

医薬品製造における次世代の品質管理

SCIEX X500R QTOFシステムを用いたバルサルタン中のNDMAと他の不純物検出の未知比較スクリーニング(GUCS)ワークフロー

Axel Besa
SCIEX, Germany

バルサルタンは高血圧と心不全の治療に処方薬として用いられています。2012年に物質の特許が切れ、多くのジェネリック医薬品メーカーが市場に参入しております。特許切れから6年後の2018年7月、世界各国の規制当局は、バルサルタンを含有していた製品の多くについて自主回収を通知いたしました。バルサルタンは原薬中に発がん性と遺伝毒性を持つことが知られているN-ニトロソジメチルアミン(NDMA)を含んでおります。^{1,2}最近では、N-ニトロソジエチルアミン(NDEA)も検出されております。現在、これらの不純物は、2012年に実施した合成法の変更に起因すると考えられておりますが、その時点では不純物は検出されておらず、すべての規制当局及び監督当局は、これらの変更を承認しておりました。

イルベサルタン、ロサルタン、バルサルタンのようなサルタン系薬剤は、血圧を低下させ、血流を改善するために世界中で使用されているアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)である。FDAの最新のリコールでは、1000以上のARB製品ロットに潜在的な発がん性不純物が含まれていることが明らかになりました。³

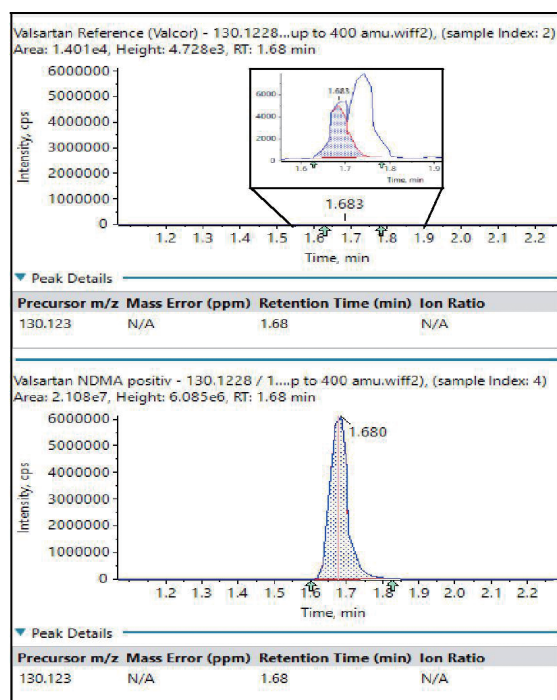


図1. GUCSワークフロー バルサルタン標品(上図)および市販品(下図)におけるNDMAのイオン・クロマトグラム(XIC)を抽出。両方のXICが同じyスケールでプロットされました。NDMAはサンプルの1000倍以上高い強度(下図)で検出されたのに対し、拡大領域(上図)では非常に低いレベルだが、NDMAと同重体不純物が標準品中に検出されました。



これらのリコールは、製薬企業だけでなく、事業を監督する規制当局にとっても、事業の損失、評判の損失、信用の損失に深刻な影響を及しております。

過去に用いられていた分析では、これらの不純物を迅速かつ確実に検出するには不十分であったため、新しい分析技術とワークフローは医薬品製造管理現場にとって大きなメリットとなる可能性があります。このテクニカルノートでは、不純物を定量的に検出することで医薬品の安全性を向上させ、バッチ間での比較モニタリングを可能にし、医薬品製造管理現場での学習と実施が容易なLC-MS/MSの一般的な未知の比較スクリーニング(GUCS)ワークフローを紹介いたします。

SCIEX X500R QTOF LC-MS/MS システムを用いたPharma QC分析の主な特徴

- X500R QTOF LC-MS/MSは、ノンターゲットスクリーニング、サスペクトスクリーニング、ターゲット分析に適したベンチトップタイプの高分解能精密質量のシステムです。
- SWATH® AcquisitionとSCIEX OS Software 1.5を使用したGUCSワークフローでは、バッチで製造された活性製薬物質と標準品を比較して、不純物分析およびQC分析を容易、正確、迅速に行うことができます。
- MarkerView™ソフトウェアを使用すると、統計分析によって、ジェネリック医薬品の製造拠点の共有による潜在的な影響を明らかにすることができます。

メソッド

試料調製: 秤量および粉碎後、重量比10%のバルサルタン錠を1.5 mL遠心管に移し、メタノール500μLを加え、5分間激しく振り混ぜた後、5分間超音波処理しました。次に、500μLのMilliQ-水を加え、チューブを5分間振盪し、5分間超音波処理しました。次いで、試料を10,000rpm、4°Cで35分間遠心分離しました。最後に、上清を褐色ガラスバイアルに直接移しました。

クロマトグラフィー: 二つのLCメソッドをSCIEX ExionLC™ ADシステムで使用いたしました。いずれの場合も、移動相A=水+0.1% FAおよび移動相B=アセトニトリル+0.1% FAを用いました。

- NDMAと関連不純物用LC条件:** Phenomenex Synergi Polar1 100x4.6; 2.5 μm カラムに10μLを注入。表1に示している900μL/分の流量でグラジエントを行いました。
- 一般的な不純物のプロファイリング用LC条件:** Phenomenex Luna Omega Polar 100x2; 1.6μm カラムに3μLのサンプルを注入した。表1に示している600μL/分の流量でグラジエントを行いました。

表1: LC-MS法のグラジエント条件

時間	%A	%B
方法 1		
0	60	40
0.5	60	40
5.0	0	100
6.5	0	100
7.0	60	40
8.5	60	40
方法 2		
0.0	90	10
0.1	90	10
5.0	0	100
7.0	0	100
7.5	90	10
9.5	90	10

質量分析: SCIEX X500R QTOF LC-MS/MS System、二つの異なる取得方法を実施しました。

- NDMAと関連不純物に最適なMS条件:** NDMAと関連不純物の検出に最良のイオン化効率が見られることが知られている大気圧化学イオン化法 (APCI) を用いました。Information dependent acquisition (IDA) を、smart dynamic exclusion機能を用いたトップ10候補のモニタリングに用いました。TOFMS: 65~400amu、積算時間100ms。MS/MSTOF: 50-400amu、積算時間60ms。総サイクル時間0.9秒、40V±20Vのコリジョンエネルギー、イオン源温度480°C、ネブライザー電流 5μA DP 60V、CUR 30psi、CAD 7、GS1 65psi。
- 一般的な不純物のプロファイリング条件:** 極性及び半極性化合物の大部分はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いて容易にイオン化することができるので、SWATHを用いて一般的なスクリーニング及び統計解析処理をポジティブモード及び負イオンモードで行いました。TOFMS: 70~750amu、積算時間100ms。TOF・MS/MS: 60ms積算時間で12の可変ウィンドウを使用したSWATH Acquisition。TOFMS/MSマスレンジ50-750 amu。合計サイクルタイム2秒。40V±20Vのコリジョンエネルギー、イオン源温度540°C IS 5500V、DP 80V、CUR 30psi、CAD 7、GS1 65psi、GS2 75psi。

データ処理: データ取得とデータ処理にはSCIEX OS 1.5を用いました。GUCSワークフローは、ソフトウェアのAnalytics部分内の非ターゲットデータ処理方法と、内部で開発されたライブラリー（これはユーザが選択できます。）を用いて実現されました。統計解析にはMarkerViewソフトウェアを用いました。

結果

未知のスクリーニングのためにLC-MS/MSを使用する古典的なワークフローは、多数の情報処理に悩まされます。典型的には、実際のサンプル内で検出される何千もの特徴から、適切な時間枠内で望ましくない単一の重要なそれとおそらく少量の不純物を検出することをほぼ不可能です。対照的に、SCIEX X500R QTOFシステムおよびSCIEX OSソフトウェア1.5によって使用されるGUCSワークフローは、一つまたは複数のサンプルに対する標準品サンプルまたは標準物質との自動比較を可能にし、標準品サンプル中に存在しない関連する特徴に焦点が当てられます。GUCSのワークフローは、不純物プロファイリングおよび医薬品QCにとって理想的であり、製薬製品の安全性プロファイルに多くの時間を費やすことなく、より正確に評価することができます。

不純物分析に適したGUCSワークフロー

NDMAは多くのバルサルタン製品において汚染物質になることが知られており、本スタディーの第一段階では、GUCSのワークフロー（メソッド1:質量分析とクロマトグラフィー）を利用して、NDMAと関連化合物の検出に最適化されたLC-MS/MSメソッドの開発を行いました。

表2は、標準品 (Valsacor D60897) に対する一般的なバルサルタン医薬品 (1Aファーマ, HL6907) のGUCS分析からの差次的に検出されたピークリストを示しています。GUCSのワークフローでは、アルゴリズムを使用してリファレンスとサンプルの両方のピークを検索し、メソッドで指定された閾値を超えるものに対してライブラリー検索を実行します。今回の場合、面積比7倍以上の全ての化合物を検出させました。

サンプル:対照で検出されたすべての化合物が記載され、存在量に従って分類される。標準品(または有意に低かった)では検出されなかった24化合物がジェネリック製品で検出されました。

ライブラリー検索でピークが特定されない場合は、ワンクリックでChemSpider検索を開始できます。ChemSpiderは、MSデータから精密質量と同位体比の情報に一致する最適な化学式を検索します。次に返された構造体ファイル(.mol)を使用します。

表2:最適化NDMA法によるGUCSの結果

Index	Component Name	Precursor Mass	Expected RT	Retention Time	Area Ratio of comp...
2418	130.1228 / 1.67	130.123	1.67	1.68	1505.136
2560	145.1340 / 1.53	145.134	1.53	1.53	965.627
2088	75.0559 / 1.15	75.056	1.15	1.14	172.325
2215	106.0868 / 0.88	106.087	0.88	0.87	96.950
2292	116.1076 / 1.32	116.108	1.32	1.32	41.199
2129	88.0763 / 1.11	88.076	1.11	1.11	36.288
2995	194.0970 / 2.54	194.097	2.54	2.54	19.552
3362	237.1138 / 2.54	237.114	2.54	2.54	19.502
3706	296.2589 / 3.95	296.259	3.95	3.95	16.771
2463	136.0222 / 2.10	136.022	2.10	2.09	15.354
3146	209.1080 / 2.54	209.108	2.54	2.54	14.240
2522	141.0917 / 1.16	141.092	1.16	1.17	11.266
2185	99.0550 / 1.18	99.055	1.12	1.12	9.947
2146	95.0598 / 1.11	95.060	1.11	1.12	9.132
2538	143.0709 / 1.11	143.071	1.11	1.12	8.659
2929	186.1496 / 1.55	186.150	1.55	1.55	8.448
2801	172.1338 / 1.32	172.134	1.32	1.31	8.340
2238	109.1018 / 1.32	109.102	1.32	1.32	8.162
3089	203.0920 / 1.13	203.092	1.13	1.12	8.045
2309	118.1234 / 0.88	118.123	0.88	0.88	7.690
2638	155.1072 / 1.32	155.107	1.32	1.31	7.667
3056	199.0971 / 1.11	199.097	1.11	1.12	7.601
2517	141.0552 / 1.11	141.055	1.11	1.12	7.433
2204	102.0919 / 1.20	102.092	1.20	1.20	7.258

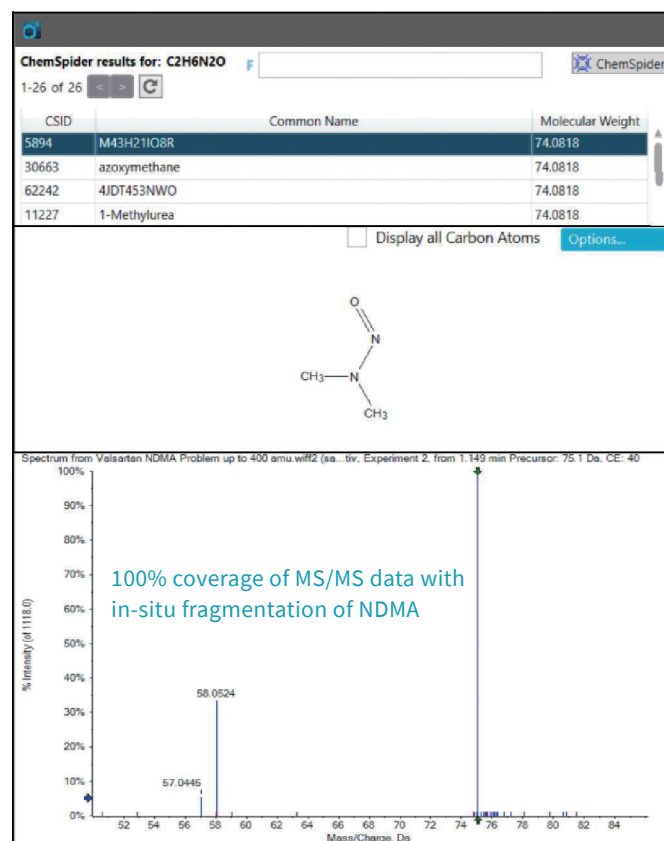


図2. ChemSpiderおよびAutoFragワークフロー 上のリストはChemSpiderデータベースとMSデータからの精密質量と同位体比を用いて同定した同重体化合物である。トップヒットの構造は中央に示されている。AutoFragの結果の下部には、色分けされた検証が表示されます。青色のフラグメントは指定された構造から計算され、赤色のフラグメントはその構造から生成できません。図に示すように、NDMAでは100%の相関と適用範囲が認められます。

AutoFragツールは、ChemSpiderからフラグメンテーションのデータを取得し、MS/MSの実験データと照合する。

NDMAは、自動ライブラリー検索において3番目に豊富な不純物であることが確認されました。表2に示すように、1A Pharma製剤中のNDMA量はValsacor標準品の170倍以上であった。

ライブラリー検索中にNDMAが同定されなかった場合を、図2にChemSpiderおよびAutoFragワークフローを示しております。高分解能精密質量とMSデータからの同位体比情報を用いて、 $C_2H_6N_2O$ の式を m/z 75.0559について予測しました。次に、ChemSpider検索では、この式に一致する可能性のある化合物が返されます。AutoFragツールはChemSpiderからの構造情報を用いてフラグメンテーションを予測し、実際に測定されたMS/MSフィンガープリントと比較しております。NDMAは一致率が高く、明確に正しく同定されました。

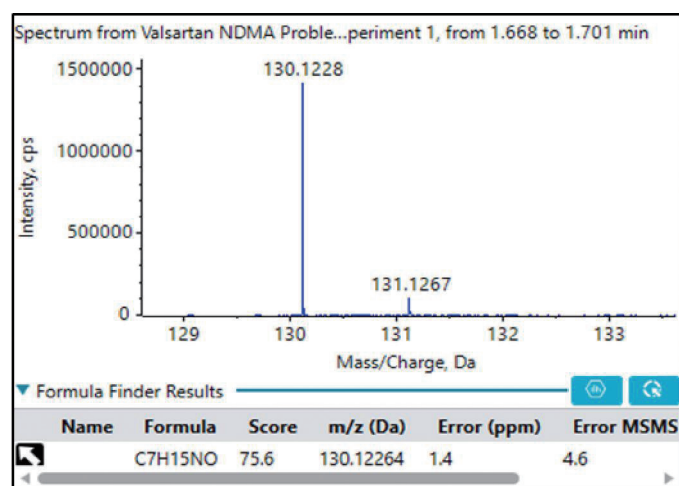


図3. 表2の最も豊富な化合物のMSスペクトル 精密質量データと同位体比を用いて、C₇H₁₅NOの化学式をRT 1.68でのm/z130.1228について予測しました。

図1は、RT=1.68におけるm/z=130.123のための1Aファーマ製品とバルサコール標準物質XICの比較を示しています。これは表2に見られる最も豊富な不純物である。図1に示されているように、この化合物の濃度は標準品よりもジェネリック製品で1000倍以上高いことが分かります。

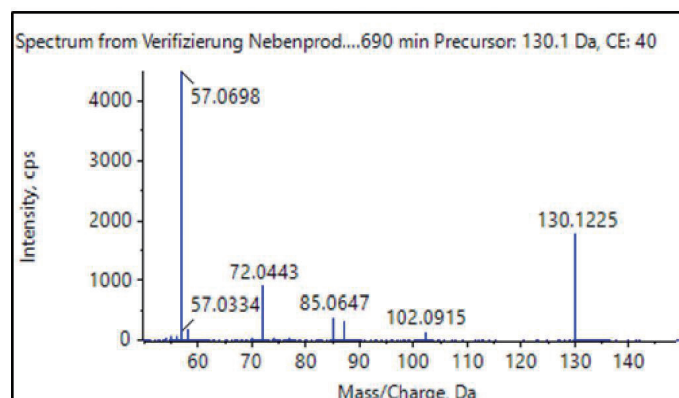
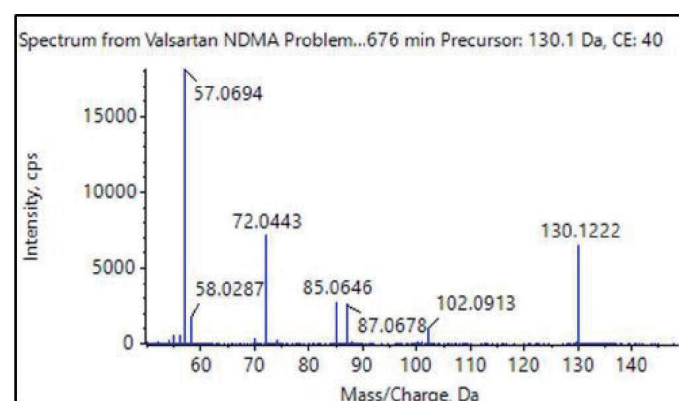


図4. ジメチルバレラミドのMS/MSデータの比較 (上図) MS/MS スペクトル発 m/z130.123、RT1.68、1Aファーマサンプル。(下図)同じフラグメンテーションパターンを示すジメチルバレラミド標準物質のMS/MS スペクトル。サンプルと標準物質のRTも同じでした。

図3は、メチルバレラミドと同定されたこの化合物のMSデータ。この同定は後にジメチルバレラミド標準 (図4) を用いて確認しました。

比較のために、表2から面積比が最も低いピークのXICを図5に示す。バルサコール標準品では微量検出されたが、1A Pharmaサンプルでは7倍以上高い存在量が検出されました。本システムは、この化合物をバレラミドとしてライブラリーから自動的に同定し、後にバレラミド標準物質 (図6) を用いて確認しました。

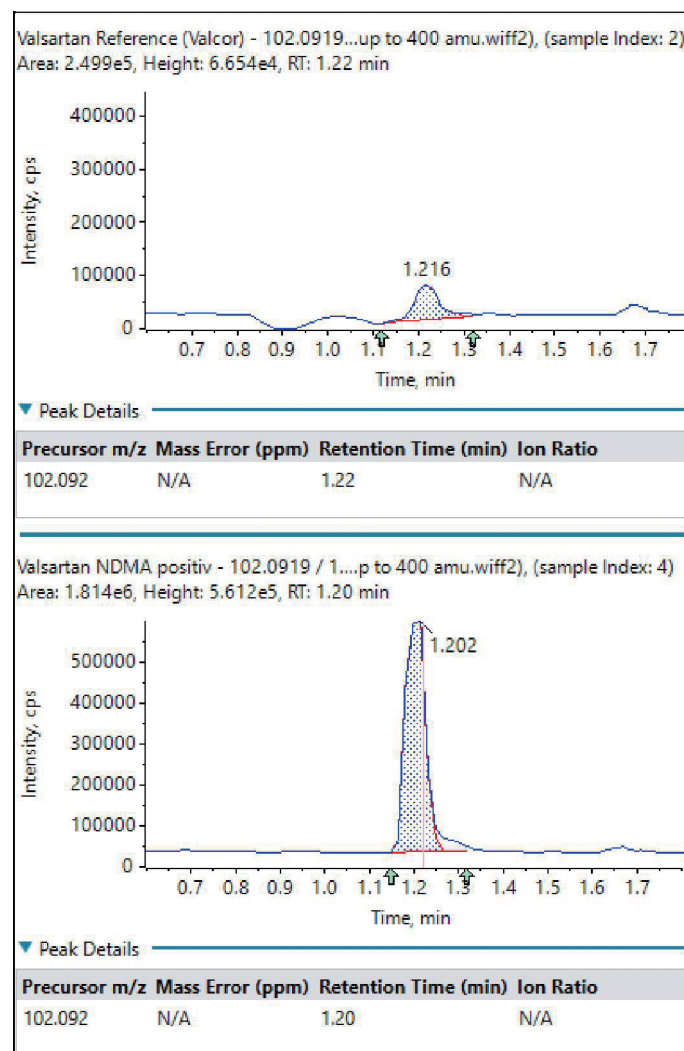


図5. バレラミドのXICデータの比較 (上図) バルサコール標準品。(下図) 1Aファーマサンプル。微量のバレラミドが標準品中に検出されているが、1Aファーマサンプルでは7倍高い存在量が認められている。

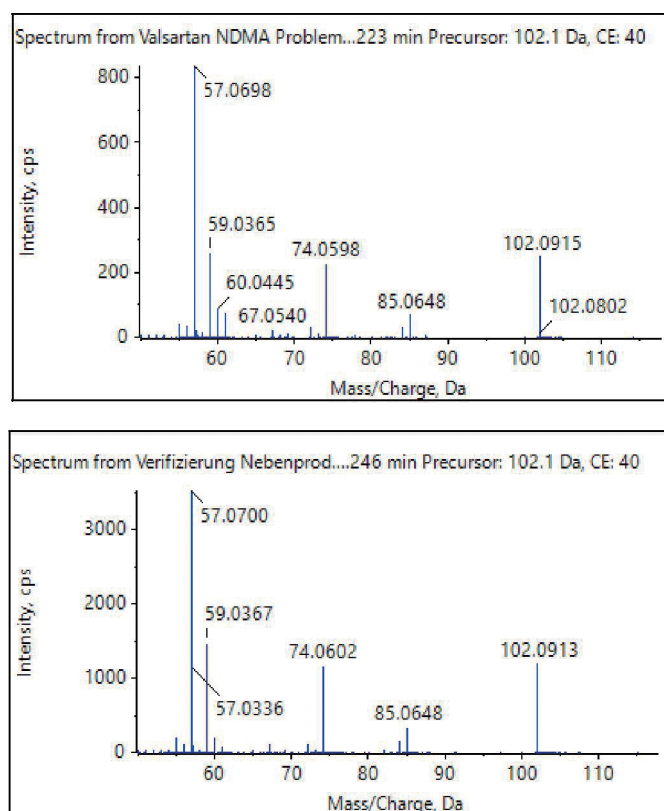


図6. バレラミドのMS/MSデータの比較 (上図) RT 1.2のm/z102.092のMS/MSスペクトルから。(下図)同じフラグメンテーションパターンの変ラミド標準物質MS/MSスペクトルです。サンプルと標準物質のRTも同じでした。

大部分の有機化合物はESIを用いてより容易にイオン化できるので、GUCSワークフロー(メソッド2の概要)をより一般的な方法として、この試験の第二部に用いております。ESIとSWATHを用い、同一の検索条件を使用することで、差分として検出されたコンポーネントの数が約24倍に大幅に増加しました。この方法はNDMAには最適化されておきませんが、すべての化合物を検出するためのより一般的な方法として、前述の三つの化合物(NDMA、バレラミド、ジメチルバレラミド)はいずれも閾値である7倍を超えて検出しました。

一般的な方法を用いて検出された化合物のリストは、NDMA最適化法を用いて生成されたリストよりもはるかに多くの未同定ピークを有する可能性があります。しかし、合成経路の化学反応物質や錠剤マトリックスが知られているので、これにより、合理的な提案の範囲が絞り込まれます。このように、GUCSのワークフローは、バッチ間の品質問題の監視、アクティブコンポーネント合成の問題と修正の特定、さらには生産の起源の特定にも非常に適しています。

バッチ比較のための統計解析

潜在的な問題を特定するもう一つのアプローチは、統計を使用することです。様々なメーカーからの9種類の異なるバルサルタン試料をESI SWATH(メソッド2)を用いて分析し、生データをMarkerViewソフトウェアに直接インポートしました。各サンプルを複数回測定して、オートサンプラーの変動性またはクロマトグラフィーのわずかな差を明らかにしました。

図7に、MarkerView ソフトウェアを用いた主成分分析(PCA)を示します。PCA分析は、データ中の各ピークについてm/z、強度、および保持時間を用いて実施しました。複数回測定したそれぞれのバルサルタンサンプルについて良好にグループ分けされております。実際、PCAは再現性全体を評価する簡単な方法です。というのは、再現性の程度が高い場合には、一つのグループ内での緊密なクラスタリングが反映されるからです。再現性のあるLC-MS/MSメソッドは、バッチ間生産からの少量の豊富な不純物のような関連群間の小さな差異を検出するために重要です。

Valsartan Ratiopharmが右下黄色のプロット、Valsacorが右側の緑のプロット、1A ファーマ HE6254が左上のプロットになります。このHE6254は他の左下にプロットされているValsartan製品とは有意に異なります。上で議論した群の間で、バルサルタン標準混合物、黒いアスタリスク、中央は、すべてのサンプルの平均を反映します。このサンプルは、他の8つのサンプルの混合物として作成されており、中央にクラスターがあるため、すべてのサンプルの平均化した要素があります。

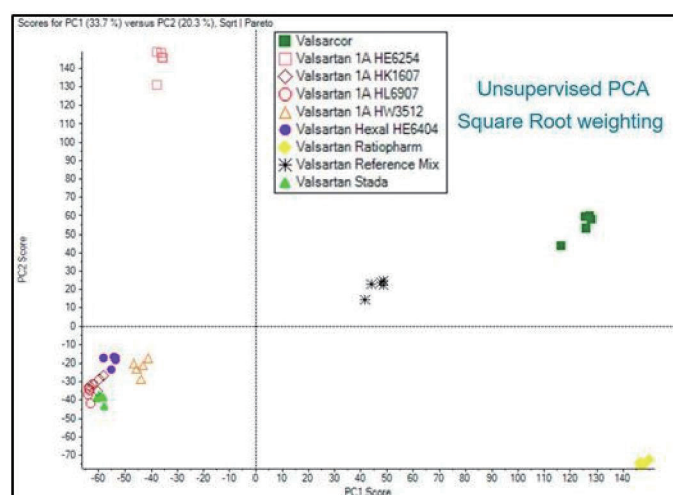


図7. MarkerView ソフトウェアを用いた主成分分析(PCA) 9種類の異なる一般的なバルサルタン製品(異なる1Aファーマバッチからの5)の教師なしPCA分析を示した。異なるメーカーからのレプリケーションは、適切にグループ化されます。左上の1A ファーマ(H6254)のバッチは、左下の他の1A ファーマバッチと明確に分離しており、検出された化合物に有意差があることを示しています。

興味深いことに、左上部の1A ファーマ HE6254左下部の他の1A ファーマバッチから分離されており、このバッチと他の1Aファーマバッチとの間に大きな違いがあることを示しています。

左下(HK1607)サンプルの一つとHE6254のTICデータを重ね合わせると、HE6254に検出された二つの主要なピークがあり、他のサンプル(図8)では検出されませんでした。m/z457.1498を用いたRT 2.93分のピークをさらに解析すると、それがアジルサルタンであるが、m/z569.1662、RT3.53分でのピークはアジルサルタン-メドキシミルであることを示しております。これらの化合物の両方は、我々の共同研究者の1人によって、ワークフローを試すためにブラインドテストとして試料中にスパイクされていました。

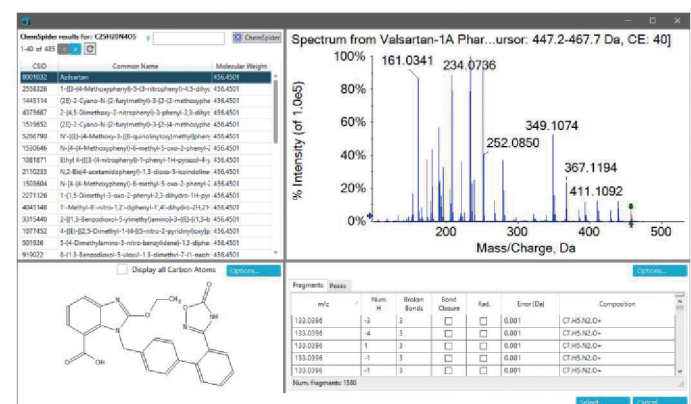
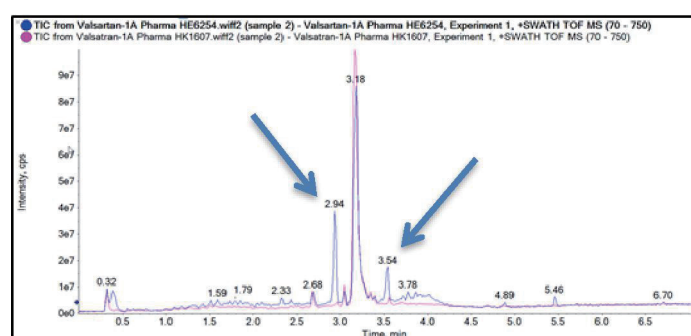


図8. バルサルタン製品における未知のピークの同定 (上図) HK1607(マゼンタ)のTICにHE6254(青)を重ねて表示。HE6254のTICで観測された二つの主要な付加的ピーク(青矢印)に明瞭な差が見られた。(下図)アジルサルタンの同定を示すm/z457.1498を用いたRT2.93分でのHE6254ピークに関するChemSpiderおよびAutoFragの結果。

結論

GUCSワークフローはシンプルで使いやすいワークフローであり、微量の不純物を効率的に検出できるため、製薬企業のQCラボに大きなメリットをもたらします。X500R QTOFシステムの高分解能と質量精度のために、ワークフローは複雑な処方やマトリックスにおいても定性と定量分析の両方に優れた選択性を提供します。このタイプのワークフローは、微量の潜在的に重要な不純物の検出および定量と同様に不純物プロファイリングと不純物モニタリングを正確性に行うために必須です。包括的SWATHと組み合わせることで、標品と一つまたはそれ以上の試料の間の関連する違いを、MS/MSデータから容易に検出、検証、同定することが出来ます。

統計解析を用いることで、より大きなバッチ間スケールでの不整合を明らかにすることにより、不純物の由来をより深く知ることが出来ます。ロット間及び製造場所間の違いや、合成経路の変更又はその他の要因による不純物の由来を特定するのに役立ちます。

References

1. German Federal Institute for Drugs and Medical Devices, BfArM, press release no. 5/18, 2018, July 4, 2018.
2. Food and Drug Administration, FDA announces voluntary recall of several medicines containing Valsartan following detection of an impurity, July 13 2018.
3. FDA ARB Recalls: UCM615703.pdf, November 2018, 27th

Acknowledgements

This work was initiated and driven by the Group of Prof. Fritz Sörgel, Institute for Biomedical and Pharmaceutical Research, IBMP, Prof. Ulrike Holzgrabe, University of Würzburg, and Prof. Mona Tawab, Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker e.V., and their teams, respectively. Thanksto Dr. Clemens Bidmon for coordinating and summarizing the status quo around the latest findings.