

**USP General Chapter <1469> 에 따른 HSGC-MS/MS 시스템을 이용한 원료의약품에서 7종 니트로사민의 정량분석**

**요약**

◆ USP General Chapter <1469>의 절차-2에 따른 HSGC-MS/MS 이용한 로사르탄 원료의약품에서 7종의 니트로사민의 분석

**□ 배경**

**개요:** 2018년 7월 의약품 규제당국은 발사르탄을 함유한 제품에서 니트로사민 불순물 (NAS) 인 N-니트로소메틸아민(NDMA)이 존재한다는 사실을 처음으로 발견했다. 발사르탄은 엔지오텐신 II 수용체차단제 (ARB)이며 일반적으로 사르탄류라고하는 유사 화합물 계열에 속한다. 더 나아가 N-니트로소메틸아민(NDEA), N-니트로 디 이 소 프 로 필 아 민 (NDIPA), N-니트로 소 메틸 이 소 프 로 필 아 민 (NEIPA), N-니트로 소 디 부 틸 아 민 (NDBA) N-니트로 소 디 프 로 필 아 민 (NDPA), N-니트로소메틸피페리딘 (NMPrZ)을 포함하는 다른 니트로사민류는 사르탄 계열에 속하는 다른 제제와 원료의약품 (API's), 완제품 (FPP)에서 거의 검출되지 않았다.

**니트로사민은 무엇인가?:** 니트로사민 니트로소 작용기를 포함한 모든 분자를 의미한다. 물론 이것들은 일부 식품이나 식수공급에서 존재하기도 하지만 약물에서의 존재는 허용할 수 없는 것으로 여겨진다.

**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 1>에 나타난 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

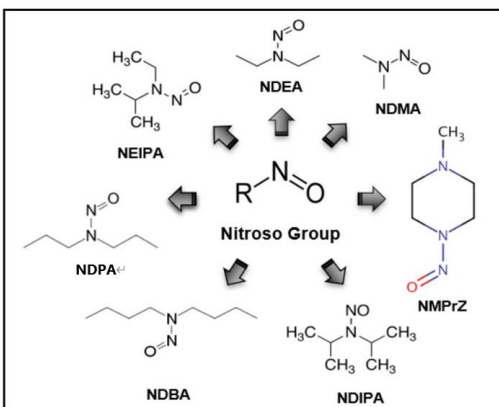


그림 1. 니트로소 그룹인 NDMA, NDEA, NEIPA, NDIPA, NDPA, NDBA, 및 NMPrZ의 구조

**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.

니트로사민이 발생하는 낮은 수준은 의약품 테스트에 어려움을 초래하고 미국식품의약국 (USFDA) 의약품에서 니트로사민을 결정할 때 고려할 수 있는 여러 테스트 방법을 발표하는 데 도움이 되었다. 또한 최근에 미국약전 (USP)은 사르탄류에서 니트로사민에 대해 제안된 제너럴 챕터 <1469>를 발표했다.

제안된 장은 원료의약품과 완제의약품에서 니트로사민 불순물의 적절한 관리를 위해 발전된 현재의 과학적 및 규제적 접근방식과 일치한다. 이 표준의 목적은 니트로사민 불순물 제어를 위한 과학기반 접근방식을 제공하여 의약품에서 불순물을 제거하거나 줄이는 것이다. 이 응용자료는 제너럴 챕터<1469>의 절차-2를 기반으로 했다.



그림 2. GCMS-TQ<sup>TM</sup>8050 NX 와 HS-20 시스템

□ 방법

7 개의 니트로사민류 표준물질과 1 개의 내부표준물질에 대한 MRM 조건은 <표 2> 에 나타내었으며, 분석조건은 <표 3> 에 나타내었다.

표 2. 니트로사민류의 MRM 조건

MRM Transitions				
Nitrosamine Impurity	MRM-1	CE-1	MRM-2	CE-2
NDMA	74.00 > 44.10	6	74.00 > 42.10	21
NDMA-d <sub>6</sub>	80.00 > 50.00	5	Not Applicable	
NDEA	102.00 > 85.10	6	102.00 > 56.10	15
NEIPA	116.00 > 99.10	5	71.00 > 56.100	5
NDIPA	130.00 > 88.00	6	130.10 > 42.20	12
NDPA	130.10 > 113.10	6	130.10 > 43.20	18
NDBA	116.00 > 99.10	5	158.00 > 99.00	10
NMPrZ	99.00 > 56.10	12	99.00 > 72.10	9

표 3. 분석조건

GCMS System	: GCMS-TQ8050 NX with HS-20		
Column	: HS Stabilwax 30-meter, 0.32 mm I.D., 1.0 μm d <sub>f</sub>		
Injection Mode	: Split		
Flow control Mode	: Column Flow		
Carrier Gas	: Helium		
Column Flow	: 1.8 mL/min		
Diluent	: Methanol-Acetonitrile		
Time Program	Ramp Rate (°C./min)	Temp (°C)	Hold Time (min)
	-	45.00	3.00
	10	130.00	3.00
	15	190.00	0.00
40	240.00	15.25	
MS Parameter			
Ionization Mode	: Electron Ionization(EI)		
Ion Source Temp	: 250 °C		
HS Parameter			
Oven Temp	: 110 °C		
Pressurizing Gas Pressure	: 20 psi		
Shaking Level	: off		
Equilibrating Time	: 10.0 Min		
Load Time	: 2.0 Min		
Injection Time	: 1.0 Min		
Cycle Time	: 45.00 Min		

□ 시료 분석

헤드스페이스 바이알에 100 mg 의 이미다졸(imidazole)과 로사르탄 원료의약품 200 ± 10 mg을 넣는다. 아세토니트릴에 녹아 있는 16.0 μL/L의 내부표준물질 1.0 mL와, 메탄올 1.0 mL 를 추가한다. 그리고 바이알을 조여준다.

□ 회수율 첨가 분석

헤드스페이스 바이알에 100 mg 의 이미다졸(imidazole)과 로사르탄 원료의약품 200 ± 10 mg을 넣는다. 아세토니트릴에 녹아 있는 16.0 μL/L의 내부표준물질 1.0 mL와, LOQ 용액 1.0 mL 를 추가한다. 그리고 바이알을 조여준다.

N-니트로소디메틸아민(NDMA)

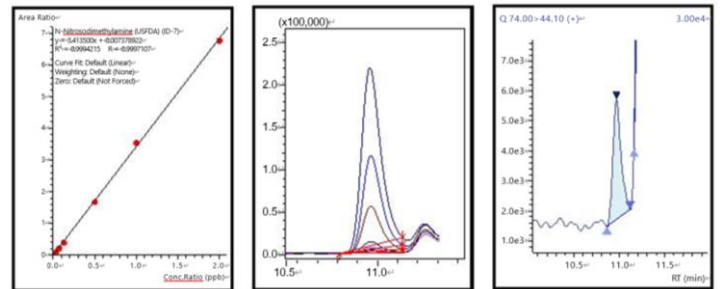


그림 3. NDMA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

N-니트로소디에틸아민(NDEA)

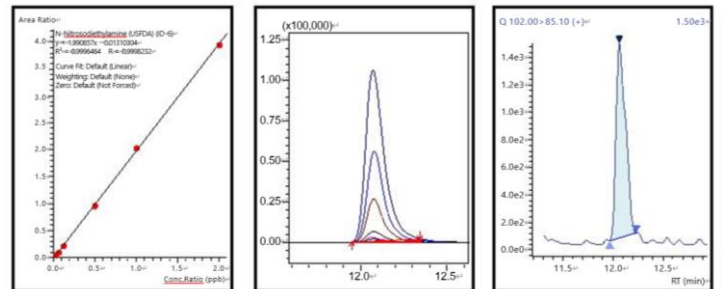


그림 4. NDEA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

N-니트로에틸이소프로필아민(NEIPA)

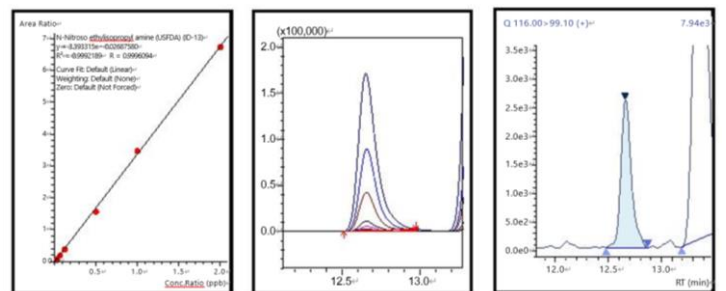


그림 5. NEIPA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

N-니트로디이소프로필아민(NDIPA)

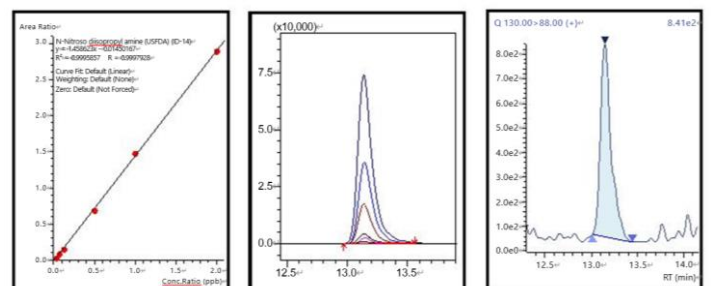


그림 6. NDIPA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

**N-니트로소디프로필아민(NDPA)**

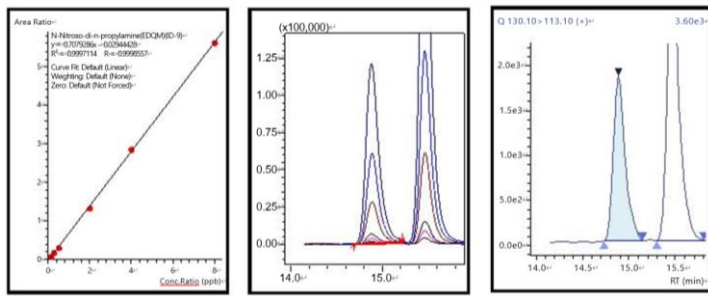


그림 7. NDPA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

**N-니트로소디부틸아민(NDBA)**

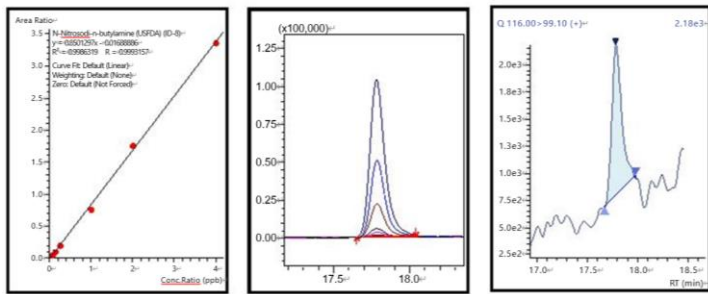


그림 8. NDBA의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

**N-니트로소메틸피페리딘(NMPPrZ)**

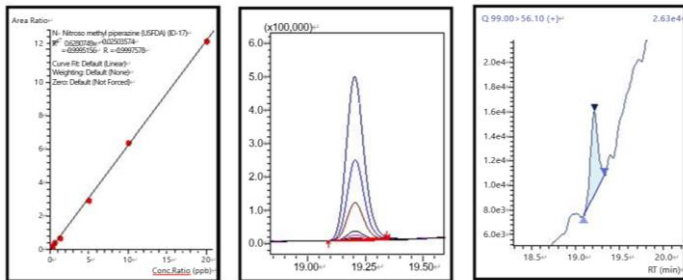


그림 9. NMPPrZ의 검량선, 농도별 표준물질과 정량한계 크로마토그램

표 4. 검량선 결과

성분	검량선 범위 (ppb)	R <sup>2</sup>	정량한계 (LOQ)		
			농도 (ppb)	%RSD (n=6)	S/N*
NDMA	2.5 to 160	0.999	2.5	8.5	50
NDEA		0.999		12.6	472
NEIPA		0.999		6.6	651
NDIPA		0.999		9.5	399
NDPA	10 to 640	0.999	10	7.5	612
NDBA	5 to 320	0.999	5	9.2	58
NMPPrZ	25 to 1600	0.999	25	14.6	28

\* = Peak to Peak

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

표 5. 정량한계 농도에서 로사르탄 원료의약품에 시료 첨가 연구 (결과는 시료에 상대적임)

로사르탄 원료의약품				
이름	Sampl Amt. (ppb)	Amt. Spiked (ppb)	Found Amt. (ppb)	% Recovery
NDMA	Below LOQ	2.5	2.63	105
NDEA	Below LOQ	2.5	2.24	90
NEIPA	Below LOQ	2.5	2.44	97
NDIPA	Below LOQ	2.5	3.19	127
NDPA	Below LOQ	10.0	10.56	106
NDBA	Below LOQ	5.0	5.54	111
NMPPrZ	Below LOQ	25.0	27.75	111

표 6. USP<1469>와 시마즈 자료의 정량한계 비교

	USP <1469>	Shimadzu Application Note
	LOQ (ppb)	LOQ (ppb)
NDMA	20.0	2.5
NDEA		
NEIPA		
NDIPA		
NDPA	Not Applicable	10.0
NDBA		5.0
NMPPrZ		25.0

**□ 결과**

- USP 제너럴 챕터는 4개의 NSA(NDMA, NDEA, NEIPA 및 NDIPA)에만 적용되는 반면 Shimadzu 방법은 추가로 3개의 NSA의 정량에 사용할 수 있다. (NDPA, NDBA 및 NMPPrZ)
- 상관 계수(r<sup>2</sup>)는 7가지 니트로사민에 대해 0.999보다 컸다.(표 4)
- LOQ 수준에서 반복성(n=6)은 15% RSD 미만인 것으로 나타났다. (표 4)
- 회수율 분석은 LOQ 수준에서 진행되었으며 70~130%의 허용 기준과 일치했다. (표 5)

**□ 결론**

고감도 차폐 검출기를 탑재한 시마즈 GCMS-TQ8050 NX는 감도, 반복성, 정밀성이 뛰어나며 8배 이상의 감도를 제공하여 현재의 규제 한계를 뛰어넘는 뛰어난 노이즈 제거 기능을 제공한다.

Copyright © 2018 SHIMADZU group. All rights reserved.



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

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  
스팩 크롬 TEL 02)540-0078 FAX 02)540-1278