

Сравнение следовых примесей в оригинальных и генерических лекарственных препаратах с помощью интеллектуального ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ

Автор

Д-р Кайл Коверт (Kyle Covert)
Agilent Technologies, Inc.



Аннотация

В этом исследовании представлена методика, позволяющая сравнить сопутствующие примеси в оригинальных и генерических безрецептурных препаратах парацетамола. В работе использовался масс-селективный детектор для жидкостной хроматографии (ВЭЖХ-МСД) Agilent InfinityLab iQ и ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II. Примеси в этом исследовании обнаруживались в концентрациях ниже, чем можно надежно обнаружить с помощью УФ-детектора.

Введение

Большинство безрецептурных лекарств доступно в виде генерических препаратов, разработанных на основе оригинальных лекарственных препаратов. Эти генерические препараты продаются различными производителями, что порождает конкуренцию и помогает снизить цены, делая препарат более доступным. К производителям генерических безрецептурных препаратов предъявляются те же требования в отношении эффективности, чистоты, устойчивости и предельных концентраций примесей, что и предъявляемые Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA США) к зарегистрированным оригинальным препаратам.¹ Поэтому производителям генерических препаратов приходится характеризовать свою продукцию. Как правило, для этого применяется ВЭЖХ с УФ-детектором. Использование масс-селективного детектора позволяет значительно снизить продолжительность анализа для большинства методик фармакопей США и Европы², так как это позволяет однозначно определять концентрацию соединений для слившихся пиков по массе иона определяемого соединения.

В данном исследовании сравниваются сопутствующие примеси в оригинальных и генерических безрецептурных препаратах парацетамола. Для скрининга на примеси применялся ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II с ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ. Одноквадрупольный ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ — это надежный детектор, отличающийся долговечностью и простотой эксплуатации. Работа с ним интуитивно понятна и доступна даже минимально обученному персоналу. Он поддерживает высокие скорости потока ВЭЖХ и автоматически оптимизирует параметры масс-спектрометра для получения лучших результатов. Масс-спектрометрический детектор позволяет однозначно обнаруживать активные фармацевтические ингредиенты (АФИ), сопутствующие им примеси и, самое главное, неизвестные и непредвиденные примеси. ВЭЖХ-МСД

Agilent InfinityLab iQ легко устанавливается в стойку имеющегося ВЭЖХ в качестве дополнительного модуля. Он специально сконструирован для простоты подключения к системам ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II, Agilent 1290 Infinity II и даже к более старым. Его конструкция позволяет подключить его в ту же розетку, что и остальные модули ВЭЖХ. Вся система ВЭЖХ, включая МСД и вакуумный насос, может быть размещена в стойке Agilent InfinityLab Flex Bench MS. Это не только освобождает место на рабочем столе, но и позволяет легко и безопасно переместить всю систему целиком.

Экспериментальная часть

Стандарты и реактивы

Все реагенты и растворители по степени чистоты были предназначены для ВЭЖХ или для ВЭЖХ-МС. Метанол был приобретен в компании Honeywell (Морристаун, Нью-Джерси, США). Стандарты АФИ парацетамола, его сопутствующих примесей и уксусной кислоты были приобретены в компании Millipore-Sigma (Merck, Дармштадт, Германия). Вода высшей степени очистки была получена с применением интегральной системы Milli-Q, оборудованной фильтром тонкой очистки LC-Pak и мембранным картриджем с размером пор 0,22 мкм (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс, США).

Образцы безрецептурных лекарственных препаратов были приобретены в местных аптеках и обозначены препарат 1 (оригинальный препарат) и препарат 2 (генерический препарат).

Оборудование

Система ВЭЖХ-МСД Agilent iQ состоит из следующих модулей:

- Насос Agilent 1290 Infinity II High-Speed Pump (G7120A).
- Автосамплер Agilent 1290 Infinity II Vialsampler (G7129B).
- Многоколоночный термостат Agilent 1290 Infinity II (G7116B).
- Детектор на диодной матрице Agilent 1290 Infinity II (G7117B).

- ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ (G6160AA).

Детектор на диодной матрице был снабжен оптической ячейкой Max-Light длиной 60 мм (G4212-60007), чтобы обеспечить максимальную чувствительность для работы с ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ.

Пробоподготовка

Выбранные стандарты примесей отвешивались в центрифужные пробирки объемом 15 мл, разбавлялись до рабочей концентрации 1 мг/мл метанолом и помещались в ультразвуковую ванну на 15 мин. 100 мкл каждого из стандартов помещались в вialу с винтовой крышкой объемом 2 мл и разбавлялись до 1 мл смесью 80:20 MeOH/H₂O. Полученный раствор последовательно разбавлялся смесью 80:20 MeOH/H₂O для получения калибровочных растворов со следующими концентрациями: 10; 5; 2,5; 1; 0,5 и 0,1 мкг/мл. Образцы безрецептурных лекарственных препаратов представляли собой таблетки с 500 мг парацетамола (АФИ). Парацетамол и его примеси экстрагировались из таблетки метанолом. Для этого таблетка препарата помещалась в центрифужную пробирку объемом 15 мл с 10 мл метанола, которая встряхивалась в течение 30 мин, затем помещалась на 30 мин в ультразвуковую ванну, после чего центрифугировалась в течение 15 мин со скоростью 4 500 об/мин. 1 мл полученного раствора с концентрацией АФИ 50 мг/мл отбирался для анализа в вialу с винтовой крышкой объемом 2 мл.

Agilent OpenLab CDS

Для сбора и обработки данных и создания отчетов использовался пакет Agilent OpenLab CDS. Agilent OpenLab CDS имеет полный набор функций, которые обеспечивают целостность данных в соответствии с требованиями части 11 Свода федеральных правил (код 21) FDA США, приложения 11 Европейского соглашения и аналогичных нормативных документов. ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II и ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ — это надежные и долговечные системы ВЭЖХ-МС для повседневного использования в лабораториях, сертифицированных по стандартам надлежащих практик в фармацевтической промышленности.

Результаты и их обсуждение

Определение линейного диапазона калировки с помощью OpenLab CDS 2.4

Калибровочные кривые строились с помощью пакета Agilent OpenLab CDS 2.4. Программа анализа данных из состава пакета OpenLab CDS позволяет

пользователю легко создавать калибровочные кривые (рис. 1) и сохранять их данные для быстрого автоматического количественного анализа проб. Калибровочные кривые для стандартов примесей строились по внешнему стандарту для шести концентраций в трех повторениях для каждой концентрации: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкг/мл. Эти концентрации соответствуют концентрациям 2, 10,

20, 50, 100 и 200 млн д. относительно концентрации АФИ в пробе. Этот диапазон был выбран для того, чтобы охватить весь ожидаемый диапазон концентраций примесей в пробах лекарственных препаратов. Калибровочные кривые приведены на рис. 2. Для всех определяемых соединений калибровочные кривые имели R^2 более 0,99.

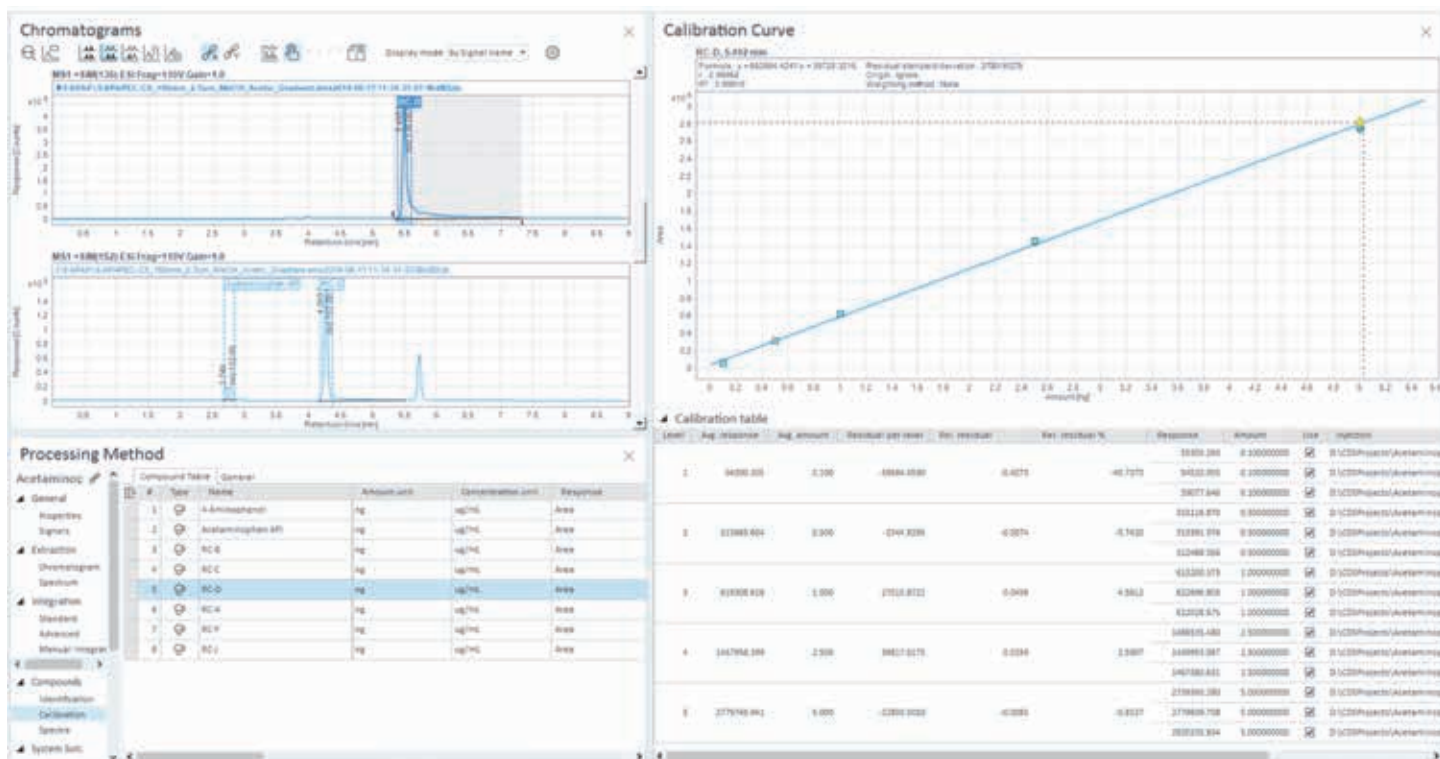


Рис. 1. Программа анализа данных пакета Agilent OpenLab CDS с открытой вкладкой калибровочных кривых. Пользователь может легко просматривать хроматограммы и калибровочные кривые вместе и выбирать для расчетов калибровочную кривую, обновляемую в режиме реального времени.

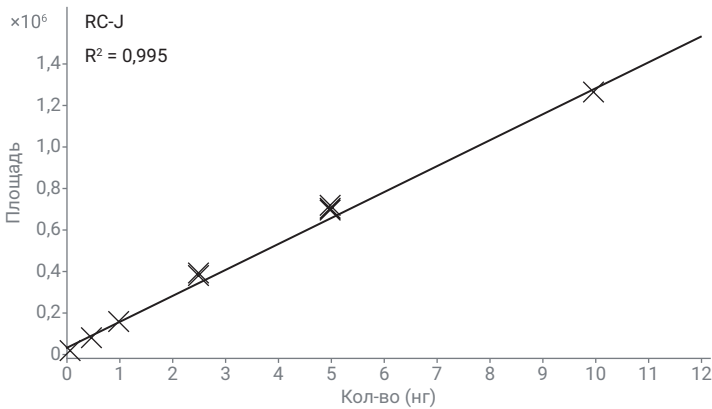
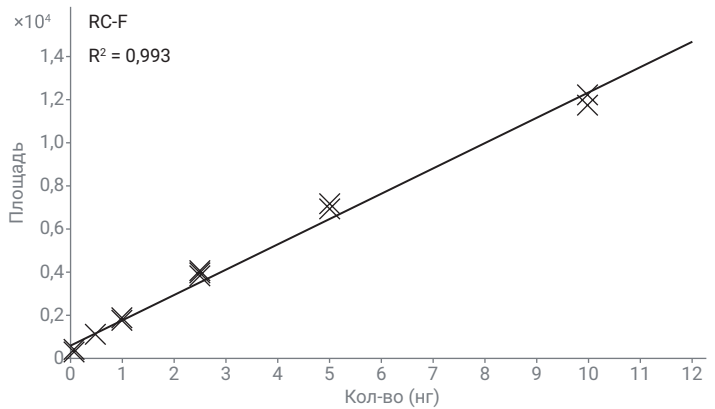
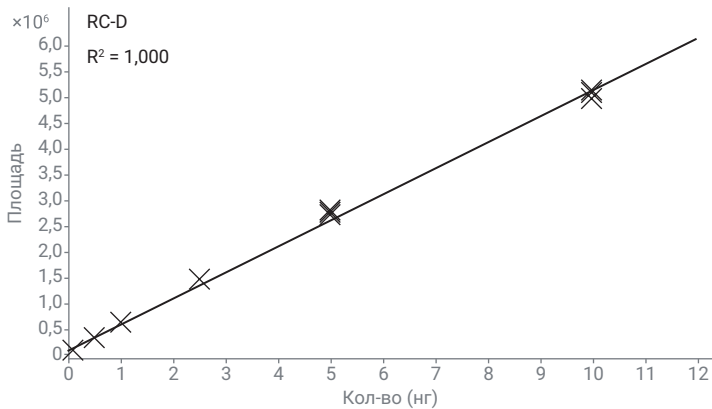
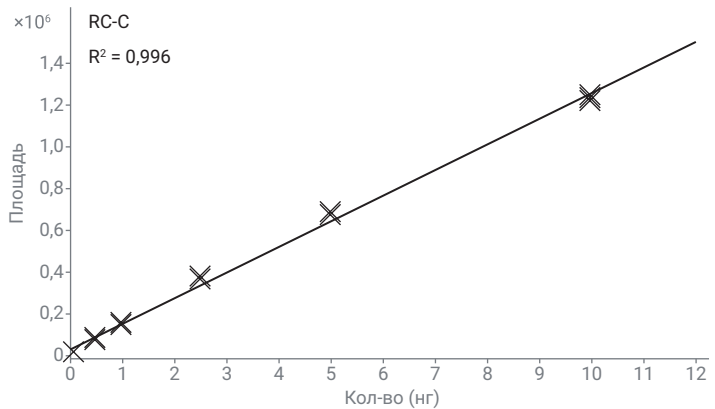
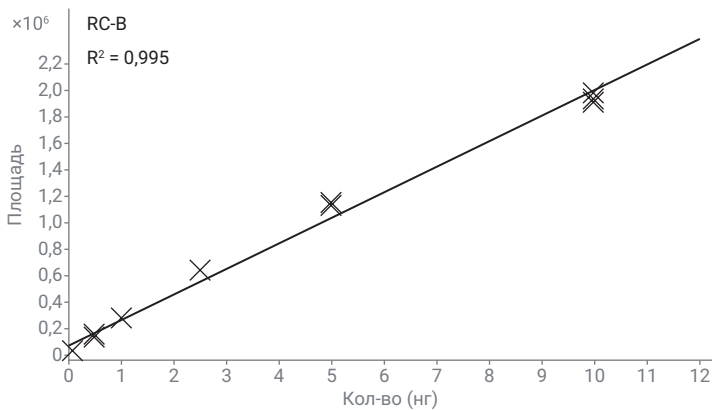
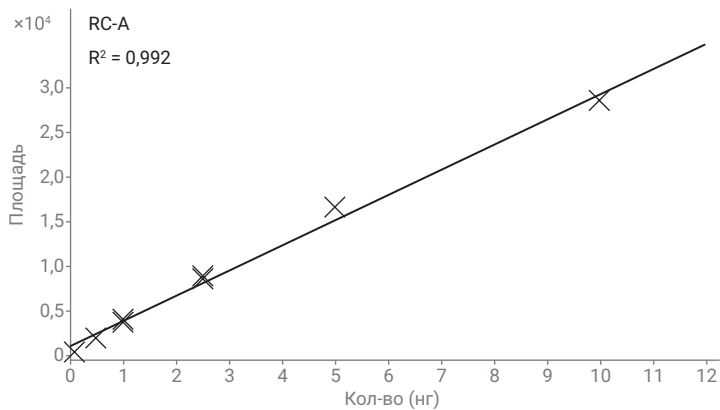
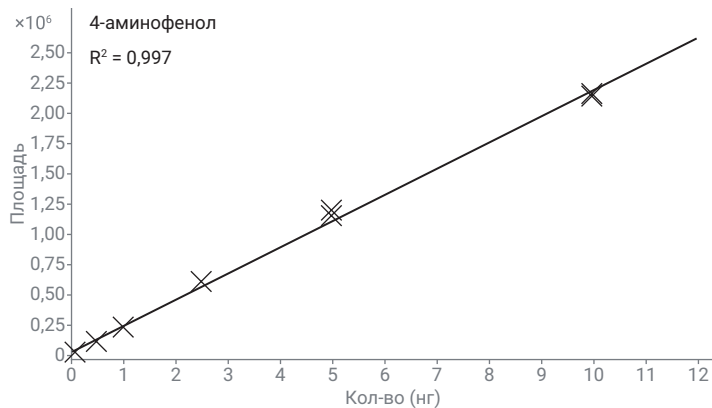
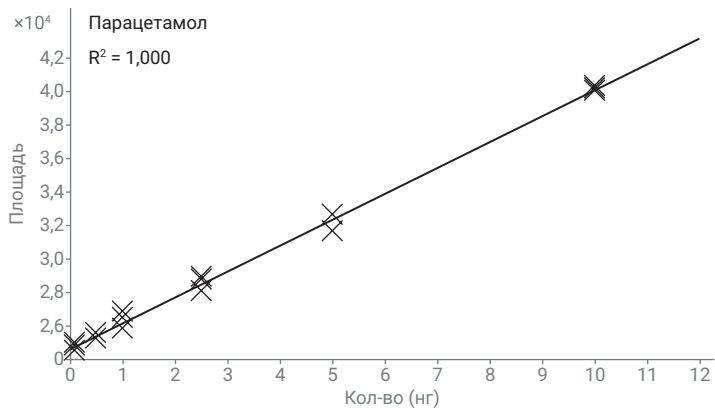


Рис. 2. Калибровочные кривые по внешнему стандарту для АФИ и примесей, перечисленных в табл. 1. Стандарты всех исследуемых соединений анализировались три раза, и все калибровочные кривые продемонстрировали R^2 более 0,99.

Для защиты МСД очень важно не допустить попадания в него пика АФИ препарата

ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ имеет встроенный распределительный кран, который помогает определять примеси в концентрированных пробах и обеспечивает долговечность и надежность МСД. Этот кран позволяет

переключить поток после детектора на диодной матрице в отходы во время выхода пика АФИ, чтобы избежать насыщения МСД из-за его высокой концентрации (50 мг/мл). Сначала проба анализируется с отключенным от хроматографического тракта МСД, чтобы определить диапазон времени, в котором выходит пик АФИ (рис. 3).

Встроенный распределительный кран ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ устанавливается на переключение потока в отходы в диапазоне от 2,5 до 3,5 мин. Как показано на рис. 3, это позволяет не допустить попадания в МСД только пика АФИ и снова переключает поток на масс-спектрометр до выхода первого примесного пика.

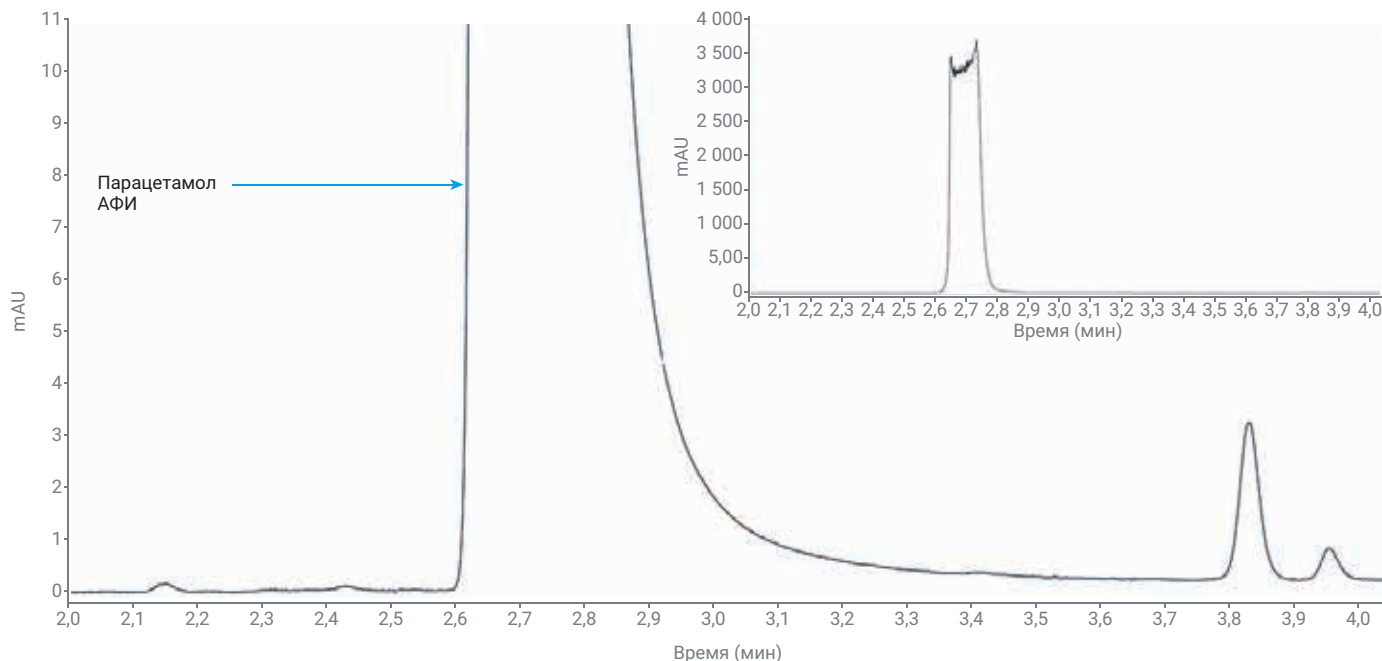


Рис. 3. Увеличенный участок хроматограммы 1 мкл пробы лекарственного препарата с 50 мг/мл АФИ (парацетамол). На врезке показана полная интенсивность сигнала для этой хроматограммы.

Идентификация примесей в безрецептурных препаратах

Чтобы оптимизировать методику ВЭЖХ и добиться достаточно хорошего разделения, примеси, перечисленные в табл. 1, анализировались отдельно, в виде стандартов. После этого анализировался 1 мкл смешанной пробы, содержащей в себе АФИ и стандарты примесей в концентрации 10 мкг/мл, чтобы сравнить полученную хроматограмму с хроматограммами проб лекарственных препаратов и идентифицировать присутствующие в них примеси (рис. 4).

После этого анализировались по 1 мкл проб лекарственных препаратов.

Для всех примесей, перечисленных в табл. 1, записывались пики в режиме мониторинга выбранного иона (SIM).

На рис. 5 показано, что в пробах лекарственных препаратов были обнаружены не все сопутствующие примеси. Только для четырех из них удалось подтвердить их присутствие в пробах: 4-аминофенол, RC-A, RC-B и RC-D. В этом исследовании сравнивались только пики SIM сопутствующих примесей (рис. 6), все остальные компоненты препарата в хроматограмму не включались.

Таблица 1. Список стандартов АФИ и примесей.

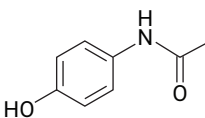
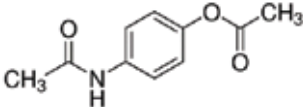
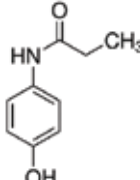
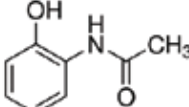
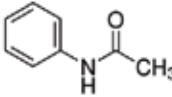
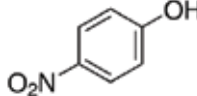
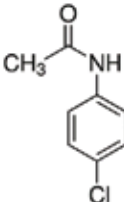
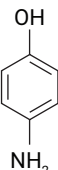
Соединение	г/моль	Структура
Парацетамол	151,2	
Сопутствующая примесь А	193,2	
Сопутствующая примесь В	165,2	
Сопутствующая примесь С	151,2	
Сопутствующая примесь D	135,2	
Сопутствующая примесь F	139,1	
Сопутствующая примесь J	169,6	
4-аминофенол	109,1	

Таблица 2. Параметры системы ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II.

Параметр	Значение для ВЭЖХ												
Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 3,0 × 150 мм, 2,7 мкм при 40 °С (кат. № 693975-306)												
Подвижная фаза А	0,1% уксусной кислоты в воде												
Подвижная фаза В	0,1% уксусной кислоты в метаноле												
Градиент	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Время</th> <th>% В</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>	Время	% В	0	10	7	50	8	80	8,5	80	9,0	10
Время	% В												
0	10												
7	50												
8	80												
8,5	80												
9,0	10												
Продолжительность задержки после завершения анализа	2,5 мин												
Скорость потока	0,6 мл/мин												
Объем ввода	1 мкл												
УФ-детектор	(265,0; 5,0 / дл. волны сравн. 360,0; 80,0), (318,0; 5,0 / без сравн.)												

Таблица 3. Параметры ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ.

Параметр	Значение для одноквадрупольного МС
Источник ионизации	ESI+
Фильтр пиков	0,02 мин
Время сканирования/задержки	Сканирование 100 мс SIM 50 мс
Температура газа-осушителя	325 °С
Расход газа	10 л/мин
Давление в распылителе	35 psi
Напряжение на входе в капилляр	3,5 кВ
Напряжение фрагментирования	90 В
Диапазон сканирования	<i>m/z</i> от 100 до 300
Ионы SIM	<i>m/z</i> 110, 152, 194, 166, 136, 140, 170

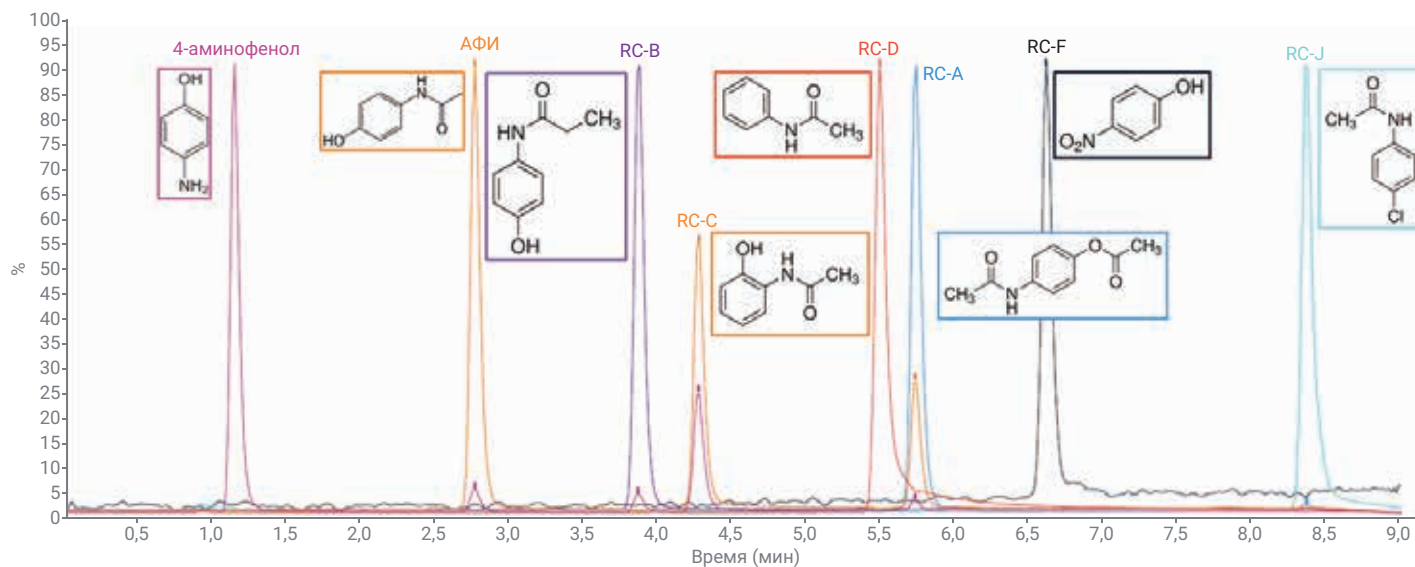


Рис. 4. Хроматограммы SIM 1 мкл стандартов АФИ и примесей (10 мкг/мл). Каждый пик выделен своим цветом. Шкала интенсивности сигнала в относительных величинах, чтобы все пики были хорошо видны.

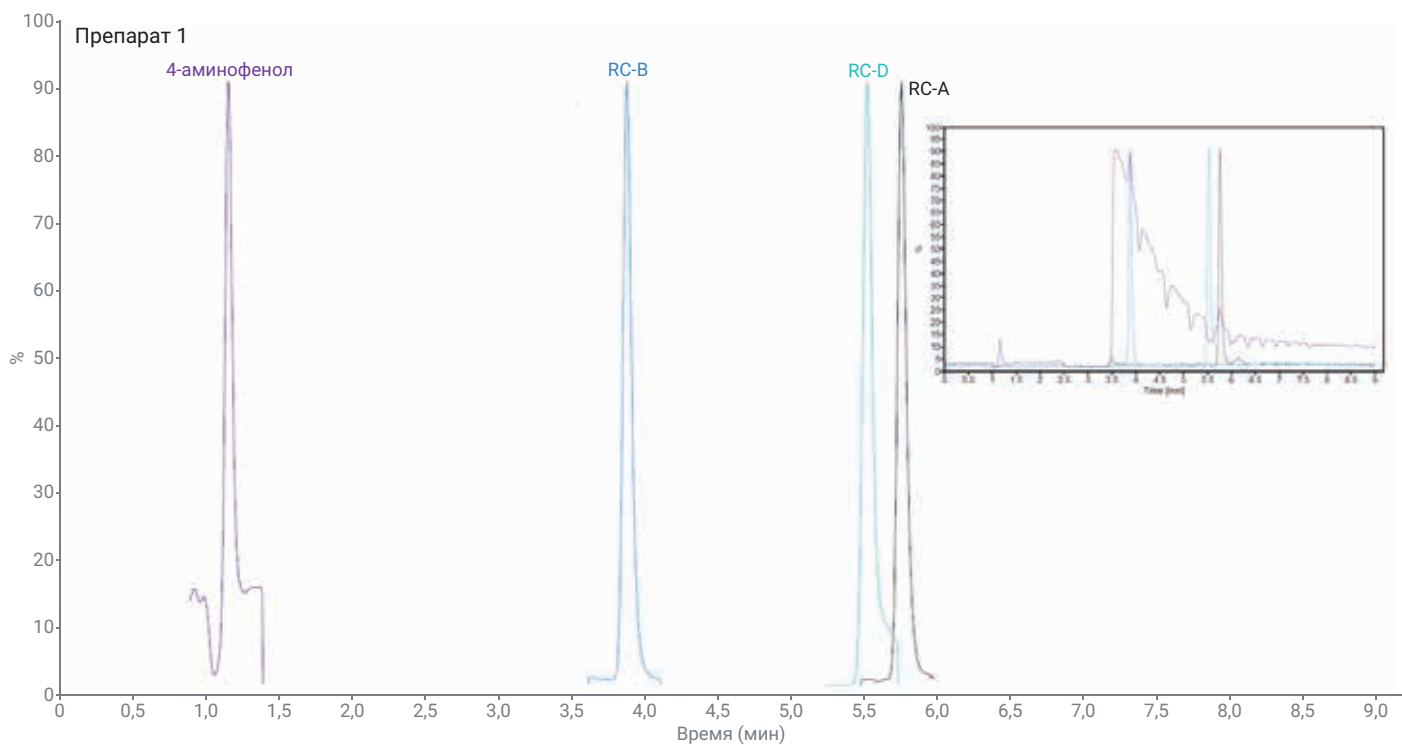


Рис. 5. Выделенные хроматограммы SIM 1 мкл препарата 1 с 50 мг/мл АФИ. Для простоты восприятия сигналы SIM ограничены периодом $\pm 0,5$ мин. Суммарная хроматограмма SIM показана на врезке. Широкий пик на врезке — это оставшийся фрагмент пика АФИ, регистрируемый при том же значении m/z , что и 4-аминофенол (m/z 110).

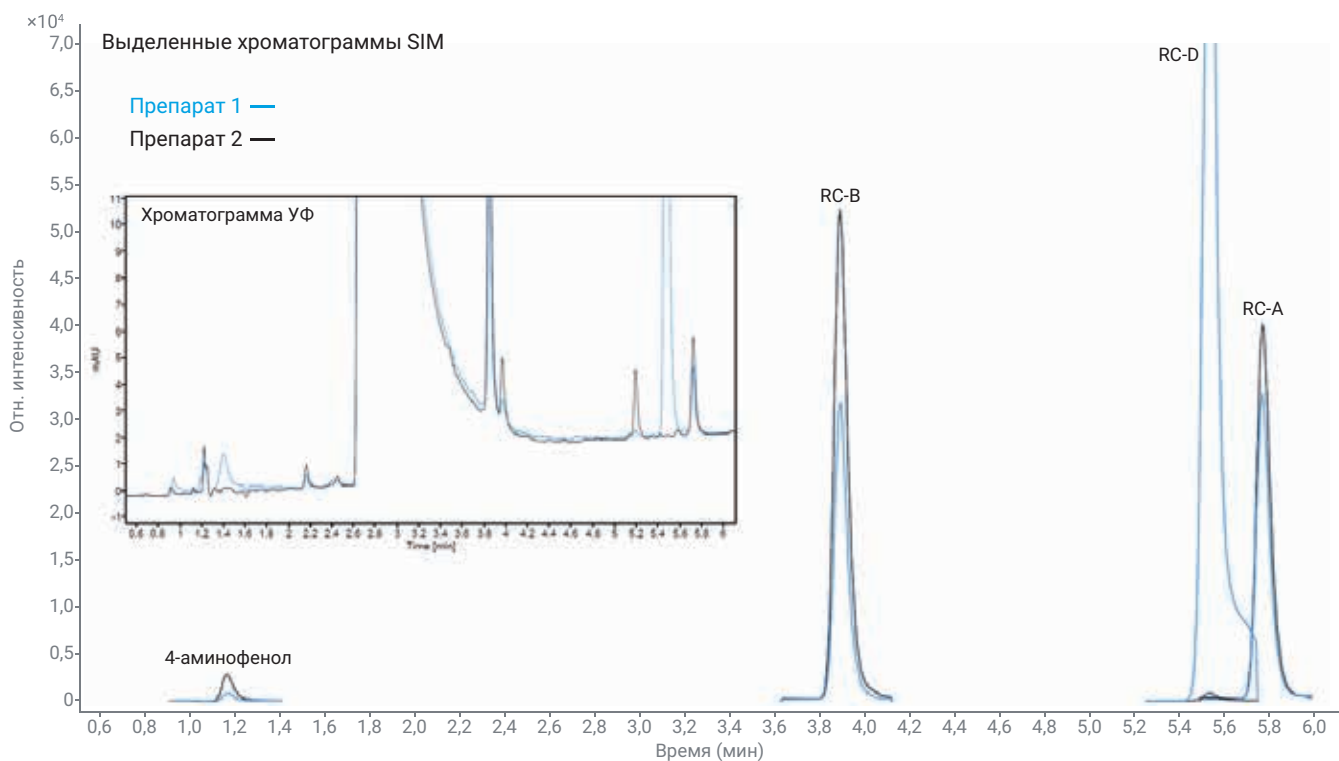


Рис. 6. Выделенные хроматограммы SIM примесей, обнаруженных в пробах безрецептурных лекарственных препаратов. Голубая линия — препарат 1, черная — препарат 2. Для простоты восприятия пики примесей были вырезаны из полной хроматограммы. Хроматограмма на врезке, полученная на УФ-детекторе, показывает в пробе множество других соединений, не связанных с примесями из табл. 1.

Сравнение оригинального и генерического безрецептурных препаратов

На рис. 6 сравниваются хроматограммы исследованных стандартных примесей в пробах 1 и 2: 4-аминофенола, RC-A, RC-B и RC-D. Самым интересным здесь является пик RC-D, который для препарата 1 был намного интенсивнее, чем для препарата 2. Однако суммарная интенсивность пиков 4-аминофенола, RC-B и RC-A для препарата 2 выше. В табл. 4 приведены количества найденных примесей относительно АФИ (в млн д.) для каждого из исследованных лекарственных препаратов. Несмотря на то, что эти количества значительно ниже рекомендованных FDA США³, различие в составе примесей между оригинальным и генерическим препаратами очевидно.

Таблица 4. Сравнение относительных (млн д. по отношению к количеству АФИ) количеств примесей в пробах лекарственных препаратов. Максимальная концентрация выделена полужирным шрифтом.

Примесь	Препарат 1, млн д. по отн. к АФИ	Препарат 2, млн д. по отн. к АФИ
4-аминофенол	0,440 *	1,586 *
RC-A	3,010	4,960
RC-B	4,260	14,72
RC-D	21,32	Не обнаружено
RC-C	Не обнаружено	Не обнаружено
RC-F	Не обнаружено	Не обнаружено
RC-J	Не обнаружено	Не обнаружено

* Ниже нижнего предела калибровки, экстраполированное значение.

Выводы

ВЭЖХ-МСД Agilent InfinityLab iQ позволяет легко обнаруживать примеси в безрецептурных лекарственных препаратах в пикограммовых (ввод в колонку) количествах (нг/мл). Оригинальный и генерический безрецептурные препараты исследовались на содержание примесей, и результаты сравнивались между собой. В оригинальном препарате в обнаруживаемых количествах были найдены четыре примеси: 4-аминофенол, RC-A, RC-B и RC-D, в то время как в генерическом препарате в обнаруживаемых количествах имелись три примеси: 4-аминофенол, RC-A и RC-B. Хотя анализ обнаружил в оригинальном препарате больше примесей, суммарная концентрация этих примесей в генерическом препарате была выше. Оба безрецептурных лекарственных препарата были изготовлены в соответствии с руководством FDA США³, и количество примесей в них значительно ниже пределов, указанных в этом руководстве: 15 мкг/мл, или 0,03% от концентрации АФИ. УФ-детектор не позволяет надежно определять количество этих примесей в таких концентрациях (см. табл. 4). Различие в составе примесей для двух АФИ может быть результатом различий в составе исходного сырья, а также процессов синтеза и очистки, применяемых в ходе производства.

Литература

1. Генерические лекарственные препараты. <https://www.fda.gov/drugs/buying-using-medicine-safely/generic-drugs>. USFDA, May 16, 2019. По сост. на 22 июля 2019 г.
2. Фармакопейная статья «Парацетамол» фармакопеи США. The United States Pharmacopeia Convention. May 1, 2014.
3. Министерство здравоохранения и социального обеспечения США; FDA; CDER; CBER. Guidance for Industry Q3B(R2) Impurities in New Drug Products. ICH, July 2006, Rev. 2.

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2019
Напечатано в США 8 октября 2019 г.
5994-1431RU

