SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. 04-AD-0283-ENK

Gas Chromatograph Mass Spectrometer GCMS-QP 2020 NX

GC-MS 'FASST' 모드를 이용한 시럽 약 속 Ethylene Glycol 및 Diethylene Glycol 스크리닝 (Part 1 – 인도네시아 BPOM 방법)

Screening of Ethylene Glycol and Diethylene Glycol in Medical Syrup by GCMS with FASST mode (Part1 - as per Indonesian BPOM Method)

사용자 활용 포인트

- ◆ GCMS-QP2020 NX 분석 장비의 스크리닝 분석을 위한 고속 스캔 가능
- ◆ Fast Automated Scan/SIM Type(FASST) 모드로 스캔 및 Single Ion Monitoring(SIM) 자료 연속적으로 수집 가능
- ◆ 한번의 주입으로 EG와 DEG 모두 정확하게 식별하고 정량화
- ◆ 분석 결과의 우수한 신뢰성과 재현성

■ 서론

의약품의 화학적 오염은 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 예를 들어, 인도네시아에서는 시럽 약의 Ethylene glycol(EG) 및 Diethylene glycol(DEG) 오염과 관련하여 어린이 중 최소 195명이 사망한 것으로 보고되었다[1]. 서아프리카 감비아에서도 오염된 시럽 약으로 인해 70명의 어린이 사망이 의심되었다[2]. 이 사건들은 세계보건기구(WHO)의 관심을 끌었고, 따라서 이 문제에 대한 세계적인 경보 발령으로 이어졌다.

Propylene glycol, Glycerol 및 Sorbitol은 일반적으로 시럽 약에서 부형제로 사용된다. 이 물질들은 제형화 중 활성 성분의 용해도를 개선하는데 도움이 된다. 또한 약물의 맛에 영향을 미치는 증점제 및 감미료의 역할을 한다. 이러한 원료들은 독성 Ethylene glycol(EG)과 Diethylene glycol(DEG)로 쉽게 오염된다. 지난 수십 년 동안 EG 및 DEG로 인한 시럽 약의 수많은 오염 사건이 보고되었다[3]. EG와 DEG를 우발적으로 섭취하면 복통, 구토, 설사, 배뇨 불능, 두통, 의식 장애, 사망에 이르는 신장 손상이 발생할 수 있다.

본 뉴스레터에서는 Shimadzu GCMS-QP2020 NX를 사용하여 시럽 약에서 EG 및 DEG를 식별하고 정량화 하는 방법을 살펴보고자 한다. Fast Automated Scan/SIM Type(FASST) 모드를 사용하여 분석을 진행하며, 이 모드는 단일 주입 내에서 정확한 검증 및 정량을 위해 스캔 모드와 SIM(Selected Ion Monitoring) 모드의 연속 작동을 가능하게 한다.

그림1. Shimadzu GCMS-QP2020 NX with AOC-20i+s Plus

■ 분석 조건

분석에는 Shimadzu GCMS-QP2020 NX 와 AOC-20i+s Plus 자동주입장치를 사용하였다(그림 1). 분석 조건의 세부 사항은 인도네시아 식품의약청(BPOM)의 방법에서 약간 수정하여 표 1에 나타냈다[4]. 분석법은 최소한의 샘플 준비가 필요하므로 시스템의 성능과 견고성을 향상시키기 위해 수정되었다. 5 m 통합 가드 컬럼이 있는 캐필러리 컬럼을 사용하여 성능 손실 위험 없이 광범위하고 복잡한 매트릭스를 처리할 수 있게 기능을 향상하였다. 시료 매트릭스의 시스템 오염을 최소화하기 위해 20:1 의 높은 스플릿 비율이 사용되었다. 더 나은 피크 모양을 얻을 수 있도록 데이터 포인트 수를 늘려주기 위해서, 스캔 및 SIM의 이벤트 시간은 각각 0.2초, 0.1초로 단축시켰다.

표 1. GCMS 분석 조건

Flow Control Mode	Constant Flow
Column Flow Rate	0.65 mL/min
Injection Mode	Split (Split Ratio = 20)
Injection Port Temp.	250 °C
Injection Volume	1 µL
Carrier Gas	Helium
Column	SH-PolarWax column with 5 m integrated guard column (30 m long, 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness)
Column Oven Temp. Program	Initial Temp 100 °C (hold for 1 min) -Increase to 130 °C with a rate of 10 °C/min (hold 7 min) -Increase to 240 °C with a rate of 20 °C/min (hold 3 min) -Increase to 250 °C with a rate of 20 °C/min (hold 3 min)
Ion Source Temp.	230 °C
Interface Temp.	240 °C
Acquisition Mode	FASST (Scan/SIM)
Event Time (sec)	Q3 Scan: 0.2 Q3 SIM: 0.1
Scan m/z Range	29 to 400 amu
SIM Ions	EG: 31 (target ion) 33 and 62 (reference ions) DEG: 45 (target ion) 75 and 31 (reference ions)

■ 샘플 전처리

1000ppm 표준용액 준비

EG 와 DEG는 일본 TCI에서 구입하였다. 메탄올에 용해되어 있는 EG 와 DEG 표준용액은 별도의 100 mL 부피 플라스크에 각각 100 mg 을 용해하여 준비하였다. 잘 용해시키기 위해 100 mL 표시까지 채우기 전 50 mL 정도 메탄올을 넣은 상태에서 초음파 처리를 한다. 표준 용액은 표 2와 같이 5 mL 부피 플라스크에 일련의 다양한 농도의 보정 표준 용액 넣어 준비하였다.

표 2. 검정곡선을 위한 5 mL 부피 플라스크를 이용한 EG와 DEG 농도 별 준비

Level	Ethylene Glycol		Diethylene Glycol	
	Conc /ppm	Amount from 1000 ppm stock/ µL	Conc /ppm	Amount from 1000 ppm stock/ µL
1	6	30	12	60
2	8	40	16	80
3	10	50	20	100
4	12	60	24	120
5	14	70	28	140

시럽 약 바탕시료 준비

시럽 약 바탕시료 10 mL를 100 mL 부피 플라스크에 옮겨 바탕시료 용액을 준비한다. 시럽에 50 mL 메탄올을 넣어 정량을 하였다. 눈금선까지 정량 전 용해를 개선하기 위해 시럽 약을 메탄올로 표시선까지 채우기 전 5분간 초음파 처리를 진행하였다. 그 후 희석된 혼합물을 0.45 µm PTFE 멤브레인 필터로 여과했다. 이어서 반복성 실험을 위해 바탕시료 용액에 EG 6 ppm 및 DEG 12 ppm을 첨가하였다.

시판중인 시럽 약 샘플 2종(샘플 A,B)을 구입하여 유사한 방법으로 준비하였으며, 10 mL 부피 플라스크를 사용하여 부피를 축소하여 실험에 사용하였다. 회수율 실험을 위해 시료 A에 EG 4 ppm과 DEG 20 ppm을 주입하였고, 샘플 B에 DEG 20 ppm을 주입하였다.

■ 결과 및 토의

FASST screening 방법 설정

메탄올에 다양한 농도의 EG(6 ~ 14 ppm) 및 DEG(12 ~ 28 ppm)을 준비하고 FASST 모드로 분석하여 검정 곡선을 그렸다. 그림 2a-d 는 별도로 만든 두 검정곡선이 EG와 DEG 모두에 대해 R^2 값이 0.9985 이상인 선형 직선성을 나타내는 것을 보여준다. 그 후 시럽 약의 바탕시료와 첨가 용액(EG 6ppm 및 DEG 12 ppm)을 이어 분석하였다. 대조군인 시럽 약의 바탕시료에서 DEG는 검출되지 않았고(그림 3b), 무시할 수 있는 양의 EG(정량할 수 없음)만 존재하므로(그림 3a) 내인성 EG 양은 결과에 미미한 영향을 주는 것으로 가정했다.

시럽 약 바탕시료에 표준물질을 첨부한 반복 주입(n=10) 실험 결과는 표 3에 나타냈다. 6 ppm EG 및 12 ppm DEG에 대해 각각 1 %,2 % 의 농도 반복성(% RSD)이 얻어져 높은 정밀도를 보였다. EG(118 % ~ 123 %), DEG(103 % ~ 109 %) 모두에 대해 적절한 % 회수율 값도 얻었다. EG 6 ppm(그림 3c), DEG 12 ppm(그림 3d)의 정량화가 성공적으로 진행되었고, LOQ(정량한계)는 신호 대 잡음비(S/N) 비율이 200 이상 으로 설정하였다.
그림 4a-b 는 표준용액의 레벨 5(표 2)의 TIC 스캔 결과와 EG(*m/z* 31) 와 DEG(*m/z* 45) 타겟 이온에 대한 SIM 질량 크로마토그램 결과를 보여준다. TIC 결과를 바탕으로, 머무름 시간이 8.817 분(그림 4a)과 15.374 분(그림 4b)에 두 개의 두드러진 피크가 관찰되었고, 이 두 피크는 각각 EG와 DEG에 해당한다.

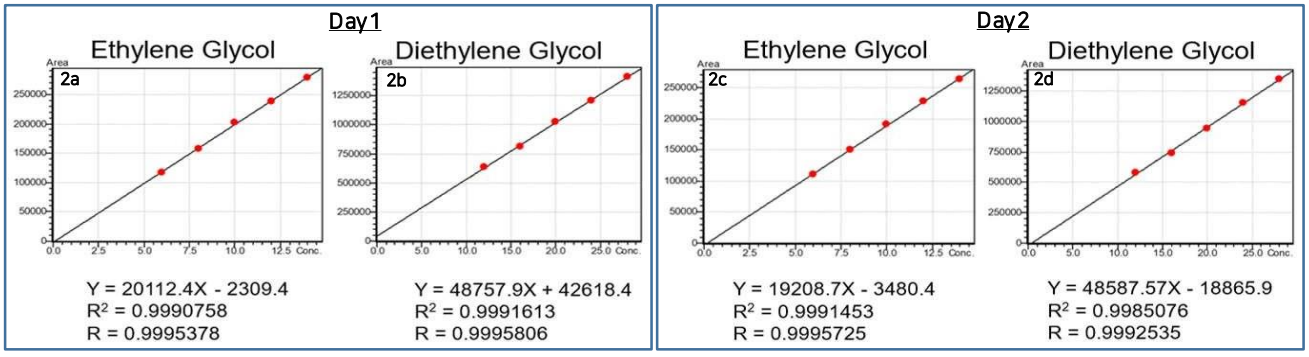

그림 2a-d. EG와 DEG 검정곡선

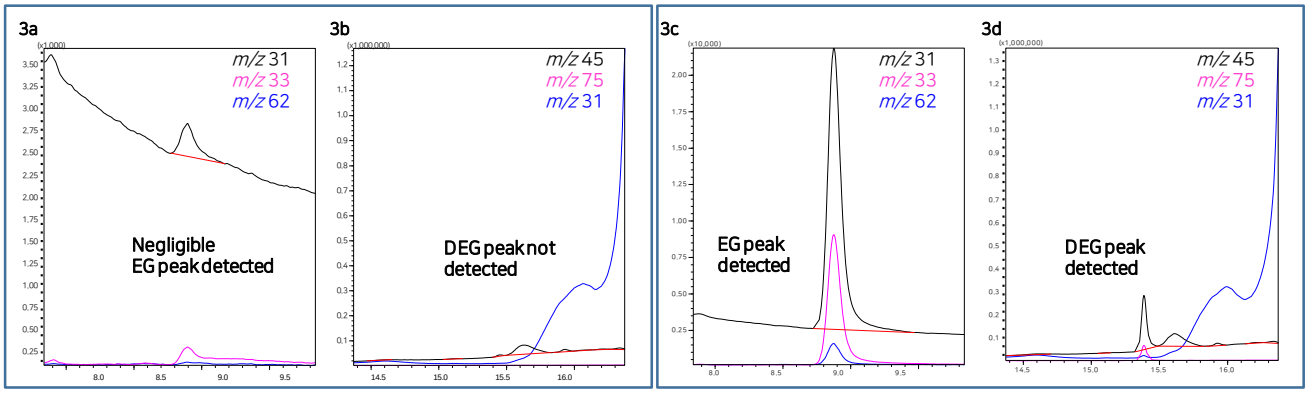

그림 3a-b. 시럽 약 바탕시료의 SIM 질량 크로마토그램

그림 3c-d. 시럽 약 바탕시료에 6 ppm EG 와 12 ppm DEG를 주입한 샘플의 SIM 질량 크로마토그램

표 3. 바탕시료에 6 ppm EG 와 12 ppm DEG 샘플의 반복성(n=10) 및 회수율

Injection	EG detected /ppm	DEG detected /ppm	%Recovery EG	%Recovery DEG
1	7.08709	13.07627	118%	109%
2	7.24933	12.75458	121%	106%
3	7.40988	12.76441	123%	106%
4	7.30253	12.45931	122%	104%
5	7.32590	12.47512	122%	104%
6	7.32913	12.57976	122%	105%
7	7.28901	12.60053	121%	105%
8	7.30924	12.54618	122%	105%
9	7.18782	12.31182	120%	103%
10	7.21388	12.38494	120%	103%
Std. Dev.	0.09001963	0.22249365		
Average	7.270381	12.595292		
%RSD	1.24%	1.77%		

BPOM 분석법에서 알 수 있듯이, SIM 결과를 정량에 사용하였다. EG는 *m/z* 31 을 Target ion으로 하였고 *m/z* 33 과 62를 Reference ion으로 정하였다. 반면에, DEG는 *m/z* 45 Target ion으로 정하였고, *m/z* 75 and 31을 Reference ion으로 정하였다. 그림 5a-b 는 시럽 약 바탕시료에 표준품을 주입한 샘플의 질량 크로마토그램과 NIST 2020 library에서 나온 질량 크로마토그램을 나타내었고, EG와 DEG는 Library 결과와 유사성 지수가 90, 93으로 높은 유사성을 보여준다.

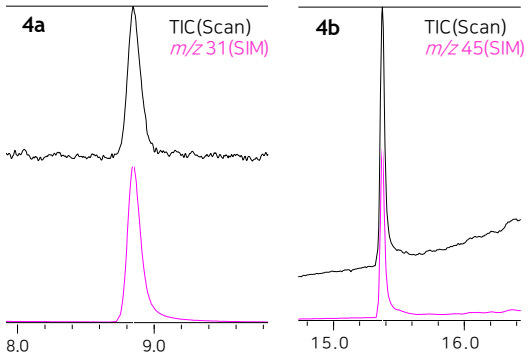

그림 4a-b. 표준 레벨 5의 EG 와 DEG TIC 스캔 결과와 SIM Target ion 크로마토그램

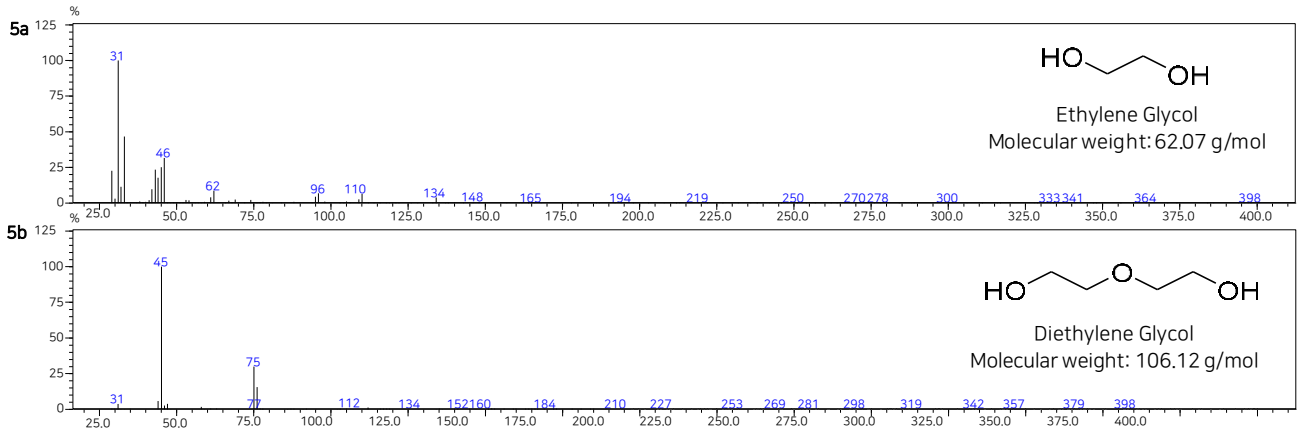

그림 5a-b. 표준품(6 ppm EG 와 12 ppm DEG)을 주입한 시럽 약에서 검출된 EG와 DEG 질량 스펙트럼

시판중인 시럽 약 분석

시판중인 시럽 약 샘플 A,B는 시럽 약 바탕시료 대조군과 동일한 샘플 처리를 하였다. 간략하게, 샘플 1 mL를 메탄올 5 mL가 들어 있는 10 mL 부피 플라스크로 옮겼다. 그 후, 희석된 혼합물을 5분 동안 초음파 처리하고 표시선까지 채웠다. 그런 다음 희석된 혼합물을 0.45 µm PTFE 멤브레인 필터를 통해 여과했다. 여과된 샘플을 GCMS 분석에 직접 사용하였다.

샘플 A와 샘플 B에서 검출된 EG 와 DEG 양

표 4와 표 5는 샘플 A, B 분석 결과를 요약한 것이다. 샘플 A의 경우, 7.18 ppm의 EG(avg n=4)가 검출되었다. 따라서, 샘플 A에 존재하는 EG와 DEG의 합은 희석배수를 고려했을 때 0.07 mg/mL에 해당한다. 샘플 B의 경우, 10.20 ppm의 EG(avg n=4)가 검출되었다. 한편, 미량의 DEG(LOQ 미만)가 검출되었는데, 이는 이 샘플에서 DEG에 대한 낮은 일일 농도 재현성을 설명한다. 따라서, 희석배수를 고려한 후 샘플 B에 존재하는 EG 및 DEG 농도의 합은 0.11 mg/mL 이하 이다.

이 실험은 Shimadzu GCMS-QP2020 NX가 오염된 시럽 약에서 EG 및 DEG를 검출하기 위한 반복성 및 민감도 측정에서 우수한 성능을 보임을 입증했다.

높은 반복성 관찰

분석하고자 하는 물질의 농도가 검정곡선 범위 내에 있을 때 높은 수준의 재현성이 관찰된다. 하루 동안 0.01 %에서 1.95 % 범위의 %RSD가 관찰되었다. 표 4 와 표 5 에서 관찰된 결과의 높은 정밀도는 표 3의 결과와 매우 일치 했다. 실험실 내 정밀도 테스트를 위해 여러 날짜에 걸쳐 분석한 결과 2.22 %에서 3.92 % 사이의 적당한 수준의 정밀도를 보였다.

% 실험 회수율

샘플 A와 B의 바탕시료가 없기 때문에, 시럽 약 샘플 A와 B 에 직접 표준품을 첨가하여 % 회수율을 분석하였다. 시럽 약 샘플 A에는 4 ppm의 EG와 20 ppm의 DEG를 첨가하였고, 시럽 약 샘플 B에는 DEG 20 ppm을 첨가하였다. 샘플 B에 EG는 검정곡선 수준을 초과하지 않도록 첨가하지 않았다.

개별 샘플에서 검출된 분석물의 추가 양은 당일 첨가하지 않은 샘플의 분석물 평균값과 차이를 측정하여 계산하였다. 샘플 B의 내부 DEG 수준이 LOQ보다 낮았으므로 첨가하지 않은 샘플의 DEG 기여도는 무시할 수 있을 것으로 가정한다. 표 6은 회수율 측정 실험의 결과와 % 회수율을 요약한 것이다.

표 4. 시럽 약 샘플 A EG와 DEG 검출 결과 요약

Day	EG detected /ppm	Avg EG detected /ppm (n=2)	%RSD	Day	DEG detected /ppm	Avg DEG detected /ppm (n=2)	%RSD	(EG+DEG)/ (mg/mL)
1	7.17694	7.277225	1.95%	1	ND	ND	ND	0.07
1	7.37751			1	ND			0.07
2	6.98670	7.084415	1.95%	2	ND	ND	ND	0.07
2	7.18213			2	ND			0.07
Avg EG *n*=4	7.18082			Avg DEG *n*=4	ND		Avg Sum *n*=4	0.07
Intermediate Precision	2.22%			Intermediate Precision	ND			

사용된 약어: avg = 평균, ND = 검출되지 않음

EG 검출
DEG는 샘플 A에서 검출되지 않음

표 5. 시럽 약 샘플 B EG와 DEG 검출 결과 요약

Day	EG detected /ppm	Avg EG detected /ppm (n=2)	%RSD	Day	DEG detected /ppm	Avg DEG detected /ppm (n=2)	%RSD	(EG+DEG)/ (mg/mL)
1	10.54466	10.54558	0.01%	1	0.51743	0.53152	3.75%	0.11
1	10.54650			1	0.54561			0.11
2	9.79652	9.857925	0.88%	2	1.48060	1.49213	1.09%	0.11
2	9.91933			2	1.50365			0.11
Avg EG *n*=4	10.20175			Avg DEG *n*=4	1.0118225		Avg Sum *n*=4	0.11
Intermediate Precision	3.92%			Intermediate Precision	54.83%			

사용된 약어: avg = 평균

EG 검출
DEG는 검출되나 샘플 B에서 LOQ 이하로 검출

표 6. 샘플 A에서 검출된 스파이크 EG 및 DEG와 샘플 B에서 검출된 스파이크 DEG 분석 결과

Sample A				Sample B	
Amount of spkied EG detected / ppm	% Recovery	Amount of spiked DEG detected / ppm	% Recovery	Amount of spiked DEG detected / ppm	% Recovery
4.405055	110 %	23.93676	120 %	23.24588	116 %
4.705645	118 %	24.05775	120 %	23.23355	116 %
3.144905	79 %	24.74546	124 %	24.36432	122 %
3.225340	81 %	25.07093	125 %	22.95413	115 %

시럽 샘플 A EG의 % 회수율은 79 % ~ 118 % 그리고 DEG는 120 % ~ 125 %이다. 시럽 샘플 B의 경우, DEG에 대한 % 회수율은 115 %~ 122 % 으로 관찰되었다. 이상적인 정확도에서 약간 벗어난 것은 매트릭스 효과 때문이었다. 이 분석 방법에서 샘플이 GCMS 시스템에 주입되기 전 최소한의 샘플 준비 과정만을 거치기 때문에 예상된 바였다. 매트릭스-매치 분석법은 분석 능력을 향상시킬 것으로 예상되며, 뉴스레터 2부에서 이에 대해 살펴볼 것이다.

복잡한 매트릭스에서 FASST의 장점

그림 6a-b와 그림 7a-c는 FASST 모드를 사용하여 각각 샘플 A 및 샘플 B의 TIC 및 질량 크로마토그램을 나타냈다. 샘플 A에서 EG가 검출되었고, 샘플 B에서는 EG와 DEG가 모두 검출되었다. 샘플 A에서 EG 피크의 머무름 시간이 8.760 분에서 9.025 분으로 이동하는 것이 관찰되었다.(그림 6a-b). 이는 샘플 A 매트릭스에서 컬럼에 과부하가 걸린 거대한 초기 용리 피크(그림 6a) 때문이었다. FASST 분석 모드를 사용했기 때문에 예상 머무름 시간이 변경되었음에도 불구하고 EG는 여전히 높은 신뢰도의 분석결과를 보였다. FASST 분석 모드의 스캔 모드 데이터를 사용하여 EG 검출에 영향을 미치는 거대한 간섭 피크는 NIST 2020 라이브러리 확인 결과 97의 높은 유사성 지수를 보이는 프로필렌글리콜로 식별되었다.

표적 화합물의 감도를 유지하면서 알려지지 않은 간섭 피크를 식별하는 FASST 모드 분석의 이점은 이 실험에서 잘 입증되었다.

계산 방법 및 조언

샘플의 농도는 다음과 같은 형태로 얻은 선형 검정 곡선 방정식으로 계산한다 :

$$y = ax + c$$

where
x = EG 혹은 DEG 농도 (ppm)
y = GCMS를 통해 얻은 면적값
a = 검정곡선 기울기
c = 절편

시럽 약의 EG+DEG (mg/mL) 합계량은 다음 식으로 계산한다 :

$$(EG+DEG) = x \cdot F/1000$$

where
x = EG와 DEG 농도 합 (ppm)
F = 희석 배수

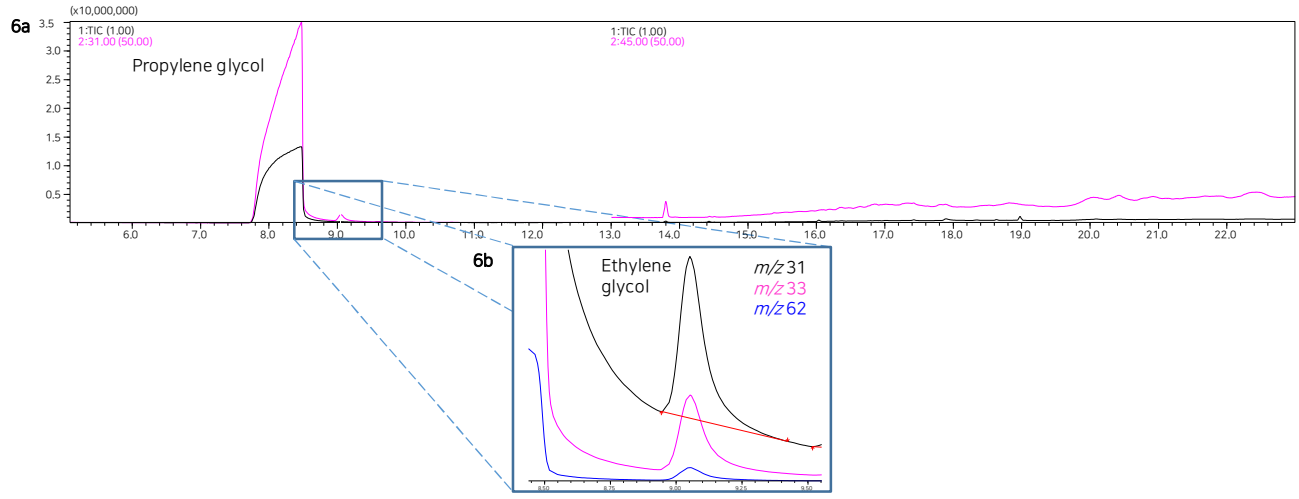

그림 6a-b. 샘플 A의 TIC 및 질량 크로마토그램(EG 및 DEG 정량 이온)과 EG가 검출된 확대 크로마토그램(SIM)

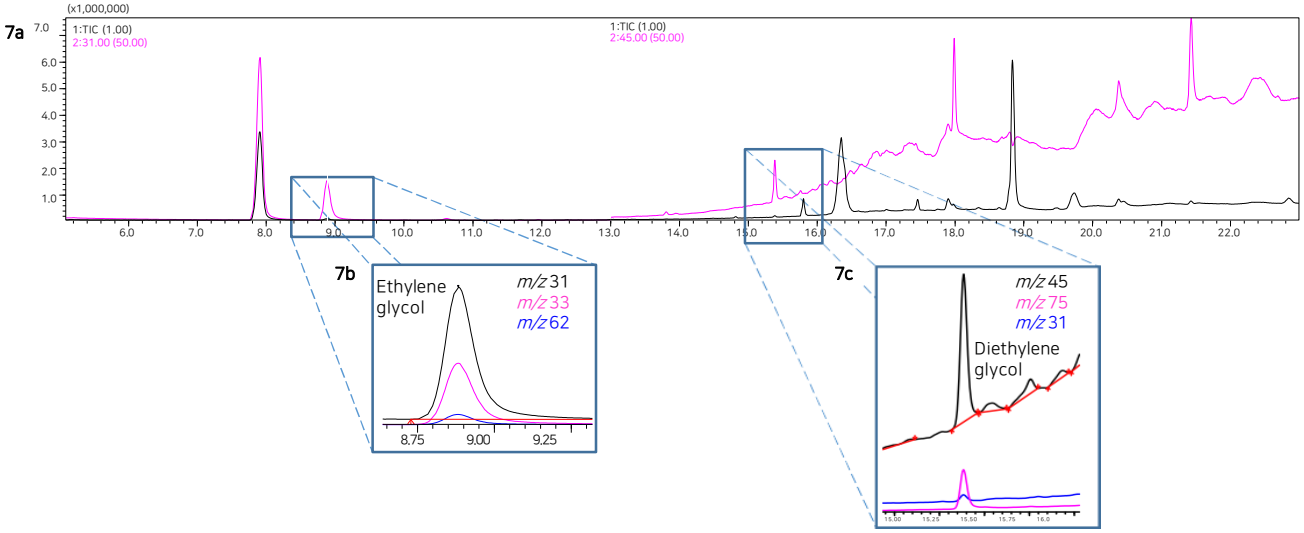

그림 7a-c. 샘플 B의 TIC 및 질량 크로마토그램(EG 및 DEG 정량 이온)과 EG와 DEG 정량 이온이 검출된 확대 크로마토그램(SIM)

점성이 매우 높은 샘플의 경우 원하는 부피를 정확하게 옮기는 것이 제한적일 수 있다. 이 경우 시럽 샘플의 밀도를 먼저 확인한 다음 옮길 샘플의 양을 정확하게 칭량해야 한다. 희석배수는 다음과 같이 계산하여야 한다 :

$$F = \rho \cdot Vt/Wt$$

where F = 희석 배수
ρ = 시럽 약의 밀도 (g/mL)
Vt = 희석 후 총 부피 (mL)
Wt = 시럽 약의 무게 (g)

샘플 점도가 원하는 정확한 부피를 얻는데 어려움이 없는 경우 희석계수는 다음과 같이 계산해야 한다:

$$F = Vt/V1$$

where F = 희석 배수
Vt = 희석 후 총 부피 (mL)
V1 = 시럽 약의 부피 (mL)

■ 결론

오염된 시럽 약 섭취로 인한 대량 중독의 향후 위험을 방지하려면 엄격한 품질 관리가 강조되어야 한다. 본 뉴스레터에서 Shimadzu GCMS-QP2020 NX는 인도네시아 BPOM 방법에 따라 최소한의 시료 준비로 다른 두 가지 매트릭스인 시럽 약의 EG와 DEG를 높은 감도와 높은 정확도로 검출 할 수 있다.

접근 방식의 한계는 최소한의 샘플만 사용되었고, 매트릭스 효과로 인해 적당한 % 회수율을 얻는데 그쳤다. 이 방법은 샘플 매트릭스가 다른 다양한 샘플에 대해 실험실에서 신속하게 테스트하는데 적합하지만 제약 산업의 품질 관리 실험실에 대한 엄격한 정확도 요구 사항을 충족하지 못할 수 있다. 본 뉴스레터 파트2에서 매트릭스 매치 분석법을 사용하여 상기 문제를 해결하기 위해 별도의 분석법이 개발될 것이다.

■ References

1. Indonesia child deaths blamed on syrup medicines rise to 195. Channel NewsAsia, www.channelnewsasia.com/asia/indonesia- child-deaths-syrup-medicines-acute-kidney-injury-195-3050491, [Accessed 30 Nov 2022]
2. Indonesia bans cough syrup material linked to Gambia child deaths. Channel NewsAsia, https://www.channelnewsasia.com/asia/indonesia-bans-cough- syrup-material-gambia-child-deaths-maiden-pharma-3009396, [Accessed 1 Dec 2022]
3. Barr, D.B., et al, Identification and Quantification of Diethylene Glycol in pharmaceuticals implicated in poisoning epidemics: An historical laboratory perspective. 2007. *J. Anal. Toxicol.,* **31**, pp 209-303.
4. Metode Analysis Uji Cemaran Etilen Glikol (EG) dan Dietilen Glikol, Badan Pengawas Obat dan Makanan, 24 Oct 2022.

04-AD-0283-ENK

Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China.
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.
Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".
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.

Copyright © 2022 SHIMADZU group. All rights reserved.