

UYGULAMA NOTU

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

2D-LC-MSMS ile İlaç Hammaddelerinde İmpurite Analizi

HAZIRLAYAN

Dr. Engin BAYRAM
Kim. Müh. M. Fatih Şenol
Ant Teknik Cihazlar Ltd. Şti.

KONU:

İlaç etken maddelerindeki genotoksik safsızlıkların 2D-LCMSMS (Co-Sense) sistemi ile tayini.

ÇALIŞMANIN AMACI:

İlaç içerisinde, eser derişimlerde bulunsalar dahi, sebep oldukları DNA hasarına bağı olarak mutajen/kanserojen etki gösteren genotoksik ilaç impüritelerinin kalitatif ve kantitatif analizi.

METOD ve MATERYALLER:

Çalışma Shimadzu marka LCMS-8040 model LC-MSMS sistemi ile yapılmıştır.

Kullanılan Standart Türleri:

Etken maddenin (Rabeprazol) USP standardı kullanılmıştır.

Ekstraksiyon Yöntemi:

Standart ve numuneler MeOH:Su (40:60 v/v) içerisinde çözülür, şırınga ucu filtreden (0.45um naylon) süzülerek sisteme enjekte edilir.

Hesaplama: Numune değerlendirmesi ilk olarak kalitatif (kütle spektrumları ve standart alıkonma zamanları referans alınır) olarak, ardından dış standart metoduyla (seyrelme ve numune miktarı dikkate alınarak) kantitatif olarak tayini gerçekleştirilir.

ANALİTİK KOŞULLAR:

Mobil Faz (1.D)	Metanol:Fosfat Tamponu, 50mM pH:7.0 (3:2, v/v)
Kolon (1.D)	GL Science InertSustain C18 (150X4.6mm, 5um)
Mobil Faz (Trap/Desalting)	Amonyum Asetat (50mM, Suda)
Kolon (Trap/Desalting)	Inertsil ODS-3 (20X4mm, 5um)
Mobil Faz (2.D)	Metanol:Amonyum Asetat, 10mM*
Kolon (2.D)	Shim-pack XR-ODS 50X2mm, 2.2um

Cihaz	: Shimadzu LCMS-8040	Akış Hızı(1.D)	: 1 mL/dk
		Akış Hızı(Trap)	: 5 mL/dk
		Akış Hızı(2.D)	: 0,4 mL/dk
Kolon Fırın Sıcaklığı	: 30 °C	Dedektör	: SPD-20A(1.D)/LCMS-8040(2.D)
Enjeksiyon Hacmi	: 5 uL	Süre	: 45 dk

2D-LCMSMS Time Program

	Time	Module	Command	Value
1	8,57	Pumps	Pump C Flow	1
2	8,58	Controller	Event	24
3	8,58	Pumps	Pump C Flow	0,5
4	8,58	Pumps	Pump D Flow	0,2
5	8,59	Pumps	Pump D Flow	5
6	9,54	Pumps	Pump D Flow	5
7	9,55	Controller	Event	23
8	9,55	Pumps	Pump D Flow	0
9	9,56	Pumps	Pump C Flow	0,5
10	9,57	Pumps	Pump C Flow	1,5
11	11,00	Pumps	Pump B Conc.	40
12	15,00	Pumps	Pump B Conc.	95
13	20,00	Controller	Event	4
14	20,00	Pumps	Pump D Flow	0
15	20,01	Pumps	Pump D Flow	0,2
16	30,00	Pumps	Pump B Conc.	95
17	30,00	Pumps	Pump C Flow	1,5
18	30,01	Pumps	Pump B Conc.	40
19	30,01	Pumps	Pump C Flow	1
20	45,00	Controller	Stop	

UV Dalga Boyu : 290nm

MS Koşulları :

Instrument Parameters View Normal Advanced End Time : 45.00 min

MS Interface Data Acquisition LC Time Prog. Pump Detector A Column Oven Controller Autosampler AutoPurge

CID Gas CID Gas... Attenuation... Loop Time...

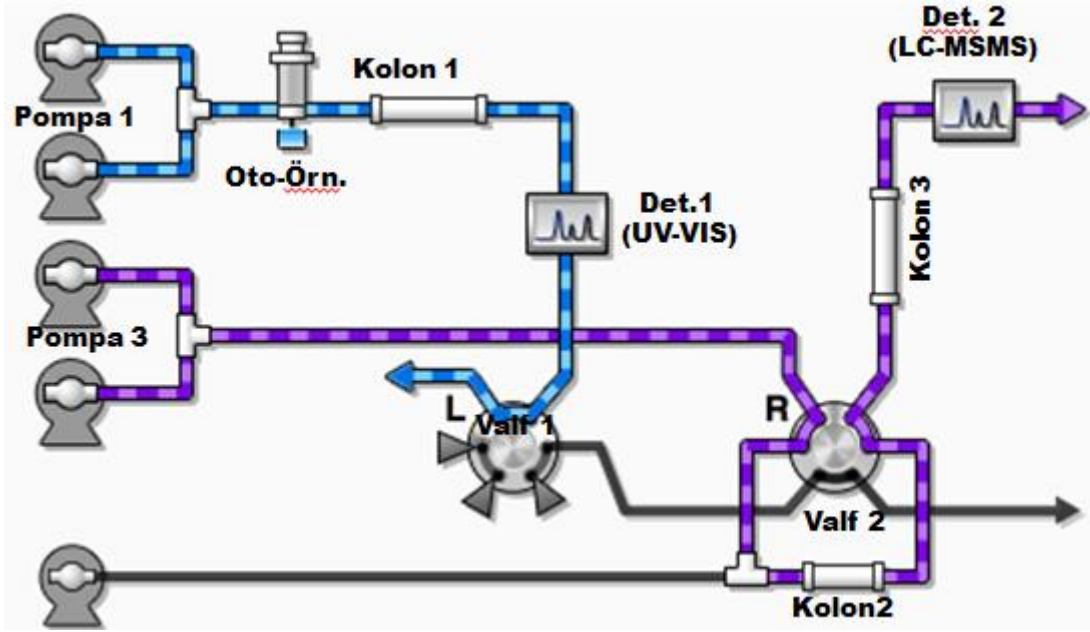
Type	Event#	+/-	Compound Name m/z	Time (0,000 min - 45,000 min)
Q3 Scan	1	+	100,00:650,00	
Q3 SIM	2	+	IMP 2 (SIM) 508,00	
Q3 SIM	3	+	IMP 3 (SIM) 569,00	
Q3 SIM	4	+	IMP 1 (SIM) 394,00	
Q3 SIM	5	+	Rabeprazole (SIM) 360,00	
Product Ion Scan	6	+	508,00 > 100,00:520,00	
MRM	7	+	Rabeprazole (MRM) 360,00>2	
MRM	8	+	IMP 2 (MRM) 508,20>242,20	
MRM	9	+	IMP 1 (MRM) 394,10>210,10	
MRM	10	+	IMP3 (MRM) 569,20>328,20	

Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msec)	CE
Ch1	360,00	242,00	50,0	-15,0
Ch2	360,00	195,00	50,0	-15,0
Ch3	360,00	150,00	50,0	-35,0

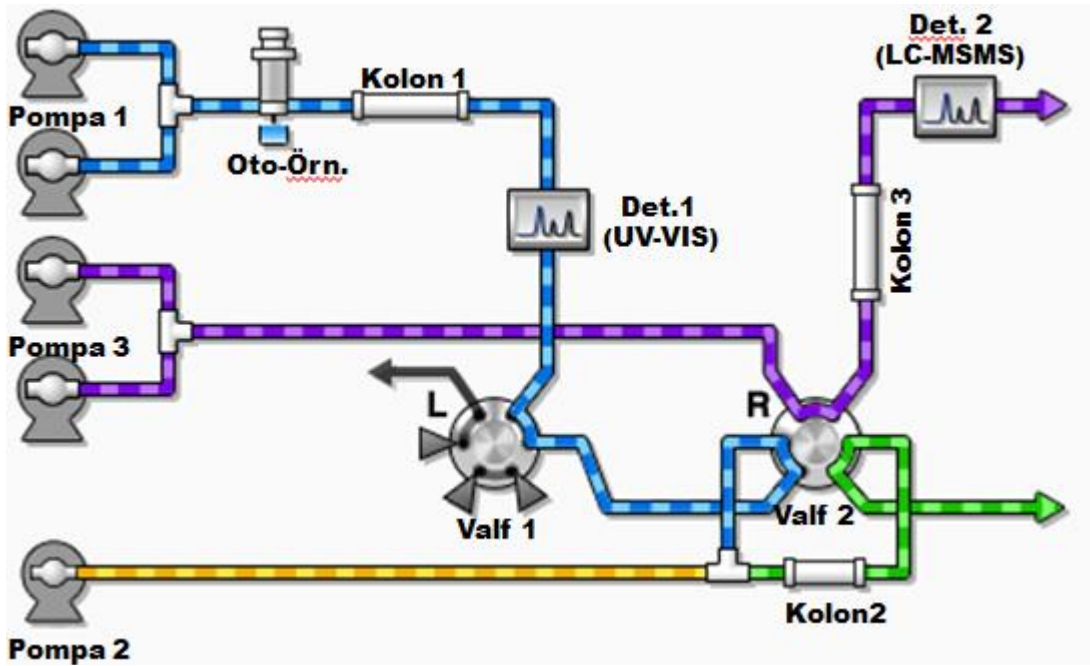
SONUÇLAR ve GÖRÜŞLER

Rabeprazole etken maddesinin içerdiği impuritetlerin analizi, 2.D-LC-UV-MSMS sistemi ile simultane olarak gerçekleştirilmiştir.

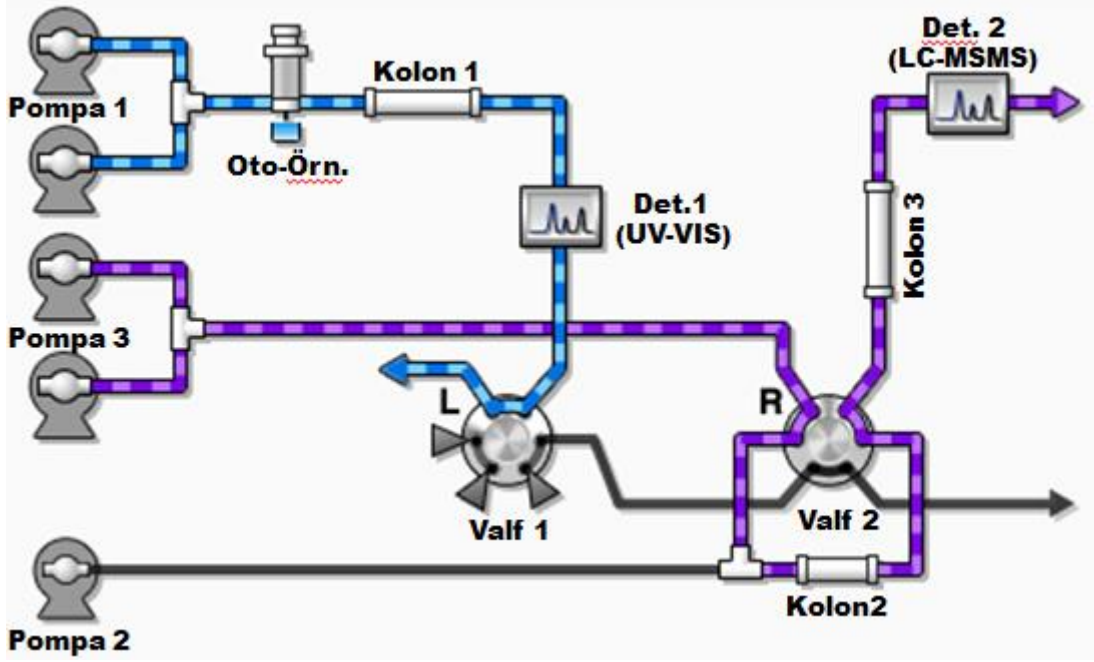
Bilindiği üzere, LC-MSMS analizlerinde uçucu olmayan inorganik tuzların ve asit/baz çözeltilerinin kullanımı mümkün değildir. 2.D-LC-MSMS sistemi ile, birinci boyutta referans alınan farmakopi metoduna uygun mobil fazlar kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirilir (Birinci boyut/1.D), hedef pik, alıkonma zamanı ve farmakopideki kriterler dikkate alınarak diverter valf (FCV-20AH2) aracılığıyla trap kolonuna alınır (Trapping), HPLC sisteminden gelen ve LC-MSMS için uygun olmayan tuzlar uzaklaştırılır (Desalting) ve yine bir diverter valf (FCV-20AH2) aracılığıyla LC-MSMS sistemine iletilerek (ikinci boyut/2.D) analiz gerçekleştirilir (Adım 1-3).



Adım 1: 1D Kromatografik Ayrım ve Deteksiyon (UV); Hedef İmpurite ana madde ve diğer impuritetlerden ayrılır.



Adım 2: Trapping/Desalting; Hedef impurite, trap kolonunda alıkonur, Trap (alıkonma), uçucu organik tampon içeren mobil faz ile gerçekleştirilir. HPLC, 1.Boyutta kullanılan, az uçucu/uçucu olmayan inorganik tampon uzaklaştırılarak MS analizi için uygun ortam sağlanır.

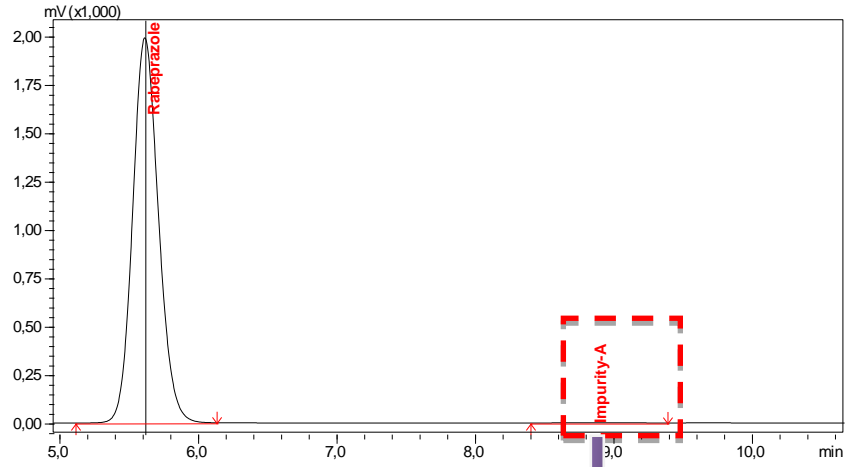


Adım 3: 2D Pompa 3 ve Kolon 3 aracılığı ile 2. Boyuttaki kromatografik ayırım ve MS dedeksiyonu gerçekleştirilir.

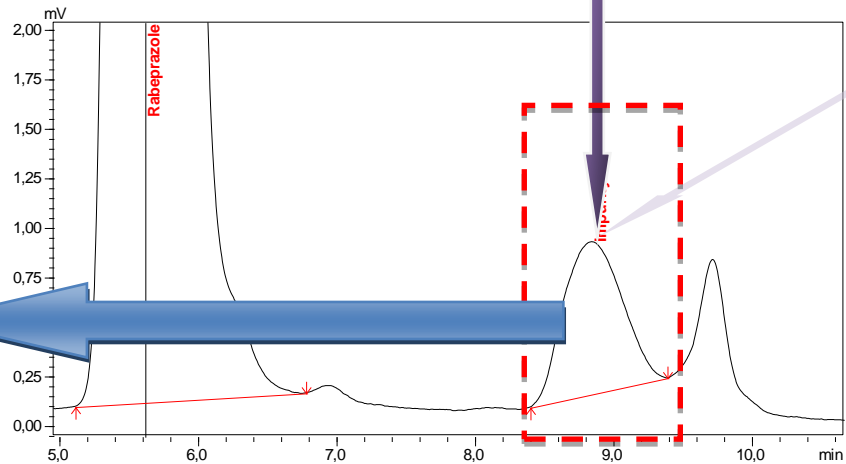
Kromatogramlar

1. Rabeprazol İmp A, HPLC Kromatogramı

Datafile Name: Rabeprazole_5mg_5uL_Cosense_IMP__01.lcd
Sample Name: Rabeprazole_5mg_5uL_Cosense_IMP

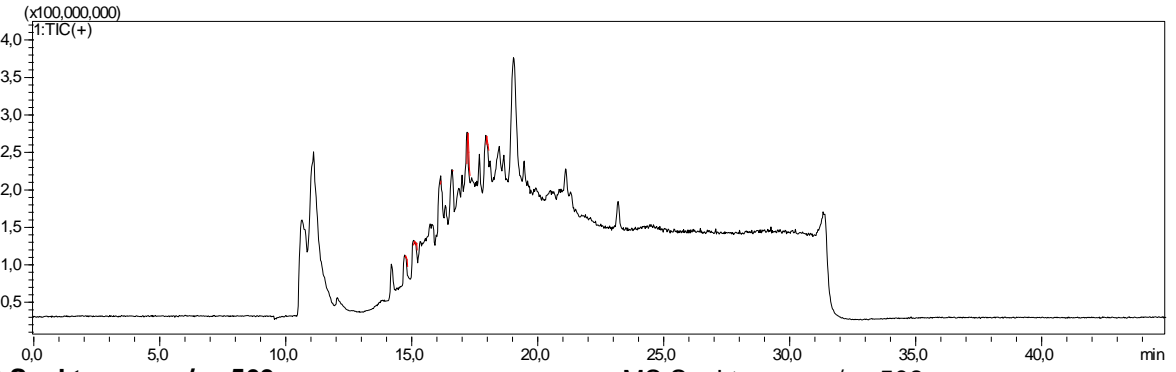


Datafile Name: Rabeprazole_5mg_5uL_Cosense_I P__01.lcd
Sample Name: Rabeprazole_5mg_5uL_Cosense_I P

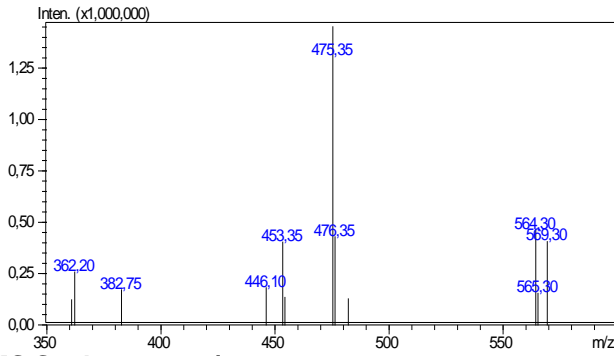


2. LC-MSMS Kromatogramları

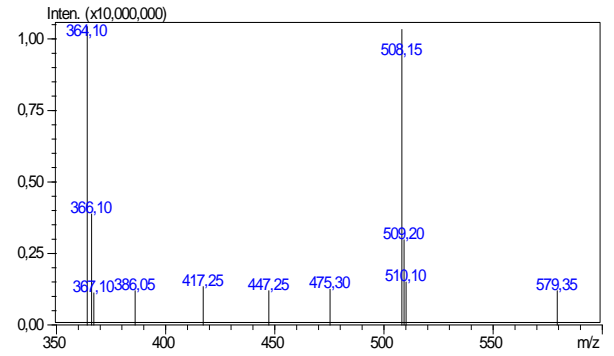
Kromatogram, TIC (Q3 Scan)



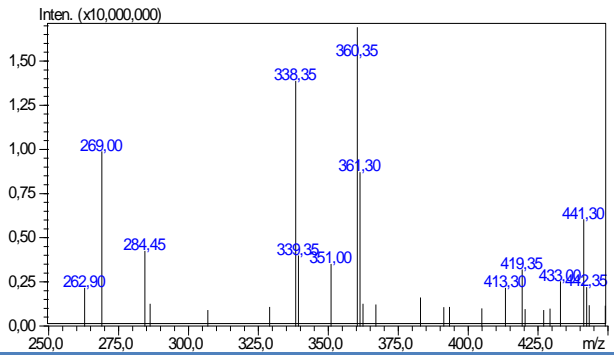
MS Spektrumu, m/z= 569



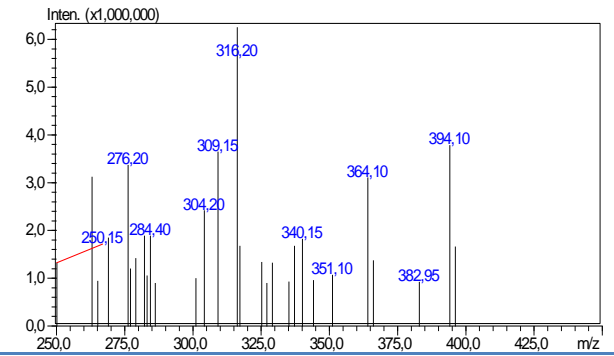
MS Spektrumu, m/z= 508



MS Spektrumu, m/z= 360



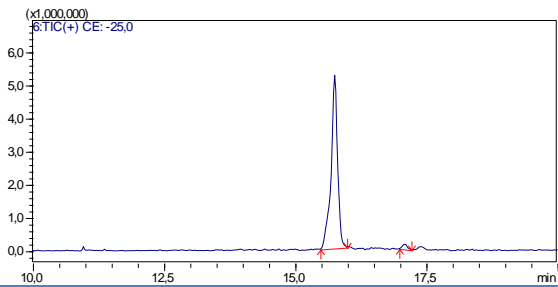
MS Spektrumu, m/z= 394



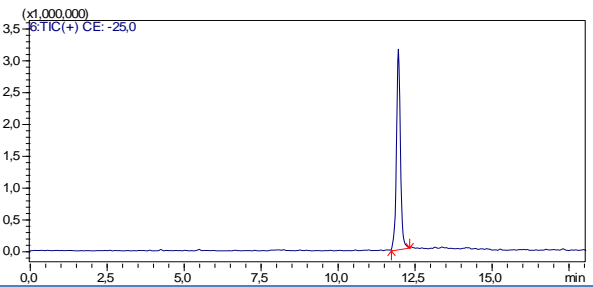
Çalışmada, MSMS parametrelerinde görüleceği üzere Scan, SIM, Product Ion Scan ve MRM modları, (yöntemin kalitatif ve kantitatif olarak güçlü olması amacıyla) aynı zaman aralığına analiz için kullanılmıştır.

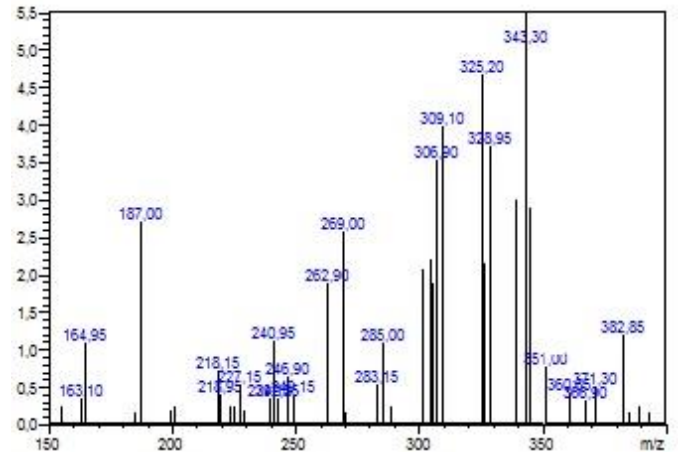
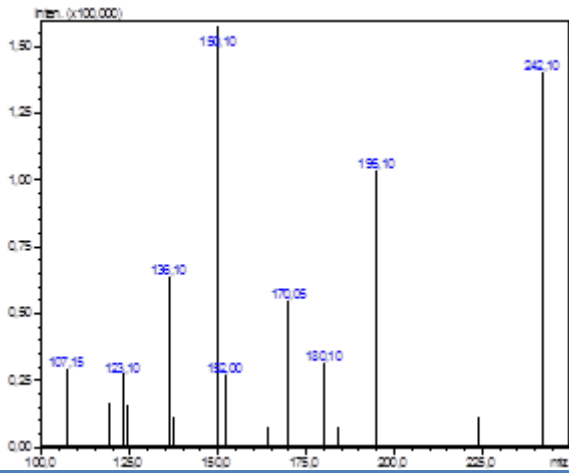
Kromatogram, TIC (Product Ion Scan)

Precursor m/z: 508, CE=-25V



Precursor m/z: 569, CE=-25V

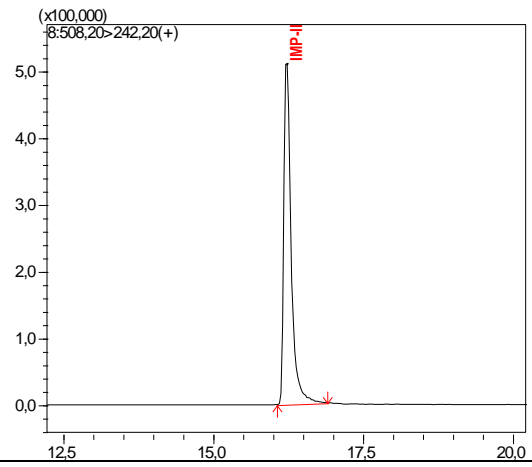
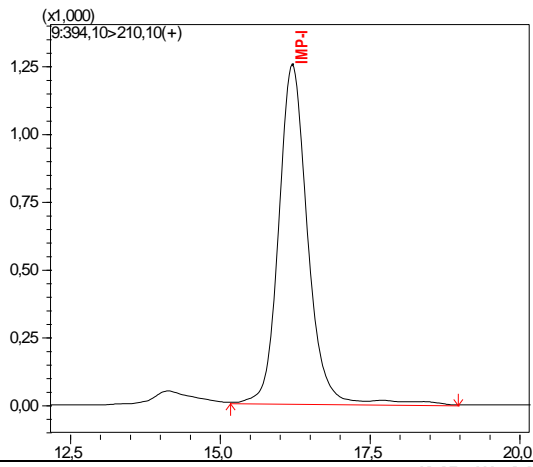




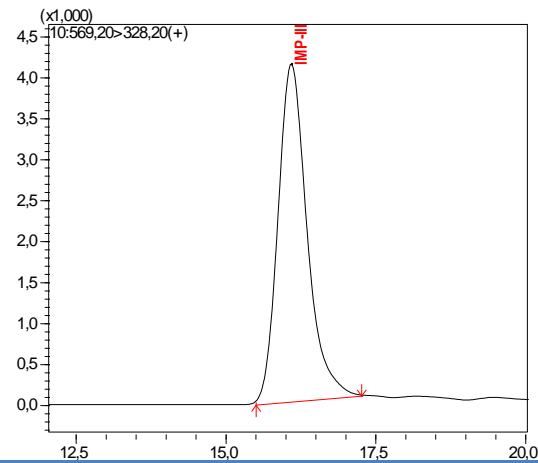
Kromatogram (MRM)

IMP-I, MRM Trans.: 394.1>210.1

IMP-II, MRM Trans.: 508.2>242.2



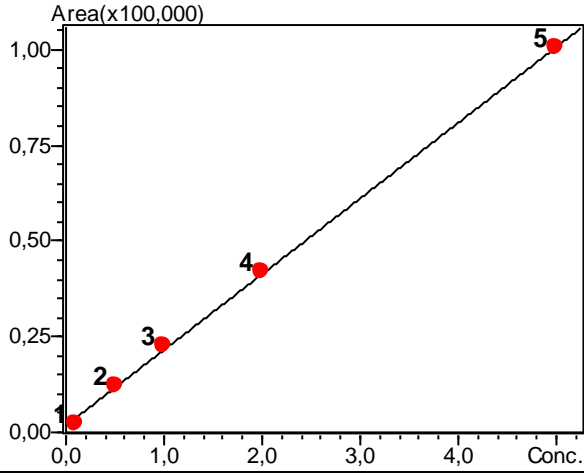
IMP-III, MRM Trans.: 569.2>228.2



3. Kalibrasyon Eğrileri

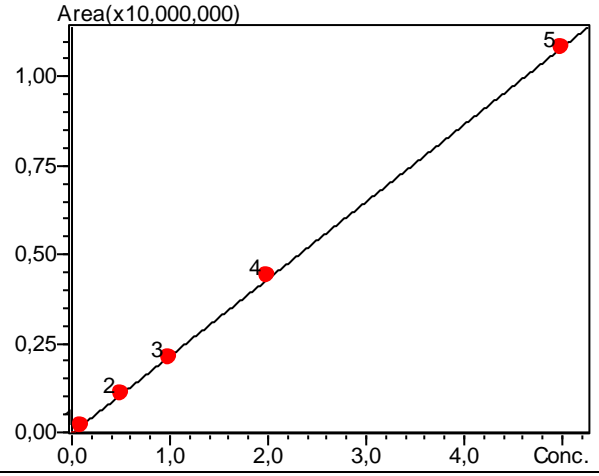
IMP-I, MRM Trans.: 394.1>210.1

$r^2=0.999$



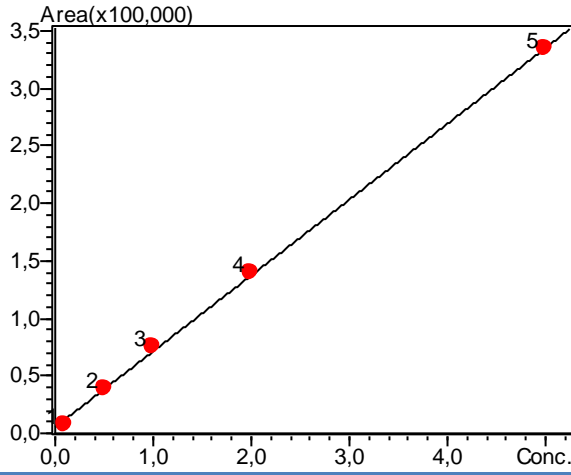
IMP-II, MRM Trans.: 508.2>242.2

$r^2=0.999$



IMP-III, MRM Trans.: 569.2>228.2

$r^2=0.999$



Bu Aplikasyon Notu uygulamanın gerçekleştirildiği tarihe ait bilgiler ışığında oluşturulmuştur.
Bu yayında yer alan bilgilerin referans gösterilerek başka bir yerde kullanılması Ant Teknik'in iznine tabidir.
Aplikasyon Notu Ant Teknik tarafından önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir.