

高速液体クロマトグラフによる軟膏剤中のテストステロンの分析について

生活衛生部門

Determination of testosterone in ointments using high performance liquid chromatography (HPLC)

Division of Food and Environment Hygiene

Abstract

It has been reported that testosterone (TS) in Pharmaceutical Preparations and Health Foods is determined by GC/FID, GC/MS and absorbance spectrophotometry. However, it was difficult to determine the contents of TS in ointments because it was usually disturbed by base ingredients in ointments.

We studied extractation procedure of TS and HPLC conditions. We established simple and precise quantitative procedure. TS in ointments was extracted with ethanol. The contents of TS were determined under the condition using acetonitrile-water (70:30 v/v) as a mobile phase in combination with ODS column (4.6mm i.d. ×15cm).

TS was separated satisfactorily from base ingredients in ointments on the chromatography. We determined two commercial pharmaceutical preparations (both were Ointments) with this procedure. We found that the contents of TS in them conform to the standards.

Key Words : テストステロン testosterone (TS), 医薬品 Pharmaceutical Preparations, 軟膏剤 Ointments, 基剤 base ingredients, 高速液体クロマトグラフ high performance liquid chromatography (HPLC)

1 はじめに

当所では、薬事法に基づき、市内に流通している一般用医薬品を対象として、有効成分が製造承認書に定められている含量規格に適合しているか試験検査を行っている。

平成18年6月に薬事法の一部が改正され、一般用医薬品をその副作用等による健康被害が生じるおそれの程度に応じて、第一類医薬品、第二類医薬品又は第三類医薬品に区分することとされた。

平成19年3月の厚生労働省医薬食品局長通知により、テストステロン(以下TSと示す)は一般用医薬品のうち健康被害に特に注意が必要な第一類医薬品の一つに指定された。

製剤中のTSの分析法は、これまでにGC/FID⁽¹⁾, GC/MS⁽¹⁾, 吸光光度法⁽²⁾などが報告されているが、軟膏剤の場合は測定を行う際に、軟膏基剤などの夾雑成分による妨害を受けやすく、TSを定量することが困難であった。

そこで高速液体クロマトグラフ(以下HPLCと示す)を用いて、比較的簡易で、精度の高いTSの定量方法を検討したので報告する。

2 方法

(1) 試料

京都市内で市販されているTSを含有する医薬品(軟

膏剤2検体:A, B)

(2) 標準溶液の調製

ア TS標準のエタノール溶液: TS標準品(ナカライテスク社製)約20mgを精密に秤量し、エタノールに溶かして20mlとし、標準原液とする。これを必要に応じてエタノールで希釈し、10, 20, 30mg/L濃度に調製して標準溶液とした。

イ TS標準のメタノール溶液: メタノールを溶媒として、前述のエタノール溶液と同様にして標準溶液を調製した。

(3) 装置

HPLC: 島津製作所LC-10AT

(4) 試料溶液の調製

軟膏剤中からTSを抽出する前処理方法を検討するために、抽出溶媒としてエタノール及びメタノールを用いて、図1, 2に示すような方法で試料溶液を調製した。

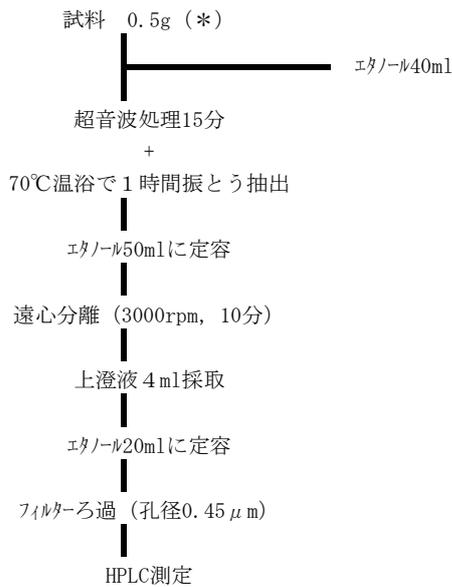
なお、エタノールはメタノールより沸点が高いため、エタノールによる抽出は70℃で、メタノールによる抽出は60℃で行った。

(5) 定量

試料溶液及びTS標準溶液の各10μlをHPLCに付し、

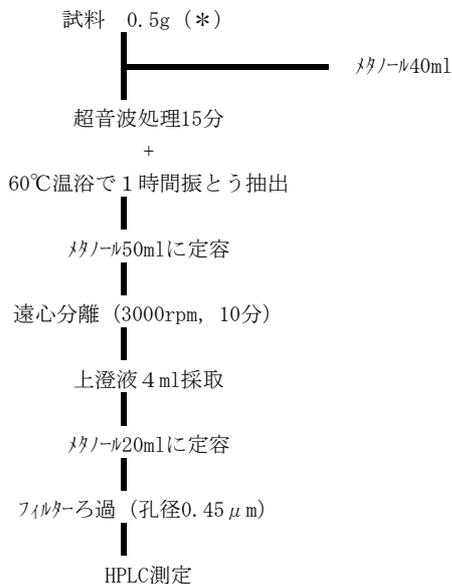
表 1 HPLC 測定条件

| | |
|-------|--|
| カラム | ODS (Mightysil : 5 μ m , 4.6mm i. d. \times 15cm, 関東化学製) |
| 検出波長 | 241nm |
| カラム温度 | 40 $^{\circ}$ C |
| 流速 | 0.5ml/min |
| 移動相 | アセトニトリル/水 (70 : 30) |
| 注入量 | 10 μ l |



(*) 軟膏剤A, BともにTSとして5mg含有。

図 1 エタノールを抽出溶媒として用いた前処理方法



(*) 軟膏剤A, BともにTSとして5mg含有。

図 2 メタノールを抽出溶媒として用いた前処理方法

ピーク面積による絶対検量線法により試料溶液中のTSを定量した。なお、定量についてはTSの抽出溶媒(エタノール又はメタノール)の標準溶液を用いて行った。

HPLC 測定条件を表 1 に示す。

検出波長は、TSの極大波長 241nm に設定した。

3 結果と考察

(1) HPLC 測定条件の検討

①TSのピーク形状が左右対称でシャープである, ②試料由来の夾雑成分のピークと分離して検出できるという二つの条件を満たす最適なクロマトグラムを得るために、逆相系のODS (Mightysil : 5 μ m , 4.6mm i. d. \times 15cm) を分離カラムとして用い、カラム温度 40 $^{\circ}$ C で移動相及び流速の条件を検討した⁽³⁾。表 2 に検討した条件を示す。

表 2 HPLC の移動相及び流速条件の検討

| 条件 | 移動相 | 流速 (ml/min) | |
|-----|-----|---------------------|-----|
| I | i | メタノール/水 (70 : 30) | 1.0 |
| | ii | アセトニトリル/水 (70 : 30) | |
| II | i | アセトニトリル/水 (90 : 10) | 1.0 |
| | ii | アセトニトリル/水 (70 : 30) | |
| | iii | アセトニトリル/水 (50 : 50) | |
| III | i | アセトニトリル/水 (70 : 30) | 1.0 |
| | ii | | 0.5 |
| | iii | | 0.3 |

条件Ⅰでは、移動相の組成について検討した。図3にメタノール/水(70:30)及びアセトニトリル/水(70:30)の移動相によるTS標準溶液(20mg/L)と試料溶液のクロマトグラムの一例を示す。メタノール/水(70:30)の移動相の場合、TSの保持時間は4.7分で、試料溶液ではTSのピークが試料由来の夾雑成分のそれと重なった。一方、アセトニトリル/水(70:30)の移動相の場合、TSの保持時間は2.7分で、試料溶液ではTSのピークが試料由来の夾雑成分のそれと分離して検出することができ、ピーク形状もシャープで良好であった。従って移動相の組成は、アセトニトリル/水系とした。

条件Ⅱでは、アセトニトリル/水系の移動相の混合比について検討した。図4にアセトニトリル/水(90:10)、(70:30)、(50:50)の移動相による試料溶液のクロマトグラムの一例を示す。アセトニトリル/水(70:30)の場合、TS(保持時間2.7分)のピークの半値幅は0.1分であった。アセトニトリル/水(90:10)にした場合、TSの保持時間(2.3分)と半値幅(0.1分)はともにほとんど差が見られなかった。いずれもTSのピーク形状は良好であった。しかし、アセトニトリル/水(50:50)にした場合、TS(保持時間5.1分)のピークの半値幅は0.15分となり、ピーク形状は比較的小さくやや広がりが見られたため、移動相として適当ではなかった。またアセトニトリル/水の混合比を変化させても、TSと他の含有成分とは分離して検出できることが認められた。従って今回、移動相の混合比はアセトニトリル/水(70:30)とした。

条件Ⅲでは、移動相の流速について検討した。表3にアセトニトリル/水(70:30)の移動相による流速1.0ml/min、0.5ml/min、0.3ml/minでのTSの保持時間と半値幅を示す。流速1.0ml/minではTSの保持時間は2.7分とやや早く、流速0.3ml/minではTSの保持時間は9.1分で、半値幅は0.28分とピークが比較的広がるため、いずれも適当ではなかった。流速0.5ml/minではTSの保持時間は5.4分、半値幅は0.17分とピーク形状も良好であった。従って流速は0.5ml/minとした。

条件Ⅰ、Ⅱ、Ⅲの検討の結果、最終的にHPLC測定条件について、移動相はアセトニトリル/水(70:30)、流速は0.5ml/minとすることとした。

(2) 抽出溶媒の検討

TSを抽出する溶媒として、エタノール及びメタノールを選択し、同一試料について比較検討した。

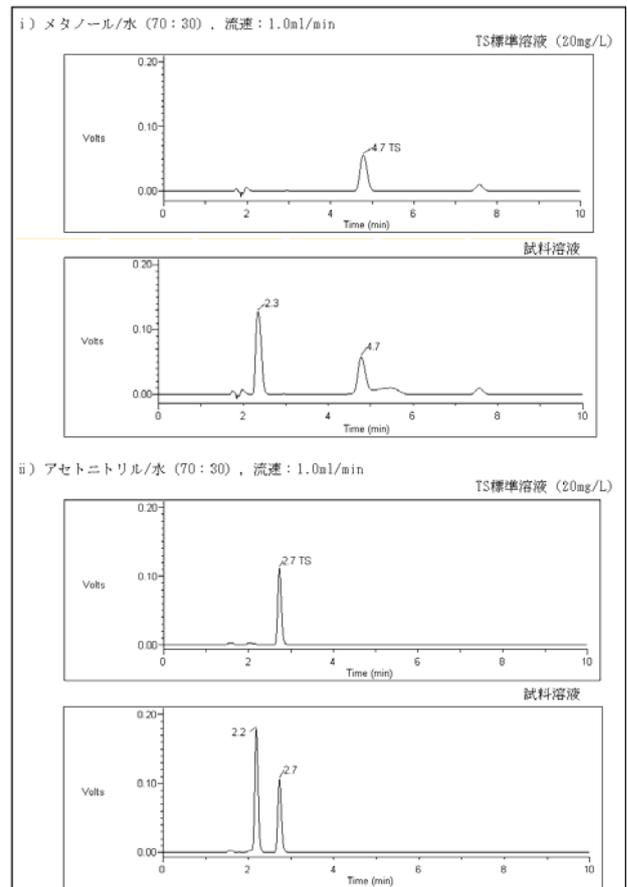


図3 (条件Ⅰ)メタノール/水(70:30)及びアセトニトリル/水(70:30)の移動相によるTS標準溶液と試料溶液のクロマトグラムの一例

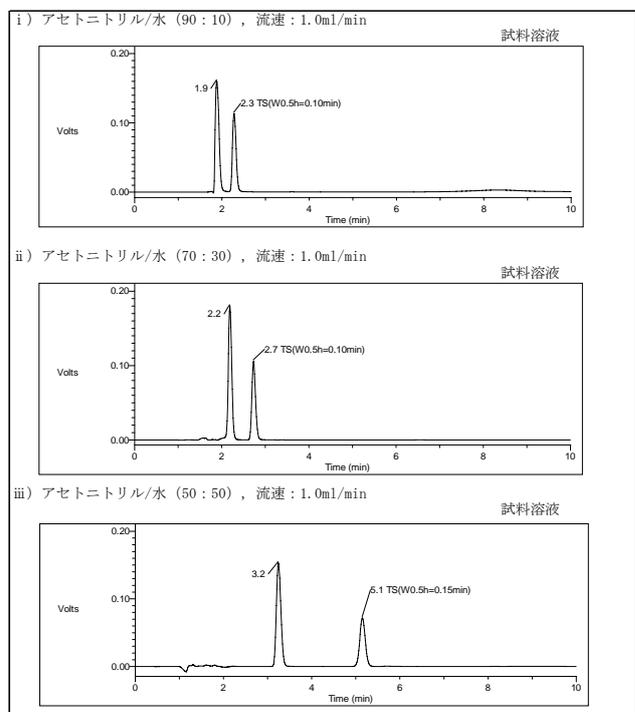


図4 (条件Ⅱ)アセトニトリル/水(90:10)、(70:30)、(50:50)の移動相による試料溶液のクロマトグラムの一例 (*) W0.5h : 半値幅

表3 (条件Ⅲ) HPLC 移動相の流速変化による TS の保持時間と半値幅の比較

| 流速 (ml/min) | TSの保持時間 (min) | W _{0.5h} (min) (*) |
|-------------|---------------|-----------------------------|
| 1.0 | 2.7 | 0.10 |
| 0.5 | 5.4 | 0.17 |
| 0.3 | 9.1 | 0.28 |

(*) W_{0.5h} : 半値幅

表4 抽出溶媒による TS 含有量の比較

| 試料 | 溶媒の種類 | | | |
|------|-----------|------|-----------|------|
| | エタノール | | メタノール | |
| | TS含有量 (%) | C.V. | TS含有量 (%) | C.V. |
| 軟膏剤A | 96.1 | 0.9 | 96.5 | 4.4 |
| 軟膏剤B | 96.7 | 1.7 | 75.6 | 4.6 |

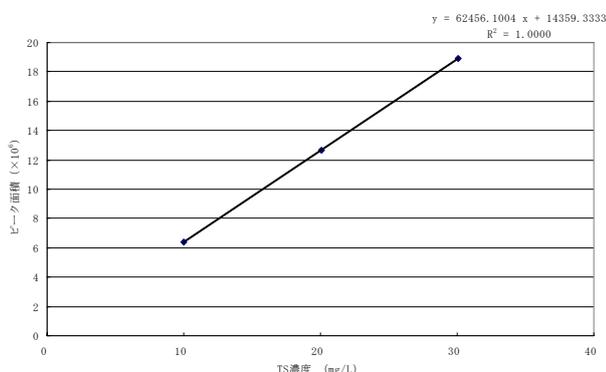


図5 TS 検量線

表4にエタノール及びメタノール抽出による TS 含有量の比較を示す。TS 含有量は、各試料の TS 表示量に対する実際の TS 定量値の割合を示しており、n=3 の平均値を求めた。

TS 含有量について、軟膏剤 A ではエタノールで 96.1%、メタノールで 96.5%と差はなかったが、軟膏剤 B ではエタノールで 96.7%、メタノールで 75.6%であった。このことから、試料の中には、メタノールで TS を十分に抽出できないものがあることが分かった。

また TS 含有量のばらつきを示す変動係数(C.V.)に

ついては、エタノールの場合、軟膏剤 A で 0.9%、軟膏剤 B で 1.7%となり、メタノールより良好な結果が得られた。以上のことから、エタノールは両試料について、TS を効率良く抽出でき、定量値のばらつきも少ない抽出溶媒と考えられた。

(3) 検量線

HPLC による TS 標準溶液 (エタノール溶液) の検量線は、図5に示すように 10~30mg/L の範囲で良好な直線性を示した (相関係数 $r > 0.9999$)。

(4) 試料の試験結果

京都市内で市販されている TS 含有製剤 (軟膏剤 2 検体: A, B) を試験した。表4に示すように TS 含有量 (n=3 の平均) は、軟膏剤 A は 96.1%、軟膏剤 B は 96.7% で、ともに製造承認書に定められている含量規格に、適合していることが確かめられた。

4 まとめ

HPLC を用いて、TS を含有する軟膏剤の定量方法を検討した。

(1) HPLC の測定条件を検討した結果、逆相系の ODS を分離カラムとして用い、カラム温度 40℃で移動相をアセトニトリル/水 (70 : 30)、流速を 0.5ml/min とした場合、軟膏基剤などの夾雑成分による妨害を受けることなく、試料中の TS を定量できる最適なクロマトグラムが得られた。

(2) TS の抽出溶媒を検討した結果、エタノールは効率良く抽出でき、定量値のばらつきも少ないことから、抽出溶媒として適当であることが分かった。

(3) 市販されている TS 含有製剤 2 検体について試験した結果、ともに製造承認書に定められている含量規格に、適合していることが確かめられた。

以上のことから本法は簡易で、精度の高い分析方法であり、市販の TS を含有する軟膏剤の定量に有用であると考えられる。

5 参考文献

- (1) 守安貴子, 他 : TLC, GC/FID 及び GC/MS による健康食品中の男性ホルモンの検索法, 東京都立衛生研究所年報, **53**, 40-44 (2002)
- (2) (財)日本公定書協会編 : 日本薬局方 (第十五改正), 743-745, じほう (2006)
- (3) Nacalai Tesque, Inc. : COSMOSIL Chromatogram Index, 372, Nacalai Tesque, Inc. (2003)