

## 理化学試験法の改正に関する研究

研究分担者 四方田千佳子 (独) 医薬品医療機器総合機構

第 16 改正日本薬局方第一追補で、一般試験法として 2.63 誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラズマ質量分析法を収載し、ICHQ3D 金属不純物のガイドラインの調和に向けた準備を整えた。今後、ICHQ3D の調和が進むと、金属の測定法のための基本的な一般試験法を 3 薬局方で調和する予定となっている。そこで、昨年度は、USP に既に収載されている 233 金属不純物 - 操作を検討することとし、記載されている方法に従って、我が国の市販医薬品テプレノン細粒、エダラポン注射剤、および添加剤から日本薬局方バレイショデンプンを取り上げて、鉛、水銀、ヒ素、鉛の含有量評価及び添加回収試験を実施し、問題なく実施可能であることを確認した。

本年度は、昨年度に分析を試みた 4 種の金属について、デンプンを試料として添加回収試験全体を通した定量限界を求め、含有量の有効桁数がどの程度であるかを明らかにすることとした。また、金属不純物の測定法として、原子吸光光度法の複数の方法の適用を、個別金属のための規格試験法としての可能性を検討した。

研究協力者

中田裕二 日本食品分析センター 千歳研究所

### A. 研究目的

USP では、医薬品や添加剤に含まれる元素の不純物を規定する一般試験法が、2012 年の USP36 - NF31 Second Supplement において <233>Elemental Impurities-Procedures が収載された。すなわち USP<232>Elemental Impurities-Limits では不純物となる元素の 1 日許容摂取量 (PDE) を規定し、USP<233>では試料の前処理を含め、分析法を規定している。

その後、USP は 2013 年 6 月に、この二つの一般試験法を取り下げて、ICHQ3D の動向に合わせた一般試験法の改訂版を出す予定であると発表した。2014 年 12 月にはさらなる改訂版を HP 上に公開し、USP Forum に掲載予定としている。現時点で ICHQ3D のステップ 3 での規制すべき金属の許容一日摂取量を表 1 に示した。新たな USP から提案された規制値の値は、一部異なっており、特に大容量注射剤の規制値は、各成分中含有量に対する規制という規格設定を前回から踏襲したままとなっており、今後の ICH の議論を複雑にしている。

個別金属(元素)分析の PDG における調和の動きは、これらの動きと関連して開始のめどは立っていないが、昨年度に検討した操作の内容から特に本質的な変更は行われていない。

そこで、今年度は昨年度に実施した金属分析の全操作を実施した場合の定量限界を求め、どこまでの値が信頼できる精度を有するかを明らかに

することを試みた。

また、ICP のみに頼ること無く金属の分析を実施可能か検討するために、原子吸光光度法によるいくつかの分析を試みた。

### B. 方法

医薬品添加剤中の金属不純物分析法として、以下 3 法のヒ素、カドミウム、鉛及び水銀の検出下限及び定量下限を算出した。算出は無添加試料及び無添加試料に一定量添加した試料を各 6 回測定し、添加試料から無添加試料の値を差し引いた 6 回の測定値の標準偏差(SD)について、以下の式から求めた。

検出下限 =  $t \times SD$  ( $t = 4.03$ )

定量下限 =  $10 \times SD$

なお、試料あたりの各金属の許容濃度は、1 日摂取量を 10g とした場合、ヒ素 1.5  $\mu\text{g/g}$ 、カドミウム 0.5  $\mu\text{g/g}$ 、鉛 0.5  $\mu\text{g/g}$ 、水銀 4  $\mu\text{g/g}$  である。

#### 1) ICP 質量分析法

試料溶液の調製

試料としてバレイショデンプンを用い、仮定摂取量を 10g とした。

試料 0.5 g をマイクロ波分解容器に量りとり、硝酸 5 mL 及び過酸化水素水 1 mL を加え、分解した。分解後、放冷し、デジチューブ (SCP SCIENCE 製) に移し、内標準溶液を 500  $\mu\text{L}$  加え、水で正確に 50 mL としたものを試料溶液(ヒ素、カドミウム及び鉛)とした。試料に下表に示した濃度になるようヒ素、カドミウム、鉛及び水銀を添加し、同様に処理したものを添加試料溶液(ヒ素、カドミウム及び鉛)とした。

表 各元素の添加量

ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
0.1J	0.1J	0.1J	0.2J

さらに、試料溶液または添加試料溶液 2 mL をデジチューブにとり、硝酸 5 mL、塩酸 0.25 mL 及び内標準溶液 480 µL を加え、水で正確に 50 mL としたものを試料溶液(水銀)及び添加試料溶液(水銀)とした。

内標準溶液の調製

デジチューブにビスマス標準液 500 µL、テルル標準液及びタリウム標準液 50 µL を量りとり、水で正確に 50 mL としたものを内標準溶液(1 µg/mL)とした。

標準溶液の調製

標準溶液濃度を下表に示した。許容濃度を J としたときの 0J(BL), 0.5J 及び 2J 相当濃度になるように調製を行った。

表 標準溶液濃度(µg/L)

標準溶液	ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
0J	0	0	0	0
0.5J	7.5	2.5	2.5	1
2J	30	10	10	4

デジチューブにヒ素標準液、カドミウム標準液及び鉛標準液を量りとり、硝酸 5 mL 及び内標準溶液 500 µL を加えて水で正確に 50 mL としたものを標準溶液(ヒ素、カドミウム及び鉛)とした。

デジチューブに水銀標準液を量りとり、硝酸 5 mL、塩酸 0.25 mL 及び内標準溶液 500 µL を加えて水で正確に 50 mL としたものを標準溶液(水銀)とした。

測定

標準溶液及び試料溶液を ICP 質量分析装置に導入し、内標準元素に対する各元素のイオンカウント数比を Y 軸に、各元素の濃度を X 軸にとり、得られた検量線から試料溶液中の濃度を求め、試料中の各元素濃度を算出した。内標準元素を下表に示した。

表 内標準元素

測定元素	ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
内標準元素	テルル	タリウム	ビスマス	タリウム

ICP 質量分析装置操作条件

ICP 質量分析装置: パーキンエルマー社製 NexION 300D  
 プラズマ条件: 高周波出力; 1.6 kW  
 補助ガス: 1.20 L/min(アルゴン)  
 プラズマガス: 18.00 L/min(アルゴン)  
 ネブライザガス: 1.06 L/min(アルゴン)

測定質量数: 75(ヒ素), 114(カドミウム), 208(鉛)及び 202(水銀)

内標準限度: 130(テルル), 205(タリウム)及び 209(ビスマス)

2) 原子吸光光度法による限度分析

2-1) 日局一般試験法 7.02 プラスチック製医薬品容器試験法の鉛の試験法第一法に準じる方法

デンブンを試料として、以下のように、鉛及びカドミニウムの測定を試みた。

試料溶液の調製

デンブン 5 g を磁製るつぼに量りとり、硫酸 2 mL で潤し、徐々に加熱して炭化させた後、500 で強熱し灰化した。冷後、残留物を水で潤し、塩酸 2 mL を加えて蒸発乾固し、さらに塩酸 1 mL を加えて加温溶解した。クエン酸一水和物溶液(1→2)/塩酸混液(1:1)1 mL 及び加温した酢酸アンモニウム溶液(2→5)1 mL を加えた後、磁製るつぼの内容物を分液ロートに移した。分液ロートにクエン酸水素二アンモニウム溶液(1→4)10 mL 及びプロモチモールブルー試液 2 滴を加え、アンモニア試液で中和した。硫酸アンモニウム溶液(2→5)10 mL を加え、水で液量を約 100 mL とした後、N,N-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物溶液(1→20)20 mL を加え、混和後 5 分間放置した。4-メチル-2-ペンタノン を正確に 10 mL 加えて 5 分間振とうし、4-メチル-2-ペンタノン層を分取し、試料溶液(カドミウム及び鉛)とした。試料と共に、カドミウム 0.1J 及び鉛 0.5J を添加し、同様に処理したものを添加試料溶液(カドミウム及び鉛)とした。

なお、参考に添加回収試験を行った。

標準溶液の調製

標準溶液濃度を下表に示した。許容濃度を J としたときの 0J(BL), 0.5J, 1J 及び 2J 相当濃度になるように調製を行った。

分液ロートにカドミウム標準液及び鉛標準液を量りとり、クエン酸水素二アンモニウム溶液(1→4)10 mL 及びプロモチモールブルー試液 2 滴を加え、以下試料溶液と同様に処理したものを標準溶液とした。

表 標準溶液濃度(µg/mL)

標準溶液	カドミウム	鉛
0J	0	0
0.5J	0.125	0.125
1J	0.25	0.25
2J	0.5	0.5

## 測定

標準溶液及び試料溶液を原子吸光光度計で測定した。各元素の吸光度を Y 軸に、各元素の濃度を X 軸にとり、得られた検量線から試料溶液中の濃度を求め、試料中の各元素濃度を算出した。

### 原子吸光光度計操作条件

機種: 日立ハイテクノロジーズ社製 Z-2310  
光源ランプ: カドミウム中空陰極ランプ及び鉛中空陰極ランプ  
分析線波長: 228.8 nm(カドミウム)及び 283.3 nm(鉛)  
支燃性ガス: 空気  
可燃性ガス: アセチレン

### 2-2) 原子吸光光度法(電気加熱方式または冷蒸気方式)による方法

#### 電気加熱方式(ヒ素, カドミウム及び鉛)

ICP 質量分析法で調製した試料溶液を用い、標準溶液は、許容濃度を J としたときの 0J(BL), 0.5J, 1J 及び 2J 相当濃度になるように調製した。

標準溶液	ヒ素	カドミウム	鉛
0J	0	0	0
0.5J	7.5	0.5	2.5
1J	15	1	5
2J	30	2	10

標準溶液及び試料溶液を原子吸光光度計で測定した。各元素の吸光度を Y 軸に、各元素の濃度を X 軸にとり、得られた検量線から試料溶液中の濃度を求め、試料中の各元素濃度を算出した。なお、参考として添加回収試験を行った。添加試料溶液は測定時に試料溶液に下表の濃度となるよう各元素を添加したものをを用いた。

ヒ素	カドミウム	鉛
0.5J	0.5J	0.5J

### 原子吸光光度計操作条件

機種: アジレントテクノロジー社製 240FS AA  
光源ランプ: ヒ素中空陰極ランプ, カドミウム中空陰極ランプ及び鉛中空陰極ランプ  
分析線波長: 193.7 nm(ヒ素), 228.8 nm(カドミウム)及び 283.3 nm(鉛)  
乾燥温度: 120 (ヒ素), 120 (カドミウム)及び 110 (鉛)

灰化温度: 1400 (ヒ素), 250 (カドミウム)及び 600 (鉛)

原子化温度: 2600 (ヒ素), 1800 (カドミウム)及び 2100 (鉛)

#### 冷蒸気方式(水銀)

ICP 質量分析法で調製した試料溶液(水銀), 添加試料溶液(水銀)及び標準溶液を用いた。標準溶液濃度を下表に示した。許容濃度を J としたときの 0J(BL), 0.5J, 1J 及び 2J 相当濃度になるように調製を行った。

標準溶液	水銀
0J	0
0.5J	1
1J	2
2J	4

標準溶液及び試料溶液各 5 mL に塩化スズ( )・硫酸溶液を 0.5 mL を加え、還元気化水銀測定装置で測定した。吸光度を Y 軸に、濃度を X 軸にとり、得られた検量線から試料溶液中の濃度を求め、試料中の各元素濃度を算出した。なお、参考として添加回収試験を行った。

#### 還元気化水銀測定装置操作条件

原子吸光光度計: 日本インスツルメント社製マーカーキュー/RA-3320  
光源ランプ: 低圧水銀ランプ  
分析線波長: 253.7 nm

## C. 結果

### 1) ICP 質量分析法

各元素の検出下限及び定量下限推定値を表 2 及び 3 に示した。また、各元素の実測値を表 4 ~ 表 7 に示した。

### 2) 原子吸光光度法による元素分析

#### 2-1) 日局一般試験法 7.02 プラスチック製医薬品容器試験法の鉛の試験法第一法に準じる方法

各元素の検出下限及び定量下限推定値を表 8 及び表 9 に示した。また、各元素の実測値を表 10 及び 11 に、添加回収率を表 12 に示した。

#### 2-2) 日局一般試験法原子吸光光度法(電気加熱方式または冷蒸気方式)による方法

##### 電気加熱方式(ヒ素, カドミウム及び鉛)

各元素の検出下限及び定量下限推定値を表 13 及び 14 に示した。また、各元素の実測値を表 15 ~ 17 に、添加回収率を表 18 に示した。

##### 冷蒸気方式(水銀)

検出下限及び定量下限推定値を表19及び20に示した。また、実測値を表21に、添加回収率を表22に示した。

#### D. 考察

USP<233>に準拠したICP質量分析法の全分析操作を通じての定量下限推定値はヒ素 0.05 µg/g、カドミウム 0.01 µg/g、鉛 0.06 µg/g、水銀 0.22 µg/g と許容濃度 J に対して 0.02J ~ 0.12J 相当濃度であり、十分な感度があることが確認された。検出下限値は、ICP 質量分析法でしばしば言われている値よりかなり大きな値であるが、これは全操作を通じての検出下限であるため、より現実に近い値である。

別にカドミウム及び鉛について、日本薬局方一般試験法収載の「プラスチック製医薬品容器試験法」に準拠した溶媒抽出法を用いて原子吸光光度計により定量下限の推定を行ったところ、カドミウム 0.02 µg/g、鉛 0.13 µg/g と許容濃度 J に対して 0.04J ~ 0.26J 相当濃度であった。なお、添加回収率の平均値はカドミウム 104 %、鉛 117 % と良好な結果が得られた。溶媒抽出法を伴う特殊な方法ではあるが、通常の原子吸光光度計でも、規格試験に適用可能であることが示差された。

また、ICP 質量分析法において調製した試料溶液について、日本薬局方一般試験法収載の「原子吸光光度法(電気加熱方式または冷蒸気方式)」検量線法で測定を行ったところ、ヒ素 0.28 µg/g、カドミウム 0.02 µg/g、鉛 0.14 µg/g、水銀 0.20 µg/g と許容濃度 J に対して 0.04 ~ 0.28J 相当濃度の結果が得られ、ICP 質量分析法と同様に有効な方法であることが確認された。なお、電気加熱方式の添加回収率はヒ素 76 %、カドミウム 78 %、鉛 94 % であった。ヒ素及びカドミウムの回収率が若干低めの傾向であったが、これは、検量線法を用いて測定したことが原因であると考えられた。電気加熱方式はマトリックスの影響を受けやすいため、標準添加法で測定することで改善されると予想される。水銀の添加回収率は 99 % と良好な結果が得られた。

昨年度からの検討により、USP<233>に準拠した ICP 質量分析法は問題なく実施可能であり、一日摂取量を 10g とした場合の規制値に対する測定は、原子吸光光度計を含む、検討したいずれの分析法でも可能であることが明らかとなった。

現在国際調和が予定されている一般試験法は、ごく基本的な一般原則を示すもので、実際の測定操作の事例を示すものではない。そのため、個別の規格試験法に記載する分析操作法の事例を示

して欲しいという要望もあり、今後、汎用されることが考えられる試験法を参考情報等に記載することも必要であり、さらに、試験操作法の一般化の検討を行う必要があると考えられる。

#### E. 健康危険情報

該当する情報なし

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 知的所有権の取得状況
2. 実用新案登録  
なし

表1. ICHQ3Dステップ3現在の金属不純物のPDE値と金属分類

金属	PDE(μg/day)			金属	PDE(μg/day)			
	経口製	注射	吸入		経口製剤	注射剤	吸入剤	
クラス1	As	15	15	1.9	Pd	100	10	1.0
	Cd	5.0	6.0	3.4	Pt	1000	10	1.4
	Hg	40	4.0	1.2	クラス2B Rh	1000	10	1.4
	Pb	5.0	5.0	5.0	Ru	1000	10	1.4
クラス2A	Co	50	5.0	2.9	Tl	8.0	8.0	69
	Mo	180	180	7.6	Ba	13000	1300	340
	Se	170	85	140	Cr	11000	1100	2.9
	V	120	12	1.2	Cu	1300	130	13
クラス2B	Ag	170	35	6.9	クラス3 Li	780	390	25
	Au	130	130	1.3	Ni	600	60	6.0
	Ir	1000	10	1.4	Sb	1200	600	22
	Os	1000	10	1.4	Sn	6400	640	64

表2 検出下限推定値(μg/g)

ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
0.021	0.005	0.025	0.089
(0.02J相当)	(0.01J相当)	(0.05J相当)	(0.02J相当)

表3 定量下限推定値(μg/g)

ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
0.05	0.01	0.06	0.22
(0.04J相当)	(0.02J相当)	(0.12J相当)	(0.05J相当)

表4 ICP 質量分析法と素試験結果

試験回数	無添加試料				添加試料			(SP)-(SmAv) (μg/g)
	濃度 (μg/L)	採取量 (g)	含量 (μg/g)	濃度平均 (SmAv)	濃度 (μg/L)	採取量 (g)	含量 (SP) (μg/g)	
1	0.021	0.5030	0.002	0.000	1.708	0.5043	0.169	0.169
2	0.012	0.5011	0.001		1.760	0.5047	0.174	0.174
3	0.009	0.5025	0.000		1.759	0.5017	0.175	0.175
4	0.011	0.5020	0.001		1.772	0.5007	0.176	0.176
5	0.006	0.5017	0.000		1.780	0.5016	0.177	0.177
6	0.010	0.5042	0.000		1.860	0.5048	0.184	0.184
SD	0.006	-	0.001	-	0.050	-	0.005	0.005
SD*4.03	-	-	-	-	-	-	-	0.021
SD*10	-	-	-	-	-	-	-	0.05

表5 ICP質量分析法カドミウム試験結果

試験回数	無添加試料				添加試料			(SP)-(SmAv) ( $\mu\text{g/g}$ )
	濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	採取量 (g)	含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	平均 (SmAv)	濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	採取量 (g)	含量 (SP) ( $\mu\text{g/g}$ )	
1	0.020	0.5030	0.001	0.001	0.512	0.5043	0.050	0.049
2	0.020	0.5011	0.001		0.510	0.5047	0.050	0.049
3	0.019	0.5025	0.001		0.492	0.5017	0.049	0.048
4	0.019	0.5020	0.001		0.496	0.5007	0.049	0.048
5	0.019	0.5017	0.001		0.502	0.5016	0.050	0.049
6	0.021	0.5042	0.002		0.503	0.5048	0.049	0.048
SD	0.001	-	0.001	-	0.008	-	0.001	0.001
SD*4.03	-	-	-	-	-	-	-	0.005
SD*10	-	-	-	-	-	-	-	0.01

表6 ICP質量分析法鉛試験結果

試験回数	無添加試料				添加試料			(SP)-(SmAv) ( $\mu\text{g/g}$ )
	濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	採取量 (g)	含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	平均 (SmAv)	濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	採取量 (g)	含量 (SP) ( $\mu\text{g/g}$ )	
1	0.018	0.5030	0.001	0.003	0.520	0.5043	0.051	0.048
2	0.019	0.5011	0.001		0.535	0.5047	0.053	0.050
3	0.021	0.5025	0.002		0.524	0.5017	0.052	0.049
4	0.020	0.5020	0.001		0.522	0.5007	0.052	0.049
5	0.014	0.5017	0.001		0.665	0.5016	0.066	0.063
6	0.166	0.5042	0.016		0.530	0.5048	0.052	0.049
SD	0.061	-	0.007	-	0.057	-	0.006	0.006
SD*4.03	-	-	-	-	-	-	-	0.025
SD*10	-	-	-	-	-	-	-	0.06

表7 ICP質量分析法水銀測定結果

試験回数	無添加試料				添加試料			(SP)-(SmAv) ( $\mu\text{g/g}$ )
	濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	採取量 (g)	含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	平均 (SmAv)	濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	採取量 (g)	含量 (SP) ( $\mu\text{g/g}$ )	
1	0.015	0.5030	0.037	0.012	0.380	0.5043	0.941	0.929
2	0.007	0.5011	0.017		0.391	0.5044	0.968	0.956
3	0.003	0.5025	0.007		0.401	0.5029	0.996	0.984
4	0.002	0.5020	0.004		0.399	0.5014	0.994	0.982
5	0.002	0.5017	0.004		0.399	0.5018	0.993	0.981
6	0.002	0.5042	0.004		0.393	0.5035	0.975	0.963
SD	0.006	-	0.014	-	0.008	-	0.022	0.022
SD*4.03	-	-	-	-	-	-	-	0.089
SD*10	-	-	-	-	-	-	-	0.22

表8 検出下限推定値( $\mu\text{g/g}$ )

カドミウム	鉛
0.006	0.05
(0.02J相当)	(0.10J相当)

表9 定量下限推定値( $\mu\text{g/g}$ )

カドミウム	鉛
0.02	0.13
(0.04J相当)	(0.26J相当)

表10 原子吸光光度法(プラスチック製医薬品容器試験法)カドミウム試験結果

試験回数	無添加試料				添加試料			(SP)-(SmAv) ( $\mu\text{g/g}$ )
	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	採取量 (g)	含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	平均 (SmAv)	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	採取量 (g)	含量 (SP) ( $\mu\text{g/g}$ )	
1	0.0021	5.0001	0.0041	0.0035	0.0273	5.0008	0.0545	0.0510
2	0.0017	5.0003	0.0033		0.0277	5.0045	0.0553	0.0518
3	0.0022	5.0026	0.0043		0.0282	5.0085	0.0563	0.0528
4	0.0018	5.0092	0.0035		0.0288	5.0032	0.0575	0.0540
5	0.0017	5.0004	0.0033		0.0281	5.0048	0.0561	0.0526
6	0.0014	5.0048	0.0027		0.0271	5.0023	0.0541	0.0506
SD	0.0003	-	0.0006	-	0.0007	-	0.0013	0.0013
SD*4.03	-	-	-	-	-	-	-	0.006
SD*10	-	-	-	-	-	-	-	0.02

表11 原子吸光光度法（プラスチック製医薬品容器試験法）鉛試験結果

試験回数	無添加試料				添加試料			(SP)-(SmAv) ( $\mu\text{g/g}$ )
	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	採取量 (g)	含量 ( $\mu\text{g/g}$ )	濃度平均 (SmAv)	濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	採取量 (g)	含量(SP) ( $\mu\text{g/g}$ )	
1	-0.0008	5.0012	0	0.0015	0.1462	5.0004	0.2923	0.2908
2	0.0012	5.0000	0.0024		0.1442	5.0020	0.2882	0.2867
3	0.0012	5.0011	0.0023		0.1442	5.0019	0.2882	0.2867
4	0.0012	5.0016	0.0023		0.1383	5.0005	0.2765	0.2750
5	-0.0008	5.0020	0		0.1502	5.0008	0.3003	0.2988
6	0.0012	5.0030	0.0023		0.1562	5.0001	0.3123	0.3108
SD	0.0011	-	0.0013	-	0.0061	-	0.0123	0.0123
SD*4.03	-	-	-	-	-	-	-	0.050
SD*10	-	-	-	-	-	-	-	0.13

表12 原子吸光光度法（プラスチック製医薬品容器試験法）添加回収率(%)

試験回数	カドミウム	鉛
1	102	116
2	104	115
3	106	115
4	108	110
5	105	120
6	101	124
平均	104	117

表13 検出下限推定値( $\mu\text{g/g}$ )

ヒ素	カドミウム	鉛
0.111 (0.08J相当)	0.005 (0.01J相当)	0.053 (0.11J相当)

表14 定量下限推定値( $\mu\text{g/g}$ )

ヒ素	カドミウム	鉛
0.28 (0.19J相当)	0.02 (0.04J相当)	0.14 (0.28J相当)