

추출물 및 침출물(E&L) 스크리닝 시험에서의 차이 분석

Agilent 7200 GC/Q-TOF 시스템과 데이터 마이닝
소프트웨어 사용

응용 자료

제약산업

저자

Syed Salman Lateef,
Upendra Simha, Andreas Tei
Agilent Technologies, Inc.

개요

추출물 및 침출물(E&L)의 분석에 있어 데이터 해석과 화합물 식별은 중요한 과제입니다. 대조군 및 시료 데이터의 해석은 대개 수동으로 행해지며, 많은 시간이 소모될 수 있습니다. 소프트웨어 기반 데이터 해석은 이러한 문제를 크게 완화합니다. Mass Profiler Professional(MPP)는 계량분석화학(Chemometrics) 소프트웨어로서 차이 분석을 수행하여 시료 내 화합물의 분포를 간편히 시각화할 수 있는 수단을 제공합니다.

전자 이온화(EI)를 활용한 GC/MS로 E&L 화합물을 분석하는 과정에서 화합물을 식별하기 위해서는 어느 정도의 전문 지식이 필요합니다. EI를 활용한 분석에서는 보통 뚜렷한 분자 이온을 포함하지 않은 질량 스펙트럼 결과를 얻기 때문에, 그 식별은 특징적인 조각화 패턴(fragmentation pattern)과의 매칭 정도에 달려 있습니다. E&L 실험에서, 화합물이 낮은 농도로 존재하거나 강한 화학적 백그라운드 노이즈의 간섭을 받을 경우 조각화 매칭 점수는 상당히 낮을 수 있습니다. 그래서 모든 화합물을 단순하게 조각화 패턴만으로 명확히 식별할 수 있는 것은 아닙니다. 본 연구에서는 accurate mass 고분해능 Agilent 7200 GC/Q-TOF 시스템의 EI 및 화학 이온화(CI) 두가지 모드에서 안과약품(ODP)과 그 용기 및 포장(CCS)을 분석하였습니다.

MPP 소프트웨어는 화합물 분포를 설명하고 데이터 해석을 돕기 위해 사용하였습니다. CI 모드는 분자 피크(또는 그 이온 부가물)의 accurate mass에 기반한 화합물 식별을 지원합니다. 또한 데이터베이스가 갖추어져 있을 경우, CI는 EI에 의해 검출된 화합물 식별을 확인하는 데에도 사용하여 추가로 화합물을 검출할 수 있습니다.



Agilent Technologies

소개

추출물(Extractables)이란 과도한 시간 및 온도 조건에서 적절한 용매에 노출될 경우 제품으로부터 스며 나오는 화합물입니다. 침출물(Leachables)이란 보통 추출물(Extractables)의 일종으로, 정상적인 공정 조건이나 가속 보관 조건에서 포장재에 직접 접촉하여 약물 제형으로 스며 드는 화합물입니다¹. 침출물은 일반적으로 추출물 연구 결과를 사용하여 표적 방식으로 확인합니다. 하지만 비표적 침출물 연구를 수행하는 것은 유리합니다. 비표적 침출물 연구를 통해 stress 조건 하에서 약물 제형과 용기 및 포장 간 상호작용으로 형성되는 새로운 침출물을 검출할 수 있기 때문입니다.

추출물, 침출물 및 그 대조군의 화합물 분포를 겹쳐 보면, 이를 기초로 화합물의 근원을 이해하는 데 도움이 됩니다. 이 방법에서 수동으로 데이터를 해석하는 것은 매우 지루한 작업이기 때문에, 계량분석화학 소프트웨어인 Mass Profiler Professional(MPP)을 활용하면 바탕용액 차감을 기초로 차이 분석을 가능케 하며, 시료들 간의 유의한 차이를 시각화하는 데 도움을 줍니다. 관심 화합물의 농도가 대조군보다 높을 경우 MPP의 배율 변화 차이 분석을 사용하여 존재하는 화합물로 간주할 수 있습니다.

추출 및 침출(E&L) 화합물은 잠재적으로 약물 제형을 오염시킬 수 있기 때문에, 이러한 화합물의 정확한 식별이 필요합니다. 화합물 식별 워크플로는 전자 이온화(EI) 모드²에서 얻은 데이터를 크로마토그래피 deconvolution한 뒤 라이브러리 검색으로 이어집니다. 스펙트럼 매칭 정도는 라이브러리 매칭 점수로 나타납니다. E&L 화합물의 다양성으로 인해 다수 화합물들이 유사한 조각화

패턴을 가질 수 있기 때문에, 이들의 명확한 식별을 어렵게 합니다. 그래서 대부분의 경우 정확하게 화합물을 식별하려면 전문 지식이 요구됩니다. 하지만, 고분해능 accurate mass 화학 이온화(CI)를 EI와 조합해 사용하면 분자 중의 선정을 상당히 단순화할 수 있게 됩니다. EI 스펙트럼은 분명한 분자 이온을 제공하지 못할 수 있으나, CI 스펙트럼은 이러한 분자 이온 신호를 포함할 수 있습니다. 분자 이온 신호와 accurate mass 정보와 결합하면 화학식을 얻는 데 도움이 되어 화합물의 확인을 지원합니다. Pan, C.; et al.³은 EI와 CI 모드를 활용하여 액체 제형 내의 미지 침출물을 식별해냈습니다. 또한 이러한 접근법을 통해 부드러운 이온화(CI 같은)에서 더 잘 검출되는 새로운 화합물을 맞춤형 데이터베이스의 도움으로 검출하였습니다. 여기서 맞춤형

데이터베이스는 CI 데이터를 마이닝하여 E&L의 식별 범위를 늘리는 데 사용하였습니다.

본 연구에서는 accurate mass 고분해능 Agilent 7200 GC/Q-TOF 시스템을 이용하여 안과 약품(ODP) 유래의 준휘발성 추출물 및 침출물을 분석하였습니다. 그림 1은 본 연구에 사용된 워크플로를 보여줍니다. GC/Q-TOF 시스템은 EI 및 CI 두 모드에서 작동하였습니다. EI 스펙트럼은 deconvolution 후 NIST 라이브러리 검색을 통해 매칭하였습니다. EI 모드에서 잠정적으로 식별된 화합물을 확인하기 위해 EI 스펙트럼으로 맞춤 제작된 표적 데이터베이스에서 accurate mass CI 스펙트럼을 검색하였습니다. 고분해능 accurate mass CI/MS/MS는 잠재적 화합물의 구조 규명에 사용하였습니다.

워크플로

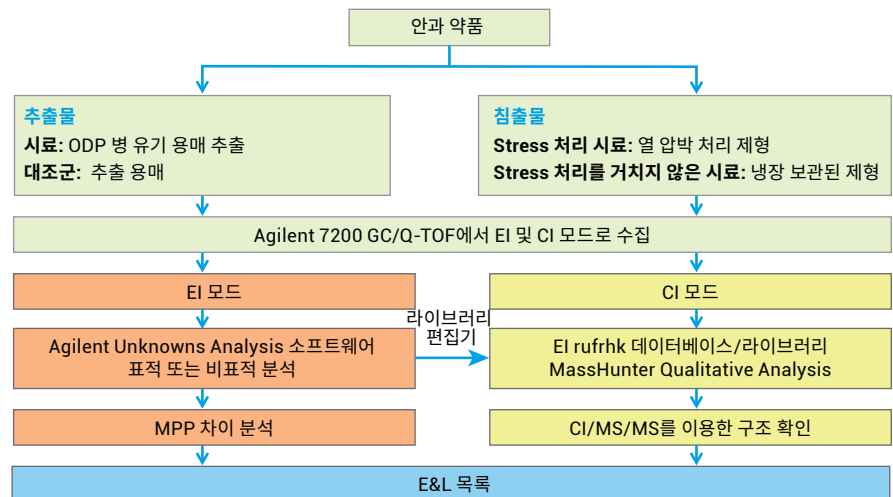


그림 1. 고분해능 accurate mass Agilent 7200 GC/Q-TOF를 이용하여 준휘발성 화합물의 분석을 위한 추출물 및 침출물 워크플로

실험

재료

HPLC grade *n*-hexane(99%)은 RCI Labscan(태국)에서 구입하였습니다.

침출물 연구를 위한 시료 전처리

안과 약품(5mL)은 지역 약국에서 구입하였습니다. 침출물 연구에는 안과 약품 제형과 그 용기 및 포장을 사용하였습니다. 시료 전처리는 Jenke; *et al.*⁴의 방법을 적용하였습니다. 제형 5mL를 용기 및 포장에 담긴 상태로 60°C에서 24시간 동안 가열해 stress 처리한 침출물 시료를 제조하였습니다. Stress 처리를 거치지 않은 침출물 시료는 제조업체 권장 조건에서 보관된 약물 제형이었습니다. Stress 처리를 거쳤거나 거치지 않은 제형 모두 3배 부피의 *n*-hexane으로 액-액 추출법을 이용해 *n*-hexane에서 2회 반복 추출하였습니다. 그런 다음 *n*-hexane 용매를 건조시키고 5mL가 되게 *n*-hexane에 재용해시킵니다. 본 실험에서 사용된 모든 유리기구는 헥산에 하룻밤 동안 담궈 세정하였습니다.

추출물 실험을 위한 시료 전처리

본 추출물 실험에는 빈 ODP 병(침출물 실험의 경우와 동일 제형의)을 사용하였습니다. 추출물 실험에서는 잘 헹군 용기 및 포장에 *n*-hexane 5mL를 추가하고 1.5시간 동안 초음파 처리하였습니다. 초음파 처리 후 용매를 분석에 사용하였습니다. 추출 용매 *n*-hexane을 대조군/바탕용액으로 사용하였습니다.

데이터 수집 및 처리

EI와 CI 분석 모두에서, 모든 시료에 내부 표준물질 triphenyl phosphate(1ppm)를 첨가하였습니다. 데이터 수집 및 처리에는 다음의 애질런트 소프트웨어를 사용하였습니다.

- Agilent MassHunter Acquisition 소프트웨어 (B.07.02)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어, 개인 복합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL Manager) Standalone 툴(B.07.00) 포함
- Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어, Library Editor 및 Unknown Analysis standalone 툴(B.07.01) 포함
- Agilent Mass Profiler Professional 소프트웨어 (Ver. 13.1)

EI 데이터 분석

데이터 파일은 스펙트럼의 deconvolution을 위해 Agilent MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어를 사용해 처리하고, NIST14 라이브러리에서 검색하여 매칭정도를 확인하였습니다. 매칭 점수가 80 이상인 화합물 선정에 사용하였습니다.

Accurate mass EI 라이브러리 생성

매칭 점수가 80 이상인 EI 검색 결과를 정렬하여 Library Editor 소프트웨어로 전송하였습니다. 라이브러리(.xml 포맷)는 명칭, 화학식, 머무름 시간(RT) 및 스펙트럼과 같은 화합물 정보를 포함하였습니다.

MPP 분석

EI 데이터는 Unknowns Analysis 소프트웨어의 재처리를 거쳐 deconvolution 된 후 accurate mass EI .xml 라이브러리로 스펙트럼 및 머무름 시간의 매칭 분석을 수행하였습니다. 이 단계는 MPP 소프트웨어로 전송할 결과를 필터링하는 데 도움이 되었습니다. 각 시료 내 화합물의 강도를 내부 표준물질(triphenyl phosphate)의 강도로 정규화하였습니다. 2배 강도 배율 변화에 기반하여, 모든 시료에서 바탕용액(*n*-hexane)에 존재하는 화합물들을 제거하였습니다.

반정량 추정

Jenke; *et al.*⁵에 의해 설명된 절차에 따라 triphenyl phosphate 상대 감응을 활용하여 침출물의 양을 추정하였습니다.

E&L PCD(개인 화합물 데이터베이스)

추출물 및 침출물에 대해 발표한 문헌으로 구성된 맞춤형 데이터베이스를 생성하였습니다. 데이터베이스 항목은 화학식, accurate mass 및 CAS ID로 구성되었습니다.

CI 데이터 분석

CI 데이터는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어의 Find by Formula 알고리즘으로 처리하였으며, 알고리즘은 가능한 부가물로 $[M+H]^+$, $[M+C_2H_5]^+$ 및 $[M+C_3H_7]^+$ 를 포함하였습니다. EI .xml 라이브러리는 분자식 데이터베이스로 사용되었습니다. CI 데이터는 E&L PCD를 사용하여 다른 추출물도 검색하였습니다.

CI/MS/MS를 이용한 구조 규명

CI/MS/MS 데이터 파일은 MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어의 Find by Targeted MS/MS 기능으로 처리하였습니다. ACD 소프트웨어(ACD Labs, Toronto)를 이용해 조각 구조를 그렸습니다.

기기 파라미터

표 1은 본 분석에서 사용된 기기 파라미터를 보여줍니다.

표 1. 본 실험에서 사용된 Agilent 7200 GC/Q-TOF 기기 파라미터

파라미터	값
GC	
기기	Agilent 7890A GC
주입 포트	Multimode 주입구(MMI)
모드	비분할
Septum purge 유량	3mL/분
주입 프로그램	600°C/분에서 70°C(0.2분) ~ 325°C(7분)
라이너	Ultra Inert Splitless, single taper, glass wool(p/n 5190-3163)
운반 가스	헬륨
유량	1.3mL/분 (일정함)
분할 배출구로 퍼지 흐름	60mL/분에서 2.73분
Gas saver	20mL/분에서 3분
오븐 프로그램	50°C (3분) ~ 320°C (7분) at 6°C/분 평형 시간: 1분 분석 시간: 55분
컬럼	Agilent DB-5ms, 30m × 250µm, 0.25µm(p/n 122-5532)
주입량	2µL
MS	
기기	Agilent 7200 GC/Q-TOF
튜닝	자동
이송 라인	280°C
MS 소스(EI 및 CI)	300°C
MS Quad	175°C
질량 범위	55 - 700 amu
수집 속도	5.00 스펙트럼/초
전자 이온화	
EI 방출 전류	35µA
EI 전자 에너지	70eV
화학 이온화	
CI 방출 전류	240µA
CI 가스 유량	20% EPC
CI 전자 에너지	115eV
모드	양이온
CI 반응 가스	Methane
충돌 셀 EPC	질소, 1.5mL/분

결과 및 토의

추출물 및 침출물(E&L) 시료는 EI 및 CI 모드 모두를 통해 수집하였습니다. CI 결과에 근거하여 CI/MS/MS 실험을 별도로 수행하였습니다.

EI 모드 GC/Q-TOF 분석

수집된 EI 데이터는 Unknowns Analysis 툴을 이용해 크로마토그래피 deconvolution을 수행한 후 라이브러리 매칭을 진행하였습니다. 이 소프트웨어로 화합물의 높이에 기반한 필터링을 수행할 수도 있으나, 본 연구에서는 해당 필터링은 적용하지 않았습니다. 침출물 실험과 비교해 추출물 시료에서 많은 화합물이 식별되었습니다. 그 이유는 준휘발성

유기화합물이 수용성인 약물 제형보다 플라스틱 용기에서 더 많이 검출되었기 때문입니다. 예를 들어, 폴리머 포장재에 사용되는 추출물인 benzene 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)이 머무름 시간 15.1분에서 식별되었습니다(그림 2). Deconvolution된 이 성분의 추출 이온 크로마토그램(EIC)은 동시 용리되고 동일한 피크 모양을 가진 반면(그림 2c), 그 EI 스펙트럼은 단위 질량 (NIST) 라이브러리 검색에서 88 이상의 매칭 점수를 나타냈습니다(그림 2D).

A 성분 식별 결과

Component RT	Compound Name	Match Factor	Formula	CAS#
14.7161	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl undecyl es...	85.5	C19H40O3S	1000309-19-4
14.7667	(Z)-(Z)-Hex-3-en-1-yl 2-methylbut-2-eno...	88.7	C11H18O2	84060-80-0
14.8453	Cyclopentane, decyl-	85.7	C15H30	1795-21-7
14.9045	Nonane, 4,5-dimethyl-	86.7	C11H24	17302-23-7
15.0335	Decane, 3-ethyl-3-methyl-	87.2	C13H28	17312-66-2
15.1635	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	88.5	C14H22	1014-60-4
15.3683	Heneicosane	88.8	C21H44	629-94-7
15.5985	2-Bromo dodecane	84.3	C12H25Br	13187-99-0
15.7453	Dodecane, 4,6-dimethyl-	86.6	C14H30	61141-72-8
15.9094	5-Methoxindane	84.5	C10H12O	1000342-73-8

B 추출 이온 크로마토그램(EIC)

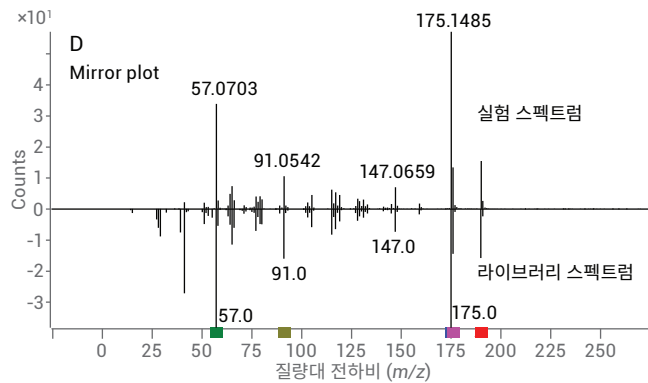
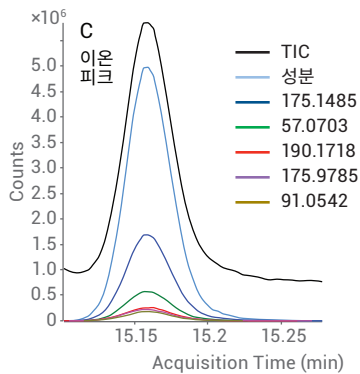
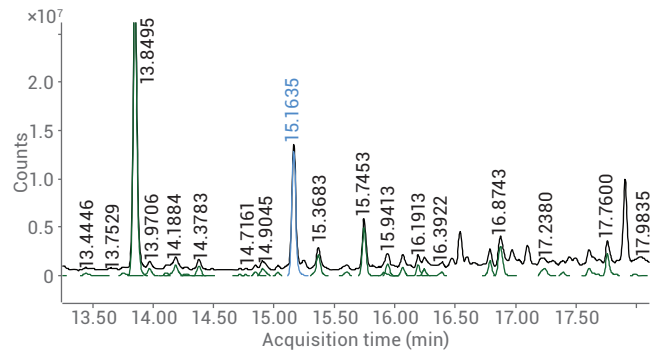


그림 2. Unknown Analysis 소프트웨어는 deconvolution 및 NIST 라이브러리 검색을 통해 benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)을 식별한 성분 목록 (A), deconvolution 된 성분 크로마토그램(B), 개별 성분의 EIC 오버레이(C), 그리고 deconvolution 된 성분 스펙트럼과 라이브러리 결과의 mirror plot(D)

데이터 해석 및 차이 분석

라이브러리 매칭 점수가 80 이상인 화합물은 추가적인 처리를 위해 MPP 소프트웨어에 CEF 파일로 전송하였습니다. 이 단계에서는 정규화, 배율 변화 기반의 바탕용액 차감 및 시각화를 포함하였습니다. 정규화 단계는 각 시료에 첨가된 내부 표준물질의 강도에 따라 모든 화합물의 강도를 정규화 하는 것입니다. 이 정규화는 시료들 간 개별 화합물의 강도 차이를 설명하는 데 도움이 됩니다. 정규화 후, 데이터를 *n*-hexane 바탕시료에서 발견되는 화합물들을 차감하도록 처리하였습니다. 바탕 용매에도 첨가제 및 추출물이 존재할 수 있기 때문에, 단지 바탕용액 차감만으로 시료에서 화합물들을 무심코 제거할 수도 있습니다. 그러므로 차감 테크닉에 배율 변화 분석을 적용하는 것이 중요합니다. 배율 변화 분석에서,

바탕시료와 비교할 때 강도가 2배 이상 증가한 화합물은 차이가 있는 것으로 간주하고 보류하였습니다.

MPP 데이터 해석 및 관련 벤 다이어그램은 여러 시료들 간의 화합물 분포를 시각화 합니다. 그림 3은 stress 처리한 침출물 시료를 추출물과 비교 (3A), 그리고 stress 처리를 거치지 않은 침출물과 비교(3B)한 벤 다이어그램을 보여줍니다. Stress 처리 침출물과 추출물 시료를 비교한 결과 8종의 공통 화합물을 식별하였습니다.

데이터 분석 결과, stress 처리 침출물 시료와 stress 처리를 거치지 않은 침출물 시료(그림 3B)가 15종의 공통 화합물을 함유하고, 그리고 stress 처리 시료에서 독특하게 16종의 화합물을 발견한 것으로 나타났습니다. 공통 화합물은 열 압박 후 시료에 남아

있었습니다. 이 비교 결과를 근거로, stress 처리를 거치지 않은 시료에서 독특하게 발견된 4종의 화합물은 열 압박 조건 하에서 분해되는 것으로 보입니다.

15종의 공통 화합물 중 추출물에서 유래된 것이 있는지를 알아 보기 위해, 중첩도를 작성했습니다(그림 3C). 결과에 따르면, stress 처리를 거치지 않은 침출물 시료에 존재하는 15종의 화합물 중 6종이 용기에서 유래되었음을 보여줍니다. 그 중 benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)은 stress 처리를 가하지 않은 조건에서도 침출되었습니다. (E)-3-Eicosene은 제형에 존재하는 비극성 알케인이며, 열 압박의 영향을 받지 않으나 추출물로서 유래한 것은 아닙니다. 결과를 시각화하는 벤 다이어그램을 사용하면 E&L 결과의 이해 및 이들의 가능한 근원 결정에 도움이 됩니다.

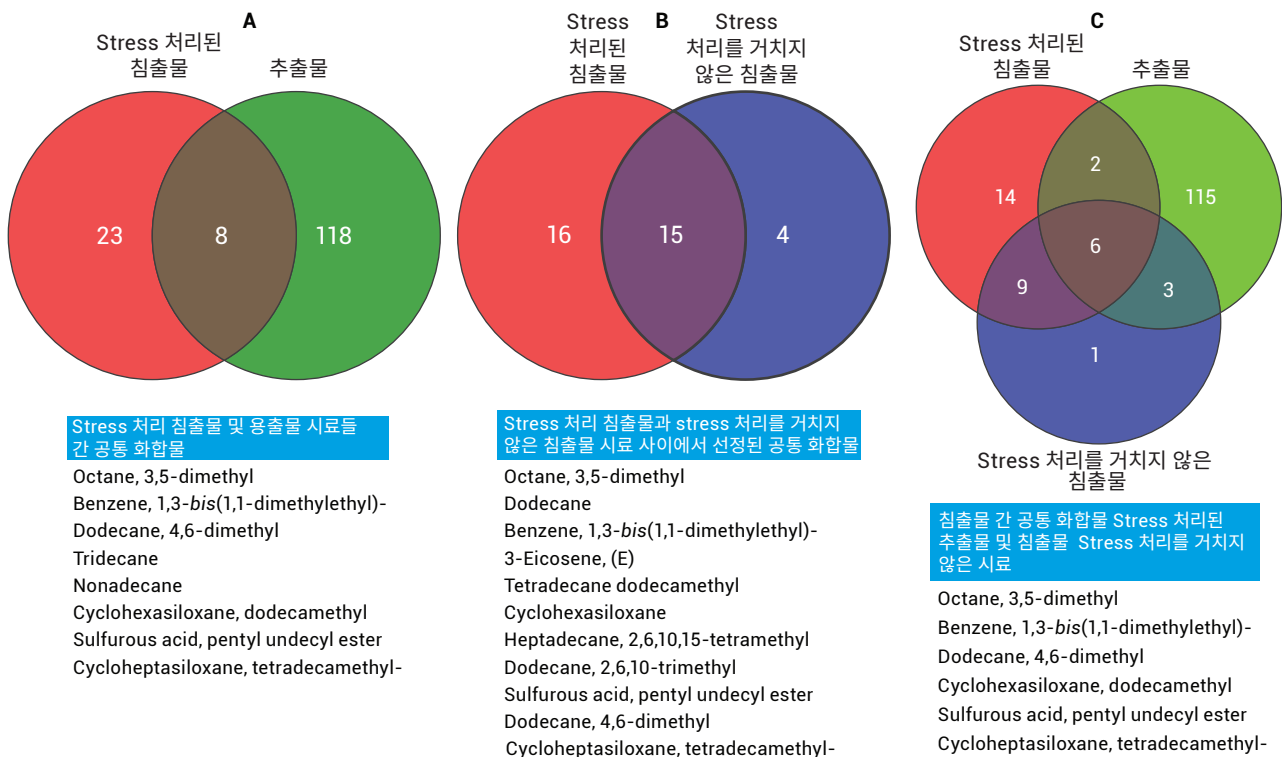


그림 3. Stress 처리 침출물과 추출물 (A), stress 처리 침출물과 stress 처리를 거치지 않은 침출물(B), 그리고 stress 처리 침출물, 추출물, stress 처리를 거치지 않은 침출물 세 가지 시료 모두에서 중첩되는 화합물을 보여주는 MPP 벤 다이어그램. 아래의 각 중첩 결과 표는 비교된 시료들 간 공통으로 선정된 화합물 목록을 보여줌

안과약품 제형 내 침출물의 반정량 추정

침출물의 반정량 추정은 Jenke; et al.⁵에 의해 앞서 기술된 것과 같이 내부 표준물질로 triphenyl phosphate를 사용해 측정되었습니다. 분석 평가 임계값(AET)은 이 값을 넘게 되는 경우 화학자가 독성 평가 필요성을 보고해야 하는 임계값입니다. 최신 PQRI(Product Quality Research Institute) 실무그룹 보고서에 따르면⁶, ODP의 AET는 농도(ppm)에 기초하여 계속 보고됩니다. 침출물의 농도가 1ppm을 초과하면 이를 보고하고, 10ppm을 초과하면 화합물을 식별하고, 20ppm을 초과하면 위험 평가를 진행합니다. Stress 처리 침출물 시료의 반정량 결과는 표 2에 나와 있습니다. 4종의 화합물이 20ppm 기준을 초과하는 것으로 발견되어, 안전성 평가 시험이 필요할 것입니다.

CI 소스로 검출된 추출물 및 침출물의 확인 및 추가 범위

유사한 조각화 패턴을 가진 화합물은 종종 라이브러리 매칭 점수에 차이가 거의 없어 동일한 라이브러리 결과를 나타냅니다. 최선의 방법은 라이브러리 매칭 점수가 가장 큰 화합물을 선택하는 것입니다. 여기에 티에 의해 식별된 화합물의 (전부는 아니더라도) 일부를 확인하기 위해 대안으로 CI를 수행하였습니다. 티 모드 결과로부터 생성된 맞춤형 데이터베이스에서 CI 데이터를 검색하였습니다. 표 3은 추출물에서 발견되고 CI 모드에서도 확인된 티 화합물의 목록을 보여줍니다. 예를 들어, stress 처리된 침출물, stress 처리를 거치지 않은 침출물과 추출물에서 공통으로 존재하는 benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl) (C₁₄H₂₂)의 라이브러리 매칭 점수는 88이었습니다. 다른 화합물 Benzo[c]furanone, 3,3,4,7-tetramethyl (C₁₂H₁₄O₂)과 2,3,4,5,6-pentamethyl acetophenone(C₃H₁₈O)은 각각 78과 77인 유사한 점수값으로 실험 스펙트럼과 일치하였습니다. CI 검출 결과는, 질량 정확도 2ppm으로 benzene,1,3-bis(1,1-dimethylethyl)의 존재를 사용하였으며, 티 결과를 증명하였습니다.

표 2. Stress 처리 침출물 및 추출물 시료들 간 공통 화합물의 반정량 추정*

Stress 처리된 침출물 시료	반정량 추정(ppm)*
Octane, 3,5-dimethyl	3
Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	132
Dodecane, 4,6-dimethyl	7
Tridecane	12
Nonadecane	8
Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	80
Sulfurous acid, pentyl undecyl ester	39
Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	22

*정량값은 최대 4배까지 차이가 있을 수 있음⁵

표 3. CI 모드 결과를 보여주는 추출물 및 침출물 목록. 티 모드에서 검출된 화합물 입증

화합물	질량	공식	질량 오차 (ppm)
추출물			
Naphthalene	128.0626	C ₁₀ H ₈	1.8
10,18-Bisnorabieta-8,11,13-triene	242.2026	C ₁₈ H ₂₆	1.2
Benzene, (1-butylheptyl)-	232.2190	C ₁₇ H ₂₈	2.8
Benzene, (1-butylhexyl)-	218.2030	C ₁₆ H ₂₆	1.8
Benzene, (1-butylloctyl)-	246.2350	C ₁₈ H ₃₀	4.8
Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	190.1720	C ₁₄ H ₂₂	2.0
Benzene, 1,3-dichloro-	145.9690	C ₆ H ₄ Cl ₂	0.4
Biphenyl	154.0780	C ₁₂ H ₁₀	0.4
Cyclopentane, decyl-	210.2350	C ₁₅ H ₃₀	1.1
Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	222.0560	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	0.7
Methyl salicylate	152.0470	C ₈ H ₈ O ₃	1.9
Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1-phenyl	208.1250	C ₁₆ H ₁₆	1.1
Naphthalene, 2-methyl-	142.0780	C ₁₁ H ₁₀	0.1
Stigmasta-3,5-diene	396.3760	C ₂₉ H ₄₈	0.1
침출물			
3-Carene	136.1250	C ₁₀ H ₁₆	4.2
3-Hexanone	100.0890	C ₆ H ₁₂ O	2.1
Benzoic acid, 2-benzoyl-, methyl ester (o-methylbenzyl benzoate)	240.0790	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	0.7
9H-Thioxanthen-9-one, 2-(1-methylethyl)	254.0770	C ₁₆ H ₁₄ OS	0.8

CI E&L 데이터는 문헌 보고된 E&L 화합물을 포함하는 맞춤형 PCD 데이터베이스를 사용해 처리하였습니다. 결과는 평균 질량 정확도 3.0ppm 미만으로 추가 E&L이 검출된 것을 보여줍니다(표 4). 눈 자극제인 benzoic acid, 4-ethoxy-, ethyl ester (ethyl 4-ethoxybenzoate) 또한 질량 정확도 1.7ppm으로 침출물 성분으로서 검출되었습니다.

표 4. CI GC/MS에 의해 식별된 추가 E&L 화합물

화합물	질량	질량 오차 (ppm)
추출물		
1-Decene	140.1565	5.5
1-Heptene	98.1096	5.1
1-Octene	112.1252	5.0
1-tetradecanamine	213.2457	5.8
2,4-Diethyl-9H-thioxanthen-9-one	268.0922	2.9
2-Naphthol	144.0575	3.9
2-Nonenal, 2-pentyl-	210.1984	5.1
4,7-Methano-1H-indene, 3a,4,7,7a-tetrahydro-	132.0939	1.2
4-Phenylbenzophenone	258.1045	4.1
9H-Fluorene	166.0783	5.5
Acenaphthylene	152.0626	3.1
Benz[e]acephenanthrylene	252.0939	3.6
Benzaldehyde	106.0419	4.4
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	166.0630	2.5
Ethylbenzoyl-formate	178.0630	2.0
Squalene	410.3913	0.9
Xylene; <i>o</i> -xylene	106.0783	4.8
침출물		
Benzenamine, 2,4-dimethyl	121.0892	3.6
4-Methylbenzophenone	196.0888	0.1
3-Penten-2-one, 4-methyl-	98.0732	0.1
2-Hexanone	100.0888	0.9
Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate; propyl paraben	180.0786	1.0
Naphthalene, 2,6-bis(1-methylethyl)-	212.1565	1.4
Benzenemethanol	108.0575	1.4
Cyclopentasiloxane, 2,2,4,4,6,6,8,8,10,10-decamethyl	370.0940	1.7
Benzoic acid, 4-ethoxy-, ethyl ester	194.0943	1.7
Phenol, nonyl-BHT	220.1827	2.1
2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	96.0575	2.3
Octadecanoic acid, 9,10-dihydroxy-, methyl ester	330.2770	2.4
Dihydromethylfuranone	98.0368	3.9
2-Ethylanthraquinone	236.0837	4.2
2,3-Pentanedione, 4-methyl-	114.0681	4.2

CI/MS/MS를 이용한 구조 확인

Accurate mass CI/MS/MS를 잠정적으로 식별된 미지 화합물의 구조를 확인하고 규명하는 데 사용하였습니다. 한 예로, 식별 결과를 확인하기 위해 CI 모드 분석으로 검출된 자극제인 benzoic acid, 4-ethoxyethyl ester (ethyl 4-ethoxybenzoate)

를 CI/MS/MS로 분석하였습니다. Accurate mass 데이터는 분자 이온 및 모든 관련된 조각 이온의 실험식을 정하는 데 도움이 되었습니다. 그림 4는 ethyl 4-thoxybenzoate의 CI/MS/MS 분석을 m/z 195.1016의 조각 이온에 할당된 구조와 함께 보여주고 있습니다. 또 다른 예에서, decylcyclopentane의

EI 스펙트럼은 210의 분자 피크를 얻지 못했습니다(그림 5A). CI 및 CI/MS/MS의 사용으로, decylcyclopentane의 정체를 확인하였습니다(그림 5B 및 5C). CI/MS/MS 스펙트럼은 또한 추가 시료의 자동 식별을 위한 맞춤형 라이브러리에도 저장할 수 있습니다.

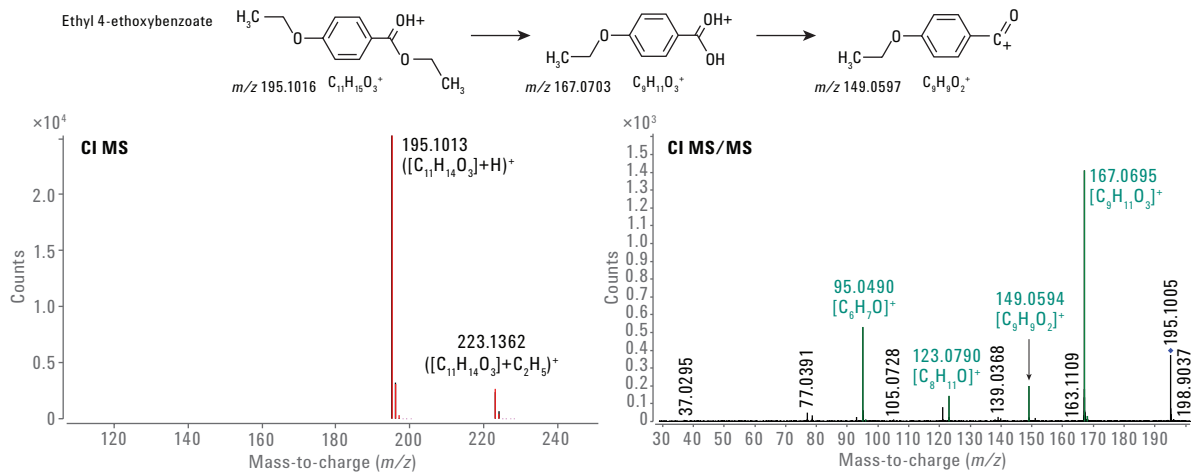


그림 4. Ethyl 4-ethoxybenzoate의 구조 확인

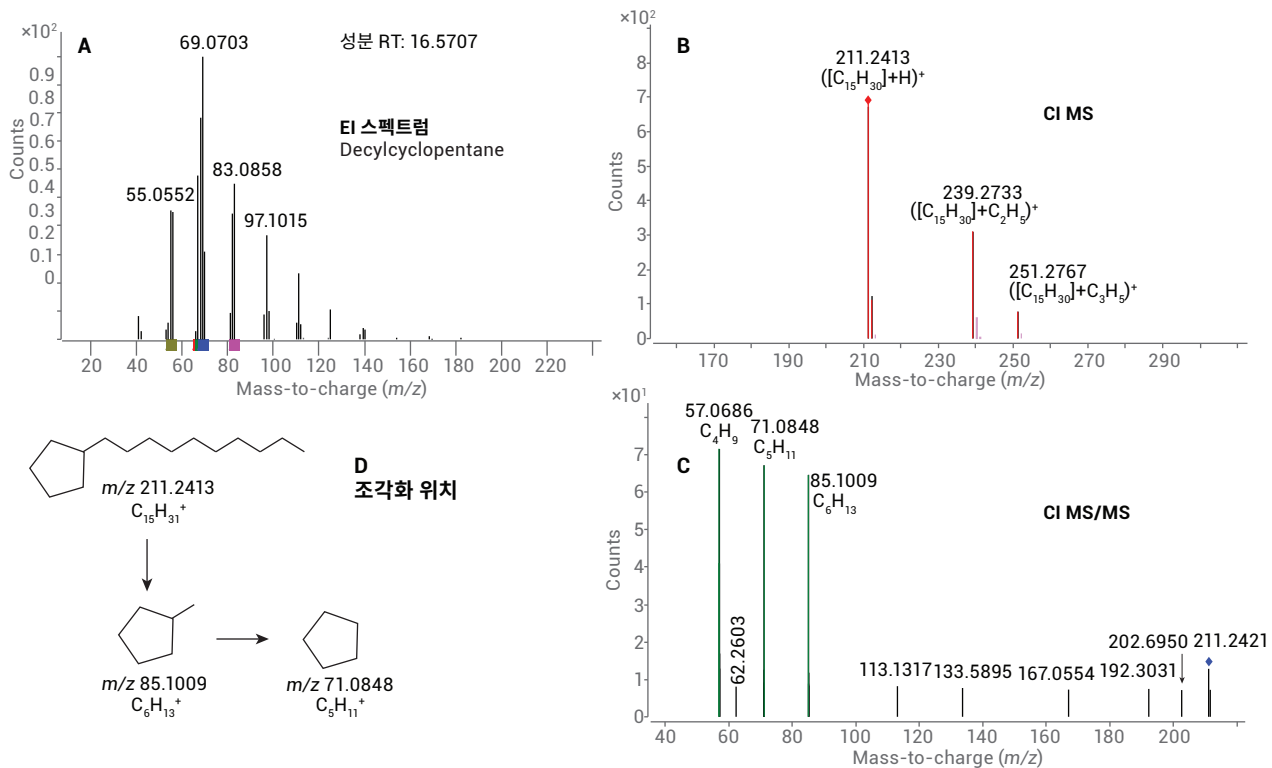


그림 5. Decylcyclopentane의 구조 확인 Decylcyclopentane의 EI 스펙트럼(A), CI MS 스펙트럼(B), CI MS/MS 스펙트럼(C), 그리고 제안된 조각화 경로(D)

결론

Agilent 7200 GC/Q-TOF를 이용하여 안과 약품(ODP) 내의 E&L 화합물에 대해 고분해능 accurate mass 정성 스크리닝 및 식별을 수행하였습니다. E&L 화합물 분석에서 얻은 CI 데이터는 화합물 식별에 도움이 되도록 NIST 14.0 라이브러리와 매칭하였습니다. 시료 세트의 차이 분석을 가능케 하는 Agilent Mass Profiler Professional 소프트웨어의 사용을 통해 데이터 처리 및 해석이 용이해졌습니다. 벤 다이어그램은 시료 그룹들 간 독특한 화합물 및 공통 화합물을 결정하는 데 사용하였습니다. 반정량 분석 결과는 4가지 화합물의 농도가 염려스러운 정도임을 보여 주었습니다. 이들 화합물에 대해서는 추가적인 정량 및 안전성 평가 테스트가 요구됩니다. 실험 및 문헌 데이터를 통합시킨 맞춤형 데이터베이스를 만들어 CI 데이터 검색에 사용하였습니다. Accurate mass CI 데이터는 잠정적 매칭 결과를 확인하고 식별된 화합물 목록을 확장하는 데 도움을 주었습니다. 데이터베이스 및 라이브러리 생성의 유효성과 CI 및 accurate mass 데이터를 제공하는 CI/MS/MS GC/Q-TOF의 사용으로 검출 및 식별된 화합물의 수가 증가하였습니다.

참고문헌

1. Recommendations for Extractables and Leachables Testing Part 1: Introduction, Regulatory Issues, and Risk Assessment. *BioProcess International*, Dec 2007.
2. Wong, D. M., Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds from Generic Liquid Drug Formulations Using GC/MSD System, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5632EN 2015.
3. Pan, C.; et al. Strategy for Identification of Leachables in Packaged Pharmaceutical Liquid Formulations. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 2008, 46, 520-527.
4. Jenke, D.; et al. Extractables Characterization for Five Materials of Construction Representative of Packaging Systems Used for Parenteral and Ophthalmic Drug Products. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2013, 67, 448-511.
5. Jenke, D.; et al. Utilization of Internal Standard Response Factors to Estimate the Concentration of Organic Compounds Leached from Pharmaceutical Packaging Systems and Application of Such Estimated Concentrations to Safety Assessment. *J. Chromat. Sci.* 2012, 50, 206-212.
6. Houston, C. T. The PQRI PODP Approach: Understanding Threshold Concepts and Their Application To Different Routes of Administration. *Talk present at E&L Europe 2015*, November 2015.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2016, 2018
2018년 1월 29일, 한국에서 발행
5991-6688KO

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



Agilent Technologies