

Ultivo QQQ LC/MS를 이용한 Nitrosamine 불순물 측정

약물 제조 공정의 규제 유전독성 불순물 검출

저자

Chander Mani 및
Saikat Banerjee
Agilent Technologies, Inc.

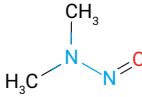
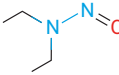
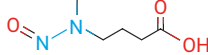
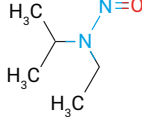
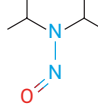
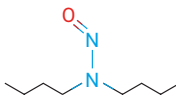
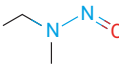
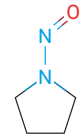
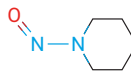
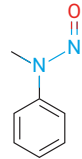
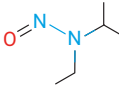
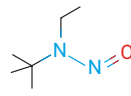
개요

최근 밝혀진 바에 따르면 일부 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB) 의약품에 발암성 nitrosamine 불순물이 포함되어 있는 것으로 나타났습니다¹. 그 결과, 다수의 해당 제품이 리콜되면서 문제가 된 목표 농도 이상의 nitrosamine 불순물을 검출할 수 있는 분석법의 필요성이 강조되었습니다. 이 응용 자료에서는 감도 높은 Agilent Ultivo LC/TQ 기반 분석법의 활용 방법에 대해 설명합니다. 이 분석법은 미국 식품의약국(FDA)에 기재된 6종의 nitrosamine 뿐만 아니라 잠재적으로 돌연변이를 일으킬 수 있는 또 다른 nitrosamine 불순물 6종을 동시에 검출할 수 있습니다.

서론

ARB 의약품인 Valsartan, Losartan 및 Irbesartan의 리콜 발표가 나오면서 FDA와 유럽 의약청(EMA)을 포함한 규제 기관에서 N-Nitroso 불순물에 대한 관심이 집중되었습니다. Nitrosamine 불순물은 이러한 의약품의 제조 공정에서 극미량으로 생성되는 부산물입니다. 이러한 불순물은 잠재적 발암 물질(즉, 잠재적인 유전독성 불순물)로 분류됩니다. 이 응용 자료에 설명된 LC/MS 기반 분석법은 Ultivo QQQ LC/MS에서 수행하였습니다. 이로부터 12종의 nitrosamine 화합물에 대한 포괄적인 분석 결과를 매우 낮은 검출 한계값으로 얻을 수 있었습니다. 모든 nitrosamine 불순물은 74~158 범위의 저분자량 물질들입니다. 포함 화합물:

- N-nitrosodimethylamine (NDMA)
- N-nitrosodiethylamine (NDEA)
- N-nitroso-4-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA)
- N-nitrosoethylisopropylamine (NEIPA)
- N-nitrosodiisopropylamine (NDIPA)
- N-nitrosodibutylamine (NDBA)
- N-nitrosoethylmethylamine (NMEA)
- N-nitrosopyrrolidine (NPyR)
- N-nitrosopiperidine (NPIP)
- N-methyl-N-nitrosoaniline (NMPHA)
- N-isopropylmethyl nitrosamine (NMIPA)
- N-tert-butyl-N-ethylnitrosamine

Nitrosamine 화합물	화학 구조
NDMA	
NDEA	
NMBA	
NEIPA	
NDIPA	
NDBA	
NMEA	
NPyR	
NPIP	
NMPHA	
NMIPA	
N-tert-butyl-N-ethylnitrosamine	

실험

화학물질 및 시약

연구에 사용된 12종 nitrosamine 표준물질은 인도 텔랑가나 주 하이데라바드에 위치한 PS3 Labs LLP 에서 제공 받았습니다. 메탄올 및 물과 같은 LC/MS 등급 용매는 Honeywell에서 구입했습니다. 분석에 사용된 포름산은 Fluka에서 구입했습니다.

데이터 분석

Ultivo용 Agilent MassHunter Acquisition 소프트웨어(버전 1.1)를 사용하여 데이터를 수집하고 분석했습니다.

MS/MS 전이값은 Agilent MassHunter Optimizer 소프트웨어를 이용하여 수집 및 최적화하였으며, 개별 화합물 원액(각 개별 화합물 농도 1,000ng/mL, 흐름 주입 모드에서 주입 부피 1µL) 주입을 통해 최적의 전구 이온 및 생성 이온, fragmentor 전압 및 충돌 에너지 등을 결정하였습니다.

LC 구성 및 파라미터

표 1. UHPLC 구성과 설정

파라미터	값												
기기	Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A) Agilent 1290 Infinity II multisampler(G7167B) Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)												
니들 세척	메탄올: 물/ 80:20												
시료 희석제	물												
Multisampler 온도	6°C												
주입 부피	40µL												
분석 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell HPH C18, 2.1 × 100mm 1.9µm(p/n 695675-702)												
컬럼 온도	40°C												
이동상 A	0.2% 포름산 함유 물												
이동상 B	메탄올												
유속	0.4mL/분												
그라디언트	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>5.5</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>	시간(분)	%B	0	1	2	13	5.5	80	8	95	10	95
시간(분)	%B												
0	1												
2	13												
5.5	80												
8	95												
10	95												
중지 시간	10분												
사후 시간	3분												

TQ 질량 분석기 구성 및 파라미터

표 2. MS 구성 및 이온화원 설정

파라미터	값
기기	Agilent Ultivo QQQ 질량 분석기
이온화원	대기압 화학 이온화(APCI)
MS/MS 모드	다이내믹 MRM(dMRM)
이온 모드	양이온
건조 가스 온도	300°C
건조 가스 유속	6L/분
Nebulizer 압력	55psi
APCI 히터	350°C
APCI 니들, 양이온 모드	4µA
캐필러리 전압(양이온)	3,000V
MS1/MS2 분해능	0.7/0.7(Unit/Unit)
측정 시간	가변적

분석물질별 MS/MS 화합물 정보

표 3. Ultivo dMRM 모드의 상세 MRM 설정

화합물	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)	머무름 시간 (분)	머무름 시간 구간 (분)	Fragmentor 전압(V)	충돌 에너지 (V)	극성
NDEA	103.1	75.1	3.484	1.5	85	8	+
NDEA	103.1	47.1	3.484	1.5	85	16	+
NDMA	75.1	58	1.143	1.24	65	10	+
NDMA	75.1	43.1	1.143	1.24	65	17	+
NMBA	147.1	44.2	2.247	1.2	50	7	+
NMBA	147.1	87.2	2.247	1.2	50	7	+
NEIPA	117.1	75.1	4.325	1.0	70	7	+
NEIPA	117.1	47.1	4.325	1.0	70	15	+
NDIPA	131.1	89.1	4.916	1.0	50	5	+
NDIPA	131.1	43.1	4.916	1.0	50	7	+
NDBA	159.1	57.2	6.096	1.0	70	7	+
NDBA	159.1	41.1	6.096	1.0	70	24	+
NMEA	89.1	61.1	2.109	1.37	75	10	+
NMEA	89.1	43.1	2.109	1.37	75	10	+
NPyR	101.1	55.1	2.248	1.43	55	18	+
NPyR	101.1	41	2.248	1.43	55	26	+
NPIP	115.1	69.1	3.809	1.0	85	9	+
NPIP	115.1	41.2	3.809	1.0	85	26	+
NMPhA	137	66.1	5.029	1.32	45	18	+
NMPhA	137	107	5.029	1.32	45	10	+
NMIPA	103.1	61	3.358	1.0	60	8	+
NMIPA	103.1	43	3.358	1.0	60	8	+
N-tert-butyl-N-ethylnitrosamine	131	75.1	4.897	1.0	40	4	+
N-tert-butyl-N-ethylnitrosamine	131	57.1	4.897	1.0	40	6	+

결과 및 토의

검량 농도 범위는 0.05~100ng/mL였으며 표 4에 구체적인 사항을 기재하였습니다. 모든 분석물질의 R² 값은 0.996 이상이었으며 전체 농도 범위에 걸쳐 선형 감응을 나타냈습니다. 그림 1은 Ultivo TQ의 대표적 다이내믹 MRM(dMRM) 크로마토그램 오버레이로, 10ng/mL에서 12종의 모든 nitrosamine 화합물의 용리를 보여줍니다.

표 4. Agilent Ultivo TQ 결과 요약. 데이터는 신호 대 잡음비(S/N), 계산된 LOQ, 회귀 계수 및 검량선 피팅을 포함. 모든 표준물질은 1/x 가중 검량선 사용

화합물	Agilent Ultivo TQ					
	LOD (ng/mL)	LOD (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R ²	직선성 범위 (ng/mL)
NDMA	0.05	9.74	0.1	13.49	0.997	0.05~100
NDEA	0.025	22.68	0.05	53.82	0.998	0.025~100
NMBA	0.05	23.88	0.1	31.18	0.998	0.05~100
NEIPA	0.025	57.37	0.05	69.67	0.999	0.025~100
NDIPA	0.025	15.72	0.05	45.18	0.998	0.025~100
NDBA	0.05	225.18	0.1	323.11	0.999	0.025~100
NMEA	0.075	7.84	0.1	12.10	0.999	0.1~100
NPYR	0.075	30.02	0.1	41.72	0.999	0.1~100
NPIP	0.1	11.60	0.15	14.11	0.998	0.15~100
NMPhA	0.075	29.58	0.1	45.34	0.994	0.075~100
NMIPA	0.025	42.17	0.05	208.86	0.996	0.025~100
N-tert-butyl-N-ethylnitrosamine	0.075	54.92	0.1	81.62	0.999	0.075~100

* S/N은 Agilent MassHunter Quantitative 10 소프트웨어에서 Auto-RMS 알고리즘 및 노이즈 기준 '시료(sample)'를 사용하여 산출함

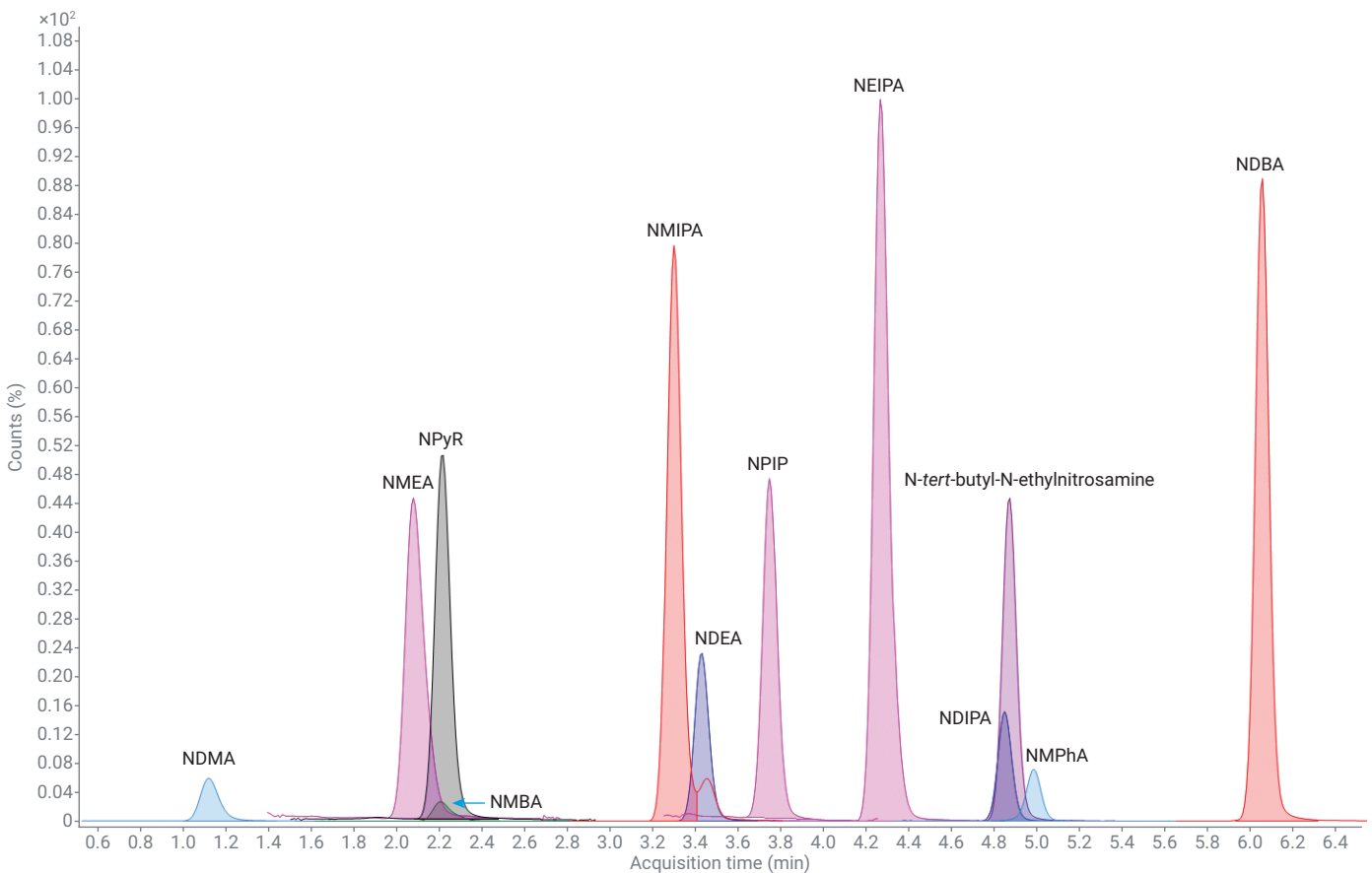


그림 1. 12종 nitrosamine 화합물의 용리를 나타내는 dMRM 크로마토그램 오버레이

정확도 및 재현성

12종 화합물 각각에 대한 검량선은 정량 한계(LOQ)에서의 정확도가 예상 농도 한계의 20% 이내에 있음을 보여줍니다. 표 4에서 제시된 측정 선형 검량 범위에 대한 검출 한계, 정량 한계 및 산출된 통계 자료가

나타나 있으며, 모든 검량 포인트에 걸쳐 CV<15%의 재현성을 보였습니다. 표 5에는 여러 농도 수준에서 얻은 결과의 정확도 및 재현성에 대한 상세 요약이 나타나 있습니다. 그림 2에서는 Ultivo LC/TQ 시스템을 통해 생성된 대표적인 검량선을 보여줍니다.

표 5. 다양한 농도 수준에서 Agilent Ultivo LC/TQ로 얻은 정확도 및 재현성(n = 3)

농도 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NEIPA		NDIPA		NDBA	
	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV
0.1	95.53	5.63	96.23	5.78	84.73	0.00	96.37	5.82	107.9	9.01	99.63	6.47
0.25	102.47	2.79	98.53	4.77	95.53	4.31	101.43	5.16	101.6	3.59	105.53	3.60
0.5	100.00	2.68	98.53	2.15	105.67	1.15	95.30	3.15	95.30	1.06	95.77	2.07
1.0	104.27	4.70	99.47	1.22	105.67	1.80	98.47	4.59	97.63	3.88	95.77	2.39

농도 (ng/mL)	NMEA		NPyR		NPIP*		NMPPhA		NMIPA		N-tert-butyl-N-ethyl nitrosamine	
	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV
0.1	110.97	7.27	97.7	6.56	112.27	4.52	100.6	8.81	105.23	2.58	105.27	4.56
0.25	105.1	5.64	103.63	6.66	101.43	4.79	106.43	6.59	107.5	7.97	106.47	5.27
0.5	91.87	6.20	96.20	3.19	93.07	5.83	84.40	3.35	90.50	5.61	96.77	0.26
1.0	93.80	5.39	99.97	2.36	102.67	0.79	108.03	2.25	100.23	2.94	94.83	1.10

* NPIP의 경우, 첫 번째 농도는 0.1ng/mL이 아니라 0.15ng/mL임

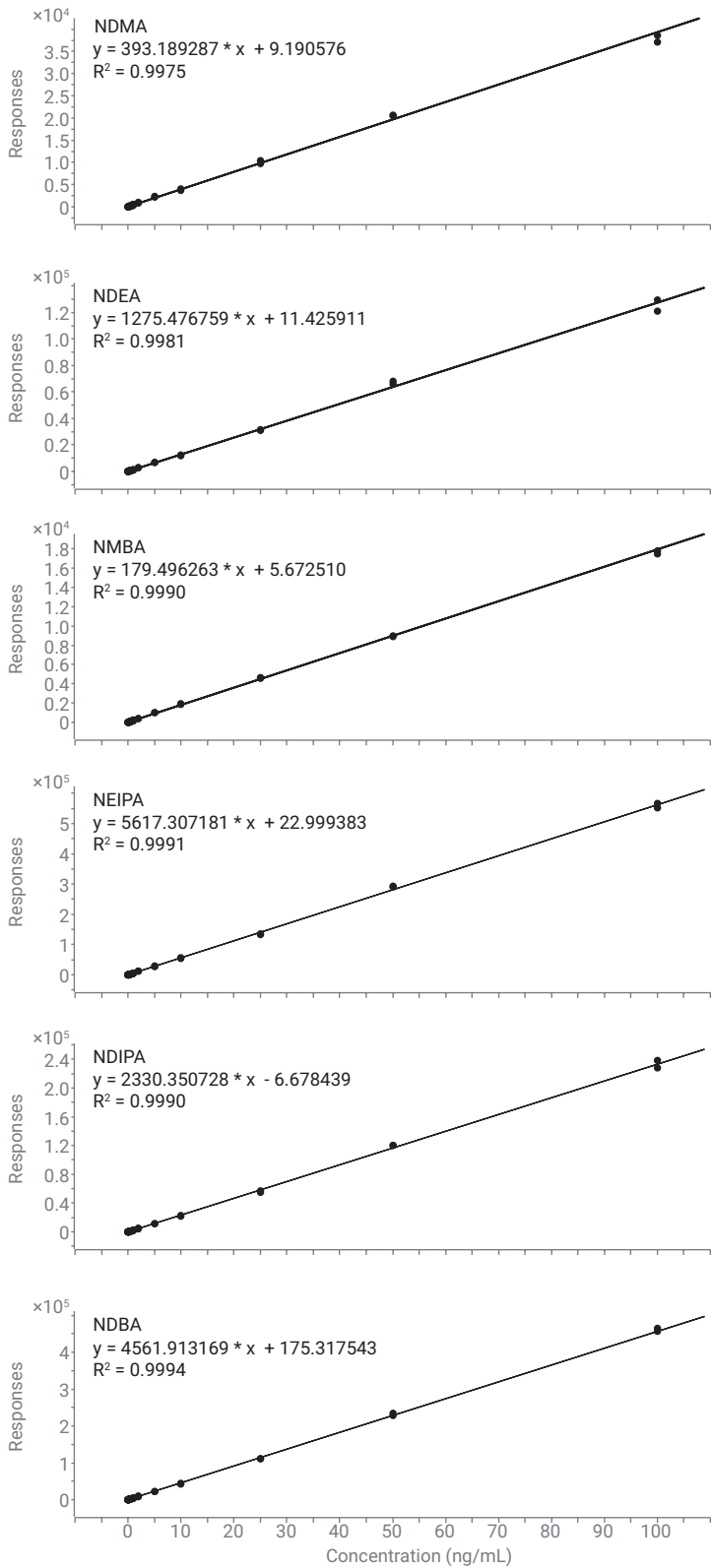


그림 2. 크로마토그램 전체에서 관찰된 화합물에 대한 Agilent Ultivo LC/TQ의 대표적 검량선. 모든 검량선은 1/x 가중 계수 사용

결론

Agilent Ultivo QQQ LC/MS는 규제 요건에서 요구하는 낮은 농도 수준으로 nitrosamine 불순물을 분석할 수 있습니다. 본 응용 자료는 저농도 수준의 특정 nitrosamine 불순물 검출에서 Ultivo LC/TQ의 감도를 보여줍니다. 이 분석법은 다른 ARB 의약품의 불순물 정량에도 적용할 수 있습니다. 이 때, 의약품의 용리 패턴에 따라 크로마토그래피 조건에 약간의 변화를 주면 됩니다.

참고문헌

1. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
2. FDA guidance document: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities.
3. FDA guidance document: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of six nitrosamine impurities in ARB drugs.

감사의 글

Nitrosamine 표준물질을 제공해주신 인도 텔랑가나 주 하이데라바드에 위치한 PS3 Labs LLP에 진심으로 감사 드립니다.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 11월 08일, 한국에서 인쇄
5994-1383KO

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

