

LC-QTOF를 이용한 합성 화합물 내 불순물 정성 분석

저자

정중목,
한국애질런트테크놀로지스(주)

개요

합성 화합물 시료 내에 존재하는 불순물은 미량일지라도 제품의 성능 저하를 초래하며 특히 제품이 의약품이라면 인체에 심각한 부작용을 가져올 수도 있습니다. 존재하는 불순물의 성분을 알 수 있다면 제조 공정상 어느 단계에서 발생했는지 추적하여 공정을 개선하거나, 인체에 미치는 유해도를 조사하여 유해도가 높으면 발생하지 않도록 공정을 바꾸거나 유해도가 낮으면 규제 농도 이하로 관리할 수 있습니다. 이와 같이 불순물의 성분을 알아내는 일은 합성 화합물 제조 시에 필수적인 과정입니다.

본 응용 자료는 합성 화합물 시료 내에 존재하는 미지의 불순물이 어떤 물질인지 확인하는 방법, 특히 LC-QTOF를 이용하여 결과를 얻는 방법에 대해 기술하고 있습니다. 확인하고자 하는 미지 물질에 대한 정보가 있을 경우의 접근 방법과 아무 정보가 없을 때의 접근 방법으로 나누어서 구체적으로 설명하였습니다. 또한 LC-QTOF를 이용할 때 제약사항 중의 하나인 질량 분석기에 호환되지 않는 이동상을 사용하여 LC 분석법을 설정한 경우 이동상을 바꾸거나 분획 분취기(fraction collector)를 사용하지 않고 바로 QTOF로 분석할 수 있는 2DLC-QTOF를 이용하여 효율적으로 불순물을 정성 확인할 수 있는 방법에 대해 설명하였습니다.

서론

합성 화합물의 순도를 유지하는 것은 중요합니다. 원재료로 사용되는 물질에 불순물이 포함되어 있으면 최종 생산물의 품질이 저하되거나 수율이 떨어지는 문제가 발생할 수 있습니다. 합성 화합물이 약으로 사용될 경우에는 포함된 불순물이 환자의 건강에 심각한 위험을 초래할 수도 있습니다. 그래서 제약산업에는 국민 건강을 지키기 위하여 국가적인 규제가 적용되어 엄격하게 불순물의 양과 종류를 통제하고 있으며 일반 화합물 제조 분야에서는 회사 자체의 가이드라인이나 국제협회의 규약으로 불순물을 통제하고 있습니다.

불순물의 성분을 알고 있을 때에는 해당 불순물의 표준품을 구하여 정량을 하는 방법으로 접근할 수 있습니다. 하지만 불순물의 성분을 알지 못할 때에는 불순물을 알아내기 위하여 정량과는 다른 차원의 접근법이 요구됩니다. 본 응용 자료에서는 미지의 불순물을 동정하기 위해 어떤 방식으로 분석을 진행해야 하는지 차례대로 설명하고 있습니다. 우선 예상 후보가 있을 경우에 가지고 있는 데이터베이스나 라이브러리를 사용하여 검색하는 방법을 다루고 있습니다. 한편 관련 정보가 전혀 없는 미지 물질인 경우 측정된 정확한 질량값으로부터 분자식을 유도할 수 있고, 또한 해당 분자식을 가지는 다양한 구조의 이성질체 중 더 가능성이 높은 구조를 특정하기 위하여 타겟 분자를 조각화시킨 MSMS 스펙트럼을 해석하는 방법을 제시하고 있습니다.

불순물 모니터링을 위해 기존에 설정한 LC 분석법을 동일하게 사용하여 LC-QTOF로 미지 불순물을 동정하기 위해서는 해당 이동상이 LCMS에 사용 가능한지 확인해야 합니다. LCMS에 사용할 수 없는 인산염과 같은 비휘발성 염을 포함하고 있다면 직접적으로 LCMS에 적용할 수는 없습니다. 이런 경우에는 2DLC를 이용하여 LCMS에 호환 가능한 이동상으로 바꾸어 주는 과정이 필요합니다. 어떤 방식으로 이런 접근이 가능한지 2DLC에 대한 설명을 기재하였습니다.

사회가 발전함에 따라 제품의 품질에 대한 기대수준도 높아졌습니다. 제조업에서 기존에 요구되던 불량률이 0.001%였던 것이 0.0001%로 기대수준이 높아졌다고 가정해 보면, 상황을 단순화시켜서 말하자면 원료물질의 순도가 99.999%였던 것을 99.9999%로 끌어올려야 한다는 것입니다. 분석적인 측면에서 이는 불순물이 기존보다 1/10로 낮게 존재하더라도 검출하고 동정할 수 있어야 한다는 것을 뜻하며, 기존보다 10배 높은 감도가 필요하다는 의미입니다.

의약품에서도 마찬가지입니다. 국민 건강에 대한 위해 요소를 최소화하기 위해 관리·감독기관은 더 낮은 농도의 불순물을 관리해야 하는 방향으로 규제를 만들어가고 있습니다. 즉 극미량 분석을 해야 하는 쪽으로 변해가고 있다는 뜻입니다. 이렇게 극미량 분석과 높은 정확도를 요구하는 상황에 최적화된 검출/동정법이 LC-QTOF를 이용한 분석법이며 앞으로 이에 대한 활용 가치는 더욱 증대될 것입니다.

실험

분석 조건

Agilent 1290 Infinity II HPLC와 Agilent 6546 Q-TOF를 사용하였습니다. HPLC 분석 조건은 표 1에, MS 분석 조건은 표 2에 나타내었습니다.

표 1. Agilent 1290 Infinity II HPLC 분석 조건.

파라미터	값		
기기	Agilent 1290 infinity II high speed pump(G7120A) Agilent 1290 infinity II multisampler(G7167B) Agilent 1290 infinity II integrated column compartment(G7116B) Agilent 1290 infinity II diode array detector(G7117B)		
Multisampler 온도	4°C		
주입량	20µL		
1D 컬럼	타사 C18, 4.6x150mm, 5µm		
2D 컬럼	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 2.1x50mm, 1.8µm		
컬럼 온도	30°C		
1D 완충액	15mM KH2PO4 in Water (pH 5.6 Phosphoric acid로 조절)		
1D 이동상 A	완충액: ACN = 97: 3		
1D 이동상 B	완충액: ACN = 70: 30		
2D 이동상 A	0.1% formic acid in Water		
2D 이동상 B	0.1% formic acid in ACN		
1D 유속	1.0mL/분		
1D 그레디언트	시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0	100	0
	15	100	0
	45	50	50
	50	0	100
	55	0	100
70	100	0	
2D 유속	0.4mL/분		
2D 그레디언트	시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0	98	2
	0.2	98	2
	2.5	50	50
	3	50	50
	3.1	98	2
	4.5	98	2

표 2. Agilent 6546 QTOF 분석 조건.

파라미터	값
이온화원	전자적 분무 이온화(ESI)
스캔 모드	MSMS
극성	Positive/Negative
건조 가스 온도	300°C
건조 가스 유속	12L/분
Nebulizer 압력	40psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유량	12L/분
캐필러리 전압	4000V
노즐 전압	1000V
Fragmentor 전압	120V
Skimmer 전압	100V
MS & MSMS 스캔 범위	50~1000m/z
MS & MSMS 스캔 속도	2spectra/초

결과 및 토의

미지 물질의 정성 분석은 크게 두 가지로 나눌 수 있습니다. 미지 물질로 추정되는 물질에 대한 정보가 있는 경우와 없는 경우입니다. 이를 간략하게 표 3에 정리하였습니다. 추정되는 물질(suspect)이 있을 때는 그 물질의 정보를 활용하여 어떤 물질인지 알아낼 수 있습니다. 물질 정보의 종류는 두 가지로 나눌 수 있는데 MS 스펙트럼 수준에서 전구 이온(precursor ion)을 확인할 수 있는 데이터베이스와 MSMS 스펙트럼 수준에서 조각 이온(product ion)의 깨진 패턴을 확인할 수 있는 라이브러리가 있습니다. 데이터베이스는 이론적으로 정의되는 분자식, 질량값, 물질명 등을 포함하는데 그림 1에 데이터베이스 일부를 예시로 나타내었습니다. 실험을 통하여 얻은 MS 스펙트럼 상의 m/z값과 데이터베이스에 저장된 질량값으로 계산된 m/z값을 매칭하여 미지 물질이 정성적으로 어떤 물질인지 확인할 수 있는데 매칭 결과에 대한 예시를 그림 2에 나타내었습니다.

표 3. 미지 물질의 정성 분석 분류.

정보	데이터 처리 과정	스펙트럼 수준
추정 물질 정보 O (suspect)	데이터베이스 매칭	MS
	라이브러리 매칭	MSMS
추정 물질 정보 X (nontarget)	MFG(Molecular Formula Generation)	MS
	MSC(Molecular Structure Correlation)	MSMS

Name	Formula	Mass	CAS	ChemSpider	IUPAC
Abamectin B1a (Avemec...	C48H72O14	872.49221	65195-55-3	10286553	(1R,2S,4'S,5S,6R,8'R,10'E,12...
Acephate	C4H10NO3P5	183.0119	30560-19-1	1905	O,S-Dimethyl acetylphospho...
Acetamiprid	C10H11ClN4	222.06722	135410-20-7	184719	(1E)-N-[(6-Chloro-3-pyridinyl)met...
Aldicarb	C7H14N2O2S	190.0776	116-06-3	7844539	(5E)-7,7-Dimethyl-4-oxa-8-thia-2...
Amisulbrom	C13H13BrFN5O4S2	464.95764	348635-87-0	8414145	3-[3-bromo-6-fluoro-2-methyl-1...
Azimsulfuron	C13H16N10O5S	424.10258	120162-55-2	77873	N-[(4,6-Dimethoxy-2-pyrimidinyl)...
Azinphos-methyl	C10H12N3O3PS2	317.00577	86-50-0	2181	O,O-Dimethyl S-[(4-oxo-1,2,3-b...
Azoxystrobin	C22H17N3O5	403.11682	131860-33-8	2298772	Methyl (2E)-2-[(6-(2-cyanoph...
Bendiocarb	C11H13NO4	223.08446	22781-23-3	2224	2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-4-...

그림 1. 데이터베이스 예시.

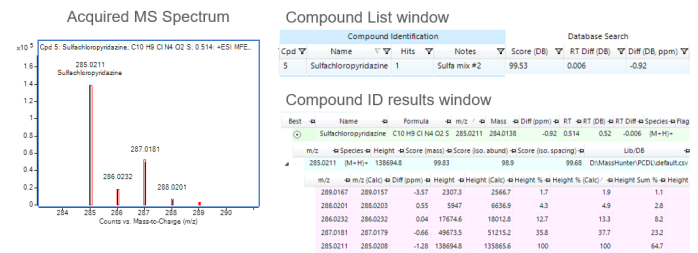


그림 2. 획득된 MS 스펙트럼과 데이터베이스를 매칭한 결과 예시.

라이브러리는 특정 물질의 전구 이온에서 유래된 조각 이온의 패턴, 즉 조각 이온의 m/z값과 생성 비율을 저장한 정보를 포함하며, 그림 3에 MSMS 라이브러리의 일부를 예시로 나타내었습니다. 실험을 통하여 획득한 MSMS 스펙트럼과 라이브러리의 스펙트럼을 매칭하여 미지 물질이 정성적으로 어떤 물질인지 데이터베이스 매칭보다 더 높은 정확도로 그리고 상이한 구조의 이성질체끼리의 차이도 확인할 수 있으며 매칭 결과에 대한 예시를 그림 4에 나타내었습니다.

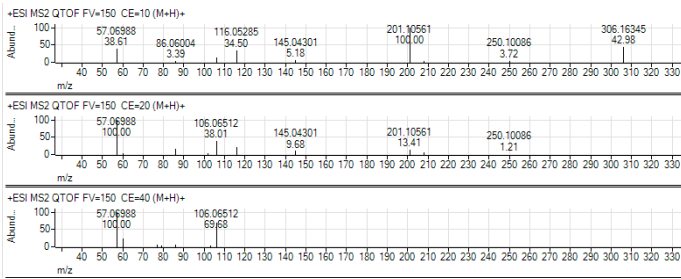


그림 3. MSMS 라이브러리 예시.

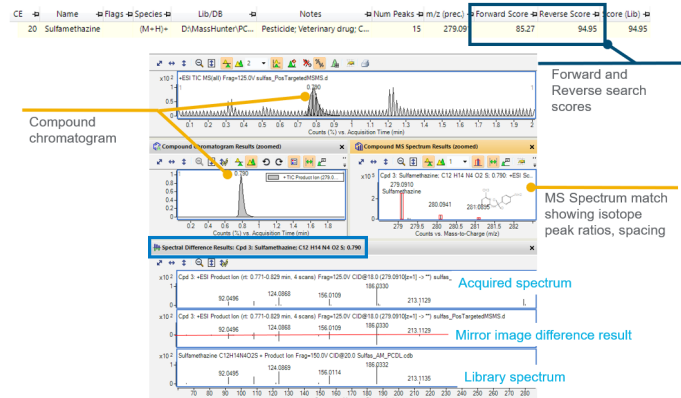


그림 4. 획득된 MSMS 스펙트럼과 라이브러리를 매칭한 결과 예시.

미지 물질로 추정되는 물질에 대한 정보가 없을 경우(nontarget)에는 표 3에 보는 바와 같이 MFG(Molecular Formula Generation)과 MSC(Molecular Structure Correlation)이라는 데이터 처리 기법을 사용하여 물질의 분자식 또는 구조식을 알아낼 수 있습니다. MFG는 그림 5에서 보는 바와 같이 획득된 MS 스펙트럼의 동위원소 분포 패턴을 이용하여 해당 분자를 구성하고 있는 원자의 종류와 개수를 유추하여 분자식 후보들을 도출해주며 각 후보들은 질량 정확도, 동위원소 비율, 동위원소 간격 등의 이론값과 측정값 사이의 부합도를 점수화하여 보여줍니다.

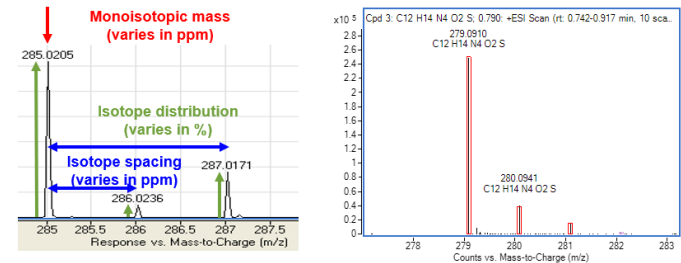


그림 5. 특정 분자의 동위원소 분포패턴과 획득된 MS 스펙트럼으로부터 유추된 분자식 후보 결과 예시.

MFG를 이용하여 분자식을 확인하였더라도 동일한 분자식을 가진 여러가지 구조의 이성질체가 존재할 수 있습니다. 구조식까지 확인해야 미지 물질의 정성 분석이 마무리되었다고 할 수 있습니다. 이 경우에 사용하는 데이터 처리 기법이 MSC입니다. MSC는 확정된 분자식으로부터 유래할 수 있는 여러 구조식과 미지 물질의 MSMS 스펙트럼 간의 상관관계를 점수화하여 어떤 구조가 가장 가능성이 높은지 추정해 줍니다. 획득한 MSMS 스펙트럼 상에서 특정 조각 이온이 추정된 구조식의 어떤 부분에서 유래했는지 혹은 유래할 수 없는지를 판단합니다. 구조식에 대한 원천은 Chemspider나 PubChem과 같은 공개된 데이터베이스와 연동하거나 분석자가 임의로 만든 mol file을 사용할 수 있습니다. 그림 6은 MSC에서 어떤 식으로 결과를 보여주는지 나타내고 있습니다.

실제 분석에서 미지 물질을 동정할 때 가장 어려운 경우 중의 하나가 LC 분석법으로 질량 분석기에 사용할 수 없는 인산염과 같은 비휘발성염을 사용하였을 때입니다. 크로마토그램 상에서 분해능과 재현성을 우수하게 만드는 장점이 있어서 LC 분석에서 인산염은 널리 사용되는데 질량 분석기에서는 호환하여 사용할 수 없으므로 질량 분석용 LC 분석법을 새로 만들어야 하는 경우가 발생합니다. 이 경우에 이동상의 조성을 바꾸면 원래 이동상 조건에서와는 다른 순서로 피크들이 나오거나 경우에 따라서는 피크가 사라지기도 합니다. 분획 분취기를 사용하여 원래 이동상 조건에서 다른 피크와 겹치지 않게 미지 물질의 용리액을 받아서 질량 분석기와 호환되는 LC 조건으로 LCMS 분석을 진행할 수도 있습니다. 하지만 이러한 방법은 시간과 노동력이 많이 소요될 뿐 아니라 LCMS 분석 전까지 한동안 이동상과 공기에 노출된 용리액 속의 타겟 성분은 분해되어 사라지기도 합니다. 이 문제를 해결할 수 있는 방법이 2DLC를 사용하는 것입니다. 간단하게 말하면 2DLC-QTOF는 원래 이동상 조건(1D조건)으로 분리된 타겟 피크를 루프에 저장한 후 루프 속의 용리액을 질량 분석기에 호환 가능한 이동상 조건으로 두 번째 컬럼에 주입하여 분석하는 방법입니다. 그림 7에 2DLC-QTOF의 구성을 나타내었습니다.

Formula	m/z	Mass	Diff (ppm)	RT	Species	Score
C12 H14 N4 O2 S	279.0908	278.0836	0.44	0.792	(M+H)+	99.04
C14 H16 N O3 S	279.0908	278.0835	5.6	0.792	(M+H)+	92.37
C11 H18 O6 S	279.0908	278.0835	-3.99	0.792	(M+H)+	91.67
C10 H12 N7 O S	279.0908	278.0837	-4.76	0.792	(M+H)+	91.67

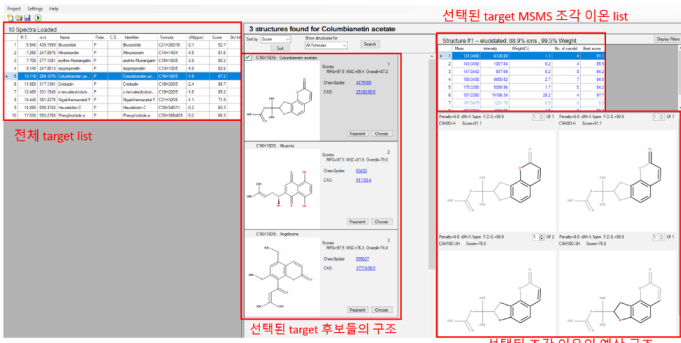


그림 6. 획득된 MSMS 스펙트럼을 이용하여 MSC에서 유추된 구조식 후보 결과 예시.

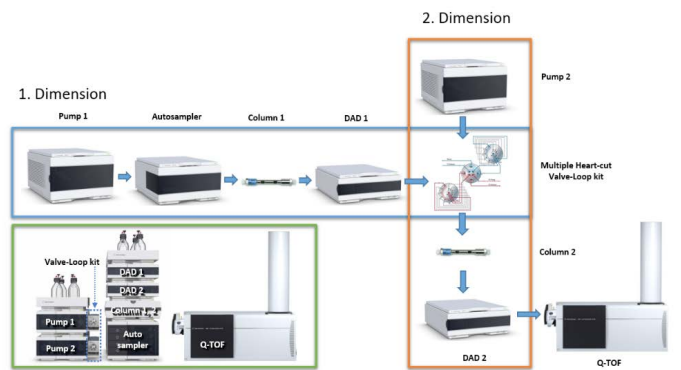


그림 7. 2DLC-QTOF 구성.

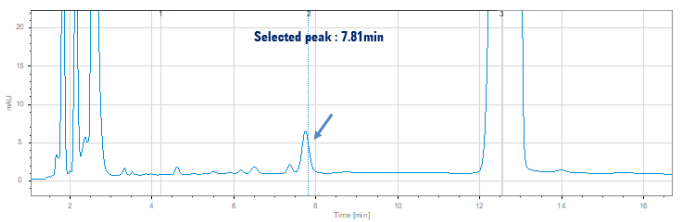


그림 8. UV 크로마토그램(1D, 230nm).

지금부터는 위에서 설명한 2DLC-QTOF와 MSC를 이용하여 실제로 미지 물질을 분석하여 구조식까지 확인한 결과를 기술합니다. 앞에 기재된 분석 조건과 같이 1DLC 조건은 인산염을 사용하여 직접적으로 QTOF에 도입할 수 없습니다. 2DLC 조건은 LC-QTOF에 호환하여 사용할 수 있는 포름산을 사용하였습니다. 그림 8은 1D UV 크로마토그램이며 7.81분의 피크가 정성 분석해야 할 미지 물질입니다.

그림 9에서는 2D 크로마토그램을 보여주고 있는데 두 번째 UV 검출기에서 검출된 UV 크로마토그램과 LC-QTOF에서 검출된 음이온 및 양이온 크로마토그램(TIC)을 각각 나타내고 있습니다. UV 크로마토그램, 양이온 크로마토그램, 음이온 크로마토그램 모두에서 1.53분에 피크가 검출된 것을 확인할 수 있습니다.

크로마토그램 상에서 검출된 피크에 해당되는 MS 스펙트럼을 양이온 모드와 음이온 모드에서 각각 얻어서 그림 10과 그림 11에 나타내었습니다. 획득된 MS 스펙트럼으로부터 MFG 기법으로 데이터 처리를 하여 양이온/음이온 모두에서 C₂₀H₃₇N₇O₈S₄라는 분자식을 높은 점수로 유추할 수 있었습니다.

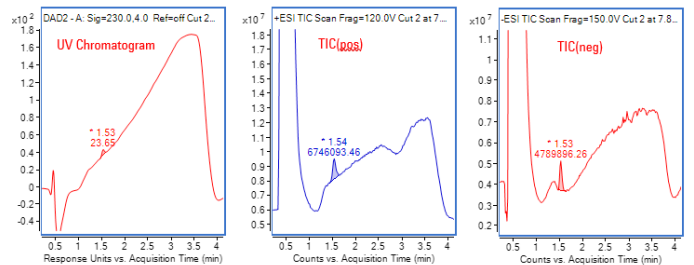


그림 9. UV 크로마토그램 및 양이온/음이온 TIC(2D).

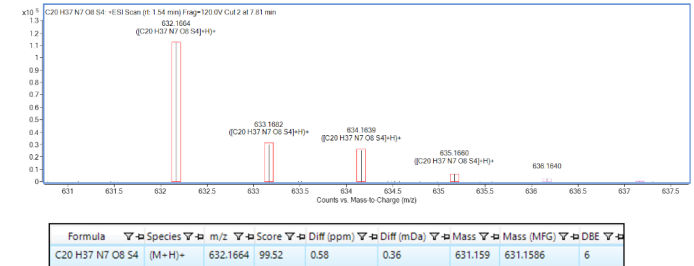


그림 10. 양이온 MS 스펙트럼과 MFG 결과.

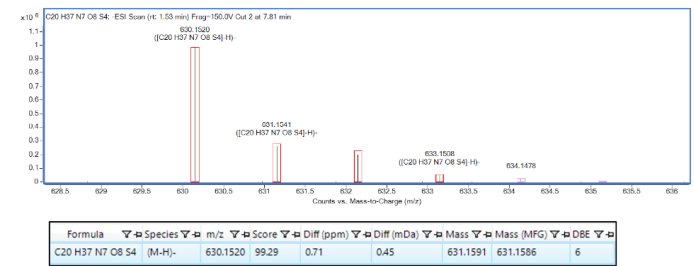


그림 11. 음이온 MS 스펙트럼과 MFG 결과.

MS 스펙트럼으로부터 유도한 분자식은 다양한 구조로 존재할 수 있습니다. C₂₀H₃₇N₇O₈S₄라는 분자식에 포함된 원소들이 결합할 수 있는 경우의 수, 즉 가능한 구조의 수는 수천 가지도 넘을 것입니다. 하지만 의약품물질을 합성하는 과정 중에 생성된 불순물이 이 물질은 의약품물질과 유사한 구조를 가질 가능성이 크므로 수천 가지의 구조를 다 고려할 필요는 없고 의약품물질과 그의 중간 산물에서 생성될 수 있는 구조를 중점적으로 검토하면 됩니다. 우선 타겟 물질의 모이온을 조각화시켜서 그 조각 이온의 스펙트럼, 즉 그림 12와 같은 MSMS 스펙트럼을 얻을 수 있습니다. 이 스펙트럼 상의 조각 이온들은 타겟 물질의 구조와 관계가 있으므로 조각 이온들의 존재와 구조와의 상관도를 계산하여 어떤 구조가 더 가능성이 높은 구조인지 알아낼 수 있습니다.

그림 13은 MSC 결과를 나타낸 것입니다. 예상 구조 후보들이 생성할 수 있는 이론적인 조각 이온과 실제로 생성된 조각 이온과의 상관관계를 각각의 구조별로 점수화하여 보여줍니다. 이 결과를 통해서 해당 미지 물질이 어떤 구조와 더 가까운지 알아낼 수 있습니다. 결론적으로 여러가지 구조 중에 1번과 같은 구조일 확률이 가장 높다고 할 수 있습니다. NMR과 같은 다른 분석기기의 결과와 교차 검증을 한다면 더 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 수 있으며 100%의 신뢰도를 얻기 위해서는 최종적으로 해당 물질의 표준품과 결과를 비교해야 하지만 그 전 단계에서 후보를 추리는 작업에 MSC 결과를 유용하게 사용할 수 있습니다.

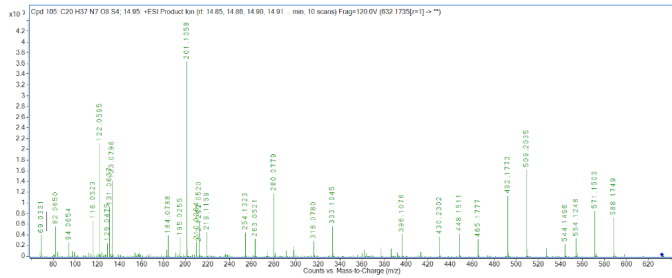


그림 12. 타겟 물질의 MSMS 스펙트럼.

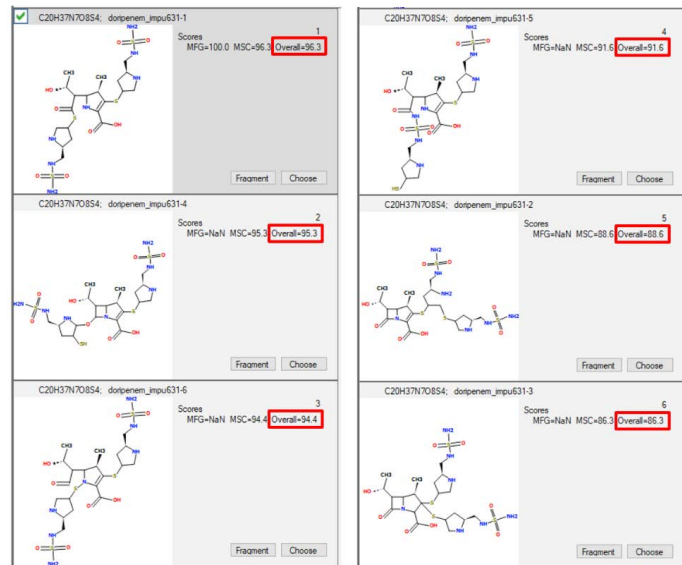


그림 13. 타겟 물질의 예상 구조와 그 구조의 가능성을 점수화한 MSC 결과.

결론

Agilent MassHunter Qualitative analysis 소프트웨어와 LC-QTOF에서 생성한 데이터로 데이터베이스 및 라이브러리 매칭 기능을 사용하면 예상 물질 후보 중에서 부합하는 미지 물질의 정성 확인이 가능합니다. 하지만 예상 물질 후보가 없다고 하더라도 MFG와 MSC를 사용한 데이터 처리를 통해 미지 물질의 분자식 및 구조식을 알아낼 수 있었습니다. 또한 2DLC와 QTOF를 결합하여 분획 분취기를 사용하는 복잡한 과정 없이 질량 분석기에 호환되지 않는 이등성 조건하에서 검출한 미지 물질을 QTOF에서 바로 분석이 가능함을 확인하였습니다.

관련 문헌

1. ICH Guideline Q3A (R2): Impurities in new drug substances.
2. ICH Guideline M7: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk.
3. Sonja K. Application of Multiple Heart-Cutting 2D-LC in Method Development for Impurity Analysis. Agilent Technologies application note, publication number 5991-5643EN, 2015.
4. Dinesh U.; Syed S. L. Identification and Structural Elucidation of Amlodipine Impurities Using High Resolution LC/MS and LC-MS/MS. Agilent Technologies application note, publication number 5991-6411EN, 2015.

www.agilent.com/chem

DE44377.9318287037

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 8월 25일, 한국에서 발행
5994-3827KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

