

2.00 クロマトグラフィー総論

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。
なお、三薬局方で調和されていない部分のうち、調和合意において、
調和の対象とされた項中非調和となっている項の該当箇所は「◆ ◆」
で、調和の対象とされた項以外に日本薬局方が独自に規定することとし
た項は「◇ ◇」で囲むことにより示す。
三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

1. はじめに

クロマトグラフィーの分離技術は多段階の分離法であり、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。本法では、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。
◇液体クロマトグラフィーのシステム適合性は、本法の規定のほか、
液体クロマトクロマトグラフィー(2.01)に記載の規定を適用するこ
とができる。◇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。

2. 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、下に定義
されるパラメーターを使用して設定される。装置によっては、SN比と
分離度のようなパラメーターは、装置メーカーの提供するソフトウ
ェアを使って計算する。使用者には、そのソフトウェアで使われてい
る計算方法が日本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2.00-1)。

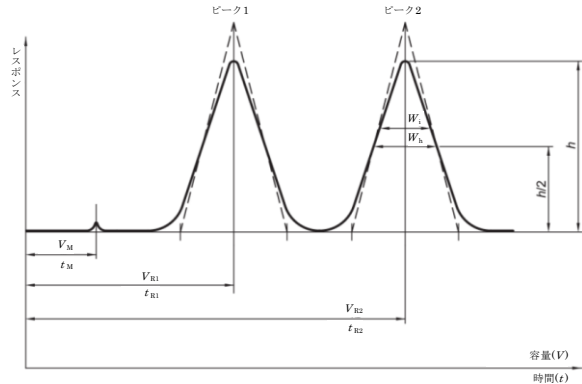


図2.00-1

- V_M = ホールドアップボリューム
- t_M = ホールドアップタイム
- V_{R1} = ピーク1の保持容量
- t_{R1} = ピーク1の保持時間
- V_{R2} = ピーク2の保持容量

- t_{R2} = ピーク2の保持時間
- W_h = ピーク高さの中心におけるピーク幅
- W_i = 変曲点におけるピーク幅
- h = ピーク高さ
- $h/2$ = ピーク高さの中心

分配係数(K_0)

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は、次式で求められる分配係数によって与えられる。

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

- t_R = 保持時間
- t_0 = カラムに保持されない成分の保持時間
- t = 完全浸透する成分の保持時間

デュエルボリューム(D)(V_D とも呼ばれる)

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

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

移動相:

移動相A: 水

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

流量: 十分な背圧が得られるように設定する(例えば2 mL/分)。
検出: 紫外可視吸光度計 265 nm
吸光度が50%増加するときの時間 $t_{0.5}$ (分)を決定する(図2.00-2)。

$$D = t_0 \times F$$

- $t_0 = t_{0.5} - 0.5 t_0$ (分)
- t_M = あらかじめ決めたグラジエント時間(20分)
- F = 流量(mL/分)

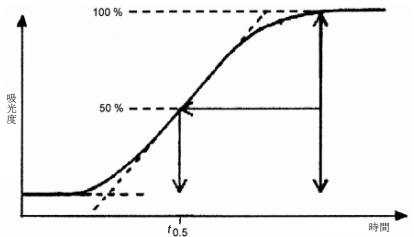


図2.00-2

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。

ホールドアップタイム(t_M)

カラムに保持されない成分の溶出に必要な時間(図2.00-1でベースラインの目盛りは分又は秒)。

86 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
87 成分の保持時間(t_0)という。

88 ホールドアップボリューム(V_M)

89 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。

90 V_M は次式により、ホールドアップタイムとmL/分で表され
91 た流量(F)から計算する。

$$92 \quad V_M = t_M \times F$$

93 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
94 成分の保持容量(V_0)という。

95 ピーク

96 単一成分(又は、二つ若しくはそれ以上の分離されない成分)
97 がカラムから溶出されたときに、検出器の応答を記録したクロ
98 マトグラム的一部分。

99 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
100 て表される。

101 ピークバレー比(p/v)

102 ピークバレー比は、二つのピークのベースライン分離が達成
103 されないとき、システム適合性の適合要件の一つとして利用さ
104 れる(図2.00-3)。

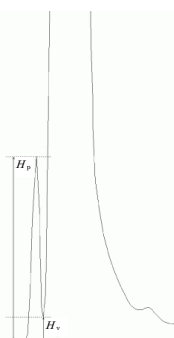


図2.00-3

$$107 \quad p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

108 H_p = マイナーピークの基線からの高さ

109 H_v = マイナーピークとメジャーピークの分離曲線の最下点
110 (ピークの谷)の基線からの高さ

112 理論段高さ(H)(同義語：理論段相当高さ(HETP))

113 カラムの長さ(L)(μm)と理論段数(N)の比。

$$114 \quad H = \frac{L}{N}$$

115 理論段数(N)

116 カラム性能(カラム効率)を示す数値。用いる技術によるもの
117 の、恒温、イソクラティック、又は等密度の条件下で得られた
118 データによってのみ、次式により理論段数として求めることが
119 できる。そのとき、 t_R と w_h は同じ単位で表される。

$$120 \quad N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

121 t_R = 被検成分のピークの保持時間

122 w_h = ピーク高さの中心におけるピーク幅($b/2$)

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

125 換算理論段高さ(h)

126 理論段高さ(H)(μm)と粒子径(d_p)(μm)の比。

$$127 \quad h = \frac{H}{d_p}$$

128 相対保持比(R_{rel})

129 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、
130 標準成分の移動距離に対する被検成分の移動距離の比として求
131 められる(図2.00-4)。

$$132 \quad R_{rel} = b/c$$

133 a = 移動相の移動距離

134 b = 被検成分の移動距離

135 c = 標準成分の移動距離

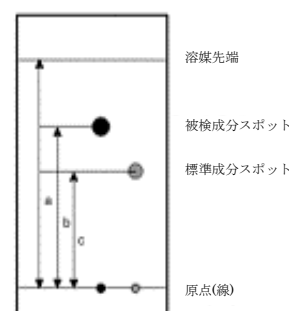


図2.00-4

138 保持比(r)

139 保持比は、次式により概算する。

$$140 \quad r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

141 t_{Ri} = 被検成分のピークの保持時間

142 t_{Rst} = 標準成分のピークの保持時間(通常試験される成分に
143 対応するピーク)

144 t_M = ホールドアップタイム

146 ホールドアップタイムでの補正なしの保持比(r_0)、又は相対保 147 持時間(RRT)

148 次式により計算する。

$$149 \quad r_0 = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

150 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、
151 ホールドアップタイムでの補正なしの保持比である。

152 相対保持時間(RRT)

153 ホールドアップタイムでの補正なしの保持比を参照。

155 分離度(R_s)

156 二つの成分のピーク間の分離度(図2.00-1)は、次式により
157 計算する。

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

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

◇なお, ピークが完全に分離するとは, 分離度 1.5 以上を意味する. ベースライン分離ともいう. ◇

デンス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, 保持時間の代わりに, 移動距離を用いて次式により, 二つの成分のピーク間の分離度を計算する.

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

R_{F1} , R_{F2} = それぞれのピークの保持時間. 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

R_f 値 (R_F)

R_f 値は, 薄層クロマトグラフィーで用いられており, 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 2.00-4).

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

b = 被検成分の移動距離

a = 溶媒先端の移動距離

保持係数 (k)

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) としても知られる) は以下のように定義されている.

$$k = \frac{\text{固定相の成分量}}{\text{移動相の成分量}} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

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

被検成分の保持係数は, 次式によりクロマトグラムから求められる.

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

t_R = 保持時間

t_M = ホールドアップタイム

保持時間 (t_R)

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 2.00-1, 基線のスケールは, 分又は秒).

保持容量 (V_R)

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 (F : mL/分) を用いて次式により計算する.

$$V_R = t_R \times F$$

200 カラムに保持されない成分の保持時間 (t_0)

201 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
202 分子サイズが大きな成分の保持時間 (図 2.00-5).

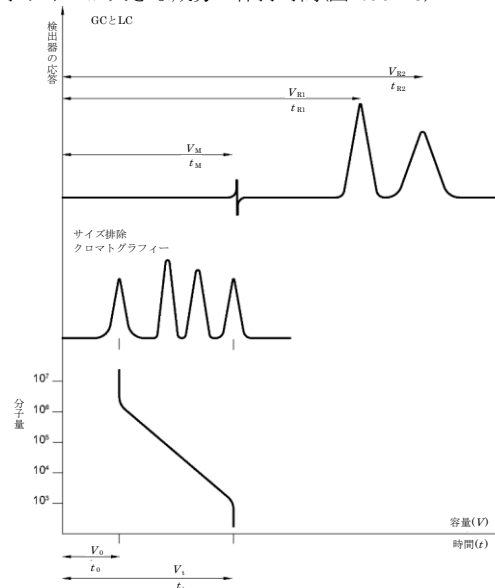


図 2.00-5

205 カラムに保持されない成分の保持容量 (V_0)

206 サイズ排除クロマトグラフィーにおいて, 最大ゲル孔より分
207 子サイズが大きな成分の保持容量. カラムに保持されない成分
208 の保持時間と流量 (F : mL/分) を用いて次式により計算する.

$$V_0 = t_0 \times F$$

210 分離係数 (α)

211 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
212 係数は, 常に 1 より大きい).

$$\alpha = k_2 / k_1$$

214 k_1 = 最初のピークの保持係数

215 k_2 = 2 番目のピークの保持係数

216 SN 比 (SN)

217 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
218 する. SN 比は次式により計算する.

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

220 H = 標準溶液から得られたクロマトグラム中の被検成分のピーク
221 高さ (図 2.00-6). ピークの頂点から, ピーク高
222 さの midpoint におけるピーク幅の 20 倍に相当する範囲で
223 測定し外挿された基線までの高さ

224 h = ブランクを注入後に得られたノイズ幅 (図 2.00-7). 標準
225 溶液から得られたクロマトグラム中, ピーク高さの midpoint
226 におけるピーク幅の 20 倍に相当する範囲で測定する.
227 可能ならば, 標準溶液でピークが観察されるのと同じ位置で測定する.

228

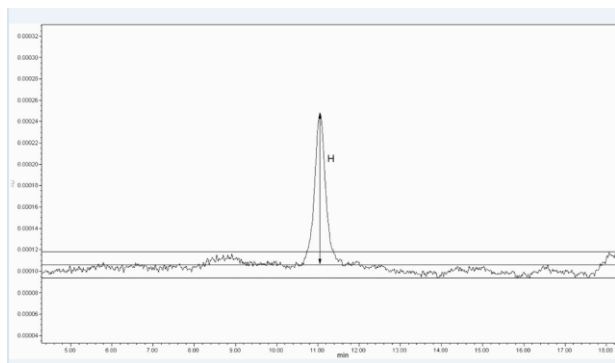


図2.00-6 標準溶液のクロマトグラム

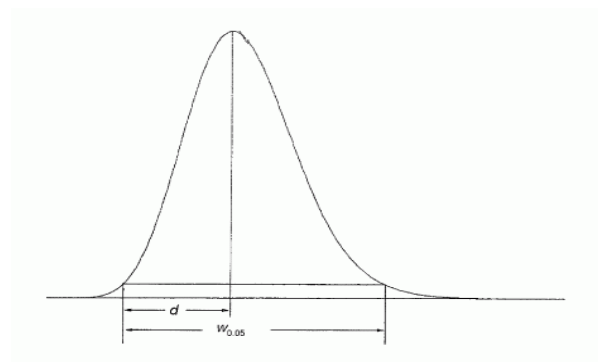


図2.00-8

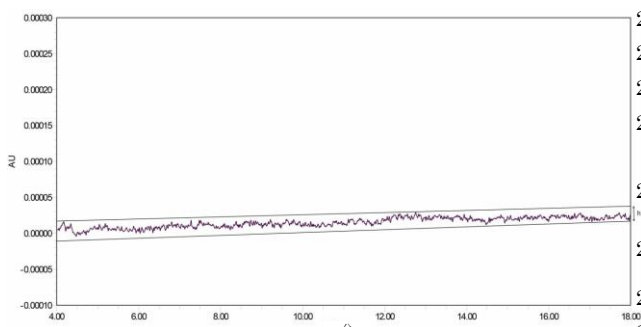


図2.00-7 ブランクのクロマトグラム

溶媒や試薬、移動相、試料マトリックス、ガスクロマトグラフィーの温度プログラムに由来するピークの影響で、ピークの高さの中心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、ピークの高さの中心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。

シンメトリー係数(A_s)

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ルリング係数としても知られる)(図2.00-8)は、次式により計算する。

$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$ = 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

$A_s = 1$ 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、ピークはテールリングしている。 $A_s < 1.0$ のときは、ピークがリーディングしている。

システムの再現性

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、次式により計算して得られた相対標準偏差(%RSD)により表される。

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

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

完全浸透する成分の保持時間(t_R) (Total mobile phase time (t_R))

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分子サイズが小さな成分の保持時間(図2.00-5)。

完全浸透する成分の保持容量(V_0) (Total mobile phase volume (V_0))

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分子サイズが小さな成分の保持容量。完全浸透する成分の保持時間と流量(F)(mL/分)を用いて次式により計算する。

$$V_0 = t_R \times F$$

3. システム適合性

本項は、液体クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーのみに適用する。

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の適格性を示されなければならない。

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ることを確認するために不可欠である。理論段数、保持係数(質量分布比)、システムの再現性、SN比、シンメトリー係数、分離度/ピークバレー比が、クロマトグラフィーシステムの性能評価に用いられることがある。医薬品各条に記載の複雑なクロマトグラフィープロファイルの場合(例えば、生物製品)には、視覚的なプロファイルの比較が、システム適合性試験として用いられる。

クロマトグラフィーに影響を与える因子として以下のものがある。

- ・ 移動相の組成及び温度

- ・移動相の水溶性成分のイオン強度及びpH
- ・流量, カラムの大きさ, カラム温度, 圧力
- ・固定相の特徴(粒子型, モノリス型などの支持体のタイプも含む), 粒子径又は孔サイズ, 空隙率, 比表面積
- ・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の)化学的な修飾の程度

保持時間及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。保持比に適用される基準は定められていない。クロマトグラフィーを用いた当該試験全体を通してシステム適合性の要件に適合していることが必要である。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い。

◇システム適合性に次の項目を設けるとき, 別に規定するもののほか, 各項目は以下に示す要件が満たされていなければならない。◇

システムの再現性—有効成分又は添加剤の定量

有効成分又は添加剤の定量において, それらの純物質の目標含量が100%で, システ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($n = 3 \sim 6$)により算出される最大許容相対標準偏差(%RSD_{max})の限度値が定められている。

ピークレスポンスの最大許容相対標準偏差は, 表2.00—1に示す適切な値を超えてはならない。

$$\%RSD_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%, n-1}}$$

$$K: K = \frac{0.6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%, 5}}{\sqrt{6}} \text{より得られる定数}(0.349), \text{ここで} \frac{0.6}{\sqrt{2}} \text{は} B =$$

1.0のとき, 注入回数6回で必要となる相対標準偏差(パーセント)

B : (医薬品各条で規定されている上限 — 100)%

N : 標準溶液の繰り返し注入回数 ($3 \leq n \leq 6$)

$t_{90\%, n-1}$: 90パーセント確率水準におけるステューデントの t 値(両側検定, 自由度 $n-1$)

表2.00—1 最大許容相対標準偏差(定量)

	注入回数 n			
	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

$B = (\text{医薬品各条中の含量規格の上限} - 100)\%$

システムの感度

システムの感度を表すためにシグナルノイズ比(SN比)が用いられる。定量限界(SN比10に相当)は報告の閾値以下である。

ピークの対称性

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係数(テーリング係数)は0.8 ~ 1.8である。

4. クロマトグラフィー条件の調整

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れている。

クロマトグラフィーによる試験において, 根本的に医薬品各条に規定する試験方法を変更することなく, 種々のパラメータ

を調整することができる範囲を以下に示す。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が必要である。

複数パラメーターの調整は分析システムに対して累積的な影響を及ぼしうるため, 使用者はその影響を適切に評価し, 十分なリスクアセスメントを行わなければならない。分離パターンがプロファイルとして示されている場合は, 特に重要である。

いかなる調整も医薬品各条に規定する試験方法に基づいて行わなければならない。

医薬品各条に規定する試験を行う際に, いかなる調整においても追加の検証試験が必要となるだろう。調整後の医薬品各条に規定する試験方法の適合性を検証するために, 変更によって影響を受ける可能性のある関連する分析性能特性を評価する必要がある。

以下に示す要件に従って医薬品各条に規定する試験方法を調整したとき, 適切な再バリデーションを行うことなく更なる調整を行うことは許容されない。

システム適合性基準への適合は, 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すように設定されているかどうかを確認するために必要とされる。

グラジエント溶離(液体クロマトグラフィー)及び温度プログラム(ガスクロマトグラフィー)における試験条件の調整は, イソクラティック溶離(液体クロマトグラフィー)及び恒温条件(ガスクロマトグラフィー)における試験条件の調整より難しい。なぜならば, それらの調整によりあるピークの位置が, 異なるグラジエントステップ, あるいは異なる溶出温度に移行することにより, 近接したピークが部分的若しくは完全に重なる, あるいは溶出順が逆転するといった可能性が有り, ピークの同定の間違いやピークの見落とし, 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。

◇生物薬品の試験では, ペプチドマップ法, 糖鎖試験法, 及び分子不均一性に関する試験のように, 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適否の判定基準に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。◇

◇生薬等は本項の対象外とする。◇

4.1. 液体クロマトグラフィー: イソクラティック溶離

カラムパラメーターと流量

・固定相: 置換基の変更は認められない(例えば, C18がC8に変更されるなど)。固定相のその他の物理化学的特性, つまりクロマトグラフィー用担体, 表面修飾, 化学修飾は類似していなければならない。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は, 上記要件が満たされている場合には許容される。

・カラムの大きさ(粒子径及び長さ): カラムの粒子径, 長さは, カラムの長さ(L)と粒子径(d_p)の比が一定のまま, 又は, 規定された L/d_p の比率の-25%から+50%の間の範囲に変更することができる。

・全多孔性粒子から表面多孔性粒子の粒子径を調整する場合: 全多孔性粒子から表面多孔性粒子の粒子径を調整する場合は, 理論段数(N)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 d_p の組み合わせも使用することができる。システム適合性の要件に適合し, 管理すべき不純物の選択性と溶出順が同等であることが示されれば, これらの変更は認

められる。

・内径：粒子径やカラム長の変更がない場合に、カラム内径を調整する場合があるかもしれない。

より小さな粒子径、又は、より小さなカラム内径への試験条件の変更により、ピークボリュームがより小さくなる場合には、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。

粒子径を変更するときには、流量の調整が必要となることがあるかもしれない。粒子径のより小さいカラムでは、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より、次式に従って変更可能である。

$$F_2 = F_1 \times [(d_{c2}^2 \times d_{p1}) / (d_{c1}^2 \times d_{p2})]$$

F_1 = 医薬品各条の流量(mL/分)

F_2 = 調整された流量(mL/分)

d_{c1} = 医薬品各条のカラムの内径(mm)

d_{c2} = 使用するカラムの内径(mm)

d_{p1} = 医薬品各条の粒子径(μm)

d_{p2} = 使用するカラムの粒子径(μm)

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

カラムの大きさの変更による調整後、更に流量の±50%の変更が許容される。

カラムの温度：別に規定するもののほか、規定される操作温度の±10℃。

本試験法のシステム適合性と、クロマトグラフィー条件の調整で記載されている許容範囲内で、更なる試験条件(移動相、温度、pHなど)の変更が必要となる場合があるかもしれない。

移動相：

・組成：マイナーな溶媒成分の量は、相対的に±30%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 ~ 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くなる。絶対的な10%以上の成分組成の変更は行われたい。微量成分は(100/ n)%以下のものからなり、 n は移動相の構成要素の総数である。

・移動相の水系組成のpH：別に規定するもののほか、±0.2 pH単位

・移動相の緩衝液組成の塩濃度：±10%

・流量：カラムの大きさに変更がない場合、±50%までの流量の調整が認められる。

検出波長：変更することはできない。

注入量：カラムの大きさを変更する場合、注入量の調整は次式

が利用できる。

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

V_{inj1} = 医薬品各条の注入量(μL)

V_{inj2} = 調整した注入量(μL)

L_1 = 医薬品各条のカラムの長さ(cm)

L_2 = 新たなカラムの長さ(cm)

d_{c1} = 医薬品各条のカラムの内径(mm)

d_{c2} = 新たなカラムの内径(mm)

上記の式は、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に適用できない場合があるかもしれない。

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、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容される。

4.2. 液体クロマトグラフィー：グラジエント溶離

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より慎重さが求められる。

カラムパラメーターと流量

・固定相：置換基の変更は認められない(例えば、C18がC8に変更されるなど)。固定相のその他の物理化学的特性、つまりクロマトグラフィー用担体、表面修飾、化学修飾は類似していなければならない。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は、上記要件が満たされている場合には許容される。

・カラムの大きさ(粒子径及び長さ)：カラムの粒子径、長さは、カラムの長さ(L)と粒子径(d_p)の比が一定のまま、又は、規定された L/d_p の比率の-25%から+50%の間の範囲に変更することができる。

全多孔性粒子から表面多孔性粒子の粒子径を調整する場合：本試験法及び医薬品各条に示されるシステム適合性に使用される個々のピークで $(t_R/w_R)^2$ 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 d_p の組み合わせも使用することができる。

システム適合性の要件に適合し、管理すべき不純物の選択性と溶出順が同等であることが示されれば、これらの変更は認められる。

・内径：粒子径やカラム長の変更がない場合に、カラム内径を調整する場合があるかもしれない。

より小さな粒子径、又は、より小さなカラム内径への試験条件の変更により、ピークボリュームがより小さくなる場合には、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。

粒子径を変更するときには、流量の調整が必要となることがあるかもしれない。粒子径のより小さいカラムでは、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より、次式に従って変更可能である。

491 $F_2 = F_1 \times [(d_{c2}^2 \times d_{p1}) / (d_{c1}^2 \times d_{p2})]$

492 F_1 : 医薬品各条の流量(mL/分)

493 F_2 : 変更後の流量(mL/分)

494 d_{c1} : 医薬品各条のカラムの内径(mm)

495 d_{c2} : 使用するカラムの内径(mm)

496 d_{p1} : 医薬品各条のカラム粒子径(μm)

497 d_{p2} : 使用するカラム粒子径(μm)

498 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、

499 選択性をコントロールするグラジエント容量に影響する。カラム

500 容量に比例してグラジエント容量を変え、グラジエント条件

501 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ント

502 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

503 と流量 F の積であるため、グラジエント条件のそれぞれの時間

504 を、カラム容量に対するグラジエント容量の比($L \times d_c^2$)が一定

505 になるように変更する。ここで、変更したグラジエント時間

506 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

507 次式で計算できる。

508 $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times d_{c2}^2) / (L_1 \times d_{c1}^2)]$

509 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

510 更が必要である。

511 (1) L/d_p で示されるカラムの長さ及び粒子径の変更、

512 (2)粒子径とカラムの内径の変更による流量の変更、そして、

513 (3)カラムの長さ、内径及び流量の変更による各グラジエント

514 の時間の変更である。この条件の例を次に示す。

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(d_c)(mm)	4.6	2.1	ユーザーの選択
粒子径(d_p)(μm)	5	3	ユーザーの選択
L / d_p	30.0	33.3	(1)
流量(mL/分)	2.0	0.7	(2)
グラジエント調整因子 (t_{G2}/t_{G1})		0.4	(3)
グラジエント条件			
%B	時間(分)	時間(分)	
30	0	0	
30	3	(3×0.4)=1.2	
70	13	[1.2+(10×0.4)]=5.2	
30	16	[5.2+(3×0.4)]=6.4	

516

517 (1) L/d_p が-25～+50%の範囲内の11%増加

518 (2) $F_2 = F_1 [(d_{c2}^2 \times d_{p1}) / (d_{c1}^2 \times d_{p2})]$ を用いて計算

519 (3) $t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times d_{c2}^2) / (L_1 \times d_{c1}^2)]$ を用いて計算

520

521 ・カラムの温度：別に規定するもののほか、規定した試験条件

522 の±5℃

523 本試験法のシステム適合性とクロマトグラフィー条件の調整

524 で記載されている許容範囲内で、更なる試験条件(移動相、温

525 度、pHなど)の変更が、必要となることがあるかもしれない。

526 **移動相**

527 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

528 場合に変更できる。

529 ・システム適合性の要件に適合していること。

530 ・主なピークが元の条件で得られた保持時間の±15%の範囲

531 内で溶離している。ただし、これはカラムの大きさを変更し

532 た場合は適用できない。

533 ・移動相の組成及びグラジエントが、最初のピークが十分に保

534 持され、最後のピークが溶出されるものであること。

535 ・移動相の水系組成のpH：別に規定するもののほか、±0.2

536 pH単位

537 ・移動相の緩衝液組成の塩濃度：±10%

538 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

539 ームを検討するかカラムを変えることが望ましい場合がある。

540 **デュエルボリューム**

541 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

542 び保持比が著しく変わることがある。このようなことが起こる

543 のは、デュエルボリュームが変化しているためかもしれない。

544 医薬品各条においては、分析法を開発した際の装置と実際に使用

545 する装置のデュエルボリュームの違いを考慮して、グラジエント

546 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

547 で、グラジエント勾配の調整を行うのが望ましい。その使用する

548 装置のイソクラティックのステップ長さを決めるのは試験者の

549 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

550 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

551 の勾配表に記載された時間(t 分)は次式で計算した時間(t_c 分)

552 に置き換えても構わない。

553 $t_c = t - (D - D_0) / F$

554 D = デュエルボリューム(mL)

555 D_0 = 分析法開発時のデュエルボリューム(mL)

556 F = 流量(mL/分)

557

558 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

559 を行った場合は、グラジエント勾配の調整を行う目的で導入

560 されたイソクラティックのステップを省略できる。

561 **検出波長**：変更できない。

562 **注入量**：カラムの大きさを変更する場合、注入量の調整には次

563 式が利用できる。

564 $V_{inj2} = V_{inj1} (L_2 d_{c2}^2) / (L_1 d_{c1}^2)$

565 V_{inj1} = 医薬品各条の注入量(μL);

566 V_{inj2} = 調整した注入量(μL);

567 L_1 = 医薬品各条のカラムの長さ(cm);

568 L_2 = 新たなカラムの長さ(cm);

569 d_{c1} = 医薬品各条のカラムの内径(mm);

570 d_{c2} = 新たなカラムの内径(mm) ;

571 上記の式は全多孔性粒子カラムから表面多孔性粒子カラムへ

572 の変更には適用できない場合があるかもしれない。

573 カラムの大きさを変更しない場合でも、システム適合性の要

574 件が確立された許容限度値内であれば注入量は変更することが
575 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
576 (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、
577 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
578 満たす限り許容される。

579 4.3. ガスクロマトグラフィー

580 カラムパラメーター

581 固定相：
582 粒子径：最大50%まで減らすことができ、増やすことは
583 できない(充填カラム)。
584 膜厚：－50 ～ ＋100%(キャピラリーカラム)
585 カラムの大きさ
586 長さ：－70 ～ ＋100%
587 内径：±50%
588 カラムの温度：±10%
589 温度プログラム：温度の調整は上述の通り許容される。昇温
590 速度と各温度の保持時間の調整は±20%まで許容される。

591 流量：±50%

592 上記の調整は、システム適合性の要件に適合し、管理すべき
593 不純物の選択性と溶出順が同等であることが示されれば、許容
594 される。

595 **注入量及びスプリット比**：システム適合性の要件が確立された
596 許容限度値内であれば注入量及びスプリット比は変更するこ
597 とができる。注入量を減少させる場合又はスプリット比を増
598 加させる場合は、ピークレスポンスの検出(検出限界)及び再
599 現性に特に注意が必要である。注入量の増加又はスプリット
600 比の減少は、特に、測定すべきピークの直線性と分離度がシ
601 ステム適合性を満たす限り許容される。

602 **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
603 イン温度の条件**：分解や濃縮が起こらない場合は±10℃

604 5. 定量

605 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
606 される。

607 5.1. 外部標準法

608 検量線法

609 被検成分の標準物質を用いて、直線性が示される範囲内で複
610 数濃度の標準溶液を調製し、一定量を注入する。
611 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
612 ク面積又はピーク高さを縦軸にプロットして検量線を得る。
613 検量線は通例直線回帰で得られる。次に、試料溶液を医薬品各
614 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
615 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
616 又はピーク高さを測定し、被検成分量を検量線から読み取るか、
617 計算する。

618 一点検量法

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

623 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
624 で実施されなければならない。

625 5.2. 内標準法

626 検量線法

627 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
628 ラム上の他の全てのピークと完全に分離する安定な物質を内標
629 準物質として選ぶ。

630 一定量の内標準物質と標準被検試料を段階的に加えて、数種
631 の標準溶液を調製する。それぞれの標準溶液の一定量を注入し
632 て得られたクロマトグラムから、内標準物質に対する標準被検
633 成分のピーク面積又はピーク高さの比を求める。これらの比を
634 縦軸に、標準被検成分量又は内標準物質質量に対する標準被検成
635 分量の比を横軸にとり、検量線を作成する。この検量線は、通
636 例、直線回帰で得られる。

637 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
638 いる、同量の内標準物質を含む試料溶液を調製する。検量線を
639 作成したときと同じ条件でクロマトグラフィーを行い、内標準
640 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め、
641 検量線から被検成分量を求める。

642 一点検量法

643 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
644 の標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、いずれに
645 も一定量の内標準物質を加え、同一の条件でクロマトグラフィー
646 を行い、得られた比を比較して、被検成分量を求める。

647 5.3. 面積百分率法

648 ピークの直線性が示されれば、医薬品各条では被検成分のパー
649 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
650 生じるピークや、判別限界又は報告の閾値以下のピークを除
651 いた、全てのピークの面積の総和に対する、それぞれのピーク
652 面積の百分率で求められる。

653 6. その他の留意事項

654 6.1. 検出器の応答

655 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
656 単位質量あたりのシグナル出力である。相対的な検出器の応
657 答係数(通例、レスポンス係数と呼ぶ)は、ある物質の標準物質
658 に対する検出感度を表す。感度係数は、応答係数の逆数である。
659 類縁物質試験では、医薬品各条に示された感度係数は常に適用
660 される(すなわち、応答係数が0.8-1.2の範囲外の場合)。

661 6.2. 妨害ピーク

662 溶媒、試薬、移動相、試料マトリックスに由来するピークは
663 除外する。

664 6.3. ピークの測定

665 主ピークから完全には分離しない不純物のピークの積分は、
666 通例、タンジェントスキムによる(図2.00-9)。

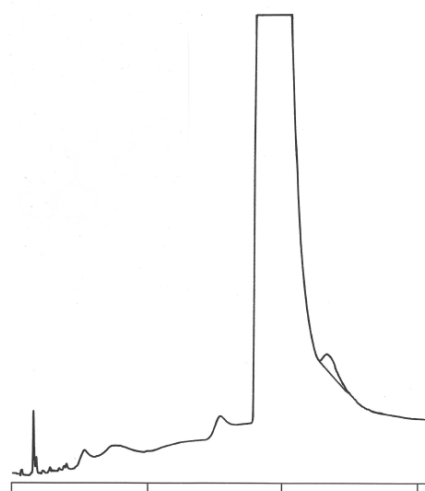


図2.00-9

667
668

669 6.4. 報告の閾値

670 類縁物質試験において不純物の総量が規定されている場合や、
671 ある不純物に対して定量的な評価が規定されている場合は、適
672 切な報告の閾値及びピーク面積を積分するための適切な条件を
673 設定することが重要になる。そのような試験では、報告の閾値、
674 つまり、不純物量がその値を超えると報告が必要とされる限度
675 値は、一般に0.05%である。