

高速液体クロマトグラフィーによる軟こう中の副じん皮質ホルモン及びパラベンの同時定量

前田有美恵[®]， 小和田和宏 ， 山本 政利 ，
佐野 智子 ， 増井 俊夫* ， 中澤 裕之**

(1988年6月28日受理)

HPLCにより，軟こう中の11種類の副じん皮質ホルモン及び4種類のパラベンを一斉分析する方法を確立した。試料の前処理として，軟こう中の基剤を除去するためにディスポーザブルのSep-Pakシリカゲルカートリッジを用いたクリーンアップを行った。HPLCの条件は，カラム：Inertsil ODS-2，移動相：水/メタノール系，検出波長：UV 240 nm（副じん皮質ホルモンの極大吸収付近）とそれぞれ設定することにより，良好な分離が得られた。定量はs-ブチルパラベンを内標準物質として用いる内標準法により行った。検量線は副じん皮質ホルモンについては2~100 µg/ml，パラベンについては1~50 µg/mlの濃度範囲でいずれも原点を通る良好な直線性を示した。添加回収実験の結果は回収率，精度ともに良好であった。本法は簡便な前処理により副じん皮質ホルモン及びパラベンを迅速・正確に一斉分析できることから日常分析法として有用な方法である。

1 緒 言

副じん皮質ホルモン（以下 CCS と略記）を含有する製剤は，抗炎症作用や免疫賦活作用など種々の薬理効果を有する治療薬として多くの臨床分野では用いられている。しかしこれらの効果を期待する CCS の薬理学的量は，各種代謝系への CCS の異化作用の増大を伴い，又感染に対する抵抗性減弱などの副作用をも有する¹⁾。

一方 CCS には軟こう中で不安定であることが報告されている²⁾ものもあり，製剤の品質を確保するうえで主成分である CCS の含有量を正確に把握する必要がある。従来 CCS の定量に用いられていた比色法³⁾や蛍光法⁴⁾は，同じ官能基を有する分解物や不純物などの類縁物質が共存する場合に，これらとの分離定量が困難であった。近年，操作性や定量性に優れた HPLC が CCS の分析にも応用されるようになった。これまでの CCS に関する HPLC による報告をみると，単一成分については ODS カラムを用いた分析法が日本薬局方⁵⁾にも幾つか収載されているが，多成分を一斉分析する場合に

は，シリカゲルを固定相とする順相クロマトグラフィー⁶⁾ やスチレン-ジビニルベンゼン系ポラスポリマーを充てん剤として用いた方法⁸⁾が主体であった。又，軟こうや眼軟こうにおいては防腐剤としてパラベンが処方されている例が多いが，CCS 及びパラベンを一斉分析する HPLC 法はこれまでにほとんど報告されていない。

そこで今回，軟こう中の11種類の CCS 及び4種類のパラベンの一斉分析に，はん用性の高い逆相系 ODS カラムを用いた HPLC 分離条件の検討を行った。又，軟こう中に含まれる基剤などの共存物質を除去するために，ディスポーザブルのシリカゲルカートリッジを用いた簡便なクリーンアップ方法についても検討し，良好な結果を得たので併せて報告する。

2 実験方法

2.1 試料

CCS 含有軟こう 16 検体を試料とした。

2.2 試薬

CCS 標準品：プレドニゾロン (PR)，フルオシノロンアセトニド (FA)，トリアムシノロンアセトニド (TA)，酪酸ヒドロコルチゾン (HB) 及び吉草酸ベタメタゾン (BV) は日本薬局方品を用いた。又フルオシノニド (FL)，ジフルプレドナート (DF)，吉草酸デキサメタゾ

* 静岡県衛生環境センター：420 静岡県静岡市北安東 4-27-2

** 厚生省国立公衆衛生院：108 東京都港区白金台 4-6-1

ン (DX), 吉草酸酢酸プレドニゾン (PV), プロピオン酸ベクロメタゾン (BD) 及び吉草酸ジフルコルトロン (DV) は標準品として製薬会社から供与されたものを用いた。なお, これらの標準品は日本薬局方⁶⁾ 又は製薬会社の標準品規格に従って乾燥後使用した。

CCS 標準原液: 各 CCS 標準品約 100 mg を精ひょうし, それぞれメタノールに溶解して正確に 100 ml としたものを各 CCS 標準原液とした。

パラベン標準品: メチル, エチル, *n*-プロピル及び *n*-ブチルパラベンは東京化成工業製特級品を日本薬局方⁶⁾ に従って乾燥後用いた。

パラベン標準原液: 各パラベン標準品約 100 mg を精ひょうし, それぞれメタノールに溶解して正確に 100 ml としたものを各パラベン標準原液とした。

内標準溶液: *s*-ブチルパラベン (東京化成工業製, 試薬特級品) 約 50 mg を精ひょうし, メタノールに溶解して 100 ml としたものを内標準溶液とした。

カートリッジ: ディスポーザブルの Sep-Pak シリカゲルカートリッジ (Waters 製) を用いた。

モデル基剤: 日本薬局方⁶⁾ の軟こう剤の項に従い, 流動パラフィン 10 g 及び白色ワセリン 90 g を混和して調製した。

2.3 装置

HPLC: 日立製作所製 635 型液体クロマトグラフに島津製作所製紫外吸収検出器 SPD-2A 型, ガスクロ工業製カラムオープン 555 型及び協和精密製オートサンブラー KSST-601 型を装着したのものを用いた。

振り混ぜ器: イワキ製 V-S 型

冷却遠心分離機: 日立工機製 SCR-20BA 型

超音波浴槽: 国産電気製 UT-6 型

ロータリーエバポレーター: 東京理化工機製 N-1 型

2.4 HPLC 条件

カラム: Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm, ガスクロ工業製)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相 A: メタノール/水 (50:50); PR, TA, FA 及びパラベン (メチル, エチル, *n*-プロピル及び *n*-ブチル) 分析用

移動相 B: メタノール/水 (60:40); HB, FL, DF, DX, BV, PV, BD, DV 及びパラベン (メチル, エチル, *n*-プロピル及び *n*-ブチル) 分析用

流速: 0.7 ml/min

検出波長及び感度: UV 240 nm, 0.04 AUFS

試料注入量: 10 μ l

2.5 試験溶液の調製

軟こう 1.0 g を精ひょうしてテトラヒドロフラン 5 ml 及び内標準溶液 1 ml を加え 5 分間激しく振り混ぜて溶

解し, メタノール 15 ml を加えて混和後しばらく放置する。これを冷却遠心分離 (5000 rpm, 5 min, 0 $^{\circ}$ C) し, この上澄み液 10 ml をとり減圧下 30 $^{\circ}$ C で溶媒を留去し, 乾固する。残留物にヘキサン/クロロホルム (70:30) 10 ml を添加し超音波浴槽内で溶解させた後, その 4 ml をカートリッジに通す。このカートリッジをヘキサン/クロロホルム (70:30) 10 ml で洗浄した後, カートリッジに吸着された CCS 及びパラベンを酢酸エチル 10 ml で溶出させる。溶出液の溶媒を減圧下 30 $^{\circ}$ C で留去後, メタノール 10 ml に溶解し, 試験溶液とする。

2.6 検量線の作成

各 CCS 標準原液及び各パラベン標準原液を混合し, これに内標準溶液 1 ml を添加した後, CCS の濃度が 0.002~0.100 mg/ml, パラベンの濃度が 0.001~0.050 mg/ml となるようにメタノールで希釈して各標準溶液を調製する。これらの標準溶液には 0.01 mg/ml の濃度の内標準物質が含有される。各標準溶液を HPLC に供し, 内標準物質に対する CCS 及びパラベンの面積比よりそれぞれの検量線を作成する。

3 結果及び考察

3.1 HPLC 測定条件の検討

鎌田ら⁷⁾ はカラム充てん剤として逆相系 ODS の Fine Pack SIL C18 を用いた場合, 移動相の比率を変化させても CCS の分離が不十分であり, 順相系の Zorbax SIL のほうが良好な分離能を示すことを報告している。又, 江島ら⁸⁾ はパラベンが配合された場合にはシリカゲル又はニトリル系化学結合型シリカゲル, あるいはポラスポリマーを充てん剤として用いる必要があることを報告している。

著者らは充てん剤として一般によく用いられる逆相系 ODS により CCS 及びパラベンの一斉分析を行うことを目的に, Inertsil ODS-2 カラムを用いて分離条件を検討した。

3.1.1 移動相の検討 移動相としてメタノール/水系及びアセトニトリル/水系の両者について検討したところ, 個々の CCS とパラベンの分離を考慮した場合にアセトニトリル/水系ではメチルパラベンとプレドニゾンが分離しなかった。しかし, メタノール/水系ではこれらが十分に分離したので以後メタノール/水系を用いることにした。

メタノール/水系の移動相における溶出順序により, CCS は *n*-ブチルパラベンよりも早く溶出するグループ

A (PR, TA 及び FA) と、*n*-ブチルパラベンよりも遅く溶出するグループ B (HB, FL, DF, DX, BV, PV, BD 及び DV) との二つに大別された。これら二つのグループに対する最適な移動相条件を求めるために、移動相中のメタノール濃度が CCS 及びパラベンの capacity factor (k') に及ぼす影響について検討し、その結果の一部を Fig. 1 に示した。極性の大きいグループ A の CCS はメタノール 60% 以上で PR 及びエチルパラベンの 2 成分、又 TA, FA 及び *n*-プロピルパラベンの 3 成分がそれぞれ重なった。しかしメタノール 50% (移動相 A) の条件でこれらは相互に十分分離された。一方、極性の小さいグループ B の CCS はメタノール 50% では k' が非常に大きいため分析に長時間を要するが、逆にメタノール 70% では HB, FL 及び DF の保持時間が近似し分離が不十分であった。しかしメタノール 60% (移動相 B) の場合には分離、保持時間ともに良好であった。以上のことより、はん用性の高い逆相系の ODS カラムを用い、移動相 A, B の 2 条件で、11 種類の CCS 及び 4 種類のパラベンを良好に分離することができた。

3.1.2 測定波長の選定 各 CCS の移動相溶液における紫外吸収スペクトルの極大はすべて 237~243

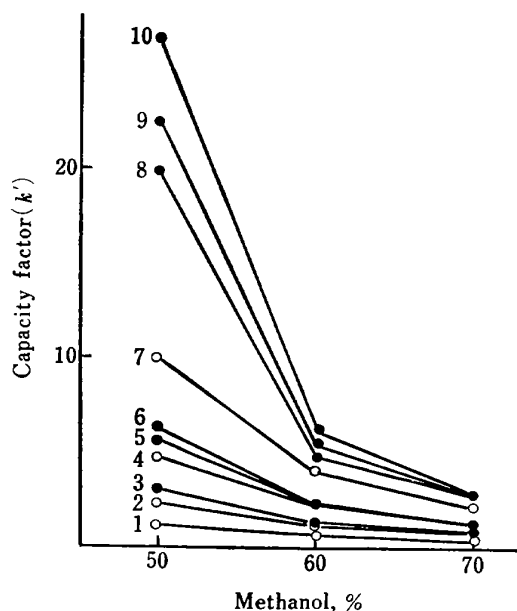


Fig. 1 Effect of methanol concentration in mobile phase on capacity factors of corticosteroids (●) and parabens (○)

1: methylparaben, 2: ethylparaben, 3: prednisolone, 4: *n*-propylparaben, 5: triamcinolone acetonide, 6: fluocinolone acetonide, 7: *n*-butylparaben, 8: hydrocortisone butyrate, 9: fluocinonide, 10: difluprednate

nm の領域にあり、又パラベンの極大吸収波長は 257 nm 付近であった。そこでそれぞれの分子吸光係数及び軟こう中の配合量を考慮して測定波長を 240 nm に設定した。

3.1.3 内標準物質の検討 本法を軟こう製剤に適用した場合に予想される前処理及び定量操作に伴う誤差を少なくし、分析精度を向上させる目的で内標準法を用いることにした。内標準物質として軟こうに配合されることのない化合物について検討した結果、化粧品中のパラベンの定量⁹⁾において内標準物質として使用した *s*-ブチルパラベンが、移動相 A, B いずれの条件においても適当であった。以上の検討の結果、得られた標準溶液のクロマトグラムを Fig. 2 及び Fig. 3 に示した。

3.2 検量線

各 CCS については 0.002~0.100 mg/ml, 又各パラベンについては 0.001~0.050 mg/ml の濃度範囲において、いずれも原点を通る良好な直線関係 ($r > 0.999$) が得られた。なお本法による検出限界は各 CCS 2 ng, 各パラベン 1 ng であった。

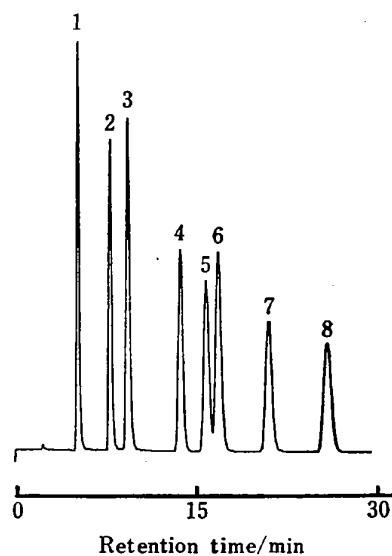


Fig. 2 Liquid chromatogram of corticosteroids (group A) and parabens in standard solution

Peak—1: methylparaben, 2: ethylparaben, 3: prednisolone, 4: *n*-propylparaben, 5: triamcinolone acetonide, 6: fluocinolone acetonide, 7: internal standard (*s*-butylparaben), 8: *n*-butylparaben; Column: Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 150 mm); Column temperature: 40 $^{\circ}$ C; Mobile phase: methanol-water (50:50); Flow rate: 0.7 ml/min; Detection: UV 240 nm (0.04AUFS)

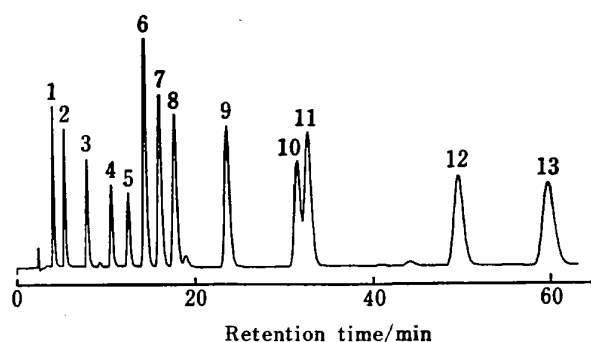


Fig. 3 Liquid chromatogram of corticosteroids (group B) and parabens in standard solution

Peak—1: methylparaben, 2: ethylparaben, 3: *n*-propylparaben, 4: internal standard (*s*-butylparaben), 5: *n*-butylparaben, 6: hydrocortisone butyrate, 7: fluocinonide, 8: difluprednate, 9: dexamethasone valerate, 10: betamethasone valerate, 11: prednisolone valerate-acetate, 12: beclomethasone dipropionate, 13: diflucortolone valerate; Mobile phase: methanol-water (60:40); Other conditions as shown in Fig. 2.

3.3 シリカゲルカートリッジを用いた前処理方法の検討

軟こう中に共存する基剤などの成分は HPLC 分析時にカラムを劣化させたり CCS の定量を妨害するおそれがある。これまでに、基剤などの成分を除去するためアセトニトリル-ヘキサン分配⁷⁾やカラムクロマトグラフィー¹⁰⁾によるクリーンアップ方法が報告されているが、これらの方法は煩雑な抽出やカラムの調製が必要である。そこで、簡便な前処理方法についてモデル基剤を用いて以下検討した。冷却下遠心分離することにより重量比で約 85% の基剤を除去することができたが、残りの 15% を除去するためにディスポーザブルのシリカゲルカートリッジを用いることにした。モデル基剤に CCS 及びパラベンを添加し、2.5 に示した方法により得た残留物の溶解溶媒、更に基剤などの共存成分を除去するカートリッジの洗浄溶媒として、ヘキサン/クロロホルムの混合溶媒を用いて (80:20)~(50:50) まで種々の組成を検討した。その結果、溶解溶媒及び洗浄溶媒としてヘキサン/クロロホルム (65:35) を用いた場合には 15 ml で *n*-ブチルパラベンが溶出しはじめたが、(70:30) を用いた場合、15 ml までカートリッジを洗浄しても各 CCS 及びパラベンが溶出しなかった。そこで、残留物の溶解及び洗浄にヘキサン/クロロホルム (70:30) の溶媒を用いることにし、その洗浄液量は 10 ml とした。更にカートリッジに吸着された CCS 及びパラベン

の溶出溶媒についてもヘキサン/クロロホルム、クロロホルム、クロロホルム/酢酸エチル、酢酸エチル、酢酸エチル/メタノールの 5 種類の溶媒について検討した。前三者の溶媒では PR をはじめとする成分の溶出が不十分であったが、酢酸エチルを用いた場合には全成分が完全に溶出した。なお、酢酸エチル/メタノールでは基剤から不明成分の溶出が見られた。そこで溶出溶媒として酢酸エチルを用いることにした。その溶出パターンの一部を Fig. 4 に示した。なお、その溶出液量については、最も早く溶出する *n*-ブチルパラベンは 2 ml で十分であったが、最も遅く溶出する PR は 8 ml 必要であった。そこで CCS 及びパラベンを完全に溶出させるために溶出液量は 10 ml とした。

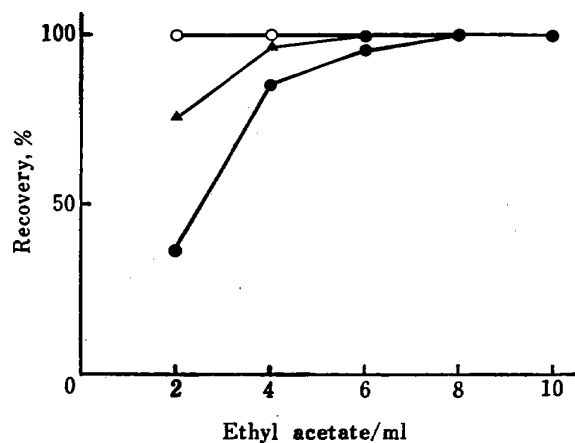


Fig. 4 Elution patterns of prednisolone (●), hydrocortisone butyrate (▲) and *n*-butylparaben (○) on Sep-Pak silicagel cartridge

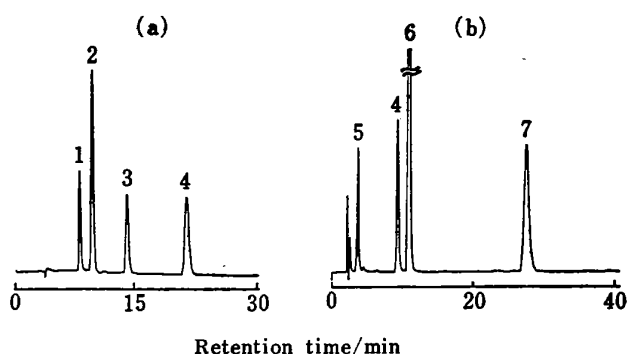


Fig. 5 Liquid chromatograms of extracts from ointments (a) and (b)

Peak—1: ethylparaben, 2: prednisolone, 3: *n*-propylparaben, 4: internal standard (*s*-butylparaben), 5: methylparaben, 6: *n*-butylparaben, 7: betamethasone valerate; Conditions (a) as shown in Fig. 2, (b) as shown in Fig. 3.

Table 1 Recoveries of corticosteroids and parabens from ointment base

Compounds	Amount added/ mg g ⁻¹	Amount found/ mg g ⁻¹	Recovery, %	R. S. D., %
Methylparaben	0.50	0.500	100.1	0.4
Ethylparaben	0.50	0.496	99.3	0.8
<i>n</i> -Propylparaben	0.50	0.492	98.4	0.6
<i>n</i> -Butylparaben	0.50	0.497	99.4	0.7
Prednisolone	1.0	1.025	102.5	1.3
Triamcinolone acetonide	1.0	1.032	103.2	0.9
Fluocinolone acetonide	1.0	0.988	98.8	1.5
Hydrocortisone butyrate	1.0	1.023	102.3	1.5
Fluocinonide	1.0	1.024	102.4	1.6
Difluprednate	1.0	1.022	102.2	1.6
Dexamethasone valerate	1.0	1.019	101.9	1.4
Betamethasone valerate	1.0	0.990	99.0	1.5
Prednisolone valerate-acetate	1.0	1.026	102.6	2.4
Beclomethasone difluprednate	1.0	1.011	101.1	2.2
Diflucortolone valerate	1.0	1.022	102.2	1.8

Average of five experiments; R. S. D. : relative standard deviation

Table 2 Analytical results of corticosteroids (CCS) and parabens in commercial ointments

Ointment No.	Kinds of CCS	Contents of CCS/ mg g ⁻¹	Contents of paraben/mg g ⁻¹			
			Methyl	Ethyl	<i>n</i> -Propyl	<i>n</i> -Butyl
1	Prednisolone	5.140	0.433	*	*	0.957
2	Prednisolone	5.065	*	0.963	0.962	*
3	Triamcinolone acetonide	1.026	*	*	*	*
4	Fluocinolone acetonide	0.258	*	*	*	*
5	Hydrocortisone butyrate	1.073	*	*	*	*
6	Fluocinonide	0.513	*	*	*	*
7	Fluocinonide	0.506	*	*	*	*
8	Fluocinonide	0.500	0.480	*	0.474	*
9	Difluprednate	0.518	*	*	*	*
10	Dexamethasone valerate	1.180	*	*	*	*
11	Dexamethasone valerate	1.180	*	*	*	*
12	Betamethasone valerate	1.271	1.016	*	*	1.010
13	Betamethasone valerate	1.228	0.206	*	*	1.753
14	Prednisolone valerate-acetate	2.913	0.098	*	0.106	*
15	Beclomethasone difluprednate	0.241	*	*	*	*
16	Diflucortolone valerate	0.990	*	*	*	*

* less than 0.025 μg/g

このように冷却遠心分離やカートリッジを用いた精製などの一連の前処理操作により、基剤をほとんど除去することができた。

3.4 添加回収実験

2.2 のモデル基剤に CCS 及びパラベンを添加し 5 回繰り返し測定して回収実験を行ったところ、Table 1 に示すように回収率は 98.4~103.2%，相対標準偏差は 2.4% 以下と良好な結果が得られた。本法は簡便な前処理により、正確で精度の高い CCS 及びパラベンの定量が可能であることが確認された。

3.5 実試料の分析結果

軟こう製剤 16 検体の分析に本法を適用したところ、他成分の影響を受けることなく良好なクロマトグラム (Fig. 5) が得られた。これら実試料の分析結果を Table 2 に示した。なお、CCS の表示量は 0.25~5 mg/g の範囲にあったが、実際の分析値は表示量の 96.4~107.3% であった。又パラベンは 6 検体から検出され、メチル、エチル、*n*-プロピル、*n*-ブチルの 4 種類がそれぞれ 2 種類ずつの組み合わせで使用されていた。

以上、基剤などの脂溶性物質を除去するためディスポ

ーザブルのシリカゲルカートリッジを用いた簡便な前処理を行った後に、はん用性の高い ODS カラム、水-メタノール系の移動相を用いた HPLC に供し、*s*-ブチルパラベンを内標準物質として定量することにより、軟こう中の 11 種類の CCS 及び 4 種類のパラベンを迅速簡便かつ正確に同時定量することができた。本法を軟こう製剤に適用したところ、いずれも他成分の影響を受けることなく良好に分析でき、軟こう中の CCS 及びパラベンの一斉日常分析法として有用であることが確認された。

文 献

- 1) 竹田亮祐：日本医師会雑誌，**96**，1145 (1987)。
- 2) 上原真一，宮竹ノリエ，重岡捨身，風間成孔，秋山和幸：東京衛研年報，**33**，90 (1982)。
- 3) 中路幸男，太田美矢子，早川堯男，川村次良：医薬品研究，**7**，17 (1976)。
- 4) 徳永裕司，木村俊夫，川村次良：薬学雑誌，**100**，200 (1980)。
- 5) 厚生省：第十一改正日本薬局方，p. 19，(1987)。
- 6) 増川健二，清水禮治，宮本尚明，藤本雄三，津曲喜雅：医薬品研究，**16**，78 (1985)。
- 7) 鎌田国広，観 照雄，吉原武俊，原田裕文：衛生化学，**28**，341 (1982)。
- 8) 江島 昭，立沢政義，松田りえ子：医薬品研究，**15**，118 (1984)。
- 9) Y. Maeda, M. Yamamoto, K. Owada, S. Sato, T. Masui, H. Nakazawa and M. Fujita : *J. Chromatogr.*, **410**, 413 (1987)。
- 10) 徳永裕司，木村俊夫，川村次良：医薬品研究，**15**，87 (1984)。

☆

Simultaneous determination of corticosteroids and parabens in ointments by HPLC. Yumie MAEDA, Kazuhiro OWADA, Masatoshi YAMAMOTO, Satoko SANO, Toshio MASUI* and Hiroyuki NAKAZAWA** (*Shizuoka Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 4-27-2, Kitaando, Shizuoka-shi, Shizuoka 420; **The National Institute of Public Health, 4-6-1, Shirokanedai, Munato-ku, Tokyo 108)

A rapid, simple and reliable method was developed for the simultaneous determination of eleven corticosteroids, such as prednisolone, triamcinolone acetonide, fluocinolone acetonide, hydrocortisone butyrate, fluocinonide, difluprednate, dexamethasone valerate, betamethasone valerate, prednisolone valerate-acetate, beclomethasone dipropionate and diflucortolone valerate, and four parabens, such as methyl, ethyl, *n*-propyl and *n*-butylparaben in ointments by HPLC. The method involves a clean-up on a disposable Sep-Pak silicagel cartridge. Fat-soluble excipients are removed through the cartridges with 10 ml of hexane-chloroform (70 : 30). Corticosteroids and parabens are then eluted from the cartridges with 10 ml of ethyl acetate and determined by HPLC on a reversed-phase column with water-methanol (50 : 50 and 60 : 40) as the mobile phase, and detected at 240 nm with 0.04AUFs using *s*-butylparaben as an internal standard. The method was successfully applied to the analysis of ointment base spiked corticosteroids and parabens, and the sufficient recoveries (98.4~103.2%) were obtained with relative standard deviation of 0.4~2.4%.

(Received June 28, 1988)

Keyword phrases

simultaneous determination of corticosteroids and parabens in ointment; reversed-phase HPLC; pretreatment with disposable silicagel cartridge.