

Agilent LC/MSD iQ 질량 분석기 및 WalkUp 소프트웨어에 의한 빠른 API 순도 확인

저자

Kyle Covert 및 Robert Ley
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

개요

이 응용 자료에서는 UV 기반 분석법에 질량 정보를 추가하여 크로마토그래피의 효율성을 크게 향상시킬 수 있는 방법을 보여줍니다. 질량 정보를 추가하면 빠른 크로마토그래피 분석법에서 동시 용리되는 종을 쉽게 구별할 수 있으며, 특히 이러한 화합물이 UV 검출기에 대해 좋지 못한 감응을 보이거나 발색단(chromophore)을 포함하지 않은 경우에는 그 효과가 더욱 두드러집니다. 경우에 따라서는 UV만 사용하는 워크플로 대비 극미량 화합물을 100배 더 뛰어난 수준으로 검출할 수 있습니다. 본 응용 자료에서는 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 시스템과 Agilent MassHunter WalkUp 소프트웨어를 함께 사용하여 오픈 액세스 환경에서의 22종 원료 의약품(API) 순도 분석을 수행하였습니다. InfinityLab LC/MSD iQ는 표준 HPLC 워크플로에 질량 정보를 추가해주는 견고한 자기 인식(self-aware) 질량 검출기입니다. MassHunter WalkUp은 LC/MS 시스템을 오픈 액세스 환경에서 사용할 수 있도록 해주는 소프트웨어입니다.

서론

원료 의약품(API)의 합성에서는 많은 반응 단계를 모니터링해야 합니다. 신뢰성 있고 비용 효율적인 합성 경로를 확립하려면 각 반응 단계에서 전반적인 순도와 수율을 테스트해야 합니다. 다음 단계에 대한 적절한 의사결정을 위해서는 빠른 결과를 얻는 것이 매우 중요합니다. 질량 정보를 추가하면 크로마토그래피에서 동시에 용리되는 분석물질을 질량 검출을 통해 식별할 수 있기 때문에, 더욱 빠른 액체 크로마토그래피 분리 분석법을 사용할 수 있습니다. 또한, UV 검출을 사용하는 경우에 필요한 표준물질 분석을 줄이거나 없앨 수 있습니다. 또한 일부 실험실에서는 질량 분석 검출과 관련된 분석법 구현의 복잡성 때문에 외부 분석 그룹과의 협력을 통해 API 순도를 테스트하기도 합니다. MassHunter WalkUp 소프트웨어와 함께 사용하는 InfinityLab LC/MSD iQ 단일 사중극자(SQ) 질량 분석기는 질량 확인이 가능한 직관적인 오픈 액세스 시스템을 제공하여 이러한 복잡성을 제거해 줍니다.

탁월한 신뢰성을 보여주는 InfinityLab LC/MSD iQ SQ 질량 분석기(MSD)는 스마트 진단 기능을 갖추고 있으며, 낮은 유속에서부터 높은 유속까지 처리할 수 있습니다. 또한 Auto Acquire라 불리는 지능형 자동 수집 모드에서 MS 파라미터를 자동으로 최적화하여 최상의 결과를 제공할 수 있습니다. 크로마토그래피는 이 질량

분석기를 기존 Agilent 1260 Infinity II 또는 1290 Infinity II LC 스택에 추가하여 사용할 수 있습니다. 게다가 이 시스템은 이전 세대의 애질런트 LC 스택과도 원활하게 통합할 수 있습니다.

여기에 MassHunter WalkUp 소프트웨어를 결합하면 기기를 오픈 액세스 시스템으로 활용할 수 있습니다. WalkUp 사용자에는 다음의 두 가지 유형이 있습니다.

- 시스템 관리자
- 시료 제출자

분석법은 관리자가 제어하므로 통제된 환경에서 시료 제출이 가능합니다. WalkUp은 (구조적으로) 수집 및 데이터 분석 소프트웨어 위에서 작동하기 때문에 제출자는 Agilent OpenLab CDS에 대한 사전 지식이 필요하지 않습니다. 그림 1에 나타난 화면과 같이 WalkUp의 Rapid Sample Submission 사용자 인터페이스(UI)를 사용하여 시료를 제출하기만 하면 되므로 사실상 사용 교육이 필요 없습니다.

그림 1. Agilent MassHunter WalkUp 소프트웨어의 Rapid Sample Submission 사용자 인터페이스. 시료 제출자는 로그인하여 분석법을 선택한 다음 표적 질량/이름을 입력만 하면 됩니다. 측정 및 데이터 분석은 백그라운드에서 자동으로 수행하기 때문에 제출자는 이메일을 통해 PDF 포맷의 결과 보고서를 받게 됩니다.

실험

표준물질 및 화학물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 LC/MS 등급을 사용하였습니다. Acetonitrile(ACN)은 Honeywell(Morristown, NJ, USA)에서 구입하였습니다. 모든 API 화합물은 Millipore-Sigma(Merck, Darmstadt, Germany)에서 구입하였습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22µm POU(point-of-use) 멤브레인 필터 카트리지를 장착한 Milli-Q Integral 시스템(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)에서 얻었습니다.

기기

분석 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

- 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 InfinityLab LC/MSD iQ(G6160A)

Agilent 60mm Max-Light 카트리지를 플로우 셀(G4212-60007)을 장착한 DAD를 사용하여 UV 검출기의 감도를 극대화하였습니다.

시료 전처리

API 표준물질을 15mL Falcon 튜브에 칭량하고 용해도에 따라 ACN이나 메탄올(MeOH)을 선택하여 10µg/mL 농도로 희석하였습니다. 시료를 즉시 분석한 뒤 용액 상태로 실온에서 3개월 이상 보관하며 시료 분해를 시뮬레이션하였습니다. 시료 순도 분석을 위한 표적 질량으로 명목 질량(nominal mass)을 선택하여 각 API를 분석하였습니다.

표 1. API 화합물 목록

API	명목 질량(Da)		
Amitriptyline	277	Buspirone	385
Erythromycin	733	Clozapine	326
Captopril	217	Cetirizine	388
Trazodone	371	Paclitaxel	853
Paroxetine	329	Aspirin	180
Clopidogrel	321	Loratadine	382
Fosinopril	563	Fexofenadine	501
Nefazodone	469	Phenytoin	252
Zofenopril	429	Caffeine	194
Norethindrone	298	Ibuprofen	206
Carboplatin	371	Omeprazole	345

표 2. Agilent 1290 Infinity II LC 분석법 파라미터

파라미터	HPLC 설정값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 1.9µm, 40°C(p/n 699675-902)
이동상 A	0.1% 포름산 함유 물
이동상 B	0.1% 포름산 함유 ACN
그라디언트	시간(분) %B
	0.00 5
	1.75 90
	2.90 90
3.00 5	
사후 시간	0.7분
유속	0.8mL/분
주입 부피	1µL
UV 검출	[254,5/ref. 360, 80]nm

표 3. Auto Acquire 기능에 의해 자동 구성된 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 파라미터

파라미터	LC/MSD iQ 설정값
이온화원	ESI±
수집 모드	Auto Acquire 모드
포인트/초	2
스캔 범위	m/z 100~1,000

OpenLab CDS

데이터의 수집, 처리 및 보고서 작성에 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.

MassHunter WalkUp 소프트웨어

MassHunter WalkUp은 OpenLab CDS, ChemStation 및 MassHunter 수집 플랫폼에 추가하는 '애드-온' 형식의 오픈 액세스 애질런트 소프트웨어입니다. WalkUp은 일반 데이터 수집 기능 상위에 있는 제어 소프트웨어로서 시료를 제출하기 위한 간단한 사용자 인터페이스를 제공합니다.

결과 및 토의

시료 순도 평가를 위한 추가 MS 정보

HPLC 워크플로에서 UV 검출에 MSD를 더하면 다른 차원의 정보를 기존 분석에 추가할 수 있습니다. 뿐만 아니라, MSD는 UV 흡수가 좋지 않거나 활성 발색단을 포함하지 않은 화합물을 검출할 수 있습니다. 그리고 UV 검출만으로는 파악할 수 없는 동시 용리 분석물질에 대한 명확한 정보도 제공합니다. 질량 정보를 사용하면 불순물의 식별이 더욱 쉬워지고 분석 표준물질이 필요하지 않아 이러한 표준물질의 머무름 시간 측정에 시간을 소모하지 않아도 됩니다. 이를 통해 예상 머무름 시간을 알지 못해도 시료의 순도를 빠르게 평가할 수 있습니다.

API인 erythromycin은 UV 스펙트럼에서 흡수를 잘 하지 않는 것으로 알려져 있습니다. 불순물이 검출되는 파장은 API 검출 파장과 다릅니다. 대부분의 경우에 불순물의 표준물질이나 유기 반응 중간체는 구하기가 어렵습니다. 게다가 API의 210nm 흡수는 노이즈와 거의 구분할 수 없어, 표준물질을 측정하여 예상 머무름 시간을 찾는 방법만으로 확인이 가능합니다.

그림 2는 MS 크로마토그램을 통해 나타난 질량 검출의 유용성을 보여줍니다. 이를 통해 명목 질량(733Da)에 기초하여 erythromycin으로 식별된 큰 피크를 관찰할 수 있습니다. 질량 정보가 없었다면 어떤 UV 피크가 불순물이고 어느 것이 API인지 명확히 구분하기가 어려웠을 것입니다.

Sample Purity Results

Target mass	Target found in analysis	Purity (%)	Purity result
733.0	Yes	85.44	Impure

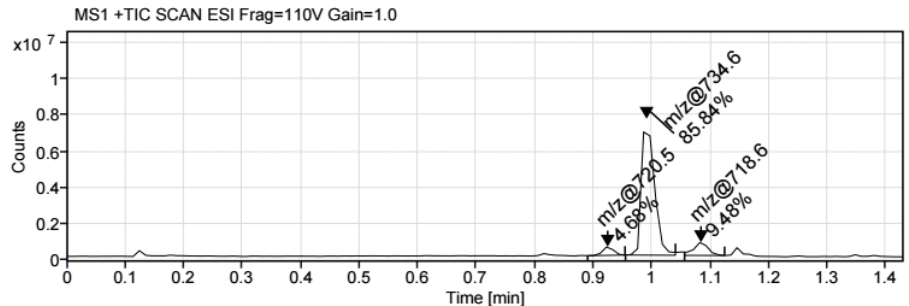
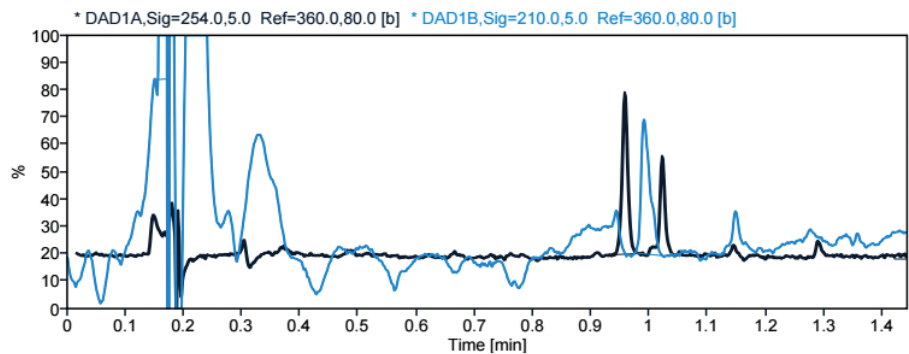


그림 2. Erythromycin 시료에 대한 시료 순도 평가 결과. 상단의 그림은 254 및 210nm에서의 UV 크로마토그램을 나타내며(각각 검은색과 파란색으로 표시) 하단의 그림은 기본 피크(base peak) m/z 및 피크 면적 %가 표시된 MS 크로마토그램입니다. MS 데이터로부터 210nm에서의 크로마토그래피 피크는 API(약 1.0분)이고 254nm에서 검출된 두 개의 피크는 불순물임을 확인할 수 있습니다.

OpenLab CDS 시료 순도 워크플로를 통한 반응 모니터링 간소화

OpenLab CDS는 데이터의 자동 처리와 보고서 생성을 지원하는 워크플로를 기본으로 제공합니다. 미리 설정된 분석법이 있어 시료 제출자가 데이터 분석을 수행할 필요가 없기 때문에 귀중한 시간을 절약할 수 있습니다. 시료 순도 평가 워크플로에서 제출자는 측정 중에 모니터링할 표적 질량을 최대 5개까지 입력할 수 있습니다. 측정 완료 후 스캔 신호로부터 추출된 표적 질량의 지정 부가물을 이용하여 자동으로 데이터 처리를 수행합니다. 이 자동 데이터 처리에서는 그 다음으로 표적 부가물의 총 EIC 머무름 시간을 바탕으로 스캔 신호에서 일치하는 피크를 찾습니다. 표적 부가물이 검출되면 보고서에 이 물질이 "검출됨"으로 표시되고, TIC % 또는 EIC/TIC %를 바탕으로 한 다음의 계산 과정을 통해 시료 순도를 측정합니다.

본 응용 자료는 양이온 모드의 TIC % MS 시료 순도 평가 워크플로에 대하여 $[M+H]^+$ 및 $[M+Na]^+$ 를 표적 부가물로 선택하였습니다(그림 3 참조). 덧붙여 음이온 스캔 모드에서는 $[M-H]^-$ 및 $[M+HCOO]^-$ 를 표적 부가물로 선택하였습니다.

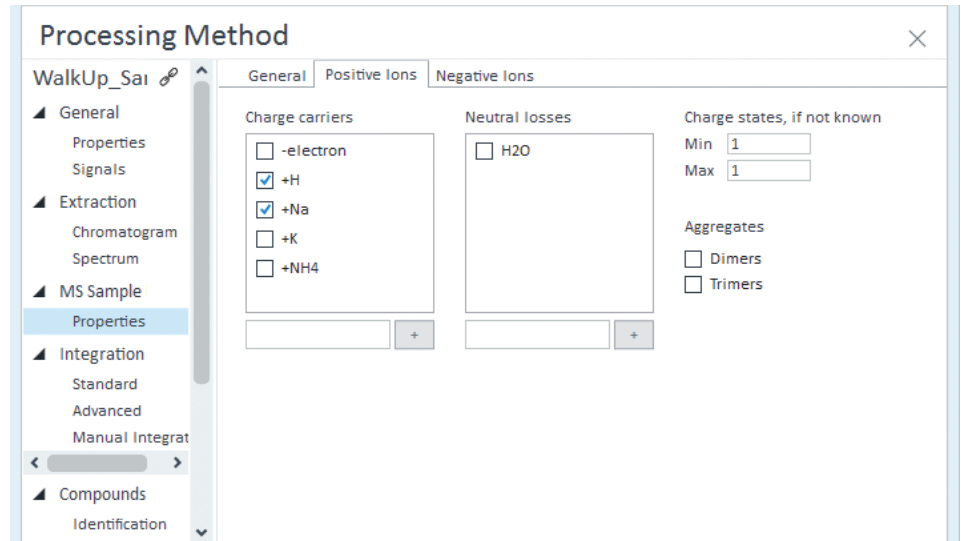


그림 3. Agilent OpenLab CDS Data Analysis의 processing method 탭에 나타나는 MS 시료 순도 처리 분석법 파라미터. MS 시료 순도는 TIC %로 산출되었습니다. 양이온 스캔 모드를 위해 H⁺ 및 Na⁺를 표적 부가물로 선택하였습니다. 음이온 스캔 모드에 대해서는 HCOO⁻ 부가물과 탈양성자화 분자를 표적 부가물로 선택하였습니다. 파라미터를 저장하면 모든 측정에 대해 데이터 처리와 보고서 생성을 기기가 자동으로 수행합니다.

그림 4는 OpenLab 데이터 분석 화면과 22종 API의 시료 순도 평가 결과를 보여줍니다. 모든 주입을 한 눈에 확인할 수 있으며 최소 순도 허용치를 충족하지 못하거나 검출되지 않은 API는 빨간색으로 표시되어 있습니다. 시료 제출자는 그림 6의 예시와 같은, 각 API에 대한 시료 순도 평가 보고서를 받게 됩니다.

화학 반응 추정에 필수적인 질량 정보

적절한 의사결정을 내리고 그에 따른 조정을 하기 위해서는 합성 경로 전반에 걸쳐 반응을 모니터링할 수 있는 것이 관건입니다. 최적의 조치를 취하기 위해서는 빠르고 신뢰성 있는 결과가 필요합니다. 이 모의 분해 연구에서는 먼저 새로 제조한 captopril을 희석하여 210nm에서 측정하였습니다. 그 결과 UV 크로마토그램에서 하나의 피크를 관찰할 수 있었습니다. 질량 정보를 바탕으로 이 물질은 API인 것으로 확인됩니다. MS 크로마토그램에서는 하나의 피크만이 관측되었고 표적 질량의 EIC가 이 단일 피크와 일치하기 때문에 시료 순도는 100%입니다. 양이온 모드의 MS 피크에 대한 질량 스펙트럼에서는 m/z 218 및 457인 두 개의 피크가 나타납니다. 전자는 API $[M+H]^+$ 이고 후자는 나트륨 부가물 이합체 $[2M+Na]^+$ 입니다.

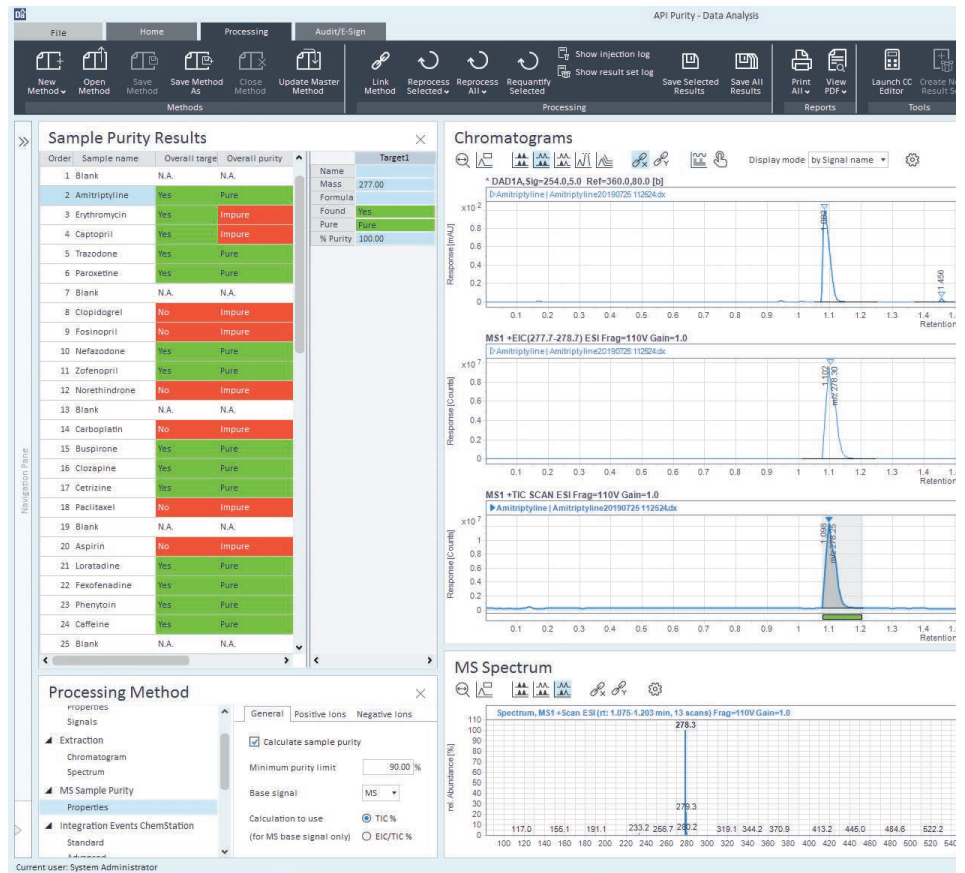


그림 4. 시료 순도 평가 워크플로를 위한 Agilent OpenLab CDS 2.4 데이터 분석 UI. Sample Purity Results 창에서는 주입 시퀀스에 대한 시료 순도 평가 결과를 보여줍니다. 각 행은 시료 이름과 더불어 처리 분석법에서 설정한 허용치를 기준으로 시료의 순수 여부를 표시해 줍니다(이 경우, 90% 이상은 순수). UV 및 MS 크로마토그램은 오른쪽에 표시되고 선택한 피크의 MS 스펙트럼이 아래에 표시됩니다.

실온에서 3개월 보관한 시료 용액의 MS 크로마토그램에는 두 개의 피크가 나타나는데, 양이온/음이온 스캔 모드의 기본 피크(base peak)는 각각 m/z 218/216 및 433/431 입니다. m/z 218은 $[M+H]^+$ 부가물에 해당하고, m/z 433은 새로운 물질입니다. 그림 6B에 나타난 210nm 에서의 UV 피크는 m/z 218의 표적 질량이 아닌 m/z 433의 이 새로운 물질입니다. Captopril의 명목 질량이 217Da인데 비추어 볼 때, m/z 433은 $[2M-2H+H]^+$ 일 가능성이 높습니다. Captopril의 구조를 살펴보면 (그림 5) 시간이 지남에 따라 이황화 결합이 형성될 수 있다고 추정할 수 있습니다. 이러한 경우 질량 정보는 API의 분해 산물을 측정하는 데 매우 중요합니다. m/z 433의 이황화 결합 이합체가 검출되어 captopril 시료의 순도는 58.49%에 불과한 것을 알 수 있습니다.

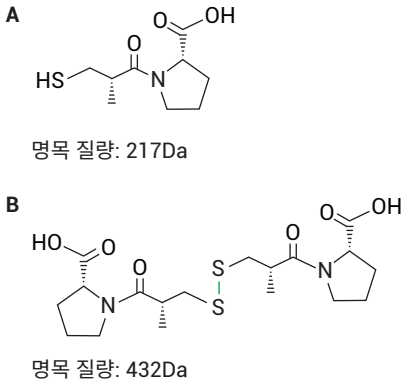


그림 5. Captopril 및 이황화 결합 이합체의 분자 구조

Sample Purity Results

Target mass	Target found in analysis	Purity (%)	Purity result
217.0	Yes	100.00	Pure

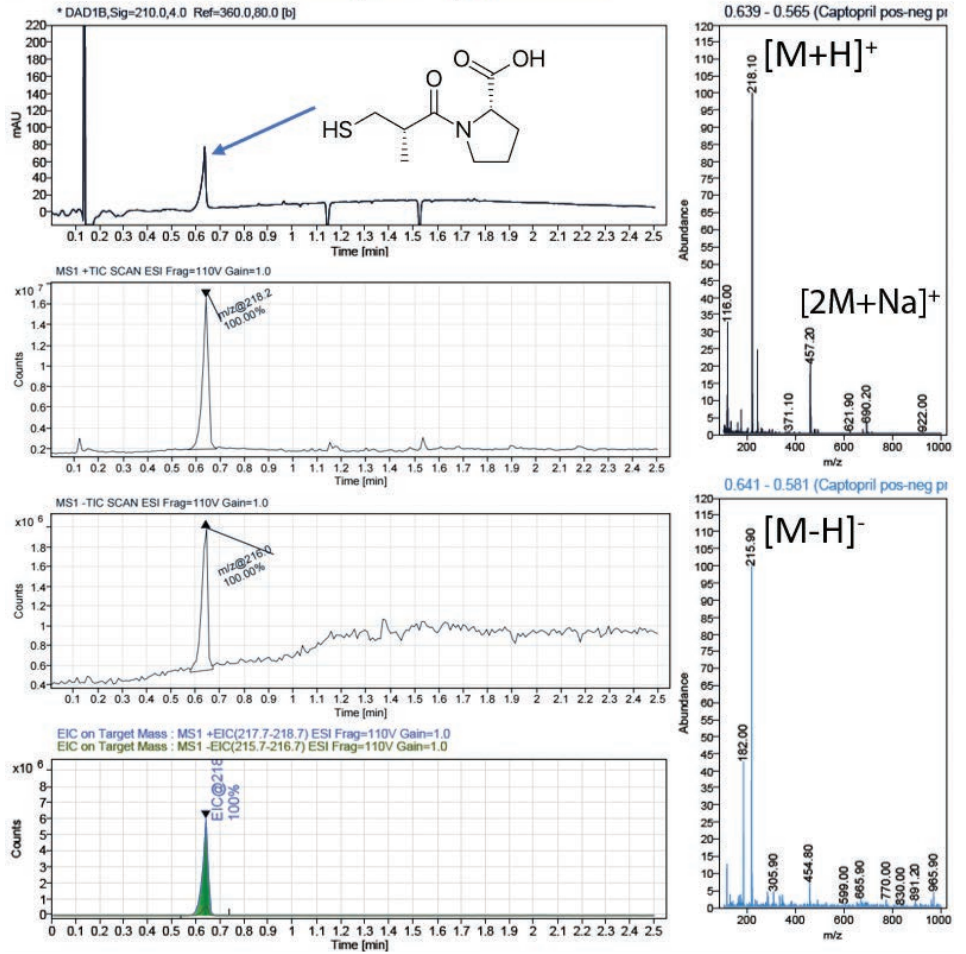


그림 6A. 새로 조제한 captopril. 이 보고서에 상단의 시료 순도 평가 결과와 함께 기본 피크의 m/z 가 표시된 UV 및 MS 크로마토그램을 포함하고 있습니다. 어떤 피크가 API를 구성하는지를 보여주는 표적 화합물의 EIC도 나타나 있습니다. MS 스펙트럼은 오른쪽에 표시되어 있으며 명확한 설명을 위해 수동으로 부가물 표지에 대한 주석을 달았습니다.

질량 정보는 API의 불순물을 식별하는 데 매우 유용합니다. 질량 분석기(MSD)를 사용하면 동시 용리 분석물질을 식별할 수 있어 생산성이 향상됩니다. InfinityLab LC/MSD iQ는 시료 순도 평가 워크플로에 질량 정보를 추가해 주는 UV 검출 조합의 완벽한 시스템입니다. 시료의 UV 흡수가 강하지 않거나 표준물질을 얻기 어려운 경우에 특히 이러한 질량 정보가 중요합니다. MassHunter WalkUp을 사용하면 질량 분석기에 대한 사전 지식이 필요 없는 직관적인 사용자 인터페이스를 통해 여러 사용자가 시료를 제출할 수 있습니다. 이를 InfinityLab LC/MSD iQ와 결합하면 진정한 오픈 액세스 소프트웨어를 경험할 수 있어, 빠른 결과와 신속한 의사결정이 필요한 실험실에서 귀중한 시간을 절약할 수 있습니다.

Sample Purity Results

Target mass	Target found in analysis	Purity (%)	Purity result
217.0	Yes	58.49	Impure

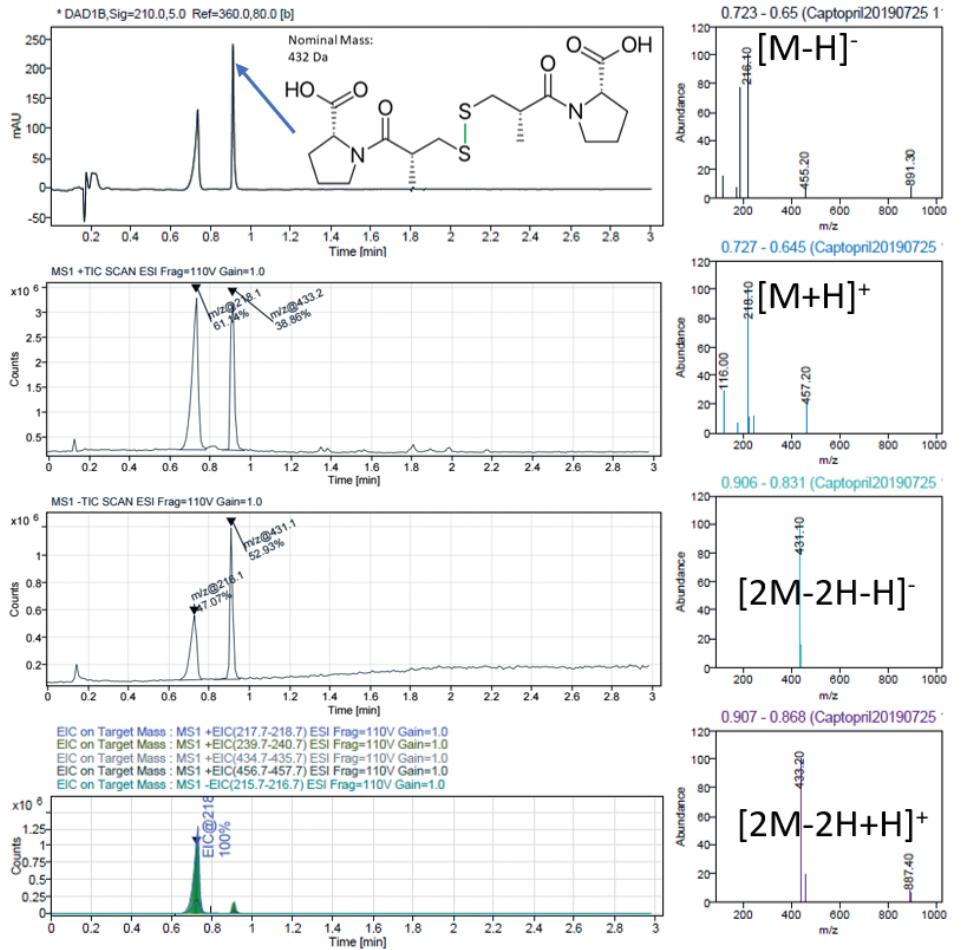


그림 6B. 실온에서 3개월간 보관한 captopril 시료. 0.9분 위치에 m/z 433인 새로운 물질이 존재하는데, 이는 두 API 분자 사이에 황화물 결합이 형성되었음을 의미할 가능성이 가장 높습니다. 질량 정보를 사용하면 이 새로운 물질을 쉽게 식별할 수 있습니다. 이러한 보고서는 WalkUp에서 자동 생성되며 시료 제출자에게 직접 이메일로 전송됩니다. MS 스펙트럼은 오른쪽에 표시되어 있으며 명확한 설명을 위해 수동으로 부가물 표지에 대한 주석을 달았습니다.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 11월 08일, 한국에서 인쇄
5994-1503KO
DE.8889814815

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