

医薬品分析のための試料調製法

1 はじめに

医薬品は、服用する立場の患者を保護するため、高度に品質の確保された製品の供給が要請されている。この目的達成のため、定量分析、化学構造の確認試験、純度試験など各種分析による精度の高い品質評価法が必須となる。また投与された医薬品は吸収、分布、代謝、排泄といった過程を経つつ、その一部が作用点に達し薬効を示す。薬物動力学的な測定結果は、処方、投与方法、投与量などのドラッグデザイン、患者の薬物濃度モニタリングに寄与する。一方近年いわゆる健康食品に、作為的に医薬品成分が混入され、製品を購入、摂取した消費者の健康被害事例が報告されている。消費者の健康を守る上で、医薬品成分が添加されたいわゆる健康食品は、薬事法により無承認無許可医薬品として監視されており、医薬品成分を検索するための分析の必要性が高まっている。このような状況のもと、本稿では原薬・製剤、生体試料、健康食品に含まれた医薬品成分の分析時に必要となる試料調製、前処理法の概要について記述する。

2 原薬・製剤

医薬品の品質と試験方法の規範書である日本薬局方（日局）¹⁾には、原薬・製剤に係る公定分析法が記載されている。日局には医薬品を分離分析する方法として薄層クロマトグラフィー（TLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、液体クロマトグラフィー（HPLC）が、また化学構造を確認する方法としては紫外外部吸光度測定法（UV）、赤外吸収スペクトル測定法（IR）が記載され、核磁気共鳴スペクトル測

定法（NMR）も採用されている。ほかにも物質の旋光度、融点測定など物理化学的な試験、電位差滴定による定量試験、製剤試験等が規定されている。医薬品の原料である原薬は、安全性、有効性を確保するため類縁物質質量が制限され、純度的には100%に近いものが多い。一般に原薬の日局試験用試料溶液は、試料を粉碎後なんらかの溶媒（例えばメタノール等のアルコール、酸、塩基溶液）に溶解させれば調製できる場合が多い。一方製剤は、原薬と安定剤、コーティング剤などの添加剤成分を製造的に混合、充てんし、患者が薬効成分を服用しやすい形にしたものであり、生体内では遊離した成分が薬効を示すよう設計されている。医薬品成分以外の添加剤成分が配合されているため、これらの共存成分が分析の際には、目的成分の抽出または呈色反応の妨害となることがあり、いかにして目的成分を誤差なく抽出するかが課題となる。製剤を製造する段階では徐放化、腸溶化等の溶出制御がなされる場合があり、とくに錠剤、顆粒剤からの成分抽出の場合は注意しなければならない。測定値の信頼性を確保するため、固形剤からの試料調製の際は製剤上のバラツキを考慮し、少なくとも10個以上秤取し、粉末となるまですりつぶして均等に混合した後分析し、製品を評価する必要がある。また、多成分系であることが多い一般用医薬品、生薬分析の際は、個々の有効成分の定量において、他の有効成分等による妨害があり、測定が困難なケース、定量値の信頼性に乏しいケースがしばしば見られる。しかし、この場合でも公定分析法である日局や医薬品製造承認書に記載された「規格及び試験方法」においては、複雑な過程を有する前処理法を採用するよりは良好な回収率を確保

するため、特異性の高い機器分析（例えばHPLC）試験法を採用することが重視されている。HPLCの場合、試料調製のステップは、アルコール、移動相溶媒による成分抽出法が日常の品質管理試験の中でよく利用されている。図1に医療用フロプロピオン製剤(カプセル剤)の内容物を取り出し粉末とし、水/メタノール混液(1:1)で抽出した後定量分析したとき得られたHPLCクロマトグラムを示す²⁾。

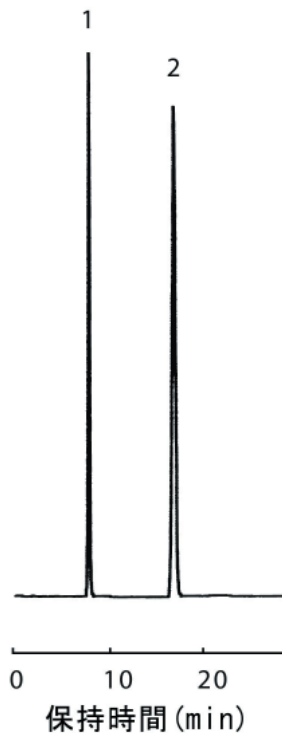


図1. フロプロピオンのHPLCクロマトグラム
1: フロプロピオン, 2: パラアミノ安息香酸イソプロピル (内標準物質).
操作条件: カラム, Wakosil 5C18 (4.6 × 150 mm, 和光純薬), 移動相, 水/アセトニトリル/酢酸混液 (700:300:1), 流速, 1.2mL/min, カラム温度, 40°C, 検出, 275 nm.

3 生体試料

薬物は生体内においてタンパク質、無機塩などの内因性夾雑物と共存している。このため、分析手順の簡易化、濃縮、分析機器の保護と劣化防止を目的とした試料調製が必要となり、処理法の選択により測定結果が左右される場合も少なくない。

血清や血漿を試料としたときの除タンパク法として、沈殿法がある。アセトニトリル、アセトン、メタノールなどの有機溶媒を試料に添加することによって、溶液の誘電率変化を起し、タンパク

質を変性沈殿させる。試料に対して有機溶媒を1〜4倍容量加え、ミキサーでよくかき混ぜ、遠心分離し変性タンパク質を除去する。有機溶媒による方法は、目的成分の抽出を同時に行なうことができ、更に除タンパク後の濃縮も容易で汎用性が高い。除タンパク後の成分分離に最もよく用いられるのが有機溶媒を用いる液-液抽出であり、疎水性成分の分離に適する。試料水溶液と混ざり合わない酢酸エチル、ジエチルエーテルなどの有機溶媒を用い、目的成分を有機溶媒層に抽出する。一方、化学結合型シリカゲルを充てんしたカートリッジカラムによる固相抽出も汎用されており、選択性のある充てん剤をつめたカラムに試料溶液を負荷し、充てん剤に成分を保持し、ついで溶離液で溶出する。HPLCの分離モードを基礎とした前処理技術であるが、固相抽出では保持-解離が起きるように溶媒和を極端な条件にとることが多い。また吸引装置を用いることにより、同時に多検体を処理することもできる。充てん剤には、極性相、無極性相、アニオン交換相、カチオン交換相などがあり、HPLC用化学結合型充てん剤が利用される。ほかに限外ろ過膜を用い、分子サイズに基づき除タンパクを行なう限外ろ過法³⁾が用いられ、遊離型成分の抽出に応用される。

4 健康食品

生活習慣を変えることは容易ではないため、ダイエットまた滋養強壮、精力増強を標ぼうした健康食品が、多数販売され人気を集めている。しかし、なかには作為的に医薬品成分が添加された製品が流通しており、成分検索の必要性が生じている。ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)は、成分の構造に関する情報が得られるため、食品など複雑な成分の混合物の分析には欠かせない手段となっている。また化合物検索システムを用いると、検出成分の情報が得られやすいことから、健康食品に添加された医薬品成分をスクリーニングする方法としても有効である。一方、フォトダイオードアレー(多波長)検出器を併用したHPLCも、ピーク成分をより正確に確認できるため、成分同定には有効である。

健康食品に含まれる医薬品成分の分析は、法規

制、製品品質のばらつきを考慮すると、成分定量より成分確認に主眼が置かれることが多い。作為的に混入される医薬品量は、服用量を意識したものであり、分析法の検出限界は服用量の1/20程度で十分と考えられ、検出感度が問題となることは比較的少ない。従って製剤と同様、検体を粉碎した後、抽出溶媒としてメタノール、アセトンなどの有機溶媒を用い、GC/MS、LC/MS用の試料溶液を調製する。ただ痩身効果を有する甲状腺末中の甲状腺ホルモン（チロキシン）は微量なため、プロテアーゼによる酵素分解、液-液抽出を組み合わせた試料溶液の調製⁴⁾を行わないと、LC/MS測定はできない。またシブトラミン、フェンフルラミンなど国内では未承認の医薬品成分が混入されることが少なくなく、さらに摘発逃れを

目的としたN-ニトロソフェンフルラミン、ホモシルデナフィルなどデザイナーズドラッグと呼ばれる医薬品誘導体の混入も多いため、検出に際し注意を要する。図2に健康食品の内容物を取り出し粉末とし、メタノールで抽出した後分析したとき得られたN-ニトロソフェンフルラミンのHPLCクロマトグラムとUVスペクトルを示す⁵⁾。また図3に健康食品を分析したとき得られたチロキシンのLC/MSスペクトルを示す⁶⁾。

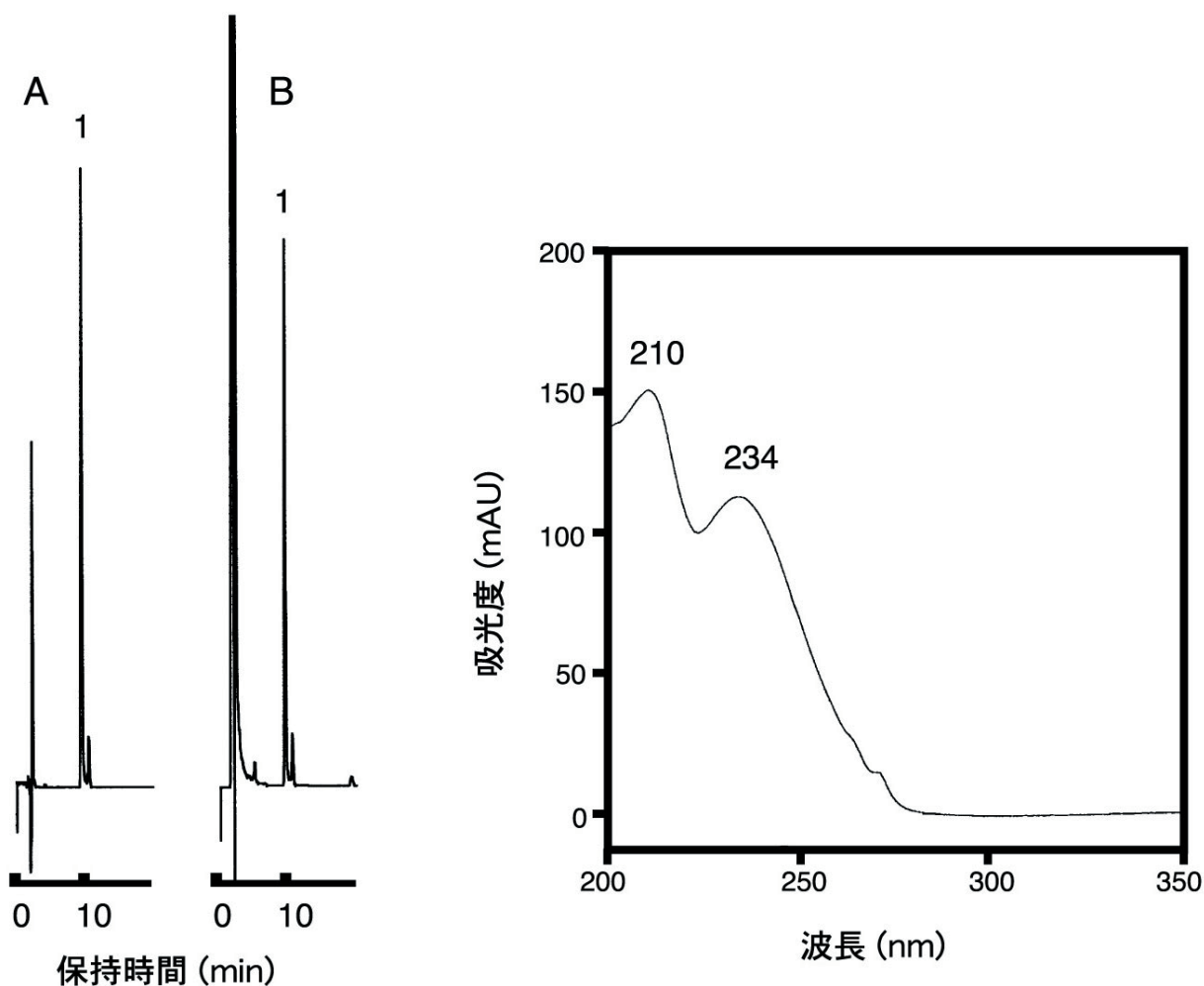


図2. N-ニトロソフェンフルラミンのHPLCクロマトグラムとUVスペクトル

A: 標準溶液, B: 健康食品陽性検体. 1: N-ニトロソフェンフルラミン.

操作条件: カラム, Cosmosil 5C18 MS II (4.6 × 150 mm, ナカライ), 移動相, アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸混液 (550:450:1), 流速, 0.8mL/min, カラム温度, 40°C, 検出, 235 nm.

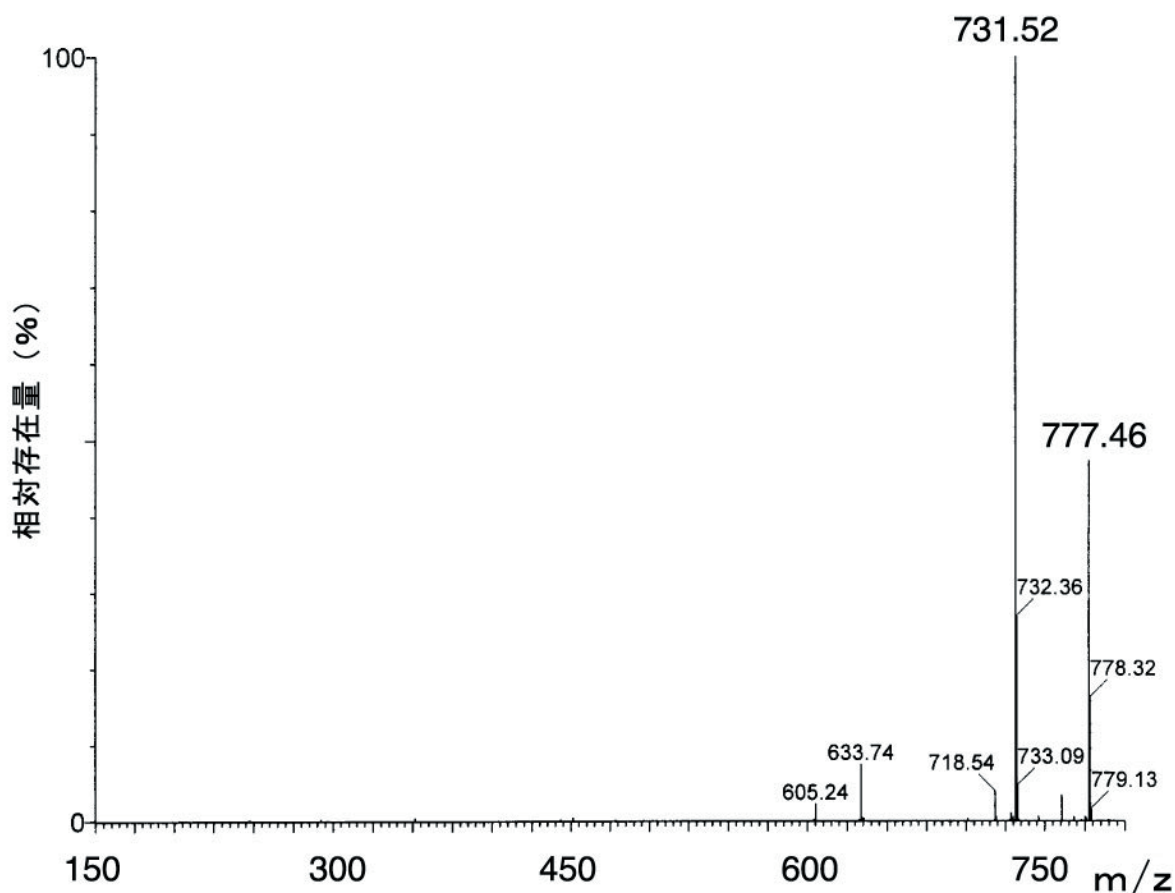


図3. チロキシンのLC/MS スペクトル

操作条件：LC 条件；カラム，TSK gel ODS 80TM (4.6 × 150 mm，東ソー)，移動相，水 / アセトニトリル / トリフルオロ酢酸混液 (600:400:4.5)，流速，1.0mL/min，カラム温度，40℃，保持時間，12.0分。ESI-MS 条件；スプリット比，1:8，スプレー電圧，3kV，コーン電圧，30V，イオン源温度，100℃，デソルベーション温度，250℃，測定イオン，正イオン。

5 おわりに

医薬品は生命関連製品であり、分析対象成分を正しく評価するため、試料の採取、調製法にも、分析法バリデーションの概念が導入され、正確な測定値を得るための方策が確立されてきている。今後さらに、製剤中の微量有効成分、血液中の代謝産物分析の際などに応用できる効率的、実用的かつ科学技術進歩の導入を踏まえた試料調製法の開発が望まれる。

(2002).

- 4) “高速液体クロマトグラフィーハンドブック改訂2版”，日本分析化学会関東支部編，丸善（株），p233 (2000).
- 5) 三上栄一，大野 勉，岡 尚男，石原廣男：医療薬学，31，52 (2005).
- 6) E. Mikami, T. Ohno, H. Matsumoto, S. Sekita: J. Health Sci., 49, 547 (2003).

(文責 化学部 三上栄一)

参考文献

- 1) “第十五改正日本薬局方”，厚生労働省告示第285号，平成18年3月31日.
- 2) 三上栄一，伊藤裕子，大野 勉，早川順子：医薬品研究，27，626 (1996).
- 3) 小坂妙子，浜田洋彦：食品衛生学雑誌，43，225

