

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、カブトガニ (*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変化を指標とする光学的測定法がある。光学的測定法には、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、マルチウェ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

圍にあればよい。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

る。

これらの試験管又は容器を通例、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に保ち、振動を避けて 60±2 分間静置した後、穏やかに約 180° 転倒し、内容物を観察する。流出しない堅固なゲルが形成されているとき、陽性とする。ゲルを形成しないか、又は形成したゲルが流出するとき、陰性とする。

調製した 4 種の濃度のエンドトキシン標準溶液を用いて、この 4 種の液を 1 組とした試験を 4 回行う。

各回の試験において、濃度 0.25λ のエンドトキシン標準溶液がすべて陰性を示さないとき、試験は無効である。試験が無効となつたときは、試験条件を整備して再試験を行う。

各回の試験において、陽性を示す最小エンドトキシン濃度をエンドポイント濃度とし、次の式によって幾何平均エンドポイント濃度を求める。

$$\text{幾何平均エンドポイント濃度} = \text{antilog} (\Sigma e/f)$$

Σe : 各回のエンドポイント濃度の対数 e の和

f : 試験の回数

求めた幾何平均エンドポイント濃度が $0.5 \sim 2.0 \lambda$ の範囲にあるとき、ライセート試薬の表示感度は確認されたことになる。

(ii) 反応干渉因子試験

本試験は、試料溶液について、反応を促進又は阻害する因子の有無を調べる試験である。

表 7-1 に従い、試料溶液を用いて A 及び B 液を調製し、エンドトキシン試験用水を用いて C 及び D 液を調製する。これらの液につき、A 及び B 液は 4 回、C 及び D 液は 2 回試験する。反応温度、反応時間及びゲル化判定法は、(1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する。

B 液及び C 液の幾何平均エンドポイント濃度は、(1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験の計算式を準用して求める。

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。

表 7-1

液	エンドトキシン添加濃度/被添加液	希釀液	希釀倍数	希釀後の添加エンドトキシンの濃度	試験の回数
A	0/試料溶液	—	—	—	4
B	2 λ /試料溶液	試料溶液	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	4
C	2 λ /エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	1 2 4 8	2 λ 1 λ 0.5 λ 0.25 λ	2
D	0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	2

A 及び D 液のすべてが陰性を示し、C 液の試験結果によりライセート試薬の表示感度が確認されたとき、反応干渉因子試験は有効とする。

B 液の試験において幾何平均エンドポイント濃度が 0.5

～ 2.0λ の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないものと判定し、試料溶液は反応干渉因子試験に適合とする。幾何平均エンドポイント濃度がこの範囲にないとき試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釀倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釀し、試験を行う。なお、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液又は希釀した試料溶液につき、ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理などを施すことができる。

(2) 限度試験法

本法は、試料溶液に規格値を超えるエンドトキシンが含まれるか否かを、ライセート試薬の表示感度を指標とし、ゲル化反応により判定する方法である。

(i) 操作法

表 7-2 に従い、A、B、C 及び D 液を調製し、これらの 4 種の液を 1 組として試験を 2 回行う。A 及び B 液の試料溶液は、(1) 予備試験 (ii) 反応干渉因子試験に適合する溶液を用いる。

反応温度、反応時間及びゲル化判定は、(1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する。

表 7-2

液	エンドトキシン添加濃度/被添加液	試験の回数
A	0/試料溶液	2
B	2 λ /試料溶液	2
C	2 λ /エンドトキシン試験用水	2
D	0/エンドトキシン試験用水	2

(ii) 判定

B 及び C 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性で、D 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、試験は有効とする。

A 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、被検試料はエンドトキシン規格に適合とする。

A 液の 2 回の試験結果において、1 回が陰性で、他の 1 回が陽性のとき、試験を更に 2 回行う。この 2 回の試験結果がいずれも陰性でないとき、被検試料はエンドトキシン規格に不適とする。

A 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性のとき、A 液が最大有効希釀倍数で希釀された試料溶液で調製されている場合、被検試料はエンドトキシン規格に不適とし、A 液の試料溶液の希釀倍数が最大有効希釀倍数未満の場合、最大有効希釀倍数で希釀した試料溶液で試験を行う。

(3) 定量試験法

本法は、試料溶液中のエンドトキシン濃度をゲル化反応のエンドポイントを求ることによって測定する方法である。

(i) 操作法

表 7-3 に従い、A、B、C 及び D 液を調製する。これらの 4 種の液を 1 組として試験を 2 回行う。A 及び B 液の試料溶液は、(1) 予備試験 (ii) 反応干渉因子試験に適合する溶液を用いる。

試験の操作条件は (1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する。

表 7-3

液	エンドトキシン 添加濃度/被添加液	希釈液	希釀 倍数*	希釀後の添加エン ドトキシンの濃度	試験の 回数
A 0/試料溶液	エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン 試験用水	1	—	2
			2	—	
			4	—	
			8	—	
B 2 λ/試料溶液	—	—	1	2 λ	2
C 2 λ/エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン 試験用水	1	2 λ	2
			2	1 λ	
			4	0.5 λ	
			8	0.25 λ	
D 0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	—	2

*A 液の段階希釀は、最大有効希釀倍数を超えない範囲で適宜変更してよい。

(ii) エンドトキシン濃度の算出及び判定

2回の試験でいずれも、D 液は陰性を、B 液は陽性を示し、C 液の幾何平均エンドポイント濃度が $0.5 \sim 2.0 \lambda$ の範囲にあるとき、試験は有効とする。

A 液の希釀系列において、陽性を示す最大の希釀倍数をエンドポイントとし、 λ にエンドポイントにおける希釀倍数を乗じて得た値を A 液のエンドトキシン濃度とする。

A 液の 2 回の試験結果より、幾何平均エンドトキシン濃度を求める。幾何平均エンドトキシン濃度は、(1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験の計算式を準用して求める。

A 液の希釀系列の中に陽性を示すものがないとき、A 液のエンドトキシン濃度は λ に A 液の最小希釀倍数を乗じた値未満とする。

A 液の希釀系列のすべてが陽性のとき、A 液のエンドトキシン濃度は、 λ に A 液の最大希釀倍数を乗じた値以上とする。

A 液の平均エンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/単位) を算出する。

被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/単位) が、医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合する。

光学的測定法

(1) 比濁法

本法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度の変化を測定することにより、試料溶液のエンドトキシン濃度を測定する方法である。エンドポイントー比濁法とカイネティックー比濁法がある。

エンドポイントー比濁法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後における反応液の濁度との間の用量反応関係に基づく方法である。

カイネティックー比濁法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された濁度に達するのに要した時間又は濁度の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法である。

試験は、通例、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で行い、濁度は吸光度又は透過率で示される。

(2) 比色法

本法は、エンドトキシンのライセート試液との反応により、発色合成基質から遊離される発色基の量を吸光度又は透過率で測定することにより、エンドトキシンを定量する方法である。エンドポイントー比色法とカイネティックー比色法がある。

エンドポイントー比色法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後における発色基の遊離量との間の用量反応関係に基づく方法である。

カイネティックー比色法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された吸光度又は透過率に達するのに要する時間又は発色の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法である。

試験は、通例、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で行う。

(3) 予備試験

比濁法又は比色法の精度と有効性を保証するために、検量線の信頼性確認試験及び反応干渉因子試験を行う。

(i) 検量線の信頼性確認試験

本試験は、ライセート試薬の各ロットにつき行う。

用いるライセート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも 3 種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製し、これらの各濃度の溶液につき、3 回以上測定して検量線を作成する。エンドトキシン標準溶液とライセート試液の容量比、反応時間、反応温度、pH などの操作条件は用いるライセート試薬の至適条件に従う。

検量線の濃度範囲を 2 枠より大きくするとき、1 枠大きくするごとに用いるエンドトキシン標準溶液の濃度を 1 濃度ずつ追加する。

作成した検量線の相関係数 r を求めるとき、その絶対値 $|r|$ が 0.980 以上であることを確認する。

検量線の信頼性が確認されなかったときは、試験条件を整備して再試験を行う。

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。

(ii) 反応干渉因子試験

表 7-4 に従い、A, B, C 及び D 液を調製して、試験を行う。ライセート試液の採取量、ライセート試液に対する試料溶液の容量比、反応時間などの操作条件は、用いるライセート試薬の至適条件に従う。

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。

表 7-4

液	エンドトキシン添加濃度	被添加液	試験管又は ウエルの数
A	0	試料溶液 ^{※1}	2 以上
B	検量線の中点濃度 ^{※2}	試料溶液 ^{※1}	2 以上
C	3 濃度以上 ^{※3}	エンドトキシン試験用水	各濃度, 2 以上
D	0	エンドトキシン試験用水	2 以上

^{※1} 最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液を用いてよい。

^{※2} 検量線の中点又は中点付近のエンドトキシン濃度になるように、エンドトキシン標準溶液を添加する。

^{※3} (3) 予備試験 (i) 検量線の信頼性確認試験で用いた濃度。

本試験は次の条件に適合しないとき、無効である。

1. C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上である。

2. D 液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である。

B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算する。添加エンドトキシンの回収率が 50 ~ 200 % の範囲にあるとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定する。

エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う。なお、試料溶液又は最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、ろ過、反応干渉因子の中和、透析又は加熱処理などを施すことができる。

(4) 定量

(i) 操作法

表 7-4 に示す A, B, C 及び D 液を調製し、(3) 予備試験 (ii) 反応干渉因子試験を準用して操作する。

(ii) エンドトキシン濃度の算出

C 液で作成した検量線を用い、A 液のエンドトキシン濃度を算出する。

ただし、次のすべての条件に適合しないとき、試験は無効である。

1. C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上である。

2. B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算するとき、その回収率は 50 ~ 200 % の範囲にある。

3. D 液の結果が、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検出限界未満である。

(iii) 判定

A 液のエンドトキシン濃度に基づき、被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/単位) を求め、その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合する。

8. 核磁気共鳴スペクトル測定法 (¹H)

核磁気共鳴（以下「NMR」という。）スペクトル測定法 (¹H) は、磁場内に置かれた物質の構成原子核 ¹H がその核に特有の周波数のラジオ波に共鳴して低エネルギーの核スピニ状態から高エネルギーの核スピニ状態に遷移することによってラジオ波を吸収する現象を利用したスペクトル測定法である。

原子核の核スピニ *I* は、 $0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots, \frac{n}{2}$ (ただし、*n* は整数) などの値 (¹H では $I = \frac{1}{2}$) をとる。核を磁場の中に置くと、核モーメントは磁場量子数 *m_i* に従って $2I + 1$ (¹H では 2) の方向に配向する。配向したエネルギー準位間に遷移を起こさせるには次式の周波数 *v* のラジオ波を与える必要がある。すなわち、磁回転比 *r* の核を外部磁場 *H₀* の中に置いたとき

$$v = r \cdot \frac{H_0}{2\pi}$$

r: 磁回転比

H₀: 外部磁場

であるから、周波数 *v* のラジオ波の照射によって共鳴条件が満たされ、その周波数のラジオ波の吸収 (NMR シグナル) が観測される。どのような環境の核 (¹H) に対しても吸収の係数 (遷移の確率) は一定であるので、得られた NMR シグナルは核 (¹H) の数に比例する。このような遷移によって高エネルギー準位に偏った核スピニは、一定時間後に再び熱平衡分布にもどる (緩和する) が、これに要する時間を緩和時間といふ。

分子を磁場の中に置くと分子内の電子が核 (¹H) を外部磁場から遮へいする。分子中の核 (¹H) の環境が異なるとその遮へいの度合も異なるので、それぞれの異なる環境の核 (¹H) の共鳴周波数も異なることになり、別々のシグナルとして観測される。このシグナルの位置は化学シフト *δ* として表現される。化学シフトの定義は次式のとおりである。

$$\delta \text{ ppm} = \frac{\nu_s - \nu_r}{\omega} \times 10^6$$

ω: 発振器の周波数 (60 MHz, 100 MHz など)

ν_s: 試料核の共鳴周波数

ν_r: 基準核の共鳴周波数

化学シフトは、通例、基準物質 (基準核) のシグナルの位置を 0 とした ppm 単位で表す。

分子内の各核 (¹H) における磁場は、周囲の電子の寄与 (核遮へい) だけでなく分子中の他の核磁石 (核スピニをもっている核は、それ自身が一つの磁石である) の影響下にもあるので、核磁石間の相互作用によってシグナルは分裂する。この分裂の間隔をスピニースピニ結合定数 *J* という。*J* はヘルツ (Hz) 単位で表す。*J* は外部磁場の大きさに依存せず、分裂のパターンは相互作用する核 (¹H) の数が増すにつれ複雑になる。