トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液を
移動相として用いた高速液体クロマトグラフィー
によるアラントインの迅速定量

山本隆三, 関 雅晴, 大内一弘,* 小谷野真一,
中沢修一, 永谷康典, 佐藤 宏
ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所

**A Rapid Determination of Allantoin by High-performance Liquid
Chromatography Using Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl
Buffer as a Mobile Phase**

Ryuzo YAMAMOTO, Masaharu SEKI, Kazuhiro OUCHI,* Shin-ichi KOYANO,
Shuichi NAKAZAWA, Yasunori NAGATANI, and Hiroshi SATO
*Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Co., LTD., 2512-1,
Oshikiri, Konan-machi, Osato-gun, Saitama 360-0111, Japan*

(Received December 26, 1997)

A rapid and simple method for the determination of allantoin in pharmaceuticals by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography using an ODS column was presented. In general, it is difficult to retain allantoin to the ODS column owing to its very low hydrophobicity. We solved these problems by the use of a Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing tetra-*n*-hexylammonium bromide (THAB) as an ion-pair reagent for the mobile phase. Comparatively low concentrations of Tris-HCl buffer (0.9 mM) and THAB (0.5 mM) gave a high capacity factor (k'). As a results of the examination of the chromatographic behavior, it is confirmed that the retention mechanism of allantoin to the ODS column on the present method was not the ion-pair mode, but the ion-exchange mode. Calibration curves for allantoin showed a good linearity in the range of 10 to 400 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.9999$). The reproducibility (R.S.D., $n=6$) was invariably good (0.37%). The lowest concentration of allantoin for the determination was 200 ng per 20 μl of injection. The present method was successfully applied to the determination of allantoin in commercial eyedrops with good recovery (99.4%). It was found that allantoin in pharmaceuticals could be determined by the present method in short time and without any complicated derivatization.

Key words—allantoin; HPLC; ODS column; Tris; ion-pair reagent; eyedrop

緒

言

アラントインは抗炎症作用, 抗潰瘍作用, 細胞賦活作用等を有し, 眼科用薬, 皮膚疾患治療薬等の医薬品及び化粧品に広く配合されている. また, 山薬及び葛根等の生薬,^{1,2)} 抗潰瘍薬アルジオキサの主成分³⁾ として含有されている.

アラントインの HPLC 法による定量法として, ODS カラム,^{4,5)} アミノカラム^{6,7)} 及びイオン

交換カラム^{1,8)}を用いた方法が報告されている。アラントインの疎水性が非常に低いため、ODS カラムを用いた方法では、カラムに保持され難く、カラムを長くする等⁹⁾の工夫がされているが十分ではない。また、通常の移動相条件では、アラントインとイオンペア試薬とのイオンペアが形成され難く、さらにイオン化する pH⁹⁾ においてアラントインが不安定であるため、¹⁰⁾ イオンペア試薬を用いた例は現在までに報告されていない。¹¹⁾ 医薬品及び化粧品中のアラントインの定量法としては、アミノカラム及びイオン交換カラムを用いた方法が一般的であり、また、プレ及びポストカラム誘導体化法¹²⁾ も多く報告されている。

したがって、一般的で比較的安価な ODS カラムにイオンペア試薬を用いアラントインを保持させることが可能となれば、簡便で汎用性の高い定量法を確立することができると考えた。そこで我々は、移動相に含まれる緩衝液及びイオンペア試薬がアラントインの ODS カラムへの保持に与える影響について種々検討した。その結果、移動相として Tris-HCl 緩衝液及びイオンペア試薬の組み合わせを選択することにより、アラントインが ODS カラムに保持されることを見出し、再現性の良い、簡便な迅速定量法を確立した。また、本法におけるアラントインの ODS カラムへの保持機構について検討した。さらに、医薬品に配合されるアラントインの定量にも応用した。

実 験 の 部

1. 試料及び試薬 点眼剤は自社製市販品 (アラントイン (2 mg/ml), アミノエチルスルホン酸 (2 mg/ml), 塩酸テトラヒドロゾリン (0.1 mg/ml), マレイン酸クロルフェニラミン (0.1 mg/ml) 及び塩化リゾチーム (5 mg/ml) 配合) を用いた。アラントインは金剛化学(株)製を用い、純度 99.0% 以上のものを標準物質とした。トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) は和光純薬工業(株)製試薬特級、テトラ-*n*-ヘキシルアンモニウムブロマイド (THAB) はナカライテスク(株)製を用いた。その他の試薬は市販の試薬特級及び HPLC 用グレードを用いた。

2. 使用機器 HPLC 装置は(株)島津製作所製送液ポンプ: LC-10AD 型, オートサンプラー: SIL-10A 型, カラムオーブン: CTO-10A 型, UV 検出器: SPD-10AV 型及びデータ処理装置: CLASS-LC10 型を使用した。HPLC カラムは(株)資生堂製 Capcell Pak C₁₈ SG120 (25 cm × 4.6 mm i.d.), Capcell Pak NH₂ (25 cm × 4.6 mm i.d.) 及び東ソー(株)製 TSK-Gel SCX (15 cm × 6.0 mm i.d.) を使用した。

3. ODS カラムを用いたアラントインの定量法 試料 (点眼剤) を移動相で希釈し、*p*-アミノアセトフェノン (最終濃度: 10 µg/ml) を内標準物質として加え、アラントインの最終濃度が 20 µg/ml になるように調製し、その 20 µl を HPLC に注入した。ODS カラムは Capcell Pak C₁₈ SG120 を 40°C で使用した。移動相は 1 mM Tris 溶液及び 5 mM THAB のメタノール溶液の混液 (9:1) を 0.1 N 塩酸により pH を 7.5 に調整した液 (最終濃度, Tris: 0.9 mM, THAB: 0.5 mM) を使用した。流量は 1 ml/min, 検出波長は 230 nm に設定した。なお、アミノカラム又はイオン交換カラムを使用する場合、試料を 1/15 M のリン酸二水素カリウム緩衝液で希釈し、アラントインの最終濃度が 20 µg/ml になるように調製し、その 20 µl を HPLC に注入した。

結 果 及 び 考 察

1. 移動相の pH 及び濃度の検討 アラントインがイオンペア試薬とイオンペアを形成するためには、アラントインの pK_a が 8.9⁹⁾ であることを考慮すると、中性からアルカリ性で緩衝能を示す緩衝液を移動相として選択する必要がある。そこで、イオンペア試薬 THAB を含む

Fig. 1. Effect of pH on the k' of Allantoin in Tris-HCl and Phosphate Buffer

○, Tris-HCl buffer; △, phosphate buffer. Detection, 230 nm; column, Capcell Pak C₁₈ SG120 (25 cm × 4.6 mm i.d.); column temperature, 40°C; mobile phase, 1 mM buffer/10 mM THAB in methanol (9:1) (pH 7–9); flow rate, 1 ml/min.

Fig. 2. Effect of the Concentration of Buffer on the k' of Allantoin in Tris-HCl and Phosphate Buffer

○, Tris-HCl buffer; △, phosphate buffer. Mobile phases were 0.2–2 mM buffer/10 mM THAB in methanol (9:1) (pH 7.5). Other HPLC conditions were the same as described in Fig. 1.

Tris-HCl 緩衝液及びリン酸緩衝液を用い、ODS 系カラムにおけるアラントインの保持係数 (k') に与える pH の影響を検討した (Fig. 1). その結果、アラントインの k' はいずれの緩衝液を用いても pH が高くなるに従い増加し、特に Tris-HCl 緩衝液では顕著であった。しかし、pH 8 以上ではアラントインがアラントイン酸に酸化される等、不安定であり、¹⁰⁾ また、カラムの耐久性も考慮して移動相の pH を 7.5 とした。

次に移動相の pH を 7.5 に固定し、緩衝液の濃度について検討した (Fig. 2). Tris-HCl 緩衝液を用いた場合、アラントインは ODS カラムに保持された。一方、リン酸緩衝液を用いた場合、ほとんど保持されなかった。また、いずれの緩衝液においても濃度が高くなるに従い k' の減少傾向が認められた。

アラントインがイオンペア試薬とイオンペアを形成するためには、解離型であることが必要である。しかし、pH 7.5 においてアラントインはほとんど解離しておらず、イオンペアを形成するためにはアラントインの活性プロトンを引き抜く塩基が必要である。したがって、Tris は緩衝液としてのみならず、アラントインの活性プロトンを引き抜く塩基として作用し、アラントインとイオンペア試薬とのイオンペア形成を向上させる作用も有することが示唆された。一方、リン酸は塩基として作用しないことから、アラントインが ODS カラムに保持されないものと考えられた。

次に、pH 7.5 で緩衝能を示し、また、Tris の pK_b に近い他の塩基を用い ODS カラムのアラントインの保持について検討した (Fig. 3). トリエタノールアミン等の塩基を用いた場合もアラントインは ODS カラムに保持された。また、塩基の濃度は Tris も含め、低濃度であるほどアラントインが ODS カラムに強く保持された。しかし、1 mM 以下の濃度では、各塩基ともに k' が変動し、再現性に乏しかった。この原因は塩基の濃度が低く、緩衝能が弱くなり、pH 変動を起

Fig. 3. Effect of the Concentration of Bases on the k' of Allantoin

○, Tris; □, triethanolamine; △, morpholine; ●, 2-amino-2-methyl-1-propanol; ■, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol. Mobile phases were 0.2—5 mM base/10 mM THAB in methanol (9 : 1) (pH 7.5). Other HPLC conditions were the same as described in Fig. 1.

Fig. 4. Effect of Tetra-alkylammonium Bromides on the k' of Allantoin

○, THAB; △, tetra-*n*-amylammonium bromide; □, tetra-*n*-butylammonium bromide. Mobile phases were 1 mM Tris-HCl buffer/0.1—2 mM ion-pair reagent in methanol (9 : 1) (pH 7.5). Other HPLC conditions were the same as described in Fig. 1.

こしやすくなったためと推察された。以上の結果から、移動相にはアラントインが ODS カラムに最も強く保持される Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を選択し、その最終濃度を安定した保持を示す 0.9 mM に設定した。

イオンペア試薬について種々検討した結果、テトラアルキルアンモニウム塩がアラントインの ODS カラムへの保持に有効であることを見出した。そこで炭素鎖長 4—6 のテトラ-ブチル、アミル及び *n*-ヘキシルアンモニウムブロマイドを用い、それらの移動相中の最終濃度が 0.1—2.0 mM におけるアラントインの k' を比較した (Fig. 4)。炭素鎖長が長くなるに従い k' は増大し、THAB では濃度が高くなるに従い k' は減少傾向を示した。以上の結果から、イオンペア試薬にはアラントインが ODS カラムに最も強く保持される THAB を選択し、その最終濃度を安定した保持を示す 0.5 mM に設定した。

2. アラントインの ODS カラムへの保持機構の検討 IPC における保持機構は、(1) 電荷を有する溶質とイオンペア試薬の親水性部位との間でイオンペアが形成され、保持はこのイオンペアと固定相との間の疎水的相互作用により生じる (イオンペアモード)¹³⁾ (2) イオンペア試薬の疎水性部位が固定相に吸着されることによりイオン交換体が形成され、保持はこのイオン交換体と電荷を有する溶質との間のイオン交換作用により生じる (イオン交換モード)¹⁴⁾ 等の仮説が提唱されているが、正確な保持機構については未だに解明されていない。

本法における移動相は通常の IPC と比較して、低濃度の緩衝液及びイオンペア試薬が有効であった。また、アラントインの HPLC 法による定量法において、イオンペア試薬を用いた例は現在までに報告されていない。そこで、本法におけるアラントインの ODS カラムへの保持機構について検討した。アラントイン、イオンペア試薬及び ODS カラムとの相互作用を検討するため、Tris, THAB 等の組成を変化させた移動相を用いてアラントインの k' を比較した。

Fig. 5. Retention Mechanism of Allantoin by Reversed-Phase Ion-Pair HPLC

本法における移動相から THAB を除いたもの (MP1) 又は本法における移動相から Tris を除いたもの (MP2) を移動相として用いた場合, アラントインは保持されなかった (k' 0.07 及び k' 0.10). 次に MP1 で平衡化した後に MP2 を用いた場合もアラントインは保持されなかった (k' 0.10). しかし, MP2 で平衡化した後に MP1 を用いた場合, アラントインは保持された (k' 0.99). この場合の k' は本法における移動相を用いた場合とほぼ同じ値を示した (k' 0.94).

以上の結果から, 本法におけるアラントインの ODS カラムへの保持機構は, アラントインが THAB とイオンペアを形成し, ODS カラムと疎水的相互作用により保持されるイオンペアモードではなく, まず THAB が疎水的相互作用により ODS カラムに吸着し, イオン交換体を形成し, pH 7.5 で緩衝能を示し, かつアラントインの活性プロトンを引き抜く塩基としての作用を有する Tris の存在下, アラントインとこのイオン交換体との間でイオンの相互作用により保持されるイオン交換モードであることを確認した (Fig. 5).

3. ODS カラムによるアラントインの定量性 本法において, 検量線は 10—400 $\mu\text{g/ml}$ までの範囲で原点を通る直線性を示し ($Y=0.518 X+0.0057$, $r=0.9999$), 標準溶液の繰り返し注入による再現性は相対標準偏差 0.37% ($n=6$) と良好な結果が得られた. また, 定量下限 ($S/N=3$) は注入量 20 μl で 200 ng であった.

4. 医薬品中のアラントインの定量 本法をアラントインが処方される機会の多い点眼剤の定量に応用した. 点眼剤中のアラントインの定量にあたり, 本法, アミノカラム⁶⁾ 及びイオン交換カラム¹⁾ を用いた方法との添加回収率及び再現性を比較した.

本法から得られた結果は, アミノカラム及びイオン交換カラムを用いた方法の結果と比較して添加回収率及び再現性において同等以上であった (Table 1).

本法における分析時間は短く, 標準溶液及び試料溶液から得られたクロマトグラムはピークの形状及び分離ともに良好であり, 妨害となるピークも認められなかった (Fig. 6). 以上の結果から, 本法は点眼剤中のアラントインの定量に応用することが可能であり, 簡便かつ汎用性の高い定量法であることが示唆された.

Table 1. Comparison of Recoveries and Reproducibilities of Present Method with Other Methods on the Determination of Allantoin in an Eyedrops

Method	Recovery ^{a)}		Reproducibility	
	Amounts of allantoin (mg)		R.S.D. (%)	
	Added	Found		
Present method	1.0092	1.0084	99.4	0.58
SCX column	1.0088	1.0112	100.2	0.89
NH ₂ column	1.0088	1.0094	100.1	2.03

a) $n=6$.

Fig. 6. Typical HPLC Chromatograms of Allantoin in an Eyedrops
(a), standard solution; (b), test solution. 1, allantoin; 2, internal standard.

ま と め

アラントインの HPLC 法による定量法は、アミノカラム又はイオン交換カラムを用いた方法が一般的であり、ODS カラムを用いた方法ではアラントインがカラムに保持され難いことから、煩雑なプレ又はポストカラム誘導体化が必要であった。しかし、今回、イオンペア試薬 THAB を含む Tris-HCl 緩衝液を移動相に用いることにより、アラントインを ODS カラムに保持させることが可能になり、医薬品中のアラントインの再現性等が良好な定量法を確立した。本法における移動相は通常の IPC と比較して低濃度の緩衝液及びイオンペア試薬が有効であり、その保持機構は疎水的相互作用によるイオンペアモードではなく、イオンの相互作用によるイオン交換モードであることを確認した。本法は一般的で比較的安価な ODS カラムを用い、煩雑な誘導体化を必要とせず、短時間分析が可能な簡便かつ汎用性の高い定量法である。さらに本法を点眼剤中のアラントインの定量に応用したところ、良好な結果が得られ、その有用性を確認した。

引 用 文 献

- 1) 相楽和彦, 須藤桂一, 吉田継親, 生薬, **42**, 268—271 (1988).
- 2) 萩原輝彦, 上原真一, 渡辺四男也, 東京衛研年報, **44**, 76—79 (1993).
- 3) 日本公定書協会編, “第 13 改正日本薬局方解説書,” 廣川書店, 東京, 1996, pp. 117—120.
- 4) Tiemeyer W., Giesecke D., *Anal. Biochem.*, **123**, 11—13 (1982); Balcells J., Guada J. A., Peiró J. M., Parker D. S., *J. Chromatogr.*, **575**, 153—157 (1992).
- 5) Eiteman M. A., Gordillo R. M., Cabrera M. L., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **348**, 680—683 (1994).
- 6) Kutsuna H., Ohtsu Y., Yamaguchi M., *J. Chromatogr.*, **635**, 187—193 (1993).
- 7) Trivedi R. J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 290—294 (1988); Zaidi Z. R., Sena F. J., Basilio C. P., *J. Pharm. Sci.*, **71**, 997—999 (1982); Dennis R., Dezelak C., Grime J., *Acta Pharm. Hung.*, **57**, 267—274 (1987).
- 8) Masson S., Sciaky M., Desmoulin F., Fontanarava E., Cozzone P. J., *J. Chromatogr. B. A.*,

- 563**, 231—242 (1991); Terzuoli L., Pandolfi M., Arezzini L., Pizzichini N., Marinello E., Pagani R., *ibid.*, **663**, 143—147 (1995).
- 9) 日本公定書協会編, “化粧品原料基準第二版注解,” 薬事日報社, 東京, 1984, pp. 38—42.
- 10) 山本信也, 大友三男, 小松一男, 高松 翼, 松岡昌弘, 薬誌, **113**, 515—524 (1993); 雨宮敬, 伊藤弘一, 鈴木助治, 中村 弘, 東京衛研年報, **44**, 94—97 (1993).
- 11) Chen X. B., Matuszewski W., Kowalczyk J., *J. AOAC. Int.*, **79**, 628—635 (1996).
- 12) Chen X. B., Kyle D. J., Ørskov E. R., *J. Chromatogr. B. A.*, **617**, 241—247 (1993); Hirota K., Kawase M., Ohmori S., Kisie T., *ibid.*, **277**, 165—172 (1983); 横山俊夫, 木下俊夫, 分析化学, **40**, 349—353 (1991); Kawase J., Ueno H., Tsuji K., *J. Chromatogr.*, **253**, 237—242 (1982).
- 13) Wahlund K. G., *J. Chromatogr.*, **115**, 411—422 (1975); Fransson B., Wahlund K. G., Johansson I. M., Schill G., *ibid.*, **125**, 327—344 (1976); Horváth C., Melander W., Molnar I., Molnár P., *Anal. Chem.*, **49**, 2295—2305 (1977); Melander W. R., Horváth C., *J. Chromatogr.*, **201**, 211—224 (1980).
- 14) Kraak J. C., Jonker K. M., Huber J. F. K., *J. Chromatogr.*, **142**, 671—688 (1977); Kissinger P. T., *Anal. Chem.*, **49**, 883 (1977); Knox J. H., Jurand J., *J. Chromatogr.*, **125**, 89—101 (1976); Knox J. H., Hartwick R. A., *ibid.*, **204**, 3—21 (1981).