[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
20(1) 55 - 60 (1994)

ヒスチジン銅注射液の安定性

酒井正博*†¹, 上野芳男†¹, 安生紗枝子†¹, 中村幹夫†², 加藤尚之†²

東邦大学医学部附属大森病院薬剤部†¹

東邦大学医学部化学研究室†²

Stability of Copper Histidinate Injection

MASAHIRO SAKAI*†¹, YOSHIO UENO†¹, SAEKO ANJO†¹,

MIKIO NAKAMURA†², and NAOYUKI KATO†²

Department of Pharmacy, TOHO University Omori Hospital†¹

Department of Chemistry, TOHO University School of Medicine†²

(Received October 15, 1993)
(Accepted November 2, 1993)

The solution stability of copper histidinate, which has been used in place of copper acetate or copper sulfate as an intravenous injection for copper supplement treatment of Menkes disease, has been studied. The solutions with various pH's were prepared and their spectral change was monitored by means of UV-visible spectrometer. Although spectral change was very small in acidic and neutral solutions at 5°C, a large decrease in the absorption peak at 630 nm was observed in the basic solution.

Change in the copper concentration was quantitatively analyzed by both UV-visible and ICP-MS spectroscopic techniques. Based on these results, the neutral and acidic copper histidinate solutions were concluded to be stable at least for a month if they are stored at 5°C.

Keywords—copper histidinate injection; Menkes disease; stability; UV

はじめに

従来、先天性銅代謝異常症であるメンケス病による銅欠乏症の改善を目的とした銅補充療法では、酢酸銅あるいは硫酸銅注射液の静注¹⁾が行われてきたが、最近では生理的なヒスチジン銅注射液の皮下注²⁻⁶⁾が用いられるようになった。しかし、この注射液の安定性に関する報告例はない。そこで今回、ヒスチジン銅注射液を種々の pH で

調製し、外観観察、pH 測定、可視吸収スペクトル測定および溶液中の銅濃度測定を経時的に行い、その安定性について検討し若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試薬

塩化銅(Ⅱ)は化学用, L-ヒスチジン, 水酸化ナトリウム, 塩化ナトリウム(和光純薬)は特級試薬を用いた。

2. ヒスチジン銅注射液の調製

ヒスチジン銅注射液は Sherwood ら³⁾の方法に基づき、塩化銅(Ⅱ) 106.0mg (0.79mmol)

†¹ 東京都大田区大森西6-11-1; 6-11-1, Omori-Nishi, Ota-ku, Tokyo, 143 Japan

†² 東京都大田区大森西 5-21-16; 5-21-16, Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo, 143 Japan

と L-ヒスチジン 244.4mg (1.75m mol) を塩化ナトリウム溶液 (1mol/l) に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (0.2mol/l) で pH を 7.4 に調製した後、塩化ナトリウム溶液を再度加え、全体を 100 ml とした。ここで得られた溶液をフィルター (ポアサイズ 0.22 μ m, タイプ: GV, 直径: 13mm, ミリポア) を通しバイアルに充填した (試料 B)。上記の方法に準じて酸性 (pH 4.1) および塩基性 (pH 10.0) ヒスチジン銅溶液を調製し、バイアルに充填した。これらの溶液をそれぞれ試料 A, C として用いた。

3. 外観観察

肉眼により色調変化、析出物の有無を観察した。保存条件は 5°C 遮光、室温遮光、室温露光とし、各々の試料に対して試料調製直後、試料調製 7 日、14 日、21 日、1 カ月、2 カ月、および 3 カ月後の変化を観察した。

4. pH 測定

pH の測定には pH 測定器 (東亜電波工業, HM-30S) を用いた。沈殿の存在する試料は上記のフィルターでろ過後測定した。

5. ヒスチジン銅溶液のスペクトル測定

各試料の可視吸収スペクトルを分光光度計 (島津製作所, UV-200S) で測定した。セルは光路長 1 cm を用いた。沈殿の存在する試料はろ過後測定した。

6. 銅含有量測定

誘導結合プラズマ-質量分析 (ICP-MS; Perkin-Elmer HGA-500) 法を用いて、各試料溶液中の銅濃度を測定した。沈殿の存在する試料はろ過後測定した。

結果および考察

1. 安定性に及ぼす pH, 温度および光の影響

各試料保存後の外観観察結果を Table 1 に示す。試料 A (pH 4.1) を 5°C 遮光で保存した場合、3 カ月後でも外観変化は見られなかった。しかし、室温で保存した場合には、遮光、露光にかかわらず 21 日後には淡青色から青緑色に変化した。また、2 カ月後には沈殿の存在が見られた。

試料 B (pH 7.4) を 5°C 遮光で保存した場合、3 カ月後に色調は青色から深緑色に変化した。また、室温で保存した場合は遮光、露光にか

Table 1. Changes in Appearance during Storage of Copper L-Histidinate Solution¹⁾

Samples ²⁾	Conditions ³⁾	Time					
		7days	14days	21days	1month	2months	3months
A	light(-), 5°C	—	—	—	—	—	—
	light(-), r.t	—	—	+—	+—	+↓	+↓
	light(+), r.t	—	—	+—	+—	+↓	+↓
B	light(-), 5°C	—	—	—	—	—	+—
	light(-), r.t	+—↓	+↓	+↓	+↓	+↓	+↓
	light(+), r.t	+—↓	+↓	+↓	+↓	+↓	+↓
C	light(-), 5°C	+—	+—	+	+	+↓	+↓
	light(-), r.t	+↓	+↓	+↓	+↓	+↓	+↓
	light(+), r.t	+↓	+↓	+↓	+↓	+↓	+↓

1) color: —; no change +—; a little change +; apparent change

↓ : precipitation

2) pH's were adjusted at 4.1, 7.4 and 10.0 for samples A, B, and C, respectively.

3) r.t: room temperature

かわらず7日後には同様の色調変化および沈殿の存在が見られた。また、沈殿の量は経時的に増加した。

試料C (pH 10.0) は外観変化が最も顕著であった。すなわち、5°C 遮光で保存した場合、7日後に青色から深緑色へ変化し、2カ月後には沈殿が見られた。また、室温に保存した場合は試料Bと同様に7日後に色調変化と沈殿の存在が確認された。

以上の結果から、溶液の pH が試料の安定性に大きな影響を与えることがわかった。特に酸性試料が最も安定で、中性、塩基性になるにつれ錯体の安定性が減少することが判明した。また、室温に比べ 5°C 保存では変化が小さいことが示された。それに対して遮光と露光では明確な差異は認められなかった。

2. ヒスチジン銅および銅イオンの含有率の経時変化

Fig. 1. Visible Spectra of Copper L-Histidinate (0.79m mol/ml), Copper (II) Chloride (0.79m mol/ml) and L-Histidine (1.57m mol/ml)

□ : Sample A; pH4.1 △ : Sample B; pH7.4 ○ : Sample C; pH10.0

Fig. 2. Calibration Curves of Copper L-Histidinate in Solution with Different pH

ヒスチジン銅注射液の安定性を定量的に検討するため、試料A, B, Cに含まれるヒスチジン銅の含有率を下記により測定した。Fig. 1 に塩化銅(Ⅱ)、ヒスチジンおよびヒスチジン銅溶液の可視吸収スペクトルを示す。

塩化銅(Ⅱ)およびヒスチジン溶液では500nm以上の長波長部に吸収を示さないことから、630nmに極大を持つ幅広い吸収はヒスチジン銅錯体由来するものと考えた。そこで、塩化銅(Ⅱ) 26.5mgと2当量のヒスチジン 61.1mgを塩化ナトリウム溶液(1mol/l)に溶解し100mlとした。pHは水酸化ナトリウム溶液(0.2mol/l)で調製した。同様に塩化銅(Ⅱ) 53.0mg, 79.5mg, 106mgを用い、上記の操作により試料A, B, Cの濃度系列を作成した。それらの630nmにおける吸光度はFig. 2に示すように、いずれの場合にも良好な直線が得られた。pHによって検量線の傾きが異なるのは、低pHではヒスチジンが水素イオンと結合するため銅錯体の一部が解離するからと考えられる。この検量線を用いてヒスチジン銅の経時的な含有率変化を求めた。沈殿のある試料はろ過した後吸光度を測定した。

Fig. 3に示すように、各試料とも5°Cで保存した場合にはヒスチジン銅濃度の顕著な低下は見られなかったが室温保存では試料によって変化の程度が大きく異なった。すなわち、試料Aでは3ヵ月後でも80%の含有率を示したのに対して、試料B, Cではそれぞれ50%, 40%まで減少した。酸性試料ではpHの経時変化は見られないためpH 4.1の検量線はそのまま用いた。

Fig. 2より、pH 7.4, pH 10.0の検量線は6%以内で一致しているためpHに経時変化は見られたが、先の検量線を用いた。

次にヒスチジン銅濃度の減少が溶液中の銅イオン濃度の減少に対応するか否かを調べるため、変化の大きかった試料Cに対し銅イオン濃度を定量した。Table 2に試料調製直後の銅含有量を100%としたときの銅イオン含有率を示した。この結果はUV法によって得られた値ときわめて良く一致した。このことから錯体濃度の経時的な減少は銅イオン濃度の減少と対応することが判明した。

a) Sample A(pH4.1)

b) Sample B (pH7.4)

c) Sample C (pH10.0)

■ : stored under protection from light at 5°C
 ▲ : stored under protection from light at room temperature
 ● : stored under the light at room temperature

Fig. 3. Changes in Copper L-Histidinate Content

3. ヒスチジン銅の分解機構

溶液中のヒスチジン銅と銅イオンの濃度がほぼ同じ割合で減少することは、銅化合物の析出が分解の本質であることを示している。沈殿が塩基性溶液で特に顕著であったことからFig. 4に示す銅に対する水酸化物イオンの反応が考えられる。水酸化銅(Ⅱ)の溶解度積は 2.2×10^{-20} であるため、錯体と平衡にある銅イオンが溶液中の水酸化物イオンと結合し、水酸化銅(Ⅱ)となり析出すると考えられ、塩基性溶液中での変化が説明できる。

Table 2. Comparison of the Content in Sample C(pH 10.0)
Determined by ICP-MS and UV Methods

Time Methods	Initial	14days	28days
ICP-MS; Cu(%)	100	80.7±7.6	66.8±2.5
UV; Cu(L-His) 2(%)	100	80.0±0.0	64.0±0.0

The sample was stored without protection from the light
at room temperature.

(n=4)

Mean±S.D. is presented.

 Fig. 4. Possible Reactions Occurring during the Storage
of Copper L-Histidinate Solution

- : initial pH was adjusted at 10.22
- △ : initial pH was adjusted at 7.60
- : initial pH was adjusted at 7.39
- ▲ : initial pH was adjusted at 7.20
- : initial pH was adjusted at 4.15

Conditions : 5°C, light(-)

Fig. 5. Time Dependence of the pH Values

4. 注射液調製時の pH 値の許容範囲の検討

Sherwood らの調製法³⁾では注射液の pH は 7.38—7.40 の範囲に設定されている。調製時の注射液の pH の影響を検討するため、pH が 7.20, 7.39, 7.60 の中性試料, 10.22 の塩基性試料および 4.15 の酸性試料について試料調製後に 5°C 遮光で保存した場合の pH 経時変化を検討した。

Fig. 5 に示すように、塩基性試料では pH の著しい低下がみられたが、中性および酸性試料では 3 カ月間の範囲で経時変化は認められなかった。塩基性試料の水酸化物イオンの低下は沈殿生成によるものと考えられる。以上のことより、pH が 7.20—7.60 の範囲でも安定であることがわかった。

結 論

ヒスチジン銅注射液の安定性を検討するため酸性、中性および塩基性の試料について、外観観察、pH 値測定、可視吸収スペクトル測定、溶液中の銅含量測定を経時的に行った。その結果、以下の事項が明らかになった。

1) ヒスチジン銅注射液 (pH 7.4) は 5°C 保存で 1 カ月間は安定であった。

2) ヒスチジン銅注射液調製時の pH は、報告されている範囲 (pH 7.38—7.40) から pH 7.20—7.60 で広くとっても安定性に変化は認められなかった。

3) ヒスチジン銅注射液の品質劣化の原因として水酸化物イオンの影響が考えられた。

引 用 文 献

- 1) 児玉浩子, 小児医学, **25**, 335-348 (1992).
- 2) D.M. Danks, *Amer. J. Med. Gen.*, **30**, 859-864 (1988).
- 3) G. Sherwood, B. Sarkar, S. Kortsak, *J. Inher. Metab.*, **12**, 393-396 (1989).
- 4) 有本 潔, 柳川悦子, 諸岡啓一, 多田博史, 松尾多希子, 高木一江, 日本先天代謝異常学会誌, **6**, 170 (1990).
- 5) 片岡なつ恵, 反野雅巳, 浜口 弘, 内藤春子, 二瓶健次, 日本小児科学会雑誌, **95**, 511 (1991).
- 6) 日向平明, 高橋徹男, 岡安多香子, 荒島真一郎, 梶井直文, 日本小児科学会誌, **96**, 1931-1934 (1992).