

Agilent GC/TQ와 수소 운반 가스를 사용한 사르탄 계열 의약품 내 니트로사민 불순물 정량 분석



저자

Soma Dasgupta, Vivek Dhyani,
Anastasia Andrianova 및
Joel Ferrer
Agilent Technologies, Inc.

개요

헬륨 부족에 대응하여 실험실에서는 가스 크로마토그래피/질량 분석기(GC/MS) 분석을 위한 대체 운반 가스의 사용 가능성을 모색하고 있습니다. 이 응용 자료에서는 운반 가스로서 수소의 적합성을 보여주고 고효율 이온화원(HES)을 갖춘 **Agilent 7010 시리즈 QQQ(TQ) GC/MS 시스템**, 또는 **Agilent HydroInert 이온화원**을 갖춘 **Agilent 7000E QQQ GC/MS**와 결합된 Agilent 8890 가스 크로마토그래피 시스템을 사용하여 특정 사르탄 계열 의약품 내 8가지 니트로사민 불순물을 분석할 때 헬륨 사용과 비교합니다. 수소 운반 가스로 분석한 8가지 니트로사민 불순물에 대한 NIST 라이브러리의 스펙트럼 일치 범위는 79-97였습니다. 0.3-50ng/mL의 농도 범위에서 $R^2 > 0.99$ 로 탁월한 검량 직선성이 관찰되었습니다. 감도 요구 사항은 신호 대 잡음비(S/N) 요구 사항 10에 따라 0.03ppm에서 충족되었습니다. OpenLab ECM XT와 MassHunter Acquisition 13.0을 통합하여 데이터 관리를 간소화하여 분석가가 기기 생성 데이터에 중앙 집중식으로 액세스할 수 있고 협업이 촉진되며 데이터 무결성이 유지되고 워크플로 프로세스가 최적화되었습니다.

소개

최근 몇 년 사이 헬륨 공급에 어려움이 생기면서 수소와 같은 대체 운반 가스로의 전환에 대한 관심이 크게 높아졌습니다. 수소는 효율적인 GC 운반 가스이지만, 정확한 결과를 얻으려면 분석물질과의 반응성을 이해하는 것이 중요합니다. 수소는 헬륨에 비해 더 빠른 실행 시간과 더 우수한 크로마토그래피 분리능과 같은 몇 가지 장점이 있습니다. 그러나 수소에는 시료 분석물질과의 수소 반응으로 인해 발생할 수 있는 감도 손실 및 스펙트럼 변화와 같은 몇 가지 문제도 있습니다. 이러한 반응은 총 이온 크로마토그램(TIC)에서 피크의 질량 스펙트럼을 변화시키고 잠재적으로 잘못된 화합물 식별로 이어질 수 있습니다. 헬륨에서 수소 운반 가스로의 전환은 신중한 계획과 실행이 필요하므로 매우 중요한 결정입니다. "EI GC/MS 기기의 헬륨-수소 운반 가스 전환 가이드"¹에서 원활한 전환을 위한 포괄적인 가이드를 제공합니다. 또한 **HydroInert 소스**를 주입하면 수소와의 반응성 화합물에 대해서도 스펙트럼 정확도를 보전할 수 있습니다. 그 결과, 휘발성 유기 화합물², 다환 방향족 탄화수소(PAH)^{3,4} 및 EPA TO-15.⁵에 나열된 대상 화합물 분석을 포함하여 수소 운반 가스를 사용하여 다양한 응용 작업을 성공적으로 수행했습니다.

이러한 수요가 많은 응용 분야 외에도 의약품에서 니트로사민 불순물 분석 또한 중요한 다른 응용 분야입니다. 헬륨을 운반 가스로 사용하는 방법은 의약품 내 니트로사민 불순물 분석에 널리 사용되었습니다. 니트로사민은 특정 조건에서 수소와 반응하여 원하지 않은 아민이나 히드라진으로 전환될 수 있습니다. 따라서 수소 운반 가스를 사용할 때 스펙트럼 품질이 영향을 받지 않도록 보장하는 것이 중요합니다. 이 응용 자료에서는 8가지 니트로사민 불순물, 즉 nitrosodimethylamine(NDMA), N-nitrosomethylethylamine(NMEA), N-nitrosodiethylamine(NDEA), N-nitroso-ethylisopropylamine(NEIPA), N-nitrosodiisopropylamine(NDIPA), N-Nitrosodipropylamine(NDPA), N-nitrosodi-n-butylamine(NDBA), 및 N-Nitrosopiperidine(NPIP) 분석법의 일부로 HES 및 HydroInert 이온화원과 함께 수소 운반 가스를 사용하는 방법을 평가합니다. 얻어진 결과는 스펙트럼 품질, 직선성, 반복성, 회수율 및 의약품 내 니트로사민 분석에 대한 현행 규정 준수 여부 측면에서 평가했습니다.

실험

테스트한 활성 원료 의약품(API) 및 의약품에는 valsartan, irbesartan, losartan 및 olmesartan이 포함되었습니다. 원료 의약품 500mg을 정확히 측정해 15mL의 일회용 유리 원심분리 튜브에 넣고, 볼륨 피펫을 사용하여 내부 표준물질 용액(약 50ng/mL NDMA-d₆의 dichloromethane 용액) 5mL를 첨가했습니다. 시료를 1분간 볼텍싱 처리 후, 원심분리기에 넣고 4,000rpm에서 5분간 회전시켰습니다. 용해되지 않은 원료 의약품이 바닥에 침전되었습니다. 일회용 피펫을 사용해 약 2mL의 디클로로메탄 층을 0.45µm 나일론 필터로 걸러낸 후, 분석을 위해 GC 바이알로 옮겼습니다.

표준물질 준비

표준물질 stock을 희석하여 0.3-50ng/mL 범위의 검량 용액을 얻었고 내부 표준물질로 NDMA-d₆이 포함된 dichloromethane에 전처리했습니다.

계측과 분석

분석은 HES를 갖춘 7010 시리즈 GC/TQ 및 HydroInert 이온화원을 갖춘 7000E GC/TQ와 결합된 Agilent 7693A 자동 액체 시료 주입기(ALS)가 장착된 8890 GC 시스템을 사용하여 수행했습니다. 분리는 Agilent J&W VF-WAXms GC, 60m x 0.25mm, 0.25µm 캐필러리 컬럼(부품 번호 CP9207)에서 수행했습니다. 또는 Agilent J&W VF-WAXms GC, 30m x 0.25mm, 0.25µm 캐필러리 컬럼 2개(부품 번호 CP9205)를 각각 1mL/분 및 1.2mL/분의 유량으로 사용하는 중간 컬럼 백플러시 구성을 사용하여 동일한 파라미터를 적용할 수 있습니다. 백플러시 설정도 평가했습니다. 표 1과 2에 각각 GC 및 MS 파라미터를 나타내었습니다.

GC/TQ는 다이내믹 MRM(dynamic Multiple Reaction Monitoring, dMRM) 모드에서 작동되었습니다. 9개 불순물에 대한 모든 MRM 트랜지션은 GC/TQ용 Agilent MassHunter Optimizer를 사용하여 개발했으며 데이터 수집에 사용되었습니다(표 3).

표 1. GC 파라미터

파라미터	값
GC 시스템	Agilent 8890 GC 시스템
MMI 주입 모드	펄스 비분할: 0.5분까지 15psi
주입구 온도	250°C
주입구 라이너	Ultra Inert, 비분할, 단일 테이퍼, 유리솜(부품 번호 5190-2293)
오븐 온도 프로그램	40°C(1.5분) 20°C/분으로 200°C까지 승온(0분) 60°C/분으로 250°C까지 승온(3분)
총 실행 시간	13.33분
MS 이송 라인 온도	250°C
주입량	2µL
GC 컬럼	VF-WAXms 헬륨: 30m x 0.25mm, 0.25µm 컬럼(품번 CP9205) 수소: 60m x 0.25mm, 0.25µm 컬럼(품번 CP9207) 및 2개의 30m x 0.25mm, 0.25µm 컬럼을 사용한 중간 컬럼 백플러싱
운반 가스	수소 1mL/분(HES 및 HydroInert의 경우) 또는 헬륨 1.2mL/분(HES의 경우)

표 2. MS 파라미터.

파라미터	값
MS 시스템	HES를 갖춘 Agilent 7010 시리즈 GC/TQ 및 HydroInert(HI) 이온화원을 갖춘 Agilent 7000E GC/TQ
모드	전자 충돌, 70eV(HES 및 HI 이온화원 모두)
이온화원 온도	250°C
사중극자 온도	Q1 및 Q2 = 150°C
MS1 및 MS2 분리능	모든 화합물 유닛
충돌 가스 유속	질소, 1.5mL/분
퀀칭 가스 유속	헬륨 운반 가스 사용 시 헬륨 2.25mL/분, 수소 운반 가스 사용 시 꺼짐

소프트웨어 및 데이터 무결성

GC/MS용 MassHunter Acquisition 13.0 소프트웨어와 MassHunter Quantitative Analysis 12.1 소프트웨어를 포함한 Agilent MassHunter 워크스테이션이 데이터 수집 및 분석에 사용되었습니다. OpenLab Electronic Content Management (ECM) XT 구성을 통해 다양한 국가 및 EU 전자 기록 규정을 준수할 수 있습니다. 자동화된 도구와 프로세스에는 관련 권한이 있는 사용자를 생성하는 기능, 감사 추적 생성, 및 데이터 침해 또는 손실 위험을 최소화하기 위한 원격 데이터 저장 기능이 포함됩니다. MassHunter 응용과 함께 사용된 OpenLab ECM XT는 기기, 데이터 시스템 및 실험실 소프트웨어에서 생성된 데이터에 대한 단일 액세스 지점을 포함해 유연한 데이터 관리 솔루션을 제공했습니다. 분석 작업자는 스토리지 위치의 데이터에 액세스하여 데이터 무결성을 손상시키지 않고 수행할 수 있으며 워크플로에 대한 일관된 프로세스를 생성할 수 있습니다.

표 3. 정량적/정성적 트랜지션(dMRM 기반).

화합물	머무름 시간(분)	MRM 전이	CE
NDMA-D ₆	8.437	80 → 50	5
NDMA	8.448	74 → 44.1	6
		74 → 42.1	24
		43.1 → 42.1	10
NMEA	8.767	87.9 → 71	4
		87.9 → 42.1	24
		43.1 → 42.1	10
NDEA	8.969	101.9 → 85.1	4
		101.9 → 56	20
		101.9 → 44.1	14
NEIPA	9.198	115.9 → 99	6
		115.9 → 44	16
		71 → 56	6
NDIPA	9.366	130 → 88	6
		130 → 71	16
		130 → 42.1	12
NDPA	9.832	130 → 113.1	2
		101 → 70	2
		70 → 43.1	6
NDBA	10.796	158 → 141.1	4
		158 → 99.1	10
		116 → 99.1	4
NPIP	11.088	84 → 56	22
		113.9 → 97.1	8
		113.9 → 84.1	8
		113.9 → 55	26
		113.9 → 42.1	24

결과 및 토의

스펙트럼 일치 품질

헬륨 또는 수소 운반 가스를 사용하여 8개 분석물질 각각에 대한 전체 스캔 스펙트럼을 획득한 후 NIST 라이브러리와 비교했습니다. 그림 1에 나타난 바와 같이 7010 시리즈 GC/TQ-HES 시스템과 수소 운반 가스를 사용했을 때 우수한 일치 점수(> 90)를 얻었습니다. 7000E GC/TQ-HydroInert 소스 구성과 함께 수소 운반 가스를 사용할 때는 우수한 일치 점수(> 80)를 얻었습니다. HES 사용 시 평균 일치 점수가 높은 것은 감도가 향상된 결과일 수 있습니다.

질량 스펙트럼의 무결성을 유지하면 헬륨 및 수소 운반 가스 분석법에 동일한 MRM 전이를 사용할 수 있습니다(표 3).

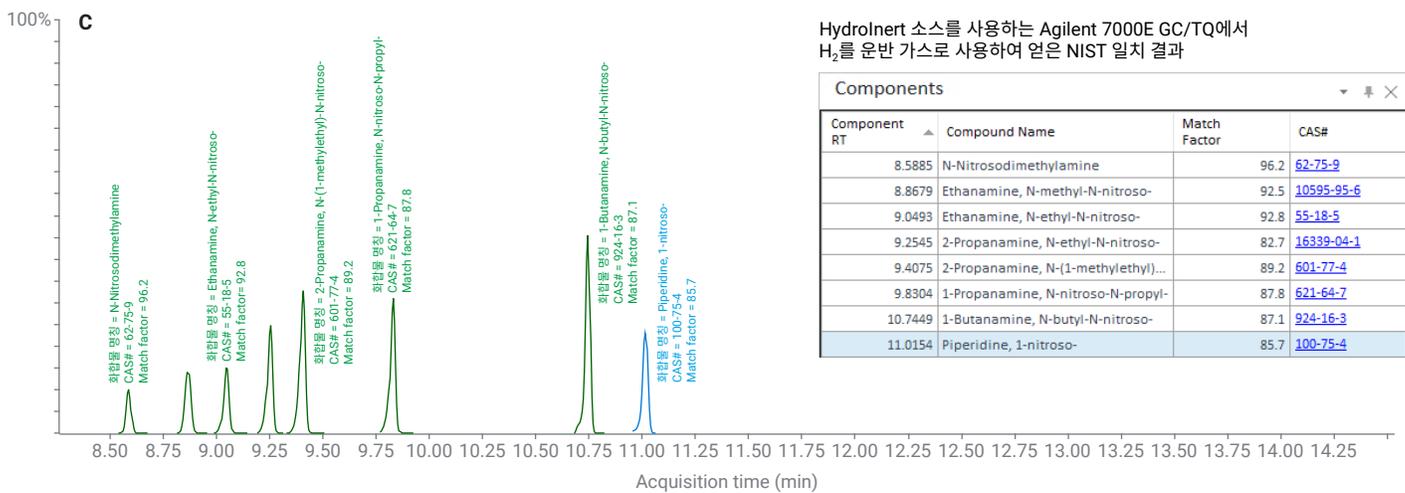
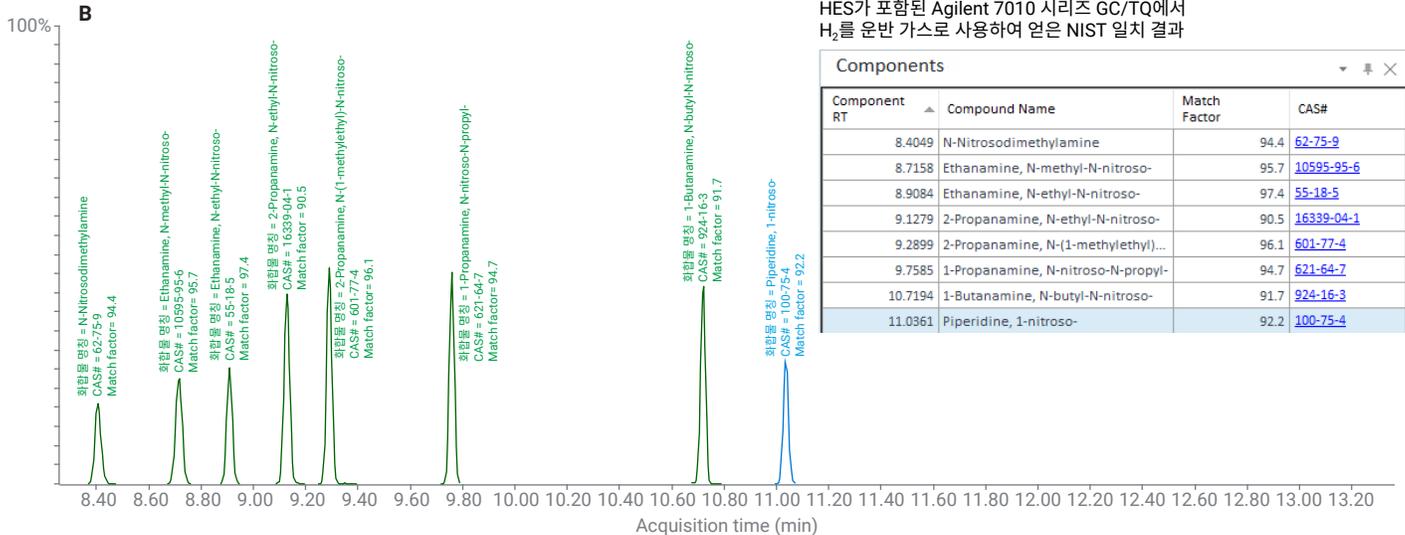
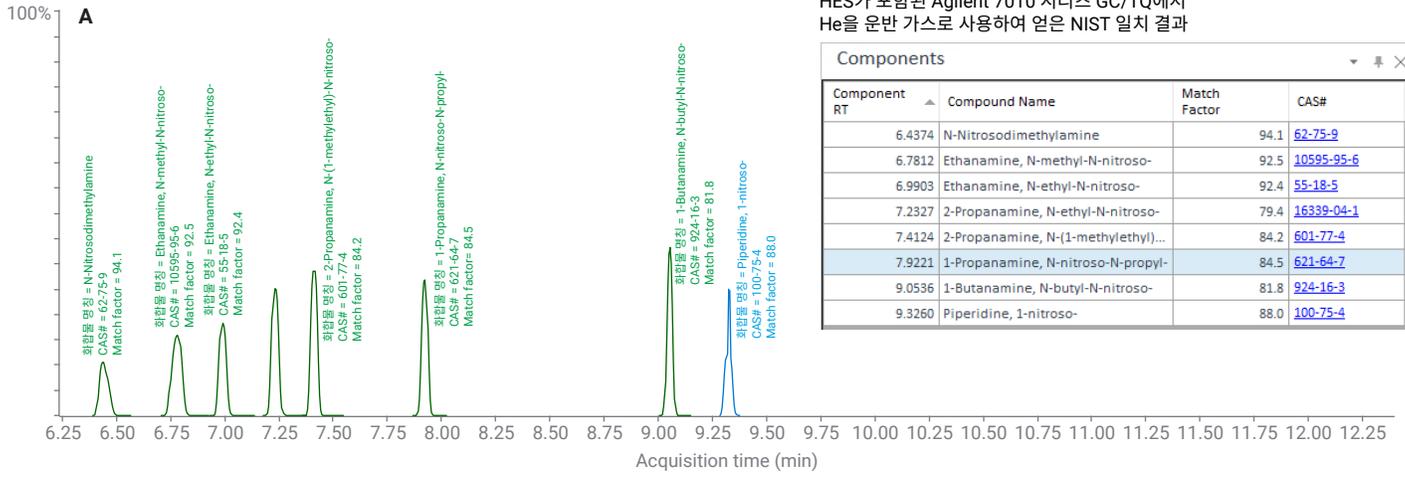


그림 1. HES로 헬륨 운반 가스 사용 시(A), HES로 수소 운반 가스 사용 시(B) 및 Hydrolnert 소스로 수소 운반 가스 사용 시(C) 8가지 니트로사민 불순물의 분리 결과. 삽입된 부표 FID 획득된 전체 스캔 질량 스펙트럼에 대한 관련 NIST 일치 점수를 보여줍니다

직선성

0.3-50ng/mL 범위에서 8가지 불순물에 대한 분석법 검량 성능을 입증했으며 $R^2 > 0.99$ 였습니다(표 4). 가장 낮은 검량 수준은 정성 이온에 대한 이온 비율이 이온 비율 기준을 통과한 농도였습니다. 수소 운반 가스를 사용할 때 7010 시리즈 GC/TQ-HES 및 7000E GC/TQ-HydroInert 소스 설정에서 모두 3ng/mL 이하의 검출 한계를 얻었습니다.

정량 한계

최신 규제 지침에 따르면^{6,7}, 정량 한계(LOQ)는 측정된 특정 니트로사민 불순물에 대해 설정된 허용 한계를 초과해서는 안 됩니다. 다양한 니트로사민을 평가하기 위해 단일 분석법을 사용하는 경우 각 개별 니트로사민에 대한 LOQ에서 해당 분석법의 선택도를 검증해야 합니다. LOQ가 0.03ppm 이하인 분석법을 사용하는 것이 원료 의약품 및 완제 의약품에 대한 제약 산업의 일반적인 요구 사항입니다.

시료 전처리에는 10x 희석(5mL의 dichloromethane로 추출된 500mg)이 포함됩니다. 원료 의약품을 30ppb(0.03ppm)로 첨가한 회수율 연구 결과, 이 연구에서 측정된 각 니트로사민 불순물에 대해 농도가 3ng/mL인 추출물이 생성되었습니다. 이 농도는 각 니트로사민 불순물에 대한 일반적인 30ppb LOQ 요구 사항을 준수했습니다.

7010 시리즈 GC/TQ를 사용하여 6개월에 걸쳐 헬륨과 수소 간에 운반 가스를 전환했으며 이러한 세 번의 운반 가스 변경 전체에 걸쳐 결과를 비교했습니다. 그림 2는 일관된 스펙트럼 정확도, 검량 반응, 이온 비율 및 감도가 관찰되었음을 보여줍니다. 스펙트럼 정확도는 측정 기간 동안 영향을 받지 않았으며 모든 분석물에 대해 지속적으로 높은 라이브러리 일치 점수(> 90)를 생성했습니다. 운반 가스를 변경한 후 스펙트럼 정확도를 유지하고 일관된 검량 반응, 이온 비율 및 감도를 생성할 수 있다는 사실은 실제 응용에 분석법을 적용해도 적합함을 입증합니다.

표 4. 다양한 운반 가스 및 이온화원에 대한 검량 수준.

화합물	검량 범위(ng/mL)			미국 약전(USP)에 따른 최저 검량 수준에서 정량자 전이의 S/N		
	He 운반 가스를 사용하는 Agilent 7010 시리즈 GC/TQ	H ₂ 운반 가스를 사용하는 Agilent 7010 시리즈 GC/TQ	HydroInert 소스를 사용하는 Agilent 7000E GC/TQ	He 운반 가스를 사용하는 Agilent 7010 시리즈 GC/TQ	H ₂ 운반 가스를 사용하는 Agilent 7010 시리즈 GC/TQ	HydroInert 소스를 사용하는 Agilent 7000E GC/TQ
NDMA	0.1-50	0.5-50	3-50	> 12	> 10	> 10
NMEA	0.2-50	0.3-50	1-50	> 200	> 12	> 40
NDEA	0.05-50	0.5-50	1-50	> 20	> 10	> 100
NEIPA	0.05-50	1-50	3-50	> 50	> 80	> 90
NDIPA	0.05-50	0.5-50	1-50	> 80	> 10	> 60
NDPA	0.1-50	0.3-50	3-50	> 100	> 10	> 10
NDBA	0.1-50	1-50	3-50	> 60	> 10	> 20
NPIP	0.1-50	1.25-50	3-50	> 60	> 10	> 10

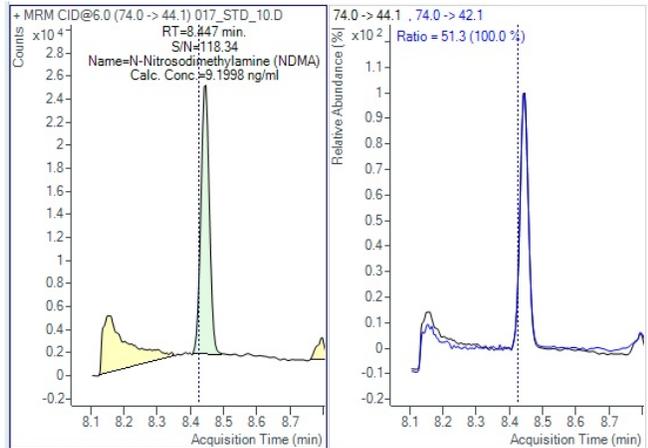
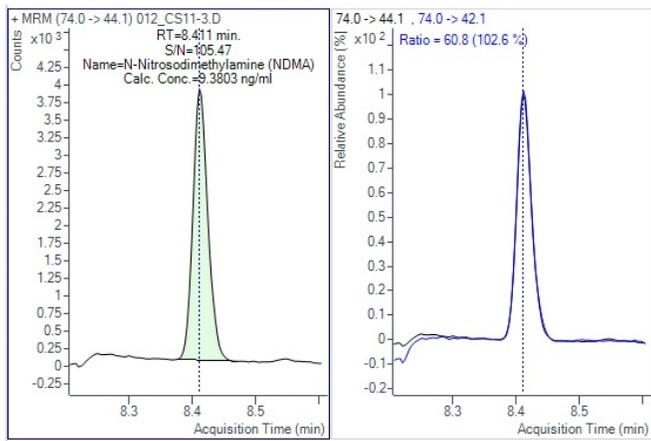
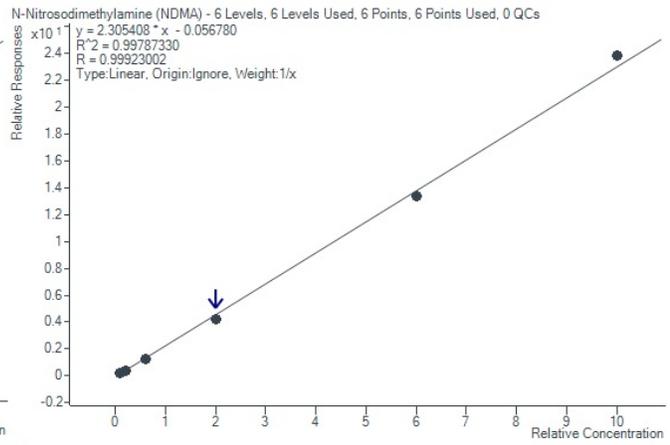
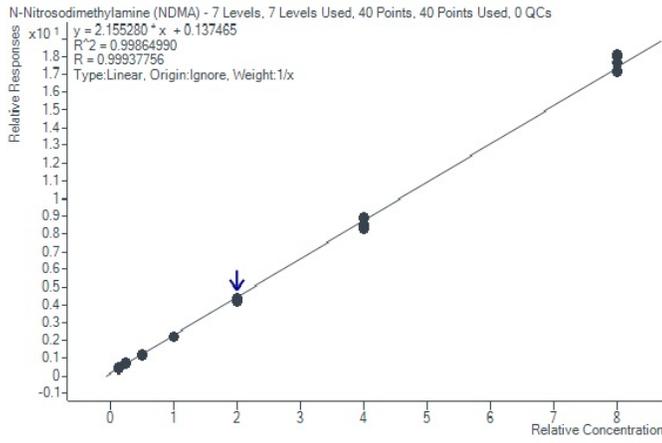
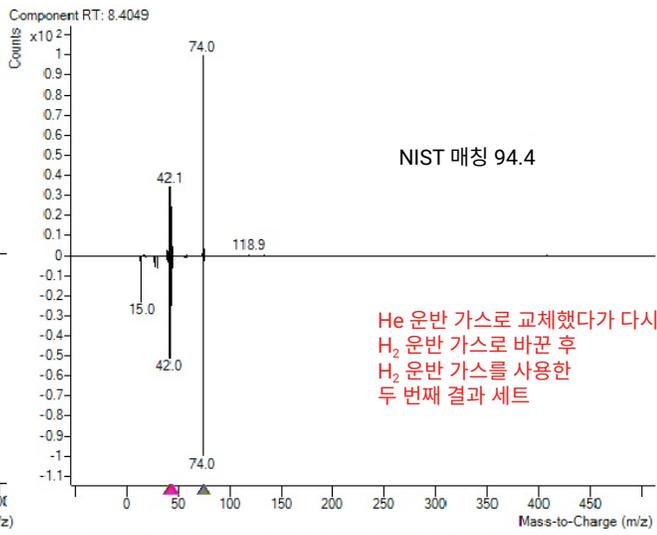
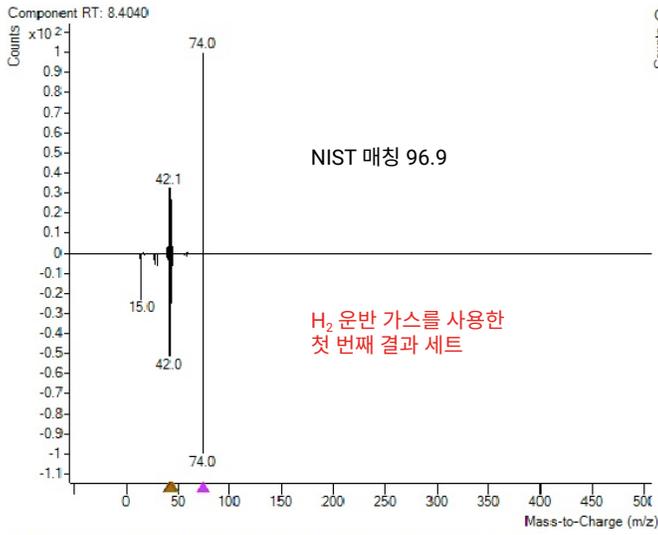


그림 2. Agilent 7010 시리즈 GC/TQ와 함께 헬륨 가스를 사용하기 전후에 수소 운반 가스를 사용하여 일관된 라이브러리 일치 점수, 검량 및 이온 비율을 얻었습니다

안정성

150회 연속 주입에 대한 결과 안정성은 이전에 헬륨 운반 가스를 사용하여 평가되었습니다(5994-4618EN⁸에서 설명). 본 연구에서는 수소 운반 가스에 대해서도 동일한 평가를 수행했습니다(그림 3). RSD(절대 면적을 기준으로 계산)는 모든 분석물질에 대해 < 10%였으며, 계산된 농도 RSD(내부 표준물질 교정 후)는 < 7%였습니다. 이는 반응의 장기 안정성과 일상적 분석에서 분석법의 적용 가능성을 보여줍니다.

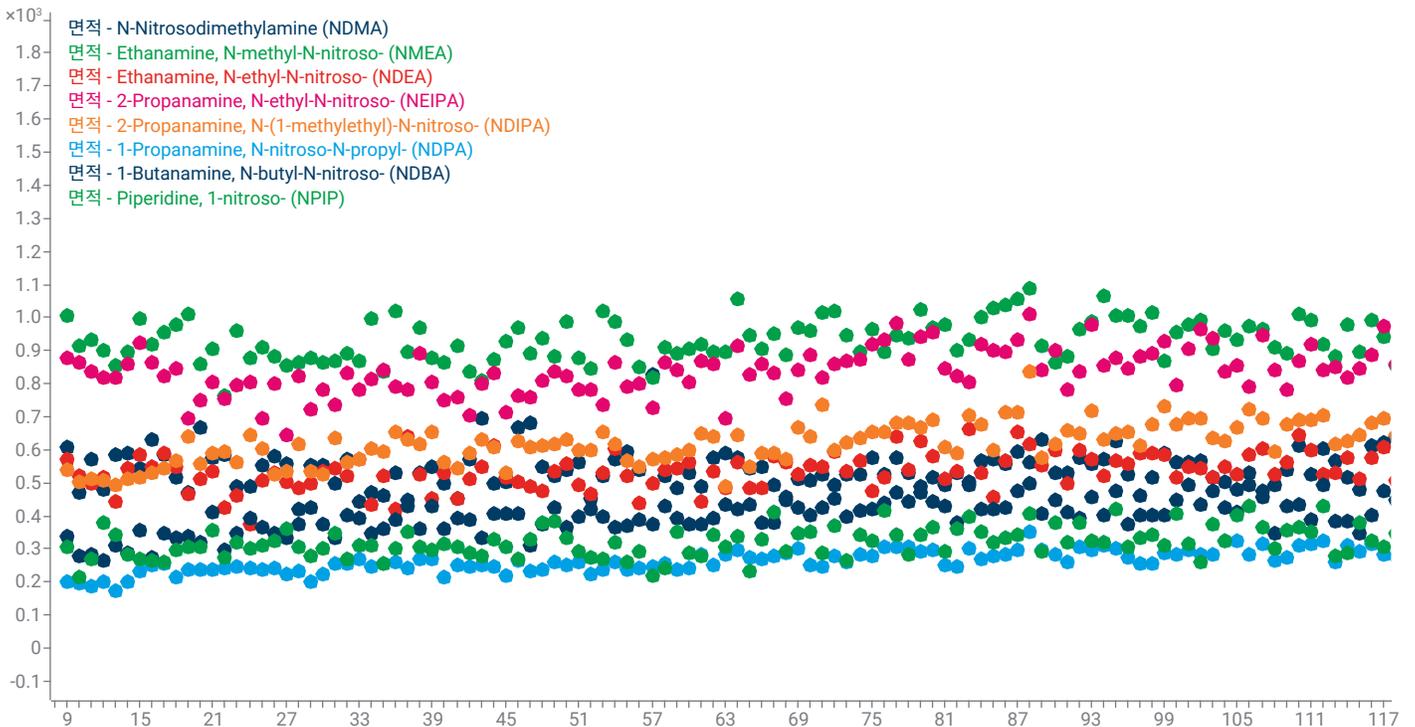


그림 3. 30ppb의 니트로사민 불순물 회수율 시료에 대한 피크 면적 추세(HydroInert 소스를 사용하는 Agilent 7000E GC/TQ 사용)(원료 의약품 기준). 이 플롯은 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어의 메트릭 플롯 기능을 사용하여 생성했습니다

중간 컬럼 백플러시

희석률 10에서 대량의 원료 의약품 매트릭스가 분석 시스템에 도입되었습니다. 이로 인해 RT가 이동하고 피크 응답이 점진적으로 감소할 수 있습니다. 이 문제를 극복하기 위해 중간 컬럼 백플러시 기능을 사용할 수 있습니다. 이 구성에서는 두 개의

동일한 30m 컬럼(0.25mm x 0.25 μ m) 사이에 PUU(Purged Ultimate Union)가 설치되었습니다. 중간 컬럼 백플러시 구성을 사용할 때 RT 및 피크 면적을 포함한 일관된 결과를 얻었습니다. 그림 4는 25회, 50회, 100회 연속 시료 실행 후 얻은 RT 및 피크 면적의 예를 보여줍니다.

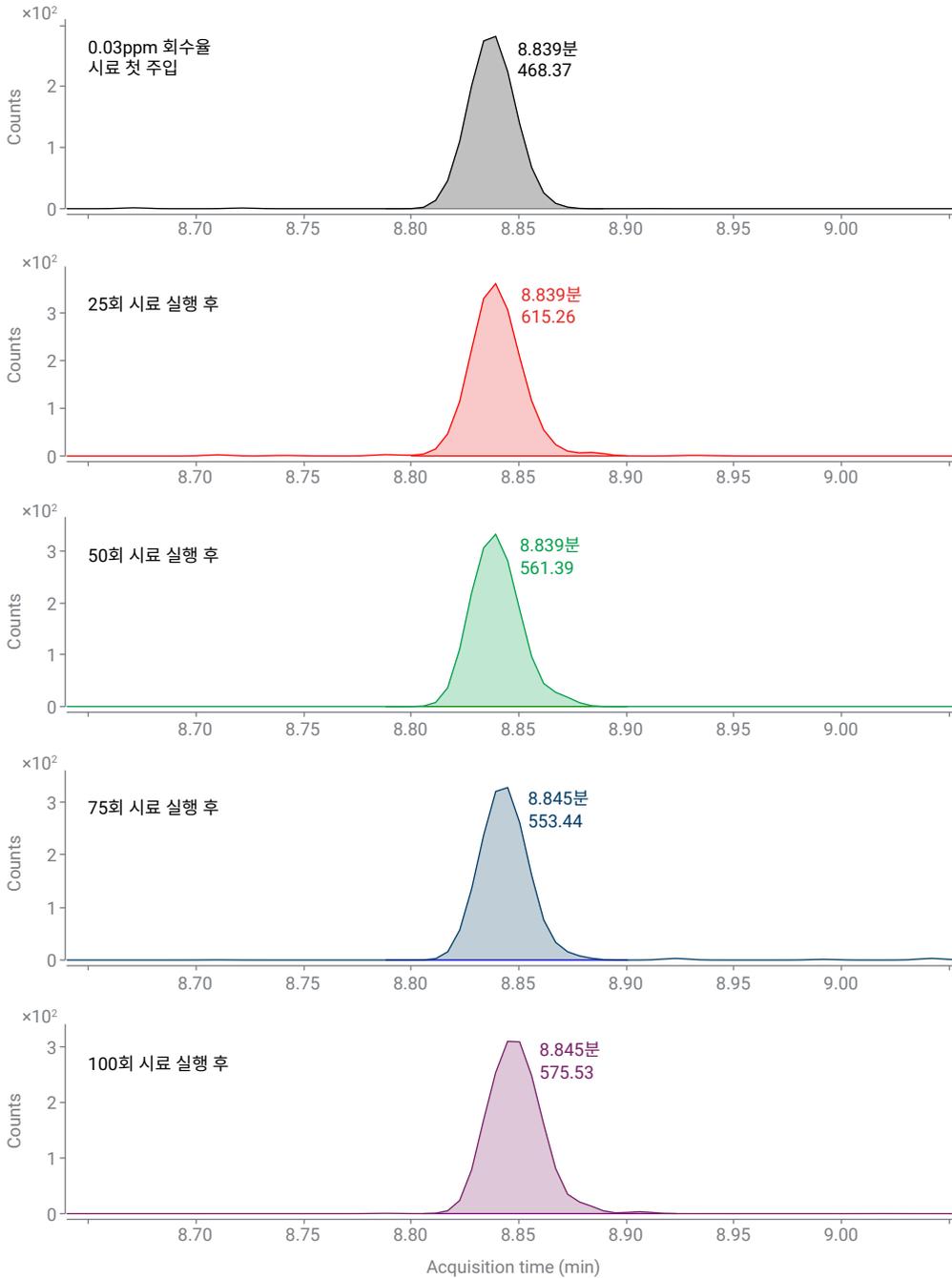


그림 4. 중간 컬럼 백플러시 설정 사용 시 25회, 50회, 100회 연속 시료 실행 후 일관된 머무름 시간(RT)과 피크 면적을 얻었습니다

회수율

시료 회수율은 원료 의약품인 valsartan, irbesartan, losartan 및 olmesartan을 0.03ppm으로 강화하여 계산했습니다. HES 및 HydroInert 소스 설정 모두에서 수소 운반 가스를 사용할 때 회수율은 충분했으며 그 범위는 80-120%였습니다.

결론

Agilent 7010 시리즈 GC/TQ(HES) 또는 Agilent 7000E GC/TQ (HydroInert 소스)와 함께 Agilent 8890 GC 시스템에서 수소 운반 가스를 사용했을 때 사르탄 의약품 및 물질에서 8가지 니트로사민 약물 불순물 측정 시 우수한 성과가 얻어졌습니다. 0.03ppm에서 성능을 검증했으며 허용 가능한 회수율과 장기 반복성을 얻었습니다. HydroInert 소스를 장착한 7000E GC/TQ와 HES 소스를 장착한 7010 시리즈 GC/TQ 모두 시스템이 필요한 검출 한계에 이를 수 있도록 도움이 되었습니다. OpenLab ECM XT와 MassHunter Acquisition 13.0을 통합하여 데이터 관리를 간소화하여 분석가가 기기 생성 데이터에 중앙 집중식으로 액세스할 수 있고 협업이 촉진되며 데이터 무결성이 유지되고 워크플로 프로세스가 최적화되었습니다.

참고 문헌

1. Agilent EI GC/MS 기기에서 운반 가스를 헬륨에서 수소로 전환, *Agilent Technologies 사용자 가이드*, 발행 번호 5994-2312KO, **2020**.
2. Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 수소 운반 가스 및 HydroInert 소스를 사용하는 헤드스페이스 GC/MSD로 먹는물의 휘발성 유기 화합물 분석. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-4963KO, **2022**.
3. Quimby, B. D.; Haddad, S.; Andrianova, A. A. GC/MS, 수소 운반 가스 및 Agilent HydroInert 소스를 사용한 PAH 분석. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-5711KO, **2023**.
4. Haddad, S.; Quimby, B. D.; Andrianova, A. A. 까다로운 토양 매트릭스에서 Agilent HydroInert 소스를 사용한 수소 운반 가스를 이용한 PAHs의 GC/MS/MS 분석. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-5776KO, **2023**.
5. Miles, L.; et al. 수소 운반 가스와 Agilent HydroInert 소스를 사용한 EPA TO-15 분석. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 59945359KO, **2022**.
6. U.S Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry. February **2021**. <https://www.fda.gov/media/141720/download>
7. European Medicines Agency. Questions and Answers for Marketing Authorization Holders/Applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 Referral on Nitrosamine Impurities in Human Medicinal Products. 15 January **2024**. https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf
8. Dasgupta, S.; Dhyani, V; Churley, M. Quantification of Nine Nitrosamine Impurities in Sartan Drugs Using an Agilent GC-TQ. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-4618EN, **2022**.

www.agilent.com

DE18669787

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 5월 16일 한국에서 발행
5994-7438KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
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