

ACQUITY™ Premier 시스템과 Xevo™ TQ Absolute Tandem Quadrupole 질량분석기를 사용한 메트포르민 내 니트로사민의 고감도 정량 분석

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville, Amy Bartlett

Waters Corporation

요약

의약품에 니트로사민 불순물이 존재하면 인체 건강에 심각한 위험을 초래할 수 있으므로 감도와 선택성이 매우 높은 분석법을 사용해 ng/mL 미만의 니트로사민을 모니터링해야 합니다. 본 연구에서는 메트포르민 의약품 내 9가지 니트로사민 불순물(NDMA, NDEA, NEIPA, NMOR, NDIPA, NDPA, NMPA, NMBA, NDBA)의 검출과 정량을 위해 Tandem Quadrupole 질량분석기 사용 시 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC™) 분석법의 개발과 성능에 중점을 둡니다. 크로마토그래피 분리는 Atlantis™ Premier™ BEH C₁₈ AX 컬럼을 이용하여 수행했습니다. Waters Xevo TQ Absolute 질량분석기와 ACQUITY Premier 시스템을 함께 사용하여 감도와 정확도 높은 정량화를 달성했습니다. 니트로사민의 정량 한계(LOQ) 범위는 순 용매에서 0.01~0.1ng/mL, 메트포르민 의약품에서 0.025~0.1ng/mL였습니다. 0.025ng/mL(또는 20mg/mL 메트포르민 의약품에서 0.00125ppm)의 니트로사민에서 85~110%의 회수율을 달성함으로써 정확도 높은 정량 성능을 얻을 수 있었습니다.

이점

- Xevo TQ Absolute Tandem Quadrupole 질량분석기에서 MRM 수집 모드를 사용하여 메트포르민 의약품 내 미량의 니트로사민을 검출
- ACQUITY Premier 시스템과 Atlantis Premier BEH C₁₈ AX 컬럼을 함께 사용하여 메트포르민 의약품 내 니트로사민을 안정적으로 분리

- 높은 정밀도, 재현성, 직선성 및 정확도로 메트포르민 의약품 내 니트로사민을 정량분석

소개

니트로사민 불순물은 인체 발암 가능성이 있거나 암을 유발할 수 있는 화합물로 간주됩니다.^{1,2} 2018년부터 여러 시판 의약품에서 니트로사민이 발견되면서 안지오텐신 II 수용체 차단제(ARB), 히스타민 차단제 라니티딘(Zantac)을 포함하여 대대적인 제품 리콜이 발생했고 이후 메트포르민으로까지 확대되었습니다.^{3,4} 의약품 내 니트로사민의 양을 제한하기 위해 미국 FDA와 유럽 의약품청(EMA)은 의약품 내 니트로사민에 대해 일일 허용 섭취량(나노그램/일)을 규정했습니다.^{4,5} 이러한 한계치는 최대 일일 권장 복용량을 기준으로 지정된 제품에서 니트로사민의 임계 농도를 결정하는 데 사용됩니다.

메트포르민은 제2형 당뇨병 환자의 고혈당 치료에 사용되는 처방 의약품입니다.³ 일일 섭취 허용치인 96나노그램을 초과하는 NDMA가 검출되면서 여러 메트포르민 의약품이 리콜되었습니다.³

니트로사민을 허용되는 규제 한계치까지 측정하려면 감도와 선택성이 높은 분석법이 필요합니다. 다양한 의약품에서 미량 니트로사민을 정확하게 식별하고 정량화하는 데 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS) 기기가 사용되고 있습니다.^{6,7}

본 연구에 제시된 UPLC-MS/MS 분석법은 메트포르민 의약품 또는 활성 제약 성분(API)에서 9가지 니트로사민(표 1)을 높은 감도와 선택성으로 검출하고 정량화하였습니다. Xevo TQ Absolute Tandem Quadrupole 질량분석기와 ACQUITY Premier 시스템을 사용하여 분석법을 개발했습니다. 본 연구를 통해 메트포르민 의약품의 검출 및 정량 한계(LOD 및 LOQ), 재현성, 직선성 및 정확도를 포함한 분석법 성능 특성을 입증했습니다.

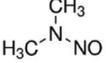
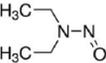
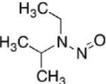
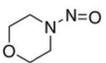
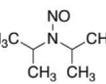
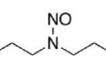
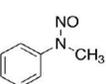
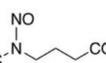
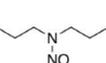
#	화합물	이름	화학식	MM	구조
1	N-nitrosodimethyl amine	NDMA	$C_2H_6N_2O$	74.05	
2	N-nitrosodiethyl amine	NDEA	$C_4H_{10}N_2O$	102.08	
3	N-nitrosoethyl isopropyl amine	NEIPA	$C_5H_{12}N_2O$	116.09	
4	N-nitrosomorpholine	NMOR	$C_4H_8N_2O_2$	116.06	
5	N-nitrosodiisopropyl amine	NDIPA	$C_6H_{14}N_2O$	130.11	
6	N-nitrosodipropyl amine	NDPA	$C_6H_{14}N_2O$	130.11	
7	N-Nitrosomethylphenyl amine	NMPA	$C_7H_8N_2O$	136.06	
8	N-nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid	NMBA	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.07	
9	N-nitrosodibutylamine	NDBA	$C_8H_{18}N_2O$	158.14	

표 1. 니트로사민 목록 및 해당 화학 정보. MM: 단일동위원소 질량(Da).

실험

니트로사민 표준물질은 TRC(Toronto Research Chemicals) 및 Sigma-Aldrich에서, 질량분석 등급의 포름산 암모늄, 용매 및 포름산은 Honeywell에서, 메트포르민 의약품은 Sigma-Aldrich에서 구입했습니다.

순 용매의 표준 용액

5.0-10mg/mL의 각 니트로사민을 포함하는 개별 원액 표준 용액을 사용하여 메탄올에 100µg/mL의 9가지 니트로사민을 포함하는 혼합 표준 용액을 만들었습니다. 혼합 표준 용액을 물로 순차적으로 희석하여 LOD, LOQ 및 직선성 표준 용액을 준비했습니다.

메트포르민 의약품(DS)

메트포르민 의약품 샘플 용액은 20mg/mL의 수용액으로 준비했고 분석 전에 0.2µm PVDF 시린지 필터(제품번호: WAT200806 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200806-acrodisc-syringe-filter-pvdf-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html>>)를 사용하여 여과했습니다.

LC 조건

LC 시스템:	ACQUITY™ Premier 시스템
검출:	MS/MS
바이알:	LCMS 최대 회수율 2mL 용량, 제품번호: 600000670 CV
컬럼:	Atlantis™ Premier BEH C ₁₈ AX(2.1 x 100, 1.7µm), 제 품번호: 186009368
컬럼 온도:	40°C
샘플 온도:	10°C
주입 부피:	30.0µL
유속:	0.4mL/분
이동상 A:	5mM 포름산 암모늄 수용액 + 0.1% 포름산
이동상 B:	5mM 포름산 암모늄 메탄 용액 + 0.1% 포름산

그래디언트:

그래디언트 테이블에 설명

그래디언트 테이블

시간 (분)	유속 (mL/분)	%A	%B	곡선
초기	0.400	98.0	2.0	초기
1.0	0.400	98.0	2.0	6
6.0	0.400	5.0	95.0	6
6.6	0.400	5.0	95.0	6
6.7	0.400	98.0	2.0	6
9.0	0.400	98.0	2.0	6

MS 조건

MS 시스템:

Xevo™ TQ Absolute Tandem Quadrupole 질량분석기

이온화 모드:

APCI+

수집:

MRM 모드, 표 2에 설명

코로나 전압:

2.5(μA)

APCI 프로브 온도:

325°C

디졸베이션 가스 흐름:

950L/시간

콘 가스 유속:

300L/시간

분무기:

300L/시간

총돌 가스 유속: 0.20mL/분

소스 온도: 150°C

데이터 관리

데이터 관리: 기기 제어: MassLynx™ v4.2

데이터 프로세싱: TargetLynx™

화합물	Precursor 이온 (m/z)	Product 이온 (m/z)	콘 전압 (V)	총돌 에너지 (eV)	소프트 이온화
NDMA	75.05	58.05 (quantifier)	30	10	아니요
		43.00 (qualifier)	30	10	
NDEA	103.20	74.90 (quantifier)	30	10	아니요
		46.90 (qualifier)	30	14	
NMOR	117.10	86.93 (quantifier)	25	11	아니요
		45.09 (qualifier)	25	14	
NEIPA	117.20	74.99 (quantifier)	20	9	예
		43.10 (qualifier)	20	13	
		47.10 (qualifier)	20	13	
NDPA	131.16	89.16 (quantifier)	16	9	아니요
		43.14 (qualifier)	16	12	
		47.11 (qualifier)	16	12	
NDIPA	131.20	89.10 (quantifier)	20	9	예
		43.10 (qualifier)	20	12	
		47.10 (qualifier)	20	12	
NMPA	137.05	66.10 (quantifier)	26	15	아니요
		107.15 (qualifier)	26	10	
NMBA	147.10	117.10 (quantifier)	20	5	예
		44.00 (qualifier)	20	12	
NDBA	159.20	57.10 (quantifier)	30	12	아니요
		41.10 (qualifier)	30	12	
		103.23 (qualifier)	30	10	

표 2. TQ Absolute 질량분석기를 사용한 MRM 전이 설정. 모든 니트로사민에 대해 피크당 13개 포인트 및 Auto Dwell(자동 드웰)로 수집 설정.

결과 및 논의

모든 니트로사민, 특히 고농축 메트포르민 API 피크와 극성이 강한 NDMA 피크 사이의 크로마토그래피 분리를 보장하기 위해 분석법을 개발할 때 다양한 컬럼 케미스트리를 탐구했습니다. 농축된 API 피크와 저농도 불순물 피크가 분리되면 전환 밸브를 통합하여 API를 폐기물로 보내는 동시에 불순물을 MS로 전달하여 분석할 수 있습니다. API를 폐기물로 전환함으로써 매트릭스가 미량 수준의 불순물에 미치는 이온화 억제 또는 이온화 향상의 영향을 줄여줍니다.

니트로사민 및 메트포르민 분석을 위한 컬럼 스크리닝이 그림 1에 나와 있습니다. 메트포르민 피크의 용리를 평가하기 위해, 1ng/mL 니트로사민을 포함한 10ng/mL 메트포르민 의약품 샘플을 사용하여 전환 밸브 없이 MS 트레이스를 수집했습니다. ACQUITY Premier HSS T3과 ACQUITY CSH™ Phenyl Hexyl은 모든 니트로사민에 적절한 머무름을 제공하며, ACQUITY Atlantis Premier BEH C₁₈ AX는 메트포르민과 NDMA 간에 최상의 크로마토그래피 분리를 제공했습니다(그림 1). 또한 BEH C₁₈ AX 컬럼은 NDPA, NDIPA 및 NMPA를 포함하여 근접하게 용리되는 니트로사민 간의 분리능을 향상시켰습니다.

NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDBA 및 NMBA⁸를 포함한 6가지 니트로사민 분석에 대한 이전 연구를 기반으로 니트로사민의 검출과 정량화에 포지티브 모드의 대기압 화학 이온화(APCI)가 사용되었습니다. 니트로사민에 대한 MRM 전이와 MS 이온화 파라미터는 MassLynx 소프트웨어 내의 IntelliStart™ 기능을 사용하여 개발되었습니다.

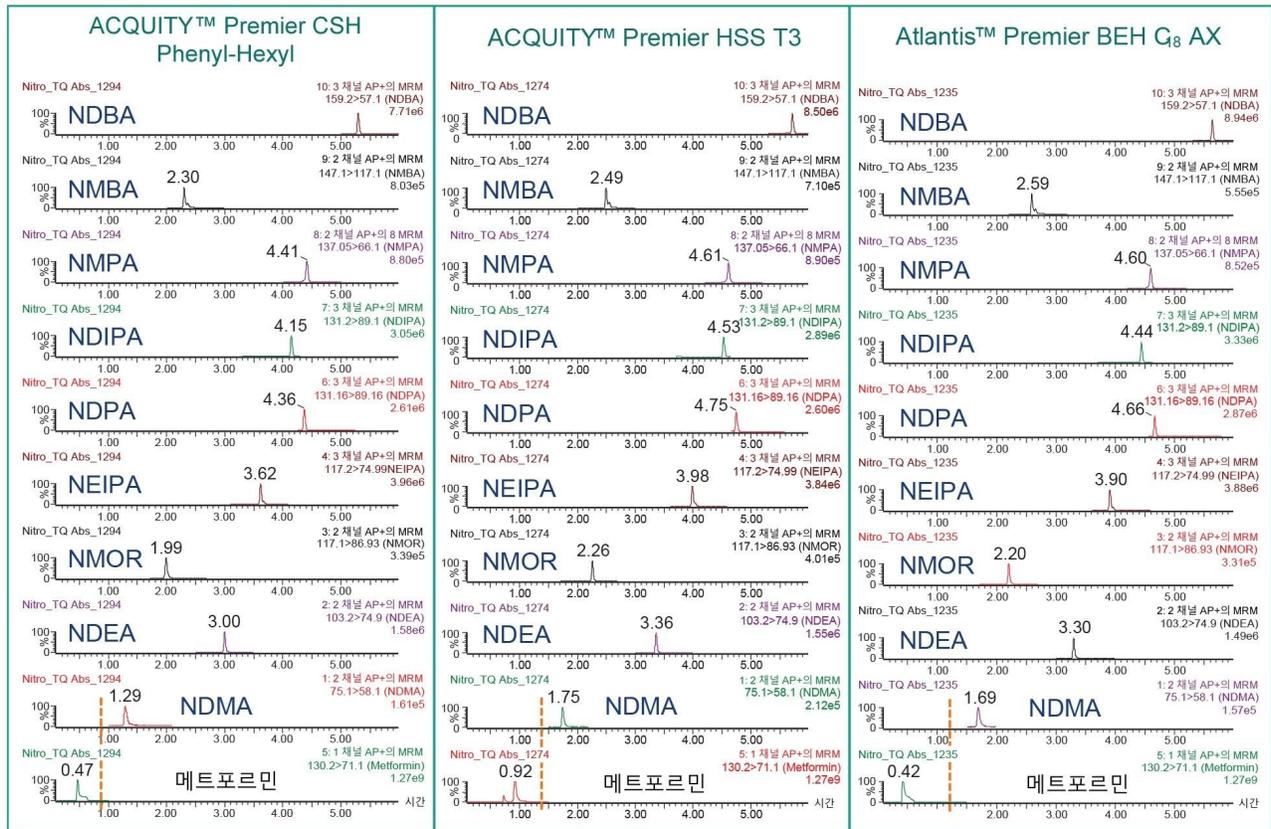


그림 1. 컬럼을 통한 니트로사민과 메트포르민의 분리. 전환 밸브를 사용하지 않고 Xevo TQ Absolute를 사용하여 수집한 10ng/mL 메트포르민 내 1ng/mL 니트로사민 용액.

순 용매의 정량분석

UPLC-MS/MS 분석법으로 얻을 수 있는 니트로사민의 LOD 및 LOQ는 각각 3:1 및 10:1의 신호대 잡음비(S/N) 기준에 따라 확인되었습니다. 순 용매 내 LOQ 용액의 대표적 크로마토그램은 그림 2에, LOD, LOQ 및 직선성을 포함한 분석법 성능 특성은 표 3에 요약되어 있습니다. NDMA의 LOD 및 LOQ는 각각 0.05 및 0.1ng/mL인 것으로 나타났습니다. 또한 NDEA, NMOR, NEIPA, NDPA, NDIPA, NMPA, NMBA 및 NDBA의 LOD 및 LOQ는 0.005와 0.01ng/mL이었습니다. 0.1 및 0.01ng/mL의 LOQ는 20mg/mL 메트포르민 의약품에서 0.005 및 0.0005ppm에 해당합니다. 6회 반복 주입 데이터를 기준으로 니트로사민의 피크 면적의 상대 표준 편차(RSD)가 10% 미만으로 LOQ 수준에서 우수한 성능을 얻었습니다(표 3). 본 연구에서는 데이터 가변성을 수정하기 위한 내부 표준물질이 사용되지 않았습니다. 또한 이 분석법은 MS 반응과 농도 사이에 직선성 관계를 나타냈으며 상관 계수는 0.996 이상이었습니다(표 3).

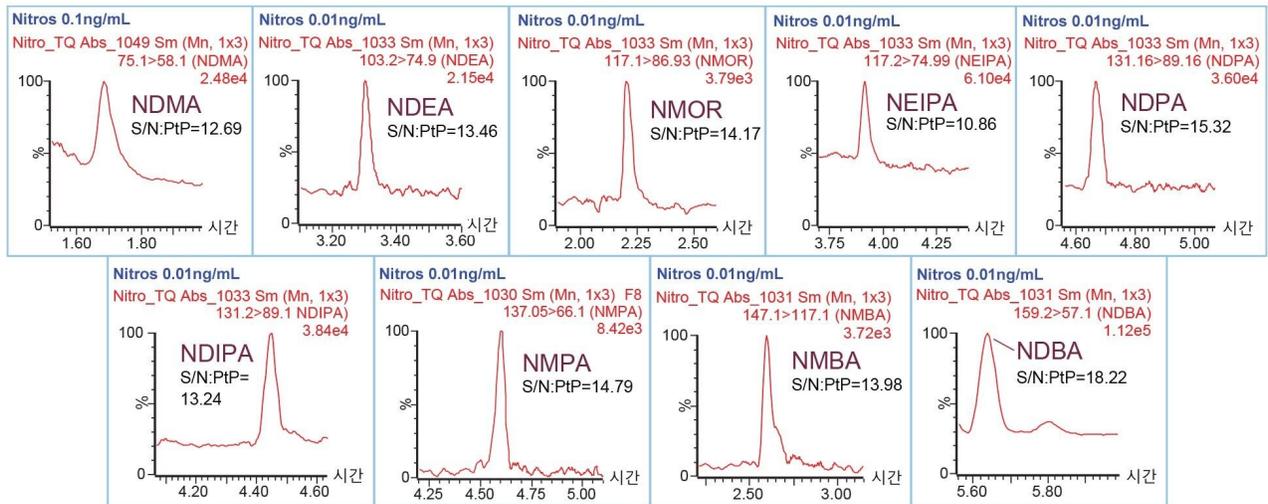


그림 2. Xevo TQ Absolute와 MRM 모드를 사용하여 순 용매(물)에서 제조된 LOQ 수준 니트로사민 표준 용액의 대표적 크로마토그램. PtP를 사용한 S/N: 피크-피크.

#	이름	MRM 전이	LOD 농도 (ng/mL)	LOD (단위: ppm)*	LOD (S/N)	LOQ 농도 (ng/mL)	LOQ (단위: ppm)*	LOQ (S/N)	피크 면적의 LOQ %RSD(상대 표준 편차 %)**	직선성 범위, 농도 (ng/mL)	직선성 맞춤 R ²
1	NDMA	75.05>58.05	0.05	0.0025	6.39	0.1	0.005	12.69	5.88	0.1-100	0.9996
2	NDEA	103.20>74.90	0.005	0.00025	4.92	0.01	0.0005	13.46	5.95	0.025-100	0.9997
3	NMOR	117.10>86.93	0.005	0.00025	5.61	0.01	0.0005	14.17	8.45	0.025-100	0.9996
4	NEIPA	117.20>74.99	0.005	0.00025	5.22	0.01	0.0005	10.86	7.83	0.025-100	0.9997
5	NDPA	131.16>89.16	0.005	0.00025	4.25	0.01	0.0005	15.32	7.58	0.025-100	0.9997
6	NDIPA	131.20>89.10	0.005	0.00025	6.03	0.01	0.0005	13.24	4.69	0.025-100	0.9997
7	NMPA	137.05>66.10	0.005	0.00025	5.28	0.01	0.0005	14.79	9.38	0.025-100	0.9996
8	NMBA	147.10>117.10	0.005	0.00025	3.44	0.01	0.0005	13.98	5.40	0.05-100	0.9959
9	NDBA	159.20>57.10	0.005	0.00025	8.01	0.01	0.0005	18.22	2.85	0.025-100	0.9998

표 3. Xevo TQ Absolute와 MRM 모드를 사용하여 순 용매 중 니트로사민에 대해 얻은 분석법 성능. * 20mg/mL 메트포르민에 대한 LOQ(단위: ppm). ** 6회 반복 주입 데이터를 기준으로 합니다. 1/x 가중치의 직선성.¹

메트포르민 의약품의 정량분석

MRM 수집 모드로 20mg/mL 수용액의 메트포르민 의약품 샘플에 니트로사민이 존재하는지 분석했습니다. 분석법 정확도를 평가하기 위해 메트포르민 샘플에 0.025, 0.1 및 1ng/mL의 니트로사민을 첨가했습니다. 이를 통해 고농도의 메트포르

민 샘플에서 니트로사민 불순물을 정확하게 측정할 수 있음을 확인했습니다. 메트포르민 DS와 니트로사민이 첨가된 메트포르민 DS 샘플에서 니트로사민(NDMA, NDEA, NMOR 및 NEIPA) 분석을 보여주는 대표적 크로마토그램이 그림 3에 나와 있습니다. 분석 결과 이 연구에서 테스트한 20mg/mL 메트포르민 의약품 샘플에서는 검출 가능한 니트로사민이 확인되지 않았습니다. 또한, 니트로사민이 첨가된 메트포르민 샘플과 순 표준 용액 내 니트로사민의 MS 반응과 S/N은 유사했으며, 이는 고농도의 메트포르민 피크에서 이온화 억제자가 발생하지 않았음을 나타냅니다.

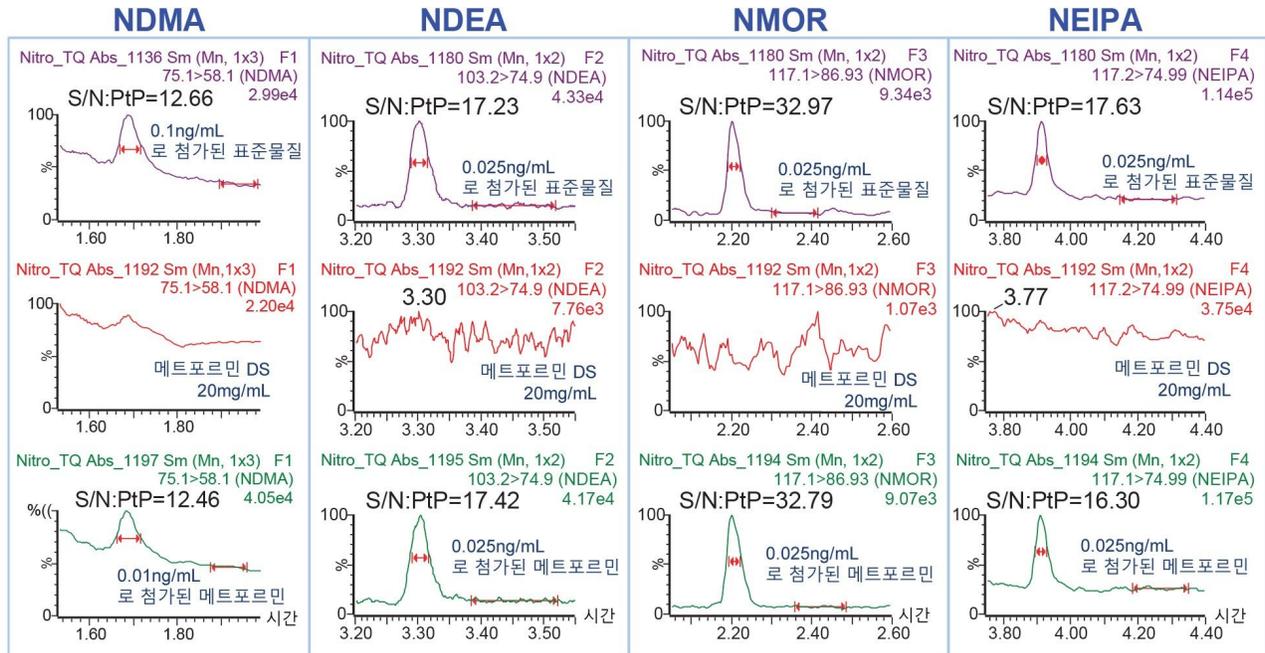


그림 3. 20mg/mL의 메트포르민 의약품(DS) 및 니트로사민이 첨가된 메트포르민 테스트 샘플 중 니트로사민 분석에 대한 대표적 크로마토그램.

회수율은 TargetLynx 소프트웨어를 사용하여, 계산된 농도와 이미 알고 있는 첨가 농도를 비교하여 계산하였습니다. 메트포르민 DS에서 준비된 검량 표준물질은 니트로사민의 회수율을 계산하는 데 사용되었습니다. 정확한 정량분석을 위해, 일반적으로 샘플과 표준물질에 대해 동일한 매트릭스를 사용하는 것이 권장됩니다. 매트릭스에 분석물질 또는 간섭이 포함될 경우, 표준물질을 추가할 수 있습니다.

메트포르민 DS의 니트로사민 표준물질에 대한 검량선은 MS 반응과 농도 사이의 직선성 관계를 나타냈으며 $R^2 \geq 0.999$ 였습니다(그림 4). 메트포르민 의약품의 모든 니트로사민에 대해 우수한 분석법 정확도가 얻어졌습니다(표 4). NDMA의 경우 0.1 및 1ng/mL에서 회수율 범위는 각각 89~98% 및 93~98%였습니다. 기타 불순물의 경우, 0.025ng/mL(또는 20 mg/mL 메트포르민 의약품에서는 0.00125ppm)에서의 회수율 범위는 85~110%였으며, 5회 샘플 주입에서 RSD는 \leq

6.50%였습니다.

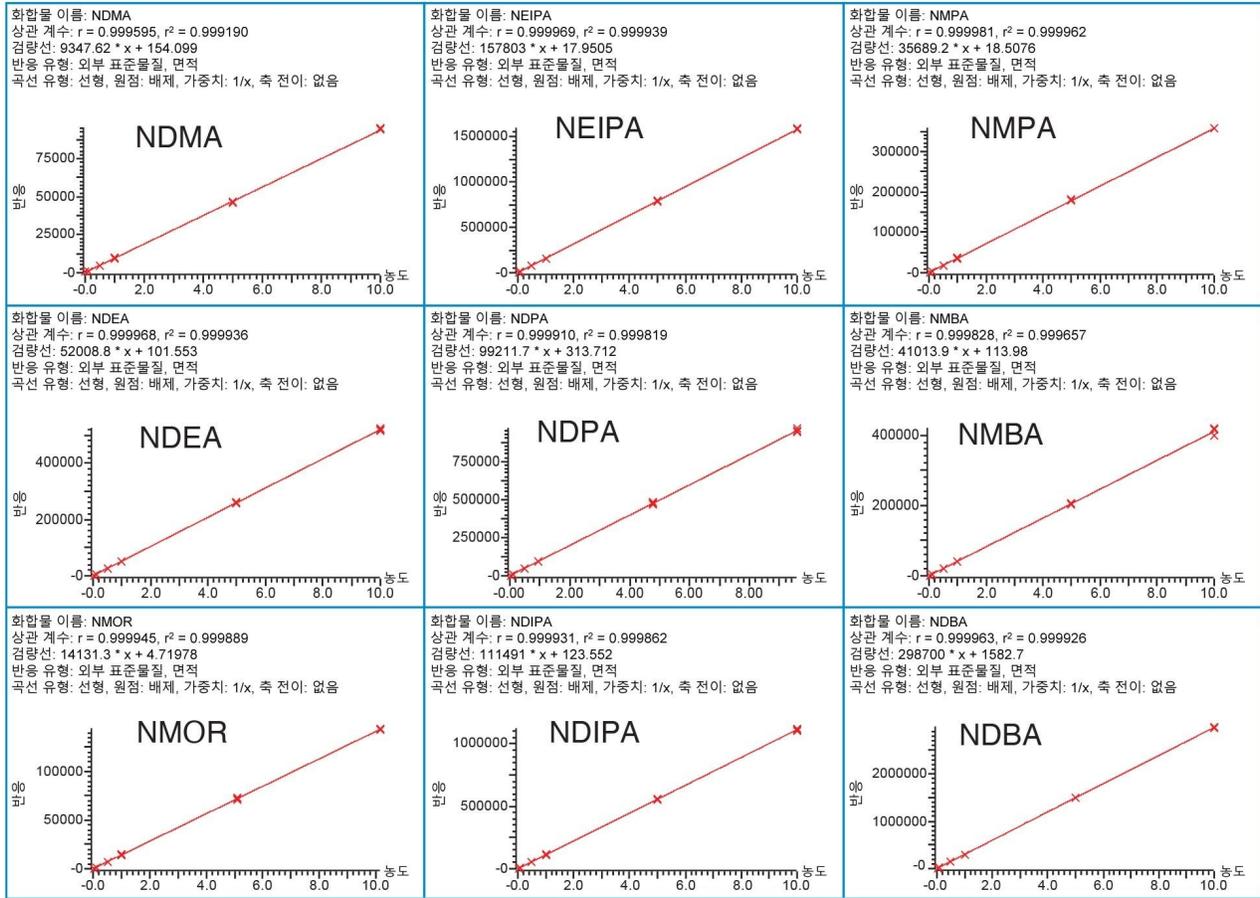


그림 4. 메트포르민 의약품(NDMA: 0.1-10ng/mL, 기타 불순물: 0.025-10ng/mL)에서 준비된 니트로사민 표준물질의 검량선.

이름	0.25ng/mL에서의 회수율(%)	0.025ng/mL에서 회수율의 %RSD (상대 표준 편차 %)	0.1ng/mL에서의 회수율(%)	0.1ng/mL에서 회수율의 %RSD (상대 표준 편차 %)	1ng/mL에서의 회수율(%)	1ng/mL에서 회수율의 %RSD (상대 표준 편차 %)
NDMA	n/a	n/a	89-98	3.45	93-98	1.95
NDEA	97-110	4.61	97-103	2.46	99-100	0.74
NMOR	93-103	3.67	100-105	2.06	97-101	1.50
NEIPA	97-103	2.60	102-106	1.65	98-101	0.94
NDPA	85-102	6.50	93-104	4.57	97-101	1.44
NDIPA	96-104	3.20	97-104	3.08	99-101	0.73
NMPA	95-110	6.39	96-100	2.70	99-102	1.20
NMBA	96-108	5.10	101-108	3.13	101-104	1.45
NDBA	105-110	2.19	100-103	0.92	96-99	1.22

표 4. 분석법 정확도. 20mg/mL 메트포르민 의약품에 상이한 농도로 첨가된 니트로사민의 회수율(샘플 5회 반복 주입).

결론

본 응용 자료에서는 ACQUITY Premier 시스템과 Xevo TQ Absolute 질량분석기를 함께 사용하여 메트포르민 의약품에서 니트로사민을 검출하고 정량화하기 위한 고감도 분석법을 개발했습니다. Atlantis™ Premier BEH C₁₈ AX 컬럼을 사용하여 탁월한 크로마토그래피 분리 성능을 얻었습니다. 이 분석법을 통해 순 용매에서 0.01~0.1ng/mL, 20mg/mL 메트포르민 의약품에서 0.025~0.1ng/mL의 LOQ 한계에 도달하는 우수한 정량 성능을 입증했습니다. 메트포르민 의약품에서 니트로사민의 직선성 및 정확도는 $R^2 \geq 0.999$ 였으며, 회수율은 85~110%를 나타냈습니다.

설명된 UPLC-MS/MS 분석법은 메트포르민 의약품 내 니트로사민에 대해 매우 감도가 높고 특이적이며 정확한 분석을 제공하여, 제품 품질 및 안전에 있어 대단히 중요한 잔류 수준 니트로사민에 대해 그 목적에 부합하며 정확도 높은 모니터링을 가능하게 합니다.

참고문헌

1. ICH M7(R1) Assessment and Control of NDMA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit

Potential Carcinogenic Risk, International Conference on Harmonization.

2. G. Brambilla, A. Martelli, Genotoxic and Carcinogenic Risk to Humans of Drug-Nitrite Interaction Products, *Mutat. Res.* 635 (2007) 17–52.
3. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin> <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin>> .
4. FDA, Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), February 2021.
5. European Medicines Agency, *Nitrosamine impurities in human medicinal products, Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490*, 25 June 2020.
6. Parr MK and Joseph JF. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *JPBA* 2018;164(2019):536–549.
7. Gushargi AJ and Halden RU. Critical Review of Major Sources of Human Exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere* 2018;210:1124-1136.
8. Lame ME, Lindsay H. High sensitivity quantification of Nitrosamines Genotoxic Impurities: LC-MS Analysis of Ranitidine Drug Product Using the Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-XS Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. Waters Application Note, [720006899](https://www.waters.com/720006899), 2020.

주요 제품

ACQUITY Premier 시스템 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ Absolute Triple Quadrupole 질량분석기 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-tq-absolute.html>>

MassLynx MS 소프트웨어 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007725KO, 2022년 9월

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[이용 약관](#) [개인정보 처리방침](#) [상표 사이트맵](#) [채용 정보](#) [쿠키](#) [쿠키 기본 설정](#)