

# 약품 불순물 분석을 위한 고분해능 샘플링 2D-LC

관련 레벨에서 API 피크 아래 숨겨진 불순물 검출

## 응용 자료

저분자 약품 및 일반 의약품

### 저자

Susanne Stephan, Sonja Krieger  
Agilent Technologies, Inc.  
Waldbronn, Germany

### 개요

활성 의약품 성분(API)과 비교해 저농도의 불순물을 분석하는 것은 약물 품질 관리에 중요합니다. 불순물이 API와 구조적으로 비슷하고 농도 차이가 큰 경우 크로마토그래프 분리 및 검출이 힘들어질 수 있습니다.

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 솔루션을 사용해 comprehensive (LCxLC), multiple heart-cutting (MHC), high-resolution sampling 2D-LC(HiRes 2D-LC)를 쉽게 전환할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 HiRes 2D-LC를 사용해 서로 가까운 곳에서 용리된 화합물 두 가지를 분리할 수 있습니다. 이러한 화합물 중 하나는 농도가 매우 낮은 상태로 존재하고 농도가 더 높은 화합물 피크 아래 가려져 있습니다. Chlorodifluorobenzoic acids 및 아마이드 분해 insulin을 각각 표준 물질 및 실제 시료로 분석했습니다.



**Agilent Technologies**

## 소개

약품 품질 및 환자 안전과 관련해 약물의 순도를 분석하는 것은 매우 중요합니다<sup>1</sup>. ICH 지침 Q3A(R2)에 따르면, API와 비교해 threshold값이 0.05%<sup>2</sup>를 초과하는 새로운 약물의 불순물은 보고해야 합니다. 이러한 레벨에서 불순물을 분리 및 검출하는 것은 쉽지 않은 일입니다. 특히 불순물이 활성 의약품 성분(API)과 구조적으로 관련이 있는 경우에는 더욱 그렇습니다.

이 응용 자료에서는 불순물 분리 및 검출을 위해 고분해능(HiRes) 샘플링 2D-LC를 사용하는 것을 입증하고, 100% 및 0.05%의 상대 농도에서 chlorodifluorobenzoic acid의 다양한 이성질체에 대한 예를 보여줍니다. Agilent 1290 Infinity II 광역 동적 범위 다이오드 어레이(HDR-DAD) 불순물 분석기 솔루션을 <sup>2</sup>D 검출기로 사용해 이러한 응용의 정밀도 및 정확도를 더욱더 개선할 수 있습니다. HiRes 샘플링 2D-LC/MS를 사용한 구조적으로 비슷한 불순물 검출을 보여주기 위해 아마이드 분해 insulin을 실제 샘플로 분석합니다. 2D-LC의 또 다른 장점은 <sup>2</sup>D 분리가 염 제거 단계를 수행해, MS 이온소스<sup>3</sup>의 <sup>1</sup>D 완충제에서 많은 양의 염으로 인해 야기되는 이온 억제를 방지할 수 있다는 것입니다. Agilent MassHunter용 <sup>2</sup>D Chromatogram Creator를 사용해 MassHunter에서 2D-LC/MS 데이터를 확인하고 분석할 수 있습니다.

HiRes 샘플링 2D-LC의 경우 그림 1에서 확인할 수 있는 것처럼 선택한 시간 범위에서 여러 가지 작은 부분을 수집해 <sup>1</sup>D 크로마토그램에서 피크의 전체 영역을 포괄하는 방식으로 표적 화합물을 결정할 수 있습니다. 각 커트는 샘플링 루프에 보관되며 모든 커트는 2차원에서 연속적으로 분석됩니다. 이 모드에서 선택한 모든 화합물을 2차원으로 전송해 분석하도록 합니다. 이러한 방식을 사용해 선택된 공동 용리 화합물을 HiRes 샘플링 프로세스에 적용해 2차원 분석을 할 수 있습니다. 이를 통해 기술 개요<sup>4</sup>에서 확인할 수 있는 것처럼 신뢰할 수 있는 정량화가 가능합니다.

## 실험

### 기기

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 솔루션은 다음과 같은 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A) 2개
- Agilent 1290 Infinity II 멀티 샘플러(G7167B) 및 Infinity II 샘플 콜러(옵션 #100)
- Agilent 1290 Infinity II 멀티 컬럼 온도 조절 장치(G7116B) 2개
- Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기(G7117B) 3개 및 3.7mm, 10mm, 60mm 맥스 라이트 카트리지 셀 (G4212-60008)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A) 및 2 포지션/4 포트 듀오 밸브(2D-LC 밸브 헤드, G4236A)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A) 2개 및 multiple heart-cutting 밸브(G4242-64000)(40µL 루프 장착)

아마이드 분해 insulin 분석을 위해 Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 솔루션에 Dual Agilent Jet Stream ESI 이온화원이 장착된 Agilent 6545 Q-TOF를 결합했습니다. <sup>1</sup>D 완충제에서 매우 많은 양의 염이 이온화원으로 들어가는 것을 방지하기 위해 이전 응용 자료<sup>5</sup>에서 권장한 것처럼, 일정표를 사용해 MS 전환 밸브를 전환함으로써 각 <sup>2</sup>D 분석을 시작하고 1분 동안 폐기물에 대한 방향을 지정합니다.

### 소프트웨어

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 에디션 개정 C.01.07 SR2 [255] 및 Agilent 2D-LC 소프트웨어, 제품 버전 A.01.03 [025], 및 Agilent HDR-DAD ChemStation AddOn, 제품 버전 A.01.01 [015].
- Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어 LC/MS 데이터 수집, 버전 B.08.00, Build 8.00.8026.0
- Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어 정성 분석, 버전 B.07.00, Build 7.0.7024.0
- MassHunter용 Agilent <sup>2</sup>D Chromatogram Creator, 개정 1.0.15

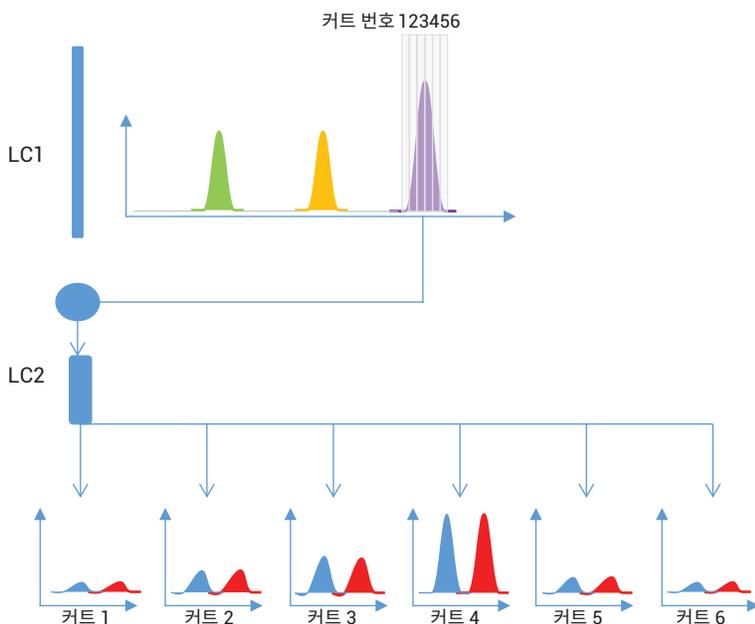


그림 1. high-resolution sampling 2D-LC 그림

## 화학품

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용했으며 Acetonitrile 및 sodium sulfate는 Merck 제약회사(Darmstadt, 독일)에서 구입했습니다. Formic acid, phosphoric acid, sodium phosphate dibasic, ammonium phosphate monobasic은 Sigma-Aldrich사(Steinheim, 독일)에서 구입했습니다. 초순수는 0.22µm membrane point-of-use cartridge를 장착한 Milli-Q Integral 시스템(Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)에서 얻었습니다. 5-chloro-2,4-difluorobenzoic acid, 3-chloro-2,4-difluorobenzoic acid, 2-chloro-4,5-difluorobenzoic acid 표준물질 및 소 취량의 insulin은 Sigma-Aldrich사(Steinheim, 독일)에서 구입했습니다.

## 시료

chlorodifluorobenzoic acids 원액은 물과 acetonitrile을 50/50으로 섞어 농도 1mg/mL로 준비했습니다. 농도 비율이 다른 세 가지 화합물의 혼합물을 이러한 원액을 사용해 준비했습니다.

1mg/mL의 insulin을 pH 2.55의 25mM sodium phosphate buffer에서 용해했습니다. deamidation을 촉발하기 위해 insulin 용액을 pH 9로 조정했고 실온에서 12시간 동안 보관했습니다.

## High-resolution sampling

## chlorodifluorobenzoic acids 분석을 위한 high-resolution sampling 2D-LC 방법

	<sup>2</sup> D 검출기 DAD 및 10mm 맥스 라이트 카트리지 셀	<sup>2</sup> D 검출기 HDR-DAD 솔루션
<b>컬럼</b>		
1차원	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 × 100mm, 1.8µm(p/n 959758-902)	
2차원	Agilent ZORBAX Eclipse Plus PAH, 2.1 × 100mm, 1.8µm(p/n 959764-918)	
<b><sup>1</sup>D 펌프</b>		
용매 A	물 + 0.1% phosphoric acid	
용매 B	Acetonitrile	
유량	0.2mL/분	
Gradient	0분 - 30%B 10분 - 30%B 12분 - 80%B 14분 - 80%B 15분 - 30%B	
<b><sup>2</sup>D 펌프</b>		
용매 A	물 + 0.1% phosphoric acid	
용매 B	Acetonitrile	
유량	0.5mL/분	
Gradient	0분 - 20%B 4분 - 25%B 5분 - 25%B	
<sup>2</sup> D Gradient 중지 시간	5.00분	
<sup>2</sup> D 사이클 시간	6.00분	
중지 시간	15분	
<b>High-resolution sampling</b>		
시간 기반	6.54분	7.83분
샘플링 시간	7초	9초
커트 수	9	10
<b>다중 컬럼 온도 조절 장치</b>		
1차원	30°C	
2차원	30°C	
<b>멀티샘플러</b>		
주입량	1µL	5µL
니들 세척	methanol/물 50/50에서 10초	
<b><sup>1</sup>D 다이오드 어레이 검출기</b>		
파장	210nm/4nm, Reference 395nm/10nm	
Data rate	40Hz	
<b><sup>2</sup>D 검출기</b>		
	DAD(10mm 셀)	HDR-DAD
파장	210nm/4nm, Reference 395nm/10nm	
Data rate	40Hz	

**(수정된) 아마이드 분해 insulin 분석을 위한 High-resolution sampling 2D-LC/MS 방법<sup>3</sup>**

파라미터	값
<b>컬럼</b>	
1차원	Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1 × 150mm, 2.7µm(p/n 693775-902)
2차원	Agilent ZORBAX Bonus RP 2.1 × 50mm, 1.8µm(p/n 857768-901)
<b><sup>1</sup>D 펌프</b>	
용매 A	60mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 40mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2.21
용매 B	Acetonitrile/물 80/20
유량	0.3mL/분
Gradient	0분 - 29%B 28분 - 43%B 29분 - 90%B 30분 - 90%B 31분 - 29%B
<b><sup>2</sup>D 펌프</b>	
용매 A	물 + 0.1% formic acid
용매 B	Acetonitrile/물 80/20 + 0.1% formic acid
유량	0.4mL/분
Gradient	0분 - 6.25% B 0.1분 - 23% B 2.6분 - 35% B 2.7분 - 90% B 2.8분 - 90% B 2.9분 - 6.25% B
<sup>2</sup> D Gradient 중지 시간	3.00분
<sup>2</sup> D 사이클 시간	5.00분
중지 시간	38분
<b>High-resolution sampling</b>	
시간 기반	15.64분
샘플링 시간	4초
커트 수	10

파라미터	값
<b>다중 컬럼 온도 조절 장치</b>	
1차원	40°C
2차원	40°C
<b>멀티샘플러</b>	
주입량	1µL
니들 세척	50/50 methanol/물에서 10초
<b><sup>1</sup>D 다이오드 어레이 검출기</b>	
파장	195nm/4nm, 기준 395nm/100nm
Data rate	40Hz
<b><sup>2</sup>D 다이오드 어레이 검출기</b>	
파장	195nm/4nm, 기준 395nm/100nm
Data rate	40Hz
<b>MS 파라미터</b>	
모드	양이온
가스 온도	200°C
가스 유량	13L/분
Nebulizer	35 psig
Sheath 가스 온도	375°C
Sheath 가스 유량	12L/분
VCap	2,500V
노즐 전압	300V
Fragmentor	175V
Skimmer	65V
Oct 1 RF Vpp	750V
질량 범위	100 ~ 3,200m/z
수집 속도	2 spectra/s

**MS 전환 밸브 일정표**

시각표	시작 시간 (분)	전환 밸브 위치	시각표	시작 시간 (분)	전환 밸브 위치
1	0	MS	13	42.02	MS
2	16.02	폐기물	14	46.02	폐기물
3	17.02	MS	15	47.02	MS
4	21.02	폐기물	16	51.02	폐기물
5	22.02	MS	17	52.02	MS
6	26.02	폐기물	18	56.02	폐기물
7	27.02	MS	19	57.02	MS
8	31.02	폐기물	20	61.02	폐기물
9	32.02	MS	21	62.02	MS
10	36.02	폐기물	22	66.02	폐기물
11	37.02	MS	23	67.02	MS
12	41.02	폐기물			

## 2D-LC용 방법 설정

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 솔루션을 사용해 High-resolution sampling 2D-LC를 수행했습니다. 밸브 구성(그림 2)은 2개의 multiple heart-cutting 밸브에 연결된 2 포지션/4 포트 듀오 밸브로 구성되었으며 12개의 샘플링 루프를 보관합니다. 이러한 설정으로 통해 최대 10개의 연속 커트를 샘플링하고 분석할 때까지 보관합니다. HiRes 샘플링 2D-LC의 경우 시료 분석을 방지하기 위해 루프를 최대 80%로 채우는 것이 좋습니다. 그림 3은 chlorodifluorobenzoic acids 분석을 위한  $^2\text{D}$  펌프에 사용되는 방법 설정을 보여줍니다. 첫째로 샘플의 1D-LC 분리가 실행되고 크로마토그램이 미리보기 창에서 reference 신호로 로드되었습니다. 대상 물질 피크에 따라 HiRes 샘플링이 시간을 기반으로 설정되었으며 전체 피크 폭을 포괄하는 chlorodifluorobenzoic acids에 대한 9개의 커트가 포함됩니다. 해당 1D 조건에서 샘플링 시간 7초는 루프를 58%로 채우는 것입니다.  $^2\text{D}$  검출기 역할을 하는 Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 불순물 분석기 솔루션에 적용되는 주입량을 늘리려면 10개의 커트가 필요하고 샘플링 시간이 9초로 높아지면 전체 1D 피크 폭이 포함됩니다. 이에 따라 루프의 75%가 채워집니다. 아마이드 분해 insulin의 HiRes 샘플링의 경우 다음 절차에 따라 방법을 설정했습니다. 샘플링 시간 4초 동안 10개의 커트를 가져왔고 이는 루프를 50%로 채우는 것입니다.

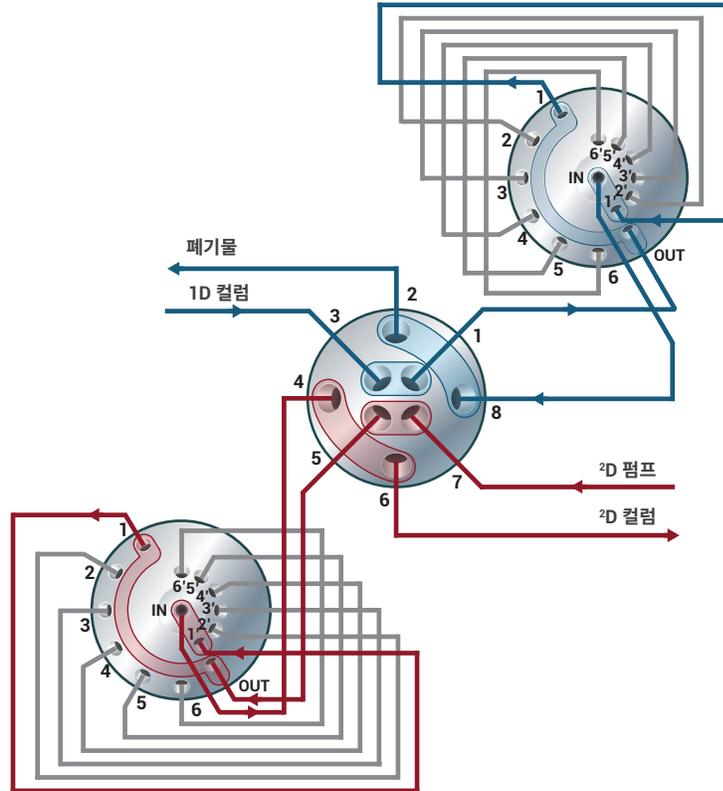


그림 2. Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 솔루션의 밸브 구성, 12개 샘플링 루프 보관

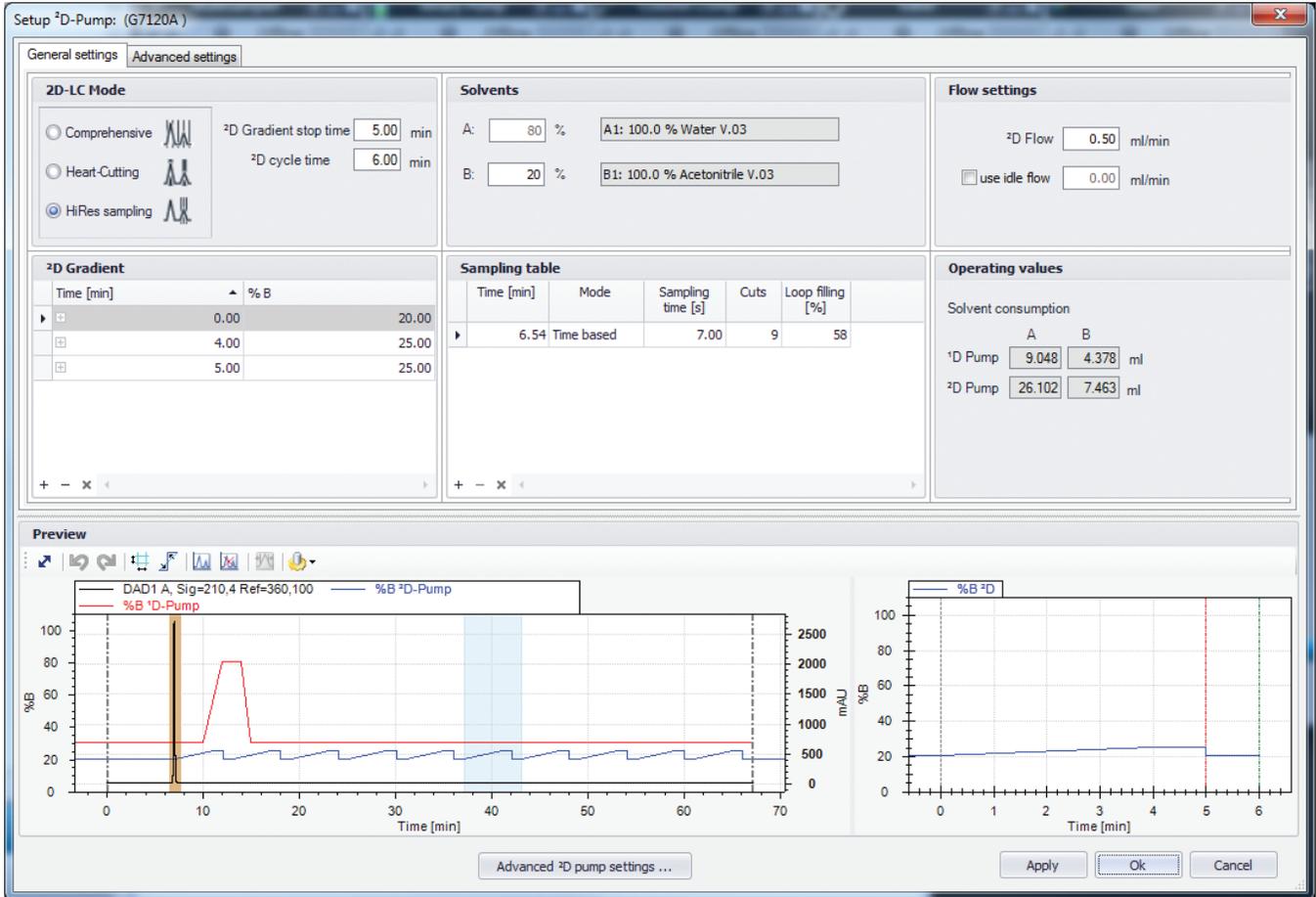


그림 3. 2D 펌프용 방법 설정

## 결과 및 토의

### chlorodifluorobenzoic acids 분석

농도 비율이 다른 3가지 이성체 2-chloro-4,5-difluorobenzoic acid(화합물 1), 5-chloro-2,4-difluorobenzoic acid(화합물 2), 3-chloro-2,4-difluorobenzoic acid(화합물 3, 그림 4의 구조) 혼합물을 HiRes 샘플링 2D-LC를 사용해 분석했고 처음에는 2D 검출기로 10mm 맥스 라이트 카트리지가 셀이 장착된 Agilent 1290 Infinity II DAD를 사용했습니다.



그림 4. 분석한 세 가지 chlorodifluorobenzoic acids의 화학적 구조

그림 5는 동일하게 농도 레벨이 낮은 세 가지 모든 화합물이 포함된 두 가지 혼합물(파란색), 상대 농도 레벨 100%인 화합물 3과 상대 농도 레벨 0.05%인 화합물 1 및 2(적색)의 1D 크로마토그램을 보여줍니다. 파란색 크로마토그램에서는 세 가지 분리된 피크를 관찰할 수 있지만, 적색 크로마토그램에서는 화합물 2(0.05%의 상대 농도)가 화합물 3(100%의 상대 농도) 아래 가려져 있어 별도의 피크로 검출될 수 없었습니다. 이러한 화합물에 대한 2D-LC 분석에서는 HiRes 샘플링을 사용해 피크 3의 전체 폭을 샘플링하고 2D 컬럼에서 9개의 커트를 연속 분석했습니다. 그림 6은 1D 피크의 샘플링 scheme과 2 ~ 5커트의 2D 크로마토그램 결과를 보여줍니다. 커트 2에서 피크가 검출되지는 않았습니다. 커트 3은 1D에서 검쳐졌던 화합물 2 및 3의 분리된 피크 2개를 보여줍니다.

커트 4에는 주로 화합물 3이 포함되어 있고 매우 적은 양의 화합물 2가 포함되어 있습니다. 커트 5에는 화합물 3만 검출되었습니다.

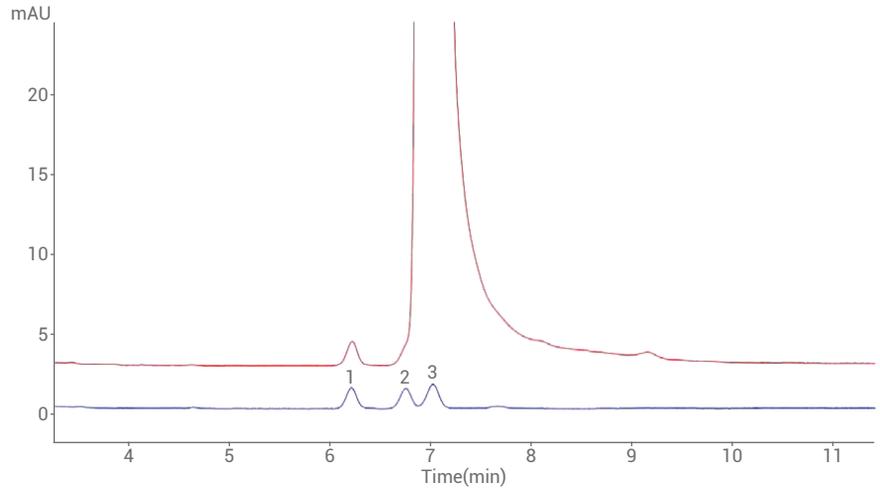


그림 5. 화합물 3의 상대 농도 100%, 화합물 1 및 2의 상대 농도 0.05%(빨간색 곡선), 세 가지 모든 화합물의 상대 농도 0.05%(파란색 곡선)에서 두 가지 혼합물의 1D 크로마토그램

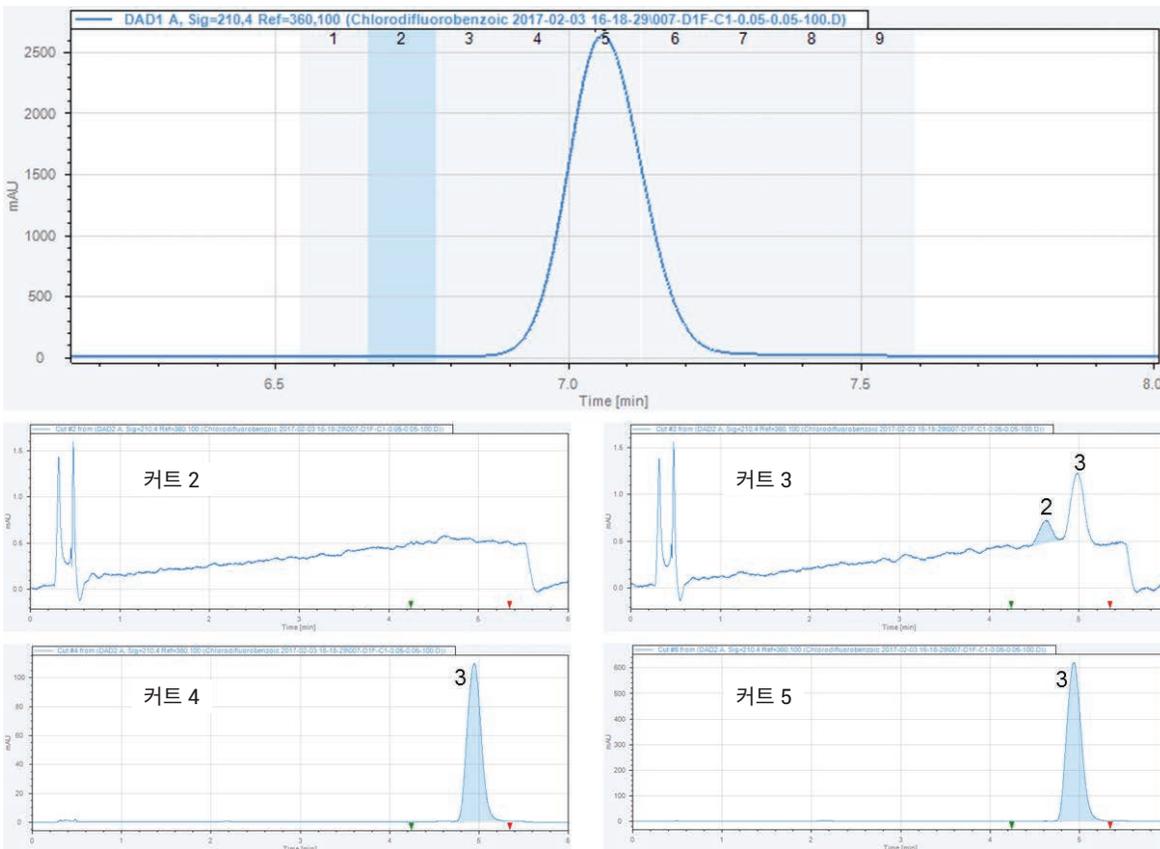


그림 6. 화합물 3의 전체 피크에 대해 1 ~ 9개의 커트로 샘플링된 1D 크로마토그램(상단). 커트 2, 3, 4, 5 분석을 위한 2D 크로마토그램을 보여줍니다

ICH 지침에 명시된 보고 threshold 값에 따라 이 방법의 유용성을 평가하기 위해 세 가지 chlorodifluorobenzoic acids의 다양한 혼합물을 준비했습니다. 혼합물에 포함된 세 가지 chlorodifluorobenzoic acids의 상대 농도는 화합물 3은 100%, 화합물 1 및 2는 0.05%, 0.10%, 0.15%입니다. 화합물 3(3-chloro-2,4-difluorobenzoic acid) 및 화합물 2(5-chloro-2,4-difluorobenzoic acid)의 피크 영역은 그림 7에서 확인할 수 있는 것처럼 Chemstation의 2D-LC 뷰어를 사용해 모든 피크에서 2D 피크의

총합으로 계산했습니다. 6번 반복 실험에서 각 혼합물을 분석했습니다. 표 2는 세 가지 다른 혼합물에 대해 계산한 상대 표준 편차(RSD)와 함께 평균 피크 영역을 보여줍니다. 혼합물 1, 2, 3에 대한 농도가 더 낮은 화합물 2 피크의 평균 신호 대 잡음비는 각각 3.2, 5.9, 12.2로 정량 한계(LOQ)의 범위에 포함되거나 범위에 못 미칩니다. 화합물 2의 통합된 피크에 대한 RSD 값이 최대 7.95%로 상대적으로 높다는 점을 보여줍니다. 화합물 2는 화합물 3과 비교해 상대적인 영역 비율 0.03%, 0.07%, 0.14%에서 검출할 수

있었습니다. 두 가지 화합물 모두에 대해 1D를 실행해 응답 계수가 1.17로 결정되었다는 점을 고려해 정확도 값을 71.6 ~ 108.5%로 계산할 수 있고 이는 주요 화합물과 불순물의 농도 차이가 크다는 점에서 볼 때 이미 우수한 결과입니다. ICH 지침 Q3A(R2)에 명시된 보고 threshold값(0.05%)에 따라 1차원의 주피크에서 공동 용리되는 불순물에 대해 high-resolution sampling 2D-LC를 사용해 관련 레벨에서 불순물을 분리 및 검출하는 것이 가능하다는 점을 보여주는 것입니다.

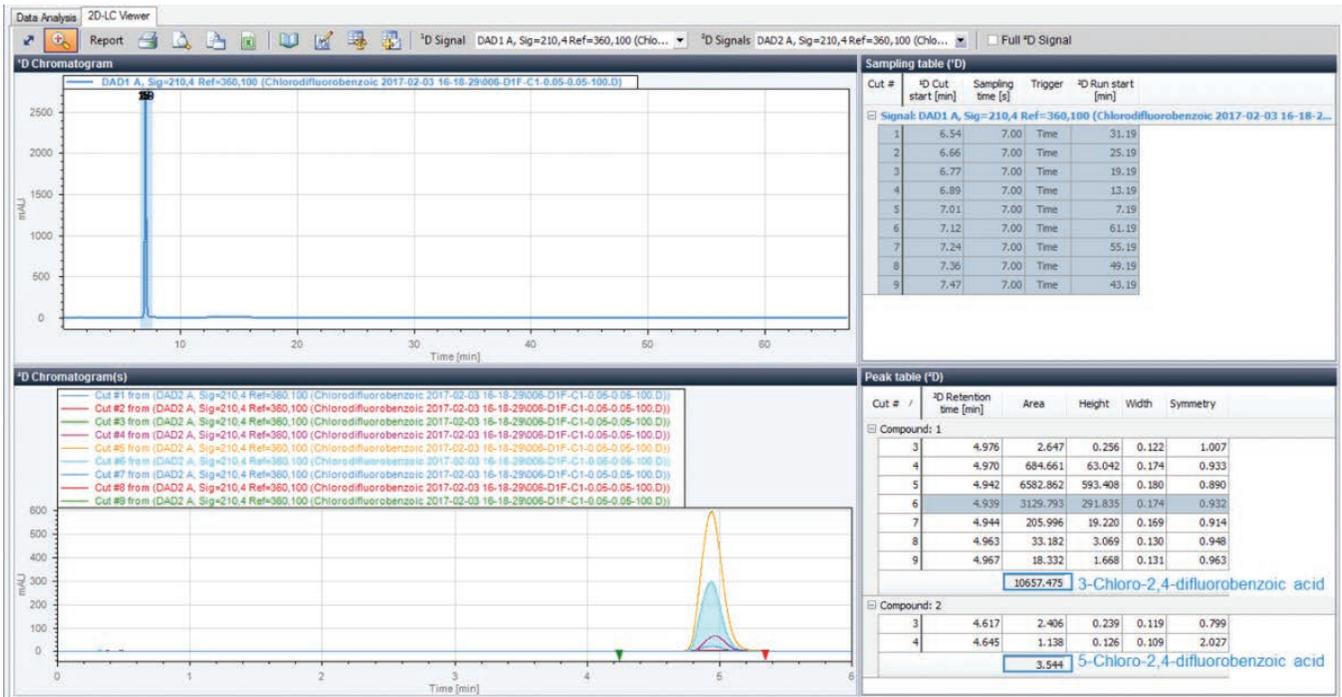


그림 7. Chemstation의 2D-LC에 표시되는 화합물 2(5-chloro-2,4-difluorobenzoic acid) 및 3(3-chloro-2,4-difluorobenzoic acid)의 피크 영역과 chlorodifluorobenzoic acids에 대한 high-resolution sampling 2D-LC 분석 결과

표 2. Agilent 1290 Infinity II DAD와 10mm 맥스 라이트 카트리지 셀을 2 검출기로 사용해 6번 연속 실험으로 3가지 다른 혼합물에 대해 계산한 평균 피크 영역 및 상대 표준 편차. 화합물 3에 대한 화합물 2의 영역 비율은 %로 표시합니다. 정확도 계산을 위해 1D 피크를 사용해 계산한 반응 계수 1.17을 고려했습니다.

	3-Chloro-2,4-difluorobenzoic acid (화합물 3)		5-Chloro-2,4-difluorobenzoic acid (화합물 2)		S/N	영역 비율(%)	정확도(%)
	면적	RSD(%)	면적	RSD(%)			
혼합물 1(0.05:0.05:100%)	10,685.64	0.26	3.39	7.95	3.2	0.03	71.6
혼합물 2(0.10:0.10:100%)	10,616.72	0.39	7.47	3.22	5.9	0.07	82.3
혼합물 3(0.15:0.15:100%)	10,548.79	0.13	14.67	2.71	12.2	0.14	108.5

정밀도 및 정확도를 더욱 개선하기 위해 Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 불순물 분석기 솔루션을 2D 검출기로 사용했습니다. 이 솔루션은 2가지 다이오드 어레이 검출기의 신호를 경로 길이가 다른 맥스 라이트 카트리지와 결합해 선형역학 UV 범위를 늘렸습니다. 이를 통해 높은 농도의 화합물 3에 대한 선형 UV 범위를 초과하지 않고도 주입 용량을 늘릴 수 있었습니다. 평균 S/N 비 모두 LOQ를 초과하며 혼합물 1 ~ 3에 대해 각각 20.7, 24.1, 34.0입니다. 화합물 2의 영역 정밀도가 크게 개선되었고 RSD 값은 1.58% 미만입니다(표 3). 정확도는 96.4 ~ 108.5%의 범위로 정량화에 매우 유용합니다.

### 아마이드 분해 insulin 분석

불순물이 함유된 약학적으로 관련된 물질의 실제 시료를 만들기 위해 기본 조건에서 Bovine insulin 을 아마이드 분해했습니다. HiRes 샘플링 2D-LC/MS를 사용해 시료를

분석했습니다. MassHunter용 2D Chromatogram Creator는 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 에디션 및 MassHunter의 측정 데이터를 결합합니다. 소프트웨어에서 2D 크로마토그램을 생성하는데 획득된 전체 2D MS 데이터를 바탕으로 커트당 1 차원 크로마토그램을 하나 생성합니다. 이러한 크로마토그램은 OpenLAB

CDS ChemStation 에디션의 2D-LC 뷰어에서 제공하는 것과 비슷한 모양으로 MassHunter에 표시됩니다. 신호 지시성 커트로 내용이 풍부해진 1D UV 크로마토그램은 그림 8A에서 확인할 수 있는 것처럼 MassHunter에 표시할 수 있습니다. 그림 8B는 전체 2D-MS를, 그림 8C는 MassHunter에서 전체 2D-UV 신호를 보여줍니다.

표 3. Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 불순물 분석기 솔루션을 2D 검출기로 사용해 6번 연속 실행한 3가지 다른 혼합물에 대해 계산한 평균 피크 영역 및 상대 표준 편차. 화합물 3에 대한 화합물 2의 영역 비율은 %로 표시합니다. 정확도 계산을 위해 1D 피크를 사용해 계산한 반응 계수 1.17을 고려했습니다.

	3-Chloro-2,4-difluorobenzoic acid (화합물 3)			5-Chloro-2,4-difluorobenzoic acid (화합물 2)			정확도(%)
	면적	RSD(%)	면적	RSD(%)	S/N	영역 비율(%)	
혼합물 1 (0.05:0.05:100%)	50072.70	1.19	23.30	1.58	20.7	0.05	108.5
혼합물 2 (0.10:0.10:100%)	49020.63	0.85	42.02	1.44	24.1	0.09	99.9
혼합물 3 (0.15:0.15:100%)	48698.74	1.34	60.37	1.47	34.0	0.12	96.4

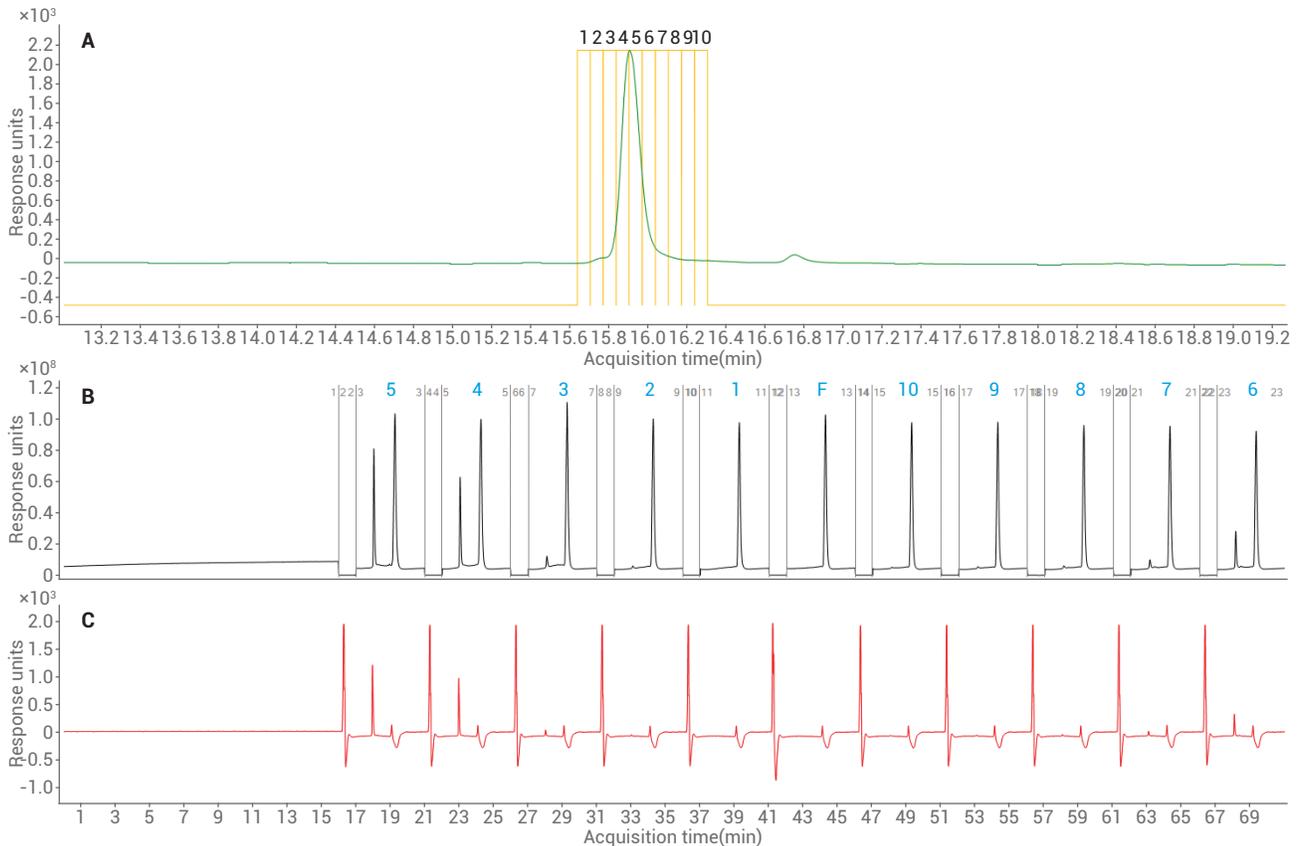


그림 8. Agilent MassHunter에 표시된 아마이드 분해 insulin 분석을 위한 신호. A) 1D-UV 신호 및 HiRes 샘플링에서 가져온 커트. B) 전체 2D-MS 신호. C) 전체 2D-UV 신호.

10개의 커트 각각에 대해 MassHunter용 2D Chromatogram Creator를 사용해 개별적인 크로마토그램을 하나씩 생성했습니다. 이러한 총 이온 크로마토그램(TIC)은 그림 9처럼 모든 10개의 커트에 대해 쌓이게 됩니다. 각 2D 분리 중 처음 1분 동안 MS 전환 밸브를 전환해 폐기물에 대한 방향이 지정되었습니다. 이러한 방식으로 모든 부분에 포함된 완충염이 MS 이온소스에서 제거되었습니다. 그림 9의 각 TIC에서 전환 밸브가 뒤로 변경되면

실행 시간 1분에 단계가 표시되고, 유량이 MS로 변경됩니다. 커트 2 ~ 10의 다양한 밀도에서 2.06분의 보유 시간 동안 주 insulin 피크를 관찰할 수 있습니다. 2D gradient에는 컬럼 플래싱을 위한 90%B의 짧은 섹션이 포함되는데, 이로 인해 약 3.2분에서 기준점의 갑작스러운 증가 및 감소가 발생합니다. 그림 10은 주 insulin 피크 테일링의 1차원에서 가져온 커트 7에 대한 TIC와 해당 2D-UV 신호를 확대한 모습입니다. 2D 크로마토그램에서

MS 및 UV 신호 모두에서 발생한 두 가지 피크를 모두 관찰할 수 있습니다. 그림 11은 두 가지 피크 모두의 질량 스펙트럼이 추출되었음을 보여줍니다. 피크 1의 동위 원소 패턴은 insulin의  $[M+5H]^{5+}$  이온으로 나타낼 수 있습니다. 피크 2의 질량 스펙트럼은 insulin의 단일 아마이드 분해 산물에 해당하는 동위 원소 패턴을 보여줍니다. 커트 6에서 동일한 화합물을 검출할 수 있었습니다(데이터 미제공).

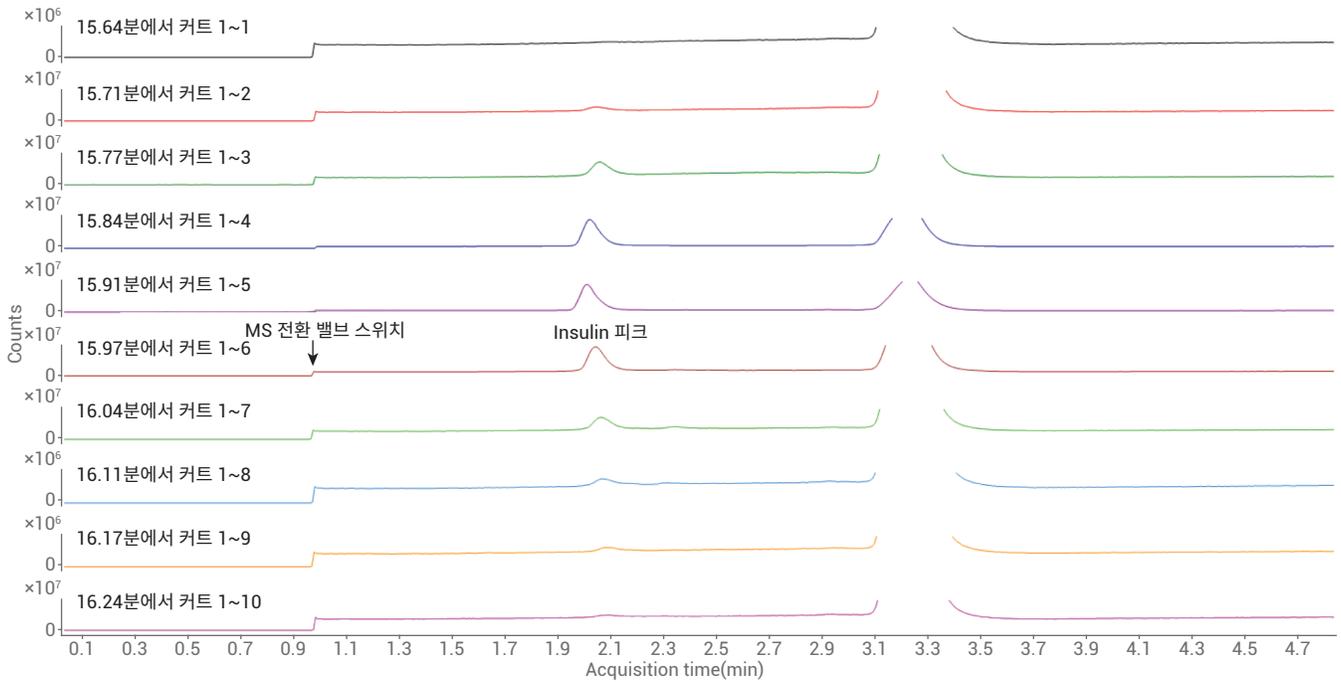


그림 9. Agilent MassHunter용 2D Chromatogram Creator를 사용해 생성한 모든 커트의 개별 2D 크로마토그램

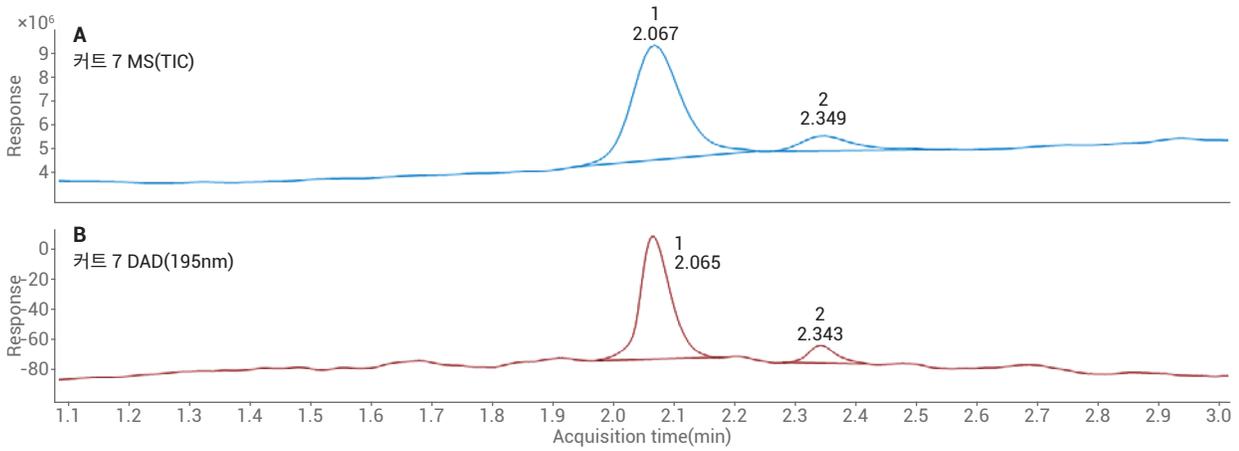


그림 10. MS(TIC) 및 UV 신호(DAD2)를 사용해 생성한 커트 7의 <sup>2</sup>D 크로마토그램

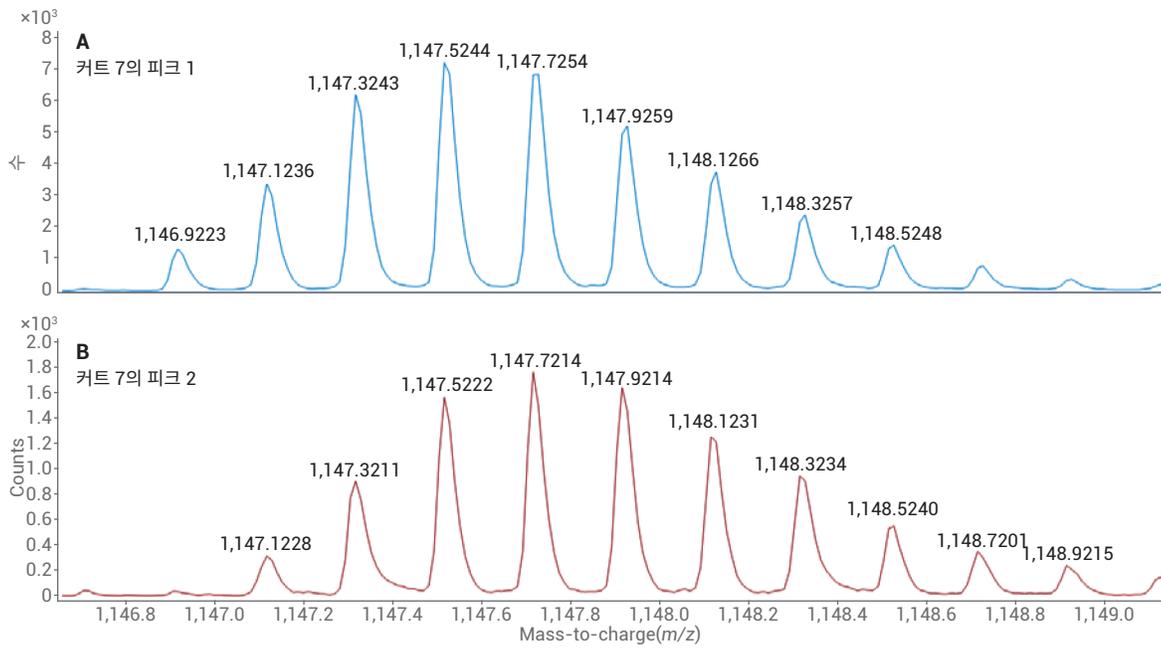


그림 11. 커트 7의 <sup>2</sup>D 크로마토그램에서 관찰된 피크 1 및 2의 질량 스펙트럼

## 결론

이 응용 자료는 high-resolution sampling 2D-LC를 사용해 구조적으로 관련이 있는 주요 화합물의 시료에 포함된 낮은 농도의 불순물 검출을 입증합니다. <sup>1</sup>D 분석에서 별도로 검출할 수 없는 새로운 물질의 불순물에 관한 ICH 지침에 따라 chlorodifluorobenzoic acids 혼합물을 사용해 상대 농도 0.05%, 0.10%, 0.15%, 100%의 화합물 HiRes 샘플링 2D-LC를 사용해 <sup>2</sup>D 컬럼으로 전송해 분리하는 과정을 보여줍니다. 5-chloro-2,4-difluorobenzoic acid 화합물을 검출했고 정확도 값은 71.6 ~ 108.5%였습니다. 면적 정밀도는 2.71 ~ 7.95%였습니다. <sup>2</sup>D 검출기로 Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 불순물 분석기 솔루션을 사용해 주입 용량을 늘려 정확도 96.4 ~ 108.5%, 정밀도 1.44 ~ 1.58%의 더 나은 결과를 얻을 수 있었습니다. HiRes 샘플링 2D-LC/MS를 사용해 분석하는 데 아마이드 분해 insulin을 실제 시료로 사용했습니다. Agilent MassHunter용 <sup>2</sup>D Chromatogram Creator를 사용해 데이터를 평가했습니다. insulin의 단일 아마이드 분해 산물이 주 insulin 피크 테일링의 1차원에서 가져온 2개의 커트에서 동위 원소 패턴을 통해 검출 및 식별되었습니다.

## 참고문헌

1. Venkatramani, C. J.; et al. Assessing Stability-Indicating Methods for Coelution by Two-Dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 3214–3225.
2. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Impurities in New Drug Substances Q3A(R2), **2006**.
3. Petersson, P.; Haselmann, K.; Buckenmaier, S. Multiple Heart-Cutting Two Dimensional Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Towards Real Time Determination of Related Impurities of Bio-Pharmaceuticals in Salt Based Separation Methods. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1468*, 95–101.
4. Stephan, S. High-Resolution Sampling 2D-LC with the Agilent 1290 Infinity II 2D-LC Solution. *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-7637EN, **2016**.
5. Schneider, S. 2D-LC/MS Characterization of Charge Variants Using Ion Exchange and Reversed-Phase Chromatography Multiple Heart-Cutting 2D-LC Analysis of Innovator versus Biosimilar Monoclonal Antibodies. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6673EN, **2016**.

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

연구 용도로만 사용하십시오.  
진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017  
2017년 6월 1일, 한국에서 발행  
5991-8082KO

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**