

# Application News

## No. C97

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### トラップフリー 2次元 HPLC と LC/MS/MS を用いた薬剤中不純物の分析

Analysis of Impurities in Pharmaceutical Ingredient Using Trap-Free Two-Dimensional HPLC and Triple Quadrupole LC/MS/MS [LCMS-8040]

医薬品（原料や最終製剤，後発医薬品），食品（健康食品，サプリメント類），ファインケミカル製品（溶媒，塗料，界面活性剤，その他多数の合成品）など幅広い分野において，製品に含まれる微量な不純物の種類や量，安全性等の管理や確認が製品の品質を保証する上で重要なポイントとなっています。製品中の微量不純物に対して，LC/MS/MS等の質量分析計を用いて測定・解析を行う手法が有用な手段として注目されていますが，一般に不純物管理においては HPLC-UV法が広く採用されており，HPLC で用いられる不揮発性移動相条件をそのまま LC/MS 分析に応用することができません。そこで測定部門では多大な労力を払い揮発性移動相条件への置き換えを行ってきました。この条件変更は溶出順序の変化や主成分近傍に溶出する不純物の見逃しなど大きなリスクを伴うため，非常に慎重な検討が求められます。

本報告では，トラップフリー 2次元 HPLC を用いて，不揮発性移動相条件で検出された不純物を，複雑な検討なしにオンラインで揮発性移動相条件に変換し，トリプル四重極型質量分析計 LCMS-8040 で分析した例をご紹介します。

Y. Inohana

#### ■ 不揮発性移動相による HPLC 分析 (1 次元目) HPLC Analysis by Non-Volatile Mobile Phase (1stD)

ここでは実験用試薬として市販されているラベプラゾールナトリウムについて，1 mg/mL の試験溶液を調製し，Table 1 に示した日本薬局方に記載の分析条件に基づいて測定を行いました。移動相としてはりん酸緩衝液が用いられており，そのまま LC/MS に導入することはできません。

Table 1 分析条件 (1 次元目)  
Analytical Conditions (1stD)

Column	: Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 4.6 μm)
Mobile Phase	: Methanol / 50 mmol/L Phosphate Buffer pH 7.0 (3/2)
Flow Rate	: 1.0 mL/min.
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 20 μL
Detection	: UV 290 nm

分析は Fig. 1 に示した装置構成のトラップフリー 2次元 HPLC と LC/MS/MS の組み合わせで行いました。各動作におけるバルブポジションにより移動相の流れ方は異なりますが，Fig. 1 においては不揮発性移動相の流路が赤色で，揮発性移動相の流路が青色で，不純物を分画するピーク捕獲ループを緑色で示してあります。

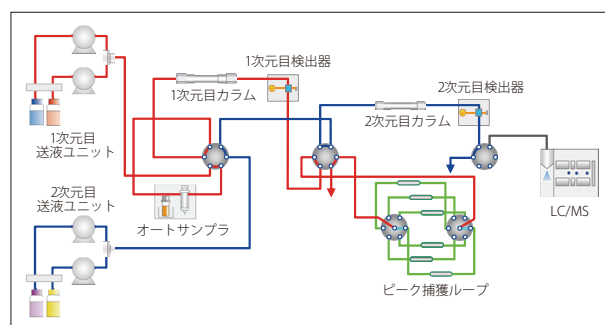


Fig. 1 流路図  
Flow Diagram

本システムを用いてラベプラゾールナトリウム 1 mg/mL 溶液を分析し，得られた UV クロマトグラムを Fig. 2 に示しました。5.3 分に主成分であるラベプラゾールが溶出しており，その前後に複数の不純物ピークを確認することができます。これらのうち図中に示した不純物 4 成分をピーク捕獲ループに分画しました。

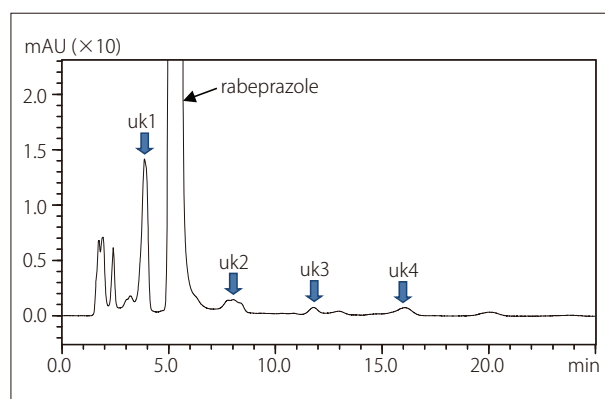


Fig. 2 ラベプラゾールナトリウムの UV クロマトグラム (1 次元目)  
UV Chromatogram of Rabeprazole Sodium (1stD)

## 揮発性移動相によるLC/MS分析(2次元目)

LC/MS Analysis by Volatile Mobile Phase (2ndD)

ピーク捕獲ループに分画した不純物 (uk1 ~ uk4) は、バルブポジション切り換えと2次元目送液ユニットにより揮発性移動相でループから押し出され、それぞれLC/MSに導入されました。2次元目分析に用いた条件はTable 2に示しました。

Table 2 分析条件(2次元目)  
Analytical Conditions (2ndD)

Column	: Shim-pack XR-ODS (50 mm L. x 2.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile Phase A	: 5 mmol/L Ammonium Acetate – water
Mobile Phase B	: Methanol
Flow Rate	: 0.2 mL/min.
Column Temp.	: 30 °C
Injection Volume	: 20 μL (Loop Volume)
Detection	: UV 290 nm, MS Q3scan (Positive and Negative Mode)

Fig. 3に示したように、それぞれのブランク測定時とサンプル測定時のUVクロマトグラムをLabSolutions LCMSのデータブラウザ機能を使って比較することで、2次元目カラムからの目的成分の溶出位置を明確に把握することができます。さらにQ3スキャン分析結果から、当該ピーク溶出時間に特異的に観測されるイオンを調べることで、目的不純物の分子量を推測することが可能です。uk-1ではブランクデータには無いピークとして、ポジティブに  $m/z$  376が、ネガティブに  $m/z$  374が観測されており、uk-1が分子量375を持つ不純物であることが分かりました。同様にループ毎のLC/MS分析データを解析し、結果をTable 3にまとめました。

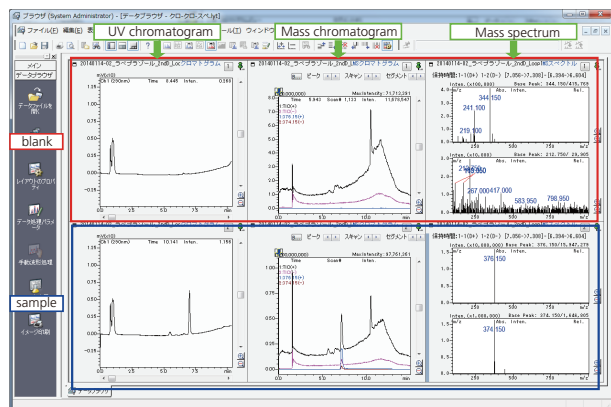


Fig. 3 データブラウザでの解析例 (uk-1)  
Analyzed Example Using Data Browser (uk-1)

Table 3 各不純物のLC/MS測定結果  
Analytical Result of Each Impurities by LC/MS

compounds	content percentage (%)	m/z		deduced MW
		positive	negative	
rabeprazole	99.045	360.20	358.15	359
uk-1	0.433	376.15	374.15	375
uk-2	0.081	394.15	392.10	393
uk-3	0.023	344.20		343
uk-4	0.046	270.20		269

さらに、LC/MS/MSを利用した場合は、不純物の分子量情報だけでなく、プロダクトイオンスキャンによる開裂パターン比較を主成分と不純物の間で行うことにより、不純物の構造を予測することも可能です。一例としてFig. 4に主成分とuk-1のプロダクトイオンスキャンの結果を示しました。uk-1はQ3スキャンの結果から分子量は375と判断できましたので、主成分であるラベプラゾールとの質量差は16Daになります。また両者のプロダクトイオンスキャンを比較すると、多くの共通する開裂が見られました。このことから、まずuk-1は主成分に近い構造を持つことが分かります。さらに、Fig. 4中で赤で囲ったプロダクトイオンはそれぞれに特異的に観測されており、かつ両者の分子量差に相当する16Daの違いを持ちます。つまりこのイオンが示す位置で構造の違いが生じていると推測することができます。Fig. 4にuk-1の推定構造を示しました。

このように、トラップフリー2次元HPLCとLC/MS/MSの組み合わせにより、不揮発性移動相条件のままで不純物ピークを高い確度で同定し、構造推定することができました。

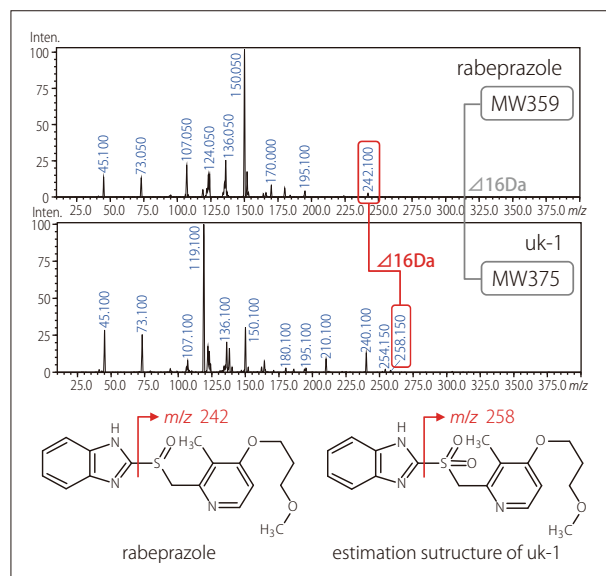


Fig. 4 ラベプラゾールとuk-1のMS/MS分析結果  
MS/MS Analysis of Rabeprazole and uk-1