薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
96 (5) 669-672 (1976)

UDC 615.356 : 577.161.1.074 : 543.544.062

高速液体クロマトグラフィーによる製剤中のビタミン A の定量

田部井智三, 大前雅彦, 河部 靖

エーザイ株式会社分析研究所¹⁾

Determination of Vitamin A in Pharmaceutical Preparations by High-Speed Liquid Chromatography

TOMOZO H. TAMEGAI, MASAHICO OHMAE and KIYOSHI KAWABE

Analytical Research Laboratory, Eisai Co., Ltd.¹⁾

(Received November 13, 1975)

In an attempt to develop a more specific and convenient method for the determination of vitamin A in preparations, high-speed liquid chromatographic method was investigated. Samples were dissolved, directly or after saponification, in a mixture of methanol and chloroform, and injected into a Permaphase "ODS" column. Vitamin A was separated from other substances by employing a mixture of methanol and water as the mobile phase, and assayed using chrysene or benzo[a]pyrene as internal standard. This method showed a substantial improvement over the Carr-Price method which had been used officially.

製剤中のビタミン A の定量法としては一般に三塩化アンチモンによる呈色反応を利用した Carr-Price 比色法²⁾ (CP 法) が採用されているが, 本法は定量に熟練を要し, かつ分解物の妨害を受けるなどの欠点を有している。

最近, 高速液体クロマトグラフィー (HSLC) が開発され, 脂溶性ビタミン類の分離についても検討されているが,³⁾ ビタミン A の分解物共存下における分離条件については検討されていない。

著者らは HSLC が分解物の妨害をうけず, 定量操作が CP 法より簡便であるという見解からビタミン A の HSLC を検討し, 製剤中のビタミン A の内部標準法による定量法を確立し, CP 法との比較を行なった。

実験の部

試料 酢酸レチノール (A acet) としては all trans 型の純結晶を用いたが, レチノール (A OH) は A acet をけん化し, アンヒドロ A (A anhydro) は原島らの方法⁴⁾ に従って調製した。

ビタミン A 軟膏および A・E 軟膏としては O/W 型基剤に試料 1 g 当り A acet 1 万 IU, および A acet 1 万 IU, 酢酸 dl- α -トコフェロール (E acet) 10 mg を含むものをそれぞれ用いた。また, 総合ビタミン剤カプセルとしては試料 1 cap 当り A acet 1000 IU, コハク酸 dl- α -トコフェロール 100 mg の他, ビタミン B₁ 10 mg, B₂ 5 mg, B₆ 5 mg および C 50 mg を配合したものを用いた。

装置 高速液体クロマトグラフは Dupont 830 型 (検出器; UV₂₅₄) を用い, カラムは逆相分配型の Permaphase ODS をつめた 50 cm×2.1 mm ステンレスカラムを, 移動相は含水メタノールを用い室温で使用した。

CP 法による定量 試料またはそのアルカリけん化物を 1% 無水酢酸のクロロホルム溶液に溶解し, 1 ml 当りビタミン A として 15 IU を含む溶液を調製し, これを試料液とした。試料液の 1 ml に三塩化アンチモン試液 3 ml を加え, 15 秒後に 610 nm の吸光度を測定した。

結果と考察

1. 定量法の検討

ビタミン A 含有製剤を HSLC によって分析する際の試料液の調製法としては試料を直接溶媒に溶解する場合

1) Location: 4-6-10, Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo.

2) F.H. Carr, E.A. Price, *Biochem. J.*, **20**, 497 (1926).

3) R.C. Williams, J.A. Schmit, R.A. Henry, *J. Chromatog. Sci.*, **10**, 494 (1972); M. Vecchi, J. Vesely, G. Oosterhelt, *J. Chromatog.*, **83**, 447 (1973).

4) K. Harashima, H. Okazaki, H. Aoki, *J. Vitaminol.*, **7**, 150 (1961).

と、あらかじめアルカリけん化して溶媒抽出後、濃縮する場合がある。前者ではビタミン A はエステル型のままであるのにたいし、後者ではビタミン A は AOH となっており、同時に配合されたビタミン E も α -トコフェロール (EOH) の型をとっている。また、製剤中にはビタミン A の主分解物として A anhydro が共存している。⁵⁾ 従って移動相を選択するにあたってはこれらの分解物が相互に最もよく分離する条件を見いだすことが必要となる。Fig. 1 は移動相のメタノール中の含水率を変化させた場合の A acet, AOH, A anhydro, E acet および EOH の保持容量の変化を示したものである。含水率が低いと各成分の重なりがみられるが、含水率を高くしていくと各成分の分離は完全になる。しかし、E acet および EOH は含水率がそれぞれ 30% および 40% 以上となると溶出しなくなる。従って分離に要する時間も考慮するとエステル型では含水率 23% 付近が、けん化物型では 37% 付近が適当であった。

次に内部標準物質として種々の多環芳香族炭化水素について HSLC を行なったところ Fig. 2 および Fig. 3 に示すように A acet の定量の際はベンゾ [a] ピレン, AOH の定量の際はクリセンが適当であることが判明した。またこれらを内部標準としたときの検量線は原点を通る直線となった。そこで、A acet の型で定量可能な場合は試料をメタノール・クロロホルム (2:1) 混液に溶解し、1 ml 当りビタミン A 400 IU, 内部標準物質 (ベンゾ [a] ピレン) 24 μ g を含む液を試料液とし、AOH の型で定量する必要がある場合は試料をピロガロール存在下、水酸化カリウムのエタノール溶液を用いてけん化し、エーテル抽出後エーテル層を水洗、減圧下に溶媒を留去してえた残留物をメタノール・クロロホルム (2:1) 混液に溶解して、1 ml 当りビタミン A 400 IU, 内部標準物質 (クリセン) 24 μ g を含む液を試料液とし、前記の条件で HSLC を行なうこととした。

Table I に添加実験の結果を示すが、どちらの方法でも回収率はほぼ 100% であり、定量精度も製剤の分析法としては十分に満足すべきものであった。

2. CP 法と HSLC 法との比較

ビタミン A 軟膏を 55° で等温虐待して経時的に試料をとり出し、HSLC および CP 法によりビタミン A 含量を測定するとともに薄層クロマトグラフィー (TLC) により分解物の追求を行なった。結果は Fig. 4 および 5 に示すようで、ビタミン A 軟膏の見かけの分解反応速度次数は CP 法では零次であったのにたいし、HSLC で

Fig. 1. Effect of Content in Mobile Phase on Separation of Vitamin A and E

column: permaphase ODS, 50 cm $\times$ 2.1 mm
mobile phase: methanol-water
flow rate: 0.5 ml/min
detector: UV₂₅₄
—○—: AOH, —●—: A acet,
—▲—: A anhydro, —□—: EOH,
—■—: E acet

Fig. 2. Separation of Vitamin A and E

column: permaphase ODS, 50 cm $\times$ 2.1 mm
mobile phase: methanol-water (77:23)
flow rate: 0.5 ml/min
detector: UV₂₅₄
A: solvent, B: AOH, C: A acet, D: A anhydro, E: EOH, F: E acet, G: Benzo [a] pyrene

Fig. 3. Separation of Vitamin AOH, A anhydro and Vitamin EOH

column: permaphase ODS, 50 cm $\times$ 2.1 mm
mobile phase: methanol-water (63:37)
flow rate: 0.5 ml/min
detector: UV₂₅₄
A: solvent, B: AOH, C: A anhydro, D: EOH, E: chrysen

5) 太幡利一, ビタミン, 25, 419 (1962).

TABLE I. Recovery of Vitamin A

Sample	Recovery (%)	
	as A acet	as AOH
Vitamin A ointment	98.5	
	99.0	
	99.5	
	97.4	
	102.1	
	$\bar{x}=99.3$	
	$s=1.8$	
Vitamin A·E ointment	100.5	100.0
	99.5	101.2
	99.9	99.6
	101.3	99.5
	100.3	99.0
	$\bar{x}=100.3$	$\bar{x}=99.9$
	$s=0.7$	$s=0.7$
Multi-Vitamin capsule		98.1
		99.6
		101.7
		100.6
		99.1
		$\bar{x}=99.8$
		$s=1.4$

column: permaphase ODS 50 cm×2.1 mm
mobile phase: methanol·water (77: 23) or (63: 37)
flow rate: 0.5 ml/min
detector: UV₂₅₄

はこのデータを時間とビタミン A 単位の数値の関係としてグラフ化しなおしたところ直線となり一次反応であることが判明した。またそれぞれの方法で求めた定量値の差も大きかった。軟膏中には分解物として A anhydro および AOH が認められるが、ビタミン A の異性体に関しては吉田らおよび Stahl⁶⁾ の方法に従って TLC を行

Fig. 4. Thin-Layer Chromatogram of Vitamin A acet in Ointment after Storage at 55°

plate: merk precoated kieselgel F₂₅₄
mobile phase: cyclohexane·ether (85: 15)
detection: SbCl₃ reagent
a: A anhydro, b: retro-Vitamin A, c: A acet, d: A OH

Fig. 5. Thermodegradation of Vitamin A in Ointment

—○—: CP method, —●—: HSLC

Fig. 6. Thin-Layer Chromatogram of Vitamin A in Multi-Vitamin Capsule and Vitamin A·E Ointment

plate: merk precoated kieselgel F₂₅₄
mobile phase: cyclohexane·ether (85: 15)
detection: SbCl₃ reagent
sample: Lot A, B, F and G of Table II
a: A anhydro, d: A OH

6) 吉田正信, 上田文雄, 牧野輝勇, 山下 脩, ビタミン, 31, 115 (1965); Egon Stahl, "Thin-Layer Chromatography a Laboratory Hand Book," Springer-Verlag Berlin, 1966, p. 274.

TABLE II. Assay of Vitamin A in Multi-Vitamin Capsule and Vitamin A·E Ointment

Sample	Method		
	Lot	HSLC	CPmethod
Multi-Vitamin Capsule 1000 iu/cap	A	1230 iu/cap	1290 iu/cap
	B	1010	1100
	C	1200	1230
	D	1100	1190
	E	1100	1200
Vitamin A·E Ointment 10000 iu/g	F	11000 iu/g	11320 iu/g
	G	9660	10090
	H	10340	11250
	I	10450	11530

なったところこれ以外のスポットを認めなかったことから異性体は生成していないものと考えられる。A anhydro は A acet の加水分解物 AOH から生成したものと考えられるが、HSLC では A acet そのものを測定しているため反応次数は A acet の分解を示している。いま A acet がまず加水分解をうけるものと仮定すると試料中の水分は A acet にたいし、大過剰で一定とみなせるから A acet は見かけ上一次反応に従って分解するものと考えられるが、⁷⁾ 実験事実はこの仮定に一致する。これにたいして CP 法では分解物の AOH, A anhydro が A acet とほぼ同一呈色強度を示して定量値に加算されるため、⁸⁾ 反応次数からは A acet の分解は推定できない。従って CP 法は速度論的考察を行なう際の定量法としては適当ではない。

またビタミン AE 軟膏および総合ビタミン剤カプセル中のビタミン A を HSLC および CP 法で求めるとともに、不けん化物につき TLC を行なったところ Table II および Fig. 6 の結果を得た。これらの製剤では A 軟膏の場合と異なり、A anhydro がほとんど生成しておらず、従って HSLC と CP 法によって求めた定量値にもあまり大きな差が認められない。また両定量値の差が小さいことから分解物の AOH もほとんど生成していないものと推定される。

結 論

HSLC による製剤中のビタミン A の定量法を確立した。本法は従来の CP 法に比較して簡便で A anhydro などの分解物の妨害をうけないため、より優れた方法と考えられる。

謝辞 終りに、本研究の発表の許可を賜った当社内藤裕次取締役社長、山岸敦取締役研究開発本部長に感謝します。

7) J.T. Carstensen, E.S. Aron, D.C. Sperd, J.J. Vance, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 561 (1966).

8) E.M. Shantz, J.D. Calley, N. Embree, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 901 (1943).