

Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러, 8890/5977 GC/MSD 시스템을 이용한 N-Nitrosodimethylamine 및 N-Nitrosodiethylamine 분석

미국 FDA 지침에 따른 sartan 의약품의 불순물 분석

저자

Abbey Fausett
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 Agilent 8890 GC를 이용해 미국 식품의약국(FDA) 분석법에 따라 sartan 제품의 불순물을 분석하는 방법을 설명합니다. 이 워크플로에는 Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러와 5977 GC/MSD도 이용하였습니다. 예상 검출 값에 해당하는 결과를 얻었습니다.

서론

세계보건기구(WHO)에 따르면 25세 이상 성인의 35%~46%는 고혈압을 앓고 있습니다¹. 이 질병은 전 세계 10억 명 이상의 사람들에게 영향을 미칩니다². Valsartan, losartan 및 기타 안지오텐신 II 수용체 차단제ARB는 전 세계적으로 널리 사용되고 비교적 저렴하기 때문에 고혈압 치료에 일반적으로 처방되는 의약품입니다. ARB의 작용 기전은 안지오텐신 II와 그 수용체 사이의 결합 과정을 억제하여 혈관 수축을 예방하고 효과적으로 혈압을 낮추는 것입니다³.

2018년 7월, 오염 위험으로 인해 valsartan 제품은 전 세계적으로 리콜되었습니다. 초기 오염물질은 N-Nitrosodimethylamin (NDMA)으로 식별되었습니다. 미국 FDA는 유통 전에 발암 물질로 의심되는 이 불순물에 대해 생산 시설에서 valsartan 제품을 스크리닝 하도록 절차 가이드를 배포했습니다⁴. 두 번째 오염물질은 리콜 직후에 확인되었으며 유럽 의약청에 의해 식별되었습니다⁵. NDMA와 같이 N-nitrosodiethylamine (NDEA)은 발암 가능성이 있는 것으로 분류되며 sartan급 의약품에 공통적인 테트라졸 고리를 합성하는 과정에서 2차 생성물로 만들어지는 것으로 여겨지고 있습니다. 이 새로운 불순물이 확인되고 테트라졸 고리와의 연관성이 제기되면서 초기 리콜은 생산 중인 모든 sartan까지 확장하게 되었습니다. 유럽 의약청의 보고에 따라 미국 FDA는 두 가지 오염물질을 단일 분석법으로 관리하기 위한 후속 규제 절차를 수립하였습니다. 수정 사항에는 서로 다른 GC 컬럼 케미스트리와 전처리 용매의 변경이 포함되어 있습니다⁶. 이 문서는 2019년 1월에 발행되었으며 헤드스페이스

샘플링을 장착한 GC/MS를 이용하여 원료 의약품과 완제품 분석 시 각각 0.10ppm 및 0.05ppm의 NDMA 및 NDEA에 대한 정량 한계(LOQ)를 설정하였습니다. FDA 절차가 Agilent 7890A GC에서 실행되기는 했지만 이 응용 자료는 Agilent 8890 GC 시스템이 7890 시스템과 동일한 뛰어난 성능을 발휘할 수 있음을 보여줍니다.

실험

순수한 NDMA 및 NDEA 표준물질은 MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)를 통해 구입하였습니다. FDA 지침⁶은 순도 99.0% 이상의 1-methyl-2-pyrrolidinone (NMP)을 사용하는 것을 요구합니다. 그러나, 고순도 용매(99.7%, MilliporeSigma)를 사용한 결과, 제공된 조건을 따르는 경우 용매 불순물 중의 표적 화합물 분리능이 개선되었습니다. 이 분석은 추가적인 글로벌 규제 기관에 적용될 수 있기 때문에 시료 전처리에 저순도 용매가 사용되는 경우의 분리를 개선하기 위해 크로마토그래피 파라미터의 유연성을 다르게 나타날 수 있습니다. 이 평가에 포함된 데이터는 FDA 프로토콜을 벗어나지 않고 그대로 따랐습니다.

분석법 조건은 다음 표에 요약되어 있습니다. 이 작업은 고속 GC 오븐(240V)에서 수행되었지만 이러한 결과를 얻는 데에 이 옵션은 필수 요건이 아닙니다. 헤드스페이스 분석법 개발에 유용한 또 다른 옵션은 헤드스페이스 이송 라인 액세서리이며, 이는 구성을 변경하지 않고도 동일한 주입구에서 헤드스페이스와 액체 주입 기능을 모두 사용할 수 있습니다. 표 1에 분석에 사용된 소모품이 나와 있습니다. FDA 지침에 따라 검량 용액을 제조하였으며 1 μ g/mL의 추가 검량 용액도 준비했습니다.

분석법 조건

Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러 조건	
오븐 온도	130°C
루프 온도	180°C
이송 라인 온도	185°C
바이알 평형화	15분
주입 시간	1분
바이알 크기(mL)	20mL
바이알 진탕	레벨 5
채우기 모드	기본값
채우기 압력	15psi
루프 채우기 모드	기본값

Agilent 8890 GC 파라미터	
주입구(분할/비분할)	헬륨
온도	220°C
모드	분할
분할비	5:1
주입구 압력(초기)	7.33psi
오븐 유형	240V-고속 오븐
평형 시간	1분
오븐 프로그램	0.5분간 40°C 유지, 20°C/분으로 160°C까지 승온, 10°C/분으로 240°C까지 승온, 2분 유지 총 주기 시간: 16.5분
컬럼	Agilent J&W DB-1701, 30m x 250 μ m, 1.0 μ m
모드	일정 유속
유속	1mL/분

Agilent 5977 GC/MSD 조건	
이온화원 유형	Extractor
이온화원 온도	230°C
질량 필터 모드	선택 이온 모니터링(SIM)
NDMA m/z	74.00
NDEA m/z	102
렌즈 직경	6mm
사중극자 온도	150°C
NDMA 측정 시간	150
NDEA 측정 시간	150

표 1. 분석에 사용되는 소모품

품명	부품 번호
헤드스페이스 바이알(20mL)	5182-0837
바이알 캡	5183-4477
GC 라이너	5190-2295
GC 셉타	5183-4759
컬럼 DB-1701	122-0733
Extractor 렌즈(6mm)	G3870-20448

결과 및 토의

분리가 충분이 이루어졌으며, 용매와 매트릭스 종으로부터도 표적 피크가 잘 분리되었습니다. 그림 1은 크로마토그램의 예입니다.

머무름 시간은 FDA 규제에 제공된 것과 일치했습니다. 그림 2A 및 2B는 NDMA 및 NDEA에 대한 세 개의 가장 낮은 검량 포인트(0.025, 0.05 및 0.1 μ g) 오버레이를 보여줍니다.

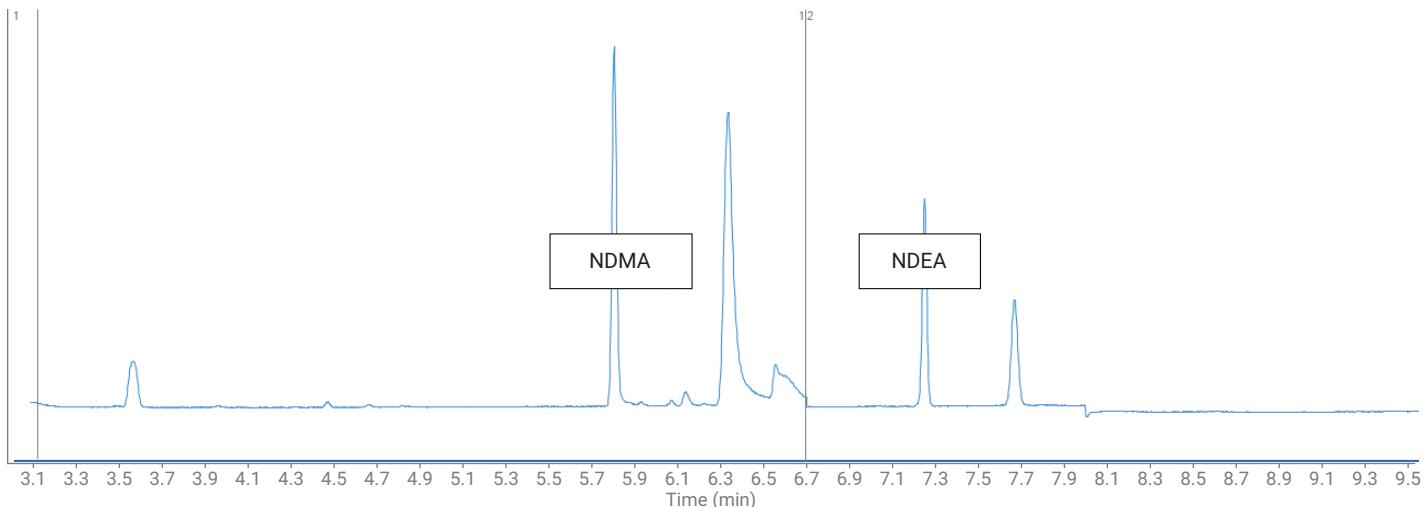


그림 1. NMP에서 NDMA와 NDEA의 1 μ g 표준 혼합물질의 선택 이온 모드에서 생성된 크로마토그램. NDMA의 머무름 시간은 5.80분이고 NDEA의 머무름 시간은 7.25분입니다.

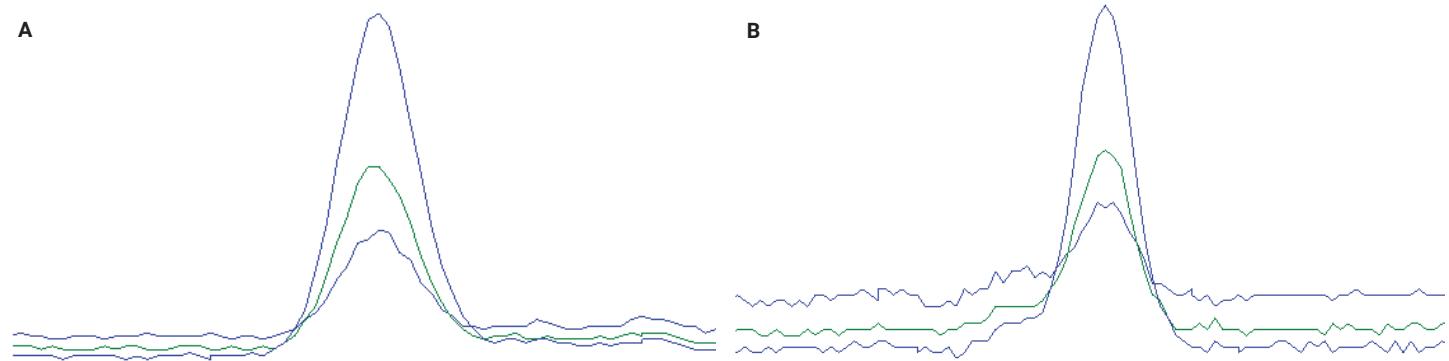


그림 2. 세 개의 가장 낮은 검량 포인트에서의 NDMA(A) 및 NDEA(B) 오버레이

Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어를 사용하여 두 개의 검량선을 생성했습니다. 곡선의 최하단에서 LOQ 및 검출 한계(LOD) 연구가 수행되었기 때문에 0.025 μ g 및 0.5 μ g의 표준물질 사이의 검량선에 대해 정량적 결과가 처리되었습니다. 전체 범위 곡선은 0.025 μ g에서 100 μ g까지 확장되며 역가중치로 0.995를 초과하는 선형 상관 관계가 있습니다. 그림 3A 및 3B는 이 기기에서 얻은 저농도 검량선 정보를 나타냅니다. LOD는 신호 대 잡음비가 3:1 이상인 컬럼에 주입된 최소량을 기록하여 정의됩니다. NDMA 및 NDEA 검량에서 0.025 μ g의 최저 포인트가 이 설정을 초과했습니다.

각 화합물에 대한 검량선을 생성한 후, 세 농도에서 표준물질을 5회 반복 분석했습니다. 표 2에 이러한 재현성 평가 결과를 요약하였습니다.

분석법 성능의 최종 평가로 매트릭스에서 스파이크 및 회수율 테스트를 수행했습니다. 사용된 LOQ를 표적으로 하여 각각 500mg의 용해된 valsartan 약물 정제를 함유한 세 바이알에 두 개의 가장 낮은 검량 표준물질을 스파이킹하였습니다. 배치 시료를 분석하여 스파이크 및 회수율 테스트 전에 NDMA 및 NDEA 화합물이 검출되지 않았음을 보여주었습니다. 표 3은 결과를 나타냅니다.

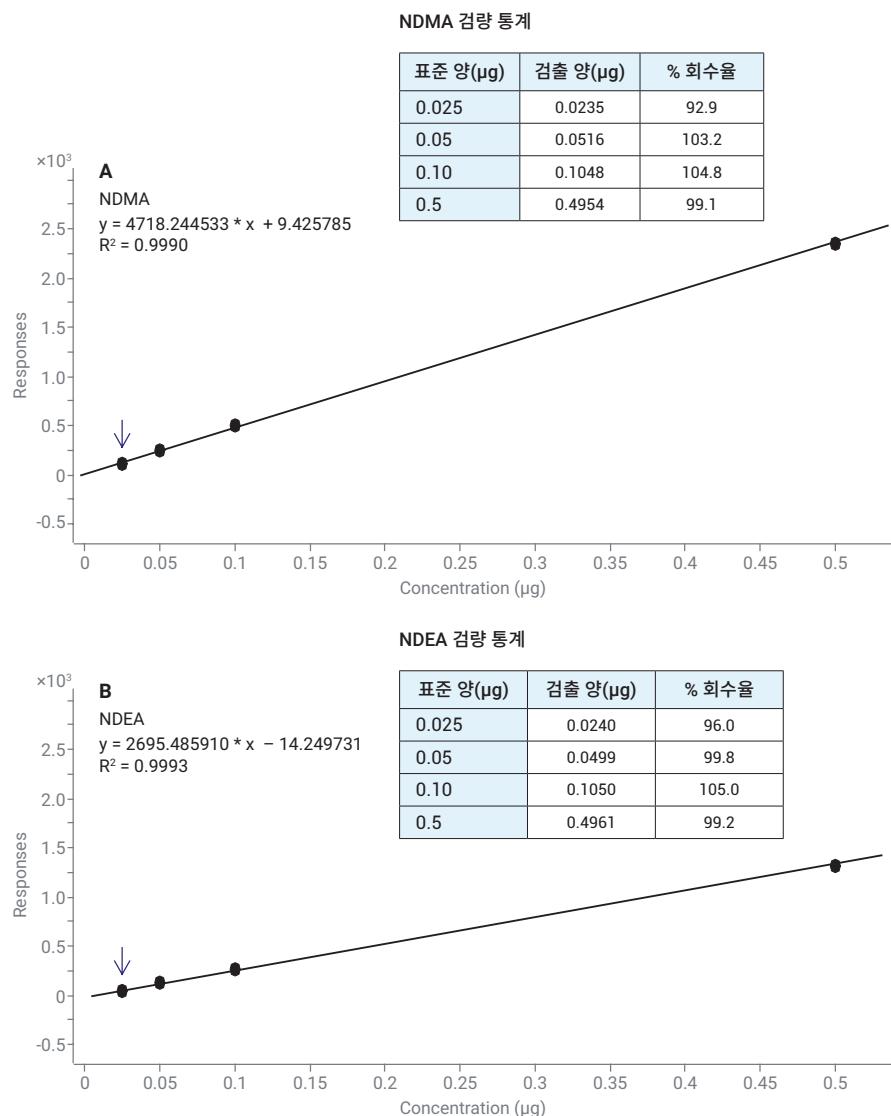


그림 3. 저농도 검량 범위에 대해 측정된 선형 회귀와 검량선에 대한 처리 후 검량 표준물질의 정확도

표 2. 표준물질의 재현성 통계($n = 5$)

	0.025 μ g 표준물질		0.05 μ g 표준물질		0.1 μ g 표준물질	
	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA	NDMA	NDEA
평균 검출 양	0.0249	0.0248	0.0518	0.0506	0.1012	0.0988
%RSD	4.95	2.89	6.24	0.7	2.65	4.07

표 3. NDMA 및 NDEA 표적 화합물에 대한 세 반복 시료로부터 얻은 LOQ 측정 결과

	표적 LOQ	평균 회수율	평균 회수율
	1ppm	0.05ppm	0.10ppm
NDMA	0.10	0.056	0.11
NDEA	0.05	0.057	0.11

결론

Agilent 8890 GC는 의약품의 안전한 스크리닝에 필요한 견고하고 재현성 있는 성능을 기준 대비 더욱 넓게 확장시킵니다. Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러 및 Agilent 5977 GC/MSD를 8890 GC와 결합하여 사용하면 FDA 지침과 sartan 제품 내의 불순물에 대한 중요 분석의 예상되는 검출 값을 준수할 수 있습니다.

참고문헌

1. Global Health Observatory (GHO) data. https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/ - Accessed 17June 2019.
2. <http://www.bloodpressureuk.org/mediacentre/Newsreleases/1billionpeopleworldwidенowhavehighbloodpressure>
3. Barreras, A.; Gurk-Turner, C. Angiotensin II Receptor Blockers. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **2003**, 16(1), 123–126. doi:10.1080/08998280.2003.11927893
4. GC/MS Headspace Method for Detection of NDMA in Valsartan Drug Substance and Drug Products. *U.S. Food and Drug Administration*, FY18-176-DPA-S.
5. European Medicines Agency Report of NDEA.
6. Combined N-Nitrosodimethylamine (NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (NDEA) Impurity Assay by GC/MS Headspace. *U.S. Food and Drug Administration*, FY19-005-DPA-S.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 09월 11일, 한국에서 인쇄
5994-1132KO

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

