

## Guidelines for the design of chromatographic analytical methods intended for CIPAC collaborative study

### CIPAC 共同試験を目的としたクロマトグラフィー分析法の設計に関する指針

M. J. タンディ博士\*、P. M. クラーク、B. ホワイト（英国）が CIPAC のために作成

農薬製品の分析におけるクロマトグラフィー法の利用が急速に拡大したことで、クロマトグラフィー用カラムの選択肢や実験パラメータのバリエーションが増え、装置への要求も高まっている。このアプローチは、限られた範囲の特定の製品を扱う農薬製造者および供給者には適しているかもしれないが、多くの異なる農薬製品の分析を行わなければならない、かつ特定の製品の分析に精通していない試験所が行う分析方法を世界規模に導入する際に、その本質的な複雑さが問題となる。CIPAC 共同試験によって世界的に使用されることを意図した分析法の執筆者は、できれば社内での開発中に、共同試験の前には確実に、その手順を合理化することが奨励される必要がある。

この文書は、キャピラリーガスクロマトグラフィー（GC）および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の分析法の設計を簡素化する方法についての指針を示している。ここでは、分析方法の性能を最適化するために変更したり、分析方法の変動を最小限に抑えたりするために一定にできる重要な実験パラメータに重点を置いている。その他のパラメータはそれほど重要ではない。クロマトグラフィーカラムの重要な選択肢は、推奨される簡単な表として大幅に簡素化している。また、溶媒、ガス、内部標準物質の必要性と使用方法の手引き書（ガイドランス）も示している。各パラメータは、分析方法のフォーマットに沿って記載されており、その重要性を個別に説明しながら明確化されている。

この指針（ガイドライン）は、クロマトグラフィーのパラメータに焦点を当てている。試料の調製や結果の品質に関する手引き書を提供するものではない。これらは、「分析方法の性能を評価するための CIPAC 共同試験の実施手順に関する CIPAC 指針」や「農薬製剤の分析方法の妥当性を確認するための検証方法についての指針」など、他の CIPAC 指針でカバーされている。しかし、このような分析方法のフォーマットを使用することの利点の一つは、CIPAC の分析方法内のクロマトグラフィーのパラメータの標準的なレイアウトを奨励するためである。

# 製剤化された資材中の有効成分のガスクロマトグラフィーによる定量

P. M. クラーク、M. J. タンディ、B. ホワイト（英国）が作成

## 1. 目的

このキャピラリーガスクロマトグラフィー（GC）法は、製剤中の有効成分の定量を行うものである。

## 2. 方法の概要

有効成分の含有量は、**内部標準法**を用いたキャピラリーガスクロマトグラフィーによって定量される。

この方法の重要なパラメータは次のとおりである：

- \* スプリット式注入法
- \* 中口径の溶融シリカキャピラリーカラム
- \* 水素炎イオン化検出器

## 3. 化学物質

[国の規格と推奨される供給者]

### 安全情報

すべての化学物質は、実験室での通常の安全手順に従って、実験用防護服、目の保護具、適切な手袋を着用して、ドラフトチャンバーの中で取り扱う必要がある。

この方法で使用する化学物質の性質や危険性について疑問がある場合は、以下のような適切な安全マニュアルを参照すること：

化学系実験室における有害物質, Luxon 編, 英国王立化学会, 第5版, 1992年, ロンドン(英国), ISBN 0-85186-229-2.  
シグマ・アルドリッチによる化学物質安全性データ集, Lenga 編, 第2版, 1988年, ミルウォーキー, ウィスコンシン州(米国), ISBN 0-941633-16-0.

### 分析用の有機溶媒（一般的にはアセトン、酢酸ブチル/エチルまたはハロゲン化アルカン）

この溶媒は抽出溶媒として使用できる必要があることが理想的であるが、分析方法の開発中に、有効成分との反応の確認が必要となる場合があるかもしれない。

選択した溶媒は、毒物学的に問題のないものを選択する必要がある。

### 内部標準物質、高純度（ $\geq 98\%$ ）

内部標準物質の揮発性と構造的な機能性（訳者注：化学的な安定性）は、精度を上げるために重要である。内部標準物質が世界中の供給者から容易に入手できることを確認する。妨害の可能性を最小限に抑えるため、高純度が望ましい。

### 有効成分

認証された純度の分析用標準品。冷蔵保存する（必要に応じて）。

## 4. 装置および操作条件

本方法を確立するために以下に示す装置を使用する。

同等の性能を持つ他の製造者の機器でこの方法を確認し、適切であることを考慮しなければならない。

装置	スプリット/スプリットレス注入口と水素炎イオン化検出器を備え、 <b>スプリットモード</b> で動作する GC システム。
注入モード	再現性のある量と速度での注入を可能にするため、オートインジェクターの使用が推奨される。
注入口ライナー	ライナーの選択、充填物の量と種類は、精度に決定的な影響を与える。ライナーは定期的に点検または交換する必要がある。そうしないと、揮発性の低い物質が蓄積して、吸着や反応を引き起こす可能性がある。

使用済みのスプリット注入口ライナーは、シラン化の前に適切に除染する必要がある。

- 注入量** 0.5～2 μl、通常 1 μl (シリンジサイズは通常 10 μl)。
- カラムの大きさ** 熔融シリカ；長さ：10～25 m  
内径：0.2～0.25 mm (0.32 mm も考慮する必要がある)  
これらの寸法は、カラムの分離効率、分析時間、容量のバランスがとれている。
- 膜厚** 0.1～0.25 μm (カラムの分離効率を維持しながら容量係数を最小化し、溶出温度を最小化するのに十分な相の厚さ)。
- 液相** 架橋されたジメチルポリシロキサン。  
幅広い用途に対応できる堅牢性を備えており、他の液相を使用することで特別な利点がない場合以外は、この液相を使用する必要がある。

その他推奨される液相

液相	コメント
架橋された 5%フェニルポリシロキサン 95%ジメチルポリシロキサン	ジメチルポリシロキサン相上での芳香族に対する選択性の向上
架橋された 14%シアノプロピルフェニル 86%ジメチルポリシロキサン	中極性の液相、特徴的な選択性
架橋された 50%フェニル 50%ジメチルポリシロキサン	中程度の極性を持つ化合物の分析に適用できる
架橋された 50%トリフロロプロピル 50%ジメチルポリシロキサン	ハロゲン化された化合物の分離のための高選択性の液相

- 注入口温度** これは、故障を最小限に抑え、精度を最適化するために評価される必要がある。
- カラム恒温槽温度** 一定温度：  
有効成分が 5～10 分 (水素キャリアガス) または 10～15 分 (ヘリウムキャリアガス) で溶出するよう温度を設定する。溶出時間を短くすると、一般的にピーク効率や分解能が低下する。カラム製造者が設定している範囲内の温度を選択すること。  
  
初期時間：  
有効成分と内部標準物質を溶出するのに十分な時間。
- 製剤アジュバントを除去するための温度プログラム (必要な場合)** プログラム速度 1： GC システムの最大上昇速度  
最終温度 1： カラムの限界温度以下  
  
最終時間 1： 全成分を溶出するのに十分な時間
- 検出器温度** 325 °C または 最終温度 1 + 25 °C
- ガスの精製** 全てのガスはモレキュラーシーブで精製する必要がある。キャリアーガスは、**酸素トラップ**でさらに**精製**する必要がある。
- 検出器ガスの流量** 製造者の推奨する方法に従う。
- キャリアーガス** 水素またはヘリウムとし、水素が好ましい。  
ヘリウムではなく水素を使用することで、機器のセットアップの負担が軽減され、分析時間が短縮されるというメリットがある。ただし、水素は、ニトロ化合物などの還元性化合物と反応する可能性がある。

ガス平均線速度： 45～55 cm s<sup>-1</sup> (水素をキャリアーガス)  
25～35 cm s<sup>-1</sup> (ヘリウムをキャリアーガス)  
上記の値は、推奨されるカラム内径範囲における最適な性能を示している。

分解能が十分であれば、分析時間を短縮するために、より大きい線速度が望ましい場合がある。

**スプリット流量** 60 - 250 ml min<sup>-1</sup> (水素をキャリアーガス)  
30 - 200 ml min<sup>-1</sup> (ヘリウムをキャリアーガス)  
このパラメータは、上記の範囲内で使用する場合、一般的に重要ではない。分析方法のセットアップを容易にするため、「スプリット比」よりも「スプリット流量」という用語が推奨される。

**データ処理** ピークの開始点と終了点を正確に定義するために、積分パラメータを正しく設定することが重要である。

訳者注：本指針が作成されたのは、文書番号から推定して 1990 年代であり、当時の GC は HP-5890 等が主流で、流量はバルブを用いて機械的に制御するものであった。しかし、最近の GC は、コンピュータで制御しているため、スプリット比とスプリット流量は連動するので、スプリット比で制御することが一般的となっている。

## 5. 適合性

保管されているカラムや新品のカラムは、使用前にコンディショニングが必要な場合がある。

許容できる再現性のあるクロマトグラムが得られるまでに、検量線溶液の注入を繰り返し行う。

得られたクロマトグラムを図 1 に示したものと比較する。図 1 のクロマトグラムの例では、目的のピークが最大目盛りで入るように示し、ピークの形状と保持を明確に示す。

有効成分の保持時間を測定する（許容可能な時間枠を分単位で示す。例：4.5±0.5 分）。

ピークの保持時間が指定した時間内に収まらない場合は、規定値内に収まるようにオープン温度やカラムヘッド圧を調整してもよい。（例えば、それぞれ±10°Cまたは±1 psi）。

訳者注：1 psi = 69 hPa = 0.070 kg/m<sup>2</sup>

これ以上の調整は、実験手順が受け入れられないことを意味する。

## 6. 定量

試料溶液の注入を行う。クロマトグラムの例を図 2 に示す。図 1 との比較により、アジュバントなどの他の成分の分離を確認することができる。

推奨されている注入順序に従って、検量線溶液と試料溶液の繰り返し注入を行う。

使用中にカラムの性能が大幅に低下した場合は、スプリット注入ロライナーの状態を確認し、必要に応じて交換する。カラムの性能が許容できない場合は、カラムを注入側から約 10 cm の長さで取り除く。

## 7. 分析方法の妥当性検証の概要

**精度**：本方法では、有効成分の適切な含有量に関連して、許容される最大相対標準偏差を記載する必要がある（例：5% の有効成分に対する RSD < 2.1）。

**精確度**：本方法では、有効成分の適切な含有量に関連して、試料中の有効成分の許容回収率の範囲を示す必要がある（例：1～10%の有効成分に対して 97.0～103.0%）。

**直線性**：本方法では、応答が直線的になる範囲を記載する必要がある（例：名目上の有効成分濃度の±20%）。

## 8. 参考文献

CIPAC 農薬製剤の分析方法の妥当性を確認するための検証方法についての指針  
分析方法の性能を評価するための CIPAC 共同試験の実施手順に関する指針。

図1 検量線溶液のクロマトグラム

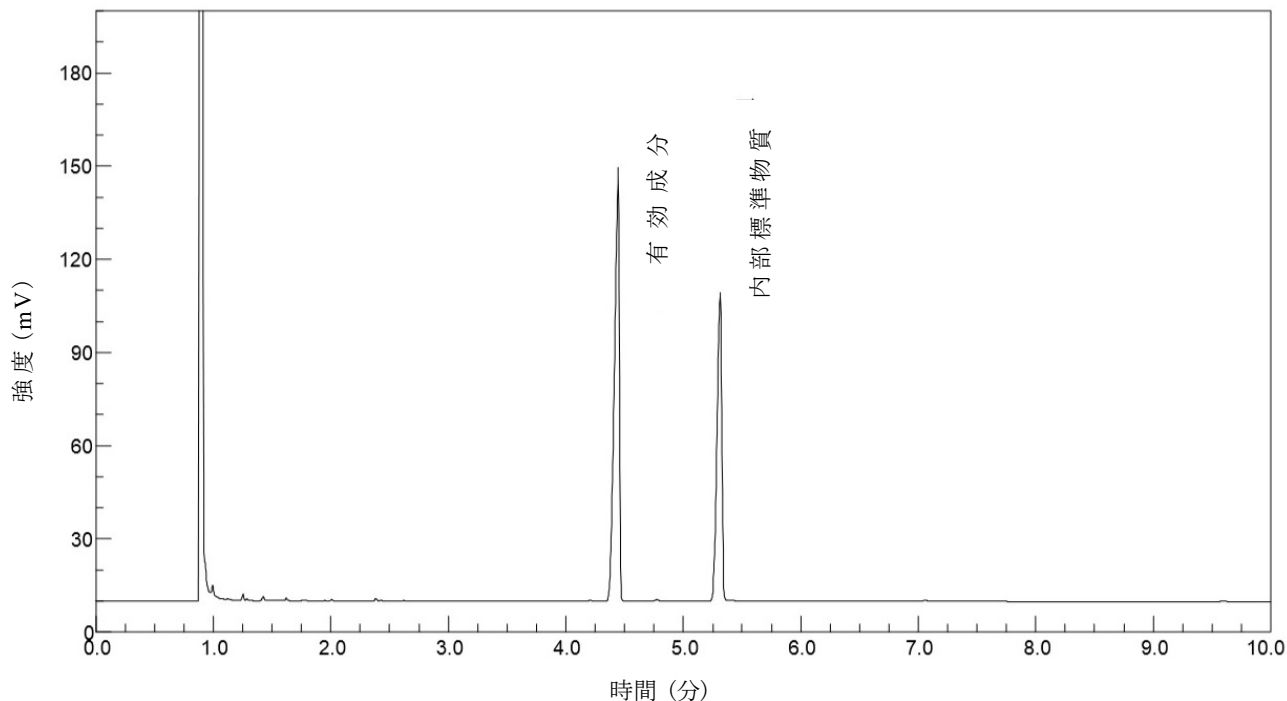
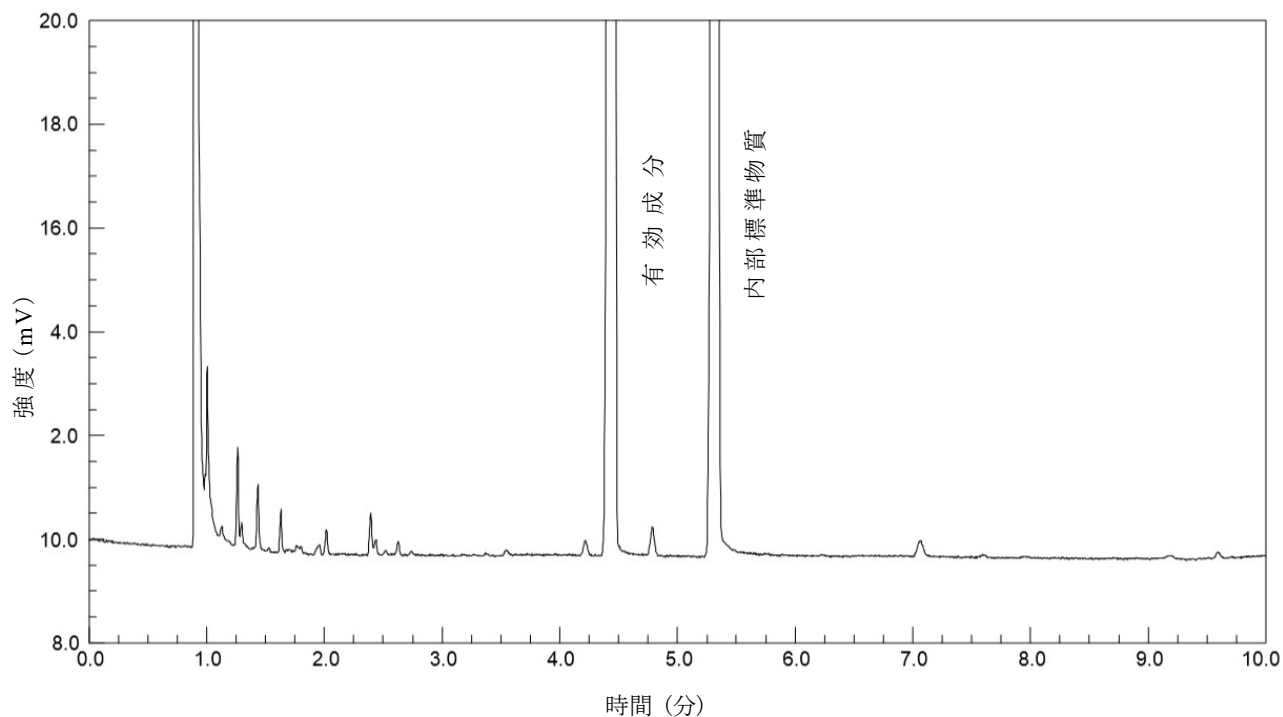


図2 試料溶液のクロマトグラム



# 製剤化された資材中の有効成分の高速液体クロマトグラフィーによる定量

P. M. クラーク、M. J. タンディ、B. ホワイト（英国）が作成

## 1. 目的

この高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法は、製剤中の有効成分を定量するためのものである。

## 2. 分析方法の概要

有効成分の含有量は、可能な限り外部標準法（絶対検量線法）を用いて高速液体クロマトグラフィーで定量する。内部標準物質は、自動化されたループインジェクターや過剰充填されたループインジェクターでは一般的に必須ではないが、試料溶液を正確に調製するために必要となる場合がある。

この分析方法の有意なパラメータは以下の通りである：

- \* 塩基不活性化エンドキャップ付きオクタデシルシリル結合シリカカラムを用いた逆相クロマトグラフィー（可能な限り）
- \* カラムの温度制御
- \* 紫外線（UV）吸光検出器（可能な限り）
- \* 初期移動相での試料調製（可能な場合）

## 3. 化学物質

[国の規格と推奨される供給者]

### 安全情報

すべての化学物質は、実験室での通常の安全手順に従って、実験用防護服、目の保護具、適切な手袋を着用して、ドラフトチャンバーの中で取り扱う必要がある。

この方法で使用する化学物質の性質や危険性について疑問がある場合は、以下のような適切な安全マニュアルを参照すること。

化学系実験室における有害物質, Luxon 編, 英国王立化学会, 第5版, 1992年, ロンドン(英国), ISBN 0-85186-229-2.

シグマ・アルドリッチによる化学物質安全性データ集, Lenga 編, 第2版, 1988年, ミルウォーキー, ウィスコンシン州(米国), ISBN 0-941633-16-0.

### 有機溶媒

HPLC 用（通常はメタノールまたはアセトニトリル）。

### 水

ASTM タイプ 2（訳者補足を参照）に準拠した精製水または HPLC 用。

### 有効成分

認証された純度の分析用標準品。

冷蔵保存（必要に応じて）。

## 4. 装置および操作条件

以下に示す装置は、本方法を確立するために使用されたものである。

同等の性能を持つ他の製造者の機器でこの方法を確認し、適切であることを考慮する必要がある。

装置	ポンプ、オートインジェクター、カラム恒温槽、UV 可変波長検出器を備えた HPLC システム。
注入モード	注入量を一定にするためには、自動注入システムまたは手動で過充填できるループの使用が推奨される。
注入量	5～20 $\mu$ l。

注入量は一般的に重要ではない。  
目的成分の応答が検出器の直線の範囲内にあることを確認する。

- カラムの大きさ** ステンレススチール；長さ：100～250 mm、内径：3～5 mm  
長さが 100 mm 未満の場合、堅牢性に欠ける方法になる可能性がある。  
内径が 3 mm 未満の場合は、専用の装置が必要である。  
適切な固定相を充填した短いガードカラムを勧める。
- 粒子径** 公称粒子径 3～5 mm のカラムを用い、このサイズを逸脱すると、操作性や性能に問題が生じる可能性がある。
- 固定相** 塩基を不活性化したエンドキャップ付きオクタデシルシリル結合型シリカ。  
これは、幅広い用途で堅牢であるため、好ましい相である。

代替可能な固定相

固定相	コメント
強度の陰イオン交換 (SAX)	陰イオンのイオン交換クロマトグラフィー用
強度の陽イオン交換 (SCX)	陽イオンのイオン交換クロマトグラフィー用
結合型のシリカ (例、シアノ基 またはアミノ基)	特殊用途向け
シリカ	順相クロマトグラフィー用

有意なメリットがある場合は、他の固定相を使用することもできる。

- カラム恒温槽温度** 温度制御 (例：40℃) により、安定した保持時間が得られる。  
分離の改善に温度が重要な場合は、他の値を使用することもできる。  
カラムの温度として「常温」という表現は使わないこと。
- 移動相** 可能であれば、混合する前に各成分を体積比で表すこと。  
有機溶媒と水溶液を別々に調製する。  
イオン性化合物の場合、pH が重要になることがある。  
強く保持された製剤中のアジュバントの除去に必要な場合を除き、グラジェントで実施しない。  
組成比の例を添付すること。  
移動相の脱気が推奨される。
- 流速** 0.5～2.0 ml min<sup>-1</sup>。  
4.6 mm 径では 1.0 ml min<sup>-1</sup>、3.2 mm 径では 0.5 ml min<sup>-1</sup> など、カラム径に応じて適切な流速を選択すること。
- 検出波長** 波長は、有効成分の UV スペクトルの中で、傾きの変化が顕著でない波長 (例：最大または最小) を選択する必要がある。  
必ず移動相の UV カットオフ値から 10 nm 以上離れた波長を使用すること。
- データ処理システム** ピークの開始点と終了点を正確に定義するために、積分パラメータを正しく設定することが重要である。

## 5. 適合性

保存されたカラムや新しいカラムは、使用前に移動相での調整が必要な場合がある。移動相の種類、時間、流量を明記すること。

許容できる再現性のあるクロマトグラムが得られるまで、検量線溶液の繰り返し注入を行う。

得られたクロマトグラムを図 1 に示したものと比較する。

図 1 のクロマトグラムの例では、目的のピークが最大目盛で入るように、ピークの形状と保持を明確に示す。

有効成分の保持時間を測定する（許容可能な時間幅を分単位で示す、例：6.3±0.5 分）。

ピークの保持時間が指定した時間内に収まらない場合は、規定値内に収まるように移動相を調整してもよい（例：50%メタノールを含む移動相の場合、メタノール濃度を±5%で調整してもよい）。  
これ以上の調整は、実験手順が適切でない可能性がある。

## 6. 定量

試料溶液の注入を行う。図2のようなクロマトグラムの例を示す。図1との比較により、アジュバントなどの他の成分の分離を確認することができる。

推奨される注入順序に従って、検量線溶液と試料溶液を繰り返し注入する。

使用中にカラムの性能が大幅に低下した場合は、ガードカラムを交換する。

保管前にカラムの洗浄が必要な場合がある。移動相の種類、時間、流量を明記すること。

## 7. 分析方法の妥当性検証の概要

**精度**：本方法では、有効成分の適切な含有量に関連して、許容される最大相対標準偏差を記載する必要がある（例：5%の有効成分に対する RSD < 2.1）。

**精確度**：本方法では、有効成分の適切な含有量に関連して、試料中の有効成分の許容回収率の範囲を示す必要がある（例：1～10%の有効成分に対して 97.0～103.0%）。

**直線性**：本方法では、応答が直線的になる範囲を記載する必要がある（例：名目上の有効成分濃度の±20%）。

## 8. 参考文献

CIPAC 農薬製剤の分析方法の妥当性を確認するための検証方法についての指針。

分析方法の性能を評価するための CIPAC 共同試験の実施手順に関する指針。

## 訳者補足

ASTM タイプ 2 の水（パラグラフ 3）

ASTM (American Society for Testing and Material) の D 1193-06 (2018) により、試験用水の標準仕様 (Standard Specification for Reagent Water) が定められている；<https://www.astm.org/d1193-06r18.html>。

項目	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4
電気伝導度, 最大, $\mu\text{S}/\text{cm}$ at 25 °C	0.0555	1.0	4.0	5.0
比抵抗, 最小, $\text{M}\Omega\text{cm}$ at 25 °C	18	1.0	0.25	0.2
pH at 25°C	—	—	—	5.0～8.0
全有機体炭素 TOC, max, $\mu\text{g}/\text{L}$	50	50	200	—
ナトリウム, 最大, $\mu\text{g}/\text{L}$	1	5	10	50
塩化物イオン, 最大, $\mu\text{g}/\text{L}$	1	5	10	50
総シリカ, 最大, $\mu\text{g}/\text{L}$	3	3	500	—

規格値は、超純水と純水の規格（メルク ライフサイエンス、ラボウォーター事業部；[https://www.merckmillipore.com/JP/ja/lw/learning/standards/Sweb.qB.BIQAAAFHuZ5Tb\\_x2,nav#ASTMD1193-06](https://www.merckmillipore.com/JP/ja/lw/learning/standards/Sweb.qB.BIQAAAFHuZ5Tb_x2,nav#ASTMD1193-06)）より引用。



図1 検量線溶液のクロマトグラム

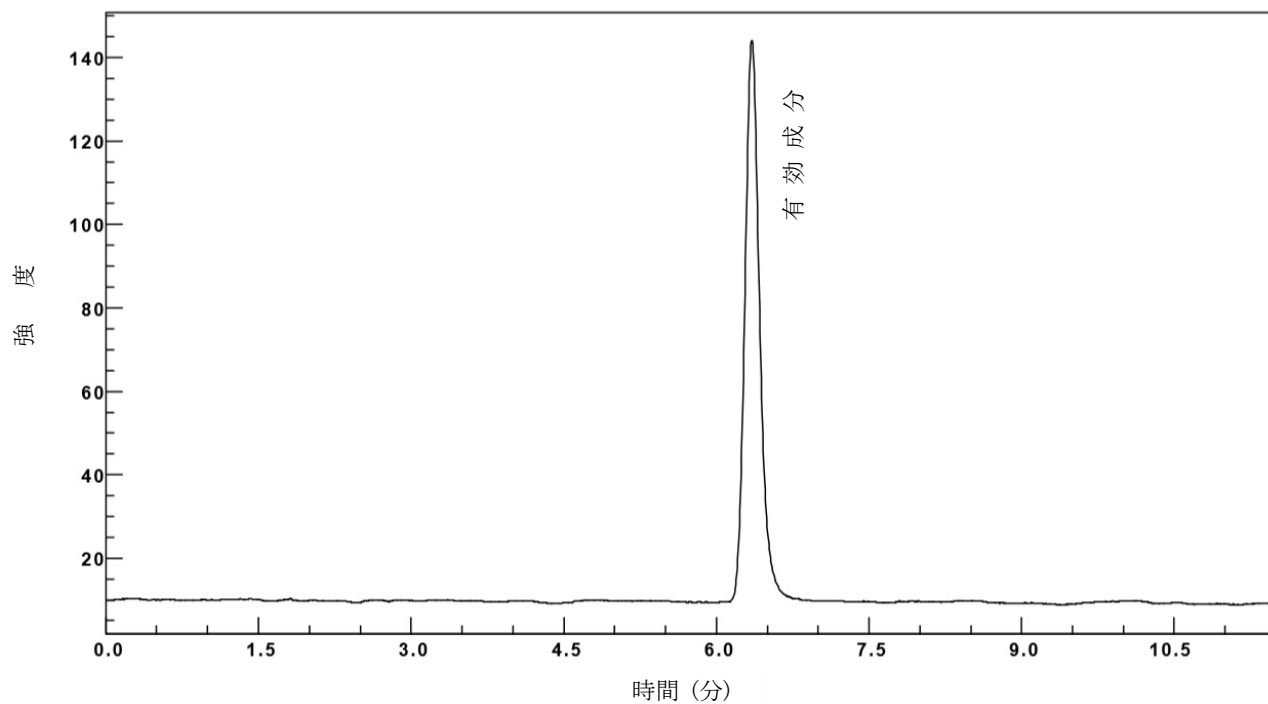


図2 試料溶液のクロマトグラム

