散剤中ヒドロコルチゾンの簡易試験^{*1}

児山知典, 岡本光美, 二村昭辰, 後藤滋夫, 玉置誠吾

岐阜県立多治見病院薬剤部^{*2}Simple Test of Hydrocortisone in Powdered Preparations^{*1}TOMONORI KOYAMA, MITSUYOSHI OKAMOTO, AKIYOSHI FUTAMURA,
SHIGEO GOTO, and SEIGO TAMAOKIDepartment of Pharmacy, Gifu Prefectural Tajimi Hospital^{*2}

(Received October 31, 1985)

A thin-layer chromatographic method for the determination of hydrocortisone in powdered preparations after the treatment of hydrocortisone with sulfuric acid is described. After developing with chloroform/methanol (85:15 v/v), silica gel plates were dried, sprayed with sulfuric acid solution, and heated. Hydrocortisone spot on the chromatogram was measured with a TLC densitometer equipped with a dual-wave length TLC scanner at λ_{EX} 380 nm, λ_{EM} 550 nm.

Keywords—hydrocortisone; thin layer chromatography (TLC); simple test; clinical applications on hospital pharmacy

はじめに

ヒドロコルチゾン (HC) は副腎皮質ホルモンのひとつである。そして HC は抗炎症作用, 抗アレルギー作用などの生理作用を有するため, 臨床等に使用されている。¹⁾ また, 院内での調剤後の製剤中 HC の監査の目的で, 薄層クロマトグラフィー (TLC) が簡易な有効手段と考え, 著者らは病院薬学の臨床応用に TLC を用いる基礎研究を報告している。²⁻⁶⁾ 一方, 上原ら⁷⁾ はプレドニゾロンに硫酸を噴霧させ螢光を発生させ TLC により定量する方法を報告している。今回, 著者らは HC の不飽和ステロイドの硫酸反応に着目し, TLC プレート上で HC を分離し, 硫酸を作用させ簡易に定性, 定量する方法を検討した。

実験方法

1. 試薬および試料

HC 標準品は東京化成製を使用した。TLC プレートは

メルク社製 Silica gel 60 precoated plate (Art. 5724) を使用した。その他の試薬および試液は特級品をそのまま使用した。

2. 装置および器具

TLC 測定は島津 C-R1A 型クロマトバックを装備した島津 2 波長クロマトキャナ CS-910 型を用いて行った。スポッティングは Pipetman P 20 (Gilson) を用い, 1-10 μ l の一定量をスポットした。

3. TLC の条件

クロロホルム-メタノール (85:15 v/v) で展開したプレートは溶媒を十分に揮散させたのち, 日局希硫酸を均一に噴霧し, 100°C 5 分間加熱, 呈色後, λ_{EX} 380 nm, λ_{EM} 550 nm とし測定した。

結果および考察

1. 螢光スポットの反応条件

HC の一定量 (20 ng) を, TLC プレートにスポット後, 反応時間を一定 (5 分間) として, 反応温度を 60-120°C と変化させ検討した結果, 90°C 以上で反応させれば一定の螢光強度が得られたため, 反応温度条件を 100°C とすることとした。

^{*1} 東海薬剤師学会学術大会 (名古屋市, 1984 年) で発表。

^{*2} 多治見市前畑町 5-161; 5-161, Maehata-cho, Tajimi-shi, 507 Japan

一方、反応温度を一定 (100°C) とし、反応時間を 0.5—10 分間と変化させ検討した結果、反応時間を 4 分間以上とすれば、一定の蛍光強度が得られたため、反応時間条件を 5 分間とすることとした。したがって、蛍光スポットの反応条件は反応温度 100°C 、反応時間 5 分間で行うこととした。なお、この蛍光スポットの安定性は、冷暗所保存で 2 週間以上安定であった。

2. 蛍光スポットの測定条件

励起波長を一定 (360 nm) とし、蛍光波長について蛍

光フィルターを 400—600 nm と変化させたとき、Fig. 1 にみられるように 550 nm 付近で最も強い蛍光が観察されたので、蛍光波長を 550 nm に設定することとした。

一方、蛍光波長を 550 nm に固定し、励起波長を 300—400 nm と変化させた時、Fig. 2 にみられるように、380 nm 付近で強い蛍光が観察されたので励起波長は 380 nm とすることとした。

これらの結果より、蛍光スポットの測定は λ_{EX} (励起波長); 380 nm, λ_{EM} (蛍光波長); 550 nm の条件で測

Fig. 1. Relationship between Wavelength and Fluorescence Intensity on the Sulfuric Acid Treatments of Hydrocortisone
Ex: 360 nm

Fig. 2. Relationship between Wavelength and Fluorescence Intensity on the Sulfuric Acid Treatments of Hydrocortisone
Em: 550 nm

Fig. 3. Dependence of R_f on Mobile Phase Composition (Chloroform-Methanol Mixtures) for Hydrocortisone

Fig. 4. Thin-layer Chromatograms on the Sulfuric Acid Treatments of Hydrocortisone

定することとした。

3. 展開溶媒の検討

HC の TLC 上のクロマト挙動をクロロホルムにメタノール、エタノール、もしくはアセトニトリルを添加して検討した結果、クロロホルム-メタノール系を採用することとした。Fig. 3はクロロホルム-メタノール系における HC の蛍光スポットの R_f 値を示す。展開溶媒は共存物質との分離を考慮しクロロホルム-メタノールの組成比を 85 : 15 v/v% とすることとした。

Table 1. Analytical Results of Hydrocortisone Contents of Commercial Tablets*

Sample No.	Hydrocortisone found mg/tablet
1	10.02
2	9.97
3	10.01
4	9.94
5	10.04

* Labeled amount : hydrocortisone 10 mg per tablet

4. 検量線の作成

HC 標品の 5—30 μg/ml 相当をそれぞれ含む溶液をメタノールに溶解し、TLC プレートにスポット後、実験方法 3 の条件下で測定した結果、10—30 ng の範囲で相関係数 0.9939 を示した (n=6)。その実験の一例を Fig. 4 および Fig. 5 に示す。

5. 定量精度の検討

HC 標品メタノール液 (10 μg/ml) 各 2 μl を同一 TLC プレートに 8 点スポットし、実験方法 3 の条件下、蛍光スポット強度を測定した結果、変動係数は 2.42% であった。

6. 製剤中 HC の定量

処方された製剤中 HC 約 10 mg 相当量を精秤し、メタノールを加えて溶解し、ろ過後、メタノールにて正確に 100 ml とした。この液 5 ml を正確に量り、メタノ

Fig. 5. Comparative Densitometric Recording on the Sulfuric Acid Treatments of Hydrocortisone
HC : hydrocortisone

ールを加え正確に 50 ml とした。この溶液 1 μ l ずつを TLC プレート上にスポットし、実験方法 3 の条件下、定量した結果を Table 1 に示す。

以上のように、本法は HC 院内処方製剤の調剤監査に簡易試験法として使用可能なことが示唆された。

参 考 文 献

- 1) “第十改正日本薬局方解説書,” 広川書店, 東京, 1981, p. C-1330.
- 2) Mitsuyoshi Okamoto, Fujizo Yamada, and Takeshi Omori : “Advances in Chromatography, 1982,” Edited by A. Zlatkis, Elsevier, Amsterdam, 1982, p.177.
- 3) Mitsuyoshi Okamoto, Fujizo Yamada, and Takeshi Omori : *Chromatographia*, **16**, 152(1982).
- 4) 岡本光美, 松井建次, 山田不二造, 野口 衛 : 薬誌, **102**, 1099 (1982).
- 5) Mitsuyoshi Okamoto, Fujizo Yamada, and Takeshi Omori : *Journal of HRC & CC*, **5**, 163 (1982).
- 6) 上原真一, 宮武ノリエ, 重岡捨身, 風間成孔, 秋山和幸 : 東京衛研年報, **33**, 90 (1982).