[薬 学 雑 誌]
YAKUGAKU ZASSHI
112 (2) 141-145 (1992)

尿素配合クリーム中の尿素的液体クロマトグラフ法による
定量と安定性評価¹⁾

安田 勉,* 赤間敏寛, 井川宏司
藤沢薬品工業株式会社物性研究所

Determination and Stability Studies of Urea in Urea Creams by
High-Performance Liquid Chromatography¹⁾

Tsutomu YASUDA,* Toshihiro AKAMA, and Hiroshi IKAWA
Analytical Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co.,
Ltd., 1-6, 2-chome, Kashima, Yodogawa-ku,
Osaka 532, Japan

(Received August 14, 1991)

A method was developed for determining urea in urea creams by high-performance liquid chromatography using strong acidic cation exchange gel. Elution was carried out with 0.05 M phosphate buffer (pH 3.4) at 40°C, and detection was made with a UV-spectrometer at 200 nm. This method was used for studying and comparing the stability of urea creams produced by ourselves and by other manufactures. The assay showed that there were differences in the stability of the tested creams.

Keywords—urea; cream; determination; HPLC

尿素は保湿作用を有することより、広く軟膏やクリーム剤に配合され、主に角化性皮膚疾患治療剤として用いられている。²⁾ 製剤中の尿素的定量法は、一般的に比色法^{3,4)}を応用して行われており、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による方法は報告されていない。著者らは、尿素配合クリーム中の尿素的を簡単な前処理操作で抽出した後、強酸性陽イオン交換カラムを用いて分離定量する HPLC を確立した。本法は尿素的の分解物との分離定量が可能で、簡便に、精度よく製剤中の尿素的を定量することができる。

本法を用いて、自製及び市販の尿素的の安定性評価を行った。その結果、自製品及び市販品の安定性に差異が認められた。

実 験 の 部

試料 尿素配合クリーム (尿素 10% 配合) は自製品 F, 市販品 A, B 及び C を用いた。

試薬 尿素は日本薬局方品, チミンは興人製, カラムは Bio Rad 社製, 他の試薬は特級品を用いた。

装置 分光光度計: UV-240 (島津製作所), HPLC-ポンプ: LC-5A (島津製作所), 検出器: SPD-2A (島津製作所), 試料注入器: WISP710B (ウォーターズ), 恒温槽: RM 35 (ラウダ)。

定量法 尿素 40 mg に相当する量を取り、クロロホルム 5 ml 及び内標準物質を含んだ移動相溶液 (又は、10% 塩化ナトリウム溶液) 40 ml を正確に加えて 15 分間振り混ぜる。この液を遠心

Fig. 1. Effect of pH, Buffer Concentration and Column Temperature on the Retention Times

●, urea; ■, cyanuric acid; ▲, biuret.

分離し、上澄液 5 μ l を HPLC により定量する。

HPLC の条件は検出波長: 200 nm, カラム: Aminex A-7 (粒子径 9 μ m, 内径 6 mm, 長さ 15 cm), カラム温度: 40°C, 移動相: 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 3.4), 流量: 0.4 ml/min, 内標準物質はチミンを用いた。

結果及び考察

1. 定量法

a. 尿素の紫外吸収スペクトル 尿素的移動相溶液中での紫外吸収スペクトルは UV 領域の長波長側に吸収がないことより、測定波長を 200 nm とした。

b. HPLC の分離条件の最適化 尿素的溶液中の分解物及び類縁物質はアンモニア、炭酸ガス、biuret 及び cyanuric acid が知られている。⁶⁾ これらの内、検出可能な biuret 及び cyanuric acid との分離を指標として最適化を検討した。

カラムはこれらの分離に適していると考えられる強酸性陽イオン交換カラム^{6,7)}を用いた。イオン交換カラムを用いて良好な分離条件を設定するためには、特に移動相の pH, 移動相の塩濃度及びカラム温度の設定が重要である。移動相は紫外吸収の弱いリン酸塩緩衝液を用いることとした。0.05 M リン酸二水素ナトリウム液に薄めたリン酸 (1→10) 又は 2 N 水酸化ナトリウム液を加えて、pH 3—5 の移動相を調製し、分離状態を検討した。また、リン酸塩緩衝液の塩濃度及びカラム温度についても同様に検討した。結果を Fig. 1 に示す。これらの結果より pH は 3.4 を、塩濃度は 0.05 M を選択した。

Fig. 2. Typical Chromatogram of Urea and Related Substances

1, urea (0.1%); 2, cyanuric acid (0.004%); 3, biuret (0.002%); 4, thymine (0.05%).

Fig. 3. Chromatograms of Commercial Urea Creams

1, sodium chloride; 2, cream base; 3, urea; 4, thymine; 5, chloroform.

(A) product F, (B) product A, (C) product B, (D) product C.

カラム温度は、分離状態、保持時間より 40°C とした。なお、内標準物質は、類縁物質との分離、基剤（自製品、市販品）との分離の点からチミンが適していた。

以上の最適化条件で測定したクロマトグラムを Fig. 2 に、実際にクリームを測定したときのクロマトグラムを Fig. 3 に示した。

c. 検量線 本法による検量線は尿素 $0.5\text{--}1.5\text{ mg/ml}$ の濃度範囲で良好な直線性を示した。

d. 繰り返し注入精度 本法により、標準溶液を 6 回繰り返し測定した結果、変動係数は 0.23% であった。

e. 尿素配合クリームからの尿素的抽出方法 クリームから水溶性の尿素有抽出する方法として、塩化ナトリウム溶液-クロロホルムによる抽出系について検討したところ、 10% 塩化ナトリウム溶液-クロロホルムが良好であった。また、移動相-クロロホルム抽出も良好であった。

Fig. 4. Stability of Commercial Urea Cream

—, at room temperature; —, at 40°C relative humidity 75%.

○, by HPLC; ▲, by colorimetric method.

(A) product F, (B) product A, (C) product B, (D) product C.

f. 添加回収実験 尿素配合クリーム基剤に 10% の尿素を加え、本法により定量して、回収率をみた。ほぼ 100% 回収された。

2. 安定性試験

先に設定した HPLC 条件を用いて、尿素配合クリーム中の尿素の安定性を調べた。安定性試験の保存条件は 40°C、相対湿度 75% で 3, 6 ヶ月間及び室温 12 ヶ月間とした。なお、定量は、クリームから尿素をイソプロパノール-水混液 (1 : 9, v/v) で抽出後、ジアセチルモノオキシム-チオセミカルバチドによる比色法⁴⁾も同時に行った。結果を Fig. 4 に示した。F は 40°C 相対湿度 75% に保存するとき、ほとんど含量低下を認めず安定であったが、A, B 及び C は低下が認められた。製剤の処方によって安定性が異なることが分かった。また、B は比色法と HPLC の測定結果に差異が認められた。比色法が基剤の影響を受けたものと思われる。

結 論

尿素配合クリーム中の尿素を簡便に抽出し、液体クロマトグラフィにより定量する方法を確立した。本法は分解物との分離定量が可能で、精度良く、製剤中の尿素を定量することができる。本法を用いて自製品及び市販品の尿素配合クリームについて安定性試験を行ったところ、安定性に差異が認められた。安定な尿素配合クリームを製造するためには処方設計が大切と考えられる。

引 用 文 献

- 1) 本研究の一部は、日本薬学会近畿支部例会で発表、大阪、1988 年 11 月。

- 2) 小幡正明, 六郷正和, 田上八朗, 皮膚科紀要, **81**, 595 (1986).
- 3) 立沢政義, 橋場茂子, 鈴木隆男, 分析化学, **17**, 430 (1968).
- 4) 金井 泉, 金井正光, “臨床検査法提要,” 金原出版, 1983, p. 423.
- 5) S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, “The Merck Index,” 11ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., U.S.A., 1989, p. 1553.
- 6) J. Kawase, H. Ueno, A. Nakae, K. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **252**, 209 (1982).
- 7) J. A. Owens, J. S. Robinson, *J. Chromatogr.*, **338**, 303 (1985).