[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY QDa 検出器による、遺伝毒性不純物の選択性・感度・頑健性の高い定量分析

Janet Hammond
Waters Corporation, Wilmslow, UK

アプリケーションのメリット

- ACQUITY® QDa® 検出器を用いて、選択性・感度・頑健性の高い分析を行うことができます。
- ACQUITY UPLC® H-Class システムにより、高分離でスループットの高い分析が 3 分間という短時間で可能です。
- MassLynx® 質量分析計ソフトウェアと Empower® クロマトグラフィーソフトウェアのどちらでも制御できるため、どちらをご使用の実験室でも運用していただけます。
- LC の流路を廃液に切り替えることで、高濃度の原薬によるイオン源の汚染を低減させます。

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC H-Class システム
（ACQUITY UPLC カラムマネージャ搭載）

ACQUITY QDa 検出器

Empower または MassLynx ソフトウェア

キーワード

UPLC、QDa、遺伝毒性不純物、定量

はじめに

遺伝毒性不純物は、DNA を変異させてガンの原因となる可能性がある化合物です。製薬メーカーにとって重要なことは、創薬の初期段階でこのような不純物の存在を認識し、原薬と製剤の双方の濃度レベルに十分な選択性と感度がある分析方法を開発することです。

遺伝毒性不純物の許容値は、毒性学的懸念の閾値の 1.5 µg/ 日以下、即ち 1 ppm 以下と定められています。これは、一般的な製薬分野での不純物の分析で定められている閾値の 500 ppm より数桁低い値です。

製薬分野での日常的な分析では、不揮発性の化合物に対しては、紫外線吸光検出器（UV）付の液体クロマトグラフが、揮発性の化合物に対しては水素炎イオン化検出器（FID）付のガスクロマトグラフが用いられています。しかし、低濃度の遺伝毒性不純物の分析には多大なる困難が生じます。このような場合、要求される水準の感度・選択性・頑健性を満たす質量分析計が必要です。中には、探索の初期段階から製造の品質管理までを通して必要な分析もあります。

本アプリケーションノートでは、遺伝毒性不純物の検出と定量のための分析条件の一例として、原薬（API）に含まれる 1- フェニルピペラジンを定量下限（LOQ）である原薬の 0.5 ppm にて分析します。使用する装置は、小型で操作が簡単で頑健性のある質量検出器 ACQUITY QDa、ACQUITY UPLC H-Class システム、ACQUITY UPLC カラムマネージャです。

分析条件

UPLC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class、
ACQUITY UPLC カラムマネージャ

カラム： ACQUITY UPLC HSS、1.8 µm、2.1 × 50 mm

カラム温度： 40℃

サンプル温度：10℃

注入量： 1 µL

流量： 0.5 mL/ 分

移動相 A： 0.05 % ギ酸水溶液

移動相 B： 0.05 % ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント：

時間（分）	A（%）	B（%）	Curve
0	95	5	-
1.5	5	95	6
2.1	5	95	6
3.0	95	5	1

分析時間： 3 分

MS 条件

MS システム： ACQUITY QDa 検出器

イオン化モード：ESI ポジティブ

SIR（Single Ion Recording）：*m/z* 163.1 Da $[M+H]^+$

キャピラリー電圧：0.8 kV

サンプリングレート：5 Hz

脱溶媒温度： 600℃

コーン電圧： 10 V

データ管理

MassLynx ソフトウェア v4.1

サンプル調製

10% アセトニトリル水溶液に、原薬 1 mg/mL に対して 10、5、1、0.5 ppm の 1-フェニルピペラジンの標準品を調製しました。

結果および考察

1- フェニルピペラジンの化学構造は図 1、ノミナル質量は 162Da です。ACQUITY QDa 検出器でのフルスキャン分析では、1- フェニルピペラジンは $[M+H]^+$ イオンの 163.1Da で検出されました。

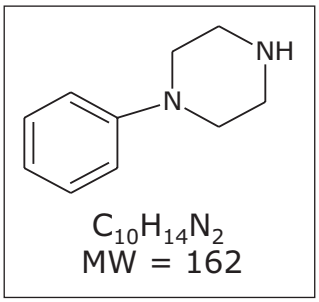

図 1. 1- フェニルピペラジンの化学構造

ACQUITY UPLC カラムマネージャの設定

MS の微量分析において汚染と回収率が低くなる問題を避けるため、マトリックスと原薬を MS のイオン源に入れないようにすることが望まれます。ACQUITY UPLC カラムマネージャを使用すると、ACQUITY QDa 検出器への流路を切り替えることができます。ACQUITY H-Class システムに接続する ACQUITY UPLC カラムマネージャの配管を利用して、移動相の流れを廃液に切り替えるように、装置をコントロールするソフトウェア上で時間イベントのテーブルを設定します。図 2 のように、ACQUITY UPLC のサンプルマネージャと、分析に使用するカラムへ接続しているアクティブプレヒーターを、直接接続します。カラムから出る配管は、アウトレット切り替えバルブの中央のポートに接続します。アウトレット切り替えバルブの「W」ポート（ポジション 1）は廃液に接続しています。アウトレット切り替えバルブの「1」ポート（ポジション 2）は、検出器に接続されています。分析中にカラムマネージャのアウトレット切り替えバルブのポジション 1（廃液）とポジション 2（検出器）を任意の時間で切り替えるように、装置をコントロールするソフトウェアで分析条件のイベントテーブルに設定をすることができます。

分析法開発

1- フェニルピペラジンが原薬の前に溶出するように、UPLC の条件を最適化しました。最終的な分析条件では、1- フェニルピペラジンが 1.2 分に溶出し、原薬は 1.5 分に溶出します。図 3 に示すように、1.3 分でバルブを切り替え、原薬を廃液に流すような時間イベントを設定しています。
ACQUITY QDa 検出器の脱溶媒温度とコーン電圧は、1- フェニルピペラジンの感度が最大になるように最適化しました。

マトリックス効果

目的の遺伝毒性不純物は、原薬、カウンターイオン、製剤の場合は添加物に対して、極めて低濃度で含まれます。そのため、低濃度の分析では選択性の問題が生じます。このような分析の際には、原薬や製剤中に遺伝毒性不純物をスパイクした試料も分析することが重要です。それらの分析により、安定性、イオンサプレッション、イオンエンハンスメントの効果を確かめることができます。今回の分析では、原薬中に 0.1, 0.5, 10 ppm の 1 - フェニルピペラジンをスパイクした試料を分析しました。その結果、原薬に遺伝毒性不純物をスパイクした試料を５回連続注入した際の 1- フェニルピペラジンの面積は、スパイクしていない遺伝毒性不純物の面積より 28% 低くなりました。これにより、マトリックスが 1- フェニルピペラジンに影響を与えていることがわかります。0.5 ppm の 1 - フェニルピペラジンに遺伝毒性不純物をスパイクした試料とスパイクしていない試料中の 1 - フェニルピペラジンの面積を、図 4 に示しています。

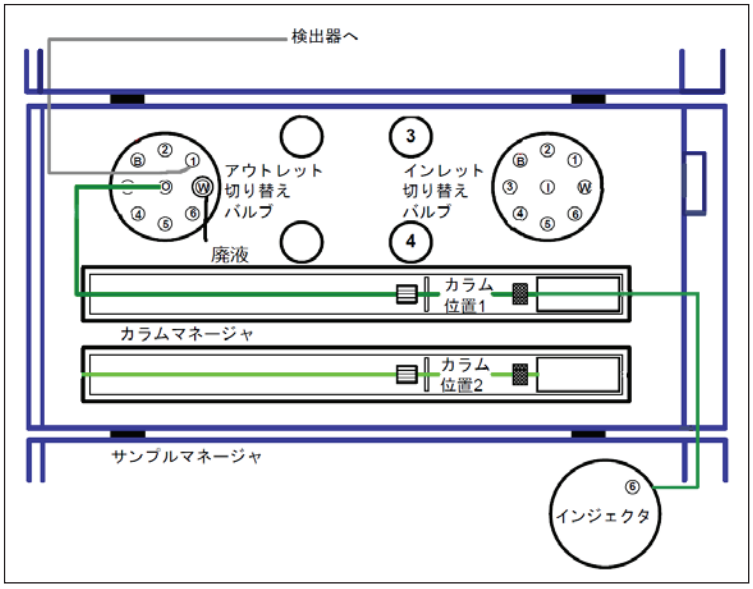

図 2. 移動相を廃液に流すような ACQUITY UPLC カラムマネージャの設定

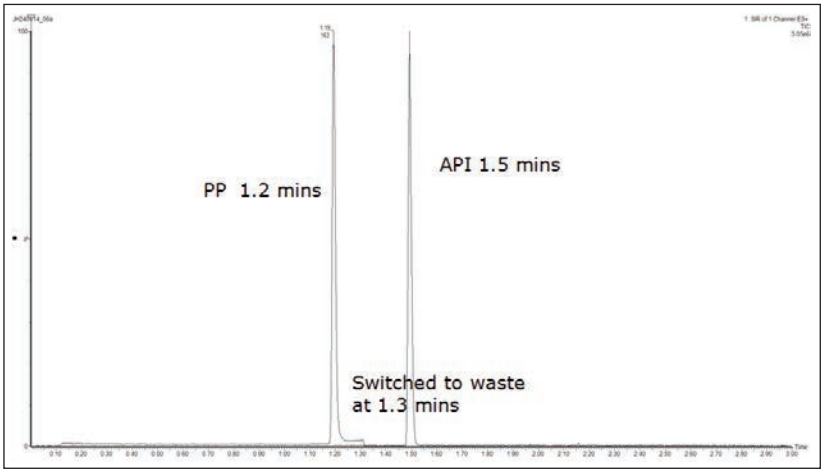

図 3. 1- フェニルピペラジンと原薬の MH+ の SIR クロマトグラム

Sample number	Area
1	802
2	791
3	847
4	827
5	810

A

Sample number	Area
1	1152
2	1182
3	1142
4	1139
5	1162

B

図 4.
A) 原薬に 0.5 ppm の 1- フェニルピペラジンをスパイクした試料を 5 回連続注入した際の面積値
B) スパイクしていない 0.5 ppm の 1- フェニルピペラジンの標準品を 5 回連続注入した際の面積値

直線性

本分析条件の直線性を、1 mg/mL の原薬中に 1- フェニルピペラジンの標準品を 0.1, 0.5, 1.0, 5, 10 ppm スパイクした試料を用いて検証しました。ピーク面積と濃度（ppm）の間には良好な直線性が確認されました（図 5）。定量限界（LOQ）でのシグナル / ノイズは 10 以上、検出限界（LOD）でのシグナル / ノイズは 3 以上を示しました（図 6A と 6B）。6 回の繰り返し連続注入の再現性は、5 段階の濃度の標準試料の全てにおいて、相対標準偏差＜4% となりました。

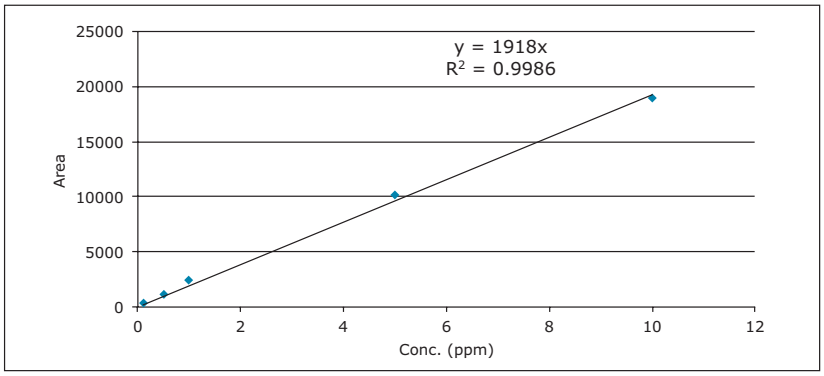

図 5.　1- フェニルピペラジンの 5 点検量線

原薬の分析

3 種類の異なるバッチの原薬を、10%アセトニトリル水溶液にて調製した試料を分析しました。その結果、どの試料にも 1- フェニルピペラジンは 0.5 ppm 未満しか含まれないことがわかりました。図 7 に一例を示しています。

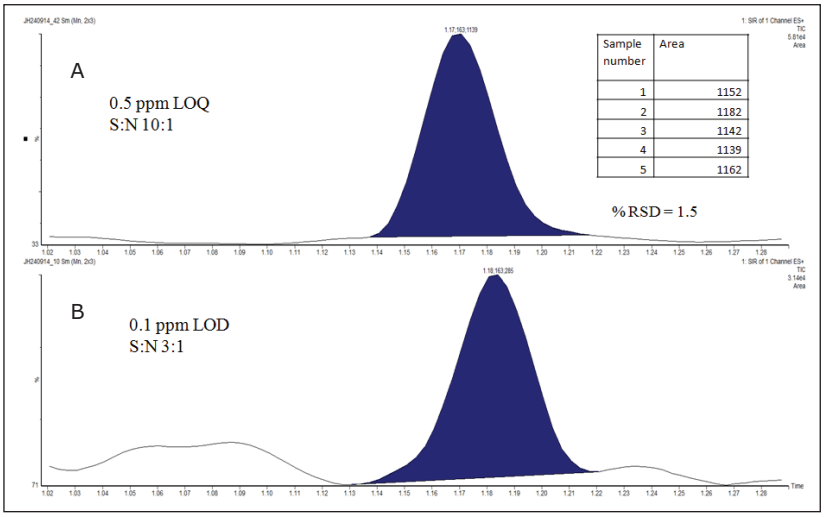

図 6.
A）定量限界（LOQ）0.5 ppm での 1- フェニルピペラジンの SIR クロマトグラム
B）検出限界（LOD）0.1 ppm での 1- フェニルピペラジンの SIR クロマトグラム

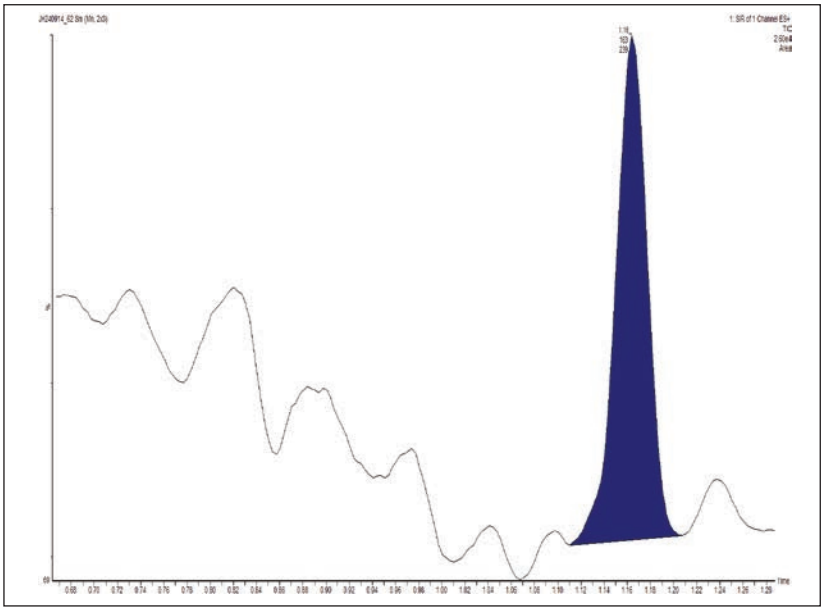

図 7.　典型的な原薬のバッチにおける 1- フェニルピペラジンの分析

結論

ACQUITY UPLC H-Class システムと ACQUITY QDa 検出器により、原薬中の 1- フェニルピペラジンの分析を良好に行うことができました。

- ACQUITY QDa 検出器で SIR を使用すると、選択性が高く、1 mg/mL の原薬中に含まれる、定量限界の 0.5 ppm の 1- フェニルピペラジンの分析までの高感度の分析が可能です。
- UPLC により、高分離でスループットの高い分析が可能で、分析時間 3 分という効率が得られます。
- ACQUITY UPLC カラムマネージャを使用すると、移動相の流路を原薬が溶出する前に廃液に切り替え、イオンソースを汚染することを防ぎます。
- 1- フェニルピペラジンの全ての濃度の標準品において、ピーク面積の再現性は、相対標準偏差 %RSD < 4% となりました。
- 1- フェニルピペラジンの標準品 0.1~10 ppm において、検量線は直線性を示しました。
- MassLynx と Empower の両方のソフトウェアにより制御が可能なため、ACQUITY UPLC H-Class QDa システムは様々な実験室で使用することが可能です。
- 創薬から品質管理までの全ての過程においてご使用いただけます。

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、ACQUITY、UPLC、ACQUITY UPLC、QDa、Empower、MassLynx および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年8月 720005372JA PDF