

参考

第十六改正 日本薬局方

(平成23年3月24日 厚生労働省告示第65号)

の質量と粒子間空隙容積の因子を含んだ粉体の体積との比である。したがって、かさ密度は粉体の粒子密度と粉体層内での粒子の空間的配列に依存する。かさ密度は、国際単位系では kg/m^3 であるが、メスシリンダーを用いて測定するので g/mL で表される($1\text{g/mL}=1000\text{kg/m}^3$)。なお、これは g/cm^3 で表してもよい。

粉体のかさ特性は、試料の調製法、処理法や保存法、すなわち、粉体がどのように取り扱われたかに依存する。粒子は、一連のかさ密度を持つように充てんすることができ、また、粉体層をこくわずか乱すだけでもかさ密度は変化する。このように、粉体のかさ密度を再現性よく測定するのは極めて難しいので、結果を記録する際には、どのようにして測定したかを明記しておくことが重要である。

粉体のかさ密度は、ふるいを通してメスシリンダーに入れた既知質量の粉体試料の体積を測定する(第1法)か、又はポリュメーターを通して容器内に入れた既知体積の粉体試料の質量を測定する(第2法)か、若しくは測定用容器(第3法)を用いることによって求める。これらの中で第1法及び第3法を用いるのが望ましい。

1.1. 第1法 (メスシリンダーを用いる方法)

1.1.1. 操作法

保存中に形成するかも知れない凝集体を解砕するために、必要ならば、試験を行うのに十分な量の粉体を1.0mm以上の目開きを持つふるいを通す。この操作は試料の性質を変化させないよう静かに行わねばならない。0.1%の精度で秤量した約100gの試料(m)を圧密せずに乾いた250mLメスシリンダー(最小目盛単位:2mL)に静かに入れる。必要ならば、粉体層の上面を圧密せずに注意深くならし、ゆるみかさ体積(V_0)を最小目盛単位まで読み取る。 m/V_0 によってかさ密度(g/mL)を計算する。この特性値を測定するためには、一般に繰り返し測定することが望ましい。

粉体の密度が小さすぎるか又は大きすぎる、すなわち、試料のゆるみかさ体積が250mL以上であるか又は150mL以下の場合には、試料量として100gを用いることはできない。したがって、このような場合には、試料のゆるみかさ体積が150mLから250mL(メスシリンダーの全容積中に占めるかさ体積が60%以上)となるような、別の試料量を選択しなければならぬ。この場合、試料の質量を結果の項目中に記載しておく。

50mLから100mLのかさ体積を持つ試料については、最小目盛単位が1mLの100mLメスシリンダーを用いることができる。この場合、メスシリンダーの容積を結果の項目中に記載しておく。

1.2. 第2法 (ポリュメーターを用いる方法)

1.2.1. 装置

装置¹⁾(図3.01-1)は目開き1.0mmのふるいを取り付けた上部漏斗から構成される。この漏斗は、粉体が通過するときに、その上を滑落したり跳ね上がったりする4枚のガラス製邪魔板が取り付けられたパッフル・ボックスの上部に固定されている。パッフル・ボックスの底部には、ボックスの直下に置かれた、粉体を集めてカップに注入できるような漏斗がある。このカップは円筒形(容積 $25.00 \pm 0.05\text{mL}$ 、内径 $30.00 \pm 2.00\text{mm}$)又は立方体(容積 $16.89 \pm 0.20\text{mL}$ 、一辺の長さ $25.4 \pm 0.076\text{mm}$)である。

3.01 かさ密度及びタップ密度測定法

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。なお、三薬局方で調和されていない部分は「^{*}」で囲むことにより示す。

^{*}かさ密度及びタップ密度測定法は、それぞれ粉末状医薬品の疎充てん時及びタップ充てん時におけるみかけの密度を測定する方法である。疎充てんとは、容器中に粉体を圧密せずにゆるやかに充てんすることであり、タップ充てんとは、粉体を充てんした容器を一定高さより一定速度で繰り返し落下させ、容器中の粉体のかさ体積がほぼ一定となるまで密に充てんすることである。

1. かさ密度

粉体のかさ密度は、タップしない(ゆるみ)状態での粉体試料

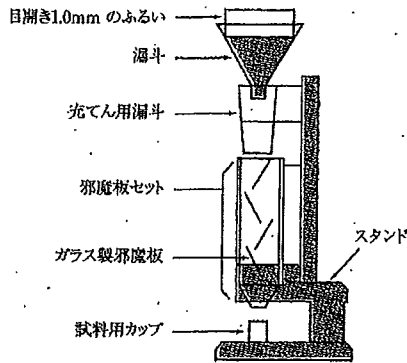


図3.01-1 ポリリメーター

1.2.2. 操作法

立方体カップの場合には最少量 25cm^3 、円筒形カップの場合には最少量 36cm^3 の粉体を用い、装置を通して試料の受器となるカップ内に過剰の粉体を溢れるまで流下させる。カップの上面に垂直に立てて接触させたヘラの刃を滑らかに動かし、圧密やカップからの粉体の溢流を防ぐためにヘラを垂直にしたままで、カップの上面から過剰の粉体を注意深くすり落とす。カップの側面からも試料をすべて除去し、粉体の質量(m)を0.1%まで測定する。式 m/V_0 (V_0 はカップの容積)によってかさ密度(g/mL)を計算する。三つの異なった試料を用いて、3回の測定値の平均値を記録する。

1.3. 第3法 (容器を用いる方法)

1.3.1. 装置

装置は図3.01-2に示すようなステンレス製の100mL円筒形容器から構成される。

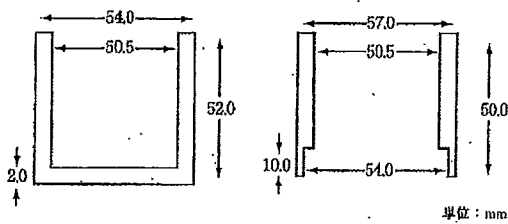


図3.01-2 測定用容器(左)と補助円筒(右)

1.3.2. 操作法

保存中に形成された凝集体を解砕し、得られた試料を測定用容器に溢れるまで自由に流入させるために、必要ならば、試験を行うのに十分な量の試料を1.0mmのふるいを通して調製する。第2法と同様に容器の上面から過剰の粉体を注意深くすり落とす。あらかじめ測定しておいた空の測定用容器の質量を差し引くことによって、粉体の質量(m)を0.1%まで測定する。式 $m/100$ によってかさ密度(g/mL)を計算し、三つの異なった試料を用いて、3回の測定値の平均値を記録する。

2. タップ密度

タップ密度は、粉体試料を入れた容器を機械的にタップした後で得られる、増大したかさ密度である。

タップ密度は粉体試料を入れた測定用メスシリンダー又は容器を機械的にタップすることにより得られる。粉体の初期体積又は質量を測定した後、測定用メスシリンダー又は容器を機械的にタップし、体積又は質量変化がほとんど認められなくなる

まで体積又は質量を読み取る。機械的タップは、メスシリンダー又は容器を持ち上げ、自重下で以下に述べる三つの方法のいずれかによって所定の距離を落下させることにより行う。タップ中に生じる塊の分離をできるだけ最小限にするために、タップ中にメスシリンダー又は容器を回転させることができるような装置がよい。

2.1. 第1法

2.1.1. 装置

装置(図3.01-3)は、次の部品から構成される。

(i) 質量 $220 \pm 44\text{g}$ の250mLメスシリンダー(最小目盛単位: 2mL)

(ii) $3 \pm 0.2\text{mm}$ の高さから公称250 ± 15 回/分、又は $14 \pm 2\text{mm}$ の高さから公称300 ± 15 回/分のタップ速度を与えることができる落下装置。メスシリンダー用の $450 \pm 10\text{g}$ の質量を持つ支持台。

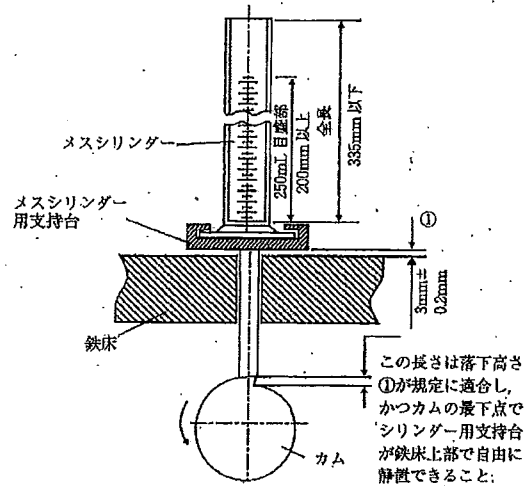


図3.01-3 タッピング装置

2.1.2. 操作法

かさ体積(V_0)の測定について先に述べたようにして行う。メスシリンダーを支持台に装着する。同じ粉体試料について10回、500回及び1250回タップし、対応するかさ体積 V_{10} 、 V_{500} 及び V_{1250} を最小目盛単位まで読み取る。 V_{500} と V_{1250} の差が2mL以下であれば、 V_{1250} をタップ体積とする。 V_{500} と V_{1250} の差が2mLを超える場合には、連続した測定値間の差が2mL以下となるまで1250回ずつタップを繰り返す。なお、バリデートされていれば、粉体によってはタップ回数はより少なくてもよい。式 m/V_f (V_f は最終タップ体積)を用いてタップ密度(g/mL)を計算する。この特性値を測定するためには、一般に測定は繰り返すことが望ましい。結果と共に、落下高さも記載しておく。

100gの試料を用いることができない場合には、試料量を減じ、 $240 \pm 12\text{g}$ の質量を持つ支持台の上に固定された $130 \pm 16\text{g}$ の適切な100mLメスシリンダー(最小目盛単位1mL)を用いる。試験条件の変更については、結果の項目中に記載しておく。

2.2. 第2法

2.2.1. 操作法

250回/分の公称速度で $3 \pm 0.2\text{mm}$ の固定した落下高さを得ら

れるタップ密度測定器を用いるほかは、第1法で指示されたように行う。

2.3. 第3法

2.3.1. 操作法

図3.01-2に示した補助円筒を装着した測定用容器を用いて、かさ密度の測定法に従って行う。適切なタップ密度測定器を用いて補助円筒付きの測定用容器を50~60回/分でタップする。200回タップして補助円筒を取り外し、かさ密度測定における第3法で示した測定用容器の上面から過剰の粉体を注意深くすり落とす。タップ操作を更に400回繰り返す。200回及び400回タップ後に得られた二つの質量の差が2%を超えた場合には、二つの連続した測定値間の差が2%未満となるまで更に200回ずつタップして、試験を行う。式 $m/100$ (m は測定用容器中の粉体質量)を用いてタップ密度 (g/mL)を計算し、三つの異なった試料を用いて、3回の測定値の平均値を記録する。タップ高さも含めた試験条件を結果の項目中に記載しておく。

3. 粉体の圧縮性の尺度

粉体のかさ特性に影響する粒子間相互作用は、粉体の流動を妨げる相互作用でもあるので、かさ密度とタップ密度を比較することは、ある特定の粉体におけるこれらの相互作用の相対的重要性を示す一つの尺度となり得る。このような比較は、例えば、圧縮性指数又はHausner比のように、粉体の流れやすさの指標としてしばしば用いられる。

圧縮性指数とHausner比は、先に述べたように粉体の圧縮性の尺度となる。これらはそれ自体、粉体層の沈下能の尺度であり、これによって粒子間相互作用の相対的重要性を評価することができる。自由流動性のある粉体については、このような相互作用はあまり重要ではなく、かさ密度とタップ密度の値は比較的近接している。流動性の乏しい粉体では粒子間相互作用はしばしば大きくなり、かさ密度とタップ密度の間にはより大きな差違が認められる。これらの差違は圧縮性指数とHausner比に反映する。

圧縮性指数：次式によって計算する。

$$\text{圧縮性指数} = (V_0 - V_f) / V_0 \times 100$$

V_0 ：ゆるみかさ体積

V_f ：最終タップ体積

Hausner比：次式によって計算する。

$$\text{Hausner比} = V_0 / V_f$$

試料によっては、圧縮性指数は V_0 の代わりに V_{10} を用いて求めることができる。 V_0 の代わりに V_{10} を用いた場合は、試験結果に明記する。

^D 装置(Scott Volumeter)は、ASTM 32990に準拠している。

4.01 エンドトキシン試験法

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

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。

1. 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℃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。

2. 溶液の調製

2.1. 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標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。エンドトキシン標準品の力価は、世界保健機関のエンドトキシン国際標準品を基準として標定される。なお、エンドトキシン単位はEUで示し、1EUは1エンドトキシン国際単位(IU)に等しい。

2.2. 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十分に振り混ぜた後、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。

2.3. 試料溶液の調製

別に規定するもののほか、被検試料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。ライセート試薬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。これらの試液又は溶液は、エンドトキシンが検出されないこと、及び反応干渉因子を含まないことが保証されたものでなければならない。

3. 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

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

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。なお、 K は発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりのエンドトキシンの量(EU/kg)であり、 M は体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量である。ただし、注射剤が頻回又は持続的に投与される場合は、 M は1時間以内に投与される注射剤の最大総量とする。

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。

4. 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、「4.1.予備試験」として「4.1.1.ライセート試薬の表示感度確認試験」及び「4.1.2.反応干渉因子試験」を行う。

4.1. 予備試験

4.1.1. 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、2 λ 、1 λ 、0.5 λ 及び0.25 λ の4種の濃度のエンドトキシン標準溶液を調製する。

ライセート試液及びそれと等しい量、通例、0.1mL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 $^{\circ}$ Cに保ち、振動を避けて60 \pm 2分間静置した後、穏やかに約180 $^{\circ}$ 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種の液を一組とした試験を4回行う。

各回の試験において、濃度0.25 λ のエンドトキシン標準溶液がすべて陰性を示すとき、試験は有効である。試験が有効でないときは、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4回の試験の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0.5～2 λ 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と判定し、以下の試験にはその表示感度を用いる。

4.1.2. 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4.01-1に従い、A、B、C及びD液を調製し、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、4.1.1.に従う。

B液及びC液の幾何平均エンドポイント濃度は、4.1.1.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。

A及びD液の試験結果がすべて陰性で、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液の試験結果において幾何平均エンドポイント濃度が0.5~2λ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。より高感度のライセート試薬を用いることにより、被検試料の最大有効希釈倍数をより大きくすることができる。なお、試料溶液から反応干渉作用を除くために、試料溶液又は希釈した試料溶液につき、適切な処理(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。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

表4.01-1

液	エンドトキシン濃度/被添加液	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
A ^{*1}	0/試料溶液	—	—	—	4
B ^{*2}	2λ/試料溶液	試料溶液	1	2λ	4
			2	1λ	
			4	0.5λ	
8	0.25λ				
C ^{*3}	2λ/エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	1	2λ	2
			2	1λ	
			4	0.5λ	
8	0.25λ				
D ^{*4}	0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	2

*1 陰性対照。試料溶液のみ。
 *2 反応干渉因子試験のための、標準エンドトキシンを添加した試料溶液。
 *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液。
 *4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

4.2. 限度試験法

本法は、被検試料が各条に規定されたエンドトキシン規格を超えるエンドトキシンを含むか否かを、ライセート試薬の表示感度に基づいてゲル化反応により判定する方法である。

4.2.1. 操作法

表4.01-2に従い、A、B、C及びD液を調製し、これらの4種の液を一組として試験を2回行う。A及びB液の試料溶液は、4.1.2.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、4.1.1.に準じる。

表4.01-2

液	エンドトキシン濃度/被添加液	試験の回数
A ^{*1}	0/試料溶液	2
B ^{*2}	2λ/試料溶液	2
C ^{*3}	2λ/エンドトキシン試験用水	2
D ^{*4}	0/エンドトキシン試験用水	2

*1 限度試験のための試料溶液。最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる。
 *2 陽性対照。A液と同倍数で希釈された試料溶液で、濃度2λとなるように標準エンドトキシンを添加したもの。
 *3 陽性対照。濃度2λのエンドトキシン標準溶液。
 *4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

4.2.2. 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

ンドトキシン試験に適合とし、いずれも陽性のとき、不適とする。

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、この2回の試験を繰り返し行う。その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試験に適合とする。両方又は一方が陽性の場合には不適とする。

ただし、陽性の結果が得られたいずれの場合でも、試料溶液の希釈倍数が最大有効希釈倍数未満の場合、最大有効希釈倍数又はそれを超えない希釈倍数で試験をやり直すことができる。

4.3. 定量試験法

本法は、被検試料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めることにより測定する方法である。

4.3.1. 操作法

表4.01-3に従い、A、B、C及びD液を調製する。これらの4種の液を一組として試験を2回行う。A及びB液の試料溶液は、4.1.2.に適合する溶液を用いる。

試験の操作条件は4.1.1.に準じる。

表4.01-3

液	エンドトキシン濃度/被添加液	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
A ^{*1}	0/試料溶液	エンドトキシン試験用水	1	—	2
			2	—	
			4	—	
8	—				
B ^{*2}	2λ/試料溶液	—	1	2λ	2
C ^{*3}	2λ/エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	1	2λ	2
			2	1λ	
			4	0.5λ	
8	0.25λ				
D ^{*4}	0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	2

*1 定量試験のための試料溶液。図4.1.1.に準じて、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適宜変更することができる。
 *2 陽性対照。A液の最小希釈倍数と同倍数で希釈された試料溶液に、濃度2λとなるように標準エンドトキシンを添加したもの。
 *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液。
 *4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

4.3.2. エンドトキシン濃度の算出及び判定

2回の試験のいずれの結果においても、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0.5~2λの範囲にあるとき、試験は有効とする。

A液の希釈系列において、陽性を示す最大の希釈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釈倍数を乗じて得た値を試料溶液のエンドトキシン濃度とする。

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

A液の希釈系列のすべてが陽性のとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は、λにA液の最大希釈倍数を乗じた値以上とする。試料溶液のエンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシン濃度(EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位)を算出する。

2回の試験により被検試料について求めた二つのエンドトキシン濃度(EU/mL, EU/mg, EU/mEq又はEU/単位)のいずれもが、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とする。

5. 光学的定量法

5.1. 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、被検試料のエンドトキシン濃度を測定する方法である。エンドポイント比濁法とカイネティック比濁法がある。

エンドポイント比濁法は、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。

5.2. 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。エンドポイント比色法とカイネティック比色法がある。

エンドポイント比色法は、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。

5.3. 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、「5.3.1. 検量線の信頼性確認試験」及び「5.3.2. 反応干渉因子試験」を行う。

5.3.1. 検量線の信頼性確認試験

ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性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。

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内で、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、8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桁より大きくするとき、1桁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、その絶対値 $|r|$ が0.980以上であるとき、検量線の信頼性は確認されたと判定する。

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。

5.3.2. 反応干渉因子試験

表4.01-4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4.01-4

液	エンドトキシン濃度	被添加液	試験管又はウエルの数
A ^{*1}	0	試料溶液	2以上
B ^{*2}	検量線の中点濃度 ^{*3}	試料溶液	2以上
C ^{*3}	B濃度以上	エンドトキシン試験用水	各濃度、2以上
D ^{*4}	0	エンドトキシン試験用水	2以上

*1 試料溶液のみ(試料溶液のエンドトキシン濃度測定用)。最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈することができる。

*2 A液と同倍数で希釈された試料溶液で、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標準エンドトキシンを添加したものである。

*3 5.3.1. で用いた各種濃度のエンドトキシン標準溶液(検量線作成用)。

*4 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

本試験は次の二つの条件に適合するとき、有効である。

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し、反応干渉因子試験に適合とする。

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、適切な処理(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。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得られることを確認する。

5.4. 定量

5.4.1. 操作法

表4.01-4に示すA、B、C及びD液を調製し、5.3.2. に準じて操作する。

5.4.2. 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液の平均エンドトキシン濃度を算出する。

本試験は次のすべての条件に適合するとき、有効である。

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。

5.4.3. 判定

A液の平均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とする。