응용 자료

제약 및 바이오제약

고분해능 Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 라니티딘 원료 의약품 및 완제 의약품에서 유전 독성 NDMA 불순물 측정

저자

Chander Mani and
Saikat Banerjee
Agilent Technologies, Inc.

개요

의약품 내 불순물은 FDA가 승인한 안전하고 효과적인 의약품에 의존하는 환자와 소비자들이 가장 우려하는 문제입니다. 라니티딘과 니자티딘은 위산의 농도를 감소시키는 H2 수용체 차단제로 위염, 속쓰림 및 위궤양을 치료하는 데 사용됩니다. 조사에 의해 라니티딘 원료 의약품 및 완제 의약품에 발암성 니트로사민 불순물이 포함되어 있는 것으로 밝혀짐에 따라 다수의 해당 제품이 리콜되었습니다. 따라서 문제가 되는 니트로사민 불순물을 검출할 수 있는 분석법에 대한 분명한 요구가 있습니다. 가장 최근에 리콜된 의약품 중에는 N-nitrosodimethylamine(NDMA)의 존재가 의심되는 라니티딘이 포함되어 있습니다. 본 응용 자료에서는 라니티딘 원료 의약품 및 완제 의약품에서 NDMA의 검출 및 정량을 위해 Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용한 민감한 고분해능 LC/MS/MS 분석법을 소개합니다.

서론

NDMA 불순물은(그림 1) 최근 FDA에서 라니티딘 의약품에 대한 리콜 조치를 발표하면서, FDA 및 EMA와 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 완제 의약품에 혼입된 것으로 추정됩니다. USFDA는 최근 특정 배치의 라니티딘 의약품에서 NDMA를 발견했습니다.

액체 크로마토그래피 질량 분석 기반의 분석법은 일반적으로 특이성과 감도가 매우 뛰어나 라니티딘 원료 의약품 및 완제 의약품에서 NDMA를 검출하고 정량할 수 있는 분석법 개발의 기초 역할을 하였습니다. 본 응용 자료에서는 6546 LC/Q-TOF를 이용해 매우 낮은 검출 한계에서도 NDMA 불순물에 대한 포괄적인 분석 결과를 제공할 수 있는 분석법을 소개합니다. 또한 이 응용 자료에서는 고분해능 6546 LC/Q-TOF의 감도를 보여줍니다.

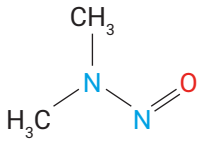

그림 1. NDMA의 화학 구조.

실험

화학물질 및 시약

연구에 사용된 NDMA 표준물질은 PS3 Labs LLP(Hyderabad, TS, India)에서 제공받았습니다. 기타 LC/MS 등급 용매(예: 메탄올, 물)는 Honeywell(Charlotte, NC, USA)에서 구입했습니다. 포름산은 Fluka (현재 Honeywell)에서 구입했습니다.

LC 구성 및 파라미터

표 1. UHPLC 구성 및 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)
	Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기(G7114B)
니들 세척	메탄올:물(80:20 v/v)
시료 희석제	물:메탄올(95:5 v/v)
Multisampler 온도	6°C
주입 부피	20µL
분석 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 4.6 × 150mm, 2.7µm(p/n 693975-702)
컬럼 온도	40°C
이동상 A	0.2% 포름산 함유 물
이동상 B	메탄올
유속	0.3mL/분
그레디언트	시간(분) %A %B 유속(mL/분) 0 95 5 0.3 6 92 8 0.3 6.1 92 8 0.5 11 5 95 0.5 11.1 5 95 0.3 11.2 95 5 0.3 14 95 5 0.3
중지 시간	14분
파장	300nm, 320nm

Q-TOF 질량 분석기 구성 및 파라미터

표 2. 질량 분석기 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	*m/z* 70 ~ 170

분석물질별 MS 화합물 정보

표 3. Agilent 6546 LC/Q-TOF 상세 MS 설정.

시간 세그먼트	시작 시간 (분)	질량 범위 (*m/z*)	Fragmentor 전압(V)	전환 밸브 위치
1	0	70~170	120	폐기물
2	6.5	70~170	120	MS
3	8.2	70~170	120	폐기물

데이터 분석

6546 LC/Q-TOF의 데이터 수집을 위해 Agilent MassHunter LC/MS 데이터 수집 소프트웨어 버전 10을 이용해 데이터를 수집하고 분석했습니다. NDMA 정량을 위해서는 TOF용 Agilent Masshunter Quantitative Analysis 버전 10을 사용했습니다.

결과 및 토의

검량 농도 범위는 0.25~100ng/mL였습니다(표 4). NDMA(*m/z* 75.0553)에 대하여 R^2 값은 0.9997 이상이었으며 전체 농도 범위에 걸쳐 선형 감응을 나타냈습니다. 그림 2는 용리 패턴을 나타내는 5ng/mL의 라니티딘 UV 크로마토그램과 함께 NDMA의 대표적인 추출 이온 크로마토그램을 보여줍니다. 표 3에 나타낸 바와 같이 전환 밸브 프로그램을 사용하여 고농도의 라니티딘을 폐기물로 전환시켰습니다.

표 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF 결과 요약. 데이터는 신호 대 잡음비(S/N), 계산된 정량 한계(LOQ), 회귀 계수, 검량선 피팅 및 선형 범위 포함. NDMA에 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	검량선	직선성 범위 (ng/mL)
NDMA	0.15	18.8	0.25	47.48	0.9997	선형	0.25~100

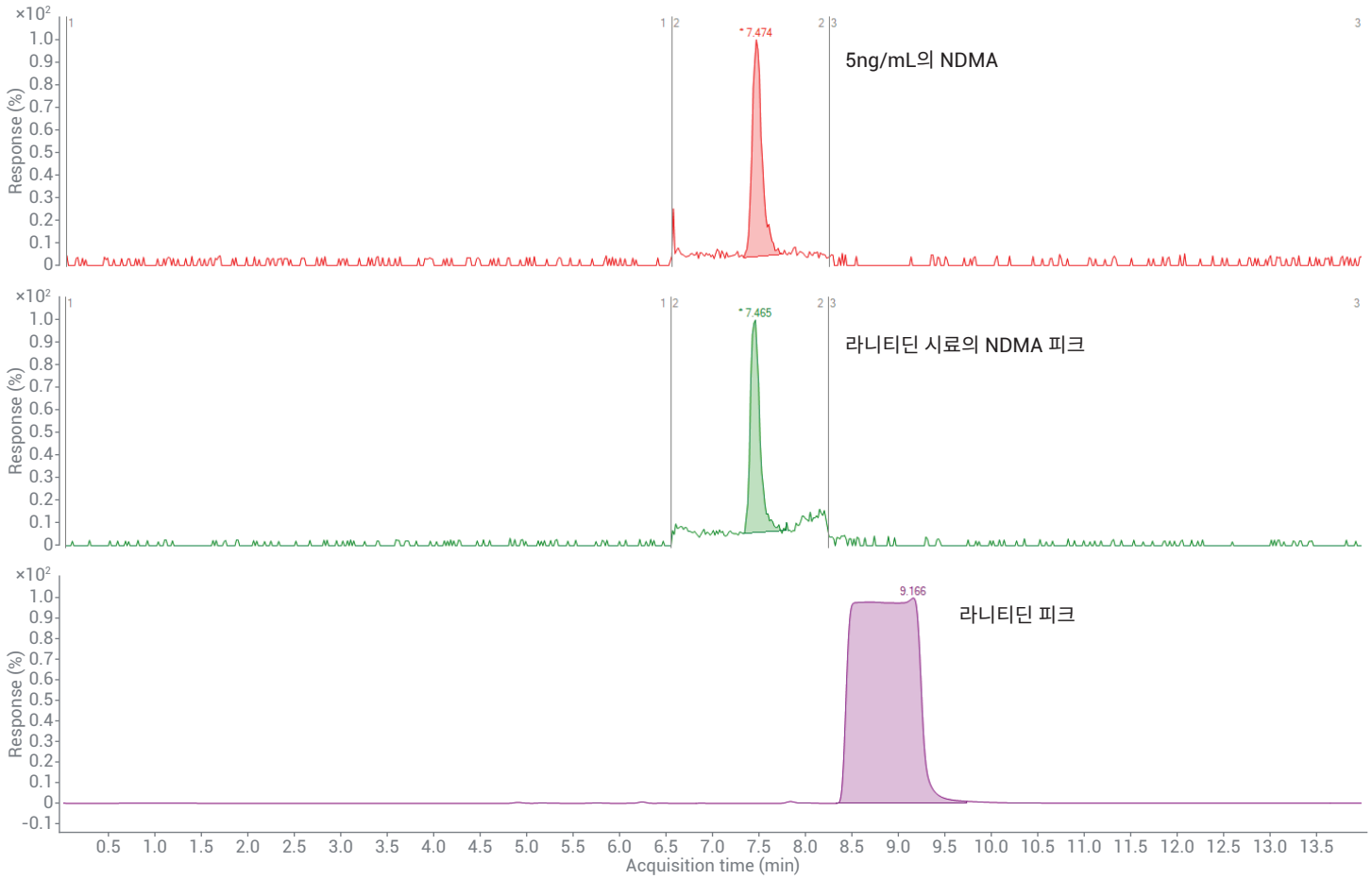

그림 2. 용리 패턴을 나타내는 라니티딘 UV 크로마토그램과 대표적인 NDMA(5ng/mL) MRM 크로마토그램.

정확도 및 재현성

NDMA에 대한 검량선은 각 검량 수준에서 예상 농도의 20% 이내의 정확도를 보였으며 모든 수준에 걸쳐 재현성은 15% 이내의 계수 변동(CV)을 나타냈습니다(그림 3). 그림 4A, 4B 및 표 5는 농도별 정확도 및 재현성을 상세하게 비교한 내용입니다.

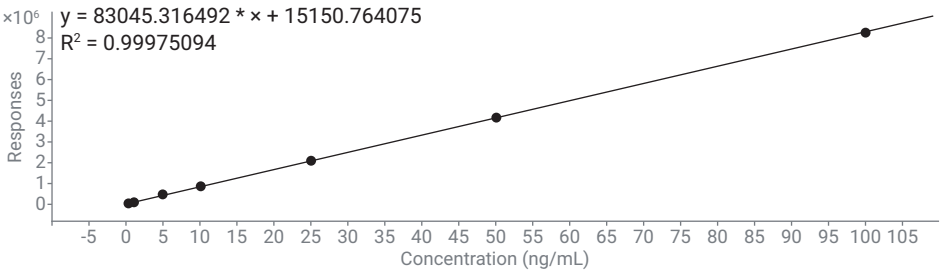

그림 3. 크로마토그램 전체에 분산되어 있는 NDMA에 대한 대표적 검량선. NDMA 검량선에 선형 함수 및 1/x 가중 계수 사용.

Sample					NDMA M...	NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N
Blank	Blank-r002.d	Blank		1.0000				☐					
0.25 ppb	0.25 ppb-r001.d	Cal	1	1.0000	0.2500	7.496	33707	☐	0.2061	0.2061	82.4	-1.3770	47.46
0.5 ppb	0.5 ppb-r001.d	Cal	2	1.0000	0.5000	7.497	53629	☐	0.4461	0.4461	89.2	-0.2417	92.22
0.5 ppb	0.5 ppb-r002.d	Cal	2	1.0000	0.5000	7.465	53993	☐	0.4505	0.4505	90.1	-2.0896	140.60
1 ppb	1 ppb-r001.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.476	104775	☐	1.0625	1.0625	106.2	-2.0565	184.65
1 ppb	1 ppb-r002.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.480	104836	☐	1.0632	1.0632	106.3	-2.0449	230.68
1 ppb	1 ppb-r003.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.481	104316	☐	1.0569	1.0569	105.7	-1.7189	368.90
1 ppb	1 ppb-r004.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.482	100169	☐	1.0070	1.0070	100.7	-2.2917	99.90
1 ppb	1 ppb-r005.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.483	100928	☐	1.0161	1.0161	101.6	-1.2478	357.81
1 ppb	1 ppb-r006.d	Cal	3	1.0000	1.0000	7.480	105196	☐	1.0675	1.0675	106.8	-1.3829	160.20
5 ppb	5 ppb-r001.d	Cal	4	1.0000	5.0000	7.474	452997	☐	5.2586	5.2586	105.2	-0.8311	1209.04
5 ppb	5 ppb-r002.d	Cal	4	1.0000	5.0000	7.475	445129	☐	5.1637	5.1637	103.3	-1.3531	560.45
10 ppb	10 ppb-r001.d	Cal	5	1.0000	10.0000	7.474	856882	☐	10.1254	10.1254	101.3	-0.9374	1438.92
10 ppb	10 ppb-r002.d	Cal	5	1.0000	10.0000	7.489	864754	☐	10.2203	10.2203	102.2	-1.7301	1477.89
25 ppb	25 ppb-r001.d	Cal	6	1.0000	25.0000	7.471	2063008	☐	24.6593	24.6593	98.6	-1.2186	2690.34
25 ppb	25 ppb-r002.d	Cal	6	1.0000	25.0000	7.469	2114326	☐	25.2777	25.2777	101.1	-0.8898	2937.14
50 ppb	50 ppb-r001.d	Cal	7	1.0000	50.0000	7.470	4190567	☐	50.2965	50.2965	100.6	-1.0925	4673.75
50 ppb	50 ppb-r002.d	Cal	7	1.0000	50.0000	7.470	4149707	☐	49.8042	49.8042	99.6	-1.9279	6299.63
100 ppb	100 ppb-r001.d	Cal	8	1.0000	100.0000	7.468	8266473	☐	99.4115	99.4115	99.4	-1.4094	12159.20
100 ppb	100 ppb-r002.d	Cal	8	1.0000	100.0000	7.468	8286854	☐	99.6571	99.6571	99.7	-1.5509	11701.05

그림 4A. Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 측정한 농도 수준별 대표 정확도 및 재현성.

Sample					NDMA M...	NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r001.d	Sample		0.0333		7.468	664819	☐	7.8110	0.2601		-2.3708	839.15
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r002.d	Sample		0.0333		7.452	668811	☐	7.8591	0.2617		-2.6682	568.31
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r003.d	Sample		0.0333		7.466	663197	☐	7.7915	0.2595		-2.5419	989.69
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0001.d	Sample		0.0333		7.465	692599	☐	8.1458	0.2713		-2.7911	825.24
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0002.d	Sample		0.0333		7.449	685728	☐	8.0630	0.2685		-0.2582	893.10
Ranitidine Tablet	Ranitidine Tablet-r0003.d	Sample		0.0333		7.450	698539	☐	8.2173	0.2736		-2.6450	1686.68
1 ppb	1 ppb-r008.d	Sample		1.0000		7.463	102906	☐	1.0399	1.0399		-1.9600	133.72
1 ppb	1 ppb-r009.d	Sample		1.0000		7.464	100057	☐	1.0056	1.0056		-1.0172	232.91
1 ppb	1 ppb-r010.d	Sample		1.0000		7.481	101921	☐	1.0281	1.0281		-1.7069	157.19
API 1	API 1-r001.d	Sample		0.0333		7.461	174701	☐	1.9051	0.0634		-1.4023	339.36
API 1	API 1-r002.d	Sample		0.0333		7.452	175971	☐	1.9204	0.0639		-1.6121	296.57
API 2	API 2-r001.d	Sample		0.0333		7.451	330214	☐	3.7790	0.1258		-2.0371	603.20
API 2	API 2-r002.d	Sample		0.0333		7.452	331673	☐	3.7966	0.1264		-2.2190	813.07
API 3	API 3-r001.d	Sample		0.0333		7.449	272822	☐	3.0874	0.1028		-1.4437	500.36
API 3	API 3-r002.d	Sample		0.0333		7.450	271769	☐	3.0748	0.1024		-1.5514	482.95
API 4	API 4-r001.d	Sample		0.0333		7.451	203712	☐	2.2547	0.0751		-0.9700	351.73
API 4	API 4-r002.d	Sample		0.0333		7.449	206482	☐	2.2880	0.0762		-1.4015	360.87
Tablet 1	Tablet 1-r001.d	Sample		0.0333		7.448	1781536	☐	21.2675	0.7082		-0.6552	3700.62
Tablet 1	Tablet 1-r002.d	Sample		0.0333		7.447	1790194	☐	21.3719	0.7117		-0.7234	2645.69
Tablet 2	Tablet 2-r001.d	Sample		0.0333		7.448	4235224	☐	50.8346	1.6928		-0.8068	9141.63
Tablet 2	Tablet 2-r002.d	Sample		0.0333		7.449	4232781	☐	50.8052	1.6918		-0.1469	7276.58

그림 4B. Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 측정한 시료 농도 수준별 대표 재현성. **참고:** API 1, API 2, API 3 및 API 4는 서로 다른 원료 의약품 로트이며, API 1을 회수 연구의 스파이킹에 사용. 마찬가지로, 라니티딘 정제에 대해, 정제 1 및 정제 2는 서로 다른 라니티딘 정제, 정제 1을 회수 연구의 스파이킹에 사용.

표 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 측정한 1ng/mL 농도의 대표 재현성.

번호	1ng/mL 감응
1	104775
2	104836
3	104316
4	100169
5	100928
6	105196
7(Bracketing)	102906
8(Bracketing)	100057
9(Bracketing)	101921
평균	102789
SD	2086.22
RSD(%)	2.03

Sample					NDMA_M...	NDMA Results							
Name	Data File	Type	Level	Dil.	Exp. Conc.	RT	Resp.	ISTD	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Mass Accuracy	S/N
API 1	API 1-r001.d	Sample		0.0333		7.461	174701	☐	1.9051	0.0634		-1.4023	339.36
API 1	API 1-r002.d	Sample		0.0333		7.452	175971	☐	1.9204	0.0639		-1.6121	296.57
Tablet 1	Tablet 1-r001.d	Sample		0.0333		7.448	1781536	☐	21.2675	0.7082		-0.6552	3700.62
Tablet 1	Tablet 1-r002.d	Sample		0.0333		7.447	1790194	☐	21.3719	0.7117		-0.7234	2645.69
Spike Standard 6 ppb	Spike Standard 6 ppb-r001.d	Sample		1.0000		7.466	457476	☐	5.3125	5.3125		-0.3589	882.27
Spike Standard 6 ppb	Spike Standard 6 ppb-r002.d	Sample		1.0000		7.464	485174	☐	5.6463	5.6463		-1.0769	1221.93
Spike Standard 48 ppb	Spike Standard 48 ppb-r001.d	Sample		1.0000		7.462	3653515	☐	43.8250	43.8250		0.5924	6178.42
Spike Standard 48 ppb	Spike Standard 48 ppb-r002.d	Sample		1.0000		7.461	3625056	☐	43.4821	43.4821		0.6249	6459.37
Blank	Blank-r00001.d	Sample		1.0000				☐					
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r001.d	Sample		0.0333		7.434	615840	☐	7.2208	0.2405		1.6787	934.18
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r002.d	Sample		0.0333		7.434	620887	☐	7.2816	0.2425		0.9507	1130.88
API 1_Spike 6 ppb	API 1_Spike 6 ppb-r003.d	Sample		0.0333		7.432	616494	☐	7.2287	0.2407		1.5689	1995.76
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r001.d	Sample		0.0333		7.428	5197274	☐	62.4274	2.0788		1.6808	10813.26
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r002.d	Sample		0.0333		7.429	5216955	☐	62.6646	2.0867		1.7166	10814.71
Tablet1_Spike 48 ppb	Tablet1_Spike 48 ppb-r003.d	Sample		0.0333		7.435	5224481	☐	62.7553	2.0898		1.4057	6946.74

그림 5. Agilent 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 측정한 농도 수준별 대표적 회수 데이터.

참고: 원료 의약품 및 완제 의약품 모두에 이미 어느 정도의 NDMA가 함유되어 있었기 때문에 더 높은 농도에서 회수 실험을 수행했습니다.

표 6A. 라니티딘 원료 의약품 6ng/mL 농도에서 수행한 회수 실험 요약.

니트로사민 불순물	라니티딘 API(30mg/mL) 스파이킹 농도(ng/mL)	회수율%
NDMA	6	93.86

표 6B. 라니티딘 의약품 48ng/mL 농도에서 수행한 회수 실험 요약.

니트로사민 불순물	라니티딘 API(30mg/mL) 스파이킹 농도(ng/mL)	회수율%
NDMA	48	94.16

결론

Agilent 6546 LC/Q-TOF 고분해능 LC/MS/MS는 저농도 수준에서 NDMA 니트로사민 불순물을 분석할 수 있습니다. 고분해능 질량 분석법을 사용하면 라니티딘 원료 의약품 및 완제 의약품에 존재하는 니트로사민 화합물을 안정적으로 검출할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 NDMA를 저농도 수준에서 검출하는 6546 LC/Q-TOF 기기의 감도를 입증했습니다. 이 분석법의 탁월한 질량 정확도는 라니티딘에서 NDMA를 정량하는 데 뛰어난 신뢰성을 갖춘 결과를 제공합니다. 라니티딘 정제를 분석하여 고농도의 NDMA를 발견하는 데 사용한 이 분석법은 라니티딘 원료 의약품 및 완제 의약품에서 저농도 NDMA 검출에 대한 USFDA 요건을 충족하기에 적합합니다.

참고문헌

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.
3. Determination of Nitrosamine Impurities Using the High-Resolution Agilent 6546 LC/Q-TOF. Agilent Technologies Application Note, publication number 5994-1372EN, **2019**.
4. FDA guidance document: Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Drug Product.
5. https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health-care-professionals-ndma-found-samples-ranitidine

감사의 글

NDMA 표준물질을 제공해주신 인도 텔랑가나주, 하이데라바드에 위치한 PS3 Labs LLP에 진심으로 감사드립니다.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 12월 19일, 한국에서 인쇄
5994-1626KO
DE.4242476852

한국애질런트테크놀로지스㈜
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