# 点眼剤基剤配合成分の細胞毒性について

Cytotoxicity of various materials in eye drops on cultured mammalian cells


島　雄一郎　Yuichiro SHIMA
小池淳平　Junpei KOIKE
折橋正浩　Masahiro ORIHASHI
木村隆仁　Takahito KIMURA
勇伊　実　Minoru YUUI
テイカ製薬株式会社　研究開発本部
Department of Research, Teika Pharmaceutical Co. Ltd.


## 緒　　言

近年、眼科学においては、主薬効成分のみならず、多種の配合剤についても種々の観点から生体への影響を研究しようとする気運が生まれている。一般用および医療用点眼薬においては、品質保持あるいは製剤設計の観点から界面活性剤、防腐剤、可溶化剤等の配合は不可欠であり、基準配合量の範囲で用いる場合には生体に対して大きな影響は無いと考えられるが、今後の点眼薬開発においてはこのような基剤配合成分の眼組織に対する影響に関する知見を製剤開発に取り入れていくことも重要なことと考えられる。

今回、我々は薬剤の影響を鋭敏に検出できる培養細胞を用いた試験系により、点眼剤各種配合剤成分の生体に対する影響を検討し、こうした試験系が上述の知見を得るのに有用な方法であるか否かについて若干の考察を加えた。

## 実験の部

### 1．実験材料

1）使用細胞：チャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞（V79細胞）

細胞は解凍、継代、観察を行いコロニー形成試験まで保存した。

2）培地及び試薬

・MO5（5%牛胎児血清を含むEarle's MEM（GIBCO））

Earle's MEM培地（GIBCO）1袋を滅菌蒸留水に溶解し、10%炭酸水素ナトリウム水溶液（和光純薬）22mL、ピルビン酸ナトリウム（GIBCO）10mLを加え、pH7.4 に調整し、滅菌蒸留水で1Lとする。調製後、濾過滅菌し牛胎児血清（GIBCO）を50mLを加える。

・0.02%EDTA含有PBS（－）

Dulbecco's PBS（－）（和光純薬）1袋及びEDTA・2Na0.1gを蒸留水500mLに溶解し、高圧蒸気滅菌する。

・0.05%EDTA含有PBS（－）

・0.05% Trypsin、0.53mM EDTA・4Na

・ギムザ染色液

ギムザ染色液（GIBCO）3mLをGurr Buffer（GIBCO）48mLに溶解する。

### 2．被験薬剤

防腐剤：塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム

可溶化剤：ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリソルベート80、ステアリン酸ポリオキシル40

溶解補助剤：プロピレングリコール、ポリエチレングリコール400

3．実験方法

1）コロニー形成阻害試験

本試験法は図1に示したとおり、日本薬局方記載プラスチック容器溶出試験法を一部改良した形で行った。初代継代培養中Subconfluentになった V79細胞懸濁液をEDTA含有PBS（－）および血清入り培地で洗浄しDMSOを取り除いた。0.05%トリプシンEDTAによりフラスコ内の細胞を剥離し、細胞を遠沈管に回収し、125 g、5分間の遠心を行った。上清を捨てペレットに培地を加え、よく懸濁した後、血球計算盤で細胞数をカウントした。細胞懸濁液を1mL中、細胞が1000個となるよう培地を加えて調製し、6ウェルマルチプレート、1ウェル中培地1mLを播いたウェルにコロニーが50個生えるよう細胞懸濁液を播種した。37℃、$CO_2$インキュベーター内24時間の培養を行った。この後各試験濃度に設定した試料検体を1mLずつ各ウェルに加え更に37℃、$CO_2$インキュベーター内で4日間の培養を行った。

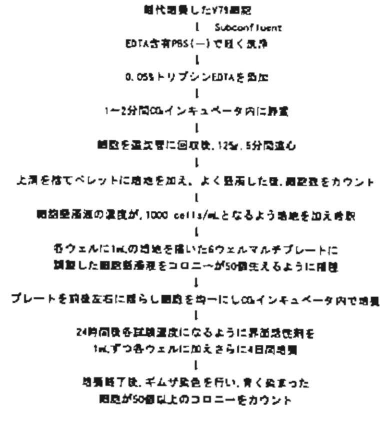



図1　V79細胞を用いたコロニー形成試験法

培養終了後、ギムザ染色を行い青く染まった細胞が50個以上のコロニーをカウントした。

2）試料検体調製

検体は各試験設定濃度になるようMO5培地を用い調製した。

3）評価

試料検体の代わりに培地1mLを加えたウェル中の細胞数をコントロールとし形成率100 %とした。各試料1検体につき各濃度4ウェルのコロニー形成率平均値をそれらより減じたものを細胞増殖抑制率として算出した。

# 結　　果

塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムとも0.0003%～0.001 %の濃度において同程度の細胞増殖抑制作用を示した。塩化ベンゼトニウムは細胞増殖抑制作用は幾分弱いことが確認された（図3）。

可溶化剤における細胞増殖抑制作用を比較すると、0.002 %～0.02%の濃度でポリソルベート80、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ステアリン酸ポリオキシル40の順で作用が弱いことが確認された（図4）。

溶解補助剤であるプロピレングリコール、ポリエチレングリコール400 では両薬剤ともほとんど細胞増殖抑制作用は認められなかったが、ポリエチレングリコール400 で、やや細胞増殖抑制作用が認められた（図5）。

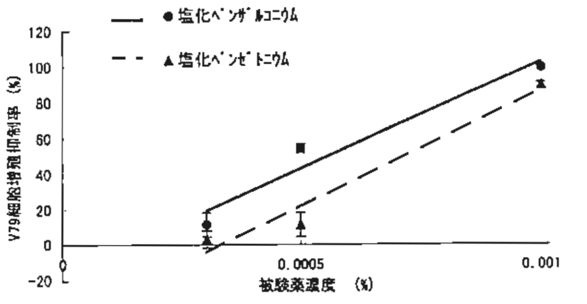



図3　防腐剤の細胞増殖抑制作用　　　mean±S. E. (n=4)

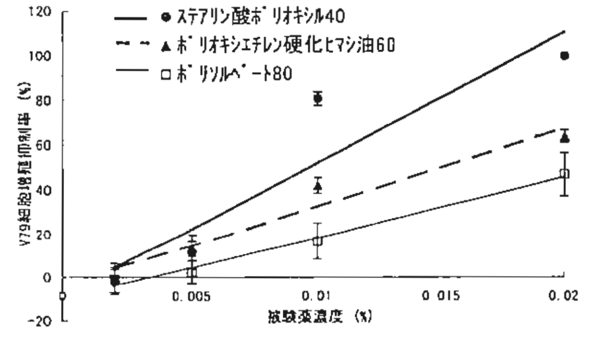



図4　可溶化剤の細胞増殖抑制作用　　　mean±S. E. (n=4)

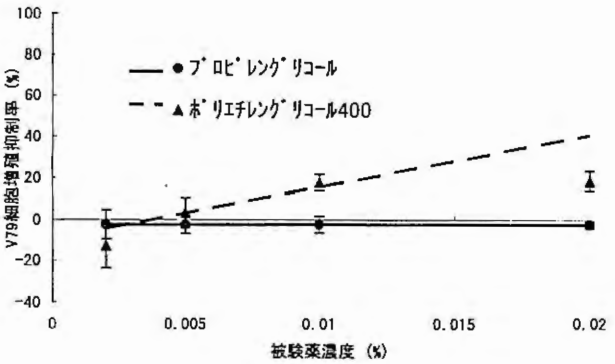



図5　溶解補助剤の細胞増殖抑制作用　　　　mean±S. E. (n=4)

## 考　　察

今回コロニー形成試験に用いたV79細胞は、日本薬局方安全性試験内のプラスチック製容器溶出試験にも用いられている、化学物質に対しきわめて鋭敏に反応する細胞である。今回の実験で行ったコロニー形成阻害試験は一連の実験操作が簡便であり、かつ比較的短期間で各試料の細胞増殖抑制作用を確認することができるという点で優れた試験法であるといえる。試験は、培養後2日目～5日目の対数増殖期にある細胞分裂の最も盛んな時期(図2)の細胞塊を生じない細胞を使用することにより、各被験薬剤の処理により、コロニー観察を通して細胞増殖能の差をはっきり確認することができた。

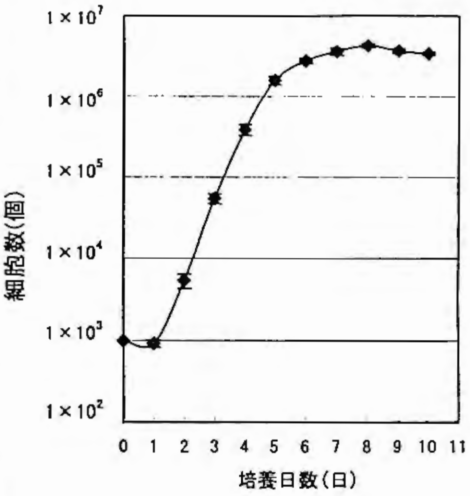



図2　V79細胞の細胞増殖曲線

初日培養細胞数は1000個/ウェルで各値は4ウェルにおける平均値±標準誤差を示す

防腐剤の生体への作用の検討は、培養細胞、組織を用いた系および動物実験等の基礎研究により数多くの報告がなされている[1)-6)]。点眼剤の処方検討においては主薬効成分の安定性あるいは薬剤の保存効力等を第一に考え、必然的に配合剤が決定されることが多いが、配合剤の種類によってはその化学的性質のみでは配合量あるいは薬剤選定に決定的な情報が得られないこともある。このような場合、生体に対する影響を知ることから、より目に優しい点眼剤の開発が可能となると考えられる。今回の実験はこのような生体系に対する情報を得る試験系としてコロニー形成試験が利用可能であるか検討を行い、一つの優れた方法であることが確認できた。今回、低濃度での塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムにおける細胞増殖抑制作用を比較した結果では、両薬剤とも同程度の細胞増殖抑制作用を示したが、細胞増殖能に与える影響は若干、塩化ベンザルコニウムの方が強いと考えられた。また可溶化剤として、３種類の化合物を比較した結果では、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、ポリソルベート80の順で細胞増殖抑制作用は大きいと思われた。

溶解補助剤ではプロピレングリコールとポリエチレングリコール400 を比較し、両者とも細胞増殖抑制作用はほとんど認められなかったが、ポリエチレングリコール400 はやや細胞増殖抑制作用は強いことが示唆された。またこの２剤においては防腐剤、可溶化剤と比較すると許容範囲はやや大きいと考えられた。

今回の実験では培養細胞を用いることにより、眼粘膜一次刺激試験において判定困難な薬剤の細かな影響も鋭敏に検出でき、防腐剤等の細胞に対する影響に関して詳細な知見を得ることができた。今後、当研究所においてこれらの試験法及び結果をもとに、点眼薬の処方検討を行う上でより厳密で正確な情報を得ることができると考えられる。また、in vivo試験において手法的、感度的に十分な結果が得られない配合剤に対し、それらの試験の一部を代替できる系に発展できるよう更なる検討が必要であると思われた。

## 参考文献


1)Mullen,W.,et al.:Ophthalmic preservatives and vehicles.Surv.Ophthalmol,17,469-483(1973).

2)Pfister,R.R and Burstein,N.:The effects of ophthalmic drugs,vehicles,and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study,Invest.Ophthalmol,15,246-259(1976).

3)Burstein,N.L.:Corneal cytotoxicity of topically applied drugs,vehicles and preservatives.Surv.Ophthalmol,25,15-30(1980).

4)Burstein,N.L.:The effects of topical drugs and preservatives on the tears and corneal epithelium in dry eye.Trans.Ophthalmol.Soc.U.K.,104,402-409(1985).

5)Tripathi,B.J.,et al.:Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium.Lens & Eye Toxicity Res,9,361-375(1992).

6)大橋 裕一:点眼薬－常識と非常識－.眼科New Insight,2,36-43(1994).

# 標準品の安定性(第2報)
# ー ペオニフロリン ー

Studies on Stability of Standard in Solvent(II)
ー Paeoniflorin ー

富山県薬事研究会分析部会(標準品の安定性分科会)
Division of Analytical Chemistry
Toyama Pharmaceutical Research Association

| | |
|---|---|
| 小　中　宏　子 | ㈱内山薬品商会 |
| Hiroko KONAKA | Uchiyama Medicine Co.,Ltd. |
| 永　井　喜　美 | ㈱延寿堂 |
| Kimi NAGAI | Enjudo Co.,Ltd. |
| 江野本加壽雄・佐　賀　一　典 | ㈱廣貫堂 |
| Kazuo ENOMOTO・Kazunori SAGA | Kokando Co.,Ltd. |
| 新　田　洋　美 | ㈱廣昌堂 |
| Hiromi NITTA | Koshodo Co.,Ltd. |
| 松　原　　　健 | ㈱富士薬品 |
| Ken MATSUBARA | Fuji Medicine Co.,Ltd. |
| 市井　満美子・広田　奈穂美 | 救急薬品工業㈱ |
| Mamiko ICHII・Naomi HIROTA | Kyukyu Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 春　日　香　織・浜谷　紀代美 | 共栄製薬㈱ |
| Kaori KASUGA・Kiyomi HAMATANI | Kyoei Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 石　田　貴　日・関　野　明　子 | 第一薬品㈱ |
| Takahi ISHIDA・Akiko SEKINO | Daiichi Medicine Co.,Ltd. |
| 福　井　　　雅・西　村　京　子 | 第一薬品工業㈱ |
| Miyabi FUKUI・Kyoko NISHIMURA | Daiichi Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 松　平　　　薫 | 大協薬品工業㈱ |
| Kaoru MATSUHIRA | Taikyo Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 佐々木　千恵 | 大光薬品㈱ |
| Chie SASAKI | Taikou Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 松　原　華　子 | 大和製薬㈱ |
| Hanako MATSUBARA | Taiwa Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 石　井　雅　恵 | 鶴居薬品工業㈱ |
| Masae ISHII | Tsurui Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 長谷川　陽子 | 東亜薬品㈱ |
| Youko HASEGAWA | Toa Medical Co.,Ltd. |
| 麦　島　紀　長 | むぎしま漢方医薬品工業 |
| Toshinaga MUGISHIMA | Mugishima Herbal Medicine Co.,Ltd. |
| 横　田　洋　一 | 富山県薬事研究所 |
| Yoichi YOKOTA | Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research. |

## 緒　　言

ペオニフロリンは、漢方薬又は漢方製剤（代表的なものとして葛根湯があげられる）に広く使用されているシャクヤク *Paeonia lactiflora* Pallasの主成分で、それらの品質評価の指標成分となっている。また日本薬局方第13改正（以下13局と示す）においては成分含量測定用として記載されており、近年グリチルリチン酸、塩化ベルベリンと共に日局標準品として取り扱われるにあたり重要性が高まってきているが、ペオニフロリンは溶液状態では不安定であるという報告[1]がある。

本分科会では、生薬成分の定量に使用する標準品が特に高価なものが多い現状から、その有効利用のため溶液保存の安定性についての検討を実施し、これまでに第1報としてグリチルリチン酸の安定性の報告[2]を行った。今回その第2報として、ペオニフロリンについて安定性の検討を行ったので報告する。

## 実　　験

### 1．移動相の検討（予試験－1）

安定性試験を実施するにあたり、ペオニフロリンのメインピークと分解産物ピークとの分離状態をみるために、3つの移動相[3]を検討した。以下に用いた試料及び操作条件について記す。

1）試料の調製及び保存条件

溶　　媒：薄めたメタノール（1→2）
試料濃度：0.1mg/mL
標 準 品：生薬試験用ペオニフロリン標準品（和光純薬工業㈱製）
保存形態：無色のアンプル管に充填・密封し、アルミホイルにて遮光した。
保存温度：60℃
保存期間：２週間

2）操作条件　次に示すもののほかは13局「シャクヤク」の成分含量測定法を準用した。

カ ラ ム：STR-ODSⅡ（$\phi$4.6 mm×15.0cm）
移 動 相：①水/アセトニトリル混液（4：1）－日局法－
　　　　　②薄めたリン酸（1→1000）/メタノール混液（2：1）
　　　　　③リン酸塩緩衝液（pH7.4）/メタノール混液（3：1）
カラム温度：40℃付近の一定温度

### 2．カラムの選定（予試験－2）

カラムによる差を把握するために、6種類のODSカラム（Table 1）について検討を行った。

1）試料の保存条件

保存温度：25℃
保存期間：12週間

| ODSカラム | メーカー | 内径(mm)×長さ(cm) |
|---|---|---|
| Cosmosil 5C18 ARII | ナカライテスク(株) | 4.6 × 15.0 |
| Shim-pack CLC-ODS | 島津製作所(株) | 6.0 × 15.0 |
| Chemcosorb 5-ODS-H | ケムコ(株) | 4.6 × 15.0 |
| STR-ODS II | 島津製作所(株) | 4.6 × 15.0 |
| L-Column ODS | (財)化学品検査協会 | 4.6 × 15.0 |
| CAPCELL-PAK C18 SG120 | (株)資生堂 | 4.6 × 15.0 |

Table 1　カラムの種類

| | 0W | 1W | 2W | 3W | 4W | 6W | 8W | 12W |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| −80℃ | ○● | | | | | | | |
| −15℃ | | | | | | ○ | | ○ ● |
| 5℃ | | | | | ○ | ○ ● | ○ | ○ ● |
| 25℃ | | ○ | | | ○ ● | ○ ● | ● | ○ ● |
| 60℃ | | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | ● |

○・・・薄めたメタノール　●・・・アセトニトリル　(n=2)

Table 2　安定性試験の計画表

2）操作条件

移　動　相：リン酸塩緩衝液（pH7.4）/メタノール混液（3：1）

その他の項目については、予試験－1と同様に行った。

### 3．安定性試験

13局記載の薄めたメタノール（1→2）で実際に何週間、高純度を維持できるかを調べる安定性試験を行った。また非アルコール溶媒としてアセトニトリル溶液についても同様に実施した。

それぞれの検体は保存期間終了後－80℃にて保管し、全保存期間終了後、－80℃保管品と同時に分析・比較することで安定性試験の評価を行った。なお、安定性は成分含量測定用ペオニフロリンの規格に準じ、面積百分率（%）で評価した。

1）試料溶液の調製及び保存条件

試 料 濃 度：薄めたメタノール（1→2）溶液　0.1mg/mL

アセトニトリル溶液　1.0mg/mL

アセトニトリルは分析直前に薄めたメタノール（1→2）で10倍希釈した。

保 存 温 度：－80℃、－15℃、5℃、25℃、60℃

保 存 期 間：0～12週間（Table 2）

2）操作条件

カ　ラ　ム：STR－ODS II（φ4.6 mm×15.0cm）

CAPCELL－PAK C18 SG120（φ4.6mm×15.0cm）

Chemcosorb 5－ODS－H（φ4.6mm×15.0cm）

移　動　相：リン酸塩緩衝液（pH7.4）/メタノール混液（3：1）

その他の項目については、予試験－1と同様に行った。

## 結果及び考察

### 1．移動相の検討（予試験－1）

各移動相におけるクロマトグラムをFig.1に示す。

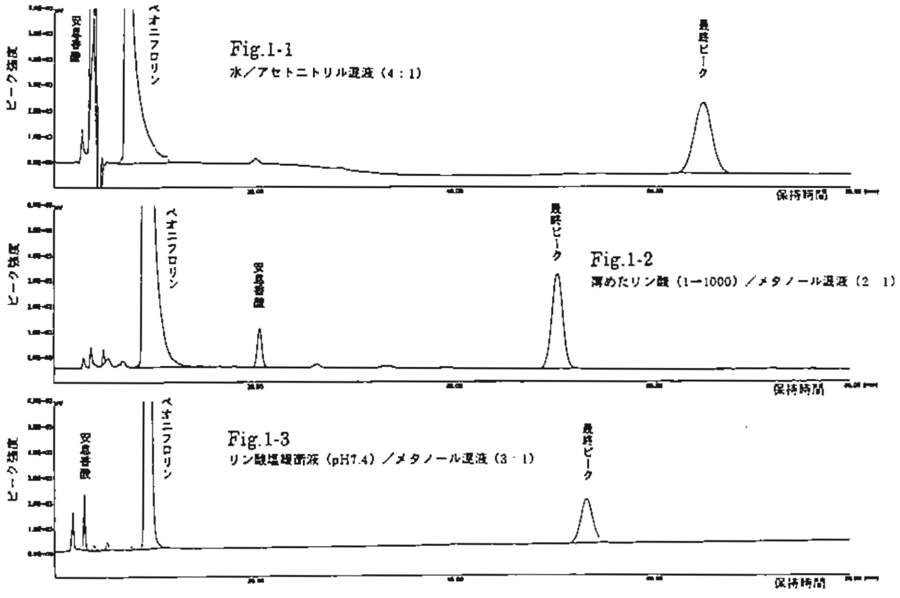



Fig.1　各移動相におけるクロマトグラム

水/アセトニトリル混液(4：1)の移動相では、溶媒ピークと分解物と思われる安息香酸ピークが重なり、ペオニフロリンピークも大きくテーリングしている。(Fig.1－1)

薄めたリン酸(1→1000)/メタノール混液(2：1)の移動相では、リン酸のイオン抑制により、安息香酸ピークはペオニフロリンピークの後方に分離したが、ペオニフロリンピークのテーリングを押さえることはできなかった。(Fig.1－2)

リン酸塩緩衝液(pH7.4)/メタノール混液(3：1)の移動相では、ペオニフロリンのピーク形状は良好で、溶媒ピークと安息香酸ピークの分離も良好で、問題ないと考えられる。(Fig.1－3)

以上のことから、ペオニフロリンの安定性の評価における移動相は、リン酸塩緩衝液(pH7.4)/メタノール混液(3：1)とした。

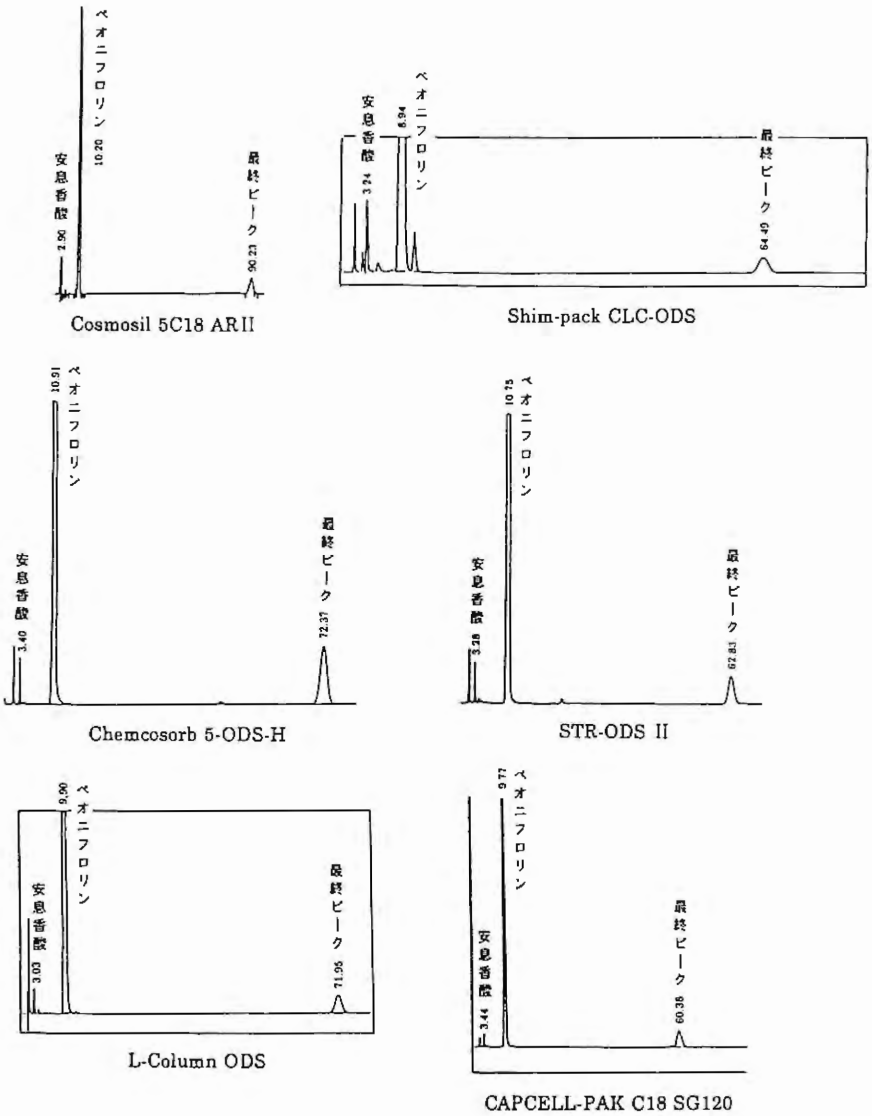



Fig.2　各カラムのクロマトグラム

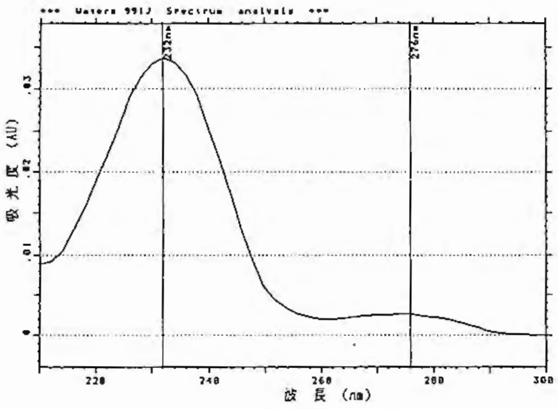
2. カラムの選定(予試験－2)

6種類のODSカラムによるクロマトグラムをFig.2に示す。

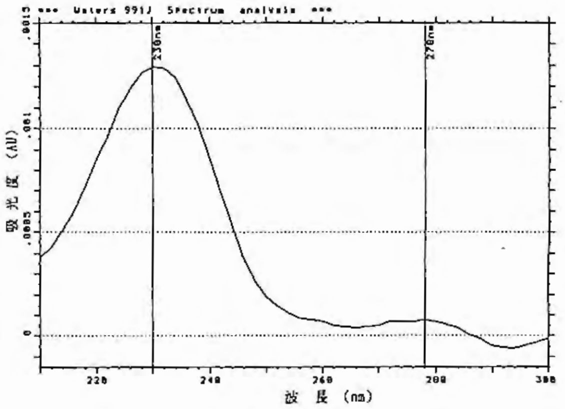
カラムによっては溶媒ピークと安息香酸ピークの分離が不十分なものも見られた。また、移動相のpHが7.4 と高いためODSカラムには苛酷な条件となり、劣化の傾向がみられたものもあった。

そこで安定性試験には、カプセルパック等のエンドキャッピングがほぼ完全に施されたものを選択することにした。

ここで、保存試料のクロマトグラムで見られた最終ピークについて、三次元スペクトルを測定したところ、ペオニフロリンと類似したスペクトルが得られた。(Fig.3)



ペオニフロリン



最終ピーク

Fig.3 三次元スペクトル

ペオニフロリンの吸収は主として安息香酸のベンゼン環によるものと考えられることから、ペオニフロリンの分解産物である最終ピークもベンゼン環を持つものと推定される。柴田らもペオニフロリン誘導体の酸加水分解物であるアグリコンについてベンゼン環の存在を報告している。[4)]

したがって、安定性試験では、加水分解による経時変化を防ぐため、溶媒として非アルコール系のアセトニトリルについても検討することにした。

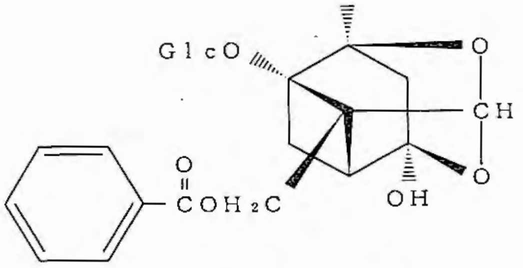



Fig.4 ペオニフロリンの構造式

3. 安定性試験

1)薄めたメタノール(1→2)溶液の安定性試験

CAPCELL－PAK C18 SG120 を用いた、ペオニフロリン、安息香酸及び最終ピークの経時変化をTable 3及びFig.5～8に示す。

保存温度は、－15℃を冷凍庫、5℃を冷蔵庫、25℃を室温、60℃を苛酷条件と想定して設定した。

ペオニフロリンの面積百分率は直線的に低下し、5℃以下の保存では12週間99.0%を保持できるが、25℃保存では約2週間で99.0%以下の値を示した。(Fig.5) なお、－80℃保管品の値を100.0 %とした定量値でも、ほぼ同様の回帰直線が得られることから、面積百分率による安定性の評価の妥当性が示された。

また、分解物である安息香酸と最終ピークの増加はペオニフロリンの減少と相関性があり、分解反応は温度により促進されることが確認できた。(Fig.6、7)更に、60℃における経時変化から、ペオニフロリンは安息香酸や最終ピークを示す物質等に変化すると推定される。(Fig.8)

STR−ODSⅡにおいても同様の結果が得られた。

しかし、Chemcosorb 5−ODS−Hにおいて99.0%以上を保持できたのは、−15℃保存では12週間、5℃保存では8週間、25℃保存では1週間と、カラムによる差が若干見られた。

| 保存期間 (Week) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ペオニフロリン | −15℃ | 99.77 | | | | | 99.68 | | 99.65 |
| | 5℃ | 99.77 | | | | 99.43 | 99.47 | 99.60 | 99.42 |
| | 25℃ | 99 77 | 99.39 | | | 98.36 | 97.20 | | 94.54 |
| | 60℃ | 99.77 | 68.23 | 11.49 | 18.65 | 2.24 | 5.70 | | |
| 安息香酸 | −15℃ | 0.02 | | | | | 0.05 | | 0.02 |
| | 5℃ | 0.02 | | | | 0.03 | 0.12 | 0.03 | 0.04 |
| | 25℃ | 0.02 | 0.12 | | | 0.16 | 0.35 | | 0.52 |
| | 60℃ | 0.02 | 9.68 | 25.99 | 23.88 | 27.04 | 27.14 | | |
| 最終ピーク | −15℃ | 0.10 | | | | | 0.10 | | 0.20 |
| | 5℃ | 0.10 | | | | 0.44 | 0.28 | 0.27 | 0.45 |
| | 25℃ | 0 10 | 0.36 | | | 1.37 | 2.22 | | 4.69 |
| | 60℃ | 0 10 | 16.71 | 47.12 | 42.43 | 50.54 | 49.60 | | |

(n=2)

Table 3　薄めたメタノール（1→2）溶液の安定性

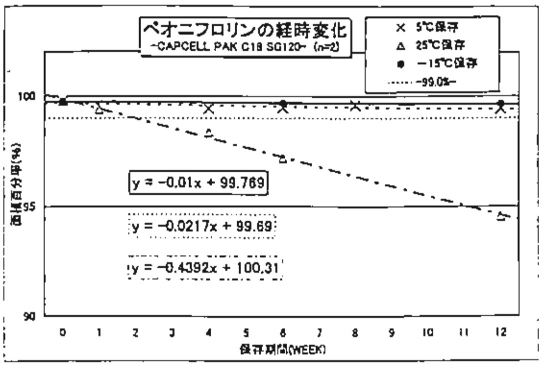



Fig.5　ペオニフロリンの経時変化

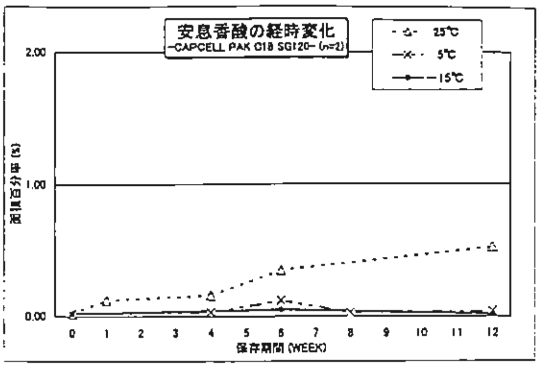



Fig.6　安息香酸の経時変化

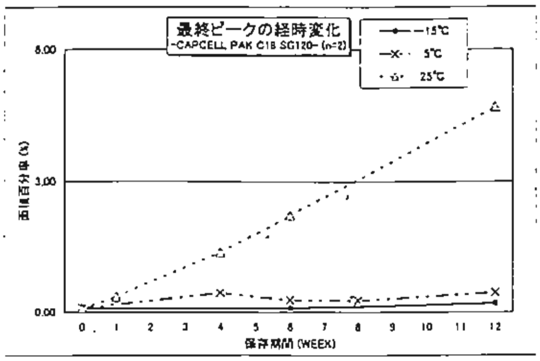



Fig.7　最終ピークの経時変化

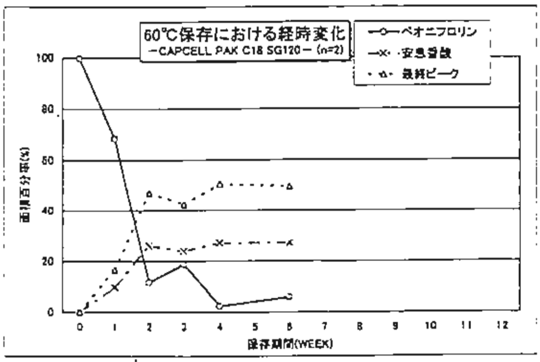



Fig.8　60℃保存における
ペオニフロリン及び分解産物の経時変化

2）アセトニトリル溶液の安定性試験

CAPCELL－PAK C18 SG120 を用いた、ペオニフロリンのアセトニトリル溶液中での経時変化をTable 4 に示す。

非常に良好な安定性が得られ、60℃の苛酷条件においても、12週間99.5%以上の高純度を保持できた。このことからも、薄めたメタノール（1→2）溶液中におけるペオニフロリンの分解は、加水分解反応によるものであると確認できた。

なお、他のカラムについても同様の結果が得られた。

| 保存期間（Week） | 0 | 4 | 6 | 8 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|
| －15℃ | 99.75 | | | | 99.93 |
| 5℃ | 99.75 | | 99.69 | | 99.79 |
| 25℃ | 99.75 | 99.79 | 99.84 | 99.79 | 99.88 |
| 60℃ | 99.75 | | | | 99.72 |

（n=2）

Table 4　ペオニフロリンのアセトニトリル溶液の安定性

## ま　と　め

1．日局記載の試験法（「シャクヤク」の成分含量測定法）の移動相（水/アセトニトリル混液（4：1））では、標準品の安定性の評価を行うことは困難であった。しかし移動相にリン酸塩緩衝液（pH7.4）/メタノール混液（3：1）を用いることで、ペオニフロリンのピーク形状や分解物との分離状態が良くなり、安定性の評価を行うことが可能となった。
2．移動相がリン酸塩緩衝液（pH7.4）/メタノール混液（3：1）である場合は、通常のODS系のカラムには苛酷な条件となるため、エンドキャッピングがほぼ完全であるカラムを選択する必要性がある。
3．ペオニフロリンの薄めたメタノール（1→2）溶液による保存では、5℃以下で約8～12週間は99.0%以上の純度を保持できたが、25℃の保存では加水分解が進み、1、2週間しか99.0%の純度を保持できなかった。
4．非アルコール系のアセトニトリルでの保存は加水分解が起きないことから、温度条件にも左右されず、溶液保存には非常に有効と思われる。

## 参 考 文 献

1）日本薬局方技術情報,685（1998）
2）小中宏子ら,標準品の安定性（第1報）－グリチルリチン酸－,家庭薬研究,16,21-27（1997）
3）原田正敏編,繁用生薬の成分定量,廣川書店,208-216（1989）
4）S.Shibata and M.Nakahara,Studies on the Constituents of Japanese and Chinese Crude Drugs.Ⅷ.Paeoniflorin, A Glucoside of Chinese Paeony Root.(1).,Chem.Pharm.Bull,11,372-378（1963）

# コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価(第2報)

Evaluation of Sodium Chondroitin Sulfate (Part 2)

富山県薬事研究会分析部会(コンドロイチン硫酸ナトリウム分科会)
Division of Analytical Chemistry, Toyama Pharmaceutical Research Association

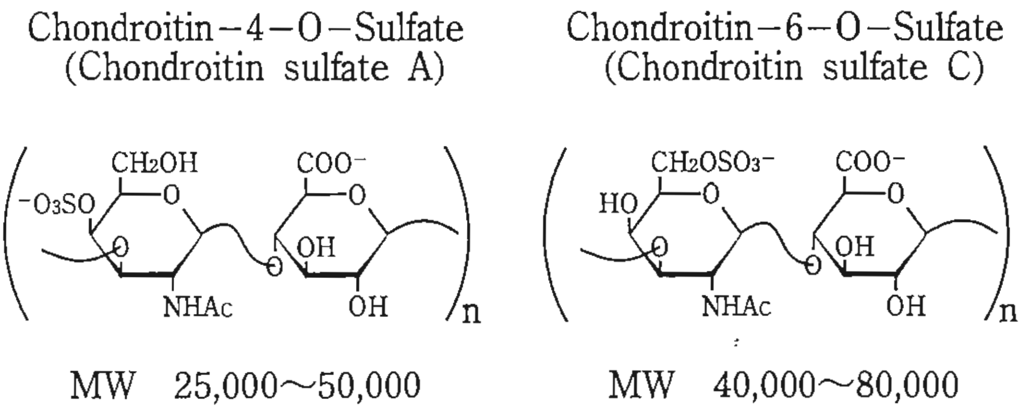
| | |
|---|---|
| 春　日　香　織 | 共栄製薬株式会社 |
| Kaori KASUGA | Kyoei Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 瀧　本　辰　也 | ダイト株式会社 |
| Tatsuya TAKIMOTO | Daito Co.,Ltd. |
| 武　田　　誠 | テイカ製薬株式会社 |
| Makoto TAKEDA | Teika Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 立　田　美　佐 | 東亜薬品株式会社 |
| Misa TATEDA | Toa Medicine Co.,Ltd. |
| 安　部　佳　子 | |
| Yoshiko ABE | |
| 佐々木　千恵 | 大光製薬株式会社 |
| Chie SASAKI | Taikou Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 大　懸　史　子 | 日本医薬品工業株式会社 |
| Humiko OOGAKE | Nichiiko Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 戸　井　志　美 | ジャパンメディック株式会社 |
| Motomi TOI | Japan Medic Co.,Ltd. |
| 佐　賀　一　典 | 株式会社廣貫堂 |
| Kazunori SAGA | Kokando Co.,Ltd. |
| 加　藤　直　子 | 第一薬品工業株式会社 |
| Naoko KATO | Daiichi Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 青木　真知子 | 明治製薬株式会社 |
| Machiko AOKI | Meiji Pharmaceutical Co.,Ltd. |
| 横　田　洋　一 | 富山県薬事研究所 |
| Yoichi YOKOTA | Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research. |


## 緒　　言

コンドロイチン硫酸は、生体内では軟骨組織中に多く分布している酸性ムコ多糖類の一種であり、N−アセチルガラクトサミンとウロン酸の2糖の繰り返し構造をとり、硫酸基の結合位置により異性体A及びCを区別し、平均分子量に差があることが知られている(Fig.1)。コンドロイチン硫酸のナトリウム塩は、医薬品分野において、液剤、錠剤、注射剤及び点眼剤等に配合されており、その品質評価法としては、従来よりカルバゾール・硫酸法が一般的である。しかし、その操作は煩雑であり、分解物であるD−グルクロン酸の含量を測定する間接的評価法であることから、コンドロイチン硫酸を分解せずに直接評価する方法が望まれた。

我々はこれまでに種々の市販コンドロイチン硫酸ナトリウムについて、カルバゾール・硫酸法を用いることにより市販品のグレードによってD−グルクロン酸含量に差があることを見いだし、更にゲルろ過カラムによるHPLCパターンの解析及びIRスペクトルの解析により、市販品には異性体A又はCが混在していることを見いだしている[1)]。

# Fig.1 コンドロイチン硫酸A及びCの構造式




そして今回我々は、コンドロイチン硫酸のような酸性ムコ多糖類が硫酸銅溶液中で銅(II)錯体を生成し、波長240 nm付近に吸収の極大を生じるという文献[2)]を参考として、市販コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価を実施し、若干の知見を得たので以下に報告する。

## 実　　　験

市販コンドロイチン硫酸ナトリウム及びコンドロイチン硫酸A又はCナトリウム塩の標準品について、3項目の試験を実施した。

### 1．試　料

市販品：X社製及びY社製、内服用及び注射用原料

標準品A及びC：コンドロイチン硫酸A及びCナトリウム塩(生化学工業株式会社製、Super Special Grade)

### 2．測定機器

各社の有する分光光度計

日立製作所 U－2000型、U－3210型、220 A型、223 型

島津製作所 UV－160 A型、UV－1600型、UV－2400型、UV－240 型、260 型

### 3．試験方法

1)吸収スペクトル及び比吸光度の比較

コンドロイチン硫酸ナトリウムを水又は1 mmol/L硫酸銅溶液に溶かした試料溶液につき、水又は1mmol/L硫酸銅溶液を対照とし、波長200～350 nmの吸収スペクトル及び吸収の極大波長における吸光度を測定し、比吸光度($E^{1\%}_{1cm}$)を算出した。

ただし、試料溶液中のコンドロイチン硫酸ナトリウムの濃度は、脱水物に換算して算出した。

(1) 1 mmol/L硫酸銅溶液の調製

硫酸銅(II)五水和物12.5gを水に溶かし、100 mLとした液(0.5 mol/L)2mLを正確に量り、水を加えて正確に1000mLとした。

(2)試料溶液の調製

・コンドロイチン硫酸ナトリウム約0.05gを精密に量り、水に溶かし、正確に50mLとした。

・コンドロイチン硫酸ナトリウム約0.1gを精密に量り、1mmol/L硫酸銅溶液に溶かし、正確に200mLとした。

2）1mmol/L硫酸銅溶液のpH設定

コンドロイチン硫酸ナトリウムをpH調整した1mmol/L硫酸銅溶液に溶かした試料溶液につき、pH調整した1mmol/L硫酸銅溶液を対照とし、各pHでの吸収の極大波長における吸光度を測定し、比吸光度を算出した（n＝1）。

（1）pH調整した1mmol/L硫酸銅溶液の調製

硫酸銅（II）五水和物12.5gを水に溶かし、100mLとした液20mLを正確に量り、水を加えて正確に100mLとした。この液1mLを正確に量り、0.002 mol/L水酸化ナトリウム溶液又は0.001 mol/L硫酸溶液を適宜加え、更に水を加えて正確に100mLとした（pH4.04～5.72）。

（2）試料溶液の調製

コンドロイチン硫酸ナトリウム約0.025gを精密に量り、pH調整した1mmol/L硫酸銅溶液に溶かし、正確に50mLとした。

3）市販コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価及び回帰直線の作成

X社及びY社製の内服用及び注射用原料各3ロット並びに生化学工業株式会社製の標準品A及びCナトリウム塩について、それぞれ約0.025gずつを精密に量り、1mmol/L硫酸銅溶液に溶かし、正確に50mLとした試料溶液につき、1mmol/L硫酸銅溶液を対照とし、波長238nmにおける吸光度を測定し、比吸光度を算出した。

また、コンドロイチン硫酸ナトリウム約0.1gを精密に量り、1mmol/L硫酸銅溶液に溶かし、正確に100mLとした。この液5、7.5、10、12.5及び15mLずつを正確に量り、1mmol/L硫酸銅溶液を加えて正確に20mLとし、試料溶液(a)～(e)とした。これらの液につき、1mmol/L硫酸銅溶液を対照とし、波長238nmにおける吸光度を測定し、回帰直線を作成した。

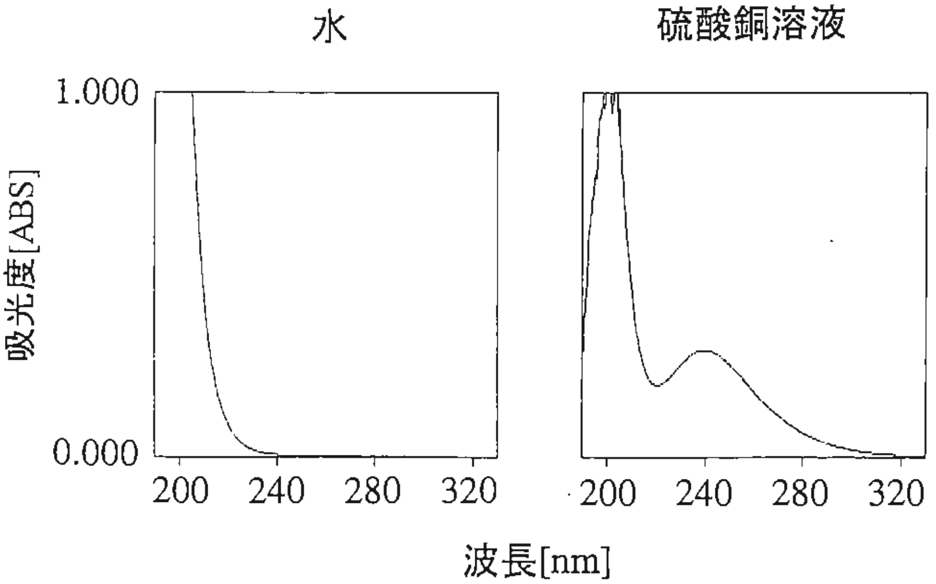
## 試験結果

1．吸収スペクトル及び比吸光度の比較

試験結果をFig.2及びTable 1に示した。

コンドロイチン硫酸ナトリウムを水に溶かした場合は、波長210nm付近に吸収の極大が存在するだけであるが、1mmol/L硫酸銅溶液に溶かすことにより、波長240nm付近に新たな吸収の極大が生じることを確認した。

Fig.2 吸収スペクトルの比較



また、水に溶かした場合、比吸光度の値は平均27.71 、相対標準偏差32.05%であり、更に吸収の極大波長にもバラツキを認め、試験者及び測定機器による影響を受けやすい傾向を認めた。

一方、1mmol/L硫酸銅溶液に溶かした場合には、平均11.32、相対標準偏差3.27%で、吸収の極大波長は238nm付近に安定しており、バラツキが小さく試験者及び測定機器による影響を受けにくいと判断した。

## Table 1 比吸光度の比較

| 試験者 | 水 | | | 硫酸銅溶液 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 波長[nm] | 吸光度 | 比吸光度 | 波長[nm] | 吸光度 | 比吸光度 |
| A | 208.0 | 1.5722 | 17.89 | 237.8 | 0.4892 | 11.02 |
| B | 208.0 | 1.509 | 17.17 | 238.0 | 0.483 | 10.88 |
| C | 206.0 | 2.504 | 28.52 | 238.8 | 0.507 | 11.42 |
| D | 205.1 | 1.941 | 22.08 | 238.0 | 0.483 | 10.88 |
| E | 193.9 | 2.8982 | 32.98 | 237.8 | 0.512 | 11.54 |
| F | 204.1 | 3.3113 | 37.68 | 237.4 | 0.507 | 11.41 |
| G | 207.0 | 2.148 | 24.44 | 238.0 | 0.510 | 11.49 |
| H | 207.0 | 3.605 | 40.92 | 237.8 | 0.530 | 11.94 |
| 平 均 | | | 27.71 | | | 11.32 |
| C.V. | | | 32.05 % | | | 3.27 % |

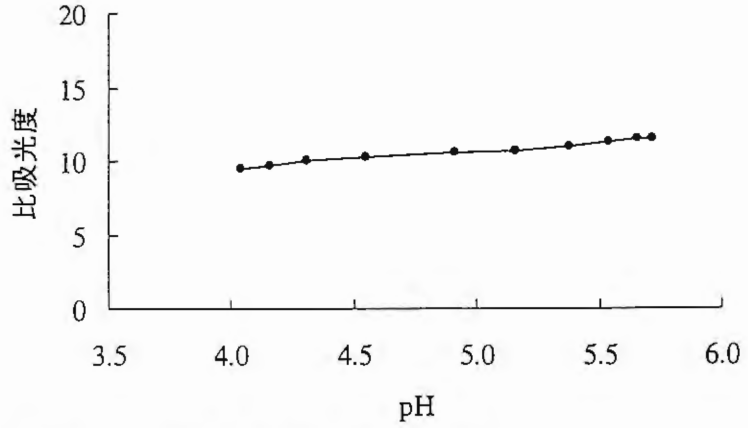
### 2．1mmol/L硫酸銅溶液のpH設定

試験結果をFig.3に示した。

1mmol/L硫酸銅溶液のpHは、約5.3 である。この1mmol/L硫酸銅溶液のpHを種々変えて比吸光度を求めたが、Fig.3に示すように、pH依存性は認められなかった。

そこで、pHの調整は実施しないこととした。

## Fig.3 硫酸銅溶液のpHと比吸光度




### 3．市販コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価及び回帰直線の作成

試験結果をTable 2に示した。

得られた比吸光度の値について、2群の平均値の比較をt検定を用いて実施したところ、X社の内服用と注射用及びX社とY社の内服用の間に統計学的な有意差を認めたが、Y社の内服用と注射用及びX社とY社の注射用の間に統計学的な有意差は認められなかった。また、コンドロイチン硫酸の異性体A(4試料)とC(10試料)の間にも統計学的な有意差は認められなかった。

同一メーカーのグレード(内服用あるいは注射用)内におけるロット間のバラツキは、D－グルクロン酸含量のバラツキと比較して小さい傾向を認めた。

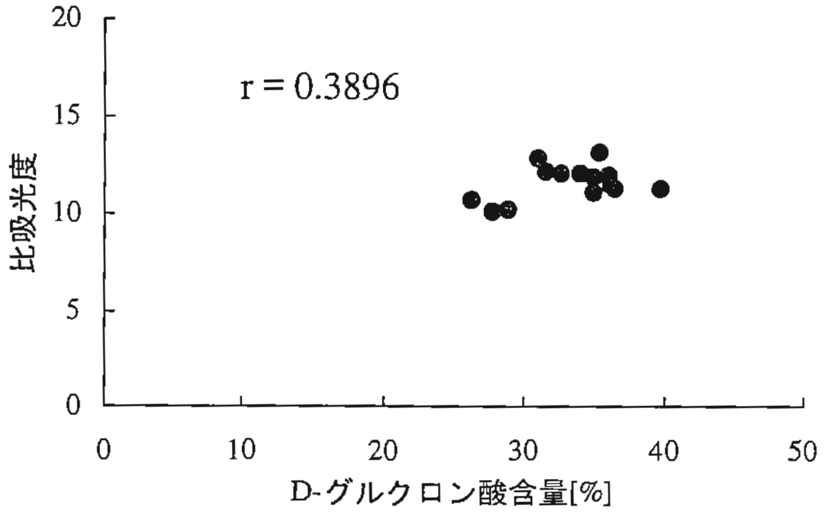
## Table 2 市販コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価

| 試料 | | 異性体 A/C | D-グルクロン酸含量[%] | n | 比吸光度 | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| X社 | 内服用原料-1 | C | 27.81 | 3 | 10.13 | 1.95 |
| | -2 | C | 26.23 | 3 | 10.70 | 0.35 |
| | -3 | C | 28.82 | 3 | 10.22 | 0.22 |
| | 注射用原料-1 | C | 39.81 | 3 | 11.25 | 0.48 |
| | -2 | C | 36.16 | 3 | 11.95 | 0.50 |
| | -3 | C | 34.99 | 3 | 11.90 | 0.47 |
| Y社 | 内服用原料-1 | C | 31.61 | 3 | 12.15 | 0.80 |
| | -2 | C | 32.73 | 10 | 12.09 | 0.63 |
| | -3 | C | 31.09 | 3 | 12.88 | 0.41 |
| | 注射用原料-1 | A | 35.49 | 3 | 13.17 | 0.14 |
| | -2 | A | 36.56 | 10 | 11.29 | 0.47 |
| | -3 | A | 34.09 | 3 | 12.04 | 0.13 |
| 生化学工業(株) | 標準品-A | A | 35.01 | 10 | 11.07 | 0.26 |
| | 標準品-C | C | 36.18 | 10 | 11.47 | 0.36 |

更にこのTable 2の試験結果を引用し、D－グルクロン酸含量と比吸光度の値の散布図(Fig.4)を作成し、両者の相関係数を求めたところ、0.3896であり、両者の間に相関関係は認められなかった。

ここで、D－グルクロン酸含量の相対標準偏差が11.4%であるのに対し、比吸光度の値の相対標準偏差は7.7%であることから、比吸光度の値はD－グルクロン酸含量と比較してそれほど大きくばらつかず、定量法への応用の可能性が示唆された。

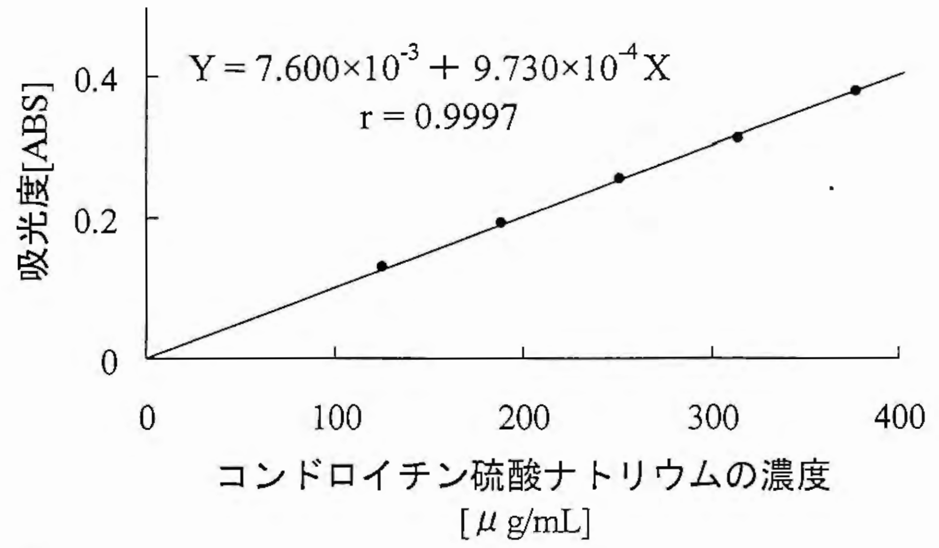
## Fig.4 D-グルクロン酸含量と比吸光度




そこで、回帰直線を作成したところ(Fig.5)、相関係数0.9997で、ほぼ原点を通る良好な直線性が得られた。

従って、単純な構成の製剤では、本法によるコンドロイチン硫酸ナトリウムの定量も可能であると考えられた。

Fig.5 回帰直線の作成




## 結　　語

・コンドロイチン硫酸ナトリウムを硫酸銅溶液に溶かした場合、銅錯体を生成して新たな吸収の極大を生じ、その波長は238nm付近に安定しており、比吸光度の値はバラツキが小さかった。

・市販コンドロイチン硫酸ナトリウムの比吸光度の値は、メーカー及びグレードにより一部で統計学的な有意差を認めたが、異性体AとCでは統計学的な有意差は認められなかった。また、同一メーカーのグレード内におけるロット間のバラツキが小さい傾向を認めた。

・各種市販品及び標準品の比吸光度の値は、D−グルクロン酸含量と比較してそれほど大きくばらつかず、定量法への応用の可能性が示唆された。

## 文　　献


1）富山県薬事研究会分析部会,コンドロイチン硫酸ナトリウムの品質評価,家庭薬研究,17,22-26（1998）

2）Toshihiko Toida and Robert J.Linhardt,Detection of glycosaminoglycans as a copper（II）complex in capillary electrophoresis,*Electrophoresis*,17,341-346（1996）