

クロマトグラフィー及び ハイフネーテッド技術を用いた 医薬化学品製造プロセス開発支援

住友化学(株) 精密化学品研究所
上田 正史
藤井 好美
中村 智和

Contribution of Chromatography and Hyphenated Technology to Production Process Development for Pharma Chemicals

Sumitomo Chemical Co., Ltd.
Fine Chemicals Research Laboratory
Masafumi UEDA
Yoshimi FUJII
Tomokazu NAKAMURA

“Chromatography” is an indispensable technique for treating small organic molecules, and “Hyphenated Technology”, which means a combination of two different techniques (in this case, chromatography and mass spectrometry, etc.), is a powerful tool for quick on-line identification of trace amount impurities in processes. During production process development for active pharmaceutical ingredients (APIs) and reactive intermediates, these techniques are mainly utilized for confirmation of synthesized target molecules, by-products and impurities, and also for their identification. This paper describes the contribution of these techniques to process study acceleration and product quality improvement, while showing some examples.

はじめに

当社精密化学部門における医薬化学品ビジネスにおいて、合成プロセス開発のスピードと製品品質はビジネスを広く展開していくための重要な要素である。しかしながら、プロセス開発を加速化しつつ良好な製品品質を確保するのは容易ではなく、特に医薬品原薬 (active pharmaceutical ingredients: APIs) においては製品品質が薬の安全性に直結するため、プロセス開発には詳細な検討が要求される。

不純物は製品品質上、最も懸念される要素である。その中でも遺伝毒性物質 (genotoxic impurities: GTIs) は極微量でも健康被害を及ぼす可能性があり、APIsの合成プロセス設計においてその副生や混入防止に十分留意する必要がある^{1),2)}。そのため、開発研究の現場においては、プロセス毎に存在する不純物を確実に検出し、分子構造を明らかにして、必要に応じて排除対策をプロセス設計に織り込むことが重要である。この過程を迅速に進めるために不純物の分析技術、構造解析技術が担う役割は大きい。

我々が扱う合成医薬化学品分野における不純物分析技術の中心はクロマトグラフィーである。これら

の物質は大部分が低～高極性の有機低分子化合物であるため、主として液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography: LC) が用いられる。LCにおいては広く普及している高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) に加え、近年では超高速液体クロマトグラフィー (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) が登場し、分析時間の短縮、分離のさらなる改善に貢献している。

クロマトグラフィーはさらに不純物の単離精製手法としても有用である。中圧でg量の試料を分離できるフラッシュクロマトグラフィー、HPLC用カラム充填剤を分取カラムに適用した分取クロマトグラフィーにより、迅速な物質単離が可能である。さらに超臨界流体を移動相溶媒として利用する超臨界流体クロマトグラフィーでは、超臨界流体の高い拡散性により、高速分析への応用に加えて、分析用カラムによるmg量の試料の高速分取が可能となっている。

一方、構造解析の中心となる技術はLCに質量分析 (Mass Spectrometry: MS) を組み合わせたLC-MSと核磁気共鳴装置 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) である。LC-MSは1990年以降に開発された大気圧イ

オン化法 (Atmospheric Pressure Ionization: API) により、LCとの結合が容易になったことで発展した装置である。現在では高感度、高分解能、及びフラグメントイオン生成技術により分子量から分子組成式、部分構造の推定が可能となり、微量不純物解析に不可欠な装置となっている。また、有機合成研究者にとって必須のアイテムであるNMRについても装置の進歩により微量での測定、解析が可能となったが、同時にLCと結合したLC-NMRの性能も飛躍的に上がり、微量成分解析への適用が可能となってきた。

二種の異なる技術を結合したこれらの技術は、総称してハイフネーテッド技術 (Hyphenated Technology) と呼ばれる。上述したLCと解析技術を組み合わせたハイフネーテッド技術³⁾においては、解析技術が先導して進歩を遂げてきたが、最新のLC技術を活かすことでさらに感度アップ、高速化が見込まれることから、近年、LC側からのアプローチが盛んである。

本稿では医薬化学品製造プロセス開発における最新のクロマトグラフィー技術を応用した分析高速化への取り組み、ハイフネーテッド技術のクロマトグラフィー側からの改善のアプローチと開発への応用について紹介する。

LC分析高速化への取り組み

1. UHPLCの展開

(1) UHPLCとは？

UHPLCは一般的に「微粒子充填カラムを用いて高速、高分離を達成するLC技術」の意味で使用されている用語であるが、実際には明確な定義はない。LC分析においては充填剤の粒子径が小さいほど分離能が向上するが、同時にカラム圧力が粒子径の二乗に反比例して高くなるため、微粒子充填カラムを用いるには通常よりも高耐圧の装置が必要となる。2004年、先陣を切ってW社が自社製の粒子径1.7 μm 充填カラムと専用の最高耐圧100MPaのLC装置を発表して話題となった。他の装置メーカー及びカラムメーカーがすぐには追随しなかったこともあり、一時期W社の装置名が超高速LCの代名詞となったこともあったが、一年を過ぎてからようやく他の装置メーカーも高耐圧装置を上市し始め、この頃から、以前はUltra High Pressure Liquid Chromatographyの略称として使用されていた「UHPLC」が一般名称として用いられるようになったようである。

カラムについては当初粒子径1.7~1.9 μm のカラムが主流であったが、より低い圧力で同等の高分離を達成しようと、粒子径2 μm 超のカラムとやや耐圧の低い装置を上市するメーカーが現れた。特に国内最大手のLC装置メーカーであるS社は、自社製の粒子

径2.2 μm カラムと最高耐圧35MPaのUHPLC装置を上市し、その後相次いで国内大手カラムメーカーから粒子径2 μm 超のカラムが発売された。粒子径サイズから前者はサブ2 μm カラム、後者はサブ3 μm カラムと区別され、前者は装置の高耐圧性を活かし、後者は通常のHPLC (コンベンショナルLC) 条件での使用も視野に入れて高速、高分離を競っている。他にも多孔質モノリスカラム、フューズドコアと呼ばれる二重構造のカラム充填剤⁴⁾ (粒子径2.7 μm) 等、低圧で高速、高分離を達成できるカラムも発売され、装置環境に合わせた選択肢が増えてきた。また、高耐圧LC装置についても近年はコンベンショナルLCを意識し、従来の5 μm カラムも使用できる併用型が主流になってきている。

(2) プロセス開発への応用

医薬化学品製造プロセス開発において不純物管理は重要なキーであり、工程分析の手段としてLCは最も有効な手法である。前述のとおり、近年GTIsが注目されており、プロセス中の不純物管理は重要度を増しているが、通常、これらの不純物の性質は高極性から低極性まで幅広く、コンベンショナルLC条件でこれらの不純物を同時検出するには長時間分析となりがちである。そのため、ピーク幅の拡大による感度の低下といった分析上の問題のみならず、データ取得に時間がかかり、特にAPIs製造プロセスにおいて行政が定めるGMP (Good Manufacturing Practice: 医薬品適正製造基準) 準拠の場合には、プロセス試験法に要求されるシステム適合試験 (System Suitability Test: SST) だけで長時間を要することになる。これらの理由から、短時間で高分離を達成できる分析技術の導入はプロセス開発のみならず製造プロセスの効率化促進に大きく寄与することが期待される。

我々は2006年より本格的にUHPLC導入に向けての情報収集と検討を開始した。検討内容を以下に記す。

① 機種を選定と制限

医薬化学品製造プロセスにおいて、LCは既に開発から製造、品質管理に広く用いられている技術であるため、UHPLC導入はコンベンショナルLC条件との共存を考慮する必要がある。そのため、基本的にはサブ3 μm カラムをターゲットとし、かつ各部署で現存する装置との互換性を考慮して、導入装置はS社製のUHPLC装置を選択した。本装置はコンベンショナルLC装置に対して、試料注入ユニットの耐圧を増し、試料注入装置からカラムまでの送液ライン径、グラジエントミキサー容量、吸光度検出器のセル容量を小さくしたもので、それぞれのユニットを交換することでコンベンショナルLC装置としても使用可

能なものである (Fig. 1)。ただし、本UHPLC装置の最高耐圧は35MPaであり、UHPLC装置としては耐圧が低いため、使用可能なカラムには制限があることが予想された。

しかしながら、Fig. 2に示すように、一般的な逆相系移動相であるアセトニトリル/水系において、市販されている主なサブ3 μ mカラムでの最高カラム圧は30MPa以下であり、多くのカラムが使用可能であることが確認された。

② カラム評価

カラム圧力面から市販サブ3 μ mカラムの多くが使用可能であることが確認できたため、引き続きカラムの分離能について調査を行った。調査は通常ODS

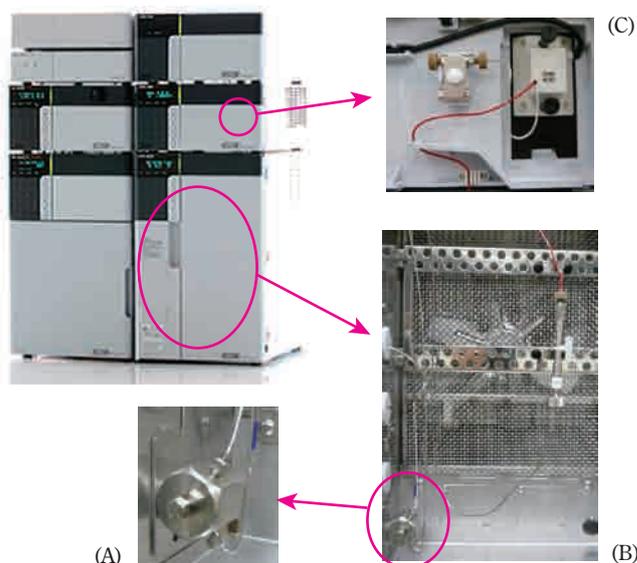


Fig. 1 UHPLC system (Prominence UFLC®)
 (A) mixer (100 μ L volume)
 (B) SUS tube (0.1 \times 600mm)
 (C) semi micro cell (2.5 μ L volume)

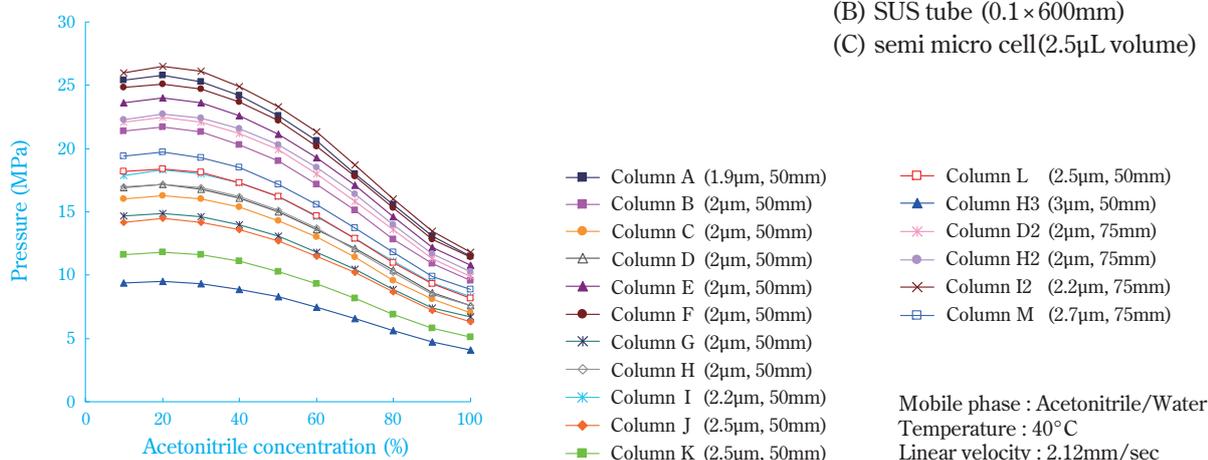


Fig. 2 Pressure of various UHPLC columns

Table 1 Evaluation of various ODS columns for UHPLC

Column	Particle size (μ m)	Length (mm)	Efficiency vs Pressure*1)			Hydrophobicity α *2)	Pyridine Tailing factor*3)
			Efficiency(N)	Pressure(MPa)	N/MPa		
Column A	1.9	50	5,446	22.6	241	1.437	2.591
Column B	2(1.8)	50	7,858	19.3	407	1.495	1.840
Column C	2(2.2)	50	6,216	13.9	447	1.508	1.887
Column D	2(2.2)	50	6,168	15.0	411	1.472	1.955
Column E	2	50	6,707	21.3	315	1.469	2.090
Column F	2	50	6,654	22.1	301	1.416	no data
Column G	2(2.2)	50	5,940	13.8	430	1.480	1.227
Column H	2	50	6,510	15.0	434	1.464	1.345
Column H2	2	75	11,300	20.2	559	1.465	no data
Column I	2.2	50	6,243	15.9	393	1.507	2.053
Column I2	2.2	75	9,637	21.7	444	no data	no data
Column J	2.5	50	6,121	12.6	486	1.480	2.259
Column L	2.5	50	6,153	16.2	380	1.488	> 2
Column M	2.7	75	10,853	17.1	635	1.506	1.960

*1) Mobile phase: Water/Acetonitrile=50/50 Temperature: 40°C Linear velocity: 2.12mm/sec Sample: Biphenyl

*2) Mobile phase: Water/Acetonitrile=40/60 Temperature: 40°C Linear velocity: 2.12mm/sec Sample: Uracil (t₀), Toluene, Ethyl benzene

*3) Mobile phase: Water/Methanol=70/30 Temperature: 40°C Linear velocity: 1.06mm/sec Sample: Pyridine, Phenol

カラム評価に用いられる理論段数、疎水性相互作用、塩基性化合物の保持とピーク形状、の3項目について実施した。結果をTable 1に示す。結果から短時間で高分離が期待でき、またカラムの性質の多様性も確認され、コンベンショナルLCと同等のカラム選択が可能であることがわかった。

(3) 普及への取り組み

プロセス開発へのUHPLCの適用を進めるため、まずは研究所内で工程分析法の分析時間短縮を図りたいテーマを募り、UHPLCでの分析法の作成を試みた。目標分析時間は不純物の分離を考慮し、15分以内とした。作成した分析法では現法の1/3~1/8程度に分析時間を短縮することができた。Fig. 3に一例を示す。本例では分離を損なうことなく分析時間を60minから8minに短縮することができた。これらの結果を踏まえ、研究所内及び製造プラントにてUHPLCの有用性について説明を行い、装置導入への

働きかけを行った。まずは興味を示した研究室で装置を立ち上げ、実際のプロセス開発研究に適用してもらったが、迅速に多くのデータを取得できると概ね好評であった。

UHPLCが一部にしか導入できない場合には、UHPLCで分析法開発を迅速に行い、その条件に相当するコンベンショナルLCでの分析条件を理論計算して分析法を確立することが可能である。その前提として充填剤の種類が同一であることが望ましいが、カラムメーカー各社が同一充填剤で粒子径の異なるカラムを揃えており、かつ装置メーカーもカラムスクリーニング用のユニットを提供するなど、UHPLCを用いた分析法開発の環境は整っており、分析法の開発部署で広く採用されている模様である。我々も2009年にD社のカラムスクリーニング可能なUHPLC装置を導入し、UHPLC技術の展開と並行して迅速な分析法開発体制を目指している。

2. コンベンショナルLCでの高速化

(1) 分離に影響するLCパラメータ

過去、5 μ mカラム全盛期に50mm程度の短いカラムでの短時間分析がFast LCという名称で話題になったことがある。当時、我々もS社のコンベンショナルLC装置で試してみたことがあるが、分離が不十分でとても使用に耐えるものではなかった。しかしながら今回、UHPLCの導入検討を進めていくうちに、分離に大きく影響するパラメータに気付かされる結果となった。コンベンショナルLCでの長時間、高流量分析では問題にならなかったパラメータが短時間、低流量の分析では分離に影響を与えるようになる。特に分離に影響するのは以下のパラメータである。

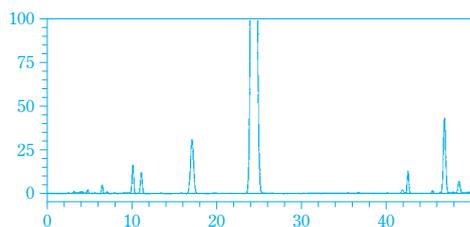
① dwell容量 (dwell volume)

グラジエント遅延容量 (gradient delay volume) とも呼ばれる。システムでの移動相ミキシング開始点からカラムトップの間の容量。ポンプヘッドからグラジエントミキサーまでの配管、グラジエントミキサー、ミキサーからインジェクター、インジェクター及びインジェクターからカラムまでの配管の総容量をさす。

② カラム外容量 (extra-column volume)

システムのインジェクション位置から検出の位置間で、カラム内の空隙容量 (void volume) を除いた総容量。カラム前容量とカラム後容量に分けられ、前者はインジェクション容量とインジェクターからカラム入口までの配管の容量、後者はカラム出口から検出器までの配管及びセルの検出点までの容量を指す。

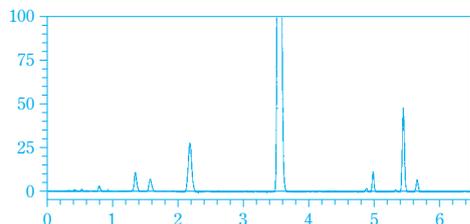
(A) Conventional LC



Conditions

Column : ODS(6.0 \times 150mm, 5 μ m)
 Mobile phase : [A] 0.1% TFA in water [B] Acetonitrile
 Gradient : 50%B(0-20min)
 50-90%B(20-50min)
 Temperature : 40°C
 Flow rate : 1.0mL/min
 Detection : UV at 254nm
 Analytical time : 60min

(B)UHPLC



Conditions

Column : ODS(3.0 \times 50mm, 2.2 μ m)
 Mobile phase : [A] 0.1% TFA in water [B] Acetonitrile
 Gradient : 45%B(0-2min)
 45-90%B(2-6min)
 Temperature : 40°C
 Flow rate : 1.0mL/min
 Detection : UV at 254nm
 Analytical time : 8min

Fig. 3 Reduction of analytical time by UHPLC

③ 試料液溶媒及び注入量

Fig. 4にLCシステムにおけるdwell容量及びカラム外容量の範囲を示す。また、S社のコンベンショナルLC装置及びUHPLC装置について、dwell容量及びカラム外容量に関係のある部分の仕様、容量をTable 2に示した。

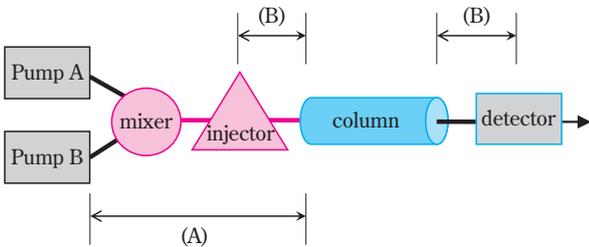


Fig. 4 Dwell volume (A) and extra-column volume (B)

Table 2 Constituents of dwell volume and extra-column volume

	LC system		
	Conventional system		UHPLC system
	Type A	Type B	
mixer volume (mL)	2.6(1.7,0.5)	2.6(1.7,0.5)	0.1
sample loop (μL)	50	100	100
Tube (injector-column)	0.3×600mm	0.25×600mm	0.1×600mm
Tube (column-UV cell)	0.25mm ID	0.25mm ID	0.13mm ID
UV cell volume (μL)	8(5)	12(2.5)	2.5
dwell volume (mL)	3~5 (at mixer volume 2.6, 1.7mL) 0.6~1.0 (at mixer volume 0.5mL)		0.4

dwell容量はグラジエント（移動相濃度勾配）の遅延を引き起こし、過大なミキサー容量は設定グラジエントカーブからの変形を引き起こす。これらの許容値はいずれもグラジエント容量（移動相溶液の流速×グラジエント時間）の10%未満と考えられている⁵⁾。S社のコンベンショナルLC装置でのミキサー標準容量は2.6mL、dwell容量は4mLを超えるため、短時間、小流量の場合の対応は困難であるが、流路の変更によるミキサー容量の削減（0.5mL）、又はUHPLC用の小容量ミキサー（容量0.1mL）の使用により、改善が見込まれる。カラム外容量については、カラム前容量では明確な基準はないが、試料液溶媒が移動相溶媒に比べて溶出力が同等か弱いという条件下では、10μL以内であれば内径が2.1mm以下のカラムでも容量の影響は無視できる⁵⁾。また、カラム後容量については検出器のセル容量がカラム内空隙容量の約10%を超えると拡散が問題になるが⁵⁾、現実的に内径2.1mm、長さ50mm以上のカラムを使用するケースではS社標準セル（容量8、12μL）でもあまり

問題にはならないようである。試料液溶媒が移動相溶媒に比して溶出力が強い場合、注入液のカラム到達後も試料の拡散が続いてピーク拡散の原因となる。溶出力が同等の場合は注入量をピーク容量（流速×ピーク検出時間）の15%以内に抑えることでピーク変形を抑制することが可能である⁵⁾。溶出力が弱ければカラムの先端で試料の濃縮が起これ、ピーク形状の改善が期待できる（Fig. 5）。

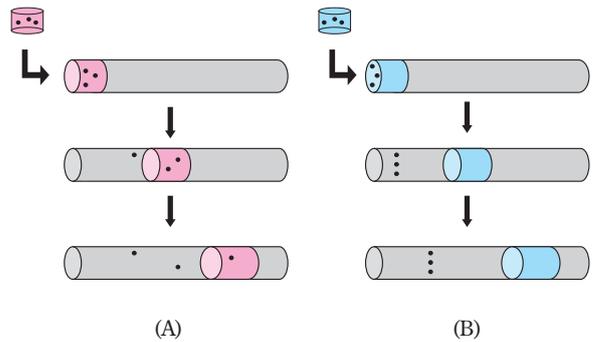


Fig. 5 Mechanism of peak broadening at solvent front
(A) Strong solvent (Methanol)
(B) Weak solvent (Water) (・): analyte

(2) カラムの選択

前記パラメータの考察より、過去にFast LCで分離がうまくいかなかった原因がLCシステムにあったことが推定された。これは、裏返せばdwell容量やカラム外容量を小さくすれば、今まであまり高分離が得られなかったカラムが活用できるということであり、カラム選択の幅が格段に広がることになる。現在までに各カラムメーカーは、コンベンショナルLC用カラムとして粒子径5μmに加え3μmカラムをほぼすべての種類に揃えている。S社のコンベンショナルLC装置の現設定では3μmカラムの性能が必ずしも十分引き出せていないことが推測され、装置構成を変更すれば3μmカラムでの分析高速化が可能な場合もあると考えられる。装置導入に時間がかかるUHPLCの展開を補うものとして、現在、並行して検討を行っているところである。

3. 超臨界流体クロマトグラフィー

超臨界流体クロマトグラフィー（Supercritical Fluid Chromatography: SFC）は超臨界状態のCO₂をメインの移動相溶媒として利用したクロマトグラフィーである。超臨界CO₂の極性はヘキサンに近い為、順相LCの代替法としての利用が一般的であるが、粘性が低く拡散係数が大きいことから一般に高分子や有機化合物の光学異性体の高速、高分離分析法として

用いられている。ただし、欧米では1000台超が稼動しているものの、日本国内では本装置が高圧ガス保安法の規制対象となり所轄官庁への届出／申請が必要なため、導入装置数がわずか20台に満たない状態であるのは非常に残念なことである。

APIsに関して、光学異性体分析は製品の薬効管理の観点から重要な位置にある。我々は10年前に当社有機合成研究所で開発された順相、逆相二系列のLC

キラルカラムスクリーニングシステムを引き継いで運用してきたが、順相系列の装置更新の際、高速スクリーニングを目的にSFC装置の導入を図った。導入したSFC装置の構成をFig. 6に示す。

装置構成としては、通常のLC装置構成に加えて、冷却機能を持つCO₂ポンプ、検出器出口にある背圧制御弁が含まれる。6種までの順相系キラルカラムを並列し、自動切換え注入が可能である。本システム

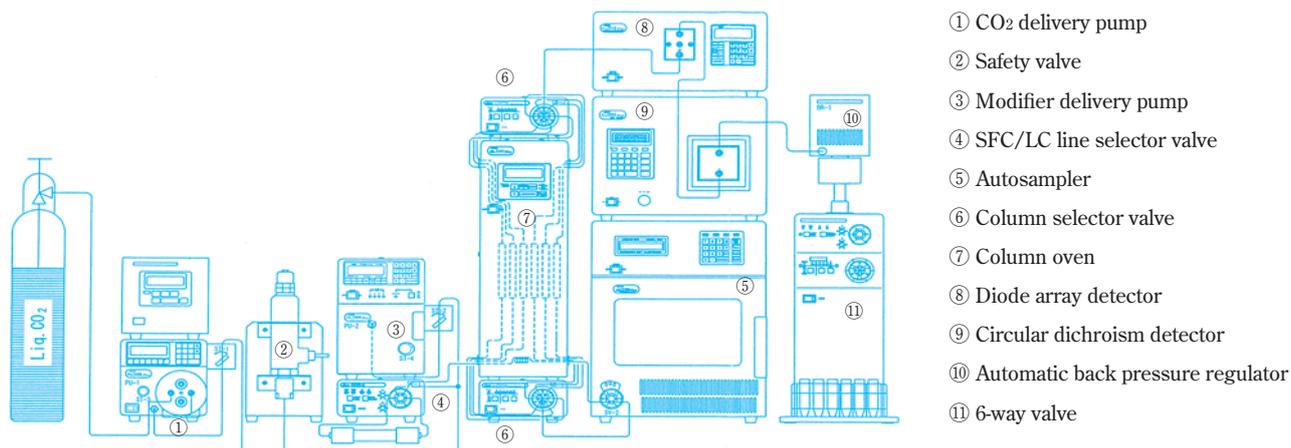


Fig. 6 SFC system

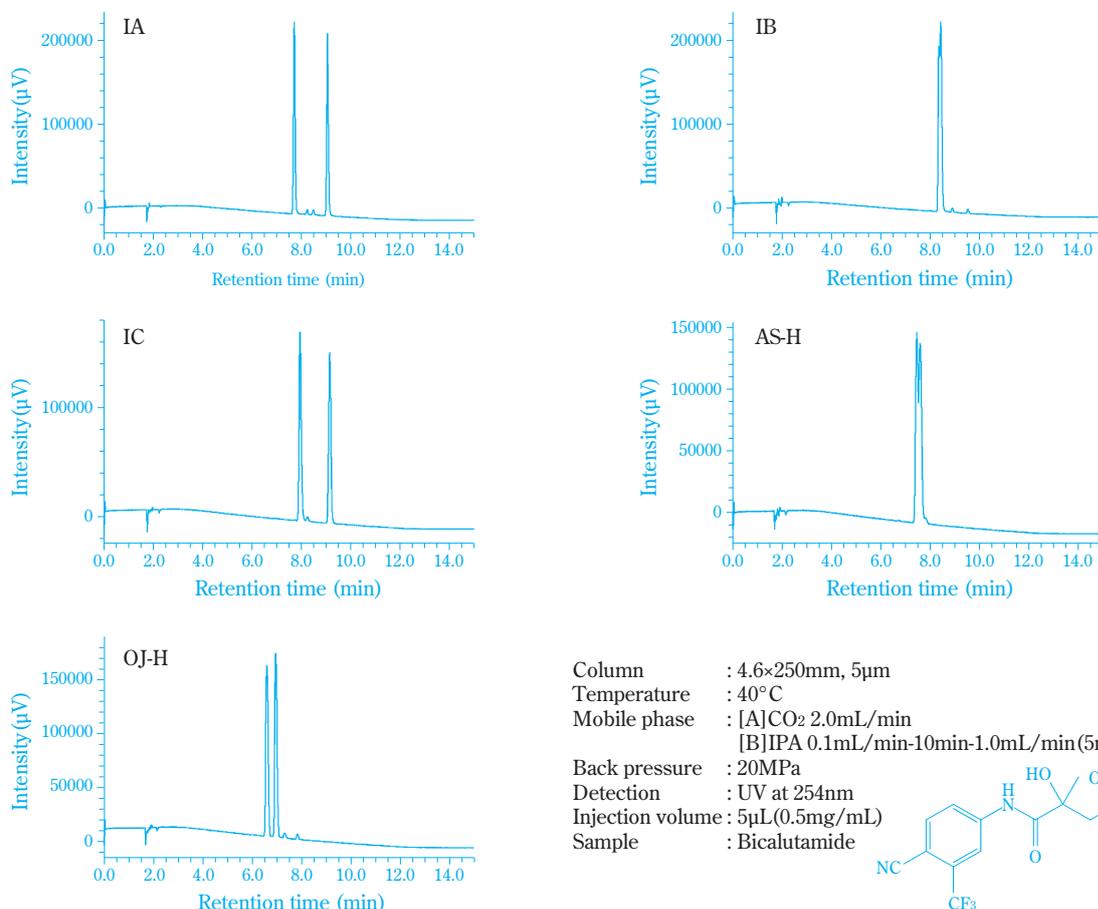
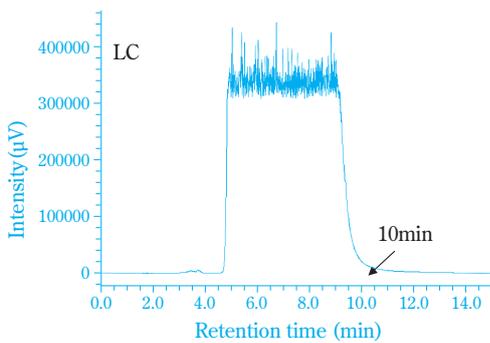


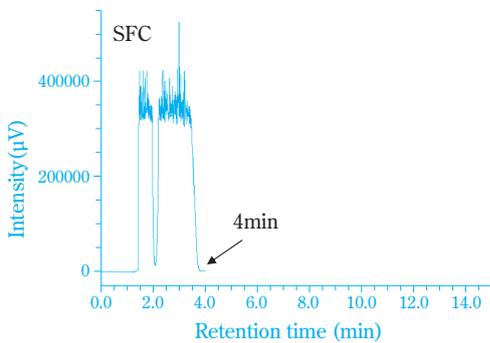
Fig. 7 Chiral column screening with SFC

では旧スクリーニングシステムで約12時間かかっていたサイクルが約3時間で完了する。スクリーニング後のコンベンショナルLC条件への変換、最適化が引き続き本装置でできるようにLC機能も付加しており、迅速な分析法開発が可能となった。実際の適用例をFig. 7に示した。本例では5種カラムについて分離を確認し、IA, ICカラムで良好な分離が認められている。

また、超臨界CO₂の高い拡散性を利用して、分析用カラムを用いた分離成分の高速分取が可能である。通常のLCではセミ分取用カラムが必要となるmg量の試料を分析用カラムで高速分離でき、分取後の試料濃縮も圧力開放後にCO₂が気化して除去されるため容易となる。SFCでの成分分取例をFig. 8に示した。コンベンショナルLC条件では負荷量7mgでの成分分離は困難であるが、SFC条件では短時間での分離が達成されている。



Column : IA(4.6×250mm, 3µm)
 Temperature : 40°C
 Mobile phase : n-Hexane/IPA = 67/33(v/v)
 Flow rate : 1.0mL/min
 Detection : UV at 254nm
 Column pressure : 7.2MPa



Column : IA(4.6×250mm, 3µm)
 Temperature : 40°C
 Mobile phase : CO₂/Methanol = 67/33(v/v)
 Flow rate : 3.0mL/min
 Detection : UV at 254nm
 Back pressure : 15MPa
 Column pressure : 23.7MPa (ΔP = 8.7MPa)

* Bicalutamide 7mg injected

Fig. 8 Preparative SFC separation

不純物解析

1. 不純物解析の流れ

医薬化学品製造プロセス開発の過程で認められる不純物の構造情報は、開発を迅速に進める上での重要な情報の一つである。LCで認められた不明不純物の構造解析を進める手順についてFig. 9に示した。本手順は二ステップで構成されている。第一ステップでは主としてLC-MSによるオンライン測定、解析を行う。この段階で構造推定にたどりつけない場合は第二ステップとして目的不純物の単離精製を行い、NMRで詳細な解析を実施する。単離精製についてはフラッシュクロマトグラフィー、分取クロマトグラフィーを利用し、特に分取クロマトグラフィーではリサイクル分取システムを用いて高純度の単離品取得を可能としている。現時点では第一ステップが解析依頼受付から1週間以内、第二ステップはその後1~2週間を目標にしているが、迅速な解析には第一ステップでの解析を効率よく実施することが重要である。

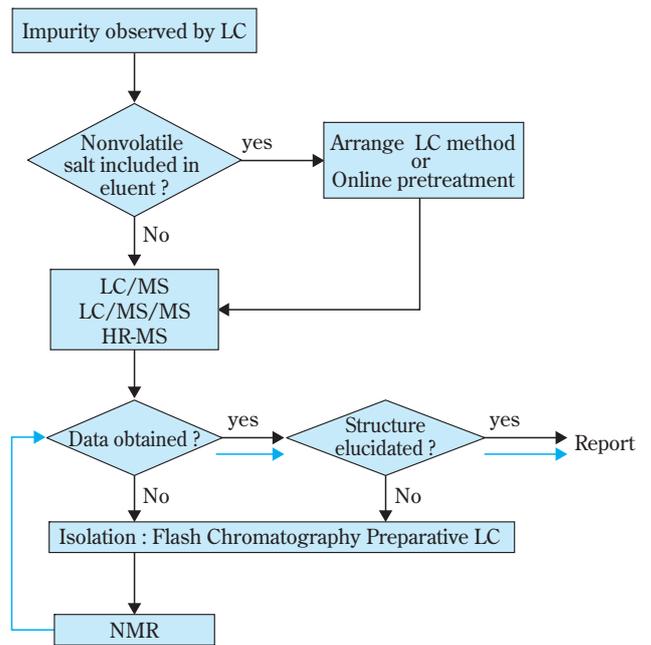


Fig. 9 Typical approach for structure elucidation of trace level impurities observed during synthesis process development

2. ハイフネーテッド技術

(1) LC-MS

当部署では電界噴霧-エレクトロスプレーイオン化法 (ElectroSpray Ionization: ESI) 及び大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization: APCI) をメインとした、MS/MS測定が可能なイオントラップ型のLC-MSを2台装備して不純物の構造解

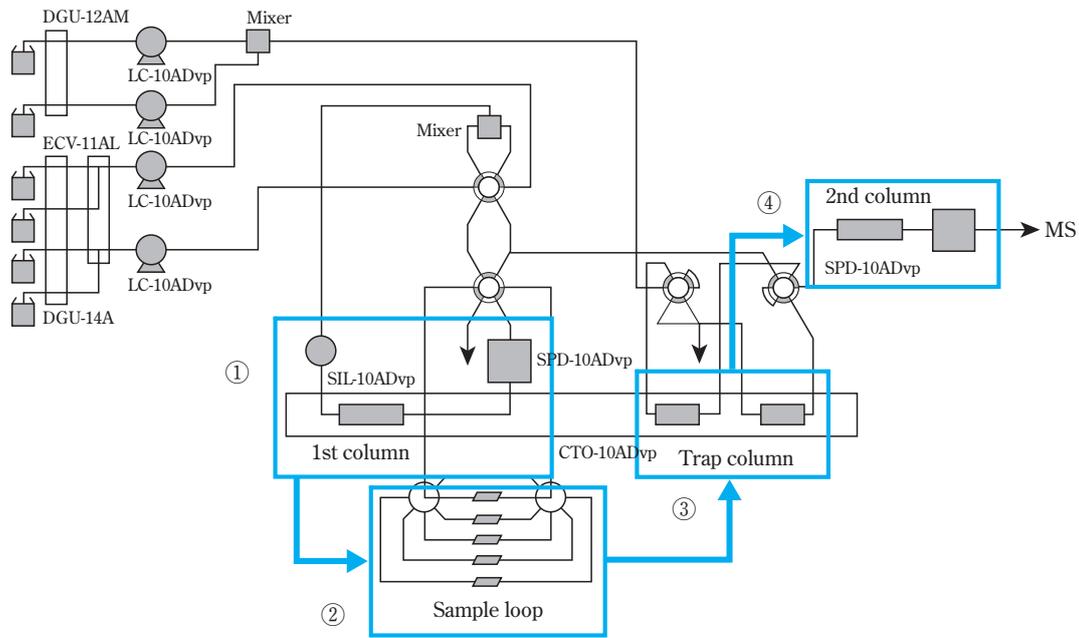
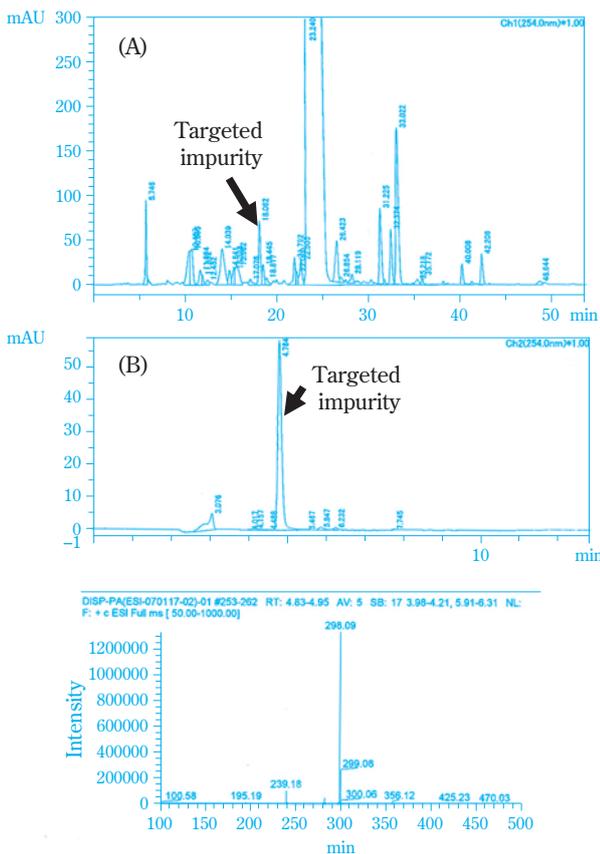


Fig. 11 Online sample pretreatment system (Co-Sense® for Microanalysis)



- (A) 1D Analytical conditions
 Column : ODS(6.0×150mm, 5μm)
 Mobile phase : [A] 5mM 1-Heptanesulfonic acid and 20mM Potassium dihydrogen phosphate in water pH3.0 adjusted by phosphoric acid
 [B] Acetonitrile
 Gradient : 20%B(0-5min)
 20-35%B(5-35min)
 35%B(35-50min)
 Flow rate : 1.0mL/min
 Temperature : 35°C
 Detection : UV at 254nm
 Injection volume : 10uL
- Online trapping conditions
 Column : ODS(2.0×5.0mm, 5μm)
 Mobile phase : [C] 0.1%TFA in water *For fractionated sample delivery
 [D] 0.1%TFA in water *For online dilution
 Total flow rate : 1.0mL/min ([C]0.1mL/min, [D]0.9mL/min)
 Dilution factor : 10fold
 Trapping time : 6min
- (B) 2D Analytical conditions
 Column : ODS(2.1×150mm, 5μm)
 Mobile phase : [A] 0.1% TFA in water
 [B] Acetonitrile
 Gradient : 20-90%B(0-20min)
 Flow rate : 0.2mL/min
 Temperature : 35°C
 Detection : UV at 254nm

Fig. 12 LC-MS analysis utilizing Co-Sense® for Microanalysis

を断面積に比例して低くすることで感度向上が可能であり、さらにはUHPLCとの接続により一層の感度アップが期待できる。Fig. 13にUHPLCを用いた例を示した。本例では1/2の試料注入量に対してMS強度

が1.6倍程度に上昇していた。MS装置は高価であり高感度装置への更新は容易ではないため、このようなLC側からの感度アップのアプローチは重要である。

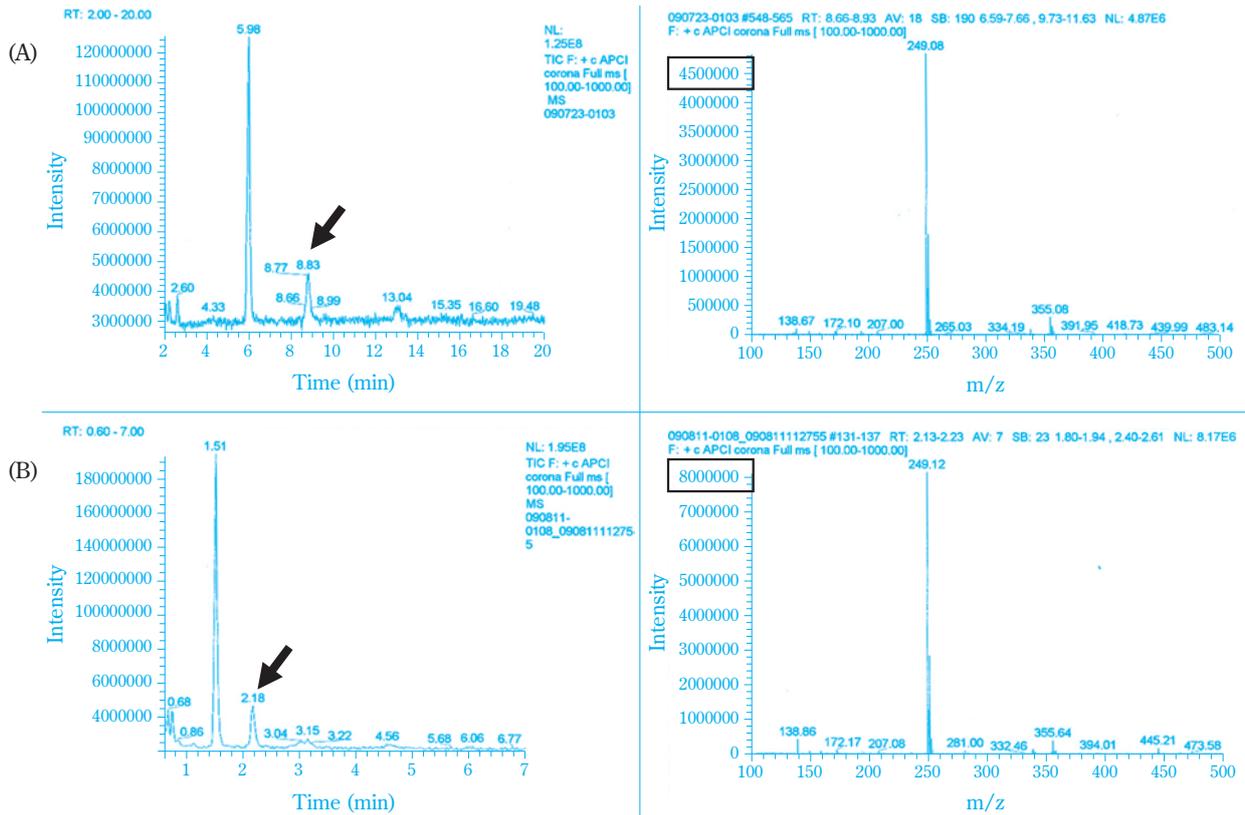


Fig. 13 Comparison of MS sensitivity between conventional LC and UHPLC

(A) Conventional LC Column: ODS (4.6×150mm, 5μm)

Injection volume: 10μL

(B) UHPLC

Column: ODS (3.0×75mm, 2.2μm)

Injection volume: 5μL

Mobile phase : 10mM Ammonium Acetate in water/Acetonitrile=30/70(v/v) Flow rate: 1.0mL/min

(2) LC-NMR

LC-MSと並んで有機低分子化合物の構造解析に有効な装置として、LC-NMRがある。ただしLC-MSとは異なり、NMR装置は現在でも非常に高価な装置であることから、NMRをLCの専用検出器として使用している例はあまり聞かず、NMR単独との切り替え使用が一般的だと思われる。通常、NMR単独での使用頻度が高いため、LC-NMRは同じハイフネーテッド技術でありながらLC-MSとは異なって時間的な制限がありがちで、我々の場合、LC-MS単独では構造解析が困難でかつ単離が難しいケース（単離操作中に分解する、揮発性が高く単離しても濃縮できない、完全な単離が困難、等）にのみ適用している。

現在利用しているLC-NMRは独立行政法人医薬基盤研究所のシステムである⁶⁾。Fig. 14に装置のフロー図を示す。共鳴周波数800MHzの高性能NMR装置でLC-NMRとして利用できる期間には制限があるが、一日単位での利用が可能である。本装置では¹Hスペクトル（一次元、二次元）及び¹³Cスペクトルが測定できる。測定に必要な試料量をモデル化合物で

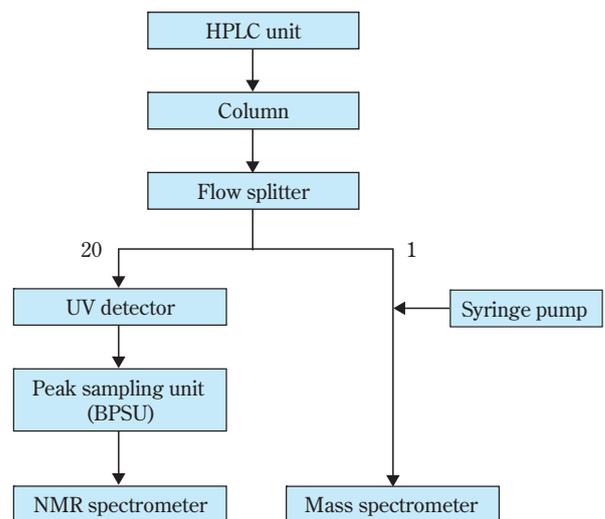


Fig. 14 Flow Diagram of LC-NMR/MS system

検証したところ、LCへの絶対注入量として一次元¹Hスペクトルで1μg、二次元¹Hスペクトルで20~50μg、¹³Cスペクトルで100μg程度であり、微量での測定が可能であった。Fig. 15に実際の測定例を示した。

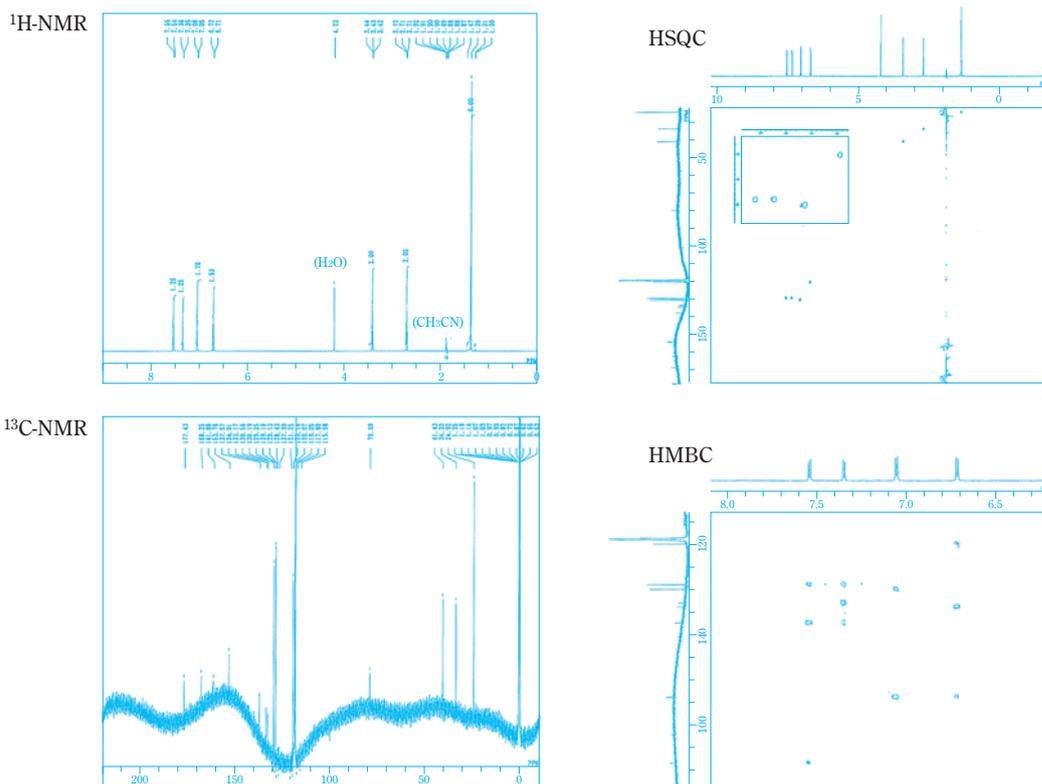


Fig. 15 NMR spectrum by LC-NMR
 Mobile phase : 0.1% TFA-d in D₂O/Acetonitrile-d₃ = 55/45(v/v)
 Injection volume : 100μL(2mg/mL)

LC-NMRの感度向上には、容量がわずか60μLのNMRフローセルにいかにか試料を多く入れて留めるかが重要である。ここでもLC側からのアプローチはピークをいかにシャープにするかに尽きる。カラム径を細くする、微粒子径カラムを使用する、溶出時間を速くする等の工夫で感度の向上は可能である。

データ解析を行う上での問題点としては、試料における高磁場側の¹Hシグナルが溶媒由来のシグナルと重複するため低濃度の場合に特に判別しにくいことがあげられる。また、我々の不純物解析の流れの中でLC-NMRは第一ステップに使用できれば迅速な解析に効果を発揮する装置であるが、高価ゆえに専用機として確保するのが困難という現実がある。小型で安価な専用機の登場が待たれるところである。

おわりに

医薬化学品製造プロセス開発の現場における、クロマトグラフィーとハイフネーテッド技術を用いての開発支援について紹介した。クロマトグラフィーは基本的には成熟した技術であり、有機低分子化合物の分析に限れば装置、カラムに現在の要求を満たすのに十分な製品群が存在する。一方で、製品群の

充実に加えて装置のブラックボックス化が進んだ結果、その特性を十分に活かすための知識、経験が不足する懸念がある。医薬化学品の製造現場ではGMP管理上、一度決定した分析条件を変更することが難しいため、分析法開発の時点での分離のみならず分析時間も含めた適切な条件設定は重要である。その意味で試験法開発者にはクロマトグラフィーについての幅広い知識、応用力が求められている。

ハイフネーテッド技術の有機低分子化合物解析への適用においても、LC-MSに関しては装置的にはほぼ成熟したものと考えられる。装置メーカーの関心はすでにバイオ関連分野にシフトしており、医薬化学品製造プロセス開発の現場では「いかに使いこなすか」の段階にある。ガスクロマトグラフィーに質量分析計を接続したGC-MSは、既に誰にでも容易に使えるレベルにあるが、LC-MSではLC部を含めたイオン化とスペクトル解析の技術、知識が必要であり、感度等の改善にはLCの知識が重要である。LC-NMRに関してはNMR技術のさらなる進歩は装置メーカーに負うところが大きい、LC側ではユーザーからのアプローチも重要である。その意味でハイフネーテッド技術におけるクロマトグラフィーの重要性はさらに増していくものと思われる。

引用文献

- 1) European Medicines Evaluation Agency, “Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on the limits of genotoxic impurities”, CPMP/SWP/5199/02, London, 28 June 2006.
- 2) U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), “Guidance for Industry. Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches.”, December 2008.
- 3) R.M.Holt, M.J.Newman, F.S.Pullen, D.S.Richards and A.G.Swanson, *J.Mass Spectrom.*, **32**, 64(1997).
- 4) J.M.Cunliffe and T.D.Maloney, *J.Sep.Sci.*,**30**, 3104 (2007).
- 5) J.W.Dolan, “Instrumental Considerations for High-Throughput LC”, 島津ハイスループットLCセミナーテキスト, (株)島津製作所分析計測事業部 (2007).
- 6) 独立行政法人医薬基盤研究所ホームページ, <http://www.nibio.go.jp/nmr/>

PROFILE



上田 正史
Masafumi UEDA

住友化学株式会社
精密化学品研究所
主席研究員



中村 智和
Tomokazu NAKAMURA

住友化学株式会社
精密化学品研究所
主任研究員



藤井 好美
Yoshimi FUJII

住友化学株式会社
精密化学品研究所
主任研究員