

国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961)

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[#]

Estradiol Reference Standard (Control 961) 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 estradiol was examined for preparation of the "Estradiol Reference Standard (Control 961)" of National Institute of Health Sciences. Analytical data obtained were as follows: melting point, 179.1 °C; UV spectrum, λ max = 281 nm; IR spectrum, the same as that of the Estradiol Reference Standard of National Institute of Health Sciences (Control 931); optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +79.5^\circ$; thin-layer chromatography, one impurity was detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), a trace amount of three impurities were detected; loss on drying, 3.17%; assay, 99.4% by UV spectrophotometry and 99.0% by HPLC.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Estradiol Reference Standard (Control 961) of National Institute of Health Sciences.

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

エストラジオールとその製剤の純度試験に用いられる国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961) を製造したので報告する。

1. 原料

エストラジオール標準品原料は、帝国臓器製薬株式会社より供与された。同社による日本薬局方外医薬品規格「エストラジオール」の規格及び試験法に基づく、主な試験成績は以下のとおりである：融点, 177.8°C; 旋光度 +81.14°; 定量, 100.35%。

2. 参照物質及び試薬

参照物質には国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 931; 以下, ER 標準品と略称する)¹⁾を用いた。試薬類は試薬特級品または特級相当品を用いた。

3. 装置

エストラジオール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 VALOR-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-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, C-R 6A 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、日局一般試験法及び局外規 (1993) 「エストラジオール」の規格及び試験法を準用した。

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薄層板シリカゲル 60 F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm)

展開溶媒：石油エーテル/エーテル/シクロヘキサノン混液 (3 : 1 : 1)

試料溶液：本品 100 mg をとり、エタノール 10 ml を正確に加えて溶かし、試料溶液とする。

操作法及び検出法：試料溶液 5 μ l (エストラジオール 50 μ g 相当量) 及びその希釈液 1 ~ 20 μ l (0.025 ~ 2 μ g 相当量) をシリカゲル薄層板にスポットし、約 15 cm 展開したのち、風乾し、更に 105°C で 10 分間加熱する。これに薄めた硫酸 (3 → 4) を噴霧した後、105°C で 3 分間加熱し、不純物スポットの有無を観察する。

4.2 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験
本品及び ER 標準品約 5.0 mg ずつを精密に量り、それぞれをエタノールに溶かし、正確に 5 ml とし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 40 μ 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：紫外吸光光度計 (測定波長：280 nm)

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

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mmφ x 150 mm)

カラム温度：30℃

移動相：水/アセトニトリル混液 (3 : 2)

流量：0.9 ml/min

検出感度：標準溶液 1 ml を正確に量り，エタノールを加えて正確に 100 ml とした液 40 μl から得たエストラジオール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，エタノールを加えて正確に 2000 ml とした液 40 μl から得たエストラジオール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。

面積測定範囲：溶媒ピークの後からエストラジオールの保持時間の約 2 倍の範囲

4.3 HPLC 法による定量

本品及び ER 標準品約 10 mg ずつを精密に量り，それぞれをメタノールに溶かし，正確に 25 ml とする。これらの液 5 ml ずつを正確に量り，それぞれに内標準溶液 2.5 ml 及びメタノール 50 ml を正確に加えた後，水を加えて 100 ml とし，試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 25 μl につき，次の条件で液体クロマトグラフ法による試験を行う。

内標準溶液：パラオキシ安息香酸エチルのメタノール溶液 (3 → 5000)

操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：205 nm)

その他の操作条件は，4.2 に記した純度試験における条件を準用する。

5. 試験結果

(1) 性状

白色の結晶性粉末で，においはない。

(2) 紫外吸収スペクトル

局外規「エストラジオール」の定量法における試料溶液につき，吸光度測定法により吸収スペクトルを測定するとき，波長 281 nm に吸収の極大が認められた (局外規規格：波長 279 ~ 283 nm に吸収の極大を示す) (Fig. 1)。また，吸収極大波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 77.8 であった。

(3) 赤外吸収スペクトル

本品及び ER 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

本品の比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は +79.5° (乾燥後，0.1 g，ジオキサン，10 ml，100 mm) であった (局外規規格： $[\alpha]_D^{25}$ ：+75 ~ +82°)。

(5) 融点

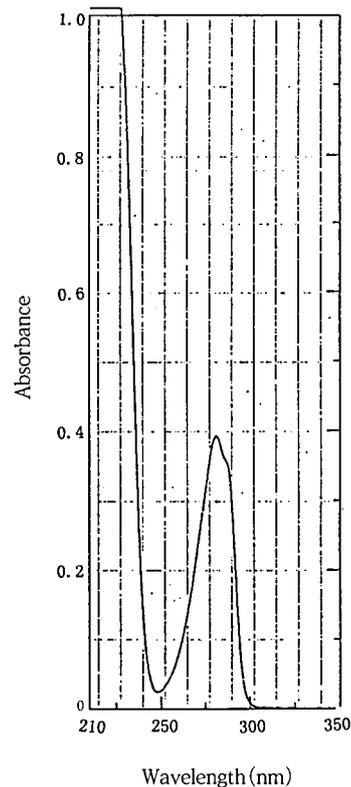


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material

本品の融点は，179.1℃であった (局外規規格：175 ~ 180℃)。

(6) 純度試験

(a) TLC 法 本品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。この結果，スポット量 50 μg において，主スポット以外のスポットが 1 個検出された。なお，本法によるエストラジオールの検出限界は，0.05 μg であった。

(b) HPLC 法 本品及び ER 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) では，面積百分率で 0.05% 以上の微量不純物が 3 個，ER 標準品 (B) では 2 個検出された。それらの不純物総量は，本品で $0.28 \pm 0.006\%$ ($n=3$)，ER 標準品は $0.17 \pm 0.003\%$ ($n=3$) と推定された。本標準品原料で微量の不純物が検出されたが，その量は，吸光度測定法による定量分析 (局外規，1993) に影響を及ぼすものではないと判断し，HPLC 法による定量分析用標準品としても十分な品質を有するものと判断した。

(7) 乾燥減量

本品の乾燥減量は，3.17% (0.5g，105℃，4時間) であった (局外規規格：3.5% 以下)。

(8) 定量

局外規「エストラジオール」の定量法を準用し，ER 標準品を対照とし，吸光度測定法による定量を行った結果， $99.4 \pm 0.2\%$ ($n=4$) の値が得られた。

別に，ER 標準品を対照として HPLC 法による定量試験

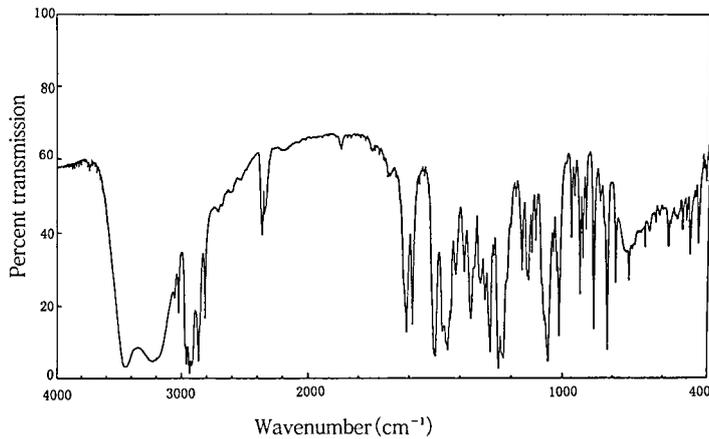


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material

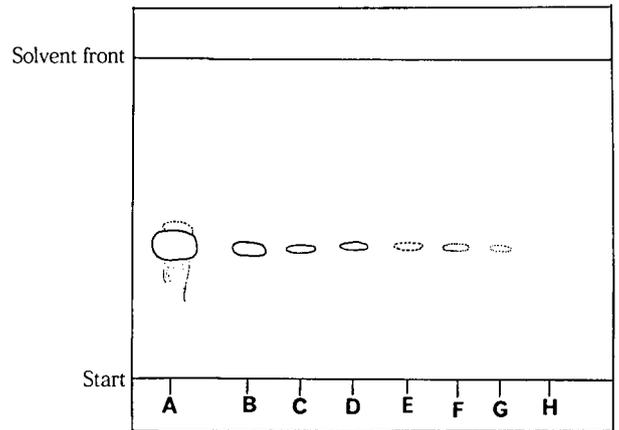


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material
Solvent system: petroleum ether/ether/cyclohexanone (3 : 1 : 1)
Spot: A to H are 50, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.05 and 0.025 μg of the raw material, respectively.

を行った結果, $99.0 \pm 0.04\%$ ($n = 4$) の値が得られた。

結 論

エストラジオール標準品原料につき, 現行の ER 標準品 (Control 931) を対照に比較検討した結果, 国立医薬品食品衛生研究所標準品として十分な品質を有することが認められたので, 国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 961) 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帝国臓器製薬株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) 北島 文, 吉井公彦, 小松裕明, 石光 進, 岡田敏史: 衛生試報, **112**, 179 (1994)

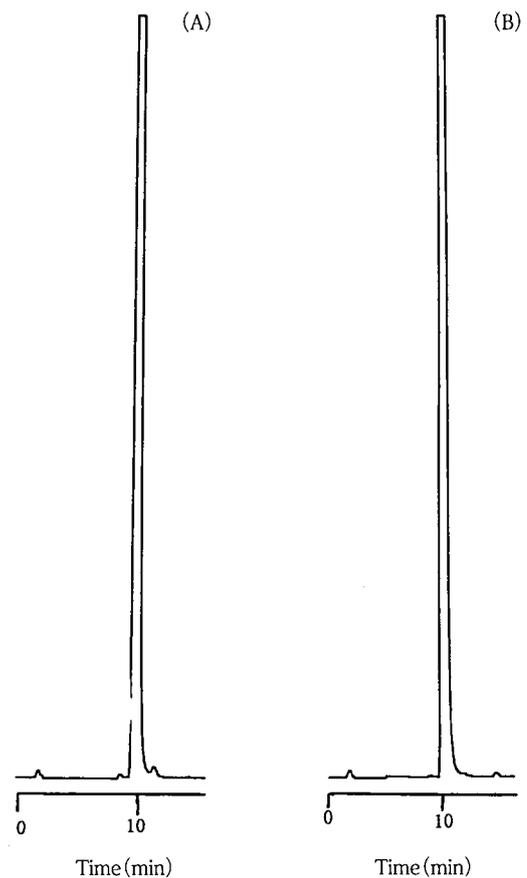


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of the raw material and Estradiol Reference Standard (Control 931)
(A) : The raw material
(B) : The Estradiol Reference Standard (Control 931)