

基原とすることから [4], 品質管理の観点でこれらを鑑別することは必要不可欠である. 一方で, どちらも類似の外観を有し, 特に, 刻みや粉末状態では, 両者の鑑別は困難である.

そこで本研究では, 酸棗仁の確認試験の新たな指標成分の探索及びインドナツメに対する純度試験のための指標成分の探索を目的に, 中国産及びミャンマー産のサンソウニンについて, 塩基配列解析により基原種を同定した上で, 両者の抽出液を LC-MS 及び TLC で分析し, 各々の特異的成分の同定を行った.

B. 研究方法

1. 実験材料

1-1. 生薬

中国産サンソウニン: 1995~2012 年に入手した 11 検体を使用した. ミャンマー産サンソウニン: 1993 及び 2011 年に入手した 5 検体を使用した. それぞれの詳細を Table 1 に示す.

1-2. 試薬

Jujuboside A (Lot. 00010525-723) は, ChromaDex 社より購入した. Oleanolic acid (Lot. TLL2332) は, 和光純薬工業株式会社より購入した. Spinosin (Lot. 213104) は, Apin Chemicals 社より購入した. LC-MS, TLC 及び成分分画に使用した各種溶媒類は, 研究用グレードのものを使用した.

2. 一般操作

LC-MS 分析は, LC-20A HPLC system (ポンプ, LC-20AD; デガッサ, DGU-20A₃; オートサンブラ, SIL-20AC_{HT}; カラムオープン, CTO-20A; PDA 検出器, SPD-M20A; Shimadzu, Japan) に, MS 検出器, LCMS-2020 (Shimadzu, Japan) を接続して使用

した. GC-MS 分析は, GC-2010 system (Shimadzu, Japan) に, MS 検出器, GC-MS-QP 2010 (Shimadzu, Japan) を接続して使用した. ¹H, ¹³C-NMR は, JEOL ECA-800 (Jeol, Japan) で測定し, ケミカルシフトは, TMS からの δ (ppm) 値で表した. 高分解能質量分析は, LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Japan) を用いて行った. 粉碎機は, MM-300 (Qiagen, Germany) あるいは, TI-200 (Irie-Shokai, Japan) を, 振盪機は, SR-2w (Taitec, Japan) を, 遠心分離機は, KUBOTA 6900 (Kubota, Japan) を用いた.

3 塩基配列解析

各検体, 1 粒 (約 30-50 mg) を液体窒素により凍結させ, MM-300 を用いて, 粉碎した後, Maxwell 16 DNA Purification Kit (Promega, USA) を用いて, genomic DNA を調製した. このものを鋳型に用いて, 植物の rDNA 領域に保存性の高い配列に設計したプライマー対により PCR を行い, 目的の遺伝子領域 (5.8S rDNA-ITS2-26S rDNA) を含む DNA 断片を増幅した. PCR 産物を精製した後, ダイレクトシーケンスにより, 塩基配列を決定した. 塩基配列解析は, Fasmac 社 (Japan) の受託解析により行われた.

4. LC-MS による分析

4-1. 試料の調製

中国産試料 (C-1~C-11) 及びミャンマー産試料 (B-1~B-4) を, ボールミル, MM-300 を用い 20 Hz, 1 min の条件で粉碎した. その粉末 1 g を正確に量り取り, メタノール 30 mL を加え, 20 分間振盪抽出し, 8,000 × g で 10 分間遠心分離し, 上澄み液を分取した. 残渣にメタノール 15 mL を加え, 同様の操作を行い, 上澄み液を分取した. 全上澄み液を合わせ, メタノールで正確に 50 mL に調整し, それを試料溶液とした.

4-2. LC-MS の分析条件

4-2-1. 中国産サンソウニン特異的成分の分析 (条件 A)

以下に示す条件で LC-MS 分析した。分析中、試料溶液を 4°C で保存した。

カラム: reversed-phase Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, GL Sciences, Japan)

移動相: 0.1% HCOOH 水溶液/アセトニトリル = 65/35

流速: 0.2 mL/min

カラム温度: 40°C

注入量: 1 μL

分析時間: 20 min

PDA 検出器 (190~800 nm; モニター波長 190 nm)

MS 検出器

イオン化法: ESI positive/negative mode

ネブライザーガス流量: 1.5 L/min

ドライイングガス流量: 10 L/min

DL 温度: 250 °C

ヒートブロック温度: 200 °C

検出器電圧: 120 kV

インターフェイス電圧: 4.5 kV/-4.5 kV

インターフェイス電流: 0.6 μA

DL 電圧: 0 V

4-2-2. ミャンマー産サンソウニン特異的成分の分析 (条件 B)

以下に示す条件を除き、条件 4-2-1 と同様に行った。

移動相: 0.1% HCOOH 水溶液/アセトニトリル = 77/23

4-2-3. Spinosin (3) の分析(条件 C)

以下に示す条件を除き、条件 4-2-1 と同様に行

った。

移動相: 0.1% HCOOH 水溶液/アセトニトリル = 85/15

PDA 検出器 (190~800 nm; モニター波長 254 nm)

5. 抽出分離

5-1. Franguloline (2) の単離

ミャンマー産生薬 (B-5; 100 g) を、ボールミル、TI-200 を用い、20 Hz, 1 min の条件で粉碎した。その粉末に MeOH (3 L) を加え室温下 24 時間抽出し、それを 2 回繰り返した。得られたエキスを減圧下濃縮乾固し、抽出物 (Myn31; 9.7 g) を得た。それに酢酸エチル (300 mL) を加えて濾過し、可溶部 (Myn31-S; 3.7 g) 及び不溶部 (Myn31-IS; 4.4 g) に分画した。可溶部の一部 (0.4 g) を酢酸エチル (5 mL) に溶解させ SNAP KP-Sil Samplet (3 g) (Biotage; Sweden) に付して SNAP Ultra カラム (25 g) に装着後、Isolera Dalton (Biotage) を用いて *n*-hexane-EtOAc (4:1→0:1) で溶出し、4 つの画分 [fr. S(1)-1; 314 mg, fr. S(1)-2; 25.6 mg, fr. S(1)-3; 7.5 mg, fr. S(1)-4; 5.2 mg] を得た。Fr. S(1)-4 (5.2 mg) に *n*-hexane/EtOAc=2:1 (3 mL) を加え、その懸濁物をシリカゲルカラム (φ 1×4 cm) に付し、*n*-hexane-EtOAc (2:1→0:1) で溶出し、2 つの画分 [fr. S(1)-4-1; 2.4 mg, fr. S(2)-4-3; 2.5 mg] とともに、franguloline (2) (fr. S(1)-4-2; 0.4 mg) を得た。

Franguloline (2) [5, 6]: White amorphous. HRTOFMS m/z 535.3279 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{31}H_{42}N_4O_4$, 535.3297) 1H -NMR (800 MHz, $CDCl_3$): see Table 2. ^{13}C -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): see Table 2.

5-2. Oleanolic acid (4) の単離

5-1 で得た酢酸エチル可溶部 (Myn31-S; 3.7 g) の一部 (1.4 g) を酢酸エチル (15 mL) に溶解さ

せ, SNAP KP-Sil Samplet (10 g) に付し, SNAP Ultra カラム (50 g) に装着した. Isolera Dalton を用いて *n*-hexane-EtOAc (2:1→0:1) で溶出し, 2 つの画分 [fr. S(2)-1; 1.3 g, fr. S(2)-2; 63.4 mg] を得た. Fr. S(2)-2 (63.4 mg) を酢酸エチル (3 mL) に溶解させ, KP-SIL (1 g) に付し, SNAP Ultra カラム(10 g) に装着した. Isolera Dalton を用いて *n*-hexane-EtOAc (1:1→0:1) で溶出し, 4 つの画分 [fr. S(2)-2-1; 37.2 mg, fr. S(2)-2-2; 2.7 mg, fr. S(2)-2-3; 6.2 mg, fr. S(2)-2-4; 4.7 mg] を得た.

一方, 残りの酢酸エチル可溶部 (Myn31-S; 1.6 g) を酢酸エチル (20 mL) に溶解させ, KP-SIL (10 g) に付し, SNAP Ultra カラム(30 g) に装着した. Isolera Dalton を用いて *n*-hexane-EtOAc (2:1→0:1) で溶出し, 3 つの画分 [fr. S(3)-1; 1.4 g, fr. S(3)-A; 12.5 mg, fr. S(3)-B; 34.6 mg] を得た.

類似の TLC パターンを示した fr. S(2)-2-2 (2.7 mg) と fr. S(3)-A (12.6 mg) を合わせて fr. C (15.3 mg) とした. これを CHCl₃ (4 mL) に溶解させ, シリカゲルカラム (ϕ 2.5 × 5 cm) に付し, CHCl₃ で溶出させて, 4 つの画分 [fr. C-1; 1.5 mg, fr. C-2; 1.9 mg, C-3; 5.7 mg, C-4; 2.0 mg] とともに oleanolic acid (3) (fr. C-5; 2.5 mg) を得た.

Oleanolic acid (4) [7]: White amorphous. ¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): δ_{H} 5.27 (1H, *dd*, *J*=4.0, 3.2 Hz, H-12), 3.21 (1H, *dd*, *J*=11.2, 4.0 Hz, H-3), 1.12, 1.07, 0.97, 0.92, 0.90, 0.76, 0.74 (3H, *s*, CH₃×7). ¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_{C} 182.9 (C-28), 143.7 (C-13), 122.7 (C-12), 79.1 (C-3), 55.3 (C-5), 47.7 (C-9), 46.6 (C-17), 45.9 (C-19), 41.7 (C-14), 41.1 (C-18), 39.3 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.1 (C-10), 33.9 (C-21), 33.2 (C-7), 32.7 (C-22), 32.5 (C-29), 30.8 (C-20), 28.2 (C-2), 27.8 (C-23), 27.3 (C-15), 26.0 (C-27), 23.7 (C-16), 23.5 (C-30), 23.0 (C-11), 18.4

(C-6), 17.2 (C-26), 15.6 (C-24), 15.4 (C-25).

6. GC-MS による分析

Razborssek MI *et al* (2008)の方法を改変して行った [8].

6-1. TMS 誘導体化

4-1 で調製した試料溶液を 500 μ L 取り, 溶媒を除去した後 *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA, 100 μ L), ピリジン(50 μ L)を加え, 70°C で 30 分間反応させた. 反応後 tetrahydrofuran (THF)で 1 mL に調整し, これを分析用試料とした.

6-2. GC-MS 分析

カラム: DB-5 (30 m×0.25 mmI.D., 0.25 μ m film thickness)

キャリアガス: ヘリウム

流速: 0.9 mL/min

昇温条件: 105 °C (0.8 min), 12 °C/min to 200 °C (0.1 min), 7 °C/min to 290 °C (6 min), 25 °C/min to 320 °C (10 min).

インジェクション温度: 290 °C

注入モード: スプリットレス

注入量: 2 μ L

インターフェース温度: 290 °C

イオン化電圧: 70 eV

C. 結果及び考察

中国産及びミャンマー産のサンソウニンの基原種を特定するため, Table 1 に示した各試料より, genomic DNA を調製し, PCR により, 核 rDNA の ITS 領域を含む DNA 断片を増幅した後, 塩基配列解析を行った. その結果, 中国産 11 検体は, ほぼ同じ配列を示し, いずれの検体も全長 184 bp だった. ただし, 2 箇所 (Aligned

positions: 88, 94) で、2 種の塩基が重なっている部位を認めた。Blast search program による相同性検索の結果、国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank; INSD) 中の *Z. jujuba* の配列 (Acc. nos.: GQ434736, DQ146572, JF421556, GQ434737 etc.) と上述の多形部位を除き、完全に一致した。ミャンマー産の 4 検体も、互いにほぼ同じ配列を示し、いずれの検体も全長 181 bp だった。ただし、3 箇所 (Aligned positions: 69, 75, 109) で、2 種の塩基が重なっている部位を認めた。相同性検索の結果、*Z. mauritiana* の配列 (Acc. nos.: KC155274, JQ627047-50, DQ146589 etc.) と多形部位を除き、完全に一致した。上記の結果から、中国産は、サネブトナツメ、ミャンマー産は、インドナツメを基原としていることが確認された。

サネブトナツメ及びインドナツメに各々の特異的成分が含まれているかを確認するため、Table 1 に示した生薬計 8 検体 (C-5, 7, 10, 11; B-1, 2, 3, 4) のメタノールエキスをそれぞれ調製し、条件 A~C で LC-MS 分析した (Figs. 1~3)。その結果、Fig. 1 において、サネブトナツメに保持時間 8.5 分付近のピークが認められ、インドナツメにはそのピークが認められなかったことから、これがサネブトナツメに特異的なピークであることが明らかとなった。また、保持時間 15 分付近のピークは、インドナツメにも若干認められたため、これは非特異的な成分であった。Fig. 2 において、インドナツメに保持時間 11 分付近のピークが認められ、そのピークがサネブトナツメには認められなかったことから、これがインドナツメに特異的なものであることが明らかとなった。一方、Fig. 3 の LC-MS 分析より、第十六改正日本薬局方 (JP16) 収載の指標成分である spinosin (3) は、両者に含まれていた。そのため、3 よりも、サネブト

ナツメに特異的な 1 の方が確認試験の新たな指標成分として適当と思われる。

そこで、まずサネブトナツメに特異的なピークを同定するため、高分解能質量分析を検討した。その結果、 m/z 1251.5957 を与え、これは既知化合物である jujuboside A (1) のギ酸付加体と推定された。そこで、1 の標品を LC-MS で分析した結果、試料由来のピークと保持時間及びマススペクトルが一致した (Figs. 4~5) ことから、サネブトナツメに特異的な成分を、jujuboside A と同定した。

次に、インドナツメに対する純度試験のための指標成分の探索を目的に、特異ピークを指標とした成分分画を行った。インドナツメの種子 (100 g) をメタノールで室温抽出し、得られたエキスの酢酸エチル可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで繰り返し分離し、 m/z 535 $[M+H]^+$ の疑似分子イオンピークを示す化合物 2 を得た。高分解能質量分析より、2 は m/z 535.3279 $[M+H]^+$ を示したことから、 $C_{31}H_{42}N_4O_4$ の分子式を持つ化合物であることが推定された。既に、インドナツメからシクロペプチドアルカロイドの単離が報告されており [9]、高分解能質量分析で得た分子量から、本化合物も類似の構造をもつものと推測した。NMR において、2 は、酸棗仁より単離の報告がある franguloline (2) と同じスペクトルを示したが、C-1, -16 のケミカルシフトはそれぞれ 123.1 ppm, 115.5 ppm と帰属されていた (Fig. 4, Table 2) [5, 6]。 1H - 1H COSY より、6.35 (H-1) は 6.67 (H-2) と、7.12 (H-16) は 7.03 (H-15) と相関が認められ、HMBC より、6.35 (H-1) は 131.9 (C-13) 及び 130.4 (C-15) と相関が認められたことから (Fig. 6)、2 の C-1, -16 のケミカルシフトをそれぞれ 115.6 ppm, 123.2 ppm と帰属した。同定した 2 が酸棗仁のインドナツメに対する純度試験の指標成分として適しているかどうかを確かめるため、インドナツメのエキスに

含まれる2をTLCで検出できるか試みた。しかし、2の含量は低く、また、鋭敏な検出試薬が見出されなかったため、TLC上での検出は困難だった。

そこで、サネブトナツメ及びインドナツメをより簡便に鑑別するため、TLC上で各エキスに特徴的なスポットがあるのか検討した。その結果、展開溶媒を *n*-hexane:EtOAc:HCOOH = 10:5:1 とし、順相のTLCで分析したところ、インドナツメにおいて、*R_f* 値 0.43 付近に赤紫色から黒紫色に変わるスポットを確認した (Fig. 7)。そこで、この成分を同定するため、同スポットを指標に、上記と同様の操作で成分分画を行った。単離した化合物のNMRを測定した結果、¹H-NMRにおいて、 δ 5.27 ppmにオレフィンプロトンが、 δ 3.21 ppmにヒドロキシメチンプロトンが、 δ 1.12, 1.07, 0.97, 0.92, 0.90, 0.76, 0.74 ppmに7本のメチルプロトンが認められた。¹³C-NMRにおいて、30本のシグナルが認められ、 δ 182.9 ppmにカルボン酸由来のカルボニル炭素が認められたことから、このものを oleanolic acid と推定し、そのNMRが文献値と一致し、標品のTLC及びNMRも一致したことから、同成分を oleanolic acid (4) と同定した[7] (Fig. 4)。

同定した4がインドナツメに特異的なのかを確かめるため、それぞれのメタノールエキスをGC-MSで分析した(Fig. 8)。その結果、インドナツメのエキスより、4の標品と保持時間及びマススペクトルが一致するピークを検出した。一方、同じ分析において、サネブトナツメのエキスからは、4は、検出されなかった (LOD, 2.8 μ g; Fig. 9)。以上のことから、4はインドナツメに特異的であることが明らかとなった。

D. 結論

酸棗仁の確認試験の指標成分及びインドナツメに対する純度試験の指標成分を探索した。その

結果、サネブトナツメに特異的な成分として、jujuboside A (1)を、インドナツメに特異的な成分として、franguloline (2)及びoleanolic acid (4)を同定した。4は、種固有の成分ではないものの、2と異なり、エキスのTLC分析で検出可能、且つサネブトナツメに対して特徴的なスポット並びにGC-MSにおいて特異的なピークを有することから、サネブトナツメ及びインドナツメの2種類の生薬を比較する場合に限り、4をインドナツメに対する純度試験の指標成分とすることが妥当と考える。

E. 参考文献

1. Jiang JG, Huang XJ, Chen J, Lin QS (2007) Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen *Ziziphus jujube*. *Nat Prod, Res* 21(4):310–320
2. Wang LE, Bai YJ, Shi XR, Cui XY, Cui SY, Zhang F, Zhang QY, Zhao YY, Zhang YH (2008) Spinosin, a C-glycosides flavonoid from semen *Ziziphi Spinozae*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 90(3):399–403
3. Crude Drugs committee of Japan Kampo Medicines Manufacturers Association ed., “The 2nd report on consumption of raw materials for crude drug in 2009 and 2010 fiscal years”, Tokyo, p. 4 (2013).
4. Personal communication from Dr. H. Yamaji in Tsumura Co. and Dr. Y. Yamamoto.
5. Tschesche R, Last F (1968) Rhamnaceae alkaloids. V. Franganine and franguloline, two additional peptide alkaloids from *Rhamnus*

frangula. Tetrahedron Lett 25: 2993–2998

6. Han BH, Han YN, Park MH, Park JI, Park MK (1990) Cyclopeptide alkaloid from Sanjoin. Saenghwahak Nyusu 10 (4): 239–245
7. Liu HB, Zheng XD, Jian YF, Liu JX, Zhu JH (2011) Constituents of the root of *Anemone tomentosa*. Arch Pharm Res 34(7):1097–1105
8. Razborssek MI, Voncina DB, Dolecek V, Voncina E (2008) Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in *Lamiaceae* and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. Chromatographia 67: 433–440
9. Panseeta P, Lomchoey K, Prabpai S, Kongsaree P, Suksamrarn A, Ruchirawat S, Suksamrarn (2011) Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of *Ziziphus mauritiana*. Phytochemistry 72:909–915

F. 研究発表

1. 学会発表

大嶋直浩, 在間一将, 鎌倉浩之, 丸山卓郎, 合田幸広, 濱戸茜, 山本豊, 姜東孝, 横倉胤夫, ミャンマー産サンソウニン (酸棗仁) の特異的成分の同定について, 日本薬学会第 134 回年会 (2014 年 3 月, 熊本)

2. 論文発表

Kumeta Y., Maruyama T. Asama H., Yamamoto Y., Hakamatsuka T., Goda Y., Species identification of *Asini Corii Collas* (donkey glue) by PCR amplification of cytochrome b gene, *J. Nat. Med.*, **68**, 181-185 (2014).

G. 知的所有権の取得状況

特になし

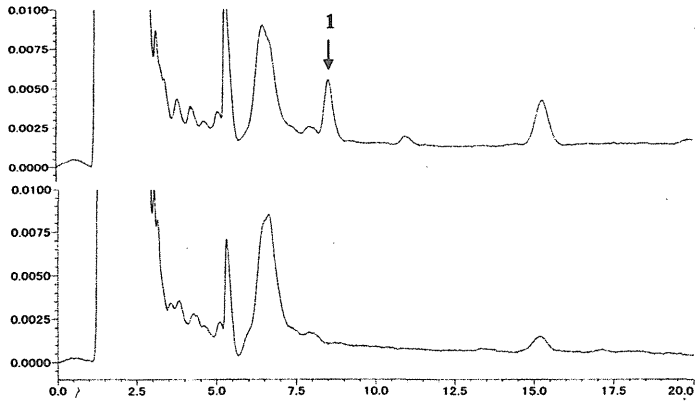


Fig. 1 中国産酸棗仁(左)及びミャンマー産酸棗仁(右)の LC-MS 分析(条件 A).

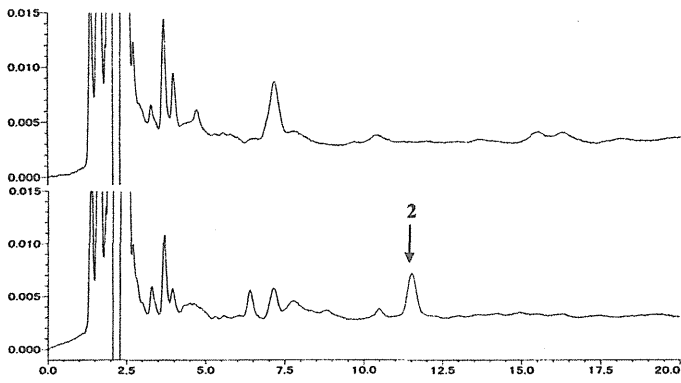


Fig. 2 中国産酸棗仁(左)及びミャンマー産酸棗仁(右)の LC-MS 分析(条件 B).

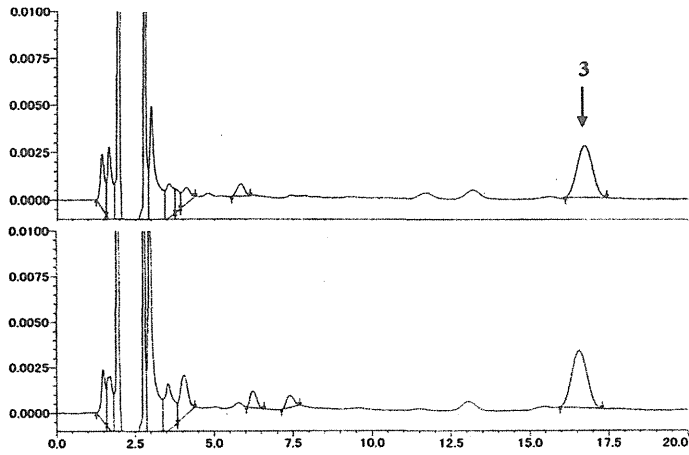


Fig. 3 中国産酸棗仁(上)及びミャンマー産酸棗仁(下)の LC-MS 分析(条件 C).

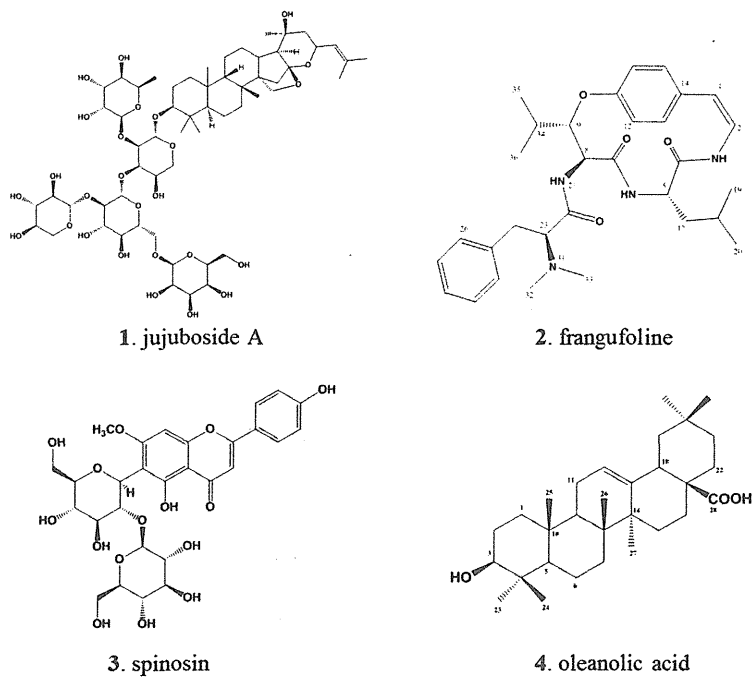


Fig. 4 化合物 1~4 の構造式.

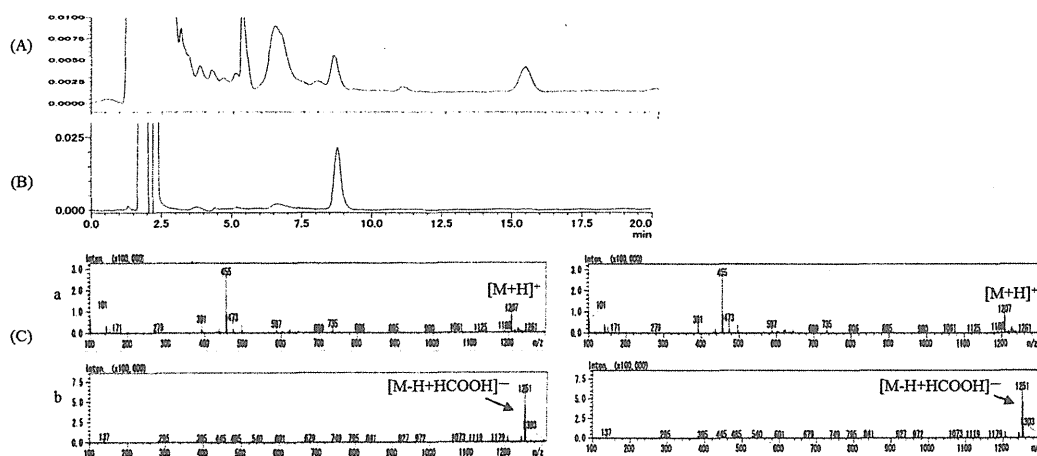


Fig. 5 中国産酸棗仁メタノールエキス(A)及び jujuboside A (標品) (B)の LC-MS 分析(条件 A) 並びにそのマススペクトル(C) (left; MeOH extract, right; standard sample)

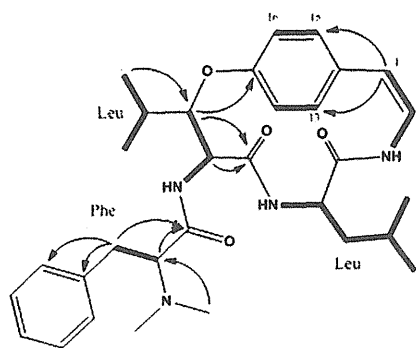


Fig. 6 Frangufoline (2)の COSY 相関(bold), key HMBC 相関(arrows)

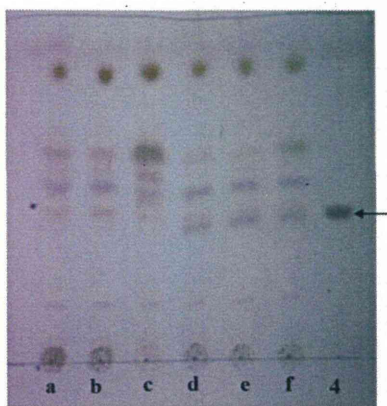


Fig. 7 サネブトナツメ(a~c), インドナツメ(d~f)及び化合物 4 の TLC
 展開溶媒: *n*-hexane:EtOAc:HCOOH=10:5:1
 Lanes a to f are C-5, -7, -11, B-2, -3, -4, respectively.

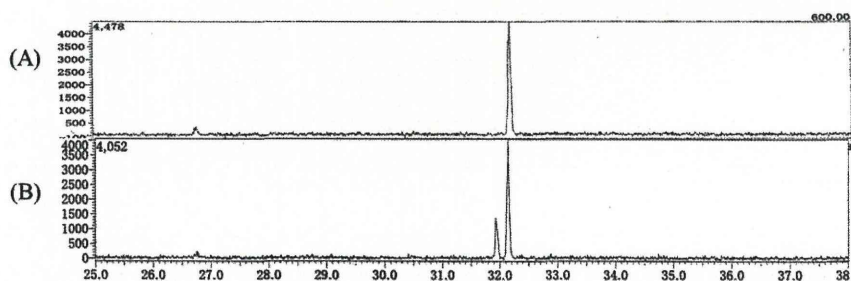


Fig. 8 Mass chromatograms at *m/z* 600 of methanol extracts from *Z. jujuba* (A) and *Z. mauritiana* (B) on GC-MS analysis.

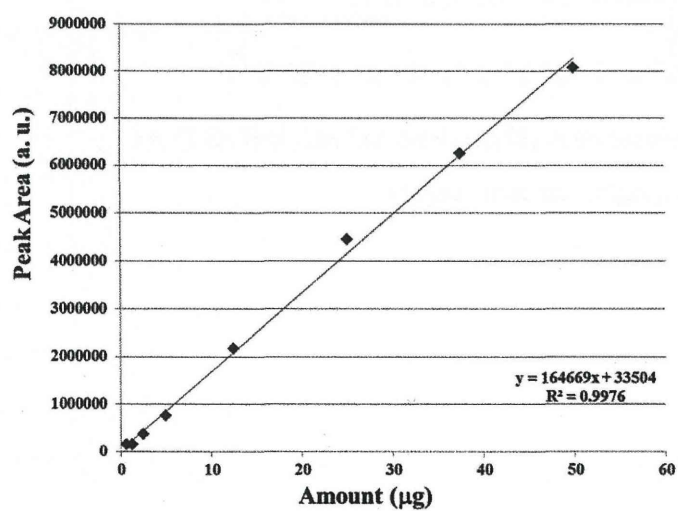


Fig. 9 Calibration curve for quantitative determination of 4 on GC-MS analysis

Table 1 酸棗仁及びその類似生薬の入手年月日及び産地

検体 No.	入手年月	産地
C-1	2012年12月	中国河北
C-2	2011年12月	中国河北
C-3	2010年11月	中国河北
C-4	2009年12月	中国河北
C-5	2009年8月	中国陝西
C-6	2008年12月	中国河北
C-7	2007年12月	中国河北
C-8	2006年11月	中国河北
C-9	1999年9月	中国河北
C-10	1997年9月	中国河北
C-11	1995年6月	中国河北
B-1	1993年3月	ミャンマー
B-2	2011年1月	ミャンマー
B-3	2011年3月	ミャンマー
B-4	2011年1月	ミャンマー
B-5	2011年3月	ミャンマー

Table 2. NMR data for **2** (CDCl₃)

position	δ_{H}		δ_{C}	
	2 (800 MHz)	ref. [6] (80 MHz)	2 (200 MHz)	ref. [6] (200 MHz)
1	6.35 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	6.35 (7.6)	115.6 ^f	123.1
2	6.66 (1H, <i>dd-like</i> , <i>J</i> =9.6, 8.0 Hz)	6.67 (10.2, 7.6)	125.7	125.9
3-NH	6.45 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9.6 Hz)	6.46 (10.2)	—	—
4	—	—	167.5	167.8
5	4.02 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =7.2, 4.0, 3.2 Hz)	4.03 (7.6, 3.6)	52.7	52.7
6-NH	5.67 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)	5.67 (7.6)	—	—
7	—	—	171.8	171.5
8	4.49 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =9.6, 6.4 Hz)	4.50 (10.3, 7.2)	55.3	55.4
9	5.00 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.4 Hz)	5.01 (7.2, 1.7)	81.7	81.9
11	—	—	156	156.2
12	7.19 ^a (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.0, 2.0 Hz)	7.06, 7.12	123	122.8
13	7.06 ^b (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	7.06, 7.12	131.9 ^e	131.8
14	—	—	132.0 ^e	132
15	7.03 ^b (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	7.06, 7.12	130.4	130.3
16	7.12 ^a (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.0, 2.0 Hz)	7.06, 7.12	123.2 ^f	115.5
17 α	1.32-1.14 (overlapped)	1.20 (11.4, 3.6)	39.1	39.4
17 β	1.68 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =11.2, 4.0, 3.2 Hz)	1.69 (11.4)	39.1	39.4
18	1.08 (1H, <i>m</i>)	1.11 (6.6)	24.5	24.5
19	0.64 ^c (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.4 Hz)	0.61 (6.5)	23.3	23.1
20	0.59 ^c (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.4 Hz)	0.65 (6.6)	20.5	20.6
21-NH	7.89 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9.6 Hz)	7.88 (10.3)	—	—
22	—	—	172.7	172.7
23	3.20-3.18 (overlapped)	3.2 (8.2)	70.5	70.6
24 α	2.84 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =16.0, 8.8 Hz)	2.85 (15.8, 8.2)	30.6	30.9
24 β	3.20-3.18 (overlapped)	3.2 (15.8)	30.6	30.9
25	—	—	140.5	140.4
26	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	129.1	128.8
27	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	128.6	129
28	7.17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =7.2, 6.6 Hz)	7.2	126.3	126.2
29	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	128.6	129
30	7.27-7.23 (overlapped)	7.2	129.1	128.8
32	2.24 (6H, <i>s</i>)	2.25	42.0	41.9
33	2.24 (6H, <i>s</i>)	2.25	42.0	41.9
34	1.92 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =7.2, 6.4, 1.6 Hz)	1.9 (6.8, 6.7, 1.7)	29.4	29.4
35	1.00 ^d (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)	1.02 (6.7)	20.5	20.4
36	1.28 ^d (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.2 Hz)	1.29 (6.8)	15.1	15.1

^{a-e}: interchangeable, ^f: 2D-NMR により決定した.

医薬品添加剤の試験法及び各条規格の改正に関する研究

研究分担者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

研究要旨 ①医薬品各条の国際調和が進められているアルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンについて、国際調和にあたっての問題点を考察した。②乳糖水和物の純度試験(1)澄明性試験を欧州薬局方から提供された試料について試験し、試験法の再現性を確認した。

研究協力者

宮崎玉樹（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
主任研究官）

A. 研究目的

医薬品添加剤は人体に対する作用が緩和ないしは無害であるという特徴とともに、医薬品製剤の必須の構成成分として、薬物療法におけるコンプライアンスや、有効成分の体内送達を確保するという重要な役割を全面的に担っている。医薬品添加剤は、全世界で多くの医薬品に共通に使われ、流通が極めて国際的であるため、先進諸国の薬局方に添加剤の品質に関する情報を規格として収載する意義は極めて大きく、国際調和が強く望まれている。現在、日本薬局方(日局)、欧州薬局方(EP)、米国薬局方(USP)の3局の間で、60余りの添加剤について調和作業が続けられている。局方間の考え方の相違から調和が膠着することや、添加剤メーカーが国内にないため調和テキストの日局各条への取り込みの際に問題が生ずる場合があり、調和の障害になる。本研究においては、調和の妨げになると思われる問題点を抽出し、解決策を提案することを目的として、調査研究、実験を行う。今年度は国際調和品目として候補に挙げられているアルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンについて検討を行う。また、昨年度に引き続き乳糖水和物の澄明性試験の試料溶解方法について検討を行い、昨年度提案した溶解方法を欧州医薬品庁から提供された試料について適用し、その有用性を確認した。

B. 研究方法

1) アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンの国際調和

アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンについて3局の医薬品各条を比較した。また、アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンの製造メーカーのWebページを検索し、製法、用途等の情報を収集した。

2) 乳糖水和物の純度試験(1)澄明性試験に関する検討
試料

EPより提供された6種類の乳糖水和物(表1)を用いた。

表1 EPから提供された乳糖水和物

Code #	Supplier batch
52241	10710657
52242	10704842
52243	10694287
52244	10687583
52245	10715608
52246	10699092

方法

溶解方法-1

本品1gを20mLの三角フラスコにとり、沸騰した水10mLを加えて溶かし、試料溶液とした。

溶解方法-2

本品1gを20mLの三角フラスコにとり、水10mLを加え、30分間攪拌して溶かし、試料溶液とした(攪拌子長さ約15mm 中央部の太さ約5mm 回転速度600rpm)。

観察方法

液層が約40mmになるよう内径約15mmの比色管に濁りの比較液I、試料溶液を加えた。黒色の背景を用い、蛍光灯の光を照射し、濁りの比較液Iと試料溶液の濁度を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は化学実験のみを行い、倫理面への配慮の必要はないと考えられる。

C. 研究結果

1) アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンの国際調和

国際調和の候補品目であるアルファー化デンプンは日本では医薬品添加物規格(薬添規)にアルファー化デンプン(資料 1)と部分アルファー化デンプン(資料 2)が収載されている。アルファー化デンプンは「コムギデンプン(日局)、トウモロコシデンプン(日局)又はバレイショデンプン(日局)を水と共に加熱してアルファー化したものを急速に乾燥したもの」と定義されている。部分アルファー化デンプンは「トウモロコシデンプン(日局)を水と共に常圧下又は加圧下で加熱して、デンプン粒を部分的にアルファー化したものを乾燥したもの」と定義されている。一方、EP (Starch, pregelatinized, 資料 3)および USP (Pregelatinized starch, 資料 4)においては1つの各条として収載されており、アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンを包含する定義となっている。アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンを包含する1つの各条とするか、別々の各条にするかによって、国際調和後の行政的対応の必要性が大きく異なると思われる。

アルファー化デンプンはバレイショデンプン由来のものの場合、アルファー化度が70-80%のものは崩壊剤、90%以上のものは結合剤として使用される。それに対して部分アルファー化デンプンは滑沢特性を有しながら、結合剤、崩壊剤、増量剤、流動補助剤の機能を有し、水に弱い薬物の安定化等の機能も有している。これらの機能はアルファー化度を精度よくコントロールすることによって実現するものと思われる。Web 検索でヒットした医薬品用の部分アルファー化デンプンは国内、海外の製品ともにトウモロコシデンプンを原料としており、アルファー化デンプンはバレイショデンプンやトウモロコシデンプンなど複数の基原デンプンから製造される。機能や用途が異なり、基原にも差があることから、アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンを区別できる試験法があるのであれば、科学的には別の各条にすべきと考える。軽質無水ケイ酸(日局)と含水二酸化ケイ素(薬添規)の国際調和に関する議論

において、軽質無水ケイ酸と含水二酸化ケイ素は技術的観点からは異なる性質をもち、異なる用途で使用されるので異なる各条にすべきであるとEPが主張している。アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンに関しても、このEPの主張が適用されるべきと考える。

アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンは偏光下の鏡検によって識別できる可能性を、平成24年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンの識別に関する研究において報告している。すなわち、入手できた医薬品用部分アルファー化デンプンにおいては複屈折による光の透過やへそで交叉する黒い十字が見られる粒子と偏光下では複屈折性を示さず、光の透過やへそで交叉する黒い十字が見られない粒子が混在する(図1)。入手できた医薬品用のアルファー化デンプンにおいては偏光下での観察において複屈折による光の透過が認められる粒子はほとんどない。したがって、偏光下の鏡検によって両者の識別が可能であると考えられた。

アルファー化デンプン各条の Coordinate Pharmacopeia は日局であるので、別々の各条にする方向で調和文書案等の作成が進むと思われるが、EP、USPの賛同が得られるかどうかは本品目の国際調和の進捗を決めるものと考えられる。

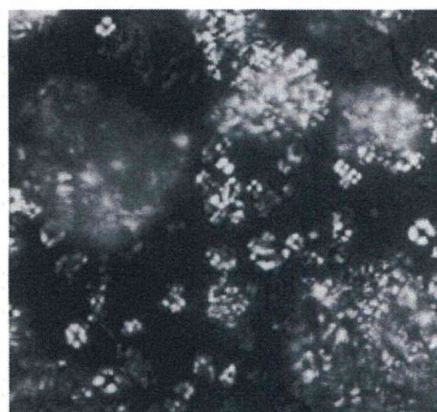


図1 部分アルファー化デンプンの偏光顕微鏡写真(10×)

<http://www.dfepharma.jp/ja-jp/excipients/starch/partly-pregelatinised-maize-starch.aspx#tab-download> より転載)

表2 試料を沸騰した水に溶解(溶解方法-1)したときの澄明性試験結果

Code #	判定								
	day1			day2			day3		
	観察者1	観察者2	観察者3	観察者1	観察者2	観察者3	観察者1	観察者2	観察者3
52241	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52242	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52243	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52244	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52245	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52246	適	適	適	適	適	適	適	適	適

表3 室温で30分間攪拌して試料を溶解(溶解方法-2)したときの澄明性試験結果

Code #	判定								
	day1			day2			day3		
	観察者1	観察者2	観察者3	観察者1	観察者2	観察者3	観察者1	観察者2	観察者3
52241	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52242	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52243	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52244	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52245	適	適	適	適	適	適	適	適	適
52246	適	適	適	適	適	適	適	適	適

適: 標準液 I の濁りより澄明

2) 乳糖水和物の純度試験(1)澄明性試験に関する検討

昨年度の検討の結果、「本品 1g を 20mL の三角フラスコにとり、沸騰水 10mL を速やかに加え溶解する。溶解後、直ちに濁度標準液 I と比較することにより、ばらつきの少ない試験結果が得られることを明らかにした。本年度は EP より提供された乳糖水和物の試料について試験を行い、本溶解方法が適用可能かを検討するとともに、新たな溶解方法として室温で 30 分間攪拌する方法についても検討した。実験日を変え、3 人の観察者で試験を行った結果、表 2 および 3 に示すように、溶解方法によらず、いずれの試料溶液もその濁度は濁りの比較液 I 以下であり、試験に適合した。また、今回、EP より提供された乳糖水和物について、日本医薬品添加剤協会においても同様に試験を行い、全ての検体について、規格に適合することを確認した。実験室間のばらつきも少ないことが示唆された。

D. 考察

1) アルファー化デンプンと部分アルファー化デンプンの国際調和

アルファー化デンプン、部分アルファー化デンプンの医薬品各条の国際調和を進めるにあたっての問題点を考察した。これまでも複数のタイプの製品がある医薬品添加剤の国際調和が行われており、黄色ワセリンと白色ワセリンや軽質無水ケイ酸と含水二酸化ケイ素のように別々の各条

として調和する場合や、ヒプロメロースやデンプングリコール酸ナトリウムのようにファミリーモノグラフとして1つの各条として調和する場合がある。いずれの場合にも個々の品目に対する定義が3薬局方で同じであった。アルファー化デンプン、部分アルファー化デンプンは日局と EP、USP との間で定義が異なるため、調和するためには日局または EP、USP の定義の変更が必要になるため、困難を伴うものと考えられる。また、医薬品用として流通するすべての部分アルファー化デンプンとアルファー化デンプンが、偏光下の鏡検によって識別できるかについての調査研究も必要であると考えられる。

2) 乳糖水和物の純度試験(1)澄明性試験に関する検討

乳糖水和物の純度試験(1)澄明性試験について、実験室間で再現性のある結果を得ることが

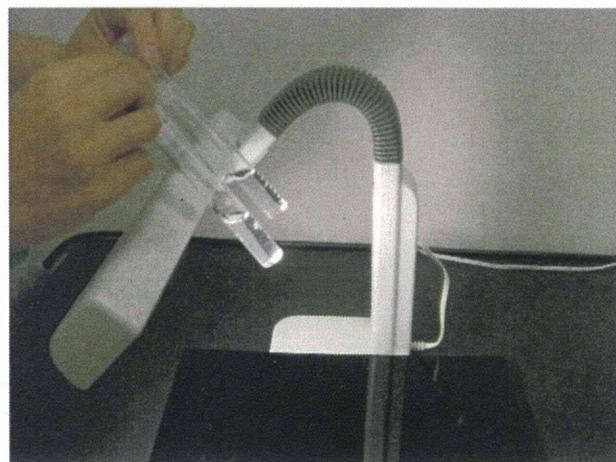


図 2 澄明性試験の目視の方法

できた。溶解方法を統一することや判定の際の目視の方法(図2)を統一したことにより、実験室間で再現性のある結果が得られたものと考えられる。しかし、判定基準に近い濁度をもつ試料については、実験室間で適否判定に差が生ずる可能性は否定できないため、室間再現性については更に検討する必要があると思われる。

E. 結論

医薬品各条の国際調和が進められているアルファ化デンプンと部分アルファ化デンプンについて、交際調和にあたっての問題点を考察した。

乳糖水和物の澄明性試験における溶解方法として、本品1gを20mLの三角フラスコにとり、沸騰水10mLを速やかに加え溶解することにより、再現性のある試験結果を得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

資料1

90 アルファー化デンプン

100418

アルファー化デンプン

Pregelatinized Starch

本品はコムギデンプン（日局）、トウモロコシデンプン（日局）又はバレイショデンプン（日局）を水と共に加熱してアルファー化したものを急速に乾燥したものである。

性状 本品は白色～微黄白色の粉末又は粒で、におい及び味はない。

本品を鏡検するとき、多孔性の透明～やや不透明な不定形又は粒状である。

本品に水を加えるとき、膨潤し、粘稠なおり状の液となる。

本品はエタノール(95)に溶けない。

確認試験

(1) 本品1gに水50mLを加え、よくかき混ぜるとき、混濁したおり状の液となる。

(2) (1)で得たおり状の液にヨウ素試液1滴を加えるとき、液は濃青色～青紫色を呈する。

純度試験

(1) 酸又はアルカリ 本品4.0gに水160mLを加え、よくかき混ぜて均一なおり状の液とした液のpHは4.0～7.0である。

(2) 重金属 本品1.0gに硫酸マグネシウム七水和物溶液(1→4)2mLを加え、水浴上で蒸発乾固した後、弱く加熱して炭化する。冷後、硫酸1mLを加え、注意して加熱した後、550～600℃で強熱し、灰化する。炭化物が残るときは、少量の硫酸で潤し、この操作を繰り返す。冷後、塩酸2mLを加え、水浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸3滴で潤し、熱湯10mLを加えて2分間加温する。

次にフェノールフタレイン試液1滴を加え、アンモニア試液を液が微赤色となるまで滴加し、希酢酸2mLを加え、必要ならばろ過し、水10mLで洗い、ろ液及び洗液をネスラー管に入れ、水を加えて50mLとする。これを検液とし、試験を行う。比較液は硫酸マグネシウム七水和物溶液(1→4)2mLに硫酸1mL及び塩酸2mLを加え、水浴上で蒸発し、更に砂浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸3滴で潤し、以下検液の調製法と同様に操作し、鉛標準液2.0mL及び水を加えて50mLとする(20ppm以下)。

(3) ヒ素 本品1.0gをとり、第3法により検液を調製し、装置Bを用いる方法により試験を行う。ただし硝酸マグネシウム六水和物のエタノール(95)溶液(1→10)は10mLとし、また希塩酸10mLを加え、水浴上で加温して溶かす。

標準色：本品の代わりにヒ素標準液2.0mLをとり、同様に操作する(2ppm以下)。

(4) 亜硫酸 本品20gをとり、硫酸ナトリウム十水和物溶液(1→2)200mLを加え、振り混ぜた後、ろ過する。ろ液100mLにデンプン試液3mLを加え、0.01mol/Lヨウ素液で持続する青色を呈するまで滴定するとき、その量は、0.5mL以下である(0.003%以下)。

(5) 酸化性物質 本品5.0gに希エタノール20mLを加え、更に酢酸(31)1mLを加えてかき混ぜ、均質な懸濁液とする。この液に、新たに製した飽和ヨウ化カリウム液0.5mLを加えてかき混ぜ、5分間放置するとき、液は青色、褐色又は紫色を呈しない。

108906

部分アルファ化デンプン

Partly Pregelatinized Starch

本品はトウモロコシデンプン（日局）を水と共に常圧下又は加圧下で加熱して、でんぷん粒を部分的にアルファ化したものを乾燥したものである。

性状 本品は白色～帯黄白色の粉末で、におい及び味はない。

本品を鏡検するとき、球形又は多角形の単粒からなり、しばしば互いに集まって複粒となっている。

本品に水を加えるとき、膨潤し、白濁した液となる。

本品はエタノール(95)にほとんど溶けない。

確認試験

- (1) 本品 1g に水 50 mL を加え、よくかき混ぜるとき、白濁した液となる。
- (2) (1) で得た液にヨウ素試液 1～2 滴を加えるとき、液は紫色～赤紫色を呈する。
- (3) (1) で得た液を煮沸し、放冷するとき、混濁したのり状の液となる。

純度試験

- (1) 酸又はアルカリ 確認試験(1)で得た液の pH は 4.0～7.0 である。
- (2) 重金属 本品 1.0g に硫酸マグネシウム七水和物溶液(1→4) 2 mL を加え、水浴上で蒸発乾固した後、弱く加熱して炭化する。冷後、硫酸 1 mL を加え、注意して加熱した後、550～600℃で強熱し、灰化する。炭化物が残るときは、硫酸少量で潤し、この操作を繰り返す。冷後、塩酸 2 mL を加え、水浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸 3 滴で潤し、熱湯 10 mL を加えて 2 分間加温する。次にフェノールフタレイン試液 1 滴を加え、アンモニア試液を液が微赤色となるまで滴加し、希酢酸 2 mL を加え、必要ならばろ過し、水 10 mL で洗い、ろ液及び洗液を合わせ、ネスラー管に入れ、水を加えて 50 mL とする。これを検液とし、試験を行う。比較液は硫酸マグネシウム七水和物溶液(1→4) 2 mL、硫酸 1 mL 及び塩酸 2 mL を加え、水浴上で蒸発し、更に砂浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸 3 滴で潤し、以下検液の調製法と同様に操作し、鉛標準液 2.0 mL 及び水を加えて 50 mL とする (20 ppm 以下)。
- (3) ヒ素 本品 1.0g をとり、第 4 法により検液を調製し、装置 B を用いる方法により試験を行う (2 ppm 以下)。
- (4) 亜硫酸 本品 20g をとり、硫酸ナトリウム十水和物溶液(1→5) 200 mL を加え、振り混ぜた後、ろ過する。ろ液 100 mL にデンプン試液 3 mL を加え、0.01 mol/L ヨウ素液で持続する青色を呈するまで滴定するとき、その量は 0.5 mL 以下である (0.003% 以下)。
- (5) 酸化性物質 本品 5.0g に希エタノール 20 mL を加え、更に酢酸(3I) 1 mL を加えてかき混ぜ、均質な懸濁液とする。この液に、新たに製した飽和ヨウ化カリウム液 0.5 mL を加えてかき混ぜ、5 分間放置するとき、液は青色、褐色又は紫色を呈しない。

乾燥減量 13% 以下 (1g, 105℃, 3時間)。

強熱残分 0.5% 以下 (2g)。

Limit:

- impurity A: maximum 0.1 per cent.

Oxidising substances (2.5.30): maximum 20 ppm, calculated as H₂O₂.

Use a mixture of equal volumes of *methanol R* and *water R* as solvent.

Sulfur dioxide (2.5.29): maximum 50 ppm.

Iron (2.4.9)

- For pregelatinised hydroxypropyl starch obtained from maize, potato, cassava or rice: maximum 20 ppm.
Dissolve the residue obtained in the test for sulfated ash in 20 mL of *dilute hydrochloric acid R* and filter. The filtrate complies with the test for iron.
- For pregelatinised hydroxypropyl starch obtained from pea: maximum 50 ppm.
Dissolve the residue obtained in the test for sulfated ash in 50 mL of *dilute hydrochloric acid R* and filter. The filtrate complies with the test for iron.

Loss on drying (2.2.32) determined on 1.000 g by drying in an oven at 130 °C for 90 min:

- maximum 15.0 per cent for pregelatinised hydroxypropyl starch obtained from maize, cassava, rice or pea;
- maximum 20.0 per cent for pregelatinised hydroxypropyl starch obtained from potato.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.6 per cent, determined on 1.0 g.

Microbial contamination

TAMC: acceptance criterion 10³ CFU/g (2.6.12).

TYMC: acceptance criterion 10² CFU/g (2.6.12).

Absence of *Escherichia coli* (2.6.13).

Absence of *Salmonella* (2.6.13).

ASSAY

Nuclear magnetic resonance spectrometry (2.2.33).

Internal standard solution. Disperse 50.0 mg of 3-trimethylsilyl-1-propanesulfonic acid sodium salt CRS in about 5 g of *deuterium oxide R1*, weighed to the nearest 0.1 mg. Store in a sealed bottle.

Test solution. Dry 5.000 g of the substance to be examined at 130 °C for 90 min. Weigh 12.0 mg of the dried substance in a 5 mm NMR tube. Add 0.1 mL of *deuterium chloride solution R* and 0.75 mL of *deuterium oxide R1*. Cap the tube, mix, and place it in a boiling water-bath until a clear solution is obtained (3 min to maximum 1 h). When a clear solution is obtained, allow to cool to room temperature. Dry the exterior of the tube and weigh to the nearest 0.1 mg. Add 0.05 mL of the internal standard solution and weigh to the nearest 0.1 mg. Determine the mass of the internal standard solution introduced. Mix thoroughly.

Apparatus: FT-NMR spectrometer operating at minimum 300 MHz.

Acquisition of ¹H NMR spectra. The following parameters may be used:

- sweep width: 8 ppm (– 1.0 to + 7 ppm);
- irradiation frequency offset: none;
- time domain: at least 64 K;
- pulse width: 90°;
- pulse delay: 10 s;
- dummy scans: 0;
- number of scans: 8.

Use the CH₃ signal of the internal standard for shift referencing. The shift of the singlet is set to 0 ppm.

Record the FID signal.

Call the integration sub-routine after phase corrections and baseline correction between – 0.5 ppm and + 6 ppm.

Measure the peak areas of the doublet from the methyl groups of the hydroxypropyl function at + 1.2 ppm (A₂), and of the methyl groups at 0 ppm of the internal standard (A₁) without ¹³C-satellites.

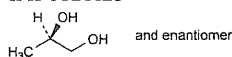
Results: measure the signal coming from the 3 protons of the methyl group in the hydroxypropyl function; calculate the percentage content of hydroxypropyl groups using the following expression:

$$\frac{3A_2}{A_1} \times \frac{P}{100} \times \frac{W_1 \times m_1}{218} \times 59 \times \frac{100}{m}$$

- 3 = numerical value representing the 3 methyl groups in the internal standard;
- A₁ = area of the methyl groups in the internal standard;
- A₂ = area of the methyl groups of hydroxypropyl;
- P = percentage content of 3-trimethylsilyl-1-propanesulfonic acid sodium salt CRS;
- W₁ = mass fraction of the internal standard in the internal standard solution, in milligrams per gram;
- m₁ = mass of the internal standard solution in the NMR tube, in grams;
- 218 = molar mass of the internal standard, in grams per mole;
- 59 = molar mass of the hydroxypropyl group, in grams per mole;
- m = mass of the substance to be examined in the NMR tube, in milligrams.

LABELLING

The label states the botanical source of the starch and the type of modification.

IMPURITIES

- A. (2R)-propane-1,2-diol (propylene glycol).

01/2010:1267

STARCH, PREGELATINISED**Amylum pregelificatum****DEFINITION**

Pregelatinised starch is prepared from *Maize starch (0344)*, *Potato starch (0355)* or *Rice starch (0349)* by mechanical processing in the presence of water, with or without heat, to rupture all or part of the starch granules, and subsequent drying. It contains no added substances but it may be modified to render it compressible and to improve its flow characteristics.

CHARACTERS

Appearance: white or yellowish-white powder.
It swells in cold water.

IDENTIFICATION

- A. Examined under a microscope using a mixture of equal volumes of *glycerol R* and *water R* it presents irregular, translucent, white or yellowish-white flakes or pieces with an uneven surface. Under polarised light (between crossed nicol prisms), starch granules with a distinct black cross intersecting at the hilum may be seen.
- B. Disperse 0.5 g in 2 mL of *water R* without heating and add 0.05 mL of *iodine solution R1*. A reddish-violet or blue colour is produced.

TESTS

pH (2.2.3): 4.5 to 7.0.

Progressively add 3.0 g to 100.0 mL of *carbon dioxide-free water R*, stirring continuously. Determine the pH when a homogeneous solution is obtained.

Oxidising substances (2.5.30). It complies with the test for oxidising substances. Use a mixture of equal volumes of *methanol R* and *water R* as solvent.

Sulfur dioxide (2.5.29): maximum 50 ppm.

Iron (2.4.9): maximum 20 ppm.

Dissolve the residue obtained in the test for sulfated ash in 20 mL of *dilute hydrochloric acid R*. Filter. The filtrate complies with the test.

Foreign matter. Examined under a microscope using a mixture of equal volumes of *glycerol R* and *water R*, not more than traces of matter other than starch granules are present.

Loss on drying (2.2.32): maximum 15.0 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 130 °C for 90 min.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.6 per cent, determined on 1.0 g.

Microbial contamination

TAMC: acceptance criterion 10³ CFU/g (2.6.12).

TYMC: acceptance criterion 10² CFU/g (2.6.12).

Absence of *Escherichia coli* (2.6.13).

Absence of *Salmonella* (2.6.13).

LABELLING

The label states the type of starch used as starting material.

FUNCTIONALITY-RELATED CHARACTERISTICS

This section provides information on characteristics that are recognised as being relevant control parameters for one or more functions of the substance when used as an excipient (see chapter 5.15). This section is a non-mandatory part of the monograph and it is not necessary to verify the characteristics to demonstrate compliance. Control of these characteristics can however contribute to the quality of a medicinal product by improving the consistency of the manufacturing process and the performance of the medicinal product during use. Where control methods are cited, they are recognised as being suitable for the purpose, but other methods can also be used. Wherever results for a particular characteristic are reported, the control method must be indicated.

The following characteristics may be relevant for pregelatinised starch used as filler, binder or disintegrant in tablets and in hard capsules.

Cold-water-soluble matter. Transfer 100 mL of *water R* at 25 ± 1 °C into a beaker and add 1.000-3.000 g of the substance to be examined while stirring. Continue to stir for 10 min. Transfer 35 mL of the dispersion to a centrifuge tube and centrifuge at 3000 g for 15 min. Transfer 25 mL of the supernatant to a crucible that has previously been dried in an oven at 120 ± 2 °C for 4 h and weighed to the nearest 0.1 mg. Evaporate to dryness on a water-bath, then place the crucible in an oven at 120 ± 2 °C for 4 h. Allow to cool in a desiccator. Weigh the crucible to the nearest 0.1 mg again.

Determine the percentage of cold-water-soluble matter using the following expression:

$$\frac{(B - A) \times \frac{100}{25} \times 100}{S \times \frac{100 - C}{100}}$$

A = initial crucible mass, in grams;

B = final crucible mass, in grams;

C = loss on drying, in per cent;

S = sample mass, in grams.

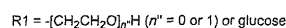
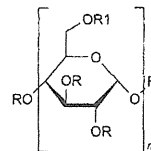
Particle-size distribution (2.9.31 or 2.9.38).

Powder flow (2.9.36).

01/2011:1785

STARCHES, HYDROXYETHYL

Amyla hydroxyethyla



$[C_6H_{10}O_5(C_2H_4O)_x]_n$ with x = molar substitution [9005-27-0]

DEFINITION

Hydroxyethyl starches are partially substituted poly(2-hydroxyethyl)ethers of waxy maize starch or potato starch, which primarily consist of amylopectine. The type of hydroxyethyl starch is defined by 2 numbers: the mean molecular weight (M_w) and the number of hydroxyethyl groups per anhydroglucose unit expressed as the molar substitution (MS). Hydroxyethyl starch is also characterised by the number of hydroxyethyl groups located at the C2 group over the number of hydroxyethyl groups located at C6, expressed as the C2/C6 ratio. The parameters M_w , MS and C2/C6 ratio are determined by the reaction conditions of the production.

PRODUCTION

Hydroxyethyl starches are produced from waxy maize starch or potato starch by acidic hydrolysis and reaction with ethylene oxide and purified by ultrafiltration.

CHARACTERS

Appearance: white or almost white powder.

Solubility: freely soluble in water and in dimethyl sulfoxide, practically insoluble in anhydrous ethanol.

Hydroxyethyl starches are hygroscopic until they reach a water content of about 12 per cent to 15 per cent.

IDENTIFICATION

First identification: A, C.

Second identification: B, C.

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: medium M_w hydroxyethyl starch CRS.

Results: the spectrum obtained shows the same absorption bands as the spectrum obtained with medium M_w hydroxyethyl starch CRS. Due to the difference in the substitution of the substance, the intensity of some absorption bands can vary.

B. To 5 mL of solution S (see Tests), add 0.1 mL of 0.05 M iodine. A reddish-brown or blue-violet colour appears.

C. Molecular weight (see Tests).

TESTS

Solution S. Dissolve 5.0 g of the substance to be examined (dried substance) in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 100.0 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is not more opalescent than reference suspension II (2.2.1).

- **pH (791)**
Sample solution: Progressively suspend 3.0 g of Pregelatinized Hydroxypropyl Potato Starch in 100.0 mL of carbon dioxide-free water, stirring continuously. Determine the pH when all the solid is wetted.
Acceptance criteria: 4.5–8.0
- **Loss on Drying (731):** Dry about 1 g at 130° for 90 min; it loses NMT 20.0% of its weight.

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed containers. Store at room temperature.
- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**
 USP Propylene Glycol RS

Pregelatinized Starch**DEFINITION**

Pregelatinized Starch is Starch that has been chemically and/or mechanically processed to rupture all or part of the granules in the presence of water and subsequently dried. Some types of Pregelatinized Starch may be modified to render them compressible and flowable in character.

IDENTIFICATION

- A water slurry of it is colored orange-red to deep blue by iodine TS.

IMPURITIES**Inorganic Impurities**

- **RESIDUE ON IGNITION (281):** NMT 0.5%, determined on a 2.0-g test specimen
- **IRON (241):** NMT 20 ppm
Analysis: Dissolve the residue obtained in the test for *Residue on Ignition* in 8 mL of hydrochloric acid with the aid of gentle heating, and dilute with water to 100 mL. Dilute 25 mL of this solution with water to 47 mL.
- **LIMIT OF SULFUR DIOXIDE**
Sample solution: Mix 20 g with 200 mL of a 1-in-5 solution of anhydrous sodium sulfate, and filter.
Analysis: To 100 mL of the clear filtrate add 3 mL of starch TS, and titrate with 0.01 N iodine VS to the first permanent blue color.
Acceptance criteria: NMT 2.7 mL is consumed (80 ppm).

SPECIFIC TESTS

- **MICROBIAL ENUMERATION TESTS (61) and TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS (62):** It meets the requirements of the tests for absence of *Salmonella* species and *Escherichia coli*. The total aerobic microbial count does not exceed 1000 cfu/g; and the total combined molds and yeasts count does not exceed 100 cfu/g.
- **pH (791):** 4.5–7.0
 Prepare a slurry by weighing 10.0 ± 0.1 g in 10 mL of alcohol and by diluting with water to 100 mL. Agitate continuously at a moderate rate for 5 min, then cease agitation and immediately potentiometrically determine the pH to the nearest 0.1 unit.
- **Loss on Drying (731):** Dry a sample at 120° for 4 h; it loses NMT 14.0% of its weight.
- **OXIDIZING SUBSTANCES**
Sample: 5 g
Analysis: To the *Sample* add 20 mL of a mixture of equal volumes of methanol and water, then add 1 mL of 6 N acetic acid, and stir until a homogeneous suspension is obtained. Add 0.5 mL of a freshly prepared, saturated solution of potassium iodide, and allow to stand for 5 min.
Acceptance criteria: No distinct blue, brown, or purple color is observed.

ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed containers. No storage requirements specified.
- **LABELING:** Label it to indicate the botanical source from which it was derived.

Pregelatinized Modified Starch**DEFINITION**

Pregelatinized Modified Starch is Modified Starch that has been chemically or mechanically processed, or both, to rupture all or part of the granules to produce a product that swells in cold water.

IDENTIFICATION

- **A.**
Sample: 0.6 g
Analysis: Transfer the *Sample* to a 25-mL glass vial with a plastic cap. Add 9.4 g of water, cap, and shake vigorously to evenly disperse the starch. Add 10 g of 2% (w/w) NaOH solution, cap, and shake vigorously for 1 min to create a smooth mixture. Evaluate within 1 min.
Acceptance criteria: The final solution is translucent to opaque with a fluid consistency. A yellow tint of the final solution is acceptable.
- **B.** An aqueous dispersion of Pregelatinized Modified Starch is colored orange-red to deep blue by iodine TS.

IMPURITIES

- **RESIDUE ON IGNITION (281)**
Sample: 2.0 ± 0.1 g
Acceptance criteria: NMT 1.5%
- **LIMIT OF SULFUR DIOXIDE**
Sample solution: Mix 20.0 ± 0.1 g of Pregelatinized Modified Starch with 100 mL of 95% alcohol, and stir for several min to completely wet the starch.
Analysis: Slowly add 100 mL of water to the *Sample solution*, and stir until a smooth suspension is obtained. Allow the starch mixture to set undisturbed until most of the starch has settled, and filter the aqueous portion through paper (Whatman No. 1 or equivalent). To 100 mL of the clear filtrate add 100 mL of water. Add 3 mL of starch TS, and titrate with 0.01 N iodine VS to the first permanent blue or purple color.
Acceptance criteria: NMT 1.7 mL of 0.010 N iodine is consumed (NMT 0.005%).

SPECIFIC TESTS

- **pH (791)**
Sample: 10.0 ± 0.1 g
Analysis: Wet the *Sample* with 10 mL of alcohol, then dilute with water to 300 mL to obtain an aqueous dispersion. Stir continuously at a moderate rate for 5 min, and determine the pH to the nearest 0.1 unit.
Acceptance criteria: 3.0–9.0
- **Loss on Drying (731)**
Analysis: Dry at 120° for 4 h.
Acceptance criteria: NMT 15%
- **MICROBIAL ENUMERATION TESTS (61) and TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS (62):** The total aerobic microbial count does not exceed 1 × 10³ cfu/g, and the total combined molds and yeasts count does not exceed 1 × 10² cfu/g. It meets the requirements of the tests for absence of *Salmonella* species and *Escherichia coli*.
- **IRON (241)**
Sample: The residue obtained in the test for *Residue on Ignition (281)*
Analysis: Dissolve the *Sample* in 8 mL of hydrochloric acid with the aid of gentle heating. Dilute with water to 100 mL in a volumetric flask. Dilute 25 mL of this solution with water to 47 ± 1 mL.