

## Chromatography Stage 4 案の趣旨等について

平成 29 年 7 月

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構  
規格基準部 医薬品基準課

今般、Chromatography に関する日米欧三薬局方国際調和案（Stage 4 案）のご意見募集を開始するにあたり、本国際調和案の作成の背景等についてご紹介することといたしました。

何卒、ご理解いただきますとともに、今後も日本薬局方の国際調和に対してご協力いただきますよう、お願い申し上げます。

### 1. 調和の背景

Chromatograph の国際調和は、ICH Q4B 専門家作業部会からの提案を受けて 2009 年より日米欧三薬局方検討会議（PDG）において議論が開始された。本調和試験法案は Ph. Eur. の 2.2.46 Chromatographic separation techniques、日局一般試験法 2.01 液体クロマトグラフィー及び参考情報「システム適合性」、並びに USP<621> CHROMATOGRAPHY に基づいて作成されたものであり、7 年に渡って PDG 対面会合及び専門家電話会議にて検討がなされ、今般、各局が Stage 4 案で意見公募を実施することが合意された。本試験法の調和は、三局がそれぞれ独自の試験法をすでに収載している状況でのレトロスペクティブな調和作業であるため、完全な調和が困難であり、各局の独自記載事項が多く含まれる状況にある。これを踏まえ、2015 年 11 月に開催された PDG ロックビル会合において、Stage 4 案意見公募実施の際に、各局での混乱を避けるため、ステークホルダーへの情報提供として、調和の背景等についての説明文書を提示することが提案された。

### 2. 調和試験法の適用対象（予定）

本調和試験法は既収載の日局医薬品各条に遡及して適用することはせず、新規収載品目から適用する予定としている。そのため、本調和試験法の日局収載に際しては、既存の一般試験法クロマトグラフィーを完全に本調和試験法と置き換えるのではなく、従来の記載が可能となるような方向で検討を進めているところである。

### 3. 調和合意に向けた今後の日局の方針について（Stage 4 案意見募集後に調和案への追記又は日局独自記載事項とする予定の項目について）

1) **SYSTEM SUITABILITY**（システム適合性）の項について、類縁物質試験における規定に関しては、各局が既に独自のシステムを確立していることから調和は困難

とされ、各局が個別に対応する方針となったため、調和案に記載されていない。そのため、日局では独自記載事項として以下の対応を予定している。

- ① 面積百分率法による試験において、システムの再現性の規定は不要である旨を明記する。
- ② 類縁物質の限度試験において、システムの再現性の規定が必要である旨を明記する。

2) **ADJUSTMENT OF CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS** (クロマトグラフィー条件の調整) の項について、以下の対応を予定している。

- ① 日局では液体クロマトグラフィーとガスクロマトグラフィーに関する記載のみ取り入れ、薄層クロマトグラフィー、超臨界クロマトグラフィーに関する記載は収載しない。
- ② 生物薬品には適応できない場合があることを明記するため、以下のような内容を追記する。

「生物薬品の試験では、ペプチドマップ法、糖鎖試験法、及び分子不均一性試験のように、液体クロマトグラフィーで得られた分離パターンをプロファイルとして設定することがある。このような試験法においては、本項に示す方法を適用できない場合がある。」

- ③ 生薬等は本項の対象外とする。

以上

G-20 クロマトグラフィー

序論

クロマトグラフィーの分離技術は多段階分離であり，試料の組成成分は固定相と移動相の 2 相間に分配される．固定相は，固体，又は固体やゲルに支持された液体である．固定相はカラムに充填されたり，層状に塗布されたり，又は膜などとして配置される．移動相は，ガス，液体，又は超臨界流体である．分離は吸着，質量分布（分配），イオン交換などに基づき，又，大きさ，質量，体積などの分子の物理化学的特性の違いによって行われる．本章では，共通のパラメーターの定義と計算方法，及び一般に適用できるシステム適合性の必要条件を記載する．分離の原理，装置，測定方法は，対応する一般試験法に記載する．

定義

医薬品各条におけるシステム適合性と適否の判定基準は，下記に定義されるパラメーターを使って設定される．装置によっては，SN 比と分離度のようなパラメーターは，装置の製造業者の提供するソフトウェアを使って計算される．使用者には，そのソフトウェアで使われている計算方法が各国の薬局方の規定と同等のものであることを確認し，もしそうでなければ，必要な補正を行う責任がある．

クロマトグラム

時間，又は容量に対して検出器の応答，溶出液中の濃度，又は溶出液中の濃度の測定に使われる他の量を，グラフ又は他の図で表したものである．理想的なクロマトグラムは，ベースライン上にガウス型ピークの連続として示される（図 1）．

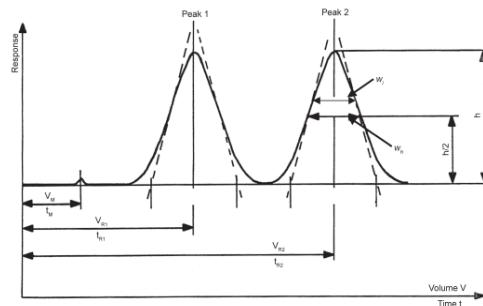


Figure 2.2.46-1.

図 1

- 24  $V_M$  = ホールドアップボリューム；
- 25  $t_M$  = ホールドアップタイム；
- 26  $V_{R1}$  = ピーク 1 の保持容量；
- 27  $t_{R1}$  = ピーク 1 の保持時間；
- 28  $V_{R2}$  = ピーク 2 の保持容量；
- 29  $t_{R2}$  = ピーク 2 の保持時間；
- 30  $W_h$  = ピーク高さの midpoint におけるピーク幅；
- 31  $W_f$  = 変曲点におけるピーク幅；
- 32  $h$  = ピーク高さ．
- 33  $h/2$  = ピーク高さの midpoint

分配係数 ( $K_0$ )

38 サイズ排除クロマトグラフィーでは、特定のカラムにおけるある成分の溶出特性  
 39 は、次の式で求められる分配係数によって与えられる：

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

40  
 41

42  $t_R$  = 保持時間；  
 43  $t_0$  = カラムに保持されない物質の保持時間；  
 44  $t_t$  = 完全浸透する物質の保持時間。  
 45

46  
 47 **デュエルボリューム ( $D$ )** ( $V_D$ とも呼ばれる)

48 デュエルボリューム (グラジエント遅延容量としても知られる) は、移動相の混  
 49 合箇所からカラムの入り口までの間の容量である。次の手順によって決定できる。

50 **カラム**：クロマトグラフィーのカラムを適当なキャピラリーチューブ (例えば  
 51 1 m × 0.12 mm) に交換する。

52 **移動相**：  
 53 - 移動相 A：水；  
 54 - 移動相 B：0.1vol% のアセトンを含む水；

時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 - 20	100 → 0	0 → 100
20 - 30	0	100

55 **流量**：十分な背圧 (例えば 2 mL/分) が得られるように設定する。

56 **検出**：紫外可視吸光光度計 265 nm

57 吸光度が 50%増加するときの時間 ( $t_{0.5}$ ) を分で決定する (図 2)。

58 
$$D = t_D \times F$$

$t_D$  =  $t_{0.5} - 0.5 t_G$  (分で示す) ；  
 $t_G$  = あらかじめ決めたグラジエント時間 (= 20 分) ；  
 $F$  = 流量 (mL/分で示す) 。

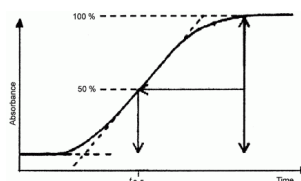


図 2

59  
 60  
 61

62 注：適用可能なところでは，この測定の試料注入部にはオートサンプラーが用いら  
 63 れ，そのときデュエルボリュームにはインジェクションループの容量も含まれる。

64

65 **ホールドアップタイム ( $t_M$ )**

66 カラムに保持されない成分の溶出に必要な時間（図 1 でベースラインの目盛りは  
 67 分又は秒）。

68 サイズ排除クロマトグラフィーでは，カラムに保持されない成分の保持時間 ( $t_0$ )  
 69 という語句が使われる。

70

71 **ホールドアップボリューム ( $V_M$ )**

72 カラムに保持されない成分の溶出に必要な移動相の液量。  $V_M$  は次の式を使って，  
 73 ホールドアップタイムと mL/分 で表された流量 ( $F$ ) から計算される：

74

$$V_M = t_M \times F$$

75 サイズ排除クロマトグラフィーでは，カラムに保持されない成分の保持容量 ( $V_0$ )  
 76 という語句が使われる。

77

78 **ピーク**

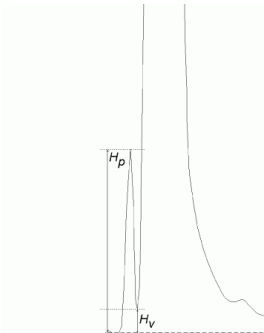
79 単一成分（又は，2つ若しくはそれ以上の分離されない成分）がカラムから溶出さ  
 80 れたときに，検出器の応答を記録したクロマトグラム的一部分。

81 ピークレスポンスは，ピーク面積又はピーク高さ ( $h$ ) によって表される。

82 **ピークバレー比 ( $p/v$ )**

83 ピークバレー比は，2つのピークのベースライン分離が達成されないとき，システ  
 84 ム適合性の適合要件の一つとして利用される（図 3）。

85



86

87

図 3

88

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

$H_p$  = マイナーピークのピークの基線からの高さ；

$H_v$  = マイナーピークとメジャーピークの間隔曲線の最下点（ピークの谷）の  
 ピークの基線からの高さ

89 **理論段高さ ( $H$ )**（同義語：理論段相当高さ (**HETP**)）

90 カラムの長さ ( $L$ ) (cm) と理論段数 ( $N$ ) の比

91

92

$$H = \frac{L}{N}$$

93

94 理論段数 ( $N$ )

95 カラム性能 (効率) は、用いる技術によるものの、恒温、イソクラティック、又  
 96 は等密度の条件下で得られたデータから、次の式を使って理論段数として求めるこ  
 97 とができる。そのとき、 $t_R$  と  $w_h$  は同じ単位で表される：

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

98

$t_R$  = 被検成分のピークの保持時間；  
 $w_h$  = ピーク高さの中心におけるピーク幅 ( $h/2$ ) 。

99 理論段数は、被検成分はもちろん、カラム、カラム温度、移動相、保持時間によ  
 100 っても変化する。

101 換算理論段高さ ( $h$ )

102 理論段高さ ( $H$ ) (cm) と粒子径 ( $d_p$ ) (cm) の比

103

104

$$h = \frac{H}{d_p}$$

105

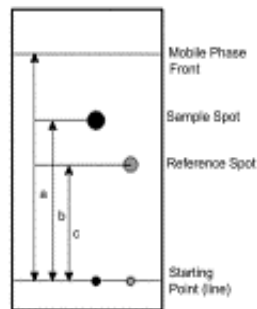
106 相対保持比 ( $R_{rel}$ )

107 相対保持比は、薄層クロマトグラフィーで用いられており、対象成分の移動距離  
 108 に対する標準物質の移動距離の比として求められる (図 4) 。

109

110

$$R_{rel} = b/c$$



111

図 4

112

113 保持比 ( $r$ )

114 保持比は、次の式を使って概算される：

115

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

$t_{Ri}$  = 対象成分のピークの保持時間；  
 $t_{Rst}$  = 標準物質のピークの保持時間 (通常試験される物質に対応するピーク)；  
 $t_M$  = ホールドアップタイム。

116

117 空間補正なしの保持比 ( $r_G$ ) [USP での同義語：相対保持時間 (RRT)] は次の  
 118 式を使って計算される：

$$r_G = \frac{t_{Ri}}{t_{Rj}}$$

119

120 別に規定するもののほか、医薬品各条に示す保持比の値は、空間補正なしの保持  
 121 比である。

122

123 **分離度 ( $R_s$ )**

124 2つの成分のピーク間の分離度 (図 1) は、次の式を使って計算される：

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

125

$t_{R1}, t_{R2}$  = それぞれのピークの保持時間。ただし  $t_{R2} > t_{R1}$  ;  
 $w_{h1}, w_{h2}$  = それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク幅。

126 デンシトメトリーを用いた定量的な薄層クロマトグラフィーでは、保持時間の代わり  
 127 りに、移動距離を用いて次の式により、2つの成分のピーク間の分離度が計算され  
 128 る：

$$R_s = \frac{1.18a(R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

129

$R_{F1}, R_{F2}$  = それぞれのピークの Rf 値。ただし  $R_{F2} > R_{F1}$  ;  
 $w_{h1}, w_{h2}$  = それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク幅 ;  
 $a$  = 原線から溶媒先端までの移動距離。

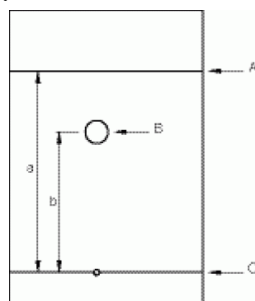
130 **Rf 値 ( $R_F$ )**

131 Rf 値 (又は、保持係数 ( $R_f$ ) としても知られる) は、薄層クロマトグラフィーで用  
 132 いられており、試料を載せた点からスポットの中心までの距離と、同じプレート上  
 133 で試料を載せた点から溶媒先端までの移動距離の比である (図 5)。

$$R_F = \frac{b}{a}$$

134

$b$  = 成分の移動距離 ;  
 $a$  = 溶媒先端の移動距離。



135

A. 移動相の先端                      B. スポット                      C. 試料を載せた線 (原線)

136

図 5

137 **保持係数 ( $k$ )**

138 保持係数（質量分布比（ $D_m$ ）又はキャパシティーファクター（ $k'$ ）としても知ら  
 139 れる）は以下のように定義されている：

140

141

142

$$k = \frac{\text{amount of component in stationary phase}}{\text{amount of component in mobile phase}} = K_c \frac{V_s}{V_M}$$

$K_c$  = 分配係数（又は平衡分配係数 equilibrium distribution coefficient とし  
 ても知られる）；

$V_s$  = 固定相の容量；

$V_M$  = 移動相の容量。

143 ある成分の保持係数は、次の式を用いてクロマトグラムから求められる：

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

144

145

$t_R$  = 保持時間；

146

$t_M$  = ホールドアップタイム。

147

148

### 保持時間 ( $t_R$ )

149

試料の注入から溶出した試料の最大ピークまでの経過時間（図 1， 基線のスケール  
 150 は、分又は秒）。

151

152

### 保持容量 ( $V_R$ )

153

ある成分が、溶出するために必要な移動相の容量。保持容量は、保持時間と流量

154

（ $F$ : mL/分）を用い次の式から計算される：

155

$$V_R = t_R \times F$$

156

157

### カラムに保持されない物質の保持時間( $t_0$ )

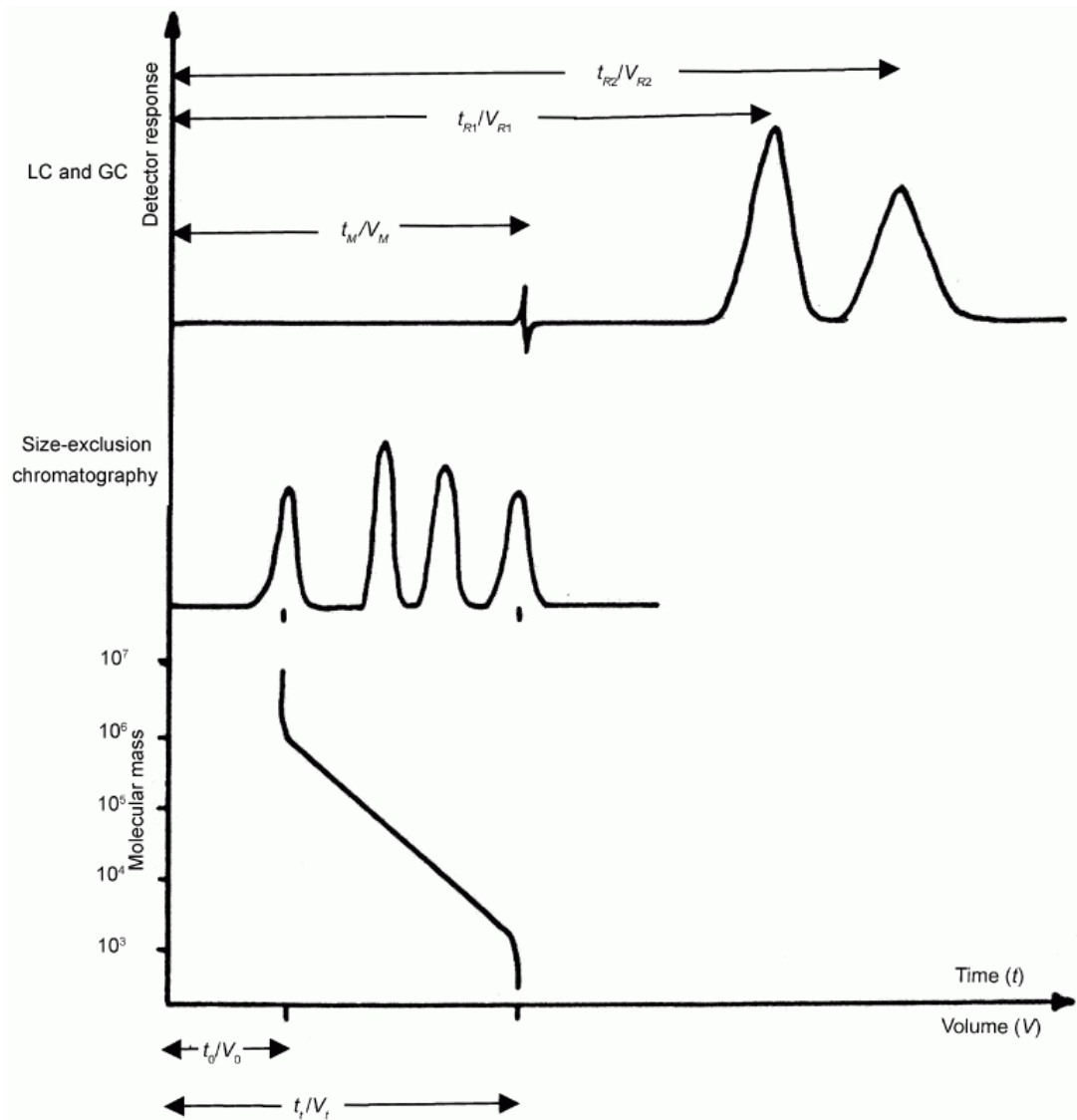
158

サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、ゲルの最大孔より大きな成分の保持時間

159

（図 6）。





160  
161

図 6

162 カラムに保持されない成分の保持容量 ( $V_0$ )

163 サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、最大ゲル孔より大きな成分の保持容量.

164 カラムに保持されない成分の保持時間と流量 ( $F$ : mL/分) を用い次の式から計算さ  
165 れる :

166

$$V_0 = t_0 \times F$$

167 分離係数 ( $\alpha$ )

168 隣り合う二つのピークから計算された保持比 (通常は、分離係数は、常に 1 より大  
169 さい) :

170

$$\alpha = k_2/k_1$$

171  $k_1$  = 最初のピークの保持係数 ;

172  $k_2$  = 2 番目のピークの保持係数.

173

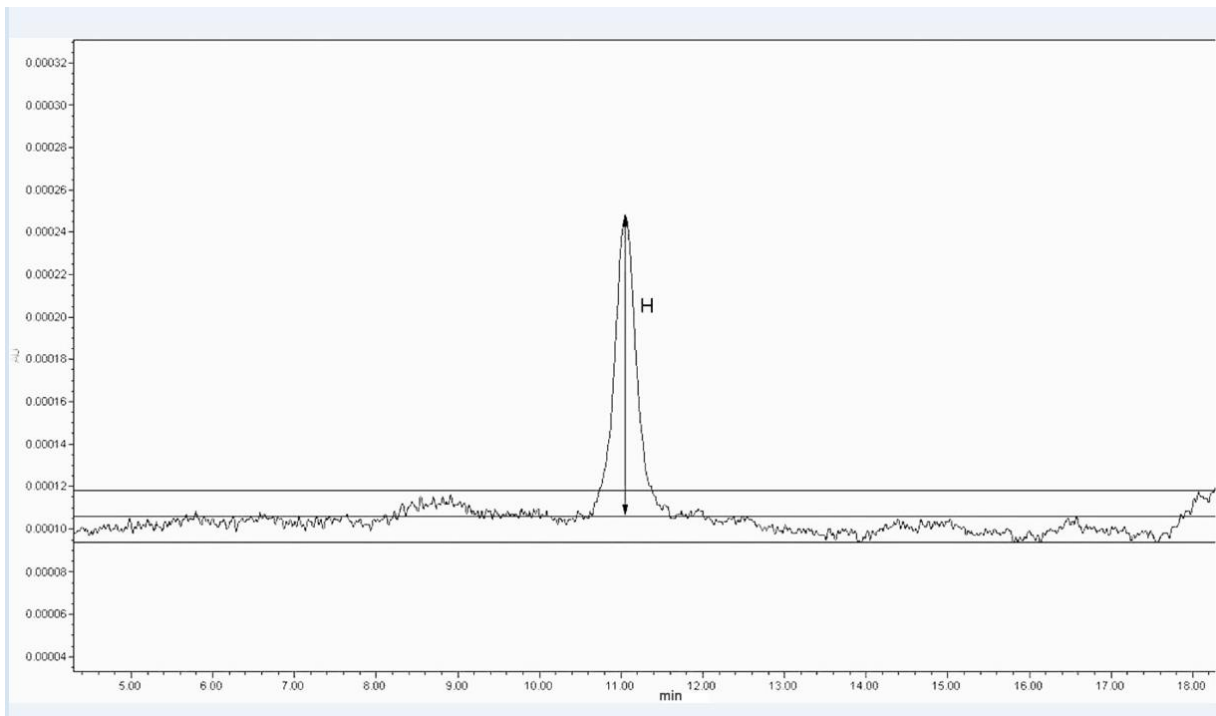
174 SN 比 ( $S/N$ )

175 短い時間間隔で生じるノイズは、定量の精度及び真度に影響する. SN 比は次の式を  
176 用いて計算される :

177

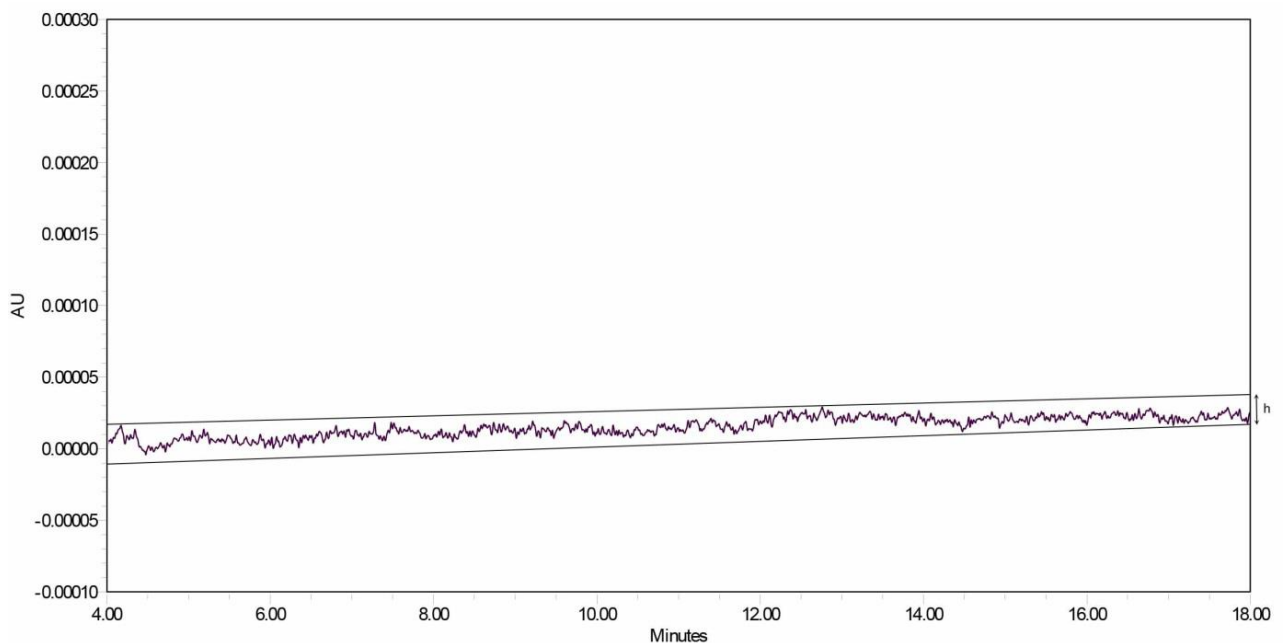
$$S/N = \frac{2H}{h}$$

- $H$  = 標準溶液から得られたクロマトグラム中の対象成分のピーク高さ (図 7) . ピークの頂点から、ピーク高さの midpoint におけるピーク幅の 20 倍に相当する範囲で測定し外挿されたピークの基線までの高さ ;
- $h$  = ブランクを注入後に得られたノイズ幅 (図 8) . 標準溶液から得られたクロマトグラム中、ピーク高さの midpoint におけるピーク幅の 20 倍に相当する範囲で測定する . 可能ならば、ピークが観察されたなるべく近い場所で測定する .



178  
179  
180  
181

図 7. 標準溶液のクロマトグラム



182  
183

図 8. ブランクのクロマトグラム

184  
185  
186  
187  
188  
189

溶媒や試薬、移動相、試料マトリックスに由来するピークの影響で、ピークの高さの  
 中点におけるピーク幅の 20 倍に相当する範囲での基線が得られない場合は、ピーク  
 の高さの中点におけるピーク幅の少なくとも 5 倍に相当する範囲で基線を求めて  
 もよい。

190 シンメトリー係数( $A_s$ )

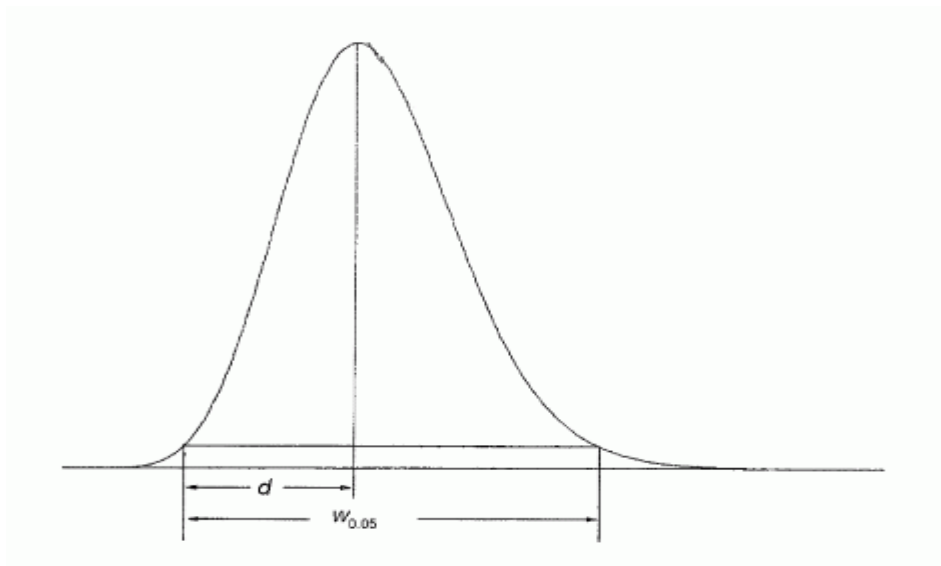
191 あるピークのシンメトリー係数 (アシンメトリー係数又はテーリング係数としても  
 192 知られる) (図 9) は、次の式を用いて計算される :

193 
$$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$  = ピーク高さの 1/20 の高さにおけるピーク幅 ;  
 $d$  = ピーク頂点から下ろした垂線と、ピーク高さの 1/20 の高さにおける  
 ピーク立ち上がり側の端までの距離。

194  
195  
196

$A_s = 1$  はシンメトリーであることを意味する。  $A_s > 1.0$  のときは、ピークはテーリ  
 ングしている。  $A_s < 1.0$  のときは、ピークがリーディングしている。



197  
198

図 9

199 システムの再現性

200 レスポンスの再現性は、標準溶液を連続して 3 回以上注入し、次の式により計算し  
 201 て得られた相対標準偏差 (%RSD) により表される。  
 202

203 
$$\%RSD = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

204

$y_i$  = ピーク面積, ピーク高さ, 内標準法によるピーク面積比の測定値 ;  
 $\bar{y}$  = 測定値の平均値 ;

$n$  = 測定回数.

205

206

207 完全浸透する物質の保持時間 ( $t_R$ ) (Total mobile phase time ( $t_R$ ))

208 サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、ゲルの最小孔径よりも小さな分子の保持  
209 時間 (図 6) .

210

211 完全浸透する物質の保持容量 ( $V_R$ ) (Total mobile phase volume ( $V_R$ ))

212 サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、ゲルの最小孔径よりも小さな分子の保持  
213 容量. 完全浸透する物質の保持時間と流量 ( $F$ ) (mL/分) を用いて以下の式から計  
214 算される.

215

$$V_R = t_R \times F$$

216

217 システム適合性

218 この項は、液体クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーのみに適用され  
219 る.

220

221

222 使用する装置の構成要素が、試験又は定量を行うのに必要な性能を有していること  
223 が保証されなければならない.

224 システム適合性試験は、クロマトグラフィーのシステムが適切な性能を維持してい  
225 ることを確認するために不可欠である. カラム効率 (apparent efficiency) , 保持  
226 係数 (質量分布比) , 分離度, シンメトリー係数が、クロマトグラフィーのシステ  
227 ムの性能の評価に用いられる.

228

229 クロマトグラフィーに影響を与える因子として以下のようなものがある.

- 230 - 移動相の組成, イオン強度, 温度, pH ;
- 231 - 流量, カラムの大きさ, カラム温度, 圧力 ;
- 232 - 固定相の特徴 (粒子型, モノリス型等の支持体のタイプも含む) , 粒子径又  
233 はマクロ孔サイズ, 空隙率, 比表面積 ;
- 234 - 逆相, 及び固定相の他の表面修飾, (エンドキャッピングや炭素含有率など  
235 の) 化学的な修飾の程度

236

237 保持時間および保持比に関する情報が医薬品各条に記載されることがある. 保持比  
238 に適用される基準は定められていない.

239

240 クロマトグラフィーのプロセス全体を通してシステム適合性の基準に従っていること  
241 が必要である. システム適合性が示されなければ, サンプルの分析は認められな  
242 い.

243

244 別に規定するもののほか, 以下の要件が満たされていなければならない.

245

246 • システムの再現性—有効成分又は添加剤の定量

247

248 有効成分又は添加剤の定量において, 原薬の純物質の目標含量が 100%で、システ  
249 ムの再現性の要件が規定されていない場合には, 標準溶液の繰り返し注入 ( $n = 3 \sim$

250 6) により算出される最大許容相対標準偏差 (%RSD<sub>max</sub>) の限度値が定められてい  
 251 る。  
 252 ピークレスポンスの最大許容相対標準偏差は、Table 1 の値を超えてはならない。  
 253

254 *Table 1- システムの再現性における必要条件 (定量)*

	注入回数 <i>n</i>			
	3	4	5	6
B (%)	最大許容相対標準偏差 RSD (%)			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27

255  $B = (\text{医薬品各条中の含量規格の上限} - 100) \%$   
 256

257 • **感度**

258 感度は、検出器に導入される移動相中の物質単位濃度当たりのシグナル出力である。  
 259 類縁物質の試験においては、感度を表すためにシグナルノイズ比 (SN 比) が用いら  
 260 れる。別に規定するもののほか、報告の閾値において、SN 比は 10 以上であること  
 261 が必要である。  
 262

263 • **ピークの対称性**

264 別に規定するもののほか、定量に用いるピークのシンメトリー係数 (テーリング係  
 265 数) は 0.8~1.8 である。  
 266

267 **クロマトグラフィー条件の調整**

268 記載されているクロマトグラフィー条件は、医薬品各条作成時に既にバリデートさ  
 269 れている。

270 クロマトグラフィーによる試験において、根本的に方法を変更することなくシステ  
 271 ム適合性の基準を満足させるために、種々のパラメーターを調整することができる  
 272 範囲を以下に示す。示されている範囲外への変更には、分析法の再バリデーション  
 273 が必要である。

274 システム適合性試験は、試験条件が、試験や定量を実施するために十分な性能を示  
 275 すように設定されているかどうかを確認するためのものである。

276 固定相は一般的な方法で記載され、多くの市販のカラムが有り、それらのクロマト  
 277 グラフィー挙動が異なっていることより、規定されたシステム適合性の基準を達成  
 278 するためには、クロマトグラフィー条件の調整が必要な場合がある。特に、逆相液  
 279 体クロマトグラフィーにおいて、種々のパラメーターの調整により、必ずしも良好  
 280 なクロマトグラフィーの結果が得られるとは限らない。そのような場合には、カ  
 281 ラムを同じタイプ (例えば、オクタデシルシリル化シリカゲル) の、望ましいクロマ  
 282 トグラフィー挙動を示す他のカラムに変更することが必要である。

283 グラジエント溶離における試験条件の調整は、イソクラティック溶離における試験  
 284 条件の調整より難しい。なぜならば、グラジエントのステップを変更することによ  
 285 り、ピーク位置が変わる可能性があり、ピークの同定の間違いやピークの見落とし、  
 286 ピーク位置が規定された溶出時間を越えることが起こるようになる。重要なパラメ  
 287 ーターに関しては、医薬品各条に、システム適合性を確保するための調整方法を明  
 288 確に規定する。

## 289 薄層クロマトグラフィー

290 移動相の組成：マイナーな溶媒成分の量は、相対的に $\pm 30\%$ 又は絶対的に $\pm 2\%$ のい  
 291 んれか大きい方の値まで調整できる。例えば、移動相の 10%の微量組成について、相  
 292 対的な 30%の調整は 7~13%の範囲となるのに対して、絶対的な 2%の調整は 8~  
 293 12%の範囲となる。したがって、相対的な値がより大きくなる。移動相の 5%の微量  
 294 組成について、相対的な 30%の調整は 3.5~6.5%の範囲となるのに対して、絶対的  
 295 な 2%の調整は 3~7%の範囲となる。このケースの場合、絶対的な値がより大き  
 296 くなる。

297 移動相の水系組成の pH：別に規定するもののほか、 $\pm 0.2\text{pH}$  単位、又は非イオン性  
 298 物質が試験される場合、 $\pm 1.0\text{pH}$  単位。

299 移動相の緩衝液組成の塩濃度： $\pm 10\%$ 。

300 スポット量 (*Application volume*)：微細な粒子径の板 (2~10 $\mu\text{m}$ ) を使用する場  
 301 合、規定された量の 10~20%とする。

## 302 液体クロマトグラフィー：イソクラティック溶離

### 303 カラムパラメーターと流量

304 ▶ 固定相：固定相の物理化学的特性の変更は許されない、すなわち、クロマト  
 305 グラフィー担体、表面修飾、化学修飾の程度は同じでなければならない。こ  
 306 れらの要件に適合すれば、全多孔性粒子カラムから表面多孔性粒子カラムへ  
 307 変更することができる。

308 ▶ カラムの大きさ：  
 309 カラムの粒子径、長さは、カラムの長さ ( $L$ ) と粒子径 ( $dp$ ) の比が一定の  
 310 まま、又は、規定された  $L/dp$  の比率の-25%から+50%の間の範囲に変更する  
 311 ことができる。表面多孔性粒子の粒子径を調整する場合は、理論段数 ( $N$ )  
 312 が規定されたカラムの-25%から+50%の範囲にあれば、他の  $L$  と  $dp$  の組み合  
 313 わせも使用することができる。システム適合性の基準が満たされ、管理する  
 314 ことが規定された不純物の選択性と溶出順が同じであることが示されれば、  
 315 これらの変更は認められる；この章に記載されているシステム適合性の許容  
 316 範囲と、クロマトグラフィー条件の調整の範囲内で、さらなる試験条件 (移  
 317 動相、温度、pH など) の変更が、必要かもしれない。

318  
 319 試験条件の変更により、理論段数が高くなり、ピークボリュームがより小さくなる  
 320 場合には、装置配管、検出器のセル容量、サンプリング速度及び注入量のような要  
 321 因によりカラム外拡散を最小にすることが必要なことがあり注意が必要である。

322 粒子径を変更するときには、流量の調整が必要となる、なぜなら、粒子径のより小  
 323 さいカラムでは、同じ性能(換算理論段高さにより評価された)を得るために、より高  
 324 い線速度が必要となるからである。流量は、カラムの内径と粒子径の両方の変更に  
 325 より、以下の式に従って変更する：

$$326 \quad F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$$

327  $F_1$  = 医薬品各条における流量 (mL/分)；

328  $F_2$  = 調整された流量 (mL/分)；

329  $dc_1$  = 医薬品各条におけるカラムの内径 (mm)；

330  $dc_2$  = 使用するカラムの内径 (mm)；

331  $dp_1$  = 医薬品各条における粒子径 (μm)；

332  $dp_2$  = 使用するカラムの粒子径 (μm)。

333 イソクラティック分離において、粒子径を 3μm 以上から 3μm 未満へ変更するとき、  
 334 20%を上回ってカラム効率が低下しないならば、線速度(流量の調整により)を更  
 335 に増加させることが認められる。同様に、粒子径を 3μm 未満から 3μm 以上へ変更  
 336 するとき、20%を上回ってのカラム効率の低下を避けるために、線速度(流量)を  
 337 更に減少させる必要がある。

338 カラムの大きさの変更による調整後、さらに流量の±50%の変更が許容される。

339     ➤ 温度：別に規定するもののほか、規定される操作温度の±10°C。

340 **移動相：**

341     ➤ 組成：マイナーな溶媒成分の量は、相対的に±30%又は絶対的に 2%のより大  
 342 きい方(上記の例を参照)の値まで調整できる。微量成分は(100/n)%より  
 343 少ないものから成り、nは移動相の構成要素の総数である；

344     ➤ 移動相の水系組成のpH：別に規定するもののほか、±0.2pH単位；

345     ➤ 移動相の緩衝液組成の塩濃度：±10%。

346 **検出波長：**変更することはできない。

347

348 **注入量：**全多孔性粒子カラムから表面多孔性粒子カラムへの変更を除き、カラムの  
 349 大きさを変更する場合、注入量は以下の式に従って変更することができる。

350

$$351 \quad V_{inj2} = V_{inj1} (L_2 dc_2^2) / (L_1 dc_1^2)$$

352

353  $V_{inj1}$  = 医薬品各条における注入量 (mL)；

354  $V_{inj2}$  = 調整した注入量 (mL)；

355  $L_1$  = 医薬品各条におけるカラムの長さ (cm)；

356  $L_2$  = 新たなカラムの長さ (cm)；

357  $dc_1$  = 医薬品各条に規定のカラムの内径 (mm)；

358  $dc_2$  = 新たなカラムの内径 (mm)。

359

360 カラムの大きさを変更しない場合でも、システム適合性の判定基準が確立された許  
 361 容限度値内であれば注入量は変更することができる。注入量を減少させる場合は、

362 ピークレスポンスの検出（限界）及び再現性に特に注意が必要である。注入量の増  
 363 加は、特に、測定すべきピークの直線性と分離度がシステム適合性を満たす限り許  
 364 容される。

365

366 **液体クロマトグラフィー：グラジエント分離**

367 グラジエントシステムにおける試験条件の変更はイソクラティックシステムの場合  
 368 より慎重さが求められる。これらの要件に適合すれば、全多孔性粒子カラムから表  
 369 面多孔性粒子カラムへ変更することができる。

370

371 **カラムパラメーターと流量**

372 ▶ **固定相**：固定相の物理的・化学的特性の変更は許されない、すなわち、クロマ  
 373 トグラフィー担体、表面修飾、化学修飾の程度は同じでなければならない。

374 ▶ **カラムの大きさ**：

375 カラムの粒子径、長さは、カラムの長さ ( $L$ ) と粒子径 ( $dp$ ) の比が一定の  
 376 まま、又は、規定された  $L/dp$  の比率の-25%から+50%の間の範囲に変更する  
 377 ことができる。表面多孔性粒子の粒子径を調整する場合は、理論段数 ( $N$ )  
 378 が規定されたカラムの-25%から+50%の範囲にあれば、他の  $L$  と  $dp$  の組み合  
 379 わせも使用することができる。システム適合性の基準が満たされ、管理する  
 380 ことが規定された不純物の選択性と溶出順が同じであることが示されれば、  
 381 これらの変更は認められる。この章に記載されているシステム適合性の許容  
 382 範囲とクロマトグラフィー条件の調整の範囲内で、さらなる試験条件（移動  
 383 相、温度、pH など）の変更が、必要かもしれない。

384

385 試験条件の変更により、理論段数が高くなり、ピークボリュームがより小さくなる  
 386 場合には、装置配管、検出器のセル容量、サンプリング速度及び注入量のような要  
 387 因により、カラム外拡散を最小にすることが必要なことがあり注意が必要である。

388 粒子径を変更するときには、流量の調整が必要となる、なぜなら、粒子径のより小  
 389 さいカラムでは、同じ性能（換算理論段高さにより評価された）を得るために、よ  
 390 り高い線速度が必要となるからである。流量は、カラムの内径と粒子径の両方の変  
 391 更により、以下の式に従って変更する：

392

$$393 F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$$

394

395  $F_1$ ：医薬品各条における流量 (mL/分)

396  $F_2$ ：変更後の流量 (mL/分)

397  $dc_1$ ：医薬品各条におけるカラムの内径 (mm)

398  $dc_2$ ：使用するカラムの内径 (mm)

399  $dp_1$ ：医薬品各条におけるカラム粒子径 ( $\mu\text{m}$ )

400  $dp_2$ ：使用するカラム粒子径 ( $\mu\text{m}$ )

401

402 グラジエント分離において、粒子径を  $3\mu\text{m}$  以上から  $3\mu\text{m}$  未満へ変更するとき、  
 403 20%を上回ってカラム効率が低下しないならば、線速度（流量の調整により）を更  
 404 に増加させることが認められる。同様に、粒子径を  $3\mu\text{m}$  未満から  $3\mu\text{m}$  以上へ変更  
 405 するとき、20%を上回ってのカラム効率の低下を避けるために、線速度（流量）を  
 406 更に減少させる必要がある。



407  
 408 カラムの大きさを変えること，すなわちカラム容量の変更は，選択性をコントロー  
 409 ルするグラジエント容量に影響する．カラム容量に比例してグラジエント容量を変  
 410 え，グラジエント条件をカラム容量に合わせて調整する．これは全ての各グラジエ  
 411 ント容量に適用する．グラジエント容量は，グラジエント時間  $t_G$  と流量  $F$  の積であ  
 412 るため，グラジエント条件のそれぞれの時間を，カラム容量に対するグラジエント  
 413 容量の比 ( $L \times dc^2$ ) が一定になるように変更する．ここで，変更したグラジエント時  
 414 間  $t_{G2}$  は元のグラジエント時間  $t_{G1}$ ，流量及びカラムの大きさから次の式で計算でき  
 415 る．

$$t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$$

416  
 417  
 418  
 419 ここで，グラジエント溶離の条件の変更には次の 3 段階の変更が必要である．  
 420 (1)  $L/dp$  で示されるカラムの長さ及び粒子径の変更，(2) 粒子径とカラムの内径  
 421 の変更による流量の変更，そして，(3) カラムの長さ，内径及び流量の変更による  
 422 各グラジエントの時間の変更である．この条件の例を次に示す．  
 423

変数	元の条件	変更した条件	備考
カラムの長さ ( $L$ ) (mm)	150	100	ユーザーの選択
カラムの内径 ( $dc$ ) (mm)	4.6	2.1	ユーザーの選択
粒子径 ( $dp$ ) ( $\mu\text{m}$ )	5	3	ユーザーの選択
$L/dp$	30.0	33.3	(1)
流量 (mL/分)	2.0	0.7	(2)
グラジエント調整因子		0.4	(3)
グラジエント条件			
%B	時間 (分)	時間 (分)	
30	0	0	
30	3	(3x0.4)=1.2	
70	13	[1.2+(10x0.4)]=5.2	
30	16	[5.2+(3x0.4)]=6.4	

- 424  
 425 (1)  $L/dp$  が  $-25 \sim +50\%$  の範囲内の 11% 増加  
 426 (2)  $F_2 = F_1 [(dc_2^2 \times dp_1) / (dc_1^2 \times dp_2)]$  を用いて計算  
 427 (3)  $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times dc_2^2) / (L_1 \times dc_1^2)]$  を用いて計算

428  
 429 ➤ 温度：別に規定するもののほか，規定した試験条件の  $\pm 5^\circ\text{C}$

430  
 431 **移動相**

- 432 ➤ 組成／グラジエント：移動相の組成及びグラジエントは次の場合に変更できる。  
 433 - システム適合性の要件に適合していること。  
 434 - 主なピークが示された保持時間の  $\pm 15\%$  の範囲内で溶離している。但し，こ  
 435 れはカラムの大きさを変更した場合は適用できない。  
 436 - 移動相の最終組成は規定されている組成よりも溶出力が弱くないこと。  
 437 ➤ 移動相の水性組成の pH：別に規定するもののほか， $\pm 0.2$  pH 単位  
 438 ➤ 移動相の緩衝液組成の塩濃度： $\pm 10\%$

439 システム適合性の要件に適合しない場合は、デュエルボリュームを検討するかカラ  
440 ムを変えることが望ましい場合がある。  
441

442  
443 **デュエルボリューム** 使用する装置構成によっては、規定した分離能、保持時間及  
444 び保持比が変わることがある。このようなことが起こる場合には、デュエルボリ  
445 ユームが多くなっているかもしれない。医薬品各条においては、試験法を開発した際  
446 の装置と実際に使用する装置のデュエルボリュームの違いを考慮して、グラジエン  
447 トを開始する前にイソクラティックのステップを加えることで、グラジエント勾配  
448 の調整を行うのが望ましい。その使用する装置のイソクラティックのステップ長さ  
449 を決めるのは試験者の責任において行う。医薬品各条の作成段階で用いたデュエル  
450 ボリュームが医薬品各条に記載されている場合は、グラジエントの勾配表に記載さ  
451 れた時間 ( $t$ 分) は次の式で計算した時間 ( $t_c$ 分) に置き換えても構わない。

$$t_c = t - (D - D_0) / F$$

452  
453  
454  $D$  = デュエルボリューム (mL)

455  $D_0$  = 試験法開発時のデュエルボリューム (mL)

456  $F$  = 流量 (mL/分)

457  
458  
459 イソクラティックのステップを用いないで分析法バリデーションを行った場合は、  
460 グラジエント勾配の調整を行う目的で導入されたイソクラティックのステップを省  
461 略できる。

462  
463 **検出波長** : 変更することはできない。

464  
465 **注入量** : 全多孔性粒子カラムから表面多孔性粒子カラムへの変更を除き、カラムの  
466 大きさを変更する場合、注入量は以下の式に従って変更することができる。

$$V_{inj2} = V_{inj1} (L_2 d_{c2}^2) / (L_1 d_{c1}^2)$$

467  
468  
469  $V_{inj1}$  = 医薬品各条における注入量 (mL) ;

470  $V_{inj2}$  = 調整した注入量 (mL) ;

471  $L_1$  = 医薬品各条におけるカラムの長さ (cm) ;

472  $L_2$  = 新たなカラムの長さ (cm) ;

473  $d_{c1}$  = 医薬品各条に規定のカラムの内径 (mm) ;

474  $d_{c2}$  = 新たなカラムの内径 (mm) .

475  
476  
477 カラムの大きさを変更しない場合でも、システム適合性の判定基準が確立された許  
478 容限度値内であれば注入量は変更することができる。注入量を減少させる場合は、  
479 ピークレスポンスの検出 (限界) 及び再現性に特に注意が必要である。注入量の増  
480 加は、特に、測定すべきピークの直線性と分離度がシステム適合性を満たす限り許  
481 容される。

482  
483 **ガスクロマトグラフィー**

484 カラムパラメーター

485 ▶ **固定相** :

- 486 - 粒子径：最大 50%まで減らすことができ、増やすことはできない（充填カラ  
487 ム）；  
488 - 膜厚：-50%～+100%（キャピラリーカラム）。  
489 ▶ カラムの大きさ：  
490 - 長さ：-70%～+100%。  
491 - 内径：±50%。  
492 ▶ 温度：±10%。

493

494 流量：±50%

495

496 注入量及びスプリット量：システム適合性の判定基準が確立された許容限度値内で  
497 あれば注入量を変更することができる。注入量を減少させる場合は、ピーク応答の  
498 検出（限界）及び再現性に特に注意が必要である。注入量の増加は、特に、測定す  
499 べきピークの直線性と分離度がシステム適合性を満たす限り許容される。

500

501 注入口温度及び静的ヘッドスペースにおけるトランスファーライン温度の条件：分  
502 解や濃縮が起こらない場合は±10

503

### 504 超臨界クロマトグラフィー

505 カラムパラメーター：

- 506 ▶ 固定相：  
507 - 粒子径：最大 50%まで減らすことができ、増やすことはできない（充填カラ  
508 ム）  
509 ▶ カラムの大きさ  
510 - 長さ：±70%  
511 - 内径：±25%（充填カラム），±50%（キャピラリーカラム）  
512 ▶ 温度：操作条件で既定している場合は±5°C

513

514 移動相の組成：充填カラムの場合は、少ない方の溶媒量は、相対値で±30%又は絶対  
515 値で±2%のいずれか大きい方まで変更できる。キャピラリーカラムの場合は、変更  
516 することはできない。

517

518 流量：±50%

519

520 検出波長：変更することはできない。

521

522 注入量：システム適合性の判定基準が確立された許容限度値内であれば注入量は変  
523 更することができる。注入量を減少させる場合は、ピークレスポンスの検出（限界）  
524 及び再現性に特に注意が必要である。注入量の増加は、特に、測定すべきピークの  
525 直線性と分離度がシステム適合性を満たす限り許容される。

526

### 527 定量

528

529 以下のような定量試験法が、一般試験法や医薬品各条に適用される。

530

531 一 外部標準法 *External standard method*.

532 ● 検量線法

533 被検成分の標準物質のいくつかの濃度の異なる標準溶液を、直線性が示される範  
534 囲内で調製し、一定量を注入する。

535 得られたクロマトグラムから、標準物質の濃度を横軸に、ピーク面積又はピーク  
536 高さを縦軸にプロットして検量線を得る。検量線は通例直線回帰で得られる。次に、  
537 試料溶液を医薬品各条に規定された方法で調製する。検量線を得た方法と同じ操作  
538 条件下で、クロマトグラフィーを行い、被検成分のピーク面積又はピーク高さを測  
539 定し、物質濃度を検量線から読み取るか、計算する。

540 • 一点検量法

541 医薬品各条では、通例、検量線の直線範囲で、ある濃度の標準溶液と、標準溶液  
542 の濃度に近い濃度の試料溶液を調製し、同じ操作条件でクロマトグラフィーを行い、  
543 得られたレスポンスを比較して、被検成分量を求める。

544 この方法では、注入操作などの全ての試験操作は、同じ条件で実施されなければ  
545 ならない。

546 — 内標準法

547 • 検量線法

548 内標準法では、被検成分に近い保持時間を有し、クロマトグラム上の他のすべて  
549 のピークと完全に分離する安定な物質を内標準物質として選ぶ。

550 一定量の内標準物質と標準被検成分を段階的に加えて、数種の標準溶液を調製す  
551 る。それぞれの標準溶液の一定量を注入して得られたクロマトグラムから、内標準  
552 物質に対する標準被検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求める。これらの比  
553 を縦軸に、標準被検成分又は内標準物質に対する標準被検成分の比を横軸に  
554 とり、検量線を作成する。この検量線は、通例、直線回帰で得られる。

555 次に医薬品各条に規定する方法に従って、検量線の作成に用いる、同量の内標準  
556 物質を含む試料溶液を調製する。検量線を作成したときと同じ条件でクロマトグラ  
557 フィーを行い、内標準物質に対する、被検成分ピーク面積又はピーク高さの比を求  
558 め、検量線から被検成分量を求める。

559  
560 • 一点検量法

561 医薬品各条では、通例、検量線が直線となる濃度範囲の一つの標準溶液及びこれ  
562 に近い濃度の試料溶液を調製し、いずれにも一定量の内標準物質を加え、同一の条  
563 件でクロマトグラフィーを行い、得られた比を比較して、被検成分量を求める。

564 — 面積百分率法

565 ピークの直線性と非飽和性が示されれば、医薬品各条では被検物質中の成分のパー  
566 セント含量は、溶媒、試薬、移動相又は試料マトリックスから生じるピークや、  
567 判別限界又は報告の閾値以下のピークを除いた、全てのピークの面積の総和に対す  
568 る、それぞれのピーク面積の百分率で求められる。

569  
570 **ピークの測定**

571 通常、ピーク面積又はピーク高さは電子的に測定される。主ピークから完全には分  
572 離しない不純物のピークの積分は、通常、バレーバレー外挿法による（図 10）。

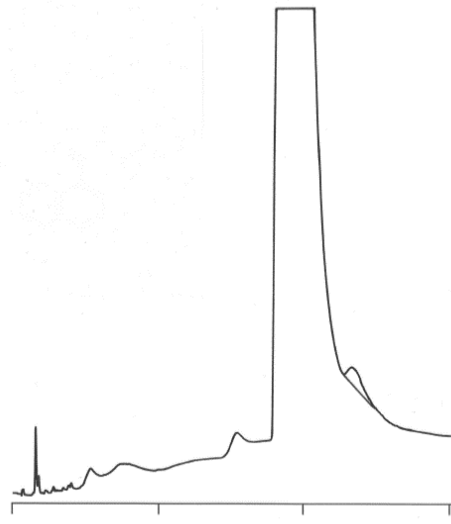


図 10

573

574

575

576 **検出器の応答**

577 検出器の感度は、検出器に入る移動相中の物質の単位濃度又は単位質量あたりの  
 578 シグナル出力である。相対的な検出器のレスポンス係数は、通例、レスポンス係数  
 579 と記載され、ある物質の標準物質に対する検出感度を表す。補正係数は、レスポ  
 580 ンス係数の逆数である。類縁物質試験では、医薬品各条に示されたどんな補正係数も  
 581 適用される（すなわち、レスポンス係数が 0.8-1.2 の範囲外の場合など）。

582

583 **妨害ピーク**

584 溶媒、試薬、移動相、試料マトリックスに由来するピークは除外する。

585

586 **報告の閾値**

587 類縁物質試験では、適切なピークの積分方法と適切な閾値を設定することが重要で  
 588 ある。報告の閾値は、その値を超えると報告が必要とされる限度値と定義される。

589