

カルボキシル基を持つ医薬品のジシクロヘキシルカルボジイミド による吸光光度定量

松田りえ子[Ⓐ], 武田 寧, 石橋無味雄

内山 充*, 鈴木 政雄, 滝谷 昭司**

(1985年10月2日受理)

塩化チオニルと塩酸ヒドロキシルアミンを用いてヒドロキサム酸を生成させ、鉄(III)イオンを加え発色させる方法に代えて、Kasaiらにより報告された一段階反応でのカルボン酸からのヒドロキサム酸生成を含む発色法を医薬品の製剤分析へ応用した。カルボン酸はジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下で過塩素酸ヒドロキシルアミンと反応して、ヒドロキサム酸を生じる。これに過塩素酸のエタノール溶液中で過塩素酸鉄(III)を加えると鉄-ヒドロキサム酸錯体を生成する。イブプロフェン、バルプロ酸ナトリウム、メフェナム酸について最適な反応条件、安定性について検討し、定量法を確立した。検量線は2~10 mMの範囲で直線性を示し、標準溶液(5 mM)を測定したときの相対標準偏差は1%以下、製剤では1~1.5%であった。14種類の薬物についてこの方法の適用を検討し、添加物の影響などについても検討した。

1 序 言

カルボキシル基に特有な発色反応の一つとして、塩化チオニルを加えてカルボン酸を酸塩化物とした後エタノールと反応させてエステルとし、塩酸ヒドロキシルアミンによりヒドロキサム酸を生成させ、更に鉄(III)イオンを加えてキレートを作り発色させる方法が用いられている。Kasaiら¹⁾は、これらの試薬に代えて、過塩素酸ヒドロキシルアミン(HAP)及び*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)との反応を利用した、カルボキシル基を持つ物質の比色定量法について報告している。この反応の機構はFig. 1に示すとおりで、DCCを脱水剤として、カルボン酸とHAPを直接反応させて

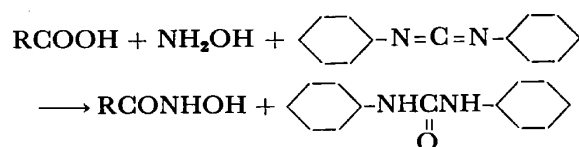


Fig. 1 Reaction of carboxylic acid, hydroxylamine perchlorate (HAP) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

* 厚生省国立衛生試験所薬品部：158 東京都世田谷区上用賀1-18-1

** 東京理科大学薬学部：162 東京都新宿区市ヶ谷船河原町12

生成したヒドロキサム酸を、過塩素酸酸性下で過塩素酸鉄(III)を加えて紫~青紫色に発色させるものである。

この方法では塩化チオニルを用いるよりも緩和な1段階の反応によりヒドロキサム酸を生成するため、操作も簡単である。この方法を薄層クロマトグラフィー²⁾、高速液体クロマトグラフィー³⁾におけるカルボン酸の特異的検出法として使った報告もある。滝谷ら⁴⁾は、この反応を利用したカルボキシル基を有する局方医薬品の確認試験法について報告している。この確認試験法は第十一改正日本薬局方では、イブプロフェン及びインドメタシンの、カルボキシル基の確認に採用される予定である。医薬品中には解熱鎮痛消炎薬をはじめカルボキシル基を持つものが多くあるが、Kasaiら¹⁾の方法では定量できないものもあったため、多くの薬物に共通な分析法を作ることが目的とし、反応条件について検討を加えた。その結果、多数の医薬品の製剤に適用できる定量法を確立したので報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

メタノール(特級)、エタノール(特級)、過塩素酸(70%, 特級)、HAP液及び過塩素酸鉄(III)は関東化学製のカルボン酸分析用試薬、DCCは和光純薬工業製、1級のものを用いた。

HAP液はエタノールで希釈して0.3 Mの溶液とし、

DCC は 0.25 M エタノール溶液とした。過塩素酸鉄(III) 溶液は過塩素酸鉄(III) を 0.2 M 過塩素酸エタノール溶液に溶かし、0.02 M の濃度とした。

試料とした薬物は各社の自社規格品をそのまま用いた。

吸収スペクトルの測定は島津製作所製 UV-260 自記分光光度計により行った。

2.2 操作法

2.2.1 薬物原末 試料の 5 mM エタノール溶液 1 ml に 0.3 M の HAP エタノール溶液及び 0.25 M の DCC エタノール溶液をそれぞれ 1 ml ずつ加え、50°C の水浴中で 20 分間反応させた後、過塩素酸鉄(III) 溶液 1 ml を加えエタノールを加えて正確に 10 ml とし、エタノール 1 ml を同様に操作したから試験溶液を対照として吸収極大波長で吸光度を測定する。

2.2.2 ブランク製剤 乳糖 1.1 g, カルボキシメチルセルロース (CMC) 又はカルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 0.4 g, トウモロコシデンプン 0.4 g, ポリビニルピロリドン 0.1 g を混和し、その 300 mg にエタノール 50 ml を加えて振り混ぜ、遠心分離した上澄み 1 ml を採り、2.2.1 の方法に従い操作する。

2.2.3 製剤 錠剤 20 個の重量を量り、粉碎した後、薬物 0.5 mmol に対応する量をひょう取しエタノール 100 ml を加えて抽出する。この液 1 ml について、2.2.1 の方法に従い操作する。顆粒剤は 2 g を粉碎し、以下錠剤の操作法に従う。

3 結果

3.1 反応条件の検討

鎮痛消炎薬のイブプロフェン (IB), メフェナム酸 (MF) 及び抗てんかん薬のバルプロ酸ナトリウム (VA) のエタノール溶液 (5 mM) を試料として反応条件の検討を行った。

3.1.1 DCC 及び HAP 濃度の影響 HAP 濃度 0.1~0.3 M, DCC 濃度 0.1~0.4 M の範囲で試薬濃度の影響について調べた。Fig. 2~4 に結果を示す。どの試料でも DCC と HAP の濃度が 0.2~0.3 M の範囲で吸光度が最大となった。VA について発色液のスペクトルへの試薬濃度の影響を Fig. 5 に示す。DCC 過剰のとき (Fig. 5A) には短波長側から試験液の吸光度が大きくなり、この条件では誤差が大きくなると思われる。HAP 過剰の場合 (Fig. 5C) は試料、から試験液とも低い吸光度となった。試薬の濃度はいずれの試料についてもよい結果を得た ([DCC]=0.25 M, [HAP]=

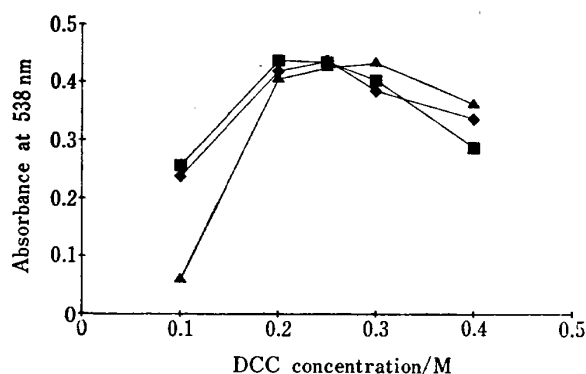


Fig. 2 Effect of concentration of HAP and DCC on reaction of ibuprofen (IB)

◆: 0.1 M HAP; ■: 0.2 M HAP; ▲: 0.3 M HAP

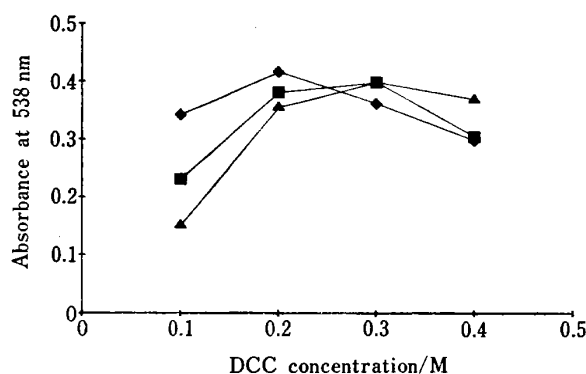


Fig. 3 Effect of concentration of HAP and DCC on reaction of sodium valproate (VA)

Symbols are same as in Fig. 2.

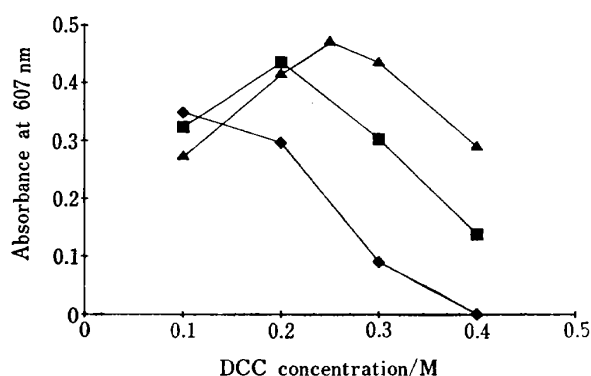


Fig. 4 Effect of concentration of HAP and DCC on reaction of mefenamic acid (MF)

Symbols are as in Fig. 2.

0.3 M とした)。

3.1.2 反応温度及び反応時間の影響 IB 及び VA について、40°C, 50°C, 60°C の水浴中で反応させた結果を Fig. 6, 7 に示す。IB については 40°C では反応の進行が遅く、60 分まで徐々に吸光度が増加した。50°

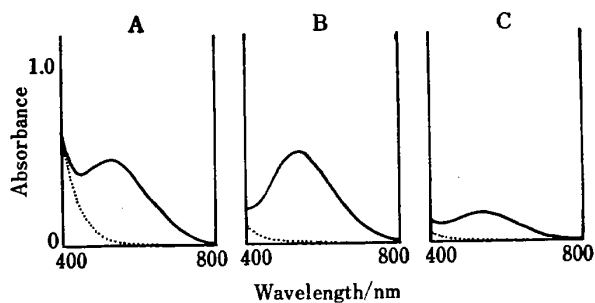


Fig. 5 Effect of concentration of HAP and DCC on the visible spectrum of VA reaction solution

A: [HAP]=0.1 M, [DCC]=0.3 M; B: [HAP]=0.3 M, [DCC]=0.3 M; C: [HAP]=0.3 M, [DCC]=0.1 M; —: sample solution; - -: blank solution; Reference: ethanol

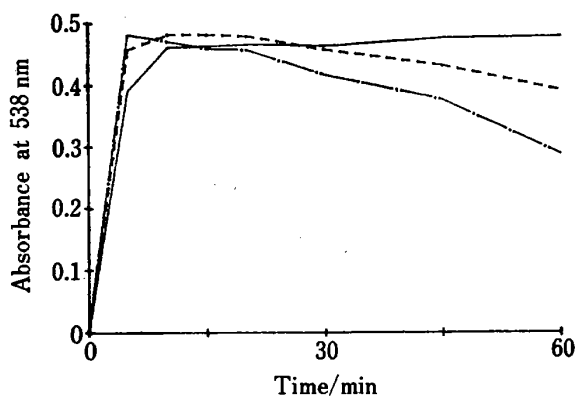


Fig. 6 Effect of temperature on reaction of IB
—: 40°C; - -: 50°C; - · - ·: 60°C

C では 5~20 分の間ほぼ一定の吸光度を与えた。又 60°C では最初の 5 分付近で吸光度は最大となった後、徐々に低下した。これは生成したヒドロキサム酸が分解しているものと思われる。VA も同様の結果が得られたが、60°C における吸光度の低下は小さかった。MF は 60°C, 10 分以後は過塩素酸鉄(III)を加えると緑色を発した。この結果から、反応温度及び時間は 50°C で 20 分間とした。

3.1.3 過塩素酸鉄(III) 濃度の影響

Table 1 に過

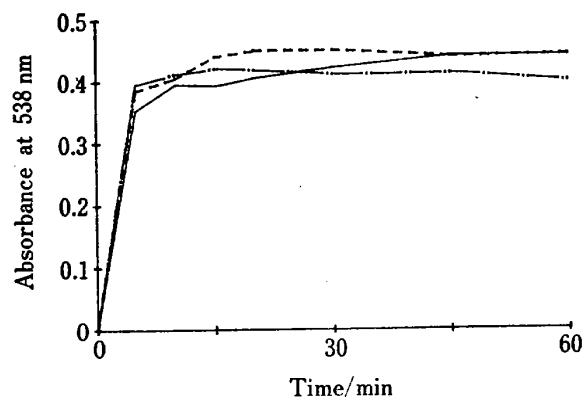


Fig. 7 Effect of temperature on reaction of VA
—: 40°C; - -: 50°C; - · - ·: 60°C

Table 1 Effect of iron(III) perchlorate concentration on coloration

Wavelength/ nm	Absorbance obtained with iron(III) perchlorate				
	0.01 M†	0.02 M	0.03 M	0.04 M	0.05 M
Ibuprofen					
583	0.424	0.468	0.469	0.454	0.040
Sodium valproate					
538	0.441	0.441	0.442	0.444	0.446

† $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ concentration; [Sample]=5 mM, [HAP]=0.3 M, [DCC]=0.25 M, 50°C, 20 min

塩素酸鉄(III) 濃度の影響を示す。0.02~0.05 M の範囲で吸光度の変化はほとんどみられないため過塩素酸鉄(III) 濃度は 0.02 M とした。

3.1.4 過塩素酸濃度の影響

Table 2 に過塩素酸鉄(III) 溶液中の過塩素酸濃度の影響を示す。IB, VA では過塩素酸鉄(III) 溶液中の過塩素酸の濃度が 0.2~3 M では吸光度は変化しないが、0.1 M 以下ではやや低下した。MF では、0.2 M で最大の吸光度を示したが、3.1.5 で述べるように、過塩素酸濃度が高い範囲では MF の発色は不安定である。従って過塩素酸濃度は 0.2 M とした。以上の条件により発色させた溶液の吸収極大は、IB, VA は 538 nm, MF は 607 nm であった。それぞれの発色液の吸収スペクトルを Fig. 8 に示

Table 2 Effect of perchloric acid concentration

Sample	Wavelength/ nm	Absorbance obtained with perchloric acid					
		0.01 M†	0.1 M	0.2 M	0.5 M	1 M	3 M
Ibuprofen	538	0.472	0.485	0.500	0.504	0.495	0.499
Sodium valproate	538	0.318	0.325	0.347	0.339	0.341	0.348
Mefenamic acid	607	0.417	0.424	0.440	0.443	0.428	0.424

† HClO_4 Concentration: [Sample]=5 mM, [HAP]=0.3 M, [DCC]=0.25 M, 50°C, 20 min, [Iron(III) perchlorate]=0.02 M

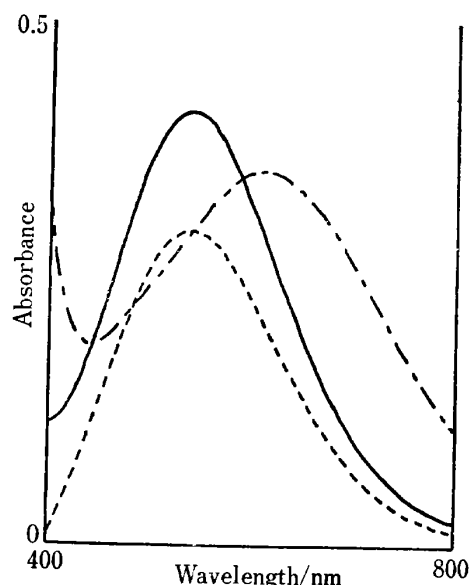


Fig. 8 Absorption spectra of ferric hydroxamates of IB, VA and MF

—: IB; --: VA; - - - : MF

す。又 VA のメタノール溶液についても検討したが、同様の吸収極大、吸光度を与えた。従って、メタノール抽出でも定量は可能である。水溶液については、DCC が析出するため他の条件を検討する必要がある。又発色液中の水分が増加すると、吸収極大波長が短波長にシフトし、吸光度が低下することが安息香酸について報告されているが、IB, VA についても同様の結果が得られたので、試料の溶媒もエタノール又はメタノールが適当と思われる。

3.1.5 発色の安定性 上記の条件で反応させた後、室温で放置したときの吸光度の変化を Fig. 9 に示す。IB, VA は 60 分間安定であったが、MF はやや不安定であった。MF の発色の安定性は過塩素酸の濃度に依存しており、高濃度でより不安定である。過塩素酸鉄(III)溶液中の過塩素酸濃度を 0.05 M とするとかなり安定となったが、この条件では 0.2 M のときよりも吸光度は低下した。MF については、過塩素酸濃度を 0.05 M とした過塩素酸鉄(III)溶液を用い、試薬を加えた後速やかに測定する注意が必要である。

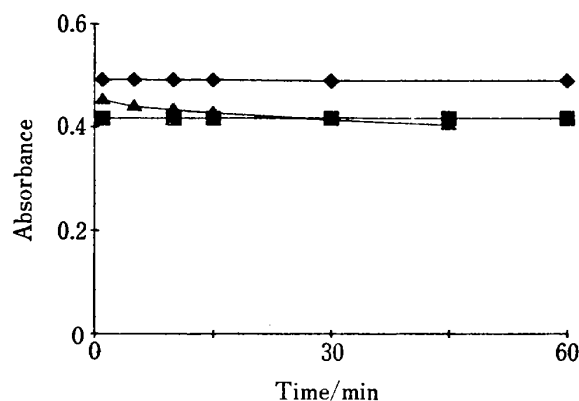


Fig. 9 Stability of color of ferric hydroxamate at room temperature

◆: IB; ■: VA; ▲: MF; Absorbance was measured at 538 nm (for IB and VA) or 607 nm (for MF).

3.1.6 検量線 IB, VA, MF の 2~10 mM の範囲の検量線は原点を通る直線となり、相関係数も 0.999 以上で、十分定量に利用できるものであった。

3.1.7 反応の再現性 IB, VA のエタノール溶液について、5 回測定し反応の再現性を検討した (Table 3)。相対標準偏差は 1% 以下でよい再現性を示した。

3.1.8 添加物の影響 医薬品製剤中には多数の添加物が含まれているが、中でも CMC は、比較的配合量も多く、使用頻度も高いものである。CMC のカルボキシル基が定量の妨害となる可能性があるのを確かめるために、乳糖、ポリビニルピロリドン、トウモロコシデンプンに CMC 又は CMC-Na を加えたブランク試料について、2.2.2 の操作法に従って操作して、吸光度を測定した。その結果、対照溶液と同等の値を得たので、CMC は妨害とならないと思われる。又、シロップ剤中などに、矯味剤、pH 調整剤としてクエン酸又はクエン酸塩が配合されている場合は定量の妨害となるので注意が必要である。

3.2 製剤の定量

IB 製剤 (100 mg 錠剤, 20% 顆粒剤), VA 製剤 (200 mg フィルムコート錠) について、2.1.3 の方法に従い

Table 3 Repeatability of the reaction

Sample	Wavelength/ nm	Absorbance					Mean	R.S.D., %
		1	2	3	4	5		
IB	538	0.437	0.430	0.434	0.432	0.432	0.433	0.55
VA	538	0.378	0.378	0.376	0.373	0.373	0.376	0.67
MF	607	0.425	0.428	0.429	0.430	0.423	0.427	0.68

[Sample]=5 mM

Table 4 Analytical results of the formulations

Sample	Content, %					Mean	R.S.D., %
IB tablet†	99.6	99.5	99.2	99.1	101.5	99.8	0.982
IB granule	102.6	102.0	102.6	102.5	100.9	102.1	0.693
VA tablet††	101.9	99.3	99.5	101.5	98.5	100.1	1.471

† Sugar coated tablet; †† Film coated tablet

Table 5 Absorption maxima for drugs containing carboxylic group

Drug, 5 mM	Solvent	λ_{\max}/nm
Alcofenac	ethanol	534
Diclofenak sodium	ethanol	516
Flufenamic acid	ethanol	568
Ibuprofen	ethanol	537
Ketoprofen	ethanol	534
Naproxen	ethanol	537
Tolfenamic acid	ethanol	576
Captopril	ethanol	528
Clinofibrate	ethanol	498
Furosemide	ethanol	575
γ -Amino- β -hydroxybutyric acid	water	—
Iodamide	ethanol	—
Levodopa	water	—
Tranexamic acid	water	523

定量を行った。5回測定した結果を Table 4 に示した。定量値, 相対標準偏差ともにより値を得, この方法は製剤の分析に十分応用可能であると思われる。

3.3 他の薬物への適用

カルボキシル基を有する薬物 14 種類について, 上述の定量法に従い反応させた。得られた吸収極大波長を Table 5 に示す。トラネキサム酸, レボドパ, γ -アミノ- β -ヒドロキシ酪酸はエタノールに溶けないため, 水溶液を試料溶液とした。水溶液を用いると DCC が析出するため, HAP, DCC 溶液は倍に希釈しそれぞれ 2 ml を加えた。レボドパは黄色から徐々に緑色に変化した。これは, レボドパのフェノール性水酸基が鉄(III)イオンと反応したものであろう。ヨードミド, γ -アミノ- β -ヒドロキシ酪酸は発色しなかった。ヨードミドにおいては, カルボキシル基に隣接して 2 個のヨウ素原子があり, これらが立体障害となっていると考えられる。

この他の 11 種類の薬物については IB などと同様に発色した。フロセミド, フルフェナム酸のように, 芳香族カルボキシル基を持つものの吸収極大は脂肪族のものよりも長波長側であった。これらの薬物についての 2~

10 mM の範囲の検量線は相関係数 0.999 以上の直線性を示した。

以上検討した結果, この DCC 及び HAP を用いるカルボキシル基の発色反応を, 医薬品製剤の定量に応用できることが示された。この反応は, 操作も簡単で多くの試料を短時間に処理でき, 自動分析にも取り入れることが可能である。又, バルプロ酸ナトリウム, カプトプリル, クリノフィブラートのように, 有効な紫外吸収を持たず, 吸光光度法で定量の困難な薬物については, 特に有用な方法と思われる。

文 献

- 1) Y. Kasai, T. Tanimura, Z. Tamura: *Anal. Chem.*, **47**, 34 (1975).
- 2) T. Tanimura, Y. Kasai, Z. Tamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1845 (1972).
- 3) M. Nakajima, Y. Ozawa, T. Tanimura, Z. Tamura: *J. Chromatogr.*, **123**, 129 (1976).
- 4) 滝谷昭司, 鈴木政雄, 湯浅恵美: 医薬品研究, **15**, 660 (1984).

☆

Spectrophotometric determination of drugs containing carboxylic group using dicyclohexylcarbodiimide. Rieko MATSUDA, Yasushi TAKEDA, Mumio ISHIBASHI, Mitsuru UCHIYAMA*, Masao SUZUKI and Shouji TAKITANI** (*National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158; **Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, 12, Ichigaya funagawaramachi, Shinjuku-ku, Tokyo 162)

The coloration method with one step formation of hydroxamate from carboxylic acid was applied to the spectrophotometric determination of drug formulations. Carboxylic acid was reacted with hydroxylamine perchlorate (HAP) to form hydroxamic acid by the aid of dicyclohexylcarbodiimide (DCC). The iron hydroxamate was formed with iron(III) perchlorate in ethanolic solution of perchloric acid. The optimum condition was studied for ibuprofen (IB), sodium valproate (VA) and mefenamic acid (MF). The established procedure is as follows. The drug was extracted with ethanol from the formulation and diluted to about 5 mM with ethanol. To 1 ml of the solution were added 1 ml of 0.3 M HAP ethanolic solution and 1 ml of 0.3 M DCC ethanolic solution. The mixture

was reacted at 50°C for 20 min. After cooling 1 ml of 0.02 M iron (III) perchlorate ethanolic solution containing 0.2 M perchloric acid was added, and ethanol was added to adjust the total volume to 10 ml. The absorbance was measured at 538 nm for IB and VA, and at 608 nm for MF. The calibration curves were linear in the range of 2 mM to 10 mM, and relative standard deviation was less than 1% for the standard solutions and 1~1.5% for the preparations ($n=5$). The applicability of this method was studied on 14

drugs.

(Received October 2, 1985)

Keyword phrases

spectrophotometric determination of drug formulation;
determination of drugs containing carboxylic group;
single step formation of hydroxamic acid using
dicyclohexylcarbodiimide.
