Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert Capillary GC 컬럼을 이용한 USP <467> 잔류 용매 분석

USP <467> 잔류 용매 Procedure B 준수

응용 자료

제약

저자

Yun Zou and Weihua Jia
Agilent Technologies Ltd
Shanghai

개요

본 응용 자료는 USP <467> classes 1, 2A, 2B 잔류 용매 분석에 사용한 Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert GC 컬럼의 뛰어난 성능을 소개합니다.

서론

원료 의약품(API) 또는 최종 제품 제조 공정에서 비롯된 잔류 용매가 의약품에 남아있을 수 있습니다. 잔류 용매의 농도는 안전성, 결정형에 미치는 영향, 용해도, 생체이용률, 안정성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 면밀히 모니터링 및 제어되어야 합니다. 반드시 원료 의약품, 부형제, 제품 전체를 모니터링해야 합니다. 품질 보증(QA) 실험실에서는 이러한 목적으로 미국 약전(USP) 분석법 <467>을 일상적으로 사용합니다[1]. 해당 기본 분석법은 품질 관리를 위해 전 세계적으로 사용되고 있으며, ICH Q3C 가이드라인을 철저히 준수합니다.

잔류 용매는 위험성 평가 결과에 따라 크게 세 가지 종류로 구분됩니다.

- Class 1 등급의 용매는 유해하므로 생산 공정에서 사용을 피해야 합니다.
- Class 2 등급의 용매는 위의 등급보다 독성이 덜하며, 제한된 수준으로 사용해야 합니다.
- Class 3 등급의 용매는 Class 1과 2의 용매에 비해 덜 유해하고 인체에 끼치는 위험도가 낮은 것으로 판단됩니다.

Agilent Technologies

USP <467>은 수용성 및 비수용성 제품, 즉, 시료 용해도에 따라 두 개의 부분으로 구분됩니다. 잔류 용매의 식별과 정량에는 세 가지 분석절차가 수반됩니다(그림 1 참조).

- **Procedure A:** 식별 및 한계 테스트, G43 상(624 타입의 컬럼) 사용
- **Procedure B:** 용매가 한계점 이상일 경우, G16상 (왁스형 컬럼)을 이용한 확인 테스트
- **Procedure C:** G43 상 또는 G16 상 중 동시 용리가 적은 쪽을 이용한 정량 테스트

이전 응용 자료에서 G43상과 동등한 Agilent J&W DB-Select 624UI GC 컬럼은 USP<467> procedure A에 따른 USP <467> 잔류 용매 분석에서 매우 우수한 성능을 나타냈습니다[2,3]. 잔류 용매 양이 1일노출허용량(PDE)을 초과하는 것으로 확인되면, Procedure B를 수행하여 분석물질을 식별합니다. A G16(WAX) 컬럼은 G43 컬럼에 비해 뛰어난 선택성을 나타내기에 확인 컬럼으로 사용할 때 매우 우수한 결과를 보여주었습니다. Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert 컬럼은 더 나은 피크 모양을 위해 설계되었으며, 높은 동급 제품 중 최고의 불활성을 검증하기 위해 엄격한 테스트 과정을 거쳤습니다. 본 연구에서는 USP <467> 잔류 용매 procedure B에 따른 분석 시 Agilent J&W DB WAX Ultra Inert 컬럼의 성능을 평가하였습니다. 본 응용 자료에는 이중 컬럼(DB-Select 624UI, DB-WAX UI)과 이중 FID를 사용한 듀얼 채널 구성의 크로마토그램 예시가 함께 제시됩니다.

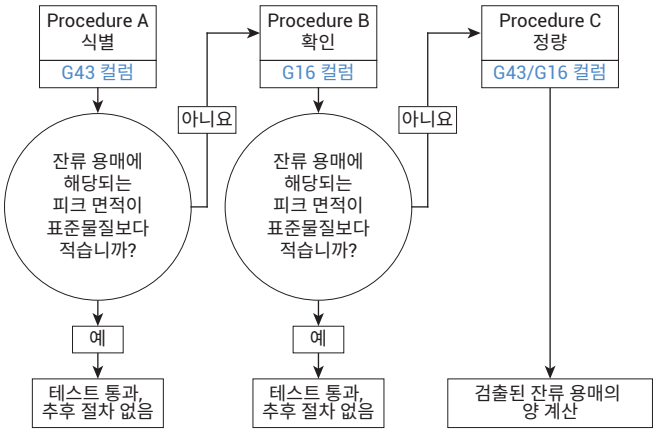

그림 1. 잔류 용매 분석을 위한 USP <467> 분석 흐름도

실험

모든 시료는 USP General Chater <467> 분석법에 따라 준비하였습니다.

화학물질 및 시약

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (> 99.5%)는 Sigma-Aldrich (Shanghai, China)에서 구매하였습니다. 실험실 정수 시스템의 탈이온수를 사용하였습니다.

수용성 제품을 위한 시료 전처리

잔류 용매 세 가지 원액을 DMSO에 혼합하여 준비하였습니다.

- 개정된 잔류 용매 분석법 467- Class 1 (p/n 5190–0490)
- 개정된 잔류 용매 분석법 467- Class 2A (p/n 5190-0492)
- 개정된 잔류 용매 분석법 467- Class 2B (p/n 5190-0491)

Class 1 용매

- 1mL 원액 바이알 + 9mL DMSO를 물로 100mL까지 희석
- 1단계 용액 1mL를 물로 100mL까지 희석
- 2단계 용액 10mL를 물로 100mL까지 희석
- 3단계 용액 1mL + 5mL 물을 20mL HS 바이알에 투입

Class 2A 용매

- 1mL 원액 바이알을 물로 100mL까지 희석
- 1단계 용액 1mL + 5mL 물을 20mL HS 바이알에 투입

Class 2B 용매

- 1mL 원액 바이알을 물로 100mL까지 희석
- 1단계 용액 1mL + 5mL 물을 20mL HS 바이알에 투입

표 1. Agilent DB-WAX UI 컬럼을 사용하는 단일 컬럼 HS-GC-FID 시스템에서 얻은 결과: 잔류 용매, 피크 번호, 실제 헤드스페이스 바이알 농도, 재현성(n = 6)

번호	화합물	농도(µg/mL)	RSD%
CLASS 1			
1	1,1-Dichloroethene	0.07	2.18
2	1,1,1-Trichloroethylane	0.08	1.37
3	Carbon tetrachloride	0.03	1.37
4	Benzene	0.02	1.86
5	1,2-Dichloroethane	0.04	2.48
CLASS 2A			
1	Cyclohexane	32.50	1.90
2	Methylcyclohexane	9.88	2.33
3	*trans*-1,2-Dichloroethene	7.87	2.06
4	Tetrahydrofuran	6.03	2.06
5	Methanol	25.17	2.98
6	Dichloromethane	5.02	2.45
7	*cis*-1,2-Dichloroethene	7.87	0.98
8	Acetonitrile	3.43	1.65
9	Toluene	7.45	1.92
10	1,4-Dioxane	3.18	2.63
11	Ethylbenzene	3.08	2.32
12	*p*-Xylene	2.55	2.26
13	*m*-Xylene	10.88	1.67
14	*o*-Xylene	1.64	2.11
15	Chlorobenzene	3.02	1.17
CLASS 2B			
1	Hexane	2.43	1.82
2	1,2-Dimethoxyethane	0.84	1.11
3	Trichloroethylene	0.67	1.23
4	Chloroform	0.50	1.15
5	2-Hexanone	0.42	1.09
6	Nitromethane	0.42	1.82
7	Pyridine	1.68	2.27
8	Tetralin	0.84	1.98

기기

DB-WAX UI GC 컬럼 성능을 평가하기 위해 본 연구에서는 USP <467> Procedure B를 사용하였습니다. Procedure B의 가이드라인을 준수하여 분석하였으며 표 2에 사용 기기와 조건을 제시하였습니다.

표 2. 단일 컬럼 GC/FID 시스템 조건

파라미터	값
GC 시스템:	Agilent 7890B
컬럼:	Agilent J&W DB-WAX UI, 30m × 0.32mm, 0.25µm (p/n 123-7032UI)
운반 가스:	헬륨(He), 35cm/s, 일정 유속 모드
주입구:	분할/비분할, 140°C, 분할비 5:1
오븐:	50°C(20분 유지)에서 165°C(20분 유지), 6°C/분
FID:	250°C
헤드스페이스:	Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러
오븐 온도:	80°C
루프 온도:	80°C
이송 라인 온도:	100°C
평형 시간:	45분
시료 루프:	1mL

평행한 이중 컬럼 구성은 그림 2를 참고하시기 바랍니다. 듀얼 채널 GC/FID 분석법은 애질런트의 다양한 응용 자료에서 확인하실 수 있습니다[4, 5]. 앞에서 설명한 분석법에 따라 정적 헤드스페이스 분석을 85°C에서 40분간 실시하자 재현성이 향상되고 분석 시간과 주기 시간이 단축되었습니다. 표 3에 GC의 실험 조건을 요약하였습니다. 이 시스템에서는 DB-WAX UI GC 컬럼을 확인용 컬럼으로 이용하였습니다. 표 4는 유동 경로 소모품 목록을 보여줍니다.

결과 및 토의

단일 컬럼 GC/FID 시스템

Procedure A의 피크 식별 결과를 확인하기 위해 Agilent J&W DB-WAX UI GC 컬럼(G16 컬럼)을 확인용 컬럼으로 사용하여 USP <467> Procedure B를 진행하였습니다. 실험 조건은 표 2를 참고하시기 바랍니다. Procedure B의 시스템 적합성 요건은 다음과 같습니다.

- Class 1 표준용액에서 benzene의 신호대 잡음비(S/N)가 5를 초과합니다.
- Class 1 표준용액의 각 피크 S/N이 3 이상입니다.
- Class 2A 표준용액에서 acetonitrile과 *cis*-dichloroethene의 분리능은 반드시 1을 초과해야 합니다.

표 3. 이중 컬럼 GC/FID 시스템 조건

파라미터	값
GC 시스템:	Agilent 7890B
컬럼 1:	Agilent J&W DB-WAX UI, 30m × 0.32mm, 0.25µm (p/n 123-7032UI)
컬럼 2:	Agilent J&W DB-select 624 UI, 30m × 0.32mm, 1.8µm (p/n 123-0334UI)
튜브:	Agilent Ultimate Plus 비활성 용융 실리카 튜브, 0.5m × 0.32mm (p/n CP803205)
운반 가스:	헬륨, 일정 유속 모드, 15psi
주입구:	분할/비분할, 140°C, 분할비 2.5:1
오븐:	40°C(5분간 유지)에서 240°C(2분간 유지), 18°C/분
FID(2개 채널 모두):	250°C
헤드스페이스:	Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러
오븐 온도:	85°C
루프 온도:	85°C
이송 라인 온도:	100°C
평형 시간:	40분
시료 루프:	1mL

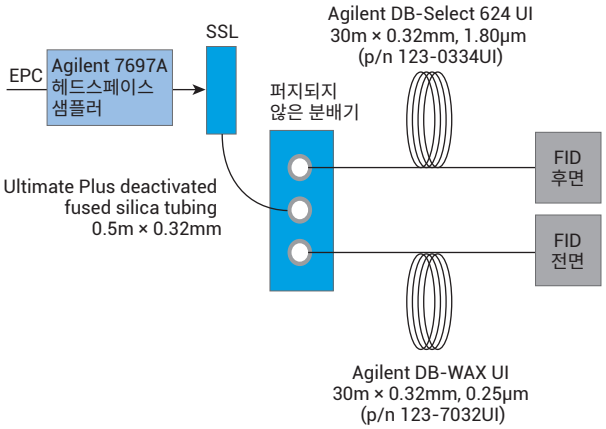

그림 2. 듀얼 채널 GC/FID 시스템

표 4. 유동 경로 소모품

파라미터	값
바이알:	헤드스페이스 크림프 탑, 편평한 바닥의 바이알, 20mL, 100/pk (p/n 5182–0837)
셉타:	Nonstick BTO 셉타(p/n 5183–4757)
컬럼 너트:	Self-tightening, 주입구/검출기(p/n 5190-6194)
내부 너트:	CFT 캐필러리 피팅(p/n G2855-20530)
분배기:	Compact splitter, inert (p/n G3181-60500)
페룰:	Short graphite: Vespel (15%:85%), 0.32mm, 10/pk (p/n 5062–3514) UltiMetal Plus Flexible Metal(0.32mm 컬럼용), 10/pk (p/n G3188-27502)
라이너:	2 mm, straight, deactivated, liner (p/n 5181–8818)
주입구 씰:	Ultra Inert, gold-plated, with washer (p/n 5190–6144)

그림 3-5는 Class 1, 2A, 2B 잔류 용매 혼합물을 DB-WAX UI GC 컬럼에서 분석한 결과가 제시되어 있습니다. 크로마토그램의 피크는 표 1을 참조하여 식별할 수 있습니다. 모노그래프에 명시된 농도 한계에서 Class 1 표준용액에서 benzene의 S/N은 85.4였고 다른 모든 화합물의 S/N은 3을 초과하였습니다. 1,1-dichloroethene, 1,1,1-trichloroethane, carbon tetrachloride, 1,2-dichloroethane의 S/N 비는 각각 68.3, 88.5, 32.3 이었습니다.

Class 2A 표준용액에서 acetonitrile과 *cis*-dichloroethene의 분리능은 1.0 이상으로 명시되어 있습니다. 그림 4에서 DB-WAX UI를 이용한 이 중요 쌍에 대한 분리능이 1.85임을 알 수 있습니다. Class 2B 표준용액을 모니터링 할 때 pyridine 피크 모양과 테일링 정도는 중요한 성능 파라미터입니다. 그림 5에 제시된 것처럼 DB-WAX UI GC 컬럼의 높은 불활성 성능으로 인해 USP가 제시하는 pyridine의 테일링 값은 1.02 이었습니다.

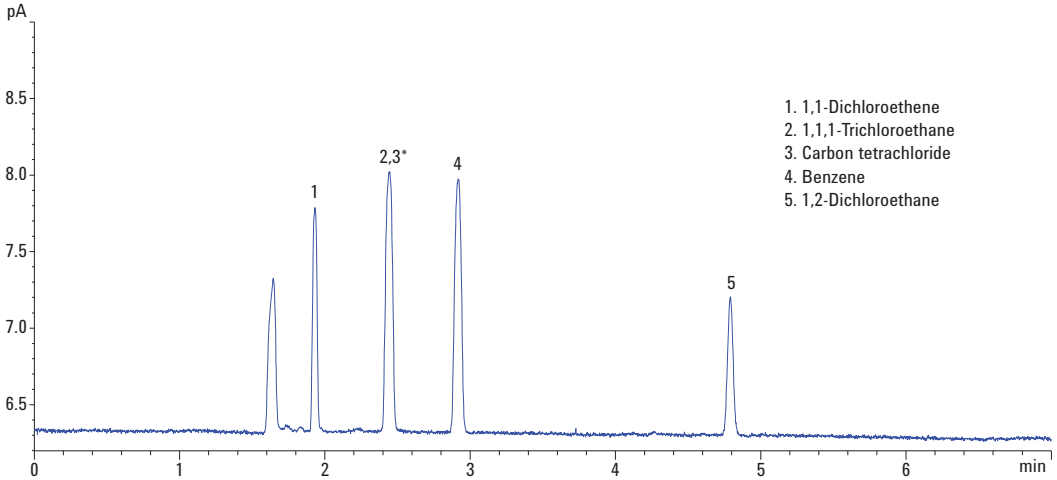

그림 3. Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert 30m×0.32mm, 0.25µm GC 컬럼에서 분석한 USP 잔류 용매 Class 1 표준용액의 크로마토그램

* Carbon tetrachloride는 G16(DB-WAX UI) 컬럼 사용 시 1,1,1-trichloroethane과 동시 용리되나, G43 컬럼 사용 시 모든 Class 1 표준물질의 피크와 잘 분리되어 용리됩니다.

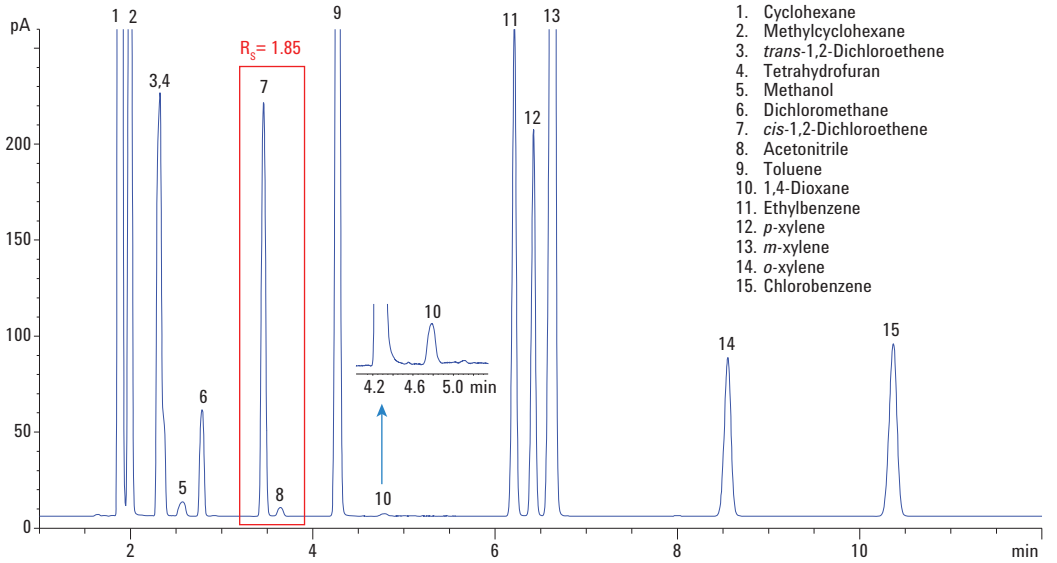

그림 4. Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert 30m×0.32mm, 0.25µm GC 컬럼에서 분석한 USP 잔류 용매 Class 2A 표준용액의 크로마토그램

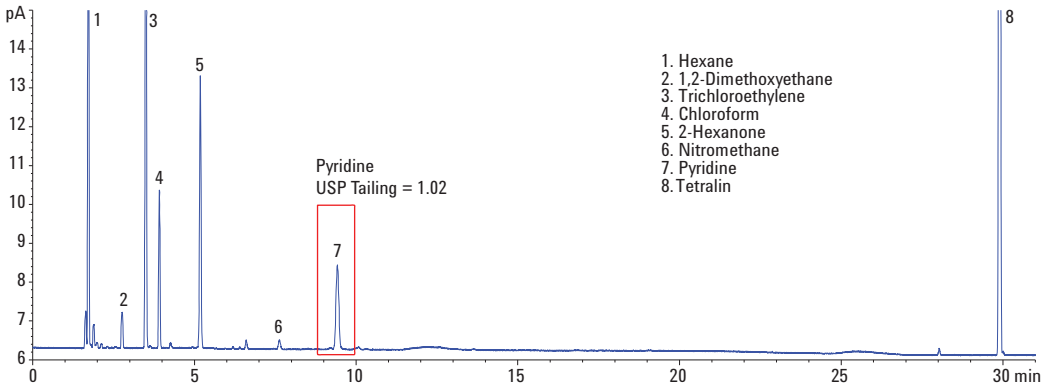

그림 5. Agilent J&W DB-WAX Ultra Inert 30m×0.32mm, 0.25µm GC 컬럼에서 분석한 USP 잔류 용매 Class 2B 표준용액의 크로마토그램

Class 1, 2A, 2B 잔류 용매 혼합물을 6회 연속 측정하여 면적 재현성(RSD%)을 평가하였습니다. 표 1은 DB-WAX UI 컬럼에서 구한 RSD% 목록입니다. RSD% 결과값은 3.0% 미만이었으며 컬럼, Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러, Agilent 7890B GC/FID 시스템의 우수한 재현성과 안정성을 입증합니다.

듀얼 채널 GC/FID 시스템

USP <467> Procedure A 및 B는 그림 2의 듀얼 채널 구성에서 1회의 실행으로 수행 가능합니다. Ultimate plus 비활성 용융 실리카 튜브를 이용해 주입구와 비활성 분배기(splitter)를 연결합니다. 30m × 0.32mm DB-Select 624UI, DB-WAX UI 컬럼에서 1:1 분할이 관찰됩니다. 단일 컬럼 GC/FID 시스템에서 이와 동등한 결과를 얻기 위한 분할비는 2.5:1입니다. Class 1, 2A, 2B 표준용매의 크로마토그램 예시가 그림 6, 7, 8에 각각 제시되어 있습니다.

USP 잔류 용매 분석의 G43 (DB-Select 624) 및 G16 (DB-WAX UI)상 모두에서 동시 용리가 나타납니다. 두 개의 상을 이용할 경우 나타나는 동시 용리되는 많은 물질들이 다르기 때문에 이중 컬럼 구성을 사용할 경우 그림 6-8에 나타난 것처럼 더욱 확실한 식별이 가능합니다.

USP 467 Procedure A는 DB-Select 624UI에서 1,1,1-trichloroethane의 S/N 값이 5를 초과하도록 규정합니다. 또한 Class 1의 다른 화합물의 S/N은 3을 초과하여야 합니다. Acetonitrile과 dichloromethane 간 분리능은 Class 2A 용액에서 반드시 1 이상이어야 합니다. 그림 6에서 제시된 것처럼 1,1,1-trichloroethane의 S/N은 52.8이었고 감도가 가장 낮았던 carbon tetrachloride의 S/N 값은 6.5였습니다. Acetonitrile과 methylene chloride 간 분리능은 3.12였습니다(그림 7 참조).

듀얼 채널 GC/FID 시스템과 DB-WAX UI GC 컬럼을 함께 사용했을 때, USP 467 Procedure B의 시스템 적합성 요건을 충족하거나 혹은 그 이상을 쉽게 충족하였습니다. Class 1 표준용액에서 benzene의 S/N은 73.5였고 다른 모든 화합물의 S/N은 3 이상이었습니다. Class 2A 표준용액에서 acetonitrile과 *cis*-dichloroethene의 분리능은 2.78이었습니다. 뿐만 아니라, DB-WAS UI 컬럼의 높은 불활성으로 매우 확실한 잔류 용매 피크 모양을 얻을 수 있었습니다. 피크 모양이 좋지 않은 pyridine의 USP 테일링은 1.06이었습니다.

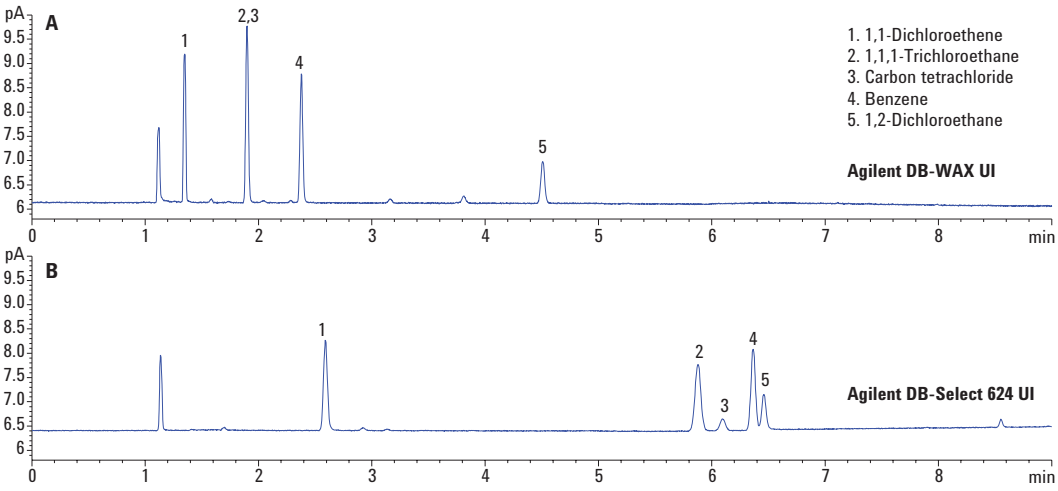

그림 6. Agilent J&W DB-WAX UI 및 Agilent DB-Select 624 UI GC 컬럼을 이용한 Class 1 표준용액의 듀얼 채널 GC/FID 크로마토그램

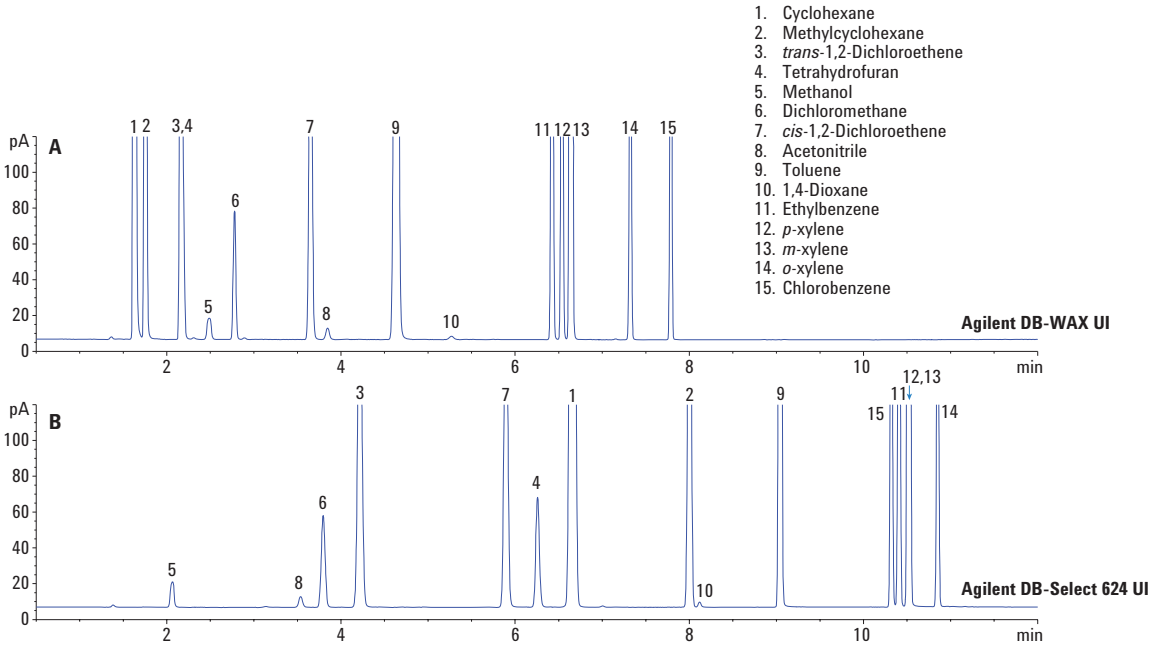

그림 7. Agilent J&W DB-WAX UI 및 Agilent DB-Select 624 UI GC 컬럼을 이용한 Class 2A 표준용액의 듀얼 채널 GC/FID 크로마토그램

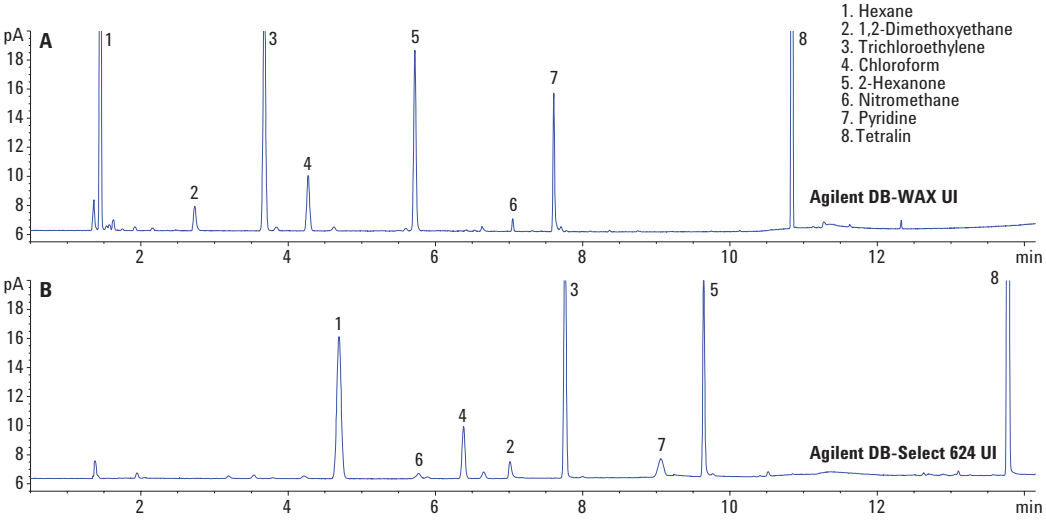

그림 8. Agilent J&W DB-WAX UI 및 Agilent DB-Select 624 UI GC 컬럼을 이용한 Class 2B 표준용액의 듀얼 채널 GC/FID 크로마토그램

결론

단일 GC/FID 시스템과 듀얼 채널 GC/FID 시스템을 사용하여 Agilent J&W DB-WAX UI GC 컬럼을 이용하여 Class 1, 2A, 2B의 잔류 용매를 시험하였습니다. USP 467 Pocedure B 분석법에서 지정한 한계에서 Agilent J&W DB-WAX UI GC 컬럼으로 3개 등급의 잔류 용매를 분석한 결과 우수한 분리능, 피크 모양, 감도, 재현성을 포함한 뛰어난 크로마토그래피 성능을 보였습니다.

참고 문헌

1. USP 32-NF 27, General Chapter USP <467> Organic volatile impurities, United States Pharmacopeia. Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville, MD, 8/2009.
2. K. Lynam. *Residual solvent Analysis with a Specifically Designed and Tested Agilent J&W DB-Select 624UI for USP <467> Column*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-0616EN, **2012**.
3. *System Parameter and Performance Comparison between Agilent 7697A and G1888A Headspace Samplers for USP <467>*; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5182EN, **2014**.
4. R. L. Firor. *Analysis of USP <467> Residual Solvents with Improved Repeatability Using the Agilent 7697A Headspace Sampler*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-7625EN, **2012**.
5. B. Tienpont, F. David, P. Sandra. *Analysis of USP <467> Residual Solvents using the Agilent 7697A Headspace Sampler with Agilent 7890B Gas Chromatograph*. Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-1834EN, **2013**.

자세한 정보

본 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹사이트 (www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 자료의 오류 또는 장비의 설치, 성능, 이 자료의 사용 등과 관련된 사고나 결과적 손상에 대해 법적 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016

2016년 11월 29일
한국에서 인쇄
5991-7531KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies