

## 브랜드 vs. 제네릭 의약품 내의 극미량 불순물 측정을 위한 자기 인식 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ의 활용

### 저자

Kyle Covert, PhD  
Agilent Technologies, Inc.



### 개요

본 연구에서는 브랜드 acetaminophen과 제네릭 일반의약품(OTC) acetaminophen 내의 관련 불순물을 비교하는 분석법을 소개합니다. 해당 워크플로는 Agilent InfinityLab 액체 크로마토그래피/질량 분석기(LC/MSD iQ)와 Agilent 1290 Infinity II LC로 구성되어 있습니다. 이 연구에서는 UV를 통해 신뢰성 있게 검출할 수 있는 수준보다 낮은 농도의 불순물을 식별하였습니다.

## 서론

대부분의 일반의약품(over-the-counter drug, OTC drug)은 브랜드 제품에 기반해 개발된 제네릭 의약품 형태로 제공되며 처방전 없이 구입할 수 있습니다. 이러한 제네릭 의약품은 여러 제조업체에서 판매하기 때문에 경쟁을 촉진하여 잠재적으로 가격을 낮춤으로써 의약품을 더 저렴하게 구입하는 데 도움을 줍니다. 제네릭 OTC 의약품 제조업체는 이미 승인된 브랜드 의약품에 대해 USFDA가 규정한 효능/효과, 순도, 안정성 및 관련 불순물 허용치 등과 같은 품질 속성을 동일하게 충족해야만 합니다<sup>1</sup>. 제네릭 의약품 제조업체는 제품과 불순물의 특성을 반드시 규명할 수 있어야 하며 이 때, HPLC 및 UV 검출을 일반적으로 사용합니다. 질량 분석기를 추가하면 일반적인 USP 또는 EP 분석법의 분석 시간을 크게 줄일 수 있습니다<sup>2</sup>. 동시 용리 성분을 표적 화합물의 질량을 통해 명확하게 구분하여 측정할 수 있기 때문입니다.

본 연구에서는 브랜드 OTC acetaminophen 및 제네릭 OTC acetaminophen 내의 관련 불순물을 비교합니다. 해당 불순물은 InfinityLab LC/MSD iQ 및 1290 Infinity II LC를 사용하여 스크리닝 하였습니다. SQ(single quadrupole) 기술을 기반으로 하는 LC/MSD iQ는 사용의 편의성과 성능의 신뢰성을 갖추도록 설계된 견고한 검출 시스템입니다. 이 기기는 최소한의 사용자 교육만으로 사용할 수 있을 정도로 직관적입니다. 높은 LC 유속을 처리할 수 있으며 MS 파라미터를 자동으로 최적화하여 최상의 결과를 제공합니다. 질량 측정을 사용하여 원료 의약품(API), 관련 불순물, 그리고 더 중요하게, 미지의 또는 예상치 못한 불순물을 명확하게 검출할 수 있습니다. 크로마토그래퍼들은 LC/MSD iQ를 새로운 모듈로서 기 사용 중인 LC 스택에 쉽게 통합할 수 있습니다. 이 기기는 Agilent 1260 Infinity II LC, 1290 Infinity II LC, 혹은 구형 LC에도 쉽게 통합할 수 있고 LC 모듈과 동일한 전원 콘센트에 연결 가능한 공간 설계를 갖추도록

특별히 설계되었습니다. MS 및 진공 펌프를 포함한 HPLC 스택을 Agilent InfinityLab Flex Bench MS에 설치하면 벤치 공간을 절약하고 전체 시스템의 위치를 신속하고 안전하게 재배치할 수 있습니다.

## 실험

### 표준물질 및 화학물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 LC/MS 등급을 사용하였습니다. 메탄올은 Honeywell(Morristown, NJ, USA)에서 구입하였습니다. Acetaminophen API 및 관련 불순물의 표준물질 그리고 acetic acid는 Millipore-Sigma(Merck, Darmstadt, Germany)에서 구입하였습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22µm POU(point-of-use) 멤브레인 필터 카트리지를 (EMD Milipore, Billerica, MA, USA)를 장착한 Milli-Q Integral시스템을 이용해 제조하였습니다.

OTC 의약품 시료는 현지 약국에서 구입했으며 브랜드 제품을 의약품 1로, 제네릭 의약품을 의약품 2로 지정하였습니다.

### 기기

LC/MSD iQ 시스템은 다음 모듈로 구성됩니다.

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Vialsampler(G7129B)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(G7117B)
- Agilent LC/MSD iQ(G6160AA)

LC/MSD iQ와의 결합에서 UV 검출기의 최대 감도를 얻기 위해 DAD에서 Agilent Max-Light 카트리지를 셀, 60mm(G4212-60007)를 사용했습니다.

### 시료 전처리

선택한 약물 불순물 표준물질을 15mL Falcon 튜브에 칭량하고 메탄올을 사용하여 1mg/mL의 작업 농도로 희석한 다음 대략 15분간 초음파 처리했습니다. 100µL의 각 표준물질을 2mL screw top 바이알에 넣고 80:20 메탄올/물로 1mL가 되도록 희석했습니다. 80:20 메탄올/물로 연속 희석하여 외부 표준법 검량선 작성에 사용하기 위한 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1µg/mL의 농도를 조제하였습니다. OTC 의약품 시료는 acetaminophen(API) 복용량당 500mg의 정제 형태로 제공되었습니다. 메탄올을 사용하여 API 및 그 불순물에 대해 간단히 액체 추출을 수행하였습니다. 의약품 정제를 10mL의 메탄올과 함께 15mL Falcon 튜브에 넣고 30분간 진탕한 다음 대략 30분 동안 초음파 처리하고 약 15분간 원심 분리기에서 4,500rpm으로 스피ن 다운 시켰습니다. 이어서, 최종 용액 1mL를 Falcon 튜브에서 2mL screw top 바이알로 피펫팅하여 최종 API 농도 50mg/mL로 분석 준비를 마쳤습니다.

### Agilent OpenLab CDS

데이터의 수집, 처리 및 보고서 작성은 Agilent OpenLab CDS 소프트웨어를 사용하였습니다. OpenLAB CDS는 US FDA 21 CFR Part 11, EU Annex 11를 비롯한 기타 유사 규제에 따른 데이터 무결성을 지원하는 규제 준수 기능을 제공합니다. 1290 Infinity II LC 및 LC/MSD iQ는 GxP 실험실의 일상적 응용 분석을 위해 LC/MS의 신뢰성과 견고성을 보장하도록 설계되었습니다.

## 결과 및 토의

### OpenLab CDS 2.4에 의한 선형 검량 범위 확정

Agilent OpenLab CDS 2.4 소프트웨어를 사용하여 검량선을 작성하였습니다. OpenLab CDS 내의 Data Analysis

화면에서 검량선을 쉽게 확인할 수 있으며 (그림 1) 이 데이터는 테스트 시료의 신속한 자동 정량을 위해 저장됩니다. 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 및 10.0µg/mL의 6개 농도 수준별로 3회 반복 분석을 거쳐 표준물질 불순물에 대한 외부 표준법 검량선을 생성하였습니다.

이러한 농도는 시료 내 API의 2, 10, 20, 50, 100 및 200ppm에 해당하며, 의약품 시료에서 예상되는 불순물 농도의 범위를 포함하기 위해 이 범위를 선택하였습니다. 그림 2는 검량선을 나타내며 모든 표적 화합물에서  $R^2 > 0.99$ 을 보였습니다.

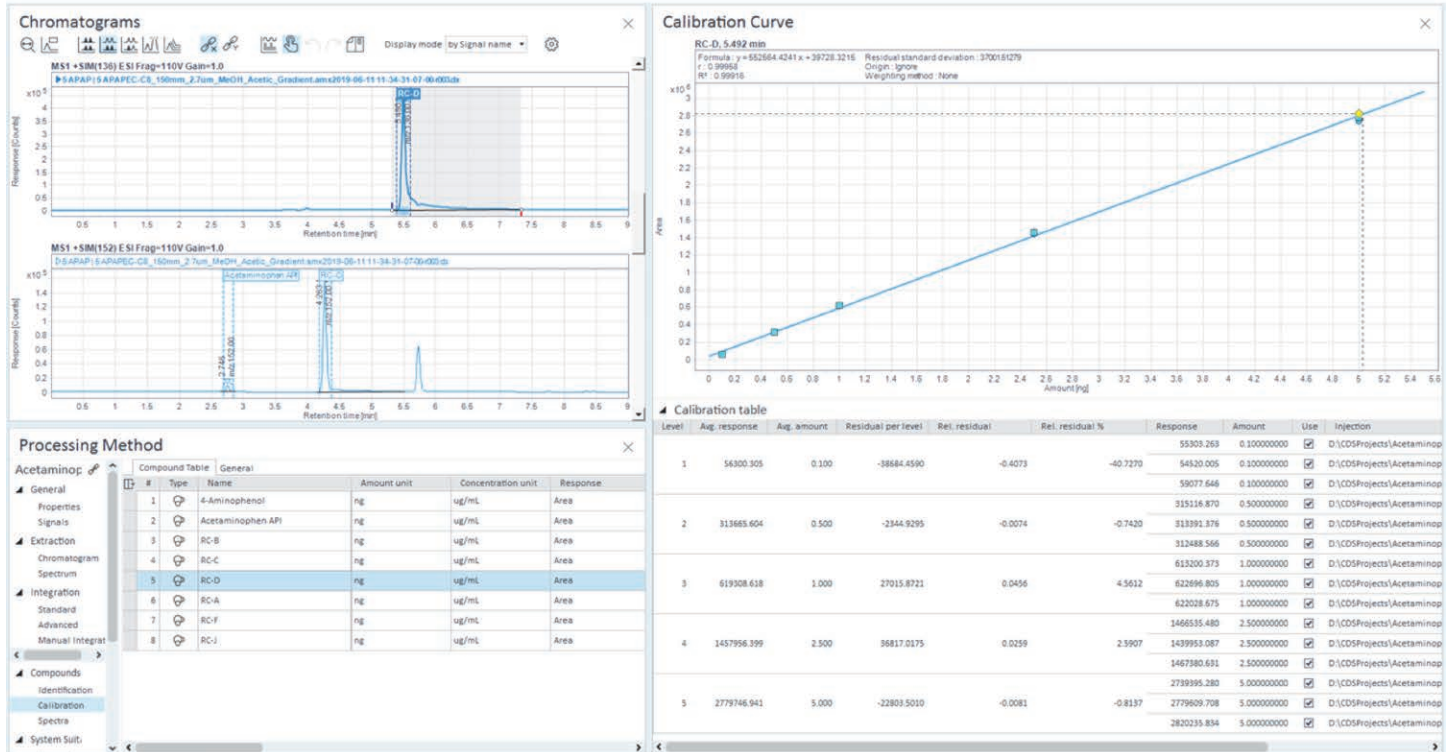


그림 1. Agilent OpenLab CDS의 Data Analysis 부분(검량선 탭 열린 상태). 사용자는 크로마토그램과 검량선을 동시에 쉽게 볼 수 있고 계산 결과가 실시간으로 업데이트되는 검량선을 선택할 수 있습니다.

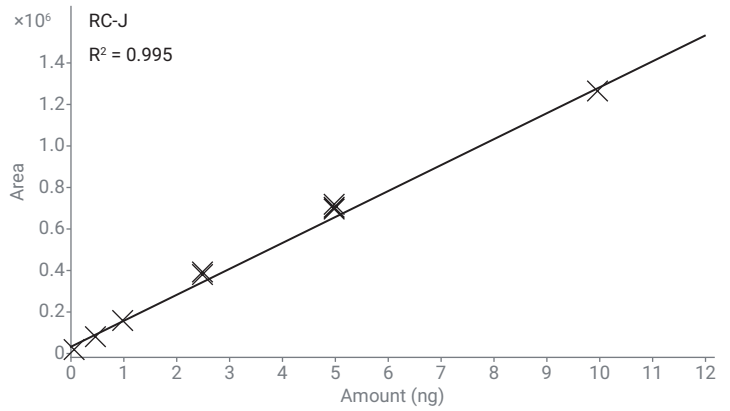
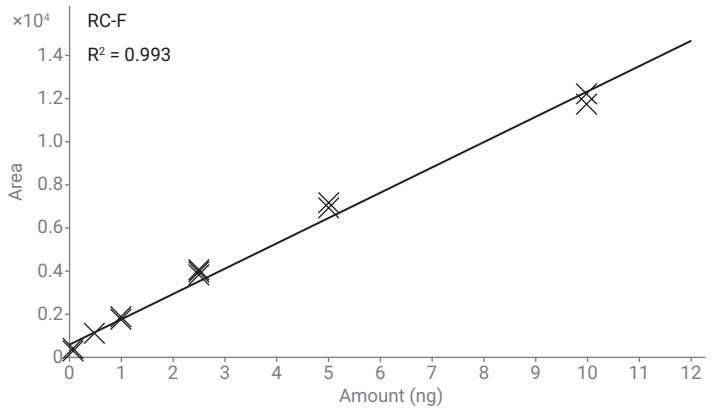
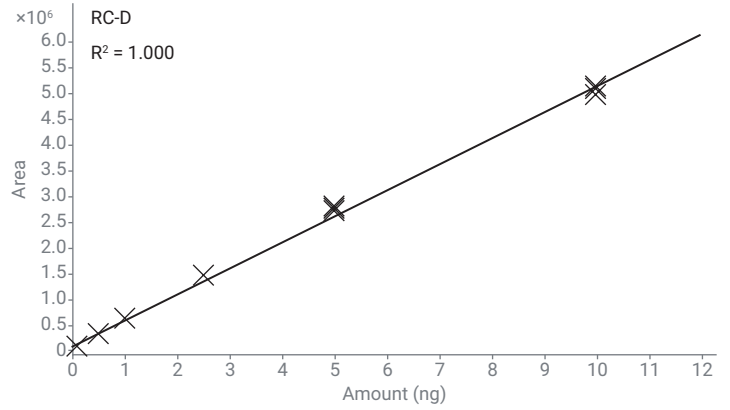
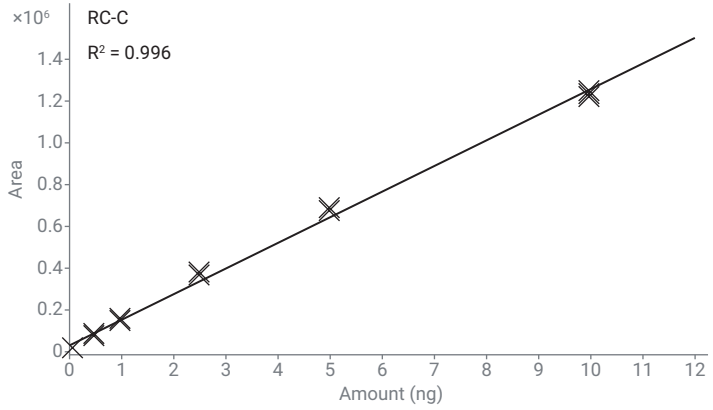
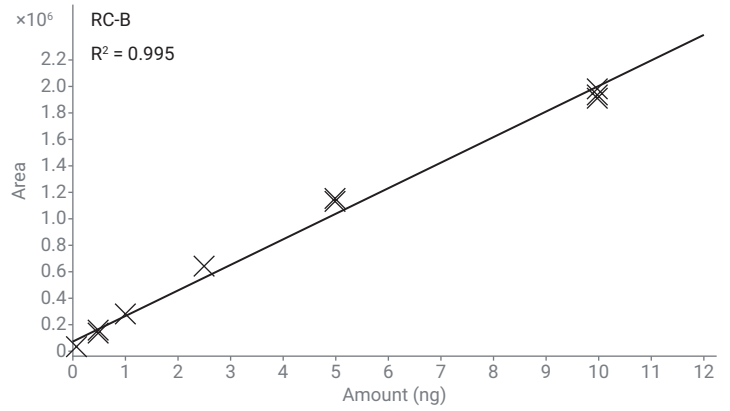
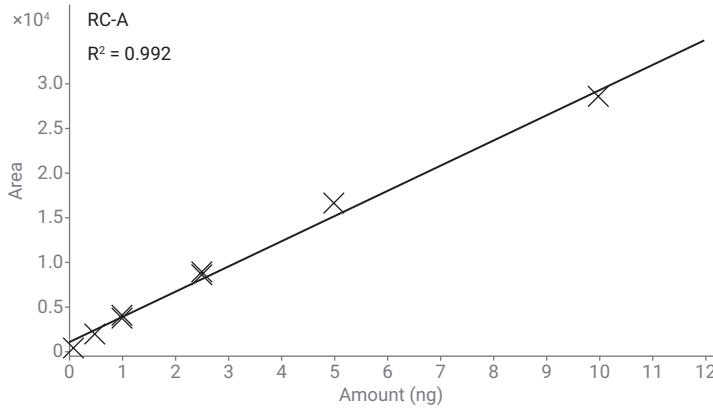
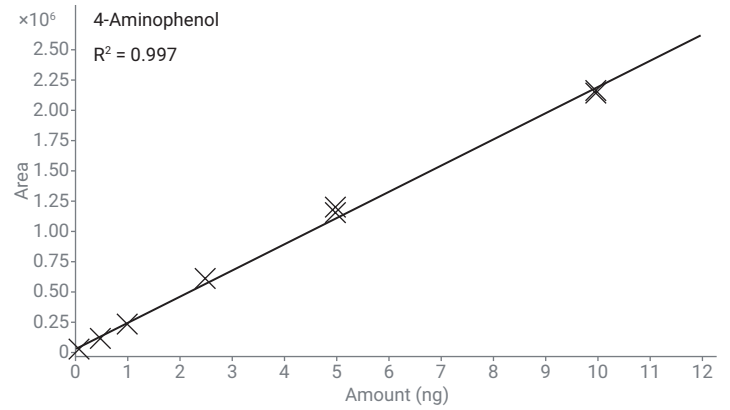
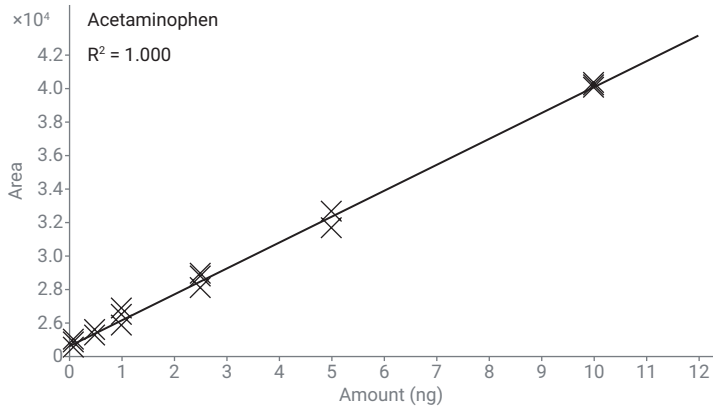


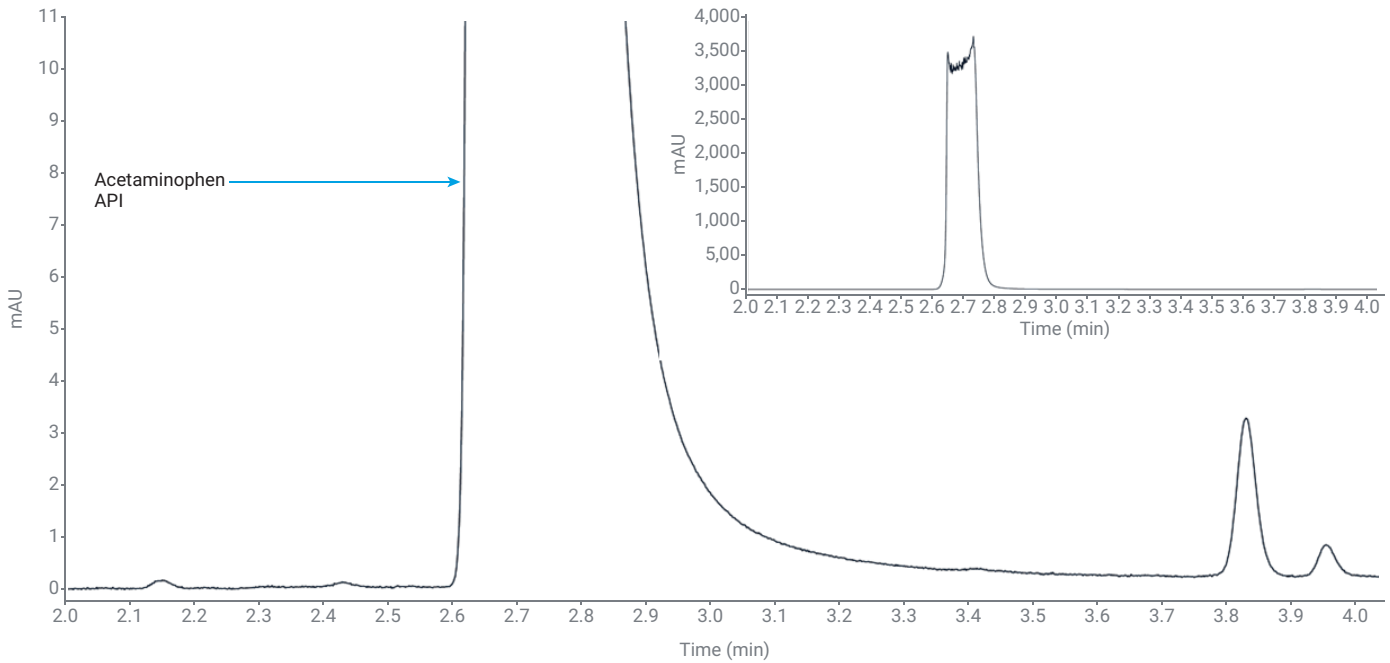
그림 2. 표 1의 API 및 불순물에 대한 외부 표준법 검량선. 모든 표적 화합물은 3회 반복 측정하였으며 R<sup>2</sup> > 0.99의 결과를 나타냈습니다.

**MS 검출기 보호에 필수적인 의약품 API 전환(diverting)**

LC/MSD iQ에는 전환 밸브가 내장되어 있어 고농도 시료가 함께 있을 때 불순물의 분석을 용이하게 하고 MS 검출기의 긴수명과 견고성을 보장합니다. 시료에 존재하는 고농도의 API(50mg/mL)로 인해

MS 검출기가 과포화되는 것을 방지하기 위해 API가 DAD 뒤에 용리될 때 흐름을 폐기물로 전환(우회)합니다. 먼저, 유동 경로에서 MS를 제외하고 시료를 측정하여 API를 전환해야 하는 시간대를 결정합니다 (그림 3).

내장된 LC/MSD iQ 전환 밸브에 대하여 2.5~3.5분동안 흐름을 폐기물로 전환하도록 설정하였습니다. 그림 3에서 볼 수 있듯이, 이는 API만 전환하고 첫 번째 불순물이 용리되기 전에 흐름을 다시 질량 분석기로 전환합니다.



**그림 3.** 50mg/mL의 의약품 API(acetaminophen)를 함유한 의약품 시료 1 $\mu$ L를 주입하여 얻은 UV 크로마토그램 확대 화면. 샵도는 동일한 주입의 전체 신호 스케일을 나타냅니다.

### OTC 시료 내 불순물 식별

LC 분석법을 최적화하여 충분한 분리를 달성하기 위해 표 1에 나열된 불순물을 개별 표준물질 시료로 측정하였습니다. 그런 다음, 10µg/mL 농도의 API 및 불순물 표준물질 혼합 시료 1µL를 주입하여 측정하고, 의약품 시료와 비교하여 시료에 존재하는 불순물을 식별하였습니다(그림 4).

의약품 시료 1µL를 주입하여 측정하였으며 선택 이온 모니터링(SIM) 모드에서 표 1에 나온 모든 불순물을 모니터링하였습니다. 그림 5는 의약품 시료에서 관련 불순물 모두가 검출되지는 않았음을 보여줍니다. 의약품 시료에서는 4-aminophenol, RC-A, RC-B 및 RC-D 등 4가지 불순물만 확인되었습니다. 이 연구에서는 유연물질을 프로파일의 SIM만 비교하고(그림 6), 제제의 일부인 다른 성분은 제외하였습니다.

표 1. API 및 불순물 표준물질 목록

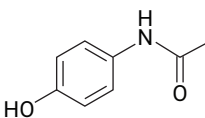
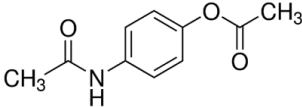
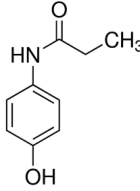
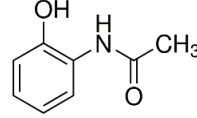
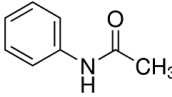
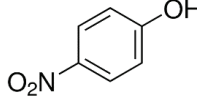
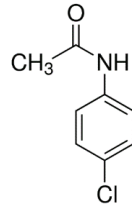
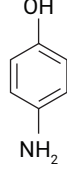
화합물	g/mol	구조
Acetaminophen	151.2	
유연물질 A	193.2	
유연물질 B	165.2	
유연물질 C	151.2	
유연물질 D	135.2	
유연물질 F	139.1	
유연물질 J	169.6	
4-Aminophenol	109.1	

표 2. Agilent 1290 Infinity II LC 분석법 파라미터

파라미터	HPLC 설정값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 3.0 × 150mm, 2.7μm, 40°C(p/n 693975-306)
이동상 A	0.1% acetic acid 함유 물
이동상 B	0.1% acetic acid 함유 메탄올
그레디언트	시간 %B
	0 10
	7 50
	8 80
	8.5 80
9.0 10	
사후 실행 시간	2.5분
유속	0.6mL/분
주입 부피	1μL
UV 검출	(265, 5/ref. 360, 80), (318, 5/no ref.)

표 3. Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 파라미터

파라미터	SQ 설정값
이온화원	ESI+
피크 필터	0.02분
스캔/측정(dwel) 시간	스캔 100ms
	SIM 50ms
건조 가스 온도	325°C
가스 유속	10L/분
Nebulizer 압력	35psi
캐필러리 전압	3.5kV
Fragmentor 전압	90V
스캔 범위	m/z 100~300
SIM 이온	m/z 110, 152, 194, 166, 136, 140, 170

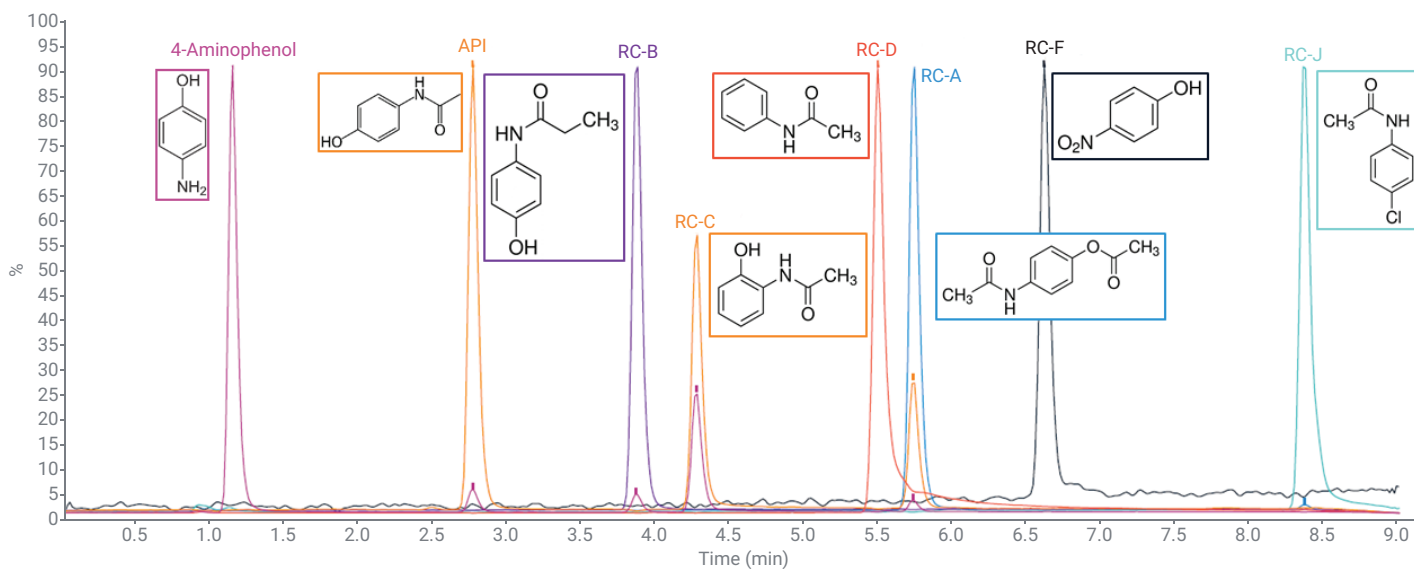


그림 4. API 및 불순물 표준물질(10μg/mL) 1μL 주입에 대한 SIM 질량 크로마토그램. 각 피크에 색상으로 구분된 구조가 표시되어 있습니다. 각 피크를 분명하게 관측할 수 있도록 신호 스케일을 상대 존재비로 설정했습니다.

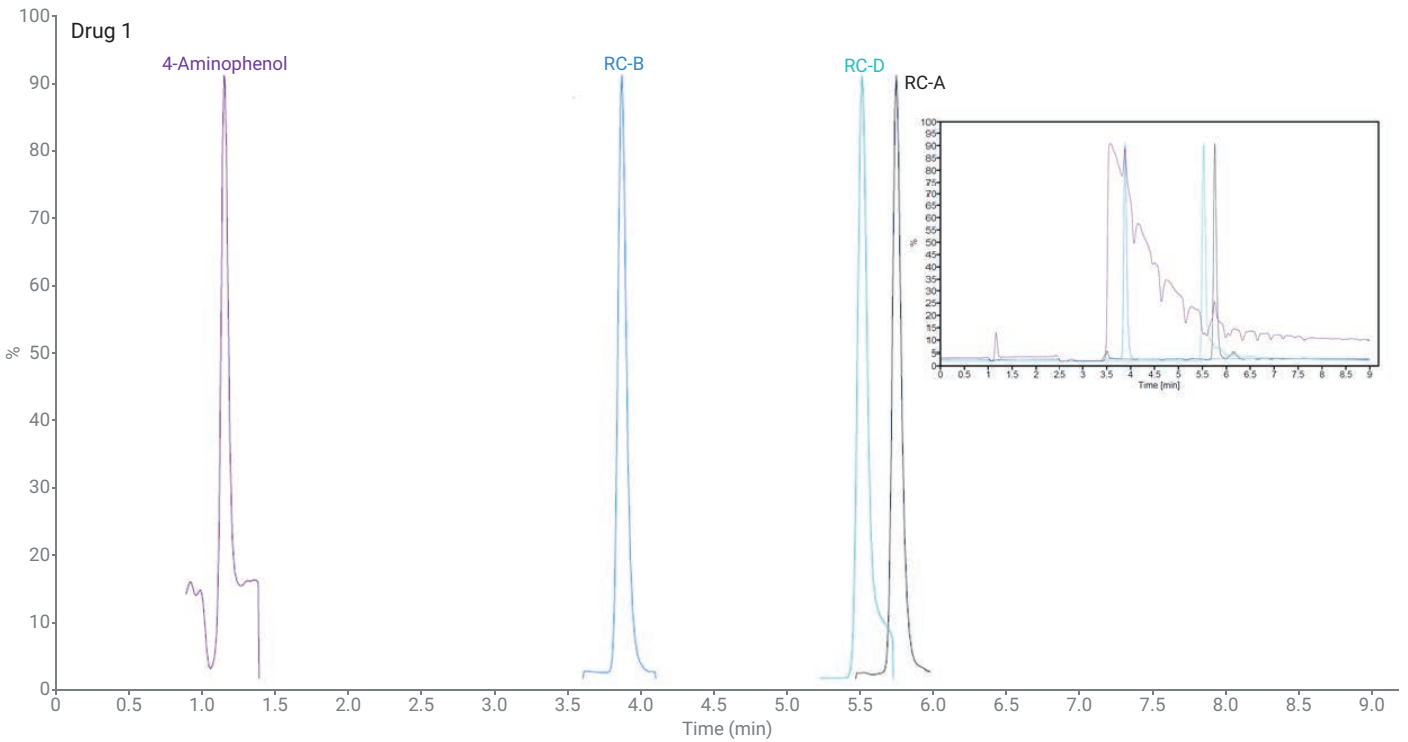


그림 5. 50mg/mL의 API를 포함한 의약품 1 시료의 1 $\mu$ L 주입에 대한 선택 SIM 이온의 추출 이온 크로마토그램(EIC). SIM 신호는 명확성을 위해 일괄적으로  $\pm 0.5$ 분 범위 지정하였으며 삽도는 전체 SIM 이온의 TIC 크로마토그램을 나타냅니다. 삽도 이미지의 넓은 피크는 4-aminophenol( $m/z$  110)과 동일한  $m/z$ 로 검출된 잔류 API의 조각입니다.

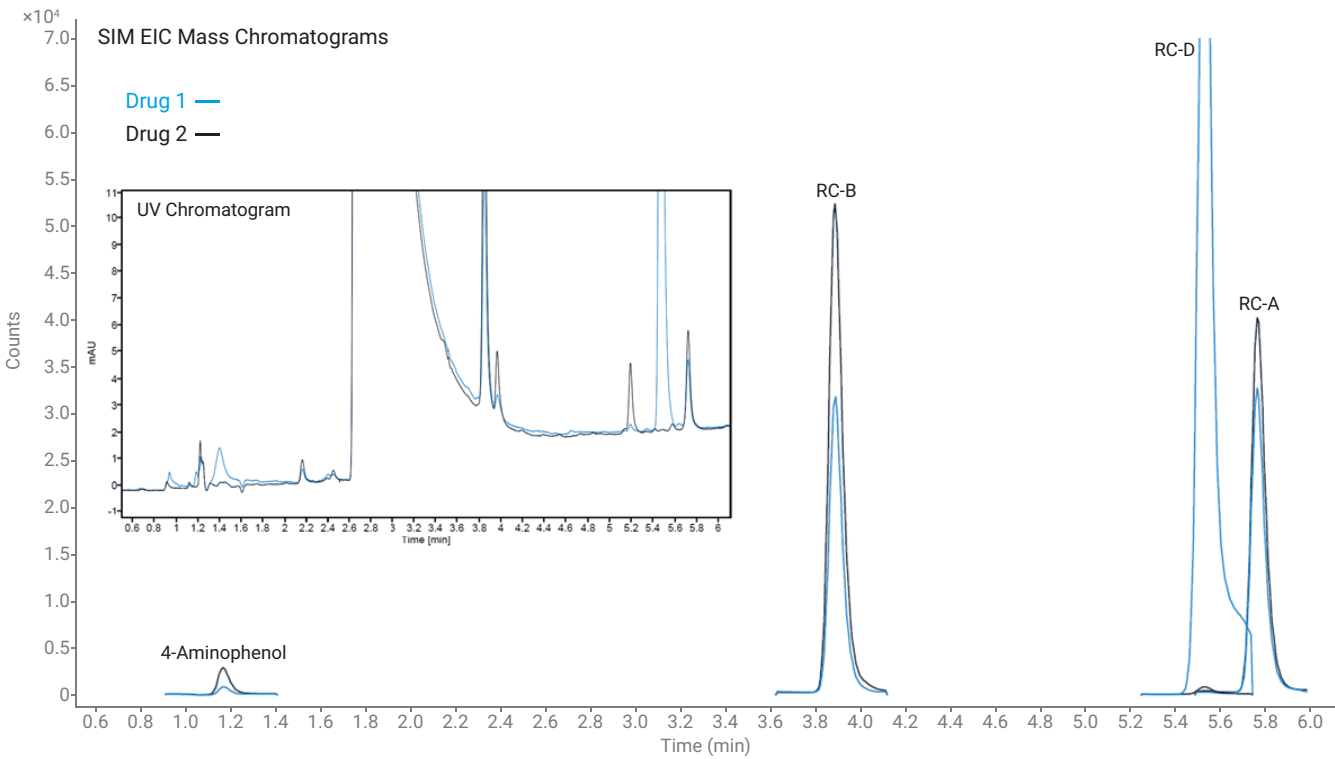


그림 6. OTC 의약품 시료에서 검출된 의약품 불순물에 대한 SIM EIC 질량 크로마토그램. 파란색 선은 의약품 1, 검은색 선은 의약품 2를 나타냅니다. 불순물 EIC는 명확성을 위해 해당 머무름 시간 주위로 범위를 지정했습니다. 삽도는 표 1의 불순물과 관련이 없는 다른 많은 화합물이 보이는 동일 주입의 UV 크로마토그램입니다.



## 브랜드 OTC vs. 제네릭 OTC 의약품 시료 비교

그림 6은 측정된 표준 불순물, 즉 4-aminophenol, RC-A, RC-B 및 RC-D 에 대한 의약품 시료 1과 2의 비교 결과를 보여줍니다. 가장 눈에 띄는 성분은 RC-D 로, 이 물질은 의약품 2보다 의약품 1에서 훨씬 높은 존재비를 보입니다. 그러나, 4-aminophenol, RC-B 및 RC-A에 대한 전반적인 불순물의 존재비는 의약품 2에서 더 높습니다. 각 의약품 시료에서 검출된 API 대비 불순물의 양(ppm)이 표 4에 나타나 있습니다. 이 양은 USFDA 권장 가이드라인보다 훨씬 낮지만<sup>3</sup>, 브랜드 의약품과 제네릭 의약품 간의 불순물 조성에 명확한 차이가 있음을 보여줍니다.

표 4. 의약품 시료 내 API 대비 불순물의 양(ppm) 비교. 상대적으로 높은 농도는 굵게 표시했습니다.

불순물	의약품 1 API 대비 ppm	의약품 2 API 대비 ppm
4-Aminophenol	0.440*	<b>1.586*</b>
RC-A	3.010	<b>4.960</b>
RC-B	4.260	<b>14.72</b>
RC-D	<b>21.32</b>	미검출
RC-C	미검출	미검출
RC-F	미검출	미검출
RC-J	미검출	미검출

\* 가장 낮은 검량 수준 미만으로 외삽하였음

## 결론

Agilent LC/MSD iQ는 OTC 의약품에 존재하는 불순물을 피코그램 수준, ng/mL(on-co까지 쉽게 검출할 수 있습니다. 브랜드 OTC 의약품과 제네릭 OTC 의약품 내의 불순물을 분석하여 비교했습니다. 브랜드 의약품에는 4-aminophenol, RC-A, RC-B 및 RC-D 등 4가지 검출 가능한 불순물이 포함되어 있었던 반면, 일반 의약품에는 4-aminophenol, RC-A 및 RC-B 등 3가지 검출 가능한 불순물이 포함되어 있었습니다. 브랜드 의약품 분석에서 더 많은 종류의 불순물이 검출되었지만, 제네릭 의약품에는 이러한 불순물이 더 높은 농도로 포함되어 있었습니다. 두 OTC 제품 모두 USFDA 가이드라인<sup>3</sup>에 따라 제조된 것이며 불순물 농도는 가이드라인에 명시된 수준 (15g/mL 또는 API의 0.03%)보다 훨씬 낮습니다. UV 검출기로는 이러한 농도(표 4 참조)의 불순물을 신뢰성 있게 정량할 수 없습니다. 또한, 두 API 사이에서 관찰된 불순물 프로파일의 차이는 출발 물질의 원천 및 제조 과정에서 사용된 합성 및 정제 공정 때문일 수 있습니다.

## 참고문헌

1. Generic Drugs. <https://www.fda.gov/drugs/buying-using-medicine-safely/generic-drugs>. USFDA, May 16, 2019. Retrieved July 22, 2019.
2. Acetaminophen USP Monograph. The United States Pharmacopeia Convention. May 1, 2014.
3. US Department of Health and Human Services; FDA; CDER; CBER. Guidance for Industry Q3B(R2) Impurities in New Drug Products. ICH, July 2006, Rev. 2.

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

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
2019년 10월 8일, 한국에서 인쇄  
5994-1431KO

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

