

Application News

No. SSK-LCMS-2303

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8050

로사르탄 원료의약품 중 Azido 불순물 분석법

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

■ 서론

발사르탄, 로사르탄, 이르베사르탄은 안지오텐신 II의 작용을 차단해 혈관 확장 및 체내 수분량을 감소시켜 혈압을 낮추는 역할을 하는 의약품이다. 최근에 이러한 사르탄류 의약품 내에서 발암물질인 니트로사민류의 불순물이 검출되어 세계적으로 이슈가 되기도 하였다. 이와 함께 변이원성 불순물로 알려진 아지도(Azido) 불순물인 AZBT도 사르탄류에서 추가적으로 검출되어 유럽의약품청(European Medicine Agency, EMA) 및 캐나다 연방보건부(Health Canada)와 같은 관리기관에서 의약품 회수를 진행하기도 하였다.

아지도 불순물은 유전적인 돌연변이를 일으키는 성질을 가진 아자이드(Azide) 계열 발암가능 물질의 일종으로 알려져 있는데, AZBT 외에도 그림 1과 같이 AZBC, AMBBT 및 AMBBC 등과 같은 다양한 성분들이 있다.

이와 관련하여 국내 식품의약품안전처에서는 아지도 불순물 중 하나인 AZBT에 대해 'LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법'^[1]을 아지도 불순물 분석 기준으로 제시하였으며, 유럽에서는 유럽의약품품질위원회(European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM)를 통해 '발사르탄, 이베사르탄, 로사르탄, 칸데사르탄 원료의약품 중 AZBT 시험법'^[2]을 제시하였다.

또, 스위스의약품청(swissmedic) 자체연구기관인 OMCL(Official Medicines Control Laboratory)에서는 EDQM 시험법을 바탕으로 'LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품에서 AZBT 및 AZBC 시험법'^[3]을 소개하였다. 이에 이 뉴스레터에서는 이러한 분석법을 바탕으로 LC-MS/MS를 이용한 로사르탄 원료의약품 내 아지도 불순물 4종 (AZBT, AZBC, AMBBT, AMBBC) 동시 분석법을 소개하고자 한다.

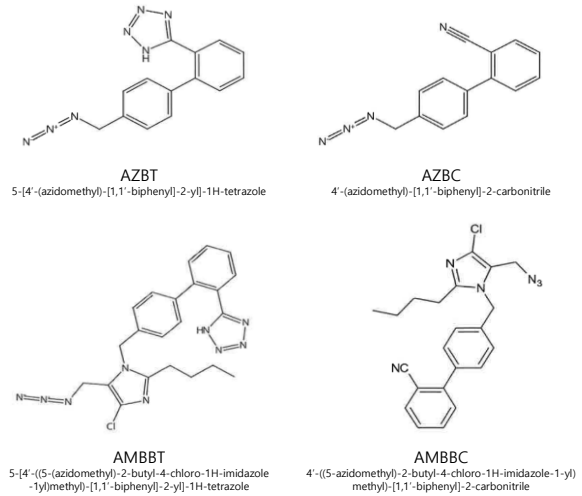


그림 1. 아지도 불순물 4 종의 화학 구조

■ 분석방법

전처리방법 및 분석조건은 식품의약품안전처 시험법^[1]과 유럽의약품품질위원회(European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM)의 시험법^[2] 및 스위스의약품청(swissmedic)의 자체연구기관인 OMCL(Official Medicines Control Laboratory)의 분석법^[3]을 참고하였다.

전처리방법

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

분석조건

분석 기기는 Shimadzu Nexera X3 LC 시스템과 LCMS™-8050 질량분석기를 이용하였으며, 4종의 아지도 불순물 분석에 대한 기기 분석조건 및 MRM 조건은 표 1과 같다.

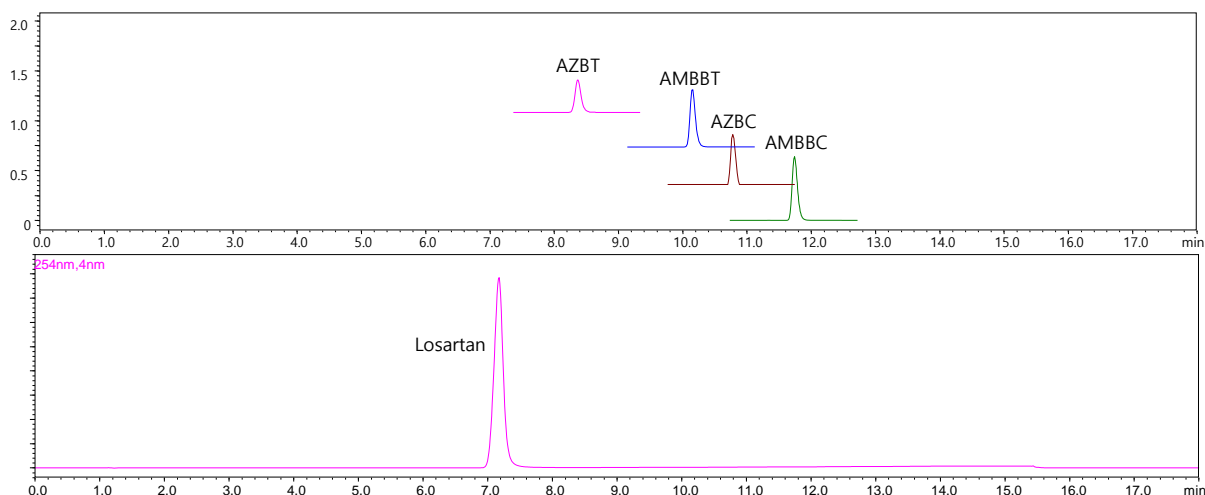


그림 2. 아지도 불순물 4종의 MS 크로마토그램(위) 및 로사르탄 원료의 UV 크로마토그램(아래)

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 % (14.01-18.0 min)				
Diverter valve	0 - 7.6 min (to waste), 7.6 - 13.0 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

로사르탄 원료와 아지도 불순물의 분리

표 1의 LC 분석 조건으로 로사르탄 원료와 아지도 불순물 4종의 분리를 최적화하였으며, 그 결과를 그림 2에 나타내었다. 로사르탄 원료와 아지도 불순물 4종의 피크 용출 순서를 바탕으로 질량분석기의 오염을 막기 위해 방향

전환 밸브를 이용하여 분석 대상 성분인 아지도 불순물 4종만 질량분석기에 도입하고 발사르탄 원료는 도입되지 않도록 하였다.

직선성

검정곡선 작성을 위해 아지도 불순물 4종의 표준물질을 80% 아세토니트릴로 희석하여 1 μg/mL 농도로 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 (0.5 – 50) ng/mL 농도 범위로 각 성분의 검정곡선을 작성하였으며, 검정곡선 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 우수한 직선성을 보였다(그림 3). 검출한계(이하, LOD) 및 정량한계(이하, LOQ)는 LabSolutions™ 소프트웨어를 이용하여 S/N=3, S/N=10으로 산출하였으며, 정량한계는 성분에 따라 (0.03-0.5) ng/mL 수준으로 나타났다(표 2).

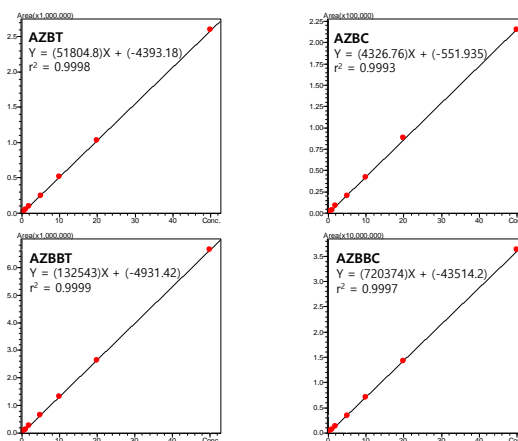


그림 3. 아지도 불순물 4종의 검정곡선

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 아지도 불순물 4 종을 아지도 불순물이 검출되지 않은 로사르탄 원료에 농도 1 µg/g(저농도), 20 µg/g(중농도), 40 µg/g(고농도)이 되도록 분석 물질을 첨가하여 분석하였다. 각 농도별로 3 개의 시료를 분석하여 얻은 평균값을 이용하여 회수율을 계산하였으며, 결과는 표 3에서 보는 것과 같이 (84 – 116)% 수준으로 나타났다.

표 3. 로사르탄 원료 중 아지도 불순물의 회수율(%), n = 3

회수율 시료	AZBT	AZBC	AMBBT	AMBBC
저농도 (1 µg/g)	100	105	89	89
중농도 (20 µg/g)	96	111	86	86
고농도 (40 µg/g)	94	116	84	84
평균	97	111	86	86

■ 결론

Shimadzu LCMS™-8050을 이용하여 로사르탄 원료의약품 내 아지도 불순물 4 종(AZBT, AZBC, AMBBT, AMBBC)에 대한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 시험결과 아지도 불순물 4 종의 검정곡선 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 우수하게 나타났으며, 검출한계 및 정량한계는 각각 (0.01 - 0.2) ng/mL와 (0.03 - 0.5) ng/mL 수준으로 나타났다. 또, 회수율은 저, 중, 고 3 개의 농도에서 (84 - 116) % 수준으로 나타났다.

■ 참고문헌

1. LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법, 식품의약품안전처 (2021)
2. <https://www.edqm.eu/documents/52006/71923/general-methodparameters-azbt-lcms.pdf/>
3. Genotoxic substances in sartans, OMCL Swissmedic (2021)