

高速液体クロマトグラフィー用ビタミン A 標品の試作研究

——パルミチン酸レチノール油ソフトカプセル

の作製とその品質及び安定性の評価——

井上孝夫， 庄司幸夫， 高島雍治， 高野礼二郎，
江沢 総， 伊藤 昭， 太幡利一^{◎*}

(1985 年 10 月 14 日受理)

現在ビタミン A の定量には，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が広く用いられている。しかし HPLC 用の標準品は，公共機関よりの交付がなされていない。そこでその標品を得るため「日局十」規格適合品のパルミチン酸レチノール {170 万国単位 (IU)/g} を中鎖脂肪酸トリグリセライド (MCT) で 20 万 IU/g に希釈し，ゼラチン軟カプセルとした。この試作標品について，それぞれ薄層クロマトグラフィー，紫外吸収スペクトル法及び一部 HPLC により 12 の実験室が参加して試験を行った。又安定性試験は，この標品について 50°C，40°C，25°C 及び室温で，6 か月にわたり行ったが，その安定性は，期待以上の良好な結果を得ることができた。

1 緒 言

1952 年 6 月に，厚生省より標準品交付規定が告示¹⁾され，ビタミン A (VA) は，肝油標準品 (マグロ肝油を分子蒸留により濃縮した画分を，精製ゴマ油で希釈し，紫外吸収スペクトル法により一定濃度に調整し遮光アンプルに封入したもの) という局方名で交付された。その主な用途は単位標準品で，比色分析用として繁用された。

1960 年以降も，同名標準品として交付されていたが，内容は肝油濃縮物に代わり合成品 {100 万国単位 (IU)/g} が用いられた。1971 年 (第八改正日本薬局方) 以降は，市場に合成品の占める割合が高いなどの理由により，パルミチン酸レチノール (Apal)，酢酸レチノールが，収載されたのを期に，フランス薬局方になって，高濃度の合成品については，従来の幾何学的補正法にかえて，吸光度比，薄層クロマトグラフィー (TLC) による確認などの制約をつけて，熟練を要するけん化抽出などの前操作を省略して，その吸収極大値のみで含量を評価する方法を，日局第 1 法とし，従来法を

第 2 法とした。今回 10 社，2 公的機関の共同研究を行った目的は，従来の第 1 法において，必要な TLC 標準品²⁾ としての価値に加え，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量目的用としても耐える標品の製造の可能性を確かめること，又最終的には，オールトランス VA エステル標品³⁾ として異性化し難い条件，例えば遮光など物理的条件を加味したものを製造することを考えて，希釈油，遮光性カプセル皮膜，Apal 濃度などについて，新たに検討し製造した。本報は安定性の検討結果についてのみ報告する。

共同実験参加者，及び所属を次に示す。

井上孝夫，庄司幸夫 (理研ビタミン)，高島雍治 (大正製薬)，高野礼二郎，石井秀樹 (日本ロシュ)，菊池三郎，松山 浩，江沢 総 (日清化学)，山岸 豊 (カネショク)，伊藤 昭 (河合製薬)，大澤祐司 (日本レダリー)，石川聖孝，丸井美由紀 (共立商事)，小林幸雄，中坪清八 (三生製薬)，沓沢美行 (クラレ)。

杉井麟三郎，清水泰幸 (農林水産省東海区水産研究所)，白井浄二，西川美知子 (農林水産省動物医薬品検査所)。

最終データ処理は，日本ビタミン AD 協会会長太幡利一 (昭和薬科大学) 及び全蒲連・蒲鉾研究所衣巻豊輔が行った。

* (社)日本ビタミン AD 協会技術委員会：154 東京都世田谷区弦巻 5-1-8 昭和薬科大学公衆衛生学教室内

2 標品の作製

2.1 パルミチン酸レチノール (Apal)

日本ロシュ製の, あらかじめ抗酸化剤として t -ブチルヒドロキシトルエン (BHT), t -ブチルヒドロキシアニソール (BHA) が添加されたものを用いた. なお本品の VA 含量は, 1g 当たり 170 万 IU で, BHT, BHA はいずれも 0.85% である. 又本品の VA 含量の調整には, ピーナッツ油が用いられている.

2.2 希釈油

理研ビタミン製の中鎖脂肪酸トリグリセライド (MCT) を用いた. 本品はカプリル酸のトリグリセライドであり, 純度は 99% 以上である.

2.3 内容油の調整及びカプセル加工

2.1, 2.2 を原料として窒素気流中で混合し, VA 含量をおよそ 20 万 IU/g に調整し, 日清化学(株)上田工場において, Table 1 に示すカプセル皮膜を用いて, カプセル加工を行った.

Table 1 Prescription of gelatin film

Gelatin	100
Glycerin	30
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	0.2
Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	0.1
Titanium dioxide	1
New cocchine (Food red No, 102)	0.25

試作カプセル (Cap) の平均重量は 352.7 mg であり, 内容油平均重量は 202.8 mg であった.

3 試験方法

3.1 分析方法

各実験所で, 製造直後の Cap 及び 3.2 に示す温度条件で保存した Cap について内容油の, Apal を以下の方法により分析した.

3.1.1 紫外吸収スペクトル法 (UV) Cap 1 個より内容油をとりだし, その約 50 mg を精密に量り, 「日局十」VA 定量法第 1 法に準じて測定し, VA 含量を求めた. 測定に使用した光度計は, 日立 200-20 型, 日立 220A 型, 日立 181 型, 島津 240 型, 日本分光 UVIDEC-340 型, 日本分光 UVIDEC-220 型及びベックマン DSB-70 型の 7 機種である.

3.1.2 HPLC 各実験所において, Apal の日常分析に適用している方法を用い, -5°C に保存した Cap

を対照として, 3.2 で保存した Cap について Apal の残存率を測定した. HPLC 条件は Table 2 に, 又得られたクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示す.

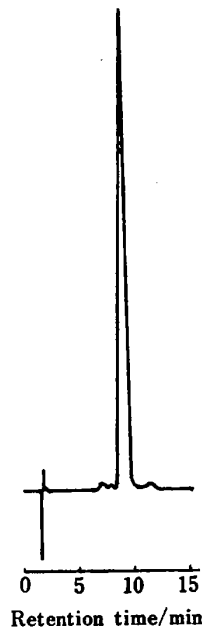


Fig. 1 Typical high performance liquid chromatogram of retinyl palmitate

分析を行った 5 実験所が用いている HPLC 機器は, それぞれ, 装置部品の組み合わせ, その他について多少の相違はあるが, それを Table 2 に示した. その差が実験所間の測定結果に及ぼす影響についても検討した. しかしすべて ODS カラムによる逆相分配クロマトグラフである. この装置と分析条件は, クロマトグラムの再現性, カラムの扱いやすさと繁用性, 移動相の経済性, 測定時間の節約などによるものと考えられ, このような多くのメリットがあるので特に支障がない限り Apal を含む製剤の測定は, この逆相系が用いられると考えて差し支えない. 著者らの用いた 5 機種より得られた HPLC クロマトグラムは, パターンとしてはすべて Fig. 1 に一致する. ここで, 本標品のメインピークの前後に少なくとも三つの小ピークが認められるが, これはパルミチン酸以外の脂肪酸の VA エステルと考えている.

3.1.3 TLC 「日局十」薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノールは, 各々 1 万 IU/Cap で, 使用目的は各エステルの TLC による確認試験, ビタミン A 油, 同カプセルの定量法に用いるように規定されている. 今回の Cap は, もとより目的の一つとして, TLC による確認試験用標品としても

Table 2 Apparatus for HPLC

Lab.	1	2	3	4	5
Instrument (Pump)	Trirotar-III	Trirotar	Trirotar-V	Hitachi 635A	QA-I
Column	Nucleosil 5C ₁₈ (4×150)	SSC-ODS-263 (6×100)	Nucleosil 5C ₁₈ (4×200)	LS-410D	Radialpak μBondapak C ₁₈ (8×100)
Temperature	Ambient	Ambient	Ambient	50°C	Ambient
Eluent	Methanol	Ethanol-water (98:2)	Methanol	Methanol-water (97:3)	Methanol
Flow rate	1.0 ml/min	1.0 ml/min	2 ml/min	1 ml/min	1.5 ml/min
Detector	UVIDEC 100-III	UVIDEC 100	UVIDEC 100-V	UVIDEC 100-III	UVIDEC 100-II
Wavelength	284 nm	325 nm	280 nm	280 nm	325 nm
Data acquisition and reduction	Chromatopac CR-1B	SIC 7000 A	HP 3390 A	—	Chromatopac CR-3A
Sample preparation	0.05 g→50 ml (Methanol)	0.05 g→50 ml (Isopropanol)	0.01 g→10 ml (Ethanol)	0.1 g→25 ml (Ethanol- Chloroform=4:1)	0.05 g→100 ml (Isopropanol)
Internal standard	—	—	Ergosteryl acetate	Di- <i>n</i> -decyl phthalate	—
Sample size	8 μl	10 μl	10 μl	10 μl	20 μl

使用できるように目指し、「日局十」により TLC も行った。

3.2 安定性試験

Cap 20 個を乾燥剤 (シリカゲル) と共に 20 ml 容褐色ガラス瓶に入れ密栓し, 5°C, 25°C, 40°C, 50°C 及び室温で保存した。

4 実験結果

4.1 製造直後の Cap の検定

Cap を 1 実験所で各 5 個, UV により VA 含量を測定した。1 回の測定ごとに, 1 Cap を用いることとした。Table 3, 4 に各実験所間の分析結果を示す。

Table 3 Collaborative results for the determination of vitamin A

Lab.	$\bar{x} \pm S.D., IU/g$	Lab.	$\bar{x} \pm S.D., IU/g$
1	217700 ± 1020	6	220000 ± 1280
2	218500 ± 239	7	220300 ± 753
3	222400 ± 1250	8	220500 ± 1300
4	221400 ± 912	9	210900 ± 699
5	214500 ± 2980	10	216600 ± 4460

Table 4 Relative extinction data in UV

Wavelength/nm	JP	Measured value ($\bar{x} \pm S.D.$)
300	0.578 ± 0.03	0.5854 ± 0.00890
310	0.815 ± 0.03	0.8188 ± 0.00526
320	0.948 ± 0.03	0.9515 ± 0.00364
326	1.000	1.0000
330	0.972 ± 0.03	0.9772 ± 0.00249
340	0.786 ± 0.03	0.7923 ± 0.00405
350	0.523 ± 0.03	0.5283 ± 0.00334

これらの総平均から標準偏差の 2 倍以上離れた測定値を棄却したときの VA 含量は, 218970 ± 3090 IU/g ($\bar{x} \pm S.D.$) であり, なおこのときの実験室内誤差は 0.728 % であった。又吸光度の比についても, すべてが「日局十」の範囲にあった。

4.2 安定性試験

3.2 に示した条件での VA 含量の経時変化を UV で各実験所が, それぞれ 2 回ずつ測定した (Table 5)。又 HPLC による結果も, Table 5 に併記した。

Table 5 Stability test data of vitamin A

	Percent rate of residue ($\bar{x} \pm S.D.$)	
	UV method	HPLC
50°C 12 weeks	96.91 ± 1.19	96.71 ± 1.66
40°C 6 months	97.02 ± 1.25	96.56 ± 0.926
25°C 6 months	98.78 ± 1.88	99.84 ± 1.18
Room temp., 6 months	99.21 ± 1.35	99.70 ± 0.541

VA 残存量は UV と HPLC とはよく一致しており, 低温保持した Cap は, Apal 標品として, いずれにも利用しうる。なお熱による過酷条件として 50°C 12 週間, 40°C 6 か月間保存した Cap について内容油の HPLC クロマトグラムを製造時のそれと比較した結果, 特に変化は認められなかった。5°C 及び室温で 6 か月保存したものは, VA 含量の低下はほとんど認められなかった。

又, 50°C 12 週間, 40°C 6 か月間保存した Cap について TLC を行ったところ, 主なスポットは一つであり, その R_f 値は -5°C 6 か月保存のものと同じした。

5 考 察

本実験において、過酷条件として常用される 60°C, 70°C を行わなかったのは、カプセル素材が、それらの条件下で破壊する可能性が高かったためである。従って、Table 5 より得られる程度の情報より活性化エネルギーの測定は極めて困難である。そこで今後 12 か月以上の保存結果を待たねばならないが、今回の試作品は、「日局十」薄層クロマトグラフ用 Apal 標準品に十分対応し得て、かつ HPLC 用標品としても活用できるものと考えられるので報告する。なおオールトランス標品として本標品の実用性につき検討した結果は、本報について詳細に報告する。

終わりに、適切な助言をいただいた勝井五一郎、清水常一両氏（前ビタミンAD協会技術委員長）に感謝する。

文 献

- 1) 国立衛生試験所編：“国立衛生試験所百年史”，p. 464 (1975).
- 2) 国立衛生試験所編：“国立衛生試験所百年史”，p. 247 (1975).
- 3) A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, M. G. De Ruyter：“*Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*”，p. 22 (1985), (Dekker, New York).
- 4) A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, M. G. De Ruyter：“*Modern Chromatographic Analysis of*

Vitamins”. p. 7 (1985), (Dekker, New York).

☆

Study on vitamin A reference standard for high performance liquid chromatography; Formulation of retinyl palmitate soft capsule and evaluation of its quality and stability. Takao INOUE, Yukio SHOJI, Yasuji TAKASHIMA, Reiji KOHNO, Hitoshi EZAWA, Akira ITO and Toshikazu TABATA (Technical Committee of the Japan Vitamin AD Association, c/o Showa College of Pharmaceutical Sciences, 5-1-8, Tsurumaki, Setagaya-ku, Tokyo 154)

Vitamin A contents are often determined by high performance liquid chromatographic method in laboratories, but the reference standard is available only for thin-layer chromatography. Vitamin A palmitate reference standard was prepared by diluting retinyl palmitate (JP grade, about 1700000 IU/g) to 200000 IU/g with middle chain triglyceride (MCT) and was packed in gelatin soft capsule. This reference standard was evaluated in 12 laboratories by TLC, UV and HPLC methods. Stability testing was carried out with this sample stored in 50°C, 40°C, 25°C and room temperature for 6 months. The stability result of this reference standard was better than expected.

(Received October 14, 1985)

Keyword phrases

vitamin A; vitamin A reference standard; retinyl palmitate; middle chain triglyceride; reference standard; HPLC; UV; TLC; Pharmacopoeia Japonica editio deca.