

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

生物薬品に関する試験方法ならびに各条の改正と国際調和に関する研究

第2次ソマトロピン国際標準品設定のための国際共同研究

分担研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

研究要旨 NIBSC より依頼を受けソマトロピンの第2次国際標準品を設定するための国際共同検定に参加した。第1次国際標準品を基準にして SE-HPLC 法による含量測定及び tibia 法による生物活性試験を行った。また、SE-HPLC、RP-HPLC 及び等電点電気泳動による純度試験並びにペプチドマップによる同等性の検討を行った。その結果、第2次国際標準品の候補品は、現行標準品と比較して含量及び比活性は同等であり、純度は、現行品よりも高純度であったので、SE-HPLC による含量測定や生物活性測定の標準品として十分な品質を有することがわかった。以上の結果を、NIBSC に報告した。

A. 研究目的

ヒト成長ホルモン（ソマトロピン）は、遺伝子組換え技術の発達により1990年頃よりヒト下垂体由来製品から組換え医薬品として大量に高純度な製品が供給されるようになった。このような状況を受けて、その標準品についても組換えDNA技術を用いて作製されたソマトロピンへの移行が行われた。すなわち、1993年に国際標準品策定のための国際共同検定が行われ、1994年に組換えソマトロピンの第1次国際標準品が設定された。本標準品の設定では、それまでの下垂体抽出ソマトロピンから、組

換えソマトロピンへの変更ばかりでなく、含量の測定法を生物活性から理化学的手法へ変更することを前提に行われた¹⁾。生物活性測定法から理化学的方法（SE-HPLC法）に移行できることは、我が国における詳細な研究により検証された²⁾。国内標準品についても国立衛生試験所をはじめとしてソマトロピン製造メーカーを含めた国内共同検定を経て、理化学的定量法に対応できる標準品が1996年に設定された³⁾。これまで第1次国際標準品は、各国のソマトロピン製造における品質管理試験における標準物質として長年使用されてきたが、

残余量がわずかになってきたのでこのたび新たに第2次国際標準品を設定する必要が生じた。このための国際共同検定への参画をNIBSCより依頼され、わが国からは国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部、同大阪支所薬品試験部の他、ソマトロピンを製造している製薬メーカー各社がこの国際共同検定に参加した。

B. 研究方法

1. 試料及び試薬

試料は、NIBSCより送付された国際標準品 (Code 88/624、含量：2.0 mg/ampoule, 比活性：3.0 I.U./mg) 及び新規標準品の候補品 (Code 98/574、製造時の目途：約 2.0mg/ampoule) と国立衛研標準品 (含量：アミノ酸分析値から 4.5 mg/ampoule) を用いた。試薬類は、JIS 特級品または特級相当品を用いた。

2. 方法

NIBSCの求めにより各測定者のin-house法で試験した。一例を以下に示す。

2-1. SE-HPLCによるソマトロピン含量、二量体及び多量体量の測定³⁾

国際標準品 (88/624)、新規標準品の候補品 (98/574) 及び国立衛研標準品に水を加えて溶かし、その表示量に基づき 1.0 mg/mL になるように希釈した。これらの試料につき以下の操作条件により SE-HPLC法により分析した。

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：214nm)

カラム：TSKG 2000SWXL (内径 7.8mm 長さ 300mm) 及び TSK guard column SWXL (内径 6.0mm 長さ 40mm)

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相：0.05M 炭酸水素アンモニウム溶液

流量：0.5mL/min

注入量：25 μ L

2-2. RP-HPLCによる関連タンパク質の割合の測定³⁾

国際標準品 (88/624)、新規標準品の候補品 (98/574) 及び国立衛研標準品に水を加えて溶かし、その表示量に基づき 1.0 mg/mL になるように希釈した。これらの試料につき以下の操作条件により RP-HPLC法により分析した。

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：220nm)

カラム：Vydac 214TP54 (内径 4.6mm 長さ 250mm)

カラム温度：45℃

移動相：0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) / n-プロパノール (71:29)

流量：0.5mL/min

注入量：50 μ L

2-3. トリプシンによるペプチドマップ分析⁴⁾

国際標準品 (88/624)、新規標準品の候補品 (98/574) 及び国立衛研標準品に 0.05 mol/L トリス塩酸緩衝

液 (pH7.5) を加えて溶かし、その表示量に基づき 2.0 mg/mL になるように希釈した。トリプシン (和光, 結晶トリプシン) に 0.05 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) を加えて溶かし、1.0 mg/mL になるように希釈した。各試料溶液 1.0 mL にトリプシン溶液 30 μ L を加えて 37°C で 4 時間インキュベートした。インキュベート終了後、直ちに凍結して反応を停止した。これらの試料につき以下の操作条件により HPLC 法により分析した。

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：214nm)

カラム：Vydac 208TP54 (内径 4.6mm 長さ 250mm)

カラム温度：30°C

移動相：

移動相 A：0.1% トリフロロ酢酸

移動相 B：0.1% トリフロロ酢酸, 90% アセトニトリル

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0-20	100 \rightarrow 80	0 \rightarrow 20
20-40	80 \rightarrow 75	20 \rightarrow 25
40-65	75 \rightarrow 50	25 \rightarrow 50
65-70	50 \rightarrow 20	50 \rightarrow 80
70-71	20 \rightarrow 100	80 \rightarrow 0
71-85	100	0

流量：1.0 mL/min

注入量：100 μ L

2-4. 等電点電気泳動法による分析⁴⁾

国際標準品 (88/624)、新規標準品の候補品 (98/574) 及び 国立衛研標準品に水を加えて溶かし、その表示

量に基づき 1.0 mg/mL になるように希釈した (溶液 A)。溶液 A を水で 20 倍希釈して溶液 B を得た。各試料の溶液 A 及び溶液 B について、電気泳動装置 Multiphor II (Pharmacia) を用いて、以下の条件で電気泳動を行った。

ゲル：Ampholine PAGplate, pH4.0-6.5 (Pharmacia)

電極液：0.1 mol/L グルタミン酸, 0.5 mol/L リン酸 (陽極),

0.1 mol/L β -アラニン (陰極)

試料の量：30 μ L

泳動条件：2000V, 25 mA, 25W, 2.5 hr

電気泳動終了後のゲルを固定液 (0.71 mol/L トリクロロ酢酸, 0.13 mol/L スルホサリチル酸) 中で 30 分間処理して固定した後、クーマシーブ リリアントブルーで染色した。

2-5. tibia 法による生物活性試験⁵⁾

頸骨骨端幅の伸長を指標とした生物活性試験を行った。国際標準品 (88/624)、新規標準品の候補品 (98/574) に 7% 炭酸水素ナトリウム, 0.1% アルブミンを加えて溶かし、その表示量に基づき 0.025 I. U. / mL 及び 0.1 I. U. / mL になるように希釈した。これらの試料溶液 0.5 mL を脳下垂体を摘出したウィスター系のオスラット (4W 齢, 1 群 10 匹) に皮下注射で 1 日 1 回、4 日間投与した。最終投与の 24 時間後にラットを殺して、頸骨をとり矢上面の中央から切断した。水、アセトン、水で洗浄した後、2%

硝酸銀溶液に2.5分浸した。水で濯いだ後、切断面を上にして水中においた。頸骨の切断面にライト(200W)をあてて焦茶色になるまで骨組織を染色した。10%チオ硫酸ナトリウムに30秒浸した後、流水で30分洗浄した。染色した頸骨をマイクロメーターを装着した実体顕微鏡下で観察し、その骨端軟骨幅測定し、平行線定量法により力価を求めた。

C. 研究結果及び考察

1. SE-HPLC によるソマトロピン含量の測定

新規標準品の候補品のSE-HPLCによるクロマトグラムの例を図1に示した。ソマトロピンのモノマーは、多量体、二量体に引き続いてシャープなピークとして溶出される。5つの異なる機関でのSE-HPLCによるソマトロピン含量の測定結果を表1に示した。新規標準品の候補品のソマトロピン含量は、 1.96 ± 0.039 mg/ampoule と計算され、施設間でのバラツキも非常に小さかった。この結果からは、候補品の含量の表示値は2.0mg/ampouleと現行国際標準品と同じ値とすることが適切であると判断された。また、国立衛研標準品についてはアミノ酸分析により4.5mg/ampouleと決定されているが、SE-HPLCによる含量の測定結果では4.39mg/ampouleと計算された。

2. SE-HPLC による二量体及び多量体含量の測定

SE-HPLCにより二量体と多量体量を合わせた含量を定量した結果を表2に示した。現国際標準品の二量体と多量体量の含量は5機関平均3.52%であり、一方、新規標準品の候補品の二量体と多量体量の含量は1.21%であった。このことは、候補品の方が重合体に関しては、現標準品より純度が高いことを示している。一方、国立衛研標準品の二量体と多量体量の含量は1.69%であった。

3. RP-HPLC による類縁タンパク質含量の測定

新規標準品の候補品のRP-HPLCによるクロマトグラムの例を図2に示した。ソマトロピンはスルホキシド体、デスアミド体に引き続き溶出される。4つの異なる機関でのRP-HPLCによるソマトロピンの類縁タンパク質含量の測定結果を表3に示した。国際標準品の類縁タンパク質含量は平均6.97%、新規標準品の候補品の類縁タンパク質含量は平均1.53%であった。このことは、候補品の方が類縁タンパク質に関しても純度が高いことを示している。一方、国立衛研標準品の類縁タンパク質含量は0.88%であった。

4. トリプシンによるペプチドマッピング分析

図3に国際標準品及び新規国際標準品の候補品のトリプシン処理した試料のペプチドマッピングの結果の一例を示す。得られた候補品のペプチ

ドの主要な 19 本のピークの溶出位置、相対的高さ等は、現行の国際標準品から得たペプチドのピークとよく一致していた。また、国立衛研標準品についても同様の結果が得られた。

5. 等電点電気泳動法による分析

国際標準品、新規国際標準品の候補品及び国立衛研標準品から得た等電点電気泳動の結果の一例を図4に示す。いずれの試料においても主バンドの等電点は約5であった。この主バンドの少し酸性側pH4.8に副バンドが認められた。国際標準品、新規国際標準品の候補品及び国立衛研標準品の溶液Aから得た電気泳動像における主バンド以外のバンドは、いずれも溶液Aを20倍希釈した溶液Bの主バンドより濃くなかった。すなわち、副バンドの含量は5%以下であることを示している。新規国際標準品の候補品及び国立衛研標準品の溶液Aから得た電気泳動像における主バンド以外のバンドは、国際標準品の溶液Aから得た電気泳動像における主バンド以外のバンドより明らかに薄かった。以上の結果より、荷電の異なる不純物の含量も新規国際標準品の候補品の方が国際標準品よりも少ないことが明らかになった。

6. tibia 法による生物活性試験

現行国際標準品を用いて tibia 法により測定した新規国際標準品の候補品の生物活性は、 5.91 ± 0.093 I. U. / ampoule であった (表4)。先に

求めた含量値 (1.96mg/ampoule) を用いて計算した候補品の比活性は、 3.0 I. U. / mg と結論され、この値は現行の国際標準品と同じであった。

D. 結論

新規国際標準品の候補品の含量は、SE-HPLC を用いた測定により 2.0 mg/ampoule と検定され、現行標準品と同じであった。tibia 法を用いた生物活性試験の結果より求めた比活性は 3.0 mg/mg と計算され、現行標準品と同等の生物活性であることが明らかになった。SE-HPLC、RP-HPLC 及び等電点電気泳動による純度試験の結果より重合体や類縁タンパク質及び荷電の異なる不純物の含量は、新規国際標準品の候補品の方がはるかに低いことが示された。すなわち、新規国際標準品の候補品は現行標準品よりも純度が高いと結論された。トリプシンによるペプチドマップより、現行国際標準品と新規国際標準品の候補品との同等性が示された。新規標準品の候補品は、現行標準品と比較して含量及び比活性は同等であり、純度は、現行品よりも高純度であったので、SE-HPLC による含量測定や生物活性測定の標準品として十分な品質を有することがわかった。

研究発表

論文発表 (国際共同研究報告)

Bristow, A. F. : The Second International Standard for Somatropin: Draft Report of an International Collaborative Study, Feb. 2000

参考文献

- 1) Bristow AF, Gaines-Das R, Jeffcoate SL, Schulster D: The First International Standard for Somatropin: report of an international collaborative study. *Growth Regulation*, **5**, 133-141 (1995)
- 2) 早川堯夫, 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, 徳永裕司, 山口照英, 新見伸吾, 押沢正: タンパク性医薬品の品質評価方法の新しい流れ: 遺伝子組換えヒト成長ホルモンの力価測定における *in vivo* bioassay から理化学的試験方法への移行のためのバリデーション, *医薬品研究*, **25**, 339-347 (1994)
- 3) 四方田千佳子, 岡田敏史, 内田恵理子, 森本和滋, 早川堯夫: 国立衛生試験所ヒト成長ホルモン標準品, *衛生試験所報告*, **114**, 130-135 (1996)
- 4) European Pharmacopoeia, Third Edition, Supplement 1999, 873-875
- 5) C. H. Li : Hormonal proteins and peptides, Vol. IV, 1-42 (1977)

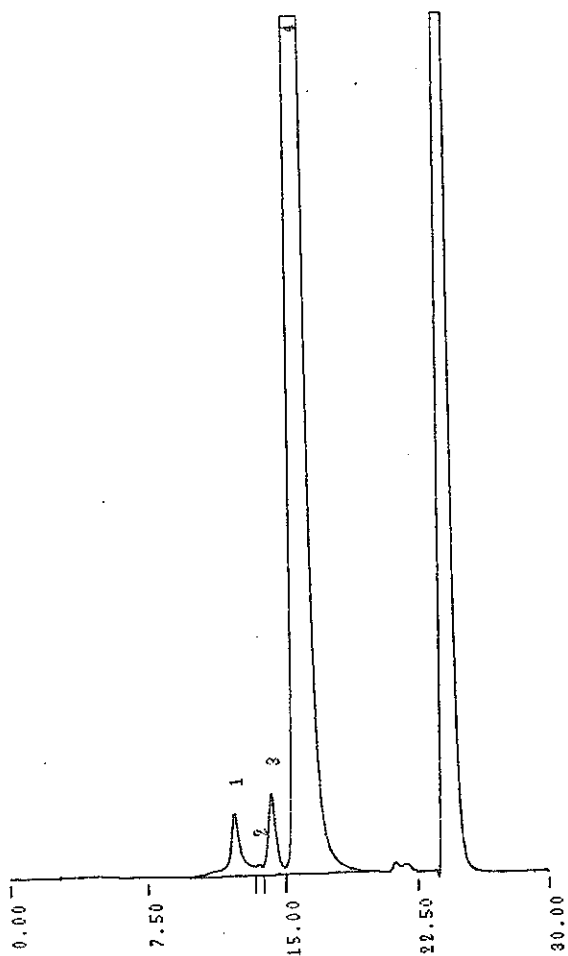


図1. 新規国際標準品の候補品のSE-HPLCのクロマトグラム

ピーク1, 2 : 多量体 ; ピーク3 : 2量体 ;
 ピーク4 : 単量体

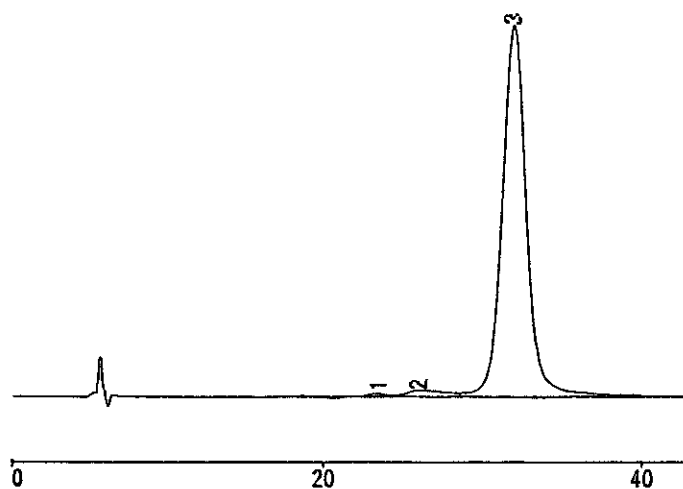


図2. 新規国際標準品の候補品のRP-HPLCのクロマトグラム

ピーク1 : スルホキシド体 ; ピーク2 :
 デスアミド体 ; ピーク3 : ソマトロピン

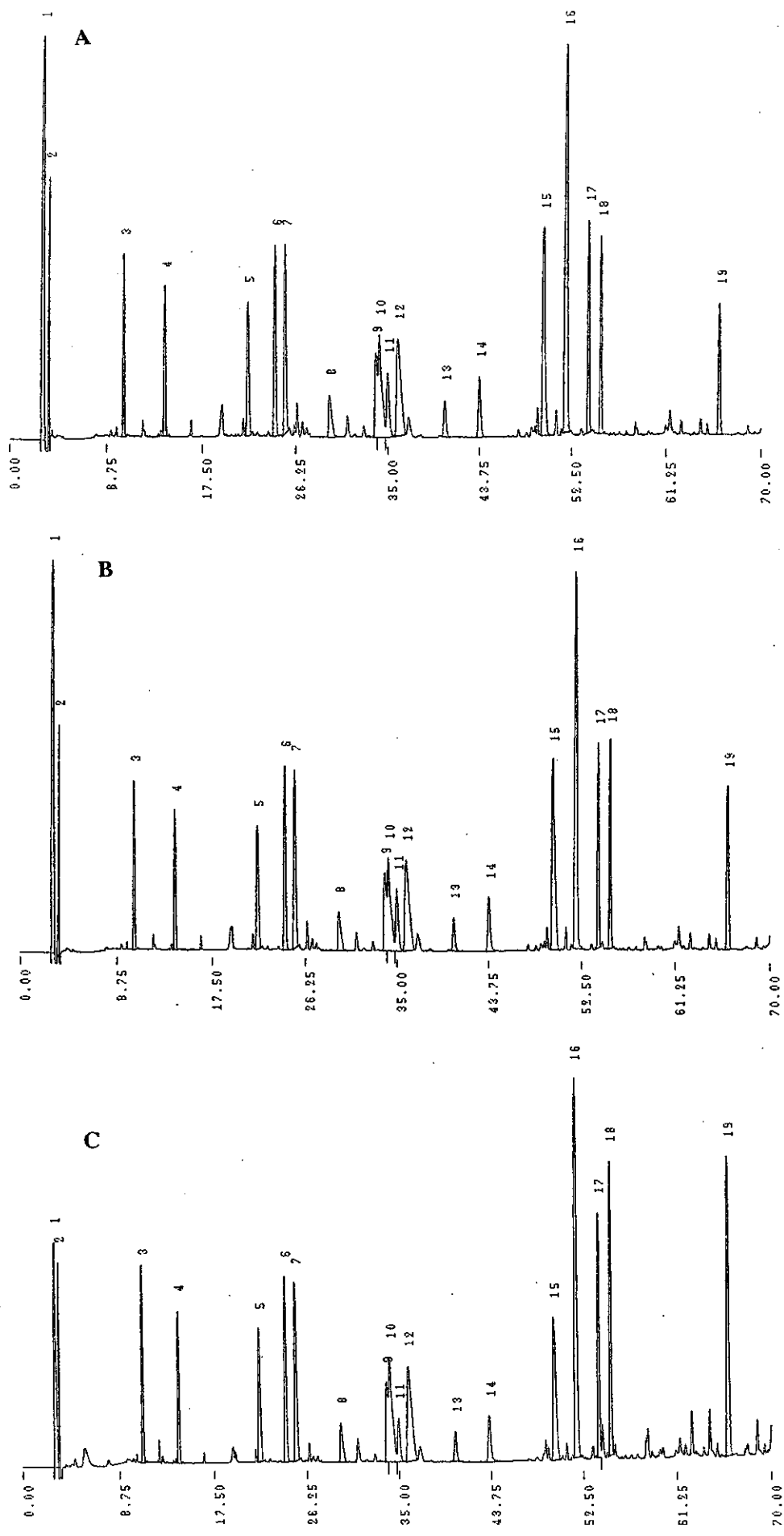


図3. ペプチドマッピング

A: 国際標準品; B: 新規国際標準品の候補品; C: 国立衛研標準品

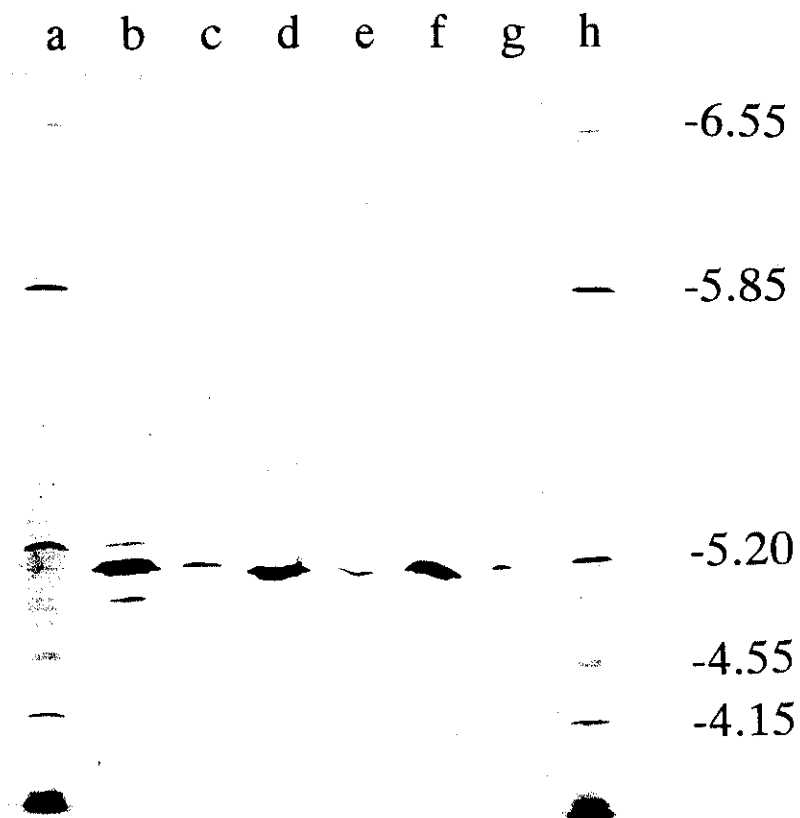


図4. 等電点電気泳動

a, h: 等電点マーカー; b: 国際標準品の溶液A; c: 国際標準品の溶液B;
d: 新規国際標準品の候補品の溶液A; e: 新規国際標準品の候補品の溶液B;
f: 国立衛研標準品の溶液A; g: 国立衛研標準品の溶液B

表1. SE-HPLCによるソマトロピン含量の測定

測定者	新規国際標準品の候補品	国立衛研標準品
	全ソマトロピン量 (mg / アンプル)	全ソマトロピン量 (mg / アンプル)
a	1.93	4.39
b	1.92	
c	1.96	
d	2.02	
e	1.96	
平均	1.96	
標準偏差	0.039	

表2. SE-HPLCによる二量体及び多量体含量の測定

測定者	国際標準品 (%)	新規国際標準品 の候補品(%)	国立衛研標準品 (%)
a	3.72	1.88	1.69
b	4.30	2.14	
c	2.09	0.63	
d	5.02	0.63	
e	2.49	0.78	
平均	3.52	1.21	
標準偏差	1.225	0.737	

表3. RP-HPLCによる類縁タンパク質含量の測定

測定者	国際標準品 (%)	新規国際標準品 の候補品(%)	国立衛研標準品 (%)
a	3.23	1.29	0.88
b	9.20	2.13	
c	7.67	<0.02	
d	7.77	1.18	
平均	6.97	1.53	
標準偏差	2.588	0.520	

表4. Tibia法による新規国際標準品の候補品の生物活性

試験No.	生物活性 (I.U. / ampoule)
1	5.87
2	5.85
3	6.02
平均	5.91
標準偏差	0.093

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

化学合成医薬品の各条の改正と国際調和に関する研究

分担研究者 石橋無味雄 国立医薬品食品衛生研究所薬品部第三室長

研究要旨 日本薬局方（日局）の医薬品各条における類縁物質等の試験には、日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議（ICH）における「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」の合意もあり、「0.1%」濃度レベルの類縁物質等が精度よく定量できる方法が必要と成りつつある。「1%」濃度レベルの類縁物質の分析を行うためには、従来、類縁物質の試験に多用された日局一般試験法の薄層クロマトグラフ法ではなく液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を整備して活用することが重要となる。そこで日局の医薬品各条において液体クロマトグラフ法又はガスクロマトグラフ法を用いる際の分析システムに対する適切な要求水準について研究を行い、医薬品各条において、研究結果を反映した表記をどのように行うかを検討した。この結果、操作条件の整備を行い、また「システムの再現性」及び「検出の確認」を整備することにより医薬品各条における類縁物質等の試験の真度や精度等を向上されることができ、現在の科学水準に基づいた試験方法を設定することができた。また ICH における合意の水準で日局医薬品の品質を保持することが可能になった。

A. 研究目的

日本薬局方（日局）の医薬品各条において類縁物質等の試験の設定を行うとき、真度、精度等が現在の科学的要求水準に適合し、かつ定量限界が現在の分析法バリデーションの要求に合致する方法を開発する目的で本研究を行った。

類縁物質等の試験に際し、日局においても日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議（ICH）における合意事項である原薬換算で「0.1%」濃度レベルの定量試験の設定が必要となりつつある。しかし、現在、日局医薬品各条における類縁物質等の試験には、薄層クロマトグラフ法が多用されていて、本法は、その検

出限界から「0.1%」濃度レベルの不純物の試験に用いることは困難な場合が多い。そこで、日局一般試験法に規定され、「0.1%」濃度レベルの類縁物質の試験に有用であると考えられる液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を試験に用いることとし、本法を「0.1%」濃度レベルの類縁物質を真度及び精度よく定量できる方法に改善する目的で本研究を行った。

B. 研究方法

日局に規定されている液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法について、まず、その操作方法について検討を行い、その結果に基づき表記方法の改善を行う。

これにより、分析の質を現行法よりも向上させる。次に、「0.1%」濃度レベルの類縁物質が真度及び精度等がよく定量でき、かつ類縁物質の検出力に信頼がもてる方法の開発を行うために、「試験の再現性」及び「検出の確認」の項に関する考え方について詳細な研究を行う。これにより、分析法バリデーションを取り入れた試験方法の設定を可能にする。

C. 研究結果

医薬品各条において必要な分析精度を担保する表記を開発した。この結果を別紙1示す。これにより、分析法バリデーションの考え方を取り入れた類縁物質の試験が可能となった。また、試験に用いる分析システムの性能のうち、「試験の再現性」及び「検出の確認」について詳細な研究を行い、別紙2及び3に示した結果を得ることができた。

これにより液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を用いた医薬品各条の試験は、分析目的物質を規格値レベルの濃度において精度よく定量できる方法に改められた。

D. 考察

日局医薬品各条は、医薬品の品質を公示したものであり、記載された事項に忠実に、かつ適切な試験が実施されれば、不特定多数の実験室で試験を行っても同様の結果が得られるように設定されていなければならない。そこで、「0.1%」濃度レベルの分析が可能である液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法による類縁物質の試験方法を整備し、現行の方法よりも必要な真度及び精度等が担保できる方法に改めることとし、研究を行った。その結果、操作条件等に対する要求水準を明らかにし、これにしたがった表記により目的が達成されるこ

とが明らかになった。さらに、「システムの再現性」及び「検出の確認」について詳細な研究を行った結果、研究結果に示すような方法で目的を達成でき、より分析法バリデーション等において現在の科学水準で要求される規格レベルにおける試験方法の設定が可能になった。

E. 結論

液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法による試験方法を整備し、現在の科学水準から要求される必要な真度及び精度等が担保できる方法を開発し、それに基づく表記に改めた。これにより、医薬品各条の試験方法は、適切に設定され则认为る。

また、「システムの再現性」及び「検出の確認」について詳細な検討を行い、医薬品各条に規定する要求を満たす分析システムを用いれば、不特定な実験室において試験を実施しても、分析法バリデーションに基づいて真度及び精度等が適切な状態で試験を行える方法に改めることができた。

これにより医薬品各条において医薬品の品質を確保するために適切かつ必要なレベルで液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を用いた試験を行えるようになった。

F. 研究発表

液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の各条表記について、日本薬局方フォーラム, 8, 110-111(1999)

G. 知的所有権の取得状況

なし

(別紙1)

液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の各条における表記の詳細について

1) 内標準法による純度試験(限度試験及び定量試験)及び定量法の記載例

1. 1) 純度試験の例

1. 1. 1) 新表記例

アルプロスタジルアルファデクス

純度試験 (2) プロスタグランジン A1 本品 0.10g をとり、水 5mL に溶かし、内標準溶液 5mL を正確に加え、エタノール(95)を加えて 15mL とし、試料溶液とする。別にプロスタグランジン A1 1.5mg をとり、エタノール(95)に溶かし、正確に 100mL とする。この液 3mL を正確に量り、内標準溶液 5mL を正確に加え、エタノール(95)2mL 及び水を加えて 15mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L につき、定量法の操作条件(試験条件及びシステム適合性)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プロスタグランジン A1 のピーク面積の比 QT 及び QS を求めるとき、QT は QS より大きくない。

内標準溶液 パラオキシ安息香酸プロピルの希エタノール溶液 (1 \rightarrow 15000)

注1) 本試験においては、判定が「試料溶液の主ピーク以外のピークの面積は、標準溶液の○○○のピーク面積より大きくない」に準じ、この表記では標準溶液のピークが認められることが確認されれば、試料溶液からも分析目的物質のピークの検出は確実に行われるとの考えから「検出の確認」を追加する必要はない。したがって、定量法の操作条件(試験条件及びシステム適合性)を準用して試験を行えば良い。

別紙1に「検出の確認」の設定に関する考え方を記載しておく。

注2) 「検出の確認」については別紙1を参照。

1. 1. 2) 現表記

純度試験 (2) 以下、日局13を参照。

1. 2) 定量法の例

1. 2. 1) 新表記例

アルプロスタジルアルファデクス

定量法 本品約 0.1g を精密に量り、水 5mL に溶かし、内標準溶液 5mL を正確に加え、

エタノール(95)を加えて15mLとし、試料溶液とする。別にアルプロスタジル標準品約3mgを精密に量り、エタノール(95)5mLに溶かし、内標準溶液5mLを正確に加え、水を加えて15mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液10 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アルプロスタジルのピーク面積の比QT及びQSを求める。

内標準溶液 パラオキシ安息香酸プロピルの希エタノール溶液 (1 \rightarrow 15000)

操作試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：205nm)

カラム：内径約5mm、長さ約15cmのステンレス管に5 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。

注1) カラムの内径(mm)及び長さ(cm)は、日本薬局方調査会に提示する試験方法の最終的な検討に用いたカラムの数値を記載する。例えば、内径4.6mm、長さ15cmのカラムを用いて分析法を設定した場合には、「内径4.6mm、長さ15cm」と記載する(従来は整数記載することになっていたが改めた)。また、内径4.6mm、長さ15cmのカラム及び内径4.6mm、長さ25cmの二本のカラムを用いて分析法を設定した場合には、「内径4.6mm、長さ15~25cm」と記載することができる。ただし、このようにカラムサイズの異なるカラムを2種用いた場合でも、実際、流量の項の保持時間を決めた1種類のカラムのサイズだけを記載することが望ましい。なお、試験方法の検討を「内径5mm、長さ15cm」のカラムで行ったにも拘わらず、内径3~7mm、長さ15~25cmのように記載されていることがあるが、このように実験が行われていない事項まで記載することは認められない。

注2) 充てん剤の粒径は、日本薬局方調査会に提示する試験方法を検討した際に使用した充てん剤の平均粒径を整数で記載する。なお、粒径が試験結果に大きな影響を与える場合には、「O~O μ m」のように粒径の分布幅を記載する。

注3) 実際の試験を行う場合、カラムについても一般試験法 液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「注意」項の規定により、各条に記載の「カラムの内径及び長さ」及び「充てん剤の粒径」を手持ちのカラムの数値に読み替えて試験を行うことができる。したがって、原案作成者は、試験方法の設定に際して得た数値を参考情報的に記載すればよい。ただし、試験方法を設定するための検討は、分析法バリデーションなどにしたがって厳密に行うこと。

カラム温度：25 $^{\circ}$ C付近の一定温度

注) 実際に試験を行う場合は、一般試験法 液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「注意」の項の規定により、「カラム温度」を変更して試験を行うことができる。

したがって、原案作成者は、試験方法の設定の際に得た数値を参考情報的に記載すればよい。ただし、試験方法を設定するための検討は、分析法バリデーションなどにしたがって厳密に行うこと。なお、厳密に温度を規定する必要がある場合には、「O~O $^{\circ}$ C」

のように温度幅で記載する。

移動相：0.02mol/L リン酸二水素カリウム試液/アセトニトリル混液（3：2）

注） 実際に試験を行う場合は、一般試験法 液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「注意」の項の規定により、「移動相の組成比，緩衝液組成，pH，イオン対形成剤濃度，塩濃度」などを変更して試験を行うことができる。したがって，原案作成者は，試験方法の設定の際に得た数値を参考情報的に記載すればよい。ただし，試験方法を設定するための検討は，分析法バリデーションなどにしたがって厳密に行うこと。

流量：アルプロスタジルの保持時間が約6分になるように調整する。

注） 実際に試験を行う場合は，一般試験法 液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「注意」の項の規定により「移動相の流量」などを変更して試験を行うことができる。したがって，原案作成者は，試験方法の設定の際に得た数値を参考情報的に記載すればよい。ただし，試験方法を設定するための検討は，分析法バリデーションなどにしたがって厳密に行うこと。

システム適合性

カラムの選定システムの性能：本品約 0.1g を水 5mL に溶かし，プロスタグランジン A1 のエタノール(95)溶液（3→200000）5mL 及び内標準溶液 5mL を加えた液 10 μ L につき，上記の条件で操作するとき，アルプロスタジル，内標準物質，プロスタグランジン A1 の順に溶出し，それぞれのピークがは完全に分離する。~~ものを用いる。~~

注）「ピークが完全に分離する」とは，一般試験法液体クロマトグラフ法の規定により分離度が 1.5 以上であることを意味する。なお，分離度が 2.9 以下では小数点以下 1 桁まで記載し，3 以上は整数で記載する。

シンメトリー係数は，通例，テーリングのときは「×以下」と規定し，リーディングのときは「×～×」と規定する。

システムの再現性：標準溶液 10 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アルプロスタジルのピーク面積の比の相対標準偏差は 1.0 % 以下である。

注 1) 「システムの再現性」は，同一の標準溶液を繰り返し注入して試験を行う。「試験」という用語が標準溶液を繰り返し調製して操作を行うようにもとれるので，用語を「測定」と改めるべきではないかとの意見があったが，品質管理の現場において試料 1 検体ごとに標準溶液を調製し直して試験操作を行うとは考えられないことからフォーラムに掲載の案のままとした。今後，委員会において審議を行う必要があると思われる。

注 2) 「システムの再現性」の設定については，別紙 2 を参照。

1. 2. 2) 現表記

定量法 (2) 以下, 日局 13 を参照.

1. 3) 定量法の例

1. 3. 1) 新表記例

アミドトリゾン酸ナトリウムメグルミン注射液

定量法 本品のアミドトリゾ酸 (C₁₁H₉I₃N₂O₄) 約 0.5g に対応する容量を正確に量り, 水を加えて正確に 200mL とする. この液 2mL を正確に量り, 内標準溶液 10mL を正確に加えた後, 水を加えて 100mL とし, 試料溶液とする. 別に定量用アミドトリゾ酸 (別途 105 °C で 4 時間乾燥し, その減量を測定しておく) 約 0.25g を精密に量り, メグルミン溶液 (3 → 1000) に溶かし, 正確に 100mL とする. この液 2mL を正確に量り, 内標準溶液 10mL を正確に加えた後, 水を加えて 100mL とし, 標準溶液とする. 試料溶液及び標準溶液 5 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アミドトリゾ酸のピーク面積の比 QT 及び QS を求める.

内標準溶液 アセトリゾン酸 0.06g をメグルミン溶液 (3 → 1000) に溶かし, 100mL とする.

操作試験条件

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 254nm)

カラム: 内径約 4mm, 長さ約 25cm のステンレス管に 5 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: リン酸テトラブチルアンモニウム 1.7g 及びリン酸一水素カリウム 7.0g を水 750mL に溶かし, 薄めたリン酸 (1 → 10) を加えて pH を 7.0 に調整した後, 水を加えて 800mL とする. この液にアセトニトリル 210mL を加えて混和する.

流量: アミドトリゾ酸の保持時間が約 5 分になるように調整する.

システム適合性

カラムの選定システムの性能: 標準溶液 5 μ L につき, 上記の条件で操作するとき, アミドトリゾ酸, 内標準物質の順に溶出し, その分離度は 6 以上のものを用いる である.

システムの再現性: 標準溶液 5 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アミドトリゾ酸のピーク面積の比の相対標準偏差は 1.0 % 以下 である.

1. 3. 2) 現表記

定量法 以下, 日局 13 を参照

2) 絶対検量線法による定量法の記載例

- 2. 1) 定量法の例
- 2. 1. 1) 新表記例

亜酸化窒素

定量法 本品の採取は純度試験を準用する。

本品 1.0mL を、減圧弁を取り付けた耐圧金属製密封容器から直接ポリ塩化ビニル製導入管を用いて、ガスクロマトグラフ用ガス計量管又はシリンジ中に採取し、このものにつき、次の条件でガスクロマトグラフ法により試験を行い、空気のピーク面積 AT を求める。別に混合ガス調製器に窒素 3.0mL を採取し、キャリアーガスを加えて全量を正確に 100mL とし、よく混合して標準混合ガスとする。その 1.0mL につき、本品と同様に操作し、窒素のピーク面積 AS を求める。

操作試験条件

検出器：熱伝導度型検出器

カラム：内径約 3mm、長さ約 3m の管に 300 ~ 500 μ m のガスクロマトグラフ用シリカゲルを充てんする。

カラム温度：30℃付近の一定温度

キャリアーガス：水素

流量：窒素の保持時間が約 2 分になるように調整する。

システム適合性

カラムの選定システムの性能：混合ガス調製器に窒素 3.0mL を採取し、本品を加えて 100mL とし、よく混合する。その 1.0mL につき、上記の条件で操作するとき、窒素、本品の順に流出し、それぞれのピークがは完全に分離する。~~ものをを用いる。~~

試験システムの再現性：上記の条件で標準混合ガスにつき、上記の条件で試験を 5 回繰り返すとき、窒素のピーク面積の相対標準偏差は 2.0 % 以下である。

- 2. 1. 2) 現表記

定量法 以下、日局 13 を参照。

3) 絶対検量線法による純度試験の例（試料溶液の希釈液を標準溶液として用いる方法を含む）

- 3. 1) 純度試験の例

- 3. 1. 1) 新表記例

アザチオプリン

(6) 類縁物質 本品 0.010g に移動相 80mL を加え、加温して溶かし、冷後、移動相を加

えて 100mL とし、試料溶液とする。この液 1mL を正確に量り、水を加えて正確に 100mL とし、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う。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定するとき、試料溶液のアザチオプリン以外のピークの合計面積は、標準溶液のアザチオプリンのピーク面積の 1/2 より大きくない。

操作試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：296nm）

カラム：内径約 4mm，長さ約 15cm のステンレス管に 5 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：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

移動相：~~薄めた~~ 0.05mol/L リン酸二水素カリウム試液溶液（1 \rightarrow 2）に薄めたリン酸（3 \rightarrow 2000）を加えて pH を 2.5 に調整する。この液 800mL にメタノール 200mL を加える。

注）「薄めた---」の表記は、鉍酸、アルカリ、メタノール及びエタノールに限る（日局 14 原案作成要領 2.11.11）。

流量：アザチオプリンの保持時間が約 8 分になるように調整する。

面積測定範囲：溶媒のピークの後からアザチオプリンの保持時間の約 3 倍の範囲

システム適合性

検出の確認：標準溶液 5 mL を正確に量り、水を加えて正確に 10 mL とする。この液 20 μ L から得たアザチオプリンのピーク面積が、標準溶液のアザチオプリンのピーク面積の 40 ~ 60 % になることを確認する。

注 1) 本原薬の規格のように「試料溶液のアザチオプリン以外のピークの合計面積は、標準溶液のアザチオプリンのピーク面積の 1/2 より大きくない。」と規定された場合には、標準溶液からアザチオプリンのピークが得られることの確認はできても、規格値レベルの分析目的物質を含む試料から調製された試料溶液から分析目的物質のピークが検出できるようにシステムが調整されているか否かは明らかではない（標準溶液のアザチオプリンのピーク面積の 1/2 に相当するレベルのピークは検出できない可能性がある）。このため、こうしたケースでは「検出の確認」の設定が必要となる。

注 2) 規格を「試料溶液のアザチオプリン以外のピーク的面積は、標準溶液のアザチオプリンのピーク的面積より大きくない」と規定した場合には、標準溶液からアザチオプリンのピークが得られることを確認すれば、試料溶液に規格値レベルの分析目的物質（標準溶液の分析目的物質と同濃度）が含まれる場合にもピークの検出は可能であるから「検出の確認」の設定は必要ない。ただし、次のアセトアミノフェンの例のように「試料溶液のアセトアミノフェン以外のピークの合計面積は、標準溶液のアセトアミノフェンのピーク的面積より大きくない」の場合には、複数含まれる分析目的物質の個々のピークは、標準溶液から得られるアセトアミノフェンのピークより小さいので「検出の確認」の設定が必要となる。なお、「検出の確認」のレベルは、ICH の原薬の不純物ガイドラインで個別規格の設定が必要とされる 0.1% の不純物が確実に検出できる程度とすることが望まし

い。

カラムの選定システムの性能：本品 0.010g に水 80mL を加え、加温して溶かし、冷後、水を加えて 100mL とする。この液 2mL をとり、別に安息香酸 0.06g をメタノール 3mL に溶かし、水を加えて 10mL とした液 2mL を加えた後、移動相を加えて 25mL とする。この液 20 μ L につき、上記の条件で操作するとき、アザチオプリン、安息香酸の順に溶出し、その分離度がは 9 以上のものを用いるのである。

システムの再現性：標準溶液 20 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、アザチオプリンのピーク面積の相対標準偏差は 1.0 % 以下である。

注) 本品の場合、「システムの再現性」においてシステムに注入されるアザチオプリンの量は 0.02 μ g で、通常の定量操作を行う場合の 1/10 程度と考えられる。この場合の相対標準偏差の設定は、実測値に基づき、また、バルブインジェクターの注入精度や分析装置に起因するノイズなどの影響を考慮して定めること。なお、サンプリングから実験値に対する判定までの「試験方法」全体の評価から得られた相対標準偏差を「システムの再現性」の規格値として設定する例が見られるが、これは誤りであるので注意すること。また試験方法全体の評価をする場合の相対標準偏差には、試料中に含まれる分析目的物質濃度が大きく影響し、例えば、ppm レベルの分析の場合には相対標準偏差 15%程度になるといわれている。

~~検出感度 標準溶液 20 μ L から得たアザチオプリンのピーク高さが 3 ~ 6mm になるように調整する。~~

3. 1. 2) 現表記

(6) 類縁物質 以下、日局 13 を参照。

3. 2) 純度試験の例

3. 2. 1) 新表記例

アセトアミノフェン

(5) 類縁物質 本品 0.050g をメタノール 1mL に溶かし、移動相を加えて 50mL とし、試料溶液とする。この液 1mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 200mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 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。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定するとき、試料溶液のアセトアミノフェン以外のピークの合計面積は、標準溶液のアセトアミノフェンのピーク面積より大きくない。

操作試験条件