高速液体クロマトグラフィーによる乳剤中酢酸 ヒドロコルチゾンの安定性試験

佐藤 孝 俊*・斉藤 好 広*・山 岡 桂 子**
佐々木真利子**・水 谷 告**

* 日本大学理工学部薬学科（東京都千代田区神田駿ヶ台1-8）

** 帝京大学病院薬剤部（東京都板橋区加賀2-11-1）

Stability Test of Hydrocortisone Acetate in Emulsion by High Speed Liquid Chromatography

Takatoshi SATO*, Yoshihiro SAITO*, Keiko YAMAOKA**,
Mariko SASAKI** and Tsuguru MIZUTANI**

* Department of Pharmacy, College of Science & Technology, Nihon University.
(8, Kanda Surugadai, 1-Chome, Chiyoda-ku, Tokyo)

** Pharmacy, Teikyo University Hospital (No. 11-1, 2-Chome, Kaga, Itabashi-ku, Tokyo)

The high speed liquid chromatography (HSLC) was adapted for the stability test of hydrocortisone acetate (HA) in emulsion.

The HSLC conditions were as follows: Model: JASCO FLC-350, Detector: UVIDEK-1, wavelength: 242 nm, Column: JASCO PACK-SV-02-500, Mobile phase: MeOH: H₂O (6:4), Flow rate: 1 ml/min, Pressure: 70 kg/cm² and Chart speed: 1 cm/min (at room temperature). Thymolphthalein (TF) was used as an internal standard material. The extracted HA was directly injected to the HSLC column, in which the stationary phase was supported by octadecylsilane.

Six kinds of emulsions containing 1% HA, which are absorption and hydrophilic ointment of improved, pharmacopeia and commercial grades, were exposed to air at 10°C or 40°C, and then measured their stability to the oxidation by using HSLC.

The result showed that the amount of HA in W/O emulsion decreased, but in O/W emulsion did not change.

Aging effect on the oxidation of six kinds of emulsions was investigated by measuring peroxide value (POV). It was found that POV of W/O emulsions increased and that of O/W emulsions were constant.

1 緒 言

軟膏中の酢酸ヒドロコルチゾン (HA) の安定性については、すでに宮崎¹⁾, 田久保²⁾, 内藤ら³⁾ によって報告されているが, HA の定量は, テトラゾリウムクロリド法又は, フェニルヒドラジン法によって行われている。

最近に至って HA をより簡便に, しかも精度よく定量できる高速液体クロマトグラフ (HSLC) 法が, Bailey ら⁴⁾ によって開発されたので, 我々はこれについて検討し, 改良を加え軟膏中の HA を一層簡便に定量することができた。

今回我々の確立した HSLC 法によって軟膏中の HA

の安定性も調べたので, その成績をここに報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

a) 白色ワセリン, 流動パラフィンなどの軟膏基剤に用いるものは, 局方品を使用した。

b) 酢酸ヒドロコルチゾン: 軟膏に添加するものは局方品を使用し, 定量用には局方品をアセトン・メタノールに加温しながら溶解し, 蒸留水を滴下し, 析出させ溶媒を汙過精製したものを使用した。

c) チモールフタレイン (TF): 特級品をエタノールにより再結晶したものを使用した。

d) 高速液体クロマトグラフ: JASCO FLC-350 (分光光度計 JASCO UVIDEC-1 付)

2.2 酢酸ヒドロコルチゾン軟膏

軟膏基剤として用いたものは、Table-1 に示す処方により調製した改良型 2 種、局方の吸水と親水性軟膏基剤及び市販の吸水と親水性軟膏基剤である。

改良型軟膏基剤は Table-1 中の油相成分を 75°C に加温しておき、あらかじめ水浴上で 75°C に加温した水相成分をかきまぜながらこれに加え、よく混和した後、放冷して固化させ、調製した。

上述の軟膏基剤それぞれ 100 g をとり、これらに HA 1 g を加え、軟膏ペラで充分混和し、さらにローラで練合した後、400 倍の顕微鏡によって観察し、HA が均等に分散されていることを認めたものを使用した。

なお軟膏中の HA 粒子の大きさは、20~30 μm であった。

Table-1 Formulas for improved ointment.

	Absorp. oint.	Hydrophil. oint.
Liquid paraffin	20	30
White petrolatum	30	20
Purified water	50	50
Span 20	—	6.4
Span 85	5.9	—
Tween 60	—	3.6
Tween 61	4.1	—

2.3 HA の HSLC 定量法

2.3.1 定量条件の検討

HSLC による HA の定量条件については、Bailey ら⁴⁾の方法を参考として種々検討した結果、次の条件が定量最適条件の一つであったので、以後の実験は、この条件によって行った。

カラム: JASCO PACK SV-02-500

移動相: メタノール-水 (6:4)

流速: 1.0 ml/min

Table-2 Recovery and reproducibility of hydrocortisone acetate in improved ointment.

HA in Absorp. oint.		HA in Hydrophil. oint.	
Taken (mg/g)	Found (mg/g)	Taken (mg/g)	Found (mg/g)
10.2	10.0	10.2	10.0
	10.0		10.0
	10.2		10.0
	10.2		10.2
	10.0		10.1
$\bar{X}$	10.1	$\bar{X}$	10.0
$\sigma/\bar{X}$ (%)	1.3	$\sigma/\bar{X}$ (%)	0.9
Recovery (%)	98.6	Recovery (%)	98.6

検出器: JASCO UVIDEC-1 (242 nm)

機種: JASCO FLC-350 型

この条件で TF を内部標準物質として HA を分離したチャートを示すと Fig.-1 の通りである。HA と TF の t_R は、1 min と 1.5 min であり、定量性は、充分見いだされた。

以上の方法を用いて検量線を求めてみた。2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 及び 15.0 mg の HA をメタノール 50 ml に溶解した HA のメタノール標準液を調製し、30 mg の TF を添加し、10 μl のサンプルサイズで HSLC により分離を行った。クロマトグラムに現れた、2 つのピーク、すなわち HA と TF の高さから、HA の比率を算出し、縦軸に高さの比率、横軸に濃度を取り、プロットしたところ原点を通る良好な直線を得た。本実験に使用した内部標準物質としての TF は、分離度及びピークの精度から適当な物質であることを確認した。

なお本法の定量限界は、0.3 μg であった。

Fig.-1 High-speed liquid chromatogram of hydrocortisone acetate.

2.3.2 軟膏から HA の抽出及び定量

Table-3 Recovery and reproducibility of hydrocortisone acetate in ointment. (JP IX)

HA in Absorp. oint.		HA in Hydrophil. oint.	
Taken (mg/g)	Found (mg/g)	Taken (mg/g)	Found (mg/g)
9.8	9.3	10.4	9.9
	9.4		10.0
	9.3		10.3
	9.5		10.2
	9.7		10.5
$\bar{X}$	9.5	$\bar{X}$	10.2
$\sigma/\bar{X}$ (%)	1.6	$\sigma/\bar{X}$ (%)	2.1
Recovery (%)	97.1	Recovery (%)	97.9

(JP: Japan Pharmacopeia)

Bailey ら³⁾は軟膏から HA の抽出をイソオクタンとメタノール混液により行っているが、同条件で HA の抽出を行ったところ界面活性剤の影響で、メタノールとイソオクタン層の分離が判然とせず、三層に分かれ、メタノール層を分取して定量してもばらつきを生じ、再現性がなかった。従って我々は、抽出条件を検討し、次の操作によって、抽出することとした。

すなわち各種軟膏試料 1g を精密に量り、50 ml の遠心沈殿管に入れ、メタノール 30 ml を加え、40°C の水浴上で加温しながら 5 min スクリューでかきまぜた後、室温に 10 min 放置し、遠心分離 (3000 rpm, 5 min) してメタノール層を分取し、この操作を更に一回行い、全メタノールを合わせ、さらにメタノールを加えて正確に 50 ml としその抽出液に 30 mg の TF を加えて HSLC 定量用試料とした。

その 10 μ l を HSLC カラムに注入して定量することとした。

本抽出法による回収率は、Table-2~4 に示す通りである。どの剤型でも 98% 前後の抽出率であったから、定量法として充分なものとする。

Table-4 Recovery and reproducibility of hydrocortisone acetate in commercial ointment.

HA in Absorp. oint.		HA in Hydrophil. oint.	
Taken (mg/g)	Found (mg/g)	Taken (mg/g)	Found (mg/g)
10.0	9.7	9.5	9.3
	9.8		9.2
	9.6		9.4
	9.4		9.4
	9.3		9.3
	9.8		
	9.7		
	9.8		
$\bar{X}$	9.6	$\bar{X}$	9.3
$\sigma/\bar{X}$ (%)	2.0	$\sigma/\bar{X}$ (%)	0.9
Recovery (%)	96.4	Recovery (%)	97.8

別に種々な HA 濃度の軟膏を調製し本抽出法によって抽出し、HSLC による分離を行ったが、軟膏 1g 中 HA 1mg 以下の低濃度軟膏では、HSLC 定量を阻害する成分が、軟膏基剤から比較的多量に抽出され、定量が充分に行えないことがわかった。従って本抽出法を適用できる範囲は、1 mg/g 以上である。

2.4 POV の測定法

軟膏の酸化分解と HA の安定性の関係を調べるため、POV 測定を行った。

POV の測定は、軟膏 1g を取り、氷酢酸：四塩化炭素混液 (3:2) 25 ml を加えて溶かし、これに飽和ヨウ化カリウム溶液 1 ml を加え、10 min 暗冷所に放置後、

蒸留水 30 ml および 1% デンブレン試液 1 ml を加え、0.01 N-チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、POV を算出した。

2.5 軟膏の安定性試験

それぞれの軟膏 50 g ずつを 100 ml の軟膏びんに入れ、軽くふたをし、10°C 及び 40°C の恒温そう中に保存し、1 週間目ごとに試料を採取して HA 含量と POV を測定した。

3 結 果

3.1 HA の安定性

試料の採取に当たっては軟膏を良くかき混ぜ、上下を均等に混和した後、その一定量を取り、HA を定量した。成績は、Table-5~7 の通りである。

この表によると 10°C に放置した基剤中の HA は、ほぼ安定であったが、40°C に放置した基剤中の HA は、測定ごとに減少するのを認めた。特に市販の基剤及び局方基剤の変化は、顕著であった。

Table-5 Stability of HA in improved ointment. (mg/g)

°C	Days Type	0	7	14	21	28
10	Absorp. oint.	10.1	10.0	9.9	9.9	9.9
	Hydrophil. oint.	10.1	10.1	10.1	10.0	10.0
40	Absorp. oint.	10.1	10.0	9.8	9.7	9.6
	Hydrophil. oint.	10.1	10.0	10.0	9.8	9.8

Table-6 Stability of HA in ointment (JP IX) (mg/g)

°C	Days Type	0	7	14	21	28
10	Absorp. oint.	9.9	9.9	9.9	9.6	9.3
	Hydrophil. oint.	10.0	10.0	10.0	9.9	9.9
40	Absorp. oint.	9.9	9.6	9.3	9.1	8.8
	Hydrophil. oint.	10.0	9.9	9.8	9.7	9.5

Table-7 Stability of HA in commercial ointment. (mg/g)

°C	Days Type	0	7	14	21	28
10	Absorp. oint.	9.9	9.9	9.7	9.4	9.2
	Hydrophil. oint.	10.0	9.9	9.9	9.8	9.7
40	Absorp. oint.	9.9	9.5	9.1	8.7	8.0
	Hydrophil. oint.	10.0	9.9	9.7	9.6	9.4

3.2 POV の変化

HA の定量ごとに POV を測定した値は、Fig.-2~4 に示す通りである。

基剤そのものの POV は、比較的安定であったが HA を添加した軟膏の POV は、やや高い値を示し、特に W/O 乳剤、すなわち吸水軟膏では、過酸化物の生成が明らかであった。また HA の安定性の悪い市販軟膏と

Fig.-2 POV of improved ointment exposed to air (at 40°C).

Fig.-3 POV of ointment (JP IX) exposed to air (at 40°C).

Fig.-4 POV of commercial ointment exposed to air (at 40°C).

局方軟膏が、改良軟膏に比べ高い値を示した。

また改良軟膏は、POV での経時変化は、一般に少なかった。

4 考 察

総じて、W/O 型乳剤中の HA が、O/W 型乳剤に比較して経時変化を受けやすい傾向にあるのは、エマルションの型による特徴で、ミセルの状態と、外相に対する添加物の分配率が関与しているものと推察される。

改良吸水軟膏の POV が、比較的低い値を示した割に局方吸水軟膏と市販吸水軟膏が、高かったのは、基剤による影響、すなわち、局方及び市販軟膏は、処方に多くの基剤が組み入れ、また 1-ヘキサデカノールのような HA の酸化を早める基剤が含まれているためではなかろうかと思われる。なお本実験においては、HA の酸化生成物の構造決定をしていないが、これについては別の機会に発表する。

以上の結果から HA の安定性を考える場合、薬物として、薬効面から考えるならば、症状による基剤の使い分けが必要であろうが、しかし HA の安定性から考えるならば、むしろ、O/W 型基剤に添加するのが望ましいと考えられる。

終わりに本研究の御指導をいただいた 本学横手教授に深謝致します。
(昭和 51 年 6 月 30 日受理)

文 献

- 1) 宮崎順一, 高野正彦, 吉野美子, 薬剤学, **24**, 83 (1964)
- 2) 田久保敬男, 唯岡知徳, 沢井とし, 薬剤学, **22**, 66 (1962)
- 3) 内藤俊一, 進藤健治, 河村文子, 服部たか子, 杉原郁子, 薬剤学, **30**, 174 (1970)
- 4) F. Bailey, P.N. Brittain, *J. Pharm. Pharmac.*, **24**, 425 (1972)
- 5) F. Bailey, P.N. Brittain, *J. Chromatogr.*, **83**, 431 (1973)