

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}}$$

t_{R1} , t_{R2} : 分離度測定に用いる二つの物質の保持時間。ただし、 $t_{R1} < t_{R2}$ 。

$W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$: それぞれのピークの高さの中間におけるピーク幅。

ただし、 t_{R1} , t_{R2} , $W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$ は同じ単位を用いる。

理論段数 カラム中における物質のバンドの広がりの度合いを示すもので、通例、次の式で定義する。

$$N = 5.55 \times \frac{t_R^2}{W_{0.5h}^2}$$

t_R : 物質の保持時間

$W_{0.5h}$: ピーク高さの中間におけるピーク幅。

ただし、 t_R , $W_{0.5h}$ は同じ単位を用いる。

注意: 標準被検試料, 内標準物質, 試験に用いる試薬及び試液は測定妨げとなる物質を含まないものを用いる。

医薬品各条の操作条件のうち、カラムの内径及び長さ、充てん剤の粒径、カラム温度、移動相の組成比、移動相の緩衝液組成、移動相の pH、移動相のイオン対形成剤濃度、移動相の塩濃度、切り替え回数、切り替え時間、グラジエントプログラム及びその流量、誘導体化試薬の組成及び流量、移動相の流量並びに反応時間及び化学反応槽温度は、規定された溶出順序、分離度、シンメトリー係数及び相対標準偏差が得られる範囲内で一部変更することができる。

4. エタノール中の揮発性混在物試験法

エタノール中の揮発性混在物試験法は、エタノール中に混在するメタノール、アセトアルデヒド、アセトン、2-プロパノール、1-プロパノール及び *t*-ブチルアルコールをガスクロマトグラフ法により試験する方法である。

操作法

試料 25 mL を正確に量り、内標準溶液 3 mL を正確に加え、試料溶液とする。別に、メタノール 5.0 g、定量用アセトアルデヒド 5.0 g、アセトン 2.0 g、2-プロパノール 1.0 g、1-プロパノール 1.3 g 及び *t*-ブチルアルコール 1.3 g を正確に量り、エタノール (99.5) を加えて正確に 100 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、エタノール (99.5) を加えて正確に 50 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、エタノール (99.5) を加えて正確に 50 mL とする。この液 25 mL を正確に量り、内標準溶液 3 mL を正確に加え、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 1 μ L につき、次の条件でガスクロマトグラフ法により試験を行う。それぞれの液の内標準物質のピーク面積に対するメタノール、アセトアルデヒド、アセトン、2-プロパノール、1-プロパノール及び *t*-ブチルアルコールのピーク面積の比 Q_{TA} , Q_{TB} , Q_{TC} , Q_{TD} , Q_{TE} , Q_{TF} 及び Q_{SA} , Q_{SB} , Q_{SC} , Q_{SD} , Q_{SE} , Q_{SF} を自動積分法により求めるとき Q_{TA} , Q_{TB} , Q_{TC} , Q_{TD} , Q_{TE} , Q_{TF} は、それぞれ Q_{SA} , Q_{SB} , Q_{SC} , Q_{SD} , Q_{SE} , Q_{SF} より大きくない。

内標準溶液 テトラヒドロフランのエタノール (99.5) 溶液 (1 \rightarrow 500)

システム操作条件

検出器: 水素炎イオン化検出器

充てん剤: ガスクロマトグラフ用球状多孔性エチルビニルベンゼン-ジビニルベンゼン共重合体 (充てんカラム)

カラム温度: 100 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

キャリアーガス: 窒素

システム適合性試験

システム性能: 標準溶液 1 μ L につき、上記の条件で操作するとき、メタノール、アセトアルデヒド、エタノール、アセトン、2-プロパノール、1-プロパノール、*t*-ブチルアルコール及び内標準物質の順に流出し、それぞれのピークの大きさは定量限界以上で、それぞれ完全に分離する。ただし、流出がエタノールの後の物質のピークは、エタノールのピークのテーリング上にピークとして示される。

システム再現性: 標準溶液 1 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、内標準物質のピーク面積に対するメタノールのピーク面積の比の相対標準偏差は 10 % 以下である。

5. 塩化物試験法

塩化物試験法は、薬品中に混在する塩化物の限度試験である。

医薬品各条には、塩化物 (Cl として) の限度をパーセント (%) で () 内に付記する。

操作法

別に規定するもののほか、医薬品各条に規定する量の試料をネスラー管にとり、水適量に溶かし 40 mL とする。これに希硝酸 6 mL 及び水を加えて 50 mL とし、検液とする。別に医薬品各条に規定する量の 0.01 mol/L 塩酸をとり、希硝酸 6 mL 及び水を加えて 50 mL とし、比較液とする。この場合、検液が澄明でないときは、両液を同条件でろ過する。

検液及び比較液に硝酸銀試液 1 mL ずつを加えて混和し、直射日光を避け、5 分間放置した後、黒色の背景を用い、ネスラー管の上方又は側方から観察して混濁を比較する。

検液の呈する混濁は、比較液の呈する混濁より濃くない。

6. 炎色反応試験法

炎色反応試験法は、ある種の元素が鋭敏にブンゼンバーナーの無色炎をそれぞれ固有の色に染める性質を利用して、その元素の定性を行う方法である。

(1) 金属塩の炎色反応 試験に用いる白金線は径約 0.8 mm で、先端は直線のままで用いる。試料が固体の場合は塩酸少量を加えてかゆ状とし、その少量を白金線の先端から約 5 mm までの部分に付け、水平に保って無色炎中に入れ、試験する。また、試料が液体の場合は白金線の先端を試料中に約 5 mm 浸し、静かに引き上げて、以下固体の場合と同

様に試験する。

(2) ハロゲン化合物の炎色反応 網目の開き 0.25 mm, 線径 0.174 mm の銅網を幅 1.5 cm, 長さ 5 cm に切り, 銅線の一端に巻き付ける。これをブンゼンバーナーの無色炎中で, 炎が緑色又は青色を呈しなくなるまで強熱した後, 冷却し, 更にこの操作を数回繰り返して酸化銅の被膜を完全に付ける。次に冷時, この銅網上に, 別に規定するもののほか, 試料 1 mg を付け, 点火して燃焼させ, この操作を 3 回繰り返した後, 銅網を無色炎中に入れ, 試験する。

炎色反応が持続するとは, その反応が約 4 秒間持続することをいう。

7. エンドトキシン試験法

エンドトキシン試験法は, カプトガニ (*Limulus polyphemus* 又は *Tachypleus tridentatus*) の血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて, グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出又は定量する方法である。本法には, エンドトキシンの作用によるライセート試液のゲル形成を指標とするゲル化法及び光学的变化を指標とする光学測定法がある。光学測定法には, ライセート試液のゲル化過程における濁度変化を指標とする比濁法, 及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。

エンドトキシン試験は, ゲル化法, 比濁法又は比色法によって行う。ただし, その結果について疑義がある場合又は係争が生じた場合は, 別に規定するもののほか, ゲル化法によって最終の判定を行う。

本法はエンドトキシンによる汚染を避けて行う。

器具

試験に用いるすべてのガラス製及びその他の耐熱性器具は, 有効とされている方法により乾熱処理を行う。通例, 少なくとも 250 °C で 30 分間の乾熱処理を行う。また, マルチウエルプレート及びマイクロピペット用チップなどのプラスチック製品を用いる場合は, エンドトキシンが検出されないこと及びエンドトキシン試験に対する干渉作用のないことが確認されたものを用いる。

エンドトキシン標準原液の調製

エンドトキシン標準原液はエンドトキシン 10000 標準品又はエンドトキシン 100 標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。なお, エンドトキシン単位は EU で示し, 1 EU は 1 エンドトキシン国際単位 (IU) に等しい。

エンドトキシン標準溶液の調製

エンドトキシン標準溶液はエンドトキシン標準原液をじゅうぶんに振り混ぜた後, エンドトキシン試験用水で希釈して調製する。エンドトキシン標準溶液は, エンドトキシンの容器への吸着を避けるため, できるだけ速やかに使用する。

試料溶液の調製

別に規定するもののほか, 医薬品をエンドトキシン試験用水で溶解又は希釈し, 試料溶液とする。医薬品容器の試験では, 別に規定する方法に従い, 試料溶液を調製する。ライセート試液と試料溶液の混液の pH が用いるライセート試薬に規定される pH 範囲になるように, 試料溶液の pH の調整を必要とする場合もある。通例, 試料溶液の pH は, 6.0 ~ 8.0 の範

囲にあればよい。pH の調整に用いる試液又は溶液はエンドトキシン試験用水を用いて調製し, エンドトキシンが検出されない容器に保存する。

最大有効希釈倍数の求め方

最大有効希釈倍数とは, 試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき, 許容される試料溶液の最大の希釈倍数である。

最大有効希釈倍数は, 次の式によって求める。

最大有効希釈倍数

$$= \frac{\text{エンドトキシン規格値} \times \text{試料溶液の濃度}}{\lambda}$$

エンドトキシン規格値: 注射剤のエンドトキシン規格値は, 投与量に基づいて規定されており, K/M に等しい。ただし, K は発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり, M は体重 1 kg 当たり 1 時間以内に投与する注射剤の最大量である。

試料溶液の濃度: 試料溶液の濃度の単位は, エンドトキシン規格値が質量当たり (EU/mg) で規定されている場合は mg/mL, 当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合は mEq/mL, 生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL, 容量当たり (EU/mL) で規定されている場合は mL/mL である。

λ : ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL) であり, 比濁法又は比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL) である。

ゲル化法

本法は, エンドトキシンの存在によるライセート試液の凝固反応に基づいて, エンドトキシンを検出又は定量する方法である。

本法の精度と有効性を保証するために, 予備試験でライセート試薬の表示感度確認試験及び反応干渉因子試験を行う。

(1) 予備試験

(i) ライセート試薬の表示感度確認試験

ライセート試薬の表示感度とは, ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試液の凝固に必要な最小エンドトキシン濃度である。ライセート試薬は各ロットにつき, 使用する前にその表示感度 λ を確認しなければならない。

本試験は, 試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

ライセート試薬の表示感度の確認は, 次の方法により行う。

エンドトキシン標準原液をエンドトキシン試験用水で希釈し, 2λ , 1λ , 0.5λ 及び 0.25λ の 4 種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製する。ライセート試薬をエンドトキシン試験用水又は適当な緩衝液で溶解し, ライセート試液とする。

ライセート試液及びそれと等しい量, 通例, 0.1 mL のエンドトキシン標準溶液を試験管にとり, 混和する。単回試験用の凍結乾燥ライセート試薬を用いる場合は, その容器にエンドトキシン標準溶液を直接加え, ライセート試薬を溶解す