

Agilent GC/Q-TOF システムを使用した ベシル酸アムロジピン中の 潜在的な遺伝毒性不純物の定量

アプリケーションノート

医薬品 QA/QC

著者

Siji Joseph and Upendra Simha
Application Scientists
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

概要

このアプリケーションノートでは、アムロジピン製剤に含まれる潜在的な遺伝毒性不純物であるメチルベンゼンスルホン酸 (MBS) およびエチルベンゼンスルホン酸 (EBS) を測定するための、GC/Q-TOF メソッドについて説明しています。Agilent 7890A GC システムを Agilent 7200A シリーズ Q-TOF と組み合わせて分析に使用しました。Agilent Q-TOF の独自の設計機能により、質量精度と質量分解能が向上しており、高い信頼性で微量の不純物の同定を確認できます。ヘリウムをキャリアガスとする Agilent J&W DB-5ms カラムを使用して、両方の成分を分離する 25 分間のメソッドを開発しました。再現性分析を評価するために、そのメソッドを検証しました。Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアを使用して、さらに EI スペクトルのピークの MS/MS を処理して、部分構造をフラグメントに割り当てることにより、不純物の構造を解明しました。Agilent Q-TOF は、それらの不純物の同定および定量の際に、化学的誘導体化を使用せずに、優れた感度を提供しました。

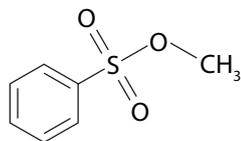


Agilent Technologies

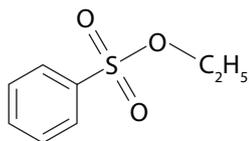
はじめに

原薬または製品中の不純物は、通常、出発物質、中間生成物、または副生成物のカテゴリーに属します。それらの既知の不純物の一部は、突然変異原または発癌性物質である可能性があります。このような不純物を、医薬品合成から完全に除去することは、非常に困難であり、不可能な場合もあります。一般に、医薬品のガイドラインでは、0.05 % を超える不純物を明記および特定することを要求しています。同様に、潜在的な遺伝毒性不純物の許容限度について、規制ガイダンスがあります。微量濃度の潜在的な遺伝毒性不純物について、信頼性の高い検出および定量を行うためには、適切な選択性および感度を持つ分析メソッドを開発する必要があります。

ベシル酸アムロジピンは、ジヒドロピリジン系のカルシウムチャネル遮断薬類に属しています。合成のいずれかの段階で、あるいは塩の結晶化段階で、アルコールが存在した場合、スルホン酸エステルが形成される可能性があります。これは、潜在的な遺伝毒性物質と見なされています^{1, 2}。ここでは、メチルベンゼンスルホン酸 (MBS) およびエチルベンゼンスルホン酸 (EBS) の微量濃度検出を実現する、感度および選択性の高い GC/Q-TOF メソッドについて説明します。MBS および EBS の構造を図 1 に示します。



MBS
分子式 C₇H₈O₃S
単同位体質量 172.0194 Da



EBS
分子式 C₈H₁₀O₃S
単同位体質量 186.0351 Da

図 1. MBS および EBS の分子構造
および分子式

実験の詳細

試薬および薬品

MBS および EBS の標準溶液は、Aldrich (インドのバンガロールに所在) から購入し、アムロジピン錠剤は、地元のドラッグストアで購入しました。分析に使用する LC/MS グレードのアセトニトリルおよびメタノールは、Sigma-Aldrich (インドのバンガロールに所在) から購入しました。

標準溶液とサンプル前処理

MBS および EBS の個別の原液は、2,000 µg/mL の濃度になるように、それぞれの適切な量をアセトニトリルに溶解させることによって準備しました。10 µg/mL の濃度で MBS および EBS を含む標準混合液は、各標準原液の一部を取り、アセトニトリルで希釈することによって準備しました。キャリブレーション標準は、分析対象の 10 µg/mL の標準混合液を、アセトニトリルによって連続希釈することによって準備しました。最終的な個別の濃度は、5、10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、および 5,000 ng/mL です。検量線は、各不純物のピーク面積を、対応する濃度に対してプロットすることによって得られました。

アムロジピン錠剤 (薬剤含量: 5 mg) を、粉末状に砕き、24 時間 70 °C で加熱しました。このように分解した医薬品に対して、アセトニトリルとメタノールを 50:50 の割合 (v/v) で混合した混合液 5 mL を追加し、10 分間超音波洗浄器にかけました。この抽出液内のアムロジピンの濃度は、1,000 µg/mL と予想されていました。次に、この有機抽出液を、3 分間 12,000 rpm で遠心分離し、アジレントのシリンジフィルタ (Agilent エコノフィルタ 25/0.2 µm PTFE) を使用してフィルタリングし、GC/MS 分析に使用しました。不純物の効率的な定量のために新たに開発した GC/Q-TOF メソッドの、真度および回収率を評価するため、既知の量の分析対象 (500 ng/mL の不純物、すなわちアムロジピンに対して 0.05 %) が、抽出された医薬品マトリックス溶液に追加されています。

GC/Q-TOF 機器およびソフトウェア

分析は、マルチモード (MM) 注入口を備えた Agilent 7890A GC を使用して実行しました。注入は、Agilent 7693A 自動液体サンプルラを使用しして実行しました。GC は、Agilent 7200A Q-TOF 質量分析装置と組み合わせられました。Agilent J&W DB-5ms (部品番号 122-5532) の 30 m × 250 µm の 0.25 µm カラムを、MM 注入口および補助 PCM に接続しました。また、アジレントのコーティングなしの不活性化フューズドシリカチューブ (部品番号 160-2625) の 0.7 m × 150 µm カラムを使用して、補助 PCM と MS 検出器を接続しました。2 µL のサンプル量が 100 °C のコールドスプリットレスモードで注入されました。0.2 分間のホールド時間の後にインジェクタの温度は、150 °C/min で上昇して 250 °C になりました。ガスセーバーがオンになっており、3 分経過後の値は 20 mL/min でした。キャリアガスは、1.9 mL/min の定流量のヘリウムでした。オーブンは、10 °C/min で 60 °C (ホールド時間 1 分) から、250 °C (ホールド時間 5 分) までにプログラムしました。トランスファーラインは 260 °C に設定しました。

7200A Q-TOF は、電子 (EI) イオン化を使用して MS モードおよび MS/MS モードで動作しました。イオン源温度は 230 °C でした。測定レートは、2 GHz の拡張ダイナミックレンジ (EDR) モードで 5 スペクトル/秒でした。MS の質量範囲は 50 から 600 Da でした。内部質量参照は使用しませんでした。シーケンスで分析実行ごとに事前にキーワードコマンド (MassCal) を使用して機器が質量校正されました。分析対象の分子イオンおよび最も存在量の多いフラグメントイオンを、タイムセグメントでの MS/MS 分析のために選択しました。また、MS/MS 分析の場合、ターゲット化合物の 3 あるいは 4 つのプリカーサイオンに対して測定時間は 200 ms/スペクトル、コリジョンエネルギーは 10 V でした。

Agilent MassHunter GC/MS 測定ソフトウェア (バージョン B.07.02) を、データ取り込みのために使用しました。すべての定性的なデータ

処理が、Agilent MassHunter Qualitative Analysis ワークステーションソフトウェア (バージョン B.07.00) を使用して実行され、定量分析は、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ワークステーションソフトウェア (バージョン B.07.00) を使用して実行されました。NIST 2014 質量スペクトル検索プログラム (バージョン 2.2) を、スペクトライブラリ検索に使用しました。MSC ソフトウェア (バージョン B.07.00) は、精密質量 MS/MS データを使用して、対象のイオンについて候補となる構造を予測し、評価します。これを使用すると、例えば ChemSpider などのデータベースを探索して、分子イオンまたはフラグメントイオンの実験式に対応する構造を抽出し、適合性スコアに従ってランク付けすることができます。

手順

メソッドバリデーション戦略は、提案された GC/Q-TOF メソッドの再現性を評価することを意図していました。これを達成するために、それぞれの分析対象の選択性、検出限界、および直線性の範囲と、機器テクニックの精度および真度を評価しました。検出下限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、および直線性を決定するために、準備した直線性のレベルを、5 回の繰り返し注入で注入しました。アムロジピン製剤のアセトニトリル抽出を使用して、Q-TOF の選択性評価を行いました。さまざまな抽出ウィンドウを使用して、分析対象分子イオンおよびフラグメントの精密質量を抽出することにより、医薬品マトリクスからの選択性を評価しました。システムの精度は、標準試料の繰り返し注入でのリテンションタイム (RT) と面積の相対標準偏差 (RSD) を測定することによって評価しました。GC/Q-TOF メソッドの真度および回収率を計算するために、スパイクした医薬品抽出物とスパイクしない医薬品抽出物を注入しました。

結果と考察

真度

DB-5ms カラムは、分析対象を、2つの明確に異なるシャープなピークに分離することができました。1,000 ng/mL の標準混合液の分析によって取得されたトータルイオンクロマトグラム (TIC) を、図 2 に示します。MBS および EBS の精密質量スペクトルを図 3 に示します。式

ジェネレータオプションを使用して、分子イオンのピークが $[C_7H_6O_3S]^+$ および $[C_8H_{10}O_3S]^+$ として正しく割り当てられました。MBS および EBS について、予測された式で、質量誤差の値は 4 ppm より小さく、同位体アバンダンスおよびスペーシングスコアが 97 よりも大きいことが判明しました (図 4)。

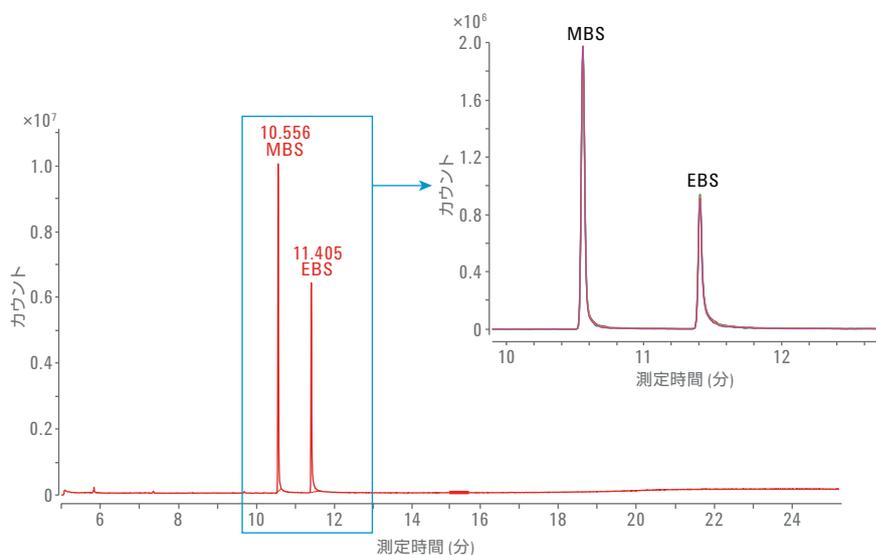


図 2. MBS および EBS の溶出プロファイル。挿入図には 5 回の繰り返し注入が重ねて表示されており、注入の再現性を表しています。

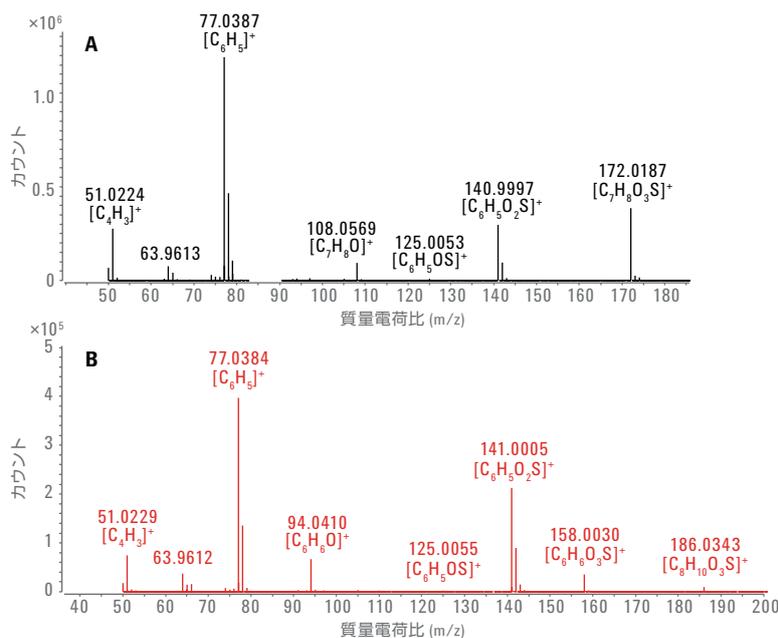


図 3. 式の生成 (generate formula) アルゴリズムから生成された式がラベルとなっている MBS (A) および EBS (B) の高分解能精密質量スペクトル。

選択性

メソッドの選択性を評価するために、ターゲットとなる分析対象の分子イオンおよびフラグメントの精密質量を、さまざまな抽出ウィンドウを使用してアムロジピン製剤マトリックスから抽出しました。図 5 を参照してください。図 5A は、医薬品マトリックスの TIC を示しています。図 5B には、シングル四重極と同等の ± 0.5 Da の抽出ウィンドウを使用した、分析対象の抽出イオンクロマトグラム (EIC) が含まれています。 ± 20 ppm と ± 10 ppm の質量精度で抽出された分析対象の EIC を、それぞれ 図 5C と 図 5D に示します。 ± 10 ppm の抽出ウィンドウを使用した EIC では、バックグラウンドの干渉を最小限にして、ターゲット化合物の選択的検出を実行できました。これにより、Q-TOF メソッドが、MBS および EBS の分離と定量を同時に実行可能な選択性を持っていることが確認されました。

A

Species	m/z	Score (Ion Abund)	Score (mass)	Score (RFQ, MSMS)	Score (RFQ)	Score (RFQ, TIC)	Score (Ion spray)	Height	Ion Formula
	172.0187	98.66	98.68	98.82	98.82	98.7	24958.8	172.0187	C ₂₁ H ₃₀ O ₃ S
	24958.8	87.7	700	172.0189	0.2	24958.8	100	89.7	
	20670.8	7.5	8.6	173.0219	0	17687.7	7.2	6.6	
	1584.3	4.7	5.4	174.0162	0	13688	4.3	3.9	

B

Species	m/z	Score (Ion Abund)	Score (mass)	Score (RFQ, MSMS)	Score (RFQ)	Score (RFQ, TIC)	Score (Ion spray)	Height	Ion Formula
	186.0341	97.32	97.89	97.89	97.89	98.59	2072.8	186.0341	C ₈ H ₁₀ O ₃ S
	8974.2	88.8	100	186.0345	0.4	8970.8	100	87.1	
	980.8	8.4	9.7	187.0376	0.8	1098.1	10.4	9	
	547.2	4.8	5.5	188.0322	0.5	426.4	4.4	3.8	

図 4. MBS (A) および EBS (B) の質量誤差の値。同位体の、低い質量誤差の値 (4 ppm よりも小さい) が強調表示されています。

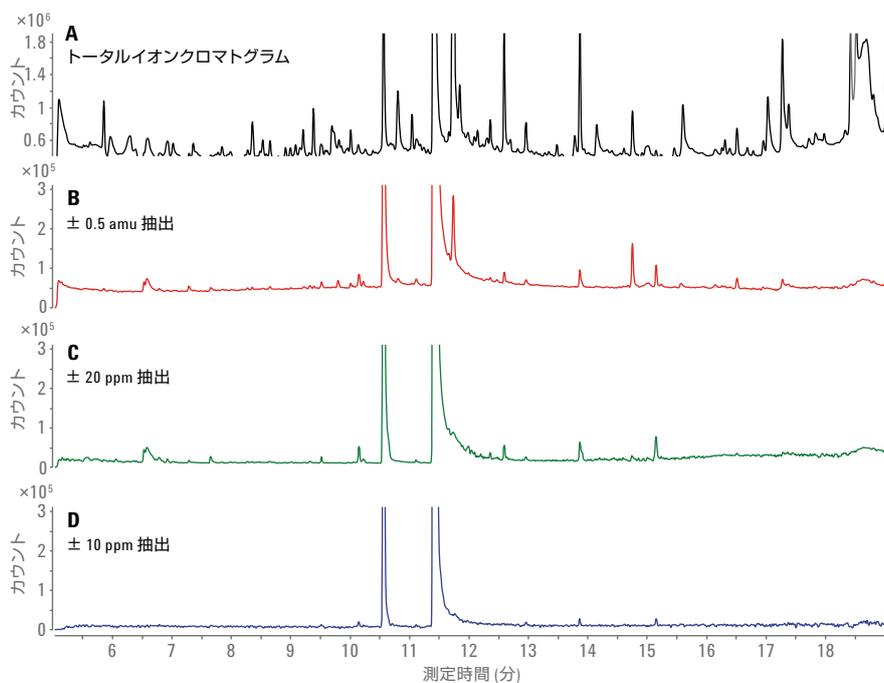


図 5. アムロジピン製剤注入における Q-TOF の TIC および分析対象の EIC。EIC はラベルに示すように、さまざまな抽出ウィンドウを使用して、ターゲットの不純物分子イオンおよび最も存在量の多いフラグメントイオン (m/z 172.0187, 140.9997, 142.0075, 77.0387, 78.0456, 51.0224, 94.0410, 158.0030, 186.0343) を抽出することによって生成しました。

LOD、LOQ、および直線性

LOD および LOQ は、濃度の低い試料の繰り返し注入から計算しました。シグナル/ノイズ比 (S/N 比) を少なくとも 10:1 と記録する分析対象のそれぞれのピークの低い濃度を LOQ とし、S/N 比が 3:1 である場合は LOD としました。MBS の LOD は 10 ng/mL、EBS の LOD は 20 ng/mL でした。MBS および EBS の直線性カーブは、ピーク面積と、LOQ から 5,000 ng/mL までの濃度範囲を使用して、プロットされています。最良の回帰応答機能を決定するために、データをプロットし、統計解析を実行することによって、さまざまな回帰モデルを評価しました。望ましいダイナミックレンジ内のデータに適合する最良のキャリブレーションモデルは、 $1/x$ の重み付けに適合させた場合の回帰直線モデルであることがわかりました。直線性の実験結果は、質量分析反応が、MBS の場合は 20 ~ 5,000 ng/mL の範囲内の濃度に比例し、EBS の場合は 50 ~ 5,000 ng/mL の範囲内の濃度に比例することを示しています。両方の分析対象について 0.99 を超える相関係数が得られました。両方の分析対象についてこのように取得した LOD、LOQ、および直線性の結果を、表 1 にまとめています。

表 1. MBS および EBS の LOD および LOQ の結果。

パラメータ	MBS	EBS
LOD		
濃度 (ng/mL)	10	20
S/N	7	3.2
ピーク面積の RSD (%)	10.7	13.7
LOQ		
濃度 (ng/mL)	20	50
S/N	10.4	10.1
ピーク面積の RSD (%)	4.9	8.4

精度

精度は、すべての濃度で繰り返し注入を実行して、両方の分析対象の RT とピーク面積の RSD を計算することによって決定しました。それらを表 2 に示します。すべての濃度での MBS の面積 RSD 値は、5.0 % よりも小さくなりました。LOQ を除くすべての濃度での EBS の面積 RSD 値は、5.0 % よりも小さくなりました。LOQ では、この値は 8.4 % でした。キャリブレーションの範囲全体で、両方の分析対象について優れた RT 精度が観察され、メソッドの堅牢性の二次的証拠となりました。すべての濃度で、MBS および EBS の RT RSD は、0.2 % を下回りました。そのため、GC/Q-TOF を使用して得られる測定結果が、注入を繰り返しても正確で高精度で、MBS および EBS の分析の要件を満たしていることがわかりました。

分解されたアムロジピン錠剤の分析

次に、このメソッドを使用して、分解されたアムロジピン製剤に由来するサンプルを分析し、MBS および EBS の量を直線式から求めました。およそ 344 ng/mL の MBS と 3,687 ng/mL の EBS が、分解されたサンプル中に存在しました。この GC-Q-TOF メソッドは、それらの微量濃度の分解不純物を検出できるように 10 倍以上感度が高くなっています。TOF-MS は、化合物の同定のための優れた質量精度を提供します。これにより、複雑なマトリクス内のサンプルを分析するときに、偽陽性が少なくなります。不純物の EI 質量スペクトルは、標準の NIST 2014 ライブラリで検索され、両方のターゲット化合物の forward match ファクターは 850 を上回りました。

表 2. 複数のキャリブレーションレベルにおける MBS および EBS の面積と RT の RSD 値。

キャリブレーション レベル (ng/mL)	MBS		EBS	
	RT RSD (%)	面積の RSD (%)	RT RSD (%)	面積の RSD (%)
20	0.01	4.87		
50	0.01	3.91	0.16	8.38
100	0.01	3.14	0.03	3.66
200	0.01	0.68	0.01	3.63
500	0.01	0.77	0.01	0.30
1,000	0.01	0.63	0.01	3.08
2,000	0.01	2.69	0.01	0.86
5,000	0.00	0.43	0.02	0.90

真度

それぞれ 500 ng/mL の量の MBS および EBS 標準試料を、分解されたアムロジピン製剤にスパイクし、回収率の評価のために分析しました。添加された量は、各不純物で、主要な薬品濃度に対して 0.05 % に相当していました。分析対象の真度は、各ピークのレスポンス/面積の増分を比較し、直線性の式を使用して逆算することによって計算しました。MBS および EBS の回収率は、それぞれ 520 ng/mL と 565 ng/mL でした。この結果は、 $100 \pm 13\%$ の範囲内の回収率を裏付けます。

MSC ソフトウェアを使用した不純物の部分構造の解明/フラグメンテーションのメカニズム

分子イオンに対して、および MBS と EBS の両方の最も存在量の多いフラグメントイオンに対して、MS/MS 分析を実行することにより、上位構造とフラグメンテーションメカニズムを解明しました。図 6 および図 7 に、MBS と EBS の MS/MS データを示します。**ターゲット MS/MS による検索 (Find by targeted MS/MS)** アルゴリズムを使用してフィーチャーを抽出しました。**式の生成 (generate formula)** アルゴリズムを使用して、分子イオンのピークが $[C_7H_8O_3S]^+$ および $[C_8H_{10}O_3S]^+$ として正しく割り当てられました。不純物のプリカーサおよびフラグメントイオンからの正確な質量情報は、Compound Exchange Format (.CEF) ファイルを使用して MSC ソフトウェアにアップロードされ、候補となるすべての構造を取得するために ChemSpider データベースと照合して検索されました。

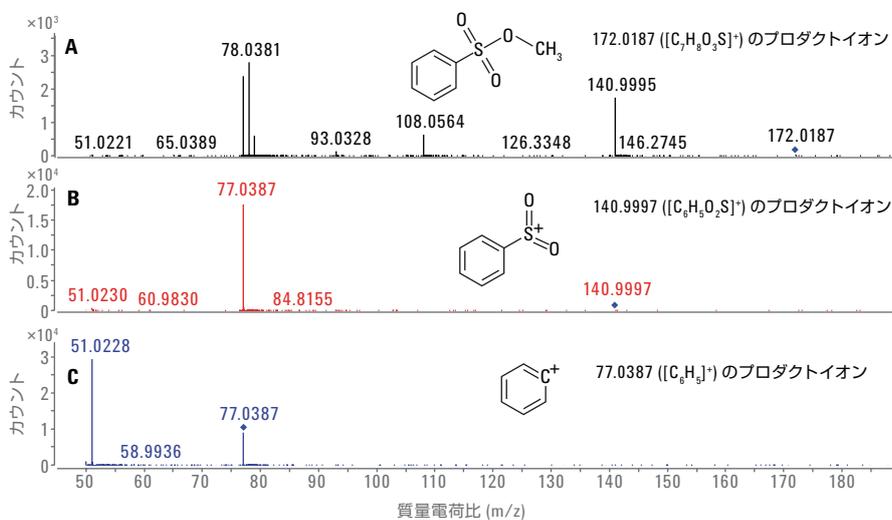


図 6. MBS の MS/MS データ (最も存在量の多いフラグメントイオンの解離イオン)

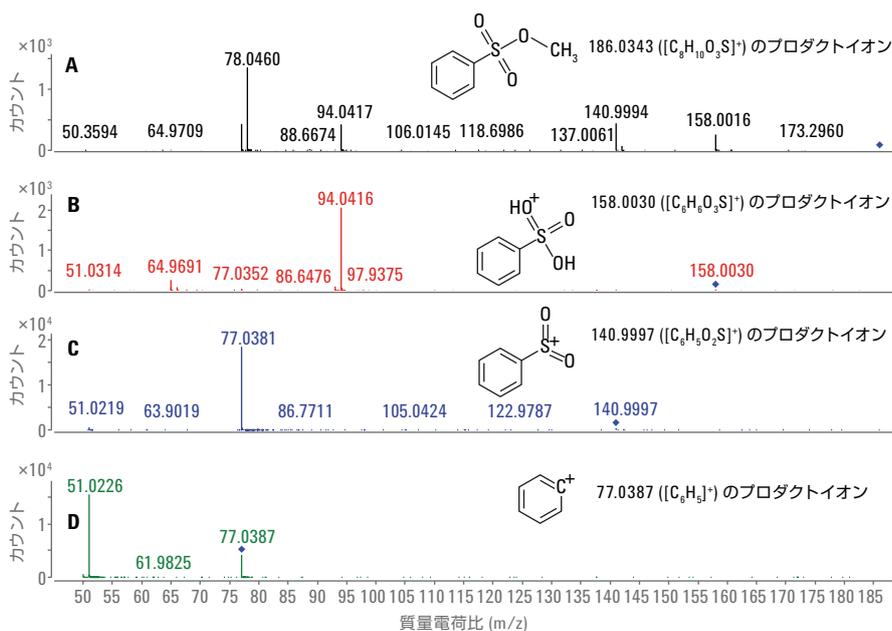


図 7. EBS の MS/MS データ (最も存在量の多いフラグメントイオンの解離イオン)

図 8 に、MSC ソフトウェアからの結果を示します。MBS 分子イオン m/z 172.0187 の MS/MS 解離イオンのフラグメンテーションメカニズムを割り当てています。

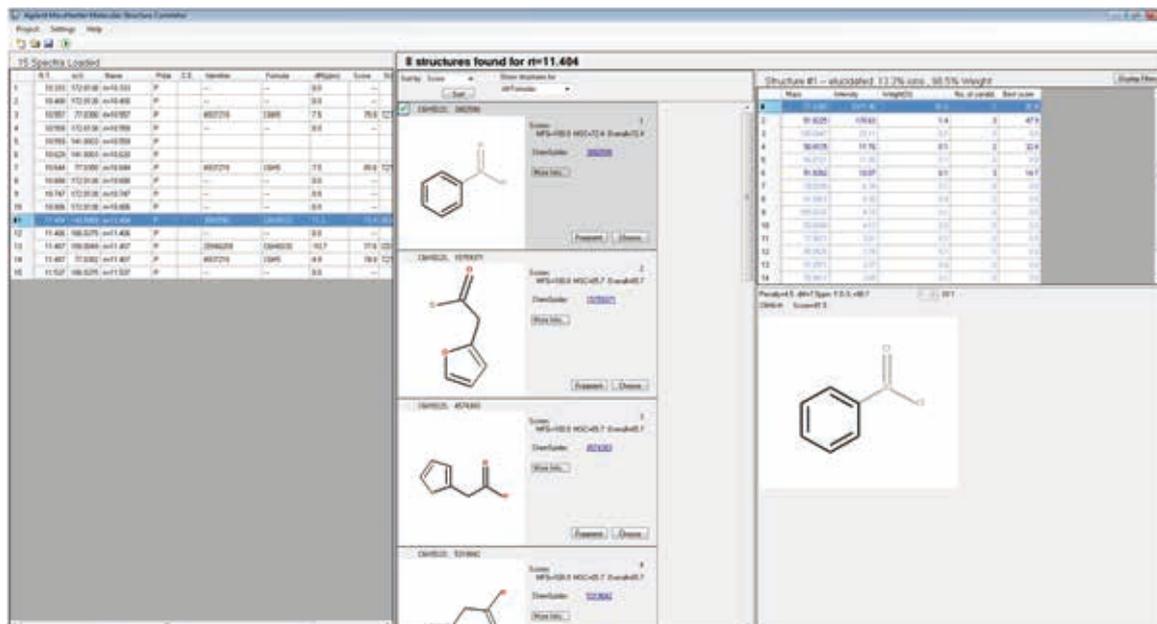


図 8. MBS の $(C_6H_5O_2S)^+$ フラグメントイオンに構造を割り当てるための MSC の結果のスクリーンショット。不純物のサブフラグメントのプリカーサおよび構造候補に対して考えられる分子構造のリストも示しています。

結論

ベシル酸アムロジピン中の、メチルベンゼンスルホン酸およびエチルベンゼンスルホン酸という 2 つの潜在的な遺伝毒性不純物の分析のために、Agilent GC 7890A GC を Agilent 7200A Q-TOF と組み合わせて使用して、感度の高い GC/Q-TOF メソッドを開発しました。これらの不純物の同定および定量には、MS モードと MS/MS モードの両方を使用しました。MS データは同定および定量に使用され、MS/MS データは不純物フラグメントメカニズムを決定するために、MSC ソフトウェアを使用して処理されました。MBS および EBS の LOD は、それぞれ 10 ng/mL と 20 ng/mL でした。

この分析メソッドは、検出のダイナミックレンジが 2 桁を超えることを示し、MBS の場合は LOD が 20 ng/mL、EBS の場合は LOD が 50 ng/mL でした。メソッドの回収率は、主要な薬品濃度に対して 0.05 % の濃度で、ターゲット不純物を医薬品マトリックスに故意に添加することによって評価しました。メソッドは再現性が高く、MBS および EBS の定量に使用できます。定量の際に化学的誘導体化は必要ありません。GC/Q-TOF を MSC ソフトウェアと組み合わせて使用すると、複雑なマトリックスから、未知の不純物の構造を解明できます。

参考文献

1. Rao, M. S; *et al.* Quantification of genotoxic impurities in amlodipine drug substance by LC-MS, *Der Pharmacia Lettre* **2014**, 6(3), pp 47-55.
2. *IARC Monographs Program on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans for ethyl methane-sulphonate* 7 (**1974**) 245.

www.agilent.com/chem/jp

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2015
Published in Japan, August 1, 2015
5991-6058JAJP



Agilent Technologies