

## 誘導体化 HPLC 法による製剤中ステアリン酸マグネシウムの迅速分離定量法の確立

新井 隆,\* 細井 康江

## Determination of Magnesium Stearate in Pharmaceutical Preparations Using Derivatization with 2-Nitrophenylhydrazine and HPLC

Takashi ARAI\* and Yasue HOSOI

*Pharmaceutical Technology Research Laboratories, Tokyo Pharmaceutical Research Center, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-16-13 Kita-kasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan*

(Received October 25, 2004; Accepted December 16, 2004)

In general, spectrophotometric methods (inductively coupled plasma or atomic absorption spectrophotometry) are used for the assay of magnesium stearate (Mg-St). In this study, a new rapid, selective assay method was developed for Mg-St in pharmaceutical formulations. The method was based on isocratic reverse-phase liquid chromatography using a mobile phase of acetonitrile-water (80 : 20, v/v) after precolumn derivatization with 2-nitrophenyl hydrazine for sensitive UV detection. Margoric acid was used as an internal standard and the substances were detectable at 230 nm or 400 nm. Using a short (2 cm) HPLC column reduced the analytical time to 5 min. Validation of the newly developed method was performed in accordance with the International Conference on Harmonization guidelines. The linearity range for Mg-St was 0.00—0.04 mg/ml (as the concentration of injected sample solution) and their correlation factor was 0.9998. The determination and detection limits for Mg-St were 6 µg and 2 µg, respectively. The proposed method was successfully applied to the determination of trace amounts of Mg-St in commercially available tablets with a high recovery percentage, good accuracy, and precision.

**Key words**—assay; magnesium stearate; HPLC; precolumn derivatization; pharmaceutical preparation; analytical procedure validation

## 緒 言

日本薬局方ステアリン酸マグネシウム (Mg-St) は、ステアリン酸とパルミチン酸のマグネシウム (Mg) 塩の混合組成からなり、金属石鹸 (有機酸金属塩) として分類される水性溶媒及び有機溶媒の大多数に難溶性の化学的に安定な物質である。工業的な用途の歴史は古く、欧州の産業革命以後、塗料の乾燥剤、潤滑剤、繊維関係の撥水剤などとして用いられてきた。<sup>1)</sup> 一方、製剤分野では錠剤及びカプセル剤の滑沢剤、潤滑剤又は付着防止剤として現在も汎用されている。

このように、Mg-St は歴史的にも種々の産業分野で使用されている化合物であるが、その分析法についてはあまり報告がなく、現在も薬局方などの公

定書には定量法として、キレート滴定法が記載されている。<sup>1,2)</sup>

近年、製剤技術分野では外部滑沢打錠技術が進歩してきており、それに伴い錠剤表面に付着している Mg-St 量を少量のサンプルで簡易、精度よく把握する必要が生じている。昨今では分光学的機器分析技術が進歩し、Mg-St の微量分析法としてマグネシウム (Mg) を指標とした inductively coupled plasma (ICP) 法<sup>3)</sup>あるいは原子吸光法<sup>4)</sup>などの方法が報告されている。しかし、錠剤中に Mg-St と同じく Mg を含む副原料として、例えばメタケイ酸アルミン酸マグネシウム (ノイシリン)、ケイ酸マグネシウム、炭酸マグネシウムなどを用いている場合、指標となる Mg の量が副原料由来の Mg と重複するため、非分離分析法である分光学的方法を用いて直接 Mg-St を定量することは困難である。

また、日本薬局方及び米国薬局方 (USP) の Mg-St の純度試験として記載されている GC による試

第一製薬株式会社製剤技術研究所・東京製剤技術センター

e-mail: arait26d@daiichipharm.co.jp

験法<sup>1,2)</sup>は、それまでのマグネシウムを指標とするものではなく、構成成分であるステアリン酸及びパルミチン酸に着目し、それらの分離分析を達成しているものの、比較的多量の試料 (Mg-St として 0.10 g) を必要とし、さらに、三フッ化ホウ素・メタノールの存在下、加熱還流反応によるメチルエステル化後、キャピラリー GC に付す複雑な方法であるため、錠剤中に含まれる微量の Mg-St を多検体処理・迅速測定するには適していない。

一方、Mg-St の分離分析法を確立する際に、一般的な分離モードである逆相系 HPLC を選択する場合の問題点としては、①疎水性が高いため保持時間 (分析時間) が長くなること、②紫外部の吸収が小さいため検出感度が低いなどが挙げられる。近年では hyphenated analysis の著しい進歩に伴い、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) による長鎖脂肪酸の分析も数例試みられているが、<sup>5,6)</sup> いずれの例も 9-anthrylmethyl ester 誘導体として分析するものであり、試薬の安定性に起因する操作性及び LC-MS が紫外吸光検出 HPLC に比べて高価である点からも日常的分析法として使用するには一般的ではない。

HPLC 検出技術の進展に視点を転じてみると、一般にアミノ基に比べ誘導体化が難しいとされていたカルボキシル基についても、近年 UV、蛍光検出用の有用な誘導体化試薬が開発されてきており、<sup>7-9)</sup> 容易に高感度検出可能な発色団基 (chromophore) を導入できることから、主に生体成分の分析を中心に種々の応用が報告されてきている。

また、HPLC カラムについては、ハイスループットスクリーニング分析 (high throughput screening: HTS) への応用を中心に、粒径 5  $\mu\text{m}$  以下の充填剤の実用化が進み、長さ 5 cm 以下のカラムでも従来の分離能を維持したまま短時間 (5—10 分以内) での分析が可能となってきた。<sup>10,11)</sup>

前述のごとく、Mg を含む製剤副原料を使用している場合、実用的な製剤中の Mg-St 分析法は確立されていない。本報告では、錠剤中に含まれる微量 Mg-St の分離分析法の確立を目的とし、主構成成分であるパルミチン酸及びステアリン酸の和を指標とし、それらの簡易な高感度プレカラム誘導体化を確立した。さらにショートカラムを用いた HPLC に付すことにより短時間 (5 分以内) で分離可能な

高感度分析法の設定ができた。次に、実製剤への適用可能性を評価するために、International Conference on Harmonization (ICH) ガイドライン及び日局の分析法バリデーションに準拠した特異性、真度、直線性、精度及びシステム適合性試験についてデータを測定した。最後に、Mg-St 定量法の実用化検討として、既に市販されている製剤 (錠剤、カプセル剤) 4 品目について、Mg-St 含量の測定を行った。

## 実験の部

狂牛病 (BSE) 問題に端を発した動物性 Mg-St と植物性 Mg-St との品質同等性の確保にも関連し、各 Mg-St の脂肪酸組成についても、論議的となることが予想された。そのため本報では、Mg-St 由来のステアリン酸ピークとパルミチン酸ピークとの分離を達成した上で、Mg-St の含量としては、ステアリン酸ピークとパルミチン酸ピークの総和をもって表すこととし、以下の検討を行った。

**1. 試料** 分析条件確立及び分析法バリデーションの際には重量約 100 mg のプラセボ錠を使用した。プラセボ錠は乳糖に滑沢剤として Mg-St、流動化剤としてメタケイ酸アルミン酸マグネシウム (ノイシリン)、その他に粉末セルロース、ケイ酸カルシウム、クロスポピドン、ヒドロキシプロピルセルロースを添加し、乳糖含量が約 80% となるように第一製薬 (株) 製剤技術研究所・東京製剤技術センターで外部滑沢打錠法により試作されたものを使用した。ただし、真度 (回収率) 測定の際には、同組成からなる粉末に Mg-St の既知量を添加し、試料とした。

**2. 試薬** Mg-St は、製剤の製造用に用いられている日東化成工業製のものを使用した。クロマトグラム上での溶出位置確認のため標品として用いたステアリン酸、パルミチン酸、及び内標準物質として用いたマーガリン酸は各々、東京化成より試薬として購入した。2-nitrophenylhydrazine (2-NPH) 誘導体化には、(株)ワイエムシィ社で販売している誘導体化試薬キット (製品番号: XSRFAR01) を使用した。すなわち、2-NPH 試液、縮合剤である 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 試液及び反応停止試液である水酸化カリウム (KOH) 試液を、キットの説明書を参考に

Miwa ら<sup>8,9)</sup>の方法に従い順次添加し誘導体化操作を行った。HPLC 溶媒は HPLC 用のものを、その他の試薬類については試薬（特級）を使用した。

**3. 実験装置** HPLC 装置は、WATERS 社のモジュール：Alliance 2697 Upgrade を用い、データの解析に Millennium 32 (Ver 3.06.01) を使用した。カラムは WATERS 社の Symmetry C18 (4.6×20 mm, 3.5 μm) を使用した。

試料の前処理の際に使用したヒーティングブロックは、アズワン(株)製ドライブロックバス EB-603 である。

#### 4. プレカラム誘導体化による HPLC 分析条件の検討

**4-1. 錠剤中 Mg-St の誘導体化** 誘導体化の検討は、Miwa らの報告<sup>8,9)</sup>を参考に、脂肪酸のカルボキシル基に着目し、縮合剤 (EDC) の存在下で 2-NPH との反応を市販の試薬キットを用いて行った。誘導体化は、有機溶媒抽出などを行わず、直接、錠剤に試薬を添加する方法を検討した。試料前処理操作を含む誘導体化のフローチャートを Fig. 1

に示す。

**4-2. 分析法バリデーション** 錠剤中に存在する Mg-St の定量的誘導体化を含めた分析法の妥当性を示すため、ICH ガイドライン及び日局の分析法バリデーションに準拠し、特異性、真度 (回収率)、直線性、精度及びシステム適合性試験について検討を行った。

特異性では、共存するほかの製剤副原料及び誘導体化の際の副反応生成物がパルミチン酸誘導体、ステアリン酸誘導体及び内標準物質であるマーガリン酸誘導体の各溶出位置に影響を及ぼさないことを、Mg-St を含まないプラセボ粉末について同様の誘導体化反応を行い、そのクロマトグラムを比較して確認した。

真度は Mg-St を含まないプラセボ製剤成分粉末に、既知量の Mg-St を添加し、その回収率を求めることで算出した。なお、含量水準は、100 mg 製剤を定めた操作により分析した場合に想定される 0.1 w/w%，すなわち 0.1 mg を 100% とし、限度試験に準ずるものとして 50%、100%、150% の 3 水準

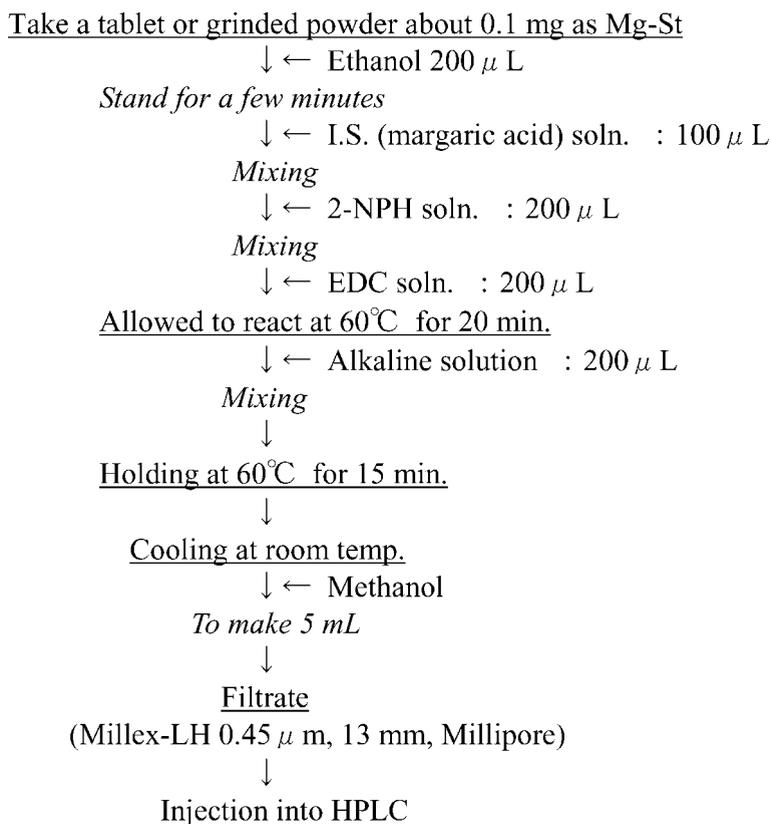


Fig. 1. Preparation Procedure of Magnesium Stearate from Tablets  
Derivatization method is according to Ref. 8 and 9.

について回収率を測定した。また、この3水準 ( $n=3$ ) の繰返しデータは、併行精度の評価データとしても採用し、9回の回収率の相対標準偏差 (RSD) を求めた。

直線性は HPLC 注入時の Mg-St 濃度として 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01, 0.02, 0.04 mg/ml の6点について評価を行った。また、定量限界, 検出限界については別途、予測された各限界近傍域での検量線 (0.0005, 0.001, 0.002 mg/ml) の回帰式の傾き (S) とレスポンスの標準偏差 ( $\sigma$ ) を求め、検出限界 (DL) =  $3.3 \sigma/S$ , 定量限界 (QL) =  $10 \sigma/S$  により算出した。

一方、システム適合性試験としては、I.S. を含む Mg-St 標準溶液を用いて、ピーク面積比及び隣接するピークとの分離度 ( $R_s$ ) について繰り返し6回注入時の再現性を試験した。

**4-3. 錠剤中の Mg-St の定量** 以上のバリデーション結果を考慮し、以下に示す分析法を確立した。

『本品若しくは粉碎した粉末の、Mg-St として約 0.1 mg に相当する量を精密に量り、エタノール 200  $\mu$ l を加えて潤し約 3 分放置し、内標準溶液 100  $\mu$ l を加えて (ポルテックスミキサーを用いて) 激しく攪拌する。試薬 A (ラベル化剤: 2-NPH 溶液) 200  $\mu$ l を加えて攪拌し、さらに試薬 B (縮合剤: EDC 溶液) 200  $\mu$ l を加えて攪拌する。蓋をして 60°C で 20 分間加温する。試薬 C (反応停止剤: KOH 溶液) 200  $\mu$ l を加えて攪拌し、蓋をして 60°C で 15 分間加温する。室温まで冷却してメタノールを加えて 5 ml とした液を 0.45  $\mu$ m のフィルターを用いてろ過し、試料溶液とする。

別に、Mg-St 約 10 mg を精密に量り、エタノールを加えて正確に 20 ml とする。懸濁状態の液を攪拌しながら、200  $\mu$ l とり、内標準溶液 100  $\mu$ l を加えて激しく攪拌する。試薬 A 200  $\mu$ l を加えて攪拌し、さらに試薬 B 200  $\mu$ l を加えて攪拌する。蓋をして 60°C で 20 分間加温する。試薬 C 200  $\mu$ l を加えて攪拌し、蓋をして 60°C で 15 分間加温する。室温まで冷却してメタノールを加えて 5 ml とした液を 0.45  $\mu$ m のフィルターを用いてろ過し、標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液 20  $\mu$ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行い、それぞれ

の液のパルミチン酸ピークとステアリン酸ピークの面積和と内標準物質ピークとの面積との比  $Q_T$  及び  $Q_S$  を求める。

試験条件

紫外吸光光度計 (測定波長: 230 nm)

カラム: 内径 4 mm, 長さ 2 cm のステンレス管に 3.5  $\mu$ m の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。(例: Symmetry C18, 4.6  $\times$  20 mm (Waters 社))

カラム温度: 35°C 付近の一定温度

移動相: アセトニトリル/水混液 (80:20)

流量: 1.2 ml/min.

内標準溶液: マーガリン酸のエタノール溶液 (1  $\rightarrow$  2000)

試液 (ラベル化剤, 縮合剤及び反応停止剤) はワイエムシ社から発売されている遊離型短鎖・長鎖脂肪酸分析キット (XSRFA01) を用いた。

試料中の Mg-St 含量は次式により算出した。

$$\text{試料中の Mg-St 含量 (mg)} = \frac{W_s}{10} \times \frac{Q_T}{Q_S} \times 0.1$$

$W_s$ : 標準溶液調製用 Mg-St の秤取量 (mg) 』

## 結果及び考察

**1. 誘導体化による分析法の確立** 2-NPH は縮合剤である EDC の存在下、カルボキシル基と反応し、対応するヒドラジッド誘導体を与える。

本法では有機溶媒抽出を行わず、錠剤そのまま、若しくは粉碎した粉末に内標準物質を含むエタノールを加えて潤し、そこに直接誘導体化試薬を順次、添加することで酸による Mg-St からのマグネシウム遊離操作を行わずして直接、ステアリン酸及びパルミチン酸に対応する 2-ニトロフェニルヒドラジッドを得ることができた。本反応により得られたヒドラジッドは紫外外部吸収波長 230 nm 若しくは 400 nm で高感度な検出が可能であった。内標準物質であるマーガリン酸を含む典型的なクロマトグラム例を Fig. 2(b) に示す。

標準溶液を用いて比較したところ、非誘導体化試料の 210 nm での直接検出に比べ、約 300 倍以上の高感度化が達成できた。また、ショートカラムを用いたところ、疎水性の高い長鎖脂肪酸誘導体にも関わらず、各ヒドラジッド誘導体は逆相 HPLC 上で 5 分以内での相互分離が可能であった。さらに誘導

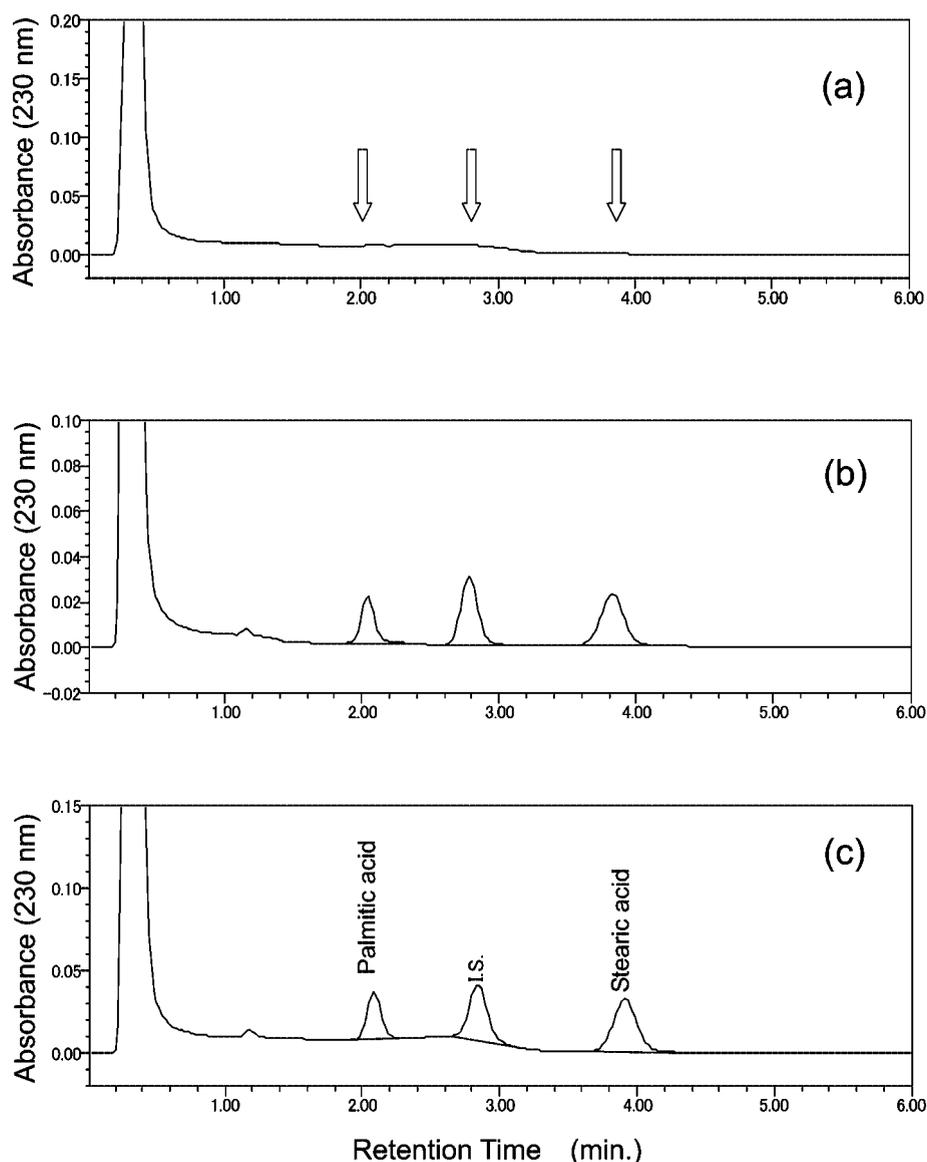


Fig. 2. Validation of Analytical Procedures

(a) Blank tablet (Mg-St free), (b) Mg-St standard solution, (c) Tablet. Mobile phase, acetonitrile-water (80 : 20), flow rate, 1.2 ml/min. Column: Symmetry C18 (4.6×20 mm, 3.5  $\mu$ m, WATERS), Column temperature: 35°C, Injection volume: 20  $\mu$ l, Peaks: 1=palmitic acid, 2=margaric acid (I.S.), 3=stearic acid.

体化反応の過程で生成した副反応物質 (by-product) は、クロマトグラムのフロント付近に集中して溶出し、Mg-St 由来のステアリン酸及びパルミチン酸ピークへの影響はみられなかった。

次項に「分析バリデーション」の結果として詳細を示す。

**2. 分析法バリデーション** Figure 2 に Mg-St 標準溶液, Mg-St を含むプラセボ錠及び空白試料を各々試験法に従い誘導体化操作を行った際のクロマトグラムを示す。Mg-St を含むプラセボ錠から得られたクロマトグラム(c)では、Mg-St の構成成分であるステアリン酸とパルミチン酸誘導体の

溶出位置付近に他の成分のピークによる妨害は認められず、かつ空白試料の誘導体化クロマトグラム(a)上でも Mg-St 関連物質溶出位置に他成分のピークが認められないことから、設定した誘導体化法及び HPLC の分析条件の特異性が確認された。

真度について、50%、100%及び150%の3濃度で繰り返し3回の添加回収実験を行った結果を Table 1 に示す。各濃度間で多少のバラツキが認められたものの、誘導体化操作を含んだ製剤中副原料の微量分析法としては良好な値であると判断された。

直線性に関して、製剤 100 mg を秤取した場合に Mg-St として 0.1% に相当する量を含む 6 点の濃度

Table 1. Accuracy

Repetition	Recovery value (%)		
	50% (0.05 mg)	100% (0.1 mg)	150% (0.15 mg)
1	100.5	94.1	92.5
2	101.1	97.2	98.3
3	96.3	96.7	95.2
Average (%)	99.3	96.0	95.3
S.D.	2.615	1.664	2.902
RSD (%)	2.63	1.73	3.05
Total average (%)		96.9	
Total S.D.		2.80	
Total RSD (%)		2.89	

(検量線範囲 注入時試料濃度として：0.00—0.04 mg/ml, [Mg-St として 0.1 mg の試料を秤取した場合の 0—0.2% に相当]) で検量線を作成したところ、パルミチン酸のピーク面積比とステアリン酸のピーク面積比の合計値と濃度の関係は Table 2 に示すように相関係数 0.999 以上が得られた。さらに回帰式の切片の 95% 信頼区間は「0」を挟むところから、本検量線は原点を通る良好な直線であると判断した。また、検出限界及び定量限界が予測された低濃度域 (0.5—2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で得られた回帰式から、傾き (S) とレスポンスの標準偏差 ( $\sigma$ ) を求め、検出限界 (DL) = 3.3  $\sigma/S$ , 定量限界 (QL) = 10  $\sigma/S$  を求めたところ、Table 2 に示すように各々 2  $\mu\text{g}$  及び 6  $\mu\text{g}$  と、限度試験に準ずる試験項目としては十分な値を示した。

回収率を測定したときの 3 水準、繰り返し 3 回の回収率から精度を評価したところ、Table 1 に示したように得られた RSD (%) は 2.9% であった。これらの結果は、真度と同様、本法が誘導体化操作を含んだ製剤中副原料の微量分析法であることを考慮すると、十分妥当な値であると判断した。

さらに、試験毎に実施するシステム適合性試験として Mg-St 標準溶液の繰り返し 6 回注入時の再現性を検討した。その結果を Table 3 に示す。内標準物質のピーク面積に対するステアリン酸とパルミチン酸のピーク面積合計の比の RSD (%) は 1.3% であり、また、ステアリン酸、パルミチン酸及び内標準物質の相互間の分離度 ( $R_s$ ) は 3.5 以上であり、いずれも良好な結果であった。

以上の分析法バリデーション結果より、Mg-St

Table 2. Linearity, Detection Limit (DL) and Quantitation Limit (QL) of Magnesium Stearate

Range of calibration curve (for linearity)	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ —0.04 mg/ml	
Correlation coefficient: ( $r$ )	0.9998	
Slope	79.97	
Intercept	-0.064	
Confidence interval (95%) of intercept	Upper	0.4278
	Lower	-0.5559
Range of calibration curve (for calculation of DL and QL)	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ —2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
$\sigma$	62.5	
S	0.0076	
Detection limit (DL)	2 $\mu\text{g}$	
Quantitation limit (QL)	6 $\mu\text{g}$	

Table 3. System Suitability Test

Repetition	Ratio of peak area	Resolution ( $R_s$ ) Stearate vs. I.S.	Resolution ( $R_s$ ) Palmitate vs. I.S.
1	1.55	3.84	3.56
2	1.57	3.85	3.59
3	1.53	3.84	3.58
4	1.59	3.87	3.60
5	1.57	3.90	3.64
6	1.58	3.90	3.63
Average	1.56	3.86	3.60
S.D.	0.02	0.03	0.03
RSD (%)	1.28	0.78	0.83

試験法は誘導体化操作を含めて測定値に対する妥当性の問題はなく、外部滑沢打錠法により製された錠剤を始めとする実製剤の Mg-St 定量に使用可能であることを検証した。

**3. 市販製剤中の Mg-St の定量** 既に市販され、一般に流通している 4 製剤につき、各ロット繰り返し 3 回の Mg-St 定量を行った結果を Table 4 に示す。各製剤とも、Mg-St の処方量 (labeled amount) に近似した測定値が得られ、また、繰り返し 3 回測定での RSD (%) は 0.67—2.13% と良好な結果が得られた。

## 結 論

HPLC による Mg-St の高感度分離分析法の確立を目的に、Mg-St からのステアリン酸及びパルミチン酸の前処理方法及び HPLC 条件を検討した。

Table 4. Assay of Magnesium Stearate in Commercially Available Pharmaceutical Preparations

Repetition	Quantity of magnesium stearate in commercially available pharmaceutical preparations (w/w%)			
	Product A	Product P	Product N	Product C
1	0.86	0.99	1.18	1.86
2	0.86	1.01	1.17	1.94
3	0.87	1.00	1.14	1.89
Average	0.86	1.00	1.16	1.90
S.D.	0.0058	0.0100	0.0208	0.0404
RSD (%)	0.67	1.00	1.79	2.13
(Labeled amount %)	(0.84)	(0.90)	(1.20)	(1.95)

高感度化を目的とし、2-NPHによるUV検出用プレカラム誘導体化を行った。その結果、ステアリン酸誘導体とパルミチン酸誘導体の良好な分離を保ちつつ、検出波長230 nmにおける注入試料濃度範囲：0.00—0.04 mg/ml（設定した試験法に従いMg-Stとして0.1 mgの試料を秤取した場合の0.0—0.2%に相当）で各々のピークは良好な直線性を示した。また、検出限界は2 µg、定量限界は6 µgであった。さらに3水準での回収率による併行精度はRSD (%) が2.9%であり、他成分とMg量が重複する製剤でのMg-St高感度分析法としての妥当性が検証できた。

また、市販されている錠剤中のMg-St分析を本法により行ったところ、処方量として記載されている値に近似した良好な実測値を得ることができた。よって、本法は製剤中のMg-Stの、特にMgが混在する系において、高選択的微量分析法として実用的利用価値の高い方法であると判断した。

#### REFERENCES

1) “14th Edition Japanese Pharmacopoeia (the explanation),” Hirokawa-syoten, 2001, pp.

D574–D578.

- 2) “U. S. Pharmacopeia 27/National Formulary 22,” 2004, pp. 2889–2890.
- 3) Oneda Y., *Seizai Kikai Gijutsu Kenkyu-Kaishi*, **12**, 311–319 (2003).
- 4) Taniguchi Y., Hibino T., Hasegawa M., Sunada H., “Hyojun Syohou Kenkyukai Kouen Youshisyu,” 2001, p. 55.
- 5) Nishimura K., Suzuki T., Katsura E., Itabashi Y., *Bunseki Kagaku*, **6**, 533–539 (2004).
- 6) Baty J. D., Willis R. G., *Biomed. Mass. Spectrom.*, **12**, 565 (1985).
- 7) Nimura N., Kinoshita T., *Anal. Lett.*, **13**, 191 (1980).
- 8) Miwa H., Hiyama C., Yamamoto M., *J. Chromatogr.*, **321**, 165–174 (1985).
- 9) Miwa H., Hiyama C., Yamamoto M., *J. Chromatogr.*, **416**, 237 (1987).
- 10) Kouno S., Gouda R., Kobayashi M., Murakita H., *Shimadzu Hyouron*, **59** [1·2], 3–12 (2002).
- 11) Nguyet A. N., Tallieu L., Plaizier-Vercammen J., Massart D. L., Heyden Y. V., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 1–19 (2003).