

Technical Report

Mass-it™機能によるLCクロマトグラムの定性能向上

Improvement of LC chromatogram performance by Mass-it function

小寺澤 功明¹、前田 一真¹、向畑 和男¹、遠山 敦彦¹

Abstract:

液体クロマトグラフィーでは光吸収を用いた紫外可視 (UV-Vis) 吸光度検出器、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器が一般的に用いられています。しかし、光吸収を用いた検出器は、光吸収のない化合物や濃度の低い化合物、時間分離の不十分な化合物 (共溶出) の検出には適していません。そこで、それを補完する検出器として質量分析計があります。質量分析計は測定原理が異なるため光吸収がない化合物も測定できます。また、質量分析計を用いると化合物の質量情報を得ることができるため、より正確な定性が可能となります。質量分析計 LCMS-2050は、質量分析計で得られた化合物の質量情報 m/z を UVクロマトグラム上にオーバーレイ表示する機能 Mass-it を持ち、UV 検出器を補完し定性分析をサポートします。

Keywords: LCMS-2050、Mass-it、UV 検出器、PDA 検出器、i-PDeA II

1. UV検出とMS検出

液体クロマトグラフィー (Liquid Chromatography, LC) は、化合物をカラムで分離し検出器でモニターする分析手法で、試料中に含まれる化合物について様々な情報を得ることができます。定性的な情報としては化合物の保持時間、定量的な情報としては検出器の信号強度が挙げられ、これらを組み合わせて定性・定量分析を行います。

フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を用いると多波長同時分析することが可能なため、時間ごとのUV吸収スペクトルが得られます。UVスペクトルは化合物固有のものであるため、化合物の成分を特定する能力 (定性能力) が向上します。Fig. 1-3に、PDA検出器を用いたLC分析の結果の一例を示します。Fig. 1は、吸収波長254 nmのUVクロマトグラムで、4つの化合物のピークが確認できます。Fig. 2は、ピーク3およびピーク4の溶出時間帯に得られたUVスペクトルで、これらの化合物が全く異なる吸収スペクトル (ひいては官能基) をもつことが示唆されています。Fig. 3は、Fig. 1-2で示した情報を、保持時間・波長・信号強度の3軸でプロットしたチャートで、すべての情報が含まれる反面、分析者が一見して結果を解釈することが難しくなっています。

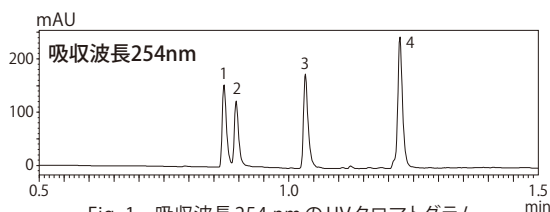


Fig. 1 吸収波長 254 nm の UV クロマトグラム

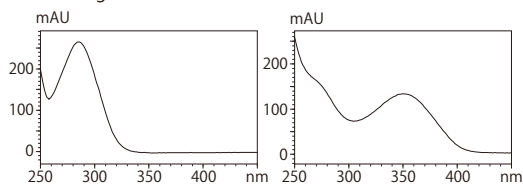


Fig. 2 UV スペクトル

左: Fig. 1 のピーク3のUVスペクトル 右: Fig. 1 のピーク4のUVスペクトル

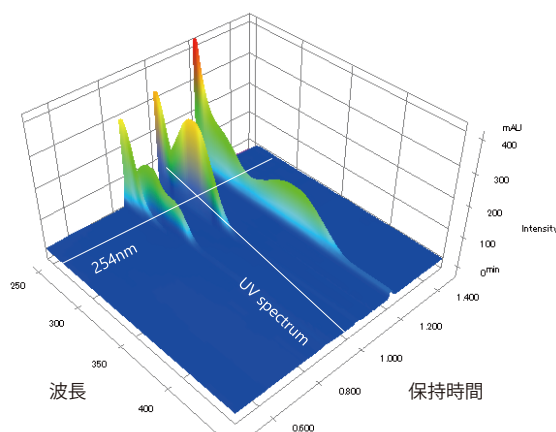


Fig. 3 PDA 検出器から得られる保持時間・波長・信号強度の3Dデータ

質量分析計 (Mass Spectrometer, MS) は、化合物を連続的にイオン化し質量情報 (m/z) を得る装置です。中でも小型でシンプルな構造をもつ LCMS-2050 は、PDA と同じ感覚で LC の検出器として用いることができ、相補的な情報をもたらします。PDA が UV 波長をスキャンするように、MS は m/z の範囲をスキャンし、得られた応答をマススペクトルとして表示します。また、 m/z を指定して時間に対してプロットすることで、定量的なクロマトグラムとしてデータを表示することもできます。



Fig. 4 PDA 検出器 SPD-M40 (左) と MS 検出器 LCMS-2050 (右)

Fig. 1, 2, 3のPDA検出器データと同時に取得した、LCMS-2050によるTIC (Total Ion Current) クロマトグラムをFig. 5に示します。MSでは保持時間0.8 min付近でピークAが検出されていますが、PDA検出器では検出されていません。これは、この化合物がUV吸収が小さい化合物のためUV検出器で検出されず、MSでのみ検出されていることを示しています。

さらに、ピーク3, 4のマスペクトルをFig. 6に示します。PDAによるUVスペクトルがパターンとして化合物の構造情報を示すのに対して、MSによるマスペクトルでは化合物の分子量情報を直接示す、きわめて特異的で定性的なピークが得られます。

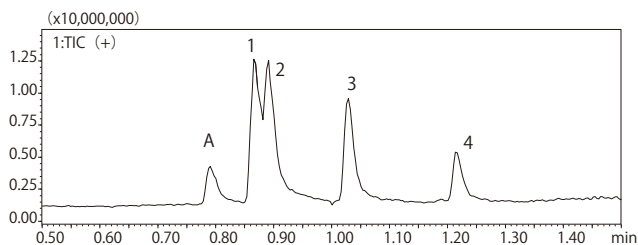


Fig. 5 MSから得られたTICクロマトグラム

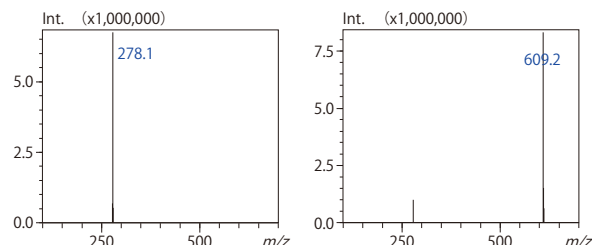


Fig. 6 Fig. 5中の各ピークのマスペクトル
(左: ピーク1のマスペクトル 右: ピーク2のマスペクトル)

Fig. 7では、Fig. 3で示した3Dデータに対して、各成分の化合物情報(化合物名・ m/z 理論値)および取得されたマスペクトルを追加しました。このように、PDAとMSを組み合わせると、3Dでも表示しきれないほどの豊富な定性情報が得られ、試料に含まれる成分全体の理解に役立ちます。

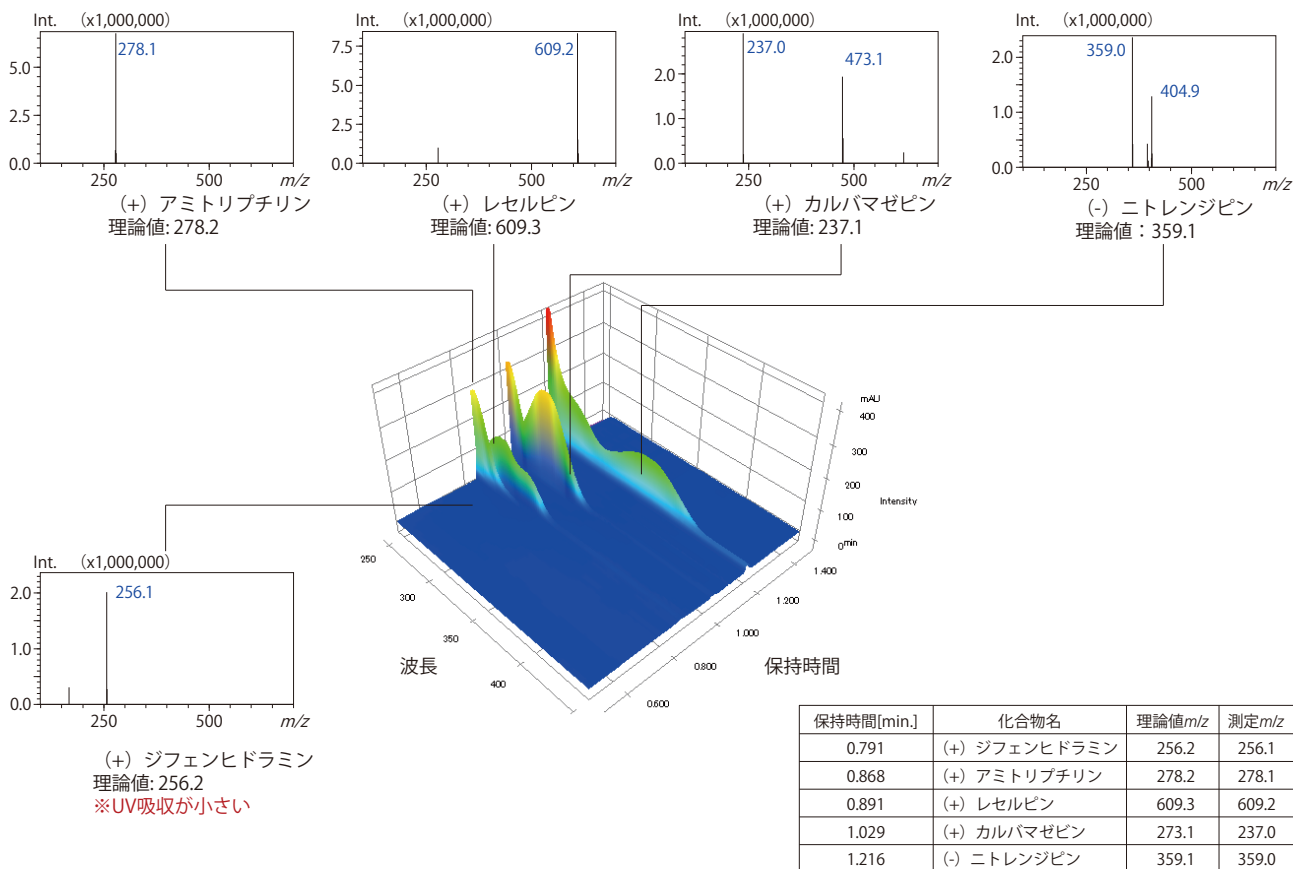


Fig. 7 PDA検出器から得られる3DデータとMSから得られるマスペクトルデータ

2. Mass-it機能とは

Mass-it機能とは、UVクロマトグラム上にマススペクトルから得られた m/z 情報を自動でオーバーレイ表示する機能です (Fig. 8)。これにより、UVクロマトグラムにおける化合物同定の信頼性および一貫性が向上します。

2-1. UV吸収がない成分をMass-it機能で検出

保持時間0.8min付近に溶出しているジフェンヒドラミンは、吸光度が小さいためPDA検出器ではピークとして検出されていませんが、MSで検出されています。そのため、Mass-it機能が m/z 情報をUVクロマトグラム上に付与し、UVで検出できない化合物の見落としを防ぎます。

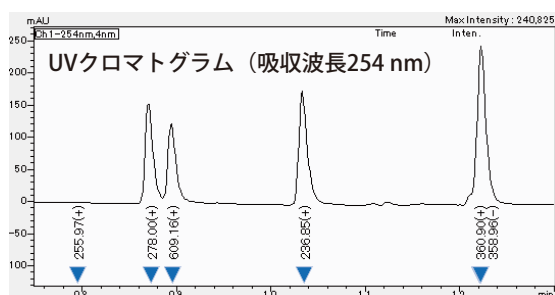


Fig. 8 Mass-it機能によるUVクロマトグラム上への m/z 情報付与

2-2. 合成品分子量確認におけるMass-it機能の活用

創薬・化学合成において定量のためにUV検出器が用いられませんが、合成確認のために質量情報を取得する場合があります。このような分析目的の解析ではMass-it機能が有用です。

不純物を含むアトルバスタチン 1000 ng/ μ Lを測定した結果をFig. 9に示します。主成分のピークがUVクロマトグラム上で10.6 min付近に検出されました。このとき、Mass-it機能がマススペクトルから得た情報 (m/z 559.3) をUVクロマトグラム上に自動で付与するため、UVクロマトグラムを見るだけで、メインピークがアトルバスタチンであることを容易に確認することができます。(Fig. 10)。

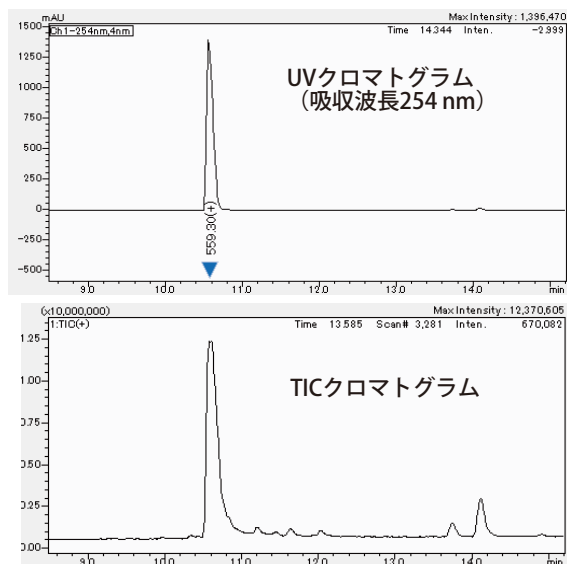


Fig. 9 Mass-it機能によるUVクロマトグラム中の主成分ピークへの m/z 情報付与

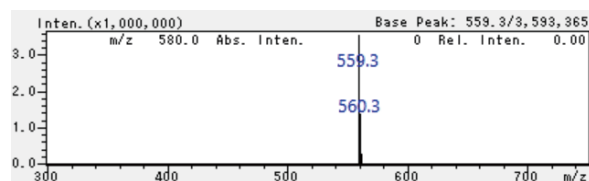


Fig. 10 アトルバスタチン主成分ピークのマススペクトル

また、Mass-it機能は主成分の確認だけでなく不純物の解析にも有用です。Fig. 9のベースライン付近を拡大したクロマトグラムをFig. 11に示します。メインピークに対して面積値0.1%以下のピークに対しても m/z 情報を付与でき、不純物の推定に役立ちます。

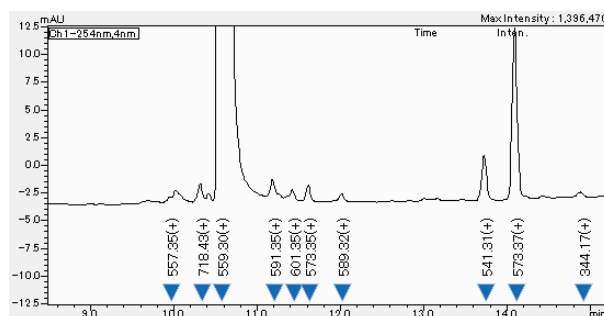


Fig. 11 Mass-it機能によるUVクロマトグラム上の不純物成分への m/z 情報付与

2-3. Mass-it機能による共溶出ピークの検出

複数の化合物がカラム分離されず同時に溶出 (共溶出) した場合、UVクロマトグラムでは1つのピークとなります。特に保持時間が近い場合、共溶出を発見することは困難です。しかし、MSではマススペクトルから共溶出を判断することが可能です。さらに、Mass-it機能がマススペクトルから得られた各化合物の m/z 情報をUVクロマトグラム上に表示し共溶出の発見をサポートします。

医薬品7成分を一斉分析したときのUVクロマトグラムをFig. 12に示します。LorazepamとOxazepamが保持時間9.4 min付近で共溶出しています。LorazepamとOxazepamはそれぞれ m/z 320.8と286.8で検出されるため、Mass-it機能によりUVクロマトグラム上に同じ位置に各 m/z 情報が付与されます。これにより、共溶出していると判断できます。

島津のPDA検出器では、i-PDeA II機能によりUVスペクトル情報からUVクロマトグラムの分離が可能です。i-PDeA IIとMass-itの両機能により、より確実な分析結果を得ることが可能となります。

UVクロマトグラム (吸収波長254 nm)

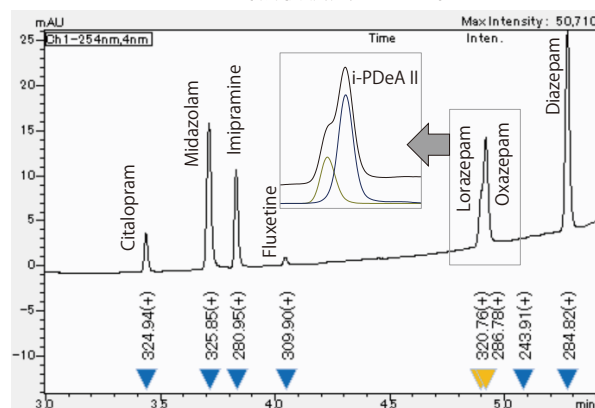
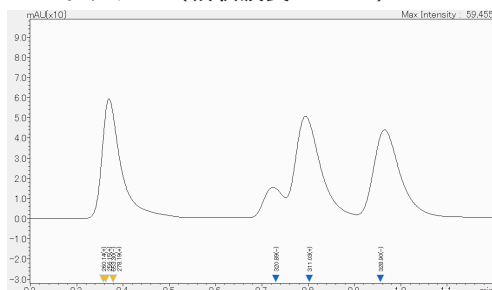


Fig. 12 医薬品7成分の測定 (i-PDeA IIとMass-itによる不分離ピークの分離)

さらに共溶出成分が多い場合の分析結果をFig. 13に示します。1つのピーク内に4成分が同時溶出した場合にも、MSにより各化合物の m/z 情報が得られ、Mass-it機能によりUVクロマトグラム上に表示されます。

UVクロマトグラム (吸収波長254 nm)



マスクロマトグラム

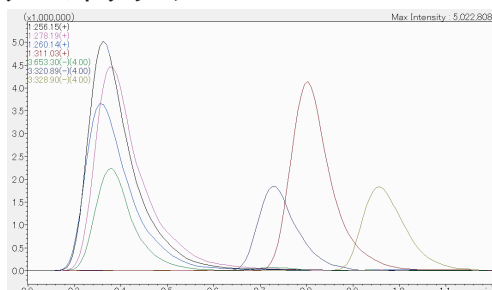


Fig. 13 保持時間0.3～0.5 min付近に4成分が共溶出しているクロマトグラム

3. Mass-it機能のアルゴリズム

Mass-it機能は、以下のアルゴリズムにより、TICクロマトグラムから m/z 情報を抽出しています。

- ①TICクロマトグラムでピーク検出します。
- ②その中に含まれるマススペクトルを積算します。
- ③検出されている m/z でマスクロマトグラムを描画します。
マスククロマトグラムでピークが形成されないものは除外されます。
ピークが形成されその保持時間が一致するものは同一成分と判定します。
保持時間が一致しないものは別成分と認識します。
- ④UVクロマトグラム上に m/z 情報を付与します。

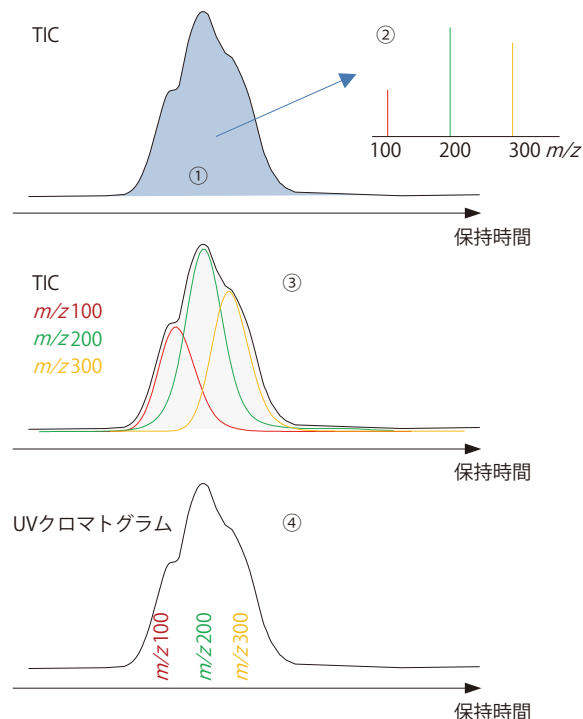


Fig. 14 Mass-itのアルゴリズム

4. まとめ

- Mass-it機能は、MSで得られた質量情報をUVクロマトグラム上に表示することができ、化合物同定をサポートします。特に合成品の分子量確認や不純物確認において有用です。
- UV吸収のない化合物を検出した場合でも、UVクロマトグラム上に質量情報を表示させることで見落としを防ぎます。
- カラムによる分離が不十分で共溶出した場合、同じ位置に質量情報を重ねて表示させます。これにより、共溶出を発見することができます。

Mass-itおよびLCMSは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2022年3月
© Shimadzu Corporation, 2022