

# Application News

No. SSK-LCMS-2401

## 리팜피신 원료의약품 중 불순물 LC-MS/MS 분석법

LC-MS/MS Method for Analysis of Impurity in Rifampicin Drug Substance

### 사용자 활용 포인트

- ◆ Shimadzu Nexera X3 system과 LCMS™-8050을 이용하여 리팜피신 원료의약품 중 불순물을 분석하였다.
- ◆ 리팜피신 원료의약품의 불순물인 MNP의 직선성, 검출한계, 정량한계, 반복성 및 회수율을 평가하였다.
- ◆ 확립된 분석조건으로 사용자가 편리하게 리팜피신 원료의약품 분석을 진행할 수 있다.

### ■ 서론

리팜피신은 리파마이신 계열의 살균성 항생제로 결핵 치료 시 핵심적인 역할을 하는 약물이다. 미국에서 리팜피신 함유 의약품 중 일부에서 니트로사민 계열 불순물(MNP, 1-methyl-4-nitrosopiperazine)이 잠정관리기준을 초과해 검출됨에 따라 식품의약품안전처는 국내 의약품의 안정성 확인을 위해 2021년 9월부터 수거 및 검사에 착수한 바가 있다.

이후, 식품의약품안전처에서는 의약품 중 불순물 분석 관련 산업계 활용을 위해 '의약품 중 불순물 분석법 자료집<sup>[1]</sup>'을 배포하였고 자료집 중에는 리팜피신 함유 의약품에 대한 MNP 불순물 분석법이 포함되어 있다.

이 뉴스레터에서는 식품의약품안전처에서 배포한 '의약품 중 불순물 분석법 자료집'에 제공된 '리팜피신 원료 및 완제의약품(단일제) 중 MNP 분석법'을 참고해 Shimadzu LCMS™-8050을 이용하여 MNP의 직선성, 검출한계, 정량한계, 반복성 및 회수율을 평가하였다.

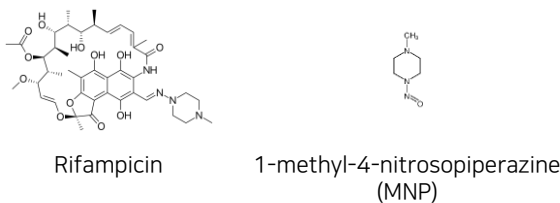


그림 1. 리팜피신과 MNP의 구조

### ■ 전처리 방법

전처리방법은 식품의약품안전처의 '의약품 중 불순물 분석법 자료집' 중 '리팜피신 원료 및 완제의약품(단일제) 중 MNP 분석법'을 참고하였다.

#### 직선성 시험

MNP 표준물질을 메탄올로 희석하여 0.5 - 200 ng/mL 범위의 직선성 시험시료를 조제하여 분석한다.

#### 재현성 시험

MNP 표준물질을 메탄올로 희석하여 5 ng/mL의 재현성 시험시료를 조제하여 분석한다.

### 회수율 시험

리팜피신 원료의약품 150 mg을 정밀하게 취하고 저/중/고농도(1/10/100 ng/mL)로 MNP 표준물질이 첨가된 메탄올 5 mL를 첨가한다. 혼합용액을 vortex mixer 및 sonicator를 이용하여 충분히 혼합한 후, 10 분 간 4,000 rpm으로 원심분리한다. 이후, 상층액을 0.2 µm PDVF Micro syringe filter로 필터링한 시료를 분석한다.

### ■ 분석조건

분석기기로 Shimadzu Nexera X3 LC 시스템과 LCMS™-8050 질량분석기를 이용하였다. 리팜피신 원료의약품 중 MNP 분석에 대한 기기분석 조건 및 MRM 조건은 표 1에 나타내었다.

표 1. MNP LC-MS/MS 분석 및 MRM 조건

LC: Shimadzu Nexera X3 system					
Column	: Shim-pack GIST C18 (2.1 x 100 mm, 2 µm)				
Mobile phase A	: 10 mM Ammonium formate in water (pH 9.0 adjusted with ammonium hydroxide)				
Mobile phase B	: Methanol				
Flow rate	: 0.3 mL/min				
Gradient Program	: B 40%(0.0 - 2.0 min) - B 100%(4.5 - 5.8 min) - B 40%(5.81 - 10.0 min) (0 - 3 min to MS, 3 - 10 min to waste)				
Column temp.	: 35 °C				
Injection volume	: 3 µL				
Sample cooler	: 4 °C				
MS: LCMS-8050					
Ionization Mode	: ESI positive				
Nebulizing Gas Flow	: 3.0 mL/min				
Heating Gas Flow	: 10.0 mL/min				
Drying Gas Flow	: 7.0 mL/min				
Interface Temperature	: 300 °C				
DL Temperature	: 150 °C				
Heat Block Temperature	: 400 °C				
MRM Condition					
Name	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)
MNP	130	100	-30	-11	-21
		58	-29	-18	-25

■ 결과

리팜피신 원료의약품과 MNP의 분리

리팜피신 원료의약품과 MNP의 분리는 그림 2과 같이 최적화하였다. 고농도 리팜피신 원료의약품은 밸브 전환을 통해 질량분석기로 주입되지 않도록 하고, MNP만 질량분석기로 도입시켜 기기 오염을 최소화하도록 설정하였다.

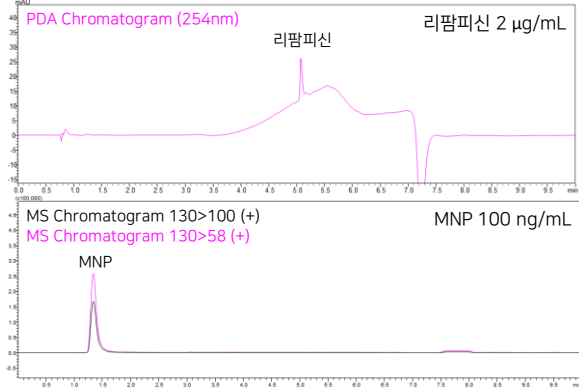


그림 2. 2 µg/mL 리팜피신의 PDA 크로마토그램과 100 ng/mL MNP의 MS 크로마토그램

직선성

MNP 검정곡선 작성을 위한 MNP 표준액 농도는 (0.5 - 200) ng/mL 범위이며, 검정곡선의 결정계수는  $R^2 > 0.999$ 로 나타났다(그림 3).

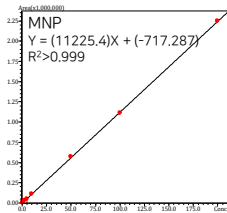


그림 3. MNP 표준액의 검정곡선 (0.5 - 200 ng/mL)

검출한계 및 정량한계

LabSolutions™ 소프트웨어를 이용하여 0.5 ng/mL MNP 표준액에서의 신호 대 잡음비(S/N)가 29.2로 산출되는 것을 그림 4와 같이 확인하였으며 이는 식품의약품안전처에서 제공한 분석법의 시스템적합성 기준( $S/N \geq 10$ )을 충족한 결과이다.

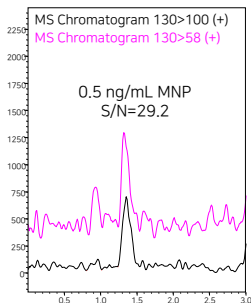


그림 4. 0.5 ng/mL MNP 표준액의 MS 크로마토그램

따라서 검출한계(이하, LOD) 및 정량한계(이하, LOQ)는  $S/N=3$ ,  $S/N=10$ 으로 계산하여 LOD는 0.05 ng/mL, LOQ는 0.2 ng/mL 수준으로 나타났다.

반복성

5 ng/mL MNP 표준액으로 반복성을 평가하였다. 6회 반복 분석 시 MNP의 피크 Area와 Height의 상대표준편차는 각각 1.2%와 2.1%로 확인되었다. 이는 식품의약품안전처에서 제공한 분석법의 시스템적합성 기준( $\%RSD \leq 10$ )을 충족한 결과이며 표 2에 반복성 결과를 나타내었다.

표 2. 5 ng/mL MNP 표준액 반복성 결과(n=6)

5 ng/mL MNP 표준액	Area	Height
# 1	53,492	6,885
# 2	53,836	6,949
# 3	54,212	7,279
# 4	54,235	6,920
# 5	52,760	6,925
# 6	54,592	6,955
%RSD	1.2	2.1

회수율

회수율을 평가하기 위해 리팜피신 원료의약품에 MNP 표준물질을 저농도 (1 ng/mL), 중농도 (10 ng/mL), 고농도 (100 ng/mL)로 첨가한 시료를 각각 6개 씩 준비하고 회수율 시험 전처리를 진행한 후 분석을 수행하였다. 회수율은 농도 별 6개 시료의 평균 농도로 계산하였으며, (91.1-98.3) 수준으로 나타났다.

표 3. 리팜피신 원료의약품 중 MNP의 농도 별 회수율(%)( n=6)

	저농도 (1 ng/mL)	중농도 (10 ng/mL)	고농도 (100 ng/mL)
# 1	1.0	10.9	91.7
# 2	0.9	9.2	90.7
# 3	0.9	10.1	91.0
# 4	1.0	9.3	91.5
# 5	1.0	9.6	90.7
# 6	1.0	9.9	90.9
평균 회수율(%)	96.0	98.3	91.1

■ 결론

이 뉴스레터에서는 식품의약품안전처에서 배포한 '리팜피신 원료 및 완제의약품(단일제) 중 MNP 분석법'을 참고하여 Shimadzu LCMS™-8050을 이용해 리팜피신 원료의약품 중 MNP의 직선성, 검출한계, 정량한계, 반복성 및 회수율을 평가하였다. 그 결과 식품의약품안전처에서 제공한 분석법의 시스템적합성 기준을 모두 충족하였다.

■ 참고문헌

- 1) 의약품 중 불순물 분석법 자료집, 식품의약품안전처(2023.05)



Shimadzu Corporation  
www.shimadzu.com/an/

Shimadzu Scientific Korea  
www.shimadzu.co.kr

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

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

SSK-LCMS-2401