Jpn. J. Hosp. Pharm.
17(5) 347-352 (1991)

院内製剤アザチオプリン注射剤の調製とその安定性

片桐義博, 馬淵和英, 岩本喜久生

島根医科大学医学部附属病院薬剤部†

Preparation and Stability of Azathioprine Injection

YOSHIHIRO KATAGIRI, KAZUhide MABUCHI, and KIKUO IWAMOTO

Department of Pharmacy, Shimane Medical University Hospital†

(Received March 14, 1991)

Azathioprine injection was prepared as an immunosuppressive dosage form for organ transplantation. The stability of azathioprine in the injection was investigated under various sterilization and storage conditions. The amount of azathioprine was determined by high-performance liquid chromatography. The amount of azathioprine in the injection decreased slightly after autoclaving but any significant difference was not observed among three sterilization conditions such as 115°C for 30 min, 121°C for 20 min and 126°C for 15 min. Azathioprine in the injection which was autoclaved at 115°C for 30 min was completely stable under subsequent storage at room temperature on exposure to light for 4 weeks. The present azathioprine injection was found to be useful as an immunosuppressive agent for organ transplantation.

Keywords—azathioprine; immunosuppressive agent; injection; content; stability; hospital preparation

緒 言

アザチオプリンは、腎移植後の免疫抑制を目的として長期投与がなされ、その有効性が認められている。新しい免疫抑制剤としてシクロスポリンが開発され、臓器移植後の拒絶反応抑制にはシクロスポリンが用いられることが多くなってきている。しかし、シクロスポリンは血中濃度が上昇すぎると腎および肝臓障害の発生頻度が高くなることが知られている¹⁻³⁾。そこで、これらの副作用を軽減化する目的でアザチオプリンあるいはステロイド剤を併用し、シクロスポリンの投与量を極力少なくしようとする試みが、腎移植⁴⁻⁶⁾ および肝移植後⁷⁻⁹⁾ の拒絶反応の抑制のために行われ

ている。

最近、わが国においても新たに幼・小児に対して生体部分肝移植も行われるようになってきている。この生体部分肝移植後の拒絶反応抑制においては、肝毒性の強いシクロスポリンの投与量を減少させるためアザチオプリンの併用が必要であり、臨床の場からアザチオプリン注射剤の院内製剤化が強く要望されている。外国においては、すでにアザチオプリンの注射剤が市販されているが、国内では経口剤のみが市販されている。

今回、著者らはアザチオプリン注射剤を調製し、オートクレーブによる滅菌時、およびその後の保存期間中におけるアザチオプリンの残存量を測定し、その安定性について検討した。

† 島根県出雲市塩冶町89-1; 89-1, Enya-cho, Izumo-shi, 693 Japan

実験方法

1. 試薬及び使用薬品

アザチオプリン標品はナカライテスク(株)製を、p-アミノ安息香酸は和光純薬製を用いた。生理食塩液は局方品(大塚製薬)を、移動相溶媒は高速液体クロマトグラフ用試薬(和光純薬)を使用した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

2. 0.2%アザチオプリン注射剤の調製

注射剤の調製法はイムラン注射剤(凍結乾燥製剤)を参考にした¹⁰⁾。Table 1 にアザチオプリン注射剤の製剤処方を示した。アザチオプリン 200 mg を採り、生理食塩液 8ml に懸濁させ、1N NaOH 0.72ml (アザチオプリンと等モル量)を添加してアザチオプリンを溶解し、生理食塩液を加えて全量100mlとした。この溶液をメンブランフィルター(マイレクス GV, 0.22 μ m)でろ過し、5ml ずつ透明アンプルへ分注した。

3. アザチオプリンの定量

アザチオプリンの定量は Ding & Benet¹¹⁾ および Lin ら¹²⁾の方法を修正した HPLC 法を用いて行った。

1) 装置および条件

装置、島津 LC-4A 型高速液体クロマトグラフ；カラム、Chemcosorb 5-ODS-H (4.6mm i. d. $\times$ 150 mm)；カラム温度、40°C；検出器、島津 SPD-2A；波長、325nm；記録計、島津 C-R 2A；移動相、0.01M 酢酸緩衝液-メタノール-テトラヒドロフラン (92:4:4, pH 4.0)；流速、1.0ml/min；検出感度、0.04 aufs。

2) 検量線

アザチオプリン標品 200mg を採り、生理食塩液 8ml に懸濁させ、1N NaOH を添加してアザチオプリンを溶解し、生理食塩液を加えて全量

100ml とした。この溶液を一定量ずつ採り内部標準液として p-アミノ安息香酸のメタノール・テトラヒドロフラン溶液 (2mg/ml) 1.6ml を加え、0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) でアザチオプリン濃度 25, 50, 75, 100, 125 μ g/ml の標準液を作成した。標準液を HPLC に注入し、得られたアザチオプリンのピーク高さから内部標準法により検量線を作成した。

3) 定量操作

0.2%アザチオプリン注射剤 1ml を採り、内部標準液 1.6ml を加え、0.01M 酢酸緩衝液で全量 20ml とした。この試料溶液 5 μ l を HPLC へ注入し、検量線よりアザチオプリンの濃度を求めた。

4. 安定性

調製した 0.2% アザチオプリン注射剤を局方に収載されている高圧蒸気法の条件、すなわち 115°C 30分、121°C 20分、126°C 15分の 3 条件で滅菌し、滅菌終了直後のアザチオプリンの含量を測定した。また、0.2% アザチオプリン注射剤を 115°C 30分の条件下で滅菌した後、28日間保存しアザチオプリンの含量を経時的に測定した。保存条件は室温 (28~30°C)・蛍光灯下、室温 (28~30°C)・遮光下および冷所 (4 $\pm$ 0.5°C)・遮光下の 3 条件とした。なお遮光は、透明アンプルに封入した注射剤を暗所に保存して行った。

結 果

アザチオプリン標品より作成した検量線を Fig. 1 に示した。内部標準物質に対するアザチオプリンのピーク高さ比と濃度から回帰直線式を求めると、 $Y=0.00984X+0.01955$ ($r=0.999$) であり、25~125 μ g/ml の濃度範囲において、良好な直線関係が得られた。また各測定点で変動係数は 1%

Table 1. Formula of 0.2% Azathioprine Injection

Rp.	Azathioprine	200 mg
	1N NaOH	0.72 ml
	Normal Saline	ad 100 ml

Fig. 1. Calibration Curve for Azathioprine by HPLC
Each point represents the mean of 4 determinations.

Fig. 2. Chromatograms of Azathioprine Injection before and after Autoclaving
Peaks: 1=azathioprine; 2=p-aminobenzoic acid (internal standard).

以下であり、測定精度も良好であった。

アザチオプリン注射剤の滅菌前と滅菌後のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。アザチオプリンおよび内部標準物質である p-アミノ安息香酸は、それぞれ保持時間 8.9 分、5.2 分に溶出し、単一なピークとして良好に分離できた。アザチオプリン

のピークは滅菌温度の上昇とともに僅かずつ低下し、またそれに伴って滅菌前には見られなかった分解物に由来すると考えられる 2 つのピークがクロマトグラム上に認められた。これらのピークは滅菌温度の上昇とともに僅かずつ上昇する傾向が認められた。6-メルカプトプリンおよびヒポキサ

Table 2. Stability of Azathioprine in Alkalinized Saline after Autoclaving

Condition	Content of azathioprine mg/ml (%)
Non sterilized	2.00 ± 0.01 (100.0 ± 0.1)
115°C 30min	1.94 ± 0.01 (97.3 ± 0.4)
121°C 20min	1.92 ± 0.01 (96.2 ± 0.8)
126°C 15min	1.91 ± 0.02 (95.7 ± 1.3)

Each value represents the mean ± S.D. of 5 experiments.

Table 3. Stability of Azathioprine in Alkalinized Saline under Various Storage Conditions

Period (day)	Content of azathioprine mg/ml (%)		
	Room temperature under light exposure	Room temperature under shading	Cold place under shading
0	1.94 ± 0.01 (100.0 ± 0.4)	1.94 ± 0.01 (100.0 ± 0.4)	1.94 ± 0.01 (100.0 ± 0.4)
4	1.93 ± 0.02 (99.4 ± 0.9)	1.94 ± 0.02 (100.0 ± 1.3)	1.94 ± 0.01 (100.0 ± 0.7)
7	1.94 ± 0.01 (100.0 ± 0.7)	1.95 ± 0.02 (100.5 ± 1.0)	1.95 ± 0.02 (100.5 ± 0.3)
14	1.96 ± 0.02 (101.0 ± 1.0)	1.93 ± 0.02 (99.4 ± 1.8)	1.96 ± 0.02 (101.0 ± 1.2)
21	1.95 ± 0.01 (100.5 ± 0.6)	1.93 ± 0.02 (99.4 ± 1.2)	1.95 ± 0.01 (100.5 ± 0.9)
28	1.97 ± 0.01 (101.5 ± 0.6)	1.96 ± 0.02 (101.0 ± 1.0)	1.94 ± 0.03 (100.0 ± 1.5)

Each value represents the mean ± S.D. of 5 experiments.

ンチンの標品を用いて同定を試みた。これら2つのピークのうち、保持時間2.4分のピークは6-メルカプトプリン標品の保持時間と一致した。ヒポキサンチン標品はこの HPLC 条件では検出されず、他のピークについては同定はできなかった。

Table 2 に滅菌前および滅菌終了直後の注射剤中のアザチオプリンの含量(残存率)を示した。115°C 30分、121°C 20分、126°C 15分の各条件下で滅菌を行った場合のアザチオプリンの含量は、滅菌前に比べていずれの滅菌条件下でも僅かに低下した。しかし、各滅菌条件間では差は認められなかった。

0.2%アザチオプリン注射剤を115°C 30分の条

件下で滅菌した後、各種条件下において保存した場合のアザチオプリンの含量(残存率)をTable 3 に示した。滅菌後28日間まで、いずれの保存条件下においてもアザチオプリンの含量の低下はまったく認められず、安定であった。

考 察

アザチオプリンは臓器移植時の免疫抑制療法においては、主にシクロスポリンと併用して用いられることが多い⁴⁻⁹⁾。本院においては、わが国で初めて幼児の生体部分肝移植が行われた。その際に医師側から、アザチオプリンの経口投与が不可能であること、さらにその投与量の厳密な調節が

必要であることにより、アザチオプリン注射剤が要望された。

アザチオプリンは注射剤としては国内において市販されていないので、必要時には院内製剤として調製しなければならない。注射剤を調製するにあたっては、その無菌性および安定性等に関する品質の確保が第一に必要である。今回、著者らはアザチオプリン注射剤の院内製剤化を目的とし、滅菌時および保存時のアザチオプリンの安定性について検討を行った。

アザチオプリンはアルカリ性領域において分解物として、6-メルカプトプリン、ヒポキサンチンおよび1-メチル-4-ニトロ-5-ヒドロキシイミダゾールを生成することが知られている^{13,14)}。著者らが行ったいずれの滅菌条件においても、クロマトグラム上に分解物と考えられる2つのピークが出現した。これら2つのピークのうち、調製したアザチオプリン注射剤のpHは約9.6であり、しかも標品の保持時間と一致したことから、1つ ($t_R = 2.4$ 分) は6-メルカプトプリンであると考えられる。他のピークについては、1-メチル-4-ニトロ-5-ヒドロキシイミダゾールと考えられるが同定はできなかった。これらの2つの分解物の毒性について、6-メルカプトプリンはアザチオプリンの活性型薬物であり、アザチオプリンは体内で6-メルカプトプリンに変換されて作用するのでまったく問題はない。他の1つについては生成量はごく微量であり、また滅菌後のアザチオプリンの残存率は96~97%であることから、この注射剤の安全性については臨床上ほぼ問題はないと考えられる。

アザチオプリンの水溶液中での安定性についての報告は少ない。Fellら¹³⁾はアザチオプリン(0.1%)の生理食塩液を室内散光・85°Cの条件下で保存した場合、5時間後のアザチオプリン残存率は約93%であったと報告している。しかし、アザチオプリン注射剤の高圧蒸気滅菌時における安定性については検討されていない。今回調製したアザチオプリン注射剤を局方に収載されている条件下で高圧蒸気滅菌を行ったところ、アザチオプリンの含量は僅かに低下する傾向が認められた。

しかし、注射剤におけるアザチオプリンの含量の低下は僅かであり、ほぼ安定であった。

アザチオプリン注射剤の保存中における安定性について、Fellら¹³⁾は生理食塩液中に溶解した場合、室温・散光下で5時間後においてもアザチオプリンの分解は認められなかったと報告している。今回調製したアザチオプリン注射剤を115°C 30分の条件下で滅菌した後、室温・蛍光灯下で保存した場合でも約1カ月までは含量の低下がまったく認められず、この注射剤は安定な製剤であるといえる。なお、115°C 30分の滅菌条件による無菌性は、枯草菌による生物学的インジケータにより随時確認しており、調製したアザチオプリン注射剤の無菌性は確保されているものと考えられる。

以上のことから、調製したアザチオプリン注射剤は局方の条件下で高圧蒸気法による滅菌が可能であり、また保存期間中の安定性も良好であり、本製剤は院内製剤として十分使用できるものと考えられる。

文 献

- 1) G.B.G. Klintmalm, S. Iwatsuki and T.E. Starzl, *Lancet*, **2**, 470-471 (1981).
- 2) K. Atkinson, J.C. Biggs, J. Hayes, M. Ralston, A.J. Dodds, A.J. Concannon and D. Naidoo, *Br. J. Haematol.*, **54**, 59-67 (1983).
- 3) M.I. Lorber, C.T. Van Buren, S.M. Flechner, C. Williams and B.D. Kahan, *Transplant. Proc.*, **19**, 1808-1810 (1987).
- 4) M.I. Lorber, S.M. Flechner, C.T. Van Buren, R.H. Kerman and B.D. Kahan, *Transplant. Proc.*, **17**(Suppl. 1), 282-285 (1985).
- 5) 吉村了勇, 岡 隆宏, 大森吉弘, 相川一郎, 福田雅武, 安村忠樹, 荒川幸平, 李 哲柱, 大坂芳夫, *移植*, **23**, 599-605 (1988).
- 6) D. Landsberg, A. Rae, A. Chiu, R. Werb, P. Taylor, C. Chan-Yan and A.D. Manson, *Transplant. Proc.*, **21**, 3323-3324 (1989).
- 7) J. Gugenheim, D. Samuel, F. Saliba, D. Castaing and H. Bismuth, *Transplant. Proc.*, **19**, 3805-3807 (1987).
- 8) M. Kalayoglu, R.J. Stratta, R.M. Hoffmann, H.W. Sollinger and F.O. Belzer, *Transplant. Proc.*, **20**(Suppl. 1), 524-529 (1988).

-
- 9) O.T. Terpstra, S.W. Schalm, W. Weimar, P.J.A. Willemse, D. Baumgartner, T.H.N. Groenland, F.W.J. Ten Kate, R.J. Porte, S. De Rave, C.B. Reuvers, J. Stibbe and J.L. Terpstra, *N. Engl. J. Med.*, **319**, 1507-1511 (1988).
 - 10) E.R. Barnhart, "PHYSICIANS' DESK REFERENCE 44ed.", 1990, p.777.
 - 11) T.L. Ding & L.Z. Benet, *J. Chromatogr.*, **163**, 281-288 (1979).
 - 12) S. Lin, K. Jessup, M. Floyd, T.F. Wang, C. T. Van Buren, R.M. Caprioli and B.D. Kahan, *Transplantation*, **29**, 290-294 (1980).
 - 13) A.F. Fell, S.M. Plag and J.M. Neil, *J. Chromatogr.*, **186**, 691-704 (1979).
 - 14) R.L. Gupta, M. Kumar, R.K. Singla and S. Singh, *Indian J. Pharm. Sci.*, **49**, 169-171 (1987).