

9.41 試薬・試液

以下の試薬・試液を次のように改める。

ヘスペリジン、定量用 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ ヘスペリジン、薄層クロマトグラフィー用。ただし、以下の定量用1又は定量用2 (qNMR純度規定)の試験に適合するもの。なお、定量用1はデシケーター(シリカゲル)で24時間以上乾燥し用いる。定量用2は定量法で求めた含量で補正して用いる。

1) 定量用1

旋光度 (2.49) $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $-100 \sim -120^\circ$ (5 mg, メタノール, 50 mL, 100 mm)。ただし、デシケーター(シリカゲル)で24時間乾燥したもの。

純度試験 類縁物質 本品2 mgをメタノール10 mLに溶かし、試料溶液とする。この液1 mLを正確に量り、移動相を加えて正確に100 mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液10 μL ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、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するとき、溶媒ピーク的面積を除いた試料溶液のヘスペリジン以外のピークの合計面積は、標準溶液のヘスペリジンのピーク面積より大きくない。

試験条件

検出器：紫外吸光度計(測定波長：285 nm)
 カラム：内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。
 カラム温度：40℃付近の一定温度
 移動相：水／アセトニトリル／酢酸(100)混液(82：18：1)
 流量：毎分 1.0 mL
 面積測定範囲：ヘスペリジンの保持時間の約6倍の範囲
 システム適合性

検出の確認：標準溶液1 mLを正確に量り、移動相を加えて正確に20 mLとする。この液10 μL から得たヘスペリジンのピーク面積が、標準溶液10 μL から得たヘスペリジンのピーク面積の3.5 ～ 6.5%になることを確認する。

システムの性能：本品及び薄層クロマトグラフィー用ナリギン1 mgずつを薄めたメタノール(1→2)に溶かして100 mLとする。この液10 μL につき、上記の条件で操作するとき、ナリギン、ヘスペリジンの順に溶出し、その分離度は1.5以上である。

システムの再現性：標準溶液10 μL につき、上記の条件で試験を6回繰り返すとき、ヘスペリジンのピーク面積の相対標準偏差は1.5%以下である。

2) 定量用2 (qNMR 純度規定)

確認試験 本品につき、定量法を準用して ^1H NMRを測定する。別に以下に示すヘスペリジンの ^1H スピン情報から、測定に用いた装置の磁場の大きさと合わせ、ヘスペリジンの参照スペクトルを作成する。本品のスペクトルとヘスペリジンの参照スペクトルを比較するとき、同一の化学シフト(±0.05 ppm)に同様の多重度のシグナルを認め、各シグナルの面積強度比は同様である。ただし、化学シフト基準物質、核磁気共鳴スペクトル測定用重水素化ジメチルスルホキシド中

の残留プロトン又は残存した水に由来するシグナルと重なるシグナルを除く。なお、シグナルの半値幅が著しく異なる場合は、本品のスペクトル及びヘスペリジンの参照スペクトルに対して、ブロードニングファクターなどの窓関数を適用してもよい。

ヘスペリジンの ^1H スピン情報

化学シフト[核] (水素数)

δ 1.11182 ppm [A] (3H), δ 2.80136 ppm [B] (1H), δ 3.15711 ppm [C] (1H), δ 3.17565 ppm [D] (1H), δ 3.24400 ppm [E] (1H), δ 3.29629 ppm [F] (1H), δ 3.30644 ppm [G] (1H), δ 3.42110 ppm [H] (1H), δ 3.44899 ppm [I] (1H), δ 3.45467 ppm [J] (1H), δ 3.56471 ppm [K] (1H), δ 3.65522 ppm [L] (1H), δ 3.80242 ppm [M] (3H), δ 3.82225 ppm [N] (1H), δ 4.48433 ppm [O] (1H), δ 4.54744 ppm [P] (1H), δ 4.61724 ppm [Q] (1H), δ 4.69205 ppm [R] (1H), δ 5.00132 ppm [S] (1H), δ 5.17791 ppm [T] (1H), δ 5.19648 ppm [U] (1H), δ 5.40646 ppm [V] (1H), δ 5.53032 ppm [W] (1H), δ 6.14721 ppm [X] (1H), δ 6.16759 ppm [Y] (1H), δ 6.92979 ppm [Z] (1H), δ 6.96759 ppm [AA] (1H), δ 6.96854 ppm [AB] (1H), δ 9.10744 ppm [AC] (1H), δ 12.04673 ppm [AD] (1H).

スピンスピン結合定数 [相関核]

6.200 Hz [A-H], -17.135 Hz [B-G], 3.177 Hz [B-W], 8.840 Hz [C-F], 9.887 Hz [C-K], 5.440 Hz [C-U], 9.341 Hz [D-H], 9.361 Hz [D-J], 5.577 Hz [D-R], 9.067 Hz [E-F], 7.812 Hz [E-S], 5.212 Hz [E-V], 5.169 Hz [F-T], 12.288 Hz [G-W], 6.257 Hz [I-K], -11.338 Hz [I-N], 3.400 Hz [J-L], 6.126 Hz [J-O], 1.852 Hz [K-N], 1.604 Hz [L-P], 4.373 Hz [L-Q], -0.538 Hz [W-Z], -0.268 Hz [W-AA], 2.223 Hz [X-Y], 2.177 Hz [Z-AA], 8.351 Hz [Z-AB], 0.268 Hz [AA-AB].

ピークの単一性 本品1 mgをメタノール5 mLに溶かし、試料溶液とする。試料溶液10 μL につき、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、ヘスペリジンのピークの頂点及び頂点の前後でピーク高さの中点付近の2時点を含む少なくとも3時点以上でのピークの吸収スペクトルを比較するとき、スペクトルの形状に差がない。

試験条件

検出器：フォトダイオードアレイ検出器 (測定波長：285 nm, スペクトル測定範囲：220 ～ 400 nm)
 カラム：内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。
 カラム温度：40℃付近の一定温度
 移動相：水／アセトニトリル／酢酸(100)混液(82：18：1)

流量：毎分 1.0 mL

システム適合性

システムの性能：本品及び薄層クロマトグラフィー用ナリギン1 mgずつを薄めたメタノール(1→2)に溶かして100 mLとする。この液10 μL につき、上記の条件で操作するとき、ナリギン、ヘスペリジンの順に溶出し、その分離度は1.5以上である。

定量法 ウルトラマイクロ化学はかりを用い、本品5 mg及び核磁気共鳴スペクトル測定用DSS- d_6 1 mgをそれぞれ精密

に量り、核磁気共鳴スペクトル測定用重水素化ジメチルスルホキシド1 mLに溶かし、試料溶液とする。この液を外径5 mmのNMR試料管に入れ、核磁気共鳴スペクトル測定用DSS- d_6 をqNMR用基準物質として、次の試験条件で核磁気共鳴スペクトル測定法(〈2.21〉及び〈5.01〉)により、 ^1H NMRを測定する。qNMR用基準物質のシグナルを δ 0 ppmとし、 δ 6.16 ppm及び δ 6.93 ~ 6.97 ppm付近のそれぞれのシグナルの面積強度 A_1 (水素数2に相当)及び A_2 (水素数3に相当)を算出する。

ヘスペリジン($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$)の量(%)

$$= M_S \times I \times P / (M \times N) \times 2.7214$$

M : 本品の秤取量(mg)

M_S : 核磁気共鳴スペクトル測定用DSS- d_6 の秤取量(mg)

I : 核磁気共鳴スペクトル測定用DSS- d_6 のシグナルの面積強度を9.000としたときの各シグナルの面積強度 A_1 及び A_2 の和

N : A_1 及び A_2 に由来する各シグナルの水素数の和

P : 核磁気共鳴スペクトル測定用DSS- d_6 の純度(%)

試験条件

装置: ^1H 共鳴周波数400 MHz以上の核磁気共鳴スペクトル測定装置

測定対象とする核: ^1H

デジタル分解能: 0.25 Hz以下

観測スペクトル幅: -5 ~ 15 ppmを含む20 ppm以上

スピニング: オフ

パルス角: 90°

^{13}C 核デカップリング: あり

遅延時間: 繰り返しパルス待ち時間60秒以上

積算回数: 8回以上

ダミースキャン: 2回以上

測定温度: 25°C

システム適合性

検出の確認: 試料溶液につき、上記の条件で測定するとき、 δ 6.16 ppm及び δ 6.93~6.97 ppm付近のシグナルのSN比は100以上である。

システムの性能: 試料溶液につき、上記の条件で測定するとき、 δ 6.16 ppm及び δ 6.93~6.97 ppm付近のシグナルについて、明らかな混在物のシグナルが重なっていないことを確認する。また、試料溶液につき、上記の条件で測定するとき、各シグナル間の面積強度比($A_1/2$)/($A_2/3$)は0.99 ~ 1.01である。

システムの再現性: 試料溶液につき、上記の条件で測定を6回繰り返すとき、面積強度 A_1 又は A_2 のqNMR用基準物質の面積強度に対する比の相対標準偏差は1.0%以下である。