

의약품 내 잠재적 변이원성 불순물에 대한 극미량 수준의 정량분석

Agilent Ultivo LC/TQ의 혼합 모드 데이터 수집 기능 사용

저자

Theresa Sosienski 및
Kyle Covert
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 dalfampridine의 원료 의약품(API)인 4-aminopyridine의 생성 과정에서 형성될 수 있는 두 가지 잠재적 변이원성 불순물인 3-aminopyridine 및 isonicotinamide의 정밀한 정량을 위한 분석법에 대해 소개합니다. Agilent Ultivo LC/TQ의 혼합 모드 수집 기능을 통해, 시료로부터 정량 정보(SIM 및 MRM)와 정성 정보(전체 스캔 및 생성 이온 스캔)를 동시에 수집할 수 있습니다. 혼합 모드는 스캔 기능을 관심 분석물질에 대한 SIM 또는 MRM과 동일한 시간 세그먼트에 통합하는 방식으로 작동합니다. 해당 분석법은 잠재적 변이원성 불순물에 대하여 규제 요건보다 훨씬 낮은 정량 한계를 제공하며 탁월한 감도와 정밀도를 보였습니다.

서론

API의 제조 공정에서 변이원성 출발물질 또는 부반응 생성물이 생산 배치에 잔류할 수 있습니다. 이러한 변이원성 불순물은 최종 제품에 유입될 수 있으므로, 제조 배치에서는 이러한 잠재적 변이원성 불순물(PMI)을 반드시 스크리닝해야 합니다. 이 분석법에서는 dalfampridine의 API인 4-aminopyridine의 생성 과정에서 형성되는 3-aminopyridine 및 isonicotinamide, 두 표적 PMI에 대해 분석합니다. Dalfampridine의 표준 용량은 20mg/1일로, 이는 총 PMI가 75ppm 미만으로 정확하게 검출되어야 함을 의미합니다(PMI에 대한 독성학적 역치(TCC) = 1.5µg/일).^{1,2} 본 응용 자료에서는 Ultivo LC/TQ의 혼합 모드 수집 기능을 이용하여 고농도 API 내에 존재하는 2종의 PMI, 즉 3-aminopyridine 및 isonicotinamide의 정량을 보여줍니다.

일반적으로 이러한 유형의 분석은 LC/UV 또는 SQ LC/MS를 사용하여 수행합니다. 그러나 LC/TQ를 사용하면 알려진 불순물의 식별에서 특이성이 개선되어 보다 정확한 정량이 가능하고, 화학적 노이즈 감소로 감도를 향상시킬 수 있습니다. Ultivo의 혼합 모드 수집 기능은 동일한 시간 세그먼트에서 MRM, SIM, 생성 이온 스캔, 전구 이온 스캔 및 neutral loss 스캔 데이터를 동시에 수집할 수 있는 특징을 가지고 있습니다. 이 혼합 모드 기능을 통해 사용자는 한 번의 주입으로 표적 화합물에 대한 정밀한 정량 뿐만 아니라 그 외의 추가 정보도 수집할 수 있습니다. 규제상의 감도 요건에 따라 표준 ESI 이온화원이 이 응용을 위한 적합하고 경제적인 선택입니다.

이 분석법에서 까다로운 부분은 PMI 화합물을 검출하는 데 있어 상대적으로 높은 농도의 API가 함께 주입된다는 점입니다. 고농도의 API는 불순물 다음에 용리되기 때문에 이 분석법에서는 크로마토그래피적 분리가 중요합니다. 본 분석법의 분석물질은 친수성이기 때문에 일반적인 역상 컬럼에서는 잘 머무르지 않습니다. 따라서, 분석물질 분리를 위해 매우 견고한 친수성 상호 작용 액체 크로마토그래피 컬럼(Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼)을 사용하였습니다. 마지막으로, API가 컬럼에서 용리되는 동안 LC흐름의 방향을 MS로부터 다른 방향으로 전환하여 잠재적인 이온화원의 오염과 MS 검출기의 포화를 방지하였습니다.

실험

시약 및 화학 물질

이 응용 자료에서 사용된 모든 시약은 HPLC 또는 LC/MS 등급입니다. Acetonitrile은 Honeywell(Morristown, NJ, USA)에서 구입하였습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22µm POU(Point-of-Use) 멤브레인 필터 카트리지를 장착한 Milli-Q Integral 시스템(Merck, Darmstadt, Germany)에서 얻었습니다. Formic acid는 Fisher Scientific(Fair Lawn, NJ, USA)에서 구입하였고, 5M ammonium formate 용액은 Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA(품번 G1946-85021)에서 구입하였습니다. 의약품 및 불순물 표준물질은 Millipore-Sigma(Merck, Darmstadt, Germany)에서 구입하였습니다.

시료 전처리

20mg/mL의 4-aminopyridine 용액을 불순물의 매트릭스로서 사용하기 위해 4-Aminopyridine을 acetonitrile에 20mg/mL로 용해시켰습니다. 3-Aminopyridine 및 isonicotinamide를 acetonitrile로 용해하여 10µg/mL의 원액 농도로 희석했습니다. 3-Aminopyridine 및 isonicotinamide의 검량선은 20mg/mL의 4-aminopyridine 원액으로 연속 희석한 것을 이용하여 작성하였습니다.

기기 구성 및 실험 파라미터

Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템

- 1260 Infinity II Flexible 펌프(G7104C)
- 통합형 컬럼 격실을 갖춘 1260 Infinity II Vialsampler(G7129A)
- 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 HS(G7117C)

Agilent Ultivo QQQ LC/MS 시스템

- 전자 분무 이온화원(G1948B)

소프트웨어

Quant-My-Way 기능을 갖춘 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 B.09

시료는 주입기 전처리 시퀀스를 거쳐 분석하였으며, 이는 니들과 주입기 루프를 물 및 메탄올로 세척한 다음, 주입 전에 초기 이동상 조건으로 플래싱하는 것입니다. 각 시료에 들어 있는 고농도의 4-aminopyridine으로 인한 주입 간 캐리오버를 최소화하기 위해, 해당 주입 시퀀스를 Agilent MassHunter Acquisition에서 간편하게 프로그래밍하였습니다. LC 분석법은 애질런트 응용 자료 5994-0864EN³에 기반하여 약간 수정하였습니다. 표 1은 HPLC 그레디언트 조건을 나타내고, 표 2는 ESI 이온화원과 Ultivo LC/TQ 파라미터를 나타냅니다.

혼합 모드 수집을 이용한 MRM 및 스캔 분석법 설정

그림 1은 미지 화합물에 대한 스캔 파라미터와 표적 PMI에 대한 MRM 파라미터를 보여줍니다. Ultivo LC/TQ는 MRM과 스캔 데이터를 동시에 수집하는 기능을 제공합니다.

표 1. Agilent 1260 Infinity II Prime LC 파라미터

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150mm, 2.7µm, PEEK-lined(p/n 673775-924)
컬럼 온도	35°C
주입 부피	1µL
이동상	A) 10mM 암모늄 포메이트 + 0.02% 포름산 함유 물 B) 0.1% 포름산 함유 아세트니트릴
유속	0.5mL/분
그레디언트	시간(분) %B 0 95 2 90 4 60 8 60
중지 시간	8.0분
사후 시간	6.0분
UV 검출	[265, 10/Ref 360, 80]nm

표 2. ESI 이온화원 파라미터

파라미터	값
가스 온도	350°C
가스 유속	10L/분
Nebulizer 압력	40psi
캐필러리 전압	4,000V(+)
LC 경로 전환(폐액 방향)	3분

Acquisition Parameters

	Scan type	Polarity	Compound/Segment name	Precursor (m/z)	MS1 res	Product (m/z)	MS2 range start (m/z)	MS2 range end (m/z)	MS2 res	Scan/Dwell time (ms)	Frag (V)	ISTD?	CE (V)	Threshold
▶	Scan	Positive					70	400		300	110	☐		0
▶	MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	68.1			Unit	100	110	☐	20	
▶	MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	52			Unit	100	110	☐	44	
▶	MRM	Positive	3-aminopyridine	95.1	Unit	41.1			Unit	100	110	☐	28	
▶	MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	80			Unit	100	110	☐	20	
▶	MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	53			Unit	100	110	☐	32	
▶	MRM	Positive	Isonicotinamide	123.1	Unit	52			Unit	100	110	☐	52	

그림 1. 간단한 혼합 모드 스캔 설정. MRM 목록에 스캔 행을 추가하기만 하면 됩니다.

결과 및 토의

분석법의 직선성, 감도 및 정밀도

표준 ESI 이온화원을 갖춘 Ultivo LC/TQ는 측정된 두 가지 불순물에 대해 탁월한 감도를 나타냈습니다. 3-Aminopyridine은 5ng/mL을 정확하게 정량할 수 있고, isonicotinamide는 4-aminopyridine 매트릭스(20mg/mL)에서 0.5ng/mL의 낮은 수준까지 정량할 수 있었습니다. 이 분석법에서 각 분석물질에 대한 정밀도는 탁월했습니다. 정량 한계에서의 6회 반복 주입에 대하여 3-aminopyridine과 isonicotinamide의 RSD%는 각각 4.25% 및 0.23%이었습니다(그림 3). 두 불순물의 6-포인트 검량선 모두에서 $R^2 > 0.99$ 의 우수한 직선성이 관측되었습니다(그림 2).

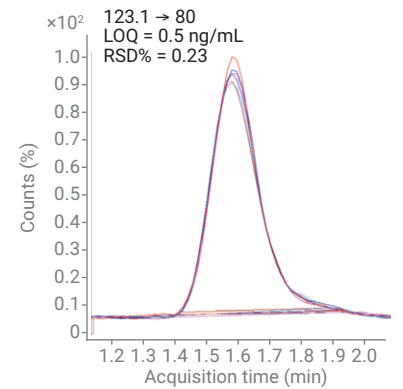
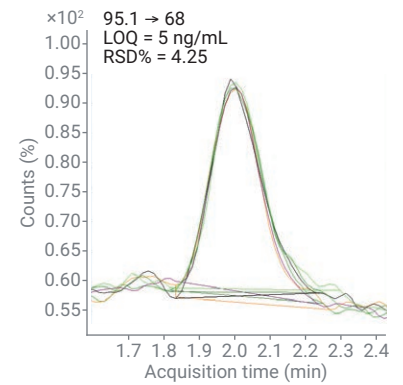
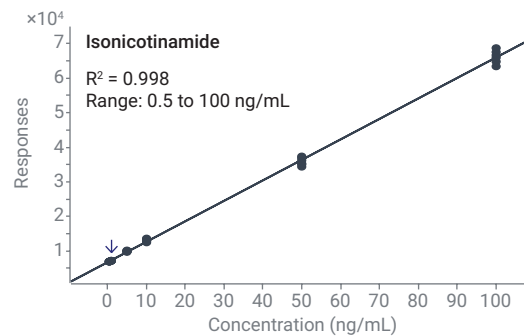
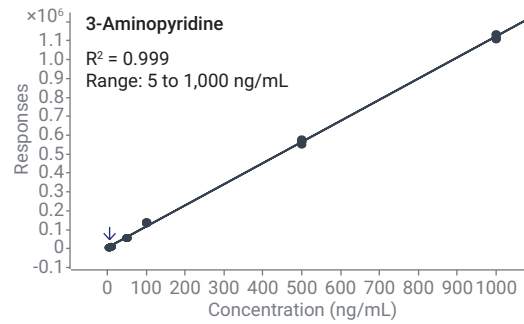


그림 2. API 매트릭스에서 측정된 3-aminopyridine 및 isonicotinamide의 6-포인트 표준 검량선 및 정량 한계에서 6회 반복 주입한 정량 이온 전이의 오버레이

혼합 모드 수집을 이용한 분석 추가 정보 획득

혼합 모드 수집을 통해 MS 사용자는 스캔 데이터와 MRM 데이터를 동시에 수집할 수 있으며, 이 과정에서 작업자는 동일 시료에 존재하는 추가 용리 화합물을 찾을 수도 있습니다. 표적 화합물의 MRM 데이터는 스캔 데이터보다 뛰어난 선택성, 감도, 정확성을 갖는 정량 결과를 제공합니다. 그리고 스캔 데이터는 시료에 존재하는 예상치 못한 분석물질에 대한 정보를 제공할 수 있습니다. DAD 모듈 역시 LC 스택에 쉽게 통합할 수 있어 질량 분석기로의 LC 흐름이 폐액 방향으로 전환되어 있는 동안 고농도의 API를 검출할 수 있는 추가적인 이점을 더해 줍니다(그림 3). 물론 혼합 모드 스캔을 사용해도 MRM 전이의 피크 모양이나 면적은 변하지 않습니다(그림 4).

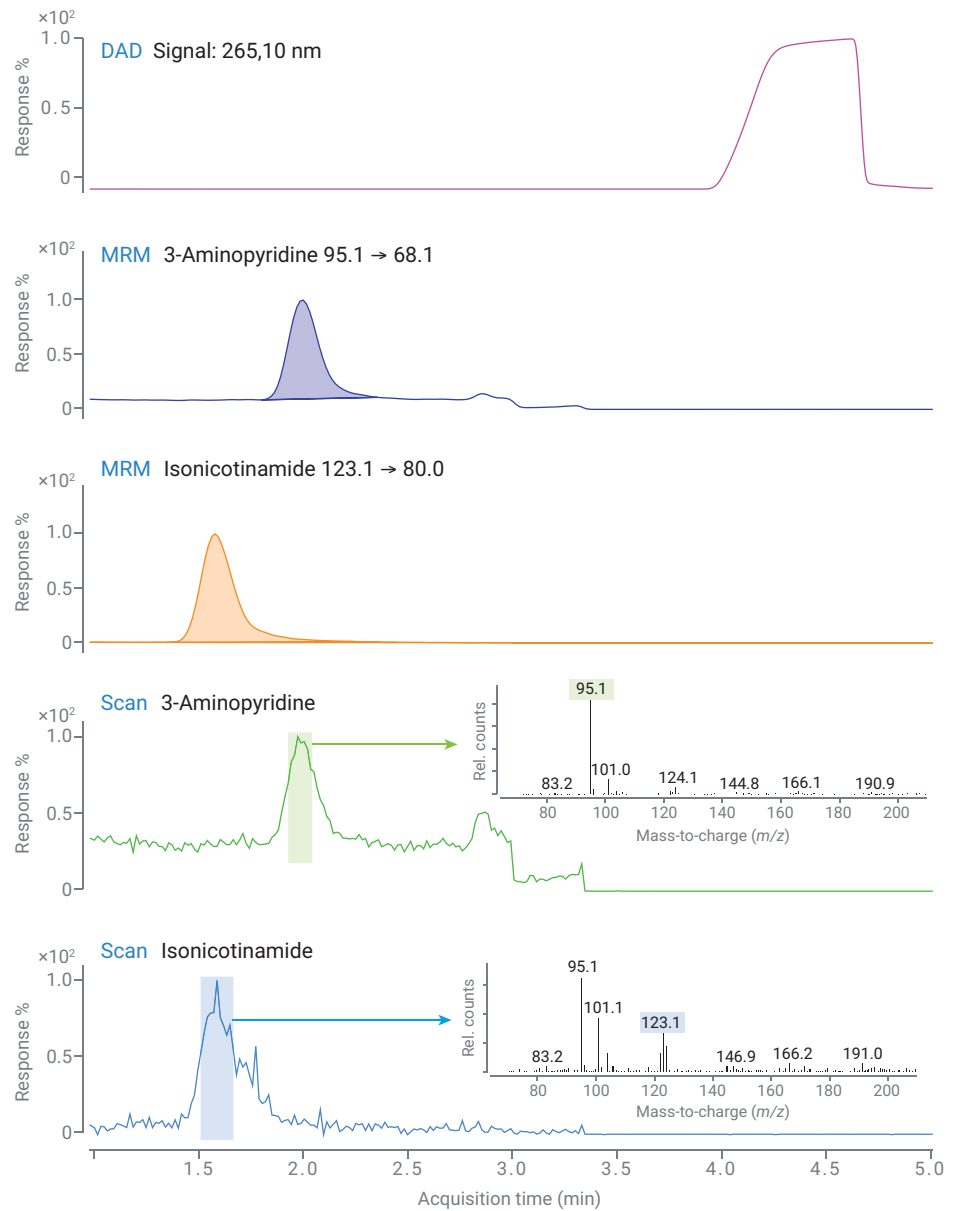


그림 3. 스캔과 MRM 동시 사용이 가능한 혼합 모드 수집. LC 흐름이 폐액 경로로 전환되어 있는 동안 DAD 신호가 API를 검출할 수 있으며, 이 과정은 MS 오염을 제한합니다. DAD 신호로는 MS에서 발견된 불순물을 검출하지 못합니다.

결론

본 응용 자료에서는 20mg/mL의 4-aminopyridine(API)에서 잠재적 변이원성 불순물(3-aminopyridine 및 isonicotinamide)에 대한 고감도의 정확한 정량에 대해 설명합니다. Agilent Ultivo 고유의 기능인 MRM을 포함하는 혼합 모드 수집을 통해, 시료에서 추가 스캔 정보를 수집하는 동시에 동일한 시간 세그먼트에서 MRM으로 PMI 화합물을 정확하게 정량할 수 있습니다. Agilent 1260 Infinity II Prime LC 시스템과 표준 ESI 이온화원을 갖춘 Ultivo의 탁월한 성능으로 인해 이 경제적인 기기 조합만으로 API를 보다 적은 양으로 샘플링 하며 PMI를 검출함과 동시에 이 잠재적인 불순물을 그대로 정확하게 정량할 수 있습니다.

참고문헌

1. US Department of Health and Human Services; FDA; CDER; CBER. M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. ICH, March **2018**.
2. Jain, M. *et al.* Determination of Five Potential Genotoxic Impurities in Dalfampridine Using Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 133, 27–31.
3. Covert, K. How to Catch a Potential Mutagenic Impurity Using an Agilent LC/MSD XT and Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z Column for Sensitive and Reliable Detection of Dalfampridine Impurities. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0864EN, **2019**.

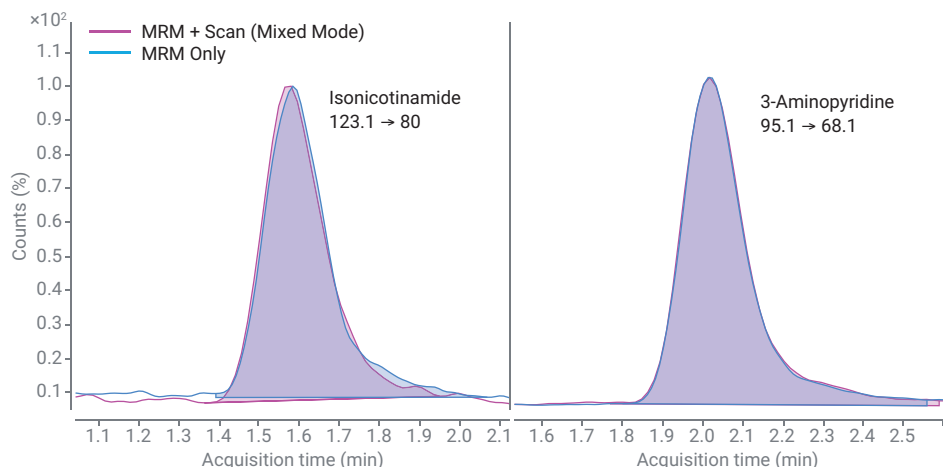


그림 4. 혼합 모드와 MRM-only 스캔 유형 사용 시 비교. 거의 동일한 피크 모양과 피크 면적이 관측됩니다.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 8월 19일, 한국에서 인쇄
5994-1238KO

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

 **Agilent**
Trusted Answers