

国立医薬品食品衛生研究所コレカルシフェロール標準品 (Control 971)

岩田美保・北島 文・前川京子・斎藤博幸
谷本 剛・岡田敏史[#]

Cholecalciferol Reference Standard (Control 971) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Aya Kitajima, Keiko maekawa, Hiroyuki Saito,
Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada[#]

The raw material for cholecalciferol was examined for preparation of the "Cholecalciferol Reference Standard (Control 971)". Analytical data obtained were as follows: melting point, 83.8°C; UV and infrared spectra, the same as those for JP Cholecalciferol Reference Standard (Control 945), respectively; specific absorbance at 265 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 485$; optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +107.4^\circ$; thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC), no impurity was detected; assay, 98.9 % by HPLC.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Cholecalciferol Reference Standard (Control 971) of National Institute of Health Science.

Keywords: cholecalciferol, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十三改正日本薬局方「コレカルシフェロール」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所コレカルシフェロール標準品 (Control 971) を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は Duphar 社 (オランダ) より入手した。本標準品原料は、高純度のコレカルシフェロール約 100 mg をアンプルに小分け・充填し、窒素置換した後、溶封されたものである。

2. 参照物質および試薬

日本薬局方コレカルシフェロール標準品 (Control 945; 日局標準品と略称)¹⁾ を対照に試験を行った。試薬は特級品又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、下記の測定装置を用いた。

セミマイクロ上皿電子天秤: メトラー, AE-240 型。

自記分光光度計: 島津製作所, UV-2500(PC)S 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。

液体クロマトグラフ装置: 日本光分の TRI PAR-VI 型

ポンプ, UVIDEC-100-VI 型検出器, 資生堂製データ処理装置 S-MC 及び恒温水槽 (東洋科学, TE-104S 型)。

4. 試験方法

特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および医薬品各条「コレカルシフェロール」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 60F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm)。

展開溶媒: シクロヘキサン/ジエチルエーテル混液 (1:1)。

試料溶液及び標準溶液: 標準品原料及び日局標準品約 10 mg を精密に量り、それぞれにクロロホルム 1 ml を正確に加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。

操作法及び検出法: 試料溶液及び標準溶液の 5~10 μl (コレカルシフェロール 50~100 μg 相当量) をシリカゲル薄層板に窒素ガスを吹きつけながらスポットし、暗所で約 15 cm 展開した後、風乾する。薄層板に濃硫酸を均等に噴霧した後、100°C で 5 分間加熱し、直ちに肉眼で観察する。

(2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品約 5 mg ずつを精密に量り、それぞれにイソオクタン 4 ml を正確に加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 10 μl 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: 254 nm)

[#] To whom correspondence should be addressed: Satoshi Okada; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-941-1533; Fax: 06-942-0716; E-mail: okada@nihs.go.jp

カラム：Chemcosorb 5Si (4.0 mm ϕ \times 150 mm)

移動相：ヘキサン/n-アミルアルコール混液 (997:3)

流量：2.0 ml/min

カラム温度：20℃

カラムの選定：日局「コレカルシフェロール」の定量法におけるカラムの選定を準用する。

検出感度：標準溶液 1 ml を正確に量り、イソオクタンを加えて正確に 100 ml とした液 10 μ l から得たコレカルシフェロールの高さが記録紙のフルスケールの約 10% の高さ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。更に、標準溶液 1 ml を正確に量り、イソオクタンを加えて正確に 2,000 ml とした液 10 μ l から得たコレカルシフェロールのピーク面積が自動積分法で測定されるように装置の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、コレカルシフェロールの保持時間の 2 倍の範囲。

5. 試験結果

(1) 性状：白色の結晶で、においはない。

(2) 融点：83.8℃

(3) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度：標準品原料のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長 265 nm に吸収の極大が認められた (Fig. 1)。この波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (265 nm) は 485 であった。日局「コレカルシフェロール」の比吸光度の規格は、同一条件で 450~490 であることから、本標準品原料の比吸光度 485 は

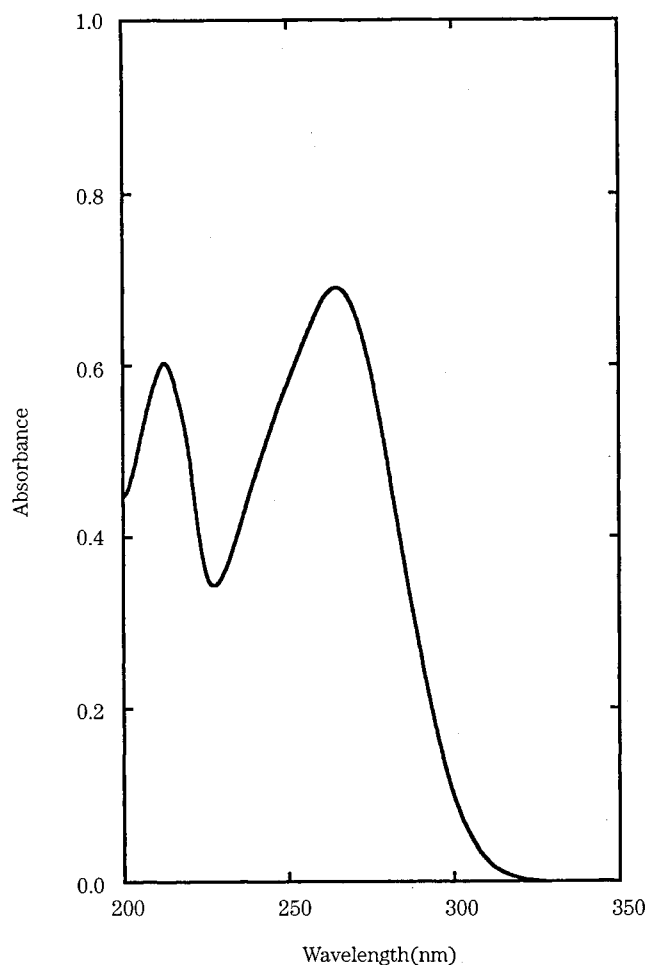


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

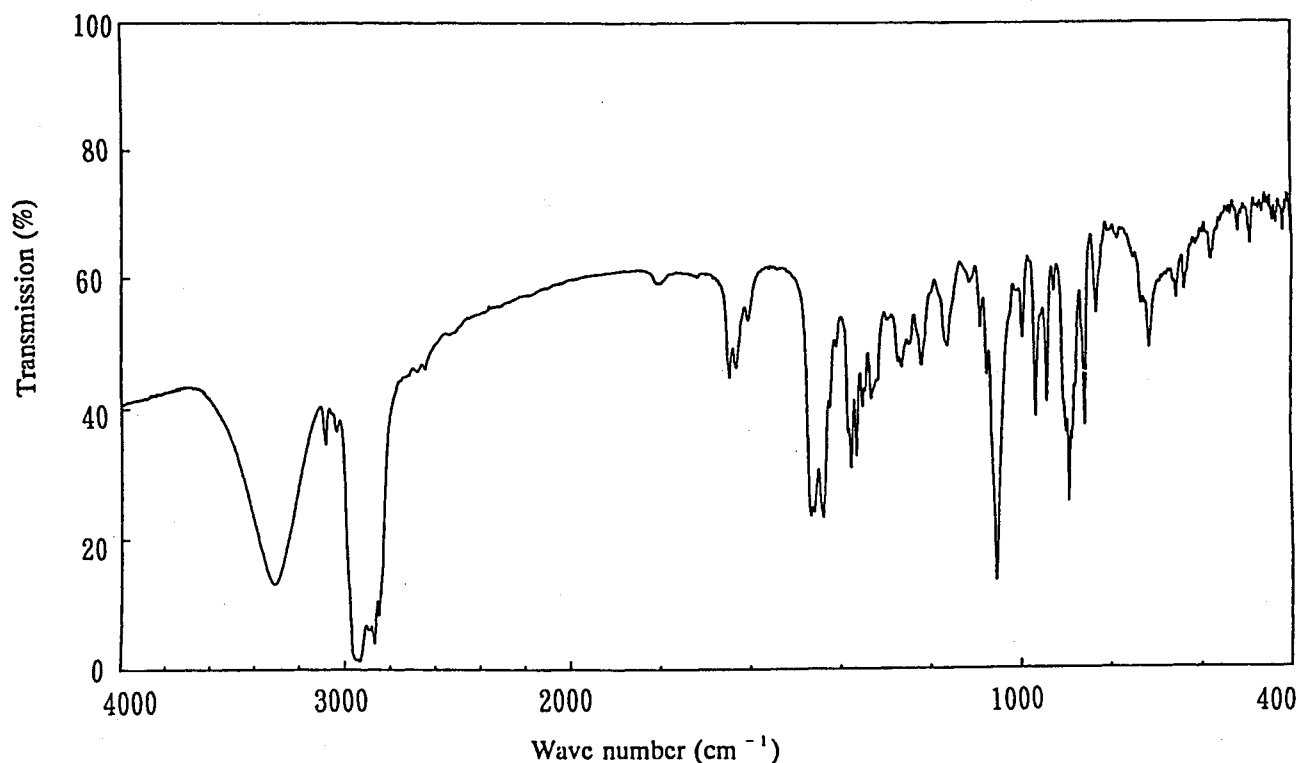


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

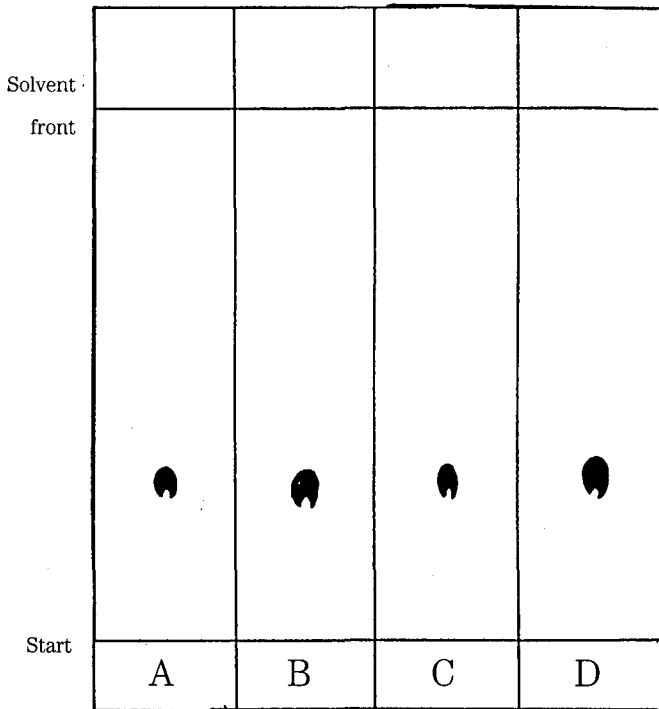


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

Solvent: cyclohexane/diethylether (1:1)

Spot: A and B are 50 μg and 100 μg of the raw material, respectively.

C and D are 50 μg and 100 μg of the Cholecalciferol Reference Standard, respectively.

日局規格に適合した。

(4) 赤外吸収スペクトル：標準品原料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)。

(5) 旋光度： $[\alpha]_D^{20} = +107.4^\circ$ (0.05 g, エタノール, 1,000 ml)。日局「コレカルシフェロール」の旋光度規格は、同一条件下で $+103 \sim +112^\circ$ であり、標準品原料の旋光度は日局規格に適合した。

(6) 純度試験

(a) TLC法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示す。標準品原料及び日局標準品とも100 μg のスポット量まで不純物スポットは認められなかった。なお、本法によるコレカルシフェロールの検出限界は0.1 μg であった。

(b) HPLC法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示す。標準品原料及び日局

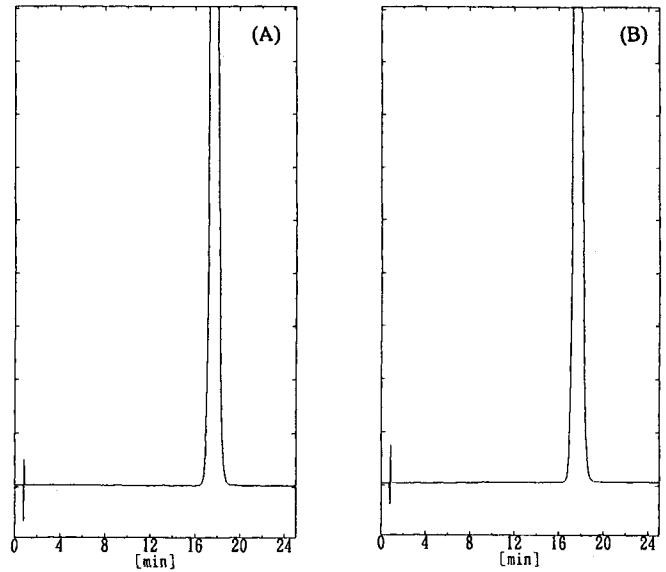


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

(A): Raw material

(B): Cholecalciferol Reference Standard (Control 945)

標準品とも面積百分率法で0.05%以上の不純物は検出されず、本標準品原料は極めて高純度に精製されたものであることが明らかとなった。

(7) 定量：日局「コレカルシフェロール」の定量法を準用し、日局標準品を対照に液体クロマトグラフ法により試験を行った結果、 $98.9 \pm 0.15\%$ ($n=3$) の値が得られた。

結 論

標準品原料として入手したコレカルシフェロールを日局標準品を対照に比較検討した結果、本標準品原料は、液体クロマトグラフ法による定量法及び赤外吸収スペクトル測定法による確認試験のための標準品として十分な品質を有することが明らかとなったので、国立医薬品食品衛生研究所コレカルシフェロール標準品 (Control 971) (日本薬局方標準品) として製造・配布することとした。

文 献

- 1) 北島 文, 前川京子, 吉井公彦, 小松裕明 谷本 剛, 岡田敏史: 衛生試報, **113**, 104 (1995)