

고분해능 LC/MS를 이용한 잠재적 유전독성 화합물의 스크리닝, 식별 및 정량

Agilent 6545 Accurate Mass Q-TOF 시스템 및
MassHunter Mass Profiler 소프트웨어를 이용한
Chlorhexidine 원료 의약품 분석

응용 자료

제약산업

저자

Syed Salman Lateef
Agilent Technologies, Inc
Bangalore, India

개요

본 연구는 잠재적 유전독성 화합물을 식별 및 정량하는 의약품의 일상적 스크리닝을 소개합니다. 이 응용 자료에서는 원료 의약품으로 chlorhexidine을 함유한 시료의 accurate mass 데이터를 얻기 위해 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS 시스템을 사용하였습니다. Agilent MassHunter Mass Profiler 소프트웨어로 데이터를 마이닝하고 다양한 시료를 비교하여 화합물의 차이 목록을 생성하였으며, 차등 목록에 대해 accurate mass 데이터베이스를 검색하여 잠재적 유전독성 화합물인 4-chloroaniline을 식별하였습니다. All Ions MS/MS 수집 모드를 사용하여 MS/MS 라이브러리 매칭으로 4-chloroaniline을 확인하고, 외부 표준물질을 이용해 이를 정량하였습니다. 이 워크플로는 이미 알려진 잠재적 유전독성 화합물을 검출하고 정량하기 위한 배치 간 시료 분석에 적합합니다.



Agilent Technologies

소개

원료 의약품은 장기간 또는 부적절한 보관 시 잠재적 유전독성 화합물을 생성할 수 있습니다. 유전독성 화합물의 검출, 식별 및 정량은 시간이 오래 걸리는 과정으로, 규제 기관¹에서는 유전독성 화합물 형성에 관해 보고할 것을 요구합니다. 최근 소프트웨어 도구의 발전으로 복잡한 시료에서 잠재적인 유전독성 화합물을 빠르고, 비용 효율적으로 검출할 수 있게 되었습니다.

Agilent MassHunter Mass Profiler(MP) 소프트웨어를 사용하면 두 시료 세트를 비교하여 이들 사이의 유의한 차이를 확인할 수 있습니다. MP 내 주성분 분석(PCA) 도구는 식별된 차이 마커 기반의 화합물 분류에 도움을 줍니다. 차이 마커란 대조 시료와 비교 시 정의된 농도를 초과하는 화합물입니다. 시료 간 차이를 식별하기 위해 맞춤 제작한 accurate mass 데이터베이스를 사용하였습니다. 이 연구에서는 분해 및 비분해된 chlorhexidine 시료의 MP 분석을 통해 시료 간에 통계적으로 차이를 보이는 화합물 목록을 얻었습니다. MP 소프트웨어의 Agilent ID Browser 기능을 사용하여 잠재적 유전독성 화합물을 함유한 맞춤 데이터베이스에서 이러한 화합물을 검색하였습니다. Accurate mass 라이브러리 매칭을 통해 화합물을 한번 더 확인한 다음, 정량하였습니다. 그림 1은 본 연구에 사용된 워크플로를 보여줍니다.

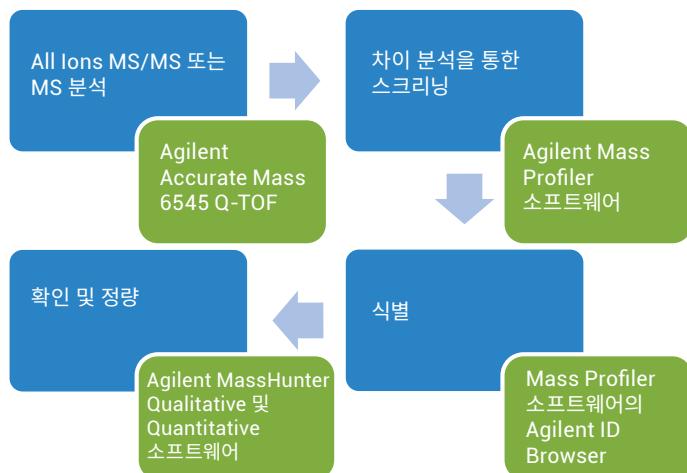


그림 1. 유전독성 화합물 분석 워크플로.

실험

시약 및 재료

Chlorhexidine 및 4-chloroaniline은 Sigma-Aldrich(인도)에서 구입하였으며, methanol은 LC/MS 등급을 사용하였습니다(Lab Scan, 방콕). 종류수는 Milli-Q 정수 시스템 (Millipore, 미국)으로 얻었습니다.

시료 전처리

분석 시료

Chlorhexidine은 1,000 μ g/mL의 methanol 용액을 취하고 동량의 100% formic acid를 추가하여 분해하였습니다. 이 용액을 80°C에서 1시간 동안 가열한 후, 50/50 methanol/물 용액을 이용하여 150 μ g/mL로 희석하였습니다. LC/MS 분석 시 chlorhexidine 피크는 내장된 전환 밸브를 통해 폐액으로 전환하였으며, 4개의 분석 시료를 준비하였습니다.

대조 시료

Chlorhexidine 표준품을 산처리하거나 가열하지 않고 4개의 대조 시료로 사용하였습니다.

표준 원액

100% Methanol(1,000 μ g/mL)로 제조한 Chlorhexidine, 100% Methanol(5,000 μ g/mL)로 조제한 4-chloroaniline

검량 희석 용액

50/50 methanol/물 용액으로 제조한 chlorhexidine 1,000ng/mL 용액

검량 시료

4-chloroaniline 표준 원액을 0.12, 0.6, 1.2, 2.4, 3, 4, 5, 9, 15, 27, 54, 75, 150, 300ng/mL 농도로 제조하였습니다. 이 농도는 유전독성 화합물을 검출할 만큼 낮기 때문에 선택한 것으로, 각각의 농도를 3개씩 준비하였습니다.

기기 및 소프트웨어

LC 파라미터

분석 물질의 크로마토그래피 분리에는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템 (Binary)을 사용하였습니다. 새로운 불순물 형성을 탐색하기 위해, 정량 분석 대비 상대적으로 긴 LC 분석법 (12분)으로 시료를 스크리닝 하였습니다. 4-chloroaniline의 정량은 짧은 All Ions MS/MS(5분) 정량 분석법으로 최적화하였습니다.

MS 파라미터

데이터 수집 및 분석에는 Agilent MassHunter 데이터 수집 소프트웨어 (B.05.01), Qualitative Analysis 소프트웨어(B.07.00), Mass Profiler 소프트웨어, Quantitative Analysis 소프트웨어(B.07.00)를 사용하였습니다.

Agilent Jet Stream Source를 장착한 Agilent 6545 Q-TOF는 양이온 모드에서 작동하였으며, Swarm Autotune으로 튜닝하였습니다. Swarm Autotune은 PSO(Particle Swarm Optimization) 기술을 사용하여 최대 21개 변수를 동시에 조정할 수 있기 때문에 기기를 더욱 견고하게 튜닝하고 최적화할 수 있습니다. 4-chloroaniline(m/z 127.0189) 정량 시, 목표 질량 범위 m/z 50~250에 대해 튜닝 변수를 특별히 선택하였습니다.

표 1. LC 파라미터

파라미터	값	
컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 3.0×50mm, 1.8 μ m(p/n 959757-302)	
컬럼 온도	40°C	
주입량	5 μ L	
자동 시료 주입기 온도	6°C	
니들 세척	Flush port(100% methanol)에서 5초간	
이동상	A) 0.1% formic acid in water B) 0.1% formic acid in methanol	
유속	0.5mL/분	
그레디언트	정량 All Ions MS/MS 분석법 시간(분) %B 0.0 40 3.0 60 4.0 60 4.1 40 5.0 40 정지 시간: 5.0분 평형 시간: 0.5분	스크리닝 MS 분석법 시간(분) %B 0.0 20 1.0 20 7.0 40 8.0 95 10.0 95 11.0 20 정지 시간: 12.0분

표 2. Q-TOF 파라미터

파라미터	값
이온화원 조건	
가스 온도	250°C
건조 가스(질소)	11L/분
분무 가스(질소)	40psig
Sheath 가스 온도	200°C
Sheath 가스 유량	11L/분
캐필러리 전압	2,500V
노즐 전압	500V
Fragmentor	120V
Skimmer	40V
Oct 1 RF Vpp	700V
수집 속도/시간	5 스펙트럼/초
기준 질량	64.0158 및 922.0098
튜닝	고감도 Slicer position 2GHz의 확장 동적 모드
충돌 에너지	0, 10 및 20eV

결과 및 토의

차이 분석을 통한 스크리닝

분해된 시료 및 대조 시료의 LC/MS 분석 데이터 파일을 Mass Profiler 소프트웨어의 재귀적 분자 특징 추출을 사용해 처리하였습니다. 통계 분석을 위해, 추출된 화합물 특징에 대한 높이 필터는 4,000 카운트로, 품질 점수는 100으로, 배율 변화는 4 이상으로 설정하였습니다. 4배 이상의 배율

변화를 적용한 것은 대조 시료와 확연히 다른 특징을 검출하기 위한 것입니다. 그림 2는 스크리닝 방법을 사용한 Log 존재비 대 머무름 시간 특징 도표로 부터 통계 분석 결과를 보여줍니다. 도표 C에 나타난 점의 상대적 크기는 특징 존재비에 비례합니다. 각각의 점은 데이터베이스 검색으로 식별할 수 있으며, 추출 이온 크로마토그램으로 함께 시각화할 수 있습니다.

PCA 도표

PCA 도표는 분해된 chlorhexidine 시료가 대조 시료와 다르고, 뚜렷이 구별되는 것을 보여줍니다(그림 3). 이는 분해된 chlorhexidine 시료가 대조군과 다른 특징을 지니고 있음을 의미합니다. 대조군은 의미있는 분리를 보이지 않았으며, 이는 대조 시료 간 편차가 없음을 나타냅니다(파란색 점).

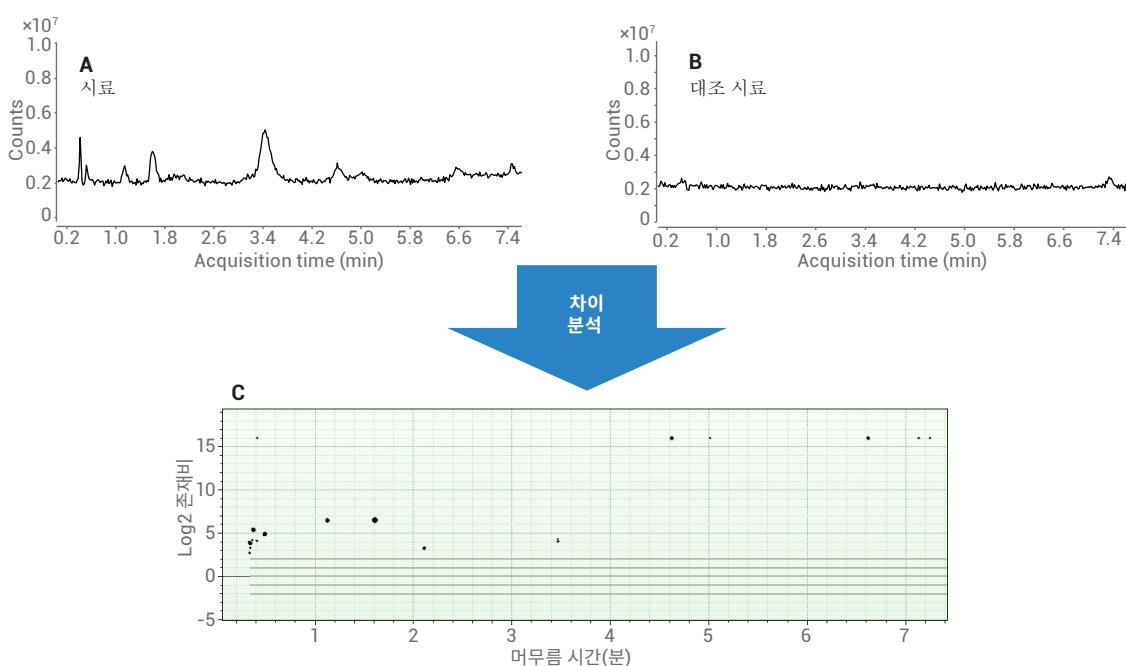


그림 2. 시료군 및 대조군에 대한 입력 파일(각각 그림 A 및 그림 B). Chlorhexidine 피크는 7.4분 후에 용리되어 도표에 나타나지 않음. 그림 C는 차이 분석 이후 Log 존재비 대 머무름 시간 도표를 나타냄

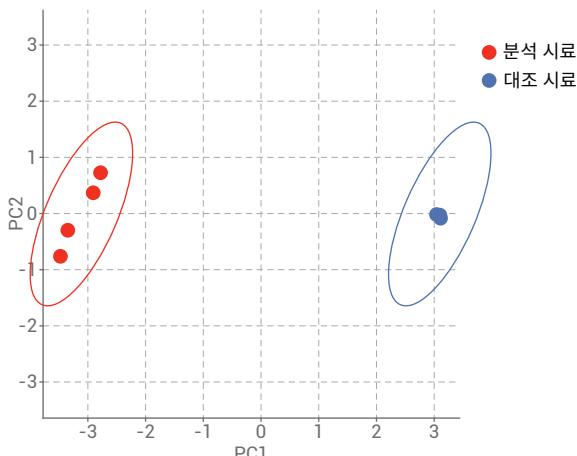


그림 3. 시료 그룹의 차이를 보여주는 PCA 도표. 빨간색 점은 분석 시료, 파란색 점은 대조 시료를 나타냄

화합물 식별

맞춤형 accurate mass 데이터베이스 및 라이브러리를 표준 화합물을 사용해 생성하였습니다. 이 데이터베이스에 chlorhexidine 불순물의 질량, 화학식 및 구조에 대해 발표한 문헌도 포함하였습니다. 통계 분석 후 Mass Profiler의 ID Browser 기능을 사용하여 accurate mass 데이터베이스에 대한 화합물의 차이 목록을 검색하였습니다. 그 결과, 분해된 시료에 잠재적 유전독성을 갖는 4-chloroaniline이 존재하는 것으로 나타났습니다(그림 4).

화합물 특징 요약

표 3은 차이 분석 및 데이터베이스 검색 결과를 요약한 것입니다. 차이 점수는 Student t-검정으로 계산하였습니다. 0~100의 값은 데이터 그룹이 얼마나 유의미하게 다른지를 나타냅니다. 이 값이 클수록 높은 신뢰도로 두 그룹의 데이터 세트가 서로 차이를 보임을 나타냅니다. 대조 시료에서도 소량으로 존재하는 4-chloroaniline의 농도는 분해 시료에서 발견되는 농도보다 현저히 낮았습니다. ID Browser에

내장된 Formula Generator를 통해 모든 화합물에 대한 화학식을 생성하였습니다. 4-chloroaniline은 잠재적 유전독성 화합물이기 때문에 라이브러리 매칭으로 더 자세히 확인하고 정량 하였습니다. 화합물 1과 같은 일부 화합물은 더 높은 농도에서 검출되었지만, 맞춤형 유전독성 데이터베이스에서는 발견되지 않았습니다. 이러한 화합물의 경우, 화학식을 계산하였습니다.

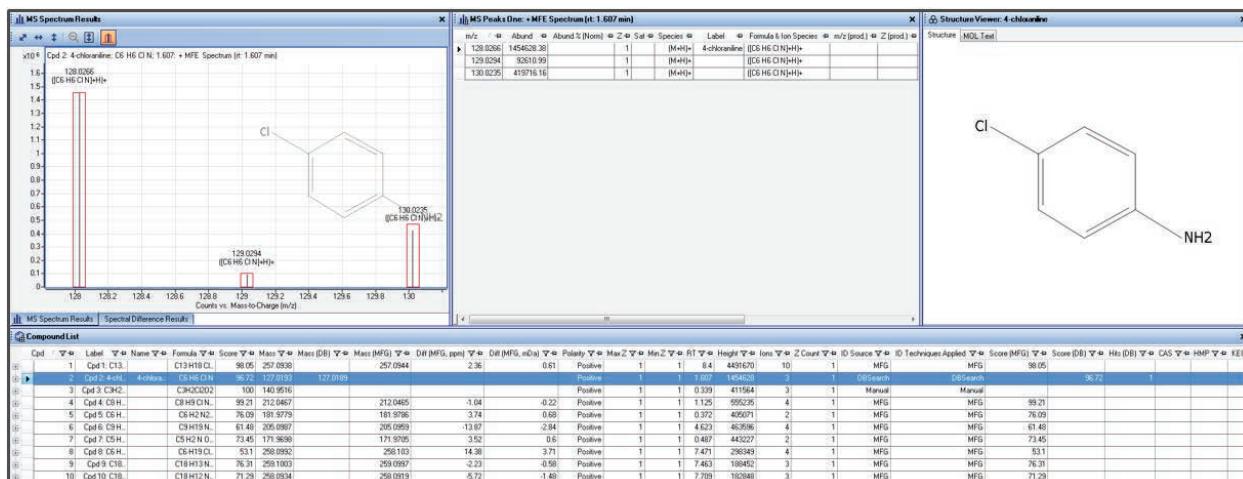


그림 4. 데이터베이스/라이브러리를 이용한 잠재적 유전독성 화합물의 식별

표 3. 시료군과 대조군 사이에서 유의미하게 증가한 화합물을 보여주는 차이 분석 특징 요약

MassProfiler 특징 요약									
ID	화학식	명칭	RT	질량	존재비	Q 점수	Log2(A1/A2)	발현	차이 점수
1	C ₁₃ H ₁₈ ClO ₃		8.4	257.0942	4664291	100	7.86	up	100
2	C ₆ H ₆ Cl N	4-chloroaniline	1.61	127.0192	1480334	100	6.51	up	100
3	C ₃ H ₂ Cl ₂ O ₂		0.34	140.9516	592521	100	3.89	up	99.9
4	C ₈ H ₉ CIN ₄ O		1.13	212.0464	551298	100	6.48	up	100
5	C ₆ H ₂ N ₂ O ₃ S		0.37	181.9781	543519	100	5.4	up	99.9
6	C ₉ H ₁₉ NS ₂		4.62	205.098	456724	100	16	up	100
7	C ₅ H ₂ NO ₄ S		0.49	171.9698	429576	100	4.89	up	100
8	C ₆ H ₁₉ CIN ₆ OS		7.47	258.1016	299708	100	5.68	up	100
9	C ₁₈ H ₁₃ NO		7.46	259.1006	186491	100	6.35	up	100
10	C ₁₈ H ₁₂ NO		7.71	258.0938	184274	100	16	up	100

잠재적 유전독성 화합물의 확인 및 정량

짧은 데이터 비의존적 수집(DIA: data-independent acquisition) 분석법을 통해 4-chloroaniline을 표적 확인하고 정량 하였습니다. 약물 시료의 DIA(All Ions MS/MS)에서, MS 및 MS/MS 정보가 모두 생성됩니다. 개인 화합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)의 MS/MS 스펙트럼에 있는 조각 이온을 사용하여 고에너지 채널로부터 이온 크로마토그램을 추출하였습니다. 저에너지 채널에서 추출한 전구체의 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 조각/생성 이온의 EIC와 정렬하여 동시 용리 점수를 구하였습니다(그림 5). 전구 이온 및 생성 이온의 accurate mass 조각 매칭 및 동시 용리를 근거로 4-chloroaniline을 확인하였습니다. 고에너지 MS 분석에서 조각을 선택한 라이브러리 MS/MS 스펙트럼 중 3개의 검증된 스펙트럼으로 4-Chloroaniline을 찾아냈습니다. 선택한 스펙트럼은 정량 분석법에서 검증 및 정량 이온으로 사용하였습니다.

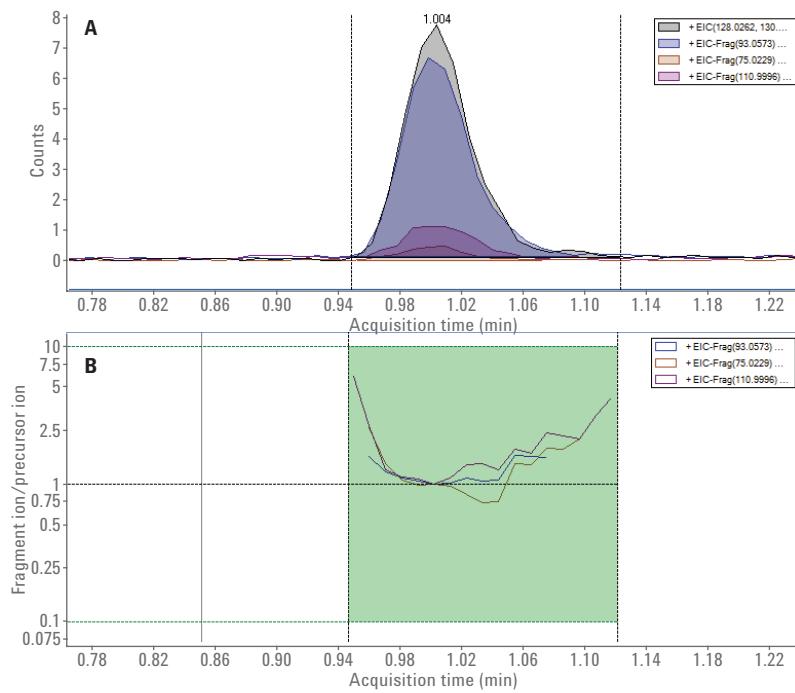


그림 5. 이온 크로마토그램에서 설정된 임계값을 초과하는 크로마토그래피 피크 내 추출 이온의 오버레이(A). 동시 용리 도표(B)는 피크 순도가 98% 이상임을 나타냄

화합물명, 머무름 시간, 전구체 이온, 조각 이온, 충돌 에너지 그리고 상대 존재비와 함께 검증 및 정량 조각 이온을 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어로 내보내기하여 그림 6과 같이 정량 분석법을 설정하였습니다. 가장 강한 세기의 이온을 정량 이온으로 사용하고, 세기가 덜 강하지만 독특한 조각 이온을 검증 이온으로 사용하였습니다.

0.1~300ng/mL 범위로 103배 이상의 검량선이 작성되었습니다(그림 7). 6545는 고감도 모드로 검량 및 튜닝하였습니다. 또한, 4-chloroaniline에 대한 일부 생성 이온의 질량이 작기 때문에 Swarm Autotune을 사용하여 낮은 질량(50~250m/z)을 위한 튜닝을 진행하였습니다. 시료 분석 결과는 분해 시료에서 29ng/mL의 평균값을 나타냈습니다. 잠재적 유전독성

화합물은 일반적으로 0.05%의 농도가 보고의 기준입니다. 1mg chlorhexidine을 10mL 용액에 용해할 경우 0.05% 한계 기준을 적용하면 최하 50ng/mL까지 정량 해야할 필요가 있습니다. 따라서 어떠한 분석에서도 낮은 LOQ를 얻을 수 있어야 합니다. 본 연구에서 개발한 분석법은 1ng/mL 미만의 농도로 존재하는 불순물을 검출할 수 있습니다.

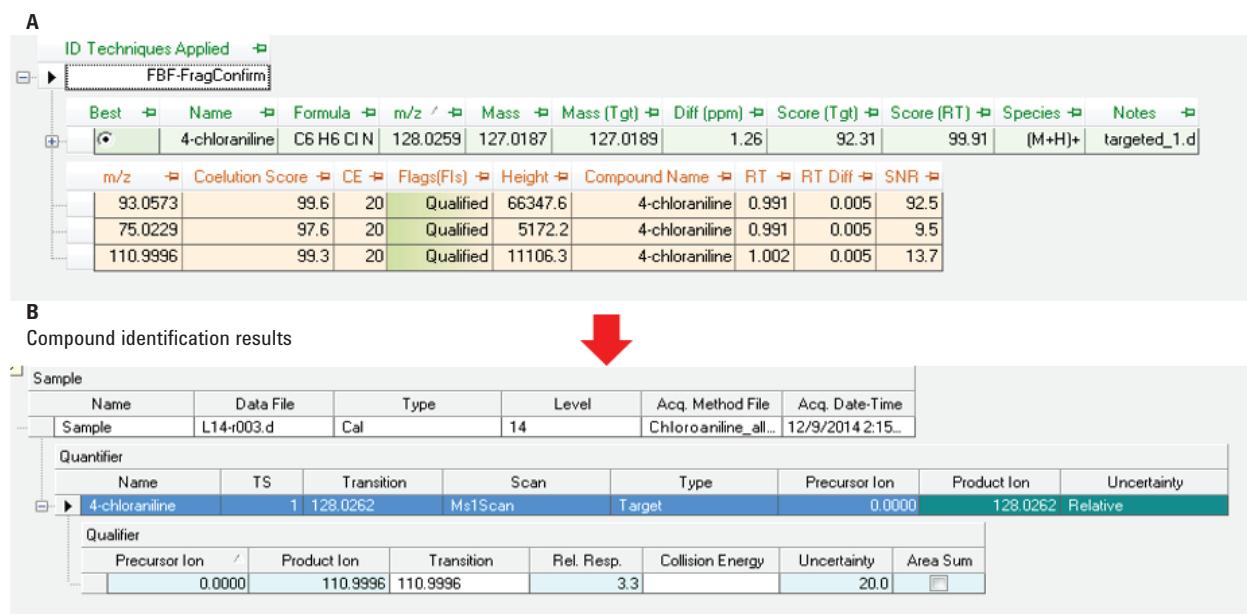


그림 6. 화합물 식별 결과를 이용한 정량 분석법 설정. (A)정성 분석 소프트웨어 스크린샷, (B)분석법 생성 예시

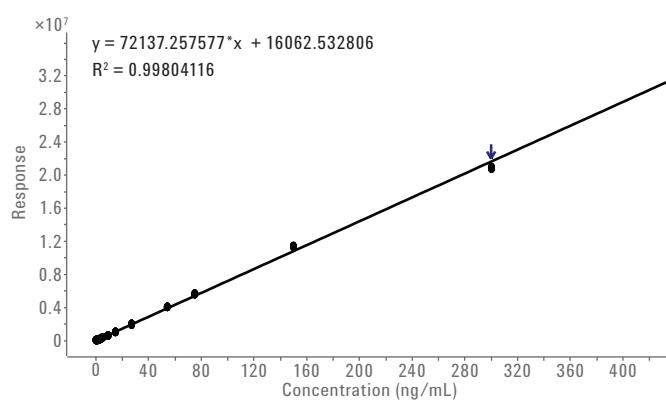


그림 7. All Ions MS/MS로 계산한 4-chloroaniline의 검량선

결론

이 응용 자료는 고분해능 LC/MS를 사용하여 잠재적 유전독성 화합물을 스크리닝, 식별, 정량할 수 있음을 보여줍니다. All Ions MS/MS 데이터를 Agilent MassHunter Mass Profiler 소프트웨어(Rev. 7.0)와 결합하여 효율적인 워크플로가 이루어졌습니다. 자동화된 차이 마커 분석을 통해 시료군과 대조군 사이의 유의한 차이가 있음이 밝혀졌습니다. 또한 PCDL를 사용하여 잠재적 유전독성 불순물을 표적 화합물로 자동 검출 및 식별하는 과정을 워크플로에 포함하였습니다. 검증 이온과 정량 이온을 생성하는 데에는 All Ions MS/MS 분석법을 사용하였으며, 이를 통해 표적 화합물을 정량 할 수 있었습니다. 이 기술로 처리한 분석 시료는 29ng/mL 또는 0.02% 농도의 4-chloraniline(0.1~300ng/mL의 선형 분석 범위)으로 측정되었습니다. 이 워크플로를 잠재적 유전독성 화합물의 식별 및 보고를 위한 일상적인 약물 시료 분석의 일부로 사용할 수 있습니다.

참고 문헌

1. EMA Guidance on the limits of genotoxic impurities, EMEA/CHMP/QWP/251344/2006
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
2015년 11월 1일 한국에서 발행
5991-6378KO

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



Agilent Technologies