니자티딘 원료 및 완제의약품 중 N-니트로소디메틸아민(NDMA) 시험법

1. 표준시료의 조제

○ 표준품

- NDMA (N-Nitrosodimethylamine)
- NDMA-D6 (N-Nitrosodimethyl-D6-amine)

○ 내부표준액의 조제

NDMA-D_6 표준품 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 내부표준원액(200 μg/mL)으로 한다. 내부표준원액 50 μL를 정확하게 취하여 25 % 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 내부표준액(500 ng/mL)으로 한다. (25 % 메탄올은 물 3 용량과 메탄올 1 용량을 혼합하여 조제한다.)

○ 표준액의 조제

NDMA 표준품(100 μg/mL) 0.1 mL를 정확하게 취하여 25 % 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL으로 하여 표준원액(500 ng/mL)으로 한다. 표준원액 및 내부표준액을 아래 표와 같이 각각 정확하게 취하여 25 % 메탄올로 정확하게 20 mL으로 한 액을 농도별 표준액으로 한다.

표 1. 농도별 표준액의 조제 시 사용량

표준액 농도 (ng/mL)	표준원액 (μL)	내부표준액 (μL)
2	80	200
5	200	200
10	400	200
25	1000	200
50	2,000	200
100	4,000	200

2. 검액의 조제

❍ (원료의약품) 니자티딘 약 300 mg을 정밀하게 달아 내부표준액 200 μL를 정확하게 취하여 넣은 다음 25 % 메탄올로 정확하게 20 mL로 하여 충분히 흔들어 섞고, 필요시 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μm의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다.

❍ (완제의약품) 이 약 20 정(또는 캡슐) 이상을 가지고 질량을 정밀하게 달아 가루로 한다. 니자티딘으로서 약 300 mg에 해당하는 양을 정밀하게 달아 넣고 내부표준액 200 μL를 정확하게 취하여 넣은 다음 25 % 메탄올로 정확하게 20 mL로 하여 충분히 흔들어 섞고, 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 0.2 μm의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다.

3. 액체크로마토그래프-질량분석기 조작조건(표 2)

❍ 표준액과 검액을 다음 LC-MS/MS 조건으로 시험하여 내부표준법에 따라 내부표준물질 피크 면적 대비 NDMA 피크면적비를 가지고 검량선을 작성하고, 검량선으로부터 검체 중 분석대상물질의 함량을 구한다.

표 2. LC-MS/MS 및 MRM 조건

Liquid Chromatography			
Column	Phenomenex Kinetex F5, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm, 100 Å		
Column temp.	30 ℃		
Mobile Phase A	Water		
Mobile Phase B	Acetonitrile		
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
	7.0 ~ 10.0	95	5
Acquisition Time	1.3 ~ 2.3 분 (이외 시간은 Divert Valve를 이용하여 MS 도입되지 않음)		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	0.4 mL/분		
Autosampler temp.	10 ℃		
Mass Spectrometer			
Ionization Mode (Polarity)	APCI (+) MRM		
APCI gas temp.	400 ℃		
APCI Nebulizer	30 psi		
APCI corrona (NC)	3 μA		
Curtain Gas (CUR)	35 psi		
Collision Gas (CAD)	Medium		

※ MRM 조건

성분		MRM 조건			
		m/z	DP (V)	CE (eV)	CXP (eV)
NDMA 분석	NDMA	75 → 43 (정량)	50	20	8
		75 → 58 (정성)	50	17	8
	NDMA-D_6	81 → 46 (정성 및 정량)	81	23	6

4. 시스템 적합성

○ 검출의 확인

표준액 2 ng/mL에서의 신호 대 잡음비가 10 이상이다.

○ 시스템 성능

검량선의 결정계수(R^2)가 0.998 이상이다.

○ 시스템 재현성

정량범위 내 동일 농도의 표준액(5 ng/mL)을 6 회 반복측정하여 내부표준물질의 면적에 대한 표준물질 면적비의 상대표준편차(RSD, %)는 10 이하이다.

5. 참고사항

○ 조작조건 중 칼럼의 안지름 및 길이, 고정상의 크기 및 칼럼온도는 규정하는 방법보다 더 좋은 정확도와 정밀도를 얻을 수 있는 범위 내에서 변경할 수 있다.

○ 니자티딘 원료의약품에서의 NDMA 정량한계 0.13 μg/g 이며, 검액의 농도는 검량선 범위내로 조절하여 사용한다.

○ 검액의 NDMA 검출 시 표준용액과 정량 및 정성이온의 상대 비를 확인하며, 허용범위는 30 % 이하이다.

○ 검체의 특성에 따라 정량, 정성 분석이온은 바탕선 잡음이 있을 수 있다.

○ 니자티딘 원료 및 완제의약품의 매트릭스가 측정결과에 영향을 미치는 경우 시험법에 대한 밸리데이션이 필요하다.

* 시험법에 문의가 있을 경우에는 의약품연구과(043-719-4605, 043-719-4616)로 연락하시기 바랍니다.