

# Application News

No. SSK-LCMS-2403

## 플루옥세틴 의약품 중 N-니트로소 플루옥세틴 불순물 분석법

LC-MS/MS Method for Determination of N-Nitroso Fluoxetine Impurity in Fluoxetine Drug Substance

### 사용자 활용 포인트

- ◆ Nexera X3 system과 LCMS™-8050RX을 이용하여 플루옥세틴 원료 중 N-니트로소 플루옥세틴 불순물 분석이 가능하다.
- ◆ N-니트로소 플루옥세틴에 대한 밸리데이션(직선성, 검출한계, 정량한계, 반복성, 회수율)을 진행하여 견고한 분석법임을 확인하였다.

### ■ 서론

플루옥세틴은 프로작(Prozac)이란 이름으로 널리 알려져 있는 항우울제이다. 항우울제로써 우울증 뿐만 아니라, 강박 장애, 폭식증, 공황장애, 월경 전 불쾌장애(PMDD)의 치료에 널리 사용된다. 우울증의 확실한 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, 다양한 원인 중 생화학적 원인으로 뇌 안에 있는 신경전달물질(노르에피네프린, 세로토닌, GABA 등)과 호르몬(갑상선, 성장 호르몬, 시상하부-뇌하수체-부신피질 축) 이상, 생체 리듬의 변화와 관련이 있다. 플루옥세틴은 신경전달물질 중 하나인 세로토닌이 분비되고 재흡수되어 사라지는 것을 막는 작용기전으로 세로토닌의 농도를 증가시키는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) 계열의 의약품이다.

최근에는 고혈압 제제인 사르타누 이외에 많은 의약품에서 니트로소 구조가 결합한 불순물이 검출되고 있고, 플루옥세틴도 마찬가지로 니트로소 구조가 결합한 N-니트로소 플루옥세틴이 검출되었다. 식품의약품안전처에서 이러한 다양한 의약품에서 검출되는 니트로소 계열의 불순물에 대하여 의약품별 일일 허용치에 관한 자료를 배포하였다<sup>1)</sup>. 자료에 의하면 니트로소-플루옥세틴의 경우 일일 최대 허용치가 100 ng/day로 설정 되어 있다.

이 뉴스레터에서는 LC-MS/MS를 이용하여 플루옥세틴 완제 의약품 중 N-니트로소 플루옥세틴 불순물의 분리 분석법 및 불순물에 대한 직선성, 검출한계, 정량한계, 회수율 측정 결과를 소개하고자 한다.

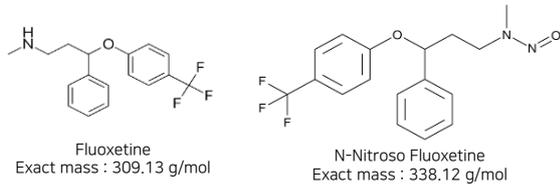


그림 1. 플루옥세틴 및 N-니트로소 플루옥세틴의 화학 구조

### ■ 분석방법

#### 표준용액 조제방법

N-니트로소 플루옥세틴 10 mg을 칭량한 뒤에 메탄올 100 mL를 가하여 녹인 후 80 %(v/v) 아세토니트릴로 희석하여 사용한다.

#### 전처리방법

원료 의약품 40 mg을 칭량한 뒤에 80 %(v/v) 아세토니트릴 20 mL를 가하여 혼합한 후에 4000 rpm에서 10분 간 원심분리를 진행한다. 이후 멤브레인 필터로 처음 검액 일부는 버리고 나머지를 취하여 LC-MS/MS에 5 µL를 주입하여 분석한다.

### 분석조건

분석조건은 유럽의약품품질관리국(EDQM)<sup>2)</sup>과 대만 식품의약품청(Twain FDA)<sup>3)</sup>의 분석조건을 참고하였다.

Shimadzu Nexera X3 LC 시스템과 LCMS-8050RX 질량분석기를 이용하였다. 플루옥세틴 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 acetonitrile : water = 95 : 5 (v/v)		
Gradient	60 % B (0 - 6 min) - 90 % B (11 min - 12 min) - 60 % B (12.01 - 15 min)		
Diverter valve	6.0 - 10.0 min (to MS)		
Column	Shim-pack GIST C18 (3.0 mm I.D x 100 mm., 3 µm)		
Column Temp.	40 °C		
Injection Volume	5 µL		
Detector	SPD-M40 (254 nm)		
Mass spectrometer LCMS-8050RX			
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 Fluoxetine	339	177	117

### ■ 결과 및 토의

#### 플루옥세틴 의약품과 N-니트로소 플루옥세틴의 분리

표 1의 분석 조건으로 플루옥세틴 의약품과 N-니트로소 플루옥세틴의 분리를 최적화하여 그림 2에 크로마토그램을 나타내었다. 플루옥세틴 의약품과 N-니트로소 플루옥세틴 피크의 검출 시간을 바탕으로 질량분석기의 오염을 최소화 하기 위해 방향 전환밸브를 이용하여 분석 대상 성분인 N-니트로소 플루옥세틴만 질량분석기에 도입되고, 플루옥세틴 의약품은 도입되지 않도록 하였다 (그림 2).

#### 직선성

검량선의 범위는 0.5 - 100 ng/mL 으로, 검량선의 결정계수 (r<sup>2</sup>)는 0.99 이상으로 우수하였다 (그림 3).

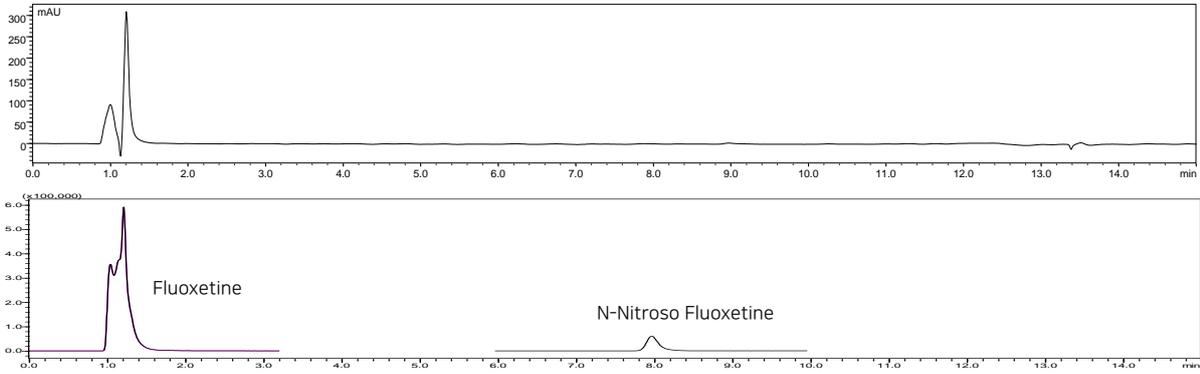


그림 2. 플루옥세틴(10 µg/mL)의 UV 크로마토그램(위) 및 플루옥세틴(100 ng/mL) 및 N-니트로소 플루옥세틴 (100 ng/mL)의 MS 크로마토그램(아래)

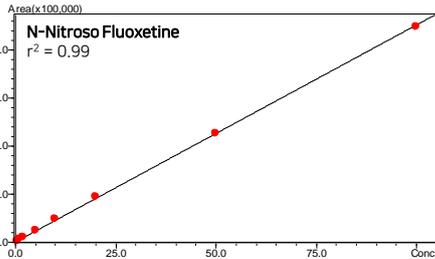


그림 3. N-니트로소 플루옥세틴의 검량선

**검출한계 및 정량한계**

검출한계는 S/N > 3, 정량한계는 S/N > 10 기준으로 측정하였다., 검출한계는 0.2 ng/mL, 정량한계는 0.5 ng/mL 으로, 그림 4에 크로마토그램을 나타내었다.

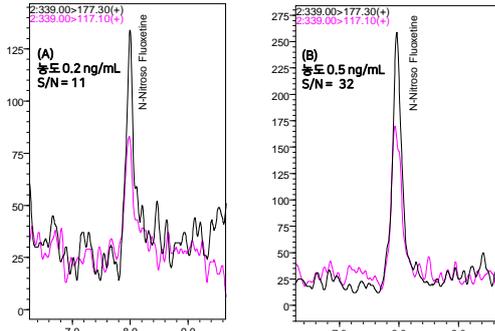


그림 4. N-니트로소 플루옥세틴의 MRM 크로마토그램 (A: LOD, B: LOQ)

**반복성**

검량선의 3번째 농도인 2 ng/mL의 N-니트로소 플루옥세틴 표준용액으로 반복성을 평가하였다. 6회 반복 분석 시 피크의 면적과 높이, 정확성을 측정하였고, 표 2에 결과를 나타내었다.

표 2. N-니트로소 플루옥세틴 표준용액의 재현성

	2 ng/mL		
	Area	Height	Conc.
# 1	9,818	832	2.05
# 2	9,765	863	2.04
# 3	10,147	836	2.12
# 4	9,691	886	2.02
# 5	9,718	808	2.03
# 6	9,536	847	1.99
Average	9,779	845	2.0
%RSD	1.9	2.9	2.0
Accuracy(%)			102.0

**회수율**

검량선 농도 범위 내에서 원료 의약품에 저농도 (2 ng/mL), 중농도 (10 ng/mL), 고농도 (50 ng/mL)가 되도록 N-니트로소 플루옥세틴 표준물질을 첨가하여 전처리 후 회수율 측정을 하였다. 저, 중, 고 농도에서 회수율은 93~96%, %RSD는 1.0~6.3% 의 값을 나타냈다 (표 3).

표 3. N-니트로소 플루옥세틴의 회수율 결과

	저농도 (2 ng/mL)	중농도 (10 ng/mL)	고농도 (50 ng/mL)
# 1	1.84	9.64	45.51
# 2	1.94	9.58	46.39
# 3	1.69	9.14	46.60
# 4	1.98	9.51	46.37
# 5	1.94	9.13	46.62
# 6	2.07	9.45	47.13
Average	1.9	9.4	46.4
% RSD	6.3	2.1	1.0
Recovery (%)	96	94	93

**■ 결론**

Shimadzu LCMS-8050RX을 이용하여 플루옥세틴 원료에서 불순물 N-니트로소 플루옥세틴에 대한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 시험 결과 N-니트로소 플루옥세틴의 검량선의 결정계수(r²)는 0.99 이상이며, 검출한계는 0.2 ng/mL, 정량한계는 0.5 ng/mL 으로 확인하였다. 반복성의 경우 2 ng/mL 농도에 대해 %RSD가 2.0%, 정확성은 102% 였다. 회수율 결과는 93~96 %이며, %RSD는 1.0~6.3%를 나타냈다.

**■ 참고자료**

- 1) 식약처 설정 니트로사민류 불순물 1일 섭취허용량 목록 (240621)
- 2) European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare ; [LC-MS/MS analytical procedures for the determination of N-nitroso-fluoxetine in fluoxetine tablets](#)
- 3) Twain Food and Drug Administration ; [Method of Test for N-Nitroso Fluoxetine in Fluoxetine Drug Substance](#)



Shimadzu Corporation  
www.shimadzu.com/an/

Shimadzu Scientific Korea  
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.  
The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. See <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> for details.  
Third party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".  
Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.  
The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

SSK-LCMS-2403