

高速液体クロマトグラフィーによる メコバラミンの定量

山口県衛生公害研究センター

北山光正・歳弘克史・藤原美智子

岡 日出生・宮村恵宣

Determination of Mecobalamin by High Performance Liquid Chromatography

Mitsumasa KITAYAMA, Katsushi TOSHIHIRO, Michiko FUJIWARA

Hideo OKA, Shigenori MIYAMURA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health

はじめに

ビタミン製剤は多くの人達の健康を維持していくためには欠かすことのできない医薬品として、数多くの種類のものが薬局等の店頭で陳列、販売されている。

これらビタミン製剤にはそれぞれ目的に応じたビタミン類が配合されており、その種類や剤形の違いなどにより有効成分の含有量はそれぞれ異なっているが、その有効成分の含量測定を行うことは不良医薬品の発見等監視指導を行う上で重要なことである。

これらビタミン類の定量法については日本薬局方¹⁾及び日本薬局方外医薬品規格²⁾で定められ、滴定法、吸光度測定法及び液体クロマトグラフ法などが用いられている。

近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) についてはその普及や分析技術の向上により、多くの物質の定量分析が可能となり、HPLCを使用したビタミン類の迅速分析法^{3~7)}や市販ドリンク剤中のビタミン類の分析に関する多くの報告^{8~10)}がある。しかし、末梢性神経障害及び貧血の治療などに用いられている¹¹⁾ビタミンB₁₂の関連化合物に関してはシアノコバラミンに関する報告^{12, 13)}があるだけで、メコバラミン(補酵素型ビタミンB₁₂)そのものを分析した報告はない。

そこで、メコバラミンを有害試薬を用いて誘導体を作ることなく直接定量可能な分析法について検討した。

実験方法

1 試料

メコバラミンを含有する医薬品のうち、錠剤8検体、注射剤2検体を試料とした。

2 試薬

(1) 定量用メコバラミン

メコバラミンは、シグマ社製を用いた。なお、メコバラミンは光により成分変化を受けやすい²⁾ため、冷暗所内での保管を遵守した。

(2) 標準溶液

定量用メコバラミン20mgを精密に量り、移動相に溶解し100mLとした。

この液10mLを正確に量り、内部標準溶液10mLを正確に加え、更に移動相を加えて100mLとした。

(3) 内部標準溶液

バニリン (和光純薬製・特級品) 10mgを精密に量り、移動相に溶解し100mLとした。

(4) 移動相

メタノール320mLに水680mLを加え、よく混和した。

(5) その他の試薬

メタノールはHPLC用を、また、それ以外の試薬は特級品を用いた。

3 装置

(1) HPLC装置：東ソーアイソクラティックシステム8010シリーズ

(2) データ処理装置：システムインストルメンツ製クロマトコーダー12

4 試験溶液の調製

錠剤は20錠以上をとり、その重量を精密に量り、粉末として試料とした。注射剤はそのまま試料とした。

試料中のメコバラミン約2mgに相当する量を100mL褐色メスフラスコに精密に量り、移動相70mLを加え

てよく振り混ぜ、内部標準溶液10mLを正確に加え、更に移動相を加えて100mLとした。

粉末試料についてはその後30分間超音波処理した後、メンブランフィルターでろ過し、試験溶液とした。

なお、試料溶液等の調製操作はすべて暗室内で行い、保管容器も完全に遮光できるものを使用した。

5 定量

試験溶液及び標準溶液のそれぞれ20 μ Lを、次の条件のHPLCに注入し、内部標準法によりピーク面積比を測定し、定量した。

HPLC条件

検出器：紫外部吸光光度計（測定波長：340 nm）

カラム：TOSOH TSK-GEL ODS-80Ts（5 μ m, 4.6mm \times 150 mm）

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：水・メタノール混液（68：32）

流量：0.9mL/min

結 果

1 HPLC条件の検討

(1) 移動相

移動相として、アセトニトリル・リン酸緩衝液混液及びアセトニトリル・酢酸緩衝液混液の2系統について、緩衝液のpHおよびアセトニトリルと緩衝液との配合割合等を変えて検討したが、メコバラミンの良いピークの形状が得られず、分析には不適であった。

そこで、移動相の成分組成を水とメタノールの混液とし、メタノール濃度によるメコバラミンの保持時間を検討した。移動相のメタノール濃度を変えたときのメコバラミンの保持時間の変化を図1に示す。メタノール濃度26%付近から、濃度が少し増加しただけで、メコバラミンの保持時間が急激に短くなる

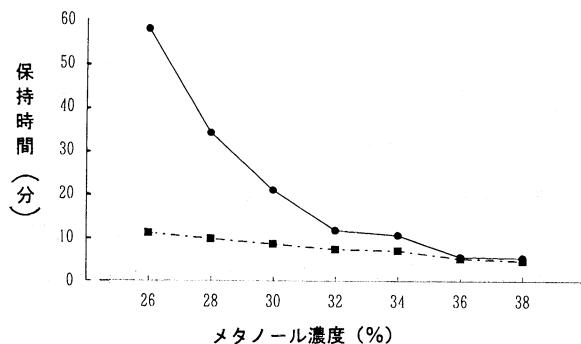


図1 メタノール濃度による保持時間の変化
●—●—●— ●—●—●— ●—●—●—
メコバラミン
—■—■—■— ■—■—■— ■—■—■—
バニリン (内部標準物質)

傾向が見られた。迅速分析のことも考慮し、メコバラミンの保持時間が10分程度となるメタノール濃度32%に決定した。

(2) 測定波長

自記分光光度計を用いて、定量用メコバラミンの移動相溶液（0.01mg/mL）の吸収スペクトルを測定したところ、波長312nm, 340nm, 375nm及び522nmの4ヶ所に吸収の極大を示した。そのうち最大吸収極大を示した340nmを測定波長に決定した。

メコバラミンの吸収スペクトルを図2に示す。

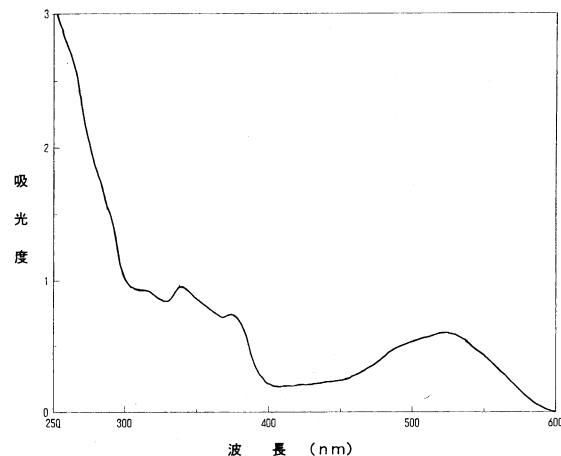


図2 メコバラミンの吸収スペクトル

(3) 内部標準物質

内部標準物質として使用する場合に必要なのは、有効成分と明確に分離されるもの、有効成分と保持時間が近接しているもの及び経時の変化を生じないものでなければならぬこと等を考慮して、バニリン、カフェイン、アセトアニリド、アセトアミノフェン、フェノール及びp-ヒドロキシ安息香酸エチルの6物質について検討した結果、バニリンがメコバラミンとの分離が良く、保持時間も適当であった。

2 シアノコバラミンとの同時分析

現在、治療薬として用いられているビタミン製剤には多くの種類のビタミンが含まれている。ビタミンB12関連化合物についても、メコバラミン以外の物質が用いられており、なかでもシアノコバラミンを主要成分とするものは一般用医薬品¹⁰⁾でも広く用いられている。

HPLCを用いたシアノコバラミンの定量法については、既に迅速分析法⁷⁾以外にも報告例^{12, 13)}があるが、今回、メコバラミンの定量法を検討するに際し、メコバラミンとの同時分析の適合について検討した。

定量用メコバラミン、シアノコバラミン（和光純薬製・特級品）及びバニリンの各物質の溶液中の濃度がそれぞれ0.02mg/mL、0.01mg/mL及び0.01mg/mLとなるように調製した移動相溶液を先に検討したHPLC条件で測定したところ、図3のクロマトグラムのとおり、いずれの物質も良好に分離され、保持時間も適当であった。

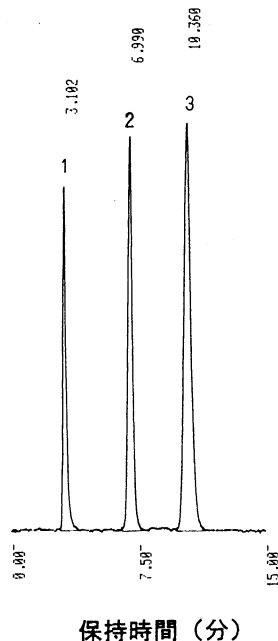


図3 標準品のクロマトグラム

ピーク1 シアノコバラミン
ピーク2 バニリン (内部標準物質)
ピーク3 メコバラミン

3 光による成分変化

メコバラミンは光により変化するため、日本薬局方外医薬品規格では試験操作も光を避け、遮光容器を用いて行うこととしており、本検討でもこれに従い行った。

室内の照明をつけず、標準溶液等の調製にも遮光性のある褐色ガラス器具等を用い、操作も短時間で迅速に行った。

しかし、試験室内では完全な遮光が出来なかったため、HPLCに試料を注入し定量したところ、メコバラミンのピークの形状が変化し、定量には不適であった。

そこで、標準溶液及び試験溶液の調製等の操作を暗室内で行い、保管容器も完全に遮光したものをを用いた結果、光の影響を受けずにメコバラミンを定量することができた。

4 検量線及び再現性

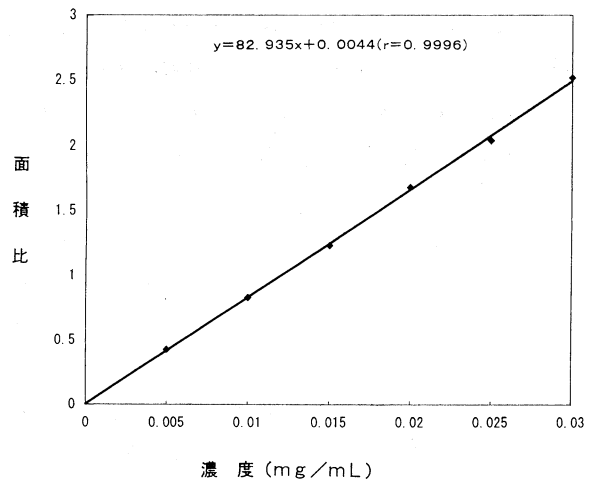


図4 内部標準法によるメコバラミンの検量線

ピーク面積による内部標準法により、メコバラミンの検量線を作成したところ、図4に示すとおり、0.005~0.03mg/mLの範囲でピーク面積比と濃度との間に原点を通る良好な直線が得られた。

また、標準溶液における再現性 (n=5) を求めたところ、変動係数0.87%と良好であった。

5 添加回収試験

メコバラミンの含まれていないビタミン錠剤にメコバラミン1mg及び2mgを添加し、その回収率を求めた。

その結果、表1のとおり回収率103.9%及び100.3%、変動係数1.73%及び1.32%と満足する結果が得られた。

表1 添加回収試験

	回収率 (%)	
	1 mg添加	2 mg添加
1	104.6	102.3
2	100.9	99.8
3	105.4	100.8
4	103.7	99.9
5	104.9	98.7
平均値	103.9	100.3
変動係数 (%)	1.729	1.316

6 市販品の分析結果

本法により市販のビタミン製剤10検体についてメコバラミンを定量した結果、表2に示すとおり表示量の95.5~108.2%とすべて含量規格範囲(90~110%)内であった。

表2 市販品の測定結果

検体	剤形	表示量 (mg)	定量値 (mg)	表示量に対する割合 (%)
A	錠剤	0.500	0.5411	108.2
B	錠剤	0.250	0.2544	101.8
C	錠剤	0.500	0.5111	102.2
D	錠剤	0.250	0.2523	100.9
E	錠剤	0.500	0.5367	107.3
F	錠剤	0.500	0.5203	104.1
G	錠剤	0.500	0.4912	98.2
H	錠剤	0.500	0.4775	95.5
I	注射剤	0.500	0.5150	103.0
J	注射剤	0.500	0.5068	101.4

注 表示量は、試料1錠中又は1アンプルのメコバラミン含有量を示す。

まとめ

ビタミン製剤中のメコバラミンについて、有害試薬等を使用せず、簡便で精度良く定量できる分析法としてHPLCを用いる試験法を検討し、次の結果を得た。

- 1 HPLC条件として、カラムに逆相系TOSOH TSK-GEL ODS-80Ts, 移動相に水・メタノール混液 (68:32) を使用し、測定波長は340nmに設定することにより、メコバラミン及びシアノコバラミンを同時に分析することができた。
- 2 試験溶液の調製は試料に移動相を加え、溶解あるいは希釈するだけの簡便な操作で十分であり、固形試料にあっても30分間の超音波処理後にろ過するだけで十分であった。
- 3 メコバラミンは光の影響を非常に受けやすい物質であるが、試験溶液等の調製等前処理を暗室内で行い、保管容器等も完全に遮光措置を施したものを使用することにより光の影響を受けずに定量することができた。
- 4 内部標準物質としてはバニリンが適当であった。
- 5 添加回収試験でも回収率103.9%及び100.3%, 変動係数1.73%及び1.32%と良好であり、市販品検査においても含有成分の妨害もなく、良好に定量することができ、品質管理又は行政試験などの分析法としては有効である。

文 献

- 1) 厚生省：第十三改正日本薬局方 (1996)
- 2) 厚生省薬務局審査課編：日本薬局方外医薬品規格 1997 (1997)
- 3) 松田りえ子：月刊薬事. 28, 825~827 (1986)
- 4) 松田りえ子：月刊薬事. 28, 1015~1017 (1986)
- 5) 石橋無味雄：月刊薬事. 33, 143~149 (1991)
- 6) 豊岡利正ほか：月刊薬事. 35, 1031~1036 (1993)
- 7) 豊岡利正ほか：月刊薬事. 36, 1675~1685 (1994)
- 8) 五日市治ほか：岩手衛研年報. 30, 23~27 (1987)
- 9) 梶村計志ほか：大阪府立公衛研所報薬事指導編. 21, 27~30 (1987)
- 10) 勝倉由美ほか：宮城県保健環境センター年報. 8, 74~76 (1990)
- 11) 日本医薬情報センター編：日本医薬品集医療薬. 1996年10月版, 薬業時報社, 566p, 1476p (1996)
- 12) 太田美矢子ほか：衛生試験所報告. 105, 65~68 (1987)
- 13) 北島文ほか：衛生試験所報告. 112, 170~174 (1994)
- 14) 帝京大学医薬情報室編：OTCハンドブック 1997~1998. 学術情報流通センター, 388p~401p (1997)