

의약품 중 불순물 분석법 자료집

2023. 5.



본 ‘의약품 중 불순물 분석법 자료집’은 식품의약품안전처에서 수행한 연구사업을 통해 시험방법의 유효성 확인(validation)을 실시한 분석법을 정리해 놓은 것으로, 관련 산업계 활용을 위해 제공할 목적으로 마련되었습니다. 본 자료집에 정리된 분석법을 적용할 때는 해당 시험기관에 적합한 방법으로 유효성 확인 또는 검증한 후에 사용하시기 바랍니다. 또한, 제시된 분석법을 변경하여 적용하고자 할 경우 반드시 유효성 확인을 실시한 후에 사용하시기 바랍니다.

니트로사민류 불순물 시험법

1. 사르탄류 원료 및 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법[LC-MS/MS]	3
2. 사르탄류 원료 및 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법[HS-GC-MS/MS]	9
3. 사르탄류 원료 및 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법[SPE-GC-MS/MS]	16
4. 사르탄류 원료 및 완제의약품 중 니트로사민류 동시분석법[LC-MS/MS]	23
5. 라니티딘염산염 원료 및 완제의약품(단일제) 중 NDMA 분석법[LC-MS/MS]	31
6. 니자티딘 원료 및 완제의약품 중 NDMA 분석법[LC-MS/MS]	36
7. 메트포르민 원료 및 완제의약품 중 NDMA 분석법[GC-MS/MS]	41
8. 엔타카폰 원료 및 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법[LC-MS/MS]	46
9. 데스-벤라팍신 원료 및 완제의약품 중 NDMA 분석법[LC-MS/MS]	52
10. 클로르페니라민말레산염 원료 및 완제의약품 중 NDMA 분석법[LC-MS/MS]	56
11. 트리메부틴말레산염 원료 및 완제의약품 중 NDMA 분석법[GC-MS/MS]	60
12. 리팜피신 원료 및 완제의약품(단일제) 중 MNP 분석법[LC-MS/MS]	64
13. 리팜피신 완제의약품(복합제) 중 MNP 분석법[LC-MS/MS]	68
14. 바레니클린 원료 및 완제의약품 중 니트로소-바레니클린 분석법[LC-MS/MS]	73

기타 불순물 시험법

15. 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 분석법[LC-MS/MS]	81
16. 사르탄류 원료의약품 중 NDMA 및 AZBT 동시분석법[LC-MS/MS]	86
17. 사르탄류 원료 및 완제의약품 중 아지도불순물 동시분석법[LC-MS/MS]	91
18. 아세트아미노펜 원료의약품 중 4-클로로아닐린 분석법[HPLC-PDA]	96
19. 메탄설폰산 중 알킬메탄설포네이트류 분석법[GC-MS]	100
20. 메탄설폰산 중 메탄설포닐염화물 분석법[GC-MS]	103
21. 원료의약품 중 알킬메탄설포네이트류 분석법[GC-MS]	106
22. 원료의약품 중 알킬톨루엔설포네이트류 분석법[GC-MS]	109
23. 원료의약품 중 알킬벤젠설포네이트류 분석법[GC-MS]	112
24. 캡슐제(HPMC) 중 2-클로로에탄올 분석법[GC-MS/MS]	115

니트로사민류 불순물 시험법

1

LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA) 및 *N*-니트로소디에틸아민(NDEA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디에틸아민(*N*-Nitrosodiethylamine, NDEA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-d₆(*N*-Nitrosodimethyl-d₆-amine, NDMA-d₆) : 99.0 %
- *N*-니트로소디에틸아민-d₁₀(*N*-Nitrosodiethyl-d₁₀-amine, NDEA-d₁₀) : 99.0 %
- 아세토니트릴(Acetonitrile) : LC/MS grade
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Shimadzu, Nexera X2)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 5500)
- 칼럼 (Phenomenex, Kinetex F5 3.0 × 100 mm, 2.6 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 내부표준원액

NDMA-d₆ 표준품 및 NDEA-d₁₀ 표준품을 메탄올에 녹여 0.5 mg/L가 되도록 하여 내부표준원액으로 한다.

■ 내부표준액

내부표준원액 0.4 mL를 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 2.5 mL로 한 뒤 정확하게 물 7.5 mL를 가하여 내부표준액 (0.02 mg/L)으로 한다.

■ 표준원액

NDMA 표준품 및 NDEA 표준품을 0.05 mL를 취하여 메탄올 10 mL에 녹여 0.5 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

표준원액 및 희석액을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조제					최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준원액 (μL)	메탄올 (μL)	증류수 (mL)	최종 부피 (mL)	
직선성표준액0	0	400	2,100	7.5	10	0
직선성표준액1	10	400	2,090	7.5	10	0.5
직선성표준액2	20	400	2,080	7.5	10	1
직선성표준액3	40	400	2,060	7.5	10	2
직선성표준액4	100	400	2,000	7.5	10	5
직선성표준액5	200	400	1,900	7.5	10	10
직선성표준액6	500	400	1,600	7.5	10	25
직선성표준액7	1,000	400	1,100	7.5	10	50
직선성표준액8	2,000	400	100	7.5	10	100

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

각 원료 성분별 무게를 아래 표와 같이 정밀하게 달아 내부표준원액 0.4 mL을 넣고 메탄올을 넣어 2.5 mL로 하여 초음파 처리한다. 여기에 물 7.5 mL를 가하여 충분히 흔들어 섞고 1분 이상 초음파 처리한 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 상층액만을 0.45 μ m의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다. 필요시 검량선 범위내로 검액을 희석하여 사용한다.

■ 완제의약품

이 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 각 원료 성분별 무게에 해당하는 양을 아래 표와 같이 정밀하게 달아 내부표준원액 0.4 mL를 넣고 메탄올을 넣어 2.5 mL로 하여 초음파 처리한다. 여기에 물 7.5 mL를 가하여 충분히 흔들어 섞고 1분 이상 초음파 처리한 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤, 상층액만을 0.45 μ m의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다. 필요시 검량선 범위내로 검액을 희석하여 사용한다.

표 2. 각 성분별 무게

성분명	발사르탄	이르베사르탄	로사르탄	피마사르탄	칸데사르탄	올메사르탄
채취량(mg)	150		50		20	

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 3. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions				
Column		Phenomenex Kinetex F5 (3.0 x 100mm, 2.6 μm)		
Column temp.		40 °C		
Mobile Phase A		Water		
Mobile Phase B		Acetonitrile		
Gradient condition		시간 (분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)
		0.0 ~ 1.5	95	5
		1.5 ~ 3.0	95 → 70	5 → 30
		4.0 ~ 5.0	70 → 10	30 → 90
		5.0 ~ 5.5	10 → 95	90 → 5
		5.5 ~ 10	95	5
Acquisition Time		1.5 ~ 5.3 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)		
Injection volume		20 μL		
Flow rate		0.4 mL/분		
Autosampler temp.		20 °C		
Mass Spectrometer Conditions				
Ionization Mode		APCI (+) MRM		
APCI gas temp.		500°C		
APCI Nebulizer		30 psi		
APCI Gas 1		45 psi		
APCI corona (NC)		3 μA		
Curtain Gas (CUR)		30 psi		
Collision Gas (CAD)		Medium		
성 분		MRM 조건		
		m/z	DP (V)	CE (eV)
1	NDMA	75 → 43 (정량) 75 → 58	75	20 16
	NDMA-d ₆	81 → 46	81	23
2	NDEA	103 → 47 (정량) 103 → 75	48	20 14
	NDEA-d ₁₀	113 → 34	81	17

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 1.8 min, NDEA 약 4.8 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (1 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (50 $\mu\text{g/L}$) 20 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부 표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 및 NDEA의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 위의 분석 조건으로 시험을 할 때, NDMA 및 NDEA의 유지시간은 표준액과 비교하여 유지시간이 같으며, 이온의 상대 비를 확인하고, 허용범위는 30 % 이하이다.
- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.

- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 각 원료성분 별 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

표 4. 각 원료 성분별 NDMA 정량한계 및 검출한계

성분명	잠정관리기준 ($\mu\text{g/g}$)	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
발사르탄	0.30	0.017	0.006
로사르탄	0.96	0.100	0.030
올메사르탄	2.40	0.250	0.076
이르베사르탄	0.32	0.033	0.010
칸데사르탄	3.00	0.250	0.076
피마사르탄	0.80	0.083	0.026

표 5. 각 원료 성분별 NDEA 정량한계 및 검출한계

성분명	잠정관리기준 ($\mu\text{g/g}$)	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
발사르탄	0.08	0.003	0.001
로사르탄	0.27	0.020	0.007
올메사르탄	0.66	0.050	0.016
이르베사르탄	0.09	0.007	0.002
칸데사르탄	0.83	0.050	0.016
피마사르탄	0.22	0.017	0.006

2

HS-GC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA) 및 *N*-니트로소디에틸아민(NDEA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 5.0 mg/mL in Methanol
- Nitrosamines Mix (Method 8270B) : 2.0 mg/mL in Dichloromethane
- *N*-니트로소디메틸아민- d_6 (*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA- d_6) : Method 521 Surrogate 1.0 mg/mL in Dichloromethane
- *N*-니트로소디에틸아민- d_{10} (*N*-Nitrosodiethylamine- d_{10} , NDEA- d_{10}) : 98 %
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 염화메틸렌(Dichloromethane) : GC grade
- 1-엔데칸올 (1-Undecanol) : 99%

3. 기기 및 소모품

- 기체크로마토그래프 (Agilent 7890A with GC sampler 80 (Headspace))
- 질량분석기 (Agilent 7000D GC/TQ)
- 칼럼 (Agilent, DB-624 60 m × 0.25 mm × 1.4 μ m, film thickness)

- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)
- 헤드스페이스바이알 (10 mL)
- 헤드스페이스바이알 마개 (Crimp 타입, 20 mm)

4. 표준액의 조제

■ 표준액

- 혼합표준원액 (48 mg/L in Dichloromethane)
10 mL 부피플라스크에 염화메틸렌 약 5 mL를 취해 넣은 후 Nitrosamines Mix (2.0 mg/mL) 240 μ L를 넣고 염화메틸렌으로 표선까지 채워 조제한다.
- NDMA 표준원액 (50 mg/L in Methanol)
10 mL 부피플라스크에 메탄올 약 5 mL를 취해 넣은 후 NDMA 표준원액 (5.0 mg/mL in Methanol) 100 μ L 취하여 넣고 메탄올로 표선까지 채워 조제한다.
- 혼합표준액 (NDMA 1.8 mg/L, NDEA 0.48 mg/L in undecanol)
10 mL 부피플라스크에 undecanol 약 5 mL를 취해 넣은 후 혼합표준원액 (48 mg/L) 100 μ L와 NDMA 표준원액 (50 mg/L) 264 μ L를 취해 넣은 후 undecanol로 표선까지 채워 조제한다.

■ 내부표준액

- NDMA-d₆ 내부표준원액은 Method 521 Surrogate (1.0 mg/mL in Dichloromethane)를 사용하였고 이 혼합표준원액에는 NDEA-d₁₀가 들어 있지 않다.
- NDEA-d₁₀ 내부표준원액은 NDEA-d₁₀ 1.0 mg을 염화메틸렌 1.0 mL에 용해시켜 조제한다.
- 혼합내부표준원액 (NDMA-d₆ 180 mg/L, NDEA-d₁₀ 48.0 mg/L in Methanol)
혼합내부표준원액의 조제는 2 mL 바이알에 메탄올 772 μ L를 정확히 취해 넣은 후 NDMA-d₆ 내부표준원액 (1.0 mg/mL in Dichloromethane) 180 μ L와 NDEA-d₁₀ 내부표준원액 (1.0 mg/mL in Dichloromethane) 48 μ L를 넣어 조제한다.

- 혼합내부표준액 (NDMA-d₆ 1.8 mg/L, NDEA-d₁₀ 0.48 mg/L in undecanol) 10 mL 부피플라스크에 undecanol 약 5 mL를 취해 넣은 후 혼합내부표준원액 (NDMA-d₆ 180 mg/L, NDEA-d₁₀ 48.0 mg/L) 100 μ L를 취해 넣고 undecanol로 표선까지 채워 조제한다.

■ 직선성 표준액

혼합표준액 및 혼합내부표준액, 1-undecanol을 넣어 표 1과 같이 직선성 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조제				NDMA 최종 농도 (μ g/L)	NDEA 최종 농도 (μ g/L)
	혼합 표준액(μ L)	혼합내부 표준액 (μ L)	1-undecanol (μ L)	최종부피 (mL)		
직선성표준액1	2.5	25	972.5	1	4.5	1.2
직선성표준액2	5	25	970.0	1	9.0	2.4
직선성표준액3	12.5	25	962.5	1	22.5	6.0
직선성표준액4	25	25	950.0	1	45	12.0
직선성표준액5	37.5	25	937.5	1	67.5	18.0
직선성표준액6	75	25	900.0	1	135.0	36.0
직선성표준액7	150	25	825.0	1	270.0	72.0
직선성표준액8	300	25	675.0	1	540.0	144.0

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

사르탄류 원료의약품 15~150 mg을 정확히 취해 10 mL 헤드스페이스 바이알에 넣고 혼합내부표준용액 (NDMA-d₆ 1.8 mg/L, NDEA-d₁₀ 0.48 mg/L in undecanol) 25 μ L 및 undecanol 975 μ L를 넣어 최종 부피가 1 mL 되게 한 다음 헤드스페이스 마개를 신속히 닫는다. 시료와 undecanol이 잘 혼합되도록 3~4분 vortex mixing 한 다음 헤드스페이스 장치에 넣고 150 $^{\circ}$ C에서 15분간 추출한 후 헤드스페이스 1.0 mL를 GC-MS/MS에 주입 분석한다.

■ 완제의약품

사르탄류 완제의약품은 원료 함량 기준으로 15~150 mg에 해당하는 양을 정확히 무게를 재어 10 mL 헤드스페이스 바이알에 넣고 혼합내부표준용액 (NDMA-d₆ 1.8 mg/L 및 NDEA-d₁₀ 0.48 mg/L in undecanol) 25 μ L 및 undecanol 975 μ L를 넣어 최종 부피가 1 mL 되게 한 다음 헤드스페이스 마개를 신속히 닫는다. 시료와 undecanol과 잘 혼합되도록 3~4분 vortex mixing 한 다음 헤드스페이스 장치에 넣고 150 $^{\circ}$ C에서 15분간 추출한 후 헤드스페이스 1.0 mL를 GC-MS/MS에 주입 분석한다.

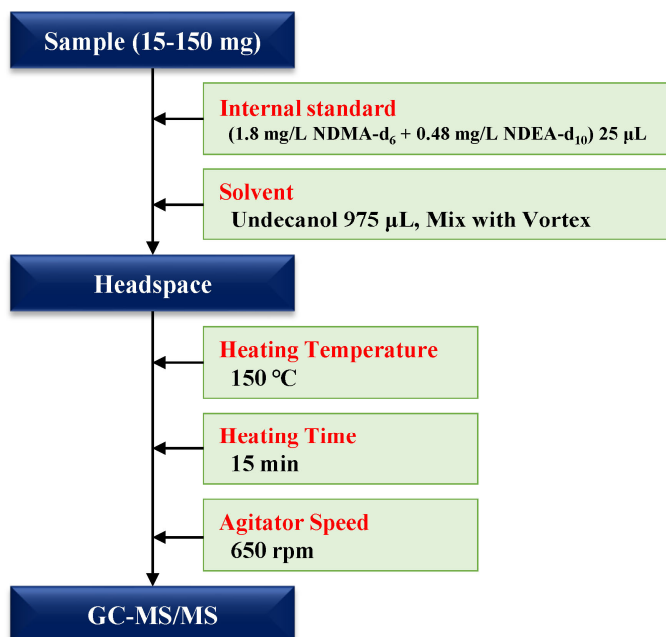


그림 1. 헤드스페이스법에 의한 NDMA 및 NDEA 분석 절차도

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 GC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Gas Chromatography Conditions				
Column	DB-624 (60 m × 0.25 mm I.D. × 1.4 μm, film thickness)			
Carrier gas	He at 1.2 mL/min.			
Inlet mode	Splitless			
Injection port temp	230 °C			
Transfer line temp	230 °C			
Oven temp. program		Rate (°C/min.)	컬럼온도 (°C)	유지시간 (min.)
	Initial		40	8
	Ramp1	12	230	16.167
Headspace parameters				
Incubation Temp	150 °C			
Incubation Time	15 min			
Syringe Temp	150 °C			
Agitator speed	650 rpm			
Fill speed	100 μL/s			
Pullup Delay	1000 ms			
Injection Speed	200 μL/s			
Pre Inject Delay	500 ms			
Post Inject Delay	500 ms			
Flush time	10 min			

※ NDMA 및 NDEA의 MRM 이온

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy(V)
NDMA	74	44	4
	74	42	11
NDEA	102	85	2
	102	56	12
NDMA-d ₆	80	50	4
	80	48	10
NDEA-d ₁₀	112	94	3
	112	50	15

7. 시스템적합성

- 표준액 (NDMA 4.5 $\mu\text{g/L}$, NDEA 1.2 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (NDMA 45 $\mu\text{g/L}$, NDEA 12 $\mu\text{g/L}$)에서의 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 및 NDEA의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} (\mu\text{g}) \div W_T$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

W_T : 검체 채취량 (g)

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.

- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

표 3. 각 원료 성분별 NDMA 정량한계 및 검출한계

성분명	잠정관리기준 ($\mu\text{g/g}$)	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
발사르탄	0.30	0.004	0.001
로사르탄	0.96	0.004	0.001
올메사르탄	2.40	0.010	0.003
이르베사르탄	0.32	0.012	0.004
칸데사르탄	3.00	0.029	0.009
피마사르탄	0.80	0.036	0.011

표 4. 각 원료 성분별 NDEA 정량한계 및 검출한계

성분명	잠정관리기준 ($\mu\text{g/g}$)	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
발사르탄	0.08	0.002	0.001
로사르탄	0.27	0.002	0.001
올메사르탄	0.66	0.006	0.002
이르베사르탄	0.09	0.008	0.002
칸데사르탄	0.83	0.019	0.006
피마사르탄	0.22	0.024	0.007

3

SPE-GC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA) 및 *N*-니트로소디에틸아민(NDEA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 5.0 mg/mL in Methanol
- Nitrosamines Mix (Method 8270B) : 2.0 mg/mL in Dichloromethane
- *N*-니트로소디메틸아민- d_6 (*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA- d_6) : Method 521 Surrogate 1.0 mg/mL in Dichloromethane
- *N*-니트로소디에틸아민- d_{10} (*N*-Nitrosodiethylamine- d_{10} , NDEA- d_{10}) : 98 %
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 아세톤(Acetone) : GC grade
- 염화메틸렌(Dichloromethane) : GC grade
- 무수황산나트륨 : Reagent grade

3. 기기 및 소모품

- 기체크로마토그래프 (Agilent 7890A)
- 질량분석기 (Agilent 7000D GC/TQ)
- 칼럼 (Agilent, DB-624 60 m \times 0.25 mm \times 1.4 μ m, film thickness)

- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)
- 추출용 카트리지 (Activated carbon extraction cartridge)
- 진공 매니폴더 (Vacuum manifold)

4. 표준액의 조제

■ 표준액

- 혼합표준원액 (48 mg/L in Dichloromethane)
10 mL 부피플라스크에 염화메틸렌 약 5 mL를 취해 넣은 후 Nitrosamines Mix (2.0 mg/mL) 240 μ L를 넣고 염화메틸렌으로 표선까지 채워 조제한다.
- NDMA 표준원액 (50 mg/L in Methanol)
10 mL 부피플라스크에 메탄올 약 5 mL를 취해 넣은 후 NDMA 표준원액 (5.0 mg/mL in Methanol) 100 μ L 취하여 넣고 메탄올로 표선까지 채워 조제한다.
- 혼합표준액 (NDMA 1.8 mg/L, NDEA 0.48 mg/L in Methanol)
10 mL 부피플라스크에 undecanol 약 5 mL를 취해 넣은 후 혼합표준원액 (48 mg/L) 100 μ L와 NDMA 표준원액 (50 mg/L) 264 μ L를 취해 넣은 후 메탄올로 표선까지 채워 조제한다.

■ 내부표준액의 조제

- NDMA-d₆ 내부표준원액은 Method 521 Surrogate (1.0 mg/mL in Dichloromethane)를 사용하였고 이 혼합표준원액에는 NDEA-d₁₀가 들어 있지 않다.
- NDEA-d₁₀ 내부표준원액은 NDEA-d₁₀ 1.0 mg을 염화메틸렌 1.0 mL에 용해시켜 조제한다.
- 혼합내부표준원액 (NDMA-d₆ 180 mg/L, NDEA-d₁₀ 48.0 mg/L in Methanol)
혼합내부표준원액의 조제는 2 mL 바이알에 메탄올 772 μ L를 정확히 취해 넣은 후 NDMA-d₆ 내부표준원액 (1.0 mg/mL in Dichloromethane) 180 μ L와 NDEA-d₁₀ 내부표준원액 (1.0 mg/mL in Dichloromethane) 48 μ L를 넣어 조제한다.

- 혼합내부표준액 (NDMA-d₆ 1.8 mg/L, NDEA-d₁₀ 0.48 mg/L in Methanol)
10 mL 부피플라스크에 메탄올 약 5 mL를 취해 넣은 후 혼합내부표준원액 (NDMA-d₆ 180 mg/L, NDEA-d₁₀ 48.0 mg/L) 100 μ L를 취해 넣고 메탄올로 표선까지 채워 조제한다.

■ 직선성 표준액

혼합표준액 및 혼합내부표준액, 염화메틸렌을 넣어 표 1과 같이 직선성 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조제				NDMA 최종 농도 (μ g/L)	NDEA 최종 농도 (μ g/L)
	혼합 표준액(μ L)	혼합내부 표준액(μ L)	염화메틸렌 (μ L)	최종부피 (mL)		
직선성표준액1	2.5	25	472.5	0.5	9.0	2.4
직선성표준액2	5	25	470.0	0.5	18.0	4.8
직선성표준액3	12.5	25	462.5	0.5	45.0	12.0
직선성표준액4	25	25	450.0	0.5	90.0	24.0
직선성표준액5	37.5	25	437.5	0.5	135.0	36.0
직선성표준액6	75	25	400.0	0.5	270.0	72.0
직선성표준액7	150	25	325.0	0.5	540.0	144.0
직선성표준액8	300	25	175.0	0.5	1080.0	288.0

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

사르탄계열 원료의약품 15~150 mg 을 정확히 취해 시험관에 넣고 혼합내부표준액 (NDMA-d₆ 1.8 mg/L, NDEA 0.48 mg/L in Methanol) 25 μ L를 넣는다. 메탄올 1.25 mL와 아세톤 1.25 mL를 넣은 후 뚜껑을 닫고 vortex를 사용해 잘 혼합한 뒤 10분간 초음파로 용해시킨다. 대부분의 원료의약품이 이 방법으로 용해되나 수용성이 강한 경우는 용해되지 않는다. 시험관에 물 7.5 mL를 가하면 물에 용해도가 낮은 원료의약품은 석출이 되나 앞서 메탄올+아세톤에 용해가 되지 않으면서 수용성이 강한 원료의약품은 완전히 용해가 된다. 석출되지 않는 시료는 용액 전체에 물 40 mL를 첨가하여 총 50 mL의 시료를 준비한다.

- 석출이 되는 경우는 원심분리기를 이용하여 4000 rpm에서 10분간 원심분리 후 유기용매가 녹아있는 물 층 전부를 조심하여 취하여 물 40 mL와 섞어서 50 mL 시료를 준비하여서 SPE 전처리용 유리병으로 옮긴다.
- 진공 매니폴더에 카본 카트리지를 정착시키고 염화메틸렌 6 mL, 메탄올 6 mL 및 물 15 mL로 차례로 통과시켜 컨디션닝한 후 앞서 준비한 시료용액 50mL를 부하 (loading)시킨다. 용출액 염화메틸렌 11 mL를 사용하여 용출시킨 다음 용출액에 약 5 g의 무수황산나트륨을 넣어 잔류 수분을 제거한다. 용출액을 새로운 시험관에 옮긴 후 용액의 부피가 약 0.5 mL가 될 때까지 질소농축기를 사용하여 농축한 다음 용액 2 μ L를 GC-MS/MS에 주입하여 분석한다.

■ 완제의약품

완제의약품을 분석할 때에는 미리 준비한 분말시료를 원료 의약품 함량기준으로 15~150 mg 에 해당하는 양을 정확히 취하여 시험관에 넣고 원료의약품의 전처리 과정과 동일하게 수행한다. 고체추출법 (SPE)에 의한 전처리 과정은 <그림 1>에 요약하여 정리하였다.

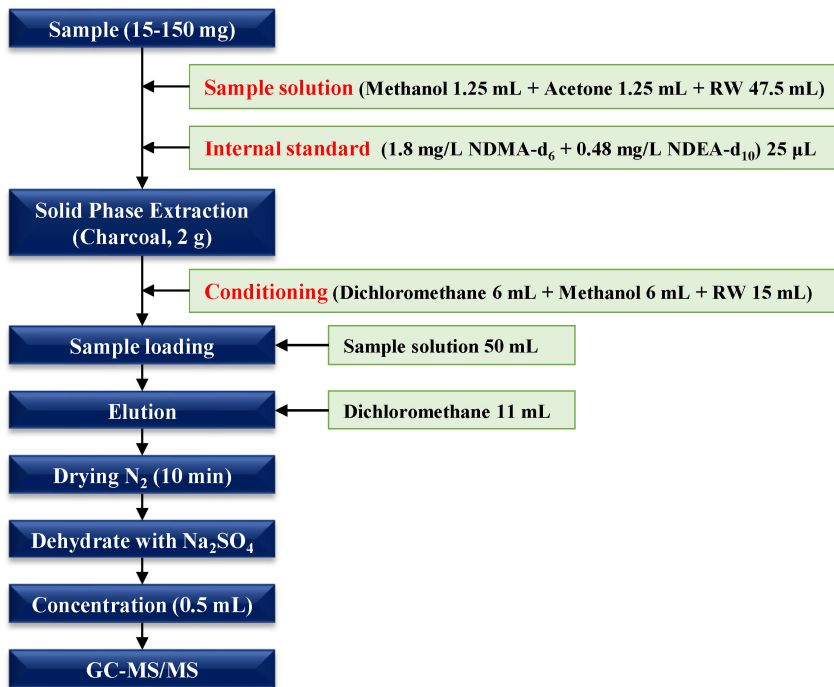


그림 1. 고체추출법 (SPE)법에 의한 NDMA 및 NDEA 분석 절차도

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 GC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Gas Chromatography Conditions				
Column	DB-624 (60 m × 0.25 mm I.D. × 1.4 μm, film thickness)			
Carrier gas	He at 1.2 mL/min.			
Inlet mode	Splitless			
Injection port temp	230 °C			
Transfer line temp	230 °C			
Oven temp. program		Rate (°C/min.)	Value (°C)	Hold time (min.)
	Initial		40	8
	Ramp1	12	230	16.167

※ NDMA 및 NDEA의 MRM 이온

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy(V)
NDMA	74	44	4
	74	42	11
NDEA	102	85	2
	102	56	12
NDMA-d ₆	80	50	4
	80	48	10
NDEA-d ₁₀	112	94	3
	112	50	15

7. 시스템적합성

- 표준액 (NDMA 9 μg/L, NDEA 2.4 μg/L)에서의 신호 대 잡음비 (S/N_비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (NDMA 90 μg/L, NDEA 24 μg/L)에서의 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 및 NDEA의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

표 3. 각 원료 성분별 NDMA 정량한계 및 검출한계

성분명	잠정관리기준 (μg/g)	정량한계 (μg/g)	검출한계 (μg/g)
발사르탄	0.30	0.001	0.0004
로사르탄	0.96	0.004	0.0012
올메사르탄	2.40	0.010	0.003
이르베사르탄	0.32	0.001	0.0004
칸데사르탄	3.00	0.012	0.0037
피마사르탄	0.80	0.003	0.001

표 4. 각 원료 성분별 NDEA 정량한계 및 검출한계

성분명	잠정관리기준 (μg/g)	정량한계 (μg/g)	검출한계 (μg/g)
발사르탄	0.08	0.0002	0.0001
로사르탄	0.27	0.001	0.0002
올메사르탄	0.66	0.002	0.0006
이르베사르탄	0.09	0.0002	0.0001
칸데사르탄	0.83	0.002	0.0007
피마사르탄	0.22	0.001	0.0002

4

LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 니트로사민류 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 니트로사민류(11종)를 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

■ 표준품(표준물질)

- *N*-니트로소디메틸아민 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA)
- *N*-니트로소디에틸아민 (*N*-nitrosodiethylamine, NDEA)
- *N*-니트로소메틸에틸아민 (*N*-nitrosomethylethylamine, NMEA)
- *N*-니트로소디프로필아민 (*N*-nitrosodipropylamine, NDPA)
- *N*-니트로소디부틸아민 (*N*-nitrosodibutylamine, NDBA)
- *N*-니트로소피롤리딘 (*N*-nitrosopyrrolidine, NPYR)
- *N*-니트로소피페리딘 (*N*-nitrosopiperidine, NPIP)
- *N*-니트로소몰포린 (*N*-nitrosomorpholine, NMOR)
- *N*-니트로다이소프로필아민 (*N*-nitrosodiisopropylamine, DIPNA)
- *N*-니트로에틸이소프로필아민 (*N*-nitrosoethylisopropylamine, EIPNA)
- *N*-니트로소-*N*-메틸-4-아미노부티르산 (*N*-nirtoso-*N*-methyl-4-aminobutyricacid, NMBA)

■ 표준품(내부표준물질)

- *N*-니트로소디메틸- d_6 -아민 (*N*-Nitrosodimethyl- d_6 -amine, NDMA- d_6)
- *N*-니트로소디에틸- d_{10} -아민 (*N*-nitrosodiethyl- d_{10} -amine, NDEA- d_{10})
- *N*-니트로소메틸에틸- d_3 -아민 (*N*-nitrosomethylethyl- d_3 -amine, NMEA- d_3)
- *N*-니트로소디-*n*-프로필- d_{14} -아민 (*N*-nitrosodi-*n*-propyl- d_{14} -amine, NDPA- d_{14})
- *N*-니트로소디-*n*-부틸- d_{18} -아민 (*N*-nitrosodi-*n*-butyl- d_{18} -amine, NDBA- d_{18})
- *N*-니트로소피롤리딘- d_8 (*N*-nitrosopyrrolidine- d_8 , NPYR- d_8)
- *N*-니트로소피페리딘- d_{10} (*N*-nitrosopiperidine- d_{10} , NPIP- d_{10})
- *N*-니트로소몰포린- d_8 (*N*-nitrosomorpholine- d_8 , NMOR- d_8)

■ 시약

- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 포름산(Formic acid) : LC-MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Shimadzu Nexera X2)
- 질량분석기 (SCIEX, TQ4500)
- 칼럼 (Phenomenex, Kinetex F5 3.0 × 100 mm, 2.6 μ m)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NDBA, NPYR, NPIP, NMOR, DIPNA, EIPNA 및 NMBA 표준품을 25 % 메탄올에 녹여 농도가 0.5 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 내부표준액

NDMA-d₆, NPIP-d₁₀, NDBA-d₁₈, NDEA-d₁₀, NMEA-d₃, NDPA-d₁₄, NPYR-d₈, NMOR-d₈을 정밀하게 달아 25 % 메탄올에 녹여 농도가 0.5 mg/L가 되도록 하여 내부표준액으로 한다.

■ 표준액

표준원액, 내부표준액 및 25 % 메탄올을 각각 취하여 8 단계로 희석하여 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제				최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)	25 % 메탄올 (μL)	최종 부피 (mL)	
직선성 표준액1	10	400	9.59	10	0.5
직선성 표준액2	20	400	9.58	10	1
직선성 표준액3	40	400	9.56	10	2
직선성 표준액4	100	400	9.50	10	5
직선성 표준액5	200	400	9.40	10	10
직선성 표준액6	500	400	9.10	10	25
직선성 표준액7	1,000	400	8.60	10	50
직선성 표준액8	2,000	400	7.60	10	100

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

표 2와 같이 각 성분별 무게에 해당하는 양을 정밀하게 달아 넣고 내부표준액을 0.4 mL를 정확하게 취하여 넣은 다음 25 % 메탄올 9.6 mL를 정확하게 넣은 다음 충분히 흔들어 녹인다. 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 다음 상층액을 0.2 μ m의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

이 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 표 2와 같이 각 성분별 무게에 해당하는 양을 정밀하게 달아 넣고 내부표준액 0.4 mL를 정확하게 취하여 넣은 다음 25 % 메탄올 9.6 mL를 정확하게 넣은 다음 충분히 흔들어 녹인다. 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 다음 상층액을 0.2 μ m의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다.

표 2. 각 성분별 무게

성분명	발사르탄	이르베사르탄	로사르탄	피마사르탄	칸데사르탄	올메사르탄
채취량(mg)	150		50		20	

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

- 측정된 mass spectrum을 가지고 기질액 또는 검액과 비교하였을 때 특이성이 보증된 이온을 선정한다.

표 3. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions			
Column	Phenomenex Kinetex F5, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm, 100 Å		
Column temp.	40 °C		
Mobile Phase A	Water or 0.1% formic acid in Water		
Mobile Phase B	Methanol or 0.1% formic acid in Methanol		
Gradient condition	시간 (분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)
	0.0 ~ 3.0	80	20
	3.0 ~ 3.5	55	45
	3.5 ~ 12.5	40	60
	12.5 ~13.0	5	95
	13.0 ~16.0	5	95
	16.0 ~16.1	80	20
	16.1 ~20.0	80	20
Acquisition Time	1.0 ~ 9.9 분, 14.5 ~ 16.0 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)		
Injection volume	20 μL		
Flow rate	0.3 mL/분		
Autosampler temp.	20 °C		
Mass Spectrometer Conditions			
Ionization Mode (Polarity)	APCI (+), (-) MRM		
APCI gas temp.	300 °C		
APCI Nebulizer	35 psi		
APCI corrona (NC)	1.5 μA		
Curtain Gas (CUR)	35 psi		
Collision Gas (CAD)	9 eV		

표 4. 분석성분별 MRM 조건

성분 및 내부표준물질		MRM 조건				RT (min)
		m/z	DP(V)	CE(eV)	CXP(eV)	
NMBA* 분석	NMBA	145 → 59 (정량) 145 → 41	-45 -45	-14 -21	-6 -6	1.33
	NDMA-d ₆	81 → 46	51	25	8	2.01
NDMA 분석	NDMA	75 → 43 (정량) 75 → 58	75 51	20 8	12 6	2.03
	NDMA-d ₆	81 → 46	51	25	8	2.01
NDEA 분석	NDEA	103 → 47 (정량) 103 → 75	81 50	15 15	4 8	5.31
	NDEA-d ₁₀	113.3 → 34	46	19	6	5.24
NMEA 분석	NMEA	89 → 61 (정량) 89 → 89	15 60	35 15	6 18	3.00
	NMEA-d ₃	92 → 64	15	15	4	2.96
NPYR 분석	NPYR	101 → 55 (정량) 101 → 41	56 56	23 37	4 6	2.82
	NPYR-d ₈	109 → 62	126	44	7	2.78
NPIP 분석	NPIP	115 → 69 (정량) 115 → 41	75 75	19 33	4 6	5.49
	NPIP-d ₁₀	125 → 78	36	21	6	5.45
NDPA 분석	NDPA	131 → 89 (정량) 131 → 43	46 46	15 23	6 8	8.16
	NDPA-d ₁₄	145 → 50	51	27	8	8.05
NDBA 분석	NDBA	159 → 103 (정량) 159 → 41	55 55	15 19	8 4	13.39
	NDBA-d ₁₈	177 → 66	61	21	6	13.21
NMOR 분석	NMOR	117 → 87 (정량) 117 → 45	60 60	20 21	8 6	2.44
	NMOR-d ₈	125 → 95	61	19	6	2.40
DIPNA* 분석	DIPNA	131 → 89 (정량) 131 → 43	116 116	11 19	4 12	7.64
	NDPA-d ₁₄	145 → 50	51	27	8	8.05
EIPNA* 분석	EIPNA	117 → 43 (정량) 117 → 47	60 60	24 26	6 6	6.29
	NPIP-d ₁₀	125 → 78	36	21	6	5.45

* NMBA, DIPNA, EIPNA 내부표준물질은 NMBA-d₃등으로 변경할 수 있다.

7. 시스템적합성

- 표준액 (1 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (50 $\mu\text{g/L}$)을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 분석성분의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.
- 검량선의 결정계수 (R^2)는 0.99 이상이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 검액 중 각 분석성분의 검출은 표준액과 비교하여 유지시간이 같으며, 이온의 상대 비를 확인하고, 허용범위는 30 % 이하이다.
- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.

- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 각 원료성분 별 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

표 5. 각 원료 성분별 니트로사민류의 정량한계($\mu\text{g/g}$)

분석물질	발사르탄	이르베사르탄	로사르탄	피마사르탄	칸데사르탄	올메사르탄
NDMA	0.033	0.033	0.100	0.100	0.250	0.250
NDEA	0.007	0.007	0.020	0.020	0.050	0.050
DIPNA	0.005	0.005	0.016	0.016	0.039	0.039
EIPNA	0.003	0.003	0.009	0.009	0.022	0.022
NMBA	0.019	0.019	0.056	0.056	0.141	0.141
NMEA	0.018	0.018	0.053	0.053	0.134	0.134
NDBA	0.002	0.002	0.005	0.005	0.012	0.012
NDPA	0.001	0.001	0.004	0.004	0.011	0.011
NPIP	0.003	0.003	0.010	0.010	0.025	0.025
NMOR	0.004	0.004	0.012	0.012	0.031	0.031
NPYR	0.017	0.017	0.05	0.05	0.125	0.125

5

LC-MS/MS를 이용한 라니티딘염산염 원료의약품 또는 완제의약품(단일제) 중 NDMA 분석법

1. 배경

본 분석법은 라니티딘염산염 원료의약품 또는 완제의약품(단일제) 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-*d*₆(*N*-Nitrosodimethyl-*d*₆-amine, NDMA-*d*₆) : 99.4 %
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 포름산(Formic acid) : 98 %, LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Shimadzu, Nexera X2)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 5500)
- 칼럼 (Cadenza, CX-C18 2.0 × 100 mm, 3 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

NDMA 표준품을 메탄올에 녹여 농도가 0.5 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 내부표준액

내부표준물질 NDMA-d₆을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 농도가 0.5 mg/L가 되도록 하여 내부표준액으로 한다.

■ 표준액

표준원액, 내부표준액, 메탄올 및 물을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제				최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)	메탄올 (μL)	물 (mL)	
직선성 표준액1	40	400	2,060	7.5	2
직선성 표준액2	100	400	2,000	7.5	5
직선성 표준액3	200	400	1,900	7.5	10
직선성 표준액4	500	400	1,600	7.5	25
직선성 표준액5	1,000	400	1,100	7.5	50
직선성 표준액6	2,000	400	100	7.5	100

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

라니티딘염산염 원료의약품 약 150 mg을 정밀하게 취하고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 라니티딘염산염으로서 약 150 mg 해당량을 정밀하게 취하고 내부표준액 0.4 mL, 메탄올 2.1 mL를 넣고 물 7.5 mL를 넣어 1분 이상 충분히 흔들어 섞는다. 필요시 4,000 rpm에서 10분 이상 원심분리한 후 상층액을 0.22 μm 의 멤브레인필터 (PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품(단일제)

라니티딘염산염 완제의약품(단일제) 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 라니티딘염산염으로서 약 150 mg 해당량을 정밀하게 취하고 내부표준액 0.4 mL, 메탄올 2.1 mL를 넣고 물 7.5 mL를 넣어 1분 이상 충분히 흔들어 섞는다. 4,000 rpm에서 10분 이상 원심분리한 후 상층액을 0.22 μm 의 멤브레인필터 (PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions				
Column	Cadenza CX-C18 (2.0 x 100mm, 3 μm)			
Column Temp.	40 °C			
Mobile Phase A	0.1 % Formic acid in Water			
Mobile Phase B	0.1 % Formic acid in Acetonitrile			
Gradient condition	시간(분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)	
	0.0	95	5	
	2.0	95	5	
	2.5	10	90	
	3.5	10	90	
	4.0	95	5	
	9.0	95	5	
Acquisition Time	1.3 ~ 2.3 (그 외 시간은 Divert valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)			
Flow rate	0.25 mL/min			
Injection vol.	5 μL			
Mass Spectrometer Conditions				
Ionization Mode(Polarity)	APCI (positive) MRM			
APCI gas temperature	400 ~ 500 °C			
APCI Nebulizer	30			
APCI Gas 1	45			
APCI corrona (NC)	3 μA			
Curtain Gas (CUR)	30 ~ 35			
Collision Gas (CAD)	medium			
MRM Conditions				
성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
NDMA	75 → 43 (정량)	75	20	18
	75 → 58	75	16.4	8
NDMA-d ₆	81 → 46	81	23	6

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 1.57 min, NDMA-d₆ : 1.54 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (2 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (50 $\mu\text{g/L}$) 5 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 피크면적비의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 검액의 *N*-니트로소디메틸아민 검출은 표준액과 비교하여 유지시간이 같으며, 이온의 상대 비를 확인하고, 허용범위는 30 % 이하이다.
- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.

- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 $0.12 \mu\text{g/g}$, $0.04 \mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

6

LC-MS/MS를 이용한 니자티딘 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 분석법

1. 배경

본 분석법은 니자티딘 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-d₆(*N*-Nitrosodimethyl-d₆-amine, NDMA-d₆) : 99.4 %
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 포름산(Formic acid) : 98 %, LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Shimadzu, Nexera X2)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 5500)
- 칼럼 (Phenomenex, Kinetex F5 3.0 × 100 mm, 2.6 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 용액의 조제

- 희석액 : 메탄올:물(1:3)

5. 표준액의 조제

- 표준원액

NDMA 표준품(100 $\mu\text{g/mL}$) 0.1 mL를 희석액을 넣어 정확하게 20 mL로 맞추어 농도가 0.5 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

- 내부표준액

NDMA-d₆ 표준품 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 맞추어 농도가 200 mg/L가 되도록 한다. 이 액 50 μL 를 정확하게 취하여 희석액을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 내부표준액(0.5 mg/L)으로 한다.

- 표준액

표준원액, 내부표준액 및 희석액을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 확인 표준액

표준액	조 제			최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	80	200	20	2
직선성 표준액2	200	200	20	5
직선성 표준액3	400	200	20	10
직선성 표준액4	1000	200	20	25
직선성 표준액5	2000	200	20	50
직선성 표준액6	4000	200	20	100

6. 검액의 조제

- 원료의약품

니자티딘 원료의약품 약 300 mg을 정밀하게 취하고 내부표준액 200 μL 를 정확하게 취하여 넣은 다음 희석액으로 정확하게 20 mL로 하여 충분히 흔들어 섞는다. 필요시 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μm 의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

니자티딘 완제의약품 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 니자티딘으로서 약 300 mg 해당량을 정밀하게 취하고 내부표준액 200 μL 를 정확하게 취하여 넣은 다음 희석액으로 정확하게 20 mL로 하여 충분히 흔들어 섞는다. 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μm 의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

7. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions			
Column	Phenomenex Kinetex F5 (3.0 x 100mm, 2.6 μm)		
Column Temp.	30 ℃		
Mobile Phase A	Water		
Mobile Phase B	Acetonitrile		
Gradient condition	시간(분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)
	0.0	95	5
	2.5	95	5
	5.0	5	95
	6.0	5	95
	7.0	95	5
	10.0	95	5
Acquisition Time	1.3 ~ 2.3 (그 외 시간은 Divert valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)		
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection vol.	10 μL		
Mass Spectrometer Conditions			
Ionization Mode(Polarity)	APCI (positive) MRM		
APCI gas temperature	400 ℃		
APCI Nebulizer	30		
APCI corona (NC)	3 μA		
Curtain Gas (CUR)	35		
Collision Gas (CAD)	medium		

MRM Conditions				
성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
NDMA	75 → 43 (정량)	50	20	8
	75 → 58	50	17	8
NDMA-d ₆	81 → 46	81	23	6

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 1.92 min, NDMA-d₆ 약 1.89 min

8. 시스템적합성

- 표준액 (2 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (5 $\mu\text{g/L}$) 10 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 NDMA 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

9. 데이터 평가 및 계산

- 검액의 NDMA 검출시 표준용액과 정량 및 정성이온의 상대 비를 확인하며, 허용범위는 30 % 이하이다.
- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

10. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 $0.13 \mu\text{g/g}$, $0.07 \mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

7

GC-MS/MS를 이용한 메트포르민 원료의약품 또는
완제의약품 중 NDMA 분석법

1. 배경

본 분석법은 메트포르민 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 5,000 µg/mL in methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-*d*₆(*N*-Nitrosodimethyl-*d*₆-amine, NDMA-*d*₆) : 1,000 µg/mL in dichloromethane
- 염화메틸렌(Dichloromethane) : GC grade
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 염산(Hydrochloric acid) : 1 mol/L

3. 기기 및 소모품

- 기체크로마토그래프 (Agilent, 7890B; Autosampler: 7693A)
- 질량분석기 (Agilent, 7000D GC/TQ)
- 칼럼 (HP-INNOWAX 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

NDMA 표준품($5,000 \mu\text{g/mL}$) $40 \mu\text{L}$ 를 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 정확하게 10 mL 로 하여 표준원액(20 mg/L)으로 한다.

■ 내부표준액

NDMA- d_6 표준품($1,000 \mu\text{g/mL}$) 1.0 mL 를 정밀하게 취하여 메탄올을 넣어 정확하게 50 mL 로 하여 농도가 20 mg/L 가 되도록 한다. 이 액 $500 \mu\text{L}$ 를 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 정확하게 10 mL 로 한 액을 내부표준액(1 mg/L)으로 한다.

■ 표준액

표준원액 $500 \mu\text{L}$ 를 정확하게 취하여 메탄올로 정확하게 10 mL 로 한 액을 표준액(1 mg/L)으로 한다. 표준액, 내부표준액 및 염화메틸렌을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제			최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준액 (μL)	내부표준액 (μL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	10	100	10	1
직선성 표준액2	20	100	10	2
직선성 표준액3	50	100	10	5
직선성 표준액4	100	100	10	10
직선성 표준액5	200	100	10	20
직선성 표준액6	500	100	10	50

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

메트포르민염산염으로서 약 500 mg 을 정밀하게 취하고 1 mol/L 염산 5 mL 를 넣고 내부표준액 $50 \mu\text{L}$ 를 정확하게 취하여 넣은 다음 충분히 흔들어 섞는다. 이 액에 염화메틸렌 5 mL 를 정확하게 넣고 충분히 흔들어 섞은 다음 $4,000 \text{ rpm}$ 에서 10분간 원심분리한다. 조심스럽게 염화메틸렌층 적당량을 취하여 $0.22 \mu\text{m}$ 의 멤브레인필터 (PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

메트포르민 완제의약품 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 메트포르민염산염으로서 약 500 mg 해당량을 정밀하게 취하여 1 mol/L 염산 5 mL를 넣고 내부표준액 50 μ L를 정확하게 취하여 넣은 다음 충분히 흔들어 섞는다. 이 액에 염화메틸렌 5 mL를 정확하게 넣고 충분히 흔들어 섞은 다음 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 필요시 조심스럽게 염화메틸렌층 적당량을 취하여 추가적으로 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리한다. 조심스럽게 염화메틸렌층 적당량을 취하여 0.22 μ m의 멤브레인필터 (PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 GC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Gas Chromatography Conditions			
Column	HP-INNOWAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)		
Inlet Temp.	230 °C		
Injection type	Splitless, Purge: 60 mL/min at 1 min		
Injection volume	2 μL		
Oven program	시간(분)	승온 (°C/min)	컬럼 온도 (°C)
	0.0	–	40
	0.5	–	40
	4.0	10	75
	8.0	5	95
	10.1	50	200
	19.1	–	250
Flow rate	1.5 mL/min		
Carrier gas	He		
Transfer Temp.	250 °C		
Mass Spectrometer Conditions			
Solvent delay	5 min		
Source Temp.	230 °C		
Quad Temp.	150 °C		
Collision gas	N ₂		
Quench gas	He		
Mode	MRM		

MRM Conditions		
성분	m/z	CE (eV)
NDMA	74 → 44 (정량)	4
	74 → 42	22
NDMA-d ₆	80 → 50 (정량)	6
	80 → 46	20

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 8.0 min, NDMA-d₆ 약 8.0 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (1 µg/L)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (5 µg/L) 2 µL씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 피크면적비의 상대표준편차는 10 % 이하이다.
- 표준액 (5 µg/L) 2 µL씩을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 NDMA 피크의 대칭계수는 2.0 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 $0.003 \mu\text{g/g}$, $0.001 \mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

8

LC-MS/MS를 이용한 엔타카폰 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 및 NDEA 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 엔타카폰 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA) 및 *N*-니트로소디에틸아민(NDEA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민 (*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-d₆ (*N*-Nitrosodimethyl-d₆-amine, NDMA-d₆) : 1000 µg/mL in Dichloromethane
- *N*-니트로소디에틸아민 (*N*-Nitrosodiethylamine, NDEA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디에틸아민-d₁₀ (*N*-Nitrosodiethyl-d₁₀-amine, NDEA-d₁₀) : 99.5 %
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 포름산(Formic acid) : LC-MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (OSAKA SODA Nanospace)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 6500 plus)
- 칼럼 (Agilent, Poroshell EC-C18 4.6 × 150 mm, 2.7 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

- NDMA 표준품을 물에 녹여 0.1 mg/L가 되도록 하여 NDMA 표준원액으로 한다.
- NDEA 표준품을 물에 녹여 0.05 mg/L가 되도록 하여 NDEA 표준원액으로 한다.

■ 내부표준액

- NDMA-d₆ 표준품을 물에 녹여 0.1 mg/L가 되도록 하여 NDMA 내부표준액으로 한다.
- NDEA-d₁₀ 표준품을 물에 녹여 0.5 µg/L가 되도록 하여 NDEA 내부표준액으로 한다.

■ 표준액

NDMA, NDEA의 표준원액 및 내부표준액을 아래 표와 같이 각각 취하여 섞은 다음 물로 정확하게 20 mL로 맞춘다. 이 액을 0.2 µm의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 직선성 표준액으로 한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	NDMA		NDEA		NDMA 최종 농도 (µg/L)	NDEA 최종 농도 (µg/L)
	표준원액 (µL)	내부표준액 (µL)	표준원액 (µL)	내부표준액 (µL)		
직선성 표준액1	100	1,000	80	800	0.5	0.2
직선성 표준액2	200	1,000	200	800	1	0.5
직선성 표준액3	400	1,000	400	800	2	1
직선성 표준액4	1,000	1,000	800	800	5	2
직선성 표준액5	2,000	1,000	2,000	800	10	5
직선성 표준액6	5,000	1,000	4,000	800	25	10

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

엔타카폰으로서 약 500 mg을 정밀하게 달아 NDMA 내부표준액 1 mL, NDEA 내부표준액 0.8 mL씩을 정확하게 취하여 넣고 적당량의 물을 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 물로 정확하게 20 mL로 맞춘다. 이 액을 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 조심스럽게 상등액을 취하여 0.22 μ m의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

이 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 엔타카폰으로서 약 500 mg을 정밀하게 달아 NDMA 내부표준액 1 mL, NDEA 내부표준액 0.8 mL씩을 정확하게 취하여 넣고 적당량의 물을 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 물로 정확하게 20 mL로 맞춘다. 이 액을 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 조심스럽게 상등액을 취하여 0.22 μ m의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions					
Column	Agilent Poroshell EC-C18 (4.6 × 150 mm, 2.7 μm)				
Column Temp.	40 ℃				
Mobile Phase A	0.1% Formic acid in Water				
Mobile Phase B	0.1% Formic acid in Methanol				
Gradient Profile	시간 (분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)		
	0.0 ~ 4.0	98	2		
	4.0 ~ 5.0	98 → 75	2 → 25		
	5.0 ~ 10.0	75	25		
	10.0 ~ 10.1	75 → 5	25 → 95		
	10.1 ~ 12.0	5	95		
	12.0 ~ 12.1	5 → 98	95 → 2		
	12.1 ~ 15.0	98	2		
Acquisition Time	3.0 ~ 5.0 분, 8.0 ~ 9.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)				
Injection Volume	10 μL				
Flow Rate	1.0 mL/분				
Mass Spectrometer Conditions					
Ionization Mode	APCI (+) MRM				
APCI Gas Temp.	300℃				
APCI Nebulizer (Gas 1)	30 psi				
APCI corona (NC)	3 μA				
Curtain Gas (CUR)	30 psi				
Collision Gas (CAD)	High				
성 분	MRM 조건				
	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)	EP (V)
NDMA	75.0 → 43.0 (정량)	90	18	10	10
	75.0 → 58.0	60	16	6	10
NDMA-d ₆	81.0 → 46.0	81	18	22	10
NDEA	103.0 → 75.0 (정량)	20	20	10	10
	103.0 → 47.0	20	22	10	10
NDEA-d ₁₀	113.0 → 34.0	90	17	2	10

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 3.53 min, NDEA 약 8.59 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (NDMA 1 $\mu\text{g/L}$, NDEA 0.5 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (NDMA 1 $\mu\text{g/L}$, NDEA 0.5 $\mu\text{g/L}$) 10 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA 및 NDEA의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도 } (\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 회석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.

- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

분석물질	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
NDMA	0.012	0.004
NDEA	0.008	0.002

9

LC-MS/MS를 이용한 데스-벤라팍신 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 분석법

1. 배경

본 분석법은 데스-벤라팍신 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민 (NDMA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-d₆(*N*-Nitrosodimethyl-d₆-amine, NDMA-d₆) : 1,000 µg/mL in Dichloromethane
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Osaka-soda, Nanospace 3004 SI-2)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 5500)
- 칼럼 (Imtakt, Cadenza CX-C18 4.6 × 50 mm, 3 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 내부표준액

NDMA-d₆ 표준품을 메탄올에 녹여 0.5 mg/L가 되도록 하여 내부표준액으로 한다.

■ 표준원액

NDMA 표준품을 메탄올에 녹여 0.5 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

표준원액, 내부표준액, 물을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조제				최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)	물 (mL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	20	100	2.5	5	2
직선성 표준액2	50	100	2.5	5	5
직선성 표준액3	100	100	2.5	5	10
직선성 표준액4	200	100	2.5	5	20
직선성 표준액5	500	100	2.5	5	50
직선성 표준액6	1,000	100	2.5	5	100

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

데스-벤라팍신 약 100 mg을 정밀하게 취하고 내부표준액 0.2 mL를 넣는다. 메탄올을 넣어 충분히 흔들어 녹인 다음 메탄올로 5 mL가 되도록 맞춘다. 필요시 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 2 mL와 물 2 mL를 충분히 흔들어 섞는다. 이 액을 0.2 μm 의 멤브레인필터 (PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

이 약 20정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 데스-벤라팍신으로서 약 100 mg 해당량을 정밀하게 취하고 내부표준액 0.2 mL를 넣는다. 메탄올을 넣어 충분히 흔들어 녹인 다음 메탄올로 5 mL가 되도록 맞춘다. 필요시 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 2 mL와 물 2 mL를 충분히 흔들어 섞는다. 이 액을 0.2 μm 의 멤브레인필터 (PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions				
Column	Cadenza CX-C18 (4.6 × 50 mm, 3 μm)			
Column temp.	40 °C			
Mobile Phase A	Water			
Mobile Phase B	Methanol			
Gradient condition	시간 (분)	이동상 A (vol %)		이동상 B (vol %)
	0.0 ~ 2.5	95		5
	2.5 ~ 5.0	95 → 5		5 → 95
	5.0 ~ 6.0	5		95
	6.0 ~ 7.0	5 → 95		95 → 5
	재평형 (3 분)	95		5
Acquisition Time	0.5 ~ 2.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)			
Flow rate	0.8 mL/분			
Injection volume	10 μL			
Autosampler temp.	15 °C			
Mass Spectrometer Conditions				
Ionization Mode	APCI (+) MRM			
APCI gas temp.	400°C			
APCI Gas 1	45 psi			
APCI corona (NC)	3 μA			
Curtain Gas (CUR)	35 psi			
Collision Gas (CAD)	8			
성 분	MRM 조건			
	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
NDMA	75.0 → 43.0 (정량)	50	20	8
	75.0 → 58.0	50	17	8
NDMA-d ₆	81.0 → 46.0	81	23	6

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 1.4 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (2 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (5 $\mu\text{g/L}$) 10 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 0.20 $\mu\text{g/g}$, 0.10 $\mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

10

LC-MS/MS를 이용한 클로르페리나민말레산염 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 분석법

1. 배경

본 분석법은 클로르페리나민말레산염 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민 (NDMA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-*d*₆(*N*-Nitrosodimethyl-*d*₆-amine, NDMA-*d*₆) : 1,000 µg/mL in Dichloromethane
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Osaka-soda, Nanospace 3004 SI-2)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 5500)
- 칼럼 (Imtakt, Cadenza CX-C18 4.6 × 50 mm, 3 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 내부표준액

NDMA-d₆ 표준품을 메탄올에 녹여 0.5 mg/L가 되도록 하여 내부표준액으로 한다.

■ 표준원액

NDMA 표준품을 메탄올에 녹여 1 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

표준원액, 내부표준액, 물을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조제				최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)	물 (mL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	10	100	4.0	5	2
직선성 표준액2	25	100	4.0	5	5
직선성 표준액3	50	100	4.0	5	10
직선성 표준액4	100	100	4.0	5	20
직선성 표준액5	250	100	4.0	5	50
직선성 표준액6	500	100	4.0	5	100

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

클로르페니라민말레산염 약 20 mg을 정밀하게 취하고 내부표준액 100 μL 과 물 4 mL를 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 메탄올로 5 mL가 되도록 맞춘다. 필요시 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.2 μm 의 멤브레인필터 (PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

이 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 클로르페니라민 말레산염 약 20 mg 해당량을 정밀하게 취하고 내부표준액 100 μL 과 물 4 mL를 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 메탄올로 5 mL가 되도록 맞춘다. 필요시 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.2 μm 의 멤브레인필터 (PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions				
Column	Cadenza CX-C18 (4.6 × 50 mm, 3 μm)			
Column temp.	40 °C			
Mobile Phase A	Water			
Mobile Phase B	Methanol			
Gradient condition	시간 (분)	이동상 A (vol %)		이동상 B (vol %)
	0.0 ~ 2.5	95		5
	2.5 ~ 5.0	95 → 5		5 → 95
	5.0 ~ 6.0	5		95
	6.0 ~ 7.0	5 → 95		95 → 5
	재평형 (3 분)	95		5
Acquisition Time	0.5 ~ 2.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)			
Flow rate	0.8 mL/분			
Injection volume	10 μL			
Autosampler temp.	15 °C			
Mass Spectrometer Conditions				
Ionization Mode	APCI (+) MRM			
APCI gas temp.	400°C			
APCI Gas 1	45 psi			
APCI corona (NC)	3 μA			
Curtain Gas (CUR)	35 psi			
Collision Gas (CAD)	8			
성 분	MRM 조건			
	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
NDMA	75.0 → 43.0 (정량)	50	20	8
	75.0 → 58.0	50	17	8
NDMA-d ₆	81.0 → 46.0	81	23	6

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 1.4 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (2 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (15 $\mu\text{g/L}$) 10 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 0.50 $\mu\text{g/g}$, 0.25 $\mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

GC-MS/MS를 이용한 트리메부틴말레산염 원료의약품 또는 완제의약품 중 NDMA 분석법

1. 배경

본 분석법은 트리메부틴말레산염 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소디메틸아민(NDMA)을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 5,000 $\mu\text{g/mL}$ in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민- d_6 (*N*-Nitrosodimethyl- d_6 -amine, NDMA- d_6) : 1,000 $\mu\text{g/mL}$ in Dichloromethane
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 디메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide) : GC grade

3. 기기 및 소모품

- 기체크로마토그래프 (Agilent, 7890B (Headspace : Agilent 7697A))
- 질량분석기 (Agilent, 7000D GC/TQ)
- 칼럼 (Agilent, DB-WAX 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 내부표준원액

NDMA-d₆ 표준품을 메탄올에 녹여 20 mg/L가 되도록 하여 내부표준원액으로 한다.

■ 내부표준액

내부표준원액 1 mL를 정확하게 취하여 디메틸설폭사이드를 넣어 정확하게 20 mL로 하여 내부표준액으로 한다(1 mg/L).

■ 표준원액

NDMA 표준품을 메탄올에 녹여 1 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

표준원액, 내부표준액을 표 1과 같이 각각 취하여 섞은 다음 디메틸설폭사이드를 정확하게 5 mL로 하여 직선성 표준액으로 한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조제			최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	25	200	5	5
직선성 표준액2	50	200	5	10
직선성 표준액3	100	200	5	20
직선성 표준액4	250	200	5	50
직선성 표준액5	500	200	5	100
직선성 표준액6	1,250	200	5	250

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

트리메부틴말레산염 약 300 mg을 정밀하게 달아 헤드스페이스 바이알에 넣는다. 내부표준액 200 μL , 디메틸설폭사이드 4.8 mL를 넣고 충분히 흔들어 섞은 액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

이 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 트리메부틴말레산염 으로서 약 300 mg에 해당하는 양을 정밀하게 달아 헤드스페이스 바이알에 넣는다. 내부표준액 200 μL , 디메틸설폭사이드 4.8 mL를 넣고 충분히 흔들어 섞은 액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 GC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Gas Chromatography Conditions				
Column		DB-WAX (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)		
Inlet temp.		220 °C		
Injection type		Split, 3:1		
Flow rate		1.2 mL/분		
Oven program		시간 (분)	승온(°C/분)	온도(°C)
		0.0 ~ 0.5	-	40
		0.5 ~ 2.0	20	70
		2.0 ~ 8.0	5	100
		8.0 ~ 10.0	50	200
		10.0 ~ 16.0 (post run)	-	250
Vial size		20 mL		
Vial shaking		Level 9 (250 shakes/분)		
Fill pressure		15 psi		
Loop size		1 mL		
Carrier gas		He		
Transfer temp.		250 °C		
Mass Spectrometer Conditions				
Solvent delay		5 min		
Source temp.		230°C		
Quad temp.		150°C		
Collision gas		N ₂		
Quench gas		He		
성 분		MRM 조건		
		m/z	CE (eV)	
NDMA 분석	NDMA	74 → 44 (정량)	22	
		75 → 42	4	
	NDMA-d ₆	80 → 50 (정량)	20	
		80 → 46	6	

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 6.9 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (5 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (10 $\mu\text{g/L}$)을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA의 피크면적비의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도 } (\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} (\mu\text{g}) \div W_T$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

W_T : 검체 채취량 (g)

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 0.08 $\mu\text{g/g}$, 0.03 $\mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

12

LC-MS/MS를 이용한 리팜피신 원료의약품 또는 완제의약품(단일제) 중 MNP 분석법

1. 배경

본 분석법은 리팜피신 원료의약품 또는 완제의약품(단일제) 중 1-메틸-4-니트로소피페라진(MNP)를 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- 1-메틸-4-니트로소피페라진 (1-Methyl-4-Nitrosopiperazine, MNP) : 99%
- 포름산암모늄 (Ammonium formate) : 99.9% 이상, LC-MS grade
- 수산화암모늄수용액 28% (Ammonium Hydroxide Solution 28%) : Reagent grade
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (OSAKA SODA Nanospace)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 6500 plus)
- 칼럼 (Waters, Acquity UPLC HSS T3 2.1 x 100mm, 1.8 μ m)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)
- 분액여두진탕기 (300r/min 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

MNP 표준품 5 mg을 메탄올 10 mL에 녹여 500 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

표준원액 2 mL를 메탄올 10 mL에 녹여 100 mg/L가 되도록 하고 10배씩 희석하여 1 mg/L가 되도록 하여 표준액으로 한다. 표준액을 각각 아래 표와 같이 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 최종 농도를 각각 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 로 하여 직선성 표준액으로 한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제			최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준액 (μL)	메탄올 (mL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	2.5	4.9975	5	0.5
직선성 표준액2	5	4.995	5	1
직선성 표준액3	10	4.99	5	2
직선성 표준액4	25	4.975	5	5
직선성 표준액5	50	4.95	5	10
직선성 표준액6	250	4.75	5	50
직선성 표준액7	500	4.5	5	100
직선성 표준액8	1000	4	5	200

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

리팜피신 원료의약품 약 150 mg을 정밀하게 취하고 메탄올 5 mL를 넣고 vortex mixer를 이용하여 충분히 흔들어 섞는다. 이 액을 취하여 0.22 μm 의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

리팜피신 완제의약품 약 20 정(또는 20 캡슐) 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 리팜피신으로서 약 300 mg을 정밀하게 달아 메탄올 10 mL를 넣고 vortex mixer를 이용하여 1 분 동안 충분히 흔들어 섞는다. 수직 운동을 하는 shaker를 이용하여 40 분 동안 충분히 흔들어 섞는다(300 r/분). 추출한 다음 4000 rpm에서 10 분간 원심분리한다. 이 액을 취하여 0.22 μm 의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions					
Column	Waters Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 100mm, 1.8 μm)				
Column Temp.	35 °C				
Mobile Phase A	10 mM Ammonium Formate in water (pH 9.0) 포름산암모늄 약 630 mg을 정밀하게 달아 물 1000 mL에 녹여 수산화암모늄을 넣어 pH 9.0으로 조정한다.				
Mobile Phase B	Methanol				
Gradient	시간(분)	Mobile Phase A (vol%)	Mobile Phase B (vol%)		
	0.0 ~ 2.0	60	40		
	2.0 ~ 6.0	0	100		
	6.0 ~ 9.0	0	100		
	9.0 ~ 9.1	60	40		
	9.1 ~ 13.0	60	40		
Acquisition Time	1.5 ~ 2.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)				
Flow rate	0.2 mL/min				
Injection vol.	3 μL				
Autosampler Temp.	4 ~ 8 °C				
Needle wash	Methanol				
Mass Spectrometer Conditions					
Ionization Mode(Polarity)	ESI (positive) MRM				
Temperature	300 °C				
Ionspray Voltage	5500				
Curtain Gas (CUR)	35				
Collision Gas (CAD)	medium				
MRM 조건	성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
	MNP	130.019 → 100.0 (정량) 130.019 → 58.0	56 56	13 25	12 8

* (참고) 유지시간 : MNP 약 1.82 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (0.5 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (5 $\mu\text{g/L}$) 3 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 MNP 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 외부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적을 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(A_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

A_T : 분석성분의 피크면적

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 0.02 $\mu\text{g/g}$, 0.002 $\mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

13

LC-MS/MS를 이용한 리팜피신 완제의약품(복합제) 중 MNP 분석법

1. 배경

본 분석법은 리팜피신 완제의약품(복합제) 중 1-메틸-4-니트로소피페라진(MNP)를 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- 1-메틸-4-니트로소피페라진 (1-Methyl-4-Nitrosopiperazine, MNP) : 99%
- 1-메틸-4-니트로소피페라진-d₄ (1-Methyl-4-Nitrosopiperazine-d₄, MNP-d₄) : 99%
- 포름산암모늄 (Ammonium formate) : 99.9% 이상, LC-MS grade
- 수산화암모늄수용액 28% (Ammonium Hydroxide Solution 28%) : Reagent grade
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (OSAKA SODA Nanospace)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 6500 plus)
- 칼럼 (Waters, Acquity UPLC HSS T3 2.1 x 100mm, 1.8 μ m)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)
- 분액여두진탕기 (300r/min 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

MNP 표준품 5 mg을 메탄올 10 mL에 녹여 500 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 내부표준액

내부표준물질 MNP-d₄ 5 mg을 메탄올 1 mL에 녹여 5,000 mg/L가 되도록 하여 내부표준원액1 (5,000 mg/L)으로 한다. 이 액 1 mL를 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 한 액을 내부표준원액2 (50 mg/L)으로 한다. 이 액 2 mL를 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 한 액을 내부표준액 (1 mg/L)으로 한다.

■ 표준액

표준원액 2 mL를 정확하게 취하여 메탄올로 정확하게 10 mL로 한 표준액(100 mg/L)을 10배씩 희석하여 표준액(1 mg/L)으로 한다. 표준액(1 mg/L)과 내부표준액을 각 아래 표와 같이 정확하게 취하여 메탄올을 넣어 최종 농도를 각각 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 µg/L로 하여 직선성 표준액으로 한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제			최종 농도 (µg/L)
	표준액 (µL)	내부표준액 (µL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	4	400	20	0.2
직선성 표준액2	10	400	20	0.5
직선성 표준액3	20	400	20	1
직선성 표준액4	40	400	20	2
직선성 표준액5	100	400	20	5
직선성 표준액6	200	400	20	10
직선성 표준액7	400	400	20	20
직선성 표준액8	1000	400	20	50

5. 검액의 조제

완제의약품 약 20 정(또는 20 캡슐) 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 리팜피신으로서 약 30 mg 해당하는 양을 정밀하게 달아 내부표준액(1 mg/L) 400 μ L를 정확하게 취하여 넣고 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL로 한 다음 vortex mixer를 이용하여 1 분 동안 충분히 흔들어 섞는다. 수직 운동을 하는 shaker를 이용하여 40 분 동안 충분히 흔들어 섞는다(300 r/분). 추출한 다음 4000 rpm에서 10 분간 원심분리한다. 이 액을 취하여 0.22 μ m의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

■ 이동상의 조제

- 이동상 A : 포름산암모늄 약 630 mg을 정밀하게 달아 물 1000 mL에 녹여 수산화암모늄을 넣어 pH 8.0으로 조정한다.
- 이동상 B : 메탄올

표 2. 기기분석 조건(복합제)

Liquid Chromatography Conditions					
Column	Waters Acquity UPLC HSS T3 (2.1 x 100mm, 1.8 μm)				
Column Temp.	35 °C				
Mobile Phase A	10 mM Ammonium Formate in water(pH 8.0) (정성이온 중 매트릭스 간섭을 줄이기 위해 pH 8.4 적용)				
Mobile Phase A	Methanol				
Gradient	시간 (분)	Mobile Phase A (vol%)	Mobile Phase B (vol%)		
	0.0	95	5		
	0.0 ~ 2.0	85	15		
	2.0 ~ 6.0	85	15		
	6.0 ~ 8.0	70	30		
	8.0 ~ 9.0	0	100		
	9.0 ~12.0	0	100		
	12.0 ~ 12.1	95	5		
	12.1 ~ 15.0	95	5		
Acquisition Time	5.0 ~ 7.0 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)				
Flow rate	0.2 mL/min				
Injection vol.	1.5 μL				
Autosampler Temp.	4 ~ 8 °C				
Needle wash	Methanol				
Mass Spectrometer Conditions					
Ionization Mode (Polarity)	ESI (positive) MRM				
Temperature	300 °C				
Ionspray Voltage	5500				
Curtain Gas (CUR)	55				
Collision Gas (CAD)	medium				
MRM 조건	성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
	MNP	130.0 → 100.0 (정량)	25	13	12
		130.0 → 58.0	25	25	8
	MNP-d4	134.1 → 104.2	25	13	12

* (참고) 유지시간 : MNP 약 5.96 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (2 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (5 $\mu\text{g/L}$) 1.5 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 MNP의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 2 $\mu\text{g/g}$, 0.8 $\mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

14

LC-MS/MS를 이용한 바레니클린 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소-바레니클린 분석법

1. 배경

본 분석법은 바레니클린 원료의약품 또는 완제의약품 중 *N*-니트로소-바레니클린을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- *N*-니트로소-바레니클린 (N-nitroso-varenicline) : 100 %
- 아세토니트릴(Acetonitrile) : LC/MS grade
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Agilent 1290 infinity system)
- 질량분석기 (Agilent 6490 Triple Quadrupole)
- 칼럼 (Imtakt, Cadenza 5CD-C18 150 × 2.0 mm, 5 μm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

N-니트로소-바레니클린 표준품을 메탄올에 녹여 1 mg/L 농도가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

N-니트로소-바레니클린 표준원액을 아래 표와 같이 취하여 섞은 다음 50 vol% 메탄올로 정확하게 50 mL로 맞춘다. 0.2 μ m의 멤브레인필터(PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 표준액으로 한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	최종농도 (μ g/L)	표준원액 (μ L)	최종 부피 (mL)
직선성 표준액1	0.8	40	50
직선성 표준액2	2	100	50
직선성 표준액3	4	200	50
직선성 표준액4	10	500	50
직선성 표준액5	20	1000	50
직선성 표준액6	40	2000	50

5. 검액의 조제

■ 원료의약품

바레니클린타르타르산염, 바레니클린살리실산염을 바레니클린으로서 약 5 mg을 정밀하게 달아 50 mL 용량플라스크에 넣고 50 vol% 메탄올로 정확하게 표선을 맞춘다. 이 후 20 분간 충분히 흔들어 섞고, 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μ m의 멤브레인필터(PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다.

■ 완제의약품

바레니클린타르타르산염, 바레니클린살리실산염 완제의약품 약 20정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 갈아 가루로 한다. 바레니클린으로서 5 mg에 해당하는 양을 정밀히 달아 50 mL 용량플라스크에 넣고 50 vol% 메탄올로 정확하게 표선을 맞춘다. 이 후 20 분간 충분히 흔들어 섞고, 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μ m의 멤브레인필터(PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions			
Column	Cadenza 5CD-C18 (150 × 2.0 mm, 5 μm)		
Column temp.	30 ℃		
Mobile Phase A	0.1% Formic acid in Water		
Mobile Phase B	0.1% Formic acid in Acetonitrile		
Gradient condition	시간 (분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)
	0.0 ~ 3.5	80	20
	3.5 ~ 4.0	80 → 70	20 → 30
	4.0 ~ 8.0	70	30
	8.0 ~ 8.1	70 → 20	30 → 80
	8.1 ~ 10.0	20	80
	10.0 ~ 10.1	20 → 80	80 → 20
	10.1 ~ 15.0	80	20
Acquisition Time	6.0 ~ 8.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)		
Injection volume	3 μL		
Flow rate	0.2 mL/min		
Autosampler temp.	4 ℃		
Mass Spectrometer Conditions			
Ionization Mode (Polarity)	ESI (+) MRM		
Capillary	3000 V		
Gas Temp	200 ℃		
Gas Flow	14 L/min		
Nebulizer	35 psi		
Sheath Gas Temp	350 ℃		
Sheath Gas Flow	11 L/min		

※ MRM 조건

성분	MRM 조건		
	m/z	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
<i>N</i> -nitroso-varenicline	241.1 → 169.1 (정량) 241.1 → 181.1	24	5

* (참고) 유지시간 : *N*-nitroso-varenicline 약 7.2 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (0.8 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (1.6 $\mu\text{g/L}$) 3 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 *N*-니트로소-바레니클린의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.
- 검량선의 결정계수(R^2)가 0.998 이상이고, 표준액 (0.8 ng/mL) 3 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 *N*-니트로소-바레니클린 피크의 대칭계수는 각 2.0 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 외부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적을 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(A_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

A_T : 분석성분의 피크면적

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.

- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 $8 \mu\text{g/g}$, $4 \mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

기타 불순물 시험법

15

LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 중 AZBT를 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다.

2. 표준품 및 시약

- AZBT (5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1H-tetrazole) : 99.71 %
- 메탄올(Methanol) : LC-MS grade
- 물(Water) : LC-MS grade
- 포름산(Formic acid) : 98 %, LC-MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (OSAKA SODA Nanospace)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 6500 plus)
- 칼럼 (Phenomenex, Kinetex F5 3.0 × 100 mm, 2.6 μm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

AZBT 표준품을 75 % 메탄올에 녹여 1 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

AZBT 표준원액을 아래 표와 같이 정확하게 취하여 75 % 메탄올을 넣어 최종농도를 각각 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g/L}$ 로 하여 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제			최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	75 % 메탄올 (mL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	10	19.99	20	0.5
직선성 표준액2	20	19.98	20	1
직선성 표준액3	40	19.96	20	2
직선성 표준액4	100	19.9	20	5
직선성 표준액5	200	19.8	20	10
직선성 표준액6	400	19.6	20	20
직선성 표준액7	1000	19	20	50

5. 검액의 조제

사르탄류 원료의약품*으로서 약 100 mg을 정밀하게 달아 75 % 메탄올을 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 75 % 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 맞춘다. 이 액을 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 조심스럽게 상등액을 취하여 0.22 μm 의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

* 이르베사르탄, 발사르탄, 로사르탄

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음 표 2의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions					
Column	Phenomenex Kinetex F5 (3.0 x 100mm, 2.6 μm)				
Column Temp.	35 ℃				
Mobile Phase A	0.1 % Formic acid in Water				
Mobile Phase B	0.1 % Formic acid in Methanol				
Gradient condition	시간(분)	이동상 A (vol %)		이동상 B (vol %)	
	0.0	70		30	
	2.0	70		30	
	2.5	50		50	
	10.0	50		50	
	10.5	5		95	
	12.5	5		95	
	12.6	70		30	
	15.0	70		30	
Acquisition Time	7.5 ~ 9.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)				
Flow rate	0.4 mL/min				
Injection vol.	5 μL				
Autosampler Temp.	4 ℃				
Mass Spectrometer Conditions					
Ionization Mode (Polarity)	ESI (positive) MRM				
Temperature	350 ℃				
Ionspray Voltage	5500				
Curtain Gas (CUR)	35.00				
Collision Gas (CAD)	medium				
MRM Conditions					
성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)	EP (eV)
AZBT	278.11 → 235.20 (정량)	36	13	10	10
	278.11 → 207.10	36	21	8	10

* (참고) 유지시간 : AZBT 약 8.96 min

7. 시스템적합성

- 표준액 (1 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (1 $\mu\text{g/L}$) 5 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 AZBT 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.
- 검량선의 결정계수(R^2)가 0.995 이상이고, 표준액 (1 $\mu\text{g/L}$) 5 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 AZBT 피크의 대칭계수는 2.0 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 검액 중 AZBT 검출시 표준액에서 정량 및 정성이온의 상대 비를 확인하며, 허용범위는 30 % 이하이다.
- 외부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적을 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(A_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

A_T : 분석성분의 피크면적

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 $0.5 \mu\text{g/g}$, $0.1 \mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

16

LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 NDMA 및 AZBT 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 중 NDMA, AZBT를 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다.

2. 표준품 및 시약

- AZBT (5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1H-tetrazole) : 99.71 %
- AZBT-d₄ (5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1H-tetrazole-d₄) : 99.71 %
- *N*-니트로소디메틸아민(*N*-Nitrosodimethylamine, NDMA) : 100 µg/mL in Methanol
- *N*-니트로소디메틸아민-d₆(*N*-Nitrosodimethyl-d₆-amine, NDMA-d₆) : 99.86 %
- 메탄올(Methanol) : LC/MS grade
- 물(Water) : LC/MS grade
- 포름산(Formic acid) : 98 %, LC-MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (OSAKA SODA Nanospace)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 6500+)
- 칼럼 (Phenomenex, Kinetex F5 3.0 × 100 mm, 2.6 µm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액

- NDMA 표준품을 25 % 메탄올에 녹여 0.5 mg/L 농도가 되도록 하여 NDMA 표준원액으로 한다.
- AZBT 표준품을 25 % 메탄올에 녹여 1.0 mg/L 농도가 되도록 하여 AZBT 표준원액으로 한다.

■ 내부표준원액

- NDMA-d₆ 표준품을 25 % 메탄올에 녹여 0.5 mg/L 농도가 되도록 하여 NDMA 내부표준액으로 한다.
- AZBT-d₄ 표준품을 25 % 메탄올에 녹여 1.0 mg/L 농도가 되도록 하여 AZBT 내부표준액으로 한다.

■ 표준액

표준원액 및 내부표준원액, 25 % 메탄올을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	NDMA		AZBT		최종 부피 (mL)	NDMA 최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)	AZBT 최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	내부 표준원액 (μL)	표준원액 (μL)	내부 표준원액 (μL)			
직선성표준액1	10	100	25	250	10	0.5	2.5
직선성표준액2	20	100	50	250	10	1	5
직선성표준액3	40	100	100	250	10	2	10
직선성표준액4	100	100	250	250	10	5	25
직선성표준액5	300	100	750	250	10	15	75
직선성표준액6	600	100	1500	250	10	30	150
직선성표준액7	1000	100	2500	250	10	50	250

5. 검액의 조제

사르탄 원료의약품으로서 아래의 표 2와 같이 성분별 무게에 해당하는 양을 정밀하게 달아 메탄올 2.0 mL, NDMA-d₆ 표준원액 0.1 mL, AZBT-d₄ 표준원액 0.25 mL을 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 물을 넣어 정확하게 10 mL로 맞춘다. 이 액을 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 조심스럽게 상등액을 취하여 0.22 μm의 멤브레인필터(PVDF)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

표 2. 각 성분별 무게

성분명	발사르탄	로사르탄	이르베사르탄
채취량(mg)	150	50	150

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 3. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions			
Column	Phenomenex Kinetex F5 (3.0 x 100mm, 2.6 μm)		
Column Temp.	35 °C		
Mobile Phase A	0.1 % Formic acid in Water		
Mobile Phase B	0.1 % Formic acid in Methanol		
Gradient condition	시간(분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)
	0.0	95	5
	3.0	95	5
	4.0	50	50
	10.0	50	50
	10.01	5	95
	12.0	5	95
	12.01	95	5
	17.0	95	5
Acquisition Time	1.6 ~ 2.5, 10.2 ~ 11.5 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)		
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection vol.	20 μL		
Autosampler Temp.	4 °C		

Mass Spectrometer Conditions					
Ionization Mode (Polarity)	APCI (positive) MRM				
APCI gas temp.	300 °C				
APCI Nebulizer(GS1)	45 psi				
APCI corrona(NC)	3 μA				
Curtain Gas(CUR)	40 psi				
Collision Gas(CAD)	Medium				
MRM Conditions					
성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)	EP (eV)
NDMA	75.0 → 43.0 (정량)	90	18	10	10
	75.0 → 58.0	60	16	8	10
NDMA-d ₆	81.0 → 46.0	51	25	8	10
AZBT	278.1 → 235.2 (정량)	35	15	12	10
	278.1 → 207.1	35	22	10	10
AZBT-d ₄	282.1 → 239.1	71	11	16	10

* (참고) 유지시간 : NDMA 약 1.9 min, AZBT 약 10.8 min)

7. 시스템적합성

- 표준액 (NDMA 0.5 μ g/L / AZBT 2.5 μ g/L)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (NDMA 5 μ g/L / AZBT 75 μ g/L) 20 μ L씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 내부표준물질의 피크면적에 대한 NDMA의 피크면적비, 내부표준물질의 피크면적에 대한 AZBT의 피크면적비의 상대표준편차는 10.0 % 이하이다.
- 표준액 (NDMA 5 μ g/L / AZBT 75 μ g/L) 20 μ L씩을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 NDMA의 피크, AZBT의 피크의 대칭계수는 각 2.0 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 내부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적 대 내부 표준물질의 피크면적비를 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도 } (\mu\text{g/g}) = \frac{(Q_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

Q_T : 분석성분의 피크면적 대 내부표준물질의 피크면적비

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

분석물질	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
NDMA	0.033	0.013
AZBT	0.02	0.008

17

LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 아지도불순물 동시분석법

1. 배경

본 분석법은 사르탄류 원료의약품 또는 완제의약품 중 아지도불순물을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- AZBT (5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1H-tetrazole) : 99.71 %
- AZBC (4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carbonitrile) : 98.29 %
- 로사르탄아지도불순물 (5-(4'-((5-(azidomethyl)-2-butyl-4-chloro-1H-imidazol-1-yl)methyl)-[1,1'-biphenyl]-2-yl)-1H-tetrazole, AZBMT) : 96.09 %
- 메탄올(Methanol) : LC-MS grade
- 물(Water) : LC-MS grade
- 포름산(Formic acid) : 98 %, LC-MS grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Shimadzu, Nexera X2)
- 질량분석기 (SCIEX, QTRAP 5500)
- 칼럼 (Phenomenex, Kinetex F5 3.0 × 100 mm, 2.6 μm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 용액의 조제

- 희석액 : 메탄올:물(3:2)

5. 표준액의 조제

■ 표준원액

AZBT 표준품 5 mg, AZBC 표준품 5 mg, 로사르탄아지도불순물 표준품 5 mg을 메탄올 100 mL에 녹여 각 50 mg/L가 되도록 한다. 이 액 1 mL를 정확하게 취하여 희석액 100 mL에 녹여 0.5 mg/L가 되도록 하여 표준원액으로 한다.

■ 표준액

표준원액 및 희석액을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제			최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	희석액 (mL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	10	9.99	10	0.5
직선성 표준액2	20	9.98	10	1
직선성 표준액3	40	9.96	10	2
직선성 표준액4	100	9.9	10	5
직선성 표준액5	300	9.7	10	15
직선성 표준액6	600	9.4	10	30
직선성 표준액7	1000	9	10	50

6. 검액의 조제

■ 원료의약품

사르탄류 원료의약품* 약 100 mg을 정밀하게 취하고 희석액 5 mL를 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 희석액 20 mL가 되도록 맞춘다. 필요시 4000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액 2 mL를 취하여 정확하게 10 mL로 한다. 이 액 0.2 μm 의 멤브레인필터 (PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

* 이르베사르탄, 발사르탄, 로사르탄

■ 완제의약품

사르탄류 완제의약품 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 사르탄류 약 100 mg 해당량을 정밀하게 취하고 희석액 5 mL를 넣어 충분히 흔들어 섞은 다음 희석액으로 20 mL가 되도록 맞춘다. 필요시 4000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액 2 mL를 취하여 정확하게 10 mL로 한다. 이 액 0.2 μ m의 멤브레인필터 (PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

7. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions			
Column	Phenomenex Kinetex F5 (3.0 x 100mm, 2.6 μ m)		
Column Temp.	40 $^{\circ}$ C		
Mobile Phase A	0.1 % Formic acid in Water		
Mobile Phase B	0.1 % Formic acid in Methanol		
Gradient condition	시간(분)	이동상 A (vol %)	이동상 B (vol %)
	0.0	55	45
	4.0	55	45
	8.0	45	55
	14.0	45	55
	16.0	40	60
	20.0	40	60
	20.1	5	95
	22.0	5	95
	22.1	55	45
	25.0	55	45
Acquisition Time	8.0 ~ 9.5, 14.0 ~ 16.0, 18.0 ~ 20.0 (그 외 시간은 Divert valve를 이용하여 버림)		
Flow rate	0.4 mL/min		
Injection vol.	5 μ L		

Mass Spectrometer Conditions					
Ionization Mode(Polarity)	ESI (positive) MRM				
Temperature	350 °C				
Ionspray Voltage	5500				
Curtain Gas (CUR)	35				
Collision Gas (CAD)	medium				
MRM Conditions					
성분	m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)	EP (eV)
AZBT	278.1 → 235.1 (정량)	36	13	10	10
	278.1 → 207.1	36	21	8	10
	278.1 → 180.1	36	29	8	10
AZBC	192.1 → 165.1 (정량)	141	31	10	10
	207.1 → 151.1	141	45	10	10
	207.1 → 179.1	141	33	14	10
Losartan azido Impurity	448.2 → 405.2 (정량)	71	15	12	10
	448.2 → 207.1	71	31	20	10
	448.2 → 377.2	71	21	10	10

* (참고) 유지시간 : AZBT 약 8.8 min, AZBC 약 14.9 min, Losartan azido Impurity 약 19.3 min

8. 시스템적합성

- 표준액 (0.5 µg/L)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (5 µg/L) 5 µL씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 AZBT, AZBC, Losartan azido impurity의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.
- 표준액 (5 µg/L) 5 µL씩을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 AZBT의 피크, AZBC의 피크, Losartan azido impurity의 피크의 대칭계수는 각 2.0 이하이다.

9. 데이터 평가 및 계산

- 외부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적을 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도 } (\mu\text{g/g}) = \frac{(A_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

A_T : 분석성분의 피크면적

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

10. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

분석물질	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
AZBT	0.1	0.04
AZBC	0.2	0.06
로사르탄아지도불순물	0.02	0.006

18

**HPLC를 이용한 아세트아미노펜 원료의약품 중
4-클로로아닐린 분석법****1. 배경**

본 분석법은 아세트아미노펜 원료의약품 중 4-클로로아닐린을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다.

2. 표준품 및 시약

- 4-클로로아닐린 (4-Chloroaniline) : 99% 이상
- 메탄올(Methanol) : HPLC grade
- 인산이수소칼륨 (Potassium dihydrogenphosphate) : HPLC grade

3. 기기 및 소모품

- 액체크로마토그래프 (Agilent, 1290II system, UV detector)
- 칼럼 (Phenomenex, XB-C18 2.1 × 150 mm, 1.7 μ m)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 용액의 조제

- 희석액 : 이동상:메탄올(3:1)

5. 표준액의 조제

■ 표준원액

4-클로로아닐린 표준품 10 mg을 메탄올을 넣어 정확하게 1,000 mL로 하여 표준원액(10 mg/L)로 한다.

■ 표준액

표준원액과 희석액을 넣어 표 1과 같이 표준액을 조제한다.

표 1. 직선성 표준액의 조제 방법

표준액	조 제		최종 농도 ($\mu\text{g/L}$)
	표준원액 (μL)	최종부피 (mL)	
직선성 표준액1	50	10	50
직선성 표준액2	100	10	100
직선성 표준액3	200	10	200
직선성 표준액4	300	10	300
직선성 표준액5	500	10	500

6. 검액의 조제

아세트아미노펜 원료의약품 약 100 mg을 정밀하게 취하여 메탄올 1 mL과 이동상 3 mL에 녹인다. 필요시 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.22 μm 의 멤브레인필터 (PTFE)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

7. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 LC 분석법에 따라 시험한다.

표 2. 기기분석 조건

Liquid Chromatography Conditions	
Detector	UV 239 nm
Column	Phenomenex Kinetex XB-C18 (2.1 x 150mm, 1.7 μm)
Column Temp.	40 $^{\circ}\text{C}$
Mobile Phase	0.05 mol/L Potassium dihydrogenphosphate in water(pH 4.7):Methanol(4:1)
Acquisition time	4-Chloroaniline 유지시간의 약 3배
Flow rate	0.4 mL/min
Injection vol.	2 μL

* (참고) 유지시간 : 4-Chloroaniline : 8.22 min

8. 시스템적합성

- 표준액 (50 $\mu\text{g/L}$)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 (200 $\mu\text{g/L}$) 2 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 4-클로로아닐린 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.
- 표준액 (200 $\mu\text{g/L}$) 2 μL 씩을 가지고 위의 조건으로 조작할 때 4-클로로아닐린 피크의 대칭계수 및 이론단수는 0.5~1.5, 15000단 이상이다. 4-클로로아닐린의 유지시간 부근에 피크가 검출되는 경우, 분리도 1.2 이상을 확보하고 필요시 조작조건을 조정한다.

9. 데이터 평가 및 계산

- 외부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적을 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(A_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

A_T : 분석성분의 피크면적

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

10. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 각각 $2 \mu\text{g/g}$, $0.8 \mu\text{g/g}$ 이다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

19

GC-MS를 이용한 메탄설폰산 중 알킬메탄설포네이트류 분석법

1. 배경

메탄설폰산 중 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설포네이트류 분석법은 의약품 조제과정 중의 잠재적 불순물인 메탄설폰산의 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 에스테르류의 양을 측정하는 방법이다. 본 분석법은 0.5 ppm ~ 100 ppm 범위에서 유효성 평가를 실시하였다. 합성 초기 단계의 높은 농도 등으로 유효성 평가 범위를 벗어난 경우는 시험용액의 농도를 적절하게 맞추어 적용한다.

2. 기기

기체크로마토그래프-질량분석기

3. 표준액의 조제

메틸메탄설포네이트, 에틸메탄설포네이트, 이소프로필메탄설포네이트 표준품 약 50 mg을 각각 정밀하게 달아 내부표준액을 넣어 정확하게 50 mL로 하여 표준원액으로 한다. 표준원액 74 μ L를 내부표준액으로 정확하게 10 mL로 하고, 다시 이 액의 100 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 10 mL로 하여 표준액(1)로 한다. 표준액(1) 3 mL를 내부표준액으로 정확하게 10 mL로 한 액을 표준액(2)로 한다.

◦ 내부표준액 : 부틸메탄설포네이트의 염화메틸렌용액(7 → 100,000,000)

4. 검액의 조제

이 약 약 0.74 g을 정밀하게 달아 물 10 mL와 내부표준액 10 mL를 넣고 천천히 흔들어 섞은 다음 추출한다. 유기층을 분리하여 무수황산나트륨이 담긴 바이알로 옮겨 흔들어 섞고, 상등액을 취하여 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

5. 기기분석

- 검출기 : 질량분석기
- 칼럼 : 질량분석기용 안지름 0.25 mm, 길이 15 m의 기체크로마토그래프용 100 % 메틸폴리실록산을 1 μ m의 두께로 코팅한 것 또는 이와 동등한 것
- 칼럼온도 : 55 $^{\circ}$ C에서 시료를 주입하고 1 분간 유지한 다음 분당 10 $^{\circ}$ C로 135 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시킨다.
- 유량 : 1 mL/분
- 운반기체 : 헬륨
- 주입모드 : pulsed splitless(250 kPa, 0.25min)
- 주입량 : 2 μ L
- 검체도입부온도 : 240 $^{\circ}$ C
- 검출기온도 :
 - 연결관 : 280 $^{\circ}$ C
 - 이온 소스 : 230 $^{\circ}$ C
 - 분석기 : 150 $^{\circ}$ C
- 측정모드 : SIM
- 생성이온 :

성분명	생성이온(m/z)
메틸메탄설폰네이트	80
에틸메탄설폰네이트	79
이소프로필메탄설폰네이트	123
부틸메탄설폰네이트	56

6. 시스템적합성

- 검출의 확인 : 표준액(2)에서 얻은 메틸메탄설포네이트, 에틸메탄설포네이트, 이소프로필메탄설포네이트 각 피크의 신호 대 잡음비는 10 이상이다.
- 시스템의 성능 : 표준액(1)에서 얻은 에틸메탄설포네이트 및 이소프로필메탄설포네이트 피크 간의 분리도는 3 이상이다.

7. 데이터 평가 및 계산

- 위의 조작조건에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 검액 및 표준액(1) 중 각 성분의 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구한다.

$$\text{각 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설포네이트의 양 (ppm)} = (Q_T / Q_S) \times (M_S / M_T) \times C \times 0.148$$

Q_S : 표준액(1) 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

Q_T : 검액 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

M_S : 각 성분별 표준품의 양(mg)

M_T : 검체의 양(mg)

C : 각 성분별 표준품의 순도(%)

0.148 : 희석배수

20

GC-MS를 이용한 메탄설폰산 중 메탄설폰닐염화물 분석법

1. 배경

메탄설폰산 중 메탄설폰닐염화물 분석법은 의약품 조제과정 중의 잠재적 불순물인 메탄설폰산의 메탄설폰닐염화물의 양을 측정하는 방법이다. 본 분석법은 0.05 ppm ~ 50 ppm 범위에서 유효성 평가를 실시하였다.

2. 기기

기체크로마토그래프-질량분석기

3. 표준액의 조제

메탄설폰닐염화물 표준품 약 50 mg을 정밀하게 달아 염화메틸렌을 넣어 정확하게 10 mL로 하여 표준원액으로 한다. 표준원액 1 mL를 정확하게 취하여 염화메틸렌을 넣어 정확하게 10 mL로 하고, 다시 이 액의 300 μ L를 정확하게 취하여 염화메틸렌을 넣어 정확하게 10 mL로 한 액을 표준액(1)로 한다. 표준액(1) 500 μ L와 내부표준액 100 μ L를 정확하게 취하여 염화메틸렌을 넣어 정확하게 15 mL로 한 액을 표준액(2)로 한다. 표준액(1) 25 μ L와 내부표준액 100 μ L를 정확하게 취하여 염화메틸렌을 넣어 정확하게 15 mL로 한 액을 표준액(3)으로 한다.

◦ 내부표준액 : 부틸메탄설폰네이트의 염화메틸렌용액(7 → 100,000)

4. 검액의 조제

이 약 약 7.4 g을 정밀하게 달아 물 5 mL를 넣고 천천히 섞는다. 식힌 후에 염화메틸렌 5 mL와 내부표준액 100 μ L를 정확하게 취하여 넣고 흔들어 섞는다. 유기층을 분리하여 무수황산나트륨 1 g이 담긴 바이알로 옮겨 흔든다. 염화메틸렌 5 mL로 두 번 반복해 추출하고, 유기층을 모아 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 사용한다.

5. 기기분석

- 검출기 : 질량분석기
- 칼럼 : 질량분석기용 안지름 0.25 mm, 길이 15 m의 기체크로마토그래프용 100 % 메틸폴리실록산을 1 μ m의 두께로 코팅한 것 또는 이와 동등한 것
- 칼럼온도 : 40 $^{\circ}$ C에서 시료를 주입하고 4 분간 유지한 다음 분당 40 $^{\circ}$ C로 200 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시킨다. 분석이 끝난 시점에 칼럼의 온도를 270 $^{\circ}$ C까지 상승시키고 8 분간 유지한다.
- 유량 : 1 mL/분
- 운반기체 : 헬륨
- 주입모드 : pulsed splitless(60 kPa, 0.1 min)
- 주입량 : 5 μ L
- 검체도입부온도 : 240 $^{\circ}$ C
- 검출기온도 :
 - 연결관 : 280 $^{\circ}$ C
 - 이온 소스 : 230 $^{\circ}$ C
 - 분석기 : 150 $^{\circ}$ C
- 측정모드 : SIM
- 생성이온 :

성분명	생성이온(m/z)
메탄설폰닐염화물	79
부틸메탄설폰네이트	56

6. 시스템적합성

- 검출의 확인 : 표준액(3)에서 얻은 메탄설폰닐염화물 피크의 신호 대 잡음비는 10 이상이다.
- 시스템의 성능 : 표준액(2)에서 얻은 메탄설폰닐염화물 및 부틸메탄설폰네이트 피크 간의 분리도는 5 이상이다.

7. 데이터 평가 및 계산

- 위의 조작조건에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 검액 및 표준액(2) 중 메탄설폰닐염화물의 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구한다.

$$\text{메탄설폰닐염화물의 양 (ppm)} = (Q_T / Q_S) \times (M_S / M_T) \times C \times 1.5$$

Q_S : 표준액(2) 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 메탄설폰닐염화물의 피크면적비

Q_T : 검액 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 메탄설폰닐염화물의 피크면적비

M_S : 메탄설폰닐염화물 표준품의 양(mg)

M_T : 검체의 양(mg)

C : 메탄설폰닐염화물 표준품의 순도(%)

1.5 : 회석배수

21

GC-MS를 이용한 원료의약품 중 알킬메탄설포네이트류 분석법

1. 배경

원료의약품 중 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설포네이트류 분석법은 의약품 조제과정 중의 잠재적 불순물인 메탄설포닉산의 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 에스테르류의 양을 측정하는 방법이다. 본 분석법은 베타히스틴메실산염을 가지고 0.2 ppm ~ 5 ppm 범위에서 유효성 평가를 실시하였다. 다른 원료의약품을 적용하는 경우, 특히 합성 초기 단계의 높은 농도 등으로 유효성 평가 범위를 벗어난 경우는 시험용액의 농도를 적절하게 맞추어 적용하고, 적합하게 유효성을 확인한다.

2. 기기

기체크로마토그래프-질량분석기

3. 표준액의 조제

메틸메탄설포네이트, 에틸메탄설포네이트, 이소프로필메탄설포네이트 표준품 약 25 mg을 각각 정밀하게 달아 톨루엔을 넣어 정확하게 5 mL로 한다. 이 액 50 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 25 mL로 하여 표준액(1)로 한다. 표준액(1) 20 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전한 것을 표준액(2)로 한다. 표준액(1) 500 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 표준액(3)으로 한다.

- 내부표준액 : 부틸메탄설포네이트의 아세토니트릴·물혼합액(4:1)용액(1 → 5,000,000)
- 유도체화 용액 : 무수티오황산나트륨 30 mg과 요오드화나트륨 60 g을 정밀하게 달아 물에 녹이고, 정확하게 50 mL로 한다.

※ 유도체화 반응에서 침전이 관찰될 수 있으나 정량에는 영향을 주지 않는다.

4. 검액의 조제

이 약 약 25 mg을 정밀하게 달아 헤드스페이스 바이알에 넣고, 내부표준액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 넣고 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 검액으로 한다.

- 공시험액 : 유도체화 용액 0.5 mL와 내부표준액 0.5 mL를 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 공시험액으로 한다.

5. 기기분석

- 검출기 : 질량분석기
- 칼 럼 : 질량분석기용 안지름 0.25 mm, 길이 30 m의 기체크로마토그래프용 시아노폴리실록산을 1 μ m의 두께로 코팅한 것 또는 이와 동등한 것
- 칼럼온도 : 40 $^{\circ}$ C에서 시료를 주입하고 1 분간 유지한 다음 분당 10 $^{\circ}$ C로 130 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시킨다. 분석이 끝난 시점에 칼럼의 온도를 240 $^{\circ}$ C까지 상승시키고 7 분간 유지한다.
- 운반기체 : 헬륨
- 유 량 : 0.5 mL/분
- 분할 비 : 1 : 20
- 헤드스페이스용 검체도입장치 조건
 - 평형온도 : 60 $^{\circ}$ C
 - 평형시간 : 30 분
 - 연결관 온도 : 120 $^{\circ}$ C
- 주입량 : 1 mL
- 검체도입부온도 : 220 $^{\circ}$ C
- 검출기온도 :
 - 연결관 : 280 $^{\circ}$ C
 - 이온 소스 : 250 $^{\circ}$ C
 - 분석기 : 200 $^{\circ}$ C

■ 측정모드 : SIM

■ 생성이온 :

성분명	정량이온(m/z)	정성이온(m/z)
메틸요오드화물*	142	127
에틸요오드화물*	156	127
이소프로필요오드화물*	170	127
부틸요오드화물*	184	127

* 유도체화 산물

6. 시스템적합성

- 검출의 확인 : 표준액(2)에서 얻은 알킬요오드화물류의 각 피크의 신호 대 잡음비는 10 이상이다.
- 시스템의 성능 : 표준액(3)에서 얻은 에틸요오드화물 및 이소프로필요오드화물 피크 간의 분리도는 1.5 이상이다.

7. 데이터 평가 및 계산

- 위의 조작조건에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 검액 및 표준액(3) 중 각 성분의 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구한다.

각 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설폰네이트의 양 (ppm) =

$$(Q_T / Q_S) \times (M_S / M_T) \times C \times 0.05$$

Q_S : 표준액(3) 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

Q_T : 검액 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

M_S : 각 성분별 표준품의 양(mg)

M_T : 검체의 양(mg)

C : 각 성분별 표준품의 순도(%)

0.05: 회석배수

22

GC-MS를 이용한 원료의약품 중 알킬톨루엔설포네이트류 분석법

1. 배경

원료의약품 중 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 톨루엔설포네이트류 분석법은 의약품 조제과정 중의 잠재적 불순물인 톨루엔설포산의 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 에스테르류의 양을 측정하는 방법이다. 본 분석법은 설타미실린토실산수화물을 가지고, 0.2 ppm ~ 5 ppm 범위에서 유효성 평가를 실시하였다. 다른 원료의약품에서 적용하는 경우, 특히 알킬톨루엔설포네이트류의 농도가 유효성 평가 범위를 벗어난 경우는 검액 및 표준액의 농도를 적절하게 맞추어 적용하고, 적합하게 유효성을 확인한다.

2. 기기

기체크로마토그래프-질량분석기

3. 표준액의 조제

메틸톨루엔설포네이트, 에틸톨루엔설포네이트, 이소프로필톨루엔설포네이트 표준품 약 25 mg을 각각 정밀하게 달아 톨루엔을 넣어 정확하게 5 mL로 한다. 이 액 50 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 25 mL로 하여 표준액(1)로 한다. 표준액(1) 40 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전한 것을 표준액(2)로 한다. 표준액(1) 500 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 표준액(3)으로 한다.

- 내부표준액 : 부틸메탄설포네이트의 아세토니트릴·물혼합액(4:1)용액(1 → 5,000,000)
- 유도체화 용액 : 무수티오황산나트륨 30 mg과 요오드화나트륨 60 g을 정밀하게 달아 물에 녹이고, 정확하게 50 mL로 한다.

※ 유도체화 반응에서 침전이 관찰될 수 있으나 정량에는 영향을 주지 않는다.

4. 검액의 조제

이 약 약 25 mg을 정밀하게 달아 헤드스페이스 바이알에 넣고, 내부표준액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 넣고 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 검액으로 한다.

- 공시험액 : 유도체화 용액 0.5 mL와 내부표준액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 공시험액으로 한다.

5. 기기분석

- 검출기 : 질량분석기
- 칼 럼 : 질량분석기용 안지름 0.25 mm, 길이 30 m의 기체크로마토그래프용 시아노폴리실록산을 1 μ m의 두께로 코팅한 것 또는 이와 동등한 것
- 칼럼온도 : 40 $^{\circ}$ C에서 시료를 주입하고 1 분간 유지한 다음 분당 10 $^{\circ}$ C로 130 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시킨다. 분석이 끝난 시점에 칼럼의 온도를 240 $^{\circ}$ C까지 상승시키고 7 분간 유지한다.
- 운반기체 : 헬륨
- 유 량 : 0.5 mL/분
- 분할 비 : 1 : 20
- 헤드스페이스용 검체도입장치 조건
 - 평형온도 : 60 $^{\circ}$ C
 - 평형시간 : 30 분
 - 연결관 온도 : 120 $^{\circ}$ C
- 주입량 : 1 mL
- 검체도입부온도 : 220 $^{\circ}$ C
- 검출기온도 :
 - 연결관 : 280 $^{\circ}$ C

- 이온 소스 : 250 ℃

- 분석기 : 200 ℃

■ 측정모드 : SIM

■ 생성이온 :

성분명	정량이온(m/z)	정성이온(m/z)
메틸요오드화물*	142	127
에틸요오드화물*	156	127
이소프로필요오드화물*	170	127
부틸요오드화물*	184	127

* 유도체화 산물

6. 시스템적합성

- 검출의 확인 : 표준액(2)에서 얻은 알킬요오드화물류의 각 피크의 신호 대 잡음비는 10 이상이다.
- 시스템의 성능 : 표준액(3)에서 얻은 에틸요오드화물 및 이소프로필요오드화물 피크 간의 분리도는 1.5 이상이다.

7. 데이터 평가 및 계산

- 위의 조작조건에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 검액 및 표준액(3) 중 각 성분의 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구한다.

각 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 톨루엔설포네이트의 양 (ppm) =

$$(Q_T / Q_S) \times (M_S / M_T) \times C \times 0.05$$

Q_S : 표준액(3) 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

Q_T : 검액 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

M_S : 각 성분별 표준품의 양(mg)

M_T : 검체의 양(mg)

C : 각 성분별 표준품의 순도(%)

0.05: 희석배수

23

GC-MS를 이용한 원료의약품 중 알킬벤젠설포네이트류 분석법

1. 배경

원료의약품 중 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 벤젠설포네이트류 분석법은 의약품 조제과정 중의 잠재적 불순물인 벤젠설포닉산의 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 에스테르류의 양을 측정하는 방법이다. 본 분석법은 암로디핀베실산염을 가지고, 2.5 ppm ~ 40 ppm 범위에서 유효성 평가를 실시하였다. 다른 원료의약품에서 적용하는 경우, 특히 알킬 벤젠설포네이트류의 농도가 유효성 평가 범위를 벗어난 경우는 검액 및 표준액의 농도를 적절하게 맞추어 적용하고, 적합하게 유효성을 확인한다.

※ 클로피도그렐베실산의 경우 본 시험법 적용 시 기체크로마토그래프 분석 중 메틸벤젠설포네이트가 인공적 분해산물로 관찰되어 적합하지 않다.

2. 기기

기체크로마토그래프-질량분석기

3. 표준액의 조제

메틸벤젠설포네이트, 에틸벤젠설포네이트, 이소프로필벤젠설포네이트 표준품 약 25 mg을 각각 정밀하게 달아 톨루엔을 넣어 정확하게 5 mL로 한다. 이 액 50 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 25 mL로 하여 표준액(1)로 한다. 표준액(1) 40 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전한 것을 표준액(2)로 한다. 표준액(1) 500 μ L를 정확하게 취하여 내부표준액으로 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 표준액(3)으로 한다.

- 내부표준액 : 부틸메탄설포네이트의 아세토니트릴·물혼합액(4:1)용액(1 → 5,000,000)
- 유도체화 용액 : 무수티오황산나트륨 30 mg과 요오드화나트륨 60 g을 정밀하게 달아 물에 녹이고, 정확하게 50 mL로 한다.

※ 유도체화 반응에서 침전이 관찰될 수 있으나 정량에는 영향을 주지 않는다.

4. 검액의 조제

이 약 약 25 mg을 정밀하게 달아 헤드스페이스 바이알에 넣고, 내부표준액 0.5 mL와 유도체화 용액 0.5 mL를 정확하게 취하여 넣고 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 검액으로 한다.

- 공시험액 : 유도체화 용액 0.5 mL와 내부표준액 0.5 mL를 정확하게 취하여 헤드스페이스 바이알에 넣고, 즉시 PTFE 코팅된 실리콘 막과 알루미늄 뚜껑으로 밀전하여 공시험액으로 한다.

5. 기기분석

- 검출기 : 질량분석기
- 칼 럼 : 질량분석기용 안지름 0.25 mm, 길이 30 m의 기체크로마토그래프용 시아노폴리실록산을 1 μ m의 두께로 코팅한 것 또는 이와 동등한 것
- 칼럼온도 : 40 $^{\circ}$ C에서 시료를 주입하고 1 분간 유지한 다음 분당 10 $^{\circ}$ C로 130 $^{\circ}$ C까지 온도를 상승시킨다. 분석이 끝난 시점에 칼럼의 온도를 240 $^{\circ}$ C까지 상승시키고 7 분간 유지한다.
- 운반기체 : 헬륨
- 유 량 : 0.5 mL/분
- 분할 비 : 1 : 20
- 헤드스페이스용 검체도입장치 조건
 - 평형온도 : 60 $^{\circ}$ C
 - 평형시간 : 30 분
 - 연결관 온도 : 120 $^{\circ}$ C
- 주입량 : 1 mL
- 검체도입부온도 : 220 $^{\circ}$ C
- 검출기온도 :
 - 연결관 : 280 $^{\circ}$ C
 - 이온 소스 : 250 $^{\circ}$ C

- 분석기 : 200 ℃

■ 측정모드 : SIM

■ 생성이온 :

성분명	정량이온(m/z)	정성이온(m/z)
메틸요오드화물*	142	127
에틸요오드화물*	156	127
이소프로필요오드화물*	170	127
부틸요오드화물*	184	127

* 유도체화 산물

6. 시스템적합성

- 검출의 확인 : 표준액(2)에서 얻은 알킬요오드화물류의 각 피크의 신호 대 잡음비는 10 이상이다.
- 시스템의 성능 : 표준액(3)에서 얻은 에틸요오드화물 및 이소프로필요오드화물 피크 간의 분리도는 1.5 이상이다.

7. 데이터 평가 및 계산

- 위의 조작조건에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 검액 및 표준액(3) 중 각 성분의 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구한다.

$$\text{각 알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 벤젠설포네이트의 양 (ppm)} = (Q_T / Q_S) \times (M_S / M_T) \times C \times 0.05$$

Q_S : 표준액(3) 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

Q_T : 검액 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비

M_S : 각 성분별 표준품의 양(mg)

M_T : 검체의 양(mg)

C : 각 성분별 표준품의 순도(%)

0.05: 희석배수

GC-MS/MS를 이용한 캡슐제(HPMC) 중 2-클로로에탄올 분석법

1. 배경

본 분석법은 식품 및 의약품에 사용하는 HPMC(히드록시프로필메틸셀룰로오스) 원료 및 완제(캡슐) 중 2-클로로에탄올을 정량하기 위해 개발되었고, 시험방법에 대한 유효성 확인(validation)을 실시하였다. 본 분석법을 적용하기 전에 시험방법에 대한 유효성 검증(verification)을 실시해야 한다. 완제의약품의 경우는 첨가제 등의 영향으로 용해도, 회수율 등에 변화가 생길 가능성이 있어, 유효성 확인 또는 검증을 실시하여야 한다.

2. 표준품 및 시약

- 2-클로로에탄올 (2-chloroethanol, 2-CE) : 100 %
- 아세토니트릴(Acetonitrile) : LC-MS grade
- 물(Water) : LC-MS grade
- EN QuEChERS salts (무수황산마그네슘 4 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g, 염화나트륨 1 g)

3. 기기 및 소모품

- 기체크로마토그래프 (Agilent 7890B 및 Autosampler 7693A)
- 질량분석기 (Agilent 7000D GC/TQ)
- 칼럼 (Agilent, DB-WAX 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)
- 분석용 전자저울 (Semi-micro급 이상)
- 원심분리기 (4000 rpm 이상)

4. 표준액의 조제

■ 표준원액의 조제

2-CE 표준품을 아세토니트릴에 녹여 10 mg/L가 되게 한다.

■ 표준액의 조제

2-CE 표준원액을 아세토니트릴에 희석하여 표준용액으로 한다. (20 µg/L~1000 µg/L)

5. 검액의 조제

HPMC 원료 또는 완제(캡슐)를 분쇄하여 가루로 한 것을 가지고 약 2 g을 정밀히 달아 50 mL 용량의 원심분리관에 넣고 물 2 mL를 넣은 후 30분간 실온에서 방치한다. 이후 아세토니트릴 10 mL를 넣어 15분간 vortex하여 충분히 흔들어 섞고 EN QuEChERS salts(무수황산마그네슘 4 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g, 염화나트륨 1 g)를 넣고 1분간 vortex하여 충분히 흔들어 섞은 다음 4 °C, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 상층액 1 mL를 취하여 멤브레인필터(Nylon, 0.2 µm)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 시험액으로 한다.

6. 기기분석

검액 및 표준액을 가지고 다음의 기기분석 조건으로 GC-MS/MS 분석법에 따라 시험한다.

표 1. 기기분석 조건

Gas Chromatography Conditions			
Column	DB-WAX(30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)		
Inlet temperature	220 °C		
Injection type	pulsed split mode(3:1)		
Injection volume	2 µL		
Oven program	유지시간 (분)	승온 (°C/분)	칼럼 온도 (°C)
	2.0	-	80
	2.0	16	200
Flow rate	1.0 mL/min		
Carrier gas	He		
Transfer temperature	250 °C		

Mass Spectrometer Conditions					
Solvent delay	3 min				
Source temperature	260 °C				
Collision gas	N ₂				
Mode	MRM				
MRM 조건	성분	RT (min)	선구이온 (m/z)	생성이온 (m/z)	충돌에너지 (CE, eV)
	2-chloroethanol	5.4	80	31 ¹⁾	5
				44	5
			82	31	5

1) 정량이온 : 각 선구이온 및 생성이온에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 적용이 가능하다.

7. 시스템적합성

- 표준액 20 µg/L (0.1 µg/g, ppm)에서의 신호 대 잡음비 (S/N비)가 10 이상임을 확인한다.
- 표준액 20 µg/L에서 위의 조건으로 시험을 6 회 반복할 때 2-클로로에탄올의 피크면적의 상대표준편차는 10 % 이하이다.

8. 데이터 평가 및 계산

- 외부표준법으로 작성한 검량선을 이용하여, 검액 중 분석성분의 피크면적을 대입하여 검체 중 분석성분의 농도를 구한다.

$$\text{검체 중 분석성분 농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{(A_T - b)}{a} \times \frac{V_T}{W_T} \times D$$

A_T : 분석성분의 피크면적

a : 검량선의 기울기

b : 검량선의 y절편

V_T : 검액의 부피 (mL)

W_T : 검체 채취량 (g)

D : 희석배수

9. 참고사항

- 표준품, 시약, 기기 등의 상세정보는 참고사항이며, 시험가능한 범위 내에서 변경이 가능하다.
- 조작조건 중에서 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 시스템적합성을 만족하는 범위 내에서 최적의 감도를 얻기 위해 변경할 수 있다. 다만 그 조작조건은 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.
- 시료의 조제 및 검액 등 시험에 사용하는 모든 용기는 차광용기를 사용한다.
- 시험법에 대한 밸리데이션 수행에서 얻은 분석성분의 정량한계 및 검출한계는 다음과 같다. 다만 실험실 조건(기기, 분석조건 등)에 따라 달라질 수 있다.

분석물질	정량한계 ($\mu\text{g/g}$)	검출한계 ($\mu\text{g/g}$)
2-클로로에탄올	0.1	0.01

의약품 중 불순물 분석법 자료집

발 행 일 2023년 5월

발 행 인 식품의약품안전평가원장 박 윤 주

편집위원장 의료제품연구부장 손 수 정

편 집 위 원 김영림, 김판순, 김자영, 안일영, 최인선, 문형실, 이은선
전혜림, 김민경, 함현주

발 행 처 식품의약품안전평가원 의료제품연구부 의약품연구과
Tel : 043-719-4603, 4618 / Fax. : 043-719-4600

주 소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

의약품 중 불순물 분석법 자료집

MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY
www.mfds.go.kr



공직자 부조리 및 공익신고안내 *신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

부조리 신고 식약처 홈페이지 “국민신문고 → 공직자 부조리 신고” 코너

공익 신고 식약처 홈페이지 “국민소통 → 신고센터 → 부패·공익신고 상담” 코너