

国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 951)

北島 文・前川 京子・吉井 公彦・小松 裕明
谷本 剛・岡田 敏史

Cyanocobalamin Reference Standard (Control 951) of the National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii, Hiroaki Komatsu,
Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada

The raw material of cyanocobalamin was tested for preparation of the "Cyanocobalamin Reference Standard (Control 951)". Analytical data obtained are as follows: loss on drying, 1.8%; infrared spectrum, the same as that of the JP Cyanocobalamin Reference Standard (Control 936); thin-layer chromatography, three impurities were detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), eight to nine kinds of impurities were detected and the total amount of impurities was estimated to be $1.6 \pm 0.13\%$ ($n=4$); assay, 99.7% by spectrophotometry specified in the JP XII and 100.4% by HPLC, respectively.

Based on the above results, the raw material was authorized as the JP Cyanocobalamin Reference Standard (Control 951).

Keywords : cyanocobalamin, quality evaluation, authorization, JP reference standard

(Received May 31, 1996)

第十二および第十三改正日本薬局方「シアノコバラミン」および「シアノコバラミン注射液」の定量法、「酢酸ヒドロキシコバラミン」の純度試験および定量法に用いられる国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 951) を製造したので報告する。

1. 原料

本標準品原料は萬有製薬㈱より購入した。同社による日局「シアノコバラミン」の規格および試験法に基づく試験成績の主なものは以下のとおりである：吸光度比, $A_{278} \text{ nm} / A_{361} \text{ nm} = 0.56$, $A_{549} \text{ nm} / A_{361} \text{ nm} = 0.30$; pH, 6.0; 乾燥減量, 2.4%; 定量 (吸光度測定法), 99.9%。

2. 参照物質および試薬

第十二改正日本薬局方シアノコバラミン標準品 (Control 936; 以後, 日局標準品と略称)¹⁾ を対照に試験を行った。試薬および溶媒類は, JIS 試薬特級品または特級相当品を用いた。

3. 装置

本標準品原料の品質評価試験にあたり, 以下の測定装置を用いた: 自記分光光度計 (日本分光, Ubest-50 型), 赤外分光光度計 (日本分光, FT-IR VALOR-III)。また, 液体クロマトグラフ装置は, 日本分光製の送液ポンプ TRI ROTER-VI および島津製作所製 C-R6A 型データ処理装置を用いた。

4. 試験方法

特に記すもののほかは, 日局一般試験法および日局「シアノコバラミン」の規格および試験法を準用する。

4.1 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板: メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル 60 (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒: (A) プロパノール/水/10%アンモニア水混液 (7:2:1) および (B) *n*-ブタノール/水/クロロホルム/酢酸/メタノール混液 (25:11:10:9:5), 試料溶液および標準溶液の調製: 本品および日局標準品 5.0 mg ずつを精密に量り, それぞれをメタノール 1 ml を正確に加えて溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。操作法および検出法: 試料溶液および標準溶液の 40 μ l (シアノコバラミン 200 μ g 相当量) および 20 μ l をシリカゲル薄層板に線状にスポットし, 約 15 cm 展開した後, 風乾する。この薄層板に裏面より白色光を照射してスポットの位置および色を観察する。

4.2 液体クロマトグラフ法による純度試験²⁾

本品および日局標準品 10.0 mg ずつを精密に量り, それぞれに水を加えて溶かして正確に 10 ml とし, 試料溶液および標準溶液とする。これらの液 10 μ l につき, 次の条件で液体クロマトグラフ法 (HPLC) による試験を行う。操作条件

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 361 nm)

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mmφ×150 mm)

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリルと0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0) の混液。ただし、0分から8分まではリン酸緩衝液/アセトニトリル混液 (89:11) を用い、8分から35分まではアセトニトリル濃度を11 v/v%から60 v/v%まで直線的に増加させ、その後、アセトニトリル濃度60 v/v%を60分まで維持する。

流量：0.7 ml/min

検出感度：試料注入量 (μg) の1/100に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約10%になるように検出器の出力あるいは記録計の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の1/2000に相当する量を注入するとき、主ピークが必ず検出されるように分析パラメーターを設定する³⁾。

面積測定範囲：試料注入後、60分間とする。

4.3 HPLC法による定量²⁾

本品および日局標準品10 mgずつを精密に量り、それぞれを内標準溶液に溶かして正確に50 mlとし、試料溶液および標準溶液とする。これらの液10 μlにつき、次の条件でHPLC法による試験を行い、内標準物質のピーク面積に対するシアノコバラミンのピーク面積の比を求め、試料中のシアノコバラミン量を求める。

内標準溶液：*p*-ヒドロキシ安息香酸の水溶液 (9→200)

操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：278 nm)

カラム：μBondapak C18 (3.9 mmφ×150 mm)

カラム温度：40℃

移動相：0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0)/アセトニトリル混液 (3:22)

流量：1.0 ml/min

5. 試験結果

(1) 性状

暗赤色の粉末である。

(2) 紫外および可視吸収スペクトル

日局「シアノコバラミン」の確認試験 (1) を準用し、吸収スペクトルを測定するとき、波長278, 361, 549 nmの位置に吸収の極大が認められた。また、それぞれの吸収極大の波長における吸光度を A_1 , A_2 , A_3 とすると、吸光度比 A_1/A_2 は0.55, A_3/A_2 は0.31であり、日局規格に適合する (日局 A_1/A_2 : 0.53~0.59, A_3/A_2 : 0.29~0.32)。本品の紫外・可視吸収スペクトルをFig. 1に示した。

(3) 赤外吸収スペクトル

本品および日局標準品の赤外吸収スペクトルを臭化カリウム錠剤法により測定し、両者のスペクトルを比較すると

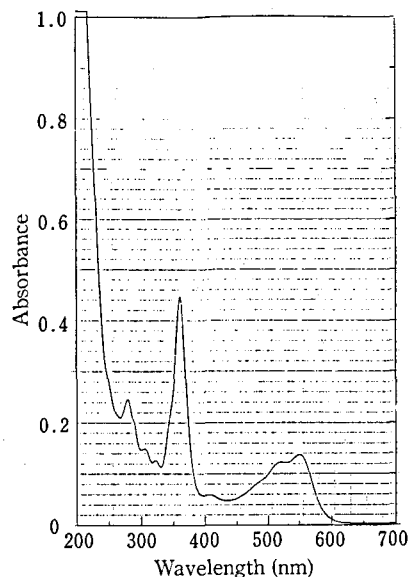


Fig. 1. Ultraviolet and visible absorption spectrum for the candidate Cyanocobalamin Reference Standard

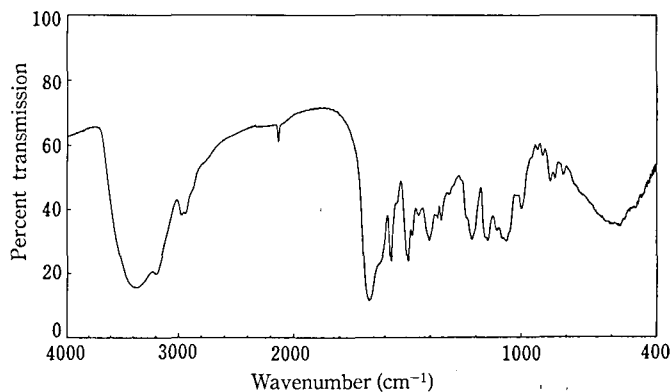


Fig. 2. Infrared absorption spectrum for the candidate Cyanocobalamin Reference Standard

とき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた (Fig. 2)。

(4) pH

本品の水溶液 (0.10 g, 煮沸冷却水 20 ml) の pH は 4.9 であり、日局規格に適合する (日局: 4.2~7.0)。

(5) 純度試験

(a) TLC法 展開溶媒 (A) および (B) で展開した本品および日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。本品および日局標準品ともスポット量 100 または 200 μg で展開溶媒 (A) で 3 個, (B) で 2 個の不純物スポットが、主スポットの前後の位置に検出された。展開溶媒 (A) は (B) に比べ、分離能および展開力において優れている。本法によるシアノコバラミンの検出限界は、展開溶媒 (A) で 0.1 μg, (B) で 0.05 μg であった。

(b) HPLC法 本品および日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られた液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。本品 (A) および日局標準品 (B) とともに、シア

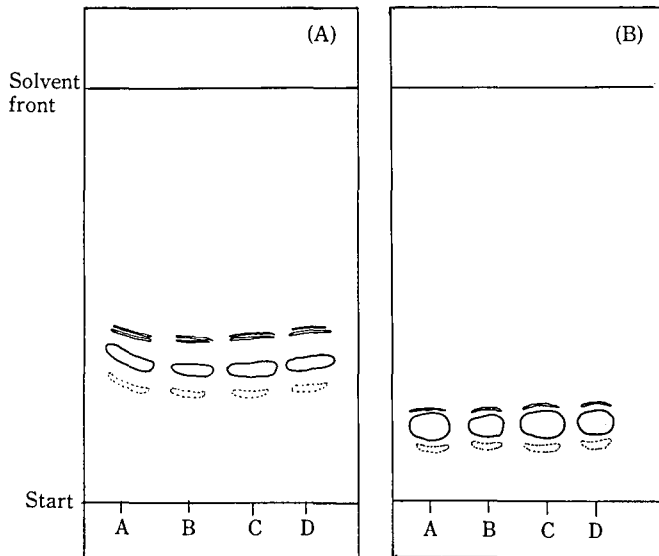


Fig. 3. Thin-layer chromatograms for the candidate and the JP Cyanocobalamin Reference Standard

Solvent system:

- (A): n-propanol/water/10% aq. ammonia (7:2:1)
 (B): n-butanol/water/chloroform/acetic acid/methanol (25:11:10:9:5)

Spot: A and B are the JP Reference Standard 200 µg and 100 µg, respectively. C and D are the candidate material 200 µg and 100 µg, respectively.

ノコバラミンのピークのほかに微量の不純物ピークが、それぞれ9個または7個認められた。面積百分率法による不純物総量は、本品で $1.6 \pm 0.13\%$ (n=4)、日局標準品で $1.1 \pm 0.16\%$ (n=3)であった。本品および日局標準品を比較するとき、不純物の数および種類に明確な差異は認められなかった。一方、両者間で総不純物量に若干の差異が認められるが、本標準品は吸光度測定法における対照標準品として利用されることを考慮すれば、試験成績に影響を与えるような不純物量の差異とは考えられない。

(6) 乾燥減量

本品の乾燥減量は、 1.8% (0.05 g, 五酸化リン, 100°C, 4時間, 減圧5 mmHg以下)であり、日局規格に適合する(日局: 12%以下)。

(7) 定量

日局「シアノコバラミン」の定量法を準用し、日局標準品を対照として吸光度測定法による定量を行った結果、 $99.7 \pm 0.4\%$ (n=4)の値が得られた。

別に、HPLC法による定量では、 $100.4 \pm 1.2\%$ (n=3)

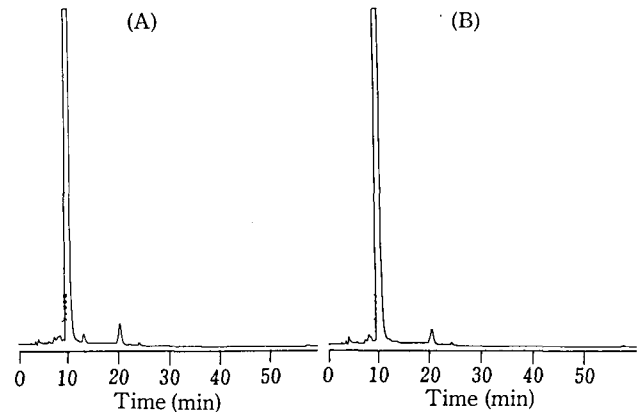


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms for the candidate and the JP Cyanocobalamin Reference Standard

(A): The candidate

(B): The JP Cyanocobalamin Reference Standard

Conditions: column, Inertsil ODS (4.6 mmφ×150 mmL); column temp., 40°C; flow rate, 0.7 ml/min; detection wavelength, 361 nm; mobile phase, a mixture of acetonitrile (AcCN) and 0.1 M phosphate buffer (pH 3.0) was used. Gradient program was as follows: AcCN concentration was constant at 11 v/v% for the first 8 minutes, and then linearly increased to 60 v/v% during 27 minutes, thereafter 60 v/v% of AcCN level was maintained.

の値が得られた。

結 論

シアノコバラミン標準品原料につき、日局標準品を対照に比較検討した結果、本品は国立衛生試験所標準品(日本薬局方標準品)として十分な品質を有することが認められた。

終わりに、本標準品の製造にあたり、ご協力いただきました萬有製薬(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) 北島 文, 吉井公彦, 小松裕明, 石光 進, 岡田敏史: 国立衛生試験所シアノコバラミン標準品 (Control 931), 衛生試験報, **112**, 170~174 (1994)
- 2) 太田美矢子, 木村俊夫, 田中 彰: 高速液体クロマトグラフィーによるシアノコバラミンの分析, 衛生試験報, **105**, 65~68 (1987)
- 3) 木村俊夫, 綱川延孝, 中守律夫: 副腎皮質ステロイドの標準品について, 医薬品研究, **17**, 143~173 (1986)