

過し、初めのろ液 10 mL を除き、次のろ液を試料溶液とする。別にインドメタシン標準品を 105 °C で 4 時間乾燥し、その約 0.05 g を精密に量り、テトラヒドロフランに溶かし、正確に 50 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、試料溶液と同様に操作し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 20 μ L につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行い、内標準物質のピーク面積に対するインドメタシンのピーク面積の比 Q_T 及び Q_S を求める。

$$\begin{aligned} & \text{インドメタシン (C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4\text{) の量 (mg)} \\ & = \text{インドメタシン標準品の量 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \end{aligned}$$

内標準溶液 パラオキシ安息香酸ブチルのメタノール溶液 (1 \rightarrow 1000)

操作条件

検出器：紫外分光光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：内径約 4 mm、長さ 10 ~ 30 cm のステンレス管に 5 ~ 10 μ m の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度：25 °C 付近の一定温度

移動相：メタノール/薄めたリン酸 (1 \rightarrow 1000) 混液 (7 : 3)

流量：インドメタシンの保持時間が約 8 分になるように調整する。

カラムの選定：4-クロロ安息香酸 0.050 g、パラオキシ安息香酸ブチル 0.030 g 及びインドメタシン 0.050 g をメタノール 50 mL に溶かす。この液 5 mL に移動相 95 mL を加える。この液 20 μ L につき、上記の条件で操作するとき、4-クロロ安息香酸、パラオキシ安息香酸ブチル、インドメタシンの順に溶出し、4-クロロ安息香酸とパラオキシ安息香酸ブチルの分離度が 2.0 以上、パラオキシ安息香酸ブチルとインドメタシンの分離度が 5 以上のものを用いる。

貯法

保存条件 遮光して、冷所に保存する。

容器 密閉容器。

ウリナスタチン

Ulinastatin

本品はヒト尿から分離精製して得たトリプシン阻害活性を有する糖たん白質を含む液であり、定量するとき、1 mL 中 45000 単位以上のウリナスタチンを含み、たん白質 1 mg 当たり 2500 単位以上を含む。

性状 本品は淡褐色～褐色の澄明な液である。

確認試験

(1) 本品の適量に水を加え、1 mL 中に 4000 単位を含むように調製した液 1 mL に、フェノールの水溶液 (1 \rightarrow 20) 1 mL を加え、更に注意しながら硫酸 5 mL を加えて振り混ぜるとき、液はだいたい色～赤だいたい色を呈する。

(2) 本品の適量に水を加え、1 mL 中に 2000 単位を含むように調製した液につき、紫外可視吸光度測定法により吸収スペクトルを測定し、本品のスペクトルと本品の参照スペクトルを比較するとき、同一波長のところに同様の強度の吸収を認める。

(3) 本品の適量に pH 7.8 の 2,2',2''-ニトリロトリエタノール緩衝液を加え、1 mL 中に 500 単位を含むように調製し、試料溶液とする。別に pH 7.8 の 2,2',2''-ニトリロトリエタノール緩衝液をとり、対照液とする。試料溶液及び対照液それぞれ 0.1 mL をとり、これに pH 7.8 の 2,2',2''-ニトリロトリエタノール緩衝液 1.6 mL を加え、更にウリナスタチン試験用トリプシン試液 0.2 mL を加えて振り混ぜた後、25 °C の水浴中で 1 分間放置する。この液に *N*- α -ベンゾイル-L-アルギニン-4-ニトロアニリド試液 1 mL を加えて振り混ぜ、更に 25 °C の水浴中で 2 分間放置するとき、試料溶液は無色、対照液は黄色を呈する。

(4) カンテン末 1.5 g に pH 8.4 のホウ酸・水酸化ナトリウム緩衝液 100 mL を加え、水浴中で加熱して溶かし、直ちに水平な台の上に置いたガラスシャーレにカンテン層が約 2 mm の厚さになるように注ぐ。カンテン溶液が固まった後、6 mm の間隔で直径約 2.5 mm の穴を 2 個 (穴 A、穴 B) あける。

本品の適量に pH 8.4 のホウ酸・水酸化ナトリウム緩衝液を加え、1 mL 中に 500 単位を含むように調製した液を穴 A に、抗ウリナスタチンウサギ血清を穴 B にそれぞれ 10 μ L ずつ入れ、カンテン板が乾燥しないようふたをして室温で一晩放置するとき、一本の明瞭な沈降線を生じる。

pH 6.0 ~ 8.0

比活性 本品につき、定量法及び次の試験を行うとき、たん白質 1 mg 当たり 2500 単位以上のウリナスタチンを含む。

(i) 試料溶液 本品の表示量に従い、本品のウリナスタチン約 10000 単位に相当する量を正確に量り、水を加えて正確に 20 mL とする。

(ii) 標準溶液 ウリナスタチン試験用ウシ血清アルブミン約 0.01 g を精密に量り、水に溶かし、正確に 20 mL とする。この液に水を加え、1 mL 中にウリナスタチン試験用ウシ血清アルブミンをそれぞれ正確に 300, 200, 100 及び 50 μ g 含む 4 種の標準溶液を調製する。

(iii) 操作法 内径約 18 mm、長さ約 130 mm のガラス試験管に各標準溶液及び試料溶液 0.5 mL ずつを、正確にとる。それぞれにアルカリ性銅試液 5 mL を正確に加えて振り混ぜ、30 °C の水浴中で 10 分間加温した後、更に、薄めたフォリン試液 (1 \rightarrow 2) 0.5 mL を正確に加えて振り混ぜ、30 °C の水浴中で 20 分間加温する。これらの液につき、水 0.5 mL を用いて同様に操作して得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、波長 750 nm における吸光度を測定する。

各標準溶液から得た吸光度から、縦軸を吸光度、横軸を濃度とする検量線を作成する。これに試料溶液から得た吸光度をあてて試料溶液中のたん白質量を求め、検体 1 mL 中の含量を計算する。

純度試験

(1) 重金属 本品 10 mL をとり、第 2 法により操作し、試験を行う。比較液には鉛標準液 1.0 mL を加える (1 ppm 以下)。

(2) 類緑物質 本品の適量に水を加え、1 mL 中に 12500 単位を含むように調製し、試料原液とする。試料原液 0.25 mL を正確に量り、これにグリセリン 0.2 mL 及び 0.05 % プロモフェノールブルー試液 0.05 mL を正確に加えて混和

し、試料溶液とする。別に、試料原液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100 mL とする。この液 0.25 mL を正確に量り、グリセリン 0.2 mL 及び 0.05 % プロモフェノールブルー試液 0.05 mL を正確に加えて混和し、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液につき、次の方法により試験を行うとき、試料溶液から得た主泳動帯以外の泳動帯は標準溶液から得た泳動帯より濃くない。

(i) ポリアクリルアミドゲル電気泳動用トリス緩衝液 A 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 18.2 g を水 80 mL に溶かし、6 mol/L 塩酸試液を加えて pH 8.8 に調整し、水を加えて 100 mL とする。

(ii) ポリアクリルアミドゲル電気泳動用トリス緩衝液 B 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 6.0 g を水 80 mL に溶かし、6 mol/L 塩酸試液を加えて pH 8.8 に調整し、水を加えて 100 mL とする。

(iii) ポリアクリルアミドゲル電気泳動用トリス緩衝液 C 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 3.0 g 及びグリシン 14.4 g を水に溶かし、1000 mL とする。

(iv) ポリアクリルアミドゲル電気泳動用アクリルアミド液 アクリルアミド 30 g 及び *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド 0.8 g を水に溶かし、100 mL とする。

(v) 分離用ゲル ポリアクリルアミドゲル電気泳動用トリス緩衝液 A 15 mL, ポリアクリルアミドゲル電気泳動用アクリルアミド液 20 mL, 水 24.5 mL, *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン 0.022 mL, 10 % ペルオキシ二硫酸アンモニウム試液 0.32 mL 及び 1 mol/L 亜硫酸ナトリウム試液 0.3 mL の割合の各液を加えて静かに振り混ぜ、ゲル作成用プレートに静かに注ぎ、その上に水を重層して 1 時間静置する。

(vi) 濃縮用ゲル 分離用ゲル上の水を除き、ポリアクリルアミドゲル電気泳動用トリス緩衝液 B 2.5 mL, ポリアクリルアミドゲル電気泳動用アクリルアミド液 2.66 mL, 水 14.6 mL, *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン 0.01 mL, 10 % ペルオキシ二硫酸アンモニウム試液 0.2 mL 及び 1 mol/L 亜硫酸ナトリウム試液 0.04 mL の割合の各液を加えて混合した液を、分離用ゲル上加える。濃縮用ゲルの高さが約 15 mm になるようにプラスチックの溝枠を水平に取り付け、2 時間静置する。

(vii) 操作法 泳動 スラブゲル電気泳動装置に調製したゲルを取り付け、上下の電極槽にそれぞれ必要量のポリアクリルアミドゲル電気泳動用トリス緩衝液 C を入れる。マイクロシリンジを用いて標準溶液及び試料溶液 10 μ L ずつを濃縮用ゲルの溝に静かに注ぎ、下側を陽極として、電気泳動を行う。プロモフェノールブルーの帯が分離用ゲルの下端から約 10 mm の位置に達したとき、電気泳動を終了させる。

染色 クーマシーブリリアントブルー R-250 2.0 g をメタノール 400 mL 及び酢酸 (100) 100 mL に溶かし、更に水を加えて 1000 mL とし、染色液とする。ゲルを取り出し、40 °C に加温した染色液に 2 時間浸して染色する。

脱色 メタノール 100 mL, 酢酸 (100) 75 mL に水を加えて 1000 mL とし、脱色液とする。染色液から取り出したゲルを、脱色液に浸して脱色する。

(3) カリジノゲナーゼ 本品の適量に水を加え、1 mL 中に約 50000 単位を含むように調製し、試料溶液とする。試験管に試料溶液 0.4 mL を正確に入れ、pH 8.2 のトリス緩衝液 0.5 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37 \pm 0.2 °C の恒温槽に入れる。5 分後にカリジノゲナーゼ測定用基質試液 (4) 0.1 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37 \pm 0.2 °C の恒温槽に戻す。更に 30 分後、薄めた酢酸 (100) (1 \rightarrow 2) 0.1 mL を正確に加えて振り混ぜたものを酵素反応液とする。別の試験管に試料溶液 0.4 mL を正確に入れ、pH 8.2 のトリス緩衝液 0.5 mL を正確に加えて振り混ぜた後、37 \pm 0.2 °C の恒温槽に入れる。35 分後に薄めた酢酸 (100) (1 \rightarrow 2) 0.1 mL を正確に加えて振り混ぜた後、更にカリジノゲナーゼ測定用基質試液 (4) 0.1 mL を正確に加えて振り混ぜたものをブランクとする。水を対照とし、紫外可視吸光度測定法により酵素反応液及びブランクの波長 405 nm における吸光度を測定し、酵素反応液の吸光度とブランクの吸光度の差を求めるとき、0.050 以下である。

分子量試験 本品の適量に移動相を加え、1 mL 中に約 6500 単位を含むように調製し、試料溶液とする。別に、 γ -グロブリン (分子量: 160000), ウリナスタチン試験用ウシ血清アルブミン (分子量: 67000) 及びミオグロビン (分子量: 17000) をそれぞれ 1.0 mg ずつ量り、移動相約 1 mL に溶かし、分子量標準品溶液とする。試料溶液及び分子量標準品溶液 50 μ L につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。各分子量標準品の保持時間から、縦軸を分子量の対数、横軸を保持時間 (分) とする検量線を作成する。これに本品の保持時間をあてて分子量を求めるとき、分子量は 67000 \pm 5000 である。

操作条件

検出器: 紫外吸光度計 (測定波長: 280 nm)

カラム: 内径約 7 mm, 長さ約 60 cm のステンレス管に 10 \sim 12 μ m の液体クロマトグラフ用多孔質シリカゲルを充てんする。

カラム温度: 25 °C 付近の一定温度

移動相: リン酸二水素カリウム 16.33 g 及びエチレンジグリコール 124.15 g を水に溶かし、1000 mL とする。必要ならば、リン酸を加えて pH を 4.0 に調整する。

流量: ウシ血清アルブミンの保持時間が約 36 分になるように調整する。

カラムの選定: 分子量標準品溶液 50 μ L につき、上記の条件で操作するとき、 γ -グロブリン、ウシ血清アルブミン及びミオグロビンの順に溶出し、 γ -グロブリンとウシ血清アルブミン、ウシ血清アルブミンとミオグロビンのそれぞれの分離度が 1.5 以上のものを用いる。

抗原性試験 本品の適量に生理食塩液を加え、1 mL 中に 15000 単位を含むように調製し、試料溶液とする。試料溶液につき、次の抗原性試験を行うとき、これに適合する。

体重 250 \sim 300 g の栄養状態のよい健康なモルモット 4 匹を用い、第 1 日目、第 3 日目及び第 5 日目に試料溶液 0.10 mL ずつを腹腔内に注射する。別に対照として、同数のモルモットに馬血清 0.10 mL を腹腔内に注射する。第 15 日目に 2 匹、第 22 日目に残りの 2 匹に、試料溶液を注

射したモルモットには試料溶液 0.20 mL を静脈内に注射し、同様に馬血清を注射したモルモットには馬血清 0.20 mL を静脈内に注射する。

注射後 30 分間及び 24 時間の呼吸困難、虚脱及び致死を観察するとき、試料溶液によって感作したモルモットは前記の症状を示さない。

ただし、馬血清によって感作したモルモットの 4 匹の全部が呼吸困難又は虚脱を示し、3 匹以上が死亡する。

毒性試験 体重 18 ~ 25 g の栄養状態のよい健康なマウス 5 匹を使用し、それぞれに本品 0.50 mL を尾静脈内に注射するとき、注射後 48 時間以内にいずれも死亡しない。注射後 48 時間以内に死亡したものがあるときは、更にまだ試験に使用していない体重 19 ~ 21 g のマウス 5 匹につき、試験を繰り返す。48 時間以内にそのいずれもが生存する。

定量法 本品の適量を正確にとり、表示量に従い、1 mL 中に約 150 単位を含むように 2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール緩衝液を加えて調製し、試料溶液とする。ウリナスタチン標準品に 2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール緩衝液を加え、その 1 mL 中にウリナスタチンとして正確に 300, 200, 100, 50 及び 0 単位を含むように調製し、それぞれ標準溶液とする。2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール緩衝液及び *N*- α -ベンゾイル-L-アルギニン-4-ニトロアニリド試液は、25 \pm 1 $^{\circ}$ C の恒温槽であらかじめ温めておく。試験管に各標準溶液及び試料溶液 0.1 mL ずつを正確にとり、それぞれに 2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール緩衝液 1.6 mL を正確に加えて振り混ぜ、25 \pm 1 $^{\circ}$ C の恒温槽に入れる。2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール緩衝液を加えて 1 分後に、氷冷してあるウリナスタチン試験用トリプシン試液 0.2 mL を正確に加えて振り混ぜ、再び恒温槽に戻す。更に 1 分後、*N*- α -ベンゾイル-L-アルギニン-4-ニトロアニリド試液 1 mL を正確に加えて振り混ぜ、恒温槽に入れ反応させる。2 分後に酢酸 (100) (1 \rightarrow 2) 0.1 mL を正確に加えて反応を停止させ、水を対照とし、紫外可視吸光度測定法により波長 405 nm における吸光度を測定する。各標準溶液から得た吸光度をもとに作成した検量線に試料溶液から得た吸光度をあてて試料溶液中のウリナスタチンの単位を求める。

貯法

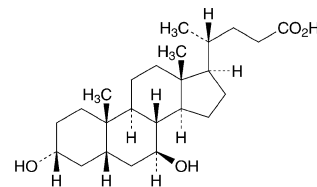
保存条件 -20 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

容器 気密容器。

ウルソデオキシコール酸

Ursodeoxycholic Acid

ウルソデオキシコール酸



$C_{24}H_{40}O_4$: 392.57

3 α , 7 β -Dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid [128-13-2]

本品を乾燥したものは定量するとき、ウルソデオキシコール酸 ($C_{24}H_{40}O_4$) 98.5 % 以上を含む。

性状 本品は白色の結晶又は粉末で、においはなく、味は苦い。

本品はエタノール (95)、エタノール (99.5) 又は酢酸 (100) に溶けやすく、クロロホルムに溶けにくく、ジエチルエーテルに極めて溶けにくく、水にほとんど溶けない。

本品は水酸化ナトリウム試液に溶ける。

確認試験 本品 0.01 g に硫酸 1 mL 及びホルムアルデヒド液 1 滴を加えて溶かし、5 分間放置する。この液に水 5 mL を加えるとき、青緑色の浮遊物を生じる。

旋光度 $[\alpha]_D^{25}$: +59.0 ~ +62.0 $^{\circ}$ (乾燥後, 1.0 g, エタノール (99.5), 25 mL, 100 mm)。

融点 200 ~ 204 $^{\circ}$ C

純度試験

(1) におい 本品 2.0 g に水 100 mL を加え、2 分間煮沸するとき、においを発しない。

(2) 塩化物 本品 2.0 g に酢酸 (100) 20 mL を加え、振り混ぜて溶かし、水を加えて 200 mL とし、よく振り混ぜ、10 分間放置する。この液をろ過し、初めのろ液 10 mL を除き、次のろ液をとり、試料溶液とする。試料溶液 40 mL に希硝酸 6 mL 及び水を加えて 50 mL とする。これを検液とし、試験を行う。比較液は 0.01 mol/L 塩酸 0.25 mL に酢酸 (100) 4 mL, 希硝酸 6 mL 及び水を加えて 50 mL とする (0.022 % 以下)。

(3) 硫酸塩 (2) の試料溶液 40 mL に希塩酸 1 mL 及び水を加えて 50 mL とする。これを検液とし、試験を行う。比較液は 0.005 mol/L 硫酸 0.40 mL に酢酸 (100) 4 mL, 希塩酸 1 mL 及び水を加えて 50 mL とする (0.048 % 以下)。

(4) 重金属 本品 1.0 g をとり、第 2 法により操作し、試験を行う。比較液には鉛標準液 2.0 mL を加える (20 ppm 以下)。

(5) バリウム (1) の液に塩酸 2 mL を加えて 2 分間煮沸し、冷後、ろ過し、ろ液が 100 mL になるまで水で洗う。この液 10 mL に希硫酸 1 mL を加えるとき、液は混濁しない。

(6) ヒ素 本品 1.0 g 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 (2 ppm 以