

国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 001)

岩田美保・小出達夫・前川京子・斎藤博幸
谷本 剛[#]・岡田敏史

Estradiol Reference Standard (Control 001) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Tatsuo Koide, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto[#], and Satoshi Okada

The raw material of tocopherol was tested for the preparation of "Estradiol Reference Standard (Control 991)". Analytical data obtained were: melting point, 178.5 °C; UV spectrum, λ max of 281 nm and specific absorbance in ethanol at λ max = 77.7; IR spectrum, same as that of the Estradiol Reference Standard (Control 964); optical rotation, $[\alpha]_D^{25} = +79.5^\circ$; thin-layer chromatography, one impurity was detected; high-performance liquid chromatography (HPLC), total amount of impurities estimated to be less than 0.6 %; loss on drying, 3.3 %; assay, 100.2 % by UV spectrophotometry and 99.9 % by HPLC.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Estradiol Reference Standard (Control 001) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: estradiol, quality evaluation, authorization, reference standard

「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 001)」を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は、帝国臓器製薬株式会社より供与された。同社による試験成績は次のとおりである。定量：99.5 %。

2. 参照物質及び試薬

国立医薬品食品衛生研究所エストラジオール標準品 (Control 964；以下、E R標準品と略称)¹⁾を対照物質とした。試薬及び溶媒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、下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計：島津製作所，UV2500PC

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-30S型

液体クロマトグラフ装置：島津製作所製のLC-6A型ポンプ，SPD-6A型検出器，CTO-6A型カラムオーブン，東ソー製のAS-8010及び資生堂製データ処理装置。

4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法及び局外規 (1997)「エストラジオール」の規格及び試験法を準用した。

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：石油エーテル／エーテル／シクロヘキサノン 混液 (3:1:1)

試料溶液及び標準溶液の調整：標準品原料及びE R標準品 0.10 mg をとり、エタノール 10 ml を正確に加えて溶かし、試料原液及び標準原液とする。エタノールを加えて試料原液及び標準原液を希釈し、数種の濃度 (0.01 ~ 0.1 mg/ml) の試料溶液及び標準溶液を調整する。

操作法及び検出法：試料溶液及び標準液 5 μ l (エストラジオール 50 μ g 相当量) 及びその希釈液 3 ~ 5 μ l (0.03 ~ 0.5 μ g 相当量) をシリカゲル薄層板にスポットし、約 12 cm 展開した後、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及び検出限界を観察する。

2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

[#] To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

標準品原料及びE R標準品約 0.010 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 10 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）

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm ϕ x 150 mm)

カラム温度：30 $^{\circ}$ C

移動相：水／アセトニトリル混液 (3：2)

流量：1.0 ml/min

検出感度：試料注入液の 1 % に相当する量を注入し、得られたピークの高さが記録紙のフルスケールの約 1/10 の高さになるように記録計の感度を調整する。更に、この条件で試料注入量の 0.05 % に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が検出されるように感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、エストラジオールの保持時間の 2 倍の範囲

3) HPLC 法による定量

標準品原料及びE R標準品約 0.010 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 2.5 ml ずつを正確に量り、それぞれに内標準溶液 1.5 ml 及びメタノール 25 ml を正確に加えた後、水を加えて 50 ml とし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 25 μ l 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。

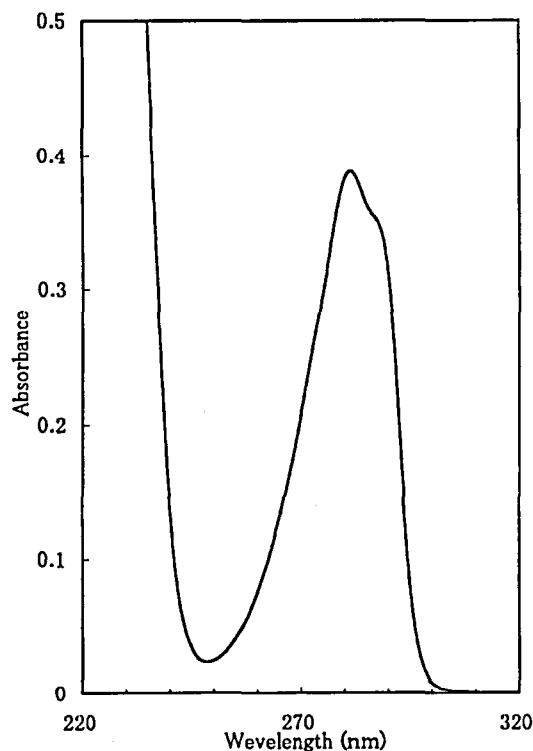


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Estradiol Reference Standard

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 $\rightarrow$ 5000)

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（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」の定量法の方法で標準品原料の紫外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）。また、吸収極大波長における比吸光度 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (λ max) は 77.6 ± 0.6 ($n=4$) であった。標準品原料の紫外吸収スペクトルを Fig.1 に示す。

3) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig.2 に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを ER 標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

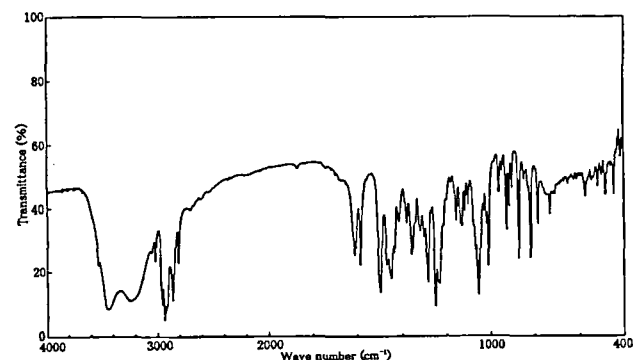


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Estradiol Reference Standard

4) 旋光度

標準品原料の比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は $+82.3 \pm 0.4^{\circ}$ ($n=3$)（乾燥後、0.1 g, ジオキサン, 10 ml, 100 mm）であった（局外規規格： $[\alpha]_D^{25}$ ： $+75 \sim +82^{\circ}$ ）。

5) 融 点

標準品原料の融点は、 $178.5 \pm 0.3^{\circ}$ C であった（局外規規格：175～180 $^{\circ}$ C）。

6) TLC 法による純度試験

標準品原料及びER標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。試料溶液及び標準溶液とも、スポット量 50 μ g まで異種スポットは認められなかった。また、本法による

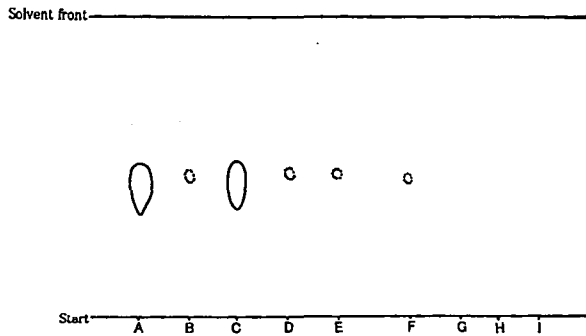


Fig.3 Thin-layer chromatograms of the raw material and NIHS Estradiol Reference Standard (Control 964)

Solvent system:petroleum ether/ether/cyclohexanone (3:1:1)

Spot;A and B are 50 μ g and 0.5 μ g of NIHS Reference Standard
C to I are 50, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.04 and 0.03 μ g of the raw material, respectively

エストラジオールの検出限界は、0.1 μ gであった。

7) HPLC法による純度試験

標準品原料及び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。標準品原料及びER標準品とも、微量の不純物ピークが検出された。面積百分率で不純物ピークの総量は、標準品原料で $0.54 \pm 0.02 \%$ (n=3), ER標準品で 0.48 % と推定された。

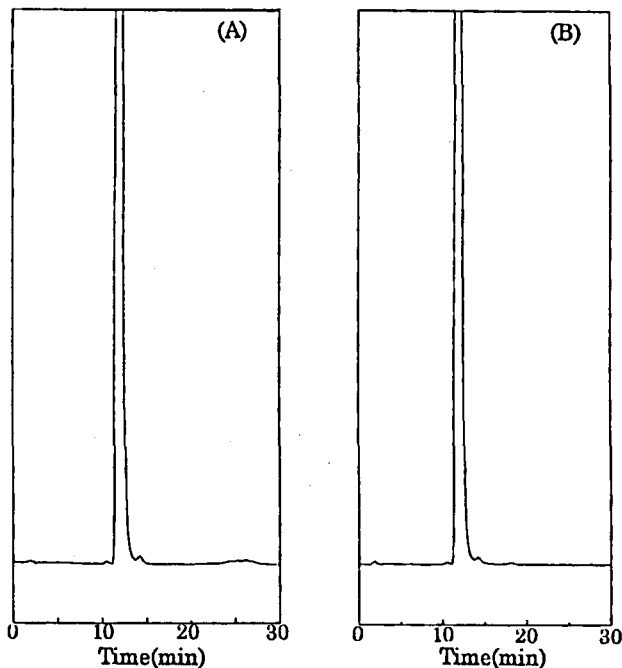


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material and NIHS Estradiol Reference Standard

(A): The raw material

(B): NIHS Estradiol reference Standard (Control 964)

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, 1997) 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。

8) 乾燥減量

本標準品原料の乾燥減量は $3.3 \pm 0.1 \%$ (n=6) (0.1 g, 105 $^{\circ}$ C, 4 時間) (局外規規格: 3.5 % 以下) であった。

9) 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、 $100.2 \pm 0.8 \%$ (n=4) の値が得られた。

別に、ER標準品を対照としてHPLC法による定量試験を行った結果、 $99.9 \pm 1.8 \%$ (n=3) 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、ER標準品 (Control 964) を対照にその品質を検討した結果、両者の間には物質特性に差のないことを確認した。この結果から、本標準品原料は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ものとし、Control 001として製造・配布することとした。

文 献

- 1) Kitajima, A., Tagashira, Y., Maekawa, K., Yoshii, K., Komatsu, H., Tanimoto, T. and Okada, S.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 187 (1997)