고분해능 LC/MS 및 Mass Profiler 소프트웨어를 이용한 용기 및 포장의 추출 화합물에 대한 검출 및 식별

응용 자료

저자

Srividya Kailasam and
Syed Salman Lateef Agilent
Technologies, India Pvt. Ltd.

개요

Agilent 6530 Q-TOF 시스템과 연결된 Agilent 1290 Infinity LC 시스템에 데이터 마이닝 소프트웨어를 결합하여 안과 약품(ophthalmic drug, ODP) 용기 및 포장(Container Closure System, CCS)의 추출 화합물을 식별하였습니다. 의약품 포장재의 추출물은 대부분 유해한 화합물이며 물리화학적 성질이 매우 다양합니다. 광범위한 검출 범위에서 모든 분석물을 확인하기 위해 교차 분석 기술이 종종 필요합니다. 일부 응용 자료가 이미 GC/MS를 사용한 분석법[1,2,3]의 유효성을 보여주었습니다. 본 응용 자료는 LC/MS를 통해 이러한 분석을 수행할 수 있는 능력을 소개합니다. Agilent 6530 Q-TOF는 데이터 비의존적 All Ions MS/MS 수집 모드(DIA)에서 양이온 및 음이온 모드 분석을 수행하였습니다. 대조 용매에서 유의미한 추출물을 구별하는 데는 Agilent MassHunter Profinder와 Agilent Mass Profiler 소프트웨어를 같이 사용하였습니다. 추출 화합물의 식별에는 Mass Profiler 소프트웨어 내의 데이터베이스 검색 기능과 추출/침출 화합물에 특정된 맞춤형 PCD(Personal Compound Database)를 사용하였습니다.

Agilent Technologies

도입

원료 의약품과 의약품은 1 차 및 2 차 포장재로부터 유입된 화학 물질에 의해 오염될 수 있습니다. 이러한 불순물은 환자의 건강에 잠재적인 영향을 미칠 수 있기 때문에 미국 FDA는 인체용 의약품 및 생물학적 제제의 용기 및 포장 업계에 이에 대한 지침을 발표했습니다[4]. 포장재에서 추출할 수 있거나 원료 의약품 또는 의약품으로 스며든 화합물을 프로파일링 하는 것은 복잡한 작업입니다. 그 이유는 다음과 같습니다.

- 1 차 및 2 차 용기 제작에 다양한 재료가 사용됨
- 추출 및 침출 불순물은 다양한 물리화학적 특성을 가짐
- 시료의 검출 농도 범위는 ng에서 µg까지 다양함
- 넓은 범위의 다양한 매트릭스에서 이러한 화합물을 검출해야 하는 어려움

이러한 과제를 해결하기 위해서는 여러 교차 분석 기술이 필요한 경우가 많습니다. 예를 들어, Norwood 등은 추출 및 침출 화합물 분석을 위해 개발된 많은 HPLC 및 LC/MS 분석법을 검토하였습니다[5].

이 연구에서는 가소제, 광 개시제, 안정화제, 항산화제 등과 같은 서로 다른 부류의 화합물에 속하는 일련의 분석물을 검출하는 범용 분석법을 개발하였습니다. 화합물의 분리, 검출 및 식별에는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템과 Agilent 6530 Q-TOF 질량 분석기를 사용하였습니다. Agilent MassHunter Profinder 및 Agilent Mass Profiler 소프트웨어 프로그램을 맞춤형 추출 및 침출 데이터베이스와 결합하여 데이터를 신속하게 분석하고 높은 신뢰도로 검출된 화합물을 확인하였습니다.

Agilent MassHunter Profinder 소프트웨어는 여러 고분해능 MS 데이터 파일을 신속하게 마이닝할 수 있습니다. 비표적 데이터 분석에서 이 소프트웨어의 recursive batch molecular feature extraction 데이터 마이닝 기능은 위양성 및 위음성 식별을 최소화합니다. 처리된 데이터의 추출 이온 크로마토그램(EIC)은 색상으로 표시된 그룹으로 나타냈습니다. 데이터는 후속 차이 분석을 위해 compound exchange file(.CEF) 형식으로 Mass Profiler 프로그램으로 쉽게 내보낼 수 있습니다. 이렇게 하면 서로 다른 시료를 쉽게 비교하고 차이 분석을 할 수 있습니다. 표적 추출 화합물을 모니터링 하는 표적 데이터 분석에서는 Profinder 소프트웨어의 Find by Formula 알고리즘을 선택하였습니다. 데이터는 시료 간 차이 분석을 위해 Profiler 소프트웨어의 확인된 목록으로 내보낼 수 있습니다.

Mass Profiler 소프트웨어는 데이터 세트 간의 유사점과 차이점을 비교하는 데 도움을 주는 통계 프로그램입니다. 다음과 같은 데이터 세트가 포함됩니다.

- 두 개별 시료,
- 시료의 반복 분석, 또는
- 두 시료 그룹의 반복 분석

또한 이 소프트웨어는 student t-test 및 시료 보정을 포함하는 시료의 주성분 분석(PCA)을 가능하게 합니다. 비표적 분석에서 성분 확인은 내장된 ID Browser 프로그램의 데이터베이스 검색과 분자식 생성의 조합을 이용합니다.

이 응용 자료에서는 추출 화합물을 신속하고 정확하게 확인할 수 있도록 그림 1과 같은 비표적 워크플로를 수행하였습니다.

실험

표 1은 PCD(Personal Compound Database) 구축에 사용된 화학물질입니다. 이 화학물질은 Sigma-Aldrich사에서 구매했습니다. MS 등급의 methanol, isopropyl alcohol(Fluke), 탈이온수(Milli-Q, Millipore)를 사용하였습니다.

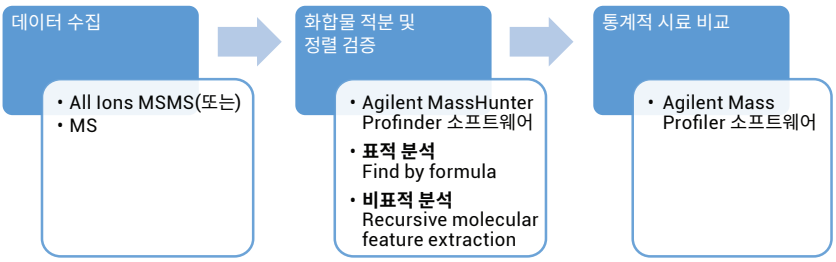

그림 1. Agilent MassHunter Acquisition, Agilent Profinder 및 Agilent Mass Profiler 소프트웨어를 이용한 데이터 처리 워크플로

표 1. 스파이킹 시료에 사용된 표적 분석물질

번호	분석물질	CAS	실험식	단일 동위원소 질량 (Monoisotopic mass)
1	Ethyl paraben	120-47-8	$C_9H_{10}O_3$	166.063
2	Irgacure 184	947-19-3	$C_{13}H_{16}O_2$	204.115
3	Irgacure 651	24650-2-8	$C_{16}H_{16}O_3$	256.1099
4	Dipropyl phthalate	131-16-8	$C_{14}H_{18}O_4$	250.1205
5	4-*n*-Octyl phenol	1806-26-4	$C_{14}H_{22}O$	206.1671
6	Diethyl hexyl phthalate	117-81-7	$C_{24}H_{38}O_4$	390.277
7	Irganox 1010	6683-19-8	$C_{73}H_{108}O_{12}$	1176.7841
8	Irganox 1076	2028-79-3	$C_{35}H_{62}O_3$	530.4699
9	Iragafos 168	31570-04-4	$C_{42}H_{63}O_3P$	646.4515

시료 전처리

원액

표준물질을 IPA에 용해시켜 각 분석물질(표 1)의 1,000ppm 원액을 제조하였습니다. 원액을 물로 희석하여 9가지 분석물질을 모두 포함한 혼합물을 만들었습니다.

표준물질 혼합 용액

각 원액을 섞고 희석하여 약 1ppm의 표적 분석물질을 만들었습니다.

추출물 시료

현지에서 구입한 안과 약병을 물로 씻고 methanol과 물을 1:1로 꽉 채웠습니다. 그런 다음 72시간 동안 55°C 오븐에 정치시킨 후 용액의 일부(200µL)를 취하여 분석하였습니다.

스파이킹 시료

표준물질 용액 10µL를 추출 시료 190µL에 첨가하여 약 0.05ppm의 표적 농도를 얻었습니다.

기기

표 2는 본 실험에 사용된 LC 및 MS 조건입니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary LC 시스템 구성:
  - Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
  - Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기(G4226A)
  - Agilent 1200 시리즈 ALS 항온 장치(G1330B)
  - Agilent 1200 시리즈 항온 컬럼 장치(G1316A)
  - Agilent 1290 Infinity 다이오드 어레이 검출기(G4212A)
  - 60mm 경로 길이 Agilent Max Light 카트리지 플로우 셀(G4212-60007)
- 100:1 분배기(G1607-60000)가 장착된 참조 질량(reference mass) 주입용 Agilent 1260 Binary 펌프 VL G1312C
- Agilent Q-TOF G6530A 및 Agilent Dual Spray Jet Stream 이온화원(G1959A)

표 2. LC 및 MS 분석법 파라미터

LC 조건	
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 3.0 × 100mm, 1.8µm(p/n 959758-306)
컬럼 온도	50°C
이동상 A	100 mg/L ammonium acetate in water
이동상 B	Methanol
유량	0.5mL/분
그레디언트	시간(분) % Methanol 0 40 8 100 11 100
정지 시간	11분
Post time	1.5분
주입량	5µL
니들 세척	1:1= methanol:물로 10초 동안 세척
자동 시료 주입기 온도	6°C
MS 조건	
이온화 모드	Dual Spray AJS-ESI
건조 가스	10L/분, 150°C
분무기 압력	30psi
Sheath 가스	11L/분, 200°C
캐필러리 전압	3500V
노즐 전압	300V
Fragmentor	145V
데이터 수집 파라미터	
수집 모드	All Ions MS Scan
Segments and CE (V)	Experiment segment no. CE (V) 1 0 2 15 3 40
극성	양이온 및 음이온
질량 범위	50~1300*m/z*
MS 스캔 비율	7 spectra/s
참조 이온	양이온: 121.0507 및 922.0098 음이온: 112.9856 및 1033.9881

소프트웨어

- Agilent MassHunter Data Acquisition B.05.01
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00
- Agilent MassHunter Profinder B.06.00
- Agilent MassHunter Mass Profiler B.07.00

결과 및 토의

화합물의 스파이킹 혼합물을 사용하여 약물 용기로부터 추출 화합물을 검출하기 위해 새로운 고분해능 LC/MS 분석법을 개발하였습니다. 스파이킹 시료는 시스템 성능 검증에도 사용됩니다. 시험 혼합물 데이터 분석을 통해 시스템의 감도와 분리능을 확보합니다. 추출 용매에 첨가된, 광범위한 극성 범위를 포함한 화합물은 표 1에 나열되어 있습니다. 표 2에 따라 분석법 파라미터를 최적화 한 다음 바탕시료, 스파이킹 시료 및 추출 시료를 각각 3 회 반복 주입하고 양이온 및 음이온 모드 모두에서 데이터를 수집하였습니다. 그림 2는 양이온 모드(그림 2A)와 음이온 모드(그림 2B)에서 얻은 추출 화합물 크로마토그램(EIC)을 보여줍니다. 그림 2A와 그림 2B에서 볼 수 있듯이, 분석물질 중 일부는 음이온 모드에서 더 나은 감도를 보였지만 다수의 분석물질은 양이온 모드에서 검출되었습니다.

추출 시료의 데이터 분석

LC/MS 분석법으로 빈 안과 약병에서 얻은 추출물을 분석하였습니다. 그림 3은 양이온 및 음이온 모드 모두에서 분석 시료의 총 화합물 크로마토그램(TCC)을 보여줍니다.

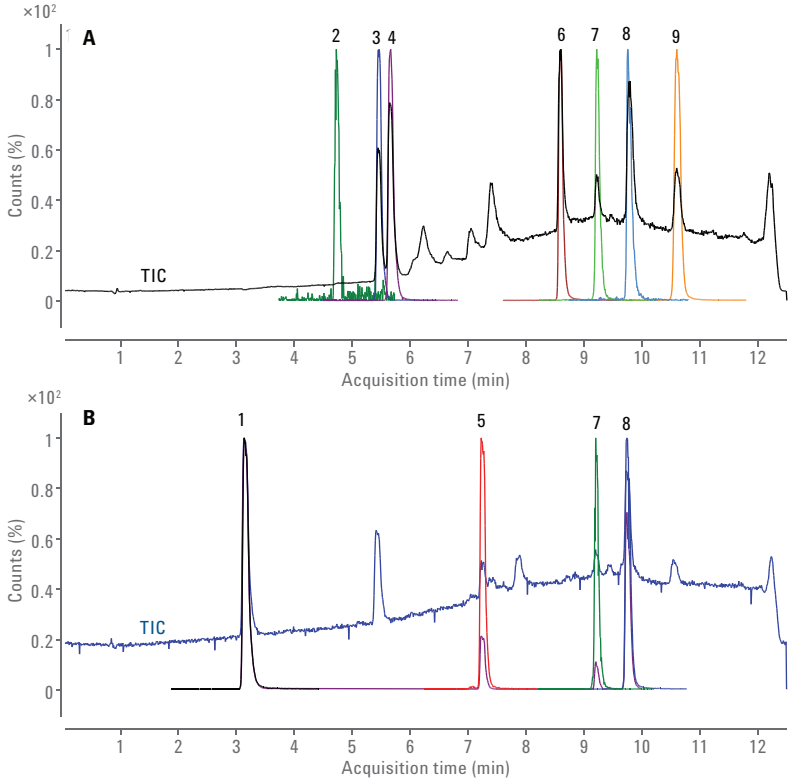

그림 2. 양이온 모드(A) 및 음이온 모드(B)에서 분석한 표적 분석물질의 화합물 크로마토그램에서 추출한, 알려진 표준물질을 첨가한 추출 시료의 총 이온 크로마토그램(TIC)

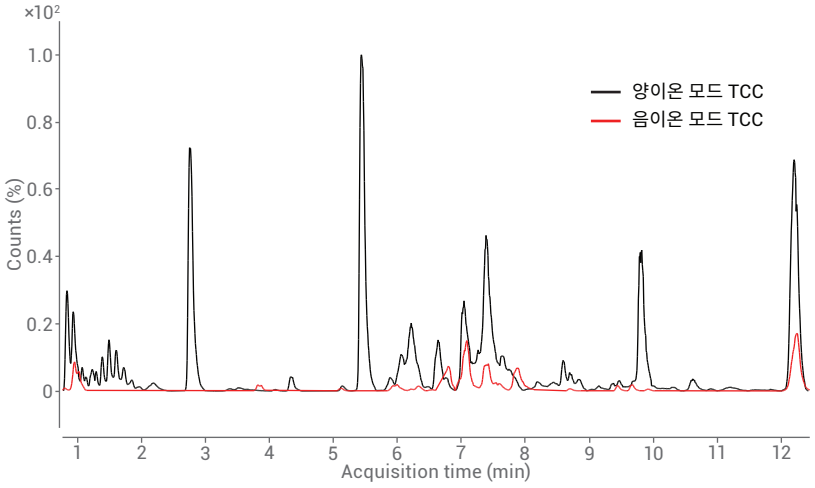

그림 3. 빈 안과 약병 추출물의 양이온 및 음이온 TCC

Agilent MassHunter Profinder 소프트웨어를 이용한 데이터 정렬

MassHunter Profinder 소프트웨어를 이용하여 수집된 데이터의 화학적 성분을 추출, 정렬 및 적분하였습니다. 적분에 실패한 성분은 육안으로 확인하여 수동 적분할 수 있습니다. 양이온 및 음이온 모드 모두에서 총 175개의 성분이 시료에서 추출되고 적분되었습니다.

Agilent MassHunter Mass Profiler 소프트웨어를 이용한 데이터 비교 및 식별

Mass Profiler 소프트웨어로 추출된 성분을 가져왔습니다. Mass Profiler 소프트웨어는 화합물 식별을 위해 데이터를 통계적으로 비교하고 데이터베이스 검색을 실행하는 데 유용합니다. 그림 4는 서로 다른 화합물을 잠정적으로 식별하는 복합 성분 목록과, Mass Profiler로 분석한 실험군과 대조군 반복 분석 시료의 성분의 양을 로그비(logarithm) 도표로 보여줍니다.

4배 변화(존재량 높이)와 > 3000의 존재량 컷오프 필터가 적용되었습니다. 양이온 및 음이온 모드 모두에서 추출 시료에서 유의한 농도로 존재하는 66개의 성분을 분석하였습니다.

Mass Profiler의 ID Browser 기능은 데이터베이스 검색 및 분자식 생성을 통해 화합물을 식별하는 데 유용합니다. 그림 5는 빈 안과 약병 추출물에서 검출된 가소제 diethylene glycol dibenzoate의 화합물명과 동위원소 분포 및 구조를 보여줍니다.

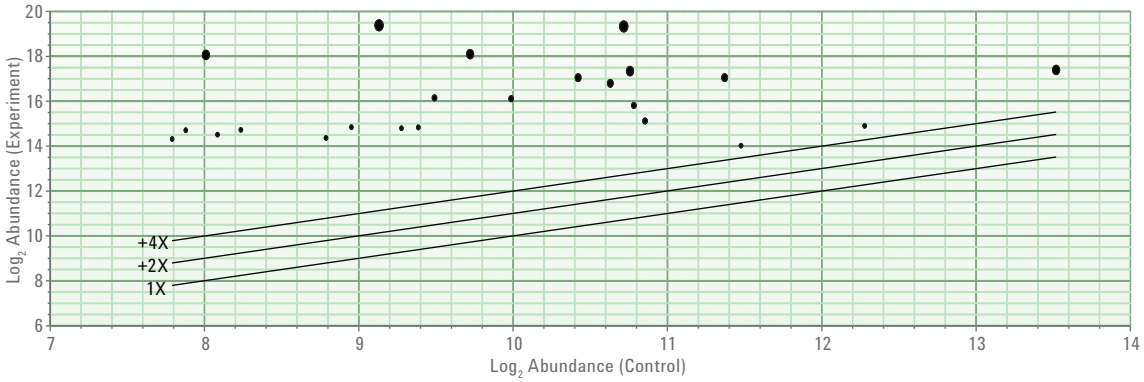

그림 4. 데이터베이스 검색을 통해 식별된 화합물(상단)과 시료와 바탕시료 내 화합물의 로그 존재량 플롯(하단)을 보여주는 Agilent Mass Profiler 분석 결과. 4배의 존재량 선은 대조적 바탕시료 대비 실험 화합물의 농도 임계값을 나타냅니다.

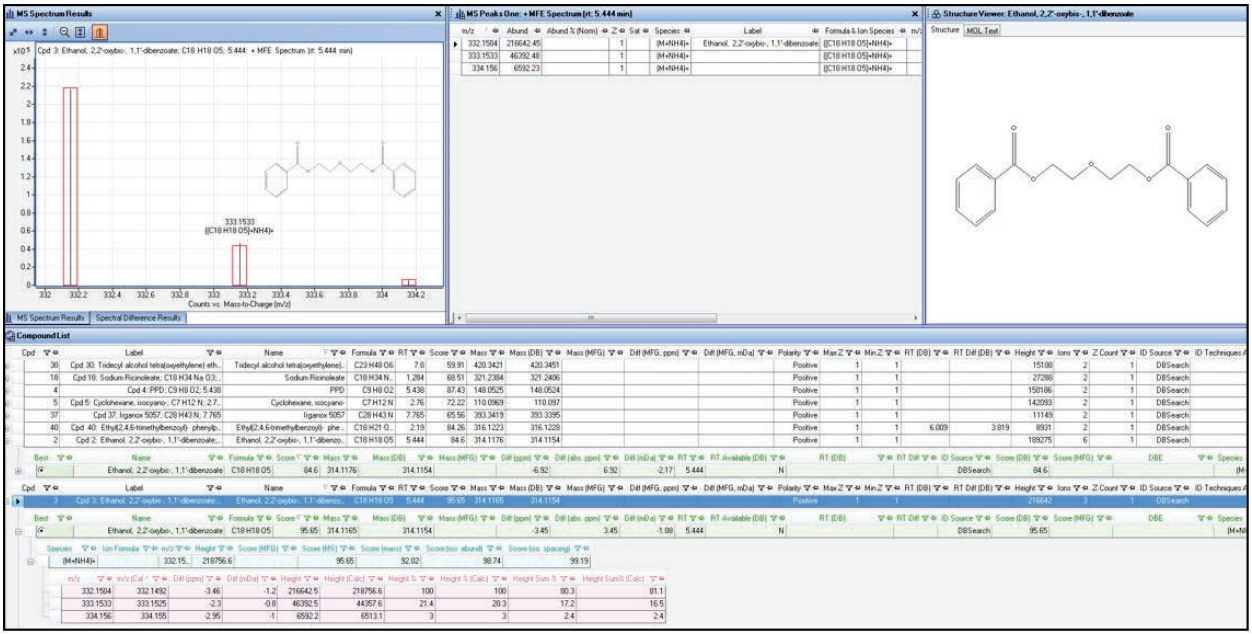

그림 5. 데이터베이스 검색 및 분자식 생성을 통해 화합물을 식별하였고 강조 표시된 화합물은 diethylene glycol dibenzoate입니다.

데이터베이스 검색에는 1,560개의 화합물에 대한 맞춤형 데이터베이스가 사용되었습니다. 66가지 서로 다른 화합물에서 accurate mass 데이터베이스를 통해 확인된 일부 화합물은 tridecyl alcohol (oxyethylene) ethanol, sodium ricinoleate, irganox 5057, ethyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)-phenylphosphinate, isocyano cyclohexane이며, irganox의 분해물, hexadecanoic palmitic acid 및 기타 많은 화합물도 검출되었습니다.

결론

이 응용 자료에서는 Agilent 6530 Q-TOF에 연결된 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 사용하여 약품 용기 및 포장에서 추출된 화합물을 분석하였습니다. 9가지 가소제의 표준물질 혼합물에 대한 분석을 통해 다수의 추출 화합물을 검출하는 데 양이온 및 음이온 전자분무 이온화(ESI) 모드 모두가 필요함을 보여주었습니다. 데이터는 2단계 워크플로를 통해 효율적으로 분석되었습니다. 첫 단계는 Agilent MassHunter Profinder 소프트웨어를 이용하여 추출물과 바탕 용매의 반복 주입 시료들에 대해 적분 및 정렬 검증을 수행하는 것이고 두 번째 단계는 Agilent MassHunter Mass Profiler 소프트웨어를 이용하여 두 시료 그룹을 통계적으로 비교하는 것입니다. 화합물 분자식을 잠정적으로 식별하고 결정하기 위해 추가 데이터베이스 검색과 Mass Profiler의 분자식 생성 기능을 사용하였습니다. 이 연구 결과는 irganox와 같은 항산화 첨가제와 ricinoleate와 같은 피부 자극제를 포함한 66개의 화합물이 빈병 추출물에 유의하게 존재한다는 것을 보여줍니다. 이 연구는 약품 용기 및 포장 공급업체의 적격성 평가와, 약품 제형의 추출물 및 침출물 연구에 적용될 수 있습니다.

참조문헌

1. Wong, D. M; Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds from Transdermal Patches Using GC/MSD Systems, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5605EN (**2015**).

2. Wong, D. M; Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds From Plastic Intravenous Bag Sets Using GC/MSD Systems, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5616EN (**2015**).

3. Wong, D. M; Firor, R. L. Analysis of Extractable/Leachable Compounds from Generic Liquid Drug Formulations Using GC/MSD Systems, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5632EN (**2015**).

4. U.S. Department of Health and Human Services- Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), *Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics;* Guidance for Industry; May **1999**.

5. Norwood, D. L; *et al.* HPLC and LC/MS Analysis of Pharmaceutical Container Closure System Leachables and Extractables**,** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2009**, *32*, pp 1768-1827.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015

2015년 11월 1일, 한국에서 발행
5991-6244KO

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

Agilent Technologies