

国立医薬品食品衛生研究所酢酸レチノール標準品(Control 971)及び  
パルミチン酸レチノール標準品 (Control 971)

谷本 剛<sup>#</sup>・岩田美保・北島 文・前川京子  
斎藤博幸・岡田敏史

Retinol Acetate Reference Standard (Control 971) and Retinol Palmitate Reference  
Standard (Control 971) of National Institute of Health Sciences

Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup>, Miho Iwata, Aya Kitajima, Keiko Maekawa,  
Hiroyuki Saito and Satoshi Okada

The "Retinol Acetate Reference Standard (Control 971)" and "Retinol Palmitate Reference Standard (Control 971)" of National Institute of Health Sciences using the assay of vitamin A ester were prepared. The proposed materials were evaluated in collaboration with four laboratories. Analytical data obtained were as follows. 1) The purities of retinol acetate and retinol palmitate measured by HPLC were  $99.9 \pm 0.06\%$  and  $94.5 \pm 0.06\%$ , respectively. 2) ultraviolet spectrum of retinol acetate and retinol palmitate showed the  $\lambda_{\max}$  at 326~327 nm. 3) The difference in relative extinction of retinol acetate and retinol palmitate at 300 nm, 310 nm, 320 nm, 330 nm, 340 nm and 350 nm are within the range provided in JPXIII. 4) The contents of retinol acetate and retinol palmitate were 52,000 IU/g and 52,200 IU/g, respectively. Based on the above results, these proposed materials were authorized to be the Reference Standards of the National Institute of Health Sciences.

**Keywords:** retinol acetate, retinol palmitate, quality evaluation, NIHS Reference Standard

日局一般試験法ビタミンA定量法の改正の必要性が指摘され<sup>1)</sup>, 現行のビタミンA定量法にHPLC法による定量操作法を追加する方向で検討されている。HPLC法は酢酸レチノール, パルミチン酸レチノールのエステル型ビタミンA及びこれらを含む製剤のビタミンA含量測定に応用されると予想されるが, この方法を設定するにはその前提としてビタミンA含量の明らかな標準品が必須となる。現在, ビタミンA関連の標準品としては「薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール標準品」及び「薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール標準品」が日本薬局方標準品として設定されているが, これらは薄層クロマトグラフ法による確認試験で用いる標準品である。そこで, 平成8年度の国立衛生試験所標準品委員会において, 日局一般試験法ビタミンA定量法の改正を円滑に進めるために, エステル型ビタミンAのHPLC法による定量法に使用することを目的とした酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノール標準品を平成9年度に設定することが決定された。

そこで, 当該標準品の候補品を調製し, この品質評価を

国立医薬品食品衛生研究所, 日本ロッシュ(株), 理研ビタミン(株)及び日清製粉(株)の4機関での共同検定によって行った。以下, その結果を報告する。

### 実験方法

#### 1. 標準品候補品の調製

標準品調製用の酢酸レチノール原体はHoffmann-Roche社で, パルミチン酸レチノール原体は理研ビタミン(株)で製造, 精製したものを使用した。この両原体を理研ビタミン(株)において, トウモロコシ油により窒素気流中で約5万IU/gとなるように希釈した。なお, この際に抗酸化剤としてBHA及びBHTを1g当たり5 $\mu$ gずつ添加した。トウモロコシ油で希釈した酢酸レチノール油及びパルミチン酸レチノール油は日清製粉(株)においてソフトカプセルに1カプセル当たり約220mgずつ充てんし, これを標準品候補品とした。

#### 2. 試験方法

##### (1)HPLC法による純度試験

各標準品候補品1アンプルの内容物の適量を精密に量り, 1mlに約100IUを含むように2-プロパノールを加えて溶かし, 試料溶液とする。試料溶液10 $\mu$ lにつき次の条件で

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-941-4419; Fax: 06-942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

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：326 nm）

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mm)

移動相：メタノール

流量：酢酸レチノール又はパルミチン酸レチノールの保持時間が、それぞれ約5分又は17分になるように調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後から、酢酸レチノールの保持時間の約7倍の範囲又はパルミチン酸レチノールの保持時間の約2倍の範囲。

#### (2) 定量法

標準品候補品のカプセルの内容物を用いて、第十三改正日本薬局方一般試験法「ビタミンA定量法」の第1法<sup>2)</sup>に従って試験した。

### 結果と考察

#### 1. 性状

酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノール標準品の候補品はそれぞれ淡黄色不透明及び淡赤色不透明の楕円形ソフトカプセルに充てんしたものである。

#### 2. HPLC法による純度試験

酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノールのクロマトグラムをFig. 1に示す。酢酸レチノールは約5分に左右対

称の鋭い1本のピークとして溶出され、面積百分率法で0.05%以上の不純物ピークは認められず、純度は $99.9 \pm 0.06\%$  ( $n=3$ )であった。一方、パルミチン酸レチノールでは約17分に左右対称の主ピークが溶出したが、約10分、13分及び25分に不純物ピークが認められ、特に約25分に溶出するピークの含量は面積百分率法で約4.5%であった。これらのことから、パルミチン酸レチノールの面積百分率法で求めた純度は $94.5 \pm 0.06\%$ であった。パルミチン酸レチノールの精製は現在の製造技術ではこれ以上は困難であると考えられている。ビタミンAの含量を質量に基づいて表す場合、本候補品の現在の純度では標準品としての位置づけは困難であるが、日局では単位（国際単位）でその含量が表記されることになっており、この場合には標準品に含まれる単位数が厳密に規定されれば今回調製した候補品の純度でも十分標準品として使用できると考えられた。

#### 3. 定量

標準品候補品のカプセル内容物の適量を精密に量り、「ビタミンA定量法」第1法に従って調製した試料溶液の紫外吸収スペクトルをFig. 2に示す。酢酸レチノール及びパルミチン酸レチノールともに波長326~327 nmに吸収の極大を示した。また、波長326 nmの吸光度を1.000としたときの波長300 nm, 310 nm, 320 nm, 330 nm, 340 nm及び350における吸光度の比はそれぞれ「ビタミンA定量法」に規定されている値の $\pm 0.030$ の範囲にあった (Table 1)。

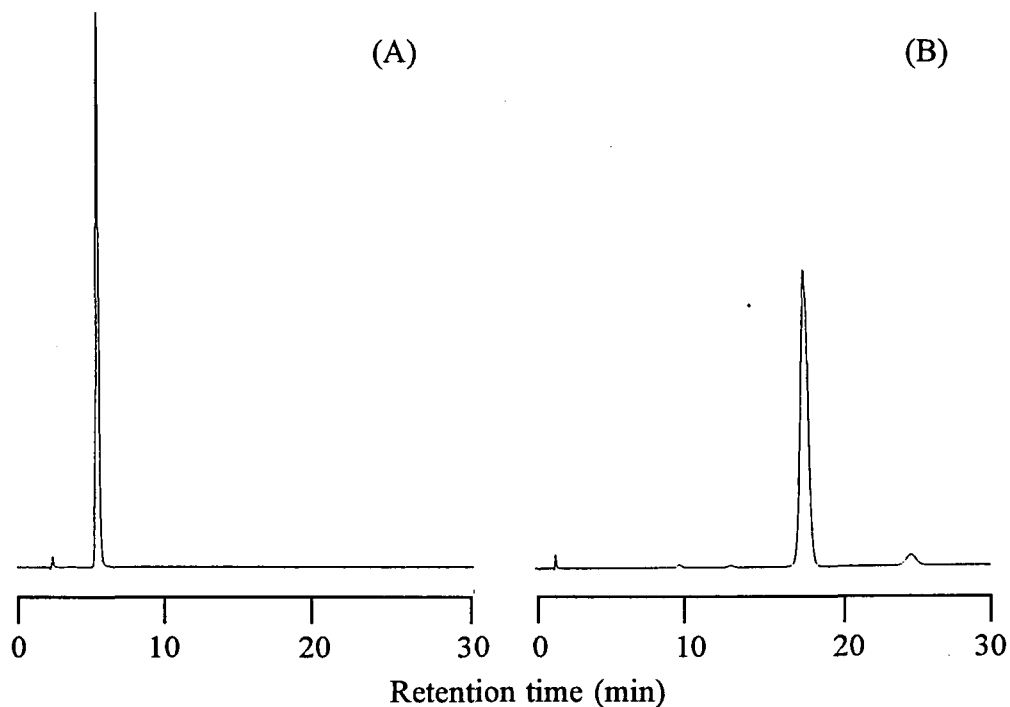


Fig. 1. High-performance liquid chromatograms of the proposed material for Retinol Acetate and Retinol Palmitate Reference Standards

A) : The proposed material for Retinol Acetate Reference Standard

B) : The proposed material for Retinol Palmitate Reference Standard

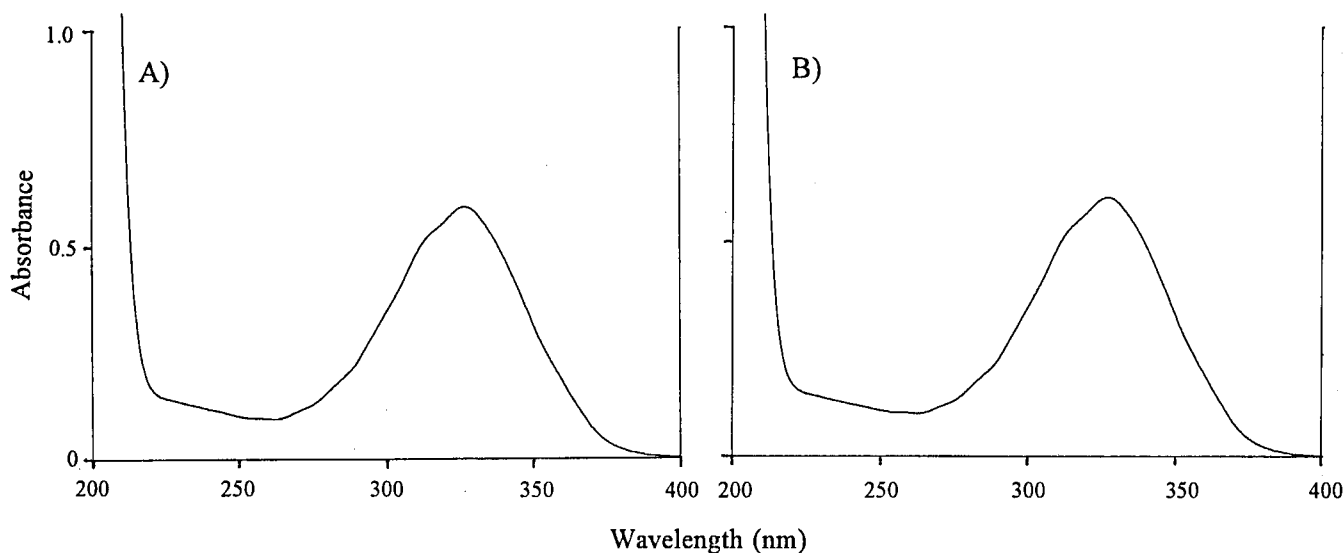


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectra of the proposed material for Retinol Acetate and Retinol Palmitate Reference Standards

- A): The proposed material for Retinol Acetate Reference Standard  
 B): The proposed material for Retinol Palmitate Reference Standard

Table 1. Relative extinctions of "Retinol Acetate Reference Standard" and "Retinol Palmitate Reference Standard" materials

$\lambda$ (nm)	Retinol acetate			Retinol palmitate		
	A	B	$\Delta(A - B)$	A	B	$\Delta(A - B)$
300	0.582	0.578	+ 0.004	0.576	0.590	- 0.014
310	0.814	0.815	- 0.001	0.807	0.825	- 0.018
320	0.947	0.948	- 0.001	0.944	0.950	- 0.001
326	1.000	1.000		1.000	1.000	
330	0.979	0.972	+ 0.006	0.983	0.981	+ 0.002
340	0.795	0.786	+ 0.009	0.804	0.795	+ 0.009
350	0.528	0.523	+ 0.005	0.541	0.527	+ 0.014

A: relative extinction of standard material.

B: value provided in JP X III

Table 2. Potency of the material prepared for "Retinol Acetate Reference Standard"

Lab.	Potency (IU/g)						Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	4	5	6	
A	51880	51360	52080	51430	51840	52200	51800 $\pm$ 340
B	52610	51910	51950	52270	51780	51830	52060 $\pm$ 320
C	51820	51720	51790	51890	51890	51800	51820 $\pm$ 65
D	52440	52610	52000	52250	52310	52140	52290 $\pm$ 216
Mean $\pm$ S.D. (n=24)							51990 $\pm$ 317

Table 3. Potency of the material prepared for "Retinol Palmitate Reference Standard"

Lab.	Potency (IU/g)						Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	4	5	6	
A	52270	52330	52510	52280	52450	52050	52320 $\pm$ 161
B	52230	52920	52140	52540	52080	52310	52370 $\pm$ 314
C	51570	51600	51880	51840	51960	51800	51780 $\pm$ 157
D	52040	52800	52100	52350	52590	52230	52350 $\pm$ 294
Mean $\pm$ S.D. (n=24)							52200 $\pm$ 340

このことは本候補品の定量に「ビタミンA定量法」第1法の適用が可能であることを示しているもので、326 nm における吸光度より両標準品候補品の1g当たりのビタミンA単位を求めた。その結果、酢酸レチノール標準品候補品は1g当たり52,000 $\pm$ 317単位 (Table 2), パルチミン酸レチノール標準品候補品は1g当たり52,200 $\pm$ 340単位 (Table 3) を含有していた。

#### ま と め

高度に精製した酢酸レチノール及びパルチミン酸レチノールをソフトカプセルに充填した酢酸レチノール及びパルチミン酸レチノール標準品候補品の品質を4機関での共同検定で試験した。その結果、本品は日局一般試験法「ビタミンA定量法」第1法の適用が可能な純度をもっていることが示され、同定量法によって酢酸レチノール標準品候

補品は1g当たり52,000 $\pm$ 317単位、パルチミン酸レチノール標準品候補品は1g当たり52,200 $\pm$ 340単位を含有していることが明らかになった。そこで、本候補品をそれぞれ初回の酢酸レチノール標準品 (1g中52,000単位含有) (Control 971) 及びパルチミン酸レチノール標準品 (1g中52,200単位含有) (Control 971) として配布することにした。

終りに、本標準品原料の製造及び品質評価にあたりご協力いただきました日本ロッシュ(株)、理研ビタミン(株)及び日清製粉(株)の各社に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 岡田敏史, 北島 文, 谷本 剛: 医薬品研究, **28**, 795-799 (1997)
- 2) 第十三改正日本薬局方: pp.89-91 (1996)