

医薬品中の潜在的な変異原性不純物の 微量レベルでの定量

Agilent Ultivo LC/TQ でのミックスモードデータ取り込みを
用いた分析

著者

Theresa Sosienski and
Kyle Covert
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、ダルファムプリジン中の医薬品有効成分 (API) である 4-アミノピリジンの製造から形成される 2 個の潜在的な変異原性不純物、3-アミノピリジンとイソニコチンアミドの高精度の定量を実現する分析メソッドについて解説します。Agilent Ultivo LC/TQ のミックスモード取り込みでは、サンプルからの定量情報の取り込み (SIM および MRM) と定性情報の取り込み (フルスキャンおよびプロダクトイオンスキャン) を同時に実行できます。ミックスモードは、スキャン機能を実際の分析対象物の SIM または MRM と同じタイムセグメントに統合することによって機能します。このメソッドでは優れた感度と精度が示され、潜在的な変異原性不純物について規制要件よりもはるかに低い定量下限が得られました。

はじめに

API の製造プロセスでは、変異原性の原材料または副反応生成物が生産バッチに残っている場合があります。これらの変異原性不純物は最終製品に含まれる可能性があり、生産済みバッチをこれらの潜在変異原性不純物 (PMI) についてスクリーニングしなければなりません。このメソッドでは、ダルファムプリジンの API である 4-アミノピリジンを、2 個のターゲット PMI である 3-アミノピリジンとイソニコチンアミドについて分析します。ダルファムプリジンの標準投与量は 20 mg/day です。つまり、総 PMI を正確に 75 ppm 未満で検出する必要があります (PMI の毒性学的懸念の閾値 = 1.5 µg/day)^{1,2}。このアプリケーションノートでは、Ultivo LC/TQ とミックスモード取り込み機能を使用した高濃度 API 中の PMI である 3-アミノピリジンとイソニコチンアミドの定量について実証します。

通常、このタイプの分析は LC/UV またはシングル四重極 LC/MS を使用して実行します。しかし、LC/TQ を使用すれば、既知の不純物の検出において特異性が高まるため、より正確な定量が可能となり、また化学的ノイズが低くなるため感度が向上します。Ultivo のミックスモード取り込み機能を使用することで、MRM、SIM、プロダクトイオンスキャン、プリカーサイオンスキャン、ニュートラルロススキャンデータの測定を同時に、同じタイムセグメントで実行できます。このミックスモード機能により、ユーザーは 1 回の注入でのターゲット化合物の高精度な定量に加え、より多くの情報の収集が可能となります。規制の感度要件に基づいて考えると、このアプリケーションには標準 ESI イオン源が適切で経済的な選択肢です。

このメソッドの課題は、試料として PMI 化合物を検出する必要のある API の濃度が、相対的に高いことです。不純物の後に溶出する API の濃度が高いため、このメソッドでは分離が重要になります。このメソッドにおける分析対象物は親水性であるため、一般的な逆相カラムでは分析対象物が十分に保持されません。このため、きわめて堅牢な親水性相互作用液体クロマトグラフィーカラム (Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z カラム) を使用して、成分を分離しました。最後に、API がカラムから溶出している間、LC ストリームを MS から切り替えて、イオン源の汚染と MS 検出器の飽和の危険を回避します。

実験方法

試薬および調製

このアプリケーションノートで使用したすべての試薬は HPLC または LC/MS グレードのものでした。アセトニトリルは Honeywell (モリスタウン、ニュージャージー州、米国) から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 µm ユースポイントメンブレンフィルタカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (メルク、ダルムシュタット、ドイツ) で精製しました。ギ酸は Fisher Scientific (フェアローン、ニュージャージー州、米国) から、5 M ギ酸アンモニウム溶液 (部品番号 G1946-85021) は Agilent Technologies (サンタクララ、カリフォルニア州、米国) から購入しました。医薬品および不純物標準は Millipore-Sigma (メルク、ダルムシュタット、ドイツ) から購入しました。

サンプル前処理

20 mg/mL の 4-アミノピリジンの溶液を不純物のマトリックスとして使用しました。4-アミノピリジンを 20 mg/mL でアセトニトリルに溶解しました。3-アミノピリジンとイソニコチンアミドをアセトニトリルに溶解し、10 µg/mL の原液濃度に希釈しました。3-アミノピリジンとイソニコチンアミドの検量線を 20 mg/mL の 4-アミノピリジン原液を用いた段階希釈によって作成しました。

機器と実験パラメータ

Agilent 1260 Infinity II Prime LC システム

- 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- 1260 Infinity II バイアルサンブラと一体型カラムコンパートメント (G7129A)
- 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 HS (G7117C)

Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS システム

- エレクトロスプレーイオン源 (G1948B)

ソフトウェア

Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア B.09 と Quant-My-Way 機能

サンブラの前処理シーケンスを用いてサンプルを分析しました。このシーケンスでは、ニードルおよびインジェクターを水とメタノールで洗浄した後、注入前に開始時の移動相条件によってフラッシュしました。この注入シーケンスは Agilent MassHunter Acquisition で簡単にプログラムして、各サンプル中の高濃度の 4-アミノピリジンによって生じる注入間のキャリーオーバーを最少に低減できます。このアプリケーションで使った LC メソッドは、Agilent アプリケーションノート 5994-0864EN³ に記載のメソッドに少し変更を加えたものです。表 1 に HPLC グラジエント条件を、表 2 に ESI イオン源と Ultivo LC/TQ パラメータを示します。

ミックスモード取り込みを使用した MRM とスキャンメソッドのセットアップ

図 1 に、未知化合物のスキャンパラメータとターゲット PMI の MRM パラメータを示します。Ultivo LC/TQ には、MRM データとスキャンデータを同時に収集する機能があります。

表 1. Agilent 1260 Infinity II Prime LC のパラメータ

パラメータ	設定値
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150 mm, 2.7 μm, PEEK-ライニング (p/n 673775-924)
カラム温度	35 °C
注入量	1 μL
移動相	A) 10 mM 酢酸アンモニウム + 0.02 % 酢酸水溶液 B) 0.1 % 酢酸アセトニトリル溶液
流量	0.5 mL/min
グラジエント	時間 (分) %B 0 95 2 90 4 60 8 60
ストップタイム	8.0 分
ポストタイム	6.0 分
検出 UV	[265, 10/Ref 360, 80] nm

表 2. ESI イオン源のパラメータ

パラメータ	設定値
ガス温度	350 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	40 psi
キャピラリー電圧	4,000 V(+)
LC を廃液に切り替え	3 分

Acquisition Parameters

Scan type	Polarity	Compound/Segment name	Precursor (m/z)	MS1 res	Product (m/z)	MS2 range start (m/z)	MS2 range end (m/z)	MS2 res	Scan/Dwell time (ms)	Frag (V)	ISTD?	CE (V)	Threshold
Scan	Positive					70	400		300	110	☐		0
MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	68.1			Unit	100	110	☐	20	
MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	52			Unit	100	110	☐	44	
MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	41.1			Unit	100	110	☐	28	
MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	80			Unit	100	110	☐	20	
MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	53			Unit	100	110	☐	32	
MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	52			Unit	100	110	☐	52	

図 1. スキャン行を MRM リストに追加するだけでミックスモードスキャンを簡単にセットアップできます。

結果と考察

メソッドの直線性、感度、精度

Ultivo LC/TQ と標準 ESI イオン源は、測定した 2 種類の不純物において優れた感度を示しました。4-アミノピリジンマトリックス (20 mg/mL) 中で、3-アミノピリジンが 5 ng/mL で正確に定量され、イソニコチンアミドが 0.5 ng/mL の低濃度で定量できました。各分析対象物についてこの分析メソッドの精度は優れており、定量下限での 6 回繰り返し注入において、3-アミノピリジンの RSD% は 4.25 %、イソニコチンアミドの RSD% は 0.23 % でした (図 3)。どちらの不純物も 6 点の検量線で $R^2 > 0.99$ となり、優れた直線性を得られました (図 2)。

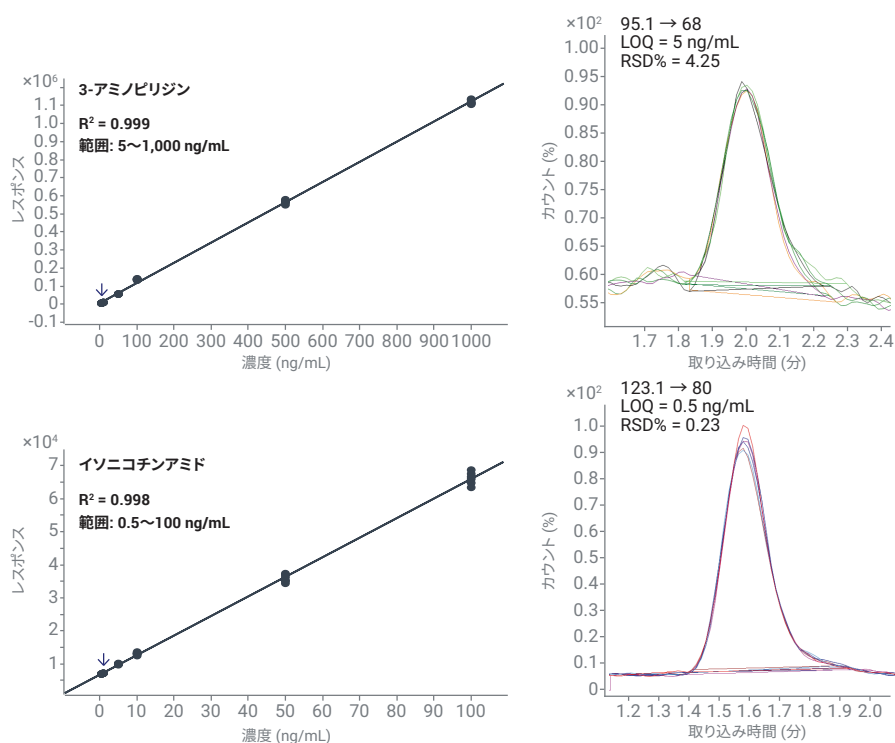


図 2. API マトリックス中で測定された 3-アミノピリジンとイソニコチンアミドの 6 ポイント標準検量線と、定量下限でのクオンティファイアトランジションの 6 回繰り返し注入の重ね合わせ表示

ミックスモード取り込みによる分析の詳細情報の取得

ミックスモード取り込みを使用すれば、MS ユーザーはスキャンデータと MRM データを同時に収集できるため、オペレータは同じサンプル中の追加の溶出化合物を検出できる可能性があります。ターゲット化合物の MRM により、スキャンデータに対して、より高い選択性および感度でより正確な定量が可能になります。スキャンデータからは、サンプル中に存在する予想外の成分に関する情報を得られます。DAD モジュールを LC 装置に容易に組み込むこともでき、質量分析計への LC フローを廃液に切り替えつつ、高濃度の API を DAD により検出できるというさらなる利点が実現します (図 3)。ミックスモードスキニングの使用でも、MRM トランジションのピーク形状や面積は変わりません (図 4)。

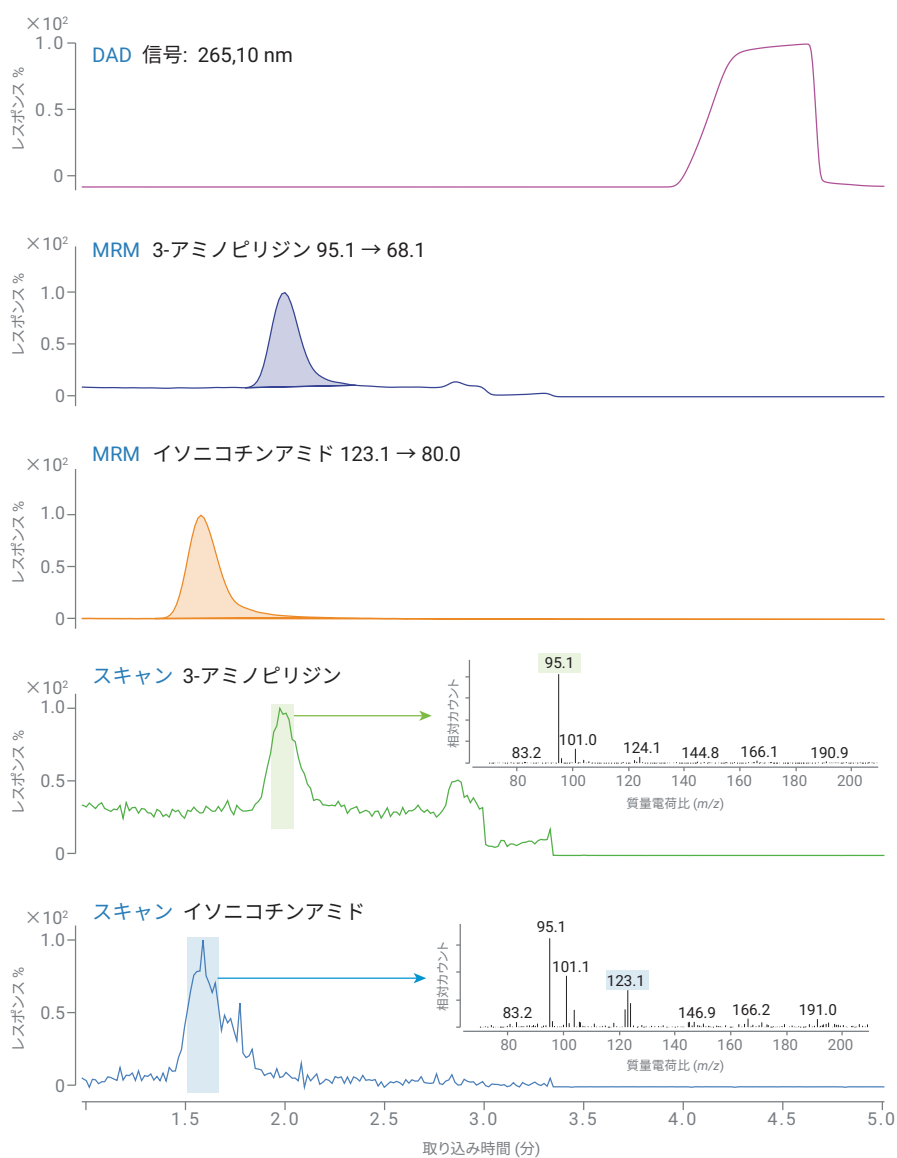


図 3. ミックスモード取り込みにより、スキャンと MRM の同時使用を実現。DAD 信号によって API を検出し、同時に LC が廃液に切り替わり、MS 汚染を制限できます。DAD 信号は MS によって検出される不純物を検出しません。

結論

このアプリケーションノートでは、API である 4-アミノピリジン (20 mg/mL) 中の潜在の変異原性不純物 (3-アミノピリジンとイソニコチンアミド) の高感度かつ正確な定量を実証しました。Agilent Ultivo 独自の機能である MRM を含むミックスモード取り込みにより、サンプルからスキャン情報を収集しつつ、同じタイムセグメントで MRM によって PMI 化合物を正確に定量できます。Ultivo の優れた性能と、Agilent 1260 Infinity II Prime LC システムに取り付けた標準 ESI イオン源により、少量の API サンプルで PMI を検出しながらも、潜在的な不純物の正確な定量を維持できることから、機器の経済的な組み合わせとして提案できます。

参考文献

1. US Department of Health and Human Services; FDA; CDER; CBER. M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. ICH, March **2018.2.**
2. Jain, M. *et al.* Determination of Five Potential Genotoxic Impurities in Dalfampridine Using Liquid Chromatography. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2016**, 133, 27-31.
3. Covert, K. How to Catch a Potential Mutagenic Impurity Using an Agilent LC/MSD XT and Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z Column for Sensitive and Reliable Detection of Dalfampridine Impurities. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0864EN, **2019.**

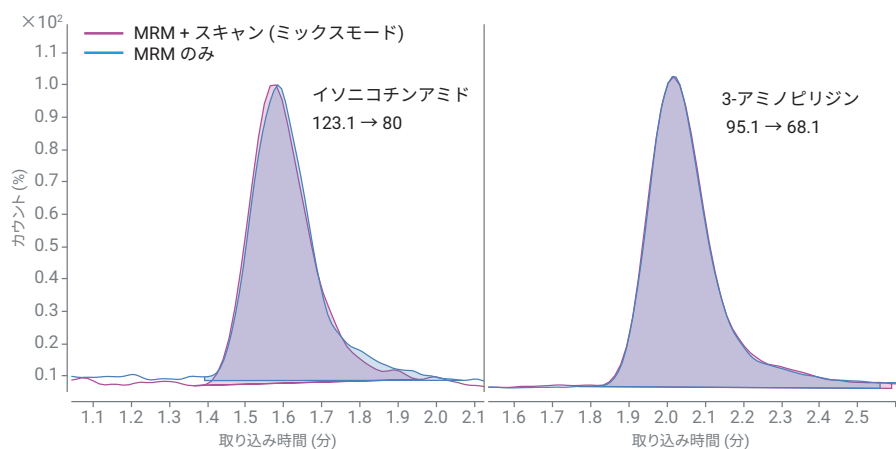


図 4. ミックスモードのスキャンタイプの使用時と MRM のみのスキャンタイプ使用時で、ほぼ同等のピーク形状とピーク面積が示されます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, August 19, 2019
5994-1238JAJP