

図 18:imp1 LC/M 分析チャート

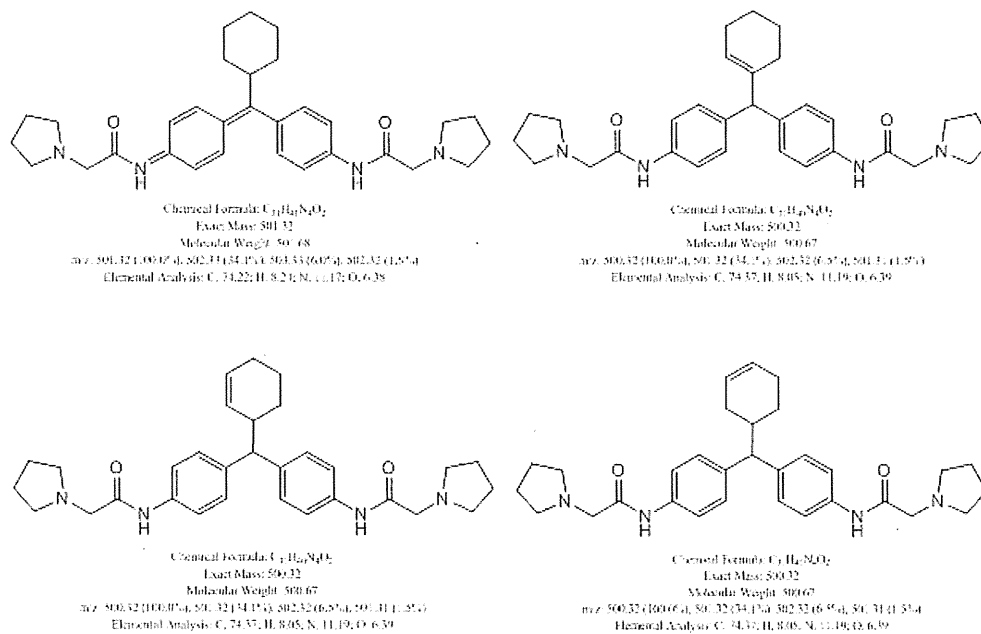


図 19:imp1推定構造体

LC/MS 分析の結果、imp1 の構造は、P092 の一部に 2 重結合が存在したもので、図-19 の構造体が考えられる。

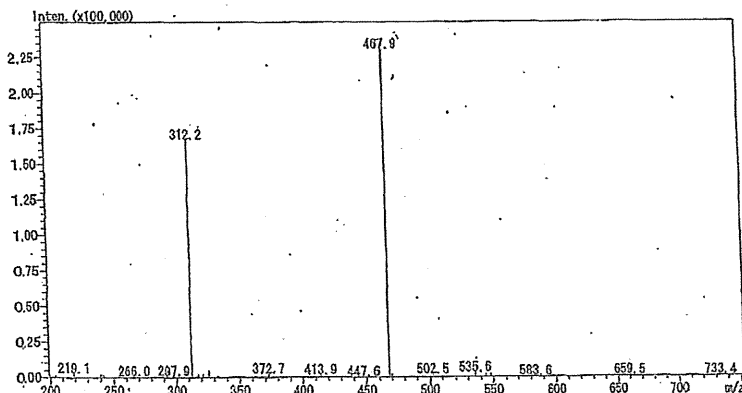
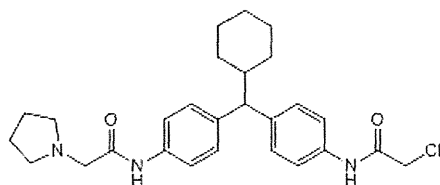


図 20:imp3 LC/MS 分析チャート



Chemical Formula: C₂₇H₃₄ClN₂O₂

Exact Mass: 467.23

Molecular Weight: 468.03

m/z: 467.23 (100.0%), 469.23 (32.3%), 468.24 (29.7%), 470.23 (9.7%), 469.24 (4.7%), 471.24 (1.5%), 468.23 (1.1%)

Elemental Analysis: C, 69.29; H, 7.32; Cl, 7.57; N, 8.98; O, 6.84

図 21: imp3 推定構造体

LC/MS 分析の結果、imp3 の構造は、図-21 の構造体が考えられる。第三工程で発生する一置換体と思われる。

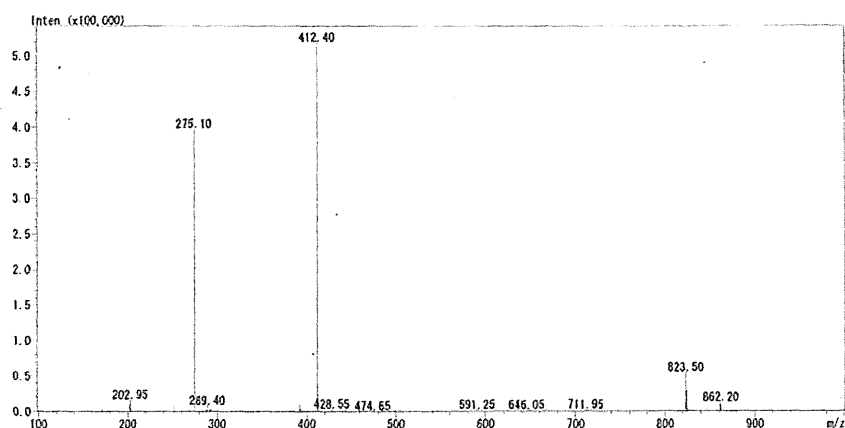
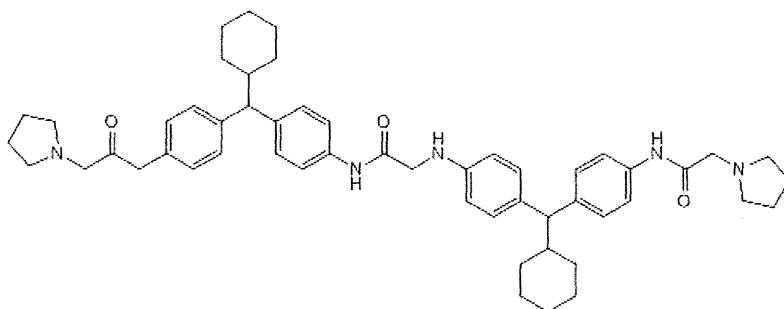


図 22: imp4 LC/MS 分析チャート



Chemical Formula: C₃₅H₄₆N₂O₂

Exact Mass: 521.52

Molecular Weight: 522.73

m/z: 521.0000 (100.0%), 523.0000 (32.3%), 522.0000 (29.7%), 524.0000 (9.7%), 523.0000 (4.7%), 525.0000 (1.5%), 522.0000 (1.1%)

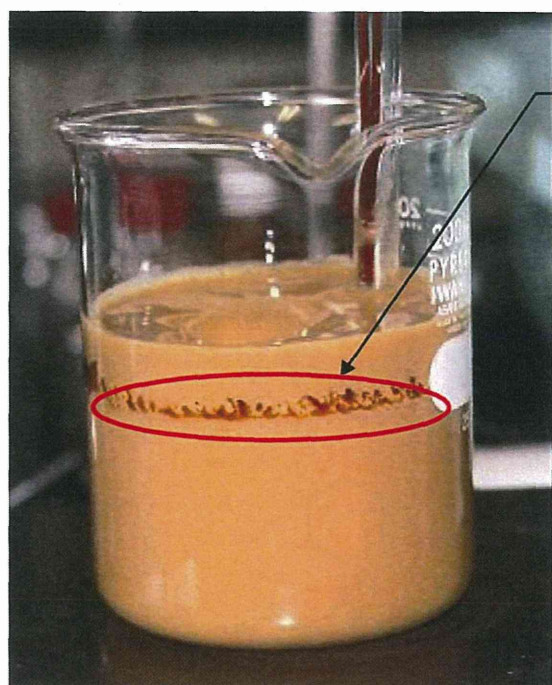
Elemental Analysis: C, 77.43; H, 8.21; N, 8.52; O, 3.84

図 23: imp4推定構造体

LC/MS 分析の結果、imp4 の構造は、図-23 の構造体が考えられる。第二工程で発生する一置換体と二置換体(目的物)が結合したものが生成し、さらに第三工程でピロリジンが付加されたものと考えられる。

5. 第一工程トルエン洗浄方法再検討

シクロヘキサンカルボキシアルデヒド 100g スケールで行った第一工程において、トルエン洗浄前の pH 調整で、粘着物質が pH 電極に付着し、pH 調整が困難となった。(図-24)



粘着性物質
pH 電極に付着し、pH 調整を困難とさせる

このため、pH3 でトルエン洗浄する前に pH1 であらかじめトルエン洗浄を行い、pH3 調整作業することにした。なお、pH1での洗浄回数は、図-25 に示したように 3 回で十分である。

図 24: 第一工程 pH 調整

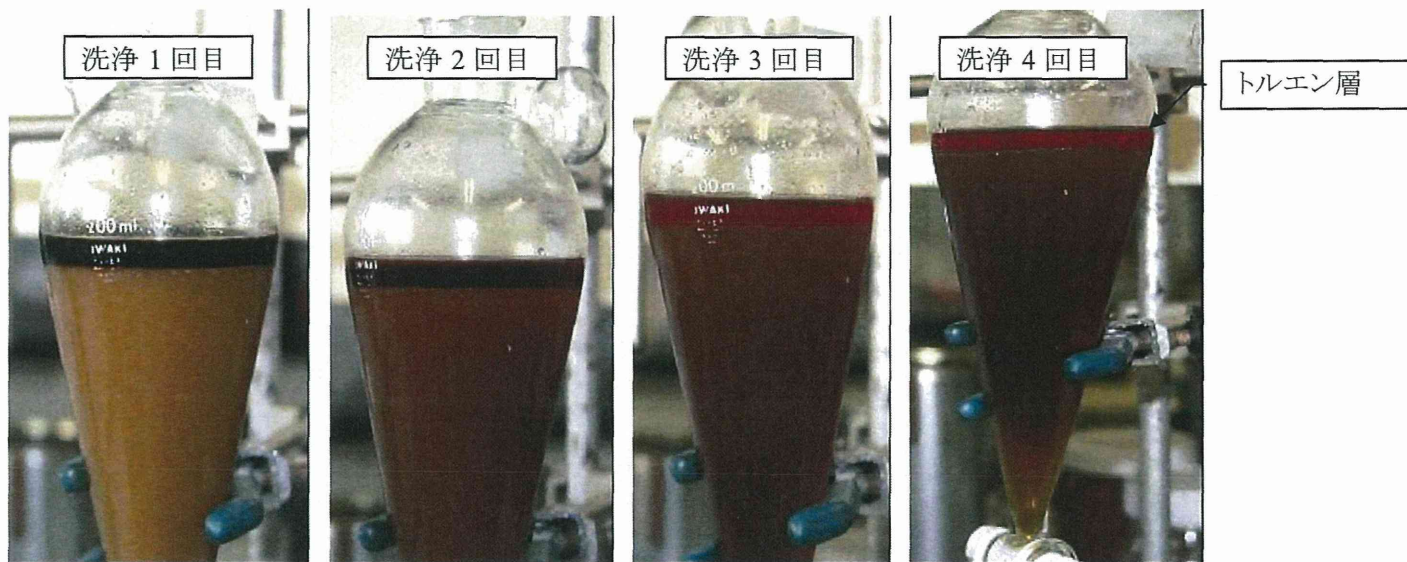


図 25: 第一工程 pH におけるトルエン洗浄回数と分液状況

洗浄回数 3 回目以降はトルエン層の色は変わらない。pH3 でもトルエン洗浄を実施することから、pH1 での洗浄回数は 3 回で十分であると判断した。したがって、nonGMP での第一工程におけるトルエン洗浄は、pH1 で 3 回、pH3 で 5 回の total 8 回洗浄とすることとした。

6. nonGMP 製造

シクロヘキサンカルボキシアルデヒド 25g、100g スケールで、ほぼ同等の品質が得られたことから、別紙のように製造フローを作成し、P092・2 マレイン酸塩 300g 納入に向けて nonGMP の製造を実施した。

①第一工程

シクロヘキシルカルボキシアルデヒド(以下 CCA)250g にアニリン 824g と濃塩酸(conc.36%)23g を添加して、窒素置換後、80℃に昇温してアニリン付加反応を行い、シクロヘキシルメチレンジアニリン(以下 CDA)反応液を得た。反応後、5%水酸化ナトリウム溶液 9.3g とジエチレングリコール 1020g を添加し、減圧蒸留でアニリンを留去した。留去後、2N 塩酸溶液とトルエンを添加しアニリン留去物を溶解し、5%水酸化ナトリウムで pH1 に調整した後、水層を分液した。さらに 2 回トルエン添加、分液を繰り返した後、水層を 5%水酸化ナトリウム溶液で pH3 に調整し、分液した。水層にトルエンを加え、分液・洗浄をする操作をさらに 4 回行った後、トルエン洗浄した水層に活性炭を添加し、室温で 30 分攪拌し、濾過により活性炭を除き活性炭処理液を得た。pH12 にコントロールしながら活性炭処理液と 5%水酸化ナトリウム溶液を添加し中和晶析を行った。析出した結晶を濾取して、45℃で減圧乾燥後 CDA388.2g 得た。

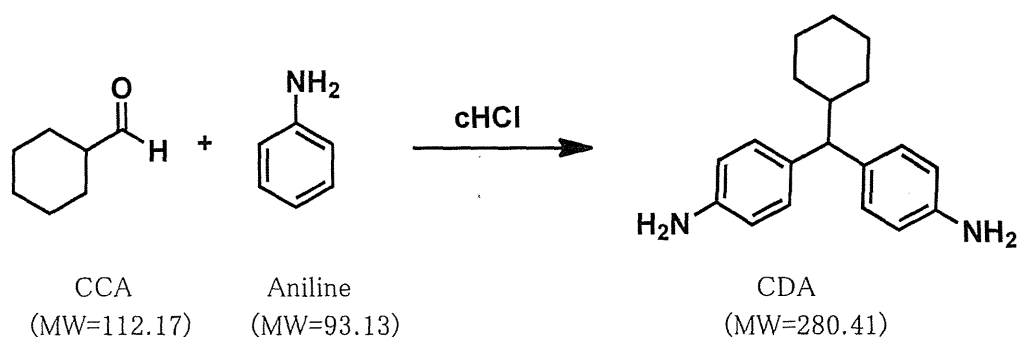


図 26:第一工程合成ルート

予め設定した管理項目を表-7 に結果のまとめを表-8 に示す。

表 7:第一工程 管理項目結果まとめ

工程	項目	基準	nonGMP KS14001
アニリン付加反応	反応温度	75~85℃	78.2~79.7℃
	反応時間	18~24hr	22hr
	冷却温度	50℃以下	44.1℃
アニリン留去	留去温度	60~140℃	135℃
	アニリン残存	HPLC エリア 0.1%以下	0.02%
トルエン洗浄-1	pH 調整	0.8~1.2	1.06
	内温	30℃以下	22.8℃
トルエン洗浄-2	pH 調整	2.8~3.2	3.1
	内温	30℃以下	20.5℃
中和晶析	晶析後 pH	10.0~12.5	11.24
	攪拌時間	1hr 以上	1hr
水スラリー	攪拌時間	1hr 以上	1hr
乾燥	水分	1.2%以下	0.5%

表-7 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。

表 8: 第一工程結果まとめ

項目	東京化成 実績 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	300g Non-GMP LotKS14001
仕込み原料	350g	25g	100g	250g
反応温度、時間	140℃、5hr	80℃、終夜	80℃、20hr	80℃、21.5hr
収量	426g	38.98g	151.9g	388.2g
収率	48.7%	62.4%	61.3%	62.1%
HPLC 純度	—	64.70%	78.2%	84.7%
晶析状態	—	良好	良好	良好

表-8 に示したように nonGMP 品は、収率 62.1%、HPLC 純度 84.7%と良好な結果であった。収率は、25g,100gスケールと同等、純度は25g、100gスケールより高い結果であった。第一工程については安定的に作業ができているものと考えられる。

②第二工程

CDA385g にジクロロメタン 4158mL とトリエチルアミン 328g を添加して、窒素置換した。窒素置換後、氷冷してクロロアセチルクロライド 366g 添加し、10℃以下でクロロアセチル化反応を行い、N,N'-[(シクロヘキシルメチレン)ジ-4,1-フェニレン]ビス(2-クロロアセトアミド)反応液(以下 CPCA) 反応液を得た。CDA 残存が規定ないであることを確認後、反応液を濾過洗浄して粗 CPCA 結晶 wet 体を得た。得られた wet 体をジクロロメタンで 3 回スラリー洗浄後、濾過、乾燥して粗 CPCA を 555g 得た。粗 CPCA553g にテトラヒドロフラン/シクロペンチルメチルエーテル(2:1)溶液 7188mL を加え、攪拌しながら 70~80℃に加温して溶解させた。溶解後、徐々に温度を下げて晶析させ、10℃以下で 2 時間以上攪拌した後、濾過、洗浄後、45℃で減圧乾燥させて CPCA 結晶 451g を得た。

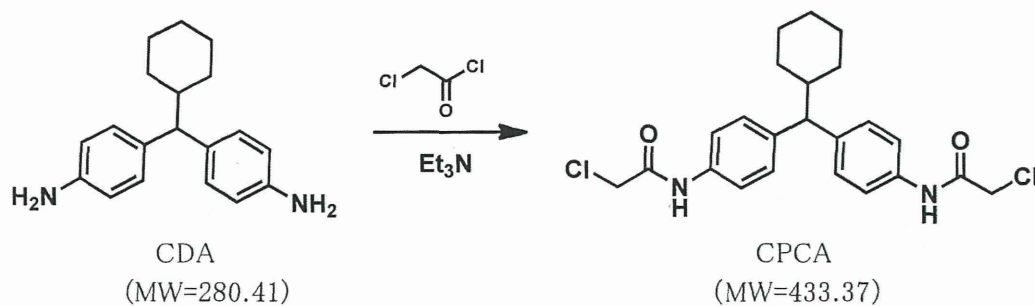


図 27: 第二工程合成ルート

予め設定した管理項目を表-9 に結果のまとめを表-10 に示す。

表 9: 第二工程 管理項目結果まとめ

工程	項目	基準	nonGMP
クロロアセチル化反応	反応温度	10℃以下	10℃以下
	CDA 残存量	HPLC エリア 1%以下	N.D.
ジクロロメタン洗浄-1	攪拌時間	10 分以上	13 分
ジクロロメタン洗浄-2	攪拌時間	10 分以上	20 分
ジクロロメタン洗浄-3	攪拌時間	10 分以上	15 分
再結晶	晶析温度	10℃以下	0.4~8.0℃
	晶析時間	2hr 以上	2hr
乾燥	乾燥減量	1%/hr 以下	0.7%/hr

表-9 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。

表 11: 第三工程 管理項目結果まとめ

工程	項目	基準	nonGMP
ピロリジン付加反応	反応温度	1~30℃	21.2~25.6℃
	HPLC r.r.t.1.20 付近 imp	1%以下	N.D.
再結晶	晶析温度	10℃以下	0.7~8.3℃
	晶析時間	2hr 以上	2hr
濾過-2	HPLC r.r.t.1.26 付近 imp	0.1%以下	0.11%
乾燥-1	乾燥減量	1%hr 以下	-
エタノール再結晶	晶析温度	10℃以下	0.9~9.9℃
	晶析時間	2hr 以上	2.5hr
濾過-3	HPLC r.r.t.1.16 付近 imp	0.1%以下	0.17%
エタノール再結晶-2	晶析温度	10℃以下	0.4~7.7℃
	晶析時間	2hr 以上	2hr
濾過-3	HPLC r.r.t.1.16 付近 imp	0.1%以下	0.07%
乾燥-2	乾燥減量	1%/hr 以下	0.24%

表-11 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。なお、エタノール再結晶については、1 回目の処理で HPLC r.r.t.1.16 付近の imp が 0.17%(HPLC area%)と基準を超えていたため、2 回目の再結晶を実施し、0.07%以下とした。

表 12: 第三工程結果まとめ

項目	東京化成 実績 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	300g Non-GMP LotKS14001
仕込み原料	515g	10.0g	153g	450g
反応時間	18hr	22hr	109hr	20.5hr
粗体収量	580g	11.44g	173.29g	519.2g
粗体収率	96.8%	98.6%	97.6%	99.5%
粗体 HPLC 純度	—	98.60%	98.4%	98.7%
精製1収量	—	11.56g	143.9g	521.5g
精製1収率	—	99.7%	81.2%	99.9%
精製晶1HPLC 純度	—	99%	98.8%	99.3%
精製2収量	450g	9.62g	119.9g	440.5g
精製2収率	75.3%	82.90%	67.8%	84.4%
精製晶2HPLC 純度	—	99.40%	99.2%	99.3%
精製3収量	—	—	115.8g	425.4g
精製3収率	—	—	65.4%	81.5%
精製晶3HPLC 純度	—	—	99.4%	99.6%

表-12 に示したように nonGMP 品は、収率 81.5%、HPLC 純度 99.6%と良好な結果であった。100g スケールにおいて反応が遅延し、1 置換体の残存が確認されたが、原料の分割添加を 30 分と短時間で行い、添加後の反応を 25℃の一定温度で行う事により 25g スケールと同様の反応速度で進行させることができた。1 置換体以外の主な不純物は 100g スケールと同様の結果が得られているが、Imp4 の area%が 0.116 と目標の 0.10%以下より若干高くなった。GMP 製造時は THF/IPE 溶液による再結晶を 1 回増やす(2 回実施)ことで対応できるものと考えられた。以上の結果から、第三工程についても安定的に作業ができるものと考えられるが、結晶に黄色の着色が認められた。

④着色対策

第三工程で得られた P092 の結晶に黄色の着色が認められたため、活性炭による脱色効果を確認した。

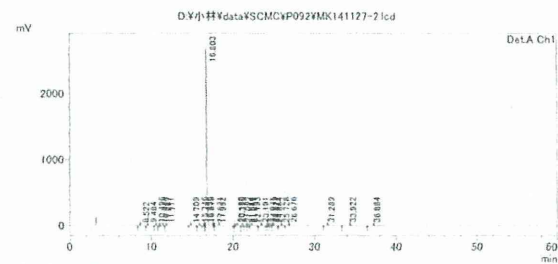
操作としては、第四工程のマレイン酸塩化前、THF 溶解後に実施するのがよいと考えた。P092 結晶 5g を THF に溶解させ、0.1%w/w の活性炭を添加、室温で 30 分攪拌後、濾過して活性炭を除去した。その結果を図-29 に示す。



図 29:活性炭処理前後の溶液比較

図-29 に示したように活性炭処理により溶液の着色が明らかに改善された。

<クロマトグラム>

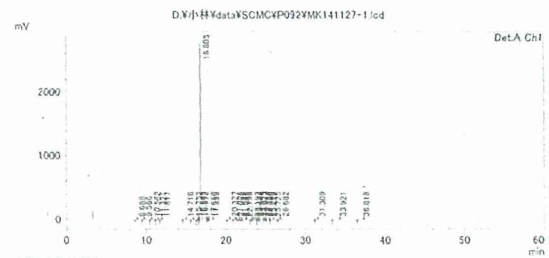


1 Det.A Ch1/254nm

<ピークレポート>

SPD-20A Ch1/254nm	ピーク#	保持時間	面積	高さ	面積%	高さ%	アーク
1	5.522	565	50	0.002	0.002		
2	9.494	294	28	0.001	0.001		
3	10.458	628	69	0.003	0.003		
4	10.950	146	24	0.001	0.001		
5	11.267	356	54	0.002	0.002		
6	11.771	487	78	0.002	0.003		
7	14.709	8455	1445	0.040	0.052		
8	15.746	21718	3264	0.091	0.118		
9	16.336	879	129	0.004	0.005		
10	16.578	195	43	0.001	0.002		
11	16.603	2327311	2756200	59.536	69.452	V	
12	17.021	1281	143	0.005	0.005	V	
13	17.852	3166	297	0.014	0.017	V	
14	20.159	854	93	0.003	0.004		
15	20.326	2099	259	0.009	0.010	V	
16	21.092	196	32	0.001	0.001		
17	21.644	18194	1721	0.052	0.062		
18	21.851	3337	443	0.014	0.016	V	
19	22.193	1271	154	0.005	0.006	V	
20	23.181	1401	152	0.008	0.009		
21	24.075	190	31	0.001	0.001		
22	24.379	560	103	0.002	0.004		
23	24.571	26043	3430	0.111	0.125	V	
24	24.954	576	76	0.002	0.003	V	
25	25.228	8757	1149	0.037	0.041		
26	26.678	2956	241	0.015	0.012		
27	31.269	854	69	0.004	0.002		
28	33.922	5007	195	0.021	0.007		
29	36.934	2718	114	0.012	0.004		
合計		23405812	2770159	100.000	100.000		

図 30:炭処理前 HPLC チャート



1 Det.A Ch1/254nm

<ピークレポート>

SPD-20A Ch1/254nm	ピーク#	保持時間	面積	高さ	面積%	高さ%	アーク
1	5.522	565	50	0.002	0.002		
2	9.494	294	28	0.001	0.001		
3	10.458	628	69	0.003	0.003		
4	10.950	146	24	0.001	0.001		
5	11.267	356	54	0.002	0.002		
6	11.771	487	78	0.002	0.003		
7	14.709	8455	1445	0.040	0.052		
8	15.746	21718	3264	0.091	0.118		
9	16.336	879	129	0.004	0.005		
10	16.578	195	43	0.001	0.002		
11	16.603	2327311	2756200	59.536	69.452	V	
12	17.021	1281	143	0.005	0.005	V	
13	17.852	3166	297	0.014	0.017	V	
14	20.159	854	93	0.003	0.004		
15	20.326	2099	259	0.009	0.010	V	
16	21.092	196	32	0.001	0.001		
17	21.644	18194	1721	0.052	0.062		
18	21.851	3337	443	0.014	0.016	V	
19	22.193	1271	154	0.005	0.006	V	
20	23.181	1401	152	0.008	0.009		
21	24.075	190	31	0.001	0.001		
22	24.379	560	103	0.002	0.004		
23	24.571	26043	3430	0.111	0.125	V	
24	24.954	576	76	0.002	0.003	V	
25	25.228	8757	1149	0.037	0.041		
26	26.678	2956	241	0.015	0.012		
27	31.269	854	69	0.004	0.002		
28	33.922	5007	195	0.021	0.007		
29	36.934	2718	114	0.012	0.004		
合計		23731507	2785509	100.000	100.000		

図 31:炭処理後 HPLC チャート

炭処理前後の HPLC チャートを図-30,-31 に示した。炭処理の影響で新たに増え類縁物質は認められず、imp2 の類縁物質が 0.052%から 0.007%と改善された。したがって、炭処理により HPLC 類縁物質が増えることはなく、工程を追加することは問題ないと判断した。

表 14: 第四工程 精製 工程管理項目 まとめ

工程	項目	基準	nonGMP
溶解	溶解温度	70~80℃	77.9℃
晶析	晶析温度	10℃以下	0.3~10℃
	晶析時間	2hr 以上	2.4hr
乾燥	残留溶媒エタノール	3500ppm 以下	2219ppm

表-14 に示したように、予め設定した管理項目については、すべて基準内であった。

第四工程 粗体、精製の製造結果を表-15 に示す。

表 15: 第四工程 製造結果まとめ

項目	東京化成 実績 LotFA5QJ	25g 実験	100g 実験	300g Non-GMP LotKS14001
仕込み原料	450g	8.00g	60g	400g
反応時間	4hr	4hr	5hr	4hr
粗体収量	719g	12.49g	91.7g	624.7g
粗体収率	109%	107%	104.6%	106.7%
粗体 HPLC 純度	—	99.40%	99.5%	99.7%
精製収量	584g	10.77g	4.22g	506.5g
精製後収率	88.9%	92.1%	88.3%	86.6%
精製品 HPLC 純度	99.6%	99.5%	99.6%	99.7%
Total yield	25.5%	33.9%	26.6%	33.2%

表-15 に示したように、精製後収率は 86.6%と 100g スケールとほぼ同等、HPLC 純度は 99.7%と 25g、100g スケールより若干良い結果となった。第一工程から Total 収率は 33.2%と 25g スケールとほぼ同じで、小実験を追認した形となった。結晶の着色については、炭処理により粗体の着色は改善されたが、精製工程の加温溶解操作で着色が強くなった結果、精晶に若干の黄色着色が認められた。

今回認められた結晶の着色に関しては、工程途中の熱虐待が原因と考えられるが、製法上回避することが難しい。また、現在長期安定性試験を実施している東京化成品にも経時的に着色が認められ、回避できない問題と思われる。したがって、現状に合わせた規格変更(性状: 白色~微黄色、溶状: 無色又は微黄色澄明)を行った。

7. 試験結果

設定した試験方法に準じて製造した P092・2 マレイン酸塩の品質を評価した。その結果を表 16 に示した。

表 16: nonGMP 品 LotKS1401 の試験結果

試験項目		規格	nonGMP LotKS1401
性状	外観	白色から微黄色の結晶性粉末	わずかに黄色の結晶性粉末
確認試験	IR	標準品のスペクトルと同一波数のところに同様の強度の吸収を認める	適
	マレイン酸定性 (TLC)	試料溶液から得られたスポットのうち一つは標準溶液のスポットと Rf 値及び濃さが同等	適
pH		3.5~5.0	pH4.0
純度試験	溶状	無色又は微黄色澄明	微黄色澄明
	塩化物	0.01%以下	0.01%以下
	重金属	20ppm 以下	20ppm 以下
	砒素	2ppm 以下	2ppm 以下
	類縁物質 (HPLC)	1%以下(個々の不純物 0.15%以下)	1%以下(最大不純物 0.11%、総不純物 0.3%)
	残留溶媒	<ul style="list-style-type: none"> ・エタノール 5000ppm 以下 ・THF 720ppm 以下 ・トルエン 890ppm 以下 ・ジクロロメタン 600ppm 以下 ・CPME 5000ppm 以下 ・酢酸エチル 5000ppm 以下 ・IPE 5000ppm 以下 	<ul style="list-style-type: none"> ・エタノール 5000ppm 以下 (2066ppm) ・THF 720ppm 以下 (153ppm) ・トルエン 890ppm 以下 (0ppm) ・ジクロロメタン 600ppm 以下 (0ppm) ・CPME 5000ppm 以下 (0ppm) ・酢酸エチル 5000ppm 以下 (0ppm) ・IPE 5000ppm 以下 (0ppm)
	エンドトキシン	0.5EU/mg 以下	0.5EU/mg 以下
	水分	10%以下	10%以下 (0.3%)
強熱残分	0.1%以下	0.1%以下(0.01%)	
定量(非水滴定)	98%~102%	99.6%	
微生物試験	細菌 50 ヶ/g 以下 真菌 10 ヶ/g 以下 大腸菌群 陰性	細菌 50 ヶ/g 以下 真菌 11 ヶ/g 以下 大腸菌群 陰性	

表-16 に示したように製造した P092・2 マレイン酸塩 LotKS14001 は、すべての項目で試験規格を満足した。

P092・2 マレイン酸塩

3. 規格検討結果報告

【概要】

GMP製造を行うに当たり、岐阜大学から開示されたP092・2マレイン酸塩の規格及び試験方法の見直しを行った。

① エンドトキシン試験	追加
② 微生物試験	追加
③ 残留溶媒	追加
④ 溶状 規格および試験方法	変更
⑤ 類縁物質の規格	変更
⑥ pHの試験方法	変更
⑦ 性状の規格	変更
⑧ NMR	削除
⑨ X線回析	削除
⑩ HPLCによる定量	削除

とした。

以上の結果を「物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料」としてまとめ、岐阜大学に提出するとともに岐阜大学の指示でPOCクリニカルリサーチ株式会社に提出した。

1. 開示された規格及び試験方法

岐阜大学から開示された規格及び試験方法を別紙-1、-2 に示した。GMP 製造にあたり、危惧された課題を表-1 にまとめた。これらについて検討を実施した。

表 1: 試験規格、方法課題まとめ

項目		課題	対応
物理的・化学的性質		東京化成で行った安定性試験時の溶解性試験で規格を外れた	規格見直し
確認試験	NMR	IRと重複	試験から除外
PH		東京化成で行った安定性試験時の試験では、懸濁状態で測定	試験方法見直し
純度試験	溶状	不溶物の確認ができない	試験方法見直し
	類縁物質	ICHの不純物ガイドラインとの相違	規格見直し
	残留溶媒	規格、試験方法なし	規格、試験方法設定
	エンドトキシン	規格、試験方法なし	規格、試験方法設定
定量		HPLCと非水滴定重複	見直し
微生物試験		規格、試験方法なし	規格、試験方法設定
X線回析		結晶多形存在せず	試験から除外

2. 規格、試験方法検討

2-1. 物理的・化学的試験(溶解性)

日本薬局方の通則に記載されている溶解性を示す用語を表-2 に示した。

用語	溶質1g又は1mLを溶かすのに要する溶媒量	
極めて溶けやすい	1mL未満	
溶けやすい	1mL以上	10mL未満
やや溶けやすい	10mL以上	30mL未満
やや溶けにくい	30mL以上	100mL未満
溶けにくい	100mL以上	1000mL未満
極めて溶けにくい	1000mL以上	10000mL未満
ほとんど溶けない	10000mL以上	

開示された P092・2 マレイン酸塩の溶解性は「メタノールに溶けやすく、水およびエタノールにやや溶けにくい」であった。一方で、長期安定性試験で溶解性評価を行ったところ、溶解性が異なることが指摘されている。このため、日局方に準じた試験方法で、溶解性を評価した。

2-1-1. 方法

評価方法は、日局方の試験方法に準じて行った。すなわち、P092・2 マレイン酸塩を①1g(1g/10mL未満相当)、②333mg(1g/30mL未満相当)、③100mg(1g/100mL未満相当)、④10mg(1g/1000mL相当)、⑤1mg(1g/10000mL相当)量りとり、メタノール、水、エタノール(99.5%)、それぞれの溶媒を10mL加え(①は5mL)、20℃±5℃で5分ごとに強く30秒振り混ぜ、30分後の溶状を目視で確認した。

2-1-2. 結果

それぞれの溶媒で行った結果を表-2,-3,-4 及び図-1、-2、-3 に示した。

表 2:メタノール溶媒での溶解性確認結果

サンプル	結果	用語
①	不溶	溶けやすい
②	溶解	やや溶けやすい
③	溶解	やや溶けにくい
④	溶解	溶けにくい
⑤	溶解	極めて溶けにくい

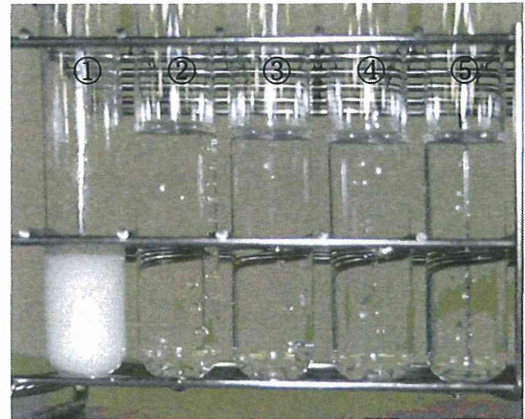


図 1:メタノール溶媒での溶解性確認結果

表 3:エタノール溶媒(99.5%)での溶解性確認結果

サンプル	結果	用語
①	不溶	溶けやすい
②	不溶	やや溶けやすい
③	不溶	やや溶けにくい
④	溶解	溶けにくい
⑤	溶解	極めて溶けにくい



図 2:エタノール溶媒(99.5%)での溶解性確認結果

表 4:水での溶解性確認結果

サンプル	結果	用語
①	不溶	溶けやすい
②	不溶	やや溶けやすい
③	不溶	やや溶けにくい
④	溶解	溶けにくい
⑤	溶解	極めて溶けにくい

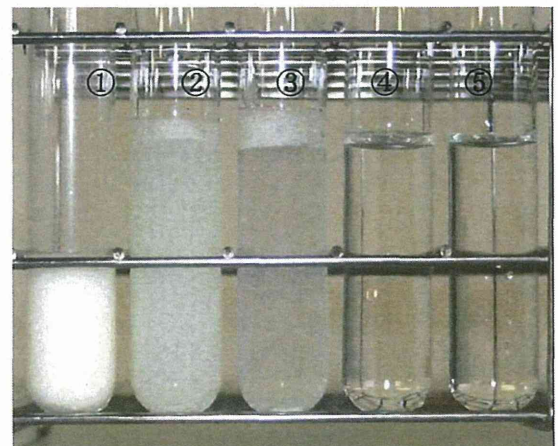


図 3:水での溶解性確認結果

以上の結果から、P092・マレイン酸塩の溶解性については、「メタノールにやや溶けやすく、水及びエタノール(99.5%)」に溶けにくいとした。

2-2. pH

開示された pH の試験方法では、「本品 1g を、煮沸し冷却した水 100mL に溶かした液の pH は 3.5 ~5.0」とあるが、この条件で試料溶液を調製したところ、液は白濁状態であった。不溶物を遠心回収し、HPLC で分析した結果、不溶物は P092・2 マレイン酸塩であることが確認できた。不溶物が存在する状態では正確な pH が測れていない可能性があるため、加温溶解して pH を測定した。その結果、わずかながら pH が上昇した。このため、pH の測定は、加温溶解後、試料溶液を 25℃ 付近まで冷却して測定する方法に変更した。

表 5:pH 測定 加温の有無による pH 比較

	加温なし	加温あり
試料1(Lot25PF-QJ)	pH3.99	pH4.03
試料2(LotKS14001)	pH3.99	pH4.03

測定温度:25±3℃



図 4: 加温なし



図 5: 加温あり

2-3. 溶状

開示された溶状の試験方法では「本品 1g を熱水 20mL に溶解するとき、溶液は、無色わずかな微濁」とある。濁りが判定や不溶物の確認の妨げになる可能性があるため、温度による溶解状態を確認した。その結果、70℃に加温することで、溶液が澄明になることが確認できた。

一方、溶液の色については、nonGMP 製造時にわずかながら結晶の着色(黄色)が認められ、溶状も微黄色となった。P092・2 マレイン酸塩の結晶着色については、先行で行われている安定性試験において、経時的に認められることから、現時点では「無色澄明」から「無色又は微黄色澄明」とすることが妥当だと判断した。

従って、溶状については、「本品 1g に水 20mL を加え、70℃で加温溶解するとき、液は無色又は微黄色澄明」と変更した。なお、溶状の規格変更に伴い、性状(結晶の色)も「白色の結晶性粉末」から「白色から微黄色の結晶性粉末」に変更した。



図 4 : P092・2 マレイン酸塩 加温温度と溶解状態

表 6:P092・2 マレイン酸塩 加温温度と溶解状態

温度	40℃	50℃	60℃	70℃
濁りの有無	+	+	±	-

2-5. 類縁物質

開示された類縁物質の規格は、HPLC area1%以下であったが、「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」(日米EU医薬品規制調和国際会議:ICH)に照らし合わせて、最大類縁物質 0.15%以下、類縁物質 1%以下と変更した。

2-6. 残留溶媒

開示された規格及び試験方法には、残留溶媒の項目が無い。このため、「医薬品の残留溶媒ガイドライン」(平成10年3月30日 医薬審第307号)に基づき新たに残留溶媒の規格を設定した(表-7)。

表 7: 残留溶媒規格

対象溶媒	規格値
エタノール	5000ppm 以下
テトラヒドロフラン(THF)	720ppm 以下
トルエン	890ppm 以下
ジクロロメタン	600ppm 以下
シクロペンチルメチルエーテル(CPME)	5000ppm 以下
酢酸エチル	5000ppm 以下
イソプロピルエーテル(IPE)	5000ppm 以下

これらの溶媒を測定する方法として、ガスクロマトグラフィーでの測定方法を検討した。

2-6-1. 方法

P092・2 マレイン酸塩 LotKS14001 0.5gを5mlメスフラスコにとり、残留溶媒試験用DMFで溶解し、メスアップし試料溶液とした。試料溶液1 μ Lを正確にガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラフのピーク面積を測定した。

分析条件

装置: ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(シマス GC-2010、TurboMatrix40)

カラム: Fused Silica, ϕ 0.32 \times 60m, 6% cyanopropylphenyl and 94% methyl polysiloxane

オープン温度: 100 $^{\circ}$ C ニードル温度: 110 $^{\circ}$ C トランスファー温度: 120 $^{\circ}$ C

HS キャリアガス圧力: 270kPa

試料気化室(HSSPL)

注入モード: スプリット 気化室温度: 200 $^{\circ}$ C キャリアガス: He

カラム流量: 2.5mL/min 線速度: 32.1cm/sec ページ流量: 3.0mL/min

カラムオープン

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C 平衡時間: 2.0min

カラム温度プログラム: 40 $^{\circ}$ Cで5分間その後12 $^{\circ}$ C/minで100 $^{\circ}$ Cまで昇温

100 $^{\circ}$ Cで0.1分間その後、35 $^{\circ}$ C/minで250 $^{\circ}$ C昇温 250 $^{\circ}$ Cで6分間保持する

(合計時間 20.39min)

検出器

検出器温度: 260 $^{\circ}$ C メイクアップガス: N₂/Air

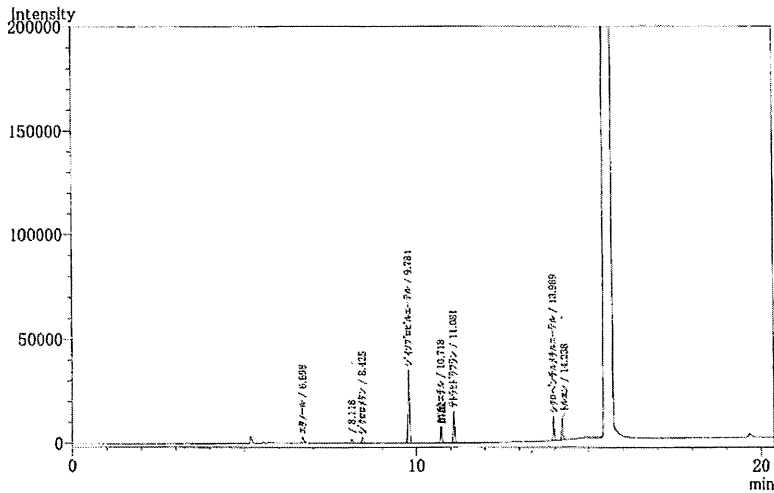
メイクアップ流量: 45mL/min

H₂ 流量: 40mL/min Air流量: 400mL/min

2-6-2. 結果

ガスクロマトグラフィー測定の結果、目的とする溶媒の分離もよく、残留溶媒が測定できることが確認できた(図-7,-8)。したがって、GC による残留溶媒の測定方法を試験項目に追加した。

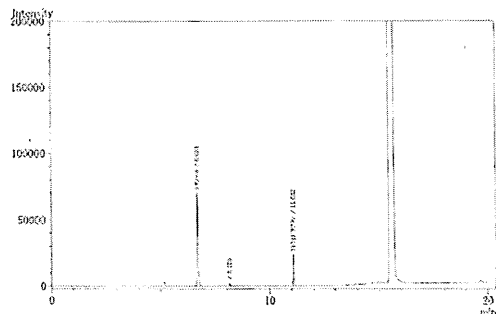
サンプルID : 検出確認(100ppm相当)
 サンプルタイプ : 未知
 注入量 : 0.05
 内標量 :
 データファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\VP092・2マレイン酸塩\141211\008
 メソッドファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\VP092・2マレイン酸塩\141211\141



ピーク番号	保持時間	面積	高さ	マーク ID#	化合物名
1	✓ 6.698	✓ 11073	2801	1	エタノール
2	✓ 8.118	5853	1691		
3	✓ 8.425	✓ 8284	2631	4	ジクロロメタン
4	✓ 9.784	✓ 120913	34367	7	ジイソプロピルエーテル
5	✓ 10.718	✓ 20642	7672	6	酢酸エチル
6	✓ 11.081	✓ 41086	14747	2	テトラヒドロフラン
7	✓ 13.989	✓ 30596	11579	5	シクロペンチルメチルエーテル
8	✓ 14.238	✓ 26229	9973	3	トルエン
合計		264676	85461		

図 5 : 各溶媒 100ppm 相当の GC チャート

分析日時 : 2014/12/11 23:27:48
 分析者 : tohazawa
 実行番号 : 10
 サンプル名 : VP02・2マレイン酸塩
 サンプルID : No.RS14001 n=1
 サンプルタイプ : 未知
 注入量 : 0.05
 内標量 :
 データファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\VP092・2マレイン酸塩\141211\010
 メソッドファイル : C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\VP092・2マレイン酸塩\141211\141



ピーク番号	保持時間	面積	高さ	マーク ID#	化合物名
1	8.681	✓ 245221	69376	1	エタノール
2	8.129	6529	1801		
3	11.092	✓ 65050	23533	2	ジイソプロピルエーテル
合計		316791	91870		

図 6 : LotKS14001 の GC チャート

2-7. エンドトキシン

本品は、投与経路を静脈とする注射剤であることから、エンドトキシン濃度を規定する必要がある。まず、規格値についての考察を行った。P092 は静脈内注射であることから、投与経路による規定量(表-8)より、kg 当たりの規定量は 5EU(K 値)となる。投与量は、現在 10mg/kg(M 値)であることから、P092・2 マレイン酸塩の規格値は $5\text{EU}/10\text{mg}=0.5\text{EU}/\text{mg}$ となる。この数値を規格値とした。

次に、この規格値のエンドトキシンが測定可能か検討を行った。

2-7-1. 方法

比濁法を用いて反応干渉因子試験を行ったところ、検体の 40 倍希釈で測定可能であることが確認できた(表-9)。

弊社で調製した P092・2 マレイン酸塩(Lot20141008)に含まれるエンドトキシンは規格内(0.5EU/mg 以下)であった。

表 8: 投与経路によるエンドトキシン規定値

投与経路	K(EU/kg)
静脈	5
静脈(放射性医薬品)	2.5
脊髄腔内	0.2
その他の投与経路	5

表 9: 比濁法による干渉因子試験結果

希釈倍率	サンプル濃度	試験結果	回収率 (%)	判定
2 倍	5mg/mL	0.457EU/mg	1738	不適
4 倍	2.5mg/mL	0.048EU/mg	133	不適
20 倍	0.5mg/mL	0.010EU/mg	34	不適
40 倍	0.25mg/mL	0.020EU/mg	90	適
200 倍	0.05mg/mL	0.101EU/mg	8	不適

回収率 50~200%の範囲⇒測定可能

以上の結果から、P092・2 マレイン酸塩中のエンドトキシンは測定可能と判断し、試験規格項目に追加した。

2-8. 微生物試験

弊社で通常行っている微生物試験方法で微生物試験が可能であることを確認し、試験項目として追加した。

以上の検討内容を踏まえ、別紙に示した「物理的・化学的性質ならびに規格及び試験法に関する資料」に試験方法及び規格をまとめた。