

博 士 論 文

イオン性化合物の保持予測に基づく
超高性能逆相液体クロマトグラフィー移動相最適化手法の確立

本論文は静岡県立大学薬食生命科学総合学府薬学研究院博士論文である

2017年9月

静岡県立大学薬食生命科学総合学府
薬学研究院 薬科学専攻
生体機能分子分析学分野

佐々木 司

**Establishment of mobile phase optimization method for the
reversed phase-ultra high performance liquid chromatography
based on retention prediction of ionogenic compounds**

September 2017

**Laboratory of Analytical and Bioanalytical Chemistry
Graduate Division of Pharmaceutical Sciences**

University of Shizuoka

Tsukasa Sasaki

目次

略語表及び代数記号表	I
方程式表	i
緒言	1
第 1 章 重回帰モデルおよび人工ニューラルネットワーク解析を用いた水相 pH および 2 成分混合有機相組成最適化手法の確立	4
第 1 節 リニアグラジエント条件におけるイオン性化合物の 2 成分混合有機相組成に対する保持予測モデルの構築	4
第 2 節 人工ニューラルネットワーク解析による水相 pH および 2 成分混合有機相組成の一斉最適化手法の確立	9
第 3 節 小括	17
第 2 章 格子状モデルを用いた水相 pH および 2 成分有機相組成の網羅的かつ一斉最適化手法の確立	18
第 1 節 Bernoulli 分布を基としたイオン性化合物の水相 pH に対する保持予測モデルの構築	18
第 2 節 格子状モデルを用いた広範な水相 pH および 2 成分有機相組成に対する保持予測手法の構築および分離条件最適化手法の確立	26
第 3 節 実験計画法を用いた最適条件における分離頑健性の評価	33
第 4 節 ロジスティックモデル回帰パラメータの物理化学的評価	36
第 5 節 小括	38
総括	39
実験の部	40
試薬	40
装置	41
分析カラム	41
ソフトウェア	41
移動相	41
第 1 章 第 1 節の実験操作	42
第 1 章 第 2 節の実験操作	43
第 2 章 第 1 節の実験操作	44
第 2 章 第 2 節の実験操作	45
第 2 章 第 3 節の実験操作	48
第 2 章 第 4 節の実験操作	48
Maple 上で動作するインハウスプログラム	49

謝辭.....	52
引用文献.....	53

略語表及び代数記号表

(アルファベット順)

略語	英語名称	邦語名称
ANN	artificial neural network	人工ニューラルネットワーク
C_i	molar concentration of ionized form of dissociable functional group	イオン型の解離性官能基のモル濃度
C_m	molar concentration of molecular form of dissociable functional group	分子型の解離性官能基のモル濃度
DoE	design of experiment	実験計画法
H1Bs	histamine H ₁ -receptor blockers	ヒスタミン H ₁ 受容体拮抗薬
I_0	retention factor of totally ionized analyte	イオン型の溶質の保持係数
I_s	remainder of retention factor of analyte between totally ionized and deionized form	分子型とイオン型の溶質の保持係数の差
k	retention factor	保持係数
K_M	pH value of the midpoint of sigmoidal curve	シグモイド曲線の midpoint の pH 値
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs	非ステロイド性抗炎症薬
$\varphi_{A/M}$	volumetric ratio of methanol in acetonitrile	アセトニトリル中に含まれるメタノールの容量組成比
φ_i	volumetric ratio of organic phase in mobile phase	移動相中に含まれる有機溶媒の容量組成比
$\varphi_{OrgI/II}$	volumetric ratio of organic solvent I in organic solvent II	有機溶媒 I 中に含まれる有機溶媒 II の容量組成比
φ_T	volumetric ratio of organic phase in mobile phase	移動相中に含まれる有機溶媒の容量組成比
p_{mol}	existence probability of molecular form of dissociable functional group	分子型の解離性官能基の存在確率
QbD	quality by design	クオリティバイデザイン
QSRR	quantitative structure retention relationship	定量的構造保持相関
ρ	slope factor at the midpoint of sigmoidal curve	シグモイド曲線の midpoint における傾き係数
RMSE	root mean square error	平均二乗誤差
RP	reversed phase	逆相

S_{CP}	score of number of critical peak pairs	クリティカルピークペア数のスコア
S'_{CP}	normalized score of number of critical peak pairs	標準化されたクリティカルピークペア数のスコア
$S_{\Delta k}$	score of minimum retention interval	最小保持間隔のスコア
$S'_{\Delta k}$	normalized score of minimum retention interval	標準化された最小保持間隔のスコア
S'_T	summation of $S'_{\Delta k}$ and S'_{CP}	$S'_{\Delta k}$ および S'_{CP} の合計
t_0	hold-up time	ホールドアップ時間
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography	超高性能液体クロマトグラフィ
wt	weight factor	重み係数

方程式表

式番号

方程式

- (1) $\ln k = A\varphi^2 + B\varphi + C$
- (2) $\ln k = A_1\varphi_1^2 + A_2\varphi_2^2 + B_1\varphi_1 + B_2\varphi_2 + C + D\varphi_1\varphi_2$
- (3) $\ln t_R = b_0 + b_1\varphi_T + b_2\varphi_{A/M} + b_{12}\varphi_T\varphi_{A/M} + b_{11}\varphi_T^2 + b_{22}\varphi_{A/M}^2$
- (4) $\ln t_R = a_0 + a_1\varphi_{\text{OrgI/II}} + a_2\varphi_{\text{OrgI/II}}^2$
- (5) $\text{p}K_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]} = \text{pH} - \log \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]}$
- (6) $\text{logit}(p_{\text{mol}}) = \ln \left[\frac{C_m}{(1 - C_m)} \right] \quad (0 < C_m < 1, \text{pH} = \text{constant})$
- (7) $p_{\text{mol,acid}} = \frac{1}{1 + e^{\rho(\text{pH} - K_M)}}$
- (8) $p_{\text{mol,base}} = \frac{1}{1 + e^{\rho(K_M - \text{pH})}}$
- (9) $k_A = \frac{I_s}{1 + e^{\rho(\text{pH} - K_M)}} + I_0$
- (10) $k_B = \frac{I_s}{1 + e^{\rho(K_M - \text{pH})}} + I_0$
- (11) $k_{A+A} = \frac{I_{s1}}{1 + e^{\rho_1(\text{pH} - K_{M1})}} + \frac{I_{s2}}{1 + e^{\rho_2(\text{pH} - K_{M2})}} + I_0$
- (12) $k_{B+B} = \frac{I_{s1}}{1 + e^{\rho_1(K_{M1} - \text{pH})}} + \frac{I_{s2}}{1 + e^{\rho_2(K_{M2} - \text{pH})}} + I_0$

$$(13) \quad k_{A+B} = k_{B+A} = \frac{I_{S1}}{1 + e^{\rho_1(\text{pH}-K_{M1})}} + \frac{I_{S2}}{1 + e^{\rho_2(K_{M2}-\text{pH})}} + I_0$$

$$(14) \quad S' = \frac{(S_i - S_{\text{Min}})}{(S_{\text{Max}} - S_{\text{Min}})}$$

$$(15) \quad S'_T = S'_{\Delta k} \times wt + (1 - S'_{\text{CP}})$$

緒言

今日の医薬品品質評価および品質保証において逆相超高性能液体クロマトグラフィー (RP-UHPLC) はその先導的役割を担う重要な分析手法の一つである¹⁻³⁾。これは溶液とした被検試料中に含まれる多数の成分を、ごく短時間に各々の成分へと分離し、かつ個別に定量が可能な傑出した分析性能を有することに依る⁴⁻⁶⁾。混合物中の各有機成分を単離し個々に定量することは、とりわけ低分子医薬品の有効性、安全性および安定性を保証するために重要である⁷⁻¹¹⁾。製剤中に含まれるべき原薬すなわち医薬品の活性本体の量的欠乏は、投薬に際して治療効果の不全をもたらす。加えて、類縁物質とよばれる原薬の合成過程に由来する副反応生成物、残留試薬または保管中に生成する分解生成物などは、対応する原薬に類似した化学構造を有する傾向があり、被投薬者に有害な薬物作用をもたらす危険性が非常に高いことが知られている^{12,13)}。この化学構造の類似性はしばしば原薬と不純物間または不純物同士の物理的および化学的性質の近似性をもたらす。特に RP-UHPLC 分析法開発においては、化合物の構造が類似する場合、固定相との相互作用の強さが同様となるため、その差を分離の原動力とするクロマトグラフィーにおいて分離難度を著しく増大させる。

RP-UHPLC を用いて望ましい分離を達成するためには、固定相修飾基、カラム温度、移動相流量、水相 pH、複数種の有機溶媒からなる混成有機相の組成比など、溶質の保持選択性を変化させうる因子 (以降分離因子と表記) の子細な最適化が必要となる。しかしながら、これら分離因子はとり得る値の範囲が非常に広範であることに加え、分離因子間に溶質の保持選択性への交互作用が存在する場合もあり、観測結果を積み上げていく試行錯誤型の手法では、網羅的評価が現実的には不可能である。そのため、各分離因子の部分的評価により至適な分析条件の探索が試みられるが、最終化された分析法の最適性は作業者の経験や知識に大きく依存する。これに対して溶質の保持予測手法を用いた分析条件の最適化は、現実的な実測回数において分離因子の客観的かつ網羅的な評価を可能とする。RP-UHPLC における溶質の保持予測を目的とした計算法的手法の代表的なものとして、溶質の物理的特性、例えば Log D 値や Log P 値、pKa 値などをその化学構造から求める定量的構造保持相関 (QSRR) 手法が知られている¹⁴⁻¹⁷⁾。しかしながら、特に医薬品候補化合物の開発初期段階においては、原薬中に含まれる微量不純物の構造は未知である^{18,19)}。そのため QSRR に基づく分析条件の最適化手法は適用が困難である。以上の背景から、実際に観測される溶質の保持挙動に対して分離因子の効果をモデル化する手法が、網羅的最適化を達成するために最も適当な選択となる。

保持予測モデルは溶質の保持および分離に対する分離因子の主効果および交互作用をシミュレートする。したがって最適な分析条件を見出すために有用なだけでなく、各因子の変動をもたらす分離への影響をも見積もることが可能となる。こうした保持予測モデルの特性は医薬品の分析法開発過程へクオリティバイデザイン (QbD) の概念²⁰⁾を組み入れる際に非常に有用であり、実際に分析法の理解²¹⁻²⁴⁾や頑健性評価²⁵⁻²⁷⁾を目的とした応用研究が報告されている。加えて、いくつかの分離因子を対象とした保持予測アルゴリズムは商用のパッケージソフトウェアとして入手可能であるなど、コンピューター支援型の分析法開発手法は

広く一般に浸透してきている。

分析法開発を支援するソフトウェアの多くはその機能の一つとして実験計画法 (DoE) を提供している。DoE では因子の効果や交互作用を予め重回帰モデルとして仮定することで、続く分散分析および回帰分析に必要な実験数と実験条件の空間的配置を統計理論に基づき最適化する。そのため非常に効率的に複数の因子の影響を同時評価可能であり、分離条件最適化への適用も数多く試みられている^{21,22,24-28})。しかしながら、パラメータ最適化検討において最も一般的な3水準 DoE で用いられる、2次までの主効果を含む重回帰モデルは、因子の変動に対して複雑な推移を示す応答に対しては精度よいフィッティングが得られない。例えば RP-UHPLC においてイオン性化合物は、移動相水相 pH に対して非常に複雑な保持挙動を示す。このため、3 pH 単位以内の狭い pH 変動幅においては2次の重回帰モデルにより良好なフィッティングを得た例が報告されているが²⁹⁻³²)、より広範囲な水相 pH 変動幅を対象とした研究においては重回帰モデルとは異なる、より複雑な非線形の保持予測モデルも用いられる³³⁻³⁵)。

一般に非線形モデルでは回帰係数の数が多く、回帰分析を行うためには DoE と比較してより多くの実測値が必要となる。しかしながら、RP-UHPLC においてイオン性化合物の保持選択性に対する移動相水相 pH の影響は極めて大きく、分離最適化において無視できない分離因子である。したがって、実験コストの増加を考慮した上でも非線形モデルを用いた高精度保持予測手法は有益であり、多数の研究が試みられている³⁶⁻³⁹)。これらの研究では単一の有機溶媒種よりなる有機相の存在下、広範囲な水相 pH に対するイオン性化合物の保持について高精度な予測を達成している。その一方で、より精密な分離最適化が期待できる、異なる2種類の有機溶媒種よりなる混合有機相の存在下においては、溶質の保持挙動がさらに複雑となる。このため、保持予測技術を用いた pH 値と2成分有機相組成の同時最適化例は、限定的な水相 pH 域においてのみ報告されている⁴⁰)。

RP-UHPLC においてイオン性化合物の保持係数 (k) に対する水相 pH および2成分混合有機相組成の効果をモデル化する場合、①水相 pH 値、②2成分有機相を構成する各有機溶媒種の容量組成比、③移動相としての水相と有機相の容量混合比の3つのパラメータを考慮する必要がある。しかしながら、見かけの移動相 pH 値^{41,42})およびイオン性化合物の pKa 値^{43,44})は共存する有機溶媒種によって変化することが知られており、前述した3つのパラメータ間に存在する交互作用についても同時にモデルへ反映させる必要がある。こうした理由から広域な2成分混合有機相組成および水相 pH の組み合わせに対するイオン性化合物の k 値予測手法は依然として確立されていない。

グラジエント溶出を用いる RP-UHPLC において、水相 pH に対するイオン性化合物の高精度 k 値予測手法は、A. Andrés 等^{37,38,45})および S. Fasoula 等³⁵)により報告されている。これらの保持予測手法は P. Wiczling 等による有機溶媒存在下における解離性化合物の酸解離定数の予測手法⁴⁶)を基にしており、酸性もしくは塩基性の解離性官能基を1つ有する溶質に対応している。一方で、イオン性化合物の中には複数の解離性官能基を有するものもあり、これらの解離性官能基は溶媒の pH 環境に依存して個々にプロトン化または脱プロトン化し、化合物の保持へ影響を及ぼす。こうした化合物の k 値は水相 pH の変化に対して複数の変曲点を有する

複雑な挙動を示すため、良好なフィッティングを得るためには、複雑なカーブを表現可能なモデル式が必要となる。

以上の背景を踏まえ、本研究では水相 pH 値と 2 成分混合有機相の容量組成比について、広域なパラメータ範囲に適用可能なイオン性化合物の保持予測手法の確立と、両パラメータの網羅的かつ同時最適化手法への応用を目的とした。第 1 章ではイオン性化合物の水相 pH 値および 2 成分有機相組成に対する複雑な保持挙動について、人工ニューラルネットワーク (ANN) 解析の適用に関する検討を実施した。ANN 解析は多数の入力変数に対するモデル化に適した解析手法であることから、構造既知化合物の QSRR パラメータと移動相条件を入力変数とした保持予測手法は多数報告がある⁴⁷⁻⁴⁹⁾。その一方で、構造未知化合物を対象とした場合、十分量の入力変数の確保が課題となることから、ANN 解析の適用例は極めて少ない。ここでは T. Kawabe 等が報告した重回帰モデルによる入力変数の補填手法⁵⁰⁾を応用し、ANN 解析を土台とした構造未知成分に対する新規の保持予測手法確立を目指した。第 2 章では ANN 解析が抱える、入力変数量の確保や予測モデルの回帰パラメータの再現性等の課題を克服するため、格子状モデルを用いた保持予測手法に関する検討を実施した。格子状モデルは、イオン性化合物の水相 pH 値に対する保持挙動モデルと 2 成分有機相組成に対する保持挙動モデルの 2 つの異なる形状のモデルをコンピューター内で仮想的に連結させた複合モデルである。ここでは水相 pH に対する新規の統計的保持予測モデル構築による、実験効率および回帰パラメータの再現性が共に高い保持予測手法の確立を目指した。

第1章 重回帰モデルおよび人工ニューラルネットワーク解析を用いた水相 pH および 2 成分混合有機相組成最適化手法の確立

第1節 リニアグラジエント条件におけるイオン性化合物の 2 成分混合有機相組成に対する保持予測モデルの構築

P. J. Schoenmakers 等により報告された溶解パラメータ理論に基づく保持係数 (k) 予測モデル[式(1)および(2)]は、水相 pH を一定とするアイソクラティック条件において、移動相組成に対する溶質の保持挙動を表現する⁵¹⁻⁵³。

$$\ln k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (1)$$

$$\ln k = A_1\varphi_1^2 + A_2\varphi_2^2 + B_1\varphi_1 + B_2\varphi_2 + C + D\varphi_1\varphi_2 \quad (2)$$

ここで、識別子 A、B、C 及び D は溶質のモル体積と溶解パラメータよりなる関数、 φ_i は移動相組成に占める有機相の容量組成比を示す。すなわち、式(1)は各 1 種類ずつの水相と有機相 (φ) よりなる 2 成分移動相組成について、式(2)は 1 種類の水相と 2 種類の有機相 (φ_1 および φ_2) よりなる 3 成分移動相組成について溶質の保持挙動を表現する。一方でグラジエント条件における移動相組成と保持の関係を考える場合、M. C. García-Álvarez-Coque 等による保持予測手法に関する総説⁵⁴)では、「グラジエントを小さなアイソクラティックのステップの積み重ねとして概括することにより、アイソクラティック条件における保持予測手法をグラジエント条件に適用することが可能である」と述べられているように、実際に式(1)をグラジエント条件における保持予測に適用した例が報告されている^{55,56})。したがって、同様の考え方を用いることで、式(2)についてもグラジエント条件への適用が可能であると考えられる。

T. Kawabe 等は pH 一定のアイソクラティック条件における 3 成分移動相組成の最適化に関する研究の中で、式(2)の DoE への適合性を向上させる目的でその誘導型である式(3)を報告した⁵⁰。

$$\ln t_R = b_0 + b_1\varphi_T + b_2\varphi_{A/M} + b_{12}\varphi_T\varphi_{A/M} + b_{11}\varphi_T^2 + b_{22}\varphi_{A/M}^2 \quad (3)$$

ここで、 φ_T は移動相に占める有機相の容量組成比を、 $\varphi_{A/M}$ は 2 成分有機相を構成するアセトニトリルおよびメタノールの容量組成比を、 b_{ij} は偏回帰係数を示す。式(3)のグラジエント条件への適用を考えた場合、 φ_T は時間とともに次第に変化する移動相中の水相と有機相の組成比が保持に及ぼす影響を表現する関数となる。つまり、式(3)の回帰を行うために用いた教師データを取得した際のグラジエント条件に対し、異なるグラジエント条件での保持を予測する場合に φ_T は重要な役割を果たすと考えられる。一方で、予め規定された時間および勾配でのリニアグラジエント分析における保持の予測という制限を設けた場合、教師データと予測値への φ_T の寄与は等価となると考えられることから、式(3)より φ_T は除かれ、式(4)を与える。

$$\ln t_R = a_0 + a_1\varphi_{OrgI/II} + a_2\varphi_{OrgI/II}^2 \quad (4)$$

ここで、 $\phi_{Org/II}$ は有機相を構成する 2 種類の異なる有機溶媒の容量組成比を、 a_i は偏回帰係数を示す。

本研究では最も一般的な RP-UHPLC 条件において、本手法の分析法開発への有用性を実証する目的で、有機相を構成する 2 種類の有機溶媒にはメタノールおよびアセトニトリルを選定した。また、試料には複数の類縁物質を含む原薬の溶液を模倣する目的で、構造が類似した 16 種類のヒスタミン H_1 受容体拮抗薬(H1Bs、Figure 1)を混合液としたものを用いた。

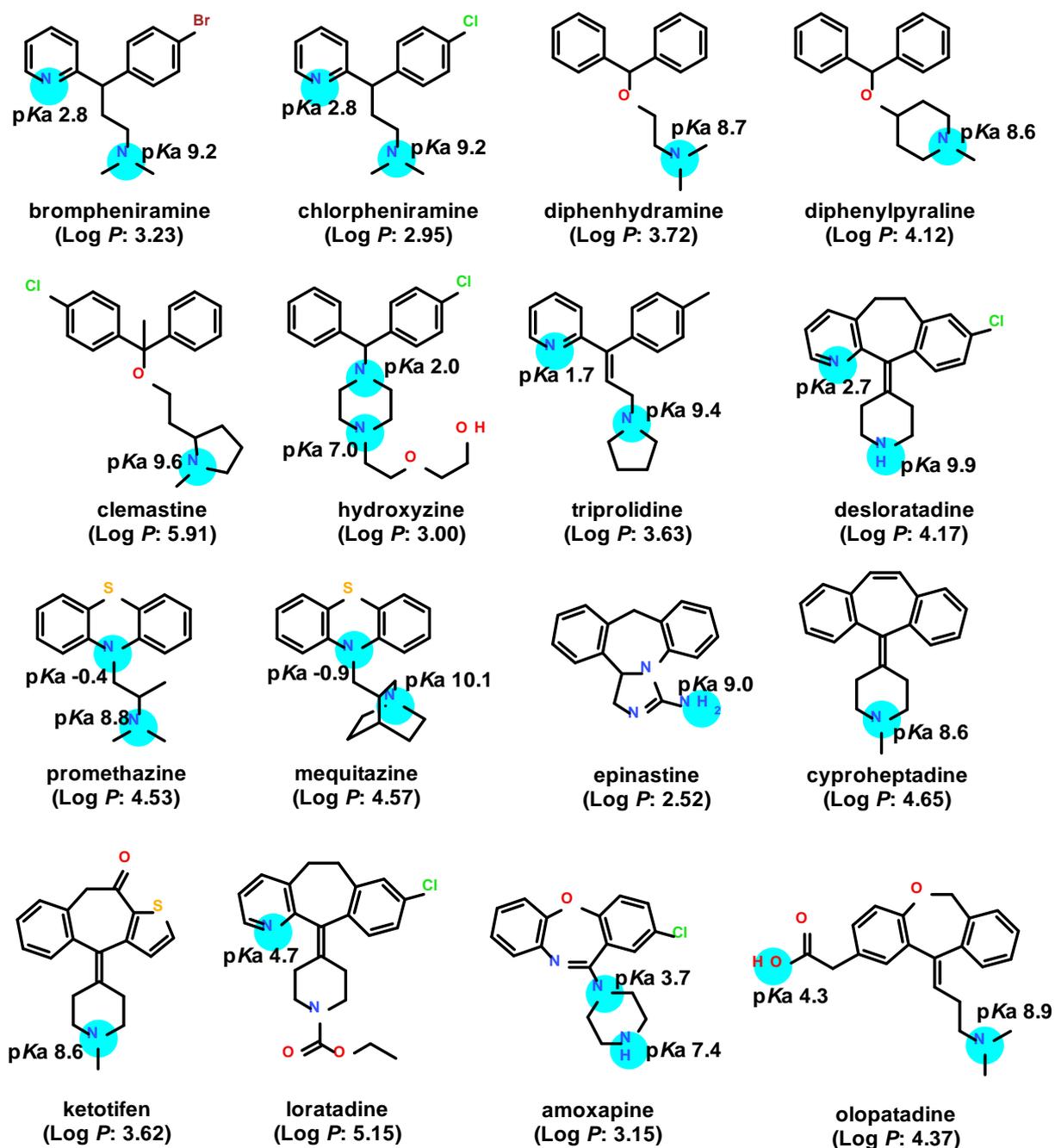


Figure 1 本研究に用いたヒスタミン H_1 受容体拮抗薬の一般名および化学構造。pKa 値および Log P 値は ACD/Labs 2014 (Build 2726) を用いて算出した。

本手法の妥当性を検証するため、pH 2.5～8.8 の範囲における 11 段階の pH に調整した水相について、アセトニトリル中に含まれるメタノールの組成比として 0%、50%および 100% の 3 種類の組成の有機相について実測した結果に対し、式(4)によるフィッティングを実施した。その後、得られた重回帰モデルよりアセトニトリル中に含まれるメタノールの組成比として 25%および 75%の点における保持予測値について、実測値との相関性解析を実施した。Figure 2 に教師データに対する式(4)によるフィッティングの概念図を、Figure 3 に相関性解析の結果を示す。

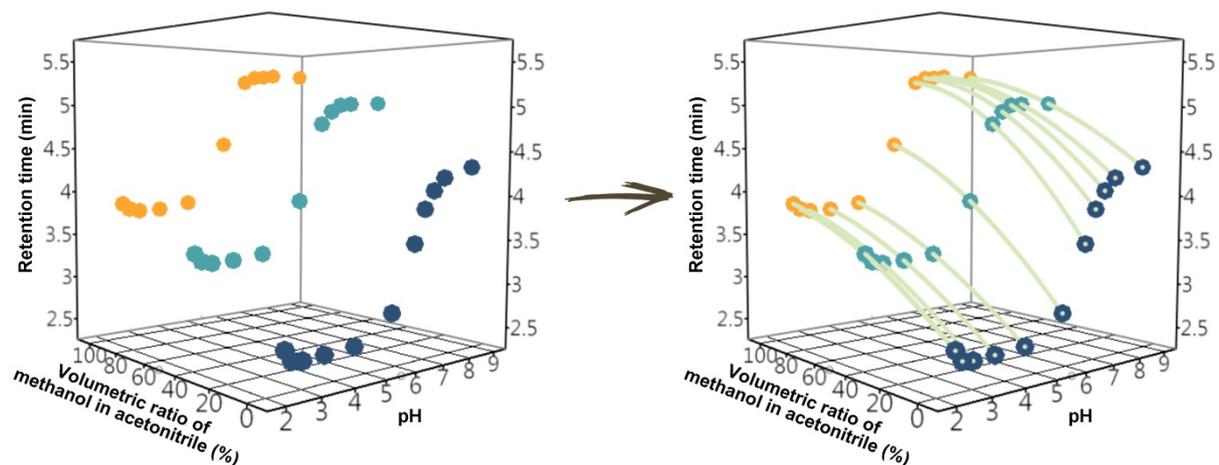


Figure 2 教師データに対する重回帰モデルフィッティングの概念図 (loratadine の実測値より構成)。クローズドサークルはアセトニトリル中のメタノール容量組成比として紺色) 0%、水色) 50%および橙色) 100%における教師データを、黄緑色の実線は重回帰モデルの軌跡を示す。

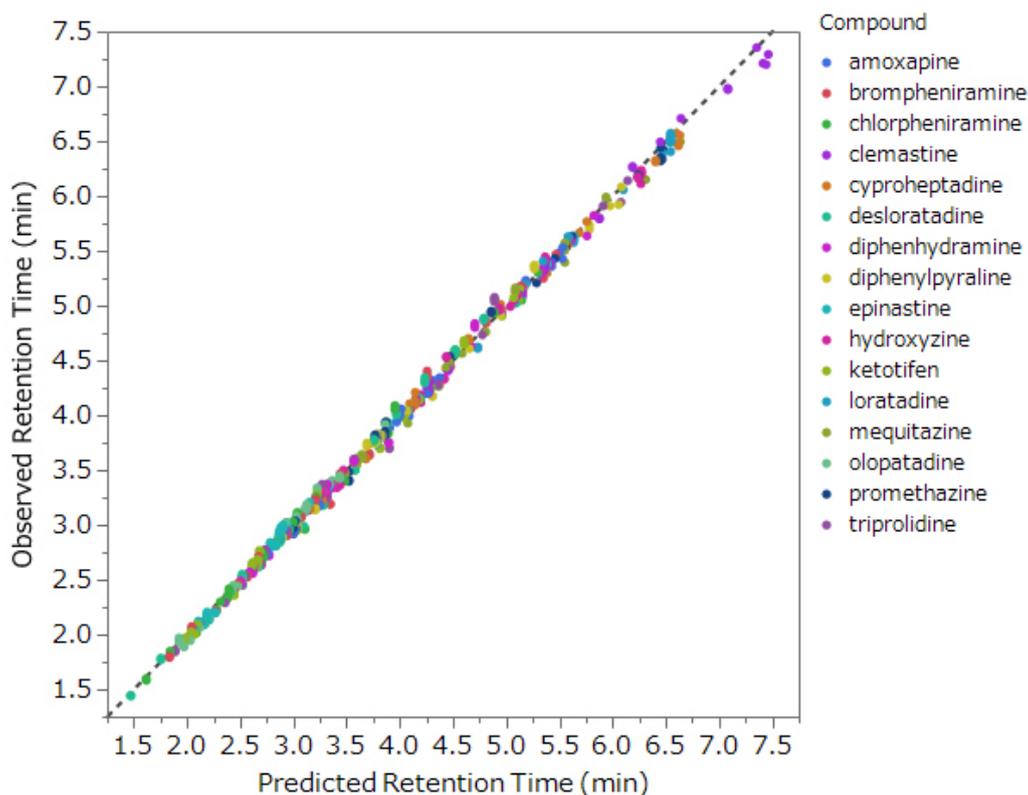


Figure 3 時間および勾配一定のリニアグラジエント条件における重回帰モデルによる 2 成分有機相組成に対する保持予測結果。破線は y 切片 0、勾配 1 の理想的相関を示す。各化合物の凡例は図中に表示。

予測値と実測値の相関性解析の結果、決定係数は 0.9983、root mean square error (RMSE) 値は 0.06 であり、誤差自由度が 0 となる 3 点の教師データからの回帰モデルであるが、オーバーフィッティングの傾向は認められず、極めて高い予測精度を示した。また、回帰直線の y 切片は -0.005、勾配は 1.006 であり、バイアスの無いおおよそ理想的な相関が認められたことから、本手法の妥当性が確認された。

Figure 2 に示したように、式(4)より得られる予測値によって、教師データ間に存在する空間はある程度充足される。したがって、得られた予測値から水相 pH 値と 2 成分有機相組成の同時最適化が可能であるか検討した。

式(4)の出力は教師データが取得された pH 条件における、任意の 2 成分有機溶媒組成に対する各化合物の保持時間予測値である。これらの出力をピーク分離に関する情報へと変換するため、最も近接するピーク頂点の間隔を $S_{\Delta k}$ 、ピーク頂点の間隔が閾値以下となるピークの組(critical peak pair)の数を S_{CP} として定義した。具体的には $S_{\Delta k}$ は分離の達成度を、 S_{CP} はクロマトグラム上でのピークの混雑さを示すスコアとなる。Figure 4 は 16 種類の H1Bs について重回帰モデルの予測値より作成した $S_{\Delta k}$ および S_{CP} のカラーマップである。 S_{CP} の算出に用いたピーク頂点間隔の閾値は 0.06 分とした。これは、実測した H1Bs のピーク幅よりおおよその分離度 1.5 を与えると逆算されたピーク頂点の間隔である。

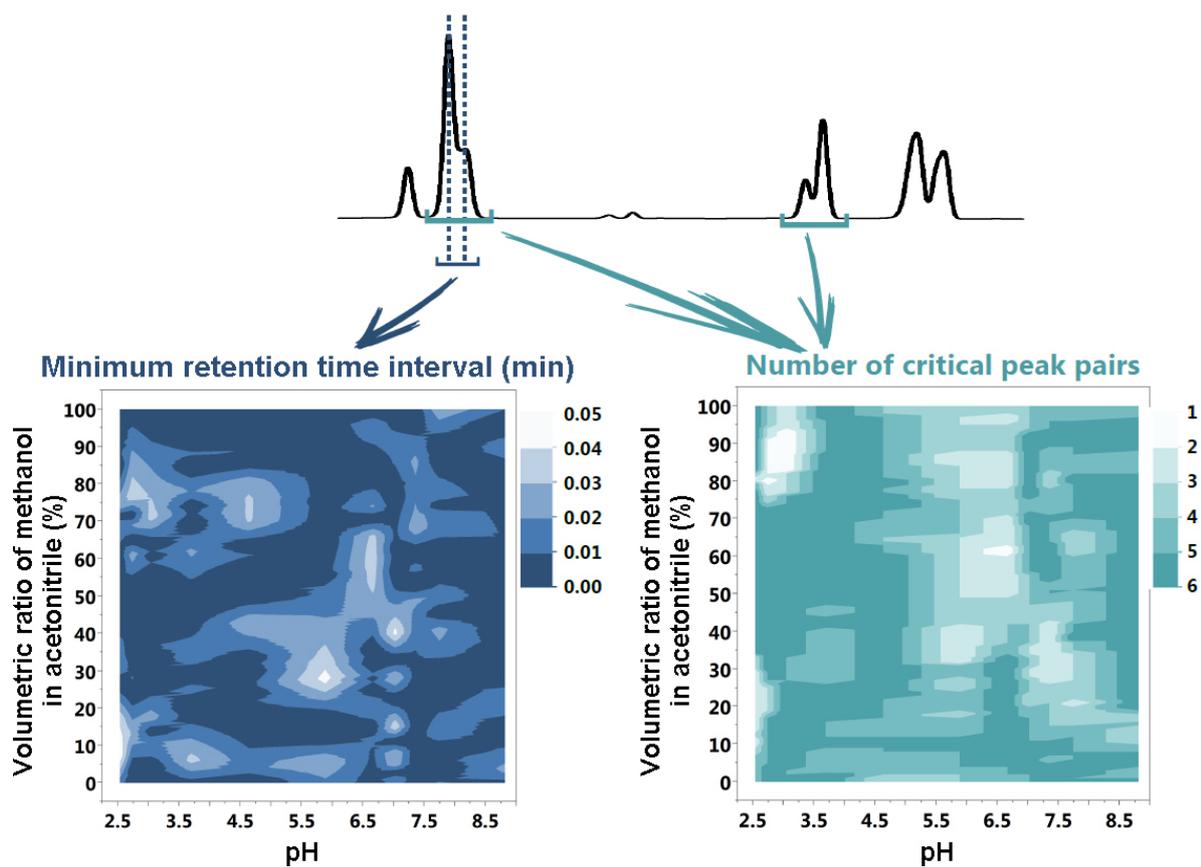


Figure 4 最小ピーク間隔（左図）と critical peak pair 数（右図）の模式図および重回帰モデル予測値より構成した H1Bs のスコアマップ。

重回帰モデルの予測値より構成したスコアマップを用いることで、水相 pH および有機相のアセトニトリル/メタノール組成比の最適な組み合わせが存在する大よその範囲（pH 5.5–7.0 およびアセトニトリル中のメタノール容量比 20%–70%）を視覚的に捉えることが可能であった。

第2節 人工ニューラルネットワーク解析による水相 pH および 2 成分混合有機相組成の一斉最適化手法の確立

式(4)に示す重回帰モデルと分離達成度を示す S_{Ak} および S_{CP} の導入によって、移動相 pH と 2 成分有機相組成の最適な組み合わせが存在すると考えられるおおよその範囲を把握することが可能であった。しかしながら、水相 pH 軸方向の保持挙動についてはモデル化されていないため、式(4)の予測結果のみでは、具体的な最適条件を見出すことが困難である。RP-UHPLC において、イオン性化合物の保持は水相 pH 値に対して複雑な非線形の挙動を示す^{36,43,44)}。したがって、水相 pH と有機相組成の両パラメータから保持を予測するためには、重回帰式などの一般的な関数に比べ、より柔軟に因子と応答を繋ぐことが可能な関数が必要となる。

人工ニューラルネットワーク(ANN)解析は入力信号(x_i)に対して重みとバイアスを与えた上で中間ノードへ渡す(Figure 5)。中間ノードではシグモイド関数、ガウス関数または Tanh 関数などの活性化関数[$h(x)$]によって入力値が変換され、出力層へと渡される。出力層においても同様に入力値に対して重みとバイアスが与えられ、最終的な予測結果を出力する。ANN モデルでは中間層の多層化および中間ノードの増数が可能であるため、非常に複雑な挙動をとる因子と応答の関係であってもモデル化が可能である。加えて、ANN は誤差逆伝播法による学習機構を備えているため、中間層および出力層への入力値に与えられる重みを自律的に最適化可能である。

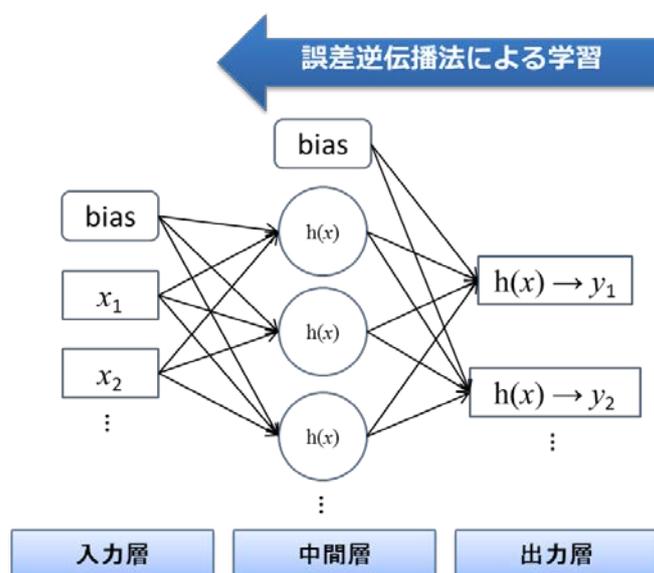


Figure 5 一層の人工ニューラルネットワークの概念図。中間層は複数の中間ノードより構成される。 x_i は入力信号を、 y_j は出力信号を、 $h(x)$ は活性化関数を示す。

ANNは強力なフィッティング能力を有するため、小数のデータを教師データとするフィッティングも可能である。しかしながら、一般にANNはオーバーフィッティングを生じやすいことが知られており、教師データはある程度の量を確保することが望ましいとされる。このことから、ANNに用いる教師データを効果的に増量させるため、式(4)の予測結果より得られたカラーマップにおいて最適条件が存在すると考えられる範囲(Figure 6)において実測値を追加し、さらに式(4)より得られる予測値へと導いた上で、水相 pH と 2 成分有機相組成の変動に対する保持挙動について、ANNによるモデリングを試みた。

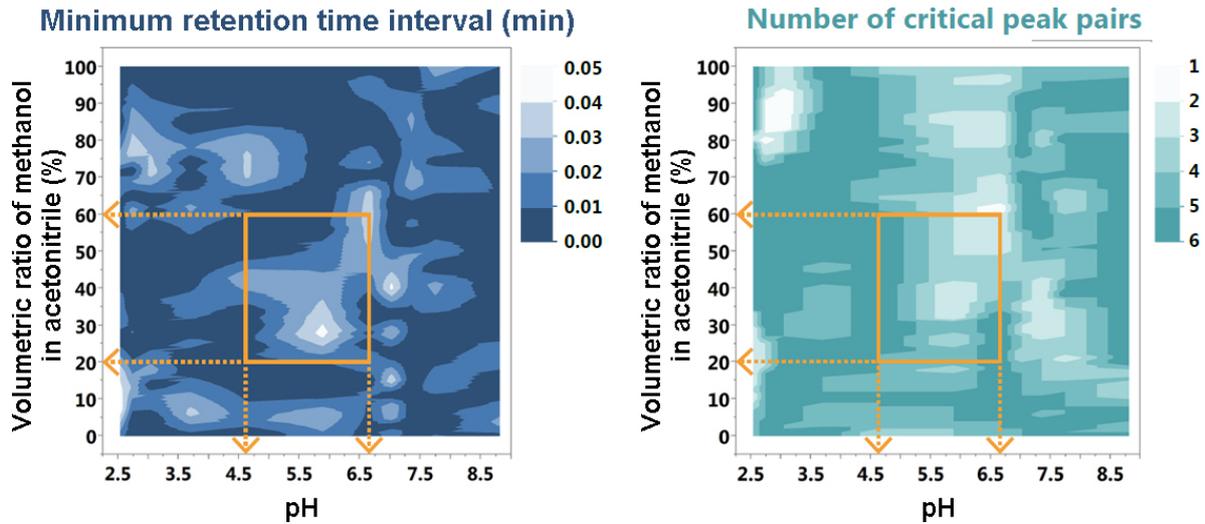


Figure 6 人工ニューラルネットワーク解析によるモデリングを実施した水相 pH および 2 成分有機相組成範囲。

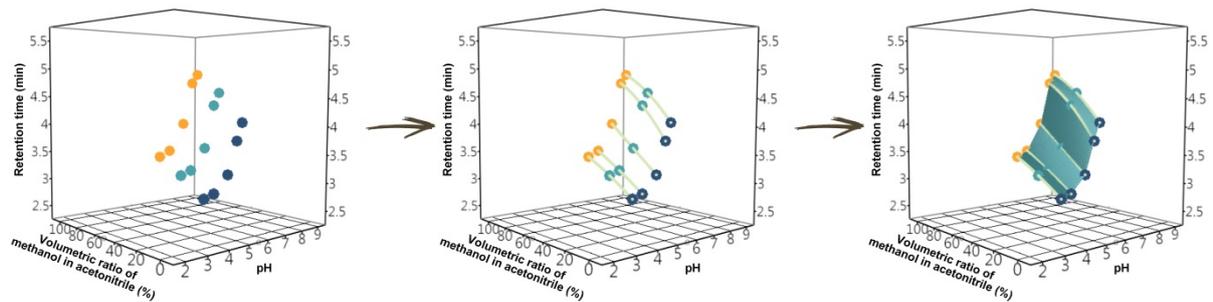


Figure 7 実測値に対する 2 成分有機相組成軸方向の重回帰モデリングと続く人工ニューラルネットワーク解析(ANN)によるモデリングの模式図。クローズドサークルはアセトニトリル中のメタノール容量比として紺色) 0%、水色) 50%および橙色) 100%における実測値を、実線は重回帰モデルによる予測値を、塗りつぶされた面は ANN モデルの予測値を示す。

Figure 7はFigure 6に示した範囲において、最終的な保持予測値を取得するまでの模式図を示す。水相 pH、2成分有機相組成および保持時間よりなる空間は、実測値に対する重回帰モデルによってストライプ状に充足され、さらに ANN モデリングによって面状に覆われる。これによって、範囲内の任意の点における予測値を取得可能となる。実際の ANN モデリングに際しては、水相 pH および有機相組成に対する分離状態をより詳細に評価する目的で、H1Bs の保持時間だけではなく、各化合物の保持時間差の絶対値も併せてモデル化した。

検討に用いた H1Bs は 16 種類であることから、最大で 120 組のピークの組が存在するが、このうち実測されたクロマトグラムより、分離を検討するうえで考慮すべきと判断された 26 組について、保持時間差の絶対値のモデリングを実施した。ANN パラメータとして中間層を 1 層、中間ノード数を 10、活性化関数は Tanh 関数とした。ANN モデルのフィッティング結果を Table 1 に示した。なお、式(4)より得た保持時間予測値および保持時間差予測値データは無作為抽出によりその一部を検証用データとし、残りを学習に用いる教師データとした。H1Bs の保持時間に対するフィッティングでは、学習および検証の両プロセスにおいて決定係数は全て 1 であった。加えて RMSE の最大値は学習プロセスで 0.007、検証プロセスで 0.009 であり、極めて良好なフィッティングが得られた。一方で、保持時間差の絶対値を応答としたフィッティングにおいて、学習および検証の両プロセスにおける決定係数の最小値は各々 0.839 および 0.822、RMSE の最大値は各々 0.023 および 0.030 であり、保持時間に対するフィッティング結果と比べるとやや劣る結果であった。これは、移動相条件の組み合わせによってはピークの溶出順序が入れ替わるなど、保持時間差の絶対値は保持時間に比べてより複雑な挙動を示すことに由来すると考えられる。しかしながら、得られた ANN モデルの RMSE は最大で 0.030 と見積もられており、実測したピーク幅より概算した分離度として約 1.5 程度の誤差であることから、分離条件の最適化を行う上で十分な予測精度が得られていると判断し、応答曲面法による最適条件探索を実施した。

Table 1 ANNによるH1Bs保持時間および保持時間差へのフィッティング結果

	学習					検証				
	決定 係数	RMSE	偏差 の平均	負の 対数尤度	度数 合計	決定 係数	RMSE	偏差 の平均	負の 対数尤度	度数 合計
amoxapine	1.000	0.002	0.002	-633.0	136	1.000	0.003	0.002	-294.6	69
brompheniramine	1.000	0.001	0.001	-744.7	136	1.000	0.001	0.001	-352.2	69
cyproheptadine	1.000	0.007	0.005	-485.8	136	1.000	0.009	0.006	-230.2	69
clemastine	1.000	0.005	0.003	-526.9	136	1.000	0.008	0.005	-235.1	69
chlorpheniramine	1.000	0.001	0.001	-793.3	136	1.000	0.001	0.001	-379.4	69
diphenhydramine	1.000	0.001	0.001	-735.6	136	1.000	0.002	0.001	-346.0	69
desloratadine	1.000	0.001	0.001	-753.1	136	1.000	0.001	0.001	-378.8	69
diphenylpyraline	1.000	0.002	0.001	-651.9	136	1.000	0.003	0.002	-298.6	69
epinastine	1.000	0.001	0.001	-731.1	136	1.000	0.001	0.001	-359.6	69
hydroxyzine	1.000	0.004	0.003	-558.3	136	1.000	0.005	0.004	-271.8	69
ketotifen	1.000	0.003	0.002	-610.9	136	1.000	0.003	0.002	-295.8	69
loratadine	1.000	0.001	0.001	-775.1	136	1.000	0.001	0.001	-370.6	69
mequitazine	1.000	0.001	0.001	-715.1	136	1.000	0.002	0.001	-346.3	69
olopatadine	1.000	0.001	0.001	-795.9	136	1.000	0.001	0.001	-391.6	69
promethazine	1.000	0.007	0.005	-481.2	136	1.000	0.009	0.007	-226.7	69
triprolidine	1.000	0.002	0.002	-644.9	136	1.000	0.003	0.002	-298.9	69
ΔtR amoxapine-diphenylpyraline	0.976	0.006	0.004	-502.0	136	0.976	0.007	0.005	-247.1	69
ΔtR amoxapine-mequitazine	0.991	0.014	0.009	-388.9	136	0.987	0.017	0.013	-182.0	69
ΔtR amoxapine-promethazine	1.000	0.004	0.002	-574.3	136	1.000	0.004	0.003	-286.6	69
ΔtR brompheniramine-desloratadine	0.999	0.004	0.003	-558.2	136	0.999	0.004	0.003	-279.3	69
ΔtR brompheniramine-ketotifen	0.995	0.007	0.005	-478.2	136	0.992	0.009	0.007	-225.5	69
ΔtR brompheniramine-triprolidine	1.000	0.001	0.001	-707.3	136	1.000	0.002	0.002	-331.1	69
ΔtR cyproheptadine-clemastine	0.999	0.006	0.004	-509.3	136	0.998	0.007	0.005	-243.2	69
ΔtR cyproheptadine-hydroxyzine	0.998	0.006	0.005	-505.1	136	0.997	0.009	0.007	-230.4	69
ΔtR cyproheptadine-promethazine	1.000	0.001	0.001	-742.8	136	1.000	0.001	0.001	-368.8	69
ΔtR clemastine-hydroxyzine	0.997	0.011	0.008	-421.4	136	0.995	0.013	0.010	-202.0	69
ΔtR clemastine-loratadine	0.995	0.023	0.018	-317.5	136	0.993	0.030	0.022	-144.6	69
ΔtR diphenhydramine-desloratadine	0.997	0.005	0.004	-521.0	136	0.997	0.007	0.005	-243.9	69
ΔtR diphenhydramine-ketotifen	1.000	0.003	0.002	-610.3	136	1.000	0.004	0.003	-290.1	69
ΔtR diphenhydramine-triprolidine	0.839	0.008	0.006	-459.2	136	0.822	0.010	0.008	-217.5	69
ΔtR desloratadine-diphenylpyraline	1.000	0.002	0.002	-636.2	136	1.000	0.003	0.002	-300.5	69
ΔtR desloratadine-ketotifen	1.000	0.003	0.002	-576.4	136	1.000	0.004	0.003	-284.4	69
ΔtR desloratadine-triprolidine	0.999	0.003	0.002	-596.5	136	0.999	0.004	0.003	-286.7	69
ΔtR diphenylpyraline-mequitazine	0.994	0.012	0.009	-404.4	136	0.987	0.019	0.013	-175.6	69
ΔtR diphenylpyraline-promethazine	1.000	0.006	0.004	-501.2	136	0.999	0.007	0.006	-241.3	69
ΔtR epinastine-ketotifen	1.000	0.004	0.003	-572.4	136	1.000	0.004	0.003	-278.3	69
ΔtR epinastine-olopatadine	0.981	0.009	0.006	-449.0	136	0.977	0.010	0.006	-217.1	69
ΔtR hydroxyzine-mequitazine	1.000	0.007	0.005	-486.1	136	0.999	0.009	0.007	-228.2	69
ΔtR hydroxyzine-promethazine	0.999	0.006	0.004	-509.6	136	0.999	0.008	0.006	-233.8	69
ΔtR ketotifen-olopatadine	1.000	0.008	0.006	-467.6	136	0.999	0.011	0.008	-212.8	69
ΔtR ketotifen-triprolidine	0.993	0.013	0.008	-396.0	136	0.984	0.018	0.012	-179.3	69
ΔtR mequitazine-promethazine	0.998	0.011	0.008	-420.4	136	0.998	0.014	0.011	-196.1	69

RMSE: root mean square error

Figure 8 は得られた ANN モデルより構成した応答曲面である。モデリングを行った 26 組のピークペアのうち、特に分離が難しいと予測されたものは amoxapine–diphenylpyraline、epinastine–ketotifen、diphenhydramine–triprolidine および mequitazine–promethazine の 4 組であった。これら 4 組のピークの保持時間差 (Δt_R) を指標に移動相条件範囲を制限した結果、分離の可能性が最も高い点として pH 5.3、アセトニトリル中のメタノール比として 35%が見出された。また、分離を維持可能な推定区間として、pH 5.3 \pm 0.1、アセトニトリル中のメタノール比として 35% \pm 5%が見出された。これら水相 pH および有機相組成の組み合わせ 9 条件における保持時間の実測値と ANN モデルより得られた予測値の相関を解析した結果(Figure 9)、決定係数は 0.9973、RMSE 値は 0.04 であり、極めて高い予測精度を示した。さらに、回帰直線の y 切片は-0.082、勾配は 1.019 であり、ほぼ理想的な相関が認められた。

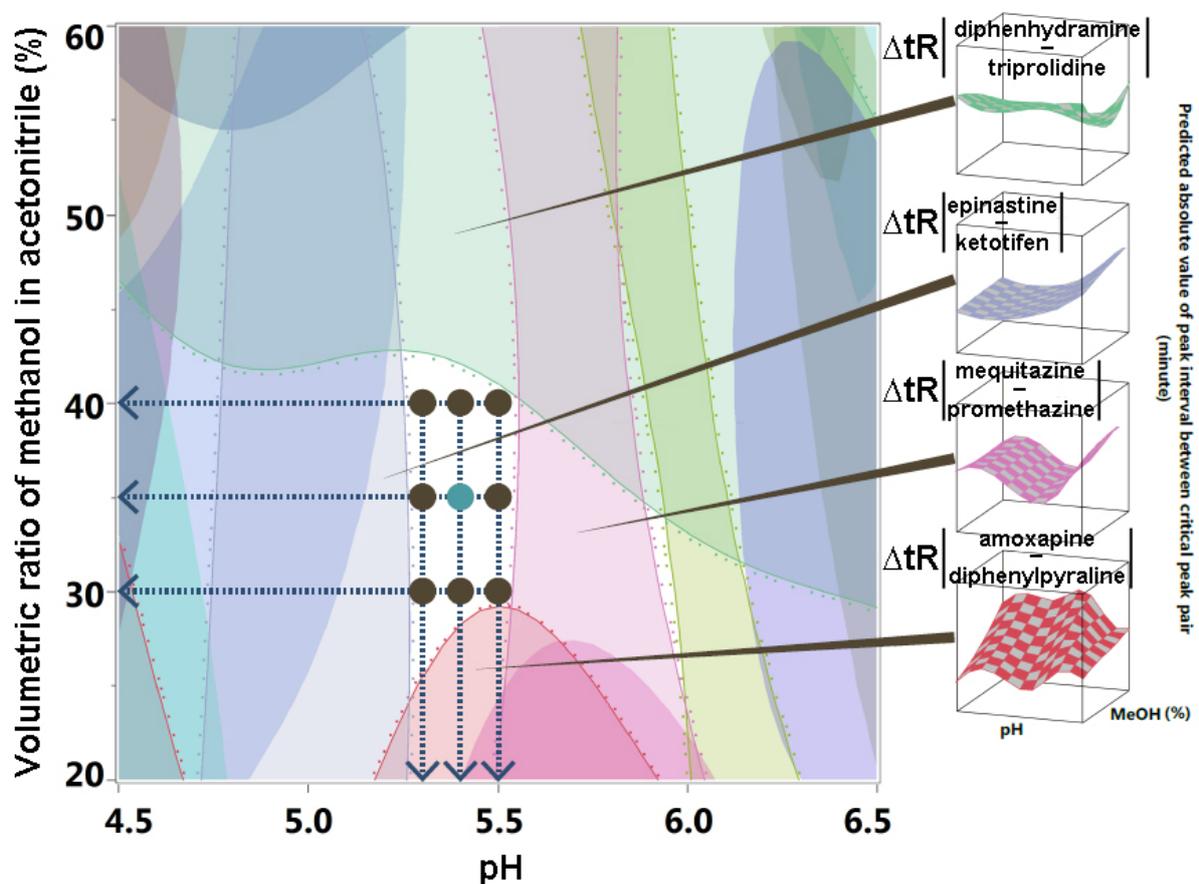


Figure 8 人工ニューラルネットワーク解析モデルより構成した応答曲面。クローズドサークルは pH 5.3 \pm 0.1、アセトニトリル中のメタノール比として 35% \pm 5%の合計 9 組の条件を示す。応答曲面上の Δt_R 値の制限閾値は amoxapine–diphenylpyraline、epinastine–ketotifen、diphenhydramine–triprolidine および mequitazine–promethazine について各々 0.002、0.02、0.045 および 0.08 を示す。

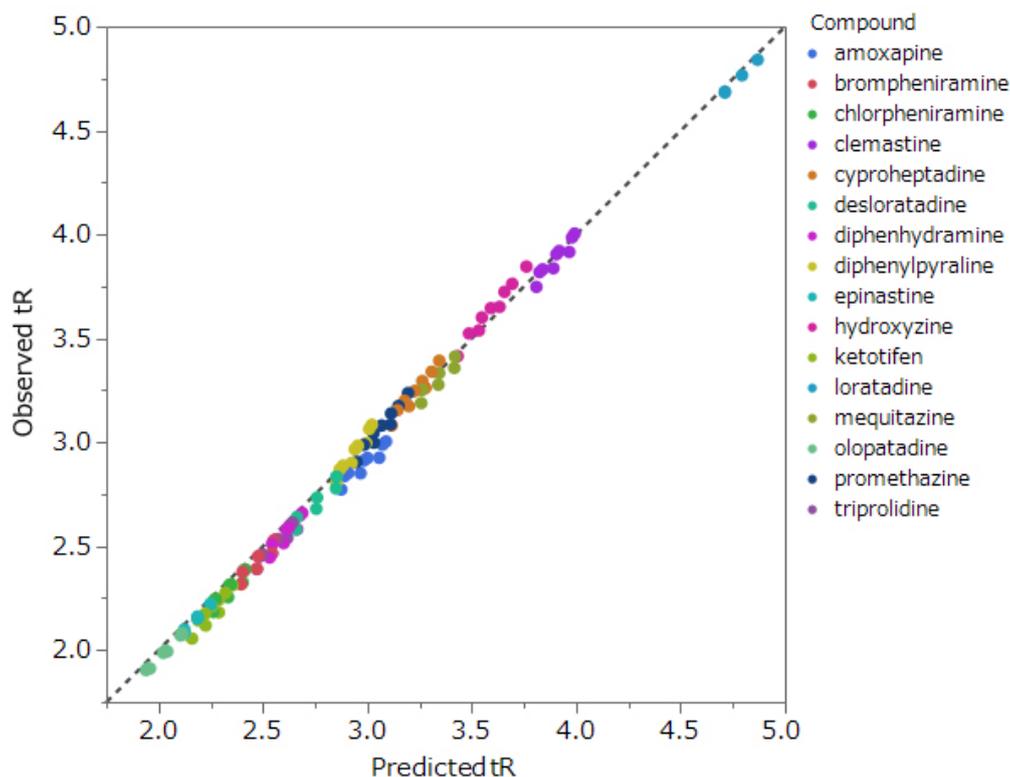


Figure 9 水相 pH 5.2、pH 5.3 および pH 5.4 各々について、アセトニトリル中のメタノール比として 30%、35%および 40%を組み合わせた、計 9 組の条件における H1Bs 保持時間の予測値と実測値の相関。破線は y 切片 0、勾配 1 の理想的相関を示す。各化合物の凡例は図中に表示。

Figure 10 には応答曲面より見出された 9 条件におけるクロマトグラムを、Table 2 には各ピーク間の分離度を示した。中心条件 (pH 5.3、35%メタノール) において、16 種類の H1Bs は分離を達成しており、本手法の有用性が示された。また、水相 pH および有機相組成に恣意的に変動を与えた結果、一部のピークの実測値が不良となったものの、16 成分全てのピークトップを確認することが可能であった。これら移動相条件の変動に対する分離悪化のリスクとして、Figure 8 に示したように、メタノール含量が増加することで、diphenhydramine–triprolidine 間の分離が、逆にメタノール含量が低下することで amoxapine–diphenylpyraline 間の分離が、水相の pH 値が低下することで epinastine–ketotifen 間の分離が悪化するという予測結果について、Figure 10 に示したように、クロマトグラム上で実際に分離が悪化する傾向が認められた。その一方、水相 pH の上昇により mequitazine–promethazine 間の分離が悪化するとの予測結果に対し、実際のクロマトグラムにおいて認められた変化は cyproheptadine–mequitazine 間の分離悪化であり、ANN モデルは常に高精度な予測を与えるわけではないという可能性が示唆された。しかしながら、本法を用いることで一定の範囲内における水相 pH および 2 成分有機相組成の同時最適化は達成され、最終的に 16 種類の H1Bs を分離することが可能であった。

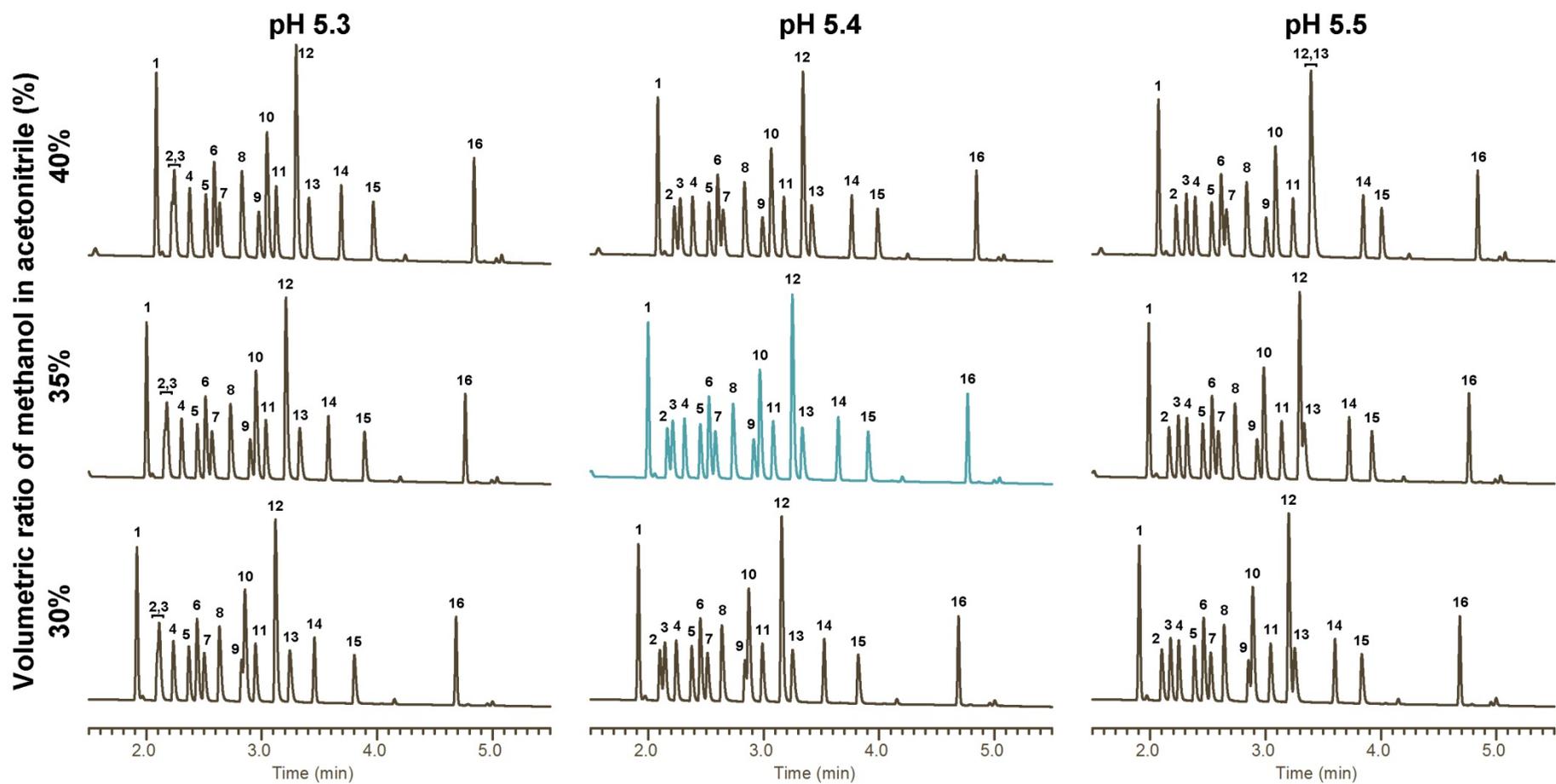


Figure 10 水相 pH 5.2、pH 5.3 および pH 5.4 各々について、アセトニトリル中のメタノール比として 30%、35% および 40% を組み合わせた、計 9 組の条件におけるクロマトグラム。1: olopatadine, 2: epinastine, 3: ketotifen, 4: chlorpheniramine, 5: brompheniramine, 6: triprolidine, 7: diphenhydramine, 8: desloratadine, 9: amoxapine, 10: diphenylpyraline, 11: promethazine, 12: cyproheptadine, 13: mequitazine, 14: hydroxyzine, 15: clemastine, 16: loratadine

Table 2 ANN モデル予測値より見出された最適条件およびその周辺領域において実測したピーク分離度

pH	Resolution								
	5.3			5.4			5.5		
volumetric ratio of methanol in acetonitrile (%)	30	35	40	30	35	40	30	35	40
olopatadine	4.1	N.A.	N.A.	5.1	4.6	3.9	5.4	4.9	4.2
epinastine	N.A.	N.A.	N.A.	1.1	1.1	1.2	2.0	2.1	2.2
ketotifen	2.4	N.A.	N.A.	2.4	2.5	2.6	1.8	1.9	1.9
chlorpheniramine	3.5	3.6	3.6	3.5	3.6	3.6	3.5	3.6	3.6
brompheniramine	1.9	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	2.0	2.0	2.1
triprolidine	1.5	1.3	1.1	1.5	1.3	1.1	1.5	1.3	1.1
diphenhydramine	3.1	3.7	4.4	2.9	3.5	4.1	2.7	3.3	3.9
desloratadine	N.A.	4.1	3.4	N.A.	4.2	3.6	5.1	4.5	3.9
amoxapine	N.A.	1.2	1.7	N.A.	1.3	1.8	0.9	1.4	1.9
diphenylpyraline	2.2	2.1	2.0	2.8	2.7	2.6	3.7	3.7	3.7
promethazine	4.3	4.4	4.4	4.1	4.2	4.2	3.9	3.9	3.5
cyproheptadine	2.9	2.8	2.6	2.2	2.0	1.7	1.2	N.A.	N.A.
mequitazine	5.4	6.2	6.9	6.7	7.6	8.4	8.4	N.A.	10.7
hydroxyzine	9.3	8.4	7.4	7.7	6.8	5.8	6.1	5.2	4.2
clemastine	24.7	24.5	24.6	24.0	24.0	23.9	23.6	23.5	23.3
loratadine									

N.A.: not available

第3節 小括

P. J. Schoenmakers 等により確立された、「溶解パラメータ理論に基づく保持予測式[式(1)および(2)]」より導かれた重回帰モデル[式(4)]は時間および勾配を予め規定したリニアグラジエント条件において、精度よく 2 成分有機相組成と保持の関係を表現可能であった。また、重回帰モデルより得られた予測値を最小ピーク間隔および近接するピークの組の数を指標に視覚化することで、最適な分離条件が存在すると推測される範囲を簡便に捉えることが可能であった。さらに、重回帰モデルより得られた各化合物の予測保持時間および保持時間差の絶対値と各移動相条件との関係は ANN によってモデル化が可能であり、一部の応答に対して予測精度を欠いたものの、最終的には 16 種類の HIBs の分離を達成した。加えて、本手法は観測可能な各化合物の保持時間情報のみに基づいた保持予測を達成しており、開発初期段階の医薬品原薬中に含まれる構造未知の不純物に対しても適用可能であると考えられる。

第2章 格子状モデルを用いた水相 pH および 2 成分有機相組成の網羅的かつ一斉最適化手法の確立

第1節 Bernoulli 分布を基としたイオン性化合物の水相 pH に対する保持予測モデルの構築

第1章において、重回帰モデルと ANN モデルを組み合わせた水相 pH および 2 成分有機相組成の同時最適化手法を確立した。しかしながら、最終的な分離予測は重回帰モデルの予測値を基に絞り込んだ範囲でのみ達成されており、広い条件範囲において網羅的最適化がなされたとは言えない。加えて、ANN モデルの予測精度を向上させる目的で教師データを追加しており、作業負担の面でも改善が望まれる。そこで本章ではイオン性化合物の水相 pH の変動に対する保持挙動のより具体的なモデル化と、広い条件範囲における網羅的最適化手法の確立を目的とし検討を行った。

RP-UHPLC において、イオン性化合物の保持はその化学構造に含まれる解離性官能基の荷電状態によって支配的な影響を受ける。一般に解離性官能基の脱荷電化は固定相への保持を増強し、反対に荷電化は固定相への保持を減弱させる。加えて、分子が複数の解離性官能基を有する場合、各々の官能基の荷電状態が個別に分子の保持に対し影響する。ここで UHPLC の流路に導入された溶質の解離性官能基はプロトン化-脱プロトン化の形態変換を繰り返している。したがって、分析カラムを通過する間の各形態の存在確率が最終的な保持を決定付けると考えられる。

Henderson-Hasselbalch 式として与えられるように、イオン性化合物の解離型および分子型の存在比は溶媒の水素イオン活量に依存する。

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]} = \text{pH} - \log \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]} \quad (5)$$

ここで、解離性官能基の分子型(C_m)とイオン型(C_i)の存在比の変化は、常に $C_i = 1 - C_m$ の関係が成り立つ 2 水準の変化であることから、任意の一定の pH 条件における C_m の存在確率 (p_{mol}) は Bernoulli 型の確率分布に従うと考えられ、以下のロジット式により表現される。

$$\text{logit}(p_{\text{mol}}) = \ln \left[\frac{C_m}{(1 - C_m)} \right] \quad (0 < C_m < 1, \text{pH} = \text{constant}) \quad (6)$$

したがって、pH の変動に対する p_{mol} の推移は式(6)の逆関数である、ロジスティック関数として表現され、酸性官能基について式(7)を、塩基性官能基について式(8)が与えられる。

$$p_{\text{mol,acid}} = \frac{1}{1 + e^{\rho(\text{pH}-K_M)}} \quad (7)$$

$$p_{\text{mol,base}} = \frac{1}{1 + e^{\rho(K_M-\text{pH})}} \quad (8)$$

ここで、 K_M はシグモイド型の確率曲線の中点における pH 値を、 ρ はシグモイド曲線の中点における傾きを示すパラメータである。前述のように、式(7)および(8)は解離性官能基の分子型の存在確率を表現する。イオン性化合物の逆相カラムへの保持は、イオン型において最も弱く、分子型において最も強くなることから、式(7)および(8)を溶質の保持係数を表す式へ誘導することで、式(9)および(10)が得られる。

$$k_A = \frac{I_s}{1 + e^{\rho(\text{pH}-K_M)}} + I_0 \quad (9)$$

$$k_B = \frac{I_s}{1 + e^{\rho(K_M-\text{pH})}} + I_0 \quad (10)$$

ここで、 I_0 はイオン型の保持の強さを、 I_s はイオン型と分子型の保持の強さの差を表す。したがって、式(9)および(10)の右辺の分数項は解離性官能基のプロトン化または脱プロトン化に伴って変動する保持の強さを表す。つまり、両式は分子のイオン型における保持の強さと解離性官能基の状態に依存した保持の変化を各々、異なる項としてモデルに含む。このため、複数の解離性官能基を有する化合物に対しては、式(11)–(13)のように分数項を多項化することで各解離性官能基が保持に及ぼす影響をモデル化可能だと考えられる。

$$k_{A+A} = \frac{I_{s1}}{1 + e^{\rho_1(\text{pH}-K_{M1})}} + \frac{I_{s2}}{1 + e^{\rho_2(\text{pH}-K_{M2})}} + I_0 \quad (11)$$

$$k_{B+B} = \frac{I_{s1}}{1 + e^{\rho_1(K_{M1}-\text{pH})}} + \frac{I_{s2}}{1 + e^{\rho_2(K_{M2}-\text{pH})}} + I_0 \quad (12)$$

$$k_{A+B} = k_{B+A} = \frac{I_{s1}}{1 + e^{\rho_1(\text{pH}-K_{M1})}} + \frac{I_{s2}}{1 + e^{\rho_2(K_{M2}-\text{pH})}} + I_0 \quad (13)$$

式(11)は2つの酸性解離性官能基を、式(12)は2つの塩基性解離性官能基を、式(13)は酸性

および塩基性の解離性官能基を1つずつ有する化合物の保持モデルとなる。

式(9)–(13)に示した保持予測モデルの妥当性を評価する目的で、第1章で用いた塩基性のHIBsに加え、Figure 11に示す酸性の非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs) 13化合物を評価化合物として用いた。

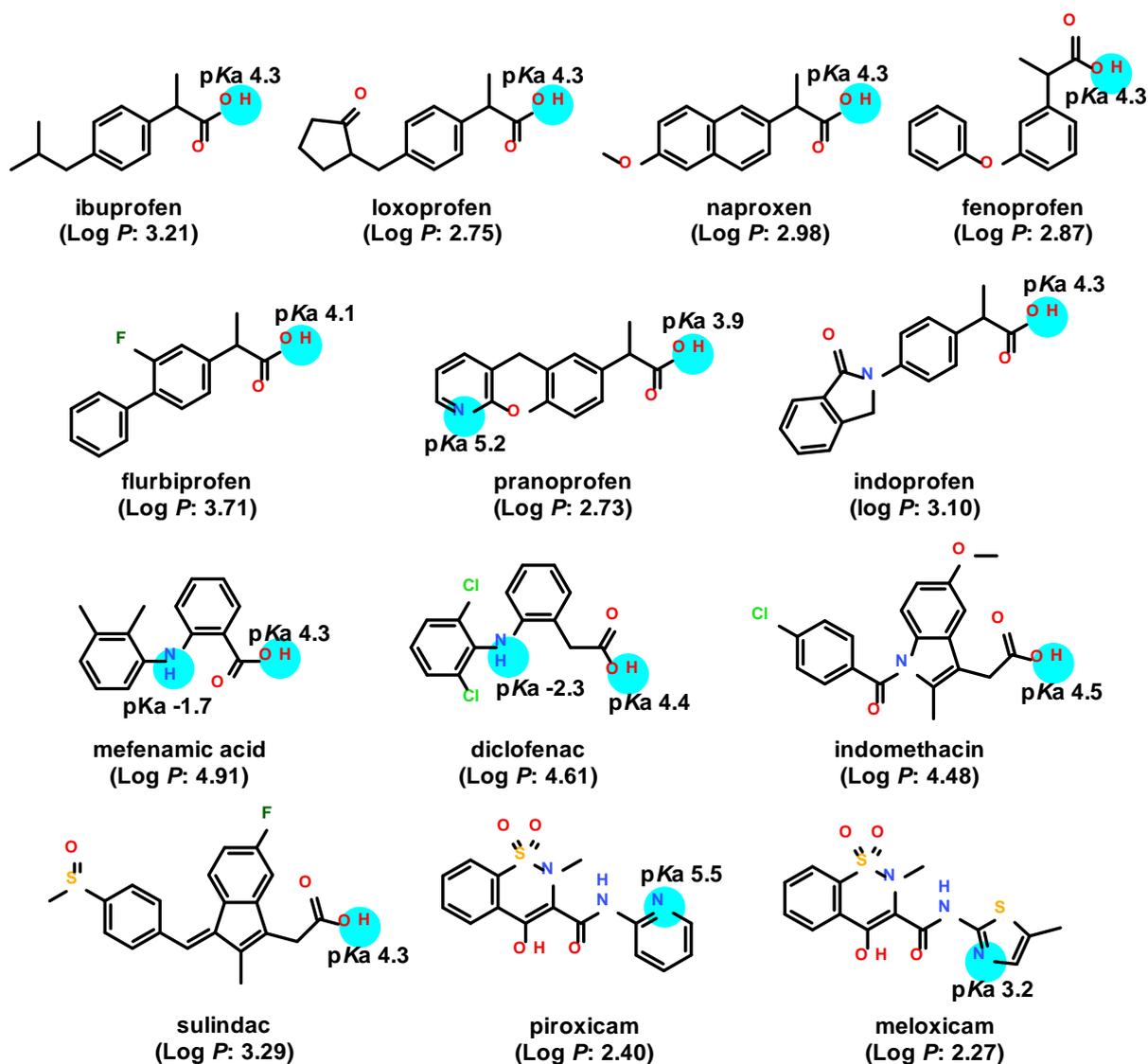


Figure 11 本研究に用いた非ステロイド性抗炎症薬の一般名および化学構造。pKa 値および Log P 値は ACD/Labs 2014 (Build 2726)を用いて算出した。

前述のように、イオン性化合物の保持は水相 pH 値に依存して大きく変動する。したがって、荷電状態に依らず確実にカラムより溶出させるためには、グラジエント条件の適用が好ましい。ここで、式(9)–(13)はグラジエント条件が保持に及ぼす影響を考慮していないことから、第1章の検討同様に時間および勾配を一定とした。一方で、共存する有機溶媒種がモデル化に及ぼす影響を評価するため、アセトニトリル中に含まれるメタノールの組成比として

0%、50%および100%の3種類の組成の有機相について各々モデル化を行った。なお、応答には試料溶液に添加した uracil の保持時間を t_0 とした各化合物の k 値を用いた。また、フィッティングに用いるロジスティックモデルを式(9)–(13)より選択する過程は次に示すとおりとした。pH 2.5~9.0 の11段階の pH に調整した水相を用いて実測した k 値を水相 pH 値に対してプロットし、変曲点が2つ以下と推察される場合は1つの解離性官能基に対するモデル[式(9)または(10)]を、変曲点が3つ以上4つ以下と推察される場合は2つの解離性官能基に対するモデル[式(11)–(13)]のいずれかとし、化合物の保持が水相 pH 塩基性化に対して減少している場合は酸性解離性官能基に対するモデルを、増大している場合は塩基性解離性官能基に対するモデルを選択した。得られたフィッティング結果のうち、水相 pH に対する保持挙動として代表的なものを Figure 12 に示した。

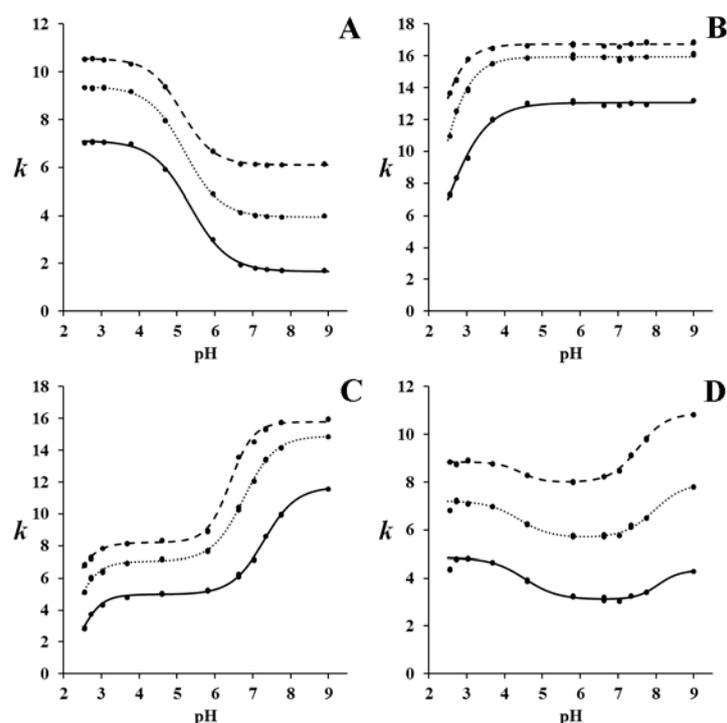


Figure 12 代表的な水相 pH に対する保持挙動のロジスティックモデルによるフィッティング結果。点はモデル化に用いた実測値を、線は得られたロジスティックモデルの軌跡を示す。A: loxoprofen、B: loratadine、C: triprolidine、D: olopatadine。実線：0% methanol in acetonitrile、点線：50% methanol in acetonitrile、破線：100% methanol in acetonitrile

ロジスティックモデルによる非線形回帰には Gauss-Newton 法を用いた。このため、例えば Figure 12C の酸性側の保持挙動のように、シグモイドカーブの midpoint や I_0 に相当するイオン型の保持の強さが実測値として得られていない場合には、回帰係数を一意に得ることができない可能性が生じる。したがって、 ρ および K_M にはとりうる値の範囲として各々 $1 \leq \rho \leq 5$ および $K_M \leq 0.5$ の制限を暫定的に設けた。また、 I_0 が明確に観測されていない場合には、 t_0 にお

ける保持係数として 0 を代入した。Table 3-5 には選択したロジスティックモデル、非線形回帰により得られた各パラメータおよび得られたロジスティックモデルの RMSE 値を示した。

16 種類の HIBs について 0% methanol in acetonitrile、50% methanol in acetonitrile および 100% methanol in acetonitrile を有機相とした際のロジスティックモデルの RMSE 値の最大値は各々 0.148、0.216 および 0.199 であり、13 種類の NSAIDs については各々 0.083、0.082 および 0.076 であった。したがって、式(9)–(13)に示したロジスティックモデルは、共存する有機相の組成に関わらず、酸性および塩基性化合物の水相 pH 値に対する保持挙動へ良好にフィッティング可能であった。一方で、Figure 12A に確認できるように、解離型と非解離型との間における保持の強さの差は共存する有機相の種類によって異なり、得られるシグモイドカーブは単純な平行移動とはならないことが明らかとなった。つまり、用いる有機相の影響を単純な補正項によって式(9)–(13)へ含めることは非常に困難であり、異なる有機相に対しては個別にモデル化を行う必要があると考えられる。なお、式(11)に示した 2 つの酸性解離性官能基を有する化合物は、検討に用いた化合物群には含まれなかったため、フィッティングの成否は評価できていないが、モデル構築の理論的背景を同じとする式(9)および(10)、式(12)および(13)において良好な結果が得られていることから、適切な化合物の保持挙動に対して同様に良好なフィッティングを得ることが可能だと考えられる。

Table 3 0% methanol in acetonitrile を有機相とした際のロジスティックモデルによる保持挙動のフィッティング結果

Analyte	Model	ρ_1	I_{s1}	K_{M1}	ρ_2	I_{s2}	K_{M2}	I_0	RMSE
amoxapine	B+B (Eq. 12)	4.919	5.998	2.218	2.035	3.935	6.890	(0)	0.064
brompheniramine	B+B (Eq. 12)	3.267	4.795	2.426	2.356	5.328	7.435	(0)	0.089
chlorpheniramine	B+B (Eq. 12)	3.430	4.381	2.496	2.370	5.271	7.467	(0)	0.088
clemastine	B+B (Eq. 12)	(5)	9.462	2.042	2.430	7.270	7.227	(0)	0.090
cyproheptadine	B+B (Eq. 12)	(5)	6.845	2.069	2.228	7.101	6.673	(0)	0.087
desloratadine	B+B (Eq. 12)	2.701	5.427	2.791	2.618	3.167	7.893	(0)	0.108
diphenhydramine	B+B (Eq. 12)	(5)	5.310	2.132	2.352	6.370	7.230	(0)	0.074
diphenylpyraline	B+B (Eq. 12)	(5)	6.318	2.091	2.340	5.826	7.195	(0)	0.071
epinastine	B+B (Eq. 12)	(5)	4.086	2.150	3.826	0.696	8.074	(0)	0.064
hydroxyzine	B+B (Eq. 12)	(5)	7.069	2.072	2.099	4.305	6.050	(0)	0.073
ketotifen	B+B (Eq. 12)	(5)	3.890	2.146	2.162	5.887	6.721	(0)	0.069
loratadine	B (Eq. 10)	1.854	13.066	2.421	-	-	-	(0)	0.148
mequitazine	B+B (Eq. 12)	(5)	7.677	2.070	2.504	5.197	7.889	(0)	0.063
olopatadine	A+B (Eq. 13)	2.291	1.741	4.529	3.470	1.227	8.054	3.110	0.059
promethazine	B+B (Eq. 12)	(5)	6.106	2.083	2.270	7.444	6.563	(0)	0.091
triprolidine	B+B (Eq. 12)	3.516	4.979	2.435	2.342	6.728	7.297	(0)	0.097
diclofenac	A (Eq. 9)	2.049	5.325	4.907	-	-	-	5.801	0.061
fenoprofen	A (Eq. 9)	1.996	5.900	5.317	-	-	-	4.284	0.063
flurbiprofen	A (Eq. 9)	1.988	5.755	5.135	-	-	-	4.823	0.059
ibuprofen	A (Eq. 9)	2.025	6.582	5.567	-	-	-	4.943	0.074
indomethacin	A (Eq. 9)	2.029	5.115	5.054	-	-	-	6.128	0.059
indoprofen	A (Eq. 9)	2.077	4.558	5.116	-	-	-	2.354	0.053
loxoprofen	A (Eq. 9)	1.997	5.452	5.351	-	-	-	1.663	0.056
mefenamic acid	A (Eq. 9)	1.895	6.422	5.178	-	-	-	6.208	0.069
meloxicam	A (Eq. 9)	2.155	5.010	4.293	-	-	-	3.559	0.029
naproxen	A (Eq. 9)	1.993	5.848	5.358	-	-	-	2.555	0.063
piroxicam	A (Eq. 9)	2.012	3.975	5.258	-	-	-	2.238	0.083
pranoprofen	A (Eq. 9)	2.202	4.538	5.196	-	-	-	1.018	0.074
sulindac	A (Eq. 9)	1.988	4.491	5.099	-	-	-	2.748	0.054

* K_M : シグモイドカーブの中心における pH 値、 ρ : シグモイドカーブの中心における傾き、 I_0 : 解離型の保持の強さ、 I_s : 非解離型と解離型の保持の強さの差、RMSE : root mean square error
 * 回帰計算において各パラメータの制限閾値で収束したものについては括弧付で示した。

Table 4 50% methanol in acetonitrile を有機相とした際のロジスティックモデルによる保持挙動のフィッティング結果

Analyte	Model	ρ_1	I_{s1}	K_{M1}	ρ_2	I_{s2}	K_{M2}	I_0	RMSE
amoxapine	B+B (Eq. 12)	3.736	8.725	1.963	2.304	4.280	6.399	(0)	0.102
brompheniramine	B+B (Eq. 12)	2.883	6.910	2.194	2.256	6.151	6.949	(0)	0.109
chlorpheniramine	B+B (Eq. 12)	2.933	6.406	2.278	2.342	6.130	7.018	(0)	0.114
clemastine	B+B (Eq. 12)	(5)	12.051	1.940	3.178	6.430	6.398	(0)	0.216
cyproheptadine	B+B (Eq. 12)	(5)	9.259	1.988	3.438	6.836	6.202	(0)	0.172
desloratadine	B+B (Eq. 12)	2.419	8.399	2.517	2.296	4.099	7.477	(0)	0.108
diphenhydramine	B+B (Eq. 12)	(5)	7.178	1.995	2.396	6.934	6.754	(0)	0.089
diphenylpyraline	B+B (Eq. 12)	(5)	8.424	2.019	2.409	6.342	6.636	(0)	0.115
epinastine	B+B (Eq. 12)	1.320	6.018	0.649	2.419	0.899	8.187	(0)	0.090
hydroxyzine	B+B (Eq. 12)	1.181	10.063	(0.5)	3.210	4.798	5.804	(0)	0.123
ketotifen	B+B (Eq. 12)	(5)	5.544	2.013	2.507	6.601	6.330	(0)	0.122
loratadine	B (Eq. 10)	2.436	15.942	2.206	-	-	-	(0)	0.111
mequitazine	B+B (Eq. 12)	4.069	10.261	1.855	2.364	5.854	7.301	(0)	0.113
olopatadine	A+B (Eq. 13)	2.383	1.544	4.377	2.502	2.294	7.956	5.671	0.063
promethazine	B+B (Eq. 12)	(5)	8.488	2.030	3.227	7.266	6.164	(0)	0.152
triprolidine	B+B (Eq. 12)	3.163	7.047	2.211	2.416	7.852	6.760	(0)	0.102
diclofenac	A (Eq. 9)	2.262	4.510	4.760	-	-	-	9.013	0.051
fenoprofen	A (Eq. 9)	2.166	5.286	5.159	-	-	-	7.220	0.059
flurbiprofen	A (Eq. 9)	2.167	5.165	4.979	-	-	-	7.810	0.055
ibuprofen	A (Eq. 9)	2.134	5.711	5.392	-	-	-	8.277	0.082
indomethacin	A (Eq. 9)	2.258	4.164	4.854	-	-	-	9.603	0.062
indoprofen	A (Eq. 9)	2.217	4.508	4.998	-	-	-	4.786	0.044
loxoprofen	A (Eq. 9)	2.105	5.448	5.196	-	-	-	3.941	0.041
mefenamic acid	A (Eq. 9)	2.048	5.668	5.020	-	-	-	9.495	0.068
meloxicam	A (Eq. 9)	2.041	4.860	4.093	-	-	-	5.834	0.028
naproxen	A (Eq. 9)	2.121	5.731	5.218	-	-	-	4.983	0.049
piroxicam	A (Eq. 9)	2.132	3.686	5.028	-	-	-	4.333	0.070
pranoprofen	A (Eq. 9)	2.267	4.598	5.060	-	-	-	3.392	0.062
sulindac	A (Eq. 9)	2.167	4.529	4.909	-	-	-	5.681	0.042

* K_M : シグモイドカーブの中間点における pH 値、 ρ : シグモイドカーブの中間点における傾き、 I_0 : 解離型の保持の強さ、 I_s : 非解離型と解離型の保持の強さの差、RMSE : root mean square error
 * 回帰計算において各パラメータの制限閾値で収束したものについては括弧付で示した。

Table 5 100% methanol in acetonitrile を有機相とした際のロジスティックモデルによる保持挙動のフィッティング結果

Analyte	Model	ρ_1	I_{s1}	K_{M1}	ρ_2	I_{s2}	K_{M2}	I_0	RMSE
amoxapine	B+B (Eq. 12)	1.879	10.475	1.084	3.515	4.019	6.258	(0)	0.125
brompheniramine	B+B (Eq. 12)	3.146	8.221	2.075	2.732	6.003	6.533	(0)	0.149
chlorpheniramine	B+B (Eq. 12)	2.896	7.652	2.112	2.586	6.213	6.605	(0)	0.129
clemastine	B+B (Eq. 12)	1.759	13.209	0.500	4.918	5.770	6.265	(0)	0.159
cyproheptadine	B+B (Eq. 12)	1.595	10.859	(0.5)	4.541	6.285	6.154	(0)	0.134
desloratadine	B+B (Eq. 12)	2.707	10.221	2.303	2.172	4.119	7.005	(0)	0.082
diphenhydramine	B+B (Eq. 12)	2.823	8.316	1.131	3.123	6.840	6.437	(0)	0.179
diphenylpyraline	B+B (Eq. 12)	1.947	9.560	0.698	3.559	6.233	6.361	(0)	0.185
epinastine	B+B (Eq. 12)	1.570	7.174	(0.5)	1.669	1.305	8.126	(0)	0.056
hydroxyzine	B+B (Eq. 12)	1.332	11.640	(0.5)	3.423	4.668	5.865	(0)	0.131
ketotifen	B+B (Eq. 12)	1.474	6.584	(0.5)	3.345	6.685	6.182	(0)	0.135
loratadine	B (Eq. 10)	2.573	16.742	1.968	-	-	-	(0)	0.109
mequitazine	B+B (Eq. 12)	2.029	11.407	0.570	2.382	5.665	6.822	(0)	0.125
olopatadine	A+B (Eq. 13)	3.424	0.856	4.417	2.707	2.898	7.534	7.989	0.062
promethazine	B+B (Eq. 12)	1.529	10.059	(0.5)	4.298	6.721	6.145	(0)	0.133
triprolidine	B+B (Eq. 12)	2.883	8.212	1.993	3.285	7.576	6.403	(0)	0.199
diclofenac	A (Eq. 9)	2.214	3.511	4.745	-	-	-	11.135	0.045
fenoprofen	A (Eq. 9)	2.304	3.903	5.052	-	-	-	9.781	0.056
flurbiprofen	A (Eq. 9)	2.375	3.777	4.920	-	-	-	10.374	0.049
ibuprofen	A (Eq. 9)	2.252	3.968	5.276	-	-	-	11.122	0.076
indomethacin	A (Eq. 9)	2.335	2.749	4.742	-	-	-	12.012	0.051
indoprofen	A (Eq. 9)	2.450	3.534	4.909	-	-	-	7.077	0.043
loxoprofen	A (Eq. 9)	2.346	4.456	5.121	-	-	-	6.102	0.036
mefenamic acid	A (Eq. 9)	2.151	4.739	5.115	-	-	-	11.554	0.060
meloxicam	A (Eq. 9)	1.839	3.900	3.989	-	-	-	7.674	0.051
naproxen	A (Eq. 9)	2.284	4.705	5.127	-	-	-	7.335	0.047
piroxicam	A (Eq. 9)	2.428	2.682	4.916	-	-	-	6.141	0.047
pranoprofen	A (Eq. 9)	2.445	3.743	4.979	-	-	-	6.020	0.037
sulindac	A (Eq. 9)	2.414	3.456	4.819	-	-	-	8.349	0.047

* K_M : シグモイドカーブの中間点における pH 値、 ρ : シグモイドカーブの中間点における傾き、 I_0 : 解離型の保持の強さ、 I_s : 非解離型と解離型の保持の強さの差、RMSE : root mean square error
 * 回帰計算において各パラメータの制限閾値で収束したものについては括弧付で示した。

第2節 格子状モデルを用いた広範な水相 pH および 2 成分有機相組成に対する保持予測手法の構築および分離条件最適化手法の確立

水相 pH に対する解離性官能基の分子型の存在確率より導いたロジスティックを用いることで、共存する 2 成分有機相の組成に関わらず、イオン性化合物の水相 pH に対する保持挙動を良好にモデル化可能であった。しかしながら、前節でも述べたとおり、式(9)–(13)は教師データの実測条件とは異なる有機相組成を用いる際に改めてモデル化を行う必要がある。一方で、式(4)に示した重回帰モデルはある一定の pH 条件下、2 成分有機相組成の変化に対する保持の変化に対して良好なフィッティングを与える。ここで、式(4)の回帰に必要な有機相組成の水準数は最低 3 であり、誤差自由度 0 のフィッティングにおいても高い予測精度を示すことが第 1 章 第 1 節の検討結果より明らかとなっている。したがって、3 水準の 2 成分有機相組成について各々ロジスティックモデルを得た場合、任意の水相 pH 値における保持予測値の組に対して式(4)によるフィッティングが可能となる。つまり、3 つのロジスティックモデルは重回帰モデルにより、2 成分有機相組成軸方向に向かって仮想的に連結され、格子状のモデルを形成する。格子状モデルの概念図を Figure 13 に示した。

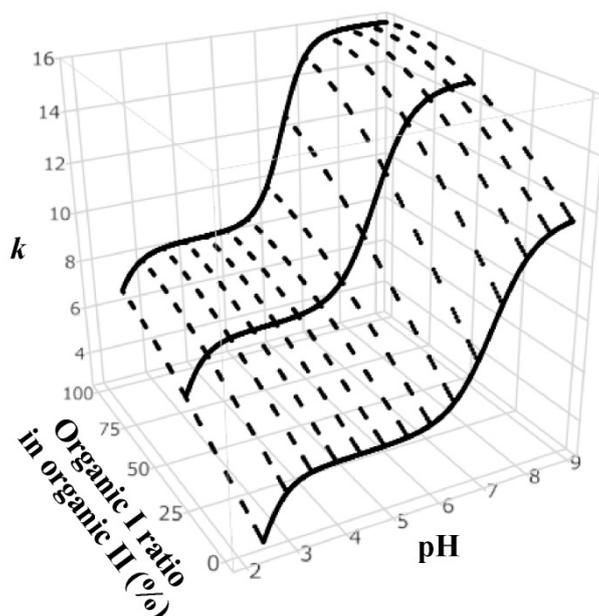


Figure 13 格子状モデルの概念図。3 水準の 2 成分有機相組成において得られた 3 つのロジスティックモデルは重回帰モデルにより仮想的に連結される。

格子状モデルの妥当性を検証するため、本章 第 1 節において 16 種類の H1Bs および 13 種類の NSAIDs の保持係数について、3 水準の有機相組成に対して得られたロジスティックモデルに対し重回帰モデルによる仮想連結を行った。なお、各ロジスティックモデルは溶質の保持係数を応答とすることから、以下に示すように式(4)の応答は保持係数の自然対数とした。

$$\ln k = a_0 + a_1\phi_{\text{OrgI/II}} + a_2\phi_{\text{OrgI/II}}^2 \quad (14)$$

Figure 14 はロジスティックモデルの回帰に用いた 11 段階の pH とは異なる、10 段階の pH に調整した水相とアセトニトリル中のメタノール比として 25% および 75% とした有機相を用いて得られた実測値に対し、格子状モデルより得られた予測値との相関性を解析した結果である。

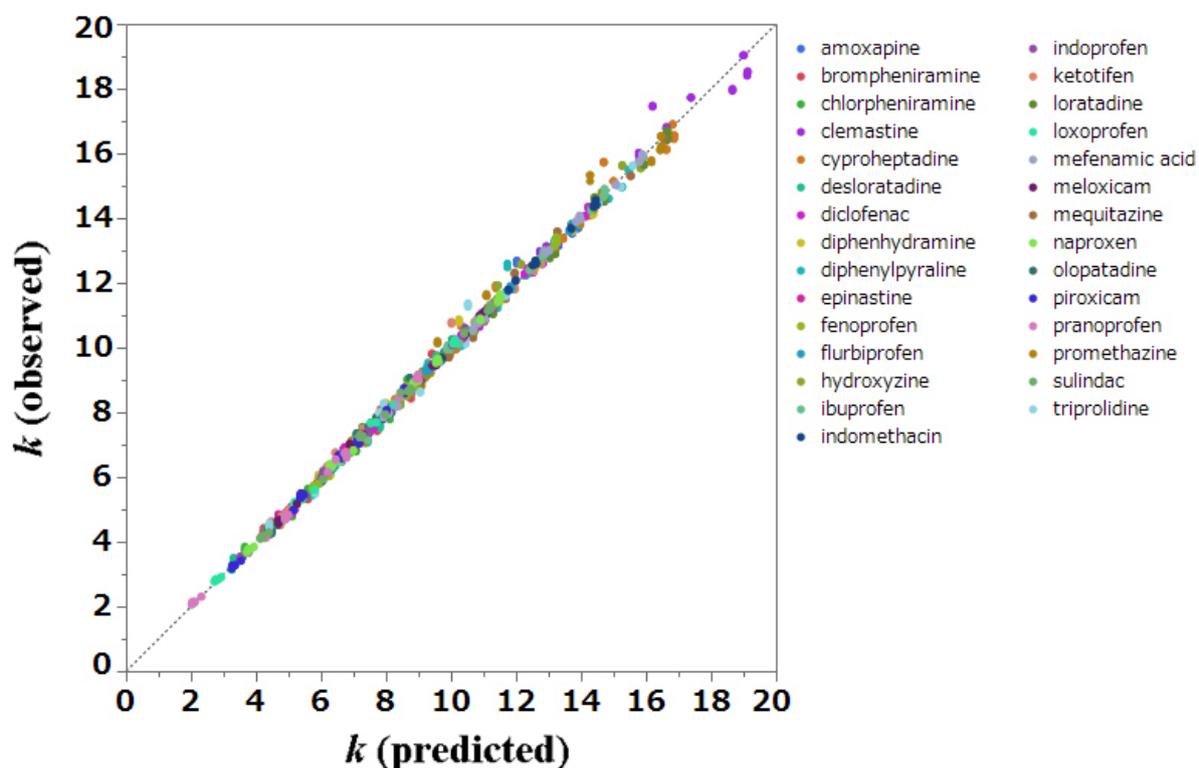


Figure 14 格子状モデル予測値と実測した保持係数の相関性解析結果。対角線は y 切片 0、傾き 1 の理想的な相関を示す。各化合物の凡例は図中に表示。

予測値と実測値間の決定係数は 0.9972、RMSE は 0.1881 であり、格子状モデルは極めて高精度な予測が可能であった。また、回帰直線の y 切片および傾きは各々 -0.007 および 1.000 であり、バイアスはほぼ認められなかった。したがって、本研究において新たに提案した格子状モデルは、RP-UHPLC において酸性、塩基性を問わずイオン性化合物の保持予測に適用可能な、極めて有効なモデルであると示された。加えて、格子状モデルを構成するロジスティックモデルは、化合物の解離性官能基の数に応じて変曲点を増減させることが可能であり、複数の解離性官能基を有するイオン性化合物の保持予測手法としても応用可能であった。

格子状モデルは酸性から塩基性の広い水相 pH 範囲にわたり、任意の 2 成分有機相組成に応じた化合物の保持予測値を出力する。したがって、分離最適化手法として応用するためには、化合物そのものの保持を示す情報から化合物間の分離を示す情報へと変換する必要がある。第 1 章 第 1 節において用いた二種類のスコア S_{AK} および S_{CP} はこの目的において有効な情報の変換手法であった。その一方で各スコアが持つ情報は、2 つのカラーマップに分割し

て描かれており総合的な評価が困難であった。そこで、スケールの異なる $S_{\Delta k}$ および S_{CP} を統合するため式(15)に従い標準化を行った。

$$S' = \frac{(S_i - S_{\text{Min}})}{(S_{\text{Max}} - S_{\text{Min}})} \quad (14)$$

その後、標準化されたスコアである $S'_{\Delta k}$ および S'_{CP} を式(15)に従って S'_T へ統合した。

$$S'_T = S'_{\Delta k} \times wt + (1 - S'_{CP}) \quad (15)$$

ここで、 wt は $S'_{\Delta k}$ および S'_{CP} の寄与の大きさを調整するための重みを示す。前述のように $S'_{\Delta k}$ は任意の pH および 2 成分有機相組成の組みあわせにおける分離の達成度を示すスコアであり、最適条件の探索においてより重要な役割を担う。したがって、重み係数は 2 以上に設定することが望ましいと考えられる。一方で重み係数が大きすぎる場合、 S'_{CP} の寄与が十分に S'_T へ反映されなくなるため、暫定的に $wt = 2$ を第一選択として設定した。

Figure 15 は $wt = 2$ として格子状モデルの予測値より構成した S'_T のカラーマップである。 S'_T の算出に用いるクロマトグラムの混雑さの指標である S_{CP} の閾値は、保持係数の差として 0.3 以下とした。これは実測されたピーク幅より分離度 2.0 ± 1.5 程度となるピーク間距離に相当する。 S'_T のカラーマップにおいて、ピーク分離に適すると予測される高スコア領域は白色で示される。つまり、水相 pH および 2 成分有機相組成の最適な組み合わせの候補として H1Bs について pH 5.5/35% methanol ($S'_T = 2.34$) および pH 6.8/50% methanol ($S'_T = 2.48$) の 2 条件が、NSAIDs について pH 3.4/15% methanol ($S'_T = 2.39$)、pH 4.2/30% methanol ($S'_T = 2.72$) および pH 8.0/70% methanol ($S'_T = 2.43$) の 3 条件が見出された。

Figure 16 に示すクロマトグラムは、スコアマップより見出された各候補条件における実測結果である。Figure 16B に示される様に、pH 6.8/50% methanol の条件では amoxapine および mequitazine のピークがやや近接しているものの、見出された 5 条件全てにおいて全成分の分離を達成した。そのうえ NSAIDs に関しては、見出された 3 つの候補条件全てにおいてベースライン分離が達成された。Figure 15B に示されるように、NSAIDs の分離に対する候補条件は酸性、塩基性およびその中間条件の全てにおいて見出されている。その一方で、Figure 15A に示されるように、H1Bs の分離に対する候補条件は中間的な pH 領域でのみ見出されている。これは、NSAIDs と比較して、H1Bs は逆相カラムへの保持選択性が類似した化合物をより多く含む試料であり、その分離を達成するためには、わずかな pH の変化に対して保持選択性が大きく変動する領域において、水相 pH の繊細な調整が必要であったためと考えられる。

以上の結果より、格子状モデルを用いた保持予測手法は水相 pH および 2 成分有機相組成の網羅的かつ同時最適化に応用可能であると示された。加えてその予測精度は非常に高速な UHPLC のタイムレンジにおいても満足に足る水準であった。また、保持予測値に対するピーク分離の達成度と、クロマトグラム上でのピークの混雑さを指標としたスコア化手法は、両移動相条件の最適な組み合わせを迅速かつ簡便に把握するのに有用であった。

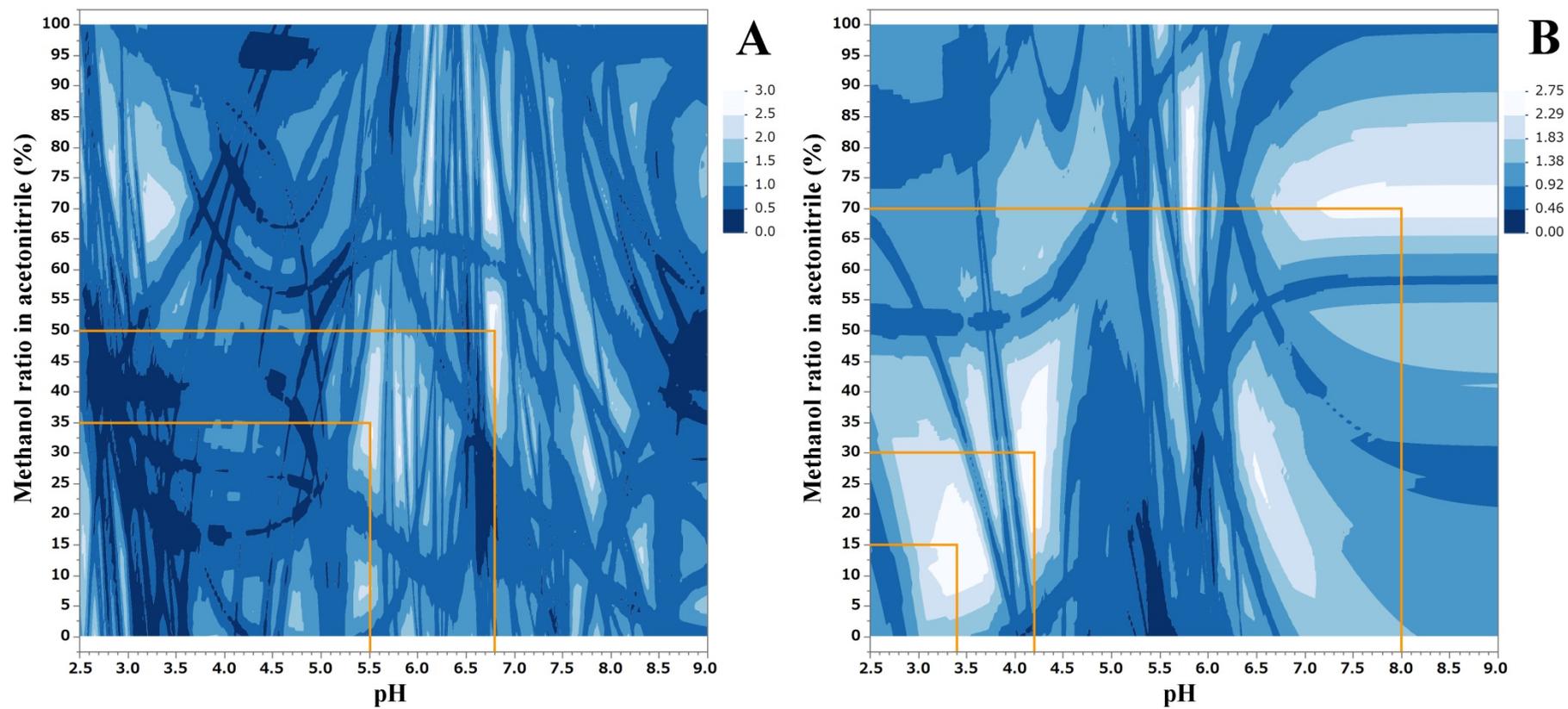


Figure 15 格子状モデルの保持係数予測値より構成した S_T スコアマップ。A は H1Bs の分離、B は NSAIDs の分離に対する水相 pH および 2 成分有機相組成の影響を示す。実線は高スコアを示した領域のうち、実測値を取得した点を示す。

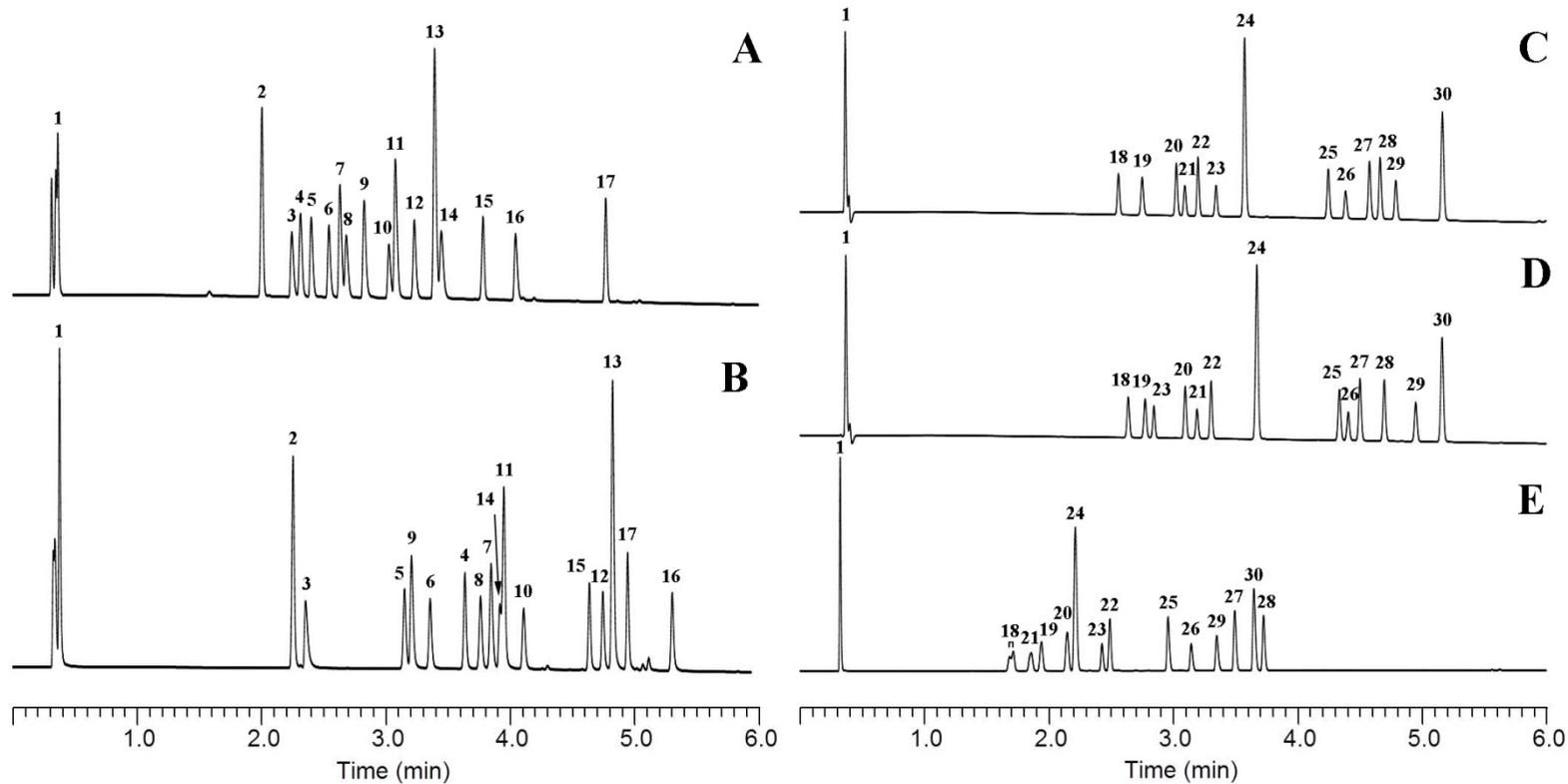


Figure 16 候補条件での実測より得られたクロマトグラム(A: H1Bs/pH 5.5/35% methanol, B: H1Bs/pH 6.8/50% methanol, C: NSAIDs/pH 3.4/15% methanol, D: NSAIDs/pH 4.2/30% methanol, E: NSAIDs/pH 8.0/70% methanol)。ピークラベル — 1: uracil, 2: olopatadine, 3: epinastine, 4: ketotifen, 5: chlorpheniramine, 6: brompheniramine, 7: triprolidine, 8: diphenhydramine, 9: desloratadine, 10: diphenylpyraline, 11: amoxapine, 12: promethazine, 13: cyproheptadine, 14: mequitazine, 15: hydroxyzine, 16: clemastine, 17: loratadine, 18: pranoprofen, 19: piroxicam, 20: indoprofen, 21: loxoprofen, 22: sulindac, 23: meloxicam, 24: naproxen, 25: fenoprofen, 26: flurbiprofen, 27: diclofenac, 28: indomethacin, 29: ibuprofen, 30: mefenamic acid

Figure 17は S'_T スコアマップより見出された各候補条件における、格子状モデルの予測値と、実測した保持係数の相関性解析結果である。NSAIDsについてはほぼ理想的な回帰直線が得られており、Figure 14の結果を再現した。一方でH1Bsについてはy切片および傾きにバイアスが認められた。

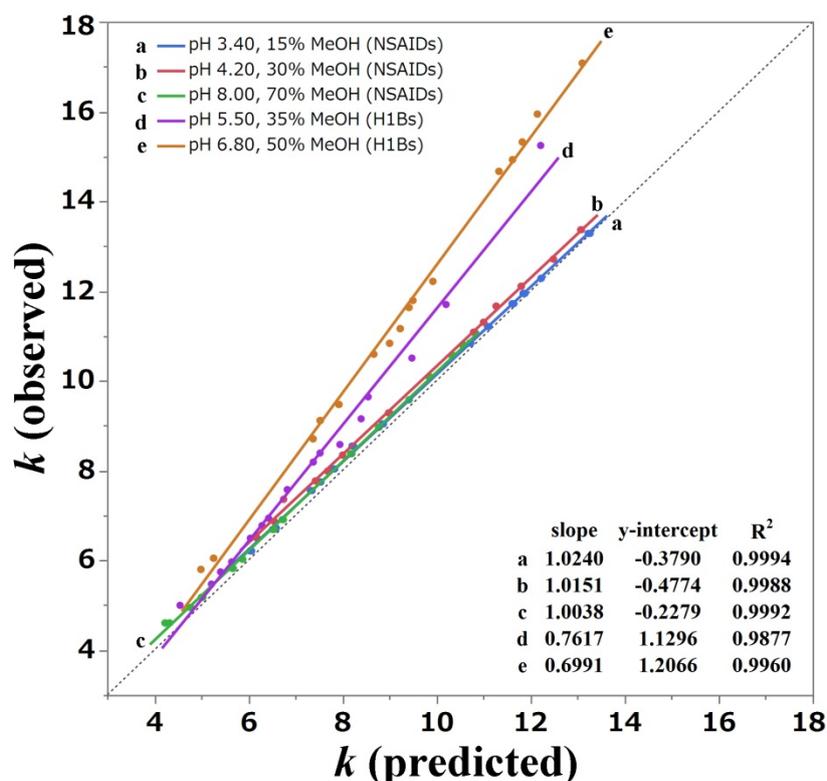


Figure 17 候補条件における格子状モデルの予測値と保持係数実測値の相関性解析結果。凡例は図中に表示。破線はy切片0、傾き1の理想的な相関を示す。

格子状モデルを得るための教師データについて、水相 pH の調整および2成分有機相の組成比の調製はともに、UHPLCのオンラインにおいて機械的に実施した。これに対し、候補条件での実測において水相 pH は pH 計を用いて手動調整されたが、NSAIDsの回帰直線にはバイアスが認められないことから、回帰直線の傾きの変動は水相 pH の調整方法の違いに由来するものではないと考えられる。その一方で、2成分有機相組成の調製方法について、NSAIDs測定の際は教師データ同様にオンライン混合により調製したのに対し、H1Bsではオフラインでの手動混合により調製を行った。Figure 14に示したとおり、有機相をオンライン混合により調製した場合、H1Bsの予測保持係数と実測保持係数はほぼ理想的な相関関係にある。したがって、H1Bsの最適条件において認められた回帰直線の傾きのバイアス (Figure 17) は2成分有機相の混合方式の違いによるものである可能性が極めて高い。一般に種類の異なる液体を混合した場合、分子間に働く相互作用が変化するため、混合前後で体積が変化することが知られている。本検討では低圧混合方式の装置を用いているため、オンライン混合の場合、

有機相の体積変化はクロマトグラフポンプのシリンダ内で生じる。つまり、有機相をオフライン混合した場合とは体積変化のタイミングが異なる。アセトニトリルとメタノールを混合した場合の過剰体積は負の値をとり、おおよそ等量での混合において体積の減少幅は最大となる⁵⁷⁻⁶⁰。Figure 17 中の直線 d および e に示すとおり、アセトニトリル中のメタノール比率が 35% から 50% へと変わるにつれ回帰直線の傾きの変動は大きくなっており、混合による体積変化の大きさと連動する傾向が認められた。

前述のとおり、有機相の調製方法によって、観測される保持係数は変動し得ることが明らかとなった。しかしながら、Figure 17 に示すように、回帰直線 d および e の決定係数は極めて 1 に近く、保持が変化した後も、各化合物ピークの相対的な位置関係は維持されていると考えられる。つまり、有機相の僅かな変動により保持は変化した一方で選択性は変化しておらず、これらの候補条件における分離は有機相組成の変動に対して頑健であったといえる。Figure 15A において、2 つの候補条件はともに有機相組成軸方向に白い領域が広がっている。したがって、格子状モデルより得られるスコアマップは最適な分離条件を示すだけでなく、選択された分析条件における分離が水相 pH や有機相組成の変動に対して有する頑健性をも可視化可能であることが示された。

第3節 実験計画法を用いた最適条件における分離頑健性の評価

前節において、格子状モデルの予測値より構成したスコアマップを用いることで頑健な分離を得られる分析条件を見出すことが可能であった。そこで、選択された分析条件における分離が、誤差因子に対してどの程度の頑健性を有するかを評価する目的で、 $L_9(3^4)$ 直交計画を用い、日間差、作業員間差、装置間差および分析カラムのロット間差について検証を行った。評価はより分離の成否が明確に判定できると考えられる H1Bs を用いて行った。分析条件は Figure 15A に示す pH 5.5/35% methanol ($S'_T = 2.39$) 周辺において、より高い頑健性が期待できる pH 5.5/33% methanol ($S'_T = 2.49$) を選択した。各誤差因子の割付は Table 6 に示すとおりであり、測定は各々3回繰り返し行った。

Table 6 $L_9(3^4)$ 直交計画による誤差因子の割付

No.	実施日	作業員	装置*	カラムロット	繰り返し
1	Day I	Operator I	Equipment II	Column Lot II	3
2	Day I	Operator II	Equipment III	Column Lot III	3
3	Day I	Operator III	Equipment I	Column Lot I	3
4	Day II	Operator I	Equipment III	Column Lot I	3
5	Day II	Operator II	Equipment I	Column Lot II	3
6	Day II	Operator III	Equipment II	Column Lot III	3
7	Day III	Operator I	Equipment I	Column Lot III	3
8	Day III	Operator II	Equipment II	Column Lot I	3
9	Day III	Operator III	Equipment III	Column Lot II	3

*: 装置はシリアル番号の異なる同一機種

Figure 18 は合計 27 回の実測より得られた各ピークパラメータ（保持係数、理論段数および分離度）について、 k 値と理論段数については 16 種の各 H1Bs ピークについて、平均値を 100%とした際の相対値を、分離度は各ピーク間について、平均値を 100%とした際の相対値をとり、分散分析を行った結果である。



Figure 18 格子状モデルより見出された H1Bs の最適条件における、誤差因子に対する分離の頑健性の評価結果。青色のマーカーは理論段数および分離度が最も小さくなる誤差因子の組み合わせを、赤色の点線は選択中の誤差因子と応答の推定値を示すガイドである。

分散分析による解析の結果、4種の誤差因子はいずれも H1Bs の k 値に対して考慮すべき影響を及ぼさなかった。また、理論段数および分離度に対して、日間差および作業員間差による影響も軽微であった。一方で、装置間差および分析カラムのロット間差は理論段数および分離度に対して影響力の大きい誤差因子であることが明らかとなった。クロマトグラフィーにおいて理論段数および分離度はその値が小さいほど、ピークの分離は悪化する。Figure 19 は理論段および分離度を最小化する誤差因子の組み合わせとなる Equipment II および Column Lot I を用いた際のクロマトグラムである。

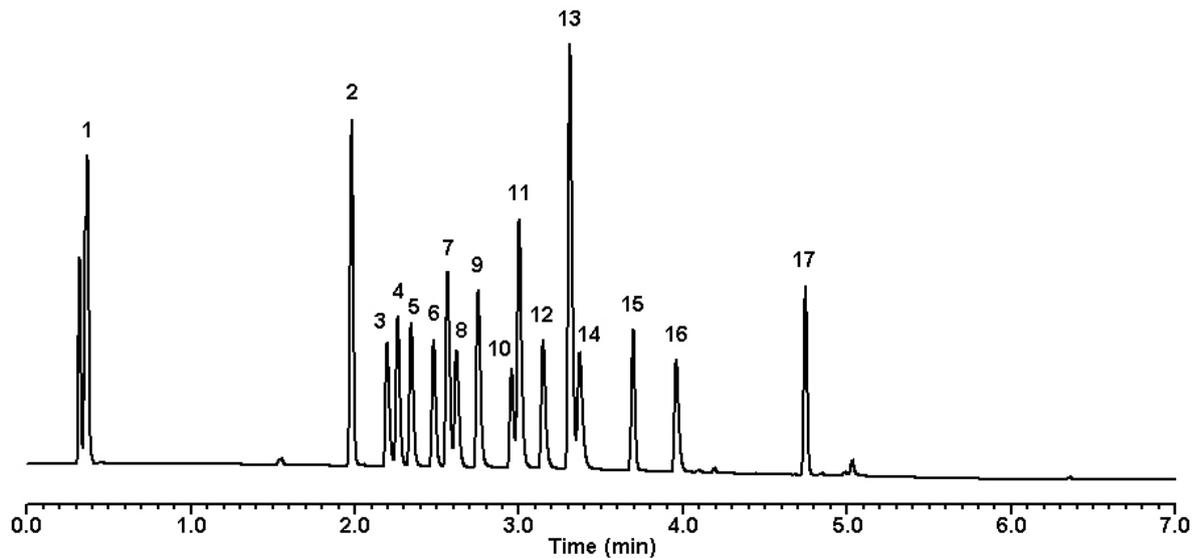


Figure 19 Equipment II および Column Lot I を用いて測定した H1Bs のクロマトグラム。ピークラベル — 1: uracil, 2: olopatadine, 3: epinastine, 4: ketotifen, 5: chlorpheniramine, 6: brompheniramine, 7: triprolidine, 8: diphenhydramine, 9: desloratadine, 10: diphenylpyraline, 11: amoxapine, 12: promethazine, 13: cyproheptadine, 14: mequitazine, 15: hydroxyzine, 16: clemastine, 17: loratadine

分散分析の結果より、Equipment II および Column Lot I を組み合わせた場合、理論段数は平均値に対して約 67%、分離度は平均値に対して約 85%まで低下する。しかしながら、Figure 19 に示したように、理論段数や分離度が悪化した状態でも、16 種類の H1Bs の分離は維持されており、当該の分析条件における分離度の頑健性は非常に高いことが示された。以上の結果より、本予測手法を用いて最適化された分析条件は、ある程度の広さを有する高スコア領域において、水相 pH および有機相組成の変動に対して分離の頑健性を有するだけでなく、誤差因子に対する頑健性も併せて有することが明らかとなった。

第4節 ロジスティックモデル回帰パラメータの物理化学的評価

格子状モデルを構成するロジスティックモデルおよび重回帰モデルはいずれも経験的モデルであり、モデル式に含まれる係数が、物理的または化学的な意味を表現するかは不明である。しかしながら、モデルが実測値に対して良好にフィッティングする場合、回帰係数が化合物に関する物理化学的特性を反映している可能性が高い。

式(9)–(13)に示したロジスティックモデルを導出する過程において、 K_M はシグモイド型の確率曲線の中心における pH 値を、 ρ はシグモイド曲線の中心における傾きを示すパラメータと定義した。したがって、 K_M は対応する解離性官能基の分子型、イオン型の存在比率が同一となる点にあたり、見かけ上の解離定数に相当すると考えられる。しかしながら、 K_M は時間とともに次第に増加する有機相の存在下での解離定数である。したがって、一般的な物理パラメータである pKa に対し相関をもつ可能性はあるが、値そのものを比較することは妥当ではない。

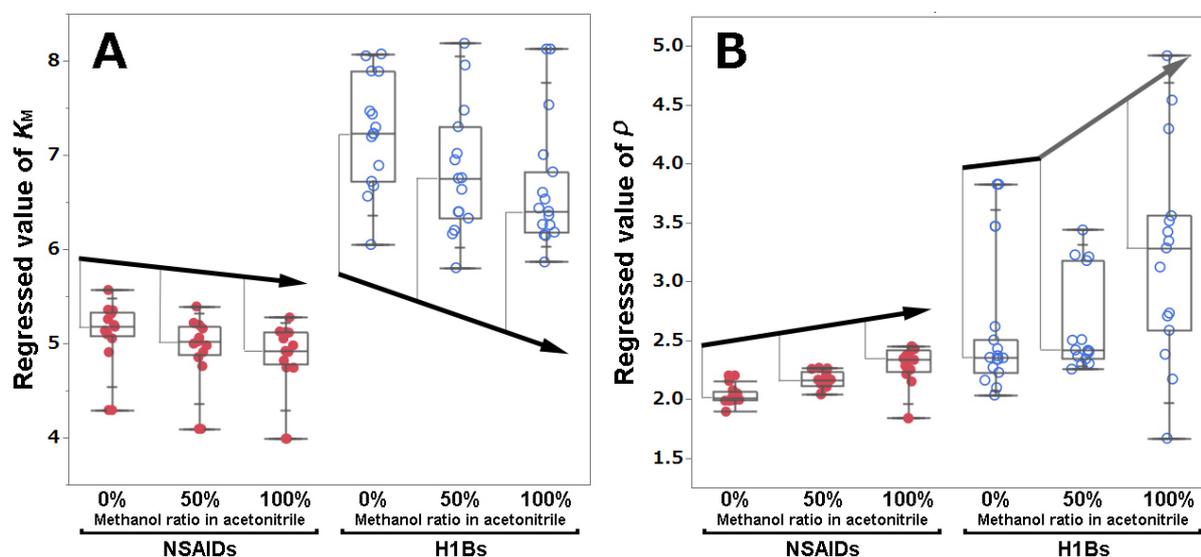


Figure 20 回帰分析により得られた NSAIDs および H1Bs の A: K_M および B: ρ パラメータの箱ひげ図。矢印は各パラメータの平均値の推移を示す。

Figure 20 には Table 2-4 に示した K_M および ρ パラメータのうち、両パラメータとも収束制限値を代用せずに回帰係数として得られたものについて分位点および平均を箱ひげ図により示したものである。Figure 20A に示すように、酸性および塩基性両官能基とも有機相のメタノール比率が増大するにつれて、 K_M は低 pH 側にシフトする傾向が認められた。つまり、有機相にメタノールが加わることで、両官能基ともより強い酸として振舞うようになると考えられる。メタノールはアルコール性のプロトン放出してメトキシドイオンを形成することに加え、非解離型においてもさらなるプロトン化を受け、メチルオキソニウムイオンを生成するなど、各存在状態においてプロトンアクセプターとして機能し得る。つまり、非プロトン性溶媒であるアセトニトリルに

プロトン性溶媒であるメタノールが加わることで、溶質の解離性官能基にとってよりプロトンを放出し易い環境が提供されると考えられる。その一方で、 ρ はメタノール比率の増加に伴って値が大きくなる傾向が認められた。つまり、シグモイドカーブの勾配は有機相中のメタノール組成比依存的に急勾配となり、溶質の保持はわずかな pH の変化に対して急激な変動を示すようになった。メタノールの有無により ρ が変動する理由も K_M 同様に、プロトン性溶媒のメタノールが共存することで、溶質のプロトンが放出され易い環境が整えられることに由来すると考えられる。

なお、Figure 20 に示すとおり、 K_M および ρ のばらつきは NSAIDs と比較して H1Bs において大きい。NSAIDs が有する解離性官能基はカルボキシル基およびスルファミド基であるのに対し、H1Bs の有する解離性官能基はアミノ基、ピリジニル基、ピペリジニル基またはイミダゾール基など、多岐にわたっているためであると考えられ、塩基性官能基に対するロジスティックモデルによるフィッティングの不安定さを示すものではないと考えられる。

第5節 小括

本章にて結果を示したとおり、水相 pH の変動に対するイオン性化合物の保持挙動は、化合物が有する解離性官能基の解離型に対する分子型の存在確率によって表現することが可能であり、その確率密度関数は Bernoulli 分布より導かれるロジスティックモデルとして与えられた。また、水相 pH と保持の関係を表現するロジスティックモデルは、2成分有機相組成と保持の関係を表現する重回帰モデルによって仮想的に連結可能であり、最終的に水相 pH および有機相組成の影響を同時に評価可能な格子状モデルを与えた。格子状モデルより得られた保持予測値は極めて高精度であり、非常に短い UHPLC のタイムレンジにおいても満足のいく予測誤差であった。また、予測された保持情報をピーク分離の指標へと変換するためのスコア化手法は、両移動相条件の組み合わせの良否を視覚化し、幅広い条件範囲においても簡便かつ網羅的な評価を可能とした。さらに、選択した分析条件の周辺における、高スコア領域の広がり、分離の頑健性を示す指標であり、両移動相条件の変動に対して分離を維持できるのみならず、カラムロット間差や装置間差といった、一般にコントロールが困難な誤差因子に対しても頑健性を示すことが可能であった。その一方で、本手法より得られる分析法は短時間のシンプルなグラジエント溶出法であり、グラジエントステップの調整による更なる分離最適化の余地を残しているため、分析条件検討の初期手法としても相応しいと考えられる。

ロジスティックモデルの回帰係数について傾向解析を行った結果、 K_M および p には 2 成分有機相中のメタノール組成比に依存した変動が示唆された。つまり、有機相の構成成分としてアセトニトリル等の非プロトン性有機溶媒と、低級アルコール等のプロトン性有機溶媒を組み合わせる場合、イオン性化合物の保持選択性に対する影響は水相 pH に依存して変動すると考えられる。したがって、分離最適化を達成するためには水相 pH と 2 成分有機相組成の同時評価は不可欠であり、この点においても本手法は有用であった。

総括

RP-UHPLCにおいて、水相 pH および 2 成分有機相組成は、分析対象物の保持選択性を大きく変化させることから、望ましい分離を達成するためには分析法開発における最適化検討が不可避である。しかしながら、広範な水相 pH に対するイオン性化合物の保持挙動は非常に複雑であり、2 成分有機相組成との同時最適化を達成しうる保持予測手法は確立されていない。第 1 章 第 1 節では、アイソクラティック条件において 2 成分有機相組成最適化に用いられている溶解パラメータ理論に基づく重回帰型の保持予測モデルが、時間および勾配一定のリニアグラジエント条件においても適用可能であることを新たに明らかとした。続く第 2 節ではイオン性化合物の水相 pH に対する複雑な保持挙動のモデル化を達成するため、重回帰モデルと ANN 解析を組み合わせた新規の保持予測および分離最適化手法を確立した。しかしながら、教師データが少ない場合、オーバーフィットに陥りやすいという ANN 解析の脆弱性を補う目的で追加実験による教師データの拡充を行った。これは重回帰モデルの予測結果を基におおよそ絞り込んだ最適条件範囲での追加実験ではあるものの、実験コストを増大させる結果となった。加えて、得られる ANN モデルの回帰係数は非常に数が多い上一意ではなく、保持挙動に対するモデルの解釈は実質的に不可能であった。

第 2 章 第 1 節において Bernoulli の確率分布を基に新たに構築したロジスティックモデルは、第 1 章 第 1 節において取得した教師データのみを用いて予測モデルの回帰が可能であり、ANN モデルを構築する際に行った教師データの拡充は不要であった。加えて、ロジスティックモデルは教師データを得た pH 範囲全域をカバーしており、水相 pH 条件に対する網羅性は、ANN モデルと比較して大幅な改善を達成した。このロジスティックモデルは、続く第 2 節において重回帰モデルとの仮想連結により格子状モデルへと導かれ、広範な水相 pH および 2 成分有機相組成範囲において極めて高い予測精度を示した。

第 2 章 第 3 節に示したとおり、本研究により新規に確立された格子状モデルを用いる分析条件最適化手法は、RP-UHPLC 法開発における条件検討の網羅性を向上させるのみならず、候補となる分析条件が誤差変動に対して備える分離の頑健性をも可視化することが可能であった。つまり、従来の試行錯誤型の分析法開発と比較して効率および客観性の両面でより優れた手法といえる。加えて、分析法開発段階で分離因子が保持に及ぼす影響を把握し、誤差変動に対する耐性を予め評価できる本手法の特徴は、分析法開発に係る QbD の考え方にも合致する点が多く、次世代の分析法開発環境整備へも貢献が期待される。また、本手法は構造未知成分へも適用可能であり、低分子医薬品の開発初期から後期のいずれの段階における品質試験法開発へも適合することから、今後の医薬品品質評価および品質保証技術向上への貢献が期待される。加えて、第 2 章 第 4 節に示したように、経験的モデルであっても、その回帰パラメータの評価により移動相条件と保持挙動の関係を具体的に考察可能であった。本研究において新たに得られた知見は、逆相液体クロマトグラフィーにおける保持選択性の本質を理解する一助となると期待される。

実験の部

試薬

試薬名	グレード	供給者
acetonitrile	HPLC	和光純薬工業株式会社
methanol	HPLC	和光純薬工業株式会社
phosphoric acid	特級	和光純薬工業株式会社
acetic acid	特級	和光純薬工業株式会社
dipotassium hydrogenphosphate	特級	和光純薬工業株式会社
uracil	特級	和光純薬工業株式会社
[H1Bs]		
amoxapine	>99.5% (HPLC)	LKT Laboratories, Inc.
brompheniramine maleate salt	biochemicals	和光純薬工業株式会社
chlorpheniramine maleate	biochemicals	和光純薬工業株式会社
clemastine fumarate	生化学用	和光純薬工業株式会社
cyproheptadine hydrochloride sesquihydrate	99%	Sigma-Aldrich Inc.
desloratadine	>98.0% (HPLC)	東京化成工業株式会社
diphenhydramine hydrochloride	生化学用	和光純薬工業株式会社
diphenylpyraline hydrochloride	Guaranteed reagent	Sigma-Aldrich Inc.
epinastine hydrochloride	>98.0% (HPLC)	東京化成工業株式会社
hydroxyzine dihydrochloride	99.1% (HPLC)	LKT Laboratories, Inc.
ketotifen fumarate	>98.0% (HPLC)	東京化成工業株式会社
loratadine	99.5% (HPLC)	LKT Laboratories, Inc.
mequitazine (mixture of isomers)	薬理研究用	和光純薬工業株式会社
olopatadine hydrochloride	>98.0% (HPLC)	東京化成工業株式会社
promethazine hydrochloride	生化学用	和光純薬工業株式会社
triprolidine hydrochloride	≥99%	Sigma-Aldrich Inc.
[NSAIDs]		
diclofenac sodium salt	100.4% (Assay)	MP Biomedicals, LLC.
fenoprofen	≥97%	LKT Laboratories, Inc.
flurbiprofen	>98.0% (HPLC)	東京化成工業株式会社
ibuprofen	生化学用	和光純薬工業株式会社
indomethacin	≥98%	ナカライテスク株式会社
indoprofen	analytical standard	Sigma-Aldrich Inc.
loxoprofen sodium salt dihydrate	薬理研究用	和光純薬工業株式会社
mefenamic acid	≥98%	LKT Laboratories, Inc.
meloxicam	≥98%	LKT Laboratories, Inc.

D, L-naproxen	≥96%	LKT Laboratories, Inc.
piroxicam	≥98%	LKT Laboratories, Inc.
pranoprofen	≥98%	LKT Laboratories, Inc.
sulindac	≥98%	LKT Laboratories, Inc.

水は Milli-Q gradient A10 超純水製造装置 (Merck Millipore, Tokyo, Japan) により製造した超純水を使用した。

装置

装置名	型式	供給者
pH 計	F-51	堀場製作所
UHPLC	ACQUITY UPLC H-class	Waters Corporation
超音波発振装置	BRANSON 8800	ヤマト科学株式会社
電子天秤	XPE205DRV	Mettler-Toledo International Inc.
電子天秤	UW2200H	株式会社島津製作所

分析カラム

名称	サイズ	供給者
ACQUITY BEH C18	粒子径 1.7 μm, 2.1 mm I.D×75 mm	Waters Corporation

ソフトウェア

名称	バージョン	供給者
Empower3	7.20.00.00 (SR1/FR2 Hotfix1)	Waters Corporation
Microsoft Excel 2010	14.0.6023.1000	Microsoft Corporation
JMP	13.0.0	SAS Institute Inc.
Maple16	16.02	Cybernet Systems Co., Ltd.

移動相

移動相 A : 10 mmol/L リン酸水溶液と 10 mmol/L 酢酸水溶液の等容量混液

移動相 B : 10 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液

移動相 C : アセトニトリル

移動相 D : メタノール

第1章 第1節の実験操作

試料

試料溶解液：アセトニトリルと水の等容量混液

試料溶液：終濃度 0.02 mg/mL に調製した 16 種の HIBs 混合溶液

UHPLC 条件

UHPLC 装置、カラム、移動相は別項に記載。

カラムシリアル番号：02473426616016

カラム温度：40°C

流量：0.5 mL/min

試料注入量：2 μ L

紫外吸光度検出器の測定波長：226 nm

データサンプリングレート：20 Hz

グラジエントタイムプログラム

Time (min)	%(A+B)	%(C+D)
0-5	80-10	20-90
5-7	10	90
7.01-11	10-80	90-20

モデリング用教師データの取得

移動相 A および B を下記の容量比で混合し、移動相(A+B)として用いた。

A:B	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
pH	2.53	2.73	3.04	3.69	4.63	5.88	6.66	7.02	7.35	7.74	8.81

移動相 C および D を 1:0、1:1 および 0:1 の容量比で混合し、移動相(C+D)として用いた。

バリデーションデータの取得

移動相 A および B を下記の容量比で混合し、移動相(A+B)として用いた。

A:B	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
pH	2.53	2.73	3.04	3.69	4.63	5.88	6.66	7.02	7.35	7.74	8.81

移動相 C および D を 3:1 および 1:3 の容量比で混合し、移動相(C+D)として用いた。

データ解析

1. 教師データに対し、pH 一定の条件における保持時間とアセトニトリル中のメタノール容量比(%、 $\phi_{\text{OrgI/II}}$)の関係について、式(4)を用いた重回帰フィッティングを行った。
2. 得られた重回帰モデルより各化合物について、 $\phi_{\text{OrgI/II}}$ の 0-100% の範囲における 1% 毎の保

保持時間予測値および全ての化合物の組み合わせの保持時間差を計算した。

3. 予測値を得た全ての pH および有機相組成の組み合わせについて、最小保持時間間隔($S_{\Delta k}$) および保持時間間隔が閾値(0.06 分)未満となる化合物の組とその総数(S_{CP})を求めた。
4. 得られた $S_{\Delta k}$ および S_{CP} について、pH および $\phi_{Org/II}$ を直交する 2 軸とした平面へ整列させた。
5. その後、 $S_{\Delta k}$ についてはより値が大きいほど白色となるように、 S_{CP} についてはより値が小さいほど白色となるように、各値に応じて着色を行った。
6. 操作 2 において得られた各化合物の予測保持時間のうち、バリデーションデータとして実測した条件に対応するものを抽出し、予測値と実測値の相関解析を行った。

データ解析操作 1-3 は Maple 上で動作する自家製プログラムを用いて実施した。データ解析操作 4-6 は JMP を用いて実施した。また、その過程における行列データの整列や変形には適宜 Microsoft Excel 2010 を用いた。

第 1 章 第 2 節の実験操作

試料および UHPLC 条件は第 1 章 第 1 節に準じた。

モデリング用教師データの取得

移動相 A および B を下記の容量比で混合し、移動相(A+B)として用いた。

A:B	6:4	5.5:4.5	5:5	4.5:5.5	4:6
pH	4.63	5.14	5.88	6.37	6.66

最適条件における実測値の取得

下記のように移動相 A および B を混合して pH を調整した水相と移動相 C および D を混合した有機相とを組み合わせ用いた。

No.	水相 pH	$\phi_{Org/II}$
1		30
2	5.3	35
3		40
4		30
5	5.4	35
6		40
7		30
8	5.5	35
9		40

$\phi_{Org/II}$: アセトニトリル中のメタノール容量比(%)

データ解析

1. 教師データに対し、pH 一定の条件における保持時間と $\phi_{\text{Org/II}}$ の関係について、式(4)を用いた重回帰フィッティングを行った。
2. 得られた重回帰モデルより各化合物について、 $\phi_{\text{Org/II}}$ の 0–100% の範囲における 1% 毎の保持時間予測値および全ての化合物の組み合わせの保持時間差を計算した。
3. 操作 2 において得られた各化合物の予測保持時間および予測保持時間差について、説明変数を pH および $\phi_{\text{Org/II}}$ とし、中間ノード数 10 の 2 層 ANN を用いてモデリングを行った。
4. 得られた ANN モデルより説明変数軸に対して pH および $\phi_{\text{Org/II}}$ を直交する 2 軸とした応答曲面を作成し、近接する化合物間の保持時間差を指標に最適条件の探索を行った。
5. 操作 4 において得られた各化合物の保持時間予測値のうち、最適条件に対応するものを抽出し、予測値と実測値の相関解析を行った。

データ解析操作 1–2 は Maple 上で動作する自家製プログラムを用いて実施した。データ解析操作 3–5 は JMP を用いて実施した。また、その過程における行列データの整列や変形には適宜 Microsoft Excel 2010 を用いた。

第 2 章 第 1 節の実験操作

試料

試料溶解液：アセトニトリルと水の等容量混液

試料溶液：終濃度 0.08 mg/mL のウラシルを含む終濃度 0.02 mg/mL に調製した 16 種の H1Bs 混合溶液および終濃度 0.08 mg/mL のウラシルを含む終濃度 0.02 mg/mL に調製した 13 種の NSAIDs 混合溶液

UHPLC 条件

UHPLC 装置、カラム、移動相は別項に記載。

[H1Bs]

カラムシリアル番号：02553510718211

カラム温度：40°C

流量：0.5 mL/min

試料注入量：2 μ L

紫外吸光度検出器の測定波長：226 nm

データサンプリングレート：20 Hz

グラジエントタイムプログラム

Time (min)	%(A+B)	%(C+D)
0–5	80–10	20–90
5–7	10	90
7.01–11	10–80	90–20

[NSAIDs]

カラムシリアル番号：02553510718219

カラム温度：45°C

流量：0.5 mL/min

試料注入量：2 μ L

紫外吸光度検出器の測定波長：220 nm

データサンプリングレート：20 Hz

グラジエントタイムプログラム

Time (min)	%(A+B)	%(C+D)
0-7	80-10	20-90
7-9	10	90
9.01-13	10-80	90-20

モデリング用教師データの取得

移動相 A および B を下記の容量比で混合し、移動相(A+B)として用いた。

A:B	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10
pH	2.54	2.72	3.02	3.67	4.59	5.81	6.62	7.02	7.34	7.75	8.98

移動相 C および D を 1:0、1:1 および 0:1 の容量比で混合し、移動相(C+D)として用いた。

データ解析

1. 教師データに含まれる H1Bs および NSAIDs の保持時間について、同時に観測された uracil の保持時間を基準として保持係数(k)を算出した。
2. 教師データに対し、 $\phi_{Org/II}$ 一定の条件における k と pH の関係について、式(9)、(10)、(12)、(13) を用いた Gauss-Newton 法による非線形回帰分析を行った。

データ解析操作 1 に Microsoft Excel 2010 を、データ解析操作 2 には JMP を用いた。

第2章 第2節の実験操作

試料

試料溶解液：アセトニトリルと水の等容量混液

試料溶液：終濃度 0.08 mg/mL のウラシルを含む終濃度 0.02 mg/mL に調製した 16 種の H1Bs 混合溶液および終濃度 0.08 mg/mL のウラシルを含む終濃度 0.02 mg/mL に調製した 13 種の NSAIDs 混合溶液

UHPLC 条件

UHPLC 装置、カラム、移動相は別項に記載。

[H1Bs]

カラムシリアル番号：02553510718211

カラム温度：40°C

流量 : 0.5 mL/min

試料注入量 : 2 μ L

紫外吸光度検出器の測定波長 : 226 nm

データサンプリングレート : 20 Hz

グラジエントタイムプログラム

Time (min)	%(A+B)	%(C+D)
0-5	80-10	20-90
5-7	10	90
7.01-11	10-80	90-20

[NSAIDs]

カラムシリアル番号 : 02553510718219

カラム温度 : 45°C

流量 : 0.5 mL/min

試料注入量 : 2 μ L

紫外吸光度検出器の測定波長 : 220 nm

データサンプリングレート : 20 Hz

グラジエントタイムプログラム

Time (min)	%(A+B)	%(C+D)
0-7	80-10	20-90
7-9	10	90
9.01-13	10-80	90-20

モデリング用教師データの取得

移動相 A および B を下記の容量比で混合し、移動相(A+B)として用いた。

A:B	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	8:2	9:1	0:10
pH	2.54	2.72	3.02	3.67	4.59	5.81	6.62	7.02	7.34	7.75	8.98

移動相 C および D を 1:0、1:1 および 0:1 の容量比で混合し、移動相(C+D)として用いた。

バリデーションデータの取得

移動相 A および B を下記の容量比で混合し、移動相(A+B)として用いた。

A:B	9.5:0.5	8.5:1.5	7.5:2.5	6.5:3.5	5.5:4.5	4.5:5.5	3.5:6.5	2.5:7.5	1.5:8.5	0.5:9.5
pH	2.62	2.86	3.27	4.17	5.09	6.32	6.84	7.18	7.52	8.06

移動相 C および D を 3:1 および 1:3 の容量比で混合し、移動相(C+D)として用いた。

最適条件における実測値の取得

下記のように移動相 A および B を混合して pH を調整した水相と移動相 C および D を混合した有機相とを組み合わせて用いた。

No.	水相 pH	$\phi_{\text{OrgI/II}}$
1	5.5	35
2	6.8	50
3	3.4	15
4	4.2	30
5	8.0	50

$\phi_{\text{OrgI/II}}$: アセトニトリル中のメタノール容量比(%)

データ解析

1. 教師データに含まれる H1Bs および NSAIDs の保持時間について、同時に観測された uracil の保持時間を基準として k を算出した。
2. 教師データに対し、 $\phi_{\text{OrgI/II}}$ 一定の条件における k と pH の関係について、式(9), (10), (12), (13) を用いた Gauss-Newton 法による非線形回帰分析を行った。
3. 得られた非線形モデルより各化合物について、pH 2.5–9.0 の範囲における 0.01 pH 単位毎の k 予測値を計算した。
4. 得られた k 予測値について、pH 一定の条件における k と $\phi_{\text{OrgI/II}}$ の関係について、式(4)を用いた重回帰フィッティングを行った。
5. 得られた重回帰モデルより各化合物について、 $\phi_{\text{OrgI/II}}$ の 0–100% の範囲における 1% 毎の k 予測値および全ての化合物の組み合わせの保持係数差を計算した。
6. 予測値を得た全ての pH および $\phi_{\text{OrgI/II}}$ の組み合わせについて、 $S_{\Delta k}$ および保持係数差が閾値 (0.3) 未満となる化合物の組と S_{CP} を求めた。
7. 操作 5 において得られた $S_{\Delta k}$ および S_{CP} について、式(14)に従い $S'_{\Delta k}$ および S'_{CP} を算出した。
8. 操作 6 において得られた $S'_{\Delta k}$ および S'_{CP} より式(15)に従い w_t を 2 として S'_T を算出した。
9. 操作 7 において得られた S'_T について、pH および $\phi_{\text{OrgI/II}}$ を直交する 2 軸とした平面へ整列させた。
10. その後 S'_T について、より値が大きいほど白色となるように各値に応じて着色を行った。
11. 操作 4 において得られた各化合物の k 予測値のうち、バリデーションデータとして実測した条件に対応するものを抽出し、予測値と実測値の相関解析を行った。
12. 操作 4 において得られた各化合物の k 予測値のうち、最適条件に対応するものを抽出し、予測値と実測値の相関解析を行った。

データ解析操作 1, 7–8 には Microsoft Excel 2010 を、データ解析操作 2–3, 9–12 には JMP を、データ解析操作 4–6 には Maple 上で動作する自家製プログラムを用いた。また、その過程における行列データの整列や変形には適宜 Microsoft Excel 2010 を用いた。

第2章 第3節の実験操作

試料

試料溶解液：アセトニトリルと水の等容量混液

試料溶液：終濃度 0.08 mg/mL のウラシルを含む終濃度 0.02 mg/mL に調製した 16 種の H1Bs 混合溶液

UHPLC 条件

UHPLC 装置、カラムは別項に記載。

移動相(A+B)：移動相 A および B を混合し pH を 5.5 に調整したもの

移動相(C+D)：アセトニトリル/メタノール = 67 : 33

カラム温度：40°C

流量：0.5 mL/min

試料注入量：2 μ L

紫外吸光度検出器の測定波長：226 nm

データサンプリングレート：20 Hz

グラジエントタイムプログラム

Time (min)	%(A+B)	%(C+D)
0-5	80-10	20-90
5-7	10	90
7.01-11	10-80	90-20

データ解析

1. 実測したデータについて、各ピークの保持係数、uracil を除く各ピークの理論段数、uracil を除く隣り合うピーク間の分離度について、全体の平均値を 100 として個々の値を標準化した。
2. 標準化した値について、変動要因が及ぼす影響を多元配置分散分析により解析を行った。データ解析操作 1 には Microsoft Excel 2010 を、データ解析操作 2 には JMP を用いた。

第2章 第4節の実験操作

第2章 第4節では JMP によるデータ解析操作のみを実施した。なお K_M および ρ は、第2章 第1節の検討で得られた値を用いた。

Maple 上で動作するインハウスプログラム

```
#データインポート
RawData := ImportMatrix("file path.file name.csv", source = csv)
#パラメータセッティング
HiComp := 100;
CompStep := 1;
CompRow := floor(HiComp/CompStep+1);
#予測値保持時間差閾値の設定
CriticalPairThreshold := 0.3;
#サブパラメータ設定と結果出力用テーブルの生成
with(LinearAlgebra);
RowNum := RowDimension(RawData);
ColNum := ColumnDimension(RawData);
SampleColNum := ColNum-2;
pHNum := floor((RowNum-1)*(1/3));
ResRowNum := CompRow*pHNum;
ResultTable := Matrix(ResRowNum+1, ColNum+(1/2)*SampleColNum*(SampleColNum-1), 0);
ExtraColNum := ColumnDimension(ResultTable)-ColNum;
ResultTable2 := Matrix(ResRowNum+1, 4+ExtraColNum);
ResultTable2[1 .. ResRowNum+1, 1 .. 4+ExtraColNum] := NULL;
#結果出力テーブル見出し行の作成
#元データ見出し行の結果テーブルへの代入
for z from 1 to ColNum do
    ResultTable[1,z]:=RawData[1,z];
end do;
CountR1 := SampleColNum-1;
PointR1 := ColNum+1;
#保持時間差列の見出し行の生成
for s1 from 1 to SampleColNum-1 do
    for t1 from 1 to CountR1 do
        ResultTable[1,PointR1] := RawData[1,s1+2]-RawData[1,s1+t1+2];
        PointR1 := PointR1+1;
    end do;
    CountR1 := CountR1-1;
end do;
#データフィッティングプログラム
with(CurveFitting): #カーブフィッティングパッケージのインストール
```

```

TempMatrix := Matrix(3,2,0): #カーブフィッティング用テンポラリーテーブルの生成
#TempMatrix[2,1]:=fLoor(HiComp/2): #有機溶媒濃度の代入
#TempMatrix[3,1]:=HiComp: #有機溶媒濃度の代入
for h from 1 to SampleColNum do #データ列の指定及びシフト
  for i from 1 to pHNum do #pH行の指定及びシフト
    SelectpH := RawData[(i-1)*3+2,1]: #選択中のpHの保存
    for j from 1 to 3 do #テンポラリーテーブルへの生データの代入
      m := RawData[(i-1)*3+j+1,h+2]:
      TempMatrix[j,2]:=ln(m):
      TempMatrix[j,1]:=RawData[(i-1)*3+j+1,2]:
    end do:
    #フィッティングモデルの生成
    TempModel := LeastSquares(TempMatrix,x,curve=a*x^2+b*x+c):
    #%MeOHに対する推定値の生成
    TempResult := Matrix(evalf([seq([x,TempModel(x)],x=0..HiComp,CompStep)])):
    for k from 1 to CompRow do #推定値の結果テーブルへの代入
      if h = 1 then #hループ1回目のみpH列および%MeOH列の値を代入
        ResultTable[k+1+(i-1)*CompRow,1] := SelectpH:
        ResultTable[k+1+(i-1)*CompRow,2] := TempResult[k,1]:
        n := TempResult[k,2]:
        ResultTable[k+1+(i-1)*CompRow,h+2] := xp(n):
      else #hループ2回目以降はフィッティングリザルトのみ結果テーブルへ代入
        o := TempResult[k,2]:
        ResultTable[k+1+(i-1)*CompRow,h+2] := exp(o):
      end if: #if分岐の終了
    end do: #推定値の結果テーブル代入ループ処理の終了
  end do: #pH行シフトループ処理の終了
end do: #データ列シフトループ処理の終了
for u2 from 1 to ResRowNum do #フィッティング結果行シフトループ
  CountR2 := SampleColNum-1:
  PointR2 := ColNum+1: #保持時間差保存開始列の指定及びリセット
  for s2 from 1 to SampleColNum-1 do #保持時間差算出ループ
    for t2 from 1 to CountR2 do
      r1 := ResultTable[u2+1,s2+2]:
      r2 := ResultTable[u2+1,s2+t2+2]:
      ResultTable[u2+1,PointR2] := abs(r1-r2):
      PointR2 := PointR2+1:
    end do:
  end do:
end do:

```

```

    CountR2:=CountR2-1:
  end do:
end do:
#保持時間差のクライテリア判定ルーティン
ResultTable2[1..ResRowNum+1,1..2] := ResultTable[1..ResRowNum+1,1..2]:
ResultTable2[1,3] := Minimum_tR_Interval_(min):
ResultTable2[1,4] := CriticalPairs:
ResultTable2[1,6] := Threshold:
ResultTable2[1,7] := CriticalPairThreshold:
for s from 1 to ResRowNum do
  MinDtR := ResultTable[s+1,SampleColNum+3];
  u := 0;
  for t from 1 to ExtraColNum-1 do
    CompDtR := ResultTable[s+1,SampleColNum+t+3];
    if CompDtR<CriticalPairThreshold then
      ResultTable2[s+1,u+5] := ResultTable[1,SampleColNum+t+3];
      u := u+1;
    end if:
    if CompDtR<MinDtR then
      MinDtR := CompDtR;
    end if:
  end do:
  ResultTable2[s+1,3] := MinDtR;
  ResultTable2[s+1,4] := u;
end do:
#結果のエクスポート1
ExportMatrix("file path.file name.csv", ResultTable1, delimiter = ",");
#結果のエクスポート2
ExportMatrix("file path.file name.csv", ResultTable2, delimiter = ",");

```

謝辞

本研究をまとめるにあたり、懇切なるご指導を賜りました静岡県立大学 生体機能分子分析学分野 轟木 堅一郎 教授に心より感謝致します。また、本研究を行う機会を与えてくださり、遂行するにあたって終始ご教示、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学 生体機能分子分析学分野 豊岡 利正 特任教授に心より御礼申し上げます。さらに、本論文を完成させるにあたり、大変有益なご助言を賜りました静岡県立大学 生体機能分子分析学分野 水野 初 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究に取り組む又とない機会を与えてくださり、遂行するにあたって多大なる御支援を頂きました第一三共株式会社 分析評価研究所 所長 大原 求氏及び研究第4グループ長 今野 竹晃氏、サプライチェーン技術・調達部 原材料調達グループ 鈴木 信幸博士、本研究を遂行するにあたり貴重なご助言、ご協力を賜りました分析評価研究所 研究第5グループ 川邊 武史博士、研究第2グループ 大橋 潤二博士、研究第3グループ 小原 栄二氏、検討結果について貴重なご意見を賜り、研究の推進を後押しして頂きました分析評価研究所 小野 誠博士、久保田 圭氏、大和田 紘喜氏、荒木 勇樹氏、塩入 優紀博士、CMC企画部 CMC企画グループ上代 才博士に深く感謝致します。また、本研究を行うにあたり、多大なるご配慮、ご支援を頂きました分析評価研究所 田村 幸介氏、内田 誠士郎氏、上山 栄二博士に御礼申し上げます。さらに、本研究を遂行するにあたり統計的な視点から考察を行うための素養を身につけるべく共に学んで頂いた STAT チームメンバー、本研究に対し科学的視点から多くのご助言を頂いた旧 SToRM メンバーに心より感謝致します。

最後に、本研究へのご理解と沢山のご協力、ご配慮を頂きました分析評価研究所 諸氏に厚く御礼申し上げます。また、私生活において全てを支えて頂いた家族に心より感謝致します。

引用文献

- 1) Wren S. A. C., Tchelitcheff P., *J. Chromatogr. A*, **1119**, 140–146 (2006).
- 2) Kumar A., Saini G., Nair A., Sharma R., *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, **69**, 371–380 (2012).
- 3) Fekete S., Kohler I., Rudaz S., Guillarme D., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **87**, 105–119 (2014).
- 4) Chesnut S. M., Salisbury J. J., *J. Sep. Sci.*, **30**, 1183–1190 (2007).
- 5) Deconinck E., Sacré P. Y., Baudewyns S., Courselle P., De Beer J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 200–209 (2011).
- 6) Dong M. W., Zhang K., *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **63**, 21–30 (2014).
- 7) Olsen B. A., Castle B. C., Myers D. P., *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **25**, 796–805 (2006).
- 8) Krishnaiah C., Reddy A. R., Kumar R., Mukkanti K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **53**, 483–489 (2010).
- 9) Nageswari A., Reddy K. V. S. R. K., Mukkanti K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **66**, 109–115 (2012).
- 10) Runje M., Babić S., Meštrović E., Nekola I., Dujmić-Vučinić Ž., Vojčić N., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **123**, 42–52 (2016).
- 11) Bellur, Atici E., Yazar Y., Ağtaş Ç., Ridvanoğlu N., Karlığa B., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **136**, 1–9 (2017).
- 12) Kruhlak N. L., Contrera J. F., Benz R. D., Matthews E. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 43–55 (2007).
- 13) Jacobson-Kram D., McGovern T., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 38–42 (2007).
- 14) Bodzioch K., Durand A., Kaliszan R., Bączek T., Vander Heyden Y., *Talanta*, **81**, 1711–1718 (2010).
- 15) Durcekova T., Boronova K., Mocak J., Lehotay J., Cizmarik J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **59**, 209–216 (2012).
- 16) Golubović J. B., Protić A. D., Zečević M. L., Otašević B. M., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **140**, 92–101 (2015).
- 17) Wang L., Zheng J., Gong X., Hartman R., Antonucci V., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **104**, 49–54 (2015).
- 18) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances, 2006. Available at:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf
- 19) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q3B(R2): Impurities in New Drug Products, 2006. Available at:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf

p4/Q3B_R2__Guideline.pdf

- 20) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q10: Pharmaceutical Quality System, 2008. Available at:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf
- 21) Vogt F. G., Kord A. S., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 797–812 (2011).
- 22) Rozet E., Lebrun P., Debrus B., Boulanger B., Hubert P., *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **42**, 157–167 (2013).
- 23) Karmarkar S., Yang X., Garber R., Szajkovic A., Koberda M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **100**, 167–174 (2014).
- 24) Mallik R., Raman S., Liang X., Grobin A. W., Choudhury D., *J. Chromatogr. A*, **1413**, 22–32 (2015).
- 25) Schmidt A. H., Stanic M., Molnár I., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **91**, 97–107 (2014).
- 26) Kormány R., Fekete J., Guillaume D., Fekete S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **89**, 67–75 (2014).
- 27) Kormány R., Molnár I., Fekete J., Guillaume D., Fekete S., *Chromatographia*, **77**, 1119–1127 (2014).
- 28) Chamseddin C., Jira T., *Anal. Methods*, **6**, 6702 (2014).
- 29) Iuliani P., Carlucci G., Marrone A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 46–55 (2010).
- 30) Debrus B., Guillaume D., Rudaz S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **84**, 215–223 (2013).
- 31) Rác N., Kormány R., Fekete J., Molnár I., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **108**, 1–10 (2015).
- 32) Krishna M. V., Dash R. N., Jalachandra, Reddy B., Venugopal P., Sandeep P., Madhavi G., *J. Saudi Chem. Soc.*, **20**, S313–S322 (2016).
- 33) Sanli N., Fonrodona G., Barbosa J., Özkan G. A., Beltran J. L., *Anal. Chim. Acta*, **537**, 53–61 (2005).
- 34) Debrus B., Lebrun P., Kindenge J. M., Lecomte F., Ceccato A., Caliaro G., Mbay J. M. T., Boulanger B., Marini R. D., Rozet E., Hubert P., *J. Chromatogr. A*, **1218**, 5205–5215 (2011).
- 35) Fasoula S., Zisi C., Nikitas P., Pappa-Louisi A., *J. Chromatogr. A*, **1305**, 131–138 (2013).
- 36) Ruiz-Angel M. J., Torres-Lapasió J. R., García-Alvarez-Coque M. C., *J. Chromatogr. A*, **1022**, 51–65 (2004).
- 37) Andrés A., Rosés M., Bosch E., *J. Chromatogr. A*, **1370**, 129–134 (2014).
- 38) Andrés A., Rosés M., Bosch E., *J. Chromatogr. A*, **1385**, 42–48 (2015).
- 39) Hubert C., Houari S., Rozet E., Lebrun P., Hubert P., *J. Chromatogr. A*, **1395**, 88–98 (2015).
- 40) Haddad P. R., Drouen A. C. J. H., Billiet H. A. H., De Galan L., *J. Chromatogr.*, **282**, 71–81 (1983).
- 41) Baeza-Baeza J. J., García-Alvarez-Coque M. C., *Anal. Chim. Acta*, **521**, 61–68 (2004).
- 42) Rosés M., *J. Chromatogr. A*, **1037**, 283–298 (2004).
- 43) Rosés M., Canals I., Allemann H., Siigur K., Bosch E., “Retention of Ionizable Compounds on

- HPLC. 2. Effect of pH, Ionic Strength, and Mobile Phase Composition on the Retention of Weak Acids.”: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac960105d>>, cited 26 November, 2015.
- 44) Canals I., Valkó K., Bosch E., Hill A. P., Rosés M., *Anal. Chem.*, **73**, 4937–4945 (2001).
 - 45) Andrés A., Téllez A., Rosés M., Bosch E., *J. Chromatogr. A*, **1247**, 71–80 (2012).
 - 46) Wiczling P., Kawczak P., Nasal A., Kaliszan R., *Anal. Chem.*, **78**, 239–249 (2006).
 - 47) Tham S. Y., Agatonovic-Kustrin S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 581–590 (2002).
 - 48) Kaliszan R., Baczek T., Buciński A., Buszewski B., Sztupecka M., *J. Sep. Sci.*, **26**, 271–282 (2003).
 - 49) Ruggieri F., D’Archivio A. A., Carlucci G., Mazzeo P., *J. Chromatogr. A*, **1076**, 163–169 (2005).
 - 50) Kawabe T., Tomitsuka T., Kajiro T., Kishi N., Toyo’oka T., *J. Chromatogr. A*, **1273**, 95–104 (2013).
 - 51) Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., Tussen R., De Galan L., *J. Chromatogr. A*, **149**, 519–537 (1978).
 - 52) Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., De Galan L., *J. Chromatogr.*, **218**, 261–284 (1981).
 - 53) Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., De Galan L., *Chromatographia*, **15**, 205–214 (1982).
 - 54) García-Álvarez-Coque M. C., Torres-Lapasió J. R., Baeza-Baeza J. J., *Anal. Chim. Acta*, **579**, 125–145 (2006).
 - 55) Chaminade P., Baillet A., Ferrier D., *J. Chromatogr. A*, **672**, 67–85 (1994).
 - 56) Vivó-Truyols G., Torres-Lapasió J. R., García-Álvarez-Coque M. C., *J. Chromatogr. A*, **1018**, 183–196 (2003).
 - 57) Sandhu J. S., Sharma A. K., Wadi R. K., *J. Chem. Eng. Data*, **31**, 152–154 (1986).
 - 58) Nikam P. S., Shirsat L. N., Hasan M., *J. Chem. Eng. Data*, **43**, 732–737 (1998).
 - 59) Tôrres R. B., Francesconi a. Z., Volpe P. L. O., *J. Mol. Liq.*, **110**, 81–85 (2004).
 - 60) Martins F., Leitão R. E., Ventura M. C., Pinheiro L., Nunes N., *J. Mol. Liq.*, **170**, 30–36 (2012).