SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. 06-SAIP-082-LC-041-ENK

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS™-8045

USP General Chapter <1469> 에 따른 LC-MS/MS 시스템을 이용한 5종의 사르탄에서 6종 니트로사민의 정량분석

요약

◆ USP general chapter <1469>에 따른 LCMS를 이용한 5 종의 사르탄류 중 6 종의 니트로사민 정량분석 했다.

◆ LCMS-8045 시스템으로 USP general chapter <1469>의 기준을 만족했다.

❑ 배경

개요: 2018년 7월 의약품 규제당국은 발사르탄을 함유한 제품에서 니트로사민 불순물(NAS)인 N-니트로소메틸아민(NDMA)이 존재한다는 사실을 처음으로 발견했다. 발사르탄은 앤지오텐신 II 수용체차단제 (ARB)이며 일반적으로 사르탄류라고하는 유사 화합물 계열에 속한다. 더 나아가 N-니트로소메틸아민(NDMA), N-니트로소-N-메틸-4-아미노부티르산(NDBA), N-니트로소에틸아민(NDEA), N-니트로소에틸이소프로필아민(NEIPA), N-니트로디이소프로필아민(NDIPA), N-니트로소디부틸아민(NDBA)을 포함하는 다른 니트로사민류는 사르탄 계열에 속하는 다른 제제와 원료의약품(API's), 완제품(FPP)에서 거의 검출되지 않았다.

발생 : 니트로사민의 생성은 2차, 3차 또는 4차 아민과 아질산염이 산성반응 존재 하에서 생성이 가능하다. 이러한 조건에서 아질산염은 아질산을 형성할 수 있으며 이는 아민과 반응하여 니트로사민을 형성할 수 있습니다. 이 외에도 시작 물질 및 원료, 회수 용매, 촉매 및 시약, 일반적 제조공정에서의 교차오염, 아질산을 이용한 담금질 공정, 포장 및 보관 같은 도매업체의 경로에서도 니트로사민의 생성과 오염을 초래한다.

독성효과/규정/분석법 : NDMA와 NDEA는 인간 발암물질로 분류된 매우 강력한 돌연변이 발암물질 그룹인 소위 "관심 집단"에 속한다. 이에 미국식품의약국(USFDA)은 NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NMPA에 대하여 <표 1>과 같이 허용 섭취 제한량(AI's)을 권고하였다. 이러한 제한은 의약품 일일 최대 복용량인(MDD) 880 mg/day에 대해 약품에서 최소 0.3 ppm이 단일 니트로사민 있는 경우에만 적용된다. 만약 동일한 약품에서 1개 이상의 니트로사민 불순물이 확인 되더라도 전체 니트로사민의 허용량은 표 1에 나타낸 26.5 ng/day 또는 0.3 ppm 미만이다.

따라서 위에서 언급한 니트로사민류의 정량한계(LOQ)보다 가능한 낮게 검출하여 단일 니트로사민 불순물이 0.03ppm 미만일 뿐만 아니라 총 니트로사민 불순물도 0.03ppm 미만인지 확인해야 한다.

표 1. 니트로사민 허용섭취량

Nitrosamine	AI Limit (ng/day)	Limit in ppm for MDD 880 mg/day
NDMA	96	0.019
NMBA	96	0.019
NDEA	26.5	0.03
NEIPA	26.5	0.03
NMPA	26.5	0.03
NDIPA	26.5	0.03

미국약전(USP)은 5개의 다른 사르탄류, 즉 올메사르탄, 텔미사르탄, 이르베사르탄, 로사르탄, 발사르탄에서 6개의 니트로사민류를 정량화 하기 위해 제안된 General Chapter <1469> 를 발표했다. 이 뉴스레터에서 "Procedure 3"은 Raptor ARC-C18 (150 mm X 3.0 mm x 2.7 µm)을 사용하여 LCMS-8045 시스템에서 수행되었다. Shim-pack velox SP-C18 (150 mm X 3.0 mm x 2.7 µm) (Part-no 227-32004-04) 에 대해서도 평가를 진행하였으며, raptor 컬럼과 동등한 성능인 것으로 확인하였다.

❑ 실험

NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA 및 NDBA 등 6개의 니트로사민류는 일본 시마즈사의 고성능 액체크로마토그래피(UHPLC)인 NEXERA XS와 삼중사중극자 질량분석기인 LCMS-8045를 사용하여 분석했다.(그림 1.)

LCMS-8045는 탁월한 감도(UFsensitivity), 30,000 u/sec (UFscanning)의 초고속 스캔 속도 그리고 5 msec (UF switching)의 극성 전환 속도로 삼중사중극자 기술의 새로운 기준을 제시하였다. 이 시스템은 높은 수준의 신뢰성과 함께 최고 품질의 데이터를 보장한다.

6 개의 니트로사민은 모두 중간 극성화합물이며, 대기압 화학 이온화(APCI) 인터페이스로 쉽게 이온화 되었다.

그림 1. Nexera XS가 장착된 LCMS-8045 시스템

❑ 방법

6 개의 니트로사민류와 4 개의 내부표준물질에 대한 MRM 조건은 <표 2> 에 나타내었으며, 분석조건은 <표 3> 에 나타내었다.

표 2. 니트로사민류의 MRM 조건

MRM Transitions			
Nitrosamine Impurity	Acquisition Mode	Polarity	MRM (Quantifier, Qualifier)
NDMA	MRM	Positive	75>43,75>44
NDMA-d_6	MRM	Positive	81>46,81>64
NMBA	MRM	Positive	147>44,147>117
NMBA-d_3	MRM	Positive	150>47,150>120
NDEA	MRM	Positive	103>75,103>47
NDEA-d_{10}	MRM	Positive	113>34,113>49
NEIPA	MRM	Positive	117>75,117>45
NDIPA	MRM	Positive	131>89,131>47
NDBA	MRM	Positive	159>41,159>29
NDBA-d_{18}	MRM	Positive	177>66,177>46

표 3. 분석조건

HPLC System	: NexeraXS
Column	: Raptor ARC-18 (150mm X 3.0mm x 2.7μm) or Shim-pack velox SP-C18 (150mm X 3.0mm x 2.7μm) (Part-no : 227-32004-04) as equivalent column
Column Oven	: 60 °C
Mobile Phases	: A-0.1% Formic acid in Water; B-0.1% Formic acid in Methanol
Flow Rate	: 0.5mL/min
Gradient program (B%)	: 0-1.5 min → 3(%);1.5-4 min → 3-50(%);4-7 min → 50-75 (%);7-8.1 min → 75-85 (%);8.1-9.2min → 85-95(%);9.2-12 min → 95 (%);12-12.1 min → 95-3 (%);17 min → STOP
Injection Volume	: 20 μL
LCMS System	: LCMS-8045 : APCI
Température	: Interface: 270°C Desolvation Line: 220°C HeaterBlock: 220°C
Gas Flow	: NebulizingGas: 3 L/min Drying Gas: 3 L/min

대표적인 사르탄류의 UV 크로마토그램과 니트로사민류의 LCMS 크로마토그램을 <그림 2>에 나타내었다.

❑ 니트로사민의 직선성

4 개의 내부표준물질과 6 개의 니트로사민류에 대한 9 개 포인트의 검정곡선은 1 %의 포름산이 함유된 물로 조제하였으며, <표 3>에 명시된 조건으로 분석하였다. <그림 3>에서 <그림 8>은 각각 NDMA, NMBA, NDEA, NEIPA, NDIPA 및 NDBA에 대한 검량선, 검량선의 농도별 중첩된 크로마토그램 그리고 정량한계(LOQ)에 대한 크로마토그램을 나타낸 것이다.

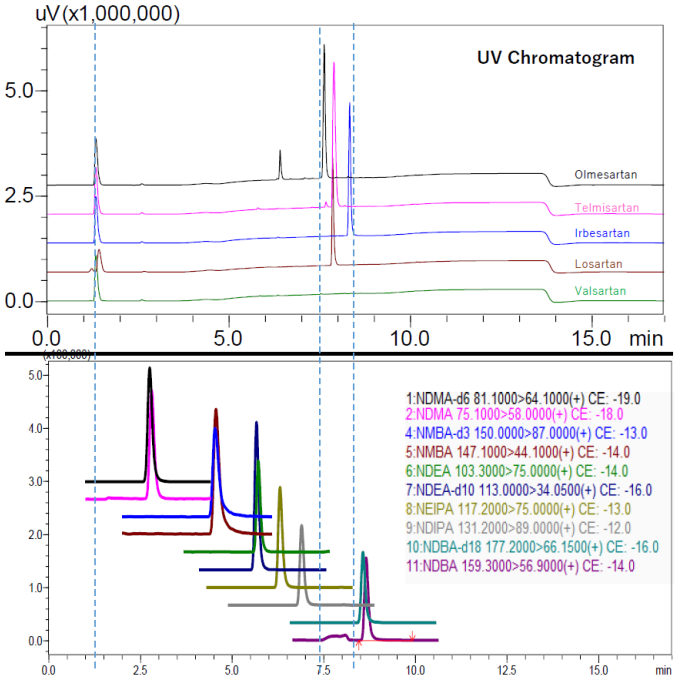

그림 2. 6 개 니트로사민의 LCMS 크로마토그램과 5 개 사르탄의 UV 크로마토그램

NDMA

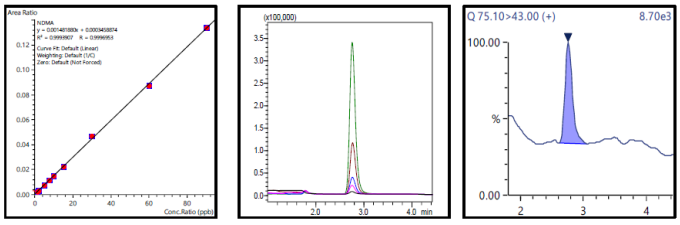

그림 3. NDMA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

NMBA

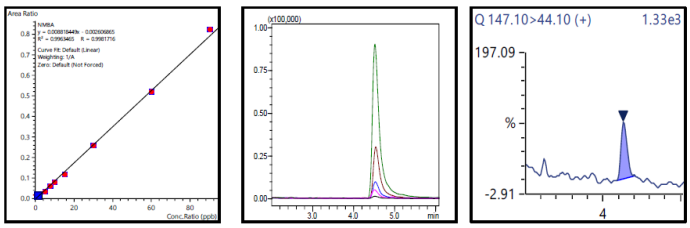

그림 4. NMBA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

NDEA

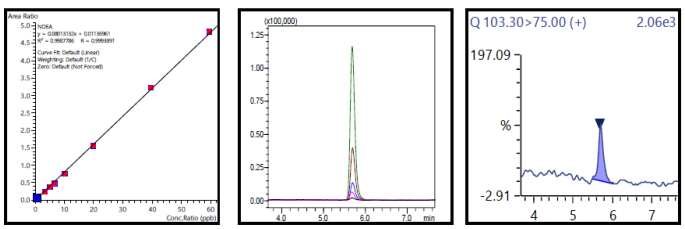

그림 5. NDEA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

NEIPA

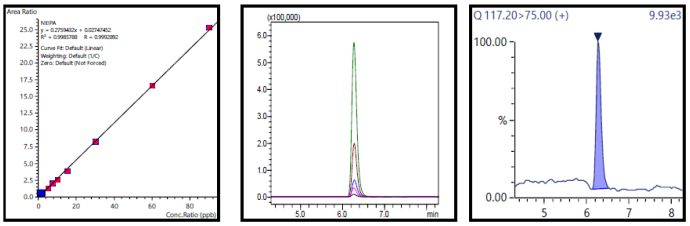

그림 6. NEIPA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

NDIPA

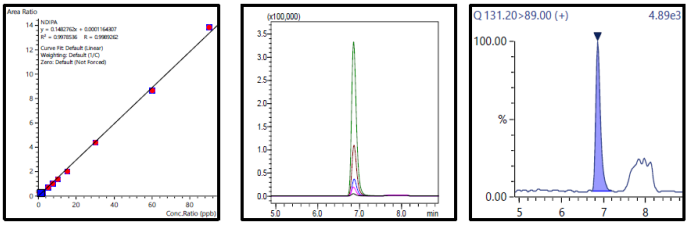

그림 7. NDIPA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

NDBA

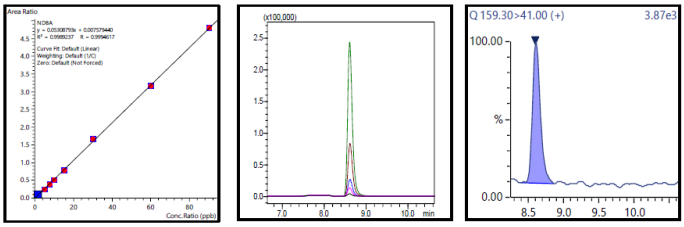

그림 8. NDBA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

표 4. 검량선 결과

성분	검량선 범위 (ppb)	R^2	정량한계 (LOQ)		
			농도 (ppb)	%RSD (n=6)	S/N
NDMA	1.33 to 90	0.999	1.33	2.68	25.34
NMBA		0.998		15.66	15.08
NEIPA		0.999		10.3	40.19
NDIPA		0.998		1.85	90.03
NDBA		0.999		3.66	89.85
NDEA	0.66 to 59.4	0.999	0.66	5.90	29.84

검량선의 범위, 신호대잡음비(S/N ratio)로 계산된 정량한계(LOQ) 및 정량한계(LOQ)에서의 % RSD를 <표 4>에 나타내었다.

❑ 시료 분석

의약품 시료 80 mg을 원심분리 튜브에 넣고, 희석용매 1188 µL와 내부표준물질 12 µL를 추가한다. 로사르탄을 제외하고(로사르탄은 5분간) 2,500 rpm 으로 20분동안 섞어준다. 그리고, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 0.22 µm의 hydrophilic PTFE 시린지 필터로 상등액을 여과한 후, LCMS 분석로 분석한다.

전체 농도는 66.6 mg/mL였으며, 정량한계(LOQ) 수준에서의 5 개의 사르탄류 시료의 대한 회수율 평가 결과는 <표 5>와 같다.

표 5. 정량한계 농도에서 사르탄류 5 종에 대한 회수율 평가

0.03 ppm 니트로사민 5 종과 0.014 ppm NDEA에 대한 회수율(%) 결과					
	Olmesartan	Telmisartan	Irbesartan	Losartan	Valsartan
NDMA	90.7	86.9	114.2	95.7	92.1
NMBA	117.7	114.5	108	112.6	118.7
NEIPA	94.5	93.7	94.4	93.7	93.7
NDIPA	100.7	105.5	98.0	81.4	86.1
NDBA	104.5	110.5	115.2	108.7	111.8
NDEA	71.8	73.2	99.6	77.1	86.8

참고: USP <1469>에 따른 회수율(%) 기준은 70 % ~ 130%임.

❑ 결론

- 제안된 미국약전의 General Chapter <1469> (Procedure 3)에 따른 5 개의 사르탄류 내 6 개의 니트로사민류에 대한 LC-MS/MS 정량분석법이 시마즈 LCMS-8045 시스템에 성공적으로 적용되었다.
- 내부표준물질 방법으로 6 개의 니트로사민류에 대해 9 개의 검량선 농도로 진행하였다.
- 상관계수는 니트로사민류 6 종 모두 0.99 이상이었다.
- 정량한계(LOQ) 수준에서의 반복성(n=6)에 대한 상대표준편차(% RSD) 25 % 이하로 나타났다.
- 정량한계(LOQ) 농도 수준에서 5 개 사르탄류에 대해 회수율 평가를 수행한 결과, 70 % ~ 130 % 수준으로 적합한 것으로 나타났다.

SHIMADZU

SHIMADZU Scientific Korea Corp.
www.shimadzu.co.kr

Copyright © 2018 SHIMADZU group. All rights reserved.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China.
This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu.
Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".
Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".
Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

본 사 TEL 02)540-5541 FAX 02)540-2163
서울사무소 TEL 02)540-5061 FAX 02)3442-6737
기술연구소 TEL 02)540-5960 FAX 02)540-5980
대전사무소 TEL 042)864-1161 FAX 042)864-1164
천안사무소 TEL 041)910-5670 FAX 041)910-5672
대구사무소 TEL 053)746-5541 FAX 053)746-5560
부산사무소 TEL 051)301-5400 FAX 051)301-5405
울산사무소 TEL 052)249-5541 FAX 052)249-2163
광주사무소 TEL 062)263-1293 FAX 062)263-1295
여수사무소 TEL 061)921-5542 FAX 061)921-5543
전주사무소 TEL 063)273-5540 FAX 063)273-5547
스 펙 크 룸 TEL 02)540-0078 FAX 02)540-1278