

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。

NMR スペクトルからは基本的には以上の 4 つのパラメーターが得られる。すなわち、化学シフト、スピニースピン結合定数、シグナル面積強度 (^1H の数)、緩和時間である。これらを利用して物質の構造解析、確認又は定量を行うことができる。

構造解析のために、デカップリング、核オーバーハウザー効果、二次元 NMR などの種々の手法を用いることができる。

装 置

NMR スペクトルの測定は次のいずれかの装置による。

(1) 連続波 NMR スペクトル測定装置

(2) パルスフーリエ変換 NMR スペクトル測定装置

操作 法

装置の感度及び分解能をエチルベンゼン、 α -ジクロルベンゼン又はアセトアルデヒドの NMR 測定用重水素化溶媒又は四塩化炭素溶液などを用いて至適条件に調整した後、通例、次の場合でスペクトルを測定する。

(1) 試料を溶媒に溶かし、少量の基準物質を加え、その溶液を NMR 試料管に注入する内部基準法か、又は基準物質の溶液を封入した細管を試料溶液とともに NMR 試料管に入れる外部基準法かのいずれかの方法で用意した試料管を NMR プローブに設置して測定する。試料溶液は完全に均一な溶液であることが望ましい。特に、固形の異物の混入があると良いスペクトルが得られない。 ^1H の NMR スペクトルの測定用溶媒としては、各種の NMR 測定用重水素化溶媒又は四塩化炭素などを用いる。溶媒の選択に当たっては、(i) 試料のシグナルと重なるシグナルを示さないこと、(ii) 試料をよく溶かすこと、(iii) 試料と反応しないことなどを考慮する必要がある。更に、溶媒の種類、溶液の濃度、重水素イオン濃度などにより化学シフトが変化することがあり、また、試料溶液の粘度が高い場合には分解能が低下するので注意する。

(2) 基準物質としては、通例、溶媒として有機溶媒を用いた場合はテトラメチルシリランを、重水を用いた場合は 3-トリメチルシリルプロパンスルホン酸ナトリウム又は 3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-d₄ を用いる。

(3) 標準試料のスペクトルと照合して物質の確認を行う場合には、できるだけ装置の発振器の周波数、溶媒の種類、試料の濃度などを標準試料のスペクトルの測定条件に一致させる。

9. ガスクロマトグラ法

ガスクロマトグラ法は、適当な固定相を用いて作られたカラムに、試料混合物を注入し、移動相として気体（キャリヤーガス）を用い、固定相に対する保持力の差を利用してそれぞれの成分に分離し、分析する方法であり、気体試料又は気化できる試料に適用でき、物質の確認、純度の試験又は定量などに用いる。

与えられたカラムに注入された混合物は各成分に固有の比率 k で、移動相と固定相に分布する。

$$k = \frac{\text{固定相に存在する量}}{\text{移動相に存在する量}}$$

この比率 k と移動相のカラム通過時間 t_0 ($k = 0$ の物質の試料注入時からピークの頂点までの時間) 及び保持時間 t_R (測定試料の注入時からピークの頂点までの時間)との間には次の関係があるので、同一条件では、保持時間は物質に固有の値となる。

$$t_R = (1 + k) t_0$$

装 置

通例、キャリヤーガス導入部及び流量制御装置、試料導入装置、カラム、カラム恒温槽、検出器及び記録装置からなり、必要ならば燃焼ガス、助燃ガス及び付加ガスなどの導入装置並びに流量制御装置、ヘッドスペース用試料導入装置などを用いる。キャリヤーガス導入部及び流量制御装置は、キャリヤーガスを一定流量でカラムに送るもので、通例、調圧弁、流量調節弁及び圧力計などで構成される。試料導入装置は、一定量の試料を正確に再現性よくキャリヤーガス流路中に導入するための装置で、充てんカラム用とキャビラリーカラム用がある。なお、キャビラリーカラム用試料導入装置には、分割導入方式と非分割導入方式の装置がある。通例、カラムは、充てんカラム及びキャビラリーカラムの二種類に分けられる。充てんカラムは、一定の大きさにそろえたガスクロマトグラフ用充てん剤を不活性な金属、ガラス又は合成樹脂などの管に均一に充てんしたものである。なお、充てんカラムのうち、内径が 1 mm 以下のものは、充てんキャビラリーカラム（マイクロパックドカラム）ともいう。キャビラリーカラムは、不活性な金属、ガラス、石英又は合成樹脂などの管の内面にガスクロマトグラフ用の固定相を保持させた中空構造のものである。カラム恒温槽は、必要な長さのカラムを収容できる容積があり、カラム温度を一定の温度に保つための温度制御機構を持つものである。検出器は、カラムで分離された成分を検出するもので、アルカリ熱イオン化検出器、炎光光度検出器、質量分析計、水素炎イオン化検出器、電子捕獲検出器、熱伝導度検出器などがある。記録装置は検出器により得られる信号の強さを記録するものである。

操作 法

別に規定するもののほか、次の方法による。装置をあらかじめ調整した後、医薬品各条に規定する操作条件の検出器、カラム及びキャリヤーガスを用い、キャリヤーガスを一定流量で流し、カラムを規定の温度で平衡にした後、医薬品各条に規定する量の試料溶液又は標準溶液を試料導入装置を用いて系内に注入する。分離された成分を検出器により検出し、記録装置を用いてクロマトグラムとして記録させる。

確認及び純度の試験

確認は、試料の被検成分と標準被検成分の保持時間が一致すること又は試料に標準被検成分を添加しても、試料の被検成分のピークの形状が崩れないことにより試験を行う。

純度は、通例、試料中の混在物の限度に対応する濃度の標準溶液を用いる方法又は面積百分率法により試験を行う。別に規定するもののほか、試料の異性体比は面積百分率法により求める。

面積百分率法は、クロマトグラム上に得られた各成分のピーク面積の総和を 100 とし、それに対するそれぞれの成分のピーク面積の比から組成比を求める。ただし、正確な組成比を得るために、混在物の主成分に対する感度比に基づくピーク面積の補正を行う。

定 量

通例、内標準法によるが、適当な内標準物質が得られない場