

医薬品中のアミン類の測定を目的としたイオンクロマトグラフィーメソッドの設計

著者

Jingli Hu, Jeffrey Rohrer, サーモフィッシャーサイエンティフィック (米国カリフォルニア州サニーベール)

キーワード

Dionex ICS-5000+ HPIC, Dionex ICS-6000 HPIC, Dionex IonPac CS16カラム, Dionex IonPac CS19カラム, Dionex CDRS 600サプレッサー, ロサルタン, メトホルミン, ラニチジン, ジフェンヒドラミン, NDMA, ニトロソアミン類

目的

医薬品サンプル中のアミンを測定するためのイオンクロマトグラフィーメソッドの開発について説明します。

はじめに

アミンとは、アンモニアの脂肪族および芳香族誘導体です。アンモニアと同様に弱塩基性を示し、イオンクロマトグラフィー (IC) による分析が適しています。アミンには医薬品 (製剤) として、また、原薬の合成に使用されるものがあります。多くのアミン製剤は、天然のアミン神経伝達物質の作用を模倣したり、阻害したりするために設計されています。例えば、クロルフェニラミンはアレルギー症状を抑える抗ヒスタミン薬です。クロルプロマジン は、眠気を誘うことなく鎮静作用をもたらす抗精神病薬で、不安感や精神的不調の緩和に用いられます。エフェドリンおよびフェニレフリンは充血除去薬として用いられます。

医薬品業界では、イオンクロマトグラフィーは非イオン性成分を含む製剤中のイオン性成分の検出に特に有用です。ICを用いるメソッドは米国薬局方の医薬品各条 (モノグラフ) に示されており、有効成分、分解生成物、不純物の測定など、あらゆる医薬品製造にかかわる工程に使用されています¹。



大方の医薬品サンプルでは、サンプル前処理はほとんど必要なく、分析対象物の誘導体化も不要です。陽イオン交換カラムを用いた脂肪族アミンのIC分析について、多数の報告がされています。米国薬局方のベタネコール塩化物のモノグラフには、陽イオン交換ICメソッドを用いたベタネコールおよびその分解生成物の測定について示されています²。

本稿では、医薬品中のアミン測定のためのメソッド開発に関するガイドです。ICカラム選択ガイド、AppsLab、およびバーチャルカラムなどのツールについて紹介します。さらに、医薬品中のジメチルアミンの測定を例に挙げ、紹介したツールの活用方法について説明します。

アミン類のIC分離の手引き

一般的に、陽イオン交換イオンクロマトグラフィーはメタンスルホン酸を溶離液とします。アミン類は酸性溶液中では陽イオンになります。陽イオン交換イオンクロマトグラフィーの主な分離モードはイオン交換です。しかし、疎水性相互作用や水素結合などその他の分離モードも、極性有機分子を固定相に保持する役割を果たしています。これらの相互作用の相対的な影響の評価は、3種類のThermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ 陽イオン交換カラム (Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS19カラム、Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS17カラム、およびThermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS12Aカラム) を使用し、構造が類似する15種類の生体アミンおよびアミノ酸の分析によって行われています。これら3種類の固定相は、分離メカニズムとして静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合、双極子相互作用、そして場合によって、芳香族環とEVB-DVB樹脂間の π - π 相互作用を利用していると報告されています³。

Dionex IonPac CS12Aカラム、Dionex IonPac CS17カラム、およびDionex IonPac CS19カラムは、カルボン酸基を陽イオン交換基とします。多孔質ポリマー基材にカルボン酸基を結合した陽イオン交換固定相は、サプレッサー式電気伝導度検出法を用いるために当社のラボが開発したものです。当初製作したIC用の陽イオン交換固定相は、無機陽イオンのピーク分離を目的としていました。その後、アミン類の分離に特化した固定相が開発されました。陽イオン交換カラムと対象アプリケーションの一覧はICカラム選択ガイドでご覧になれます⁴。

Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS16カラムは、大量のカルボン酸基を多孔質ポリマーに結合させることで、従来を大きく上回るイオン交換容量を実現しました。この大容量カラムは、濃度比10000:1のナトリウムとアンモニアの定量や、ピークが近接する他の陽イオンのさまざまな濃度比の定量が可能です。また、一般的な陽イオンと一価の低分子アミンに対して高い分離性能を発揮します。Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS16カラムを使用した医薬品中のアンモニア測定は、アプリケーションノート (AN) 1073 (炭酸水素ナトリウム中のアンモニア)⁵およびAN73482 (酒石酸水素カリウム中のアンモニア)⁶でご紹介しています。

生体アミンなどの多価アミンは、陽イオン交換固定相に強く結合します。多くの陽イオン交換カラムは、多価アミンを効率的に溶出させるために酸濃度を非常に高くするか、二価の酸を必要とします。長炭素鎖アミンなどの疎水性アミンは、カルボン酸基固定相のポリマー基材に入り込む可能性があります。このため、多くの陽イオン交換カラムでは効果的に溶出させるために有機溶媒が必要です。ICには有機溶媒を含まない溶離液が望ましいとされますが、これは溶離液リサイクルモードで電解サプレッサーを使用できるためです。Dionex IonPac CS17カラムは、単純な酸性溶離液で、アミン類の中でも特に多価アミンおよび疎水性アミンの分離を目的に開発されています。このカラムには、耐溶媒性のある55%架橋度エチルビニルベンゼン-ジビニルベンゼン共重合体の樹脂粒子が充填されています。樹脂粒子の表面は非官能性モノマーで被覆され、モノマーを枝分かれさせることでイオン交換基を修飾します。これによって、Dionex IonPac CS17固定相の疎水性は極めて低くなります。この結果、単純な組成の酸性溶離液で多価アミン、疎水性アミン、二価陽イオンを十分に溶出できます。医薬品に関連する多価アミンおよび疎水性アミンに対するDionex IonPac CS17カラムの活用は、AN194 (点眼液中のカルバコール)⁷、AN199 (セファロスポリン中のN-メチルピロリジン)⁸、およびAN249 (メタコリン塩化物、メタコリン塩化物中の不純物)⁹で紹介しています。

Dionex IonPac CS19カラムは比較的新しい陽イオン交換カラムです。一般的な陽イオン6成分、低極性アミン (アルカノールアミンおよびメチルアミンを含む)、中疎水性アミン、および多価アミン (生体アミンおよびアルキルジアミンを含む) の分析を目的として設計されています。Dionex IonPac CS17カラムと比較して、イオン交換容量が65%、理論段数が50%向上し、固定相の疎水性は高いです。高い交換容量によって、濃度が大きく異なる2つのピークの分析が可能です。また、カラムに過負荷をかけることなく、高いイオン強度のマトリックスに対応できます。医薬品中の不純物測定には大容量カラムが不可欠です。Dionex IonPac CS19カラムを使用したアミン分析は、AN298 (メトホルミン中のジメチルアミン)¹⁰、AN1057 (アルフゾシン塩酸塩、セルトラリン塩酸塩中のメチルアミン)¹¹、AN1062 (リネズリド中のモルホリン)¹²、およびAN72649 (スキサメトニウム塩化物中の塩素)¹³で紹介しています。Dionex IonPac CS18カラムおよびDionex IonPac CS20カラムもアミン測定を目的として設計されています。

表1は、Dionex IonPac CS16カラム、Dionex IonPac CS17カラム、およびDionex IonPac CS19カラムを用いた医薬品中のアンモニアおよびアミン類の測定をまとめたものです。アプリケーションの詳細は、分析アプリケーションライブラリーのThermo Scientific™ AppsLab Library (<https://appslab.thermofisher.com>) からダウンロードしてご覧になれます。AppsLabは、当社が提供するHPLC、GC、およびICなどクロマトグラフィー技術とその他分析アプリケーションの情報を集めたWebポータルです。当社の新しいアプリケーションは、AppsLabにアップロードされます。メソッドを容易に検索、フィルタリング、およびダウンロードできます。目的のアプリケーションにThermo Scientific™ Chromeleon™ クロマトグラフィーデータシステム (CDS) のeWorkflowがある場合は、Chromeleon CDSに直接ダウンロードしてすぐに実行できます。

IC分析のための最適なカラムと分離条件を探し出すことは、どのカラムを使用し、どの分離パラメーターを選択するのか推測しなければならず、従来困難な作業でした。現在では、AppsLabとカラム選択ガイドがあれば、目的の分離に適したカラムと分析条件を検索できます。アプリケーションに最適な分析条件を見つけるガイドとして、当社では「バーチャルカラム分離シミュレーター」というツールを提供しています。これは、Chromeleon管理システムソフトウェア (バージョン6.6以上) のオプションとして提供しています。グラフィック機能のない無償版はAppsLabで利用できます。バーチャルカラム分離シミュレーターは、カラムの種類、溶離液濃度、カラム温度、流量、グラジエント条件などさまざまな実験条件下でのクロマトグラムの予測ができます。条件を変えたときの結果をすぐに確認できます。カラム選択

ガイドとAppsLabをもとにカラムを選択して、分離したい成分を指定すると、最適な分離を探して表示します。一般的に使用される陽イオン交換カラムで、100以上の陽イオンを選択できます。図1に、Dionex IonPac CS16カラムを使用してメチルアミン、ジメチルアミン、およびトリメチルアミンを分離した例を示します。シミュレーターで選択できる陽イオン交換カラムとして、Dionex IonPac CS12A、Dionex IonPac CS16、Dionex IonPac CS17、Dionex IonPac CS18、Dionex IonPac CS19があります。

アプリケーションの例 — 医薬品中のジメチルアミン測定

N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) は化学式(CH₃)₂NNOで示される有機化合物です。NDMAは一部の発酵食品に含まれる発がん性物質であることが知られています¹⁴⁻¹⁵。2018年7月以降、ロサルタン、ラニチジン、メトホルミンなどの数種類の製剤からNDMAが検出されたことから、米国食品医薬品局 (FDA) により回収されています。このため、FDAはヒト用医薬品におけるNDMAを管理するための業界向けガイダンスを提供しています¹⁶⁻²¹。これにより、医薬品製造中のNDMA生成のリスクを理解することに関心が高まっています。製造工程における亜硝酸塩の使用により、第二級アミンまたは第三級アミンが存在する場合、NDMA生成のリスクが生じると考えられます (図2)²²⁻²³。したがって、原薬および製剤中の亜硝酸塩およびアミンの量を制限することが重要です。ICによる医薬品中の亜硝酸塩の測定についてAN7398²⁴で紹介しています。本稿では、医薬品サンプル中のアミン測定のためのICメソッドの開発方法について紹介します。ジメチルアミン (DMA) を例に、サンプルの性質に基づいたICメソッドの開発について順を追って説明します。

表1. 医薬品アプリケーションでアンモニアおよびアミンに対応可能なDionex IonPac陽イオン交換カラム

カラム	イオン交換容量	目的アプリケーション	アプリケーションノート番号 (英語版)	アプリケーション
Dionex IonPac CS16	最大 (5270 µeq)	短鎖アルキルアミンおよびアルカノールアミン 高濃度ナトリウム中の微量アンモニウム	1073 73482	炭酸水素ナトリウム中のアンモニア 酒石酸水素カリウム中のアンモニア
Dionex IonPac CS17	中 (1450 µeq)	多価アミン、疎水性アミン (アルカノールアミンおよびメチルアミン)	194 199 249	点眼液中のカルバコール セファロスポリン中のN-メチルピロリジン メタコリン塩化物、メタコリン塩化物中の不純物
Dionex IonPac CS19	中 (2410 µeq)	低分子極性アミン (アルカノールアミンおよびメチルアミン) 中疎水性アミン、多価アミン (生体アミンおよびアルキルジアミン)	298, 1057 1062 72649	メトホルミン中のジメチルアミン アルフゾシン塩酸塩、セルトラリン塩酸塩中のメチルアミン リネゾリド中のモルホリン スキサメトニウム塩化物中の塩素

注：容量は4 mmカラムの値です。Dionex IonPac CS16の場合、4 mmカラムは粒子径4 µmです。

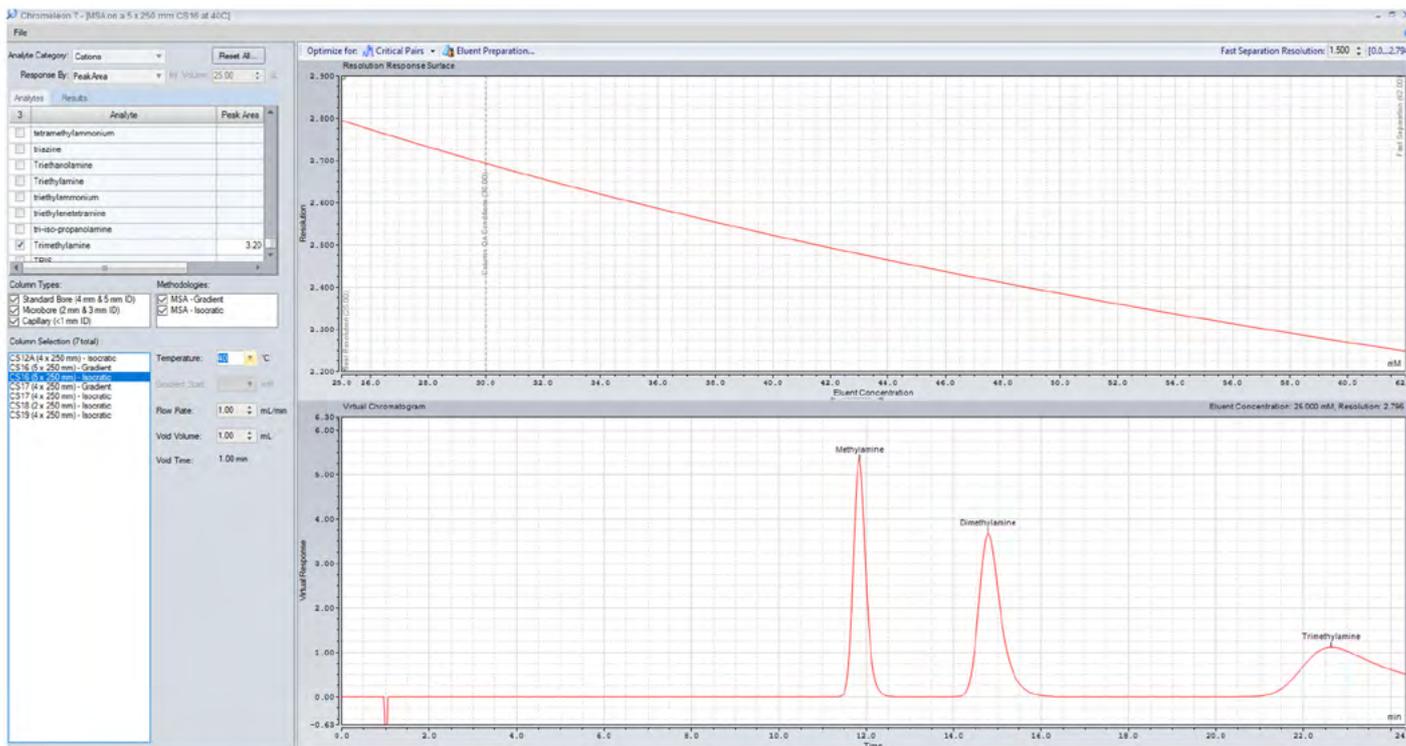


図1. パーチャルカラム分離シミュレーター

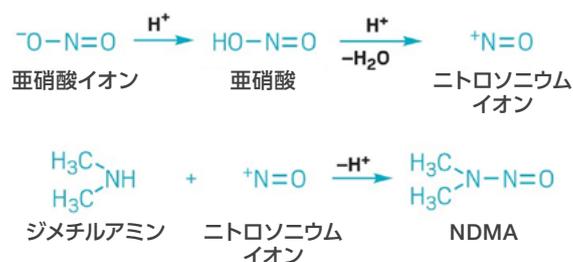


図2. NDMAの生成

装置

- 次の構成のThermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000+ HPICシステム※：
 - Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000+ DPポンプモジュール
 - Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000+ DC検出器／クロマトグラフィーモジュール、電気伝導度検出器付き
 - Thermo Scientific™ Dionex™ AS-APオートサンプラー、サンプルトレイ冷却、250 µLサンプルシリンジ (P/N 074306)、10 mLバイアルトレイ付き

- Thermo Scientific™ Chromleon™ クロマトグラフィーデータシステム (CDS) ソフトウェア、バージョン7.2.9

※後継機はThermo Scientific™ Dionex™ ICS-6000 HPIC システムです。これらのメソッドは、Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ ICS-6000 HPICシステムなど溶離液ジェネレーター (EG) を組み合わせたすべてのDionex ICシステムに使用できます。

消耗品

- Thermo Scientific™ Dionex™ EGC 500 メタンスルホン酸カートリッジ (P/N 075779)
- Thermo Scientific™ Dionex™ CR-CTC 500連続再生陽イオントラップカラム (P/N 075551)
- Thermo Scientific™ Dionex™ CDRS 600電解再生サブレッサー、2 mm (P/N 088670)
- Thermo Scientific™ Dionex™ AS-AP 10 mLオートサンプラーバイアル (P/N 074228)
- Fisherbrand™ 細口フィールドサンプルボトル、高密度ポリエチレン製 (HDPE)、125 mL、250 mL、標準物質およびサンプル保存用 (Fisher Scientific、P/N 02-895A、B)
- Thermo Fisher™ Nalgene™ 0.2 µmシリンジフィルター-PES (Fisher Scientific P/N 09-740-113)

試薬および標準物質

- 脱イオン (DI) 水、タイプ1試薬グレード、比抵抗18 MΩ・cm 以上
- 陽イオン標準液調製用の各種塩化物塩、A.C.S.試薬グレード以上
- ジメチルアミン塩酸塩、99% (Sigma-Aldrich™、P/N 126365-100G)
- ロサルタンカリウム (Sigma-Aldrich™、P/N PHR1602-1G)
- メトホルミン塩酸塩 (Sigma-Aldrich™、PHR1084-500MG)

サンプル

本実験で用いられる医薬品サンプルは表2に示しています。

分析条件 (Dionex IonPac CS16カラムメソッド)

パラメーター	条件
カラム:	Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CG16ガードカラム、3 x 50 mm (P/N 079931) Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS16分析用カラム、3 x 250 mm (P/N 059596)
溶離液:	25 mmol/L メタンスルホン酸
溶離液ジェネレーター (EG) 構成:	Thermo Scientific™ Dionex™ EGC 500 メタンスルホン酸カートリッジ、Dionex CR-CTC 500
流量:	0.5 mL/min
注入量:	25 μL、プッシュフルモード
カラム温度:	20 °C
検出:	サブレッサー式電気伝導度
サブレッサー:	Thermo Scientific™ Dionex™ CDRS 600 (2 mm) サブレッサー、リサイクルモード、37 mA
検出/サブレッサー コンパートメント:	20 °C
セル温度:	25 °C
バックグラウンド伝導度:	< 0.2 μS/cm
システムの背圧:	およそ3600 psi (100 psi = 689.5 kPa)
ノイズ:	< 1 nS/cm
分析時間:	30分

分析条件 (Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ CS19カラムメソッド)

パラメーター	条件
カラム:	Dionex IonPac CG19ガードカラム、2 x 50 mm (P/N 076029) Dionex IonPac CS19分析用カラム、2 x 250 mm (P/N 076028)
溶離液:	25 mmol/L メタンスルホン酸
溶離液ジェネレーター (EG) 構成:	Thermo Scientific™ Dionex™ EGC 500 メタンスルホン酸カートリッジ、Dionex CR-CTC 500
流量:	0.5 mL/min
注入量:	25 μL、プッシュフルモード
カラム温度:	20 °C
検出:	サブレッサー式電気伝導度
サブレッサー:	Thermo Scientific™ Dionex™ CDRS 600 (2 mm) サブレッサー、リサイクルモード、37 mA
検出/サブレッサー コンパートメント:	20 °C
セル温度:	25 °C
バックグラウンド伝導度:	< 0.2 μS/cm
システムの背圧:	およそ3600 psi (100 psi = 689.5 kPa)
ノイズ:	< 1 nS/cm
分析時間:	30分

システムの準備と設定

図3はこのICシステムの構成図を示したものです。Thermo Scientific™ Dionex™ ICS™ 5000+ HPICシステムは、Dionex ICS 5000+取付・操作マニュアル²⁵にしたがって、溶離液ジェネレーターを組み合わせたRFICシステムとして接続します。サブレッサーはリサイクルモードで取り付けます。

表2. 医薬品サンプル OTC = 市販薬; Rx = 処方薬

番号	製剤名	API	タイプ	API/錠 (mg)	ソース	適応症
1	-	ロサルタンカリウム	原薬	-	Sigma	-
2	-	メトホルミン塩酸塩	原薬	-	Sigma	-
3	Nytol™ Quickcap™	ジフェンヒドラミン塩酸塩	製剤	25	OTC	睡眠補助
4	Benadryl™	ジフェンヒドラミン塩酸塩	製剤	25	OTC	アレルギー
5	メトホルミン	メトホルミン塩酸塩	製剤	500	Rx	糖尿病
6	ロサルタン	ロサルタンカリウム	製剤	50	Rx	高血圧
7	ラニチジン	ラニチジン塩酸塩	製剤	300	Rx	糖尿病

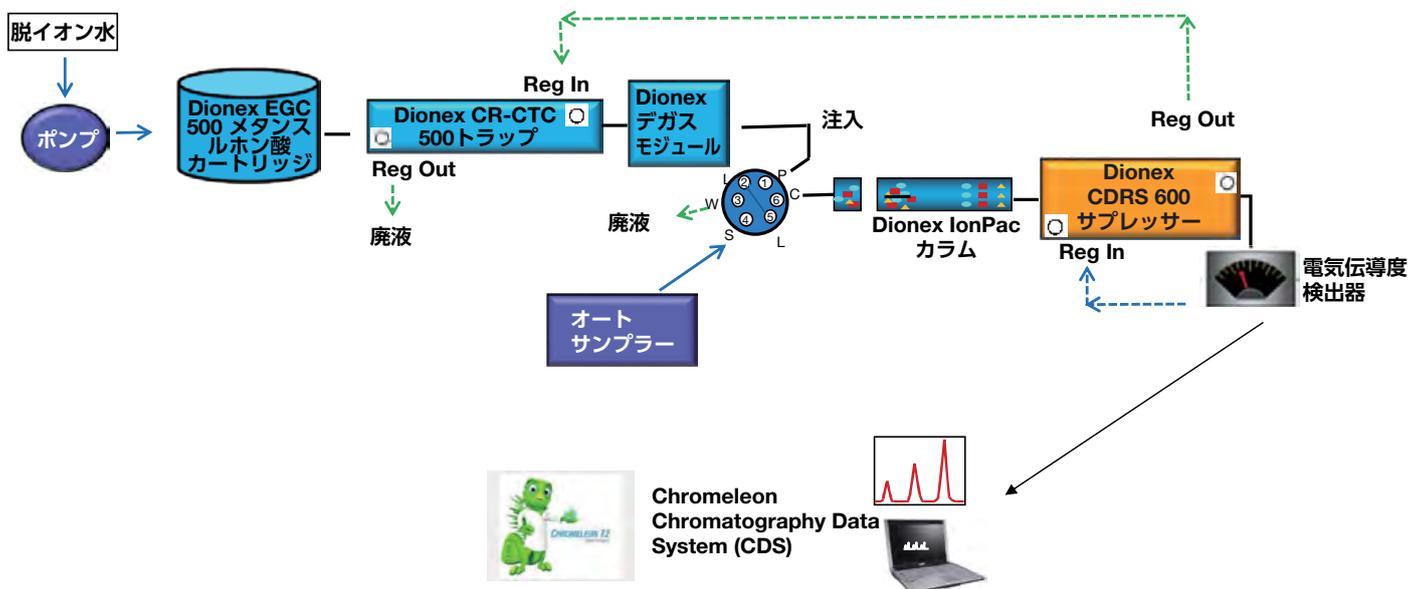


図3. 装置構成

溶液および試薬の調製

陽イオンストック標準液

ストック標準液 (1000 mg/L) は、表3にしたがって適切な量の試薬を脱イオン水100 mLに溶解して調製します。

表3. 1000 mg/Lのイオン標準液100 mLの調製に使用する化合物の量

分析対象成分	化合物	量 (mg)
リチウム	塩化リチウム	610.8
ナトリウム	塩化ナトリウム	254.2
アンモニウム	塩化アンモニウム	296.5
カリウム	塩化カリウム	190.7
ジメチルアミン	ジメチルアミン塩酸塩	180.9
マグネシウム	塩化マグネシウム六水和物	836.5
カルシウム	塩化カルシウム	366.8

DMAストック標準液

DMAストック標準液 (1000 mg/L) は、ジメチルアミン塩酸塩 180.9 mgを脱イオン水100 mLに溶解して調製します。

医薬品サンプルの調製

本実験では、医薬品におけるDMAの分離を検証するために、2種類の原薬と5種類の製剤 (表2) をサンプルとして使用しました。原薬サンプルは粉末50 mgを脱イオン水50 mLに溶解して、1 mg/mLの原薬サンプルを調製しました。製剤サンプルは、

まず錠剤全部を脱イオン水50 mLまたは10 mLに溶解して、医薬品有効成分 (API) の重量に基づき2.5~10 mg/mLになるように調製しました。錠剤が溶解するまで超音波処理し、サンプル溶液を8000 x gで15分間遠心分離しました。サンプル溶液を脱イオン水で1 mg/mLに希釈し、溶液を0.2 μm PESフィルターでろ過して調製しました。

結果と考察

イオンクロマトグラフィー分離メソッドの開発

サプレッサー式電気伝導度検出を用いる陽イオン交換クロマトグラフィー (陽イオンIC) は、μg/L~mg/L濃度の一般的な陽イオンと多くのアミンの測定において実績のあるメソッドです。AppsLab LibraryでDMAとIC装置を検索すると、AU155、AN94、AN222、およびAN298の4つのアプリケーションドキュメントが表示されます。このうち医薬品アプリケーションは、AN298: *Determination of dimethylamine in metformin HCl drug product using IC with suppressed conductivity detection* (サプレッサー式電気伝導度検出を用いるイオンクロマトグラフィーによるメトホルミン塩酸塩中のジメチルアミン測定) です。図4にAN298¹⁰のクロマトグラフィー条件と分離結果を示します。このメソッドは、Dionex IonPac CS19陽イオン交換カラムと溶離液ジェネレーターで生成したメタンスルホン酸グラジエント溶離液を使用します。AN298は、Dionex IonPac CS19が医薬品アプリケーションに適したカラムであることを示しています。ICカラム選択ガイドによると、Dionex IonPac CS19カラムはDMAなどの中疎水性アミンに適しており、カラム容量は中程度であることが示されています。

カラム : Dionex IonPac CS19分析カラム、4 x 250 mm
 Dionex IonPac CG19ガードカラム、4 x 50 mm
 EG構成 : Dionex EGC III メタンサルホン酸、Dionex CR-CTC
 溶離液 : 2 mmol/L (-7~12分)、
 2~12 mmol/L (12~16分)、
 12 mmol/L (12~18分)、
 12~40 mmol/L (18~20分)、
 40 mmol/L (20~30分)
 カラム温度 : 40 °C
 注入量 : 20 µL
 流量 : 1.0 mL/min
 検出 : 電気伝導度検出器 (サブレッサー使用、Thermo Scientific
 Dionex CSRS 300、4mm、リサイクルモード、120 mA)
 サンプル : 1) ジメチルアミン
 2) 陽イオン6成分混合標準液
 3) 陽イオン6成分およびジメチルアミン混合液

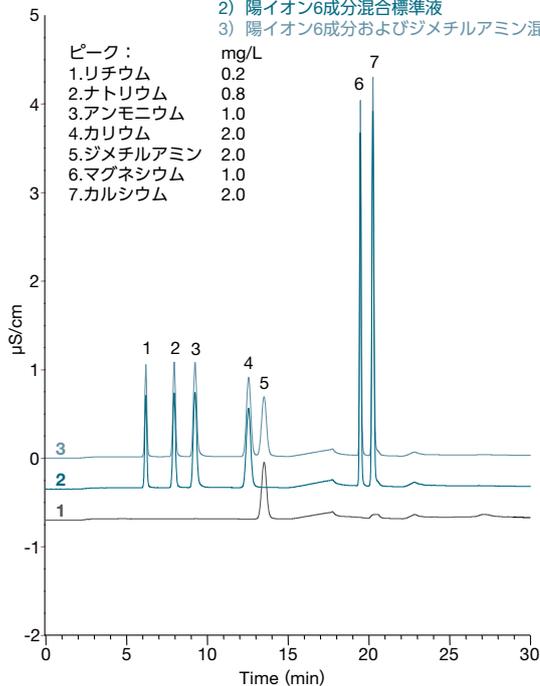


図4. DMAと一般的な陽イオン6成分の分離 (AN298)

医薬品中のDMA測定のためのICメソッドの開発を目的として、幅広いサンプルに適用できるよう、原薬と処方設計が異なる数種類の製剤を選びました。ロサルタン、ラニチジン、およびメトホルミンは、FDAのリコール対象製剤です。Benadryl™およびNyto™は、アミンを含有する最も一般的な市販薬です。一般的な無機陽イオンのうち、カリウムはDMAの付近に溶出します。カリウムはロサルタンカリウムのカウンターイオンであり、ロサルタンサンプル中にDMAよりも高濃度で存在すると考えられます。したがって、ロサルタンカリウム中のDMAを測定するメソッドの開発は、他の原薬および製剤中のDMAを測定するメソッドの開発よりも困難です。

図4から、AN298の条件下ではカリウムはDMAより先に溶出し、2つのピークはベースライン分離しています。しかし、サンプル中に高濃度のカリウムが存在すると、DMAは検出されない可能性があります。高濃度カリウムと微量DMAを分離するには、高交換容量の陽イオン交換カラムを選ぶ必要があります。また、カリウムはDMAより後に溶出して、DMAと十分に分離されるのが理想的です。ICカラム選択ガイドによると、Dionex IonPac CS16カラムは最大交換容量の陽イオン交換カラムで、DMAなどの短鎖アルキルアミンに適しています。

Dionex IonPac CS16カラムを使用するメソッドを開発する前に、Chromleon CDSのバーチャルカラムを用いてDMAがカリウムより先に溶出する条件を探しました。図5はバーチャルカラムのスクリーンショットです。Dionex IonPac CS16カラム (5 x 250 mm) を使用してカラム温度40 °CでDMAとカリウムを分離します。メタンサルホン酸濃度が25~62 mmol/Lの範囲では、DMAはカリウムより先に溶出し、メタンサルホン酸濃度を低下させると2つの成分の分離度は向上します。しかし、それでも分離度は1.5未満です。図6のバーチャルカラムのスクリーンショットは、カラム温度23 °CでDMAとカリウムを分離する場です。メタンサルホン酸濃度が25 mmol/Lのとき分離度はおよそ2.2です。溶離液濃度とカラム温度が低いほど、2つの成分の分離度は高くなるのが分かります。図7のバーチャルカラムのスクリーンショットは、DMAおよび一般的な陽イオン6成分を25 mmol/L メタンサルホン酸を用いてカラム温度23 °C、流量1 mL/minで分離する場です。DMAは他の陽イオンと分離し、40分以内にすべてのピークが溶出します。流量を1 mL/minから1.4 mL/minに増加させることで合計の分析時間を30分に短縮できます (図8)。このアプリケーションではDionex IonPac CS16の3 mmカラムを使用しました。したがって、流量は5 mmカラムの1.4 mL/minから換算して0.5 mL/minとしました [流量換算値 = 1.4 x (3/5)²]。メタンサルホン酸濃度を25 mmol/L、カラム温度を20 °Cに設定すると、ロサルタンカリウムサンプル中のDMAとカリウムの分離度は3を上回り、分析時間を30分以内に短縮することができました。

このように本メソッドの開発では、まずAppsLabで検索して適切なカラムを探しました。次に、ICカラム選択ガイドで選択するカラムを確認しました。サンプルの性質 (高濃度カリウム) を理解することで、使用可能な他のカラムを選択できました。さらに、バーチャルカラムを使用して適切な分離条件を特定できました。

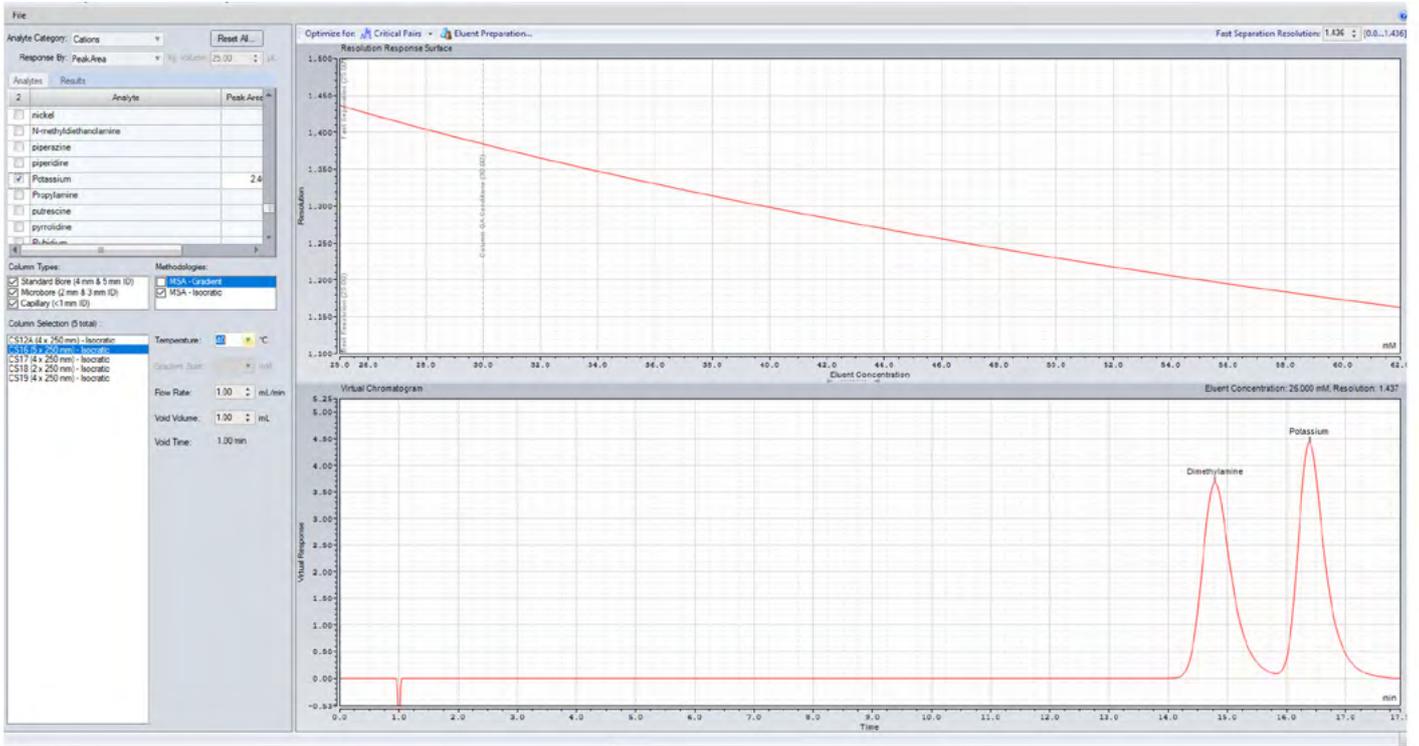


図5. パーチャルカラムのスクリーンショット。DMAとカリウムの分離、Dionex IonPac CS16カラム、カラム温度40 °C

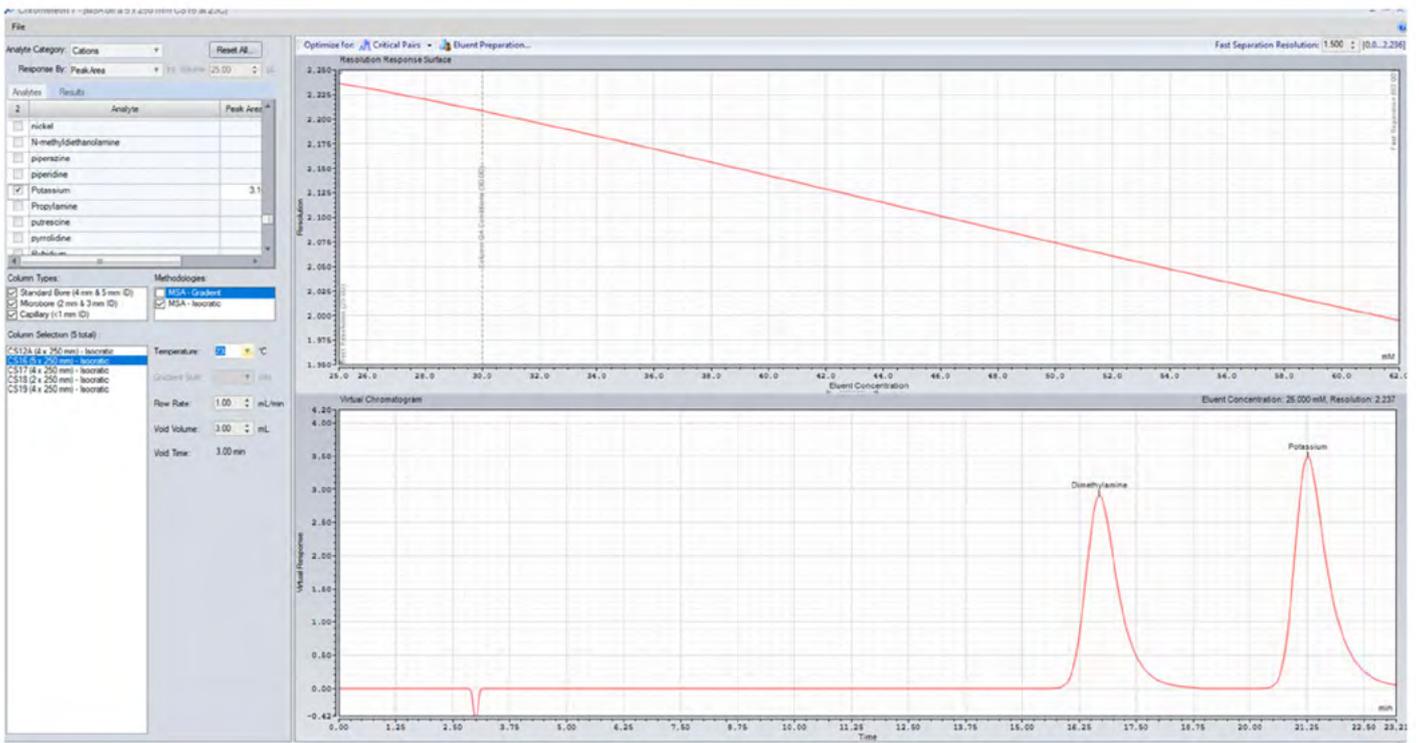


図6. パーチャルカラムのスクリーンショット。DMAとカリウムの分離、Dionex IonPac CS16カラム、カラム温度23 °C

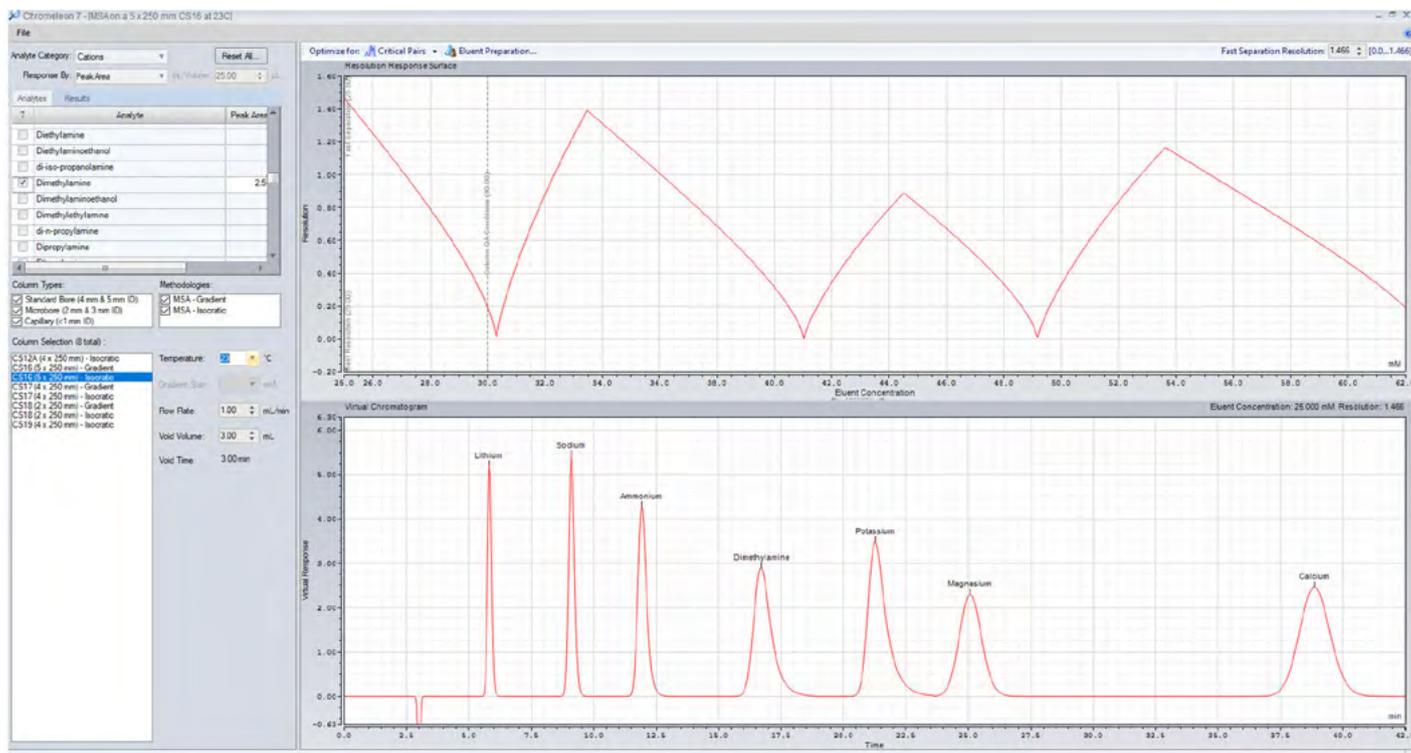


図7. パーチャルカラムのスクリーンショット。
DMAと一般的な陽イオン6成分の分離、Dionex IonPac CS16カラム、カラム温度23 °C、メタンスルホン酸濃度25 mmol/L、流量 1 mL/min

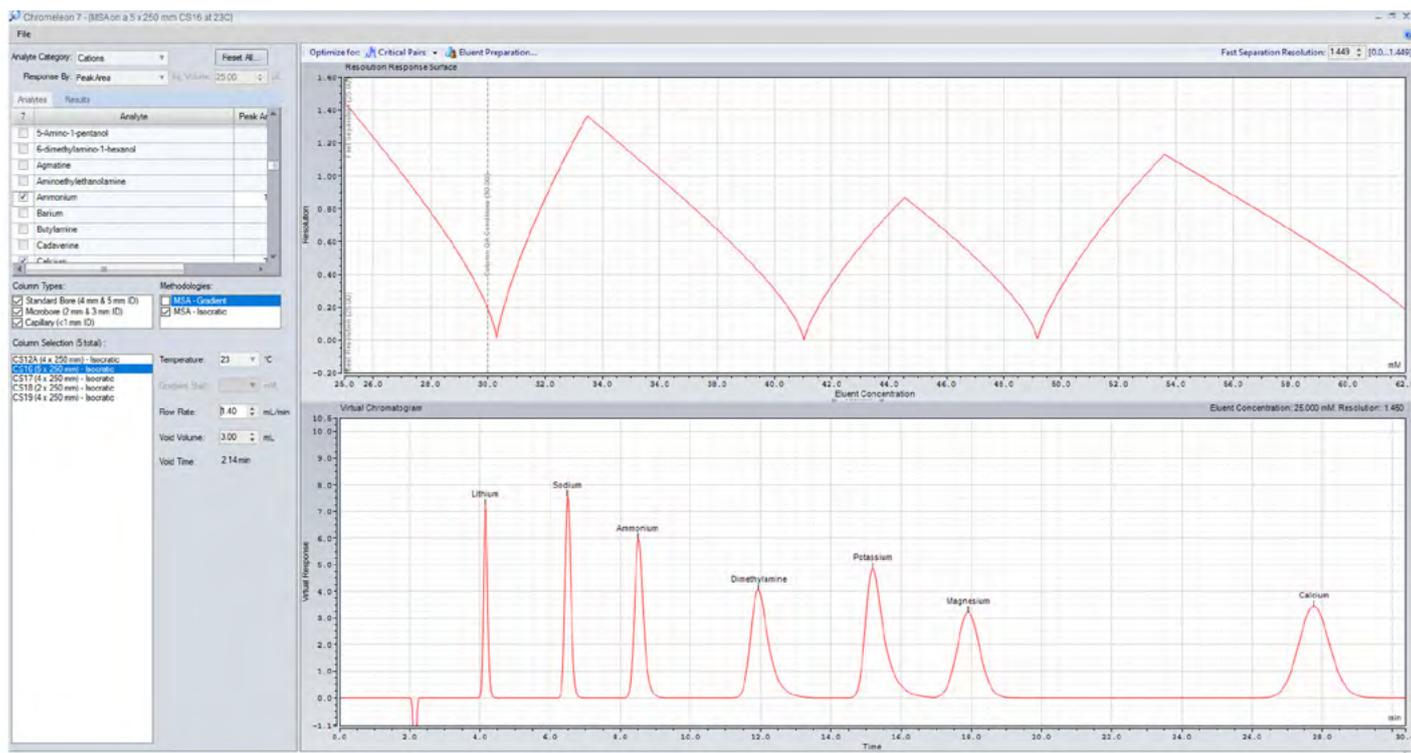


図8. パーチャルカラムのスクリーンショット。
DMAと一般的な陽イオン6成分の分離、Dionex IonPac CS16カラム、カラム温度23 °C、メタンスルホン酸濃度25 mmol/L、流量1.4 mL/min

Dionex IonPac CS16カラムを用いるメソッドを、ラニチジンやBenadrylなど一部の医薬品サンプルに適用できました。しかし、メトホルミン製剤に適用すると、次の注入時に大きなピークが出現しました。これは、分析時間内にカラムから溶出しなかったメトホルミンによるものと考えられます。溶離液ジェネレーターが生成可能な最大濃度である100 mmol/Lにメタンスルホン酸濃度を上げて、30分以内にこのようなピークの溶出が確認できませんでした。メトホルミンはポリアミンで、陽イオン交換カラムと強い相互作用を示すためだと考えられます。

Dionex IonPac CS19カラムは、特に無機陽イオン、低極性アミン（アルコールアミンおよびメチルアミン）、中疎水性アミン、および多価アミン（生体アミンおよびアルキルジアミン）の高速分離を目的として設計されています。最初にAppsLabで検索してヒットしたことから、メトホルミン製剤中のDMA測定のためのメソッド開発にDionex IonPac CS19カラムを選びました。Chromleon CDSのバーチャルカラムによると、カラム温度30 °Cのとき、いかなる溶離液濃度でもDMAとカリウムは共溶出します（図9）。これらを分離するには、カラム温度を30 °Cより低く、または高くする必要があります。カラム温度が30 °Cよりも低いとカリウムはDMAより後に溶出し、30 °Cより高いとDMAより先に溶出します。メトホルミン製剤中に高濃度でカリウムが存在するとは考えられません。したがって、カリウムがDMAより後に溶出するように分離設計を行うことは重要ではありません。

AN298では、Dionex IonPac CS19カラムを使用してカラム温度40 °Cでメトホルミン中のDMAを測定できることが実証されています¹⁰。カラム温度を低くすることは、システム全体の圧力が上昇することにつながり、より高い流量を使用して分析時間を短縮することができなくなることから、一般的に好まれません。しかし、Dionex IonPac CS19カラムは、30 °Cを超えるカラム温度で使用すると寿命が短くなります²⁶。そのため、30 °Cを超えるカラム温度で使用することは現在推奨していません。図10は、カラム温度を15 °Cから10 °Cに下げるとDMAとカリウムの分離度が向上することを示しています。したがって、本試験では分離度を高めるためにカラム温度を10 °Cに設定しました。カラム温度10 °Cのとき、メトホルミンサンプル中のDMAとカリウムの分離度は2.0を上回ります。Dionex IonPac CS19カラムを用いるメソッドは、30分間でメタンスルホン酸溶離液の濃度を3 mmol/Lの低濃度から40 mmol/Lまで徐々に上昇させてメトホルミンを溶出させ、一般的な陽イオンとDMAを分離するグラジエント条件です。図11は、Dionex IonPac CS16カラム（上）またはDionex IonPac CS19カラム（下）を用いて30分以内にDMAと一般的な陽イオンを分離したものです。図のように、DMAはナトリウム、カリウム、マグネシウムなど医薬品から検出される一般的な無機陽イオンから良好に分離されています。いずれのメソッドを選択するかは製剤の化学的性質に基づいて決定します。AppsLab、ICカラム選択ガイド、およびバーチャルカラムを用いて、医薬品中の他のアミン類を分析するICメソッドも開発できます。

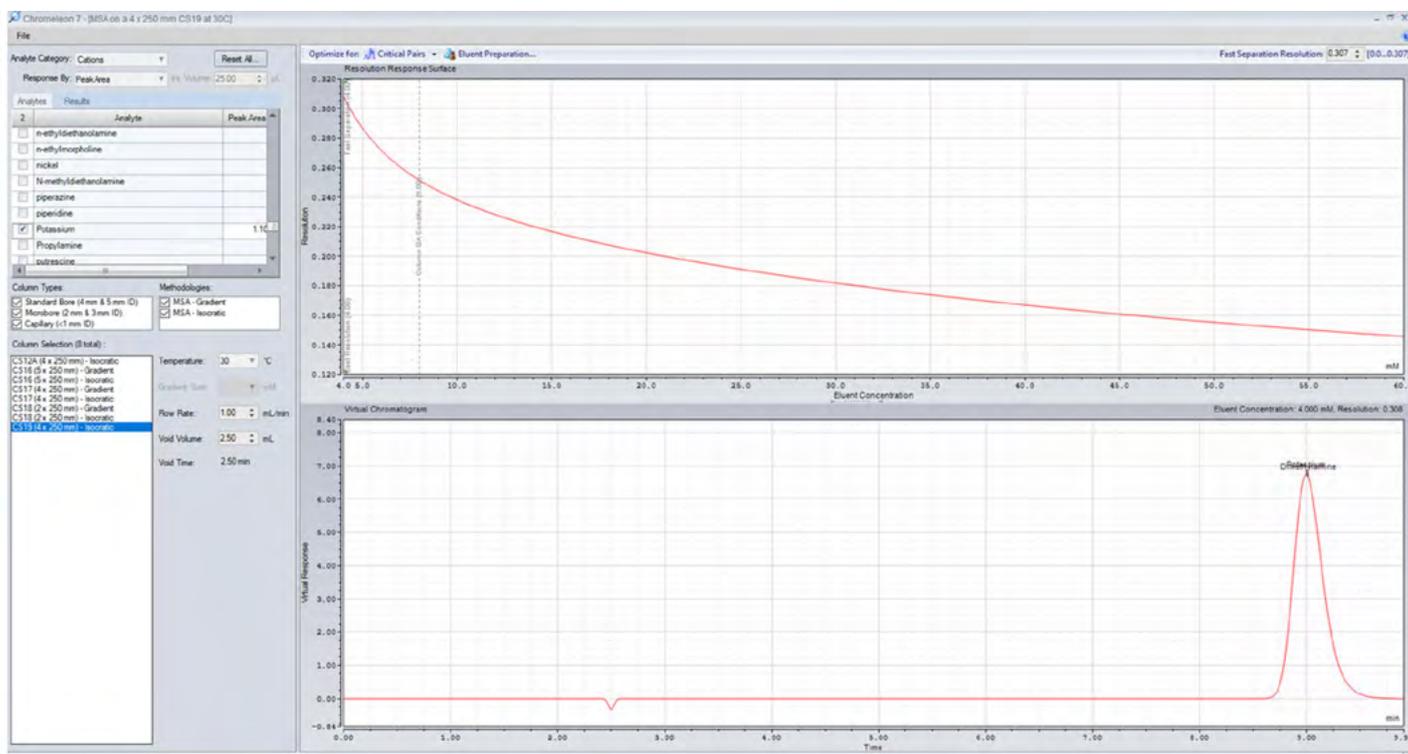


図9. バーチャルカラムのスクリーンショット。Dionex IonPac CS19カラムを使用。カラム温度30 °CでDMAとカリウムは分離しない。

分離メソッドの評価

検量線

試験対象サンプル中の幅広い濃度範囲のDMAに対応するために、DMAの電気伝導度応答による検量線を評価しました。濃度範囲は、Dionex IonPac CS16カラムメソッドで5~250 µg/L、Dionex IonPac CS19カラムメソッドで5~500 µg/Lにしました。校正標準液をそれぞれ3回測定して、測定データを二次関数で最適にモデル化しました(図12)。決定係数(r^2)はDionex IonPac CS16カラムメソッドが0.9999、Dionex IonPac CS19カラムメソッドが0.9997でした。校正後、この2つのメソッドでサンプルを分析しました。

サンプル分析

回収された3種類の医療用医薬品(ロサルタン、メトホルミン、ラニチジン)製剤と、対応する原薬のうち2種類(ロサルタンカリウム、メトホルミン塩酸塩)を本試験のサンプルとしました。一般的な2種類の市販(OTC)製剤(BenadrylおよびNytol)もサンプルとして含め、このメソッドを他のアミン製剤に適用できるかを評価しました。これらの7種類のサンプルは、亜硝酸イオン含有量についても過去に評価されています¹⁵。

表4に、これらの7種類の医薬品サンプル中のDMA含有量をまとめました。ロサルタンカリウム製剤(サンプル1)および処方製剤(サンプル6)を除くすべてのサンプルでDMAが検出されました。サンプル2(メトホルミン塩化塩製剤)では、最大量の363 ppm(µg/g)のDMAが検出されました。サンプル3~5では、18.3~48.7 ppmの範囲で検出されています。図13にBenadrylの分析結果を示しています。DMAは製剤中の他の陽イオンと分離し、分離条件は適切であることが実証されました。

表4. 医薬品サンプル中のDMA含有量、ppm(µg/g API)

サンプル	DMA	RSD (n=6)
1	<LOD	-
2	371	1.8
3	27.3	0.6
4	48.7	1.1
5	42.6	1.8
6	<LOD	-
7	18.3	2.4

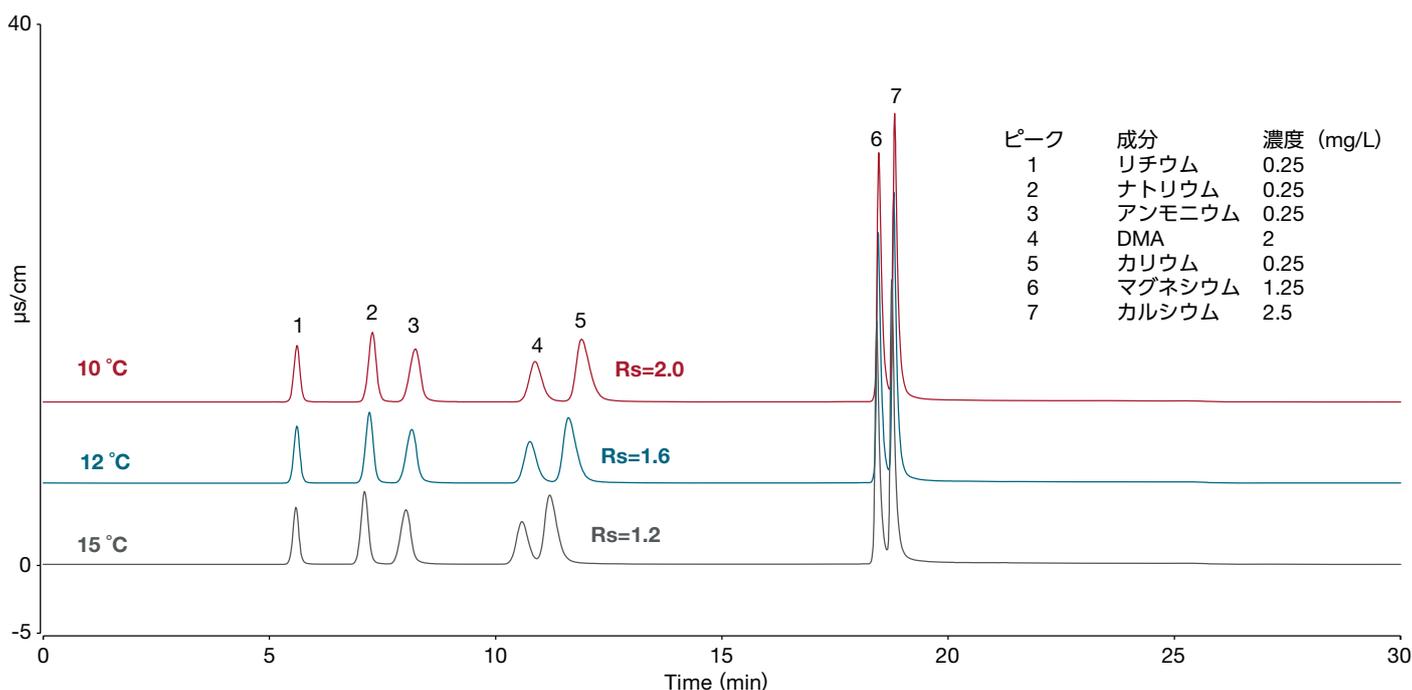


図10. DMAとカリウムの分離度に対するカラム温度の影響、Dionex IonPac CS19カラムを使用

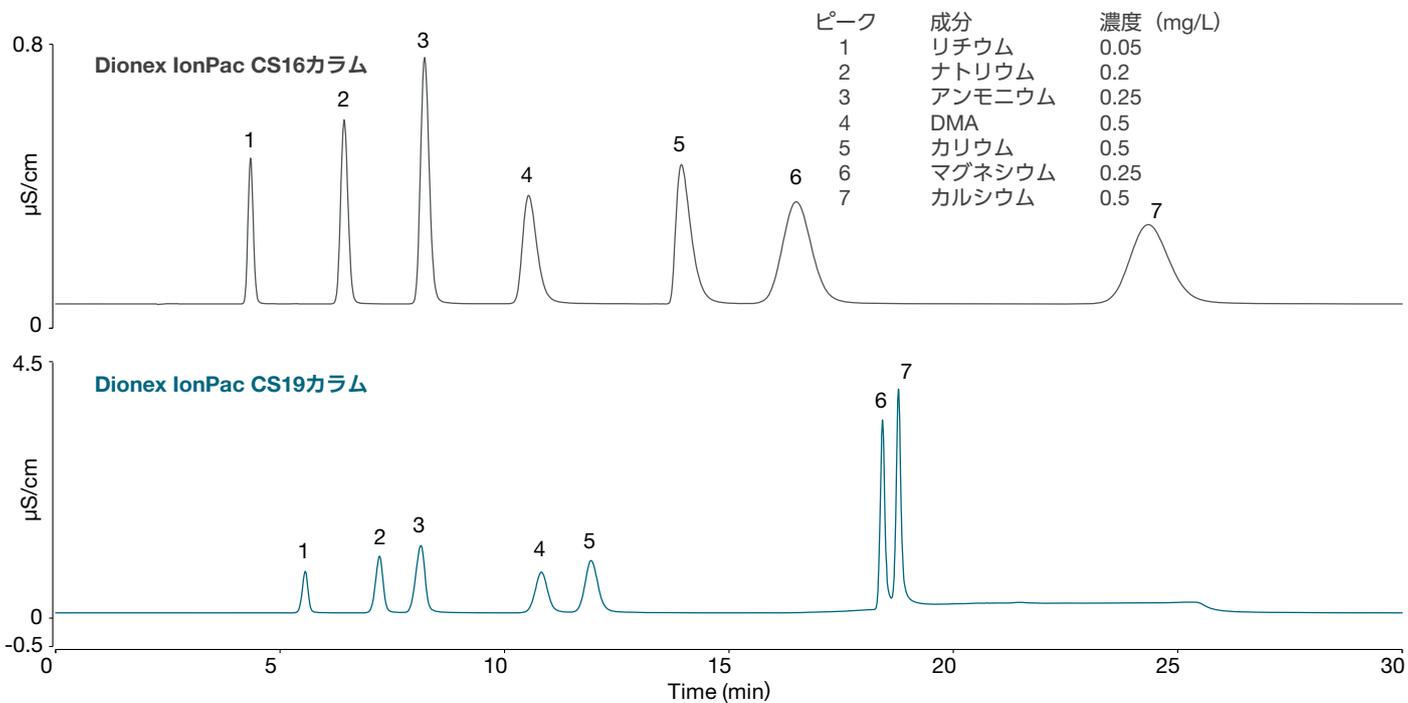


図11. Dionex IonPac CS19カラムおよびDionex IonPac CS16カラムを使用した陽イオン7成分の分離

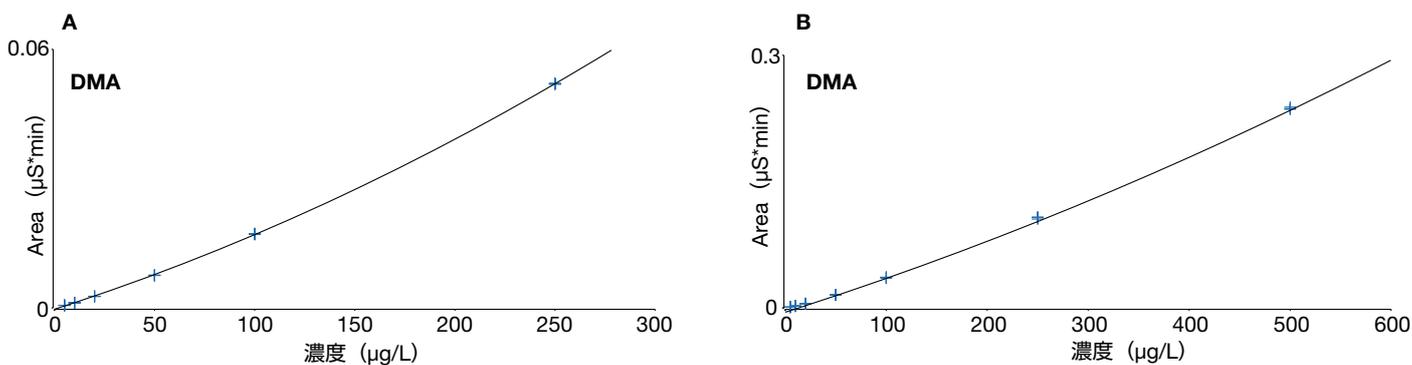


図12. DMA検量線、(A) Dionex IonPac CS16カラム、(B) Dionex IonPac CS19カラム

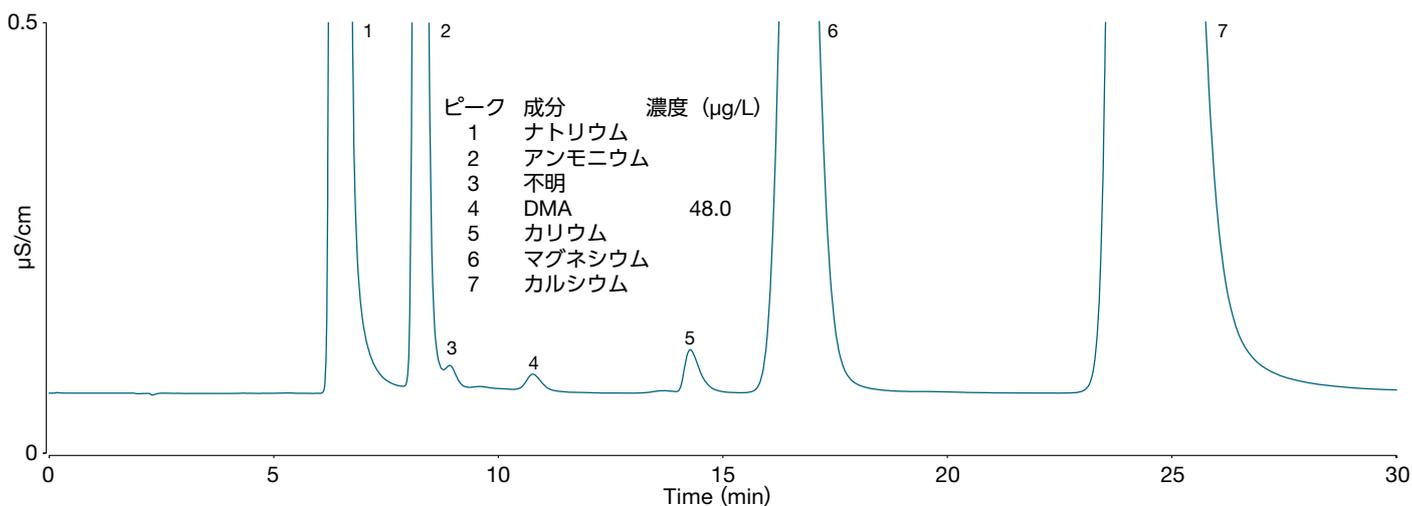


図13. Dionex IonPac CS16カラムで測定したBenadryl製剤 (サンプル4) 中のDMAの測定

カリウムはロサルタンのカウンターイオンであり、サンプル中に高濃度で存在すると考えられます。高濃度カリウムからDMAを分離できるか、また、カラムに過負荷が生じないかを確認するために、サンプル溶液6にDMAを10 µg/L添加しました。図14は、ロサルタン製剤サンプルのクロマトグラムと、DMAを10 µg/L添加したサンプルのクロマトグラムを重ね合わせたものです。カリウムはDMAの後に溶出し、DMAの定量に影響はありません。DMAの回収率は良好で、ピークの大きさから、標準液から推定した検出下限をサンプルに適用できるといえます。メトホルミンを除くリストのその他のサンプルに、Dionex IonPac CS16カラムを使用できます。メトホルミンは多価アミンで、Dionex IonPac CS16カラムの固定相と強い相互作用を示し

ます。したがって、このタイプのアミンにはDionex IonPac CS19カラムを使用する必要があります。図15に、Dionex IonPac CS19カラムを使用したメトホルミン製剤中のDMA測定結果を示します。メタンスルホン酸溶離液を用いたグラジエント条件で、0～16分 (4～40 mmol/L) ではDMAが他の陽イオンと分離し、16～25分の高濃度メタンスルホン酸 (40 mmol/L) ではメトホルミンが溶出し、20～25分で大きなピークが確認できます。亜硝酸イオンの分析と本分析により、原薬または製剤におけるニトロソアミン生成の可能性を評価できます。このDMA測定メソッドは製剤の他の成分 (たとえば、賦形剤) にも使用できます。

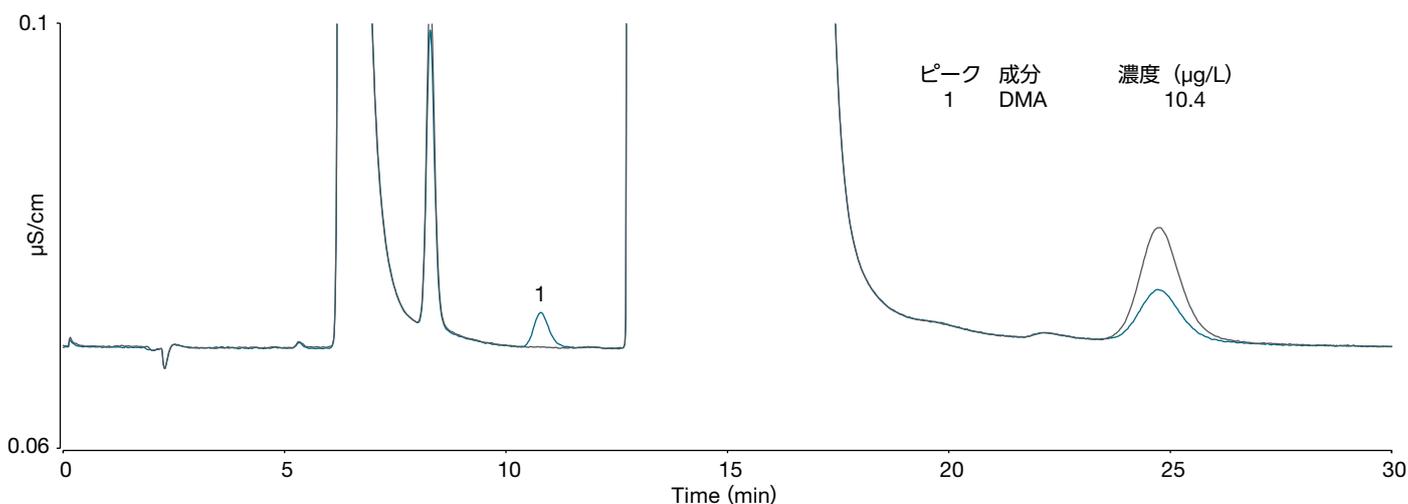


図14. ロサルタン製剤 (サンプル6) および10 µg/L添加サンプル6中のDMAの測定、Dionex IonPac CS16カラムを使用

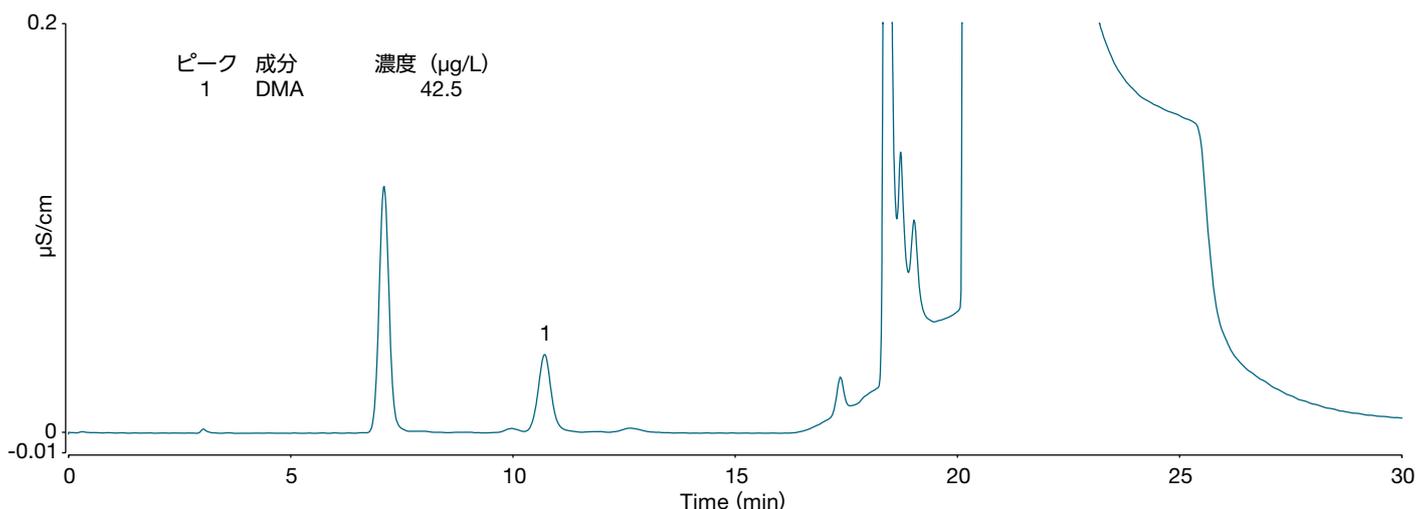


図15. メトホルミン製剤 (サンプル5) 中のDMAの測定、Dionex IonPac CS19カラムを使用

メソッドの真度と精度

メソッドの真度を添加回収試験により評価しました。サンプル2を除く各サンプルに10 µg/L、サンプル2に100 µg/LのDMAを添加しました。7種類のサンプルにおけるDMAの回収率は96.0～104%でした(表5)。メソッドの精度は校正標準液50 µg/Lを3日間それぞれに3回注入することにより評価しました。Dionex IonPac CS16カラムでは、ピーク面積のRSDは1.53%で、保持時間のRSDは0.67%でした。Dionex IonPac CS19カラムでは、ピーク面積のRSDは0.65%で、保持時間のRSDは0.07%でした。

表5. 医薬品サンプル中のDMAの添加回収率

サンプル	DMA回収率 (%)	RSD (n=6)
1	104	2.6
2	96.0	2.3
3	100	1.8
4	101	1.7
5	104	1.4
6	104	2.6
7	96.3	2.7

検出下限 (LOD)

LODは、シグナルノイズ比 (S/N) に基づいて決定しました。S/Nは、低濃度の標準試料およびブランク試料を測定してシグナルを比較し、分析成分が信頼性高く検出できる下限値を確定することで推定します。S/N=3を用いてLODを推定し、S/N=10を用いて定量下限 (LOQ) を推定します²⁷。本試験では、まず、ベースラインのノイズを決定するために、ピークが溶出しないうベースラインの代表的な1分間のピーク間ノイズを測定しました。標準液 (1 µg/L) を3回注入した平均ピーク高さから決定しました。サンプル溶液中のDMAのLODを計算した結果、Dionex IonPac CS16カラムは0.960 µg/L、Dionex IonPac CS19カラムは0.718 µg/Lになりました。医薬品サンプルは1 mg/mLで調製したことから、医薬品有効成分 (API) では重量ベースでそれぞれ0.960 µg/g API (ppm)、0.718 µg/g API (ppm) になります。

結論

本稿のガイドに従って、7種類の医薬品サンプル中のDMAを測定する2つのメソッドを開発しました。どちらのメソッドを選択するかは、製剤の化学的性質と処方設計に依存します。医薬品サンプル中のDMAのLODは1 ppm (µg/g API) 未満です。溶離液ジェネレーターを搭載したRFICシステムの再現性が高いため、このメソッドの真度と精度は高くなっています。本法は、医薬品の全ての製造工程において、ニトロソアミン生成の可能性を評価する目的でのDMAの測定に使用できます。本テクニカルノートで説明したメソッド開発方法は、医薬品サンプル中の他のアミン類を測定するICメソッドの開発にも適用できます。

参考文献

1. Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products (ed.: L. Bhattacharyya and J. S. Rohrer), John Wiley and Sons Inc. (Hoboken, New Jersey) (2012).
2. Thermo Scientific Application Note 148: Determination of bethanechol by ion chromatography. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-148-IC-Bethanechol-LPN1510-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
3. Li, Y.; Nesterenko, P.; Stanley, R.; Paull, B.; Macka, M. Comparison of cation-exchange capillary columns used for ion chromatographic separation of biogenic amines. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1571*, 193–200.
4. Thermo Scientific Dionex IonPac IC column selection guide. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/st-70588-ic-column-selection-guide-st70588-en.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
5. Thermo Scientific Application Note 1073: Determination of ammonia in sodium bicarbonate. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-1073-IC-Ammonia-Sodium-Bicarbonate-AN70815-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
6. Thermo Scientific Application Note 73482: Determination of ammonia impurity in potassium bitartrate using ion chromatography. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-73482-ic-ammonia-impurity-potassium-bitartrate-an73482-en.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
7. Thermo Scientific Application Note 194: Determination of carbachol in ophthalmic solutions using a Reagent-Free ion chromatography system. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-194-IC-Carbachol-Ophthalmic-Solutions-LPN1967-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
8. Thermo Scientific Application Note 199: Determination of N-methylpyrrolidine in cefepime Using a Reagent-Free ion chromatography system. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-199-IC-N-Methylpyrrolidine-Cefepime-LPN2005-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
9. Thermo Scientific Application Note 249: Determination of methacholine chloride and potential impurities using a Reagent-Free ion chromatography system. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-249-IC-Methacholine-Chloride-LPN2517-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
10. Thermo Scientific Application Note 298: Determination of dimethylamine in metformin HCl drug product using IC with suppressed conductivity detection. <https://appslab.thermofisher.com/App/1474/an298-determination-dimethylamine-metformin-hcl-drug-product-using-ic-with-suppressed-conductivity-detection> (accessed Mar. 25, 2022)
11. Thermo Scientific Application Note 1057: Determination of methylamine in drug products. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-1057-IC-Monomethylamine-Drugs-AN70523-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)

12. Thermo Scientific Application Note 1062: Determination of morpholine in linezolid by ion chromatography. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-1062-IC-Morpholine-Linezolid-AN70702-EN.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
13. Thermo Scientific Application Note 72649: Validation of an improved ion chromatography method for the limit of choline test in the USP Succinylcholine Chloride monograph. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-72649-ic-limit-choline-test-an72649-en.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
14. Concise International Chemical Assessment Document, N-NITROSODIMETHYLAMINE. <https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad38.pdf?ua=1> (accessed Mar. 25, 2022)
15. U.S. Environmental Protection Agency, Integrated Risk Information System (IRIS). https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0045_summary.pdf (accessed Mar. 25, 2022)
16. FDA announces voluntary recall of several medicines containing valsartan following detection of an impurity. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity> (accessed Mar. 25, 2022)
17. FDA Updates and Press Announcements on NDMA in Zantac (ranitidine). <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-zantac-ranitidine> (accessed Mar. 25, 2022)
18. Mylan initiates voluntary nationwide recall of three lots of nizatidine capsules, USP, due to the detection of trace amounts of NDMA (N-nitrosodimethylamine) impurity found in the active pharmaceutical ingredient manufactured by Solara Active Pharma Sciences Limited. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts/mylan-initiates-voluntary-nationwide-recall-three-lots-nizatidine-capsules-usp-due-detection-trace> (accessed Mar. 25, 2022)
19. FDA Updates and Press Announcements on NDMA in Metformin. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-ndma-metformin> (accessed Mar. 25, 2022)
20. GUIDANCE DOCUMENT Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs> (accessed Mar. 25, 2022)
21. USP General Chapter Prospectus: <1469> Nitrosamine Impurities. <https://www.uspnf.com/notices/nitrosamine-impurities-gc-prospectus-20200424> (accessed Mar. 25, 2022)
22. Mirvish, S. S. Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1975**, 31, 325–351.
23. Ashworth, I. W.; Dirat, O.; Teasdale, A.; Whiting, M. Potential for the formation of N-nitrosamines during the manufacture of active pharmaceutical ingredients: an assessment of the risk posed by trace nitrite in water. *Org. Process Res. Dev.* **2020**, DOI: 10.1021/acs.oprd.0c00224
24. Thermo Scientific Application Note 73987: 医薬品における亜硝酸イオンの測定 <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-73987-ic-nitrite-pharmaceuticals-an73987-ja.pdf>
25. Thermo Scientific Dionex ICS-5000+ Ion Chromatography System Operator's Manual December 2014. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-065446-ics-5000-plus-man065446-en.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
26. Thermo Scientific Dionex IonPac CS19 column product manual. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-065440-ionpac-cs19-columns-man065440-en.pdf> (accessed Mar. 25, 2022)
27. ICH Guideline Q2B, Validation of Analytical Procedures, Methodology (CPMP/ICH/281/95), Geneva, Switzerland, November 1996.

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/ic

研究用におのみ使用できます。診断用には使用いただけません。
 © 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
 All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
 Sigma-Aldrich is a trademark of Merck KGaA.
 Nytol and QuickCap are trademarks of Medtech Products Inc.
 Benadryl is a trademark of Johnson & Johnson Corporation.
 実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
 価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
 標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc IC266-A2204OB

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL : 0120-753-670 FAX : 0120-753-671
 Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan @ThermoFisherJP

thermofisher.com

代理店

ダイオテック東京株式会社

東京都台東区東上野 6-2-1

DIO

TEL : 03-3842-4882

<https://www.diotec.co.jp/>

Mail : info@diotec.co.jp

thermo scientific