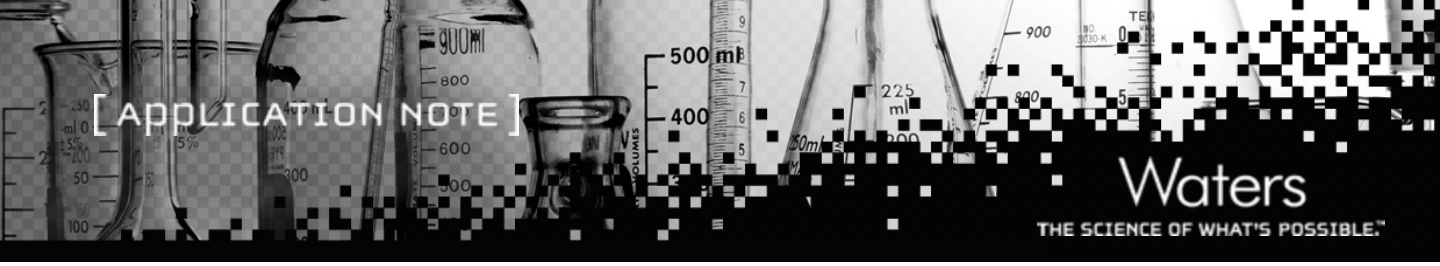


No. 720001468J

ACQUITY UPLC®による医薬品の不純物分析法開発 選択性の改善に向けて

概要

医薬品の不純物プロファイリング及び製剤分析等においては、高い選択性とスループットが求められています。また、承認申請に向けて、有効成分だけでなく製造工程及び保存時に生成する不純物についての分析法開発が求められています。Histamine-2 receptor antagonists (H2-blockers) に分類されるRanitidineは、胃酸の生成をブロックしたり防いだりします。
現在USPに記載されたRanitidine及びその類縁物質に関する定量及び不純物試験については、時間がかかり骨の折れる薄層クロマトグラフィー（TLC）及び液体クロマトグラフィー（HPLC）が利用されております[2,4]。最近のアプローチとしてはキャピラリー電気泳動による1分析あたり30分の分析例がありますが、競争の激化する今日の医薬品開発においては、より短時間での分析が求められております。
本アプリケーションでは、 旧来のHPLCによる分析と比較しより多くの不純物を同定・検出するため、3次元検出器（PDA）及びシングル四重極MS検出器を装備したACQUITY UPLC®による高分離能、ハイスループット分析の例をご紹介いたします。

実験

本アプリケーションでは、ラニチジン標準品（2 mg/mL）を85℃で48時間還流して不純物分析用の試料を調製しました。LC条件は、ピーク分離及び分析時間を最小に保ちながら最も多くのピークを検出することを狙い、カラム、pH及び温度について検討しました。

UPLCによる分析条件

装置　:ACQUITY UPLC® システム　PDA検出器
カラム　:ACQUITY BEH C_{18} 1.7μm
　2.1x 100 mm（4本検討）
カラム温度 :50 ℃
移動相A　:20mM重炭酸アンモニウム pH 9.0（2種検討）
移動相B　:メタノール
弱洗浄溶媒　:95/5 H_2O/MeOH, 1200uL
強洗浄溶媒　:50/50 H_2O/MeOH, 300uL
流速　:0.45 mL/min
注入量　:1.0μL
検出波長　:230nm
グラジエント　:Time　Profile

(min)	%A	%B
0.0	96.0	4.0
1.0	84.0	16.0
4.0	64.0	36.0
7.0	10.0	90.0

ソフトウエア　:Empower™

結果

分析法開発プロセス:　選択性の改善

4本の異なる充填剤のカラムを用いて得られた結果を図1に示します。主要な不純物はA～Jで示されています。20mMの重炭酸アンモニウム（pH 9.0）を含む5-90%Bメタノール溶液を用いた5分間のグラジエントによってカラムを評価いたしました。初期の検討では、フェニル基をもつカラムが不純物の分離に対して一番良い分離を示しました。しかしながら、不純物に対して全体的に優れたピーク形状と選択性を示したことから、分析法開発にはBEH C_{18}カラムを選択いたしました。ピークI及びピークJの分離にはフェニルカラムが一番良い分離を示しましたが、BEH C_{18}カラムによって得られたクロマトグラムも最適化が可能であると考えました。

ACQUITY UPLC® PDA/SQDシステム

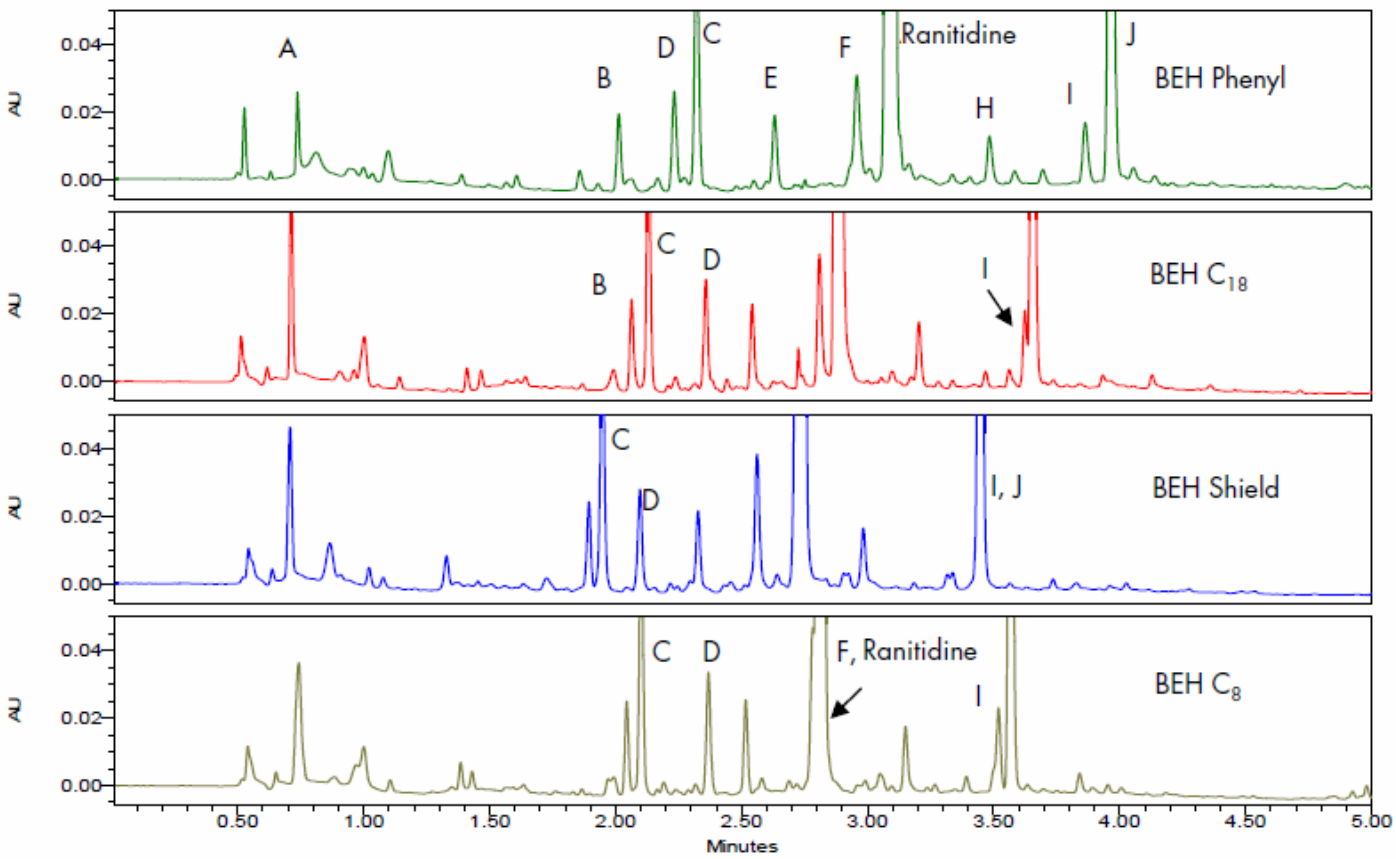


図1　カラムの検討

pH

pHを検討することは、ピーク形状及び選択性の改善に最も有効な手段の一つです。医薬品の多くは塩基性化合物であり、pKaよりも高いpHを利用することによって良好なピーク形状を得ることができます。酢酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム及びギ酸アンモニウムは、MS分析にも利用可能です。今回は、pH 5.0及び9.0でのクロマトグラムを確認し、20mM重炭酸アンモニウム（pH 9.0）緩衝液を検討用として採用いたしました。

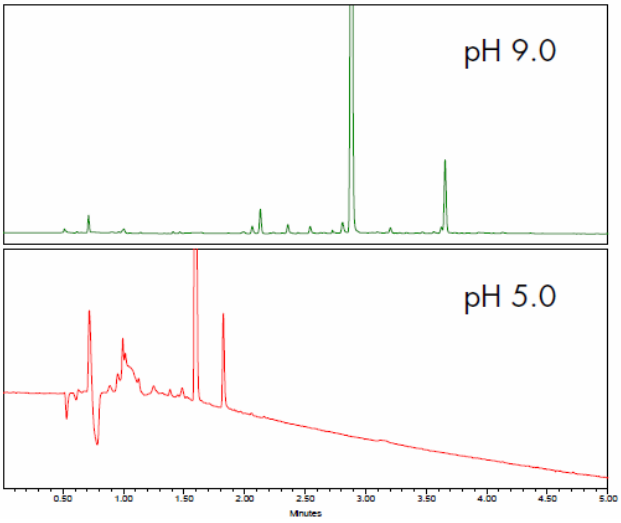
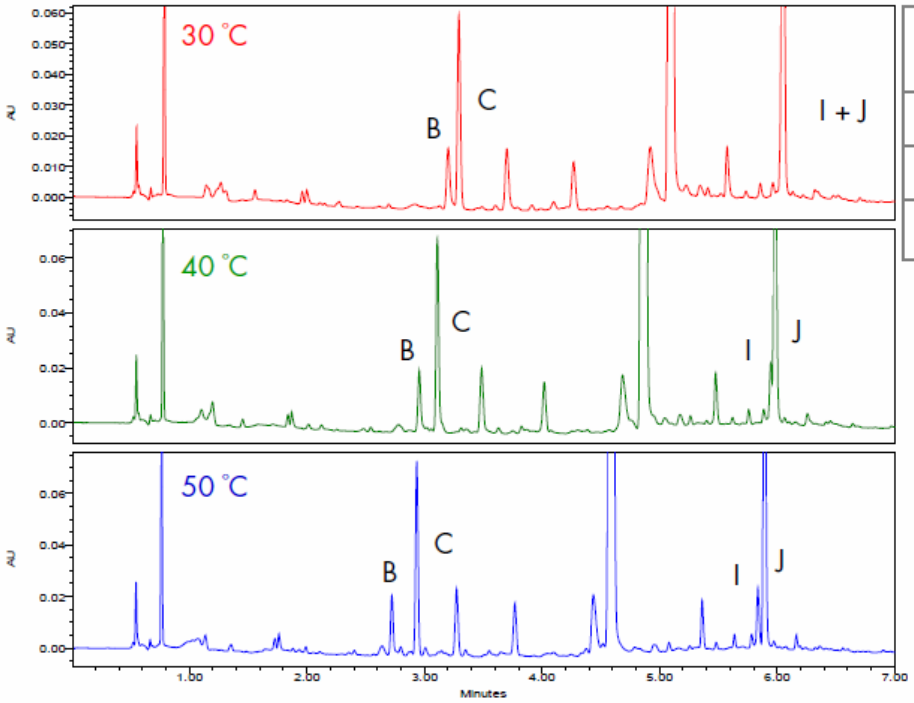


図2 pHの効果

温度

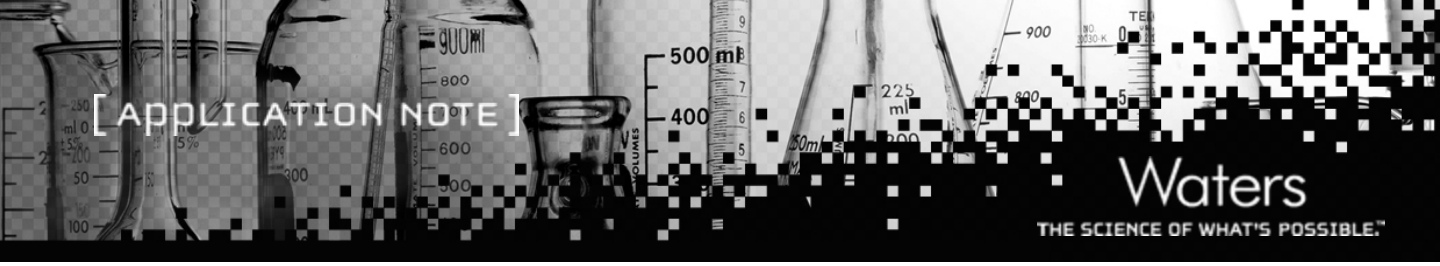
温度は検討しやすい項目の一つです。温度の上昇に伴って溶出時間は早くなり、短時間での分析が可能となります。一旦カラム充填剤及びpH、又はその他のパラメーターが決定された後、温度を最適化されることを推奨いたします。図3では、温度の上昇に伴ってよりシャープなピーク形状及び分離能の増加が認められております。

図1及び2で得られた結果から、グラジエント及びpH条件が最適化されました。メタノール4%から16%まで1分間リニアグラジエントを行い、2段階目のリニアグラジエントでは4分間で36%まで、そして最後に7分間で90%までリニアグラジエントを行います。



Temp	Rs (B + C)	Rs (I + J)
30 °C	1.80	0
40 °C	3.52	~1
50 °C	5.33	1.54

図3　温度の検討及び分離度の比較



UPLC分析条件

最終的なUPLCによる分析条件では、最短の分析時間及び最高のピーク分離を目指し、最適化が行われております。この分析法では、6分間の分析時間で11本の不純物ピークが完全分離しています。HPLCで得られた分離（図5）と比較し、UPLCによる分析ではピーク強度が向上し、分析時間が短縮化され、又より多くのピークを検出することが出来ました。

ピーク同定

A. 3-(methylamino)-5,6-dihydro-2H-1,4-thiazin-2-one oxime
B. *Unknown m/z = 387.14
C. N-{2-[({5-[(dimethylamino)methyl]-2-furyl}methyl)sulfinyl]ethyl}-N'-methyl-2-nitro-1,1-ethenediamine
D. {5-[(dimethylamino)methyl]-2-furyl}methanol (M+H=156.1024)
E. N-{2-[({5-[(dimethylamino)methyl]-2-furyl}methyl)sulfanyl]ethyl}-2-nitroacetamide
F. 2-[({5-[(dimethylamino)methyl]-2-furyl}methyl)sulfanyl]ethanamine
G. Ranitidine (active)
H. *Unknown m/z = 284.11
I. *Unknown m/z = 297.16
J. Dimer (reported as Formaldehyde adduct)[2]
K. N,N'-bis[2-[[[5-[(dimethylamino)methyl]-2-furanyl]methyl]thio]ethyl]-2-nitro-1,1-ethenediamine

*Unknown components based on current MS data.[3]

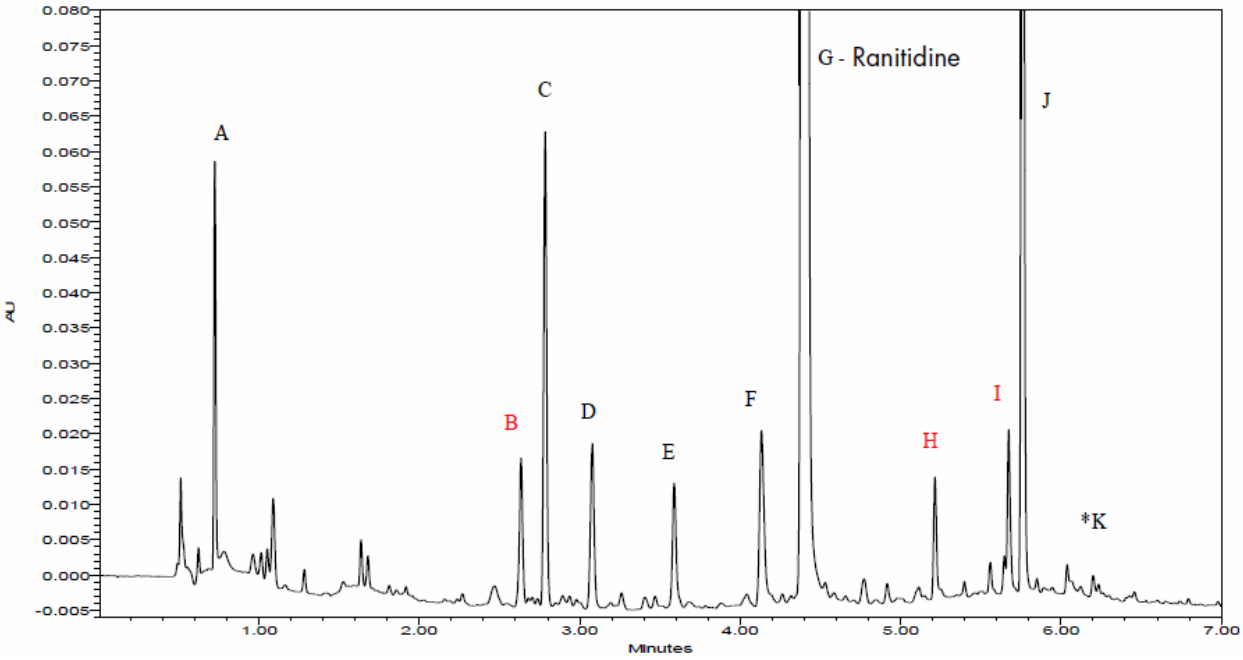
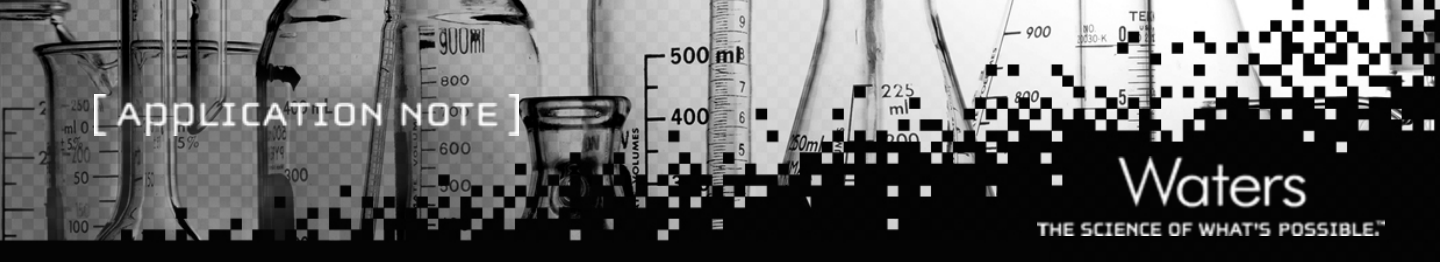


図4　最適化されたUPLCによる分析：Ranitidine及び類縁物質



MSによるピーク同定

Watersのシングル四重極MS検出器をPEEKチューブ（0.005-inch i.d.）でPDA検出器とつないでピーク同定を行いました。Empowerソフトウェアによって、簡単にピークスペクトルを確認することが可能です。

UPLC vs. HPLC

HPLCによる分析の一例を図5に示します。充填剤が異なるため単純な比較を行うことは困難ではありますが、整合性を保つため注入量については計算から算出されております。

HPLCによる分析条件

装置　:Alliance® システム 2996PDA検出器
カラム　:XTerra MS C_{18} 5μm 3.9 x 150 mm
カラム温度 :50 ℃
移動相A　:20mM重炭酸アンモニウム pH 9.0
移動相B　:メタノール
流速　:1.5 mL/min
注入量　:5.0μL
検出波長　:230nm
グラジエント　:Time Profile

(min)	%A	%B
0.0	95.0	5.0
14.0	86.0	14.0
30.0	35.0	65.0

ソフトウエア　:Empower™

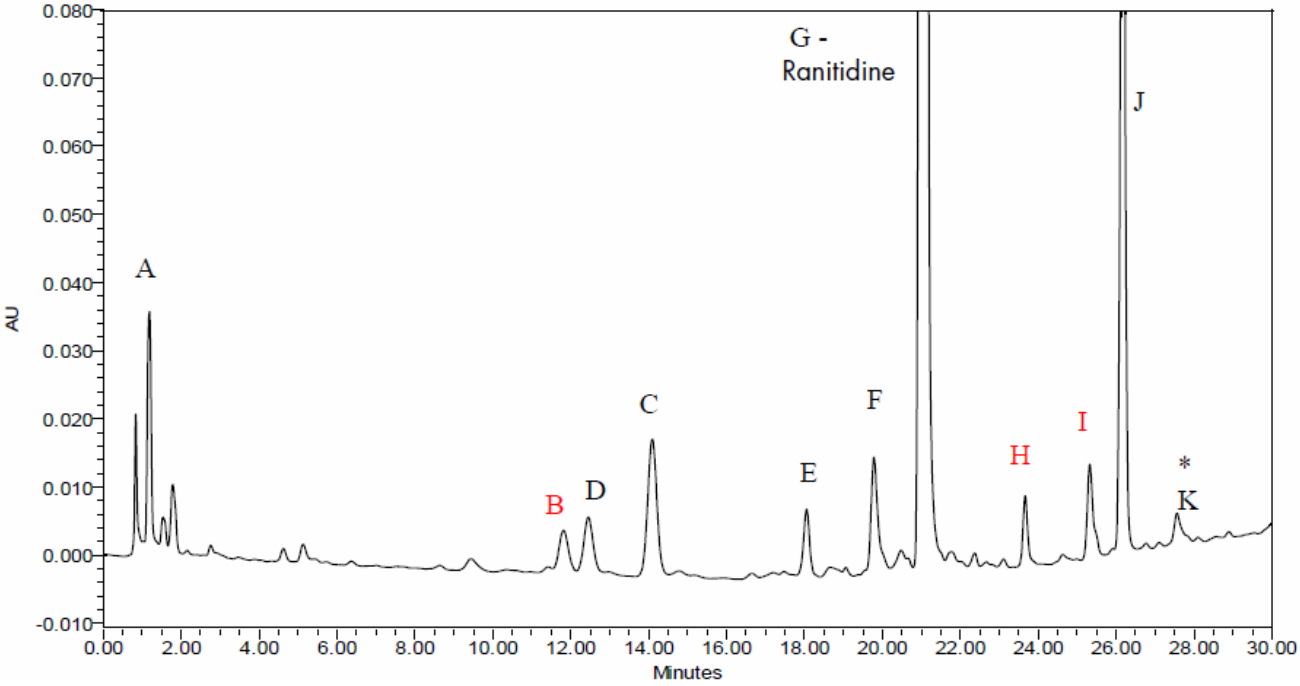
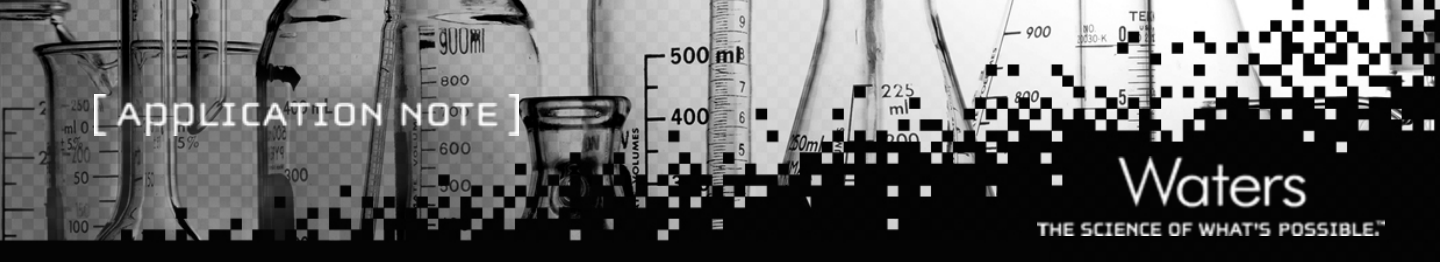


図5　HPLCによる分析：Ranitidine及び類縁物質



30分の分析時間で得られたHPLCによる分析と同等のピーク分離を達成するためUPLCで必要な分析時間は7分でした。UPLCによる分析で得られたピークはよりシャープなもので、感度の向上につながりました。HPLC及びUPLC間でのUVのS/N比を比較すると、平均で4.6倍の向上が確認されました。このようにUPLCによって得られる分離能と感度の向上によって、HPLCによる分析では34本のピークが確認されたのに対し、UPLCでは45本のピークをより大きな面積値と共に確認することが出来ました。

結論

本アプリケーションでお示しいたしましたが、不純物の分析法開発においてUPLCは威力を発揮いたします。UPLCにより、USPまたはCEでの分析法[1]と比較し、感度を向上させ分離能を維持しながら約4分の1の時間で分析を行うことができました。旧来のクロマトグラフィーの原理に従って、既に確立されている分析法開発のためのアプローチ、つまりカラム、pH及び温度といったパラメータの検討を行い最適化することが出来ました。

参考文献

1. Kelly MA, Altria KD, Grace C, Clark B.J. J Chromatogr A. 1998;798:297-306.
2. Evans MB, Haywood PA, Johnson D, Martin-Smith M, Munroe G, Wahlich C. J Pharm Biomed Anal. 1989;7:1-22.
3. Jones MD, et al. Exploring purity profiling techniques: UPLC coupled with oa-TOF mass spectrometry for structural characterization of degradants in a pharmaceutical drug substance. Waters Application Note 720001467EN. 2006.
4. United States Pharmacopoeia (USP) XXIV; National Formulary (NF) 24. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 2000;1463.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
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カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡