神奈川県衛生研究所研究報告　No. 52 (2022)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

医薬品製造販売承認書に表記されないカプセル剤皮中のタール色素の分析法の検討及び実態調査

岩橋孝祐，熊坂謙一

Study of analytical methods and a survey of the undeclared coal-tar dyes in capsule shell on the Certificate for manufacturing and marketing approval of pharmaceuticals

Takahiro IWAHASHI and Kenichi KUMASAKA

緒言

医薬品製剤に配合される有効成分及び添加物は，原則として医薬品製造販売承認書にその種類，量及び規格等を記載し，GQP及びGMP省令等に従い原料の受入れ試験から最終製品試験まで厳密な製造管理及び品質管理が行われている．しかし，医薬品中のカプセルに使用される一部の添加物については製造販売承認書への記載は必須ではない[1]など，他の添加物等とは管理方法が異なっている．また，市場に流通している医薬品は，原則として添付文書等に全ての添加物の名称を記載する必要があるが，行政による承認審査及びGMP適合性調査等でカプセルに使用される添加物やその表示の是非を確認することは難しく，使用に制限のある添加物を検査しようとしても，適切な試験方法の規定はない．近年，製造販売承認書にない添加物あるいは規格を満たしていない添加物の添加等が原因となる自主回収も散見されるが，特に使用制限がある着色剤であるタール色素[2]については，実態を確認した分析報告[3]は少ない．さらに，経口薬であるカプセル製剤のカプセルに使用可能なタール色素は11種類及びそのアルミニウムレーキであるが，現在の医薬品の製造及び品質管理体制ではGMP省令による管理対象外であり，また，添加可能なタール色素の使用実態に関する報告はない．また，タール色素はアルミニウムレーキの使用も認められているが，製品中のレーキとして使用されている金属について確認した事例はない．そこで本研究では，医薬品製剤等のカプセルの剤皮に使用されうる着色剤のタール色素12成分及びレーキ金属の３元素を対象とし，高速液体クロマトグラフ（HPLC），液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-MSMS）及び誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いた分析条件を検討するとともに流通製品における実態調査を行ったので報告する．

神奈川県衛生研究所　理化学部
〒253-0087　茅ケ崎市下町屋1-3-1

方法

１．試料

市場に製造販売されている医薬品製剤のうち，有色のカプセル製剤の内容物を除いたカプセル剤皮を対象とした．

２．分析対象

医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令[2]に規定された赤色２号（以下，R2），赤色３号（R3），赤色102号（R102），赤色104号（R104），赤色105号（R105），赤色106号（R106），黄色４号（Y4），黄色５号（Y5），緑色３号（G3），青色１号（B1），青色２号（B2）及び食品添加物の赤色40号（R40）を加えた12種類のタール色素並びに当該省令中で色素の金属レーキとして記載のあるアルミニウムの他，外用医薬品で一部使用が認められている金属レーキであるバリウム及びジルコニウムとした．

３．試薬・器材

色素は東京化成工業（株）製のFood Color Testing Solutions A set及びレギュラトリーサイエンス財団の青色２号標準品を使用した．添加回収及びサンプルブランク用のカプセルには小林カプセル（株）製の日本薬局方カプセルを使用した．メタノールは関東化学（株）製の試薬特級，液体クロマトグラフ用又はLC/MS用，アセトニトリルは同社製の液体クロマトグラフ用又はLC/MS用，酢酸アンモニウムはジーエルサイエンス（株）製LCMS用を使用した．カラムはWaters社製ACQUITY UPLC HSS T3（1.8 μm，2.1 mm×100 mm），ガードカラムは同社製ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column（1.8 μm，2.1 mm×5 mm），ろ過用フィルターはMerck社製のマイレクス-LG（孔径0.20 μm，直径13 mm，親水性，PTFE）を用いた．金属元素の分析には，標準液として富士フィルム和光純薬（株）製のアルミニウム（Al 1000）及びバリウム（Ba 1000）JCSS標準液，原子吸光分析用ジルコニウム標準液（Zr 1000）を使用し，硝酸及び過酸化水素水は同社製の有害金属測定用及び原子吸光分析用を使用した．また，測定器具にはジーエルサイエンス（株）製

DigiTUBEs及びDigiFILTER　0.45 μ m を用いた．DigiTUBEsは予め硝酸及び過酸化水素水で洗浄してから使用した.水はMerck社製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を使用した.

4．装置及び測定条件

既報[4]を参考に，HPLCとしてPDA検出器を接続したWaters社製ACQUITY UPLCを使用し，LC-MSMSは島津製作所製のNexera X2 UHPLCを接続した三連四重極質量分析計（LCMS-8050）を使用し，それぞれ測定条件を検討した．また，ICP-MSとして，アジレント社製Agilent 7800を用いた．各測定条件は表１から３に示した.

表１　HPLC測定条件

装置	ACQUITY UPLC (Waters)
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters) 2.1 mmI.D.×100 mm, 粒子径 1.8 μm
ガードカラム	ACQUITY UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column (Waters) 2.1 mmI.D.×5 mm,粒子径 1.8 μm
カラム温度	40℃
移動相	A:10 mM酢酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル
グラジエント送液条件	(A : B)95 : 5(0 min)→55 : 45(9 min)
流量	0.35 mL/min
注入量	5 μL
検出器	ACQUITY UPLC eλPDA Detector (検出波長315 nm, 測定波長200-800 nm)

表２　LC-MSMS測定条件

装置	Nexera X2 UHPLC及びLCMS-8050質量分析計（島津製作所）
カラム	ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters) 2.1 mmI.D.×100 mm,粒子径 1.8 μm
ガードカラム	Acquity UPLC HSS T3 VanGuard Pre-column (Waters) 2.1 mmI.D.×5 mm,粒子径 1.8 μm
カラム温度	40℃
移動相	A:10 mM酢酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル
グラジエント条件	(A : B)95 : 5(0 min)→50 : 50(9 min)→95 : 5(10 min)
流量	0.4 mL/min
注入量	1 μL
インターフェイス温度	300℃
DL温度	250℃
ネブライザーガス流量	3 L/min
ヒーティングガス流量	10 L/min
ヒートブロック温度	400℃
ドライイングガス流量	10 L/min
イオン化法	ESI法、ポジティブ又はネガティブモード
測定モード	多重反応モニタリング(MRM)

表３　ICP-MS測定条件

装置	Agilent 7800
RFパワー	1550 W
プラズマガス（Ar）流量	15 L/min
キャリアガス（Ar）流量	1.05 L/min
反応ガス（He）流量	4.3 mL/min
測定モード	Heモード
測定対象元素(測定質量数)	(積分時間(sec)/質量)
Al(27)	5
Zr(90)	1
Ba(138)	0.1

5．実態調査

市場に流通している小児用を含む医療用及び一般用医薬品製剤のうち，有色カプセルを使用した製剤30検体を購入し，内容物を除去した後，キャップ部とボディ部をそれぞれタール色素のスクリーニング検査から実施した．流通製品の実態調査のための検査の流れを図１に示す.

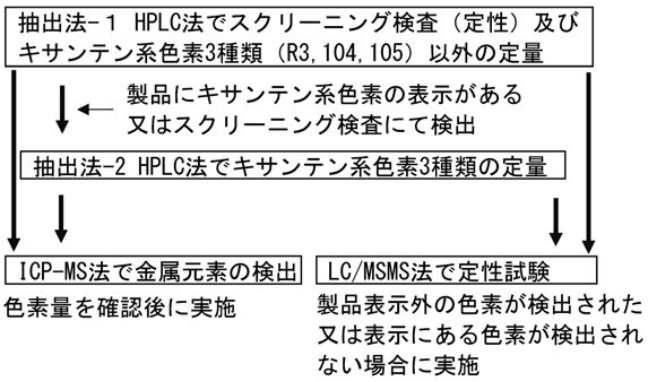

図１　色素の定性・定量と金属元素検査の流れ

6．HPLC及びLC-MSMS用試料溶液

分析対象とした12種類のタール色素のスクリーニング及びキサンテン系色素の内３種類（R3,R104及びR105）を除く９種類のタール色素の定量には10％メタノールを用いた抽出法－１を，同法では回収率の悪いキサンテン系色素３種類の定量には，50％アセトニトリルを使用した抽出法－２を用いた．各抽出法の詳細は図２に示した.

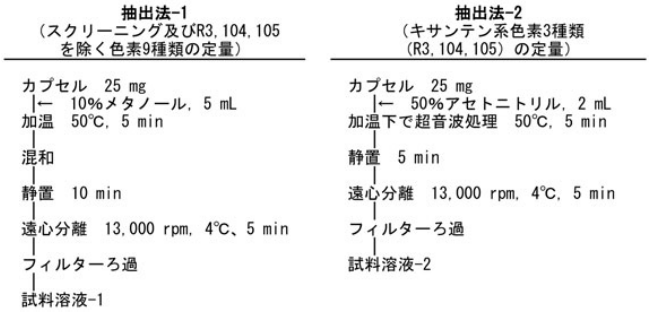

図２　HPLC及びLC-MSMS用試料溶液の調製方法

7．ICP-MS用試料溶液

約100 mgのカプセルに4 mLの60％硝酸を加え，105℃で３時間湿式分解を行った．その後，30％過酸化水素水を1 mL加え，105℃で１時間湿式分解を行った後，超純水で50 mLとした．0.45 μmフィルターでろ過後，試料溶液とし，検出した色素量に応じ１％硝酸で適宜希釈して分析した.

8．HPLC用検量線

1 mg/mLの標準原液を各抽出溶媒で希釈し，10％メタノール標準溶液は0.5，1，2.5，5，7.5，10 μg/mLを50％アセトニトリル標準溶液は0.5，1，2.5，5，7.5，10，20 μg/mLの検量線用混合標準溶液を調製し，絶対検量線法により定量を実施した.

9．分析法の評価

カプセルには「カプセル」,「ヒプロメロースカプセル」,

「プルランカプセル」があるが，代表的なゼラチン製の「カプセル」をブランク試料とし，分析法の検討及び評価を実施した．

タール色素の定量にはHPLC法を用い，特異性，直線性，真度及び精度，検出下限及び定量下限を評価した．真度・精度の評価における添加回収濃度は，製造販売承認書上の一般的な記載である「微量（0.1％以下）」の上限に相当する1 mg/gとし，１回６併行の結果により真度及び併行精度を，異なる６日間における各１回の分析結果により室内再現性を評価した．また，HPLC法における試料中の各色素の検出下限及び定量下限は標準溶液0.5 μg/mLの分析より得られた各成分ピークのシグナルノイズ比（S/N比）により評価を行い，それぞれS/N比3.3及び10となる濃度より算出した．

なお，LC-MSMSを用いたタール色素の確認は定性試験として実施し，ブランク溶液との比較による特異性及び検出下限としてピーク高さがS/N比3.3以上となる標準溶液濃度を確認した．

アルミニウム，ジルコニウム及びバリウムの各金属元素は， ICP-MSを用いた定性試験として特異性及び検出感度の確認を行った．ブランク試料からもアルミニウムが検出されることから，その特異性は添加した各金属の回収率をもって評価した．なお，ブランク試料への各金属元素量の添加量は，試料中，各色素0.1％量に結合する金属量を算出し，そのうち最も低値となった色素の金属量を踏まえ，試料中濃度としてアルミニウム20 μg/g，ジルコニウム50 μg/g，バリウム150 μg/gで添加し，特異性を確認した．また，各標準液を1%硝酸で希釈して1，5，10，25，50 ng/mLの標準溶液を調製して直線性を確認するとともに，確実に検出された最小濃度より，検出の限度値を決定した．

結果及び考察

１．分析法の検討と評価

HPLC法における分析法の評価として，特異性はブランク溶液との比較，各色素ピーク間の分離度が1.5以上かつPDAスペクトルの形状及び極大吸収波長にて確認しており，各色素のピークの保持時間及び極大吸収波長を表４に示した．

表４　HPLC測定における各色素のピークの保持時間及び極大吸収波長

色素	保持時間（分）	極大吸収波長(nm)※
R2	1.9	522
R3	6.8	529
R102	2.8	512
R104	7.9	545
R105	8.7	555
R106	7.8	562
Y4	1.5	427
Y5	3.2	483
G3	5.7	623
B1	5.9	627
B2	2.1	612
R40	3.9	510

※測定波長範囲(200～800 nm)の中で強度が高く特徴的と思われる極大の波長を記載した．

また，新藤らの報告[5]にあるとおり，ピークの保持時間の短い色素については，移動相より抽出溶媒の極性が低くなると，HPLCでのピーク形状等に影響することから，スクリーニング検査用として10％（v/v）メタノール溶液を使用することとした．（抽出法－１）しかし，10％メタノール溶液ではR3，R104及びR105の回収率が低下したことから，これらの色素を対象とした抽出には，ピークに影響がないことを確認したうえで50％（v/v）アセトニトリル溶液を使用することとした．

直線性は各溶媒で各色素とも検量線の濃度範囲の相関係数rは0.99以上であり，良好な直線性を示すことを確認した．また，真度・精度を評価した結果を表５に示した．抽出法－１を用いた色素９種類では真度84.8～97.4％，併行精度0.1～0.9 RSD％，室内再現性1.4～10.8 RSD％，抽出法－２を採用した色素（R3，R104及びR105）では真度54.7～64.9％，併行精度3.6～4.4 RSD％，室内再現性2.6～4.3 RSD％となった．抽出法－２における低回収率の原因として色素のタンパク質への吸着[6]といった報告もあったことから，回収率の向上を目指して抽出溶媒及び抽出方法を変更するなどの条件検討を行ったが，これ以上の回収率の改善を成しえることはできなかった．以上の検討結果を踏まえ，抽出法－2における真度（回収率）に改善すべき課題はあるものの，配合成分として未表示の色素検出及び金属レーキの推定に適用できると判断した．

表５　各色素の真度及び精度

抽出法	抽出法-1									抽出法-2		
測定色素	R2	R102	R106	Y4	Y5	G3	B1	B2	R40	R3	R104	R105
真度(%)	93.7	95.0	95.9	96.4	97.4	89.9	94.2	84.8	95.7	61.8	64.9	54.7
併行精度（RSD%）	0.2	0.4	0.3	0.4	0.3	0.7	0.4	0.9	0.1	3.6	3.7	4.4
室内再現性（RSD%）	1.7	2.4	1.4	2.2	1.8	10.8	6.3	4.3	1.7	2.6	2.6	4.3

キサンテン系色素3種類（R3、R104、R105）は抽出法-2で，キサンテン系色素3種類以外は抽出法-1により評価した．

表６　LC-MSMS測定における各色素のピークの保持時間及びMRM条件

色素	保持時間 (min)	ESI法 (+/-)	Precursor ion (m/z)	CE(V)	Product ion (m/z)	色素	保持時間 (min)	ESI法 (+/-)	Precursor ion (m/z)	CE(V)	Product ion (m/z)
R2	2.6	-	268.2	14.0	228.1	Y4	1.4	-	233.2	7.0	211.1
			537.2	31.0	317.0				467.2	21.0	198.0
			268.2	22.0	206.1				233.2	14.0	198.1
R3	7.4	+	836.5	-51.0	582.9	Y5	4.1	-	407.0	30.0	207.1
			836.5	-64.0	329.1				407.0	37.0	142.0
			836.5	-80.0	200.1				407.0	47.0	206.0
R102	3.7	-	268.2	22.0	206.1	G3	6.4	+	765.0	-56.0	300.2
			537.2	27.0	302.0				765.0	-48.0	306.2
			268.2	18.0	221.1				765.0	-64.0	288.4
R104	8.6	-	782.6	27.0	658.6	B1	6.7	+	749.0	-70.0	171.0
			782.6	21.0	702.3				749.0	-41.0	457.4
			782.6	28.0	656.8				749.0	-59.0	311.7
R105	9.2	-	970.5	35.0	672.9	B2	3.0	-	421.0	30.0	340.9
			970.5	52.0	517.7				421.0	47.0	248.1
			970.5	67.0	390.8				421.0	43.0	260.0
R106	8.3	+	559.0	-50.0	514.9	R40	4.7	-	451.1	32.0	207.2
			559.0	-67.0	471.0				451.1	55.0	206.2
			559.0	-57.0	435.0				451.1	24.0	372.2

また，定量下限は試料溶液濃度として0.25 μg/mL（抽出法－1は試料中濃度0.05 mg/g，抽出法－2は0.02 mg/g），検出下限は試料溶液濃度として0.1 μg/mLであった．

LC-MSMSによる定性試験では，ブランク試料溶液との比較により特異性を確認し，全ての色素において，25 ng/mLの標準溶液で各ピークのS/N比が3.3以上であったことから，検出下限濃度を一律で25 ng/mL（抽出法－1は試料中濃度5 μg/g，抽出法－2は2 μg/g）とした．各色素のピークの保持時間とMRM条件を表６に示した．

ICP-MSによる金属元素の確認では，ブランク試料への各添加濃度にてアルミニウム109.5%，ジルコニウム104.2%，バリウム101.4%と良好な回収率が得られ，その強度はブランクと比較し，十分な強度であったことから，特異性の確認とした．各金属とも直線性の範囲の相関係数rは0.99以上であり，良好な直線性を示すことを確認した．また，そのうち1 ng/mL濃度でも各金属とも検出可能であったことから，検出の下限値は試料中濃度に換算すると0.5 μg/gとなった．なお，アルミニウムについては，ブランクカプセル（サンプルブランク）からも検出されるため，試料中の含量として2.5 μg/g未満のものは不検出とした．

２．実態調査

調査結果を表７に示した．調査対象とした30製品では，R3，Y5及びB1の使用頻度が高く，製品あたりの色素数は１種類だけでなく最大４種類の色素が使用されている製品もあった．

今回のカプセル剤皮を対象とした分析では，目視確認で色素の抽出が十分に進まなかった検体はなかった．抽出が十分でない場合，既報[3]や第２版食品中の食品添加物分析法[7]等に準じて水酸化ナトリウム，塩酸等による抽出，精製を検討する必要があると考えられた．

抽出法－1でスクリーニング検査を実施したところ２製品を除き，製品表示と同じ色素が検出された．検出されなかった内の１製品（検体No.7）については，LC-MSMSによる定性試験でも検出することができなかったが，内容物の外観等から表示されたY5はカプセルではなく内容物に添加されていると推測された．残り１製品（検体No.18）は，抽出法－2で抽出したところ，表示にあるR3が検出された．

なお，製造販売承認書上は「微量（0.1%以下）」が一般的な記載であり，本定量法における色素の検出量は，ほとんどの医薬品で製品全体質量に換算しても0.1%以下であったが，検体No.9，21，22では製品全体質量の0.1%を超えていた．　0.1%を超えた製品の外観の色調は濃色であることから，この結果は妥当であると考えられる．

色素が検出されたカプセルについてICP-MSにより含有金属元素を分析したところ，12製品からブランクカプセル（サンプルブランク）における強度以上のアルミニウムが検出された．アルミニウムがレーキ由来とは断定はできないが，今後，その定量法を確立することで，その金属量と色素量の相関性を確認することにより金属レーキを推定することは可能であると考える．また，外用医薬品で使用が認められているが，カプセルに使用不可のレーキの金属元素であるジルコニウム及びバリウムについては，ジルコニウムが検出された製品があったが，その強度はいずれも低値であったことから色素由来ではないと判断した．また，元素不純物のクラス３にも指定されているバリウムは検出されなかった．

表７　実態調査結果

検体 No.	表示色素	検出したタール色素（検出量mg/g）※1											検出した金属		
		R2	R3	R102	R104	R105	R106	Y4	Y5	G3	B1	B2	R40	Al※2	Zr	Ba
1	B1										0.08			検出	検出	
2	Y5								4.26							
3	Y5								4.09							
4	Y5								4.12							
5	Y5								4.93							
6	Y5								3.59							
7	R3，Y5，B1		0.03								0.13					
8	B1										0.13			検出	検出	
9	B1，R3		46.15								0.11			検出		
10	R3，Y5，B1		0.53						2.32		0.19			検出		
11	三二酸化鉄，黄色三二酸化鉄，黒酸化鉄															
12	R102，Y5，B1			0.73					1.24		0.12			検出		
13	B1										1.04			検出		
14	B2											0.53				
15	B2											1.54				
16	なし															
17	Y5，R102			0.17					0.33					検出		
18	Y4，R3		検出					2.96								
19	R3，Y5		1.19						7.34							
20	なし															
21	Y5								6.77							
22	Y5，B1，R3		42.85						0.06		0.14			検出		
23	B2											0.38				
24	Y5，B1								0.33		0.48					
25	Y5，B1								0.24		0.68			検出	検出	
26	Y5，B1								0.35		0.61					
27	B1，Y4							0.15			0.21			検出		
28	B1，Y4，Y5，R3		8.33					0.15	0.74		0.05			検出		
29	R2，Y5	4.36							5.60							
30	B1										0.17			検出		

検出量は有色のキャップ部又はカプセル剤皮全体の値とし，空欄は未検出を示す．
※1定量限界未満は検出とした．
※2試料中の含量として2.5 μg/g未満のものは不検出とした．

まとめ

医薬品に使用されるカプセル中のタール色素の分析法を検討し，市場流通製品の実態調査を行った．色素毎の回収率に応じて，２種類の抽出法，HPLC及びLC-MSMSを用いて検査を実施したが，配合成分表示外の色素は検出されなかった．一部の製品からは，一般的なタール色素の配合量である微量を超える色素が検出された．カプセルへの色素の使用について，製造販売承認書に記載する必要はないとはいえ，視認性に有用な最低量での使用を検討することが望ましいと考える．また，色素が検出された製品について，ICP-MSを用いて金属元素の確認を行ったところ複数のカプセルよりアルミニウムが検出されたものの，色素由来と推定される強度のジルコニウム及びバリウムは検出されなかった．このことから，今回確認したカプセルに使用された色素は，製造販売承認書に記載がなくとも，他の添加物と同様に適正に製造管理されていると推測した．

文献

１）「承認基準の定められた一般用医薬品の申請書の記載及び添付資料の取扱い等について」の一部改正について，薬生薬審発 0616 第７号，令和３年６月16日，厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長通知

２）医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令，昭和四十一年厚生省令第三十号，

３）赤田良信，河野貞子，棚瀬弥一郎：高速液体クロマトグラフ法によるカプセル中の色素の定量，薬学雑誌，98，1300-1304(1978)

４）関戸晴子，岸弘子：高速液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた食品中の合成着色料の分析，神奈川県衛研報告，38，35-38(2008)

５）新藤哲也，大石充男，石川ふさ子，堀江正男，安井明子，伊藤弘一：食用黄色４号のHPLCにおける保持時間の変動，東京健安研セ年報，57，205-209（2006）

６）Ishikawa, F., Shigeoka, S., Nagashima, M., Takahashi, M., Kamimura, H., Onishi, K., et al.: Analytical method of 21 coal-tar dyes in protein-rich foods by solid-phase extraction and HPLC. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (Food Hyg. Saf. Sci.)，41，194-199 （2000）

７）厚生省生活衛生局食品化学課通知：第２版食品中の食品添加物分析法，衛化第15号，平成12年３月30日