

令和3年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 クロマトグラフィーによる医薬品分析の国際調和*2

加藤 くみ子*1

International Harmonization of Drug Analysis Using Chromatography*2

Kumiko SAKAI-KATO*1

Summary

The harmonised general chapter Chromatography was signed-off by the Pharmacopoeial Discussion Group (PDG) in September 2021. One of the main topics is the harmonization of terminology, definitions and interpretation of chromatograms. In this study, some terms which had not been included in the version <2.01> were examined.

Key words

Chromatography, Harmonization, Terminology

1 緒言

クロマトグラフィーは、固定相と移動相からなり、試料中の各成分を固定相や移動相への親和性の違いにより分離する方法である。日本薬局方へのクロマトグラフィーの取載の変遷を Table 1 に示した。第七改正（厚生省告示第76号 昭和36年4月1日）で「33. ろ紙クロマトグラフ法」が新規取載された。第八改正（厚生省告示第73号 昭和46年4月1日）で「4. ガスクロマトグラフ法」及び「24. 薄層クロマトグラフ法」が新規取載された。第十改正（厚生省告示第49号 昭和56年4月1日）で「3. 液体クロマトグラフ法」が新規取載され、装置、操作法、内部標準法、絶対検量線法に関する内容が記述された。液体クロマトグラフ法には、第十一改正（厚生省告示58号 昭和61年3月28日）で条件調整に関しての文言が追加され、第十三改正（厚生省告示73号 平成8年3月13日）で用語の解説が追記さ

れている。第十五改正（厚生労働省告示第285号平成18年3月31日）で現在の試験法番号に整備され、試験法の名称も「〇〇クロマトグラフ法」から「〇〇クロマトグラフィー」に改められている。現第十八改正日本薬局方では、クロマトグラフィー関連試験法は、〈2.01〉液体クロマトグラフィー、〈2.02〉ガスクロマトグラフィー、〈2.03〉薄層クロマトグラフィー、〈2.04〉タンパク質のアミノ酸分析法、〈2.05〉サイズ排除クロマトグラフィーと整理されている。

クロマトグラフィーの国際調和は2009年より日米欧三薬局方検討会議（PDG）において議論が進められ、2021年9月に調和合意された。調和試験法は、〈2.00〉クロマトグラフィー総論として第十八改正日本薬局方第一追補（JP18-1）に取載される予定である。〈2.00〉には、現行の一般試験法〈2.01〉液体クロマトグラフィーには記載のない、新しい用語が定義されている。また、現行の〈2.01〉に記載さ

*1 北里大学薬学部 東京都港区白金5-9-1 (〒108-8641)

School of Pharmacy, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

*2 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和3年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである。

Table 1 日本薬局方へのクロマトグラフィーの収載

改正	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ろ紙クロマトグラフ	→								
ガスクロマトグラフ	→								ガスクロマトグラフィー
薄層クロマトグラフ	→								薄層クロマトグラフィー
液体クロマトグラフ	→							液体クロマトグラフィー	

れている用語と内容が一部異なる用語もある。本研究では、これらの用語やその定義を調査・整理し、国際調和試験法の理解に活かすことを目的とする。

2 <2.00>におけるクロマトグラフィー関連用語の定義

<2.00>では、JP18の<2.01>に記載されている用語を含む約25の用語が定義されることになる。各種クロマトグラフィーに共通の用語のほかに、サイズ排除クロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーに特有の用語も定義されている。サイズ排除クロマトグラフィーは欧州医薬品庁で既収載であるが、日本薬局方では未収載であった。そのため、<2.00>に記載の用語を取り入れる形で、<2.05>サイズ排除クロマトグラフィーがJP18に新規収載された。また、<2.03>薄層クロマトグラフィーも<2.00>に記載の用語を取り入れるとともに、試験内容もより詳細に記載されて改正される予定である¹⁾。

2.1 新たな用語

<2.00>で新たに定義された主な用語は、グラジエント遅延容量 (D)、ホールドアップタイム (t_M)、ホールドアップボリューム (V_M)、保持比 (r)、ホールドアップタイムでの補正なしの保持比 (r_G)、相対保持時間 (RRT)、保持係数 (k 、<2.01>では質量分布比)、保持容量 (V_R)、理論段高さ (H)、換算理論段高さ (h) である (Table 2)。

これらの概要を記す。

① グラジエント遅延容量 (dwell volume) (D)

移動相の混合箇所からカラムの入り口までの容量で、<2.00>には、グラジエント遅延容量の測定方法が記載されている。現時点で日本薬局方の医薬品各条にはグラジエント遅延容量の記載はないが、USPでは、例えばEntecavirの定量の移動相条件に記載がある^注。

装置によりグラジエント遅延容量が異なることで、規定した分離能、保持時間及び保持比に影響する可能性がある。<2.00>「4. クロマトグラフィー条件の調整」では、グラジエント条件でグラジエント遅延容量の違いに応じ、グラジエント勾配表に記載された時間の調整法が記載されている。

② ホールドアップタイム (t_M) 及びホールドアップボリューム (V_M)

カラムに保持されない成分の溶出に必要な時間をホールドアップタイム (t_M) という。また、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をホールドアップボリューム (V_M) という。<2.01>では、移動相のカラム通過時間 t_0 ($k=0$ の物質の注入時からピーク頂点までの時間) と表記されていたパラメーターになる。

③ 保持比 (r)

ホールドアップタイムで補正した被検成分ピークと標準成分ピークの保持時間の比を保持比という。

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

t_{Ri} = 被検成分のピークの保持時間

t_{Rst} = 標準成分のピークの保持時間 (通常試験され

注 グラジエント溶離時間についてグラジエント遅延容量をおよそ1.0mLとして、HPLCシステムが設定されている²⁾。

Table 2 クロマトグラフィー関連用語の比較

2.00 クロマトグラフィー総論	改正前の 2.01 液体クロマトグラフィー
クロマトグラム	
グラジエント遅延容量 (D) (V_D とも呼ばれる)	
ホールドアップタイム (t_M)	
ホールドアップボリューム (V_M)	
ピーク	
ピークバレー比 (p/v)	ピークバレー比 (p/v)
理論段高さ (H) (同義語:理論段相当高さ (HETP))	
理論段数 (N)	理論段数 (N)
換算理論段高さ (h)	
保持比 (r)	
ホールドアップタイムでの補正なしの保持比 (r_G) 又は相対保持時間 (RRT)	
分離度 (R_S)	分離度 (R_S)
保持係数 (k)	質量分布比 (k)
保持時間 (t_R)	
保持容量 (V_R)	
分離係数 (α)	分離係数 (α)
SN 比 (S/N)	SN 比 (S/N)
シンメトリー係数 (A_S)	シンメトリー係数 (S)
システムの再現性 (相対標準偏差 (%RSD) で表される)	相対標準偏差 RSD (%)

る成分に対応するピーク)

t_M = ホールドアップタイム

④ ホールドアップタイムでの補正なしの保持比 (r_G)

日本薬局方の医薬品各条で用いられている「相対保持時間 (RRT)」に相当する。次の式で表される。

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

t_{Ri} = 被検成分のピークの保持時間

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対応するピーク)

⑤ 保持係数 (k)

保持係数は以下の式で与えられ、質量分布比 (D_m) 又は、キャパシティファクター (k') とも呼ばれる。〈2.01〉では、「質量分布比」と記載されていた。

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

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

具体的には、 k はクロマトグラムを用いて

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

t_R = 保持時間

t_M = ホールドアップタイム

から算出できる。

なおこの式は、 $t_R = (1 + k) t_M$ と変形でき、同様の式は〈2.01〉に記載されていた。

k は、移動相に存在する溶質量に対する固定相に存在する溶質量の比であり、各成分に固有の値で、この値が小さい化合物ほど、固定相に保持されにくく、速やかにカラムから溶出する³⁾。

⑥ 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

で、保持時間と流量を用いて次の式より計算できる。

$$V_R = t_R \times F$$

t_R = 保持時間

F = 流量 (mL/分)

⑦ 理論段高さ (H)

理論段高さ (H) は、理論段相当高さ (HETP) とも呼ばれ、カラムの長さ (L) (μm) と理論段数 (N) の比である。

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

理論段高さは、1理論段当たりに必要なカラム長を表している。通例、単位は μm で表す。 H の値が小さいことは、カラム効率のよいカラムであり、理論段数 N の大きなカラムを意味する。したがって、分析法を開発する際に、試料の分離には、小さい H 値と大きい N 値が得られる条件を設定する³⁾。また、カラムの長さが長いほど理論段数も大きくなるため、理論段高さを用いて長さの異なるカラムの効率を比較する際に有用である。

具体的にはアセチルシステイン (*N*-acetyl-L-cysteine) の分析事例で示す。日本薬局方医薬品各条に記載されている「アセチルシステイン」の類縁物質の試験法条件を参考にした⁴⁾。

試験条件

試料：10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *N*-acetyl-L-cysteine (富士フィルム和光純薬株式会社・特級)

HPLCシステム：Shimadzu LC-2060C (株島津製作所)

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：220nm)

カラム：

① InertSustain C18 5 μm 4.6 \times 250mm (ジーエルサイエンス株)

② Inertsil ODS-3 5 μm 4.6 \times 100mm (ジーエルサイエンス株)

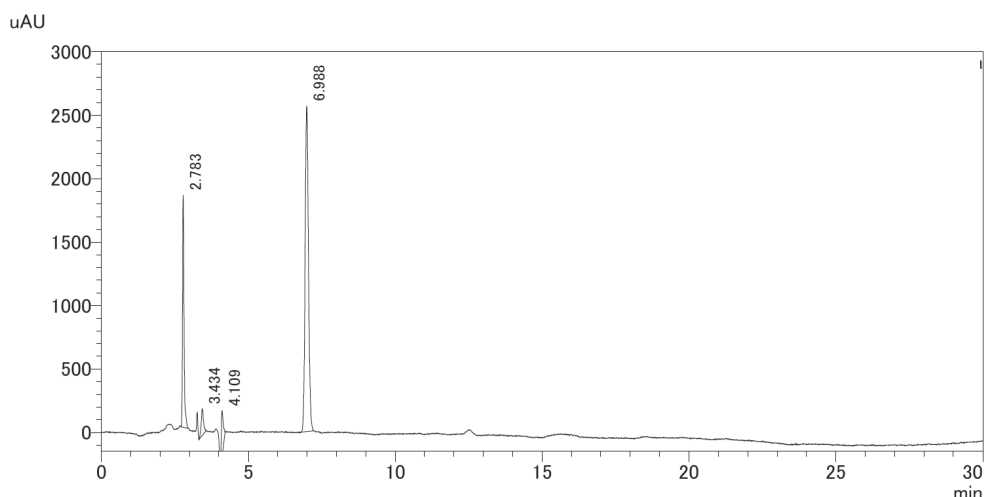
カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：薄めたリン酸 (1 \rightarrow 2500) / アセトニトリル混液 (19 : 1)

流量 0.9 mL/min

注入量：10 μL

代表的なクロマトグラムをFig. 1に示す。粒子径5 μm 、内径4.6 cm、カラム長25 cmのODSカラムを使用し、アセチルシステインのピーク理論段数及びシンメトリー係数は、Table 3に示す通りであった。医薬品各条に記載のシステム性能の要件は、それぞれ15000段以上、1.5以下となっており、この値を参考にすると適切なカラム効率を有していると考えられる。同様の試験を粒子径5 μm 、内径4.6 cm、カラム長さ10 cmのODSカラムで分析すると、Table 3に示す通り、理論段数は25 cmと比較して半分以下



HPLC条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：220nm)

カラム：InertSustain C18 5 μm 4.6 \times 250mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：薄めたリン酸(1 \rightarrow 2500)/アセトニトリル混液(19 : 1)

Fig. 1 アセチルシステインの代表的なクロマトグラム

Table 3 カラムのピーク性能

カラム長	シンメトリー係数 (A_s)	理論段数 (N)	理論段高さ (H)
25 cm	1.12	17931	13.9
10 cm	1.08	7956	12.6

 $n = 6$

に低下し15000段以上ではない。医薬品各条に記載の試験条件であるカラム長さ25 cmを、システム適合性試験で規定されている理論段数15000段で割った値は16.6 μm であるので、理論段高さは16.6 μm 以下に相当する。本研究で得られた結果は、Table 3に示す通り、25 cmカラムで13.9 μm 、10 cmカラムで12.6 μm と同様の値でいずれも16.6 μm 以内であった。このように、理論段高さでカラム効率を表すことにより、カラム長の影響を排除できる。

⑧ 換算理論段高さ (h)⁵⁾

理論段高さ (H) (μm) と粒子径 (d_p) の比 (μm) で、次の式で表される。

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

換算理論段数は、カラムの長さや粒子径に関係なくカラム効率を比較するのに役立つ、無次元パラメーターである。

2.2 調和試験法の収載により〈2.01〉から内容が一部変更となった用語

〈2.01〉の「8. 用語」に記載されていた用語の中で、定義が一部変わるのが、①S/Nの算出に用いるブランクの取り方、及び②理論段数の適用範囲である。また、〈2.00〉の「2. 定義」に記載はないが、③感度係数の設定範囲も変わることになる。

① SN比 ($S/N = 2H/h$) : H 、標準溶液から得られたクロマトグラム中の被験成分のピーク高さ : h 、ブランクを注入後に得られたノイズ幅

計算法は〈2.01〉から変更はないが、分母の h は、〈2.01〉「8. 用語」では、「対象物質のピークの前後における試料溶液又は溶媒ブランク」となっていたが、今後は h の取得は「ブランク」つまり「溶媒ブランク」の使用のみとなる。

② 理論段数自身の計算方法は〈2.01〉から変わらないが、理論段数は、恒温、アイソクラティック条件下で得られたデータによって求めることができ

る⁶⁾。したがって、グラジエント法では理論段数の規定はできない。

③ 感度係数は、〈2.01〉の「8. 用語」に記載はなかったが、原案作成要領には、「感度係数が0.7 ~ 1.3の範囲を超える場合には補正する。」とある。〈2.00〉では、「6. その他の留意事項 6.1. 検出器の応答」に「応答係数」つまり検出器からのレスポンスの比が記載され、「感度係数は、応答係数の逆数である。」と定義されている。〈2.00〉には、応答係数が0.8~1.2の範囲外の場合に適用されるとあるが、感度係数に変換すると、これまでの感度係数0.7 ~ 1.3の範囲とは異なるので注意が必要である。

なお、定義や算出法は変わっていないが、〈2.01〉では、シンメトリー係数はSで示されていたが、〈2.00〉では A_s と表記する。

2.3 サイズ排除クロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーに特異的な用語

〈2.00〉には、サイズ排除クロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーに特異的な用語も収載されている (Table 4, 5)。

Table 4 サイズ排除クロマトグラフィーに特異的な用語

2.00 クロマトグラフィー総論
分配係数 (K_0)
カラムに保持されない物質の保持時間 (t_0)
カラムに保持されない成分の保持容量 (V_0)
完全浸透する物質の保持時間 (t_f) (Total mobile phase time (t_f))
完全浸透する物質の保持容量 (V_f) (Total mobile phase volume (V_f))

Table 5 薄層クロマトグラフィーに特異的な用語

2.00 クロマトグラフィー総論
相対保持比 (R_{rel})
R_f 値 (R_f)

2.3.1 サイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除クロマトグラフィーは固定相として用

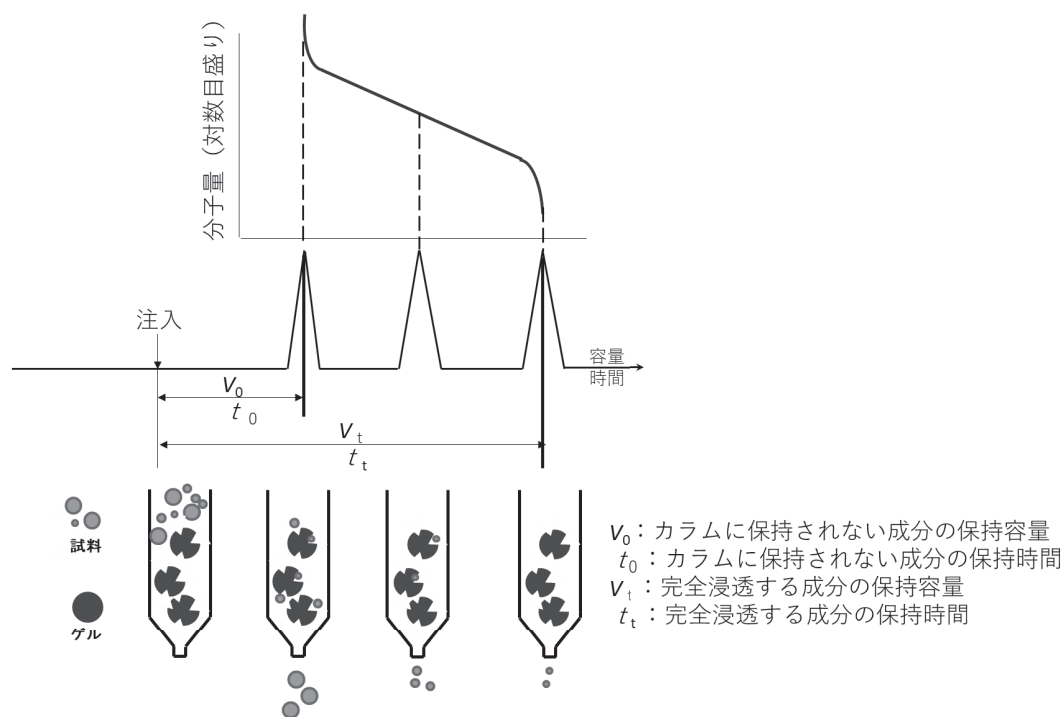


Fig. 2 サイズ排除クロマトグラフィーの概略

いる充填剤の細孔を利用して、サイズの大きいものから試料を順次分離する分析手法である (Fig. 2)。固定相と試料分子との相互作用がないことを原則とする。カラムにサイズの異なる混合試料を流した時、ゲルの細孔より大きいサイズの成分は細孔に入ることができないため、ゲルの外側を通過してカラムから溶出し、 V_0 (t_0) の位置にピークとして現れる。細孔に入ることができる成分はその大きさに応じて V_0 (t_0) と V_t (t_t) の間に現れる。そして、あるサイズより小さい成分 (一般的にはゲルの最小孔径よりも分子サイズが小さな成分) は一様に V_t (t_t) の位置に溶出する。

① 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。

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

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_t = 完全浸透する成分の保持時間

② カラムに保持されない成分の保持時間 (t_0)

サイズ排除クロマトグラフィーにおいて、ゲルの最

大孔より分子サイズが大きな成分の保持時間をカラムに保持されない成分の保持時間 (t_0) という (Fig. 2)。

③ カラムに保持されない成分の保持容量 (V_0)

最大ゲル孔より分子サイズが大きな成分の保持容量をカラムに保持されない成分の保持容量という (Fig. 2)。カラムに保持されない成分の保持時間と流量 (F : mL/分) を用いて以下の式により計算する。

$$V_0 = t_0 \times F$$

④ 完全浸透する成分の保持時間 (t_t)

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を完全浸透する成分の保持時間という (Fig. 2)。

⑤ 完全浸透する成分の保持容量 (V_t)

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を完全浸透する成分の保持容量という (Fig. 2)。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。

$$V_t = t_t \times F$$

2.3.2 薄層クロマトグラフィー

① 相対保持比 (R_{rel})

相対保持比は、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められる (Fig. 3)。

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

b = 被検成分の移動距離

c = 標準成分の移動距離

② R_f 値 (R_f)

R_f 値は、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 (Fig. 3).

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

b = 被検成分の移動距離

a = 溶媒先端の移動距離

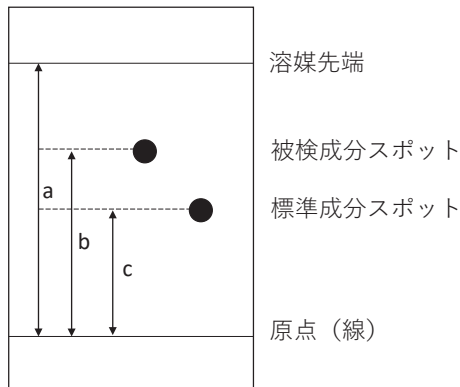


Fig. 3 薄層クロマトグラフィーの概略

3 まとめ

本研究では、調和試験法〈2.00〉に定義されたクロマトグラフィー関連用語について調査した。〈2.01〉や〈2.02〉も用語については〈2.00〉に従うこととなったため、新たに定義された用語や、内容が一部変わった用語が速やかに浸透することを望む。

文献

- 1) 〈2.03〉 薄層クロマトグラフィー. 日本薬局方フォーラム, 2022, 31 (3), p. 505-506.
- 2) Entecavir. USP-NF 2022. Issue 1, 2022, May 1.
- 3) 吉田秀幸, 巴山忠. パートナー分析化学II 改定第4版, 第3章分離分析, 2.液体クロマトグラフィー D定性・定量分析. 萩中淳, 加藤くみ子編集. 東京, 南江堂. 2021年.
- 4) アセチルシステイン. 第十八改正日本薬局方, 令和3年6月7日. 厚生労働省告示第220号.
- 5) Giddings, J.C. Reduced plate height equation: A common link between chromatographic methods. *J. Chromatography*, 1964, 13, p.301-304.
- 6) Meyer, R. Veronika. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Fourth edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2004.