ケノデオキシコール酸製剤の比較試験^{*1}

永谷 薫, 大石輝雄, 本家忠治, 品川龍太郎, 高田晶子, 高木有美

マツダ株式会社マツダ病院薬局^{*2}

Comparative Study of Chenodeoxycholic Acid Preparations

KAORU NAGATANI, TERUO OOISHI, TADAHARU HONKE,
RYUTARO SHINAGAWA, SYOKO TAKATA, and YUMI TAKAKI

Pharmacy Section, Mazda Hospital of Mazda Co., Ltd.

(Received November 12, 1984)

Three brands of chenodeoxycholic acid (RE, CH, CO) were compared by the following tests: net weight variation, content uniformity (by neutralization titration and HPLC methods), dissolution, impurity content (determination of ursodesoxycholic acid and cholic acid by HPLC, and of acetic acid ethyl ester and ethanol supposed to be residual solvents by gas chromatography), and cholesterol solubilization in vitro.

The results are as follows: 1) All the 3 preparations showed little weight and content variations, suggesting their exact filling amount; especially, RE indicated the smallest content of vehicle and the lowest deviation. 2) RE showed the most rapid dissolution, while CH and CO seemed to dissolve slowly, because they were filled by compression in #3 capsules. 3) Ursodesoxycholic acid and cholic acid were detected as impurities in the 3 preparations, and acetic acid ethyl ester in CH and CO. The quantities of these impurities were minute. 4) No difference in cholesterol solubilization was found among the 3 preparations.

Keywords—chenodeoxycholic acid preparations; comparative test; weight; content; dissolution; impurities; cholesterol solubilization; HPLC; residual solvent; gas chromatography

ヒトを始め, 多くの哺乳動物の胆汁中に認められる主要な胆汁酸の一つであるケノデオキシコール酸(CDCA)が経口投与によりコレステロール胆石の溶解効果を示す¹⁾ことから, その有用性が認められて CDCA 製剤の開発が進められ, 最近国内でも 100 mg カプセル剤として3メーカーから同時発売された。中野ら²⁾はそれらの製剤間差異について検討報告を行っているが, 著者らもこれらの追試を行うと同時に, コレステロール可溶化についても検討し, 若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

試料として表1に示す3品目5 Lotを用いた。3者とも CDCA 100 mg を含有する3号硬カプセル剤で, Lot No. DH01 のみが2号カプセルであった。ただし DH01 については溶出試験での参考試料とし, CH の場合は2 Lot の平均値でその結果を示した。

表 1. 試 料

試料名	ロット番号	剤 型	使用期限
RE	2603	硬カプセル3号	S.60. 8
CH	WWW4	"	S.62. 6
	YH14	"	S.62.12
CO	DP05	"	記載なし
	DH01	硬カプセル2号	"

^{*1} 本報は昭和58年度日本薬学会中国四国支部大会(高知市)で発表。

^{*2} 広島県安芸郡府中町青崎南2-15; 2-15, Aosaki-Minami, Fuchu-cho, Aki-gun, Hiroshima, 735 Japan

2. 内容重量偏差試験

JP X の硬カプセル内容物の重量偏差試験法に準じて、20個につき内容重量を電子天秤（ザルトリウス；2007-MP6）で精秤し内容重量偏差を求めた。

3. 含量偏差試験

JP X の含量均一性試験法に準じて、含量偏差を求めた。なお含量は中和滴定法と高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により測定した。

①中和滴定法；JP X のウルソデスオキシコール酸（UDCA）の定量法に準じて、1カプセル当たりの0.1N NaOH 液の消費量を求め、下記の式により CDCA 量を算出した。なお CDCA 原末（山之内製薬提供；Lot No. S-1）についても同様に操作した。

$$\text{CDCA (mg)} = 0.1\text{N NaOH消費量 (ml)} \times 39.258\text{mg}$$

ただし、この場合は混在する UDCA とコール酸(CA)が同時に測定されている（不純物の項より最大0.7%）可能性がある。また CDCA 原末はメーカー測定値99.0%となっている。

②HPLC 法；Nanbara ら^{3,4)}の胆汁酸塩定量法に準じた。ただし検出はUV検出器⁵⁻⁷⁾によった。すなわち1カプセルの内容物にエタノール10mlを加え5分間振とう、0.1% エストリオール液0.5mlを混和、0.22 μm フィルター（ミリポア社；MILLEX-GS）でろ過、ろ液を検液として表2に示す測定条件で注入、試料のエストリオールに対するピーク高さ比を CDCA 原末のピーク高さ比の相対値として求め、CDCA 量を算出した。

4. 溶出試験

JP X の顆粒剤崩壊試験装置を用い溶出試験を試みた。すなわち1カプセルずつを6個の補助筒に入れ、予め37±2°Cで加温した溶出液（pH 7.5）800mlに浸し、振幅55 mm、ストローク数30回/分で崩壊試験と同様に操作後、一定時間毎に2mlを採取、0.22 μm フィルターでろ過、その1mlに10倍希釈リン酸液1滴を混和（pH

4.0）、さらにエタノール1ml、0.001% エストリオール液0.4mlを加え検液とし、HPLC 法で CDCA 量を定量した。なお、肉眼的に完全崩壊後、さらに30分間溶出した時（この時点から溶出曲線はプラトーとなる）の値を100（T₁₀₀値とする）としてその溶出率を算出した。また HPLC 法による各試料の CDCA 平均含量に対する T₁₀₀ 値を最大溶出率（T_{max} とする）とした。

5. 不純物検出、定量試験

不純物として、メーカー情報等により UDCA, CA, 酢酸エチル、エタノール等を想定し、UDCA と CA は Nanbara ら³⁾の方法に準じて、酢酸エチルとエタノールはガスクロマトグラフ（GC）法により検出、定量した。

① UDCA と CA の定量；試料5カプセルの内容物にエタノール15～25 mlを混和、5分間振とう後0.22 μm フィルターでろ過、ろ液に0.001% エストリオール液を混和（CDCA：エストリオール＝2500～5000：1）、その15 μlを表2の測定条件（ただし移動相比率は0.3%炭酸アンモニウム液：アセトニトリル＝90：31）で注入、得られる試料のピーク高さ比から下記の式により1000カプセル中 UDCA、および CA 量を求めた。別に標準品として、市販錠剤ウルソ 100（東京田辺；UDCA 98.0%以上含有）、およびコール酸（片山化学；6351）を用い、同条件下でエストリオールに対するピーク高さ比を求めた。

$$\text{標準品量} \times 200 \times \text{試料ピーク高さ比} / \text{標準品ピーク高さ比}$$

② 酢酸エチルとエタノールの定量；試料10カプセルの内容物にジメチルホルムアミド（D.M.F.、岩井化学特級）25 mlを混和し、10分間振とう、遠沈（6000rpm、10分）後、上澄液5 μlを表3に示すGC法の測定条件で注入し、絶対検量線法により定量した。別に0.005%v/v 酢酸エチル（和光特級、再留）/D.M.F.液、および

表2. HPLC による CDCA の定量条件

使用機器	Waters Model 440
検出器	紫外線吸光度計 (測定波長 214nm)
感度	0.005～0.02 AuFS
カラム	Radial Pack C ₁₈
温度	室温 (27±2°C)
移動相	0.3% 炭酸アンモニウム 90 アセトニトリル 40
流速	2.0 ml/min
内部標準物質	エストリオール

表3. GC による酢酸エチルおよびエタノールの定量条件

使用機器	Simadzu GC-4BPTF
充てん剤	15% PEG 1500/Chromosorb WAW DMCS 60～80 mesh
カラム	3 mm × 1.9 m
カラム温度	70°C
注入温度	170°C
検出温度	170°C
キャリアーガス	N ₂ 80 ml/min
検出器	F. I. D

0.005 ν /v%エタノール/D.M.F.液を標準品として用いた。

6. コレステロール可溶化力試験

Furusawa ら,⁸⁾ および Holzbach ら⁹⁾ の方法に準じて各試料のコレステロール可溶化力を測定した。すなわちコレステロール (片山化学特級) 0.3g, レシチン (片山化学) 0.3g, 1N NaOH 液 5 ml, 0.9% NaCl 液 95ml を混和, ホットプレート付きマグネチックスターラ (三田理研) にて, 37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 10分間攪拌 (450 rpm) 後, 試料10カプセルの内容物を投入, 一定時間攪拌反応させ, その1ml を採り, 流水で冷却 (5分間), 0.22 μ m フィルターでろ過, ろ液中の可溶コレステロールを酵素法¹⁰⁾ (日立自動分析機 726 型による) により定量した。

7. その他

特に明記していない試薬は和光純薬特級品を用いた。

試験結果と考察

1. 内容重量

各試料とも内容重量偏差試験を3回試行した結果を表4に示した。

3者とも JP X のカプセル内容重量偏差試験の規定に適合し, 変動係数も小さく, 正確に充てんされていた。特に RE は平均重量において他製剤の 2/3 程度であり, 賦形剤は最も少なく, 変動係数も F 検定の結果から最小と推察される。なお変動係数の相違はその充てん量から判断して圧縮率の差^{11,12)}によると思われる。

2. HPLC 法の測定条件

胆汁酸塩の HPLC による定量法は数多く報告^{3-7,13-16)}されているが, 当院の現有機器の関係上, 検出器は紫外

表 4. カプセル内容重量比較 (1 Cap 中) N=20

試料名	内容重量 (mg)*1	変動係数 (%)**2
RE	168.5 $\pm$ 1.0	0.62
	167.7 $\pm$ 1.2	0.73
	167.1 $\pm$ 1.0	0.63
CH	253.8 $\pm$ 7.5	2.95
	251.9 $\pm$ 9.1	3.62
	249.7 $\pm$ 8.4	3.36
CO	251.4 $\pm$ 4.7	1.87
	249.4 $\pm$ 5.6	2.25
	248.2 $\pm$ 5.6	2.24

*1 平均値 $\pm$ 標準偏差 (mg)

*2 分散の検定

分散比 $F_s = CO/RE < F(n_1=59, n_2=59, 0.01)$

〃 $= CH/CO < F(n_1=59, n_2=59, 0.01)$

図 1. 各試料のクロマトグラム
(I.S. = 内部標準物質)

図 2. CDCA の検量線

線吸光度計 (波長 214nm) とし, その他の測定条件を検索した結果, 表 2 に示す条件下で図 1 に示すように各試料とも分離良好なクロマトグラムが得られ, また図 2

に示すように CDCA 濃度 (0.2mg~10mg/ml) とピーク高さ比に直線性を認めた。

3. 含量

内容物に中和エタノールを直接混合し、滴定する前処理なしの中和滴定法の場合、試料中の賦形剤によって終末点が不明瞭となるため、アセトン抽出による前処理を行ったが、CH と CO からはアセトンにより大量の賦形剤が抽出され、同様に終末点の明確な判定はできなかった。したがって HPLC 法による定量も試み、その結果を表5に示した。

表5には前処理なしの中和滴定法による結果も示したが、各試料の1カプセル中含量は、混在する UDCA, CA 量を考慮しても、ほぼ 100mg であり、終末点が不明瞭にもかかわらず小さい偏差であった。しかし HPLC 法によると含量において CO と他2者間に有意差が認められ、偏差は中和滴定法の結果より大きくなった。すなわち、中和滴定法は5滴 (CDCA 約10mgに相当) の範囲内での終末点の判定は人的要素が強く影響すること、また HPLC 法での測定誤差 (3.61%であった) が大きいことなどが、これらの相違の原因になったと考えられる。なお試料をいったん乳鉢内で泥状とし、エタノール抽出する方法でも同様の結果が得られた。また CDCA 原末に対する市販 CDCA 純末 (東京化成; AT02) のピーク高さ比は98.8%であったために原末を標準品として用いた。しかし本品にも CH と同程度の UDCA と CA が混在していたが、HPLC 法での測定誤差範囲内であるため定量値の補正は行っていない。

4. 溶出試験

各試料の充てん量、結晶形^{3,17)}が異なるため崩壊性、溶出性にも差があると考えられたので崩壊試験器を用いて崩壊状態を観察するとともに溶出曲線を作成した。なおカプセル剤崩壊試験装置ではカプセル内容物が網目よ

表5. CDCA 定量結果 N=10

試料名	中和滴定法(mg)*1	HPLC法(%)*2
CDCA原末	99.6±1.0(100 mg)	—
RE	100.0±1.9(1 Cap 中)	101.8±3.6*3
CH	101.0±2.9(")	104.3±4.2*3
CO	103.0±2.3(")	109.2±5.5*3

*1 CDCA 量の平均値±標準偏差 (mg)

*2 CDCA 原末を 100 とした時の 1 Cap 中の
相対平均値±標準偏差 (%)

*3 平均値の t 検定

RE: CH $t_0=1.564 < t$ (9, 0.05)

RE: CO $t_0=3.881 > t$ (9, 0.01)

CH: CO $t_0=2.456 > t$ (9, 0.05)

表6. 最大溶出率 (T_{max})

N=3

試料名	T_{max} (%)*
RE	100.5 ± 2.6
CH	97.7 ± 1.2
CO	97.0 ± 1.8

* 崩壊が完了した時点から30分後の
溶出 CDCA 量 / 各試料の平均
CDCA 量 × 100

図3. 各試料の溶出曲線 (日局崩壊試験装置による.)
溶出率; 3回の平均値

り6分以内に落下、沈降するため、溶出試験を行うには再現性が乏しいと考えられたので顆粒剤崩壊試験装置を用いた。また溶出液として JP X の第2液 (pH 6.8) を用いた時の T_{max} は80%前後であり、JP IX の第2液 (pH 7.5) では97%以上 (表6参照) となるため、溶出液 pH は7.5とした。

溶出曲線を図3に示したが、RE は最も溶出が速く、CH, CO の順であった。しかし CO の Lot No. DH01 の溶出曲線は RE とほぼ同様のパターンを示すことから、CH と CO の2者の溶出の遅れは、それらが3号カプセルに圧縮充てんされていることにも原因があると思われる。すなわち、肉眼的観察においても RE は6.5分以内に崩壊するが、CH と CO は内容物が軟塊となり容易に崩壊せず、ほぼ完全に崩壊するには CH 25分、CO 46分を要した。結晶の粒子径の差異が CDCA の溶解速度に影響するとの報告¹⁸⁾もあるが、この崩壊性不良が溶出の遅れの主たる要因と考えられる。

5. 不純物

CDCA は CA を原料とし、精製過程での有機溶媒の使

用, また製剤工程での各種添加剤の混合によって, 何らかの不純物の混入が考えられ, 中野ら²⁾も残留溶媒量に製剤間差があると報告している. したがって不純物として異性体の UDCA, 原料の CA, 溶媒の可能性が高い酢酸エチルとエタノールの4者を標的物質として, その検出, 定量を試みた. UDCA と CA のピークを分離するために表2の条件で移動相比率を種々検討した結果, 実験の項に示した混合比で, 図4に示すように分離良好でシャープなピークが得られ, 標準品を用いての各濃度とピーク高さ比は直線関係にあった. なお市販 UDCA 純末(東京化成; DR02)は CA の混合割合が高いため, CA ピークのほとんど認められなかった市販錠剤ウルソ 100(東京田辺)を用いて UDCA 標準液(ウルソ 100 の6錠を粉末とし, その5錠相当分を秤量, エタノール25mlを混和後, 0.22 μ m フィルターでろ過)を調製した. また酢酸エチルとエタノールは常法に従って, 種々の検討を加え, GC による検出, 定量を試みた.

表3に示す測定条件で酢酸エチルとエタノールの標準液を注入したとき, 図5に示すように分離良好であり, これらの濃度(酢酸エチル, エタノールともに0.01~0.3 μ l/ml)とピーク高さ比に直線性が得られた. なお酢酸エチルの定量は表2の条件下で移動相にメタノール3+リン酸緩衝液(pH 3.0) 9を用いても可能であった

図4. CA と UDCA のクロマトグラム
(CDCA 定量条件に準じる.)
移動相比率は0.3% 炭酸アンモニウム:アセトニトリル=90:31

図5. 酢酸エチルとエタノールのクロマトグラム

表7. 不純物の量(1000 Cap 中)

試料名	酢酸エチル(ml) N = 3	UDCA(g)*1 N = 6	CA(g)*2 N = 6
RE	<0.01	0.05 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.17
CH	0.44 $\pm$ 0.31	0.29 $\pm$ 0.21	0.13 $\pm$ 0.06
CO	0.36 $\pm$ 0.16	0.19 $\pm$ 0.12	0.15 $\pm$ 0.04

*1 検出限界は 0.02 g/1000 Cap

*2 " 0.01 g/1000 Cap

が, 各種ピークが出現するため, 単純ピークの得られたGC法を採用し, これらの結果を表7に示した.

UDCA と CA は3者とも存在するが, 酢酸エチルはCH と CO の両者に認められ, RE からは検出されなかった. しかし残留酢酸エチル量^{2,19)}は最高でも1000カプセル中約 0.8 ml を含有するにすぎず, 経口摂取時の毒性²⁰⁾から推察すると無視できる量であり, またエタノールは各試料ともに検出されなかった. なお本実験過程で標的物質以外のピークが各試料に1~2個認められたため, 今後の検討課題とする.

6. コレステロール可溶化力

CDCA 製剤はコレステロール胆石溶解作用のみならず、胆石形成の要因^{21,22)}の排除力によっても評価されなければならないが、本実験では溶解作用について、*in vitro* で実験可能な方法で CDCA 活性を調べた。すなわち、胆汁酸のような界面活性物質は *in vitro* でのコレステロール可溶化力が強く、²³⁾ 特に CDCA がコレステロール可溶化力に大きく影響^{24,25)}するとされている。また可溶コレステロール量は CDCA 塩濃度に比例^{8,26)}することから、各試料の CDCA 活性の比較のために、*in vitro* でのコレステロール可溶化力を測定した。なお反応液組成は生体内の胆汁酸組成^{21,27)}とは異なるが、コレステロールを約6倍量として、Furusawa ら^{8,28)}に準じ、反応温度は Holzbach⁹⁾らと同様に 37°C ^{24,25,28)}とした。また未溶解コレステロールの除去には遠沈法、マイクロフィルターを用いる方法などが報告されている⁸⁾が、本報では簡便な $0.22\mu\text{m}$ フィルター⁹⁾を用いた。

まず CDCA 原末を用いてコレステロール可溶化力試験を試みた結果、図6に示すように可溶コレステロール量は CDCA 量と比例関係が得られた。なお、コレステロール可溶化に与えるレシチン量の影響についても調べたが、CDCA 量を一定とし、レシチン量を増加すると可溶コレステロール量はわずかに増加した。しかし、レシチン不在の場合でも CDCA 量と可溶コレステロール量は比例し、図6より低い値で直線性が得られた。²⁶⁾ すなわちレシチンは *in vitro* での試験において影響は小さいと考えられる。また各試料のコレステロール可溶化力比較試験の結果を図7に示したが、製剤間差異は認められず、3者とも1時間以内に最大値に達した。反応時間を数時間とした報告もあるが、Furusawa ら⁸⁾も指摘しているように、最大値に達した後は徐々に低下傾向にあり、

図6. CDCA 濃度と可溶コレステロール量の関係

図7. コレステロール可溶化力の比較
可溶コレステロール量; 2回の
平均値

た。なおレシチン不在下では最大値到達時間は遅くなり、10%程度の低い値を示した。

結 論

1. 各試料とも内容重量偏差、および含量偏差は小さく、規定量が正確に充てんされていた。特に RE は賦形剤が他製剤の2/3量であり、偏差も最小であった。
2. 溶出は RE が最も速やかで、CH, CO の順であるが、この原因として CH, CO の2者は3号カプセルに圧縮充てんされている関係上、崩壊性不良となるためと考えられた。
3. 不純物として RE から UDCA と CA が検出され、他2者から UDCA と CA 以外にも酢酸エチルが検出されたが、いずれも無視できる程度の量であった。
4. *in vitro* でのコレステロール可溶化力は製剤間差異が認められなかった。

謝辞 本実験において、コレステロール測定にご協力をいただいた当院病理検査室諸氏、および試供品、CDC A 原末を提供されたエーザイ、山之内製薬、東京田辺の各社に深謝いたします。

文 献

- 1) R.G. Danzinger, A.F. Hofmann, L.J. Schoenfield, and J.L. Thistle: New Eng. J. Med., 286, 1 (1972).
- 2) 猪爪信夫, 本田義輝, 從二和高, 岩奥玲子, 中野真汎: 病院薬学, 10, 254 (1984).
- 3) Junichi Goto, Masatoshi Hasegawa, Hiroaki Kato and Toshio Nambara: Clinica Chimica Acta, 87, 141 (1978).
- 4) Kazutake Shimada, Masatoshi Hasegawa,

- Junichi Goto and Toshio Nambara : J. Chromatogr., **152**, 431 (1978).
- 5) Keisuke Maruyama, Hiroshi Tanimura and Yorinori Hikasa : Clinica Chimica Acta, **100**, 47 (1980).
- 6) Fumio Nakayama, Mitsuru Nakagaki : J. Chromatogr., **183**, 287 (1980).
- 7) N.A. Parris : J. Chromatogr., **133**, 273 (1977).
- 8) Teiji Furusawa, Terutsugu Nakama, Tetsuo Hisadome, and Hideaki Itoh : Gastroenterologia Japonica, **11**, 356 (1976).
- 9) R.T. Holzbach, Mitsuko Marsh, Monica Olszewski, and Keith Holan : J. Clin. Invest., **52**, 1467 (1973).
- 10) C.C. Allain, L.S. Poon, C.S.G. Chan, W. Richmond, and P.C. Fu : Clin. Chem., **20**, 470 (1974).
- 11) 高木敬次郎, 杉原正泰, 木村真太郎 : 薬剤学, **29**, 245 (1969).
- 12) 三宅康夫, 篠田愛信, 那須輝義, 古川征治, 上杉恵三, 星勝之助 : 薬剤学, **34**, 32 (1974).
- 13) Kazutaka Arisue, Zensuke Ogawa, Kazuma Kohda, Chozo Hayashi, and Yasuo Ishida : Japan J. Clin. Chem., **9**, 104 (1980).
- 14) Roger Shaw, William H. Elliott : Analytical Biochemistry, **74**, 273 (1976).
- 15) C.A. Bloch, J.B. Watkins : Journal of Lipid Research, **19**, 510 (1978).
- 16) Sumihiko Okuyama, Nobuhiko Kokubun, Sa-
kae Higashidate, Daisuke Uemura, and Yoshi-
masa Hirata : Chemistry Letters, 1443 (1979).
- 17) 日本薬剤師会雑誌, 1982年10月.
- 18) G.P. van Berge-Henegouwew, A.F. Hofmann, and T.S. Gaginella : Gastroenterology, **73**, 291 (1977).
- 19) 野田浩司, 峯本正夫, 王利一也 : 薬剤学, **44**, 128 (1984).
- 20) a) "Clinical Toxicology of Commercial Products," 3 ed. The Williams & Wilkins Company, p. 66.
b) 米国国立労働安全衛生研究所編 : "化学物質毒性データ総覧," 日本メディカルセンター, p.20.
- 21) W.H. Admirand, D.M. Small : J. Clin. Invest., **47**, 1043 (1968).
- 22) G. Nicolau, S. Shefer, G. Salen, and E.H. Mosbach : J. Lipid. Res., **15**, 94 (1974).
- 23) M.C. Carey, D.M. Small : Arch. Intern. Med., **130**, 506 (1972).
- 24) Tadashi Tateyama, Takashi Matsushiro : Tohoku J. Exp. Med., **133**, 467 (1981).
- 25) 松代隆, 長嶋英幸, 山本協二, 針生常郎, 立山正 : 最新医学, **37**, 1959 (1982).
- 26) Tetsuo Hisadome, Terutsugu Nakama, Hideaki Itoh and Teiji Furusawa : Gastroenterologia Japonica, **15**, 257 (1980).
- 27) M. Bourges, D.M. Small and D.G. Dervichian : Biochim. Biophys. Acta, **144**, 189 (1967).
- 28) W.M. Sperry, Merrill Webb : J. Biol. Chem., **187**, 97 (1950).