

Agilent InfinityLab LC/MSD iQ による ブランド医薬品およびジェネリック医薬品中の 微量不純物の測定

著者

Kyle Covert, PhD
Agilent Technologies, Inc.



概要

このアプリケーションノートでは、ブランドおよびジェネリックの市販 (OTC) アセトアミノフェン薬中の関連不純物を比較したメソッドを紹介します。分析には、Agilent 1290 Infinity II LC と質量選択検出器 InfinityLab LC/MSD iQ を用いました。このアプリケーションノートでは、UV で確実に検出できる濃度よりも低い濃度で不純物を同定できました。

はじめに

多くの OTC 医薬品は、ブランド医薬品から開発されたジェネリック医薬品として販売されており、処方せんがなくても購入できます。ジェネリック医薬品はさまざまなメーカーが販売しているため、価格競争の結果、ブランド医薬品より安価となっています。ジェネリック OTC 医薬品のメーカーは、米国食品医薬品局が定めるように、力価、純度、安定性、関連不純物のリミット値などの品質属性を、認可済みのブランド医薬品と一致させなければなりません¹。ジェネリック医薬品メーカーは一般的に HPLC および UV 検出を用いて、製品とその不純物を特性解析する必要があります。質量選択検出器を追加することで、ターゲット化合物の質量によって共溶出する化合物を明確に特定できるため、代表的な USP または EP メソッド² の分析時間を大幅に短縮することができます。

この研究では、アセトアミノフェンのブランドおよびジェネリックの OTC 医薬品中の関連不純物の比較を示します。InfinityLab LC/MSD iQ と 1290 Infinity II LC を使用して不純物をスクリーニングしました。LC/MSD iQ は、シングル四重極の技術をベースに、使いやすさと信頼性を念頭に設計された堅牢な検出器です。最小限のユーザートレーニングで直観的に使用できます。高流量 LC にも対応でき、MS パラメータを自動的に最適化して最適な測定結果を提供します。質量測定を用いることで、医薬品有効成分 (API)、関連不純物はもちろん、未知の不純物や予想外の不純物を明確に検出できます。LC/MSD iQ は、既存の LC システムの追加モジュールとして容易に増設可能です。LC モジュールと同じ電源を使用可能で装置サイズもコンパクトであるため、Agilent 1260 Infinity II LC、1290 Infinity II LC、さらに旧世代の LC と

も簡単に統合できます。HPLC システムは MS および真空ポンプを含めて、Agilent InfinityLab フレックスベンチ MS に収納できるため、ラボの省スペース化が図れると同時に、システム全体を簡単かつ安全に移動することができます。

実験方法

標準試薬および化学物質

すべての試薬と溶媒は、HPLC または LC/MS グレードのものを使用しました。メタノールは 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。アセトアミノフェン API、関連不純物、酢酸の標準品は、Millipore-Sigma (Merck、ダルムシュタット、ドイツ) 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 (EMD Millipore、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国) から採水しました。

OTC 医薬品のサンプルは、ドラッグストアで購入しました。ブランド医薬品を医薬品 1、ジェネリック医薬品を医薬品 2 としました。

装置構成

LC/MSD iQ システムは以下のモジュールで構成されます。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II バイアルサンブラ (G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)
- Agilent LC/MSD iQ (G6160AA)

UV 検出器と LC/MSD iQ の最大感度が得られるよう、DAD を Agilent Max-Light カートリッジセル、60 mm (G4212-60007) と組み合わせ使用しました。

サンプル前処理

選択した医薬品の不純物標準を計量して 15 mL Falcon チューブに入れ、MeOH で作業濃度の 1 mg/mL に希釈して、約 15 分間超音波処理しました。各標準を 100 μL ずつ 2 mL のスクリュウバイアルに加え、80:20 MeOH/H₂O で 1 mL に希釈しました。80:20 MeOH/H₂O で段階希釈を行い、外部標準曲線を作成するために、10、5、2.5、1、0.5、0.1 μg/mL の濃度の標準を作成しました。OTC 医薬品サンプルは錠剤形状で、1 錠あたり 500 mg のアセトアミノフェン (API) を含有していました。MeOH を使用して、API とその不純物のシンプルな液体抽出を行いました。錠剤薬品を 10 mL の MeOH とともに 15 mL Falcon チューブに入れて、30 分間振とうし、約 30 分間超音波処理して、4,500 rpm で約 15 分間遠心分離にかけて沈殿させました。その後、Falcon チューブから 1 mL の最終溶液をピペットで取り、2 mL スクリューバイアルに移し、API の最終濃度を 50 mg/mL にして分析しました。

Agilent OpenLab CDS

Agilent OpenLab CDS ソフトウェアを用いて、データ取り込み、データ処理、およびレポート作成をしました。OpenLab CDS ソフトウェアは、コンプライアンス機能を備えており、米国食品医薬品局 (US FDA) 21 CFR Part 11、欧州連合 Annex 11 など、各種規制のデータインテグリティに対応しています。1290 Infinity II LC と LC/MSD iQ は、GxP ラボのルーチンアプリケーションにおいて、信頼性と堅牢性に優れた LC/MS を実現できるように設計されています。

結果と考察

OpenLab CDS 2.4 による検量線直線範囲の測定

検量線は Agilent OpenLab CDS 2.4 ソフトウェアを用いて作成しました。OpenLab CDS のデータ解析で、検量線を容易に表示できます (図 1)。この検量線データはテストサン

ルの自動および迅速定量用に保存されます。外部検量線は、標準不純物用に 6 つの濃度 (0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 µg/mL) でそれぞれ 3 回繰り返し分析して作成しました。これらの濃度は、サンプル中の API の 2、10、20、50、100、200 ppm に相当します。この範囲は、医薬品サンプル中の不純物の想定濃

度を一括して扱うために選択しました。図 2 は検量線を示し、すべてのターゲット化合物で $R^2 > 0.99$ の検量線が得られました。

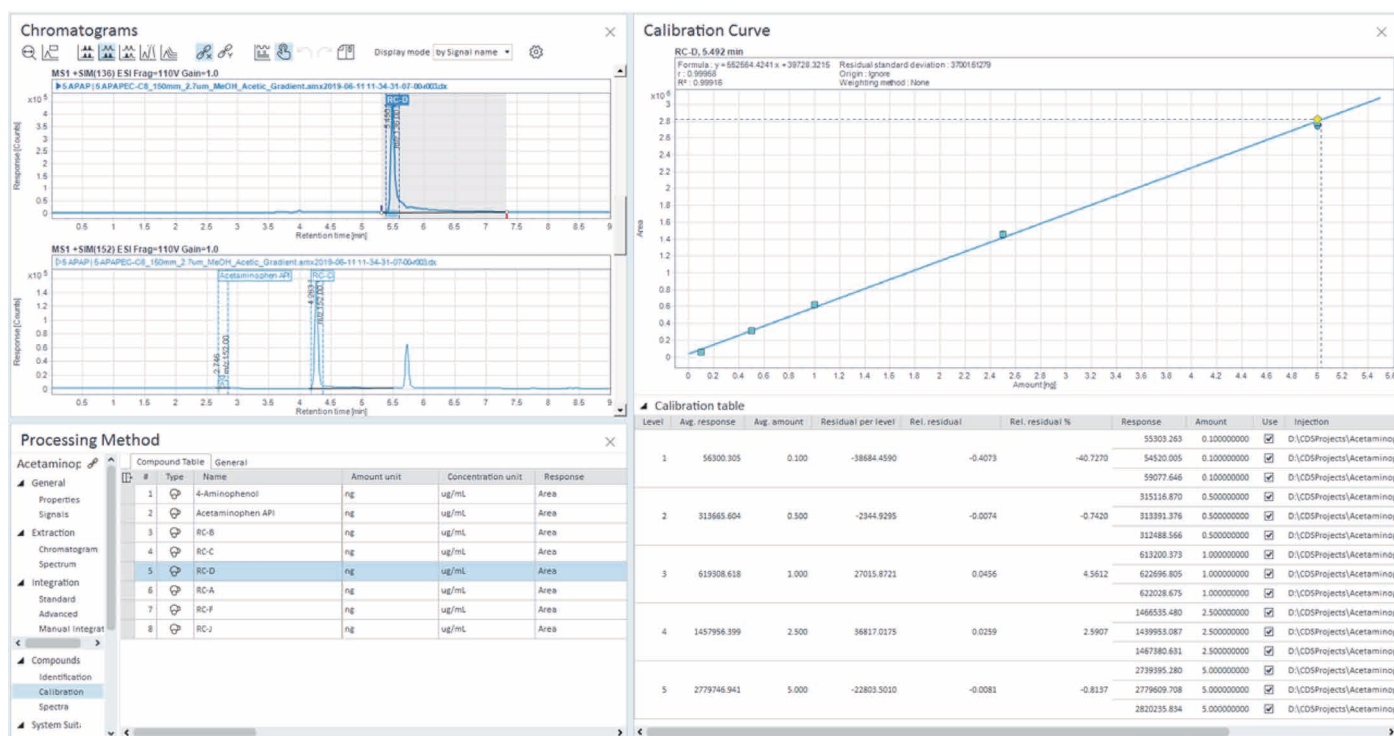


図 1. Agilent OpenLab CDS のデータ解析セクションで検量線タブを開いた状態。クロマトグラムと検量線の両方を簡単に表示し、検量線を選択して計算をリアルタイムで更新できます。

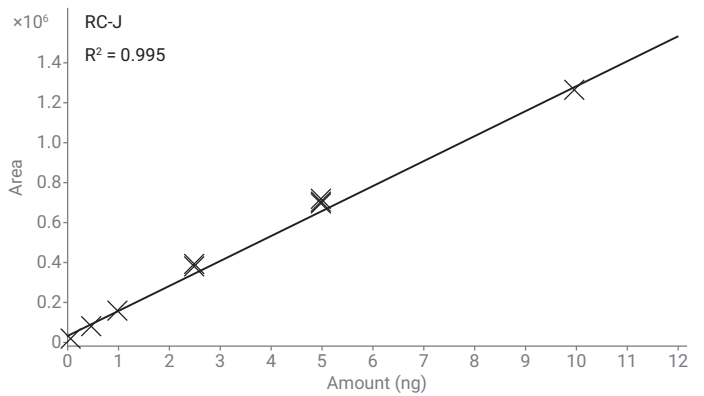
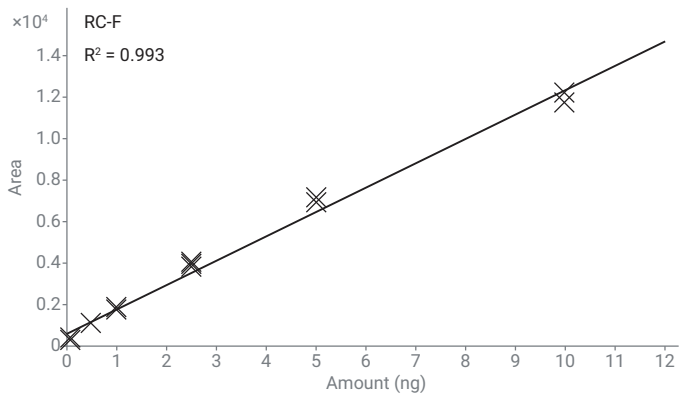
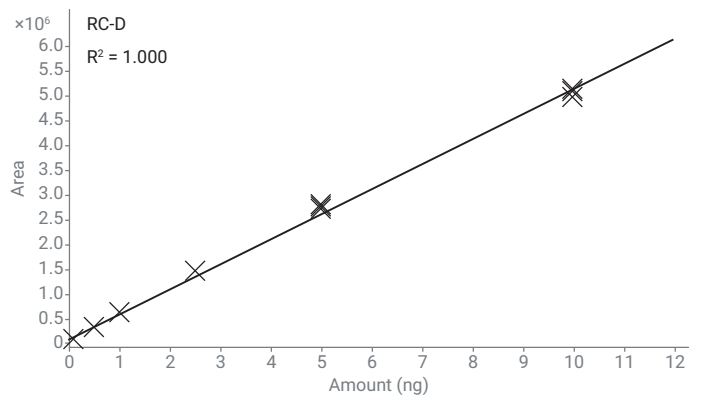
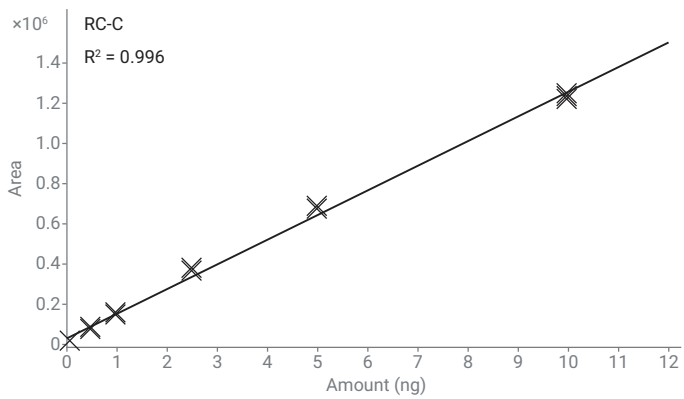
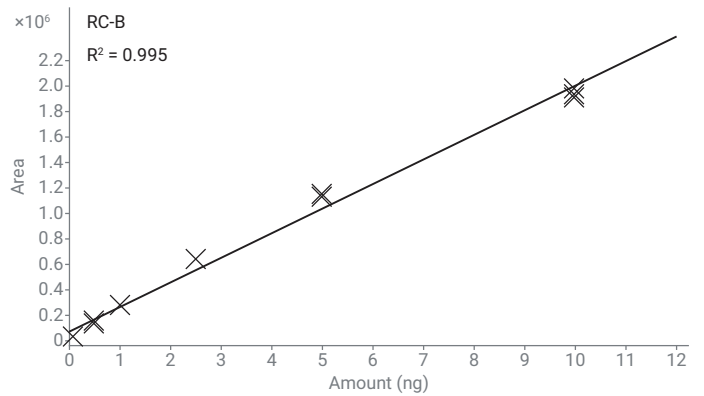
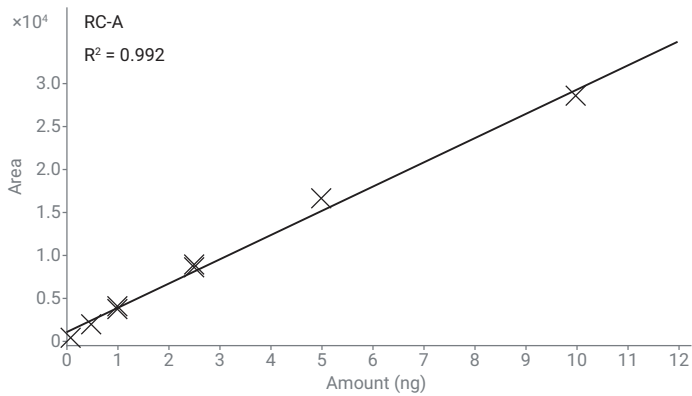
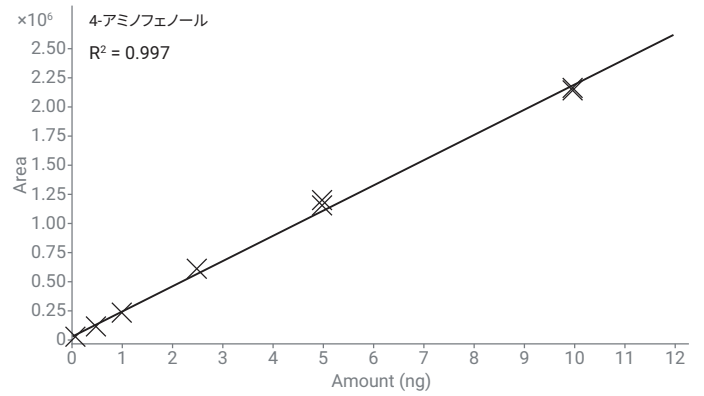
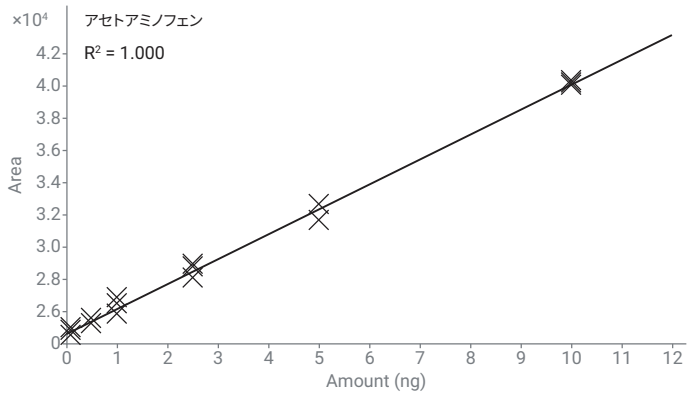


図 2. API と表 1 のリストに記載された不純物の外部標準検量線。すべてのターゲット化合物を 3 回繰り返し分析して R² > 0.99 が得られました。

MS 検出器の保護に重要となる 医薬品 API のバルブカット

LC/MSD iQ は切り替えバルブを内蔵しているため、高濃度サンプル中の不純物の分析が容易で、MS 検出器の耐久性と堅牢性が確保されます。サンプル中の高濃度の API (50 mg/mL) に起因して MS 検出器が過飽和となるのを防ぐには、API が溶出する時間に

DAD の後ろの流路が廃液側に分岐するようにします。まず、流路に MS を使用せずにサンプルを測定して、API を分岐させる時間を求めます (図 3)。

2.5 ~ 3.5 分まで流路を廃液側に分岐するように、内蔵の LC/MSD iQ 切り替えバルブを設定しました。API のみを分岐して、最初の不純物が溶出する前に、流路を質量分析計に戻すように切り替えています。

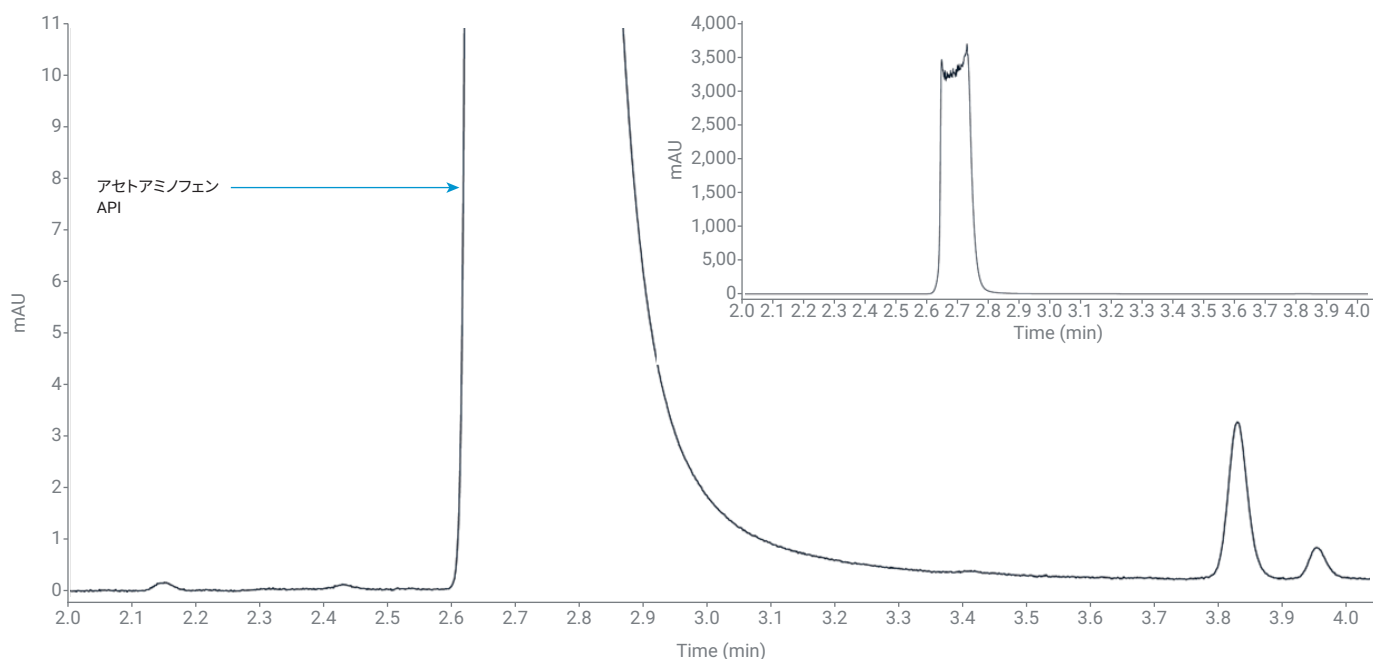


図 3. 医薬品 API のアセトアミノフェンを 50 mg/mL 含む医薬品サンプル 1 μ L 注入の UV クロマトグラムの拡大図。挿入図は同じ分析でのフルスケールを示します。

OTC サンプル中の不純物の同定

LC メソッドを最適化して適切に分離するために、表 1 に記載される各不純物を標準サンプルから個別に測定しました。その後、サンプル中の不純物の同一性を判断するために、API と不純物標準を 10 µg/mL の濃度で含む混合サンプルの 1 µL 注入を測定して、医薬品サンプルと比較しました (図 4)。

医薬品サンプルを 1 µL 注入し、表 1 のすべての不純物について選択イオンモニタリング (SIM) モードで分析しました。図 5 に、医薬品サンプル中で検出された関連不純物の一部を示します。医薬品サンプル中で確認された不純物は 4 種類のみでした。4-アミノフェノール、RC-A、RC-B、RC-D です。今回の調査では、関連化合物プロファイル (図 6) の SIM のみを比較し、製剤の一部となる他の成分は除外しました。

表 1. 標準 API および不純物のリスト

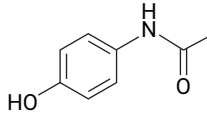
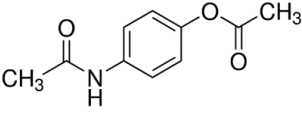
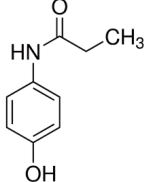
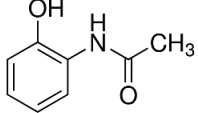
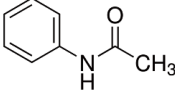
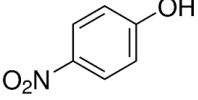
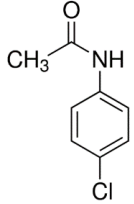
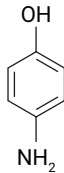
化合物	g/mol	構造
アセトアミノフェン	151.2	
関連化合物 A	193.2	
関連化合物 B	165.2	
関連化合物 C	151.2	
関連化合物 D	135.2	
関連化合物 F	139.1	
関連化合物 J	169.6	
4-アミノフェノール	109.1	

表 2. Agilent 1290 Infinity II LC メソッドパラメータ

パラメータ	HPLC の設定値												
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 3.0 × 150 mm、2.7 μm、40 °C (p/n 693975-306)												
移動相 A	0.1 % 酢酸水溶液												
移動相 B	0.1 % 酢酸メタノール溶液												
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間/分</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>8.5</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	時間/分	%B	0	10	7	50	8	80	8.5	80	9.0	10
時間/分	%B												
0	10												
7	50												
8	80												
8.5	80												
9.0	10												
ポストラン	2.5 分												
流量	0.6 mL/min												
注入量	1 μL												
検出 UV	(265, 5 nm/ref. 360, 80 nm), (318, 5 nm/no ref.)												

表 3. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ パラメータ

パラメータ	シングル四重極の設定値
イオン源	ESI+
ピークフィルタ	0.02 分
スキャンドウェルタイム	スキャン 100 ms SIM 50 ms
ドライガス温度	325 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
キャピラリー電圧	3.5 kV
フラグメンタ電圧	90 V
スキャン範囲	m/z 100 ~ 300
SIM イオン	m/z 110、152、194、166、136、140、170

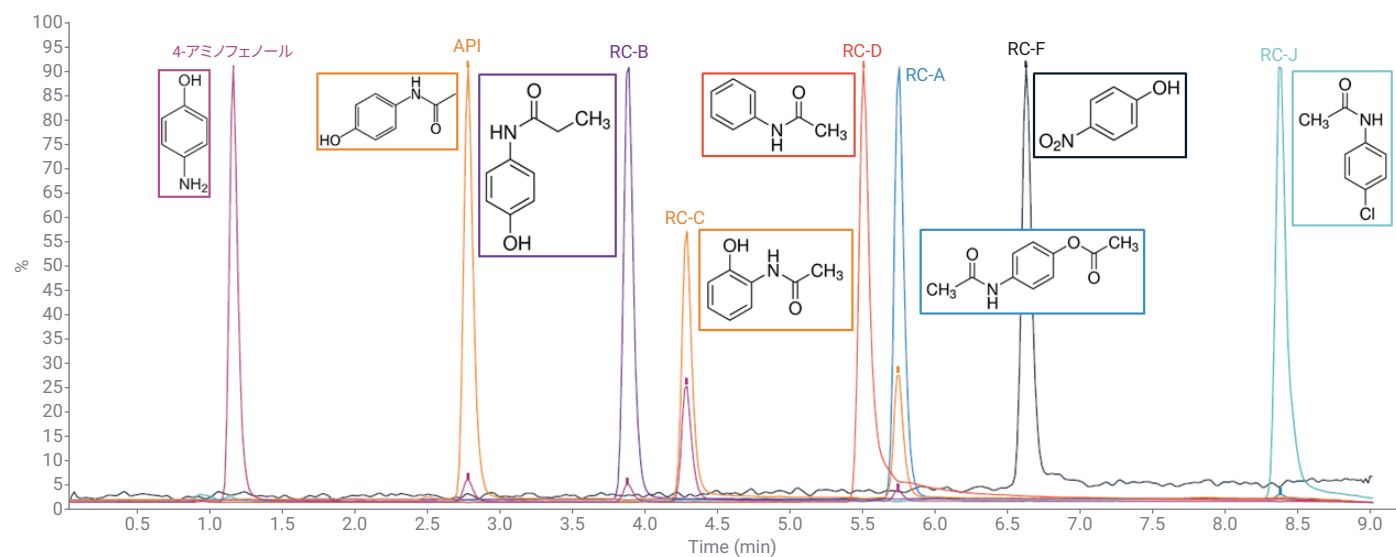


図 4. 1 μL 注入の API および不純物標準 (10 μg/mL) の SIM クロマトグラム。各ピークに色分けした構造のラベルを付けています。シグナルスケールが相対アブダンスに設定され、各ピークを明確に観察できます。

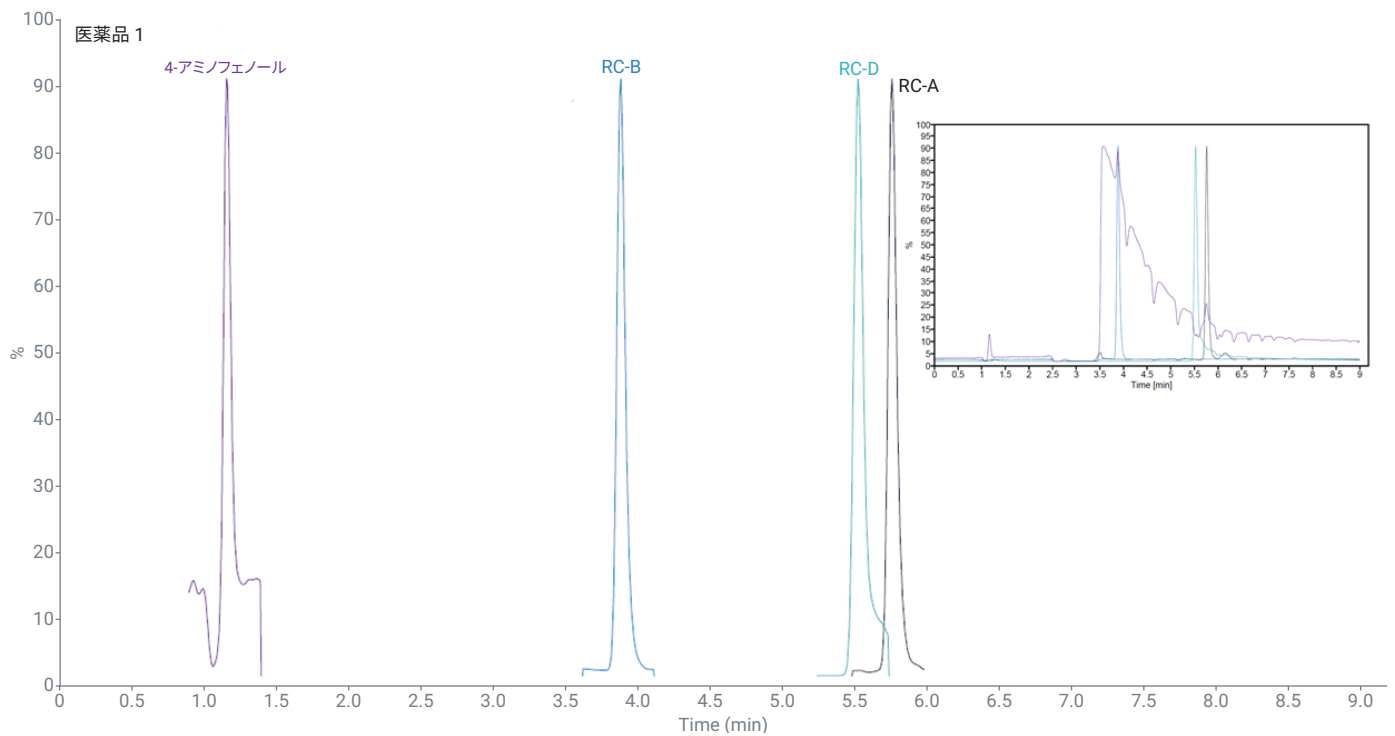


図 5. 50 mg/mL の API を含む医薬品サンプル 1 を 1 μ L 注入した際の SIM 抽出イオンクロマトグラム (EIC)。分かりやすくするために、SIM シグナルを 0.5 分で一括りとし、挿入図には SIM TIC クロマトグラム全体を示しています。挿入図のブロードピークは、4-アミノフェノール (m/z 110) と同じ m/z で検出された API のフラグメントです。

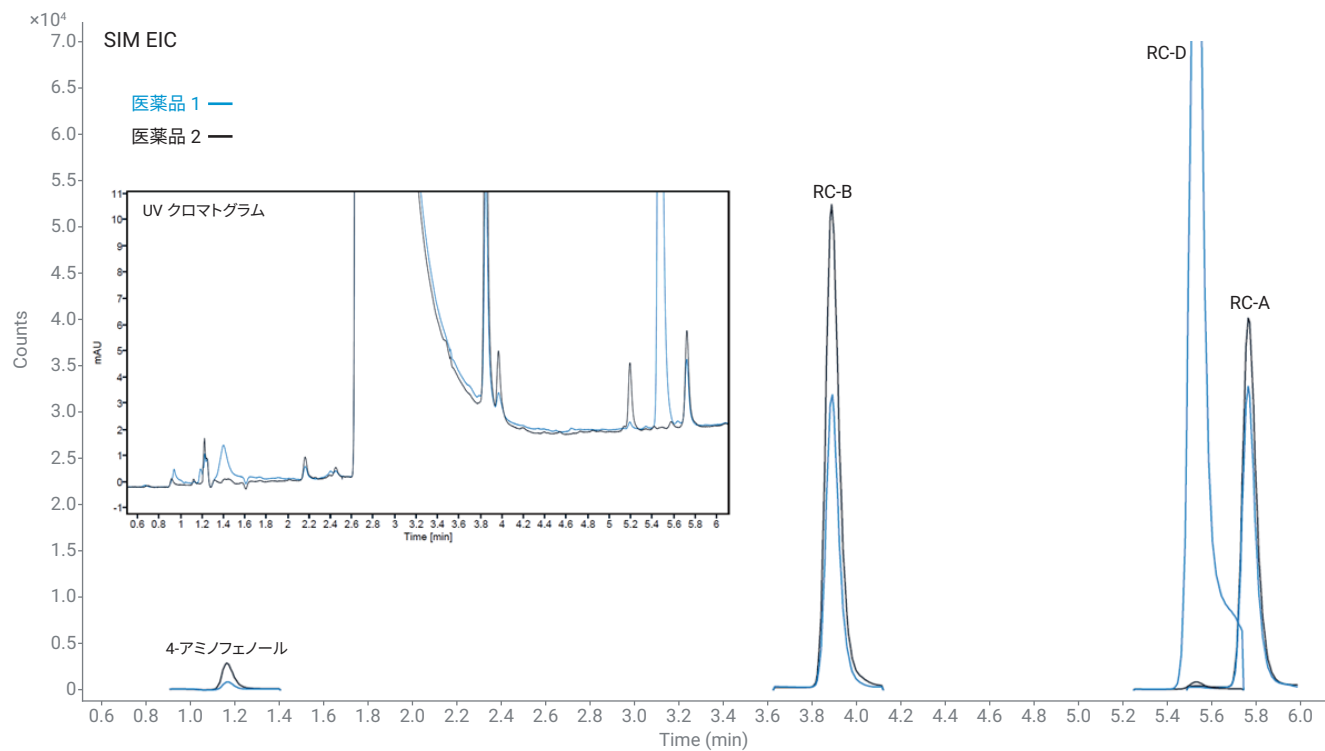


図 6. OTC 医薬品サンプル中で検出された医薬品不純物の SIM EIC。医薬品 1 は青色、医薬品 2 は黒色で示します。分かりやすくするために、不純物の EIC をそれらのリテンションタイムの周辺で一括りにしました。右上の図は同じ注入の UV クロマトグラムで、表 1 の不純物とは関連しない他の化合物を示しています。

ブランド医薬品サンプルとジェネリック OTC 医薬品サンプルの比較

図 6 に、医薬品サンプル 1 および 2 で測定した標準不純物、4-アミノフェノール、RC-A、RC-B、RC-D の比較を示します。特に興味深いのは RC-D です。医薬品 2 よりも医薬品 1 の方が大幅にアバンダンスが高くなっています。しかし、不純物のアバンダンス全体は 4-アミノフェノール、RC-B、RC-A で医薬品 2 の方が高くなっています。表 4 に、検出された不純物の量を各医薬品サンプル中の API (ppm) と比較して示します。これらの不純物の量は USFDA 推奨ガイドライン³ を十分に下回っていますが、ブランド医薬品とジェネリック医薬品で不純物の組成に明らかな違いがあります。

表 4. 医薬品サンプル中の API に対する各不純物量 (ppm) の比較。濃度が高いものを太字で示しています。

不純物	医薬品 1 (ppm 対 API)	医薬品 2 (ppm 対 API)
4-アミノフェノール	0.440*	1.586*
RC-A	3.010	4.960
RC-B	4.260	14.72
RC-D	21.32	検出されず
RC-C	検出されず	検出されず
RC-F	検出されず	検出されず
RC-J	検出されず	検出されず

* 最小キャリブレーションレベルよりも低い値は外挿法により推定しました。

結論

Agilent LC/MSD iQ により、OTC 医薬品中の不純物をピコグラムのオンカラムレベル (ng/mL) まで容易に検出できます。ブランドおよびジェネリック OTC 医薬品の不純物を分析し、比較しました。ブランド医薬品には、4-アミノフェノール、RC-A、RC-B、RC-D の 4 種類の検出可能な不純物が含まれていました。一方、ジェネリック医薬品には、4-アミノフェノール、RC-A、RC-B の 3 種類の検出可能な不純物が含まれていました。ブランド医薬品の方が、分析で検出された不純物の種類は多かったものの、含まれている不純物の濃度はジェネリック医薬品の方が高いという結果になりました。いずれの OTC 医薬品も USFDA ガイダンス³ に従って製造されており、不純物濃度はガイダンスで指定されている 15 µg/mL、つまり API の 0.03 % というレベルを大幅に下回っています。これらの濃度 (表 4 を参照) では、UV 検出器によって不純物を高い信頼性で定量することはできませんでした。さらに、2 種類の API 間で観察される不純物のプロファイリングの違いは、原材料の産地や、製造時に使用された合成および精製プロセスに起因するものと考えられます。

参考文献

1. Generic Drugs. <https://www.fda.gov/drugs/buying-using-medicine-safely/generic-drugs>.USFDA, May 16, 2019. Retrieved July 22, 2019.
2. Acetaminophen USP Monograph. The United States Pharmacopeia Convention.May 1, 2014.
3. US Department of Health and Human Services; FDA; CDER; CBER. Guidance for Industry Q3B(R2) Impurities in New Drug Products. ICH, July 2006, Rev. 2.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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, October 8, 2019
5994-1431JAJP

