

## Agilent 6475 QQQ LC/MS 시스템을 이용한 니트로사민 불순물 측정



### 저자

Linfeng Wu, Lee Bertram  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, CA, U.S.

Shan-An Chan  
Agilent Technologies, Inc.  
Taiwan

### 개요

니트로사민 불순물은 의약품 제조 과정에서 극미량으로 생성되는 부산물입니다. 이러한 불순물은 잠재적인 유전 독성 불순물 및 장기간 섭취 시 잠재적인 발암 물질로 분류됩니다. 따라서 높은 수준의 감도와 신뢰도로 최종 완전의약품에서 해당 수치를 측정하는 것이 중요합니다. 이 응용 자료에서는 Agilent 6475 QQQ LC/MS (LC/TQ) 시스템과 Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템 및 대기압 화학 이온화(APCI) 소스를 결합하여 8가지 니트로사민 불순물의 정량 성능을 평가합니다.

## 서론

최근 일부 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB) 완제의약품의 리콜 발표가 나오면서 규제 기관에서 니트로사민 불순물에 대한 관심이 집중되었습니다.<sup>1</sup> 니트로사민 불순물은 의약품 제조 공정에서 발생하는 부산물입니다. 이 물질은 장기적으로 섭취할 경우 잠재적으로 유전 독성이 있는 불순물 및 잠재적 발암 물질로 분류되는 “관심 화합물(cohort of concern)”에 속합니다.

이 응용 자료에서는 6475 LC/TQ와 1290 Infinity II Bio LC 시스템 및 APCI 소스를 결합하여 8가지 니트로사민 화합물에 대한 포괄적인 분석을 수행했습니다. 다음 화합물을 낮은 수준에서 측정할 수 있음이 입증되었습니다.

- N-Nitrosodimethylamine (NDMA)
- N-Nitrosomorpholine (NMOR)
- N-Nitrosomethylethylamine (NMEA)
- N-Nitrosopyrrolidine (NPYR)
- N-Nitrosodiethylamine (NDEA)
- N-Nitrosopiperidine (NPIP)
- N-Nitrosodi-n-propylamine (NDPA)
- N-Nitrosodi-n-butylamine (NDBA)

## 실험

### 화학 및 표준물질

분석에 사용된 모든 시약과 용매는 LC/MS 등급이었습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22µm point-of-use 멤브레인 필터 카트리지가 장착된 Milli-Q Integral 시스템(MilliporeSigma, Billerica, MA, U.S.)에서 얻었습니다. 8가지 니트로사민인 NDMA, NDEA, NMOR, NMEA, NPYR, NPIP, NDPA, NDBA가 포함된 표준물질은 애질런트의 제품(부품 번호 US-113N-1)입니다.

### 시료 전처리

니트로사민 표준물질을 용매 바탕시료(10:90 메탄올:물)에 0.0125~10ng/mL 범위의 9가지 농도 수준으로 주입했습니다. 원료의약품(API) 매트릭스 전처리는 다음 단계에 따라 수행되었습니다. 로사르탄 칼륨 완제의약품 100mg을 용매 (50:50 메탄올:물) 2mL에 녹인 후 30분간 초음파 처리했습니다. 그런 다음 시료를 12,000rpm으로 10분간 원심분리했습니다. 상층액을 수집한 다음 1:5의 비율로 물로 희석했습니다. 니트로사민 표준물질을 0.05~1ng/mL 범위의 농도에서 전처리된 API 매트릭스에 주입했습니다.

## 장비

시료 분리는 다음 모듈로 구성된 **Agilent 1290 Infinity II Bio LC 시스템**을 사용하여 수행했습니다.

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프(G7132A)
- 온도 조절 장치가 장착된 Agilent 1290 Infinity II Bio multisampler(G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)

LC 시스템은 애질런트 APCI 소스(G1947B)가 장착된 **Agilent 6475 QQQ LC/MS**(G6475AA)에 결합되었습니다. Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어 12.0은 데이터 수집에 사용했습니다.

## 분석법

액체 크로마토그래피/질량 분석(LC/MS) 조건과 파라미터는 표 1과 2에 나와 있습니다. 화합물에 대한 다중 반응 모니터링 (MRM) 설정은 표 3에 나와 있습니다. 검량선 분석에는 원점을 무시하고 1/x 가중치를 적용한 선형 피팅이 사용되었습니다.

표 1. Agilent 1290 Infinity II Bio LC 분석법:

파라미터	값	
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 150mm, 2.7µm(p/n 693975-302)	
샘플러 온도	4°C	
이동상 A	ddH <sub>2</sub> O + 0.1% 포름산	
이동상 B	MeOH + 0.1% 포름산	
유속	0.5mL/min	
주입량	20µL	
컬럼 온도	40°C	
그라디언트 프로그램	시간(분)	%B
	0.0	5
	3.5	5
	7.0	45
	9.0	60
	11.0	60
	15.0	65
	16.0	90
	16.1	5
20.0	5	

표 2. Agilent 6475 LC/TQ 파라미터.

파라미터	값
이온화원	애질런트 APCI 소스
극성	양이온
가스 온도	300°C
건조 가스 유속	7L/분
Nebulizer	25psi
APCI 기화기 온도	350°C
캐필러리 전압	4,000V
코로나 전류	4.0µA
스캔 유형	시간 세그먼트 기반 MRM
검출기 게인 계수(+)	10
LC 전환기 (폐액 방향)	0~2분; 12~13분; 14~18분 (나머지 시간 전환기는 MS 방향)

표 3. Agilent 6475 LC/TQ의 다중 반응 모니터링(MRM) 상세 설정 및 화합물 정보.

화합물 명칭	전구이온 m/z	생성이온 m/z	Dwell (ms)	Fragmentor (V)	셀 가속기 전압(V)	충돌 에너지 (V)	극성	측정된 머무름 시간(분)
NDMA	75	43	50	95	3	16	+	2.51
	75	58	50	95	3	10	+	2.51
NMOR	117	45	50	80	4	21	+	3.99
	117	87	50	80	4	11	+	3.99
NMEA	89	43	50	75	3	12	+	5.35
	89	61	50	75	3	10	+	5.35
NPYR	101	41	50	90	3	24	+	5.70
	101	55	50	90	3	19	+	5.70
NDEA	103	47	50	80	4	20	+	7.48
	103	75	50	80	4	12	+	7.48
NPIP	115	41	50	90	3	24	+	7.90
	115	69	50	90	3	12	+	7.90
NDPA	131	43	50	80	4	10	+	10.10
	131	89	50	80	4	16	+	10.10
NDBA	159	41	50	80	3	20	+	13.50
	159	57	50	80	3	12	+	13.50

## 결과 및 토의

### 검량선 분석

니트로사민의 정량 성능을 평가하기 위해 8가지 니트로사민 화합물의 검량선을 용매에서 0.0125~10ng/mL 범위의 농도로 분석했습니다.

분석 결과 요약은 다음과 같습니다.

- 모든 분석물질에 대한 우수한 크로마토그래피 분리 및 피크 모양(그림 1)
- 최저정량한계(LLOQ)를 포함한 모든 테스트된 농도에서 우수한 정밀도와 정확도가 관측되었음(표 4)
- 모든 표적 분석물질에 대해 LLOQ ≤0.025ng/mL의 높은 분석 감도(표 4)
- 테스트 농도에 대한 우수한 정량 선형성, 8가지 분석물질 모두에서 R<sup>2</sup> >0.99(그림 2)

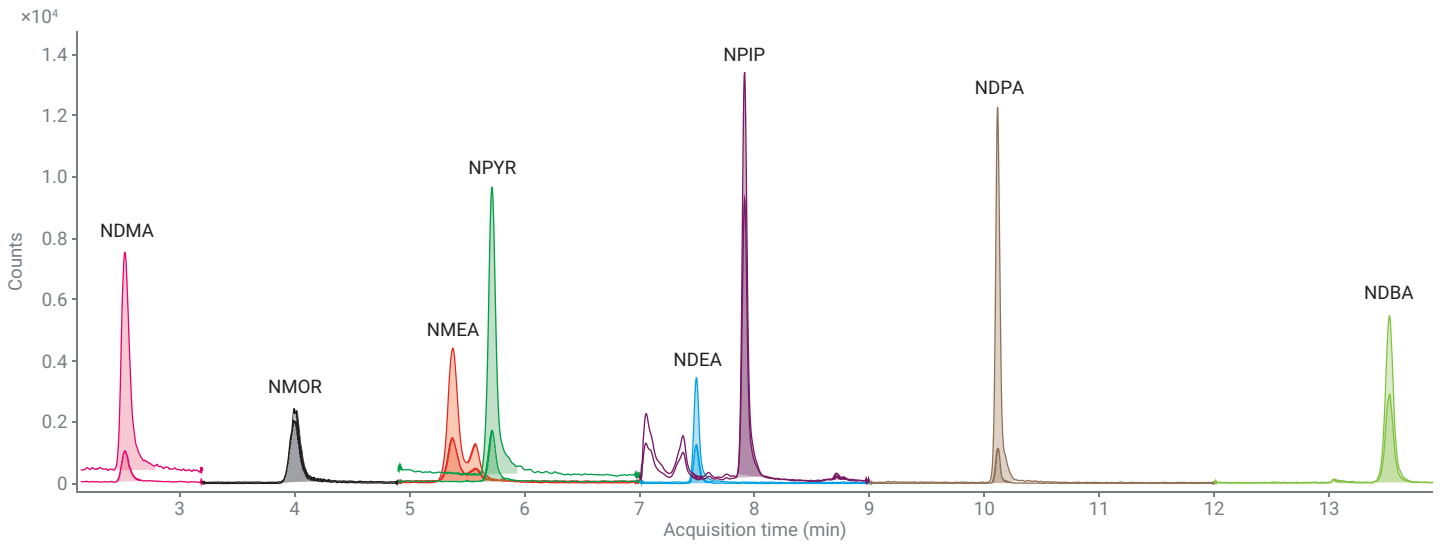


그림 1. 8가지 니트로사민 화합물에 대한 총 MRM 크로마토그램(1ng/mL).

표 4. Agilent 6475 LC/TQ 시스템을 사용한 0.025 및 0.05ng/mL에서의 평균 감응, 정량 이온의 신호 대 잡음비(S/N), %RSD 및 정확도(%) (n = 3).

농도	0.025ng/mL (n = 3)				0.05ng/mL (n = 3)				LLOQ* (ng/mL)	
	화학명	감응	S/N	RSD(%)	정확도(%)	감응	S/N	RSD(%)		정확도(%)
NDMA		1,145.08	14.63	1.28	113.86	2,154.26	23.08	1.07	105.41	0.025
NMOR		328.76	52.40	15.94	104.90	705.55	105.41	14.94	103.87	0.025
NMEA		1,057.38	40.79	3.86	116.86	1,909.29	91.84	4.81	101.00	0.0125
NPYR		918.54	24.31	2.65	115.47	1,697.56	41.59	2.45	89.61	0.025
NDEA		382.15	31.11	8.14	107.67	606.87	52.10	8.58	87.91	0.025
NPIP		890.01	57.47	6.46	97.45	2,106.81	111.72	5.30	98.29	0.025
NDPA		795.93	95.62	12.01	106.13	1,647.60	177.47	10.77	95.97	0.025
NDBA		892.36	67.66	7.58	112.05	1,581.52	123.78	7.83	101.33	0.025

\* LLOQ는 정량 이온의 경우 S/N >10, 정성 이온의 경우 S/N >3을 기준으로 측정되었으며, RSD <20%, 정확도는 80~120% 이었습니다.

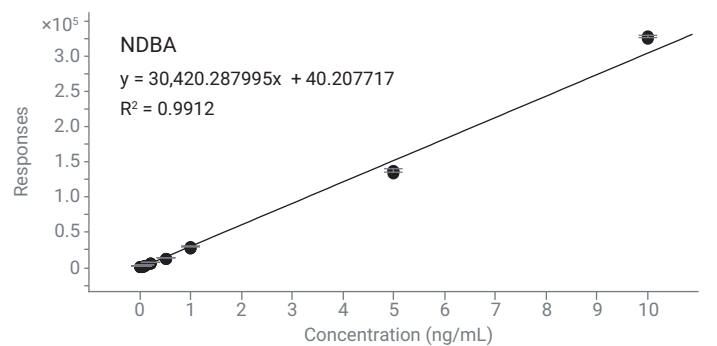
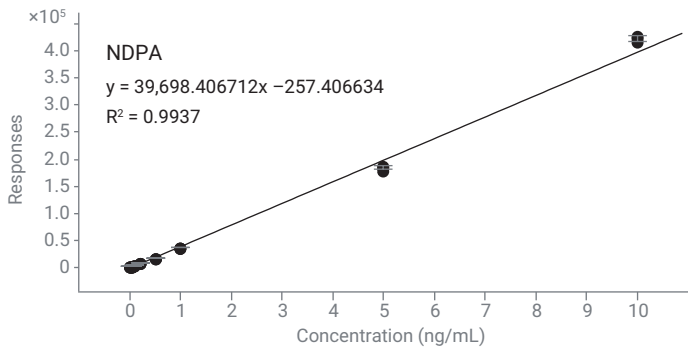
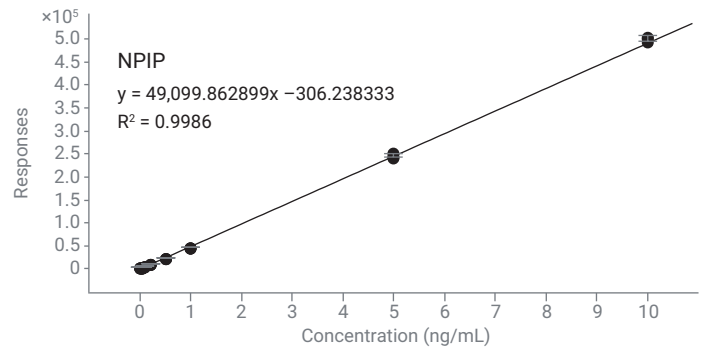
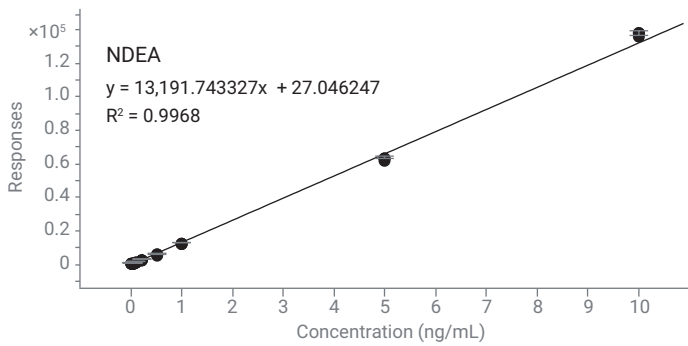
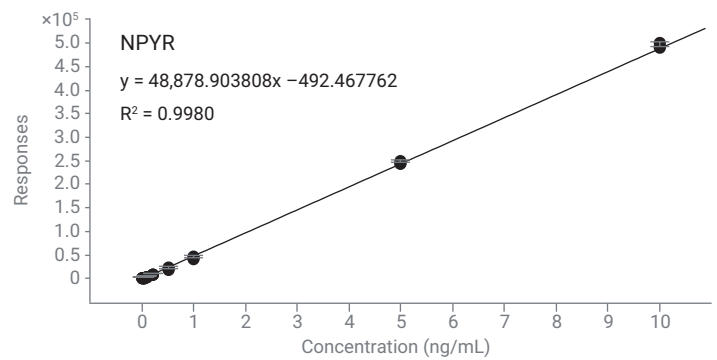
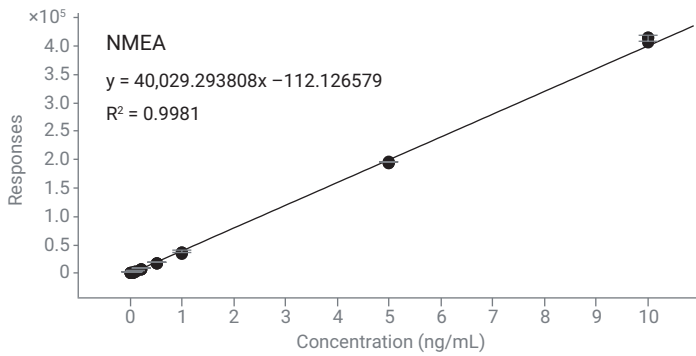
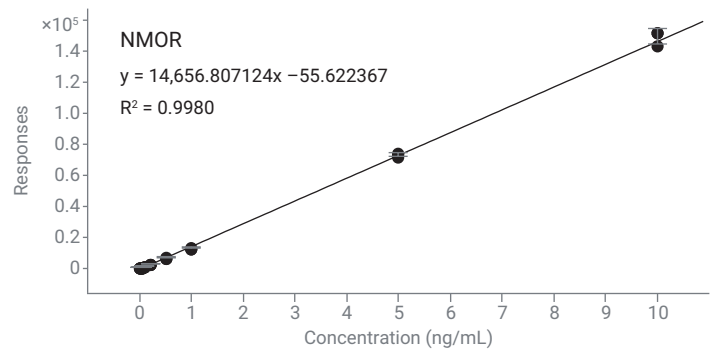
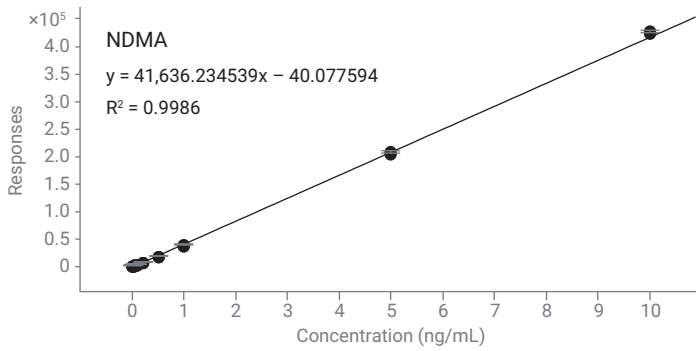


그림 2. 농도 범위 0.0125~10ng/mL의 니트로사민 화합물 8종에 대한 Agilent 6475 LC/TQ의 검량선.

### 로사르탄 칼륨 약물 매트릭스에서의 정량

완제의약품 내에 존재하는 니트로사민 불순물의 분석 성능을 연구하기 위해 니트로사민 표준물질을 0.05~1ng/mL 농도로 로사르탄 칼륨 약물 추출물에 첨가했습니다. 그 결과 8가지 니트로사민 화합물 모두 약물 매트릭스 내 0.05ng/mL 농도에서 높은 신뢰도로 정량할 수 있음을 확인하였습니다. 8가지 분석물질 모두에 대한 분석 감도는 규제 기관에서 명시한 니트로사민 허용 함량보다 훨씬 낮았습니다.<sup>2,3</sup>

NDMA는 니트로사민 불순물 분석에서 일반적으로 까다로운 화합물입니다. 그림 3은 매트릭스 바탕시료에서의 NDMA와 10mg/mL 약물 추출물 내 0.05 및 0.1ng/mL NDMA의 반복시료 측정에 대한 대표적인 크로마토그램을 보여줍니다. 약물 매트릭스 내에 저농도로 존재하는 NDMA에 대한 우수한 감응, S/N 및 재현성을 6475 LC/TQ에서 입증하였습니다.

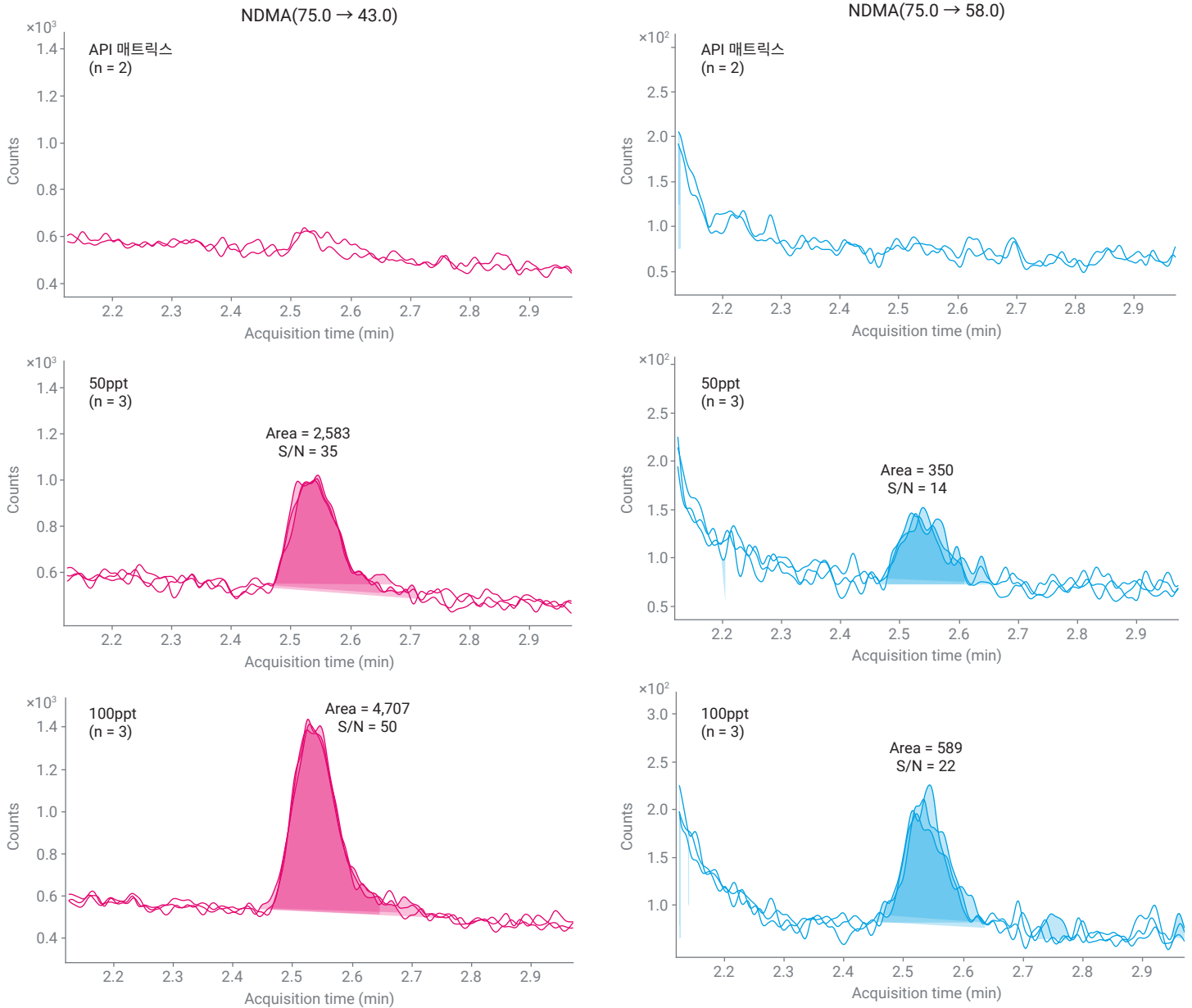


그림 3. 로사르탄 칼륨 약물 매트릭스 내 낮은 농도 수준의 NDMA 생성 이온에 대한 반복 시료 크로마토그램.

## 결론

이 응용 자료는 Agilent 6475 QQQ LC/MS 시스템이 규제 요건으로 명시된 낮은 농도 수준에서 니트로사민류 불순물을 확실하게 정량할 수 있음을 보여줍니다. 이 분석법은 다른 ARB 완제의약품 내 불순물 정량에도 적용할 수 있습니다. 단, 이 경우 완제의약품의 용리 패턴에 따라 크로마토그래피 조건에 약간의 변경이 필요할 수 있습니다.

## 참고 문헌

1. U.S. Food and Drug Administration. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan). 2023년 3월 최종 수정. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. 2021년 2월 최종 수정. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>
3. Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency. Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490. Nitrosamines Impurities in Human Medicinal Products. 2020년 6월 최종 수정. Nitrosamines EMEA-H-A5(3)-1490 - Assessment Report (europa.eu)

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

DE41584454

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023  
2023년 3월 21일 한국에서 발행  
5994-5919KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 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)