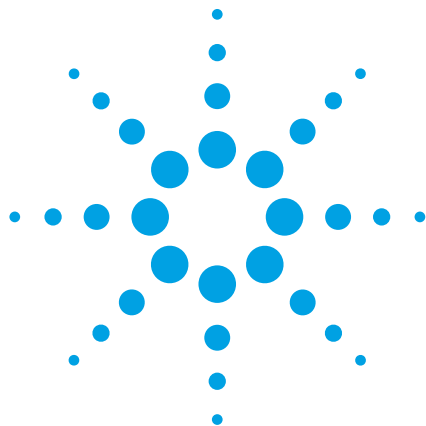




Agilent 1290 Infinity LC システムと 60 mm Agilent Max-Light カートリッジセルによる 遺伝毒性不純物の高感度検出

アプリケーションノート

医薬品開発、創薬

著者

Gerd Vanhoenacker、Frank David、
Pat Sandra
Research Institute for Chromatography
Kennedypark 26, 8500 Kortrijk, Belgium
Edgar Naegele
Agilent Technologies
Waldbronn, Germany



概要

Agilent 1290 Infinity LC システムを用いて、医薬品中の遺伝毒性が疑われる不純物 (PGI) の微量分析を行うために、10 種類のアリールアミンおよびアミノピリジン不純物を分離する汎用メソッドを開発しました。10 種類のターゲット化合物を分離する 2 つの汎用メソッドを開発し、標準溶液を用いてこれらのメソッドの性能を、60 mm Max-Light カートリッジ高感度セルを備えた Agilent Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いて評価したところ、0.2 ng/mL (オンカラムで 4 pg) という優れた検出下限が得られました。この実験で得られたデータを、Max-Light カートリッジ標準セル (10 mm) のデータと比較しました。PGI と医薬品有効成分 (API) を適切に組み合わせたサンプルに適した高速メソッドにより、実サンプルをわずか 5 分で分析することが可能でした。添加および非添加サンプルに簡単な前処理を行い、それらを用いて性能評価を行いました。



Agilent Technologies

はじめに

クロマトグラフィによる純度分析は、製薬ラボの医薬品開発や品質管理における重要なプロセスです。遺伝毒性の疑われる不純物 (PGI) は、特別なグループに分類される医薬品不純物で、最近では高い関心を集めるようになっていきます。これらの不純物は、薬剤基質の合成プロセスや製剤の製造の際の残留物で、医薬品有効成分 (API) や賦形剤の分解により生じることがあります。PGI はその構造や活性に由来する遺伝毒性を持つおそれがあり、構造的に注意すべき官能基のリストが公開されています。

欧州と米国の医薬品管理当局は、薬剤基質および製剤中の PGI の分析および低減に関するアプローチを規定するガイドラインを発行しています^{1,2}。遺伝毒性不純物の摂取量については、1.5 µg/日という毒性学的閾値 (TTC) が許容リスクと考えられています。つまり、この値が、重要な遺伝毒性が生じるリスクがきわめて低い値ということです³。ヒト用医薬品委員会 (CHMP) は、許容リスクについて、生涯にわたって遺伝毒性不純物に曝露された場合に上昇するリスクが 10 万分の 1 未満であることと定義しています。薬剤基質の全摂取量を考慮すると、PGI の分析メソッドにおいては、API との比較で低 ppm レベルの PGI を検出できる能力が求められます (たとえば、1 日あたり 500 mg の薬剤基質を処方される場合、1 日あたりの摂取量 0.5 µg に対して PGI は 1 ppm)。

PGI は極性や揮発性が大きく異なるため、さまざまな分析メソッドが用いられます。一般に、PGI 分析では、典型的な不純物分析よりも大幅に低い検出下限が求められます。多くの場合、実サンプルで求められる低い検出下限を得るために、質量分析検出器が用いられます。HPLC および UHPLC における質量分析計の使用には、いくつかの利点があります。なかでも重要な利点は、感度と選択性が向上することです。最近では、メソッド選択チャートと組み合わせた各種 PGI メソッドのレビューが公開されています⁴。

典型的な PGI 種は、アリールアミンとアミノピリジンです。これらの化合物は、API の合成にしばしば用いられます。このアプリケーションで用いた化合物の構造を図 1 に示しています。LC-MS⁵ および LC-MS/MS⁶ を用いたこれらの化合物の分析メソッドが、先ごろ公開されました。これらのシステムでは、微量 PGI を検出するのに必要な感度が得られています。優れた選択性と特異性により、API マトリックスの影響が最小限に抑えられています。しかし、これらの最先端の検出器の使用には、高額な購入費用や使用コスト、トレーニングを受けた経験豊富なスタッフの必要性、堅牢性の欠如といったいくつかの大きな欠点があります。そうしたことから、QC ルーチンラボでは、UV 検出器やダイオードアレイ検出器といった、より

安価で複雑性の低いテクニックが用いられることが多くなっています。残念ながら、これらの検出器の多くでは、最先端の MS システム (トリプル四重極など) に比べて、感度が大幅に低くなります。

このアプリケーションノートでは、UHPLC と DAD 検出を組み合わせたアリールアミンおよびアミノピリジンの測定手法を紹介します。Agilent 1290 Infinity ダイオードアレイ検出器の感度を向上させるために、Max-Light カートリッジ高感度セルが開発されました。このセルは光路長が 60 mm で、内部ボリュームはわずか 4 µL です。理論上は、光路長 10 mm の標準フローセルと比べて、感度が 6 倍に向上します (ベールの法則)。

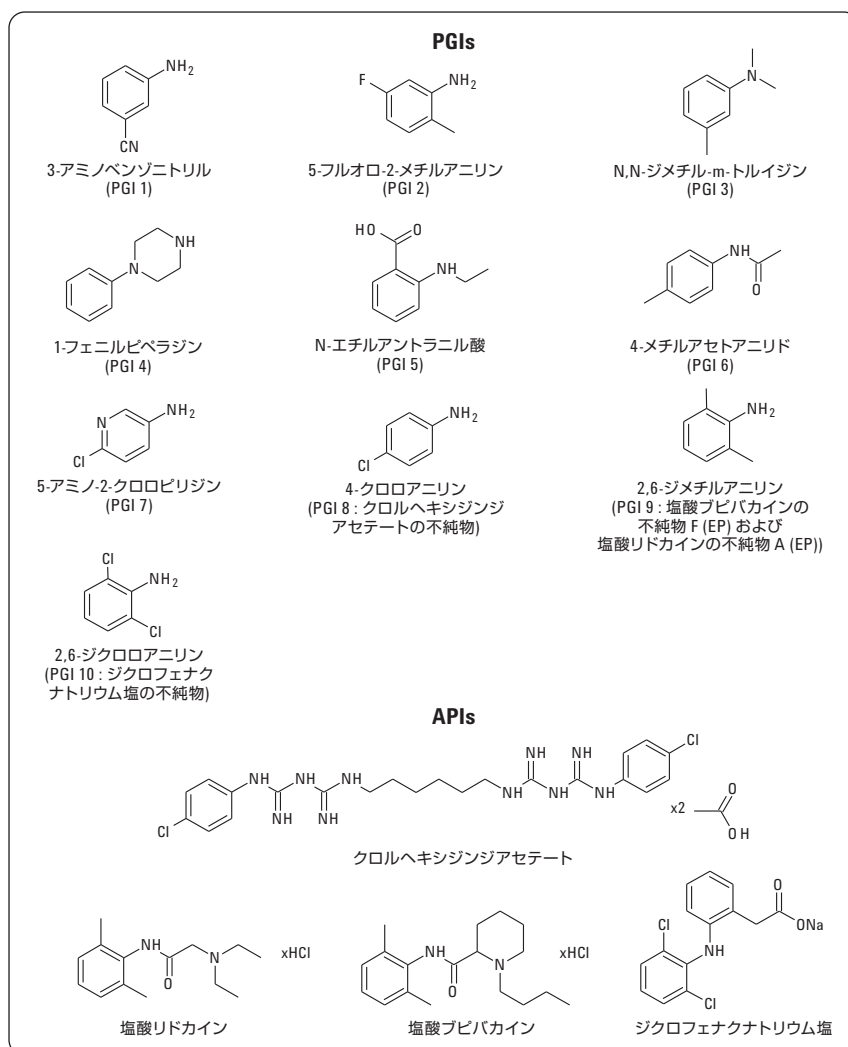


図 1
分析した PGI と API の構造

Agilent ZORBAX RRHD UHPLC カラムと組み合わせることで、API のマトリックス干渉を避けるために必要なピーク効率と選択性が得られるため、MS を使用しなくても、製剤中 PGI の微量分析に求められる検出下限が得られます。

実験手法

標準溶液

PGI の 100 µg/mL 混合溶液をアセトニトリルで調製しました。この原液を -18 °C で保管しました。10 % アセトニトリル水でさらに希釈したものを、汎用メソッドの評価に使用しました。

PGI 8、9、10 の各溶液を、アセトニトリルで調製しました。これらの溶液をアセトニトリルでさらに希釈し、専用メソッドで使用する標準溶液と添加溶液を作成しました

サンプル前処理

以下の API を選択しました。

- 塩酸ブピバカイン (純度 99 % 以上)
- 塩酸リドカイン (純度 99 % 以上)
- クロルヘキシジンジアセテート (純度 97.5 % 以上)
- ジクロフェナクナトリウム塩 (純度 98 % 以上)

サンプル前処理手順を以下に記載しています。一部の API は、超音波処理後に完全に溶解しませんでした。抽出溶媒での PGI の可溶性は良好で、添加実験では 70 % を超える回収率が得られています⁵。

- サンプル 120 mg を計量し、1.5 mL Eppendorf チューブに入れる
- 必要に応じて添加溶液を追加
- アセトニトリル 1.2 mL を追加 (API は 10 %)
- ボルテックス、30 秒間
- 超音波処理、5 分間
- ボルテックス、30 秒間
- 遠心分離、13,000 rpm、2 分間
- シリンジフィルター (ポアサイズ 0.2 µm、再生セルロース、アジレント 部品番号 5061-3366) で溶液をろ過

使用機器

以下の構成の Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを使用しました。

アジレント部品番号	説明
G4220A	Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ、デガッサ内蔵
G4226A	Agilent 1290 Infinity オートサンブラ
G1330B	Agilent 1290 Infinity サーマースタット
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
G4212-60007	Agilent Max-Light カートリッジ高感度セル (光路長 60 mm)
G4212-60008	Agilent Max-Light カートリッジ標準セル (光路長 10 mm)

クロマトグラフィ条件

アリールアミンおよびアミノピリジン汎用メソッド

	メタノールメソッド	アセトニトリルメソッド
カラム：	Agilent Eclipse Plus C18 RRHD、150 mm L x 3.0 mm id、1.8 µm dp (p/n 959759-302)	
注入量：	20 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)	
サンプル温度：	15 °C	
流速：	1 mL/min	
移動相：	A = 5 mM H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 、pH 2.75 B = メタノール	A = 5 mM H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 、pH 2.75 B = アセトニトリル
グラジエント：	0~0.5 分 10 % B 0.5~6.3 分 10~85 % B 6.3~6.5 分 85~100 % B 6.5~7.5 分 100 % B 7.5~9 分 10 % B	0~0.5 分 5 % B 0.5~6.3 分 5~80 % B 6.3~6.5 分 80~100 % B 6.5~7.5 分 100 % B 7.5~9 分 5 % B
カラム温度：	40 °C	
DAD ピーク幅：	>0.025 分	
DAD シグナル：	A = Sig 225/5 nm、Ref 450/40 nm (PGI 1、5) B = Sig 232/5 nm、Ref 450/40 nm (PGI 9、2) C = Sig 240/10 nm、Ref 450/40 nm (PGI 4、7、8、6) D = Sig 260/10 nm、Ref 450/40 nm (PGI 3) E = Sig 296/10 nm、Ref 450/40 nm (PGI 10)	

専用メソッド (特定のサンプル用)

カラム：	Agilent Eclipse Plus C18 RRHD、100 mm L x 3.0 mm id、1.8 µm dp (p/n 959758-302)
移動相：	A = 5 mM H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 、pH 2.75 B = メタノールまたはアセトニトリル
流速：	1.25 mL/min
カラム温度：	40 °C
注入量：	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)
サンプル温度：	15 °C

	PGI 8	PGI 9	PGI 9	PGI 10	PGI 10
有機溶媒：	メタノール	メタノール	アセトニトリル	メタノール	アセトニトリル
グラジエント： 0~3.5 分	30~100 %	25~100 %	15~100 %	50~100 %	35~100 %
3.5~4 分	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
4~4.8 分	30 %	25 %	15 %	50 %	35 %
DAD：					
ピーク幅	>0.013 分	>0.013 分	>0.013 分	>0.013 分	>0.013 分
シグナル	240/10 nm	232/5 nm	232/5 nm	296/10 nm	296/10 nm
リファレンス	450/40 nm	450/40 nm	450/40 nm	450/40 nm	450/40 nm

結果と考察

汎用メソッド

これまでに、LC-MS⁵ と LC-MS/MS⁶ を用いたアリールアミンおよびアミノピリジンのクロマトグラフィメソッドが開発されています。これらのメソッドでは、揮発性の移動相成分が使われています。高感度ダイオードアレイ検出に応じて移動相を最適化するために、これらのメソッドを修正しました。同じ pH、同じイオン強度で、UV を吸収するギ酸を、UV を透過するリン酸バッファに置き換えました。この調整後のクロマトグラフィの選択性は、オリジナルの LC-MS メソッドとほぼ同じでした。また、大きい検出器セルボリュームで高い効率を維持するために、カラム内径を大きくし、それに応じて流速も上げました。

MS 検出を用いる場合、イオンやイオン移動性の違いに応じてターゲット化合物を測定できるため、ターゲット PGI のクロマトグラフィ分離は、測定においてそれほど重要ではありません。DAD では、こうした検出器の選択性が得られないことから、クロマトグラフィ分離が必要となります。10 種類の PGI を完全に分離するために、2 つの汎用メソッドを開発しました。2 つのメソッドでは、有機溶媒（メタノールまたはアセトニトリル）の比率とグラジエント条件が異なります。有機溶媒の変更は、選択性に大きな影響を与えます。そのため、それを利用して、ターゲット化合物を他のターゲット化合物やマトリックス（薬剤基質）から分離することができます⁵。

高感度フローセルおよび標準フローセルを用いた標準溶液の分析例を図 2 に示しています。有機溶媒としてアセトニトリルとメタノールを使用しています。高感度セルと標準セルで得られたクロマトグラムを比較すると、感度の向上が明らかに見てとれます。しかし、この感度の向上は、ベースラインにも影響を与えています。サンプルやシステム、移動相の不

純物により生じるすべてのベースラインの変動やドリフトが、ターゲット化合物と同じように拡大されています。たとえば、アセトニトリルを用いたクロマトグラムの 3.6 分に見られる不純物がそれにあたります。この不純物は、上の図では観察されていますが、標準セルで得られた図には見られません。同じように、メタノールと高感度セルを用いた場合にも、5 分で不純物が検出されています。これら

の不純物はいずれも、ブランク分析でも検出されているため、サンプルに由来するものではありません。すべての溶媒をできる限りクリーンに保つよう注意する必要があります。高感度フローセルでは、溶媒の純度に対する要件が明らかに高くなります。一部のケースでは、各分析について、クロマトグラフィ選択性を高めるための対策をとる必要があります。

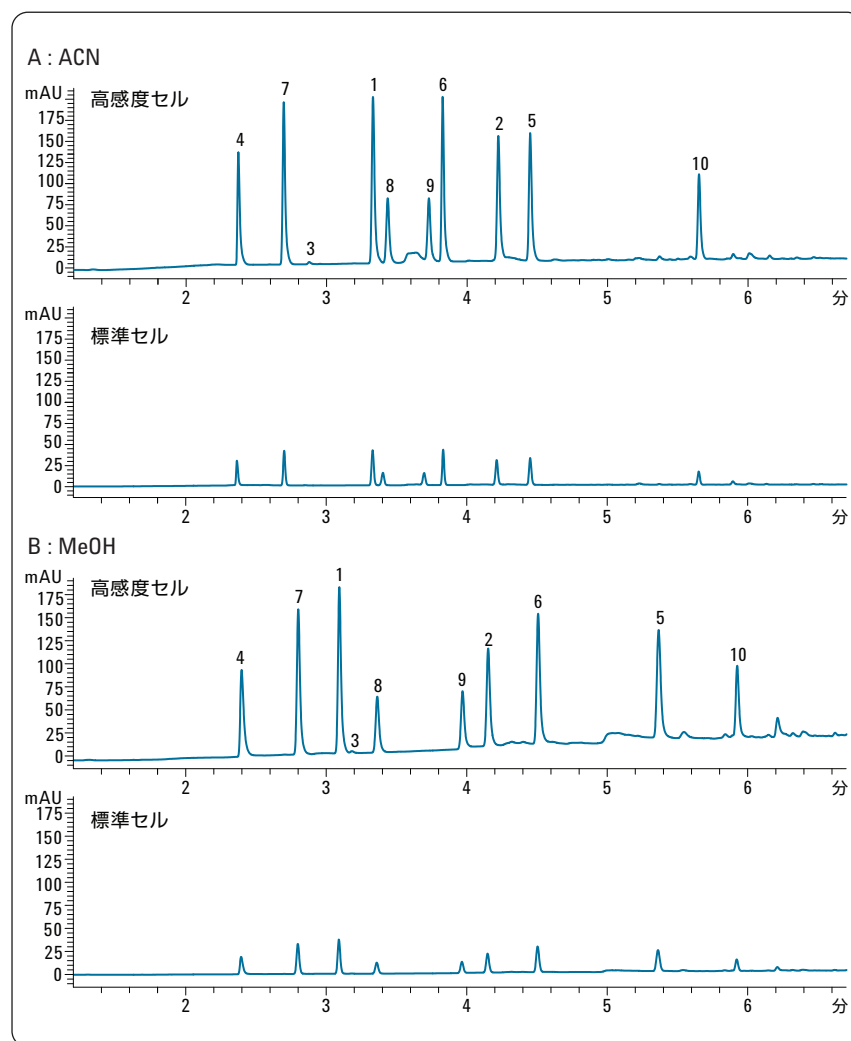


図 2
10 mm 標準 DAD セルと 60 mm 高感度 DAD セルの比較。汎用メソッドにより、150 mm カラムを用いて、全 PGI 混合標準溶液 0.5 µg/mL を分析。DAD 波長: 232 nm。A: アセトニトリル移動相 B、B. メタノール移動相 B

選択した PGI の標準溶液を用いて、メソッドの性能を評価しました。異なる濃度の溶液を 1 回ずつ注入して直線性を測定し、各濃度 (0.01、0.1、1 µg/mL) を 5 回連続で注入して再現性を算出しました。メソッドバリデーションのデータを表 1 にまとめています。高感度フローセルと標準 DAD フローセルの両方で、検出下限を測定しました。6 倍の光路長の効果が明らかに見てとれます。検出下限は大幅に低くなっています。一部の不純物では感度が 5 倍ほど向上し、さらに高くなっているケースもあります (PGI 10 など)。興味深いことに、60 mm フローセルにおいていくつかのターゲット PGI で測定された検出下限は、過去の実験において Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS システム⁶ で得られた検出下限と同様のものでした。

一部の化合物で検出下限が高くなっています。これはおもに、ベースラインの乱れや、これらの微量 PGI の検出に干渉するシステムピークに起因しています (表 1 の*で示した値)。これらの PGI の検出では、メソッドを個別に最適化することで、より低い検出下限が得られます。

濃度 0.1 ppm (0.1 µg/g API = 溶液中 0.01 µg/mL) の標準溶液の分析例を図 3 に示しています。このクロマトグラムは、各 PGI に最適な検出波長でのシグナルを示しています。

再現性 (%RSD)				直線性		LOD (ng/mL)	
アセトニトリル	0.01 µg/mL	0.1 µg/mL	1 µg/mL	範囲	R ²	60 mm	10 mm
PGI 1	0.48	0.19	0.05	0.5~200	1.0000	0.2	0.5
PGI 2	2.38	0.50	0.04	2~200	0.9959	2*	5
PGI 3	3.22	1.79	1.51	5~200	0.9997	5	20
PGI 4	0.58	0.25	0.12	0.5~200	1.0000	0.2	1
PGI 5	0.35	0.25	0.09	0.5~200	1.0000	0.2	1
PGI 6	0.61	0.14	0.02	0.5~200	0.9999	0.2	0.5
PGI 7	0.66	0.07	0.01	0.5~200	1.0000	0.2	0.5
PGI 8	0.63	0.42	0.12	0.5~200	1.0000	0.5	2
PGI 9	8.96	2.34	0.15	5~200	0.9996	2*	5
PGI 10	1.66	0.19	0.15	0.5~200	1.0000	0.2	2

再現性 (%RSD)				直線性		LOD (ng/mL)	
メタノール	0.01 µg/mL	0.1 µg/mL	1 µg/mL	範囲	R ²	60 mm	10 mm
PGI 1	2.11	0.07	0.06	0.5~200	0.9997	0.2	0.5
PGI 2	13.26	4.03	0.12	1~200	0.9994	0.5	2
PGI 3	– (=LOD)	2.89	0.75	10~200	0.9985	10	20
PGI 4	4.79	0.44	0.09	1~200	0.9999	0.5	2
PGI 5	1.73	0.89	0.36	0.5~200	0.9994	0.2	1
PGI 6	4.58	2.23	0.06	5~200	0.9997	5*	10
PGI 7	1.46	0.55	0.03	0.5~200	0.9999	0.2	0.5
PGI 8	1.67	0.24	0.22	0.5~200	1.0000	0.2	1
PGI 9	13.87	4.45	0.21	2~200	0.9997	2*	5
PGI 10	2.51	0.42	0.23	1~200	0.9992	1	5

*ベースラインの干渉により高くなっている LOD

表 1
汎用メソッドの性能

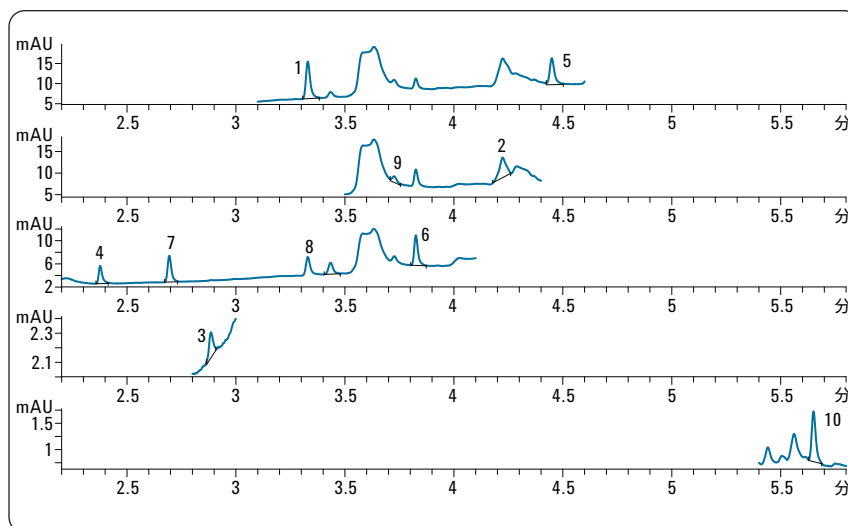


図 3
60 mm 高感度 DAD セルを用いた全 PGI 混合標準溶液 0.01 µg/mL の分析。150 mm カラム、汎用メソッド、アセトニトリル有機溶媒を使用

専用メソッド

実サンプルに含まれる PGI の測定では、医薬品有効成分（または多量に存在する他の不純物）により生じる干渉を避ける必要があります。実サンプルにおける Agilent 1290 Infinity LC 構成の適用可能性を実証するために、選択した API を分析し、既知の PGI を測定しました。汎用メソッドを用いた初期スクリーニング後に、それぞれの API/PGI について、特定の移動相グラジエントと検出器波長を用いた専用メソッドを開発しました。すべての PGI を分離する必要はなく、医薬品品質管理においては分析時間が重要な要素となることから、すべての専用メソッドで短い (10 cm) カラムを使用しました。専用メソッド (実験手法参照) のサイクル時間はおよそ 5 分です。この時間は、生産性の高い分析を実現するための許容範囲内に収まっています。

選択した 4 種類の医薬品から作成した非添加および添加溶液を分析しました。添加濃度は 0.1~100 ppm (µg/g API) です。添加サンプルの測定濃度を理論上の (添加) 濃度と比較し、回収率を測定しました。一部の API サンプルには、すでに多量の PGI が含まれていました。そのため、これらのサンプルについては、低濃度での PGI 回収率は算出できませんでした。

クロルヘキシジン中の PGI 8、リドカインおよびブピバカイン中の PGI 9、ジクロフェナク中の PGI 10 の測定濃度と回収率を表 2 に示しています。一部のケースについては、移動相 B としてアセトニトリルを用いた場合と、メタノールを用いた場合に得られた結果の両方を示しています。ほとんどの値が 100 % に近く、添加濃度 0.1 ppm の値は 80~134 % でした。これらの値は、この濃度では満足のできるものです。PGI 10 は、ジクロフェナク中濃度 0.01 µg/mL (API に対して 0.1 ppm) で検出できました。サンプルおよび標準の代表的なクロマトグラムを図 4 に示しています。

	非添加	添加 0.1 ppm	添加 1 ppm	添加 10 ppm	添加 100 ppm
クロルヘキシジン中 PGI 8、 メタノール、240 nm					
濃度 (ppm) 回収率 %	42.98	算出せず	算出せず	54.71 117.3	143.97 101.0
リドカイン中 PGI 9、メタノール、232 nm					
濃度 (ppm) 回収率 %	3.46	算出せず	4.38 91.4	12.12 86.5	96.08 92.6
リドカイン中 PGI 9、 アセトニトリル、232 nm					
濃度 (ppm) 回収率 %	4.54	算出せず	5.82 128.2	12.98 84.4	95.09 90.5
ブピバカイン中 PGI 9、 アセトニトリル、232 nm					
濃度 (ppm) 回収率 %	0.00	検出 されず	1.05 104.5	9.58 95.8	99.07 99.1
ジクロフェナク中 PGI 10、 メタノール、296 nm					
濃度 (ppm) 回収率 %	0.00	0.13 134.0	1.07 107.2	10.26 102.6	101.40 101.4
ジクロフェナク中 PGI 10、 アセトニトリル、296 nm					
濃度 (ppm) 回収率 %	0.07	0.15 80.0	1.05 97.9	10.33 102.6	100.49 100.4

表 2
非添加および添加後 API 分析における専用メソッドの性能
(ppm は API に対する濃度。API はサンプル溶液中で 10 %)

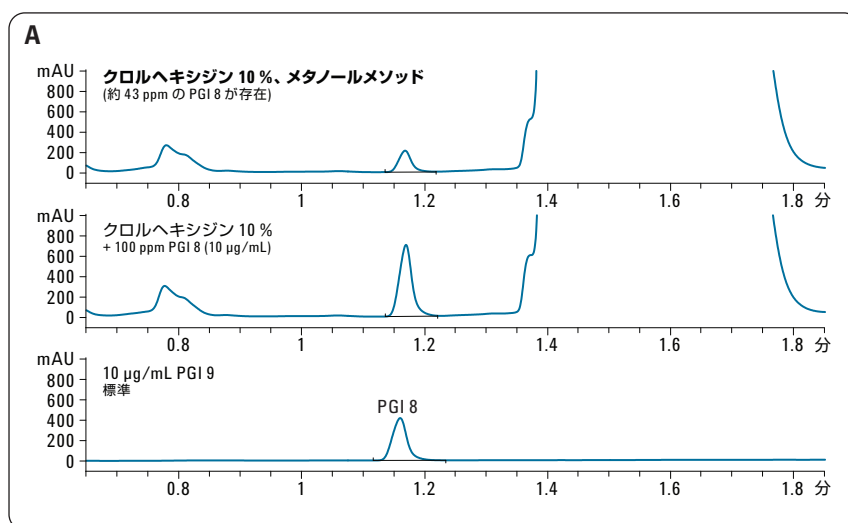


図 4
専用メソッドを用いて分析したサンプル、添加サンプル、標準溶液の代表的なクロマトグラム。
A: クロルヘキシジン中 PGI 8、B: ブピバカイン中 PGI 9、C: ジクロフェナク中 PGI 10 (続く)

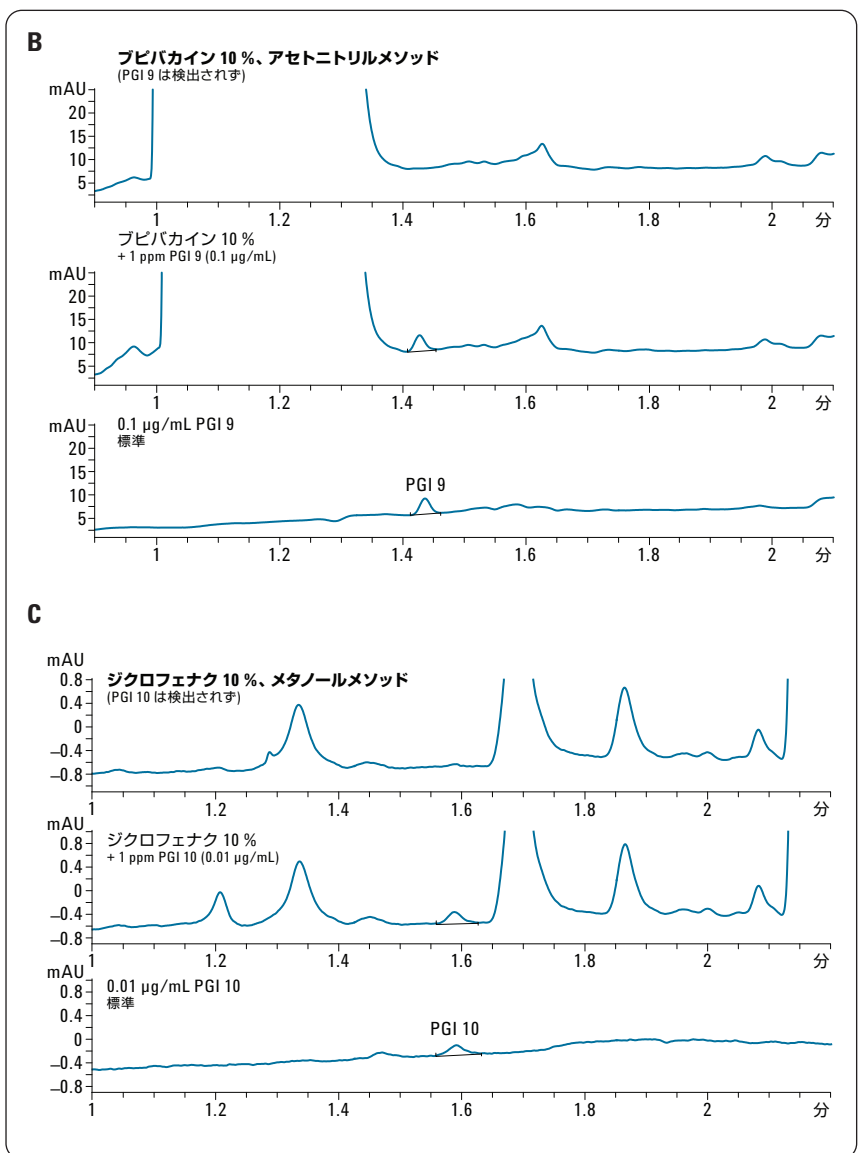


図 4
専用メソッドを用いて分析したサンプル、添加サンプル、標準溶液の代表的なクロマトグラム。
A: クロルヘキシジン中 PGI 8、B: ブピバカイン中 PGI 9、C: ジクロフェナク中 PGI 10

結論

このアプリケーションノートは、60 mm Agilent Max-Light カートリッジ高感度セルと組み合わせた Agilent 1290 Infinity LC-DAD が、API 中 PGI のルーチン微量分析において効果的な手法となることを実証しています。この種の分析に非 MS ベースのシステムを用いることで、高コストで複雑な LC-MS および LC-MS/MS システムに代わる魅力的な選択肢が実現します。

汎用メソッドでは、標準溶液に含まれるオンカラム注入量 4 pg までの不純物を検出できました。実サンプルに一般的な濃度で含まれる PGI の分析を高速化するために、各 API の専用メソッドも開発しました。

参考文献

1. Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities, EMEA, June 2006, <http://www.emea.europa.eu>.
2. Guidance for Industry, Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches, US FDA, December 2008, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079235.pdf>.

3. 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.
4. F. David, K. Jacq, G. Vanhoenacker, P. Sandra, A. Baker, *LC-GC Europe* 22 (2009) 552-561.
5. G. Vanhoenacker, E. Dumont, F. David, A. Baker, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3563-3570.
6. G. Vanhoenacker, F. David, P. Sandra, Agilent Technologies, publication 5990-5732EN, June 2010.

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。本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2011
March 1, 2011
5990-7443JAJP



Agilent Technologies