薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
119 (4) 288—298 (1999)

キャピラリー電気泳動による医薬品迅速分析 (第2報) デノパミン製剤の分析
—キラルセクターとして使用するジメチル β -シクロデキストリンの
純度が光学分割に及ぼす影響—

栺原由佳里,* 西 博行
田辺製薬株式会社・分析研究所

Fast Drug Analysis by Capillary Electrophoresis. II.
Analysis of Denopamine Tablets
—Effects of Purity of Dimethyl β -Cyclodextrin as Chiral Selector
on Enantiomer Separations—

Yukari KUWAHARA* and Hiroyuki NISHI
Analytical Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., 16-89,
Kashima 3-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8505, Japan

(Received October 23, 1998)

Capillary electrophoresis (CE) has been utilized as a tool for enantiomeric separation. It has been incorporated into both USP and EP forums as the methods for general tests and assays. In the present study, we applied CE to the assay and content uniformity of denopamine tablets (KALGUT[®]), which are clinically used as a cardiotonic agent. The electrophoretic solution consisted of phosphate buffer of pH 2.5 containing 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD) to achieve enantiomer separation, because denopamine is an optically active drug. During this study, we found that the purity of the positional isomerism of DM- β -CD, significantly influenced the resolution of denopamine enantiomers. This effect of isomer purity was also confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometer analysis. The results of the assay and system suitability test indicated that CE method could be useful as an alternative to the conventional HPLC method.

Key words—capillary electrophoresis; denopamine; enantiomer separation; 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin; octopamine

キャピラリー電気泳動 (CE) は DNA^{1,2)} やタンパク質^{3,4)} などの生体成分をはじめ、医薬品の分析に有用であり、製剤の定量^{5,6)} においても、多くの実用化検討が報告されている。既に USP フォーラムや EP フォーラムでは試験法として CE が収載され、USP フォーラムの医薬品各条ではエピネフリン注射液⁷⁾ とエタンブトール錠⁸⁾ の定量に CE 法が採用されている。

著者らは医薬品分析への CE の適用、特に迅速分析と光学分割に関する検討を行っており、様々なキラルセクターの適用について研究を行っている。⁹⁻¹²⁾ 前報では CE による医薬品迅速分析 (I) として、Ca 拮抗薬・ヘルベッサ (塩酸ジルチアゼム) 錠及び気管支拡張薬・イノリン (塩酸トリメトキノール) 錠の光学純度測定をも兼ねた CE 迅速定量法について報告した。¹³⁾ 今回は、心機能改善薬として医療用に供されているカルグート (デノパミン, DP, Fig. 1)

錠について、光学純度測定を含めた CE による迅速な定量法の検討を行った。

DP の CE 光学分割では、2,6,-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD), acetyl- β -cyclodextrin, β -cyclodextrin phosphate などの β タイプの CD が、キラルセクターとして有用であることが報告されている。^{14, 15)} 本検討では、これらの中から DM- β -CD を採用し、キラルセクターの最適濃度を CD と DP との結合定数から算出し、実際の実験による結果と比較した。ところが、この検討過程において、従来から使用しているメーカー以外の DM- β -CD を使用した場合、光学異性体間の分離度 (R_s) が大きく異なるという結果が得られた。メチル化 β -CD を用いる CE 光学分割では、メチル基の導入された位置と個数が、光学認識能に大きく影響することについては、既に報告がある。^{16, 17)} また、市販のメチル化 CD を使用する場合は、その置換度により選択性が大きく異なることについての報告もある。¹⁸⁾

そこで 6 種類の市販の DM- β -CD について、CE での DP の光学分割 (R_s) の比較、HPLC 法及び MALDI TOF/MS 法による DM- β -CD の純度の検討を行った。また、DM- β -CD の光学認識のメカニズムについて、DM- β -CD と DP の X 線結晶構造解析及び DM- β -CD と DP の結合定数などから、若干の考察を行った。さらに、ICH での検討を受け、日本薬局方 (日局) でも CE に関する技術的な検討が行われていることから、¹⁹⁾ 設定した DP の迅速定量法について、USP フォーラム²⁰⁾ に準じたシステム適合性試験を行い、DP 製剤の含量均一性試験及び定量の試験を行った。

実 験 の 部

実験材料 DP 錠 3 ロット、定量用 DP, DP ラセミ体及び塩酸トリメトキノール (AQ) ラセミ体は、いずれも田辺製薬(株)製のものを使用した。d-マレイン酸クロルフェニラミン (d-MCP) は日局品、DM- β -CD はベックマン、シグマ、ナカライテスク、片山化学、東京化成及び和光純薬の 6 社より購入したものをそのまま使用した。(±)-塩酸オクトパミン (OCT) (Fig. 1) はアルドリッチ製を、エタノール (99.5), 塩酸及びリン酸は片山化学製特級品を、メタノールは片山化学製 HPLC 用を使用した。その他の試薬は和光純薬製特級品を使用した。

実験装置及び実験方法 CE 装置にはベックマン P/ACE 5510 を使用し、データ処理は COMPAQ ProLinea 4/33 を用いて行った。レコーダーは EPSON SP-500 を、キャピラリーはベックマン及びスペルコ製、内径 75 μ m, 有効長 40 cm のフューズトシリカ管を用いた。なお、キャピラリーは冷媒を用いて 20°C の一定温度に保った。緩衝液には 20 mM リン酸二水素ナトリウム二水和物水溶液にリン酸を加えて pH 2.5 としたものをを用い、これにキラルセクターである DM- β -CD を 50 mM 添加し、使用前に孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、超音波洗浄器 (Branson 3200) を用いて脱気した。検出は 225 nm における吸収を利用して行い、印加電圧は 25 kV 一定とした。試料導入は、圧力法 (0.5 psi, 1 psi = 6894.76 Pa) により行い、導入時間は 5 秒間とした。

Fig. 1. Chemical Structures of (a) Denopamine (*R*(-)-form) and (b) (±)-Octopamine Hydrochloride

HPLC 装置は下記の通りである。システムコントローラ：島津 SCL-10A, ポンプ：島津 LC-10AD, オートサンプラー：島津 SIL-10A, サンプルクーラー：島津 SAMPLE COOLER S, カラムオーブン：島津 CTO-6A, 検出器：Shodex RI-71, インテグレータ：島津 C-R5A.

MALDI TOF/MS は Per Septive Voyager Elite-DE 装置を用いて行った。X 線結晶構造解析は Rigaku AFC5R 装置を用いて行い、解析プログラムには SHELXS-97, データベースには Cambridge Structural Database を使用した。

CE による DP 及び AQ の光学分割 市販の DM- β -CD 6 種類 (A, B, C, D, E 及び F 社品とする) を各々 50 mM 濃度で泳動液に添加し, AQ ラセミ体及び DP ラセミ体の分離について検討を行った。また, 各ラセミ体と内標準物質 (IS) として使用した *d*-MCP の分離についても検討した。試料溶液には AQ ラセミ体及び DP ラセミ体を各々 5 mg ずつ量り, 0.1 mol/l 塩酸 40 ml を加えて溶かしたものに, 1 mg/ml 濃度に調製した *d*-MCP メタノール溶液 (IS 溶液) を 5 ml 加え, さらに 0.1 mol/l 塩酸を加えて 50 ml としたものを使用した。この試料溶液 200 μ l をサンプルカップにとり, 圧力法 (5 秒間) によりキャピラリー内に導入した。

HPLC による DM- β -CD の純度試験 試料溶液には各社の DM- β -CD を 20 mg/ml 濃度になるように移動相に溶かしたものをを用い, 試料注入量は 20 μ l とした。なお, 移動相は 80% メタノール, カラムは YMC-Pack ODS-A (4.6 mm i.d., 150 mm) を 40°C で使用し, RI 検出器により検出を行った。

MALDI TOF/MS による DM- β -CD の分子量分布測定 各社の DM- β -CD をマトリックスに 2 mg/ml 濃度に溶かし, これを 1 μ l ターゲット上に塗布し, 乾固させた後, MALDI TOF/MS による分子量分布の測定を行った。なお, 加速電圧は 20 kV とした。マトリックスは 10 mg の 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を 1 ml の 10% エタノール溶液に溶かしたものをを用いた。

DM- β -CD との結合定数の算出 DM- β -CD の濃度を 0—100 mM の範囲で変化させ, それぞれの CD 濃度での DP 及びその類似化合物 OCT の移動時間及び電気浸透流 (EOF) を計測した。CD 添加にともなう EOF の変化を補正し, 以下の式 (1) により $(\mu_i - \mu_f)^{-1}$ と $[C]^{-1}$ をプロットし, 得られた直線の傾きと y 切片から結合定数 K を求めた。²¹⁾ さらに, 式 (2) により, 2 つの光学異性体の電気泳動移動度の差が最大となる CD の最適濃度 $[C]_{\text{opt}}$ を算出した。²²⁾

$$\frac{1}{(\mu_i - \mu_f)} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)K} \frac{1}{[C]} \frac{1}{(\mu_c - \mu_f)} \quad (1)$$

μ_f : CD 無添加のときの試料の電気泳動移動度, μ_i : CD を添加したときの試料の電気泳動移動度, μ_c : 試料が CD と 100% 複合体を形成した時の電気泳動移動度, K : 結合定数, $[C]$: DM- β -CD の濃度

$$[C]_{\text{opt}} = \frac{1}{\sqrt{K_R \cdot K_S}} \quad (2)$$

K_R : R 体の結合定数, K_S : S 体の結合定数

DP 及び OCT の K 値測定用試料溶液は, 各ラセミ体を各々約 5 mg, 50 ml のメスフラスコに量り込み, 0.1 mol/l 塩酸 30 ml を加えて時々振り混ぜながら超音波処理をしながら溶かし, さらに 0.1 mol/l 塩酸を加えて全量 50 ml として調製した。この液 200 μ l をサンプルカップにとり, 圧力法 (5 秒間) によりキャピラリー内に導入し, CE 分析を行った。

X 線結晶構造解析による DM- β -CD の光学認識能の検討 DM- β -CD 及び DP の X 線結晶構造解析から得られた分子構造図を用いてシュミレーションを行い, DM- β -CD の光学認識能について検討を行った。DP の分子構造図は, X 線結晶構造解析装置 Rigaku AFC5R を用いて

DP 塩酸塩の測定を行い、プログラム SHELXS-97 を用いて最適化を行うことにより得た。DM- β -CD については β -CD の分子構造図を Cambridge Structural Database より引用し、メチル化を行い、安定な配置の分子構造図を作成した。

システム適合性試験 DP ラセミ体約 5 mg を 50 ml のメスフラスコに量り込み、0.1 mol/l 塩酸を 30 ml 加えて、時々振り混ぜながら超音波処理し、溶解させた。さらに、IS 溶液 5 ml を先のメスフラスコに加え、0.1 mol/l 塩酸を加えて全量を 50 ml とし、システム適合性試験用溶液とした。この液 200 μ l をサンプルカップにとり、圧力法 (5 秒間) により、キャピラリー内に導入した。得られたエレクトロフェログラムより、各々のピーク間の R_s 及び各ピークのシンメトリー係数 (S) を求めた。なお、計算は日局 13・一般試験法・液体クロマトグラフ法に記載の式 (3) 及び (4) により求めた。²³⁾

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \quad (3)$$

t_{R1} , t_{R2} : 二つの物質の保持時間 ($t_{R1} < t_{R2}$), $W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$: それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク幅。

$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f} \quad (4)$$

$W_{0.05h}$: ピークの基線からピーク高さの 1/20 の高さにおけるピーク幅, f : $W_{0.05h}$ のピーク幅をピークの頂点から記録紙の横軸へ下ろした垂線で二分したときのピークの立ち上がり側の距離。

また、定量用 DP 約 5 mg を 50 ml のメスフラスコに精密に量り込み、0.1 mol/l 塩酸を 30 ml 加え、時々振り混ぜながら超音波処理し、溶解させた。さらに、IS 溶液 5 ml を正確に加え、0.1 mol/l 塩酸を加えて全量を 50 ml とし、定量用標準溶液とした。この液を繰り返し 6 回、圧力法 (5 秒間) によりキャピラリー内に導入し、IS に対する DP のピーク面積の比について、相対標準偏差 (RSD) を求めた。

DP 製剤の含量均一性試験 DP 製剤としてはカルグート錠 5 (DP 5 mg 含有) を用い、 d -MCP を IS 物質とした IS 法により、日局 13・一般試験法・含量均一性試験に準じて試験を行った。試料調製はカルグート錠 5 各々 1 錠を 50 ml のメスフラスコに入れ、0.1 mol/l 塩酸を 30 ml 加えて、時々振り混ぜながら 10 分間超音波処理し、錠剤を完全に崩壊させた。崩壊後、IS 溶液 5 ml を正確に加え、さらに 0.1 mol/l 塩酸を加えて全量を 50 ml とし、よく振り混ぜた後、孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過した。初めのろ液 3 ml を除き、次のろ液を試料溶液とした。試料溶液及び先述の定量用標準溶液 200 μ l をそれぞれサンプルカップにとり、圧力法 (5 秒間) によりキャピラリー内に導入した。

DP 製剤の定量 カルグート錠 5 を 20 個とり、その重量を精密に量り、粉末とした。その約 0.1 g を 50 ml のメスフラスコに精密に量り込み、0.1 mol/l 塩酸を 30 ml 加え、時々振り混ぜながら 5 分間超音波処理した後、IS 溶液 5 ml を正確に加え、さらに 0.1 mol/l 塩酸を加えて全量を 50 ml とし、よく振り混ぜた。この液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、初めのろ液 3 ml を除き、次のろ液を試料溶液とした。試料溶液及び定量用標準溶液につき、以下、DP の含量均一性試験と同様に操作して定量を行った。

結 果

1. DM- β -CD をキラルセクターとする DP 及び AQ の光学分割 6 種類の DM- β -CD

Fig. 2. Separations of Denopamine Racemate, Trimetoquinol Hydrochloride Racemate and IS by CE with DM- β -CD

Capillary, fused-silica capillary (75 μ m i.d., 40 cm to the detector); Running buffer, 20 mM phosphate buffer (pH 2.5) containing various kinds (A—F) of DM- β -CDs (50 mM); Applied voltage, 25 kV; Column temperature, 20°C; Detection, 225 nm.

を各々 50 mM 濃度で泳動液に添加し、AQ, DP の光学分割及び *d*-MCP (IS) との分離について検討を行った。結果を Fig. 2 に示す。F はこれまでの検討に使用してきた F 社の DM- β -CD を用いた時のエレクトロフェログラムで、AQ 及び DP とともに光学異性体がベースライン分離されており、IS である *d*-MCP との分離も良好であった。一方、D 社及び E 社の DM- β -CD を用いた場合（それぞれエレクトロフェログラム D 及び E）は、AQ ラセミ体はベースライン分離され、*d*-MCP との分離も良好であったが、DP ラセミ体の光学分割が不十分であった。また、A 社、B 社及び C 社の DM- β -CD を用いた場合（それぞれエレクトロフェログラム A, B 及び C）は、AQ ラセミ体は光学分割されたが DP ラセミ体は分離されず、*d*-MCP の移動時間も他の DM- β -CD の場合と比較して大きく異なり、AQ ラセミ体と同じ位置に検出された。以上の分離の結果より、今回使用した 6 種類の DM- β -CD は、ほぼ 3 種類のパターンに分類されることが示された。

2. HPLC による DM- β -CD の純度試験 6 種類の DM- β -CD について、逆相 HPLC による純度試験を行った。得られた液体クロマトグラムを Fig. 3 に示す。Blank は DM- β -CD の溶解に用いた水の液体クロマトグラムで、この分析条件下では 5 分過ぎに DM- β -CD が、12 分過ぎに TM- β -CD が溶出する。先の CE 光学分割で AQ 及び DP の光学異性体がともに良好にベースライン分離されていた F 社の DM- β -CD の液体クロマトグラムには、他と比べて保持の小さい多数のピークが認められた。一方、CE による光学分割で、DP ラセミ体が光学分割されず、他社の DM- β -CD を用いた場合に比べて大きく異なる *d*-MCP の移動時間を与えていた A, B 及び C 社の DM- β -CD の液体クロマトグラムは、ほぼ 1 本の主ピークを認めるのみで、HPLC 純度は良好であることが分かった。また、D 社及び E 社の DM- β -CD の液体クロマトグラムはこれらの中間的な結果を示した。以上、HPLC 法による DM- β -CD の分析結果からも、CE による分析結果と同様に、今回使用した 6 種類の DM- β -CD には 3 種類のパターンが有ることが示唆された。

3. MALDI TOF/MS による DM- β -CD の分子量分布測定 6 種類の DM- β -CD の MALDI

Fig. 3. Analysis of Various Kinds of DM- β -CDs by HPLC

Column, YMC-Pack ODS-A (4.6 mm i.d., 150 mm); Column temperature, 40°C; Detection, RI (32×10^{-6} RIU/FS); Mobile phase, methanol : H₂O = 8 : 2 by volume; Flow rate, 1.0 ml/min; Injection volume, 20 μ l.

Fig. 4. MALDI TOF/MS Spectra of Various Kinds of DM- β -CDs

Voltage, 20 kV; Matrix, 2,5-dihydroxy benzoic acid (10 mg) in 10% ethanol solution (1 ml).

TOF/MS スペクトルを Fig. 4 に示す。DM- β -CD の分子量は 1331 であるが、A、B 及び C 社の DM- β -CD の MALDI TOF/MS スペクトルには、DM- β -CD のピークと考えられる 1331 のピークを境に、それよりも分子量の小さい領域に 2 本のピークが、分子量の大きい領域に 3 本のピークが確認された。一方、D 及び E 社の DM- β -CD の MALDI TOF/MS スペクトルでは、

DM- β -CD のピークと考えられる 1331 のピークを境に、それよりも分子量の小さい領域に 1 本のピークが、分子量の大きい領域に 5 本のピークが確認された。また、F 社の MALDI TOF/MS スペクトルでは、DM- β -CD のピークと考えられる 1331 のピークを境に、それよりも分子量の小さい領域に 1 本のピークが、分子量の大きい領域に 3 本のピークが確認された。以上の MALDI TOF/MS の検討結果より、CE 法及び HPLC 法での検討結果と同様に、入手した DM- β -CD 6 種には 3 種類のパターンが存在することが示唆され、いずれもメチル基の導入率は 1 グルコース当たり 2 個以上であると推定された。

4. DP 及び OCT の DM- β -CD に対する結合定数 Double reciprocal plot (Lineweaver-Burk 型) により作成した DP と DM- β -CD の結合定数を求めるためのグラフを Fig. 5 に示す。DP の $R(-)$ 体及び $S(+)$ 体ともに相関係数 0.999 以上の良好な直線関係を与えた。また、他のプロット法で作図を行い、求めた K 値及びこれらを用いて算出したキラルセクターの最適濃度値を Table 1 に示す。3 者ともほぼ同じ値を与え、 $R(-)$ 体で約 20 M^{-1} 、 $S(+)$ 体で約 28 M^{-1} となり、これらから求めたキラルセクターの最適濃度は 42 mM と、実験により求めた最適濃度 50 mM とよく一致し、Wren と Rowe の、CD と化合物が 1:1 で包接するモデルから導かれた式 (2)²²⁾ の妥当性を支持した。

5. X 線結晶構造解析による光学認識能の検討 X 線結晶構造解析によるファンデルワールス半径を考慮した DP 及び DM- β -CD の分子構造図を、スペースフィルモデルを用いて Fig. 6 に示す。これらの分子構造図からも分かるように、DP がジメトキシフェニル基側から包接されるとすると DM- β -CD と接触するため、包接はやや困難であると考えられる。一方、 p -ヒドロキシフェニル基側からであれば、DM- β -CD の孔径内部に容易に取り込まれることが分かる。DP の p -ヒドロキシフェニル基側と同じ構造を持つ薬物 OCT について、DM- β -CD との結合定数を求めたところ、DP の結合定数と近い値 (約 15 M^{-1} 、 17 M^{-1}) が得られたことから、DP の p -ヒドロキシフェニル基が CD に包接されるものと考えられた。

以上から推定された DP と DM- β -CD の仮想的な包接図を、ボール&スティックモデルを用いて Fig. 7 に示す。左側が DM- β -CD の上方か

X 線結晶構造解析によるファンデルワール

Fig. 5. Double Reciprocal Plot for the Determination of Binding Constants between a DM- β -CD and Denopamine

$R(-)$ -form: $f(x) = -332.84x - 6766.1$, $R^2 = 0.99915$; $S(+)$ -form: $f(x) = -276.21x - 7545.8$, $R^2 = 0.99909$, $\square$, $R(-)$ -form; $\bullet$, $S(+)$ -form.

Table 1. Binding Constants between a DM- β -CD and Denopamine and Optimal Concentration of CD

Plot method	Form	$K \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$[C]_{\text{opt}} \text{ (mM)}$
Double reciprocal plot (Lineweaver-Burk type)	$R(-)$	20.3	42.5
	$S(+)$	27.3	
x -Reciprocal plot (Scatchard type)	$R(-)$	20.6	41.5
	$S(+)$	28.2	
y -Reciprocal plot	$R(-)$	19.7	43.0
	$S(+)$	27.5

Fig. 6. Stereoscopic Images of a DM-β-CD and Denopamine Considering from the van der Waals' Force radius: oxygen; black circle, carbon; gray circle, nitrogen; gray circle with arrow, hydrogen; white circle.

Fig. 7. The Top (Left) and Side (Right) Views of the Proposed Model of the Inclusion Compound Formed from a DM-β-CD and Denopamine

○; oxygen, ●; carbon, ●; nitrogen, ○; hydrogen.

ら観察した図で、右側が DM-β-CD の側面から観察した図である。これらの包接図からも分かるように、DP の NH 部位及び不斉炭素に結合している OH 基と、DM-β-CD 周口部の 2 位のメトキシ基及び 3 位の OH 基との間の距離は *p*-ヒドロキシフェニル基が包接されたときに最も接近した。すなわち、これらの間での水素結合が、DP の *R*(-) 体及び *S*(+) 体で異なり、光学分割されたものと考えられ、それゆえ、DM-β-CD 周口部の 2 位あるいは 3 位へのメチル基の導入率の違いが DP の光学認識に大きく影響したと言える。

6. DP の迅速分析及びシステム適合性試験 DM-β-CD の濃度を 50 mM とし、25 kV 印加することで、DP の光学純度測定をも含めた 600 秒以内での迅速定量が可能となった。定量の際に得られたある試料溶液のエレクトロフェログラムを同条件下での DP ラセミ体標品の分離例とともに Fig. 8 に示す。本条件では、*d*-MCP, DP の *R*(-) 体, *S*(+) 体の順に移動し、光学

異性体間の R_s は 1.54 であった。

酸性条件 (pH 2.5) 下では electroosmotic flow (EOF) の速度は極めて遅く、陽極から陰極に向かって発生し、電気的に中性なキラルセクターである DM- β -CD は EOF とともにゆっくり移動する。一方、塩基性薬物である DP (二級アミンの pK_a は約 8.2, フェノール性水酸基の pK_a は約 10.0)²⁴⁾ は正に帯電しているため、EOF よりも大きな電気泳動移動度で陰極に向かって移動する。この間、DM- β -CD と相互作用し、光学異性体間で DM- β -CD との結合定数が異なることによって光学異性体の分離が達成されることになる。

また、本法でのピーク面積比により作成した検量線を Fig. 9 に示す。相関係数 0.999 以上の原点を通る良好な直線関係が得られた。なお、前述の定量で用いられた濃度は約 0.1 mg/ml であった。DP の定量用標準溶液繰り返し 6 回注入時の IS に対する DP のピーク面積比の RSD は 0.40% と低く、IS と DP 活性体の R_s は 27.2, DP の光学異性体間の R_s は 1.54 となった。IS 及び DP 活性体のシンメトリー係数は、両物質ともに塩基性物質であることから、6.0 とやや大きな値となったが、各ピーク間の R_s が充分高いこと及び DP 定量用標準溶液の繰り返し 6 回注入時の RSD も低かったことより、これらの薬物の定量には問題はないと考えられた。

以上の結果より、本法が CE による DP の含量均一性試験法及び定量法として、十分、適用可能であると判断された。また、これらの値は、HPLC 法でのシステム適合性試験の結果と比較しても遜色はなく、CE 法は実用に耐えうる分離分析法であることが分かった。

7. DP 製剤の含量均一性試験 DP 製剤の含量均一性試験の結果を Table 2 に示す。DP 製剤 3 ロット、繰り返し 1 回の含量均一性試験の結果は、各ロットでそれぞれ 98.7—102.1%, 98.8—101.6% 及び 98.4—101.5%, その平均含量は 100.3%, 100.2% 及び 100.1% となった。また、測定値の RSD は、各ロットで 1.15%, 1.05% 及び 1.17% となり、重量偏差試験 (日局 12 タイプの重さのみでの偏差) での RSD 値 (各ロットで 0.99%, 0.78% 及び 0.78%) とほぼ一致した。また、日局 13 における判定値 (規定値は 15% 以下) は 2.83%, 2.51% 及び 2.67% となり、いずれも日局適合となった。

8. DP 製剤の定量 DP 製剤の定量結果を Table 3 に示す。3 ロット、繰り返し 6 回の定量

Fig. 8. Electropherograms of (A) Denopamine Racemate and (B) a Sample Solution in Assay Conditions are the Same as in Fig. 2.

Fig. 9. Calibration Curve of Denopamine
 $f(x) = 10.950x + 0.0068$, $R^2 = 0.99999$

結果は、各ロットでそれぞれ 100.1%, 100.8% 及び 99.4% となり、測定値の RSD は各ロットで 1.13%, 0.87% 及び 0.56% と、バラツキも小さく良好であった。また、HPLC での測定結果ともよく一致した。

考 察

DM- β -CD のメチル基の結合位置が、DP の光学分割において、大きな影響を与えることが分かった。これは、 β -CD の周口部のメチル基が DP の光学分割にとって重要であるためと考えられ、このことは X 線結晶構造解析により得られた分子構造図を用いた包接についてのシュミレーション実験からも支持された。本検討より、メチル化- β -CD 特に DM- β -CD をキラルセクターとして使用する CE 光学分割では、その純度（メチル基の結合位置の異なるものの混合割合）が、光学異性体の Rs に大きく影響し得ることに留意する必要があることが示された。また、今回、DP と DM- β -CD の結合定数をプロット法により求め、Wren と Rowe の式²²⁾に従って最適な CD 添加濃度を算出したところ 42 mM となり、この値は実験による最適濃度 50 mM と良く一致し、CD と DP の包接は等モル関係にあることが示された。

次に、製剤分析への応用として、DP 製剤の含量均一性試験及び定量に CE 法を適応したところ、前報の HER 及び AQ 製剤の CE による分析¹³⁾と同様に良好な結果が得られ、CE 法が実用に十分耐えうる手法であることが確認された。CE では有機溶媒を使用せず、かつ特殊なキラルカラムを利用しなくとも光学分割が達成されるなど、環境面及び経済面での利点、さらに、CE の高い分離性能、迅速性、容易なメソッド開発などといった特徴を考えると、医薬品の品質管理や簡易分析には、CE 法は極めて有力な手法であると言えよう。USP フォーラムや EP フォーラムに CE 法が収載され、国外では公定法としての利用が現実となった現在、日本でも、日局・一般試験法への早期収載が望まれるところである。

謝辞 本研究において、MALDI TOF/MS を測定していただいた田辺製薬(株) 分析研究所堀本眞吾研究員及び X 線結晶構造解析についてご助言いただいた同創薬研究所平松 元研究員に感謝します。

引 用 文 献

- 1) Guttman A., Ulfelder K. J., *Adv. in Chromatogr.*, **30**, 301—340 (1998).

Table 2. Results of Content Uniformity of Denopamine Tablets

Sample units	Sample lot		
	A	B	C
1	98.7%	99.7%	100.0%
2	99.9%	100.7%	99.2%
3	100.8%	99.9%	99.1%
4	100.8%	101.6%	99.0%
5	99.0%	99.2%	101.3%
6	99.1%	100.3%	99.8%
7	99.4%	101.4%	101.1%
8	99.7%	101.0%	98.4%
9	102.1%	98.8%	101.5%
10	101.4%	99.4%	100.2%
Average	100.3%	100.2%	100.1%
S.D.	1.15	1.05	1.17
RSD	1.15%	1.05%	1.17%
Acceptance value	2.83%	2.51%	2.67%

Table 3. Assay Results of Denopamine Tablets

Repetition	Sample lot		
	A	B	C
1	99.1%	100.4%	99.9%
2	101.2%	99.6%	99.5%
3	99.3%	101.6%	98.5%
4	100.0%	100.0%	99.8%
5	99.1%	101.6%	98.9%
6	101.7%	101.4%	99.7%
Average	100.1%	100.8%	99.4%
S.D.	1.13	0.88	0.56
RSD	1.13%	0.87%	0.56%

- 2) 馬場嘉信, 薬誌, **117**, 265—281 (1997).
- 3) Jenkins M. A., Guerin M. D., *J. Chromatogr. B.*, **682**, 23—34 (1996).
- 4) Jenkins M. A., Kulinskaya E., Martin H. D., Guerin M. D., *J. Chromatogr. B.*, **672**, 241—251 (1995).
- 5) Altria K. D., Bryant S. M., Hadgett T. A., *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, **15**, 1091—1101 (1997).
- 6) Bretnall A. E., Hodgkinson M. M., Clarke G. S., *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, **15**, 1071—1075 (1997).
- 7) *Pharmacopeial Forum*, **23**, 3991—3992 (1997).
- 8) *Pharmacopeial Forum*, **23**, 3992—3993 (1997).
- 9) Terabe S., Otsuka K., Nishi H., *J. Chromatogr. A.*, **666**, 295—319 (1994).
- 10) Nishi H., Terabe S., *J. Chromatogr. A.*, **694**, 245—276 (1995).
- 11) Nishi H., *J. Chromatogr. A.*, **735**, 57—76 (1996).
- 12) Nishi H., *J. Chromatogr. A.*, **792**, 327—347 (1997).
- 13) 桑原由佳里, 西 博行, 薬誌, **118**, 456—463 (1998).
- 14) Nishi H., Ishibuchi K., Nakamura K., Nakai H., Sato T., *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, **13**, 1483—1492 (1995).
- 15) Ishibuchi K., Izumoto S., Nishi H., Sato T., *Electrophoresis*, **18**, 1007—1012 (1997).
- 16) Tanaka M., Yoshinaga M., *J. Chromatogr. A.*, **679**, 359—365 (1994).
- 17) Weseloh G., Bartsch H., Konig W. A., *J. Microcol. Sep.*, **7**, 355—363 (1995).
- 18) Palmarsdottir S., Edholm L.-E., *J. Chromatogr. A.*, **666**, 337—350 (1994).
- 19) 早川堯夫, 医薬品研究, **29**, p. 441 (1998).
- 20) *Pharmacopeial Forum*, **22**, 1727—1735 (1996).
- 21) Kimber L., Rundlett, Daniel W., Armstrong, *J. Chromatogr. A.*, **721**, 173—186 (1996).
- 22) Wren S. A. C., Rowe R. C., *J. Chromatogr.*, **603**, 235—241 (1992).
- 23) 第十三改正日本薬局方, 第一法規, p. 23, (1996).
- 24) 西 博行, 藤本雄三, 本条理恵, 津曲喜雍, 松尾賢明, 柿本年雄, 清水禮治, 医薬品研究, **20**, 991—1000 (1989).