[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

# 医薬品原料臭化セトリモニウムの品質および純度の評価における質量検出のメリット

Margaret Maziarz,[1] Mark Wrona,[1] Dominic Moore,[2] and Chengxia O'Shea[2]
[1]Waters Corporation, Milford, MA, USA
[2]Genzyme A Sanofi Company, Northborough, USA

## アプリケーションのメリット

- UV 吸収を持たない化合物である原料の確認および定量に ACQUITY® QDa® 検出器を用いた簡単で直接的な分析方法
- ACQUITY QDa 検出器を用いた質量検出による正確な成分同定
- 複雑で時間のかかるサンプル調製手順が不要
- 既存のUPLC®システムおよび分析法との適合性

## 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

ACQUITY QDa 検出器

Empower® 3 CDS ソフトウェア

## キーワード

UPLC、QDa、UV 吸収を持たない化合物、医薬品原料、臭化セトリモニウム、粒子径 2 µm 以下の充填剤、質量分析法

## はじめに

医薬品原料は、基質としてさまざまな製剤の製造に使用されます。原料には、医薬品有効成分（API）、賦形剤、およびその他の不活性成分があります。賦形剤および不活性成分には一般的に薬理効果はありませんが、賦形剤、結合剤、崩壊剤、潤滑剤、着色料、保存剤などとして機能する必須成分です[1]。賦形剤および不活性成分の品質と純度は、最終医薬製品の安全性にとって極めて重要であり、管理されなければなりません[2]。低純度または汚染物質を含む賦形剤は最終医薬製品の安全性および有効性を損なうことがあります。したがって医薬品原料の品質および純度の正確な評価のために信頼性の高い分析法が必要です。

UV 吸収がない、または低い成分の迅速で正確な分析は困難な場合があります。これらの化合物は UV による直接検出ができないので、正確に同定および測定するためには別の分析方法を使用しなければなりません。UV 吸収のない化合物である臭化セトリモニウムの場合、クロロホルムを用いた、多段階の液液抽出で調製した試料溶液の滴定分析方法が米国薬局方（USP）モノグラフ[3]に採用されています。これは複雑で時間がかかる手順であり、QC ラボ内のルーチン試験には適していません。これに対し、質量検出は UV 吸収のない化合物の迅速で直接的かつ正確な分析が可能になり、複雑なサンプル調製手順が不要になります。

このアプリケーションノートでは、医薬品原料臭化セトリモニウム分析のための頑健かつ迅速な UPLC 分析法を紹介します。 この分析法は Genzyme A Sanofi 社との提携により開発されました。UPLC 分析法では、原料の品質および純度の迅速で、より多くの情報を含む正確な評価を実施するために ACQUITY QDa 検出器を使用します。このアプリケーションノートでは、質量検出を用いた分析法のシステム適合性および直線性を評価しました。次にこの分析法を用いて、異なるメーカー 3 社から購入した医薬品原料臭化セトリモニウムの同一性確認、純度評価、および定量を実施しました。

総合的に見て、質量検出により医薬品原料の迅速な同定および正確な分析が可能となり、QC ラボでのルーチン試験に適した技術となっています。

## 実験方法

### 溶液調製

#### 標準溶液

臭化セトリモニウム USP 標準試料（USP p/n:1102974）原液を水で溶解し、0.5 mg/mL の濃度に調製し、ストック溶液としました。次にストック溶液を水（Fisher Scientific, Optima）で希釈し 20.0 µg/mL の標準溶液としました。この標準溶液を水で希釈することにより直線性検討用標準溶液を調製しました。直線性検討用標準溶液は、次の濃度で調製しました：0.10、0.25、0.50、0.75、1.0、2.0、および 3.0 µg/mL。

#### 原料サンプル

この実験で使用した医薬品原料臭化セトリモニウムは、異なるメーカー 3 社から購入しました：

- シグマ アルドリッチ社、製品番号 : H9151-25G
- Alfa Aesar 社、製品番号 : A15235
- 東京化成工業株式会社、製品番号 : H0081

ストックサンプル溶液は、0.5 mg/mL の濃度で調製し、次に 1.0 µg/mL の濃度まで水で希釈しました。

### UPLC 分析条件

LC システム： ACQUITY UPLC H-Class

カラム： ACQUITY UPLC CSH™ $C_{18}$、2.1 × 50 mm、1.7 µm

カラム温度： 40℃

流速： 0.6 mL/min

注入量： 1.0 µL

溶媒 A： 1% ギ酸水溶液

溶媒 B: 水

溶媒 C： アセトニトリル

分離：グラジエント

| ステップ | 時間 min | 溶媒 A % | 溶媒 B % | 溶媒 C % | 曲線 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 初期値 | 10.0 | 40.0 | 50.0 | 初期値 |
| 2 | 2.0 | 10.0 | 0.0 | 90.0 | 6 |
| 3 | 2.5 | 10.0 | 0.0 | 90.0 | 6 |
| 4 | 2.6 | 10.0 | 40.0 | 50.0 | 6 |
| 5 | 4.5 | 10.0 | 40.0 | 50.0 | 6 |

パージ / サンプル洗浄液：50:50 水 / アセトニトリル

シール洗浄液：90:10 水 / アセトニトリル

UV 検出器：ACQUITY UPLC PDA：200 ～ 500 nm

### MS 分析条件

質量検出器： ACQUITY QDa（パフォーマンス）

イオン化モード： ESI+

MS 取り込み範囲： 150 ～ 350 Da

SIR： 284.3 Da

サンプリングレート：10 pts/ 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℃

データ形式： セントロイド

### データ管理

Empower 3 FR2 クロマトグラフィーデータシステム（CDS）ソフトウェア

## 結果および考察

臭化セトリモニウムは、UV 検出に必要な発色団を持たない 4 級アンモニウム塩です（図 1）。したがって、UV による直接検出は不可能です。しかし、イオン化が可能で、ACQUITY QDa 検出器で安定な MS シグナルとして検出できます。臭化セトリモニウム分析のクロマトグラフィーデータを図 2 に示しています。215 nm における UV クロマトグラム（図 2a）では、予想どおりピークは検出されませんでした。150 ～ 350 Da の質量範囲で取得した、ACQUITY QDa データ（図 2b）である、トータルイオンクロマトグラム（TIC）では、質量 284.3 Da に臭化セトリモニウムの 1 つの大きなピークが検出されました。目的化合物の質量を TIC データから抽出した、抽出イオンクロマトグラム（XIC）を図 2c に示します。目的化合物の定量試験には、目的の特定イオンのシグナル強度を記録する選択イオンレコーディング（SIR）モードを使用しました。SIR モードは分析および定量が簡単に、かつ S/N 比が向上するため、ターゲット定量に適しています（図 2d）。

## システム適合性

開発した UPLC 分析法の性能は、USP General Chapter、‹621›、Chromatography の規定に従って、2.0 µg/mL（図 3）の USP 標準試料における 6 回の繰り返し注入精度を評価、検証しました [4]。UPLC のシステム適合性結果は、284.3 Da における SIR モードを使用して解析しました（図 4）。 保持時間および面積再現性は、2.0% RSD 未満で USP 規格を十分満たしていました。

**臭化セトリモニウム**

- 分子式： $C_{19}H_{42}BrN$
- 平均質量： 364.45 Da
- モノアイソトピック質量： 363.25 Da
- 遊離塩基モノアイソトピック質量：mass: 284.33 Da
- 検出質量： $M^+$ = 284.3 Da

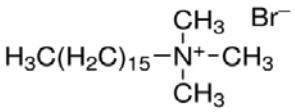


*図 1. 臭化セトリモニウムの構造および分子情報*

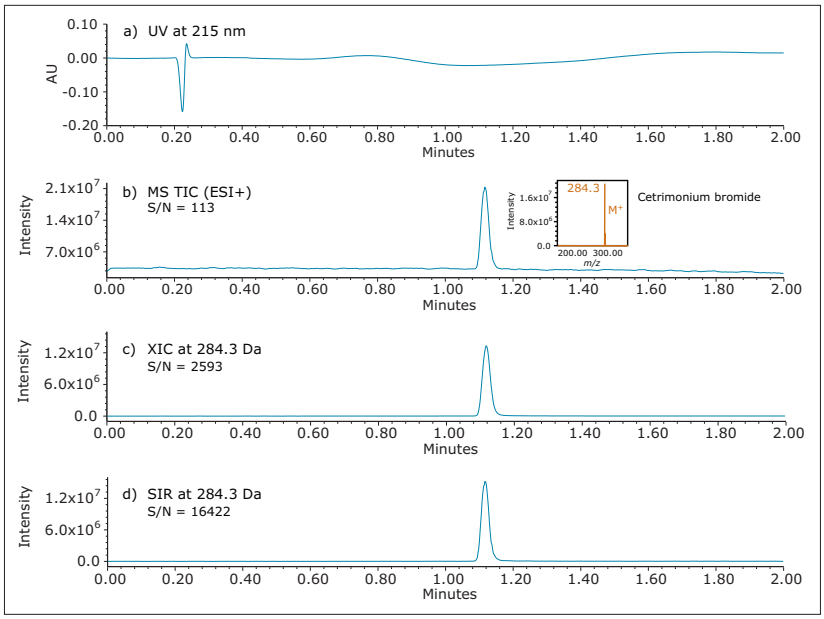


*図 2. ACQUITY UPLC H-Class/ACQUITY PDA /ACQUITY QDa システムを使用して取得した臭化セトリモニウムの UV および MS クロマトグラフィーデータ*

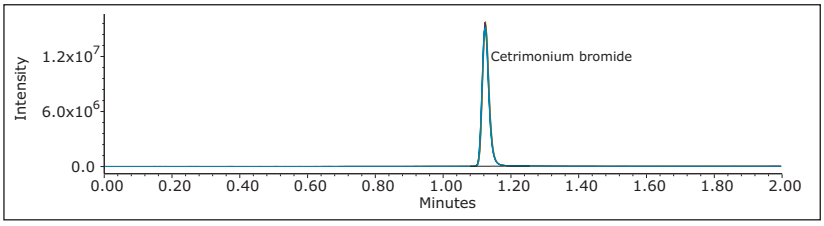


*図 3. 臭化セトリモニウム USP 標準試料の 6 回繰り返し注入（284.3 Da における SIR）の重ね書き*

**System Suitability_Report**
Sample Set ID: 10071
Result Set ID: 13076
Channel Name: QDa 2: SIR Ch1

**Name: Cetrimonium Br**

| | Name | Inj | RT | Area | USP Tailing | K Prime |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Cetrimonium Br | 1 | 1.124 | 21573313 | 1.2 | 3.5 |
| 2 | Cetrimonium Br | 2 | 1.124 | 21848031 | 1.2 | 3.5 |
| 3 | Cetrimonium Br | 3 | 1.125 | 21937619 | 1.2 | 3.5 |
| 4 | Cetrimonium Br | 4 | 1.125 | 21780348 | 1.2 | 3.5 |
| 5 | Cetrimonium Br | 5 | 1.126 | 21776335 | 1.2 | 3.5 |
| 6 | Cetrimonium Br | 6 | 1.125 | 21495826 | 1.2 | 3.5 |
| Mean | | | 1.125 | 21735245 | 1.2 | 3.5 |
| Std. Dev. | | | 0.001 | 167894.075 | | |
| % RSD | | | 0.06 | 0.77 | | |

*図 4. 臭化セトリモニウム USP 標準試料の 6 回繰り返し注入（284.3 Da における SIR）のシステム適合性結果*

## 直線性

284.3 Da における SIR モードで臭化セトリモニウム分析法の直線性を、0.1 ～ 3 µg/mL の範囲の 7 濃度について評価しました。この分析法は、相関係数 ($R^2$) ≥ 0.9969 であり、許容可能な直線性を示しました (図 5)。さらに、算出された X 値すなわち濃度のパーセント偏差は、18.0% 未満であった 0.2585 µg/mL 標準溶液を除いて 10% 未満でした (図 6)。

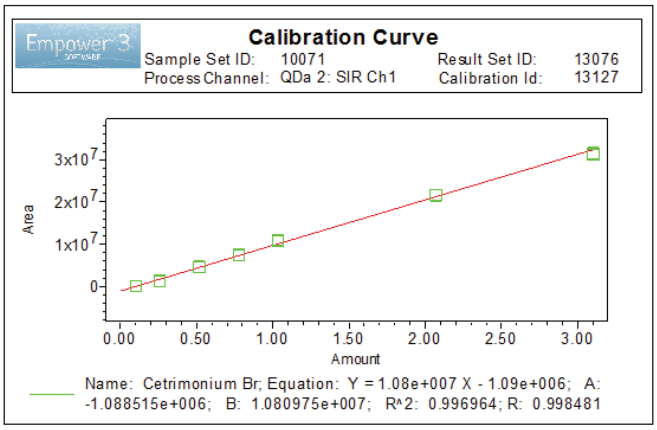


*図 5. 臭化セトリモニウムについての分析法の直線性。SIR モード (284.3 Da) を使用してデータを解析*

**Cal Curve %Deviation_Accuracy**

Sample Set ID: 10071 Result Set ID: 13076
Channel Name: QDa 2: SIR Ch1

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 0.10340**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 103451 | 0.10340 | 0.11027 | 6.642 |
| 2 | 2 | 110301 | 0.10340 | 0.11090 | 7.255 |
| 3 | 3 | 94141 | 0.10340 | 0.10941 | 5.809 |

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 1.03400**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 10724680 | 1.03400 | 1.09283 | 5.689 |
| 2 | 2 | 10704598 | 1.03400 | 1.09097 | 5.510 |
| 3 | 3 | 11081568 | 1.03400 | 1.12584 | 8.882 |

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 0.25850**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1266680 | 0.25850 | 0.21788 | -15.715 |
| 2 | 2 | 1220622 | 0.25850 | 0.21362 | -17.363 |
| 3 | 3 | 1292652 | 0.25850 | 0.22028 | -14.785 |

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 2.06800**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 21569343 | 2.06800 | 2.09606 | 1.357 |
| 2 | 2 | 21569445 | 2.06800 | 2.09607 | 1.357 |
| 3 | 3 | 21684750 | 2.06800 | 2.10673 | 1.873 |

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 0.51700**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 4658207 | 0.51700 | 0.53162 | 2.829 |
| 2 | 2 | 4578027 | 0.51700 | 0.52421 | 1.394 |
| 3 | 3 | 4662449 | 0.51700 | 0.53202 | 2.905 |

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 3.10200**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 31475067 | 3.10200 | 3.01243 | -2.888 |
| 2 | 2 | 31625936 | 3.10200 | 3.02638 | -2.438 |
| 3 | 3 | 31234155 | 3.10200 | 2.99014 | -3.606 |

**Peak: Cetrimonium BrX Value (ug/mL): 0.77550**

| | Injection | Response | X Value (ug/mL) | Calc. Value (ug/mL) | % Deviation |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 7480280 | 0.77550 | 0.79269 | 2.217 |
| 2 | 2 | 7513669 | 0.77550 | 0.79578 | 2.615 |
| 3 | 3 | 7333195 | 0.77550 | 0.77908 | 0.462 |

*図 6. SIR モード (284.3 Da) を使用して解析を行った検量線データ。算出された X 値すなわち濃度のパーセント偏差は、18.0% 未満であった 0.2585 µg/mL 標準溶液を除いて 10% 未満でした*

## サンプル分析

異なるメーカー 3 社から購入した臭化セトリモニウムを UPLC-MS を使用して分析しました。ACQUITY QDa 検出器を用いた質量検出においてピーク同一性を迅速に確認できました。ピーク純度評価は、150 ～ 350 Da の質量範囲で取得した ACQUITY QDa TIC データを使用しました。 臭化セトリモニウムの質量に相当する 284.3（± 0.2）Da と異なる質量ピークの存在を MS TIC データで評価しました。TIC に示されているように（図 7）、サンプル分析では臭化セトリモニウムに固有の質量を示す大きなピークが 1 つのみが検出されました。 さらに、ピークのリーディング、頂点、およびトレーリングのマススペクトルデータより、臭化セトリモニウムに相当する 1 つの質量の存在が示されています。 よって、臭化セトリモニウムは他のピークと共溶出していないことが示されました。よって、TIC データからは、今回評価した医薬品原料臭化セトリモニウムには汚染物質は含まれていないことが実証されました。

定量試験については、異なるメーカー 3 社から購入した医薬品原料臭化セトリモニウムを USP 標準試料と比較しました。284.3 Da における SIR を使用して実施した定量結果は、すべての原料について 98.4 - 100.4% の範囲（図 8）であり、臭化セトリモニウムについて USP モノグラフで規定されている 96.0 - 101.0 % の USP 合格基準に適合します。

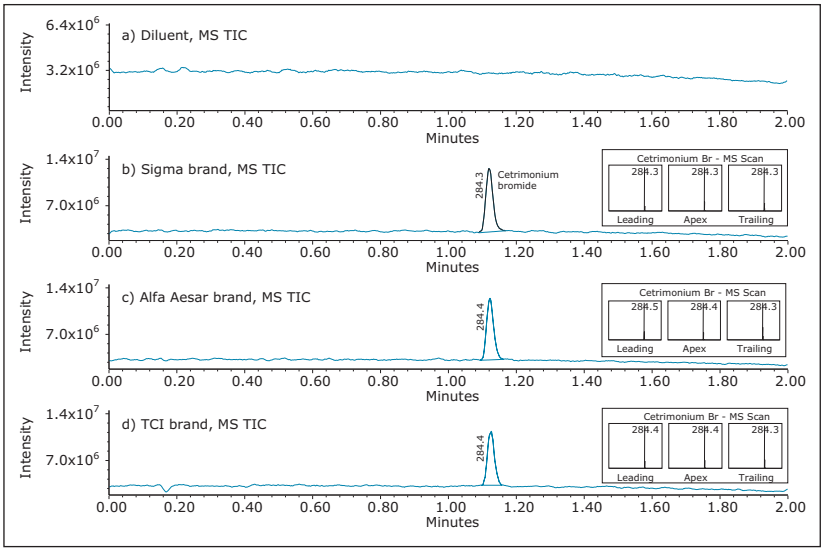


*図 7. 異なるメーカー 3 社から購入した医薬品原料臭化セトリモニウム。ピークのリーディング、頂点、およびトレーリングの TIC MS およびマススペクトルのデータ*

**Sample_Analysis_Report**

Sample Set ID: 9461
Result Set ID: 13201
Channel Name: QDa 2: SIR Ch1

SampleName: Sigma brand

| | SampleName | Name | RT (min.) | Area | Calibration Id | Calculated Amount (ug/mL) | Target Amount (ug/mL) | Assay (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Sigma brand | Cetrimonium Br | 1.124 | 10684061 | 13127 | 1.0891 | 1.0850 | 100.38 |

SampleName: Alfa Aesar brand

| | SampleName | Name | RT (min.) | Area | Calibration Id | Calculated Amount (ug/mL) | Target Amount (ug/mL) | Assay (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Alfa Aesar brand | Cetrimonium Br | 1.122 | 9244808 | 13127 | 0.9559 | 0.9660 | 98.96 |

SampleName: TCI brand

| | SampleName | Name | RT (min.) | Area | Calibration Id | Calculated Amount (ug/mL) | Target Amount (ug/mL) | Assay (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TCI brand | Cetrimonium Br | 1.125 | 9496532 | 13127 | 0.9792 | 0.9950 | 98.41 |

*図 8. 異なるメーカー 3 社から購入した医薬品原料臭化セトリモニウムについての定量結果（284.3 Da における SIR）。*

## 結論

UPLC システムに ACQUITY QDa 検出器による質量検出を使用することで、発色団をもたない医薬品原料臭化セトリモニウムを迅速かつ簡単に分析することが可能です。この新しい分析法により複雑な滴定手順の必要がなくなり、生産性が向上します。さらに、LC-MS 分析法により医薬品原料臭化セトリモニウムのサンプル確認、正確な純度評価、および定量における信頼性が向上します。質量検出によるデータを使用した分析法は、優れたシステム適合性および直線性を示しました。全体的に見て、ACQUITY QDa 検出器は、UV 検出に対する相補的検出技術として追加できる頑健で使いやすい質量検出器です。正確で信頼性の高い結果が得られ、QC ラボにおける医薬品原料ルーチン試験にとって最適な技術となっています。

## 参考文献


1. Overview of pharmaceutical excipients used in tablets and capsules, October 24 2008.
2. The United States Pharmacopeia (USP) Monograph Excipients Introduction.
3. USP Monograph, Cetrimonium Bromide, USP37-NF32, The United States Pharmacopeia Convention, official August 1, 2014.
4. USP General Chapter, <621>, Chromatography, USP37-NF32, The United States Pharmacopeia Convention, official August 2, 2014.


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、QDa、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
CSH は Waters Corporation の商標です。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。

©2017 Waters Corporation. Produced in Japan. 2017年1月 720005324JA PDF