

ペントバルビタール ナトリウム5 w/v %水溶液の 短期間保存時の安定性

千寿製薬株式会社

山際 慶典、上田 佳代子、山下 敦子

背景と目的

ペントバルビタールナトリウム(PBNa)はバルビツール酸誘導体のひとつで、抗不安、催眠、抗けいれん作用を持ち、動物実験では注射麻酔薬として安楽死の際に広く用いられてきた。Guide for the Care and Use of Laboratory Animals(ILAR指針)が示すように、動物実験に用いる麻酔薬は効果や安定性が保証されている医薬品グレードであるべきであり¹⁾、PBNaを使用する場合にも当然適用される。しかし、医薬品グレードのPBNa製剤の国内での販売は2019年をもって終了したため、動物実験の研究者はその代替としてチオベンタールナトリウムなどペントバルビタール以外の医薬品グレードのバルビツール酸誘導体を使用することとなった。それにもかかわらず、2019年末に発生した新型コロナウイルス感染症の蔓延の影響により、医薬品グレードの麻酔薬は医療目的での使用が優先され、動物実験で用いる医薬品グレードのバルビツール酸誘導体の入手が困難となつた。このため動物実験の研究者は非医薬品グレードの代替麻酔薬を動物実験で使用することを余儀なくされた。現在は医薬品グレードのバルビツール酸誘導体の供給は回復しているが、今後同様の事態が生じた場合に備え、対応策を検討しておく必要がある。

そこで私たちは、非医薬品グレードの研究用試薬として販売されているPBNaを用い、製剤の安定性が

担保された適切な調製法を定めることにした。ILAR指針では、非医薬品グレードの化合物を用いた動物実験を実施する際、その有効性を保証するためにその物理化学的特性および安定性に留意すべきとしている¹⁾。したがって非医薬品グレードの化合物を使用した麻酔薬の組成や調製方法を確立するとともに、その処方の物理化学的特性および安定性を評価する必要がある。

エタノールおよびプロピレンギリコールはPBNaを安定化させることができており²⁾、医薬品グレードのPBNa製剤に安定化剤として含まれている。この製剤を実験動物に使用する場合、エタノールやプロピレンギリコールも有効成分と同時に実験動物に投与されることになる。マウスやラットにエタノールを過剰に静脈内注射すると、血尿や異常行動が誘発され、ラットにプロピレンギリコールを過剰に静脈内注射すると、溶血するとされている³⁾。つまり、エタノールやプロピレンギリコールは実験動物にはある程度有害である。加えて、添加剤の多い製剤は調製に時間と手間がかかる。動物実験に先立って用時調製する場合、実験に使用するまで1~2週間の安定性が担保されれば十分であると考えられ、その場合は医薬品に求められるレベルの長期間の安定性(一般的に3年間程度)までは不要と思われる。よって、製剤をより単純な組成に変更することは、実験動物の福祉の観点でも、誰も

が簡便に調製できる実験操作の観点でも望ましいと考えられる。

我々は、動物福祉に配慮しつつ、調製が簡便で、動物実験に利用可能なPBNa製剤を確立するため、PBNaを濃度5 w/v %で水に溶解させた製剤の室温(25°C)あるいは冷蔵(5°C)保存下での15日間の安定性を評価した。

材料方法

(1) PBNa水溶液の調製と保存

純度規格≥95%のPBNa粉末をナカライトスク株式会社(京都、日本)から購入した。PBNa 9.0 gを量りとり、ガラスピーカーに入れ、180 mLの超純水を添加し、室温で搅拌してPBNaを完全に溶解させ、濃度5 w/v %のPBNa水溶液(5% PBNa溶液)を調製した。ガラス瓶に5% PBNa溶液を5 mLずつ分注し、蓋を閉めて密閉し、アルミホイルで遮光した。その後、25°Cあるいは5°Cに設定した恒温器にそれぞれ保存し、試験用サンプルとした。

(2) 安定性試験

保存前、および25°Cあるいは5°Cで保存したサンプルを保存1、5および15日後にそれぞれ3つずつ恒温恒湿器から取り出し、物理化学的特性項目として、外観、pH、浸透圧および定量法(PBNaおよび類縁物質の量)を以下の方法で観察・測定した。

外観は「第十八改正日本薬局方(JP18)通則」の[性状]に従い、無色の試験管に試料を入れ、色調および澄明性を目視で確認した。pH

はJP18一般試験法[pH測定法]に従い、pHメーター(F-72、株式会社堀場アドバンスドテクノ、京都、日本)を用いて測定した。浸透圧はJP18一般試験法[浸透圧]に従い、A₂O Osmometer(Advanced Instruments Ltd., Norwood, MA, USA)を用いて浸透圧モル濃度を測定し、生理食塩液(286 mOsm)に対する浸透圧比を算出した。定量法は既報⁴⁾を改変し、高速液体クロマトグラフ(HPLC；株式会社島津製作所、京都、日本)を用い、PBNa含量および類縁物質を定量した。保存した安定性試験用サンプル1 mLを正確に量り、移動相を加えて正確に100 mLとした。この液1 mLを正確に量り、移動相を加えて正確に10 mLとし、試料溶液とした。別にPBNaを105°Cで約2時間乾燥し、約10 mgを精密に量り、移動相を加えて溶かし、正確に50 mLとした。この液2.5 mLを正確に量り、移動相を加えて正確に10 mLとし、標準溶液とした。試料溶液および標準溶液50 μLずつを正確にとり、表1の試験条件で分析を行った。各々のピーク面積を自動積分法により測定し、試料溶液中のPBNaおよび類縁物質の量を以下の式により算出した。類縁物質についてはクロマトグラムの目視により、保存期間中に明らかに増加が認められたピークのみを算出した。

$$\text{PBNaの含量}(\%) = 10 \times \text{WS} \times (\text{AT} / \text{AS})$$

$$\text{類縁物質の量}(\%) = 10 \times \text{WS} \times (\text{AT(rs)} / \text{AS})$$

WS : PBNaの秤取量(mg)、AT : 試料溶液のPBNaのピーク面積、AT(rs) : 試料溶液の類縁物質のピーク面積、AS : 標準溶液のPBNaのピーク面積

PBNaおよび類縁物質の定量法の簡易分析法バリデーションとして、直線性と溶液の安定性を評価した。直線性の評価では回帰直線の相関係数が0.9997で、y切片はゼロ付近であった。24時間サンプル

クーラーに保存した試料溶液および標準溶液が安定であることを確認した。

また、標準溶液、およびそれぞれ25°Cあるいは5°Cで15日間保存したサンプルの試料溶液について、フォトダイオードアレイ(PDA；波長: 190~600 nm)を用いてPBNaの溶出時間におけるUV吸収スペクトルを求めた。すべての検査は、治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP)に準拠している千寿製薬株式会社の研究施設で実施した。

(3) 濾液中のPBNaの定量

肉眼観察が難しい不溶性PBNaの有無を確認するため、25°Cあるいは5°Cでそれぞれ16日間保存したサンプルを、孔径0.45 μmフィルター(高圧蒸気滅菌オレフィン型ポリマー、GL Sciences、日本)を通して濾過した。初流は廃棄し、得られた濾液中のPBNaの含量を前述の定量方法で行った。

(4) 濾液中の沈殿物のX線構造

回折

(3) の濾過翌日の濾液中に白色の沈殿物が観察された。この沈殿物の由来を解明するため、沈殿物の粉末X線回折測定(pXRD)を行い、試薬のPBNaと比較した。25°Cおよび5°Cで保存したサンプルの濾液をそれぞれ42°Cで1時間減圧乾燥した後、約2ヶ月間実験台に静置して残っていた水分を蒸発させ、得られた固体を乳鉢と乳棒を用いて

粉碎した(サンプルa、b)。試薬のPBNaは(1)と同じロットである(サンプルc)。各サンプルを卓上X線回折計(ミニフレックス600、リガク、日本)により測定し、pXRDパターンを電圧40 kV、電流15 mAとしたCu K α 線(1.54186 Å)を用いて補正した。

結果

(1) 安定性

安定性試験の結果を表2に示す。外観、pH、および浸透圧に変化はみられなかった。類縁物質において、5°Cで保存したサンプルには類縁物質を認められなかった。一方、25°Cで保存したサンプルには明らかに増加する類縁物質ピークが1つ認められた(図1)。このピークの保持時間およびPBNaに対する相対保持時間(RRT)はそれぞれ約12.7分および0.72であった。したがって、類縁物質ではRRT 0.72の量を算出した。標準溶液、25°Cおよび5°Cで保存したサンプルから得られたPBNaの保持時間におけるPDAによるUVスペクトルに差はなかった(図2)。

(2) 濾液中のPBNaの定量

25°Cおよび5°Cで16日間保存したサンプルの濾液中のPBNa含量はそれぞれ100.7%および99.8%であり、濾過していない15日間保存サンプルの数値とほぼ同じであった。

(3) 濾液中沈殿物のX線回折

サンプルa、bおよびcのpXRDパ

表1. PBNaおよび類縁物質定量のためのHPLC測定条件

検出器	紫外吸光度計(波長: 214 nm) フォトダイオードアレイ(波長: 190~600 nm)
カラム	内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に5 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリカゲルを充填したカラム(孔径100 Å)(InertSustain C18, GL Sciences)
カラム温度	25°Cで一定
サンプルクーラー温度	25°Cで一定
移動相	リン酸カルシウム緩衝液(pH 3.5、0.14w/v%): アセトニトリル(72:28)
流速	1.0 mL/分
移動相の条件	アイソクラティック
測定時間	45分

ターンを図3に示す。サンプルaおよびbの回折パターンは同様であったが、サンプルcの回折パターンはサンプルaやbとは異なっていた(図3)。

考察

25°Cおよび5°Cで5% PBNa溶液を15日間保存したとき、25°C保存でみられたRRT 0.72の類縁物質のわずかな増加を除き、特性項目に変動はみられなかった。RRT 0.72の類縁物質の構造を決定することはできなかったものの、文献⁴⁾を参照すると可能性のひとつとして加水分解により開環したPBNaが考えられる。この類縁物質のPBNaに対する生成量は25°Cで15日間保存したとき0.05%であった。生成量を直線外挿することにより算出すると保存後1年における類縁物質の予想生成量は約1.2%となり、一般的に医薬品に含まれる類縁物質の量と比較して、生成量は多くなる。この原因是、PBNaが溶液中で安定化剤として機能するエタノールとプロピレン glycol が今回検討した製剤では含まれていないことに加え、pHが比較的低いためと考えられた。そのため本検討で示した組成の5% PBNa溶液は長期間の保存には向いていない。しかしながら、この不

純物の生成量は、調製後約2週間以内に使用される場合に限ってはわずかなものであるといえる。PDAで得られたPBNaの保持時間におけるUVスペクトルに差はなく、観測したピークはいずれもPBNaと推定された。濾過後の製剤の定量結果から、濾過後に沈殿が生じたとしても、PBNa含量の変動は無視できるレベルであった。以上より、5% PBNa溶液は室温あるいは冷蔵保存のいずれでも15日間安定であり、動物に投与する前に用時調製し、短期間での保存に限定して使用するうえでは問題はないと考えられた。

本検討から、フィルターで濾過した5% PBNa溶液は、濾過していない場合よりも沈殿物が生成しやすいと思われた。濾過後のサンプルのpXRDパターンは、市販のPBNaとは一致しなかった。PBNaに結晶多形がある可能性はあるが、沈殿物が何であるか特定はできなかった。遊離型であるペントバルビタールの結晶多形に関して、4つの結晶多形が報告されており⁵⁾、その1つは、サンプルaおよびbの沈殿物のそれらと一致する⁶⁾。このことから、濾過後の試料でみられた沈殿物はナトリウム塩であるPBNaではなく、

遊離型のペントバルビタールであった可能性が示唆される。沈殿の原因はフィルター濾過による物理的刺激、濾過後のわずかなpH変化、フィルター溶出物の可能性があるが、不明であった。動物実験で使用する場合、調製後の製剤は濾過せずに保存し、麻酔薬として動物へ投与する直前に濾過を行うことで沈殿物生成のリスクを減らすことが可能と思われる。なお、使用にあたっては、使用者は投与前に液中に沈殿物がないことを目視で確認する必要があると考える。

一般に、動物への投与に用いる製剤に含まれる添加物はその健康状態に影響を及ぼす可能性があるため、その種類や量は必要最小限にすることが望ましい。これまでに実験室での使用のために提案されたPBNa製剤は、安定化のためエタノールとプロピレン glycol を含んでいる^{6,7)}。しかし前述のとおり、エタノールやプロピレン glycol は実験動物に有害な作用を持つ³⁾。よって、エタノールやプロピレン glycol を含まないPBNa製剤は、有害作用発現による苦痛を生じることなく安楽死に用いることができると考えられる。また、投与製剤のpHの調整は、動物の刺激または疼痛

表2. 5% PBNa溶液を25°Cおよび5°Cで15日間保存したときの安定性結果

	外観	pH	浸透圧比 [浸透圧個別値mmHg]	PBNa含量 (%)	類縁物質含量 (%)
保存前	*	9.9 [9.87, 9.90, 9.89]	1.3 [379, 379, 379]	100.3 [97.5, 100.5, 102.9]	0.018 [0.021, 0.017, 0.017]
25°C保存					
1日目	*	9.8 [9.77, 9.78, 9.71]	1.3 [379, 380, 380]	99.7 [96.8, 100.9, 101.4]	0.020 [0.021, 0.021, 0.019]
5日目	*	9.8 [9.79, 9.77, 9.79]	1.3 [382, 383, 383]	98.7 [99.1, 98.1, 98.9]	0.035 [0.036, 0.036, 0.034]
15日目	*	9.9 [9.83, 9.87, 9.91]	1.3 [380, 381, 381]	101.3 [99.4, 102.2, 102.4]	0.069 [0.067, 0.070, 0.071]
5°C保存					
1日目	*	9.8 [9.79, 9.78, 9.80]	1.3 [379, 380, 379]	98.6 [95.9, 99.0, 101.0]	0.018 [0.018, 0.019, 0.018]
5日目	*	9.8 [9.79, 9.79, 9.80]	1.3 [383, 381, 382]	98.0 [97.4, 98.0, 98.6]	0.018 [0.017, 0.017, 0.020]
15日目	*	9.9 [9.94, 9.92, 9.91]	1.3 [381, 381, 380]	101.7 [101.6, 101.6, 101.9]	0.020 [0.019, 0.021, 0.020]

* : 無色透明な液、固体を認めず (n=3)

pH、浸透圧、PBNaおよび類縁物質含量：平均値（個別値、n=3）

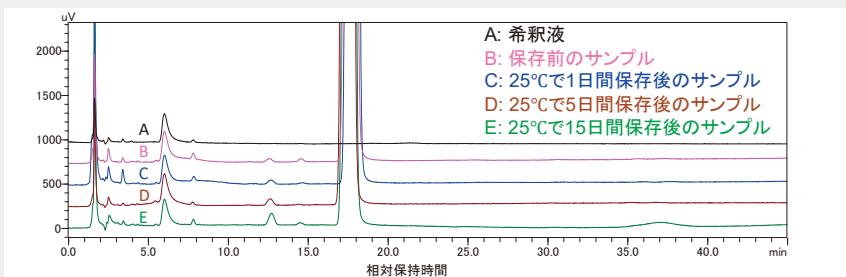


図1. 5% PBNa溶液の希釈液(A)、保存前(B)、および25°Cで1(C)、5(D)ならびに15日間(E)保存したときのクロマトグラム。保存期間中に保持時間12.7分(相対保持時間0.72)のピークが明らかに増加している。

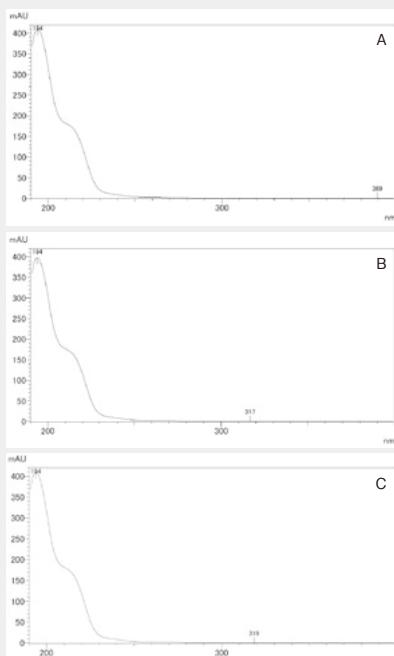


図2. PDAで得た標準溶液(A)、および25°C(B)あるいは5°C(C)で15日間保存した試料溶液のUVスペクトル。いずれのUVスペクトルにも差はみられない。

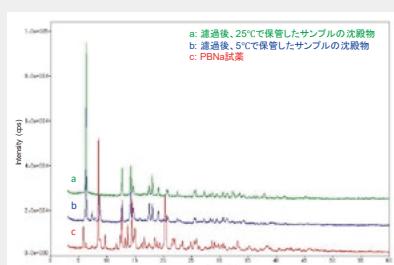


図3. 25°Cあるいは5°Cで保存していたサンプル(それぞれa,b)の濾過後の沈殿物およびPBNa試薬(c)のpXRDパターン。サンプルaとbのpXRDパターンは同様だが、サンプルCはそれらとは異なっている。

を緩和するために必要である。これまでの研究では、PBNa水溶液の沈殿のリスクをなくすにはpHを10以上に調整する必要があると報告され

2. Brynjelsen SE, Pati B. 2016. Stable Pentobarbital Formulation. US9,517,269 B1. U.S. Patent. <https://patentimages.storage.googleapis.com/ad/7f/46/0f062ef1069e71/US9517269.pdf>.
3. Gad SC, Spainhour CB, Shoemake C, et al. Tolerable Levels of Nonclinical Vehicles and Formulations Used in Studies by Multiple Routes in Multiple Species With Notes on Methods to Improve Utility. *Int J Toxicol.* 2016;35(2):95-178. doi:10.1177/1091581815622442
4. Morley JA, Elrod L Jr. Determination of pentobarbital and pentobarbital sodium in bulk drug substance and dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;16(1):119-129. doi:10.1016/s0731-7085(96)02045-6
5. Rossi D, Gelbrich T, Kahlenberg V, Griesser UJ. Supramolecular Constructs and Thermodynamic Stability of Four Polymorphs and a Co-Crystal of Pentobarbital (Nembutal). *CrystEngComm.* 2012;14:2494-2506. <https://doi.org/10.1039/c2ce06659a>.
6. University of Illinois Urbana-Champaign. [Internet]. 2021. Use of Non-Pharmaceutical Grade Compounds in Animals. Champaign: University of Illinois Urbana-Champaign [Cited 16 January 2023]. <https://animalcare.illinois.edu/policies/use-non-pharmaceutical-grade-compounds-animals>.
7. Indiana University alternatively. [Internet]. 2014. Use of Non-Pharmaceutical Grade Chemicals and Compounds in Laboratory Animals. Indianapolis: Indiana University [Cited 01 October 2024]. <https://research.iu.edu/doc/compliance/animal-care/iupui/iupui-iacucuse-of-non-pharmaceutical-grade-chemicals-compounds.pdf>.
8. Pang D, Laferriere C. Review of Intraperitoneal Injection of Sodium Pentobarbital as a Method of Euthanasia in Laboratory Rodents. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2020;59(3):346. doi:10.30802/AALAS-JAALAS-19-000081
9. Dohi M, Ueda K, Yamagawa Y, Yamashita A, Sakamoto Y. Stability of Sodium Pentobarbital 5w/v% Aqueous Solution During Short-Term Chilled and Ambient-Temperature Storage. *Vet Med Sci.* 2024 Nov;10(6):e70066. PMID: 39460652; PMCID: PMC11512436.

(日動協ホームページ、LABIO21
カラーの資料の欄を参照)

参考文献

1. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.