

医薬品有効成分中の遺伝毒性が疑われる アリールアミンおよび アミノピリジン不純物の分析

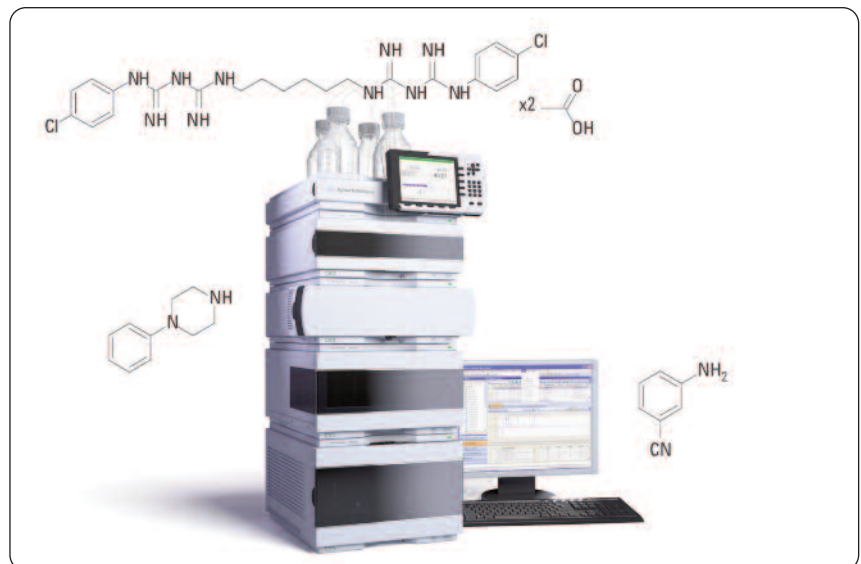
Agilent 1290 Infinity LC システムと
Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS システムを用いた
メソッド開発と高速分析

アプリケーションノート

製薬

著者

Gerd Vanhoenacker、Frank David、
Pat Sandra
Research Institute for Chromatography
Kortrijk, Belgium



概要

このアプリケーションノートでは、医薬品有効成分 (API) 中の遺伝毒性が疑われる不純物 (PGI) の定量分析における Agilent 1290 Infinity LC システムおよび Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS の可能性を紹介します。汎用的なアプローチを用いて、選択した API に含まれるアリールアミン PGI およびアミノピリジン PGI を測定しました。実際のサンプルに含まれる不純物の回収率におけるカラム長さおよび移動相の影響を調べました。全体的にもっとも高い性能が得られたのは、1.8 μm 粒子を充てんした 150 mm RRHD カラムを用いた高分離能 UHPLC でした。API とターゲット化合物の分離が良好な場合は、50 mm RRHD カラムを用いて、分析スピードとサンプルスループットを向上させることも可能です。

2,6-ジクロロアニリンの検出下限は、MS/MS を用いた場合は 20 ppb (ng/g、API に対して) 未満、DAD では 100 ppb (ng/g、API に対して) 未満でした。ESI-MS では、微量レベルの 2,6-ジクロロアニリンは検出できませんでした。



Agilent Technologies

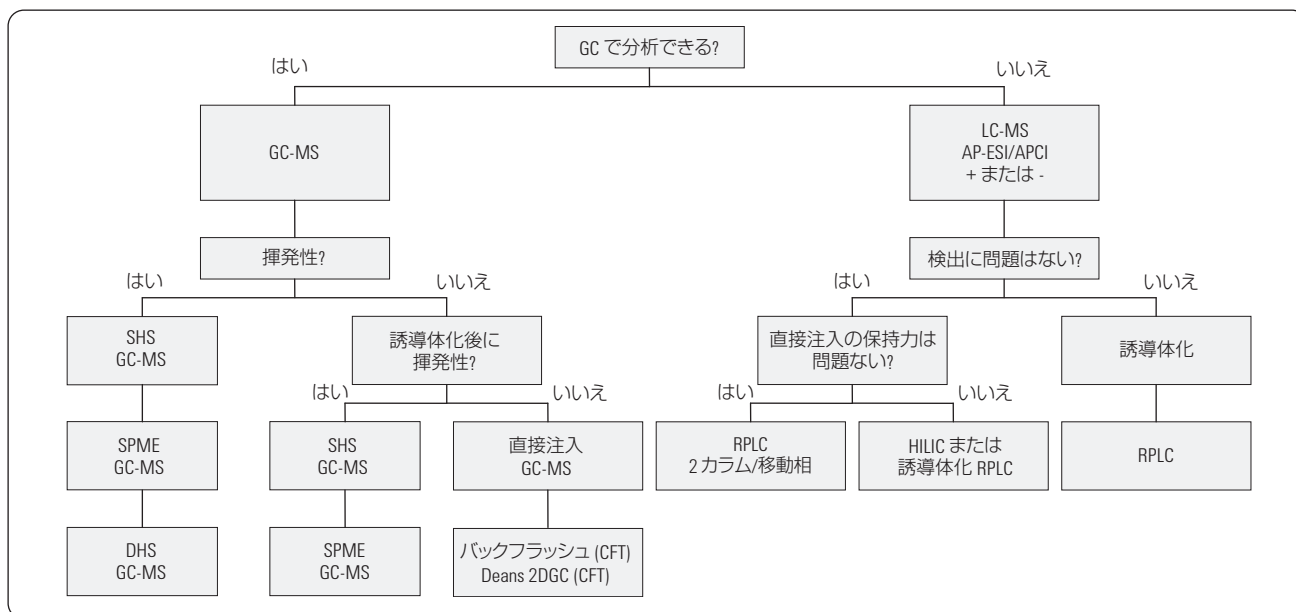


図 1
API 中 PGI 分析用のメソッド選択フローチャート³

はじめに

構造的に注意すべき機能性をもつ医薬品成分中不純物は、potential genotoxic impurity (PGI：遺伝毒性の疑われる不純物) と呼ばれます。こうした不純物は、医薬品有効成分 (API) の分解、賦形剤、物質生成時の残留物などから生じます。近年では、PGI に対する関心が高まり、毒性学的閾値 (TTC) が設定されています。¹ 1 日あたりの遺伝毒性不純物摂取量で 1.5 µg という TTC 値であれば、リスクが許容範囲内で、重大な発がん性が生じる可能性はきわめて低いとされています。医薬品委員会 (CHMP) が遺伝毒性物質への生涯曝露量をもとに定めたリスクの許容範囲は、がん発症リスクの増加率が 10 万分の 1 未満であることとされています。² その結果、API に ppm レベルで含まれる PGI を検出できる分析メソッドが必要となっています。近年では、各種の PGI に使用されるメソッドの概要が公開され、³ 簡単な質問をもとにしたメソッド選択チャートも作成されています (図 1)。

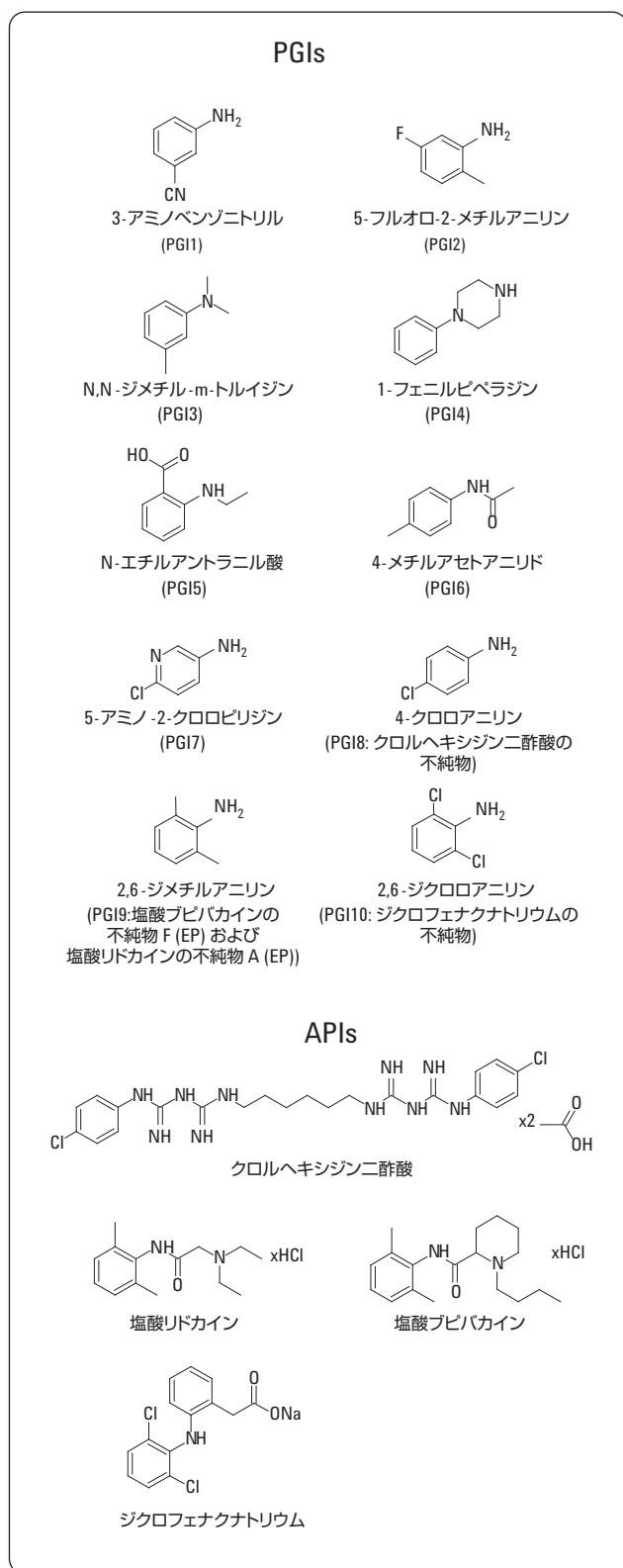
アリアルアミンとアミノピリジンは API を構成する PGI 成分で、さまざまな医薬品に微量レベルで存在している可能性があります。API に含まれるこれらの化合物を ppm 以下のレベルで分析するのは困難で、微量濃度の PGI を検出できる感度と、マトリックス干渉を低減する選択性を備えた最先端の機器が求められます。シングル四重極型の LC/MS システムを用いて、この種の化合物を微量レベルで分析する手法については、以前に紹介しています。⁴ トリプル四重極型の質量分析計を使えば、選択性と感

度をさらに高めることができます。Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) と Agilent 6410B トリプル四重極 LC/MS を組み合わせたアテノロール中 PGI (EP 不純物 D) の定量では、このアプローチの性能が実証されました。⁵

分析の感度とスピードをさらに高めるために、Agilent 1290 Infinity UHPLC システムと Agilent 6410B トリプル四重極 LC/MS システムを組み合わせ、4 種類の API に含まれる 10 種類のアリアルアミンとアミノピリジンを分析しました。分析した物質の構造を図 2 に示しています。一部の PGI は、分析に用いた API の既知不純物です。実際のサンプルにおける回収率を調べるために、高濃度の API 溶液 (スパイクなし、またはあり) を MRM モードで分析しました。PGI のうちの 1 つ (2,6-ジクロロアニリン) については、MS でのレスポンスが低い (ESI イオン化を使用)、DAD を用いて検出しました。

分析には、1.8 µm 粒子を充てんした Agilent ZORBAX RRHD カラムを使用しました。性能の優れた Agilent 1290 Infinity LC システムでは、さまざまな長さのカラムを使用することが可能です。

メタノールかアセトニトリルのいずれかを用いてクロマトグラフィーの選択性を最適化し、マトリックス干渉を除去または低減しました。



実験手法

使用装置

Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器を搭載した Agilent 1290 Infinity LC システムと、Agilent Jet Stream 技術を搭載した Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS システムを使用しました。Agilent 1290 Infinity LC システムの構成は以下のとおりです:

G4220A	一体型真空デガッサを備えた Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ
G4226A	Agilent 1290 Infinity オートサンブラ
G1316C	Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント
G4212A	Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器

メソッドパラメータ

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD、50、100 または 150 mm l × 2.1 mm id、1.8 μm
移動相	A=0.05 % ギ酸水溶液 B=メタノールまたはアセトニトリル
流量	0.5 mL/min

グラジエント

	カラム長さ			
	50 mm	100 mm	150 mm	
B=メタノール	0~0.25 分	0~0.5 分	0~0.75 分	10 % B
	0.25~2.5 分	0.5~5 分	0.75~7.5 分	10~100 % B
	2.5~3 分	5~6 分	7.5~9 分	100 % B
	3~4 分	6~7.5 分	9~11.2 分	10 % B
B=アセトニトリル	0~0.25 分	0~0.5 分	0~0.75 分	5 % B
	0.25~2.5 分	0.5~5 分	0.75~7.5 分	5~95 % B
	2.5~3 分	5~6 分	7.5~9 分	95 % B
	3~4 分	6~7.5 分	9~11.2 分	5 % B

温度	B=メタノール: 45 °C B=アセトニトリル: 40 °C
----	------------------------------------

注入	MS: 1 μL、ニードル洗浄あり (フラッシュポート、5 秒、水/メタノール 1/1) DAD: 5 μL、ニードル洗浄あり (フラッシュポート、5 秒、水/メタノール 1/1)
----	---

検出

DAD (PGI10)	
シグナル	シグナル 238/5 nm、参照 420/50 nm シグナル 296/10 nm、参照 450/50 nm
セル	標準 10 mm フローセル
スリット	4 nm
ピーク幅	>0.012 分 (20 Hz)

図 2
分析した PGI および API の構造

MS/MS (PGI1-9)

イオン化	Jet Stream 技術のポジティブイオン化による エレクトロスプレー	
Jet Stream パラメータ	乾燥ガス温度	330 °C
	乾燥ガス流量	8 L/min
	ネブライザ圧力	35 psig
	シースガス温度	340 °C
	シースガス流量	10 L/min
	キャピラリ電圧	4000 V
	ノズル電圧	500 V
取り込み	50 mm カラム	0.6~2.6 分 タイムフィルタリング オフ
	100 mm カラム	1.2~5 分 タイムフィルタリング 0.02 分
	150 mm カラム	1.8~7.5 分 タイムフィルタリング 0.02 分
MRM 設定	表 1	
	デルタ EMV	50

PGI 名称	プリカーサ イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	フラグメンター (V)	衝突 エネルギー (V)
1 3-アミノベンゾニトリル	Q 119.1 q 119.1	92.0 102.0	110 110	15 21
2 5-フルオロ-2-メチルアニリン	Q 126.1 q 126.1	111.0 109.0	110 110	17 17
3 N,N-ジメチル-m-トルイジン	Q 136.1 q 136.1	121.0 120.0	110 110	13 25
4 1-フェニル-ピペラジン	Q 163.1 q 163.1	120.0 118.1	120 120	18 25
5 N-エチルアントラニル酸	Q 166.1 q 166.1	130.0 148.0	90 90	17 5
6 4-メチルアセトアニリド	Q 150.1 q 150.1	108.0 93.0	100 100	13 25
7 5-アミノ-2-クロロピリジン	Q 129.1 q 129.1	93.0 66.0	120 120	18 25
8 4-クロロアニリン	Q 128.1 q 128.1	93.0 75.0	120 120	17 30
9 2,6-ジメチルアニリン	Q 122.1 q 122.1	105.1 77.0	110 110	16 25
10 2,6-ジクロロアニリン	DAD (MS レスポンスなし)			

表 1

分析した化合物のデータ取り込みパラメータ。Q = 定量用のトランジション、
q = 確認用のトランジション

化学物質

PGI と API は、すべて Sigma-Aldrich から入手しました。

- 塩酸プピバカイン、>99 %、5 g
- クロルヘキシジン、98 %、25 g
- 塩酸リドカイン水和物、固体、15g
- ジクロフェナクナトリウム、10 g

標準溶液

PGI の各原液 (1~3 mg/mL) をアセトニトリルで調製しました。溶液を混合し、アセトニトリルで希釈し、100 µg/mL の混合液を作成しました。この混合液を用いて、較正用溶液と標準溶液を調製しました。

サンプル前処理

以下の API を選択しました:

- 塩酸プピバカイン (純度 99 % 以上)
- 塩酸リドカイン (純度 99 % 以上)
- クロルヘキシジン二酢酸 (純度 97.5 % 以上)
- ジクロフェナクナトリウム (純度 98 % 以上)

サンプル前処理手順を以下に示しています。一部の API は、超音波攪拌で完全に溶解しませんでした。抽出溶媒における PGI の溶解度は良好で、スパイク実験では 70 % を超える回収率が示されています。

- サンプル 120 mg を計量し、1.5-mL エッペンドルフチューブに入れる
- 必要に応じてスパイク溶液を加える
- 1.2 mL アセトニトリルを加える (API は 10 %)
- ボルテックス、30 秒
- 超音波攪拌、5 分
- ボルテックス、30 秒
- 遠心分離、13,000 rpm、2 分
- シリンジフィルターで溶液をろ過する (ポアサイズ 0.2 µm、再生セルロース、Agilent p/n 5061-3366)

結果と考察

メソッドの最適化

3 種類のカラム長さ (5、10、15 cm) と 2 種類の有機モディファイヤー溶媒のモディファイヤー (メタノールとアセトニトリル) を用いて、6 種類の汎用メソッドを開発しました。移動相 A は常に 0.05 % ギ酸水溶液としました。MS 条件は、すべてのメソッドで一定としました。LC/MS/MS MRM 条件については、各ターゲット化合物の濃縮溶液 (10 ppm) を用いて選択しました。Agilent MassHunter Optimizer ソフトウェアを用いて、各 PGI のプロダクトイオン、最適なフラグメンター電圧、衝突エネルギーを自動的に決定しました。

API サンプル溶液がきわめて濃縮されており (10 % API)、サンプル溶媒が 100 % アセトニトリルであることから、強いサンプル溶媒に起因するピークの歪みや拡散を避けるためには、少量の注入が不可欠となります。また、UV 検出や MS イオン化における干渉を除去または低減し、API と PGI の分離を最大化するためには、主要化合物のピーク幅をできるだけ狭くする必要もあります。そのため、注入量は 1 μL としました。

10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 標準溶液 (100 mg/mL API 溶液で API 中 0.1 ppm に相当) の分析で得られた抽出イオンクロマトグラムを図 3 に示しています。この分析には、1.8 μm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD 粒子を充てんした 100 $\text{mm} \times 2.1 \text{ mm}$ カラムを使用しました。ギ酸 (0.05 %) 水溶液/アセトニトリルのグラジエントを使用しました。

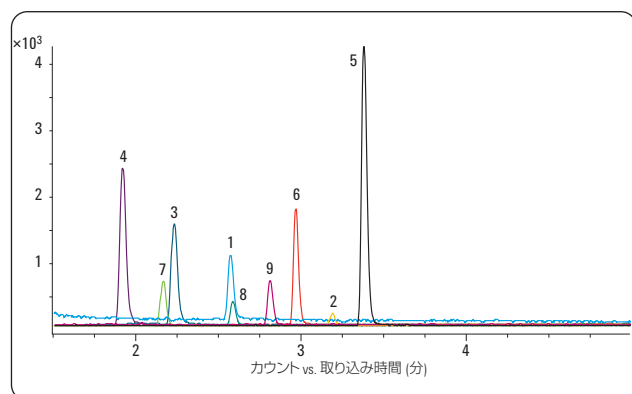


図 3
10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 標準溶液の MRM 分析により得られた抽出イオンクロマトグラム。
カラム: 100 mm 、モディファイヤー: アセトニトリル

PGI 1~9 は容易に検出できました。注入量 1 μL では、Jet Stream ESI イオン源および MRM モードを用いた場合の標準溶液の検出下限は、2 ng/mL 未満でした。

分析対象 PGI のうちの 1 種類 (PGI10、2,6-ジクロロアニリン) は、エレクトロスプレーイオン化 MS ではレスポンスが低く、DAD のみで検出できました。この化合物の UV スペクトルが最大値を示したのは 238 nm と 296 nm で、いずれの波長についても評価しました。トリプル四重極型検出器に比べて感度が低下するため、サンプルの注入量を増やしました。PGI10 は分析対象化合物のなかでもっとも保持力が高いため、多めの注入量 (5 μL) で分析しました。10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 標準溶液を 1 μL 注入および 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 標準溶液を 5 μL 注入した場合の比較を図 4 に示しています。注入量が 5 μL の場合、溶出の早い化合物で深刻なバンド拡散やピークの歪みが観察されましたが、効率や感度を損なわずに保持力の高い

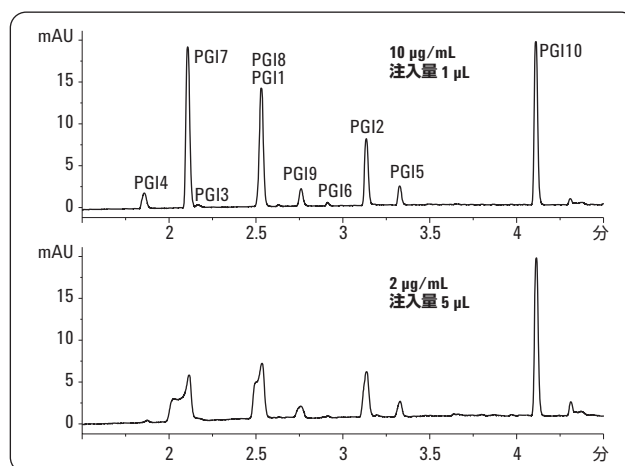


図 4
標準溶液のクロマトグラム。カラム: 100 mm 、モディファイヤー: アセトニトリル、検出: DAD 296 nm

PGI10 を測定することができました。PGI10 については、DAD 検出を用いた場合の標準溶液の検出下限は 10 ng/mL 未満でした (注入量 5 μL)。

6 種類のメソッドのバリデーションを実施しました。0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MS/MS) および 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DAD) の範囲の濃度について、直線性を測定しました。MS/MS については 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DAD については 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で再現性 ($n=5$) を測定しました。検出下限については、0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MS/MS) および 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DAD) で測定した S/N から算出しました。メソッドバリデーションデータを表 2 にまとめています。

直線性 ¹	PGI1	PGI2	PGI3	PGI4	PGI5	PGI6	PGI7	PGI8	PGI9	PGI10 238 nm	PGI10 296 nm
ACN, 50 mm	0.9996	0.9997	0.9994	0.9986	0.9997	0.9999	0.9989	0.9997	0.9997	0.9999	0.9999
ACN, 100 mm	0.9990	0.9999	0.9993	0.9905	0.9978	0.9997	0.9999	0.9996	0.9998	0.9999	0.9999
ACN, 150 mm	0.9989	0.9980	0.9989	0.9991	0.9999	0.9994	0.9996	0.9993	0.9989	0.9999	0.9997
MeOH, 50 mm	0.9999	0.9995	0.9997	0.9977	0.9995	0.9998	0.9999	0.9996	0.9999	0.9999	0.9999
MeOH, 100 mm	0.9994	0.9998	0.9999	0.9989	0.9999	0.9998	0.9996	0.9998	0.9992	0.9999	0.9999
MeOH, 150 mm	0.9998	0.9993	0.9999	0.9889	0.9991	0.9999	0.9996	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999
再現性 ²	PGI1	PGI2	PGI3	PGI4	PGI5	PGI6	PGI7	PGI8	PGI9	PGI10 238 nm	PGI10 296 nm
ACN, 50 mm	1.86	2.26	0.97	1.79	1.62	1.98	0.29	1.34	1.49	3.82	1.14
ACN, 100 mm	1.68	1.45	0.36	1.65	2.38	2.23	2.03	1.86	1.25	1.26	2.70
ACN, 150 mm	1.30	1.48	0.75	1.68	0.94	0.54	1.39	1.84	1.22	1.15	3.68
MeOH, 50 mm	1.70	1.81	0.72	1.50	0.91	1.33	0.38	1.94	1.08	4.57	4.83
MeOH, 100 mm	1.76	2.29	1.07	1.04	0.61	1.15	1.02	0.55	1.10	3.19	0.90
MeOH, 150 mm	1.60	2.16	0.93	1.39	1.00	1.43	1.81	0.68	1.69	3.21	5.75
感度	PGI1	PGI2	PGI3	PGI4	PGI5	PGI6	PGI7	PGI8	PGI9	PGI10 238 nm	PGI10 296 nm
S/N ³	13.4	4.0	10.1	46.0	100.9	25.0	30.2	3.6	6.6	8.2	6.1
LOD (ng/ml)	0.5	1.5	0.6	0.1	0.1	0.2	0.2	1.7	0.9	3.7	4.9

- MS: 0.002~1 µg/mL、注入量 1 µL、各濃度につき 1 回注入
DAD: 0.01~2 µg/mL、注入量 5 µL、各濃度につき 1 回注入
- MS: 0.1 µg/mL、注入量 1 µL、5 回連続注入
DAD: 0.2 µg/mL、注入量 5 µL、5 回連続注入
- 0.002 µg/mL (MS) および 0.01 µg/mL (DAD) で測定したシグナル/ノイズ比。S/N=3 について LOD (ng/mL) を算出。
100-mm カラムでアセトニトリルを用いて分析を実施。

表 2
メソッド性能のバリデーション結果

すべてのメソッドできわめて良好な性能が得られ、最初に溶出する PGI4 ($r^2 = 0.990$, 100 mm カラムとアセトニトリルを使用) を除き、 r^2 値は 0.995 を超えました。MRM モードを用いた場合の RSD は、おおむね 3 % 未満でした。

カラム長さの影響

API 中の PGI の測定における最大の障壁は、ターゲット化合物が API (または比較的濃度の高い他の不純物) と共溶出する可能性があることです。特に、汎用メソッドを用いる場合、その可能性は高くなります。この種の分析では、クロマトグラフィ分離能が重要な要件です。不純物の回収と正確な定量において、分離を向上させ、主成分 (または濃度の高い不純物) の干渉を低減させるためには、効率とピークキャパシティの向上が有効な手段となります。効率を高める簡単な方法は、カラム長さを長くすることです。

内径と粒子サイズが同じで、長さの異なる 3 種類のカラムを比較しました。各分析で選択性を維持するために、それぞれに応じてグラジエント時間を変更しました (比例メソッド)。精度におけるカラム長さの影響を図 5 に示しています。この図では、PGI6 標準溶液と、PGI6 1 ppm を添加したブピバカインサンプル溶液の MRM EIC を重ねて表示しています。PGI6 は、大きなブピバカインピークのテーリングの近くで溶出します。図 5 では、DAD で検出したブピバカインピークの終了時間を矢印で示しています。

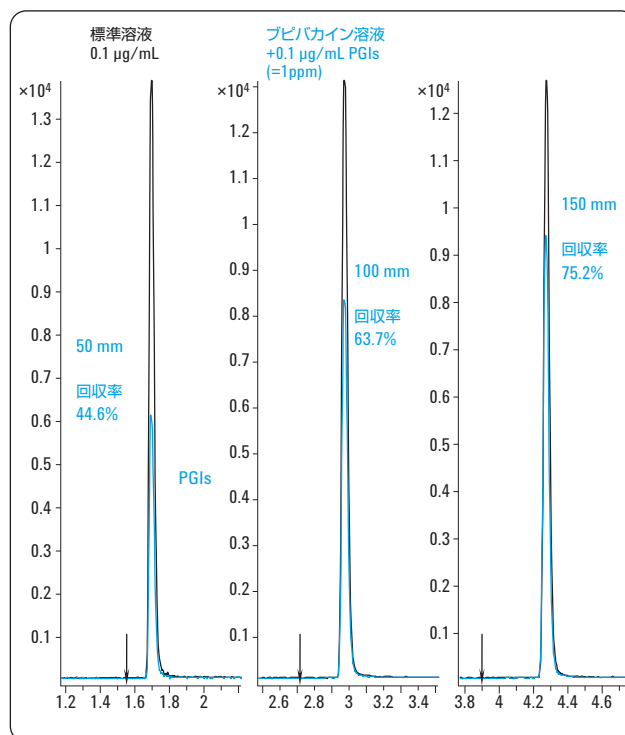


図 5
長さの異なるカラムにおける標準溶液およびブピバカイン溶液に含まれる PGI6 の分析結果の比較。モディファイヤー: アセトニトリル、検出: MS、150.1>108.0 m/z。矢印は DAD で検出したブピバカインピークの終了時間を示しています。

50 mm カラムを使うと、PGI6 の溶出時間が API に近すぎ、レスポンスは標準溶液中で同量を注入した場合の 45 % しかありません。100 mm カラムでは、API と PGI6 の分離能が向上し、回収率 (精度) も 64 % に増加しています。150 mm カラムでは、分離能と精度はさらに向上しています (回収率 > 75 %)。この例は、微量分析における高分離能 HPLC の効果を明確に示しています。汎用メソッドを用いる場合は、この効果は特に大きくなります。

選択性の調整

カラムの長さのほか、選択性を調整する手法でも、分離能 (ひいては PGI 測定の精度) を高めることができます。有機溶媒のモディファイヤー (アセトニトリルまたはメタノール) を変更し、選択性を変化させました。選択性における有機溶媒のモディファイヤーの影響は、アプリケーションによってはきわめて大きくなる場合があります。モディファイヤーはメソッドパラメータの 1 つなので、メソッド開発の際に、バッファ組成や pH よりも簡単に変更できます。メタノールまたはアセトニトリルの使用

が分離に及ぼす影響がよくわかるのは、ジクロフェナク溶液中の PGI10 の分析です。PGI10 は、ジクロフェナクの既知の不純物です。分析により得られた DAD クロマトグラム (296 nm) を図 6 に示しています。この図では、添加および非添加ジクロフェナク溶液の分析において、有機溶媒のモディファイヤーとしてメタノールを使用したケースとアセトニトリルを使用したケースを比較しています。メタノールを使うと、製剤原料に起因する不純物が、6.25 分で PGI10 と共溶出します。そのため、事前に予防策をたてておかないと、偽陽性データが生じたり、PGI10 の量を過大に評価したりする可能性があります。メタノールをアセトニトリルに交換すると、2 つの不純物はベースラインで分離され、ジクロフェナク溶液中には検出可能な量の PGI10 が存在しないことがわかります。

各種 API におけるメソッド性能

4 種類の API について、10 種類の PGI を濃度 0.1 ppm で添加する前と添加した後に分析を行いました。各不純物について、サンプル溶液の回収率を、同じ濃度の PGI を含む標準混合物と比較しました (= 精度 = (サンプルにおけるレスポンス/標準におけるレスポンス)*100)。分析にあたっては、長さ 50、100、150 mm のカラムとメタノールおよびアセトニトリルを使用しました (6 つのメソッド)。PGI10 については、238 および 296 nm で DAD により検出しました。結果を表 3 にまとめています。この表では、各 PGI のリテンションタイムと、各 API のリテンションタイム幅も示しています。灰色のエリアは、与えられた条件において PGI が API と共溶出していることを示しています。この場合、回収率はきわめて低くなっています。リドカインとクロルヘキシジンについては、それぞれ PGI 9 と PGI 8 を大量に含んでいるため、回収率を算出できませんでした。リドカインに含まれていた PGI9 は 2 ppm 以上、クロルヘキシジンから検出された PGI8 は 20 ppm 以上でした。

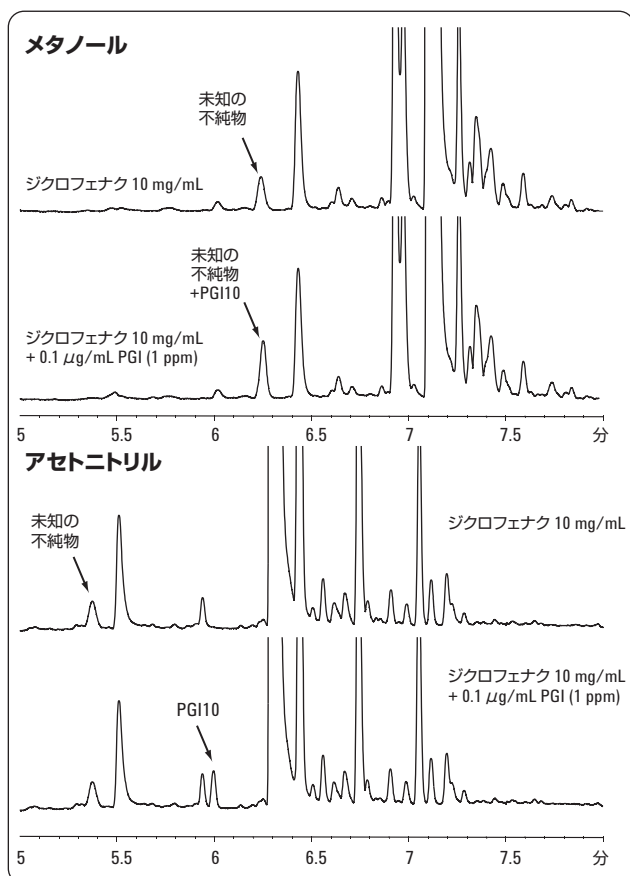


図 6 添加および非添加ジクロフェナク溶液中の PGI10 の分析において、有機溶媒のモディファイヤーとしてメタノール (上) を使用したケースとアセトニトリル (下) を使用したケースの比較。カラム長さ: 150 mm、検出: DAD 296 nm

		PGI1	PGI2	PGI3	PGI4	PGI5	PGI6	PGI7	PGI8	PGI9	PGI10 238 nm	PGI10 296 nm	
0.1 ppm													
ACN, 50 mm	リテンションタイム	1.50	1.80	1.30	1.15	1.90	1.70	1.25	1.50	1.60	2.25	2.25	
	リドカイン	0.65-1.30	22.5	38.7	0.0	0.0	52.8	32.6	0.0	16.3	(a)		
	プビバカイン	1.35-1.55	0.0	58.4	78.5	81.3	73.1	43.5	78.8	0.0	0.0		
	クロルヘキシジン	1.45-1.55	4.4	81.5	86.7	70.0	51.8	64.3	78.0	(a)	80.1		
	ジクロフェナク	>2.30	86.7	90.4	97.8	118.4	62.5	96.3	92.7	101.1	94.7	77.9	94.8
ACN, 100 mm		2.60	3.20	2.25	1.95	3.40	3.00	2.15	2.60	2.80	4.10	4.10	
	リドカイン	1.40-2.25	43.1	72.6	0.0	0.0	69.4	51.3	1.3	35.6	(a)		
	プビバカイン	2.35-2.70		83.4	83.5	82.5	91.2	64.3	83.4	0.0	52.8		
	クロルヘキシジン	2.50-2.70	2.3	91.6	94.6	65.0	53.3	80.6	61.8	(a)	91.9		
	ジクロフェナク	>4.25	88.3	96.1	94.7	95.0	61.4	94.2	93.3	104.2	97.6	88.8	87.7
ACN, 150 mm		3.70	4.60	3.20	2.75	4.90	4.30	3.10	3.70	4.05	6.00	6.00	
	リドカイン	2.10-3.15	63.6	73.5	0.0	0.0	85.1	64.5	1.6	45.4	(a)		
	プビバカイン	3.50-3.90	0.0	84.6	80.6	105.5	108.6	81.0	89.5	0.0	66.5		
	クロルヘキシジン	3.65-3.95	60.0	92.8	101.6	77.9	58.3	89.4	73.0	(a)	94.3		
	ジクロフェナク	>6.20	104.2	91.6	101.9	82.6	60.6	102.9	95.8	106.0	101.3	112.5	136.5
MeOH, 50 mm		1.35	1.75	1.35	1.10	2.20	1.90	1.25	1.40	1.65	2.35	2.35	
	リドカイン	0.65-1.40	0.0	38.5	0.0	0.0	56.3	38.5	0.0	0.0	(a)		
	プビバカイン	1.50-1.85	74.0	0.0	88.2	99.6	72.1	33.9	82.2	97.0	0.0		
	クロルヘキシジン	1.75-1.95	82.4	78.7	93.9	74.5	44.5	0.0	82.3	(a)	86.1		
	ジクロフェナク	>2.55	98.4	92.3	100.1	108.3	65.0	95.2	99.6	67.7	95.4	(b)	(b)
MeOH, 100 mm		2.40	3.10	2.35	1.85	3.95	3.40	2.15	2.45	2.90	4.30	4.30	
	リドカイン	1.35-2.40	29.0	49.2	0.0	0.0	74.7	56.7	0.4	6.5	(a)		
	プビバカイン	2.75-3.20	99.9	0.0	94.4	102.8	91.9	62.8	95.0	96.2	0.0		
	クロルヘキシジン	3.20-3.45	86.2	98.9	107.3	103.0	52.2	6.4	75.9	(a)	107.5		
	ジクロフェナク	>4.70	107.3	105.8	107.3	112.6	67.7	99.7	101.8	107.2	108.0	(b)	(b)
MeOH, 150 mm		3.40	4.45	3.40	2.65	5.75	4.90	3.10	3.50	4.15	6.25	6.25	
	リドカイン	2.00-3.45	30.5	77.2	0.0	0.0	82.7	55.1	0.0	0.0	(a)		
	プビバカイン	4.05-4.65	85.7	0.0	77.1	111.0	94.8	56.3	90.6	87.4	8.6		
	クロルヘキシジン	4.55-5.00	85.3	126.1	84.4	128.7	84.5	3.2	75.7	(a)	97.2		
	ジクロフェナク	>6.90	78.3	102.4	86.2	109.1	59.7	97.0	97.7	99.9	97.5	(b)	(b)

(a) API 中に大量に存在。回収率を算出できず。
(b) PGI10 が他の不純物と共溶出。DAD のデータなし (図 6 も参照)。

表 3

PGI 0.1 ppm を添加した API 溶液の分析結果 (回収率, %)。灰色のエリアは、与えられた条件において PGI が API と共溶出していることを示しています。

図 7 には、PGI を 1 ppm の濃度で添加したクロルヘキシジン溶液の分析例を示しています。DAD クロマトグラムでは、4.5~5 分で API の大きなピークが検出されたほか、一連の不純物や関連物質のピークも検出されています。MRM データ取り込みにより得られた抽出イオンクロマトグラムも示しています。抽出イオンクロマトグラムでは、PGI 1~9 が検出されています。図中の括弧内では、PGI の標準溶液と添加サンプル溶液の比較により算出した回収率を示しています。ほとんどの PGI で、良好な結果が得られています。精度は 70 %~130 % で、これは製薬微量分析 (限界試験) における一般的な限界値です。PGI8 は、添加濃度よりも大幅に高い濃度で、もともとの API に存在しています。そのため、このサンプルにおいては、PGI8 の回収率を測定することは不可能です。API と部分的に共溶出する PGI6 については、強度のイオン抑制の影響で、回収率 (精度) が大幅に低くなっています。

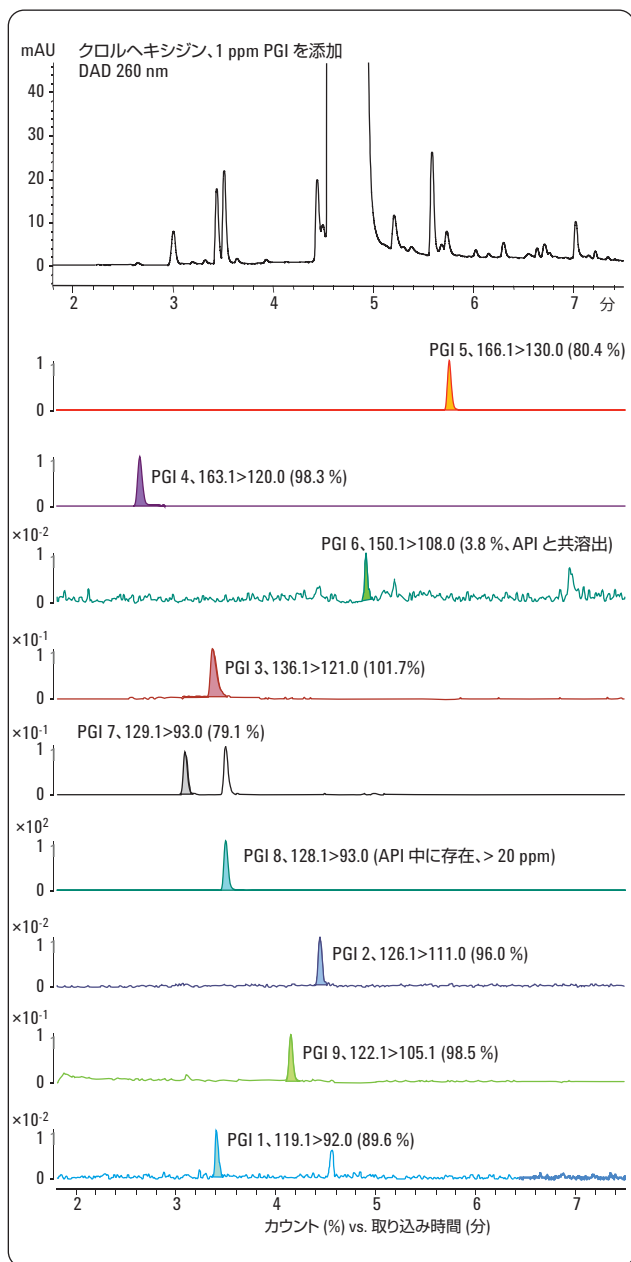


図7
1 ppm PGI を添加したクロルヘキシジンサンプルの DAD 分析結果およびクオンティファイアトランジション。カラム長さ: 150 mm、モディファイヤー: メタノール。トランジションと算出した回収率を示しています。

この分析では、選択性の調整が必要でした。メタノールをアセトニトリルに交換し、分析を繰り返しました。図8では、このメソッドで得られた MRM トランジションクロマトグラムと、メタノールを用いて得られたクロマトグラムを比較しています。同じサンプルを注入していますが、新たなメソッドを用いた場合には、PGI6 の回収が明らかに観察されています。この例は、選択性の調整というアプローチがきわめて効果的であることを示しています。

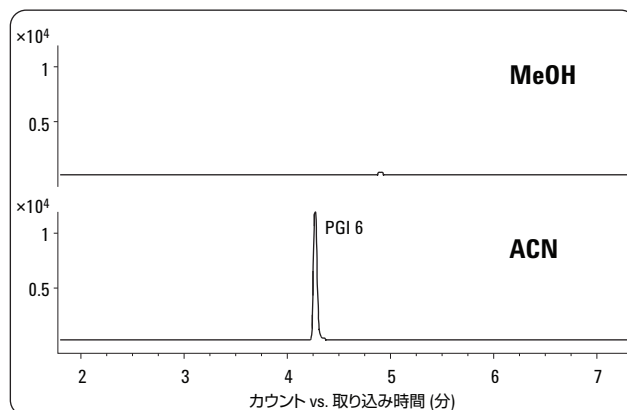


図8
クロルヘキシジン中 PGI6 (0.1 ppm で添加) の測定、150 mm カラム、メタノール (上) およびアセトニトリル (下) をモディファイヤーとして使用

有機溶媒のモディファイヤーの変更により選択性を調整するもう1つの例として、プピバカインに含まれる PGI1 の分析例を図9に示しています。アセトニトリル (図8A および B) およびメタノール (図8C および D) を用いた場合の標準溶液とサンプル溶液の MRM トランジションは、API (アセトニトリルを使用、100 mm カラム、2.35~2.70 分で溶出) の存在により、PGI1 のイオン化が完全に抑制されていることを示しています。メタノールを使用すれば、PGI1 はプピバカインと分離し、微量レベルの検出が可能になります。この例では、アセトニトリルよりもメタノールが適しています。

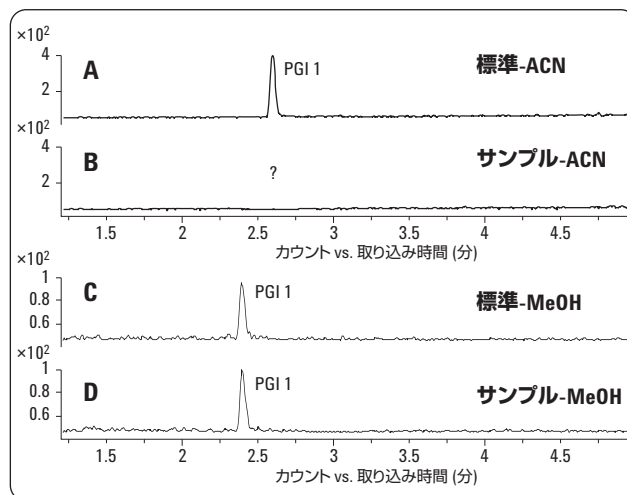


図9
プピバカイン中 PGI1 (0.1 ppm で添加) の測定、100 mm カラム

分析スピードの向上

十分な分離能が得られている場合、短いカラムを使えば、分析スピードとサンプルスループットを大幅に向上させることができます。DAD 検出を用いた UHPLC による PGI10 の分析では、この点が示されています。図 3 のクロマトグラムから、アセトニトリルを使用した場合に最適な分離能が得られることがわかっています。50 mm のカラムと速い (比例) グラジエントを使用すると、分析時間を 3 分の 1 に短縮できます。この例を図 10 に示しています。サンプル中の PGI10 は 1 ppm のレベルで検出されています。

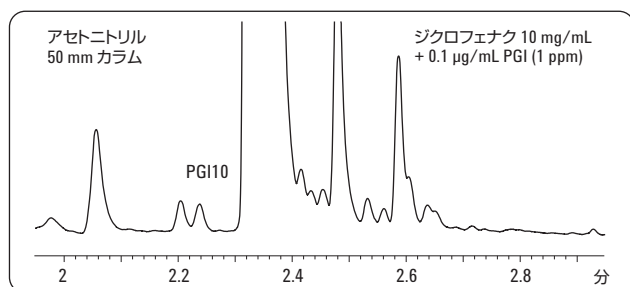


図 10
ジクロフェナク中 PGI10 (1 ppm で添加) の測定、50 mm カラム、
ACN モディファイヤー、DAD 検出

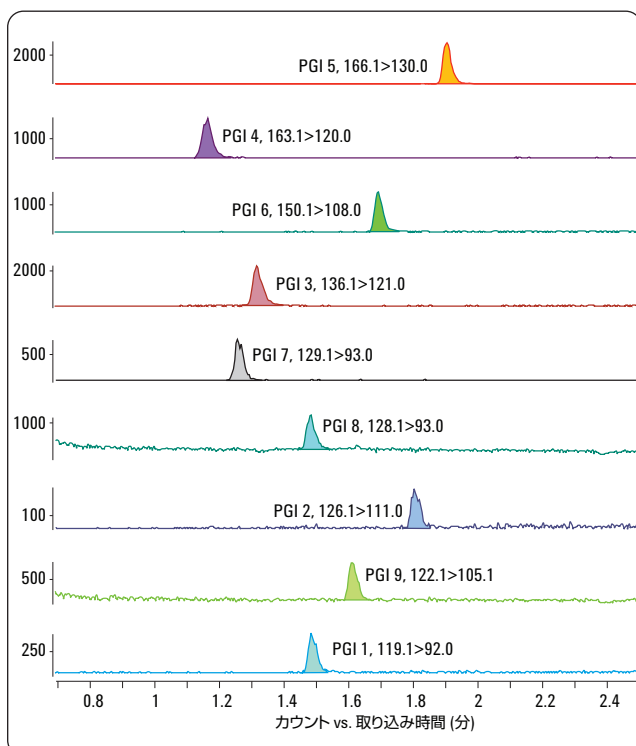


図 11
ジクロフェナク中 PGI 1~9 (0.1 ppm で添加) の測定、50 mm カラム、
ACN モディファイヤー

図 11 に示すように、50 mm カラムを用いた同じ高速 UHPLC メソッドを用いた場合、同じサンプルに含まれる他の PGI も、MRM MS/MS により検出することができます。

まとめ

Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent G6460A トリプル四重極 LC/MS システムを使えば、API に対する相対濃度が 1 ppm を大幅に下回るレベルで、アリアルアミン PGI およびアミノピリジン PGI を分析できます。有機溶媒のモディファイヤーとカラム長さを変えれば、選択性やピークキャパシティ/分離能を調節することができます。この汎用アプローチは、初期段階のメソッド開発や、メソッド最適化に先立つスクリーニング手順などに使用できます。2,6-ジクロロアニリンの検出下限は、MS/MS では 20 ppb 未満 (API に対して)、DAD では 100 ppb 未満 (API に対して) でした。MS では、微量レベルの 2,6-ジクロロアニリンは検出できませんでした。

参考文献

1. L. Müller, R.J. Mauthe, C.M. Riley, M.M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. DeGeorge, A.G.M. De Knaep, D. Ellison, J.A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C.D.N. Humfrey, A.S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D.K. Ness, M.R. O' Donovan, M.D. Smith, G. Vudathala, L. Yotti, Regul. Toxicol. Pharmacol. 44 (2006) 198-211.
2. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities, CHMP, June 2006, <http://www.emea.europa.eu>.
3. F. David, K. Jacq, G. Vanhoenacker, P. Sandra, A. Baker, LCGC Europe 22 (2009) 552-561.
4. G. Vanhoenacker, E. Dumont, F. David, A. Baker, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3563-3570.
5. S. Joseph, 「Agilent 1200 シリーズ LC 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」、アジレント・テクノロジー、アプリケーションノート、資料番号 5990-4460JAJP, August 2009.

www.agilent.com/chem/jp:lc

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2010
June 1, 2010
Publication Number 5990-5732JAJP

