creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

국 문 초 록

다환방향족탄화수소류 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 란 최소 두 개 이상의 벤젠고리가 선형으로 각을 지어 있거나 밀집된 구조로 형성된 방향족 탄화수소를 일컫는 말로, 탄소와 수소를 함유한 매우 안정된 구조의 유기화합물이다. PAHs는 의약품의 원료 및 염료, 플라스틱, 살충제를 만드는데 사용되고, 도로건설 시 사용되는 아스팔트에 포함되어 있다. PAHs는 건강을 위협하는 환경독성물질로서, 그 자체보다 체내에 흡수된 대사산물들이 발암전구물질 등으로 작용한다.

최근 들어서 PAHs 중 독성이 가장 강한 벤조피렌의 검출사례가 크게 이슈가 되었다. 식품에서 벤조피렌의 양이 기준치를 초과하여 검출된 사례가 있었고, 천연물 의약품에서도 벤조피렌이 발견되었다. 지속적인 벤조피렌의 검출에 의해 사회적 여론이 벤조피렌에 대한 불안감이 조성되어 있기 때문에 다수의 의약품에 대해 벤조피렌을 포함한 PAHs가 검출되는지를 알아보고자 하였다.

본 연구에서는 GC-MS-SIM 모드에 의한 의약품 중 다환방향족탄화수소 (PAHs) 시험법을 개발하였다. 개발된 분석법으로 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성 및 정확성에 관하여 유효성의 검증을 실시하였다. 검증된 방법을 기반으로 과립제, 산제, 정제 중 국내 시장을 기반으로 한 다빈도 의약품으로 선정된 497건에 대하여 모니터링을 시행하였다.

PAHs 중 미국 환경청(EPA)에서 정한 유해성 우선물질 16개를 GC-MS로 분석하였으며, 분석 대상으로는 최근 1년간 한국제약협회의 매출실적자료를 바탕으로 8종의 과립제, 6종의 산제, 483종의 정제를 선정하였다.

본 연구로써 확립된 과립제, 산제, 정제 중의 PAHs 추출법은 간단하고 빠른 결과를 도출하는 데 유용할 것이며, 또한 본 실험으로 도출된 결과는 유해물질 평가와 위해성 평가를 통해 국민들이 안심하고 이용할 수

있는 환경을 조성하는 데 기초자료로써 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

주 요 어 : GC-MS-SIM, PAHs, 다환방향족탄화수소, 벤조피렌, 발암물질, LLE, 의약품 안전관리

학 번 : 2014-21054

목 차

국문초록 · i

목차 · iii

그림목차 · v

도표목차 · vi

I. 서론 · 1

1. 연구배경 · 1

2. 분석대상 성분 · 2

II. 실험 · 6

1. 다빈도 의약품의 선정 방법 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 6

1-1. 생산실적, 매출실적, 처방전 발행 건수 · · · · · · · · · · · · · · · · · 6

1-2. 생산 매출 처방 발행 실적 발생의 시간 · · · · · · · · · · · · · · · · 6

2. 시약 및 기기 · 6

2-1. 시약 및 용매 · 6

2-2. 실험 기구 · 7

3. 실험방법 · 7

3-1. 추출 및 정제 방법 · 7

3-2. GC-MS를 이용한 분석 · 8

3-3. 분석법의 Method validation 수행 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 10

III. 결과 및 고찰 · 13

1. GC-MS 분석 시 시료 전처리 방법의 최적화 · · · · · · · · · · · 13
1-1. LLE 추출용매 선정 · 13
1-2. 회수율 (recovery test) · 14

2. 분석법 확립을 위한 분석법의 검증 · · · · · · · · · · · · · · · · 15
2-1. Linearity, LOD, LOQ · 15
2-2. 정확도, 정밀도 · 17

3. Blank에 표준용액을 소량 첨가하여 분석법 검증 · · · · · · · · · 19

4. 결과 해석 · 20

IV. 결론 · 24

V. 참고문헌 · 26

Abstract · 28

그 림 목 차

그림 1. 과립제, 산제, 정제의 LLE 분석 과정 · · · · · · · · · · · · · 8

그림 2. 추출용매에 따른 spiked blank에서 PAHs 회수율 · · · · · 13

그림 3. 16가지 PAHs 농도에 따른 피크의 면적비를 나타낸 검량선 · · · 16

그림 4. 과립제의 결과 chromatogram 샘플 · · · · · · · · · · · · · 21

그림 5. 산제의 결과 chromatogram 샘플 · · · · · · · · · · · · · · 21

그림 6. 정제의 결과 chromatogram 샘플 · · · · · · · · · · · · · · 22

도 표 목 차

도표 1. WHO 및 EPA의 PAHs 독성계수 · · · · · · · · · · · · · · · 2

도표 2. 본 연구에서 분석된 16 종의 PAHs · · · · · · · · · · · · · 3

도표 3. Gas Chromatography 분석조건 (GC-MS) · · · · · · · · · 9

도표 4. Selected ion groups of PAHs in GC-MS-SIM analysis · · 10

도표 5. PAHs 100, 150, 400 ng/mL 농도의 spiked blank에서 recovery · · 14

도표 6. 16가지 PAHs 검량선의 Linearity, LOD, LOQ · · · · · · · 16

도표 7. PAHs의 intra-, inter-day 정확성, 정밀성 · · · · · · · · · 18

도표 8. 공시료에서 PAHs의 intra-, inter-day 정확성, 정밀성 · · · · 19

도표 9. 의약품 497건에 대한 16종의 PAHs 검출 · · · · · · · · · 23

I. 서론

1. 연구 배경

다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 2개 이상의 벤젠고리가 결합된 형태로 탄소 및 수소 원소로 이루어진 유기화합물을 말한다. 알킬화 체인을 지닌 PAH류도 PAH에 포함되나, N, S, O의 원소나 이를 포함하는 기를 가진 헤테로고리 화합물 (heterocyclic)은 PAH에 포함되지 않는다.

100종 이상의 PAHs가 존재하나, 일반적으로 단일 화합물이 아닌 혼합물의 형태로 존재한다. 독성 성분으로 알려진 화합물로는 benzo[a]pyrene외 50종이 밝혀졌고, 그 중 17종은 다른 성분들에 비해 해가 큰 것으로 의심되고, PAHs의 전형적인 유해효과를 나타내었다. 또한 미국 환경청 (US environmental protection agency, EPA)은 암성에 근거하여 PAHs 중 우선 대상물질로 16종을 선정하였는데, 그 중 benzo[a]pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, dibenz[a,h]anthracene 등은 유전독성과 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다. (표 1)

한국에서는 최근 들어서 PAHs 중 독성이 가장 강한 벤조피렌의 검출 사례가 크게 이슈가 되었다. 식품에서 벤조피렌의 양이 기준치를 초과하여 검출된 사례가 있었고, 천연물 의약품에서도 벤조피렌이 발견되었다. 지속적인 벤조피렌의 검출에 의해 사회적 여론이 벤조피렌에 대한 불안감으로 조성되어 있기 때문에 다수의 의약품에 대해 벤조피렌을 포함한 PAHs가 검출되는지를 알아보고자 하였다.

의약품 선진국의 경우, 수년전부터 의약품 안전관리 정책방향을 효율적 약물감시(effective pharmacovigilance)를 통한 전주기적 관리체계로 전환하여 왔으며, 미국의 경우 위해완화전략(risk evaluation mitigation strategy), 유럽에서는 위해관리계획(risk management plans)같은 제도가 시행되고 있다. 따라서 우리나라의 의약품산업 환경과 여건에 적합한 의약품 안전관리 정책의 개발을 통해 적극적으로 개선대책을 마련해 나갈 필요가 있을 것이다. (J.

Korean Med. Assoc, 2012)

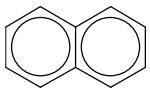
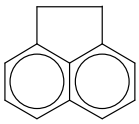
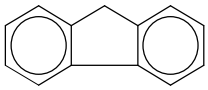
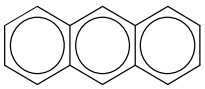
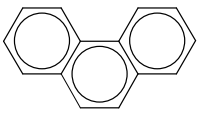
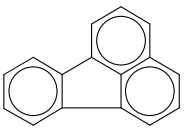
No.	PAHs	WHO	EPA
1	Naphthalene	–	0.001
2	Acenaphthylene	–	0.001
3	Acenaphthene	–	0.001
4	Fluorene	–	0.001
5	Phenanthrene	–	0.001
6	Anthracene	–	0.01
7	Fluoranthene	–	0.001
8	Pyrene	–	0.001
9	Benzo(a)anthracene	0.1	0.1
10	Chrysene	0.01	0.01
11	Benzo(b)fluoranthene	0.1	0.1
12	Benzo(k)fluoranthene	0.1	0.1
13	Benzo(a)pyrene	1.0	1
14	Dibenz(a, h)anthracene	1.0	1
15	Benzo(g,h,i)perylene	0.01	0.01
16	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	0.1	0.1

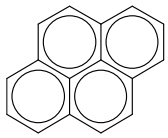
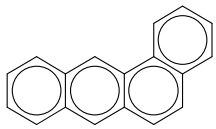
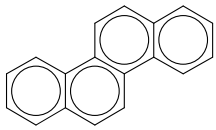
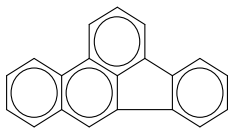
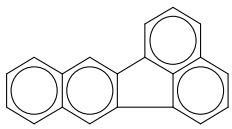
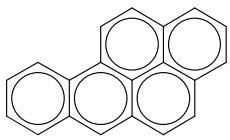
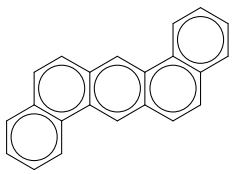
표 1. WHO 및 EPA의 PAHs 독성계수(Toxicity Equivalent Factors)

2. 분석대상 성분

다환방향족탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)는 독성이 강하여 US-EPA, Codex 및 JECFA (joint FAO/WHO expert committee on food additives)의 위해성 평가를 위한 우선순위 목록에 포함되어 있다. 미국 환경청 (EPA)에서는 이들 화합물 중 유해 우선물질로 16개 PAHs를 정하여 관리하고 있다. 본 연구에서도 의약품 제조

공정 중에 발생할 수 있는 16개 PAHs를 분석대상으로 하여 실험을 수행하였다. (표 2)

	종류	분자량	화학식	구조
1	naphthalene	128	$C_{10}H_8$	
2	acenaphthylene	152	$C_{12}H_8$	
3	acenaphthene	154	$C_{12}H_{10}$	
4	fluorene	167	$C_{13}H_9$	
5	anthracene	178	$C_{14}H_{10}$	
6	phenanthrene	178	$C_{14}H_{10}$	
7	fluoranthene	202	$C_{16}H_{10}$	

8	pyrene	202	$C_{16}H_{10}$	
9	benz[a]anthracene	228	$C_{18}H_{12}$	
10	chrysene	228	$C_{18}H_{12}$	
11	benzo[b]fluoranthene	252	$C_{20}H_{12}$	
12	banzo[k]fluoranthene	252	$C_{20}H_{12}$	
13	benzo[a]pyrene	252	$C_{20}H_{12}$	
14	dibenz[ah]anthracene	278	$C_{22}H_{14}$	

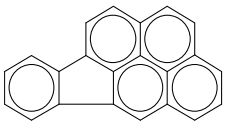
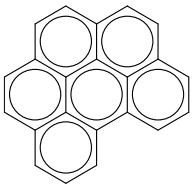
15	indeno[1,2,3-cd]pyrene	276	$C_{22}H_{12}$	
16	benzo[ghi]perylene	276	$C_{22}H_{12}$	

표 2. 본 연구에서 분석된 16 종의 PAHs

II. 실험

1. 다빈도 의약품의 선정 방법

1-1. 생산실적, 매출실적, 처방전 발행 건수

생산실적, 매출실적, 처방전 발행 건수 등의 정보는 실제 의약품의 시장 규모를 반영하는 실질적인 다빈도의 기준이 될 수 있다. 생산실적은 규정된 기간 (보통 1년 단위) 내에 국내 각 제약기업의 생산량 자료를 의미하며, 매출액은 실제 소비된 의약품의 매출단위를 의미한다. 생산실적은 반품되는 규모 내지는 물류단계의 규모를 반영할 수 없다. 따라서, 생산실적과 매출실적은 차이가 날 수 있으나, 업계 또는 자문단 구성원은 보통 매출 실적을 다빈도의 실질적 변수로 고려하는 것이 타당하다는 의견을 제시하고 있다. 또한, 처방전 발행 건수도 다빈도를 평가하기 위한 신뢰성 높은 자료이나, 건강보험심사평가원에서 관리하는 비밀 정보이므로 접근이 어렵고, 전문의약품에 제한된다. 따라서, 본 연구의 “다빈도 사용 의약품군”은 의약품 매출 실적을 고려하는 것이 타당하다.

1-2. 생산 / 매출 / 처방 발행 실적 발생의 기간

가장 최근의 의약품 시장을 반영해야 하므로 가급적이면 가장 최신의 누적 자료를 활용해야 한다. 따라서, 본 연구의 “다빈도 사용 의약품군”의 선정은 최신 의약품 시장의 현황을 반영하기 위하여 2012년 10월부터 2013년 9월까지의 누적자료를 이용하였다.

2. 시약 및 기기

2-1. 시약 및 용매

본 연구에서 사용된 모든 용매는 HPLC 등급을 사용하였다.

■ Water (J.T. Baker, USA)
■ Hexane (J.T. Baker, USA)
■ PAHs mixture 표준품 (Supelco, USA)
■ Benzo[a]pyrene-d_{12} (Sigma Aldrich, USA)
■ Acenaphthene-d_{10}, Benz[a]anthracene-d_{12} (Supelco, USA)

모든 표준품은 각각 2,000 μg/mL의 농도의 표준원액의 상태로 4 ℃에서 냉장보관 하였다.

2-2. 실험 기구

■ Shimadzu-GC-2010 (Shimadzu, Japan)
■ GCMS-QP2010 mass spectrometer (Shimadzu, Japan)
■ Ultrasonic bath (Branson, USA)
■ Vortex-genie 2 (Scientific Industries, USA)
■ Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Germany)
■ Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Germany)

3. 실험방법

3-1. 추출 및 정제 방법

PAHs는 대기, 토양, 식품, 폐기물 등에서 자주 발견될 수 있는 유해물질로 이를 분석하기 위한 다양한 방법들이 개발되었다. 전처리방법으로 시료의 매트릭스 성상에 따라 초음파 추출 (ultrasonication), 액체-액체 추출법 (liquid-liquid extraction, LLE) 및 고체상추출법 (solid phase extraction, SPE)이 사용되고 있다. 본 연구에서는 과립, 산제, 정제 의약품의 추출법으로써 장비가 저렴하고 간편한 방법인 액체-액체 추출법을 이용하여 실험을 진행하였다.

과립제, 산제, 정제 의약품의 전처리법은 시료 1 g에 HPLC용 물 4 mL와 유기용매 4 mL를 첨가하고 5분 간 액체-액체 추출 (liquid-liquid

extraction) 3회 진행하여 PAHs의 분석물질을 추출하였다. 물에 의약품을 효과적으로 용해시키기 위하여 초음파 추출을 20분 동안 진행하였다. 액체-액체 추출 시 극성층과 비극성층의 접촉 면적을 증가시키기 위하여 vortexing을 이용하였으며, 극성층과 비극성층의 층 분리를 촉진하고 부유물을 가라앉히기 위하여 centrifugation을 이용하였다. 이 용액을 N_2 가스로 500 μL까지 농축시켰다. 이 중 1μL를 GC-MS에 주입하여 분석하였다. 다음 (그림 1) 은 전처리법을 간단히 도식화한 것이다.

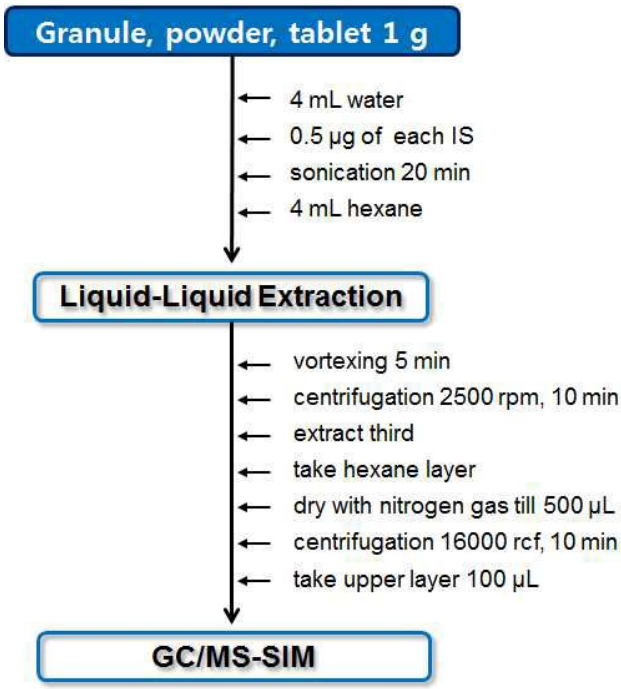


그림 1. 과립제, 산제, 정제의 LLE 분석 과정

3-2. GC-MS를 이용한 분석

의약품 중 PAHs 분석물질들의 분리와 정량분석을 위한 기기로 GC-MS를 이용하였다. 먼저 시료 전처리 과정을 거친 뒤, 헬륨을 이동상으로 하여 기존 연구[25]를 참고하여 GC-MS-SIM mode로 분리 및 분석법을 설정하였다. 분석용 컬럼은 DB-5MS 컬럼 (30 m x 0.32 m x 0.25 μm film)을 사용하였고, GC 분리관 온도는 100℃ (3 min)에서 230℃까지 15

℃/min 씩 승온시킨 후, 230℃에서 260℃ (3min)까지 5 ℃/min씩 승온시켰으며 260℃에서 310℃ (4min)까지 10 ℃/min씩 승온하여 총 25분 안에 분석 성분들이 분리가 잘 될 수 있도록 진행시켰다. (표 3) MS 조건 이온화는 전자 이온화 방식을 사용하는 electron ionization (EI)방식을 사용하였으며 이온화 에너지는 70 eV로 진행하였다. 분리관은 사중극자로써 아래의 조건에서 각 성분들의 질량 스펙트럼과 selective ion monitoring chromatogram (SIM)와 extracted ion chromatogram (EIC)을 얻었다. PAHs는 분자량과 끓는점이 비례하는 경향이 있어 머무름 시간에 따라 3가지 그룹으로 나누었다. 첫 번째 그룹은 벤젠고리를 3개 이하를 가지고 있는 분자량이 적은 naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene로, 두 번째 그룹은 고리를 4개를 가지고 있는 floranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene로, 세 번째 그룹은 벤젠 고리가 최소 4개에서 최대 6개로 구성된 benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[g,h,i]perylene, dibenzo[a,h]anthracene, indeno[1,2,3-c,d]pyreneacenaphthene로 구성하고 있다. 각 그룹별로 휘발성과 반응성이 적은 내부표준물질 (internal standard)인 acenaphthene-d_{10}, benz[a]anthracene-d_{12}, benzo[a]pyrene-d_{12}를 설정하였고 분석 시 GC-MS의 상태를 확인할 수 있는 실린지 내부표준물질 (syringe internal standard)인 phenanthrene-d_{10}를 추가로 선정하였다. (표 4)

Column	DB-5MS (30 m × 0.25 m × 0.25 m Film)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection vol.	1.0 μL
Split ratio	10:1
Injection temp.	290 ℃
Oven temp.	100℃(3min) → 15 ℃/min → 230℃ → 5℃/min → 260℃(3min) → 10℃/min → 310℃(4min)
Post oven temp.	310 ℃(3 min)
Interface temp.	290 ℃
Ionization voltage	70 eV
Analyzer	Quadrupole

표 3. Gas Chromatoghaphy 분석 조건

Ion group	Compounds	Retention time (min)	Quantitative ion (m/z)	Confirmation ion (m/z)	Area ratio
Group 1	naphthalene	5.92	128	102	14.14
	acenaphthylene	8.80	152	150	7.20
	acenaphthene	9.02	154	153	1.91
	acenaphthene-d_{10} (I.S.)	9.09	164		
	fluorene	9.95	166	165	9.57
	phenanthrene	11.54	178	176	5.53
	anthracene	11.62	178	176	6.39
	phenanthrene-d_{10} (syringe I.S.)	11.50	188		
Group 2	fluoranthene	13.77	202	200	5.59
	pyrene	14.27	202	200	5.37
	benz[a]anthracene-d_{12} (I.S.)	17.57	240		
	benz[a]anthracene	17.64	228	226	4.34
	chrysene	17.75	228	226	3.79
Group 3	benzo[b]fluoranthene	21.98	252	250	5.08
	benzo[k]fluoranthene	22.08	252	250	5.93
	benzo[a]pyrene-d_{12} (I.S.)	23.04	264		
	benzo[a]pyrene	23.12	252	250	4.58
	benzo[g,h,i]perylene	26.29	276	274	4.65
	dibenzo[a,h]anthracene	26.42	278	276	3.12
	indeno[1,2,3-c,d]pyrene	26.95	276	274	5.85

표 4. Selected ion groups of PAHs in GC/MS-SIM analysis

3-3. 분석법의 Method validation 수행

■ 직선성 (linearity) 검증

표준물질 16종 대해 calibration curve 작성을 통해 상관계수 R_2을 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다.

■ 검출한계/정량한계 설정

- 검출한계 (limit of detection, LOD)는 시료에서 분석 대상물질을 검출 가능한 최소량을 의미하여 구하는 방법은 신호 (signal) 대 잡음 (noise)에 근거하는 방법 그리고 반응의 표준편차와 검정곡선의 기울기에 근거하는 방법으로 구한다. 크로마토그램에서 나타난 분석 물질의 피

크의 신호대 잡음 비율인 S/N (signal to noise) = 3 기준으로 정하였다.

- 정량한계 (limit of quantitation, LOQ)는 시료에 존재하는 분석 대상 물질을 검정농도 (calibration points)와 질량스펙트럼 (mass spectra)에서 선택이온의 이온크로마토그램을 통하여 확인할 수 있는 최소 수준으로 검출한계와 비슷하게 신호 (signal) 대 잡음 (noise)에 근거하는 방법 그리고 반응의 표준편차와 검정곡선의 기울기에 근거하는 방법으로 구한다. 크로마토그램에서 나타난 분석 물질의 피크의 신호대 잡음 비율인 S/N = 10을 기준으로 정하였다.

■ 정확성 및 정밀성 검증

- 정확성 (accuracy)은 측정값이 이미 알고 있는 참값 또는 표준값에 근접한 정도로서, 인증표준물질 (CRM)과 같은 시료 중 알려진 농도의 분석물질을 함유하고 있는 시료의 결과값과 참값을 비교하여 구한다. 인증표준물질이 없을 경우 바탕시료 (blank sample) 또는 시료에 표준물질을 첨가하여 분석 하고 그 결과 값의 회수율을 이용하여 정확성을 검증한다.

회수율 (total recovery, %) = A/C × 100

A : 공시료에 분석물질을 첨가한 후 추출한 액의 반응

B : 추출하지 않은 분석표준물질 용액의 반응

- 정밀성 (precision)은 균일한 검체를 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성 (분산정도)를 가리키며, 일반적으로 5번 이상의 분석값의 분산, 표준편차, 혹은 상대표준편차의 계산에 의해 표현한다.

- 정확도와 정밀도는 각 표준용액 당 저, 중, 고농도 3가지로 하여 하루에 실험을 3번 시행하여 일내 (intra-day) 정밀성과 정확성을 구하고, 3일간 반복 실험을 시행하여 일간 (inter-day) 정밀성과 정확성을 확인하

였다.

■ 회수율 측정

- 회수율 실험은 blank로 진행하였다. 과립, 산제, 정제 의약품은 기본적인 부형제 및 활택제인 lactose와 magnesium stearate에 최종 농도가 저, 중, 고농도의 표준용액을 첨가하여 의약품 매트릭스의 영향을 확인하였다. 또한 회수율을 구하였다.

■ 시료의 정량은 다음과 같은 식을 사용하여 계산하였다.

- 피크면적 적분

검정곡선 방법을 사용해서 내부표준물질에 대한 추출물의 농도를 정량한다. 아래와 같이 검정곡선식을 재배열할 수 있다.

$$\frac{A_S}{A_{iS}} = aCs + b$$

여기서, A_S = 정량용 표준물질로 사용한 분석물질의 피크 면적

A_{iS} = 내부표준물질의 피크 면적

C_S = 정량용 표준물질로 사용한 분석물질의 농도

a = 직선의 기울기, b = 절편

- 농도의 계산

내부표준물질을 사용하여 시료농도를 계산할 때, PAHs의 농도를 계산하기 위해 아래와 같은 회귀식을 다시 재배열하여 농도를 계산한다.

$$C_S = \frac{(\frac{A_S}{A_{iS}} - b)}{a}$$

III. 결과 및 고찰

1. GC-MS 분석 시 시료 전처리 방법의 최적화

1-1. LLE 추출용매 선정

본 실험에서는 의약품 blank를 정밀하게 취한 뒤, PAHs mixture 표준품 100 ng/mL를 첨가하고, 추출용매를 넣고 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction)을 사용하였다. 추출용매는 극성인 의약품 주성분이 녹지 않으면서, 비극성의 PAHs가 잘 용해될 수 있는 용매인 헥산, 톨루엔, 사이클로헥산 3가지를 사용하였다. PAH spiked 의약품 시료를 이들 용매로 추출하여 GC-MS로 분석한 후, 각각의 PAHs의 피이크 면적비를 비교해 본 결과, 헥산용매가 PAH 전반에 걸쳐 70-120% 범위로 가장 좋은 추출효율을 보여주었다. (그림 2)

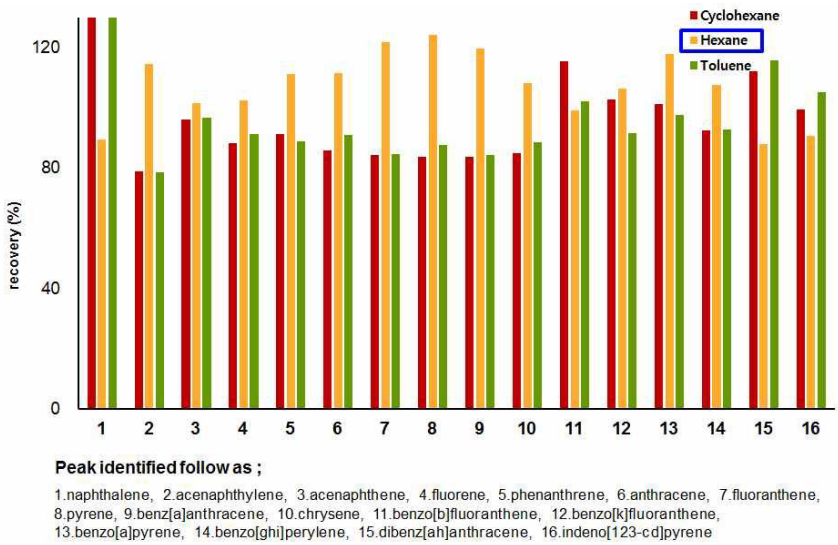


그림 2. 추출용매에 따른 spiked blank에서 PAHs의 회수율

1-2. 회수율 (recovery test)

전처리 방법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 회수율과 그에 대한 재현성을 확인하고자 하였다. 회수율은 전처리를 거치기 전과 후의 분석물질과 내부표준물질의 피크 면적비를 비교하여 백분율 (%)로서 구하였다. 각 제형별 공시료에 저, 중, 고농도 표준용액을 첨가하고 3번 반복하여 실험하였다.

의약품 blank에 최종농도가 100, 150 및 400 ng/mL 표준용액과 내부표준물질을 소량 첨가하여 액체-액체 추출법으로 정제하고 질소 가스로 농축을 시킨 다음 GC-MS로 분석하였다. 회수율은 recovery rate는 범위 71.11 - 121.46% 의 양호한 회수율을 보였으며, RSD 값은 12.21% 이하로 나타났다. (표 5)

compound	Recovery Rate (%) ± RSD (N=3)		
	100 ppb	150 ppb	400 ppb
naphthalene	108.30 ± 1.51	121.46 ± 3.77	78.34 ± 4.29
acenaphthylene	91.58 ± 0.94	76.80 ± 4.67	102.42 ± 10.99
acenaphthene	97.05 ±1.13	77.76 ± 3.40	93.77 ± 3.94
fluorene	86.23 ± 0.74	80.29 ± 5.17	119.93 ± 6.18
phenanthrene	89.72 ± 3.11	76.03 ± 6.45	109.35 ± 12.06
anthracene	89.13 ± 3.12	81.12 ± 4.63	100.01 ± 10.90
fluoranthene	99.95 ± 5.18	72.39 ± 4.27	82.63 ± 5.34
pyrene	98.71 ± 5.07	71.11 ± 4.41	81.60 ± 8.13
benz[a]anthracene	97.35 ± 6.02	80.16 ± 6.59	92.52 ± 6.56
chrysene	93.69 ± 3.94	84.71 ± 1.69	80.38 ± 5.78
benzo[b]fluoranthene	102.40 ± 3.90	73.98 ± 5.39	80.76 ± 0.55
benzo[k]fluoranthene	91.63 ± 9.56	87.47 ± 1.64	83.85 ± 3.35
benzo[a]pyrene	92.46 ± 7.28	75.34 ± 4.34	84.55 ± 2.39
benzo[g,h,i]perylene	102.50 ± 6.36	93.53 ± 4.32	107.99 ± 12.21
dibenzo[ah]anthracene	106.10 ± 8.38	88.98 ± 4.47	90.47 ± 8.99
indeno[123-cd]pyrene	96.44 ± 3.39	84.54 ± 7.09	85.02 ± 3.66

표 5. PAHs 100, 150, 400 ng/mL 농도의 spiked blank에서 recovery

2. 분석법 확립을 위한 분석법의 검증

2-1. Linearity, LOD, LOQ

분석법 검증을 검토하기 위해 각 표준품들의 직선성, 범위, LOD 및 LOQ를 검토하였다. LOD는 S/N (signal to noise) = 3.0 , LOQ는 S/N = 10.0을 기준으로 정하였다. 제형별로 1 - 500 ng/mL 농도 범위에서 5개 이상의 서로 다른 농도를 선택하여 각 표준품의 검량선은 내부표준물질의 면적비를 이용하여 직선성 (linearity)와 관련된 수치와 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ) 등을 나타내었다.

PAHs의 표준물질인 naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene의 검량선은 5 - 1000 ng/mL 사이의 농도 범위에서 상관계수 R_2 값이 0.999 이상으로 나타나 우수한 직선성을 보여주었다. 또한 benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[g,h,i]perylene, dibenzo[a,h]anthracene, indeno[1,2,3-c,d]pyrene의 검량선은 10 - 1000 ng/mL 사이의 농도 범위에서 작성되었고 상관계수 R_2 값이 0.999 이상으로 나타나 우수한 직선성을 보여주었다. **그림 3** 은 16가지 PAHs의 농도에 따른 피크의 면적비를 나타낸 검량선이다. **표 6** 은 16가지 PAHs의 검량선의 직선성 (linearity)과 관련된 수치와 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ) 등을 요약한 표이다. 각 분석물질의 정량한계는 5.26 - 14.58 ng/mL 수준을 나타냈다.

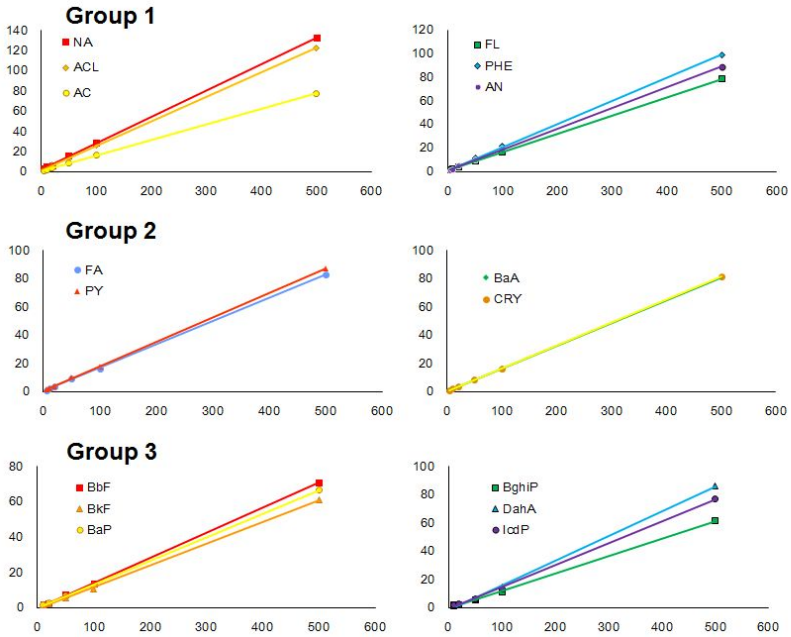


그림 3. 16가지 PAHs 농도에 따른 피크의 면적비를 나타낸 검량선

Compound	range (ng/mL)	Slope	Intercept	Corr. Coeff. (R^2)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
naphthalene	5-500	0.2625	2.1535	0.9998	1.58	5.26
acenaphthylene	5-500	0.243	1.3006	0.9997	2.39	7.95
acenaphthene	5-500	0.1542	0.6407	0.9998	2.25	7.49
fluorene	5-500	0.1557	0.5987	0.9999	1.59	5.29
phenanthrene	5-500	0.1959	1.0638	0.9998	1.70	5.68
anthracene	5-500	0.1776	0.5967	0.9997	1.90	6.35
fluoranthene	5-500	0.1649	0.4702	0.9998	1.58	5.26
pyrene	5-500	0.1736	0.5851	0.9998	1.52	5.06
benz[a]anthracene	5-500	0.1611	0.3929	0.9999	2.04	6.79
chrysene	5-500	0.1619	0.4148	1	2.47	8.25
benzo[b]fluoranthene	10-500	0.141	0.1766	0.9998	4.29	14.29
benzo[k]fluoranthene	10-500	0.122	-0.3337	0.9993	3.25	10.83
benzo[a]pyrene	10-500	0.1332	-0.0933	0.9999	4.09	13.64
benzo[g,h,i]perylene	10-500	0.1234	-0.3538	0.9994	4.38	14.58
dibenzo[ah]anthracene	10-500	0.1752	-1.6707	0.9992	3.49	11.63
indeno[123-cd]pyrene	10-500	0.1546	-0.7775	0.9989	4.14	13.79

표 6. 16가지 PAHs의 검량선의 Linearity, LOD, LOQ

2-2. 정확도와 정밀도

정확도와 정밀도는 세 가지 농도로 하여 하루에 실험을 3번 시행하여 일 내 (intra-day) 정밀성을 구하고, 3일 간 반복 실험을 시행하여 일 간 (inter-day) 정밀성과 정확성을 확인하였다.

본 연구에서 개발된 PAHs 분석법의 정밀성을 확인하기 위해 표준용액 20, 100 및 1000 ng/mL 세 가지 농도로 준비하여 하루에 실험을 3번 시행하여 일 내 (intra-day) 정밀성을 구하고, 3일 간 반복 실험을 시행하여 일 간 (inter-day) 정밀성과 정확성을 확인하였다. 분석 결과 표준용액이 20 ng/mL 일때는 상대표준편차 (C.V., %)의 값이 0.6-10.3%, 표준용액이 100 ng/mL 일때는 상대표준편차 (C.V., %)의 값이 0.4-7.2%, 표준용액이 1000 ng/mL 일 때는 상대표준편차 (C.V., %)의 값이 1.8-10.3%로 Codex Guideline의 기준 내에 수치를 보여주었다.

표 7 은 저, 중, 고농도의 PAHs에 대한 일 내 (intra-day), 일 간 (inter-day) 실험의 정확성과 정밀성에 대한 수치를 나타낸 표이다.

Compound	Conc. (ng/mL)	Intra - day(n = 3)		Inter - day(n = 3)	
		Precision (C.V., %)	Accuracy (%)	Precision (C.V., %)	Accuracy (%)
naphthalene	20	3.20	114.56	2.63	116.17
	100	1.61	99.69	3.59	99.32
	1000	1.76	104.59	3.56	105.53
acenaphthylene	20	3.38	110.60	3.88	108.11
	100	1.44	91.99	4.86	93.15
	1000	3.23	103.27	3.97	102.06
acenaphthene	20	0.55	116.46	2.31	117.75
	100	1.40	96.64	3.31	96.48
	1000	3.21	104.09	3.69	103.02
fluorene	20	0.72	108.44	1.68	108.82
	100	1.57	92.81	4.06	92.54
	1000	3.49	105.66	3.94	104.27
phenanthrene	20	0.96	106.38	2.79	105.72
	100	1.34	89.55	5.51	89.23
	1000	4.53	101.55	5.10	99.21
anthracene	20	2.89	106.34	3.74	105.38
	100	1.97	87.71	6.80	88.13
	1000	4.77	103.62	5.60	100.36
fluoranthene	20	4.61	117.37	4.71	115.29
	100	0.89	91.80	4.42	92.00
	1000	3.80	101.95	6.41	106.28
pyrene	20	3.97	117.97	4.37	114.79
	100	1.21	91.83	4.08	91.84
	1000	3.68	101.76	6.21	105.92
benz[a]anthracene	20	3.46	91.70	5.10	88.46
	100	3.03	91.09	4.18	91.90
	1000	2.94	116.44	4.11	117.81
chrysene	20	7.37	128.30	8.78	124.93
	100	2.44	95.42	3.85	95.69
	1000	3.46	110.70	4.13	112.32
benzo[b]fluoranthene	20	10.24	112.55	6.83	109.88
	100	0.64	93.53	3.38	93.26
	1000	4.87	109.39	4.94	109.40
benzo[k]fluoranthene	20	4.34	121.45	5.37	122.02
	100	3.71	95.42	7.18	97.43
	1000	3.67	110.72	4.21	110.57
benzo[a]pyrene	20	5.36	106.82	5.03	109.65
	100	0.36	90.68	3.51	89.39
	1000	3.89	115.89	5.08	117.07
benzo[ghi]perylene	20	8.13	83.11	5.91	87.91
	100	2.87	89.74	5.52	110.96
	1000	4.81	107.08	4.89	106.90
dibenzo[ah]anthracene	20	2.64	91.31	6.84	89.20
	100	4.33	83.20	5.22	85.05
	1000	10.33	115.25	7.22	114.00
indeno[123-cd]pyrene	20	10.25	105.09	8.19	103.05
	100	2.75	83.29	3.66	82.55
	1000	4.68	108.16	4.48	108.88

표 7. PAHs의 intra-, inter-day 정확성, 정밀성

3. Blank에 표준용액을 소량 첨가하여 분석법 검증

과립제, 산제, 정제 의약품 공시료인 blank tablet 1 g에 최종부피에서 농도가 100 ng/mL가 되도록 표준용액과 내부표준물질을 소량첨가 하여 액체-액체 추출법으로 정제하고 질소가스로 농축 시킨 용액을 GC-MS로 분석하였다. 정밀도 (precision)는 0.7-11.0% 범위 안에 정확도(accuracy)는 84.8-107.3% 범위 안에 포함되어 양호한 결과값을 가졌다. **표 8** 에 일간, 일내 정확도와 정밀성을 자세히 설명해두었다.

Compound	Intra - day(n = 3)		Inter - day(n = 3)	
	Precision (C.V., %)	Accuracy (%)	Precision (C.V., %)	Accuracy (%)
naphthalene	5.6	1.5	108.3	1.4
acenaphthylene	1.8	0.9	91.6	3.9
acenaphthene	1.4	1.1	97.0	1.6
fluorene	9.0	0.7	86.2	6.7
phenanthrene	8.0	3.1	89.7	5.4
anthracene	2.0	3.1	89.1	10.6
fluoranthene	3.2	5.2	99.9	11.0
pyrene	3.1	5.1	98.7	11.0
benz[a]anthracene	9.3	6.0	97.4	8.5
chrysene	7.4	3.9	93.7	8.0
benzo[b]fluoranthene	1.9	3.9	102.4	7.3
benzo[k]fluoranthene	6.1	9.6	91.6	5.4
benzo[a]pyrene	1.5	7.3	92.5	10.2
benzo[ghi]perylene	11.4	6.4	102.5	3.1
dibenzo[ah]anthracene	6.3	8.4	106.1	9.0
indeno[123-cd]pyrene	4.1	3.4	96.4	1.3

표 8. 공시료에서 PAHs의 intra-, inter-day 정확성, 정밀성

4. 결과 해석

실제 시료에서 16개의 분석물질을 정성이온 (quantitative ion)과 정량이온 (confirmationion)의 면적비를 각 표준물질의 면적비 (Table 18)와 비교한 후 검출을 확인한다. 실제 시료의 면적비와 표준물질의 면적비는 Supersedes Document No. SANCO/3131/2007[29]에 따라 상대적 강도(베이스 피크의 퍼센트(%))가 50% 이하면 ± 10% 범위, 20% 이상 - 50 미만이면 ± 15% 범위, 10% 이상 20% 미만이면 ± 20%, 10% 이하이면 ± 50% 범위 안에 포함되는지 확인하여 분석물질의 여부를 판단한다.

과립제, 산제, 정제 의약품 각각의 시료를 1 g 취해 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction)에 의해 주성분을 제거하고 분석물질을 정제한 다음 질소 가스로 농축시켜 GC-MS-SIM mode로 분석하였다.

과립제 의약품의 대표적 예로서 과립제 샘플의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram을 **그림 4** 에 나타내었다. EIC에서 naphthalene과 acenaphthene의 피크들이 매우 작게 검출되었으나, 정량한계 이하 값을 가져 검출되지 않았다고 판단하였다.

산제 의약품의 대표적 예로서 산제 샘플의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram을 **그림 5** 에 나타내었다. EIC에서 naphthalene의 피크가 매우 작게 검출되었으나, 정량한계 이하 값을 가져 검출되지 않았다고 판단하였다.

정제 의약품의 대표적 예로서 정제 샘플의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram을 **그림 6** 에 나타내었다. EIC에서 naphthalene의 피크가 매우 작게 검출되었으나, 정량한계 이하 값을 가져 검출되지 않았다고 판단하였다. 이 시료의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram에서 나타난 것처럼 naphthalene의 정량이온 (m/ z 128)과 정성이온 (m/ z 102) 피크가 정확한 면적비로 검출되었으며, 동위원소치환 내부표준물질의 피크 면적을 비교하여 확인한 결과 2.88 ng/g으로 검출되었다.

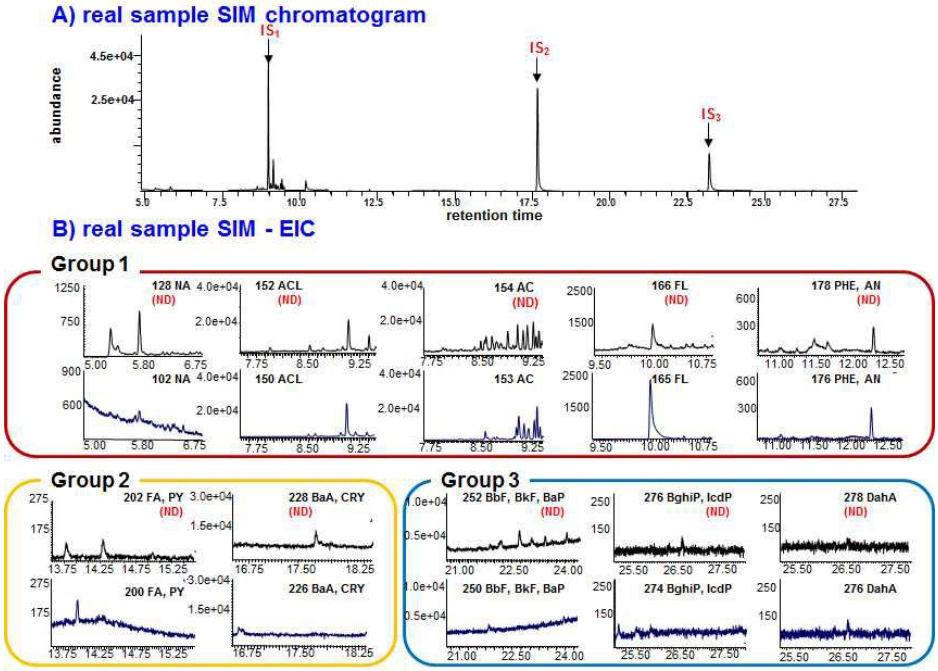


그림 4. 과립제의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram

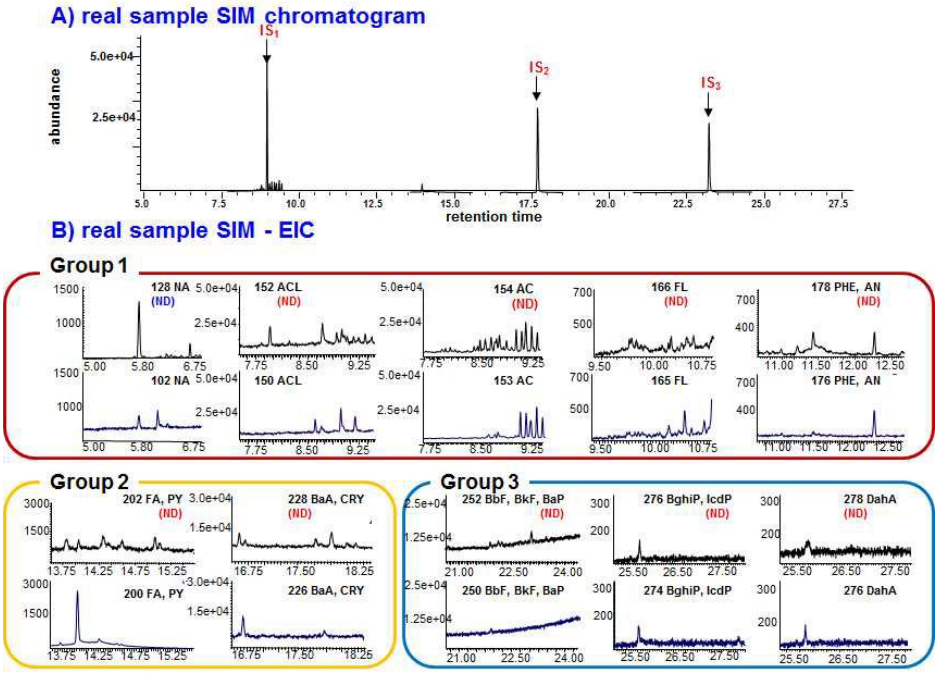


그림 5. 산제의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram

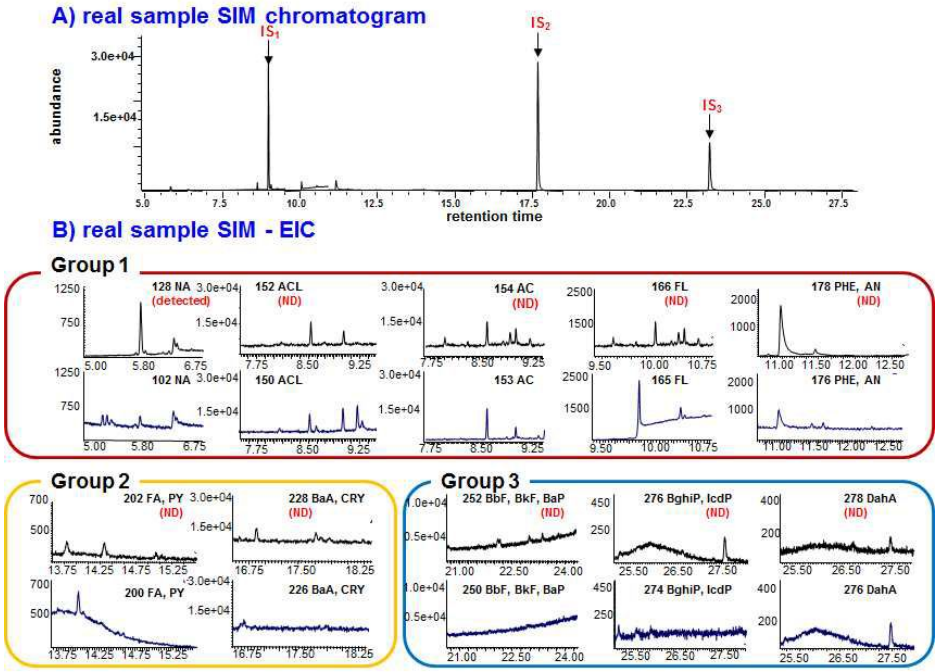


그림 6. 정제의 SIM chromatogram과 extracted ion chromatogram

과립제 의약품 8 건과 산제 의약품 6 건에서는 검출된 분석물질이 없었다. 정제 의약품 621 건 중 naphthalene은 165건에서 검출되었고, 최소 농도 1.17 ng/mg, 최대 농도 653.19 ng/mg로 나타났다. acenaphthylene은 1건에서만 7.02 ng/mg의 농도로 검출되었고, acenaphthene은 5건에서 최소 농도 4.23 ng/mg, 최대 농도 103.41 ng/mg으로 검출되었다. fluorene은 18건에서 검출되었고, 최소 농도 1.03 ng/mg, 최대 농도 672.60 ng/mg으로 나타났으며, phenanthren은 51건에서 검출되어 최소 농도 1.21 ng/mg, 최대 농도 842.47 ng/mg로 나타났다. anthracene은 6건에서 검출되었고, 최소 농도 1.72 ng/mg, 최대 농도 89.73 ng/mg 으로 나타났다. benz[a]anthracene은 1건에서 14.12 ng/mg 농도로 검출되었다. chrysene은 14건에서 검출되었고, 최소 농도 3.30 ng/mg, 최대 농도 11.66 ng/mg로 나타났고, benzo[b]fluoranthene은 5건에서 최소 농도 4.49 ng/mg, 최대 농도 78.07 ng/mg로 나타났으며, benzo[k]fluoranthene은 2건에서 각각 7.03 ng/mg, 29.38 ng/mg로 검출되었다.

benzo[g,h,i]perylene은 1건에서 10.60 ng/mg의 농도로 검출되었고, dibenzo[ah]anthracene은 4건에서 검출되어 최소 농도 10.63 ng/mg, 최대 농도 14.77 ng/mg로 나타났고, indeno[123-cd]pyrene은 2건에서 각각 7.72 ng/mg, 9.92 ng/mg이 검출되었다. (표 9)

	NA	ACL	AC	FL	PHE	AN	PY	BaA	CRY	BbF	BkF	BghiP	DahA	IcdP
검출 건수	145	1	3	15	48	6	3	1	18	6	2	1	4	2
최소 농도 값	1.17	7.02	4.23	1.03	1.21	1.72	237.55	14.12	2.65	3	7.03	10.6	10.63	7.72
최대 농도 값	562.71	7.02	103.41	77.47	842.47	89.73	736.38	14.12	11.66	78.07	29.38	10.6	14.77	9.92
평균값	35.99	7.02	32.54	14.43	46.74	19.89	412.82	14.12	4.69	19.36	18.2	10.6	11.83	8.82

표 9. 의약품 497건에 대한 16종의 PAHs 검출

※ 참고사항

이 실험에서는 다량의 의약품을 단시간에 screening하는 것을 주목적으로 하였으므로, 개별의 의약품 추출에 대하여 각각의 주성분을 고려하지 않았다.

의약품의 LLE를 시행하는 과정에서 특정 부형제가 많이 함유된 경우에는 물이나 헥산 등의 용매를 첨가하는 경우 젤리형에 가깝게 응고하는 경우가 발견되었다. 이 경우 용매를 더 첨가하거나 스파츌러를 이용하여 휘젓는 방법을 사용하였으며, 대부분의 경우에는 메탄올을 첨가하면 용해가 되었다.

또 추출물에는 PAHs외의 불순물들이 다소 많이 포함되어 있었기 때문에 GC의 컬럼이 자주 망가지는 문제점이 있었고, 그 중 특정 부형제로 추정되는 피크는 14 min(retention time) 경에 나오는 pyrene의 피크와 겹치므로 이 경우에는 pyrene의 측정이 불가능하였다.

PAHs는 플라스틱에서도 나오고 공기 중에도 포함되어 있기 때문에 가능한 외부로부터의 PAHs의 유입을 막기 위하여 유리 바이알을 사용한 것이며, 부형물을 가라앉히기 위한 맨 마지막 단계에서도 필터를 사용하지 않고 원심분리를 사용하였다.

유리 바이알은 사용 후 HPLC용 메탄올로 1번 헹군 후, 물로 3번 씻어내고 마지막에는 메탄올로 한 번 더 헹궈주었다. 그럼에도 불순물이 남아있는 경우에는 헥산과 메탄올, 물을 이용하여 깨끗해질 때까지 sonication 등으로 씻어내었다.

IV. 결론

1. 본 연구에서는 GC-MS-SIM 모드를 이용하여 과립제, 산제, 정제 등의 의약품 중 다환방향족탄화수소 (PAHs) 시험법을 개발하였다.

2. 의약품 중의 PAHs 분석에 관한 연구로는 본 연구가 최초이며, GC-MS-SIM 모드를 이용한 쉽고 빠른 분석법 확립을 통하여 누구나 쉽게 의약품 중에서 PAHs를 분석을 할 수 있도록 하였다.

3. 본 연구에서 선정된 다빈도 의약품 8종의 과립제, 6종의 산제, 483종의 정제 중에서 검출된 다환방향족탄화수소류는 극소량이므로, 이로 인한 인체에 치명적인 위해성은 없을 것으로 판단하였다.

4. 본 연구 결과는 앞으로의 의약품 중의 다환방향족탄화수소의 관리에 대한 가이드라인을 제시하는데 큰 의의가 있으므로, 본 연구 결과를 바탕으로 우리나라의 의약품산업 환경과 여건에 적합한 의약품 안전관리 정책의 개발을 통해 적극적으로 개선대책을 마련해 나갈 필요가 있을 것이다.

V. 참고문헌 (References)

1. H. G. Kicinski/S. Adamek/A. Kettrup, Trace Enrichment and HPLC Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Samples, Using Solid Phase Extraction in Connection with UV/VIS Diode-Array and Fluorescence Detection, J.Chromatographia 28, 203-208 (1998)

2. Jongki Hong, Rapid analytical determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon in sediments, J. of the Korea Society for Environmental Analysis 1, 123-132 (1998)

3. Guilherme M. Titato and Fernando M. Lancas*, Optimization and Validation of HPLC - UV - DAD and HPLC - APCI - MS Methodologies for the Determination of Selected PAHs in Water SamplesJ. Chromatographic Science 44, 35-40 (2006)

4. Maria Rosaria Mannino, Santino Orecchio Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor dust matter of Palermo (Italy) area: Extraction, GC - MS analysis, distribution and sources Atmospheric Environment 42, 1801-1817 (2008)

5. Jeong Ki Yoon, Jin Soo Park1, Sun Kyoung Shin1 and Tae Seung Kim Analytical method of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil contaminated soils, Analytical Science &Technology 21, 296-303 (2008)

6. Jungju Seo, Hye-Young Kim, Bong Chul Chung, Jongki Hong Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormonesin meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry, J.chromatography A 1067, 303-309 (2005)

※ 본 내용은 식약처 연구과제관리시스템에 등록되어 있음.

Abstract

Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pharmaceutical Products using GC-MS

Kim, Jung Yoon
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis
The Graduate School
Seoul National University

PAHs are aromatic hydrocarbons with two or more fused benzene rings, a very stable structure of the organic compound containing carbon and hydrogen. PAHs are used to produce the pharmaceutical raw materials and dyes, plastics, insecticides, and is included in the asphalt used in road construction. As PAHs are environmental toxins that threaten the health, metabolic products absorbed into the body affect as cancer precursors more than itself.

Recently, it was largely an issue that benzopyrene which is the strongest toxicity in PAHs was detected. The amount of benzopyrene was in the food more than the reference value, and also was found in natural medicines. The social consensus is ongoing insecurity by

detection of the benzopyrene, therefore a number of medicines were evaluated whether PAHs are detected, including benzopyrene.

In this study, the analytical methods for the determination of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in pharmaceuticals have been developed by GC-MS-selected ion monitoring (SIM) mode. The established methods were validated in terms of linearity, limits of detection, limits of quantitation, precision and accuracy. The monitoring of PAHs in 497 pharmaceuticals selected by investigation of high proportion in related agencies were performed on the basis of the validated methods.

We analyzed the 16 priority pollutant PAHs set by the US Environmental Protection Agency (EPA) using GC-MS, in eight kinds of granules, six kinds of powders, and 483 kinds of tablets which were selected based on sales performance data of Korea Pharmaceutical Manufacturers Association from October 2012 to September 2013.

This study has established analysis method of PAHs for granules, powders, and tablets using GC-MS-SIM will be useful to derive a simple and quick results. And the results from this experiment are expected to be used as a basis to set a guideline for PAHs, through the evaluation of hazardous substances and risk assessment.

Keywords : GC-MS-SIM, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Carcinogens, LLE, Pharmaceutical risk management

Student number : 2014-21054