

발간등록번호: 11-1471057-000667-01

# 의약품 중 불순물 발생평가 사례집

## (NDMA 사례 중심으로)

2024. 5.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

의료제품연구부 의약품연구과

본 사례집은 식품의약품안전처 공동연구를 통해 연구한 연구결과를 정리해 놓은 것으로, 관련 산업계 등의 참고를 위한 정보 제공을 목적으로 마련되었습니다. 사례집에 수록된 정보는 일부 제품에만 적용 및 연구하여 확대하여 적용할 수 없습니다. 여기에 제시된 정보는 관련 분야의 과학기술 발전에 따라 변경될 수 있으며, 식약처의 정책이나 심사 방향과는 다를 수 있음을 알려드립니다.

## 목 차

I. 개요 .....	1
II. 니트로사민류 생성기전(일반조건) .....	2
III. 제조공정 중 고려사항 .....	5
1. 합성단계 .....	5
2. 제제화단계 .....	6
3. 포장단계 .....	7
IV. 합성 단계 : 발사르탄 합성단계 중 NDMA 발생평가 .....	9
1. 사르탄 합성과정 중 NDMA 생성 가능성 .....	9
1) 합성에 사용되는 시약에서의 오염 .....	9
2) 합성반응 시 반응온도 및 조건 .....	10
3) 니트로사민을 형성하는 발생원인 조합 .....	12
2. 합성과정 중 니트로사민 생성사례 .....	13
3. NDMA 생성 가능성 분석 .....	16
1) 용매 중 디메틸아민 분석 .....	16
2) 완제의약품 중 아질산염 분석 .....	19
V. 제제화단계 : 메트포르민 제제화단계 중 NDMA 발생평가 .....	22
1. 메트포르민 제제화 과정 중 NDMA 생성 가능성 .....	22
1) 원료의약품 .....	22
2) 첨가제 .....	22
3) 수소이온농도 (pH) .....	23
4) 산화 .....	24
5) 열 .....	24
6) 물 .....	25
7) 입자 크기 .....	26
2. NDMA 생성 가능성 분석 .....	27
1) 메트포르민 의약품 중 NDMA 분석 .....	27
2) 실험계획법 접근법 .....	29
3) 원료 및 첨가제에서 아질산염 분석 .....	39

VI. 보관단계 : 니자티딘 보관단계 중 NDMA 발생평가 .....	41
1. 니자티딘 보관단계 중 NDMA 생성 가능성 .....	41
1) 온도 및 습도 .....	41
2) 첨가제 .....	41
2. NDMA 생성 가능성 분석 .....	42
1) 니자티딘 의약품 분석법 .....	42
2) 아레니우스 식을 이용한 보관조건 영향평가 .....	45
VII. 고찰 .....	53

## I. 개 요

2018년 고혈압 치료제 발사르탄 원료의약품에서 변이원성 발암물질인 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA)이 검출된 것을 시작으로 2019년과 2020년에는 라니티딘, 니자티딘, 메트포르민 및 리팜피신 등의 의약품에서도 *N*-니트로사민류 불순물들이 잇달아 검출되었다. 이에 따라 의약품 중 니트로사민류 오염에 대한 잠재적 위험성을 확인하고 불순물 원인을 규명해야 할 필요가 있다.

본 사례집은 의약품 제조과정 중 NDMA 등 니트로사민류 불순물 생성 원인 및 발생 가능성에 대하여 위험 요소를 식별하고 생성 원인을 평가하는 예시를 포함하고 있다. 합성단계에서는 발사르탄 의약품을 대상으로 니트로사민류 불순물의 주요 생성 원인인 합성과정, 용매, 시약, 반응온도, pH 등 조건에 대해 종합적으로 정리하고 주요 아민류 분석한 사례를 중심으로 기술하였다. 제제화단계에서는 메트포르민 의약품을 대상으로 열, 수분, 첨가제 등 다양한 원인 중 불순물 생성의 원인을 실험설계 방법으로 규명하는 사례를 연구하고자 하였다. 최근에 발표된 문헌에서 열과 수분이 도입되는 습식과립화 과정이 NDMA 발생에 중요한 단계로 연구된 바가 있었다(그림 1). 마지막 보관단계는 니자티딘 의약품을 대상으로 보관과정 중 온도, 습도에 의한 NDMA 생성 경향과 속도반응 상수로 예측할 수 있는 방안에 대해 연구한 결과를 제시하였다.

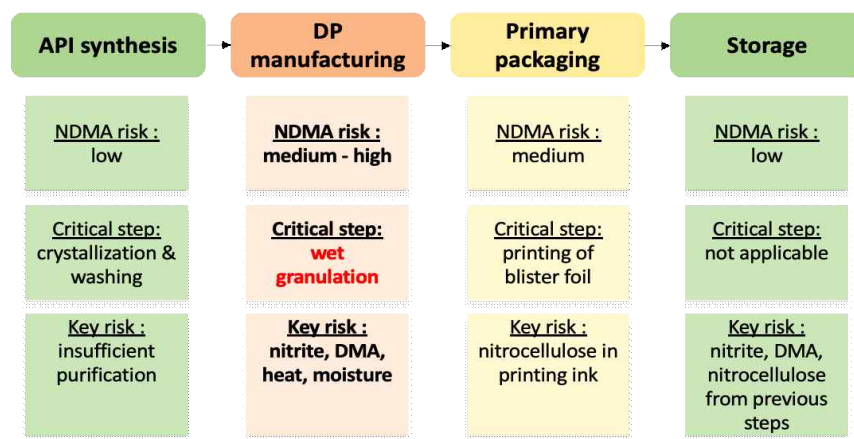


그림 1. 메트포르민 의약품 제조 단계별 NDMA 발생 평가

## II. 니트로사민 생성기전(일반적인 조건)

*N*-니트로사민류 불순물은 잠재적 발암성 또는 변이원성을 지닌 화합물로  $R_2N-N=O$  구조를 갖는 유기화합물이다. 일반적으로 니트로사민류는 아민과 니트로소화제(nitrosating agent)가 반응할 수 있는 조건에서 발생하며, 다양한 경로를 통해 생성될 수 있다(그림 2).

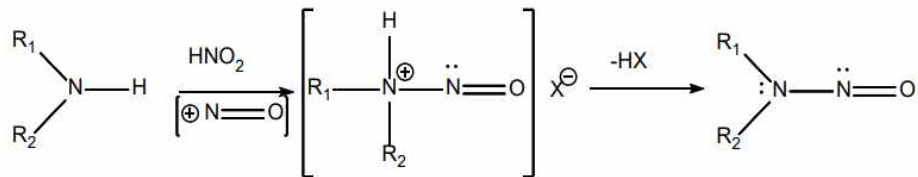


그림 2. *N*-니트로사민 생성 과정

원료의약품의 합성 및 보관 과정과 완제의약품의 제조, 포장, 보관 과정에서 니트로사민류 불순물이 발생할 수 있다. 2차, 3차 아민 또는 4차 암모늄 존재 하에 아질산 또는 니트로소화제와 산성 조건에서 반응하면 의약품 내 니트로사민류 불순물이 존재할 수 있다. 산성 조건에서 아질산염은 아질산을 형성할 수 있고, 이는 아민과 반응하여 니트로사민을 형성할 수 있다. 니트로소화제는 니트로소기 도입을 유발할 수 있는 화학물질을 의미하며 대표적인 니트로소화제에는 니트로소늄 이온, 니트로실할로젠 및 유도체, 알킬 아질산염, 삼산화 이질소와 사산화 이질소등이 있다(그림 3).

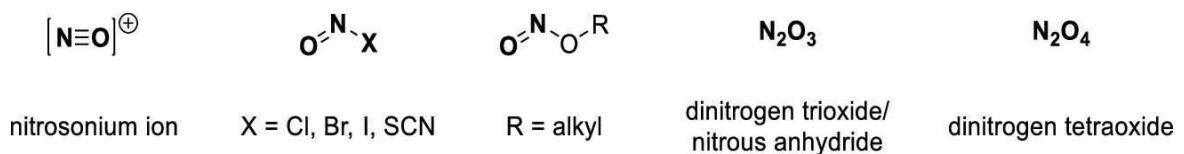


그림 3. 대표적인 니트로화제 종류

*N*-니트로사민류 불순물은 주로 아질산염이 산성 환경에서 2차, 3차 아민과 상호작용할 때 발생하고 있으며, Dimethylamine (DMA)과 같은 2차 아민의 존재는 NDMA 생성 위험을 크게 높일 수 있다. DMA는 약산성 조건에서 아질산염에서 유래하는  $NO^+$  또는  $N_2O_3$ 와 같은 니트로소화제와 쉽게 반응할 수 있으며(니트로소화 반응을 위한 최적의 pH 범위는 2.5-3.4), 이 반응환경에서 NDMA를 포함한 니트로소화합물을 형성할 수 있다(그림 4).

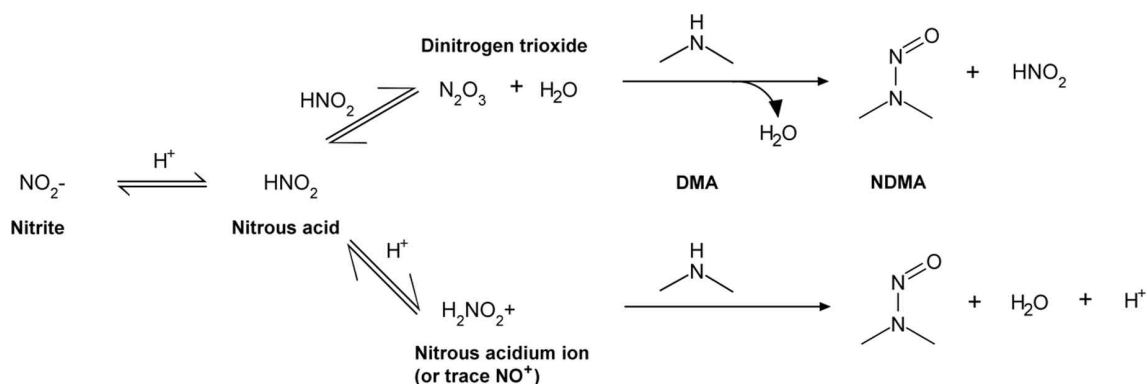


그림 4. 니트로소화제 반응에 의한 DMA로부터 NDMA가 생성되는 과정

메트포르민 의약품의 경우 염산염 형태의 2-cyanoguanidine과 DMA를 합성하여 제조되는 경우, 필연적으로 원료의약품에 소량의 DMA이 남을 수 있다(그림 5). 유럽 약전에 따르면 메트포르민 원료의약품에서 디메틸아민염산염은 불순물 F로 등재되어 있다. 메트포르민의 경우, 원료의약품에 니트로소화 반응에 민감한 2차 아민이 존재하기 때문에 NDMA 생성 가능성이 높다고 할 수 있다.

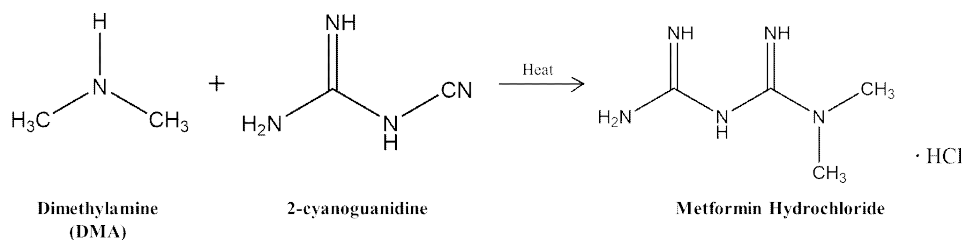


그림 5. 메트포르민 합성 과정

물이나 첨가제 중 오염되는 니트로소화제 여부나 완제의약품 제조공정 조건이 니트로사민류를 생성하는 추가적인 원인으로 알려져 있다. 니트로사민은 주로 아민과 아질산류 반응으로 생성되는데 이는 용수, 용매, 시약, 첨가제 등에 의해 오염될 수 있으며, 산성 및 열 환경에서 노출시 반응하여 니트로사민류가 잘 형성되게 된다. 산성 조건에서 아질산 분해는 일반적으로 높은 반응 속도를 나타내며 이는 니트로사민류 생성에 필요한 조건 중 하나이다. 고온에서의 반응은 아민을 생성을 유도하거나 아질산 또는 아질산염 간의 반응 속도를 증가시키며, 이는 니트로사민의 생성을 촉진시킬 수 있다(그림 6).

**N-nitrosamine formation in drug substance and drug product:**  
**3 risk factors - ALL required:**

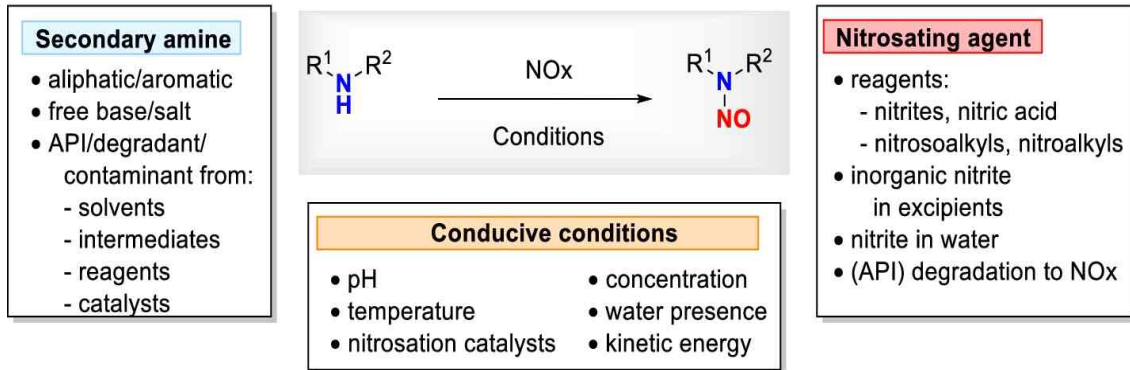


그림 6. 의약품에서 니트로사민류 형성을 촉진하는 3가지 위험 요소



### Ⅲ. 제조공정 중 고려사항

#### 1. 합성단계

##### 1) 니트로소화제의 존재

산성 반응조건에서 2차, 3차 아민 또는 4차 암모늄 존재 하에 아질산나트륨 혹은 아질산염(같은 공정 혹은 다른 공정에서)이 존재하는 경우 아질산염은 아질산을 생성할 수 있고, 이는 아민과 반응하여 니트로사민을 형성한다. 만약 합성과정 중 아질산을 잔류 아지드의 반응성을 중단하기 위해 첨가한다면 니트로사민류 생성 가능성은 증가될 수 있다.

##### 2) 2차, 3차 아민 및 4차 암모늄의 존재

아민은 다양한 원인으로 반응과정 중에 존재 또는 생성될 수 있으며 원료의약품이나 중간체 등에는 2차 또는 3차 아민이 함유되어 있을 수 있다. 또한, 시약이나 촉매로 사용되는 3차 아민이나 4차 암모늄도 니트로사민 생성에 기여할 수 있다(표 1).

표 1. 제조공정 중 니트로사민류 및 아민류 발생원인

	생성과정	원인
<b>NDMA</b> <i>N</i> -nitrosodimethylamine		DMF의 가수분해 및/또는 분해(온도)
<b>NDEA</b> <i>N</i> -nitrosodiethylamine		3차 아민인 DIPEA의 탈알킬화 TEA HCl의 4차 암모늄 염산염의 가수분해
<b>DIPNA</b> <i>N</i> -nitrosoethylethyl-amine		3차 아민인 DIPEA의 탈알킬화
<b>EIPNA</b> <i>N</i> -nitrosoethylisopropyl-amine		3차 아민인 DIPEA의 탈알킬화
<b>NMBA</b> <i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -methyl-4-aminobutyric acid		NMP의 가수분해 및/또는 분해(온도)
<b>NMPA</b> <i>N</i> -nitrosomethylphenylamine		3차 아민인 N,N-DMA의 탈알킬화
<b>NDBA</b> <i>N</i> -nitrosodibutylamine		2차 아민인 DBA의 니트로소화 및/또는 3차 아민인 TBA의 탈알킬화

## 2. 제제화단계

의약품 주성분에서 기원하는 아민기가 니트로소화 반응에 취약한 경우 제조공정 과정 또는 보관 중에 반응하여 니트로사민류 불순물을 형성할 수 있으며 특히 2차 아민의 경우 이러한 반응에 더 취약하다. 따라서 의약품의 제조공정 단계 시 다음의 사항을 고려하여야 한다.

### 1) 첨가제

일부 아질산염이 오염된 첨가제가 제제화 단계에서 사용될 경우 니트로사민류 불순물을 생성할 수 있다(표 2).

표 2. 니트로사민류 불순물 형성에 기여하는 첨가제 예시

Sr. No.	Excipients	HCHO	Hydrogen peroxide	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>
1.	Microcrystalline cellulose, PH102	0.51 ± 0.5	<2	9.4	23
2.	Lactose monohydrate	1.4	<2	0.28 ± 0.5	0.77 ± 0.5
3.	Lactose anhydrous	2.68 ± 0.5	<2	1.20 ± 0.5	1.20 ± 0.5
4.	Pre-gelatinized starch	2.13 ± 0.5	<2	1.90 ± 0.5	4.45 ± 0.5
5.	Povidone	—	24.74 ± 0.5	0.42 ± 0.5	0.35 ± 0.5
6.	Crospovidone	22.83 ± 0.5	2.12 ± 0.5	4.73 ± 0.5	15.55 ± 0.5
7.	Sodium Starch Glycolate	2.19 ± 0.5	<2	4.52 ± 0.5	46.52 ± 0.5
8.	Croscarmellose Na	0.07 ± 0.5	<2	0.70 ± 0.5	9.54 ± 0.5
9.	Magnesium stearate	0.07 ± 0.5	<2	2.26 ± 0.5	4.59 ± 0.5
10.	Hydroxypropyl Cellulose	1.41	13	0.9	3.5

### 2) pH

니트로사민류의 형성이 일반적으로 산성 조건에서 발생하는 반면, 중성 또는 염기성 환경에서는 반응성이 크게 감소한다. 따라서 pH를 중성 또는 염기성으로 바꿀 수 있는 탄산나트륨과 같은 첨가제를 포함하는 제형 설계는 니트로사민의 형성을 감소시킬 수 있다.

### 3) 온도

아질산염 및 아민을 함유한 의약품 성분이 용액 또는 과립화 과정을 거쳐 현탁액으로 존재하거나 건조단계가 고온에서 유지되는 작업을 수행할 경우 니트로사민류 불순물을 증가시킬 수 있다. 따라서, 열과 관련된 제조공정 과정이 불순물 생성에 영향을 주는지 관리하는 것이 권장된다.

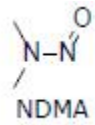
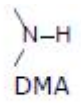
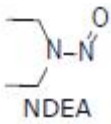
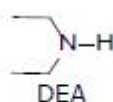
### 4) 물

용수에 미량의 아질산염 오염이 니트로사민류 생성에 영향을 줄 수 있으므로 사용전 아질산염 오염, 아민류, 니트로사민류를 관리하는 것이 권장된다.

## 3. 포장단계

직접용기 재질에 니트로셀룰로오스와 프린트잉크에 존재하는 아민류와 결합하여 니트로사민이 생성될 수 있다. 예를 들어 알루미늄 호일을 사용 하는 블리스터 포장의 경우, 열을 가하여 접합하는 과정에서 니트로셀룰로오스로부터 산화질소가 발생하고 프린트잉크 또는 원료의약품에 존재 할 수 있는 저분자 아민과 반응하여 니트로사민을 생성할 수 있다(표 3).

표 3. 완제의약품 포장재질 중 발생가능한 니트로사민

니트로사민류	NOX 공급원	Amine 공급원	NOX와 반응하는 Amine	주요 공급원
	니트로 셀룰로오스 (호일 내)	프린트잉크 (호일 내)		호일/ 프린트잉크
	니트로 셀룰로오스 (호일 내)	프린트잉크 (호일 내)		호일/ 프린트잉크

## 합성단계

(발사르탄 중 NDMA)

#### Ⅳ. 합성단계 : 발사르탄 합성단계 중 NDMA 발생평가

##### 1. 사르탄 합성과정 중 니트로사민류 생성 가능성

테트라졸 고리를 포함하는 사르탄류 원료 중 NDMA의 존재는 대부분 제조 공정의 마지막 단계에서 테트라졸 고리의 합성에 사용되는 시약, 용매, 촉매 및 반응 조건에서 기인한 것으로 알려져 있다. 구체적인 한 예로서, 사르탄류 원료의약품 합성에서 Dimethylformamide (DMF) 용매와 아질산염시약을 사용하고, 처리하는 과정 중에 NDMA 불순물이 생성될 수 있다(그림1).

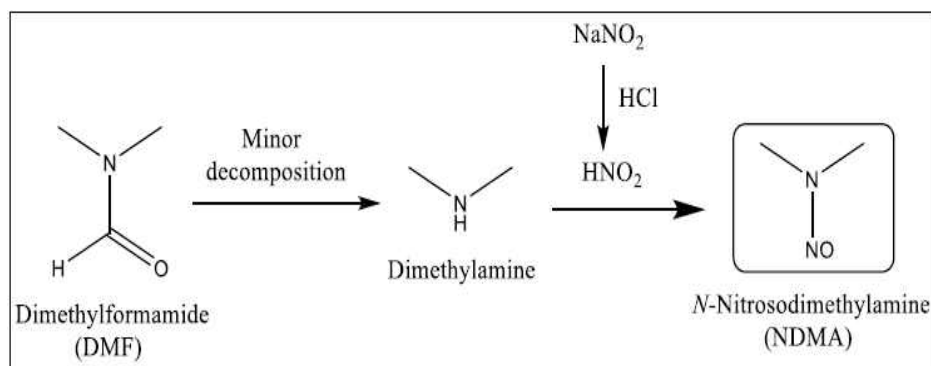


그림 1. DMF로부터 NDMA 생성

##### 1) 합성에 사용되는 시약의 오염

###### 가) 아민 시약

합성과정에서 사용되는 Triethylamine (TEA)과 Diisopropylethylamine (DIPEA) 같은 3차 아민의 경우 2차 아민인 Diethylamine, Diisopropylamine, isopropylethylamine을 분해산물 또는 불순물로 함유하고 있을 수 있고, 마찬가지로 4차 아민은 탈알킬화되어 유연물질 또는 분해생성물로서 2차 및 3차 아민을 포함하고 있을 수 있다. 예로, 일반적인 상이동 촉매로서 사용되는 Tetrabutylammonium bromide (TBAB)는 트리부틸 및 디부틸아민 불순물을 포함할 수 있다.

###### 나) 아마이드 용매

2차 아민은 아마이드 용매의 불순물로 존재할 수 있다. 대표적으로, DMF의 제조공정은 일반적으로 DMA를 이용한 합성이므로 DMA는 DMF 내 분해산물로 존재할 수 있으며 이 경우 상기 반응과정에 따라 NDMA를 생성할 수 있다.

#### 다) 외부 업체로부터 오염된 원료의 사용

외부 업체로부터 공급받는 원료로부터 니트로사민류가 오염될 수 있다. 원료물질 공급과정에 대한 정보는 니트로사민류 발생 예방에 중요한 요소이다. 원료 중 일부는 2차 또는 3차 아민을 불순물로 함유할 수 있다(예: 톨루엔). 또한, 출발물질 또는 위탁 제조원으로부터 공급받는 중간체에도 각 원료를 제조하는 과정에서 교차 오염이 발생 할 가능성이 있다. 예를 들어, 아질산나트륨은 일부 출발물질의 알려진 불순물이며 질산염 함유 원료(예: 질산칼륨)는 아질산염을 불순물로 함유할 수 있다. 아질산염 불순물은 각 원료의 공정에 따라 그 수준이 다를 수 있으며 이는 원료의약품 제조원별로 평가해야 할 수 있다.

#### 라) 회수한 용매, 촉매 및 시약의 사용

회수한 원료물질을 재사용하는 경우에는 잔류 아민(예: TEA, DIPEA)으로 인하여 니트로사민류 발생 위험을 증가시킬 수 있다. 또한, 회수 공정에 켄칭단계가 포함된 경우 니트로사민에 오염될 수 있다(예 : 잔류 아지드를 분해하기 위한 아질산염 사용). 이러한 회수 용매가 니트로사민류의 전구체를 포함하는 공정 등에 사용되는 경우 니트로사민류 발생 위험이 증가될 수 있다. 원료물질의 회수를 외부업체에 위탁할 경우나 설비의 세척공정이 적절하지 않은 경우에도 오염원에 노출될 가능성이 있다.

## 2) 합성반응 시 반응온도 및 조건

#### 가) 고온조건에서 아미드 용매의 분해

테트라졸고리 형성과정에서 용매로 사용되는 DMF 또는 TEA는 고온 또는 산성조건에서 분해되면서 DMA 또는 Diethylamine (DEA) 등 2차 아민을 생성시킬 수 있다. 이는 오염된 아질산염을 만나 NDMA 또는 NDEA 등으로 전환될 수 있다.

#### 나) 강산 또는 강염기 조건

일부 합성과정은 반응 속도를 높이고 생성물 반응으로 전환시키기 위해 촉매 (상 전이, Lewis acids)를 첨가하고, 장시간 동안 끓는점이 높은 극성 용매를 이용해 고온과정을 수행하기도 한다. 이러한 과정에 사용되는 *N*-methylpyrrolidone (NMP)은 열적 문제에 매우 안정적이지만 강한 산성 또는 알칼리성 조건에서는 *N*-methylaminobutyric Acid 로 분해 되고, 아질산염과 반응하여 *N*-Nitrosomethylaminobutyric Acid (NMBA)인 니트로사민류가 생성 될 수 있다. *N,N*-디메틸아세트아미드 및 *N,N*-디에틸아세트아미드도 유사한 반응과정을 거쳐 니트로사민류를 생성할 수 있다.

다) 합성과정 중의 산화제 사용으로 인한 DMA의 산화

DMA는 산화제가 존재할 때 니트로산화제가 없어도 자체적으로 아질산염 및 NDMA를 증가시킬 수 있다. DMA에서 전환된 하이드록실아민은 산화되어 알칼리성 환경에서 고농도의 아질산염을 생성할 수 있으며, 알칼리성에서 다시 DMA와 반응하여 NDMA를 생성할 수 있다(그림 2).

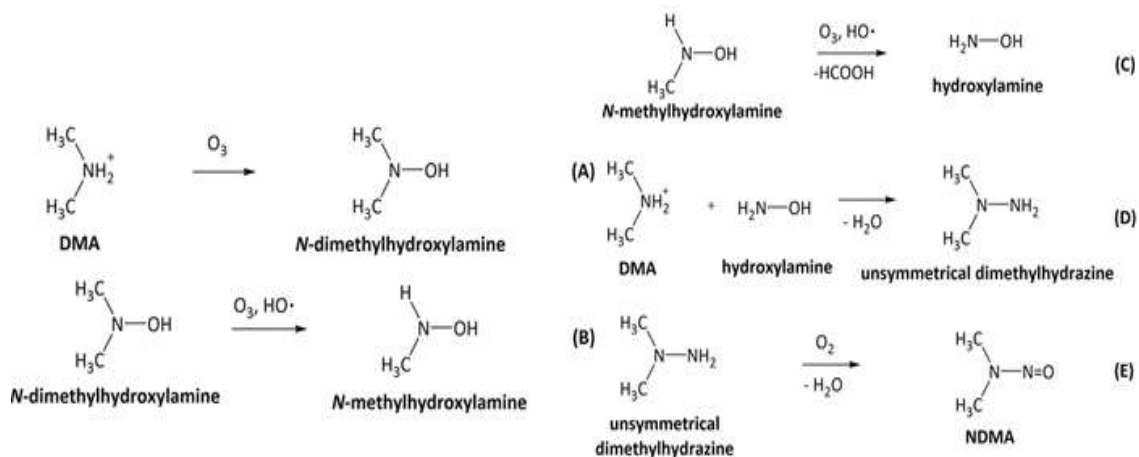


그림 2. 산화제 사용으로 인한 DMA의 산화 및 NDMA 생성과정

### 3) 니트로사민을 형성하는 발생원인 조합

니트로사민류를 형성하는 주요 니트로소화제와 아민의 기원이 되는 시약·용매는 그림과 같다(그림 3). 이러한 화합물 조합은 니트로사민류 형성 위험을 높일 수 있기 때문에 제조공정에서 우선적으로 관리해야 한다.

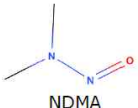
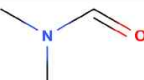

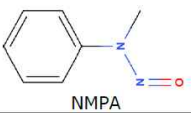
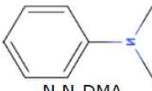
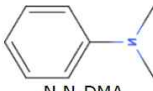
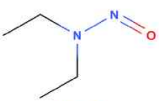
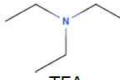
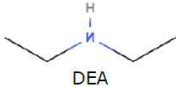
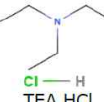
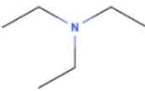
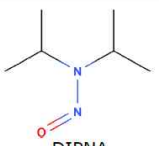

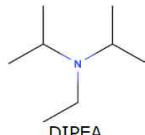
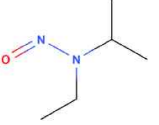
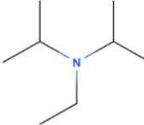
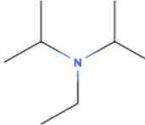
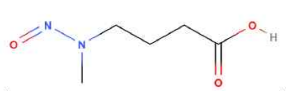

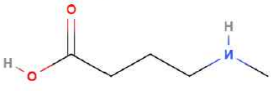
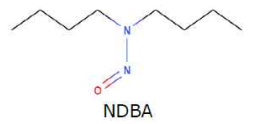
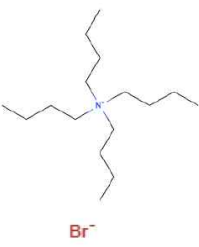
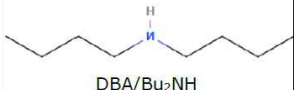
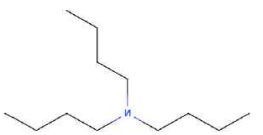
Nitrosamine	NO <sub>x</sub> Source	Amine Source	Amine nitrosated by NO <sub>x</sub>	Critical Compound Combination
 NDMA	NaNO <sub>2</sub>	 DMF	 DMA	reagent/solvent
 NMPA	NaNO <sub>2</sub>	 N,N-DMA	 N,N-DMA	reagent/solvent
 NDEA	NaNO <sub>2</sub>	 TEA	 DEA	reagent/reagent
		 TEA HCl	 TEA	reagent/catalyst
 DIPNA	NaNO <sub>2</sub>	 DIPEA	 DIPEA	reagent/reagent
 EIPNA	NaNO <sub>2</sub>	 DIPEA	 DIPEA	reagent/reagent
 NMBA	NaNO <sub>2</sub>	 NMP	 MBA	reagent/solvent
 NDBA	NaNO <sub>2</sub>	 TBAB	 DBA/Bu <sub>2</sub> NH	reagent/catalyst
			 TBA/Bu <sub>3</sub> N	

그림 3. N-니트로사민류를 생성하는 주요 니트로소화제 및 아민류의 시약·용매 조합



## 2. 합성과정 중 니트로사민류 생성 사례

### 1) 발사르탄 합성과정에서 니트로사민류 생성

처음 발사르탄을 개발한 노바티스는 합성 경로의 끝에서 두 번째 단계에서 니트릴 중간체와 트리부틸틴 아지드의 반응을 통해 테트라졸 고리를 형성하였다. 노바티스의 발사르탄 특허가 유럽에서 2011년에, 미국에서는 2012년 9월에 만료되면서 발사르탄의 제네릭 버전이 시장에 등장하게 되었다. 이 중 Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd.와 같은 중국회사들은 발사르탄 합성과정의 반응 수율을 향상시키기 위해 아지드화나트륨을 사용하는 방법으로 수정하였다. 이러한 공정에서는 아질산나트륨을 사용하여 반응 혼합물로부터 과량의 아지드화나트륨을 제거하는 방법을 사용하였고, 이러한 과정에서는 산성 조건 중 아질산나트륨과 반응용매인 DMF의 분해산물인 2차 아민간 반응으로 니트로사민류( NDMA, NDEA, NMBA)가 생성되게 된다(그림 4).

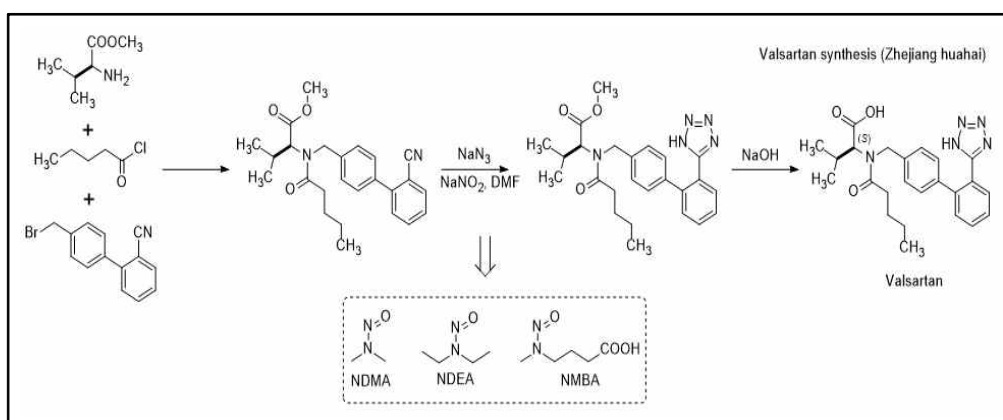


그림 4. 원료사(Zhejiang huahai) 발사르탄 합성과정 중 니트로사민류 생성 사례

### 2) 이르베사르탄 합성과정에서 니트로사민 생성

이르베사르탄의 합성은 마지막 단계에서 테트라졸 고리를 도입하는 과정을 포함한다. 이 방법은 Sanofi, Aurobindo Pharma 및 Alembic Ltd. 등의 여러 제약회사들이 사용하였고, 테트라졸 고리 도입이 니트로사민 불순물 오염과 관련이 있었다. 해당 제약사들은  $\text{Bu}_3\text{SnCl}/\text{NaN}_3$  또는  $\text{Bu}_3\text{SnN}_3$ 을 테트라졸 고리 형성 마지막 단계에 사용하였고, 이로 인해 NDMA 및 NDEA 불순물이 생성되게 된다(그림 5).

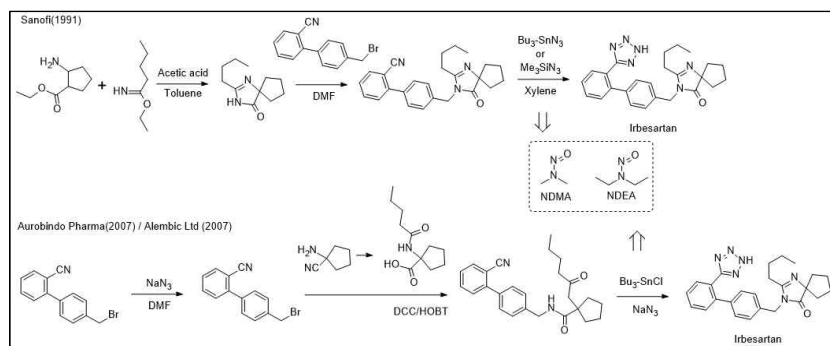


그림 5. 이르베사르탄 합성과정 중 니트로사민류 생성 사례

### 3) 로사르탄 합성과정에서 니트로사민 생성

로사르탄 합성과정에는 테트라졸 고리를 형성하기 위한 니트릴과 아지드화 나트륨을 첨가하는 포함하는 과정이 포함된다. 이 때 합성 중에서 사용된 아지드화물, 아질산 나트륨, 그리고 DMF/NMP의 조합으로 인해 NDEA 및 NMBA 생성되게 된다(그림 6).

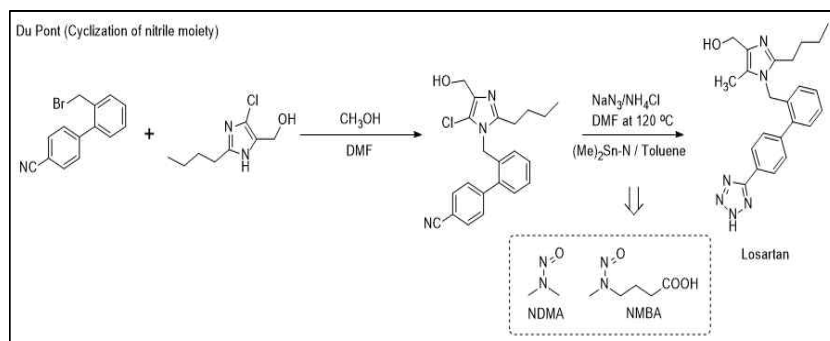


그림 6. 로사르탄 합성과정 중 니트로사민류 생성 사례

### 4) 아미노페나존 중 NDMA 생성

아미노페나존 원료의약품은 아래의 공정(그림7)으로 제조되는데 공정 중 니트로소화 단계에서 아질산나트륨을 사용한 후 후속 환원 및 메틸화 반응을 포함하고 있다. 또한 아미노페나존 원료의약품의 가수분해로 인하여 4-하이드록시피라졸-3-온 유도체와 DMA가 생성되는데 이로 인해 DMA와 아질산이 직접적인 반응하여 NDMA가 생성되게 된다.

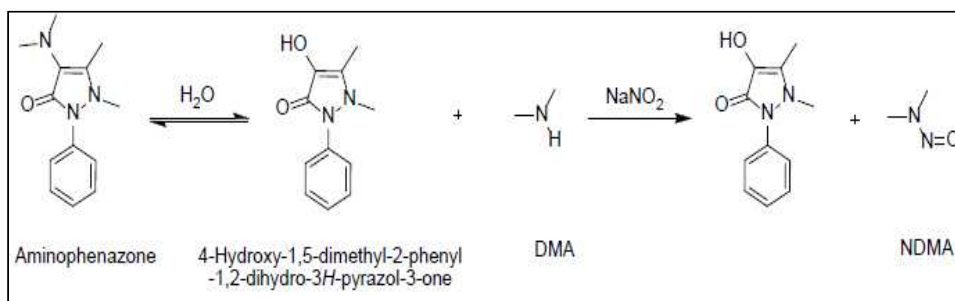


그림 7. 아미노페나존 API 합성경로

### 5) 리팜피신 중 1-Methyl-4-nitrosopiperazine (MNP) 발생

리팜피신 원료의약품의 합성단계에서 시약으로 사용되는 4-Methylaminopiperazine(AMP)의 제조과정에서 유전독성 물질인 MNP가 제거되지 않고 잔류하여 원료의약품에 혼입되는 것으로 추정되고 있다(그림 8).

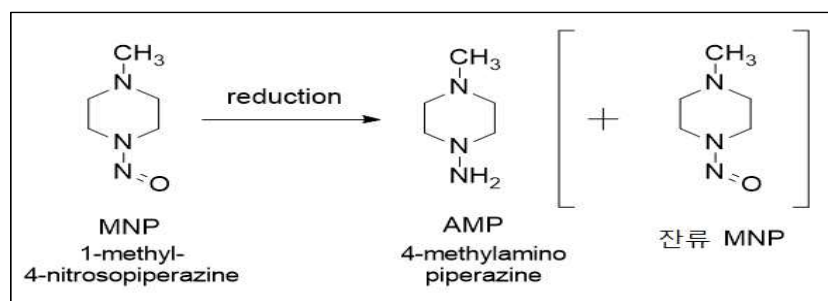


그림 8. 리팜피신 중 MNP 발생 원인

### 6) 몬테루카스트 중 N-Nitrosodipropylamine (NDPA) 발생

몬테루카스트 원료의약품의 합성 단계에서 시약으로 사용되는 Dipropylamine (DPA)이 용매로 사용되는 메탄올 중 미량으로 존재하는 아질산 등 불순물들과 반응하여 NDPA가 생성되는 것으로 추정되고 있다(그림 9).

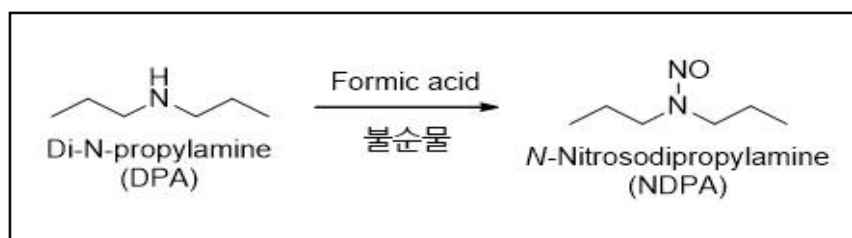


그림 9. 몬테루카스트 중 NDPA 발생원인

## 2. NDMA 생성 가능성 분석

### 1. 용매 중 디메틸아민 분석

2차 아민은 대부분의 의약품 구조에서 발견할 수 있으며 3차 아민 구조의 의약품에서도 다단계에 걸친 촉매작용으로 인하여 2차 아민이 생성될 수 있다. 본 연구의 실험결과에서도 반응용매 DMF 용매를 80도 이상에서 장시간 가온한 경우 분해물로서 다량의 DMA가 생성됨을 확인할 수 있었다(그림 10). 이와 같이 2차 아민은 일반적인 의약품 합성과정에서 반응 부산물로 발생할 수 있어 관리가 필요하다. 이에 의약품 합성 단계별로 NDMA의 생성 원인을 확인하고자 할 때 반응 단계별로 DMA의 생성량을 측정하는 것이 도움이 될 수 있다. 본 연구에서는 HPLC 기기를 활용하여 고감도의 DMA 분석을 위한 형광 정량법을 개발하였다.

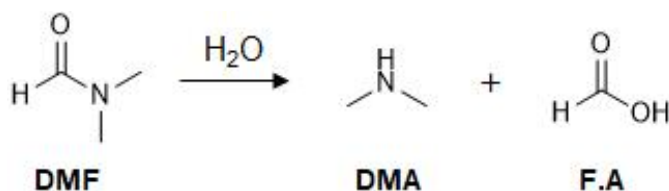


그림 10. 디메틸포름아미드(DMF)의 가수분해반응

Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl)는 주로 2차 아민과 반응하여 Fmoc 그룹을 아민에 추가시킬 수 있다. Fmoc의 플루오레닐 그룹은 형광성이 높으며 특정 UV 비활성 화합물과 반응하여 분석에 적합한 Fmoc 유도체를 생성할 수 있다. 역상 HPLC에서 반응시약과 반응생성물을 용이하게 분리하여 분석할 수 있다.

#### 1) 반응용매 중 DMA 오염도 분석

발사르탄 합성 용매로 자주 사용되는 DMF, Acetonitrile (ACN), Potassium hydroxide (KOH), TEA, Dichloromethane (DCM) 5개 용매의 DMA 오염도를 측정하기 위해 Fmoc-Cl을 활용한 형광정량법으로 분석한 결과, ACN, KOH, 및 TEA에서는 DMA 오염이 검출되지 않았으나 DMF에서는 11.4 ± 0.44 ppm의 DMA가 검출되었다. DCM에서도 약 18.2 ppb정도의 미량의 DMA가 오염된 것을 확인할 수 있었다(그림 11).

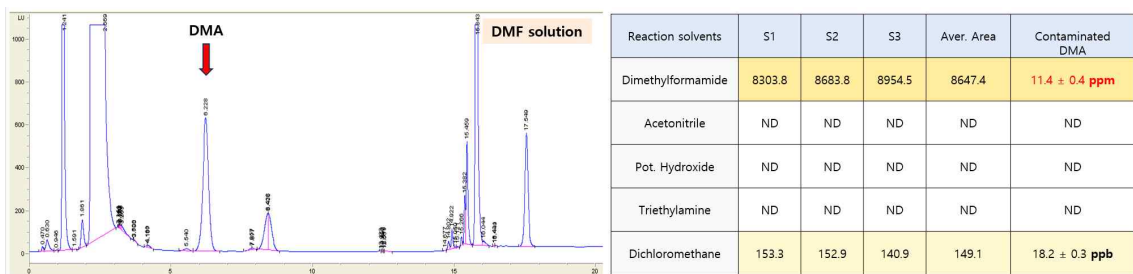


그림 11. 발사르탄 합성에 사용되는 용매의 DMA 오염도 측정

또한 반응용매 DMF를 사르탄 합성조건에서 사용될 수 있는 80도, 120도에서 24시간 가온한 후 DMA의 변화량을 분석하였다. 상온에서의 DMA 생성량에 비하여 온도에 따라서 약 2배 이상의 DMA 불순물 생성되는 것을 확인하였다(그림 12). 사르탄 합성 단계에서 테트라졸고리 생성반응에서 DMF를 사용하고 열이 가해 지는 경우 NDMA의 전구체인 DMA의 생성량이 20 ppm 이상으로 생성될 수 있음을 본 실험을 통해 알 수 있다.

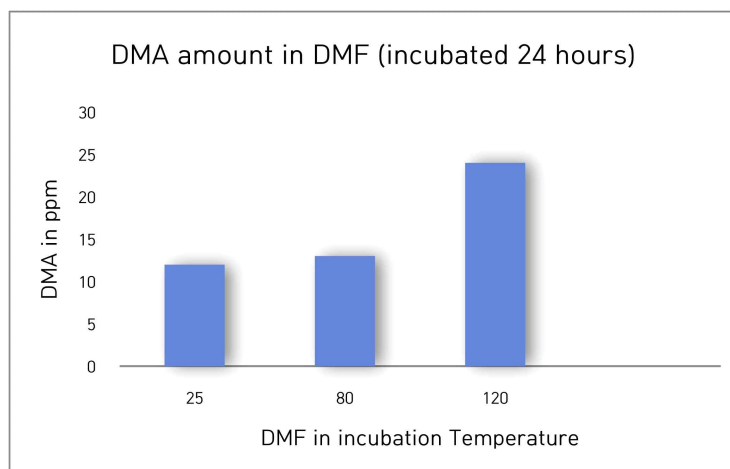


그림 12. DMF 가온 온도에 따른 DMA 생성량

## ※ 2차 아민(DMA) 분석방법

### 1. 시료 전처리

300  $\mu$ L의 Borate buffer (pH 9.5)에 녹인 DMA 표준 용액을 취하고, 여기에 ACN에 새롭게 조제한 10mM FMOC-Cl 300  $\mu$ L를 가한다. 혼합물을 약 600 rpm으로 Vortexing 하면서 실온에서 25분간 반응시킨다. 이후 1 mL 주사기와 0.22  $\mu$ m 멸균 필터를 사용하여 혼합물을 HPLC 바이알에 여과한다.

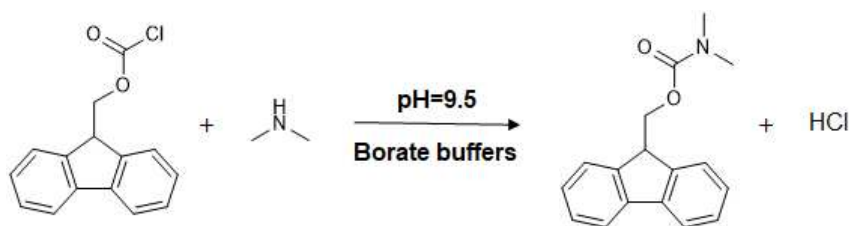


그림 13. Fmoc-Cl에 의한 DMA 형광유도체 생성

### 2. HPLC-형광검출기에 의한 DMA 분석조건

다음과 같은 조건으로 분석을 실시한다.

HPLC			
Column	Phenomenex Luna 5u Phenyl-Hexyl 100mm x 2.0 mm, 5um		
Column temperature	35 $^{\circ}$ C		
Mobile phase A	50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.5)		
Mobile phase B	Acetonitrile		
Oven program	시간 (min)	A (vol %)	B (vol %)
	12.0	60	40
	13.0	20	80
	19.0	20	80
	20.0	60	40
	25.0	60	40
Flow rate	0.65 mL/min		
Injection volume	5 $\mu$ L		

## 2. 완제의약품 중 아질산염 분석

선정된 8종의 원료 20품목의 완제의약품의 아질산염을 분석하였다. Bisoprolol 1 품목과 Felodipine 2 품목은 22~78 ng/g 수준의 아질산염이 검출되었다(표 1).

표 1. 국내 완제의약품 중 아질산염 검출 예시

API	Sample name	1차 Screening NO <sub>2</sub> (ppb)	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average NO <sub>2</sub> (ppb)
Betahistine	B-1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	B-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	B-3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	B-4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Fluoxetine	F-1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	F-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	F-3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Nebivolol	N-1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	N-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Enalapril	E-1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	E-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Bisoprolol	Bi-1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Bi-2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Bi-3	38.10	49.18	78.63	78.80	68.87
	Bi-4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Amoxicillin	A-1	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Duloxetine	D-1	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	D-2	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Felodipine	Fe-1	31.20	27.93	32.68	32.74	31.12
	Fe-2	22.17	22.85	27.54	27.33	25.91

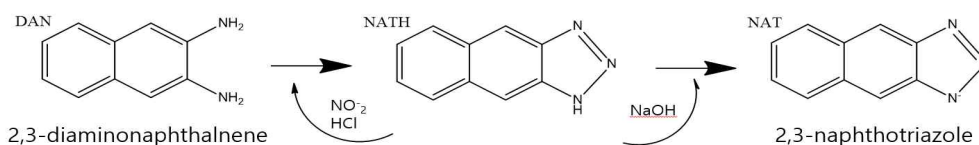
## ※ 아질산염 분석방법

### 1. 표준용액 조제

2,3-Diaminonaphthalene (DAN) 시약을 0.5M 염산에 녹여 0.62M이 되도록 준비한다. 차광 플라스크 또는 바이알에 녹여 제조하여 DAN Solution 으로 사용한다. Sodium Hydroxide 시약을 D.W.에 녹여 2.8M이 되도록 제조하여 NaOH Solution으로 사용한다. 제조한 용액은 저온 4℃에서 보관하여 사용한다. Sodium Nitrite를 물에 녹여 아질산염 1ppm을 표준원액으로 한다.

### 2. 아질산염에 대한 형광유도체화 반응

산성조건에서 DAN과 nitrite 반응은 ‘Yang-Il Fang, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda(2009)’를 참고하였다. 분석하려는 샘플은 1 mg/1mL에 맞춰 물에 용해한다. 충분한 시간동안 섞어 준 후 상층액을 200 uL 취하여 DAN Solution 20 uL를 첨가하고 Vortexing 후 상온에서 10분간 반응시킨다. 반응이 끝난 Tube에 NaOH Solution 10 uL를 넣고 Vortexing 한다. 0.22 um PVDF Membrane filter를 통해 여과하여 Vial에 담아 분석한다.



**그림 14. DAN에 의한 nitrile형광 유도체화 반응**

### 3. HPLC-형광검출 조건 설정

Agilent사의 HPLC system과 detector 모듈 (Agilent 1260 HPLC system, Agilent 1260 Infinity Fluorescence Detector, Agilent Technologies, Germany)을 사용하였다. Chromatography의 분리는 CAPCELL PAK C18 MG (5 um, 4.6 x 250 mm, Osaka Soda, Japan) 제품을 사용하였다. 이동상은 Isocratic 조건으로 60%(v/v) ACN을 사용하였다. Column의 온도는 30℃이고, 10 uL를 주입하여 1 mL/min의 유속으로 10분간 분석하였다. 형광검출기의 Excitation 파장은 375 nm, Emission 파장은 415 nm이다(표 5.).

표 5. HPLC-형광검출기에 의한 Nitrite 분석조건

HPLC		
Instrument		Agilent 1260
FLD	Excitation	375 nm
	Emission	415 nm
Column		Shiseido Capcell Pak C <sub>18</sub> MG (5um, 4.6 x 250mm)
Mobile phase [Isocratic]		D.W. : ACN = 40 : 60
Oven temperature		30℃
Flow rate		1 mL/min
Injection volume		10 μL



## 제제화단계

(메트포르민 중 NDMA)

## V. 제제화단계 : 메트포르민 제제화단계 중 NDMA 발생평가

### 1. 메트포르민 제제화 과정 중 NDMA 생성 가능성

#### 1) 원료의약품

원료의약품 자체에서 NDMA가 생성되는지 알아보기 위해 이를 분석하였다. 보관을 거치지 않은 초기단계의 원료의약품과 가혹 조건(80℃, 5일, dry heat) 보관 과정을 거친 원료의약품 모두 NDMA가 검출되지 않았다(그림 1). 따라서 NDMA는 메트포르민 원료의약품 자체에서는 생성되지 않고 완제의약품을 제조하는 과정에 의해서 NDMA가 발생하는 것으로 예측된다.

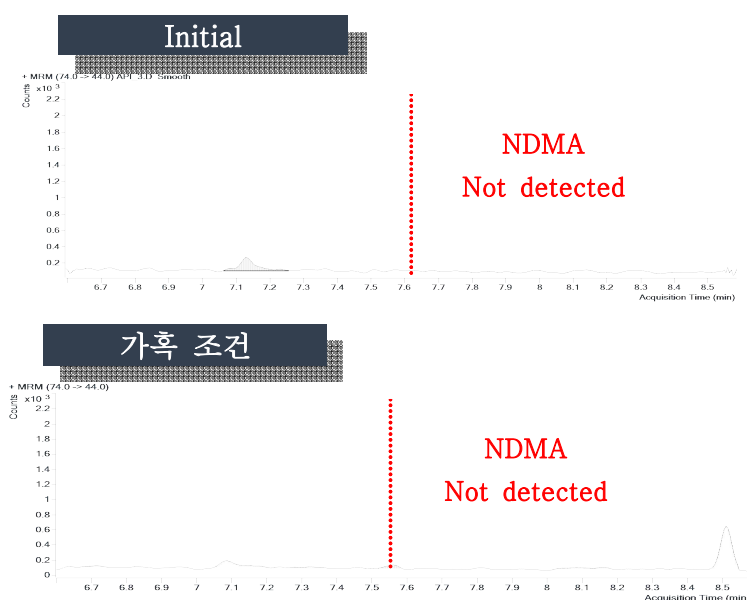


그림 1. 메트포르민 원료의약품의 초기 및 가혹조건 보관 후 분석 결과(GC-MS/MS)

#### 2) 첨가제

여러 첨가제에 미량의 질산염 및 아질산염이 함유될 수 있다고 알려져 있다. 앞서 언급한 바와 같이 메트포르민은 초기 원료인 염산염 형태의 2-cyanoguanidine과 DMA를 합성해 제조하며 이 과정으로 원료의약품에 소량의 디메틸아민이 남을 수 있다. DMA는 약산성 조건에서 아질산염 및 질산염과 반응하여 NDMA를 형성할 수 있기 때문에 첨가제 중 아질산염과 같은 니트로소화제의 함량이 중요할 수 있다.

2023년 연구에 따르면 젤라틴화 전분, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 크로스카멜로스 나트륨, 전분 글리콜산 나트륨, 크로스폴리비닐피롤리돈, 유당을 포함하여 일반적으로 사용되는 첨가제에서도 질산염 및 아질산염이 발견된 바 있다.

첨가제에 이러한 불순물이 오염되는 것은 가공수 및 제조공정, 특히 산 및 표백제 사용과 관련된 공정과 관련될 수 있으며, 첨가제의 공급업체에 따라 오염도의 차이를 보일 수 있다. 아래 그림에서는 공급업체 C, S 및 B의 배치에 비해 공급업체 A의 배치에서 아질산염 함량이 더 높고 편차가 큰 것으로 확인되었다. 히드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC) 또는 PVP의 아질산염이 100% 변환되는 경우 1000 mg 정제 당 생성될 수 있는 NDMA 또한 타 공급업체에 비해 A의 배치에서 최대 확인되었다 (그림 2). 따라서 의약품의 NDMA 생성을 줄이기 위해 첨가제 공급업체를 확인하고 변경하는 작업은 아질산염 수치를 줄여 의약품 중 NDMA 생성을 막는데 도움이 될 수 있다.

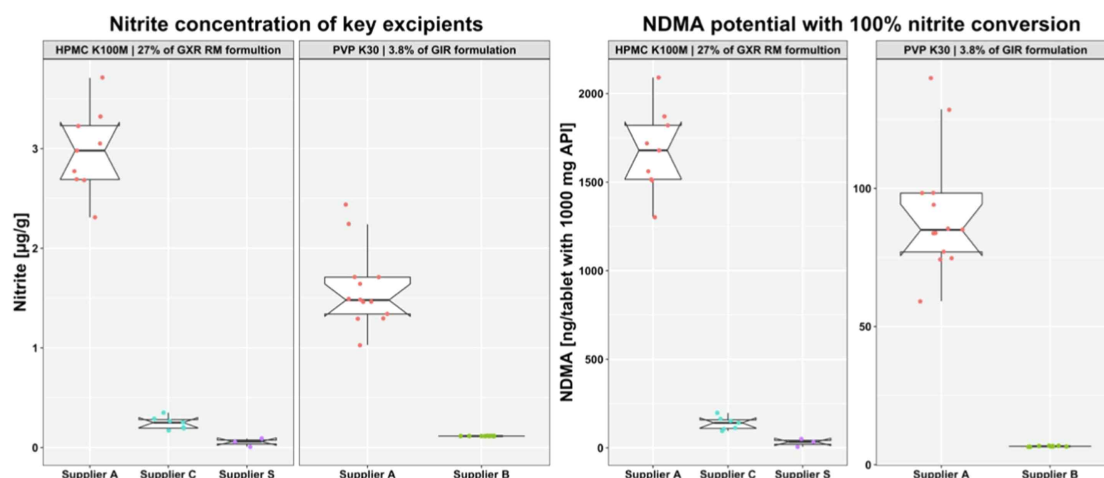


그림 2. 공급업체별 아질산염 함량 및 예상되는 최대 NDMA 농도

### 3) 수소이온농도 (pH)

산성 조건에서 2차 아민의 니트로소화 반응이 촉진되므로 산성 및 중성 제제에 약알칼리성 탄산나트륨을 첨가하여 정제 내부의 pH를 9 이상으로 조정한 경우 NDMA 생성 속도를 지연시킬 수 있다(그림 3). 일부 배치에서는 가속 조건에서 8 개월간 해당 제제를 보관 후에도 NDMA가 검출되지 않는다는 연구 결과가 있었다. 2021년 기존 연구에서도 탄산나트륨이 첨가된 메트포르민(pH 9-10) 제제에서 NDMA가 낮은 반면 산성 조건에서는 NDMA가 높은 농도로 검출되었다. 따라서 공정 중 pH 관리는 니트로소화 반응에 영향을 주어 NDMA 생성에 중요할 수 있다.

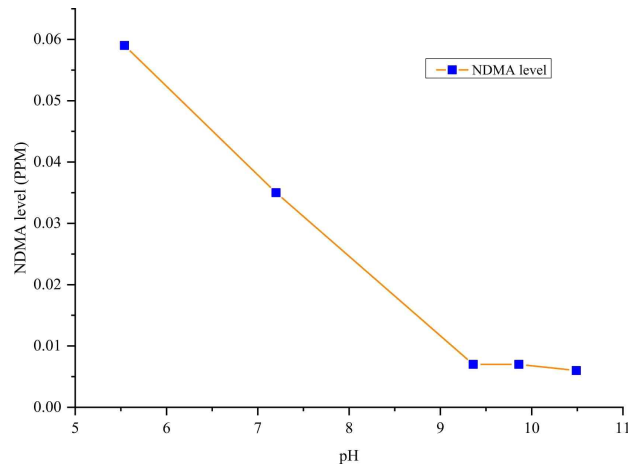


그림 3. 정제 내부 pH 변화에 따른 NDMA 농도 변화

#### 4) 산화

미국 FDA는 의약품에서 니트로사민류 발생 위험을 줄이기 위해 의약품 제제에 비타민 C, 비타민 E, 아미노산 등의 첨가를 권장한 바 있었다. 이는 항산화제가 생체 내에서 니트로사민류 형성을 억제한다는 연구 결과를 바탕으로 한 것이다. 2021년 발표한 연구에서는 아스코르브산, 아스코르브산 나트륨,  $\alpha$ -토코페롤, 카페인산, 페룰릭산을 첨가하여 80% 이상의 니트로사민류 형성 억제 효과를 확인한 바 있었다. 또한, 2023년 최근 연구에 따르면 HPMC와 혼합된 프로필갈레이트(PG)의 첨가가 NDMA의 생성을 억제할 수 있음을 확인하였다. 이는 PG가 상대적으로 낮은 산화 전위를 가져 환원제 역할을 하며 기질을 보호하여 니트로소화 반응을 방지하는 것으로 설명될 수 있다. 일부 연구에서는 의약품에서 니트로소화제가 없어도 자체적으로 아질산염 및 NDMA가 생성될 수 있음이 확인되었으며, 강력한 산화제인 과산화수소가 디메틸아민을 산화시켜 아질산염이 생성되는 메커니즘으로 밝혀졌다(그림 2).

의약품 제조 과정에서 사용되는 고분자 첨가제인 폴리에틸렌글리콜(PEG) 유도체 및 PVP는 주로 합성 중 과산화물을 사용하며, 이 과산화물은 최종 제품에서 완전히 제거되지 않아 첨가제 내 주요 산화제 공급원으로 영향을 줄 수 있다. 일부 연구에서 PVP의 건조 과정 중 상대 습도에 따라 과산화물 함량이 증가 또는 감소하는 경향을 확인한 바 있다.

#### 5) 열

최근 연구에서 제조 공정의 단계별 NDMA 생성량을 측정하였고 메트포르민의

제제화 과정 중 습식 과립화 및 코팅 과정에서 발생하는 열이 NDMA 형성을 촉진하는 것을 확인하였다(그림 5). 정제 생산과정 중 코팅 단계에서 기계로 인한 마찰과 압축으로 발생하는 열이 NDMA 형성을 촉진한다는 것을 확인하였다. 습식 과립화 단계의 건조 공정에서 발생하는 열과 습기로 메트포르민의 분해 반응과 디메틸아민의 니트로소화 반응이 가속화되어 NDMA 생성 속도가 증가할 수 있다고 보고하였다.

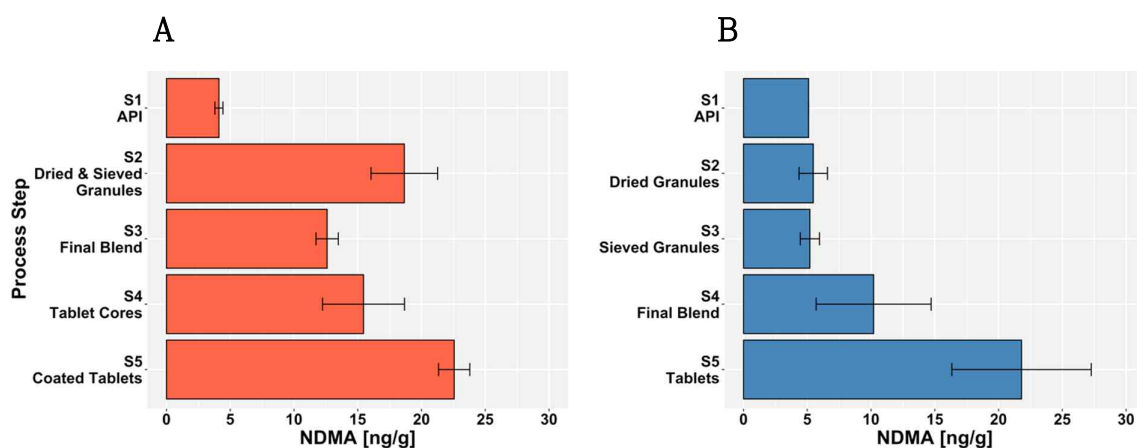


그림 5. 제제화 단계 중 NDMA 생성량 (A) 메트포르민 정제 (B) 메트포르민 서방정

## 6) 물

2020년 연구에서 공정 용수 중 아질산염에 의한 위험을 평가하였다. 아질산염은 물의 주요 불순물 중 하나이며 WHO 가이드라인에 따르면 식수에서 아질산염의 한도를 3 mg/L, 유럽에서는 0.5 mg/L로 규정하고 있다. 또한 공정수에 함유된 미량의 아질산염은 니트로사민류를 형성하는데 영향을 주며, 아질산염의 함량은 공정에 사용되는 물의 함량과 정비례한다. 그러나 원료의약품 제조에 사용되는 물에서 발견되는 아질산염은 일반적으로 낮은 수준이었다.(표 1).

표 1. 원료의약품 제조에 사용되는 물의 아질산염 함량

location	average nitrite (mg/L)	range (mg/L)	source
Coppell, Texas, USA	<0.023		City of Coppell <sup>a</sup>
Irvine, U.K.	<0.01	0 to <0.01	Scottish Water, Bradan D <sup>b</sup>
Macclesfield, U.K.	<0.012	0 to <0.012	United Utilities, Lamaload <sup>c</sup>
Montrose, U.K.	<0.01	0 to <0.01	Scottish Water, Lintrathen B <sup>d</sup>
Ringaskiddy, Ireland	<0.013	0 to <0.016	Irish Water, Cork harbor and city <sup>e</sup>
Sandwich, U.K.	0.0024	0 to 0.005	Southern Water, Beacon Hill <sup>f</sup>
Singapore	<0.03	0 to 0.066	PUB <sup>g</sup>
Stockholm, Sweden	<0.007	0 to <0.007	Stockholm Vatten Och Avfall <sup>h</sup>
Ulverston, U.K.	<0.0016	0 to <0.0016	United Utilities, Poaka Beck <sup>i</sup>

한편, 2023년 연구에서는 메트포르민의 건조 과정 이후 정제의 잔여 수분 함량이 높을수록 NDMA의 생성 속도가 느려지는 것을 확인하였다. 아질산염이나 질산염이 잔류 수분에 의해 희석되어 니트로소화 속도를 감소시키고 결과적으로 NDMA 농도가 낮아질 수 있음을 의미할 수 있다. 완제의약품의 용출 및 안정성을 고려하여 합리적인 수분 함량을 고려해야 한다.

## 7) 입자 크기

입자크기가 작을수록 안정성(열, 습도, 산화반응 등)이 낮아지고 분해산물의 생성도를 증가시켜 NDMA의 생성을 촉진 시킬 수 있다. 다수의 문헌에서 NDMA 생성요인 중 하나가 메트포르민의 입자 크기인 것으로 보고된 바 있다. 2021년 연구에서는 일반적인 입자 크기(350  $\mu\text{m}$ )로 생산된 메트포르민 정제와 상대적으로 작은 입자 크기(100  $\mu\text{m}$ )로 생산된 메트포르민 정제를 75% RH 및 60°C에서 7일 동안 보관 후 분석하였다. 일반적인 입자 크기를 가지는 정제에서는 NDMA의 농도가 11 ppb인 반면, 작은 입자 크기를 가지는 정제에서는 40 ppb의 NDMA가 검출되었다. 이는 반응이 고체 상태에서 일어나므로 입자의 표면적이 반응 속도에 영향을 미치기 때문으로 해석할 수 있다. 최근 연구에서도 API의 입자 크기를 줄여 반응 표면적을 늘리면 NDMA 생성 속도가 증가하는 것을 확인한 바 있다(그림 6).

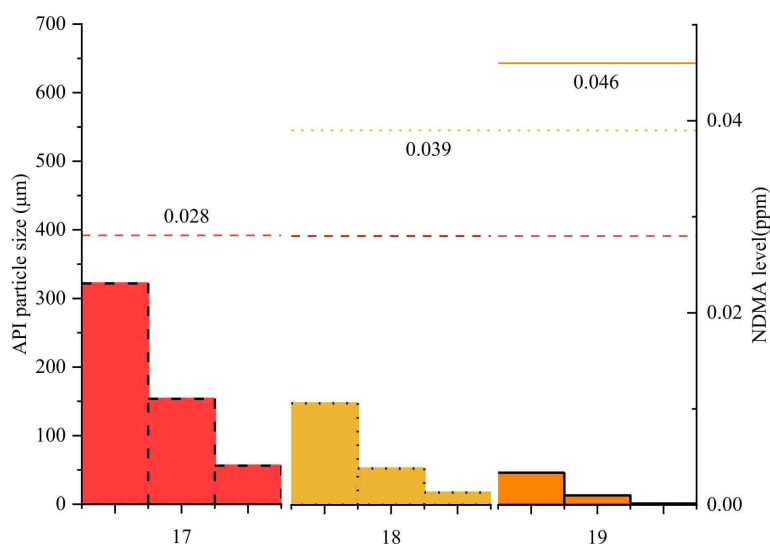


그림 6. 입자 크기가 다르게 제조된 메트포르민의 NDMA 농도 비교

## 2. NDMA 생성 가능성 분석

앞서 설명한 요인과 같이 메트포르민 중 NDMA 생성에 대한 발생 원인이 다양하여 각 요인별 모든 변수를 조합한 원인분석 연구를 수행하는 것은 불가능하다. 따라서 충분한 문헌 검토를 바탕으로 4가지 대표적 발생 원인으로 첨가제, 습식 과립화 용매, 건조 온도, 주성분 입자 크기를 우선 선정하였다(그림 7).

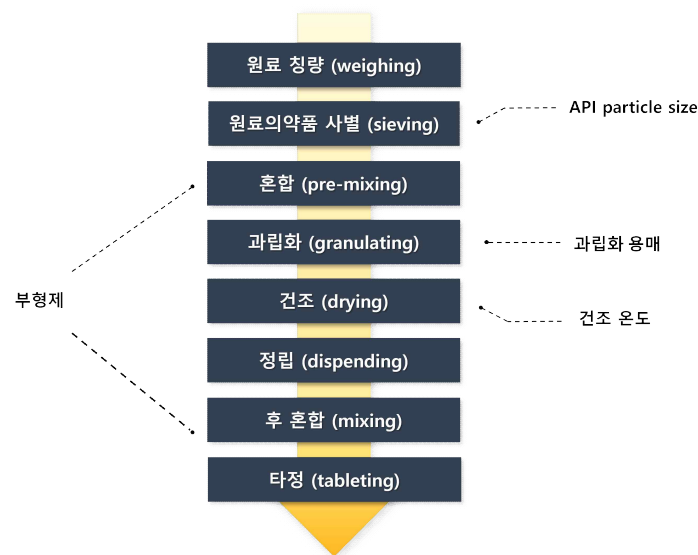


그림 7. 정제 제조 방법 모식도

본 연구에서는 각 변수에 대한 NDMA 생성 원인 분석을 합리적으로 검토할 수 있도록 통계적 실험계획법(Design of Experiment, DoE)을 적용하여 실험을 실시하는 것을 목표로 하였다.

### 1) 메트포르민 의약품 중 NDMA 분석

본 연구에서는 식품의약품안전처에서 발간한 “GC-MS/MS를 이용한 메트포르민 의약품 중 NDMA 시험법”을 적용하였다. 연구 수행에 앞서 해당 분석법의 적용성을 확인하였고 NDMA 분석 감도 개선을 위해 GC 주입모드(injection mode)를 pulsed splitless mode로 변경하였다.

기존 전처리법으로는 첨가제 중 HPMC의 겔화로 인해 매트릭스 효과 및 재현성 감소가 우려되었다. 이에 용매 첨가 순서를 변경하여 겔화를 형성하지 않는 전처리

방법을 고안하였고, 기존과 달리 디클로로메탄을 먼저 첨가하고 이후 염산 수용액을 첨가하는 방법으로 전처리 과정을 개선하였다. HPMC가 과량으로 첨가된 메트포르민 제제의 경우 해당 전처리법이 도움이 될 수 있다.

#### □ GC-MS/MS 기기 분석 조건

Agilent 8890 GC system				
Column	TG-WAXMS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)			
Inlet temperature	230℃			
Injection type	Pulsed splitless (Injection pulse pressure : 20 psi untill 0.5 min) Purge : 60 mL/min at 1 min			
Injection volume	2 μL			
Oven program	시간 (min)	승온 (℃/min)	칼럼 온도 (℃)	
	0.0	-	40	
	0.5	10	75	
	4.0	5	95	
	8.0	50	200	
	10.1	-	230	
	19.1	-	230	
Flow rate	1.5 mL/min			
Carrier gas	He			
Transfer temperature	250℃			
Agilent 7000D GC/TQ				
Solvent delay	5 min			
Source temperature	230℃			
Quard temperature	150℃			
Collision gas	N <sub>2</sub>			
Quench gas	He			
Mode	MRM	성분	m/z	CE (eV)
		NDMA	74 → 44 (정량)	4
			74 → 42 (정성)	22
		NDMA-d <sub>6</sub> (IS)	80 → 50 (정량)	6
			80 → 46 (정성)	20

#### □ 메트포르민 완제의약품 전처리법

- ① 500 mg의 메트포르민염산염으로서 칭량하였다.
- ② 50  $\mu$ L의 내부표준물(IS) 용액과 5 mL의 디클로로메탄 용액을 넣고 5분간 흔들어 섞었다.
- ③ 1 M HCl을 5 mL 넣고 5분간 흔들어 섞고 4000 rpm에서 10분간 원심분리하였다.
- ④ 디클로로메탄층을 500  $\mu$ L 취하여 0.22  $\mu$ m 멤브레인필터(PTFE)로 여과하였다.



## 2) 실험계획법 접근법

실험계획법이란 실험 목적에 맞는 인자(factor) 및 수준(level)과 그의 결과로서 나타나는 반응값(response)을 선정하여 실험을 효율적으로 수행하기 위한 계획법이다. 아래 그림과 같이 실험 목적을 설정하고 특성값 및 수준을 선택한 후 적합한 실험 계획 값을 선정한다. 실험을 통해 얻어진 데이터에 대한 통계적 분석을 수행한 후 주요 원인을 분석하는 순서로 진행된다(그림 8).

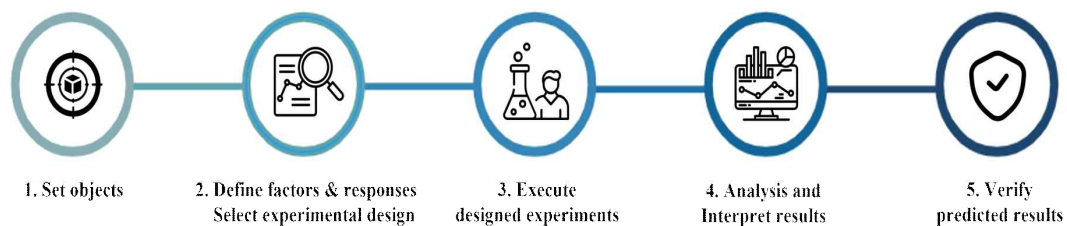


그림 8. 실험계획법 순서도

실험계획법의 종류는 크게 요인설계법(Factorial design), 반응표면분석법(Response surface methodology), 혼합물 설계법(Mixture design), 다구찌법(Taguchi method) 등이 있으며 본 연구에서는 이 중 요인설계법과 반응표면분석법을 사용하였다(그림 9).

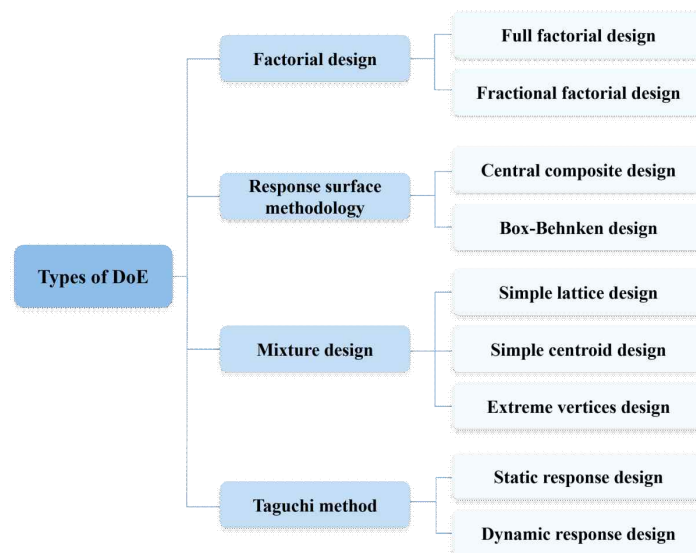


그림 9. 실험계획법 종류

## (1) 요인설계법

실험계획법 중 요인설계법은 주로 유의미한 영향을 미치는 요인을 선택하고 경향을 파악하는 데 사용된다. 본 연구에서는 상용프로그램을 활용하여 요인과 수준을 결정하고, 이를 조합하여 실험을 계획·진행하였다. 주요 요인은 첨가제, 습식 과립화 용매, 건조 온도, API 입자 크기 4가지를 선정하 수행하였다. 첨가제는 국내 메트포르민 제제 제조사(21개사)에서 가장 많이 사용되는 다빈도 첨가제 4종을 선정하였다(표 4).

표 4. 국내 제약사 메트포르민 제제에 첨가되는 주요 첨가제

제품명	HPMC	Povidone /crospovidone	PEG	Magnesium stearate	Microcrystalline cellulose	Talc	HPC
A	○	○		○	○		
B		○		○	○		
C	○	○		○			
D		○		○			
E	○		○	○		○	○
F	○	○	○	○		○	○
G		○		○			
H	○	○	○	○		○	○
I	○	○	○	○		○	
J	○			○			
K		○		○	○		
L	○	○	○	○	○	○	
M	○			○			
N	○			○			○
O		○		○	○		
P	○	○	○	○	○		
Q	○			○			
R	○	○	○	○			○
S	○	○	○	○	○		
T	○	○	○	○	○		
U	○	○	○	○	○	○	○

히드록시프로필메틸셀룰로스 (HPMC), 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리에틸렌글리콜(PEG), 스테아린산마그네슘(SMG)를 선택하여 각 첨가제가 한가지씩 제외되었을 때 NDMA 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 본 연구에서 HPMC는 첨가제 또는 서방화제, PVP는 결합제, PEG와 SMG는 활택제로서 첨가되어 메트포르민 제제를 제조하였다. 습식 과립화 용매 인자에서는 다빈도 과립화 용매로 사용되는 물과 에탄올을 선정하였다. 물에 의한 영향을 알아보기로 무수 에탄올(99.9%)을 추가로 선택하였고 습식 과립화 용매 인자는 통계 프로그램에 log 변환값으로 적용하였다. 건조 온도 인자에서는 25℃와 60℃를 선정하였다. 일반적으로 사용되는 연합 후 건조 공정의 제품 건조 온도는 40-50℃이나, 본 연구에서는 열에 의한 영향을 알아보기로 상온 조건과 드라이오븐에서 고온으로 건조될 때의 NDMA 생성을 비교하였다. API 입자 크기 인자에서는 100  $\mu$ m와 300  $\mu$ m를 선정하였다. 이 API를 표준 망체로 체질하여 100  $\mu$ m 이하와 300  $\mu$ m 이하의 API가 사용되어 제조되었을 때의 입자 크기에 따른

NDMA 생성률을 알아보고자 하였다(표 5).

표 5. 요인설계법에 사용된 인자와 인자별 수준

인자(Factors)	수준(Levels)
Excipient (excluded)	HPMC, PVP, PEG, SMG
Solvent (log (water %))	2, 0.7, -1
Drying temperature (°C)	25, 60
API particle size (μm)	100, 300

위와 같이 선정된 인자와 수준을 통계 프로그램에 입력하여 각 인자들에 대한 제제화 조건 및 실험 순서를 도출하였다. 13가지의 조합이 생성되었고 중복되는 조합을 제외하고 총 10개 조합 구성은 다음과 같았다(표 6).

표 6. 요인설계법으로 도출된 배치 구성

No.	HPMC	PVP	PEG	SMG	Binder solvent	Drying temperature (°C)	API particle size (μm)
1		✓	✓	✓	Ethyl alcohol (anhydrous)	60	100
2		✓	✓	✓	Ethyl alcohol	25	100
3		✓	✓	✓	Water	25	300
4	✓		✓	✓	Ethyl alcohol (anhydrous)	25	300
5	✓		✓	✓	Ethyl alcohol	60	100
6	✓		✓	✓	Water	60	300
7	✓	✓		✓	Ethyl alcohol (anhydrous)	25	100
8	✓	✓		✓	Ethyl alcohol	60	300
9	✓	✓	✓		Water	25	100
10	✓	✓	✓		Ethyl alcohol (anhydrous)	60	300

의약품 업체에 시험용 제제의 제조를 의뢰하여 실제 샘플을 만들었다. 공정 조건이 변경되는 단계는 원료의약품 제립, 혼합, 과립화, 건조 단계이다. 시험용 제제 제조 직후 GC-MS/MS 분석을 진행하였으나 대부분의 배치에서 NDMA가 검출되지 않았다. 이에 기존 연구를 참고하여 제조 직후 가혹조건에서의 보관실험 조건을 추가하여, 습도 조절 없이 온도를 80°C로 변경하여 NDMA 생성을 유도하였다. 모든

배치의 NDMA 농도가 정량 가능한 수준으로 확인할 수 있고 배치 간 유의미한 차이를 나타내는 80℃, 5일 보관 조건으로 선정하여 전 배치에 적용하였다(그림 10).

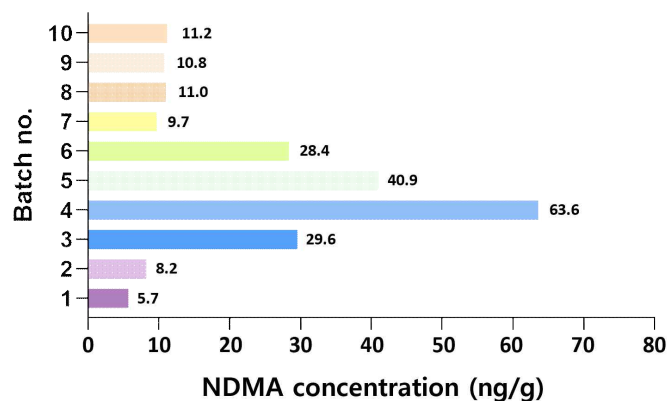


그림 10. 요인설계법으로 설계된 배치별 NDMA 농도 (가혹조건 적용)

NDMA 농도 등 실험결과를 통계 프로그램에 입력하여 Coefficient charts를 작성하였다(그림 11). Coefficient charts는 각 인자의 효과에 대한 계수(coefficient)와 95% 신뢰구간을 표시하는 오차 범위가 표시된 그래프로 이를 통해 주요 요인을 식별할 수 있다. 양의 축과 음의 축이 무관하게 x축으로부터 막대가 벗어난 정도와 오차를 고려(오차 범위가 x축을 지나지 않음)하여 주 요인을 분석 할 수 있다.

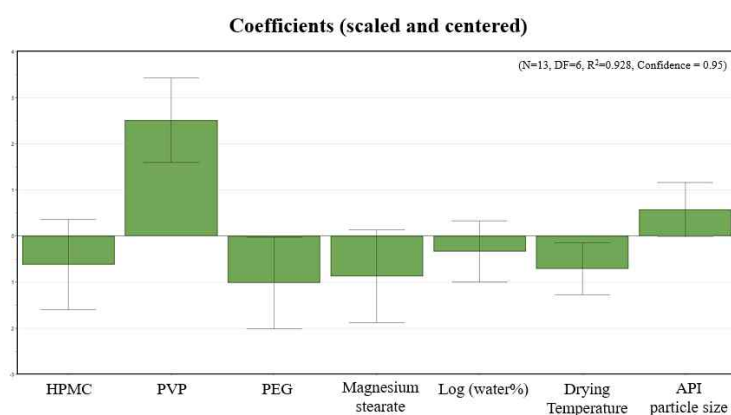


그림 11. 요인설계법으로부터 도출된 각 인자의 효과에 대한 Coefficient charts

각 첨가제의 영향도를 확인하기 위해 제조 과정에서 각 첨가제를 하나씩 제외한 후 영향을 분석한 결과, 본 연구에서는 PVP를 제외했을 때가 NDMA 생성에 영향이

가장 크다는 것을 확인하였다. 다음으로는 건조공정의 온도가 주요한 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 반면, 스테아르산마그네슘과 log (water %) 인자의 경우 오차 구간이 x축을 포함하였으므로 통계적으로 유의미하지 않게 해석되었다.

기존 문헌에서 습식 과립화 공정과 물에 포함된 아질산염에 의한 위험이 보고되었으나, 본 연구에서는 물의 영향은 미미한 것으로 분석되었다. 일반적으로 제조 과정에서 사용되는 용수에 포함된 아질산염의 수준이 낮기 때문에 추정된다. 또한, API 입자 크기가 작을수록 입자의 표면적이 증가하여 NDMA를 생성하는 반응 속도가 증가할 것이라고 예상되었으나 본 연구에서는 영향이 적었다.

여러 논문과 Coefficient charts의 막대그래프에서 볼 수 있듯이 첨가제 인자들이 NDMA 생성에 미치는 영향이 상대적으로 큰 것으로 확인되어 추가로 API와 첨가제간의 배합적합성시험을 진행하였다. 배합적합성 시험은 사용하고자 하는 첨가제가 API에 미치는 영향 등을 확인하기 위한 시험으로 본 연구에서는 타 요인의 영향을 배제하였을 때 첨가제 중 어떤 항목이 NDMA 생성에 가장 큰 영향을 주는지 알아보기 위해 실시하였다(그림 12).

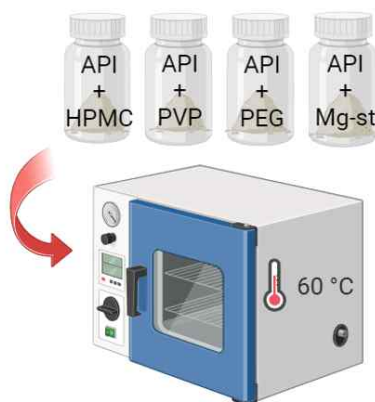


그림 12. 배합적합성 시험 방법 요약

API와 첨가제의 양을 1:5 비율로 취하고 HDPE 병에 보관하여 60℃ 오븐에서 5일 동안 보관 후 분석하였다. 실제 제제화 공정과 같이 용매를 첨가하거나 습도 조건을 추가하면 첨가제의 양이 적어도 효과가 존재할 것으로 예상되나 본 실험은 습도 조건 없이 분말 혼합물을 보관하여 충분한 첨가제의 양(원료의약품의 5배)을 취하여 실험을 진행하였다.

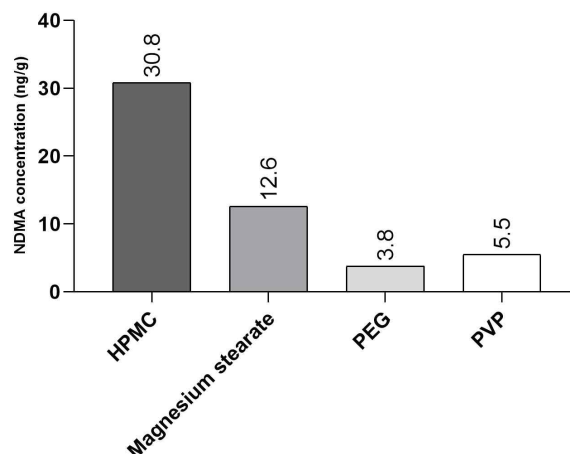


그림 13. 원료의약품-첨가제 mixture 샘플의 NDMA 농도 비교

배합적합성시험 결과, 4종의 첨가제 중 HPMC가 NDMA 생성에 가장 큰 영향을 주는 것으로 확인되었다(그림 13). 요인설계법을 통한 NDMA 생성에 영향을 줄 것으로 예상되는 요인을 분석하였다. 본 연구는 소규모로 진행된 것으로 이는 각 제조사 공정에 따라 다를 수 있으며, 배합비율 등에 세부 조건에 따라서도 다를 수 있다. 요인설계법에서 주요인으로 선정된 PVP, 건조 온도, HPMC를 주요 요인으로 선정하여 반응표면분석법을 진행하였다.

## (2) 반응표면분석법

반응표면분석법은 다수의 요인들과 그들 간의 상호작용이 반응값에 미치는 영향을 수학적, 통계적으로 분석하여 최적 조건을 도출하기 위한 실험계획법이다. 특히 변수의 수준에 따라 변화하는 반응값을 2차원 또는 3차원의 반응표면으로 나타내어 시각적으로 확인이 가능하다. 반응표면분석법 중 가장 대표적인 방법으로는 중심합성설계(Central Composite Design, CCD)와 Box-Behnken 설계(Box-Behnken design, BBD)가 있으며, 본 연구에서는 같은 수의 요인을 가질때

적은 실험 횟수로 분석이 가능한 Box-Behnken 설계법을 적용하여 상용 통계 프로그램을 활용하여 분석을 수행하였다(그림 14).

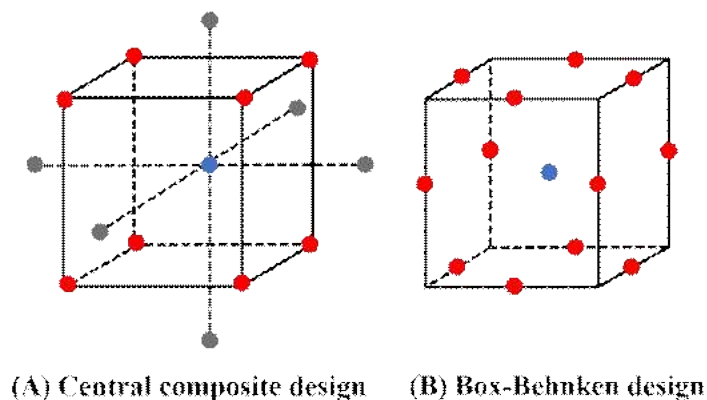


그림 14. 변수가 3개인 경우의 (A) 중심합성설계법 과 (B) Box-Behnken 설계법

선행된 요인분석법과 배합적합성시험을 통해 반응치(NDMA 검출량)에 주요하게 작용하는 변수(첨가제 2종, 건조 온도)를 선별하였다. 주요 변수와 반응값의 범위 수준은 다음 표와 같이 설정하여 반응표면분석을 진행하였다(표 6). HPMC (%)와 PVP (%)는 첨가제 전체 함량 대비 HPMC와 PVP의 백분율 함량을 의미한다.

표 6. 반응표면분석법의 인자와 인자별 수준

Factors	Low level	High level
HPMC (%)	0	10
PVP (%)	0	10
Drying temperature (°C)	25	60

이를 통계 프로그램에 입력하여 각 인자들에 대한 제제화 조건 및 실험 순서를 도출하였다. 선정된 세 가지 요인을 제외한 다른 변수들이 결과에 영향을 주지 않도록 PEG와 SMG의 함량은 각각 50 mg으로, 과립화 용매는 water로, API 입자 크기는 100  $\mu$ m로 공정 조건을 고정하였다. 중복되는 배치를 제외한 13개 배치의 구성을 아래 표에 나타내었다(표 6).

표 6. 반응표면분석법으로 도출된 배치 구성

No.	HPMC (mg)	PVP (mg)	PEG (mg)	SMG (mg)	Binder solvent	Drying temperature (°C)	API particle size (μm)
11	72.5	72.5				42.5	
12	145	0				42.5	
13	72.5	145				25.0	
14	72.5	0				25.0	
15	145	145				42.5	
16	0	72.5				60.0	
17	0	145	50	50	Water	42.5	100
18	72.5	145				60.0	
19	72.5	0				60.0	
20	0	0				42.5	
21	0	72.5				25.0	
22	145	72.5				25.0	
23	145	72.5				60.0	

반응표면분석법으로 설계된 배치별 NDMA 농도 결과 또한 제시하였다(그림 21).

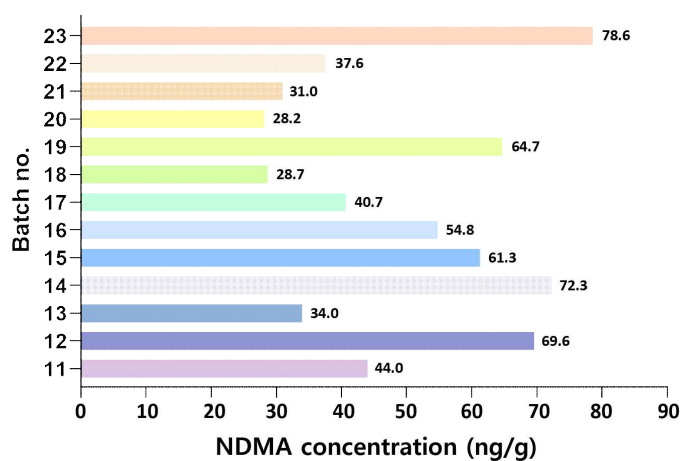


그림 21. 반응표면분석법으로 설계된 배치별 NDMA 농도 (가혹조건)

상기 결과를 통계 프로그램에 입력하여 수학적 예측 모델을 결정하였다. 실험 데이터의 유의성을 판별하여 최적의 모델을 통해 NDMA 농도에 영향을 미치는 요인들 사이의 상호작용과 영향력을 파악하였다. 선형(line), 제곱(quadratic),



그리고 2인자 교호작용(2 factor interaction) 모델 중 NDMA 농도에 대한 반응값을 가장 정확하게 설명할 수 있는 유의미한 함수 모델을 선정하였다(표 7). 위의 세가지 모델 중 p-value (source : Model)가 0.05 이하로 나타난 선형(Line) 모델이 매우 적합한 모델이라고 판단되었다. 참고로 p-value는 변수 간에 연관성이 없다는 귀무가설을 검증하는 데 사용된다.

표 7. 반응표면의 수학적 모델간 비교

	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	P-value
선형모델 (Line)	3	57.35	19.12	12.33	0.000
제곱모델 (Quadratic)	3	2.82	0.94	0.61	0.615
교호작용모델 (2 Factor interaction)	3	4.55	1.52	0.98	0.415

표 8. 반응표면의 선형 수학적 모델 결과

	Source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	P-value
선형모델 (Line)	HPMC	1	29.15	29.15	18.81	0.000
	PVP	1	16.88	16.88	10.89	0.002
	Temperature	1	11.32	11.32	7.30	0.011

반응값과 각 요인과의 상관성 분석 결과, 3가지 요인(HPMC, PVP, Temperature) 모두 반응값(NDMA 농도)과 선형 모델에서 p-value가 0.05보다 낮으므로 통계적으로 유의한 연관성이 있는 것으로 판단된다(표 8). 일반적으로 유의 수준은 0.05로 설정되며, 유의 수준의 값 이하에서는 결과가 통계적으로 유의미하다고 간주되어 귀무가설을 기각하고 대립가설을 받아들여지게 된다.

반응표면분석법의 결과로 3D plot, 등고선 그래프 결과를 얻었다. 그래프를 분석한 결과에 따르면 HPMC 함량이 적을수록, PVP 함량이 많을수록, 건조 온도가 낮을수록 NDMA 생성이 감소하는 경향이 있었다(그림 22, 23, 24).

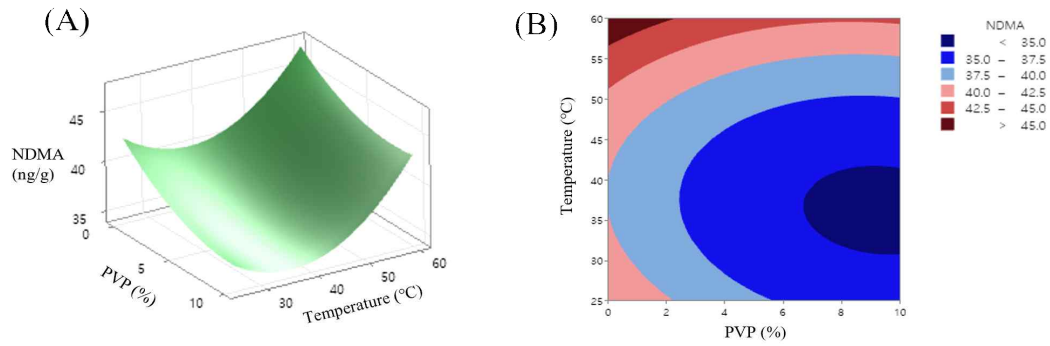


그림 22. PVP와 건조 온도의 3D plot과 등고선

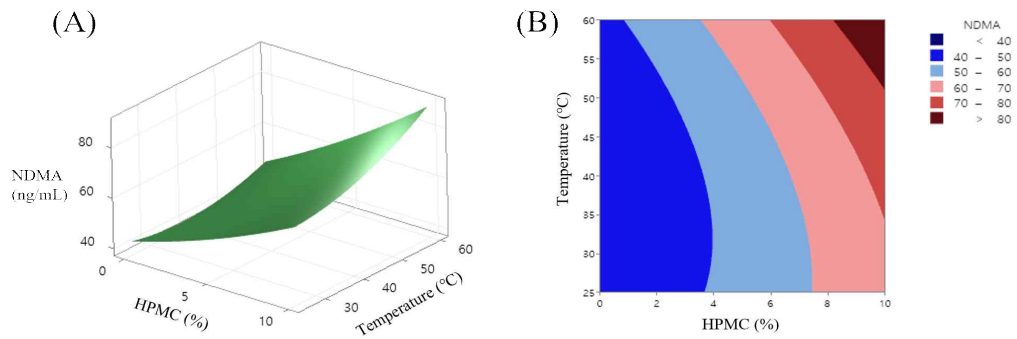


그림 23. HPMC와 건조 온도의 3D plot과 등고선

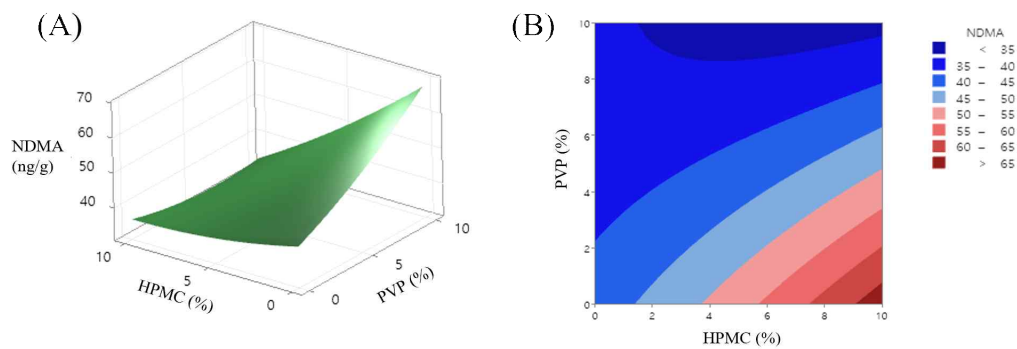


그림 24. PVP와 HPMC의 3D plot과 등고선

예상했던 바와 같이, 건조 온도가 높아질수록 NDMA 생성 속도가 증가했음을 확인할 수 있었다. 메트포르민 제제화 단계 중 NDMA 원인 분석 사례 연구를 통해,

첨가제의 영향, 온도 등의 원인을 찾고, 분석하였으며, 이러한 결과가 불순물 원인을 찾는 데 도움이 될 수 있다. 무엇보다 건조 과정에서 온도를 상온에 가깝게 유지하여 화합물의 열 노출을 최소화해야 하며, 첨가제의 영향에 따라 NDMA 농도가 변할 수 있어 이를 관리하는 방법을 찾는 것이 중요하다. 특히, 배합적합성 시험 결과, 첨가제 중 HPMC가 NDMA 생성에 미치는 영향이 크게 나타났으며 HPMC와 같은 셀룰로오스 계열에서 잔류한 아질산염이 메트포르민에서 분해된 디메틸아민과 반응하여 NDMA를 형성할 가능성이 제기되고 있다. 첨가제 내 아질산염의 함량은 같은 첨가제 종류임에도 제조사에 따라 매우 상이할 수 있으므로 개별 공정조건에서 주요 요인은 다를 수 있으므로 개별 공정에 맞는 방법을 모색하여 평가하는 것이 필요하다.

### 3) 원료 및 첨가제에서 아질산염 분석

원료 및 첨가제에서 아질산염을 정량하여 니트로사민에 대한 위험을 예측할 수 있다 (표 9). 원료 및 첨가제의 아질산염 함량을 분석하여 아질산염 함량이 낮은 공급업체의 원료 및 첨가제를 선정하는 등 NDMA 생성 가능성을 낮출 수 있다.

표 9. 완제의약품 중 아질산염 분석 예시

첨가제	샘플 1 % (m/m)	샘플 2 % (m/m)	샘플 3 % (m/m)	아질산염 함량 (ppm)
Metformin HCl	94.5	69.0	48.5	0.01 - 0.05
Povidone K30	3.8	-	-	0.1 - 2.5
Magnesium stearate	0.9	0.5	0.6	0 - 1.7
Carmellose sodium	-	3.4	4.9	< 0.03
HPMC 100 k	-	27.1	35.0	0.01 - 3.7
HPMC E5	-	-	1.0	0 - 0.54
Microcrystalline cellulose	-	-	10.0	0 - 0.24
Coating	0.8	-	-	<0.03

## 보관단계

(니자티딘 중 NDMA)

## Ⅵ. 보관단계 : 니자티딘 보관단계 중 NDMA 발생평가

### 1. 니자티딘 보관단계 중 NDMA 생성 가능성

#### 1) 온도 및 습도

라니티딘염산염에 대한 기존 연구에서 가속시험을 통해 온도 및 습도가 NDMA의 생성에 미치는 영향을 확인한 바 있다. 해당 연구는 라니티딘 원료를 21일간 보관하였으며 50~80℃의 온도 조건과 10~80%의 상대습도 조건에서 실험을 실시하였으며, 온도와 상대습도의 증가가 NDMA 형성 속도를 증가시키는 것을 관찰하였다. 고형 시료의 경우 NDMA 형성 속도가 상대적으로 낮았으며, 높은 상대습도에서는 시료의 조해성이 관찰되었다. 조해성은 라니티딘의 화학적 분해를 촉진시키고 NDMA의 생성을 증가시켰다. 이와 같이 온도와 습도는 라니티딘의 안정성에 영향을 미치며 NDMA의 형성 속도를 증가시키는 원인이 될 수 있다.

#### 2) 첨가제

메트포르민 제품 중 NDMA 생성 위험 요소 평가에 대한 기존 연구에서 API 합성, 제제, 포장, 보관 단계 별 NDMA 발생 영향 평가를 진행하였고 아질산 이온, DMA, 니트로셀룰로오스 등이 보관 단계 중 주요 위험 요소라고 확인된 바 있었다.

## 2. NDMA 생성 가능성 분석

니자티딘 중 NDMA는 원료의약품 자체 불안정성으로 인한 분해(공정 또는 보관 과정 중) 및 첨가제/포장재 유래 불순물로 인하여 생성이 주 원인으로 추정되고 있다. 이를 고려하여 주요 영향 예상인자로 온도 및 습도와 제제별 비교를 포함하여 NDMA 발생에 어떠한 영향을 주는지 실험을 실시하였다.

### 1) 니자티딘 의약품 분석법

식품의약품안전처 니자티딘 원료 및 완제의약품 중 NDMA 시험법에 따라 분석을 실시하였다.

#### (1) 표준용액 조제

##### 표준액의 조제

NDMA 표준품( $100\ \mu\text{g/mL}$ )  $0.1\ \text{mL}$ 를 정확하게 취하여 25 % 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준원액( $0.5\ \mu\text{g/mL}$ )으로 한다. 표준원액 및 내부표준액을 아래 표 1과 같이 각각 정확하게 취하여 25 % 메탄올로 정확하게 20 mL로 한 액을 농도별 표준액으로 한다(표 1).

##### 내부표준액의 조제

NDMA-d6 표준품 20 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 내부표준원액( $200\ \mu\text{g/mL}$ )으로 한다. 내부표준원액  $50\ \mu\text{L}$ 를 정확하게 취하여 25 % 메탄올을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 내부표준액( $0.5\ \mu\text{g/mL}$ )으로 한다 (25 % 메탄올은 물 3 용량과 메탄올 1 용량을 혼합하여 조제한다).

#### (2) 시료전처리

##### (원료의약품)

니자티딘 약 300 mg을 정밀하게 달아 내부표준액  $200\ \mu\text{L}$ 를 정확하게 취하여 넣은 다음 25 % 메탄올로 정확하게 20 mL로 하여 충분히 흔들어 섞고, 필요시 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을  $0.2\ \mu\text{m}$ 의 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  $\mu$ L를 정확하게 취하여 넣은 다음 25 % 메탄올로 정확하게 20 mL로 하여 충분히 흔들여 섞고, 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액을 0.2  $\mu$ m의 멤브레인필터로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음의 여액을 검액으로 한다 (25 % 메탄올은 물 3 용량과 메탄올 1 용량을 혼합하여 조제한다).

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. 니자티딘 완제의약품의 경우 주로 캡슐, 정제의 형태이며 각 제제의 주성분 함량을 고려하여 시험법의 내용에 따라 전처리를 진행하였다.

### (3) LC-MS/MS 조건 설정 및 최적화

제시된 시험법의 LC-MS/MS 분석조건은 아래와 같다(표 2). 본 영향 평가에서는 Vanquish UHPLC Systems, TSQ Altis Triple Quadrupole MS (Thermo, USA) 기기로 분석 조건을 최적화하여 사용하였다(표 3). LC 조건은 해당 분석법과 동일하게 적용하였으며 MS 조건은 기기의 최적화된 조건을 적용하여 시스템 적합성 시험을 수행하여 시험법 적용성을 확인하였다.

표 3. 최적화 적용 시험법 HPLC 및 LC-MS/MS 조건

HPLC			
Column	Phenomenex Kinetex F5, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm, 100 Å		
Column temp.	30 °C		
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 °C		
LC-MS/MS			
TSQ Altis Triple Quadrupole MS (Thermo, USA)			
Ion Source Type		APCI (+) MRM	
Sheath Gas (Arb)		45	
Aux gas (Arb)		5	
Ion Transfer Tube Temp.		325 °C	
Vaporizer Temp.		350 °C	
Pos. Ion Discharge current		3 μA	
LC-MS/MS			
TSQ Altis MRM (Thermo, USA)			
	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)
NDMA(정량)	74.88	43.04	14
NDMA(정성)	74.88	57.95	12.5
NDMA-d <sub>6</sub>	80.96	46.04	16.29



## ※ 평가에 적용된 의약품

보관조건 중 발생 영향인자 평가를 위해 시판 중인 니자티딘 제제를 적용하였다. 첨가제의 영향평가를 동시에 진행하기 위하여 다양한 첨가제로 구성된 대상 의약품을 선정하였으며, 해당 의약품들을 이용하여 온도 및 습도 조건에 따라 발생하는 NDMA에 대한 평가를 수행하였다(표 5).

표 5. 대상 의약품의 첨가제 구성

	A	B	C	D	E
Dosage form	캡슐제	캡슐제	캡슐제	캡슐제	정제
Diluent	전분	유당	전분	셀룰로오스	셀룰로오스/ 전분
Capsule lubricant	스테아르산마그네슘	스테아르산마그네슘/ 라우릴황산나트륨	스테아르산마그네슘/ 라우릴황산나트륨	라우릴황산나트륨	스테아르산마그네슘/ 폴리에틸렌글리콜
Anticaking agent			탈크		콜로이드성 이산화규소
Suspending agent			카르복시메틸 셀룰로오스칼슘		
Water repelling agent	디메티콘				
Coating agent					산화티탄/ 히프로멜로오스

## 2) 아레니우스 식을 이용한 보관조건 영향평가

### (1) 아레니우스 식

보관조건 중 발생 영향인자 평가를 위해 아레니우스식을 도입하였다. 의약품의 사용기한 평가는 가속 및 가혹시험 등을 통해 안정성을 평가한다. 아레니우스식을 이용하면 실제 보관 조건보다 온도를 높게 설정하여 단기간 보관 후 속도 상수(k)를 확보하고, 이를 외삽하여 장기간 보관했을 때 분해되는 정도를 이론적으로 예측할 수 있다. 기존 아레니우스식은 온도에 의한 영향만 평가하였으나, 습도 역시 유효성분의 불안정성에 기여하므로 본 연구에서는 아래 표 6과 같이 습도의 영향이 포함된 수정된 아레니우스식을 적용하였다.

표 6. 아레니우스식

기존 아레니우스식	수정 아레니우스식
$k = A \times e^{\left(\frac{-E_a}{R \times T}\right)}$	$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R \times T} + B \times RH$

수정 아레니우스식은 위와 같이 작성할 수 있으며 습도 및 온도에 따라 정제 내 유효성분의 분해를 예측할 수 있는데, 속도상수(k)는 온도(T, K) 및 습도(RH, %)에 영향을 받으며, 그 외 식에 포함된 상수들은 Pre-exponential term (A), Moisture sensitivity (B), 기체상수 (R) 등이 있다. 다만, 외삽 활용의 특성상 오차의 개입이 클 수 있으므로, 예측치 신뢰 구간의 확인 및 고려가 반드시 필요하다.

## (2) 수정 아레니우스 식 확립을 위한 보관조건 영향 평가

평가에 사용된 의약품에 대한 아레니우스식 확립을 위해 온도 및 습도 보관조건에 따라 니자티딘 제품 중 NDMA 생성 농도를 다음의 순서로 확인하였다.

### ① 상대습도 60 % 조건 실험(표 7)

- 보관 온도 30, 40, 50, 60 °C 조건으로 3주 간 보관
- 각 주차(0, 1, 2, 3주)에 NDMA 농도(ppm)를 분석하여 개별 온도 조건에서의 시료 중 NDMA 생성 속도 상수(k) 값을 값을 획득

### ② 상대습도 30 % 조건 실험(표 8)

- 보관 온도 30, 40, 50, 60 °C 조건으로 3주 간 보관
- 각 주차(0, 1, 2, 3주)에 NDMA 농도(ppm)를 분석하여 개별 온도 조건에서의 시료 중 NDMA 생성 속도 상수(k) 값을 획득

### ③ 회귀 분석

- 수정 아레니우스식의 상수 항을 정하기 위하여 획득한 자료를 회귀 분석(y, x1, x2는 각각  $\ln k$ ,  $1/T$ , RH)하여 개별 보관 온도 및 습도 조건에 따른 k 값의 예측이 가능한 수정 아레니우스 모델 식( $\ln k = \ln A - E_a/R \cdot 1/T + B \cdot RH$ ) 및 특정 k값의 신뢰 구간 계산을 위한 통계 지표 확보

- ④ 특정 보관 온도, 습도 조건 및 보관 기간 중 NDMA 발생 농도 예측
- 수정 아레니우스 모델 식 및 통계 지표를 활용하여 특정 조건 k 값의 신뢰 구간 계산
  - $\ln C = kt + \ln C_0$  식에 관련 수치를 대입하여, 특정 조건, 기간 중 발생할 NDMA 농도 예측

### (3) 속도 상수 k 확립을 통한 각 제제의 NDMA 발생 농도 예측

3주간의 보관과정을 통해 각 제제별로 생성된 NDMA의 함량을 분석하였다. 결과를 바탕으로 온도 및 습도 조건에 기반한 속도상수를 도출할 수 있는 아레니우스 식을 각 제제별로 확립하였다.

표 7. 니자티딘 의약품 내 NDMA (µg/g) 분석 결과 표 (상대습도 60 %)

니자티딘 의약품 내 NDMA (µg/g) 분석 결과 (상대습도 60 %)																				
제품	A 제제				B 제제				C 제제				D 제제				E 제제			
시간 온도	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주
30℃	0.08	0.08	0.07	0.07	0.10	0.09	0.11	0.09	0.10	0.09	0.11	0.12	0.11	0.10	0.10	0.09	0.16	0.16	0.17	0.19
40℃	0.08	0.09	0.07	0.10	0.10	0.10	0.11	0.14	0.10	0.10	0.11	0.12	0.11	0.10	0.11	0.11	0.16	0.17	0.18	0.21
50℃	0.08	0.10	0.07	0.18	0.10	0.11	0.12	0.22	0.10	0.14	0.21	0.31	0.11	0.13	0.16	0.22	0.16	0.19	0.48	0.95
60℃	0.08	0.16	0.38	0.79	0.10	0.25	0.61	2.24	0.10	0.38	1.13	3.28	0.11	0.24	0.66	1.62	0.16	1.25	14.7	32.9

표 8. 니자티딘 의약품 내 NDMA (µg/g) 분석 결과 표 (상대습도 30 %)

니자티딘 의약품 내 NDMA (µg/g) 분석 결과 (상대습도 30 %)																				
제품	A				B				C				D				E			
시간 온도	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주	초기	1주	2주	3주
30℃	0.12	0.13	0.10	0.13	0.14	0.14	0.13	0.14	0.13	0.13	0.12	0.14	0.12	0.13	0.13	0.15	0.20	0.21	0.22	0.21
40℃	0.12	0.13	0.11	0.14	0.14	0.15	0.15	0.17	0.13	0.14	0.13	0.15	0.12	0.13	0.11	0.14	0.20	0.22	0.26	0.30
50℃	0.12	0.14	0.13	0.16	0.14	0.17	0.18	0.24	0.13	0.15	0.17	0.20	0.12	0.18	0.17	0.23	0.20	0.31	0.44	0.80
60℃	0.12	0.16	0.19	0.39	0.14	0.35	0.65	1.33	0.13	0.30	0.73	1.83	0.12	0.28	0.36	0.69	0.20	1.08	5.29	19.5

3주간의 분석결과를 바탕으로 각 제제별 속도상수를 확립하고 온도 및 습도 조건에 따라 NDMA의 발생 농도를 예측할 수 있는 수정 아레니우스 계산식을 산출하였으며, 다음은 B 제제에 대한 결과이다.

○ B 제제

상대습도 60 % 조건에서 30, 40, 50, 60 °C 조건으로 3주 간 보관 후 각 주차 (0, 1, 2, 3주)에 NDMA 농도(ppm)를 분석하여 개별 온도 조건에서의 시료 중 NDMA 생성 속도 상수(k) 값을 산출하였다(그림 4, 표 9).

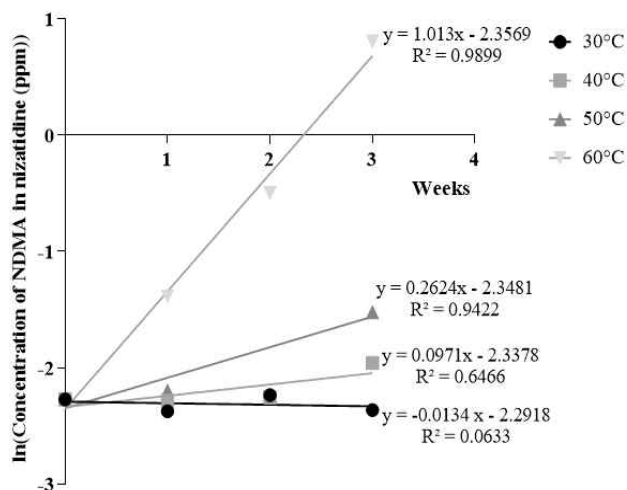


그림 4. 상대습도 60% (30, 40, 50, 60 °C)에서 시험결과(weeks vs. lnC)

표 9. 상대습도 60 % (30, 40, 50, 60 °C)에서 시험결과(weeks vs. lnC) 및 속도 상수 (k)

Weeks	ln(Concentration of NDMA in nizatidine (ppm))			
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	-2.273	-2.273	-2.273	-2.273
1	-2.375	-2.283	-2.198	-1.386
2	-2.235	-2.254	-	-0.498
3	-2.364	-1.959	-1.523	0.807
<i>k</i> (ppm/week)	-	0.1619	0.2624	1.0130

상대습도 30 % 조건에서 30, 40, 50, 60 °C 조건으로 3주 간 보관 후 각 주차 (0, 1, 2, 3주)에 NDMA 농도(ppm)를 분석하여 개별 온도 조건에서의 시료 중 NDMA 생성 속도 상수(k) 값을 산출하였다(표 10).

표 10. 상대습도 30 % (30, 40, 50, 60 °C)에서 시험결과(weeks vs. lnC) 및 속도 상수 (k)

Weeks	ln(Concentration of NDMA in nizatidine (ppm))			
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
0	-1.995	-1.995	-1.995	-1.995
1	-1.945	-1.877	-1.749	-1.044
2	-2.079	-	-1.693	-0.425
3	-1.952	-1.772	-1.431	0.284
k (ppm/week)	-	0.0713	0.1747	0.7456

획득/변형한 자료를 회귀 분석(y, x1, x2는 각각 lnk, 1/T, RH)하여 개별 보관 온도 및 습도 조건에 따른 k 값의 예측이 가능한 수정 아레니우스 모델식 ( $\ln k = \ln A - E_a/R \cdot 1/T + B \cdot RH$ ) 및 특정 k 값의 신뢰 구간 계산을 위한 통계 지표 산출하였다(표 11).

표 11. 회귀분석을 통한 통계지표 예시

회귀분석 통계량	
다중 상관계수	0.972154
결정계수	0.945084
조정된 결정계수	0.908473
표준 오차	0.302681
관측수	6

	자유도	제곱합	제곱 평균	F 비	유의한 F
회귀	2	4.73	2.365	25.81438	0.012869
잔차	3	0.274847	0.091616		
계	5	5.004846			

	계수	표준 오차	t 통계량	P-값	하위 95%	상위 95%	하위 95.0%	상위 95.0%
Y 절편	31.62359	4.899008	6.455101	0.007541	16.03276	47.21552	16.0327593	47.21442
1/T	-10852.8	1577.153	-6.88124	0.006286	-15872	-5833.56	-15871.975	-5833.56
RH %	0.014603	0.007061	2.068165	0.130471	-0.00787	0.037075	-0.0078680	0.037075

수정 아레니우스 모델 식 및 통계 지표를 활용하여 특정 조건 k 값의 신뢰 구간 계산 후 특정 조건, 기간 중 발생가능 NDMA 농도를 예측해 보았다. 해당 결과는 표 12에 요약하였다.

상대습도 60%에서 계산된 298,60K에 대한 신뢰 구간(신뢰도 95%)에 기반하여 해당 시료의 잔여 사용 기한 경과 시 NDMA 농도 구간을 예측한 결과, 0.57~4.46 ppm으로 출하 한계 농도 0.32 ppm를 초과할 가능성이 예측되었다. 30% 습도 조건으로 계산된 298,30K에 대한 신뢰 구간(신뢰도 95%)에 기반하여 해당 시료의 잔여 사용기한

경과 시 NDMA 농도 구간을 예측한 결과, 0.31~1.17 ppm으로 출하 한계 농도 0.32 ppm를 초과할 가능성이 예측되었다.

반면에 상대적으로 낮은 온도 조건으로 계산된 277,60K의 신뢰 구간(신뢰도 95%)에 기반하여 해당 시료의 잔여 사용 기한 경과 시 NDMA 농도 구간을 예측한 결과, 0.12~0.13 ppm으로 출하 한계 농도 0.32 ppm 보다 낮게 예측되었다. 보관조건을 낮은 온도로 설정할 경우 NDMA의 생성속도가 줄어드는 것을 확인할 수 있는데, 이는 회귀분석 결과 중  $1/T$  항의  $p$  값이 RH% 항의  $p$  값 보다 작은 것에서도 예측할 수 있다.

표 12. 상대습도 60 % 및 30 % / 4, 20, 25 °C에서 NDMA 농도 예측 결과

			최소치	평균치	최대치
25°C (298 K)/ 60 %RH	C0	ppm	0.103	0.103	0.103
	C (예측값)	ppm	<b>0.573</b>	<b>1.309</b>	<b>4.457</b>
	k	ppm/week	0.0134	0.0199	0.0294
	t	weeks	128	128	128
25°C (298 K)/ 30 %RH	C0	ppm	0.103	0.103	0.103
	C (예측값)	ppm	<b>0.312</b>	<b>0.531</b>	<b>1.171</b>
	k	ppm/week	8.64E-03	0.0128	0.0190
	t	weeks	128	128	128

			최소치	평균치	최대치
4°C (277 K)/ 60 %RH	C0	ppm	0.103	0.103	0.103
	C (예측값)	ppm	<b>0.115</b>	<b>0.121</b>	<b>0.131</b>
	k	ppm/week	8.48E-04	0.00126	0.00186
	t	weeks	128	128	128
20°C (293 K)/ 60 %RH	C0	ppm	0.103	0.103	0.103
	C (예측값)	ppm	<b>0.259</b>	<b>0.404</b>	<b>0.779</b>
	k	ppm/week	0.00720	0.0107	0.0158
	t	weeks	128	128	128

## ○ 종합결과

B제제의 방법을 동일하게 A~E 제제에 적용하여 속도상수를 확보하고, 온도 및 습도 보관조건에 따른 NDMA 생성 농도를 예측하였으며, 표 13와 같이 정리 하였다.

표 13. 제제별 온도 및 습도 보관조건에 따른 NDMA 생성 농도 예측 결과

	A 제제	B 제제	C 제제	D 제제	E 제제
<b>25℃, 60 %RH (ppm/week)</b>					
Low bound at CL 95%	5.0819e-3	1.3405e-2	4.4101e-3	2.2734e-4	9.8262e-3
Up bound at CL 95%	1.0184e-2	2.9433e-2	8.1640e-3	2.4693e-3	1.7824e-2
<b>25℃, 60 %RH (ppm)</b>					
Low bound at CL 95%	0.1766	0.5728	0.1120	0.1128	0.3534
Up bound at CL 95%	0.2602	4.4566	0.1260	0.1443	0.6701
<b>25℃, 30 %RH (ppm)</b>					
Low bound at CL 95%	0.1499	0.3116	0.1071	0.1144	0.3433
Up bound at CL 95%	0.1873	1.1711	0.1155	0.1679	0.6358
<b>4℃, 60 %RH (ppm)</b>					
Low bound at CL 95%	0.1218	0.1148	0.0993	0.1100	0.1647
Up bound at CL 95%	0.1236	0.1307	0.0995	0.1102	0.1678

\*니자티딘 제제 중 NDMA 출하 한계 농도: 0.32 ppm

수정 아레니우스 모델 식 및 통계 지표를 활용하여 특정 조건, 기간 중 발생할 NDMA 농도를 예측하는데 사용하였고 이를 5종의 제제에 적용시켜 유효기간까지 보관 시 발생하는 NDMA의 농도를 예측해 보았다. 우선, 25 ℃, RH 60 % 조건으로 예측한 결과 제제 별로 다양한 k 값이 예측되었고, 일부 제제(B, E)의 k 값은 상당히 큰 것으로 확인되었다. 제제별 k 예측 값의 신뢰 구간 중첩 여부를 통하여 분석한 결과, A, B, C, D, E 제제의 k값이 서로 2~4개 제제와 상이할 것으로 예측되었다. 다른 제제의 조건으로 유효기간까지 보관 시 B, E 제제 중 NDMA의 농도가 출하 한계 농도 보다 높아 질 것으로 예측할 수 있었다. 니자티딘 제제 보관 중 NDMA 생성 영향 예상 인자의 기여도는 온도, 습도 순으로 판단된다. 또한, A~E간에 속도상수 k값 크기는 B, E, A, C, D 순이었으며, 니자티딘 제제 종류에 의한 특징적 영향은 찾지는 못하였다.

#### (4) 습도 보정 아레니우스 식을 이용한 보관조건 영향평가 특징

본 사례를 통해 습도 보정 아레니우스 식을 이용한 보관 중 NDMA 발생평가에 대한 방법을 제시하였다. 습도 보정 아레니우스 식을 통해 다양한 온도 조건에서 보관 후 NDMA의 생성 속도 상수를 산출하고 외삽을 통해 장기간 보관 시 NDMA의 생성 농도를 예측할 수 있었다. 기존의 의약품의 안정성 시험 또는 유연물질의 평가는 장기간의 시험을 통해 정보를 확보할 수 있으나, 습도 보정 아레니우스식을

활용하면 단기간의 시험을 통해 결과를 예측할 수 있는 장점이 있다. 해당 방법을 NDMA의 생성 평가에 적용하면 온도 및 습도 보관조건에서 생성되는 NDMA의 양을 예측하면 의약품 유효기간 동안 NDMA 허용기준 초과 여부를 예측해 볼 수 있다.

다만, 외삽 활용의 특성 상, 오차가 크기 때문에 예측치 신뢰 구간을 확인하고, 참고로만 활용할 수 있다.



## VII. 고찰

본 사례집은 의약품 제조과정 중 NDMA 등 니트로사민류 불순물 생성 원인 및 발생 가능성에 대하여 합성 과정 중 아민과 아질산염의 반응, 제제화 과정 중 첨가제의 사용, 보관 중 온도 및 습도 등 단계별로 불순물 생성 위험 요소를 식별하고 생성 원인에 대한 구체적인 평가 방안을 검토 및 분석하여 마련하였다.

합성 과정 중 NDMA 생성 가능성은 다양하다. 원료물질 중 불순물로서 2차 또는 3차 아민을 함유하거나 질산염 등 아질산을 유연물질로 함유하고 있을 수 있다. 주로 테트라졸 고리를 포함하는 사르탄류 주성분에서 *N*-니트로사민의 존재는 대부분 제조 공정의 마지막 단계에서 테트라졸 고리의 합성에 사용되는 시약, 용매, 촉매 및 반응 조건 등에서 기인한 것으로 예측되었다. 합성단계에서는 다양한 니트로사민 생성사례를 통해 생성원인을 종합적으로 평가하며 분석 가능한 정량법 사례를 보고하였다.

제제화 과정 중에서는 실험계획법 및 요인설계법을 통해 메트포르민 의약품에서의 불순물 발생 주요 원인을 찾고자 하였다. 건조과정에서 온도를 높게 유지할 경우 NDMA 농도가 높아지는 것이 예상되었고 NDMA 농도가 HPMC 함량에 비례하여 증가하고 PVP 함량에 반비례하는 경향을 확인하였다. 하지만 실험계획법을 설계할 때 실험 횟수를 최소화하여 진행하였으므로 인자들의 주요 효과와 인자 간의 상호작용 효과가 명확히 분리되지 못하여 교란(confounding)이 발생할 가능성이 있다. 이는 실험 결과 해석 시 특정 인자의 영향을 정확히 파악하는 데 제한을 줄 수 있다. 또한, 본 연구의 시험 제제가 실험실스케일로 이루어져 제한된 배치 사이즈와 짧은 공정 시간으로 인해 열과 습도에 대한 노출 시간이 제한되었다. 따라서 NDMA 생성률이 실제보다 낮았을 것으로 예상된다. 또한 같은 종류의 첨가제를 사용하더라도 제조사에 따라 아질산염 함량이 상이하여 불순물 생성의 차이를 보일 수 있다는 점도 중요한 한계로 작용한다. 따라서 본 사례와는 다르게 제약회사마다 다른 결과를 보일 수 있다. 상기 제한점을 보완하고 본 분석연구 사례를 활용하면 메트포르민 및 기타 의약품에서의 불순물 발생 잠재적 원인과 가능성을 경제적으로 평가하는 수단으로 사용할 수 있을 것이다.

보관 중에서는 개별 보관 온도 및 습도 조건에 따른 니자티딘 제품 중 NDMA 생성 농도 예측 방안을 마련하고자 하였다. 니자티딘은 물질 자체 불안정성으로 인한 자체분해(공정 또는 보관 과정 중) 및 첨가제/포장재 유래 물질로 인하여 NDMA가 생성되는 것으로 추정되고 있다. 이에 따라 주요 영향 예상 인자로 첨가제, 온도 및 습도로 나누어 해당인자들에 대한 발생 영향인자 평가를 진행하였고, 니자티딘 제품 보관 중 NDMA 생성 영향 예상 인자의 기여도는 첨가제 compatibility, 온도, 습도 순으로 예측되었다.

이번 사례집에서는 의약품 중 NDMA 사례 중심으로 생성 원인 및 발생 가능성에 대하여 주요 단계에서 위험 요소를 식별하고, 이와 관련된 여러 사례들을 소개하여 구체적인 평가 방안을 제시하고자 하였다. 이번 사례집이 니트로사민류 불순물 생성 가능 의약품의 제품개발에 대한 설계에 도움을 줄 것으로 기대한다.

## “의약품 중 불순물 발생평가 사례집(NDMA 사례 중심으로)”

---

발 행 일 2024년 5월

발 행 인 식품의약품안전평가원장 박 윤 주

편집위원장 의료제품연구부장 손 수 정

편 집 위 원 김판순, 김자영, 김민정, 최인선, 안일영, 전해림,  
김지윤, 김민경, 신지현, 함현주

한상범, 이용문, 최용석, 이동규, 조황의, 김형민

발 행 처 식품의약품안전평가원 의료제품연구부 의약품연구과

Tel : 043-719-4603 / Fax. : 043-719-4600

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,

주 소 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

---