高速液体クロマトグラフィーによるシステイン アルキルエステルの定量

堺 純一, 水田 博彰*

(1978 年 6 月 22 日受理)

高速液体クロマトグラフを用いて、システインアルキルエステル（システインメチルエステル、システインエチルエステル）の迅速分析法を検討した。

システインアルキルエステルをベンゾイルクロリドで *N*, *S*-ジベンゾイル化し紫外外部吸収基を導入した後、 μ Bondapak C_{18} を固定相に、アセトニトリル/炭酸アンモニウム水溶液を移動相とし、内部標準法による定量分析を行った。

結果は分析のばらつきも小さく ($\sigma=0.6\%$)、製剤の安定性試験に適用すると従来の分光光度法に比べて、より選択性の高い分別定量法であった。

1 緒 言

システインのアルキルエステル（システインメチルエステル、システインエチルエステル）は医薬品として広く用いられており、その定量法として、従来主としてチオール基を定量する多くの測定法¹⁾（ヨウ素滴定法²⁾や吸光度測定法³⁾など）が報告されている。しかし、これらの方法はチオール基を有する不純物あるいは分解生成物が存在する場合、当然定量値に影響を与えるものと考えられる。

一方、システインアルキルエステルのクロマトグラフィーによる分析法についてはそのほとんどが薄層クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー⁴⁾などによる定性的なものであり、定量分析についての報告はない。

そこで著者らは、システインアルキルエステルを *N*, *S*-ジベンゾイル化し紫外外部吸収基を導入することによって UV モニターを備えた高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略記）による定量法を検討した。

その結果、不純物あるいは分解生成物として予想されるシステイン、シスチン、システイン酸と分別定量が可能であり、2, 2'-ジチオジビリジンをを用いる分光光度法⁵⁾（以下 2-PDS 法と略記）と比較したとき、HPLC が優れた選択的定量法であることが分かったので結果を報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

クロロホルム：試薬特級品を 4, 5 回水洗したものを用いて塩化カルシウムで一晩乾燥した後蒸留して用いた。

ベンゾイルクロリド溶液、4-ニトロベンゾイルクロリド溶液、3, 5-ジニトロベンゾイルクロリド溶液：それぞれ試薬特級品をクロロホルムに溶解し 0.15 M 溶液とした。

4-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液：試薬特級 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド 320mg をクロロホルム 50 ml に溶解した。

ベンゾフェノン溶液：試薬特級 ベンゾフェノン 100 mg をクロロホルム 50 ml に溶解した。

2-PDS 溶液：試薬特級 2, 2'-ジチオジビリジンをメタノールに溶解し 1.2×10^{-3} M 溶液とした。

N-エチルマレイミド溶液：試薬特級 *N*-エチルマレイミド 1 g を 50 ml の水に溶解した。

リン酸塩緩衝液：1/15 M リン酸水素二ナトリウム溶液と 1/15 M リン酸二水素カリウム溶液を用いて pH 7.5 に調整した。

L-シスチンジメチルエステル塩酸塩及び L-シスチンジエチルエステル塩酸塩：E. Abderhalden ら⁷⁾の方法に準じてそれぞれを合成した。それぞれ融点 173.0°C 及び融点 187.4°C。

検量線に用いる標準品は Leonidas ら⁸⁾の方法に準じて各々合成した。

N, *S*-ジベンゾイル-L-システインメチルエステル（以下 DBCME と略記）（融点 145.6°C）

N, *S*-ジベンゾイル-L-システインエチルエステル（以下 DBCEE と略記）（融点 108.8°C）

N, *S*-ジ(4-ニトロベンゾイル)-L-システインエチルエ

* 吉富製薬株式会社研究開発本部製剤研究所：福岡県築上郡吉富町小祝 955

ステル (融点 178.2°C)

N, *S*-ジ (3,5-ジニトロベンゾイル)-*L*-システインエチルエステル (融点 204.5°C)

2.2 装 置

高速液体クロマトグラフ: ウォーターズ社 ALC 204 型 (検出器: 254nm)

分光光度計: 島津 UV-210 デジタルダブルビーム 分光光度計

3 測定方法

3.1 HPLC 法による測定

3.1.1 HPLC 条件

カラム: μ Bondapack C₁₈ (4mm I.D. $\times$ 30cm)

移動相: アセトニトリル/0.05% 炭酸アンモニウム, pH 6.5 (55/45)

流速: 2.0 ml/min

3.1.2 システインアルキルエステルの定量 システインアルキルエステル塩酸塩 10mg をクロロホルム 10 ml 及びトリエチルアミン 0.1 ml の混液に溶かす。これにベンゾイルクロリド溶液 1 ml を加えてよく振り混ぜた後室温で 10 分間放置する。減圧乾固後残さに内部標準としてシステインメチルエステルの場合は 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 2 ml を、システインエチルエステルの場合はベンゾフェノン溶液 2 ml を各々加え溶かした後、その 1 μ l を注入し、あらかじめ作成して得た検量線より定量した。

3.1.3 錠剤の定量 錠剤 5 錠の重量を量り、すりつぶした後エタノール抽出し、不溶部分を濾紙を用いて濾過した液から主薬 10mg に相当する量を採取し、エタノールを減圧留去した後、その残さを 3.1.2 の方法で測定を行った。

3.2 2-PDS 法による錠剤の定量

Grassetti ら⁶⁾の方法に従って行った。すなわち、錠剤 5 錠をすりつぶした後粉末を正確に量り取り、水を加えてよく振り混ぜた後濾過する。濾液を 0.01N 塩酸溶液で希釈し試料溶液とする。別にシステインアルキルエステル原末を正確に量り 0.01N 塩酸溶液で希釈した液を標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 1 ml ずつを正確に量り取り、リン酸塩緩衝液 3 ml と 2-PDS 液 1 ml を加えてよく振り混ぜた後、0.01N 塩酸溶液 1 ml について同様の操作をした溶液を対照として波長 343 nm における吸光度を測定することによって定量を行った。

3.3 薄層クロマトグラフィー

システインアルキルエステルは TLC 操作中チオール基が酸化されるのであらかじめ *N*-エチルマレイミドによってチオール基をマスクし展開した⁹⁾。すなわち、システインアルキルエステル 20mg 対応量に *N*-エチルマレイミド溶液 5 ml を加えて溶かし、2 時間放置した後、その 5 ml を試験溶液とする。

吸着剤: シリカゲル 60F254, 厚さ 0.25 mm (メルク社製)

展開溶媒: *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (5:1:2)

検出法: ニンヒドリン呈色

4 実験結果及び考察

4.1 測定条件の検討

4.1.1 測定条件の検討 システインアルキルエステルに紫外外部吸収基を導入するための反応試薬の検索をシステインエチルエステルについて行った。反応試薬としてアミノ基¹⁰⁾、チオール基¹¹⁾¹²⁾との反応試薬として繁用されるベンゾイルクロリド及びそのニトロ誘導体である 4-ニトロベンゾイルクロリド、3,5-ジニトロベンゾイルクロリドを用いてそのベンゾイル化反応を検討した。実験は次のように行った。システインエチルエステル塩酸塩 10mg をクロロホルム 10 ml 及びトリエチルアミン 0.1 ml の混液に溶かす。これに各反応試薬溶液 1 ml をそれぞれ加えよく振り混ぜた後、室温放置する。経時後反応液を減圧乾固し残さに内部標準としてベンゾフェノン溶液をベンゾイルクロリドの場合は 2 ml、4-ニトロ及び 3,5-ジニトロベンゾイルクロリドの場合は 3 ml を各々加え溶かした後その 1 μ l を高速液体クロマトグラフに注入し、各標準品によってあらかじめ作成して得た検量線より、各反応試薬による反応率を測定した。結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 に示すように反応試薬としてベンゾイルクロリドが最も優れていた。

反応 30 分における各反応液の薄層クロマトグラフィーを Fig. 2 に示す。システインエチルエステル 20 μ g 相当量をスポットした。4-ニトロベンゾイルクロリド、3,5-ジニトロベンゾイルクロリドを反応試薬とした場合は副反応が認められる。

以上の結果に基づいて、20°C 及び 40°C においてベンゾイルクロリドを用いたシステインメチルエステル及びシステインエチルエステルの反応率を測定した結果を Table 1 に示す。通常の条件下では、反応は速やかに完結し、又生成物は安定であった。

4.1.2 検量線の作成 DBCME 及び DBCEE 約 14 mg, 18 mg, 22 mg, 26 mg を精ひょうしこれに内部

Fig. 1 Reaction rate of cysteine ethyl ester

1 : Benzoyl chloride; 2 : 4-Nitrobenzoyl chloride;
3 : 3,5-Dinitrobenzoyl chloride

Fig. 2 Thin-layer chromatograms of reaction solution of cysteine ethyl ester (30 min)

Solvent—Chloroform : methanol (100 : 1); Detection : UV-light (2536 Å); 1 : DBCEE; 2 : Reaction solution (with benzoyl chloride); 3 : Benzoyl chloride; 4 : *N*, *S*-Di(4-nitrobenzoyl)-*L*-cysteine ethyl ester; 5 : Reaction solution (with 4-nitrobenzoyl chloride); 6 : 4-Nitrobenzoyl chloride; 7 : *N*, *S*-Di(3,5-dinitrobenzoyl)-*L*-cysteine ethyl ester; 8 : Reaction solution (with 3,5-dinitrobenzoyl chloride); 9 : 3,5-Dinitrobenzoyl chloride

Table 1 Reaction rates of cysteine alkyl esters with benzoyl chloride (20°C, 40°C)

Sample	°C	Reaction time (min)			
		10	20	40	60
Cysteine methyl ester	20	99.3	100.2	99.8	98.7
	40	98.8	99.5	100.4	100.1
Cysteine ethyl ester	20	98.5	99.7	98.8	99.4
	40	99.2	98.9	99.4	99.7

標準物質として DBCME の場合は 4-ジメチルアミノベンゾアルデヒド溶液 2 ml を, DBCEE の場合はベンゾフェノン溶液 2 ml を各々加え溶かした後, その 1 μl を HPLC に付した. 得られたクロマトグラムのピーク比を縦軸に重量比を横軸にとり検量線を作成した. それぞれ原点を通る直線が得られた.

4.1.3 共存物質の影響 システインアルキルエステルは主として加水分解によるエステル結合の切断, チオール基の空気酸化後チオラジカルの二量化によるジスルフィドの生成, チオール基のスルホン酸への酸化³⁾ など, 次のような分解経路が考えられる.

このうち, システイン及びシスチンは 3.1.2 の条件ではクロロホルム-トリエチルアミン溶媒に不溶であるためベンゾイル化反応が起こらない. システイン酸は過剰のベンゾイルクロリドが移動相中で加水分解して生じた安息香酸のピークと同じ保持時間を有し, シスチンジアルキルエステルと同様保持時間の差より定量を妨害しない.

4.2 製剤の定量

4.2.1 製剤の定量への適用 市販のシステインメチルエステル, システインエチルエステルを含む錠剤からの定量を 3.1.3 の方法で行った結果を Table 2 に示す. 定量値のばらつきが少なく満足すべき結果であった.

4.2.2 錠剤の安定性試験への適用 市販システインエチルエステル錠剤数ロットを 60°C で 3 週間過酷条件下に置いたものを HPLC と 2-PDS 法で測定してみた.

Fig. 3 Chromatogram of DBCME

a: Benzoic acid and *N*-benzoyl cysteic acid; b: Benzoyl chloride; c: 4-Dimethylaminobenzaldehyde (internal standard); d: *N, N'*-Dibenzoyl cystine dimethyl ester; e: DBCME

Fig. 4 Chromatogram of DBCEE

a: Benzoic acid and *N*-benzoyl cysteic acid; b: Benzoyl chloride; c: *N, N'*-Dibenzoyl cystine diethyl ester; d: Benzophenone (internal standard); e: DBCEE

Table 2 Determination of cysteine alkyl esters in tablets

Sample No.	Cysteine methyl ester (%)	Cysteine ethyl ester (%)
1	97.2	99.1
2	98.6	98.6
3	98.0	100.1
4	97.5	98.8
5	97.8	99.5
$\bar{x}$ †	97.8	99.2
S. D.††	0.53	0.60

† Mean value of five determination; †† Standard deviation

結果は Table 3 に示すとおりであった。又、これら錠剤の TLC パターンを Fig. 5 に示した。Table 3 に示すように HPLC と 2-PDS 法には定量値に明らかな差が見られる。一方、Fig. 5 に示すように錠剤にシステインの含有が見られることから二つの測定法間の定量値の差は主としてシステインによるものであると考えられる。2-PDS 法が主薬の分解によって生成したシステインも測定しているのに対して HPLC は主薬のみを選択的に測定しているものと考えられる。

Fig. 5 Thin-layer chromatograms of tablets (60 °C, 3 weeks)

Solvent—*n*-Butanol : acetic acid : water (5 : 1 : 2); Detection : Ninhydrine spray; 1: Tablets; 2: Cysteine ethyl ester; 3: Cysteine; 4: Cystine diethyl ester; 5: Cystine; 6: Cysteic acid

Table 3 Determination of cysteine ethyl ester in tablets (60°C, 3 weeks)

Sample No.	Cysteine ethyl ester found (%)	
	HPLC	2-PDS method
1	72.4	89.8
2	74.1	85.7
3	87.5	92.3
4	74.6	90.7

5 結 語

HPLC を用いて システインアルキルエステルを 定量 するための研究を行った。紫外部吸収基を導入する反応試薬としてベンゾイルクロリド及びそのニトロ誘導体について検討した結果ベンゾイルクロリドが最も優れていた。反応は室温で速やかに完結し、不純物あるいは分解産物として予想されるシステイン、シスチンジアルキルエステル、シスチン、システイン酸との分離定量が可能であった。錠剤の定量においてもばらつきが少なく満足すべき結果を得た。錠剤の安定性試験に適用してみると、従来の 2-PDS 法との間に測定値に差が認められ、錠剤の安定性試験法として本法は高い選択性を有する優れた測定法であるといえる。

終わりに、終始御指導を賜った当社常務取締役研究開発本部長中西美智夫博士並びに実験に協力された当研究所の諸氏に感謝します。

文 献

- 1) 松本 博：化学と生物, **3**, 318, 378 (1965).
- 2) T. F. Lavine : *J. Biol. Chem.*, **109**, 141 (1935).
- 3) P. D. Boyer : *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 4331 (1954).
- 4) J. Jonson, J. Eyem, J. Sjöguist : *Anal. Biochem.*, **51**, 204 (1973).
- 5) J. P. Hardy, S. L. Kerrin : *Anal. Chem.*, **44**, 1497 (1972).
- 6) D. R. Grassetti, J. F. Murray, Jr. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 41 (1967).
- 7) E. Abderhalden, E. Wybert : *Chem. Ber.*, **49**, 2449 (1916).
- 8) L. Zervas, I. Photaki, N. Ghelis : *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 1337 (1963).

- 9) 第三版食品添加物公定書解説書, B-393 (1973), (食品添加物公定書解説書編集委員会).
- 10) 日本化学会編：“新実験化学講座”, 13 巻, p. 91 (1977), (丸善).
- 11) G. F. Grillot, P. M. Levin, R. Green, R. I. Bashford : *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1863 (1950).
- 12) E. Wertheim : *ibid.*, **51**, 3662 (1929).
- 13) 大饗 茂：“有機イオウ化合物の化学”, (上), p. 79 (1969), (化学同人).

☆

High performance liquid chromatographic determination of cysteine esters. Hiroaki MIZUTA and Junichi SAKAI (Pharmaceutical Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd., 955, Koiwai, Yoshitomi-cho, Chikugo-gun, Fukuoka)

A rapid and selective method for determination of cysteine alkyl esters (cysteine methyl ester and cysteine ethyl ester) by high performance liquid chromatography equipped with a UV monitor was established. This method was based on analysis by high performance liquid chromatography using a micro particulate, bonded reversed-phase column after conversion to their benzoyl derivatives. The procedure was as follows : 10 mg of cysteine alkyl ester, 0.1 ml of triethylamine and 1.5×10^{-4} mol of benzoyl chloride were dissolved in 10 ml of chloroform and the mixture was allowed to stand for 10 min at room temperature. After evaporated to dryness, the residue was dissolved in 2 ml of the internal standard solution. One μ l of this solution was injected into the chromatograph. The column (4 mm I.D. $\times$ 30 cm) packed with μ Bondapak C₁₈ was equilibrated and eluted with acetonitrile/0.05% ammonium bicarbonate buffer solution (pH 6.5) (55/45), and the column effluent was monitored at 254 nm. This method was not disturbed by cysteine, cystine dialkyl esters, cystine and cysteic acid which are expected as impurities or decomposition products of cysteine alkyl esters. When applied to the determination of tablets, this method had enough accuracy and higher selectivity compared with colorimetric method using 2,2'-dithiodipyridine.

(Received June 22, 1978)

Keywords

Benzoyl chloride

Cysteine alkyl ester

High performance liquid chromatography