

日局強熱残分試験法に関する検討

北川輝幸, 梅山由美, 平田かおる, 幸田繁孝*

Studies on Residue on Ignition Test in JP

Teruyuki KITAGAWA, Yumi UMEYAMA, Kaoru HIRATA, and Shigetaka KODA*

*Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Analytical Research Laboratories, 2-1-6,**Kashima, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan*

(Received August 17, 2001; Accepted October 31, 2001)

The Residue on Ignition Test specified in General Tests, Japanese Pharmacopeia is a method to measure the weight of the residual substance not volatilized when the sample is ignited under a constant condition. Generally, this test is intended to determine the content of inorganic substances contained as impurities in an organic substance, and, occasionally, to determine the amount of inorganic substances contained as components in an organic substance. Our laboratories have adopted this test method for the above two purposes in the case of the quality control for drug substances, synthetic intermediates, starting materials in the course of drug development. Some validation studies have been conducted for this test in order to clarify the quantitation limit in the case of an application for the former purpose, and trueness and precision in the case of the latter purpose. Consequently, the quantitation limit was determined as around 0.50 mg. The amount of sample should be determined based on this quantitation limit (mg) and the level of quantitation limit (%) or that of specification limit (%) should be considered from the view point of each testing purpose. The test method was also confirmed to have a good trueness and precision as the determination method for an alkaline salt, such as sodium, potassium or calcium salt, of organic compounds, as long as the test is operated with great care not to scatter the content out of crucible during ignition to incineration.

Key words—residue on ignition; validation; quantitation limit; trueness; precision

緒 言

第14改正日本薬局方（以下、日局14又はJP14と記載）に規定されている強熱残分試験法は、試料を一定条件下で強熱するとき、揮発せずに残留する物質の量を測定する方法であり、日局には、古くより収載の重量分析法である。本試験法は、①通例、有機物中に不純物として含まれる無機物の含量を知るために用いられるが、②場合によっては、有機物中に構成成分として含まれる無機物の量を測定するためにも用いられる。

著者らの試験室においても、様々な開発段階における原薬、合成中間体、合成原料等、幅広い化合物の品質管理試験において、①②の両方の目的から本試験法を活用してきている。しかしながら、本法は、古くに確立された公定法であることから、いわゆるバリデーションに関する報告は見当たらない。

一方、上記各試料に本試験を適用した結果を正しく評価し、また各対象物の品質規格を設定する上で、本法の定量性、特に試験法の真度及び精度を把握しておくことが重要である。

今回、この観点から、日局一般試験法である強熱残分試験法を不純物又は構成成分の定量法として位置付けた上で、分析法バリデーション¹⁾の考え方を適用した。すなわち、上記①の目的に適用する場合の定量限界、並びに②の目的に適用する場合の真度及び精度を評価した結果を報告する。

実 験

1. 試料 無機化合物として、以下の試料を用いた。塩化ナトリウム、硝酸ナトリウム、無水リン酸水素二ナトリウム、ホウフッ化ナトリウム*、臭化カリウム、臭素酸カリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、無水硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化カルシウム二水和物、硝酸カルシウム四水和物（以上13点の内12点は、

Table 1. Results of Residue on Ignition Test for Various Kinds of Inorganic Compounds

Inorganic compound	NaCl	NaNO ₃	Na ₂ HPO ₄	NaBF ₄	KBr	KBrO ₃	NH ₄ Cl	(NH ₄) ₂ SO ₄
Expected weighing form	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄	—	—
Theoretical residue on ignition (%) [A]	121.53	83.56	100.06	64.69**	73.22	52.17	0	0
Determined residue on ignition (%) [B]	121.49	83.52	105.38*	66.21	73.09	52.09	0.03	0.00
[B] - [A]	-0.04	-0.04	5.32	1.52	-0.13	-0.08	0.03	0.00

* It needed a very long time to get a constant weight of residue on ignition. ** The theoretical residue on ignition was 65.94% when corrected with the amount of NaF contained in NaBF₄.

JIS 又は試薬メーカー特級品であり、*のみ化学用グレード品である。

有機化合物として、以下の試料を用いた。クロモグリク酸ナトリウム (C₂₃H₁₄Na₂O₁₁)、キノトラストナトリウム水和物 (C₁₇H₁₁N₆NaO₃ · H₂O)、グルコン酸カリウム (C₆H₁₁KO₇)、フタル酸水素カリウム [C₆H₄(COOK)(COOH)]、アスコルビン酸カルシウム (C₁₂H₁₄CaO₁₂ · 2H₂O)、グルコン酸カルシウム (C₁₂H₂₂CaO₁₄) (以上 6 点は、藤沢薬品工業株式会社規格適合品である)。

なお、水和物試料についてはそのまま、水和物以外の試料についてはデシケーター (シリカゲル) 中で一晩乾燥後、用いた。

2. 装置 以下の装置を用いた。化学天秤 (ザルトリウス 1712MP8 型, 2024MP6 型, R200D 型) 及び電気炉 (池田理化 MFP-300N 型, ヤマト FP-41 型)

3. 強熱残分試験 日局 14 に準拠し、以下の通り行った。あらかじめ恒量にした白金製るつぼに、試料の一定量を精密に量り、これに硫酸少量を加えて潤す。徐々に加熱してなるべく低温でほとんど灰化又は揮散させた後、いったん放冷する。さらに硫酸少量で潤して徐々に加熱し、白煙が生じなくなった後、550°C で強熱し、残留物を完全に灰化し、放冷後、その質量を精密に量る。放冷はデシケーター (シリカゲル) で行い、強熱～放冷～秤量は恒量が得られるまで繰り返す。

結果及び考察

1. 無機不純物の秤量形 一般の合成工程で不純物として混入の可能性の大きな 8 種類の無機塩化合物を試料とし、各 100 mg を用い、前記強熱残分試験に従って操作し、得られた結果を Table 1 に示す。

リン酸塩及びホウフッ化物以外の 6 種類の化合物はすべて理論強熱残分とよく一致した。すなわち、塩化物、硝酸塩、臭化物、臭素酸塩等はすべて定量的に硫酸塩に置換されること、ナトリウム塩及びカリウム塩はそれぞれ硫酸ナトリウム及び硫酸カリウムとして定量できること、並びにアンモニウム塩は完全に揮散することを確認した。

一方、理論強熱残分と一致しなかった 2 種類の化合物の内、無水リン酸水素二ナトリウムについては、試験後の残分を X 線マイクロアナライザにより分析したところ、るつぼ中の白金の剥離が認められ、PtP₂ の生成²⁾が示唆された。本品は、石英製又は磁性のるつぼを用いた場合にも恒量に至らず、本試験法条件下でリン酸塩を硫酸塩に置換するのは困難であること³⁾を確認した。また、ホウフッ化ナトリウムで理論値に対し 1.52% 高い結果が得られたのは、用いた試料がフッ化ナトリウムとして 1.2% のフッ化物を有していた (イオンクロマトグラフィーにより確認) ことが原因と考えられる。これは、不純物のフッ化ナトリウム含量で補正した時のホウフッ化ナトリウムの強熱残分理論値 (65.94%) が実測値 (66.21%) とほぼ一致していることから推察される。

2. 強熱残分試験法の定量限界 試料中に最も混入しやすい金属塩であるナトリウム塩の秤量形である硫酸ナトリウムを試料とし、以下の方法により本試験法を無機不純物量の測定法として用いる場合の定量限界を検討した。

硫酸ナトリウム溶液 (0.50 mg/mL) を調製し、その 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL 及び 1 mL (硫酸ナトリウムとして、0.10 mg, 0.20 mg, 0.30 mg, 0.40 mg 及び 0.50 mg を含む) をそれぞれマイクロピペットで正確に量り、あらかじめ恒量にした白金製るつぼに入れ、穏やかに加熱して蒸発乾固し

Table 2. Repeatability of Amount (mg) of the Residue Obtained by Residue on Ignition Test with Different Amount of Sodium Sulfate (Na_2SO_4)

Added amount of sodium sulfate (mg)	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
1	0.08	0.26	0.27	0.41	0.44
2	0.03	0.14	0.25	0.38	0.50
3	0.07	0.14	0.29	0.38	0.50
4	0.04	0.17	0.25	0.37	0.46
5	0.08	0.21	0.28	0.37	0.47
6	0.04	0.17	0.32	0.43	0.46
Mean	0.06	0.18	0.28	0.39	0.47
S.D.	0.023	0.046	0.027	0.024	0.024
R.S.D. (%)	38	26	9.6	6.2	5.1

(Note) Each value in the table represents amount (mg) of residue weighed after ignition to constant weight.

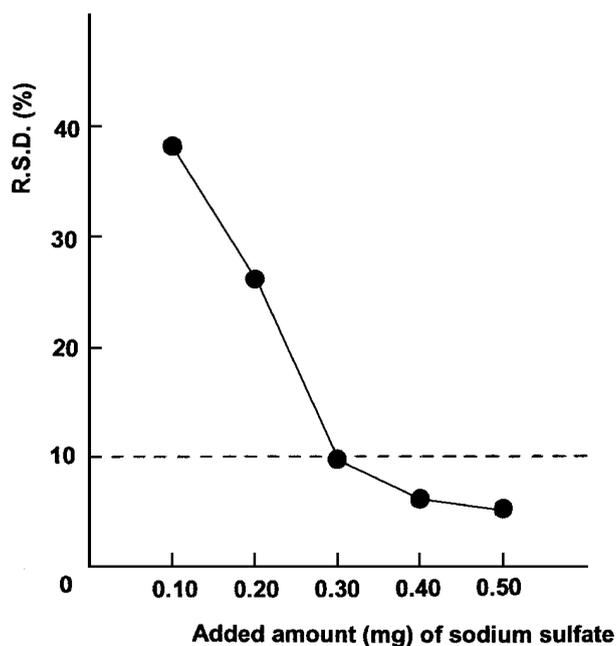


Fig. 1. Relationship between added amount of sodium sulfate and repeatability of residue on ignition

た後、硫酸少量を加えて潤す。以下、前記の方法により強熱残分試験を行い、恒量となった時の残留物の質量を求めた。試験は、各添加量に対し、繰り返し6回行い、また硫酸ナトリウムとして0.40 mg及び0.50 mgを添加しての試験については測定日を変えて同様の検討を行った。

硫酸ナトリウム添加量と強熱残分の併行精度の関係を調べた結果をTable 2及びFig. 1に示す。硫酸ナトリウムとして0.40 mg及び0.50 mg添加した場

Table 3. Intermediate Precision of Amount (mg) of the Residue Obtained by Residue on Ignition Test with Different Amount of Sodium Sulfate (Na_2SO_4)

Added amount of sodium sulfate (mg)	Testing date	1	2	3	4	5
	Replicate number	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
0.40	Mean	0.39	0.34	0.36	0.37	0.35
	S.D.	0.024	0.026	0.045	0.027	0.042
	R.S.D. (%)	6.2	7.6	12.5	7.3	12.0
0.50	Mean	0.47	0.48	0.49	0.51	0.50
	S.D.	0.024	0.031	0.028	0.027	0.011
	R.S.D. (%)	5.1	6.5	5.7	5.3	2.2

(Note) Each value in the table represents amount (mg) of residue weighed after ignition to constant weight.

合の相対標準偏差 (R.S.D.) はほぼ同等の値が得られたが、硫酸ナトリウムの添加量が0.30 mg以下になるとR.S.D. は急激に上昇した。次に、硫酸ナトリウムの添加量が0.40 mg及び0.50 mgの場合につき、測定日を変えて室内再現精度 (日間変動) を調べた結果をTable 3に示す。添加量0.50 mgの場合は各測定日のR.S.D. が2.2%—6.5%の範囲内であったのに対し、添加量0.40 mgの場合は各測定日のR.S.D. が6.2%—12.5%と日間変動の中で10%を超えるR.S.D. が得られた。ここで、日局参考情報に記載の分析法バリデーションの考え方にに基づき、本試験法の定量限界を強熱残分のR.S.D. が10%以下となる量と考えると、日間変動も考慮し、「0.50 mg」となる。なお、この時、真度の推定値 (0.50 mg) と室内再現精度から計算される標準誤差の値から真度 δ の95%信頼区間を求めると、 $-0.02091 \leq \delta \leq 0.00025$ となる。すなわち、 σ の95%信頼区間に0を含んでいたことから、本定量限界「0.50 mg」においては、精度のみならず、真度も良好であることが確認された。

なお、定量限界を0.50 mgとした場合、試料採取量が少なくなるにつれて強熱残分 (%) の定量限界は大きくなる。このことは、日局で最も多くの各条品目に適用されている「0.10%以下」の規格値を適用する場合、定量限界を考慮すると、試料採取量を0.5 g以上 (望ましくは1 g) とする必要があることを表している。すなわち、定量限界 (%) あるいは規格限度値をどこまで低くすべきかによって、試料採取量を適切に設定する必要があると考えられる。

Table 4. Results of Metal Content in Sodium, Potassium and Calcium Salt Compounds Determined by Residue on Ignition Test

Sample compound	Replicate number	Residue on ignition (%)		([A] - [B]) × 100 (Range, Mean, R.S.D.)	
		Theoretical value [A]	Determined value [B] (Range)		
Sodium salt	NaCl	3	121.53	120.54~121.49	99.2~100.0, 99.6, 0.41%
	NaNO ₃	6	83.56	68.71~83.52	82.2~100.0, 93.2, 8.47%
	C ₁₇ H ₁₁ N ₆ NaO ₃ ·H ₂ O	15	18.29	18.12~18.37	99.1~100.4, 99.6, 0.44%
	C ₂₃ H ₁₄ Na ₂ O ₁₁	3	27.72*	27.40~27.50*	98.8~99.2, 99.1, 0.23%
Potassium salt	KCl	3	116.85	116.58~116.84	99.8~100.0, 99.9, 0.10%
	K ₂ SO ₄	3	100.00	99.93~100.30	99.9~100.3, 100.1, 0.21%
	C ₆ H ₁₁ KO ₇	6	37.19	36.96~37.06	99.4~99.7, 99.5, 0.12%
	C ₆ H ₄ (COOK)(COOH)	6	42.66	42.54~42.68	99.7~100.0, 99.9, 0.12%
Calcium salt	CaCl ₂ ·2H ₂ O	6	92.60	86.94~92.59	93.9~100.0, 97.4, 2.97%
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	3	57.65	57.55~58.22	99.8~101.0, 100.5, 0.64%
	C ₁₂ H ₁₄ CaO ₁₂ ·2H ₂ O	6	31.93	31.18~32.37	97.7~101.4, 99.7, 1.18%
	C ₁₂ H ₂₂ CaO ₁₄	6	31.63	28.07~31.32	88.7~99.0, 95.1, 4.78%

* These values were calculated as anhydrous basis.

Table 5. Relationship between Ignition Method and Metal Content of Calcium Gluconate

Ignition method	Replicate number	Residue on ignition (%)		([A] - [B]) × 100 (Range, Mean, R.S.D.)
		Theoretical value [A]	Determined value [B] (Range)	
With Bunsen burner	6	31.63	28.07~31.32	88.7~99.0, 95.1, 4.78%
Without Bunsen burner*	6	31.63	31.37~31.94	99.2~101.0, 99.9, 0.67%

* Sand bath was employed instead of Bunsen burner and controlled at about 300°C.

3. 強熱残分試験法の真度及び精度 先にも記載したように、強熱残分試験法は、無機不純物量の測定法として用いる以外に、有機物中に構成成分として含まれる無機物（金属塩）の量を測定するためにも用いられる。この場合の定量性を、金属塩タイプの医薬品原薬として最も多いアルカリ金属塩（ナトリウム塩及びカリウム塩）並びにアルカリ土類金属塩（カルシウム塩）を用いて検討した。

すなわち、試料として、ナトリウム塩、カリウム塩及びカルシウム塩それぞれにつき、無機塩及び有機塩各2種計4種の化合物を試料とし、各0.1gを用いて前記の方法により強熱残分試験を行い、次式により、回収率を求めた。

$$\text{回収率(\%)} = \left[\frac{\text{実測強熱残分値(\%)}}{\text{理論強熱残分値(\%)} * } \right] \times 100$$

*：試料中の金属がすべて硫酸塩に置換・残存した場合の、試料に対する金属の硫酸塩の質量(%)

結果を Table 4 に示す。硝酸ナトリウム、塩化カルシウム及びグルコン酸カルシウムの3種化合物に

おいて精度上の問題が認められ、繰り返し試験の一部で低い定量値が得られた。しかしながら、それ以外のナトリウム塩、カリウム塩及びカルシウム塩では、すべて理論値に対して99%以上の回収率、かつ相対標準偏差も1%以下の値を示し、真度及び精度ともに良好な結果が得られた。

次に、定量性に問題の認められた3種の塩につき、その原因を調べるため、強熱・灰化時のるつぼ内試料の状態を観察した。その結果、これらはいずれもブンゼンバーナーでの強熱操作中、試料の飛散が認められ、場合によっては、るつぼ外にまで達することがわかった。そこで、定量性に問題の認められた上記試料の内、実際に灰化の必要な有機試料であるグルコン酸カルシウムを試料とし、炭化～灰化段階の強熱温度を一定（約300°C）でるつぼ内をほぼ均一に調節できるように、砂浴を用いて試験操作（灰化後の強熱は550°Cの電気炉を使用）を行った。

結果は Table 5 に示すように、カルシウムの回収率は95.1%から99.9%に向上し、その併行精度も

大きく向上した。このことから、本試験法における定量値の低下やばらつきの原因は、強熱・灰化操作中の試料の飛散によるものと考えられる。また、この点に注意して試験を行えば、本法は、有機化合物のナトリウム塩、カリウム塩及びカルシウム塩の定量法として十分な真度及び精度を持った方法であると考えられる。

結 語

医薬品の開発段階における様々な化合物の品質管理を目的として、日局一般試験法に収載の強熱残分試験法により、試料中の無機不純物含量を測定する場合、及びアルカリ金属又はアルカリ土類金属塩試料中の金属塩含量を測定する場合の定量性につき、分析法バリデーションの考え方を適用し、検討した。

その結果、前者の場合の定量限界は「0.50 mg」程度と考えられ、適用する試験の目的に応じて、すなわち定量限界 (%) あるいは規格限度値のレベルによって、試料採取量を適切に設定する必要があること、後者の場合には、強熱・灰化操作中の試料の飛散に注意して試験を行えば、本法は、有機化合物のナトリウム塩、カリウム塩及びカルシウム塩の定量法として十分な真度及び精度を持った方法であることが確認された。

強熱残分試験法は、三極薬局方検討会議 (PDG)

において USP, EP 及び JP 間の調和が進められてきたが、漸く 2000 年 11 月、これまで各薬局方間で異なっていた強熱温度が「 $600 \pm 50^\circ\text{C}$ 」とすることで合意がなされた。⁴⁾ 本合意に基づき、日局では、第 14 改正第 1 追補で強熱温度の改定がなされる予定であるが、筆者らの今回の検討は、日局 14 一般試験法記載の強熱温度「 $450 \sim 550^\circ\text{C}$ 」の上限である 550°C で行っており、三極調和された強熱温度範囲にも入っていること、並びに「 $600 \pm 50^\circ\text{C}$ 」及び「 $450 \sim 550^\circ\text{C}$ 」の両強熱温度間で結果に差のないことは上記調和作業の中で検討済みであることから、³⁾ 今回の検討結果は、三極調和の強熱残分試験法を用いて品質管理を行っていく上でも適用できるものと考えられる。

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labor and Welfare, “The Japanese Pharmacopoeia Fourteenth Edition”, F-114 (2001).
- 2) Hirokawa Shoten, “Dai-14 Kaisei Nihon Yakkyokuhou Kaisetsusyo”, B-141 (2001).
- 3) Society of Japanese Pharmacopoeia, “The Japanese Pharmacopoeia Technical Information,” 101 (2001).
- 4) Japanese Pharmacopoeial Forum, **10**, 135 (2001).