The Japan Society for Analytical Chemistry

BUNSEKI KAGAKU Vol. 52, No. 4, pp. 259–263 (2003)
© 2003 The Japan Society for Analytical Chemistry

技術論文

アルシアンブルー 8GX を用いるコンドロイチン硫酸ナトリウム/ヒドロキシプロピルメチルセルロース混合物の分別定量

服部 学®[1], 有田 淳哉[1], 田淵 照人[1], 小池 茂行[2], 中村 洋[3]

Fractional determination of sodium chondroitin sulfate/hydroxypropylmethylcellulose mixture using Alucian Blue 8GX

Manabu HATTORI[1], Junya ARITA[1], Nobuhito TABUCHI[1], Shigeyuki KOIKE[2] and Hiroshi NAKAMURA[3]

[1] Pharmaceutical Products Division, Lion Corporation, 100, Tajima, Odawara-shi, Kanagawa 256-0811
[2] Analytical Research Center, Lion Corporation, 1-3-7, Honjyo, Sumida-ku, Tokyo 130-8644
[3] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, 12, Ichigaya-Funagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 162-0826

(Received 27 December 2002, Accepted 17 February 2003)

Using Alucian Blue 8GX (AB), a simple fractional determination method was developed for sodium chondroitin sulfate (ChS-Na) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) respectively in a drug. From a sample solution containing both ChS-Na and HPMC, ChS-Na was precipitated selectively as the ChS-Na-AB complex under a low-pH condition. After dissolution of the ChS-Na-AB complex in an alkali solution, ChS-Na was determined by the absorbance at 615 nm. The supernatant of the sample solution was subjected to gel permeation chromatography (GPC). The amount of HPMC was determined by the peak height of HPMC. These methods have safty, high-specificity and high-repeatability. These methods are therefore useful for drugs which contain both acidic mucopolysaccharide and a non-ionic polymer.

Keywords : sodium chondroitin sulfate; hydroxypropylmethylcellulose; Alucian Blue; absorbance; gel permeation chromatography.

1 緒　　言

コンドロイチン硫酸は，軟骨，骨，軟骨腫（しゅ），頸靭（けいじん）帯，角膜，血管壁，腱（けん）など結合組織に広く分布する分子量2万～5万の酸性ムコ多糖類であり，A（4-硫酸），B（β-ヘパリン，デルマタン硫酸），C（6-硫酸）の3種類が存在する．この中でCタイプのコンドロイチン硫酸ナトリウム（ChS-Na）は，日本薬局方外医薬品規格（局外規）に収載され，角膜保護や関節症，術後の癒着防止を目的として，点眼剤や注射剤などの医薬品に用いられており（Fig. 1），工業的にはサメのヒレから精製される天然の水溶性高分子である[1)2)]．

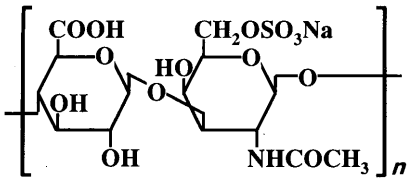
一方，ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）は，精製されたパルプをアルカリ処理した後，エーテル化剤を反応させて得られる分子量が1万～100万の非イオン性の水溶性高分子であり，製剤に粘度を付与することを目的として，点眼剤や貼（ちょう）付剤など様々な医薬品に用いられている[3)4)]（Fig. 1）．

ChS-Naの代表的な定量法である局外規・コンドロイチン硫酸ナトリウム注射液の定量法（カルバゾール硫酸法）[5)]は，1）カルバゾールの反応特異性が低く，アミノ酸や他の水溶性高分子の影響を受ける，2）98℃ 以上の高温で硫酸を反応させるため危険を伴うという問題点があっ

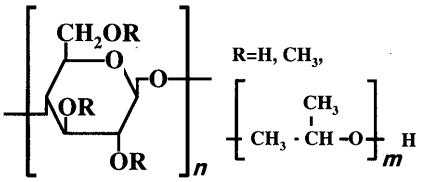
[1] ライオン株式会社薬品研究所：256-0811　神奈川県小田原市田島100
[2] ライオン株式会社分析センター：130-8644　東京都墨田区本所1-3-7
[3] 東京理科大学薬学部薬品分析化学研究室：162-0826　東京都新宿区市谷船河原町12

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry



ChS-Na : sodium chondroitin sulfate



HPMC : hydroxypropylmethylcellulose

Fig. 1 Structure of ChS-Na and HPMC

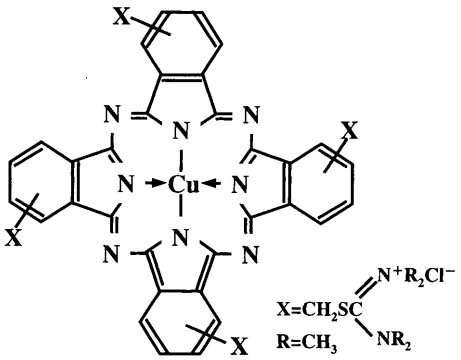


Fig. 2 Structure of Alucian Blue 8GX

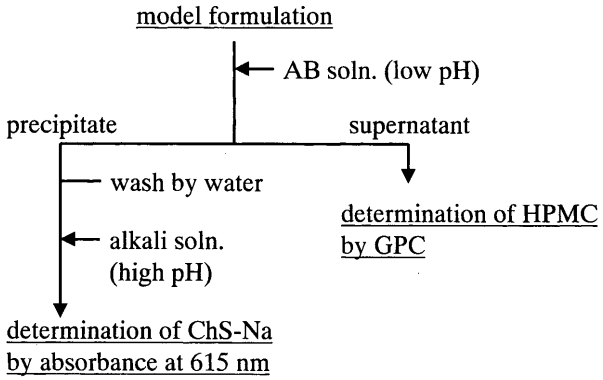


Fig. 3 Flow chart of AB method

Table 1 Model formulation

Ingredient	Concentration/ g 100 ml^{-1}
Sodium chondroitin sulfate	0.05
Hydroxypropylmethylcellulose2906[a)]	0.25
Potassium L-aspartate	0.25
Aminoethyl sulfonic acid	1.0
Sodium chloride	0.3
Boric acid	0.5
Sodium borate	0.05
Disodium edetate	0.05
Water	Balance
pH	7
Viscosity (mPa·s)	4

a) Metolose 65SH-1500 (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.)

た．更に ChS-Na と HPMC を同時に配合した医薬品の定量については，物理化学的性質の違いを利用して両成分を分離する前処理を必要とした．

そこで著者らは，矢部らの方法[6]を参考として，酸性ムコ多糖類の染色色素であるアルシアンブルー 8GX（AB, Fig. 2）の ChS-Na に対する反応特異性を利用することにより，ChS-Na と HPMC の両成分を安全かつ特異的に，しかも再現性よく定量する試験法（AB 法）を確立したので報告する．

2 測定フロー

AB 法の測定フローを Fig. 3 に示す．酸性条件下では，AB のイソチオウロニウム基が正に帯電し，ChS-Na の硫酸基あるいはカルボキシル基が負に帯電することによって静電相互作用し，特異的に複合体を形成して沈殿する．本法では，1）この沈殿物をアルカリ溶液で再溶解させ，615 nm における吸光度から ChS-Na 量を，2）上澄液をゲル沪過（GPC）カラムに供して高速液体クロマトグラフ法（HPLC）により HPMC 量を，それぞれ定量する．

3 実　　験

3・1 試料・試液

試料：ChS-Na 及び HPMC，L-アスパラギン酸カリウム，アミノエチルスルホン酸，塩化ナトリウムを有効成分とする点眼剤のモデル組成（Table 1）を使用した．

ChS-Na 溶液：コンドロイチン硫酸ナトリウム「生化学」注射用（生化学工業製，製造専用）又は局外規コンドロイチン硫酸ナトリウム（マルハ製，製造専用）を 105℃ で 4 時間乾燥した後，水に溶解して使用した．標準溶液は，カルバゾール硫酸法により，含量が 92% 以上のものを使用し，含量補正を行った．なお，ChS-Na のクロス定量実験に用いた ChS-Na のカルバゾール硫酸法より求めた含量は，ロット A：93.2%，ロット B：95.7%，ロット C：97.0% であった．

HPMC 溶液：メトローズ 65SH-1500（信越化学工業製，日本薬局方 HPMC2906 適合品）を 105℃ で 1 時間乾燥した後，70℃ 以上の水に分散，冷却溶解したものを使用した．標準溶液は，日本薬局方ヒドロキシプロピルメチルセルロース 2906 の定量法[3]によりメトキシル基含量が 27.0～29.0%，ヒドロキシプロポキシル基含量が 5.0～7.5% の

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

ものを使用した．

AB 溶液：アルシアンブルー 8GX（Ingrain Blue 1，シグマ製，色素含量 50% 以上）1 g に塩酸（和光純薬製，特級）4.2 ml，リン酸二水素ナトリウム二水和物（和光純薬製，特級）1.79 g 及び水を加えて 100 ml とし，沪過（アドバンテック東洋製，No.5B）したものを使用した．

アルカリ溶液：2-アミノエタノール（和光純薬製，特級）200 ml に 5 mol/l 水酸化ナトリウム溶液（和光純薬製，容量分析用）4 ml を加えて混合したものを使用した．

HPLC 移動相：塩化ナトリウム（和光純薬製，特級）5.8 g を水に加えて溶解し，1000 ml（0.1 mol/l）としたものを使用した．

3・2　実験方法

3・2・1　ChS-Na 定量法　モデル組成を水で適宜希釈した溶液（ChS-Na 30 μg/ml）1 ml に AB 溶液 0.2 ml を加え，20 分間静置した後，析出した沈殿物を 3000 rpm で 30 分間遠心分離した．上澄液を捨て残留物に水 3 ml を加え，よく振り混ぜた後，再び同条件において遠心分離した．上澄液を捨て残留物にアルカリ溶液 5 ml を加えて溶解したものを試料溶液とした．同様に操作した標準溶液及び空試験の水とともに試料溶液の 615 nm における吸光度を測定し，式（1）より ChS-Na 量を求めた．

$$\text{モデル組成中の ChS-Na 量（mg/100 ml）} = (A_t - A_b)/(A_s - A_b) \times C_s \times R_s \times D \qquad (1)$$

A_t：試料溶液の吸光度，A_s：標準溶液の吸光度，A_b：空試験液の吸光度，C_s：標準溶液の ChS-Na 濃度（mg/100 ml），R_s：標準溶液の含量補正項，D：試料溶液の希釈倍率．

なお，R_s は標準溶液に使用した ChS-Na の含量（%）をカルバゾール硫酸法より求め，その割合を計算に用いた．

3・2・2　HPMC 定量法　モデル組成（HPMC 2.5 mg/ml）5 ml に AB 溶液 5 ml を加え，析出した沈殿物を 3000 rpm で 10 分間遠心分離した．上澄液をメンブランフィルター（関東化学製，HLC-DISK13 水系，0.45 μm）にて沪過したものを試料溶液とした．同様に操作した標準溶液とともに下記の操作条件の HPLC に供し，HPMC ピークの高さを求め，式（2）より HPMC 量を求めた．

$$\text{モデル組成中の HPMC 量（mg/100 ml）} = H_t/H_s \times C_s \times D \qquad (2)$$

H_t：試料溶液のピーク高さ，H_s：標準溶液のピーク高さ，C_s：標準溶液の HPMC 濃度（mg/100 ml），D：試料溶液の希釈倍率．

Table 2　Repeatability & trueness of AB method (ChS-Na)

Repeatability of standard solution		Trueness of model formulation	
Repeat	Absorbance	Repeat	Recovery, %
1	0.4346	1	101.8
2	0.4340	2	101.8
3	0.4473	3	98.9
4	0.4479	4	98.6
5	0.4410	5	99.7
6	0.4408	6	99.5
Ave.	0.4409	Ave.	100.1
SD	0.0060	SD	1.41
CV	1.36	Trueness	0.1

3・2・3　HPLC システム及び測定条件　デュアルポンプ及び示差屈折率検出器，デガッサー，オートサンプラーがカラムオーブンと一体となった GPC 専用システム（Shodex GPC-101，昭和電工製）及びレコーダー（Chromatocorder21，システムインスツルメンツ製）を使用した．カラムは極性有機溶媒系 GPC カラム（TSK-gel α-2500 300 mm × 7.8 mm i.d.，東ソー製）を 2 本直列に接続して使用した．カラム温度は 40℃，移動相の流量は 0.8 ml/min，試料注入量は 20 μl とした．なお，示差屈折率検出器のリファレンス側にはカラムを接続せずに，移動相を流量 0.8 ml/min で流した．

4　結果及び考察

4・1　ChS-Na の定量

4・1・1　検量線，再現性及び添加回収率　ChS-Na 溶液（20～40 μg/ml）を用いて検量線を作成した．その結果，$Y = 0.0093X - 0.0062$，相関係数 0.9953 のほぼ原点を通る良好な直線関係が認められた．

ChS-Na 標準溶液（30 μg/100 ml）について 6 回操作を繰り返し，吸光度の相対標準偏差を求めた．結果を Table 2 に示す．相対標準偏差は 1.36% であり，良好な再現性が得られた．

添加回収率については，ChS-Na 以外の成分をすべて含むモデル組成の濃縮液に，所定濃度となるよう ChS-Na 溶液を添加して調製した試料を用い，その ChS-Na 量を測定した（Table 2）．平均添加回収率は 100.1%，標準偏差は 1.41% であり，測定値の平均値と真の値との差である真度は，0.1% と良好であった．また，モデル組成から ChS-Na を除いたブランク組成について，AB 法による吸光度を測定した結果，空試験の水と同じ値を示し，HPMC をはじめとする他成分の影響はなかった．

4・1・2　ChS-Na ロットの影響　ChS-Na は天然の水溶性高分子であるため，AB との反応性に対するロットの影響について検討した．ロットの異なる 3 種の ChS-Na を用

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

Table 3 Robustness of AB method (ChS-Na)

Standard solution	Recovery, %		
	Model formulation		
	A	B	C
A	99.9	97.3	97.6
B	99.6	97.0	97.3
C	102.9	100.2	100.5

Index A, B, C mean lot of ChS-Na.

Table 4 Repeatability & trueness of AB method (HPMC)

Repeatability of standard solution		Trueness of model formulation	
Repeat	Height/μV	Repeat	Recovery, %
1	93133	1	100.3
2	93563	2	100.4
3	93536	3	100.5
4	93840	4	99.4
5	94254	5	100.4
6	94013	6	99.8
Ave.	93723	Ave.	100.1
SD	397	SD	0.44
CV	0.42	Trueness	0.1

いて，標準溶液3種とモデル組成3種をそれぞれ調製し，クロス定量を行った（Table 3）．その結果，ChS-Naのロットが異なる標準溶液を用いて定量した場合においても，モデル組成の添加回収率は97.0～102.9%であり，頑健性の高いことが確認できた．

4・2 HPMCの定量

4・2・1 検量線，再現性及び添加回収率 HPMC溶液：(2.0～3.5 mg/100 ml）を用いて，検量線を作成した．その結果，$Y=32374X-258.53$，相関係数0.9969のほぼ原点を通る良好な直線関係が認められた．

HPMC標準溶液（2.5 mg/100 ml）について，6回操作を繰り返し，ピーク高さの標準偏差を求めた．結果をTable 4に示す．相対標準偏差は0.42%であり，良好な再現性が得られた．

添加回収率については，HPMC以外の成分をすべて含むモデル組成の濃縮液に，所定濃度となるようHPMC溶液を添加して調製した試料を用い，そのHPMC量を測定した（Table 4）．平均添加回収率は100.1%，相対標準偏差は0.44%であり，真度0.1%と良好であった．また，モデル組成からHPMCを除いたブランク組成について測定した結果，HPMCの溶出時間にピークは認められず，ChS-Naの影響はなかった（Fig. 4）．

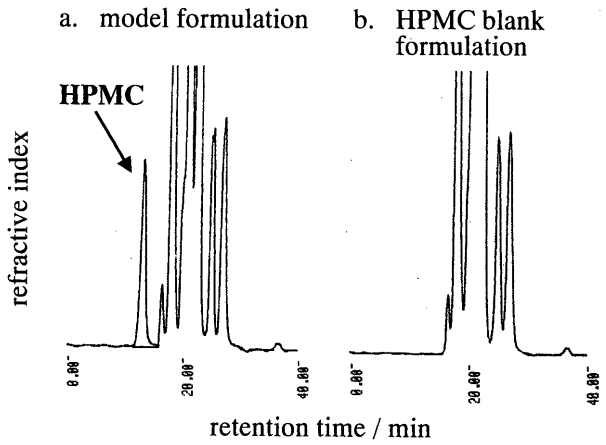


Fig. 4 GPC-HPLC chromatograms of AB method (HPMC)

4・3 まとめ

以上の結果から，AB法はChS-NaとHPMCが同時に配合されたモデル組成において，検量線性，再現性がよく，添加回収率，特異性の高いChS-NaとHPMCの定量法であることが確認できた．また，天然の水溶性高分子であるChS-Naのロット違いによる定量結果への影響は±3%以内であり，頑健性の高いことを確認した．これまでの既存定量法では，製剤組成ごとにChS-NaとHPMCを分離するための前処理条件を設定する必要があるが，AB法では，ABとChS-Naの特異的な静電相互作用による複合体形成を利用しているため，他の配合成分の影響を受けにくく，モデル組成以外の様々なChS-Naと非イオン性高分子を同時に配合した複合製剤の医薬品に応用できると考える．

ところで，AB溶液のpHを変えることにより，硫酸基を有するコンドロイチン硫酸やヘパリンとカルボキシル基のみを有するヒアルロン酸に対するABの選択性が変化することが組織染色において知られている[7]．したがって，AB溶液のpHを適切に設定することにより，ChS-Naのみでなく，ヒアルロン酸など他の酸性ムコ多糖類と様々な非イオン性高分子などとの複合系に対して，本試験法を展開できると考える．

（2002年2月，第7回LCテクノプラザにおいて一部発表）

文 献

1) 長谷川栄一，鈴木 旺，瀬野信子，平野茂博：“ムコ多糖の構造と機能”，第2版，(1968)，(南江堂)．
2) 阿部喜美子，長谷川栄一編：“ムコ多糖実験法〔I〕”，化学の領域増刊96，(1972)，(南江堂)．
3) 財団法人日本公定書協会編：“第十四改正日本薬局方”，p. 952 (2001)，(じほう)．
4) 堀内照夫：“水溶性高分子の最新技術”，(2000)，(シーエムシー)．
5) 日本公定書協会：“日本薬局方外医薬品規格2002”，

NII-Electronic Library Service

The Japan Society for Analytical Chemistry

p. 645 (2002), (じほう).
6) 矢部芳枝，二宮隆博，柏場英明，辰濃　隆，岡田太郎：食衛誌, **28**, 13 (1987).
7) 渡辺明郎，広井禎之：*Medical Technology*, **29**, 197 (2001).

要　旨

コンドロイチン硫酸ナトリウム及びヒドロキシプロピルメチルセルロースを同時に配合した医薬品について，アルシアンブルー 8GX を利用した両成分の分別定量法を開発した．酸性条件下において，アルシアンブルー 8GX とコンドロイチン硫酸ナトリウムは，特異的に複合体を形成して沈殿する．沈殿物をアルカリ溶液で溶解させ，その吸光度よりコンドロイチン硫酸ナトリウムを定量した．また，上澄みを GPC カラムに供し，ヒドロキシプロピルメチルセルロースを定量した．これらの試験法は，安全かつ特異性，再現性に優れ，酸性ムコ多糖類と非イオン性高分子を配合した医薬品の定量に応用することができる．

NII-Electronic Library Service