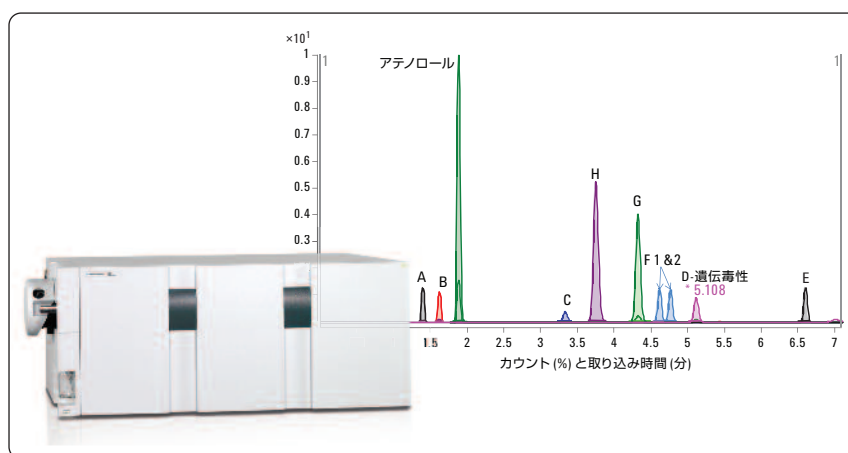


Agilent 1200 シリーズ RRLC および 6410B トリプル四重極 LC/MS システムを用いた LC/ESI/MS/MS によるアテノロール中の 遺伝毒性「不純物 D」の定量

アプリケーションノート

著者

Siji Joseph
Agilent Technologies
Bangalore, India



概要

アテノロールは心臓選択性 β 遮断剤です。これは、高血圧、狭心症、不整脈、心筋梗塞の治療に使用します。アテノロールは偏頭痛の予防治療にも使用されます。¹(欧州薬局方にあるとおり) アテノロールには 8 つの不純物があり、そのうちの 1 つ (不純物 D) が遺伝毒性不純物です。このため、純度表示メソッドの感度がこの不純物の定量にとって重要になります。本アプリケーションノートでは、UV および 質量分析計を用いたアテノロール不純物の定量分析法について説明します。ここで新たに開発した分析法は、既存の欧州/米国薬局方 (EP/USP) メソッドよりも明らかに優れた分離能および高い感度を実現するシンプルで高速な方法です。質量分析計のパラメータを素早く最適化するためにアジレントの MassHunter Optimization ソフトウェアを使用しました。

UV 検出器を使用した Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムにより 2.0% ~ 0.03% の濃度範囲、0.9999 以上の相関係数 (0.25% 未満の限界濃度) で不純物を定量できます。Agilent 6410B トリプル四重極型 (QQQ) 質量分析計を Agilent 1200 シリーズ RRLC システムに接続すると、0.9992 以上の相関係数を維持したまま定量範囲を 5 ppb の濃度まで大幅に引き下げることができます。不純物 D の測定イオンはプリカーサイオン: m/z 244.1 プロダクトイオン: m/z 107 です。



Agilent Technologies

はじめに

「医薬保健製品の品質にかかわる欧州指令」(EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care)では、遺伝毒性不純物の取り扱いに関するガイドラインの確立に重点が置かれています。こうしたガイドラインはモノグラフ仕様の改訂時に使用できます。欧州薬局方(6.0)には、アテノロール、2-[4-[(2RS)-2-ヒドロキシ-3-[(1-メチルエチル)アミノ]プロキシ]フェニル]に含まれる8つの不純物が不純物A～Hとしてリストされています。不純物D(クロロアルキル化合物)には遺伝毒性があることが分かっています。2アテノロールの分子構造と欧州薬局方に規定されている8つの不純物の分子構造を図1に示します。

薬剤

アテノロールと関係不純物はすべてLGC Promochem(ドイツ)から購入しました。本実験で使用した溶媒はすべてHPLCグレードの物です。アセトニトリルはLabscan社から、トリフルオロ酢酸(TFA)はFluka社から購入。純水装置によるイオン交換水を使用しました。米国/欧州薬局方メソッドの実施に使用した他の薬剤は、すべてSigma Aldrich社から購入したものです。

機器

すべてのLC分析は、Agilent 1200 SL シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムで実施しました。システム構成は、Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ SL (デガッサ装備)、Agilent 1200 シリーズオー

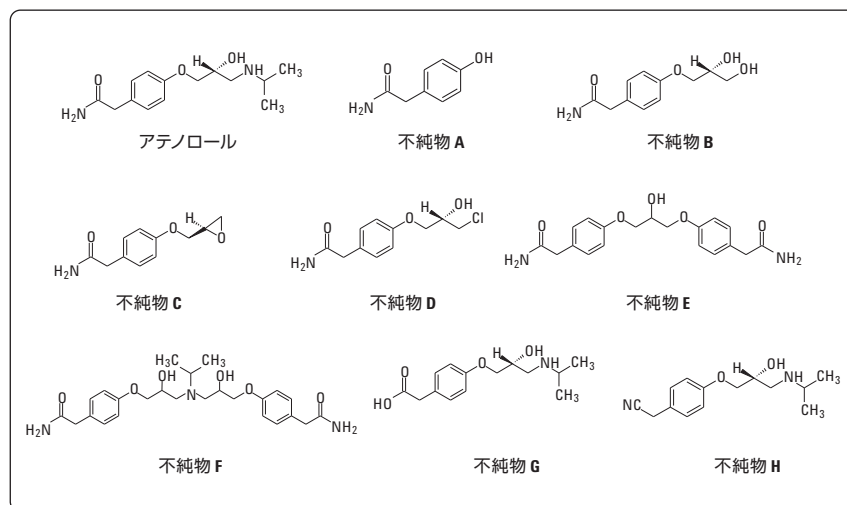


図1
アテノロールの分子構造とEP(6.0)に規定されている8つの不純物の分子構造

トサンブラ SL、および Agilent 1200 シリーズカラム恒温槽 SL です。ESI/MS/MS は、Agilent 6410B トリプル四重極 LC/MS システムを使用して行いました。システムの制御とデータの取り込みにはアジレントの MassHunter Workstation ソフトウェア(バージョン B.01.04)を使用しました。

試料調製

LC 実験用の試料調製

各不純物の 1000 ppm 保存溶液と、アテノロールの 2000 ppm 保存溶液を別々に調製しました。各不純物の検量線用 20 ppm (レベル: 8)、10 ppm (レベル: 7)、5 ppm (レベル: 6)、2.5 ppm (レベル: 5)、1.25 ppm (レベル: 4)、0.625 ppm (レベル: 3)、0.313 ppm (レベル: 2)、および 0.156 ppm (レベル: 1) 溶液は、

この保存溶液をアテノロールの 1 ppm 溶液で希釈して調製しました。希釈する不純物保存溶液の量は、個々の不純物の重量および力価に応じて正確に計算しました。レベル 5 を除いた上記の各レベルの溶液を 3 回注入し、レベル 5 の溶液を 6 回注入して(システム適合性試験用溶液)、検量線を作成しました。

ESI/MS/MS 実験用の試料調製

ESI/MS/MS 実験に使用した不純物およびアテノロール保存溶液の濃度は 1 ppm です。これよりも低い濃度の溶液は、この保存溶液を 1 ppm のアテノロール溶液で希釈して調製しました。すべてのレベルの溶液を 5 回注入して検量線を作成しました。

LC 条件の開発

最初に、比較を行うために、欧州薬局方 (EP) と米国薬局方 (USP) メソッドを使用して各不純物とアテノロールの溶出パターンを再現しました。USP メソッド 3 による分析には、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm (内径) × 250 mm, 5 μm) カラムを使用し、EP メソッドによる分析には、Agilent ZORBAX ODS (4.6 mm (内径) × 150 mm, 5 μm) カラムを使用しました。典型的なクロマトグラムを図 2 (a および b) に示します。

EP と USP に定められているクロマトグラフ条件はアイソクラティックであり、両メソッドで使用する緩衝液は質量分析 (MS) には不適合です。質量分析用メソッドについては、TFA を添加したメタノールがどの不純物に対しても優れた分離能を示すことが判明しました。TFA を加えるだけでどんな顕著な付加イオンを生成することなくプロトン化分子の生成を促進しました。すべてのクロマトグラフ分離に Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm) を使用しました。LC のパラメータを表 1 にまとめます。移動相 A と B を 1 対 1 の比率で事前に混ぜ合わせておき、その混合溶液を希釈液として使用しました。表 2 は移動相の濃度変更時間です。代表的な LC クロマトグラムを図 2c に示します。

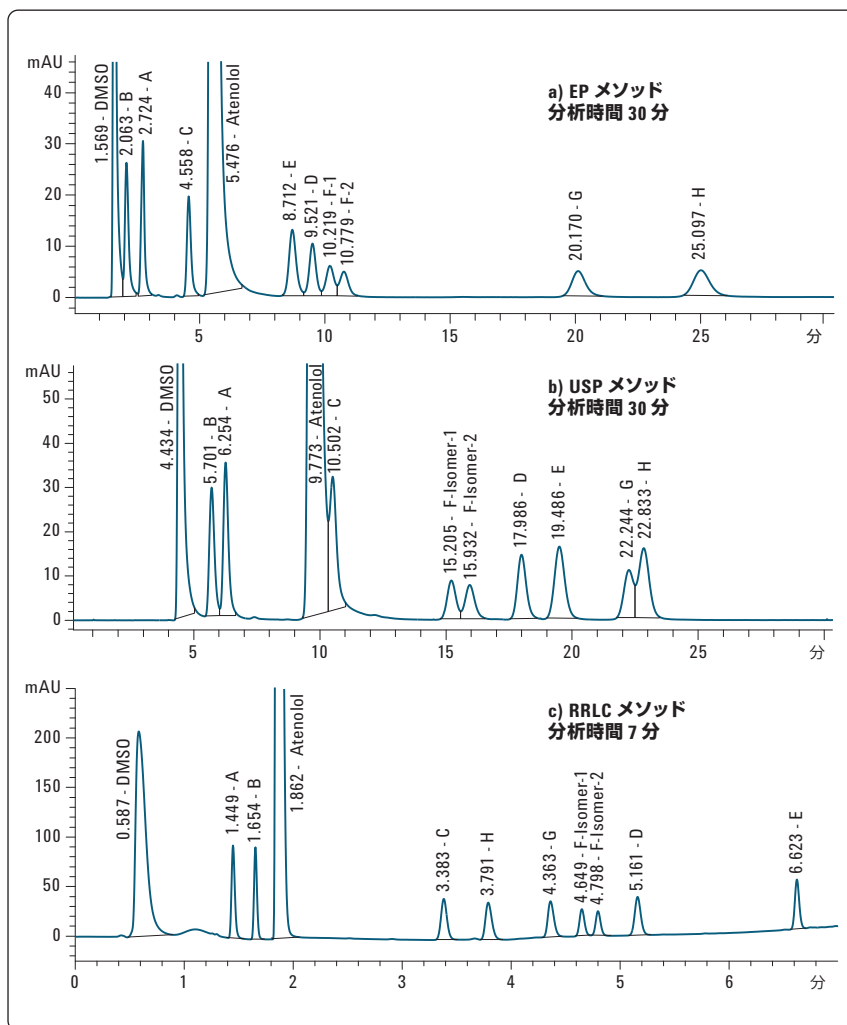


図 2
アテノロールの溶出パターンと、(a) EP、(b) USP および (c) RRLLC メソッドに規定されている 8 つの不純物の溶出パターン

パラメータ	詳細
移動相 A	TFA 含有濃度 0.1% の水
移動相 B	TFA 含有濃度 0.05% のメタノール
流量	1.5 mL/min
ポストラン時間	2.5 分
注入量	5 μL
ニードル洗浄モード	フラッシュポートを 10 秒間作動させた
カラム温度	25 °C
検出	226 nm

表 1
LC パラメータ

時間 (分)	移動相 A の濃度 (%)	移動相 B の濃度 (%)
0	95	5
0.1	80	20
2.5	80	20
5.0	70	30
6.5	60	40
7.0	60	40
7.1	95	5

表 2
実験に使用したグラジエント時間

ESI/M からの溶出物をエレクトロスプレーイオン化源 (ESI) に導入しました。乾燥ガスの流量は 13 mL/min、乾燥ガス温度は 345 °C、キャピラリ電圧は 4000V、ネブライザ圧力は 60 psi に設定しました。

MS パラメータの最適化には、アジレントの MassHunter Optimization ソフトウェア (バージョン B.01.04) を使用しました。このソフトは、マルチリアクションモニタリング (MRM) モードで使用するデータ取り込みパラメータを自動的に最適化します。化合物ごとに 500 ppb 濃度の溶液を使用して個別に最適化を行いました。Optimization ソフトウェアで得られた MS パラメータを (溶出順に) 表 3 にまとめます。アテノロールと各不純物のレスポンスは、それぞれ所定のフラグメンター電圧とコリジョンエネルギーを使用して MRM の正イオンモードで測定しました。どのイオンについても、ドウェルタイムは 200 msec/イオンでした。アテノロールと各不純物の溶出パターンを図 3 に示します。

化合物名	分子量	プリカーサーイオン (m/z)	クオンティファイア (m/z)	フラグメンター電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)
不純物 A	151.16	152.1	107	134.1	97
不純物 B	225.24	226.1	145	107	107
アテノロール	266.33	267.2	145	190	129
不純物 C	207.22	208.1	133	178	82
不純物 H	248.32	249.1	172	207.1	124
不純物 G	267.32	268.1	145.1	190	128
不純物 F	473.56	474.3	281.1	145	178
不純物 D	243.68	244.1	107	145	111
不純物 E	358.38	359.1	107	145	125

表 3
MassHunter Optimization ソフトウェアによって最適化した各化合物の MS パラメータ

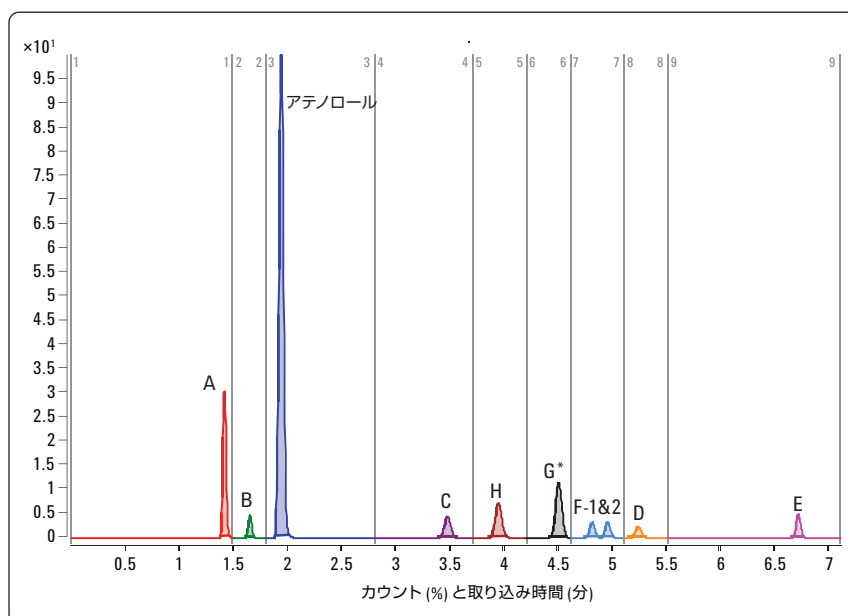


図 3
アテノロールと 8 つの不純物に関する重ね書き MRM クロマトグラム

結果のまとめ

ここに示した新規開発メソッドには、既存の EP/USP メソッドと比較して次のような利点があります。

分析時間が短い:

新しい RRLC メソッドでは、図 4 に示す溶出パターンが得られ、すべてのピークが 7 分の分析時間できれいに分離されています。分析時間の短縮によって効率と生産性が高まります。

ピークがきれいに分離される:

EP メソッドによる不純物 D (リテンションタイム (RT): 9.521) と不純物 F の最初の異性体ピーク (RT: 10.219) との分離度は 1.27 でした。USP メソッドの場合、不純物 A (RT: 6.254) と不純物 B (RT: 5.701) との分離度は 1.52 でした。不純物 C (RT: 10.502) とアテノロールのピーク (RT: 9.773) との分離度は 1.41 でした。不純物 H (RT: 22.833) と不純物 G (RT: 22.244) との分離度は 0.70 という低い値でした。

新しいメソッドで実測された最も低い分離度は 3.02 (アテノロールと不純物 B の分離度) です。不純物間の分離度が高くなると、製造工程で不純物を特定しやすくなります。各ピークの純度は、Chemstation ソフトウェアのピーク純度機能によって確認されたものです。

不純物 F の異性体の分離能が向上する:

EP メソッドで実測された不純物 F 異性体間での分離度は 0.86 (RT: 10.219 と 10.779 min)、USP メソッドでの分離度実測値は 1.08 (RT: 15.205 と 15.932 min) でした。新しいメソッドでは、この分離度が大幅に向上し、1.77 になります (図 4)。

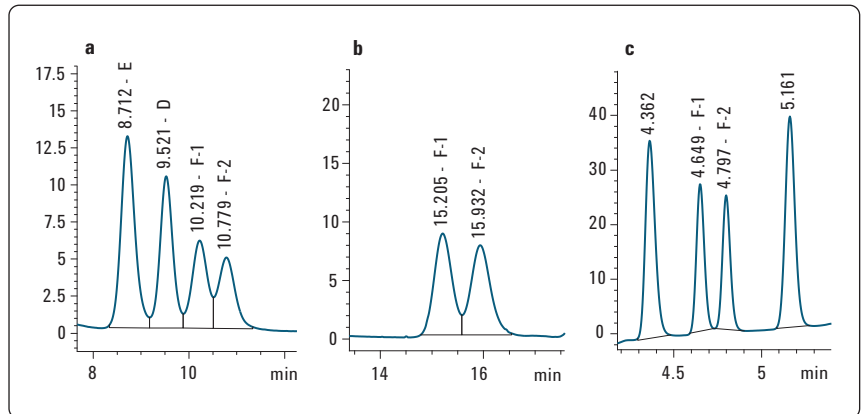


図 4 (a) EP、(b) USP、および (c) Agilent 1200 シリーズ RRLC による不純物 F 異性体分離の拡大図

感度が向上する:

新しい RRLC-UV メソッドでは、0.03% (0.315 ng/μL: 定量限界 (LOQ)) ~ 2.0% (20 ng/μL) の濃度範囲で不純物 D を直接定量する際の感度が大幅に向上します。測定結果による検出限界 (LOD) は 0.0156% (0.156 ng/μL) です。統計学的な見地からは、LOD レベルでの保持時間の相対標準偏差 (RSD) は 0.022%、ピーク面積の RSD は 1.992% (n=3) でした。ESI/MS/MS 法を使用すると、不純物 D の LOQ をさらに 0.005 ng/μL (5 ppb) まで引き下げることができ、LOD は 3 ppb でした。

優れた UV 検出の直線性:

どの不純物についても、0.0156% ~ 2.0% の濃度範囲での直線性は相関係数が 0.9999 以上でした。これは、Agilent 1200 シリーズ RRLC 検出器の直線性能が飛び抜けて高いことを証明するものです。

リテンションタイムおよびピーク面積に関する優れた RSD:

システム適合性試験分析 (不純物濃度 0.25%, n=6) に対して保持時間およびピーク面積の RSD を計算しました。その結果を表 4 にまとめます。優れた結果は、1200 シリーズ RRLC 注入装置の精度と再現性の高さを証明しています。

サンプル	面積 RSD	RT RSD
A	0.201%	0.036%
B	0.247%	0.000%
アテノロール	0.151%	0.028%
C	0.217%	0.046%
H	0.232%	0.037%
G	0.183%	0.082%
F 異性体-1	0.173%	0.095%
F 異性体-2	0.131%	0.087%
D	0.186%	0.059%
E	0.153%	0.054%

表 4. システム適合性反復試験に関する RT とピーク面積の RSD

ESI/MS/MS の直線性:

どの不純物についても、LOQ レベルから 500 ppb までの濃度範囲の ESI/MS/MS による検量線は、相関係数:0.99 を超える優れた MS/MS 直線性を示しました。各不純物の LOD、LOQ、(LOQ レベルにおける) S/N 比、および相関係数を表 5 にまとめます。不純物 D の検量線は図 5 に示すとおりです。

MS/MS 回収率:

どの低レベル不純物についても、回収率は 80% ~ 120% の範囲内でした。不純物 D の平均回収率は 100.65 ± 9.05% (91.6% ~ 109.7% の範囲) でした。こうした結果から、このメソッドが 5 ppb ~ 500 ppb という広い不純物 D 濃度範囲にわたって信頼できるメソッドであることがわかります。この機器構成を使用すれば、S/N 比が 11 以上で 5 ppb 濃度 (定量限界濃度) の不純物 D を簡単に定量できます。

サンプル名	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	LOQ における S/N 比	相関係数
不純物 A	<1	1	>23	>0.991
不純物 B	2	4	>10	>0.999
不純物 C	2	3	>12	>0.999
不純物 D (遺伝毒性あり)	3	5	>11	>0.999 (図 5)
不純物 E	2	3	>10	>0.994
不純物 F	2	4	>12	>0.999
不純物 G	<1	1	>40	>0.995
不純物 H	1	2	>19	>0.992

表 5
各不純物に関する LOD、LOQ、S/N 比、および直線性

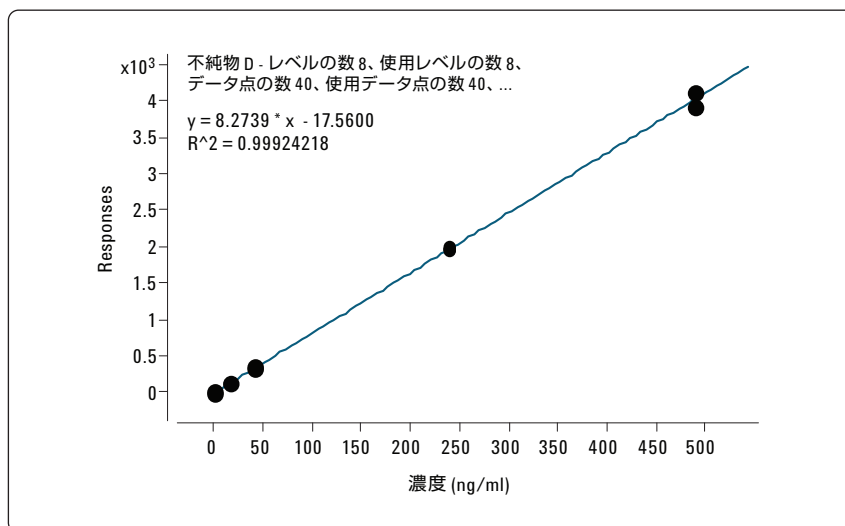


図 5
5 ppb ~ 500 ppb 濃度の不純物 D に関する検量線

結論

Agilent 1200 シリーズ RRLC システムは、アテノロール中の遺伝毒性不純物 D の測定に高速、正確、高感度で信頼性の高いメソッドを提供します。このメソッドは、UV 検出によって既存のメソッドよりも低い LOD および LOQ を実現し、品質管理アプリケーションの要件をすべて満たします。高感度な Agilent 6410B トリプル四重極 LC/MS と Agilent 1200 シリーズ RRLC システムを連結して用いることで、LOD および LOQ 値を引き下げることができ、最終的な医薬製品に混入している不純物を正確に測定できるようになります。

参考文献

1.
『Martindale』 第 5 版 (2007)、1093 ページ
2.
D. P. Elder その他、『J Pharm Biomed Anal』 (2008)
3.
USP 29 アジア版公式モノグラフ (2008)/アテノロール、211 (3) ページ
4.
『欧州薬局方』 第 6.0 版、第 2 巻 (2008)、1228 ~ 1229(4) ページ

www.agilent.com/chem/jp

本文書記載の製品は薬事法に基づく医療機器の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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in Japan, August 1, 2009
Publication Number 5990-4460JAJP



Agilent Technologies