

Table 7 「システム適合性」の各項目の設定の意義

検出の確認：純度試験において、対象とする不純物等のピークがその規格限度値レベルの濃度で確実に検出されることを確認することによって、使用するシステムが試験の目的を達成するために必要な性能を備えていることを検証する。

システムの性能：被検成分に対する特異性が担保されていることを確認することによって、使用するシステムが試験の目的を達成するために必要な性能を備えていることを検証する。

システムの再現性：標準溶液あるいはシステム適合性試験用溶液を繰り返し注入したときの被検成分のレスポンスのばらつき（精度）が試験の目的に適うレベルにあることを確認することによって、使用するシステムが試験の目的を達成するために必要な性能を備えていることを検証する。

験の目的に適うレベルにあることを確認することにより、使用するシステムが試験の目的を達成するために必要な性能を備えていることを検証します。

8.3 「検出の確認」の試験方法と適合要件 (Table 8)

「検出の確認」は、純度試験のうち、定量的な試験で設定が求められ、HPLC/GCを用いた分析システムの（感度と）レスポンスの数値的信頼性を確認するための項目です。

ただし、限度試験の場合や限度値レベルでの検出が「システムの再現性」等の項目で確認できる場合は「検出の確認」の項を設定する必要はないとしています。

8.4 「検出の確認」の項目の必要性？

「検出の確認」は、USPやEPでは要求していない項目であるため、設定の意義を問う声があります。USPに対応する項目がないのは確かですが、EPでは「定量限界」が要求項目とされています。

EPが設定を求めている「定量限界」や、日局が日局14まで設定を求めている「検出感度」（これは分析法バリデーションにおける「検出限界」に相当する）は、基本的には分析法バリデーションにおいて評価されるパラメータであり、分析システムに変更がない限り、日常的に確認する必要はないと考えられます。

また、「定量限界」は、それ以上の濃度では、ノ

Table 8 「検出の確認」の試験方法と適合要件

- 純度試験のうち、定量的な試験で設定が求められる。
 - HPLC/GC法を用いた分析システムのレスポンスの数値的信頼性を確認するための項目である。
- 「定量的試験では、通常、「検出の確認」の項を設け、規格限度値レベルの溶液を注入したときのレスポンスの幅を規定して、限度値付近でレスポンスが直線性をもつことを示す。」
- 「検出の確認」の項を設定しなくてもよい場合
 - 「限度試験のように、規格限度値と同じ濃度の標準溶液を用いて、それとの比較で試験を行う場合」
 - 「限度値レベルでの検出が「システムの再現性」などで確認できる場合」

イズの影響を受けない信頼性のある数値が求められることを示す分析能パラメータですが、その評価だけでは、定量的な試験において求められる直線性について評価したことにはなりません。

「検出の確認」は、類縁物質の規格限度値レベルの濃度の溶液を注入したときに、規定された範囲に入るレスポンスを示すこと（例えば、Table 2のアフロックアロンの類縁物質試験における「検出の確認」の規定のように、標準溶液の20%に希釈した液のレスポンスが、標準溶液のレスポンスの15~25%（20%を中心とした範囲）に入ることを確認することによって、限度値付近の濃度においてレスポンスがおおまかな直線性を有していることを検証しようとするものです。

このように、「検出の確認」は、定量的な純度試験において、得られる定量値が信頼性のあるものであることを日常的に簡便な形で確認するのに有効な評価項目と思われます。

9. 「システムの性能」、特に溶出順の規定について

次に、特異性に関わる評価項目である「システムの性能」について、特に溶出順に注目して説明します。

9.1 溶出順を巡る日局委員会での議論と理化学試験法委員会の対応 (Table 9, 10)

理化学試験法委員会において検討された改正案のVer. 6では、溶出順と分離度の両方を規定すること

Table 9 溶出順の規定は必須か？ (1)

- 改正案 (Ver.6) における「システムの性能」の規定
「原則として、分離対象物質 (基本的には、隣接するピークが望ましい) との溶出順と分離度で規定する。」
- この案に対する日局委員からの意見
 - 溶出順については再考の必要がある。溶出順の規定のために性能のよい新しいカラムが使用できない例は多く見受けられる。かつては ODS カラムのエンドキャッピングが甘く、塩基性薬物は溶出が遅くかつテーリングがひどかったため、イオンペア試薬を入れて内標準物質との分離度を改善せざるを得なかった。最新のカラムはエンドキャッピングがしっかりされており、塩基性薬物でもテーリングせずかつ理論段数も格段に良くなっている。
 - 新しいカラムでは塩基性薬物の溶出が速くなったのに対して、内標準物質の溶出は変わらないため、昔のカラムを基に決められた溶出順が新しいカラムでは逆転してしまっており、試験に使うことができない。
 - 会社などでは、仕方なく、エンドキャッピングが甘く、理論段数の低い (古い) カラムをメーカーに無理を言って確保してもらっているとのことである。
 - 改正案 (Ver.7) では、定量法では溶出順の規定を必須としないこととし、システムの性能の規定を次のように改めた：

「原則として、分離対象物質 (基本的には、隣接するピークが望ましい) との分離度で規定する。純度試験では、分離対象物質との溶出順を併せて規定する。」

 - この案に対する別の日局委員からの意見
 - 規格及び試験方法の設定での各種バリデーションは使用するカラムの性能を規定した上で実施しており、そのときの実測値を考慮してシステム適合性を規定している。しかしながら、序文に「当該医薬品の規格が設定されたときと同様に」の記載があるにもかかわらず、今回の改正案では、実際にバリデーションを行ったときと異なる条件、すなわち、内標準物質と測定成分の溶出順が異なることも許容することになる。溶出順序が異なるシステムで試験を行うことは、再バリデーションの必要な範疇であり、科学的におかしい。
 - 結局、溶出順の規定に関しては、「必須とすべきでない」と「必須とすべきである」との正反対の意見が出されたことになる。

とされていまして、ところが、Ver. 6 案について日本薬局方内で各条担当の委員会に意見を求めたところ、ある委員から、古い各条品目では、溶出順の規定のために、性能の良い新しいカラムが使用できない例がかなりあるとの意見が出されました。

かなり前に当該の品目が日局に記載された際には、ODS カラムのエンドキャッピングが甘く、塩基性薬物は溶出が遅くかつテーリングがひどかったため、イオンペア試薬を入れて内標準物質との分離を改善するようなことが行われていました。

ところが、最近の新しいカラムは、エンドキャッピングがしっかりされており、塩基性薬物でもテーリングせずに溶出するようになりました。内標準物質の溶出は変わらずに、塩基性薬物の溶出が速くなったために、古いカラムを基に決められていた溶出順が新しいカラムでは逆転してしまい、試験に使うことができないというようなことが起こっています。そこで、会社ではわざわざエンドキャッピングの甘いカラムをメーカーに無理をいって作らせて対応し

ており、このような状況は改善すべきであるということでした。

そこで、Ver. 7 案では、定量法では溶出順の規定はしなくてもよいとしたところ、別の委員から、溶出順を規定することによって試験法の信頼性が守られており、溶出順が変わるようなことがあれば、再バリデーションが必要と考えられるので、溶出順を要求項目から外してしまうのはおかしいとの意見が出されました。

このように、溶出順の設定に関しては、必須とすべきではないとの意見と必須とすべきとの正反対の意見が出されるという事態が生じました。

このため、理化学試験法委員会でも更に検討を進めた結果、Table 10 に示すように、カラムの交換の前後で分析システムが同等の試験結果を与えるかどうかは、「分析システム変更時の管理」によって担保すべき問題であり、それを丸ごとシステムの性能が維持されているかどうかを日常的に確認する試験である「システム適合性」に持ち込むべきではない

Table 10 溶出順の規定は必須か？ (2)

Table 9 に示した意見に対しては、次のように考えられる。

- I) 分析システム変更時の管理で担保すべき問題を、丸ごとシステム適合性試験に持ち込んでいるのではないか？
- 新しいカラムが当該試験に使えるかどうかのチェックは、医薬品の品質試験における分析システム変更時の管理の一環として、そのカラムの導入前に行っておくべきことである。
 - 新しいカラムを用いてシステム適合性の試験を実施し、それまで使っていたカラムと同様の結果を与えることが確認されれば、そのカラムを用いて品質試験を行ってよい。
 - 新しいカラムによって分離度が大きく変わる、溶出順が異なるなどの溶出パターンの変化がもたらされるのであれば、特異性、真度、精度などが担保されているかどうか懸念されるので、再バリデーションを行って、そのカラムを品質試験に用いることが適切かどうか検討する必要がある。
- ▶ カラムの導入前に上記のような作業が行われるのを前提とすれば、定量法の場合、システムの性能に溶出順を規定する必要がないケースが多いと考えられる。
- II) 分離度に関する考察
- 分離度は、「○○○と△△△の分離度は#以上である。」のように規定される。カラムを例にとってこの規定について考察する。
 - カラムを試験に使い続けると、次第に劣化して分離能が悪く（分離度が小さく）なっていく。
 - また、カラムの交換では、次の3つのケースが起こりうる。
 - 1) 交換前と比べて、分離度がほとんど変わらない場合
 - 2) 分離度が小さくなる場合（-の方向への変化）
 - 3) 分離度が大きくなる場合（+の方向への変化）
 - 1) は、特に問題はない。
 - 2) と3) では、特異性の確保の観点からは2)の方が問題であることから、分離能の悪い性能の良くないカラムや劣化してピークの分離が悪くなったカラムなど、特異性の担保が危ぶまれるカラムが試験に使われるのを防ぐために、「分離度#以上」との規定が設けられる。
 - では、3)の交換前に比べて分離度が大きくなる場合はどう考えればよいのであろうか？例えば、「分離度は3以上」と規定されているときに、交換前に3.5であった分離度が交換後に7となった場合、何らの検証も行わずにこのカラムを使って試験を続けても良いか？
 - 「分離度は3以上」との要件に適合しているので、特異性は担保されていると言える。
 - しかしながら、分離度がこれまでの倍になるような大きな溶出パターンの変化が分析システムに起こっていることから、特異性以外の分析システムの性能である真度や精度が変更前と同じレベルに維持されているかどうか懸念される。したがって、分析結果の信頼性を確保する立場から見ると、何のチェックも行わずにこのカラムを使って試験を続けて良いとは言えない。
 - ▶ 分析システム変更時にはその適切性を評価し管理すべきであるとの観点からは、分離度が+の方向へ大きく変化する場合についても、このカラムを当該の試験に用いることが適切かどうかを再バリデーションを行って検証する必要がある。
 - 溶出順が逆転するケースについて
 - 溶出順の逆転は、分離度の符号が一側に転じたケース（下記の分離度の式で $t_{R2} > t_{R1}$ とされる2つのピークの保持時間が逆転して $t_{R2} < t_{R1}$ となってしまったケース）と位置づけられる。
$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5R1} + W_{0.5R2}} \quad (t_{R2} > t_{R1} \text{ とする})$$
 - この場合、溶出順が逆転するような大きな変化が分析システムに起きており、特異性、真度、精度などの分析システムの性能が試験の目的に適うレベルに達しているかどうか懸念されるため、このカラムの使用に当たっては、このカラムを当該の試験に用いることが適切かどうかを再バリデーションを行って検証する必要がある。
 - ▶ このように分析システム変更時の管理を行うとともに、分離度の規定を活用することによって、溶出順の規定を必須としなくても分析結果の信頼性を確保することは可能と考えられる。

との判断に至りました。

すなわち、新しいカラムが当該の試験に使えるかどうかのチェックは、品質試験における「分析システム変更時の管理」の一環として、そのカラムの導入前に行っておくべきことと考えられます。新しいカラムを用いてシステム適合性の試験を（他に必要と考えられる試験がある場合には、その試験も）行い、それまで使っていたカラムと同等の結果を与えることが確認できれば、そのカラムを品質試験に使っても問題ないといえるでしょう。しかしながら、分離度が大きく変わる、溶出順が異なるなどの溶出パターンの変化がもたらされるのであれば、特異性、真度、精度が担保されているかどうか懸念されますので、必要な項目について再バリデーションを行って、そのカラムを当該の品質試験に使用してよいかどうかを再検討する必要があります。

理化学試験法委員会では、新しいカラムの導入前に上記のような作業が行われることを前提とすれば、定量法の場合には溶出順を規定する必要がないケースが多いと結論付けました。

9.2 分離度に関する考察 (Table 10)

システムの性能においては、分離度を評価項目に設定することとされていますが、この分離度の規定から何が言えるかを、溶出順の規定との関連で考察してみました。

分離度は通常「○○○と△△△の分離度は#以上である。」のように規定されます。

カラムを使用し続けると、次第に劣化して分離能が悪く、つまり分離度が小さくなるのが一般的です。

また、カラムの交換では、1) 交換前後で分離度がほとんど変わらない場合、2) 交換後の分離度が交換前よりも小さくなる場合、3) 逆に交換前よりも大きくなる場合の3つのケースが考えられます。

1) は問題ありません。2) と3) では、特異性確保の観点からは、2)の方が問題となることから、分離能の悪いカラムや劣化して分離が悪くなったカラムなど、特異性の担保が危ぶまれるカラムが試験に使われるのを防ぐために、「分離度#以上」との規定が設けられます。

では、3)のケースは問題ないかといいますと、例えば、「分離度は3以上」と規定されているとき、交換前に3.5であった分離度が7になった場合に、

何の検証も行わずにこのカラムを使って品質試験を続けてもよいのでしょうか？

「分離度は3以上」の要件にも、溶出順の要件にも適合していますので、杓子定規に言えば、何も問題はないといえるかもしれません。しかしながら、分離度がこれまでの倍になるような大きな溶出パターンの変化が分析システムに起こっているわけですから、分析システムが本当にカラムの交換前と同じ性能を有しているかどうか懸念されます。したがって、試験結果の信頼性を確保する立場からは、何のチェックも行わずにこのカラムを使って品質試験を続けてよいとはいえません。

以上の考察からは、カラムの交換によって分離度がプラスの方向へ大きく変化する場合についても、再バリデーションを行う必要があると考えられます。

更に、溶出順が逆転するケースについても、次のように考察されます。このケースは、Table 10に示した分離度の計算式において、 $t_{R2} > t_{R1}$ とされている2つのピークの保持時間が逆転して $t_{R2} < t_{R1}$ となってしまう、計算される分離度 R_s が計算上マイナスになってしまうケースに相当します。

この場合、杓子定規に考えれば、「分離度#以上」(#はプラスの数値)と規定されているのに、マイナスとなってしまったのですから、このカラムの使用は不適切との判断を下すこともできるように思われます。

これに対して、特異性の確保という観点から考察すれば、マイナス側に転じたとしても絶対値として同じ数値以上であれば(すなわち、被検成分と分離確認用物質との分離さえ十分であれば)、品質試験には使用可能ではないかと思われれます。

結局、この場合も、溶出順が逆転するような大きな変化が分析システムで起こっていることから、再バリデーションを行って、このカラムを試験に使ってよいかを検証することが適切だと思われれます。

このように、「分析システム変更時の管理」を行うとともに、分離度の規定を活用することによって、溶出順の規定を必須としなくても、分析結果の信頼性を確保することは可能と考えられます。USPが溶出順を要求していないのも、分離度を要求することで十分であるとの判断があるように思われれます。

9.3 理化学試験法委員会の結論 (Table 11)

理化学試験法委員会では、この問題について、最

Table 11 溶出順の規定は必須か？ (3)

日局理化学試験法委員会では、最終的に次の対応を取ることにした。

- 1) 日局に収載する HPLC/GC 法には、下記の 2) を前提として、システムの性能を次のように規定し、定量法の場合には溶出順の規定を必須のものとし、しないこととする：

「定量法では、原則として、被検成分と分離確認用物質（基本的には、隣接するピークが望ましい）との分離度、及び必要な場合には、溶出順で規定する。純度試験では、原則として、被検成分と分離確認用物質（基本的には、隣接するピークが望ましい）との分離度及び溶出順で規定する。」

- 2) 参考情報収載予定の「システム適合性」に、分析システムの変更時には、当該の変更が適切なことを確認して、評価の尺度に狂いが生じないように管理する必要があり、カラムの交換前のチェックにおいて溶出順が逆転するなど、溶出パターンが大きく変わる場合には、そのカラムを品質試験に用いることが適切かどうか再検証する必要がある旨を記載する。

最終的に Table 11 に示すような対応をとることにしました。

HPLC/GC 法に追加する規定については、参考情報へ収載予定の「システム適合性」の一般的規定に「分析システム変更時の管理」の規定を盛り込むことを前提として、定量法の場合には溶出順の設定を必須のものとし、溶出順を規定した方がよいケースもあることを考慮して、「分離度、

及び必要な場合には、溶出順で規定する。」と記載することにしました。

Fig. 1 は、カラムを交換したときに取るべき措置を分離度に基づいて判断するときのイメージを示したものです。「システムの性能」に「分離度 3 以上」と規定されており、変更前のシステムでの分離度の実測値が n の場合を想定しています。分離度と溶出順の両者が規定されている場合には、変更後の分離度が 3 未満になってしまうと、マイナスとなった場合も含めてすべて不適と判断されることとなります。カラムの交換によって分離度が n よりかなり大きくなってしまふ場合は、規定の上では適となりますが、変更時の管理の観点からは再検証が必要と考えられます。これに対して、分離度のみが規定されている場合には、不適と明確に言える範囲は 3~ -3 の間です。 -3 以下の領域については、上述のように不適とも考えられますし、被検成分と分離確認用物質との分離は十分と思われることから、不適としなくてもよいとも考えられます。いずれにせよ、このカラムの導入にあたっては、再検証が必要と考えられます。

10. 「システムの再現性」を巡る問題点

「システムの再現性」については、Table 3 で示したように、グラジエント法を用いる場合や溶出の遅い成分を含む試料を分析する場合など、1 回の試験に長い時間を要する試験の場合の対応、試験の繰り返し回数や許容限度値をどのように設定するかな

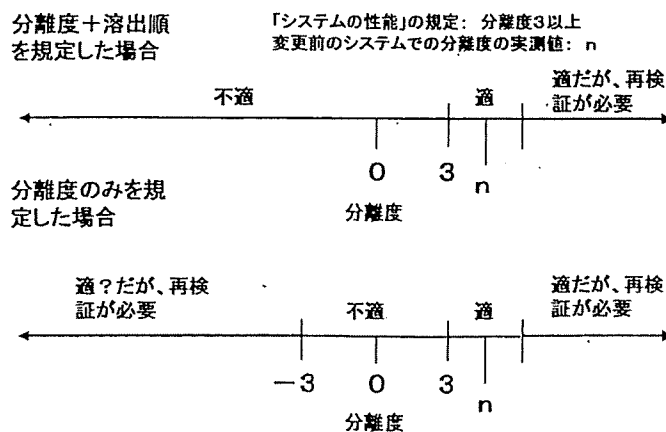


Fig. 1 カラムを交換したときに取るべき措置の分離度に基づく判断のイメージ

どが問題となります。

11. 「システムの再現性」の試験方法と適合要件 (Table 12)

「システムの再現性」の許容限度値は、通常、繰り返し注入における被検成分のレスポンスの相対標準偏差 (RSD) として規定されます。「システムの再現性」の試験は、試料の試験を始める前にすべて済ませておかなければいけないと決められているように考えている方が多いようですので、標準溶液の注入を、例えば、一連の試料の試験の前後に分けて行う方法や試料の試験の間に組み込んで行う方法を採用してもよいことを明記しました。試料の試験を始める前にだけ分析システムの稼働状態をチェックするよりも、このような方法の方が、長い時間にわたる稼働性能をチェックすることになりますので、試験結果の信頼性確保の観点からは好ましいようにも思われます。

繰り返し注入の回数は6回を原則としましたが、1回の分析に時間がかかる場合には、6回注入時にシステムの再現性がどのくらい担保されているかを確認した上で、それと同等の再現性が担保されるように、達成すべきばらつきの許容限度値を厳しく規定することによって回数を減らしてもよいと規定しました。その方法並びに許容限度値の目安については、第二追補に収載予定の参考情報に記載することとしました。

S/N比 次の式で定義する。

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

H : 対象物質のピークの基線(バックグラウンドノイズの中央値)からのピーク高さ

h : 対象物質のピークの前後における試料溶液または溶媒ブランクのクロマトグラムのバックグラウンドノイズの幅

なお、基線及びバックグラウンドノイズは対象物質のピーク高さの中点におけるピーク幅の20倍に相当する範囲で測定する。また、溶媒ブランクを用いる場合、対象物質が溶出する位置付近で、上記とほぼ同様の範囲で測定する。

Table 12 「システムの再現性」の試験方法と適合要件

- 「システムの再現性の許容限度値は、通常、繰り返し注入における被検成分のレスポンスの相対標準偏差 (RSD) として規定する。試料溶液の注入を始める前に標準溶液の注入を繰り返す形だけでなく、標準溶液の注入を試料溶液の注入の前後に分けて行う形や試料溶液の注入の間に組み込んだ形でシステムの再現性を確認してもよい。」
- 「繰り返し注入の回数は6回を原則とするが、グラジエント法を用いる場合や試料中に溶出が遅い成分が混在する場合など、1回の分析に時間がかかる場合には、6回注入時とほぼ同等のシステムの再現性が担保されるように、達成すべきばらつきの許容限度値を厳しく規定することにより、繰り返し注入の回数を減らしてもよい。」
 - 繰り返し回数を減らしたときにどの程度の許容限度値とすべきかの目安については、参考情報「システム適合性」に記載する。
- 「システムの再現性の許容限度値は、当該試験法の適用を検討した際のデータと試験に必要なとされる精度を考慮して、適切なレベルに設定する。」
 - 設定すべき許容限度値の目安については、参考情報「システム適合性」に記載する。

12. S/N比 (Fig. 2) 及びピークバレー比 (Fig. 3) の定義

HPLC/GC法の用語の定義にS/N比及びピークバレー比を追加記載しました。

ピークバレー比とは、クロマトグラム上の2つの

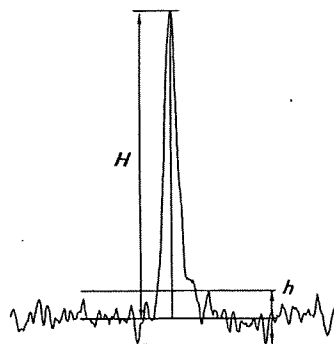


Fig. 2 S/N比の定義

ピークバレー比 クロマトグラム上の二つのピークの間でベースライン分離が達成できないときに、それらのピーク間の分離の程度を示す指標となるもので、ピークバレー比 p/v として次の式で定義する。

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

H_p : マイナーピークのピークの基線からのピーク高さ
 H_v : マイナーピークとメジャーピークの間で分離曲線の最下点(ピークの谷)のピークの基線からの高さ

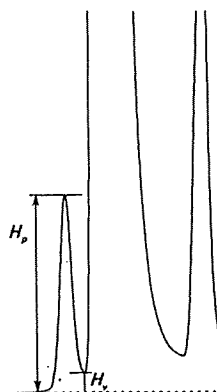


Fig. 3 ピークバレー比の定義

ピークでベースライン分離が達成できないときに、それら2つのピーク間の分離の程度を示す指標となるものです。

日局では、ヒトインスリン(遺伝子組換え)の各条において、ピークバレー比によりピーク間の分離の程度を規定しています。

13. 参考情報に収載予定の「システム適合性」の記載内容について (Table 13)

日局 15 第二追補で参考情報に収載予定の「システム適合性」の一般的規定についてご説明します。なお、この参考情報については、現在、改正案に対して寄せられた意見を基に修正案を作成中の段階にあります。以下の説明は、修正案に基づいて行いますが、告示までに多少の変更がありうることをご承知下さい。

13.1 まえがき

まえがきには、「試験結果の信頼性を確保するためには、日本薬局方などに収載されている試験法を含め、既存の試験法を医薬品の品質試験に適用する際に、試験を行う施設の分析システムを使って当該試験法が目的に合う試験結果を与えることをあらかじめ検証することが肝要であり、そうした検証を行った上で、分析システムの稼動状態を日常的に確認する試験としてシステム適合性の試験を行う必要がある。」と記載し、「試験法適用時の検証」と「システム適合性」との関係を示しました。

試験法適用時の検証は、分析に携わるものの常識とも言えるものです。これまでしたことのない試験

を行う場合、公定書に記載されている試験法であっても、被検成分はちゃんと検出されるか、妨害はないか、添加回収率はどうかなどの検証を行ってから実際の試料の分析に取り掛かることは、分析者としての常識といえます。これらの検証作業は、公定法取載時に行われた分析法バリデーションを自分のところの分析システムに合わせて、簡略化した形で確かめていることとなります。

Table 14 に示したように、USP31 の<1225> Validation of Compendial Procedures にも、「USP や NF に収載の分析法を医薬品の試験に用いる場合には、その方法の正確さや信頼性について再確認する必要はなく、その方法が実際に使う条件下で試験の目的に適合することを確かめておけばよい。(but merely verify their suitability under actual conditions of use.)」との記載があり、公定法を使う場合であっても、事前に、その方法により、その試験室のシステムを用いて、試験の目的に合う結果を出し得ることを確認(公定法適用時の検証)するよう、FDA が求めていることが明記されています。

13.2 システム適合性の意義

「システム適合性」とは、試験法の適用時に目的に合う試験結果を与えることが検証された分析システムが、実際に品質試験を行う際にも適切な状態を維持していることを確認するための試験方法と適合要件を規定したものです。

通常、一連の品質試験ごとに適合性を確認するための試験が行われます。規定されたシステム適合性

Table 13 参考情報「システム適合性」(案)の記載

まえがき

「試験結果の信頼性を確保するためには、日本薬局方などに収載されている試験法を含め、既存の試験法を医薬品の品質試験に適用する際に、試験を行う施設の分析システムを使って当該試験法が目的に適う試験結果を与えることをあらかじめ検証することが肝要であり、そうした検証を行った上で分析システムの稼働状態を日常的に確認する試験としてシステム適合性の試験を行う必要がある。」

(試験法適用時の検証)

- 分析に携わる者の常識
- USPにおける記載

1. システム適合性の意義

「「システム適合性」とは、試験法の適用時に目的に適う試験結果を与えることが検証された分析システムが、実際に品質試験を行う際にも適切な状態を維持していることを確認するための試験方法と適合要件について規定したものであり、

- 通常、一連の品質試験ごとに適合性を確認するための試験が行われる。
- システム適合性の試験方法及び適合要件は、医薬品の品質規格に記載される試験方法の中で規定する。
- 規定されたシステム適合性の適合要件が満たされない場合には、その分析システムを用いて行った品質試験の結果を採用してはならない。」

2. システム適合性設定時の留意事項

「規格試験法中に設定すべきシステム適合性の項目は、試験の目的と用いられる分析法のタイプに依存している。

- システム適合性の試験は、日常的に行う試験であることから、使用する分析システムが目的とする品質試験を行うのに適切な状態を維持していることを確認するのに必要な項目を選び、迅速かつ簡便に行えるような試験として設定することが望ましい。
- 例えば、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いた定量的な純度試験の場合には、システムの性能(試験対象物質を特異的に分析しうることの確認)、システムの再現性(繰り返し注入におけるばらつき程度の確認)、検出の確認(限度値レベルでのレスポンスの数値的信頼性の確認)などの項目について設定する。

(1) 許容限度値の設定

(2) システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法

3. 分析システム変更時の考え方(分析システム変更時の管理)

「目的に適う試験結果を与えることが検証された試験法と分析システムが基本的に変更されずに、品質試験が日常的に繰り返される場合には、システム適合性で規定された適合要件を満たしていることを確認すればよい。」

「しかしながら、当該の品質試験が長期にわたって続けられる間には、試験法や分析システムにも種々の変更が必要となる状況も起こり得る。

- これらの変更は、製造方法の変更の場合のように製品の品質に直接影響を与えるものではないが、品質を評価する際の尺度に影響を与えるものであり、変更の結果、評価の尺度に狂いが生じれば、適切でない品質のものを許容したり、逆に適切な品質のものを排除したりすることも起こり得る。
- そのため、試験法や分析システムの変更時には当該の変更が適切なことを確認して、評価の尺度に狂いが生じないように管理する必要がある。」

「試験法を変更する場合には、変更の内容に応じた適切なバリデーションを行う。

一方、例えば、同じ試験室において液体クロマトグラフィーの装置やカラムの更新、試験者の交替などを行う場合には、上述の変更時の管理の一環として、変更した分析システムにより少なくともシステム適合性の試験を行って、変更前と同等の結果が得られることを確認する。

- 同等な結果が得られないとき、例えば、液体クロマトグラフィーのカラムを交換したとき、新しいカラムによって試験の対象成分と分離確認用物質との溶出順が逆転するなどの溶出パターンの大きな変化がもたらされるような場合には、特異性などが担保されているかが懸念されるため、そのカラムを当該品質試験に用いても目的に適う試験結果が得られることを再検証する必要がある。」

Table 14 USP31 の<1225> Validation of Compendial Procedures の記載

"According to these regulations*, users of analytical methods described in the USP-NF are not required to validate accuracy and reliability of these methods, but merely verify their suitability under actual conditions of use".
(*: the Current Good Manufacturing Practice regulations)

[cGMPでは、USPやNFに収載の分析法を医薬品の試験に用いる場合には、その方法の正確さや信頼性について再確認する必要はなく、その方法が実際に使う条件の下で試験の目的に適合することを確かめておけばよいとされている。]

の適合要件が満たされない場合は、その分析システムを用いて行った品質試験の結果を採用してはならないとされています。

13.3 システム適合性設定時の留意事項

規格試験法の中に設定すべきシステム適合性の項目は、試験の目的と用いられる分析法のタイプに依存しています。

HPLC/GC法のシステム適合性の規定も、参考情報のシステム適合性の一般的規定も、主に定量的な試験を念頭に置いた記載がなされているため、例えば、限度試験についてはあまり触れられていません。限度試験の分析法バリデーションでは、特異性

と検出限界の評価が求められていますので、システム適合性においても、それに対応した項目を選べばよいわけです。品質試験を行おうとする方が、当該の試験の場合には、どのような項目の評価が必要かを考えて、適切に設定する必要があります。

以下、HPLC/GC法のシステム適合性の規定を補完する事項として、HPLC法におけるシステムの再現性の許容限度値設定の目安、並びに品質試験の質を落とさずにシステムの再現性の試験の繰り返し回数を減らす方法について説明します。

13.3.1 HPLC法におけるシステムの再現性の許容限度値設定の目安 (Table 15)

システムの再現性の試験の繰り返し注入の回数は6回を基本とし、6回の繰り返し注入における許容限度値を参考情報の記載 (Table 15) を参考にして設定します。ただし、日局収載の医薬品各条に記載された試験法を用いる場合には、各条の規定に従います。

原薬の定量法については、含量規格が98.0~102.0%の場合のように、規格の幅が5%以下の場合には「1.0%以下」を目安として適切に設定することとしています。これは、今までいついかなる場合にも適用しうるもののように運用されており、厳しすぎるとの声が強かった $n=6$, $RSD \leq 1.0\%$ の原則が適用される範囲を限定することをねらいとし

Table 15 設定すべき許容限度値の目安

「許容限度値の設定

(略) 6回繰り返し注入における許容限度値を下記の記載を参考にして設定する。なお、日本薬局方収載の医薬品各条に規定された試験法により試験を行う場合には、当該各条に規定された許容限度値に従う。

原薬の定量法 (原薬の含量がほぼ100%, あるいはそれに近い場合) : 分析システムが、製品中の有効成分含量のばらつきの評価に適切な精度で稼働していることを確認できるレベルに設定する。例えば、含量規格の幅が、液体クロマトグラフィーを用いた定量法において含量規格として設定されることの多い98.0~102.0%の場合のように、5%以下の場合には「1.0%以下」を目安として、適切に設定する。

製剤の定量法 : 製剤の含量規格の幅、並びに原薬の定量法におけるシステム再現性の規定 (原薬と製剤に同様の試験法が用いられている場合) を考慮に入れて、適切に設定する。

類縁物質試験 : 標準溶液やシステム適合性試験用溶液等、システム再現性の試験に用いる溶液中の有効成分濃度を考慮して、適切に設定する。試料溶液を希釈し、0.5~1.0%の有効成分濃度の溶液を調製して、システム再現性の試験に用いる場合には、通例、「2.0%以下」を目安として、適切に設定する

なお、上記の目安は、ガスクロマトグラフィーの場合には適用しない。」

たものともいえます。

また、類縁物質試験については、日局化学薬品委員会において設定の原則としている「2.0%以下」を目安として適切に設定することとしました。

13.3.2 繰り返し注入の回数を減らす方法

グラジエント法を用いる場合や試料中に溶出の遅い成分が混在する場合など、1回の分析に時間がかかる場合に、システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法 (Table 16) を記載しました。

この方法により、必要な場合には、繰り返し注入の回数を減らして設定することができるし、日常の品質試験の中でも同様な考えに基づいて運用することもできます。

しかしながら、繰り返し注入の回数を減らすことは、システムの再現性を確認する上で1回の試験の重みが増すということであり、試験者に対する教育訓練及び装置の適切な維持管理がより重要になるこ

とに留意する必要があります。

Table 16 は、システムの再現性の試験の質を繰り返し回数が6回 ($n=6$) の試験と同等に保つために、 $n=3\sim 5$ の試験で達成すべきバラツキの許容限度値を示したものです。この表から、例えば、許容限度値が $n=6$ で1%の場合には、 $n=4$ の試験では0.72%の許容限度値を設定すればよいことがわかります。

この方法の設定根拠となる OC 曲線を Fig. 4 に示しました。分析システムの性能が10.45%のところですべての OC 曲線が1点に集まっており、排除すべき性能の分析システムがシステムの再現性の試験に合格してしまう確率が一定 (5%) となっていることが確認できます。

13.4 分析システムの変更時の考え方

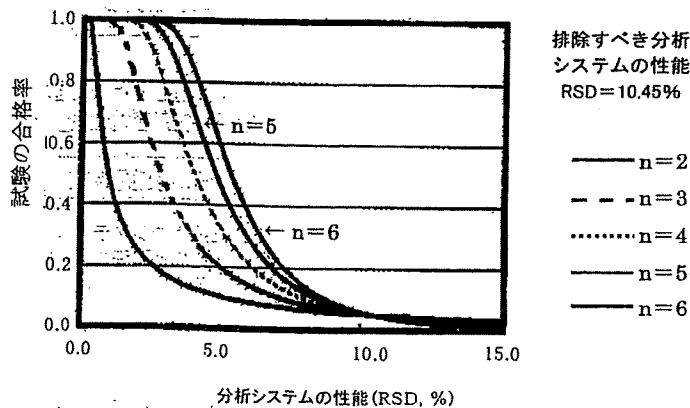
(Table 16)

分析システムを変更した場合には、変更した条件で変更前と同等の試験結果が得られることを確認す

Table 16 繰り返し回数を減らしたときの許容限度値の目安

$n=6$ の試験に規定されたばらつき許容限度値		許容限度値 (RSD) *					
		1%	2%	3%	4%	5%	10%
達成すべきばらつき許容限度値	$n=5$	0.88%	1.76%	2.64%	3.52%	4.40%	8.81%
	$n=4$	0.72%	1.43%	2.15%	2.86%	3.58%	7.16%
	$n=3$	0.47%	0.95%	1.42%	1.89%	2.37%	4.73%

* 排除すべき性能の分析システムがシステム適合性の試験に合格する確率を5%とした。



各繰り返し数の試験における許容値 (RSD, %): $n=2$; 0.65, $n=3$; 2.36, $n=4$; 3.57, $n=5$; 4.40, $n=6$; 10.45

Fig. 4 システム適合性試験において排除すべき分析システムの性能を一定にした場合の OC 曲線

る必要があります。

分析システムに変更がない場合には、システム適合性で規定された適合要件を満たしていることを確認すればよいわけです。

しかしながら、当該の品質試験が長期にわたって続けられる場合、試験法や分析システムにも種々の変更が必要となる状況も起こり得ます。これらの変更は、製造方法の変更の場合のように、品質に直接影響を与えるものではありませんが、品質を評価する際の尺度に影響を与え得るものです。変更の結果、評価の尺度が狂えば、適切でない品質のものを許容したり、逆に適切な品質のものを排除するようなことが起こり得るため、試験法や分析システムの変更時には、当該の変更が適切なことを確認して、評価の尺度に狂いが生じないように管理する必要があります。

試験法を変更する場合は、変更の内容に応じて適切なバリデーションを行う必要があります。一方、同じ試験室において、HPLCの装置やカラムの変更、試験者の交替などを行う場合は、上述の変更時の管理の一環として、変更したシステムによって、システム適合性の試験を（他に必要と考えられる試験があれば、その試験も）行い、変更前と同等の結果が得られることを確認します。同等な結果が得られれば、そのまま品質試験を続ければよいわけですが、同等な結果が得られない場合、例えば、前述し

たようなカラムの交換によって溶出パターンの大きな変化が生じた場合などには、そのカラムを当該の品質試験に用いて目的に合う試験結果が得られることを再検証する必要があります。

13.5 品質試験結果の信頼性確保のためのフロー (Fig. 5)

Fig. 5に示すように、新規の試験法を開発したときには、「分析法バリデーション」を行う必要があります。これに対して、既存の試験法を自分のところで新しく適用する場合には、まえがきに記載された「試験法適用時の検証」が求められます。

実際に品質試験を始めてから分析システムを変更することなく試験を継続している場合は、「システム適合性試験」を実施して、システムの性能が維持されていることを確認していればよいわけです。しかしながら、分離能が低下するなど、カラムの劣化が明らかとなった場合は、その原因を検討し、カラムを交換するなどの措置を取る必要が出てきます。カラムの交換など、分析システムに変更を加えた場合には、変更した条件でシステム適合性の試験を行い、変更前と同等の結果が得られることを確認します。同等の結果が得られれば、そのまま品質試験を継続し、同等といえない結果が得られた場合には、適切な再バリデーションを行うこととなります（「分析システム変更時の管理」）。

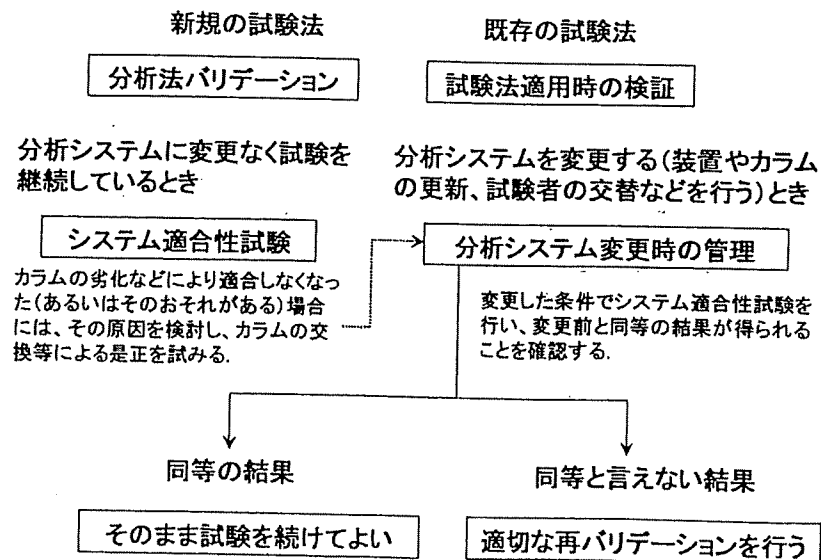


Fig. 5 品質試験結果の信頼性確保のためのフロー

14. おわりに

USPでは、USP31 1st Supplementで“Qualification of Analytical Instruments”（分析装置の適格性評価）が新しく収載されており、その中で、USPの試験結果の信頼性確保の考え方の全体像を示しています。「分析装置の適格性評価」を土台として、その上に「分析法バリデーション」、「システ

ムの適合性」、「品質管理試料の分析」などを重層的に積み上げて、試験結果の信頼性を確保していくといった考え方であり、概ね妥当なもののように思われます。

日局でも、これらを参考にして、品質試験結果の信頼性確保のため規定を更に整備していきたいと考えています。

ヘパリン純度試験に関する研究 (第4報)

合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日局標準品としての適用性の評価

川崎 ナナ^{*1}, 橋井 則貴^{*1}, 杉本 直樹^{*2}, 高倉 大輔^{*1},
秦 艶^{*1}, 細山 沙織^{*3}, 戸井田敏彦^{*3}, 山口 照英^{*1}

(受付:平成20年9月8日, 受理:平成20年10月27日)

Studies on the Heparin Purity Test (Part 4)

Evaluation of Synthesized Over-sulfated
Chondroitin Sulfate for JP StandardNana KAWASAKI^{*1}, Noritaka HASHII^{*1}, Naoki SUGIMOTO^{*2},
Daisuke TAKAKURA^{*1}, Yan QIN^{*1}, Saori HOSOYAMA^{*3},
Toshihiko TOIDA^{*3} and Teruhide YAMAGUCHI^{*1}

緒 言

過硫酸化コンドロイチン硫酸 (Over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS) は, すべての水酸基が硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステルであり (Fig. 1), 米国やドイツにおいて急激な血圧低下やアナフィラキシー反応を引き起こしたヘパリンナトリウム製剤に含まれていた異物の本体として特定されている¹⁻³⁾. 米国等で発生した有害事象を受けて, 我が国でも緊急対応として, 日本薬局方 (日局) 各条ヘパリンナトリウム及び日本薬局方外医薬品規格 2002 各条ヘパリンカルシウムを一部改正し, 純度試験に ¹H-核磁気共鳴 (NMR) スペク

トル測定法を用いた OSCS の限度試験を追加することとなった^{4,5)}. これらの試験は約 0.5% の OSCS を限度値とする限度試験であり, システム適合性において, 検出限界相当の OSCS 標準品を含むヘパリン溶液の ¹H-NMR スペクトルを測定することにより, 分析システムの特異性と検出感度を確認することとされている. したがって, システム適合性確認のための日局 OSCS 標準品の確立は急務である.

国立医薬品食品衛生研究所では, OSCS 混入ヘパリンナトリウムから OSCS を精製し (OSCS-NIHS), FDA から入手した OSCS との構造特性の類似性を確認した上で, OSCS 限度試験設定のための OSCS 標準物質として用いてきた. しかし, OSCS が混入

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 同上
Division of Environmental Chemistry

^{*3} 千葉大学大学院薬学研究科 千葉市稲毛区弥生町 1-33 (〒263-8522)
Graduate school of Pharmaceutical Sciences & Faculty of Pharmaceutical Sciences, 1-33, Yayoi-cho,
Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
E-mail: nana@nihs.go.jp

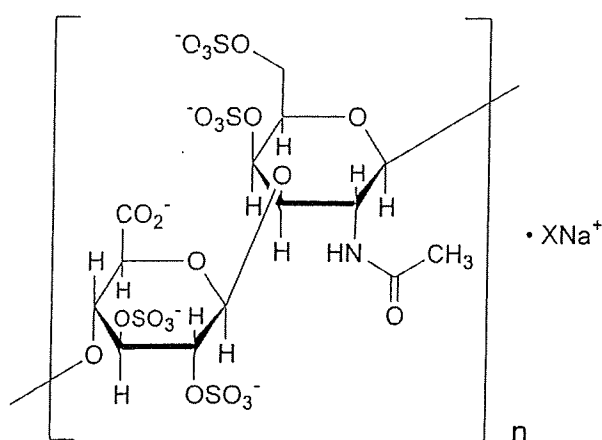


Fig. 1 OSGS の構造

したヘパリンナトリウムの供給には限りがあり、OSGS-NIHS を日局 OSGS 標準品として提供することは困難であることから、日局 OSGS 標準品を安定的に供給するための対策が不可欠となった。戸井田ら⁶⁾は、トリブチルアミン及び三酸化イオウピリジニウム錯体を用いてウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルを更に硫酸エステル化することにより、すべての水酸基が硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル (OSGS-T) を得ることに成功している。この OSGS-T と OSGS-NIHS の品質特性、すなわち、構造特性、純度、及びヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム限度試験条件下での分析結果に類似性が確認できれば、OSGS-T を日局 OSGS 標準品として利用できる可能性が高い。本研究は、OSGS-T の日局 OSGS 標準品としての適用可能性を明らかにすることを目的として、OSGS-NIHS 及び OSGS-T の品質特性を比較したものである。

実験方法

1. 試料

OSGS 混入ヘパリンナトリウムは日本バルク薬品⁷⁾より供与された。ウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルは New Zealand Pharmaceuticals (Palmerston, ニュージーランド) より購入した。ヘパリンナトリウムは、ニプロファーマ⁸⁾より供与された。ヘパリンカルシウムは味の素⁹⁾及び沢井製薬¹⁰⁾から供与された。3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-*d*₄ (TSP, 重水素化率 98%) は、アルドリッチ社から購入した。重水 (重水素化率

99.9%) はアイソテック社より購入した。

2. OSGS-NIHS の精製

400 mg の OSGS 混入ヘパリンナトリウムを 1.0 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した液につき、陰イオン交換 HPLC を行った⁷⁾。HPLC 装置は、HITACHI Model D-7000 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。カラムは、ジエチルアミノエチル (DEAE) 基を結合させた多孔性親水ポリマーゲル (粒子径 10 μm) を充てんした TSKgel DEAE-5PW (21.5 mm I. D.×15 cm, 東ソー) を用いた。溶離液には、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (A 溶媒) と、20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M NaCl (B 溶媒) を用いた。流速は 4 mL/min, またカラム温度は 40℃ に設定した。サンプル注入前及び注入後 1 分間は A 溶媒を送液した。次に、39 分かけて B 溶媒を 100% まで直線的に上昇させた。検出波長は 230 nm とした。OSGS のピーク画分を分取し (Fig. 2A), 最終濃度 70% (v/v) になるよう冷エタノールを加え、激しく攪拌した。氷上で 30 分静置した後、遠心分離 (4℃, 9,000×g, 15 分間) により OSGS を回収した。OSGS の沈澱を遠心濃縮装置で乾燥した後、1.0 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した。更に、同様に再度 HPLC を行った。得られた OSGS のピークを分取し、エタノール沈澱により OSGS を回収した後、沈澱を適量の超純水に溶解し、凍結乾燥して OSGS-NIHS とした。

3. OSGS-T の合成

平均分子量約 15 kDa のウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルナトリウムから、陽イオン交換カラムを用いてナトリウムを除去し、トリブチルアミン塩に交換した。凍結乾燥後、コンドロイチン硫酸エステルトリブチルアミン塩 100 mg を 20 mL ジメチルスルホキシドに溶解し、500 mg の三酸化イオウピリジニウム錯体を加えた後、40℃ にて 6 時間反応させた。反応終了後、水 20 mL を加えて分子量 10 kDa カットの透析チューブに移し、水に対して 24 時間透析して試薬を除去した後、凍結乾燥し、OSGS-T とした。

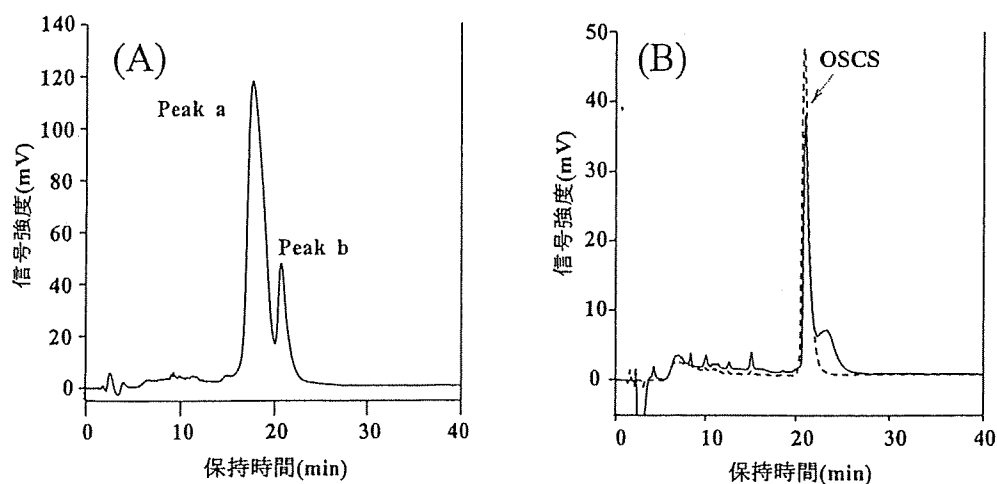


Fig. 2 陰イオン交換 HPLC による OSCS の精製

(A) ヘパリンナトリウムからの OSCS の精製. Peak a, ヘパリンナトリウム; peak b, OSCS.

(B) OSCS-T の精製. 実線, OSCS-T; 破線, OSCS-NIHS.

4. DEAE-OSCS-T の調製

OSCS-T 約 10 mg を 1.0 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し、実験方法 2. に準じて HPLC を行い、主なピークを回収した (Fig. 2B). 最終濃度 70% (v/v) になるよう冷エタノールを加え、実験方法 2. と同様に処理した後、凍結乾燥し、DEAE-OSCS-T とした。

5. NMR

5.1 $^1\text{H-NMR}$

OSCS-NIHS, OSCS-T, 及び DEAE-OSCS-T 4.0 mg をそれぞれ最終濃度 0.01% (w/v) の TSP を含む重水溶液 (TSP 重水溶液) 0.60 mL に溶かして試料溶液とした。これらの液につき TSP を内部基準物質として日本薬局方一般試験法 NMR <2.2I> に従い $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。装置は日本電子 (JEOL) の JNM-ECA 500 (500 MHz) を用いた。温度は 33°C に設定し、スピニングはオフとした。データポイント数は 32,768 とし、スペクトル範囲は DHO のシグナルを中心に ± 6.0 ppm とした。積算回数は 32 回、パルス角は 90°, 繰り返しパルス待ち時間は 20 秒、ダミーキャンは 4 回とした。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。

別に、ヘパリンナトリウム又はヘパリンカルシウム 20 mg を、0.10 mg の OSCS-NIHS 又は OSCS-T

を含む TSP 重水溶液 0.60 mL に溶解した。これらの液につき、上記と同様の条件で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。

5.2 二次元 NMR

1) ^1H Detected Multiple Quantum Coherence (HMQC)

OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T 4.0 mg をそれぞれ TSP 重水溶液 0.60 mL に溶かし OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T 試験溶液とした。この液につき、JEOL JNM-ECA 500 を用いて HMQC スペクトルを測定した。データポイント数は 1,024 × 256、スペクトル範囲は ^1H 側を $\delta -1.0 \sim 6.0$ ppm, ^{13}C 側を $\delta -10.0 \sim 200$ ppm とした。温度を 33°C、繰り返しパルス待ち時間を 1.5 秒と設定し、ダミーキャンを 4 回行った。積算回数は 128 回とした。

2) ^1H - ^1H Correlation Spectroscopy (COSY)

実験方法 5.2 1) で調製した OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T 試験溶液について JEOL JNM-ECA 500 を用いて COSY スペクトルを測定した。データポイント数は 1,024 × 512、スペクトル範囲は $\delta -1.0 \sim 6.0$ ppm とした。温度を 33°C、繰り返しパルス待ち時間を 1.5 秒と設定し、ダミーキャンを 4 回行った。積算回数は 16 回とした。

6. OSCS-T の OSCS-NIHS への換算

OSCS-NIHS 1.0 mg を最終濃度 0.001% (w/v) の TSP を含む重水溶液 (0.001% TSP 重水溶液) 1.0 mL に溶かし, OSCS-NIHS 原液 (1.0 mg/mL) とした. この液 0.08, 0.10, 0.15 及び 0.20 mL に, それぞれ 0.52, 0.50, 0.45 及び 0.40 の 0.001% TSP 重水溶液を加えて 0.08, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg/0.6 mL OSCS-NIHS 溶液とした. これらの液につき, スピニングをオフとし, 25°C で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した. 装置は JEOL の JNM-ECA 600 (600 MHz) を用いた. データポイント数は 32,768, スペクトル範囲は δ 5.0 ppm を中心に ± 7.5 ppm, パルス角は 90°, 繰り返しパルス待ち時間は 20 秒と設定し, ダミーキャンは 2 回行った. 積算回数は TSP のシグナルの S/N 比 50 以上が得られる回数とし, ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた. 測定後, ベースラインを基準として TSP 由来のシグナルの積分値 (δ 0.00 \pm 0.02 ppm) に対する OSCS-NIHS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの積分値 (ピーク中心 \pm 0.01 ppm) を求めた. *y* 軸を TSP のシグナルの積分値に対する OSCS-NIHS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの相対積分値として, また, *x* 軸を OSCS-NIHS 量 (0.08, 0.10, 0.15, 0.20 mg) として検量線を作成した.

別に, 0.15 mg の OSCS-T に, 0.001% TSP 重水溶液 0.60 mL を加えて OSCS-T 溶液とし, 上記と同一条件で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した. ベースラインを基準として TSP 由来のシグナルの積分値 (δ 0.00 \pm 0.02 ppm) に対する OSCS-T の *N*-アセチル基に由来するシグナルの積分値 (ピーク中心 \pm 0.01 ppm) を求め, 先に作成した検量線から OSCS-NIHS 換算量 (mg) を求めた.

結 果

1. 陰イオン交換 HPLC

DEAE カラムを用いた陰イオン交換 HPLC (DEAE-HPLC) におけるグリコサミノグリカン硫酸エステル保持時間は, 結合している硫酸エステルの数に影響され, 硫酸エステルが 2 糖単位あたり 4 個結合している OSCS は, 2~2.5 個結合しているヘパリンよりも後に溶出される (Fig. 2A). OSCS-NIHS 及び OSCS-T の硫酸エステル化の度

合いを比較する目的で, DEAE-HPLC における OSCS-NIHS 及び OSCS-T の溶出パターンを比較した. 主成分はほぼ同じ時間 (約 21 分) に溶出されことから, どちらも硫酸エステル化の度合いはほぼ同じであることが推定された. しかし, OSCS-T からは主ピークの後 (約 23 分) にマイナー成分が溶出され, UV 吸収から算出した主ピークに対するマイナーピークの割合は約 30% であった (Fig. 2B).

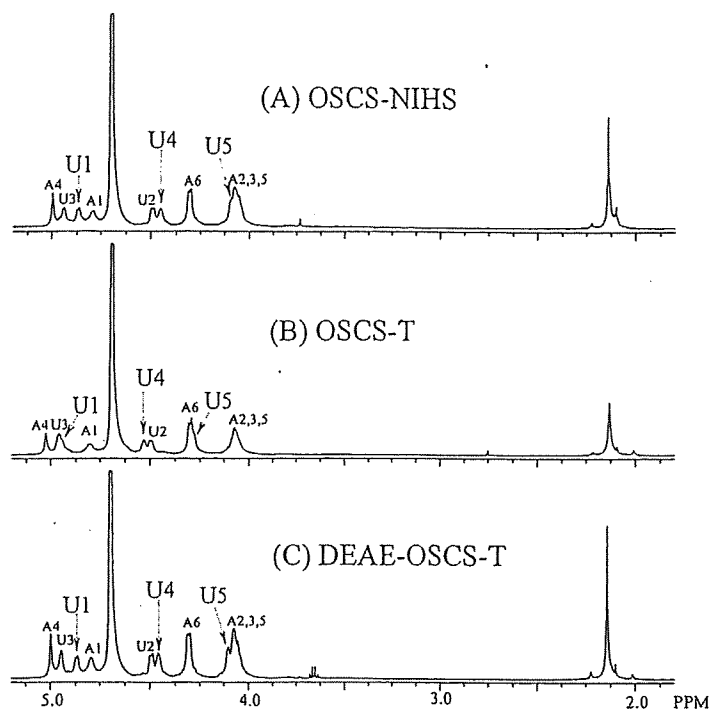
2. $^1\text{H-NMR}$

OSCS-NIHS 及び OSCS-T の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較したところ, OSCS-NIHS 及び OSCS-T の *N*-アセチルガラクトサミンのプロトンに由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致するが, OSCS-T のグルクロン酸の 1, 4 及び 5 位のプロトンに相当する δ 4.94, 4.53 及び 4.28 ppm のシグナルは, OSCS-NIHS より低磁場にシフトしていることが明らかになった (Fig. 3A, 3B, Table 1).

OSCS-NIHS は, NaCl を含む溶離液を用いた DEAE-HPLC により単一ピークのリチウム塩として回収されたものであるが, OSCS-T は水に対して透析したものであり, ナトリウムの割合が異なることや, マイナー成分が含まれていることなど, OSCS-NIHS とわずかな違いがある. これらの差異が化学シフトの違いの原因であることが推察されたので, OSCS-T から NaCl 含有溶離液と DEAE-HPLC により, 主成分のリチウム塩 (DEAE-OSCS-T) を回収し, 再度 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した. その結果, OSCS-NIHS と DEAE-OSCS-T の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルはよく一致することが確認された (Fig. 3A, 3C, Table 1).

3. HMQC 及び COSY

OSCS-NIHS 及び OSCS-T の HMQC スペクトルを比較したところ, OSCS-T のグルクロン酸の 1, 4 及び 5 位の ^1H と ^{13}C 以外の相関ピークの観測位置はほぼ一致していた (Fig. 4A, 4B). また, OSCS-NIHS と DEAE-OSCS-T の HMQC スペクトルを比較した結果, すべての相関ピークが一致した (Fig. 4A, 4C). 一方, OSCS-NIHS 及び OSCS-T の COSY スペクトルを比較したところ, 主な相関ピークは一致したが, OSCS-T のスペク

Fig. 3 OSCS の $^1\text{H-NMR}$

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T.

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位;U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す.(例) A1: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位のプロトンの観測位置を示す.

Table 1 OSCS-NIHS, OSCS-T及びDEAE-OSCS-Tの化学シフト

Monosaccharide	NIHS	OSCS-T	DEAE-OSCS-T
4,6- <i>O</i> -sulfo- <i>N</i> -acetyl-galactosamine			
H1	4.80	4.80	4.80
H2	4.08	4.07	4.08
H3	4.08	4.08	4.08
H4	5.00	5.02	5.00
H5	4.06	4.06	4.05
H6	4.31	4.30	4.31
<i>N</i> -Acetyl	2.14	2.13	2.14
2,3- <i>O</i> -sulfo-glucuronic acid			
H1	4.86	4.94 ^a	4.87
H2	4.49	4.50	4.49
H3	4.94	4.96	4.95
H4	4.46	4.53 ^a	4.46
H5	4.10	4.28 ^a	4.10

^a OSCS-NIHS と比較して低磁場にシフトしていたOSCS-Tのプロトンの化学シフト

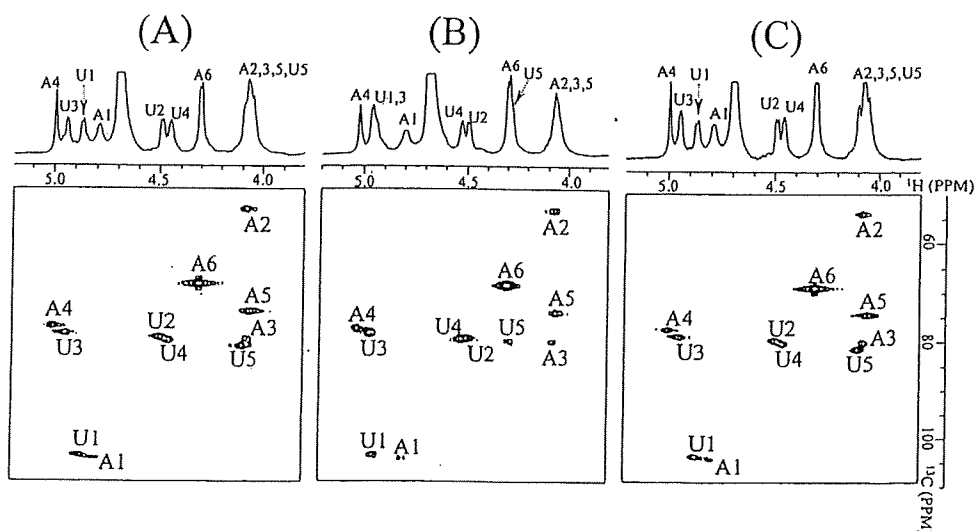


Fig. 4 OSCS の HMQC

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;

U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.

A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位; U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す。

(例) A1: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位の ^1H と ^{13}C の相関ピークの観測位置を示す。

トルの δ 4.92 と 4.06 ppm 及び δ 4.56 と 4.06 ppm の間に、OSCS-NIHS のスペクトルには認められない相関ピークが観察された (Fig. 5A, 5B)。そこで、DEAE-OSCS-T の COSY 測定を行ったところ、これらの相関ピークは消失し、OSCS-NIHS のスペクトルとほぼ一致することが確認された (Fig. 5A, 5C)。このことから、4.92 と 4.06 ppm 及び 4.56 と 4.06 ppm 間に観測された相関ピークは、OSCS-T に含まれていたマイナー成分に由来するシグナルであることが示唆された。この相関ピークは、硫酸エステル化されたヒアルロン酸の 3 及び 6 位が硫酸エステル化された *N*-アセチルグルコサミンの 1 位 (δ 4.92 ppm) と 2 位 (δ 4.06 ppm)、及び 2 位 (δ 4.06 ppm) 及び 3 位 (δ 4.56 ppm) の相関ピークの観測位置にほぼ一致することから⁸⁾、原料であるウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルナトリウムに混入していたヒアルロン酸が、硫酸エステル化されたものと推定された。以上のように ^1H -NMR, HMQC 及び COSY スペクトルから得られた化学シフトの比較から、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の主成分の構成糖と硫酸エステル基の結合位置はほぼ同じであると考えられた。

4. OSCS-T の OSCS-NIHS 量への換算

OSCS-T と OSCS-NIHS は品質特性上類似性があると考えられたことから、OSCS-T の OSCS-NIHS 含量に対する換算値を求めることとした。0.080, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg の OSCS-NIHS を 0.001% TSP 重水溶液 0.6 mL に溶解した液につき ^1H -NMR スペクトルを測定し、TSP のシグナルの積分値に対する OSCS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの相対積分値を *y* 軸として、また、OSCS-NIHS 量を *x* 軸としてプロットしたところ、直線性が確認された ($Y=4.8621 X-0.01$, $R^2=0.9998$) (Fig. 6)。また 0.10 mg の OSCS-NIHS を 3 回測定したときの相対標準偏差は 1.0% であり、検量線から求めた真度は $99.1 \pm 1.0\%$ であった。この検量線を用いて、0.15 mg の OSCS-T を OSCS-NIHS 量に換算したところ、 0.12 ± 0.001 mg (OSCS-NIHS に対する相対純度 82%) であった。

5. ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムへ添加したときの OSCS の ^1H -NMR

OSCS-NIHS と OSCS-T の DEAE-HPLC 溶出パターン、 ^1H -NMR, HMQC 及び COSY スペク

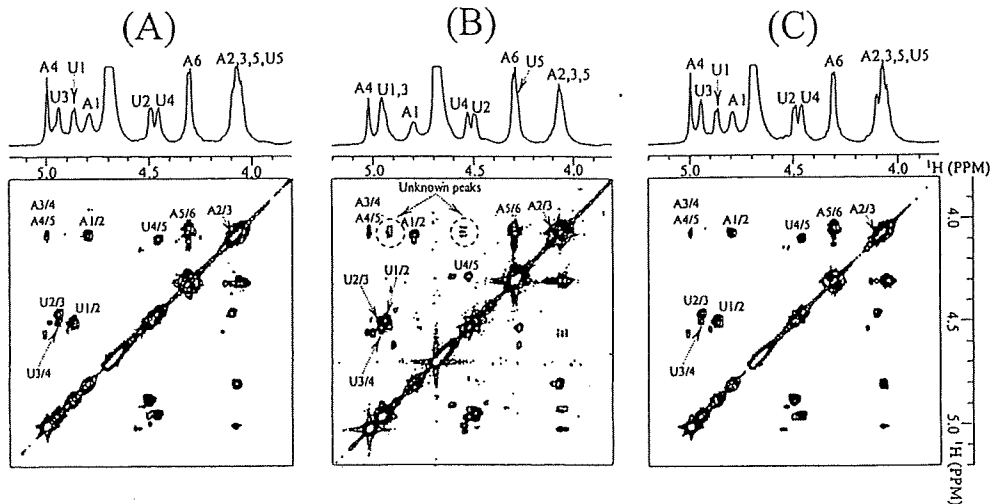
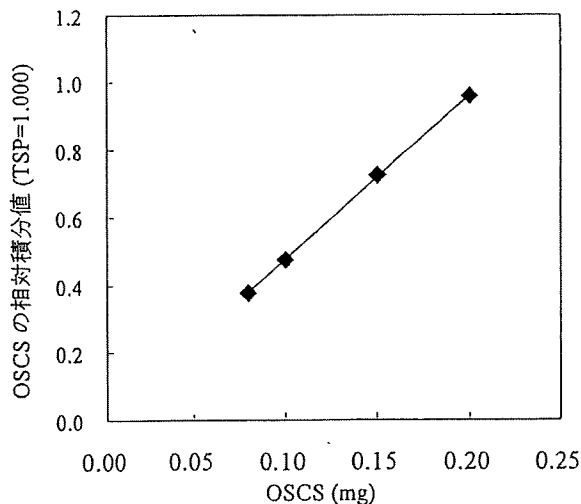


Fig. 5 OSCS の COSY

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位; U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す。(例) A1/2: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位と 2 位の ^1H の相関ピークの観測位置を示す。Fig. 6 ^1H -NMR を用いた OSCS 定量試験における OSCS-NIHS の直線性

トル等におずかな差異が認められたことから、これらの差異がヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム純度試験のシステム適合性評価に与える影響を調べた。システム適合性で用いる量に相当する 0.10 mg の OSCS-NIHS と DEAE 未処理 OSCS-

T を 20 mg のヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムに添加して ^1H -NMR スペクトルを測定し、OSCS の *N*-アセチル基のプロトンに由来するシグナルを比較した。その結果、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムのいずれにおいても、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の *N*-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致し、シグナルの強度にも目立った差はないことが確認された (Fig. 7, 8)。

考 察

日局各条ヘパリンナトリウム及び日本薬局方外医薬品規格 2002 各条ヘパリンカルシウムの純度試験である OSCS の限度試験は、OSCS が混入しているヘパリンから精製した OSCS-NIHS を用いて確立されたものであり、特異性及び検出限界は、OSCS-NIHS を用いて評価されたものである。本研究では、OSCS-NIHS と合成 OSCS-T の構造特性、純度、及び限度試験結果等の品質特性を比較することによって、OSCS-T を日局 OSCS 標準品として使用することの妥当性を評価したものである。

OSCS-T の主成分の構造特性を OSCS-NIHS の

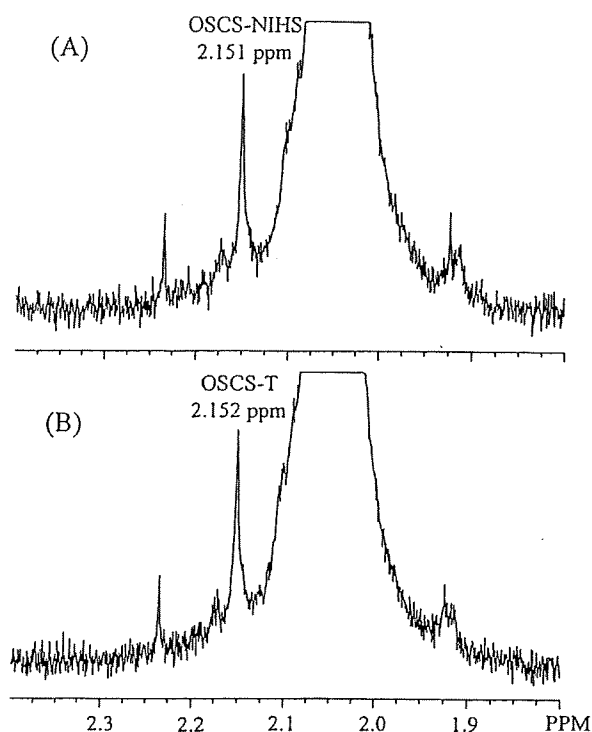


Fig. 7 ヘパリンナトリウムに添加された OSCS の ^1H -NMR スペクトル (δ 1.8~2.4 ppm). OSCS-NIHS (A) 及び OSCS-T (B) の *N*-アセチル基に由来するピークの化学シフト.

構造特性と比較したところ、DEAE-HPLC における溶出位置、並びに DEAE で処理した後の ^1H -NMR, HMQC 及び COSY スペクトルが類似していたことから、両者の硫酸エステル結合数及び結合位置、並びに 2 糖構成単位はほぼ一致していることが明らかになった。

純度については、DEAE-HPLC, COSY 及び定量結果から、OSCS-T にはわずかに他の成分が混入していることが明らかとなった。混入成分として、 ^1H -NMR 及び COSY スペクトルで得られた化学シフトから、原料に混入していたヒアルロン酸が硫酸エステル化されたものなどが推察された。しかし、OSCS の *N*-アセチル基のシグナルの面積強度から OSCS-T 量を OSCS-NIHS 量に換算することが可能であること、また、OSCS-T の OSCS-NIHS への換算量は 80% 以上であることから、OSCS-T は、システムの感度を評価するための標準品として利用可能であると判断された。

ヘパリンナトリウムやヘパリンカルシウムに OSCS-NIHS 及び OSCS-T を添加して ^1H -NMR

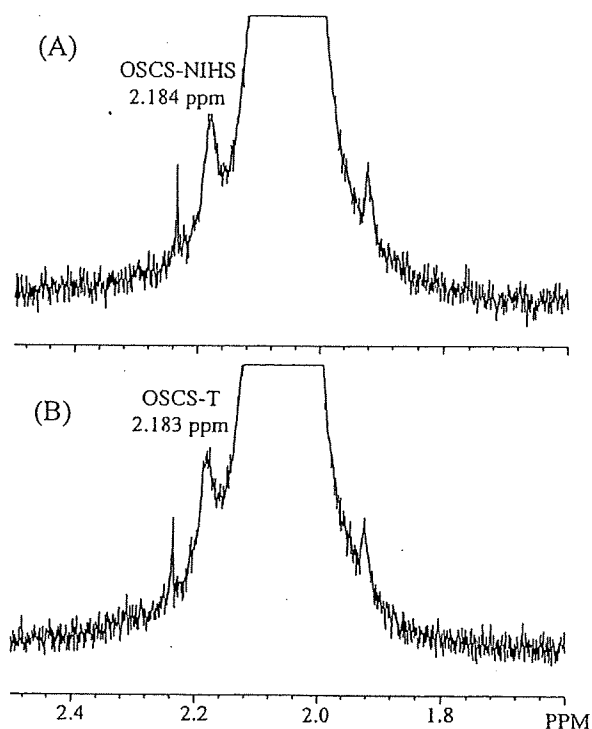


Fig. 8 ヘパリンカルシウムに添加された OSCS の ^1H -NMR スペクトル (δ 1.6~2.5 ppm). OSCS-NIHS (A) 及び OSCS-T (B) の *N*-アセチル基に由来するピークの化学シフト.

を測定したとき、*N*-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致することが確認された。OSCS-NIHS 及び OSCS-T の限度試験結果は類似していたことから、システムの特異性の評価に OSCS-T を用いることには問題はないと判断された。

以上のように、OSCS-T にはマイナー成分として他のグリコサミノグリカン硫酸エステルが混入していること、並びに OSCS-NIHS とナトリウム含量が異なることが示唆されたが、これらの差異は、システムの感度及び特異性の確認に影響するものではないことが確認された。OSCS-T はシステム適合性確認のための日局 OSCS 標準品として用いることが可能であると思われる。

謝 辞

ヘパリンナトリウムをご供与いただいた日本バルク薬品(株)及びニプロファーマ(株)、ヘパリンカルシウムをご供与いただいた味の素(株)及び沢井製薬(株)、並びに OSCS 標準物質をご供与いただいた FDA に厚