

Agilent GC-TQ と水素キャリアガスを用いた サルタン系医薬品中の ニトロソアミン不純物の定量



著者

Soma Dasgupta, Vivek Dhyani,
Anastasia Andrianova, and
Joel Ferrer
Agilent Technologies, Inc.

概要

ヘリウム不足に対応するため、ラボはガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC/MS) 用の代替キャリアガスによる測定方法を探しています。このアプリケーションノートでは、ある種のサルタン系医薬品に含まれる 8 種類のニトロソアミン不純物の分析で、キャリアガスとしての水素の適合性と、ヘリウムとの比較を示します。この実験では、Agilent 8890 ガスクロマトグラフシステムと超高感度イオン源 (HES) を搭載した Agilent 7010 シリーズトリプル四重極 (TQ) GC/MS システム、または Agilent 7000E トリプル四重極 GC/MS と Agilent HydroInert イオン源の組み合わせを用いました。水素キャリアガスで分析した 8 種類のニトロソアミン不純物の NIST ライブラリに対するスペクトル照合の一致度は 79 から 97 でした。濃度範囲 0.3 ~ 50 ng/mL で検量線の優れた直線性 ($R^2 > 0.99$) が見られました。感度の要件は 0.03 ppm で満たされ、次いで S/N 比の要件 10 も満たされました。OpenLab ECM XT と MassHunter Acquisition 13.0 の統合によりデータ管理が効率化されたことで、機器により生成されたデータへのアクセスの一元化、コラボレーションの促進、データ整合性の維持、ワークフロープロセスの最適化が実現しました。

はじめに

ヘリウムの入手性はここ数年にわたり懸念されていて、水素のような代替キャリアガスへの移行に対する関心が大きく高まっています。水素は有効な GC キャリアガスですが、正確な分析結果を得るためには、分析対象物との反応性を理解することが重要です。水素には、ヘリウムに比べて分析時間が短い、クロマトグラフィー分離能が高いなどの長所があります。その一方で、感度が低下する可能性がある、分析対象物のサンプルと水素が反応してスペクトルが変化するなどの課題もあります。このような反応が、トータルイオンクロマトグラム (TIC) 内のピークの質量スペクトルに影響を与え、化合物の誤同定を引き起こす可能性があります。ヘリウムから水素へのキャリアガスの切り替えは、慎重に計画して実施すべき大きな変更です。「Agilent EI GC/MS 機器でのヘリウムから水素へのキャリアガス切り替えユーザーガイド」¹ では、この切り替えを円滑に行うための全体的な手順を説明しています。また、Hydrolnert イオン源の導入により、反応性の高い化合物であっても、水素の存在下でスペクトル忠実度を維持できるようになりました。その結果、水素キャリアガスを使用して、揮発性有機化合物²、多環芳香族炭化水素 (PAH)^{3,4}、EPA TO-15 に載っているターゲット化合物など、さまざまなアプリケーションで分析に成功しました。⁵

こういった需要の高いアプリケーションだけではなく、医薬品に含まれるニトロソアミン不純物の分析も重要なアプリケーションの 1 つです。医薬品中のニトロソアミン不純物の分析では、キャリアガスとしてヘリウムが広く使用されています。ニトロソアミンは特定の条件下で水素と反応し、有害なアミンやヒドラジンに変化することがあります。したがって、水素キャリアガスを使用しても、スペクトル品質は影響を受けないと立証することが重要です。このアプリケーションノートでは 8 種類のニトロソアミン不純物の分析メソッドの一部として、HES と Hydrolnert イオン源と使用した水素キャリアガスを評価します。分析する不純物は、ニトロソジメチルアミン (NDMA)、N-ニトロソメチルエチルアミン (NMEA)、N-ニトロソジエチルアミン (NDEA)、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-ニトロソジプロピルアミン (NDPA)、N-ニトロソジ-*n*-ブチルアミン (NDBA)、N-ニトロソピペリジン (NPIP) です。得られた結果について、スペクトル品質、直線性、再現性、回収率、および医薬品中のニトロソアミンの分析に対する現在の規制への準拠を評価しました。

実験方法

試験の対象となった医薬品有効成分 (API) および医薬品は、バルサルタン、イルペサルタン、ロサルタン、オルメサルタンでした。500 mg の原薬を正確に計量して使い捨ての 15 mL ガラス製遠心分離管に入れ、計量ピペットを用いて 5 mL の内部標準溶液 (約 50 ng/mL NDMA-d₆ ジクロロメタン溶液) を加えました。これらのサンプルを 1 分間ボルテックスした後、4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。溶解しなかった原薬は底部に沈みました。使い捨てのピペットを用い、0.45 μm ナイロンフィルタを通して約 2 mL 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。

標準溶液の前処理

標準原液を希釈して、濃度 0.3 ~ 50 ng/mL のキャリブレーション溶液を生成し、NDMA-d₆ を含むジクロロメタンを内部標準として前処理しました。

機器および分析

分析には、Agilent 7693A オートサンブラ (ALS) を搭載した 8890 GC システムと、HES 搭載 7010 シリーズ GC/TQ、および Hydrolnert イオン源搭載 7000E GC/TQ を組み合わせて用いました。分離は、Agilent J&W VF-WAXms GC、60 m × 0.25 mm、0.25 μm キャピラリカラム (部品番号 CP9207) で行いました。また、Agilent J&W VF-WAXms GC、30 m × 0.25 mm、0.25 μm キャピラリカラム (部品番号 CP9205) 2 本からなるミッドカラムバックフラッシュ構成を使い、それぞれ流量を 1 mL/min と 1.2 mL/min に設定して同じパラメータを適用することもできるようにし、このバックフラッシュ設定についても評価しました。表 1 に GC パラメータを、表 2 に MS パラメータを示します。

GC/TQ の操作はダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) モードで行いました。GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer を使用して、9 種類の不純物すべてについて MRM トランジションを発生させ、データ取り込みに使用しました (表 3)。

表 1. GC パラメータ

パラメータ	値
GC システム	Agilent 8890 GC システム
MMI 注入モード	パルスドスプリットレス：15 psi、0.5 分まで
注入口温度	250 °C
注入口ライナ	ウルトライナート、スプリットレス、シングルテーパー、ガラスウール (部品番号 5190-2293)
オープン温度 プログラム	40 °C (1.5 分間) 20 °C/min で 200 °C まで昇温 (0 分間) 60 °C/min で 250 °C まで昇温 (3 分間)
合計分析時間	13.33 分
MS トランスファー ライン温度	250 °C
注入量	2 µL
GC カラム	VF-WAXms ヘリウム：30 m × 0.25 mm、0.25 µm カラム (部品番号 CP9205) 水素：60 m × 0.25 mm、0.25 µm カラム (部品番号 CP9207) および 30 m × 0.25 mm、0.25 µm カラム 2 本でミッドカラムバックフラッシュ
キャリアガス	水素 1 mL/min (HES および HydroInert 用) または ヘリウム 1.2 mL/min (HES 用)

表 2. MS パラメータ

パラメータ	値
MS システム	HES 搭載 Agilent 7010 シリーズ GC/TQ および HydroInert (HI) イオン源搭載 Agilent 7000E GC/TQ
モード	電子衝撃、70 eV (HES と HI イオン源の両方)
イオン源温度	250 °C
四重極温度	Q1 および Q2 = 150 °C
MS1 および MS2 分離能	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	ヘリウムキャリアガス使用時は 2.25 mL/min でヘリウム、 水素キャリアガス使用時はスイッチをオフ

ソフトウェアおよびデータインテグリティ

データの取り込みおよび分析には、GC/MS 用 MassHunter Acquisition 13.0 ソフトウェアおよび MassHunter Quantitative Analysis 12.1 ソフトウェアを含む Agilent MassHunter ワークステーションを使用しました。OpenLab 電子コンテンツ管理 (ECM) XT は、さまざまな国家や EU の電子記録に関する規則への準拠を促進する機能を提供します。このような自動化されたツールやプロセスには、関連する権限を持つユーザーの作成、監査証跡の生成、データの漏洩や紛失のリスクを最小限に抑えるためのリモートデータストレージなどの能力があります。OpenLab ECM XT と MassHunter アプリケーションを併用したことにより、機器やデータシステム、ラボのソフトウェアにより生成されたデータに一か所からアクセスでき、柔軟なデータ管理が可能でした。保存場所からのデータアクセスにより、分析者はデータインテグリティを損なうことなくコラボレーションに参加し、ワークフローに一貫性のあるプロセスを設けることができます。

表 3. 定量/定性トランジション (dMRM ベース)

化合物	リテンションタイム (分)	MRM トランジション	CE
NDMA-D ₆	8.437	80 -> 50	5
NDMA	8.448	74 -> 44.1	6
		74 -> 42.1	24
		43.1 -> 42.1	10
NMEA	8.767	87.9 -> 71	4
		87.9 -> 42.1	24
		43.1 -> 42.1	10
NDEA	8.969	101.9 -> 85.1	4
		101.9 -> 56	20
		101.9 -> 44.1	14
NEIPA	9.198	115.9 -> 99	6
		115.9 -> 44	16
		71 -> 56	6
NDIPA	9.366	130 -> 88	6
		130 -> 71	16
		130 -> 42.1	12
NDPA	9.832	130 -> 113.1	2
		101 -> 70	2
		70 -> 43.1	6
NDBA	10.796	158 -> 141.1	4
		158 -> 99.1	10
		116 -> 99.1	4
NPIP	11.088	84 -> 56	22
		113.9 -> 97.1	8
		113.9 -> 84.1	8
		113.9 -> 55	26
		113.9 -> 42.1	24

結果と考察

スペクトルマッチの品質

8 種類の分析対象物それぞれについて、ヘリウムまたは水素キャリアガスを用いてフルスキャンスペクトルを取得し、NIST ライブラリと比較しました。図 1 に示すとおり、7010 シリーズ GC/TQ と HES のシステムで水素キャリアガスを使用し、優れた一致スコア (> 90) を得ることができました。7000E GC/TQ と HydroInert イオン源のセットアップで水素キャリアガスを使用した場合の一致スコアは良好 (> 80) でした。HES を使った場合の平均一致スコアが高いのは、感度の向上によりレスポンスが高くなったためと考えられます。

質量スペクトルの信頼性を維持することにより、ヘリウムおよび水素キャリアガスメソッドで同一の MRM トランジションを使用できました (表 3)。

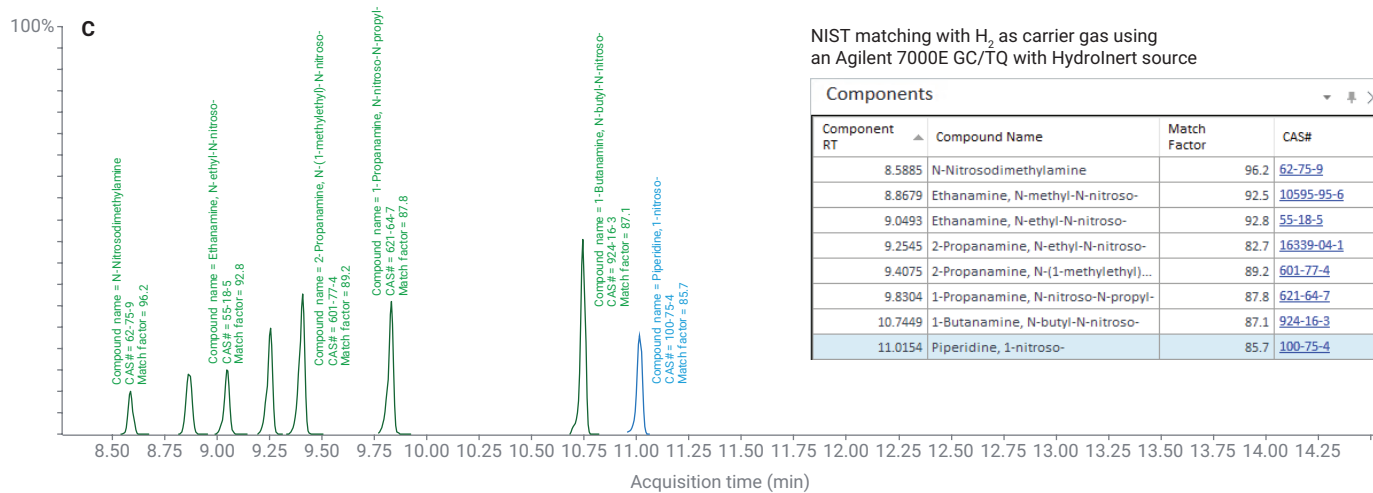
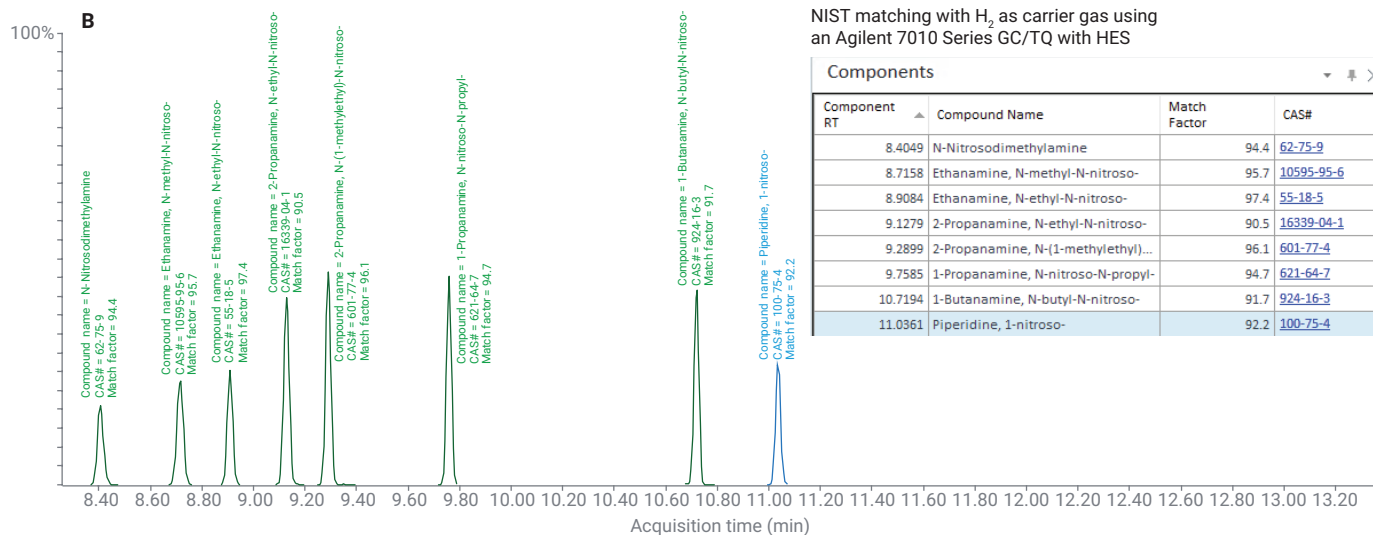
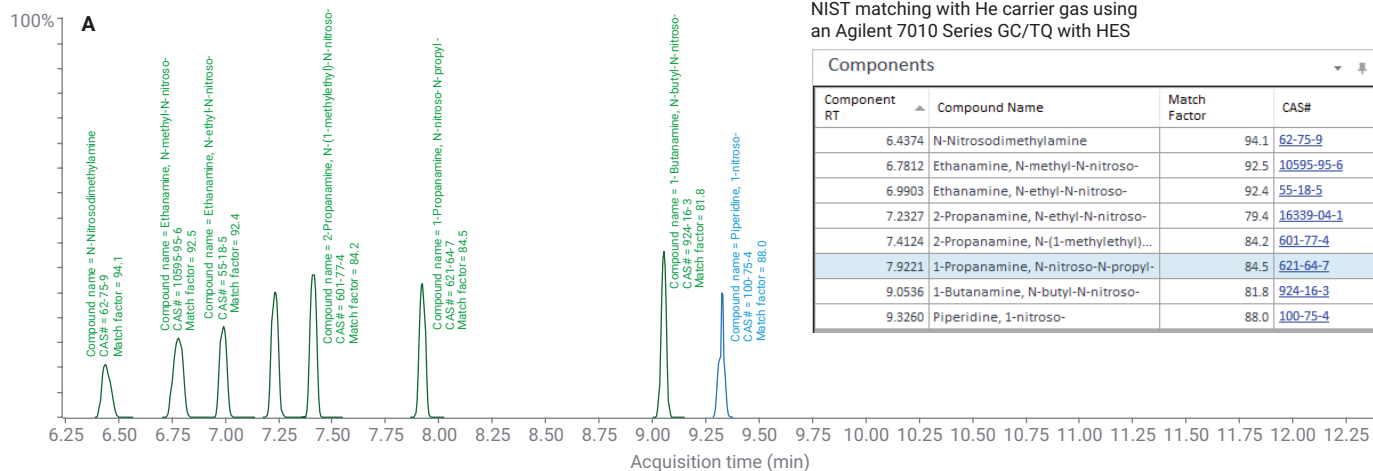


図 1. ヘリウムキャリアガスと HES (A)、水素キャリアガスと HES (B)、水素キャリアガスと HydroInert イオン源 (C) を用いて 8 種類のニトロソアミン不純物を分離しました。横の表は測定で得られたフルスキャン質量スペクトルの NIST 一致スコアを示します。

直線性

8種類の不純物について、0.3～50 ng/mLの範囲で、メソッドキャリブレーション性能 $R^2 > 0.99$ が実証されました（表4）。キャリブレーションの最低レベルは、確認イオンのイオン比がイオン比の基準に合格する濃度でした。水素キャリアガスを使用した場合、7010 シリーズ GC/TQ-HES と 7000E GC/TQ-HydroInert イオン源の両方で、検出限界 3 ng/mL 以下を達成しました。

定量下限

規制当局の最新の指令によると⁶⁷、定量下限（LOQ）は、測定の対象となる特定のニトロソアミン不純物について、規定の許容限度よりも低い必要があります。1つの分析メソッドでさまざまなニトロソアミンを評価する場合、ニトロソアミンそれぞれのLOQでそのメソッドの選択性を検証する必要があります。0.03 ppm 以下のLOQを持つメソッドの使用は、製薬業界で一般的な、原薬や医薬品に対する要件です。

サンプル前処理では、10倍希釈（ジクロロメタン 5 mL で 500 mg を抽出）を行います。30 ppb（0.03 ppm）の原液をスパイクした回収試験では、この試験で測定したニトロソアミン不純物それぞれについて、濃度 3 ng/mL の抽出物を得られました。この濃度は、各ニトロソアミン不純物の代表的なLOQ要件である30 ppbに適合しています。

7010 シリーズ GC/TQ を用いて、6か月間、キャリアガスをヘリウムと水素の間で切り替え、このキャリアガス切り替えのうち3回の結果を比較しました。図2は、一貫したスペクトル忠実度、キャリブレーションレスポンス、イオン比、および感度が認められたことを示しています。測定期間中、スペクトル忠実度は影響を受けず、すべての分析対象物に対し、常に高いライブラリー一致スコア（> 90）が得られました。キャリアガス切り替え後も、スペクトル忠実度を維持し、一貫したキャリブレーションレスポンス、イオン比、感度をもたらす能力は、このメソッドが実際のアプリケーションに適していることを証明しています。

表4. キャリアガスおよびイオン源ごとのキャリブレーションレベル

化合物	キャリブレーション範囲 (ng/mL)			最低キャリブレーションレベルでのクオンティファイアトランジションの米国薬局方 (USP) S/N		
	Agilent 7010 シリーズ GC/TQ と He キャリアガス	Agilent 7010 シリーズ GC/TQ と H ₂ キャリアガス	Agilent 7000E GC/TQ と HydroInert イオン源	Agilent 7010 シリーズ GC/TQ と He キャリアガス	Agilent 7010 シリーズ GC/TQ と H ₂ キャリアガス	Agilent 7000E GC/TQ と HydroInert イオン源
NDMA	0.1 ~ 50	0.5 ~ 50	3 ~ 50	> 12	> 10	> 10
NMEA	0.2 ~ 50	0.3 ~ 50	1 ~ 50	> 200	> 12	> 40
NDEA	0.05 ~ 50	0.5 ~ 50	1 ~ 50	> 20	> 10	> 100
NEIPA	0.05 ~ 50	1 ~ 50	3 ~ 50	> 50	> 80	> 90
NDIPA	0.05 ~ 50	0.5 ~ 50	1 ~ 50	> 80	> 10	> 60
NDPA	0.1 ~ 50	0.3 ~ 50	3 ~ 50	> 100	> 10	> 10
NDBA	0.1 ~ 50	1 ~ 50	3 ~ 50	> 60	> 10	> 20
NPIP	0.1 ~ 50	1.25 ~ 50	3 ~ 50	> 60	> 10	> 10

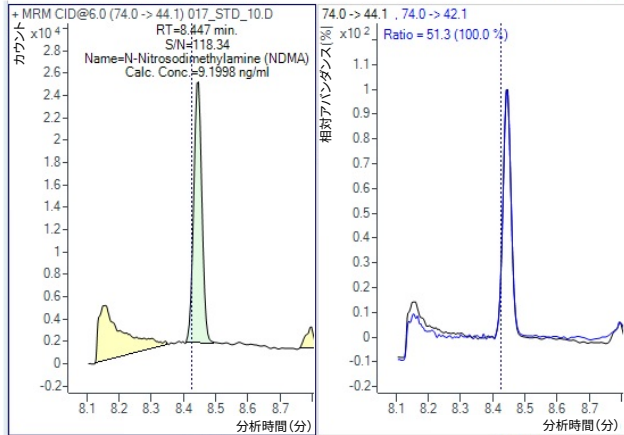
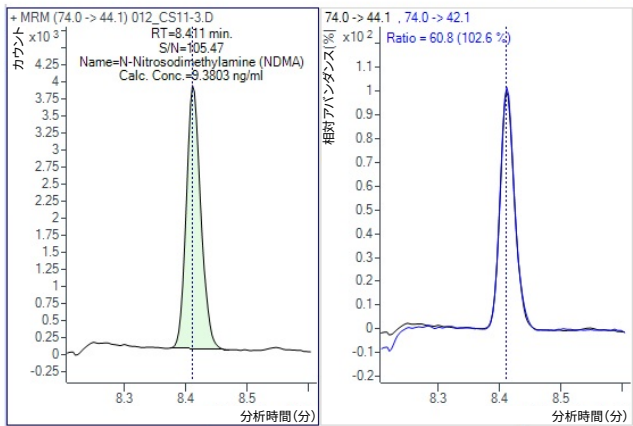
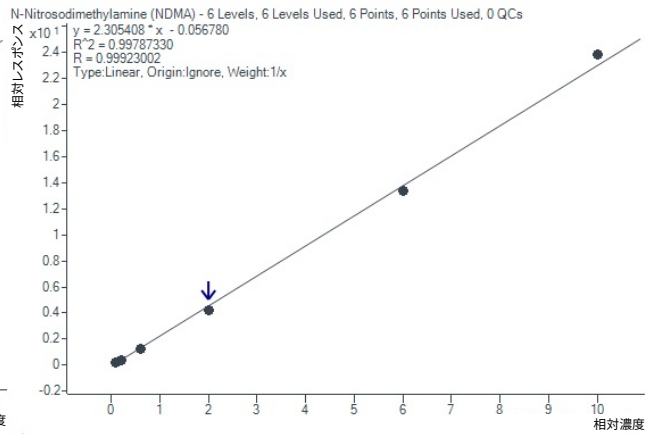
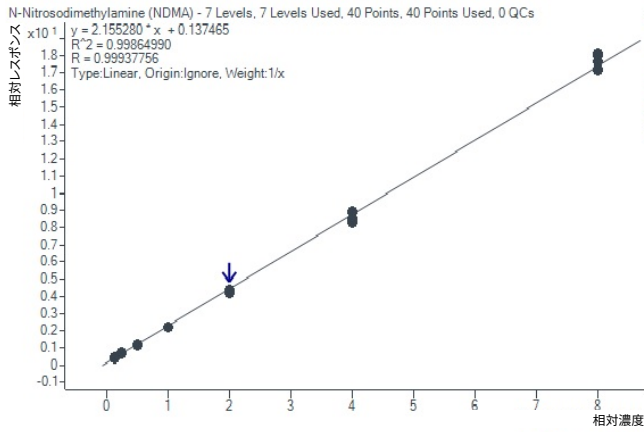
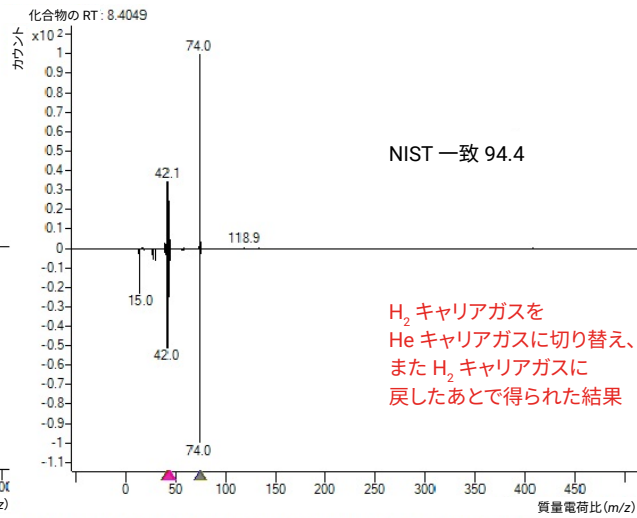
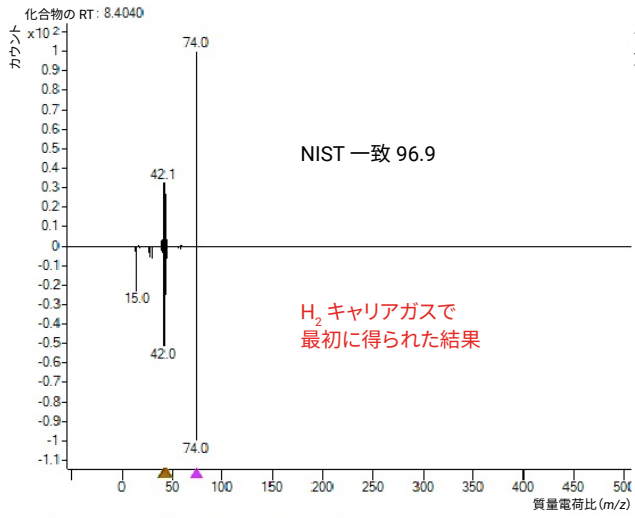


図 2. Agilent 7010 シリーズ GC/TQ でヘリウムガスを使用する前と後に水素キャリアガスを使用して、一貫したライブラリー一致スコア、キャリブレーション、イオン比が得られました。

安定性

以前、ヘリウムキャリアガスを用いて、150回の連続注入における結果の安定性を調査しました（5994-4618EN⁸を参照）。今回は、水素キャリアガスを使用して、同じ評価を行いました（図3）。すべての分析対象物について、RSD（絶対面積に対して計算）は10%未満で、計算濃度のRSD（内部標準補正後）は7%未満でした。これは、レスポンスの長期安定性とルーチン分析へのメソッドの適用性を示しています。

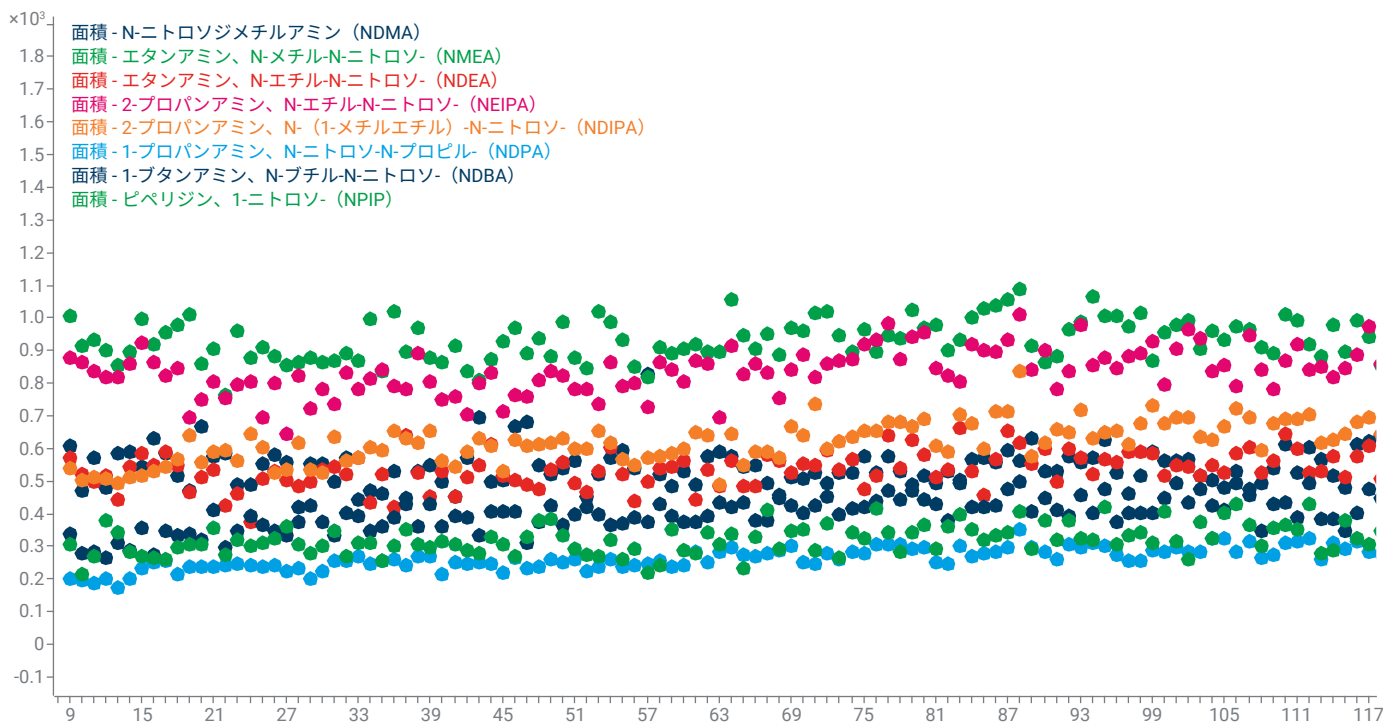


図3. (原薬に対して) 30 ppb のニトロソアミン不純物回収サンプルのピーク面積のトレンド (HydroInert イオン源搭載の Agilent 7000E GC/TQ を使用)。プロットには、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアのメトリックプロット機能を使用しました。

ミッドカラムバックフラッシュ

希釈倍率が 10 の場合、かなり大量の原薬マトリックスが分析システムに導入されました。これはリテンションタイム (RT) シフトやピーク応答の漸減につながる可能性があります。この問題はミッドカラムバックフラッシュ機能を使用することで克服できます。この構成では、30 m カラム (0.25 mm

× 0.25 μm) 2 本の間にはパーズ付き Ultimate ユニオン (PUU) を設置します。ミッドカラムバックフラッシュ構成を使用したところ、RT、ピーク面積を含め、一貫性のある結果を得ることができました。図 4 に、25 回、50 回、100 回連続サンプル分析後に得られた RT とピーク面積の例を示します。

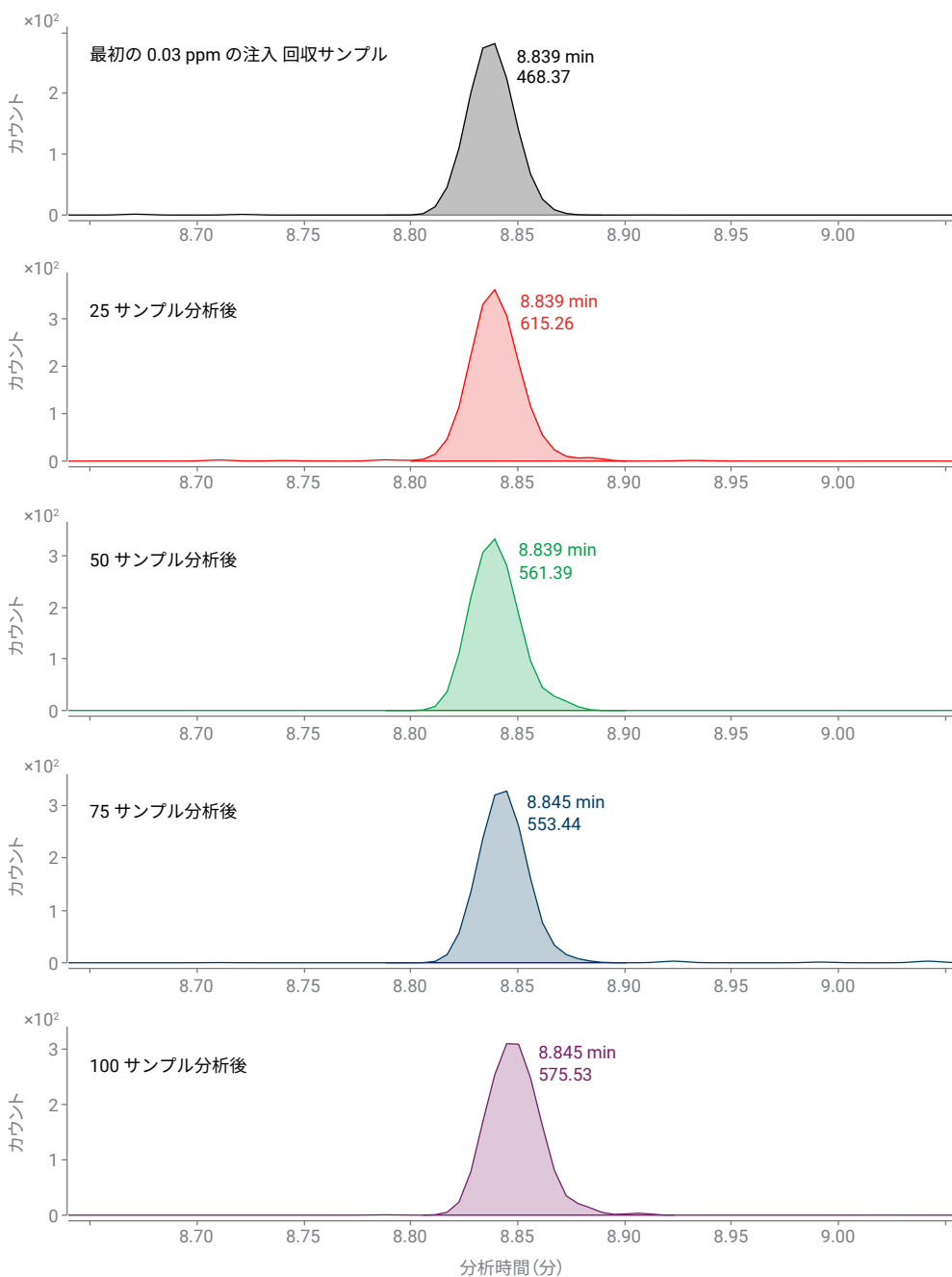


図 4. ミッドカラムバックフラッシュ設定を使用した場合、25 回、50 回、100 回の連続サンプル分析後に一貫性のあるリテンションタイム (RT) とピーク面積が得られました。

回収率

サンプル回収率は、0.03 ppm の原薬（バルサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、およびオルメサルタン）を添加して計算しました。回収率は十分であり、HES と HydroInert イオン源の両方のセットアップで水素キャリアガスを使用した場合、80 ~ 120 % でした。

結論

Agilent 7010 シリーズ GC/TQ (HES)、または Agilent 7000E GC/TQ (HydroInert イオン源) を備えた Agilent 8890 GC システムでの水素キャリアガスの使用について、サルタン系医薬品および物質中の 8 種類のニトロソアミン医薬品不純物測定で優れた性能が実証されました。性能は 0.03 ppm で検証され、許容される回収率と長期間の再現性が認められました。HydroInert イオン源を搭載した 7000E GC/TQ と HES イオン源を搭載した 7010 シリーズ GC/TQ のどちらも、必要な検出限界を達成するためのシステムの能力を向上させました。OpenLab ECM XT と MassHunter Acquisition 13.0 の統合により、データ管理が効率化されたことで、機器により生成されたデータへのアクセスの一元化、コラボレーションの促進、データ整合性の維持、ワークフロープロセスの最適化が実現しました。

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。

DE18669787

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, May 16, 2024

5994-7438JAJP

参考文献

1. Agilent EI GC/MS 機器でのヘリウムから水素へのキャリアガス切り替え, Agilent Technologies ユーザガイド user guide, publication number 5994-2312JAJP, **2020**.
2. Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 水素キャリアガスと HydroInert イオン源を用いたヘッドスペース GC/MSD による飲料水中の揮発性有機化合物の分析. Agilent Technologies application note, publication number 5994-4963JAJP, **2022**.
3. Quimby, B. D.; Haddad, S.; Andrianova, A. A. 水素キャリアガスおよび Agilent HydroInert イオン源を用いた GC/MS による PAH の分析. Agilent Technologies application note, publication number 5994-5711JAJP, **2023**.
4. Haddad, S.; Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 水素キャリアガスを用いた PAH の GC/MS/MS 分析—分析困難な土壌マトリックスでの Agilent HydroInert イオン源の利用. Agilent Technologies application note, publication number 5994-5776JAJP, **2023**.
5. Miles, L.; et al. 水素キャリアガスと Agilent HydroInert イオン源を用いた EPA TO-15 分析. Agilent Technologies application note, publication number 5994-5359JAJP, **2022**.
6. U.S Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. February **2021**. <https://www.fda.gov/media/141720/download>
7. European Medicines Agency. Questions and Answers for Marketing Authorization Holders/Applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 Referral on Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products. 15 January **2024**. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf
8. Dasgupta, S.; Dhyani, V; Churley, M. Quantification of Nine Nitrosamine Impurities in Sartan Drugs Using an Agilent GC-TQ. Agilent Technologies application note, publication number 5994-4618EN, **2022**.