

Application News

No. 04-AD-0288-ENK

Gas Chromatograph Mass Spectrometer GCMS-QP 2020 NX GC-MS 'FASST' 모드를 이용한 시럽 약 속 Ethylene Glycol 및 Diethylene Glycol 스크리닝 (Part2- QC 테스트를 위한 개선된 분석법)

Screening of Ethylene Glycol and Diethylene Glycol in Medical Syrup by GCMS with FASST mode (Part2- Improved Method for QC Testing)

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
- ◆ 매트릭스-매치 분석을 통해 개선된 높은 % 회수율

■ 서론

애플리케이션 뉴스레터 1부에서는 인도네시아 BPOM에서 권장하는 분석법을 사용하여 시럽 약에서 Ethylene glycol(EG) 및 Diethylene glycol(DEG)을 스크리닝 하는 GCMS-QP2020 NX의 우수한 성능을 성공적으로 보여주었다^[1]. 이 분석 방법은 최소한의 샘플 준비가 필요하고, 관련 기관의 실험실에서 다양한 브랜드의 시럽 약을 쉽게 선별할 수 있어 시장에서 시럽 약의 안전성을 신속하게 평가할 수 있다. 그러나 매트릭스 효과가 분석법의 % 회수율에 영향을 미치기 때문에, 이 접근 방식은 제약 산업의 엄격한 QC 테스트 요구 사항을 충족하지 못할 수 있다. 따라서 본 뉴스레터에서는 이러한 격차를 해소하고자 한다.

분석법의 정확도를 향상시키기 위해 매트릭스-매치 분석법을 사용하여 BPOM 분석법을 약간 수정하기로 결정하였다. 약간의 수정을 통해 분석법 선택성이 크게 향상되어 복잡한 매트릭스가 있는 시료의 경우에도 EG 및 DEG를 정확하게 정량할 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

분석은 Shimadzu GCMS-QP2020 NX 와 AOC-20i+s Plus 자동주입장치를 사용하였다(그림 1). 분석 조건의 세부 사항은 인도네시아 식품의약품(BPOM)의 방법에서 약간 수정하여 표 1에 나타냈다^[2]. 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

시럽 약 시료 전처리

시럽 약 시료 10 mL를 100 mL 부피 플라스크에 옮겨 시료를 메탄올로 희석하였다. 메탄올을 눈금선까지 채우기 전, 용해도를 개선하기 위해 5분간 초음파 처리를 진행하였다. 그 후 희석된 혼합물을 0.45 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과했다. 여과한 시료 1 μL를 GCMS로 분석한 결과 EG는 미미한 양으로 검출되었고 DEG는 검출되지 않았다^[1]. 따라서, 내인성 EG의 수준은 실험 결과에 거의 기여하지 않을 것으로 가정하기 때문에 이 시럽 약을 바탕시료로 사용하였다. 이어서, 이 여과된 시럽 약 바탕시료는 매트릭스 매치 보정 분석(표 2)의 준비에 사용되었다. 동시에 보정 분석의 레벨 1(LOQ) 및 레벨 3에 해당하는 표준품이 첨가된 샘플을 별도로 준비했다.

매트릭스-매치 분석법 검정 곡선 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 했다. 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

■ 결과 및 토의

매트릭스-매치 보정 분석

시럽 약 바탕시료에 다양한 농도의 EG(6 ~ 14 ppm) 및 DEG(12 ~28 ppm)를 첨가하여 매트릭스 매치 보정 분석을 위한 표준품을 만들고 FASST 모드를 사용하여 분석했다. 그림 2a ~ 2d를 보면 EG와 DEG 모두에 대해 매트릭스-매치 보정 분석에서 R²가 0.999 이상인 직선성을 보였다. 두 다른 날짜에서 검정 곡선의 선형 방정식 사이의 높은 유사성은 사용된 방법의 견고성과 신뢰성을 보여준다.

뉴스레터 1부와 같이 BPOM 방법과 같은 SIM 정량 이온을 사용하였다. EG는 m/z 31을 타겟 이온으로 정량하였고, m/z 33 및 62를 레퍼런스 이온으로 검증하였다. DEG는 m/z 45를 타겟 이온으로 정량하였고, m/z 75 및 31를 레퍼런스 이온으로 검증하였다.

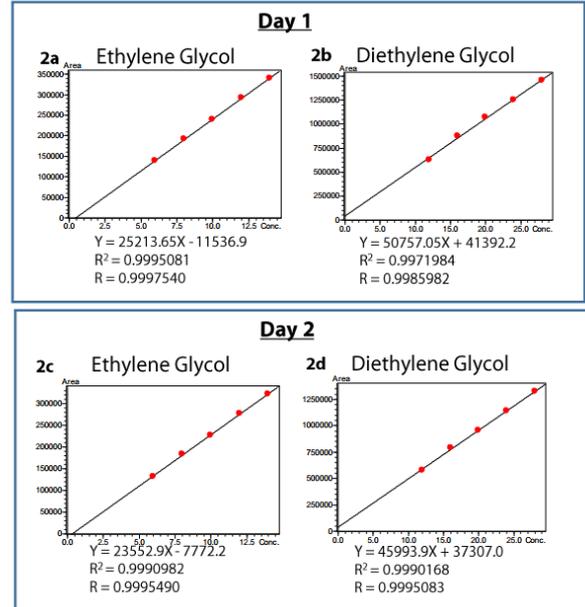


그림 2a-d. EG 및 DEG 매트릭스 매치 분석을 통해 얻은 검정곡선

표준품 첨가 바탕시료 레벨 1과 3의 % 회수율

표 3은 EG(6 및 10 ppm)와 DEG(12 및 20 ppm)에 대해 레벨 1(LOQ) 및 레벨 3 농도 수준에서 기존의 비매트릭스 매치 분석법과 매트릭스 매치 보정 분석법을 사용한 표준품 첨가 샘플의 % 회수율에 대한 결과를 요약한 것이다. 기존의 비매트릭스 매치 분석법의 경우 EG의 회수율은 118% ~ 120%이다. 표준품 첨가 샘플에서 EG 및 DEG를 정량화하려고 시도할 때 상당한 양의 편향성이 관찰된다. 이 편향은 매트릭스 매치 보정 분석법을 사용하여 개선되었다. 동일한 데이터 세트에 대해 매트릭스 매치 분석법을 사용하여 얻은 EG의 회수율(%)은 99% ~ 102%, DEG의 경우 98% ~ 105%이다. 얻은 결과는 그림 2a에서 2d까지와 매우 일치하며, 실험실 내 정밀성 테스트로 다른 두 날짜간 분석 결과, 매트릭스 매치 보정 분석법 간의 검정곡선이 높은 유사성을 보였다.

높은 수준의 정밀도

표 3에서 관찰된 높은 정밀도는 뉴스레터 1부 결과와 높은 유사도를 보여준다. 매트릭스 매치 보정 분석법의 % RSD는 비매트릭스 매치 분석법의 결과와 매우 유사하였다. 매트릭스 매치 보정 분석법을 사용하여 얻은 농도 % RSD는 0.38%에서 2.90% 범위였다. 이것은 방법을 수정하거나 날짜 변동이 정밀도에 미치는 영향이 미미하다는 것을 보여준다.

선택성 및 정확도 향상

위에서 언급한 바와 같이, 데이터를 처리하기 위해 매트릭스 매치 보정 분석법을 사용하여 분석한 후 % 회수율은 이상적인 값인 100%에 근접한다(표 3). 더 나은 정확도로 EG 및 DEG를 정량화할 수 있는 분석법으로 개선했음을 알 수 있다. 이 분석법은 EG 및 DEG 존재량이 무시할 수 있는 양 (Blank로 사용하기에 적합한 양)이 존재하는 오염되지 않은 완제품의 이전 배치를 사용하는 제약 산업의 QC 실험실에도 적합하다.

이 분석법의 한계는 EG 및 DEG의 양이 무시할 수 있는 양이 포함된 바탕시료가 필요하다는 것이다. 다양한 매트릭스로 구성된 다양한 범위의 샘플을 테스트 해야 하는 기관이나 실험실에서는 뉴스레터 1부에 제시된 접근 방식이 더 실용적일 수 있다^[1].

표 3. 매트릭스-매치 보정 분석법과 매트릭스-매치 분석법을 사용하지 않은 분석법(용매 - 메탄올 사용) 결과 비교

EG spiked /ppm	DEG spiked /ppm	Non-Matrix-Matched Calibration plot				Matrix Matched Calibration plot			
		EG detected /ppm	DEG detected /ppm	%Recovery EG	%Recovery DEG	EG detected /ppm	DEG detected /ppm	%Recovery EG	%Recovery DEG
6	12	7.20433	12.9938	120%	108%	6.11272	12.50618	102%	104%
6	12	7.20901	13.15353	120%	110%	6.11644	12.65962	102%	105%
6	12	7.08610	12.80426	118%	107%	6.01840	12.32410	100%	103%
6	12	7.06675	12.29578	118%	102%	6.00297	11.83565	100%	99%
	%RSD	1.06%	2.91%		%RSD	1.00%	2.90%		
10	20	11.94484	20.35343	119%	102%	9.89412	19.57594	99%	98%
10	20	11.92798	20.42981	119%	102%	9.88068	19.64931	99%	98%
10	20	12.01733	21.17994	120%	106%	9.95195	20.36990	100%	102%
10	20	12.01584	21.47227	120%	107%	9.95076	20.65070	100%	103%
	%RSD	0.39%	2.65%		%RSD	0.38%	2.65%		

■ 계산

본 뉴스레터에서 % 회수율 및 정밀도 계산은 선형 방정식에서 유추된 샘플 농도를 기반으로 하므로 시럽 약의 EG 및 DEG의 최종 농도는 표시하지 않았지만, 농도계산 방법은 뉴스레터 1부를 참조할 수 있다.

■ 결론

뉴스레터 1부에 대한 후속 조치로 매트릭스-매치 보정 분석법을 사용하여 분석법의 선택성을 어떻게 개선할 수 있었는지 보였다. 그 결과 완제품의 출하 테스트에 대한 제약 업계의 까다로운 QC 표준을 충족할 수 있었다. 본 뉴스레터(파트 2)에서 얻은 매우 정확한 결과는 뉴스레터 파트 1에서 관찰한 내용과 일치한다.

뉴스레터 1부와 2부 모두 Shimadzu GCMS-QP2020 NX 분석장비를 통해 최소한의 시료 준비로 시럽 약에서 EG 및 DEG를 정확하고 민감하며 정밀하게 검출할 수 있음을 보여주었다. 개발된 방법은 관련 당국, 시험소 또는 제약 품질 관리의 엄격한 요구 사항을 충족하는데 적합하다.

■ References

1. Chia, C. G. et al, Screening of Ethylene Glycol and Diethylene Glycol in Medicinal Syrup by GCMS with FASST mode (Part 1 - as per Indonesia BPOM Method), Shimadzu Application News No. 04-AD-0283-EN.
2. Metode Analisis Uji Cemarkan Etilen Glikol(EG) dan Dietilen Glikol, Badan Pengawas Obat dan Makanan, 24 Oct 2022.

