

Agilent 7697A ヘッドスペースサンプラ、 8890/5977 GC/MSD システムを用いた N-ニトロソジメチルアミンおよび N-ニトロソジエチルアミンの分析

US FDA ガイダンスに基づく AT1 受容体拮抗薬の不純物分析

著者

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 8890 GC による AT1 受容体拮抗薬中の不純物分析を米国食品医薬品局 (US FDA) メソッドに従って実行する方法を説明します。このワークフローでは、Agilent 7697A ヘッドスペースサンプラ (HSS) と 5977 GC/MSD を用います。分析結果は、予測した検出値と一致しました。

はじめに

世界保健機構によると、25 歳以上の成人の 35 ~ 46 % が高血圧症です¹。高血圧症は、世界中で 10 億人以上の人に影響を及ぼしています²。バルサルタン、ロサルタンなどのアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) は、世界中で入手でき比較的安価なため、高血圧症の治療用に一般的に処方されている薬剤です。ARB のメカニズムはアンジオテンシン II とその受容体との結合を阻害し、血管の収縮を防ぎ、効果的に血圧を低下させます³。

2018 年 7 月、汚染物質リスクに起因するバルサルタン製品の世界規模のリコールが発表されました。最初に特定された汚染物質は、N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) です。US FDA は、製造施設向けの指針として、バルサルタン製品中の発がん性が疑われる不純物を出荷前にスクリーニングする手順を公開しました⁴。2 つ目の汚染物質は、最初の汚染物質 NDMA のリコールの直後に特定され、欧州医薬品庁によって確認されました⁵。この N-ニトロソジエチルアミン (NDEA) は NDMA と同様に、発がん性のある物質に分類され、AT1 受容体拮抗薬クラスの医薬品に共通するテトラゾール環の合成中に二次生成物として生成されると考えられています。この新しく確認された汚染物質がテトラゾール環と関連していたことで、最初のリコールが拡大し、製造中のすべての AT1 受容体拮抗薬に影響しました。欧州医薬品庁の報告書を受け、US FDA は 2 種類の汚染物質に単一メソッドで対処するための補足の規制手順を作成しました。この修正により、調製用溶媒が変更され、別の GC カラムが用いられることになりました⁶。2019 年 1 月に発行されたこの文書では、GC/MS とヘッドスペースサンプリング

を用いた原薬と最終製品の両方の分析について、NDMA と NDEA の定量下限 (LOQ) 値をそれぞれ 0.10 ppm と 0.05 ppm に定めています。FDA の手順は Agilent 7890A GC で実行されましたが、このアプリケーションノートでは Agilent 8890 GC システムが 7890 システムと同等の優れた性能を有していることを示します。

実験方法

NDMA および NDEA 標準は非希釈のものを MilliporeSigma 社 (米国マサチューセッツ州パーリントン) から購入しました。FDA のガイダンス⁶ では、純度 99.0 % 以上の 1-メチル-2-ピロリジノン (NMP) を使用するように定められています。しかし、より高い純度の溶媒 (99.7 %, MilliporeSigma) を使用したところ、所定の条件に従った場合に、溶媒不純物からのターゲット化合物の分離能が向上しました。この分析は、その他のグローバルな規制機関にも適用できるため、試料調製に純度の低い溶媒を使用すると、分離能の良いデータを得るためのパラメータを柔軟に設定できる場合とできない場合があるかもしれません。本報のデータは、この評価を含め、FDA プロトコルを遵守して取得しました。

次の表に、メソッド条件まとめています。今回の分析は高速 GC オープン (240 V) で実行しましたが、このオプションは結果を得るうえで必須ではありません。ヘッドスペースメソッドの開発に有用な別のオプションとして、ヘッドスペーストランスファーラインアクセサリがあります。これを用いると、構成を変えずに同じ注入口でヘッドスペース注入機能と液体注入機能に対応できます。表 1 に、この実験で使用した消耗品を示します。標準液を FDA ガイダンスに従って準備し、さらに 1 µg/mL のポイントを追加して準備しました。

メソッド条件

Agilent 7697A ヘッドスペースサンブラ条件	
オープン温度	130 °C
ループ温度	180 °C
トランスファーライン温度	185 °C
バイアル平衡化時間	15 分
注入時間	1 分
バイアルサイズ (mL)	20 mL
バイアル攪拌	レベル 5
充填モード	デフォルト
充填圧力	15 psi
ループ充填モード	デフォルト

Agilent 8890 GC パラメータ	
注入口 (スプリット/スプリットレス)	ヘリウム
温度	220 °C
モード	スプリット
スプリット比	5:1
吸気口圧力 (初期)	7.33 psi
オープンタイプ	240 V 高速オープン
平衡化時間	1 分
オープンプログラム	40 °C で 0.5 分間 20 °C/min で 160 °C に昇温、 10 °C/min で 240 °C に昇温、 2 分間ホールド 合計サイクルタイム: 16.5 分
カラム	Agilent J&W DB-1701、 30 m × 250 µm、1.0 µm
モード	定流量
流量	1 mL/min

Agilent 5977 GC/MSD 条件	
イオン源タイプ	エクストラクタ
イオン源温度	230 °C
マスフィルタモード	選択イオンモニタリング (SIM)
NDMA m/z	74.00
NDEA m/z	102
レンズ直径	6 mm
四重極温度	150 °C
NDMA ドウェル	150
NDEA ドウェル	150

表 1. 分析で使用した消耗品

説明	部品番号
ヘッドスペースバイアル (20 mL)	5182-0837
バイアルキャップ	5183-4477
GC ライナ	5190-2295
GC セブタム	5183-4759
カラム DB-1701	122-0733
エクストラクタレンズ (6 mm)	G3870-20448

結果と考察

分離は十分に行われ、溶媒およびマトリックス種からターゲットピークが十分に分離しています。図 1 に、クロマトグラム例を示します。

リテンションタイムは FDA 規制で提供されるリテンションタイムと一致しました。図 2A と 2B に、NDMA と NDEA の最も低い 3 つのキャリブレーションポイント (0.025、0.05、0.1 μg) の重ね表示を示します。

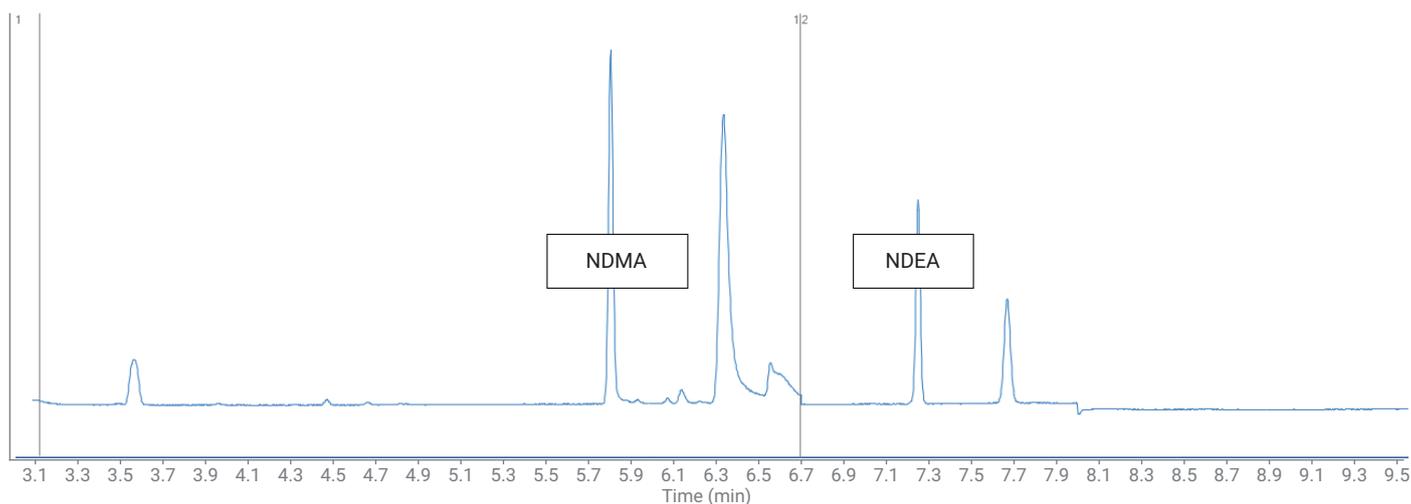


図 1. NMP 中の NDMA および NDEA の 1 μg 標準混合物の選択イオンモードでのクロマトグラム。NDMA のリテンションタイムは 5.80 分、NDEA のリテンションタイムは 7.25 分

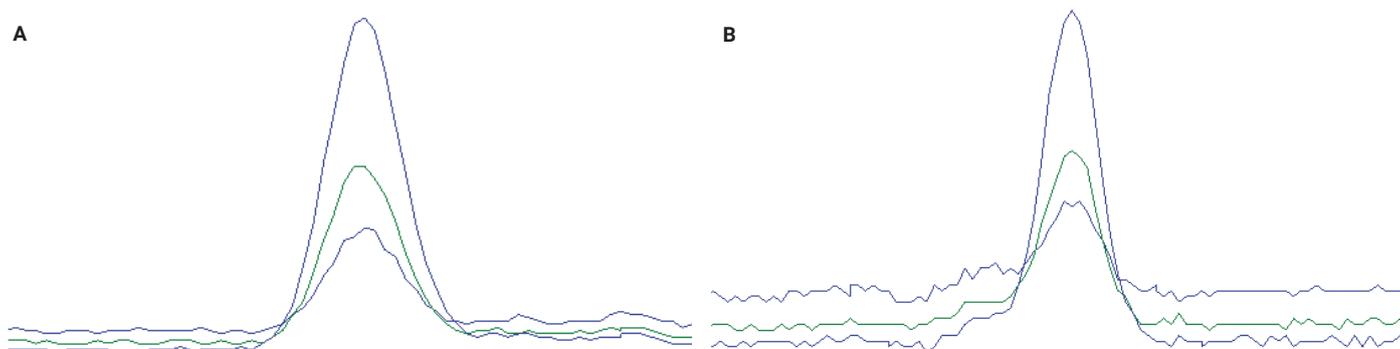


図 2. 3 つのキャリブレーションポイントでの NDMA (A) と NDEA (B) の重ね表示

2つの検量線はAgilent MassHunter Quantitative Analysisソフトウェアを用いて生成しました。LOQと検出限界(LOD)を検量線の下限で調べるために、定量結果を0.025 µgから0.5 µgの検量線に対して処理しました。逆重み付けを用いて0.995以上の直線相関で、フルレンジの検量線を0.025 µgから100 µgまで延長します。図3Aおよび3Bに、この機器で得られた低レベルの検量線を示します。LODは、最少のオンカラム注入量により少なくともS/N比3:1以上で定義されます。NDMAおよびNDEAのキャリブレーションにおいて、0.025 µgの最少ポイントはこの値を超えていました。

各化合物の検量線を生成後、検量線内の3つのレベルで標準液を5回繰り返し分析しました。表2に、この再現性の評価の結果をまとめています。

メソッド性能の最後の評価として、マトリックス中で添加回収試験を行いました。前述のLOQをターゲットとして、2つの最少濃度の標準液を3つのバイアルにスパイクし、それぞれのバイアルが500 mgのバルサルタン医薬錠剤を含むようにしました。添加回収試験の前にバッチサンプルを分析して、NDMAおよびNDEA化合物が検出されないことを確認しました。表3に、結果を示します。

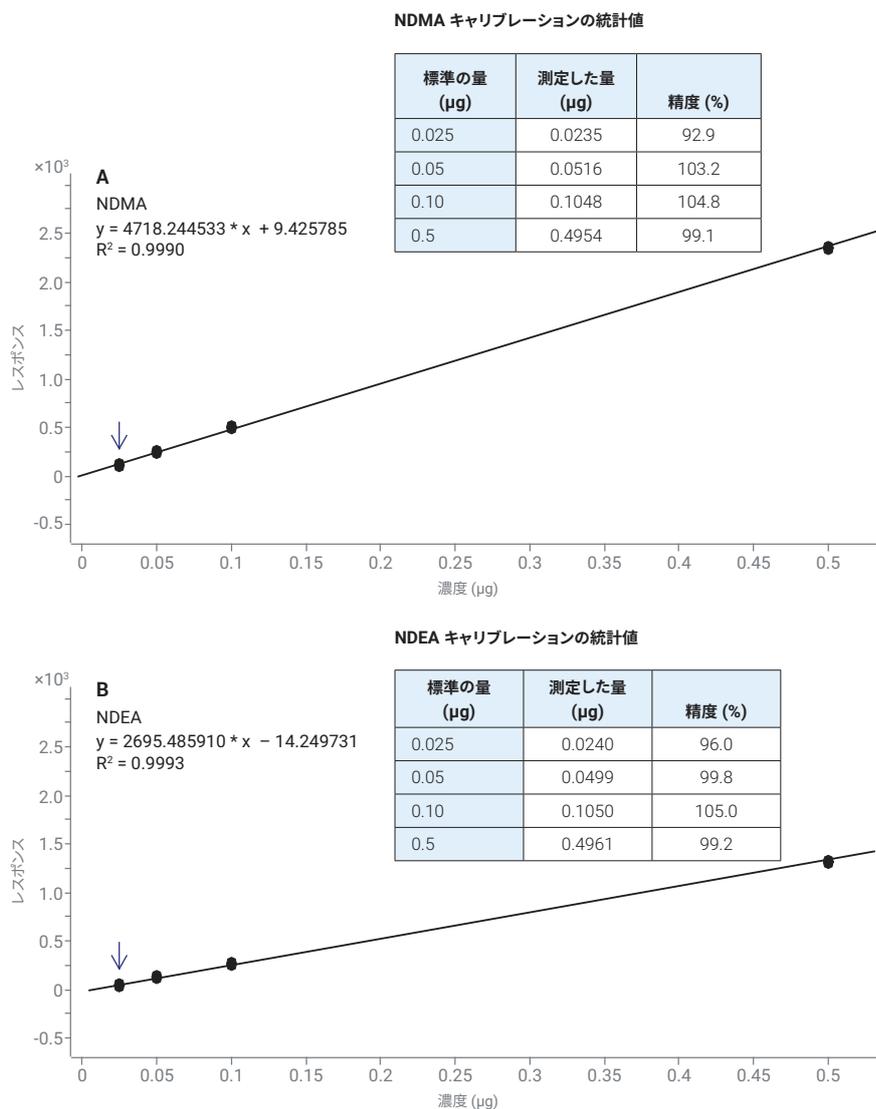


図 3. 低レベルのキャリブレーション範囲の直線回帰と検量線に対する処理後の精度

表 2. 標準液の再現性の統計値 (n = 5)

	0.025 µg 標準		0.05 µg 標準		0.1 µg 標準	
	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA
測定量の平均値	0.0249	0.0248	0.0518	0.0506	0.1012	0.0988
% RSD	4.95	2.89	6.24	0.7	2.65	4.07

表 3. NDMA および NDEA ターゲット化合物について 3 回の繰り返しサンプル分析による LOQ の判定

	ターゲット LOQ	平均回収率	平均回収率
	1 ppm	0.05 ppm	0.10 ppm
NDMA	0.10	0.056	0.11
NDEA	0.05	0.057	0.11

結論

Agilent 8890 GC は、医薬品の安全性スクリーニングに必要な堅牢性と再現性に関して、これまで以上に優れた性能を備えています。8890 GC とともに、Agilent 7697A ヘッドスペースサンブラと Agilent 5977 GC/MSD を用いることで、FDA の指令を遵守し、AT1 受容体拮抗薬中の不純物分析で求められる検出値を達成できます。

参考文献

1. Global Health Observatory (GHO) data. https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/ - Accessed 17 June 2019.
2. <http://www.bloodpressureuk.org/mediacentre/Newsreleases/1billionpeopleworldwidenowhavehighbloodpressure>
3. Barreras, A.; Gurk-Turner, C. Angiotensin II Receptor Blockers. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **2003**, *16*(1), 123–126. doi:10.1080/08998280.2003.11927893
4. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products. *U.S. Food and Drug Administration*, FY18-176-DPA-S.
5. European Medicines Agency Report of NDEA.
6. Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS Headspace. *U.S. Food and Drug Administration*, FY19-005-DPA-S.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, September 11, 2019

5994-1132JAJP