

고분해능 Agilent 6546 LC/Q-TOF를 이용한 니트로사민 불순물 측정



저자

Chander Mani, Saikat Banerjee
Agilent Technologies, Inc.

개요

안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB) 의약품은 일반적으로 고혈압과 심부전 치료에 사용됩니다. 최근 일부 ARB 의약품에 발암성 니트로사민(nitrosamine) 불순물이 포함되어 있는 것으로 밝혀짐에 따라 다수의 해당 제품이 리콜되었습니다. 그러한 이유로, 문제가 되는 니트로사민 불순물을 검출할 수 있는 분석법에 대한 분명한 요구가 있습니다. 이 응용 자료에서는 미국식품의약국(USFDA)에 기재된 니트로사민류 6종에 대한 검출 및 정량을 위해, Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용한 고감도, 고분해능 LC/MS/MS 분석법을 소개하며, 이와 함께 11종 니트로사민 불순물의 동시 검출을 보여줍니다.

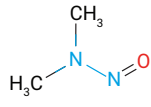
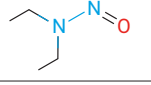
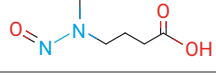
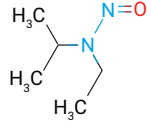
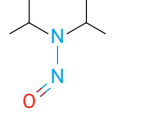
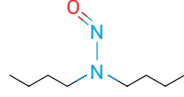
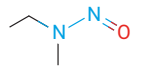
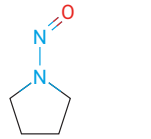
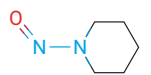
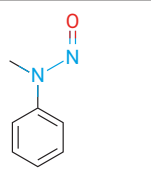
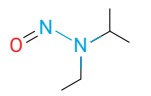
서론

N-니트로소(N-nitroso) 불순물은 최근 FDA에서 Valsartan, Losartan, Irbesartan 등과 같은 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB) 의약품에 대한 리콜 조치를 발표하면서, FDA 및 EMA 같은 규제 기관의 집중을 받았는데, 이는 이러한 제품들이 니트로사민(nitrosamine) 불순물을 포함할 가능성이 있기 때문입니다. 이러한 니트로소 화합물은 인간에 대한 잠재적 발암물질로 분류되며, 제조 공정 중의 극미량 부산물로 완제의약품에 혼입된 것으로 추정됩니다.

본 응용 자료에서는 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 11종의 니트로사민 불순물을 낮은 검출 한계로 분석하는 과정에 대한 포괄적 내용을 제시합니다. 이들 불순물은 74~158 범위의 저분자량(LMW) 물질로서, 대상 화합물은 다음과 같습니다.

- 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)

액체 크로마토그래피 질량 분석(LC/MS) 기반의 분석법은 일반적으로 특이성과 감도가 매우 뛰어나 이 모든 불순물을 검출하고 정량할 수 있는 단일 분석법 개발의 기초 역할을 하였습니다. 이 응용 자료에서는 고분해능 6546 LC/Q-TOF의 감도를 보여줍니다.

니트로사민 화합물	화학 구조
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)	

실험

화학물질 및 시약

연구에 사용된 11종의 니트로사민 표준물질은 모두 인도 텔랑가나 주, 하이데라바드에 위치한 PS3 Labs LLP 에서 제공 받았습니다. 기타 LC/MS 등급 용매(예: 메탄올 및 물)는 Honeywell 에서 구입했습니다. 포름산은 Fluka에서 구입했습니다.

데이터 분석

6546 LC/Q-TOF의 데이터 수집을 위해 Agilent MassHunter software suite 10을 이용해 데이터를 수집하고 분석했습니다. 개인 화합물 데이터베이스 및 라이브러리 (PCDL)를 맞춤 생성하여 Find by Formula 알고리즘을 이용한 식별에 사용한 후 정량 분석을 수행하였습니다.

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 v/v)												
시료 희석제	물												
Multisampler 온도	6°C												
주입 부피	40µL												
분석 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell HPH C18 2.1 × 100 mm 1.9 µm(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												

Q-TOF 질량 분석기 구성 및 파라미터

표 2. MS 구성 및 이온화원 설정

기기	Agilent 6546 LC/Q-TOF
이온화원	대기압 화학 이온화(APCI)
MS 모드	MS
이온화 모드	양이온
건조 가스 온도	300°C
건조 가스 유속	6L/분
Nebulizer 압력	45psi
APCI 히터	350°C
APCI 니들(양이온)	4µA
캐필러리 전압(양이온)	3,000V
질량 범위	70~170 m/z

분석물질별 MS 화합물 정보

표 3. Agilent 6546 LC/Q-TOF 상세 MS 설정

시간 세그먼트	시작 시간 (분)	질량 범위 (m/z)	수집 속도 (스펙트럼/초)	Fragmentor 전압 (V)
1	0	70~170	1.5	120
2	1.6	70~170	1.5	90
3	2.8	70~170	2	120

결과 및 토의

검량 농도 범위는 0.05~100ng/mL였습니다(표 4). 모든 분석물질에 대하여 R² 값은 0.996 이상이었으며 전체 농도 범위에 걸쳐 선형 감응을 나타냈습니다. 그림 1은 테스트한 모든 니트로사민 화합물(10ng/mL)에 대하여 오버레이 한 대표적 추출 이온 크로마토그램을 보여줍니다.

표 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF 결과 요약. 데이터는 신호 대 잡음비(S/N), 계산된 LOQ, 회귀 계수, 검량선 피팅 및 선형 범위를 포함. 모든 표준물질은 선형 함수 및 1/x 가중 검량선 사용

화합물	검출 한계 (ng/mL)	검출 한계 (S/N)	LOQ (ng/mL)	LOQ (S/N)	R ²	Cal. Curve	직선성 범위 (ng/mL)
NDMA	0.1	16.54	0.25	35.72	0.999	선형	0.1~100
NDEA	0.05	29.56	0.1	79.2	0.999	선형	0.1~100
NMBA	0.25	12.16	0.5	27.88	0.996	선형	0.5~100
NEIPA	0.1	11.22	0.25	80.6	0.998	선형	0.1~100
NDIPA	0.075	16.65	0.15	21.99	0.999	선형	0.075~100
NDBA	0.1	44.60	0.25	61.56	0.997	선형	0.1~100
NMEA	0.05	18.42	0.1	23	0.998	선형	0.05~100
NPyR	0.1	29.73	0.15	50.39	0.999	선형	0.1~100
NPIP	0.075	12.18	0.1	25.30	0.998	선형	0.075~100
NMPhA	0.25	24.22	0.5	32.30	0.997	선형	0.5~100
NMIPA	0.075	29.79	0.1	47.46	0.997	선형	0.075~100

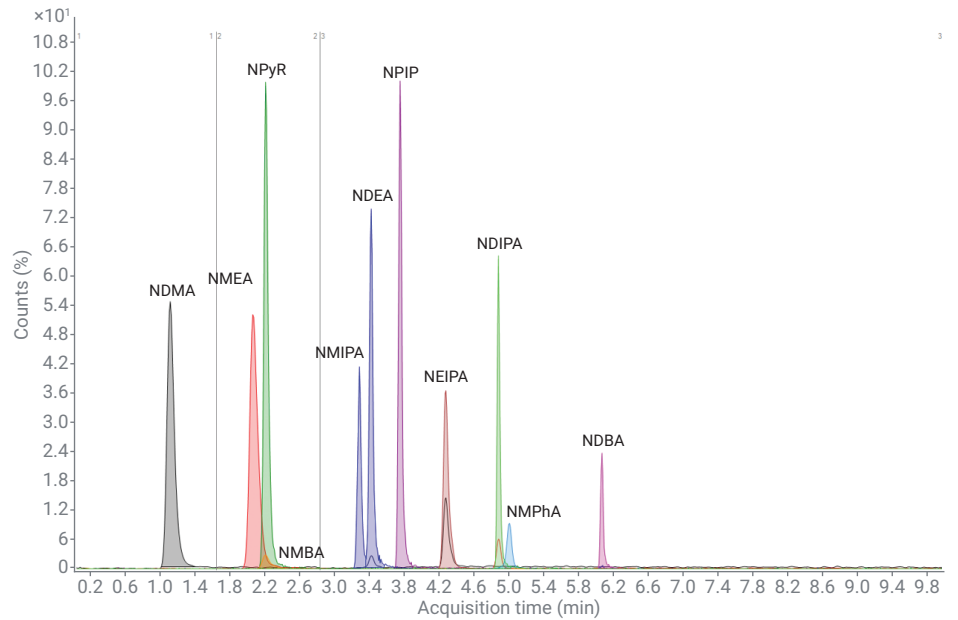


그림 1. 니트로사민 화합물 11종에 대한 용리를 나타낸 대표 추출 이온 크로마토그램의 오버레이

정확성과 재현성

11종의 각 화합물에 대한 검량선은 각각의 검량 수준에서 예상 농도의 20% 이내의 정확도를 보여주었으며, 모든 농도 수준에서 재현성은 CV <15%를 나타냈습니다(그림 4). 표 5는 농도별 정확도 및 재현성을 상세하게 비교한 내용입니다.

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS
N-Nitrosodimethylamine(NDMA)	C2H6N2O	74.04801	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	1.131	62-72-9
N-Nitrosoethylmethylamine(NMEA)	C3H8N2O	88.06366	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2.075	10595-95-6
N-Nitrosopyrrolidine(NPyR)	C4H8N2O	100.06366	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2.222	930-55-2
N-Nitrosodiethylamine(NDEA)	C4H10N2O	102.07931	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3.426	55-18-5
N-Isopropylmethyl nitrosamine(NMIPA)	C4H10N2O	102.07931	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3.297	30553-08-5
N-Nitrosopiperidine(NPIP)	C5H10N2O	114.07931	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	3.766	100-75-4
N-Ethyl-N-Nitroso-2-propanamine(NEIPA)	C5H12N2O	116.09496	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	4.289	16339-04-1
N-Nitrosodiisopropylamine(NDIPA)	C6H14N2O	130.11061	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	4.886	601-77-4
N-methyl-n-nitrosoaniline(NMPhA)	C7H8N2O	136.06366	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	5.009	614-00-6
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid(NMBA)	C5H10N2O3	146.06914	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2.219	61445-55-4
N-Nitrosodibutylamine(NDBA)	C8H18N2O	158.14191	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	6.059	924-16-3

그림 2. 식별과 정량을 위해 Find by Formula에 사용한 PCDL


Name	Transition 
N-Nitrosodimethylamine(NDMA)	75.0552
N-Nitrosoethylmethylamine(NMEA)	89.0709
N-Nitrosopyrrolidine(NPyR)	101.0710
N-Nitrosodiethylamine(NDEA)	103.0866
N-Isopropylmethyl nitrosamine(NMIPA)	103.0866
N-Nitrosopiperidine(NPIP)	115.0866
N-Ethyl-N-Nitroso-2-propanamine(NEIPA)	117.1022
N-Nitrosodiisopropylamine(NDIPA)	131.1179
N-methyl-n-nitrosoaniline(NMPhA)	137.0709
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyricacid(NMBA)	147.0766
N-Nitrosodibutylamine(NDBA)	159.1492

그림 3. 여러 니트로사민 불순물 정량을 위해 추출한 m/z

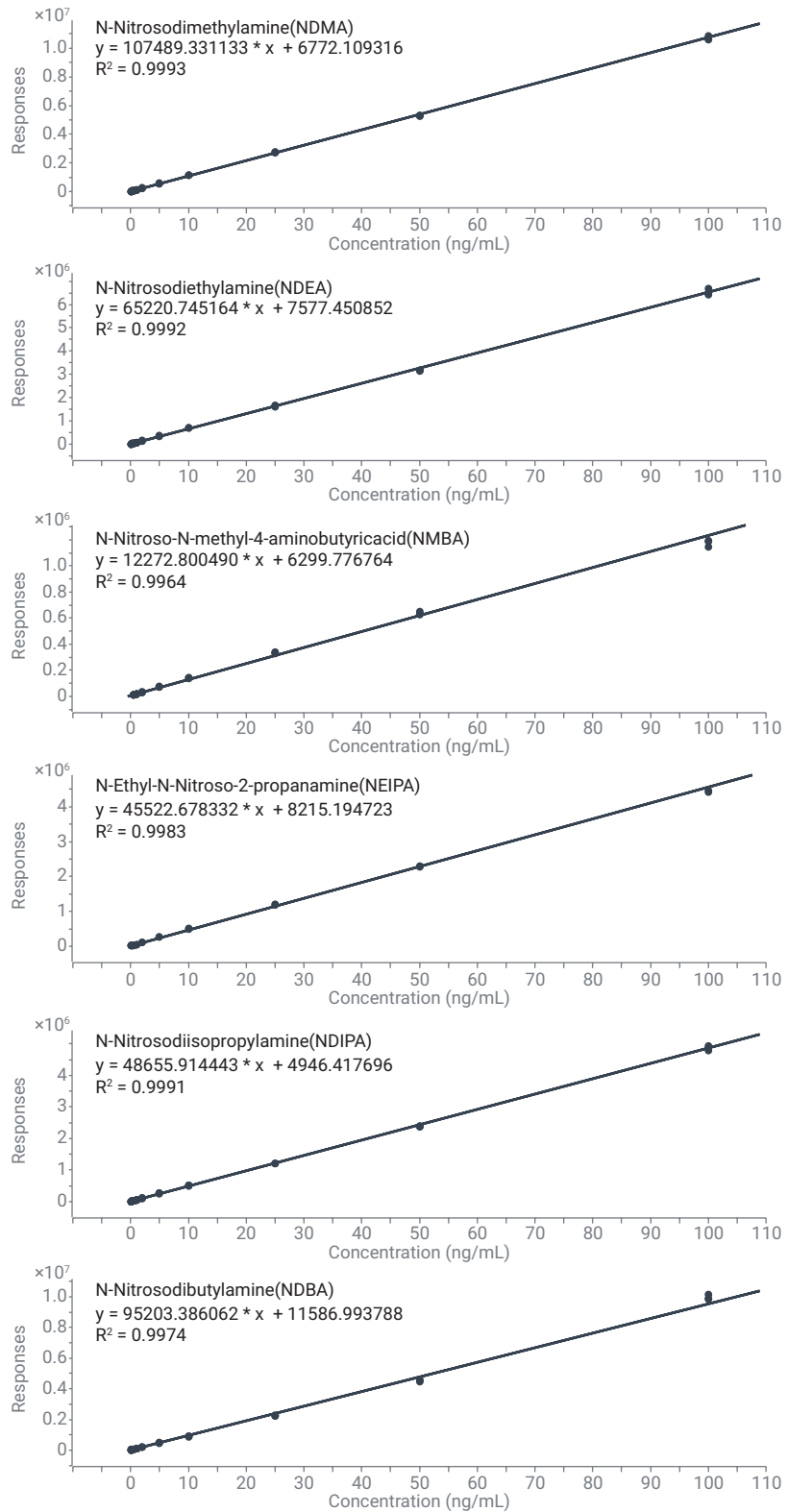


그림 4. 크로마토그램 전체에 분산되어 있는 화합물에 대한 대표적 검량선. 모든 검량선은 선형 함수 및 $1/x$ 가중 계수 사용

표 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 측정된 농도 수준별 대표 정확도 및 재현성(n=3)

농도 (ng/mL)	NDMA		NDEA		NMBA		NDIPA		NDBA		NMEA	
	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV	평균	CV
0.1	86.67	5.57	83.53	1.59	NA	NA	91.30	0.55	101.03	6.19	93.93	1.67
0.25	87.00	3.96	88.33	2.58	NA	NA	91.33	4.67	95.13	5.69	89.40	4.55
0.5	97.23	4.51	101.17	3.62	92.40	1.96	94.6	2.27	102.30	3.38	102.53	3.28
1.0	104.93	2.44	110.80	2.47	98.37	5.80	109.83	2.13	101.80	1.15	103.23	0.78

결론

Agilent 6546 LC/Q-TOF 고분해능 LC/MS/MS는 저농도 수준의 니트로사민 불순물을 분석할 수 있습니다. 고분해능 질량 분석법은 의약품 내 니트로사민 화합물의 존재 유무를 신뢰성 있게 검출합니다. 이 응용 자료에서는 이러한 니트로사민 불순물을 저농도 수준에서 검출하는 6546 LC/Q-TOF 기기의 감도를 보여주었습니다. 해당 분석법은 다른 ARB 의약품에서 이러한 불순물을 정량하는 데에도 사용할 수 있습니다. 이 경우, 의약품의 용리 패턴에 따라 크로마토그래피 조건에 약간의 변화를 주어 질량 분석기 오염을 방지하기 위해 의약품 피크가 폐기물로 전환될 수 있도록 할 수 있습니다.

참고 문헌

1. USFDA guidance document: Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine impurities.
2. USFDA guidance document: Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC/HRMS) method for the determination of Six nitrosamine impurities in ARB drugs.

감사의 글

니트로사민 표준물질을 제공해주신 인도 텔랑가나 주, 하이데라바드에 위치한 PS3 Labs LLP에 진심으로 감사드립니다.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 11월 4일 한국에서 인쇄,
5994-1372KO

한국에질런트테크놀로지스(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