

Application News

No. C185

LC/MS

トラップフリー2次元HPLCとLCMS™-9030を用いた薬剤中不純物の構造解析

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、製品中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证する上で重要なポイントとなっています。製品中の不純物について、品質管理部門では、HPLC-UV法により既知成分の確認が行われています。一方、研究部門では、HPLC-UV法のメソッドを基に、より感度および特異性に優れた質量分析計を用いて未知成分の測定・解析を行うことが求められています。

しかし、HPLCで用い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ないため、研究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にて、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、四重極飛行時間型質量分析計LCMS-9030を用いて精密質量にて構造解析した例をご紹介します。

T. Iida, Y. Inohana

■ 不揮発性移動相による HPLC 分析 (1次元目)

ここでは実験用試薬として市販されているアトルバスタチンカルシウムについて、1 mg/mLの試験溶液を調製し、表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。移動相としては不揮発性であるクエン酸緩衝液が用いられているため、そのままLC/MSに導入することはできません。

表1 分析条件 (1次元目)

| | |
|------------------|--|
| Column | : Shim-pack™ VP-ODS (250 mmL. × 4.6 mmI.D., 5 μm) |
| Mobile Phase A | : Citrate buffer pH 5.0 / Acetonitrile / Tetrahydrofuran (4/1/1 = v/v/v) |
| Mobile Phase B | : Acetonitrile / Tetrahydrofuran (1/1 = v/v) |
| Time program | : B.Conc 7% (0-40 min) → 40% (80 min) → 7% (80.1-100 min) |
| Flow Rate | : 1.43 mL/min |
| Column Temp. | : 40 °C |
| Injection Volume | : 20 μL |
| Detection | : UV 254 nm |

分析は図1に示した装置構成のトラップフリー2次元HPLCとLCMS-9030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、不揮発性移動相の流路を赤色、揮発性移動相の流路を青色、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。

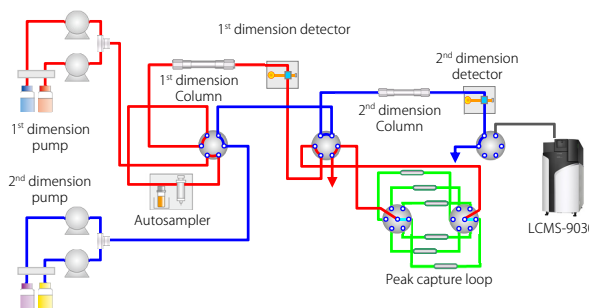


図1 流路図

本システムを用いてアトルバスタチンカルシウム溶液を分析し、得られたUVクロマトグラムを図2に示しました。保持時間約16分に主成分であるアトルバスタチンが溶出しており、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16成分(主成分を含む)をピーク捕獲ループに分画しました。

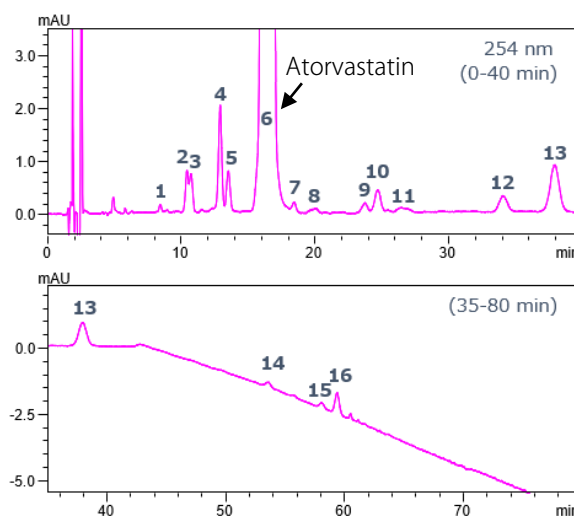


図2 アトルバスタチンカルシウムのUVクロマトグラム (1次元目)

揮発性移動相による LC/MS 分析 (2次元目)

ピーク捕獲ループに分離した主成分および不純物 (ID 1~16) 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 LCMS-9030 に導入されました。2次元目分析に用いた条件は表 2 に示しました。

表 2 分析条件 (2次元目)

| | |
|------------------|--|
| Column | : Shim-pack XR-ODS (50 mmL X 2.0 mmI.D., 2.2 μm) |
| Mobile Phase A | : 10 mmol/L Ammonium Formate - water |
| Mobile Phase B | : Acetonitrile |
| Time program | : B.Conc 10% (0 min) → 100% (6-6.5 min) → 10% (6.51-10 min) |
| Flow Rate | : 0.3 mL/min. |
| Column Temp. | : 40 °C |
| Injection Volume | : 20 μL (Loop Volume) |
| Detection | : UV 254 nm, MS, MS/MS scan (ESI Positive or Negative Mode) |

表 3 各不純物の LCMS-9030 測定結果 (ポジティブモード)

| ID | RT (HPLC) | EP listed impurities | [M+H] ⁺ theoretical | [M+H] ⁺ observed | error (PPM) | Content (%) |
|----|-----------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| 1 | 8.44 | | | 591.2501 | | 0.01 |
| 2 | 10.44 | impurity F | 718.3498 | 718.3497 | -0.13 | 0.04 |
| 3 | 10.74 | | | 575.2551 | | 0.04 |
| 4 | 12.92 | | | 575.256 | | 0.12 |
| 5 | 13.53 | impurity A | 541.2697 | 541.2695 | -0.37 | 0.05 |
| 5 | 13.53 | | | 557.2445 | | 0.05 |
| 6 | 16.30 | Atorvastatin | 559.2603 | 559.2601 | -0.31 | 99.41 |
| 7 | 18.39 | | | 557.2446 | | 0.01 |
| 8 | 20.10 | | | 557.2445 | | 0.01 |
| 9 | 23.73 | | | 601.2709 | | 0.01 |
| 10 | 24.68 | impurity G | 573.2759 | 573.2762 | 0.48 | 0.03 |
| 11 | 26.43 | | | 591.25 | | 0.01 |
| 12 | 34.07 | | | 573.2393 | | 0.04 |
| 13 | 37.93 | impurity H | 541.2497 | 541.2499 | 0.35 | 0.12 |
| 14 | 53.51 | | | 416.1655 | | 0.02 |
| 15 | 58.02 | impurity D | 432.1606 | 432.1607 | 0.32 | 0.02 |
| 15 | 58.02 | | | 362.1187 | | 0.02 |
| 16 | 59.34 | impurity D | 432.1606 | 432.1605 | -0.15 | 0.07 |

それぞれブランクとサンプル測定時の比較から、2次元目カラムからの目的成分の溶出を明確に確認することができます。LCMS-9030 によるスキャン分析結果から、当該ピークの溶出時間に特異的に観察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。ポジティブモードおよびネガティブモードにおける測定結果を表 3、4 にまとめました。また、主成分アトルバスタチンやヨーロッパ薬局方 (European Pharmacopoeia: EP) に記載されている不純物に関しては理論質量値と比べて高い質量精度で帰属されました。

表 4 各不純物の LCMS-9030 測定結果 (ネガティブモード)

| ID | RT (HPLC) | EP listed impurities | [M-H] ⁻ theoretical | [M-H] ⁻ observed | error (PPM) |
|----|-----------|----------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1 | 8.44 | | | 589.2354 | |
| 2 | 10.44 | impurity F | 716.3353 | 716.3358 | 0.70 |
| 3 | 10.74 | | | 573.2406 | |
| 4 | 12.92 | | | 573.241 | |
| 5 | 13.53 | impurity A | 539.2551 | 539.2552 | 0.10 |
| 5 | 13.53 | | | 555.2301 | |
| 6 | 16.30 | Atorvastatin | 557.2457 | 557.2457 | 0 |
| 7 | 18.39 | | | 555.2305 | |
| 8 | 20.10 | | | N.D | |
| 9 | 23.73 | | | 599.2565 | |
| 10 | 24.68 | impurity G | 571.2614 | N.D | |
| 11 | 26.43 | | | N.D | |
| 12 | 34.07 | | | N.D | |
| 13 | 37.93 | impurity H | 539.2352 | N.D | |
| 14 | 53.51 | | | 414.1506 | |
| 15 | 58.02 | impurity D | 430.1460 | N.D | |
| 15 | 58.02 | | | 360.1035 | |
| 16 | 59.34 | impurity D | 430.1460 | 430.1455 | -1.19 |

さらに、MS/MS スキャンを利用した場合は、不純物の分子量情報だけでなく、プロダクトイオンの情報から構造解析することも可能です。例として、EP 記載の不純物 F を高い質量精度で MS/MS 分析し、ACD/Labs 社 MS Workbook Suite ソフトウェアにより、開裂部位を自動帰属した例を図 3 に示します。

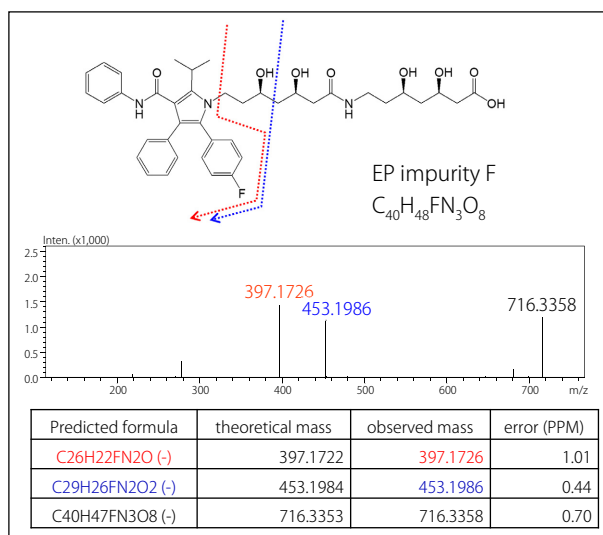


図 3 EP 記載 不純物 F の MS/MS 分析結果 (ネガティブモード)

まとめ

このように、トラップフリー 2次元 HPLC と精密 MS/MS 分析が可能な LCMS-9030 の組み合わせにより、不揮発性移動相条件のまま不純物ピークを高い確度で同定することができました。

Shim-pack および LCMS は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。