

無水乳糖 (改正 4)  
ステージ 4 案 (CP: EP)

ブリーフィングノート

1. 本改正は、簡略改正により改正 3 が 2008 年 6 月に合意署名されたため、「改正 4」と呼ぶこととする。

2. 溶状

溶解した液は試験の前に放冷することを規定した。液の澄明性及び色調をより客観的に評価するために、比較液を導入した。

3. 酸又はアルカリ

2008 年 6 月に合意署名された簡略改正 (改正 3) に含まれている変更を取り込んでいる。

4.  $\alpha$ -及び $\beta$ -乳糖

実験研究の結果 (添付) に基づき、誘導体の調製法を最適化し、コールドオンカラム注入法の代替として、古典的な注入口の使用も選択できるようにした。実験研究では、コールドオンカラム注入法を使用することにより、再現性に優る結果が得られたが、精度は、本試験の目的から満足される範囲内であり、古典的な注入法も満足されるものであった。更に、JP からの意見に従い、注入用バイアルの大きさの記載は削除した。

本試験は EP の各条品目において、強制力のない FRC 項に記載することを、PDG に同意を求めたいと考えている。

5. 微生物限度

TYMC (総真菌数) の許容基準 :

JP は 50 CFU/g の限度値を提案している。非無菌製品の微生物限度試験の調和試験法を検討する段階で、微生物学者は許容基準を  $10^x$  で表示することに合意している。このような背景から、TYMC (総真菌数) を許容基準  $10^1$  として規定することを提案する。しかしながら、EP の専門家たちは、この許容基準は非常にきびしく、乳糖にとっては必要ないと考えている。この許容基準については、もっと後のステージで、公募意見に基づいて再考することを提案する。

サルモネラの試験 :

JP はサルモネラの試験を含めることを要請している。乳製品にサルモネラが存在する可能性は認めるが、意見公募の期間中に、現状の製造プロセスがこのリスクを除いているかどうかを確認するためにデータ収集を行うことを提案する。

したがって、本試験は意見公募の後で見直すことを条件として、ステージ 4 の提案に含めている。

**改正 4 のステージ 4 案**  
**無水乳糖**  
**ANHYDROUS LACTOSE**

本品は  $O$ - $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranose ( $\beta$ -乳糖) 又は  $O$ - $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranose ( $\beta$ -乳糖) と  $O$ - $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranose ( $\alpha$ -乳糖) の混合物である。

**溶状**

本品 1 g を熱湯 10 mL に溶かし、放冷するとき、液は澄明でほとんど無色である：この液の澄明性は水と同じか、又はこの液の濁度は比較乳濁液 I のそれ以下であり、更にこの液の色は色の比較液 BY<sub>7</sub> よりも濃くない。

この液につき、波長 400 nm における吸光度を測定し、吸光度の値をセルの層長 (cm) の値で除したとき、その値は 0.04 以下である。

**旋光度**

本品約 10 g を精密に量り、50 °C に加温した水 80 mL に溶かした後、放冷する。アンモニア試液 0.2 mL を加え、30 分間放置する。次に水で希釈して 100 mL とする：20 °C における、本品の換算した脱水物の量を用いて計算した旋光度は +54.4 ° ~ +55.9 ° である。

**酸又はアルカリ**

本品 6 g を新たに煮沸し冷却した水 25 mL に加熱して溶かし、冷後、フェノールフタレイン試液 0.3 mL を加えるとき、液は無色である。この液に液の色が無色から淡赤色又は赤色に変化するまで 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液を加えるとき、その量は 0.4 mL 以下である。

**乾燥減量**

80 °C で 2 時間乾燥する：減量はその質量の 0.5 % 以下である。

**強熱残分**

0.1 % 以下。強熱温度は 600 ± 50 °C とする。

**水分 - カールフィッシャー法**

1.0 % 以下。ただし、本品をメタノール/ホルムアミド混液 (2 : 1) に加えた系で測定する。

**たんぱく質及び光吸収物質**

本品の 1 w/v% 溶液につき、波長 210 ~ 300 nm における吸光度を測定する。吸光度の値をセルの層長 (cm) の値で除したとき、波長 210 ~ 220 nm においては 0.25 以下、270 ~ 300 nm においては 0.07 以下である。

**α及びβ異性体含量 (異性体比)**

ガスクロマトグラフィーで試験する。

試料溶液： 本品 10 mg をスクリーキャップ付き反応バイアルにとり、ジメチルスルホキシド/トリメチルシリルイミダゾール/ピリジン混液 (195 : 220 : 585) 4 mL を加え、室温で 20 分間超音波処理を行う。この液 400 μL を注入用バイアルにとり、ピリジン 1 mL を加え、密栓して振り混ぜる。

標準溶液： α-乳糖・β-乳糖混合物 (1 : 1) 10 mg をスクリーキャップ付きバイアルにとり、ジメチルスルホキシド/トリメチルシリルイミダゾール/ピリジン混液(195 : 220 : 585) 4 mL を加え、室温で 20 分間超音波処理を行う。この液 400 μL を注入用バイアルにとり、ピリジン 1 mL を加え、密栓して振り混ぜる。

プレカラム：

- 材質：中極性不活性フェーズドシリカ<sup>(1)</sup>
- サイズ：長さ 2 m, 直径 0.53 mm

カラム：

- 材質：フェーズドシリカ
- サイズ：長さ 15 m, 直径 0.25 mm
- 固定相：ガスクロマトグラフィー用 5 % フェニル-メチルシリコンポリマー (被覆膜厚 = 0.25 μm)<sup>(2)</sup>

キャリアーガス：ヘリウム

カラム圧力：70 kPa

温度：

—温度は次のようにプログラムする：

	時間 (分)	温度 (°C)
カラム	0 - 1	80
	1 - 3	80 - >150
	3 - 15.5	150 - >300
	15.5 - 17.5	300
注入口		275 又はコールドオンカラム注入
検出器		325

検出器：水素炎イオン化検出器

注入：0.5 μL, スプリットレス注入法又はコールドオンカラム注入法

<sup>(1)</sup> Restek Corp.社の Guard column が適当である。

<sup>(2)</sup> Varian 社の CP Sil 8 CB が適当である。

$\beta$ -乳糖 (保持時間=約 12 分) に対する相対保持時間:  $\alpha$ -乳糖=約 0.9

システム適合性: 標準溶液:

— 分離度:  $\alpha$ -乳糖と  $\beta$ -乳糖のピーク間が 3.0 以上

$\alpha$ -乳糖の含量 (%) を次式により計算する:

$$100S_a/(S_a + S_b)$$

$\beta$ -乳糖の含量 (%) を次式により計算する:

$$100S_b/(S_a + S_b)$$

$$S_a = \alpha\text{-乳糖のピーク面積}$$

$$S_b = \beta\text{-乳糖のピーク面積}$$

**微生物限度** (国際調和試験法) - TAMC (総好気性微生物数): 許容基準  $10^2$  CFU/g. TYMC (総真菌数): 許容基準  $10^1$  CFU/g. また大腸菌及びサルモネラは認めない.

## 試薬

### 硫酸ヒドラジニウム試液

硫酸ヒドラジニウム 1.0 g を水に溶かして 100.0 mL とし, 4 ~ 6 時間放置する.

### ヘキサメチレンテトラミン試液

ヘキサメチレンテトラミン 2.5 g を 100 mL の共栓三角フラスコに入れ, 25.0 mL の水を加えて溶かす.

### 乳濁原液 (ホルマジン乳濁原液)

調製した共栓三角フラスコ中のヘキサメチレンテトラミン試液に硫酸ヒドラジニウム試液 25.0 mL を加え, かき混ぜた後, 24 時間放置する. 本乳濁原液は表面に傷のないガラス容器中で 2 ヶ月間安定である. 本乳濁原液はガラスに付着してはならず, 使用前にはよく混合しなければならない.

### 標準乳濁液

乳濁原液 15.0 mL を水で薄めて 1000.0 mL とする. 用時製し, 24 時間以内に使用する.

### 比較乳濁液 I

標準乳濁液 5.0 mL をとり, 水 95.0 mL を加える. 使用前に混合し振り混ぜる.

### 黄色比較原液

塩化鉄(III) 六水和物 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 46 g に薄めた塩酸 (1→40) を加えて溶かし, 1000.0 mL とする. 滴定により含量を求め, 1 mL 中に塩化鉄(III) 六水和物 45.0 mg を含むように, 薄めた塩酸 (1→40) を加える. 遮光する.

滴定—この液 10 mL を正確に量り、250 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL、塩酸 5 mL 及びヨウ化カリウム 4 g を加え、密栓し、暗所に 15 分間放置し、水 100 mL を加える。デンプン溶液 0.5 mL を指示薬として加え、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム液を用いて滴定する。

$$0.1 \text{ mol/L チオ硫酸ナトリウム液 } 1 \text{ mL} = 27.03 \text{ mg } \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$$

#### 赤色比較原液

塩化コバルト(II)六水和物 ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 60 g に薄めた塩酸 (1→40) を加えて溶かし、1000.0 mL とする。滴定により含量を求め、1 mL 中に塩化コバルト(II)六水和物 59.5 mg を含むように、薄めた塩酸 (1→40) を加える。

滴定—この液 5 mL を正確に量り、250 mL の共栓三角フラスコに入れ、過酸化水素試液 5 mL 及び 300 g/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加える。10 分間穏かに煮沸し、冷後、希硫酸 60 mL 及びヨウ化カリウム 2 g を加える。密栓し、穏かに振とうして沈殿を溶かす。デンプン溶液 0.5 mL を指示薬として加え、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム液を用いて滴定する。滴定の終点では液の色は淡赤色を呈する。

$$0.1 \text{ mol/L チオ硫酸ナトリウム液 } 1 \text{ mL} = 23.79 \text{ mg } \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$$

#### 青色比較原液

硫酸銅(II)五水和物 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 63 g に薄めた塩酸 (1→40) を加えて溶かし、1000.0 mL とする。滴定により含量を求め、1 mL 中に硫酸銅(II)五水和物 62.4 mg を含むように、薄めた塩酸 (1→40) を加える。

滴定—この液 10 mL を正確に量り、250 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 50 mL、薄めた酢酸 (100) (3→25) 12 mL 及びヨウ化カリウム 3 g を加える。デンプン溶液 0.5 mL を指示薬として加え、0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム液を用いて滴定する。滴定の終点では液の色はごくうすい褐色を呈する。

$$0.1 \text{ mol/L チオ硫酸ナトリウム液 } 1 \text{ mL} = 24.97 \text{ mg } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$$

#### デンプン溶液

溶性デンプン 1.0 g を水 5 mL とすり混ぜ、これをヨウ化水銀(II) 10 mg を含む熱湯 100 mL 中にかき混ぜながら注ぎ込む。用時、感度試験を行う。  
感度試験。デンプン溶液 1 mL と水 20 mL の混液に、ヨウ化カリウム約 50 mg 及びヨウ素試液 0.05 mL を加える。液は青色を呈する。

#### BY (黄褐色) 比較液

黄色比較原液 2.4 mL、赤色比較原液 1.0 mL、青色比較原液 0.4 mL 及び薄めた希塩酸 (1→10) 6.2 mL を混和する。

#### 比較液 BY<sub>7</sub>

BY 比較液 2.5 mL 及び薄めた希塩酸 (1→10) 97.5 mL を混和する。