

Agilent GC/Q-TOF 시스템을 사용한 Amlodipine Besylate의 잠재적 유전독성 불순물 정량

응용 자료

저자

Siji Joseph, Upendra Simha
Application Scientists
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

개요

본 응용 자료는 amlodipine 의약품의 잠재적 유전독성 불순물인 methylbenzene sulphonate(MBS)와 ethylbenzene sulphonate(EBS)의 분석을 위한 GC/Q-TOF 분석법을 설명합니다. 분석을 위해 Agilent 7890A GC 및 Agilent 7200A 시리즈 Q-TOF를 연동 사용하였습니다. Agilent Q-TOF의 고유한 설계 특징으로 질량 정확도 및 질량 분해능을 향상하여 높은 신뢰성의 극미량 불순물 식별을 확인할 수 있습니다. 헬륨을 운반 가스로 사용하는 Agilent J&W DB-5ms 컬럼은 두 분석물질을 분리하는 25분 분석법을 개발하는 데 사용하였습니다. 이 분석법은 재현성 분석을 평가하기 위해 검증하였습니다. EI 스펙트럼 피크의 추가 MS/MS는 Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator(MSC) 소프트웨어로 조각에 하부 구조를 할당하여 불순물 구조를 규명하였습니다. Agilent Q-TOF는 화학적 유도체화 없이 이러한 불순물을 식별 및 정량하기 위한 탁월한 감도를 제공했습니다.

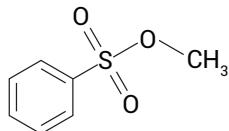


Agilent Technologies

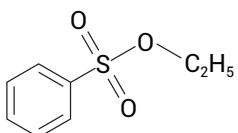
서론

원료 의약품 또는 완제 의약품의 불순물은 일반적으로 원료, 중간물 또는 부산물의 범주에 속합니다. 이러한 알려진 불순물 중 일부는 잠재적 돌연변이 유발물질 또는 발암물질입니다. 이러한 불순물을 약물 합성에서 완전히 제거하는 것은 어렵거나 거의 불가능할 수 있습니다. 일반적으로 의약품 지침은 0.05%를 초과하는 불순물은 명시 및 식별할 것을 요구합니다. 마찬가지로 잠재적 유전독성 불순물의 허용 한계에 대한 규제 지침도 있습니다. 극미량 잠재적 유전독성 불순물의 확실한 검출 및 정량을 위한 분석 방법은 적절한 선택성과 감도로 개발하여야 합니다.

Amlodipine besylate는 dihydropyridine형 칼슘 채널 차단제에 속합니다. 합성 단계 또는 염 결정화 단계에서 알코올의 존재는 잠재적 유전독성 물질로 간주되는 sulphonic acid ester의 형성을 유발할 수 있습니다^{1,2}. 여기에서는 methyl benzene sulfonate(MBS)와 ethyl benzene sulfonate(EBS)의 극미량 검출을 위한 높은 감도와 선택성을 갖춘 GC/Q-TOF 분석법을 설명합니다. MBS 와 EBS의 구조는 그림 1과 같습니다.



MBS
분자식 C₇H₈O₃S
단일 동위원소 질량 172.0194 Da



EBS
분자식 C₈H₁₀O₃S
단일 동위원소 질량 186.0351 Da

실험 세부 정보

시약 및 화학 물질

MBS와 EBS 표준물질은 Aldrich(Bangalore, India)에서, amlodipine 정제는 지역 약국에서 구매했습니다. 분석에 사용된 LC/MS 등급 acetonitrile과 methanol은 Sigma-Aldrich(Bangalore, India)에서 구매했습니다.

표준물질 및 시료 전처리

MBS와 EBS의 개별 원액은 acetonitrile에 각각 적당량을 2,000 μ g/mL의 농도로 용해하여 준비했습니다. 각 표준 원액의 분취를 취하고 acetonitrile로 희석하여 농도 10 μ g/mL의 MBS 및 EBS를 함유한 표준 혼합물을 준비했습니다. 검량 표준물질은 acetonitrile로 최종 개별 농도 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 및 5,000ng/mL를 산출하기 위해 분석물질의 표준 혼합물 10 μ g/mL를 희석하여 준비했습니다. 검량선은 해당 농도에 대해 각 불순물의 피크 면적을 플롯으로 나타내 얻었습니다.

Amlodipine 정제(약물 함량: 5mg)는 가루로 분쇄하고 70°C에서 24시간 동안 가열했습니다. 이 분해된 약품에 5mL의 50:50의 용매 혼합물, acetonitrile:methanol(v/v)을 첨가하고 10분간 초음파 처리했습니다. 이 추출물의 amlodipine 예상 농도는 1,000 μ g/mL였습니다. 그런 다음 유기 추출물을 12,000rpm에서 3분간 원심분리하고 애질런트 시린지 필터(Agilent Econofilter 25/0.2 μ m PTFE)로 여과한 후 GC/MS 분석에 사용했습니다. 불순물의 효율적인 정량을 위해 새로 개발된 GC/Q-TOF 분석법의 정확도와 회수율을 평가하고자, 추출된 의약품 매질 용액에 알려진 양의 분석물질(불순물 500ng/mL, amlodipine에 대해 0.05%)을 첨가했습니다.

GC/Q-TOF 기기와 소프트웨어

멀티모드(MM) 주입구가 장착된 Agilent 7890A GC로 분석하였습니다. Agilent 7693A 자동 시료 주입기로 시료를 주입하였습니다. GC는 Agilent 7200A Q-TOF 질량 분석기와 연동하였습니다. Agilent J&W DB-5ms, (p/n 122-5532) 30m \times 250 μ m, 0.25 μ m 컬럼은 멀티모드 주입구 및 보조 PCM에 연결하였고 Agilent uncoated deactivated fused silica tube (p/n 160-2625) 0.7 m \times 150 μ m 컬럼은 보조 PCM 및 MS 검출기에 연결하였습니다. 2 μ L 시료량을 100에서 cold splitless 모드로 주입하였습니다. 0.2분 유지 시간 후 주입구 온도는 150°C/분으로 250°C까지 승온하였습니다. Gas saver는 3분 후 20mL/분으로 시작하였습니다. 운반 가스인 헬륨은 1.9mL/분, 일정 유속입니다. 오븐은 10°C/분으로 60°C (1분 유지)부터 250°C(5분 유지)까지 프로그래밍되었습니다. 이송 라인은 260°C로 설정하였습니다.

7200A Q-TOF는 전자 충격(EI) 이온화를 사용한 MS 및 MS/MS 모드로 운영하였습니다. 이온화원 온도는 230°C였습니다. 수집 속도는 2GHz EDR(extended dynamic range) 모드에서 5스펙트럼/초였습니다. MS 질량 범위는 50~600Da였습니다. 내부 질량 참조는 사용하지 않았지만, 각 실행 전에 시퀀스에서 키워드 명령 (MassCal)을 사용하여 기기를 질량 검량하였습니다. 분석물질 분자 이온과 가장 존재비가 높은 조각 이온은 시간 세그먼트 MS/MS 분석을 위해 선택했습니다. 또한 MS/MS 분석의 경우 수집 시간은 200ms/스펙트럼이었고 총돌 에너지는 타겟 분석물질 당 3개 또는 4개의 전구물질을 사용하여 10V였습니다.

그림 1. MBS 및 EBS의 분자 구조 및 화학식

Agilent MassHunter GC/MS Acquisition 소프트웨어(버전: B.07.02)를 데이터 수집에 사용하였습니다. 모든 정성 데이터 처리는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis Workstation 소프트웨어(버전: B.07.00)를, 정량 분석은 Agilent MassHunter Quantitative Analysis Workstation 소프트웨어(버전: B.07.00)를 사용하여 수행하였습니다. NIST 2014 Mass Spectral Search Program(버전: 2.2)은 스펙트럼 라이브러리 검색에 사용하였습니다. MSC 소프트웨어(버전: B.07.00)은 accurate mass MS/MS 데이터를 사용해 관심 이온의 가능한 구조를 예측하고 평가합니다. 예를 들어 ChemSpider와 같은 데이터베이스 마이닝에 사용하여 분자 이온 또는 조각 이온의 실험식에 해당하는 구조를 추출하고 적합성 점수에 따라 순위를 지정하는 데 사용할 수 있습니다.

절차

본 분석법 밸리데이션 전략은 제안된 GC/Q-TOF 분석법의 재현성을 평가하기 위한 것이었습니다. 이를 위해 각 분석물질의 선택성, 검출 한계 및 직선성 범위는 물론 기기 기술의 정밀도와 정확도를 평가하였습니다. 준비된 직선성 레벨은 검출 한계(LOD), 정량 한계(LOQ) 및 직선성 확인점을 위해 5회 반복 주입하였습니다. Amlodipine 의약품의 acetonitrile 추출물은 Q-TOF 선택성 시험에 사용하였습니다. 선택성은 의약품 매질의 다양한 추출창으로 분석물질 분자 이온 및 조각의 정확한 질량을 추출하여 평가했습니다. 시스템 정밀도는 머무름 시간(RT)의 상대 표준편차(RSD)와 표준물질의 반복 주입 면적을 측정하여 평가했습니다. GC/Q-TOF 분석법의 정확도와 회수율 연산을 위해 spiked/unspiked 의약품 추출물을 주입했습니다.

결과 및 토의

정확도

DB-5ms 컬럼으로 두 개의 잘 분리된 선명한 피크로 분석물질을 분리할 수 있었습니다. 1,000ng/mL 표준 혼합물 분석으로 얻은 분석 총 이온 크로마토그램(TIC)은 그림 2와 같습니다. MBS 및 EBS의 accurate

mass spectra는 그림 3과 같습니다. Formula generator 옵션으로 분자 이온 피크를 $[C_7H_8O_3S]^+$ 및 $[C_8H_{10}O_3S]^+$ 로 정확하게 할당하였습니다. MBS 와 EBS의 경우, 예측 화학식에 대한 동위원소 존재비 및 간격 점수가 97보다 클 때 질량 오차 값은 4ppm 미만으로 판명되었습니다(그림 4).

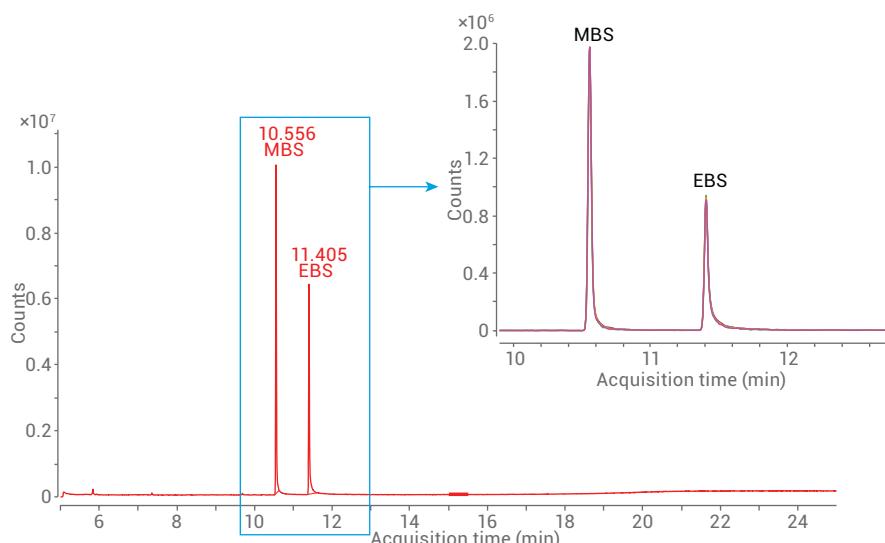


그림 2. MBS 및 EBS의 용리 프로파일. 덧붙여진 5회 반복 주입 오버레이는 주입 재현성을 입증합니다.

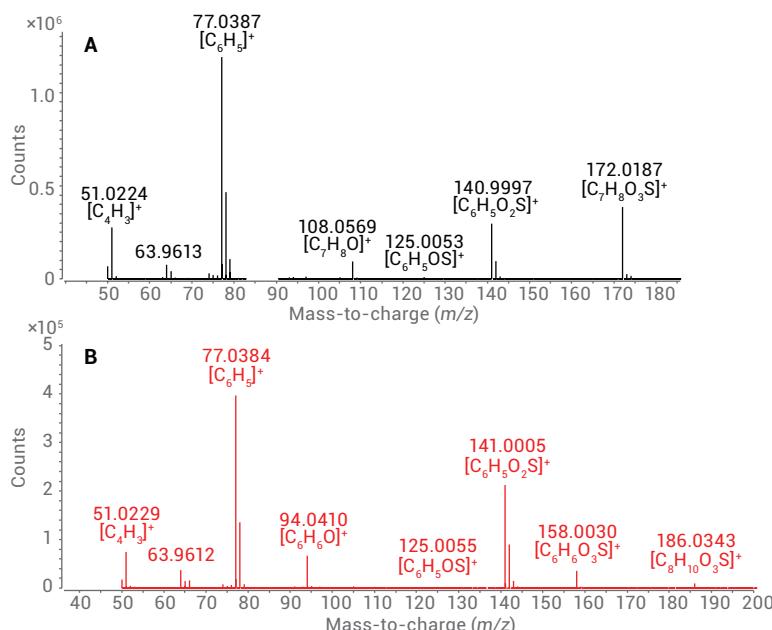


그림 3. Generate formula 알고리즘에 의한 화학식을 라벨한 MBS(A) 및 EBS(B)의 높은 분해능의 accurate mass 스펙트럼

선택성

분석법의 선택성을 평가하기 위해, 표적 분석물질 분자 이온 및 조각의 accurate mass는 다양한 추출 창을 사용하여 amlodipine 약물 매질로부터 추출했습니다. 이는 그림 5와 같습니다. 그림 5A는 의약품 매질의 TIC입니다. 그림 5B는 $\pm 0.5\text{Da}$ 의 SQ 추출 창을 사용한 분석물질 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 포함합니다. $\pm 20\text{ppm}$ 및 $\pm 10\text{ppm}$ 의 mass accuracy로 추출한 분석물질 EIC는 각각 그림 5C와 5D로 확인할 수 있습니다. 추출 창이 $\pm 10\text{ppm}$ 을 이용한 EIC는 최소 바탕 간섭으로 표적 분석물을 선택적으로 검출했습니다. 이에 따라 Q-TOF 분석법이 MBS 및 EBS의 동시 분리 및 정량에 선택적인 것으로 확인하였습니다.

A

Best	ID Source	Formula	Species	m/z	Score	Diff (ppm)	Score (MFG)	Mass (MFG)	DBE
MFG	C7 H10 O3 S	M+	172.0187	98.62	0.98	98.62	172.0194	4	
Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Score (iso. spacing)	Height	Ion Formula
M+	172.0187	96.66	99.68		98.82	98.82		99.7	C7 H10 O3 S
Height (Calc) Height Sum% (Calc) Height % (Calc) m/z (Calc) Diff (mDa) Height Height % Height Sum % m/z Diff (ppm)									
1240587.5	87.7	100	172.0189	0.2	245858.8	100	89.7	172.0187	1.11
202610.8	7.5	8.6	173.0219	0	17897.7	7.2	6.5	173.0219	-0.26
13024.3	4.7	5.4	174.0162	0	10666	4.3	3.9	174.0162	-0.04

B

Best	ID Source	Formula	Species	m/z	Score	Diff (ppm)	Score (MFG)	Mass (MFG)	DBE
MFG	C8 H10 O3 S	M+	186.0341	97.89	2.39	97.89	186.0351	4	
Species	m/z	Score (iso. abund)	Score (mass)	Score (MFG, MS/MS)	Score (MS)	Score (MFG)	Score (iso. spacing)	Height	Ion Formula
M+	186.0341	97.32	97.89		97.89	97.89		98.59	C8 H10 O3 S
Height (Calc) Height Sum% (Calc) Height % (Calc) m/z (Calc) Diff (mDa) Height Height % Height Sum % m/z Diff (ppm)									
9394.3	86.8	100	186.0345	0.4	9970.8	100	87.1	186.0341	2.18
960.8	8.4	9.7	187.0376	0.8	1035.1	10.4	9	187.0368	4.32
547.2	4.8	5.5	188.0332	0.5	436.4	4.4	3.8	188.0316	2.44

그림 4. MBS(A) 및 EBS(B)의 질량 오차값. 강조된 부분은 동위원소에 대한 낮은 질량 오차값 (< 4ppm)을 보입니다.

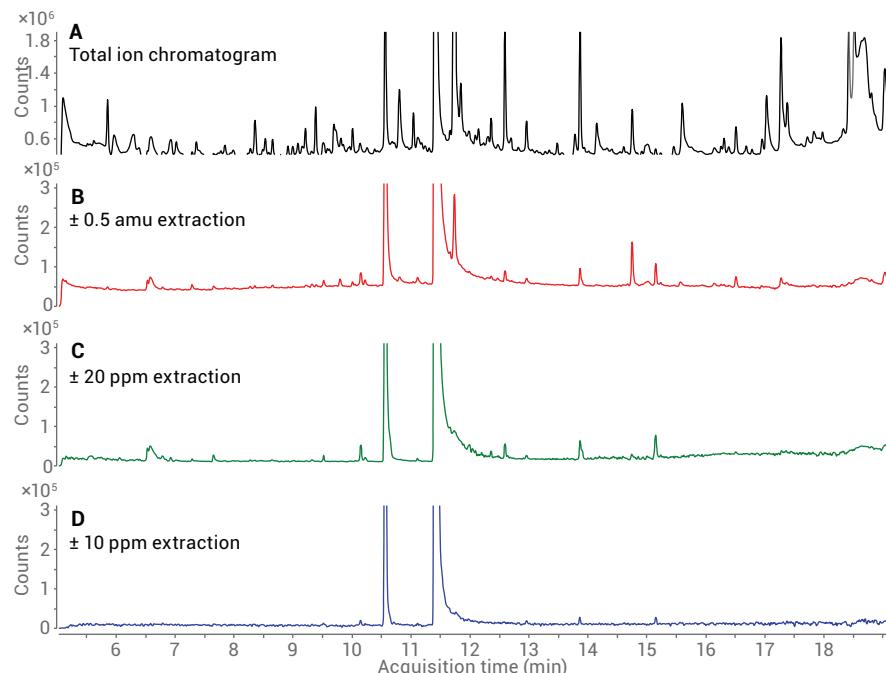


그림 5. Amlodipine 의약품 주입 분석물질 Q-TOF TIC 및 EIC. EIC는 라벨과 같이 다양한 추출 창으로 타겟 불순물 분자 이온 및 가장 존재비가 높은 조각 이온(m/z 172.0187, 140.9997, 142.0075, 77.0387, 78.0456, 51.0224, 94.0410, 158.0030, 186.0343)을 추출하여 생성하였습니다.

LOD, LOQ 및 직선성

낮은 직선성 레벨 전처리의 반복 주입으로 LOD 및 LOQ를 연산했습니다. 신호 대 잡음비(S/N) 최소 10:1인 각 분석물질 피크의 최저 농도는 LOQ로 신호 대 잡음비 3:1은 LOD로 기록하였습니다. MBS의 LOD는 10ng/mL이며 EBS의 LOD는 20ng/mL이었습니다. MBS 및 EBS의 선형 곡선은 LOQ에서 5,000ng/mL까지 농도 범위 대 피크 영역을 사용하여 플롯으로 나타냈습니다. 최상의 회귀 반응 함수를 결정하기 위해, 데이터를 플롯으로 나타내고 통계 분석을 수행하여 다양한 회귀 모델을 평가했습니다. 원하는 측정 범위 (dynamic range) 내에서 데이터에 적합한 최상의 검교정 모델은 1/x 가중치에 적합한 선형 회귀 모델로 결정하였습니다. 직선성 실험 결과에 따르면 질량 분석 반응은 MBS의 경우 20~5,000ng/mL, EBS의 경우 50~5,000ng/mL의 농도 범위 내에서 비례했습니다. 상관 계수는 두 분석물질 모두에서 0.99 이상 이었습니다. 두 분석물질에서 얻은 LOD, LOQ 및 직선성 결과는 표 1에 요약되어 있습니다.

표 1. MBS와 EBS의 LOD 및 LOQ 결과

파라미터	MBS	EBS
LOD		
농도(ng/mL)	10	20
S/N	7	3.2
피크 면적 RSD(%)	10.7	13.7
LOQ		
농도(ng/mL)	20	50
S/N	10.4	10.1
피크 면적 RSD(%)	4.9	8.4

정밀도

정밀도는 모든 농도 레벨의 반복 주입으로 두 분석물질에 대한 RT 및 피크 면적 RSD를 연산하여 결정하였습니다. 이는 표 2에 요약되어 있습니다. 모든 농도 레벨에서 MBS에 대한 면적 RSD 값은 5.0% 미만이었습니다. LOQ를 제외한 모든 농도 레벨에서 EBS에 대한 면적 RSD 값은 5.0% 미만이었고, LOQ의 경우 이 값은 8.4%였습니다. 검교정 범위 전반에서 두 분석물질 모두는 우수한 RT 정밀도를 확인할 수 있었고 분석법 견고성에 대한 2차 증거를 제공하였습니다. 모든 농도에서 RT RSD는 MBS 및 EBS에 대해 0.2% 미만이었습니다. 따라서 GC/Q-TOF 기기를 사용한 측정은 반복 주입 시 정확하고 정밀하였으며 MBS 및 EBS 분석 요건을 충족했습니다.

분해된 amlodipine 정제 분석

이 분석법을 사용하여 분해된 amlodipine 의약품에서 추출한 시료와 직선성 방정식으로 형성된 MBS 및 EBS의 양을 분석했습니다. 약 344ng/mL의 MBS와 3,687ng/mL의 EBS가 분해된 시료에 존재했습니다. 이 GC-Q-TOF 분석법은 이러한 극미량 분해 불순물 검출에 10배 이상의 감도를 가집니다. TOF-MS는 화합물 식별에 높은 질량 정확도를 제공하여 복잡한 매질 시료 분석의 긍정 오류를 줄입니다. 표준 NIST 2014 라이브러리에서 불순물의 EI 질량 스펙트럼을 검색했으며, 두 표적 분석물질 모두 정방향 매치 인자가 850을 초과했습니다.

표 2. 검교정 레벨의 MBS과 EBS에 대한 면적 및 RT의 RSD 값

검량 농도 (ng/mL)	MBS		EBS	
	RT RSD(%)	면적 RSD(%)	RT RSD(%)	면적 RSD(%)
20	0.01	4.87		
50	0.01	3.91	0.16	8.38
100	0.01	3.14	0.03	3.66
200	0.01	0.68	0.01	3.63
500	0.01	0.77	0.01	0.30
1,000	0.01	0.63	0.01	3.08
2,000	0.01	2.69	0.01	0.86
5,000	0.00	0.43	0.02	0.90

정확도

별도의 MBS 및 EBS 표준물질 500ng/mL을 분해된 amlodipine 의약품에 스파이킹하고 분석하여 회수율을 평가했습니다. 첨가된 양은 주요 약물 농도와 관련하여 각 불순물의 0.05%에 해당합니다. 분석물질의 정확도는 각 피크의 반응/면적 증가치를 비교하여 연산하고 직선성 방정식으로 역연산했습니다. MBS와 EBS에서 회수된 양은 각각 520ng/mL과 565ng/mL이었습니다. 그 결과 $100 \pm 13\%$ 이내의 회수율을 확인합니다.

MSC 소프트웨어를 이용한 불순물 하부 구조 해석/파편화메커니즘

MS/MS 분석은 분자 이온 및 MBS 와 EBS 모두에서 가장 존재비가 높은 조각 이온에 대해 수행되어 상위 구조와 그 조각화 메커니즘을 해석했습니다. 그림 6과 7은 MBS 및 EBS의 MS/MS 데이터입니다. **Find by targeted MS/MS** 알고리즘으로 이 특성을 추출했습니다. 분자 이온 피크는 **generate formula** 알고리즘으로 $[C_7H_8O_3S]^+$ 및 $[C_8H_{10}O_3S]^+$ 로 정확하게 할당하였습니다. 불순물의 전구 물질 및 조각 이온에서 얻은 정확한 질량 정보는 Compound Exchange Format(.CEF) 파일을 사용해 MSC 소프트웨어에 업로드하고 가능한 모든 구조를 검색하기 위해 ChemSpider 데이터베이스를 검색했습니다.

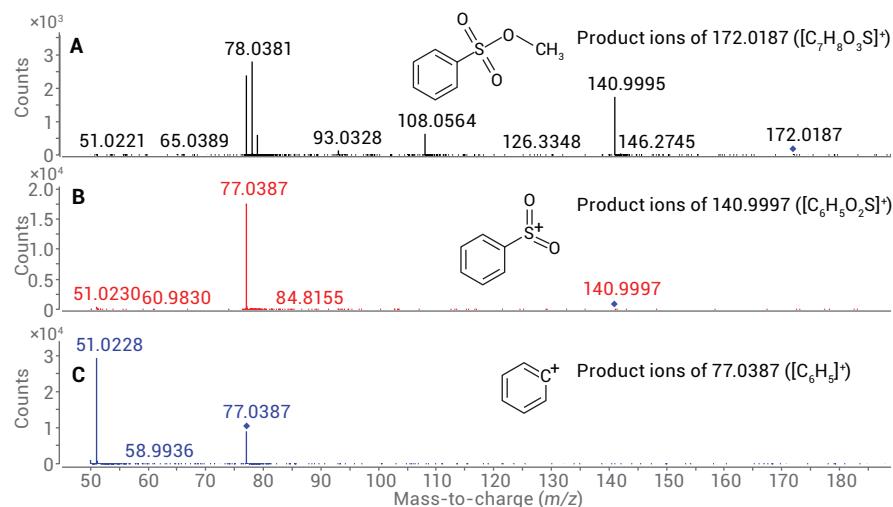


그림 6. MBS의 MS/MS 데이터(가장 존재비가 높은 조각 이온의 해리 이온)

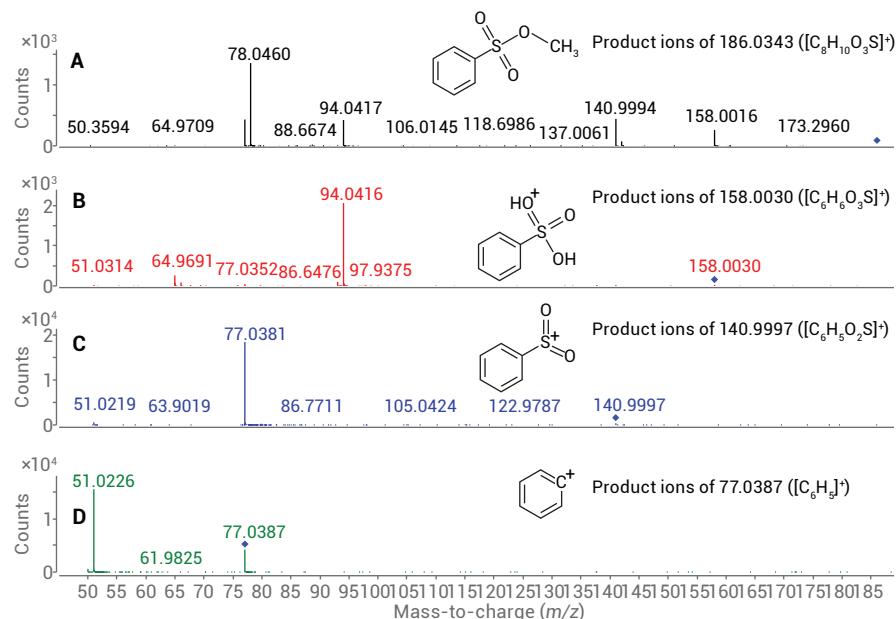


그림 7. EBS의 MS/MS 데이터(가장 존재비가 높은 조각 이온의 해리 이온)

그림 8은 MBS 분자 이온 m/z 172.0187의 MS/MS 해리 이온에 대한
파편화 메커니즘을 할당하면서 MSC
소프트웨어의 결과를 보여줍니다.

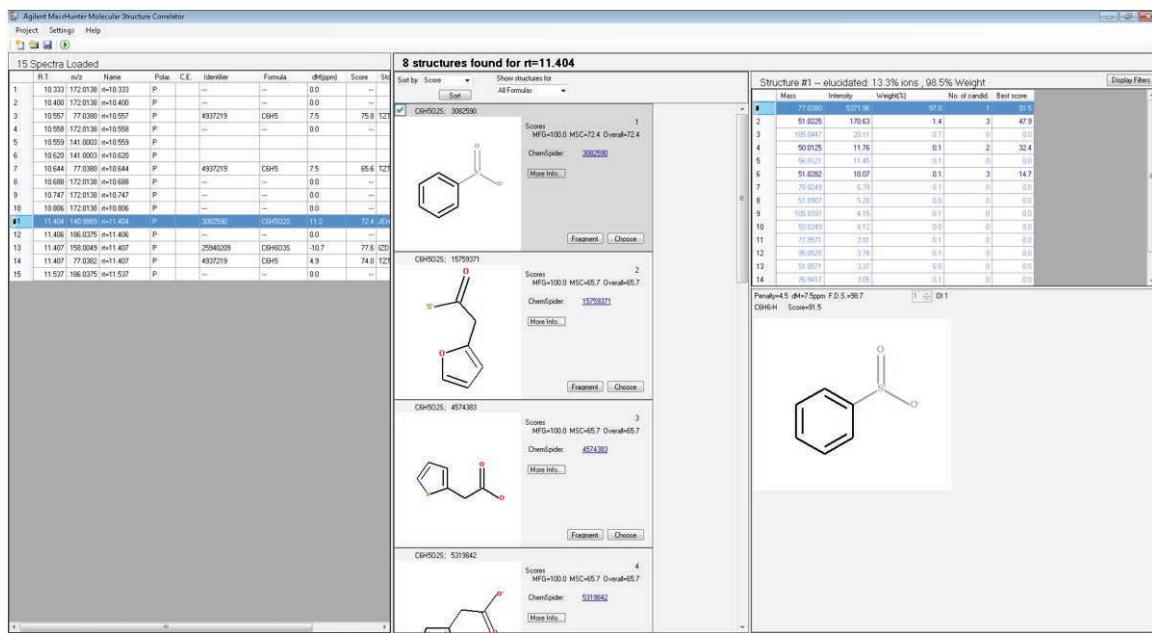


그림 8. MBS ($C_6H_5O_2S$)⁺ 조각 이온에 구조 할당을 위한 MSC 결과 스크린샷. 불순물 하위 조각의 전구 및 후보 물질 구조에 대한 가능한 분자 구조 목록입니다.

결론

Amlodipine besylate의 두 개의 잠재적 유전독성 불순물인 methylbenzene sulphonate와 ethylbenzene sulphonate 분석을 위한 높은 감도의 GC/Q-TOF 분석법은 Agilent 7890A GC와 Agilent 7200A Q-TOF를 연동하여 개발하였습니다. MS 및 MS/MS 모드 모두 이러한 불순물의 식별 및 정량에 사용하였습니다. MS 데이터는 식별 및 정량에 사용하였으며 MS/MS 데이터는 MSC 소프트웨어로 처리하여 불순물 파편화 메커니즘을 확인했습니다. MBS와 EBS의 LOD는 각각 10ng/mL와 20ng/mL이었습니다.

이 분석법은 MBS 및 EBS 각각에 대해 20ng/mL 및 50ng/mL의 LOQ로 검출의 측정 범위(dynamic range) 10^2 이상을 입증하였습니다. 분석법 회수율은 주요 약물 농도와 관련하여 0.05% 농도로 약물 매질에 표적 불순물을 의도적으로 첨가하여 평가했습니다. 이 분석법은 재현성이 있으며 화학 유도체화 없이 MBS 및 EBS 정량에 사용할 수 있습니다. GC/Q-TOF는 MSC 소프트웨어와 함께 복잡한 매질의 미지 불순물의 구조를 해석하는 데 사용할 수 있습니다.

참고문헌

1. Rao, M. S; et al. Quantification of genotoxic impurities in amlodipine drug substance by LC-MS, *Der Pharmacia Lettre* 2014, 6(3), pp 47-55.
2. IARC Monographs Program on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans for ethyl methane-sulphonate 7 (1974) 245.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
2015년 8월 1일, 한국에서 발행
5991-6058KO

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



Agilent Technologies