一般試験法

一般試験法は、共通な試験法をまとめたものである。別に規定する場合を除き、乾燥減量試験法、色素試験法、水分測定法(カールフィッシャー法)、製剤の粒度の試験法、注射剤の不溶性異物検査法、注射剤の不溶性微粒子試験法、バイオオートグラフィー、発かび試験法、pH測定法、プラスチック製医薬品容器試験法、崩壊試験法、無菌試験法及び力価試験法は、それぞれの試験法又は測定法によって行う。

液体クロマトグラフィー、炎色反応試験法、エンドトキシン試験法、ガスクロマトグラフィー、眼軟膏剤の金属性異物試験法、鉱油試験法、紫外可視吸光度測定法、製剤均一性試験法、赤外吸収スペクトル測定法、窒素定量法(セミミクロケルダール法)、注射剤用ガラス容器試験法、定性反応、薄層クロマトグラフィー、発熱性物質試験法、微生物限度試験法及び溶出試験法は、別に規定する場合を除き、日本薬局方の一般試験法を準用する。

乾燥減量試験法

乾燥減量試験法は、試料を乾燥し、その減量を測定する方法である。この方法は乾燥することによって失われる試料中の水分、結晶水の全部又は一部及び揮発性物質などの量を測定するために用いる。医薬品各条の規格の乾燥減量の項に、その医薬品の水分、結晶水の全部又は一部及び揮発性物質などの量の許容限度の％をもって示す。また、別に規定する場合を除き、当該項の()内において、次の操作法の第1法又は第2法により試験を行うことを示す。

操作法

第1法

はかり瓶をあらかじめ、医薬品各条に規定する方法に準じて30分間乾燥し、その質量を精密に量る。試料は医薬品各条に規定する量の±10％の範囲内で採取し、はかり瓶に入れ、別に規定するもののほか、その層が5mm以下になるように広げた後、その質量を精密に量り、これを乾燥器に入れ、医薬品各条に規定する条件で乾燥する。試料が大きいときは、手早く粉砕して径2mm以下としたものを用いる。乾燥後、乾燥器から取り出し、質量を精密に量る。加熱して乾燥する場合は、加熱温度を医薬品各条に規定する温度の±2℃の範囲とし、乾燥後、デシケーター(シリカゲル)で放冷する。

医薬品各条に規定する乾燥温度よりも低温で融解する試料は、融解温度より5～10℃低い温度で、1～2時間乾燥した後、医薬品各条に規定する条件で乾燥する。乾燥剤は医薬品各条に規定するものを用い、しばしば取り替える。

第1法による場合、医薬品各条に、例えば「1.0％以下(第1法、1g、105℃、4時間)」と規定するものは、本品約1gを精密に量り、105℃で4時間乾燥するとき、その減量が本品1gにつき、10mg以下であることを示し、また、「0.5％以下(第1法、1g、減圧、酸化リン(V)、4時間)」と規定するものは、本品約1gを精密に量り、酸化リン(V)を乾燥剤としたデシケーターに入れ、4時間減圧乾燥するとき、その減量が本品約1gにつき5mg以下であることを示す。

第2法

はかり瓶をあらかじめ、試験品の場合と同様の条件で30分間乾燥し、その質量を精密に量る。試料は1g±10％の範囲内で採取し、はかり瓶に入れ、その層が5mm以下になるように広げた後、その質量を精密に量り、これを真空乾燥器に入れ、減圧下(0.67kPa以下)、60℃で3時間乾燥する。ただし、医薬品各条に、例えば「(第2法、105℃)」のように「(第2法)」の後に条件が記載されている場合には、「(第2法)」の後に記載された条件のみ変更して試験を実施する。

乾燥後、シリカゲル中を通した乾燥空気を真空乾燥器に入れて常圧に戻し、真空乾燥機から取り出し、質量を精密に量る。加温して乾燥する場合は、60℃又は医薬品各条に規定する温度の±2℃の範囲とし、乾燥後、デシケーター（酸化リン(V)又はシリカゲル）で放冷する。

$$\text{乾燥減量}(\%) = \frac{\text{乾燥によって減少した質量(mg)}}{\text{試験品の採取量(mg)}} \times 100$$

色素試験法

色素試験法は、乳房内に注入する製剤中に含まれるブリリアントブルーFCF（$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$）の量を定量する試験法である。試験は、吸光度測定法を用い、別に規定する場合を除き、次の方法で行う。

試験法

1　標準溶液　食用青色１号標準品（食品添加物公定書標準品）を硫酸を乾燥剤としたデシケーターに入れ、24時間減圧乾燥し、その約25mgを精密に量り、酢酸アンモニウム溶液（1→300）を加えて溶かし、正確に100mLとする。この液1mLを正確に量り、酢酸アンモニウム溶液（1→300）を加えて正確に100mLとし、標準溶液とする。

2　試料溶液　試料をよくかき混ぜて均一にした後、ブリリアントブルーFCF（$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$）約5mgに対応する量を精密に量り、必要ならば、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸エチル、四塩化エチレン又はベンゼン適当量を加え、これに酢酸アンモニウム溶液（1→300）20mLを加えてよく振り混ぜ、遠心分離し、水層を分取する。さらに、必要ならば、酢酸アンモニウム溶液（１→300）20mLずつで同様の操作を繰り返し、全分取液を合わせる。この分取液に酢酸アンモニウム溶液（１→300）を加えて正確に100mLとする。必要ならば、ろ過又は遠心分離する。この液5mLを正確に量り、酢酸アンモニウム溶液（1→300）を加えて正確に100mLとし、試料溶液とする。必要ならば、ろ過又は遠心分離する。

3　操作法　標準溶液及び試料溶液につき波長630nm付近における吸収の極大波長で吸光度A_S及びA_Tを測定する。

1回注入量中のブリリアントブルーFCF（$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$）の量（mg）

$$= \text{標準品の採取量(mg)} \times \frac{\text{表示された注入量(mg)}}{\text{試料の採取量(mg)} \times 5} \times \frac{A_T}{A_S}$$

4　判定　1回注入量中のブリリアントブルーFCF（$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$）の量（mg）が20～30mgのとき、適合とする。

水分測定法（カールフィッシャー法）

水分測定法は、メタノールなどの低級アルコール及びピリジンなどの有機塩基の存在で水がヨウ素及び二酸化イオウと次の式に示すように定量的に反応することを利用して水を測定する方法である。

$$I_2 + SO_2 + 3C_5H_5N + CH_3OH + H_2O \rightarrow$$
$$2(C_5H_5N^+H)I^- + (C_5H_5N^+H)^-OSO_2OCH_3$$

測定法には、容量滴定法と電量滴定法がある。容量滴定法は、反応に必要なヨウ素を水分測定用試液中に溶解させ、試料中の水と反応して消費されたヨウ素の滴定量により、水分を測定する方法である。電量滴定法は、ヨウ化物イオンを混合した水分測定用試液を用い、電解によりヨウ素を発生させる。ヨウ素が定量的に水と反応することに基づき、電解に要した電気量により、水分を測定する方法である。

$$2I^- \rightarrow I_2 + 2e^-$$

1　容量滴定法

装置

通例、自動ビュレット、滴定フラスコ、かき混ぜ機及び定電圧分極電流滴定装置又は定電流分極電位滴定装置からなる。

水分測定用試液は吸湿性が非常に強いので、装置は外部からの吸湿を防ぐようにする。防湿には、シリカゲル又は水分測定用塩化カルシウムなどを用いる。

試薬

日本薬局方に規定する水分測定用試薬のほか、以下の試薬を用いる。

(1) 水分測定用メチルセロソルブ

メチルセロソルブ1,000mLに乾燥用合成ゼオライト30gを加え、密栓し、時々穏やかに振り混ぜ、約8時間放置し、更に約16時間静置した後、透明なメチルセロソルブを分取する。湿気を避けて保存する。本品1mL中の水分は0.3mg以下とする。

試液及び標準液の調製法

(1) 水分測定用試液

調製　次のいずれかの方法により調製する。

i　調製法1

ヨウ素63gを水分測定用ピリジン100mLに溶かし、氷冷し、乾燥二酸化イオウを通じ、その増量が32gに達したとき、水分測定用クロロホルム又は水分測定用メタノールを加えて500mLとし、24時間以上放置後、用いる。

ii 調製法2

水分測定用イミダゾール102gを水分測定用メチルセロソルブ又は水分測定用ジエチレングリコールモノエチルエーテル350mLに溶かし、氷冷し、液温を25～30℃に保ちながら、乾燥二酸化イオウを通じ、その増量が64gに達したとき、ヨウ素50gを加えて溶かし、24時間以上放置後、用いる。

iii調製法3

水分測定用メチルセロソルブ150mLに乾燥二酸化イオウを通じ、その増量が32gに達したとき、水分測定用2－メチルアミノピリジン81gを水分測定用メチルセロソルブ又は水分測定用クロロホルム250mLに溶かして氷冷した液に加え、更にヨウ素36gを加えて溶かし、24時間以上放置後、用いる。

標定　水分測定用試液は日時の経過とともに変化するので、用時、標定する。操作法に従い、水分測定用メタノール適量を乾燥滴定フラスコにとる。これにあらかじめ水分測定用試液を終点まで滴加し、フラスコ内を無水の状態にしておく。次に、水約30mgを精密に量り、速やかに滴定フラスコに入れ、激しくかき混ぜながら水分測定試液で終点まで滴定する。水分測定用試液の1mLに対応する

水（H_2O）のミリグラム数f(mg/mL)を次の式により求める。

$$f(\mathrm{mg/mL}) = \frac{\text{水（}H_2O\text{）の採取量（mg）}}{\text{水（}H_2O\text{）の滴定に要した水分測定用試液の量（mL）}}$$

(2) 水・メタノール標準液

本標準液は、遮光して湿気を避け、冷所に保存する。

調製　水分測定用メタノール500mLを1,000mLの乾燥メスフラスコにとり、水2.0mLを加え、水分測定用メタノールを加えて1,000mLとする。

標定　本標準液の標定は、水分測定用試液の標定に続いて行う。操作法に従い、水分測定用メタノール適量を乾燥滴定フラスコにとり、これにあらかじめ水分測定用試液を終点まで滴加し、フラスコ内を無水の状態にしておく。次に、水分測定用試液10mLを正確に加え、調製した水・メタノール標準液で終点まで滴定する。水・メタノール標準液1mL中の水（H_2O）のミリグラム数f'（mg/mL）を次の式によって求める。

$$f'(\mathrm{mg/mL}) = \frac{f(\mathrm{mg/mL}) \times 10(\mathrm{mL})}{\text{滴定に要した水・メタノール標準液の量（mL）}}$$

操作法　水分測定用試液による滴定は湿気を避けて行い、原則として、これを標定したときの温度と同一の温度で行う。被滴定液中に一対の白金電極又は双白金電極を浸し、可変抵抗器を適当に調節して電極間に微小電圧を加え、水分測定用試液を滴加するとき変化する電流（μA）を測定し（定電圧分極電流滴定法）、滴定が進むにつれて回路中の電流が大きく変化し、数秒で再び元の位置に戻る。滴定の終点に達すると、この電流の変化が一定時間持続する（通例、30秒間以上）。この状態になったときを滴定の終点とする。または、電極間に微小電流を流しておき、水分測定用試液を滴加するとき、変化する電位差（mV）を測定し（定電流分極電位差滴定法）、滴定が進むにつれて回路中の電圧計の値が数百ミリボルトの分極状態から急に減少し、消極状態となり、数秒で再び元の位置に戻る。滴定の終点に達すると、消極状態が一定時間持続する（通例、30秒間以上）。この状態になったときを滴定の終点とする。ただし、逆滴定により定電圧分極電流滴定法を用いる場合は、水分測定用試液が過量に存在する間は電流計の針が振り切れ、終点に達すると急に元の位置に戻る。定電流分極電位差滴定法を用いる場合、水分測定用試液が過量に存在する間は、電圧計の値が元の位置にあり、終点に達すると一定の電圧がかかる。

水分測定用試液による滴定は、別に規定するもののほか、次のいずれの方法によってもよい。終点は、通例、逆滴定を行う場合の方が明瞭に判別できる。

(1) 直接滴定

別に規定するもののほか、次の方法による。

水分測定用メタノール適量を乾燥滴定フラスコにとり、水分測定用試液を終点まで滴加してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に、水分5～30mgを含むような量の試料を精密に量り、速やかに滴定フラスコに入れ、かき混ぜて溶かし、激しくかき混ぜながら水分測定用試液で終点まで滴定する。試料が溶剤に溶けないときは手早く粉末とし、水分5～30mgを含むような量の試料を精密に量り、速やかに滴定フラスコに入れ、湿気を避けて5～30分間かき混ぜた後、激しくかき混ぜながら滴定を行う。水分測定用メタノールの代わりに、水分測定用ピリジン／水分測定用エチレングリコール混液（5：1）を用いてもよい。

別に、試料が溶剤に溶けないとき又は試料がカールフィシャー反応を妨害するときは、水分気化装置を用いて試料を加熱し、窒素をキャリアーとして試料中の

水分を滴定フラスコに導入することができる。

なお、滴定は湿度の低い雰囲気下で行う必要があるが、滴定に長時間を要するなど雰囲気中の水分の影響が避けられない場合は、試料を測定したときと同様の操作により空試験を行い、補正する。

$$\text{水}(H_2O)\,\% = \frac{\text{試料の滴定に要した水分測定用試液の量(mL)} \times f\,(\text{mg/mL})}{\text{試料の質量(mg)}} \times 100$$

(2) 逆滴定

別に規定するもののほか、次の方法による。

i　固体の場合

水分測定用メタノール適量を乾燥滴定フラスコにとり、水分測定用試液を終点まで滴加してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に、水分5～30mgを含むような量の試料を精密に量り、速やかに滴定フラスコに入れ、過量の水分測定用試液の一定量を加え、かき混ぜて溶かし、激しくかき混ぜながら水・メタノール標準液で終点まで滴定する。試料が溶剤に溶けないときは手早く粉末とし、その質量を精密に量り、速やかに滴定フラスコに入れ、過量の水分測定用試液の一定量を加え、湿気を避けて5～30分間かき混ぜた後、激しくかき混ぜながら滴定する。

$$\text{水}(H_2O)\,\% = \frac{[\text{水分測定用試液の量(mL)}] \times f\,(\text{mg/mL}) - [\text{滴定に要した水・メタノール標準液の量(mL)}] \times f'\,(\text{mg/mL})}{\text{試料の質量(mg)}} \times 100$$

ii　液体の場合

試料約1gを乾燥滴定フラスコに精密に量り、正確に水分測定用クロロホルム10mL及び過量の水分測定用試液の一定量を加えて、水・メタノール標準液で終点まで滴定する。別に、正確に水分測定用クロロホルム10mLを乾燥滴定フラスコにとり、過量の水分測定用試液の一定量を加えて水・メタノール標準液で同様に滴定し、水分測定用クロロホルム10mL当たりの水分測定用試液の量(mL)を量る。

$$\text{水}(H_2O)\,\% = \frac{A \times f\,(\text{mg/mL}) - B \times f'\,(\text{mg/mL}) - C \times f\,(\text{mg/mL})}{\text{試料の質量(mg)}} \times 100$$

ただし、

A：加えた水分測定用試液の量(mL)

B：滴定に要した水・メタノール標準液の量(mL)

C：水分測定用クロロホルム10mL当たりの水分測定用試液の量(mL)

iii　軟膏等の場合

試料約1gを乾燥滴定フラスコに精密に量り、正確に水分測定用クロロホルム10mLを加えて溶かし、過量の水分測定用試液の一定量を加えて、水・メタノール標準液で終点まで滴定する。別に、正確に水分測定用クロロホルム10mLを乾燥滴定フラスコにとり、過量の水分測定用試液の一定量を加えて水・メタノール標準液で同様に滴定し、水分測定用クロロホルム10mL当たりの水分測定用試液の量(mL)を量る。

$$水(H_2O)\% = \frac{A \times f(\mathrm{mg/mL}) - B \times f'(\mathrm{mg/mL}) - C \times f(\mathrm{mg/mL})}{試料の質量(\mathrm{mg})} \times 100$$

ただし、

A：加えた水分測定用試液の量(mL)

B：滴定に要した水・メタノール標準液の量(mL)

C：水分測定用クロロホルム10mL当たりの水分測定用試液の量（mL）

製剤の粒度の試験法

製剤の粒度の試験法は、製剤総則中の製剤の粒度の規定を試験する方法である。

操作法

(1) 顆粒剤

本剤は、10号(1,700μm)、12号(1,400μm)及び42号(355μm)ふるいを用いて試験を行う。ただし、本試験法に用いるふるいの枠の内径は75mmとする。

本剤20.0gを正確に量り、前記のふるい及び受器を重ね合わせた用器の上段のふるいに入れ、上蓋をした後、3分間水平に揺り動かしながら、時々軽くたたいてふるった後、各々のふるい及び受器の残留物の質量を量る。

(2) 散剤

本剤は、18号(850μm)、30号(500μm)及び200号(75μm)のふるいを用いて試験を行う。ただし、この試験に用いるふるいの枠の内径は75mmとする。

本剤10.0gを正確に量り、前記のふるい及び受器を重ね合わせた用器の上段のふるいに入れ、上蓋をした後、3分間水平に揺り動かしながら、時々軽くたたいてふるった後、各々のふるい及び受器の残留物の質量を量る。

注射剤の不溶性異物検査法

注射剤の不溶性異物検査法は、注射剤中の不溶性異物の有無を調べる検査法である。

第1法　溶液である注射剤及び用時溶解して用いる注射剤の溶剤は、この方法による。

容器の外部を清浄にし、白色光源の直下、約1,000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するとき、澄明で、容易に検出される不溶性異物を認めてはならない。ただし、プラスチック製水性注射剤容器を用いた注射剤にあっては、上部及び下部に白色光源を用いて、8,000～10,000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するものとする。

第2法　用時溶解して用いる注射剤は、この方法による。

容器の外部を清浄にし、異物が混入しないよう十分に注意して、添付の溶解液又は注射用水を用いて溶解し、白色光源の直下、約1,000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するとき、澄明で、明らかに認められる不溶性異物を含んではならない。ただし、注射用プラスチック容器を用いた注射剤にあっては、上部及び下部に白色光源を用いて、8,000～10,000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するものとする。

注射剤の不溶性微粒子試験法

注射剤の不溶性微粒子とは、製剤中に意図することなく混入した、気泡ではない容易に動く外来性、不溶性の微粒子である。

不溶性微粒子を測定する方法は2種あり、第1法（光遮蔽粒子計数法）又は第2法（顕微鏡粒子計数法）で試験する。第1法での試験を優先するが、場合によってはまず第1法で試験し、次に第2法で試験する必要がある。ただし、本試験法は、乳濁性注射剤及び懸濁性注射剤には適用しない。

第1法　光遮蔽粒子計数法

不溶性微粒子数の限度は、表示量が100mL以上の注射剤は本剤1mL中の個数に換算するとき、10μm以上のもの25個以下、25μm以上のもの3個以下であり、表示量が100mL未満の注射剤は1容器あたり10μm以上6,000個以下、25μm以上600個以下である。

第2法　顕微鏡粒子計数法

不溶性微粒子数の限度は、表示量が100mL以上の注射剤は本剤1mL中の個数に換算するとき、10μm以上のもの12個以下、25μm以上のもの2個以下であり、表示量が100mL未満の注射剤は1容器あたり10μm以上3,000個以下、25μm以上300個以下である。

バイオオートグラフィー

バイオオートグラフィーは、薄層クロマトグラフィーを応用して分離した混合物中の活性を有する成分を、生物学的方法によって、確認する方法である。試験は、次の方法で行う。

試験法

1　展開溶媒、常用標準希釈液、試料液、培地、試験菌及びその菌液の調製

医薬品各条に規定する。

2　培養箱の形状

通例、ステンレス鋼製の高さ約25mm、横200～300mm、縦350～500mmの箱を用いる。用時、蓋又は底面にガラス板を用いる培養箱の場合は、使用するガラス板とともに滅菌して用いる。

3　薄層板

200mm×200mmの平滑で均一な厚さのガラス板に、医薬品各条に規定する固定相固体を水で懸濁し、適当な器具を用いて0.2～0.3mmの均一な厚さに塗布する。風乾後、105～120℃の間の一定温度で30～60分間加熱、乾燥して調製する。ガラス板の代わりに適当なプラスチック板などを用いることができる。なお、別に調製されたこれと同等の薄層板を用いることができる。

また、薄層板は、湿気を避けて保存する。

4　操作法

滅菌した培養箱に、培地200～300mLを加えて平板を作る。この上に試験菌液100～150mLを加え、一様に広げた後、培養箱を平らに保ち、1時間以上、5℃以下に保存した後、使用する。これらの操作は、できるだけ無菌的に行う。通例、薄層板の原線を等間隔に4等分し、4区画となるように垂直線を引く。第1の区画から第3の区画の各原線の中央に、各常用標準希釈液の高濃度のものから順次5μLずつを、第4の区画の原線の中央には試料液5μLを、それぞれ正確にマイクロピペットを用いてスポットし、風乾する。

この薄層板を、必要ならば、展開溶媒の蒸気で飽和した容器の中に入れ、30～60分間放置した後、展開溶媒を上昇させる。温度は、20～30℃で行う。溶媒の上達線が、薄層板の上端から10～30mmに達したとき、展開をやめ、薄層板を取り出し、室温で放置し、溶媒を乾燥除去する。乾燥後、薄層板をそのまま培養箱の培地上に置く。この際、薄層板の各部と培地とは完全に接着するように注意して並べる。5～15分間接触させた後、薄層板を取り去る。これらの操作は、雑菌が入らぬよう注意して行う。培養箱は、32～37℃で17～20時間培養する。

5　R_f値、移動距離、測定値、計算及び判定

医薬品各条に規定する。ただし、R_f値は、次式によって求め、小数点以下2けた目を四捨五入する。

$$R_f = \frac{\text{原線から阻止円の中心までの距離}}{\text{原線から溶媒先端までの距離}}$$

発かび試験法

発かび試験法は、製剤総則中の準散剤、準粒剤及び指定賦形剤の発かびを試験する方法である。

操作法　白紙及び黒紙上に、それぞれ本剤約100gをとり、広げて肉眼で観察するとき、発かびを認めない。

pH測定法

pH測定法は、医薬品又は医薬品の一定溶液のpHをガラス電極によるpH計を用いて測定する試験法であり、日本薬局方一般試験法pH測定法を準用する。ただし、別に規定する場合を除き、試料溶液は、次のように調製する。

試料溶液

医薬品各条の規格のpHの項では、試料溶液を［］又は()内に記載する。［］又は()内において、用時濃度とは当該医薬品の使用法の表示に従い使用時の濃度の溶液を作ることを、飽和溶液とは試験品の下に示す飽和水溶液を、mL中の質量を溶液とともに記載したものは記載された質量がその溶液1mL中に含まれるように調製することを、mL中の力価を溶液とともに記載したものは表示力価のある場合にはその表示力価に従い、その他の場合は力価推定値に従い、記載された力価がその溶液1mL中に含まれるように調製することを、それぞれ意味する。単に溶液と記載した場合は、水溶液を示し、必要ならば、加温して溶かし、冷後試料溶液とすることができる。

また、単に懸濁液と記載した場合は、水を溶媒とした懸濁液を示す。[]又は()を付けないものは、試験品の濃度のままで試料溶液とする。

飽和水溶液

一定量の15～25℃の水を採り、飽和量よりもやや過量と推定される溶質を入れ、15～25℃において約10分間激しく振り混ぜた後、遠心分離した溶液とする。

プラスチック製医薬品容器試験法

日本薬局方一般試験法プラスチック製医薬品容器試験法を準用する。ただし、プラスチック製水性注射剤容器(2.1. ポリエチレン製又はポリプロピレン製水性注射剤容器、2.2. ポリ塩化ビニル製水性注射剤容器、2.3. その他の水性注射剤容器)を次の容器に読み替えるものとする。

ポリエチレン製・ポリプロピレン製容器　本容器は、抗生物質を水性溶剤に溶かし若しくは懸濁した液状の製剤又は用時水性溶剤で溶かし若しくは懸濁して用いる抗生物質に使用するポリエチレン製・ポリプロピレン製容器をいう。容器は、有害なプラスチック添加剤の溶出の無いものであって、用時溶解又は懸濁の前後を問わず、注射剤である抗生物質と物理的又は化学的に作用してその性状又は品質に影響を与えず、外部からの異物や微生物が侵入しないものであり、次の規格に適合するものである。

(1) 透明性容器は、「1.4.1.第1法」で試験した時、透過率55%以上である。「1.4.1.第1法」で試験できない場合は、「1.4.2.2.操作法(ⅱ)無対照法」によって試験を行う。その場合、容器に水を入れた試料を“濁っている”と判断した率は20%未満であり、容器に参照乳濁液を入れた試料を“濁っている”と判断した率は80%以上である。
(2) 外観使用上差し支えを生じるようなすじ、きず、泡その他の欠点のないものである。
(3) 水蒸気透過性　「1.5.1.第1法」に従って試験したとき、減量は0.20%以下である。
(4) 重金属　検液の色の変化は、比較液より濃くない。ただし、容器切片採取量は、1.0gとする。
(5) 鉛　「1.1.3.1.第1法」によって操作し、標準溶液と比較したとき、試料溶液の吸光度は、標準溶液の吸光度以下である。
(6) カドミウム　「1.1.4.1.第1法」によって操作し、標準溶液と比較したとき、試料溶液の吸光度は、標準溶液の吸光度以下である。
(7) 強熱残分　残分は、0.1%以下である。
(8) 溶出物
　(i) 泡立ち　生じた泡は、3分以内にほとんど消滅する。
　(ii) pH　試験液及び空試験液の差は、1.5以下である。
　(iii) 過マンガン酸カリウム還元物質　0.002mol/mL過マンガン酸カリウム液の消費量の差は、1.0mL以下である。
　(iv) 紫外線吸収スペクトル　波長220nm以上241nm未満における吸光度は0.08以下、波長241nm以上350nm以下における吸光度は0.05以下である。
　(v) 蒸発残留物　1.0mg以下である。
(9) 細胞毒性試験　IC_{50}(%)は、90%以上である。その他の標準試験方法を用いたとき、結果は陰性である。

崩壊試験法

崩壊試験法は、内用又は子宮・膣及び直腸に適用する固形医薬品が、試験液中、定められた条件で規定時間内に崩壊するかどうかを確認する試験法である。錠剤、粒剤及び準粒剤はⅠ振とう試験法を、子宮・膣挿入剤及び坐剤はⅡ静置試験法を用いる。ただし、直径20mm以上の大きさの錠剤及び徐放性の製剤にはⅠ振とう試験法を適用しない。

試験法

Ⅰ振とう試験法

1　装置

この試験に用いる装置は、日本薬局方一般試験法崩壊試験法に規定する装置を用いる。

2　試験液

この試験に用いる試験液は、日本薬局方一般試験法崩壊試験法に規定する試験液を用いる。

3　操作法

試験器を受軸に取り付け、ビーカー中に浸し、1分間29～32往復、振幅53～57mmの上下運動を行うように調節する。試験器が最も下がったとき、下の網面はビーカーの底から25mmにあり、ビーカーに入れる液の量は試験器の上面が液の表面に一致するようにする。試験中、液の温度は、37±2℃に保つ。

粒剤のほかは、試験品6個をとり、試験器のガラス管に1個ずつ入れ、試験器をあらかじめ温度及び液量を調節したビーカー中の試験液に浸し、一定時間上下運動を行った後、試験器を静かに試験液から取り出し、ガラス管内網上の試験品の状態を観察する。補助盤を入れるように規定されているときは、試験器のガラス管に試験品を入れ、次に、補助盤の表面を上にして、1個ずつ入れた後、同様に操作観察する。ただし、測定が困難なときは、補助盤の使用を省くことができる。

(1) 錠剤

試験液に水を用い、補助盤を入れ、30分間上下運動を行った後観察するとき、試験品の残留物をガラス管内に認めない、認めても海綿状の物質である又は軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは、適合とする。

ガラス管1個に限り、そのガラス管内に原形をとどめるとき又は破片を認めるときは、新たに試験品6個をとってこの試験を繰り返し、試験品の残留物をガラス管内に認めない、認めても海綿状の物質である又は軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは、適合とする。

(2) 粒剤及び準粒剤

粒剤又は準粒剤を30号(500μm)ふるいで製剤の粒度の試験法(1)顆粒剤の規定に準じてふるい、30号ふるい上に残った試験品0.10gずつをそれぞれ補助筒6個にとり、補助筒を試験器のガラス管に1個ずつ入れて底に固定し、30分間上下運動を行った後、補助筒を取り出して観察するとき、試験品の残留物を補助筒の網上に認めない、認めても補助筒1個に限るとき又は軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは、適合とする。ただし、剤皮を施した顆粒については、試験液に水を用い、60分間上下運動を行う。

Ⅱ静置試験法

1　本試験法は、子宮・膣挿入剤に適用する。

(1) 装置

200～2,000mLのビーカーを用い、ビーカーの底から10～50mmの位置に5.5号

(3,350μm)ふるいを置く。

(2) 操作法

装置3個に試験品各1個ずつを置き、網上の試験品が浸漬する量の微温湯を加え、37～39℃に5時間静置して観察するとき、試験品の残留物を網上に認めない、認めても海綿状の物質である又は軟質の物質がわずかのときは、適合とする。

試験品1個に限り、その網上に試験品の原形をとどめるとき又は破片を認めるときは、新たに試験品3個をとってこの試験を操り返し、試験品の残留物を網上に認めない、認めても海綿上の物質である又は軟質の物質がわずかのときは、適合とする。

2 本試験法は坐剤に適用する。

(1) 装置

内径90～100mmのペトリ皿及び恒温装置を用いる。

(2) 操作法

ペトリ皿3枚に試験品各1個ずつを置き、37～39℃の恒温装置内に2時間静置して観察するとき、試験品が軟泥状若しくは海綿状である又は原形をとどめていても、軽く圧して全体が軟質であるときは、適合とする。

無菌試験法

無菌試験法は、培養法によって医薬品中の生菌の有無を確認する試験法である。本試験法により、試験を行う医薬品各条において別に規定する場合を除き、Ⅰ直接法又はⅡメンブランフィルター法のいずれかの方法によって試験を行う。

また、この試験に使用する水、試薬・試液及び計量器・用器の必要な部分は、無菌のものを用いる。操作は、無菌設備内で厳密な注意の下で行う。

Ⅰ直接法

直接法は、医薬品の一部を直接培地に加えて培養し、医薬品中の生菌の有無を確かめる試験法である。

1　細菌試験

試験は、次の方法で行う。

(1) 培地及びその調製法

チオグリコール酸培地Ⅰ

L－シスチン	0.5g
カンテン	0.75g
塩化ナトリウム	2.5g
ブドウ糖　(一水和物／無水)	5.5／5.0g
酵母エキス(水溶性)	5.0g
カゼイン製ペプトン	15.0g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5g
又はチオグリコール酸	0.3mL
レザズリン溶液(1→1,000)(用時調製)	1.0mL
水	1,000mL

(滅菌後のpH7.1±0.2)

L－シスチン、カンテン、塩化ナトリウム、ブドウ糖、酵母エキス(水溶性)及びカゼイン製ペプトンを水と混合し、加温して溶かした後、チオグリコール酸ナトリウム又はチオグリコール酸を加えて溶かし、必要ならば、水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後のpHが7.1±0.2になるように調整する。必要ならば、溶液を煮沸しないように加温し、暖かいうちに湿らせたろ紙を用いてろ過する。次に、レザズリン溶液(1→1,000)を加え、よく混和して試験管に分注し、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間加熱して滅菌した後、直ちに常温に冷却し、遮光して常温で保存する。保存中に水分が蒸発して流動性に変化が認められた培地又は上部1/3以上が赤色に変わった培地は使用しない。ただし、このように変色した培地でも水浴中で加温して、赤色部分が1/3以下になったときは使用して差し支えないが、その後、再び1/3以上が赤色に変わったものは使用しない。

チオグリコール酸培地Ⅱ

L－シスチン	0.5g
塩化ナトリウム	2.5g
ブドウ糖　(一水和物/無水)	5.5／5.0g
酵母エキス(水溶性)	5.0g
カゼイン製ペプトン	15.0g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5g
又はチオグリコール酸	0.3mL
水	1,000mL

L－シスチン、塩化ナトリウム、ブドウ糖、酵母エキス(水溶性)及びカゼイン製ペプトンを水と混合し、加熱して溶かした後、チオグリコール酸ナトリウム又はチオグリコール酸を加えて溶かし、必要ならば、水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後のpHが7.1±0.2になるように調整する。必要ならば、溶液を煮沸しないよ

うに加熱し、温かいうちに湿らせたろ紙を用いてろ過する。別に規定する試験管に分注し、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間加熱して滅菌した後、直ちに常温に冷却し、遮光して常温で保存する。

いずれの培地についても、乾燥培地を用いる場合には、水で液状にしたとき上記の培地と同一成分を有し、同等又はより優れた細菌の発育を示さなければならない。

調製したこれらの培地は、30～32℃で少なくとも3日間保ったとき、混濁などの異常を認めてはならない。また、培地が細菌の発育のために満足すべき状態になるかどうかをみるために、調製した培地の一部を取り、これに偏性嫌気性菌(例えば *Clostridium sporogenes*)及び発育の困難な菌(例えば *Streptococcus pyogenes*)を接種して培養したとき、菌の発育を認めなければならない。

(2) 培地の選択

通例、試験にはチオグリコール酸培地Ⅰを用いる。ただし、試料が懸濁しているか又は粘性が高いためにチオグリコール酸培地Ⅰを使用することが困難なときは、チオグリコール酸培地Ⅱを用いる。

(3) 試験品の取り方

容器の数を記載しない場合

試験品は、4容器からそれぞれ規定された量を採取する。

採取量の特例

医薬品各条の無菌試験において規定された試料(液)の量又は濃度が、1容器中の内容量を用いて採取又は調製することのできない場合は、2容器以上を用いて試験を行う。ただし、この場合、6容器を限度とする。

(4) 操作法

① 試料(液)の調製

別に規定する場合を除き、試料(液)は1容器ごと又は同一容器の1箇所ごとに採取した試験品について、それぞれ、別に規定する場合を除き、薬剤の種類、剤型などにより、次の方法で調製する。

A．ペニシリン系抗生物質を含まない製剤

A－ｉ水性製剤：用時溶解又は懸濁して使用する製剤は、添付の溶剤又は水で表示の量に溶解又は懸濁したものを更に10倍希釈したものを試料液とし、その他のものも10倍希釈して試料液とする。

A－ii油性製剤：油性製剤約1gに綿実油又は椿油を9mL加えるか、綿実油又は椿油を8mLとポリソルベート80を1mL混合したものを加えて溶解又は懸濁したものを試料液とする。ただし、セファロニウム製剤、セファゾリン製剤、セフロキシム製剤又はセファピリン製剤にあっては、試験品1容量に対し、約40℃に加温した綿実油8容量及びポリソルベート80　1容量を加え均一にし、この液1容量にpH7.0に調整した塩酸ヒドロキシルアミン溶液(1→50)9容量を加え、室温に2時間放置する。なお、セフロキシム製剤にあっては、放置後、水で10倍希釈する。

B．ペニシリン系抗生物質を含む製剤

A－ｉ又はA－iiのいずれかの方法に準じて作製した液を試料原液として、次のB－ｉ又はB－iiのいずれかの方法によって不活化又は希釈する。

B－ｉ：適当量の試料原液をとり、pH6.0に調整した塩酸ヒドロキシルアミン溶液(1→300)で3～6mg(力価)/mL又は5,000～10,000単位/mLに相当する溶液又は懸濁液を調製し、1時間常温に放置したものを試料液とする。

B－ii：適当量の試料原液をとり、濃度が3～6mg(力価)/mL又は5,000～10,000単位/mLに相当する溶液又は懸濁液を調製し、試料液とする。ただし、この方法では試料液を加える培地に、あらかじめ試料液中に含まれるペニシリン系抗生物質を不活化するに十分な量のペニシリン分解酵素を加えたものを使用しなければならない。

② 試料(液)の量及び試験管本数

別に規定する場合を除き、A－i若しくはii又はB－i若しくはiiのいずれかの

方法で試料液を調製し、培地15mLずつを入れた試験管2本をとり、試料(液)それぞれ1mLを加える。試料(液)の量は、その記載値の±10%の誤差を許容する。試験管は、約20mm×約150mmのものを用いる。また、試料(液)の採取にはピペット、注射器等を用いる。

③　培養

操作は、規定された培地量を入れたそれぞれの試験管に、規定された試料(液)の量を加え、よく混和した後、全ての試験管を30～32℃で少なくとも14日間培養する。試料(液)が油性のときは、加えた直後及び培養中時々振り混ぜて、油液がよく培地中に分散するようにする。

④　判定

試料(液)を培養した全ての試験管中に菌の発育を認めないときは、無菌であると判定する。肉眼的に判定が困難な場合は、試験管内容の一部をとり、直接若しくは塗抹染色して鏡検するか又は新しい培地に移して少なくとも3日間培養して生菌の有無を確認する。

試験の結果、判定が困難なときは、新たに2倍量以上の試験品を用いて試験を操り返す。

2　真菌試験

試験は、次の方法で行う。

(1) 培地及びその調製法

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0g
ダイズ製ペプトン	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素二カリウム	2.5g
ブドウ糖　(一水和物/無水)	2.5g／2.3g
水	1,000mL

(滅菌後のpH7.3±0.2)

全成分を水に溶かし、若干加温して溶液にする。溶液を室温に冷却し、必要ならば、水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後のpHが7.3±0.2になるように調整する。必要ならば、ろ過をし、これを試験管に分注し、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で15～20分間加熱して滅菌した後、遮光して室温で保存する。また、培地が真菌の発育のために満足すべき状態になるかどうかをみるために、調製した培地の一部をとり、これにアスペルギルス属(例えば *Aspergillus brasiliensis*)及びカンジダ属(例えば *Candida albicans*)を接種して培養したとき、菌の発育を認めなければならない。

(2) 試験品のとり方

1の細菌試験(3)試験品のとり方を準用する。

(3) 操作法

①　試料(液)の調製

1の細菌試験(4)操作法を準用する。

②　試料(液)の量及び試験管本数

①により試料(液)を調製し、培地15mLずつを入れた約20mm×約150mmの試験管2本をとり、それぞれに試料(液)それぞれ1mLを加える。試料(液)の量は、その記載値の±10%の誤差を許容する。

③　培養

操作は、規定された培地量を入れた試験管それぞれに、規定された試料(液)の量を加え、よく混和した後、全ての試験管を20～25℃で少なくとも14日間培養する。試料(液)が油性のときは、加えた直後及び培養中時々振り混ぜて、油液がよく培地中に分散するようにする。

④　判定

試料(液)を培養した全ての試験管中に菌の発育を認めないときは、無菌であ

ると判定する。肉眼的に判定が困難な場合は、試験管内容の一部をとり、直接若しくは塗抹染色して鏡検し、又は新しい培地に移して4～5日間培養して生菌の有無を確認する。

試験の結果、判定が困難なときは、新たに2倍量以上の試験品を用いて試験を繰り返す。

Ⅱ メンブランフィルター法

メンブランフィルター法は、医薬品中の生菌をメンブランフィルター上に捕捉し、同時に抗菌剤の影響を取り除いた条件下で培養して医薬品中の生菌の有無を確かめる試験法である。試験は、次の方法で行う。

1　培地及びその調製法

Ⅰの1の細菌試験及びⅠの2の真菌試験における培地及びその調製法を準用する。

2　試験品のとり方

別に規定する場合を除き、試験品は、6容器から4の(1)の規定により採取する。ただし、1容器の内容量が5g又は5g(力価)を超える場合は3容器から採取することができるが、この場合、同一容器内の異なった2箇所から、ほぼ等量に採取する。また、1容器の内容量が50g又は50g(力価)を超える場合は1容器から採取することができるが、この場合、同一容器内の異なった6箇所から、ほぼ等量に採取する。

逆に、1容器の内容量が少なく、4の(1)に規定する試料(液)の量を採取するのに2容器以上を要する場合は、4容器を限度とする。

3　希釈用液とその調製法

希釈液の調製及び試料液ろ過後のメンブランフィルターのろ過洗浄には、次の希釈用液を使用する。

希釈用液

カゼイン製ペプトン	1.0g
水	1,000mL

カゼイン製ペプトンを水に溶かし、若干加温して溶液にする。水酸化ナトリウム試液を用いて、滅菌した後のpHが7.1±0.2になるように調整する。必要ならば、ポリソルベート80を0.1g/dL添加した希釈用液を用いることができる。適当量に小分け分注した後、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間加熱して滅菌して使用する。

4　操作法

この試験に用いる細菌ろ過器は、0.2～0.45μmの孔径を有する直径47～50mmのメンブランフィルターを装着した無菌試験用に作られたものを使用する。ろ過システムに通じる空気は、全て微生物を完全に除去できるフィルターを通過したものでなければならない。

(1) 試料液の調製

別に規定する場合を除き、試験品の各容器から、非液状製剤では約0.5gずつ、液状製剤では1mLずつ採取し、希釈用液100mLに混合し完全に溶解したものを試料液とする。100mLの希釈用液で溶解が困難な場合は、いくつかに分けて溶解し、それぞれを試料液とする。ただし、試料が疎水性で溶解しにくいものにあっては、試料約1gを採取し、ろ過滅菌によって無菌に製したミリスチン酸イソプロピル又は菌の発育に影響のないその他の溶剤を加え、ろ過可能な濃度に溶解して試料液を調製する。この試料液の濃度は、通例、1g/dLとする。なお、必要ならば、加温するが、その温度は40℃を限度とし、その処理は15分以内に行う。

(2) ろ過並びに試料メンブランフィルター及び対照メンブランフィルターの調製

試料液及び対照として希釈液を、それぞれ別のろ過器で加圧又は吸引してろ過し、更にそれぞれ100mLずつ3回希釈用液で洗浄ろ過後、十分に水分を除く。メンブランフィルターをろ過器より取り出して、はさみ又はカッターで2分する。(この操作は、あらかじめ2分した試料液及び希釈用液について、それぞれ別々のろ過器を用いて行うことができる。)

それぞれを次表の試験区分の試料メンブランフィルター及び対照メンブランフィルターとして用いる。ただし、対照メンブランフィルターは、試験日ごと及び希釈用液調製日の異なるごとに調製する。

試料ﾒﾝﾌﾞﾗﾝﾌｨﾙﾀｰ		対照ﾒﾝﾌﾞﾗﾝﾌｨﾙﾀｰ	培養温度	培地
試験区分	細菌試験	細菌試験対照	30～32℃	ﾁｵｸﾞﾘｺｰﾙ酸培地 I 40～100mL
	真菌試験	真菌試験対照	20～25℃	ｿｲﾋﾞｰﾝ･ｶｾﾞｲﾝ･ﾀﾞｲｼﾞｪｽﾄ培地 40～100mL

5　培養

4の(2)の試験区分に従って、通例、それぞれの試験管(約38mm×約200mm)に1枚ずつの試料メンブランフィルター及び対照メンブランフィルターを投入し、それぞれの温度で培養する。培養時間は、いずれも少なくとも14日間とする。

6　吸着試験

試料がメンブランフィルターに吸着されるか、あるいは洗浄操作で除去されにくい性質のものであるかを確認するため、本試験を行う。

別に、4の(2)に準じて、2枚の試料メンブランフィルターを調製する。試験区分表に従って各試験管に1枚ずつ投入した後、それぞれの検査すべき試料に感受性の高い菌約100個を接種し、その菌に好適な温度で培養する。この結果、接種菌の発育を認めた場合は、試料が吸着されていないと判定する。もし、いずれかの接種菌が発育しないときは、発育阻止物質が吸着しているものと判定する。この場合は、メンブランフィルターの材質の異なったものに変更するか、洗浄液にポリソルベート80を加えるなど適当な方法で発育阻止物質を除去する。この試験は、同一の成分及び分量の試験品について、試料ごとに行う必要はない。

7　判定

試料メンブランフィルターと対照メンブランフィルターの入った全ての試験管に菌の発育が認められないときは、無菌と判定する。肉眼的に判定が困難な場合は、試験管内容の一部をとり、直接若しくは塗抹染色して鏡検するか又は新しい培地に移して培養するなどして生菌の有無を確認する。

試験の結果、判定困難なときには、新たに2倍量以上の試験品とメンブランフィルターを用いて試験を繰り返す。

力価試験法

力価試験法は、医薬品中の抗生物質の力価を生物学的又は化学的方法によって測定する試験法であり、下記の方法で試験を行う。医薬品各条の力価試験中において、円筒平板法とあるのはⅠの、標準曲線法とあるのはⅡの、比濁法とあるのはⅢの、光学的標準曲線法とあるのはⅣの、光学的方法とあるのはⅤの、ヨウ素滴定法とあるのはⅥの方法と医薬品各条の規定とによってそれぞれ試験を行う。この試験(光学的標準曲線法、光学的方法及びヨウ素滴定法を除く。)に使用する水、試薬・試液及び計量器・用器の必要な部分は、無菌のものを用いる。

Ⅰ円筒平板法

1　円筒(カップ)

外径7.9～8.1mm、内径5.9～6.1mm、高さ9.9～10.1mmのステンレス鋼製の円筒を用いる。なお、円筒は、試験に支障を来たすものであってはならない。

2　培地

次の組成の培地を用いる。ただし、培地の成分として単にペプトンと記載してある場合は、獣肉製ペプトン又はカゼイン製ペプトンのいずれを用いてもよい。培地のpHの調整は、水酸化ナトリウム試液又は1mol/L塩酸試液を用い、滅菌後のpHが所定のものとなるようにする。滅菌は、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間行う。ただし、 *Bacillus subtilis* ATCC 6633の培地は、アンモニア試液、水酸化カリウム試液又は1mol/L塩酸試液を用いて調整する。なお、既製の乾燥培地は、それぞれ規定の組成によって調製した培地と同一成分を有し、同等の試験菌の発育及び性能を示す場合には、これを使用することができる。

(1) 試験菌移植用寒天培地

① 一般試験菌の場合

別に規定する場合を除き、次のいずれかの培地を使用する。

i　ペプトン　10.0g　肉エキス　5.0g
塩化ナトリウム　2.5g　カンテン　13.0～20.0g

以上をとり、水を加えて溶かし、1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.4～6.6とする。

ii　獣肉製ペプトン　6.0g　肉エキス　1.5g
カゼイン製ペプトン　4.0g　ブドウ糖　1.0g
酵母エキス　3.0g　カンテン　13.0～20.0g

以上をとり、水を加えて溶かし、1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.4～6.6とする。

② *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 の場合

ペプトン　5.0g　リン酸二水素カリウム　1.0g
酵母エキス　2.0g　硫酸マグネシウム七水和物　0.5g
ブドウ糖　15.0g　カンテン　13.0～20.0g

以上をとり、水を加えて溶かし、1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.0～6.2とする。

(2) 試験菌増殖用培地

ペプトン　10.0g　肉エキス　5.0g
塩化ナトリウム　2.5g

以上をとり、水を加えて溶かし、1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.9～7.1とする。

(3) 種層用寒天培地及び基層用寒天培地

医薬品各条で規定する。

3　試験菌

医薬品各条で規定する。

4　菌液又は胞子液の調製

試験菌として *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228、*Micrococcus luteus* ATCC 9341、*Proteus* sp.(MB838)、 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031、*Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617、 *Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Escherichia coli* NIHJ、*Escherichia coli* ATCC 27166 及び *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 を用いるときは、次の方法で菌液又は胞子液を調製する。

(1) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228、*Proteus* sp.(MB838)、 *Escherichia coli* NIHJ、*Escherichia coli* ATCC 27166、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 又は *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 の菌液の調製

試験菌を斜面とした2の(1)の①の試験菌移植用寒天培地に約1週間間隔で移植を繰り返し、32～37℃で培養しながら継代保存した試験菌を、使用に当たって2の(2)の試験菌増殖用培地に接種し、32～37℃で16～18時間(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P にあっては16～24時間)培養し、菌液とし、5℃以下に保存する。*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 の菌液は5日、その他の菌液は7日以内に使用する。

(2) *Micrococcus luteus* ATCC 9341 の菌液の調製

試験菌を斜面とした2の(1)の①の試験菌移植用寒天培地に約1週間間隔で移植を繰り返し、32～37℃で16～24時間継代培養する。この菌を2の(2)の試験菌増殖用培地に接種し、32～37℃で16～24時間、必要ならば、振とうしながら培養し、菌液を作る。あるいは、この菌をルー瓶に入れた2の(1)の①の試験菌移植用寒天培地の表面に接種し、32～37℃で16～24時間培養し、発育した菌を適当量の生理食塩液又は水に浮遊させ、菌液とし、5℃以下に保存する。菌液は、5日以内に使用する。

(3) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 の胞子液の調製

試験菌を斜面とした2の(1)の①の試験菌移植用寒天培地に約3か月間隔で移植を繰り返し、32～37℃で培養しながら継代保存した試験菌をルー瓶に入れた同培地に接種し、32～37℃で1週間以上培養して胞子を作らせる。この胞子を生理食塩液又は水に浮遊させて、65℃で30分間加熱する。遠心分離を行い、胞子をとり、更に生理食塩液又は水で3回遠心分離して洗った後、生理食塩液又は水に浮遊させて、65℃で30分間加熱し、胞子液とし、5℃以下に保存する。胞子液は、6か月以内に使用する。

(4) *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 の菌液の調製

試験菌を斜面とした2の(1)の②の試験菌移植用寒天培地に約1か月間隔で移植を繰り返し、25～26℃で40～48時間の培養をしながら継代保存した試験菌を斜面とした同培地に接種し、25～26℃で40～48時間の培養する。この斜面寒天培地に生理食塩液を加え、発育した菌を洗い、他の試験管に移し菌液とし、5℃以下に保存する。菌液は、30日以内に使用する。

5　円筒寒天平板の調製

内径約90mmのペトリ皿の場合は基層用寒天培地20mLを、内径約100mmのペトリ皿の場合は同培地21mLを、また、大型皿を用いる場合は培地の厚さが2～3mmとなるように同培地を分注し、寒天培地を平らに行き渡らせ、水平に静置して固化させ、基層とする。一度溶かして試験菌の活力を阻害しない温度に冷却した医薬品各条に規定する種層用寒天培地に医薬品各条又は4のそれぞれで規定された菌液又は胞子液を加え、十分に混合した後、ペトリ皿においては4.0mLを、大型皿においてはその厚さが1.5～2.5mmとなるように基層に分注し、その表面に一様に広がるように前後左右に傾け水平に静置して、培地を固化させ平板とする。4個の円筒を平板上に(内径約90mmのペトリ皿の場合には半径約25mm、内径約100mmのペトリ皿の場合には半径約28mmの円周上に)、隣り合う各々が中心に対して約90°となるように置き、円筒寒天平板を作る。また、大型皿平板を用いる場合は、ペトリ皿平板に準ずる配置に円筒を置き、4個1組でペトリ皿1枚分とする。平板上に円筒を置く際に

は、円筒を10～13mmの高さから垂直に落とす。基層用寒天培地に添加する菌液又は胞子液の量は、円筒寒天平板を培養したとき、高濃度の常用標準希釈液による阻止円の直径が20～25mmに、低濃度の常用標準希釈液による阻止円の直径が15～20mmになるように調整する。

なお、円筒寒天平板の代わりに、平板に平板器底に達する直径7.9～8.1mmの円形の穿孔を施した穿孔寒天平板を用いることができる。

6　常用標準希釈液

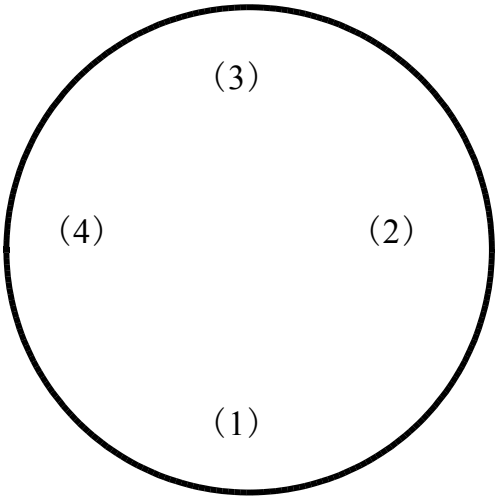
医薬品各条で規定する常用標準品の希釈液を用いる。(以下、高濃度の希釈液を「S_H」、低濃度の希釈液を「S_L」という。)

7　試料液

医薬品各条で規定する。(以下、高濃度の試料液を「U_H」、低濃度の試料液を「U_L」という。)医薬品各条で規定する試料液の濃度は、その濃度が明らかである限り、記載量の±5%の範囲で調製することができる。

8　操作法

円筒寒天平板5枚(大型皿円筒平板の場合はこれに準ずる配置区分)を使用する。次の図に示す各円筒寒天平板の第1の円筒にはS_Hを、第2の円筒にはU_Hを満たす。残りの第3及び第4の円筒にはS_L及びU_Lをそれぞれ満たす。なお、穿孔寒天平板の各孔に注入する常用標準希釈液及び試料液は、各一定容量ずつで満たす。各寒天平板を32～37℃で16～20時間培養する。培養後、それぞれの阻止円の直径(mm)を少なくとも0.25mmの精度で測定する。必要ならば、測定した阻止円の直径を次の表に例示する様式のカードに記入する。



円筒番号	(1)	(2)	(3)	(4)
円筒内容 平板培地	常用 標準 高濃度希釈液 S_H	常用 標準 低濃度希釈液 S_L	高濃度 試料液 U_H	低濃度 試料液 U_L
Ⅰ Ⅱ Ⅲ Ⅳ Ⅴ	mm	mm	mm	mm
計	ΣS_H	ΣS_L	ΣU_H	ΣU_L

9　力価計算

円筒内の液体の力価(P)と阻止円の直径(d)との間には、次の関係が成立してい

る。

$d=\alpha\log P+\beta$　　ただし、α及びβは定数

必要に応じて、この関係式を確かめ、採取した試料中の力価を次の式により求める。

採取した試験品の力価＝A×高濃度常用標準希釈液1mL中の力価×高濃度試料液の希釈倍率

ただし、

$$\log A=\frac{IV}{W}$$

$$I=\log\frac{S_{\mathrm{H}}\text{の力価}}{S_{\mathrm{L}}\text{の力価}}$$

$V=\Sigma U_{\mathrm{H}}+\Sigma U_{\mathrm{L}}-\Sigma S_{\mathrm{H}}-\Sigma S_{\mathrm{L}}$

$W=\Sigma U_{\mathrm{H}}+\Sigma S_{\mathrm{H}}-\Sigma U_{\mathrm{L}}-\Sigma S_{\mathrm{L}}$

S_{H}、S_{L}、U_{H}及びU_{L}の各円筒平板の阻止円直径(mm)の和をそれぞれΣS_{H}、ΣS_{L}、ΣU_{H}及びΣU_{L}とする。

Ⅱ標準曲線法

1　円筒、培地、試験菌及び胞子液の調製は、Ⅰ円筒平板法のそれぞれを準用する。

2　円筒寒天平板の調製

Ⅰ－5円筒寒天平板の調製を準用する。ただし、内径約100mmのペトリ皿を用い、6個の円筒を半径約28mmの円周上に隣り合う各々が中心に対して約60℃となるように置くものとする。また、大型皿平板を用いる場合には、ペトリ皿に準ずる配置に円筒を置き、6個1組でペトリ皿1枚分とする。

なお、円筒寒天平板の代わりに穿孔寒天平板を用いることができる。

3　常用標準希釈液

医薬品各条で規定する常用標準品の希釈液を用いる。

4　試料液

医薬品各条で規定する。

医薬品各条で規定する試料液の濃度は、その濃度が明らかである限り、記載量の±5%の範囲で調製することができる。

5　操作法

医薬品各条で規定する各濃度の常用標準希釈液を用いて標準曲線を作り、その中心常用標準希釈液及び試料液を用いて試料液の測定を行う。

中心常用標準希釈液を除く各濃度の常用標準希釈液について、それぞれ3枚の円筒寒天平板を使用する。3枚の円筒寒天平板を1組として、各円筒寒天平板上の1個おきに3個の円筒に中心常用標準希釈液を満たし、他の3個の円筒には同一濃度の常用標準希釈液を満たす。この操作を各濃度の常用標準希釈液ごとに行う。同時に別の円筒寒天平板3枚を用い、各円筒寒天平板上の1個おきに3個の円筒に中心常用標準希釈液を満たし、他の3個の円筒には試料液を満たす。一方、大型皿円筒寒天平板を用いる場合は、以上の円筒寒天平板に準じた配置区分で同様の操作を行う。なお、穿孔寒天平板の各孔には常用標準希釈液及び試料液を一定容量ずつ注入する。各円筒寒天平板を32～37℃で16～20時間培養し、各阻止円の直径を少なくとも0.25mmの精度で測定する。

6　力価計算

常用標準希釈液各組の3枚の円筒寒天平板(大型皿円筒寒天平板の場合は、これに準じた配置区分)上の中心常用標準希釈液の阻止円直径の平均値、各濃度の常用標準希釈液の阻止円直径の平均値及び全ての組の中心常用標準希釈液の阻止円直径の

平均値(補正用平均値)を求める。補正用平均値は、修正のために用いる。各組の中心常用標準希釈液の平均値が補正用平均値と相違するときは、その差をその組の常用標準希釈液の平均値に加減して修正する。例えば、ある濃度の組の常用標準希釈液の平均値が19.0mmであって、その組の中心常用標準希釈液の平均値が19.8mmであり、補正用平均値が20.0mmであるとき、これを19.0mm＋(20.0mm－19.8mm)であると修正する。これらの修正された値を用いて力価の対数と阻止円直径の関係を示す標準曲線を半対数方眼紙に書く。

次に、試料液の阻止円直径の平均値とこれに対応する中心常用標準希釈液の阻止円直径の平均値を求める。試料液の阻止円直径の平均値が中心常用標準希釈液の平均値より大きいときは、その差を標準曲線上の中心濃度が示す阻止円直径に加え、小さいときはその差を減じて補正し、その直径に対する標準曲線上の点から試料液のmL当たりの力価を求める。ここで得た力価の値に試料液の希釈倍数を乗じ、採取した試験品の力価を求める。なお、等比的5段階濃度の常用標準希釈液を用いる場合は、次の式によって計算し、標準曲線を書くことができる。

$$L=\frac{3a+2b+c-e}{5}$$

$$H=\frac{3e+2d+c-a}{5}$$

L：標準曲線の最低濃度に対する阻止円直径の計算値

H：標準曲線の最高濃度に対する阻止円直径の計算値

c：補正用平均値

a、b、d、e：aは、最低濃度常用標準希釈液に対する阻止円直径の修正した平均値。b、d、eは順次に、より高濃度の各常用標準希釈液に対するそれぞれの阻止円直径の補正した平均値。L点とH点を半対数方眼紙に記し、直線で結ぶ。

Ⅲ比濁法

1　試験菌

医薬品各条で規定する。

2　培地

次の組成の培地を用いる。培地のpHの調整は、水酸化ナトリウム試液又は1mol/L塩酸試液を用い、滅菌後のpHが所定のものとなるようにする。なお、いずれの培地についても、乾燥培地を用いる場合には、水で液状にしたとき、それぞれ規定の組成によって調製した培地と同一成分を有し、同等又はより優れた菌の発育を示さなければならない。滅菌は、高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間行う。

(1) 試験菌移植用寒天培地

獣肉製ペプトン	6.0g	肉エキス	1.5g
カゼイン製ペプトン	4.0g	ブドウ糖	1.0g
酵母エキス	3.0g	カンテン	13.0～20.0g

以上をとり、水を加えて溶かし、1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.4～6.6とする。

(2) 試験菌浮遊用液状培地

ペプトン	5.0g	ブドウ糖	1.0g
酵母エキス	1.5g	無水ﾘﾝ酸水素二ﾅﾄﾘｳﾑ	3.0g
肉エキス	1.5g	ﾘﾝ酸二水素ｶﾘｳﾑ	1.32g
塩化ナトリウム	3.5g		

以上をとり、水を加えて溶かし、1,000mLとし、滅菌する。pHは、6.9～7.1とする。

なお、無水リン酸水素二ナトリウム3.0gの代わりにリン酸水素二カリウム

3.68gを用いることができる。

3　試験菌液の調製

試験菌を2の(1)のそれぞれの菌の斜面とした試験菌移植用寒天培地に32～37℃で16～24時間培養し、少なくとも3回継代培養する。この菌を斜面とした試験菌移植用寒天培地に移植し、32～37℃で16～18時間培養した後の新しい試験菌を用い、別に規定する場合を除き、次のように試験菌液を調製する。

試験菌を約5mLの水に浮遊させ、これを試験菌移植用寒天培地300mLを入れた2本のルー瓶に加え、表面に一様に塗布した後、32～37℃で16～24時間培養し、菌を集め、適当量の水に浮遊させて光電光度計を用い、650nmにおける透光率が約65%となるように調製する。この液は、5℃以下に保存し、14日以内に使用する。用時、この液6.0mLをとり、約15℃に冷却した2の(2)の試験菌浮遊用液状培地100mLに加え、試験菌液とする。

4　常用標準希釈液

医薬品各条で規定する常用標準希釈液を用いる。

5　試料液

医薬品各条で規定する。

医薬品各条で規定する試料液の濃度は、その濃度が明らかである限り、記載量の±5%の範囲で調整することができる。

6　操作法

内径13.5～14.5mm、長さ約130mmの試験管3本を1組とする。

常用標準希釈液の各濃度ごとにそれぞれ1組ずつ、また試料液に1組を使用する。各組の試験管ごとに同一濃度の常用標準希釈液又は試料液を1.0mLずつとる。これらの全ての試験管に試験菌液9.0mLずつを加え、アルミニウム若しくはステンレス鋼製又はガラス製の深さ40mmの蓋又は綿栓を施し、35～37℃の水浴中で3～4時間培養する。別に、水1.0mLと試験菌浮遊液9.0mLを混ぜた試験管を同様に培養し、対照液とする。培養後、薄めたホルムアルデヒド液(1→3)0.5mLずつを各組の試験管及び対照液に加え、光電光度計を用い、530nmにおける透光率又は吸光度を測定する。

7　計算法

常用標準希釈液の各組ごとに透光率又は吸光度を平均して各濃度における平均透光率又は平均吸光度を求める。常用標準希釈液の図表が直線を示すようなグラフ用紙を選定し、その縦軸に平均透光率又は平均吸光度を、横軸に濃度をとり、隣り合う2点を直線で結ぶ図表を書く。次に、試料の組の透光率又は吸光度を平均して試料の平均透光率又は平均吸光度を求め、この値から図表を用いて試料液のmL当たりの力価を求める。ここで得た力価の値に試料液の希釈倍数を乗じ、採取した試験品の力価を求める。

なお、等比的5段階濃度の常用標準希釈液を用いる場合は、次の式によって計算し、L点とH点をグラフ用紙に記し、これを結び直線を書くことができる。

$$L=\frac{3a+2b+c-e}{5}$$

$$H=\frac{3e+2d+c-a}{5}$$

L：常用標準希釈液の最低濃度における透光率又は吸光度の計算値

H：常用標準希釈液の最高濃度における透光率又は吸光度の計算値

a、b、c、d及びe：各常用標準希釈液の平均透光率又は平均吸光度

Ⅳ光学的標準曲線法

1　常用標準溶液又は常用標準測定液

医薬品各条で規定する。

2　試料溶液又は試料測定液

医薬品各条で規定する。

医薬品各条で規定する試料測定液(又は試料溶液)の濃度は、その濃度が明らかである限り、記載量の±5%の範囲内で調製することができる。

3　対照液

別に規定する場合を除き、常用標準品を含まない常用標準測定液の調整方法と同様に操作して調製した溶液を対照液とする。

4　操作法

(1) 透光率を測定する場合

光電光度計を用い、各常用標準測定液、試料測定液及び対照液を医薬品各条において規定する波長における対照液の透光率が100%となるように光電光度計を調整し、各常用標準測定液及び試料測定液の透光率を同一波長で測定する。

(2) 吸光度を測定する場合

分光光度計を用い、各常用標準測定液及び試料測定液につき、対照液を用い、医薬品各条において規定する波長におけるそれぞれの吸光度を同一波長で測定する。

5　計算法

グラフ用紙は、常用標準測定液(又は常用標準溶液)の図表が直線を示すようなものを選定する。

(1) 透光率を測定した場合

グラフ用紙を用い、各常用標準測定液の透光率について、各常用標準測定液(又は常用標準溶液)の濃度を横軸に、透光率を縦軸にとって、図表を書く。

この図表を用いて試料測定液の透光率から、試料測定液(又は試料溶液)のmL当たりの力価を求める。ここで得た力価の値に試料測定液(又は試料溶液)の希釈倍数を乗じ、採取した試験品の力価を求める。

(2) 吸光度を測定した場合

グラフ用紙を用い、各常用標準測定液の補正した後の吸光度について、各常用標準測定液(又は常用標準溶液)の濃度を横軸に、吸光度を縦軸にとって、図表を書く。

この図表を用いて試料測定液の吸光度から、試料測定液(又は試料溶液)のmL当たりの力価を求める。ここで得た力価の値に試料測定液(又は試料溶液)の希釈倍数を乗じ、採取した試験品の力価を求める。

V 光学的方法

医薬品各条で光学的方法と掲げた力価試験は、日本薬局方一般試験法紫外可視吸光度測定法に準じて試験を行う。

VI ヨウ素滴定法

次の方法で行う。

1　常用標準希釈液

医薬品各条で規定する。

2　試料(液)

医薬品各条で規定する。

3　操作法

常用標準希釈液及び試料(液)をそれぞれ100mLの共栓フラスコに入れ、水酸化ナトリウム試液2.0mLずつを加え、正確に15分間放置した後、それぞれに薄めた塩酸(1→10)2.0mL、0.005mol/Lヨウ素液10mLを正確に量って加え、正確に15分間放置し、微量ビュレットを用い、それぞれ0.01mol/Lチオ硫酸ナトリウム液で滴定する。滴定は、フラスコの内容液が無色になるまで行う。必要ならば、デンプン試液0.2

～0.5mLを指示薬として用いる。

別に、常用標準希釈液及び試料（液）にそれぞれ0.005mol/Lヨウ素液10mLを正確に量って加え、以下、同様に操作し（ただし、15分間放置しない。）、空試験を行い、補正する。常用標準希釈液及び試料（液）の消費した0.005mol/Lヨウ素液の量（mL）をそれぞれA_S及びA_Tとする。

4　計算

次の式により力価を計算する。

$$\text{試料（液）中の力価} = \text{常用標準希釈液中の力価} \times \frac{A_T}{A_S}$$