

# Application News

No. SSK-GCMS-2001

## GC-MS/MS

Gas Chromatograph Mass Spectrometer

### Analysis of *N*-Nitrosodimethylamine(NDMA) in Metformin products by GC-MS/MS

2018년에 고혈압 치료제인 사르탄류 (Sartan-type drug)에서 인체 발암 추정물질(2A)인 *N*-니트로소디메틸아민 (*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA)이 검출되었으며, 2019년에는 위장약 치료제인 라니티딘 (Ranitidine)에서 NDMA가 검출되었다. 최근에는 당뇨병 치료제인 메트포르민 (Metformin)에서도 NDMA가 검출되는 등 제약 분야에서 원료물질 이외의 불순물이 검출되는 사례가 많이 발생하고 있다.

이에 최근에 발생한 메트포르민 의약품 중 NDMA 검출과 관련하여 싱가포르 보건과학청(이하, HAS)<sup>1)</sup>과 국내 식품의약품안전처(이하, MFDS)<sup>2)</sup>에서 분석법을 공개하였으며, 본 뉴스레터에서는 MFDS 시험법을 바탕으로 메트포르민 중 NDMA 분석을 진행하였다. 또, 회수율 평가는 HAS의 시험법을 바탕으로 실시하였다.



#### GC-MS/MS 장비 구성 및 분석 조건

메트포르민 중 NDMA 분석을 위한 세부 분석 조건은 <표 1>과 같다.

표 1. GC-MS/MS 분석조건

GC-MS/MS system	GCMs-TQ8050				
Column	: Stabilwax (60 m x 0.25 mm x 0.25 μm)				
Injection volume	: 2 μL				
Injection mode	: Splitless (High pressure injection ; 250 kPa, 1 min)				
Injection temp.	: 250 °C				
Column flow	: 1 mL/min				
GC temp.	: 40 (1 min) → 20 °C/min → 250 °C (3 min)				
Ion Source temp.	: 200 °C				
Interface temp.	: 250 °C				
Acquisition mode	: MRM				

Compound	Ch 1 m/z	Ch 1 CE	Ch 2 m/z	Ch 2 CE
1. NDMA	74)44	7	74)42	21
2. NDMA-d <sub>6</sub>	80)50	6	80)46	18

### MFDS와 HAS 시험법의 전처리 과정

MFDS 시험법과 HAS 시험법에 공개된 메트포르민 전처리 과정은 아래 <그림 1>과 같다. 두 시험법 모두 1 N 염산을 이용해 용해한 후, Dichloromethane(이하, DCM)을 이용해 추출하여 유기용매층에 녹아 있는 NDMA를 분석하는 방법으로, 사용하는 용매의 양에는 차이가 있는 것을 확인할 수 있다.

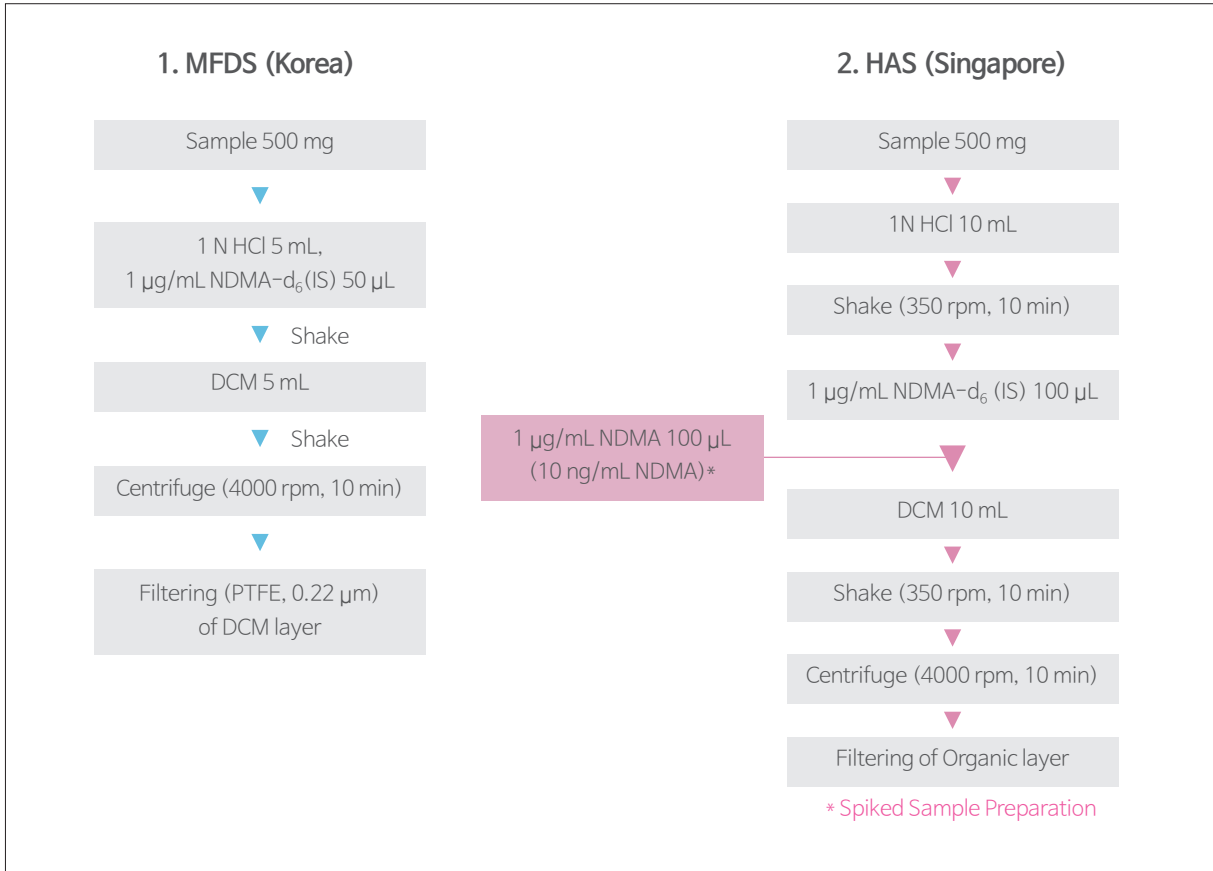


그림 1. MFDS 및 HAS 시험법의 Flow chart

### 한국 - MFDS의 GC-MS/MS법을 이용한 NDMA 분석 결과

#### 1. 검량선

NDMA 및 NDMA-d<sub>6</sub> 내부표준물질을 각각 DCM에 녹여 1 mg/L이 되도록 표준원액을 조제한 후, DCM으로 희석하여 NDMA는 1, 2, 5, 10, 20, 50 ng/mL이 되게 하였으며, NDMA-d<sub>6</sub>는 10 ng/mL이 되도록 첨가하여 검량선을 작성하였다.

NDMA 검량선과 크로마토그램은 <그림 2>와 같으며, 직선성은  $R^2 = 0.999$ 로 나타났다. 또한, <표 2>에서 보는 것과 같이 표준품 1 ng/mL에서 S/N은 51, 정량한계 LOQ는 1.9 ng/g, 5 ng/mL에서의 피크비대칭계수는 1.01로 나타났다.

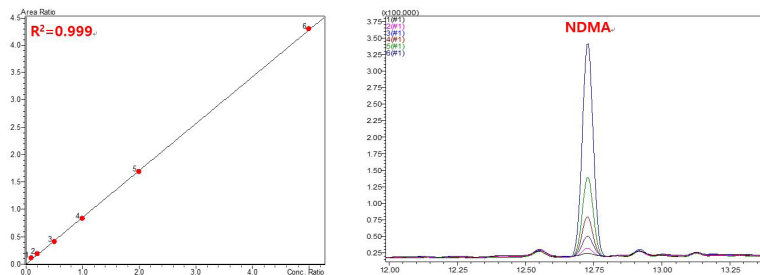


그림 2. MFDS 시험법에 따른 NDMA 검량선과 크로마토그램

표 2. NDMA와 NDMA-d<sub>6</sub>의 S/N, 비대칭계수, LOD 및 LOQ

NO	NDMA Conc. (ng/mL)	Area		S/N	Asymmetry Factor
		NDMA	NDMA-d <sub>6</sub>		
1	1	24,143	218,032	51	1.04
2	2	40,792	213,832	189	1.02
3	5	89,063	215,454	203	1.01
4	10	175,345	210,800	633	1.02
5	20	346,828	205,830	929	1.00
6	50	922,932	214,944	2957	1.01
LOD				0.06 ng/mL (0.6 ng/g)	
LOQ				0.19 ng/mL (1.9 ng/g)	

## 2. 시스템의 재현성

국내 MFDS 시험법에 따라 농도 5 ng/mL를 6회 반복했을 때, 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 피크면적의 상대표준편차(% RSD)는 <표 3>에서 보는 것과 같이 0.9 % 로 나타났으며, 이는 시험법에서 제시한 상대표준편차 5 % 이하에 적합한 것으로 나타났다.

표 3. NDMA 5 ng/mL를 이용한 시스템의 재현성 평가 (n=6)

Sample	No	Area		Area ratio (NDMA/NDMA-d <sub>6</sub> )	Area ratio Average	% RSD
		NDMA	NDMA-d <sub>6</sub>			
STD 5 ng/mL	1	90,878	201,550	0.45	0.45	0.9
	2	89,782	202,600	0.44		
	3	92,572	205,718	0.45		
	4	92,081	204,471	0.45		
	5	91,874	201,927	0.45		
	6	97,080	214,198	0.45		

## ■ 싱가포르 - HAS 시험법에 따른 회수율 시험

### 1. 검량선

NDMA 및 NDMA-d<sub>6</sub> 내부표준물질을 각각 DCM에 녹여 1 mg/L이 되도록 표준원액을 조제한 후, DCM으로 희석하여 NDMA는 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL이 되게 하였으며, NDMA-d<sub>6</sub>는 10 ng/mL이 되도록 첨가하여 검량선을 작성하였다.

NDMA 검량선과 크로마토그램은 <그림 3>과 같으며, 직선성은 R<sup>2</sup> = 0.999로 나타났다. 또한, <표 4>에서 보는 것과 같이 표준품 1 ng/mL에서 S/N은 80, 정량한계LOQ는 2.5 ng/g, 5 ng/mL에서의 피크 비대칭계수는 1.01로 나타났다.

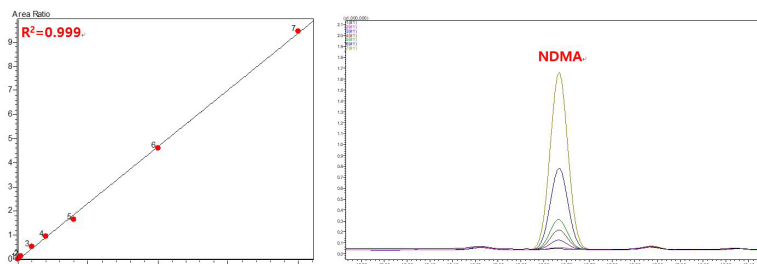


그림 3. HAS 시험법에 따른 NDMA 검량선과 크로마토그램

표 4. NDMA와 NDMA-d<sub>6</sub>의 S/N, 비대칭계수, LOD 및 LOQ

NO	NDMA Conc. (ng/mL)	Area		S/N	Asymmetry Factor
		NDMA	NDMA-d <sub>6</sub>		
1	0	-	506,693	-	-
2	1	52,399	466,909	80	1.03
3	5	244,552	463,484	317	1.01
4	10	443,233	463,595	485	1.01
5	20	789,289	478,505	936	1.02
6	50	2,088,526	453,322	1994	1.01
7	100	4,425,715	468,660	6768	1.01
LOD				0.04 ng/mL (0.8 ng/g)	
LOQ				0.12 ng/mL (2.5 ng/g)	

## 2. 회수율 평가

회수율 확인을 위해 싱가포르 HAS 시험법에 따라 검량선 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL가 되게 하였으며, 기기 검출농도가 10 ng/mL 이 되도록 7 세트 전처리를 수행하여 측정하였다. 이 때 사용한 검량선의 직선성은 <그림 3>과 같이  $R^2 = 0.999$ 로 나타났으며, 회수율은 <표 5>에서 보는 것과 같이 94.4 %, % RSD는 3.8 %로 나타났다. 또한, NDMA 및 NDMA-d<sub>6</sub>의 크로마토그램은 <그림 4>와 같다.

표 5. NDMA 회수율 평가 (10 ng/mL, n=7)

NO	Area		Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
	NDMA	NDMA-d <sub>6</sub>		
1	376,439	334,743	9.8	97.6
2	370,713	303,061	9.0	90.0
3	388,073	322,579	9.1	91.4
4	356,670	324,225	10.0	99.7
5	381,482	321,106	9.3	92.5
6	379,601	333,969	9.7	96.6
7	378,258	320,368	9.3	93.1
Average			9.5	94.4
% RSD			4.0 %	3.8 %

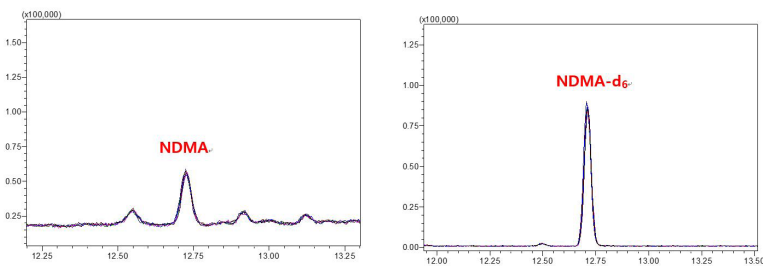


그림 4. NDMA & NDMA-d<sub>6</sub>의 크로마토그램 (n=7)

## ■ 결론

본 뉴스레터는 국내 MFDS 시험법인 'GC-MS/MS를 이용한 의약품 메트포르민 내 NDMA 분석법'을 바탕으로 NDMA 성분에 대해 분석법을 검토하여 검량선의 직선성, 비대칭계수, 재현성, 정량한계 등이 시험법에서 요구하는 적합 범위 내에 있는 것을 확인하였으며, 싱가포르 HAS 시험법 중 회수율 평가 항목에 대해서도 적합한 수준인 것으로 나타났다.

## ■ 참고 문헌

- 1) DETERMINATION OF N-NITROSODIMETHYLAMINE (NDMA) IN METFORMIN PRODUCTS BY HRAM-GCMS, Singapore, 2019
- 2) 식품의약품안전처, GC-MS/MS를 이용한 메트포르민 의약품 중 NDMA 시험법, 2020, [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_218/view.do?seq=33310](https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=33310)