

## 高速液体クロマトグラフィーによるフィゾスチグミンの 定量法と水溶液中の安定性\*<sup>1</sup>

山添喜久雄, 鈴木一市, 森田久代, 川影逸郎, 藤井喜一郎  
浜松医科大学医学部附属病院薬剤部\*<sup>2</sup>

### Determination of Physostigmine by High Performance Liquid Chromatography and the Stability in Aqueous Solutions\*<sup>1</sup>

KIKUO YAMAZOE, KAZUICHI SUZUKI, HISAYO MORITA,  
ITSURO KAWAKAGE, KIICHIRO FUJII

Pharmacy of Hamamatsu University School of Medicine Hospital\*<sup>2</sup>

(Received June 2, 1982)

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed for the determination of physostigmine (PS) in the presence of degradation products, and the stability of PS in aqueous solution was also examined by this method.

Sufficient separation was effected on an ODS column with an eluent of CH<sub>3</sub>CN : 0.5% CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> aq. (70 : 30). Tolperisone HCl was most suitable of all drugs studied for the internal standard. Coefficient of variation for determination of PS was less than 1%. HPLC method was better, in its simplicity and accuracy, than other methods (U. S. P. methods etc.).

PS in buffered aqueous solution was most stable at about pH 3, when heated in boiling water. Although PS solution in anaerobic condition was almost colorless and produced rubreserine and unknown decomposed substance not recognized in aerobic condition, no difference could be detected for the degradation rate of PS.

It was found that N<sub>2</sub> exchange retards the discoloration, but it has no effect on the stability of PS solution.

**Keywords**—physostigmine; HPLC; determination; stability; degradation

#### はじめに

製剤中のフィゾスチグミン (PS) の定量法として、USP XX などに収載されている非水滴定 (NT) 法および吸光度 (UV) 法,<sup>1)</sup> Davies らの NaNO<sub>2</sub> でニトロ化する (NO) 法,<sup>2)</sup> Friend らの分解させて生じるラブレゼリン量より求める方法<sup>3)</sup> などが知られているが、抽出操作などを必要とし簡便な方法ではない。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による PS の検出例はほとんどなく、Kneczke<sup>4)</sup> によって点眼液中の PS の分離が行われたが、安定性や分解物などの詳細な検討はなされてい

ない。

PS は水溶液中不安定で、ラブレゼリンなど各種の分解物が生成することが知られており、<sup>5)</sup> HPLC による PS の安定性を検討する場合、これら分解物共存下でも PS を分離して定量できる測定条件を設定しなければならない。

今回著者らは、各種分解物との分離が可能な測定条件と分解物に影響されない内部標準物質 (I. S.) を検討し、HPLC による簡便な定量法の開発を試みた。また、加熱分解した PS 水溶液について各種定量法の測定成績を比較した。さらに、HPLC 法を用いて水溶液中の安定性について pH および N<sub>2</sub> 置換の影響を検討した結果、若干の見解を得たので報告する。

\*<sup>1</sup> 日本薬学会第 102 年会 (大阪, 1982年 4 月) で発表。

\*<sup>2</sup> 浜松市半田町 3600; 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, 431-31 Japan

## 実験方法

### 1. 試薬および試液

PS のサリチル酸塩は局方品を用い、NT 法には非水滴定用試薬を使用した。その他のものについては試薬特級を用いた。Sørensen 緩衝液：0.1M 第二クエン酸 Na および 0.1N 塩酸または 0.1N NaOH, リン酸緩衝液：0.2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  および 1N NaOH.

### 2. 試料液の調製

0.1% サリチル酸 PS 水溶液をガラスアンプルに密封し、煮沸水浴中加熱した。N<sub>2</sub> 置換はアンプル密封時に N<sub>2</sub> ガスで30秒間バブリングして行った。

### 3. HPLC 法

装置：日本分光 TRIROTAR III, カラム：JASCO-PACK SS-10-ODS-B, 検出器：日本分光 UVIDEC-100 III, 測定波長：240nm, 積分計：SIC 5000E 型, 記録計：日本分光 RC-125, 移動相：CH<sub>3</sub>CN-0.5% CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> aq. (7:3). I.S.：塩酸トルペリゾン (日本化薬). 試料注入量：試料液 1ml と 0.1% I.S. 水溶液 1ml とを合わせ、その 10 $\mu$ l を注入。

### 4. pH 測定および可視紫外吸光度測定

日立堀場 F-7DE 型デジタル pH メータ, 日立 200-20 型ダブルビーム分光光度計。

### 5. USP-NT 法

USP XX に準拠し、PS 50mg 相当量の試料液に NaHCO<sub>3</sub> 250mg を加え CHCl<sub>3</sub> で抽出し、抽出液に酢酸を加え、これを過塩素酸-ジオキサンで滴定。変曲点は pH メータで電位差により測定。

### 6. USP-UV 法

USP XX に準拠し、サリチル酸 PS 10mg 相当量の試料液に pH 7.8 のリン酸緩衝液を加え、エーテル抽出しこれをうすめた塩酸 (1 $\rightarrow$ 1000) で再抽出し、246nm で吸光度を測定。

### 7. NO 法

Davies らの方法にしたがって乳酸酸性条件下 NaNO<sub>2</sub> と試料液 0.5ml を反応させ、NH<sub>4</sub>OSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> で安定化する。これを CHCl<sub>3</sub> で抽出し 417nm で吸光度を測定。

## 結果・考察

### 1. HPLC 法による定量

#### 1) 測定条件の検討

PS の分解物にはラブレゼリン以外にエゼリンブルーやエゼリンブラウンなどの分解物が知られており、分解は複雑に進行するものと考えられることから、実際に加熱分解させた試料を用いて各種分解物共存下での PS の

分離条件を検討した。ODS カラムに移動相として CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 系を用いて分析したが満足のゆく結果は得られず、7:3 の混合比で H<sub>2</sub>O に 0.5% の CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> を添加したところ、PS と分解生成物を再現性よく分離することができた (Fig. 1)。I.S. の選択にあたっては分解物と完全に分離していることが必要であることから、主に医薬品を中心に検討した。Fig. 1 に示すクロマトグラムより分解物がサリチル酸と PS の間に出ること、および化合物の安定性<sup>9)</sup> や測定時間の面から点線のピークで示す塩酸トルペリゾンが最もよいことがわかった。Table 1 に I.S. として検討した化合物とその保持時間 (R.T.) を示す。

#### 2) 検量線の直線性と定量精度

塩酸トルペリゾンを用いる内部標準法により、PS 注入量が 0.3—7.0 $\mu$ g (N=7) のものを用いて検量線を作製した。I.S. に対する PS の積分値比 (Y) と PS 濃度 (X) との間に直線関係があり、最小二乗法による回帰直線は  $Y=0.95X+0.008$  ( $r=0.999$ ) であった。また N=4 におけるくり返し精度は 1% 以下と良好であった。

#### 2. 各種定量法の定量精度

HPLC 法で求めた定量精度を信頼しうる定量法と比較した (Table 2)。USP-NT 法においては、抽出操作や混在する水分の影響が大きいと考えられ、C.V. が 5% と精度はやや劣る。また、USP-UV 法では比較的精度はよいが、多量の試料を必要とし抽出操作が 2 段階におよ

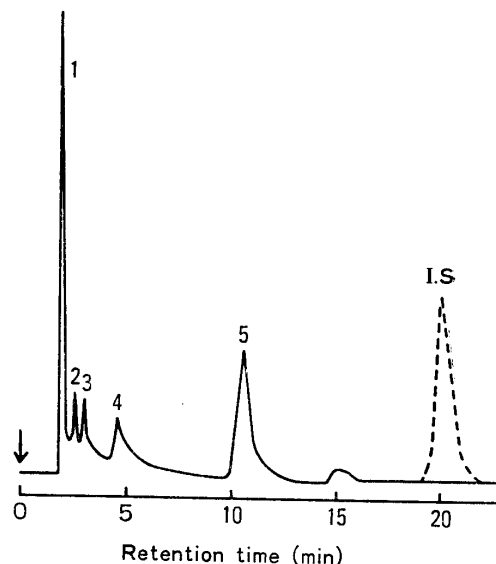


Fig. 1. HPLC Chromatogram of Physostigmine Salicylate and its Degraded Products

Peaks 1: salicylic acid  
2: rubreserine  
5: physostigmine  
3,4: unknown

Table 1. Retention Time of Compounds as Internal Standard

Compound	R.T. (min)	Compound	R.T. (min)
Phenacetin	1.4	Isoxsuprine	2.0
<i>d</i> -Methylephedrine	1.5	Primidone	2.1
Pipemidic acid	1.5	Caffeine	2.1
Aspirin	1.5	Naphthoresorcinol	2.4
Sulpyrin	1.5	Pentoxifylline	2.6
<i>p</i> -Hydroxybenzoate esters		Noscapine	3.5
methyl	1.5	Tolbutamide	3.6
ethyl	1.7	Haloperidol	4.2
propyl	1.8	Clotrimazole	6.3
Nicotinic acid	1.6	Biperiden	8.4
Digoxin	1.8	Perisoxal	12.4
Sulfamethoxazole	1.8	Tolperisone	19.7
Deslanoside	1.8		
Carbamazepine	1.9		

Table 2. Coefficient of Variation of Various Methods for the Determination of Physostigmine Salicylate

	HPLC	USP-NT <sup>a)</sup>	USP-UV <sup>b)</sup>	NO <sup>c)</sup>
n <sup>d)</sup>	4	3	3	3
C.V. (%)	0.4	5.1	1.6	2.1

- a) Potentiometric titration of USP XX  
 b) Absorption spectroscopy of USP XX  
 c) Absorption spectroscopy of D.J.G. Davies  
 d) Number of experiments

ぶことなど簡便ではない。NO 法もまた精度的にはよいが前者 2 法と同様の抽出操作やニトロ化の反応の操作を要する。これらの結果から HPLC 法は抽出など複雑な操作の必要もなく、精度よく簡便に定量できる方法であることがわかった。

### 3. 水溶液中の安定性

#### 1) pH の影響

PS はアルカリ水溶液中で容易に加水分解・酸化をうけてラブレゼリンになることが知られているが、製剤化の指標となる酸性側での安定性を検討するために、Sørensen 緩衝液で pH を 1.8—6.3 の各 pH に調整した試料を煮沸水浴中 30 分加熱し、残存率を HPLC 法により測定した (Fig. 2)。pH 1.8—3.8 では残存率に変化なかったが、pH 5.3 では 92%、pH 6.3 では 35% と pH の上昇とともに残存率は低下した。このように PS 水溶液の安定 pH 領域が 3 付近であることがわかり Christenson<sup>7)</sup> や Davies<sup>8)</sup> らの報告と同様な結果が得られた。

#### 2) N<sub>2</sub> 置換の影響

ラブレゼリンは分解による着色の原因物質であり、このために各種の安定化法が検討され亜硫酸塩の着色防止

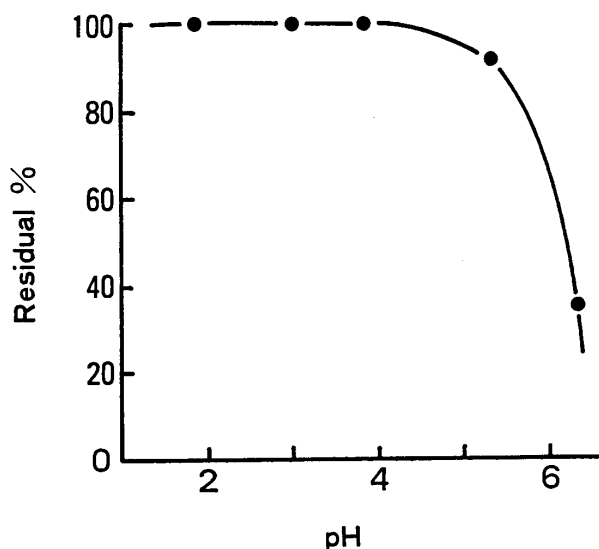


Fig. 2. Effect of pH on the Stability of Physostigmine

効果が認められている。しかし Davies らは亜硫酸塩が加水分解を抑制しないことを明らかにしており、<sup>8)</sup>さらに亜硫酸塩の反応性からも寺尾らは反応性をもつ添加剤に依存する製造方式は避けるべきであると述べている。<sup>8)</sup>そこで、添加剤に依存しない方法として N<sub>2</sub> 置換を行い安定性におよぼす影響を検討した。

HPLC による N<sub>2</sub> 置換中の分解試料のクロマトグラムを Fig. 3-1 に示す。Fig. 1 で無置換の場合認められなかった R.T. が約 7 分の位置にはほぼ特異的に 6 のピークがあらわれ、着色も無置換のものに比べ非常にわずかであった。この 6 のピークはさらに加熱を続けても 3 や 4 のピークに移行することなく、わずかに 2 のピークと主に 6 のピークが増すのみであった。Fig. 3-2 で UV スペクトルを比較すると、無置換のものでは加熱後 PS の λ<sub>max</sub> である 240nm の吸収が減じてゆくのに対して、置

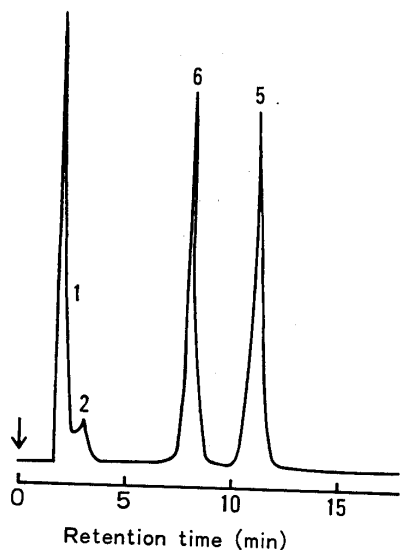


Fig. 3-1. HPLC Chromatogram of Physostigmine Salicylate and its Degraded Products under Anaerobic Condition

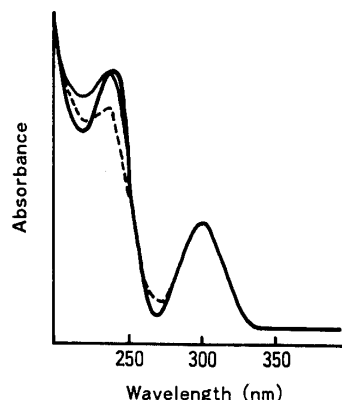


Fig. 3-2. Absorption Spectra of Physostigmine Salicylate

— : No degradation  
 - - : Anaerobic degradation  
 ···· : Aerobic degradation

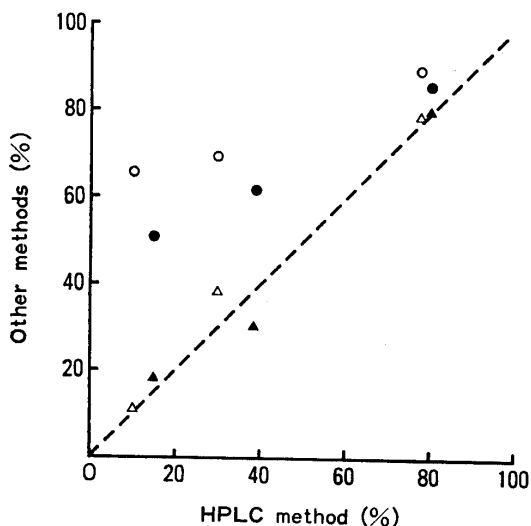


Fig. 4. Correlation of Analytical Values between HPLC and Other Methods

○● : USP-UV, ○△ : Anaerobic condition  
 △▲ : NO, ●▲ : Aerobic condition  
 USP-NT was unmeasurable

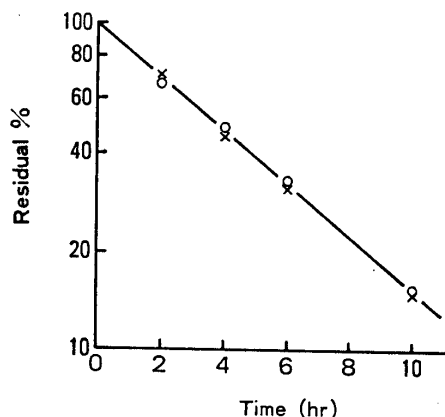


Fig. 5. Effect of N<sub>2</sub> Gas on the Stability of Physostigmine at pH 5.3

—○— : Anaerobic condition  
 —×— : Aerobic condition

換したものでは 240nm の吸収がわずかに低波長側にシフトするのみであり変化なかった。6 のピークが有色のものでなく、240nm 付近に吸収をもつと思われることから、PS が加水分解されて生じるエゼロリンやデオキシラブレゼリン<sup>9)</sup> などの存在が考えられるが、現在のところ同定にはいたっていない。このような N<sub>2</sub> 置換中の分解について検討された例はなく、N<sub>2</sub> 置換の有無で生成する分解物および着色現象に差異が認められた点は興味深い。

NO法は分解物共存下でも定量可能な方法と Davies ら

は述べているが、<sup>2)</sup> N<sub>2</sub> 置換中の分解にまでは言及していない。また、その他の定量法についても分解物の影響に関して明確にされていないことから各種定量法の測定値に対する分解物の影響を検討した (Fig. 4)。N<sub>2</sub> 置換の有無の両者について HPLC 法で残存率が約 80%、30%、10% に加熱分解させた試料を Table 2 で示した定量法で測定したところ、USP-NT 法ではいずれの場合にも明確な変曲点を示さず測定不能であった。さらに USP-UV 法では HPLC 法・NO 法に比べ高い値を示し、若干ではあるが N<sub>2</sub> 置換中の方が値は高く 240nm 付近の分

解物の影響が考えられる。これらの結果から、USP-NT法および USP-UV 法では分解物の影響を大きく受けるものと考えられ、分解試料の測定には不適當である。一方、NO 法と HPLC 法との測定値はよく近似しており HPLC 法による測定値の信頼性は高いものと考えられる。

なお、N<sub>2</sub> 置換した場合も I.S. に塩酸トルペリゾンを用いたが、分解物の影響をうけることなく有用であった。

### 3) 経時変化

N<sub>2</sub>置換の有無で分解物・外観変化に差異が認められたことから pH 5.3 に調整した N<sub>2</sub> 置換の有無の試料の経時的残存率を検討した。Fig. 5 に示すように、共に煮沸水浴中 2 時間で約 70%、4 時間で約 50% と残存率は同程度であり、残存率の対数と加熱時間の間に直線関係が認められた。このように N<sub>2</sub> 置換を行うことにより着色は抑制できるが、分解に対しては無置換の場合と同程度に進行することが確かめられた。

### 結 論

各種の HPLC 条件を検討した結果、他の定量法に比べ簡便で再現性よく分解物共存下でも PS を定量できる

HPLC 法を開発した。PS 水溶液を N<sub>2</sub> 置換して加熱分解すると、無置換のものとは比べその外観変化や生成する分解物に差異が認められた。しかし、分解の程度は N<sub>2</sub> 置換の有無で差異はなく、N<sub>2</sub> 置換することにより着色は抑制されるが安定性に対して効果のないことがわかった。

### 文 献

- 1) U. S. Pharmacopeia XX, 1980.
- 2) D. J. G. Davies, G. Fletcher : J. Pharm. Pharmacol., **20**, 108S (1968).
- 3) D. G. Friend, O. Kraye : J. Pharmacol. Exp. Ther., **71**, 246 (1941).
- 4) M. Kneezke : J. Chromatogr., **198**, 529(1980).
- 5) S. Ellis : J. Pharmacol. Exp. Ther., **79**, 364 (1943); B. Robinson : J. Pharm. Pharmacol., **17**, 89 (1965).
- 6) 末永栄一, 村上 昶, 大前雅彦 : 薬剤学, **24**, 63 (1963).
- 7) I. Christenson : Acta Pharmaceutica Suecica, **6**, 287 (1969).
- 8) 寺尾求馬, 丸井悦子, 田中恵子, 中尾泰子 : 薬誌, **100**, 81 (1981).
- 9) E. F. Travecedo, V.I. Stenberg : Tetrahedron Lett., **52**, 4539 (1970).