

## 아세트아미노펜 함유 의약품 중 4-aminophenol 함유량 분석

의약품분석팀

박원희 · 이춘영 · 정희정 · 한은정 · 정윤경 · 조주연 · 김유경 · 오영희

### 4-Aminophenol Contents in Acetaminophen-Containing Drug Products

*Pharmaceutical Analysis Team*

**Won-hee Park, Chun-yeong Lee, Hee-jeong Jeong,  
Eun-jeong Han, Yoon-kyung Jeong, Ju-yeon Jo,  
You-kyung Kim and Young-hee Oh**

#### Abstract

The aim of this study was to determine the amount of 4-aminophenol in acetaminophen-containing drug products. 4-Aminophenol is a toxic impurity formed by acetaminophen hydrolysis. For this study, 25 commercially available drug products were purchased in Seoul 13 tablets, 6 extended-release tablets, 3 dry syrups, 1 syrup and 2 oral suspensions. We analyzed their contents by using high performance liquid chromatography(HPLC)-photodiode array(PDA) detector with Acclaim Mixed-Mode WCX-1 column at 300 nm according to the method described in the General Chapters of United State Pharmacopoeia(USP) 39th Edition. The limit of detection(LOD) and the limit of quantitation(LOQ) were 0.164 ug/mL and 0.498 ug/mL, respectively, with the coefficient of calibration correlation( $R^2$ ), 0.9996. Under this analysis condition, no 4-aminophenol was detected in any of the 25 products tested.

**Key words** : acetaminophen, 4-aminophenol, HPLC, impurity

## 서 론

해열진통제 성분중의 하나인 아세트아미노펜은 다빈도로 처방되는 전문의약품이며, 시민들이 쉽게 구입할 수 있는 안전상비약이기도 하다. 이들은 정제, 현탁액, 시럽제 등 다양한 제제형태로 환자에게 투약되고 있으며, 단일성분 뿐만 아니라 복합처방 형태로 생산 및 유통되고 있다.

최근까지 국내에서 품목허가(또는 신고)받은 아세트아미노펜 단일성분 의약품의 품목수는 식품의약품안전처 온라인의약도서관을 통해 조사한 결과 101개 품목이었고(1), 이중 국내 제약회사에서 생산한 아세트아미노펜 단일성분 품목수는 2015년 38품목, 2014년 42품목, 2013년은 43품목이었다. 또한 제조업체수는 2015년 20개, 2014년 23개 그리고 2013년은 24개 업체로 생산금액은 400억에서 500억 수준으로 조사되었다(2~4).

4-aminophenol은  $H_2NC_6H_4OH$ 의 구조식을 가진 유기화합물로 흑백필름의 현상액으로 주로 사용되었다. 또한 아세트아미노펜의 산업 합성 공정 시 4-aminophenol이 최종 중간산물로 생성되며 무수아세트산을 첨가 하면 아세트아미노펜이 합성된다(5). 또한 아세트아미노펜의 주 분해산물인 4-aminophenol은 아세트아미노펜이 가수분해되어 생성되는 유해한 불순물로서(6), 아세트아미노펜을 생체 투여한 후 약물 대사 결과 4-aminophenol이 생성되면 신장독성을 유발한다는 보고가 있다(7~9).

생체조직액 및 의약품 중 아세트아미노펜과 4-aminophenol의 분석방법은 흡광도측정법, HPLC법 그리고 전기영동법 등 다양한 기기를 활용하고 있다(10~14). 흡광도측정법은 4-aminophenol이 산화제 존재 하에 황화나트륨과 결합하여 색소를 생성하면 가시광선 영역에서 그 양을 측정하여 4-aminophenol을 분석하는 방법이며, HPLC법은 UltraViolet Detector 또는 Amperometric Detector를 이용하여 아세트아미노펜 및 4-aminophenol을 동시에 분석할 수 있다. 또한 전기영동법은 소량의 검액, 짧은 분석 시간 및 뛰어난 분리능 등의 이점이 많아 제약 분야에서 폭 넓게 응용되고 있다.

나라별 공정서에 기재된 아세트아미노펜 정제 시험법을 살펴보면 유럽약전 제8개정에는 아세트아미노펜 원료만 기재되어 있고 정제는 기재되어 있지 않았다(15). 영국약전 2016년도 개정판에는 파라세타몰 정제로서 시험법이 기재되어 있고, 유연물질은 4-aminophenol을 포함한 여러 불순물의 한도시험을 하도록 규정되어 있다(16). 미국약전 39개정은 일반시험법에 아세트아미노펜을 함유한 의약품은 4-aminophenol에 대한 불순물 시험이 규정되어 있으나(17) 대한민국약전 11개정(18) 및 일본약전 17개정에는 정제에 대한 불순물 시험 규정이 없다(19).

본 연구는 유통 아세트아미노펜 함유 단일 제제 중 4-aminophenol의 불순물 함유량을 분석함으로써 대한민국약전에 유해성분 항목을 추가하는 고시 개정의 기준 마련을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

서울시에서 유통되고 있는 아세트아미노펜 단일 성분 의약품 25건을 구입하여 실험에 사용하였다. 제형별로 보면 일반정제 13건, 서방정제 6건, 건조시럽 3건, 시럽 1건, 현탁액 2건이고 제조업체 수는 표 1과 같다.

**Table 1.** Commercially available single component-acetaminophen sample's information

Drug form	No. of Pharmaceuticals	No. of Items
Tablets	7	13
Extended-Release Tablets	9	6
Dry Syrup	2	3
Syrup	1	1
Oral Suspensions	2	2

## 2. 표준품 및 시약

4-Aminophenol 표준품은 USP Reference Standard(USA)를 사용하였고 HPLC용 용매로서 Acetonitrile은 HPLC grade(J.T. Baker, USA)를 사용하였다. 시약은 Sodium citrate dihydrate(Sigma-Aldrich, USA), Citric acid anhydrous(Wako, Japan), Potassium phosphate monobasic(Wako, Japan), Sodium phosphate dibasic(Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. 표준액과 분석시액을 여과할 때는 disposable syringe filter(Minisart RC 15, 0.45 $\mu$ m, Sartorius Stedim, Germany)를 사용하였다.

## 3. 분석기기

표준액 및 분석시액 전처리를 위한 초음파추출기는 Ultrasonic Bath Branson 8800(Branson Ultrasonic Corporation, USA)를 사용하였고, 분석에 사용한 기기는 Acquity UPLC H-Class (Waters, USA)로 Photodiode Array Detector를 이용하여 검출하였다.

## 4. 시험방법

미국약전 39개정 General Chapters(227) 4-aminophenol in acetaminophen-containing drug products에 따라 시험하였고(16), 분석조건은 표 2와 같으며 시험에 사용된 용량플라스크는 차광을 위해 모든 갈색을 사용하였다.

### 1) 표준원액 조제

4-Aminophenol 표준품을 취하여 25 ug/mL의 농도가 되도록 희석액으로 조제하였다. 희석액은 버퍼액·아세트니트릴(9:1, v/v) 혼합액으로 조제하였고, 버퍼액은 구연산나트륨이수화물 4.0 g과 무수구연산 1.5 g을 취하여 물을 넣어 녹여 1 L로 조제하였다.

### 2) 표준액 조제

표준원액 15 mL 및 검액원액 25 mL를 정확히 취해 희석액을 넣어 50 mL로 조제한 후, 0.45-um disposable syringe filter로 여과하여 처음 여액 3 mL는 버리고 여액을 취하여 표준액으로 하여 HPLC로 분석하였다.

**Table 2.** Condition of HPLC for analysis

Detector	PDA e $\lambda$ Detector(Waters, USA)		
Wavelength	UV300 nm		
Column	Acclaim Mixed-Mode WCX-1(4.6 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m, Thermo, USA)		
Column temperature	30°		
Flow rate	1.0 mL/min.		
Injection volume	10 $\mu$ L		
Mobile phase	A. 10 mM phosphate buffer pH 7.0 B. Water C. Acetonitrile		
Time(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0	90	5	5
5	90	5	5
7	10	10	80
7.1	90	5	5
10	90	5	5

### 3) 검액원액 조제

서방정제 및 일반정제는 20정의 무게를 정밀하게 달아 평균 무게를 구한 후 가루로 하여 아세트아미노펜으로서 1,000 mg 해당량을 정밀하게 달고, 시럽, 건조시럽 및 현탁액은 아세트아미노펜 1,000 mg 해당량을 정밀하게 취한다. 희석액 60 mL를 넣어 30분간 초음파 추출한 후 이 액을 식힌다. 희석액을 넣어 정확히 100 mL로 하여 아세트아미노펜 10 mg/mL 가 되도록 조제한다. 이 때 초음파추출기는 Ultrasonic Bath Branson 8800 (Branson Ultrasonic Corporation, USA)를 사용하였다.

### 4) 검액 조제

검액원액 25 mL를 정확히 취해 희석액을 넣어 50 mL로 조제한 후 0.45- $\mu$ m disposable syringe filter로 여과하여 처음 여액 3 mL는 버리고 여액을 취하여 검액으로 한 후 HPLC로 분석하였다.

### 5. 분석법의 유효성 검증

본 분석법은 미국약전 방법을 그대로 적용하여 시험하였으며, 아세트아미노펜 함유 완제 의약품 중 불순물인 4-aminophenol에 대한 순도시험 중 한도시험에 해당되는 시험방법으로 분석법의 유효성 검증 파라미터는 대한민국약전 의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인에 따라 검출한계, 정량한계 및 직선성을 이용하여 분석법의 유효성을 확인하였다(18).

## 결과 및 고찰

### 1. 아세트아미노펜 단일성분 의약품 국내 유통 현황

아세트아미노펜은 단일성분 및 복합성분 등 많은 제품이 생산 유통되고 있으며 그 중 단일성분 제품의 국내 제조업체 수 및 생산 품목수를 제형별로 정리하면 표 3과 같다(2~4).

2015년에 국내에서 생산된 아세트아미노펜 제품은 총 38품목이고 제형별로 보면 정제 16, 서방정제 7, 건조시럽 3, 시럽 1, 현탁액 2품목으로 시료 구입 시 정제 및 서방정제를 제외한 시럽, 건조시럽 및 현탁액 제형은 품목수가 매우 제한적인 것을 알 수 있다.

### 2. 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 직선성

4-aminophenol의 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 반응의 표준편차와 검량선 기울기에 근거하는 방법에 따라 구하였다. 4-aminophenol 표준품을 5단계 0.5 ug/mL, 1.0 ug/mL, 2.0 ug/mL, 5.0 ug/mL, 10.0 ug/mL로 희석하고 단계별로 3회 반복 측정하여 평균값으로 검량선을 작성하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \delta/S$$

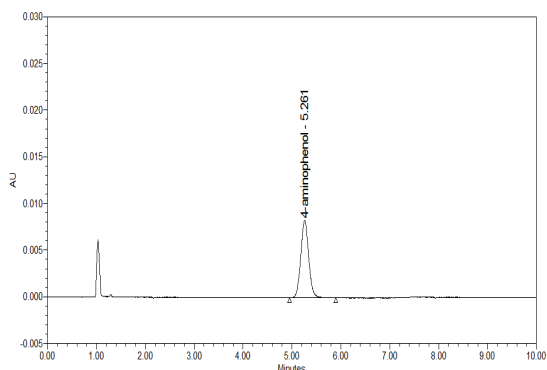
$$LOQ = 10 \times \delta/S$$

**Table 3. Single component-acetaminophen drug product's domestic manufacture condition**

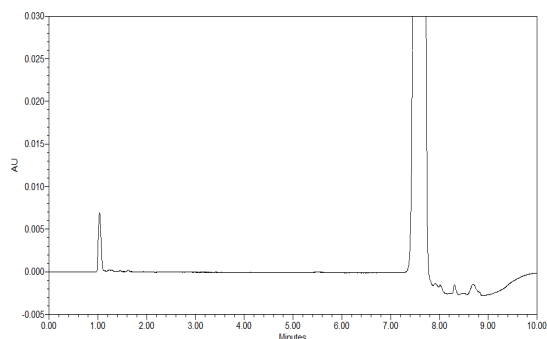
Manufacture Year	2015		2014		2013	
	Number of pharmaceuticals	Number of items	Number of pharmaceuticals	Number of items	Number of pharmaceuticals	Number of items
Tablets	16	24	19	29	19	29
Extended release tablets	7	8	8	9	8	9
Dry Syrup	3	3	1	1	1	1
Syrup	1	1	1	1	1	1
Oral suspensions	2	2	2	2	3	3
Total	29	38	31	42	32	43

$\delta$ 는 반응의 표준편차(mean standard deviation)이며,  $S$ 는 검량선의 기울기(individual slope)이다. 본 실험에 사용된 방법으로 구한 검출한계, 정량한계는 각각 0.164 ug/mL, 0.498 ug/mL이고, 시험한 농도에서  $R^2 = 0.9996$ 으로 양호한 직선성을 나타내었으며, 표준용액 및 검액의 크로마토그램은 그림 1 및 2와 같다.

미국약전 일반시험법의 4-aminophenol에 대한 불순물 한도시험은 검액 중 아세트아미노펜 최종농도인 5.0 mg/mL 대비 4-aminophenol이 0.15%이하로 규정되어 있다. 표준액은 표준원액 및 검액원액 일정량을 취해 희석하여 4-aminophenol 및 아세트아미노펜의 최종농도가 각각 7.5 ug/mL 및 5.0 mg/mL 되도록 조제하였고, 검액은 아세트아미노펜 최종농도가 5.0 mg/mL가 되도록 조제하였다. 따라서 4-aminophenol 분석 시 위의 LOD 및 LOD 측정치로 미국약전 일반시험법에



**Fig. 1.** HPLC chromatogram of 4-aminophenol standard solution.



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of single component-acetaminophen drug sample solution.

따른 4-aminophenol의 함량을 비교적 양호하게 정량 분석 가능한 것으로 판단된다.

### 3. 유통 아세트아미노펜 함유 의약품 중 4-aminophenol 분석

아세트아미노펜 단일성분 의약품 25품목을 구입하여 실험하였다. 제형은 정제 13건, 서방정제 6건, 현탁액 2건, 시럽제 1건 및 건조시럽 3건으로 15개 제약회사 제품이였다(표 1 참조). 아세트아미노펜의 주 분해산물인 4-aminophenol의 분석은 미국약전 일반시험법 4-aminophenol in acetaminophen containing drug products에 명시된 방법대로 표준액 및 검액 중 4-aminophenol의 피크면적으로 구하여 계산식에 따라 분석한 결과 25품목 모두 4-aminophenol이 검출되지 않았다.

완제의약품의 품질관리는 식품의약품안전처에서 품목허가(또는 신고) 받은 기준 및 시험법에 따라 해당 제약회사에서 실시하고 있으며 그 시험방법 및 분석조건은 회사마다 다르며 아세트아미노펜정제의 경우 대한민국약전, 미국약전, 자사기준 등 매우 다양하다. 아세트아미노펜 원료 및 완제의약품 중 불순물의 분석법은 분석장비에 따라 검출농도의 차이를 보이고 있다. Amperometric detector를 이용한 HPLC법으로 진통제 복합성분 중 4-aminophenol을 분석한 경우 LOD 및 LOQ는 각각 1.0 ng/mL, 3.5 ng/mL로 매우 낮은 농도까지 검출이 가능하였으며, 정제 3건 및 캡셀제 2건의 실험 결과 4-aminophenol은 검출되지 않았다고 보고되었다(10). 또한 아세트아미노펜을 포함한 복합성분 좌제를 ion-paired reverse HPLC-PDA로 4-aminophenol 및 유기불순물을 분석한 결과 LOD 및 LOQ는 각각 0.059 ug/mL, 0.178 mg/mL이었고(11), 이동상의 pH 값에 따라 4-aminophenol이 분해되거나 아세트아미노펜이 가수분해되어 생성되기도 한다고 보고되었다(12). Amperometric detector를 이용한 capillary electrophoresis법으로 아세트아미노펜 정제 및 복합성분 캡셀제 등 10품목에 대한 4-aminophenol을 분석한 결과 모든 제품에서 검출되지 않았다(13). 한편 Amperometric detector를 이용한 HPLC법으로 아세트아미노펜 단일성분 정제에

대한 불순물을 측정된 결과 3제품 모두에서 4-aminophenol이 2.99~6.33 ppm 농도로 검출되었다(14). 본 연구는 HPLC(PDA)로 분석하였으나 분석 장비 및 검출기의 종류에 따라 LOD 및 LOQ 값이 달라질 수 있으며 검출한계가 더 낮은 분석조건에서는 아세트아미노펜 제제 중 생성될 수 있는 다양한 미량 불순물에 대한 정량이 가능하리라 생각된다.

외국의 공정서를 종합해 보면 아세트아미노펜 원료 및 제제 중 불순물의 한도시험 대상에 4-aminophenol이 명시되어 있으나, 우리나라 및 일본의 공정서는 4-aminophenol에 대한 불순물 한도시험 규격이 없다. 다행히 본 시험에서는 유통 아세트아미노펜 단일성분 의약품 중 4-aminophenol은 검출되지 않았으나, 해열진통제를 투약하는 환자에게 독성물질을 경감시킬 수 있도록, 그리고 국내 공정서에 4-aminophenol 순도시험 항목을 설정함으로써 안전한 의약품이 유통될 수 있도록 규격이 강화되었으면 한다.

## 결론

해열진통제로 다빈도 처방 및 판매되고 있는 아세트아미노펜 단일제제 의약품의 불순물의 함유량을 알아보고자 미국약전 일반시험법을 적용하여 분석한 결과,

1. 일반정제 13건, 서방정제 6건, 건조시럽 3건, 시럽 1건 및 현탁액 2건 등 총 25개 의약품 중 불순물인 4-aminophenol은 검출되지 않았다.
2. 표준곡선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9996으로 양호한 직선성을 나타내었고, LOD 및 LOQ는 각각 0.164 ug/mL, 0.498 ug/mL이었다.

## 참고문헌

1. <http://drug.mfds.go.kr/html/index.jsp#>
2. 원희목 : 의약품 생산실적표, 한국제약협회, 2015.

3. 원희목 : 의약품 생산실적표, 한국제약협회, 2014.
4. 원희목 : 의약품 생산실적표, 한국제약협회, 2013.
5. <https://en.wikipedia.org/wiki/4-Aminophenol>
6. The United States Pharmacopeia 39 : U. S. Pharmacopeial Convention, 2016.
7. Newton, JF, Kuo, CH, Gemborys, MW, Mudge, GH and Hook, JB : Nephrotoxicity of p-aminophenol, a metabolite of acetaminophen in Fischer 344 rat. Toxicol. Appl. Pharmacol, 65:336~341, 1982.
8. Newton, JF, Bailie, MB and Hook, JB : Acetaminophen nephrotoxicity in the rat. Renal metabolic activation in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 70:433~444, 1983.
9. Newton, JF, Kuo, CH, Deshore, GM, Hoefle, D, Bernstein, J and Hook, JB : The role of p-aminophenol in acetaminophen induced nephrotoxicity.: effect of bio(p-nitrophenyl)phosphate on acetaminophen an p-acetaminophen nephrotoxicity and metabolism. Toxicol. Appl. Pharmacol. 69:29~293, 1985.
10. Wyszecza-Kaszuba, E, Warowna-Grzeskiewicz, M and Fijalek, Z : Determination of 4-aminophenol impurities in multicomponent analgesic preparations by HPLC with amperometric detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32:1081~1086, 2003.
11. Jiri, V, Pavel, H, Ales, J and Pavel, C : Separation and determination of impurities in paracetamol, codeine and pitophenone in the presence of fempiverinium in combined suppository dosage form. Journal of Pharmaceutical and Biomedical

- Analysis, 102:85~92, 2015.
12. Hanysova, L, Kastner, P and Kimes, J : Study of stability of 4-aminophenol as dominant decomposition product of paracetamol. Chem. Listy, 98:152~156, 2004.
  13. Qingcui, C, Lianmei, J, Xiuhui, T and Jiannong, Y : Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. Analytica Chimica ACTA, 606:246~251, 2008.
  14. Wyszeccka-Kaszuba, E, Warowna-Grzeskiewicz, M and Fijalek, Z : Determination of 4-aminophenol impurities in selected pharmaceutical preparations by HPLC method with amperometric detection. Acta Polonine Pharmaceutics-Drug Research, 58(5): 325~329, 2001.
  15. European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare : The European Pharmacopoeia 8th Edition, 2016.
  16. The Medicines & Healthcare products Regulatory Agency : The British Pharmacopoeia, 2016.
  17. U.S. Pharmacopeial Convention : The United States Pharmacopeia 39th Edition, 2016.
  18. Minister of Food and Drug Safety : The Korean Pharmacopoeia 11th Edition, 2016.
  19. The Ministry of Health, Labour and Welfare : The Japanese Pharmacopoeia 17th Edition, 2016.