



# UHPLC 불순물 프로파일링에서의 분석 감도 개선 및 결과의 신뢰성 극대화를 위한 질량 분석 도입

## 응용 자료

의약품



### 저자

Siji Joseph  
Agilent Technologies, Inc.  
Bangalore, India

Hua Dong  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA

### 개요

원료의약품의 순도시험을 위한 분석법은 약전에 명시되어 있습니다. HPLC-UV 검출은 우수한 신뢰성과 편의성, 견고성을 바탕으로 품질관리 실험실의 불순물 프로파일링에서 가장 널리 사용되는 액체 크로마토그래피 기술입니다. 그러나 UV 검출이 한계를 드러내는 경우가 종종 발생합니다. 예를 들어, 분석물질이나 불순물의 UV 흡광이 좋지 않은 경우, 피크가 동시용리되는 경우, 분석이 필요한 미지성분이 검출된 경우, 그리고 특히 기준일탈(OOS) 결과를 조사할 필요가 발생한 경우가 이에 해당됩니다. 게다가 분해산물의 경우 발색단 손실로 인해 원료의약품(API)에 비해 현저하게 적은 UV 감응을 나타낼 수 있습니다. 이러한 상황에서 질량 검출기를 UV 검출기와 직렬로 연결하여 사용하면 분석 결과에 대한 신뢰성을 크게 향상시킬 수 있습니다. 본 응용 자료에서는 InfinityLab LC/MSD XT 시스템을 통한 질량분석의 이점, 즉 정확한 피크 식별, 화합물 동시용리 여부 판정, UV 흡광이 낮은 화합물의 검출 및 추가 확인 목적의 화합물 라이브러리 검색 등을 기술하였습니다.



**Agilent Technologies**

## 소개

Enalapril maleate(그림 1)는 고혈압, 증후성 심부전, 무증상성 좌심실 기능장애(그림 1)의 치료에 사용되는 약물입니다. 미국 및 유럽 약전에서 권장하고 있는 Enalapril maleate의 일상적 불순물 프로파일링을 위한 분석기기는 UV 검출을 이용하는 액체 크로마토그래피입니다. Enalapril maleate에는 구조적 연관성이 있는 9종의 불순물이 있습니다. 불순물은 일반적으로 주 원료의약품(API)에 대한 비율로 보고합니다. 통상적으로, Enalapril maleate 및 구조적으로 유사한 불순물의 경우 유의한 수준으로 UV 활성을 보이는 발색단이 존재하지 않기 때문에 저파장 215nm를 UV 검출에 사용합니다. UV 검출을 통해 알려진 불순물 및 미지 불순물에 대한 백분율 면적값을 계산하는 것은 쉽지 않은 일입니다. 이 표적물질들이 양호한 UV 감응을 보이지 않기 때문입니다. 따라서 오직 UV 피크 면적값만으로 순도를 결정하는 것은 모호하고 확실하지 않을 수 있습니다.

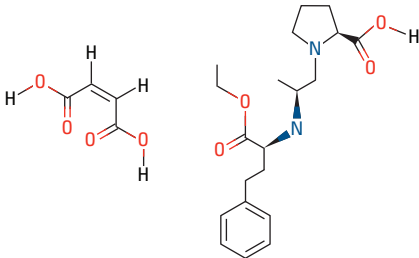


그림 1. Enalapril maleate의 화학 구조

단일 사중극자(SQ) 질량검출을 추가하면 일반 제약 실험실에서 이러한 분석적 요구사항들을 해결하는 데 도움이 됩니다. 일반적인 HPLC 시스템과 유사한 설치 공간을 가진 Agilent LC/MSD XT(질량 분석기)의 경우, 특별히 기존의 크로마토그래피 스택에 통합이 용이하도록 설계되었습니다. 질량 분석 데이터는 Enalapril maleate 분석에서 상대적으로 UV 활성이 낮은 화합물과 동시용리되는 불순물에 대한 신뢰할 수 있는 검출과 식별 결과를 제공합니다. 본 응용 자료에서는 일상의 품질관리 불순물 프로파일링에 질량 분석을 사용할 경우의 이점에 대해 소개합니다.

## 실험 세부 사항

### 표준품 및 화학물질

본 실험의 Methanol, Formic acid 및 Enalapril maleate 표준물질은 Sigma-Aldrich(Santa Clara, CA)에서 구입하였습니다. 전 실험 과정에서 Milli-Q(Merck, Darmstadt, Germany)로 만든 증류수를 사용하였습니다. 그 외 본 연구에 사용된 모든 화학물질은 Sigma-Aldrich 제품을 사용하였습니다.

## 기기

LC/MSD 시스템은 다음과 같은 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1260 Infinity II Binary Pump(G7112B)
- Agilent 1260 Infinity II Sampler(G7129A)
- Agilent 1260 Infinity II Diode Array Detector(G7117C)
- Agilent InfinityLab LC/MSD XT 시스템 + ESI-AJS 옵션(G6135C)

데이터 수집, 처리 및 보고서 작성에는 Agilent OpenLAB CDS 소프트웨어를 사용하였습니다. OpenLAB CDS에서는 US FDA 21 CFR Part 11, EU Annex 11 및 유사 규제와의 데이터 무결성을 지원하는 규정준수(compliance) 특징을 제공합니다. Agilent 1260 Infinity II LC 및 Agilent LC/MSD XT는 신뢰성을 보장할 수 있도록 설계되어 일상 응용에서 바로 사용할 수 있는 LC/MS입니다.

## 분석법 파라미터

약전에서 권장하고 있는 불순물 분석 크로마토그래피법은 질량 분석기와 호환되지 않는 이동상을 사용합니다. 본 실험에서는 Methanol과 물 구성으로 질량 분석과 호환 가능한 분석법을 개발하였습니다. LC 및 MS 기기 파라미터는 표 1 및 2에 나와 있습니다.

## 절차

Enalapril maleate 1µL를 Methanol에 1,000µg/mL로 희석하여 LC/MS 시스템에 주입하였습니다. 고농도 원료의약품 조건에서도 기기의 성능을 유지할 수 있도록 UV 검출 후의 컬럼 용리액은 주 원료의약품 피크가 용리되는 동안 전환 밸브를 통해 폐기물쪽으로 우회하였습니다. LC/MSD XT에서 검출된 불순물은 그 성분의 식별 확인을 위해 자체 라이브러리에서 검색하였습니다.

표 1. Agilent 1260 Infinity II LC 분석법 파라미터

파라미터	설정값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 2.7µm, 온도 55°C
이동상 A	0.1 % Formic acid in water
이동상 B	0.1% Formic acid in methanol
그레디언트	시간 B%
	0 20
	1 20
	12 90
Post run	3분
유량	0.8mL/분
주입량	1µL, methanol로 니들 세척, flush port 7초간 작동
UV 검출	a) 215nm
수집 속도	40Hz
MS 검출	
질량 범위	65–600m/z
Delta EMV	250V
스캔 시간	200ms
Fragmentor 전압	125V

표 2. Agilent LC/MSD XT AJS 파라미터

파라미터	설정값
이온화원	AJS 전자 분무 이온화
극성	양이온
피크 필터	0.02분
측정 시간(Dwell time)	30ms
건조 가스 온도	250°C
건조 가스 유량	7L/분
Sheath 가스 온도	300°C
Sheath 가스 유량	10L/분
Nebulizer 압력	30psig
캐필러리 전압(양극)	1,500V
노즐 전압	0V
전환 밸브(폐기물 방향)	3.39 ~ 3.99분

## 결과 및 토의

### 약한 발색단의 불순물 검출에 적합하지 않은 UV 검출

그림 2에서는 UV 데이터를 기반으로 한 Enalapril maleate 시료의 용리 프로파일을 보여줍니다. UV 검출기를 통해 얻어진 데이터를 검토한 결과, 7종의 불순물 피크가 시료 내에서 검출되었으며, 원료의약품의 면적 백분율 순도는 98.7%로 측정되었습니다. 원료의약품 및 그 불순물의 UV 감도가 낮아, 원료의약품에 비하여 저농도인 불순물을 신뢰할 수 있는 수준으로 검출하는 데에 제약이 따랐습니다.

### 질량 분석기 용리 프로파일

Enalapril maleate 시료의 UV 감도가 낮은 문제는 질량 분석 기반의 검출로 극복할 수 있습니다. 본 연구에서는 Agilent LC/MSD XT 콤팩트 질량 분석기를 사용하여 시료 구성 성분을 크로마토그래피 용리 후 그 질량에 따라 효율적으로 추적할 수 있었습니다. 그림 3에서는 LC/MSD XT를 통해 관측된 용리 프로파일을 나타내고 있습니다. 질량 분석기에서 2종의 추가적인 피크를 더 검출할 수 있었는데, 이는 UV 검출 단독에서는 관측되지 않았던 것입니다.

### 통합형 전환 밸브를 통해 시스템의 견고성 확보

MS 스펙트럼 정보는 UV 활성이 낮은 불순물의 검출 및 확인을 용이하게 해줍니다. 그러나 농도가 높은 원료의약품 시료를 반복적으로 주입하는 경우, 질량 분석기 이온화원을 서서히 오염시킬 수 있습니다. 이러한 문제는 애질런트 질량 분석기에 내장된 전환 밸브를 통해 최소화할 수 있습니다. 이 밸브는 고농도 주 피크(1,000µg/mL)가 용리되는 동안의 컬럼 용리액의 흐름을 폐기물 쪽으로 전환하도록 설정할 수 있습니다. LC 분석법 개발 과정 중, 주 원료의약품 피크가 나머지 불순물로부터 확실하게 분리될 수 있도록 하였습니다. 전환 밸브 스위칭은 매우 매끄럽게 이루어지며 머무름 시간의 재현성도 그림 4에서 보이는 바와 같이 유지되었습니다.

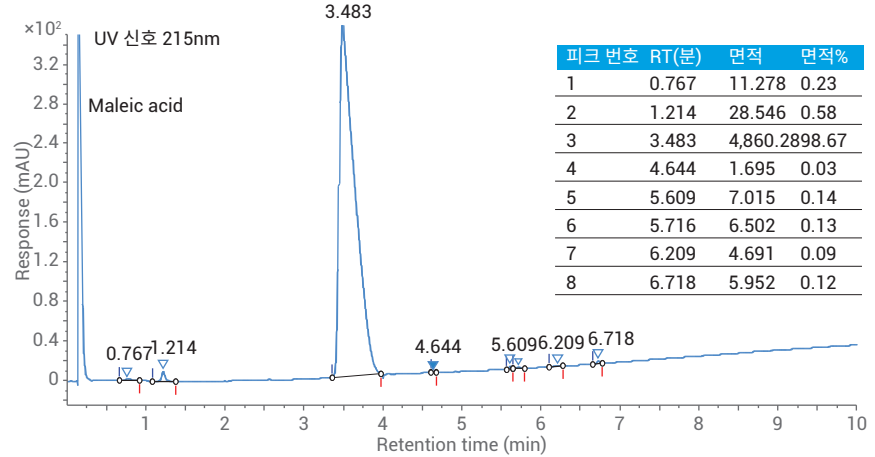


그림 2. 215nm에서의 Enalapril maleate LC/UV 용리 프로파일. 농도가 1,000ug/mL인 원료의약품의 감응이 고작 350mAU 정도로 UV 흡광이 좋지 않음을 확인

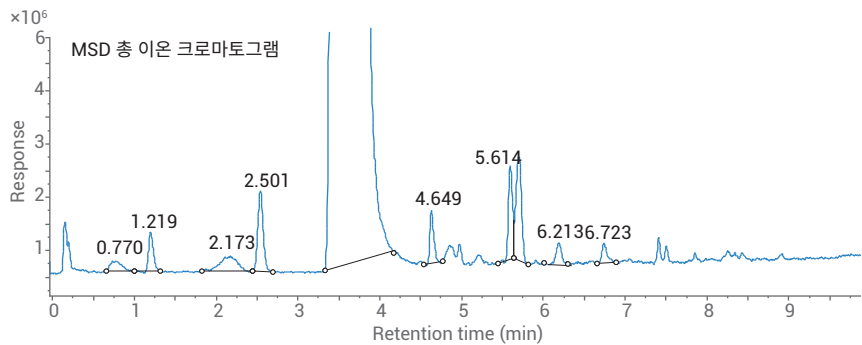


그림 3. Enalapril maleate의 질량 분석에 대한 총 이온 크로마토그램(TIC). MS 검출을 통해 추가적인 불순물 피크가 파악됨. 예를 들어, 2.501분에서 용리되는 불순물은 질량 분석기를 통해 검출되었으나, UV 검출 시에는 관측되지 않음

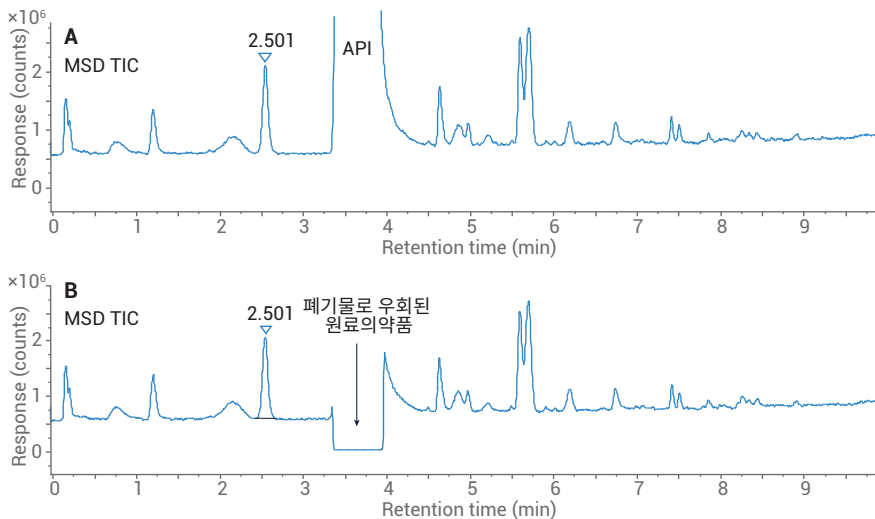


그림 4. A) Enalapril maleate의 LC/MSD XT TIC 결과 B) 전환 밸브를 통해 고농도 원료의약품 피크를 폐기물로 우회하였을 시의 Enalapril maleate에 대한 LC/MSD XT TIC 결과. 머무름 시간의 재현성이 높은 것으로 전환 밸브의 작동이 원활하게 이루어지고 있음을 입증함

## LC/MSD XT를 통한 예기치 않은 UV 비활성 불순물의 검출

Enalapril maleate 및 관련 불순물은 Agilent LC/MSD XT를 통하여 완전하게 이온화 및 검출하였습니다. 질량 분석기를 통하여 UV 흡광으로는 검출하지 못한 2종의 새로운 중요 불순물을 검출하였습니다. 예를 들어, 새롭게 발견된 불순물 중 하나는 2.5분에 용리되는 것으로 나타났습니다. 본 불순물의  $m/z$  값은 280Da으로, 그림 5에서 추출 이온 크로마토그램(EIC)을 확인할 수 있습니다. 이어 본 불순물의 질량 스펙트럼 정보를 이전에 제작된 원료의약품 관련 불순물 사용자 정의 라이브러리에서 검색하여, 불순물 B로 식별하였습니다(그림 6).

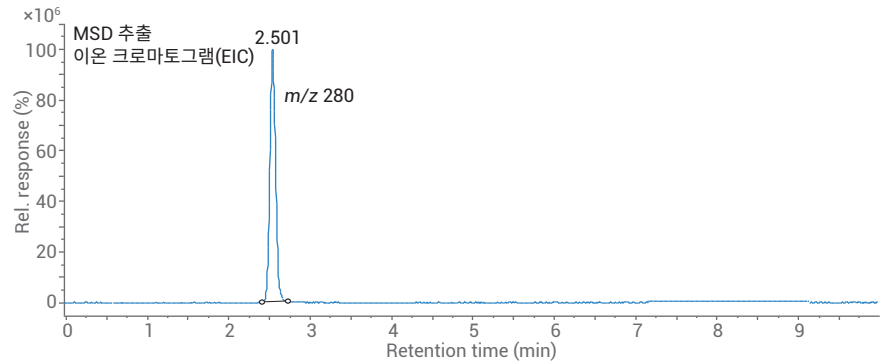


그림 5.  $m/z$  280으로, 2.5분 시점에서 용리된 불순물 1종의 추출 이온 크로마토그램(EIC). 이 불순물은 UV 검출 시 발견되지 않았음

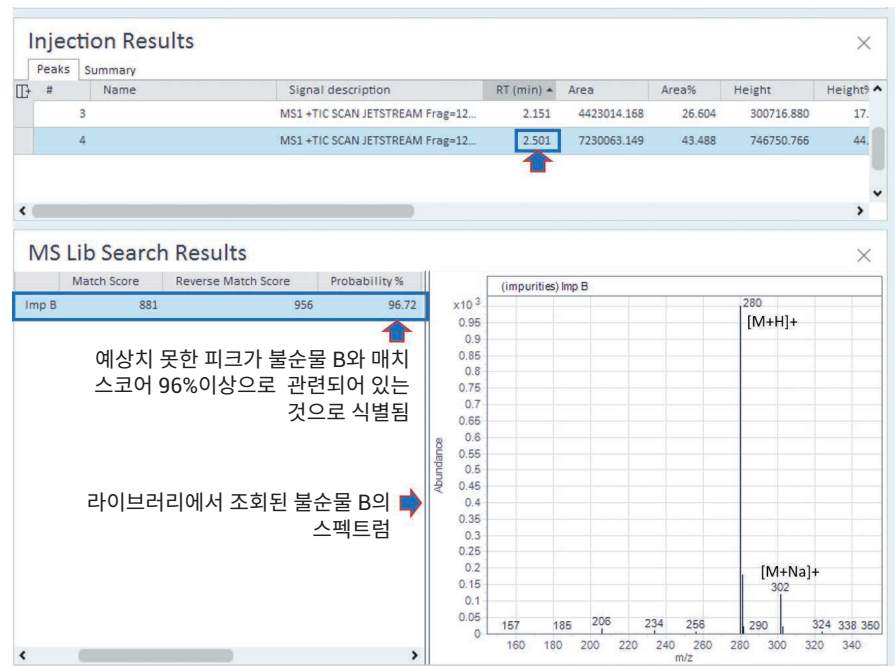


그림 6.  $m/z$  280 불순물에 대한 라이브러리 검색 결과.  $m/z$  280을 라이브러리에서 검색한 결과, 불순물 B로 확인(확률 점수 96% 이상)

## 동시용리 화합물의 식별이 가능한 질량 분석 검출

피크의 동시용리는 불순물 프로파일링 시 문제가 되며, 원료의약품 순도 평가의 정확도를 떨어뜨릴 수 있습니다. 이 경우 크로마토그래피의 피크 형태만을 고려하는 경우가 종종 있으며, UV 피크 순도 기능을 사용하여 LC-UV 분석 중의 스펙트럼과 이를 비교하기도 합니다. 그러나 이러한 접근법은 동시용리된 피크의 UV 스펙트럼이 유사한 경우 실패할 가능성이 있습니다. UV 검출과 더불어 Agilent LC/MSD XT를 함께 사용하면 이러한 문제를 해결할 수 있습니다.

Enalapril maleate 원료의약품의 경우, UV 검출 결과로부터 5.6분 그리고 5.7분 시점에 비교적 잘 분리된 두 개의 피크를 확인할 수 있었습니다(그림 7A). 그러나 LC/MSD XT를 통한 총 이온 크로마토그램(TIC)의 스펙트럼 분석 결과, 5.7분 피크 내에 동시용리된 불순물이 존재하는 것으로 나타났습니다(그림 7B). 각 불순물의 추출 이온 크로마토그램(EIC)은 예상 불순물의 동시용리를 명확하게 보여 주었습니다(그림 7C). 그림 8에서는 5.7분 시점 피크에서 동시용리된 것으로 관측된 불순물의 질량 스펙트럼을 확인할 수 있습니다.

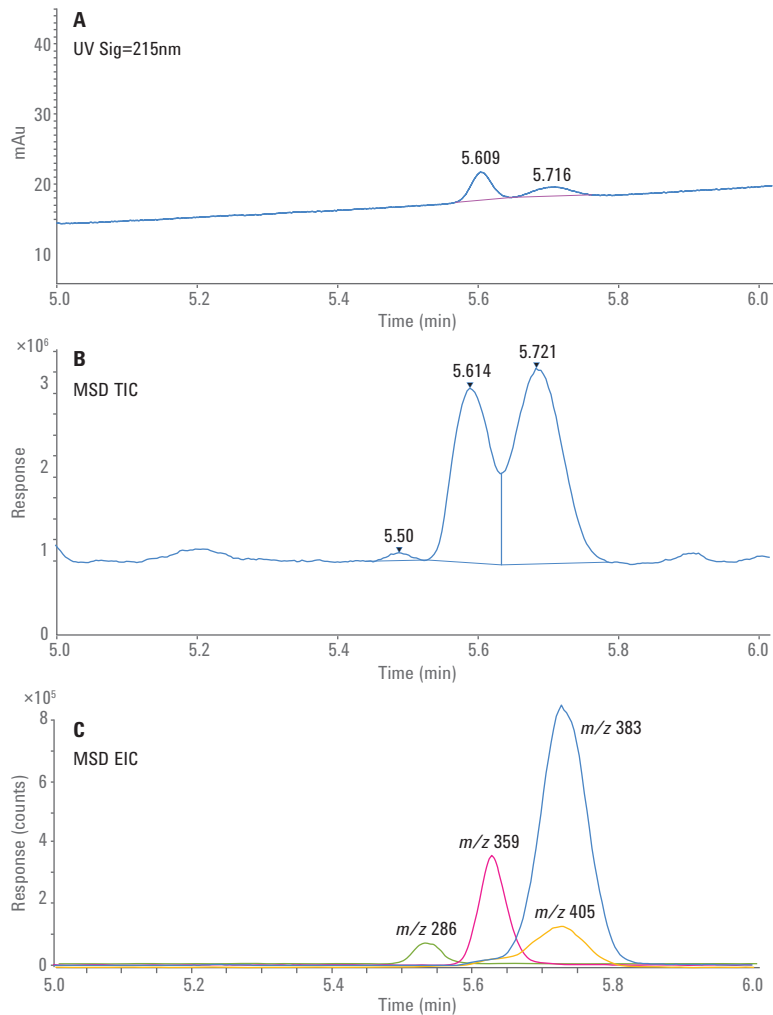


그림 7. 질량 검출 방식을 사용하면, UV 검출에서 관측되지 않았던 동시용리 피크의 식별이 용이해짐  
 A) UV 검출 결과, 5.6분 및 5.7분에서 두 개의 피크가 나타남 B) LC/MSD XT의 TIC 결과에서는 5.5분에서 추가로 저농도 불순물이 발견됨. 5.72분 피크의 스펙트럼 평가를 통해  $m/z$  383 및  $m/z$  405에 해당하는 두 피크의 동시용리가 확인됨 C) 5.5 ~ 5.7분 사이에 용리되는 전체 불순물의 추출 이온 크로마토그램(EIC) 오버레이

## 결론

Agilent LC/MSD XT와 UV 검출 기법을 함께 사용하는 경우, 결과의 모호성을 피하고, 불순물 프로파일링 결과에 대한 신뢰도를 높일 수 있는 것으로 나타났습니다. 불순물 검출이 까다로운 양상을 보이는 경우, 즉, 동시용리 피크가 발생하거나, UV 흡광이 좋지 않을 때 Agilent LC/MSD XT로 얻은 질량 정보가 불순물 프로파일링 결과의 신뢰도를 높이는 데에 도움을 줄 수 있습니다. Agilent OpenLab CDS 소프트웨어에 포함된 화합물 라이브러리 생성 및 검색 옵션은 신약 연구 및 품질 관리 환경에서 화합물을 식별하는데 도움이 됩니다. 또한 OpenLAB CDS 소프트웨어에서 포함하고 있는 고급 기술 제어는 일반 제약 QA/QC 실험실에서 데이터 무결성을 뒷받침하기 위한 필수 기능들을 제공합니다.



그림 8. TIC 결과 중 5.7분 용리 피크에서 관측되는 MS 스펙트럼. 두 개의 서로 다른 시점에, 서로 다른 스펙트럼이 발견되었으므로, 불순물의 동시용리 가능성이 제기됨. 5.693분에서의 스펙트럼에서는  $m/z$  405.4인 불순물(A)의 존재를 가늠해 볼 수 있으며, 5.737분의 MS 스펙트럼에서는  $m/z$  383.4인 불순물(B)의 존재를 제시함

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

연구 용도에만 사용하십시오. 진단 용으로는 사용할 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017  
2017년 5월 15일, 한국에서 발행  
5991-7931KO

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



**Agilent Technologies**