

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 001)

前川京子・岩田美保・小出達夫・斎藤博幸
谷本 剛[#]・岡田敏史

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

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

The raw material of cholecalciferol was examined for the preparation of "Cholecalciferol Reference Standard (Control 001)". Analytical data obtained were: melting point, 83.2°C ; UV and infrared spectra, the same as those of JP Cholecalciferol Reference Standard (Control 971), respectively; specific absorbance at 265 nm, $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 478$; optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +108.6^\circ$; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 100 µg ; high-performance liquid chromatography (HPLC), total amount of impurities estimated to be less than 0.05%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Cholecalciferol Reference Standard (Control 001).

Keywords: cholecalciferol, quality evaluation, authorization, JP 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 001)” (日本薬局方標準品) を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は第一製薬株式会社より入手した。本標準品原料は、高純度のエルゴカルシフェロール約100mg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 971 ; 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：島津製作所製のLC-6A型ポンプ, SPD-10A型検出器, CT0-6A型カラムオープン, 東ソー製のAS-8010型オートサンプラー, 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テッド薄層板シリカゲル60F254 (厚さ, 0.25mm)。

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10mgを精密に量り、それぞれにクロロホルム1ml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15cm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。

1) 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5mgずつを精密に量り、それ

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

それにイソオクタン4ml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 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：紫外吸光度計（測定波長：254nm）

カラム：Chemcosorb 5Si（4.0mm ϕ x 150mm）

移動相：ヘキサン/n-アミルアルコール混液（997:3）

流量：2.0ml/min

カラム温度：20°C

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1mlを正確に量り、イソオクタンを加えて正確に100ml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1mlを正確に量り、イソオクタンを加えて正確に2000ml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。

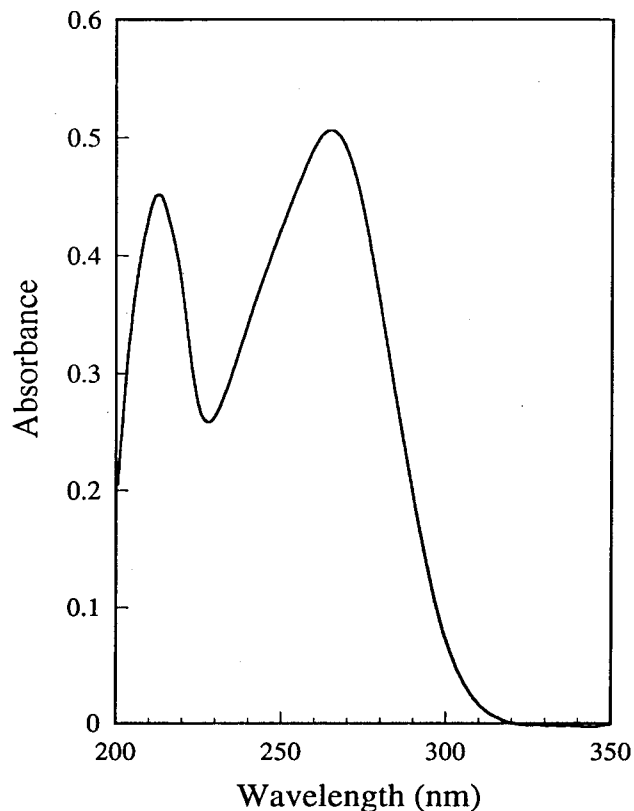


Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

5. 試験結果

1) 性状：白色の結晶で、においはない。

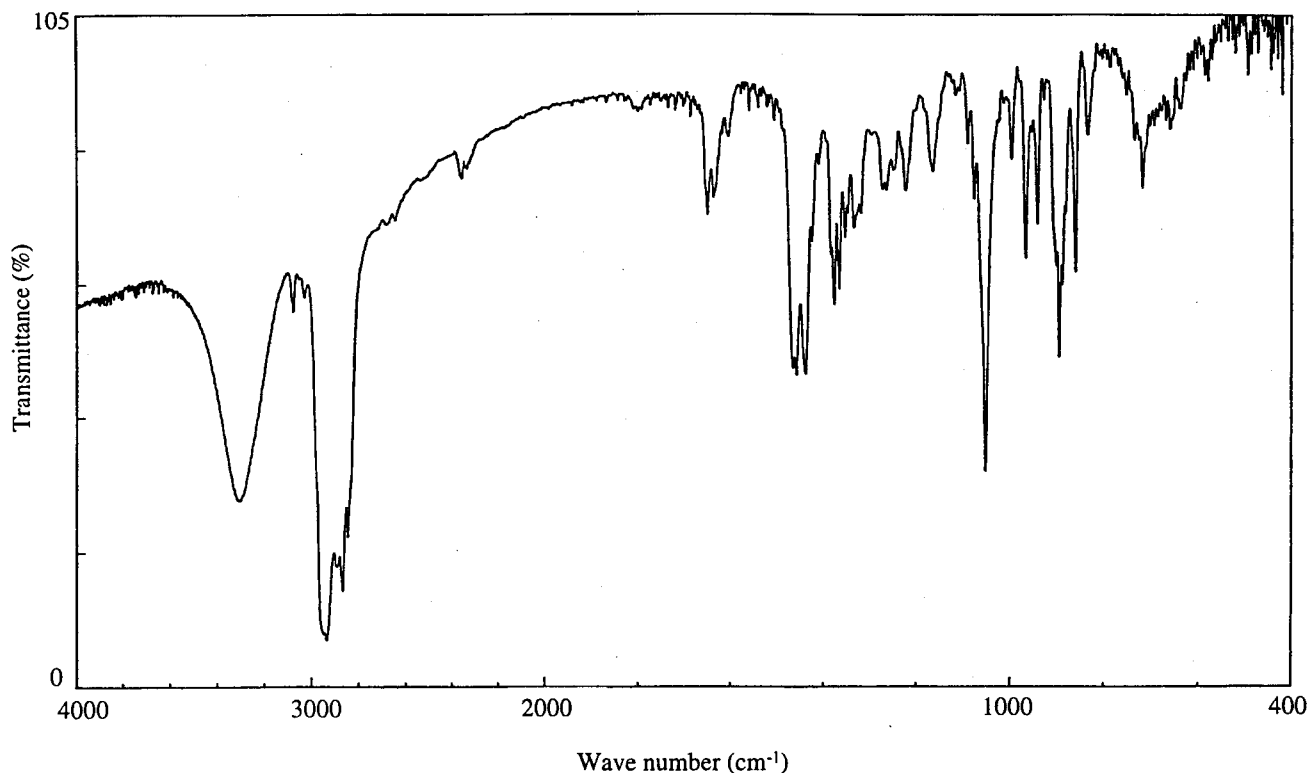


Fig. 2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

2) 融点 : 83.2°C

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265nm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 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (265nm) は478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478は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に標準品原料の赤外吸収スペクトルを示す。

5) 旋光度

$[\alpha]_D^{20} = +108.6^\circ$ (0.05g, エタノール, 1000ml)。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 $+103^\circ \sim +112^\circ$ であり、標準品原料の旋光度は日局規格に適合した。

6) TLC法による純度試験

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。

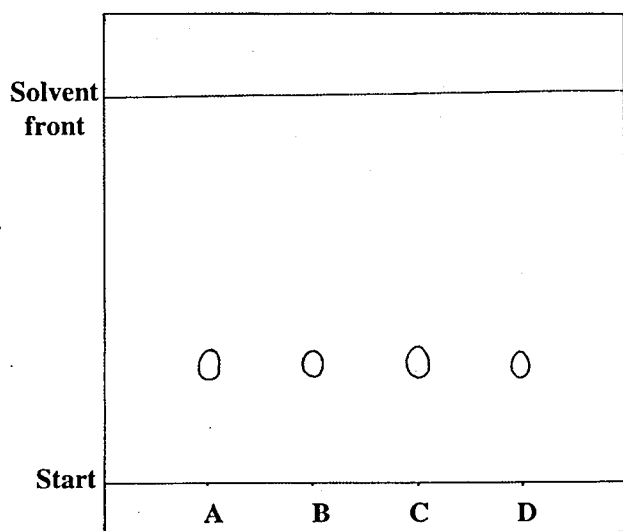


Fig. 3 Thin-layer chromatogram of the raw material and Cholecalciferol Reference Standard (control 971)

Solvent system: cyclohexane/diethylether (1:1)

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

C and D are 100 μg and 50 μg Cholecalciferol Reference Standard (control 971), respectively.

7) TLC法による純度試験

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標準品ともに面積百分率法で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。面積百分率で求めた不純物ピークの総量は標準品原料で $0.027 \pm 0.005\%$ (n=3), 日局標準品で $0.043 \pm 0.004\%$ (n=2)と推定された。

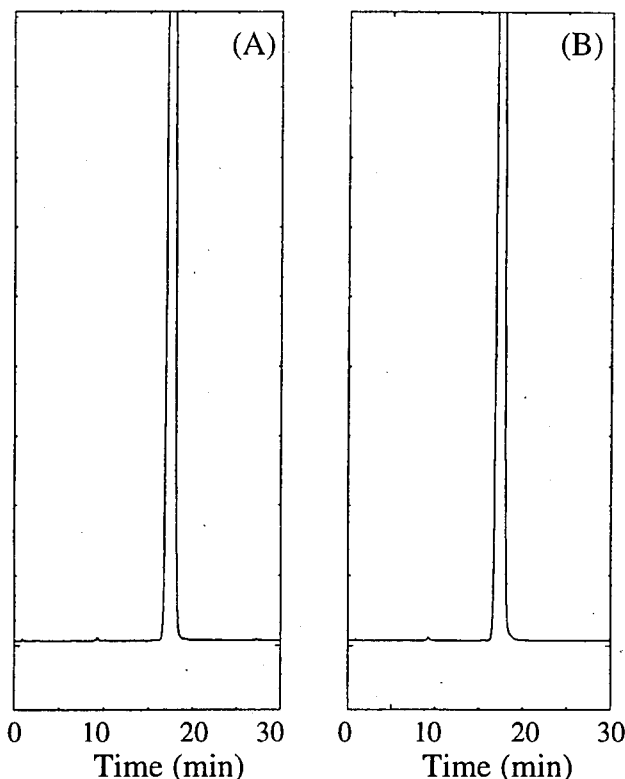


Fig. 4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Cholecalciferol Reference Standard (control 971) (B)

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 001) (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) 岩田美保, 北島 文, 前川京子, 斎藤博幸, 谷本 剛, 岡田敏史: 衛生研報, 116, 174 (1998)