

1 イソロイシン・ロイシン・バリン顆粒

2 確認試験及び定量法の項を次のように改める。

3 確認試験 本品を粉末とし、「L-イソロイシン」約92 mgに  
4 対応する量を取り、移動相に溶かし、100 mLとし、試料溶  
5 液とする。別にL-イソロイシン0.46 g、L-ロイシン0.92 g  
6 及びL-バリン0.55 gを移動相に溶かし、100 mLとする。こ  
7 の液10 mLを取り、移動相を加えて50 mLとし、標準溶液と  
8 する。試料溶液及び標準溶液20 μLにつき、次の条件でクロ  
9 マトグラフィー総論 (2.00) の液体クロマトグラフィーによ  
10 り試験を行うとき、試料溶液及び標準溶液から得たそれぞ  
11 れのピークの保持時間は等しい。

12 試験条件

13 検出器：紫外吸光度計(測定波長：210 nm)  
14 カラム：内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に3  
15 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル  
16 化シリカゲルを充填する。  
17 カラム温度：40℃付近の一定温度  
18 移動相：リン酸二水素ナトリウム二水和物31.2 gを水  
19 1000 mLに溶かし、リン酸を加えてpH 2.8に調整する。  
20 この液970 mLにアセトニトリル30 mLを加える。  
21 流量：L-バリンの保持時間が約2.5分になるように調整  
22 する。  
23 システム適合性  
24 分離度：標準溶液20 μLにつき、上記の条件で操作する  
25 とき、バリン、イソロイシン、ロイシンの順に溶出し、  
26 イソロイシンとロイシンの分離度は1.5以上である。

27 定量法 本品10包以上を取り、内容物を取り出し、粉末とす  
28 る。L-イソロイシン(C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>)約0.95 gに対応する量を精  
29 密に量り、内標準溶液10 mLを正確に加え、0.1 mol/L塩酸  
30 試液に溶かし、250 mLとする。この液2 mLを量り、0.02  
31 mol/L塩酸試液を加えて200 mLとし、試料溶液とする。別  
32 に定量用L-イソロイシン、定量用L-ロイシン及び定量用L-  
33 バリンを105℃で3時間乾燥し、それぞれ約0.2 g、約0.4 g  
34 及び約0.24 gを精密に量り、内標準溶液2 mLを正確に加え、  
35 更に0.1 mol/L塩酸試液を加えて溶かし、100 mLとする。こ  
36 の液2 mLを量り、0.02 mol/L塩酸試液を加えて100 mLとし、  
37 標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液20 μLにつき、次の  
38 条件でクロマトグラフィー総論 (2.00) の液体クロマトグラ  
39 フィーにより試験を行う。試料溶液の内標準物質のピーク面  
40 積に対するL-イソロイシン、L-ロイシン及びL-バリンの  
41 ピーク面積の比 $Q_{Ta}$ 、 $Q_{Tb}$ 及び $Q_{Tc}$ 並びに標準溶液の内標準物  
42 質のピーク面積に対するL-イソロイシン、L-ロイシン及  
43 びL-バリンのピーク面積の比 $Q_{Sa}$ 、 $Q_{Sb}$ 及び $Q_{Sc}$ を求める。

44 L-イソロイシン(C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>)の量(mg)  
45  $=M_{Sa} \times Q_{Ta} / Q_{Sa} \times 5$   
46 L-ロイシン(C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>)の量(mg) $=M_{Sb} \times Q_{Tb} / Q_{Sb} \times 5$   
47 L-バリン(C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>)の量(mg) $=M_{Sc} \times Q_{Tc} / Q_{Sc} \times 5$   
48  $M_{Sa}$ ：定量用L-イソロイシンの秤取量(mg)  
49  $M_{Sb}$ ：定量用L-ロイシンの秤取量(mg)  
50  $M_{Sc}$ ：定量用L-バリンの秤取量(mg)

51 内標準溶液 グリシンの0.1 mol/L塩酸試液溶液(1→20)  
52 試験条件  
53 検出器：可視吸光度計(測定波長：570 nm)  
54 カラム：内径4.6 mm、長さ6 cmのステンレス管に3 μm  
55 のポリスチレンにスルホン酸基を結合した液体クロマ  
56 トグラフィー用強酸性イオン交換樹脂(Na型)を充填  
57 する。  
58 カラム温度：57℃付近の一定温度  
59 反応槽温度：130℃付近の一定温度  
60 反応時間：約1分  
61 移動相：移動相A、移動相B、移動相C、移動相D及び移  
62 動相Eを次の表に従って調製後、それぞれにカプリル  
63 酸0.1 mLを加える。

|                          | 移動相 A   | 移動相 B   | 移動相 C   | 移動相 D   | 移動相 E   |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| クエン酸一水<br>和物             | 19.80 g | 22.00 g | 12.80 g | 6.10 g  | —       |
| クエン酸三ナ<br>トリウム二<br>水和物   | 6.19 g  | 7.74 g  | 13.31 g | 26.67 g | —       |
| 塩化ナトリウ<br>ム              | 5.66 g  | 7.07 g  | 3.74 g  | 54.35 g | —       |
| 水酸化ナトリ<br>ウム             | —       | —       | —       | —       | 8.00 g  |
| エタノール<br>(99.5)          | 130 mL  | 20 mL   | 4 mL    | —       | 100 mL  |
| チオジグリコ<br>ール             | 5 mL    | 5 mL    | 5 mL    | —       | —       |
| ベンジルアル<br>コール            | —       | —       | —       | 5 mL    | —       |
| ラウロマクロ<br>ゴール溶液<br>(1→4) | 4 mL    | 4 mL    | 4 mL    | 4 mL    | 4 mL    |
| 水                        | 適量      | 適量      | 適量      | 適量      | 適量      |
| 全量                       | 1000 mL | 1000 mL | 1000 mL | 1000 mL | 1000 mL |

64 移動相の切換え：標準溶液20 μLにつき、上記の条件で  
65 操作するとき、内標準物質、バリン、イソロイシン及  
66 びロイシンの順に溶出し、イソロイシンとロイシンの  
67 分離度が1.2以上になるように、移動相A、移動相B、  
68 移動相C、移動相D及び移動相Eを順次切り換える。  
69 反応試薬：酢酸リチウム二水和物407 gを水に溶かし、  
70 酢酸(100) 245 mL、1-メトキシ-2-プロパノール  
71 801 mL及び水を加えて2000 mLとし、10分間窒素を  
72 通じ、(I)液とする。別に1-メトキシ-2-プロパノ  
73 ール1957 mLにニンヒドリン77 gを加え、5分間窒素  
74 を通じた後、水素化ホウ素ナトリウム0.161 gを加え、  
75 30分間窒素を通じる。この液に等容量の(I)液を加え  
76 る。用時製する。  
77 移動相流量：毎分0.40 mL  
78 反応試薬流量：毎分0.35 mL  
79 システム適合性  
80 分離度：標準溶液20 μLにつき、上記の条件で操作する  
81 とき、内標準物質、バリン、イソロイシン及びロイシ  
82 ンの順に溶出し、イソロイシンとロイシンの分離度は  
83 1.2以上である。  
84 システムの再現性：標準溶液20 μLにつき、上記の条件  
85 で試験を6回繰り返すとき、内標準物質のピーク面積  
86 に対するイソロイシン、ロイシン及びバリンのピーク

87 面積の比の相対標準偏差は、それぞれ1.0%以下であ  
88 る。  
89  
90