응용 자료

제약 및 바이오제약

Agilent

Trusted Answers

애질런트 GC/MS/MS 기기를 사용한 완제의약품 및 원료의약품 내 5가지 니트로사민 불순물에 대한 분석

저자

Soma Dasgupta,
Lalith Hansoge, Vivek Dhyani,
Samir Vyas,
Melissa Churley
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용자료에서는 Agilent 7890B 또는 8890 GC와 Agilent 7010B QQQ GC/MS 시스템을 결합하여 sartan 완제의약품 및 원료의약품 내 5가지 극미량 니트로사민 불순물(NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA)을 측정 및 추정하는 포괄적인 솔루션에 대해 설명합니다. 7010B QQQ GC/MS는 고효율 이온화원(HES)을 장착하여 뛰어난 감도, 재현성, 정밀도 및 규제 한계를 넘는 성능을 제공합니다. 이 분석법은 현 규제가 요구하는 수준보다 2~20배나 낮은 정량 한계를 제공합니다.

서론

2018년 7월에 FDA는 N-nitrosodimethylamine(NDMA) 검출을 이유로 Valsartan에 대해 리콜 조치를 발표했습니다. 모든 제약업체의 안지오텐신 수용체 차단제(ARB)류 완제의약품 및 API에 대한 조사가 이어졌고, Valsartan, Irbesartan, Losartan에 대한 추가 리콜 조치가 시행되었습니다. 이들 제품은 NDMA와 N-nitrosodiethylamine(NDEA)을 모두 포함하는 것으로 드러났습니다. 이들 두 물질은 동물과 인간에게 발암물질인 것으로 알려져 있습니다.

또한 N-nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), N-nitrosodiisopropylamine (NDIPA), N-nitrosodibutylamine(NDBA), N-nitrosomethyl-4-amino-butyric acid(NMBA) 등의 다른 불순물 역시 잠재적인 니트로사민 불순물로 고지되었습니다. 잠정 한계를 초과하는 위와 같은 불순물 함유로 인해 현재까지 1,110여 개의 다른 로트에 속하는 sartan 의약품(Valsartan, Losartan, Irbesartan)이 리콜되었습니다.

이들 불순물에 대한 분석법으로 FDA Office of Testing and Research(OTR)가 발표한 여러 방법 중에서 가장 최신 분석법은 SQ GC/MS와 헤드스페이스 기반 주입을 이용한 4가지 불순물에 대한 분석과, QQQ GC/MS/MS의 액체 주입에 기반한 5가지 불순물에 대한 분석입니다. SQ MS는 종종 모호한 결과를 생성하며, 감도가 떨어집니다. 이와 달리 GC/MS/MS는 이러한 상황에서 특이성을 유지하여 활용도가 더 높기 때문에 GC/MS 분석법보다 선호됩니다.

7890B 또는 8890 GC와 7010B GC/MS/MS를 결합하여 OTR 분석을 수행하였으며, 두 시스템 모두 5가지 불순물에 대해 뛰어난 분석 성능을 나타낸다는 것을 밝혀냈습니다. 한층 발전된 이온화 효율과 20배의 이온 생성 성능을 갖춘 HES는 확실한 극미량 분석 성능을 제공합니다. 8890 GC는 키패드 대신 터치스크린 인터페이스로 GC를 제어하며, 진단 테스트, 시스템 모니터링 경고, 모바일 접근 등의 기능을 제공합니다.

실험

시료 전처리

이 분석에서 테스트된 API와 완제의약품에는 Valsartan, Olmesartan, Irbesartan, Losartan이 포함됩니다. 500mg의 API를 정확히 측정해 15mL의 일회용 유리 원심분리 튜브에 넣고, 볼륨 피펫으로 5mL의 내부 표준물질 용액(~50ng/mL NDMA:C13-d_6 in dichloromethane)을 첨가하였습니다. 일부 sartan 의약품(예: Valsartan과 Olmesartan)은 디클로로메탄에 완전히 용해되었으나, 다른 sartan 의약품(예: Irbesartan)은 용해되지 않거나 탁한 용액을 생성했습니다. 이들 시료는 1분간 vortex 처리한 후, 4,000rpm으로 2.5분간 원심분리하였습니다. 일회용 피펫을 사용해 약 2mL의 디클로로메탄 층을 0.45µm 나일론 필터로 걸러낸 후, 분석을 위해 GC 바이알로 옮겼습니다.

표준물질 준비

표준물질 원액을 100, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5ng/mL 농도로 희석해 검량 용액을 제조했습니다. 각각의 검량 용액은 내부 표준물질로 NDMA:C13-d_6를 포함하여 디클로로메탄(내부 표준물질)으로 제조하였습니다.

기기

분석은 Agilent 7693A 자동 시료 주입기를 장착한 Agilent 7890B 또는 8890 GC와 Agilent 7010B QQQ GC/MS를 사용해 이루어졌습니다. GC는 7697A 헤드스페이스 샘플러를 멀티모드 주입구(MMI)에 연결하여 구성하였습니다. 직경 30m × 0.25mm, 1.0µm의 Agilent J&W VF-WAXms GC 캐필러리 컬럼은 주입구로부터 MS로 연결되었습니다.

표1 및 2는 GC 및 MS 기기 파라미터를 나타냅니다.

표 1. GC 파라미터

파라미터	값
MMI 주입 모드	펄스 비분할: 0.5분까지 12.285psi
주입구 온도	250°C
오븐 온도 프로그램	40°C(0.5분), 20°C/분의 속도로 200°C까지(0분 유지), 60°C/분의 속도로 250°C까지(3분간 유지)
총 분석 시간	12.33분
MS 이송 라인 온도	250°C
주입 부피	2µL
운반 가스	헬륨, 1mL/분

MS 수집 방법

OTR 분석법의 MRM이 데이터 수집에 사용되었습니다.

결과 및 토의

화합물은 충분히 분리되었으며, 표적 피크가 용매와 매트릭스 종으로부터도 잘 분리되었습니다. 모든 5가지 화합물에 대한 머무름 시간은 FDA에서 규정한 바와 일치했습니다(그림 1과 2).

검량선은 선형 맞춤을 통해 생성하였습니다. FDA는 상관 계수 R^2이 ≥0.998일 것을 요구합니다. 이 연구에서는 5가지 불순물 모두에 대해 R^2 >0.999의 뛰어난 직선성을 나타냈으며, 이는 그림 3A(7890B GC)와 3B(8890 GC)에 나타나 있습니다.

표 2. MS 파라미터

파라미터	값	
모드	전자 이온화, 40eV	
이온화원 온도	250°C	
사중극자 온도	Q1 및 Q2 = 150°C	
MRM 모드 조건		
MS1 분리능	모든 화합물 유닛	
MS2 분리능	모든 화합물 유닛	
충돌 가스 유속	질소, 1.5mL/분,	
Quenching 가스 유속	헬륨, 4mL/분	
검출기 게인	1	
정량/정성 전이 (FDA 분석법)	시작 시간: 6.5분	**NDMA** 74 → 44, CE 15, dwell 150 ms 74 → 42, CE 20, dwell 50 ms NDMA:C13-d_6 82 → 48, CE 20, dwell 100 ms
	시작 시간: 7.60분	**NDEA** 102 → 85, CE 10 V, dwell 150 ms 102 → 56, CE 18 V, dwell 150 ms
	시작 시간: 8.03분	**NEIPA** 116 → 99, CE 10 V, dwell 150 ms 71 → 56, CE 10 V, dwell 150 ms
	시작 시간: 8.25분	**NDIPA** 130 → 88, CE 10 V, dwell 150 ms 130 → 42, CE 10 V, dwell 150 ms
	시작 시간: 8.70분	**NDBA** 158 → 99, CE 10 V, dwell 150 ms 84 → 56, CE 22 V, dwell 150 ms

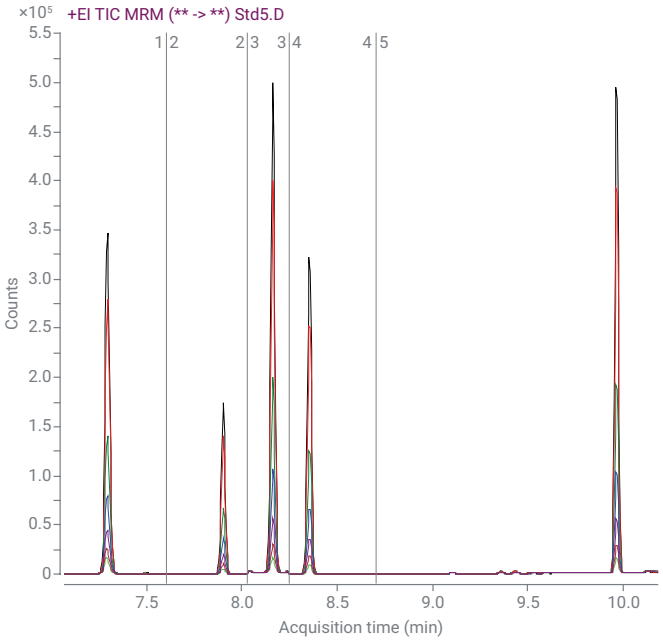


그림 1. 디클로로메탄 내 5가지 불순물에 대한 7개 검량 수준의 MRM TIC 크로마토그램 오버레이(Agilent 8890 GC)

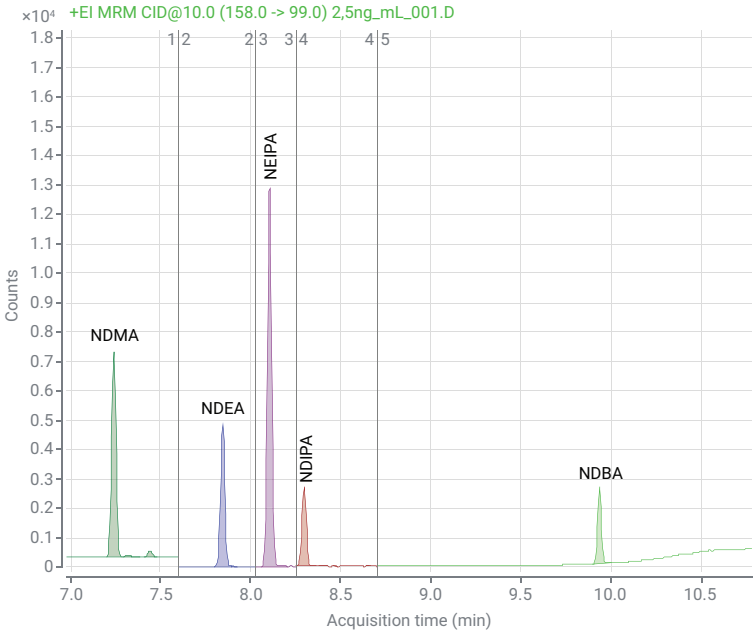
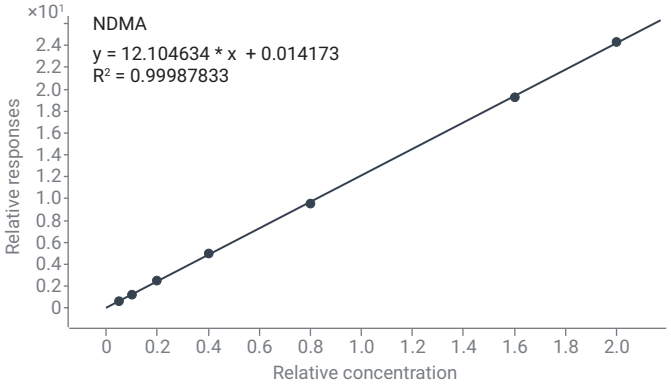
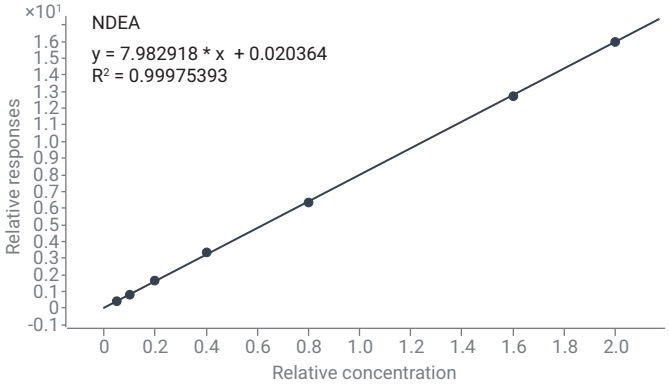
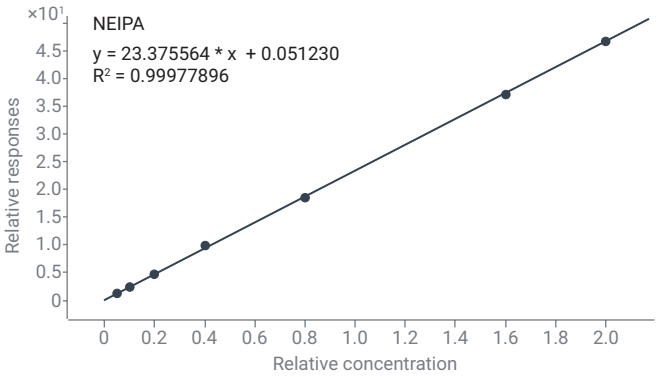
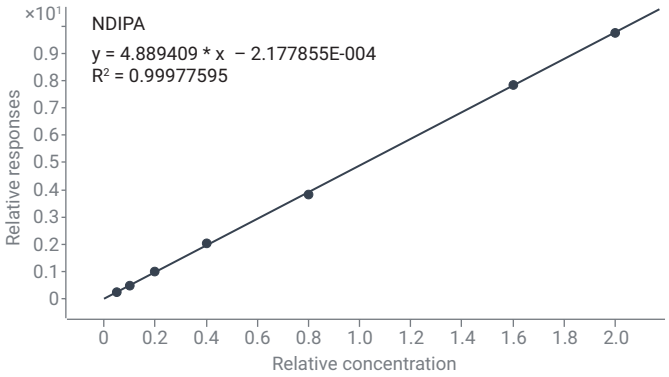


그림 2. 가장 낮은 농도(2.5ng/mL)의 디클로로메탄 내 5가지 불순물 혼합물 검량 표준물질의 추출 MRM 크로마토그램(quant transition)(Agilent 7890B GC)









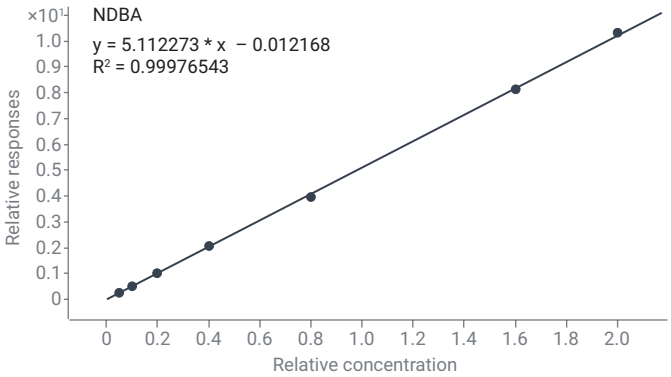
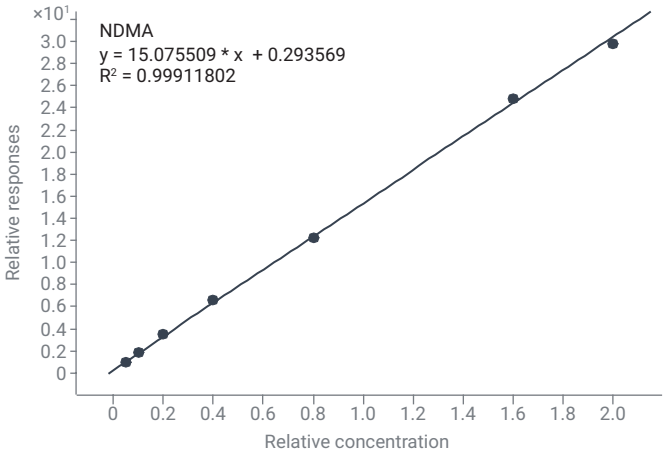
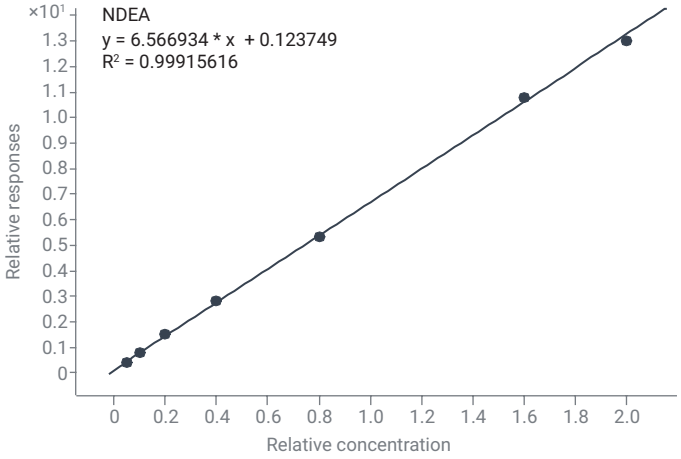
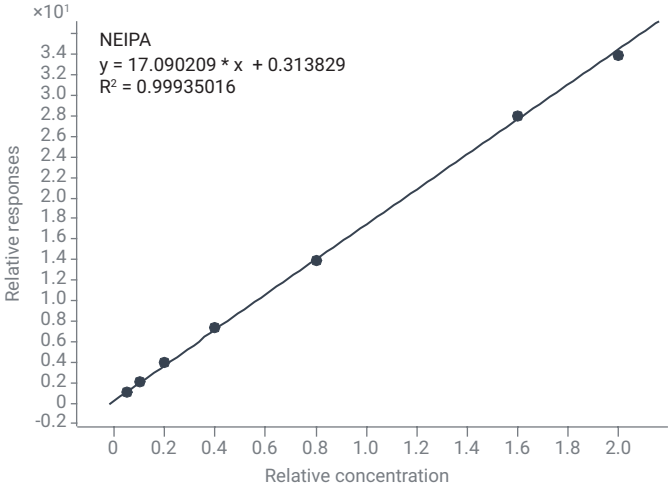
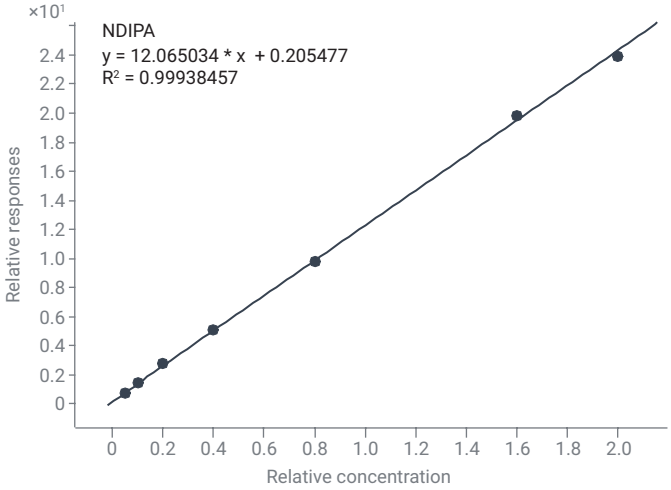


그림 3A. Agilent 7890B GC를 사용해 생성한 5가지 니트로사민 불순물의 검량선









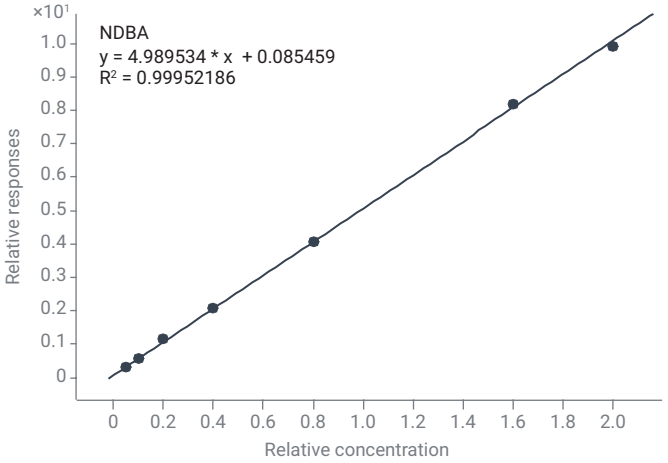


그림 3B. Agilent 8890 GC를 사용해 생성한 5가지 니트로사민 불순물의 검량선

검증된 FDA-OTR 분석법에서 40ng/mL 표준물질의 6회 반복 주입에 대한 %RSD는 ≤5여야 합니다. 이 연구에서는 40ng/mL 표준물질의 재현성을 확인하였으며, 표 3에서와 같이 5가지 불순물 모두에서 %RSDs <2(6회 연속 주입)의 결과가 나타났습니다.

OTR 분석법에서는 신호 대 잡음비(S/N) 10이 LOQ 측정의 기초로 사용되었습니다. 이 연구에서는 FDA LOQ에서 권장된 농도로 스파이킹한 시료의 S/N이 분석법이 요구하는 값에 비해 훨씬 높게 나타나, 기기가 규제된 감도를 쉽게 충족시킴은 물론 더 낮은 LOQ를 성취해 정말 극미량의 검출도 가능함을 보였습니다. FDA에서 규정한 의약품 LOQ와 이 연구에서 나타난 LOQ는 표 4에 정리되어 있습니다. LOQ 수준에서의 시료 내 불순물에 대한 크로마토그래피 예와 계산된 S/N은 그림 4에 나와 있습니다.

표 3. 40ng/mL 니트로사민 불순물의 피크 면적 및 %RSD(Agilent 8890 GC)

유형	명칭	NDMA 면적	NDEA 면적	NEIPA 면적	NDIPA 면적	NDBA 면적
Std	STD3_001.D	134044.10	57894.56	151634.00	106545.00	43152.93
Std	STD3_002.D	130975.10	57019.84	147810.80	104067.40	42709.92
Std	STD3_003.D	131357.00	56826.24	149615.50	104264.10	42613.02
Std	STD3_004.D	134631.90	57973.19	152279.80	106116.10	43753.81
Std	STD3_005.D	132140.20	57361.97	149922.00	105469.30	43118.18
Std	STD3_006.D	131370.50	57048.14	149667.10	103762.50	42816.16
	RSD(%)	1.17	0.84	1.07	1.11	0.97

표 4. FDA 분석법이 정한 완제의약품의 LOQ 및 이 연구에서 성취한 LOQ(Agilent 7890B GC)

불순물	FDA LOQ (ppm)	LOQ (성취, ppm)	개선 요인
NDMA	0.008	0.0025	>3
NDEA	0.005	0.0005	10
NEIPA	0.005	0.00025	20
NDIPA	0.005	0.0025	2
NDBA	0.025	0.008	>3

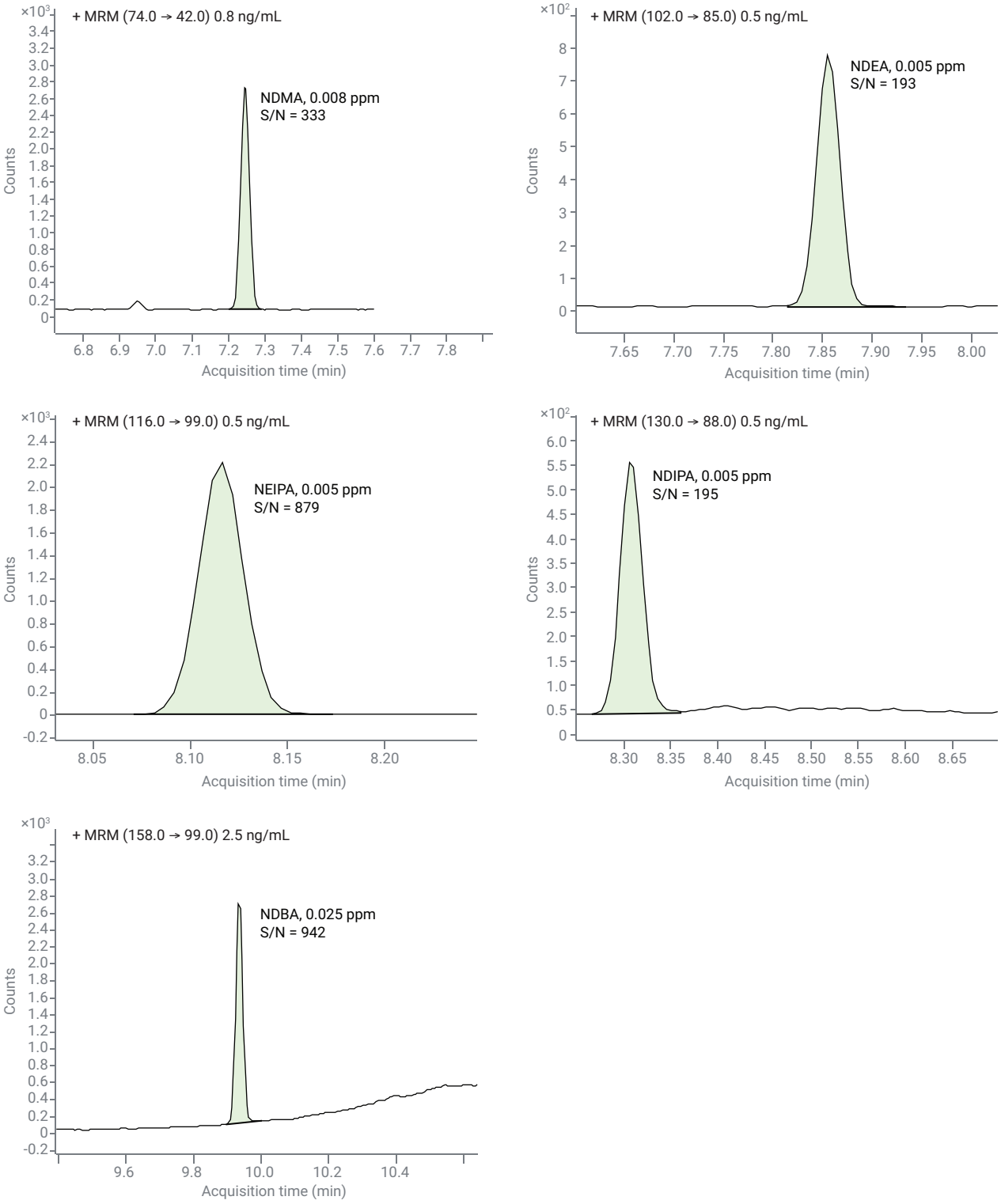


그림 4. FDA LOQ에서 권장한 농도로 스파이킹한 시료의 S/N(Agilent 7890B GC)

결론

7890B-7010B 및 8890-7010B GC/MS/MS 시스템은 모든 5개 니트로사민 불순물에 대해 비슷하게 훌륭한 성능을 나타냈습니다. 8890 GC는 진단 테스트, 시스템 모니터링 경고, 터치스크린 제어, 모바일 접근 기능을 제공합니다. 7010B QQQ GC/MS의 설계에는 HES가 포함되어 있어 7890B 및 8890 GC가 제공하는 비활성 시료 경로와 함께 사용되었을 경우, 극미량의 불순물에 대해 보다 낮은 검출 한계를 나타냅니다. 이와 같은 특징은 5가지 잔류 불순물에 대한 신뢰성 있는 정량 분석을 가능케 했습니다. 권장 수준의 2 ~ 20배 낮은 한층 진보된 LOQ를 나타내는 고감도 분석이 분석법 파라미터의 변경 없이도 가능했습니다.

참고문헌

1. https://www.fda.gov/media/123409/download
2. https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/search-list-recalled-angiotensin-ii-receptor-blockers-arbs-including-valsartan-losartan-and

www.agilent.com/chem

DE.6920601852

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020

2020년 4월 22일, 한국에서 인쇄
5994-1821KO

한국애질런트테크놀로지스㈜
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

Agilent
Trusted Answers