

# 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 ]

### 目 次

- 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>
  - 2. これだけは知っておきたいHPLCの基礎知識と基本原理
    - バリデーションの必要性 ;
    - 2.1. HPLCの基礎知識
      - 2.1.1. HPLCで使用される用語
      - 2.1.2. HPLCカラム内で起こっている分離現象 (液クロが “生き物” に例えられるわけ)
      - 2.1.3. 液クロで最も広範囲に応用・汎用されている順相系カラム及び逆相系カラムの概略
      - 2.1.4. 液クロの基本的用語の定義
    - 2.2. 液クロの定性と定量法の基本原理
      - 2.2.1. 定性分析 : Qualitative analysis
      - 2.2.2. 定量分析 : Quantitative analysis
        - 計測標準と計測のトレーサビリティ
        - 1) 絶対検量線法 : Absolute calibration method
        - 2) 内部標準法 : Internal standard method
        - 3) 標準添加法 : Standard addition method

3. これだけは知っておきたいHPLCの測定のポイント
  - 3.1. 標準溶液と試料溶液の測定環境を酷似させる
  - 3.2. 標準溶液と試料溶液の安定化を図る
  - 3.3. 有効数字の管理は、測定精度及び作業効率を向上させる
  - 3.4. 移動相には、常に精製度の高い溶液を使用する
  - 3.5. 「信号ピークの高さ」を比較する場合、信号の波形が完全に相似形であることを確認す
  - 3.6. 「信号ピークの面積」を比較する場合、信号の重なり及び信号のベースラインが明確であることを確認する
  
4. ~信頼性ある測定値を得るためには、何を確認すればいいのか？ ~  
 検体を具体的にどのように扱うか？
  - 4.1. 食品 と 医薬品： Foods and Medical supplies  
 食品と医薬品の区分・定義
  - 4.2. 信頼性ある測定値を得るためには、何を確認すればいいのか？  
 「設定した測定条件」の妥当性を検証する方法
    - 4.2.1. 医薬品製剤など構成成分が明確になっている検体
    - 4.2.2. 食品、生体成分など構成成分が明確になっていない検体
    - 4.2.3. 新規成分分析に対する分析法の設定  
 事例：食品中のメラミンの試験法について

## 第 講座 [ 演習問題 ]

### 目 次

#### 第 講座

1. HPLC 分析のノウハウ
  - 1.1. これだけは知っておきたいHPLCの測定時に発生し易いトラブルとその原因
    - 1.1.1. 2種類の溶液を混合する場合には、調整処方に従って忠実に調整する
    - 1.1.2. 移動相の流速に対するカラム内圧力の影響
    - 1.1.3. 移動相溶液中の気泡及び溶存ガスを適切に低減させる方法を用いた上で測定する
    - 1.1.4. 液クロでの気泡発生に伴う障害及び溶存酸素の影響
    - 1.1.5. 移動相中の溶存ガスの除去方法：脱気処理方法
  - 1.2. 『液クロ』トラブルシューティング Q & A  
 事例に基づく測定のポイント
    - 1.2.1. 標準溶液調製用の希釈溶媒が不適當であった事例  
 SOP；試薬の品質に関する事項；規格と製造ロット
    - 1.2.2. 標準溶液及び試料溶液を調製する溶媒の組成が不適當
    - 1.2.3. 分析カラムの性能劣化
  
2. 試薬の管理；試薬の品質に関する事項
  - 2.1. 規格と製造ロット（ヘキサン規格）
  - 2.2. 分析に対する妨害不純物の確認方法：ブランク試験
- 3.3. 測定用試料調製及び移動相溶液調整における基礎知識
  - 1) ガラス電極 pH 計の 原理及び pH 標準液
  - 2) 計測機器及び物理・化学的試験に使用されるガラスの一般特性

## 第 講座 [ 演習問題 ]