

Application News

No. SSK-LCMS-2402

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8050

LC-MS/MS를 이용한 시타글립틴 의약품 중 N-니트로소 시타글립틴 불순물 분석

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

사용자 활용 포인트

- ◆ Shimadzu Nexera X3 system과 LCMS™-8050을 이용하여 시타글립틴 원료 및 완제의약품 중 불순물을 분석하였다.
- ◆ 시타글립틴 원료 및 완제의약품의 불순물인 N-니트로소 시타글립틴의 직선성, 검출한계, 정량한계, 반복성 및 회수율을 평가하였다.

■ 서론

최근 사르타닌류 이외에 많은 의약품에서 암을 유발할 수 있는 니트로소 구조의 불순물이 검출되고 있으며, 시타글립틴에서도 니트로소 불순물인 니트로소 시타글립틴(NTP)이 검출되었다.

시타글립틴은 DPP-4(dipeptidyl peptidase-4) 억제제 계열의 경구용 당뇨병 치료제로 음식물 섭취 시, 위장관에서 분비되는 인크레틴이라는 호르몬이 혈당의 수준에 따라 혈당 의존적으로 인슐린과 글루카곤의 분비를 조절하여 혈당을 조절한다. 다시 말하자면, DPP-4 억제제가 인크레틴을 분해하는 효소 DPP-4를 억제하여 인슐린 분비는 증가시키고, 글루카곤 분비는 억제함으로써 혈당을 조절하는 것이다. 시타글립틴의 1일 최대 복용량은 100mg/day이나 투약 후 배설이 신장에서 이루어지기 때문에 신장의 장애 정도에 따라 용량 조절이 필요할 수 있다.

식품의약품안전처에서 이러한 다양한 의약품에서 검출되는 니트로소 불순물에 대하여 의약품별 일일 허용치에 관한 자료를 배포하였고, 시타글립틴의 불순물의 경우 일일 최대 허용치가 37 ng/day로 설정 되어 있다.

이 뉴스레터에서는 LC-MS/MS를 이용하여 시타글립틴 원료 및 완제의약품 중 니트로소-시타글립틴 불순물 분리 분석법을 소개하고자 한다.

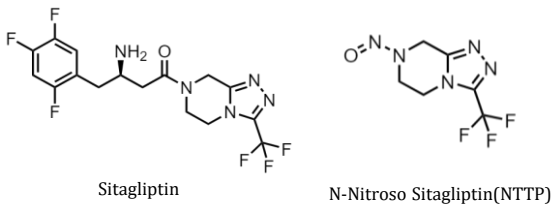


그림 1. 시타글립틴 및 시타글립틴 불순물의 화학 구조

■ 분석방법

전처리방법

원료의약품 100 mg 및 완제의약품은 20정 이상을 분쇄한 후 시타글립틴 100 mg에 해당하는 양을 칭량한 뒤에 25 % 메탄올 10 mL를 가하여 혼합한 후에 4000 rpm에서 10분 간 원심분리를 진행한다. 이후 상층액 일부를 취하고 LC-MS/MS에 10 µL를 주입하여 분석한다.

분석조건

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

표 1. 기기 분석 조건

Liquid chromatograph Nexera X3			
Flow rate	0.5 mL/min		
Mobile Phase	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in methanol		
Gradient	B 10% (0 - 4 min) - B 95% (6.5 min) - B 95% (6.5 - 7.5 min) - B 10% (7.51 - 10 min)		
Diverter valve	2.0 - 6.0 min (to MS)		
Column	Shim-pack GIST C18 (3.0 x 100 mm., 3 µm)		
Column Temp.	40 °C		
Injection Volume	10 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 Transition			
Name	Precursor Ion (m/z)	Product Ion 1 (m/z)	Product Ion 2 (m/z)
N-Nitroso Sitagliptin	222	192	165

■ 결과 및 토의

시타글립틴 원료와 시타글립틴 불순물의 분리

표 1의 LC 분석 조건으로 시타글립틴 원료와 시타글립틴 불순물의 분리를 최적화하였고 그 결과는 그림 2에 나타내었다. 시타글립틴 원료와 시타글립틴 불순물 피크의 검출 시간을 바탕으로 질량분석기의 오염을 막기 위해 방향 전환밸브를 통해 이용하여 분석 대상 성분인 시타글립틴 불순물만 질량분석기에 도입되고, 시타글립틴 원료는 도입되지 않도록 하였다.

직선성

검정곡선 작성에 사용된 표준용액의 조제를 위해 시타글립틴 불순물 표준물질을 25 % 메탄올로 희석하여 각 1 µg/mL 농도로 조제하였다. 이를 단계별로 희석하여 모두 (0.5 - 100) ng/mL 농도 범위로 각각의 검정곡선을 작성하였고 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(그림4), 정량한계는 0.1 ng/mL, 검출한계는 0.05 ng/mL 이었다. (표 2).

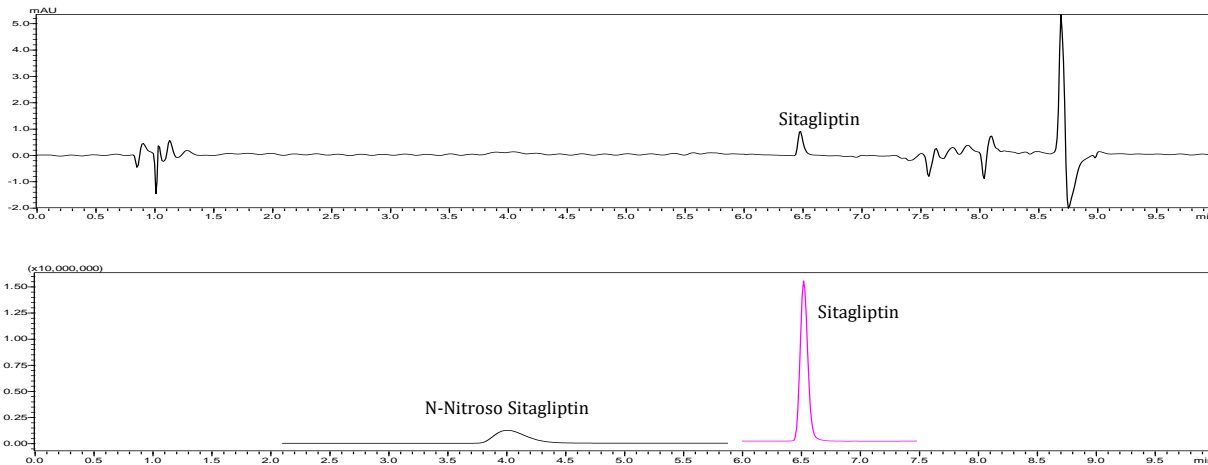


그림 2. 시타글립틴(10 µg/mL)의 UV 크로마토그램(위) 및 시타글립틴(100 ng/mL) 및 시타글립틴 불순물(100 ng/mL)의 MS 크로마토그램(아래)

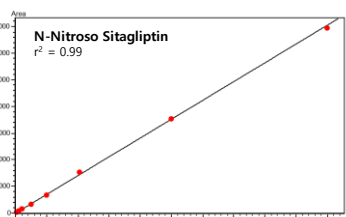


그림 3. 시타글립틴 불순물의 검정곡선

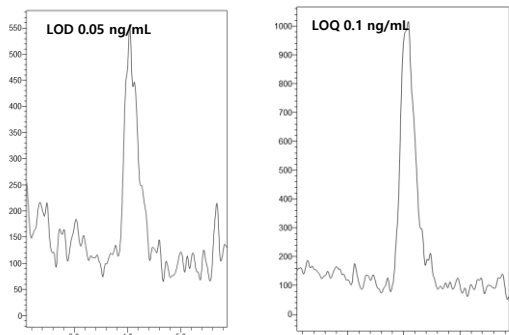


그림 4. 시타글립틴 불순물의 검출한계(왼쪽)와 정량한계(오른쪽) 크로마토그램

표 2. 시타글립틴 불순물의 LOD 및 LOQ

농도 (ng/mL)	N-Nitroso Sitagliptin
LOD	0.05
LOQ	0.1

반복성

0.5 ng/mL 시타글립틴 불순물 표준액으로 반복성을 평가하였다. 6회 반복 분석 시 크로마토그램 Area와 Height의 상대표준편차는 각각 1.2%와 2.1%로 확인되었고, 표 3에 반복성 결과를 나타내었다.

표 3. 시타글립틴 불순물의 반복 재현성

	Area	Height
# 1	82,313	4,611
# 2	83,696	4,231
# 3	83,602	4,505
# 4	85,462	4,600
# 5	83,931	4,614
# 6	84,046	4,293
%RSD	1.1	3.5

회수율

회수율 평가를 위해 시타글립틴 불순물이 검출되지 않은 시타글립틴 원료 및 완제의약품에 0.1 µg/g(저농도), 0.5 µg/g(중농도), 2 µg/g(고농도) 농도가 되도록 분석 물질을 첨가하여 분석하였다. 각 농도별로 6개의 시료를 조제한 후 분석하여 얻은 평균 농도를 이용하여 회수율을 계산하였으며, 결과는 표 4과 같다.

표 4. 시타글립틴 원료 및 완제 중 시타글립틴 불순물의 회수율(%), n = 6

	저농도 (0.1 µg/g)		중농도 (0.5 µg/g)		고농도 (2 µg/g)	
	원료	완제	원료	완제	원료	완제
#1	0.075	0.108	0.411	0.451	1.708	1.775
#2	0.083	0.106	0.417	0.460	1.721	1.785
#3	0.080	0.106	0.414	0.458	1.721	1.789
#4	0.080	0.107	0.413	0.461	1.724	1.808
#5	0.079	0.105	0.413	0.455	1.727	1.793
#6	0.080	0.106	0.413	0.457	1.738	1.791
Average	0.080	0.106	0.414	0.457	1.723	1.790
% RSD	3.0	1.0	0.4	0.8	0.5	0.6
Recovery (%)	79.5	106.3	82.7	91.4	86.2	89.5

■ 결론

Shimadzu LCMS™-8050을 이용하여 시타글립틴 원료 및 완제의약품에서 내 시타글립틴 불순물(N-Nitroso Sitagliptin)에 대한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 시험결과 시타글립틴 불순물의 검정곡선 결정계수(r^2)는 0.99 이상이고, 검출한계는 0.05 ng/mL와 정량한계는 0.1 ng/mL 이었다. 회수율은 저, 중, 고 농도에서 (79.5 – 106.3)%의 회수율을 보였다.