



Q-TOF LC/MS と Advanced ソフトウェアソリューションを使用した 潜在的遺伝毒性分解不純物の スクリーニングと同定

アプリケーションノート

医薬品

著者

Siji Joseph,
Syed Salman Lateef, Vinayak A.K, and
Sreelakshmy Menon
Agilent Technologies
Life Science Centre India

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent LC および LC/MS システムをさまざまな Agilent ソフトウェアソリューションと組み合わせて使用することで、潜在的遺伝毒性分解物をスクリーニングし、同定し、単離する方法について説明します。この実験では、試験対象物として酸化分解アトルバスタチンカルシウムを使用しました。Agilent 1290 Infinity LC システムで分解の程度をスクリーニングし、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS システムで MS および MS/MS 情報を取得して不純物を同定しました。Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアおよび Agilent Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアでデータを処理し、分解物の候補となる構造を提示しました。MSC によって提示されたリストから、遺伝毒性の可能性を示す官能基を持つ不純物に遺伝毒性不純物のラベルを付けました。これらの遺伝毒性不純物の MS/MS フラグメンテーションパターンを既知の類似した構造と比較して結果を確認しました。アジレントのマスベースフラクションコレクションシステムを使用して、遺伝毒性不純物の分画を複雑な分解サンプルから単離しました。この分離プロセスをスケールアップすると、NMR などの技術を使用した詳細な構造確認に対応する十分な量の不純物を確保することができます。



Agilent Technologies

はじめに

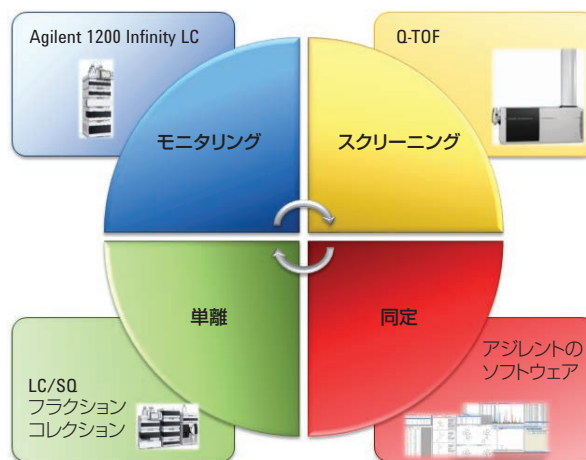
製剤原料の純度は、薬剤の安全性と品質にとって非常に重要です。多くの薬剤は環境条件に対する感度が高く、分解しやすいものです。事前に設定されたストレス条件の下で製剤原料の安定性プロファイルを調べることは標準的な作業です。処理または保管時に一部の薬剤が酸化分解することで遺伝毒性不純物が生成されることがあります。医薬品メーカーは、低濃度の遺伝毒性不純物をモニタリングし、同定することが求められています。

2009年に Matja らがアトルバスタチンの酸化分解メカニズムとエポキシド不純物の生成を確認しました¹。Grahek らは2011年にこの結果を強調しています²。エポキシドは、エポキシド環が歪んでいるため求電子性を持っています^{3, 4}。このような化学反応性により、多くの脂肪酸および芳香族エポキシドには変異原性があります⁵。ペルオキシラジカルはアルケンと反応し、ヒドロペルオキシドを生成することがあります。エポキシド分析に最も一般的に使用される分析技術は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) です⁵。このアプリケーションノートでは、MS/MS データを使用してアトルバスタチンから生成される微量の潜在的遺伝毒性エポキシド分解物をスクリーニングし、同定するための迅速で信頼性の高いソフトウェア支援ソリューションについて説明します。このメソッドでは、詳細な特性解析を行うための遺伝毒性不純物のマスベースフラクションコレクションを示します。

実験方法

試薬および薬品

アトルバスタチンカルシウム製剤原料を Aldrich から購入しました。分析に使用するすべての溶媒は LC/MS グレードのもので、Fluka から購入しました。緩衝液と試薬は Aldrich から購入しました。純水は、Milli Q 純水生成装置 (Millipore、米国) で生成しました。



使用機器

次で構成される Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システムを使用して HPLC/UV 分析を実行しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ 4220A
- Agilent 1290 Infinity オートサンブラ G4226A
- Agilent 1290 Infinity サーマスタット G1330B

- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント G1316C
- Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 G4212A、60 mm Max-Light フローセル付き (p/n G4212-60007)
- Agilent ChemStation OpenLab CDS ソフトウェア (v. C.01.05) を使用クロマトグラフィーパラメータを表 1 に示します。

表 1. Agilent 1290 Infinity LC システムのクロマトグラフィー分析条件

緩衝液	3.9 g/L の酢酸アンモニウム水溶液、氷酢酸で pH 5.0 に調整	
移動相	A) アセトニトリル、テトラヒドロフラン、緩衝液 (21:12:67) B) アセトニトリル、テトラヒドロフラン、緩衝液 (61:12:27)	
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C8、2.1 × 100 mm、2.7 μm カラム、30 °C	
注入量	1.5 μL	
ニードル洗浄	50:50 メタノール:水	
流量	0.31 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	移動相 B (%)
	0	0
	16	0
	28	80
	34	100
	40	100
	42	0
	46	0
DAD	シグナル 244/4 nm、60 mm フローセル、> 0.05 分 (5 Hz)	

不純物をスクリーニングするために、Agilent 1290 Infinity LC システムを、Agilent Jet Steam (AJS) デュアルソースを使用する Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS に結合しました。Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェア (B.05.01) によりデータを取り込みました。表 2 に 6530 Q-TOF LC/MS の取り込みおよびイオン源のパラメータを示します。

不純物の単離のために、Agilent 6150 シングル四重極 LC/MS システムおよび Agilent 1260 Infinity フラクションコレクタ Bio-FC-AS (G5664A) モジュールを Agilent 1290 Infinity バイナリ LC システムに接続し、Agilent ChemStation OpenLab CDS ソフトウェアを使用して動作させました。1260 Infinity フラクションコレクタの動作条件を表 3 に示します。

手順

製剤原料を 3% 過酸化水素を用いて 40 °C で 24 時間処理し、アトルバスタチンカルシウムを酸化分解しました。不安定な水素を持つ官能基は酸化されやすく、ヒドロペルオキシド、水酸化物、またはケトンを形成します。USP (米国薬局方) に記載されたアトルバスタチンの液体クロマトグラフィーアッセイメソッドを使用し、1290 Infinity LC/UV システムで分解の程度をモニタリングしました^{6, 7}。不純物、分解サンプル、および未分解サンプル (コントロール) を、ポジティブとネガティブの両方のイオン化モードを使用した 6530 Q-TOF LC/MS を使用して分析しました。潜在的遺伝毒性を持つ不純物を MassHunter ソフトウェアで同定し、6150 シングル四重極 LC/MS を 1260 Infinity フラクションコレクタに結合して、潜在的遺伝毒性不純物を単離しました。

表 2. Agilent 6530 Q-TOF LC/MS 取り込みパラメータ

取り込みモード	MS および自動 MS/MS
イオンポラリティ	ポジティブとネガティブを交互に使用
ガス温度	275 °C
ガス流速	5 L/min
ネブライザ	45 psi
シースガス温度	325 °C
シースガス流速	12 L/min
ノズル電圧	500 V
フラグメンター	75 V
スキマ	65 V
コリジョンエネルギー	1 V
V Cap	4,000
MS、スキャン範囲	100 ~ 1,700 m/z、1 スペクトル/s
MS/MS、スキャン範囲	50 ~ 1,700 m/z、3 スペクトル/s
アイソレーション MS/MS	中 (4 amu)
ランプコリジョンエネルギー	傾き 5、オフセット 2.5

表 3. Agilent 6150 シングル四重極 LC/MS および Agilent Infinity 1260 Infinity フラクションコレクタのパラメータ

モード	SIM およびスキャンモードでのネガティブイオン化
乾燥ガス流量	8 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
乾燥ガス温度	300 °C
シースガス温度	250 °C
シースガス流速	5 L/min
キャピラリキャップ	1,300 V
ノズル電圧	2,000 V
デュエルタイム	195 msec
コレクタディレイ	0.2 分
フラグメンター	70 V
ピーク幅	0.1 分
フラクショントリガモード	ピークベース
最大ピーク時間	0.5 分
アクティブスプリット比	7:1
周波数	2.222 (Hz)
容量	300 µL
注入量	20 µL (アセトニトリル:水 70:30 を使用した 10 秒間のニードル洗浄)
サンプルターゲット質量	431.1、465.1、501.1
SIM イオン	430.1、464.1

データ解析ワークフロー

Agilent MassHunter Profinder (B.06.00) で、未分解 (コントロール) サンプルと分解サンプルの不純物の違いを抽出しました。次に、抽出した不純物を Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 統計解析ソフトウェア (12.6.1) で解析し、不純物の定量値が 2 倍以上を超えるものをピックアップしてリストを生成しました。MassHunter PCDL マネージャ (B.04.00) で開発したデータベースを使用し、ID ブラウザ (MassHunter Qualitative Software Find by Formula アルゴリズム) でこのリストを検索しました。このデータベースには、文献と Mass-Meta-Site ソフトウェア (4.1.1 Molecular Discovery Ltd) から得られた既知不純物とアトルバスタチン分解物の精密質量および分子式が含まれます。

Agilent MassHunter 分子特性抽出 (MFE) アルゴリズムによって処理された未知不純物 (不純物の定量値が 2 倍以上を超えるもの) のプリカーサおよびフラグメントイオン情報を Agilent Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアにインポートし、候補となる構造が提示されました。MSC ソフトウェアの詳細と、不純物を同定するための複数のアプローチは、アジレントの文献 5991-1375EN に記載されています⁸。MSC での構造検索には次のステップが含まれます。

1. ChemSpider に接続します。
2. 提示された分子式の構造を ChemSpider から検索します。
3. 実験データに基づいて理論上の副構造を割り当てます。
4. 総スコアが設定値よりも低いすべての不純物をフィルタリングし、理論フラグメンテーションが実験で得られたフラグメンテーションパターンと一致する、条件を満たすすべての構造を表示します。

提示された構造のリストから潜在的遺伝毒性不純物を同定し、ラベルを付けました。さまざまなソフトウェアソリューションを使用したデータ解析ワークフローを図 1 にまとめます。

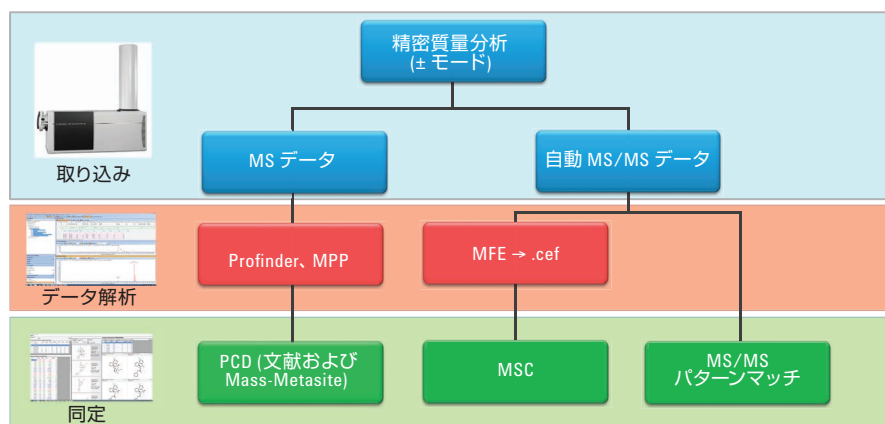


図 1. 既知不純物および未知不純物を同定するためのさまざまな Agilent ソフトウェアツールを使用したソフトウェアワークフロー

結果と考察

分解の程度のモニタリング

修正 USP メソッドを使用して分析したコントロールと分解アトルバスタチンサンプルの HPLC/UV データを図 2 に示します。それまでも存在していた不純物の増加と新たな不純物の形成を含む、4% の分解が観察されました。Agilent Poroshell 120 EC-C8 カラムは、共溶出がほぼなく、ほとんどの不純物ピークの優れたクロマトグラフィー分離を提供しました。

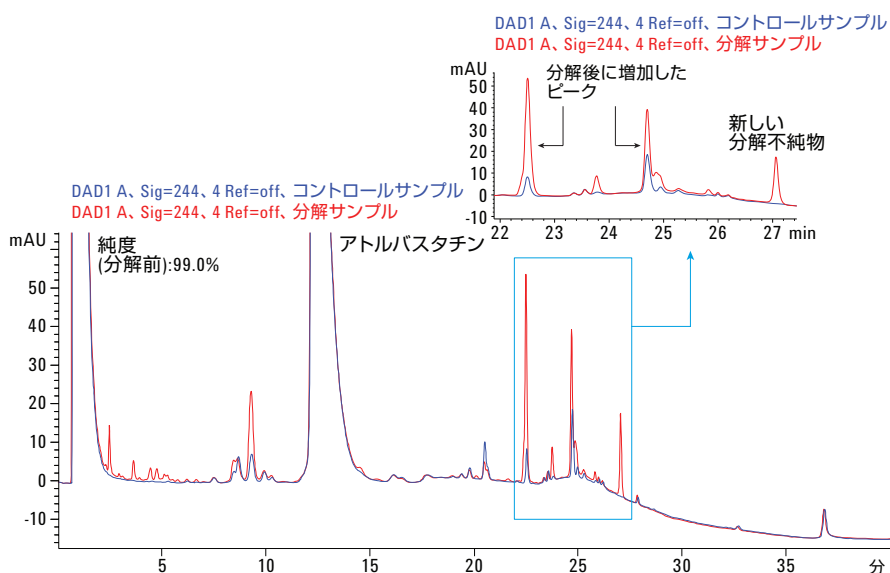


図 2. HPLC-UV メソッドを使用した分解の程度のモニタリング。未分解サンプル (青) と分解サンプル (赤) の 244 nm における UV トレースを重ね合わせました。LC クロマトグラムの一部を拡大し、新しい不純物ピークの形成と不純物ピークの増加を示します。

不純物の精密質量スクリーニング

ポジティブとネガティブの両方のイオンモードを使用した HPLC/Q-TOF 分析によって分解物の存在を確認しました。図 3 に、安定したサンプルと分解サンプルの全イオンクロマトグラム (TIC) を重ねて表示します。

不純物の同定

Agilent MassHunter Profinder のバッチ再帰的特性抽出アルゴリズムにより、分解サンプルまたは未分解サンプルのデータファイル処理しました。結果を Mass Profiler Professional (MPP) にエクスポートし、倍率変化による解析を行いました。質量が 465.1589 の不純物の EIC とスペクトルを示す MassHunter Profinder の画面を図 4 に示します。このピークはブランクと未分解サンプルにはないため、Profinder の結果は質量 465.1589 の不純物が分解時に生成されたことを示します。複数の分析でこれらの観察が確認されました。

図 5 の 4 つの集合のベン図は、未分解サンプルと分解サンプルの不純物を図に示したものです (ポジティブとネガティブの両方のイオンモード)。分解サンプルおよび未分解サンプルの結果の倍率変化による分析から、約 15 種類の不純物に 2 倍を超える変化があったことがわかりました。図 6 に、ポジティブモードとネガティブモードで検出された分解物のベン図を示します。ポジティブモードでは 7 種類の不純物が、ネガティブモードでは 8 種類の不純物が増えました。15 種類の不純物のうち、2 つのアプレギュレーション不純物が共通のものでした。

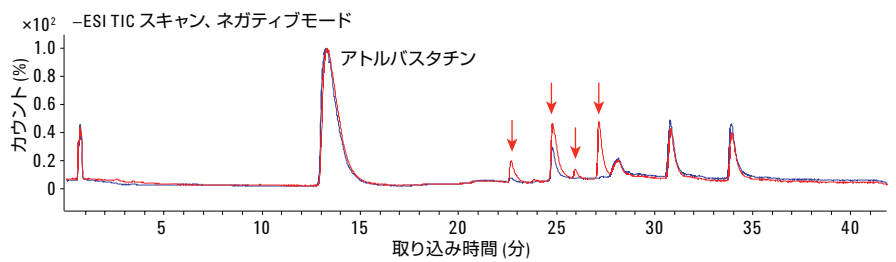


図 3. 未分解サンプルと分解サンプルの TIC の重ね表示。分解サンプルの TIC で観察された新しい重要なピークに印を付けました

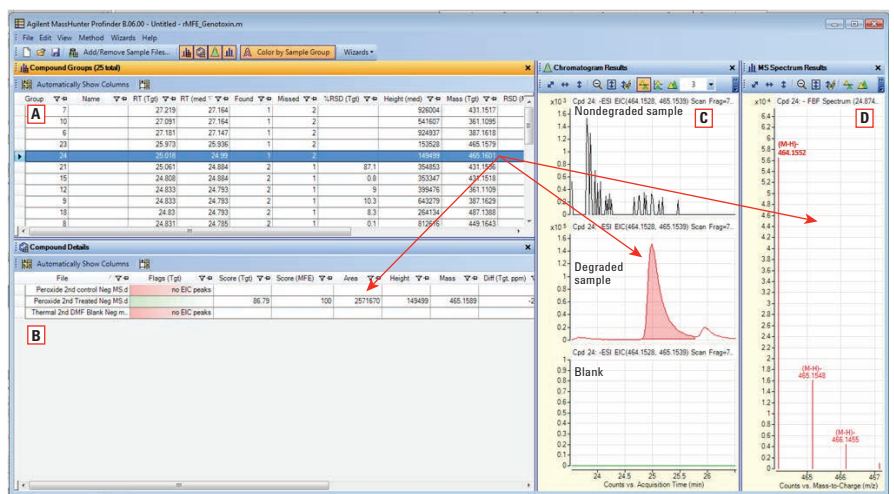


図 4. 分子量 M = 465.1589 の未知不純物について選択した Agilent MassHunter Profinder の結果のスクリーンショット。パネル A は化合物グループテーブルです。ここでは中性粒子質量とリテンションタイムによって化合物の特性が並べられています。パネル B は化合物詳細テーブルです。ここでは、各特性について個別のスコア、フラグ、アバンドランスなどの詳細が表示されます。パネル C には、ブランク、未分解、および分解トレースから選択した m/z の抽出イオンクロマトグラム (EIC) が表示されます。パネル D は、選択したイオンの対応する質量スペクトルが表示されます。

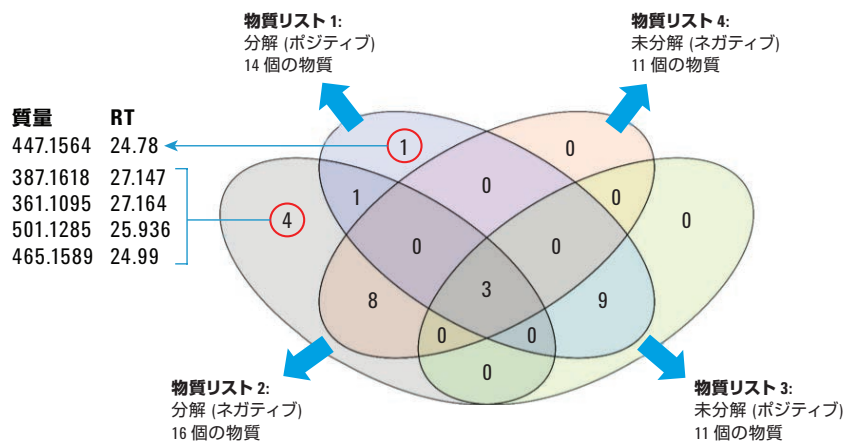


図 5. 安定したサンプルと分解サンプルの間の不純物の分布を示す 4 つの集合のベン図。LC/MS のポジティブおよびネガティブモードの分解サンプルで観察された固有の不純物に赤い丸で印を付けています

これらの 15 種類の不純物の精密質量データを精密質量パーソナル化合物データベース (PCD) で検索したところ、5 種類の既知不純物が同定されました。ここでは、Mass-MetaSite ソフトウェアが示したアトルバスタチンの酸化生成物が含まれます。

分子特性抽出 (MFE) アルゴリズムを使用して Q-TOF MS/MS データを処理し、残りの未同定不純物の MS および MS/MS 情報を抽出しました。この情報を MSC ソフトウェアにインポートし、各未知不純物の推定構造を得ました。MSC は、ppm 単位の質量偏差を用いて、候補となるすべての副構造を各フラグメントイオンについて計算します。図 7 には、質量 465.1578 の未知不純物 (C₂₆H₂₄FN₀₆) の MSC の結果を示すスクリーンショットが含まれます。この結果は、エポキシドおよびヒドロペルオキシド官能基が含まれる潜在的な構造を示しています。すべての検索結果は 10 秒未満で得られました。

15 種類のすべての不純物の構造を同定した後、そのうちの 3 つに遺伝毒性エポキシドおよびヒドロペルオキシド官能基が含まれることがわかりました。提示された注意が必要な構造を図 8 に示します (不純物 I、II、III)。これらの構造は参考文献を使用して確認しました^{1, 2, 9}。不純物 I および II は USP (米国薬局方) に記載されており、Muhammad Ashfaq らは、不純物 III を酸化時に形成される候補となる不純物として示しました⁹(LC/UV データから、不純物 III のパーセンテージ面積は 0.1 % 以下でした)。

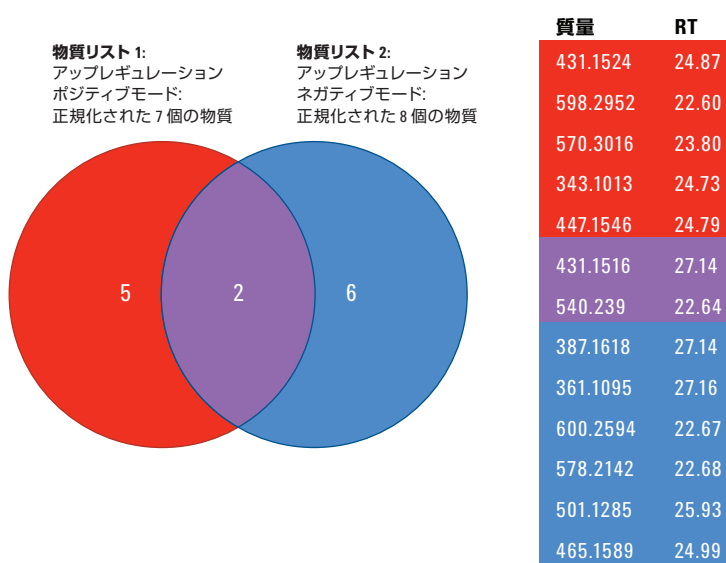


図 6. 倍率変化が 2 を超えるポジティブモードとネガティブモードで見つかった不純物のベン図。記載されたリテンションタイム (RT) から、共溶出している不純物がわずかであることがわかりました。

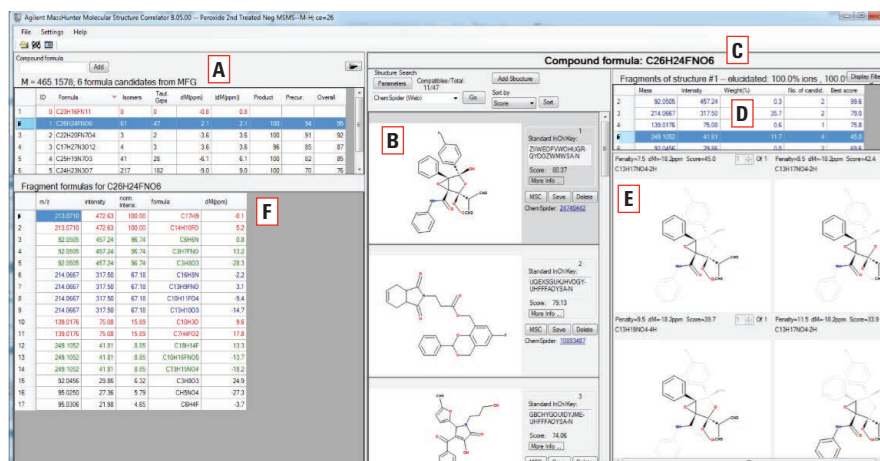


図 7. 質量 465.1578 の未知不純物の MSC の結果のスクリーンショット。
 A) 各 MS/MS フラグメントイオンの精密質量とプリカーサからのニュートラルロスに基づく MFG スコア
 B) 提示された注意が必要な構造は最初の位置にある
 C) 全フラグメントイオン強度の 100 % をこの MSC で説明できるため、総スコアは 80.37 となる
 D) 214.0667 で 2 つなど、複数の異性体構造の候補
 E) 個々の副構造をペナルティとともに表示

MS/MS パターンマッチングを使用した構造の比較

新たに同定された不純物 III (質量 465) の MS/MS フラグメンテーションパターンを既知不純物 II と比較し、構造を確認しました (図 9)。m/z 464.1505 (ネガティブモード、(M-H)⁻) の不純物 III のフラグメンテーションパターンは、不純物 II (m/z 448.1656) のパターンと類似しており、MSC の結果をサポートしています。不純物 II と III は、ヒドロペルオキシド官能基の 1 つの酸素原子が違うだけです。

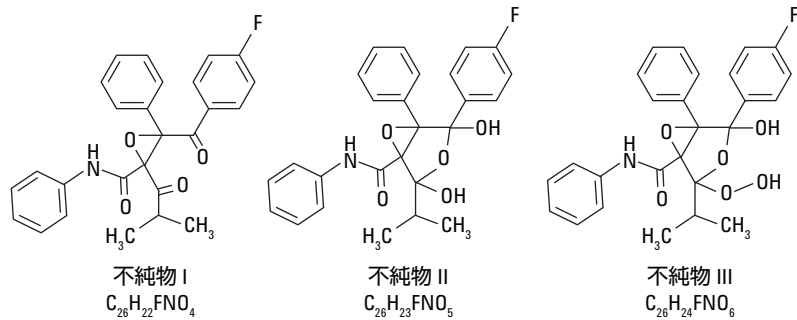


図 8. アトルバスタチンの酸化分解サンプルで見つかった、注意が必要な構造 (エポキシドおよびヒドロペルオキシド官能基) を持つ不純物 (I、II、III)

遺伝毒性不純物の単離

新たに形成された注意が必要な不純物 I および III が質量トリガフラクションコレクションで補集され、ここからアクティブスプリッタによりフローが質量分析装置に向けられました。補集した分画の純度を LC/SQ で分析したところ (図 10)、これらの純度が非常に高いことがわかりました。このプロセスをスケールアップすると、または複数の注入をプールすると、NMR などの技術を使用した詳細な構造確認を行うことができます。

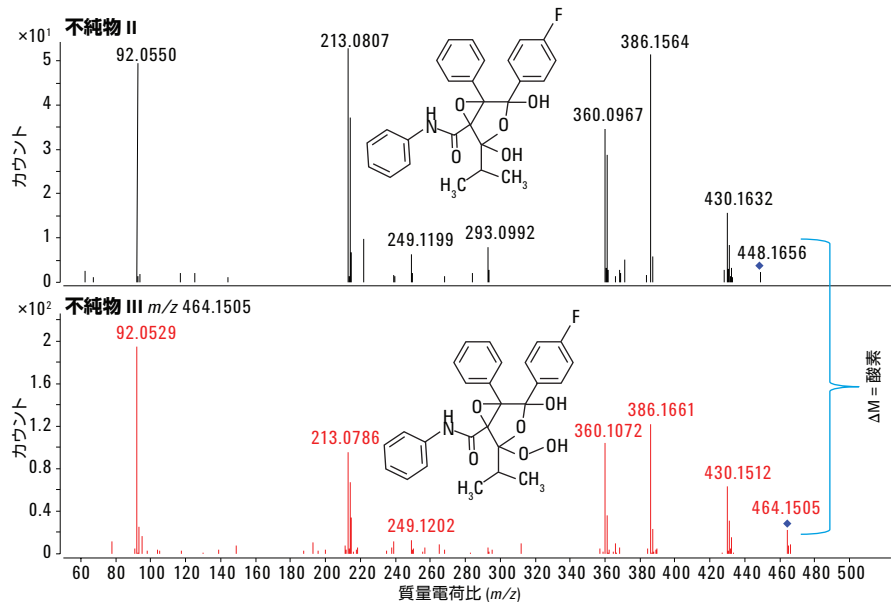


図 9. ネガティブモードで新たに検出された、M:465.4702 (下のトレース) の注意が必要な不純物 III と、M:449.4708 (上のトレース) の注意が必要な既知不純物 II とのフラグメンテーションパターンの比較

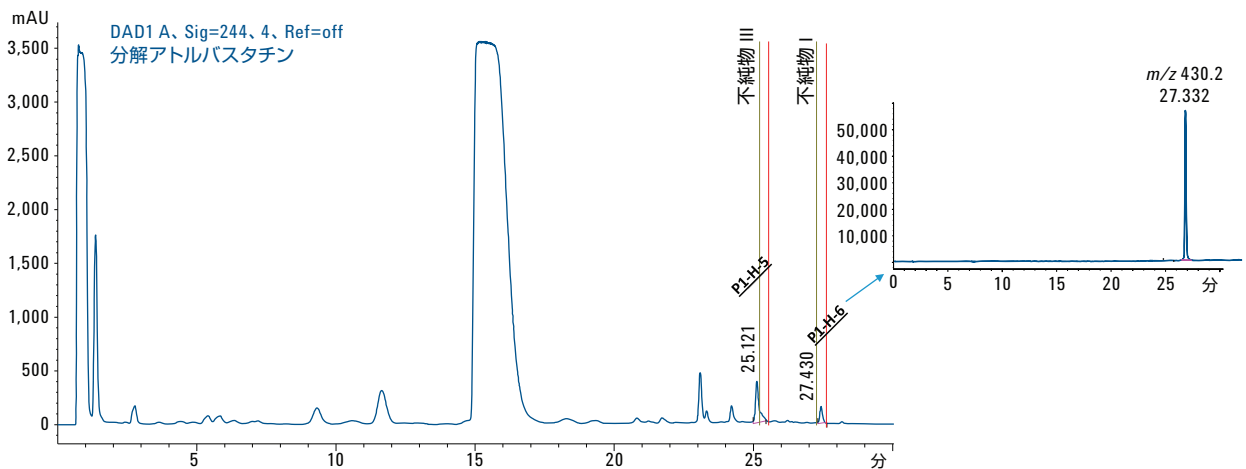


図 10. 質量に基づくアプローチを使用した注意が必要な不純物 (不純物 I および III) のフラクションコレクション。補集した分画の純度を LC/SQ 分析を使用して確認し、不純物 I の結果を挿入図に例として示します。

結論

このアプリケーションノートでは、アトルバスタチン製剤原料を強制的に分解させることで生じた候補となる潜在的遺伝毒性不純物の構造同定を行う方法について説明しました。このワークフローには、LC/UV および精密質量 Q-TOF LC/MS による分解サンプルのスクリーニングが含まれます。LC/UV 分析で分解の程度を推定し、Q-TOF LC/MS 分析ですべての不純物の精密質量情報を収集します。精密質量データをさまざまな Agilent MassHunter ソフトウェアソリューションを使用して処理することで、既知不純物が同定され、未知不純物の候補となる構造が提示されます。遺伝毒性を持つ、注意が必要な新たな不純物 (エポキシド不純物) の形成は、MSC が提示する構造から同定されます。結果をサポートするために、構造的に類似した既知不純物との MS/MS フラグメントパターンマッチを実行することができます。Agilent LC/MS 分析フラクションコレクションシステムは、潜在的遺伝毒性不純物の補集と補集した分画の純度の確認に使用します。この実験では、エポキシドなどの熱安定性の低い遺伝毒性不純物を Agilent Jet Stream イオン源を使用して容易にモニタリングできることも証明されました。

謝辞

本プロジェクトの計画と実施に際して多大な技術的支援をいただきました Roy Helmy 博士、Merck & Co., Inc. に感謝いたします。

参考文献

1. Kračun, M., *et al.*, Isolation and structure determination of oxidative degradation products of atorvastatin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**, 50:729–736.
2. Grahek, *et al.*, United States Patent, Patent NO.:US 8,044,086 B2, Date of Patent:Oct. 25, **2011**.
3. Srinivasareddy, K., Nama, S., Estimation of genotoxic impurities by chromatographic techniques, Priyadarshini institute of pharmaceutical education Kornepadu, **2013**, (M), India. IJPRBS, Volume 2(3):306-324.
4. Jouyban, A., Parsa, H., Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, Drug Applied Research Center and Faculty of Pharmacy, Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, ISBN 978-953-51-0004-1.
5. Eldera, D.P., Snodin, D., Teasdale, A., Analytical approaches for the detection of epoxides and hydroperoxides in active pharmaceutical ingredients, drug products and herbals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2010**, 51:1015–1023.
6. USP method for atorvastatin calcium assay and organic impurities, USP34–NF29, **2010**.
7. Effective use of pharmacopeia guidelines to reduce cost of chromatographic analysis, Agilent publication 5991-1053EN.
8. 「Agilent Q-TOF LC/MS と MassHunter データ処理ソフトウェアによる医薬品不純物の同定とプロファイリング」、アジレント資料番号 5991-1375JAJP
9. Ashfaq, M., *et al.*, Degradation of atorvastatin:(1R,2S,4S,5S)-4-(4-fluorophenyl)-2-hydroperoxy-4-hydroxy-2-isopropyl-N,5-diphenyl-3,6-dioxabicyclo[3.1.0]hexane-1-carboxamide, *Acta Crystallographica Section E*, 18 June **2008**, Structure Reports, accepted 16 July 2008.

www.agilent.com/chem/jp

本資料記載の情報は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2014
Published in Japan, May 1, 2014
5991-4404JAJP



Agilent Technologies