

## 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 031)

村上美保・森田有紀子・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛<sup>#</sup>

### Cholecalciferol Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup>

The raw material of cholecalciferol was examined for the preparation of the "Cholecalciferol Reference Standard (Control 031)". The analytical data obtained were: melting point, 86.3 °C; UV spectrum,  $\lambda_{\max}$  of 264.6 nm and specific absorbance in ethanol at 265nm = 476.2; IR spectrum, same as that of the cholecalciferol Reference Standard (Control 003); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = 109.4$  °; thin-layer chromatography, one impurity was detected at 50  $\mu\text{g}$ ; high-performance liquid chromatography, total amount of impurities estimated to be less than 0.04 %.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Cholecalciferol Reference Standard (Control 031) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: cholecalciferol, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十四改正日本薬局方「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  
究所標準品「コレカルシフェロール標準品 (Control 031)  
(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

標準品原料は第一化成品株式会社より入手した。同社  
による試験成績は次のとおりである。融点：85.0 °C，  
比吸光度： $E_{1\text{cm}}^{1\%}(265\text{nm}) = 476.2$ ，旋光度： $[\alpha]_D^{20} = +$   
109.4 °，含量：99.3 %

#### 2. 参照物質及び試薬

日本薬局方コレカルシフェロール標準品 (Control  
003；日局標準品)<sup>1)</sup>を参照物質とした。試薬及び溶媒  
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試験にあたり、下記の装置を用い  
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

旋光計：日本分光，DIP・317型

融点測定器：宮本理研工業，PA・30S型

液体クロマトグラフ装置：島津製作所のLC・10AD型  
ポンプ，SPD・10AV型検出器，GL・サイエンスのModel  
557型カラムオープン，ミリポア製のWatersTM717型オ  
ートサンプラー及び資生堂製S・mcデータ処理装置

#### 4. 試験方法

特に記すもののほかは、第十四改正日本薬局方の一般  
試験法及び医薬品各条「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  
60F<sub>254</sub> (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)

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  $\mu\text{l}$   
(コレカルシフェロール 50 ~ 100  $\mu\text{g}$  相当量) をシリカゲ  
ル薄層板に窒素ガスを吹き付けながらスポットし、暗所  
で約 15 cm 展開した後、風乾する。紫外線照射 (波長：  
254 nm) 下で観察した後、薄層板に濃硫酸を均等に噴  
霧し、その後 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、

<sup>#</sup>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

それぞれをイソオクタン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  $\mu$ lにつき、次の条件で分析を行った。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、全ピーク面積に対する相対面積百分率を求める。

#### 操作条件

検出法：紫外吸光度計（波長：254 nm）

カラム：CHEMCOSORB 5si（4.0 mm $\phi$  × 150 mm）

移動相：n-ヘキサン/n-アミルアルコール（997：3）

流量：コレカルシフェロールの保持時間が約18分になるように調整する。

カラム温度：20 付近の一定温度

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：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紙の感度を調整する。さら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、得られる主ピーク面積が検出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：白色の粉末でにおいはなかった。
- 2) 融点：86.3
- 3) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度

標準品原料溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長264.6 nm付近に吸収の極大が認められた。また、極大吸収波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (265 nm) は  $483.6 \pm 3.8$  (n = 3) 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。

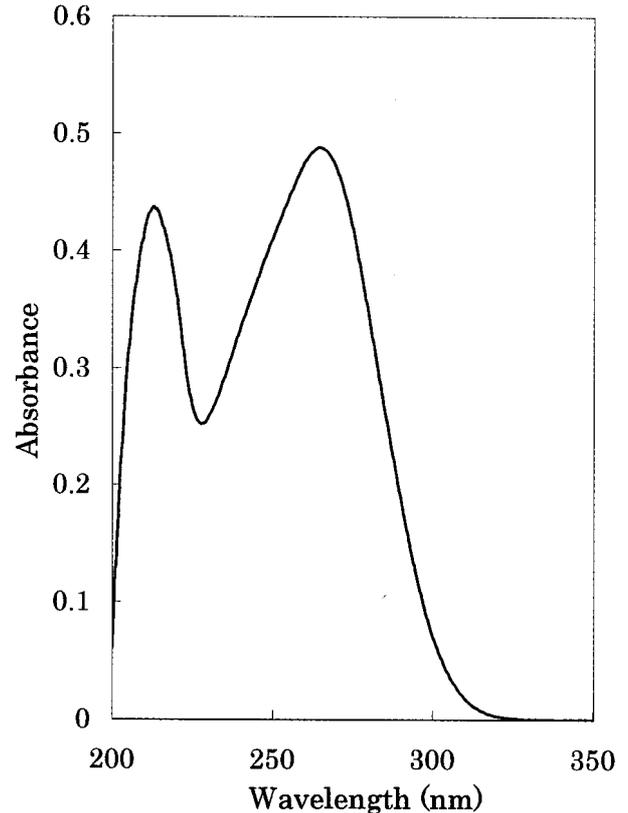


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

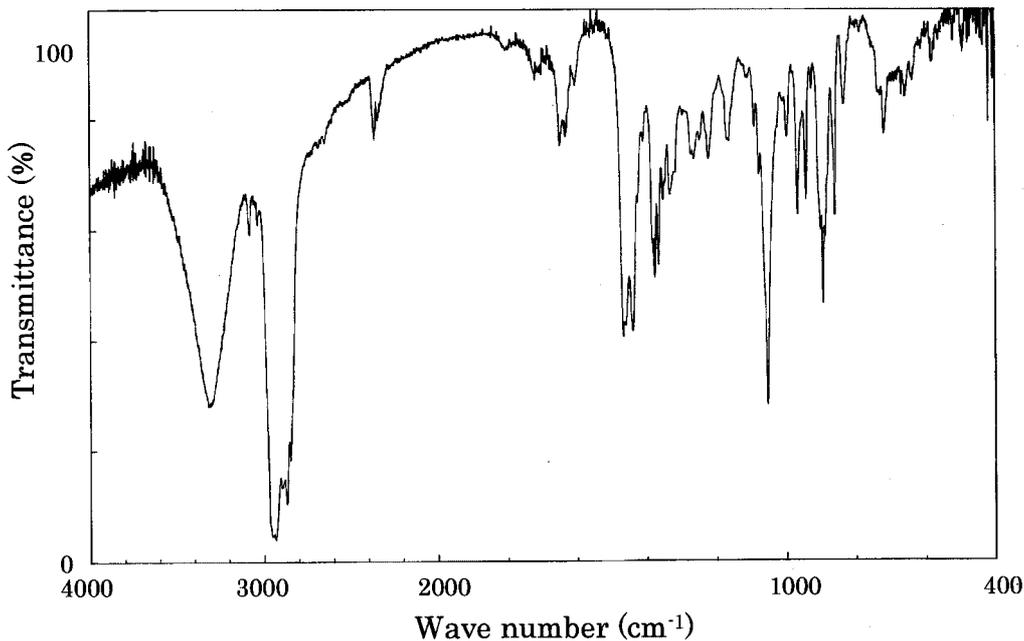


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

4) 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日局標準品のそれと比較するとき、同一波長のところに同様の強度の吸収を認めた。

5) 旋光度

標準品原料の比旋光度  $[\alpha]_D^{20}$  は  $+105.1 \pm 1.04$  (n = 3) (0.1 g, エタノール, 20 ml) であった。

6) TLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品について得られた薄層クロマトムをFig.3に示す。標準品原料及び日局標準品ともスポット量 50  $\mu\text{g}$  以上で1個の微量異種スポットを検出した。また、本品によるコレカルシフェロールの検出限界は紫外線照射下で0.06  $\mu\text{g}$ 、濃硫酸噴霧のもので0.1  $\mu\text{g}$

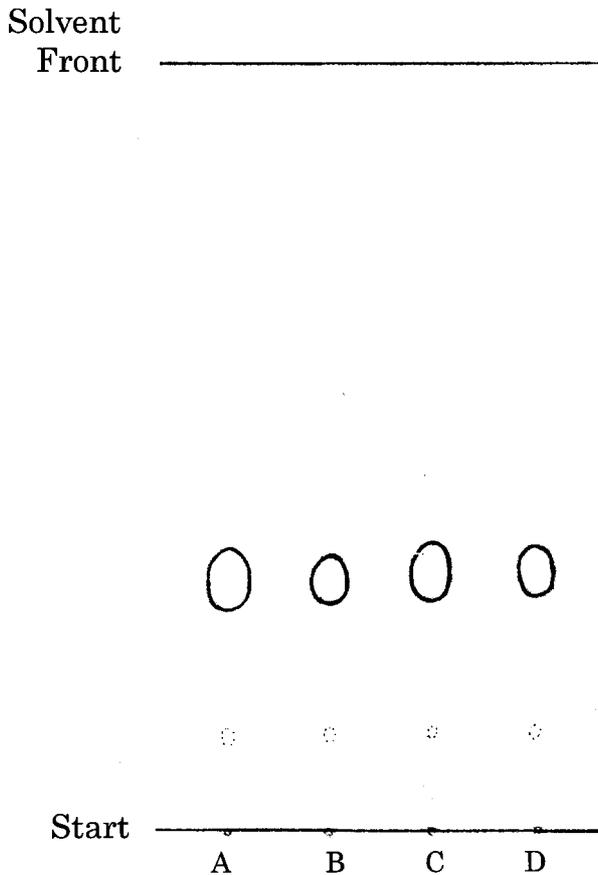


Fig.3 Thin-layer chromatogram of Cholecalciferol  
Spot : A and B are 100 and 50  $\mu\text{g}$  of Cholecalciferol Reference Standard (Control 003)  
C and D are 100 and 50  $\mu\text{g}$  of the raw material

であった。

7) HPLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られたクロマトグラムをFig.4に示す。標準品原料で3~4個、日局標準品で4個の微量の不純物ピークが観察された。面積百分率法での不純物ピークの総和は、標準品原料で0.04  $\pm$  0.01 % (n = 3), 日局標準品で0.03  $\pm$  0.01 % (n = 2) と推定された。

結 論

コレカルシフェロール標準品原料につき、日局標準品 (Control 003) 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はなく、標準品原料の純度は99.5%以上であることを確認した。この結果から、国立医薬品食品衛生研究所標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有するものと認定し、Control 031として製造・配布を開始した。

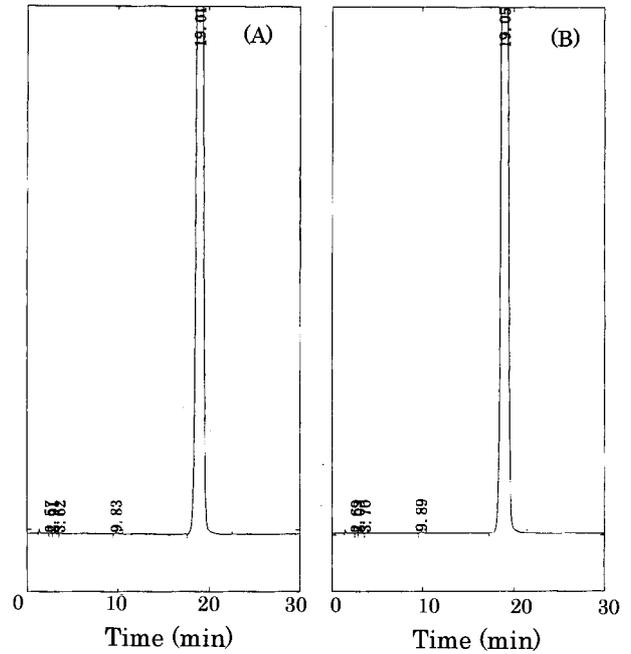


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Cholecalciferol Reference Standard (Control 003) (B)

文 献

1) Iwata, M., Koide, T., Maekawa, K., Saito, H. and Tanimoto, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 107-109 (2001)