

## Analytical methods to manage potential impurities in drug substances

Kyung Min Park<sup>1,†</sup>, Won Mi Kim<sup>1,†</sup>, Su Hyun Ahn<sup>1</sup>, Ha Lim Lee<sup>1</sup>,  
Su Hyeon Hwang<sup>1</sup>, Wonwoong Lee<sup>2,★</sup>, and Jongki Hong<sup>1,★</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 55338, Korea

(Received November 11, 2021; Revised December 31, 2021; Accepted January 4, 2022)

## 의약품 중 잠재적 불순물 관리를 위한 분석법 연구 동향

박경민<sup>1,†</sup> · 김원미<sup>1,†</sup> · 안수현<sup>1</sup> · 이하림<sup>1</sup> · 황수현<sup>1</sup> · 이원웅<sup>2,★</sup> · 홍종기<sup>1,★</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 약학대학, <sup>2</sup>우석대학교 약학대학

(2021. 11. 11. 접수, 2021. 12. 31. 수정, 2022. 1. 4. 승인)

**Abstract:** Potential impurities in pharmaceuticals could be produced during manufacture, distribution, and storage and affect quality and safety of pharmaceuticals. In particular, highly reactive impurities could result in carcinogenic (mutagenic) effects on human body. International Conference on Harmonisation (ICH) has provided M7(R1) guideline for “Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk” and recommended an adoption of this guideline to the authorities. ICH M7(R1) guideline provides classification, accepted intakes, and controls of potential impurities in pharmaceuticals. However, since appropriate and unified analytical methods for impurities in pharmaceuticals have not been provided in this guideline, most potential impurities in pharmaceuticals are still difficult to manage and supervise by pharmaceutical companies and regulatory authorities, respectively. In this review, we briefly described definition of unintended mutagenic impurities, basic information in ICH M7(R1) guideline, and analytical methods to determine potential impurities. This review would be helpful to manage and supervise potential impurities in pharmaceuticals by pharmaceutical companies and regulatory authorities.

**요약:** 의약품의 제조, 유통, 보관 과정에서 발생할 수 있는 잠재적 불순물은 의약품의 품질과 안전에 영향을 미치며 반응성이 높은 불순물의 경우 인체에 대한 발암성(변이원성)을 나타내기도 한다. 이를 위해 국제의약품규제조화위원회(International Conference on Harmonisation, ICH)에서는 “잠재적 발암 위험을 제한하기 위한 의약품 중 DNA 반응성(변이원성) 불순물의 평가 및 관리”에 대한 내용을 담은 M7(R1) 가이드라인을 제공하여 채택을 권고하였다. 하지만 가이드라인에서도 잠재적 불순물에 대한 분류, 섭취 허용량, 관리방안 등과 대표적인 불순물 14 종에 대한 가이드라인 적용을 소개하는데 그치고 있어 제약 회사와 규제 당국에서 실제 관리를 위한 의약품 중 잠재적 불순물의 분석에 어려움을 겪고 있다. 이에

<sup>†</sup>Authors are equally contributed.

**★** Corresponding author

Phone : +82-(0)2-961-9255, +82-(0)63-290-1573 Fax : +82-(0)2-961-0357

E-mail : [jhong@khu.ac.kr](mailto:jhong@khu.ac.kr), [wwlee@woosuk.ac.kr](mailto:wwlee@woosuk.ac.kr)

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

따라 본 총설에서는 비의도적 변이원성 불순물의 정의와 ICH M7(R1) 가이드라인에 소개된 내용을 간략하게 살펴보는 한편 현재까지 보고된 주요 잠재적 불순물의 분석 동향을 살펴보고자 한다. 이를 통해 식약처를 비롯한 감독 기관과 제약회사 등에서 의약품 중 잠재적 불순물 관리에 조금이나마 도움이 되고자 한다.

**Key words:** potential impurity, mutagenic (carcinogenic) impurity, active pharmaceutical ingredient, drug substance, ICH M7(R1), analytical method

## 1. 서 론

최근 완제 의약품 및 활성 의약품 원료성분(Active Pharmaceutical Ingredient; API)에 불순물의 함유 가능성으로 인한 사회적인 관심이 모아지고 있다. 의약품에 존재하는 불순물은 완제의약품 제조 시 원료의약품, 반응 물질, 시약, 용매, 촉매 등의 다양한 화학물질을 사용한 복잡한 합성 경로를 통한 합성 과정 중 발생 가능하며, 중간 물질, 부산물 및 분해 산물 등으로도 발견되기도 한다.<sup>1,2</sup> 이외에도 의약품이 유통 및 보관 과정에서도 기후 변화나 사람의 부주의로 인한 온도 변화에 노출될 경우 의약품의 품질에 문제가 생기게 되고 결과적으로 불순물 발생 가능성이 있다.<sup>3,4</sup> 이렇듯 다양한 경로를 통해 의약품에 존재 가능한 불순물은 의약품 제조, 유통 및 보관 과정에서 발생된 비의도적 생성물이며 이러한 불순물은 의약품의 안정성, 안전성, 효능 및 품질에 영향을 끼칠 뿐만 아니라, 유전자 변이(변이원성), 염색체 재배열을 유발할 수 있고, 이런 불순물에 장기간 노출될 경우 DNA의 알킬화로 인한 손상으로 발암 가능성이 있다.<sup>2,4-6</sup> 이런 비의도적으로 생성되는 불순물을 제어하기 위해 제조 공정을 수정, 변경을 하기에는 많은 시간, 비용의 소모와 더불어 위험 가능성이 있는 화학물질의 사용을 완전히 배제하기는 어렵다. 최근 의약품 내 불순물 관리 규제의 국제적인 경향은 의약품 제조 공정 수정, 개발을 통한 합성과정에서의 불순물 제어와 같은 회피적인 방법보다는 불순물의 생성 가능성을 파악하고 전략적으로 제어하는 것에 중점을 두고 있다.<sup>1,4,5,7-9</sup> 의약품 내에 존재 가능한 불순물의 종류와 각 불순물별 허용 가능한 수치가 다르기 때문에, 불순물의 효과적인 제어를 위해서는 각 불순물의 생성 경로를 확인하고 미량의 불순물도 검출할 수 있는 적절한 분석법이 필요하다. 따라서, 본 논문에서는 의약품에 존재하는 불순물 중 국제 의약품 규제 조화 위원회(International Conference on Harmonisation, ICH)에서 제어, 관리하

기 위해 제시한 M7(R1) 가이드라인에 대한 기본적인 내용을 살펴보는 한편 의약품 내에 존재 가능한 잠재적 불순물의 검출법 개발과 관련한 연구 동향에 대해서 조사하고 이를 간략하게 정리하여 제공하고자 하였다.

## 2. ICH M7(R1) 가이드라인 및 불순물의 분류

### 2.1. ICH M7(R1) 가이드라인이란

국제 의약품 규제 조화 위원회(ICH)는 1990년 설립된 국제회의로 창설 초기에는 각 나라별 규제 기관과 제약업체가 모여 의약품의 과학기술적 측면과 지침에 관한 논의를 통해 활동을 조정하는 것을 목표로 하였다. 2000년대 이후의 ICH는 안전하고 효과적인 의약품을 개발, 등록 및 유지하기 위해 의약품 생산 및 제조 전 과정에 걸쳐 전세계적인 조화를 통해 공중 보건에 기여하는 것을 사명으로 한다. ICH에서 제시하는 지침은 크게 Quality (품질), Safety (안전성), Efficacy (약효), Multidisciplinary (종합) 4개로 구분되고 있다. 이 지침 중 ICH 가이드라인 ‘M7(R1) 잠재적 발암 위험을 제한하기 위한 의약품 내 DNA 반응성(변이원성) 불순물의 평가 및 관리’는 안전성과 품질 위험 요소 관리에 대한 내용을 담고 있다.

원료의약품은 시약, 용매, 촉매 등 다양한 화학물질의 합성 반응을 거쳐 완제의약품으로 제조되므로 합성 과정 혹은 합성 이후 분해의 결과로 원료의약품과 완제의약품에 불순물이 잔류할 수 있다. 이 가이드라인의 목적은 다양한 불순물 중에서도 변이원성 불순물의 안전성 확인 및 관리를 통하여 잠재적 발암 위험을 낮추는데 적용할 수 있는 실용적인 지침을 제공하는 것이다. 이 가이드라인은 무시할 수 있을 정도의 발암 위험을 유발할 것으로 예상되는 변이원성 불순물의 수준을 확립하여 위험을 관리하는 데 도움을 주며, 원료의약품 또는 완제의약품에 존재하거나 존재가 예상되는 변이원성 불순물의 평가와 관리를 위한 권

고사항을 제공한다. 이 가이드라인은 가이드라인 적용 범위, 시판 의약품에 대한 고려사항, 원료의약품 및 완제의약품의 불순물 평가, 위해 평가 요소, 위해 특성화 등으로 구성되어 있다.<sup>10</sup>

**2.2. 실제 불순물, 잠재적(비의도적, 변이원성, 발암성) 불순물이란**

불순물의 평가는 구조 결정을 통해 기존에 알고 있는 실제 불순물의 변이원성에 대해 검사하는 과정과 최종 원료의약품에 존재 가능한 잠재적 불순물의 평가를 실시하고 변이원성에 대한 추가적인 평가 여부를 판정하는 2단계의 과정을 거치게 된다.

**2.2.1. 실제 불순물(actual impurities)**

실제 불순물(actual impurities)은 구조가 알려진 불순물로 원료 의약품이나 완제 의약품 내에 존재한다는 것이 알려져 있는 불순물을 지칭한다. 실제 불순물은 ICH Q3A에 정의된 최종 원료의약품에 보고가 필요한 역치를 초과하는 수준으로 존재하는 합성 불순물과 허가 신청된 장기 보존 조건, 1차 포장 및 2차 포장에서 마찬가지로 ICH Q3A에 따른 보고가 필요한 역치를 초과하여 존재하는 분해 생성물로 구분할 수 있다. 이 때 함유량에 따라 낮으면 타당성 자료만 제출하고 높을 경우 화학구조자료에서 안전성입증자료(반복투여 독성, 유전독성시험 등)까지도 제출하여야 한다.

**2.2.2. 잠재적 불순물(potential impurities)**

잠재적 불순물(potential impurities) 또한 마찬가지로

합성 불순물과 분해 산물로 나뉘 수 있으며 원료의약품에 존재 가능한 출발 물질, 시약, 또는 출발물질부터 원료의약품까지의 합성경로에서 발생하는 중간체 등이 합성 불순물에 해당한다. 원료의약품 및 완제의약품의 장기 보존 조건 하에서 합리적으로 예측되는 잠재적 분해 산물은 가속안정성시험 및 ICH Q1B에 따른 광안정성 확인 시험에서 ICH Q3A/B의 구조 결정이 필요한 역치를 초과하여 생성되지만, 1차 포장과 장기 안정성 보존 조건에서 원료의약품과 완제의약품에서는 확인되지 않은 분해 산물을 포함한다.

**2.2.3. 불순물의 분류**

실제 및 잠재적 불순물은 ICH 가이드라인 M7(R1)에 제시된 다음의 Table 1에 따라 다섯 개의 클래스로 분류하며 기본적으로 발암성시험과 박테리아를 이용한 변이원성시험 결과에 대한 데이터베이스와 문헌검색을 통해 위해 평가를 실시하여 이와 같은 데이터를 얻을 수 없는 경우 변이원성시험 결과 예측을 위해 구조-활성 상관관계(Structure-Activity Relationships, SAR) 평가를 실시하여 분류한다.

**2.3. 잠재적 불순물의 섭취 허용량 산출 방식에 따른 계열별 분류**

ICH 가이드라인 M7(R1)의 부록에서는 변이원성과 발암성 물질로 간주되며 의약품 제조 시 널리 사용되거나 ICH M7에 기술된 원칙을 설명하는데 유용한 화합물 14종의 잠재적 불순물에 대해 섭취 허용량(acceptable intake; AI) 또는 1일 노출 허용량(permissible

Table 1. 변이원성 및 발암 가능성에 따른 불순물 클래스 및 이에 따른 관리 방법<sup>10,11</sup>

클래스	정의	관리를 위한 제안 조치
1	변이원성과 발암성이 확인된 물질	화합물별 허용 한계 이하로 제어
2	변이원성은 확인, 발암 가능성은 확인되지 않은 물질 (박테리아 변이원성 양성 및 설치류 발암성 유발 데이터 없음)	허용 한계 수준 또는 그 이하로 관리 (일반적 혹은 조정된 threshold of toxicological concern (TTC))
3	경고 구조 (structural alert)가 있으나, 원료의약품의 구조와 무관한 물질, 변이원성 데이터 없음	허용 한계 수준 또는 그 이하로 관리되거나 (일반적 혹은 조정된 TTC), 박테리아 변이원성 시험 시행; 비·변이원성 물질인 경우 = 클래스 5, 변이원성 물질인 경우 = 클래스 2
4	경고 구조가 있으나, 검사된 원료의약품 또는 원료의약품과 관련된 화합물(예, 공정중간체)에 동일한 경고 구조가 있고 비·변이원성임	비·변이원성 불순물로서 관리
5	경고 구조 없음 또는 변이원성이 없음을 증명하기에 충분한 데이터를 가진 경고 구조	비·변이원성 불순물로서 관리

daily exposure; PDE)을 산출하였다. 이러한 AI 또는 PDE의 산출은 잠재적 종양 발생률(tumorigenic dose 50; TD<sub>50</sub>)과 치사율(lethal dose 50; LD<sub>50</sub>)을 기반으로 한다. 여기서, TD<sub>50</sub>은 대조 동물의 종양 발생 빈도를 고려하여 해당 종에서 표준 수명 종료 시 동물 절반에서 종양을 유발할 수 있는 만성 용량-비율로 체중 kg당 시험 물질 mg (mg/kg)으로 나타낸다. 즉, 종양발생률이 50%가 되는 용량을 말한다.<sup>12,13</sup> 반면, LD<sub>50</sub>은 실험동물에 물질을 투여할 때 지정된 시간 간격 내에 실험동물의 50%가 죽게 되는 용량으로 mg/kg으로 나타낸다.<sup>12</sup> LD<sub>50</sub>이라는 수치는 크면 낮은 급성 독성을 나타냄을 의미하고, 작으면 매우 높은 잠재적 독성을 가짐을 의미한다. LD<sub>50</sub>은 변종, 종, 그리고 실험 조건에 따라 다르지만, 급성 독성의 유용하고 실질적인 척도임이 입증되었으며 널리 사용되고 이해되고 있다.<sup>13</sup>

표준 방법으로 제시되는 암 발생 추정치 TD<sub>50</sub>에서 선형 외삽법을 기본 방법(default approach) 외에도 비선형(역치) 작용 기전에 의해 불확실성 계수를 사용하여 PDE 계산하는 방법과 환경 내 노출을 고려하여 허용 가능 한계를 설정하는 등의 방법으로 AI 또는 PDE를 설정할 수 있다.

TD<sub>50</sub>으로부터 선형 외삽 하는 방법은 변이원성 작용 가능성이 있는 발암성 물질의 섭취 허용량 산출 시 사용하는 1 차 방법으로 역치 메커니즘(threshold mechanism)이 확립되지 않아 비선형 용량-반응 곡선 결과로 이어지는 작용 기전에 대한 정보가 없는 class 1 불순물 (변이원성 발암물질)에 대하여 사용하였다. 이에 속하는 잠재적 불순물에는 acrylonitrile, benzyl chloride, bis(chloromethyl)ether, 1-chloro-4-nitrobenzene (para-chloronitrobenzene), p-cresidine, dimethylcarbamoyl chloride, ethyl chloride, glycidol, hydrazine, methyl chloride가 있다

시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 변이원성에 대한 역치가 수립된 DNA 반응 화합물의 경우 최대 무작용량(no-observed effect level; NOEL)의 확인 및 불확실성 계수를 사용하여 PDE값을 구한다. 이 방식은 낮은 용량에서 인체 관련성이 부족한 작용기전을 가진 발암물질에 대한 화합물 특이적 평가에 적합하다고 보고 있다. 이에 속하는 잠재적 불순물로는 aniline 및 aniline HCl이 있다.

잠재적 불순물이 음식과 내인성 대사 등 다른 환경적 요인에서 유래하여 인체 노출량이 매우 높은 경우, 섭취 허용량을 더 높여 설정하게 된다. 대표적인 예시로는 hydrogen peroxide가 있다.

기타 분류 군으로 분류되는 불순물에는 p-chloroaniline 및 p-chloroaniline HCl, dimethyl sulfate가 있다. 이 중에서 비장의 종양 발생과 연관이 있는 불순물은 p-chloroaniline 및 p-chloroaniline HCl이다. 비장의 종양은 비선형 용량-반응 작용 기전을 고려할 때 헤모시테린증(hemosiderosis)과 관련이 있으나 저용량에서는 헤모시테린증을 유발하지 않으므로 인체와 관련성이 없지만, 간 종양에 대한 변이원성 작용 기전을 배제할 수 없어 p-chloroaniline이 유발하는 간세포 선종과 암종을 합하여 더 높은 TD<sub>50</sub> 값을 선형 외삽법을 이용하여 AI를 계산한다. Dimethyl sulfate는 경구 발암물질과 인체 발암물질일 가능성이 높다고 판단되지만 제한적인 발암성 연구 결과로 인하여 TD<sub>50</sub> 산출에 적합하지 않다. 이러한 점을 감안하여 dimethyl sulfate는 독성학적 역치(threshold of toxicological concern; TTC)를 적용하여 제한한다.

위의 관리대상 불순물 14 종 이외에도 ICH M7(R2)에서는 2019년 관리대상 불순물 6 종이 추가로 제안되었다. Pharmaceutical Manufacturers Association (PhRMA)와 European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA)로부터 제안된 물질인 acetaldehyde, vinyl acetate, 그리고 Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA), U.S. Food and Drug Administration (USFDA), Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)로부터 제안된 물질인 ethyl bromide, isopropyl chloride 2-bromoethanol, ethyl methanesulfonate (EMS)가 있다.<sup>14</sup>

또한 ICH 가이드라인 M7에서 직접적으로 제시된 화합물 외에도 대표적인 변이원성 불순물인 N-nitrosodimethylamine (NDMA)는 ICH 가이드라인 M7(R1)에서 Class 1로 분류되는 불순물로 잠재적인 발암 위험이 있는 변이원성 물질이다. USFDA는 2019년 9월 ranitidine내의 NDMA 검출을 확인하여 2020년 4월 시장에서 ranitidine을 최종 철수결정을 내렸으며 식품 의약품안전처에서도 2019년 9월 7개 ranitidine 원료의약품 제조소에서 NDMA 잠정 관리 기준이 초과됨에 따라 국내 유통 완제품 전체인 269 품목에 대해 잠정적으로 제조 수입 및 판매를 중지한 상태이다.

이어서, azide의 경우 완제의약품 제조과정에서 잔류할 가능성이 있는 sodium azide를 제거하기 위해 첨가되는 sodium nitrite와 산성 조건하에 반응하여 nitrous acid를 형성할 수 있다. 형성된 nitrous acid는 amine과 반응하여 NDMA를 형성할 수 있다. 따라서 azide의 경우 그 자체로는 인체 발암물질로 분류되지는 않지

만 의약품 내에 존재할 경우 NDMA와 같은 변이원성 물질의 전구체가 될 수 있기에 관리가 필요한 물질이다.<sup>15,16</sup> Azido 화합물의 경우도 2021년 5월 캐나다 연방보건부 (Health Canada)에서 ‘sartans’ 계열의 의약품에서 허용한도를 초과하는 azido가 검출되어 sartan을 원료로 하는 irbesartan, losartan, valsartan 등의 완제의약품에 대해 회수 조치를 내렸으며 식품의약품안전처도 2021년 6월 같은 성분 고혈압약에서 azido 불순물 평가 및 시험검사 결과 제출 명령을 내린 상태이다. 이와 같은 이유로 인간에게 암을 유발하는 구체적인 위험은 아직 밝혀지지 않았지만 변이원성 물질의 경우 장기간 노출될 경우 암 발생 위험이 증가하기 때문에 일정 수준 이하로 유지하도록 권고하고 있다.<sup>17</sup>

## 2.4. Threshold of Toxicological Concern (TTC)

### 2.4.1. TTC의 개념

유전 독성 불순물이 임계값 관련 메커니즘을 통해 작용한다는 증거가 없거나 불충분한 경우, 안전 한계를 설정하는 것이 오히려 문제가 될 수 있다. European Medicines Agency (EMA) 접근방식은 식품 포장 재료로부터 나오는 오염물에 USFDA가 처음 적용한 개념으로 “규제 문제의 임계값”으로 알려져 있다. 이 원칙은 규제기관이 위해의 위험이 무시할 수 있는 극히 낮은 수준의 오염에 대해 우려해서는 안 된다고 명시하고 있다. 이후 실행된 연구에서는 규제 임계값을 정량화하는 것을 목표로 하여 “독성학적 역치(Threshold of Toxicological Concern, TTC)”로 재지정되었다.

TTC란 발암성 또는 다른 독성의 영향이 나타내지 않는 섭취허용량과 관련된 연구가 실시되지 않은 화학물질의 섭취허용량을 규정하기 위해 개발된 개념이다. TTC에 기초가 되는 방법은 중앙 발생 중 가장 감수성이 높은 동물 종과 가장 감수성이 높은 부위에 대한 TD<sub>50</sub>(중앙발생률이 50%인 용량) 데이터를 사용하여, TD<sub>50</sub>에서부터 단순 선형 외삽법에 의해 중앙 발생률이 10<sup>-6</sup>이 되도록 계산하는 매우 보수적인 방법이다. 원료의약품 및 완제의약품의 변이원성 불순물에 대한 허용 한계 평가에 TTC를 적용하는 경우 이론적으로 일생 동안 10<sup>-5</sup> 발암율에 해당하는 값으로 1.5 µg/day 가 정당화된다. 하지만 TTC 이하의 섭취에도 유의적인 발암 위험 가능성이 있는 일부 화학물질이 발견되고 있다. 이러한 강한 변이원성 발암물질 그룹은 ‘cohort of concern’으로 알려져 있으며, 아플라톡신 유사 화합물 (aflatoxin-like), N-니트로소 (N-nitroso-) 화합물 및 알킬-아조시 (alkyl-azoxy) 화합물이 이에 속

한다.<sup>10,11,18</sup>

### 2.4.2. TTC에 기반한 섭취 허용량

변이원성 불순물의 TTC에 기반한 섭취 허용량인 사람 당 1.5 µg/day에 따른 위하는 이론상 평생 노출된 경우 10만 명 중 1 미만일 정도로 크게 영향을 주지 않을 정도이고, 대부분의 의약품 관리에 이용되는 허용 한계를 계산하는 기본값으로서 일반적으로 사용된다. 이렇듯 TTC는 이론적인 개념으로 실질적인 위해를 나타내는 현실적 지표는 아니지만, TTC 개념은 모든 변이원성 화합물의 안전한 노출량에 대한 추정치를 제공하고 있다. 일반적으로 장기 투여 (10년 초과)되는 의약품에 존재하는 변이원성 불순물의 발암성 데이터를 얻을 수 없는 경우(클래스 2 및 3)에 이 방법을 사용한다.<sup>11,18</sup>

설치류에 700 개 이상의 발암물질에 대한 발암성 효력을 분석한 결과, 0.15 µg/day 미만의 노출은 평생 발암 위험을 100만분의 1 이상 증가시키지 않을 것으로 추정되었다. 따라서 가장 강력한 발암물질을 제외한 모든 물질에 대해 하루 0.15 µg를 “사실상 안전한 용량”으로 간주하는 것이 합리적이다. EMEA가 권고하는 실제 한도는 1.5 µg/day이며, 이는 10만분의 1 미만의 일생에서의 발암 위험 확률을 의미하며, 추가 복용 범위는 환자의 약 복용에 따른 유익성에 의해 정당화된다. 반면에, 위에서 언급했듯이 아플라톡신 유사 화합물, N-니트로소 화합물, 아조시 화합물 등은 더 낮은 함량의 섭취에도 발암 가능성이 존재하므로 더욱 엄격한 제어가 요구된다. 또한, 일반적인 TTC 한도는 ICH 가이드라인에서 제시한 일반적인 자격 기준보다 몇 배 더 낮은 수준으로 설정되어 있기 때문에 이를 따라야 하는 제조업체에는 여전히 수많은 기술적, 분석적 문제가 따른다.<sup>19,21</sup>

## 2.5. Less Than Lifetime (LTL)

### 2.5.1. LTL의 개념

LTL은 의약품과 관련된 화합물의 불순물에 대하여, 섭취 허용량의 계산을 위한 위해성 해석에 사용되는 개념으로 평생보다 짧은 기간을 의미하는 Less Than Lifetime의 약어이다. 발암성이 이미 알려진 물질에 대한 표준 위해 평가의 경우, 축적량에 따라 발암 위험이 증가된다고 가정하므로 적은 양에 일생 동안 지속적으로 노출되는 발암 위해가 짧은 기간에 걸친 축적 노출량, 발암 위해와 동등하다고 평가할 수 있다. 각 불순물이 함유된 의약품을 복용하는 기간은 약물 중

류에 따라 만성적으로 복용하거나 짧은 기간 동안 간헐적으로 복용하는 등의 차이가 있는데, LTL의 개념은 짧은 기간 동안 혹은 간헐적으로 복용하는 경우에 적용하여 일일 섭취 용량을 구하는데 이용된다.<sup>22-24</sup>

### 2.5.2. LTL 노출에 대한 섭취 허용량

의약품 중의 변이원성 불순물에 대한 LTL (평생보다 짧은 기간) 섭취 허용량은 독성학의 기본 개념인 Haber 법칙에 따라 농도(C)\*시간(T)=상수(k)를 전제로 발암성은 투여량과 노출 기간 모두를 근거로 하고 있다. 의약품 변이원성 불순물의 LTL 동안 노출에 대해, 화합물의 일일 섭취 허용량을 이용하여 평생 (70년) 동안의 누적 용량을 계산하고, 이를 총 노출 일수로 나누어 계산하게 된다.

ICH M7(R1)의 가이드라인에 따르면, 1개월 이하, 1~12개월 및 1년 이상부터 제3상 임상시험 완료까지의 개발 단계에서 제한된 투여 기간 동안 변이원성 불순물의 섭취 허용량은 LTL 개념을 사용하도록 권장된다(Table 2). 여기서 산출된 섭취 허용량은 아직 이익이 확립되지 않은 임상 개발의 초기 단계에서는 10<sup>-6</sup>의 위해를, 개발 후기에는 10<sup>-5</sup>의 위험 수준을 유지한다.

### 2.6. 의약품 개발, 제조 및 시판 단계에서 잠재적 불순물 관리

전술했듯이 원료의약품 또는 완제의약품은 합성 및 분해의 과정에서 잠재적 불순물이 발생할 수 있다. 따라서 의약품을 개발하고 제조한 뒤 시판하는 단계까지 잠재적인 불순물에 대한 관리가 요구되므로 다음과 같은 알고리즘을 통해 판단하고 관리할 수 있다.

시험 데이터를 통해 잠재적 유전독성 우려가 있을 시 불가피하지 않을 경우 유전독성 불순물이 없는 대체품을 사용한다. 하지만 사용이 불가피할 경우 가능한 한 낮은 수준으로 유전독성 불순물을 낮추어야 한다. 또한, 예상되는 섭취량이 TTC 1.5 µg/day를 초과하지 않으면 무시할 수 있는 위험으로 간주하고 초과한다면 섭취 수준이 1.5 µg/day를 허용할 수 있는지 확인한다. 허용할 수 있는 범위의 섭취 수준이라면 무시하거나 허용할 수 있는 위험으로 간주하고 그렇지

않다면 사용을 제한하거나 사용을 금지하여야 한다.

의약품 중 잠재적 유해물질은 환자의 체내에서 유전독성 및 발암성을 유발하여 체내에서 심각한 부작용을 일으켜 환자의 건강을 위협할 수 있다. 하지만 현재 의약품 중 잠재적 유해물질을 신속히 스크리닝하고 확인하는 절차의 구비는 미흡한 실정이다. 따라서 본 논문에서는 의약품 중 잠재적 유해물질에 대한 정량, 정성적 분석기법을 계열별로 정리하였으며 향후 나아가야 될 방향 및 최신 분석 기법에 대하여 소개하였다.

## 3. 잠재적 불순물 분석법 개발 동향

본 장에서는 ICH M7(R1)에서 지정한 관리 대상 불순물 14 종과 ICH M7(R2)에서 2019년도 제안된 관리 대상 불순물 6 종을 비롯한 주요 변이원성 불순물의 분석법에 대해서 살펴보고자 하며 이들의 화학 구조는 Fig 1 과 Table 3에 정리하였으며 대표적인 변이원성 불순물에 대한 분석법 연구동향은 Table 4에 정리하였다.

### 3.1. TD<sub>50</sub>에서 선형 외삽법

#### 3.1.1. Acrylonitrile

Acrylonitrile은 의약품 합성 과정에서 친전자성 반응 시약으로 사용되는 물질로,<sup>27</sup> 경구 투여된 acrylonitrile은 간에서 대사 되어 시안화물로 전환되어 DNA나 단백질과 결합하는 변이 원성 및 유전 독성을 갖는다.<sup>28</sup> acrylonitrile은 휘발성 질소 물질로 많은 문헌에서 수상 시료에 있는 acrylonitrile의 정량을 위해 기체 크로마토그래피(gas chromatography; GC)를 사용하는 추세이다.<sup>29</sup> GC는 가스 상 시료의 분석에 적합한 방법으로 특히 headspace (HS)-GC의 경우 유기화합물의 열분해 방식에 비해 휘발성의 nitrile을 측정하는데 더욱 적합하고, 검출기의 경우 질소-인 검출기(nitrogen-phosphorus detector; NPD), 질량분석기(mass spectrometry; MS)를 주로 적용하는 것으로 보고되었다.<sup>30-32</sup> 의약품에 직접 분석한 사례는 적지만 플라스틱 용기와 같은 고체 시료의 경우는 제분 후 용해 과정을 거쳐 분석에 적용되고, 생체 시료나 바닷물처럼 액체 시

Table 2. 변이원성 불순물 투여 기간별 허용되는 섭취량<sup>10,18</sup>

투여 기간	≤1개월	>1~12개월	>1~10년	>10년~평생
1일 섭취량 (µg/day)	120	20	10	1.5

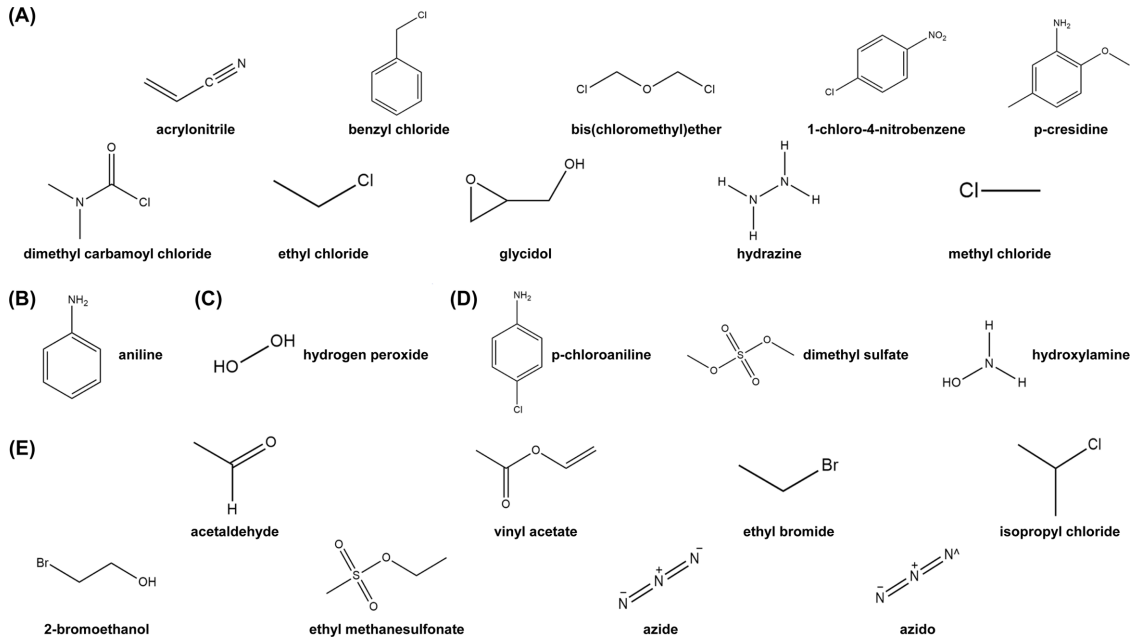


Fig. 1. 대표적인 변이원성 불순물 구조식<sup>25,26</sup> (A) TD<sub>50</sub>에서 선형의압 계산 불순물, (B) 역치기반 PDE 계산 불순물, (C) 내인성 및 식품 노출군 불순물, (D) 기타 분류 불순물, (E) 2019년 추가 제안 및 기타 불순물

Table 3. 대표적인 변이원성 불순물<sup>25,26</sup>

변이원성 불순물	이화학적 특징			
Acrylonitrile	AI/PDE (µg/day): 6	CAS no.: 107-13-1	M.W.: 53.06 g/mol	B.P.: 77 °C
	특성: 톡 쏘는 자극적인 냄새의 무색, 열은 황색 휘발성 액체, 고무, 플라스틱, 합성섬유, 항공우주산업의 탄소섬유 제조에 사용			
Benzyl Chloride	AI/PDE (µg/day): 41	CAS no.: 100-44-7	M.W.: 126.58 g/mol	B.P.: 179 °C
	특성: 톡 쏘는 자극적인 냄새의 무색 가연성 액체			
Bis(chloromethyl)ether	AI/PDE (µg/day): 0.004	CAS no.: 542-88-1	M.W.: 114.96 g/mol	B.P.: 104-106 °C
	특성: 톡 쏘는 자극적인 냄새가 나는 무색의 인화성 액체, 가열 시 hydrochloric acid와 기타 chlorinated 화합물의 독성 증기 생성			
1-Chloro-4-nitrobenzene	AI/PDE (µg/day): 117	CAS no.: 100-00-5	M.W.: 157.55 g/mol	B.P.: 242 °C
	특성: 달콤한 냄새의 열은 노란색 결정형 고체, 가열 시 nitrogen oxides, hydrogen chloride, phosgene, chlorine의 독성 증기 생성			
p-Cresidine	AI/PDE (µg/day): 45	CAS no.: 120-71-8	M.W.: 137.18 g/mol	B.P.: 235 °C
	특성: 흰색 결정형 방향족 아민, 가열 시 nitrogen oxide를 포함한 자극적인 독성 가스 생성			
N,N-Dimethyl carbamoyl chloride (DMCC)	AI/PDE (µg/day): 5, 0.6(흡입)*	CAS no.: 79-44-7	M.W.: 107.54 g/mol	B.P.: 167 °C
	특성: 자극적인 냄새의 투명한 무색, 노란색의 액체, 물에서 dimethylamine, carbon dioxide, hydrogen chloride로 빠르게 가수분해			
Ethyl Chloride	AI/PDE (µg/day): 1,810	CAS no.: 75-00-3	M.W.: 64.51 g/mol	B.P.: 12.5 °C
	특성: 특징적인 날카로운 냄새의 무색 압축 액화 인화성 가스			

Table 3. Continued

변이원성 불순물	이화학적 특징			
Glycidol	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 4 특성: 무색, 무취의 점성이 있는 액체, 1,2-epoxypropane으로부터 유래한 Epoxide이며 1차 알코올	CAS no.: 556-52-5	M.W.: 74.08 g/mol	B.P.: 167 °C
Hydrazine	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 39, 0.2(흡입)* 특성: 무색의 혼중, 암모니아 냄새의 기름진 액체, 반응성이 매우 높아 산업용, 의료용으로 사용되는 환원제	CAS no.: 302-01-2	M.W.: 32.05 g/mol	B.P.: 114 °C
Methyl chloride	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 1,360 특성: 희미하고 달콤한 냄새의 무색 인화성 액화 가스, 약물 제조 시 화학반응 중간체 등 의료용, 석유 정제 용제 등 산업용으로 응용	CAS no.: 74-87-3	M.W.: 50.49 g/mol	B.P.: -23.7 °C
Aniline	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 720 특성: 특유의 곰팡이 냄새가 나는 무색 기름진 액체, 염료, 사진용 화학물질, 농약 제조 등에 활용	CAS no.: 62-53-3	M.W.: 93.13 g/mol	B.P.: 184 °C
Hydrogen peroxide	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 68,000, 0.5%중 낮은 값 특성: 날카로운 냄새의 상온에서 쓴맛이 나는 무색 액체, 강력한 산화제로 살균제, 항바이러스제로 활용	CAS no.: 7722-84-1	M.W.: 34.02 g/mol	B.P.: 141 °C
p-Chloroaniline	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 34 특성: 약간 달콤한 특징적인 아민 냄새가 나는 흰색 또는 옅은 노란색 고체	CAS no.: 106-47-8	M.W.: 127.57 g/mol	B.P.: 232 °C
Dimethyl sulfate	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 1.5 특성: 양과 같은 냄새의 무색 기름진 액체, 물에 의해 분해되어 발열, sulfuric acid 발생	CAS no.: 77-78-1	M.W.: 126.13 g/mol	B.P.: 188 °C
Hydroxylamine	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 2 특성: 무취의 흰색 큰 고체 또는 작은 고체 결정, 박테리아 같은 미생물의 생물학적 nitrification 반응의 중간체	CAS no.: 7803-49-8	M.W.: 33.03 g/mol	B.P.: 70 °C
2-Bromoethanol	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): - 특성: 특유의 달콤한 냄새의 무색, 진한 갈색 액체	CAS no.: 540-51-2	M.W.: 124.96 g/mol	B.P.: 148-150 °C
Ethyl methanesulfonate (EMS)	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): - 특성: 투명한 무색의 액체, 물에서 ethanol, methanesulfonic acid로 가수분해	CAS no.: 62-50-0	M.W.: 124.16 g/mol	B.P.: 213 °C
Ethyl bromide	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 32 특성: 에테르와 유사한 냄새의 무색, 황색 휘발성 액체, 냉매, 국소마취제, 알킬링제 등으로 활용	CAS no.: 74-96-4	M.W.: 108.97 g/mol	B.P.: 38 °C
Isopropyl chloride	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): - 특성: 클로로포름과 유사한 냄새의 무색 액체	CAS no.: 75-29-6	M.W.: 75.54 g/mol	B.P.: 35 °C
Acetaldehyde	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 185 특성: 자극적인 숨막히는 냄새의 투명한 무색 액체, 향료제로 아세트산, 향수, 염료, 약품의 제조 활용	CAS no.: 75-07-0	M.W.: 44.05 g/mol	B.P.: 20 °C
Vinyl acetate	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): 758 특성: 달콤한 과일향의 맑은 무색 인화성 액체, 공업용 화학물질, 식품 포장용 플라스틱 필름의 코팅 제작에 활용	CAS no.: 108-05-4	M.W.: 86.09 g/mol	B.P.: 72.7 °C
Azido	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): - 특성: 에어백의 추진제로 사용, 무기질 radical 상태	CAS no.: 12596-60-0	M.W.: 42.02 g/mol	-
Azide	AI/PDE ( $\mu\text{g/day}$ ): - 특성: RN <sub>3</sub> 의 작용기, 공명구조 상태	CAS no.: 14343-69-2	M.W.: 42.02 g/mol	-

Table 3 내 약어: Molecular weight (M.W.), boiling point (B.P.)

\*: 경로 특이적 기준



료의 경우 용매를 사용해 추출 후 여과, 증류나 원심 분리를 이용하여 분리한 후 분석을 진행하는 것으로 보고되었다.<sup>30-32</sup>

### 3.1.2. Benzyl chloride

Benzyl chloride는 유해 휘발성 유기 화합물(volatile organic compounds; VOCs) 중 하나로 플라스틱의 제조 시에 첨가되는 난연제, 청소도구, 인형, 공기청정기, 가구 등 다양한 제품에서 VOCs가 방출되는 것으로 알려져 있다. 따라서, Benzyl chloride는 발암성 물질로서 sub-ppm 수준으로 정확하게 정량화되어 통제가 요구되는 물질이다.<sup>33</sup> Benzyl chloride는 화학적 과정이나 합성 과정 동안 나타나는 약물학적 과정과 관계된 기체 상의 불순물이므로 GC를 이용해 분석한다. 특히, HS-GC는 시료 내의 비 휘발성 성분을 최소화하고 기체 상의 물질만 분석이 되어 매트릭스 영향이 낮기 때문에 크로마토그래피에 의한 분리에서 간섭을 줄일 수 있어 선호되는 추세이다.<sup>5,34</sup> 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector; FID) 혹은 전자포획검출기(electron capture detector; ECD)를 연결하여 분석 시 ppm 수준의 검출 감도 확보가 가능하고 할로젠 화합물에 대한 선택성과 검출 감도가 높게 나타난다고 보고하였다.<sup>35,36</sup> 시료 전처리법으로는 고체상 미세추출법(solid phase micro extraction; SPME)을 활용하는데 이는 잔류 용매의 분석을 다루는데 용이하고, ppb나 ppt 수준의 발암성 위험 물질의 정량도 가능하다고 보고되었다.<sup>37,38</sup>

### 3.1.3. Bis(chloromethyl)ether

Bis(chloromethyl)ether (BCME)는 매우 낮은 수준에서도 발암성이 입증되었으며 일반적인 산업 원료인 염산과 포름알데히드에서 불순물로 생성될 수 있다. 따라서 BCME 측정을 위한 정밀한 분석법의 개발이 요구된다. BCME의 기존 시료 전처리 방법으로는 흡착 튜브를 활용한 방법이 제시되었고 이 방법은 낮은 농도 수준의 검출이 가능하다는 장점이 있다. 이후, 크로마토그래피 분해능의 개선으로 효율적인 분석을 수행하고자 흡착 튜브에서 탈착 후 유도체화 방법이 보고되었다. 적절한 시료 전처리 과정을 거친 시료는 GC-MS를 사용한 분석으로 높은 검출 감도와 선택성을 확보하였다고 보고하였다.<sup>39,40</sup>

### 3.1.4. 1-Chloro-4-nitrobenzene

1-Chloro-4-nitrobenzene (CNB)은 오일 첨가제, 의약

품, 농약 및 기타 화학제품의 제조과정에서 발생 가능한 불순물이다. 일상생활과 밀접한 제품들의 제조공정에서 발생할 수 있기 때문에 CNB의 노출을 피하기 어려우며 자연에서 쉽게 분해되지 않고 인체에 매우 유해하기 때문에 민감한 분석법의 개발이 중요하다.<sup>41</sup> CNB 측정을 위해서는 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC) 또는 GC와 같은 정밀도, 검출 감도 및 특이성이 높은 분석법의 사용이 가능하지만,<sup>42,43</sup> 편리성, 검출 감도 및 특이성, 비용 및 시간 절감이 뛰어난 전기화학적 감지 기법이 널리 사용되는 추세이다. CNB은 carbon nanohorns (CNHs)/ $\beta$ -CD nanohybrids 전극을 통한 전기화학적 센싱이 적용되었다. CNH는 넓은 표면적과 높은 전자 전달 능력으로 전하 수송이 우수하고  $\beta$ -CD은 CNHs와 CNH의 시너지를 촉진해 전극 표면에 더 많은 양의 CNB를 흡착할 수 있다. CNHs/ $\beta$ -CD nanohybrids 전극은 간단한 방법으로 제조할 수 있고 CNB 검출에 대해서 안전성, 특이성 및 회수율이 우수하다고 보고되었다.<sup>41</sup>

### 3.1.5. *p*-Cresidine

아조 염료(azo dye)는 aromatic amines을 전구체로 합성되는 물질로 화장품, 의약품, 종이, 식품 및 섬유 산업 등 다양한 용도에 사용되지만 불법 첨가물로서 문제를 일으키기도 한다.<sup>44,45</sup> 방향족 아민(aromatic amines)의 아미노기는 대사적으로 활발하며 단백질과 DNA의 손상을 일으키는 하이드록실아민을 생성할 수 있기에 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에 의해 잠재적인 발암물질로 분류되었다.<sup>46</sup> 아조 염료에서 파생된 방향족 및 니트릴 분석에는 높은 재현성, 특이성 및 변동성 확보가 가능한 GC-MS 분석법을 적용하는 것으로 보고되었다.<sup>45,47,48</sup> 증기압이 높은 방향족 아민의 특징은 GC-MS를 이용한 분석에 매우 유용하지만, 검출 감도가 특정 화합물의 분석에 충분하지 않을 수 있어 적절한 시료 전처리 과정이 요구된다.<sup>46</sup> *p*-Cresidine의 시료 전처리 과정 중 하나인 SPME은 서로 다른 매트릭스의 분석에 적용하는 방법으로 빠르고 적은 양의 독성 화합물을 사용하며, 고농축 인자를 생성하기 때문에 기존의 추출 방법보다 선호된다. 다른 추출법인 분산 액체-액체 미세 추출법(dispersive liquid-liquid micro-extraction; DLLME)은 쉽고 간편하고 높은 추출 효율성과 높은 분석 물질 회수 및 친환경적인 방법으로 유기 및 무기물 분석에 널리 사용되는 미세 추출 방법이다.

DLLME의 높은 효율성은 추출 용제를 샘플 용액 전체에 매우 미세한 방울로 분산시키는 분산 용제의 사용에서 비롯된다고 보고되었다.<sup>49</sup> 이용액 분산 액체-액체 미세추출법(binary solvent dispersive liquid-liquid micro-extraction; BSDLLME)은 문헌에 많이 보고되지 않았지만, 두 종류 이상의 추출 용매를 결합함으로써 다중 분석 물질의 추출 효율을 개선할 수 있는 가능성이 있어 연구할 가치가 있다고 보고되었다.<sup>46</sup>

### 3.1.6. Dimethylcarbamoyl chloride

*N,N*-Dimethylcarbamoyl chloride (DMCC)은 활성 알킬 화제이자 많은 의약품 및 살충제 제조에서 중간체로 사용되고 있는 물질이다. 이는 유기 합성에 넓은 응용을 갖는 Vilsmeier reaction 하에서 chlorination 물질과 *N,N*-dimethylformamide (DMF)의 반응으로 생성된다. IARC에서 DMCC를 잠재적인 발암 물질로 분류하고 있어 이를 규제해야 할 필요가 있는데, Vilsmeier reaction 하에서 생성되는 DMCC의 허용 수준은 일반적인 분석법으로는 검출되기 힘들 정도로 매우 미량이다. 공기 중 ppb 수준으로 미량 존재하는 DMCC의 분석에는 GC를 적용한 분석과 정량분석을 위해 proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR)과 GC-MS방법이 적용되었다. <sup>1</sup>H-NMR를 적용한 정량 분석은 가수 분해 속도 상수 및 반감기를 파악하는 전처리방법을 이용하였으며, 연구 결과 Vilsmeier reaction에서 DMCC를 정확하게 측정할 수 있었다고 보고하였다.<sup>50</sup>

### 3.1.7. Ethyl chloride

산업용 에틸화제 및 국소 마취제 제조에 사용되는<sup>51</sup> ethyl chloride는 비정형 항정신병제 계열 약물인 ziprasidone hydrochloride의 염산염 형성 과정에서 발생하는 alkyl chloride 계열 불순물 중 하나이다. Ziprasidone hydrochloride 내의 ethyl chloride를 분석하기 위하여 필요한 시료 전처리법으로는 2 mL의 methanol을 98 mL의 DMSO에 희석하여 혼합한 용액을 첨가해 시료를 희석하는 방법이 보고되었다.<sup>52</sup> 일반적으로 우수한 선택성과 검출 감도를 가지고 있어 최근 alkyl halides 분석에 많이 활용되고 있는 GC-ECD 방법은 염소화물보다는 요오드화물과 브롬화물에 더 민감하기 때문에 ethyl chloride의 분석에는 검출 감도가 낮아 적절하지 못하다. 따라서 희석을 통해 전처리한 ethyl chloride 시료는 가장 활용도가 높고 널리 사용 가능한 GC-MS를 사용하여 분석하는 추세이다.<sup>5</sup>

### 3.1.8. Glycidol

Glycidol은 IARC에서 분류한 발암물질 중 Group 2A에 속하는 물질로 인체 발암성에 대한 증거는 불충분하고 제한적이지만 동물 발암성에 대한 증거는 충분한 물질 중 하나이다.<sup>53</sup> Glycidol은 올리브유와 같은 식용 식물성 오일 정제 과정에서 발생하는 불순물로 알려져 있고, 이렇게 섭취된 glycidol은 체내에서 lipase에 의해 유리형으로 변환되어 체내에서 간 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>54</sup> 식품 내 존재하는 glycidol의 경우 일반적으로 시료 내에 2-monochloropropanediol ester (2-MCPDE) 및 3-monochloropropanediol ester (3-MCPDE)와 같은 물질이 함께 공존하고 있어 일반적인 전처리법으로는 분리가 완전히 이루어지지 않을 수 있기 때문에 시료에서 분석하고자 하는 성분만을 추출하는 고체상 추출법 (solid-phase extraction; SPE)<sup>55</sup> 또는 matrix solid phase dispersion (MSPD)를 적용하여 시료의 전처리를 실시한다. 식용유로부터 추출된 glycidol의 분석에는 heptafluorobutyrylimidazole (HFBI) 유도체화 과정을 통해 시료주입부의 오염도를 크게 낮추면서 정확성과 경제성을 높인 GC-tandem mass spectrometry (MS/MS)을 이용한 분석법이 보고되었다.<sup>54</sup>

### 3.1.9. Hydrazine

높은 반응성을 띠는 염기성 물질인 히드라진 (hydrazine)은 nifuroxazide, carbidopa, imatinib mesylate 등의 의약품 합성 시 시약으로 사용된다.<sup>56</sup> USFDA에서 작성한 잠재적으로 위험한 성분 (hazardous or potentially hazardous constituents, HPHC)에는 담배와 담배연기성분이 포함되고, 이 담배 연기 성분에 히드라진 (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)이 포함된다. 이러한 히드라진은 IARC에서 Group 2B 발암물질로 분류되어 관리가 필요하다.<sup>57,58</sup> 히드라진의 기존 분석법으로는 잠재 염료 유도체의 선택적 변환을 유발하여 신호 형광체를 생성하여 분석하는 것이 보고되었다.<sup>59</sup> 다른 분석법으로는 resorufin acetate 유도체와 dichlorofluorescein의 선택적 가수분해를 이용한 새로운 이중 신호 탐침이 있으며, 히드라진 분해는 dichlorofluorescein과 resorufin의 fluorochrome의 페놀 잔기를 재생시키고, 과산화수소나 과불산수소를 시각화하기 위해 고안된 탐침과 동일하게 이중 신호가 실현되었다고 보고하였다.<sup>60,61</sup> 히드라진의 최신 분석법으로는 뛰어난 감도 및 특이성, 검출감도를 확보하기 위해 GC-MS를 활용한 분석법이 주로 보고되고 있다.<sup>56,62,63</sup> HPLC-diode array detector (DAD)와 GC-FID의 경우 낮은 ppm 수준에서 히드라진을 분석하기에는 선택성

과 검출 감도가 떨어져서 부적절하다고 판단되기 때문이다.<sup>56</sup> 또한, 분석 시 매트릭스 내의 분석 방해 요인을 줄일 수 있는 head-space GC를 활용한 분석법도 제시되었다.<sup>64</sup>

#### 3.1.10. Methyl chloride

대기 중 메틸브로민화물( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) 및 염화메틸( $\text{CH}_3\text{Cl}$ )은 성층권 오존 파괴를 촉매 하는 것으로 알려져 있는데<sup>65</sup> 이들 물질은 주로 자연 발생원에서 유래하며, 극히 일부만이 인위적으로 발생한다. 염화메틸 분석을 위한 시료 전처리법으로는 purge & trap 기법과<sup>66</sup> HS-SPME 방법이 보고되었다. 식물과 토양에서 염화메틸의 배출량을 정량화하기 위해 적용된 HS-SPME는 간단하고, 빠르고, 민감하며, 경제적이고, 비파괴적이라는 장점이 있다. 제시된 SPME법 중 폴리디메틸 실록산 및 카르복센(PDMS/CAR)과 같은 혼합 SPME 코팅의 민감도는 휘발성 유기 화합물 추출에 있어 단일 코팅 SPME인 PDMS보다 훨씬 높은 것으로 보고되었다. 이는 PDMS 코팅보다 더 많은 양의 휘발성 유기 화합물을 추출할 수 있으며, 특히 짧은 시료 과정 및 비평형 조건일 경우에 유리하다고 볼 수 있다.<sup>67</sup> 이러한 전처리법을 적용한 시료는 휘발성 성분인 염화메틸의 분석을 위해 GC-ECD 로 분석하여 할로겐 원소 분석에서 높은 재현성과 정밀도, 낮은 검출 한도를 확보하였다고 보고하였다.<sup>5,66,67</sup>

### 3.2. 역치 작용기전이 있는 불순물의 PDE 계산법

#### 3.2.1. Aniline 및 aniline HCl

아닐린과 아닐린 염산염을 비롯한 유도체 중 일부는 높은 독성과 발암 가능성이 있는 물질이지만 많은 산업현장에서 염료 생산, 의약품 제조 등과 같이 다양한 목적으로 생산되고 있다. 또한, 아닐린이 불순물로서 포함될 수 있는 카프로락탐은 자동차, 전자 및 인공 섬유 산업에서도 광범위하게 응용되고 있다.<sup>63</sup> 따라서, 카프로락탐의 특정 미량 수준 오염은 중합 및 생산된 섬유의 특성에 직접적인 영향을 미치기도 하며 높은 독성 및 발암성으로 정밀한 분석법 개발의 중요성이 대두되고 있다.<sup>68</sup> 아닐린을 분석하기 위한 최신 분석법으로 다양한 시스템의 수소 결합을 연구하는데 광범위하게 활용되고 있는 Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)을 적용한 방법이 보고되었다. FT-IR 분석법 적용 시 시료 전처리의 경우 시료를 유기용매와 혼합한 후 가압 프레스로 압축하여 디스크를 만들어 분석에 적용하는 방법이 보고되었다.<sup>69</sup>

이외에 아닐린 불순물을 분석하기 위해 GC, HPLC 등 다양한 분석 기기를 활용한 분석법이 제시되었다. 그중 SPME-GC-MS를 적용한 분석법은 카프로락탐 매트릭스의 간섭 가능성을 줄이거나 피할 수 있기 때문에 낮은 수준의 불순물이어도 검출될 수 있다는 장점이 있다고 보고되었다.<sup>63</sup> 또 다른 분석법으로 착색제 D&C RED 17에 불순물로 존재하는 아닐린을 ultra-HPLC-photodiode array detector (UHPLC-PDA)를 적용하여 정량 분석하는 방법이 제시되었다. UPLC-PDA를 적용한 방법은 이전에 사용되던 gravity-elution column chromatography-spectrophotometry 보다 구현이 더 간단하고, 빠르며, 감도 높은 결과를 얻을 수 있다고 보고하였다.<sup>70</sup>

### 3.3. 환경 내 노출을 고려한 허용가능 한계

#### 3.3.1. Hydrogen peroxide

과산화수소는 의약품 제조 과정에서 부형제로 사용되는 물질로, 정상적인 조건에서도 제약 성분의 산화 및 분해할 수 있는 화학적 반응성 시약이다. 따라서, 약물의 화학적 안정성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 첨가제의 잔류 과산화수소를 측정하는 것은 제형의 개발과 제품의 품질 관리적 측면에서 중요하다.<sup>71</sup> 다양한 식품을 비롯하여 의약품에서도 검출될 수 있는 과산화수소를 분석하기 위한 시료 전처리법으로는 주로 시료를 물이나 용매에 녹인 후, 여과 과정을 거쳐 분석에 적용하는 방법이 보고된다. 과산화수소의 최신 분석 경향으로는 의약품에서 미량으로 존재하는 발암성 과산화수소 불순물을 빠르고, 민감하고, 선택적으로 검출할 수 있는 방법인 HPLC 분석법이 사용되는 추세이다.<sup>72</sup> 더 나아가, LC-dual channel ECD, LC-coulometric ECD를 활용한 분석법도 보고되었는데 이는 기존의 HPLC 방법에서 더 나아가 이동상의 간섭에서 과산화수소의 분리를 개선하는 장점을 갖고 있어 부형제로 사용 후 잔류하는 낮은 수준의 과산화수소 정량에 매우 빠르고 정확하고 편리하다고 보고되었다.<sup>5,71,73,74</sup>

### 3.4. 기타분류군

#### 3.4.1. *p*-Chloroaniline 및 *p*-chloroaniline HCl

염화아닐린 (*p*-chloroaniline)은 반복적 노출 시 청색증과 methemoglobin 혈증을 유발하고, 비장 섬유증, 세포 증식증에 부차적인 종양 형성의 간접적 메커니즘을 유발하는 발암성 작용 기전을 가진 것으로 알려졌다.<sup>75-77</sup> 염화아닐린은 세척제, 소독제, 연고 등 다양

한 약물에서 발견되며, 피부 소독을 위해 사용되는 국소 살균소독제인 chlorhexidine의 분해 산물로 알려져 있다.<sup>78</sup> 염화아닐린을 분석하기 위한 HPLC-UV 방법은 USP 29에 수록되기도 했으며, 이 방법은 pH에 예민한 방법으로 pH를 3.0으로 맞춘 인산 완충 용액을 사용하는 방법이 제시되었다.<sup>79,80</sup> 이 외에, 염화아닐린과 그 유도체를 분리, 분석하기 위한 목적으로 추출한 침전물을 구성 요소 별로 분리하기 위해 시료에서 침전물을 형성하여 GC-MS를 활용한 분석법이 보고되었다.<sup>81</sup>

### 3.4.2. Dimethyl sulfate

디메틸 황산(dimethyl sulfate; DMS)는 의약품 유기 합성에 일반적으로 사용되는 알킬화 시약 중 하나이다. DMS의 인체 발암성은 아직 임상 또는 역학적 증거가 충분하지 않지만 인체에 대한 잠재적 발암 물질로 분류된다.<sup>82</sup> 따라서 의약품 내에 불순물로 존재 가능한 DMS의 분석법이 필요하며, 최근에는 주로 GC-MS를 활용한 분석법이 제시되고 있다.<sup>83</sup> 먼저 의약품 활성 원료(active pharmaceutical ingredient; API) 제조에서 API 중간체가 수용성인 경우 매트릭스 효과를 피하기 위해 LLE를 통한 시료의 전처리를 실시한다. 시료에 추출 용액을 첨가하고 원심분리한 후 유기층을 GC-MS로 분석한다고 보고되었다.<sup>82</sup> 반대로 API 중간체가 지용성 화합물인 경우 DMS를 유도체화하여 분석을 실시한다. 유도체화 시약으로 부탄올(*n*-butanol)을 이용해 농업 살균제로 사용되는 hexaconazole에서 headspace 용 바이알에 잔류 DMS를 부탄올을 사용하여 알킬화하여 HS-GC-MS로 DMS를 분석을 실시하였다.<sup>84</sup> 이러한 API 공정 과정에서 분석하는 방법 외에도 완제품에서 DMS를 분석하는 방법으로  $\alpha$ -sulfonated methyl ester ( $\alpha$ -SME)에서 hex산을 사용해 DMS를 추출한 뒤 GC-MS로 분석을 실시하여 잠재적 불순물인 DMS를 분석하는 방법이 제시되었다.<sup>83</sup>

### 3.4.3. Hydroxylamine

히드록실아민(hydroxylamine)은 인간, 동물, 식물에서 독성을 나타낼 가능성이 있고, 퓨린 염기에서 피리미딘 염기로의 전이를 유발하므로 제약 공정에서 ppm 수준 제어가 필요한 유전 독성 불순물이다.<sup>85-87</sup> 또한, hydroxylamine의 경우 발색단 부재, 저분자량, 탄소 원자 부재, 높은 극성과 같은 물리화학적 특성으로 인해 열적으로 불안정하고 원래의 형태로 쉽게 측정되지 않는 특징이 있다.<sup>87</sup> 따라서, hydroxylamine의

최신 분석 경향은 샘플의 전처리법에 따라 GC-MS, HPLC-UV, LC-MS 로 다양하게 나뉜다. 의약품 샘플의 전처리로 산화제를 사용하여 hydroxylamine을 NO<sub>2</sub>로 전환하여 측정하는 경우, 반응이 높은 온도에서 수행되어 기체 생성물을 발생시키므로 GC를 이용하여 분석을 한다고 보고되었다.<sup>85</sup> 의약품 시료의 전처리 시 API의 분해를 막기 위해 침전을 시켜 상층액만을 분리한 후 유도체화를 실시하는 경우 HPLC-UV를 적용한 분석이 실시되었다.<sup>86</sup> 시료 전처리 시 유도체화, 산화제 등을 사용하지 않는 경우 hydroxylamine의 비발색성 화합물 특성으로 직접적인 UV 기반 검출이 어렵고 탄소 원자가 없어 FID의 적용도 어렵기 때문에 LC-MS를 적용한 분석을 실시한다고 보고되었다.<sup>87</sup>

## 3.5. 추가 관리대상 불순물

### 3.5.1. Acetaldehyde

아세트알데히드(acetaldehyde; ACD)는 돌연변이를 유발하는 유전독성 발암물질이다. Angiotensin receptor blocker인 candesartan cilexetil (CC)를 합성할 때 1-chloroethylcyclohexyl carbonate를 이용한 에스테르화 단계에서 ACD가 불순물로 생성될 수 있다. ACD의 경우 저분자량, 비발색단 물질로 적절한 시료 전처리를 하지 않을 경우 분석에 어려움이 따르므로, 유도체화 시료 전처리법을 적용한 분석법이 제시되었다. 산성 조건 하에 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 유도체화 시약이 ACD의 카보닐기와 유도체화 반응하여 HPLC-UV 정량 분석하는 방법과<sup>88</sup> *O*-2,3,4,5,6-(pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride (PFBHA) 시약을 적용한 유도체화 과정 후 static headspace (SHS)-GC-MS를 적용한 분석법이 보고되었다.<sup>89</sup>

### 3.5.2. Vinyl acetate

초산 비닐(vinyl acetate; VA)는 IARC에서 Group 2B 발암 물질로 분류된다. VA는 폴리 초산 비닐(poly vinyl acetate), 폴리 비닐 알코올(poly vinyl alcohol), 또는 에틸렌 비닐 아세테이트(ethylene-vinyl acetate) 등과 같은 수지의 산업적 생산에 사용되는 물질로<sup>90</sup> 불순물로 존재할 가능성이 있으므로 적절한 분석법의 개발이 필요하다. VA를 분석하기 위한 시료 전처리법으로 튜브에 VA를 흡착하는 방법과<sup>91,92</sup> 담배 연기에서 VA를 측정하기 위해 담배 연기를 포집하여 용매에 용해하여 분석하는 방법이 제시되었다.<sup>90</sup> VA를 활성탄 튜브에 흡착 후 이황화탄소로 탈착 시켜 GC-FID로 분석한 방법의 VA 검출 한계는 100 ng/mL,<sup>91</sup>

담배 연기를 포집 후 용매에 녹여 분석하는 방법의 경우 selected ion monitoring (SIM) 모드의 GC-MS를 통해 분석하여 VA 검출 한계는 20 ng/mL로 나타난 것으로 보고되었다.<sup>90</sup>

### 3.5.3. Ethyl bromide

Divalproex sodium (DPS)은 간질성 대발작과 복합성 부분 발작의 치료에 사용되는 항경련제이다.<sup>93</sup> DPS 합성 과정 중 사용되는 원료 의약품인 *n*-propyl bromide에 의해 잠재적 불순물로 ethyl bromide가 생성될 수 있다. Ethyl bromide는 *in vivo*에서 알킬화제로 작용하여 유전 독성을 유발하는 물질로 작용하기 때문에 적합한 관리가 필요하다.<sup>94</sup> DPS와 같이 약물 내의 ethyl bromide 분석에는 회석법을 이용해 전처리를 적용하고,<sup>95</sup> 곡류와 견과류 내에 포함된 ethyl bromide 분석에는 매트릭스 간섭을 최소화하기 위하여 HS-SPME 전처리법을 적용하였다.<sup>5</sup> 적절한 전처리과정을 거친 샘플은 alkyl halide에 대해 우수한 선택성과 감도를 가진 GC-MS법을 주로 활용하여 분석하는 것으로 보고되었다.<sup>5,95</sup>

### 3.5.4. Isopropyl chloride

Isopropyl chloride는 혈관 신생을 저해하고 암세포의 성장을 저해하는 tyrosine kinase inhibitor 계열 항암제 중 하나인 pazopanib의<sup>96</sup> 합성 과정에서 생성되는 것으로 예측되는 유전독성 불순물 중 하나이다. Pazopanib의 API 합성 마지막 경로에서 사용되는 2-propanol HCl에 의해 최종적으로 합성된 pazopanib에서 isopropyl chloride의 발생 가능성이 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>97</sup> 의약품 내 존재하는 미량의 isopropyl chloride를 분석하기 위해서는 메탄올과 DMSO를 혼합한 회석 용액을 이용해 시료를 회석하는 전처리법을 적용한 후, 비교적 분자량이 낮고 휘발성이 높은 isopropyl chloride을 GC-FID를 적용하는 분석법이 제시되었다.<sup>52</sup>

### 3.5.5. 2-Bromoethanol

Miglitol은 당뇨병 치료제 중 하나로 소장에서 oligosaccharide와 polysaccharides로부터 포도당을 생성하는  $\alpha$ -glucosidase를 저해하여 인체 내 당 수치를 조절한다.<sup>98</sup> Miglitol의 합성 과정에서 잠재적 불순물로 haloalkyl alcohol 계열의 2-bromoethanol 또는 2-chloroethanol, 2-iodoethanol 등이 발생할 수 있다.<sup>99</sup> 이렇게 의약품 내에서 발생한 2-bromoethanol을 분석

하는 방법에는 다양한 방법이 있으나, 최근 연구 동향에 따르면 한 번의 분석만으로 haloalkyl alcohol 계열 불순물을 동시에 분석할 수 있는 고속 GC-MS법이 보고되었다. 이보다 이전에 제시되었던 2D-GC-FID 분석법의<sup>100</sup> 경우 시료 전처리로 유도체화 과정이 필요하지만 고속 GC-MS에 적용되는 샘플 전처리법의 경우 이보다 간단한 dichloromethane 회석액을 이용한 추출법이 제시되었다.<sup>101</sup>

### 3.5.6. Ethyl methanesulfonate (EMS)

EMS와 Methyl methanesulfonate (MMS)는 동물에게 돌연변이를 유발할 뿐만 아니라 발암성을 유발하는 DNA 알킬화제로 알려져 있다.<sup>102</sup> EMS와 MMS는 의약품 합성 과정에서 반대이온으로 주로 사용되는 methanesulfonic acid (MSA)와 제조 과정에서 용매로 사용된 메탄올 또는 에탄올 간의 반응 부산물로 생성된다.<sup>103</sup> 의약품에 존재하는 EMS를 분석하기 위해 주로 실행되는 시료 전처리과정은 유기용매를 이용하여 의약품 내 EMS를 용해시키는 방법이 제시되었다.<sup>104-106</sup> 준비된 시료는 빠른 분석능과 높은 감도를 가진 GC-FID<sup>104</sup> 또는 GC-MS 적용하여 실시하는 것으로 보고되었다.<sup>105</sup>

## 3.6. Azide/Azido 계열 불순물

### 3.6.1. Azide

에어백의 구성성분 중 하나인 sodium azide는 아지드(azide) 계열의 물질 중 하나로 제초제 등의 농업 분야와 고무, 라텍스 등 산업 분야에도 사용되는 물질이다. 무취의 백색 분말인 sodium azide는 물이나 산과 반응 혹은 고체 금속과 접촉 시 반응하여 유독 가스(hydrazoic acid)를 생성한다.<sup>107-109</sup> 또한, azide는 활성 의약품 성분(API)인 sartan 계열 약물의(irbesartan, candesartan, valsartan) 합성 전구 물질로 사용되는데 인체에서 cytochrome *c* oxidase 억제로 독성 효과를 일으키기에 의약품 내 잔류량 관리가 필요하다.<sup>108,109</sup> Azide를 분석하기 위한 전처리법으로는 sartan 계열 약물을 0.1 M NaOH 용액에 녹이고 pH를 4.5로 조절하여 침전물을 PVDF로 여과하여 상층액을 분석하는 방법과<sup>108</sup> sartan 계열 약품을 분쇄하여 400  $\mu$ L의 물과 10  $\mu$ L의 프로피온산 무수물(propionic anhydride)을 첨가하여 준비하는 방식이 보고되었다.<sup>109</sup> 의약품에 존재하는 azide를 분석하기 위해 최근 제시된 분석법으로는 HPLC-UV를 활용한 분석법과<sup>108</sup> HS-GC-FID/FID로 분석하는 방법이 있다. HS-GC-FID/FID 분석법

Table 4. 대표적인 변이원성 불순물 분석법 개발 동향

Analytes	sample	Sample preparation	Chromatography	Column	Mobile phase (flow rate)	Detector (analyzer)	Detection limits (ng/mL)	Ref.
	Male wistar rat blood	Centrifugation	HS-GC	HP-PLLOT Q (30 m × 0.53 mm, 40 μm)	Helium (5 ml/min)	Nitrogen-phosphorus	0.8	[30]
Acrylonitrile	Plastic container used in food processing or storage	Dissolution in 2.5 ml N,N-diethylacetamide	HS-GC	DB-35MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	Helium (0.7 ml/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	-	[31]
	Sea water	Extraction with dichloromethane and dilution with hexane	GC	HP/BP-20 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	Helium (1.5 ml/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	0.08	[32]
	Drug substance	HS-SPME (50/30 μm Carboxen/PDMS/DVB)	GC	Rtx-5 Amine (30 m × 0.53 mm, 3.0 μm)	Helium (35 cm/s)	Flame ionization	0.3	[33]
Benzyl chloride	Drug substance	Dilution with 1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethyl)sulfonylimide	HS-GC	VF-624ms (30 m × 0.53 mm, 3.0 μm)	Helium (1 ml/min)	Electron capture	2.5	[115]
	Air in child care room	Collected in tube (CDS 20:35 mesh Tenax-TA/Carboxen)	GC	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 1 μm)	Helium (1 ml/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	1	[116]
Bis(chloromethyl)ether	Air	Collected in tube (packed with Tenax TA (200 mg) or Tenax GR (400 mg)) and derivatization to bis(p-fluorophenoxy)methyl ether (BFPME) using p-fluorophenolate	GC	HP-5 (30 m × 0.25 mm, 1 μm)	Helium (35 cm/s)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	0.01	[40]
1-Chloro-4-nitrobenzene	Serum, urine	Deproteinization and SPE (polycarboxylic acid exchanger)	HPLC	Luna C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)	A: 0.25 M ammonia solution and 0.25 M acetic acid (pH 8.7) (60:40, v/v) and acetonitrile (70:30, v/v) B: 0.25 M acetic acid and acetonitrile (pH 4.4) (20:80, v/v) (1 mL/min)	Photodiode array	190	[43]
p-Cresidine	Paprika	Centrifugation	GC	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	Helium (3.4 ml/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	27.85	[45]
	Wastewater, tap water	DLLME (methanol+chloroform) and centrifugation	GC	HP-5 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	Helium (1.8 ml/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	0.19	[49]
Dimethyl carbamoyl chloride	Vilsmeier Reaction mixture	Heating and extraction with dichloromethane	GC	DB-1701 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	Helium (1 ml/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	200	[50]

Table 4. Continued

Analytes	sample	Sample preparation	Chromatography	Column	Mobile phase (flow rate)	Detector (analyzer)	Detection limits (ng/mL)	Ref.
Ethyl chloride	Ziprasidone Hydrochloride (anti-psychoic drug)	Extraction with dimethylsulfoxide	GC	DB-624 (60 m × 0.53 mm, 3 µm)	Helium	Flame ionization	790	[52]
Glycidol	Edible oil	SPE * hexane phase (Sep-Pak Plus SI cartridge) * acetonitrile phase (Sep-Pak Plus C18 cartridge)	LC	BEH-C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)	A: water and MeOH (85:15, v/v) B: MeOH and water (97.5:2.5, v/v)	Mass spectrometer (time of flight)	0.07	[122]
Hydrazine	Imatinib Mesylate	Centrifugation and chemical derivatization	GC	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helium	Mass spectrometer (triple quadrupole)	0.11	[56]
	Drug substances	Chemical derivatization	HS-GC	DB-624 (25 m × 0.2 mm, 1.12 µm)	Helium	Mass spectrometer (triple quadrupole)	-	[64]
Methyl chloride	Sea water	Purge and trap	GC	Rtx-624 (60 m × 0.32 mm, 1.8 µm)	Nitrogen (2.1 mL/min)	Electron capture	2.7 pM	[66]
	Plant and soil	SPME fiber (CAR-PDMS)	HS-GC	CYCLODEX-B (30 m × 0.256 mm, 0.25 µm)	Helium	Mass spectrometer (triple quadrupole)	0.1	[67]
Aniline and Aniline HCl	Caprolactam Color additive D&C Red No. 17	SPME fiber (Carbowax-divinylbenzene) Add tetrahydrofuran	GC UPLC	HP-INNOWAX (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) BEH-C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)	Helium (1 mL/min) A: 0.2 M ammonium acetate in water B: ACN	Mass spectrometer (triple quadrupole) Photodiode array	- 98000	[63] [70]
Hydrogen peroxide	Commercial milk	LLE (acetonitrile)	HPLC	Thermo Acclaim 120-C8 (150 mm × 2.1 mm, 3 µm)	A: water B: ACN	Photodiode array	280 µg/L	[73]
p-Chloroaniline and p-Chloroaniline HCl	Mixture of 6.0% NaOCl and 2.0% chlorhexidine Toothpaste, mouthwash, wound cleanser, skin and hand disinfectants	Dissolution in mobile phase and centrifugation Dilution with mobile phase and centrifugation	LC HPLC	BEH-C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm) XBridge-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm)	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buffer (pH 8.0) (1 mL/min) Acetonitrile and pH 3.0 phosphate buffer (32:68, v/v)	Dual channel electrochemical Photodiode array	1-10 50	[71] [124]
Dimethyl sulfate	Aqueous soluble API intermediate $\alpha$ -sulfonated methyl ester Hexaconazole technical (fungicide)	Precipitation Centrifugation Hexane extraction and filtration Chemical derivatization	GC GC GC HS-GC	ZB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) DB-624 (30 m × 0.32 mm, 1.8 µm) MS-HP5 (30 m × 0.32 mm, 0.25 µm) DB-624 (30 m × 1.4 mm, 0.25 µm)	Helium (1 mL/min) Helium (1.5 mL/min) Helium (1 mL/min) Helium (1.5 mL/min)	Mass spectrometer (time of flight) Mass spectrometer (triple quadrupole) Mass spectrometer (triple quadrupole) Mass spectrometer (triple quadrupole) Mass spectrometer (triple quadrupole)	- 300 800 24	[81] [82] [83] [84]

Table 4. Continued

Analytes	sample	Sample preparation	Chromatography	Column	Mobile phase (flow rate)	Detector (analyzer)	Detection limits (ng/mL)	Ref.
Hydroxylamine	API sample	Syringe filtration	HS-GC	capillary GS-Q (30 m × 0.32 mm, 5 μm)	Helium (MSD : 1.2 mL/min TCD : 3 mL/min ECD : 3 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole), thermal-conductivity, electron-capture	MSD : 14 TCD : 1.5 ECD : 1.4	[85]
	API (Vorinostat, Zileuton)	Chemical derivatization (FMOC-Cl)	HPLC	Phenomenex Curosil PFP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	methanol and 0.5% formic acid (pH 3.0) (85:15, v/v)	Photodiode array	-	[86]
	Droxidopa, PEL1	Sonication	LC	Hypercarb (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)	A: 0.1 % formic acid B: acetonitrile	Mass spectrometer (triple quadrupole)	8	[87]
Acetaldehyde	Candesartan cilexetil	Filtration	HPLC	Inertsil ODS 3V (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)	water and acetonitrile (40:60, v/v) (1 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	200	[88]
	Excipients (lactose, mannitol, microcrystalline cellulose, poloxamer, etc.)	Chemical derivatization (PFBHA)	SHS-GC	MSD: Rtx-5MS (30 m × 0.32 mm, 1 μm) FID: Rtx-1701 (60 m × 0.53 mm, 1 μm)	Helium (2 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole), flame ionization	1	[89]
Vinyl acetate	Cigarette mainstream smoke	Collected in glass bottle	GC	SGE BP 624 (0.32 mm, 1.8 μm)	Helium (2.6 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	20	[90]
	Air	Collected in tube	GC	Column A: stainless steel column (3 m × 6 mm) (10% free fatty acid phase on chromosorb-P) Column B: stainless steel column (3 m × 6 mm) (0.4% Carbowax-1500 on a Carbowax A )	Argon (60 mL/min)	Flame ionization	100	[91]
Ethyl bromide	Divalproex Sodium drug substance	add water	HS-GC	DB-1 (30 m × 0.32 mm, 3 μm)	Helium (1.2 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	2.5	[130]
	Grain, Oilseeds, Nuts, dry fruits	SPME (DVB/CAR/PDMS fiber)	HS-SPME- GC	PorapLOT Q (50 m × 0.32 mm, 10 μm)	Helium	Mass spectrometer (triple quadrupole)	0.03	[131]
2-Bromoethanol	Ziprasidone hydrochloride	Headspace	GC	DB-624 (60 m × 0.53 mm, 3 μm)	Helium	Flame ionization	930	[52]
	API (Carbamazepine)	Chemical derivatization (BSTFA)	Two-dimen- sional capil- lary GCv	Primary column: HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) Second column: DB-17MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	Helium (1 mL/min)	Flame ionization	100	[100]
Miglitol drug substance	Sonication and filtration	Fast GC	DB-1 (15 m × 0.25 mm, 1 μm)	Helium (1 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	700	[101]	



Table 4. Continued

Analytes	sample	Sample preparation	Chromatography	Column	Mobile phase (flow rate)	Detector (analyzer)	Detection limits (ng/mL)	Ref.
Ethyl methanesulfonate	Pharmaceutical drug substance	Dilution with (acetonitrile, ethyl acetate, methylene chloride, 1,2-dichloro-methane, and toluene)	GC	DB-WAX (30 m × 0.53 mm, 1 µm)	Helium (5 mL/min)	Flame ionization	1000	[104]
	Imatinib mesylate	add n-hexane	GC	DB-1 (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm)	Helium (3 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	300	[105]
Azide	Sartans (irbesartan, candesartan, valsartan)	Dissolution in 0.1 M NaOH and filtration	HPLC	Synergi Hydro RP (250 mm × 4.6 mm, 4 µm)	A: 0.5 g/L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in water B: acetonitrile	Photodiode array	0.17 g/g	[108]
	Candesartan, losartan, irbesartan, olmesartan medoxomil, and valsartan	Dissolution in water	HS-GC	Zebtron ZB-BAC1 (30 m × 0.32 mm, 1.8 µm) Zebtron ZB-BAC2 (30 m × 0.32 mm, 1.2 µm)	Helium (1 mL/min)	Flame ionization	1.9	[109]
	Zidovudine(1-(3-azido-2,3-dideoxy-β-D-ribofuranosyl)-5-methylpyrimidine-2,4(1H,3H)-dione), lamivudine, nevirapine tablet	Sonication and filtration	HPLC	YMC-Pack ODS-AQ (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	A: ammonium acetate in water (pH 4.2) B: methanol (0.8 mL/min)	Photodiode array	-	[112]
Azido	Sartan drug (irbesartan, valsartan, losartan)	Centrifugation and filtration	LC	Phenomenex Kinetex F5 (100 mm × 3.0 mm, 2.6 µm)	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in methanol (0.4 mL/min)	Mass spectrometer (triple quadrupole)	LOQ: 0.5	[113]

은 propionitrile을 내부표준물질로 사용하여 sartan 의 약품에 함유된 azide 이온과 propionic anhydride 사이에 ethyl isocyanate 형성을 유도하여 수성의 azide의 정량분석을 하였다고 보고하였다.<sup>109</sup>

### 3.6.2. Azido

아지도(azido) 화합물은 유전적인 돌연변이를 일으키는 성질인 변이원성을 갖는 것으로 알려져 있다. 최근 irbesartan, losartan, valsartan 등의 sartan 계열의 고혈압 치료제에서 AZBT(5-(4'-(azidomethyl)-[1,1'-biphenyl]-2yl)-1H-tetrazole) 불순물이 검출되어 논란이 되었으며, 이 불순물은 원료의약품의 합성과정에서 Br-OTBN(4'-Bromomethyl-2-cyano-biphenyl)과 sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )가 반응하여 발생하는 것으로 추정되고 있다.<sup>110</sup> 또한, 복제약 항균제는 승인 기준에 따라 불순물 분석이 요구되지 않는데 piperacillin/tazobactam 복제약에 대한 불순물을 조사했을 때 돌연변이 유발 물질인 azido 화합물이 검출되기도 하였다. 의약품 분석 시 샘플 전처리법은 azido 화합물을 분석할 때 주로 실시하는 시료를 메탄올이나 물과 같은 용매에 녹여 원심 분리하여 상층액을 필터로 여과하는 방법을 사용하였다고 보고하였다.<sup>111</sup> 이후, 적절한 시료 전처리 과정을 거친 시료에서 azido 화합물의 분석에는 주로 LC-MS나 HPLC-UV와 같은 LC를 적용한 분석법이 주로 보고되었다.<sup>112,113</sup>

## 4. 결론 및 전망

화학 합성 기반의 의약품은 반응 시약과 용매, 촉매 등과 같은 다양한 화학물질의 합성 반응을 통해 제조되므로 복잡한 화학 합성 경로에 따른 합성 반응에 의해서 중간체, 부산물 혹은 분해 산물로서 만들어진 불순물이 잠재적으로 존재하기도 하며 보관 및 유통 과정에 따라 변질되어 형성된 불순물 또한 혼재되어 있을 수 있다. 이러한 불순물 중에서도 DNA와 반응하여 변이원성(발암성)을 나타내는 고위험성 불순물들은 의약품 복용에 따라 체내에 흡수될 경우 인체에 심각한 위해를 끼칠 우려가 있다. 따라서 국제의약품 규제조사위원회(ICH)에서는 의약품 중 변이원성 불순물을 평가하고 관리할 수 있는 가이드라인을 제공하고 있다. 하지만 이 가이드라인에서는 불순물의 분류 방안, 섭취허용량, 관리방안 등에 대해서 포괄적인 설명으로 다루고 있어 실제적인 원료의약품 및 완제의약품 내에 존재하는 잠재적 변이원성 불순물을 분석

하여 관리 감독하는데 어려움을 겪고 있는 실정이다.

따라서 본 논문에서는 국제의약품규제조사위원회에서 제시한 가이드라인의 내용을 재정리하여 알기 쉽도록 기술하는 한편 제안된 잠재적 불순물들을 중심으로 의약품 혹은 의약품 외의 시료에서 분석한 연구 결과들을 사례로서 조사하여 정리하였다. 식의약품 뿐만 아니라 각종 산업 현장에서 발생되어 관련 종사자나 일상 생활 중에서도 노출 가능한 각종 변이원성 물질들은 시료 중에서 직접 분석을 수행하거나 회석 용매를 이용한 추출 방법부터 휘발성 불순물 분석을 위한 headspace 기법과 SPME, 그 외에도 분산 용매를 이용하여 추출 효율을 높인 DLLME 등과 같은 각종 시료추출기법이 사용되었으며 검출 감도와 재현성, 정밀도를 높이기 위한 각종 유도체화기법 또한 활용되고 있다. 시료 내의 각종 변이원성 불순물을 분석하기 위해서 NMR과 FT-IR, 전기화학적 센서기법에서부터 크로마토그래피 기법을 중심으로 UVD, FID, ECD, NPD 및 MS와 같은 고감도의 장비를 활용한 분석법들이 다양하게 개발되어 있다. 보고된 분석법 중 일부 불순물들에 대한 경우 아직 의약품 시료에 대한 분석법 개발 사례가 드물어 식품이나 환경, 생체 시료로부터 분석을 수행한 연구 사례들까지 종합적으로 조사하여 기술하였다. 하지만 동일 분석대상성분에 대한 분석법 개발 사례는 이를 통해 의약품 중에서 잠재적인 변이원성 불순물들에 대한 분석법을 개발하고자 하는 관리감독기관을 비롯하여 제약산업계와 기타 유관기관에서 종사하는 연구자들에게 조금이나마 도움을 줄 수 있으리라고 판단하였다.

현재에도 *in silico* 기반의 잠재적 불순물을 관리할 수 있는 방안이 소개되어 있긴 하지만 알려져 있지 않은 발생 경로를 통해 원료의약품이나 완제의약품 중에 혼재될 가능성이 있는 미지의 변이원성 불순물들은 계속하여 잠재적 위해요소로서 남아있을 것이다. 또한 향후에는 관리 감독해야 하는 불순물의 종류와 숫자가 지속적으로 증가할 것으로 예측되며 이를 위해서는 잠재적 불순물의 관리 감독을 위한 각종 분석 기법의 개발 요구가 증가할 것이다. 이에 따라 다양한 종류의 잠재적 불순물을 동시에 분석하기 위해 크로마토그래피와 같은 분리 기법과 연계된 고감도의 검출 기법을 이용한 분석법이 지속적으로 활용되어 이들을 관리 감독하고자 하는 각종 기관의 요구를 충족 시키는데 일조할 수 있을 것이라고 생각된다. 이와 더불어 대량 시료의 처리가 가능한 각종 시료 전처리 기법은 고감도, 고분해능의 분석 기기에 대한 필요성

과 마찬가지로 수많은 원료의약품과 완제의약품 관리 감독을 위해 필수적이므로 지속적인 개발 노력이 기울여질 것이다. 앞으로도 잠재적인 변이원성 불순물에 대한 분석법 개발 노력은 원료의약품과 완제의약품을 안전하게 사용할 수 있도록 다양한 방법론을 활용하여 지속적으로 시도될 것이고 이러한 노력을 통해 멀지 않은 미래에는 의약품 내에 존재할 우려가 있는 미지의 각종 변이원성 불순물에 대한 선제적 관리가 가능하게 될 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전평가원의 연구개발비 (20173의약안162)에 의해 일부 지원받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. J. P. Bercu, S. M. Galloway, P. Parris, A. Teasdale, M. Masuda-Herrera, K. Dobo, P. Heard, M. Kenyon, J. Nicolette, E. Vock, W. Ku, J. Harvey, A. White, S. Glowienke, E. A. Martin, L. Custer, R. A. Jolly and V. Thybaud, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **94**, 172-182 (2018).
2. M. Maithani, R. Raturi, V. Gupta and P. Bansal, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **40**(15), (2017).
3. N. Kumar and A. Jha, *Saudi Pharm. J.*, **25**, 176-183 (2017).
4. B. Leblanc, C. Charuel, W. Ku and R. Ogilvie, *Int. J. Pharm. Med.*, **18**(4), 215-220 (2004).
5. D. Q. Liu, M. Sun and A. S. Kord, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 999-1014 (2010).
6. M. Shelke, S. S. Deshpande and S. Sharma, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **50**(3), 226-253 (2020).
7. L. Muller, R. J. Mauthe, C. M. Riley, M. M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. De George, A. G. M. De Knaep, D. Ellison, J. A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C. D. N. Humfrey, A. S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D. K. Ness, M. R. O'Donovan, M. D. Smith, G. Vudathala and L. Yotti, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **44**, 198-211 (2006).
8. D. Jacobson-Kram and T. McGovern, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 38-42 (2007).
9. A. Teasdale and D. P. Elder, *Trends Anal. Chem.*, **101**, 66-84 (2018).
10. ICH, Guidelines M7 Mutagenic impurities, <https://www.ich.org/page/multidisciplinary-guidelines>, Assessed 2 Aug 2021.
11. 식품의약품안전처, 의약품 불순물 유전독성 평가 가이드라인 [민원인 안내서] 2017. 10., [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_1060/view.do?seq=13434&srchFr=&srchTo=&srchWord=%EC%9D%98%EC%95%BD%ED%92%88+%EB%B6%88%EC%88%9C%EB%A0%BC+%EC%9C%A0%EC%A0%84%EB%8F%85%EC%84%B1+%ED%8F%89%EA%B0%80+%EA%B0%80%EC%9D%B4%EB%93%9C%EB%9D%BC%EC%9D%B8&srchTp=0&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&Data\\_stts\\_gubun=C9999&page=1](https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=13434&srchFr=&srchTo=&srchWord=%EC%9D%98%EC%95%BD%ED%92%88+%EB%B6%88%EC%88%9C%EB%A0%BC+%EC%9C%A0%EC%A0%84%EB%8F%85%EC%84%B1+%ED%8F%89%EA%B0%80+%EA%B0%80%EC%9D%B4%EB%93%9C%EB%9D%BC%EC%9D%B8&srchTp=0&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&Data_stts_gubun=C9999&page=1), Assessed 2 Aug 2021.
12. R. S. Gable, *Addiction*, **99**(6), 686-696 (2004).
13. R. Peto, M. C. Pike, L. Bernstein, L. S. Gold and B. N. Ames, *Environ. Health Perspect.*, **58**, 1-8 (1984).
14. European Medicines Agency, ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit_en.pdf), Assessed 2 Aug 2021.
15. European Medicines Agency, Assessment report, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf), Assessed 13 Aug 2021.
16. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Sodium Azide: Systemic Agent, [https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard\\_29750027.html](https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750027.html), Assessed 13 Aug 2021.
17. Health Canada, Multiple lots of irbesartan, losartan and valsartan drugs recalled, <https://healthycanadians.gc.ca/recall-alert-rappel-avis/hc-sc/2021/75715a-eng.php>, Assessed 13 Aug 2021.
18. 식품의약품안전처, [ICH Guideline] M7(R1) 잠재적 발암 위험을 제한하기 위한 의약품 중 DNA 반응성 (변이원성) 불순물의 평가 및 관리, [https://www.nifds.go.kr/brd/m\\_105/view.do?seq=30606&srchFr=&](https://www.nifds.go.kr/brd/m_105/view.do?seq=30606&srchFr=&)

- srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\_seq\_1=0&itm\_seq\_2=0&multi\_itm\_seq=0&company\_cd=&company\_nm=&page=3, Assessed 30 Aug 2021.
19. D. I. Robinson, *Org. Process. Res. Dev.*, **14**(4), 946-959 (2010).
  20. C. W. Felix, *Food Protection Technology*, p29-37, CRC Press, Boca Raton, 1987.
  21. I. C. Munro, A. G. Renwick and B. Danielewska-Nikieł, *Toxicol. Lett.*, **180**, 151-156 (2008).
  22. Y.-J. Kang, M.-S. Kim, M.-T. Lee, S.-H. You, J.-E. Lee, J.-H. Eom and S.-Y. Jung, *J. Pharmacoepidemiol. Risk Manag.*, **13**(1), 10-16 (2021).
  23. S. P. Felter, R. B. Conolly, J. P. Bercu, P. M. Bolger, A. R. Boobis, P. M. J. Bos, P. Carthew, N. G. Doerrer, J. I. Goodman, W. A. Harrouk, D. J. Kirkland, S. S. Lau, G. C. Llewellyn, R. J. Preston, R. Schoeny, A. R. Schnatter, A. Tritscher, F. van Velsen and G. M. Williams, *Crit. Rev. Toxicol.*, **41**(6), 507-544 (2011).
  24. Government of UK, Less than lifetime exposure: principles for consideration of risk, <https://www.gov.uk/government/publications/less-than-lifetime-exposure-principles-for-consideration-of-risk>, Assessed 31 Aug 2021.
  25. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), <https://www.cdc.gov/niosh/npg/default.html>, Accessed 1 Oct 2021.
  26. International Labour Organization, <https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.listCards3>, Accessed 1 Oct 2021.
  27. P. Ellis, M. Kenyon and K. Dobo, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **65**(2), 201-213 (2013).
  28. F. P. Guengerich, L. E. Geiger, L. L. Hogy and P. L. Wright, *Cancer Res.*, **41**, 4925-4933 (1981).
  29. D. L. Vassilaros and T. J. Bzik, *Environ. Sci. Technol.*, **25**(5), 878-883 (1991).
  30. M. Shibata, K. Inoue, Y. Yoshimura, H. Nakazawa and Y. Seto, *Arch. Toxicol.*, **78**, 301-305 (2004).
  31. K. Ventura, A. Eisner and M. Adam, *Cent. Eur. J. Public Health*, **12**, S86-S89 (2004).
  32. K. C. Giiven and T. Gezgin, *Acta Pharm. Sci.*, **47**, 15-20 (2005).
  33. R. P. Frost, M. S. Hussain and A. R. Raghani, *J. Sep. Sci.*, **26**, 1097-1103 (2003).
  34. J. V. Henshaw, *LCGC North America*, **29**(10), 914-924 (2011).
  35. T. Kojima and Y. Tanaka, *Anal. Chem.*, **48**, 1760-1762 (1976).
  36. C. F. Poole, *J. Chromatogr. A*, **1296**, 15-24 (2013).
  37. C. C. Camarasu, M. Mezei-Szuts and G. B. Varga, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**, 623-638 (1998).
  38. C. C. Camarasu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23**, 197-210 (1998).
  39. K. P. Evans, A. Mathias, N. Mellor, R. Silvester and A. E. Williams, *Anal. Chem.*, **47**(6), 821-824 (1975).
  40. J. Unwin and J. A. Groves, *Anal. Chem.*, **68**, 4489-4493 (1996).
  41. O. J. Kingsford, J. Qian, D. Zhang, Y. Yi and G. Zhu, *Anal. Methods*, **10**(45), 5372-5379 (2018).
  42. J. Mitchell Jr and H. D. Deveraux, *Anal. Chim. Acta*, **100**, 45-52 (1978).
  43. H. Below, N. Lehan and A. Kramer, *Microchim. Acta*, **146**, 129-135 (2004).
  44. T. Platzek, C. Lang, G. Grohmann, U-S Gi. and W. Baltes, *Hum. Exp. Toxicol.*, **18**, 552-559 (1999).
  45. P. Otero, S. K. Saha, A. Hussein, J. Barron and P. Murray, *Food Anal. Methods*, **10**(4), 876-884 (2017).
  46. B. Ç. Özkan, M. Firat, D. S. Chormey and S. Bakırdere, *Microchem. J.*, **145**, 84-89 (2019).
  47. M. Adosinda M. Martins, N. Lima, A. J. D. Silvestre and M. J. Queiroz, *Chemosphere*, **52**, 967-973 (2003).
  48. B. W. Manning, C. E. Cerniglia and T. W. Federlei, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(1), 10-15 (1985).
  49. U. Balçık, D. S. Chormey, M. F. Ayyıldız and S. Bakırdere, *Microchem. J.*, **155**, 104712 (2020).
  50. M. Stare, K. Laniewski, A. Westermark, M. Sjögren and W. Tian, *Org. Process. Res. Dev.*, **13**, 857-862 (2009).
  51. Q. Yang, B. P. Haney, A. Vaux, D. A. Riley, L. Heidrich, P. He, P. Mason, A. Tehim, L. E. Fisher, H. Maag and N. G. Anderson, *Org. Process. Res. Dev.*, **13**(4), 786-791 (2009).
  52. T. Kaleemullah, M. Ahmed, H. K. Sharma, K. V. S. N. Raju and M. N. Kumar, *Der Pharma Chem.*, **3**(6), 390-399 (2011).
  53. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol 77, Some Industrial Chemicals, <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Industrial-Chemicals-2000>, Accessed 4 Sep 2021.

54. X. Zheng, W. Fu, K. Zheng, B. Gao, L. Lin, W. Liu, Z. Lin and Q. Fang, *Food Control*, **123**, 107766 (2021).
55. J.-G. Yim, H.-W. Jang and K.-G. Lee, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**(3), 257-262 (2010).
56. E. U. Stolarczyk, K. Eksanow and K. Filip, *Anal. Lett.*, **49**(14), 2337-2346 (2016).
57. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol 71, Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide, <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Re-evaluation-Of-Some-Organic-Chemicals-Hydrazine-And-Hydrogen-Peroxide-Part-1-Part-2-Part-3--1999>, Accessed 28 Sep 2021.
58. Y.-Y. Liu, I. Schmeltz and D. Hoffmann, *Anal. Chem.*, **46**(7), 885-889 (1974).
59. A. A. Ensafi and B. Rezaei, *Talanta*, **47**, 645-649 (1998).
60. A. Louie, *Chem. Rev.*, **110**, 3146-3195 (2010).
61. M. G. Choi, J. O. Moon, J. Bae, J. W. Lee and S.-K. Chang, *Org. Biomol. Chem.*, **11**(18), 2961-2965 (2013).
62. K. McAdam, H. Kimpton, S. Essen, P. Davis, C. Vas, C. Wright, A. Porter and B. Rodu, *Chem. Cent. J.*, **9**(13), (2015).
63. N. Li and J. Zou, *J. Appl. Polym. Sci.*, **100**(4), 3141-3144 (2005).
64. M. Sun, L. Bai and D. Q. Liu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**(2), 529-533 (2009).
65. WMO. Scientific, Assessment of Ozone Depletion: 2006, <https://csl.noaa.gov/assessments/ozone/2006/chapters/contentsprefaceexecutivesummary.pdf>, Accessed 28 Sep 2021.
66. G.-P. Yang, X.-L. Lu, G.-S. Song and X.-M. Wang, *Chinese J. Anal. Chem.*, **38**(5), 719-722 (2010).
67. N. Yassaa, A. Wishkerman, F. Keppler and J. Williams, *Environ. Chem.*, **6**(4), 311-318 (2009).
68. Y.-y. Zhao, Z.-z. Jing, H.-p. Li and H.-s. Zhang, *Microchem. J.*, **69**(3), 213 -217 (2001).
69. X. Meng-Xia and L. Yuan, *Spectrochim. Acta Part A*, **58**, 2817-2826 (2002).
70. H. H. W. Yang and A. Weisz, *J. AOAC Int.*, **101**(6), 1961-1966 (2018).
71. T. Huang, M. E. Garceau and P. Gao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 1203-1210 (2003).
72. A. Gosar, T. Shaikh, S. Botkondle, N. Mahadik and R. Tole. *Int. J. Pharm. Res. Health Sci.*, **7**(5), 3068-3071 (2019).
73. A. S. Ivanova, A. D. Merkuleva, S. V. Andreev and K. A. Sakharov, *Food Chem.*, **283**, 431-436 (2019).
74. H. Yue, X. Bu, M.-H. Huang, J. Young and T. Raglione, *Int. J. Pharm.*, **375**, 33-40 (2009).
75. National Toxicology Program, Toxicology and Carcinogenesis Studies of para-Chloroaniline Hydrochloride in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies), [https://ntp.niehs.nih.gov/publications/reports/tr/300s/tr351/index.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpGolinks&utm\\_term=tr351abs](https://ntp.niehs.nih.gov/publications/reports/tr/300s/tr351/index.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpGolinks&utm_term=tr351abs), Accessed 5 Oct 2021.
76. National Toxicology Program, Bioassay of p-Chloroaniline for possible carcinogenicity, [https://ntp.niehs.nih.gov/publications/reports/tr/100s/tr189/index.html?utm\\_source=direct&utm\\_medium=prod&utm\\_campaign=ntpGolinks&utm\\_term=tr189abs](https://ntp.niehs.nih.gov/publications/reports/tr/100s/tr189/index.html?utm_source=direct&utm_medium=prod&utm_campaign=ntpGolinks&utm_term=tr189abs), Accessed 5 Oct 2021.
77. J. S. Bus and J. A Popp, *Food Chem. Toxicol.*, **25**, 619-626 (1987).
78. G. Szekeley, M. C. A. De Sousa, M. Gil, F. C. Ferreira and W. Heggie, *Chem. Rev.*, **115**(16), 8182-8229 (2015).
79. L. Havlíková, L. Matysova, L. Novakova, R. Hajkova and P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1169-1173 (2007).
80. Z. Y. Yuabova, D. R. Holschlag, S. A. Rodriguez, C. Qin, V. V. Papov, F. Qiu, J. F. McCaffrey and D. L. Norwood, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **31**, 2318-2330 (2008).
81. B. R. Basrani, S. Manek, D. Mathers, E. Fillery and R. N. S. Sodhi, *J. Endod.*, **362**, 312-314 (2010).
82. J. Zheng, W. A. Prittsa, S. Zhanga and S. Wittenberger, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50**(5), 1054-1059 (2009).
83. B. Tay Y. Ping and H. A. Aziz, *J. Surfactants. Deterg.*, **22**(4), 751-756 (2019).
84. N. H. Petha, R. S. Lokhande, D. T. Seshadri and R. M. Patil, *Microchem. J.*, **133**, 506-509 (2017).
85. J. P. Guzowski Jr, C. Golanoski and E. R. Montgomery, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 963-974 (2003).
86. M. Song, S. Wu, P.-b. Lu, Y.-n. Qiao and T.-j. Hang, *Anal. Methods*, **8**, 8352-8361 (2016).
87. T. Kumar, M. Ramya, V. Srinivasan and N. Xavier, *J. Chromatogr. Sci.*, **55**(7), 683-689 (2017).

88. S. S. Kumar and R. K. Srivastava, *Indian J. Pharm. Sci.*, **80**(4), 744-749 (2018).
89. Z. Li, L. K. Jacobus, W. P. Wuelfing, M. Golden, G. P. Martin and R. A. Reed, *J. Chromatogr. A*, **1104**, 1-10 (2006).
90. J. Diekmann, C. Biefel and K. Rustemeier, *J. Chromatogr. Sci.*, **40**(9), 509-514 (2002).
91. K. S. Sidhu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1**(6), 300-302 (1981).
92. A. Sturaro, G. Parvoli, L. Doretta, C. Bancomina and C. Neonato, *Org. Mass Spectrom.*, **29**(10), 575-577 (1994).
93. J. L. Lunde, R. E. Nelson and H. F. Storandt, *Pharmacotherapy*, **27**, 1202-1205 (2007).
94. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Concise International Chemical Assessment Document, <https://inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad42.htm>, Accessed 15 Sep 2021.
95. S. R. Reddy, K. H. Reddy, M. N. Kumar, P. M. Reddy, J. V. R. Reddy and H. K. Sharma, *J. Chromatogr. Sci.*, **57**(2), 101-107 (2019).
96. S. Sleijfer, I. Ray-Coquard, Z. Papai, A. Le Cesne, M. Scurr, P. Schöffski, F. Collin, L. Pandite, S. Marreaud, A. De Brauwier, M. van Glabbeke, J. Verweij and J.-Y. Blay, *Clin. J. Oncol. Nurs.*, **27**, 3126-3132 (2009).
97. P. A. Harris, A. Bolor, M. Cheung, R. Kumar, R. M. Crosby, R. G. Davis-Ward, A. H. Epperly, K. W. Hinkle, R. N. Hunter III, J. H. Johnson, V. B. Knick, C. P. Laudeman, D. K. Luttrell, R. A. Mook, R. T. Nolte, S. K. Rudolph, J. R. Szewczyk, A. T. Truesdale, J. M. Veal, L. Wang and J. A. Stafford, *J. Med. Chem.*, **51**, 4632-4640 (2008).
98. G. W. Aylward, *Eye*, **19**, 1115-1118 (2005).
99. S. R. Khobare, V. Gajare, E. V. Reddy, R. Datrika, M. Banda, V. Siddaiah, S. S. Pachore, U. Timanna, V. H. Dahanukar and U. K. S. Kumar, *Carbohydr. Res.*, **435**, 1-6 (2016).
100. F. David, K. Jacq, P. Sandra, A. Baker and M. S. Klee, *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 1291-1300 (2010).
101. N. Rajana, D. V. Ramana, R. R. Ganta, D. R. Devi, A. A. Deshpande, J. M. Babu and K. Basavaiah, *Sep. Sci. Plus*, **3**(10), 511-522 (2020).
102. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, vol 7, Some Anti-Thyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals, <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Anti-Thyroid-And-Related-Substances-Nitrofurans-And-Industrial-Chemicals-1974>, Accessed 9 Sep 2021.
103. H. G. Ramjit, M. M. Singh and A. B. Coddington, *J. Mass Spectrom.*, **31**(8), 867-872 (1996).
104. W. Li, *J. Chromatogr. A*, **1046**, 297-301 (2004).
105. K. Ramakrishna, N. V. V. S. S. Raman, K. M. V. N. Rao, A. V. S. S. Prasad and K. S. Reddy, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 780-783 (2008).
106. P. R. Kakadiya, B. P. Reddy, V. Singh, S. Ganguly, T. G. Chandrashekar and D. K. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 379-384 (2011).
107. S. Chang and S. H. Lamm, *Int. J. Toxicol.*, **22**, 175-186 (2003).
108. M. Gricar and S. Andrenšek, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **125**, 27-32 (2016).
109. O. Wachelko, P. Szpotb and M. Zawadzki, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **192**, 113671 (2020).
110. 식품의약품안전처, 고혈압치료제(사르탄류)와 금연 치료보조제(바레니클린) 안전성 조사 실시, [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_99/view.do?seq=454744](https://www.mfds.go.kr/brd/m_99/view.do?seq=454744), Accessed 9 Sep 2021.
111. S. Fujimura, T. Sato and A. Watanabe, *J. Antimicrob. Agents*, **3**(2), 1000138 (2017).
112. P. Aparna, S. V. Rao, K. M. Thomas, K. Mukkanti, P. B. Gupta, K. Rangarao, G. K. Narayan, T. Sandip and K. Upendra, *Pharmazie*, **65**(5), 331-335 (2010).
113. 식품의약품안전처, LC-MS/MS를 이용한 사르탄류 원료의약품 중 AZBT 시험법, [http://nifds.go.kr/brd/m\\_18/view.do?seq=12584&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=2](http://nifds.go.kr/brd/m_18/view.do?seq=12584&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=2), Accessed 9 Sep 2021.
114. H. Ono, K. Hisatani and K. Kamide, *Polym. J.*, **25**(3), 245-265 (1993).
115. T. D. Ho, P. M. Yehl, N. P. Chetwyn, J. Wang, J. L. Anderson and Q. Zhong, *J. Chromatogr. A*, **1361**, 217-228 (2014).
116. D. C. Vu, T. L. Ho, P. H. Vo, G. Carlo, J. A. McElroy, A. N. Davis, S. C. Nagelg and C.-H. Lin, *Anal. Methods*, **10**, 730-742 (2018).
117. H. Hiratsuka, T. Okamoto, S. Kuroda, T. Okutsu, H.

- Maeoka, M. Taguchi and T. Yoshinaga, *Res. Chem. Intermed.*, **27**(1), 137-153 (2001).
118. F. Bruner, G. Bertoni and C. Severini, *Anal. Chem.*, **50**(1), 53-55 (1978).
119. V. M. Vorotyntsev, G. M. Mochalov, M. A. Kolotilova, and E. V. Volkova, *J. Anal. Chem.*, **61**(9), 883-888 (2006).
120. Z. Gajdosechova, Z. Mester and E. Pagliano, *Anal. Chem. Acta*, **1064**, 40-46 (2019).
121. K. Hamada and H. Morishita, *Sepctrosc. Lett.*, **13**(6), 373-380 (1980).
122. K. Hori, N. Koriyama, H. Omori, M. Kuriyama, T. Arishima and K. Tsumura, *Food Sci. Technol.*, **48**, 204-208 (2012).
123. E. Helms, N. Arpaia and M. Widener, *J. Chem. Educ.*, **84**(8), 1328-1330 (2007).
124. M. A. Cardoso, M. L. D. Fávero, J. C. Gasparetto, B. S. Hess, D. P. Stremel and R. Pontarolo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **34**, 1556-1567 (2015).
125. W. J. Ehlhardt and J. J. Howbert, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **19**(2), 366-369 (1990).
126. C. Chavis, C. De Gourcy and J.-L. Imbach, *Carbohydr. Res.*, **135**, 13-27 (1984).
127. H. Wang, G. J. Provan and K. Helliwell, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 387-392 (2002).
128. L. Homanen, *Spectrochim. Acta Part A*, **39**(1), 77-84 (1983).
129. M. E. Tuttolomondo, A. Navarro, T. Peña, E. L. Varetti and A. Ben Altabef, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7946-7956 (2005).
130. S. R. Reddy, K. H. Reddy, M. N. Kumar, P. M. Reddy, J. V. R. Reddy and H. K. Sharma, *J. Chromatogr. Sci.*, **57**(2), 101-107 (2019).
131. X. Du, W. Zhang, B. Liu, T. Liu, Y. Xiao, M. Taniguchi and Y.L. Ren, *J. AOAC Int.*, **102**(6), 1877-1883 (2019).
132. K. Hamada and H. Morishita, *Sepctrosc. Lett.*, **13**(6), 373-380 (1980).
133. N. Sheppa, *Trans. Faraday Soc.*, **46**, 533-539 (1950).
134. R. L. Hudson and R. F. Ferrante, *Mon. Notices Royal Astron. Soc.*, **492**, 283-293 (2020).
135. J. Forshed, B. Erlandsson and S. P. Jacobsson, *Anal. Chim. Acta*, **552**, 160-165 (2005).
136. R. J. Koopmans, R. Van Der Linden and E. F. Vansant, *Polym. Eng. Sci.*, **22**(14) 878-882 (1982).
137. J. I. Bryant, *J. Chem. Phys.*, **40**(11), 3195-3203 (1964).

---

### Authors' Position

Kyung Min Park	: Undergraduate Student
Won Mi Kim	: Undergraduate Student
Su Hyun Ahn	: Undergraduate Student
Ha Lim Lee	: Undergraduate Student
Su Hyeon Hwang	: Graduate Student
Wonwoong Lee	: Assistant Professor
Jongki Hong	: Professor