

■ 서론

메탄설폰산(Methanesulfonic acid, MSA)은 제약 산업에서 활성 원료 의약품(Active Pharmaceutical Ingredients, 이하, APIs)의 합성 및 제형 개발 등 다양한 용도로 널리 사용되는 유기산이며, 용해도와 안정성이 높을 뿐만 아니라 광범위한 시약 및 반응 조건과의 호환성으로 인해 의약 합성에서 다른 산보다 많이 선호된다.^[1] 하지만, APIs의 합성 과정 중 결정화 및 정제 시, 주로 사용되는 메탄올(methanol) 및 에탄올(ethanol)과 쉽게 반응하여 비의도적인 유전 독성 불순물(Genotoxic impurities, GTI)인 메탄설폰네이트(Methanesulfonates)를 생성한다^[2].

미국 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)과 유럽의약청(European Medicines Agency, EMA)은 메탄설폰네이트와 같은 유전 독성 불순물(GTI)의 일일 섭취 한도인 독성학적 우려 임계값(Toxicological concern, TCC)을 1.5 ug/day으로 설정하였으며,^[2] 이로 인해 제약 산업에서 의약품 개발 시 모든 단계에서 이러한 미량 수준의 유전독성 불순물을 모니터링 및 관리해야 한다.

이에 국내 식품의약품안전처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)에서도 이와 관련하여 의약품 제조과정 중 비의도적으로 발생할 수 있는 불순물을 체계적으로 관리하는데 도움을 주기 위해 23년 '의약품 중 불순물 분석법 자료집'을 발간하였다^[3].

본 뉴스레터에서는 해당 자료집을 토대로 그림 1과 같이 메탄설폰산 중 알킬메탄설폰네이트류(Alkyl methanesulfonate) 3종과 메탄설폰닐염화물(Methane sulfonyl chloride)에 대해 GCMS-QP2020 NX를 이용하여 분석법 적합성을 평가하였다.

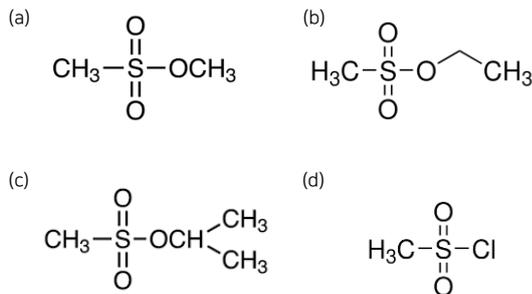


그림 1. 메탄설폰산 불순물 구조 (a) 메틸메탄설폰네이트 (b) 에틸메탄설폰네이트 (c) 이소프로필메탄설폰네이트 (d) 메탄설폰닐 클로라이드의 구조식

■ 기기 분석

메탄설폰산 중 잠재적 불순물 측정을 위한 측정 장비는 그림 2와 같이 Shimadzu GCMS-QP2020 NX를 사용하였으며, 기기 분석을 위한 세부 조건은 표 1과 같다.



그림 2. GCMS-QP2020 NX

표 1. GCMS-QP2020 NX 분석 조건

GCMS-QP2020 NX	
Analytical column	: SH-I (60 m × 0.25 mm I.D., 1.0 μm)
Column temp.	: 55 °C (1 min) → 10 °C/min → 135 °C → 20 °C/min → 300 °C (1 min)
Gas flow	: 1.5 mL/min
Injection mode	: Splitless (High Pressure injection ; 250 kPa, 0.5 min)
Split ratio	: 5:1
Injector temp.	: 240 °C
Ion source temp.	: 230 °C
Interface temp.	: 280 °C
	: SIM (m/z)
	메틸메탄설폰네이트 : 80, 79, 65
	에틸메탄설폰네이트 : 79, 109, 97
	이소프로필메탄설폰네이트 : 123, 79, 109
	메탄설폰닐염화물 : 79, 81, 64
	부틸메탄설폰네이트 (IS) : 56, 79, 109

■ 표준원액

분석에 사용된 표준물질 중 메틸메탄설폰네이트(99%), 에틸메탄설폰네이트(99%), 이소프로필메탄설폰네이트(99%)는 Fisher Scientific Korea, 메탄설폰닐염화물과 내부표준물질(IS) 부틸메탄설폰네이트(Butyl methanesulfonate)는 Sigma Aldrich에서 구매하였으며, 염화메틸렌(Dichloromethane) 및 무수황산나트륨(Sodium sulfate)은 각각 TEDIA와 JUNSEI Chemical 에서 구매하였다.

알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설폰네이트 표준액

부틸메탄설폰네이트 내부표준액 7 µL를 염화메틸렌 100 mL로 한 용액에 희석한 후, 다시 이 액의 100 µL를 정확하게 취하여 염화메틸렌 100 mL (70 µg/L)의 용액으로 준비한다. 그 후 메틸메탄설폰네이트, 에틸메탄설폰네이트, 이소프로필메탄설폰네이트 표준품 50 mg을 각각 정밀하게 달아 내부표준액을 넣어 정확하게 50 mL로 하여 혼합 표준원액으로 한다. 이 표준원액 74 µL를 내부표준액 10 mL로 정확하게 희석하고, 다시 이 액의 100 µL를 정확하게 취하여 내부표준액 10 mL로 하여 표준액 A-1(74 µg/L)로 한다. 표준액 A-1 3 mL를 내부표준액으로 희석하여 10 mL로 한 액을 표준액 A-2(22 µg/L)로 한다.

메탄설폰닐염화물 표준액

내부표준액 부틸메탄설폰네이트 7 µL를 염화메틸렌 100 mL (70 mg/L)에 취하여 준비한다. 메탄설폰닐염화물 표준액은 50 mg을 정밀하게 달아 염화메틸렌 10 mL로 하여 표준원액으로 한다. 표준원액 1 mL를 정확하게 취하여 염화메틸렌 10 mL로 하고, 다시 이 액의 300 µL를 정확하게 취하여 염화메틸렌 10 mL로 한 액을 표준액 B-1(15 mg/L)으로 한다. 표준액 B-1 500 µL와 내부표준액 100 µL를 취하여 염화메틸렌 15 mL로 한 액을 표준액 B-2(0.5 mg/L)로 한다. 표준액 B-3(25 µg/L)은 표준액 B-1 25 µL와 내부표준액 100 µL를 취하여 염화메틸렌 15 mL에 희석하여 준비한다.

■ 시스템적합성

알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설폰네이트의 시스템 적합성

표준액 A-2에서 얻은 메틸메탄설폰네이트, 에틸메탄설폰네이트, 이소프로필메탄설폰네이트의 각 피크 신호 대 잡음비(S/N)는 10 이상이며, 표준액 A-1에서 얻은 메틸메탄설폰네이트 및 이소프로필메탄설폰네이트 피크간 분리도는 3 이상이어야 한다. 피크의 분리도(Resolution, R)는 아래 식 (2)에 따라서 계산하였다.

$$\text{분리도 } R = 2 \times (t_R - t_{Rn}) / (W + W_p) \dots\dots\dots (2)$$

- t_R : 대상 피크의 머무름 지수 (min)
- t_{Rn} : 인접한 피크의 머무름 지수 (min)
- W : 피크 폭(Peak width)
- W_p : 인접한 피크의 피크 폭

메탄설폰닐염화물의 시스템 적합성

표준액 B-3에서 얻은 메탄설폰닐염화물의 피크 신호 대 잡음비(S/N)는 10 이상이며, 표준액 B-2에서 얻은 메탄설폰닐염화물 및 부틸메탄설폰네이트 피크간 분리도는 5 이상이어야 한다.

■ 검액의 조제

알킬(메틸, 에틸, 이소프로필) 메탄설폰네이트 검액

메탄설폰산 원료 의약품 약 0.74 g을 정밀하게 달아 물 10 mL와 내부표준액 10 mL를 넣고 천천히 흔들어 섞은 다음 추출한다. 유기층을 분리하여 무수황산나트륨이 1 g이 담긴 바이알로 옮겨 흔들어 섞고, 상등액을 취하여 멤브레인필터(PTFE, 0.45 µm)로 여과하여 처음 여액은 버리고 다음 여액을 검액으로 한다.

메탄설폰닐염화물 검액

메탄설폰산 원료 의약품 약 7.4 g을 정밀하게 달아 물 5 mL를 넣고 천천히 섞는다. 식힌 후에 염화메틸렌 5 mL와 내부표준액 100 µL를 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.

■ 농도 계산

메탄설폰산 중 알킬메탄설폰네이트류 및 메탄설폰닐염화물의 농도(mg/L)는 내부표준물질의 피크면적에 대한 검액 및 표준액 (메탄설폰네이트 표준액 A-1, 메탄설폰닐염화물 표준액 B-2 기준)의 각 성분 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구하여 아래 식 (1)에 적용할 수 있다. 이때 사용된 희석배수는 메탄설폰네이트 화합물의 경우 0.148, 메탄설폰닐염화물의 경우 1.5를 적용한다.

$$\text{검체 농도(mg/L)} = (Q_T / Q_S) \times (M_S / M_T) \times C \times \text{희석배수} \dots (1)$$

- Q_T : 표준액 중 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 성분의 피크면적비
- Q_S : 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(%)

■ 결과

크로마토그램

GCMS-QP2020 NX를 이용하여 분석한 메탄설폰산 중 알킬메탄설폰네이트류 및 메탄설폰닐염화물의 크로마토그램은 그림 3과 같다.

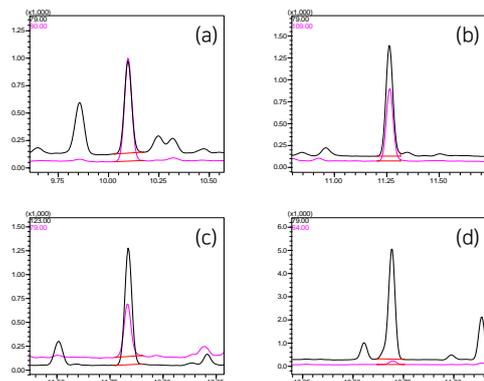


그림 3. (a) 메틸메탄설폰네이트, (b) 에틸메탄설폰네이트, (c) 이소프로필메탄설폰네이트 (22 µg/L) 및 (d) 메탄설폰닐염화물 크로마토그램 (25 µg/L)

표 2. 알킬메탄설포네이트류 (22 µg/L) 및 메탄설포닐염화물(25 µg/L)의 S/N

No.	성분명	S/N (n=5)					평균
		#1	#2	#3	#4	#5	
1	메틸메탄설포네이트	122	136	144	136	140	136
2	에틸메탄설포네이트	60	53	54	53	57	55
3	이소프로필메탄설포네이트	96	82	98	92	84	90
4	메탄설포닐염화물	49	54	55	56	54	54

표 3. 메탄설포산 중 알킬메탄설포네이트류 및 메탄설포닐염화물의 회수율 (%)

No.	성분명	회수율 - 농도(ng/L)				% RSD	회수율 (%)
		#1	#2	#3	Average		
1	메틸메탄설포네이트	52.7	53.6	53.6	53.3	1.0	72.0
2	에틸메탄설포네이트	60.3	65.3	65.4	63.7	4.7	86.1
3	이소프로필메탄설포네이트	64.6	67.0	68.5	66.7	2.9	90.1
4	메탄설포닐염화물	352	356	365	358	1.9	71.5

S/N 및 분리도 (R)

GC-MS를 이용한 메탄설포산 중 알킬메탄설포네이트류 및 메탄설포닐염화물의 S/N은 표 2에 나타난 것과 같이 5반복 측정된 결과, 허용 기준인 10 이상인 평균 54 - 136으로 나타나 분석 장비의 감도가 적합함을 보여주었다.

피크간 분리도 적합성의 경우, 에틸메탄설포네이트와 이소프로필메탄설포네이트의 분리도는 6.0으로 허용기준 (≥3.0)에 충족하였다. 메탄설포닐염화물과 내부표준물질 부틸메탄설포네이트의 분리도 또한 34.9로 허용기준(≥ 5.0)을 충족하였다 (표 4).

표 4. 알킬메탄설포네이트류 및 메탄설포닐염화물의 피크간 분리도 (R)

	알킬메탄설포네이트류	메탄설포닐염화물
t_R	11.26	10.69
t_{Rn}	11.84	14.01
W	0.08	0.09
W_p	0.11	0.10
R	6.0	34.9

회수율 평가 (%)

회수율 평가를 위해 미리 확인한 불검출 검액에 알킬메탄설포네이트류의 경우 표준액 A-1, 메탄설포닐염화물은 B-2의 농도를 기준으로 표준액을 첨가하여 GC-MS로 분석하였다. 회수율 결과는 표 3에서와 같이 알킬메탄설포네이트류는 (72.0 - 90.1) %, 메탄설포닐염화물은 71.5 %로 나타나 모두 양호한 수준으로 확인되었다.

■ 결론

이 뉴스레터는 의약품 제조과정 중 비의도적으로 발생할 수 있는 불순물을 관리하기 위해 식품의약품안전처에서 발행한 '의약품 중 불순물 분석법 자료집'을 바탕으로 GC-MS를 이용한 메탄설포산 중 알킬메탄설포네이트류 및 메탄설포닐염화물 분석법의 적합성을 확인하였다. Shimadzu GCMS-QP2020 NX를 이용하여 분석한 결과 시스템 적합성의 허용 기준을 모두 충족하여 메탄설포산의 불순물 분석이 가능함을 확인하였으며, 회수율 평가 결과도 70 % 이상으로 양호하게 나타났다.

■ 참고문헌

1. Zongyun Huang, *Development of a simple method for quantitation of methanesulfonic acid at low ppm level using hydrophilic interaction chromatography coupled with ESI-MS*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol 102, 5 January 2015, 18-24
2. Jie Zhou, Jie Xu, Xiangyuan Zheng, Wenyan Liu, Feng Zheng, *Determination of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in methanesulfonic acid by derivatization followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, J Sep Sci. 2017 Sep; 40 (17) :3414-3421
3. 식품의약품안전처 보도참고자료 '식약처, 제약업계의 비의도적 발생 불순물 관리 지원' 2023-04-24

