

Agilent GC/MS/MS による医薬品および 原薬中の 5 種類のニトロサミン不純物の分析

著者

Soma Dasgupta,
Lalith Hansoge, Vivek Dhyani,
Samir Vyas, and
Melissa Churley
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 7890B または 8890 GC を Agilent 7010B トリプル四重極 GC/MS システムと組み合わせて、AT1 受容体拮抗薬および原薬中の微量濃度の 5 種類のニトロサミン不純物 (NDMA、NDEA、NEIPA、NDIPA、および NDBA) を測定して評価するための包括的なソリューションについて説明します。Agilent 7010B トリプル四重極 GC/MS には超高感度イオン源 (HES) が搭載されており、優れた感度、再現性、精度を実現していると同時に、規制限界の点でも優れています。このメソッドでは、現行の規制で必要とされる定量下限 (LOQ) よりも 2 ~ 20 倍低い LOQ を達成できます。

はじめに

2018年7月に、FDAはバルサルタンにN-ニトロソジメチルアミン（NDMA）が含まれているという理由により、この製品のリコールを発表しました。すべてのメーカーのアンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）クラスのAPIおよび最終医薬品を引き続き調査した結果、バルサルタン、イルベサルタン、およびロサルタンが追加でリコールされました。これらの製品には、NDMAおよびN-ニトロソジエチルアミン（NDEA）が含まれていることがわかりました。いずれも動物および人間に対する発がん性が疑われている物質です。

続いて、別の不純物N-ニトロソエチルイソプロピルアミン（NEIPA）、N-ニトロソジイソプロピルアミン（NDIPA）、N-ニトロソジブチルアミン（NDBA）、およびN-ニトロソメチル-4-アミノ酪酸（NMBA）が、ニトロサミン不純物の可能性があるとして警告されました。現在に至るまで、1,100を超える異なるロットに属するAT1受容体拮抗薬（バルサルタン、ロサルタン、およびイルベサルタン）に、暫定的限界値を超えるこれらの不純物が含まれていたため、リコールされています。

FDA Office of Testing and Research（OTR）が公開した、これらの不純物の分析メソッドのうち、最新のものとして4種類の不純物に対するシングル四重極GC/MSとヘッドスペースの注入を用いた分析メソッド、および5種類の不純物に対するトリプル四重極GC/MS/MSによる液体注入ベースのメソッドがあります。シングル四重極MSは、場合によっては結果が不明瞭になり感度が低下します。一方、GC/MS/MSはこのような状況においても特異性が得られるため、GC/MSよりも適したメソッドです。

今回、7890Bまたは8890GCのいずれかを7010B GC/MS/MSと組み合わせてOTRメソッドを実施した結果、両方のシステムが5種類の不純物すべてに対して非常に有用で優れた性能を発揮しました。イオン化効率が向上し、イオン生成特性が20倍のHESにより、信頼性の高い微量分析が実施できます。8890GCには、GCの制御用としてキーパッドの代わりにタッチスクリーンインターフェースが備えられており、診断テスト、システムモニタリングアラート、およびモバイルアクセス機能も用意されています。

実験方法

サンプル前処理

分析では、APIおよび医薬品として、バルサルタン、オルメサルタン、イルベサルタン、およびロサルタンを用いました。500mgのAPIを正確に計量して使い捨ての15mLガラス製遠心分離管に入れ、計量ピペットを用いて5mLの内部標準溶液（～50ng/mL NDMA:C13-d₆ ジクロロメタン溶液）を加えました。一部のAT1受容体拮抗薬（バルサルタン、オルメサルタンなど）はジクロロメタン中に完全に溶解できましたが、別のAT1受容体拮抗薬（イルベサルタンなど）は溶液が濁るかまたは溶解できませんでした。これらのサンプルを1分間ボルテックスした後、4,000rpmで2.5分間遠心分離しました。使い捨てのピペットを用い、0.45μmナイロンフィルタを通して約2mLのジクロロメタン層をろ過し、GCバイアルに移して分析を実施しました。

標準液の前処理

標準原液を適切に希釈して、濃度100、80、40、20、10、5、および2.5ng/mLのキャリアブレーション溶液を生成し、内部標準としてNDMA:C13-d₆を含むジクロロメタンでそれぞれを前処理しました。

装置構成

Agilent 7693Aオートサンブラを搭載したAgilent 7890Bまたは8890GCをAgilent 7010Bトリプル四重極GC/MSと組み合わせて分析しました。GCは、7697Aヘッドスペースサンブラをマルチモード注入口（MMI）に接続して構成しました。寸法が30mm×0.25mm、1.0μmのAgilent J&W VF-WAXms GCキャピラリーカラムを、注入口からMSに接続しました。

表1と表2に、GCパラメータとMSパラメータを示します。

表1. GCパラメータ

パラメータ	設定値
MMI注入モード	バルブドスプリットレス：12.285psi、0.5分まで
注入口温度	250°C
オープン温度プログラム	40°C（0.5分間） 20°C/min～200°C（0分間） 60°C/min～250°C（3分間）
分析時間	12.33分
MSトランスファライン温度	250°C
注入量	2μL
キャリアガス	ヘリウム、1mL/min

MS 取り込みメソッド

OTR メソッドの MRM を用いてデータを取り込みました。

結果と考察

化合物の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した。5 種類の化合物すべてのリテンションタイムは、FDA の規制値に一致していました (図 1 および 2)。

検量線は直線近似により作成しました。FDA は、相関係数 R^2 を ≥ 0.998 とするよう規定しています。図 3A (7890B GC) および 3B (8890 GC) に示すように、今回の研究では 5 種類の不純物すべてに対して、 $R^2 > 0.999$ という非常に良好な直線性が得られました。

表 2. MS パラメータ

パラメータ	設定値
モード	EI, 40 eV
イオン源温度	250 °C
四重極温度	Q1 および Q2 = 150 °C
MRM モードの条件	
MS1 分解能	すべての化合物
MS2 分解能	すべての化合物
コリジョンガスフロー	窒素 (1.5 mL/min)
クエンチガスフロー	ヘリウム (4 mL/min)
検出器ゲイン	1
定量/定性トランジション (FDA メソッド)	開始時間: 6.5 分 NDMA 74 → 44, CE 15 V, ドウエル 150 ms 74 → 42, CE 20 V, ドウエル 50 ms NDMA:C13-d ₆ 82 → 48, CE 20 V, ドウエル 100 ms
	開始時間: 7.60 分 NDEA 102 → 85, CE 10 V, ドウエル 150 ms 102 → 56, CE 18 V, ドウエル 150 ms
	開始時間: 8.03 分 NEIPA 116 → 99, CE 10 V, ドウエル 150 ms 71 → 56, CE 10 V, ドウエル 150 ms
	開始時間: 8.25 分 NDIPA 130 → 88, CE 10 V, ドウエル 150 ms 130 → 42, CE 10 V, ドウエル 150 ms
	開始時間: 8.70 分 NDBA 158 → 99, CE 10 V, ドウエル 150 ms 84 → 56, CE 22 V, ドウエル 150 ms

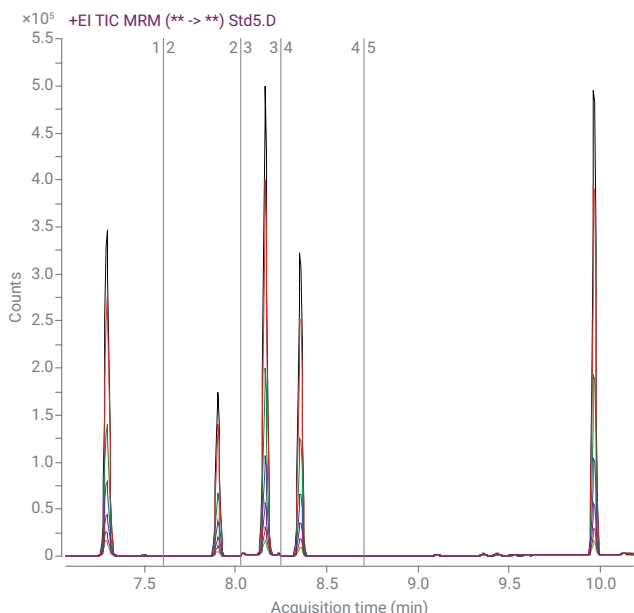


図 1. ジクロロメタン中の不純物 (5 種類) の 7 つのキャリブレーションレベルにおける MRM TIC クロマトグラムの重ね表示 (Agilent 8890 GC)

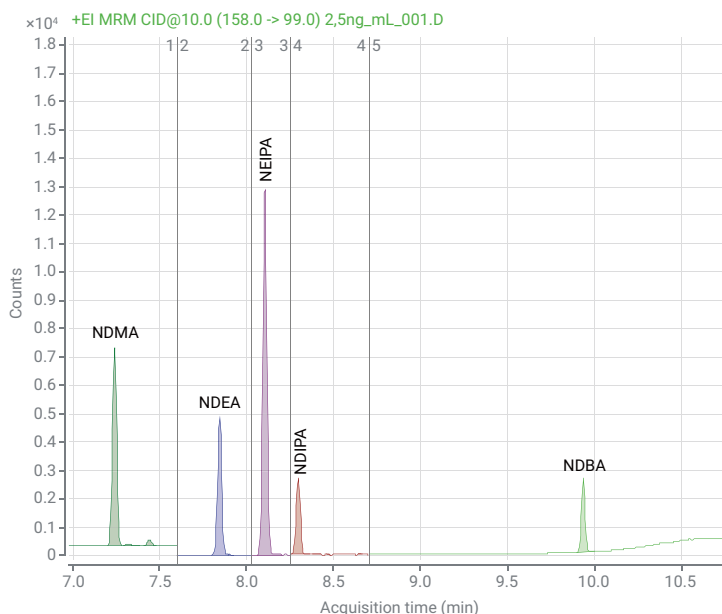


図 2. ジクロロメタン中の不純物 (5 種類) の 2.5 ng/mL 混合における最低の標準溶液の抽出 MRM クロマトグラム (定量トランジション) (Agilent 7890B GC)

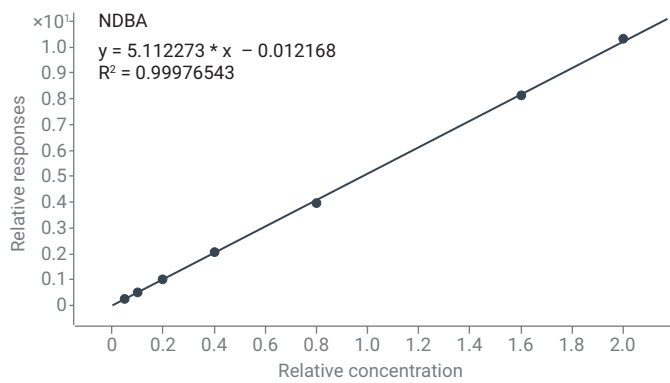
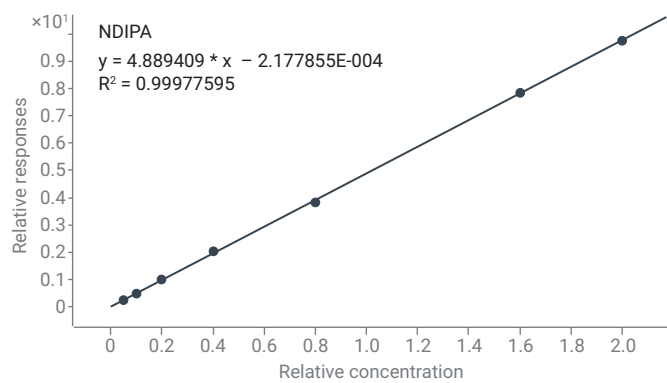
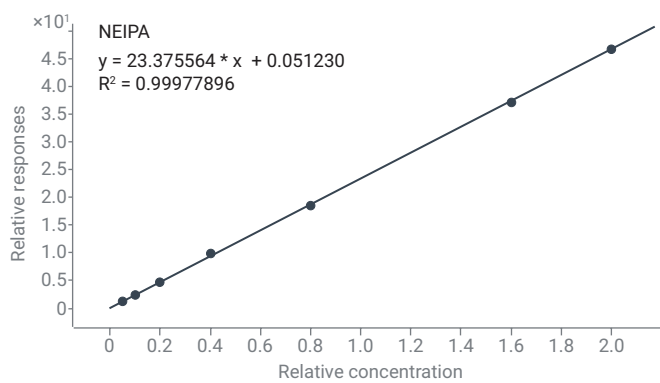
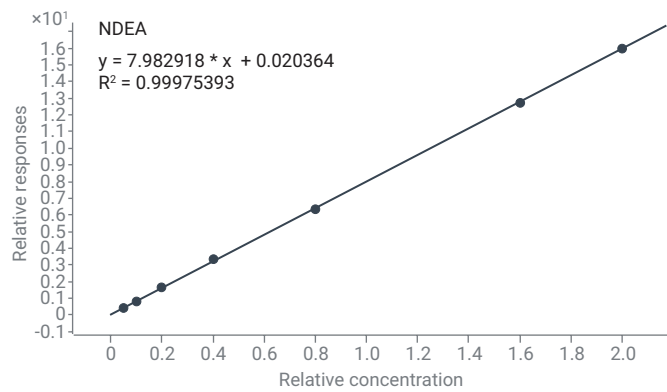
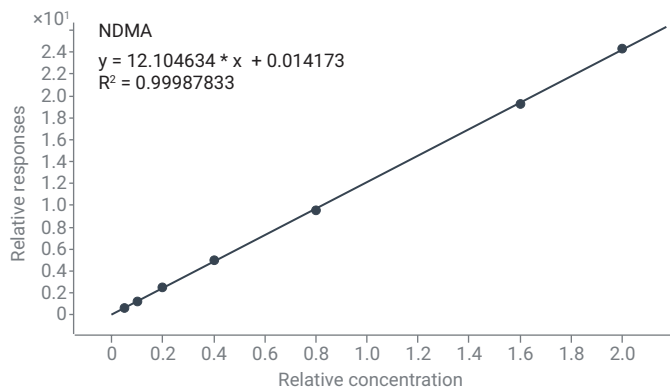


図 3A. Agilent 7890B GC による 5 種類のニトロサミン不純物の検量線

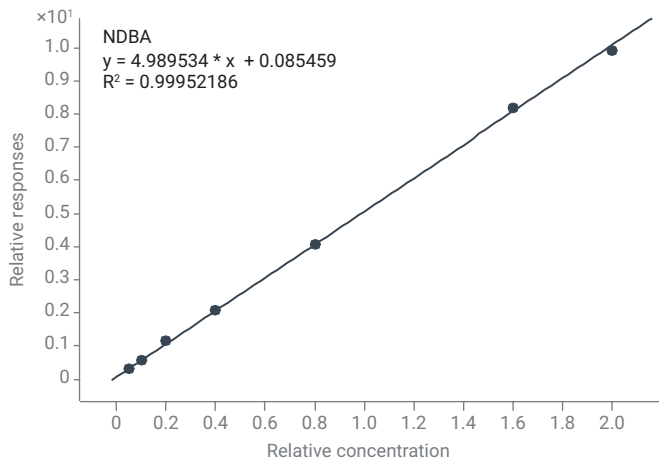
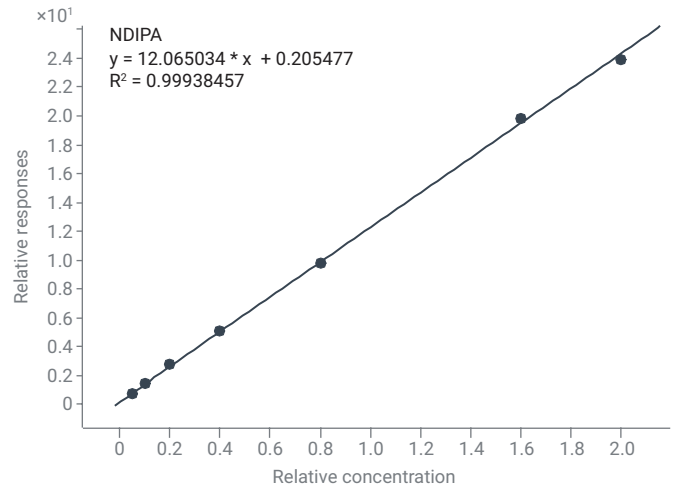
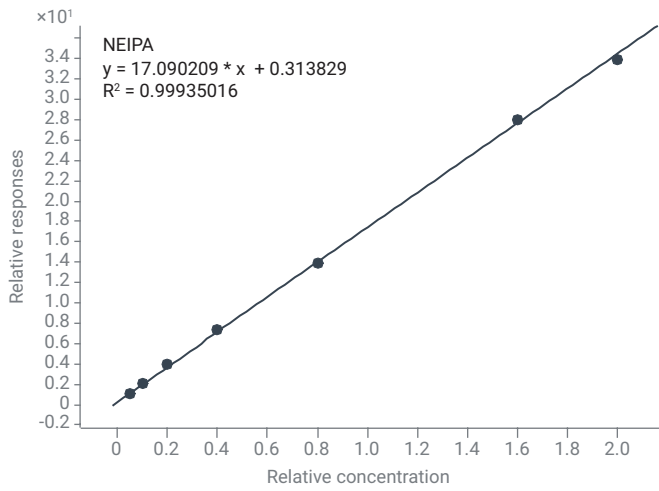
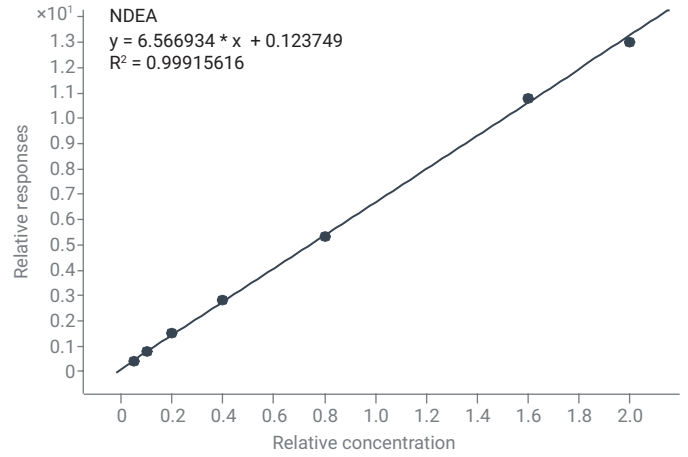
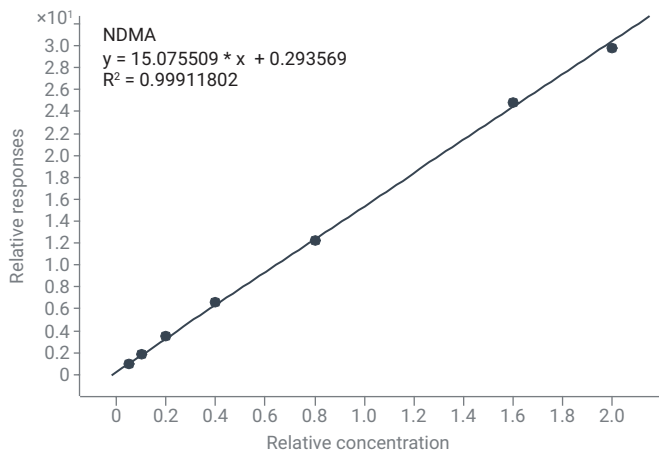


図 3B. Agilent 8890 GC による 5 種類のニトロサミン不純物の検量線

検証済みの FDA-OTR メソッドでは、40 ng/mL 標準の 6 回繰り返し注入の %RSD が ≤ 5 である必要があります。表 3 に示すように、今回の研究で 40 ng/mL 標準の再現性を確認したところ、5 種類の不純物すべてに対して %RSD < 2 (6 回の連続注入) という結果が得られました。

OTR メソッドでは、LOQ 測定の基準として S/N 比 10 を用いています。今回、FDA が LOQ として推奨している濃度でスパイクしたサンプルの S/N 比は、メソッドに必要な値よりかなり高いことがわかりました。これは、機器が感度要件を十分に満たしており、より低い LOQ が達成できたことにより、ごく微量の濃度の検出が可能であることを示しています。FDA が示している医薬品の LOQ と今回の研究で得られた LOQ を表 4 に示します。また、LOQ 濃度でのサンプル中の不純物のクロマトグラフィー例と算出した S/N 比を図 4 に示します。

表 3. 40 ng/mL におけるニトロサミン不純物のピーク面積と %RSD 値 (Agilent 8890 GC)

タイプ	サンプル名	NDMA 面積	NDEA 面積	NEIPA 面積	NDIPA 面積	NDBA 面積
標準	STD3_001.D	134044.10	57894.56	151634.00	106545.00	43152.93
標準	STD3_002.D	130975.10	57019.84	147810.80	104067.40	42709.92
標準	STD3_003.D	131357.00	56826.24	149615.50	104264.10	42613.02
標準	STD3_004.D	134631.90	57973.19	152279.80	106116.10	43753.81
標準	STD3_005.D	132140.20	57361.97	149922.00	105469.30	43118.18
標準	STD3_006.D	131370.50	57048.14	149667.10	103762.50	42816.16
	RSD (%)	1.17	0.84	1.07	1.11	0.97

表 4. FDA メソッドによる医薬品の LOQ と今回の研究で得られた LOQ (Agilent 7890B GC)

不純物	FDA LOQ (ppm)	LOQ (今回得られた値、ppm)	改善度
NDMA	0.008	0.0025	> 3
NDEA	0.005	0.0005	10
NEIPA	0.005	0.00025	20
NDIPA	0.005	0.0025	2
NDBA	0.025	0.008	> 3

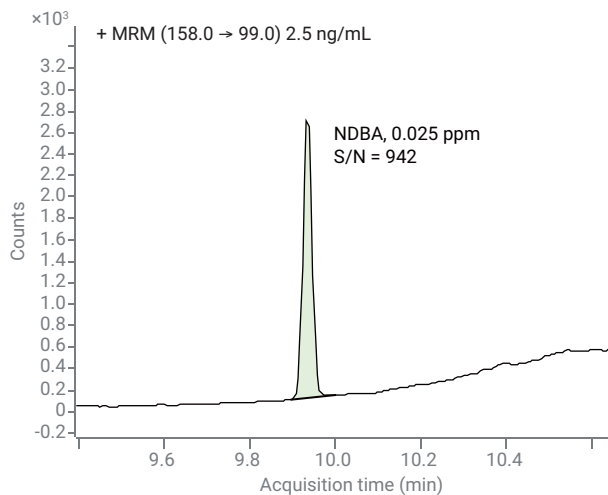
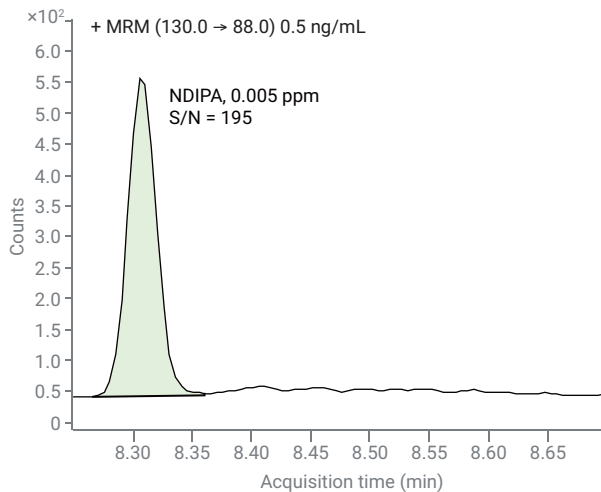
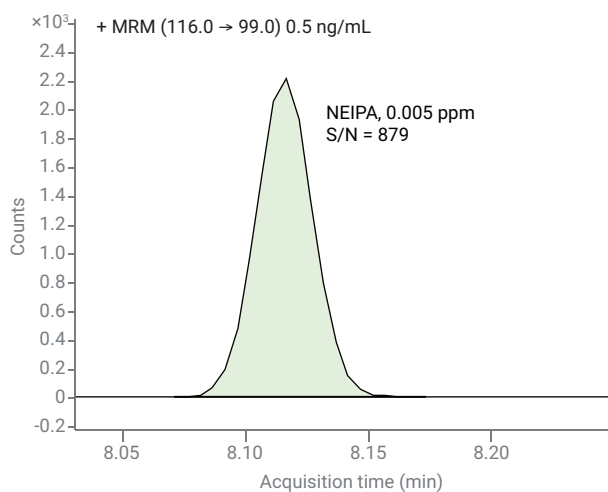
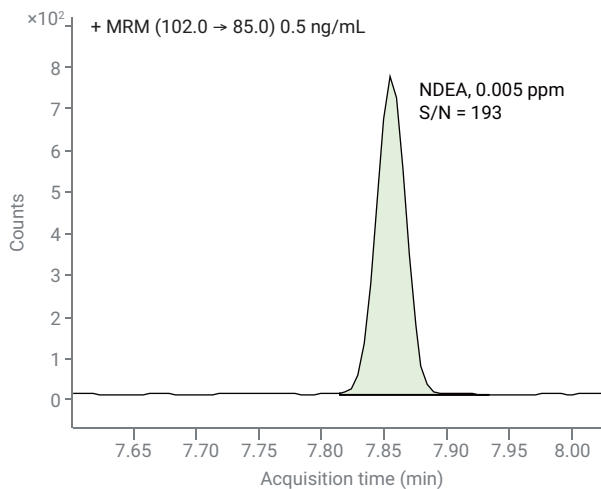
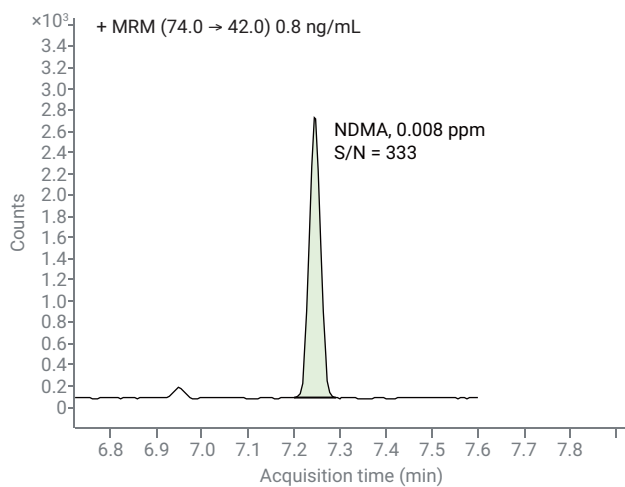


図 4. FDA が LOQ として推奨している濃度でスパイクしたサンプルの S/N 比 (Agilent 7890B GC)

結論

7890B と 7010B および 8890 と 7010B GC/MS/MS システムは、5 種類のニトロサミン不純物すべてに対して同等の優れた性能を示しました。8890 GC には、診断テストとシステムモニタリングアラート、さらにタッチスクリーン制御とモバイルアクセス機能が備えられています。HES を含めた Agilent 7010B トリプル四重極 GC/MS は、7890B および 8890 GC が提供する不活性サンプルパスと組み合わせた際に、微量濃度の不純物の検出限界を引き下げるように設計されています。これらの機能により、5 種類の残留物すべてに対して信頼性の高い定量が実施できました。メソッドパラメータを変更しなくても、推奨濃度より 2 ~ 20 倍低い LOQ で高感度の分析を実施できます。

参考文献

1. <https://www.fda.gov/media/123409/download>
2. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/search-list-recalled-angiotensin-ii-receptor-blockers-arbs-including-valsartan-losartan-and>

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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. 2020
Printed in Japan, April 22, 2020
5994-1821JAJP
DE.6920601852