

Application News

No. L440

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

“Co-Sense for Impurities” による薬剤成分中不純物の LC/MS/MS 分析

LC/MS/MS Analysis of Impurities in Pharmaceutical Ingredient by “Co-Sense for Impurities”

一般に不純物管理には HPLC-UV 法がよく用いられています。しかし、不純物の定性、定量のためには主成分と不純物の分離に加えて不純物間の分離も必要となり、分離条件の設定にも手間を要することがあります。更に、試料の由来やロット違いなどにより夾雑成分の種類や量が異なる場合もありますので配慮が必要となります。

今回は、医薬品成分中不純物の分析に、2 次元分離機能を備えた LC/MS/MS システムを利用した例についてご紹介します。

K. Yamabe K. Sonomura

■不純物ピークの LC/MS 分析

LC/MS Analysis of Impurity Peak

ここでは、ラベプラゾールナトリウムの試料溶液 (1 mg/mL) を日本薬局方に基づいた Table 1 の分析条件で測定しました。

装置は Fig. 1 の構成をもつ “Co-Sense for Impurities” システムを使用し、赤色の流路で分析を行いました。得られた UV クロマトグラムを Fig. 2 に示します。

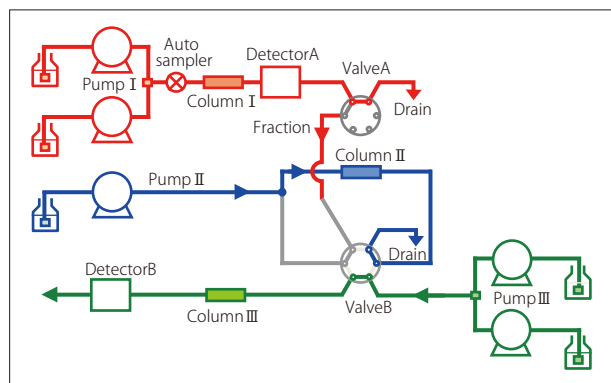


Fig. 1 流路図
Flow Diagram

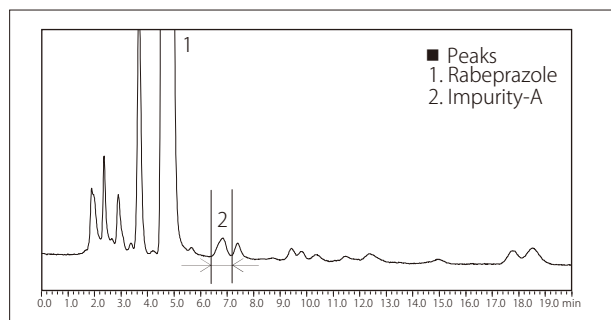


Fig. 2 ラベプラゾールナトリウムの UV クロマトグラム
UV Chromatogram of Rabepazole Sodium

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

Column (I)	: Shim-pack VP-ODS (150 mL × 4.6 mm I.D., 4.6 μm)
Mobile Phase	: Methanol / 50 mmol/L Phosphate buffer pH7.0 (3/2)
Flow Rate	: 1.0 mL/min
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 20 μL
Detection (A)	: UV 290 nm

MS 検出では揮発性移動相で分析するため、Fig. 1 の青色 (トラップ) と緑色 (2 次元目) の流路では揮発性移動相を使用しました。

日本薬局方条件で分析中に解析したいピークが溶出したタイミングで Fig. 1 のバルブ A を切換え、溶出液を青色の流路に導入し、揮発性水溶液と混合してカラム (II) に濃縮します。そしてバルブ B の切換えで緑色の流路を接続し、揮発性移動相で溶出します。この工程の分析条件を Table 2 に示しました。

Table 2 分析条件
Analytical Conditions

Column (II)	: STR-ODS II (10 mL × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Mobile Phase	: 100 mmol/L Ammonium Acetate
Flow Rate	: 5.0 mL/min
Column (III)	: Shim-pack XR-ODS (50 mL × 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase	: Methanol / 10 mmol/L Ammonium Acetate (3/2)
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Detection (B)	: LCMS-8030 (ESI)

Fig. 2 の保持時間約 6.8 分の不純物ピーク A (主成分のピーク面積の約 0.06 %) のスキャン測定を行い、検出された ESI ポジティブの m/z 394.1, m/z 508.2, m/z 569.2 のマスクロマトグラムを Fig. 3 に示します。試料溶液のダイレクトな LC/MS 分析ではこれらピークはほぼ同じ溶出位置を示しましたが、2 次元分離によって分離が促進され 3 種の不純物 (IM1 ~ IM3) のピークをそれぞれ判別することができました。

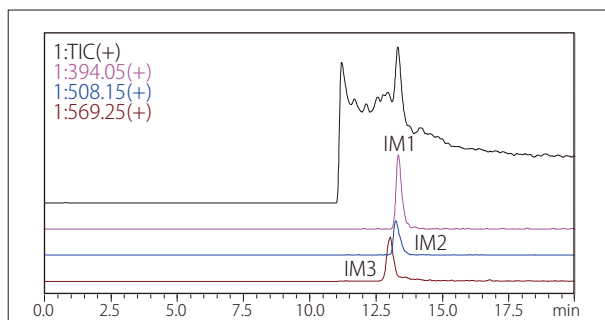


Fig. 3 不純物ピーク A のマスクロマトグラム
Mass Chromatograms of Impurity-A Peak

■不純物の構造解析と MRM 測定

Structure Prediction and MRM Analysis of Impurities

m/z 508.2 についてプロダクトイオンスキャンを行い、主成分と比較することによって不純物 IM2 の構造の推測を行いました。Fig. 4 にプロダクトイオンスペクトルを示します。ここでは、主成分に benzimidazol-2-thiol が結合したものと推測しました。

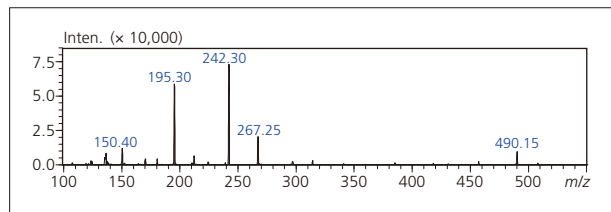
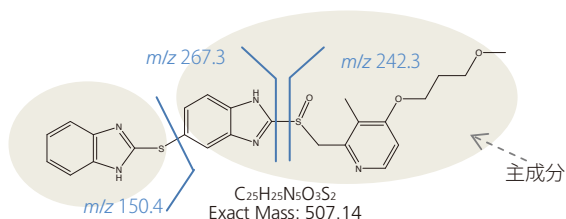


Fig. 4 m/z 508.2 のプロダクトイオンスペクトル
Product Ion Spectrum of m/z 508.2



さらに不純物 IM1～IM3 について MRM 測定を行いました。本方法によって、試料溶液の繰り返し測定での再現性や、試料注入量を変化させたときの直線性が得られることを確認することができました。

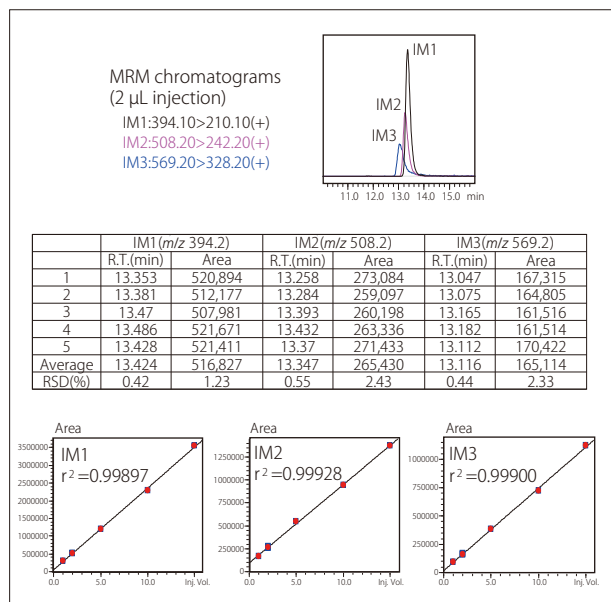


Fig. 5 不純物 IM1～IM3 の MRM 測定
MRM Analysis of Impurity IM1-IM3

■不純物ピークの 2 次元分離

2-Dimensional Separation of Impurity Peak

LC/MS/MS での分析により、UV 検出した不純物ピーク A (Fig. 6 のピーク 2) には 3 つの不純物成分が同時に溶出されていることが確認できたことから本システムを用いて更なる分離検討を行いました。

その結果、Table 3 の条件において 2 次元分離移動相 A の酢酸アンモニウム水溶液 (②) を酢酸水溶液 (①) に変更すれば、Fig. 6 右のクロマトグラム②からクロマトグラム①のように変化し、さらに不純物を分離することができました。

また、Fig. 6 ではすべて同じ縦軸スケールで UV クロマトグラムを示していますが、左側の 1 次分離のみの元の不純物ピーク A と比較すれば、2 次元分離した UV クロマトグラムではピーク強度が増大しています。本方法によって分離と感度の両方を改善することで、UV による高感度定量も可能になると考えられます。

Table 3 分析条件
Analytical Conditions

Column (II)	: STR-ODSII (10 mmL. \times 4.6 mmI.D., 5 μ m)
Mobile Phase	: 10 mmol/L Ammonium Acetate
Flow Rate	: 5.0 mL/min
Column (III)	: Shim-pack XR-ODS (50 mmL. \times 2.0 mmI.D., 2.2 μ m)
Mobile Phase	: A; ① 0.1 % Acetic acid aq. ② 10 mmol/L Ammonium Acetate
	B; Methanol
Time Program	: B CONC 40 % (0 min) \rightarrow 65 % (5 min) Mixer : 180 μ L
Flow Rate	: 0.2 mL/min
Detection (B)	: UV 290 nm

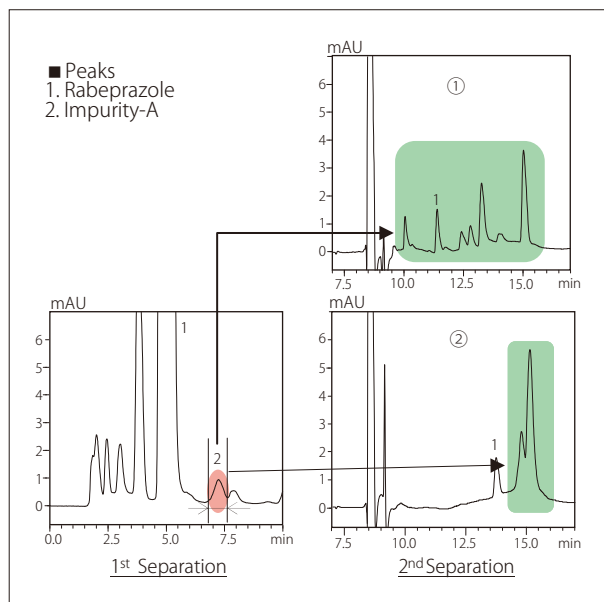


Fig. 6 不純物ピーク A の 2 次元分離
2-Dimensional Separation of Impurity-A Peak