

インドネシアで流通している複合ビタミンBシロップ製剤中の ビタミンB群のイオンペアクロマトグラフィー分析

宮崎玉樹[#], 堀寄允文, 阿曾幸男, 奥田晴宏

Ion-pair HPLC analysis of B vitamins in syrup products in Indonesia

Tamaki Miyazaki[#], Tadafumi Horisaki, Yukio Aso, Haruhiro Okuda

A training course for analysis of B vitamins in syrup products was undertaken at the National Agency of Drug and Food Control at Jakarta as part of the project to deliver safe drugs to people in Indonesia by Japan International Cooperation Agency. Analytical methods have been developed for quantitative determination of B vitamins by ion-pair high-performance liquid chromatography using 1-hexanesulfonic acid sodium salt. Measurements were performed for two syrup products removed from a drug store in Jakarta to determine the amount of each vitamin B. The measured values of riboflavin 5'-phosphate sodium, nicotinamide and pyridoxine hydrochloride were almost the same with those of nominal content for both products. While the measured values of thiamine hydrochloride, pantothenol and cyanocobalamin were approximately twice the amount of nominal contents.

Keywords: B vitamins, ion-pair HPLC, syrup, Indonesia

はじめに

インドネシアでは、公的病院や保険所などに供給された医薬品が地域住民の医療を支えている。しかし、製造・品質管理が不十分で品質の劣る医薬品、あるいは偽医薬品の流通が問題になっており、GMP査察や試験検査技術の向上など国家医薬品食品監督庁（BPOM）における品質確保および安全対策が喫緊の課題となっている。独立行政法人国際協力機構（JICA）による「インドネシア・安全な医薬品を届けるプロジェクト」はそのような相手国の薬事事情の改善を支援するため、提言、セミナー、研修などを通じ、BPOMおよび地方支所職員の医薬品管理に係る知識と技術の向上を目標としている。今回、2007年から5カ年計画で実施されている当該プロジェクトの一環として、ジャカルタに本拠を置くBPOMにおいて二週間の医薬品分析研修を行った。

今年度の研修は、インドネシアにおいて公的な試験法が設定されていない複合ビタミンBシロップ製剤中のビ

タミンB群（塩酸チアミン（VB₁）、リン酸リボフラビンナトリウム（VB₂）、ニコチンアミド（VB₃）、パントテノール（VB₅）、ピリドキシン塩酸塩（VB₆）、シアノコバラミン（VB₁₂））の一斉定量法の設定を目的として行われた。BPOMでは、インドネシアで流通している小児用複合ビタミンBシロップ製剤の品質確保のため、製剤中に含有されるビタミンB群の定量が試みられていた。しかし、米国薬局方のVB₆（Pyridoxine Hydrochloride）各条に記載されている高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法を参考にした分析条件により複合ビタミンBシロップ製剤の測定を行ったところ、想定していた数以上のピークが観察されたこと、各ピークの分離が不十分であったことなどから、分析条件の設定に関してJICAプロジェクトに技術協力が求められた。そこで研修においては、イオンペアHPLC分析における溶離液中の有機溶媒の比率やイオンペア試薬の濃度、カラム温度などの分析条件がビタミンB群のピークの分離に及ぼす影響について理論を講義した後、実技演習を行った。しかし、分離が不十分な成分があるうえ、未知成分のピークも検出されたことから、研修期間中には分析条件を確立できなかった。そこで、帰国後当所において、フォトダイオードアレイ検出器（PDA）を使用して未知成分の推定を行うとともに、HPLC分析条件の改良を試みた。

[#] To whom correspondence should be addressed to Tamaki Miyazaki; Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext. 227; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: miyazaki@nihs.go.jp

本研究では、インドネシアで流通している複合ビタミンBシロップ製剤中のビタミンB群の定量に適用可能な新たなイオンペアHPLC法を確立したので、研修の講義で用いた参考データ作成のための基礎検討結果も含めて報告する。

実験方法

1. 試 薬

リボフラビンおよび

p-ヒドロキシ安息香酸は試薬一級を、ブチルパラベン液体クロマトグラフ用標準品を、VB₅は試薬グレードの物を用いた。メタノールは高速液体クロマトグラフ用を、アセトニトリルはLC/MS用を使用した。1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム (1-HexSO₃Na) および1-オクタンスルホン酸ナトリウム (1-OctSO₃Na) はイオンペアクロマトグラフ用を用いた。リボフラビンとVB₅以外のビタミンB (VB₁, VB₂, VB₃, VB₆, VB₁₂) およびその他の試薬は、特級を使用した。試薬類は全て、和光純薬工業(株)製であった。水は、超純水製造装置 (Millipore社製Direct-Q®3UV) により精製した比抵抗値が18.2MΩ・cm以上の純水を用いた。

2. 試 料

インドネシアの薬局から入手した小児用複合ビタミンBシロップ製剤2種類 (Becombion® Syrup, Becombion® Extra Lysine) を試料とした。含有されるビタミンB群の種類と5 mLあたりの含量の表示量は両製剤ともに、VB₁が5 mg, VB₂が2 mg, VB₃が20 mg, VB₅が3 mg, VB₆が2.5 mg, VB₁₂が3 μgであった。

3. 装 置

高速液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製のオンラインデガッサ (DGU-12A), 送液ユニット (LC-10AD_{VP}), カラムオーブン (CTO-20AC), PDA (SPD-M10A_{VP})あるいは紫外可視検出器 (UV-VIS, (SPD-20A)), オートサンプラー (SIL-10AD_{VP}), データ処理ソフトウェア

(CLASS-VP) を使用した。

4. 標準溶液の調製および検量線の作成

各ビタミンB標準溶液の調製には、試薬を用いた。標準溶液の原液としてVB₁は0.5 mg/mL, VB₂は4 mg/mL, VB₃は2 mg/mL, VB₅は2 mg/mL, VB₆は0.5 mg/mL, VB₁₂は0.5 mg/mLの水溶液を調製した。リボフラビン標準溶液の原液は、メタノール/水 (1/2) 混液で0.06 mg/mLとなるように調製した。ビタミンB群のHPLCピークの分離に及ぼす測定条件の影響を検討する際は、各ビタミンB標準溶液の原液をHPLCの溶離液で2~10倍希釈した単一成分溶液,あるいは数種類の標準溶液の原液を適宜混合した溶液を用いた。

シロップ製剤中の各ビタミンBの定量に際しては、標準溶液の原液をHPLCの溶離液で希釈し、それぞれ下記の濃度範囲で5点検量線を作成した。

VB ₁	0.02~0.10 mg/mL
リボフラビンおよびVB ₂	0.01~0.05 mg/mL
VB ₃	0.02~0.10 mg/mL
VB ₅	0.2~1.0 mg/mL
VB ₆	0.01~0.05mg/mL
VB ₁₂	0.0002~0.0010 mg/mL

5. 定 量

シロップ製剤中の各ビタミンBの定量は、Table 1に示す3通りの条件で行った。VB₅とVB₁₂を定量する際は製剤原液を、VB₁, VB₂, VB₆を定量する際はHPLCの溶離液で製剤を25倍に希釈した溶液を、VB₃を定量する際は製剤を100倍に希釈した溶液を試料溶液とし、その20 μLを高速液体クロマトグラフに注入した。予め各ビタミンBの検量線作成過程で得られたピークの保持時間および保持時間においてPDAにより得られた紫外吸収スペクトル (UVスペクトル) の情報を参考に、試料溶液のクロマトグラム上でそれぞれのビタミンBに相当するピークを同定し、その面積を求め、予め作成しておいた

Table 1 HPLC conditions used for B vitamins analysis

	#1	#2	#3
Mobile phase (A/B)	7/3	9/1	9/1
A:	5 mL acetic acid+1 L water, 10 mM 1-HexSO ₃ Na	10 mM sodium phosphate buffer (pH 4.0), 5 mM 1-HexSO ₃ Na	0.2 % phosphoric acid, 5 mM 1-HexSO ₃ Na
B:	methanol	acetonitrile	acetonitrile
Column temperature	25°C	40°C	40°C
Flow rate	0.8 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min
UV wavelength for detection	270 nm for VB ₁ , VB ₂ , VB ₃ ; 290 nm for VB ₆	270 nm for VB ₁ , VB ₂ , VB ₃ ; 290 nm for VB ₆ ; 360 nm for VB ₁₂	220 nm for VB ₅

各ビタミンBの検量線から試料溶液中の対象ビタミンB濃度を求めた。さらに、得られたそれぞれのビタミンB濃度に希釈倍率を乗じて製剤中の濃度を算出し、結果は3回測定の実値と標準偏差とを成分表示量に対する百分率で示した。

結果と考察

インドネシアのBPOMにおいて検討されていた分析条件は米国薬局方のPyridoxine Hydrochloride各条に記載されている条件を参考にしており、オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) を充填したカラムを用い、5 mMの1-HexSO₃Naを含む酢酸水溶液 (酢酸5 mL + 水1 L, pH 2.8) とメタノールを7対3の割合で混合した液を溶離液とし、カラム温度は30°Cである。しかし、この条件では一部のビタミンBの分離が不十分なため、溶離液中のメタノールの比率、pH、イオンペア試薬の濃度や種類、カラム温度を変えてより良い条件を検討した。

Fig. 1に、各ビタミンBの保持時間に及ぼすメタノール混合比の影響を示す。溶離液中のメタノール混合比が低いほどそれぞれのビタミンBの分離はよくなったが、保持時間が長くなった。一方、溶離液のpHを変えるとVB₁とVB₁₂ではピーク形状と保持時間が変化した (Fig. 2)、今回検討したpHの範囲内では他のビタミンBの保

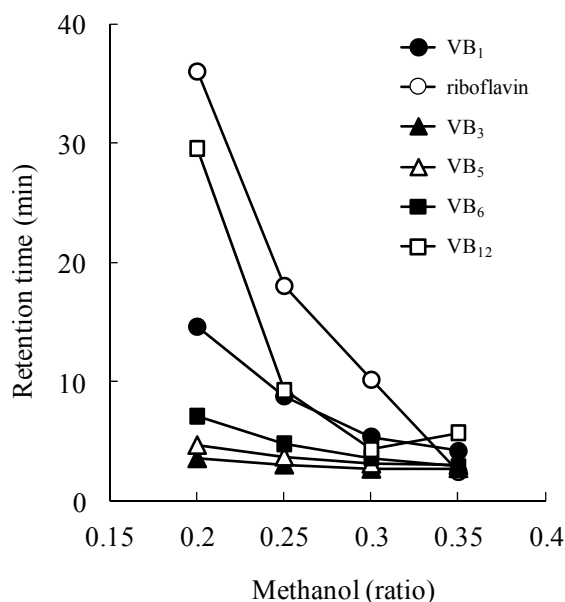


Fig. 1. Effect of methanol on the retention time of B vitamins

Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)
Mobile phase: A/B (4/1-13/7), A; 10 mM phosphate buffer (pH 2.8) containing 5 mM 1-HexSO₃Na, B; methanol
Flow rate: 1.0 mL/min
Column temperature: 30°C
Detector: UV-VIS (200 nm)

持時間には大きな影響が見られなかった。

Fig. 3に、ビタミンBの保持時間に及ぼす溶離液中のイオンペア試薬濃度の影響を示す。1-HexSO₃Naの濃度が増加するとVB₁、VB₃、VB₆の保持時間が長くなり、特にVB₁の保持時間の遅れが顕著であった。また、VB₁のピークのシンメトリー係数は1-HexSO₃Na濃度の増加に従って減少し (1 mM: 2.4 $\rightarrow$ 5 mM: 1.7 $\rightarrow$ 10 mM: 1.2 $\rightarrow$ 20 mM: 1.1), 10 mM以上の1-HexSO₃Na濃度においてテーリングがほぼ抑制されることが示された。

イオンペア試薬を1-HexSO₃Na (5 mM) から1-OctSO₃Na (5 mM) に変えると、VB₃の保持時間は約2倍に、VB₆の保持時間は約3倍になった。VB₁は1-OctSO₃Naをイオンペア試薬として用いると、90分までに溶出しなかった。さらに1-OctSO₃Naをイオンペア試薬として用いると、VB₃のピークはテーリングし、VB₁₂のピークはブロード化した。したがって、ビタミンBの分析には1-OctSO₃Naよりも1-HexSO₃Naが適していると考えられた。

Fig. 4に、ビタミンBの保持時間に及ぼすカラム温度の影響を示す。カラム温度が低いほど、クロマトグラムの先頭付近に溶出するVB₃とVB₁₂の分離がよくなった。30°Cで使用するよりもカラム圧が約2 MPa/cm²増加し

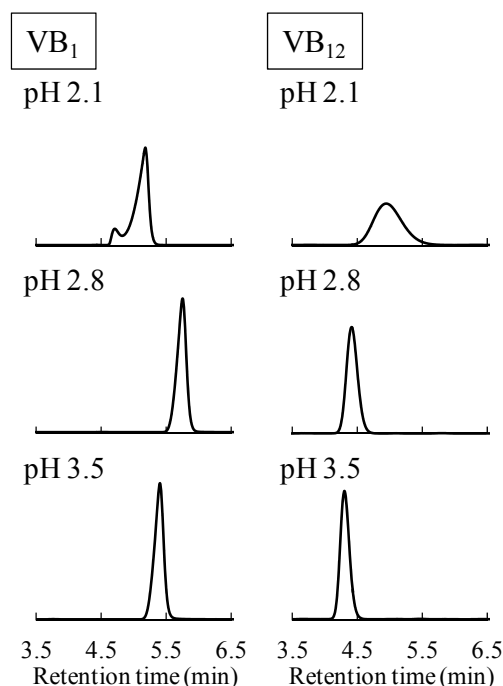


Fig. 2. Effect of pH of aqueous mobile phase on the peak shape and retention time of VB₁ and VB₁₂

Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)
Mobile phase: A/B (7/3), A; 10 mM phosphate buffer containing 5 mM 1-HexSO₃Na, B; methanol
Flow rate: 1.0 mL/min
Column temperature: 30°C
Detector: UV-VIS (200 nm)

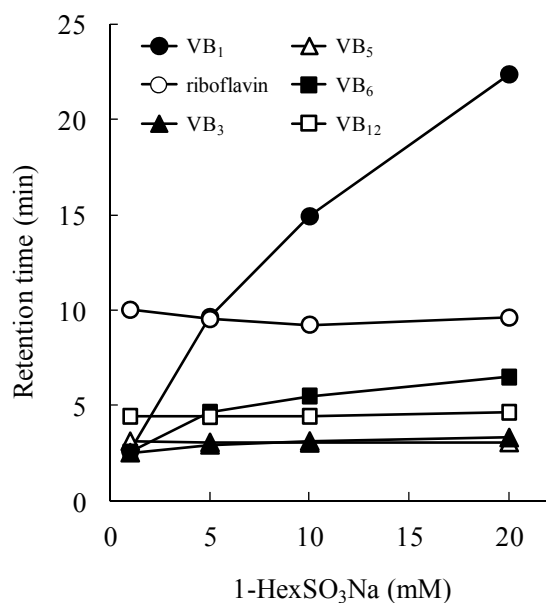


Fig. 3. Changes in the retention time of B vitamins with increasing the concentration of 1-HexSO₃Na

Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)
 Mobile phase: A/B (7/3), A; 5 mL acetic acid+1 L water containing 1-20 mM 1-HexSO₃Na, B; methanol
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Column temperature: 30°C
 Detector: UV-VIS (200 nm)

たが使用推奨最大圧力以下であったので、成分分離の観点から25°Cが適切と考えられた。

以上の検討をもとに選択した分析条件 (Table 1, #1) により測定したBecombion®Syrupのクロマトグラムを Fig. 5に示す。Becombion®Extra Lysineにおいても、同様のクロマトグラムが得られた。ピークの同定は、保持時間とPDA検出器で得られたUVスペクトルの比較により行った。

製剤に含まれる6種類のビタミンBの中ではVB₂が最も早く溶出し、このピークより前に溶出したピークは、製剤中のビタミンB以外の成分あるいはインジェクションショックと推定された。また、VB₂は図中で枠囲みした2本のピークに割れた。検量線の作成時など標準溶液を注入した場合も同様にピークが2本観察されたこと、初めのピークの立ち上がり付近である保持時間2.7 minから2本目のピークトップのやや後 (保持時間3.1 min) までのUVスペクトルが同じ吸収パターンを示したことから、両ピークをもってVB₂とみなした。VB₅はVB₂とVB₃のピークの中に保持時間を有するが、250 nm以上の波長領域に特徴的な吸収を持たないこと、VB₃に比べて含有量が約1/10と少ないことから、本分析条件では定量できなかった。VB₃の後に溶出するVB₁₂については、

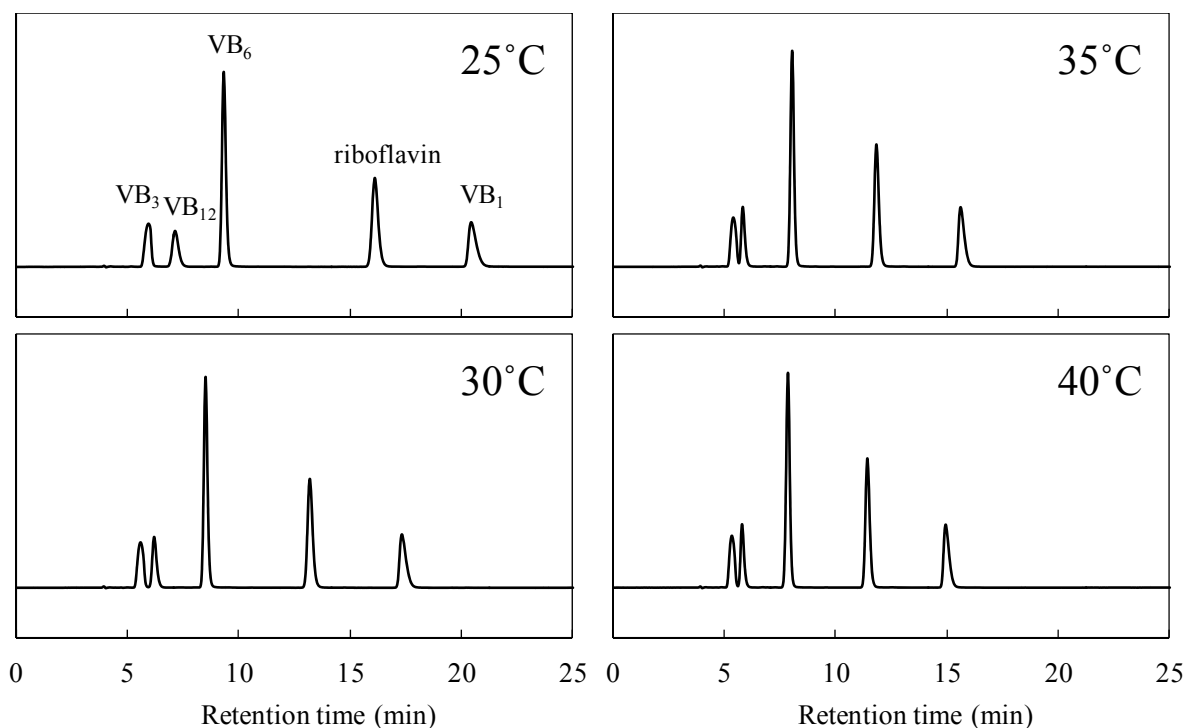


Fig. 4. Chromatograms of mixture of B vitamins measured under different column temperature

Column: Shim-pack CLC-ODS (M) (5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm)
 Mobile phase: A/B (7/3), A; 5 mL acetic acid+1 L water containing 5 mM 1-HexSO₃Na, B; methanol
 Flow rate: 0.7 mL/min
 Column temperature: 25-40°C
 Detector: PDA (280 nm)

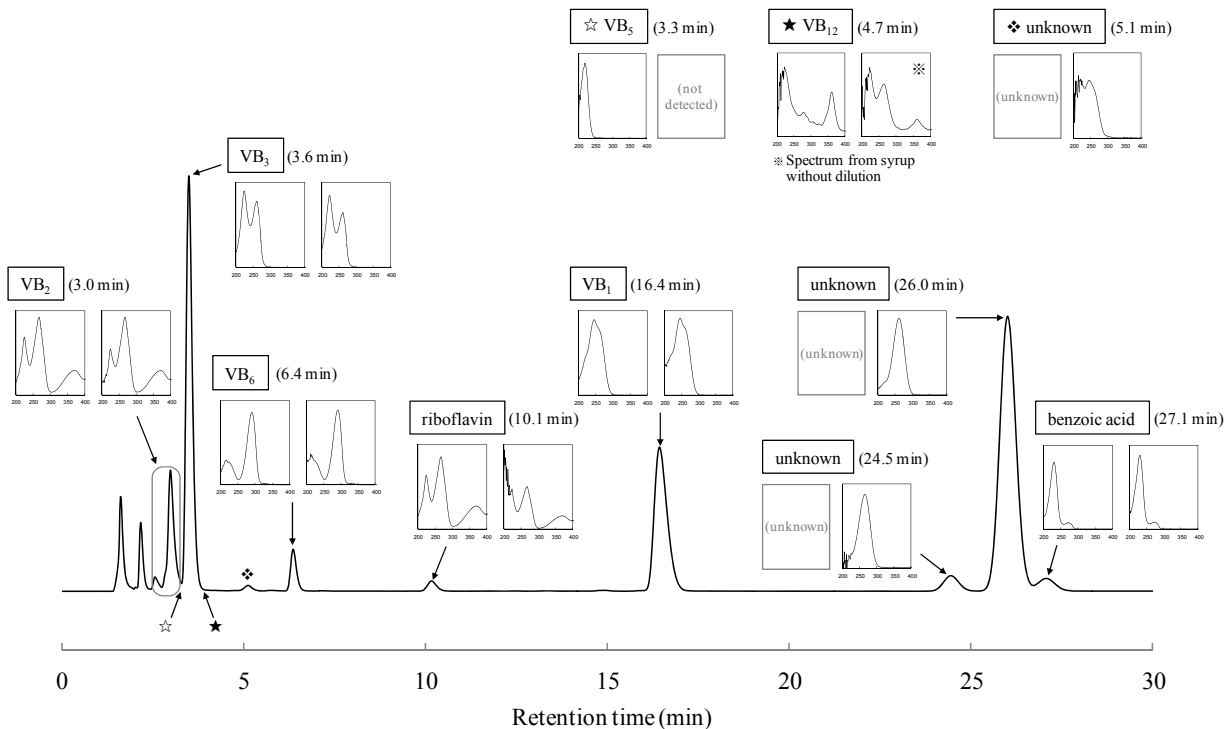


Fig. 5. Chromatogram of Becombion[®]Syrup (25 times dilution) under the HPLC conditions of #1

Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)

Detector: PDA (270 nm)

Time in parenthesis is the retention time of each substance. Spectra in the left side are those obtained by PDA from standard solutions, and spectra in the right side are those from the sample solution.

標準溶液のクロマトグラムではほぼ対称な1本のピークが観察されたのに対し、製剤のクロマトグラムでは2本のピークが観察された (Fig. 6)。PDA検出器で測定されたUVスペクトルは、2本のピークのどちらも370 nm付近にVB₁₂に特徴的な吸収極大を示したが、保持時間がVB₁₂の標準溶液と一致しなかったため、本分析条件ではVB₁₂の定量を行わなかった。5.1, 10.1, 24.5, 26.0, 27.1 minには、含有成分として表示されているビタミンB群以外のピークが観測された。10.1 minのピークはリボフラビンであり、VB₂の不純物として含まれていたものか、あるいはVB₂の分解により生成したものと考えられる。VB₂の表示量に対するリボフラビンの相対的な量は、Becombion[®]Syrupでは 7.7 ± 0.3 %, Becombion[®]Extra Lysineでは 6.0 ± 0.1 %であった。27.1 minのピークは保持時間とUVスペクトルから、安息香酸であることが確認された。24.5 minと26.0 minのピークも保存剤に由来すると考えられるが、保持時間とUVスペクトルからパラベン類やp-ヒドロキシ安息香酸ではないことが明らかになった。

#1の分析条件ではVB₅とVB₁₂の2つのビタミンBが定量できなかったため、ジーエルサイエンス(株)が公表している複合ビタミンB (VB₁, VB₂, VB₃, パントテン

酸, VB₆)の一斉分析¹⁾の溶離液 (5 mM 1-HexSO₃Naを含む0.2 %リン酸水溶液/アセトニトリル (9/1)) を用いて分析したところ、VB₁₂は標準溶液の原液を注入した場合にも溶出が確認できなかった。VB₁₂は溶離液のpHが低くなると保持時間が延長し、ピークがブロード化する傾向がある (Fig. 2)。VB₁₂はpH 2付近において、解離状態の異なる分子種が共存することが報告されている²⁾。5 mMの1-HexSO₃Naを含む0.2 %リン酸水溶液のpHは1.9であるため、この水溶液を用いた溶離液中ではVB₁₂が種々の荷電状態を有する複数の分子種として存在し、ピークがブロード化して検出できなかったと考えられた。VB₁₂はpH 4付近ではほぼ1種類の荷電状態を示すことから、1-HexSO₃Na (5 mM) を含むpH 4.0の10 mMリン酸ナトリウム塩緩衝液を用いた溶離液を検討した (Table 1, #2)。この溶離液を用いて得られたクロマトグラムをFig. 7に示す。VB₁₂は他のビタミンBや未知物質と完全に分離し、16.1 minに溶出した。またVB₁, VB₃, VB₆の分離も良好であった。ただし、VB₂は#1の分析条件の場合と同様、図中に枠囲みで示した2本のピークとなり、VB₅のピークと重なった。溶離液の組成比やカラム温度を調整してもVB₅と他のビタミンBとの分離を改善することができなかったため、VB₅はジ

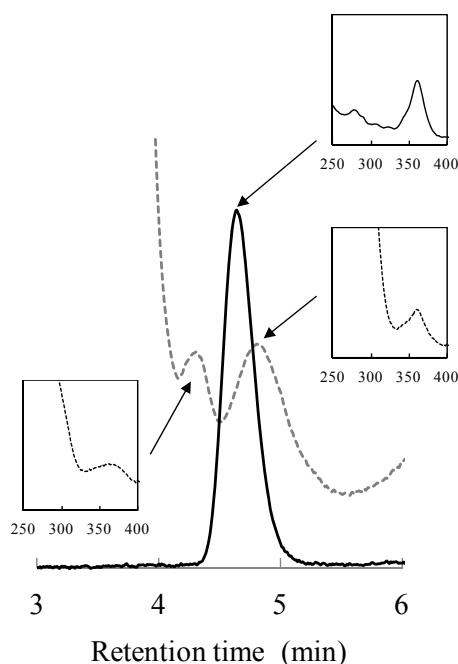


Fig. 6. Comparison of chromatograms for VB₁₂ in a standard solution (solid line) and in Becombion[®] Syrup (dotted line) measured under the HPLC conditions of #1
Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)
Detector: PDA (360 nm)
UV spectra were obtained by PDA at the retention time of each peak top.

ーエルサイエンス(株)が公表している溶離液 (Table 1, #3) を用いて定量することとした。VB₅は紫外および可視領域における吸収が小さくシロップ製剤を希釈せずに注入しなくてはならなかったが、VB₃のピークの裾に溶出した (Fig. 8)。

今回選択した分析条件が、異なるメーカーのODSカラムを用いた場合にも適用可能か、用いるカラムをInertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm) からShim-pack CLC-ODS (M) (5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm) に変えて測定を行った。Shim-pack CLC-ODS (M) では、分析対象ビタミンB群の中で最後に溶出するVB₁₂の保持時間が9.5 min、検出される全ピークの中で最後に溶出する未知物質の保持時間が23.9 minと、やや測定時間が短縮されたが、各ビタミンBと未知物質の溶出順序には変わりがなく、それぞれのピークの分離も良好であった。

#1, #2あるいは#3の分析条件により測定したインドネシアで市販されているシロップ製剤中の6種類のビタミンBの定量結果をTable 2に示す。VB₂, VB₃, VB₆は、ほぼ表示どおり含有されていた。VB₁とVB₁₂については、表示量の約2倍の値が得られた。VB₁は、溶離液の異なる2種類の分析条件下ではほぼ同等の定量値が得られたこと、PDA検出器によって測定されたUVスペ

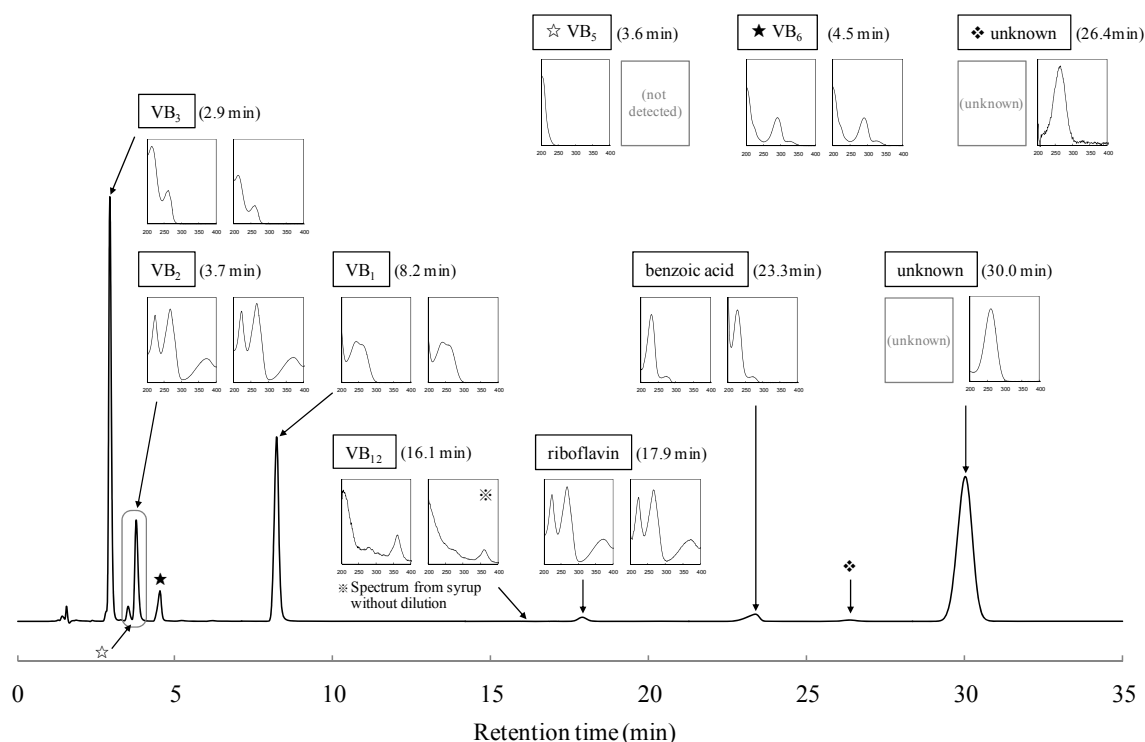


Fig. 7. Chromatogram of Becombion[®] Syrup (25 times dilution) under the HPLC conditions of #2

Column: Inertsil ODS-3 (3 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm)

Detector: PDA (270 nm)

Time in parenthesis is the retention time of each substance. Spectra in the left side are those obtained by PDA from standard solutions, and spectra in the right side are those from the sample solution.

クトルがピークの先端，極大，裾のいずれにおいてもVB₁試薬のスペクトルと同じであり単一成分のピークであると確かめられたことから，含有量が表示量の2倍であると考えられた。VB₁₂については1種類の溶離液での定量結果であるが，PDA検出器によって測定されたUVスペクトルがVB₁₂に特徴的なスペクトルであったことから，未知成分の妨害はなく，表示量の2倍のVB₁₂が製剤中に含まれていると考えられた。VB₅は，Fig. 8の試料溶液におけるUVスペクトルからわかるように，標準溶液では見られなかった270 nm付近の吸収が認められ，約十倍量含有されるVB₃との分離が不完全であることが考えられた。また，カラム [1] での結果がカラム [2] での結果よりも低い傾向が見られたことから，カラムの種類によってVB₃やその他製剤マトリクス由来の成分との分離が異なる可能性が考えられた。シロップ製剤の検体数を増やすなどして，傾向と再現性を確かめる必要がある。

今回設定した分析条件#2と#3の併用を，インドネシアで流通する複合ビタミンBシロップ製剤中のビタミンB群の定量の“in-house method”として採用するため，両分析条件についてインドネシアの試験機関

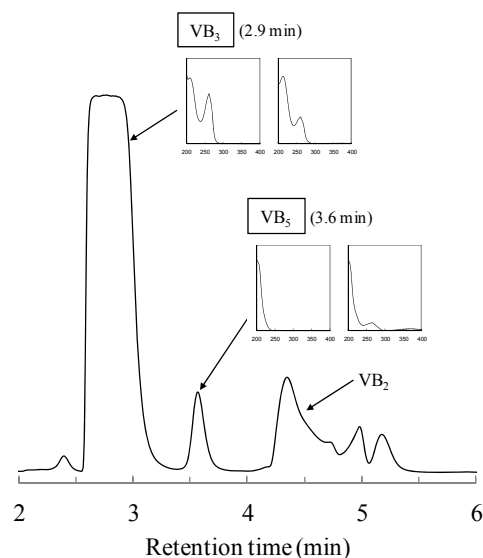


Fig. 8. Part of chromatogram of Becombion® Syrup (without dilution) under the HPLC conditions of #3

Column: Inertsil ODS-3 (3 μm, 4.6×150 mm)

Detector: PDA (220 nm)

Time in parenthesis is the retention time of each B vitamin. Spectrum in the left side is that obtained by PDA from standard solutions, and spectrum in the right side is that from the sample solution.

Table 2 Nominal amount and relative measured values of B vitamins in syrup samples

	Nominal amount (mg/5 mL)	HPLC conditions	HPLC column*	Relative measured values against nominal amount (%)	
				Becombion®	Becombion®
				Syrup	Extra Lysine
VB ₁	5	#1	[1]	194.7 ± 8.1	193.7 ± 1.0
		#2	[1]	193.2 ± 2.8	188.4 ± 2.3
		#2	[2]	194.2 ± 2.0	185.6 ± 2.4
VB ₂	2	#1	[1]	95.9 ± 3.9	96.6 ± 0.2
		#2	[1]	101.8 ± 2.3	102.1 ± 1.0
		#2	[2]	100.4 ± 0.3	100.4 ± 1.0
VB ₃	20	#1	[1]	98.3 ± 0.8	101.6 ± 2.1
		#2	[1]	102.5 ± 0.3	102.0 ± 0.4
		#2	[2]	98.8 ± 2.6	101.0 ± 1.0
VB ₅	3	#3	[1]	129.0 ± 1.1	87.9 ± 1.0
		#3	[2]	162.4 ± 8.7	212.8 ± 4.8
VB ₆	2.5	#1	[1]	99.9 ± 4.3	98.5 ± 0.4
		#2	[1]	101.0 ± 2.4	98.3 ± 2.7
		#2	[2]	103.1 ± 4.6	103.6 ± 1.9
VB ₁₂	0.003	#2	[1]	205.1 ± 2.6	204.0 ± 5.2
		#2	[2]	190.9 ± 2.5	186.7 ± 0.4

Relative measured values are the average ± standard deviation (n=3).

* HPLC column used: [1] Inertsil ODS-3 (3 μm, 4.6×150 mm); [2] Shim-pack CLC-ODS(M) (5 μm, 4.6×150 mm).

(BPOMおよび地方支所)においてバリデーションを行うこととなった。その際、分析条件#3については、カラム温度や流速などの調整によりVB₃、VB₅、VB₂の分離の改善を試みて、最終的な分析条件を決定する予定である。

参考文献

- 1) InertSearch™ for LC, Inertsil® Applications, Data No. LA028-0000
- 2) <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=cyanocobalamin&source=fp>