

## 国立医薬品食品衛生研究所リボフラビン標準品 (Control 951)

北島 文・田頭 洋子・前川 京子・吉井 公彦  
小松 裕明・谷本 剛・岡田 敏史\*

Riboflavin Reference Standard (Control 951) of  
National Institute of Health Sciences

Aya Kitajima, Yoko Tagashira, Keiko Maekawa, Kimihiko Yoshii,  
Hiroaki Komatsu, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada\*

The raw material for riboflavin was tested for preparation of the "Riboflavin Reference Standard (Control 951)" of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained were as follows: melting point, 284.6°C (decomposition); specific absorbance,  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ =857 (267 nm), 277 (373 nm), 326 (445 nm); IR spectrum, the same as that of JP Riboflavin Reference Standard (Control 921); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20}$ =-135.6°; thin-layer chromatography, three impurities were detected; high-performance liquid chromatography, a small amount of 10 impurities were detected; loss on drying, 0.10%; assay, 100.4% by spectrophotometry.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Riboflavin Reference Standard (Control 951) of National Institute of Health Sciences (Japanese Pharmacopoeia).

**Keywords**: riboflavin, quality evaluation, authorization, reference standard  
(Received May 30, 1997)

第十三改正日本薬局方に記載されている「リボフラン」、  
「リボフラビン散」、  
「リン酸リボフラビンナトリウム」及び  
「リン酸リボフラビンナトリウム注射液」の定量に用い  
られる国立医薬品食品衛生研究所（日本薬局方）リボフラ  
ビン標準品（Control 951）を製造したので報告する。

### 1. 原料

リボフラビン標準品原料は東京田辺製薬（株）より購入  
した。同社による試験成績は以下のとおりである：融  
点, 286°C；旋光度, -139°；乾燥減量, 0.08%；総窒  
素, 14.7%；比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (445 nm), 328.

### 2. 参照物質及び試薬

参照物質には日本薬局方リボフラビン標準品（Control  
921；以下、日局標準品と略称する）<sup>1)</sup>を用いた。試薬は試  
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 VAROL-Ⅲ）、旋光計（日本分  
光, DIP-370型）、融点測定器（宮本理研, PA-20S型）。ま  
た、液体クロマトグラフ装置は島津製作所製の LC-6 A

型ポンプ、SPD-6 A 型検出器、C-R 6 A 型データ処理装置  
を用いた。

### 4. 試験方法

別に記すもののほかは、第十三改正日本薬局方の一般試  
験法及び医薬品各条「リボフラビン」の試験法を準用した。

#### 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薄層板シリカゲル  
60 (厚さ, 0.25 mm)

展開溶媒：ジクロロメタン/メタノール/テトラメチルア  
ンモニウムヒドロキシド混液 (80:19:1)

試料溶液及び標準溶液：本品及び日局標準品を乾燥し、  
その約10 mg を精密に量り、それぞれに希水酸化ナトリウ  
ム試液 1 ml を加えて溶かした後、0.1N 塩酸試液 1 ml 及び  
メタノールを加えて正確に 50 ml とし、試料溶液及び標準  
溶液とする。

操作法及び検出法：標準溶液 20  $\mu$ l (4  $\mu$ g) 及び 30  $\mu$ l (6  
 $\mu$ g)、試料溶液またはその希釈液の 1~30  $\mu$ l (0.01~6  $\mu$ g)  
をシリカゲル薄層板にプロットし、約 10 cm 展開したの  
ち、風乾する。これに紫外線 (主波長 366 nm) を照射し、  
不純物スポットの有無を観察する。

#### 2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品及び日局標準品約 10 mg ずつを精密に量り、それぞ  
れを移動相に溶かして正確に 100 ml とし、試料溶液及び

\* To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43  
Houenzaka, Chuo-ku, Osaka 540, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-  
0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

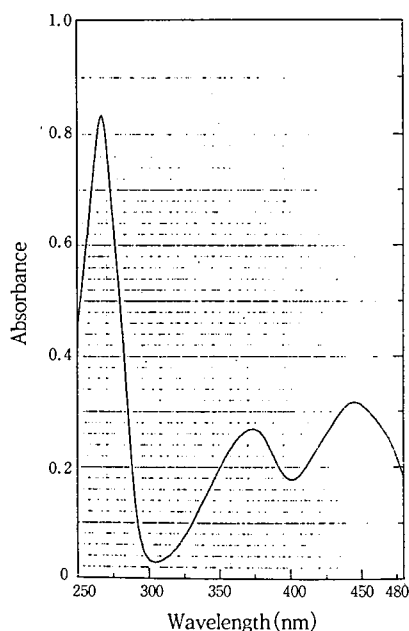


Fig. 1. Ultraviolet and visible absorption spectrum of the raw material

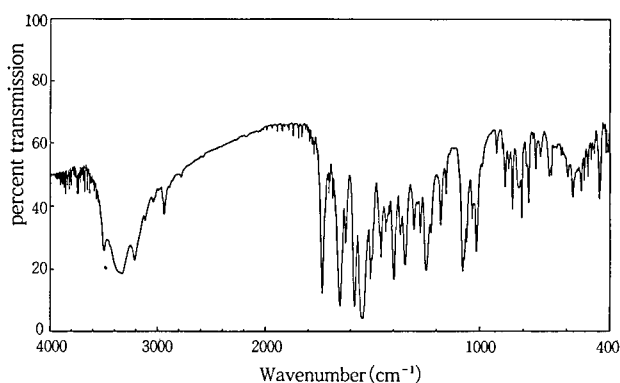


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

標準溶液とする。これらの液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う。

#### 操作条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：267 nm）

カラム：Inertsil ODS-2（4.6 mm $\phi$  x 150 mm）

移動相：0.005 M リン酸緩衝液（pH3.0）/アセトニト

リル混液（875：125）

流量：0.8 ml/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

検出感度：標準溶液1 mlを正確に量り、移動相を加えて正確に100 mlとした液20  $\mu$ lから得たりボフラビンのピーク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、標準溶液1 mlを正確に量り、移動相を加えて正確に2000 mlとした液20  $\mu$ lから得たりボフラビンのピーク面積が必ず検出されるように分析パラメーターを設定する。

## 5. 試験結果

### (1) 性状

だいたい黄色の粉末で、わずかににおいがある。

融点：283.8 $^{\circ}$ C（分解）

### (2) 紫外及び可視吸収スペクトル

本品約0.01 gを精密に量り、pH7.0のリン酸緩衝液を加えて溶かし、正確に1000 mlとする。この液につき、リン酸緩衝液を対照に吸収スペクトルを測定するとき、波長267, 373, 446 nmに吸収の極大が認められた（Fig. 1）。それぞれの吸収極大波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  は857（267 nm）、277（373 nm）、326（445 nm）であった。また、それぞれの吸収極大における吸光度を  $A_1, A_2, A_3$  とするとき、 $A_2/A_1=0.323, A_3/A_1=0.380$  であり、日局の規格（ $A_2/A_1=0.314\sim0.333, A_3/A_1=0.364\sim0.388$ ）に適合した。

### (3) 赤外吸収スペクトル

本品及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) 旋光度

日局「リボフラビン」の旋光度の項の測定条件を準用して試験したときその比旋光度  $[\alpha]_D^{25}$  は $-135.6^{\circ}$  であった。

### (5) 純度試験

(a) TLC法 本品及び日局標準品の薄層クロマトグラムをFig. 3に示す。試料溶液、標準溶液とも6  $\mu$ gずつ塗布するとき、主スポット以外に3個のスポットが検出された。また、本法によるリボフラビンの検出限界は、0.02  $\mu$ gであった。

(b) HPLC法 本品及び日局標準品のHPLC法による純度試験で得られた液体クロマトグラムの一例をFig. 4に示す。本品（A）及び日局標準品（B）とも微量の不純物ピークが多数観察され、面積百分率0.05%以上の不純物ピークは10個を数えた。これらの不純物で総量は本品で $1.43\pm0.033\%$ （ $n=5$ ）、日局標準品で $1.48\pm0.132\%$ （ $n=3$ ）と推定された。

### (6) 乾燥減量

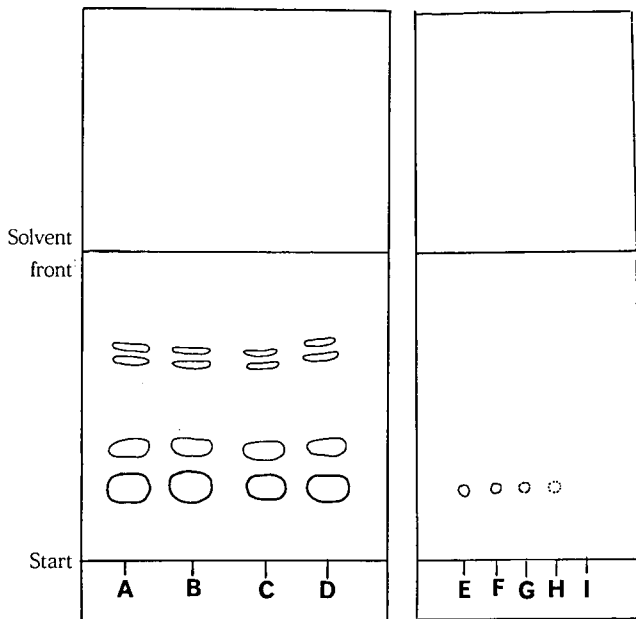
本品の乾燥減量は0.10%（0.5 g, 105 $^{\circ}$ C, 2時間）であった。

### (7) 定量

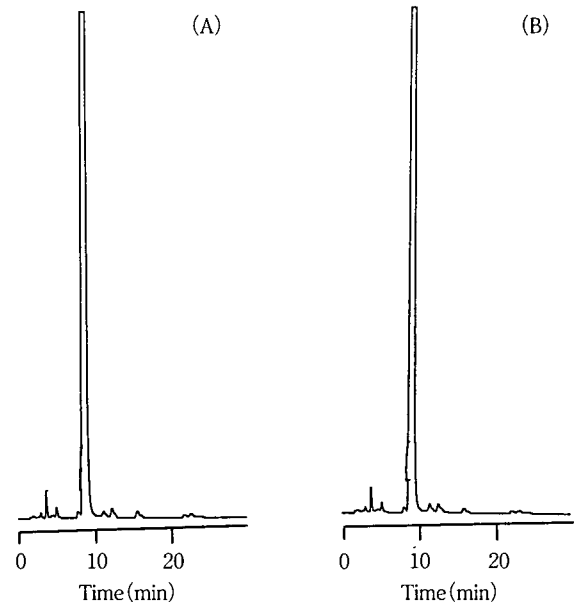
日局「リボフラビン」の定量法を準用し、日局標準品を対照に吸光度測定法により本品の定量を行った結果、 $100.4\pm0.3\%$ （ $n=4$ ）の値が得られた。

## 結 論

日局標準品は「リボフラビン」とそれらの製剤において、吸光度測定法による定量試験に用いられるものである。



**Fig. 3.** Thin-layer chromatograms of the raw material and the JP Riboflavin Reference Standard  
Solvent system: dichloromethane/methanol/tetramethylammonium hydroxide (80 : 19 : 1)  
Spot: A and C are 6  $\mu$ g and 4  $\mu$ g of the JP Reference Standard, respectively.  
B, D to H are 6, 4, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 and 0.01  $\mu$ g of the raw material, respectively.



**Fig. 4.** High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Riboflavin Reference Standard  
(A) : The raw material  
(B) : The JP Riboflavin Reference Standard

HPLC 法による純度試験で明らかなように、本品の純度は HPLC 法による定量用標準物質として用いるには必ずしも十分なものではないが、吸光度測定法において用いる標準物質としては十分な品質を有する。したがって、本品を国立医薬品食品衛生研究所標準品とし、日本薬局方で規定される医薬品の品質試験に利用しうる品質を有するものと判断し、これを国立医薬品食品衛生研究所（日本薬局方）

リボフラビン標準品（Control 951）として配布することとした。

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東京田辺製薬（株）に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 泉 若江, 北島 文, 吉井公彦, 小松裕明, 石光 進, 岡田敏史: 衛生試報, **111**, 123 (1993)