

通信講座

社内実践教育及び自己研鑽に！

GMP；試験・検査要員及び開発研究者向け実用講座

HPLC及び紫外吸光光度法・蛍光分析法バリデーション

第 講座



指導講師 スペクトル解析支援センター
特級検査分析士 長谷川秀夫 薬学博士

< 主催 >

スペクトル解析支援センター

日本真空機器株式会社

〒174-0063 東京都板橋区前野町1-3-4

TEL：03-5914-0056 FAX：03-5914-0057

URL：http://www.jve.co.jp

GMP ; 試験・検査要員及び開発研究者向け実用講座

HPLC及び紫外吸光光度法・蛍光分析法バリデーション

指導講師 スペクトル解析支援センター 薬学博士 長谷川秀夫

本講座の主旨

分析機器は、技術の開発・進展に伴い測定値がデジタル化され、さらに装置内部がブラックボックス化されてきた。そして高感度検出が可能となり、試料を入れれば何らかの測定値が得られるようになってきた。

分析によって得られた計測値は、目的を持ったデータであるから商品設計、研究・開発、品質管理などに使用され、ある時は法律・規制の対象にもなり、また国際問題にもなりかねない。さらに計測された値は、数値としてデジタル化され歩きだし、そしてやがて走り出す。

本講座の目的は、機器分析法の基盤となっている分離・分析技法の内、汎用されるHPLC・分光分析法の基本的な原理・現象を実例に基づき理解し、分析法バリデーションを実施することにある。

本講座は、このような状況に対応するための分析法バリデーションに関する試験・検査要員及び開発研究者向けの実用講座である。

指導講師は、食品メーカーで五訂日本食品標準成分表基礎データの作成、天然物を含む多成分系の経腸栄養剤4品目及び新薬1品目の医薬品製造承認申請、試験方法の変更申請、栄養食品等の開発に続くその品質管理の実務を担当し、また過去には分析機器メーカーに在籍していた。

本実務講座は、その実務経験に基づく分析値の信頼性を確保するための教育講座である。

著書 ; " Q & Aでわかる 液クロトラブルシューティング " 丸善出版

目 次

第 講座

1. これだけは知っておきたい分光分析のポイント
 - 1.1. 吸光光度法の基礎知識
 - 1.1.1. 吸光光度法による定性・定量分析法の概要
 - 1.1.2. 光吸収と色
 - 1.1.3. 吸収スペクトル法による定性分析法（同一性確認）
 - 1.1.4. 吸収スペクトルによる定量分析法
 - 1.1.5. 吸光光度法の原理
 - 1.1.6. 吸収スペクトルの測定原理
<事例；吸光光度計における波長の校正>
 - 1.2. 蛍光光度法の基礎知識
 - 1.2.1. 蛍光光度法による定性・定量分析法の概要

1.2.2. 蛍光スペクトルと蛍光強度

1.3. 分光器の消耗品的部品

1.3.1. 分光器の消耗部品の動作原理及びその取扱・管理

1.3.1.1. 光源ランプ

1.3.1.2. 分光セル

2. 分析法バリデーション：Analysis validation

2.1. バリデーションの必要性：

2.2. 測定値の信頼性検証の必要性；バリデーションの必要性：

2.2.1. 如何にして信頼性ある定量値を得るか？

それには分析法バリデーションが必須である。

<測定ごとに異なるデータをどうみるか>

「精確さ：Accuracy」；真度、正確さ：Trueness と 精度：Precision

2.2.2. 信頼性の検証；分析法バリデーション

測定値の信頼性 「真度」・「精度」

- 1) 同定及び選択性・特異性の確認：Specificity
- 2) 感度・検出限界：Detection Limit
- 3) 定量限界：Quantitative Limit
- 4) 検量線の実用範囲：Range for calibration
- 5) 検量線の直線性：Linearity for calibration
- 6) 精確さ；真度/精度：Accuracy / Precision
- 7) 堅牢性（頑健性）：Robustness
- 8) 回収率：Recovery

2.2.3. 分析法バリデーションの種類・目的

2.2.4. 用語の定義、測定誤差と測定値の“ばらつき”

2.2.4.1. 用語の定義

- (1) 標準液・標準溶液
- (2) 試料調製・試料調整
- (3) 正確・精密

2.2.4.2. データの取扱

- (1) 有効数字（事例に基づく練習問題）
- (2) 標準偏差（手計算による標準偏差の算出による練習問題）

第 講座 [演習問題]

第 講座

1. HPLC分析法バリデーション（科学的根拠・妥当性の確認）

< 試料調製の重要性及び信頼性検証の必要性 >

「液クロ」カラムは、“生き物”に例えられる中で信頼性ある定量値を如何にして得るか？

高速液体クロマトグラフィ（High Performance Liquid Chromatography ; HPLC）、通称液クロは、溶液（移動相）を固定相の間に通すことにより、移動相と固定相間での成分の分配、吸着・脱離（吸脱着）現象によって、溶液中の各成分を分離・精製する技法である。

検体に対する前処理の簡便さと、注入から定量までが装置の組み合わせによって、自動的に行うことができるため、分析化学を始め多くの分野で使われている。

ところが、液クロは基本的な問題を抱えている。それは、移動相と固定相間での成分の分配、吸着・脱離（吸脱着）現象が環境の影響を受けやすく、測定ごと、さらに時間の経過とともに、カラム内での状態が刻々と変化するからである。この変化そのものが、液クロの特徴であり また条件を変化させることにより高い分離度で成分を分離・精製できることに繋がる。ゆえに“生き物”に例えられる。この本質の一つは、分離カラムのベースとなっているシリカゲル自身の構造特性に由来するとも考えられる。検体溶液中には、通常多くの未知成分が含まれている。分離カラムに最初の検体が注入された後、充填剤には未知成分の一部が吸着したままになっている。その吸着した未知成分が、分離カラム内の固定相・移動相間の分配係数を刻々と変化させる。2 回目の検体を注入時には、当然のことながら、分配係数が初回の注入時とは異なってくる。計測後、クロマトグラム上で信号が出なくなり、安定した状態と見えても、カラムからは充填剤に吸着した成分が溶出している。それにもかかわらず設定した条件では検出されていない、あるいは非常にブロードな信号となり見かけ上検出されていないだけの場合がほとんどである。