

# Application Note

島津アプリケーションノート No.3(医薬)



Medicine

## 洗浄バリデーションをトータルサポートする 島津の分析機器のご紹介

河野慎一      山口忠行      田中美奈子      山部恵子      橋本紅良      合田隆大  
S.KAWANO    T.YAMAGUCHI    M.TANAKA      K.YAMABE      A.HASHIMOTO    T.GODA

### 1.はじめに

医薬品製造において品質管理・安全性の確保は最も重要な要件です。製造設備の洗浄は、製造設備での薬物の交叉汚染、異物の混入を防止するのが目的です。GMPにおけるバリデーション基準では洗浄バリデーションの実施が規定されています。洗浄は製造に適した方法を各医薬品製造業者がその妥当性を評価・実施するのが実情であり、画一的なものではありません。洗浄バリデーションに用いる分析法は、目的を達成できる方法であり、分析する残留物などが限度値以下となる場合でも十分な検出感度を持つことが検証されなければならないとされています。洗浄を評価する分析機器としては全有機体炭素計(TOC)、高速

液体クロマトグラフ(HPLC)、紫外可視分光光度計(UV)が一般によく用いられています。測定対象は医薬品成分や洗剤などです。製造品目、許容水準などによって使用される機器は異なりますが、これらを単独で、あるいは組み合わせて分析が行なわれ、分析結果によって次の作業が実行されます。分析機器を接続したネットワークの構築は電子記録/電子署名規制への対応はもちろん、利便性を高めてお客様の業務を強力に支援します。ここでは洗浄バリデーションの概要を簡単にご説明し、残留物の許容基準について、また、洗浄バリデーションに適した分析機器・ソフトウェアをご紹介します。

## 2.GMPにおける洗浄のバリデーション

GMPにおけるバリデーションとは、製造所の構造設備ならびに手順、工程その他の製造管理および品質管理の方法が、期待される結果を与えることを検証し、これを文書とすることをいいます。バリデーションの実施対象には「洗浄等の作業」の他、「製造工程」と「製造を支援」するシステムが含まれます。「洗浄等の作業」のバリデーションは、当該作業を実施することにより製品への汚染及び交叉汚染を十分防止できることを保証することを目的とします。

バリデーションは(1)当該製造所において新たに医薬品の製造を開始する場合、(2)製造手順等に製品の品質に大きな影響を及ぼす変更がある場合、(3)その他製品の製造管理及び品質管理を適切に行うために必要と認められる場合に実施することが求められています。

GMPにおいて、洗浄のバリデーションと、その結果に基づく洗浄手順の策定は、①責任者および担当者

の配置、②手順書の作成、③実施計画書の作成と品質部門への報告、④バリデーションの実施、⑤結果の判定と期待される結果達成の確認、⑥結果の品質部門への報告、⑦結果に基づく衛生管理基準書・製品標準書の作成・改訂、⑧衛生管理基準書・製品標準書に基づく関係者への教育訓練、⑨製造指図書や手順等に従った洗浄作業の実施と記録の作成、⑩洗浄作業の記録を含む製造管理記録の確認と文書による品質部門への報告という段階を経て実施されます。文書の保管期間は通常、手順書や実施計画書については使用しなくなった日から、実施記録等については作成の日から5年間、あるいは当該手順書や記録などに係る製品の有効期間に1年を加算した期間のどちらか長いほうと定められています。生物由来医薬品についてはその製品特性に応じてより長い期間の保管が求められています。

## 3.洗浄バリデーションにおける残留許容基準の設定

医薬品および原薬(API)には、前に製造した医薬品および原薬(API)や洗剤、微生物、浮遊微粒子、ほこり、潤滑剤、原材料、中間体、助剤などのほか、洗浄作業による分解物(製品残渣あるいは洗剤)などの様々な物質が混入することがあります。残留物又は汚染物の限度値は、最も毒性のある又は製品の品質に最も影響を及ぼす残留物又は汚染物に基づいたもの

とすることが必要です。

残留許容基準の設定に関しては、何らかの根拠が存在すること、基準値未滿の測定が可能であることなどが満たされなければなりません。一般に以下に示す4つの設定方法が知られています。実際には各製造者の判断により最も適した方法が用いられているのが現状です。

### 3-1 最大無作用量(NOEL: no-effect level)からの許容基準による設定方法

信頼性のある毒性試験により、NOEL(化学物質の毒性試験で、複数の容量段階で動物への毒性を観察したとき、有害、無害を含めた影響が認められない最高の暴露量)が得られている場合には、これを補正し

て算出された一日許容暴露量であるPDE(permitted daily exposure, 一日許容暴露量)値から次製品への残留許容量を科学的に計算することが可能となります。

PDE 値は「医薬品の残留溶媒ガイドライン」で使用されていますが、動物から得られたNOELをヒトに対するPDE 値に補正するために、動物の種別や毒性、毒性

$$\text{PDE 値} = (\text{NOEL} \times \text{標準体重}) / (\text{F1} \times \text{F2} \times \text{F3} \times \text{F4} \times \text{F5})$$

続いて残留物が次製品に均一に含有されると仮定して、そのPDE 値と次製品のバッチサイズ及び投与量

$$\text{残留許容総量} = (\text{PDE 値} \times \text{次製品のバッチサイズ}) / (\text{次製品の日最大投与量})$$

試験の期間などを考慮する様々な係数(F1~F5)を用いて補正を行います。

を用いて、設備器具(装置、機器及び部品)への残留許容総量を計算します。

### 3-2 0.1%投与基準による設定方法

治験薬(治験原薬)などは、安全性(最大無作用量のNOEL または最小作用量のLOEL)が明確でなくPDE 値が計算できないことが多いため、この基準がよく適用されます。

$$\text{残留許容総量} = (\text{有効成分(残留成分)の日あたりの最小投与量} \times 0.1\% \times \text{次製品のバッチサイズ}) / (\text{次製品の日最大投与量})$$

PDE 値のかわりに、有効成分(残留成分)の日当たりの最小投与量の0.1%濃度を使用します。

### 3-3 10 ppm基準による設定方法

0.1%基準と同様に、治験薬(治験原薬)などで安全性(最大無作用量のNOEL または最小作用量のLOEL)や一日の投与量が明確でなくPDE 値から残留物の許容総量を計算することができない場合などに、この基準が適用されます。PDE 値のかわりに、投与量

$$\text{残留許容総量} = 10 \text{ ppm} \times \text{次製品のバッチサイズ}$$

にかかわらず 10 ppm とするもので、食品中での許容可能な汚染に対する過去の限度を応用しています。多くの場合はNOEL からの許容基準や0.1%投与基準などの方法よりも厳しい基準が設定されます。

### 3-4 目視基準による設定方法

目視による確認は従来よく行なわれてきました。一般に目視で観察できるレベルは100 µg/4 inch<sup>2</sup>程度といわれていますが、適切な感度を得られるのであれば、機器分析に代えることができます。ただし、観察者による評価のばらつきが生じないよう適切な措置(計画的に教育訓練を行なうなど)をとる必要があります。

この他、特定のアレルギー性の成分(ペニシリン、セファロsporin、または活性の高いステロイドや細胞毒性物質)については、適用可能な最良の分析方法で検出限度以下でなければならないとされており専用工場での製造が推奨されます。また専用設備においても、残留物の劣化などを考慮して、定期的に洗浄を確認する必要があります。

#### 参考文献

1) 原薬・製剤 洗浄バリデーション及び具体的な洗浄方法 サイエンス&テクノロジー株式会社

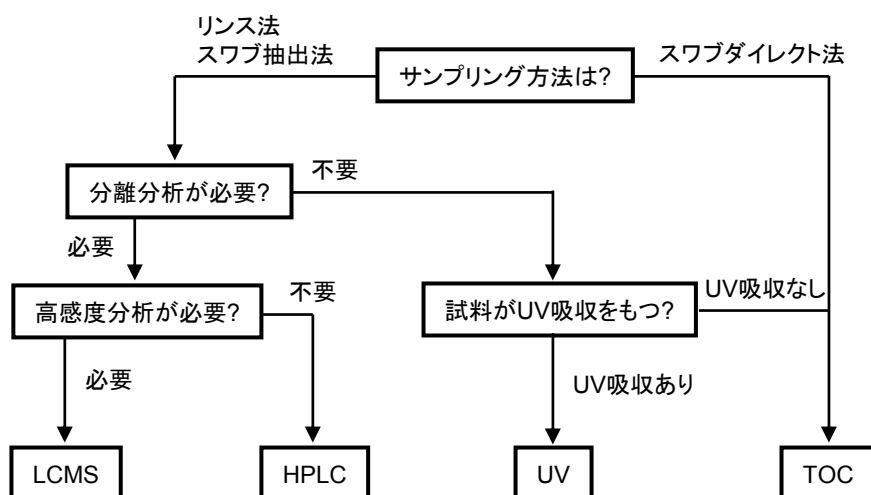
## 4. 洗浄バリデーションにおける分析方法と分析機器

洗浄バリデーションにおいて、分析機器は製造設備への残留物の定量分析を行うために用いられます。様々な分析機器の中から目的に合致した分析法、装置を選定し使用しなければなりません。洗浄バリデーションによく使用されている TOC, HPLC, UV をご紹介いたします。また、高感度という観点から今後普及

が見込まれる LCMS についても解説いたします。特に分析機器を複数台使用する場合、ネットワークの構築がデータの管理上非常に有効です。これを目的として開発されたソフトウェア CLASS-Agent についてもご紹介いたします。

洗浄バリデーションに使用される島津分析機器の特長

装置	製品名	特長	本文記載頁
全有機体炭素計(TOC)	TOC-V SSM-5000A (固体試料燃焼装置)	測定の迅速性 簡便な操作性 濃縮や抽出等の前処理は不要	p. 5 - 7
高速液体クロマトグラフ(HPLC)	Prominence Prominence UFLC	定量精度が高い 分離分析が可能 拡張性が高い 試料のオンライン濃縮が可能	p. 8 - 14
紫外可視分光光度計(UV)	UV-1800	簡便な操作性 測定の迅速性 省スペース	p. 15 - 18
液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS)	LCMS-2020	高感度 分離分析が可能 拡張性が高い	p. 19 - 22



洗浄バリデーションに使用される装置選択の目安

## 4-1 全有機体炭素計(TOC)



### 4-1-1 測定原理

全有機体炭素測定法(TOC 法)は、酸素や水素などと結合して有機化合物を構成している炭素の量を測定する方法であり、一般的に、有機物を酸化分解することで、そこに含まれる炭素から生成される二酸化炭素を定量し、その値から試料中に存在する全有機体炭素(TOC)の量を求めます。

有機物の炭素を二酸化炭素に酸化させる酸化分解の方法には、有機物を燃焼により分解する燃焼酸化分解方式や、有機物を紫外線照射または酸化剤を添加することにより分解する湿式酸化分解方式があります。また、二酸化炭素を定量する方法には非分散形赤外線式ガス検出法 NDIR(=Non-dispersive infrared detector) や導電率検出法があり、島津 TOC-V 計にも採用している NDIR 方式は、二酸化炭素の選択性に優れ、試料中の他の共存成分による干渉を受けにくく長期安定性

に優れています。

試料中には酸素や水素などと結合して有機化合物を構成している炭素(全有機体炭素:TOC)と、無機化合物の構成元素であり炭酸物質として存在する炭素(無機体炭素:IC Inorganic Carbon)があり、これらを合わせたものを全炭素(TC:Total Carbon)と呼びます。TOC を求める方法には酸性化通気処理法(NPOC 法)と引き算法(TC-IC 法)の2通りがあります。酸性化通気処理法(NPOC 法)では、試料に酸を加え、通気処理し試料から IC を除去し、試料に残る TOC を測定して TOC 値を求めます。引き算法(TC-IC 法)では、試料の TC と IC を各々測定しその差から TOC を求めます。TC-IC の測定では、TC に占める IC が大きいと TOC の誤差がおおきくなるため、一般的に前者の酸性化通気処理による TOC 測定法が広く採用されています。

### 4-1-2 サンプルング法とTOC法による洗浄バリデーション

測定原理からもわかるように洗浄バリデーションで TOC 計を使用すると、残留物の成分を特定しないで有機炭素量総量として測定しますので、洗剤や予期しない汚染物質などあらゆる有機残留物を検出することができます。

TOC 法で洗浄バリデーションする場合には、サンプルング法の違いにより3種類の方法があります。

#### ①リンスサンプルングーTOC 測定法

製造装置を洗浄した後の最終リンス液を試料とし

TOC を測定する方法です。この方法では水に溶けない残留物はサンプルングできませんので、適用範囲を検討する必要があります。

#### ②スワブサンプルングー溶媒抽出ーTOC 測定法

製造装置内部をスワブ材で拭き取り、その付着物を溶媒に抽出して TOC を測定する方法です。TOC 法では、溶媒には有機性溶媒は使えず純水を使用するため、リンスサンプルング法と同様に水に溶けない残留物は検出できませんので、適用範囲を検討する必要があります。

### ③スワブサンプリングー直接燃焼炭素測定法

Fig.1にスワブサンプリングー直接燃焼炭素測定法の手順例を示します。製造装置内部をスワブ材で拭き取り、拭き取ったスワブ材をセラミックス製の試料ポートに載せて、そのまま島津固体試料燃焼装置SSM-5000AのTC測定部の燃焼炉に入れ、付着物をスワブ材ごと燃焼させ、炭素量を測定する方法です。この方法ではスワブ材そのものを燃焼させて炭素を測

定するため、スワブ材には炭素が含まれない石英ろ紙を使用します。スワブサンプリング法は残留物を物理的に拭き取り採取することができますので水に溶けない残留物の検出もでき、また溶媒抽出する必要がないため、迅速・簡便に測定できます。この方法で測定されるのは全炭素量(TC)ですが、許容限度値以下を判定するという意味においては、TOC量の測定と同等とみなすことができます。

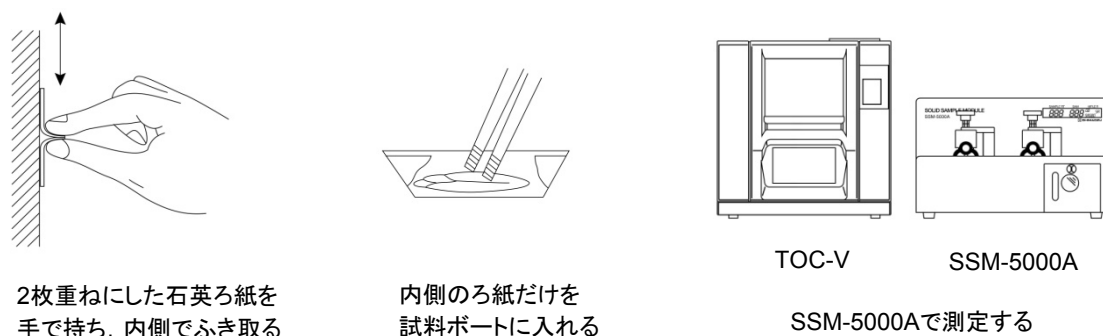


Fig. 1 スワブサンプリングー直接燃焼炭素測定法による残留物評価の手順

### 4-1-3 TOC測定例

スワブサンプリングー直接燃焼炭素測定法における薬物成分トラネキサム酸と製造設備の洗剤のスワブ回収率試験を紹介します。

まず薬物成分であるトラネキサム酸の水溶液と洗剤Aについて島津固体試料燃焼装置SSM-5000Aで炭

素濃度を測定しました。トラネキサム酸は163.6 mgを純水100 mLに溶解させて1000 mgC/L溶液を調製し洗剤Aは1 mLを純水で100 mLに溶解させて1%溶液を調製し、これらの溶液をSSM-5000Aで濃度測定したところTable 1のようになりました。

Table. 1 固体試料燃焼装置SSM-5000Aによる濃度測定結果

試料名	TC測定値[mgC/L]
1000 mgC/L トラネキサム酸溶液	964.6
1%洗剤A溶液	1310

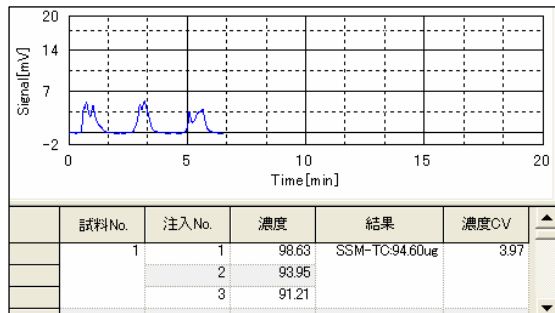
次に、これらの溶液を清浄なガラス板に展開し、それを加熱処理した石英ガラスろ紙でふき取り、試料ポートに置いてSSM-5000A炭素濃度を測定し回収率試験をしました。その結果がTable 2, Fig. 2です。ふき取り操作によるブランクを測定するため純水を同様に添

加してふき取り測定しましたが、ブランクはゼロでした。

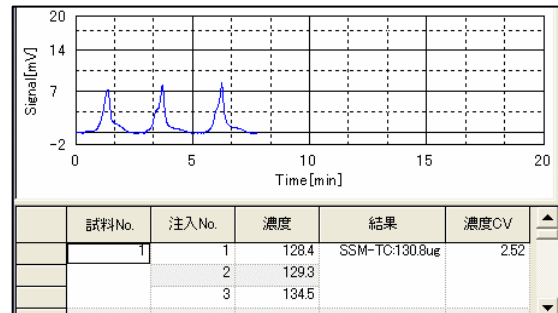
トラネキサム酸と洗剤Aのどちらもスワブ回収率は95%以上あり、TOC計を用いたスワブサンプリングー直接燃焼炭素測定法は製造設備の洗浄確認に有効な方法であることがわかります。

Table. 2 SSM-5000Aによるスワブサンプリングー直接燃焼炭素測定による回収率試験結果

試料名	TC測定値[ $\mu\text{gC}$ ]	理論値[ $\mu\text{gC}$ ]	回収率 (TC測定値/理論値)
ブランク(純水)	0	0	-
1000 mgC/L トラネキサム酸溶液	94.6	96.5	98.1 %
1%洗剤A溶液	130.8	131.0	99.8 %



トラネキサム酸溶液測定データ



洗剤A溶液測定データ

Fig. 2 回収率試験結果データ

### 測定条件

分析計 : 島津全有機体炭素計 TOC-V<sub>OPH</sub> + 固体試料燃焼装置 SSM-5000A

測定項目 : TC

スワブ材 : ADVANTEC 石英ガラスろ紙 QR-100(サイズ 45 mm)を 600 °Cで 15 分加熱処理したもの

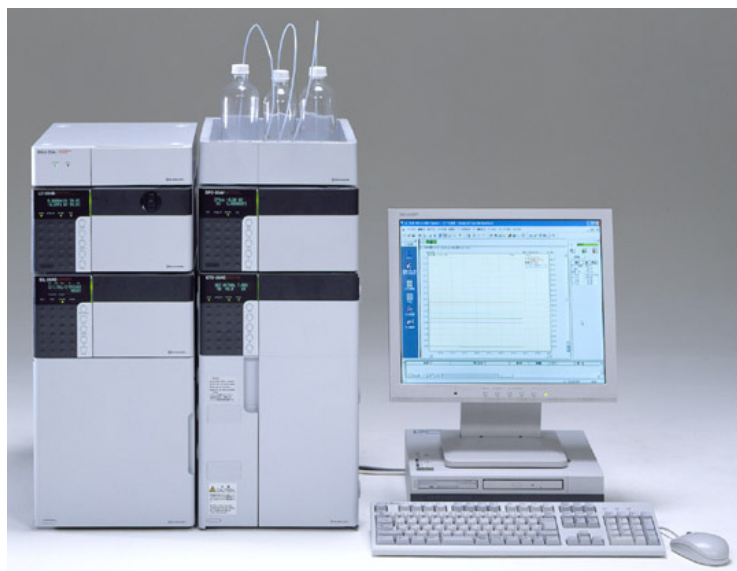
測定方法 : 試料溶液 100  $\mu\text{L}$  を 5 cm  $\times$  5 cm のガラス板に展開し, 400  $\mu\text{L}$  純水で湿らせたスワブ材でふき取り, スワブ材ごと燃焼測定

検量線 : 1%C グルコース水溶液 30  $\mu\text{L}$  (=300  $\mu\text{gC}$ ) で校正

### 参考文献

- 1) 原薬・製剤 洗浄バリデーション及び具体的な洗浄方法 サイエンス&テクノロジー株式会社
- 2) 島津アプリケーションニュース No.035 SSM-5000A による洗剤残留物のスワブ/直接燃焼炭素測定 (洗浄バリデーションへの適用)

## 4-2 高速液体クロマトグラフ(HPLC)



## 4-2-1 HPLCとは

## 4-2-1-1 HPLC法の原理

高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）とは、混合物試料を各成分に分離し、得られた結果（クロマトグラム）から定性分析（どのような成分が含まれているか）、または定量分析（目的の成分の濃度や量はいくらか）するための分離分析法の一種です。

HPLC による分離には、円筒形の筒に微細なシリカゲルや樹脂等の充てん剤を密に詰めた「カラム」と呼ばれる分離管が用いられます。このカラムに「溶離液」

（別名 移動相）と呼ばれる液体を連続的に通液し、平衡状態に達したところで混合物試料をカラムに導入すると、充てん剤に吸着（保持）されて溶出されにくい成分や、充てん剤に吸着されずに溶離液の流れに乗って溶出される成分など、成分によってカラム内の滞在時間に差が生じます。この原理を利用したものが HPLC による分離となります。分離の程度は溶離液の組成や流速、カラム温度によって制御することができます。

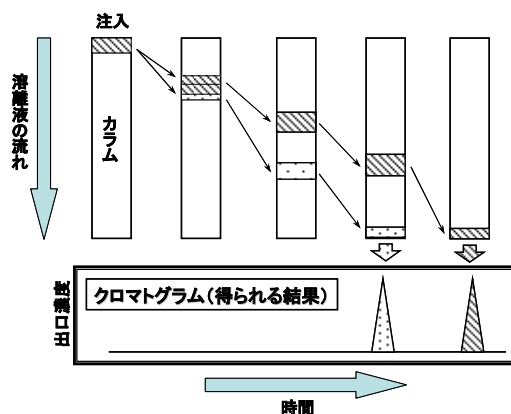


Fig. 3 分離の過程とクロマトグラム



Fig. 3 には分離の過程とクロマトグラムの模式図を示しました。

一般に、ある一定条件下では成分毎の溶出時間がそれぞれ一定となるため、溶出時間からその成分

が何であるかを推定(定性)することができ、また得られたクロマトグラムのピーク面積値からは、混合物試料に含まれる各成分の量を算出(定量)することができます。

## 4-2-1-2 HPLCの構造

代表的な HPLC 装置の流路図を Fig. 4 に示します。上流から順に、溶離液を入れる「溶離液槽」、溶離液を送液するための「ポンプ」、試料溶液を導入するための「試料導入装置」、カラムを一定温度に保つための「カラム恒温槽」、カラムから溶出した成分を検出するための「検出器」、検出器からの信号を記録するための「デ

ータ処理装置」などから構成されています。現在市販されている HPLC 装置は各ユニットが独立したコンポーネントタイプとなっており、分析用途に応じてコンポーネントの組み合わせを変更して使用する形態のものが多くなってきています。

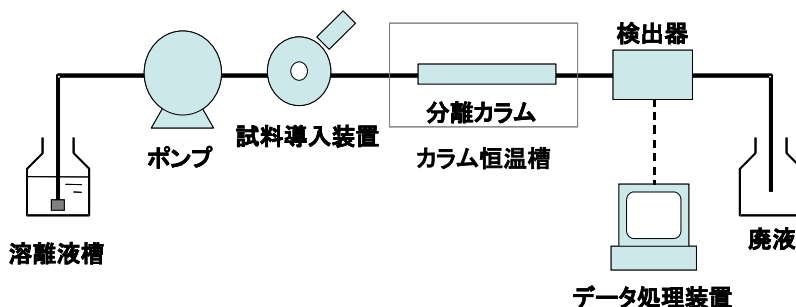


Fig. 4 HPLCの流路図

## 4-2-1-3 HPLCの検出器

HPLC の検出器は、目的に応じて様々な原理のものが用いられています。Table 3 には、代表的な検出器について、対象物質および一般的な感度をまとめまし

た。なかでも吸光度検出器(フォトダイオードアレイ検出器)が最も広く用いられています。

Table. 3 HPLC検出器の種類と対象物質および感度

種類	対象物質	最小検出感度
吸光度検出器(フォトダイオードアレイ検出器)	吸光物質	ng
蛍光検出器	発蛍光物質	pg
示差屈折率検出器	溶離液と屈折率の差がある物質	μg
蒸発光散乱検出器	不揮発性物質	μg
電気伝導度検出器	イオン性物質	ng
電気化学検出器	酸化還元性物質	pg
質量分析計	イオン化可能な物質	pg

#### 4-2-1-4 HPLCの分離モード

HPLC では充てん剤固定相と溶離液(移動相)の組み合わせによって、様々な分離モードが選択できます。その中でも代表的な4つの分離モードの特徴と用途などをTable 4に示しました。

これらの中でもっとも広く用いられているのが「逆相クロマトグラフィー」であり、この分離モードは、「極性が低い(水に溶けにくい)成分ほどカラムへの保持が強い(溶出が遅い)」という性質を持っています。逆相クロ

マトグラフィーでよく用いられる充てん剤は「オクタデシル基結合型シリカゲル」であり、シリカゲルに炭素数18個の炭化水素鎖を化学結合させています。この充てん剤は一般に ODS カラムあるいは C18 カラムと呼ばれています。一方、溶離液には水、メタノール、アセトニトリルなどの極性溶媒が多く用いられ、その混合比や pH、添加する塩の種類や濃度によって分離が調節できます。

Table. 4 HPLCにおける分離モード

分離モード	分離機構	充てん剤	分析対象	備考
逆相	非極性固定相・極性移動相間の分配平衡(疎水性相互作用)	非極性官能基結合型シリカゲル	水、アルコールなどに可溶性有機物一般	適用範囲が広い。同族体の分離に優れる
順相	極性固定相・非極性移動相間の分配/吸着平衡	シリカゲル, 極性官能基結合型シリカゲル	やや極性の小さい有機物一般	異性体の分離に優れる
イオン交換	イオン交換基とイオン性物質との静電的相互作用	イオン交換樹脂	イオン性物質(陽イオン, 陰イオン)	水溶性の高いイオン性物質に適する
サイズ排除	高分子充填剤の網目構造または細孔による分子ふるい効果	ポリスチレンゲル	高分子物質(水溶性, 非水溶性)	分子量の違いにより分離する。保持時間から分子量の推定が可能。

#### 4-2-2 HPLC法と洗浄バリデーション

HPLC 法は目的とする成分を選択的に測定できるという利点を有することから、洗浄バリデーションに適した分析手法の一つといえます。しかし HPLC 法では、目的成分とほぼ同じ保持時間に不純物が溶出した場合、目的成分の含有量を正確に測り知ることができません。

このようなリスクを低減するために“洗浄バリデーション-HPLC 法”の検出にはフォトダイオードアレイ検出器がよく用いられています。フォトダイオードアレイ検出器は、特定波長での測定はもちろんのこと、紫外・可視スペクトルを同時に採取することができるため、標準試料のスペクトルデータと未知試料から得られた

当該ピークのスペクトルデータを比較することで、類似性を確認することができます。保持時間と合わせて類似性を比較することで、“洗浄バリデーション-HPLC 法”における定性精度を高めることができます。

また昨今の HPLC では、生産性向上を目的とした分析時間の短縮が重要なテーマとなっており、微粒子充てん剤カラムを用いた超高速 LC が注目されています。これは、洗浄バリデーションの結果を迅速に現場へフィードバックすることが求められる部署において注目されている技術の一つです。

#### 4-2-2-1 超高速液体クロマトグラフィーとは

近年、分析業務の効率化や生産性の向上を目的として、分析のハイスループット化が進展してきており、HPLC においても超高速分析技術が注目され始めています。

HPLC 法において分析時間を短縮するためには、カラムを短くする、もしくは移動相線速度(流速)を高めることなどが考えられますが、現在広く用いられている汎用カラム(充填剤粒子径 5  $\mu\text{m}$  程度)を使用した場合にはカラム効率が低下し、従来の分離を得ることができません。そこで HPLC 法における高速化へのアプローチとして、充填剤の微粒化が検討されています。特に 2  $\mu\text{m}$  程度の充填剤は、より低い理論段高さを得ることができ、かつ高流量領域でもカラム効率が低下しないという特長を有しています。その反面、カラムの圧力損失は充填剤粒子径の二乗に反比例して増大す

るため、カラムやシステムへの圧力負荷が大きくなり、使用できる装置が限られてしまう、あるいはカラム長さが制限されるといった短所を持ち合わせています。

このような観点に基づき、島津製作所は高速化と HPLC が従来持つ分離性能や基本性能(感度, 正確さ, 精密さ), 汎用性および操作性等の両立を実現するために、粒子径 2.2  $\mu\text{m}$  の高速高分離分析用カラム“Shim-pack XR-ODS”を開発しました。

また、島津製作所は高速高分離分析用カラム“Shim-pack XR-ODS”の性能を有効に活用するために、超高速 LC システム“Prominence UFLC”を開発しました。この“Prominence UFLC”は、従来の HPLC に求められる本来の基本性能や汎用性を犠牲にすることなく、真の高速高分離を実現することを目的として開発されたシステムです。

#### 4-2-2-2 超高速液体クロマトグラフィーによる脂溶性ビタミン類の分析

ビタミンには水に溶けやすい水溶性のものと、油に溶けやすい脂溶性のものがあります。脂溶性ビタミンは体内に蓄積されやすく、欠乏症が起こりにくいという利点を有する反面、過剰摂取は健康障害を引き起こす要因となることが知られています。

脂溶性ビタミンのような難水溶性成分をスワブ法にて評価する場合、スワブ剤にエタノールなどの有機溶

媒を染み込ませる必要があるため、全有機体炭素測定法(TOC法)では測定することができません。

Fig. 5 に超高速 LC システム“Prominence UFLC”および高速高分離分析用カラム“Shim-pack XR-ODS”を用いた脂溶性ビタミンの高速一斉分析例を、Table 5 に分析条件を示します。

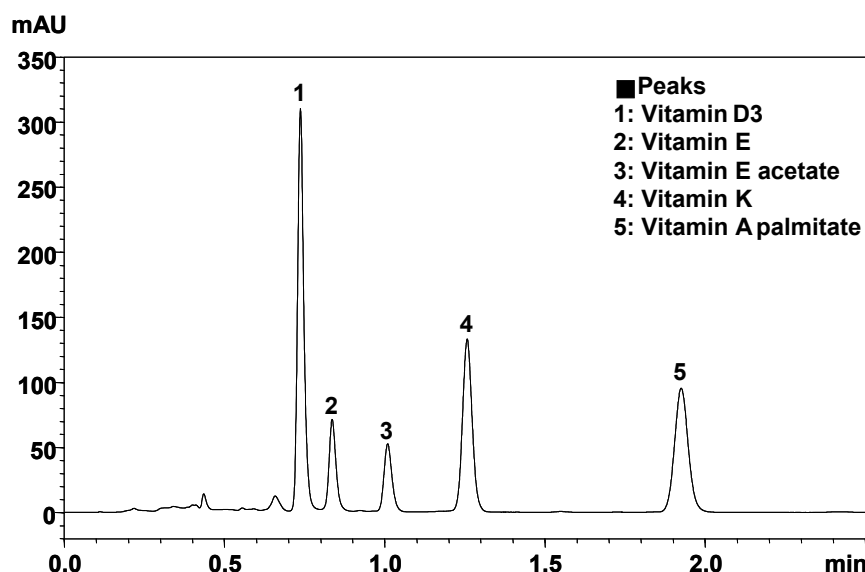


Fig. 5 脂溶性ビタミン5成分のクロマトグラム

Table. 5 分析条件

Column	: Shim-pack XR-ODS (3.0 mmI.D. x 75 mmL , 2.2 $\mu$ m)
Mobile phase	: A; methanol, B; ethanol, A/B = 75/25
Flow rate	: 1.2 mL/min
Injection volume	: 4 $\mu$ L
Column temperature	: 50 $^{\circ}$ C
Detection	: SPD-20A at 280 nm
UV cell	: semi-micro cell

#### 4-2-2-3 超高速液体クロマトグラフィーによるセフェム系抗生物質の分析

セフェム系抗生物質は $\beta$ -ラクタム系抗生物質の一種であり、広い抗菌スペクトルと強い抗菌作用を有することから、一般的に注射薬や飲み薬などの医薬品として利用されています。洗浄バリデーションでは、製造設備におけるこれら抗生物質の残留量を迅速に確認および評価することが求められています。

Fig. 6 に超高速 LC システム “Prominence UFLC” および高速高分離分析用カラム “Shim-pack XR-ODS” を用いたセフェム系抗生物質 12 成分 (Cefamandole は 2 ピーク) の高速一斉分析例を、Table 6 に分析条件を示します。

##### Peaks

- 1: Cefadroxil
  - 2: Cephapirin
  - 3: Cefalexin
  - 4: Cefaclor
  - 5: Cephadrine
  - 6: Cefataxime
  - 7: Cefazolin
  - 8: Cefuroxime
  - 9: Cefoperazone
  - 10: Cefoxitin
  - 11: Cefamandole A
  - 12: Cephalothin
  - 13: Cefamandole B
- 50 mg/L each

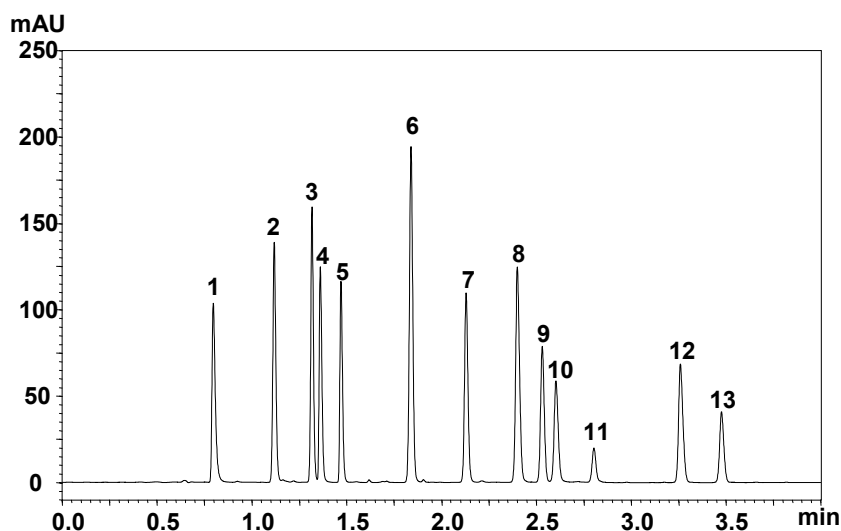


Fig. 6 セフェム系抗生物質12成分のクロマトグラム

Table. 6 分析条件

Column	: Shim-pack XR-ODS (3.0 mmI.D. x 100 mmL , 2.2 $\mu$ m)
Mobile phase A	: water containing 0.1% formic acid
Mobile phase B	: acetonitrile
Gradient program	: 15%B(0 min)→55%B(3.5 min)→15%B(3.51-6.5 min)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Injection volume	: 4 $\mu$ L
Column temperature	: 40 $^{\circ}$ C
Detection	: SPD-20A at 260 nm
UV cell	: semi-micro cell

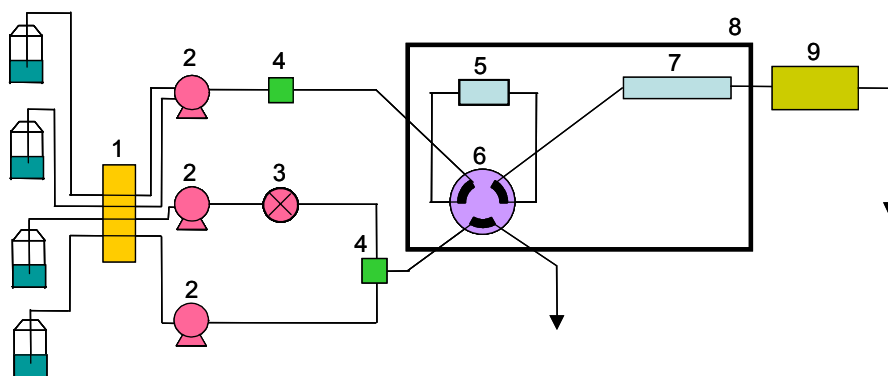
## 4-2-2-4 洗浄バリデーションのための自動化

HPLC 法には前処理法の一つとして、スイッチングバルブを用いたオンライン自動前処理システムがあります。これは注入された試料中の目的成分を前処理カラムへ一旦保持し、その後分離を目的として分析用カラムへ導くシステムです。

一般的にHPLCの逆相クロマトグラフィーでは、試料溶媒に有機溶媒を多く含んだ試料を大量に注入するとピークが歪むことが知られています。この問題を回避するためには、試料を高極性溶媒（例えば水）で希釈

するなどの前処理操作が事前に必要となります。

Fig. 7 には、洗浄バリデーションを目的としたカラムスイッチングシステムを示します。本システムは、1) オンライン希釈法を採用することにより試料の事前希釈なしで試料を大量に注入できる、2) オンラインで希薄試料を濃縮することができるため、煩雑な前処理を必要としない、3) 高感度に分析できる、4) 省力化と検体処理能力の向上をもたらす、などの特長を有しています。



1: 脱気ユニット, 2: 送液ユニット, 3: オートサンプラ, 4: ミキサ,  
5: トラップ用カラム, 6: 切替バルブ, 7: 分析用カラム,  
8: カラムオープン, 9: 検出器

Fig. 7 自動前処理システムの構成

Fig. 8 には、ポリエチレングリコール 1000 の 20%メタノール溶液 (0.1 mg/L) を擬似試料として 10 mL を注入し、水で希釈注入して濃縮カラムへ送り、分析したクロマトグラムを示します。また Table 7 に分析条件を示します。ポリエチレングリコールは UV 吸収を持たないため、検出には蒸発光散乱検出器 (ELSD) を用い

ました。

HPLC オンライン自動前処理システムは、洗浄バリデーションにおける希薄試料でさえも、大量に注入して濃縮を行うことで、感度よく分析できることがわかります。なお本分析条件では、約 2000 倍の濃縮効果が見込めました。

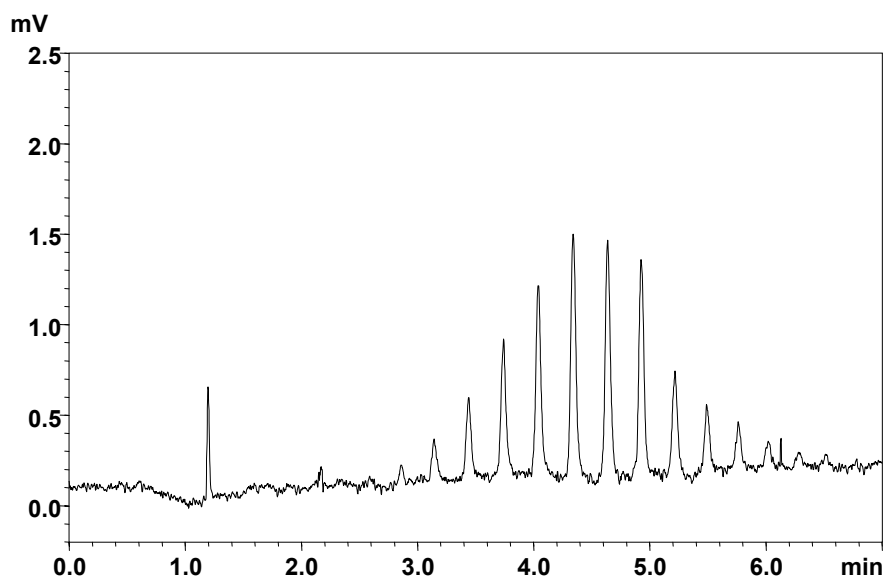


Fig. 8 ポリエチレングリコールのクロマトグラム

Table. 7 分析条件

## [For sample injection]

Column : Imtakt Unison UK-C18 (4.6 mmI.D. x 30 mmL , 3.0  $\mu$ m)  
 Mobile phase : A; water, B; acetonitrile, A/B = 97/3  
 Flow rate : 1.0 mL/min  
 Injection volume : 10 mL

## [For dilution]

Mobile phase : water  
 Flow rate : 2.0 mL/min  
 Dilution factor : 3

## [For separation]

Column : Imtakt Unison UK-C18 (3.0 mmI.D. x 100 mmL , 3.0  $\mu$ m)  
 Mobile phase A : water  
 Mobile phase B : acetonitrile  
 Gradient program : 20%B(0 min)→30%B(6.5 min)→20%B(6.51-8.0 min)  
 Flow rate : 1.0 mL/min  
 Column temperature : 40 °C  
 Detection : ELSD-LT II  
     Temperature : 40 °C  
     Nebulizer gas : N<sub>2</sub>  
     Gas pressure : 350 kPa

## 参考文献

- 1) 島津評論 Vol.65 [1・2] 93~108 (2008) 超高速液体クロマトグラフィーの食品分析への応用 山口ら
- 2) 島津 Prominence UFLC アプリケーションデータシート No.20
- 3) 島津アプリケーションニュース No.L348

## 4-3 紫外可視吸光光度計(UV)



## 4-3-1 概要

紫外可視分光光度計(UV)は、医薬分野はもちろん、化学工業、電気・電子、食品などの業界において、欠かせない分析装置です。装置によって測定波長範囲

は異なりますが、紫外・可視領域の波長はおおむね200～900 nmであり、この波長範囲の光を用いて測定を行います。

## 4-3-2 分光光度計の構造

分光光度計の構造は、Fig. 9 に示しますように、光源、分光器、試料室、検出器の4つの部分から構成されています。

光源には通常二つのランプが用いられます。重水素ランプは紫外域(190～350 nm)、ハロゲンランプは可視域(350～900 nm)の測定に使用されます。分光部では光源より放射された全波長の混ざった白色光を回折格子(グレーティング)を用いて分光させます。分

光した光はスリットを通過して、試料室のサンプルに照射されます。

入射光の強度( $I_0$ )とサンプルを透過した光の強度( $I$ )の間には、 $I = I_0 \times 10^{(-\epsilon \cdot c \cdot l)}$ の関係式が成り立ちます( $\epsilon$ : 吸光係数,  $c$ : 試料濃度,  $l$ : 光路長)。吸光度は、 $\text{Absorbance} = \log(I_0/I)$ で定義され、上記式より  $\text{Absorbance} = \epsilon \cdot c \cdot l$ となります。すなわち、吸光度は試料濃度に比例することがわかります。

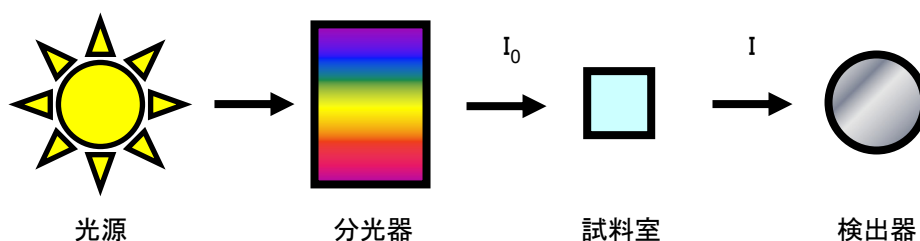


Fig. 9 分光光度計の構造

検出器にはフォトダイオードなどが用いられ、光量に比例した電流が出力され、データとして取り込まれます。

分光光度計にはシングルビーム分光光度計とダブルビーム分光光度計があります。ダブルビーム分光光度計では、単色光がビームスプリッタによってサンプル側とレファレンス側に分けられます。この方式では光源のエネルギーが変動しても、リファレンス光でキャン

セルされるため、測定結果に悪影響を及ぼさず、正しい測定値が得られます。

測定時の重要なパラメータとしてスリット幅があげられます。スリット幅は分解(能)や(スペクトル)バンド幅とほぼ同じ意味で使われます。UV-1800では1 nm固定で、ヨーロッパの薬局方で求められている波長分解性能を充分クリアできます。

### 4-3-3 分析例

島津分光光度計 UV-1800 を用いて、洗剤 A およびアセチルサリチル酸溶液の分析例を示します。分析条件は Table 8 のとおりです。

Fig. 10 に洗剤 A の吸収スペクトル、Fig. 11 に最大吸収波長 225 nm での検量線、Table 9 にブランク液 10 回繰り返し測定結果および標準偏差  $\sigma$  を示します。定量下限値の求め方の一つとして、ノイズレベルの

10 倍の吸光度に対する濃度値として計算される方法があります<sup>1)</sup>。

洗剤 A の場合、 $10\sigma = 0.00096$  Absorbance、検量線式  $y = 0.00599x - 0.00142$  より定量下限値は  $0.00096/0.00599 \approx 0.16$  mg/L となります。

Table 8 測定条件

測定使用装置	UV-1800
測定波長範囲	190 – 300 nm (洗剤A) 250 – 350 nm (アセチルサリチル酸)
スキャンスピード	中速
サンプリングピッチ	1 nm
測光値	吸光度
スリット幅	1 nm
光源切替波長	340 nm
セル	10 mm石英角セル

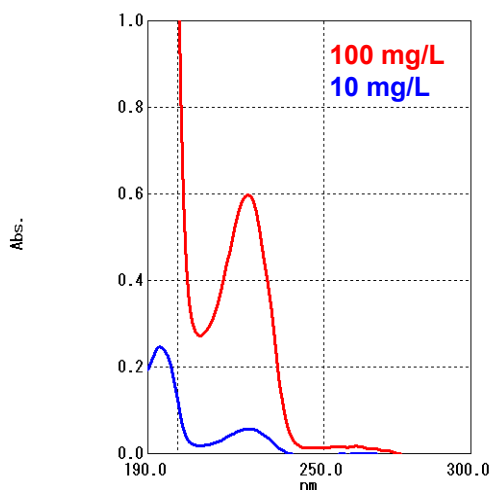


Fig. 10 洗剤Aの吸収スペクトル

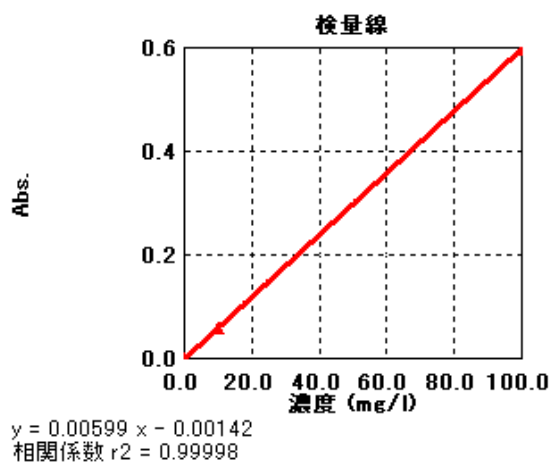


Fig. 11 洗剤Aの検量線



Table. 9 洗剤Aのブランク液10回繰り返し測定結果および標準偏差σ

サンプルID	WL 225.0
1	0.00009
2	0.00020
3	0.00008
4	0.00011
5	0.00018
6	0.00012
7	0.00021
8	0.00034
9	0.00000
10	0.00006
標準偏差σ	0.000096

Fig. 12 にアセチルサリチル酸メタノール溶液の吸収スペクトル, Fig. 13 に最大吸収波長 276 nm での検量線, Table 10 にブランク液 10 回繰り返し測定結果および

標準偏差σを示します。

アセチルサリチルの定量下限値は 0.42 mg/L となります。

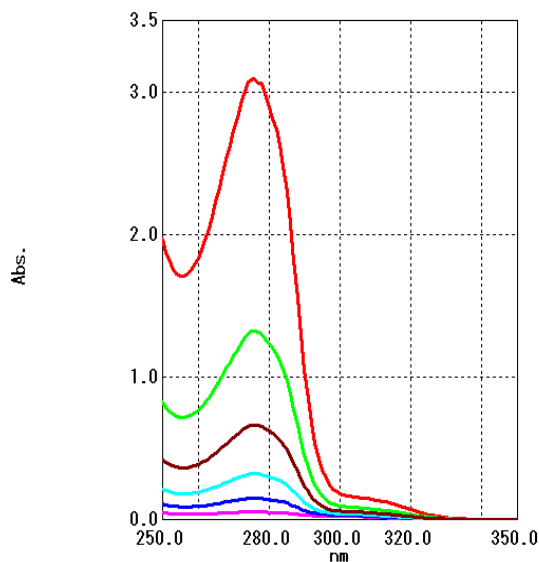


Fig. 12 アセチルサリチル酸溶液の吸収スペクトル

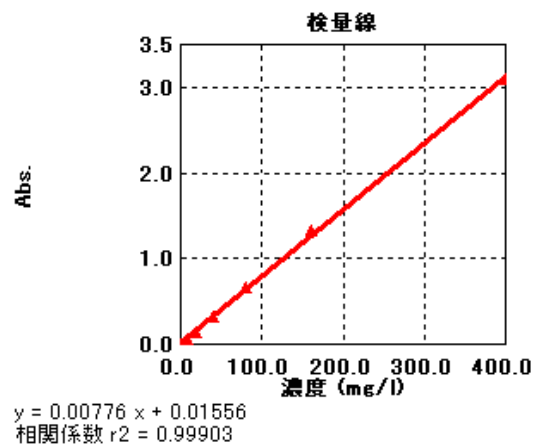


Fig. 13 アセチルサリチル酸溶液の検量線

Table. 10 アセチルサリチル酸のブランク液10回繰り返し測定結果および標準偏差  $\sigma$ 

サンプルID	WL 276.0
1	0.00009
2	-0.00018
3	-0.00024
4	0.00018
5	0.00067
6	0.00079
7	0.00037
8	0.00024
9	0.00021
10	0.00035
標準偏差 $\sigma$	0.000325

#### 4-3-4 おわりに

UV 分光光度計は装置のコンディショニングや分析に時間をかけることなく、専任の技術者を特に必要とすることなく、容易に洗浄バリデーションへの応用に利用していただくことが可能です。

また、UV 分光光度計の定量下限値を求めることは残留物や洗浄残渣を評価できる下限値を把握することにも有用であると考えられます。

#### 参考文献

- 1) 社団法人 日本分析化学会編 平井昭司監修：“現場で役立つ化学分析の基礎” 7章(2006)オーム社  
その他 島津アプリケーションニュース 光吸収分析

No.A403『紫外可視分光光度計 UV-1800 によるビタミン B12 とカフェインの定量下限値の測定』

## 4-4 液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS)



液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS)は製薬をはじめとして環境、食品、化学、メタボロミクスなど幅広い分野で普及している分析装置です。

LC では固定相(カラム)と移動相に対する親和力(保持力)の差によって成分を分離し UV, 蛍光, 電気伝導度などで検出します。これらの検出器では、物質の定性は主に保持時間で行います。また、MS では試料成分をさまざまな方法でイオン化させ、得られたイオンの  $m/z$  値とその相対量を測定します。得られたマススペクトルからは分子量の情報が得られるため、定性分析の大きな助けになります。

LCMSは分離能力に優れたLCと定性能力に優れたMSを結合した装置で、スキャン測定により得られる  $m/z$  値の情報により、他の LC 検出器により得られる保持時間による定性を補完します。また選択イオンモニタリング(SIM)測定では、測定対象物に特有の  $m/z$  値を用いて検出することで高感度な測定が可能になり、定量分析に利用できます。

質量分析計は試料導入のための機器(LC など)と質量分析計をつなぐインターフェース部、試料をイオン化するイオン源、生成イオンを効率よく導入するレンズ部、イオンを  $m/z$  値によって分離する質量分析部、および分離したイオンを検出する検出部から構成されます。イオン源にはさまざまな種類がありますが、近年、LCMS で広く用いられているのはエレクトロスプレーイ

オン化法(ESI)、大気圧化学イオン化法(APCI)、大気圧光イオン化法(APPI)の3種類です。これらは大気圧下でイオン化するのが特徴で、大気圧イオン化法(API)と呼ばれます。ここではもっとも広く用いられるイオン化法であるESIについてご説明します。

ESIはイオン性、高極性化合物に有効なイオン化法で、医薬品およびその関連物質、天然物、生体試料などの分析に広く用いられています。ESIでは試料溶液は先端に3~5 kV程度の高電圧を印加したキャピラリーに導かれ、キャピラリーの外側から霧化ガス(ネブライザガス)を流しながらスプレーすることで細かな帯電液滴が作られます。帯電液滴は移動の過程で溶媒の蒸発表面電荷の増加が進み、電荷同士の反発力が液体の表面張力を超えると分裂します。蒸発と分裂を繰り返し、最終的には試料イオンが気相に放出される(イオン蒸発)と考えられています(Fig. 14)。

イオンを分離する質量分析部には扇形磁場型、四重極型、飛行時間型、イオントラップ型およびこれらを組み合わせたものなどさまざまな型が用いられます。ここでは比較的安価で広く普及している四重極型MSについてご説明します。四重極型MSではその名前の通り真空中に4本の金属棒が中心軸から等距離・平行に配置され、互いに対向する電極には同じ極性の電圧が、隣接する電極には正負逆の電圧がかけられています(Fig. 15)。

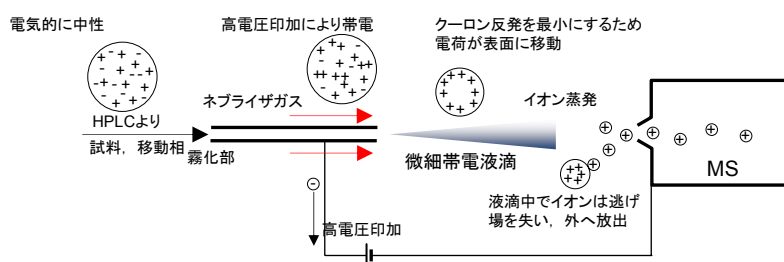


Fig. 14 エレクトロスプレーイオン化(ESI)

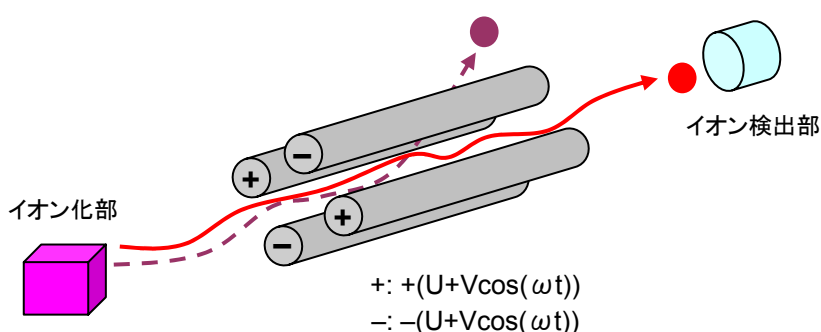


Fig. 15 四重極型MSの模式図

それぞれの電極に、直流電圧と高周波交流電圧を重ね合わせてかけると四重極の中には高速で位相の変化する電場が生じます。イオンは四重極領域を振動しながら進みますが、特定の条件で“安定な振動”となるイオンのみが四重極を通過して検出器に到達できます。その他のイオンは不安定な振動となり電極に衝突したり、系外に飛び出したりして検出されません。直流電圧と高周波交流電圧の比を一定に保って電圧を変化させることで、“安定な振動”状態になるイオンの  $m/z$  値を変化させ、低質量から高質量のイオンを順番に通過させることができ、マススペクトルが得られます。通過させるイオンの  $m/z$  値を数種類に固定させる SIM モードでの分析も可能です。SIM モードで得られたクロマトグラムは再現性に優れているため定量分析に用いられます。

四重極は小型で操作や保守が簡便、比較的安価と

いう特長があります。また、他の質量分離法と比べて低い真空度での質量分離が可能なので LC と組み合わせた質量分析に適した MS といえます。定性分析、定量分析の両方に対応可能で、質量分析計のスタンダードと位置づけられています。

島津の LCMS-2020 はイオン化法に ESI(オプションで APCI も使用可能)、質量分析部に四重極型 MS を備えた液体クロマトグラフ質量分析計で、簡便な操作により分子量情報の取得と高感度な定量分析を行うことができます。

LC-MS による医薬品関連物質の分析例として、超高速液体クロマトグラフ Prominence UFLC と液体クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2020 を用いてイソプロピルアンチピリンを分析した結果をご紹介します。イソプロピルアンチピリンは解熱鎮痛作用を持つ成分で、解熱鎮痛薬、総合感冒薬などに配合されています。

Table. 11 分析条件

Column	: Shim-pack XR-ODS (2.0 mmI.D. x 50 mmL , 2.2 $\mu$ m)
Mobile phase A	: water containing 0.1% formic acid
Mobile phase B	: acetonitrile
Gradient program	: 30%B(0 min) $\rightarrow$ 95%B(1 min)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Injection volume	: 1 $\mu$ L
Column temperature	: 40 $^{\circ}$ C
Ionization mode	: ESI-Positive mode
Probe voltage	: 4.5 kV
DL temperature	: 250 $^{\circ}$ C
BH temperature	: 400 $^{\circ}$ C
Nebulizing gas flow	: 1.5 L/min
Drying gas flow	: 20 L/min
DL,Q-array voltage	: Default value
Scan range	: $m/z$ 100 – 500 (50 msec/Scan)
SIM monitor ion	: $m/z$ 231.2 (50 msec/Ch)

Fig. 16 にイソプロピルアンチピリンのマススペクトルと構造式を示します。イソプロピルアンチピリンは分子

量 230 で、マススペクトルではイソプロピルアンチピリンにプロトン( $H^+$ )が付加したイオンが確認されました。

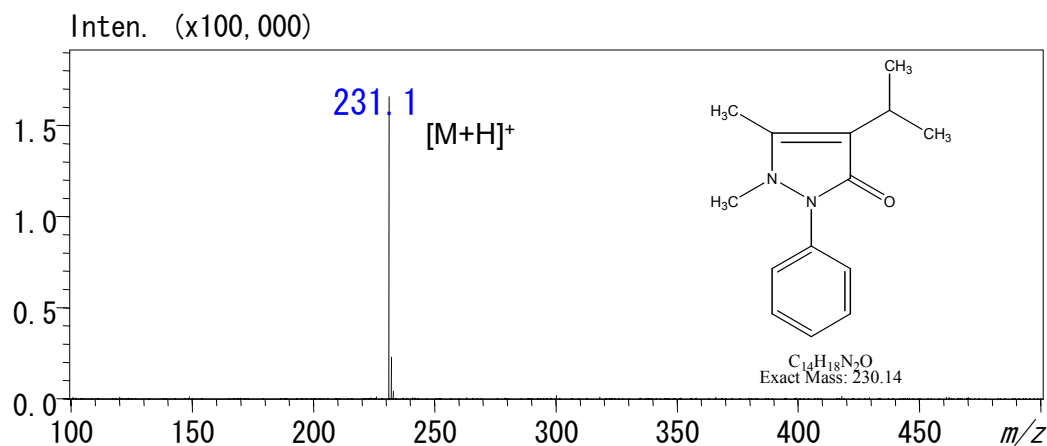


Fig. 16 イソプロピルアンチピリンのマススペクトルと構造式

Fig. 17 にイソプロピルアンチピリンの SIM 分析結果を示します。SIM クロマトグラムは 50  $\mu\text{g/L}$  で、検量線は 0.5 - 100  $\mu\text{g/L}$  の範囲で示しました。検量線の相関係数は 0.9999 以上の良好な値が得られています。また、1  $\mu\text{g/L}$  におけるピーク面積値の変動係数(n=5)は

9.56%で、低濃度の試料に対しても良好な再現性が得られています。以上の結果から、LCMS は洗浄バリデーションにおける医薬品の微量分析に適した分析法であるといえます。

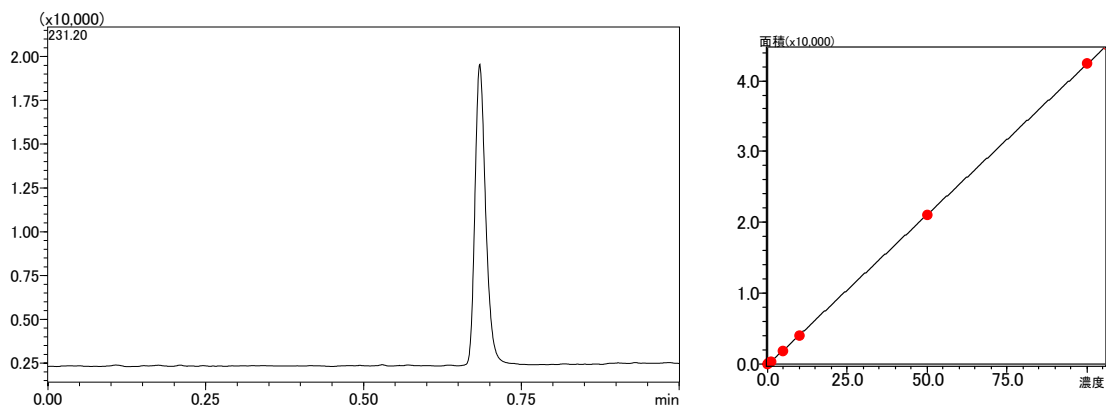
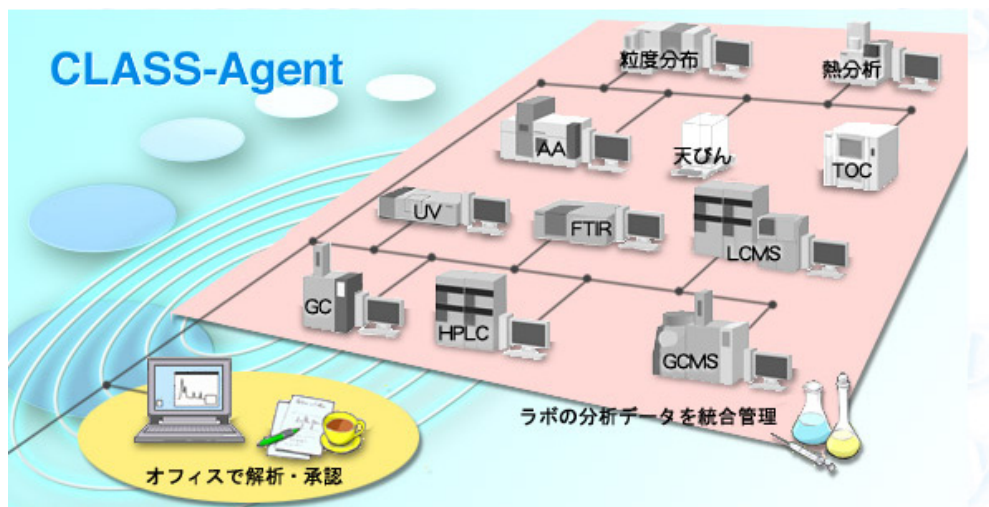


Fig. 17 イソプロピルアンチピリンのSIM分析結果(左: SIMクロマトグラム(50  $\mu\text{g/L}$ ), 右: 検量線)

#### 参考文献

- 1) 原薬・製剤 洗浄バリデーション及び具体的な洗浄方法 サイエンス&テクノロジー株式会社
- 2) 島津 LCtalk 特集号 8 LC-MS 入門

## 4-5 CLASS-Agent



CLASS-Agent ソフトウェアは TOC, HPLC, UV, LCMS, GC, GCMS, FTIR, 原子吸光, 熱分析, 粒度分布, X線回折, 天びん, 画像や文書データなどのさまざまなファイルをデータベースで管理するためのソフトウェアです。

スピーディなデータ検索やオフィスからラボのデータを解析・承認など、ラボ業務を“らくらく便利”にするお手伝いをします。また指紋認証などによる強力なセキュリティ確保など電子記録/電子署名規制にも準拠し、ラボ業務の“しっかりキッチリ管理”を支援します。電子記録/電子署名(ER/ES)規制とは、GLP/GCP (clinical)/GMP の規制下で行われた試験に基づいて

作成された電子記録・電子署名・電子的な提出物に適用される、電子記録(Electronic Records)/電子署名(Electronic Signatures)に関する規制で、FDA 21 CFR Part11 や厚生労働省電子記録・電子署名に関する指針などのことです。ER/ES 規制では、従来からの紙ベースでの記録の取扱いを電子媒体に置き換える場合の要求事項を規定しています。ソフトウェアにデータをいつでも再現できるためのデータの完全性、採取した生データが上書き・変更・削除などから確実に保護されるためのセキュリティ、だれが、いつ、どのような操作を行ったかを明確にするオーディットレイルなどの機能が要求されます。

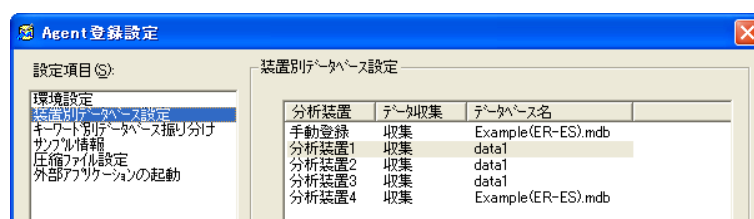
#### ・データを振り分け自動登録

TOC, HPLC, UV, LCMS, GC, GCMS, FTIR, 原子吸光, 熱分析, 粒度分布, 天びんなどの各種測定データを自動的に収集しデータベースに登録します。

収集したデータの登録先は分析装置名, 試料名, 分析者名, 分析月などにより自動的に振り分けすることができます。プロジェクト毎にデータを自動的に集め

たり、共有する事もできます。

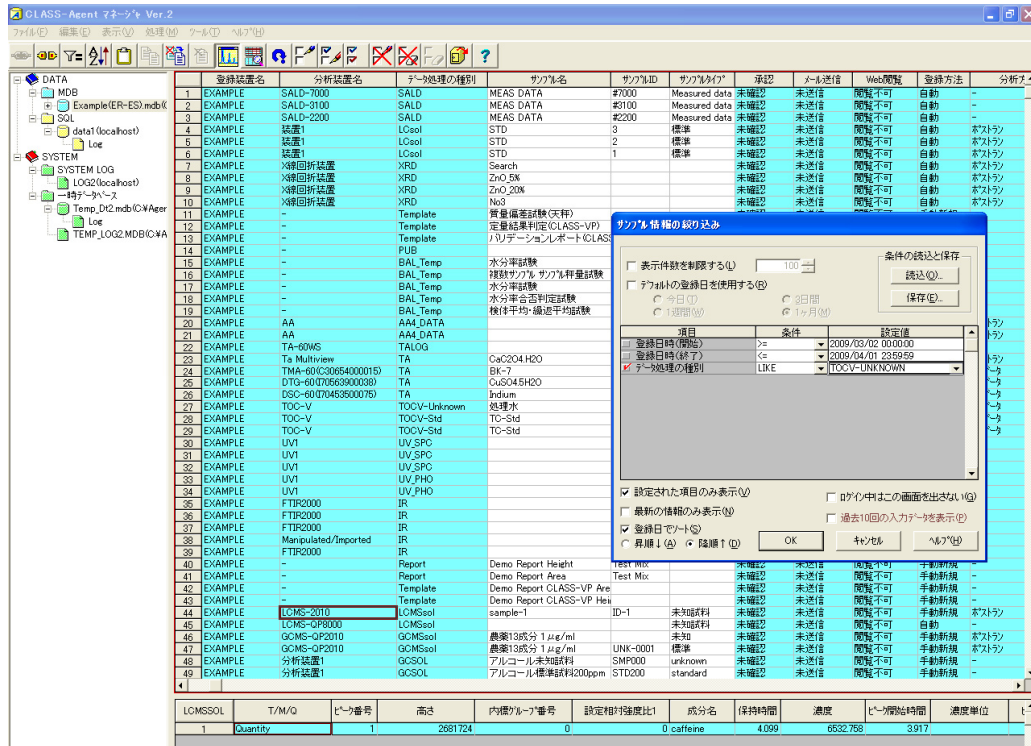
クロマトグラムやスペクトル情報, メソッド, 定量計算結果や分析レポートのイメージ(PDF形式), Andi形式のデータなどのファイル情報が一つのファイルに圧縮保存されて、データベースで管理されます。



## データの検索

データベースでは試料名、分析日時、分析装置名、分析者などをキーワードにして目的のデータを簡単に検索できます。「特定の文字列を含む試料の指定期間

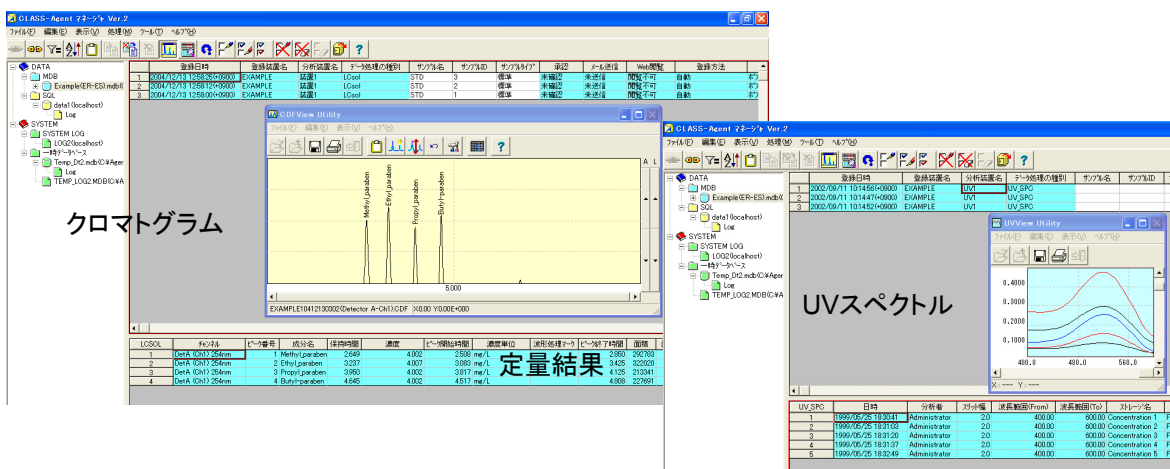
に分析したデータを一覧表示」することや、サンプル名サンプル ID、ファイル名による検索なども簡単に、検索条件の保存や読み込みもできます。



## データの整理

データを選択すると同一画面上でクロマトグラム(UVスペクトル)や定量計算結果を閲覧することができ、データ整理に便利です。また、データ整理のためのファ

イル移動もドラッグ & ドロップ操作で簡単に、利用目的に応じて必要なデータを集める事が簡単に行えます。



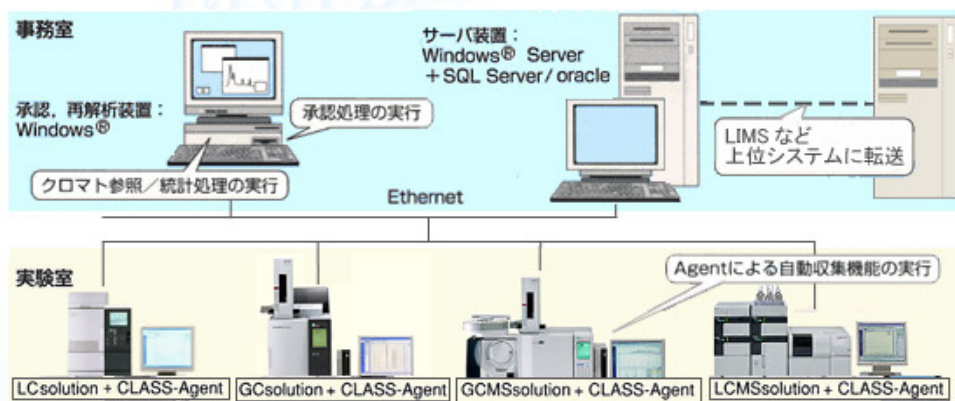


### ・オフィスで解析, 承認

LANに接続するだけで、離れたラボのデータも手軽にオフィスのノートパソコンで再解析したり承認を行うことができます。複数の人が同時に閲覧することも可能です。また、他の部屋にある装置のメソッドやスケジュールを共有し、ラボの分析・測定業務の効率化もはかれます。CLASS-Agent サーバーエディションを使用する事により、本格的なクライアント・サーバ型のシステ

ムにも対応しています。

オプションの CLASS-Agent WebManager をサーバー PC にインストールすれば、分析データを閲覧するためにクライアント PC に特別なソフトをインストールすることなく、Internet Explorer®を介して CLASS-Agent のデータベースに保存されたデータを閲覧できます。



## 5. まとめ

洗浄バリデーションの簡単な概要説明と洗浄バリデーションに用いられる分析機器 (TOC, HPLC, UV, LCMS) についてご紹介いたしました。TOC は全有機体炭素を簡便に測定するのに有効です。HPLC は成分毎の定量が可能、UV は操作が容易で測定に時間を要しません。LCMS は HPLC よりさらに高感度な分析が可能です。製造設備の洗浄の評価について、これらのラ

インアップからサンプリング方法や対象物質に応じた機器の選択が可能です。また、CLASS-Agent を用いると複数の装置台数、複数機種からなるネットワークの構築が可能であり、業務の効率化に大きく寄与することができます。洗浄バリデーションをトータルサポートする島津の製品群をどうかご利用ください。

\* 本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行 2009年8月