

高速液体クロマトグラフィーによるビタミン 剤中のニコチン酸トコフェロールの定量

山口県衛生公害研究センター (所長: 田中一成)

藤原 美智子・歳 弘 克 史・珠 山 光 顕

Determination of Tocopherol Nicotinate in Vitamin Capsules by High Performance Liquid Chromatography

Michiko FUJIWARA, Katsushi TOSHIHIRO

Mitsuaki TAMAYAMA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Kazushige TANAKA)

はじめに

末梢循環障害用薬として用いられているニコチン酸トコフェロール (TCN) はトコフェロール (TOC) とニコチン酸 (NiA) の誘導体であり, TOCとNiAの生理作用をそれぞれ併せもつ有用な医薬品である. しかし, 光と温度 (融点約38°C) に不安定であるため, その保存には十分な注意が必要である.

このTCNは日本薬局方外医薬品成分規格1986 (局外規) に収載され, その定量法として, 鉄- $\alpha\alpha'$ ジピリジルによる比色法¹⁾が採用されている. しかし, この方法ではTCNとTOCを分離定量することはできない.

近年, 医薬品の成分別定量が重要視され, その分析機器として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が利用され, その報告も多い^{2, 3)}. そこで, TCN定量においてTOCとNiAの分別定量がHPLCで可能かどうか検討した. 同時に, 市販のTCN製剤 (カプセル剤) について, 局外規法とHPLC法で測定した定量値を比較検討したので報告する.

実験方法

1 試料

市販のTCN製剤を分析試料に供した.

2 試薬

定量用TCNは和光純薬工業㈱製の生化学用を, メタノールは和光純薬工業㈱製のHPLC用を, その他の試薬は試薬特級品をそれぞれ用いた.

3 装置

超音波洗浄器: Yamato BRANSONIC-220

高速液体クロマトグラフ: 島津 LC-5A

4 HPLC測定条件

カラム: Merck社 Lichrosorb RP-18 (4.0mm i.d. × 250mm)

移動相: メタノール・水混液 (98:2)

流速: 1.0ml/min.

測定波長: UV283nm

カラム温度: 室温

注入量: 10 μ l

5 定量方法

試料20個をとり, その内容物を取り出し精秤した後, 粉末とする. TCNとして約50mgに相当する粉末を100ml容メスフラスコに精秤し, エタノール約50mlを加え, 時々振り混ぜながら, 15分間超音波処理した後, 内標準溶液 [フタル酸ジオクチルのエタノール溶液 (1→100)] 4mlを加える.

更にエタノールを加えて100mlとした後, 0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過し, そのろ液

を試験溶液とする。別に定量用TCN約50mgを精秤し、エタノール50mlに溶かし、内標準溶液4mlを加え、更にエタノールを加えて100mlとし、標準溶液とする。以下常法どおり、試験溶液および標準溶液を用い、内標準法でHPLC分析を行う。

結果および考察

1 HPLC測定条件の検討

(1) 移動相

現在、TOCおよびその誘導体である酢酸トコフェロール(TCA)などのHPLCによる分別定量では、カラムとして逆相分配カラムが用いられ良好な結果を得ている⁽⁴⁻⁷⁾。そこで、高分離能を有するとされているODS系カラムを用い、

移動相について検討を加えた。移動相として含水メタノールを用いたが、移動相中の水分量が分離能と保持時間にどう影響するかを調べたのがFig. 1である。この図から、水分量が多くなると分離は良くなるが保持時間が長くなるという欠点がある。そこで、短時間に分別定量できる点を考慮した。その結果、分離もほぼ満足でき、保持時間も短い2%水分濃度のものを用いることにした。

(2) 測定波長

次に測定波長について検討した。各測定対象成分のエタノール溶液のUVスペクトルをFig. 2に示す。この図から、各成分ともそれぞれ極大吸収波長をもつことがわかる。例えば、TCNでは264nm、TOCで292nm、NiAで262nmなどで

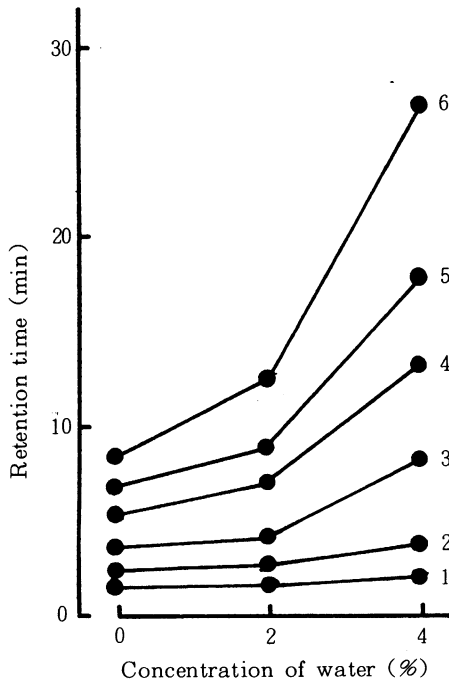


Fig. 1. Effect of concentration of water on retention time of standard solution.
1, nicotinic acid; 2, nicotinamide;
3, dioctyl phthalate (internal standard)
4, tocopherol; 5, tocopherol acetate;
6, tocopherol nicotinate.

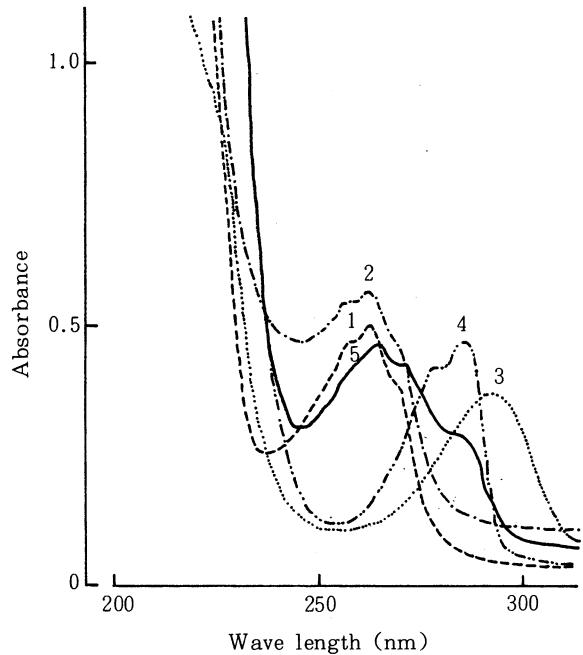


Fig. 2. Absorption spectra of standard solution.
1, nicotinic acid (0.02mg/ml, ethanol);
2, nicotinamide (0.02mg/ml, ethanol);
3, tocopherol (0.05mg/ml, ethanol);
4, tocopherol acetate (0.1mg/ml, ethanol);
5, tocopherol nicotinate (0.05mg/ml, ethanol).

ある. そこで, 各成分に十分な感度を示す波長としてTCNの吸収の肩にあたる283nmを測定波長とした. この測定波長283nmの時のHPLCにおけるクロマトグラムをFig.3に示す. Fig.3の

左図からわかるように, 短時間(15分間)のうち各成分とも鋭敏なピークが出現する. なお, Fig.3の右図には, 市販のTCN製剤の分析例を示した. 市販TCN製剤からはTCNしか検出されず, そのピークは鮮明で, しかも妨害ピークも見られないことがわかった.

2 検量線の作成

TCN標準溶液を用い, 定量方法どおり操作し検量線を作成したところ, Fig.4に示すように, 0.05~1.0mg/mlの範囲で, ピーク高比(y)とTCN濃度(x)との間に原点を通る良好な直線 $y = 1.99x - 0.013$, $r = 0.999$ が得られた.

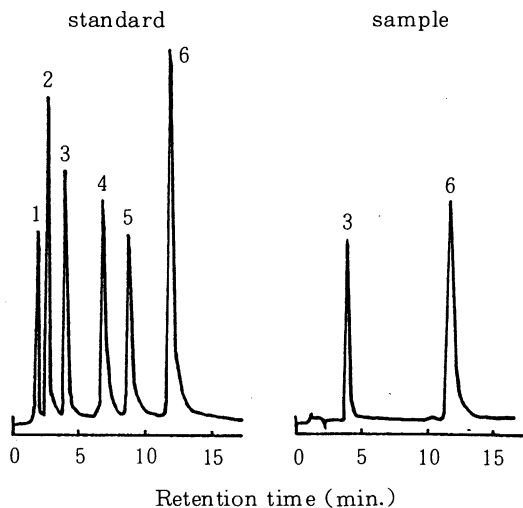


Fig.3. Chromatogram obtained with standard (left) and sample (right).

- Peak 1, nicotinic acid;
2, nicotinamide;
3, dioctyl phthalate (internal standard);
4, tocopherol;
5, tocopherol acetate;
6, tocopherol nicotinate.

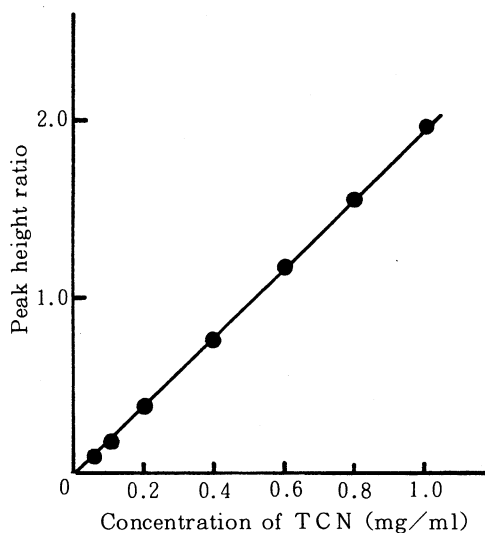


Fig.4. Calibration curve of TCN.

Table 1. Recovery of TCN added to the commercial products.

Sample	TCN added (A)	TCN found (B)	TCN in sample* (C)	TCN recovered (B-C)	Recovery ratio of TCN (B-C/A × 100)
Commercial Product	10 mg	63.7 mg	53.6 mg	10.1 mg	101.0 %
"	10	63.2	53.3	9.9	99.0
"	25	79.7	54.5	25.2	100.8
"	25	79.8	54.3	25.5	102.0
"	50	104.5	54.6	49.9	99.8
"	50	104.3	54.3	50.0	100.0
Mean					100.4 %
Std dev.					1.0
Coeff. of var.					1.0 %

* Sample weight; about 100 mg

3 添加回収実験

市販のTCN製剤約100mg (TCNとして約50mgに相当)に標準TCNを10mg, 25mgおよび50mgを添加し, TCNの回収率を求めた結果をTable 1に示す. その結果, 回収率は99.0~102.0%で平均100.4%, 変動係数1.0%と添加量に関係なく良好であった.

4 分析精度の検討

市販のTCN製剤を用い, 本法における分析精度(反復性)の検討を行った結果をTable 2に示す. その結果, 6回繰り返した実験において, 定量値は平均103.1%で, 標準偏差0.91, 変動係数0.89%と良好であった.

Table 2. Repeatability tests of the HPLC method for the determination of TCN in the commercial product.

Exper. times	TCN
1	102.6 %
2	102.0
3	102.3
4	103.0
5	104.4
6	104.2
Mean	103.1 %
Std dev.	0.91
Coeff. of var.	0.89 %

5 本法と局外規法とにおける定量値

市販のTCN製剤を用い, 本法と局外規法(公定法)により定量した値をTable 3に示す. 2製剤について実施したが, 本法における方法で6回, 公定法による方法で3回, それぞれ定量した. その結果, HPLCを用いた本法での定量値と比色法で求めた公定法での定量値とは有意差のないことがわかった. したがって, 他の成分も同時に分別定量できることから, HPLCを用いた本法の方が公定法よりTCN製剤を測定する定量法としてはより良い方法と考えられる. なお, 定量操作時間も本法の方が加水分解後, 遊離トコフェロールとして定量する公定法よりはるかに短時間ですみ, その上, 定量操作も本法の方が公定法より簡便である.

要約

HPLC法によるビタミン剤中のTCNの定量法について検討し, 次の結果を得た.

- 1 本法によると製剤中のTCNは勿論のこと, 遊離のTOCやNiA, さらにTCAやニコチン酸アミド(NAA)も同時に分別定量できる.
- 2 本法におけるTCNの添加回収率は99.4±1.2%, 変動係数1.2%, 6回繰り返した実験での変動係数は0.89%と, 分析精度とも良好であった.
- 3 本法により求めた市販製剤中のTCN定量値と公定法により求めたそれとは差がなく, 短時間かつ簡便に求められる本法の方が公定法に比べより良い定量法と考えられる.

Table 3. Comparison of proposed and official methods in determination of TCN in the commercial products.

	No 1		No 2	
	Proposed method	Official method	Proposed method	Official method
	104.0 %	104.9 %	103.3 %	100.2 %
	104.4	105.4	102.2	103.0
	103.6	102.5	103.5	101.5
	103.5		102.3	
	103.4		102.9	
	104.0		102.7	
Mean	103.8 %	104.3 %	102.8 %	101.6 %
Std dev.	0.35	1.3	0.48	1.2
Coeff. of var	0.33 %	1.2 %	0.47 %	1.2 %

稿を終るにあたり、御指導と御校閲をいただきました当センター所長田中一成博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生省薬務局：日本薬局方外医薬品成分規格. 758～759 (1986)
- 2) 井上哲男編集：医薬品・製剤の分析. 東京，地人書館，1980，p.151～168.
- 3) 日本公定書協会編集：かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法. 大阪，薬業時報社，1986，p.137～166.
- 4) 厚生省：第十一改正日本薬局方. 551～553 (1986)
- 5) 厚生省：第十一改正日本薬局方. 698～699 (1986)
- 6) 松田りえ子：月刊薬事. **28**, 825～828 (1986)
- 7) 勝井五一郎ら：医薬品研究. **15**, 632～638 (1984)