

# Application News

No. SSK-LCMS-2002

## LC-MS/MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

LC-MS/MS를 이용한 사르탄계열 의약품 중 니트로사민류 11종 동시 분석법  
(Analysis of 11 Nitrosamines in Sartan-type Drugs by LC-MS/MS)

2018년에 고혈압 치료제인 발사르탄(Valsartan)에서 인체 발암 추정물질(IARC Group 2A)인 N-니트로소디메틸아민 (N-Nitrosodimethylamine, 이하 NDMA)이 검출<sup>1)</sup>되었으며, 2019년에는 위장병 치료제인 라니티딘(Ranitidine)에서 NDMA가 검출<sup>2)</sup>되었다. 또, 최근에는 당뇨병 치료제인 메트포르민 (Metformin)에서도 NDMA가 검출<sup>3)</sup>되는 등 제약 분야에서 원료물질 이외의 불순물이 검출되는 사례가 많이 발생하고 있다. 이 뉴스레터에서는 식품의약품안전처(이하 MFDS)에서 공개한 관련 분석법 중 '사르탄계열 의약품 중 니트로사민류 11종 동시 시험방법(LC-MS/MS)<sup>4)</sup>을 바탕으로 SHIMADZU LCMS-8050 시스템을 이용한 응용 자료를 소개하고자 한다.



그림 1. LC-MS/MS system

### ■ LC-MS/MS 시스템 구성 및 분석조건

사르탄계열 의약품 중 니트로사민류 분석을 위한 액체크로마토그래프-질량분석기의 세부 분석 조건은 아래 <표 1>, <표 2>와 같다. NMBA의 경우, MFDS 시험방법의 'negative ion'보다 'positive ion'에서의 감도가 우수하여 이 뉴스레터에서는 'positive ion' 조건으로 최적화하였다.

표 1. LC-MS/MS 분석조건

LC system	Nexera X3
Flow	0.3 mL/min
Mobile phase A	0.1 % Formic acid in water
Mobile phase B	Methanol
Gradient	20 % B (0.0-3.0 min) - 45 % B (3.5 min) - 60 % B (9 min) - 95 % B (10-16.0 min) - 20 % B (16.1-20.0 min)
Column	Restek Ultra PFPP (3.0 x 100 mm., 3 μm)
Column oven	40 °C
Injection volume	20 μL
MS system	LCMS-8050
Ionization	APCI
Nebulizing gas	N <sub>2</sub> , 3 L/min
Interface temp.	350 °C
DL temp.	200 °C
Heat block temp.	200 °C
Drying gas	N <sub>2</sub> , 5 L/min

표 2. MRM 조건

No	Name	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion CE(V)	Qualifier ion (m/z)	Qualifier ion CE(V)	Polarity
1	NDMA	75 > 43	-17	75 > 58	-10	+
2	NDEA	103 > 75	-14	103 > 47	-17	+
3	NMEA	89 > 61	-14	89 > 43	-14	+
4	NDPA	131 > 89	-12	131 > 43	-14	+
5	NDBA	159 > 103	-13	159 > 41	-20	+
6	NPYR	101 > 55	-17	101 > 41	-25	+
7	NPIP	115 > 69	-15	115 > 41	-20	+
8	NMOR	117 > 87	-12	117 > 45	-19	+
9	DIPNA	131 > 89	-11	131 > 43	-12	+
10	EIPNA	117 > 75	-10	117 > 43	-17	+
11	NMBA	147 > 117	-11	147 > 44	-13	+

■ 사르탄 계열 의약품 중 니트로사민류 11종 동시 분석을 위한 전처리 방법

MFDS 시험방법에 공개된 사르탄 계열 의약품의 전처리 과정은 <그림 2>와 같으며, 전처리에 사용되는 각 의약품(원료의약품, 완제의약품)의 성분별 무게는 <표 3> 과 같다. <표 3>과 같이 성분에 맞게 칭량한 시료를 25 % 메탄올에 용해하고, 원심분리한 상층액을 멤브레인 필터로 여과한 후 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다.

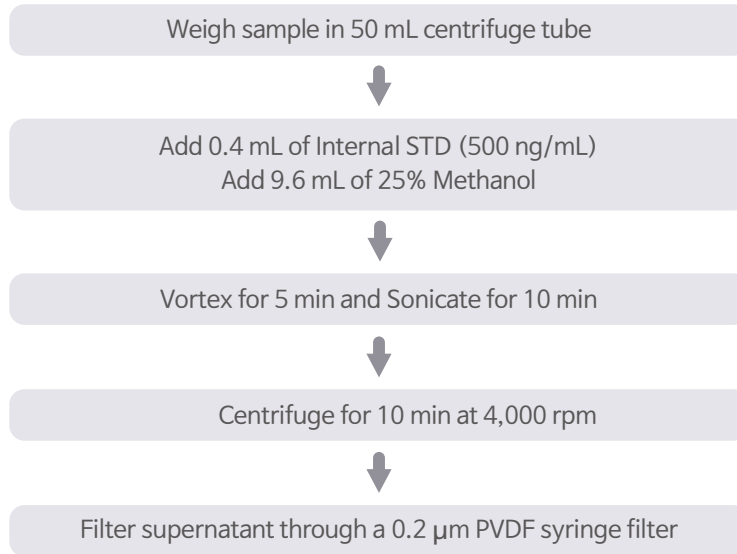


그림 2. MFDS 시험법의 전처리방법

표 3. 의약품 성분별 무게

의약품 성분명	무게 (mg)
발사르탄	150
로사르탄	50
올메사르탄	20
이르베사르탄	150
칸데사르탄	20
피마사르탄	50

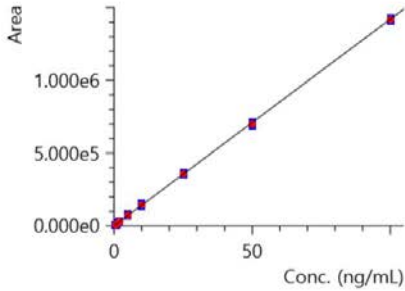
■ LC-MS/MS를 이용한 니트로사민류 11종 동시분석 결과

1. 검정곡선

니트로사민류 11종 표준물질 및 내부표준물질을 각각 25 % 메탄올에 녹여 500 ng/mL가 되도록 표준원액을 조제한 후, 25 % 메탄올로 희석하여 니트로사민류 11종 표준물질은 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL이 되게 하였으며, 내부표준물질은 20 ng/mL이 되도록 첨가하였다. 각 성분 별 검정곡선은 <그림 3>과 같으며, 결정계수( $R^2$ )는 모든 성분에서 0.99 이상으로 나타났다.

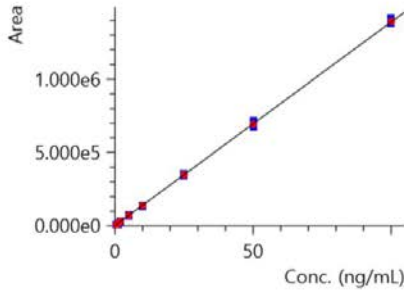
**ID1: NDMA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9997657$   $R = 0.9998828$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 14196.33x + 824.8575$   
Processing Method: External Standard



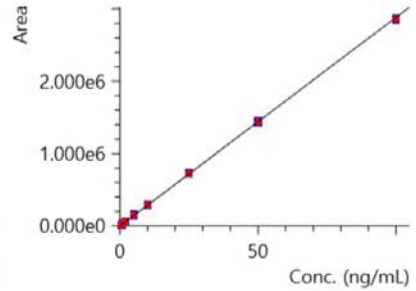
**ID2: NDEA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9999776$   $R = 0.9999888$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 13869.19x + 2403.354$   
Processing Method: External Standard



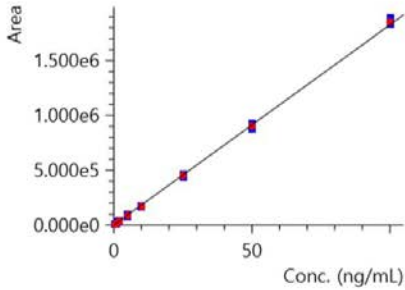
**ID3: NMEA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9994478$   $R = 0.9997239$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 28874.04x - 2516.306$   
Processing Method: External Standard



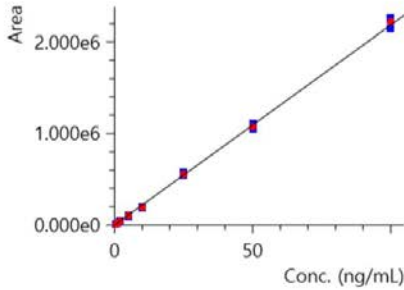
**ID4: NDPA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9995353$   $R = 0.9997676$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 18272.65x + 496.9575$   
Processing Method: External Standard



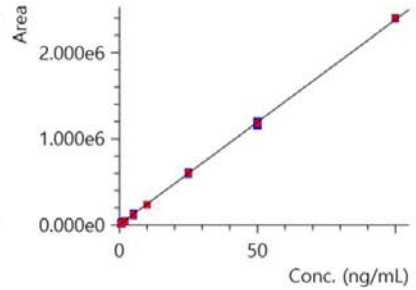
**ID5: NDBA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9989305$   $R = 0.9994651$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 21852.57x + 519.0229$   
Processing Method: External Standard



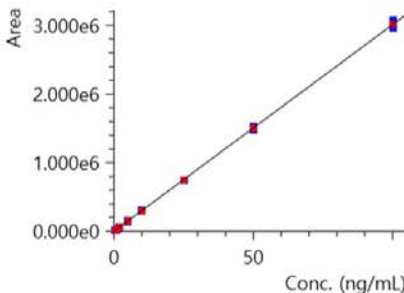
**ID6: NPYR**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9993095$   $R = 0.9996547$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 23779.01x + 4783.446$   
Processing Method: External Standard



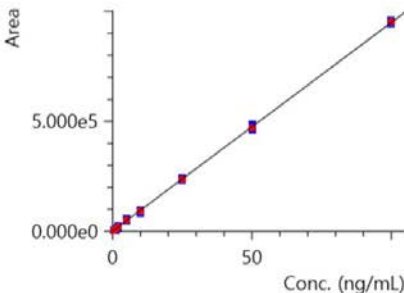
**ID7: NPIP**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9999657$   $R = 0.9999829$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 30126.09x + 1388.194$   
Processing Method: External Standard



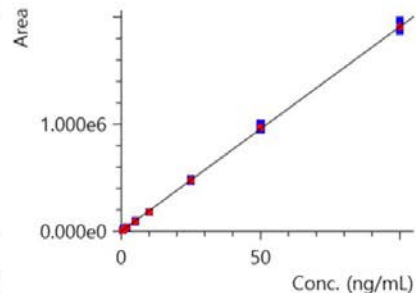
**ID8: NMOR**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9996304$   $R = 0.9998152$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 9482.551x + 1193.627$   
Processing Method: External Standard



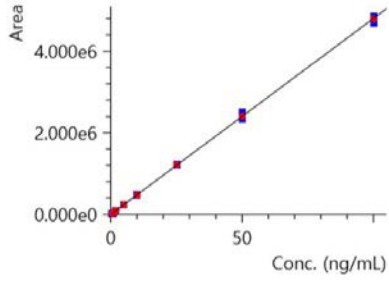
**ID9: DIPNA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9996814$   $R = 0.9998407$   
Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
| Weighting: 1/C | Equation:  $y = 19102.76x + 1124.071$   
Processing Method: External Standard



**ID10: EIPNA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9999364$   $R = 0.9999682$   
 Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
 | Weighting: 1/C | Equation:  $y = 48028.96x + 1557.179$   
 Processing Method: External Standard



**ID11: NMBA**

Correlation coefficient:  $R^2 = 0.9942718$   $R = 0.9971318$   
 Calibration curve: Curve type: Linear | Zero: Not Forced  
 | Weighting: 1/C | Equation:  $y = 29708.33x + 1423.361$   
 Processing Method: External Standard

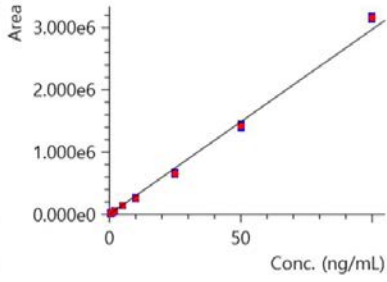


그림 3. 니트로사민류 11종의 검정곡선

2. 크로마토그램

농도 1 ng/mL의 니트로사민류 11종에 대한 개별 크로마토그램을 (그림 4)에 나타내었다.

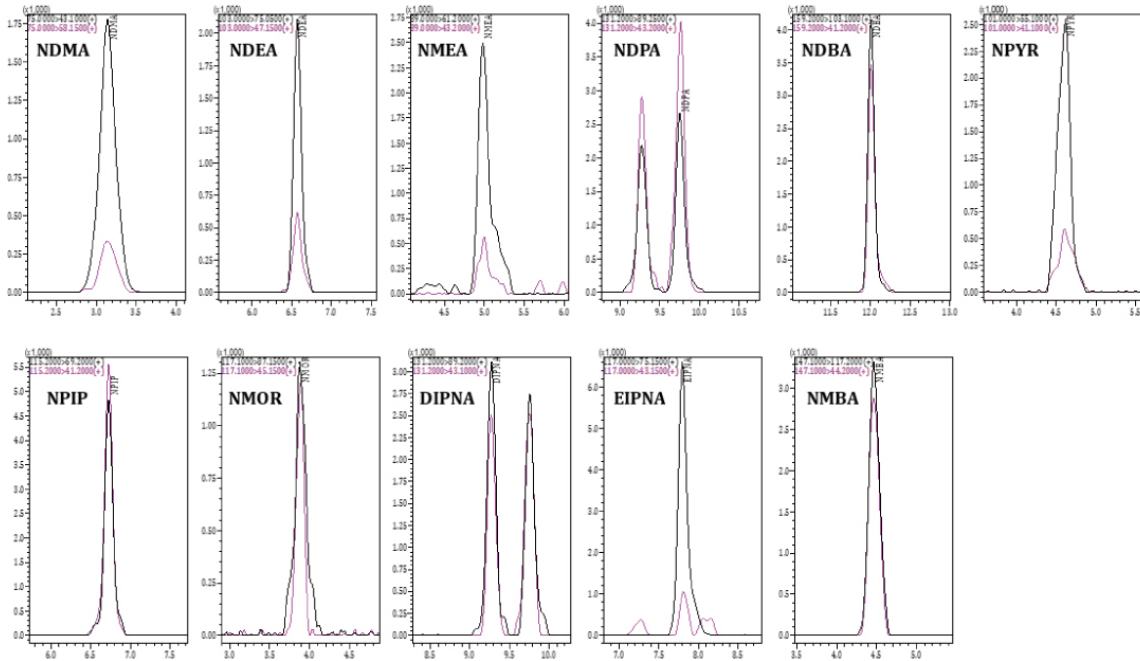


그림 4. 니트로사민류 11종 크로마토그램 (1 ng/mL)

### 3. 정확도 및 정밀도

정확도 및 정밀도는 정량범위 내 저농도, 중농도, 고농도 수준인 1 ng/mL, 5 ng/mL, 50 ng/mL 농도의 QC 용액을 조제하여 6회 반복 측정하는 것으로 산출하였으며, <표 4>에서 보는 것과 같이 정확도는 (92 ~ 110) %, 정밀도(% RSD, n=6)는 (1 ~ 5) % 수준으로 나타났다.

표 4. 니트로사민류 11종의 농도별 정확도 및 정밀도

#	성분명	1 ng/mL		5 ng/mL		50 ng/mL	
		정확도 (%)	정밀도 (% RSD)	정확도 (%)	정밀도 (% RSD)	정확도 (%)	정밀도 (% RSD)
1	NDMA	103	4.8	101	4.8	98	1.5
2	NDEA	103	4.7	101	3.9	100	1.6
3	NMEA	92	3.7	102	2.8	99	0.9
4	NDPA	105	4.7	96	4.5	99	1.7
5	NDBA	108	1.5	99	4.1	99	1.9
6	NPYR	96	4.0	98	2.4	99	1.5
7	NPIP	102	2.7	98	3.1	100	1.1
8	NMOR	103	4.7	106	5.2	98	1.2
9	DIPNA	103	2.3	97	4.9	102	2.5
10	EIPNA	102	1.8	101	1.9	100	2.9
11	NMBA	110	2.6	102	3.2	99	1.1

### 4. 회수율 시험

해당 분석법의 전처리 방법에는 분석물질인 니트로사민류만 추출하는 과정이 없기 때문에 샘플에는 과량의 의약품도 함께 존재하게 된다. 따라서 의약품에 의한 매트릭스 영향을 최소화하기 위해 사르탄 계열 의약품 중 이르베사르탄, 올메사르탄, 로사르탄, 발사르탄 원료를 UV 검출기로 분석하여 용출되는 시간을 확인하였으며, 방향전환밸브(divert valve)를 사용하여 분석 대상 성분인 니트로사민류 11종만 Mass spectrometer에 도입될 수 있도록 하였다. 니트로사민류 11종 및 원료 4종의 용출 순서는 <그림 5>와 같다.

회수율 시험은 이르베사르탄, 올메사르탄, 로사르탄, 발사르탄 원료의약품에 대해서 니트로사민류 11종의 표준용액을 5 ng/mL 농도로 첨가하여 평가하였으며, <표 5>에서 보는 것과 같이 (87 ~ 108) % 수준으로 나타났다. 단, NDBA의 경우, 로사르탄, 발사르탄의 원료물질과 인접하여 검출됨에 따라 매트릭스의 영향으로 인해 회수율을 확인할 수 없었으며, 정확한 NDBA 함량 확인을 위해서는 분리에 대한 추가적인 검토가 요구된다.

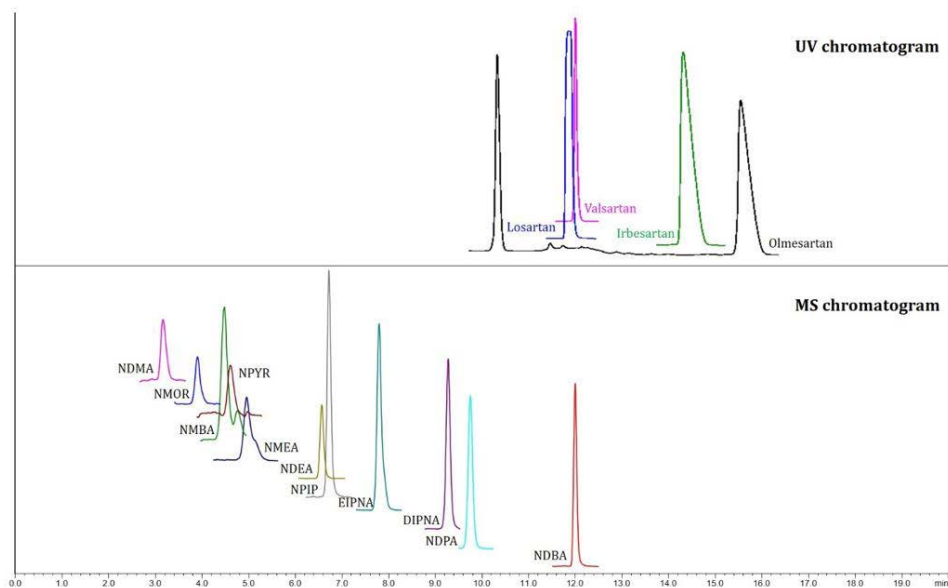


그림 5. 니트로사민류 11종 및 사르탄 계열 의약품 크로마토그램

표 5. 사르탄 계열 원료 4종에 대한 니트로사민류 11종 회수율 평가

#	성분명	회수율 (%)			
		이르베사르탄	올메사르탄	로사르탄	발사르탄
1	NDMA	99	98	91	94
2	NDEA	99	107	93	94
3	NMEA	99	103	97	99
4	NDPA	103	103	99	100
5	NDBA	99	107	-	-
6	NPYR	96	90	96	96
7	NPIP	102	103	98	99
8	NMOR	97	102	108	107
9	DIPNA	103	105	100	105
10	EIPNA	103	105	95	98
11	NMBA	87	91	100	103

### 5. 정량한계

정량한계는 니트로사민류 11종 표준용액 1 ng/mL를 기준으로 신호 대 잡음비(Signal to noise ratio, S/N) 10을 기준으로 산출하였으며, <표 6>에서 보는 것과 같이 (0.1 ~ 0.3) ng/mL수준인 것으로 나타났다. 또, MFDS 시험법의 시스템 적합성 기준인 1 ng/mL에서의 신호 대 잡음비도 (29 ~ 174) 수준으로 적합 기준인 10 이상으로 확인되었다.

표 6. 니트로사민류 11종의 신호대 잡음비 및 정량한계

#	성분명	신호대 잡음비 (1 ng/mL)	정량한계 (ng/mL)
1	NDMA	30	0.3
2	NDEA	58	0.2
3	NMEA	72	0.1
4	NDPA	62	0.2
5	NDBA	132	0.1
6	NPYR	32	0.3
7	NPIP	80	0.1
8	NMOR	29	0.3
9	DIPNA	70	0.1
10	EIPNA	174	0.1
11	NMBA	145	0.1

## ■ 결론

이 뉴스레터는 식품의약품안전처의 '사르탄계열 의약품 중 니트로사민류 11종 동시 시험방법 (LC-MS/MS)'에 따라 직선성, 정밀도, 정량한계를 평가하였다. 각 성분들의 검정곡선 결정계수( $R^2$ )는 0.99 이상으로 나타났으며, 정밀도는 5 % 이내, 표준용액 1 ng/mL에서의 신호 대 잡음비는 10 이상으로 시험법에서 요구하는 시스템 적합 범위에 있는 것으로 확인되었다. 또, 정확도는 성분에 따라 (92 ~ 110) % 수준으로 확인되었으며, 회수율은 의약품 원료에 따라 (87 ~ 108) % 수준으로 확인되었다.

## ■ 참고 문헌

- 1) 식품의약품안전처, 안전성 서한 배포 알림 (발사르탄 함유 제제)  
<https://nedrug.mfds.go.kr/pbp/CCBAC01/getItem?totalPages=1&limit=10&searchYn=true&page=1&title=%EB%B0%9C%EC%82%AC%EB%A5%B4%ED%83%84&safeLetterNo=277>
- 2) 식품의약품안전처, 의약품 안전성 서한 배포 알림 (라니티딘 제제)  
<https://nedrug.mfds.go.kr/pbp/CCBAC01/getItem?totalPages=1&limit=10&searchYn=true&page=1&title=%EB%9D%BC%EB%8B%88%ED%8B%B0%EB%94%98&safeLetterNo=435>
- 3) 식품의약품안전처, '메트포르민' [당뇨병치료제] NDMA 검출 여부 직접 조사 중  
[https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_99/view.do?seq=43866](https://www.mfds.go.kr/brd/m_99/view.do?seq=43866)
- 4) 식품의약품안전처, 사르탄계열 의약품 중 니트로사민류 11종 동시 시험방법 (LC-MS/MS)  
[https://mfds.go.kr/brd/m\\_218/view.do?seq=33300](https://mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=33300)