Agilent G1888 ネットワークヘッドスペースサンプラを用いた医薬品中の残留溶媒測定

アプリケーション

医薬品

著者

Roger L. Firor
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

概要

6890N GC/FID および 5973 inert MSD に G1888 ネットワークヘッドスペースサンプラを接続し、規制残留溶媒の測定に用いました。各種濃度（公表された許容基準濃度未満を含む）の混合標準液を用いて、システムパフォーマンスを実証しました。測定には、クラス 1 およびクラス 2 の溶媒（日米 EU 医薬品規制調和国際会議 [ICH] ガイドラインに準拠）のほか、USP 467 にリストアップされた溶媒を用いました。Siltek flow path（不活性なサンプルパス）を装備し、70 検体の自動分析ができる G1888HSS は、旧世代サンプラと比較して不活性度が改善され、併行精度が向上し、キャリーオーバーが低下します。本サンプラの集中コントロールおよびシーケンス機能は、アドオンソフトウェアモジュールを用いることにより Agilent GC ケミステーションに組み込むことができます。

はじめに

揮発性有機不純物（OVIs）は原薬または他の医薬品製造工程で生じます。それらの溶媒は収率の向上および結晶性や溶解性の向上を目的として使用されます [1]。その他の要因（包装、輸送、保存など）も残留溶媒濃度に影響を及ぼすおそれがあります。ガスクロマトグラフィー（GC）と静的ヘッドスペースサンプリング装置の組み合わせは、医薬品中の低濃度残留溶媒の測定に使用しやすいハイスループット分析ツールであると認められており、医薬品製造施設内のほぼすべての品質管理（QC）ラボで採用されています。サンプル調製は比較的平易で、分析手法は規定のモノグラフにより容易にバリデートすることができます。

医薬品規制調和国際会議（ICH）により勧告された一般ガイドラインでは、溶媒は 3 種類のクラスに分類されています [2]。クラス1の溶媒はヒトにおける発がん性が強く疑われる溶媒及び環境に有害な影響を及ぼす溶媒で、医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒とされています。一方、クラス 2 の溶媒は毒性が疑われるため、医薬品中の残留量を規制すべき溶媒とされています。クラス 3 の溶媒はヒトに対して低毒性と考えられる溶媒です。USP 467 には、クラス 1 およびクラス 2 の溶媒の一部がリストアップされています。

本アプリケーションノートでは、クラス 1 およびクラス 2 の溶媒の分析および定量を例示します。残留溶媒の一覧は表 1 をご覧ください。

表 1A. クラス 1 の溶媒（医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒）[2]

溶媒	濃度限度値 (ppm)	考慮した点
ベンゼン	2	発がん性
四塩化炭素	4	毒性及び環境への有害性
1,2-ジクロロエタン	5	毒性
1,1-ジクロロエテン	8	毒性
1,1,1-トリクロロエタン	1500	環境への有害性

表 IB. クラス 2 の溶媒（医薬品中の残留量を規制すべき溶媒）[2]

溶媒	Permissible daily Exposure （ppm） （mg／日）	濃度限度値 （ppm）
アセトニトリル	4.1	410
クロロベンゼン	3.6	360
クロロホルム	0.6	60
シクロヘキサン	38.8	3880
1,2-ジクロロエテン	18.7	1870
ジクロロメタン	6.0	600
1,2-ジメトキシエタン	1.0	100
N,N-ジメチルアセトアミド	10.9	1090
N,N-ジメチルホルムアミド	8.8	880
1,4-ジオキサン	3.8	380
2-エトキシエタノール	1.6	160
エチレングリコール	6.2	620
ホルムアミド	2.2	220
ヘキサン	2.9	290
メタノール	30.0	3000
2-メトキシエタノール	0.5	50
メチルブチルケトン	0.5	50
メチルシクロヘキサン	11.8	1180
N-メチルピロリドン	48.4	4840
ニトロメタン	0.5	50
ピリジン	2.0	200
スルホラン	1.6	160
テトラリン	1.0	100
トルエン	8.9	890
1,1,2-トリクロロエテン	0.8	80
キシレン*	21.7	2170

*通常、60% の m-キシレン，14% の p-キシレン，9% の o-キシレン及び 17% のエチルベンゼンの混合物

表 1C. 医薬品中の USP 467 規制溶媒

溶媒	濃度限度値 （ppm）
塩化メチレン	600
クロロホルム	60
ベンゼン	2
トリクロロエチレン	80
1,4-ジオキサン	380

残留溶媒およびその他の汚染物質濃度の安全とみなされる値は近年、低濃度化される傾向にあります。その理由としては、長期曝露つまり低レベル曝露の蓄積により生じうる潜在的な有害作用に関する情報や、分析機器の検出感度が向上したことが挙げられます。例えば、溶媒N-メチルピロリドンに関しては、新たに得られた毒性データを踏まえ、1997 年に規定された PDE（permitted daily exposure：医薬品中に残留する溶媒の 1 日当たりに摂取が許容される最大量）および残留濃度限度値が 2003 年、10 倍低い値に改訂されています [3]。テトラヒドロフランに関しても、カテゴリーがクラス 3 からクラス 2 の溶媒に変更され、PDE および濃度限度値がトルエンより厳しい値に変更されました [3]。クラス 2 の溶媒に関しては、表 1B に医薬品中の PDE および濃度限度値を示します [4]。

実験

本稿では、2 種類のシステムを説明します。GC/FID を用いた第一のシステムは、定常的な品質管理業務に採用されるシステムと考えられます。一方、GC/MS を用いた第二のシステムは、未知物質の調査、ほぼ同時に溶出するピークがある場合の個別の定量や、溶媒化合物の確定に使用されます。全実験とも、ヘッドスペースバイアル（容量 10 mL）の試料に、マトリックスとして水 5mL を加え、溶媒が抽出され易いよう硫酸ナトリウム 1g を添加しました。

ヘッドスペースサンプラには 1-mL サンプルループを用いました。ピーク幅が過度に広がらないよう十分な流量を維持する必要があるため、スプリット注入を行います。典型的な 0.53-mm ID カラムの流量に関しては、スプリット比 2:1 以上が推奨されます。

表 2.　機器の設定条件

FID システム

6890N GC

注入口	ボラタイル·インレット
温度	160 °C
スプリット比	2:1～5:1
キャリアガス	ヘリウム
キャリア流量	9 mL/min
検出器	FID、250 °C

GC オーブンのプログラム

初期温度	35 °C
初期温度保持時間	20 min
昇温速度	25 °C/min
最終温度	250 °C
最終温度保持時間	15 min
カラム	30 m × 0.53 mm × 3 µm DB-624
	30 m × 0.45 mm × 2.55 µm DB-624

G1888A ヘッドスペースサンプラ

ループサイズ	1 mL
バイアル加圧	14.0 psig
ヘッドスペースオーブン	85 °C
ループ温度	100 °C
ﾄﾗﾝｽﾌｧｰﾗｲﾝ温度	120 °C
平衡化時間	30min、低速攪拌
GC サイクルタイム	50 min
加圧時間	0.15 min
ベント（ループフィル）時間	0.15 min
注入時間	0.5 min

5973 inert システム

6890N GC

注入口	ボラタイル·インレット
温度	160 °C
スプリット比	2:1～5:1
キャリアガス	ヘリウム
注入口圧	2.7 psi
カラム流量	1.7 mL/min

GC オーブンのプログラム

初期温度	35 °C
初期温度保持時間	20 min
昇温速度	20 °C/min
最終温度	250 °C
最終温度保持時間	15 min
カラム	30 m × 0.32 mm × 1.8 µm DB-624

G1888A ヘッドスペースサンプラ

FID システムと同じ設定

5973 inert

スキャン範囲	30～200 amu、サンプリング回数 2
SIM	100 ms dwell
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
チューン	BFB.u

標準物質

USP 467	Restek #36228
	AccuStandard NF-467-R
ICH クラス 1 および 2	Restek #36228（クラス 1）
	#36229（クラス 2A）
	#36230（クラス 2B）

考察

GC システム

医薬品製造施設内の QC ラボの大半は、USP 467 または ICH ガイドラインで規定された残留溶媒の測定にガスクロマトグラフィー（GC）を使用しています。溶媒の分離には、DB-624（USP G43）を用いたキャピラリー GC が汎用されますが、共溶出が認められる場合の分離方法には、別のカラム（DB-1701、DB-5、DB-WAX [USP G16] など）が使用されることもあります。ヘッドスペースサンプリングには、カラムの劣化を招くおそれのある多量の水の注入が回避されるなど、溶液直接注入法より優れた長所が多くあります。

図 1 にクラス 1 およびクラス 2 の残留溶媒を測定したクロマトグラムを示し、表 3 に溶媒の濃度およびピーク番号（化合物 ID）を示します。

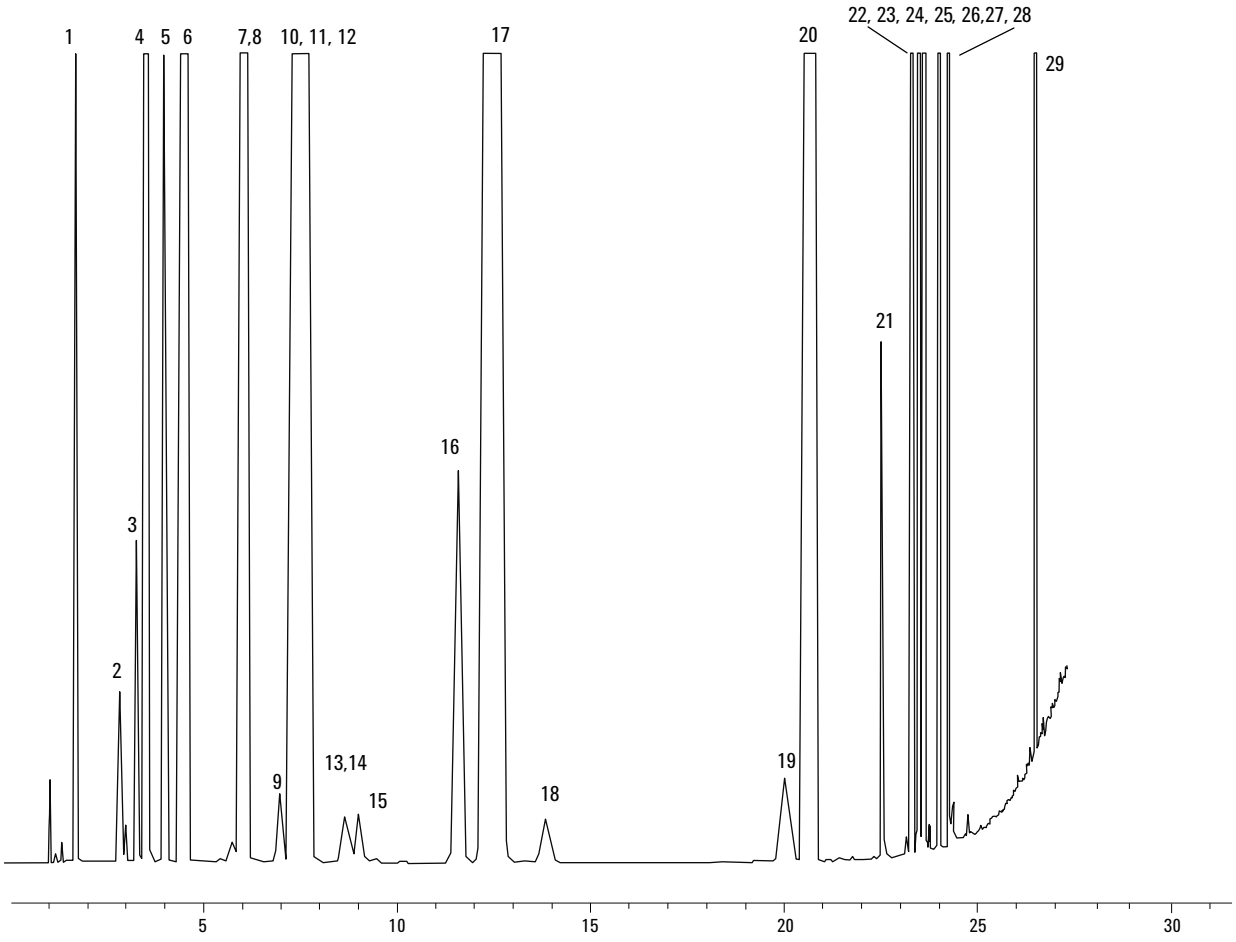


図 1.　クラス 1 およびクラス 2 の残留溶媒のクロマトグラム。G1888、6890NGC/FID およびボラタイル・インレット。

これらの溶媒濃度は、医薬品検体 100 mg を 5 mL に溶解した条件におけるガイドライン限度値に相当します。USP 467 の規制溶媒に関しては、規制値より低い濃度（Restek 標準溶液 #36228 10 µL）におけるクロマトグラムを図 2 に示しますが、このような低い濃度においても優れたシグナル対ノイズ比が得られています。本稿に記載する濃度は、サンプリング前の分析対象物質のヘッドスペースバイアル中溶液濃度と定義します。

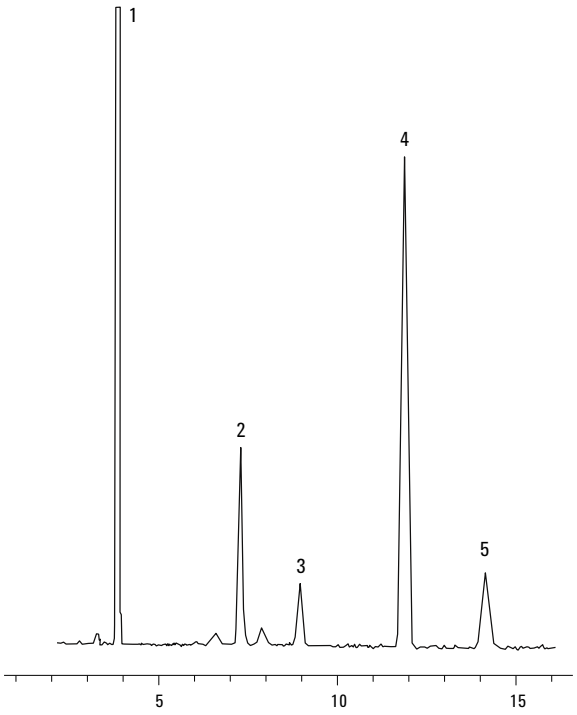


図 2.　ピーク番号および濃度：1.　塩化メチレン 1.2 µg/mL、2.　クロロホルム 0.12 µg/mL、3.　ベンゼン 0.004 µg/mL、4.　トリクロロエチレン 0.16 µg/mL、5.　1,4-ジオキサン 0.76 µg/mL

前述した分析条件において DB-624 カラムに生じた共溶出を表 4 に示します。長さ 30 m×内径 0.45 mm×膜厚 2.55 µm の DB-624 カラムを用いた条件では、ベンゼンおよび 1,2-ジクロロエタンがオーブン温度 35°C で分離して、溶出できます（図 3）。

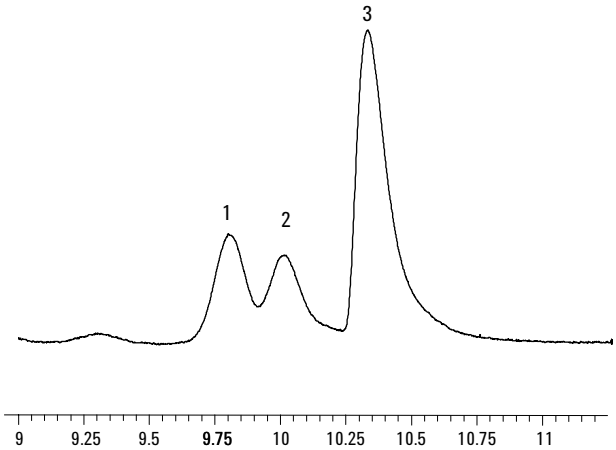


図3.　ベンゼンおよび 1,2-ジクロロエタンの分解能。ピーク番号：1.　ベンゼン、2.　1,2-ジクロロエタン、3.　1,2-ジメトキシエタン

USP 467 の規制対象となっている溶媒の検量線を図 4 に示します。検量線は勧告の濃度限度値よりはるかに低濃度を含む濃度範囲で直線性を示しています。この濃度範囲は、厚膜 0.53 mm および 0.45 mm ID カラムのダイナミックレンジが直線性を示す範囲内にあります。

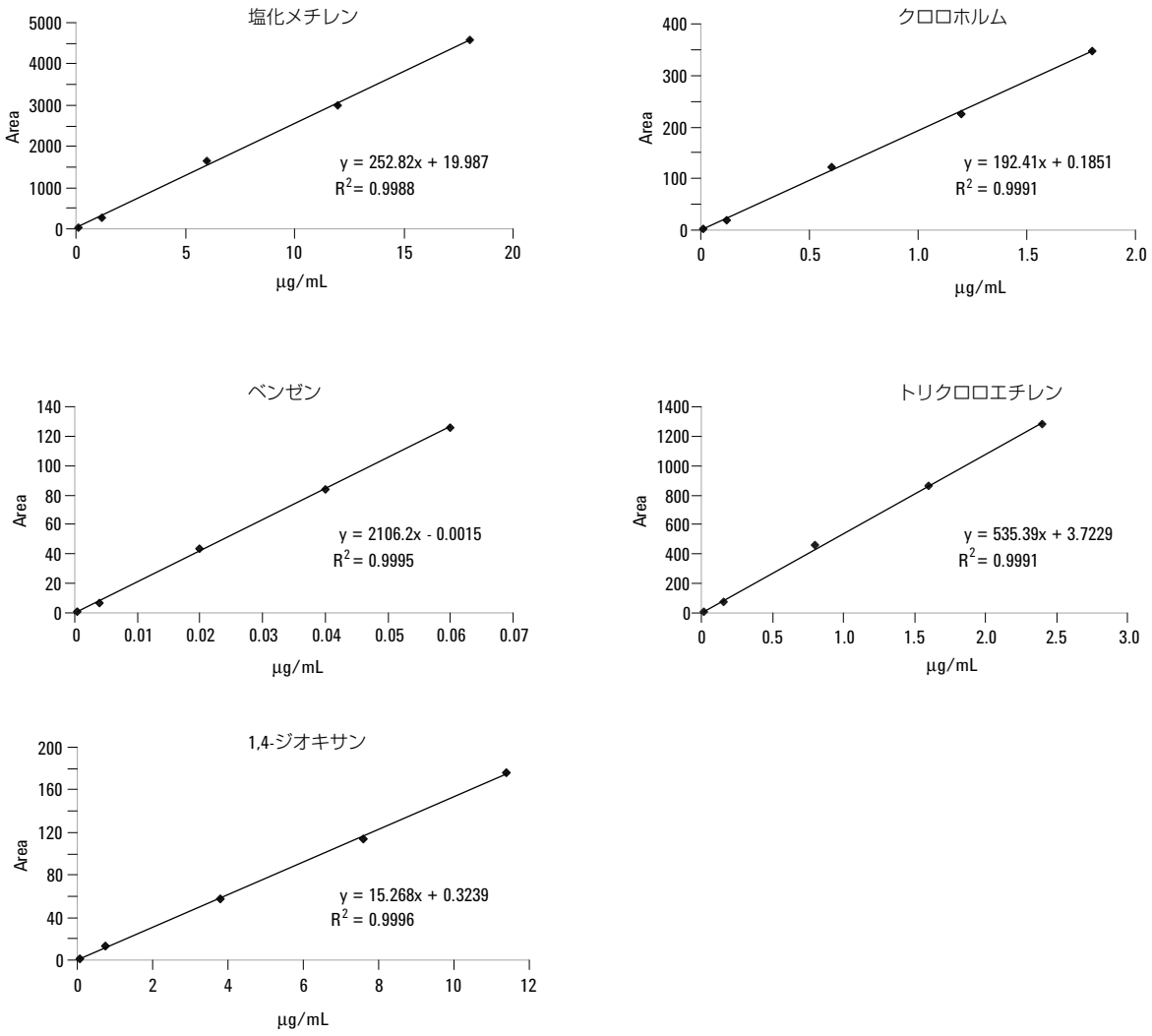


図 4.　USP467 溶媒の検量線

ヘッドスペースの平衡化時間は 60 分に設定するのが一般的ですが、ほとんどの場合、30 分で十分です。図 5 には、ヘッドスペースの平衡化時間を 30 分とした条件と 60 分とした条件で得られた主な成分（クラス 1 およびクラス 2 の溶媒）のクロマトグラム 2 本を重ねて示します。ピーク面積にはほとんど差が認められませんが、化合物によっては平衡化時間を 30 分とした条件においてピーク面積がわずかに増大するものもあります。

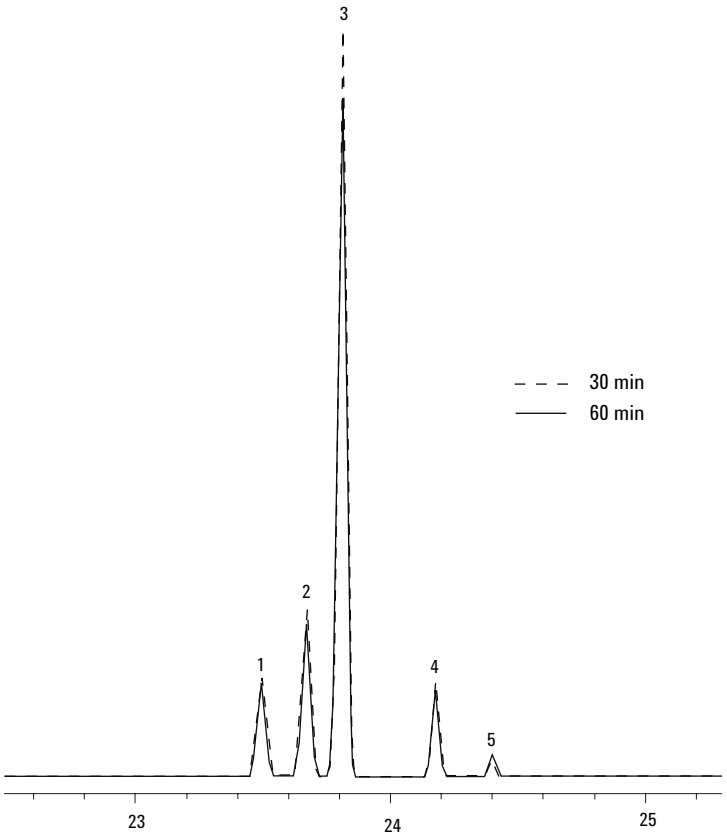


図 5.　ヘッドスペースの平衡化時間を 30 分とした条件と 60 分とした条件における主な化合物のピークの重ね書き：1.　クロロベンゼン、2.　エチルベンゼンおよび DMF、3.　m-キシレン、p-キシレン、4.　o-キシレン、5.　N,N-ジメチルアセトアミド

表 3.　クラス 1 およびクラス 2 の残留溶媒濃度*。表中の ID はクロマトグラム中の番号に対応

溶媒	ID	濃度 (µg/mL)	溶媒	ID	濃度 (µg/mL)
メタノール	1	60	トリクロロエテン	16	1.6
1,1-ジクロロエテン	2	0.16	メチルシクロヘキサン	17	236
アセトニトリル	3	8.2	1,4-ジオキサン	18	7.6
塩化メチレン	4	12	ピリジン	19	4
ヘキサン	6	5.1	トルエン	20	17.8
cis-1,2-ジクロロエテン	7	37.4	2-ヘキサノン	21	1
ニトロベンゼン	8	1	クロロベンゼン	22	7.6
クロロホルム	9	1.2	エチルベンゼン	23	7.38
四塩化炭素	10	0.08	N,N-ジメチルホルムアミド	24	17.6
シクロヘキサン	11	77.6	m-キシレン	25	26.04
1,1,1-トリクロロエタン	12	30	p-キシレン	26	6.08
ベンゼン	13	0.04	o-キシレン	27	3.9
1,2-ジクロロエタン	14	0.1	N,N-ジメチルアセトアミド	28	21.8
1,2-ジメトキシエタン	15	2	テトラリン	29	2

*表に示した濃度はサンプリング前のヘッドスペースバイアル中の溶液濃度である。ピーク 5（trans-1,2-ジクロロエテン）は、クラス 1 またはクラス 2 の溶媒としては表に示さない。

表 4.　0.53-mm ID DB-624 を用いた条件で確認された共溶出

共溶出群	溶媒
1（部分的）	ベンゼン、 1,2-ジクロロエタン
2	ニトロベンゼン、cis-1,2-ジクロロエテン
3	四塩化炭素、シクロヘキサン、1,1,1-トリクロロエタン*+
4	エチルベンゼン、DMF
5	m-キシレン、p-キシレン

* トリクロロエタンはシクロヘキサン非共存下では四塩化炭素と分離される。

+ 図6に、30 m×0.45 mm×2.55 µm DB-624 Agilent part no.124-1334 の使用条件におけるピークの分離を示す。

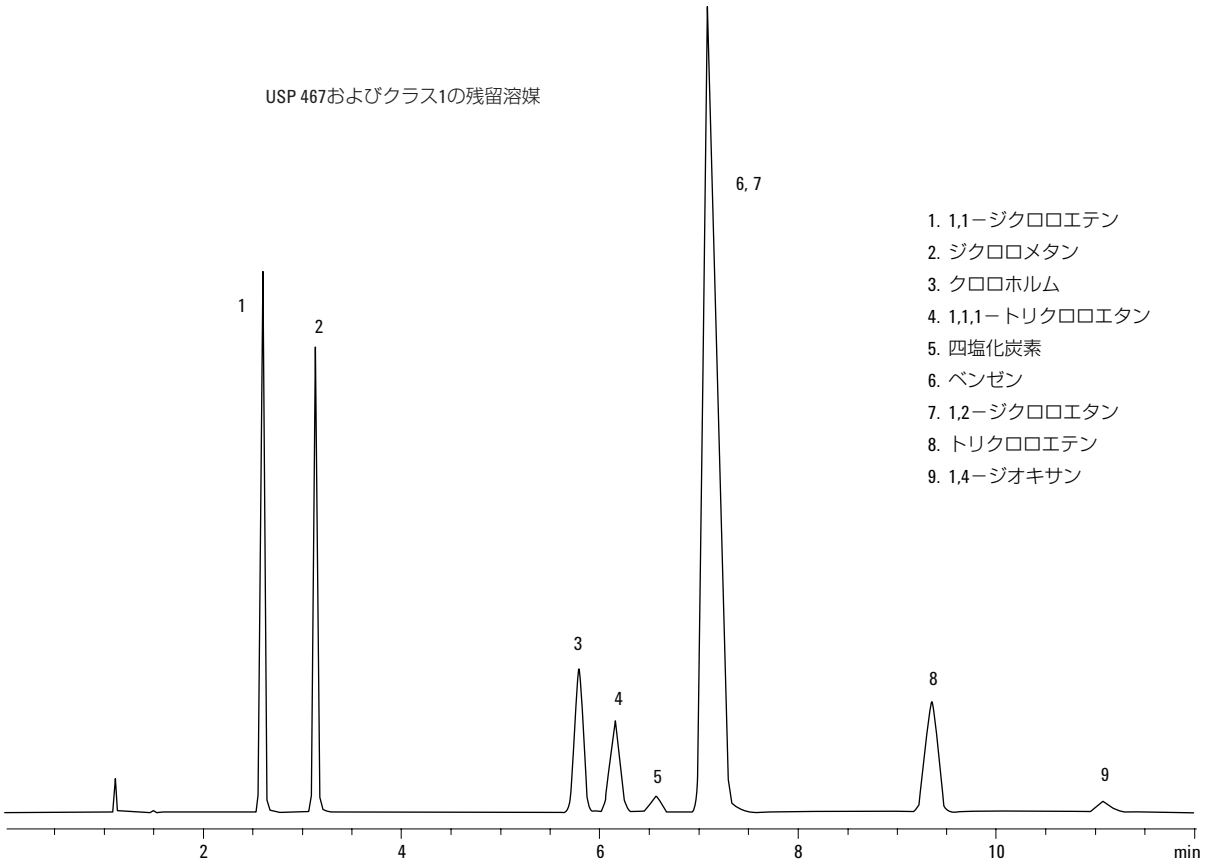


図 6.　30 m×0.45 mm×2.55 µm DB-624 カラム使用条件における USP 467 およびクラス 1 の溶媒（各 1 ppm）のクロマトグラム。GC オーブンの初期温度は40 °Cとした。

MSD システム

G1888／6890N／5973 inert システムを用いて測定したクラス 1 およびクラス 2 の溶媒のトータルイオンクロマトグラム（TIC）を図 7 に示します。

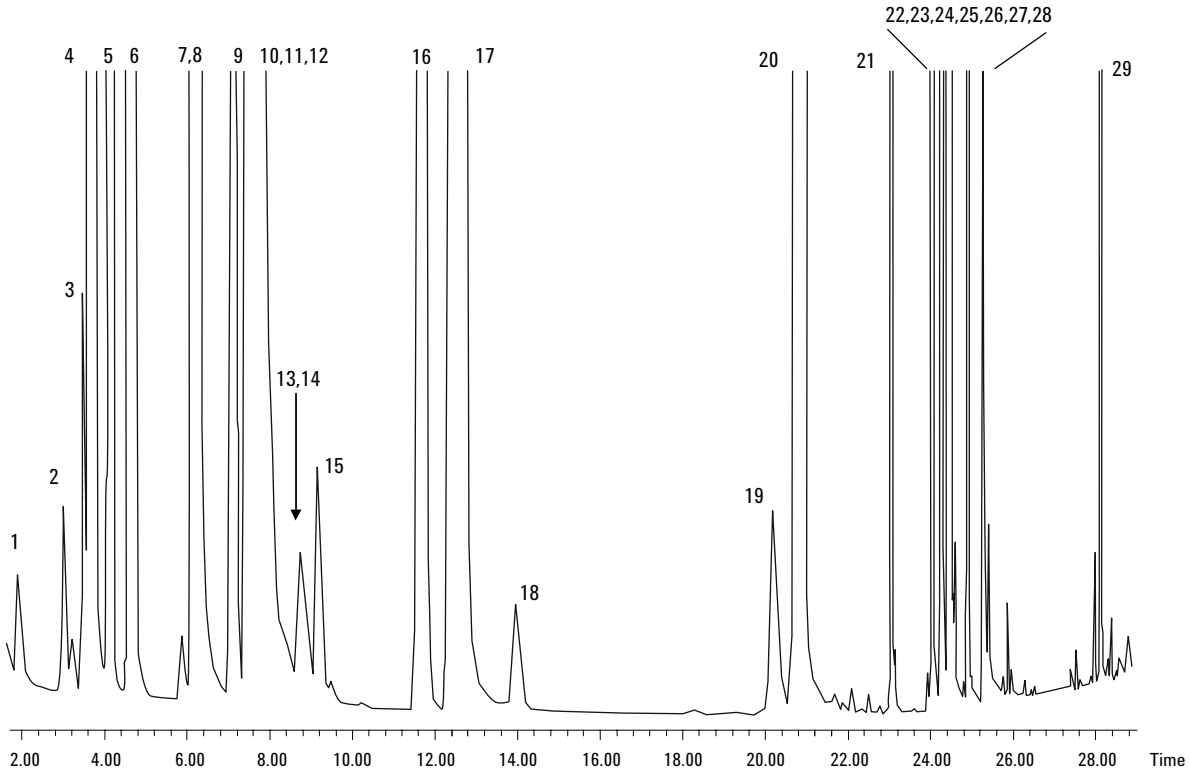


図 7.　クラス 1 およびクラス 2 の溶媒の TIC。化合物のピーク番号は表 3 を参照。

分析対象物質の溶液濃度およびピーク番号を表 3 に示します。ガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー（GC／MS）は水素炎イオン化検出法（FID）に置き換わるもうひとつの検出法であり、共溶出の問題の解決、あるいは未知物質の同定に有効です。また、選択イオンモニタリング（SIM）モードを用いれば、卓越した感度および選択性が得られ、医薬品の製造工程開発において微量不純物の同定・定量する際に有用であるものと考えられます。

キャリーオーバー

医薬品製造時に汎用される抽出溶媒の多くは水溶性でないため、実際の被検溶媒は一般に疎水性溶媒です。汎用される溶媒としては、DMA（N,N-ジメチルアセトアミド）、DMSO、ピリジン、DMI（1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン）などが挙げられます。使用される溶媒の多くは沸点が高いため、ヘッドスペースにキャリーオーバーが生じる可能性があります。G1888 は加熱ゾーンの温度むらの改善により、各部流路およびベントバルブ内での高沸点成分の凝結の低減に成功しました。

G1888 は「Sequence Vent Purge」と表示された拡張機能メニューを用いて、ユーザーがベントパージ時間をプログラムできる新たな機能を搭載しています。ベントパージ時間とは、注入後、ベントラインがパージされている時間をいいます。ベントパージ時間のデフォルト値は 30 秒ですが、サイクルタイムのほぼ上限まで延長することができます。本稿のキャリーオーバー実験では、溶媒がキャリーオーバーする可能性をさらに低減するため、ベントパージ時間を 20 分としました。

純溶媒 100 µLを10 mL バイアルに添加しました。溶媒添加量を増やしても、注入量は変わりません。溶媒バイアルと水ブランクバイアルを交互に 10 本セットし、実験の項に示した分析条件による連続測定を行いました。この試験はピリジン、DMSO および DMA に関して実施しました。3 種類の溶媒とも、キャリーオーバー（[ブランクバイアルから得た溶媒ピーク面積／溶媒バイアルから得た溶媒ピーク面積]×100）は 0.006% 未満でした。また、全てのブランクバイアルから得た溶媒ピーク面積の相対標準偏差が±3 %であったことから、いかなる傾向も示唆されませんでした。キャリーオーバーの追加試験として、DMA バイアル（µL／10 mL バイアル）を連続 10 本注入後、水ブランクバイアル 2 本を注入しました（ヘッドスペースのオーブン温度条件 100 °C）。1 本目のブランクのキャリーオーバーは 0.004%、2 本目のブランクのキャリーオーバーは 0.001% でした。

製薬企業が今日使用している溶媒のうち最も効率的なもののひとつは DMI（沸点225 °C）です。表 5 に、DMI のキャリーオーバー試験に用いたシステム設定条件の一覧を示します。DMI と水ブランクのバイアルを交互にセットし、ヘッドスペースの連続測定を行いました。結果を図 8 に示します。

高濃度の DMI を用いるとカラムが過負荷状態となり、ピーク面積に若干の不一致が生じますが、本試験の目的上、このことは問題となりません。キャリーオーバー測定値は 0.003% 未満でした。

表 5.　DMI キャリーオーバー試験に用いた設定

ヘッドスペースオーブン	220 °C
ループ	250 °C
トランスファーライン	250 °C
バイアル平衡化時間	30 min
ベントパージ時間	20 min
検体	100 µL DMI／10 mL バイアル
ブランク	5 µL 水／10 mL バイアル
ボラタイル·インレット	250 °C
スプリット比	10 : 1
オーブンのプログラム	35 °C（0 分）～260 °C（15 分），25 ℃/min 25 °C/min

実際の分析対象物質のキャリーオーバー試験にも、純溶媒のキャリーオーバー試験と同様の方法を用いました。USP 467 標準物質（Restek # 36007）100 µL を 5 mL 水/1 g Na_2SO_4 の入ったバイアルに添加しました。これらのバイアルと純水ブランクバイアルを交互に連続 10 本セットし、バイアル平衡化温度 85 °Cで測定しました。いずれのブランクバイアルのクロマトグラムから、面積が測定可能な分析対象物質のピークは認められませんでした。

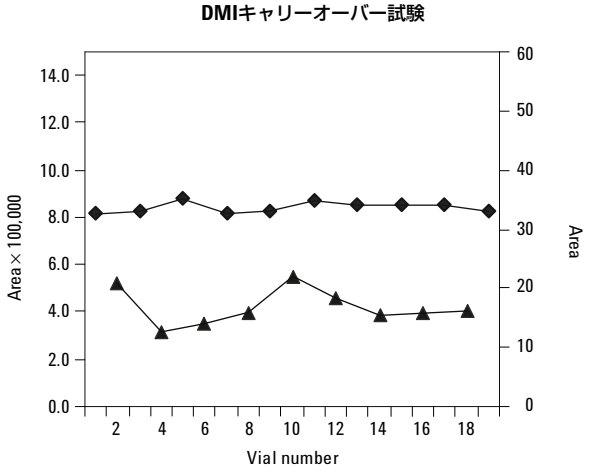


図8.　DMI に関するキャリーオーバー試験の結果

結論

医薬品製造業者は残留溶媒、OVI および関連汚染物質が製品中に含まれない、あるいは規定された安全値未満であることを保証する必要があります。ごく低濃度の不純物の正確な測定を妨げる要因のひとつは、分析対象物質と機器のサンプル流路内面が相互作用や反応を示す傾向にあることです。弊社はこうした問題を解決すべく、不活性な新規ヘッドスペースサンプラである G1888 システムを開発しました。G1888 システムは注入から検出に至るまでのサンプル流路内において反応性および吸着性を示しません。このことにより、従来の機器に共通の問題点であったキャリーオーバーが著しく低減されました。加熱ゾーンが高温に対応するため、使用できる溶媒系の選択肢が広がりました。不活性イオン源を採用した 5973 inert MSD と G1888 システムを組み合わせれば、未知物質の同定または確認が必要な場合に卓越した結果を得ることができます。本アプリケーションでは、医薬品に使用される広範なクラスの溶媒を G1888 ヘッドスペースサンプラシステムにより分析した結果、キャリーオーバーの低下、卓越した検出感度および ppm～ppb の範囲にわたる良好な直線反応が認められました。

本稿で概説した方法および手順には、残留溶媒の分析時に想定されるアプローチを例示していますが、研究室ではシステム適合性試験を実施し、ICH または USP ガイドラインに照らして解析方法をバリデートする必要があります。

参照文献

1. Anil M. Dwivedi, Residual Solvent Analysis in Pharmaceuticals, (Nov., 2002) *Pharmaceutical Technology*, 42-46.
2. Guidance for Industry, Q3C Impurities: Residual Solvents, U.S. Department of Heath and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) Dec. 1997, ICH.
3. Revised PDEs for NMP and THF, Federal Register, 68, (219), Nov. 2003, Notices, 64353.
4. Limits of Residual Solvents, Federal Register, 62, (247), Dec. 1997, Notices 67380-67381.

www.agilent.com/chem

詳細については

Agilent 製品とサービスの詳細な情報については、下記ウェブサイトをご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

http://www.agilent.com/chem/jp

Agilent は、この文書に含まれる誤りあるいは本資料の提供、履行、使用に関連して生じた付随的または間接的な損害について責任を負いません。

ここに記載される情報、説明および仕様は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2004

Printed in the U.S.A.
June 21, 2004
5989-1263JAJP

Agilent Technologies