[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

錠剤製剤中のUV吸収のないメマンチン定量分析にACQUITY QDa検出器を利用するメリット

Margaret Maziarz, Mark Wrona, and Sean M. McCarthy
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- ACQUITY® QDa® 検出器による UV 吸収を持たない化合物の容易かつ直接的な分析手法
- 複雑で時間のかかる誘導体化工程を不要に
- ご使用の UPLC® システム、UPLC 分析法に適応

ソリューション

ACQUITY UPLC® H-Class システム

ACQUITY UPLC カラム

ACQUITY QDa 検出器

Empower® 3 ソフトウェア

シリンジフィルター

キーワード

UPLC、QDa、non-chromophoric 化合物、メマンチン塩酸塩、粒子径 2 µm 以下のカラム、質量分析計、ApexTrack 解析

はじめに

UV 発色団を欠く、または UV 吸光係数が低い化合物の分析には、直接 UV 検出を用いることができず、これに替わる別の分析系を用いた同定、定量が必要となり、難易度の高いものとなりがちです。しかし、全ての医薬品について、成分を正確に同定することは特に重要であり、万が一これをおろそかにすれば医薬品の安全性や薬効が危険にさらされることとなります。

UV 吸収が弱い、または全くない成分を UV 検出する場合には、プレまたはポストカラム誘導体化が必要となります。UV 吸収を持たないメマンチン塩酸塩についても、文献には投与量の定量的な決定に使用するいくつかの誘導体化法が存在します。製剤中のメマンチン塩酸塩の定量法として、プレカラム誘導体化を用いて UV 検出を行う HPLC 分析法 [1,2] や GC-FID 分析法 [3,4] も報告されています。これらの分析法は効果的で高感度ではありますが、品質管理の現場でルーチン分析として実施することを考えると理想的な手法とは言えません。これらの手法では、面倒で複雑な誘導体化を必要としたり、ガスクロマトグラフィーのような別個の機器分析を行わなければなりません、また分析系が直接的ではなく、複雑になるほど、予期せぬデータのばらつきも増加します。そして分析法の品質向上のためには、分析法開発にも頑健性試験にも、さらには技術修得、モニタリングにも余計に時間をかける必要が生じます。

一方、質量分析計（MS）を検出手段とした場合はどうでしょうか？ MS は UV 吸収を持たない成分についても、迅速で、正確な定量を可能にし、複雑なサンプルの前処理も不要にします。

本アプリケーションでは、アルツハイマー病との関連が深い認知症の治療に用いられる、UV 吸収を持たない成分メマンチンを例に取り、小型でありながら高い頑健性を実現し、極めて容易に操作できる ACQUITY QDa 検出器の利用法の一例をご紹介します。錠剤中のメマンチン塩酸塩を定量するために、ACQUITY QDa 検出器を加えた UPLC 分析法を用い、分析系の安定性、直線性、特異性を確認し、MS がルーチン分析にも導入可能であることを示します。

全般的に MS による検出は迅速な同定を可能にし、UV 吸収を持たない成分についても正確で信頼性のある分析結果をもたらします。UV 検出技術を補い、QC ラボにおけるルーチン分析にとっても適切な検出手法となります。

実験方法

UPLC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class

カラム： ACQUITY UPLC CORTECS® C_{18}+、1.6 µm、2.1 × 50 mm

カラム温度： 45℃

流速： 0.6 mL/min

注入量： 1.0 µL

溶媒 A： 125 mM ギ酸水溶液

溶媒 B： 水

溶媒 C： アセトニトリル

分離モード： グラジエント

	時間（分）	溶媒 A (%)	溶媒 B (%)	溶媒 C (%)	曲線
1	初期条件	10.0	85.0	5.0	初期条件
2	2.5	10.0	42.5	47.5	6
3	2.6	10.0	0.0	90.0	6
4	3.1	10.0	0.0	90.0	6
5	3.2	10.0	85.0	5.0	6
6	5.0	10.0	85.0	5.0	6

パージ溶媒 / 洗浄溶媒：水 / メタノール＝ 50：50

シールウォッシュ：水 / アセトニトリル＝ 90：10

UV 検出器： ACQUITY UPLC PDA 検出器 210-400 nm（検出波長 210 nm）

MS 条件

MS 検出器： ACQUITY QDa 検出器（パフォーマンス）

イオン化モード： ESI (+)

MS レンジ： 100-300 Da

SIR（Single Ion Recording）：180.2 Da

サンプリングレート：10 ポイント / 秒

キャピラリー電圧：0.8 kV

コーン電圧： 15 V

プローブ温度： 600℃

データモード： セントロイド

データ取り込みおよび解析：Empower 3 FR 2

サンプル調製

標準溶液

メマンチン塩酸塩は 1.0 mg/mL となるようメタノールで溶解し、これをストック溶液としました。ストック溶液を標準品希釈液（メタノール / 水＝ 10：90）にて希釈し、0.005 mg/mL 溶液を調製した後、標準品希釈液でさらに希釈し、直線性試験用標準溶液としました。直線性試験用標準溶液濃度は 0.05、0.10、0.15、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/mL としました。

錠剤試料溶液

10 mg のメマンチン塩酸塩を含む錠剤を 0.1 N 塩酸 / エタノール * で 1.0 mg/mL の濃度となるよう溶解し、ストック試料溶液としました。この溶液を超音波処理し、3500 rpm で 30 分間遠心分離した後、ポアサイズ 0.2 µm の GHP メンブレンシリンジフィルターでろ過し、試料希釈液（0.1 N 塩酸）にて希釈し 0.75 µg/mL に調製しました。

* 最終分析条件では他の溶解条件、ろ過条件についても検討しました（文中に記載）。

結果および考察

メマンチン塩酸塩は、UV 検出に必要な発色団を欠く三環性アミンであるため（図 1）、直接、UV で検出することはできません。しかしながら、容易にイオン化する性質を持つため ACQUITY QDa 検出器を用いることにより頑健なシグナルが得られます。図 2 に複数の検出法によるクロマトグラムを示しました。予測通り、UV 210 nm において 1 µg/mL のメマンチンのシグナルは検出されませんでした（図 2a）。

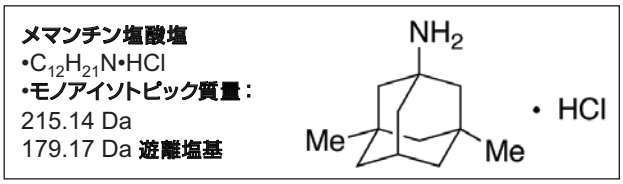

図 1. メマンチン塩酸塩の化合物情報および構造

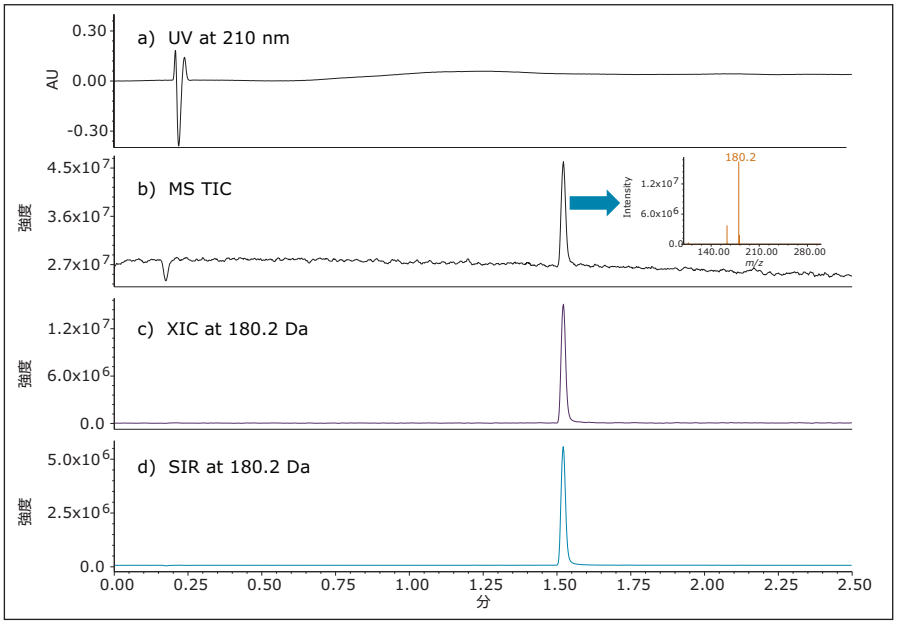

図 2. ACQUITY UPLC H-Class システムと PDA 検出器、ACQUITY QDa 検出器によるメマンチン塩酸塩の UV および MS クロマトグラム

システム適合性

UPLC 分析法の性能を、USP General Chapter <621> ”クロマトグラフィー” 5 の定義に従い 1 µg/mL の標準品の 5 回の注入再現性により評価しました（図 3）。180.2 Da の SIR データを用いた UPLC のシステム適合性結果を図 4 に示しました。保持時間、面積値とも USP の定める 2%RSD 以下の良好な再現性結果が得られました。

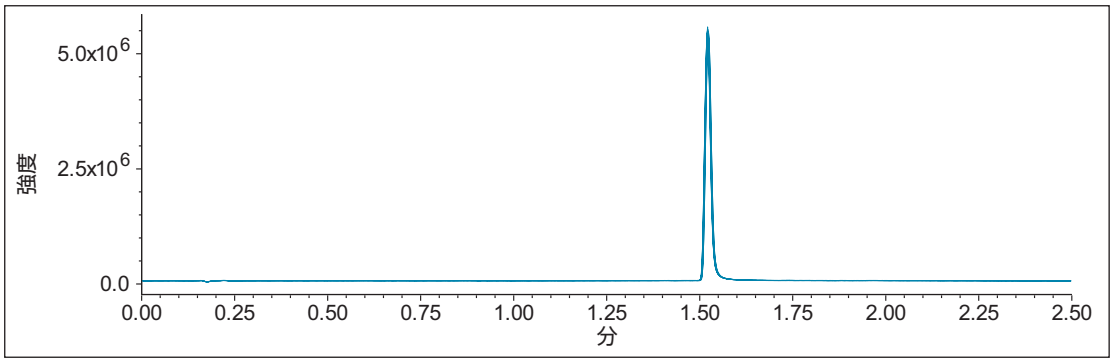

図 3. メマンチン塩酸塩標準品の 5 回注入重ね書きクロマトグラム：180.2 Da の SIR MS データ

システム適合性試験結果レポート

サンプルセットID：12773
結果セットID：14455
チャンネル名 QDa 3: SIR Ch1

名前：メマンチン

	名 前	サンプル名	#	保持時間	面積	USPテーリング係数	保持係数
1	メマンチン	メマンチンSS：1ug/mL	1	1.523	6071507	1.2	5.1
2	メマンチン	メマンチンSS：1ug/mL	2	1.522	6076992	1.2	5.1
3	メマンチン	メマンチンSS：1ug/mL	3	1.521	6107702	1.2	5.1
4	メマンチン	メマンチンSS：1ug/mL	4	1.521	6139821	1.2	5.1
5	メマンチン	メマンチンSS：1ug/mL	5	1.521	6157180	1.2	5.1
平均				1.522	6110640	1.2	5.1
標準偏差				0.001	37714.946		
% RSD				0.06	0.62		

図 4. 標準品 5 回分析によるシステム適合性結果 メマンチン塩酸塩標準品の 5 回注入重ね書きクロマトグラム：180.2 Da の SIR MS データ

直線性

MS 検出によるメマンチン塩酸塩分析法の直線性は、0.05 µg/mL から 1.0 µg/mL の 7 濃度の標準品により評価しました。ピーク面積値とメマンチン塩酸塩濃度は R^2 0.998 以上の良好な相関を示し（図 5）、計算値の % 偏差も 7.0% 以下と算出されました（図 6）。

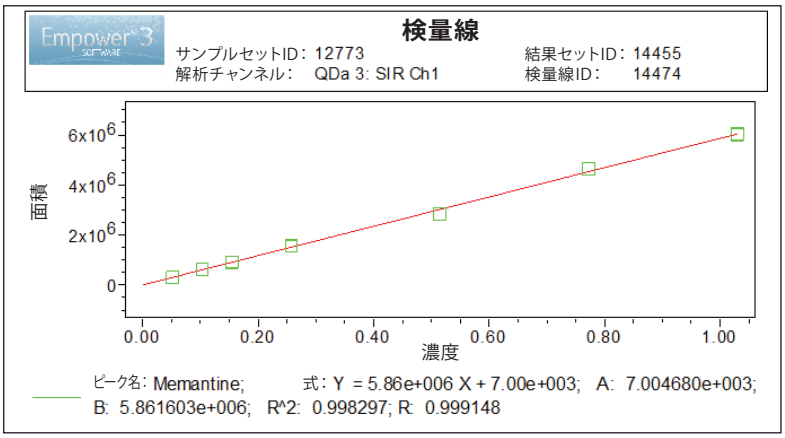

図 5. 180.2 Da SIR MS データを用いたメマンチン塩酸塩分析法の直線性

Empower 3 SOFTWARE

検量線 %偏差

サンプルセットID：12773　結果セットID：14455
チャンネル名：　QDa 3: SIR Ch1

メマンチン X 値：(ug/mL): 0.05150

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	1	1	305873	0.05150	0.05099	-0.995
2	メマンチン	1	2	309364	0.05150	0.05158	0.161
3	メマンチン	1	3	305437	0.05150	0.05091	-1.139

メマンチン X 値：(ug/mL): 0.10300

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	2	1	635819	0.10300	0.10728	4.152
2	メマンチン	2	2	625800	0.10300	0.10557	2.493
3	メマンチン	2	3	639816	0.10300	0.10796	4.814

メマンチン X 値：(ug/mL): 0.15450

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	3	1	920154	0.15450	0.15578	0.832
2	メマンチン	3	2	917046	0.15450	0.15525	0.488
3	メマンチン	3	3	911865	0.15450	0.15437	-0.084

メマンチン X 値：(ug/mL): 0.25750

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	4	1	1561034	0.25750	0.26512	2.959
2	メマンチン	4	2	1566506	0.25750	0.26605	3.322
3	メマンチン	4	3	1579787	0.25750	0.26832	4.202

メマンチン X 値：(ug/mL): 0.51500

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	5	1	2837467	0.51500	0.48288	-6.237
2	メマンチン	5	2	2843904	0.51500	0.48398	-6.023
3	メマンチン	5	3	2856054	0.51500	0.48605	-5.621

メマンチン X 値：(ug/mL): 0.77250

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	6	1	4662628	0.77250	0.79426	2.817
2	メマンチン	6	2	4642911	0.77250	0.79089	2.381
3	メマンチン	6	3	4640096	0.77250	0.79041	2.319

メマンチン X 値：(ug/mL): 1.03000

	ピーク名	レベル	Injection	レスポンス	X 値（µg/mL）	計算値（µg/mL）	%偏差
1	メマンチン	7	1	6015896	1.03000	1.02513	-0.473
2	メマンチン	7	2	6042378	1.03000	1.02965	-0.034
3	メマンチン	7	3	6041853	1.03000	1.02956	-0.043

図 6. 180.2 Da SIR MS データによる検量線データ計算値の % 偏差は 7.0% 以下

実試料分析

市販のメマンチン塩酸塩錠剤を UPLC/MS 分析法にて分析し、ルーチン分析への適応性を確認しました。錠剤試料のサンプル前処理法を開発するため、メマンチン塩酸塩錠剤に関する USP 各論[4] に定義された合格基準を満たすことを目的に、様々な試料希釈溶媒、ろ過フィルターについて検討を行いました。

各論では、"メマンチン塩酸塩錠剤は表示量の 90% 以上 110%以下のメマンチン塩酸塩($C_{12}H_{21}N \cdot HCl$)を含む" と定義されています。

本実験で検討した試料希釈溶媒を表 1 に示しました。各種溶媒で溶解した試料のストック溶液を各々超音波処理し、遠心分離を行いました。その後、分析に用いる濃度に希釈する前に 0.2 µm GHP シリンジフィルターでろ過しました。この結果、50 : 50 0.1 N HCl/ エタノールを希釈溶媒とした場合に、最も高い 99.9% の回収率が得られました。

錠剤前処理	希釈溶媒 (ストック試料溶液調製時)	希釈溶媒 (分析試料溶液調製時)	%回収率
1	H_2O	90:10 H_2O/メタノール	67.0
2	0.01 M H_3PO_4	0.01 M H_3PO_4	89.4
3	0.05 M H_3PO_4	0.05 M H_3PO_4	91.9
4	0.1 M H_3PO_4	0.1 M H_3PO_4	91.9
5	0.1 N HCl	0.1 N HCl	90.1
6	50:50 0.05 M H_3PO_4/エタノール	0.05 M H_3PO_4	93.7
7	50:50 0.1 N HCl/エタノール	0.1 N HCl	99.9

表 1. メマンチン塩酸塩錠剤の前処理法開発における希釈溶媒の検討

希釈溶媒に加え、フィルターが及ぼす回収率への影響についても検討しました。試料溶液中の粒子あるいは不溶性物質はクロマトグラフィーや回収率に悪影響を与えることがあるため、フィルターろ過により回収率に改善が見られるケースが多々あります。3 種類のフィルターメンブレンについて、無ろ過のコントロールと比較し回収率への影響を検討しました(表 2)。ストック試料溶液を 0.1 N HCl / エタノール= 50 : 50 で希釈し 3 種のポアサイズ 0.2 µm のシリンジフィルターでろ過した結果、表 2 に示したように GHP メンブレンを使用した際に、錠剤製剤中のメマンチン塩酸塩の回収率が最大となりました。無ろ過のコントロールでは、GHP メンブレンでろ過した場合よりも明らかに低い回収率が確認されました。これらの結果により回収率を最大にするためには、適切なフィルターを選択し試料のろ過を行うことが必要であることがわかります。

シリンジフィルター	ウォーターズP/N	ストック溶液希釈溶媒	分析試料希釈溶媒	%回収率
無ろ過	N/A	50:50 0.1N HCl/エタノール	0.1N HCl	94.5
GHP	WAT200562	50:50 0.1N HCl/エタノール	0.1N HCl	99.8
Nylon	WAT097962	50:50 0.1N HCl/エタノール	0.1N HCl	93.3
PVDF	WAT200804	50:50 0.1N HCl/エタノール	0.1N HCl	98.1

表 2. メマンチン塩酸塩の試料前処理法の開発におけるシリンジフィルターの検討

実試料の分析については、錠剤の前処理を 3 回別個に行いメマンチン塩酸塩を定量しました。ACQUITY QDa 検出器による試料希釈溶媒（ブランク）および錠剤試料溶液の 180.2 Da の SIR クロマトグラムを図 7 に示しました。3 回の前処理を行ったメマンチン塩酸塩の平均回収率は 96.0-100.1% であり（図 8）、メマンチン塩酸塩錠剤の USP 各論に定められている 90.0 -110.0% という合格基準に十分適合する結果となりました。

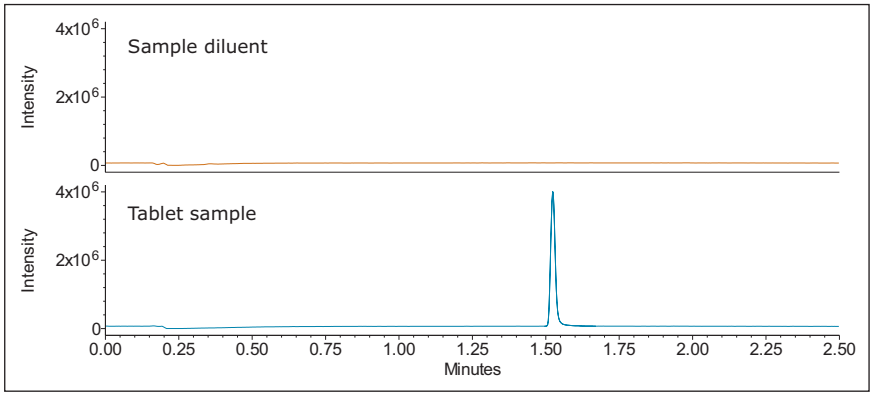

図 7. メマンチン塩酸塩錠剤の SIR（180.2Da）測定

サンプル回収率レポート

サンプルセットID：12660
結果セットID：14518
チャンネル名：QDa 3: SIR Ch1

名前：メマンチン錠剤前処理 1

	サンプル名	#	検量線 ID	濃度 (µg/mL)	表示濃度 (µg/mL)	回収率 (%)	合否
1	Memantine Tablet Prep 1	1	14474	0.7178	0.7500	95.70	合格
2	Memantine Tablet Prep 1	2	14474	0.7231	0.7500	96.41	合格
3	Memantine Tablet Prep 1	3	14474	0.7200	0.7500	96.00	合格
Mean						96.0	
Std. Dev.						0.4	
% RSD						0.37	

名前：メマンチン錠剤前処理 2

	サンプル名	#	検量線 ID	濃度 (µg/mL)	表示濃度 (µg/mL)	回収率 (%)	合否
1	Memantine Tablet Prep 2	1	14474	0.7533	0.7500	100.44	合格
2	Memantine Tablet Prep 2	2	14474	0.7470	0.7500	99.60	合格
3	Memantine Tablet Prep 2	3	14474	0.7514	0.7500	100.19	合格
Mean						100.1	
Std. Dev.						0.4	
% RSD						0.43	

名前：メマンチン錠剤前処理 3

	サンプル名	#	検量線 ID	濃度 (µg/mL)	表示濃度 (µg/mL)	回収率 (%)	合否
1	Memantine Tablet Prep 3	1	14474	0.7334	0.7500	97.79	合格
2	Memantine Tablet Prep 3	2	14474	0.7348	0.7500	97.98	合格
3	Memantine Tablet Prep 3	3	14474	0.7275	0.7500	97.00	合格
Mean						97.6	
Std. Dev.						0.5	
% RSD						0.53	

図 8. 錠剤試料中のメマンチン塩酸塩回収率。180.2Da の MS データ。メマンチン塩酸塩錠剤の USP 各論に定められている 90.0 -110.0% という合格基準に十分適合。

結論

ACQUITY QDa 検出器の MS 検出が、UV 吸収を欠くメマンチン塩酸塩の検出、定量を可能にします。MS データを用いたシステム適合性試験、直線性試験の結果は良好なものであり、錠剤分析についてもメマンチン塩酸塩の簡単な前処理法を開発しました。分析前の複雑で面倒なプレカラム誘導体化処理を伴わない方法です。SIR を利用することは目的の成分の質量のみを選択することを可能にし、製剤試料分析における様々な阻害を排除します。

ACQUITY QDa 検出器は、簡単に操作できるだけではなく、高い頑健性を有し、UV 検出とは異なる原理でそのデータを補完します。正確かつ信頼性の高いデータを提供し、QC ラボにおけるルーチン分析にとって理想的な検出を実現します。

参考文献

1. Narola B., Singh A.S., Santhakumar P.R., Chandrashekhar T.G., A Validated Stability-Indicating Reverse Phase HPLC Assay Method for the Determination of Memantine Hydrochloride Drug Substance with UV-Detection Using Precolumn Derivatization Technique, *Analytical Chemistry Insights*, 2010:5, 37–45.
2. Jalalizadeh H., Raei M., Tafti R.F., Farsam H., Kebriaeezadeh A., Souri E., A Stability-Indication HPLC Method for the Determination of Memantine Hydrochloride in Dosage Forms through Derivatization with 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene, *Scientia Pharmaceutica*, 2014:82, 265–279.
3. Jadhav S.A., Landge S.B., Niphade N.C., Development and Validation of Stability-Indicating GC-FID Method for the Quantitation of Memantine HCl and Its Non-Chromophoric Impurities in Bulk and Pharmaceutical Dosages, *Chromatography Research International*, 2012, 10.
4. USP Monograph, Memantine Hydrochloride Tablets, USP37-NF32, The United States Pharmacopeia Convention, official May 1, 2014.
5. USP General Chapter, <621>, Chromatography, USP36-NF31, The United States Pharmacopeia Convention, official December 2013.

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、CORTECS 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7月 720005179JA PDF