

5종 사르탄 원료의약품에서 아지도 불순물의 정량 분석

Robust and Sensitive Azido Impurities Quantitative Analysis in Five Sartan Drug Substances

■ 요약

이 뉴스레터는 시마즈 LCMS-8060을 사용하여 5종의 사르탄류 - 올메사르탄, 로사르탄, 아르베사르탄, 발사르탄 및 칸데사르탄 - 에서 아지도 불순물(AZBT, AZBBT)을 측정하는 감도가 우수하고 견고한 분석법을 보여준다.

■ 배경

안지오텐신 II 수용체 길항제로도 알려진 사르탄은 고혈압 환자와 특정 심장 또는 신장 질환이 있는 환자에게 사용되는 약물의 한 종류이며, 혈관을 수축시키고 혈압을 상승시키는 호르몬인 안지오텐신 II의 작용을 차단함으로써 작용한다. 지난 몇 년간 사르탄 의약품은 발암 가능성이 있는 NDMA(N-nitrosodimethylamine)에 대한 우려로 회수되었다. 그러나 NDMA만이 이러한 약물에서 우려되는 불순물은 아니다. 제약회사들이 NDMA 문제를 다루면서 아지도 불순물로 알려진 새로운 잠재적으로 위험한 화학물질들을 발견했다.

아지도 불순물은 돌연변이를 일으켜 사람들의 DNA를 변화시키고 잠재적으로 암 위험을 높일 수 있다는 것을 나타낸다. 2021년 초, 캐나다와 유럽 정부는 특정 사르탄 의약품에서 아지도 불순물이 검출된 후 해당 의약품 제조업체에 회수를 요청했다.

Azidomethyl-biphenyl-tetrazole(AZBT)로 알려진 아지도 불순물 중의 하나인 (5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1H-tetrazole은 올메사르탄, 로사르탄, 아르베사르탄과, 발사르탄, 그리고 칸데사르탄같은 일부 사르탄 의약품에서 활성 성분의 제조 과정에서 생성될 수 있다.

로사르탄 아지도 불순물인 5-[4'-[(5-(azidomethyl)-2-butyl-4-chloro-1H-imidazol-1-yl)methyl]-[1,1'-biphenyl]2-yl]-1H-tetrazole(AMBBT)은 지금까지 로사르탄 칼륨에서만 검출되었다.

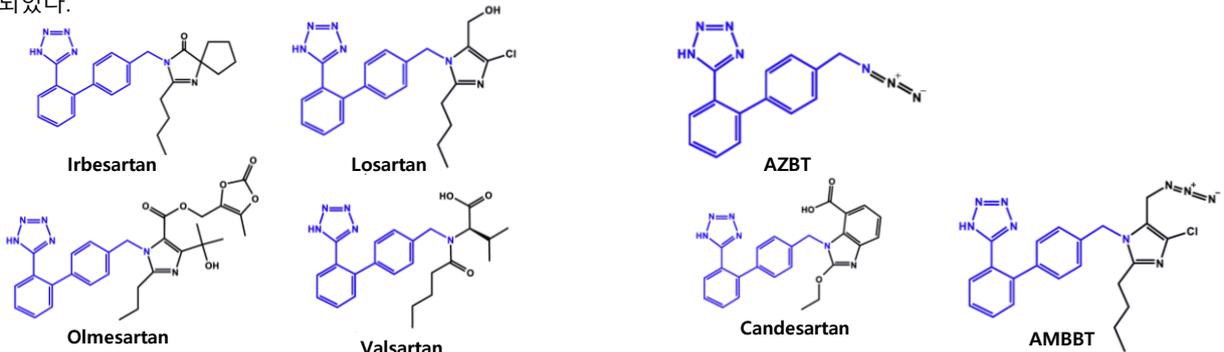


그림 1. 5종의 사르탄 의약품과 2종의 아지도 불순물의 화학 구조

이러한 아지도 불순물과 사르탄 의약품들은 페닐기에 결합된 테트라졸 고리의 오르쏘 위치에(ortho-position) 또 다른 페닐그룹을 결합하는 유사한 골격 구조를 가지고 있다(그림1).

생체 내 연구에서 추가 정보가 없는 경우, 이러한 아지도 불순물이 독성학적 우려의 임계값(1인당 1일 1.5 µg, ICM7)³이하로 제어되는지 확인할 필요가 있다. 따라서, 사르탄 약물에 포함된 아지도 불순물의 정확하고 신뢰할 수 있는 정량화가 중요하다.

이 뉴스레터에서는 Shimadzu LCMS-8060 삼중 사중극자 질량 분석기를 사용하여 두 가지 아지도 불순물(AZBT 및 AMBBT)을 동시 분석할 수 있는 고감도의 정확한 LCMS 분석법을 소개한다. Shim-pack Velox SP-C18 컬럼(PN: 227-32003-03)을 사용하여 8.5 분 만에 2 개의 아지도 불순물과 5 개의 사르탄 약물 물질을 완전히 분리하였다.

■ 시약 및 방법

사르탄 의약품(올메사르탄, 로사르탄, 아르베사르탄, 발사르탄, 칸데사르탄)은 시그마-알드리치에서 구입하였으며, 2 개의 아지도 불순물은 토론토 리서치 케미컬로부터 구입하였다. LCMS등급의 용매(포름산, 메탄올, 물)는 허니웰에서 구입하였다.

AZBT 와 AMBBT 표준용액 조제

AZBT와 AMBBT 각 1 mg을 정확하게 칭량한 뒤, 1 mL 메탄올로 녹여 1000 µg/mL의 농도가 되도록 표준원액을 조제했다. 이 초기 표준원액을 100 % 메탄올을 첨가하여 1 µg/mL로 희석했다. AZBT와 AMBBT 모두 최종 농도가 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 ng/mL가 되도록 1 µg/mL 표준원액을 메탄올(9):물(1) 용매로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액을 조제했다.

시료 조제

각 사르탄 의약품(올메사르탄, 로사르탄, 이르베사르탄, 발사르탄 칸데사르탄) 약 5 mg을 칭량하고, 메탄올(9):물(1) 용매 1 mL로 녹인다. 각 시료를 1 분간 잘 섞은 뒤에 초음파 처리하여 완전히 용해시킨다.

분석조건

고감도 및 신뢰성 있는 분석을 수행하기 위해 시마즈 SPD-M40 PDA 검출기와 LCMS-8060을 사용하였다. 코어셀 기술로 LC에서 분리능을 극대화한 Shim-pack Velox SP-C18 컬럼을 사용하여 사르탄류 의약품과 아지도 불순물을 8.5 분만에 분리하였다. 방향전환밸브는 질량분석기의 오염을 피하기 위해 고농도의 의약품들이 버려지는 동안에 고감도의 분석을 위해 질량분석기 안으로 아지도 불순물만 보내기 위해 개발했다. 자세한 분석조건은 표1-3에 나타내었다.

표1. LC-40 조건

| | |
|-------------------------|--|
| Column | : Shim-pack Velox SP-C18 (100mm x 2.1mm, 2.7µm) [PN: 227-32003-03] |
| Mobile phase A | : Water containing 5 mM ammonium formate and 0.1 % formic acid |
| Mobile phase B | : Methanol |
| Gradient Program | : 50 % B (0 - 1 min) → 70 % B (2 min) → 98 % B (5.3 - 7 min) → 50 % B (7.1 - 8.5 min) |
| Flowrate | : 0.4 mL/min |
| Column Oven Temperature | : 40 °C |
| Autosampler Temperature | : 4 °C |
| Injection Volume | : 5 µL |
| Stop Time | : 8.5 min |
| PDA Wavelength Range | : 190 - 800 nm |
| Divert Valve Program | : Waste (0 - 2.5 min) → MS (2.5 - 3.2 min) → Waste (3.2 - 5 min) → MS (5 - 5.7 min) → Waste (5.7 - 8.5min) |

표2. MS 조건

| | |
|------------------------|--------------|
| Interface | : ESI |
| Mode | : MRM |
| Polarity | : Positive |
| Nebulizing Gas Flow | : 3.0 L/min |
| Heating Gas Flow | : 12.0 L/min |
| Interface Temperature | : 300 °C |
| DL Temperature | : 250 °C |
| Heat Block Temperature | : 400 °C |
| Drying Gas Flow | : 5.0 L/min |

표3. MRM 조건

| Compound | Precursor Ion (m/z) | Product Ion (m/z) | Dwell Time (ms) | Q1 (V) | Collision Energy (V) | Q3 (V) |
|--------------------|---------------------|-------------------|-----------------|--------|----------------------|--------|
| AZBT (Quantifier) | 278.00 | 235.15 | 163.0 | -11.0 | -10.0 | -10.0 |
| AZBT (Qualifier) | 278.00 | 207.10 | 163.0 | -11.0 | -16.0 | -14.0 |
| AMBBT (Quantifier) | 448.15 | 207.10 | 163.0 | -17.0 | -24.0 | -21.0 |
| AMBBT (Qualifier) | 448.15 | 405.15 | 163.0 | -17.0 | -14.0 | -29.0 |

주입 순서

- Null 1회 주입
- 희석 용매 1회 주입(메탄올(9):물(1) 용매)
- 시스템 적합성 표준용액 (5 ng/mL) 6 회 반복 주입
- 검출한계(LOD) (0.0005 ng/mL) 3 회 반복 주입
- 검량선 표준용액 농도에서 고농도 순으로 3 회 반복 주입(0.01 - 500 ng/mL)
- 첨가하지 않은 각각의 사르탄 의약품 3 회 반복 주입(1.0 mg/mL)
- AZBT의 회수율 평가를 위해 각 사르탄에 3가지 농도가 첨가된 시료 3 회 반복 주입
- 첨가하지 않은 로사르탄 의약품 3 회 반복 주입(0.1 mg/mL)
- AZBBT의 회수율 평가를 위해 로사르탄에 3가지 농도가 첨가된 시료 3 회 반복 주입
- 배치 전체에서 브래킷 표준용액(5 ng/mL) 4회 주입
- 배치 중간에 희석용매 4 회 주입과 배치 마지막에 희석용매 2 회 주입

데이터 처리

LabSolutions 소프트웨어를 사용하여 데이터를 수집하고, LabSolutions Insight LCMS를 사용하여 데이터를 처리했다. Insight는 빠른 데이터 처리 및 데이터 검토 기능을 갖추고 있어 분석자들이 데이터를 보다 효율적으로 분석할 수 있습니다.

■ 결과 및 토의

크로마토그래피 분리

Shim-pack Velox 컬럼의 향상된 분해능으로 5 개의 사르탄 약물 물질과 2 개의 아지도 불순물을 8.5 분 만에 완전히 분리했다. 5 가지 사르탄 의약품의 대표적인 UV 크로마토그램과 AZBT 및 AMBBT의 MRM 총 이온 크로마토그램(TIC)을 그림 2에 나타내었다. 그림 2의 파란선은 방향전환밸브 시점을 보여주고 있다. LC 크로마토그래피 분리와 방향전환밸브 프로그램의 조합으로 2 개의 아지도 불순물만 고감도 질량 분석기에 주입하고, 고농도 시료 도입으로 인한 오염은 방지하였다.

시스템 적합성 및 재현성

AZBT와 AMBBT 모두에 대한 시스템 적합성과 재현성은 5 ng/mL 표준 용액의 6 회 반복 주입과 배치 전체에 걸쳐 표준 용액 4 회 추가 브라켓 주입으로 평가하였다. 결과는 표 4(AZBT), 표 5(AMBBT)에 요약하였다. 두 불순물 모두 10 회 주입에 대한 머무름 시간과 피크 면적에 대한 % RSD 는 3 % 미만으로 시스템의 우수한 견고성과 재현성을 보여주었다.

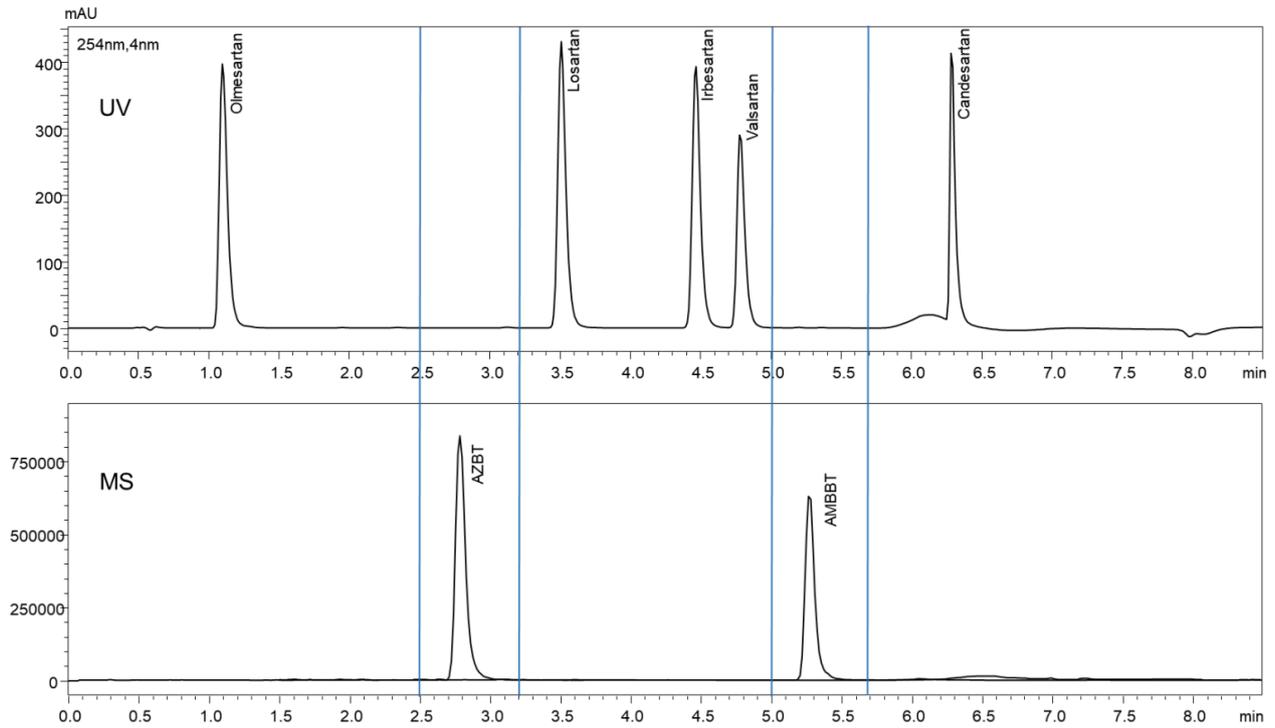


그림 2. 5 가지 사르탄 약물의 대표적인 UV 크로마토그램과 AZBT 및 AMBBT의 MS MRM 총 이온 크로마토그램(TIC). 파란색 선은 전환 밸브 전환 시점을 나타냄.

표4. AZBT의 시스템 적합성 및 재현성

| | Number | RT (min) | Area | Calculated conc. (ng/mL) |
|--------------------|----------|----------|---------|--------------------------|
| Initial replicates | 1 | 2.778 | 1440283 | 4.983 |
| | 2 | 2.775 | 1447854 | 5.009 |
| | 3 | 2.779 | 1447695 | 5.009 |
| | 4 | 2.777 | 1437430 | 4.973 |
| | 5 | 2.777 | 1517842 | 5.252 |
| | 6 | 2.778 | 1503493 | 5.202 |
| Bracket standards | 7 | 2.776 | 1522246 | 5.267 |
| | 8 | 2.778 | 1513057 | 5.235 |
| | 9 | 2.780 | 1425233 | 4.931 |
| | 10 | 2.779 | 1439822 | 4.982 |
| Average | 2.778 | 1469496 | 5.084 | |
| Std Dev | 0.001494 | 39212.1 | 0.1357 | |
| %RSD | 0.1 | 2.70 | 2.70 | |

표5. AMBBT의 시스템 적합성 및 재현성

| | Number | RT (min) | Area | Calculated conc. (ng/mL) |
|--------------------|----------|----------|---------|--------------------------|
| Initial replicates | 1 | 5.270 | 1526722 | 5.053 |
| | 2 | 5.270 | 1528349 | 5.059 |
| | 3 | 5.272 | 1543055 | 5.107 |
| | 4 | 5.271 | 1541265 | 5.101 |
| | 5 | 5.268 | 1631733 | 5.401 |
| | 6 | 5.270 | 1594880 | 5.279 |
| Bracket standards | 7 | 5.269 | 1595266 | 5.280 |
| | 8 | 5.267 | 1582259 | 5.237 |
| | 9 | 5.271 | 1545476 | 5.115 |
| | 10 | 5.269 | 1609229 | 5.326 |
| Average | 5.270 | 1569823 | 5.196 | |
| Std Dev | 0.001494 | 37294.9 | 0.1235 | |
| %RSD | 0.03 | 2.38 | 2.38 | |

검출한계 및 정량한계

검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ) 결과는 표 6에 요약하였다. 검출한계는 피크면적과 신호 대 잡음비 (S/N) 3 이상을 기준으로 하였다. 정량한계는 정확도, 재현성 및 신호 대 잡음비(S/N) 10 이상을 기준으로 하였다. 정량한계에서의 데이터 정확도는 (90-110) % 이내, %RSD는 9 %였다. 검출한계 및 정량한계의 정량 이온의 대표적인 크로마토그램은 그림 3과 같다.

표6. 검출한계와 정량한계 값

| 화합물 | 검출한계 | | 정량한계 | |
|-------|-------|------|-------|-------|
| | ng/mL | S/N* | ng/mL | S/N* |
| AZBT | 0.005 | 6.04 | 0.01 | 15.16 |
| AMBBT | 0.005 | 6.13 | 0.01 | 21.02 |

*S/N은 0.5 분의 노이즈 범위를 rms 알고리즘을 사용하여 계산함.

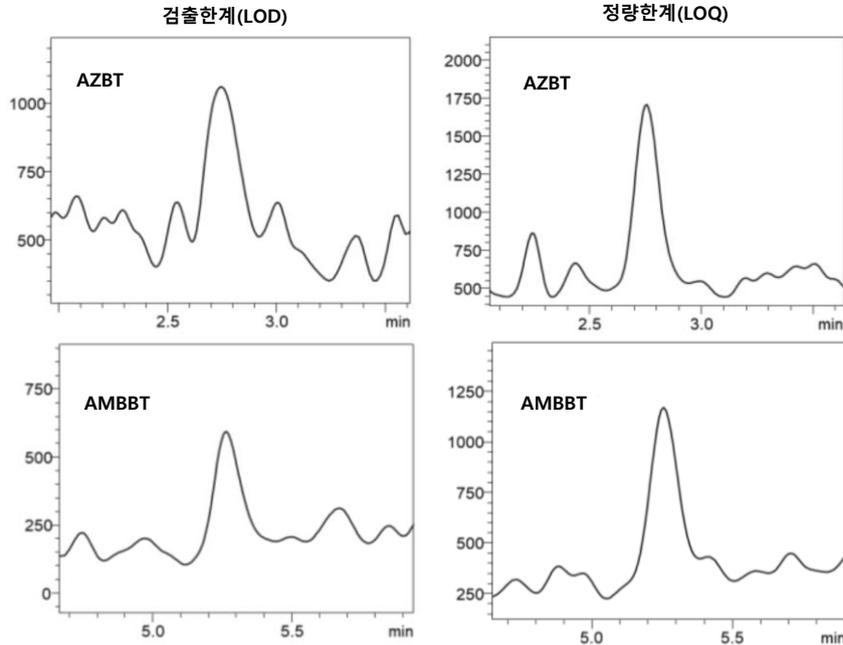


그림3. 검출한계 및 정량한계 주입에서 정량이온의 대표적인 크로마토그램

직선성

AZBT에 대한 검량선 농도 범위는 (0.01-500) ng/mL이고. AMBBT의 검량선 농도 범위는 (0.01-200) ng/mL이다.

그림 4는 아지도 표준물질의 직선성을 보여준다. 두 화합물 모두 4 자릿수에서 0.999 보다 큰 R²의 직선성을 보여주고 있으며, 모든 검량선의 정확도는 (80 - 120) % 이내로 나타났다.

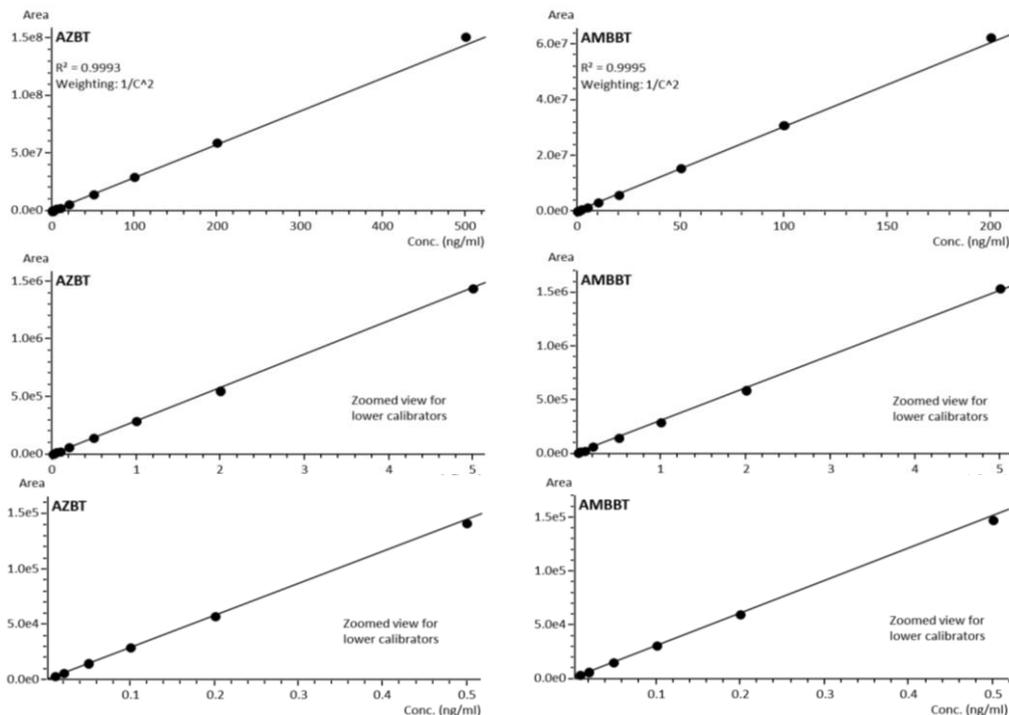


그림4. AZBT와 AMBBT의 검량선 및 저농도에서의 검량선

회수율 결과

AZBT의 회수율은 AZBT 3 가지 농도(0.1, 5.0, 50 ppm)를 로사르탄과 이베사르탄을 제외한 각각의 사르탄 의약품 1.0 mg/mL에 첨가하여 평가했다. 로사르탄과 이베사르탄은 기존 원료의약품에 고농도의 AZBT(로사르탄은 ~ 10 ppm, 이베사르탄은 ~ 90 ppm)가 존재했기 때문에 회수율 평가는 0.5 ppm 농도의 AZBT를 첨가했다. AMBBT의 회수율은 AMBBT 3 가지 농도(5.0, 50, 500 ppm)를 0.1 mg/mL의 로사르탄 의약품에 첨가하여 평가했는데, 이는 첨가하지 않은 로사르탄에서 AMBBT 양이 높았기 때문이다. (~1530 ppm).

회수율은 아래의 방정식을 사용하여 계산하였다. 측정된 각 불순물의 회수율 %는 (70 - 130) % 이내로 나타났다.⁴ 회수율 시험에 대한 결과는 표 7에 정리하였으며, 배치 중 또는 배치 중간에 주입된 희석 용매에서 carryover는 관찰되지 않았다.

$$\text{Recovery \%} = \frac{\text{첨가한 시료의 면적값} - \text{첨가하지 않은 시료의 면적값}}{\text{아지도 표준용액의 면적값}} \times 100$$

표7. AZBT와 AMBBT의 회수율 결과

| 1.0 mg/mL의 사르탄류 원료에서 AZBT의 회수율 | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|-------------------|-------|
| 사르탄류 | 첨가하지 않은 시료에서의 양 (ppm) | 첨가한 양 (ppm) | 첨가한 시료에서의 양 (ppm) | 회수율 % |
| 올메사르탄 | 0.27 | 0.10 | 0.38 | 110 |
| | | 5.00 | 5.48 | 104 |
| | | 50.00 | 49.55 | 98 |
| 로사르탄 | 9.41 | 0.50 | 10.05 | 128 |
| | | 5.00 | 14.53 | 102 |
| | | 50.00 | 57.83 | 97 |
| 이베사르탄 | 89.06 | 0.50 | 89.47 | 82 |
| | | 5.00 | 95.19 | 123 |
| | | 50.00 | 133.28 | 88 |
| 발사르탄 | 0.29 | 0.10 | 0.40 | 115 |
| | | 5.00 | 5.19 | 98 |
| | | 50.00 | 51.58 | 103 |
| 칸데사르탄 | 0.28 | 0.10 | 0.41 | 124 |
| | | 5.00 | 5.20 | 98 |
| | | 50.00 | 48.12 | 96 |
| 0.1 mg/mL 로사르탄 원료에서의 AMBBT 회수율 | | | | |
| 로사르탄 | 1530.22 | 5.00 | 1536.54 | 126 |
| | | 50.00 | 1565.98 | 71 |
| | | 500.00 | 1945.86 | 83 |

■ 결론

이 뉴스레터는 5 가지 사르탄의약품(올메사르탄, 로사르탄, 이베사르탄, 발사르탄 및 칸데사르탄) 중 AZBT 및 AMBBT 분석을 위한 단일 LCMS 분석법을 소개한다. Shim-pack Velox SP-C18 컬럼을 사용하여 8.5 분만에 모든 사르탄류 및 아지도 불순물을 완전히 분리하였다. 또, 방향 전환 밸브를 사용하여 아지도 불순물을 질량분석기로 도입하고, 검출기를 사르탄 의약품의 오염으로부터 보호하였다.

직선성은 AZBT (0.01–500 ng/mL) 및 AMBBT (0.01–200 ng/mL)에 대해 넓은 검량선 범위에서 R² 0.999 이상을 얻었으며, 회수율 시험 결과는 모두 (70-130) % 이내였다.

이 뉴스레터는 사르탄류 의약품 중 아지도 불순물 분석에 있어서 Shimadzu LCMS-8060에 대한 감도와 재현성을 입증하였다.

■ 참고문헌

1. Risk of the presence of mutagenic azido impurities in losartan active substance.
[Online] <https://www.edqm.eu/en/-/risk-of-the-presence-of-mutagenic-azido-impurities-in-losartan-active-substance>
2. Multiple lots of irbesartan, losartan and valsartan drugs recalled.
[Online] <https://recalls-rappels.canada.ca/en/alert-recall/multiple-lots-irbesartan-losartan-and-valsartan-drugs-recalled>
3. International Council For Harmonisation Of Technical Requirements For Pharmaceuticals For Human Use (ICH), Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, M7(R1), Current Step 4 version, March 2017.
4. Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. November 1996 ICH.

