[Jpn. J. Toxicol. Environ. Health]
衛 生 化 学
41 (1) 85-91 (1995)

キャピラリー電気泳動法による目薬の成分分析

岩上正藏,^a 沢辺善之,^a 中川照眞^b

大阪府立公衆衛生研究所,^a 京都大学薬学部^b

Determination of Components in Eye Lotion by Capillary Electrophoresis

SHOZO IWAGAMI,^a YOSHIYUKI SAWABE^a and TERUMICHI NAKAGAWA

Osaka Prefectural Institute of Public Health,^a 1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku,

Osaka 537, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,^b

Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received August 18, 1994)

Capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with sodium dodecyl sulfate (SDS) as an anionic carrier were applied to the analysis of nine principal components of eye lotion. Simultaneous separation of these components except cyanocobalamin (VB₁₂), which has the same migration time with that of electroosmotic flow, was achieved by CZE using a 72 cm×50 μm i.d. fused silica capillary tube filled with 20 mM borate buffer (pH 10) at 25 kV DC voltage with UV detection at 200 nm. Under these conditions, the peak of chondroitin sulfate (CS) was overlapped with that of aspartic acid in case the latter was contained in the sample as a co-existing component. However, when pH was decreased to 9, CS was separated from other components and also from aspartic acid, and gave a more shapely peak. VB₁₂ could be separated from other components by MEKC with 20 mM borate buffer (pH 10) containing 40 mM SDS. The applicability to the determination of nine principal components of eye lotion is demonstrated.

Keywords — eye lotion; capillary zone electrophoresis; micellar electrokinetic chromatography; simultaneous determination; sodium dodecyl sulfate

緒 言

目薬（一般点眼薬）は充血除去成分、消炎・収斂成分、抗ヒスタミン薬をはじめ、ビタミン、アミノ酸などを含有する混合製剤であるため、その成分分析には HPLC が多く用いられている。¹⁻⁴⁾しかし、多成分の同時分析については、Akiyama ら⁴⁾による 6 成分の同時定量法が報告されているにすぎない。しかもこの方法はテーリングがひどく、分離効率が悪いと十分な分離が達成されているとはいえない。したがって、HPLC を用いて更に多くの成分を同時分析するのは、より困難であることが予想される。

一方、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)^{5,6)}は従来のクロマトグラフィーを凌ぐ高分離能を有するた

め、現在最も注目されている新しい分離分析法である。さらに、CZE の泳動用緩衝液中にイオン性界面活性剤を添加し、そのミセル（キャリアー）への試料成分の分配現象を利用したミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)⁷⁾は、CZE では原理上不可能である非荷電物質の分離にも適用できるため、これらの方法は生薬、漢方製剤あるいは混合製剤などの多成分系医薬品中の各成分の分離分析に適した方法であると考えられる。著者らはすでに CZE 及び MEKC を用いた生薬や漢方製剤中の指標成分の分析、^{8,9)}生薬試験用標準品の純度検定¹⁰⁾などを行ない、これらの方法の有用性について論じてきた。

今回、著者らは CZE 及び MEKC を用いて、目薬に繁用される有効成分 9 種の同時分析について検討を行ったので報告する。

実験の部

1. 試薬 分析対象とした有効成分9種のうち、シアノコバラミン(VB₁₂)、コンドロイチン硫酸ナトリウム(CS)は片山化学工業から購入したものを用いた。塩酸ピリドキシン(VB₆)、マレイン酸クロルフェニラミン(CM)、アラントイン(AL)は和光純薬工業製を使用した。メチル硫酸ネオスチグミン(NM)、塩酸ナファゾリン(NH)はシグマ社より購入したものを用いた。グリチルリチン酸二カリウム(DG)は丸善製薬製、タウリン(TA)はキシダ化学製を使用した。これら9成分について、それぞれ一定量を秤り水に溶解したのち、内標準溶液と等量混合して標準溶液とした。

四ホウ酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム及び水酸化ナトリウムは和光純薬工業製試薬特級を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)はナカライテスク製難溶性蛋白質研究用を使用した。

フェルラ酸(4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸)は東京化成工業製を使用した。メタノールはHPLC用を用い、水は超純水製造装置(ミリポア社, MILLI-Q SP.TOC.)を用いて製造したものを使用した。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2. 試料及び試料溶液の調製 試料には市販の目薬9種(A-I)を用いた。

CSの分析に際しては、目薬をそのまま試料とした。VB₆及びALについては、あらかじめ水で5倍希釈した目薬と内標準溶液を等量混合して試料溶液とした。その他の成分については、目薬と内標準溶液を等量混合して試料溶液とした。

3. 内標準溶液 フェルラ酸15 mgを水100 mlに溶解したものを用いた。

4. 泳動用緩衝液 20 mM ホウ酸-リン酸緩衝液は、20 mM 四ホウ酸ナトリウム溶液及び20 mM リン酸二水素ナトリウム溶液を混合し、pH 7-9に調整して用いた。また、pH 10の20 mM ホウ酸緩衝液は、20 mM 四ホウ酸ナトリウム溶液に1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えてpHを10に調整した。

5. CZE及びMEKC キャピラリー電気泳動装置はアプライド・バイオシステムズ(ABI)社のModel 270 Aを使用した。分離用のキャピラリーは内径50 μ m、長さ72 cm(有効長50 cm)のフューズドシリカ管を用い、200 nmでオンカラムUV検出した。試料の導入は正極より減圧導入法によって1.5秒間行った。泳動用緩衝液には20 mM ホウ酸-リン酸緩衝液(pH 7-9)あるいは20 mM ホウ酸緩衝

液(pH 10)を用いた。さらに、MEKCの場合にはこの緩衝液中にSDSを濃度を変えて溶解した。キャピラリーは試料導入前に0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で、ついで泳動用緩衝液で洗浄した。分離はすべて35°Cの空気恒温槽中で行い、印加電圧は25 kVとした。なお、ピーク面積及びピーク高さの測定には日立クロマトインテグレーターD-2500を使用した。

結果及び考察

1. 移動時間に及ぼす泳動用緩衝液のpHの影響

実験に供した9成分の移動時間と泳動用緩衝液のpHとの関係をFig. 1に示した。なお、電気浸透流速の測定にはメタノールを用いた。

Fig. 1から明らかなように、NM、NH及びCMの移動速度は電気浸透流のマーカーとして用いたメタノールの移動速度よりも大きかった。これは、これら3成分のそれぞれの塩基部分の一部がこの実験条件下においては正に帯電し、電気浸透流による移動に加えて、負極側へ電気泳動を起したためであると考えられる。また、電気的に中性であるVB₁₂はCZEモードでは電気泳動を起こさないで、電気浸透流と同じ速度で移動した。

pH 10の泳動用緩衝液を用いた場合に、VB₁₂以外の8成分の同時分離が可能となった。この時のエレクトロフェログラムをFig. 2に示した。また、Fig. 3

Fig.1. Effect of pH of Running Buffer on Migration Times of Components of Eye Lotion

Running buffer: 20 mM borate-phosphate buffer (pH 7-9) or 20 mM borate buffer (pH 10), total applied voltage: 25 kV, total tube length: 72 cm (effective length: 50 cm), sample introduction time: 1.5 s under vacuum, temperature: 35°C, detection wavelength: 200 nm.

Fig. 2. Separation of Components of Eye Lotion

Running buffer: 20 mM borate buffer (pH 10). Peak assignment and concentration: 1=cyanocobalamin [0.1 mg/ml], 2=pyridoxine (as its hydrochloride) [0.12 mg/ml], 3=neostigmine (as its methylsulfate) [0.07 mg/ml], 4=chlorpheniramine (as its maleate) [0.07 mg/ml], 5=allantoin [0.5 mg/ml], 6=naphazoline (as its hydrochloride) [0.05 mg/ml], 7=glycyrrhizic acid (as its dipotassium salt) [0.5 mg/ml], 8=chondroitin sulfate (as its sodium salt) [0.75 mg/ml], 9=taurine [2.5 mg/ml], I.S.=ferulic acid [0.07 mg/ml]. For other conditions, see Fig. 1.

には目薬の実試料の分離例を示した。ただ、この条件下ではアスパラギン酸塩が共存すると、CSのピークが妨害を受けることがわかった (Fig. 3 目薬 F)。しかし、pH 9 で CZE を行ったところ、Fig. 4 のように CS とアスパラギン酸を分離することができ

た。なお、CS のピーク形状は pH 9 の時が最も良好であった。

2. 移動時間に及ぼす泳動用緩衝液中の SDS 濃度の影響

pH 10 の泳動用緩衝液を用いた場合の、9 成分の

Fig. 3. Electropherograms of Commercially Available Eye Lotions (A and F)

Running buffer: 20 mM borate buffer (pH 10). Peak assignments, refer to Fig. 2. For other conditions, see Fig. 1

移動時間に及ぼす SDS 濃度の影響を Fig. 5 に示した。VB₁₂ は CZE モードでは電気浸透流と同じ速度で移動したが、SDS ミセルをキャリアーとする MEKC では、SDS ミセルとの相互作用のために正極方向に電気泳動を起こし、その結果電気浸透流速より移動速度は小さくなった。また、MEKC モードでは NM, NH, CM の 3 成分の移動時間が著しく増大した。このことは、これら 3 成分と SDS ミセルとの相互作用が非常に大きいことを示している。

Fig. 6 には SDS 濃度が 40 mM の時のエレクトロフェログラムを示した。この条件下では、VB₆, AL, DG, TA の同時分離も可能であったが、NM と CS の分離はやや不十分であった。なお、SDS ミセルをキャリアーとする MEKC では NH と CM はほとんど分離されなかった。Fig. 7 には目薬中の VB₁₂ の分離例を示した。

以上の結果から、CS は pH 9 の CZE で、VB₁₂ は pH 10 の MEKC (SDS 40 mM) でそれぞれ分離定量することとし、残りの 7 成分については pH 10 の

CZE で同時定量することとした。

3. 目薬中の有効成分の定量

Table I に、9 成分それぞれについての検量線と検出限度を示した。9 成分それぞれについて、内標準法によるピーク面積比、ピーク高さ比及び絶対法によるピーク面積、ピーク高さに基づいて検量線を作成し、その結果それぞれの成分について、最も相関性の高いものを採用した。

以上の方法を用いて、市販目薬 9 種 (Eye Lotion A-I) の有効成分の定量を行った結果を Table II に示した。

結 論

混合製剤中の有効成分の同時分析への CZE や MEKC の応用例としては、解熱鎮痛薬の成分分析¹¹⁾ 水溶性ビタミンの分離¹²⁾ などが報告されており、物理化学的性質の異なる成分の同時分析においては特に MEKC が有用であると考えられる。今回著者らは CZE と MEKC を用いて、目薬の有効成分

Fig. 4. Separation of Chondroitin Sulfate from the Components of Eye Lotion F

Running buffer: 20 mM borate-phosphate buffer (pH 9).

Peak assignments, refer to Fig. 2.
For other conditions, see Fig. 1.

Fig. 5. Effect of SDS Concentration on Migration Times of Components of Eye Lotion

Running buffer: 20 mM borate buffer (pH 10).
For other conditions, see Fig. 1.

Fig. 6. Electrokinetic Separation of Components of Eye Lotion

Running buffer: 20 mM borate buffer (pH 10) containing 40 mM SDS.

Peak assignments, refer to Fig. 2.

Concentration: 1=0.13 mg/ml, 2=0.16 mg/ml, 3=0.1 mg/ml, 4=0.1 mg/ml, 5=0.65 mg/ml, 6=0.07 mg/ml, 7=0.65 mg/ml, 8=1 mg/ml, 9=3.3 mg/ml, I.S.=0.1 mg/ml.

For other conditions, see Fig. 1.

Fig. 7. Separation of Cyanocobalamin (VB₁₂) from Other Components of Eye Lotion A

Running buffer: 20 mM borate buffer (pH 10) containing 40 mM SDS.

Peak assignments, refer to Fig. 2.

For other conditions, see Fig. 1.

として繁用される9成分の同時分析を試みた。その結果、電気的に中性であるVB₁₂を除いた、残りの成分の同時分析がpH 10のCZEで可能となった。但し、アスパラギン酸が共存する場合は、この条件下ではCSのピークが妨害を受けた。しかし、pH 9でCZEを行うことにより、CSとアスパラギン酸は分離された。一方、VB₁₂はMEKCでは他の成分と容易に分離することがわかった。これらの分析条件を用いて9種の有効成分の定量を行ったところ、ほぼ満足すべき結果が得られた。

謝辞 本実験に御協力いただいた帆玉薬品医薬品卸北沢恵子氏に深謝致します。

TABLE I. Calibration Curves and Detection Limits for the Components in Eye Lotion

Component	Analytical Mode	Correlation Coefficient (γ)	Concentration range ($\mu\text{g/ml}$)	Coefficient of variation (%) ($n=3$) [concentration]	Detection limit ($\mu\text{g/ml}$) (S/N=3)
VB ₆	CZE (pH 10) Area Ratio	0.999	50–250	2.0 [100 $\mu\text{g/ml}$]	0.6
CM	CZE (pH 10) Area Ratio	0.994	50–250	3.0 [100 $\mu\text{g/ml}$]	0.8
AL	CZE (pH 10) Area Ratio	0.999	100–500	2.9 [200 $\mu\text{g/ml}$]	1.0
DG	CZE (pH 10) Area Ratio	0.995	250–2 500	4.7 [500 $\mu\text{g/ml}$]	20
TA	CZE (pH 10) Area Ratio	0.998	500–6 000	6.7 [1 000 $\mu\text{g/ml}$]	50
NM	CZE (pH 10) Height Ratio	0.999	10–50	5.6 [20 $\mu\text{g/ml}$]	1.5
NH	CZE (pH 10) Height Ratio	0.999	5–25	1.2 [10 $\mu\text{g/ml}$]	0.8
VB ₁₂	MEKC (pH 10) Area Ratio SDS 40 mM	0.992	50–250	2.6 [100 $\mu\text{g/ml}$]	1.4
CS	CZE (pH 9) Area	0.999	500–10 000	6.1 [1 000 $\mu\text{g/ml}$]	100

TABLE II. Contents of Components in Commercially Available Eye Lotions

Eye lotion	Component of eye lotion																	
	VB ₁₂		VB ₆		NM		CM		AL		NH		DG		CS		TA	
	mean ^{a)}	C.V. ^{b)}	mean	C.V.	mean	C.V.	mean	C.V.	mean	C.V.	mean	C.V.	mean	C.V.	mean	C.V.	mean	C.V.
A	21.7 (20) ^{c)}	3.3	104 (100)	1.2	2.04 (2)	3.1	10.1 (10)	2.0			2.05 (2)	3.2	107 (100)	3.7			96.4 (100)	6.4
B	10.2 (10)	0.7	103 (100)	2.9	2.02 (2)	2.6	9.95 (10)	8.3					107 (100)	0.6			99.5 (100)	7.5
C	20.3 (20)	3.0			2.16 (2)	0.9	20.7 (20)	0.9							101 (100)	3.3	544 (500)	1.8
D			102 (100)	5.4	2.20 (2)	1.3			107 (100)	3.0			110 (100)	4.5				
E					5.18 (5)	0.5	30.3 (30)	3.1									1 010 (1 000)	4.0
F			99.5 (100)	2.2	1.26 (2)	6.2	20.9 (20)	2.0	98.5 (100)	1.7			52.9 (50)	6.8	105 (100)	4.1	487 (500)	0.8
G							28.3 (30)	3.4					265 (250)	1.6			964 (1 000)	5.8
H							30.0 (30)	3.5					255 (250)	3.2				
I									103 (100)	3.4	2.72 (3)	2.0						

a) mg/100 ml.

b) Coefficient of variation (%; $n=3$).

c) The values in the parentheses show contents claimed (mg/100 ml).

引用文献

- 1) G. Andermann, A. Richard, *J. Chromatogr.*, **298**, 189 (1984).
- 2) E. Vidal-Ollivier, G. Schwadrohn, R. Elias, G. Balansard, A. Babadjamian, *J. Chromatogr.*, **463**, 227 (1989).
- 3) M. Zenki, J. Ohtani, T. Ikeda, K. Toei, *Chem. Lett.*, 885 (1990).
- 4) S. Akiyama, K. Nakashima, K. Yamada, N. Shirakawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 3171 (1991).
- 5) F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th.P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **169**, 11 (1979).
- 6) J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, **218**, 209 (1981); *Idem*, *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- 7) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- 8) 岩上正藏, 沢辺善之, 中川照眞, *生薬*, **45**, 232 (1991); *Idem*, *生薬*, **46**, 49 (1992); *Idem*, *生薬*, **46**, 339 (1992).
- 9) 岩上正藏, 沢辺善之, 中川照眞, 第22回生薬分析シンポジウム講演要旨集, 大阪, 1993年11月, p.15.
- 10) 岩上正藏, 沢辺善之, 中川照眞, *生薬*, **47**, 222 (1993).
- 11) S. Fujiwara, S. Honda, *Anal. Chem.*, **59**, 2773 (1987).
- 12) H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, *J. Chromatogr.*, **465**, 331 (1989).