

HPLC法の分析時間短縮化に関する検討(第4報)

—生薬成分について—

Study on shortening of analysis time in high performance liquid chromatography. IV. Crude drugs

中林佐知栄	株式会社廣貫堂	安藤英広	小太郎漢方製薬株式会社
Sachie NAKABAYASHI	Kokando Co., Ltd.	Hidehiro ANDO	Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.
野原江里子	株式会社廣貫堂	青木大晋	第一薬品工業株式会社
Eriko NOHARA	Kokando Co., Ltd.	Daishin AOKI	Daichi Yakuhin Kogyo Co., Ltd.
小此木明	クラシエ製薬株式会社	水原沙織	前田薬品工業株式会社
Akira OKONOGI	Kracie Pharmaceutical Co., Ltd.	Saori MIZUHARA	Maeda Pharmaceutical Co., Ltd.
堀井周文	クラシエ製薬株式会社	永井喜美	株式会社延寿堂
Chikafumi HORII	Kracie Pharmaceutical Co., Ltd.	Kimi NAGAI	Enjudo Co., Ltd.
金本美幸	株式会社富士薬品	中村直子	共栄製薬工業株式会社
Miyuki KANAMOTO	Fujiyaku Co., Ltd.	Naoko NAKAMURA	Kyoei Pharmaceutical Co., Ltd.
市井満美子	救急薬品工業株式会社	横田洋一	富山県薬事研究所
Mamiko ICHII	Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.	Yoichi YOKOTA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

製造管理及び品質管理における分析では多検体を処理する必要性から、1検体当たりの分析時間の短縮化が求められている。また、近年では、経済状況の悪化に起因するアセトニトリルの価格高騰といった事象から使用溶媒の削減にも注力する必要がある。

これまでに高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に使用する ODS カラムを日本薬局方等の公定書で汎用される粒径 $5\mu\text{m}$ (内径 4.6mm 、長さ 150mm)から粒径 $3\mu\text{m}$ (内径 4.6mm 、長さ 75mm)に変更することで、分析時間の短縮化と移動相溶媒の削減を図ってきた¹⁻³⁾。

今回、検討対象成分としては、成分が複数存在し分析時間の長い日局ブシ末中の総アルカロイドと、加えて重要生薬であり、また、類似成分が複数存在するため高分離が要求される日局センナ末中の総センノシド(センノシド A 及びセンノシド B)の合計二種類の生薬成分を選択した。

実験方法

1. 日局ブシ末中の総アルカロイドの分析

1) 試薬及び試料

ブシジエステルアルカロイド混合標準物質(和光純薬工業㈱)

ブシモノエステルアルカロイド混合標準物質(和光純薬工業㈱)

日局ブシ末

2) 試験方法

第十五改正日本薬局方第二追補「真武湯エキス」の純度試験法に準じた。

ブシモノエステルアルカロイド混合標準溶液、ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液を 1:1 で混合したものをブシアルカロイド混合標準溶液とした。

また、日局ブシ末 1.0g を正確に量り、ジエチルエーテル 20mL を加えて振り混ぜた後、0.1mol/L 塩酸試液 3.0mL を加えて 10 分間振り混ぜた。これを遠心分離しジエチルエーテル層を除いた後、ジエチルエーテル 20mL を加えて同様の操作を繰り返した。水層にアンモニア試液 1.0mL 及びジエチルエーテル 20mL を加えて 30 分間振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取した。水層はアンモニア試液 1.0mL 及びジエチルエーテル 20mL を用いて同様の操作を 2 回行った。全上澄液を合わせ、減圧下で溶媒を留去した後、残留物にブシ用リン酸緩衝液/アセトニトリル混液(1:1)10mL を正確に加えて溶かし、この液を遠心分離し、上澄液を試料溶液とした。

3) 試験条件

今回検討したカラムを以下に示す。

対照カラムは、「財団法人日本公定書協会編，JPTI 日本薬局方技術情報 2006⁴⁾」に例として記載されている TSKgel ODS-80 T_M (粒径 5 μ m、内径 4.6mm、長さ 150mm、東ソー製) を用いた。

- (1)YMC-Pack ODS-A (粒径 3 μ m、内径 4.6mm、長さ 75mm、YMC 製)
- (2)Mightysil RP-18GP(粒径 3 μ m、内径 4.6mm、長さ 75mm、関東化学製)
- (3)Inertsil ODS-4(粒径 3 μ m、内径 4.6mm、長さ 75mm、ジーエルサイエンス製)

検出器は紫外吸光光度計 (測定波長: 245nm)、カラム温度は 40°C 付近の一定温度、移動相は、ブシ用リン酸緩衝液/テトラヒドロフラン混液(183:17)を用い、流量は毎分 1.0mL とした。各社は Table.1 に示した機器を用いて分析を行った。

Table.1 各社で使用した分析機器

会社	A 社	B 社	C 社	D 社
使用機器	Prominence LC-20AB	L-2000	Prominence LC-20AD	LC-2010A
メーカー	島津	日立	島津	島津

2. 日局センナ末中の総センノシドの分析

1) 試薬及び試料

センノシド A 標準品 (日本公定書協会)

センノシド B 標準品 (日本公定書協会)

日局センナ末

2) 試験方法

第十五改正日本薬局方「センナ」の定量法に準じた。

センノシド A 標準品(別途水分を測定しておく)約 10.0mg を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1→100)に溶かし、正確に 20mL としたものを標準原液(1)とした。また、センノシド B 標準品(別途水分を測定しておく)約 10.0mg を精密に量り、炭酸水素ナトリウム溶液(1→100)に溶かし、正確に 20mL としたものを標準原液(2)とした。標準原液(1)5mL 及び標準原液(2)10mL を正確に量り、メタノールを加えて正確に 50mL とし、標準溶液とした。日局センナ末 0.5g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、薄めたメタノール

(7→10)25mL を加え、30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取した。残留物は薄めたメタノール(7→10)10mL ずつで 2 回 10 分間振り混ぜて遠心分離し、上澄液を分取した。全抽出液を合わせ、薄めたメタノール(7→10)を加えて正確に 50mL とし、試料溶液とした。

各社は Table.2 に示した機器を用いて分析を行った。

Table.2 各社で使用した分析機器

会社	A 社	B 社	C 社	D 社
使用機器	Waters Alliance 2695(検出器 : Waters 2996)	LC-2010A/CHT	Waters Alliance 2695(検出器 : Waters 2996)	LC-10AVP
メーカー	Waters	島津	Waters	島津

3) 試験条件

対照カラムは、「財団法人日本公定書協会編, JPTI 日本薬局方技術情報 2006⁵⁾」に例として記載されている TSK-gel ODS-80Ts(粒径 5 μ m、内径 4.6mm、長さ 150mm、東ソー製)を用いた。今回検討したカラムを下記に記す。

(1)L-column ODS (粒径 3 μ m、内径 4.6mm、長さ 75mm、CERI 製)

(2)CAPCELL PAK C18 SG120 (粒径 3 μ m、内径 4.6mm、長さ 75mm、資生堂製)

検出器は紫外吸光光度計 (測定波長 ; 340nm)、カラム温度は 50 $^{\circ}$ C 付近の一定温度、移動相は薄めた pH5 の 1mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1→10)/アセトニトリル混液(17:8)1000mL に臭化テトラ n-ヘプチルアンモニウム 2.45g を加えて溶かしたものをを用いた。流量は毎分 1.0mL とした。

対照カラムでのシステム適合性におけるシステム性能は標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、センノシド B、センノシド A の順に溶出し、その分離度は 15 以上で、センノシド A のピークの理論段数は 8000 段以上であった。システムの再現性は標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返す時、センノシド A のピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下であった。

実験結果

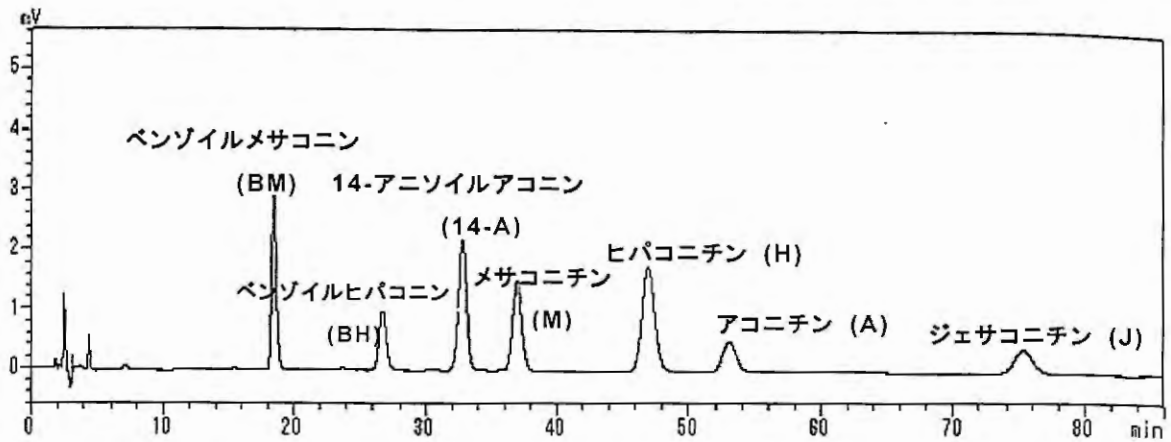
1. ブシ末中におけるブシアルカロイドの分析 (Table. 3~6, Fig.1~3)

対照カラムを用いて分析を行ったところ、ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン、14-アニソイルアコニン、メサコニチン、ヒパコニチン、アコニチン、ジェサコニチンの順に溶出した (Fig.1)。また、その他の 3 種類の検討カラムも同様の傾向を示した (Fig.2)。対照カラムによる標準溶液の分析において、隣接する成分との分離の困難なメサコニチン及びアコニチンについて、3 種類の検討カラムは良好な分離度を維持し、かつ高い理論段数が得られた (Table.3)。なお、各カラムにおけるブシモノエステルアルカロイドの定量値の差は夾雑物のピークの影響によるものと考えられる (Table.4)。

純度試験においては対照カラムとほぼ同等の結果が得られたが、カラムによってはメサコニチン、アコニチン及びジェサコニチンのピークが妨害された (Fig.3)。分析時間については対照カラムである TSK gel ODS-80T_M のジェサコニチン溶出時間は約 69 分、YMC-Pack ODS-A 約 29 分、Myghtysil RP-18GP 約 26 分、Inertsil ODS-4 約 40 分であった。最も分析時間が短かった Myghtysil RP-18GP においては約 40 分間分析時間が短縮された。ブシ末中のブシモノエステルアルカロイドの定量においては YMC-Pack ODS-A

が、ブシジエステルアルカロイドの分析においては Mightysil RP-18GP が最も優れたカラムパフォーマンスを示した (Table.5,6)。

Fig.1 対照カラムのクロマトグラム(ブシアルカロイド混合標準溶液)



※ 分析機器 : LC-2010A

Table.3 メサコニチン及びアコニチンのピーク情報(標準品の分析)

カラム	メサコニチン			アコニチン		
	保持時間(min)	分離度*1	理論段数	保持時間(min)	分離度*2	理論段数
TSK gel ODS-80T _M	34.06	3.24	12761	48.80	3.66	14621
YMC-Pack ODS-A	14.80	2.59	9638	20.94	3.02	9706
Mightysil RP-18 GP	13.49	2.97	9711	19.01	3.06	9896
Inertsil ODS-4	19.68	3.18	9218	28.15	3.17	9308

*1: 14-アニソイルアコニンとの分離度 *2: ヒパコニチンとの分離度

Table.4 ブシ末中のブシモノエステルアルカロイドの定量

カラム	ベンゾイルメサコニチン (mg/g)	ベンゾイルヒパコニチン (mg/g)	14-アニソイルアコニチン (mg/g)
TSK gel ODS-80T _M	0.05	0.11	0.01
YMC-Pack ODS-A	0.08	0.12	0.00
Mightysil RP-18 GP	0.07	0.16	0.01
Inertsil ODS-4	0.08	0.12	0.00

Table.5 ベンゾイルヒパコニチン及び 14-アニソイルアコニチンのピーク情報 (ブシ末の分析)

カラム	ベンゾイルヒパコニチン			14-アニソイルアコニチン		
	分離度*	理論段数	シンメトリー係数	分離度*	理論段数	シンメトリー係数
TSK gel ODS-80T _M	4.28	7071	0.92	3.03	9782	1.39
YMC-Pack ODS-A	2.11	6066	0.83	2.15	6749	1.49
Mightysil RP-18 GP	1.69	5514	0.93	1.06	7840	1.51
Inertsil ODS-4	1.12	9107	1.20	3.62	7784	1.38

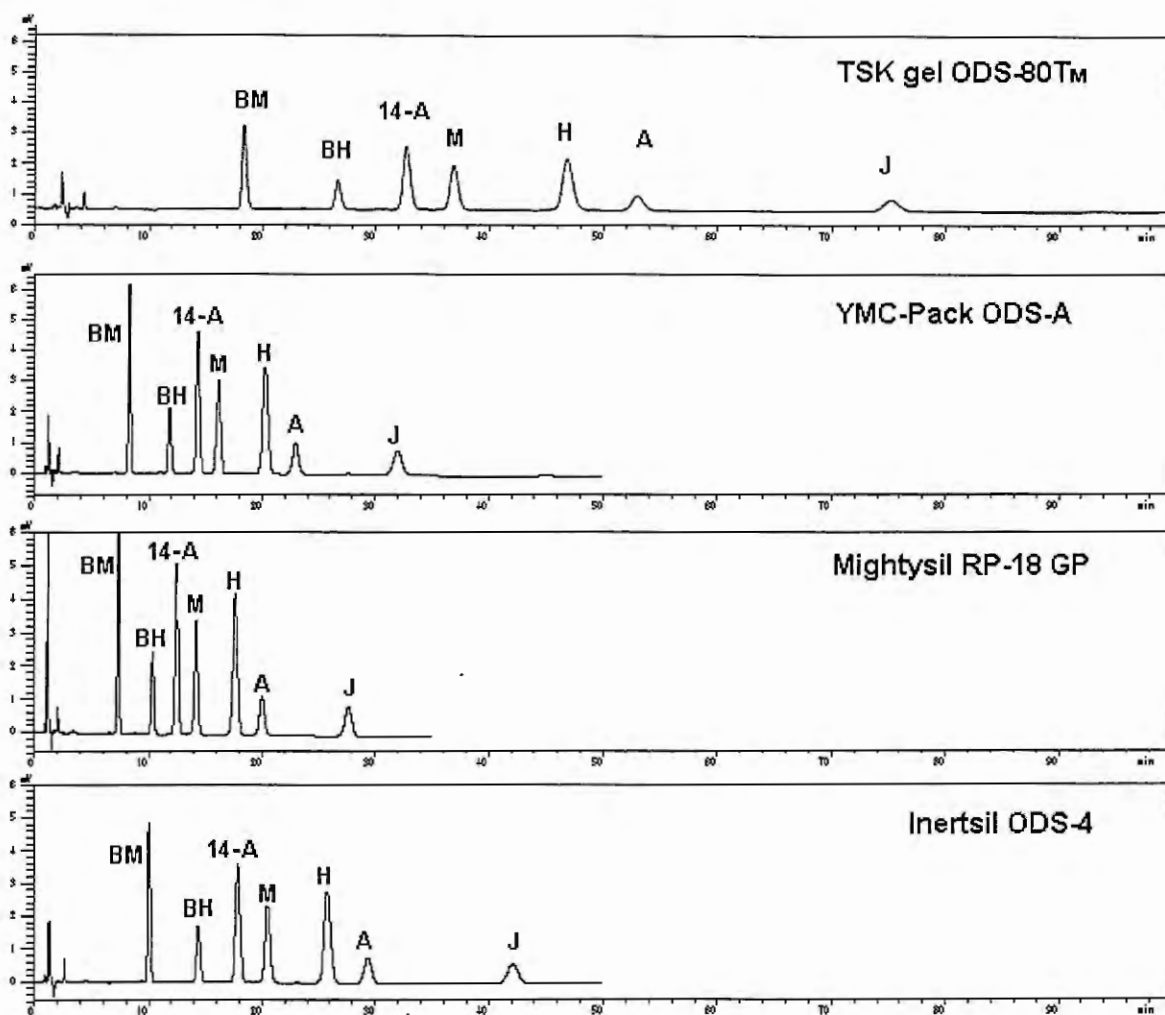
*: 夾雑ピークとの分離度

Table.6 メサコニチン及びアコニチンのピーク情報 (ブシ末の分析)

カラム	メサコニチン			アコニチン		
	分離度*	理論段数	シンメトリー係数	分離度*	理論段数	シンメトリー係数
TSK gel ODS-80T _M	3.73	8395	0.75	3.29	9024	1.13
YMC-Pack ODS-A	1.00	8192	-	2.89	5620	1.43
Mightysil RP-18 GP	4.81	6901	0.84	2.84	5094	0.84
Inertsil ODS-4	1.34	9491	1.06	2.03	6458	1.35

*: 夾雑ピークとの分離度

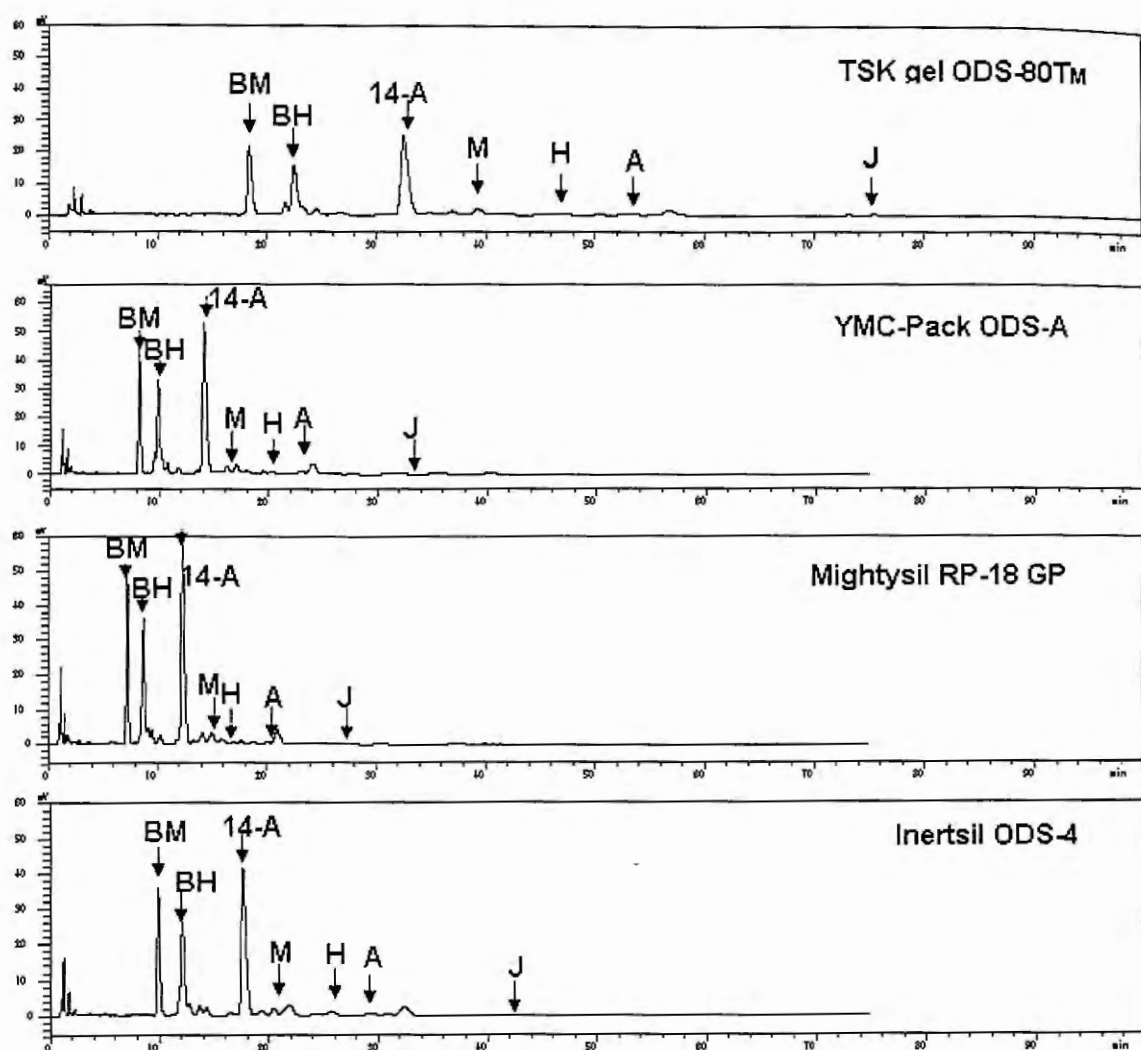
Fig.2 各カラムのクロマトグラム (ブシアルカロイド混合標準溶液)



BM:ベンゾイルメサコニン、BH:ベンゾイルヒパコニン、14-A:14-アニソイルアコニン、
M:メサコニチン、H:ヒパコニチン、A:アコニチン、J:ジェサコニチン

※ 分析機器 : LC-2010A

Fig.3 各カラムのクロマトグラムの比較 (ブシ末の分析結果)



BM:ベンゾイルメサコニン、BH:ベンゾイルヒパコニン、14-A:14-アニソイルアコニン、
M:メサコニン、H:ヒパコニン、A:アコニン、J:ジェサコニン

※ 分析機器 : LC-2010A

2. センナ末中における総センノシドの分析 (Table.7、8、Fig.4)

粒径 $3\mu\text{m}$ のカラムの選定にあたり、粒径 $5\mu\text{m}$ (内径 4.6mm 、長さ 150mm) の種々のカラムを用い、センナを分析した (Table.7)。その結果、センノシド B とその前に溶出する不明ピーク (U1) の分離が良好であった L-column ODS 及びセンノシド A の後に溶出する不明ピーク (U3) 保持時間が最も早かった CAPCELL PAK C18 SG120 を選定し、粒径 $3\mu\text{m}$ カラムでの検討を行うことにした。なお、極性や疎水性相互作用などの充填剤の性質の違いと溶出挙動にははっきりとした関係が認められなかった。

粒径 $3\mu\text{m}$ の L-column ODS 及び CAPCELL PAK C18 SG120 の $3\mu\text{m}$ について、センノシド B とその前に溶出する夾雑物 U1 の分離は十分で、定量値は粒径 $5\mu\text{m}$ の対照カラムとほぼ同等であり、良好な結果を得た。分析時間は L-column ODS で約 $1/2$ に、CAPCELL PAK C18 SG120 で約 $1/3$ に短縮できた (Table.8、Fig.4)

Table.7 センナ末中の総センノシド分析結果 (粒径 5 μ m)

カラム	SA 理論段数	分離度			保持時間 (min)		
		U1-SB	U2-SA	SB-SA	SB	SA	U3
TSKgel ODS-80Ts (対照カラム)	14146	4.2	2.4	18.1	15.3	29.1	56.6
L-column ODS	11586	4.0	4.5	15.7	13.7	25.1	52.8
Unison US-C18	11560	3.9	4.2	16.5	14.8	28.1	54.5
CAPCELL PAK C ₁₈ SG120	9873	3.8	3.9	12.5	11.4	19.3	39.4
Mightysil RP-18GP	12202	3.7	10.1	15.6	12.8	23.0	45.0
Atlantis T3	12977	2.4	10.1	20.2	15.3	32.3	47.6
YMC-Pack Pro C18	13801	2.3	5.6	16.9	9.7	17.8	27.3
Inertsil ODS-SP	12169	1.9	4.6	19.5	14.0	28.8	41.8

SA: センノシド A, SB: センノシド B, U1: センノシド B の前に溶出する不明ピーク
 U2: センノシド B とセンノシド A の間に溶出する不明ピーク、U3: センノシド A の後に
 溶出する不明ピーク

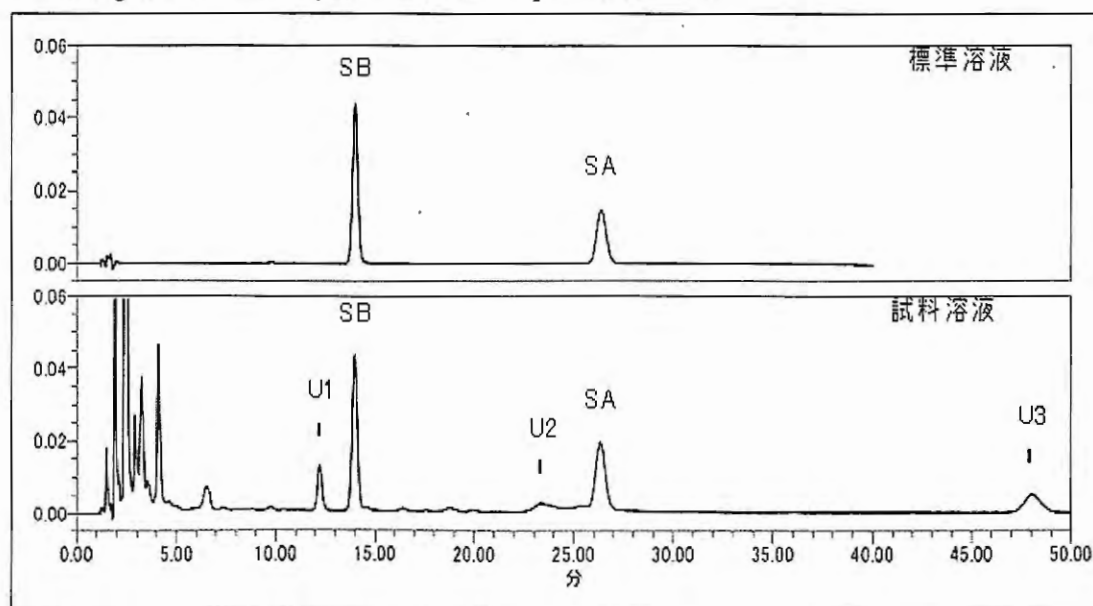
Table.8 センナ末中の総センノシド分析結果

カラム	理論 段数	分離度		保持時間 (min)		再現性 RSD	定量値 (%)
		U1-SB	SB-SA	SA	U3		
TSKgel ODS-80Ts (対照カラム, 5 μ m)	14249	3.9	18.3	27.1	50.4	0.30	1.80
L-column ODS (3 μ m)	11447	3.6	14.7	11.9	23.9	0.43	1.77
CAPCELL PAK C ₁₈ SG120 (3 μ m)	8869	3.2	11.8	8.5	17.6	0.26	1.78

※SA: センノシド A, SB: センノシド B, U1: センノシド B の前に溶出する不明ピーク
 U3: センノシド A の後に溶出する不明ピーク

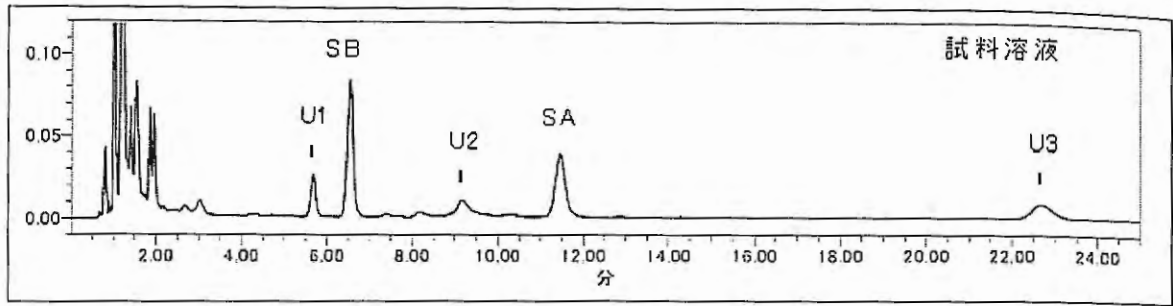
Fig.4 センナ末中の総センノシド分析結果

・ TSK-gel ODS-80Ts ϕ 4.6 \times 150mm、5 μ m(対照カラム)

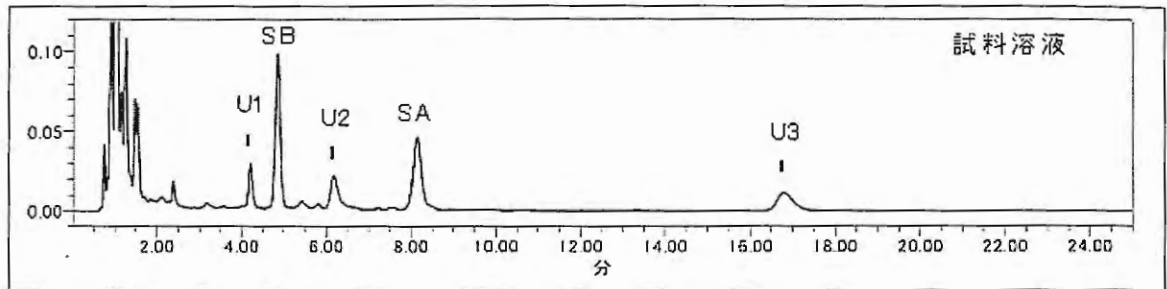


※分析機器: LC-2010A/CHT

・ L-column ODS $\phi 4.6 \times 7.5$ mm、 $3\mu\text{m}$



・ CAPCELL PAK C18 SG120 $\phi 4.6 \times 7.5$ mm、 $3\mu\text{m}$



※分析機器：LC-2010A/CHT

考察

ブシ末中の総アルカロイドの分析について、検討した3種類のカラムで本研究の目的である分析時間の短縮を行う事が出来た。ブシモノエステルアルカロイドの定量においては分析時間が短く、最も良いカラムパフォーマンスを示した YMC-Pack ODS-A が、ブシジエステルアルカロイドの分析においては、アコニチンとメサコニチンに対して、他のピークによる妨害が少なかった Mightysil RP-18GP が分析に適しているカラムである事が示唆された。これらのことより標準溶液の分析に問題がなくても、試料の分析を行う場合は分析目的（純度試験・定量など）に応じてカラムを選択し分析を行う必要性が示唆された。その理由としては、充填剤毎の性質の違いにより、目的成分および夾雑物質が異なる溶出挙動を示すため、目的成分と夾雑物質の分離に影響を受けることが考えられる。

センナ末中の総センノシドについて、JP15に記載されている粒径 $5\mu\text{m}$ 内径 4.6mm 長さ 150mm の ODS カラムに替え、粒径 $3\mu\text{m}$ 内径 4.6mm 長さ 75mm の ODS カラムを用いて検討を行った結果、ピーク形状、定量値、分離度及び再現性に問題はなく、分析時間の短縮化により移動相溶媒を削減できるカラムを見出すことができた。しかし、今回検討した充填剤では、類似した性質の充填剤を用いても、溶出時間及び夾雑ピークとの分離挙動がそれぞれ異なることが認められたことから、他の充填剤を用いるときは、注意が必要である。

文献

- 1) 堀井周文ら：HPLC法の分析時間短縮化に関する検討(第3報)－生薬成分について－家庭薬研究 No.30、31-43(2011)
- 2) 安藤英広ら：HPLC法の分析時間短縮化に関する検討(第2報)－生薬成分について－家庭薬研究 No.29、23-30(2010)
- 3) 永井善美ら：HPLC法の分析時間短縮化に関する検討－生薬成分について－家庭薬研究 No.28、28-34(2009)

- 4) 財団法人日本公定書協会編, JPTI 追補 日本薬局方技術情報 2010
八味地黄丸 p176-181
- 5) 財団法人日本公定書協会編, JPTI 日本薬局方技術情報 2006
センナ p1497-1498

流動層造粒と撈拌造粒による精密な造粒方法の検討

Smart Granulation Methods by Fluidized-Bed Granulator and High Shear Mixer

富山県薬事研究会製剤部会

Division of Drug Formulation Toyama Pharmaceutical Research Association

小口 桂 Katsura OGUCHI	前田薬品工業株式会社 Maeda Pharmaceutical Industry Co., Ltd.	瀬尾 由理 Yuri SEO	救急薬品工業株式会社 Kyukyu Pharmaceutical Co., Ltd.
斉藤 充広 Mitsuhiro SAITO	共栄製薬工業株式会社 Kyoiei Pharmaceutical Co., Ltd.	覚張 直樹 Naoki KAKUHARI	キョーリンリメディオ株式会社 Kyorin Rimedio Co., Ltd.
水木 康裕 Yasuhiro MIZUKI	株式会社広貫堂 KOKANDO Co., Ltd.	杉窪 克哉 Katsuya SUGIKUBO	小太郎漢方製薬株式会社 Kotaro Pharmaceutical Co., Ltd.
安岡 貴治 Takaharu YASUOKA	小林化工株式会社 Kobayashi Kako Co., Ltd.	福田 大輔 Daisuke FUKUTA	三九製薬株式会社 Sankyu Pharmaceutical Co., Ltd.
塚本 雅之 Masayuki TSUKAMOTO	第一薬品工業株式会社 Daiichi Yakuhin Kougyou Co., Ltd.	大西 浩介 Kosuke OHNISHI	辰巳化学株式会社 Tatsumi Kagaku Co., Ltd.
中農 勇大 Isao NAKANO	辰巳化学株式会社 Tatsumi Kagaku Co., Ltd.	麻生 健治 Kenji ASO	テイカ製薬株式会社 Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
有賀 直樹 Naoki ARUGA	東亜薬品株式会社 Toa Pharmaceuticals Co., Ltd.	工藤 洋造 Yozo KUDO	富山小林製薬株式会社 Toyama Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.
成川 努 Tsutomu NARIKAWA	富山小林製薬株式会社 Toyama Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.	熊田 俊吾 Shungo KUMADA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
津村 泰匡 Yasumasa TSUMURA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.	村田 友昭 Tomoaki MURATA	日医工株式会社 Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd.
霜鳥 武司 Takeshi SHIMOTORI	日本曹達株式会社 Nippon Soda Co., Ltd.	川上 拓郎 Takuro KAWAKAMI	株式会社富士薬品 Fujiyakuhin Co., Ltd.
中齋 浩文 Hirofumi NAKASAI	明治製薬株式会社 Meiji Pharmaceutical Co., Ltd.	五十嵐 健太 Kenta IGARASHI	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.
吉森 浩之 Hiroyuki YOSHIMORI	渡辺薬品工業株式会社 Watanabe Pharmaceutical Co., Ltd.	境 祥智 Shoji SAKAI	渡辺薬品工業株式会社 Watanabe Pharmaceutical Co., Ltd.
渡辺 進 Susumu WATANABE	株式会社渡邊薬品 Watanabe Pharmaceutical Co., Ltd.	永井 秀昌 Hidemasa NAGAI	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research.
明 長良 Nagayoshi MYO	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research.		

結 言

口腔内崩壊錠 (OD 錠) は、口に含んだ時に唾液や少量の水で容易に崩壊することから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者にも服用しやすい剤形であり、近年、相次いで開発が行われている。本研究では、富山県薬事研究会製剤部会の共同研究の一環として、OD 錠の製剤設計の上で基盤となる造粒技術に着目し、粒子径が均一な造粒物の製造条件を検討した。造粒方法として、流動層造粒と攪拌造粒を取り上げ、流動層造粒では結合剤のスプレーを間欠スプレーにして、造粒水分量を一定のレベルに保ち、均一な粒子径の造粒物となる条件を検討した。また、攪拌造粒では、結合剤の滴下をスプレーにて行い、結合剤の均一化を図り、最適な造粒条件の検討を試みた。これらの造粒方法の違いが物性に及ぼす影響についての基礎的実験を実施したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 処方

(1) エテンザミドを含有する標準処方

(ア) 流動層造粒処方

エテンザミド	90 g (30%)
乳糖(200M)	138 g (46%)
コーンスターチ	63 g (21%)
HPC-L(8%水溶液 112 g)	9 g (3%)
合 計	300 g (100%)

(イ) 攪拌造粒処方

エテンザミド	300 g (30%)
乳糖(200M)	460 g (46%)
コーンスターチ	210 g (21%)
HPC-L	30 g (3%)
合 計	1000 g (100%)

上記処方に水 200 mL を滴下

(2) アスコルビン酸を含有する標準処方

(ア) 流動層造粒処方

アスコルビン酸	90 g (30%)
乳糖(200M)	138 g (46%)
コーンスターチ	63 g (21%)
HPC-L(8%水溶液 112 g)	9 g (3%)
合 計	300 g (100%)

(イ) 攪拌造粒処方

アスコルビン酸	300 g (30%)
乳糖(200M)	460 g (46%)
コーンスターチ	210 g (21%)
HPC-L	30 g (3%)
合 計	1000 g (100%)

上記処方に水 160 mL を滴下

(3) D-マンニトール単体処方

(ア) 流動層造粒処方

D-マンニトール	292.5 g (97.5%)
HPC-L(8%水溶液 94 g)	7.5 g (2.5%)
合 計	300 g (100%)

(イ) 攪拌造粒処方

D-マンニトール	975 g (97.5%)
HPC-L	25 g (2.5%)
合 計	1000 g (100%)

上記処方に水 100 mL を滴下

2. 操作条件

(1) 流動層造粒機 (FL-LABO) による造粒

実験装置：流動層造粒機 (FL-LABO 型、フロイント産業(株)製)

間欠微調整タイマー (FT-011、東京硝子器械(株)製)

操作法：処方 300 g を量り取り、装置容器内に投入し、結合剤 (HPC-L 8%水溶液) のスプレー条件を変えて造粒実験を行った。スプレー開始時の給気温度は統一した。

ア) 連続スプレーの場合

給気温度 60°C、風量 0.3 m³/min、スプレーエア-0.1MPa、パルスエア-0.17MPa で造粒した。また、予備試験の結果から造粒物の平均粒子径が 200 μm 前後となるスプレー液速度に設定した。

スプレー液速度	エテンザミド処方	7.7 g/min (送液ポンプ目盛り : 5)
	アスコルビン酸処方	6.0 g/min (送液ポンプ目盛り : 4)
	マンニトール処方	3.0 g/min (送液ポンプ目盛り : 2.5)

イ) 間欠スプレーの場合

1 と同じ条件で、チュービングポンプの電源を間欠タイマーで制御した。間欠タイマーでは ON の時間はポンプの電源が入り、結合液がスプレーされ、OFF 時間はスプレーが停止する。ON の時間と OFF の時間を① ON : 50 秒、OFF : 10 秒または、② ON : 20 秒、OFF : 10 秒に設定し、造粒実験を実施した。乾燥の終点は排気温度 38°C とし、乾燥後の造粒物を 1000 μm で篩下し、物性評価に用いた。

(2) 攪拌造粒機 (ハイスピードミキサー) による造粒

実験装置 : ハイスピードミキサー (FS-GS-5 型、深江パウテック(株)製)

2 流体スプレー装置 (FV-3-6 型、深江パウテック(株)製)

操作法 : 処方 1,000g を量り取り、攪拌造粒機に投入し、アジテーター回転数 400 rpm、チョッパー回転数 1500 rpm で 1 分間混合した後、滴下法では、精製水を規定量滴下しながら、混合時と同じ回転数で 10 分間 (滴下時間含む) 造粒した。精製水の滴下量はあらかじめ、処方ごとに行った予試験結果から、最適な滴下量を決定した。また、スプレー法では、スプレー液速度を 20 g/min に調整して装置に取り付け、10 分間造粒した。造粒後、流動層造粒機 (FLO-1 型、フロイント産業(株)製) にて約 500 g ずつ 2 回に分けて乾燥した (給気温度 60°C、10 分間)。乾燥後の造粒物を 1000 μm で篩下し、物性評価に用いた。

3. 物性評価

乾燥後の各造粒物の整粒品 (1000 μm pass 品) について、かさ密度 (見かけ密度)、粒度分布、平均粒子径を測定した。平均粒子径は正規確率紙 (対数正規分布) を用いて描いた回帰直線から算出した。また、粒子径 150~250 μm の整粒品について、マイクロ스코プ (DS-400C、マイクロ・スクエア(株)製) にて粒子形状の写真を撮影した。攪拌造粒品では 1000 μm on 品の重量についても測定を行った。

実験結果

① エテンザミド含有処方 (流動層・攪拌造粒物)

エテンザミド含有処方について流動層造粒装置によりスプレー条件を変えて造粒実験を行った結果、間欠スプレーが連続スプレーと比較して粒度分布の狭い造粒品が得られた。また、間欠スプレーのスプレー時間の設定では、スプレー時間 20 秒、停止時間 10 秒に設定した条件が、最も粒度分布の狭い造粒品となった (Fig. 1)。また、間欠スプレーでは連続スプレーと比較して平均粒子径及びかさ密度の小さい造粒品が得られた (Table 1)。

一方、攪拌造粒において、精製水を滴下法とスプレー法によって造粒し、得られた造粒物を比較した結果では粒度分布、かさ密度、平均粒子径に違いは認められなかったが (Fig. 2, Table 2)、1000 μm on 品の重量はスプレー法において減少していた (Table 2)。

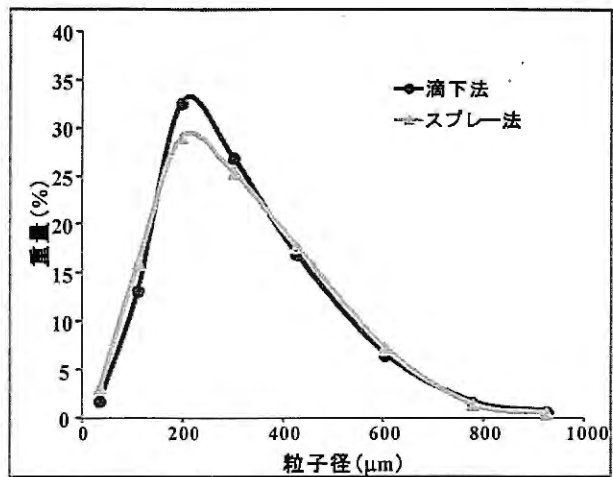
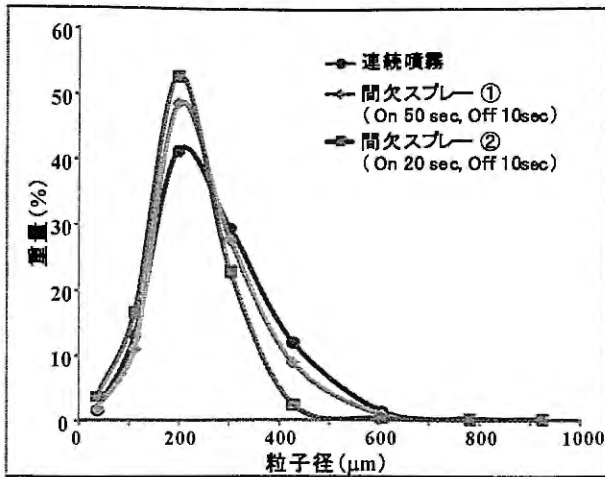


Fig. 1 エテンザミド含有処方粒度分布 (流動層)

Fig. 2 エテンザミド含有処方粒度分布 (攪拌)

②アスコルビン酸含有処方 (流動層・攪拌造粒物)

アスコルビン酸含有処方について流動層造粒装置によりスプレー条件を変えて実験を行った結果、間欠スプレーが連続スプレーと比較してシャープな粒度分布の造粒物が得られた (Fig. 3)。間欠スプレーにおいて、スプレー時間 50 秒、停止時間 10 秒の条件では、凝集が発生したため、造粒を中止した。また、間欠スプレーでは連続スプレーと比較して平均粒子径の大きな造粒物が得られていたが、かさ密度について変化は認められなかった (Table 1)。

一方、攪拌造粒では、粒度分布がスプレー法によりきれいな正規分布になっていたものの、有意な差は認められなかった (Fig. 4)。しかしながら、スプレー法においてかさ密度及び平均粒子径の低下が認められ、1000 μm on 品の重量の減少も認められた (Table 2)。

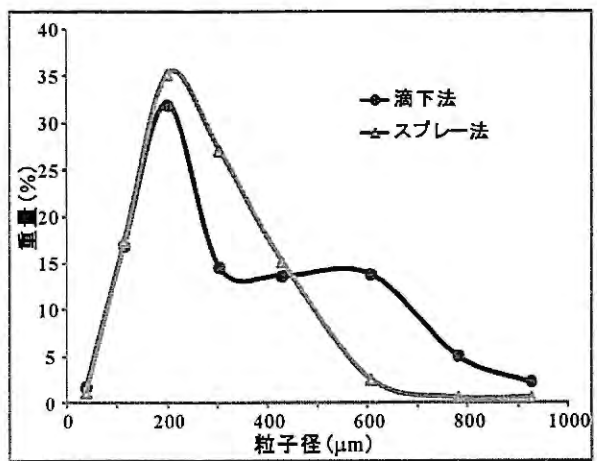
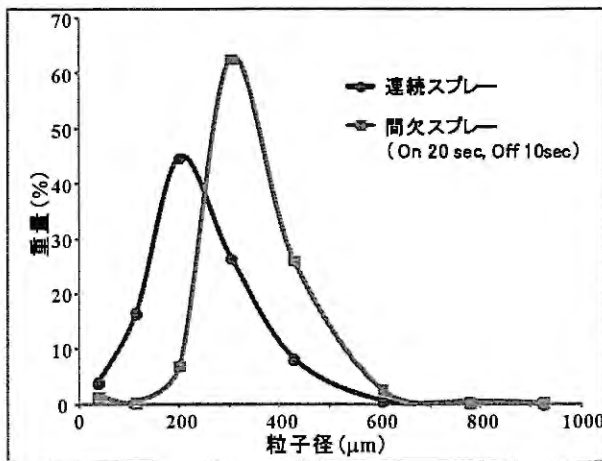


Fig. 3 アスコルビン酸含有処方粒度分布 (流動層)

Fig. 4 アスコルビン酸含有処方粒度分布 (攪拌)

③D-マンニトール単体処方 (流動層・攪拌造粒物)

D-マンニトール単体処方について流動層造粒装置によりスプレー条件を変えて造粒実験を行った結果、間欠スプレーが連続スプレーと比較してシャープな粒度分布が得られた。また、間欠スプレーでも、間欠タイマーの設定をスプレー時間 20 秒、スプレー停止時間 10 秒に設定したものが、最もシャープな粒度分布となった (Fig. 5)。また、間欠スプレーでは連続スプレーと比較して平均粒子径及びかさ密度の小さい造粒物が得られた (Table 1)。

一方、攪拌造粒において、精製水を滴下法とスプレー法によって造粒し、得られた造粒物を比較した結果では粒度分布、かさ密度、平均粒子径に違いには認められなかったが (Fig. 6, Table 2)、1000 μm on 品の重量はスプレー法において減少していた (Table 2)。

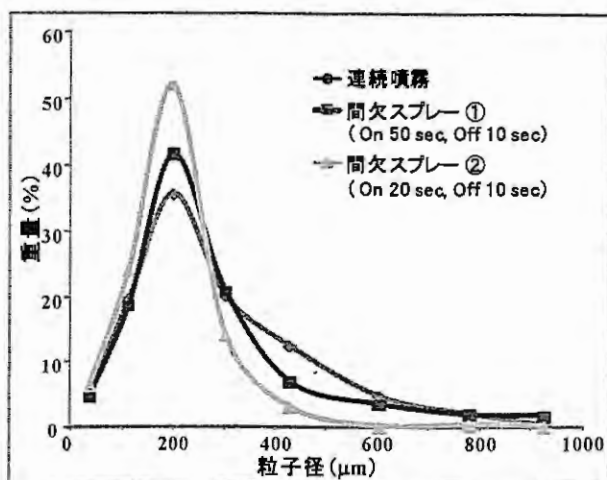


Fig. 5 マンニトール処方粒度分布 (流動層)

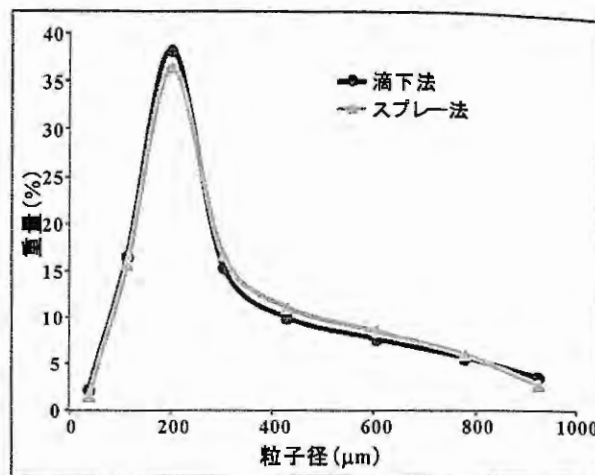


Fig. 6 マンニトール処方粒度分布 (攪拌)

Table 1. 流動層造粒品の物性測定値

流動層造粒	エテンザミド			アスコルビン酸		マンニトール		
	連続スプレー	間欠スプレー (50:10)	間欠スプレー (20:10)	連続スプレー	間欠スプレー (20:10)	連続スプレー	間欠スプレー (50:10)	間欠スプレー (20:10)
かさ密度 (g/cm ³)	0.396	0.361	0.350	0.213	0.208	0.468	0.415	0.359
平均粒子径 (μm)	216.6	179.5	207.5	187.8	296.7	213.0	207.1	160.5
マイクロスコープ写真								

(※ 流動層造粒品はほぼすべて 1000 μm ふるいをパスしたため、1000 μm on 重量は測定していない)

Table 2. 攪拌造粒品の物性測定値

攪拌造粒	エテンザミド		アスコルビン酸		マンニトール	
	滴下	スプレー	滴下	スプレー	滴下	スプレー
かさ密度 (g/cm ³)	0.615	0.588	0.629	0.603	0.567	0.563
平均粒子径 (μm)	248.2	240.1	274.3	226.4	254.2	260.3
1000 μm on 重量 (g)	132.7	48.0	176.0	28.0	467.7	116.4
マイクロスコープ写真						

考察

今回、我々は粒子径の均一な造粒物を得ることを目的として、一般的な造粒法である流動層造粒と攪拌造粒のラボ機を用いて検討を行った。処方には、1) 難溶性薬物であるエテンザミドを30%配合する処方、2) 水溶性薬物であるアスコルビン酸を30%配合する処方、3) OD錠の賦形剤に多用されるD-マンニトールの単体処方の3種類について実験を行った。その結果、流動層造粒では、3種類すべての処方において、連続スプレーと比較して間欠スプレーにより粒子径がより均一になっていることが確認された。流動層造粒では結合剤を一定条件で一定量連続的にスプレーする方法に比べ、結合剤の噴霧、停止を繰り返す間欠スプレー法により、粒子径の揃った造粒品が得られることが報告されており¹⁾、今回の実験でも、間欠スプレーの有効性が確認された。また今回、その条件として、噴霧及び停止時間をそれぞれ20秒、10秒に設定した条件が最もシャープな粒度分布となっており、噴霧・停止時間の間隔を狭くした方が、より過剰湿潤・粗大粒化を抑制することが明らかとなった。また、エテンザミドとマンニトール処方においては、間欠スプレーによって、平均粒子径及びかさ密度の低下が認められ、粗大粒子の形成が抑制され、粒子径が均一になっていることが確認された。しかし、アスコルビン酸処方では、間欠スプレーで平均粒子径の増大が認められた。この詳細な原因は不明であるが、アスコルビン酸は極めて水に溶けやすい性質があるため、他の処方と比較して粒度分布の挙動が異なったものと考えられる。

一方、攪拌造粒においては、結合液を滴下する条件に比べ、スプレーする条件の方が、粒子径の揃った造粒品が得られることが報告されている²⁾。今回行った結果では、いずれの処方においても、スプレー法による粒度分布(1000 μm 以下)への影響は小さかったが、アスコルビン酸処方においては、粒度分布が正規分布となっていた。一般的に、アスコルビン酸などの水溶性薬物配合処方では、通常の攪拌造粒による造粒が難しいことが知られているが、このような処方に対しては、スプレー法が有効であると考えられた。また、スプレー法では粗大粒子の形成が顕著に抑制されており、結合剤が均一に細密分布されていると考えられる。

今回の実験により、流動層造粒では間欠スプレーを用い、攪拌造粒では結合液をスプレーする方法によって、均一な粒子径の造粒物 that 得られることが確認された。特に、粒子が機械的な力を受けにくい流動層造粒においては、間欠スプレーの有効性が確認された。また、攪拌造粒においては、攪拌・解砕羽根による強いせん断・転動作用によって結合剤が細密分布されることから、結合液添加条件の影響は小さいものの、水溶性薬物の造粒や粗大粒化の抑制にはスプレー法が有効であることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 増田 義典：精密製剤設計を支える流動層造粒技術, (27) 77-82, PHARM TECH JAPAN (2011)
- 2) H. Leuenberger: Monitoring mass transfer processes to control moist agglomeration, 56-73, Pharmaceutical Technology (1986)

HPLCの移動相溶媒の代替に関する検討
—鼻炎用点鼻薬成分について—

Research on Substitutes for Solvent at Mobile Phase in HPLC
—Nose drops for Rhinitis—

—富山県薬事研究会分析部会（鼻炎用点鼻薬分科会）—
Division of Analytical Chemistry Toyama Pharmaceutical Research Association

小山裕樹 Hiroki KOYAMA	株式会社池田模範堂 Ikeda Mohando Co.,Ltd.	前田綾子 Ayako MAEDA	ダイト株式会社 Daito Pharmaceutical Co.,Ltd.
熊本卓也 Takuya KUMAMOTO	東亜薬品株式会社 TOA Pharmaceutical Co.,Ltd.	田嶋沙野花 Sayaka TAJIMA	ファーマパック株式会社 Phamapack Co.,Ltd.
老松聡 Satoshi OIMATSU	株式会社富士薬品 FUJIYAKUHIN Co.,Ltd.	西川直志 Tadashi NISHIKAWA	株式会社陽進堂 Yoshindo Inc.
		横田洋一 Yoichi YOKOTA	富山県薬事研究所 Toyama Prefectural Institute For Pharmaceutical Research

緒言

分析時間の短縮や溶媒の削減など分析業務の省力化・低コスト化は重要な課題であり、一昨年にはアセトニトリルの供給不足、価格高騰が問題となった。そこでカラムのサイズダウンによる分析時間短縮、安価で安定供給されるメタノールを用いた移動相および2種の有機溶媒の混合による分離改善を検討し、設定した分析法について定量性確認を行った。

実験方法

1. フェニレフリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩およびリドカイン

試料

市販鼻炎用点鼻薬（30 mL 中）

フェニレフリン塩酸塩 150 mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩 150 mg およびリドカイン 30 mg

方法

一般用医薬品の試験法（上巻）¹⁾ および昨年度の検討結果²⁾ を参考として検討より設定した下記の試験法で実験を行った。

試料 2 mL（フェニレフリン塩酸塩約 10 mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約 10 mg およびリドカイン約 2 mg に対応する量）を正確に量り、内標準溶液 5 mL を正確に加え、

さらに移動相を加えて 30 mL とし、孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液 3 mL を除き、次のろ液を試料溶液とする。別に「リドカイン」を約 50 mg 精密に量り、移動相に溶かし、正確に 50 mL とし、リドカイン標準原液とする。別に「フェニレフリン塩酸塩」約 50 mg および「クロルフェニラミンマレイン酸塩」約 50 mg をそれぞれ精密に量り、これにリドカイン標準原液 10 mL を正確に加え、移動相を加えて溶かし、正確に 50 mL とする。この液 10 mL を正確に量り、内標準溶液 5 mL を正確に加え、さらに移動相を加えて 30 mL とし、標準溶液とする。試料溶液および標準溶液 3 μL につき、以下の条件で試験する。

内標準溶液 パラオキシ安息香酸エチルの移動相溶液 (3→5000)

試験条件

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（検出波長：230 nm）

カラム：Table1 に示す

移動相：Table2 に示す

カラム温度：40°C 付近の一定温度

流量：1.3 mL/min

使用機器

Table3 に示した分析機器を使用し、各社でシステム再現性および定量値を求めた。

Table 1 使用したカラム

1	L-column ODS 5 μm 4.6 mm I.D. \times 150 mm（財団法人化学物質評価研究機構製） *文献1記載カラム
2	L-column ODS 3 μm 4.6 mm I.D. \times 75 mm（財団法人化学物質評価研究機構製）

Table 2 検討した移動相

1	1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1→375) / アセトニトリル / リン酸混液 (750 : 250 : 1)
2	A 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムの溶液 (1→500) / メタノール / リン酸 (500 : 500 : 1)
	B 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1→500) / リン酸 (1000 : 1) A 液：B 液混液 (50~100 : 0~50) *100 になるように比率調整
3	A 液：メタノール / 2-プロパノール (30~45 : 0~15)
	B 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (2→550) / リン酸 (550 : 1) A 液：B 液混液 (50~60 : 40~50) *100 になるように比率調整
4	A 液：メタノール / テトラヒドロフラン (30~45 : 0~15)
	B 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (2→550) / リン酸 (550 : 1) A 液：B 液混液 (50~60 : 40~50) *100 になるように比率調整
5	1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム水溶液 (1→275) / メタノール / テトラヒドロフラン / リン酸混液 (550 : 400 : 50 : 1)

Table 3 各社の使用機器

分析機器/会社	A社	B社	C社	D社	E社
ポンプ	LC-20AB	LC-10AD	LC-20AT		LC-20ACXR
検出器	SPD-M20A	SPD-10A	SPD-20AV	LC-2010C HT	SPD-20A
オートサンプラー	SIL-20A	SIL-10AD	SIL-20ACHT		SIL-20ACXR

2. テトラヒドロゾリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩およびリドカイン 試料

市販鼻炎用点鼻薬（1 mL 中）

テトラヒドロゾリン塩酸塩 1 mg, クロルフェニラミンマレイン酸塩 5 mg 及びリドカイン 3 mg

方法

一般用医薬品の試験法（上巻）³⁾ および昨年度の検討結果²⁾ を参考として検討より設定した下記の試験法で実験を行った。

試料 1 mL（テトラヒドロゾリン塩酸塩約 1 mg、クロルフェニラミンマレイン酸塩約 5 mg およびリドカイン約 3 mg に対応する量）を正確に量り、内標準溶液 5 mL を正確に加え、さらに移動相を加えて 30 mL とし、孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液 3 mL を除き、次のろ液を試料溶液とする。別に「テトラヒドロゾリン塩酸塩」を約 0.025 g を精密に量り、移動相に溶かし、正確に 50 mL とした液 2 mL、「クロルフェニラミンマレイン酸塩」を約 0.05 g を精密に量り、移動相に溶かし、正確に 50 mL とした液 5 mL、「リドカイン」を、その約 0.06 g を精密に量り、移動相に溶かし、正確に 100 mL とした液 5 mL を正確に量り、それぞれを合わせ、内標準溶液 5 mL を正確に加え、移動相を加えて 30 mL とし、標準溶液とする。試料溶液および標準溶液 3 μ L につき、以下の条件で試験する。

内標準溶液 パラオキシ安息香酸エチルの移動相溶液（3 \rightarrow 10000）

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（検出波長：230 nm）

カラム：粒子径 3 μ m の ODS カラム（内径約 4.6 mm、長さ約 75 mm）Inertsil ODS-4（GL-サイエンス）

移動相：Table4 に示す

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

流量：1.0 mL/min

使用機器

Table5 に示した分析機器を使用し、各社でシステム再現性および定量値を求めた。

Table 4 検討した移動相

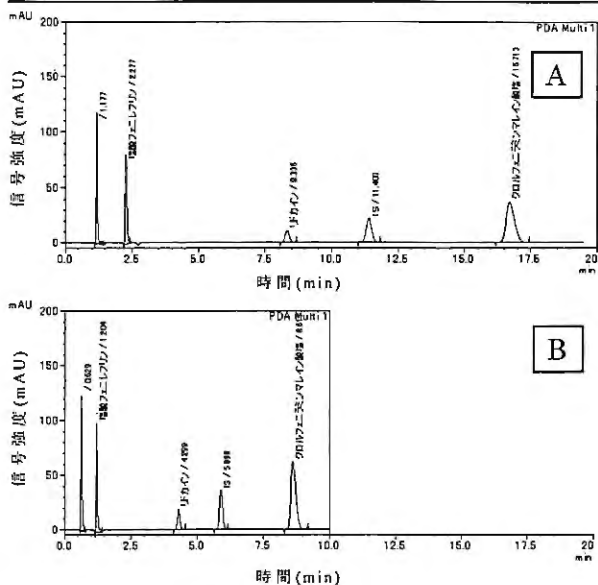
1	1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1.04 \rightarrow 770,pH2.2）／アセトニトリル（750：250）
2	A 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1.013 \rightarrow 1000）／メタノール（50：50）
	B 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1.013 \rightarrow 1000） A 液：B 液混液（50 \sim 100：50 \sim 0）＊トータル 100 になるように混合比率調整
3	A 液：メタノール／2-プロパノール（30 \sim 45：0 \sim 15）
	B 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1.013 \rightarrow 1000,pH2.2） A 液：B 液混液（50 \sim 60：50 \sim 40）＊トータル 100 になるように混合比率調整
4	A 液：メタノール／テトラヒドロフラン（30 \sim 45：0 \sim 15）
	B 液：1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1.013 \rightarrow 1000,pH2.2） A 液：B 液混液（50 \sim 60：50 \sim 40）＊トータル 100 になるように混合比率調整
5	1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液（1.1 \rightarrow 650,pH2.2）／メタノール／テトラヒドロフラン（600：340：60）

Table 5 各社の使用機器

分析機器/会社	A社	B社	F社
ポンプ	LC-20AB	LC-10AD	
検出器	SPD-M20A	SPD-10A	CLASS-VP システム
オートサンプラー	SIL-20A	SIL-10AD	

実験結果

1. フェニレフリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩およびリドカイン



充てん粒子径 5 μm カラムを用いた文献 1 記載分析法において、充てん粒子径を 3 μm にサイズダウンし、分析時間短縮検討を行った (Table1)。充てん粒子径 5 μm カラムおよび充てん粒子径 3 μm カラムを用いて行った分析で得られた代表的なクロマトグラムおよび分析パラメーターをそれぞれ Fig.1 および Table6 に示す。分析時間は短縮され、溶出順序など分離特性には大きな変化はなかったものの、全体的に理論段数および分離度が減少した。特に最初に溶出するフェニレフリン塩酸塩では理論段数が約半分程度となった。以上の結果から、溶出の速い成分について理論段数に注意が必要なもの、同一のメーカー、同一の充てん剤シリーズであれば、粒子径をサイズダウンしたとしても分離特性は大きく変わらずに、半分程度の時間短縮が可能であることが示唆された。

Fig.1 カラム変更前後のクロマトグラム
A: 変更前(5 μm カラム)
B: 変更後(3 μm カラム)

Table 6 カラム変更前後の分析パラメーター: 代表値: A社 SHIMADZU 製 LC-20A シリーズ

成分	Phe		Li		IS		Chl	
	5 μm	3 μm	5 μm	3 μm	5 μm	3 μm	5 μm	3 μm
粒子径	5 μm	3 μm	5 μm	3 μm	5 μm	3 μm	5 μm	3 μm
保持時間(min)	2.277	1.204	8.336	4.299	11.403	5.898	16.713	8.613
理論段数	7549	3355	12015	8977	14442	10611	12918	10077
分離度	-	-	29.68	23.43	8.99	7.80	10.99	9.51

Phe: フェニレフリン塩酸塩, Li: リドカイン, Chl: クロルフェニラミンマレイン酸塩

次にアセトニトリルの代替としてメタノールを用いる移動相への変更を検討した。検討には充てん粒子径 3 μm カラムを用いた。アセトニトリルとメタノールの溶出強度の違いを勘案して、移動相中のメタノール比率を最小 25%、最大 50% として 5% 刻みで調製し分析を行った (Table2-2)。なお、メタノール比率による分離挙動を把握するため、移動相中のイオンペア試薬量およびリン酸量は一定になるように調製した。

メタノール比率 40~50% のクロマトグラムを Fig.2 に示す。アセトニトリルを用いた移動相のクロマトグラムと比較すると、内標準物質とリドカインの溶出順序に逆転が起こり、ピークの溶出順序はフェニレフリン塩酸塩、リドカイン、内標準物質、クロルフェニラミンマレイン酸塩となった。ただしメタノール比率が 40% 以下のとき、クロルフェニラミンマレイン酸塩は設定した分析時間の 30 分以内で溶出しなかった。各メタノー

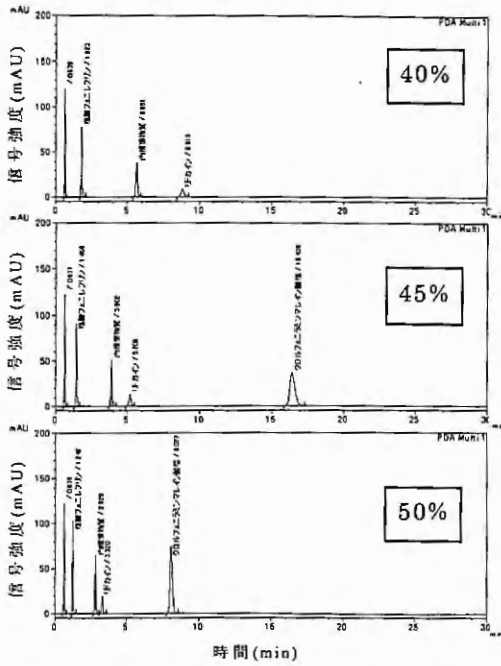


Fig.2 各メタノール濃度の移動相でのクロマトグラム

- 40% : 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1→300) / メタノール / リン酸 (600 : 400 : 1)
 45% : 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1→275) / メタノール / リン酸 (550 : 450 : 1)
 50% : 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1→250) / メタノール / リン酸 (500 : 500 : 1)

Table7 各メタノール濃度での分析パラメーター：代表値：A社 SHIMADZU製 LC-20A シリーズ
 (*「-」(ハイフン)は保持時間が30分以上のため測定せず)

メタノール		Phe			Li		
比率	保持時間(min)	理論段数	分離度	保持時間(min)	理論段数	分離度	
40%	1.823	5146	-	5.651	11267	24.38	
45%	1.466	4306	-	3.902	10188	20.01	
50%	1.242	3777	-	2.829	8884	15.83	

メタノール		IS		Chl		
比率	保持時間(min)	理論段数	分離度	保持時間(min)	理論段数	分離度
40%	8.818	7510	10.23	-	-	-
45%	5.206	6576	6.35	16.438	10269	24.85
50%	3.320	5987	3.37	8.077	10385	19.50

そこで分離のよかったメタノール比率45%を有機溶媒比率として設定し、2-プロパノールまたはテトラヒドロフランを第二の有機溶媒として添加することで、分析時間の短縮と分離の向上を検討した。第二の有機溶媒の比率は全量の5%、10%、15%として同量のメタノールと置換し、調製して分析を行った (Table2-3、4)。

アセトニトリルよりも極性が低いこれらの第二の有機溶媒を添加することで、溶出は全体的に速くなる傾向にあった。その中でもテトラヒドロフランによる影響は特に大きく、溶出速度は著しく上昇し、溶出順序が変化した。またリドカインおよびクロルフェニラミンマレイン酸塩については、フェニレフリン塩酸塩および内標準物質と比較して、より溶出速度の上昇率が大きかった。以上の結果より、これらの溶媒添加による影響の大きさは成分ごとに異なっており、そのために溶出順序の変化が起こったと考えられる。

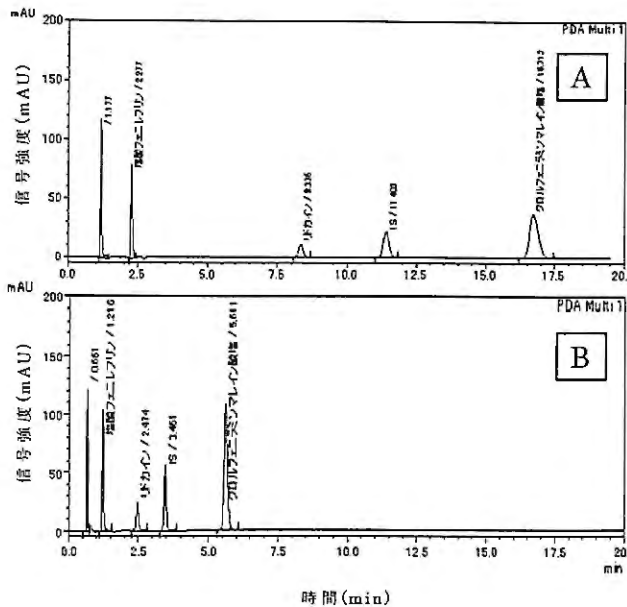


Fig.3 移動相検討前後のクロマトグラム

A: 文献1記載分析法 (カラム: Table1-1, 移動相: Table2-1)

B: 検討後設定した分析法 (カラム: Table1-2, 移動相: Table2-5)

検討を行った中で分離度、理論段数および分析時間を考慮した結果、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 (1→275) / メタノール / テトラヒドロフラン / リン酸混液 (550 : 400 : 50 : 1) (Table2-5) を移動相として採用した。検討前後の代表的なクロマトグラムおよび分析パラメーターをそれぞれ Fig.3 および Table8 に示す。溶出時間が早くなったことで理論段数は低下したが、試験に問題ない分析パラメーターが得られた (Table9)。カラム圧は文献1記載方法による約7 MPa から約16 MPa に上昇したが、メーカー推奨上限を超えなかった。分析時間は文献1記載方法の約40%程度である6分に短縮することができた。

Table 8 移動相検討前後の分析パラメーターの比較: 代表値: A社 SHIMADZU製 LC-20A シリーズ

	Phe		Li		IS		Chl	
	検討前	検討後	検討前	検討後	検討前	検討後	検討前	検討後
保持時間(min)	2.277	1.216	8.336	2.474	11.403	3.461	16.713	5.611
理論段数	7549	3574	12015	5143	14442	9542	12918	9905
分離度	-	-	29.68	11.50	8.99	7.07	10.99	11.73

これまでの検討結果から分析条件を定め、参加企業のうち5社で定量操作を行い、分析の精度及び再現性の確認を行った。システムの再現性および定量値の各社平均値をそれぞれ Table10 および Table11 に示す。いずれも問題のない値が得られた。

Table 9 分析パラメーター: 代表値: A社 SHIMADZU製 LC-20A シリーズ

	Phe		Li		IS		Chl	
	標準溶液	試料溶液	標準溶液	試料溶液	標準溶液	試料溶液	標準溶液	試料溶液
保持時間 (min)	1.185	1.180	2.465	2.460	3.416	3.411	5.683	5.678
理論段数	3098	3274	4941	5052	9145	9153	9172	9254
分離度	-	-	11.37	11.60	6.73	6.78	11.95	12.00

Table 10 システムの再現性(%) (参加企業5社)

Table 11 定量値(%) (参加企業5社)

(n=6)	A社	B社	C社	D社	E社	平均
Phe	0.15	0.05	0.05	0.29	0.08	0.12
Li	0.43	0.11	0.04	0.76	0.11	0.29
Chl	0.12	0.06	0.04	0.10	0.07	0.08

	A社	B社	C社	D社	E社	平均
Phe	99.3	99.5	99.4	99.5	99.2	99.4
Li	99.2	99.4	99.6	99.1	99.6	99.4
Chl	99.9	99.7	99.8	99.7	99.5	99.7

2. テトラヒドロゾリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩およびリドカイン

文献3記載の Inertsil ODS-2 では充てん粒子径 3 μm カラムが市販されていないため、ODS-4 の充てん粒子径 3 μm カラムを用いて文献3記載移動相 (Table4-1) で分析を行ったところ十分な分離が得られなかった。次にアセトニトリルをメタノールに替えて分析を行った (Table4-2)。分離特性についてメタノールへの変更による溶出順序の変化が認められたが、これも十分な分離は得られなかった (Table12、Fig.4)。

Table 12 各メタノール濃度での分析パラメーター：代表値：F社 SHIMADZU製 CLASS-VPシステム

メタノール	Th		Li		IS		Chl	
比率	段数	分離度	段数	分離度	段数	分離度	段数	分離度
40%	7026	-	5325	2.56	8005	3.92	7274	12.28
45%	5458	-	4303	2.07	7130	5.48	6453	4.85
50%	4284	-	3595	1.63	4763	5.73	-	-

Th：テトラヒドロゾリン塩酸塩、Li：リドカイン、Chl：クロルフェニラミンマレイン酸塩

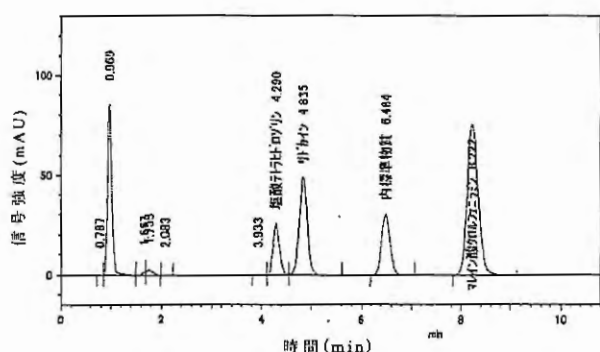


Fig.4 メタノール比率 45% 移動相 (Table4-2) のクロマトグラム

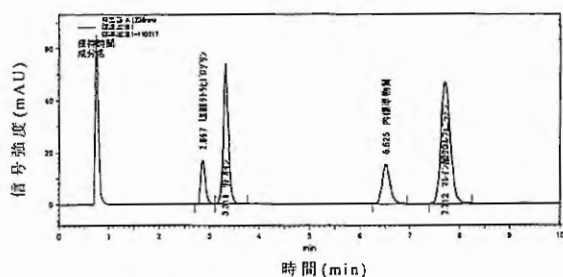


Fig.5 検討後設定した移動相 (Table4-5) のクロマトグラム

そこで第二の有機溶媒として、2-プロパノール (Table4-3) およびテトラヒドロフラン (Table4-4) を用いて分離の改善を試みたところ、テトラヒドロフランを用いた分析条件で良好な結果が得られた。その代表的なクロマトグラムおよび分析パラメーターをそれぞれ Fig.5 および Table13 に示す。

文献3記載の結果と、検討した分析法により得た結果を比較すると、全体の分析時間は約半分程度にまで短縮が可能であった。またカラム圧は検討後で約 12 MPa であり、メーカー推奨上限を超えなかった。以上の結果から、溶出の速い成分の分析パラメーターに注意が必要であるものの、粒子径 3 μm カラムにてアセトニトリルをメタノールに替えて分析することは可能であり、分析時間を短縮できることが示唆された。各社の再現性 (Table14) も問題なく、安定した定量値 (Table15) が得られた。

Table 13 分析パラメーター：代表値：F社 SHIMADZU製 CLASS-VPシステム

	Th	Li	IS	Chl
保持時間 (min)	2.867	3.319	6.525	7.712
理論段数	5327	4371	8605	8041
分離度	-	2.53	13.32	3.80

Table 14 システム再現性 (%) (参加企業 3 社)

(n=6)	A社	B社	F社	平均
Th	0.16	0.23	0.30	0.23
Li	0.13	0.08	0.20	0.14
Chl	0.15	0.07	0.14	0.12

Table 15 定量値 (%) (参加企業 3 社)

	A社	B社	F社	平均
Th	99.2	99.5	98.8	99.2
Li	99.4	99.7	99.1	99.4
Chl	98.8	98.9	98.5	98.7

考察

今回、2種類の鼻炎用点鼻薬を用いて分析業務の省力化・低コスト化を目的とした、カラムのサイズダウンによる分析時間の短縮検討、アセトニトリルの代替としてメタノールを用いた移動相の検討および2-プロパノールおよびテトラヒドロフランを添加することによる分離改善の検討を行い、設定した分析法について定量性の確認を行った。

フェニレフリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩およびリドカインにおいて、文献1記載の分析法の約40%程度の分析時間で分析を行うことができ、分離度等の分析パラメーターや定量再現性および機種間再現性にも問題ない分析法を設定することができた。2-プロパノールやテトラヒドロフランの添加による分離特性の変化は、より良好な分離と分析時間の短縮に有用であった。

テトラヒドロゾリン塩酸塩、クロルフェニラミンマレイン酸塩およびリドカインにおいては、今回検討を行った Inertsil ODS-4 の充填粒子径 3 μm カラムへのサイズダウンによる分析時間短縮の際に、既存の試験方法での良好な分離が得られなかった。しかし移動相のアセトニトリルをメタノールに替え、第二の有機溶媒としてテトラヒドロフランを添加することにより良好な分離を得ることができた。その結果約50%程度の分析時間で分析を行うことができ、定量再現性および機種間再現性にも問題ない分析法を設定することができた。

以上のことから、前年度の検討で示された移動相溶媒のアセトニトリルをメタノールに替えての分析について、他の分析法への応用が可能であることが示唆された。

文献

- 1) 真弓忠範編、一般用医薬品の試験法・上巻-5 薬効群収録、初版、真弓忠範編、株式会社薬業時報社、日本、1997、219-221
- 2) 西川直志ら、HPLC の移動相の代替溶媒に関する基礎的検討、家庭薬研究、No.30、44-51 (2011)
- 3) 真弓忠範編、一般用医薬品の試験法・上巻-5 薬効群収録、初版、真弓忠範編、株式会社薬業時報社、日本、1997、213-218

膵臓β細胞の高血糖誘発細胞死に対する保護効果を有する天然物の探索

Screening for natural materials with protective potency to cell death induced by high concentration of ribose in pancreatic β cells

松永孝之 小笠原勝 高津聖志
Takayuki MATSUNAGA Masaru OGASAWARA Kiyoshi TAKATSU

富山県薬事研究所
Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

緒言

わが国において糖尿病及び糖尿病の可能性のある人は、2003年には1,620万人、2007年には2,210万人と増加傾向にある¹⁾。わが国では2型糖尿病の患者が大半であるが、その発症過程は次のように考えられている。当初は、肥満などに伴うインスリン抵抗性の増大に対して膵臓β細胞がインスリン分泌能を増大させることにより血糖値を正常に保つ代償機構が働くが、インスリン抵抗性の継続により、この代償機構の不全が徐々に発現し、血糖値が徐々に上昇してくる。最終的に、膵臓β細胞の機能不全及び細胞消失が進行し、糖尿病を発症するものと推測されている²⁾。

糖尿病による高血糖状態においては、酸化ストレスなどの亢進により、血管内皮細胞や膵臓β細胞などが障害を受け、糖尿病合併症や糖尿病の増悪につながっている³⁾。そのため、抗酸化活性などを有する天然物は、糖尿病の予防・治療薬になることが期待される。本研究では、膵臓β細胞由来の培養細胞を用いて、高血糖培養条件下における細胞死に対する保護効果を有する天然物をスクリーニングし、医薬シーズとしての有用性の可能性を検討した。

実験方法

1. 被検試料

本試験で用いた被検試料は、市販化合物ライブラリー(502種、フナコシ)、供与いただいた天然物エキス(154種、クラシエ製薬(株))及び化合物(61種、リードケミカル(株))、薬事研究所所有化合物(31種)である。被検試料は、ジメチルスルフォキシドまたはリン酸緩衝生理食塩水に溶解して用いた。

2. 細胞培養

ハムスター膵β細胞株 HIT-T15 は、10%の非働化牛胎児血清(FBS)、0.1mg/mLのカナマイシンを含む Ham's F12 培地中にて継代、維持した。

3. 細胞増殖能の測定

細胞増殖は、WST-1 Cell Counting Kit(和光)を用いて評価した。10%FBSを含む Ham's F12 培地で HIT-T15 細胞を 2.5×10^4 個/mL の細胞密度に調製し、96 ウェルプレート内の各ウェル当たり 2.5×10^3 個を播種した。細胞がプレートに接着後、被検試料を含む培地に交換し、5%炭酸ガス培養器(37°C)で7日間培養した。培養4日目に、各被検体を含む新しい培地に交換した。培養終了後、各ウェルの培地を、10%WST-1を含む10%FBS - Ham's F12 培地に交換し、さらに4時間培養した後、波長450nmにおける吸光度を測定した。なお、インスリン分泌量を測定する場合は、細胞増殖能測定前に10mM グルコース含むクレブスーリンガー緩衝液に交換して2時間培養し、培地中に分泌されたインスリン量を測定した。

4. インスリン濃度の測定

HIT-T15 細胞による培地中へのインスリン分泌量は、マウスインスリン測定キットを用いてプロトコールに従って測定した。

実験結果

1. 膵臓β細胞におけるフルクトース及びリボースによる細胞毒性

グルコースに比べて糖毒性の強いフルクトース及びリボースの膵臓β細胞由来HIT-T15細胞に対する細胞毒性を比較検討した。その結果、いずれも用量依存的に細胞毒性を発現したが、リボースの方が低濃度で毒性を示すことが確認された(Table1)。

フルクトース(mM)	生細胞率	リボース(mM)	生細胞率
0	100	0	100
50	68.5	5	62.7
100	45.5	10	45.2
200	19.9	20	13.9
400	-2.1	40	-1.1

そこで、抗酸化活性及び非酵素的糖化反応阻害活性を有するアミノグアニジンのリボースによる細胞毒性に対する保護効果を検討した。その結果、Table2に示すように、リボース単独時には13.6%の生細胞率を示すが、アミノグアニジン併用により1mM適用時は、24.2%、3mM適用時は46.5%と細胞毒性を軽減した。また、データには示さないが、フルクトースによる細胞毒性に対してもアミノグアニジンは保護効果を示した。

作用濃度 (mM)	リボース(20mM)	
	-	+
コントロール	100	13.6
アミノグアニジン	1.0	24.2
	3.0	46.5

2. 膵臓β細胞におけるリボースによる細胞毒性に対する天然物の保護効果

膵臓β細胞におけるリボースによる細胞毒性に対する748種の天然物エキス及び化合物の保護効果を検索した。このスクリーニングにおいて、化合物については、1μMまたは10μM、天然物エキスについては20μg/mLとして細胞毒性の発現しない濃度で試験した。その結果、リボースによる細胞毒性に対する保護効果を有する天然物としてフォルスコリンが見出された(Table3)。リボース単独時の生細胞率が12.2%の時にフォルスコリンを併用することにより、1μMでは57.5%、3μMでは59.9%と低濃度で顕著な保護効果を示した。この時、膵臓β細胞によるインスリン分泌もリボース処理によりコントロールの18.6%に減少したが、3μMフォルスコリン併用時には51.1%の分泌能を保持していた。

Table3 膵臓β細胞におけるリボースの細胞毒性に対する
フォルスコリンの効果

	作用濃度 (μ M)	リボース(20mM)	
		-	+
コントロール		100	12.2
フォルスコリン	1	99.1	57.5
	3	101.8	59.9
	10	109.5	49.4

3. 膵臓β細胞におけるリボースによる細胞毒性に対する cAMP 上昇物質の保護効果
 フォルスコリンは、アデニレートシクラーゼ活性化剤として良く知られていることから、リボースによる細胞毒性に対する保護効果にアデニレートシクラーゼによりATPから合成されるcAMPの関与が推察される⁴⁾。そこで、cAMPの細胞透過性誘導体のクロロフェニルチオcAMP(cpt-cAMP)及びcAMP分解酵素のホスホジエステラーゼ阻害剤であるテオフィリン誘導体のイソブチルメチルキサンチン(IBMX)の細胞障害に対する保護効果を検討した。その結果、Table4に示すように、両化合物はリボースによる細胞毒性を軽減することが認められた。この時、インスリン分泌能も改善しており、20mMリボースによりインスリン分泌能はコントロールの18.6%に低下したが、0.1mM cpt-cAMPの併用により42.6%に、また、1mM IBMXの併用により35.0%にインスリン分泌能は回復した。

Table4 膵臓β細胞におけるリボースの細胞毒性に対する
クロロフェニルチオcAMPおよびイソブチルメチルキサンチンの効果

	作用濃度 (mM)	リボース(20mM)	
		-	+
コントロール	0	100	12.2
cpt-cAMP	0.01	83.5	23.8
	0.1	97.0	56.7
IBMX	1.0	80.5	39.0

考察

糖尿病は、1型と2型に分類されるが、いずれも最終的にはインスリンの分泌細胞である膵臓β細胞の機能不全あるいは細胞消失により進行すると共に各種合併症を来すことになる。そのため、糖尿病の発症予防あるいは進展阻止のためにはβ細胞機能の保全が重要である。糖尿病による高血糖状態の持続に伴い、糖毒性が各種組織で見られるようになり、特に、膵臓β細胞では糖毒性による酸化ストレスを受け易くなる³⁾。これは、β細胞では酸化ストレスに対する防御機構が脆弱であるためとされている⁵⁾。また、高血糖状態により非酵素的糖化反応であるグリケーションが生じるため細胞障害が起きやすい事が指摘されている⁶⁾。そこで、糖毒性による培養膵臓β細胞における細胞死に対する天然物などの保護効果を検討した。

このスクリーニングでは、比較的低濃度で細胞毒性を発現するリボースを用い、被検物自身の細胞毒性を示さない処理濃度で検討した。その結果、フォルスコリンに保護効果が認められた。フォルスコリンは、シソ科のコリウスフォルスコリの根に含まれるジテルペン化合物であり、cAMPの合成酵素であるアデニレートシクラーゼを活性化することが良く知られている⁴⁾。このことから、フォルスコリンによるリボース誘発

細胞死に対する保護効果は、細胞内cAMPの上昇によることが推察される。そこで、cAMPの細胞透過性誘導体であるcpt-cAMP及びcAMP分解酵素の阻害剤であるIBMXの効果を検討したが、同様にリボースによる細胞死の発現を抑制した。cAMPが、細胞死をもたらすアポトーシスを抑制することは、肝細胞⁷⁾や膵臓β細胞⁸⁾において既に報告されている。この作用機序としては、アポトーシス誘発タンパクの不活化及びアポトーシス抑制タンパクの合成促進などによることが指摘されている⁹⁾。この様に、cAMP上昇をもたらす化合物はアポトーシスを抑制することが期待されるが、フォルスコリンは、膵臓β細胞に対して選択的ではなく、糖尿病の予防・治療薬に適用することは困難であると考えられる。

最近、糖尿病治療薬として汎用されているインクレチン作動薬は、血糖値の上昇に依存してインスリン分泌を促進するため低血糖をもたらさない特徴を有している¹⁰⁾。作用機序としては、細胞内cAMPの上昇によりインスリン分泌を増強すると共に、膵臓β細胞のアポトーシスによる細胞数減少を抑制することが報告されている¹¹⁾。今回のスクリーニングで見出されたフォルスコリンとは異なり、インクレチン作動薬は、膵臓β細胞膜上の受容体を介して作用することから選択性もあるものとされる。このように、cAMP上昇物質は、インスリン分泌の促進及び細胞死に対する保護作用の観点からも、膵臓β細胞に対する選択性を備えていれば、優れた糖尿病治療薬になり得るものと思われる。

謝辞

本研究で用いた被検物を御提供頂きましたクラシエ製薬株式会社とリードケミカル株式会社に感謝致します。

本研究は、文部科学省「イノベーションシステム整備事業」地域イノベーションクラスタープログラム富山・石川地域「ほくりく健康創造クラスター」事業の分担研究課題（天然薬物の免疫制御を活用した医薬品シーズの開発、研究代表者：高津聖志）の一環として実施しました。

参考文献

- 1) 平成19年度国民健康・栄養調査
- 2) Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S. and Sharma, S.: Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes, *Diabetes*, 50, S154-159(2001)
- 3) 鈴木春彦、井原裕、清野裕：膵β細胞疲弊の分子機構；膵β細胞糖毒性、*Diabetes Frontier*, 15, 146-150(2004)
- 4) Souza, N.J., Dohadwalla, A.N., Reden J.: Forskolin, a labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory and adenylate cyclase activating properties, *Med. Res. Rev.*, 201-219(1983)
- 5) Tiedge, M., Lotz, S., Drinkgern, J. and Lenzen, S.: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells, *Diabetes*, 46, 1733(1997)
- 6) 吉川敏一、長谷川剛二：糖尿病と酸化ストレス、*Diabetes J.*, 30, 79-85(2002)
- 7) Li, J., Yang, S. and Billiar, T.R.: Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor α-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release by primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation, *J.Biol.Chem.*, 275, 13026-13034(2000)

- 8) Jhala, U.S., Canettieri, G., Sreaton, R.A., Kulkarni, R.N., Krajewski, S., Reed, J., Walker, J., Lin, X., White, M. and Montminy, M.: cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2, *Genes and development*, 17, 1575-1580(2003)
- 9) Kwon, G., Pappan, K.L., Marshall, C.A., Schaffer, J.E. and McDaniel, M.L.: cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in β -cells, *J.Biol.Chem.*, 279, 8938-8945(2004)
- 10) 山田祐一郎 : インクレチン作用、治療、92, 591-596(2010)
- 11) Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X. and Perfetti, R.: Glucagon-like peptide-1 inhibit apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, *Endocrinol.*, 144, 1444-1455(2003)