

USP<467> 잔류 용매 분석법

Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러와 Agilent 7890B GC를 결합한 Agilent 5977A MSD의 적용

저자

Roger L. Firor and
Mike Szelewski
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE 19808-1610
USA

개요

Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러를 연결한 Agilent 5977 시리즈 GC/MSD 시스템을 사용하여 USP <467> 잔류 용매 분석법의 Procedure A에 따라 수용액 중의 제한 농도에서 잔류 용매를 분석하였습니다. 스캔 데이터를 통해 Class 1, Class 2A, Class 2B 용매의 경우, 2.5% RSD보다 우수한 재현성을 확인할 수 있었습니다. Ultra Inert 1-mm 내경의 라이너를 장착한 멀티모드 주입구(MMI)를 사용하여 응용 실리카 헤드스페이스 이송 라인으로부터 시료를 주입하였습니다. 소스 온도 250°C, 사중극자 온도 200°C에서 Atune과 Etune을 비롯한 다양한 튜닝을 적용하여 데이터를 수집하였습니다. 데이터 분석에는 Agilent MassHunter Quant 소프트웨어를 사용하였습니다.

서론

품질 관리(QA) 실험실에서는 일반적으로 미국 약전(USP) 분석법 <467>으로 잔류 용매를 분석합니다¹. 세계적으로 품질 관리에 보편화된 분석법일 뿐만 아니라 ICH Q3C는 업계의 불순물 분석을 위한 가이드라인으로 사용되고 있습니다.

의약품의 잔류 용매는 주로 원료 의약품(API) 또는 최종 의약품의 제조 공정에서 비롯되었을 가능성이 있습니다. 이들 잔류 용매에는 어떠한 치료 효과도 없기 때문에 최대한 제거하는 것이 좋습니다. 안전성, 결정형에 미치는 영향, 용해도, 생체이용률, 안정성 측면을 고려했을 때 역시 잔류 용매 농도를 모니터링 및 제어해야 합니다. 반드시 원료 의약품, 부형제, 제제 전체를 모니터링해야 합니다.

USP <467> 가이드라인을 준수합니다¹. Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러의 고급 기능을 활용할 수 있도록 헤드스페이스 파라미터를 조정 및 최적화하여 사용했습니다. USP 모노그래프와 상이한 분석법도 허용되나 분석법 자체의 밸리데이션과 USP 절차와의 비교 과정이 필요할 수 있습니다. 명료성을 위해 용매는 종류(class)에 따라 별도로 시험하였습니다.

USP <467>은 Class 1 및 Class 2 잔류 용매를 시험하기 위한 다음 세 가지 절차를 명시하고 있습니다.

- **Procedure A:** 식별 및 한계 시험
- **Procedure B:** 확인 시험
- **Procedure C:** 정량 시험

Procedure A에는 G43상(Agilent 624 컬럼, VF-624ms 또는 DB-624), Procedure B에는 G16상(HP-INNOWax)을 사용합니다. 일반적으로 두 상 중 하나에서 동시용리되는 분석물질은 다른 하나의 상에서 동시용리되지 않습니다. 이 응용 자료의 주된 목적은 분석감도와 재현성을 평가하는 데 있으므로 Vf-624ms 컬럼만을 사용하였습니다. 앞에서 설명한 것처럼 듀얼 FID(624 및 INNOWax 컬럼) 혹은 FID/MSD를 사용하여 다르게 구성할 수도 있습니다^{2,3,4,5}.

헤드스페이스에 기반한 분석법의 경우, USP <467> 제한 농도 또는 그 이하 농도의 분석 용매에서 재현성이 좋지 않다는 고질적 단점을 안고 있었습니다. 향상된 기체역학 제어, 우수한 가열 구역 제어, 정밀한 타이밍을 사용할 수 있게 되면서 재현성과 정밀성이 향상된 잔류 용매 분석이 가능해졌습니다. 비활성 extractor 소스를 포함한 Agilent 5977B 시리즈 GC/MSD의 기능 역시 재현성 향상에 기여하였습니다.

GC 헤드스페이스 MSD 시스템은 무엇보다도 미지 성분이 포함된 잔류 용매 분석에서도 뛰어난 성능을 제공합니다. SIM을 사용하여 동시용리 문제를 해결할 수 있어 한층 더 우수한 분석 감도를 기대할 수 있습니다.

실험

본 응용 자료에서는 7890B-7697A를 연결한 5977 시리즈 GC/MSD 시스템 성능을 연구하기 위해 USP 분석법 <467> Procedure A를 사용하였습니다. Agilent 7890B GC는 멀티모드 주입구(MMI)를 장착하였습니다. 내경1mm의 비활성 직선형 라이너(p/n 5190-4047)를 사용하였습니다.

순수로 Class 1, Class 2A, Class 2B 잔류 용매를 제한 농도로 희석하였습니다. 정확한 표준용액 제조를 위해 유기물질을 포함하지 않은 물을 사용하는 것이 중요합니다. 종류별 용액 250mL을 최종 농도로 제조한 후 자동 피펫을 사용해 6mL을 덜어 20mL 바이알로 옮깁니다. PTFE 라인 셉타만을 사용하였습니다. 용액에 염을 넣지 않았습니다. 잔류 용매 표준용액의 애질런트 부품 번호는 다음과 같습니다.

Class 1: p/n 5190-0490

Class 2A: p/n 5190-0492

Class 2B: p/n 5190-0513

내경 0.53mm의 비활성 용융 실리카 튜브를 사용하여 Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러와 주입구를 연결하였습니다. MMI로의 인터페이스는 셉텀을 통해 연결되었습니다. 분석에는 분리능, 속도, 용량, 사용 편의성을 갖춘 VF-624ms 컬럼 (30m, 0.25mm ID)을 사용하였습니다.

바이알 압력은 7697A 헤드스페이스 샘플러의 기체역학 제어 모듈(PCM)에서 제어합니다. 운반 가스는 주입구 EPC에서 헤드스페이스 샘플러로 그리고 다시 7890B 주입구로 이동합니다. 샘플링 단계는 EPC로 제어되어 사용자는 교차 오염을 최소화하면서 간결하고 재현성 있는 분석법으로 헤드스페이스 바이알 샘플링을 전반적으로 제어할 수 있게 됩니다. 또한 EPC 모듈 내 기압 보정이 함께 진행됩니다. 파라미터 설정은 7697A 헤드스페이스 샘플러 키보드 또는 통합 헤드스페이스 제어 소프트웨어에서 할 수 있습니다. 그림 1은 MSD ChemStation의 헤드스페이스 바이알 샘플링 화면을 표시합니다.

7697A 헤드스페이스 샘플러의 배기 제어 기능을 통해 시료 루프를 충전할 때의 최종 바이알 압력을 원하는 대로 조절할 수 있습니다. 이러한 제어를 통해 재현성이 우수한 결과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 분석물질의 분배계수 k 에 따라 감도 역시 향상할 수 있습니다⁶. 7697A 헤드스페이스 샘플러는 세 가지 바이알 가압 모드를 지원합니다.

- 압력 제한을 받는 유속(Flow limited to pressure)
- *압력 비례(To pressure)*, 200mL/분 유속으로 제어
- 지정 유량(Fixed volume)

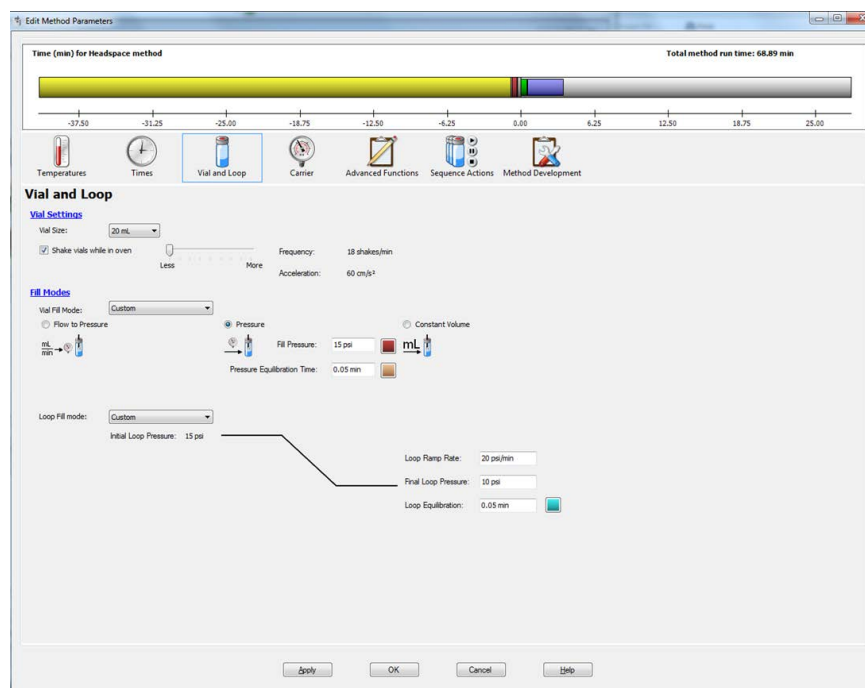


그림 1. HS 바이알을 20psi/분의 속도로 15psi까지 가압한 후 10psi로 배기한 20mL 바이알 파라미터

모든 실험에서 **압력 비례(To pressure)** 모드를 사용하였습니다. 그림 1은 바이알 샘플링 파라미터를 설정하는 MSD ChemStation 화면입니다. 헤드스페이스 샘플링용 HS 바이알 승압 범위는 10psi ~ 15psi 입니다.

응결 감소를 위해 설계된 수분 트랩은 배출구 라인으로 이어지며 다음 분석 이전에 퍼지됩니다. 헤드스페이스 샘플러 루프는 1.0mL입니다. 운반 가스와 바이알 가압에는 헬륨 가스를 사용합니다. 표 1은 응용별 파라미터를 표시합니다.

Agilent MassHunter 소프트웨어

5977 시리즈 GC/MSD 시스템은 Agilent 7000B GC/MS/MS에서와 유사하게 Agilent MassHunter(MH) 소프트웨어를 사용할 수 있습니다. 데이터 수집이 개선되어, 특히 SIM 테이블 설정이 용이합니다. 단일 화면에 SIM, 스캔, 온도 파라미터가 표시되므로 빠르게 확인할 수 있습니다. 현 MSD ChemStation 수집 분석법을 MH에서 직접 불러와 사용할 수 있습니다.

MH Qualitative Analyses (Qual) 또는 MH Quantitative Analysis (Quant) 중 하나로 데이터 분석이 가능합니다. 본 응용 자료는 크로마토그램 표시에 MH Qualitative Analyses 소프트웨어를 사용하였습니다. MH Quantitative Analysis 소프트웨어는 화합물 적분에 활용되며 후속 RSD 계산은 Excel에서 실시하였습니다. 현재 MSD ChemStation 정량 데이터베이스(검량 테이블)는 포함된 Converter를 통해 쉽게 MH Quant 형식으로 변환할 수 있습니다.

반드시 MH Qual, Quant를 사용해야 하는 것은 아닙니다. 5977 시리즈 GC/MSD 시스템 수집 소프트웨어는 MH 형식과 기존 MSD ChemStation 형식으로 데이터를 자동 저장합니다. 실험실에서는 데이터 분석 패키지에서 선택해 사용하면 됩니다.

본 연구는 다음의 소프트웨어 버전으로 수행하였습니다.

- MSD ChemStation B.07.00 수집
- MassHunter B.05.01 Quant
- 헤드스페이스 컨트롤 소프트웨어 B.01.04

표 1. 잔류 용매 분석용 시스템 파라미터

파라미터	값
가스 크로마토그래피	Agilent 7890B GC
주입 포트	멀티모드 주입구
라이너	1-mm id Ultra Inert (p/n 5190-4047)
주입 온도	140°C
주입구 유속	일정 유속 1.3mL/분
분할비	20:1, 100:1
오븐 프로그램	18°C/분의 속도로 40°C(5분)에서 240°C(2분)로 승온
컬럼	VF-624ms, 30m × 0.25mm, 1.4µm
MSD	Agilent 5977A 시리즈 GC/MSD 시스템
이송 라인	190°C
MS 소스	250°C
MS Quad	200°C
튜닝	etune, atune, bfb 튜닝 사용
스캔	29 에서 150amu, 10.3 scans/sec
Gain 인자	1.00
헤드스페이스	Agilent 7697A 헤드스페이스 샘플러
바이알 가압 가스	헬륨
루프 크기	1.0mL
바이알 대기 유속	20mL/분
이송 라인	0.53mm 비활성 응용 실리카
HS 오븐 온도	85°C
HS 루프 온도	85°C
HS 이송 라인 온도	100°C
바이알	20mL, PTFE/실리콘 셉타
바이알 진탕	레벨 1
바이알 채우기 모드	압력(To pressure)
바이알 채우기 압력	15psi
루프 필링 모드	맞춤형
루프 경사율	20psi/분
루프 최종 압력	10psi
루프 평형화 시간	0.05분
운반 가스 제어 모드	GC 운반 가스 제어
추출 후 배출	설정
주입 후 퍼지	3분 동안 100mL/분 유속으로 퍼지

결과 및 토의

그림 2는 순수에서 제조한 제한 농도의 Class 1 잔류 용매 TIC를 표시합니다. VF-624ms 컬럼에서 Class 1 용매 (benzene, 1,2-dichloroethane)의 바탕선 분리를 확인할 수 있습니다.

표 2는 보고된 전체 종류의 스캔 RSD와 Class 2A의 SIM RSD를 나타냅니다. 대부분의 RSD가 2.5% 미만이었습니다. k값이 작은 용매에서 대부분 높은 RSD 값을 보입니다. 시료 전처리 시 발생한 차이가 k값이 작은 용매에 큰 영향을 미치는 요인으로 작용했을 수 있습니다. Dimethyl sulfoxide (DMSO),dimethyl acetamide (DMAC), 1,3-dimethyl-2-imidazolinone (DMI), 또는 이들의 혼합물(DMSO/물 등)과 같은 다른 용매 시스템이 결과에 작용합니다. RSD는 수용액 희석액을 사용한 본 실험의 RSD보다 낮거나 최소 같아야 합니다.

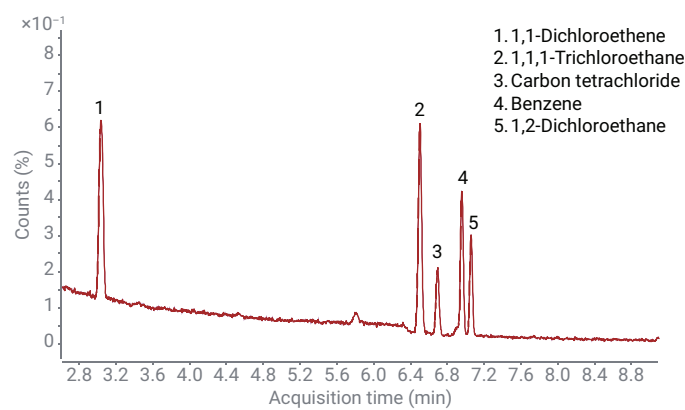


그림 2. 순수에서 제조한 제한 농도의 Class 1 잔류 용매 TIC

표 2. 잔류 용매 Class 1, Class 2A, Class 2B 재현성. 전체 종류(class)의 스캔 데이터 및 Class 2A의 SIM 데이터 표시. 수용성 희석액에서 제한 농도로 제조

화합물	USP 한계(ppm)	Scan RSD (%)	SIM RSD(%)
Class 1 (n = 8)			
1,1-Dichloroethene	8	0.9	
1,1,1-Trichloroethane	1,500	1.9	
Carbon tetrachloride	4	1.5	
Benzene	2	0.7	
1,2-Dichloroethane	5	0.9	
Class 2A(n = 10)			
Methanol	3,000	2.8	2.4
Acetonitrile	410	3.3	2.3
Dichloromethane	600	2.5	2.2
trans-1,2-Dicloroethene	1,870	2.4	2.2
cis-1,2-Dichloroethene	1,870	2.1	2.1
Tetrahyrofuran	720	3.0	2.2
Cyclohexene	3,880	2.7	1.3
Methylcyclohexane	1,180	4.3	1.6
1,4-Dioxane	380	2.6	2.3
Toluene	890	0.7	2.0
Chlorobenzene	360	1.9	2.1
Ethylbenzene	2,170	1.9	2.1
m-Xylene, p-Xylene	2,170	2.1	1.8
o-Xylene	2,170	2.1	1.8
Class 2B(n = 9)			
Hexane	290	3.2	
Nitromethane	50	3.8	
Chloroform	60	2.5	
1,2-Dimethoxyethane	100	2.7	
Trichloroethene	80	2.5	
Pyridine	200	3.9	
2-Hexanone	50	2.4	
Tetralin	100	2.5	

그림 3은 Class 2A 용매의 전형적 TIC
입니다. 그림 4는 작은 피크를 표시하기
위해 확대한 크로마토그램입니다.

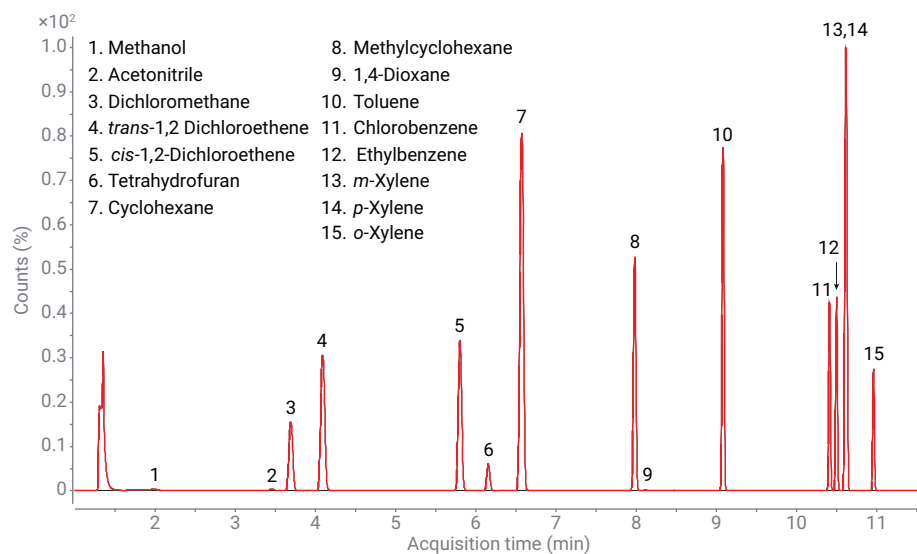


그림 3. Class 2A 용매의 전형적 TIC

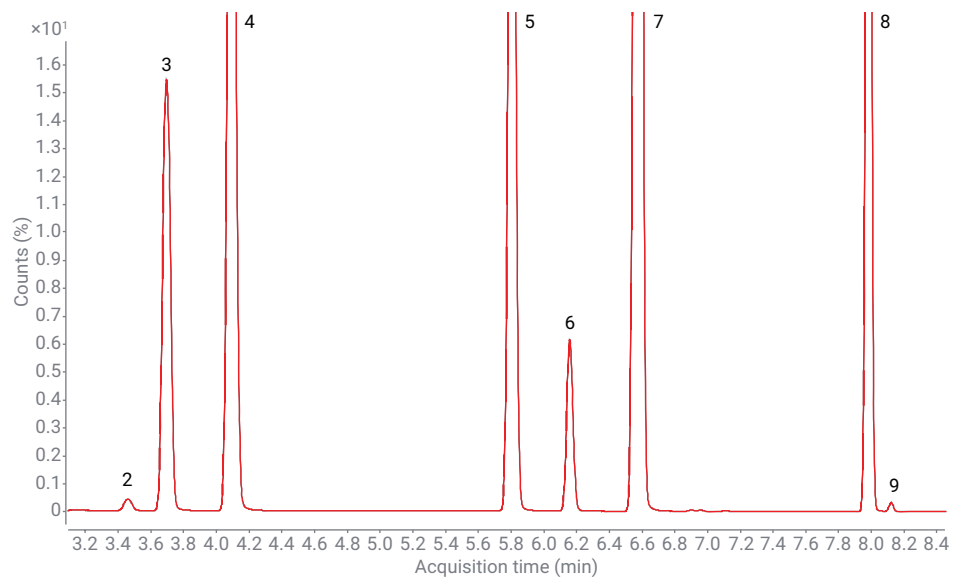


그림 4. 감응이 낮은 화합물(acetonitrile과 1,4-dioxane)을 표시하기 위한 확대 크로마토그램 피크 번호는 그림 3을 참조하십시오.

그림 5는 SIM 크로마토그램, 표 3은 사용된 SIM 이온을 각각 보여줍니다. 분석 시 100:1의 분할비를 적용하였습니다. 라이너로 빠르게 주입할수록 methanol 피크의 대칭성은 향상됩니다. 이와 같이 큰 분할비에서도 매우 훌륭한 신호대 잡음비 (S/N)를 얻을 수 있습니다.

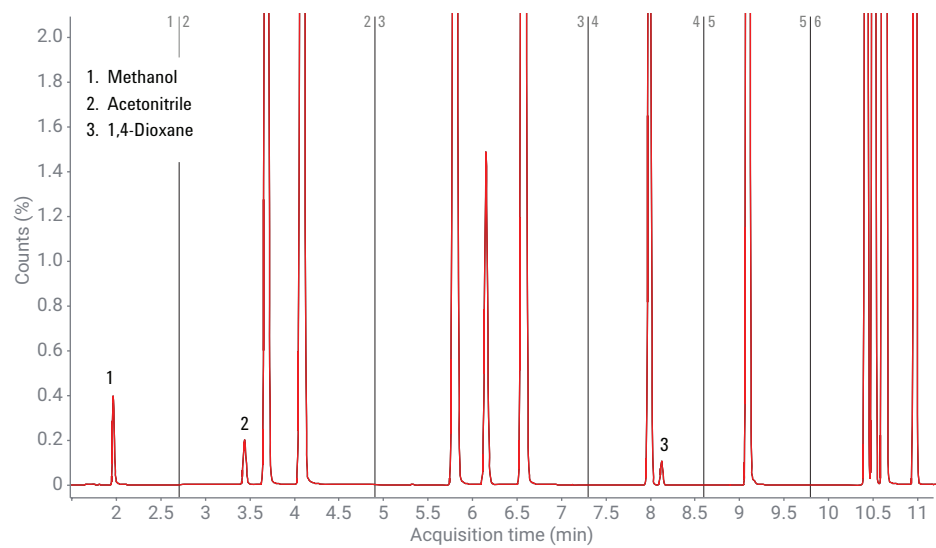


그림 5. Class 2A SIM 크로마토그램 및 SIM 그룹 타임 브래킷 사용

표 3. Class 2A 용매의 SIM 그룹

그룹	화합물	SIM 이온
1	Methanol	31,29
2	Acetonitrile Dichloromethane <i>trans</i> -1,2-Dicloroethene <i>cis</i> -1,2-Dichloroethene	39,41,84,86,96,98
3	Tetrahyrofuran Cyclohexene Methylcyclohexane	56,71,72,84,96,98
4	1,4-Dioxane	58,83,88,98
5	Toluene	91,92
6	Chlorobenzene Ethylbenzene <i>m</i> -Xylene, <i>p</i> -Xylene, <i>o</i> -Xylene	91,106,112,114

그림 6은 MSD ChemStation 수집의 SCAN/SIM 설정 창(Class 2A)을 표시합니다. 그림 7은 Class 2B 용매의 일반적인 SIM 분석을 보여줍니다. 분할비는 20:1입니다. Nitromethane에서 우수한 S/N이 관찰됩니다. 통상적으로 Pyridine은 극성으로 인해 분석이 힘든 용매로 분류되지만 VF-624ms 컬럼에서는 최소한의 피크 테일링만이 관찰되는 것을 볼 수 있습니다. 사용된 SIM 파라미터는 표 4에, 그림 8의 MSD ChemStation의 설정 창을 참고하시기 바랍니다.

세 가지 종류의 용매를 모두 적용할 때 624상에 동시 용리가 발생할 수 있습니다. 이러한 문제는 이중 컬럼 구성을 사용하는 FID 시스템을 통해 해결됩니다. FID 시스템의 두 번째 채널에서는 INNOWax 컬럼을 사용하여 624 상과는 다른 순서로 용리가 이루어집니다. MSD의 SIM을 사용하면 단순히 624 상을 사용할 때 발생하는 문제를 해결할 수 있습니다.

5977 시리즈 GC/MSD 시스템은 신약 개발과 신제형의 규모 확대 시 매우 효과적인 분석 도구입니다. 뿐만 아니라 USP <467> 가이드라인에 해당하지 않는 다른 일반적인 분석법을 개발할 때도 효과적으로 활용할 수 있는 시스템입니다. 시료에 미지의 피크 또는 용매가 있다면 이 시스템이 최적의 솔루션이 될 것입니다. 알고 있는 혹은 미지의 저농도 불순물을 다룰 때 SIM의 우수한 감도가 결정적인 도움이 됩니다.

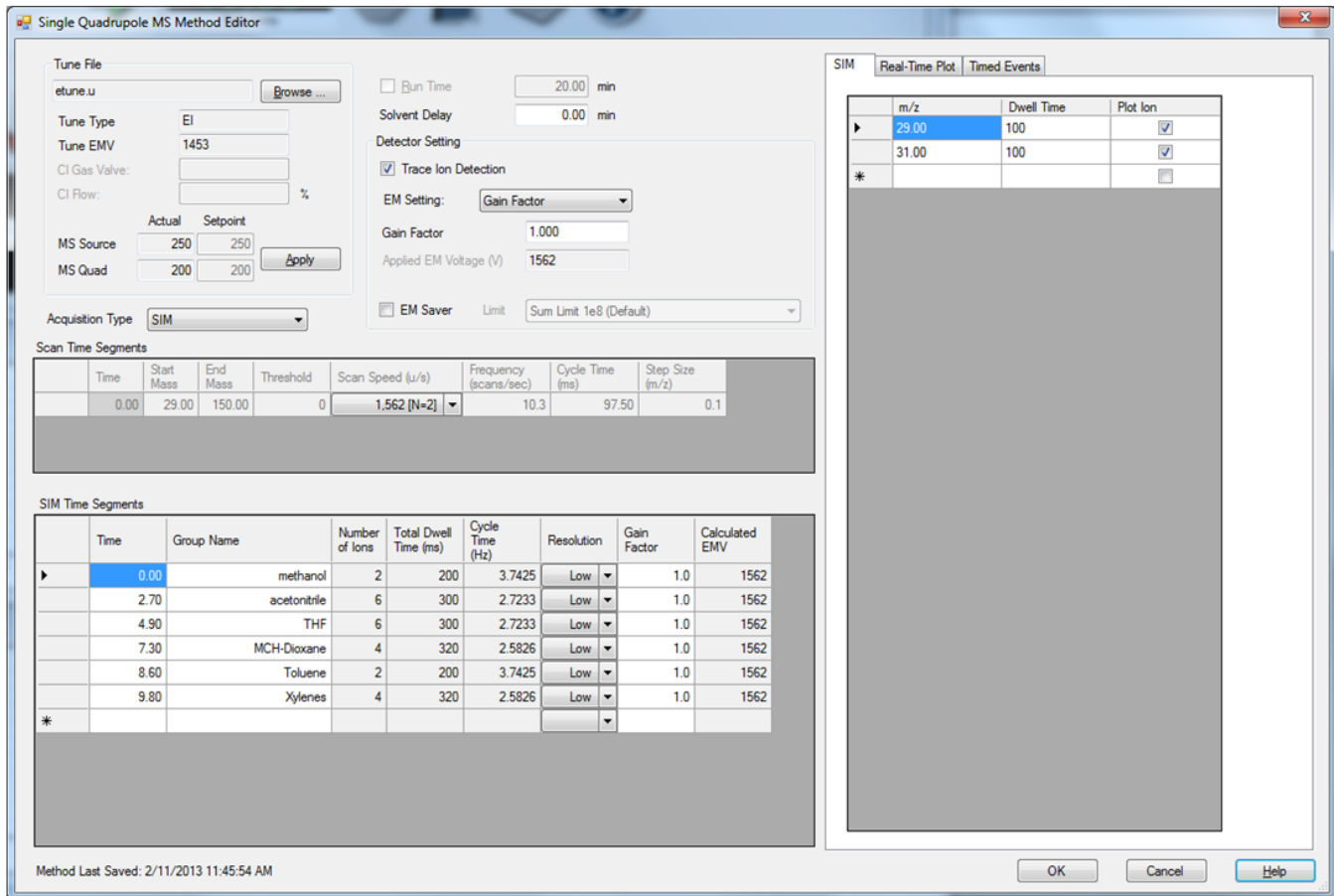


그림 6. MSD ChemStation 수집의 SCAN/SIM 설정 창(Class 2A)

표 4. Class 2B 용매의 SIM 그룹

그룹	화합물	SIM 이온
1	Hexane	56,57
2	Nitromethane	46,61
3	Chloroform	83,85
4	Dimethoxyethane	45,60
5	Trichloroethene	130,132
6	Pyridine, 2-Hexanone	52,58,79,85
7	Tetralin	104,132

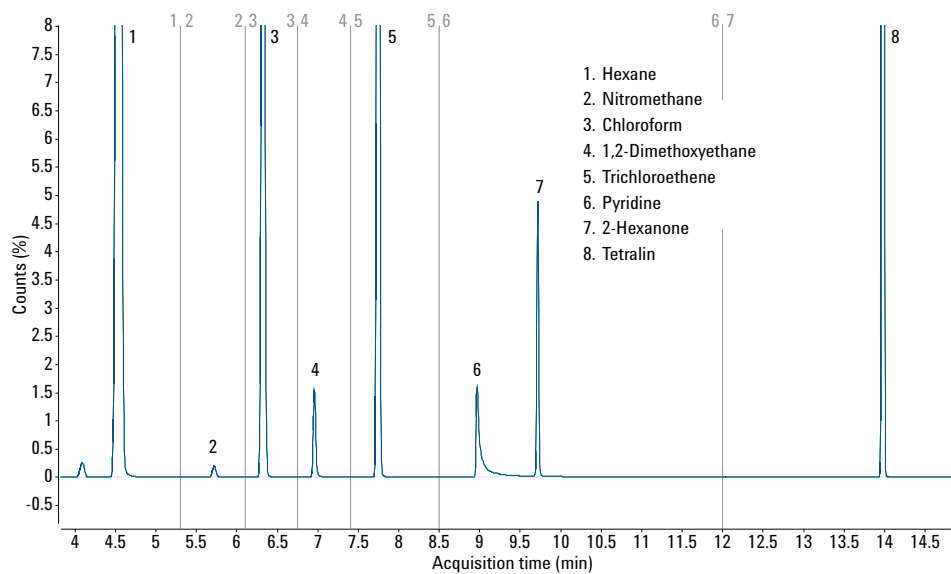


그림 7. Class 2B 용매의 일반적인 SIM 분석

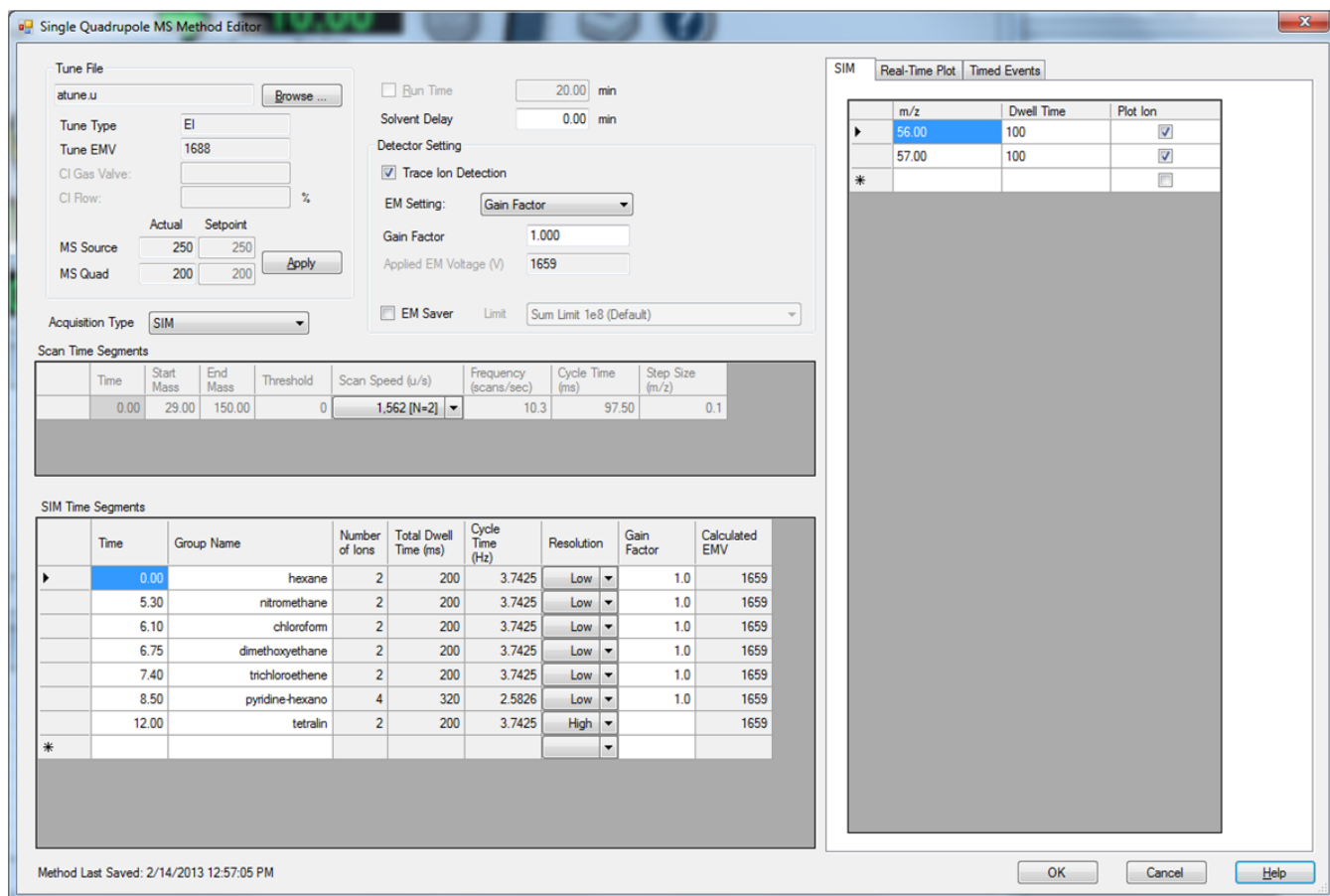


그림 8. Class 2B 용매의 MSD ChemStation의 SCAN/SIM 설정 창

결론

Agilent 5977 시리즈 GC/MSD 시스템/
Agilent 7890B GC/Agilent 7697A
헤드스페이스 샘플러는 잔류 용매 분석에
탁월한 재현성을 제공합니다. MSD를
사용하여 원료 의약품(API)과 부형제를
비롯한 제약 원료물질에 포함된 용매
불순물을 효과적으로 분석할 수 있습니다.
무엇보다도 미지 성분을 식별해야 하는
의약품 발굴과 공정 규모확대 분야에
효과적으로 도입 가능합니다.

7697A 헤드스페이스 샘플러의 비활성
시료 경로, 설정값 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 이상의 안정성을
유지하는 가열 영역, EPC 제어 기반의
유연한 바이알 샘플링 기능으로 우수한
시스템 성능을 보장합니다. 본 시스템에서는
교차오염이 전혀 발견되지 않았습니다.
사용자 설정 가능한(유속과 횟수) 니들/루프
퍼지 그리고 배출구 라인 퍼지 기능으로
시스템은 매 분석이 종료된 이후 깨끗하게
청소됩니다.

본 문서에서는 5977 시리즈 GC/MSD
시스템을 활용하여 잔류 용매 분석 시 적용
가능한 여러 가지 전략을 제시합니다. 모든
실험실에서는 USP 또는 ICH 가이드라인을
준수하도록 원하는 분석법에 대한 시스템
적합성 연구 및 밸리데이션을 반드시
진행하여야 합니다. MSD 구성은 특히 미지
성분 식별이 필요한 사례 혹은 확실하지 않은
내용을 확인하고자 하는 QA 실험실에서
효과적으로 활용할 수 있습니다.

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. Gudat, A. E.; Firor, R. L. Improved
Retention Time, Area Repeatability,
and Sensitivity for Analysis
of Residual Solvents, *Agilent
Technologies Application Note*,
publication number 5989-6079EN.
3. Firor, R. L. Analysis of USP<467>
Residual Solvents with Improved
Repeatability Using the Agilent 7697A
Headspace Sampler, *Agilent
Technologies Application Note*,
publication number 5990-7625EN.
4. Tienpont, B.; et al. Analysis of
USP<467> Residual Solvents using
the Agilent 7697A Headspace
Sampler with the Agilent 7890B
Gas Chromatograph, *Agilent
Technologies Application Note*,
publication number 5991-1834EN.
5. Firor, R. L. Fast Analysis of USP
467 Residual Solvents using the
Agilent 7890A GC and Low Thermal
Mass (LTM) System, *Agilent
Technologies Application Note*,
publication number 5990-5094EN.
6. Firor, R. L. Optimizing Vial
Pressurization Parameters for the
Analysis of USP<467> Residual
Solvents Using the 7697A
Headspace Sampler, *Agilent
Technologies Application Note*,
publication number 5990-9106EN.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 3월 9일, 한국에서 인쇄
5991-2079KO

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