SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. SSK-LCMS-2205

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8050

LC-MS/MS를 이용한 사르탄계열 의약품 중 Azido 불순물의 정량분석

Quantitative analysis of Azido impurity in Sartan-type Drugs using LC-MS/MS

■ 서론

사르탄계열 원료의약품의 Azido 불순물인 AZBT(5-(4`-(azidomethyl)-[1,1`-biphenyl]-2yl)-1H tetrazole)는 유전적인 돌연변이를 일으키는 물질로 알려져 있으며, 이와 관련하여 2021년 5월 캐나다에서는 Azido 불순물이 초과 검출된 원료의약품 이르베사르탄, 발사르탄, 로사르탄에 대해 회수 조치를 취하였다. 이에 국내 식품의약품안전처(이하, 식약처)에서도 'LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법'을 고시하여 분석 기준을 제시하였다.[1]

이 뉴스레터에서는 식약처에서 고시한 시험법을 바탕으로 Shimadzu LCMS-8050을 이용하여 AZBT의 정량한계, 검정곡선, 재현성 및 첨가회수율 등을 검토하였다.

Shimadzu LCMS™-8050

■ 분석조건

AZBT 분석에 대한 기기 분석 조건 및 MRM 조건은 각각 표 1과 표 2에 나타내었다.

표 1. LC-MS/MS 분석 조건

Liquid Chromatography		Mass spectrometry	
System	: Nexera X3	System	: LCMS-8050
Analytical Column	: Shim-pack Velox PFPP (2.1 x 150 mm., 2.7 µm)	Ionization method	: ESI (+)
Flow rate	: 0.4 mL/min	Nebulizer gas flow	: 3 L/min
Mobile phase	: (A) 0.1 % Formic Acid in Water	Dry gas flow	: 10 L/min
	: (B) 0.1 % Formic Acid in Methanol	Heating gas flow	: 10 L/min
Gradient	: 30 % B (0-2.0 min) - 50 % B (2.5-11.0 min) - 95 % B (11.5 - 12.5) - 30 % B(12.6 - 15.0 min)	Interface temp.	: 300 ℃
Column Temp.	: 35 ℃	Desolvation Line temp.	: 250 ℃
Autosampler Temp.	: 4 ℃	Heat block temp.	: 400 ℃
Injection volume	: 5 µL		

표 2. MRM (Multiple Reaction Monitoring) 조건

MRM Condition						
Target compound	Polarity	Q1 m/z	Q3 m/z	Q1 Voltage (V)	Collision Energy (V)	Q3 Voltage (V)
AZBT	Positive	277.9	235.1	-14	-9	-25
		277.9	207.1	-14	-15	-14

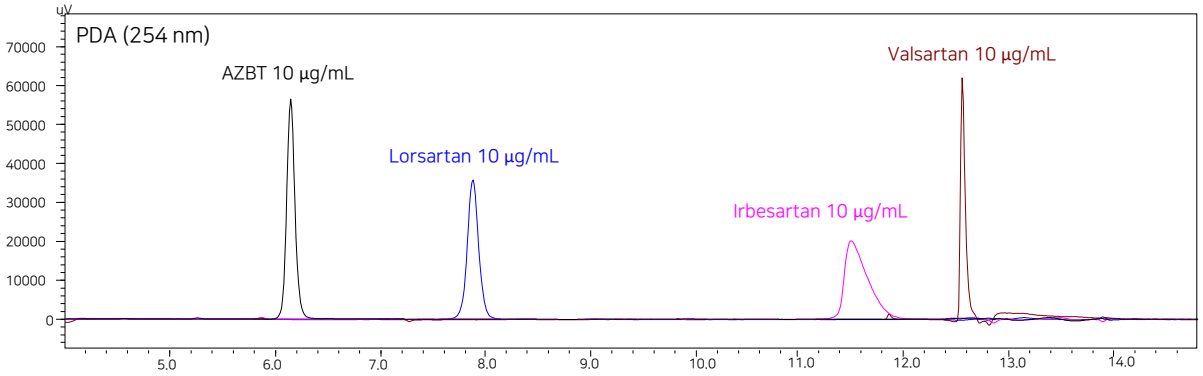

그림 1. AZBT와 사르탄계열 원료의약품의 PDA 크로마토그램

■ AZBT와 사르탄계열 원료의약품의 분리

각 성분 피크의 분리도 및 머무름 시간을 확인하기 위해 AZBT와 사르탄계열 원료의약품을 75 vol% 메탄올로 희석하여 표 1의 LC 분석 조건으로 PDA 검출기를 사용하여 분석하였다. 분석결과, AZBT, 이르베사르탄, 발사르탄 및 로사르탄의 용출순서는 그림 1과 같다. 그림 1의 크로마토그램을 바탕으로 질량분석기의 오염을 막기위해 방향전환밸브를 이용하여 분석 대상 성분인 AZBT만 질량분석기에 도입되고, 원료의약품은 도입되지 않도록 하였다.

■ MRM 크로마토그램

표 1과 2의 LC 및 MS 조건으로 AZBT 표준물질을 분석했을 때 얻은 MRM 크로마토그램은 그림 2와 같다.

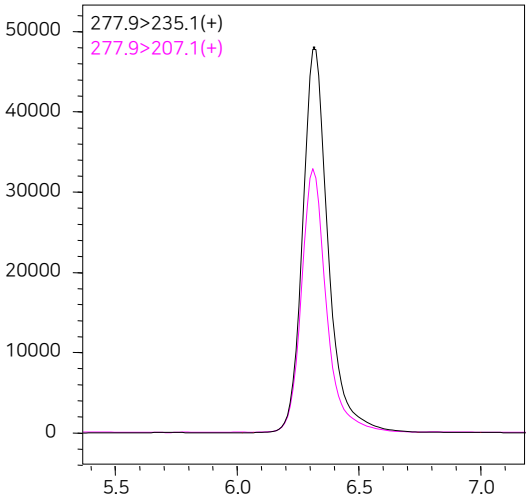

그림 2. AZBT의 MRM 크로마토그램 (농도 1 ng/mL)

■ 검정곡선 및 정량한계

검정곡선 작성을 위해 AZBT 표준물질을 농도 1 µg/mL가 되도록 75 vol% 메탄올에 녹여 조제한 후, 75 vol% 메탄올로 희석하여 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 ng/mL가 되도록 표준용액을 만들었다.

농도 별 표준용액을 4,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 0.2 µm 멤브레인필터(PVDF)로 여과한 여액으로 분석하여 검정곡선을 작성하였다.

분석결과, AZBT 검정곡선의 결정계수(R^2)는 0.999 이상으로 그림 3과 같이 우수한 직선성을 나타내었으며, 정량한계인 0.01 ng/mL (S/N>10)에서의 크로마토그램은 그림 4와 같다.

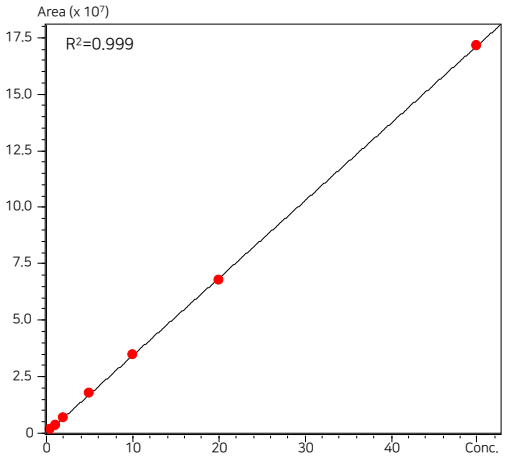

그림 3. AZBT의 검정곡선 (0.5 - 50.0 ng/mL)

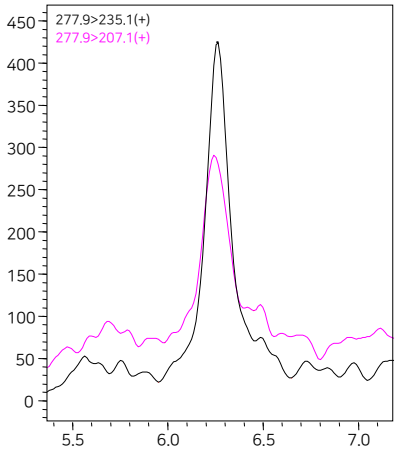

그림 4. AZBT의 정량한계(0.01 ng/mL) MRM 크로마토그램

■ 재현성

재현성 확인을 위해 농도 1 ng/mL인 AZBT 표준용액을 6회 반복 분석하였다. 6회 반복 분석시 피크의 대칭계수는 모두 2.0 이하였으며, 재현성 결과 및 크로마토그램을 표 3 및 그림 5에 각각 나타내었다.

표 3. 6회 반복 분석 시 재현성 결과 (농도 1 ng/mL)

No.	Area
1	342,252
2	341,433
3	339,156
4	339,255
5	332,387
6	336,475
Average	338,493
STDEV	3609.7
%RSD	1.1
Avg. of tailing factor	1.3

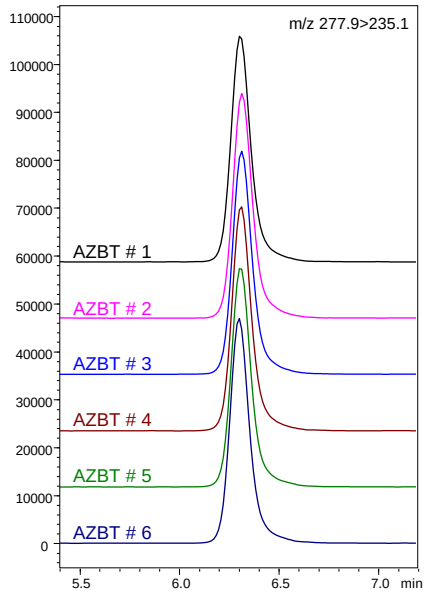

그림 5. AZBT 6회 반복분석 시 MRM 크로마토그램 (농도 1 ng/mL)

■ 첨가회수율 및 재현성

첨가회수율 평가를 위해 사르탄계열 원료의약품인 이르베사르탄, 발사르탄 및 로사르탄 100 mg을 75 vol% 메탄올에 녹여 1,000 µg/mL 농도가 되도록 조제하였다. 각 원료의약품 용액에 AZBT 농도가 1 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL이 되도록 첨가하여 4,000 rpm에서 10분 간 원심분리한 후, 상등액을 0.2 µm 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 첨가회수율 시료로 하였다. 각 원료의약품에 대해 6회 반복 분석하여 첨가회수율 및 재현성을 평가하였으며, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4. AZBT의 원료의약품 별 첨가회수율 결과

	Recovery(%) (n=6)		
	1 ng/mL (%RSD)	5 ng/mL (%RSD)	20 ng/mL (%RSD)
Irbesartan	89.6 (2.0)	91.8 (1.1)	91.9 (0.4)
Valsartan	102.6 (1.2)	98.9 (1.0)	98.7 (0.1)
Lorsartan	89.0 (1.7)	89.4 (0.7)	86.5 (0.7)

■ 결론

식품의약품안전처의 'LC-MS/MS를 이용한 사르탄계열 원료의약품 중 AZBT 시험법'에 근거하여 Shimadzu LCMS-8050을 이용하여 Azido 불순물인 AZBT에 대해 검정곡선, 정량한계, 재현성 및 첨가회수율 등을 평가하였다. 그 결과, AZBT 표준액 1.0 ng/mL에서의 신호 대 잡음비(S/N>10), 검정곡선의 결정계수(R^2 >0.995), 피크의 대칭계수(tailing factor<2.0) 및 6회 반복시험 시 피크면적의 상대표준편차(%RSD<10.0) 항목의 시험법 시스템적합성 기준을 모두 충족하였다.

검정곡선은 0.5 – 50 ng/mL 범위에서 결정계수(R^2)가 0.999 이상으로 나타났으며, 정량한계는 0.01 ng/mL로 확인되었다. 6회 반복 측정(농도 1 ng/mL)에 대한 AZBT의 재현성은 1.1 %로 나타났으며, 원료의약품인 이르베사르탄, 발사르탄 및 로사르탄에 대한 첨가회수율(Recovery)은 (86.5 – 102.6) % 수준으로 확인되었다.

이상에서의 결과를 바탕으로 Shimadzu LCMS-8050을 이용하여 사르탄계열 원료의약품 내 AZBT의 고감도 정량분석이 가능할 것으로 판단된다.

■ 참고문헌

1) 식품의약품안전처, LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법 (2021.08)

SSK-LCMS-2205

Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
Shimadzu Scientific Korea
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.

Copyright © 2022 SHIMADZU group. All rights reserved.