

1 2.01 液体クロマトグラフィー

2 次のように改める。

3 液体クロマトグラフィーは、適当な固定相を用いて作られた
4 カラムに試料混合物を注入し、移動相として液体を用い、固定
5 相に対する保持力の差を利用してそれぞれの成分に分離し、分
6 析する方法であり、液体試料又は溶液にできる試料に適用でき、
7 物質の確認、純度の試験又は定量などに用いる。

8 1. 装置

9 通例、移動相送液用ポンプ、試料導入装置、カラム、検出器
10 及び記録装置からなり、必要に応じて移動相組成制御装置、カ
11 ラム恒温槽、反応試薬送液用ポンプ及び化学反応槽などを用い
12 る。ポンプは、カラム及び連結チューブなどの中に移動相及び
13 反応試薬を一定流量で送ることができるものである。試料導入
14 装置は、一定量の試料を再現性よく装置に導入するものである。
15 カラムは、一定の大きさにそろえた液体クロマトグラフィー用
16 充填剤を内面が平滑で不活性な金属などの管に均一に充填した
17 ものである。なお、充填剤の代わりに固定相を管壁に保持させ
18 たものを用いることができる。検出器は、試料の移動相とは異
19 なる性質を検出するもので、紫外又は可視吸光度計、蛍光光
20 度計、示差屈折計、電気化学検出器、化学発光検出器、電気伝
21 導度検出器(導電率検出器)及び質量分析計などがあり、通例、
22 数 μg 以下の試料に対して濃度に比例した信号を出すものであ
23 る。記録装置は、検出器により得られる信号の強さを記録する
24 ものである。必要に応じて記録装置としてデータ処理装置を用
25 いてクロマトグラム、保持時間、又は成分定量値などを記録あ
26 るいは出力させることができる。移動相組成制御装置は、段階
27 的制御(ステップワイズ方式)と濃度勾配制御(グラジエント方
28 式)があり、移動相組成を制御できるものである。

29 2. 操作法

30 装置をあらかじめ調整した後、医薬品各条に規定する試験条
31 件の検出器、カラム、移動相を用い、移動相を規定の流量で流
32 し、カラムを規定の温度で平衡にした後、医薬品各条に規定す
33 る量の試料溶液又は標準溶液を試料導入装置を用いて試料導入
34 部より注入する。分離された成分を検出器により検出し、記録
35 装置を用いてクロマトグラムとして記録させる。分析される成
36 分が検出器で検出されるのに適した吸収、蛍光などの物性を持
37 たない場合には、適当な誘導体化を行い検出する。誘導体化は、
38 通例、プレカラム法又はポストカラム法による。

39 3. 確認及び純度の試験

40 本法を確認試験に用いる場合、試料の被検成分と標準被検成
41 分の保持時間が一致すること、又は試料に標準被検試料を添加
42 しても試料の被検成分のピークの形状が崩れないことを確認す
43 る。なお、被検成分の化学構造に関する知見が同時に得られる
44 検出器が用いられる場合、保持時間の一致に加えて、化学構造
45 に関する情報が一致することにより、より特異性の高い確認を
46 行うことができる。

47 本法を純度試験に用いる場合、通例、試料中の混在物の限度
48 に対応する濃度の標準溶液を用いる方法、又は面積百分率法に
49 より試験を行う。別に規定するもののほか、試料の異性体比は
50 面積百分率法により求める。

51 面積百分率法は、クロマトグラム上に得られた各成分のピー

52 ク面積の総和を100とし、それに対するそれぞれの成分のピー
53 ク面積の比から組成比を求める。ただし、正確な組成比を得る
54 ためには混在物の主成分に対する感度係数によるピーク面積の
55 補正を行う。

56 4. 定量

57 4.1. 内標準法

58 内標準法においては、一般に、被検成分になるべく近い保持
59 時間を持ち、いずれのピークとも完全に分離する安定な物質を
60 内標準物質として選ぶ。医薬品各条に規定する内標準物質の一
61 定量に対して標準被検試料を段階的に加えて数種の標準溶液を
62 調製する。この一定量ずつを注入して得られたクロマトグラム
63 から、内標準物質のピーク面積又はピーク高さに対する標準被
64 検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求める。この比を縦
65 軸に、標準被検成分量、又は内標準物質量に対する標準被検成
66 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
67 例、原点を通る直線となる。次に医薬品各条に規定する方法で
68 同量の内標準物質を加えた試料溶液を調製し、検量線を作成し
69 たときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、その内標準物
70 質のピーク面積又はピーク高さに対する被検成分のピーク面積
71 又はピーク高さの比を求め、検量線を用いて被検成分量を求め
72 る。

73 医薬品各条では、通例、上記の検量線が直線となる濃度範囲
74 に入る一つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、
75 医薬品各条で規定するそれぞれの量につき、同一条件で液体ク
76 ロマトグラフィーを行い被検成分量を求める。

77 4.2. 絶対検量線法

78 標準被検試料を段階的にとり、標準溶液を調製し、この一定
79 量ずつを正確に、再現性よく注入する。得られたクロマトグラ
80 ムから縦軸に標準被検成分のピーク面積又はピーク高さ、横軸
81 に標準被検成分量をとって、検量線を作成する。この検量線は、
82 通例、原点を通る直線となる。次に医薬品各条に規定する方法
83 で試料溶液を調製する。次に検量線を作成したときと同一条件
84 でクロマトグラムを記録させ、被検成分のピーク面積又はピー
85 ク高さを測定し、検量線を用いて被検成分量を求める。

86 医薬品各条では、通例、上記の検量線が直線となる濃度範囲
87 に入る一つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、
88 医薬品各条で規定するそれぞれの量につき、同一条件で液体ク
89 ロマトグラフィーを行い被検成分量を求める。この方法は、注
90 入操作など測定操作の全てを厳密に一定の条件に保って行う。

91 5. ピーク測定法

92 通例、次の方法を用いる。

93 5.1. ピーク高さ測定法

94 (i) ピーク高さ法：ピークの頂点から記録紙の横軸へ下ろし
95 た垂線とピークの両裾を結ぶ接線(基線)との交点から頂点まで
96 の長さを測定する。

97 (ii) 自動ピーク高さ法：検出器からの信号をデータ処理装置
98 を用いてピーク高さとして測定する。

99 5.2. ピーク面積測定法

100 (i) 半値幅法：ピーク高さの midpoint におけるピーク幅にピーク
101 高さを乗じる。

102 (ii) 自動積分法：検出器からの信号をデータ処理装置を用い
103 てピーク面積として測定する。

104 6. システム適合性

105 システム適合性は、クロマトグラフィーを用いた試験法には

106 不可欠の項目であり、医薬品の試験に使用するシステムが、当
107 該の試験を行うのに適切な性能で稼働していることを一連の品
108 質試験ごとに確かめることを目的としている。システム適合性
109 の試験方法と適合要件は、医薬品の品質規格に設定した試験法
110 の中に規定されている必要がある。規定された適合要件を満た
111 さない場合には、そのシステムを用いて行った品質試験の結果
112 を採用してはならない。

113 システム適合性は、基本的に「システムの性能」及び「シス
114 テムの再現性」で評価されるが、純度試験においてはこれらに
115 加えて「検出の確認」が求められる場合がある。適切な場合に
116 は、クロマトグラフィー総論〈2.00〉に規定のシステム適合性
117 の項目により評価することもできる。ただし、本法とクロマト
118 グラフィー総論〈2.00〉を組み合わせることはできない。

119 6.1. 検出の確認

120 純度試験において、対象とする不純物等のピークがその規格
121 限度値レベルの濃度で確実に検出されることを確認することに
122 よって、使用するシステムが試験の目的を達成するために必要
123 な性能を備えていることを検証する。

124 定量的試験では、通例、「検出の確認」の項を設け、規格限
125 度値レベルの溶液を注入したときのレスポンスの幅を規定して、
126 限度値付近でレスポンスが直線性を持つことを示す。なお、限
127 度試験のように、規格限度値と同じ濃度の標準溶液を用いて、
128 それとの比較で試験を行う場合や、限度値レベルでの検出が
129 「システムの再現性」などで確認できる場合には「検出の確
130 認」の項は設けなくてもよい。

131 6.2. システムの性能

132 被検成分に対する特異性が担保されていることを確認するこ
133 とによって、使用するシステムが試験の目的を達成するために
134 必要な性能を備えていることを検証する。

135 定量法では、原則として、被検成分と分離確認用物質(基本
136 的には、隣接するピークが望ましい)との分離度、及び必要な
137 場合には、溶出順で規定する。純度試験では、原則として、被
138 検成分と分離確認用物質(基本的には、隣接するピークが望ま
139 しい)との分離度及び溶出順で規定する。また、必要な場合に
140 は、シンメトリー係数を併せて規定する。ただし、適当な分離
141 確認用物質がない場合には、被検成分の理論段数やシンメトリ
142 ー係数で規定しても差し支えない。

143 6.3. システムの再現性

144 標準溶液あるいはシステム適合性試験用溶液を繰返し注入し
145 たときの被検成分のレスポンスのばらつきの程度(精度)が試験
146 の目的にかなうレベルにあることを確認することによって、使
147 用するシステムが試験の目的を達成するために必要な性能を備
148 えていることを検証する。

149 システムの再現性の許容限度値は、通例、繰返し注入におけ
150 る被検成分のレスポンスの相対標準偏差(RSD)として規定する。
151 試料溶液の注入を始める前に標準溶液の注入を繰り返す形だけ
152 でなく、標準溶液の注入を試料溶液の注入の前後に分けて行う
153 形や試料溶液の注入の間に組み込んだ形でシステムの再現性を
154 確認してもよい。

155 繰返し注入の回数は6回を原則とするが、グラジエント法を
156 用いる場合や試料中に溶出が遅い成分が混在する場合など、1
157 回の分析に時間がかかる場合には、6回注入時とほぼ同等のシ
158 ステムの再現性が担保されるように、達成すべきばらつきの許
159 容限度値を厳しく規定することにより、繰返し注入の回数を減

らしてもよい。

161 システムの再現性の許容限度値は、当該試験法の適用を検討
162 した際のデータと試験に必要なとされる精度を考慮して、適切な
163 レベルに設定する。

164 7. 試験条件の変更に関する留意事項

165 医薬品各条の試験条件のうち、モノリス型カラムの孔径、移
166 動相のイオン対形成剤濃度、切替え回数、切替え時間、ポスト
167 カラム法における誘導体化試薬の組成及び流量、反応時間及び
168 化学反応槽温度は、適切に分析性能の検証を行ったうえで一部
169 変更できる。それ以外の以下を含む試験条件の変更は、生薬等
170 を除き、クロマトグラフィー総論〈2.00〉に記載されているク
171 ロマトグラフィー条件の調整の内容に従う。

172 カラムの内径及び長さ、充填剤の粒径、カラム温度、移動相
173 の組成比、移動相の緩衝液組成、移動相のpH、移動相の塩濃
174 度及びグラジエントプログラム及び移動相の流量。

175 8. 注意

176 標準被検試料、内標準物質、試験に用いる試薬及び試液は測
177 定の妨げとなる物質を含まないものを用いる。

178