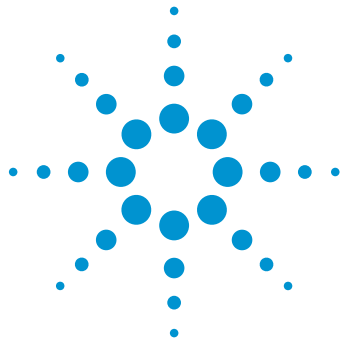




불순물 측정 분석법 개발에서 Multiple Heart-Cutting 2D-LC의 응용

Agilent 1290 Infinity 2D-LC 솔루션

응용 자료

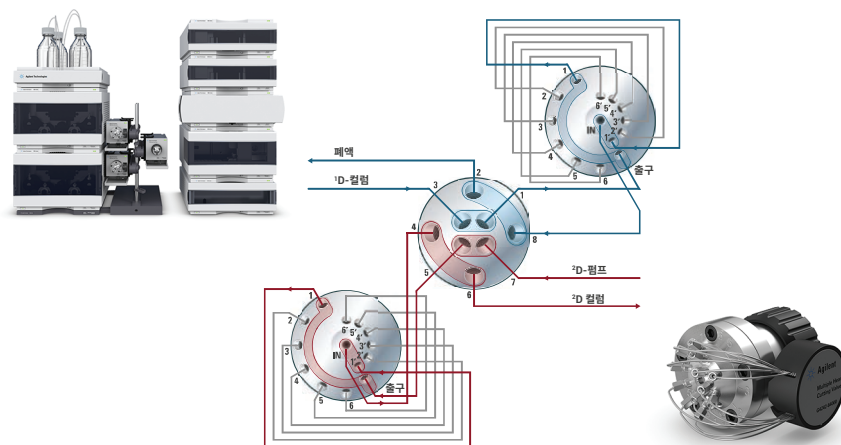
저분자 의약품 및 제네릭 의약품

저자

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

개요

불순물 분석은 의약품과 정밀 화학 제품의 개발과 생산 과정에서 매우 중요합니다. 본 응용 자료에서는 multiple heart-cutting 2D-LC가 의약품과 정밀 화학 제품의 불순물 측정 분석법 개발에 이상적임을 제시합니다. Agilent 1290 Infinity 2D-LC를 이용해 1차원 분리에서 검출된 피크를 모두 heart-cut한 후 선택성이 다른 2차원 장치로 옮겨 분리시킵니다. 이 방식으로 동시 용리 가능성이 있는 화합물을 발견할 수 있었습니다. 또한 시료에 의심되는 불순물을 첨가하여 시료 내 불순물을 확인할 수 있었습니다.



Agilent Technologies

소개

의약품과 정밀 화학 제품 내 불순물의 분석은 의약품과 화학 업계에서 매우 중요한 일입니다. ICH 가이드라인 Q3A (R2)에서는 새 의약품에 대해 0.05% 이상 존재하는 불순물은 보고하고 0.1% 이상인 불순물은 그 정체를 밝혀야 한다고 규정하고 있습니다.¹

의약품과 정밀 화학 제품의 불순물 분석은 해당 성분의 농축액을 액체 크로마토그래피를 이용해 분석하는 방법으로 실시할 수 있습니다. 의약품이나 정밀 화학 제품 속 불순물은 의약품 또는 정밀 화학 제품의 주성분 및 기타 불순물과 구조적으로 유사한 경우가 많습니다. 따라서 선택성이 한정된(컬럼-용매 조합) 시스템으로는 분리가 불가능할 수도 있습니다. 한 가지 해결책은 용리 성분을 heart-cutting 하여 선택성이 다른 분리 시스템으로 옮겨 분리하는 것입니다. Agilent 1290 Infinity 2D-LC 기반의 heart-cutting 2D-LC를 이용해 주성분과 함께 용리되는 불순물을 분리하는 방법은 앞선 응용 자료에서 설명한 바 있습니다.²

불순물 측정 분석법 개발 시 불순물은 모두 검출되어야 하며 주성분이나 기타 불순물과 함께 용리되어서는 안 됩니다. Heart-cutting 2D-LC라면 그럴 염려가 없습니다. 1290 Infinity 2D-LC로는 1차원 분리 시 복수의 피크를 heart-cutting할 수 있을 뿐만 아니라 heart-cut을 루프로 저장했다가 후속 2차원 분석에 이용할 수 있습니다.

본 응용 자료에서는 대표적인 의약품 시료를 multiple heart-cutting 2D-LC로 분석하는 과정을 설명합니다. 1차원 분리 후 검출되는 피크는 모두 heart-cutting을 거쳐 선택성이 다른 2차원 분리를 통해 분석되었습니다. 그 결과 1차원 분리 시 동시 용리된 성분을 찾아낼 수 있었습니다.

실험

2D-LC 분석법

1차원 펌프	
용매 A	물 + 0.1% 포름산
용매 B	아세토니트릴 + 0.1% 포름산
유량	0.2mL/min
Gradient	5 %B at 0min 95 %B at 20min 95 %B at 25min
Post time	10분
2차원 펌프	
용매 A	물 + 0.1% 포름산
용매 B	메탄올 + 0.1% 포름산
유량	2.0mL/min
Gradient 및 gradient 변화도	10 %B at 0.00min to 50 %B at 22.00min 70 %B at 1.50min to 95 %B at 22.00min
² D gradient 정지 시간	1.50분
² D 분석 주기	2.00분
자동 시료 주입기(Autosampler)	
주입량	2μL
시료 온도	6°C
니들 세척	10s in methanol/water (50/50, v/v)
향온 컬럼 장치	
1차원 컬럼	오른쪽 30°C
2차원 컬럼	왼쪽 30°C
Multiple heart-cutting	
작동 모드	1차원 머무름 시간에 따라 heart-cuts(2차원 세그먼트) 세트에 시간 기반 multiple heart-cutting이 실시되었습니다. 0.40분의 샘플링 시간으로 불순물의 heart-cutting이 실시되었습니다(> 200%의 루프 충전). 0.10분(50% 루프 충전)의 샘플링 시간으로 주성분 피크에 대해 짧은 간격으로 heart-cut을 연속 실시하였습니다.
다이오드 어레이 검출기	
1차원	파장 254nm/4nm, 레퍼런스 360nm/100nm data rate 20-Hz
2차원	파장 254nm/4nm, 레퍼런스 360nm/100nm data rate 80-Hz

기기

multiple heart-cutting 분석용 Agilent 1290 Infinity 2D-LC는 다음 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary Pump(G4220A, 2x)
- Agilent 1290 Infinity Autosampler(G4226A) with Agilent 1290 Infinity Thermostat(G1330B)
- Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment(G1316C)
- Agilent 1290 Infinity Valve Drive(G1170A) with 2-position/4-port duo-valve(2D-LC valve head, G4236A)
- Agilent 1290 Infinity Valve Drive(G1170A, 2x) with multiple heart-cutting valves(G4242-64000, 2x) equipped with 40- μ L loops
- Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector(G4212A, 2x) with 10-mm Max-Light cartridge cell(G4212-60008)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition Software, version C.01.07 [27] with Agilent 1290 Infinity 2D-LC Acquisition Software, version A.01.02 [24]

컬럼

- 1차원: Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 $\times$ 150mm, 1.8 μ m(p/n 959759-902)
- 2차원: Agilent Poroshell 120 Bonus-RP, 4.6 $\times$ 50mm, 2.7 μ m(p/n 699968-901)

화학품

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용했으며 아세토니트릴과 메탄올은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였습니다. 초순수는 0.22 μ m membrane point-of-use cartridge를 장착한 Milli-Q Integral 시스템(Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)에서 얻었습니다. 포름산은 애질런트(p/n G2453-85060) 제품입니다.

시료

여러 가지 불순물이 들어 있는 의약품을 나타내는 시료로는 메탄올/물(50/50, v/v)에 N,N-diethyl-*m*-toluamide(DEET)과 몇 가지 불순물을 첨가한 용액을 사용하였습니다.

결과 및 토의

의약품 또는 정밀 화학 제품의 불순물 측정 분석법을 개발할 때 제기되는 한 가지 중요한 의문은 해당 분석법으로 모든 불순물이 주성분과 다른 불순물에서 완전히 분리되는지를 확인하는 것입니다. 그림 1은 C18-컬럼과 물-아세토니트릴 gradient(각각 0.1% 포름산 포함)를 이용한 1차원 불순물 분석을 보여주고 있습니다. 확대된 크로마토그램을 보면 주성분과 두 불순물이 부분적으로 동시 용리된 것을 관찰할 수 있습니다. 이 부분적 동시 용리 문제를 해결하고 동시 용리 가능성이 있는 모든 피크를 검사하기 위해, 피크를 heart-cutting한 후 선택성이 다른 2차원 분리 장치로 옮기는 방법을 이용할 수 있습니다.

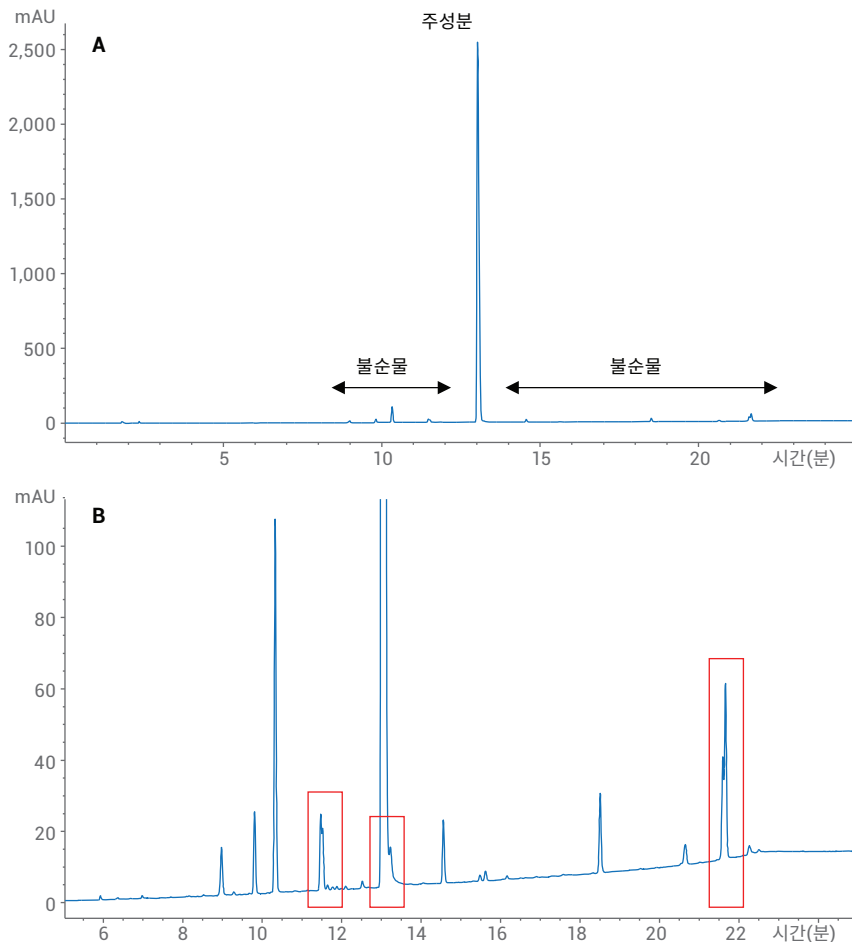


그림 1. 설명된 2D-LC 분석법의 1차원 조건에 따른 1차원 불순물 분석, 부분적 동시 용리가 표시됨, (A) 100% 크기, (B) 확대

그림 2의 패널 A는 multiple heart-cutting의 연결 다이어그램입니다. 동시 구성에서 가운데에 위치한 2D-LC 밸브와 multiple heart-cutting 밸브 2개가 보입니다. 그림 2의 패널 B는 multiple heart-cutting 밸브입니다. 압력 시험 후 사전 설치된 40μL 루프가 보입니다.

multiple heart-cutting 알고리즘을 적용하면 밸브 전환을 최소로 줄이고 1차원 시스템에서 용리된 피크를 heart-cut한 후 2차원 분석을 신속하게 진행할 수 있습니다. multiple heart-cutting 2D-LC 분석을 할 때마다 첫 heart-cut은 데크 A(그림 2 A 오른쪽에 있는 multiple heart-cutting 밸브)의 루프 1에서 이루어집니다. 다음 중앙 2D-LC 밸브로 전환하여 첫 heart-cut이 2차원 시스템에서 분석됩니다. 첫 heart-cut의 2차원 분석에서는 최대 5개의 heart-cut이 데크 B(그림 2 A 왼쪽에 있는 multiple heart-cutting 밸브)의 루프 1 ~ 5로 이동해 2차원 분석 시점까지 보관됩니다. 각 데크(multiple heart-cutting 밸브)에서는 1차원 용리와 2차원 용매의 통과에 루프가 하나씩 필요합니다. 첫 heart-cut의 2차원 분석이 완료되고 중앙 2D-LC 밸브로 다시 전환되면 데크 A의 루프 1 ~ 5에 heart-cut이 다섯 개까지 보관됩니다. 동시에 데크 B에 보관된 heart-cut이 2차원에서 분석됩니다. 데크에 heart-cut을 보관할 때에는 그 데크에 보관된 heart-cut의 분석 전에 플러시 gradient가 실시되며, 보관된 heart-cut의 2차원 분석은 보관의 역순으로 실시됩니다.

multiple heart-cutting 알고리즘을 적용하면 1차원 분석이 끝나기 전에 heart-cut의 2차원 분석을 시작할 수 있습니다. 이는 같은 분석 중에 루프를 heart-cutting에 다시 사용할 수 있고 장착된 루프보다 많이 heart-cut을 할 수 있다는 의미입니다. multiple heart-cutting 알고리즘과 일상적 운영, 소프트웨어 기능에 관해서는 기술 개요³에서 더 자세히 설명합니다.

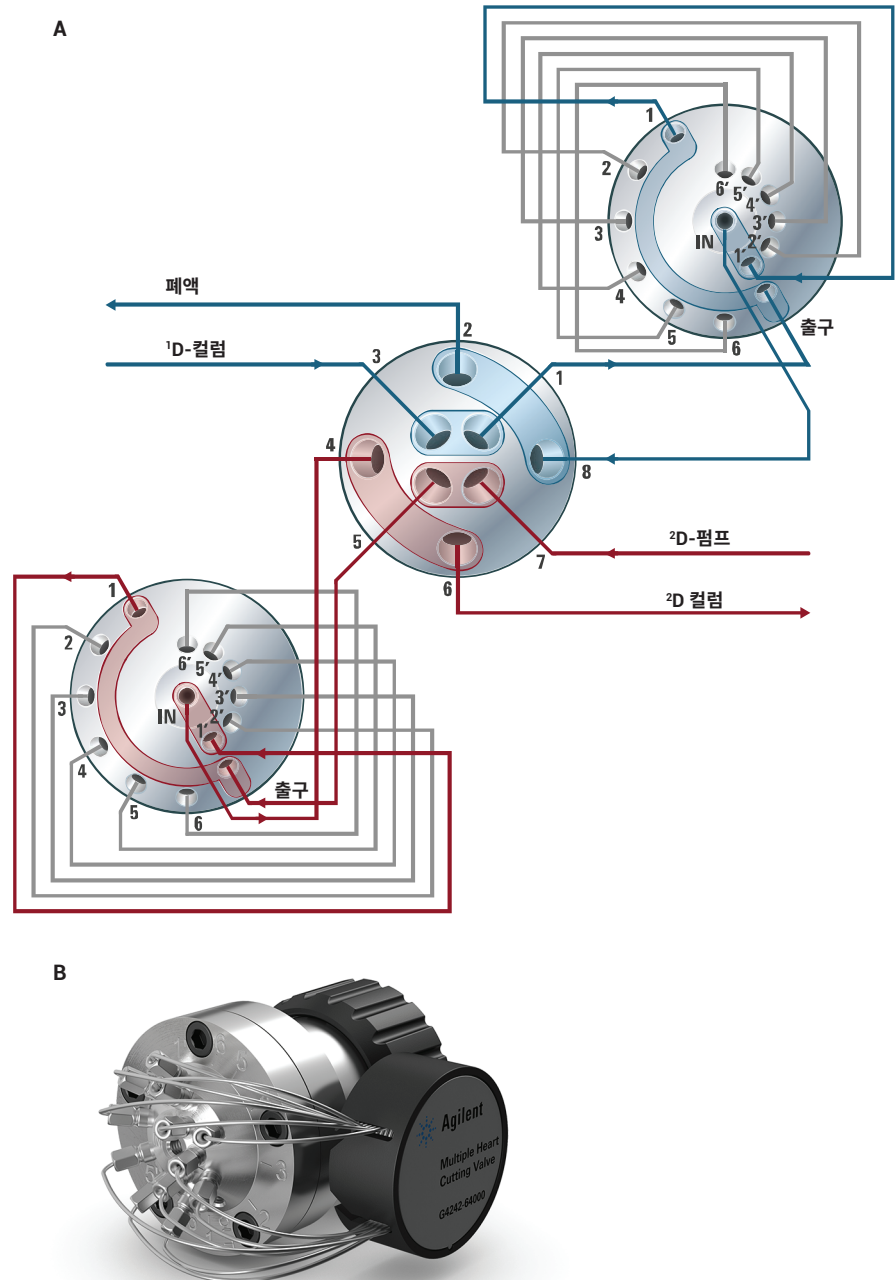


그림 2. A) Multiple heart-cutting의 연결 다이어그램. 동시 구성에서 가운데에 위치한 2D-LC 밸브와 multiple heart-cutting 밸브 2개가 보임. B) 사전 설치된 캐필러리가 있는 multiple heart-cutting 밸브

Multiple heart-cutting은 시간 기반 (예를들어 알고 있는 시료의 차원 분리)에 대해서는 전용 heart-cut 시간 적용) 또는 피크 기반(예를들어 미지 시료에 대해서는 1차원 피크의 검출에 따라 heart-cutting 시작)으로 실시할 수 있습니다. 그림 1에 명시된 불순물 분석의 경우 시간 기반의 multiple heart-cutting이 사용되었습니다. 동시에 용리되는 시료 성분을 찾기 위해 모든 불순물을 heart-cutting하여 2차원에서 분석하였습니다. 또한 주성분 피크에 대해 짧은 간격으로 heart-cut을 연속 실시하였습니다.

그림 3에 multiple heart-cutting을 위한 분석법 설정 방법이 나와 있습니다. Gradient 미리보기 섹션에서 1차원 reference 크로마토그램을 불러온 후 heart-cutting의 시간 세그먼트를 자동으로 생성할 수 있습니다. 생성된 시간 세그먼트는 2D 시간 세그먼트 표에서 수정할 수 있으며 관심 영역의 면밀한 조사를 위해 수동으로 heart-cut을 추가할 수도 있습니다. 불순물의 heart-cutting을 위해 0.4분의 샘플링 시간을 선택하였습니다. 이것은 200%의 루프 충전(40 μ L 루프 크기, 0.20mL/분 유속) 시간과 동일합니다. 루프의 과충전으로 인해 루프는 1차원 용리물질로 가득 채워졌습니다. Gradient 미리보기 섹션을 확대한 부분을 보면 먼저 용리된 네 가지 불순물의 heart-cutting에 대한 시간 세그먼트가 보입니다. 오렌지색 영역은 샘플링 시간을 나타내고 어두운 부분은 1차원 용리에서 2차원으로 옮겨간 부분을 나타냅니다. 주성분 피크에 대해 짧은 간격으로 heart-cut을 연속 실시하기 위해 0.1분(50% 루프 충전)의 샘플링 시간을 선택하였습니다. 그 결과 주성분 피크를 포함한 1차원 용리가 손실 없이 샘플링되었습니다.

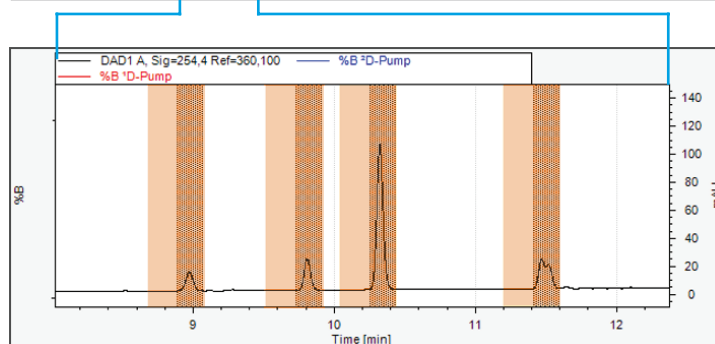
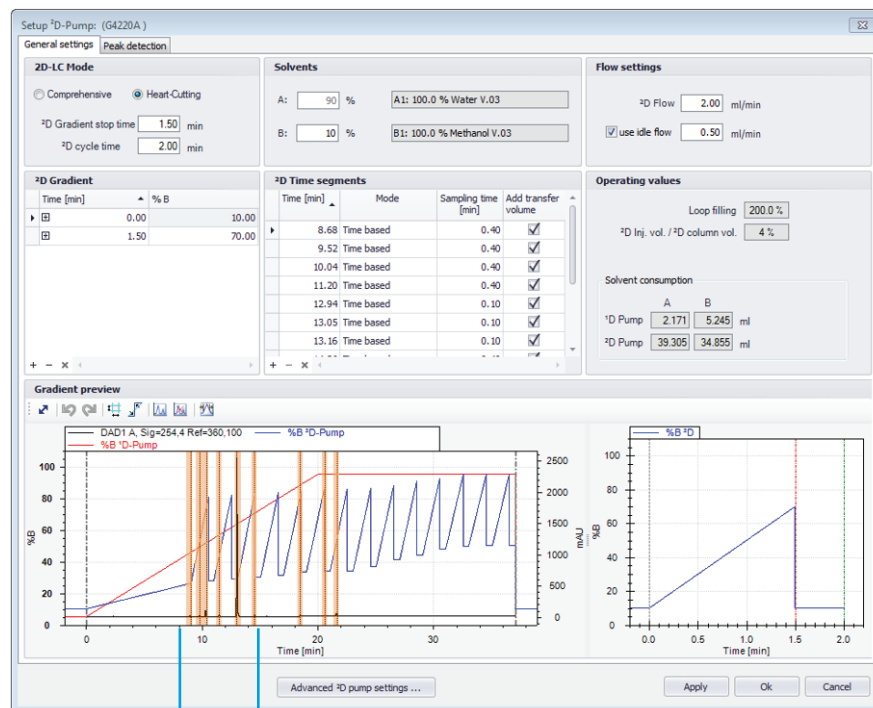


그림 3. Multiple heart-cutting을 위한 분석법 설정 방법

그림 4는 2D-LC heart-cut 뷰어에 나타난 multiple heart-cutting 2D-LC 분석의 결과를 보여주고 있습니다. 맨 위 두 패널에 heart-cut이 표시된 1차원 크로마토그램(왼쪽)과 heart-cut 표(오른쪽)가 각각 나와 있습니다. 아래에는 2차원 검출기에 기록된 2차원 크로마토그램이 왼쪽에 나와 있습니다. 여기서 heart-cut의 2차원 분석 순서

(보관 역순과 플러시 gradient(F)로 분석된 것)를 역추적할 수 있습니다. 오른쪽에는 3차원 크로마토그램을 표시하고 겹쳐놓을 수 있습니다.

불순물의 heart-cut 2차원 분석에서 얻은 결과는 그림 5에 나와 있습니다. Heart-cut 4-11번의 경우 1차원에서 부분적으로 용리된 화합물을 2차원에서 분리할 수 있었습니다.

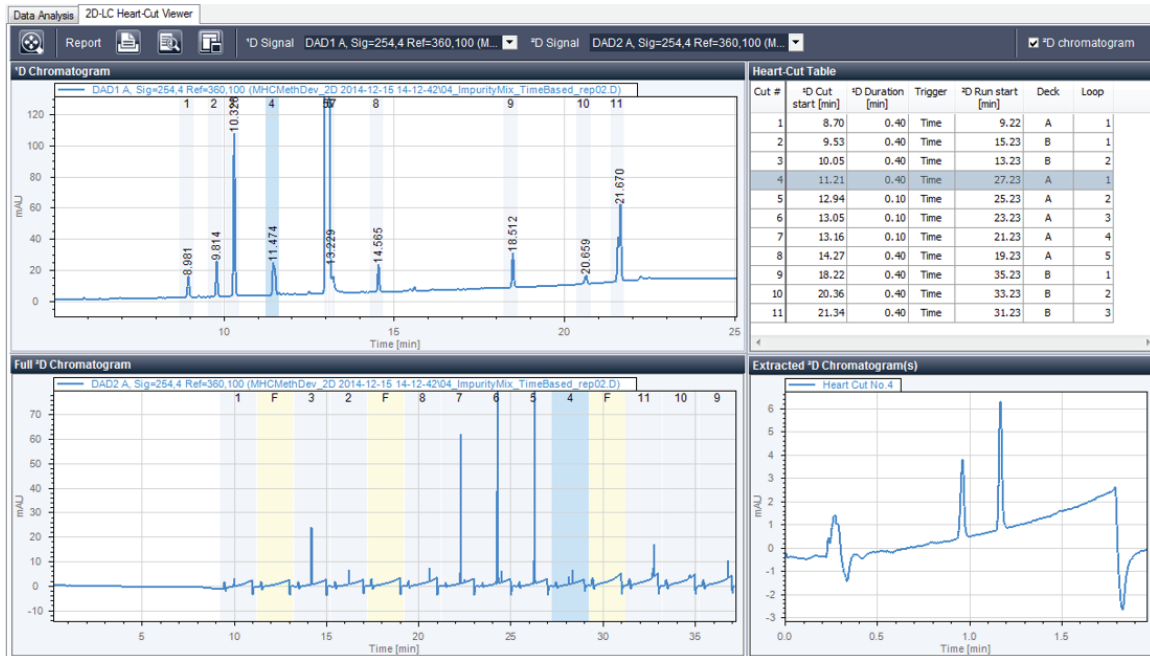


그림 4. 2D-LC heart-cut 뷰어에 나타난 multiple heart-cutting 2D-LC 분석 결과

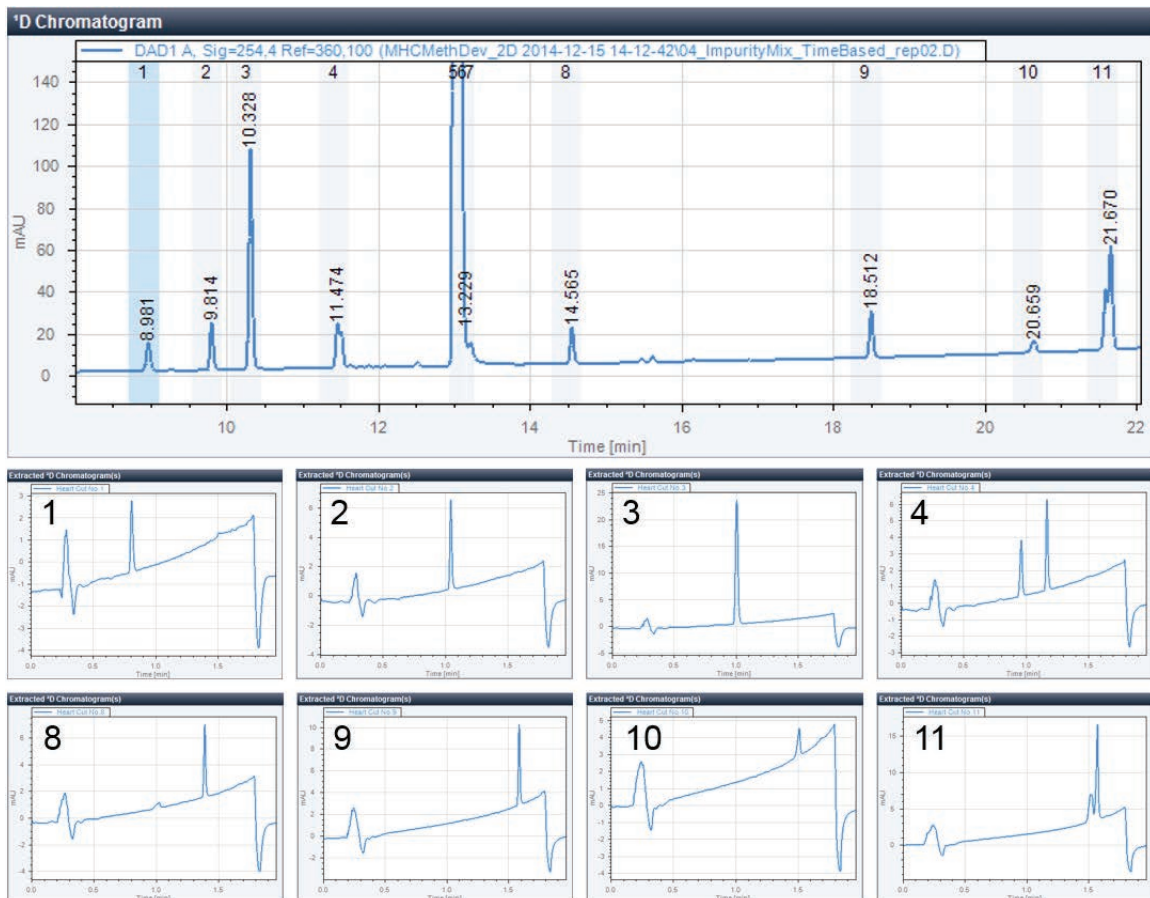


그림 5. 불순물의 2차원 분석 결과 위 패널: Heart-cut이 표시된 1차원 크로마토그램 아래 패널: 2차원 크로마토그램

그림 6은 주성분 피크에 대해 짧은 간격으로 heart-cut을 연속 3번 실시한 2차원 분석 결과를 보여주고 있습니다. 전체적으로, 2차원 분석에서는 동시 용리된 세 가지 불순물과 주성분을 분리했습니다. 한 불순물은 주성분 피크 (heart-cut 5 ~ 7)에 완전히 포함되어 있는 것으로 검출되었습니다. 두 번째 불순물은 heart-cut 6과 7에서 나타나며, 1차원 분리에서 주성분과 부분적으로 동시 용리된 세 번째 불순물은 heart-cut 7에서 분리됩니다.

불순물 분석에서 불순물의 정체를 확인하기 위해 시료에 의심되는 화합물을 합성 및 첨가할 수 있습니다. 일례로, 1차원 분리에서 주성분과 동시 용리된 불순물을 시료 용액에 첨가하여 2차원 분리에서 주성분과 분리되었습니다. 그림 7은 늘어나는 불순물을 첨가한 시료를 분석한 결과입니다. Heart-cutting 후 늘어난 불순물을 2차원 분석에서 검출할 수 있었습니다. Multiple heart-cutting 2D-LC는 기술 개요³에 명시된 바와 같이 안정적인 정량 분석에 필요한 직전성과 재현성을 자랑합니다.

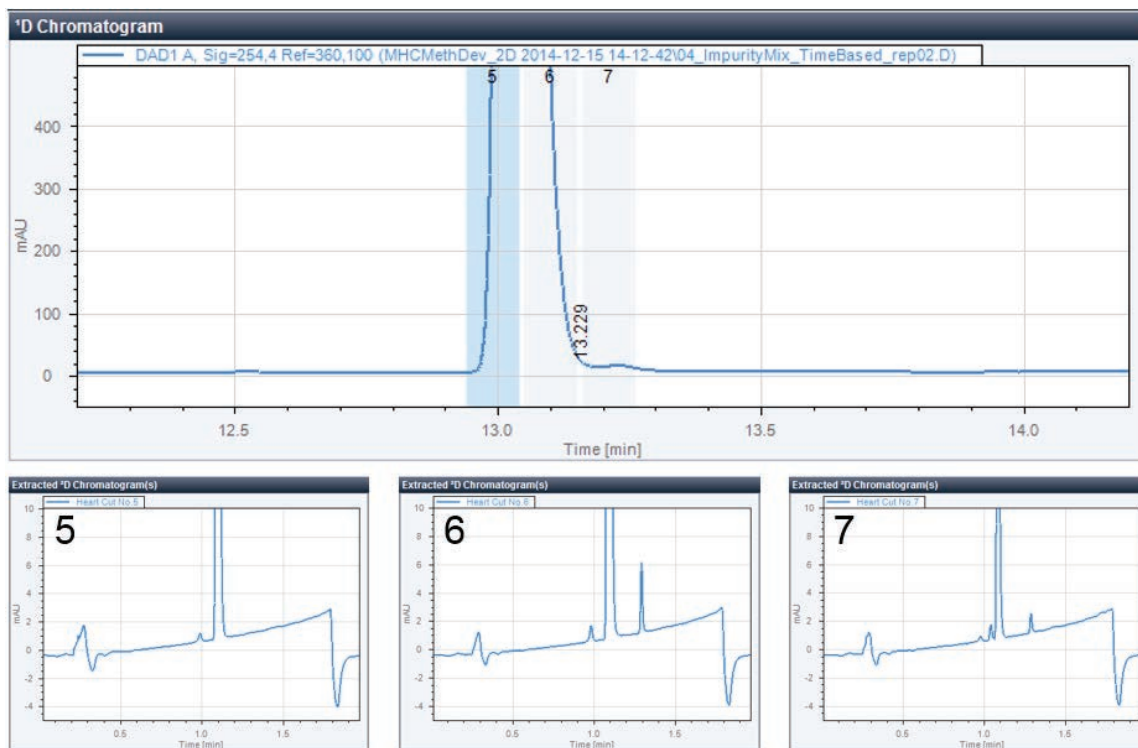


그림 6. 주성분의 2차원 분석 결과 위 패널: Heart-cut이 표시된 1차원 크로마토그램 아래 패널: 2차원 크로마토그램

결론

Agilent 1290 Infinity 2D-LC와 multiple heart-cutting을 결합하면 1차원 분리에서 생성된 복수의 피크를 heart-cutting해 선택성이 다른 2차원 분리로 옮겨 분석할 수 있습니다. 본 응용 자료는 multiple heart-cutting 2D-LD가 의약품이나 정밀 화학 제품, 제약 및 화학 제형의 불순물 측정 분석법 개발에 이상적임을 보여주고 있습니다. 1차원 분리 후 검출된 피크를 2차원 분리로 보내면 동시 용리 가능성이 있는 성분을 검출할 수 있습니다.

참고문헌

1. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, Impurities in new drug substances (Q3A(R2)), October 25, 2006.
2. Naegele, E., Detection of Impurities by Heart-Cutting using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0834EN, 2012.
3. Buckenmaier, S., Multiple Heart-Cutting with the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-5615EN, 2015.

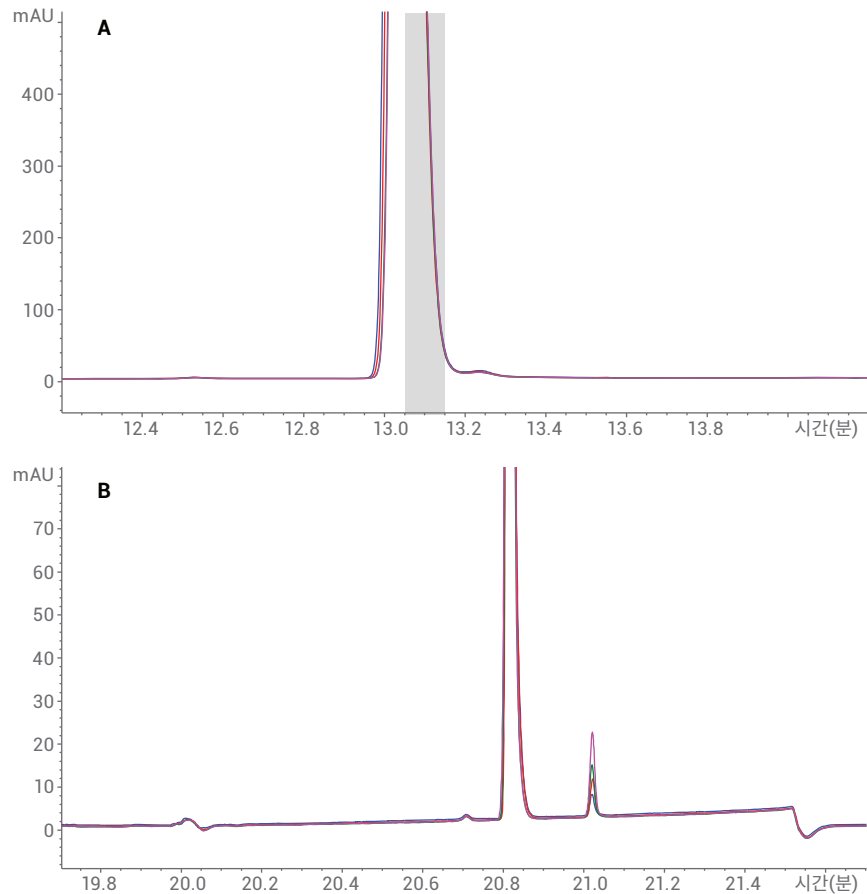


그림 7. 늘어나는(첫 양 대비 2배, 3배, 4배) 불순물을 첨가한 시료 분석 결과 A) Heart-cut이 표시된 1차원 크로마토그램의 오버레이 B) 2차원 크로마토그램의 오버레이

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
2015년 6월 1일, 한국에서 발행
5991-5643KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국에질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies