

## Technical Review

## HPLC ハイフネーテッド技術による医薬品の不純物の構造決定

村上智教、福津直人

Structure Elucidation of Impurities in Pharmaceuticals by  
HPLC Hyphenated Techniques

Tomonori Murakami, Naoto Fukutsu

*Daiichi Sankyo Co., Ltd., Pharmaceutical Technology Division Analytical and Quality Evaluation Research Laboratories**1-12-1 Shinomiya, Hiratsuka, Kanagawa 254-0014***Abstract**

Pharmaceutical impurities arise during manufacturing and storage of both drug substances and drug products. These pharmaceutical impurities sometimes cause pharmacological and toxicological effects. Therefore, impurities need to be adequately controlled to assure the quality and safety of pharmaceuticals. As a consequence, identification and safety qualification are essential even for impurities present at small amounts. HPLC hyphenated techniques have been applied to identify pharmaceutical impurities since this approach enables rapid structural determination of low-level impurities without time-consuming isolation and purification processes. In this review, the effectiveness and advantage of complementary use of HPLC hyphenated techniques, LC-MS, LC-IR and LC-NMR, in the structure elucidation of pharmaceutical impurities are described.

**Keywords:** LC-NMR, LC-MS, solvent-elimination LC-IR, identification, pharmaceutical, impurity, degradation product

**1. 緒言**

医薬品中の不純物は、製造過程や保存期間中に生成するものであり、その混入を避けることはできない。これら不純物は、医薬品には不必要なものであり、時として予期せぬ作用を示すことから、適切に管理される必要がある。日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) の新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン (ICH Q3A (R2)) [1]及び新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン (ICH Q3B (R2)) [2]は、不純物の安全性を確認する閾値及び構造決定を実施する閾値を規定している。また、最近では遺伝毒性を有する不純物について、厳しい管

理が求められている[3,4]。Table 1 に ICH ガイドラインにおける構造決定の閾値をまとめた。原薬中の不純物としては、一日投与量として 2 g 以下の場合には 0.10% 以上の不純物について構造を解析することが求められている。製剤の不純物については、一日に 20mg の有効成分を含む製剤が投与される場合を例にとると、0.2% 以上の不純物について構造解析が必要となる。製剤中の不純物は、有効成分に対する相対量として表されるため、有効成分 20mg に対して 0.2% の不純物は、絶対量として 0.04mg に相当する。一錠の錠剤重量を 100mg とすると、錠剤の全構成成分に対しては 0.04% という微量な量となる。このように、製剤中の不純物の構造解析

第一三共株式会社製薬技術本部分析評価研究所  
〒254-0014 神奈川県平塚市四之宮1-12-1

**Tel:** 0463-31-6888

**Fax:** 0463-38-3944

**E-mail:** murakami.tomonori.a5@daiichisankyo.co.jp

**Table 1.** Thresholds for identification of impurities in new drug substances and new drug products.

## 原薬中の不純物

1日最大投与量	構造決定の必要な閾値
2 g 以下	0.10%又は1日摂取量1.0mg
2 g を超える	0.05%

## 製剤中の不純物

1日最大投与量	構造決定の必要な閾値
< 1 mg	1.0%あるいは1日総摂取量 5 µg
1 mg~10mg	0.5%あるいは1日総摂取量20µg
>10mg~ 2 g	0.2%あるいは1日総摂取量 2 mg
> 2 g	0.10%

を行うにあたっては、試料の大部分を占める錠剤の構成成分から微量不純物を分離し、構造を決定しなければならない。

従来、医薬品中の不純物の構造解析は、分取用の液体クロマトグラフィー等を用いて不純物を単離・精製し、各種スペクトルを測定することにより行われてきた。しかしながら、スペクトル測定に必要な量 (mg オーダー) の不純物を、試料の大部分を占める複雑なマトリックスから高純度で単離するためには、濃縮、脱塩、精製操作が必要であり、時間を要する。また、単離する過程において、目的とする不純物の分解が避けられない場合もある。分離分析装置である HPLC と各種スペクトロメーターを接続したハイフネーテッド技術を用いることで、こうした煩雑で複雑な単離、精製操作を必要とせず構造解析を行うことが可能となる。そのため、HPLC ハイフネーテッド技術は、医薬品不純物の構造解析へ積極的に活用されてきている。

HPLC と質量分析装置 (MS) とを組み合わせた LC-MS は、精密な分離及び感度の両方を兼ね備えていることから、医薬品の不純物の構造解析においては欠くことのできない技術となっている。特別な試料の前処理や装置の工夫を必要とせず、容易に構造情報を得ることができる。飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) やイオントラップ型質量分析計 (IT-MS) を使用すれば、精密な組成式情報及び部分化学構造情報が得られる。

構造解析という点においては、赤外分光光度計と HPLC との組み合わせも有用である。得られる情報は官能基情報に限られるが、部分構造を確認する手段として活用できる。

核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、多くの構造情報が得られる最も有力なスペクトルであることから、核磁気共鳴装置と HPLC の接続は、医薬品中の不純物の構造解析においても理想的な装置といえるだろう。しかしながら、NMR は感度が低いことから、その実用化に向けては、多くの研究と装置の改良が行われてきた。また、試料導入部である HPLC の部分については、不足する感度を補うべく、多くの試料を

NMR のフローセルへ導入するための応用研究が試みられた。その結果、現在では、医薬品不純物の構造解析にルーチン的に利用されようとしている。

本稿では、医薬品の微量不純物の構造解析へのハイフネーテッド技術の応用に着目し、その有用性について述べる。

## 2. LC-MS の応用

LC-MS は、医薬品の不純物構造解析においてルーチン的に利用されている分析技術であり [5,6]、得られる分子式情報は構造解析の起点となる。LC-MS は、感度が良いこと、簡便にスペクトルを取得できることから、医薬品の不純物の構造解析においては、始めに LC-MS により、分子量及び組成式に関する情報、及び部分的な構造情報を取得することが多い。

HPLC の移動相としては、揮発性の緩衝液を用い、移動相に添加する緩衝塩や試薬の濃度は、試料のイオン化を抑制しないよう、適切に設定する必要がある。また、イオンペア試薬が必要な場合には、市販されている揮発性試薬の利用が可能であり、容易に分離条件を設定できる。医薬品には極性官能基を有する化合物が多いことから、MS でのイオン化においては、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が適用できる。ここでイオンが検出できない場合には、大気圧化学イオン化 (APCI) 法等の他のイオン化法の適用を検討する。観測されたイオンの帰属にあたっては、 $\text{NH}_4^+$  や  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  だけでなく、移動相に用いた有機溶媒や酸等が付加したイオン、 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  等の多電荷イオンや  $[2\text{M} + \text{H}]^+$  等のクラスターイオン、さらにはインソース衝突誘起解離に注意する必要がある。飛行時間型又は電場型フーリエ変換質量分析計は、精密な分子式情報を与えることから、医薬品不純物の構造解析において特に活用されている [7-9]。また、イオントラップ型質量分析計を用いれば、 $\text{MS}^n$  測定により観測されるフラグメント情報から、部分構造に関する詳細な情報を得ることができる。 $\text{MS}^n$  測定においては、プリカーサーイオンの選択幅 (isolation width) を広く設定し、同位体イオンを含めた解析を行うことによって、Cl や Br といった特徴的な同位体パターンを有する元素を含む部分構造を帰属することが可能である [10]。

応用研究分野においては、重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) を用いた水素/重水素 (H/D) 交換測定も積極的に活用されている [9,11-12]。H/D 交換を用いることにより、不純物が有する交換性プロトンの個数に応じて  $m/z$  が増加するシグナルを観測し、カルボキシル基や水酸基、アミノ基を特定することができる。ロキソプロフェンを有効成分とするテープ製剤の分解物の構造解析においては、 $\text{MS}/\text{MS}$  測定において観測されたプロダクトイオンの解析結果と交換性プロトンに関する情報から、分解物の構造を推定している [13]。Table 2 に水酸基とカルボキシル基を特定した結果をまとめた。ロキソプロフェンは、カルボキシル基に由来する交換性プロトンを 1 個有している。分

**Table 2.** Structural analysis of degradation products in heat-stressed loxoprofen sodium adhesive tapes by LC-MS.

化合物	精密 MS による 推定分子式	分子式 の変化	交換性 プロトン数	解析結果
ロキソプロフェン (主薬)	$C_{15}H_{18}O_3$	-	1 (-COOH)	-
分解物 1	$C_{15}H_{18}O_5$	+ 2 O	2	酸化 ジカルボン酸体
分解物 2	$C_{15}H_{18}O_4$	+ 1 O	2	酸化 水酸化体
分解物 3	$C_{25}H_{36}O_3$	+ $C_{10}H_{18}$	0	添加剤との反応 メントールエステル体

分解物 1 では、精密質量分析より推定された分子式において、酸素の 2 個の増加が示されるとともに、交換性プロトンも 1 個増加している。このことから、新たにカルボキシル基が 1 つ導入されたジカルボン酸体であることが示唆された。分解物 2 においては、交換性プロトンは 1 個増加しているものの、精密質量分析により推定された分子式からは、酸素 1 個分の増加しか示されなかった。このことから、分解物 2 は水酸基が導入された水酸化体であることが示された。分解物 3 については、交換性プロトンが消失していることから、エステル体であることが示唆された。このように、交換性プロトンに関する情報は、MS<sup>n</sup> 測定によるフラグメント情報と併せ、官能基の変化を理解するために活用できる。

さらに、<sup>18</sup>O アイソトープを利用する手法も、不純物や分解物の生成機構を理解するために活用されている。副腎皮質ステロイドの塩基性条件下における自動酸化分解に関する報告[14]では、<sup>18</sup>O<sub>2</sub>を用いて新規分解メカニズムを解明している。また、カプセル剤の分解に関する研究[15]では、H<sub>2</sub><sup>18</sup>Oを用いた強制分解実験により生成する分解物の構造を解析することにより、分解機構を研究し、添加剤中の不純物とのメイラード反応により生成するフリーラジカルが、酸化分解を誘起したことを明らかにしている。

### 3. LC-IR の応用

赤外吸収 (IR) スペクトル法は、化合物に特異的なスペクトルを得ることができる。そのため、HPLC に IR を接続した LC-IR は、構造解析において有用な技術の一つである。LC-IR は、必ずしも十分な感度を有しているとは言えないものの、NMR や MS で構造を特定できない場合に力を発揮する。LC-MS で官能基の存在が示唆されるものの、目的とする官能基が NMR に応答しない場合、その結合位置や結合様式を完全に特定することができない。例えば、NMR で十分に感度が得られない、カルボニル炭素の確認等への応用が挙げられる。

LC-IR は、HPLC の移動相に用いられる有機溶媒、水、酸

及び緩衝塩は、赤外領域に強い吸収を示すことから、HPLC からの溶出液を検出セルに直接導入して測定を行うことは困難であり、フローセル法の構造解析への応用は限られている。一方で、HPLC からの溶出液を超音波で微細化した後、加熱下、窒素もしくはヘリウム気流でスプレーしながら、減圧条件に保つことで溶媒を留去する溶媒除去法は、移動相の影響を受けにくく、不純物の構造解析に適用することが可能である。溶媒除去法では、試料を ZnSe や Ge 製のプレート上に連続的に捕集し、堆積した試料の IR スペクトルを測定する。装置図の一例を Figure 1 に示す。移動相に使用できる緩衝塩は、LC-MS と同様、揮発性に限られ、移動相組成の変動によりバックグラウンドが変化することから、グラジエント溶離の場合には解析に注意が必要である。感度及びピーク分離は、移動相流量、サンプル滴下速度、サンプルステージの回転速度、さらには試料の結晶化にも影響される。

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるオルメサルタンメドキシミルを有効成分とする製剤の二量体分解物の構造解析では、LC-IR によりその結合様式を明らかにしている[16]。オルメサルタンメドキシミルと二量体分解物の IR スペクトルを Figure 2 に示す。二量体の結合様式として、エステル、アミド、酸無水物等の可能性が考えられたが、オルメサルタンと比較して新たに観測されたピークは、エステルの C=O に帰属される領域に検出され、分解物はエステル結合を介した二量体であることが示された。

### 4. LC-NMR の応用

#### 4.1. LC-NMR

LC-NMR は、装置の高磁場化、プローブローブの改良による高感度化及び移動相溶媒シグナルを消去するパルスプログラムの開発により、実用的な分析法として医薬品の不純物分析への応用が進んだ。NMR スペクトルは、多くの構造情報をもたらすことから、不純物の構造解析における最も有力なツールといえる。LC-MS で得た分子構造情報を基に、構造確定のために取得が必要なスペクトルを決定し、LC-NMR

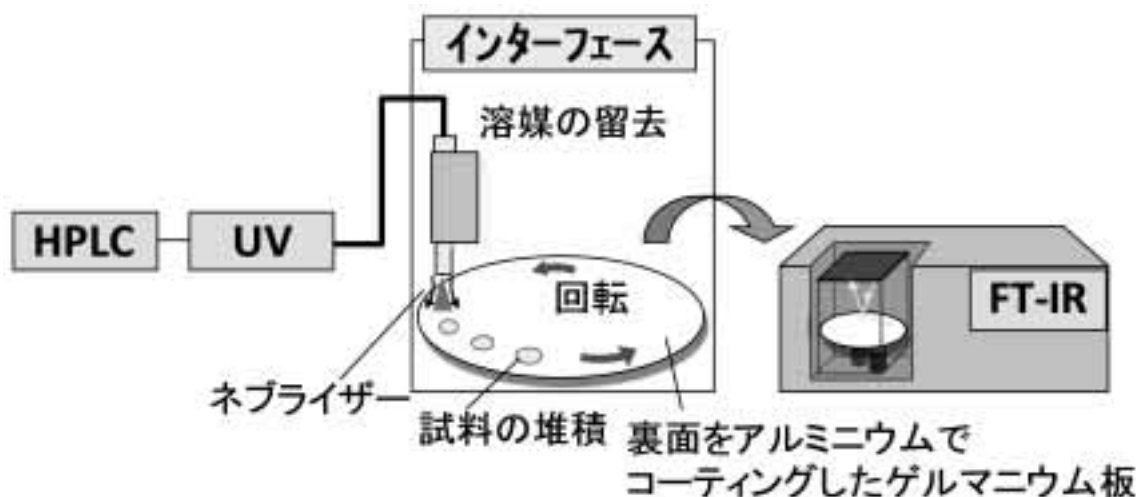


Figure 1. Schematic diagram of a solvent-elimination LC-IR system.

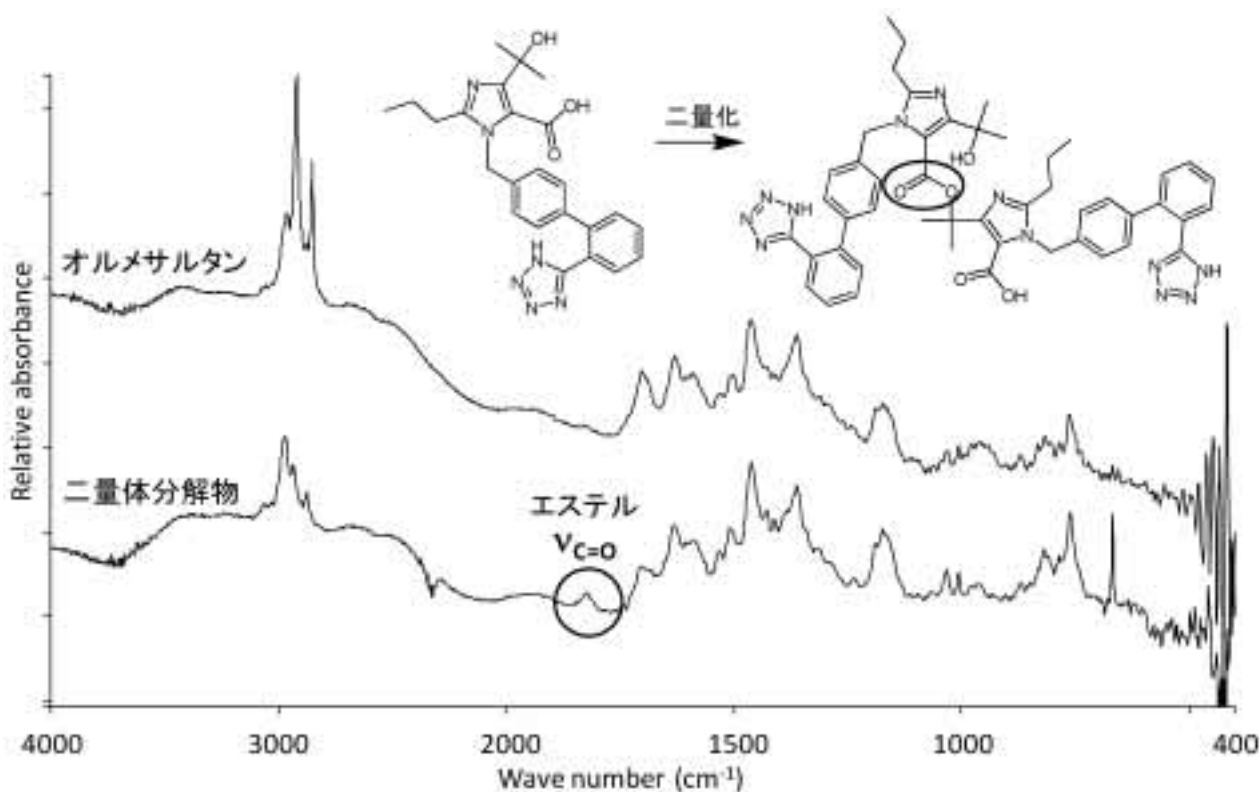


Figure 2. LC-IR spectra of olmesartan and its dimeric degradation product.

の実験系を組む。<sup>1</sup>H NMR スペクトルからだけでは構造の確定に至らない場合には、二次元スペクトルの取得を検討する。医薬品不純物の構造解析においては、目的とする不純物の<sup>1</sup>H NMR スペクトルを、医薬品そのもののスペクトルと比較することで構造が決定できる場合もある。

LC-NMR の測定法には、on-flow と、stopped-flow の2つの方法がある。on-flow 法は、UV 検出と同様に、HPLC の移動相の送液を続けたまま NMR 測定を行う方法であり、横

軸をケミカルシフト、縦軸を HPLC の保持時間とした二次元スペクトルが得られる。しかしながら、on-flow 法においては、試料がフローセルを通過する間に NMR 測定を行う必要があるため、高い濃度の試料溶液が必要であり、微量な不純物の測定には適さない。一方、stopped-flow 法は HPLC の UV 検出器等のシグナルを利用し、HPLC の移動相の送液を止める、もしくは流路切り替えバルブ等で NMR フローセルへのラインを切り替えることにより、試料をフローセ

ル内に滞留させて NMR 測定をする方法である。HPLC ピークを NMR のフローセルの中に滞留させて測定することで、通常の NMR 測定と変わりなく、長時間のスペクトル測定が可能となることから、本手法は医薬品の不純物のような微量成分の測定に適している。また、フローセルに導入できる不純物の量によっては、二次元 NMR 測定も可能である。ただし、HPLC 注入量を増加させるだけでは感度良く測定することはできず、限られた容量のフローセル中に、HPLC で分離されたピーク全体が導入できるよう、試料負荷量を含めて適切な HPLC 条件を設定することが重要である。HPLC のピークの半値幅は、カラム内径や移動相の流量により変化することから、ピーク全体をフローセルに導入するためには、フローセルの容量に合わせ、適切なカラム内径を選択しなければならない。Figure 3 に、セミマイクロカラムを用いてピークの半値幅を小さく保ち、溶出液中の成分濃度を上げることによって、高感度に測定できた例を示す。容量が120 $\mu$ l のフローセルの場合、内径4.6mm のカラムを用いた測定では、ピーク成分の約60% (ピーク幅として9秒分) しかフローセル中に導入されなかった。一方で、内径2.0mm のカラムを用いた測定では全ピーク成分をフローセルに導入しての測定が達成されている。

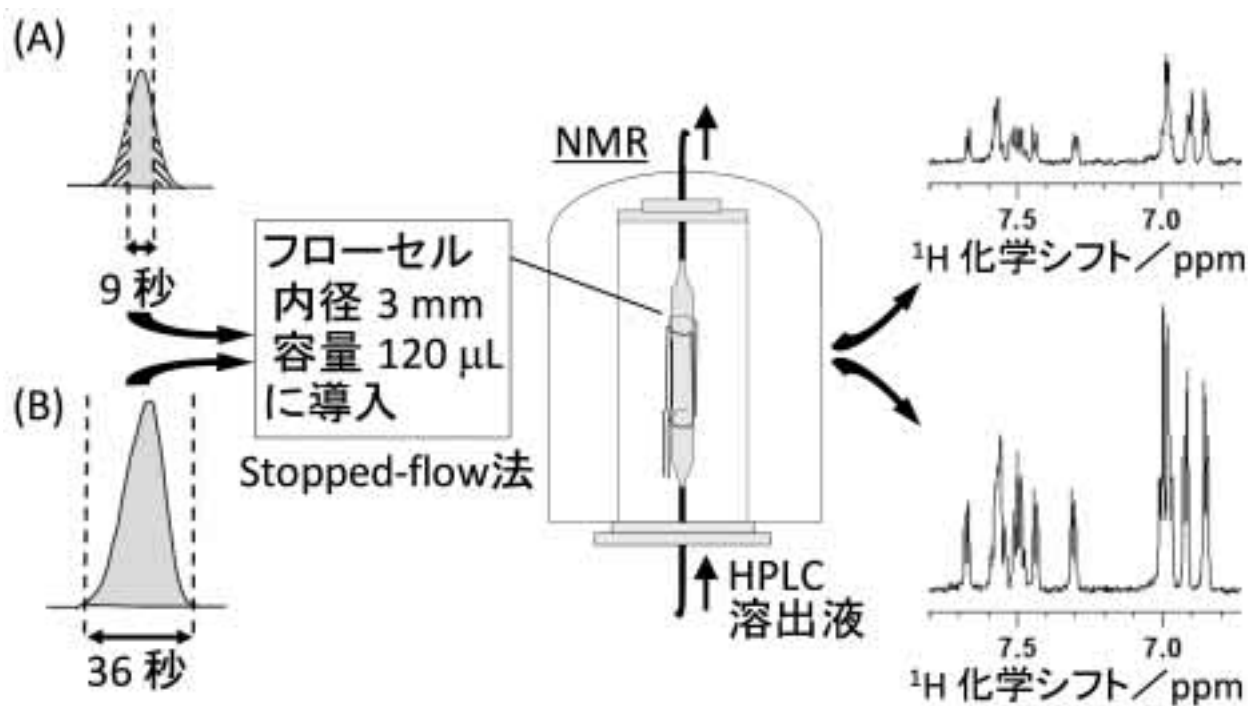
LC-NMR 装置を用いて $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定する際に必要とされる試料の量は、分子量400程度の化合物では、磁場強度が500MHz の装置では、on-flow モードで5~10  $\mu$ g、stopped-flow モードで0.2~1  $\mu$ g 程度と言われている。

検出コイルを20K の極低温に冷却して測定を行うプローブを用いれば、約4倍程度感度が向上することから、さらに微量な成分を測定することが可能である[17]。

ここで、stopped-flow 法による不純物の構造決定例を紹介する。オルメサルタンメドキシミル製剤の保存期間中に増加する二量体分解物の構造解析では、分取中に二量体分解物が加水分解をするため、NMR スペクトルを得ることが不可能であった。そこで苛酷条件下で強制的に二量体分解物を増加させた製剤を調製し、分取することなく、stopped-flow 法を用いて $^1\text{H}$  NMR スペクトルを測定した[16]。微量不純物の NMR 測定においては、移動相に重水素化溶媒を用いた場合にも、溶媒の残留プロトンシグナルがスペクトルに大きな影響を及ぼす。本例では、移動相のアセトニトリル由来シグナルと分解物シグナルの重なりが生じたため、移動相有機溶媒をメタノールに変更して測定を行った。移動相に重アセトニトリル及び重メタノールを用い、二量体分解物の $^1\text{H}$  NMR スペクトル測定した結果を Figure 4 に示す。このように、HPLC から溶出した試料を直接 NMR 測定する場合には、試料シグナルに干渉をしない有機溶媒や緩衝剤の選定が必要である。

#### 4.2. カラムスイッチング法の応用

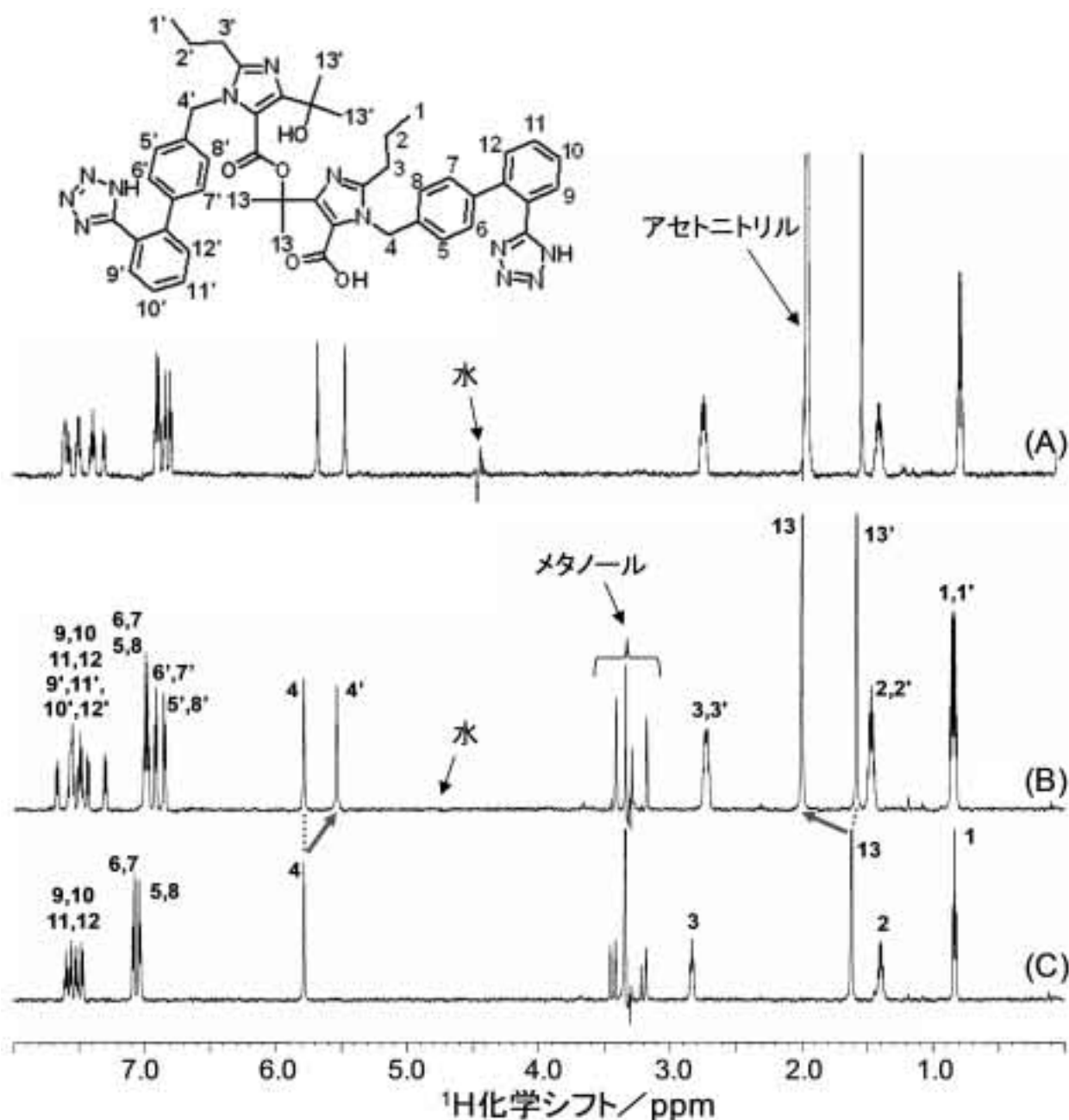
カラムスイッチング法は、分析対象とする化合物を他のマトリックスから分離、濃縮、精製することに優れており、医薬品代謝物の分析等の分野で多く応用されてきた。不純物の構造解析においては、複数の HPLC システムを切り替えバ



**Figure 3.** Comparison of  $^1\text{H}$  NMR spectra obtained with (A) conventional column (4.6 mm i.d., flow rate 0.8 mL/min) and (B) semi-micro column (2.0 mm i.d., flow rate 0.2 mL/min). Each  $^1\text{H}$  NMR spectrum resulted from the accumulation of 256 scans by stopped-flow method with the same injected amount of the sample (2  $\mu$ g).

ルブで組み合わせることにより、オンラインで濃縮、脱塩、精製を行うことが可能となる。LC-NMRによるNMRスペクトルの測定では、先の例で示したように移動相のプロトンがスペクトルに影響を及ぼす。そこで、HPLC分離後に濃縮、脱塩、精製の他、重溶媒への切り替えを行うNMR測定試料溶液調製用前処理カラムスイッチングHPLCシステムが開発されている[18]。その後、同様のシステムをNMRに

接続した装置を応用し、マレイン酸アムロジピンを有効成分とする錠剤中の2種の分解物について、構造解析を行った[19]。Figure 5にシステム図を示す。ここでは、40℃/75%RHの条件下で強制的に分解物を増加させた試料を用いると共に、トラップカラムで目的とする分解物を濃縮することで、オンラインでの二次元NMR測定を可能とした。 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 相関を解析する Double-quantum filtered correlation spectroscopy

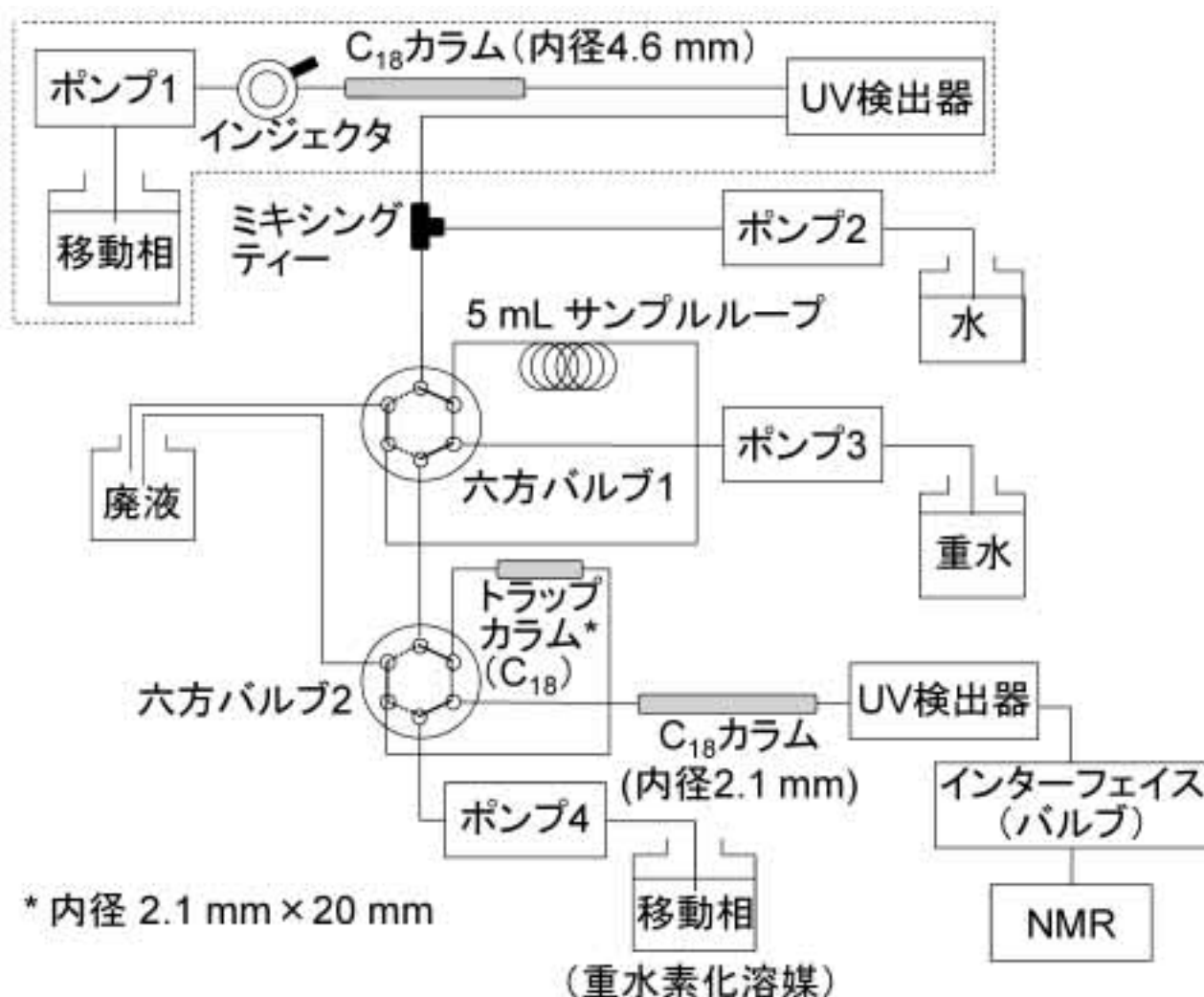


**Figure 4.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of (A) dimeric degradation product of olmesartan medoxomil obtained with  $\text{CD}_3\text{CN}$  as an organic component of the mobile phase, (B) dimeric degradation product and (C) olmesartan with  $\text{CD}_3\text{OD}$  as an organic component of the mobile phase. The methyl signal (13) which is overlapped with the residual acetonitrile signal was detected by replacing  $\text{CD}_3\text{CN}$  with  $\text{CD}_3\text{OD}$  of the LC mobile phase in the LC-NMR measurements.

(DQF-COSY) スペクトルと $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ロングレンジ相関を解析する Heteronuclear multiple bond coherence spectroscopy (HMBC) スペクトルの測定を行っている。分解物 1 の DQF-COSY スペクトルを Figure 6 に示す。パルス磁場勾配を用いて測定することにより、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルでは移動相中の水のシグナルの干渉により観測されなかったラクトースの  $\beta$ -アノメリックプロトンを検出している。また、隣接プロトンとのカップリング定数を解析することで、製剤添加剤成分のラクトースとのメイラード反応生成物についての結合様式までも明らかにした。次に、分解物 2 の HMBC スペクトルを Figure 7 に示す。HMBC スペクトルは、NMR スペクトルの中でより高濃度の試料が必要とされるが、本システムを適用することにより解析可能な良好なスペクトルを取得している。このスペクトルを解析した結果、分解物 2 は、塩である

マレイン酸とのマイケル付加反応物であることが明らかとなった。

また、HPLC 分離前の試料のオンライン濃縮によっても、NMR フローセルへ高濃度の試料を導入することができる。一例として、ロキソプロフェンを有効成分とするテープ剤中の分解物について構造解析を行った研究[13]では、トラップカラムをスイッチングバルブ HPLC システムに組み込み、加圧抽出法により 80% アセトンを用いて 3.9–6.0 MPa で分解物を抽出した後、トラップカラムにてオンライン濃縮し、NMR 測定を行っている。Figure 8 にシステム図を示す。抽出後の希釈液及び移送液として 0.05% (v/v) TFA 水溶液を用い、分解物構造中のカルボキシル基の解離を抑制することにより、高回収率での逆相カラムへのトラップを達成した。次に、トラップカラムの下流に接続した分析カラムにて、ト



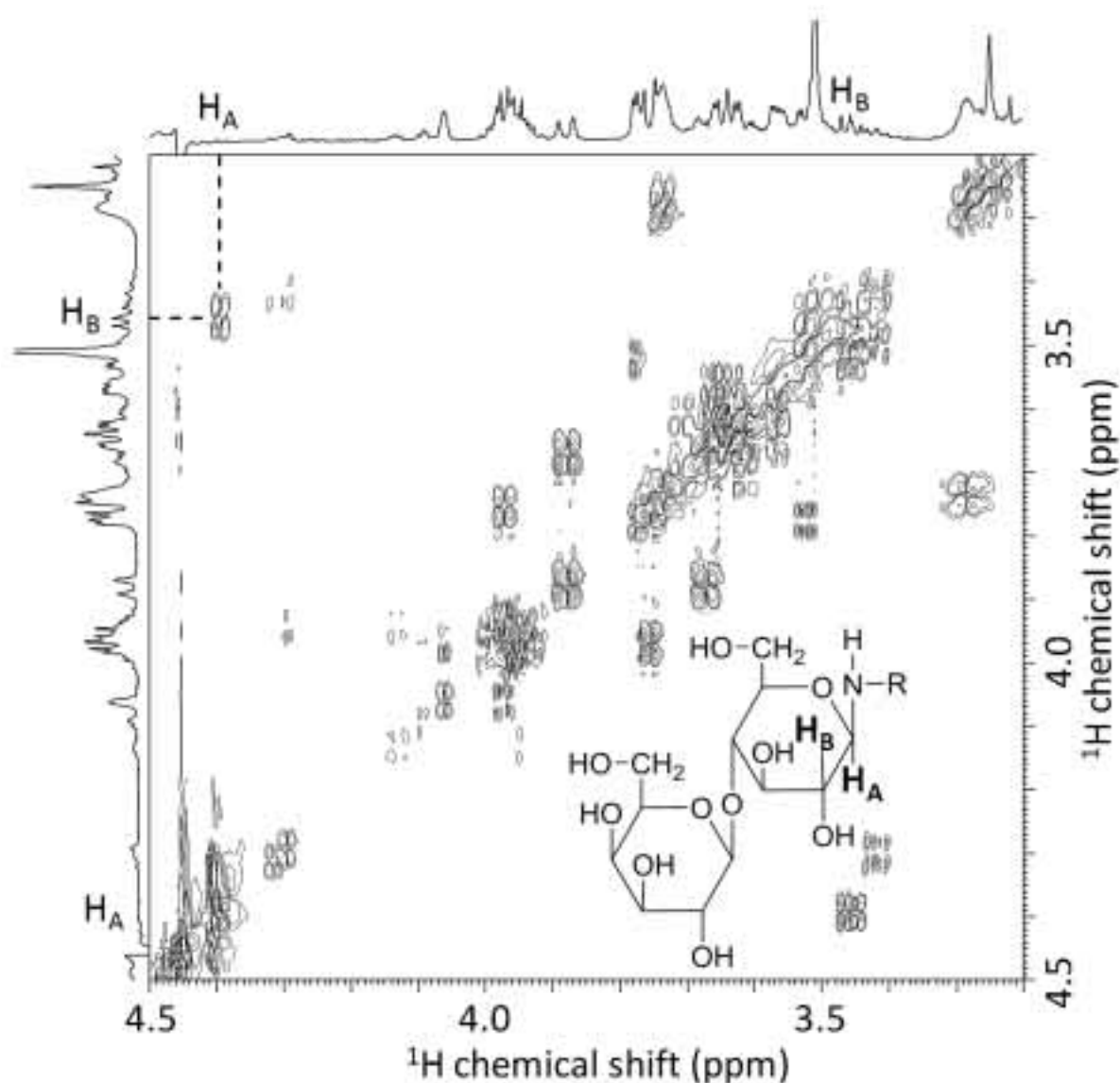
**Figure 5.** Schematic diagram of the column switching system for the on-line sample pre-concentration in LC-NMR analysis. Approximately 100  $\mu\text{g}$  of two degradation products were separated on the analytical C18 column (4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm) and trapped in the trapping column (2.1 mm i.d.  $\times$  20 mm). The trapped degradation products were separated again on the analytical C18 column (2.1 mm i.d.  $\times$  150 mm) with the deuterated mobile phase and transferred to the NMR.

ラップカラム上に濃縮した複数の成分を分離し、その後、流路切り替えバルブを用いて各成分を個別にフラクションループに蓄えた。ループ中に蓄えた各成分を、NMR フローセルに順次導入し、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルの測定を行っている。この手法を用いることによって、1回のHPLC分析で、複数の不純物のNMRスペクトルを連続的に測定することを可能としている。本研究では、テープ剤の粘着基材の影響を避け、膏体に対して相対質量0.03%レベルの3種の分解物の構造解析が達成された。分解物2については、フラクションループを効果的に利用することで、近接して溶出する過大な分解物1のピークの混入を避け、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルの測定を行っている。Figure 9に各分解物の $^1\text{H}$  NMR スペクトルを

示す。

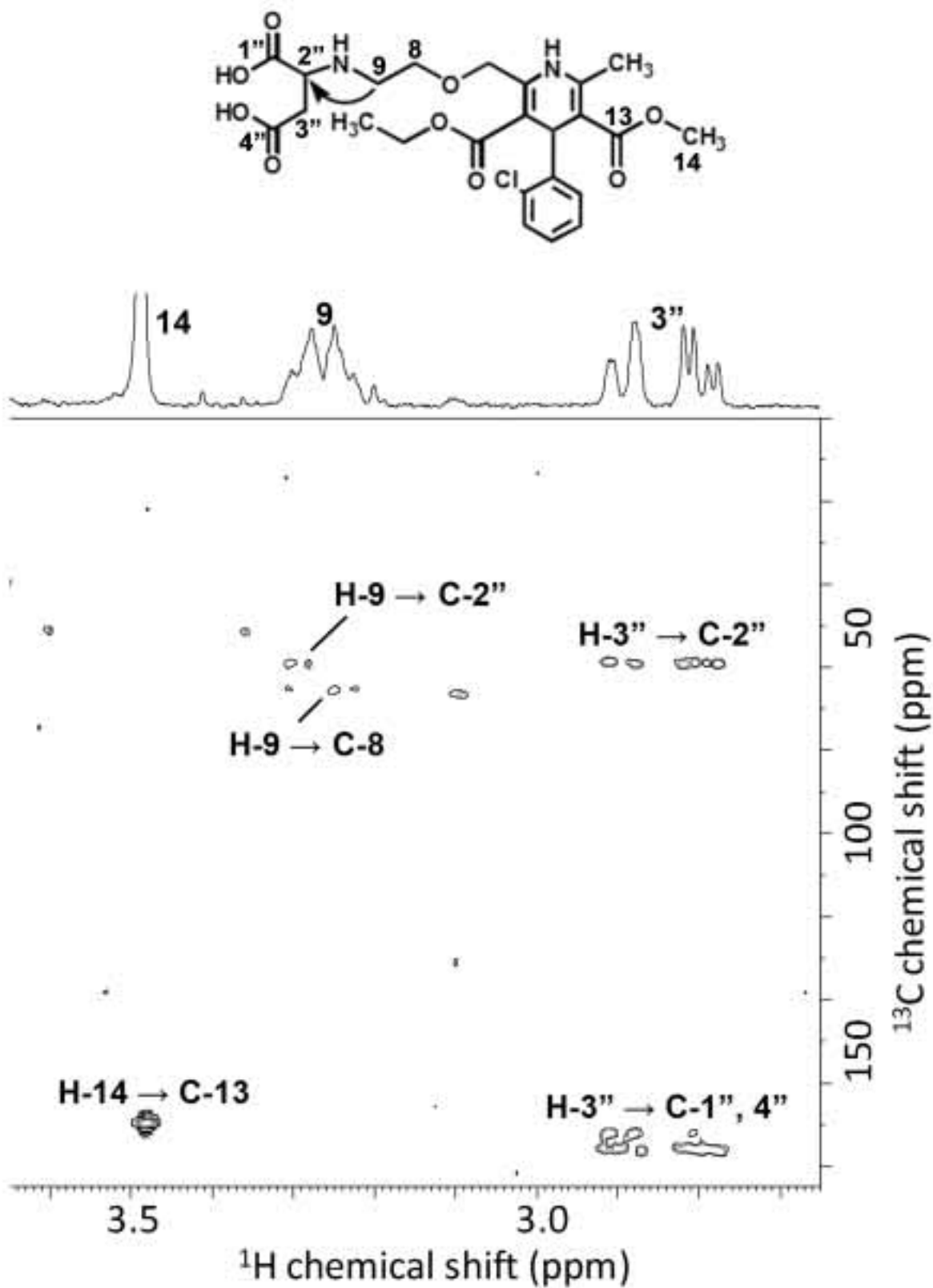
#### 4.3. 固相抽出の応用

固相抽出 (SPE) を組み入れたLC-NMRシステムが開発され、既に応用されている[20]。LC-SPE-NMRシステムは、HPLCで分離した目的成分を同一のSPEカートリッジに繰り返し捕集できることから、不純物を高濃度に濃縮することができる。目的成分を捕集したSPEカートリッジは、不要な溶媒や塩を適切な溶媒で置換することにより除去した後、窒素気流で乾燥する。続いて、トラップした不純物を任意の溶媒でNMRへ展開することにより、NMRスペクトルを測定する。このとき、重水素化溶媒を用いてNMRへ展開すれ

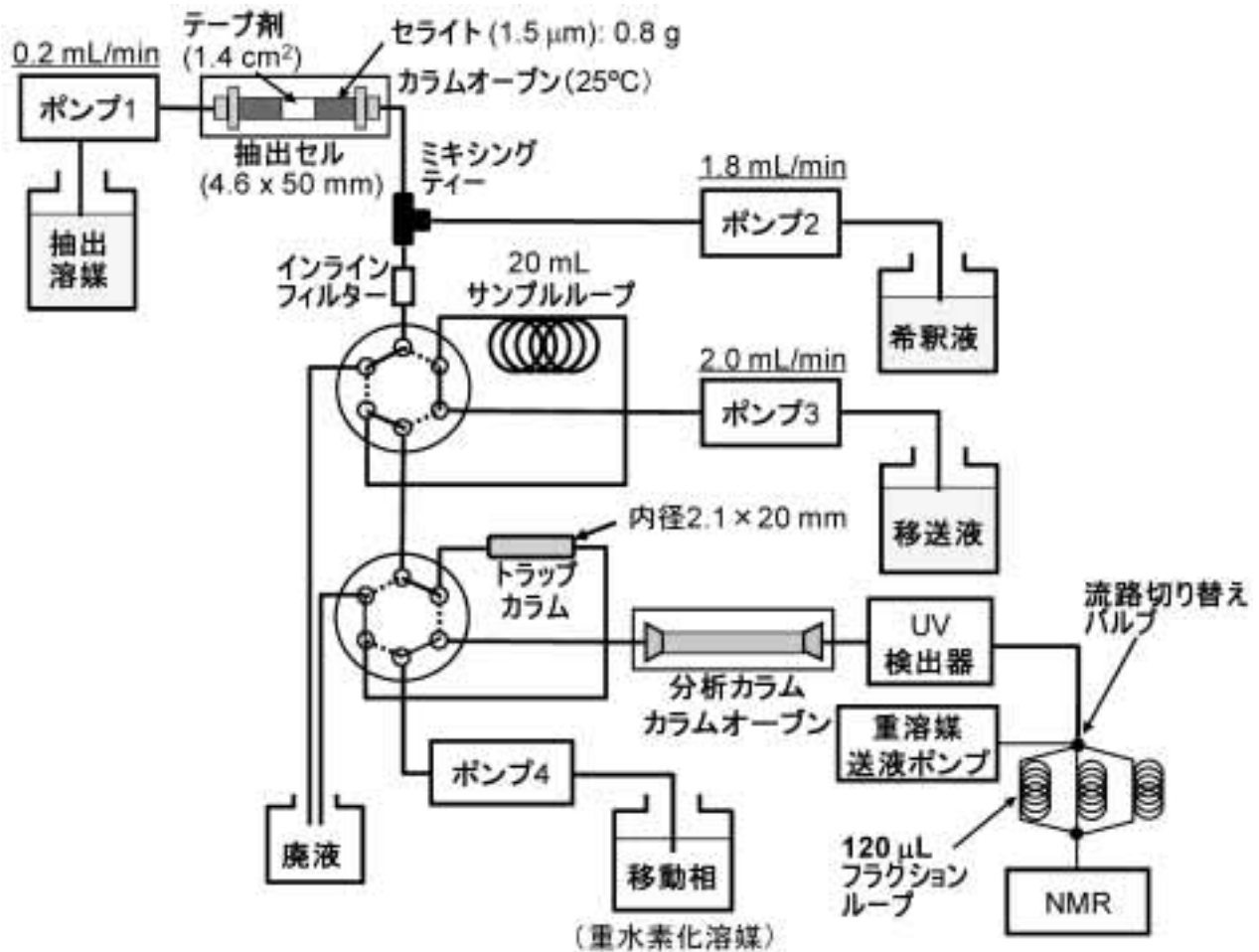


**Figure 6.** DQF-COSY spectrum of DP-1 (Maillard reaction product of amlodipine with lactose) obtained using the column switching system for the on-line pre-concentration in LC-NMR analysis. The key signal of the anomeric proton (HA) obscured by water suppression in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum was observed in this spectrum with pulsed field gradient solvent suppression.





**Figure 7.** HMBC spectrum of DP-2 (Michael addition reaction product of amlodipine with maleic acid) obtained using the column switching system for the on-line sample pre-concentration in LC-NMR analysis.



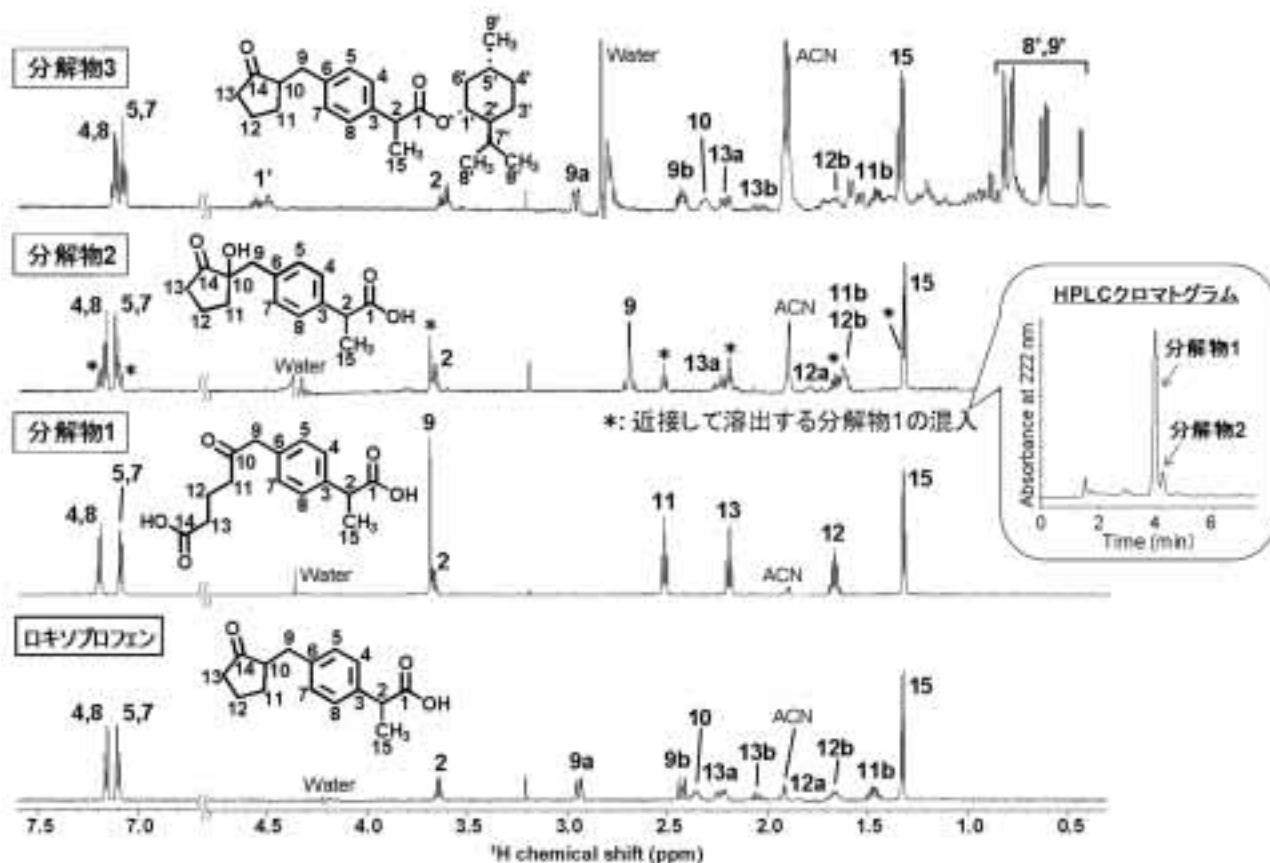
**Figure 8.** Schematic diagram of the column switching system for the on-line sample pre-concentration after pressurized liquid extraction in LC-NMR analysis. Three degradation products were extracted from the adhesive tape at a pressure range of 3.9 to 6.0 MPa for 10 min and trapped in the trapping column (2.1 mm i.d. × 20 mm). The trapped degradation products were separated on the analytical C18 column (4.6 mm i.d. × 150 mm) with the deuterated mobile phase and stored in separate fraction loops prior to transfer to the NMR.

ば、分離に用いた HPLC 移動相溶媒等の影響を受けず、良質な NMR スペクトルを得る事ができる。ただし、HPLC 移動相やカートリッジへの捕集のための希釈液中に含まれる夾雑物も同時に濃縮されるため、試液調製時には高純度の溶媒・試薬を用いる等、注意が必要である。5-アミノサリチル酸製剤の分解物の構造解析[21]では、添加剤であるクエン酸との反応生成物 3 種について、LC-SPE-NMR により  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを取得している。NMR シグナルの分裂パターンの解析により、MS 解析においては差別化できなかったエステル及びアミドの構造異性体について、構造決定が達成された。また、製剤中の酸化分解物へ応用した例では[22]、分取した分解物をさらに LC-SPE で高濃度に濃縮、精製することにより、オンラインで二次元 NMR スペクトルのみならず  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを測定し、アルデヒド体が生成したことを明らかにしている。

## 5. まとめ

HPLC ハイフネーテッド技術は、医薬品中の微量な不純物の構造解析には欠くことのできない技術となっている。LC-NMR をルーチン的に適用できるようになったことが、HPLC ハイフネーテッド技術による不純物の構造解析を大きく前進させたといえよう。HPLC ハイフネーテッド技術を用いれば、不純物の構造解析に必要とされてきた、煩雑で時間を要する単離、精製を伴わずに構造を決定することができる。構造解析には、各種スペクトロメーターを相補的に利用することが有用であることから、LC-MS のみならず、LC-NMR や LC-IR の積極的な活用が望ましい。これら装置及び技術のさらなる発展に期待したい。

また最近では、不純物プロファイリングへも HPLC ハイフネーテッド技術が応用されている[23]。この分野における HPLC ハイフネーテッド技術の一層の応用も期待される。



**Figure 9.**  $^1\text{H}$  NMR spectra of loxoprofen and its degradation products obtained using the column switching system for the on-line sample pre-concentration after pressurized liquid extraction in LC-NMR analysis.

#### 文献

- [1] 新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインの改定について (平成14年12月16日, 医薬審発第1216001号).
- [2] 新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインの改定について (平成15年6月24日, 医薬審発第0624001号).
- [3] EMEA-CHMP, Guideline on the Limit of Genotoxic Impurities (CPMP/SWP/5199/02, EMEA/CHMP/QMP/251344/2006), 2006.
- [4] US FDA, Guidance for Industry: Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches (Draft), 2008.
- [5] Ermer, J.; Vogel, M. *Biomed. Chromatogr.* **2000**, *14*, 373–383.
- [6] Pan, C.; Liu, F.; Mott, M. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 1228–1259.
- [7] Eckers, C.; Haskins, N.; Langridge, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1916–1922.
- [8] Hoke, S. H.; Morand, K. L.; Greis, K. D.; Baker, T. R.; Harbol, K. L.; Dobson, R. L. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *212*, 135–196.
- [9] Chen, G.; Khusid, A.; Daaro, I.; Irish, P.; Pramanik, B. N. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 967–970.
- [10] Franolic, J. D.; Lehr, G. J.; Barry, T. L.; Petzinger, G. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *26*, 651–663.
- [11] Liu, D. Q.; Wu, L.; Sun, M.; MacGregor, P. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 320–329.
- [12] Shah, R. P.; Sahu, A.; Singh, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 1037–1046.
- [13] Murakami, T.; Kawasaki, T.; Takemura, A.; Fukutsu, N.; Kish, N.; Kusu, F. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1208*, 164–174.
- [14] Li, M.; Chen, B.; Monteiro, S.; Rustum, A. M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4575–4581.
- [15] Wu, Y.; Dali, M.; Gupta, A.; Raghavan, K. *Pharm. Dev. Technol.* **2009**, *14*, 556–564.
- [16] Murakami, T.; Konno, H.; Fukutsu, N.; Onodera, M.; Kawasaki, T.; Kusu, F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 553–559.
- [17] Spraul, M.; Freund, A. S.; Nast, R. E.; Withers, R. S.; Maas, W. E.; Corcoran, O. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1546–1551.
- [18] Yokoyama, Y.; Kishi, N.; Tanaka, M.; Asakawa, N. *Anal.*

- Sci.* **2000**, *16*, 1183–1188.
- [19] Murakami, T.; Fukutsu, N.; Kondo, J.; Kawasaki, T.; Kusu, F.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1181*, 67–76.
- [20] Sandvoss, M.; Bardsley, B.; Beck, T. L.; Lee–Smith, E.; North, S. E.; Moore, P. J.; Edwards, A. J.; Smith, R. J. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 762–770.
- [21] Larsen, J.; Staerk, D.; Cornett, C.; Hansen, S. H.; Jaroszewski, J. W. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 839–842.
- [22] Pan, C.; Liu, F.; Ji, Q.; Wang, W.; Drinkwater, D.; Vivilecchia, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 581–590.
- [23] Li, Y.; Liu, D. Q.; Yang, S.; Sudini, R.; McGuire, M. A.; Bhanushali, D. S.; Kord, A. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *52*, 493–507.