

ICP-MSによる元素不純物試験法と重金属試験法、 及びヒ素試験法との比較検討

高山 信幸, 米田 哲也, 小木曾 英夫, 小笠原 勝, 薬事研究会分析部会

The comparative study of ICP-MS elemental impurity test method, heavy metal test method, and arsenic test method

Nobuyuki TAKAYAMA, Tetsuya YONEDA, Hideo OGISO, Masaru OGASAWARA,
The Chemical Analysis Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

第十八改正日本薬局方には、元素不純物試験法<2.66>に係る規定に従って適切に製剤を管理する旨の記載が通則に盛り込まれている。本検討では、元素不純物試験法がこれまで用いてきた重金属試験及び、ヒ素試験法と比較して、測定結果にどの程度の差異があるのか検討を行った。

添加回収試験において、銀 (Ag)、オスミウム (Os)、鉛 (Pb) の回収率が過大に評価された。Osは酸の存在下でマイクロ波を照射すると酸化して、揮発性の四酸化オスミウムを生成する。四酸化オスミウムがスプレーチャンバー内で気化し過剰に装置に導入されることが、過大評価の原因である。そのため、安定化剤を添加する検討を行った。安定化剤として、チオ尿素、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、あるいは、メタ重亜硫酸カリウムを用いたところ、Osの添加回率は規定の範囲内となった。Ag及びPbの過大評価に関しては、標準液中のAg及びPbが塩化銀 (AgCl) や塩化鉛 (PbCl₂) などに変化し沈殿した結果、標準液中のAg及びPb濃度が低下したことが原因であると分かった。これら沈殿物は、標準原液を調製後一定時間保管した場合に認められ、標準液中の塩酸と反応して生成したものと考えられた。

Summary

The Japanese Pharmacopoeia 18th edition has contained the general rules that drugs should be appropriately controlled within acceptable limits in accordance with the elemental impurity test method<2.66>. In this study, we examined the difference in measurement results in the elemental impurity test method, compared with the heavy metal test and arsenic test method that have been used so far.

In the process of spike recovery test, the recovery rates of silver (Ag), osmium (Os), and lead (Pb) were overestimated. Os can be oxidized by microwave irradiation under acidic conditions, then it forms osmium tetroxide, which is a volatile species. Under such conditions, osmium tetroxide is volatile in the spray chamber and gets introduced into the ICP-MS system in large excess. Because of this, the amount of osmium can be overestimated. So, we investigated the effects of stabilizers. As stabilizers, thiourea, ascorbic acid, sodium sulfite, potassium metabisulfite were used. Regarding the overestimation of silver and lead, lowered concentrations of Ag and Pb in standard solution due to occurring to precipitate such as AgCl and PbCl₂ were revealed to be the cause of the overestimation. These precipitates were generated in a certain period after preparing the standard solution probably by reacting with standard solution-derived hydrochloric acid.

キーワード：医薬品, 元素不純物, 誘導結合プラズマ質量分析計, マイクロ波分解

Key words：drug, impurity element, inductivity coupled plasma mass spectrometry, microwave decomposition

緒 言

厚生労働省医薬品局より発行された「医薬品の元素不純物ガイドラインについて」では、平成29年4月1日以降に承認申請される新医薬品に対してICHで検討された元素不純物ガイドラインICH-Q3Dが適用されることとなり、元素不純物の各成分の一日の許容曝露

量 (PDE値) が設定されている (表1)¹⁾。令和3年6月公示の第十八改正日本薬局方には、日本薬局方の製剤は、一般試験法の元素不純物試験法<2.66>に従って管理する旨の記載が通則に盛り込まれており、経過措置期間内に元素不純物試験法を運用する必要がある²⁾。

富山県薬事総合研究開発センターが所有する誘導結

合プラズマ質量分析計（7900 ICP-MS, アジレント社製）はppbレベルでの微量元素成分を測定することができる。本報告書では、元素不純物分析の包括的な理解を深めることを目的とし、ICH-Q3Dにおけるオプ

ション1が選択された場合を例（表1）とした。元素不純物試験法に基づく管理が、従来の重金属試験法<1.07>やヒ素試験法<1.11>と比較し、試験結果に及ぼす影響を確認したため、その結果を報告する。

表1 オプション1のための元素不純物許容濃度。

一日投与量が10 g以下の製剤中の元素不純物の評価をするためにオプション1が選択された場合。

元素	クラス	経口製剤の濃度 µg/g	注射剤の濃度 µg/g	吸入剤の濃度 µg/g
Cd	1	0.5	0.2	0.2
Pb	1	0.5	0.5	0.5
As	1	1.5	1.5	0.2
Hg	1	3	0.3	0.1
Co	2A	5	0.5	0.3
V	2A	10	1	0.1
Ni	2A	20	2	0.5
Tl	2B	0.8	0.8	0.8
Au	2B	10	10	0.1
Pd	2B	10	1	0.1
Ir	2B	10	1	0.1
Os	2B	10	1	0.1
Rh	2B	10	1	0.1
Ru	2B	10	1	0.1
Se	2B	15	8	13
Ag	2B	15	1	0.7
Pt	2B	10	1	0.1
Li	3	55	25	2.5
Sb	3	120	9	2
Ba	3	140	70	30
Mo	3	300	150	1
Cu	3	300	30	3
Sn	3	600	60	6
Cr	3	1100	110	0.3

試験方法及び結果

① 重金属試験法と元素不純物試験法での比較検討

本検討では、ICH-Q3DのJ値に相当する量の金属を添加した製剤を、重金属試験法 <1.07> 第3法と元素不純物試験法 <2.66> でそれぞれ検液を調製し、各試験を実施して結果を比較した。加えて、各検液中の元素濃度を測定し、添加回収率を評価した。

金属添加製剤の作製

表2で示される標準原液を用いて、経口製剤中の許容濃度から換算したJ値となるように金属を製剤に添加した。使用した製剤の含有成分と外観を表3に示す。

表2 標準原液の組成

使用標準原液（アジレント製）	含有元素
ICH/USP Oral Target Elements Standard A	5 ppm : Cd, Pb 15 ppm : As 30 ppm : Hg
ICH/USP Oral Target Elements Standard B	8 ppm : Tl 50 ppm : Co 100 ppm : V 150 ppm : Ag, Se 200 ppm : Ni
ICH/USP Oral Target Elements Standard C	100 ppm : Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru
ICH/USP Oral Target Elements Standard D	550 ppm : Li 1,200 ppm : Sb 1,400 ppm : Ba 3,000 ppm : Cu, Mo 6,000 ppm : Sn 11,000 ppm : Cr

表3 検討①で使用した錠剤サンプルの成分組成（1錠あたり 約0.3g）

成分名	成分比率（%）	外観
D-マンニトール	77	
結晶セルロース	10	
コーンスターチ	7	
アスコルビン酸	3	
スクラロース	0.07	
黄色4号	0.003	
ヒドロキシプロピルセルロース	3	

重金属試験法（灰化法）²⁾

金属添加製剤1錠を石英製又は磁製のるつぼに入れ、初めは注意して弱く加熱した後、500℃～600℃で強熱し、灰化した。冷後、王水1 mLを加え、水浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸3滴で潤し、熱湯10 mLを加えて2分間加温した。次にフェノールフタレイン試液1滴を加え、アンモニア試液を液が微赤色となるまで滴下し、希酢酸2 mLを加え、検液のみろ過し、水10 mLで洗い、ろ液及び洗液をネスラー管に入れ、水を加えて50 mLとし、検液（金属添加試料）とした。比較液（鉛添加試料）は王水1 mLを水浴上で蒸発乾固し、以下検液の調製法と同様に操作し、鉛標準液10 ppmを0.3 mL加え、水を加えて50 mLとした。ブランク溶液は空のるつぼを検液の調製法と同様に操作し調製した。検液、比較液、及びブランク溶液に硫化ナトリウム試液1滴ずつを加えて混和し、5分間放置した後、白色の背景を用い、上方または側方から観察して液の色を比較した。

*比色後、これら3つの溶液を重金属試験試料としてICP-MSにて測定した。

元素不純物試験法（マイクロ波分解法）

マイクロ波分解容器に製剤を投入し、超純水6 mL、35%塩酸1 mL、70%硝酸3 mLを加え、以下に示した条件でマイクロ波分解した。冷却後、超純水で希釈し、50 mLとした。また、ブランク溶液及び添加回収試験溶液も同様の方法で調製した。

マイクロ波分解の条件

1. 350 Wで15分間マイクロ波照射
2. 15分間で700 Wまでマイクロ波の出力上昇
3. 700 Wで20分間マイクロ波照射
4. 50℃まで冷却（約30分間）

標準溶液の調製

表2に示した標準原液を用いて、経口製剤中の許容濃度から換算したJ値を基準とし、0J, 0.5J, 1J, 1.5Jを含む4点の濃度となるように設定し（表4）、希釈を行った。酸の最終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように調製した。

表4 標準溶液の元素濃度

元素	レベル 単位 [ppm]			
	0J レベル 1	0.5J レベル 2	1J レベル 3	1.5J レベル 4
Cd	0	0.0015	0.003	0.0045
Pb	0	0.0015	0.003	0.0045
As	0	0.0045	0.009	0.0135
Hg	0	0.009	0.018	0.027
Co	0	0.015	0.03	0.045
V	0	0.03	0.06	0.09
Ni	0	0.06	0.12	0.18
Tl	0	0.0024	0.0048	0.0072
Au	0	0.03	0.06	0.09
Pd	0	0.03	0.06	0.09
Ir	0	0.03	0.06	0.09
Os	0	0.03	0.06	0.09
Rh	0	0.03	0.06	0.09
Ru	0	0.03	0.06	0.09
Se	0	0.045	0.09	0.135
Ag	0	0.045	0.09	0.135
Pt	0	0.03	0.06	0.09
Li	0	0.165	0.33	0.495
Sb	0	0.36	0.72	1.08
Ba	0	0.42	0.84	1.26
Mo	0	0.9	1.8	2.7
Cu	0	0.9	1.8	2.7
Sn	0	1.8	3.6	5.4
Cr	0	3.3	6.6	9.9

内標準溶液の調製

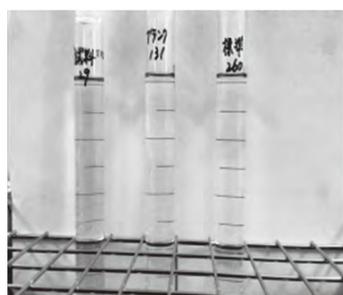
内標準原液（表5）を超純水で100倍希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように調製した。

表5 内標準原液の組成

使用標準原液（アジレント製）	含有元素
Pharma Internal Standard 1	25,000 ppb : Te
	10,000 ppb : Sc
	5,000 ppb : Ge, In, Lu, Bi

結果

重金属試験法では、添加した金属の総量が比較標準液の金属量より多いため、金属添加試料は、比較液よりも明らかに濃い色を呈した（図1 左）。ICP-MSを用いての添加回収試験の結果（図1 右）、重金属試験法の検液では多くの元素で添加回収率が低く、灰化時に揮散したと考えられた。一方で、Ag, Os, Pbについては回収率が過大評価されていた。Osは、マイクロ波を照射することで、揮発性の高い四酸化オスミウムを生じることが報告されている。マイクロ波分解の過程で四酸化オスミウムが生成し、試料導入時の噴霧部において四酸化オスミウムが気化したため、装置への導入量が多くなり、添加回収率が高く算出されたと考えられた。Ag, Pbの過大評価に関しては、検討④にて追加検証を行うこととした。



左から、金属添加試料、ブランク、鉛標準液

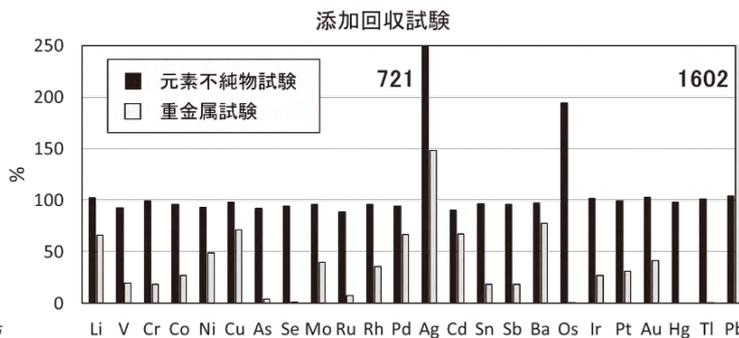


図1 重金属試験による比色法（左）とICP-MSによる測定結果（右）

表6 検討②で使用した錠剤サンプルの成分組成（1錠あたり 約0.3g）

成分名	成分比率 (%)	外観
乳糖	82.7	
結晶セルロース	9.7	
コーンスターチ	4.7	
ヒドロキシプロピルセルロース	2.9	
赤色106号	少量	

② ヒ素試験法と元素不純物試験法での比較検討

本検討では、ICH-Q3DのJ値に相当する量の金属を添加した製剤を、ヒ素試験法 <1.11> 第4法と元素不純物試験法 <2.66> でそれぞれ検液を調製し、各試験を実施して結果を比較した。加えて、各検液中の元素濃度を測定し、添加回収率を評価した。

金属添加製剤の作製

表2で示される標準原液を用いて、経口製剤中の許容濃度から換算したJ値となるように金属を製剤に添加した。使用した製剤の含有成分と外観を表6に示す。

ヒ素試験法²⁾

金属添加製剤1錠を白金製、石英製又は磁製のつぼに入れ、硝酸マグネシウム六水和物のエタノール(95)溶液(1→10)10 mLを加え、エタノールに点火して燃焼させた後、徐々に加熱し、強熱して灰化した。冷後、残留物に塩酸3 mLを加え、水浴上で加温して溶かし、検液(金属添加試料)とした。ブランク溶液は空のつぼを検液の調製法と同様に操作し調製した。

ヒ素試験装置の発生瓶に検液をとり、少量の水で洗いこんだ後、メチルオレンジ試液1滴を加え、アンモニア試液又は希塩酸を用いて中和した。中和後、薄めた塩酸(1→2)5 mLおよびヨウ化カリウム試液5 mLを加え、2～3分間放置した後、更に酸性塩化スズ(Ⅱ)試液5 mLを加え、室温で10分間放置した。次に水を加えて40 mLとし、ヒ素分析用亜鉛2 gを加え、直ちに排気管とガラス管を連結したゴム栓を発生瓶につけた。

標準色の調製は、発生瓶にヒ素標準液2 mLを正確に加え、更に薄めた塩酸(1→2)5 mL及びヨウ化カリウム試液5 mLを加えて2～3分間放置した後、酸性塩化スズ(Ⅱ)試液5 mLを加え、室温で10分間放置した。以下、上記試料と同様に操作して得た吸収液の呈色を標準色とした。

*検液をメスフラスコに移し、超純水で希釈し、

100 mLに定容した。酸の最終濃度は硝酸2.1%、塩酸0.35%となるように調製した。これをヒ素試験試料としてICP-MSにて測定した。

元素不純物試験法(マイクロ波分解法)

上述の「①重金属試験法と元素不純物試験法での比較検討」の時と同様に調製を行った。冷却後、超純水で希釈し、100 mLとした。

標準溶液の調製

表2に示した標準原液を用いて、経口製剤中の許容濃度から換算したJ値を基準とし、0J、0.5J、1J、1.5Jを含む4点の濃度となるように設定し、希釈を行った。酸の最終濃度が硝酸2.1%、塩酸0.35%となるように調製した。

内標準溶液の調製

上述の「①重金属試験法と元素不純物試験法での比較検討」の時と同様に調製を行った。

結 果

今回実施のヒ素試験法において、比較液であるヒ素標準液の濃度は50 ppb、検液は11.25 ppbとなっているため、金属添加試料は標準液よりも薄い色を呈する。試験結果では、金属添加試料は標準色よりも薄い色を呈した(図2左)。元素不純物試験法とヒ素試験法での比較においては、検証①の重金属試験法と同様にAg、Os、Pdの回収率が大幅に高かった(図2右)。ヒ素試験法では灰化する前に、硝酸マグネシウム六水和物のエタノールを用いて、試料を燃焼することにより、各金属は不揮発性となり、灰化時における揮散を防ぐことができる。試料の灰化前に硝酸マグネシウム六水和物エタノールを添加した場合と添加しなかった場合とで比較した結果を図3に示す。硝酸マグネシウム六水和物エタノールを添加した場合、Hg、Tl以外の元素の回収率は上がっており、灰化時の揮散が抑制されていると考えられる。

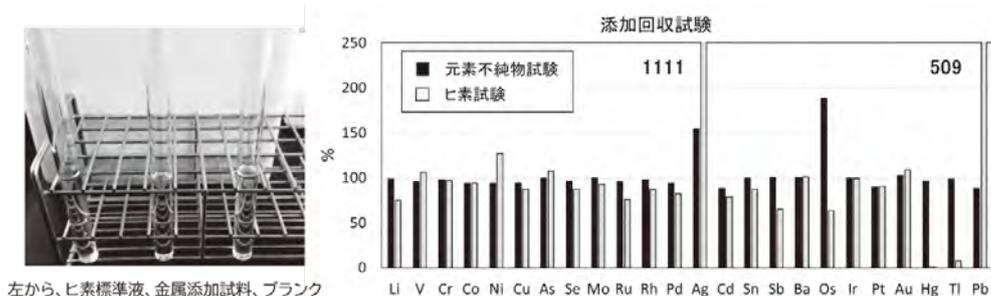


図2 ヒ素試験による比色法(左)とICP-MSによる測定結果(右)

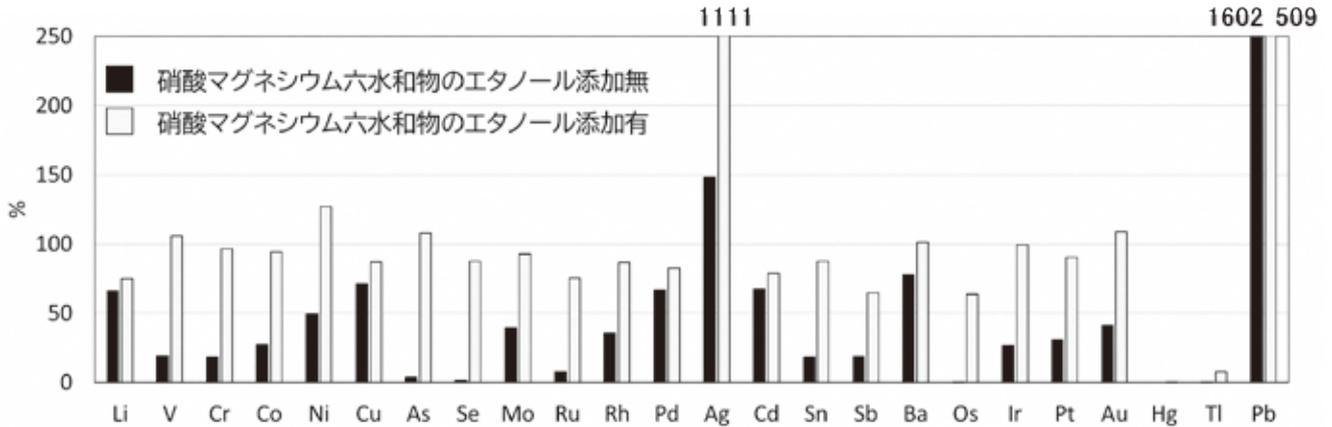


図3 硝酸マグネシウム六水和物エタノールの添加効果

③ オスミウムの高感度分析の検討

検討①②ではオスミウム (Os) が過大評価された。これはマイクロ波照射により揮発性の高い四酸化オスミウムが生じ、スプレーチャンバー内でOsが豊富な状態となり、ICP-MSに過剰に導入されたことが原因と考えられた³⁻⁵⁾。Osの安定化にはチオ尿酸・亜硫酸ナトリウム・アスコルビン酸・メタ重亜硫酸カリウムが効果的であると報告されている⁶⁾。検討③では、チオ尿酸・亜硫酸ナトリウム・アスコルビン酸・メタ重亜硫酸カリウムをそれぞれ、マイクロ波分解後の検体に添加し、オスミウムの過大評価を抑えることができるか、検討を行った。

検証①②の元素不純物試験法と同様に、金属を製剤に添加しマイクロ波照射による試料前処理を行った。マイクロ波分解後の処理液に安定化剤としてチ

オ尿酸 1 g/L, アスコルビン酸 2 g/L, 亜硫酸ナトリウム 7.5 g/L, メタ重亜硫酸カリウム 7.5 g/Lとなるようにそれぞれ添加した。

結果

チオ尿酸の添加では71%, アスコルビン酸の添加では110%, 亜硫酸ナトリウムの添加では67%, メタ重亜硫酸カリウムの添加では73%の回収率でオスミウムを測定することができた(図4)。上記の結果から、オスミウムの測定において、一定量の安定化剤の添加が過大評価の抑制に有効であることを確認した。一方で、亜硫酸ナトリウム添加時では適合基準の70%を下回っているため、最適な添加量の検討が必要である。

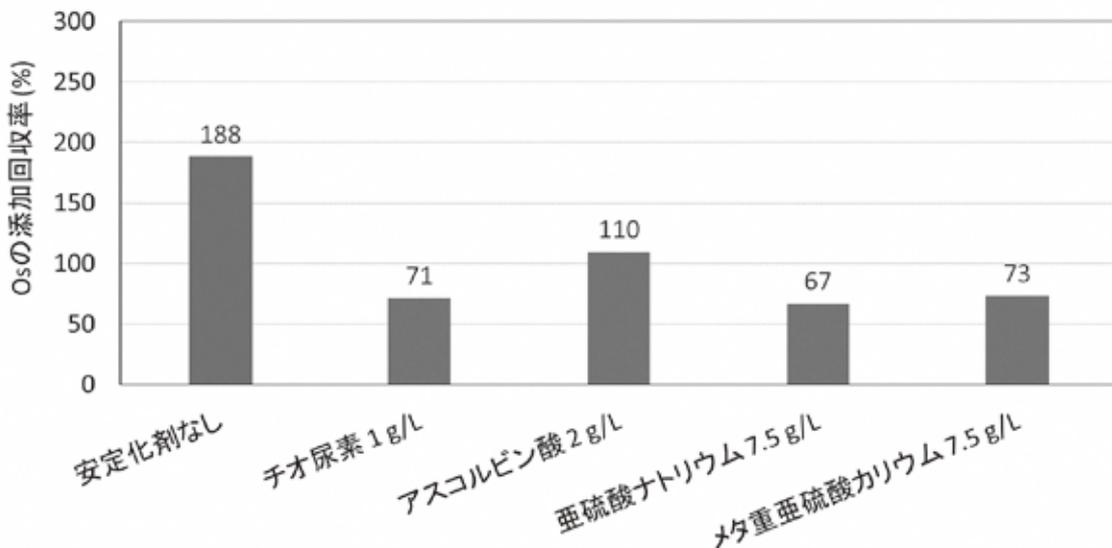


図4 オスミウムの添加回収率

④ 標準液の保存安定性に関する検討

元素不純物試験法で金属濃度の管理が義務付けられている金属は24元素である。これらの元素を同時に分析するためには、各元素の標準液を混合する必要がある。標準液には金属を水溶液中で安定化させるため、硝酸や塩酸などが添加されている。例えば、金 (Au) の標準液には塩酸が添加されているため、銀 (Ag) や鉛 (Pb) と混合すると、塩酸と

反応し塩化銀 (AgCl) や塩化鉛 (PbCl₂) などの沈殿物を生成することがある。このような沈殿物は、試薬を混合した際には確認されなくても、時間が経過することで形成することもある。ICP-MSにおける混合標準液の保存安定性については、明確な指標は存在しないため、本項目で検討した。通常の手順通りに調製した混合標準液を1週間冷所に保存し、添加回収試験を実施してその影響を評価した。

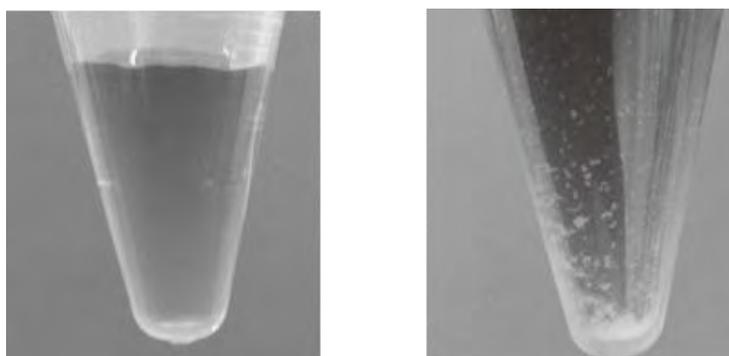


図5 調製直後の標準液 (左) と調製1週間後の標準液 (右)

結 果

図5から分かるように、調製後1週間経過した標準液では白い沈殿物が確認できる。これは、銀 (Ag) や鉛 (Pb) が塩酸と反応し塩化銀 (AgCl) や塩化鉛 (PbCl₂) が生成したためであると考えられる。これら標準液を使用して添加回収試験を実施したところ、表7が示す結果となった。調製直後の標準液を使用した場合、回収率は良好な値であるのに対し、調製1週間後の標準液では、回収率が非常に高い値となっている。これは標準液を製剤に添加する際、白い沈殿物も添加したためであると考えられる。よって標準液は用事調製とすることが望ましい。

表7 標準液の違いによる添加回収率

回収率	銀(Ag)	鉛(Pb)
調製直後の標準液	106%	101%
調製1週間後の標準液	1459%	271%

ま と め

本報告では、元素不純物試験法 <2.66> と、従来法の重金属試験法 <1.07> やヒ素試験法 <1.11> を比較し、試験法の違いが試験結果に及ぼす影響を確認した。重金属試験法及びヒ素試験法で採用される灰化法と、元素不純物試験法で採用されるマイクロ波分解法

のそれぞれで添加回収試験を実施した。灰化法では揮散の影響によりほとんどの元素の回収率が低くなった。ヒ素試験法における灰化では、硝酸マグネシウム六水和物のエタノール溶液を添加することで、Hg, Tl以外の元素の揮散が抑えられることを確認した。マイクロ波分解法ではAg, Os, Pb以外の元素の回収率が適合基準内となった。

Osの酸化による過大評価については各種安定化剤を添加することで解決した。Osは製剤に意図的に添加された場合にのみ評価対象となり、安定化剤の添加量について検討が必要となる。Ag, Pbの添加回収率における過大評価は、標準液を調製後に生成したAgClやPbCl₂が原因であると判明した。24元素分析用の標準液の調製は、用事調製とすることが重要である。

参考文献

- 1) 厚生労働省：合意ガイドライン 元素不純物ガイドラインQ3D., 4版 2014
- 2) 厚生労働省：第十八改正日本薬局方., 2021
- 3) 高山信幸, 米田哲也, 竹林憲司, 小笠原勝, 薬事研究会分析部会：ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討., 富山県薬事総合研究開発センター年報., 47 34-38 2020
- 4) 高山信幸, 米田哲也, 竹林憲司, 小笠原勝, 薬事研究会分析部会：ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討 (第2報) ., 富山県薬事総合研

究開発センター年報., 48 57-64 2021

- 5) Cornel Venzago, Maximilian Popp, Jessica Kovaca, Andrea Kunkel: Pharmacopeial requirements for elemental impurities: a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilization., *J. Anal. At. Spectrom.*, 28 1125-1129 2013
- 6) Nobuyuki Takayama, Tetsuya Yoneda, Kenji Takebayashi, Masaru Ogasawara, Kiyoshi Takatsu: Pharmacopeial requirements for elemental impurities: Stabilizers for osmium isotopes in microwave-irradiated acid digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis., *Chem. Pharm. Bull.*, 68 1034-1048 2020