

# Application News

No. SSK-LCMS-2304

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8060NX

## 네비보롤 원료의약품 중 N-니트로소네비보롤 불순물 분석법

LC-MS/MS Method for Detection and Quantitation of N-Nitroso Nebivolol Impurity in Nebivolol Drug Substance

### ■ 서론

네비보롤은 고혈압과 신부전 치료에 쓰이는 약물로 교감신경 말단에서 분비되는 노르에피네프린이나 에피네프린이 작용하는 베타수용체를 차단하는 약물이다. 베타차단제는 그 작용 부위에 따라 1~3 세대로 나눌 수 있는데, 1 세대는 베타1과 베타2 수용체 둘 다를 차단하는 비선택적 차단제이고, 2 세대는 베타1 수용체만 차단하는 선택적 차단제이다. 마지막으로 3 세대는 베타수용체 차단 뿐만 아니라 부가적인 혈관확장작용을 갖고 있는 베타 차단제로서 네비보롤이 3세대에 해당한다. 네비보롤의 작용기전은 주로 심장에 분포되어 있는 베타1 수용체를 선택적으로 차단하면서, 부가적으로 산화질소(NO)를 생성하여 혈관확장작용을 한다.

최근에는 NDMA 등의 니트로사민류 외에 주성분과 유사구조를 갖는 니트로사민류의 발생이 국내외에서 지속적으로 보고되고 있는데, 그 중 하나가 네비보롤 원료의약품에서 발생하는 N-니트로소 네비보롤(N-Nitroso Nebivolol)이다. 이와 관련하여 식약처에서는 1일 섭취허용기준 설정과 불순물 분석 시험결과 제출을 제약사별로 요구하였으며, 대부분의 제약사들이 네비보롤 불순물의 일일섭취허용 기준을 846 ng/일로 설정하여 자체적으로 관리하고 있다. 이에 이 뉴스레터에서는 LC-MS/MS를 이용하여 네비보롤 원료의약품 중 N-니트로소 네비보롤 불순물 분리 분석법을 소개하고자 한다.

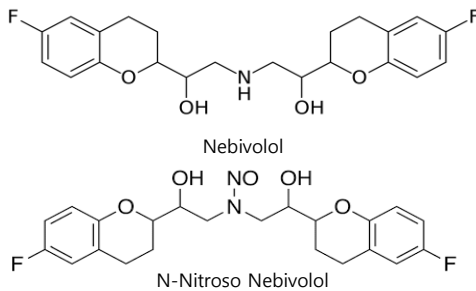


그림 1. 네비보롤 및 N-니트로소 네비보롤 불순물의 화학 구조

### ■ 분석방법

#### 전처리방법

네비보롤 원료 10 mg에 메탄올 100 mL를 가하여 혼합한 후 4000 rpm에서 10 분간 원심분리를 진행하였다. 이후 상층액 일부를 취하여 LC-MS/MS에 5 µL를 주입하여 분석하였다.

### 분석조건

분석기기로는 Shimadzu Nexera X3 LC 시스템과 LCMS™-8060NX 질량분석기를 이용하였으며, N-니트로 소네비보롤 분석을 위한 기기 분석조건 및 MRM 조건은 표 1과 같다.

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 acetonitrile			
Gradient	B 20% (0-1 min) – B 100% (7-9 min) – B 20% (9.01-12 min)			
Diverter valve	5.0 - 7.0 min (to MS)			
Column	Shim-pack GIST-HP C18 (2.1 x 150 mm., 3 µm)			
Column Temp.	40 °C			
Injection Volume	5 µL			
Detector	SPD-40 (254 nm)			
Mass spectrometer LCMS™-8060NX				
Ionization method	ESI (Positive)			
Nebulizing Gas Flow	3 L/min			
Heating Gas Flow	15 L/min			
Drying Gas Flow	3 L/min			
Interface Temp.	400 °C			
DL Temp.	250 °C			
Heat Block Temp.	400 °C			
MRM 조건				
Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion 1 (m/z)	Product Ion 2 (m/z)	Product Ion 3 (m/z)
N-Nitroso Nebivolol	435	224	405	254

### ■ 결과 및 토의

#### 네비보롤 원료와 N-니트로소 네비보롤 불순물의 분리

표 1의 LC 분석 조건으로 네비보롤 원료와 N-니트로소 네비보롤의 분리를 최적화하였으며, 그 결과는 그림 2와 같다. 네비보롤 원료와 N-니트로소 네비보롤 피크의 용출 순서를 바탕으로 질량분석기의 오염을 막기 위해 방향 전환밸브를 이용하여 분석 대상 성분인 N-니트로소 네비보롤만 질량분석기에 도입되고, 네비보롤 원료는 도입되지 않도록 하였다.

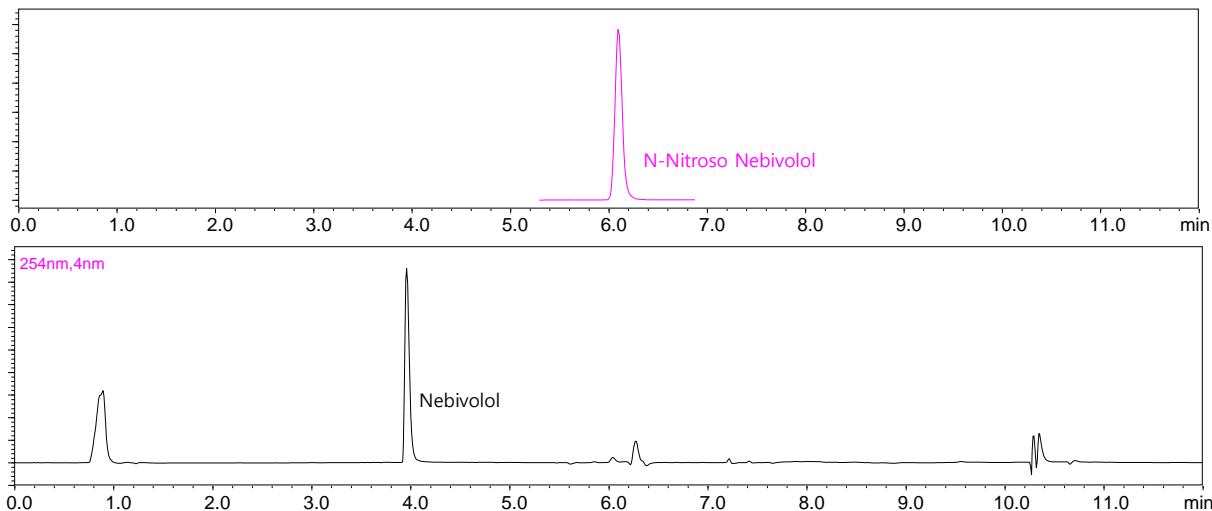


그림 2. N-니트로소 네비보롤의 MS 크로마토그램(위) 및 네비보롤 원료의 UV 크로마토그램(아래)

### 직선성

검정곡선 작성에 사용된 표준용액의 조제를 위해 N-니트로소 네비보롤 표준물질을 메탄올로 1 µg/mL 농도로 조제하였다. 이를 메탄올로 단계별로 희석하여 농도범위 (0.2 – 100) ng/mL로 검정곡선을 작성하였으며, 직선성은 결정계수( $r^2$ ) 0.99 이상으로 우수하게 나타났다(그림 3). 검출한계 (이하, LOD) 및 정량한계 (이하, LOQ)는 LabSolutions™ 소프트웨어를 이용하여 S/N=3, S/N=10으로 산출하였으며(그림4), 정량한계는 0.2 ng/mL, 검출한계는 0.1 ng/mL로 나타났다(표 2).

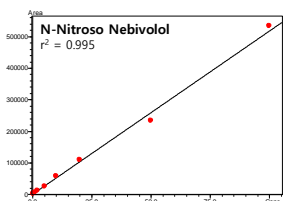


그림 3. N-니트로소 네비보롤의 검정곡선

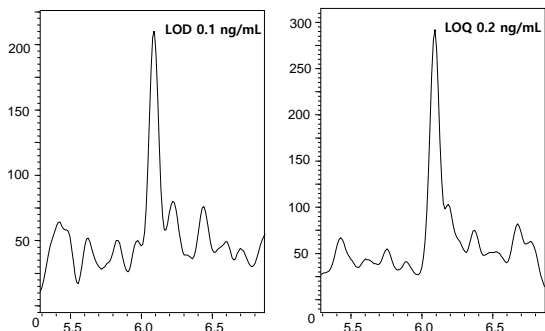


그림 4. N-니트로소 네비보롤의 검출한계(왼쪽)와 정량한계(오른쪽) 크로마토그램

표 2. N-니트로소 네비보롤의 LOD 및 LOQ

농도 (ng/mL)	N-Nitroso Nebivolol
LOD	0.1
LOQ	0.2

### 회수율

회수율 평가를 위해 N-니트로소 네비보롤이 검출되지 않은 네비보롤 원료에 2 µg/g(저농도), 10 µg/g(중농도), 50 µg/g(고농도) 농도가 되도록 분석 물질을 첨가하여 분석하였다. 각 농도별로 6 개의 시료를 조제하여 분석한 평균 농도를 이용하여 회수율을 평가하였으며 결과는 표 3과 같다.

표 3. 네비보롤 원료 중 N-니트로소 네비보롤의 회수율(%), n = 6

	저농도 (2 µg/g)	중농도 (10 µg/g)	고농도 (50 µg/g)
#1	2.36	10.57	54.96
#2	1.96	9.32	56.20
#3	2.05	10.15	49.13
#4	2.03	10.47	55.59
#5	1.57	10.75	56.74
#6	1.97	10.77	55.42
Average	1.99	10.34	54.67
% RSD	12.7	5.3	5.1
Recovery (%)	99.6	103.4	109.4

### ■ 결론

Shimadzu LCMSTM-8060NX 을 이용하여 네비보롤 원료의약품 중 N-니트로소 네비보롤에 대한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 시험결과 N-니트로소 네비보롤의 검정곡선 결정계수( $r^2$ )는 0.99 이상으로 우수하게 나타났으며, 검출한계는 0.1 ng/mL, 정량한계는 0.2 ng/mL로 나타났다. 회수율은 저농도(2 µg/g), 중농도(10 µg/g), 고농도(50 µg/g)에서 (99.6 – 109.4)% 수준의 회수율을 보였다.