

1 2.00 クロマトグラフィー総論

2 次のように改める。

3 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。
 4 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、
 5 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「◆」
 6 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
 7 した項は「◇」で囲むことにより示す。
 8 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
 9 医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

10 1. はじめに

11 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、
 12 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
 13 定相は、固体、又は固体やゲルに支持された液体である。固
 14 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
 15 などとして配置される。移動相は、ガス、液体、又は超臨界
 16 流体である。分離は吸着、質量分布(分配)、イオン交換など
 17 に基づき、また、大きさ、質量、体積などの分子の物理化学
 18 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
 19 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
 20 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
 21 テム適合性は、本法の規定のほか、液体クロマトグラフィー
 22 (2.01)に記載の規定を適用することができる。◇分離の原理、
 23 装置、測定方法は、対応する一般試験法に記載する。

24 2. 定義

25 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、
 26 以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
 27 によっては、シグナルノイズ比(SN比)と分離度のようなパラ
 28 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
 29 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
 30 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、
 31 もしそうでなければ、必要な補正を行う責任がある。

32 クロマトグラム

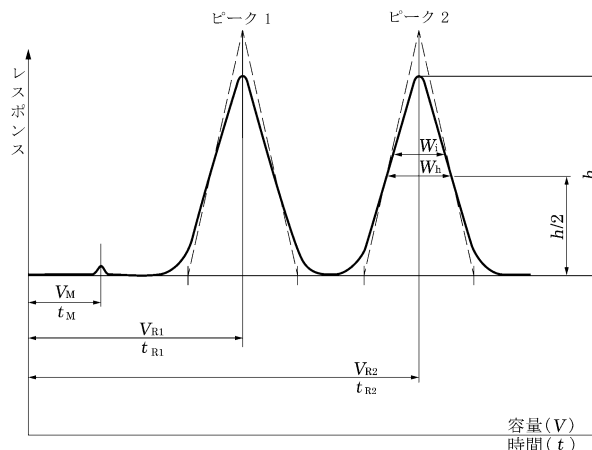
33 時間、又は容量に対して検出器の応答、溶出液中の濃度、
 34 又は溶出液中の濃度の測定に使われる他の量を、グラフ又は
 35 他の図で表したものである。理想的なクロマトグラムは、ベ
 36 ースライン上にガウス型ピークの連続として示される(図2.00
 37 -1)。

38 分配係数(K_0)

39 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
 40 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
 41 て与えられる。

$$42 K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

- 43 t_R : 保持時間
- 44 t_0 : カラムに保持されない成分の保持時間
- 45 t_t : 完全浸透する成分の保持時間



46

- 47 V_M : ホールドアップボリュウム
- 48 t_M : ホールドアップタイム
- 49 V_{R1} : ピーク1の保持容量
- 50 t_{R1} : ピーク1の保持時間
- 51 V_{R2} : ピーク2の保持容量
- 52 t_{R2} : ピーク2の保持時間
- 53 W_0 : ピーク高さの midpoint におけるピーク幅
- 54 W_b : 変曲点におけるピーク幅
- 55 h : ピーク高さ
- 56 $h/2$: ピーク高さの midpoint

57 図2.00-1

58 グラジエント遅延容量(dwelling volume) (D) (V_0 とも呼ばれる)

59 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
 60 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。
 61 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
 62 チューブ(例えば1 m × 0.12 mm)に交換する。

63 移動相：

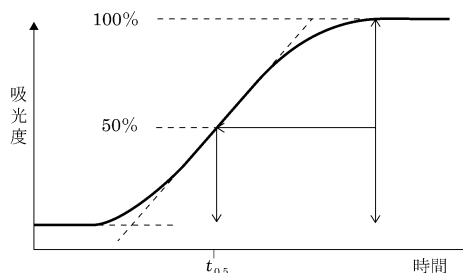
- 64 移動相A : 水
- 65 移動相B : 0.1 vol%のアセトンを含む水

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

66 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)。
 67 検出：紫外可視吸光度計 265 nm
 68 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
 69 -2)。

70 $D = t_D \times F$

- 71 t_D : $t_{0.5} - 0.5t_G$ (分)
- 72 t_G : あらかじめ決めたグラジエント時間(20分)
- 73 F : 流量(mL/分)



74

75 図2.00-2

76 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
77 トサンプラーが用いられ、そのときグラジエント遅延容量
78 にはインジェクションループの容量も含まれる。

79 ホールドアップタイム(t_M)

80 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
81 でベースラインの目盛りは分又は秒)。

82 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
83 い成分の保持時間(t_0)という。

84 ホールドアップボリューム(V_M)

85 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。

86 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
87 た流量(F)から計算する。

$$88 \quad V_M = t_M \times F$$

89 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
90 い成分の保持容量(V_0)という。

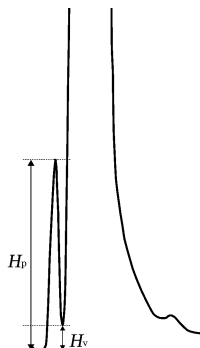
91 ピーク

92 単一成分(又は、二つ若しくはそれ以上の分離されない成
93 分)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
94 クロマトグラム的一部分。

95 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
96 て表される。

97 ピークバレー比(ρ/v)

98 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
99 成されないとき、システム適合性の適合要件の一つとして利
100 用される(図2.00-3)。



102 図2.00-3

$$103 \quad \rho/v = \frac{H_p}{H_v}$$

104 H_p : マイナーピークの基線からの高さ

105 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
106 (ピークの谷)の基線からの高さ

107 理論段高さ(H) (同義語：理論段相当高さ(HETP))

108 カラムの長さ(L : μm)と理論段数(N)の比。

$$109 \quad H = \frac{L}{N}$$

110 理論段数(N)

111 カラム性能(カラム効率)を示す数値。用いる技術によるも
112 のの、恒温、イソクラティック、又は等密度の条件下で得ら
113 れたデータによってのみ、次式により理論段数として求める

114 ことができる。ここで、 t_R と w_h は同じ単位で表される。

$$115 \quad N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

116 t_R : 被検成分のピークの保持時間

117 w_h : ピーク高さの midpoint におけるピーク幅($h/2$)

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

120 換算理論段高さ(h)

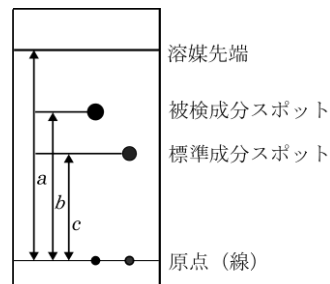
121 理論段高さ(H : μm)と粒子径(d_p : μm)の比。

$$122 \quad h = \frac{H}{d_p}$$

123 相対保持比(R_{rel})

124 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、
125 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
126 求められる(図2.00-4)。

$$127 \quad R_{rel} = b/c$$



128

129 図2.00-4

130 a : 移動相の移動距離

131 b : 被検成分の移動距離

132 c : 標準成分の移動距離

133 保持比(r)

134 保持比は、次式により概算する。

$$135 \quad r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

136 t_{Ri} : 被検成分ピークの保持時間

137 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
138 対応するピーク)

139 t_M : ホールドアップタイム

140 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 141 保持時間(RRT)

142 次式により計算する。

$$143 \quad r_0 = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

144 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、
145 ホールドアップタイムでの補正なしの保持比である。

146 相対保持時間(RRT)

147 ホールドアップタイムでの補正なしの保持比を参照。

148 分離度(R_s)

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

$$151 \quad R_S = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

152 t_{R1} , t_{R2} : それぞれのピークの保持時間. ただし $t_{R2} > t_{R1}$

153 w_{h1} , w_{h2} : それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク
154 幅

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

157 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
158 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、
159 二つの成分のピーク間の分離度を計算する。

$$160 \quad R_S = \frac{1.18a(R_{F2} - R_{F1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

161 R_{F1} , R_{F2} : それぞれのピークの R_f 値. ただし $R_{F2} > R_{F1}$

162 w_{h1} , w_{h2} : それぞれのピークの高さの midpoint におけるピーク
163 幅

164 a : 原線から溶媒先端までの移動距離

165 R_f 値 (R_f)

166 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
167 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
168 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
169 (図2.00-4)。

$$170 \quad R_f = \frac{b}{a}$$

171 b : 被検成分の移動距離

172 a : 溶媒先端の移動距離

173 保持係数 (k)

174 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
175 (k')としても知られる)は以下のように定義されている。

$$176 \quad k = \frac{\text{固定相に存在する成分量}}{\text{移動相に存在する成分量}} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

177 K_C : 分配係数(又は平衡分配係数 equilibrium distribution
178 coefficientとしても知られる)

179 V_S : 固定相の容量

180 V_M : 移動相の容量

181 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
182 められる。

$$183 \quad k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

184 t_R : 保持時間

185 t_M : ホールドアップタイム

186 保持時間 (t_R)

187 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
188 (図2.00-1, 基線のスケールは、分又は秒)。

189 保持容量 (V_0)

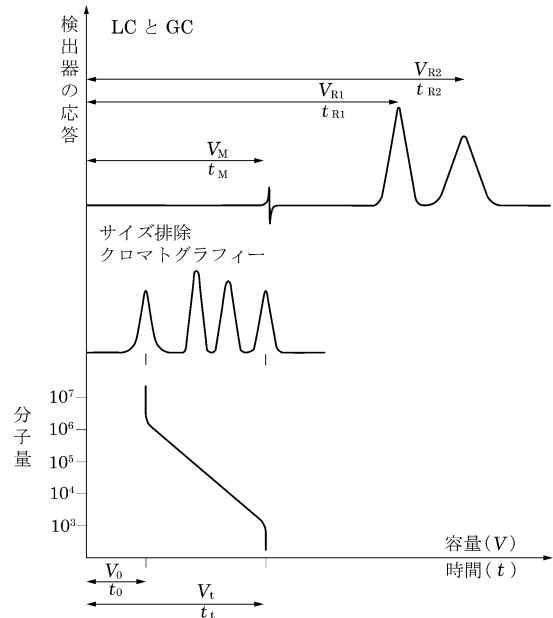
190 ある成分が、溶出するために必要な移動相の容量. 保持容
191 量は、保持時間(t_R)と流量(F : mL/分)を用いて次式により計

算する。

$$193 \quad V_R = t_R \times F$$

194 カラムに保持されない成分の保持時間 (t_0)

195 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
196 り分子サイズが大きな成分の保持時間(図2.00-5)。



197

198 図2.00-5

199 カラムに保持されない成分の保持容量 (V_0)

200 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
201 分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
202 成分の保持時間(t_0)と流量(F : mL/分)を用いて次式により計
203 算する。

$$204 \quad V_0 = t_0 \times F$$

205 分離係数 (α)

206 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
207 係数は、常に1より大きい)。

$$208 \quad \alpha = k_2 / k_1$$

209 k_1 : 最初のピークの保持係数

210 k_2 : 2番目のピークの保持係数

211 SN比 (S/N)

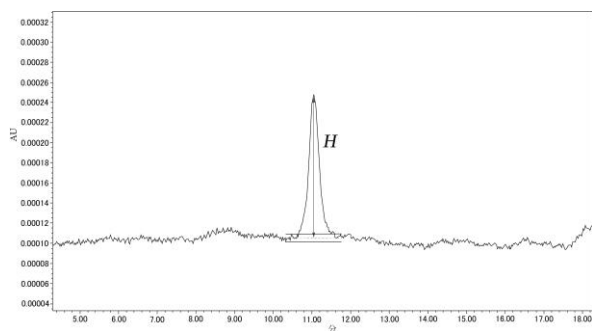
212 短い時間間隔で生じるノイズは、定量の精度及び真度に影
213 響する。SN比は次式により計算する。

$$214 \quad S/N = \frac{2H}{h}$$

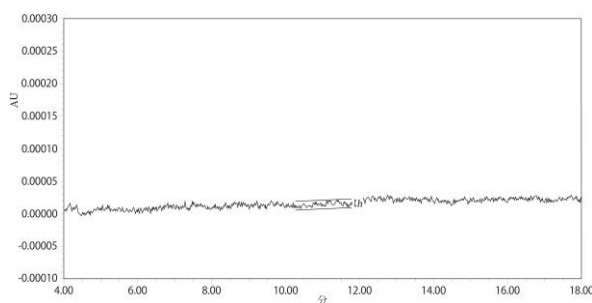
215 H : 標準溶液から得られたクロマトグラム中の被検成分
216 のピーク高さ(図2.00-6). ピークの頂点から、ピーク高
217 さの midpoint におけるピーク幅の少なくとも5倍に相当する
218 範囲で測定し外挿された基線までの高さ

219 h : ブランクを注入後に得られたノイズ幅(図2.00-7). 標
220 準溶液から得られたクロマトグラム中、ピーク高さの中
221 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

222 測定する。可能ならば、標準溶液でピークが観察される
223 のと同じ位置で測定する。



224
225 図2.00-6 標準溶液のクロマトグラム



226
227 図2.00-7 ブランクのクロマトグラム

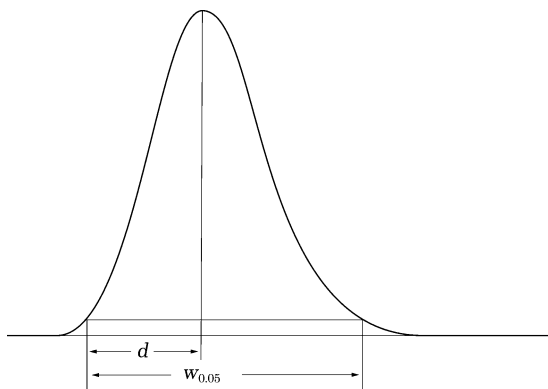
228 シンメトリー係数 (A_s)

229 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
230 テーリング係数としても知られる)(図2.00-8)は、次式によ
231 り計算する。

$$232 A_s = \frac{W_{0.05}}{2d}$$

233 $w_{0.05}$: ピーク高さの1/20の高さにおけるピーク幅
234 d : ピーク頂点から下ろした垂線と、ピーク高さの1/20の
235 高さにおけるピーク立ち上がり側の端までの距離

236 $A_s = 1$ はシンメトリーであることを意味する。 $A_s > 1.0$ の
237 ときは、ピークはテーリングしている。 $A_s < 1.0$ のときは、
238 ピークがリーディングしている。



239
240 図2.00-8
241 システムの再現性

242 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
243 し、次式により計算して得られた相対標準偏差(%RSD)によ
244 り表される。

$$245 \%RSD = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

246 y_i : ピーク面積, ピーク高さ, 又は内標準法によるピーク
247 面積比の測定値
248 \bar{y} : 測定値の平均値
249 n : 測定回数

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

252 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
253 よりも分子サイズが小さな成分の保持時間(図2.00-5)。

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

256 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
257 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
258 分の保持時間(t_t)と流量(F : mL/分)を用いて次式により計算
259 する。

$$260 V_t = t_t \times F$$

261 3. システム適合性

262 本項の規定は、液体クロマトグラフィー及びガスクロマト
263 グラフィーのみに適用する。

264 使用する装置の構成要素が純度試験等や定量を行うのに必
265 要な性能を有していることの適格性が示されなければならない。
266

267 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
268 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。
269 理論段数、保持係数(質量分布比)、システムの再現性、
270 SN比、シンメトリー係数、分離度/ピークバレー比が、ク
271 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
272 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
273 イルの場合(例えば、生物薬品)には、視覚的なプロファイル
274 の比較が、システム適合性試験として用いられる。

275 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
276 なものがある。

- 277 ・移動相の組成及び温度
- 278 ・移動相の水溶性成分のイオン強度及びpH
- 279 ・流量、カラムの大きさ、カラム温度、圧力
- 280 ・支持体のタイプ(粒子型、モノリス型など)、粒子径又
281 は孔径、空隙率、比表面積などの固定相の特性
- 282 ・逆相、及び固定相の他の表面修飾、(エンドキャッピング
283 や炭素含有率などの)化学的な修飾の程度

284 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
285 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。

286 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
287 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
288 適合性が示されなければ、試料の分析は認められない。

289 ◇システム適合性に次の項目を設けると、別に規定する
290 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
291 ならない。◇

292 システムの再現性—有効成分又は添加剤の定量

293 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
294 標含量が100%で、システムの再現性の要件が規定されてい
295 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
296 出される最大許容相対標準偏差(%RSD_{max})の限度値が定めら
297 れている。

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

$$300 \quad \%RSD_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

$$301 \quad K: K = \frac{0.6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}} \text{より得られる定数}(0.349), \text{ここで} \frac{0.6}{\sqrt{2}}$$

302 は $B = 1.0$ のとき、注入回数6回で必要となる相対標準偏
303 差(パーセント)

304 B : (医薬品各条で規定されている上限 - 100)%

305 n : 標準溶液の繰り返し注入回数 ($3 \leq n \leq 6$)

306 $t_{90\%,n-1}$: 90パーセント確率水準におけるステューデント
307 の t 値(両側検定, 自由度 $n-1$)

308 表2.00-1 最大許容相対標準偏差(定量)

| B(%) | 注入回数 n | | | |
|------|----------|------|------|------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 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 |

309 $B = (\text{医薬品各条中の含量規格の上限} - 100)\%$

310 システムの感度

311 システムの感度を表すためにSN比が用いられる。定量限
312 界(SN比10に相当)は報告の閾値以下である。これは、報告の
313 閾値においてピークのSN比が10以上であることを意味して
314 いる。この要件は、報告の閾値が設定される試験にのみ適用
315 される。

316 ピークの対称性

317 別に規定するもののほか、純度試験等や定量法において、
318 定量に用いられる標準溶液のピークのシンメトリー係数(テー
319 リング係数)は0.8 ~ 1.8である。

320 4. クロマトグラフィー条件の調整

321 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
322 成時に既にバリデートされている。

323 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
324 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
325 メーターを調整することができる範囲を以下に示す。示され
326 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
327 である。

328 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
329 影響を及ぼすため、使用者はその影響を適切に評価し、
330 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
331 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
332 である。

333 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
334 行わなければならない。

335 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
336 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

337 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
338 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
339 価する必要がある。

340 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
341 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
342 調整を行うことは許容されない。

343 システム適合性基準への適合は、試験条件が、純度試験等
344 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
345 いるかどうかを確認するために必要とされる。

346 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
347 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、
348 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
349 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
350 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、
351 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
352 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
353 重なる、あるいは溶出順が逆転するといった可能性があり、
354 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
355 定された溶出時間を越えることが起こるようになる。

356 ◊生物薬品の試験では、ペプチドマップ法、糖鎖試験法、及
357 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
358 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
359 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、
360 本項に示す方法を適用できない場合がある。◊

361 ◊生薬等は本項の対象外とする。◊

362 4.1. 液体クロマトグラフィー：イソクラティック溶離 363 カラムパラメーターと流量

364 ・固定相：置換基の変更は認められない(例えば、C18がC8
365 に変更されるなど)。固定相のその他の物理化学的特性、つ
366 まりクロマトグラフィー用担体、表面修飾、化学修飾の程
367 度は類似していなければならない。全多孔性粒子カラムか
368 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
369 ている場合には許容される。

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

374 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
375 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
376 場合は、理論段数(N)が規定されたカラムの-25%から+
377 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
378 ことができる。

379 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
380 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
381 認められる。

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

384 より小さな粒子径、又は、より小さなカラム内径への試験
385 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
386 には、装置配管、検出器のセル容量、サンプリング速度及び
387 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
388 必要なことがあり注意が必要である。

389 粒子径を変更するときには、流量の調整が◊必要となるこ
390 とがあるかもしれない◊。粒子径のより小さいカラムでは、

391 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、
392 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
393 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
394 である[◇]。

$$395 \quad F_2 = F_1 \times [(d_{e2}^2 \times d_{p1}) / (d_{e1}^2 \times d_{p2})]$$

396 F_1 : 医薬品各条の流量(mL/分)

397 F_2 : 調整された流量(mL/分)

398 d_{e1} : 医薬品各条のカラムの内径(mm)

399 d_{e2} : 使用するカラムの内径(mm)

400 d_{p1} : 医薬品各条の粒子径(μm)

401 d_{p2} : 使用するカラムの粒子径(μm)

402 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
403 μm 未満へ変更するとき、20%を上回ってカラム性能が低下
404 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
405 ことが認められる。同様に、粒子径を3 μm 未満から3 μm 以
406 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
407 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
408 る。

409 カラムの大きさの変更による調整後、更に流量の $\pm 50\%$ の
410 変更が許容される。

411 ・カラムの温度：別に規定するもののほか、規定される操作
412 温度の $\pm 10^\circ\text{C}$ 。

413 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
414 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、
415 温度、pHなど)の変更が必要となることがあるかもしれない。
416 **移動相**

417 ・組成：マイナーな溶媒成分の量は、相対的に $\pm 30\%$ まで調
418 整できる。例えば、移動相の10%の微量組成について、相
419 対的な30%の調整は7 ~ 13%の範囲となる。移動相の5%
420 の微量組成について、相対的な30%の調整は3.5 ~ 6.5%の
421 範囲となる。絶対的な10%以上の成分組成の変更は行われ
422 ない。微量成分は(100/ n)%以下のものからなり、 n は移動
423 相の構成要素の総数である。

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

426 ・移動相の緩衝液組成の塩濃度： $\pm 10\%$

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

429 **検出波長**：変更することはできない。

430 **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
431 式が利用できる。

$$432 \quad V_{inj2} = V_{inj1} (L_2 d_{e2}^2) / (L_1 d_{e1}^2)$$

433 V_{inj1} : 医薬品各条の注入量(μL)

434 V_{inj2} : 調整された注入量(μL)

435 L_1 : 医薬品各条のカラムの長さ(cm)

436 L_2 : 新たなカラムの長さ(cm)

437 d_{e1} : 医薬品各条のカラムの内径(mm)

438 d_{e2} : 新たなカラムの内径(mm)

439 上記の式は、全多孔性粒子カラムから表面多孔性粒子カ
440 ラムへの変更には適用できない場合があるかもしれない。

441 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

442 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
443 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
444 ンスの検出(検出限界)及び再現性に特に注意が必要である。

445 注入量の増加は、特に、変更後も測定すべきピークの直線性
446 と分離度が十分に満たされている場合に限り許容される。

447 4.2. 液体クロマトグラフィー：グラジエント溶離

448 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
449 ラティックシステムの場合より慎重さが求められる。

450 カラムパラメーターと流量

451 ・固定相：置換基の変更は認められない(例えば、C18がC8
452 に変更されるなど)。固定相のその他の物理化学的特性、つ
453 まりクロマトグラフィー用担体、表面修飾、化学修飾の程
454 度は類似していなければならぬ。全多孔性粒子カラムから
455 表面多孔性粒子カラムへの変更は、上記要件が満たされ
456 ている場合には許容される。

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

461 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
462 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
463 使用される個々のピークで $(t_R/w_b)^2$ が規定されたカラム
464 の -25% から $+50\%$ の範囲にあれば、他の L と d_p の組み合
465 わせも使用することができる。

466 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
467 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
468 認められる。

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

471 より小さな粒子径、又は、より小さなカラム内径への試験
472 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
473 には、装置配管、検出器のセル容量、サンプリング速度及び
474 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
475 が必要となることがあり注意が必要である。

476 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
477 があるかもしれない[◇]。粒子径のより小さいカラムでは、
478 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、
479 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
480 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
481 である[◇]。

$$482 \quad F_2 = F_1 \times [(d_{e2}^2 \times d_{p1}) / (d_{e1}^2 \times d_{p2})]$$

483 F_1 : 医薬品各条の流量(mL/分)

484 F_2 : 調整された流量(mL/分)

485 d_{e1} : 医薬品各条のカラムの内径(mm)

486 d_{e2} : 使用するカラムの内径(mm)

487 d_{p1} : 医薬品各条のカラム粒子径(μm)

488 d_{p2} : 使用するカラム粒子径(μm)

489 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
490 は、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。
491 カラム容量に比例してグラジエント容量を変え、グラジエン
492 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
493 ラジエント容量に適用する。グラジエント容量は、グラジエ

494 ント時間 t_G と流量 F の積であるため、グラジエント条件のそ
495 れぞれの時間を、カラム容量に対するグラジエント容量の比
496 ($L \times d_c^2$) が一定になるように変更する。ここで、変更したグ
497 ラジエント時間 t_{G2} は元のグラジエント時間 t_{G1} 、流量及びカ
498 ラムの大きさから次式で計算できる。

$$499 \quad t_{G2} = t_{G1} \times (F_1 / F_2) [(L_2 \times d_{c2}^2) / (L_1 \times d_{c1}^2)]$$

500 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
501 変更が必要である。

- 502 (1) L/d_p で示されるカラムの長さ及び粒子径の変更、
503 (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、
504 (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
505 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 : μ m) | 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 | |

506 (1) L/d_p が -25 ~ +50% の範囲内の11%増加

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

508 (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

509 ・カラムの温度：別に規定するもののほか、規定した試験条
510 件の $\pm 5^\circ\text{C}$

511 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
512 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、
513 温度、pHなど)の変更が、必要となることがあるかもしれな
514 い。

515 移動相

516 ・組成/グラジエント：移動相の組成及びグラジエントは次
517 の場合に変更できる。

- 518 (i) システム適合性の要件に適合していること。
519 (ii) 主なピークが元の条件で得られた保持時間の \pm
520 15% の範囲内で溶離している。ただし、これはカラム
521 の大きさを変更した場合は適用できない。
522 (iii) 移動相の組成及びグラジエントが、最初のピーク
523 が十分に保持され、最後のピークが溶出されるもので
524 あること。

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

527 ・移動相の緩衝液組成の塩濃度： $\pm 10\%$

528 システム適合性の要件に適合しない場合は、グラジエント
529 遅延容量を検討するかカラムを変えることが望ましい場合が
530 ある。

531 グラジエント遅延容量

532 使用する装置構成によっては、規定した分離能、保持時間

533 及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
534 こるのは、グラジエント遅延容量が変化しているためかもし
535 れない。医薬品各条においては、分析法を開発した際の装置
536 と実際に使用する装置のグラジエント遅延容量の違いを考慮
537 して、グラジエントを開始する前にイソクラティックのステ
538 ップを加えることで、グラジエント勾配の調整を行うのが望
539 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
540 さ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
541 成段階で用いたグラジエント遅延容量が医薬品各条に記載さ
542 れている場合は、グラジエントの勾配表に記載された時間(t
543 分)は次式で計算した時間(t_c 分)に置き換えても構わない。

$$544 \quad t_c = t - (D - D_0) / F$$

545 D ：グラジエント遅延容量(mL)

546 D_0 ：分析法開発時のグラジエント遅延容量(mL)

547 F ：流量(mL/分)

548 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
549 ションを行った場合は、グラジエント勾配の調整を行う目的
550 で導入されたイソクラティックのステップを省略できる。

551 検出波長：変更できない。

552 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
553 次式が利用できる。

$$554 \quad V_{inj2} = V_{inj1} (L_2 d_{c2}^2) / (L_1 d_{c1}^2)$$

555 V_{inj1} ：医薬品各条の注入量(μ L)

556 V_{inj2} ：調整された注入量(μ L)

557 L_1 ：医薬品各条のカラムの長さ(cm)

558 L_2 ：新たなカラムの長さ(cm)

559 d_{c1} ：医薬品各条のカラムの内径(mm)

560 d_{c2} ：新たなカラムの内径(mm)

561 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
562 への変更には適用できない場合があるかもしれない。

563 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
564 要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
565 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
566 の検出(検出限界)及び再現性に特に注意が必要である。注入
567 量の増加は、特に、変更後も測定すべきピークの直線性と分
568 離度が十分に満たされている場合に限り許容される。

569 4.3. ガスクロマトグラフィー

570 カラムパラメーター

- 571 ・固定相：
572 粒子径：最大50%まで減らすことができ、増やすことは
573 できない(充填カラム)。
574 膜厚： $-50 \sim +100\%$ (キャピラリーカラム)
- 575 ・カラムの大きさ
576 長さ： $-70 \sim +100\%$
577 内径： $\pm 50\%$
- 578 ・カラムの温度： $\pm 10\%$
- 579 ・温度プログラム：温度の調整は上述の通り許容される。昇
580 温速度と各温度の保持時間の調整は $\pm 20\%$ まで許容される。
- 581 流量： $\pm 50\%$
582 上記の調整は、システム適合性の要件に適合し、管理すべ
583 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、

584 許容される。
 585 **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
 586 た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
 587 ることができる。注入量を減少させる場合又はスプリット
 588 比を増加させる場合は、ピークレスポンスの検出(検出限
 589 界)及び再現性に特に注意が必要である。注入量の増加又は
 590 スプリット比の減少は、特に、変更後も測定すべきピーク
 591 の直線性と分離度が十分に満たされている場合に限り許容
 592 される。

593 **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**
 594 **ライン温度の条件**：分解や濃縮が起こらない場合は $\pm 10^{\circ}\text{C}$

595 5. 定量

596 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
 597 用される。

598 5.1. 外部標準法

599 検量線法

600 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
 601 複数濃度の標準溶液を調製し、一定量を注入する。

602 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
 603 ー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。
 604 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
 605 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
 606 操作条件下でクロマトグラフィーを行い、被検成分のピーク
 607 面積又はピーク高さを測定し、被検成分量を検量線から読み
 608 取るか、計算する。

609 一点検量法

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

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

616 5.2. 内標準法

617 検量線法

618 内標準法では、被検成分に近い保持時間を有し、クロマト
 619 グ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
 620 内標準物質として選ぶ。

621 一定量の内標準物質に対して標準被検試料を段階的に加え
 622 て、数種の標準溶液を調製する。それぞれの標準溶液の一定
 623 量を注入して得られたクロマトグラムから、内標準物質に対
 624 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。
 625 これらの比を縦軸に、標準被検成分量又は内標準物質質量に対
 626 する標準被検成分量の比を横軸にとり、検量線を作成する。
 627 この検量線は、通例、直線回帰で得られる。

628 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
 629 用いた標準溶液と同量の内標準物質を含む試料溶液を調製す
 630 る。検量線を作成したときと同じ条件でクロマトグラフィー
 631 をを行い、内標準物質に対する、被検成分のピーク面積又はピ
 632 ーク高さの比を求め、検量線から被検成分量を求める。

633 一点検量法

634 医薬品各条では、通例、検量線が直線となる濃度範囲の一
 635 つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、い
 636 ずれにも一定量の内標準物質を加え、同一の条件でクロマト
 637 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

638 める。

639 5.3. 面積百分率法

640 ピークの直線性が示されれば、医薬品各条では被検成分
 641 のパーセント含量は、溶媒、試薬、移動相又は試料マトリッ
 642 クスから生じるピークや、判別限界又は報告の閾値以下のピ
 643 ークを除いた、全てのピーク的面積の総和に対する、それぞ
 644 れのピーク面積の百分率で求められる。

645 6. その他の留意事項

646 6.1. 検出器の応答

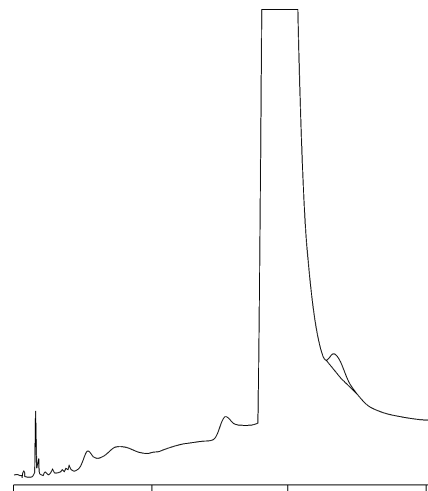
647 検出器の感度は、検出器に入る移動相中の物質の単位濃度
 648 又は単位質量あたりのシグナル出力である。相対的な検出器
 649 の応答係数(通例、レスポンス係数と呼ぶ)は、ある物質の標
 650 準物質に対する検出感度を表す。感度係数は、応答係数の逆
 651 数である。類縁物質試験では、医薬品各条に示された感度係
 652 数は常に適用される(すなわち、応答係数が0.8 ~ 1.2の範囲
 653 外の場合)。

654 6.2. 妨害ピーク

655 溶媒、試薬、移動相、試料マトリックスに由来するピーク
 656 は除外する。

657 6.3. ピークの測定

658 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、
 659 通例、タンジェントスキムによる(図2.00-9)。



660

661 図2.00-9

662 6.4. 報告の閾値

663 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
 664 や、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
 665 は、適切な報告の閾値及びピーク面積を積分するための適切
 666 な条件を設定することが重要になる。そのような試験では、
 667 報告の閾値、つまり、不純物量がその値を超えると報告が必
 668 要とされる限度値は、一般に0.05%である。

669

670