

分析パラメータの連続的なスクリーニングを用いた 医薬品不純物の効率的な HPLC 試験法開発

2018 年

古川 俊太郎

目次

要旨	1
第 1 章 序論	5
第 2 章 実験	10
第 1 節 試薬及び機器	10
第 2 節 実験機器・ソフトウェア	11
第 3 節 移動相の調製	12
第 4 節 サンプル調製	13
第 1 項 「実験 1：2 液と 3 液混合のグラジエント分析の比較」で使用した サンプル	13
第 2 項 「実験 2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ」及 び「実験 3：従来の移動相を使用したスクリーニングとの比較」で使用し たサンプル	13
第 5 節 実験 1：2 液混合と 3 液混合のグラジエント分析の比較	15
第 2 項 3 液混合のグラジエント分析	17
第 3 項 2 液混合のグラジエント分析	19
第 6 節 実験 2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ	21
第 1 項 スクリーニング	21
第 2 項 最適化	24
第 3 項 最終化	27
第 7 節 実験 3：従来の移動相を使用したスクリーニングとの比較	29
第 3 章 結果及び考察	31
第 1 節 実験 1：2 液混合と 3 液混合のグラジエント分析の比較	31

第 1 項	2 種のリン酸緩衝液の混合比率と得られる pH	31
第 2 項	2 液混合と 3 液混合のグラジエント分析の比較	34
第 2 節	実験 2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ	37
第 1 項	Step 1：スクリーニング	39
第 2 項	Step 2：スクリーニング結果の解析	40
第 3 項	Step 3：最適化の出発点の決定	48
第 4 項	Step 4：最適化	52
第 5 項	Step 5：最終化	57
第 4 節	従来の移動相を使用したスクリーニングとの比較	59
第 5 節	HPLC 移動相中での見かけの pK_a	64
第 6 節	分析パラメータの連続的なスクリーニングの応用について	68
第 4 章	結論	69
参考文献	70
論文目録	73
主査，副査名	74
謝辞	75

要旨

【実験の背景及び目的】

近年、HPLCを用いた多くの医薬品不純物のHPLC試験法開発手法が報告されている。その多くは、スクリーニング→最適化の出発点の決定→最適化という手順であるが、実際の運用の際に問題点が3つある。1つ目は、不純物の標品が必要なため、標品の入手が困難な医薬品開発初期には適用できない点である。また、不純物標品なしでは、異なる分析条件間での不純物の相関の確認が困難な場合が多く、スクリーニングで全ての不純物が同時に分離検出されなかった場合は、不純物数を見誤るリスクがある。2つ目は、最適化の出発点の決定の際、分析パラメータ（例：移動相pH、カラム温度）に対するその領域での不純物ピークの保持時間やピーク同士の分離の頑健性が考慮されない点である。3つ目は前述の理由から最適化の指標が正確に把握できないことである。そこで本研究では、分析パラメータの連続的なスクリーニングを用いた、医薬品の効率的なHPLC試験法の開発手法の構築を目的とした。そして、本研究手法を不純物標品が十分に得られておらず、不純物数も未知な医薬品開発初期の試験法開発に適用した。UV検出器を使用し、分析パラメータを連続的に変動させ、スクリーニングの結果を通して不純物を追跡可能（ピークトラッキング）にすることで次の3つの目標：(1) 医薬品中の不純物数の把握、(2) 不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定、(3) 最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定を試みた。最後に、分析パラメータの連続的なスクリーニングの利点として、緩衝液・有機溶媒混合系での有機化合物の見かけの pK_a を明らかにできる点とその理解の重要性について議論した。

【実験方法】

- ・医薬品不純物のHPLC試験法開発のケーススタディでは、ベンゾカインを医薬品主成分と見なし、その構造類似性から12種類の化合物を構造未知の不純物として選定した。12種類の化合物は医薬品に実際に混入してくる濃度を想定して、主成分に対して0.05%～0.4%となるレベルで添加した。

- ・HPLCのクォータナリーポンプシステムに酸性（pH 2.2）と中性（pH 8.0）のリン酸緩衝液を接続し、その間のpH（pH 2.5～pH 7.5までの0.5間隔）が得られる混合比を求めた。次に、アセトニトリルを有機溶媒に用いた3液混合グラジエント分析を行い、意図したpHがHPLC中で調製できているかを確認した。さらに、予めpHを調整した緩衝液とアセトニトリルの2液混合グラジエント分析との違いを3つのpHで比較した。試料として、前述の計13種類の化合物を同じ濃度で混合したものをを用いた。

- ・HPLC分析条件（3液混合グラジエント分析）

UV検出器：220 nm，カラム：XBridge C18 (4.6x150 mm, 3.5 μ m)，移動相A：10 mM リン酸緩衝液（pH 2.2），移動相B：10 mM リン酸緩衝液（pH 8.0），移動相C：アセトニトリル，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40°C，注入量：5 μ L，グラジエント条件：0-18 分，95-20%（移動相A+B），5-80%（移動相C）

- ・スクリーニングではカラムを4種類，カラム温度を3水準，移動相pHを13水準の計33条件を分析した。変動因子以外は上記のHPLC分析条件で測定を行った。最適化では3因子（移動相pH，カラム温度，グラジエント時間）の実験計画法を実施した。最終化では実験計画で検証された条件を実際に測定した。

【結果及び考察】

3液と2液混合グラジエント分析の比較：

pH 3.5, 5.0, 6.5 において、通常の HPLC 分析で実施する 2 液混合と本研究で使用する 3 液混合グラジェントの分析結果を比較した。ピーク形状と保持時間は 2 液と 3 液混合グラジェントで同等であった。このことから、3 液混合グラジェント分析においても、意図した pH が HPLC 内で調製され、アセトニトリルとのグラジェント分析も良好に行えていることがわかった。これにより、少ない移動相調製で、多くの移動相 pH を効率的にスクリーニングできる手法が確立した。

医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ：

まず、スクリーニング結果の解析において、本研究手法が医薬品中の不純物数の把握が可能かを検証した。XBridge C18 カラムで分析パラメータを連続的に変動させた結果について、重ね書きクロマトグラムを作成した。次に、隣り合う条件間で各不純物の溶出時間、ピーク形状及びピーク面積比較等から、全ての分析条件を通して不純物ピークをピークトラッキングすることができた。移動相 pH についてスクリーニングした結果及びピークトラッキングを図 1 に示す（化合物同定のため番号を付与した）。pH 2.5 において偶然 12 種類全ての不純物が分離

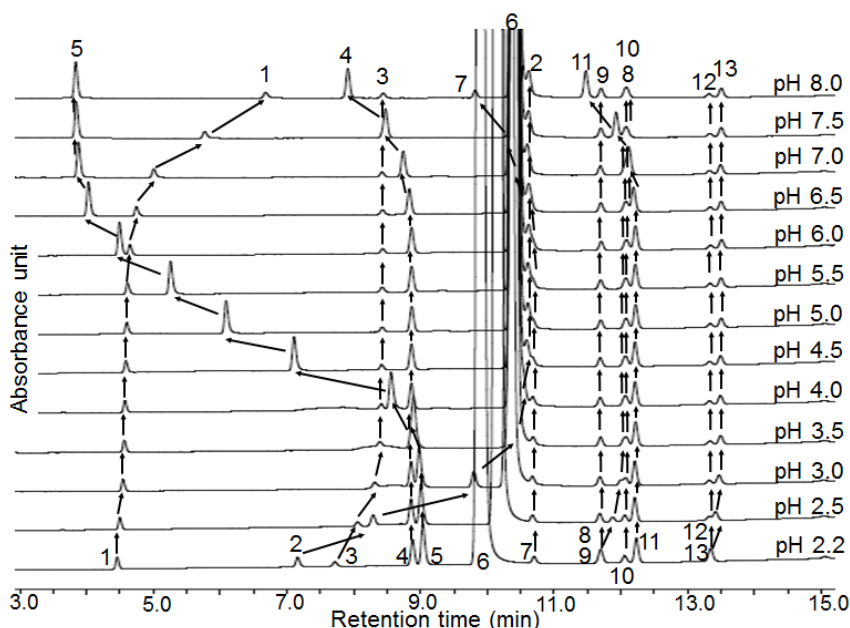


図1：XBridge C18カラムでのpHスクリーニングの重ね書きクロマトグラム

していたが、この条件がなかったとしても、ピークトラッキングによって不純物数把握が可能であることが示唆された。カラム温度及びカラムのスクリーニングの結果からも不純物数の総数が 12 であることが確認され、本研究の目標(1)が達成できることが確認された。全 33 条件で検出されたピーク数を表 1 にまとめた。報告されているスクリーニング手法は数種類の移動相 pH のみを検証するものが多い。もしも、移動相のスクリーニングが pH 4.0 と pH 8.0 のみで実施されていた場合、不純物総数を 11 と誤認識してしまう可能性が高い。

表 1：スクリーニングで検出された不純物数のまとめ

カラム/カラム温度	移動相pH													
	2.2	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	
XBridge C18/40°C	10	12	11	9	10	10	10	10	10	10	9	9	10	
XBridge C18/32°C	11	-	-	-	10	-	-	-	9	-	-	-	10	
XBridge C18/25°C	10	-	-	-	10	-	-	-	8	-	-	-	11	
XBridge Shield RP18/40°C	12	-	-	-	10	-	-	-	9	-	-	-	9	
XSelect HSS C18 SB/40°C	9	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	9	
XSelect CSH Phenyl-Hexyl/40°C	11	-	-	-	9	-	-	-	10	-	-	-	10	

次に不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の同定が可能かを検証した。ベンゾカイン（主成分）の保持時間は、pH 3 以上で安定するものの直後に溶出するピークとの分離が悪い（図 1）。一方、pH 3 以下では移動相 pH の変動に対して保持時間が変化するものの、不純物と安定的に分離できる領域であることがわかる。他のカラムでも同様の傾向が認められたことから、pH 3 以下を最適化の出発点とした。また、酸性付近での不純物の分離パターンから XBridge Shield RP18

を最適化に使用することとした。このように本研究手法により、不純物の頑健な分離が保障できる領域を最適化出発点に選択することができた。さらに、最適化領域における分析パラメータの変動の不純物分離への影響が事前に予測できていることから、最適化指標となる分離の改善が必要な不純物ピーク（Critical pair: CP）が5つであると同定した。以上により、目標(2)と(3)が達成できることが確認された。5つのCPについて実験計画法により最適化を行った。応答局面による解析を行い、全ての不純物の分離が頑健な最適条件を見出した。試験法開発の最終化段階として、実験計画法により推定された条件を実際に分析し、全ての不純物ピークが良好に分離できる条件を得ることができた（図2）。

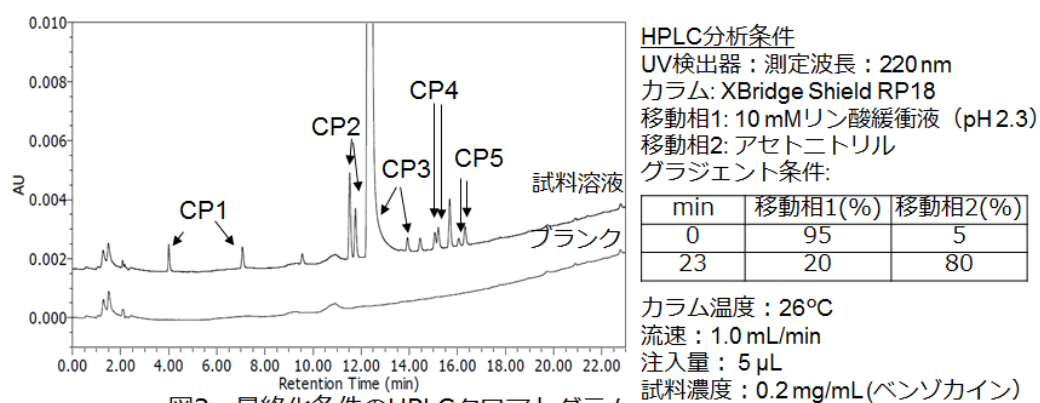


図2：最終化条件のHPLCクロマトグラム

分析パラメータの連続的なスクリーニングの利点（見かけの pK_a の理解）：

最後に、分析パラメータの連続的なスクリーニングの利点として、緩衝液・有機溶媒混合系での有機化合物の見かけの pK_a を明らかにできる点とその理解の重要性について考察する。化合物の各移動相 pH に対する保持時間をプロットすることで、pH に応答した保持時間の推移を知ることができる。また、この情報から実際に分析を行っている緩衝液と有機溶媒の種類と組成、及びカラム温度での見かけの pK_a を見積もることが可能である。

pK_aの付近ではイオン型と分子型の比率が大きく変わるために、化合物の保持時間がpHの微妙な変化によって大きく変わることが知られている。そのため、一般的には化合物のpK_aから1.5以上離れたpHで試験法を設定することが、頑健な保持のために重要であると報告されている。例えば、図1のピーク5はpK_a4.1（酸）の化合物であり、pH 2.6以下とpH 5.6以上が理想の移動相pHとなるはずである。しかし、リン酸緩衝液・アセトニトリル混合系、カラム温度40℃でのHPLC分析においては、pH 5.6は移動相pHの僅かな変化に保持時間が大きく影響を受ける領域であることがわかる（図3）。これは有機溶媒の存在によって、化合物の見かけのpK_aが変化した（4.1→5.4）ことが原因であると推測される。化合物のpK_a情報から移動相pHを決定するHPLC試験法開発手法も報告されているが、HPLC分析における見かけのpK_aを考慮に入れないと試験法開発を失敗する可能性が示された。

以上のことより、不純物の構造が明らかになり、pK_a等の物理化学的情報がわかっていたとしても、実際にHPLC分析を行わないと頑健な保持が得られる移動相pH領域はわからないと推察される。このことから、本研究手法は不純物標品が得られている医薬品開発後期の不純物のHPLC試験法開発にも有用な情報を提供できることが示された。

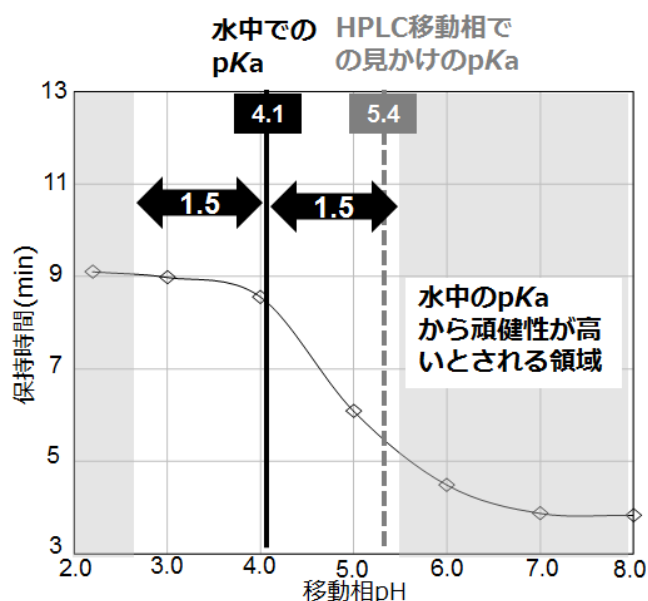


図3：ピーク5の各pHにおける保持時間

【結論】

本研究では分析パラメータの連続的なスクリーニング手法を、不純物標品が十分に得られておらず、不純物数も未知な医薬品開発初期を模倣した試験法開発に適用した。本手法は（1）医薬品中の不純物数の把握、（2）不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定、（3）最適化手法となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定が可能なが検証された。本研究手法は化合物のHPLC分析中での見かけのpK_aを明らかにすることができることがわかった。この情報は全ての分野のHPLC分析において頑健性の高い試験法開発のために有用であると考えられることから、本研究手法は医薬品以外のHPLC試験法開発への適用も期待される。

【参考文献】

Shuntaro Furukawa, Yutaka Hirakura, Kunikazu Moribe, Continuous screening of analytical parameters facilitates efficient development of HPLC methods required for impurity profiling, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2017, Vol 40, No. 11, 564-575.

第1章 序論

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は環境、化学物質、食品、製薬等々の多くの分野で使用される分析手法の1つである。また、HPLC は同じ分野の中でもその用途は多岐に渡る。例えば、製薬業界では大きく2つに分けると定量試験と定性試験に分類されるが、不純物試験、含量、溶出試験、工程管理、構造解析、代謝物解析などの多くの異なる目的の分析に使用される¹⁾。定量試験法の開発は大きく2つのカテゴリーに分類される。1つは分析対象物を使用する場合、1つはそれを使用しない又は使用できない場合である。多くの試験法開発は前者に分類される。この場合、分析対象物が事前に決まっていることから、試験法開発のゴールとしてはそれらが良好に分離・検出・定量できる条件を見つけることである。一方、分析対象物を使用できない場合としては、全ての分析対象標品を入手することが困難な、医薬品開発の初期ステージでの不純物の HPLC 試験法開発が挙げられる。一般的に医薬品の開発初期段階では、情報が限られていることもあり、医薬品に含まれる不純物プロファイルを完全に理解することは難しく、同時にそれらの標品を事前に入手できない場合も多い。この場合、不純物の HPLC 試験法開発は、分離すべき不純物を明らかにするところから始める必要がある (Figure 1)。そのため、こうした環境下で適切に医薬品の品質を保証する試験法開発は、分析科学者にとってチャレンジングなものであった。さらに患者を不純物の副作用から守るために、医薬品中の不純物含量は International Conference on Harmonization (ICH) ガイドライン (Q3A/B) に基づいて低いレベルまで管理する必要がある²⁾。こういった理由から CMC (Chemistry, manufacturing and control) 分析の分野では、特に不純物の HPLC 試験法開発は時間のかかる業務の1つであった。一方、分析部門の限られた時間と資源の観点から、医薬品開発をサポート

する効率的で頑健な不純物の HPLC 試験法を早急に開発することは必要不可欠であった。

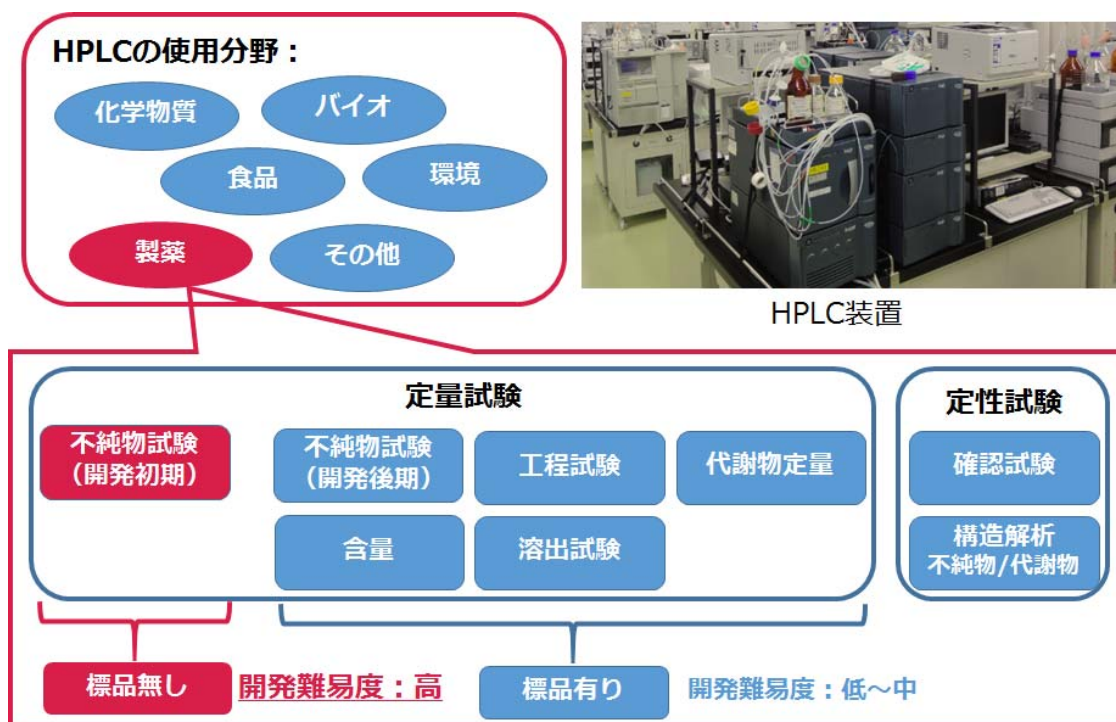


Figure 1 Use of HPLC in the pharmaceutical industry

近年、多くの医薬品不純物の HPLC 試験法開発の効率化手法が報告されてきた。その多くは、(1) 最初に種々の分析パラメータのスクリーニングを実施、(2) その結果から最適化プロセスの出発点を決定、(3) その後、分析化学者の経験に基づいた試行錯誤又は試験法開発ソフトウェア (Fusin AE, ChromSword, DryLab 等) で最適化するというものである³⁻⁹⁾ (Figure 2)。この流れ自体は道理にかなっているが、実際の運用の際に問題点が3つあった。

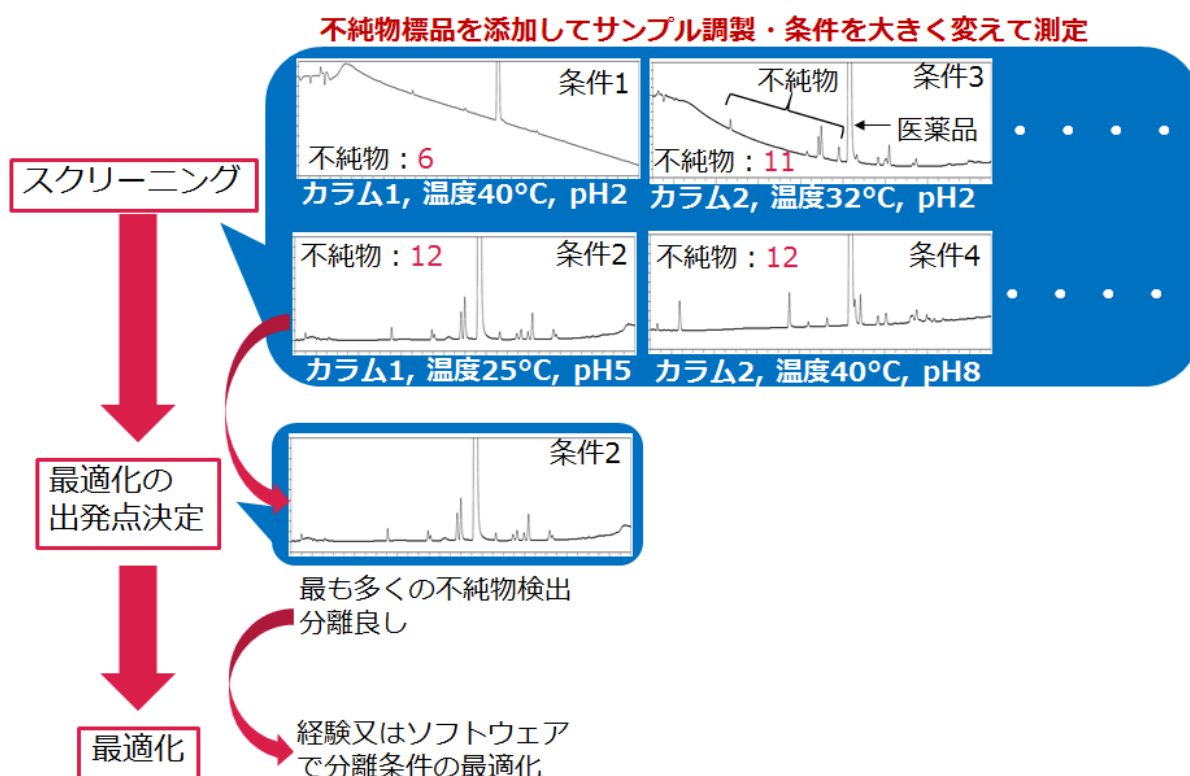


Figure 2 Traditional HPLC method development flow for impurity profile

1つ目として、既に報告されている手法では、不純物の標品が試験法開発の全ての段階で使用されており、その試験法開発戦略は、これらの入手が困難な医薬品の開発初期には適用できない点である。また、不純物標品なしでは、スクリーニングにおける異なる分析条件間での不純物の相関を確認することは難しい場合が多い。そのため、スクリーニング結果の中に全ての不純物が同時に分離検出されている条件が偶然な場合は、測定対象の数を見誤ることにつながり、医薬品中の全ての不純物を検出するという試験法開発のゴールを達成できない結果となる。2つ目は、最適化の出発点を決定する段階では、スクリーニング条件で得られた不純物同士の分離パターンにのみ注意が注がれることが多い。そのため、不純物ピークの保持時間や分離が分析パラメータ（例えば移動相 pH やカラム温度等）に対する最適化領域での不純物ピークの保持時間やピーク同士の分離の頑健性が考慮されることは少ない。もし、頑健性が

十分でない領域を最適化の出発点に設定してしまうと、最終的な試験条件としては本質として頑健性が悪いものになってしまう可能性がある。例えば、HPLC の移動相の pH が分析対象物の pK_a に近い場合には、その溶出挙動は移動相 pH や塩濃度の僅かな変化に敏感に影響される¹⁰⁾。これは試験方法の妥当性を確認する分析法バリデーション¹¹⁾における失敗のリスクを高めることになり、試験法開発を改めて実施する必要性が発生する場合も少なくない。3 つ目は、前述の理由から最適化の指標が正確に把握できない点である。通常、最適化の段階では分離の改善の必要な不純物ピークを同定し、実験計画法等を用いてそれらの分離が最大となる条件を探すのが一般的である。従って、これが適切に設定されていないと、最終化された試験方法の妥当性が疑われる結果となる。

そこで、本研究では分析パラメータの連続的なスクリーニングを用いた、医薬品不純物の効率的な HPLC 試験法開発手法の構築を目的とした。HPLC の検出器としては、品質管理現場で不純物試験法に最も多く使用される UV 検出器を使用し、不純物標品が十分に得られていない医薬品開発初期を模倣した試験法開発に適用した。本試験法開発の戦略としては、移動相 pH やカラム温度等の分析パラメータを連続的に変動させ、スクリーニングの結果を通して不純物を目視で追跡（ピークトラッキング）できるようにする。これにより次の 3 つの目標：（1）医薬品中の不純物数の把握、（2）不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定（最適化プロセスにおける分析パラメータ変動に伴う不純物ピークの溶出挙動の理解）、（3）最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定を試みた。

本研究では次に挙げる 3 つの実験を行った。1 つ目として、多くの移動相を調製することは分析化学者にとって少なからず負担であることから、必要最小限の移動相調

製で数多くの分析を可能とする手法を検証した。ここでは、HPLC のクォータナリーポンプシステムを用いて、酸性 (pH 2.2) と中性 (pH 8.0) の 2 種類の緩衝液を混合させて、その間にある複数の pH の移動相を HPLC 内で調製すると同時に有機溶媒とのグラジエント分析を同時に行った。2 つ目として、医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディを行った。ここでは、ベンゾカインを医薬品主成分、その分子量及び構造が類似した 12 種類の化合物を構造未知の不純物と想定して選択した。これらが実際の医薬品中に不純物として残留するレベルである 0.05%~0.4%含まれる試料について一連の試験法開発 (スクリーニング・最適化・最終化) を行った。3 つ目として、従来の移動相を用いたスクリーニングとの比較を行い、本研究の移動相スクリーニング手法が、医薬品中の不純物数の把握、不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定、及び最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピーク同定の観点で優れていることを確認した。最後に HPLC 試験法開発における、緩衝液・有機溶媒の混合系での有機化合物の見かけの pK_a の理解の重要性について議論する。

第2章 実験

第1節 試薬及び機器

アセトニトリル (HPLC グレード), ホウ酸, ギ酸, 酢酸, アンモニア水 (28.0-30.0%) 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液, リン酸二水素カリウム, リン酸水素カリウムは Kanto Chemical (Tokyo, Japan)より購入した。リン酸 (85%, HPLC グレード) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から入手した。水酸化カリウム溶液 (45%, HPLC グレード), 過塩素酸 (70%) はそれぞれ Fluka Corporation (St. Louis, MO, USA), Shigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。水は Milli-Q system (Merck Millipore, Molsheim, France)を使用して精製したものを使用した。

Ethyl 3- aminobenzoate (>97.0% purity), Methyl 4-hydroxybenzoic acid (>99.0% purity), 4-Methoxybenzoic acid (>99.0% purity), Ethyl 4-aminobenzoate / Benzocaine (>99.0% purity), Ethyl 4-Hydroxybenzoic acid (>99.0%), Isopropyl 4-aminobenzoate (>98.0% purity), Methyl 3-amino-4-chlorobenzoate (>98.0% purity), Isopropyl 4-hydroxybenzoic acid (>98.0% purity), Methyl 2-hydroxybenzoate (>99.0% purity)及び Ethyl 2-aminobenzoate (>99.0% purity) は Tokyo Chemical Industry Co., LTD. (Tokyo, Japan)より入手した。Methyl 4-(aminomethyl) benzoate hydrochloride, Methyl 4-aminobenzoate (98% purity)及び Methyl 4-amino-3-chlorobenzoate (>98% purity)はそれぞれ Shigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), ACROS (Morris Plains, NJ, USA)及び APOLLO (Manchester, UK)より購入した。

The XBridge C18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 µm), XBridge Shield RP18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 µm), XSelect HSS C18 SB (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 µm)及び XSelect CSH Phenyl-Hexyl (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 µm) は Waters (Milford, MA, USA)より購入したものをを使用した。

第2節 実験機器・ソフトウェア

全ての HPLC 実験は 6-column select valve を内蔵した Waters (Milford, MA, USA) の e2695 Alliance HPLC Separation Module を使用した。検出器としては 2489 UV/Vis detector を使用した。実験の制御及び解析には Waters の Empower 3 software を使用した。

pH メータ (LAQUA F-73) は Horiba (Kyoto, Japan) から購入したものを使用した。

実験計画法では SAS Institute (Cary, NC, USA) の JMP を使用した。

第3節 移動相の調製

各実験において使用した移動相については、Table 1 に示した方法で調製した。

Table 1 Mobile phase preparation

Mobile phase name	Preparation of 10 mM solutions	Exp. No.*
10 mM phosphoric acid solution (pH 2.2)	Phosphoric acid solution was prepared by adding 685 μ L of phosphoric acid to 1 L of water.	1 and 2
10 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)	Potassium phosphate buffer was prepared by adding 685 μ L of phosphoric acid and 1555 μ L of potassium hydroxide to 1 L of water.	1 and 2
10 mM potassium phosphate buffers (pH 3.5, pH 5.0, and pH 6.5)	Potassium phosphate buffers were prepared by adding 685 μ L of phosphoric acid to 1 L of water and adjusting the solution to pH 3.5, pH 5.0, or pH 6.5 using potassium hydroxide solution.	2
10 mM potassium phosphate buffers (pH 2.3, pH 2.5, and pH 2.7)	Potassium phosphate buffers were prepared by adding 685 μ L of phosphoric acid to 1 L of water and adjusting the solution to pH 2.3, pH 2.5, or pH 2.8 using potassium hydroxide solution.	2
10 mM sodium perchlorate buffer (pH 2.2)	Sodium perchlorate buffer was prepared by adding 848 μ L of perchloric acid to 1 L of water and adjusting the solution to pH 2.2 using 1 mol/L sodium hydroxide.	3
10 mM potassium phosphate buffer (pH 3.0)	Potassium phosphate buffer was prepared by dissolving 1.36 g of potassium dihydrogen phosphate in 1 L of water and adjusting the solution to pH 3.0 using phosphoric acid.	3
10 mM ammonium formate buffer (pH 4.0)	Ammonium formate buffer was prepared by adding 381 μ L of formic acid to 1 L of water and adjusting the solution to pH 4.0 using ammonium hydroxide.	3
10 mM ammonium acetate buffer (pH 5.0)	Ammonium acetate buffer was prepared by adding 572 μ L of acetic acid to 1 L of water and adjusting the solution to pH 5.0 using ammonium hydroxide.	3
10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)	Potassium phosphate buffer was prepared by dissolving 1.74 g of dipotassium hydrogen phosphate to 1 L of water and adjusting the solution to pH 6.0 using phosphoric acid.	3
10 mM potassium phosphate buffers (pH 7.0)	Potassium phosphate buffer was prepared by adding 685 μ L of phosphoric acid to 1 L of water and adjusting the solution to pH 7.0 using potassium hydroxide.	3
10 mM sodium borate buffer (pH 8.0)	Sodium borate buffer was prepared by dissolving 0.618 g of boric acid in 1 L of water and adjusting the solution to pH 8.0 using 1 mol/L sodium hydroxide.	3

*Exp. No. refers to the corresponding experiment number in “Experimental” and “Results and discussion” sections.

第4節 サンプル調製

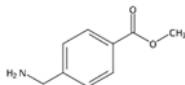
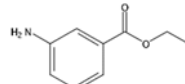
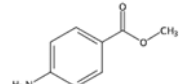
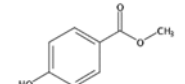
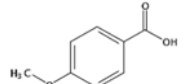
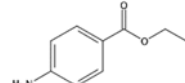
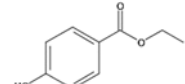
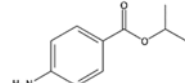
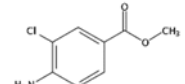
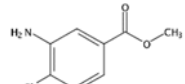
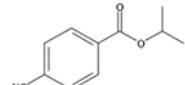
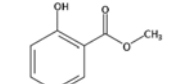
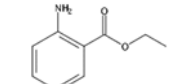
第1項 「実験1：2液と3液混合のグラジエント分析の比較」で使用したサンプル

「実験1：2液混合と3液混合のグラジエント分析の比較」で使用したサンプルを Table 2 に示した 13 種類の化合物を水/アセトニトリル (9:1) に溶解させ、全ての成分の濃度が約 9 µg/mL となるように調整した。調製した試料溶液は冷凍保存し、使用する際に解凍した。

第2項 「実験2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ」及び「実験3：従来の移動相を使用したスクリーニングとの比較」で使用したサンプル

全ての化合物を水/アセトニトリル (9:1) に溶解させ、ベンゾカイン (Ethyl 4-aminobenzoate) の濃度が 0.3 mg/mL, その他の 12 種類の化合物の濃度が Table 2 に示すようにベンゾカインに対して 0.05%から 0.40%の濃度になるように各化合物の濃度を調整した。調製した試料溶液は冷凍保存し、使用する際に解凍した。

Table 2 Physicochemical properties of test compounds

No.	Compound	Structure	pK_a^a	$LopP^a$	% ^c
1	Methyl 4-(aminomethyl) benzoate		8.67	1.29	0.10
2	Ethyl 3-aminobenzoate		3.50	1.56	0.10
3	Methyl 4-aminobenzoate		2.47	1.33	0.05
4	Methyl 4-hydroxybenzoic acid (Methylparaben)		8.31	1.88	0.25
5	4-Methoxybenzoic acid (<i>p</i> -Anisic acid)		4.47 (4.09 ^b)	1.78	0.40
6	Ethyl 4-aminobenzoate (Benzocaine)		2.51	1.84	-
7	Ethyl 4-hydroxybenzoic acid (Ethylparaben)		8.31	2.39	0.07
8	Isopropyl 4-aminobenzoate		2.63	2.19	0.06
9	Methyl 4-amino-3-chlorobenzoate		0.52	2.32	0.10
10	Methyl 3-amino-4-chlorobenzoate		1.51	1.72	0.08
11	Isopropyl 4-hydroxybenzoic acid (Isopropylparaben)		8.40	2.75	0.25
12	Methyl 2-hydroxy benzoate (Methyl salicylate)		9.76	2.52	0.05
13	Ethyl 2-aminobenzoate (Ethyl anthranilate)		2.20	2.69	0.10

Compound 6 is benzocaine, the API for the case study of method development.

^aCalculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (ACD/Labs), ^bMeasured, ^cImpurity contents of method-development case studies

第5節 実験1：2液混合と3液混合のグラジエント分析の比較

第1項 2種のリン酸緩衝液の混合比率と得られる pH

HPLC 装置の移動相 A ラインと移動相 B ラインにそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.2) と 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) を設置した。HPLC のクォータナリポンプを使用して移動相 A と移動相 B を混合させた。装置構成を Figure 3 に示す。移動相 A と移動相 B の混合比を随時変化させて、pH 2.5, pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5 となる移動相 A と移動相 B の比率を求めた。システムの構成上、混合液はクォータナリポンプの直後から採取が困難であったことから、オートサンプラーの出口から採取した。採取した溶液は pH メータを使用して pH を測定した。混合比を切り替えた際は、約 3 分送液した後に pH を測定した。2つの緩衝液の混合比率は設定した pH と得られた pH が 0.05 pH unit 以内になるまで調整を続けた。

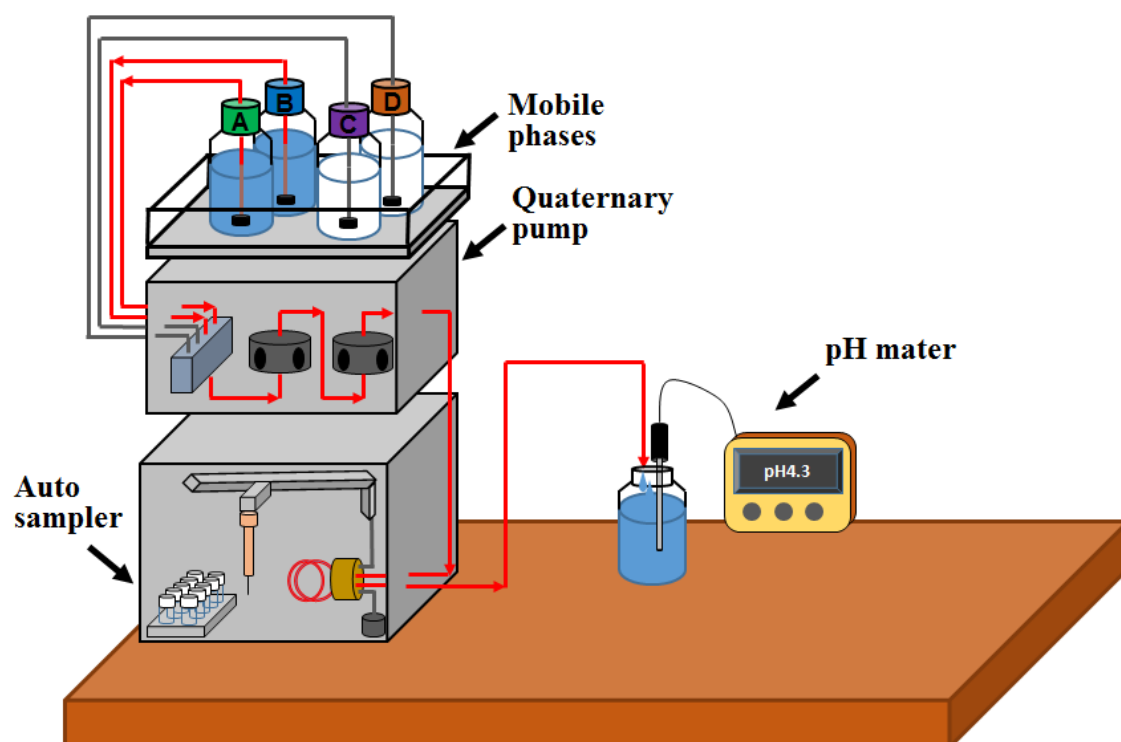


Figure 3 Instrument configuration for mixing ratios of two phosphate buffers and the pH values of the mixtures

HPLC 分析条件

移動相： Mobile phase A: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.2)

Mobile phase B: 10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)

流速：1.0 mL/min

第2項 3液混合のグラジエント分析

HPLC 装置の移動相 A ライン，移動相 B ライン及び移動相 C ラインにそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.2)，10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 及びアセトニトリルを設置した。移動相 A ラインと移動相 B ラインの混合比率を変更させ，pH 2.2，pH 2.5，pH 3.0，pH 3.5，pH 4.0，pH 4.5，pH 5.0，pH 5.5，pH 6.0，pH 6.5，pH 7.0，pH 7.5，pH 8.0 を HPLC 内で調整すると同時に，移動相 C ラインのアセトニトリルと 3 液混合でのグラジエント分析を行った。装置構成を Figure 4 に示す。グラジエント分析条件の詳細は以下に示した。「第2章 第4節 第1項」で調製した 13 種類の化合物混合液を用いて次に示す HPLC 分析条件で分析した。HPLC 分析間のカラム平衡化時間は 7 分以上とした。

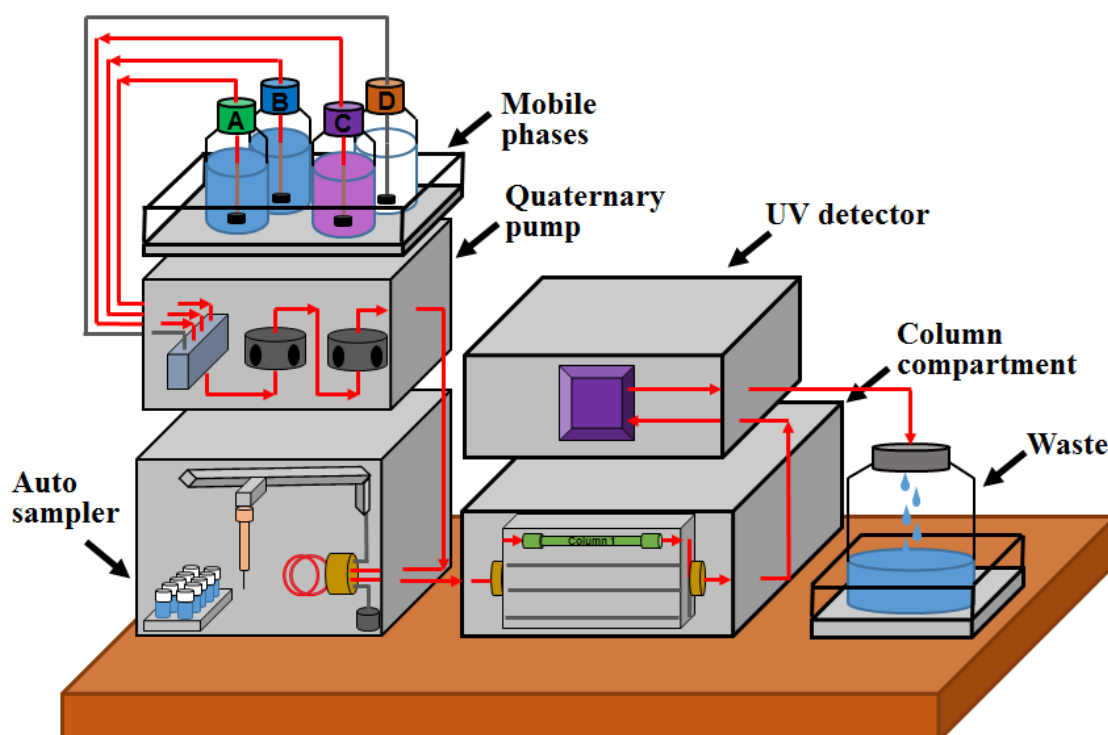


Figure 4 Instrument configuration for three mobile-phase gradient system

HPLC 分析条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）

カラム： Column 1: The XBridge C18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)

移動相： Mobile phase A: 10 mM リン酸緩衝液（pH 2.2）

Mobile phase B: 10 mM リン酸緩衝液（pH 8.0）

Mobile phase C: アセトニトリル

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

注入量：5 μ L

サンプル温度：5°C

グラジエント条件：

min	A%	B%	C%
0	$95 \times X^*/100$	$95 \times (100 - X^*)/100$	5
18	$20 \times X^*/100$	$20 \times (100 - X^*)/100$	80

*各 pH での分析における X の値については以下のものを使用した。

pH	2.2	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
X	100.0	78.0	58.0	51.0	48.3	47.3	46.7	45.8	43.0	35.0	22.0	7.0	0.0

第3項 2液混合のグラジエント分析

HPLC 装置の移動相 C ライン及び移動相 D ラインにそれぞれアセトニトリルと 10 mM リン酸緩衝液を設置し、2 液混合のグラジエント分析を行った。移動相 D ラインには 10 mM リン酸緩衝液 pH 3.5, pH 5.0 又は pH 6.5 のいずれかを接続し、「第2章 第4節 第1項」で調製した 13 種類の化合物混合液を用いて次に示す HPLC 分析条件で分析した。装置構成を Figure 5 に示す。移動相 D のリン酸緩衝液は順次手動で交換した。HPLC 分析間のカラム平衡化時間は 7 分以上とした。

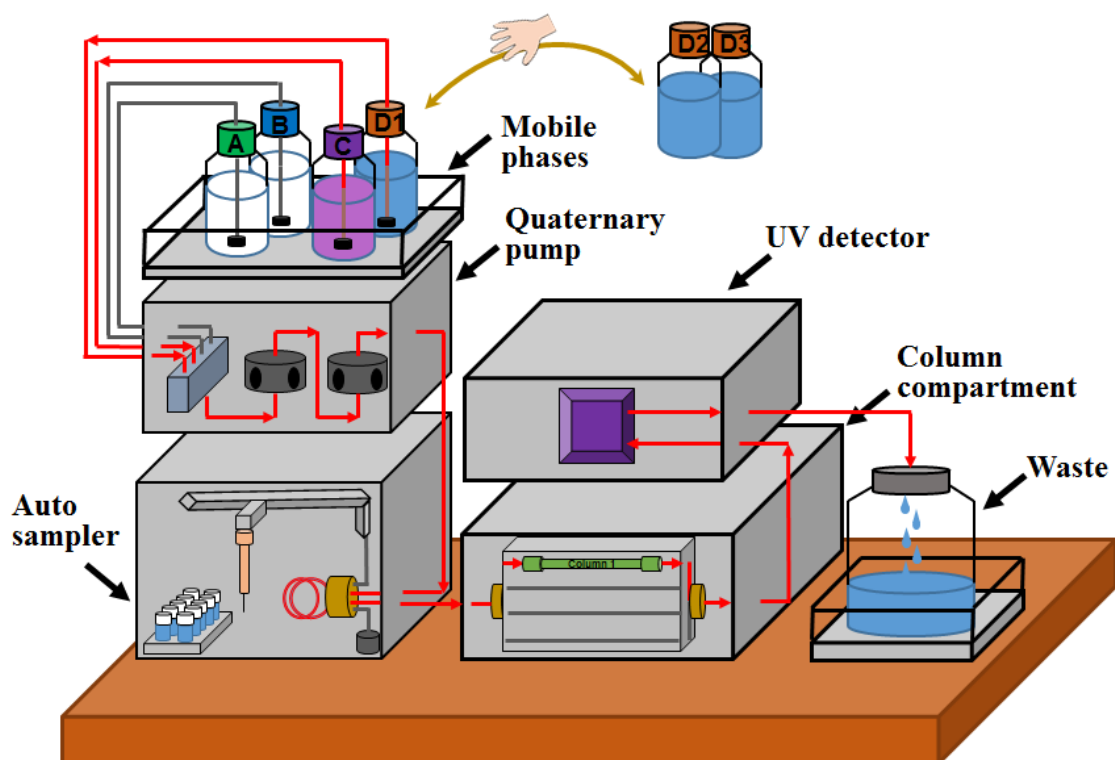


Figure 5 Instrument configuration for two mobile-phase gradient system

HPLC 分析条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）

カラム： Column 1: The XBridge C18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)

移動相： Mobile phase C: アセトニトリル

Mobile phase D: 10 mM リン酸緩衝液（pH 3.5, pH 5.0 又は pH 6.5）

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

注入量：5 μ L

サンプル温度：5°C

グラジエント条件：

min	C%	D%
0	5	95
18	80	20

第6節 実験2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ

第1項 スクリーニング

HPLC 装置の移動相 A ライン，移動相 B ライン及び移動相 C ラインにそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.2)，10 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 及びアセトニトリルを設置した。カラムコンパートメントに 4 本の HPLC カラムを接続した。「第2章 第5節 第2項」と同様に 3 液混合でのグラジェント分析を行った。装置構成を Figure 6 に示す。カラム温度としては 25°C，32°C 又は 40°C を使用した。「第2章 第4節 第2項」で調製した 13 種類の化合物混合液を用いて次に示す HPLC 分析条件で分析した。HPLC 分析間のカラム平衡化時間は 7 分以上とした。

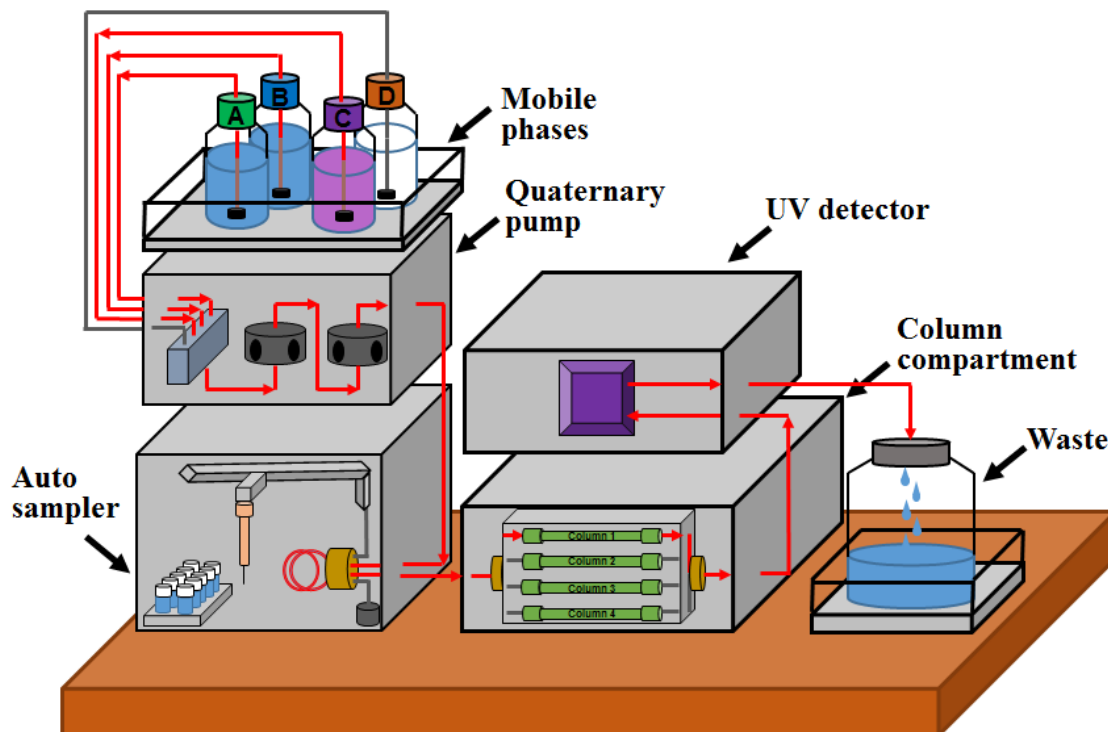


Figure 6 Instrument configuration for the screening process

HPLC 分析条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）

カラム： Column 1: The XBridge C18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)
Column 2: XBridge Shield RP18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)
Column 3: XSelect HSS C18 SB (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)
Column 4: XSelect CSH Phenyl-Hexyl (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)

移動相： Mobile phase A: 10 mM リン酸緩衝液（pH 2.2）

Mobile phase B: 10 mM リン酸緩衝液（pH 8.0）

Mobile phase C: アセトニトリル

カラム温度：25°C, 32°C 又は 40°C

流速：1.0 mL/min

注入量：5 μ L

サンプル温度：5°C

グラジエント条件：

min	A%	B%	C%
0	$95 \times X^*/100$	$95 \times (100 - X^*)/100$	5
18	$20 \times X^*/100$	$20 \times (100 - X^*)/100$	80

*各 pH での分析における X の値については以下のものを使用した。

pH	2.2	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
X	100.0	78.0	58.0	51.0	48.3	47.3	46.7	45.8	43.0	35.0	22.0	7.0	0.0

実際に分析した全 33 条件の組み合わせを Table 3 に示した。

Table 3 Column type, column temperatures, and mobile-phase pH values used for evaluating HPLC methods

Column	Column temp. (°C)	Mobile phase pH
XBridge C18	40	2.2, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0
XBridge C18	32	2.2, 4.0, 6.0, 8.0
XBridge C18	25	2.2, 4.0, 6.0, 8.0
XBridge Shield RP18	40	2.2, 4.0, 6.0, 8.0
XSelect HSS C18 SB	40	2.2, 4.0, 6.0, 8.0
XSelect CSH Phenyl-Hexyl	40	2.2, 4.0, 6.0, 8.0

第2項 最適化

HPLC 装置の移動相 A ライン，移動相 B ライン，移動相 C ライン，及び移動相 D ラインにそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.2)，10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.5)，アセトニトリル及び 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.8) を設置した。グラジエント分析としては移動相 C ラインと移動相 A ライン，移動相 B ライン又は移動相 D ラインとの 2 液混合のグラジエント分析を行った。装置構成を Figure 7 (図は移動相ライン A と移動相ライン C でのグラジエント分析) に示す。カラム温度としては 25°C，32.5°C 又は 40°C を使用した。グラジエント分析の時間は 13 分，18 分又は 23 分とした。

「第2章 第4節 第2項」で調製した 13 種類の化合物混合液を用いて次に示す HPLC 分析条件で分析した。HPLC 分析間のカラム平衡化時間は 7 分以上とした。

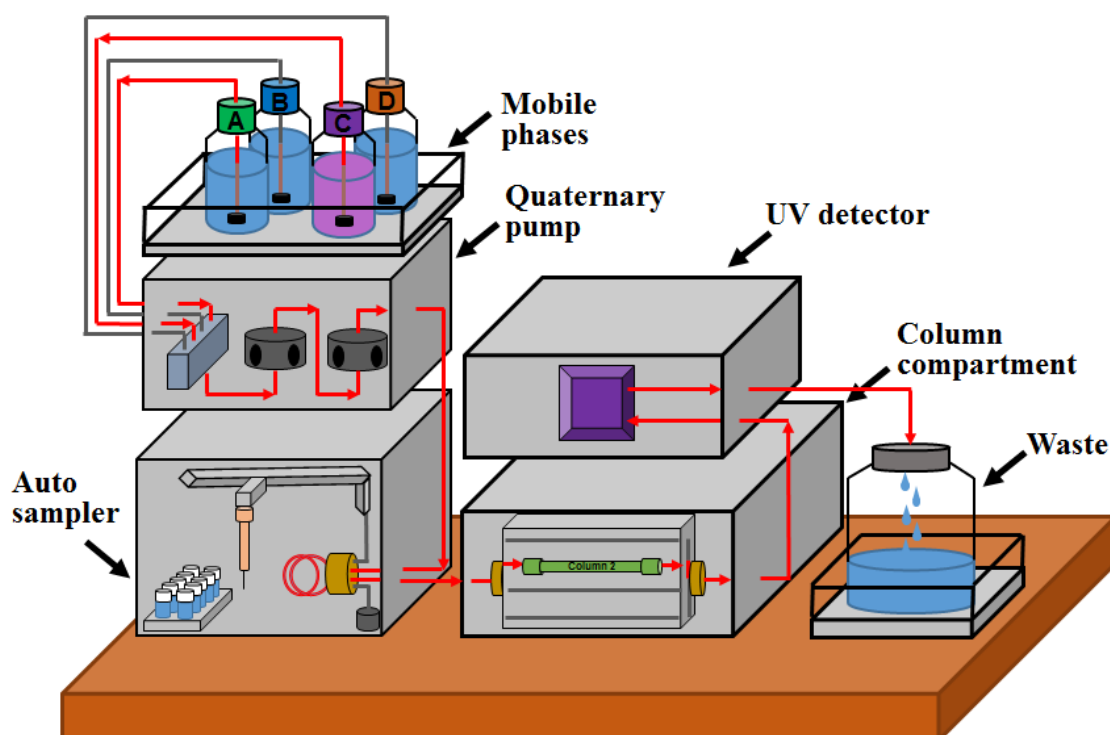


Figure 7 Instrument configuration for the optimization step

HPLC 分析条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）

カラム： Column 2: XBridge Shield RP18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)

移動相： Mobile phase A: 10 mM リン酸緩衝液（pH 2.3）

Mobile phase B: 10 mM リン酸緩衝液（pH 2.5）

Mobile phase C: アセトニトリル

Mobile phase D: 10 mM リン酸緩衝液（pH 2.8）

カラム温度：25°C, 32.5°C 又は 40°C

流速：1.0 mL/min

注入量：5 μ L

サンプル温度：5°C

グラジエント条件：

min	A%, B%又はD%	C%
0	95	5
13, 18 又は 23	20	80

実際に分析した 15 条件の組み合わせ及び分析した順番を Table 4 に示した。

Table 4 Design of experiment for method optimization

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
	Mobile phase pH	Column Temp. (°C)	Gradient time (min)
DOE Run-1	2.5	32.5	18
DOE Run-2	2.8	40	18
DOE Run-3	2.2	32.5	23
DOE Run-4	2.5	40	13
DOE Run-5	2.2	32.5	13
DOE Run-6	2.8	32.5	23
DOE Run-7	2.5	25	23
DOE Run-8	2.5	32.5	18
DOE Run-9	2.8	25	18
DOE Run-10	2.2	25	18
DOE Run-11	2.5	40	23
DOE Run-12	2.5	25	13
DOE Run-13	2.8	32.5	13
DOE Run-14	2.2	40	18
DOE Run-15	2.5	32.5	18

第3項 最終化

HPLC 装置の移動相 A ラインと移動相 C ラインにそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.3) とアセトニトリルを設置し、2 液混合のグラジエント分析を行った。装置構成を Figure 8 に示す。「第2章 第4節 第2項」で調製した 13 種類の化合物混合液を用いて次に示す HPLC 分析条件で分析した。HPLC 分析間のカラム平衡化時間は 7 分以上とした。

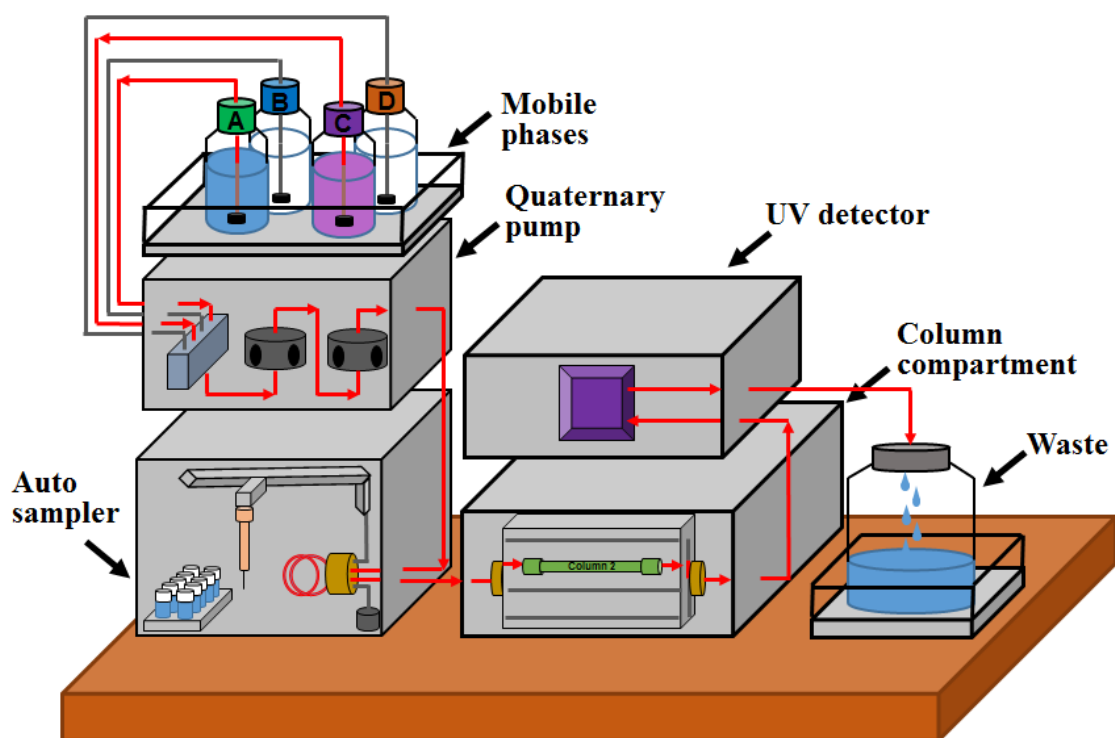


Figure 8 Instrument configuration for the method finalization step

HPLC 分析条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）

カラム： Column 2: XBridge Shield RP18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)

移動相： Mobile phase A: 10 mM リン酸緩衝液（pH 2.3）

Mobile phase C: アセトニトリル

カラム温度：26°C

流速：1.0 mL/min

注入量：5 μ L

サンプル温度：5°C

グラジエント条件：

min	A%	C%
0	95	5
23	20	80

第7節 実験3：従来の移動相を使用したスクリーニングとの比較

HPLC 装置の移動相 D ラインに 10 mM 過塩素酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2), 10 mM リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 3.0), 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0), 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0), 10 mM リン酸水素カリウム緩衝液 (pH 6.0), 10 mM リン酸水素カリウム緩衝液 (pH 7.0) 又は 10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を接続し, 2 液混合のグラジエント分析を行った。移動相 D は順次手動で交換した。システム構成を Figure 9 に示す。「第2章 第4節 第2項」で調製した 13 種類の化合物混合液を用いて次に示す HPLC 分析条件で分析した。

HPLC 分析間のカラム平衡化時間は7分以上とした。

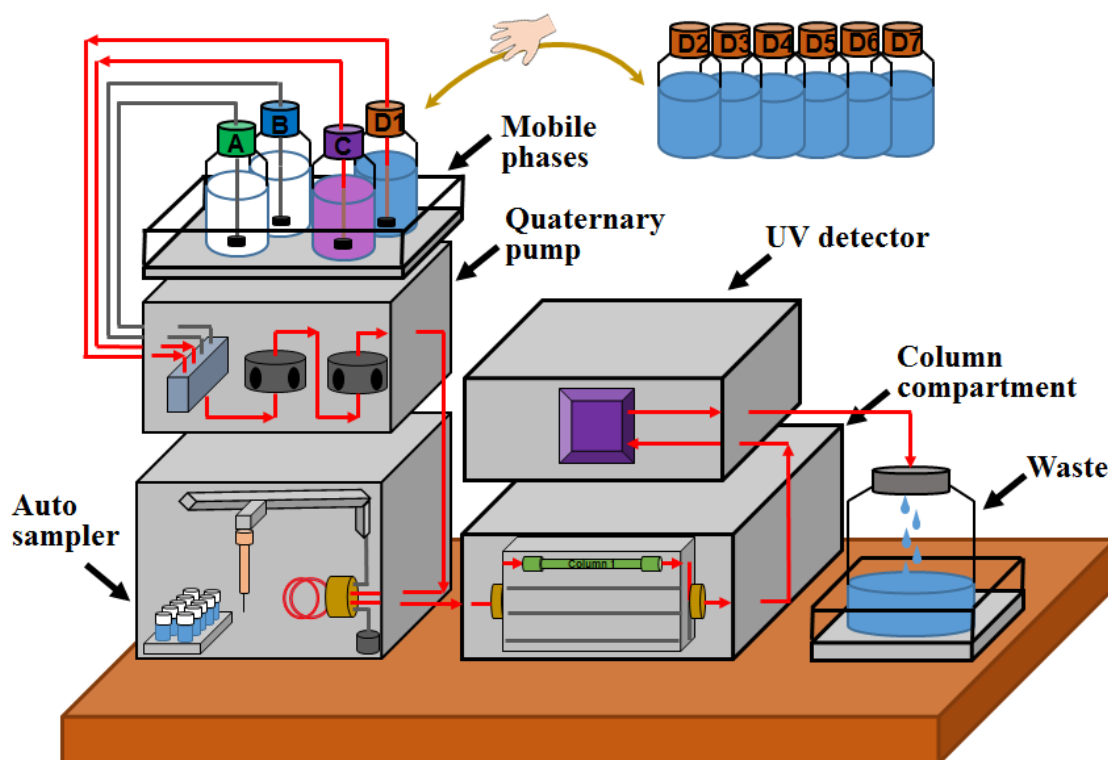


Figure 9 Instrument configuration for the conventional mobile phase screening

HPLC 分析条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）

カラム： Column 1: The XBridge C18 (4.6 mm id x 150 mm, 3.5 μ m)

移動相： Mobile phase C: アセトニトリル

Mobile phase D: 10 mM 過塩素酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2), 10 mM
リン酸二水素カリウム緩衝液 (pH 3.0), 10 mM ギ酸アンモニウム緩
衝液 (pH 4.0), 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0), 10 mM
リン酸水素カリウム緩衝液 (pH 6.0), 10 mM リン酸水素カリウム緩
衝液 (pH 7.0) 又は 10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)

カラム温度：40°C

流速：1.0 mL/min

注入量：5 μ L

サンプル温度：5°C

グラジエント条件：

min	C%	D%
0	5	95
18	80	20

第3章 結果及び考察

第1節 実験1：2液混合と3液混合のグラジエント分析の比較

第1項 2種のリン酸緩衝液の混合比率と得られる pH

UV 短波長を使用した医薬品不純物の HPLC 試験を行う場合には、UV 吸収の少ない緩衝液を使用することが望ましい。そこで、本研究では、幅広い pH 範囲の緩衝液を調製可能なリン酸カリウム系の緩衝液を用いることとした。移動相の調製は少なからず分析科学者の負担であり、必要最小限の移動相調製で試験法開発を行うことができれば、実験室での生産性の向上が望まれる。そこで、酸性 (pH 2.2) 及び中性 (pH 8.0) の2つの移動相緩衝液のみを調製し、HPLC 中でこれらを混合させることで、その間の pH を調整することとした。理論的にはこれら2つの緩衝液の混合により、pH 2.2～pH 8.0 の間の全ての pH を調整することが可能である。さらに、4液まで同時に混合可能なクォータナリポンプの利点を用いて、HPLC 中で pH 2.2 と pH 8.0 の緩衝液を混合させて、その間の pH を調整すると同時にアセトニトリルとのグラジエント分析を行うことを試した。

クォータナリポンプのコントロール誤差が稼働性評価の基準を満たしていたとしても、HPLC 装置中で pH を調整するには正確でない場合もありうる。このため、2つのリン酸緩衝液の混合比率とその時得られる pH は、意図しない不要な可能性を排除するために HPLC 装置を用いて取得した。pH 2.2 と pH 8.0 の緩衝液は HPLC 装置の A ラインと B ラインに接続した。移動相 A と移動相 B の合計流速は 1.0 mL/min とし、得られた溶液の pH は校正された pH メータで確認した。合計 11 種類(2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5)の pH となる移動相混合比率を求めた。

結果を Table 5 にまとめた。pH 2.2 と pH 8.0 の緩衝液のリン酸濃度は同じ (10 mM) であることから、HPLC 内で調整された全ての緩衝液のリン酸濃度は 10 mM であり、水酸化カリウム濃度だけが異なることを示している。

Table 5 Mixing ratios of two phosphate buffers and the pH values of the mixtures

pH 2.2 (%)	pH 8.0 (%)	pH
100.0	0.0	2.2
78.0	22.0	2.5
58.0	42.0	3.0
51.0	49.0	3.5
48.3	51.7	4.0
47.3	52.7	4.5
46.7	53.3	5.0
45.8	54.2	5.5
43.0	57.0	6.0
35.0	65.0	6.5
22.0	78.0	7.0
7.0	93.0	7.5
0.0	100.0	8.0

リン酸カリウム緩衝液としては、酸性側は pH 1、塩基性側は pH 12 付近まで調製することが可能であるが、次の 3 つ理由から、移動相 pH の上限は pH 8 とし、2 種類の緩衝液を混合させた場合の pH の検証範囲は pH 2.2～pH 8.0 とした。1 つ目の理由は多くのシリカゲルベースのカラムは pH 2-9 の外では劣化が早くなり、使用が制限されているからである。2 つ目の理由はあまり幅広い pH レンジにすると、2 つの移動相の混合比が細かくなりすぎ、HPLC 装置での再現性が悪くなることが懸念されたからである。3 つ目の理由は、塩基性の緩衝液（pH 9 以上）は空気中の二酸化炭素の影響を受けて容易に pH が変わってしまうため、保存に特別な注意が必要となってしまうからである。

さらに、pH 2.2 と pH 8.0 の緩衝液は、溶液の試薬と校正されたマイクロピペットを使用することで、濾過や pH メータを使用せずに、再現良く簡便に調製できるようにした。濾過や pH メータを使用した移動相調製法によってはコンタミが発生し、グラジェント分析で問題となるゴーストピーク発生の原因となることも報告されている¹²⁾。

第2項 2液混合と3液混合のグラジエント分析の比較

従来のグラジエント分析は、あらかじめ pH が調整された緩衝液と有機溶媒の2液混合で実施するのが一般的である。これは、2液まで混合可能なバイナリポンプの HPLC が広く普及していることも理由であると考えられる。分析パラメータの連続的なスクリーニング手法では、3種類の移動相（緩衝液2種と有機溶媒1種の合計3液混合）のグラジエント分析を行う。このことから、一連の実験を開始する前に従来の2液混合でのグラジエント分析とベースラインノイズ、各成分の保持時間及びピーク形状の観点で同等の結果が得られるかを検証した。カラムとしては XBridge C18 を用いて、pH 3.5, pH 5.0 及び pH 6.5 にて比較を行った。3液混合のグラジエント分析では移動相 A, B, C にそれぞれ pH 2.2 の緩衝液, pH 8.0 の緩衝液, アセトニトリルを接続して実施した。従来の2液混合のグラジエント分析では移動相 D に各 pH の緩衝液, 移動相 C にアセトニトリルを接続して実施した。その結果を Figure 10 にまとめた。

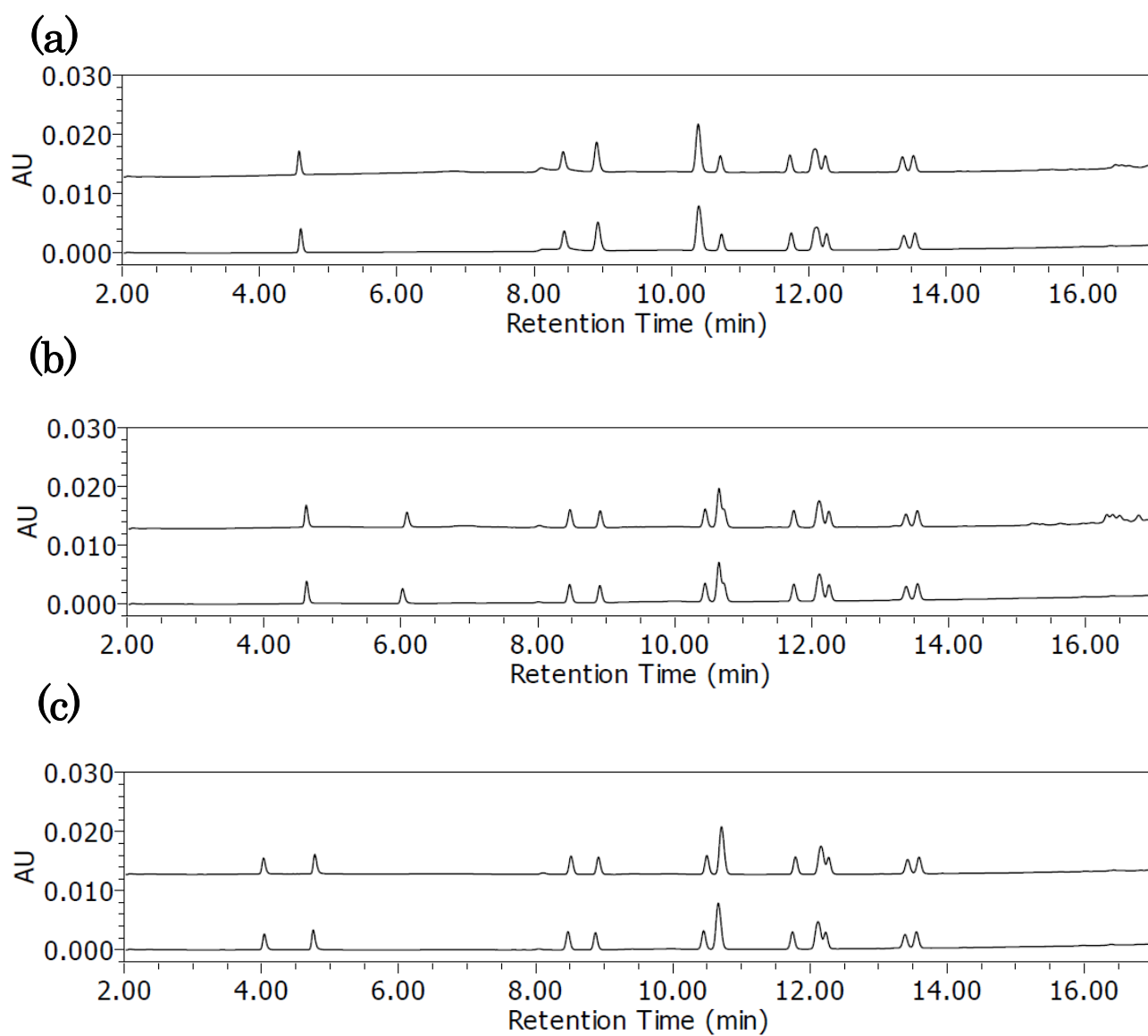


Figure 10 Comparison of the two- (upper) and three- (lower) mobile-phase gradient systems at (a) pH 3.5, (b) pH 5.0, and (c) pH 6.5

2 液及び 3 液混合系のグラジエント分析で、ベースラインノイズ、各ピーク成分の保持時間及びピーク形状の観点で同等のクロマトグラムが得られた。13 種類の化合物にはイオン性の化合物も多く含まれており、HPLC 中での pH 調製及び、有機溶媒との混合が意図した通りに実現できていることが示唆された。このことから、少ない移動相調製で、多くの移動相 pH を効率的にスクリーニングできる手法が確立された。

2 液混合の pH 3.5 (Figure 10 (a) upper) 及び pH 5.0 (Figure 10 (b) upper) のクロマトグラムにおいて、保持時間 16 分以降に夾雑ピークが検出されていることがわかる。これらはブランク分析でも検出されており、pH 調整の際にコンタミしたものと推察された¹²⁾。

第2節 実験2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ

分析パラメータの連続的なスクリーニングが実際の医薬品不純物の HPLC 試験法開発に有用であることを検証するために、ケーススタディを行った。モデル化合物として、エステル型の局所麻酔薬の1種である4-アミノ安息香酸エチル（ベンゾカイン）を医薬品主成分に選択した。より難易度の高い HPLC 試験法開発を実践するために、ベンゾカインの実際の製造法で混入してくる不純物ではなく、ベンゾカインと分子量と化学構造の酷似した12種類の化合物を不純物候補に選定した。これらの不純物を医薬品中に実際に混入してくる量（0.05%から0.40%）を想定して添加した溶液を用いて、不純物標品が入手できていない医薬品開発初期の一連の不純物の HPLC 試験法開発をシミュレーションした。本研究では不純物標品が全て入手できていない段階での試験法開発を意図していることから、12種類の化合物標品を溶出位置確認に使用することは一切行わなかった。試験法開発は次のステップで行った（Figure 11）。スクリーニング、スクリーニング結果の解析、最適化の出発点の決定、最適化、最終化の順に行った。

スクリーニング結果の解析と最適化の出発点の決定のプロセスにおいて、次の3つの目標：（1）医薬品中の不純物数の把握、（2）不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定（最適化プロセスにおける分析パラメータ変動に伴う不純物ピークの溶出挙動の理解）、（3）最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定を試みた。

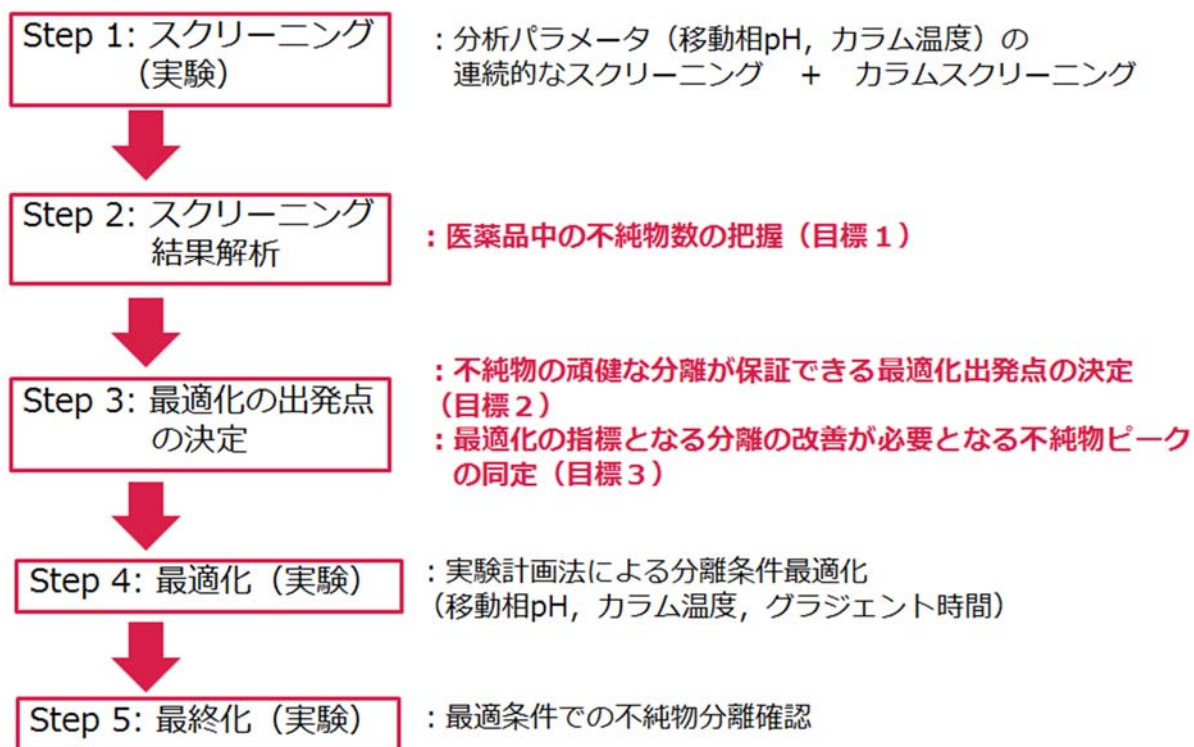


Figure 11 A new strategy for efficient HPLC method development utilizing continuous screening of analytical parameters

第1項 Step 1：スクリーニング

スクリーニングとして検証した分析パラメータとしては、一般的に分離に大きな影響があるとされている移動相 pH、カラム温度、HPLC カラム種類とした。HPLC カラムは選択性が大きく異なる 4 種類のカラムを選択した。基準カラムである XBridge C18 を用いて、移動相 pH (13 種類) とカラム温度 (3 条件) を連続的にスクリーニングした。残りの 3 種類のカラムでは分析時間短縮の目的で、移動相 pH は 4 条件、カラム温度は 1 条件のみとした (Table 3)。使用した HPLC カラム充填剤の粒子径の最適な線速度及びカラム背圧を考慮して、流量は 1.0 mL/min とした。医薬品開発初期では可能な限り不純物を見逃さないために、検出波長としては比較的多くの官能基が吸収を持つ、UV 短波長領域 (210 nm~230 nm) に設定することが望ましい。特に、医薬品分解の中には共鳴系の損失によって、短波長側にしか吸収を持たないものもある。本研究ではベンゾカインの UV 吸収の極大の 1 つが 220 nm にであったことも考慮して、220 nm を検出波長とした。

第2項 Step 2：スクリーニング結果の解析

スクリーニング結果の解析の段階において、本研究の目標の1つ目である「医薬品中の不純物数の把握」を行った。スクリーニング結果を通して全ての不純物の溶出位置が把握できること（ピークトラッキング）でこれが可能になると推察された。

XBridge C18 で pH 及びカラム温度を連続的にスクリーニングした際の結果をそれぞれ Figure 12 と Figure 13 に示す。pH 2.2 での不純物の溶出順に各ピークに番号をアサインした。本研究では、分析パラメータ（特に移動相 pH）を細かくスクリーニングしたことから、各ピーク成分の分析パラメータの変動に対する応答傾向が明らかになった。これにより、隣り合う分析条件間での各不純物の溶出時間、ピーク形状及びピーク面積比較等から、不純物標品がなくてもピークトラッキングを目視で行うことができた。Figure 14 に pH の連続的なスクリーニング結果（Figure 12）をピークトラッキングした例を示した。これにより、不純物数が 12 であることが明らかとなった。

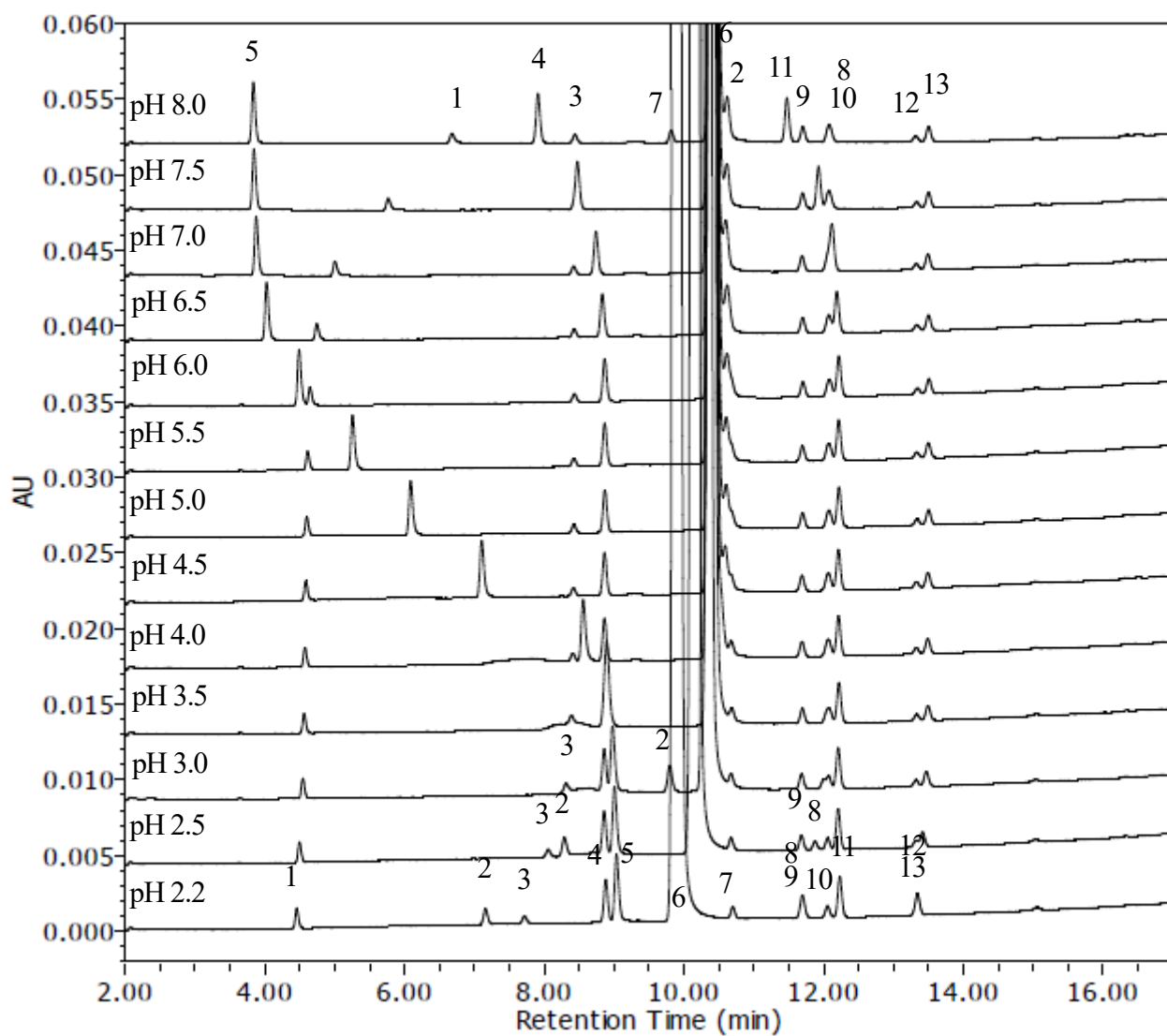


Figure 12 Influence of mobile-phase pH on the elution pattern of benzocaine and impurities using an XBridge C18 column

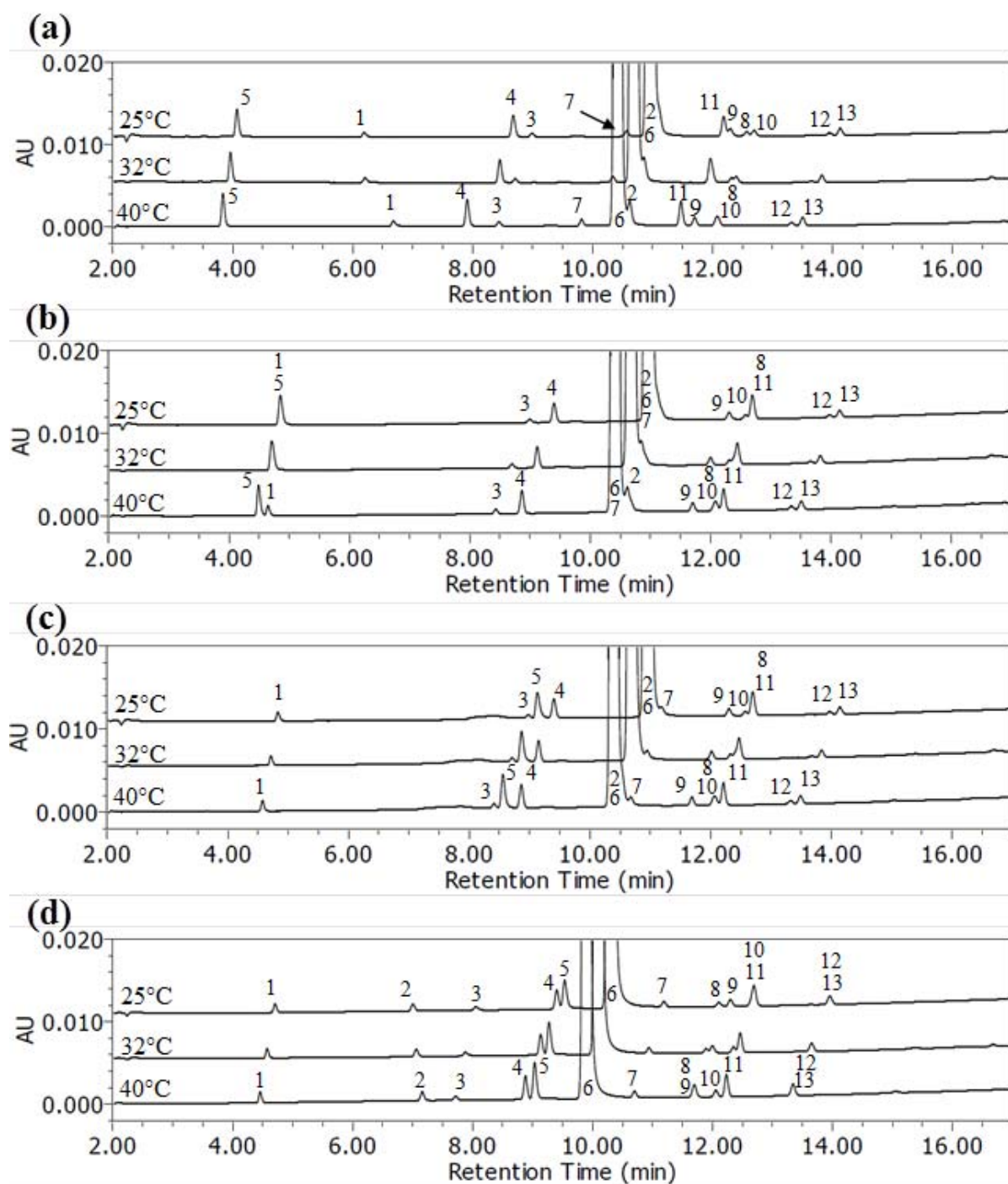


Figure 13 Influence of column temperature on the elution pattern of benzocaine and impurities using an XBridge C18 column at (a) pH 8.0, (b) pH 6.0, (c) pH 4.0, and (d) pH 2.2

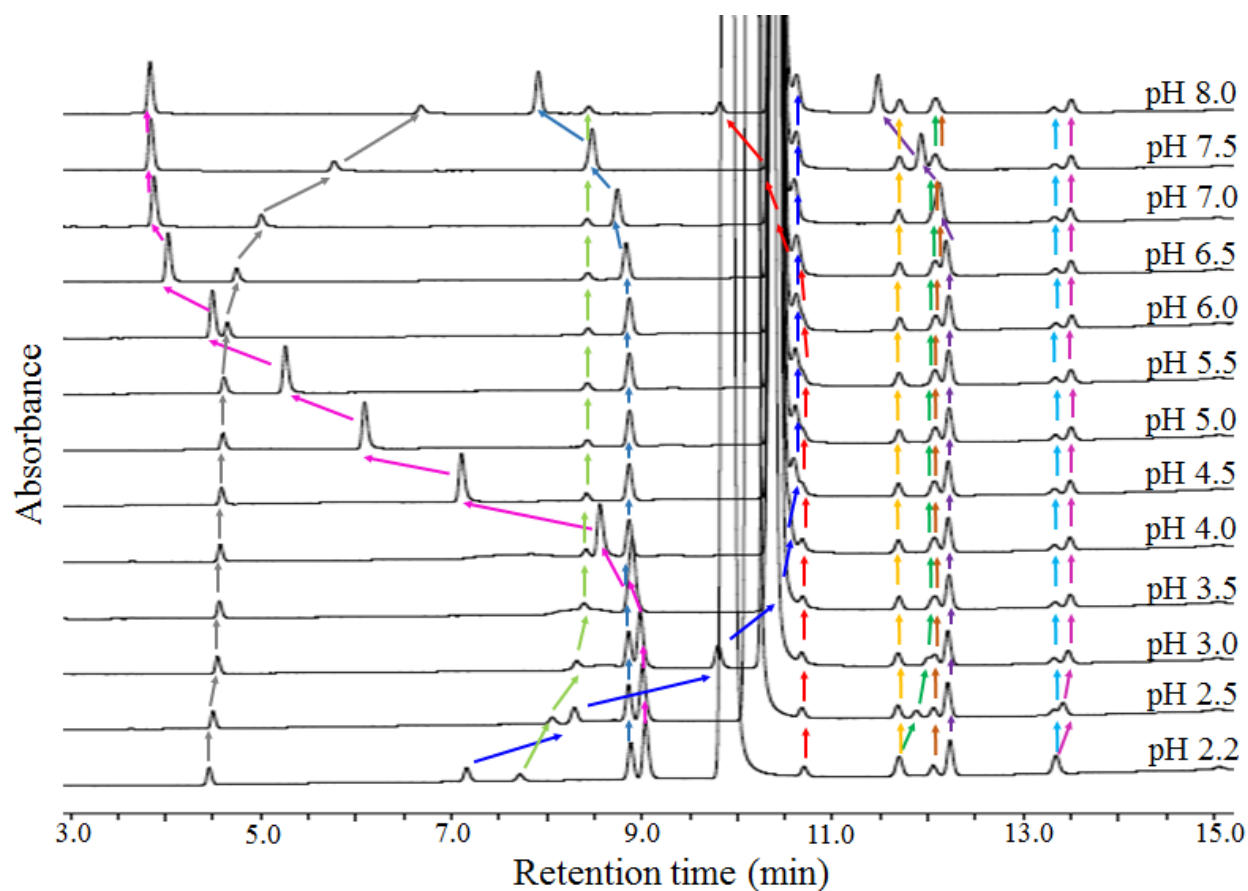


Figure 14 Peak tracking image on the mobile phase pH screening

HPLC カラムブランドを連続的にスクリーニングすることはできないことから、選択性が異なるカラムを使用したスクリーニング結果は、連続的なスクリーニングから得られた不純物数が正しいことを確認する目的で使用した。3 本のカラムでのスクリーニング結果においても、12 成分以上の不純物は検出されなかった (Figure 15)。全てのスクリーニング条件で検出された不純物ピーク数を Table 6 にまとめた。以上のことから不純物数が 12 であることが確認され、本研究の目標である「医薬品中の不純物数の把握」が達成できることが確認された。

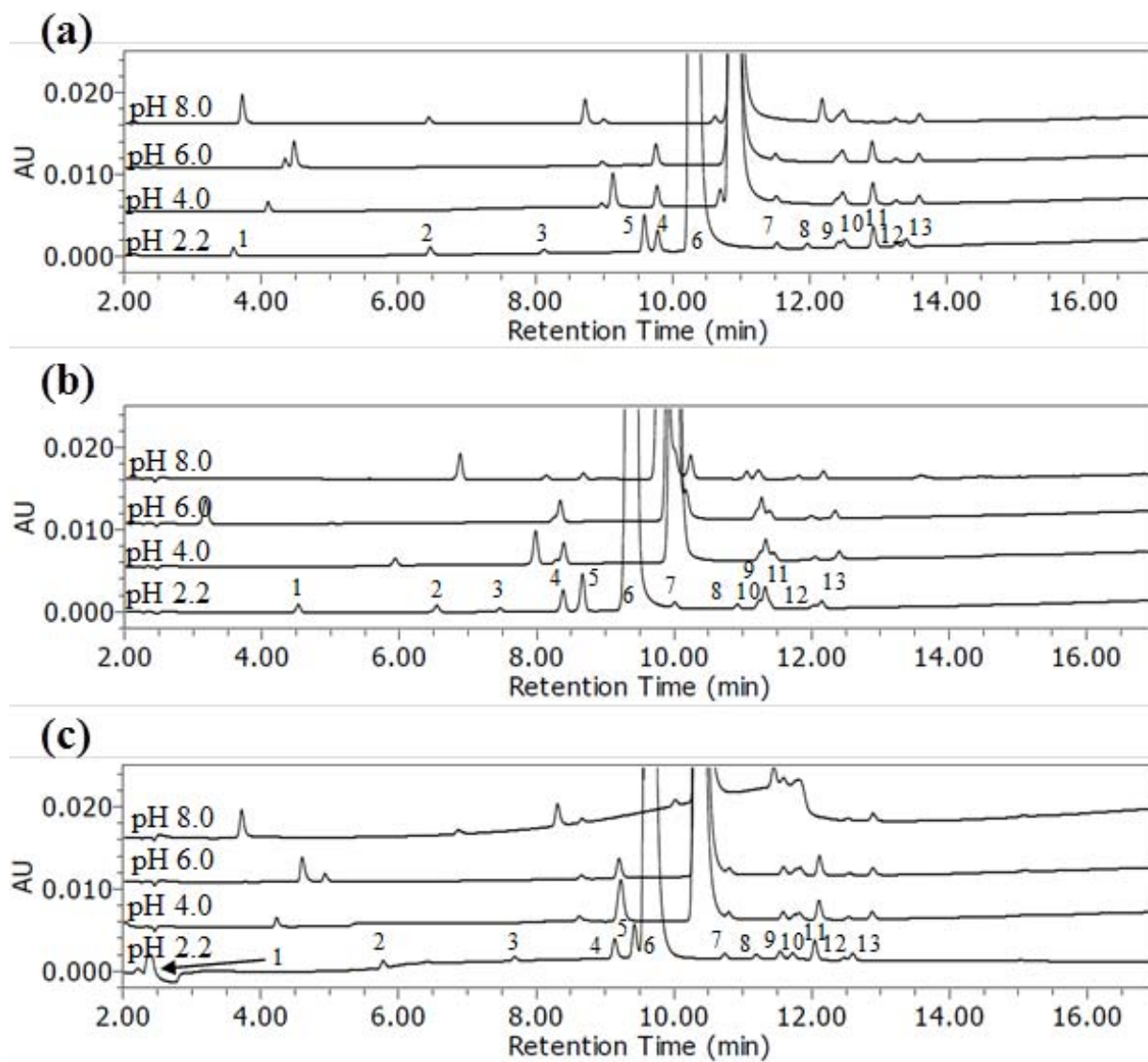


Figure 15 Demonstration of the selectivity difference generated for benzocaine and impurities with the (a) XBridge Shield RP18 column, (b) XSelect HSS C18 SB column, (c) XSelect CSH Phenyl-Hexyl column, using mobile-phase pH 2.2, pH 4.0, pH 6.0, and pH 8.0

Table 6 Summary of the number of peaks detected

Separation system (Column/Column temp.)	Number of peaks Mobile phase pH													
	2.2	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	
XBridge C18/40°C	10	12	11	9	10	10	10	10	10	10	9	9	10	
XBridge C18/32°C	11	-	-	-	10	-	-	-	9	-	-	-	10	
XBridge C18/25°C	10	-	-	-	10	-	-	-	8	-	-	-	11	
XBridge Shield RP18/40°C	12	-	-	-	10	-	-	-	9	-	-	-	9	
XSelect HSS C18 SB/40°C	9	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-	9	
XSelect CSH Phenyl-Hexyl/40°C	11	-	-	-	9	-	-	-	10	-	-	-	10	

これまで報告されている医薬品不純物の HPLC 試験法開発では、スクリーニング段階において、移動相を 2～5 種類程度検証するものが多い^{6,9,13)}。また、条件ごとに異なる移動相添加剤が使用され、pH 2 Unit 以上離れていることが多い。このため、分析条件間で不純物の溶出パターンが大きく異なることから、ピークトラッキングには不純物標品が必須であった^{6,9,13)}。通常はピークトラッキングの概念は HPLC 試験法開発の最適化段階でのみ適用されることが多い^{6,7,9,14)}。調査したところでは、不純物標品を用いずに、HPLC/UV 検出器でスクリーニング結果を通してピークトラッキングを達成した報告はない。

さらに、主成分であるベンゾカインのピーク面積はスクリーニング条件を通してほとんど変化しなかったが、Peak 1, Peak 2, Peak 4 及び Peak 5 のピーク面積が pH の変動によって大きく変わっていることが Figure 12 よりわかる。移動相 pH が小さくなるにつれて、Peak 1 のピーク面積は増加しているが、逆に Peak 2, Peak 4 及び Peak 5 は減少している。この現象は化合物がイオン性化合物であり、イオン型と分子型の UV 吸収パターンが大きく異なることに起因していると考察することができる。この

ような化合物を含む場合は、条件を大きく変えて実施する従来のスクリーニング手法ではピークトラッキングがより一層難しくなると推察された。

本研究では化学構造の酷似した化合物を不純物対象として選択したために、ほとんどの条件で不純物ピーク同士が重なる現象が観察された。XBridge C18 で、カラム温度 40°C、移動相 pH 2.5 の時に偶然 12 成分全てが検出されたが、この条件がなかったとしても、分析パラメータが隣り合うクロマトグラム同士の比較により、不純物の総数が 12 であることを推定することは可能である（例えば、Figure 12 の pH 2.2/40°C と pH 3.0/40°C の比較）。もし、報告されているスクリーニング手法のように、スクリーニング段階で移動相として pH 4.0 と pH 8.0 しか実施されていなかった場合、XBridge C18/pH 8.0/25°C の条件（Figure 13 (a)）において、1 つの不純物（Peak 2）がベンゾカインのピークに重なってしまっていることはわからなかったと推察される。その場合、分析化学者は分析すべき不純物の総数を 11 と誤って認識してしまうことになる。これは、医薬品の品質管理においては致命的な問題である。

高速液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）がピークトラッキングに使用されることが報告されているが^{13,15)}、同位体等の同じ化学組成の化合物を見分けることはできない。Table 2 を見るとわかるように、本研究では 3 種類の化学組成の同じ化合物（C₈H₈O₃ ; 化合物 No. 4 と No. 5, C₉H₁₁NO₂; ; 化合物 No. 1, No. 2, No. 6 及び No. 13, C₈H₈ClNO₂ ; 化合物 No. 9 と化合物 No. 10）が使用されており、LC/MS を使用してもピークトラッキングすることは難しい。また、実際の医薬品不純物の中にも化学組成が同じである異性体の不純物は数多く存在する。さらに MS 検出器の特性上、トリフルオロ酢酸（TFA）、ギ酸、酢酸、アンモニア等の揮発性の移動相添加剤しか使用できないという制約がある。これらの移動相添加剤は化学構造上、UV の短波長側

に強い吸収を持つために、UV 短波長側を検出波長として医薬品主成分に対して約 0.1%以下の不純物を良好に検出することは困難な場合がある（第3章 第4節で検証する）。それでは、医薬品の品質管理現場で最も汎用的である UV 検出器を用いた医薬品の不純物の HPLC 試験法には適さない。フォトダイオードアレイ検出器（PDA detector）がピークトラッキングに使用されることもある^{14,16)}が、不純物レベルが医薬品主成分に対して約 0.1%以下と少なく、その UV スペクトルパターンが分析条件（特に移動相 pH）によって変わってしまう場合は適用が困難である。

第3項 Step 3：最適化の出発点の決定

最適化の出発点の決定の段階において、本研究の目標の2つ目と3つ目である「不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定」と「最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定」を行った。これらは最適化が実施される領域での分析パラメータの変動に対する各ピーク成分の溶出挙動を理解することで達成できる。

医薬品不純物の HPLC 試験法において、特に重要なことは、全ての不純物が主成分と十分に分離していることである。つまり、医薬品主成分に近接して溶出するピークは良好な頑健性を持って、分離していなくてはならない。まず、スクリーニングから得られた包括的な情報 (Figure 12, Figure 13, Table 6) をもとに、どの移動相条件が最適化の出発点にふさわしいかを検証した。通常予想されるように、移動相 pH が分離に最も影響を与えることがわかった。ベンゾカイン (Peak 6) の保持時間は pH 3～pH 8 の間で安定しているが、ベンゾカインと Peak 2 と Peak 7 の分離は4本全てのカラムで良くなかった。一方、pH 2～pH 3の間ではベンゾカインの解離型と非解離型の両方が存在するため、保持時間は移動相 pH の僅かな変動に対して変わりやすいが、ベンゾカインと不純物の分離が十分に頑健である唯一の領域であった。このことから、pH 2～pH 3 付近を最適化の出発点の分析条件の1つと決定した。

次に、最適化に使用するカラムを決定した。XBridge C18 での pH 2.2 でのピークアサイン結果を基に、ピーク面積及び溶出時間から他の3本のカラムの pH 2.2 でのピークアサインを行った (Figure 15)。また、pH 2.2 での各分析条件でのベンゾカインのシンメトリー係数及び、ベンゾカインとその直前と直後に溶出する不純物ピークの分離度を Table 7 にまとめた。

Table 7 Summary of the symmetry factors and resolution of benzocaine at pH 2.2

Separation system (Column/Column temp.)	Symmetry factor of main peak	Main peak resolution (pre/post)
XBridge C18/40°C	1.07	7.58/7.18
XBridge C18/32°C	1.09	7.04/7.40
XBridge C18/25°C	1.10	6.17/7.38
XBridge Shield RP18/40°C	1.20	4.39/10.60
XSelect HSS C18 SB/40°C	0.92	5.96/4.76
XSelect CSH Phenyl-Hexyl/40°C	1.21	1.65/9.12

XSelect HSS C18 SB と XSelect CSH Phenyl-Hexyl は次の理由から最適化の候補から外した。(1) XSelect HSS C18 SB と XBridge Phenyl では Peak 7 が主成分ピークのテーリング上に溶出している。(2) 主成分ピーク回りの分離としては、XSelect CSH Phenyl-Hexyl において、直前に溶出する Peak 5 との分離が悪かった (Rs: 1.65)。

XBridge C18 と比較して XBridge Shield RP18 では pH 2.2 において全ての不純物が検出されており、不純物同士の分離が最も良好であった。以上の理由から、最適化の出発点としては XBridge Shield RP18 を用い、移動相は酸性付近 (pH 2 から pH 3) とすることとした。このようにして、「不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定」が達成できることが確認された。

次に、最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピーク (Critical pair) の選定を行った。連続的なスクリーニングで得られた情報 (分析パラメータの各ピーク成分の溶出挙動に対する影響) は、最適化の出発点の決定以外に最適化で検証すべき Critical pair の選定にも有用であった。

XBridge C18 での包括的なスクリーニング結果と最適化を実施する XBridge Shield RP18 での pH 2.2 での分離パターンから次の 5 つのピークの間を Critical Pair (CP) に

選択した。スクリーニングの段階では時間節約のため、移動相 pH とカラム温度の連続的なスクリーニングは XBridge C18 カラムのみで実施した。一方、移動相 pH やカラム温度に対する各ピークの応答は、カラムブランドではなく各化合物の物理化学的性質に依存する部分が多いことから、異なるカラムであっても同じように適用することができた。

(1) CP1 (Peak 2 と Peak 3) : pH が高くなるにつれて、Peak 2 と Peak 3 の分離が悪くなる (Peak 2 と peak 3 の溶出順序が逆転する)。(2) CP2 (Peak 4 と Peak 5) : pH が高くなるにつれて、Peak 4 と Peak 5 の分離は改善するが、pH 2.2 付近では近接している。(3) CP3 (Peak 6 と Peak 7) : pH が高くなるにつれて、Peak 6 (ベンゾカイン) と Peak 7 の分離が悪くなる。(4) CP4 (Peak 9 と Peak 10) : 移動相 pH やカラム温度によって Peak 9 と Peak 10 が重なる。(5) CP5 (Peak 12 と Peak 13) : pH が高くなるにつれて、Peak 12 と Peak 13 の分離が改善するが、pH 2.2 付近では近接している (Figure 16)。このようにして、「最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定」が達成できることが確認された。

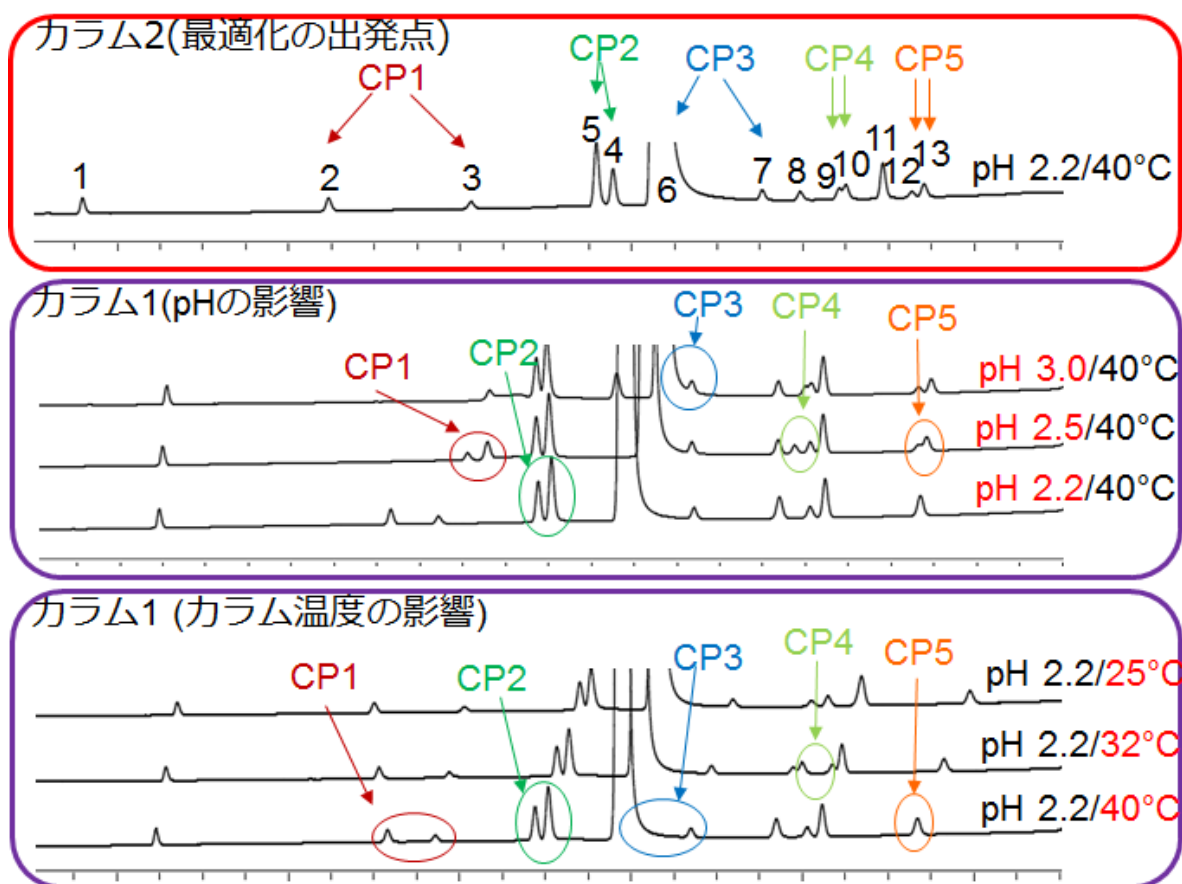


Figure 16 Determination of critical pairs (CPs) for the optimization process

さらに、スクリーニングの結果より、最適化を実施する pH 2 から pH 3 付近では、移動相 pH とカラム温度が分離に影響する要因であることから、これらを最適化で検証するパラメータとした。また、スクリーニングでは実施しなかったグラジエント勾配も分離に影響がある重要なパラメータであることが知られており、合計 3 種類のパラメータを最適化で検証することとした。

分析パラメータの連続的なスクリーニングでは、これまで報告されてきたスクリーニング手法では得られなかった有用な情報を取得することができた^{7,8)}。誤った Critical pair の選定を行った場合、開発された HPLC 試験方法の妥当性が疑われる可能性がある。

第4項 Step 4 : 最適化

HPLC 試験法の最適化は実験計画法を用いて実施した。Step 3 での解析から、ある程度決まった領域に最適な条件があることがわかっている。実験計画のモデルとしては、計画点が少ないボックス-ベンケン (Box-Behnken) 計画を使用した¹⁸⁾。

移動相 pH, カラム温度及びグラジエント時間の3つの因子が、5つの応答 (Critical pair) に与える影響を確認した。ボックス-ベンケン計画の計画点は因子水準の最高点と最低点及びその中間点の組み合わせである。各因子水準については、移動相は pH 2.2, pH 2.5, pH 2.8, カラム温度は 25°C, 32.5°C, 40°C, グラジエント時間は 13, 18, 23 分とした。3 因子のボックス-ベンケン計画では合計 15 実験が必要とされる。実験の計画点を Figure 17 に示した。

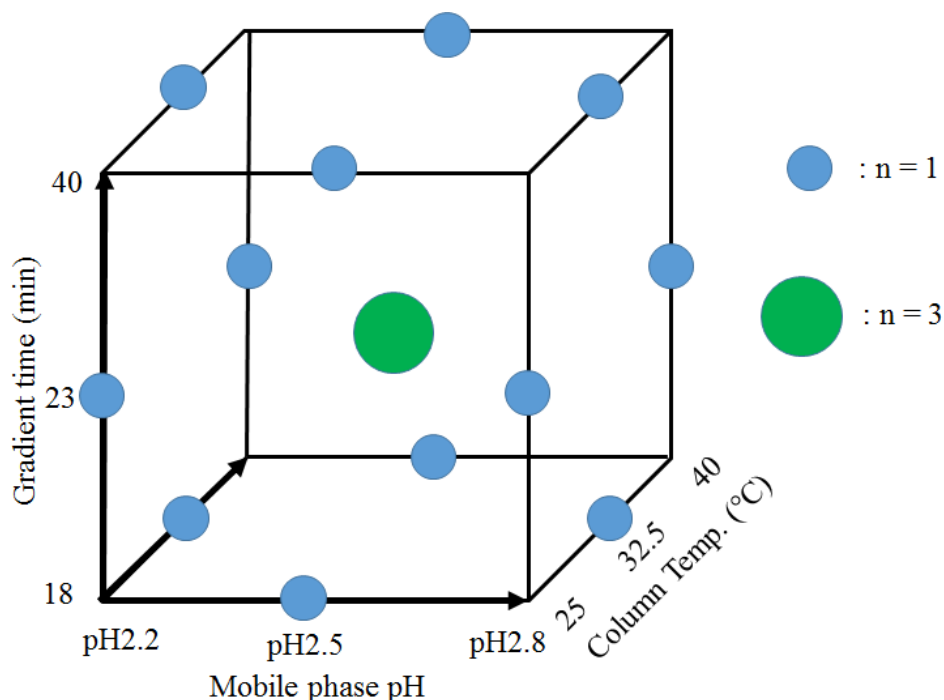
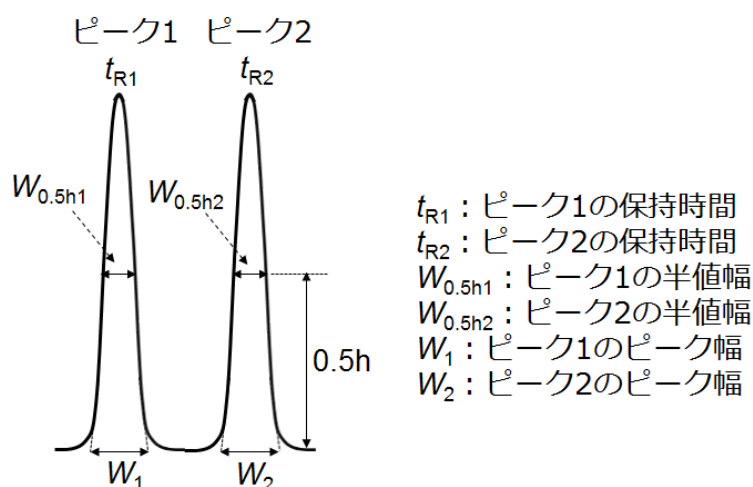


Figure 17 Design of experiment for method optimization

CP1, CP2, CP3, CP5 については検証した全ての領域で分離度 (R) が得られたことから、分離度を応答として選択した。一方、CP4 については一部の条件で2本のピークが近接し、分離度が求められなかったことから、より実験計画を適切に理解するために分離係数 (α) を用いて評価した。分離度及び分離係数については以下の式を用いて算出した。得られた結果はモデル構築の目的で JMP に転送され解析された。



$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}}$$

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

ただし、 R : 分離度 α : 分離係数 t_0 : ホールドアップ時間

それぞれ5つの応答への分析パラメータの影響を視覚的に評価するために、JMP が作成した応答曲面を用いた。特に分離が困難であった Critical pair (CP4 と CP5) の分離はグラジエント時間が23分の時に最も良好であったことから、グラジエント時間が23分の際の移動相 pH とカラム温度の分離に与える影響を Figure 18 に示す。例えば、CP1 については、移動相 pH の低い場合に分離度が大きくなる傾向があった。

一方、カラム温度については pH が低領域（pH 2.2 付近）では低い温度、pH が高い領域（pH 2.8 付近）では高い温度の時に分離度が大きくなる傾向が見られた。

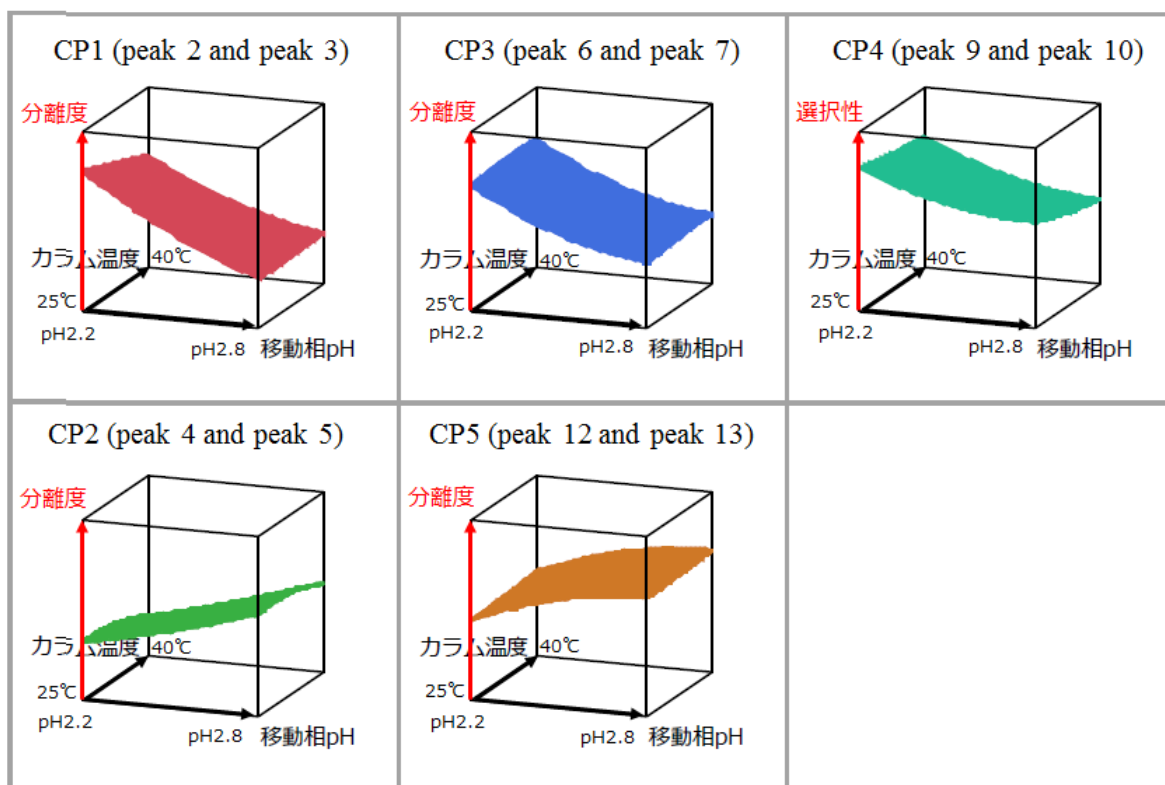


Figure 18 Three-dimensional (3D) response surface plots for the effect of mobile-phase pH and column temperature on resolution of critical pairs using a 23 min gradient

最適条件の目標としては、CP1, CP2, CP3, CP5 については分離度が 1.5 以上（完全分離の指標）と CP4 については、選択性（ α ）が 1.01 以上を満たす領域と定義した。選択性が 1.01 以上の時に分離度が算出可能であり、分離度 1.0 以上が得られていた。グラジエント時間が 23 分の時の移動相 pH とカラム温度の相互作用を示す応答曲面を算出した（Figure 19）。許容領域（Region of acceptability）と書かれた白い領域は JMP が予想した全ての Critical pair の目標が達成されている領域である。全ての Critical pair の分離が最大になり、かつある程度の頑健性が保証された最適条件（Optimum condition）は、移動相 pH は 2.3、カラム温度は 26°C、グラジエント時間は 23 分であった。

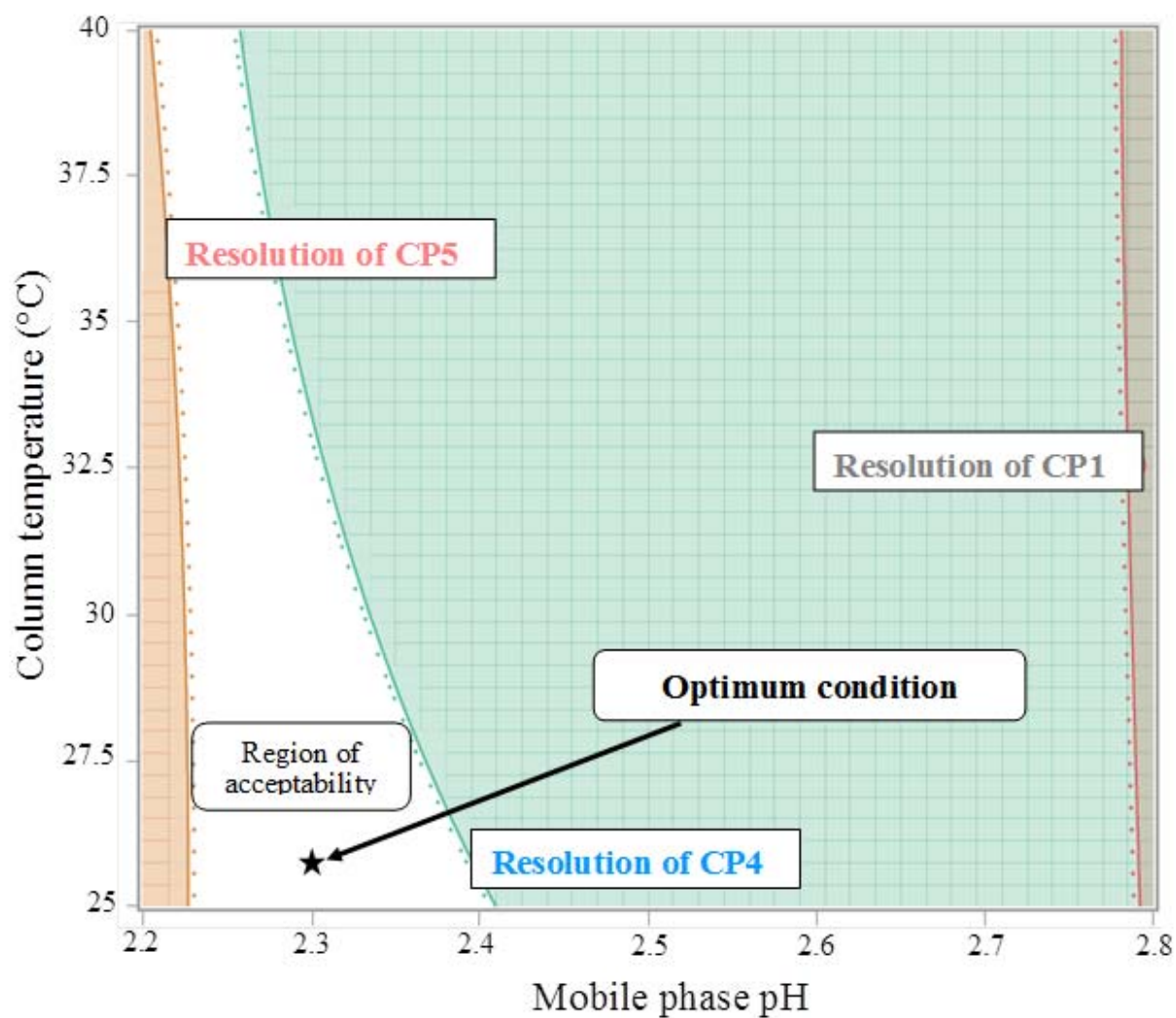


Figure 19 A response graph showing interactions between mobile-phase pH and column temperature using a 23 min gradient. The white area, marked as region of acceptability, corresponds to the method conditions predicted using JMP when target goals can be achieved.

第5項 Step 5：最終化

実験計画法の予測を検証するために、最終的な最適条件で実験を行った（Figure 20）。全ての不純物ピークは良好に分離した。また、CP の実際の分離も実験計画の予想と良く一致した（Table 8）。

以上、Step 1 から Step 5 を通して、分析パラメータの連続的なスクリーニングを用いた試験法開発フローにより、効率的に頑健で質の良い医薬品の HPLC 試験法が開発できることが検証された。

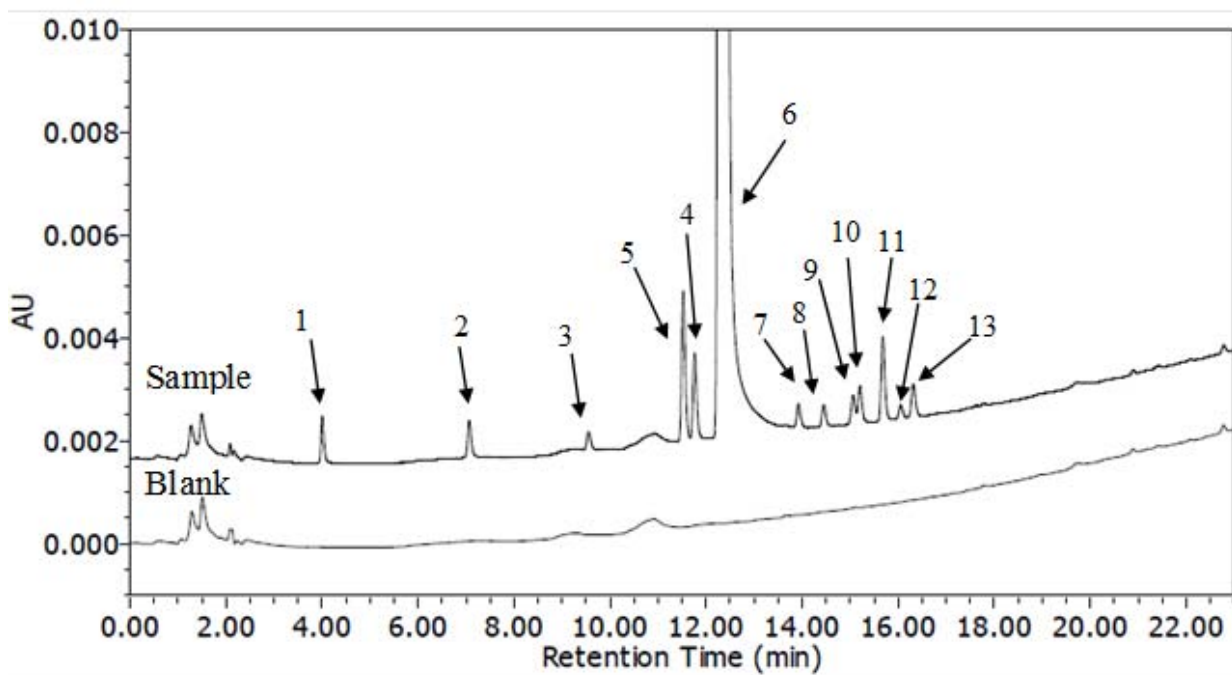


Figure 20 Final chromatogram for benzocaine and impurities using an XBridge Shield RP18 column

Table 8 Comparison of actual and predicted resolutions for each critical pair

Critical pair	Actual resolution	Predicted resolution by JMP
CP1 (peak 2 and 3)	17.7	16.6
CP2 (peak 4 and 5)	1.8	1.7
CP3 (peak 6 and 7)	11.2	10.9
CP4 (peak 9 and 10)	1.0	1.0
CP5 (peak 12 and 13)	1.8	1.8

本研究ではあえて分離の困難な試料を用いて検討を行ったため、スクリーニング段階において移動相は0.5 pH ずつ検討し、合計 33 条件の分析を行った。本研究の結果から、分離すべき不純物の数等にも依存するが、通常であれば 1.0 pH ずつスクリーニングすれば十分ピークトラッキングは可能と推察される。これにより分析条件も 33 から 27 に減らすことが可能である。分析時間の観点では、既に報告されている方法の 12 又は 16 条件と比較すると条件数が多い^{7,8)}ため、本研究手法の方が時間を必要とすることが欠点として挙げられる。しかしながら、医薬品中の不純物プロファイルを完全に明らかにし、頑健な医薬品不純物の HPLC 試験法を安定的に開発でき、患者の安全を保障できる本研究手法の利点は、この欠点を十分に補うことができる。汎用的な耐圧の HPLC を使用すると、27 条件のスクリーニングには約 28 時間が必要であった。一方、高速分析が可能な超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) を使用することで、分析時間は 28 時間から 4 時間まで短縮が可能であり、複数の HPLC 装置を並行して使用することで更なる時間短縮が可能となる。この場合、スクリーニング条件数の多少の違いは医薬品の試験法開発全体の時間の中では無視できるレベルである。

第4節 従来の移動相を使用したスクリーニングとの比較

試験法開発のスクリーニング段階においては、数種類の移動相 pH のみを用いて検討するケースが比較的多い^{7,9)}。また、これらの方法では緩衝能の観点から各移動相 pH の移動相添加剤の濃度や種類が異なることがほとんどである。一方、調 pH を 1.0 ずつスクリーニングしたものも一部報告されている¹³⁾。そこで、従来の移動相を用いて移動相 pH を連続的にスクリーニングする手法により、試験法開発のケーススタディで検証した 2 つの目標（医薬品中の不純物数の把握、不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定）について達成可能かを検証した。pH 2.2 から pH 8.0 までの 7 種類の移動相に使用されている移動相添加剤は過去に報告されているものから無作為に選択した^{1,3-10,13,15,17)}。一方、移動相添加剤の濃度については実験デザインをシンプルにする目的で 10 mM に統一した。試料としては「実験 2：医薬品不純物の HPLC 試験法開発のケーススタディ」で使用したものと同一ものを用いた。得られた結果を Figure 21 に示す。各ピークに振られている番号は Table 2 に示した化合物番号を示す。これらの保持時間は各化合物の標品を使用して決定した。

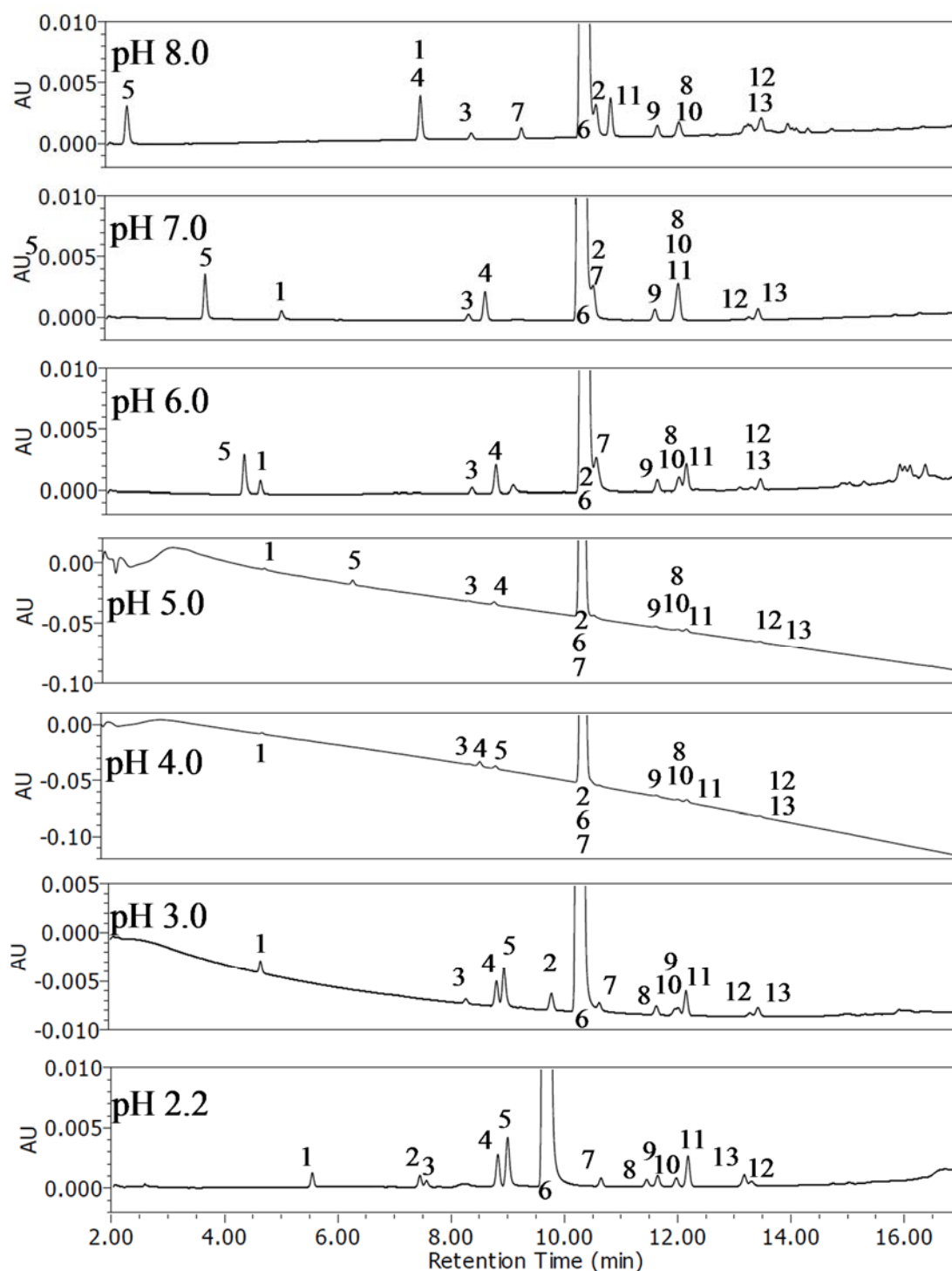


Figure 21 Influence of mobile-phase pH on the elution patterns of benzocaine and impurities using different mobile-phase modifiers
pH 2.2: 10 mM sodium perchlorate, pH 3.0: 10 mM potassium dihydrogen phosphate, pH 4.0: 10 mM ammonium formate, pH 5.0: 10 mM ammonium acetate, pH 6.0: 10 mM dipotassium hydrogen phosphate, pH 7.0: 10 mM potassium phosphate, pH 8.0: 10 mM sodium borate

まず、医薬品中の不純物数の把握が可能かを検証した。移動相添加剤の種類が異なると隣り合う条件同士で溶出パターンが大きく異なり、得られたクロマトグラムからの目視でのピークトラッキングは不可能であった。そのため、スクリーニング条件で最も多く検出された不純物数が医薬品中の不純物数となり、分析パラメータの連続的なスクリーニングで行ったような医薬品中の不純物数の把握はできないことが示された。各化合物の HPLC 分析における保持挙動は移動相 pH のみならず、化合物と移動相中の添加剤成分（イオンペア効果）やカラム固定相中の残存シラノール（イオン交換効果）との相互作用に影響を受ける。このことを考慮に入れない場合は、pH を 1.0 ずつスクリーニングしたとしても、隣り合う条件のクロマトグラムを比較して目視でピークトラッキングすることは難しい。Figure 21 の結果から、移動相添加剤の種類の違いが各化合物の保持挙動に特に大きく影響することがわかった。さらに、ギ酸と酢酸の強い UV 吸収のために、pH 4.0 と pH 5.0 では 0.1%以下のピークの検出自体が困難であった。これらの結果から UV 吸収のない同じ種類の移動相添加剤を使用した pH スクリーニングが隣り合うクロマトグラムを目視で関連づけさせるには必要不可欠であることがわかった。

次に不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定が可能かを検証した。分析した 13 成分の移動相 pH に対する保持時間をプロットした (Figure 22)。分析パラメータの連続的なスクリーニングは Figure 12 の結果、従来の移動相を用いたスクリーニングは Figure 21 の結果を用いた。Figure 22 に記載されている Peak 番号は Table 2 の化合物番号に相当する。

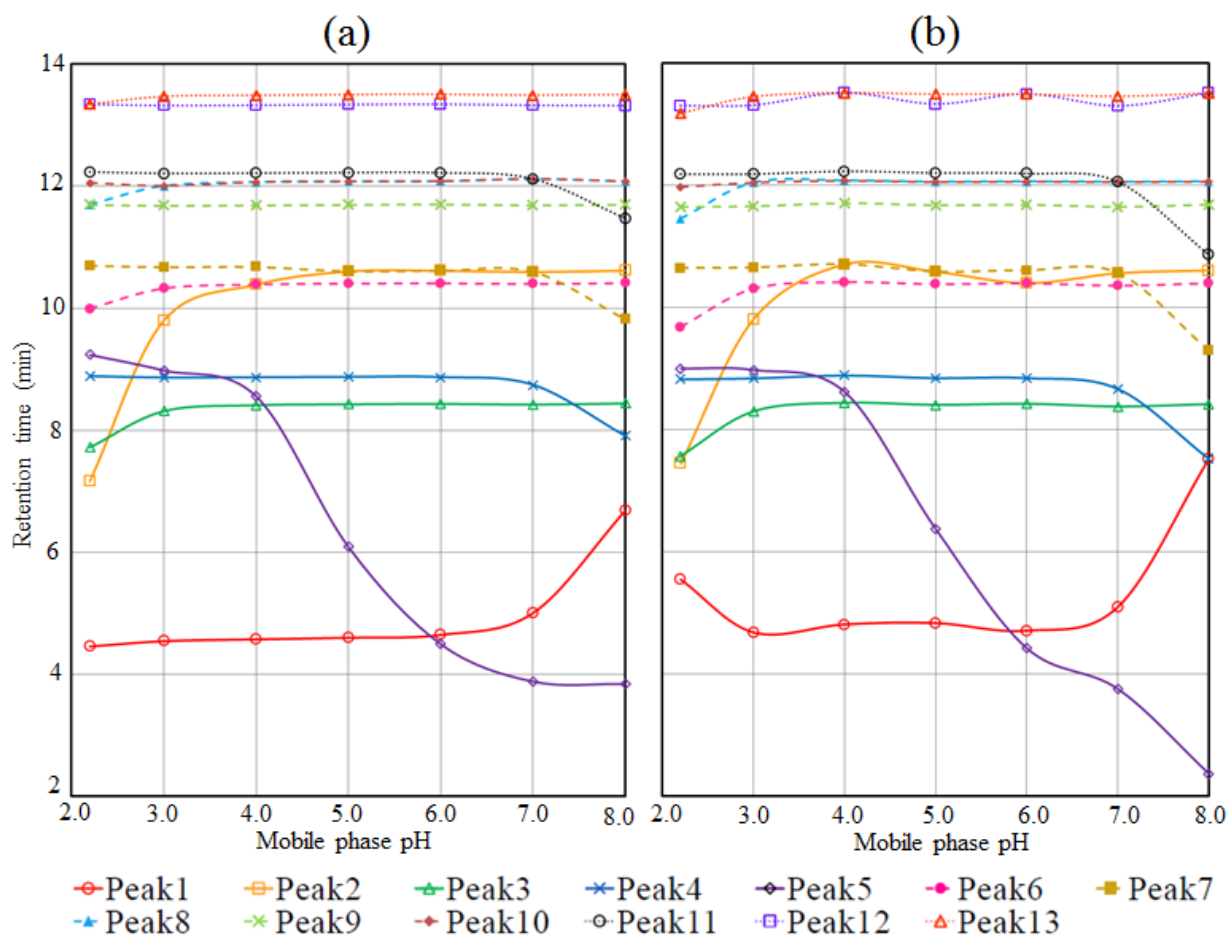


Figure 22 Retention times of each peak as a function of pH for the continuous (a) and conventional (b) screening strategies

分析パラメータの連続的なスクリーニングから得られた結果は、各化合物の持つ官能基から予測される保持時間挙動を示した。例えば、Peak 1 の Methyl 4-(aminomethyl) benzoate は塩基性化合物であり、 pK_a は ACD で 8.67 と計算されている。Peak 1 の保持時間は pH 7.0 から pH 8.0 の間で急激に増加し、化合物の物理化学的性質と整合があった。Figure 22 (a)より、移動相 pH 6.0 以下は Peak 1 の分子のほとんどがイオン型になっているため、移動相 pH の僅かな変化によって保持時間が変化しない領域であることがわかる。つまり、Peak 1 の分析に適した条件であることが言える。この場

合、当然近接する Peak 成分がその移動相 pH 付近で Peak 1 に重ならないことが前提である。

一方、従来の移動相を用いたスクリーニングでは、Peak 1 は pH 2.2 から pH 3.0 の間で保持時間が減少し、さらに pH 7.0 から pH 8.0 の間で増加し、両性イオンの様な挙動を示した。このため、Figure 22 (b)より Peak 1 の保持時間が安定する領域は pH 3.0 から pH 6.0 となり、分析パラメータの連続的なスクリーニングでの結果と比較して狭い範囲となってしまった。pH 2.2 での保持時間の増加がこの主な原因であるが、理由は次の様に推察される。pH 2.2 で使用した移動相添加剤は過塩素酸ナトリウムである。そのため、アニオンである過塩素酸イオン (ClO_4^-) とカチオンである Peak 1 (R-NH_3^+) がイオンペアを形成し、疎水性が増したために保持が増加したと推察される。同じ種類の移動相添加剤が使用されていなかった場合、pH 6.0 以下での保持時間は変化しなかったと考察される。他にも Peak 2, Peak 5 及び Peak 12 は従来の移動相を使用したスクリーニング手法では実際の化学構造と異なる保持時間応答を示した。このように、従来の移動相を使用したスクリーニング手法では逆に誤った移動相 pH を最適化の出発点にしてしまう可能性がある。

以上の結果から、従来の移動相を使用したスクリーニング手法では不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定が難しいことが示された。また、分析パラメータの連続的なスクリーニングから得られる結果から、分析対象物の HPLC 分析における物理化学的性質の情報が得られることが示唆された。

第5節 HPLC 移動相中での見かけの pK_a

最後に有機化合物の HPLC 移動相中（緩衝液・有機溶媒混合系）での見かけの pK_a （Apparent pK_a ）の理解の重要性について議論する。Peak 5 の 4-Methoxybenzoic acid (*p*-Anisic acid) を例に、pH と HPLC での保持時間の関係について説明する。4-Methoxybenzoic acid はイオン性化合物であり、 pK_a の実測値は 4.1 (acid) である。従って、以下の pH と pK_a の関係式に従うと、pH 4.1 での分子型とイオン型の比率は 1:1 となる。pH が 1.0 酸性側にシフトすると分子型とイオン型の比率は 10:1 となり、さらに pH が 1.0 酸性側にシフトするとその比率は 100:1 となる。

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]}$$

ただし、[AH]: 分子型の濃度 [A⁻]: イオン型の濃度

Figure 23 (a) に 4-Methoxybenzoic acid の各 pH 溶液中での分子型とイオン型の比率を示した。

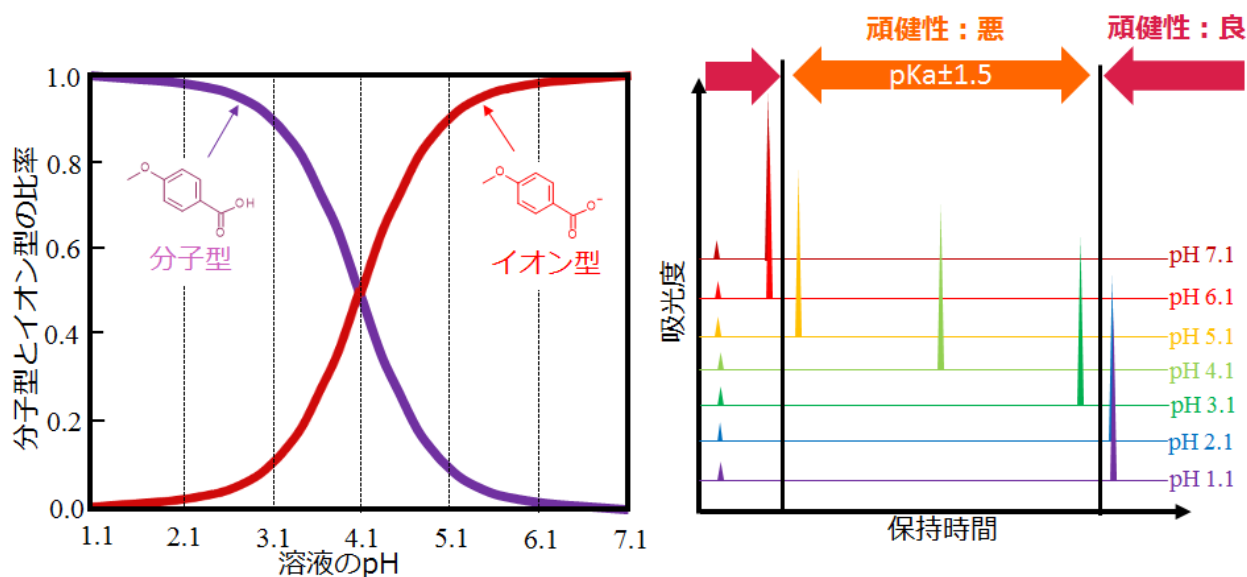


Figure 23 (a): Fraction of species present for 4-methoxybenzoic acid as a function of pH of solution
(b): Theoretical retention time of 4-methoxybenzoic acid using absolute buffer as a mobile phase

また、pH 1.1, pH 2.1, pH 3.1, pH 4.1, pH 5.1, pH 6.1 及び pH 7.1 の緩衝液のみを HPLC の移動相に使用したと仮定した場合の 4-Methoxybenzoic acid の保持時間を Figure 23 (b)に示した。保持時間は各 pH 溶液での分子型とイオン型の存在比に依存して決まるため、一般的にイオン性化合物の保持時間は pK_a から ± 2.0 の範囲にある場合に变化して見える。従って、4-Methoxybenzoic acid のイオン化に伴う保持時間の減少は約 pH 2.1 以上で起こると予想される。しかし、実際は約 pH 3.8 以上から保持の減少が開始していた。Figure 22 (a)の 4-Methoxybenzoic acid (Peak 5)の溶出挙動から HPLC 分析における見かけの pK_a を約 5.4 と見積もることができた。これは有機溶媒の存在によって、 pK_a が約 1.3 上昇したことを示唆している¹⁹⁻²¹⁾。HPLC 分析では頑健性の高い分析のためには移動相 pH は全ての分析対象物の pK_a から 1.5 以上離れるのが理想とされている¹⁰⁾。また、分析対象物の pK_a 情報から試験法開発に使用する移

動相 pH を決定する手法も報告されている⁵⁾。もし、この一般的な知識と化合物の水
中での pK_a から、移動相 pH 5.6 ($= 4.1 + 1.5$) を選択した場合は、4-Methoxybenzoic acid
にとって保持時間の頑健性が悪い pH 領域となってしまう (Figure 24)。このように、
移動相 pH を化合物の pK_a をもとに選択して試験法開発を行う場合は、前述したよう
に問題のある試験法を開発してしまう危険性がある。むしろ HPLC 分析において
は、緩衝液・有機溶媒混合系での見かけの pK_a を考慮して移動相 pH を決定すること
が重要である。このように、不純物の構造が明らかになり、 pK_a 等の物理化学的情報
がわかっていたとしても、実際に HPLC 分析を行わないと頑健な保持が得られる移
動相 pH 領域はわからない。従って、本研究手法は不純物標品が得られている医薬品
開発後期の不純物の HPLC 試験法開発にも有用な情報を提供できることが示され
た。

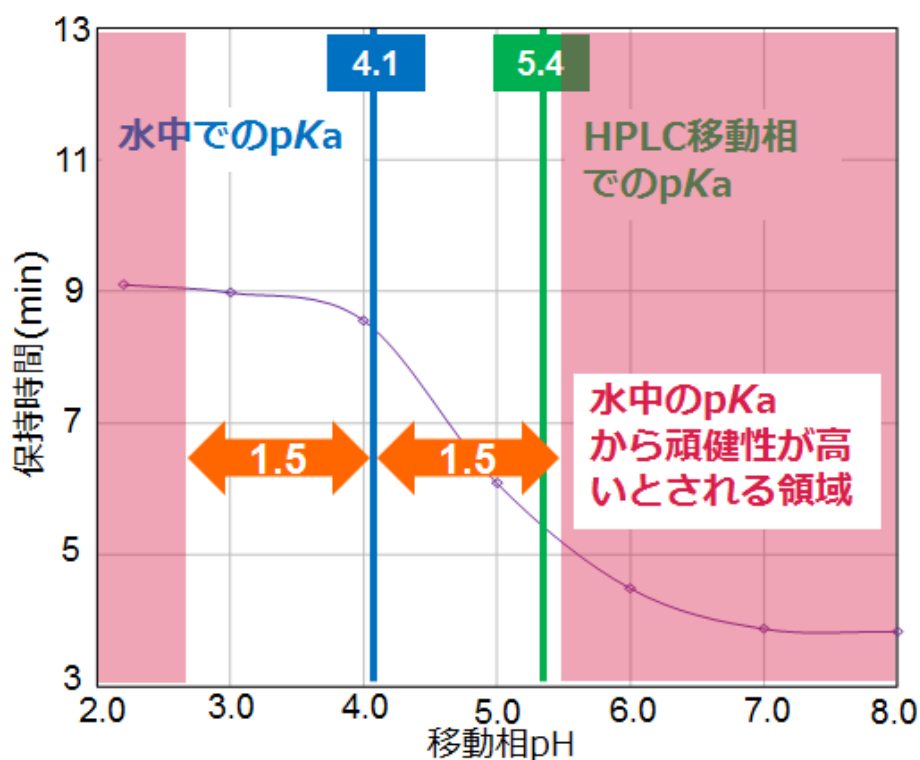


Figure 24 Retention time of 4-Methoxybenzoic acid as a function of pH and pK_a values in aqueous solution and HPLC mobile phase

さらに、分析パラメータの連続的なスクリーニングでは各ピークの物理化学的性質（酸、中性又は塩基）が予想できることから、その不純物が構造未知の場合は、MS 検出器と組み合わせて構造解析業務を効率的に行うことができると推察された。2 次元 HPLC システムを使用することで、不揮発性の緩衝液を使用していた場合でも LC/MS 分析が可能である²²⁾。

第6節 分析パラメータの連続的なスクリーニングの応用について

本研究では分析パラメータの連続的なスクリーニングを用いたシンプルな試験法開発を示すために、クォータナリポンプの4ライン中の3ラインのみを使用した。4本目のラインに有機溶媒や緩衝液の塩濃度スクリーニングを同時にする目的で、他の種類の有機溶媒や水を接続することも可能である。分析パラメータの連続的なスクリーニングの概念は、本研究で示した医薬品不純物の HPLC 試験法以外の多くの HPLC 試験法開発に応用することができる。本研究では短波長の UV 検出を目的に試験法開発のケーススタディを行ったが、薄めたギ酸や TFA 溶液とアンモニア溶液の組み合わせは長波長の UV 検出や MS 検出器での試験法開発に適した系である。

Auto Blend PlusTMは Empwer 3 のソフトウェアの1つであり、クォータナリポンプの HPLC である ACQUITY UPLC H-Class や ACQUITY Arc System で使用できる²³⁾。このソフトウェアは目的とする移動相 pH やイオン強度となる移動相の混合比を計算することができるから、このソフトウェアを適切に使用することで、分析パラメータの連続的なスクリーニングをより簡便に行うことができる。

第4章 結論

分析パラメータの連続的なスクリーニングを用いた医薬品不純物の効率的な HPLC 試験法開発手法を構築し、不純物標品が十分に得られていない医薬品の開発初期を想定した試験法開発のケーススタディに適用した。医薬品中の不純物数も未知という設定での試験法開発であったが、本研究手法は医薬品中の不純物数を決定し、不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定することができた。また、最適化の指標となる分離の改善が必要な不純物ピークの同定をすることができた。

4 液まで同時に送液可能なクォータナリーポンプシステムを用いて、酸性 (pH 2.2) と中性 (pH 8.0) の 2 種類のみの移動相から、その間にある 11 種類の pH の移動相を HPLC 内で混合させて調製すると同時にアセトニトリルとのグラジエント分析を行った。従来のグラジエント分析は 2 成分の移動相を混合させるが、3 成分を混合させても今回実施した範囲では調製された移動相 pH 及びベースラインノイズの観点では従来の系と比較して遜色ないことが示された。これにより、試験法開発段階での移動相調製にかかる工数を大幅に削減できることがわかった。

また、分析パラメータの連続的なスクリーニング手法は、報告されている移動相を用いたスクリーニング手法より医薬品中の不純物数の決定と不純物の頑健な分離が保障できる最適化出発点の決定の観点で優れていることが確認された。さらに、本研究手法は HPLC 分析で一般的な緩衝液・有機溶媒混合系における、構造未知及び構造既知の有機化合物の見かけの pK_a を明らかにすることができた。この情報は全ての分野の HPLC 分析において頑健性の高い試験法開発のために有用であることから、本研究手法は医薬品以外の HPLC 試験法開発への適用も期待される。

参考文献

1. Lunn, G.; Schmuff, N. R. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*, Vols. 1–4, John Wiley: New York, 1997–2000.
2. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline: Impurities in New Drug Substances Q3A(R2), step 5,
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf
3. Warner, A.; Piraner, I.; Weimer, H.; White, K. Development of a purity control strategy for pemetrexed disodium and validation of associated analytical methodology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 105, 46-54.
4. Reid, G. L.; Cheng, G.; Fortin, D. T.; Harwood, J. W.; Morgado, J. E.; Wang, J.; Xue, G. Reversed-phase liquid chromatographic method development in an analytical quality by design framework. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2013, 36, 2612-2638.
5. Wang, L.; Zheng, J.; Gong, X.; Hartman, R.; Antonucci, V. Efficient HPLC method development using structure-based database search, Physico-chemical prediction and chromatographic simulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 104, 49-54.
6. Jayaraman, K.; Alexander, A. J.; Hu, A. Y.; Tomasella, F. P. A stepwise strategy employing automated screening and DryLab modeling for the development of robust methods for challenging high performance liquid chromatography separations: A case study. *Anal. Chem. Acta*, 2011, 696, 116-124.
7. Stafford, J. D.; Maloney, T. D.; Myers, D. P.; Cintron, J. M.; Castle, B. C. A systematic approach to development of liquid chromatographic impurity methods for pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 56, 280-292.
8. Biswas, K. M.; Castle, B. C.; Olsen, B. A.; Risley, D. S.; Skivic, M. J.; Wright, P. B. A simple and efficient approach to reversed-phase HPLC method screening. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 49, 692-701.

9. Hewitt, E. F.; Lukulay, P.; Galushko, S. Implementation of rapid and automated high performance liquid chromatography method development strategy for pharmaceutical drug candidates. *J. Chromatogra. A*. 2006, 1107, 79-87.
10. Heyrman, A. N.; Henly, R. A. Importance of Controlling Mobile Phase pH in Reversed Phase HPLC. *Keystone Technical Bulletin*. 1999, TB 99-06.
11. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2(R1), step 5,
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
12. Nelson, M. D.; Dolan, J. W. *LCGC*. 1988, 16, 992-996.
13. Dumarey, M.; Sneyers, R.; Janssens, W.; Somers, I.; Heyden, Y. V. Drug impurity profiling: Method optimization on dissimilar chromatographic systems Part I: pH optimization of the aqueous phase. *Anal. Chem. Acta*. 2009, 656, 85-92.
14. Hawryl, M. A. HPLC-diode array detector fingerprints of various *Mentha* species. *J. AOC international*. 2014, 97, 1268-1273.
15. Xue, G.; Bendick, A. D.; Chen, R.; Sekkulić, S. S. Automated peak tracking for comprehensive impurity profiling in orthogonal liquid chromatographic separation using mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*. 2004, 1050, 159-171.
16. Kumar, S.; Zhuang, J.; Zhang, P.; Huang, J.; Rustum, A. Application of computer-assisted automated method development tools for HPLC method development for various pharmaceutical samples. Abstracts of Papers, 250th ACS National Meeting & Exposition, Boston, MA, United States, August 16-20, 2015
17. Karmarkar, S.; Garber, R.; Genchanok, Y.; George, S.; Yang, X.; Hammond, R. Quality by design (QbD) based development of stability indicating HPLC method for drug and impurities. *J. Chrom. Sci.* 2011, 49, 439-446.
18. Box, G.; Behnken, B. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. 1960, 2, 455-475.

19. Subirats, X.; Rosés, M.; Bosch, E. On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pK_a of analytes-A review. *Sep. Puri. Review.* 2007, 36 (3), 231-255.
20. Rosario, L.; Yuri, K. Reversed-phase HPLC. *HPLC for pharmaceutical science.* 2007, 139-239.
21. Espinosa, S.; Bosch, E.; Rosés, M. Retention of ionizable compounds on HPLC. 12. The properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile-water mobile phase that influence HPLC retention. *Anal. Chem.* 2002, 74, 3809-3818.
22. Zhang, K.; Li, Y.; Tsang, M.; Chetwyn, N. P. Analysis of pharmaceutical impurities using multi-heartcutting 2D LC coupled with UV-charged aerosol MS detection. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2986-2992.
23. Chavali, A.; Wheat, T. E.; McConvile, P. R. Systematic screening of pH and ionic strength as method development tools for reversed-phase separations. Pittcon 2013, Philadelphia, March 17-21, 2013.

論文目録

本学位論文内容は、以下の発表論文による。

Furukawa, S., Hirakura Y., Moribe, K. Continuous screening of analytical parameters facilitates efficient development of HPLC methods required for impurity profiling. J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 2017, 40 (11), 564-575.

主査, 副査名

本学位論文の審査は, 千葉大学大学院医学薬学府で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	戸井田 敏彦
----	-------------------	------	--------

副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	工学博士	根矢 三郎
----	-------------------	------	-------

副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	樋坂 章博
----	-------------------	------	-------

謝辞

終わりに臨み，本研究に際して終始ご懇篤なるご指導，ご鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 森部久仁一教授に深甚なる謝意を表します。

博士課程への入学においてご助言いただき，さらに本研究に関して有益なご助言とご指導を賜りましたアステラス製薬株式会社 物性研究所 分析第1研究室室長 平倉穰博士に深く感謝の意を表します。

本研究の機会を与えてくださり，ご激励とご配慮を賜りましたアステラス製薬株式会社 物性研究所所長 三村尚志博士に深く感謝いたします。

最後に，終始私を暖かく見守り，支えてくれた家族に感謝いたします。