

アプリケーションノート

## バルサルタンおよびニトロソアミン類不純物の UPLC-MS 分析における Analytical Quality by Design に基づいた分析法開発

---

Fadi L. Alkhateeb, Paul D. Rainville

日本ウォーターズ株式会社



---

要約

バルサルタンおよび 6 種の遺伝毒性不純物の混合物の分析のために、Analytical Quality by Design (AQbD) のアプローチを使用した超高速液体クロマトグラフィー分析法を開発しました。DryLab、Empower、Waters の各システムを使用して、分析法開発のプロセスを自動化しました。最終的な分析法では、HSS T3 カラム (10 cm × 2.1 × 1.7 μm)、有機溶媒としてメタノール、および 0.1% ギ酸水溶液の水系移動相を使用しました。開発した分析法では、優れた頑健性と再現性が見られました。例えば、標準混合物でのピークの保持時間の相対標準偏差 (% RSD) は、3 日間にわたる分析で 0.9% でした。これらの結果は、AQbD アプローチおよび自動化ソフトウェアを使用することで、分析法についての深い知見が得られることを示しています。また、その結果として、非常に頑健で再現性の高い分析法を開発できることを示しています。

## アプリケーションのメリット

- Empower 3 クロマトグラフィデータシステム (Empower CDS) および DryLab4 ソフトウェアと組み合わせた ACQUITY UPLC H-Class システムの、高効率で高性能な分析法開発を示す
- DryLab と Empower のシームレスな統合により、分析法開発プロセスの全自動化ができることを示す
- バルサルタンおよび 6 種の遺伝毒性不純物の混合物の高性能で頑健な分析法を開発

---

## はじめに

遺伝毒性不純物は、メカニズムにかかわらず、遺伝物質の有害な変化の原因となる物質として ICH S2 (R1) ガイドラインで定義されています<sup>1</sup>。このような不純物に主に懸念されることは、非常に低濃度でも、ヒト細胞と相互作用して変異およびがんを引き起こす可能性があることです。そのため、遺伝毒性不純物はすべて避ける必要があります。避けられない場合は、規定のレベル以下に低減する必要があります。バルサルタン、ロサルタン、イルベサルタンなど、様々なアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) 中のこれらの不純物が出現したことにより、これらの薬品の市場から広範な製品リコールが発生し、この問題には、米国 FDA および欧州医薬品庁 (EMA) などの規制当局が注目するようになりました。規制を遵守するためには、これらの化合物の分析に使用する分析法が、正確で頑健、かつ高感度であることが非常に重要です。頑健で正確な分析法を開発する方法として、分析法開発プロセスにおける Analytical Quality by Design (AQbD) の原則の採用が挙げられます。AQbD は分析法開発の体系的なアプローチで、事前に定義された目標から開始して、分析法の性能に対するクロマトグラフィーの要因の影響を合理的に把握していきます<sup>2</sup>。このアプローチでは、複数の変数のスクリーニングが行われ、試験する要因が分析法の性能に与える影響について幅広い情報が得られます。この情報は、分析法の性能基準を満たすことが確認された要因の多次元の組み合わせに対応する、Method Operable Design Region (MODR) を確立するために使用します。このアプローチの成果として、ライフサイクル全体にわたって期待される性能を提供でき、目的に適合し、適切に設計され、理解しやすく、堅牢な分析法が開発できます<sup>3,4</sup>。

このアプリケーションノートでは、ソフトウェア支援 AQbD アプローチを導入して、バルサルタン標準試料および 6 種の遺伝毒性不純物 (NDMA、NMBA、NDEA、NEIPA、NDIPA、NDBA) の分析のための分析法開発を行いました。

た。

ACQUITY UPLC H-Class システムにカラムマネージャおよび溶媒選択バルブを装備して実験を行い、幅広い条件で自動化された探索を行うことができました。

この試験では AQbD ソフトウェアとして、DryLab4 分析法開発ソフトウェアを使用しました。ACQUITY UPLC H-Class PLUS システムでの分析法開発における AQbD の原則の詳細については、以前のアプリケーションノートに記載しています<sup>5</sup>。

## 実験方法

### 混合試料および標準試料の調製

バルサルタンおよび 6 種のニトロソアミン（遺伝毒性不純物）はすべて Toronto Research Chemicals（カナダ、オンタリオ、North York）から購入しました。これらの化合物の原液は、それぞれの標準試料の必要量を正確に計量し、メタノールに溶解して調製しました。次に、これらの原液を用いて、バルサルタンとすべての不純物を含む混合試料を調製しました。この混合試料は、各標準試料の原液をサンプル溶媒の 80/20（v/v）水/メタノールに希釈して調製しました。混合試料中の各分析種の最終濃度は、バルサルタンが約 0.1 mg/mL で、各不純物は約 0.07 mg/mL でした。これらの化合物の名前や分子量などの詳細を以下の表 1 に示します。

分析種	一般名	モノアイソトピック質量 (Da)
NDMA	N-ニトロソジメチルアミン	75.05
NMBA	N-ニトロ-N-メチル-4-アミノ酪酸	146.07
NDEA	N-ニトロソジエチルアミン	102.08
NEIPA	N-ニトロソエチルイソプロピルアミン	116.09
NDIPA	N-ニトロソジイソプロピルアミン	130.11
NDBA	N-ニトロソジブチルアミン	158.14
API	バルサルタン	435.22

表 1. この試験で使用した遺伝毒性不純物および医薬品有効成分 (API)

### LC 条件

LC システム:

ACQUITY UPLC H-Class システム、クオータナリーソルベントマネージャー (QSM)、サンプルマネージャー (FTN)、カラムマネージャー、2 つの CM 補助カラムマネージャー

、PDA 検出器、QDa 質量検出器を搭載

検出:	PDA および QDa
カラム:	HSS T3 カラム、2.1 × 100 mm、1.8 μm pH 範囲: 1 ~ 8
カラム温度:	30 ~ 60 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	3 μL
流速:	0.4
移動相 A:	0.1% (v/v) ギ酸水溶液
移動相 B:	アセトニトリルおよびメタノール
グラジエント:	2 ~ 98% B/5 分または 15 分。グラジエントは t = 0 に開始し、2 分間の最終ホールドを行ってから、初期条件に戻しました。
UV 検出:	245 nm

## MS 条件

MS システム:	ACQUITY QDa 質量検出器
イオン化モード:	ESI+
取り込み範囲:	100 ~ 500 Da
キャピラリー電圧:	0.8 kV
ソース温度:	600 °C

コーン電圧: 15 V

## データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア: Empower 3 クロマトグラフィーデータシステムおよび DryLab4

MS ソフトウェア: Empower 3

## 結果および考察

上述したように、Analytical Quality by Design は、事前に定義された目標から始める分析法開発の体系的アプローチであり、健全な科学に基づいています。分析法開発に AQBd の原則を採用することで、分析法の性能に与える様々なクロマトグラフィーの影響をより良く理解できるようになります。更に、分析法の性能の目標がすべて満たされる頑健なデザインスペースの定義が容易になります。このデザインスペースは、このスペースの範囲内での調整は変更とみなされないため、規制面で柔軟性であり、「規制当局の承認後プロセス」を必要としません<sup>6</sup>。

DryLab は市販の AQBd ソフトウェアです。DryLab を Empower と組み合わせて使用し、AQBd の原則に適合した分析法開発を行います。また、必要な分析法すべてを CDS (Empower) 内で作成することで、分析法開発プロセス全体を自動化できます。自動分析法開発プロセス用の DryLab - Empower のワークフローには、図 1 に示すような複数のステップが含まれます。各ステップの詳細を、以下に記載します。

### DryLab の Empower 自動 AQBd モデリングワークフロー



図 1. DryLab - Empower AQBd 分析法開発プロセスに含まれる複数のステップのワークフロー

## 実験計画

ICHによると、実験計画法（DOE）は、「プロセスに影響を与える要因と、そのプロセスのアウトプットとの関係を決定するための構造化、組織化された分析法」と定義されています。DryLab は、DOE アプローチを使用して、AQbD の原則に適合する頑健な LC 分析法を開発します。AQbD 分析法開発プロセスのこの部分では、リニアグラジエントのワーキングメソッドを選択し、最適化が必要な変数を定義します。試験対象の変数の種類・数に応じて、ソフトウェア内で分析法開発にいくつかの実験デザインが使用できます。この試験では、3 変数（3D）実験デザインを選択しました。この DOE グラジエント時間では、試験する変数として、3 元モディファイヤー組成（メタノール）および温度のすべてを選択しました。この試験に含まれる実験数の合計は、図 2 に詳細に記載しているように 12 実験です。DOE は選択後に Empower にエクスポートされ、これらの実験に必要なすべてのメソッドおよびメソッドセットが作成されました。また、必要なすべてのコンディショニング/平衡化メソッドおよびメソッドセットも作成して、エクスポートしました。DryLab ソフトウェア内でワンクリック操作するだけで、この作業が自動的かつシームレスに行われました。この自動化機能は、Empower CDS および Waters システムでのみ可能です。これらの実験のためにメソッドおよびメソッドセットを手動で作成する時間を節約することで、分析法開発にかかる時間を大幅に短縮できるため、この機能は特に有用です。また、転記ミスをなくすることもできます。

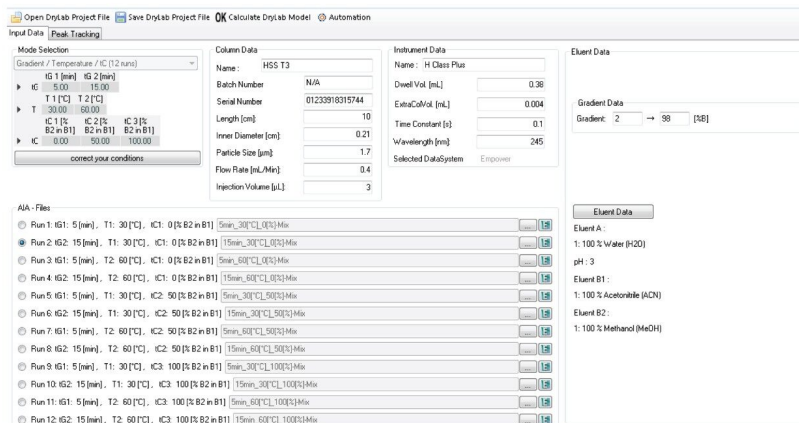


図 2. 3D DOE およびこの研究で試験したすべての変数が表示されている DryLab ソフトウェアのスクリーンショット

## ピークトラッキング

実験がすべて実施された後、データが、Empower で解析されてから、DryLab ソフトウェアにインポートされます。Empower での解析には、得られたクロマトグラムにあるすべての目的のピークのみを波形解析し、これらのピークの分離度、テーリング、対称性などの重要なクロマトグラフィーパラメーターを計算する作業が含まれています。次に、12 の異なるクロマトグラムにわたって、ピークが自動的にトラッキングされます。DryLab ソフトウェアのピークトラッキングの大半は、ピーク面積に基づいています。この機能を用いることで、妥当な精度でピークのトラッキングを行えますが、手動ピーク割り当てが必要になることもあります。例えば、共溶出の場合、ソフ



トウェアでは、共溶出するピークの手動の「スプリット」や、ピーク位置の並べ替え・順序変更を行うことで、より正確なピークトラッキングが可能になります。このソフトウェアのもう1つの重要な機能は、分析種の分子質量を利用して、より正確なトラッキングを可能にすることです。ソフトウェアは、すべてのピークについて Apex  $m/z$  (ACQUITY QDa 質量検出器) の値も自動的にインポートするため、ピークのトラッキングが正確に行われていることが確認できます。

## デザインスペースのモデリング

次に、データが解析され、すべてのピークがトラッキングされた後、ソフトウェアが自動的にモデルを構築し、希望するピーク間の分離が達成できる条件の組み合わせを示すマップを作成します。ここで、混合物に含まれる分析種に対応する7本のピークに加えて、未知の不純物による追加のピークが3本現れることに注意してください。結果として、2つの分離マップが作成されました。1つは10本のピークで得られたマップで、もう1つは7本のピークのみで得られたマップです。図3に、12回の実験に基づいて得られた分離マップを示します。図3Aに見られるように、元のリニアグラジエントプロファイルである2~98%B(100%メタノール)および $t_G=25$ 分を使用することで、すべてのピークがよく分離しました(クリティカルペアの分離度、 $R_{s,crit}=1.6$ )。一方、目的の7本のピークのみを考慮すると、図3Bに示すように、非常に広範な実験条件で、すべての分析種についてベースライン分離が得られます。更に、同一条件でのモデリングで、7つの分析種のピークのみを考慮した場合、クリティカルペアの最低分離度17.6の達成が予測されました。バルサルタンおよび6種のGTIの分離が本研究の目標であるため、以降の実験ではこれらの分析種の分離にのみ注目することにしました。

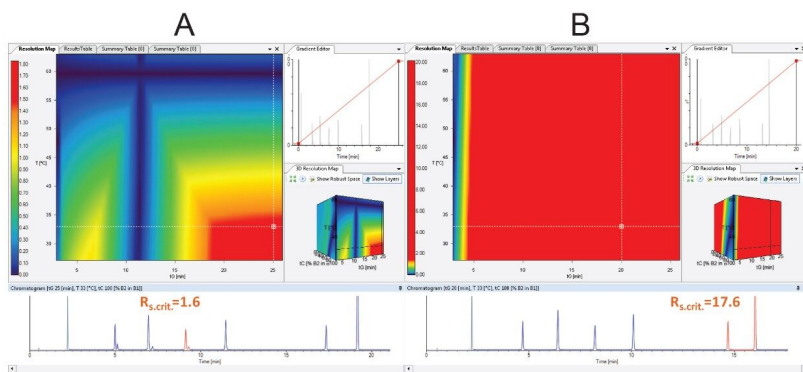


図3. DryLab の分離マップのスクリーンショット。A は、3つの未知の不純物を含む10本のピークの間での MODR を、B は、目的の7本のピークの間での MODR を示します。赤色はデザインスペースを示しており、すべてのピーク間で最低限の分離度が達成されています(この場合は1.5)。対応するグラフ中の十字ポインターの位置は、ワーキングポイントの条件を示しています。

## 頑健性評価

分析法開発プロセスのこの部分では、過去の実験のモデル（図 3B）から得られた最終的な分析法の頑健性を評価しました。この評価では、選択したワーキングポイントでの装置の許容限界と、分析法の変数やパラメーターの変動により発生する可能性のあるフェイルを考慮に入れています。図 4A は最終的な分析法の頑健性評価と、様々なクロマトグラフィーパラメーターにおける装置の許容限界を示しています。評価の結果、7本のピークすべての間での最低分離度 16 が、すべての分析にわたって 100% 得られることがわかります。

更に、頑健性評価により、ルーチン使用時に予測される分離度の範囲と、分離に最大の影響を及ぼす分析法のパラメーターがすべて示されました。例えば、本研究では、図 4B に示すように、分離度に影響を及ぼす最も重要なパラメーターは、流速とグラジエント時間の 2 つでした。このように重要な分離パラメーターを特定することで、より効率の良い分析法管理戦略に役立ちます。

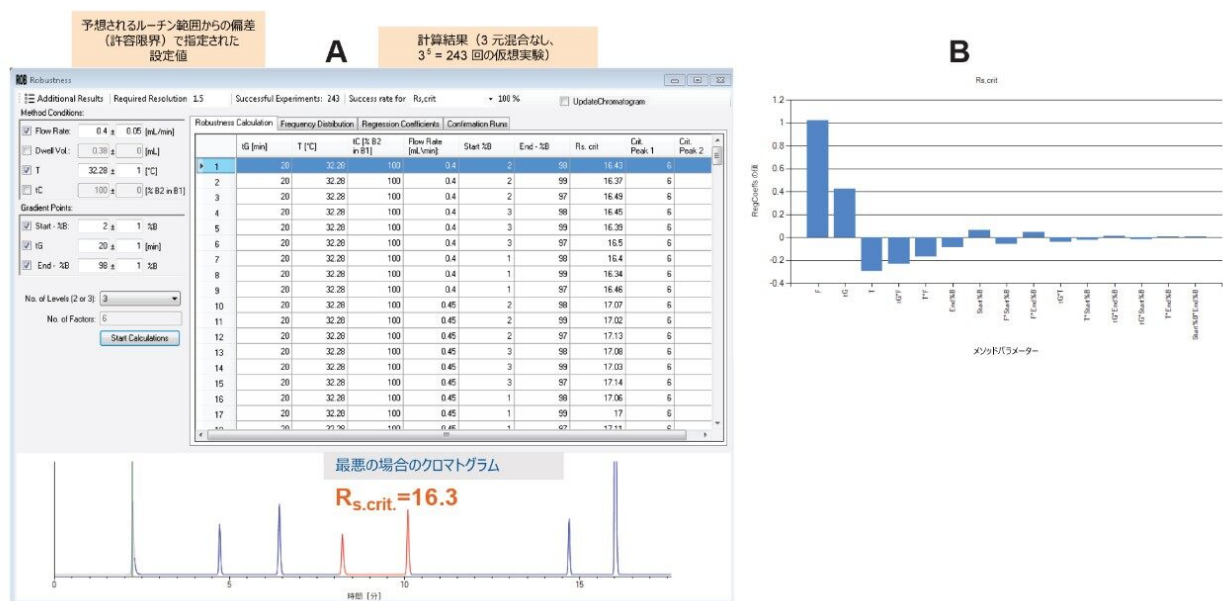


図 4. DryLab の頑健性評価モジュールのスクリーンショット。A は、装置の許容限界に基づいた、243 回のバッチ実験の計算結果を、予測される偏差と共に示し、B は、重要な分離度に与える影響で並べ替えた回帰係数を示しています。

### DryLab モデリングの検証

頑健性評価に基づいて予測された結果を検証するために、これらの結果を分析種の実験と比較することが重要でした。そのため、頑健性評価で得られた最終条件で、複数の検証実験を実施しました。これらの実験では、予測された性能が、観察された性能と一致していることが示されました。例えば、表 2 に示すように、実際にワーキングポイント条件の予測（クリティカルペアの分離度 17.6）を検証しました。この実験を 3 日間にわたって 15 回繰り返して行い、分析法の再現性を試験しました。開発した分析法の再現性は非常に高いことがわかり、すべての分析において、保持時間、ピーク面積、分離度の %RSD 値が 1% 未満でした。3 日間にわたるすべての結果を、表 2 にまとめています。図 5 に、この実験の 1 日目の 5 回繰り返し注入を示しています。



分析種	平均 tR	%RSD	平均面積	%RSD	R <sub>s</sub>	%RSD	平均 tR	%RSD	平均面積	%RSD	R <sub>s</sub>	%RSD	平均 tR	%RSD	平均面積	%RSD	R <sub>s</sub>	%RSD
NDMA	1.82	0.23	186390	0.87	NA	NA	1.83	0.22	181919	0.50	NA	NA	1.81	0.37	183171	0.62	NA	NA
NDBA	3.52	0.09	88159	0.08	17.8	0.1	3.56	0.82	88344	0.26	18.2	0.8	3.48	0.32	89054	0.31	19.0	0.1
NDEA	5.45	0.05	171360	0.14	26.4	0.1	5.49	0.73	170085	0.20	26.3	0.4	5.41	0.20	168783	0.22	26.2	0.2
NEIPA	7.53	0.07	106297	0.18	25.1	0.1	7.57	0.62	104908	0.20	24.9	0.5	7.50	0.13	103670	0.43	24.7	0.1
NDIPA	9.60	0.06	155434	0.29	23.3	0.1	9.63	0.49	153998	0.20	23.2	0.2	9.56	0.10	152567	0.16	23.1	0.2
NDBA	14.52	0.04	121057	0.82	57.0	0.0	14.60	0.24	119285	0.25	56.7	0.3	14.50	0.08	117344	0.26	56.3	0.2
バルサルタン	15.95	0.02	961622	0.08	17.7	0.0	16.06	0.12	966832	0.04	17.8	0.8	15.94	0.13	974682	0.06	17.6	0.7

表 2. 図 5 に詳細を記載したワーキングポイントの条件で分析した際の、7つの分析種の混合物についてのピーク面積、保持時間、分離度 (R<sub>s</sub>) のまとめ

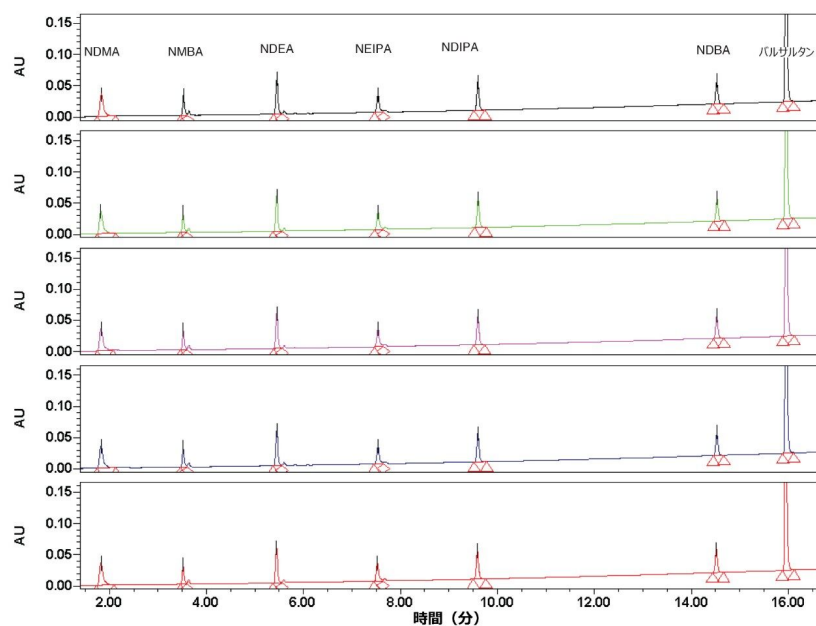


図 5. ワーキングポイントの条件でのバルサルタンおよび 6 種の GTI の 5 回繰り返し注入。条件は、温度 = 33 °C、流速 = 0.40 mL/分です。グラジエントプロファイルは、25 分で 2~98% メタノールのリニアグラジエントでした。カラム: 100 mm × 2.1 mm HSS T3、1.8 μm。

## 結論

- 体系的な AQbD 分析法開発により、バルサルタンおよび NDBA の分離がグラジエント時間に強く依存することが示された
- DryLab を Empower および Waters システムと併用したことで、分析法開発プロセス全体の自動化において大

きなメリットが得られた

- AQbD の原則を分析法開発に採用することで、頑健で再現性の高い分析法が開発できた
- ACQUITY QDa 質量検出器により、さまざまなクロマトグラムにわたるピークのトラッキングが容易になるため、この装置は分析法開発に不可欠である

---

## 参考文献

1. ICH S2 (R1), Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, 2012.
2. International Conference on Harmonization (ICH), Q8(R2): *Pharmaceutical Development* (August 2009).
3. G.L. Reid, J. Morgado, K. Barnett, B. Harrington, J. Wang, J. Harwood, D. Fortin, Analytical Quality by Design (AQbD) in Pharmaceutical Development, *American Pharmaceutical Review* 144191 (2013).
4. M.A.K.B.M. Chatfield, E.H.P.J.S. Karmarkar, A.M.A.M.P. Andy, R.D.S.M.D. Trone, Q.W.Z.W.Y. Zhao, Evaluating Progress in Analytical Quality by Design, (2017).
5. F.L. Alkhateeb, P. Rainville, Applying a Software-Assisted Analytical Quality by Design Approach for the Analysis of Formoterol, Budesonide, and Related Compounds by UPLC-MS, Waters, August 2019, 720006654EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006654en.pdf>> .
6. S. Fekete, I. Molnár, Software-Assisted Method Development in High Performance Liquid Chromatography, *World Scientific*, 2018.

---

## ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

Empower クロマトグラフィードータシステム <<https://www.waters.com/513188>>

720007033JA、2020 年 12 月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.