

Application News

No. SSK-LCMS-2302

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8050

발사르탄 원료의약품 중 Azido 불순물 분석법

LC-MS/MS Method for Detection and Quantitation of Azido Impurities in Valsartan Drug Substance

■ 서론

발사르탄, 로사르탄, 이르베사르탄과 같은 사르탄류 원료의약품은 고혈압과 신부전 치료에 쓰이는 약물로 체내 수분량을 증가시키는 안지오텐신 II의 작용을 차단해 혈관 확장 및 체내 수분량을 감소시켜 혈압을 낮추는 역할을 한다. 그러나, 최근 사르탄류 의약품 내에서 아지도(Azido) 불순물이 검출됨에 따라 일부 국가에서는 아지도 불순물이 초과 검출된 의약품에 대해 회수 조치를 취하였다.

아지도 불순물은 유전적인 돌연변이를 일으키는 성질을 가진 Azide(아자이드) 계열의 발암가능 물질로 알려져 있다. 이에 국내 식품의약품안전처에서는 의약품 안전성 확보를 위해 'LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법'을 배포하여 아지도 불순물 중의 하나인 AZBT에 대한 규제를 실시하였다. 이와 관련하여 본 뉴스레터에서는 그림 1과 같이 AZBT 외에 아지도 불순물로 알려져 있는 AZBC, AMBBT, AMBBC를 포함한 4종에 대해 LC-MS/MS를 이용하여 발사르탄 원료의약품 중 아지도 불순물 동시 분석법을 소개하고자 한다.

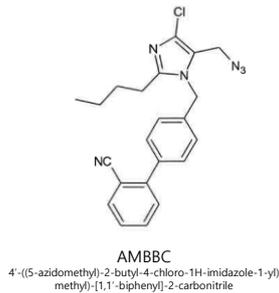
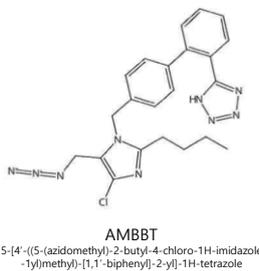
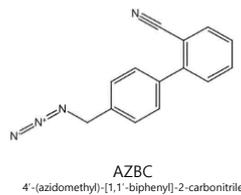
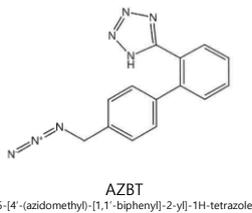


그림 1. 아지도 불순물 4종의 화학 구조

■ 분석방법

전처리방법 및 분석조건은 식품의약품안전처 시험법^[1]과 스위스의약품(swissmedic)의 자체연구기관인 OMCL(Official Medicines Control Laboratory)의 분석법^[2]을 참고하였다.

전처리방법

발사르탄 원료 100 mg에 80% 아세토니트릴 100 mL를 가하여 혼합한 후에 4000 rpm에서 10분 간 원심분리를 진행한다. 이후 상층액 일부를 취하고 LC-MS/MS에 5 µL를 주입하여 분석한다.

분석조건

분석 기기로 Shimadzu Nexera X3 LC 시스템과 LCMS™-8050 질량분석기를 이용하였다. 4종의 아지도 불순물 분석에 대한 기기 분석조건 및 MRM 조건은 표 1에 나타내었다.

표 1. 기기 분석 조건

Liquid chromatograph Nexera X3	
Flow rate	0.4 mL/min
Mobile Phase	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in 95% acetonitrile
Gradient	B 35% (0 min) – B 40% (5.5 min) – B 100% (12-14 min) – B 35% (14.01-18 min)
Diverter valve	0 - 7.6 min (to waste), 7.6 - 9.0 min (to MS), 9.0 - 9.6 min (to waste), 9.6 - 18 min (to MS)
Column	Shim-pack GIST C18 (3.0 x 100 mm., 3 µm)
Column Temp.	40 °C
Injection Volume	5 µL
Detector	SPD-40 (254 nm)

Mass spectrometer LCMS™-8050	
Ionization method	ESI (Positive)
Nebulizing Gas Flow	3 L/min
Heating Gas Flow	10 L/min
Drying Gas Flow	10 L/min
Interface Temp.	300 °C
DL Temp.	250 °C
Heat Block Temp.	400 °C

MRM 조건

Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion 1 (m/z)	Q1 (V)	Collision Energy (V)	Q3 (V)
AZBT	278	235	-10	-9	-25
AZBC	207	179	-13	-23	-17
AMBBT	448	405	-10	-11	-19
AMBBC	405	192	-14	-22	-18

■ 결과 및 토의

발사르탄 원료와 아지도 불순물의 분리

표 1의 LC 분석 조건으로 발사르탄 원료와 아지도 불순물 4종에 대한 분리를 최적화하였고, 그 결과는 그림 2와 같다. 피크의 용출

순서를 바탕으로 질량분석기의 오염을 막기 위해 방향전환 밸브를

이용하여, 분석 대상 성분인 아지도 불순물 4종만 질량분석기에 도입되도록 하였다.

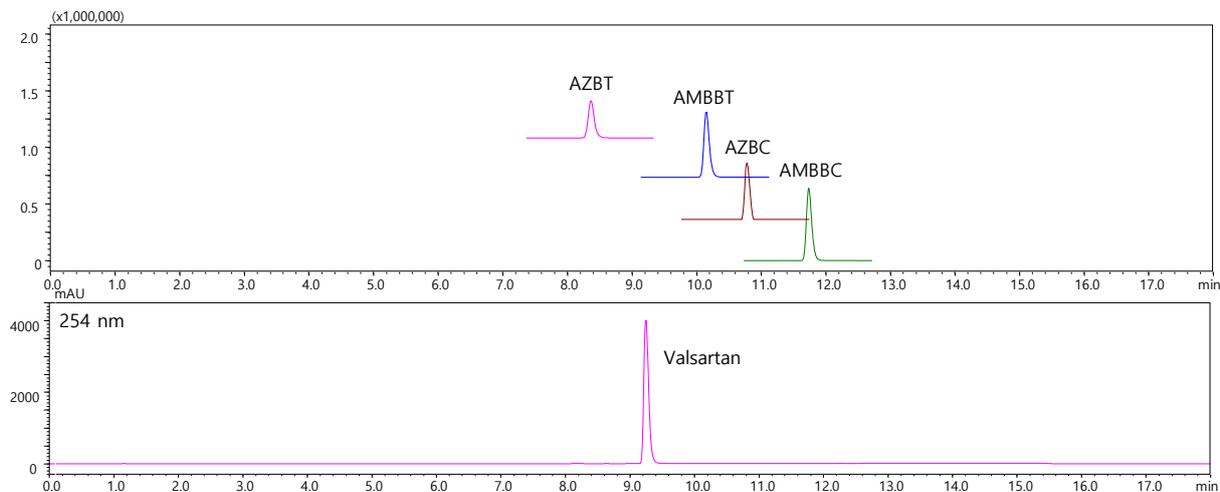


그림 2. 아지도 불순물 4종의 MS 크로마토그램(위) 및 발사르탄 원료의 UV 크로마토그램(아래)

직선성

검정곡선 작성을 위해 4종의 아지도 불순물 표준물질을 80 % 아세트니트릴로 희석하여 1 µg/mL 농도로 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 (0.5 - 50) ng/mL 농도 범위로 검정곡선을 작성하였으며, 검정곡선의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 그림 3과 같이 우수한 직선성을 보였다. 검출 한계 (이하, LOD) 및 정량 한계 (이하, LOQ) 는 LabSolutions™ 소프트웨어를 이용하여 $S/N=3$, $S/N=10$ 으로 산출하였으며, 정량한계는 표 2에서 보는 것과 같이 성분에 따라 (0.03 - 0.5) ng/mL 수준으로 나타났다.

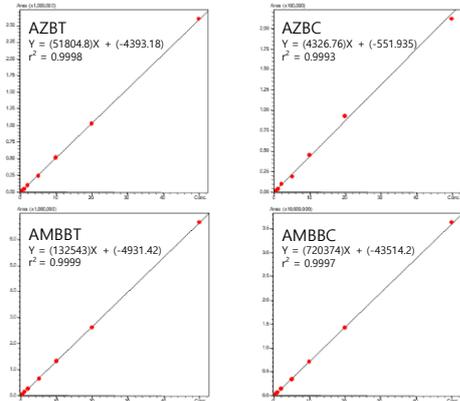


그림 3. 아지도 불순물 4종의 검정곡선

표 2. 아지도 불순물 4종의 LOD 및 LOQ

농도 (ng/mL)	AZBT	AZBC	AMBBT	AMBBC
LOD	0.03	0.2	0.03	0.01
LOQ	0.1	0.5	0.1	0.03

회수율

회수율 평가를 위해 4종의 아지도 불순물이 검출되지 않은 발사르탄 원료에 저농도 (1 µg/g), 중농도 (20 µg/g), 고농도 (40 µg/g)로 분석 물질을 첨가하여 분석하였다. 각 농도별로 조제한 3 개의 시료를 분석하여 얻은 평균 농도로 회수율을 계산하였으며, 결과는 표 3과 같이 (93.0 - 105.3)% 수준으로 나타났다.

표 3. 발사르탄 원료 중 아지도 불순물의 회수율(%), $n=3$

회수율 시료	AZBT	AZBC	AMBBT	AMBBC
저농도 (1 µg/g)	105	98	103	98
중농도 (20 µg/g)	100	105	98	93
고농도 (40 µg/g)	101	101	99	94
평균 회수율 (%)	102	101	100	95

■ 결론

시마즈 LCMS-8050을 이용하여 발사르탄 원료의약품 중 4종의 아지도 불순물(AZBT, AZBC, AMBBT, AMBBC) 동시 분석법을 확립하였다. 시험결과, 아지도 불순물 4종의 검정곡선 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 나타났으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 (0.01 - 0.2) ng/mL와 (0.03 - 0.5) ng/mL 수준으로 나타났다. 또, 저, 중, 고농도에서 각 성분의 회수율은 (93 - 105)% 로 우수하게 나타났다.

■ 참고문헌

- 1) LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법, 식품의약품안전처 (2021)
- 2) Genotoxic substances in sartans, OMCL Swissmedic (2021)

