

Agilent Cary 60 UV-Vis를 사용한 미국약전 모노그래프의 분석법 검증

USP 모노그래프에 따른 황산 마그네슘의 철 불순물
정량화



저자

Ciaran Worth, Wesam Alwan
및 Fabian Zieschang
Agilent Technologies, Inc.

개요

본 연구에서는 Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 황산 마그네슘 내 철 불순물의 정량화에 관한 미국약전(USP) 모노그래프를 검증하는 방법을 설명합니다. Cary 60에는 18셀 멀티셀 체인저를 장착하여 Agilent Cary WinUV 소프트웨어의 제어 하에 바탕 용액, 표준물질 및 시료를 자동으로 분석했습니다. 검증된 분석법을 사용하여 두 황산 마그네슘 시료 내 철의 상대적 중량이 0.5 $\mu\text{g/g}$ 의 지정 한도 이하인 것으로 확인했습니다. 이러한 결과는 Cary 60이 제약 관련 품질 관리 응용에 적합함을 보여줍니다.

소개

국가 및 국제 차원의 정부 기관들은 약물의 안전성, 효능, 품질 및 라벨링을 보장하기 위해 의약품에 규제합니다. 이러한 기관은 약물 개발자와 제조업체를 위한 제약 모노그래프를 출간하여 연구, 개발 및 제조 프로세스 전반에 걸쳐 일관된 품질 표준을 유지하는 데 도움을 줍니다. USP, 유럽약전(Ph. Eur.), 영국약전(BP), 일본약전(JP), 중국약전(ChP)과 같은 주요 약전은 공식 편람의 일부로 제약 모노그래프를 출간합니다. 모노그래프는 허용 한도 내에서 불순물을 측정하는 것을 포함하여 제약 물질의 정량화를 위한 방법을 제공하며, 규제 요구 사항을 준수하는 데 필수적입니다. UV-Vis 분광법은 다양한 제약 모노그래프에서 일반적으로 명시되는 기술입니다.

우수 의약품 제조 관리 기준(GMP)에 따르면, 제약 물질을 분석하는 데 사용되는 모든 기술은 실제 사용 조건에서 적합성을 확인하기 위한 평가를 거쳐야 합니다. USP는 USP 일반 챕터 <1226> 약전 절차 검증에서 약전 절차 검증에 대한 일반 정보를 제공하고, USP 일반 챕터 <857> 자외선-가시광선 분광법에서 UV-Vis 분광 기술에 대한 특정 지침을 제공합니다.^{1,2}

이전 응용 자료에서 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계와 Cary WinUV 소프트웨어를 이용해 USP <857>에 명시된 많은 검증 테스트에 요구되는 측정을 수행했습니다.³ 본 연구에서는 18셀 멀티셀 체인저가 장착된 Cary 60 UV-Vis를 USP 황산 마그네슘 모노그래프에 따라 황산 마그네슘 내 철을 정량화하는 분석법 검증에 어떻게 이용할 수 있는지에 대한 예를 제공합니다.⁴

Cary 60 UV-Vis

Cary 60 UV-Vis는 제약 실험실에서 다양한 물질을 일상적으로 분석하는 데 이상적인 유연하고 강력하며 안정적인 UV-Vis 시스템입니다(그림 1). Cary 60 UV-Vis는 강력한 제논 램프 광원을 사용해 고품질 데이터 수집과 낮은 소유 비용의 이점을 함께 제공합니다. 10년 보증을 통해 입증되는 이 램프의 견고성과 신뢰성은 잠재적인 교체 및 재검증 비용을 줄이고 기기 가동 시간을 극대화합니다.

Cary 60 UV-Vis는 환경에 미치는 영향에 대해 독립적인 감사를 받았으며 My Green Lab에서 검증한 ACT(책임감, 일관성, 투명도) 라벨을 획득했습니다. 이 라벨은 전체 수명 주기 동안 Cary 60 UV-Vis가 환경에 미치는 영향에 대한 정보를 제공합니다.

Cary 60 UV-Vis는 생산성이나 과학적 진보를 저해하지 않으면서 실험실의 환경 영향을 개선합니다.



그림 1. Agilent Cary 60 UV-Vis 분광 광도계에는 제논 램프에 대한 10년 교체 보증이 포함되어 있습니다.

실험

시약

- **붉은 염산(HCl):** HCl 1mL 수용액(물 1,000mL)
- **용액 A:** 아세트산 암모늄 500mg/mL 수용액
- **용액 B:** 아스코르브산 13.4mg/mL 수용액
- **색상 시약:** 3-(2-pyridyl)-5,6-di-(2-furyl)-1,2,4-triazine-5',5"-disulfonic acid, 이나트륨염 3.8mg/mL
- **표준 철 원액:** 희석된 HCl에 들은 1.0µg/mL 철

바탕 용액, 표준물질 및 시료 용액 준비

USP 황산 마그네슘 모노그래프⁴는 황산 마그네슘 시료에서 철의 상대적 질량을 정량화하기 위해 UV-Vis를 사용하여 알려진 세 가지 표준 용액을 분석하고 최적 피팅을 이용해 계산하는 방법을 설명합니다.

모든 유리기구는 붉은 HCl로 세척했습니다. 2.0, 5.0, 10.0 mL의 표준 철 원액을 각각 50mL 용량 플라스크에 옮긴 후 붉은 HCl을 이용해 35mL로 희석하는 식으로 세 가지 표준물질을 준비했습니다. 50mL 용량 플라스크에 희석된 HCl 35mL을 옮겨서 바탕 용액을 준비했습니다. 모든 원액은 테스트 당일에 준비했습니다.

10g의 황산 마그네슘(CAS 번호 7487-88-9)을 50mL 용량 플라스크에 옮기고 붉은 HCl을 이용해 35mL로 희석하는 식으로 두 가지 시료 용액을 준비했습니다. 확립된 매트릭스 매칭 검량선을 사용하여 시료 용액의 철 농도를 결정했습니다.

표 1. 황산 마그네슘에서 철의 상대적 질량을 계산하는 데 사용되는 표준물질.

표준물질	철 농도(mg/L)	표준물질 내 철 질량(µg)
표준물질 1	0.04	2
표준물질 2	0.1	5
표준물질 3	0.2	10

기기

Cary 60 UV-Vis에는 18셀 멀티셀 체인저가 장착되었으며 Cary WinUV 소프트웨어로 제어됩니다. 각 큐벳을 차례로 위치시켜 최대 18개의 큐벳을 자동으로 측정할 수 있도록 멀티셀 체인저가 자동으로 이동합니다. 따라서 멀티셀을 사용하여 하나의 분석법으로 여러 표준물질, 시료 및 반복 실행을 무인으로 실행할 수 있어 생산성이 크게 향상되었습니다.⁵ 실온에서 1cm 경로 길이의 셀을 사용하여 측정을 수행했습니다.

Cary WinUV Concentration 응용 소프트웨어로 농축법을 만들어 바탕 용액, 표준물질 및 시료 측정값을 수집하는 데 사용했습니다. 이 분석법은 자동으로 바탕 감산을 수행하고, 농도 곡선을 작성하고, 시료 내 철 농도를 계산했습니다. 분석법 파라미터를 표 2에 나타내었습니다.

표 2. Agilent Cary 60 UV-Vis 분석법에 사용되는 Agilent Cary WinUV Concentration 응용 소프트웨어 파라미터입니다.

파라미터	설정
분석 파장	594nm*
신호 평균화 시간(SAT)	0.5초
스펙트럼 대역폭(SBW)	1.5
표준물질 수	3
시료 수	2

* USP 황산 마그네슘 모노그래프에 명시됨⁴

결과 및 토의

분석법 검증

USP <857>²에 기술된 UV-Vis 분석법의 검증 프로세스에는 다음 요구 사항이 포함됩니다.

측정 정확도: 측정 정확도는 필요한 매트릭스 내에서 알려진 농도의 분석물에 대한 회수율을 조사하여 결정할 수 있습니다.

황산 마그네슘 테스트에서 철의 측정 정확도는 0.1mg/L의 공칭 농도를 갖는 황산 마그네슘 표준 시료 3개에 0.2µg/mL 철 표준 용액 2, 4, 6mL를 첨가하여 결정했습니다. 그런 다음 6번의 반복 실행으로 측정값을 수집하고 첨가한 각 용액의 평균 흡광도를 계산하여 철 농도를 계산했습니다. 그런 다음 수식 1을 사용하여 회수율을 계산했습니다.

수식 1.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

여기서:

C₁ = 측정된 농도

C₂ = 계산된 농도

황산 마그네슘에서 예상 철 농도의 100 ± 6% 회수율 결과(표 3)는 불순물 분석에서 평균 회수율에 대해 USP <857>에서 규정한 허용 한도인 80.0-120.0% 이내에 충분히 들어왔습니다.

표 3. Agilent Cary 60 UV-Vis 분광기를 사용하여 세 가지 농도의 철 표준물질 (0.2mg/L)을 첨가한 세 가지 황산 마그네슘 시료에 대해 회수율 분석을 실시했습니다.

황산 마그네슘 정확도 시료	공칭 농도 (mg/L)	스파이크 표준물질의 용량 (mL)	계산된 농도 (mg/L)	측정된 농도 (mg/L)	회수율(%)
1	0.100	2	0.1166	0.1104	94.6
2		4	0.1286	0.1218	94.8
3		6	0.1375	0.1403	102.0

측정 정밀도: 정밀도 또는 반복성은 분석 테스트 농도의 100%에서 유사하게 준비한 6개 시료 용액의 농도를 측정하고 상대 표준 편차 (RSD)를 측정하여 결정할 수 있습니다.

황산 마그네슘 내 철 농도 테스트의 정밀도는 분석 매트릭스 50mL에 10µg의 철을 공칭 농도로 첨가한 표준 용액을 여섯 부분으로 나누어 결정했습니다. Cary 60 UV-Vis를 사용하여 18셀 체인저에 넣은 6개 부분의 흡광도를 594nm에서 측정했습니다. WinUV Concentration 응용 소프트웨어의 시료 평균화 기능을 사용하여 6개의 반복 시료 모두 동일한 실행 내에서 측정했습니다. 측정의 반복성은 각 시료의 측정 농도에 대한 RSD를 계산하여 평가했습니다. RSD는 1.8%인 것으로 측정되었으며, 이는 USP <857>에서 규정한 15.0-20.0%의 NMT(not more than) 한도 내에 있습니다.

표 4. 황산 마그네슘의 6회 반복 시료에서 철의 정밀도 측정.

시료	흡광도	시료 농도(mg/L)
시료 1-1	0.1864	0.1894
시료 1-2	0.1884	0.1924
시료 1-3	0.1929	0.1993
시료 1-4	0.1898	0.1946
시료 1-5	0.1881	0.1920
시료 1-6	0.1875	0.1911
표준 편차(SD)	0.002276	0.00348
%RSD	1.205	1.802113

특이성: 특이성은 표준 및 시료 매트릭스의 스펙트럼 범위에 대한 간섭이 없음을 입증함으로써 보장할 수 있습니다.

Cary WinUV Scan 응용 소프트웨어에서 공칭 농도 0.2mg/L의 바탕 및 표준 철 용액에 대한 파수 스캔을 수행했습니다. 그림 2는 594nm의 표적 피크 주변에서 철이 없는 용액(바탕 용액)과 동일한 철 용액에서 색상 시약(3-(2-pyridyl)-5,6-di-(2-furyl)-1,2,4-triazine-5,5'-disulfonic acid, 이나트륨염)의 광도 응답을 비교한 내용입니다. 바탕 용액은 분석 스펙트럼 범위에서 광도 응답을 보이지 않으므로 이 범위 내에서 간섭이 없음을 나타냅니다.

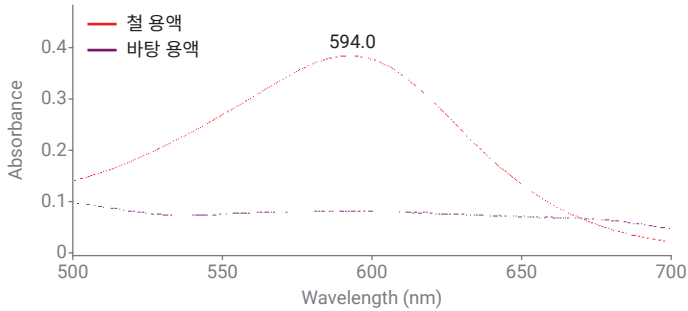


그림 2. 철이 포함된 용액에 색상 시약을 첨가할 때와 동일한 시약을 바탕 용액(철 없음)에 첨가할 때의 파장 스캔을 비교한 내용입니다.

정량 한계(QL): 철의 QL은 바탕 용액을 6번 반복 측정하여 SD를 계산하고 그 값에 10을 곱하여 추산했습니다. 이 테스트에서는 추정 QL이 0.00231mg/L로 계산되었습니다. 이 추정 정량 한계를 확인하려면 한계치에서 이 측정의 신호대 잡음비가 10보다 커야 하며 이 농도에서의 측정이 정확하고 정밀한 것으로 확인되어야 합니다. 궁극적으로, QL이 유효한 것으로 간주되기 위해서는 모노그래프에 명시된 한도의 50% 이하여야 합니다.

표 5. 바탕 용액에 대한 6회 반복 측정을 통해 계산된 농도와 철의 추정 QL입니다.

반복	농도(mg/L)
1	0.00776
2	0.0075
3	0.00776
4	0.00802
5	0.00762
6	0.00736
SD	0.000231
QL	0.002319

Cary 60 UV-Vis 절차의 성공적인 검증을 고려하면 USP 모노그래프에 따른 황산 마그네슘 내 철 분석을 확신을 가지고 수행할 수 있습니다. 검증을 통해 기기와 실험 파라미터가 실제 사용 조건에 적합하다는 것이 확인되었습니다.

황산 마그네슘 내 철 농도 측정: 황산 마그네슘에서 철의 상대적 질량을 결정하기 위해 USP 모노그래프에서는 분석 매트릭스에 있는 세 가지 철 표준 용액의 흡광도 값을 사용하여 검량선을 생성해야 한다고 명시하고 있습니다. 그러면 황산 마그네슘 시료에 있는 철의 상대적 질량을 수식 2를 사용하여 결정할 수 있습니다.

분석 매트릭스를 준비하기 위해 표준 용액, 시료 용액 및 바탕 용액에 각각 5mL의 용액 B와 색상 시약을 첨가했습니다(실험 섹션 참조). 그런 다음 각 용액의 용량을 희석된 HCl로(50mL) 채웠습니다.

각 표준 용액의 흡광도를 바탕 용액과 비교하여 측정하고, 그림 3과 같이 철 함량에 따라 그래프로 나타냈습니다.

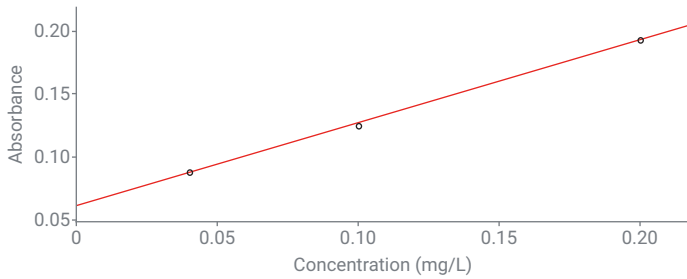


그림 3. Agilent Cary 60 UV-Vis를 사용하여 3가지 매트릭스 매칭 철 표준 용액을 측정하여 얻은 검량선입니다.

그런 다음 두 시료 용액의 흡광도 값을 측정하고, 그 값을 사용하여 수식 2에 따라 황산 마그네슘의 질량에 대한 철 함량을 계산했습니다.

수식 2.

$$\text{결과} = \frac{C}{W}$$

여기서:

C = 시료 용액의 철 함량(μg)

W = 시료 용액에서 황산 마그네슘의 질량

표 6. 두 가지 황산 마그네슘 시료의 상대적 철 함량.

황산 마그네슘 시료	철 함량(μg)	결과($\mu\text{g/g}$)
시료 1	3.1	0.31
시료 2	2.5	0.25

철에 대한 결과는 USP 모노그래프에 명시된 상한인 NMT 0.5 $\mu\text{g/g}$ 의 허용 기준 내에 들어옵니다.

결론

여기서는 18셀 체인저가 장착된 Agilent Cary 60 UV-Vis를 사용하여 USP 모노그래프의 UV-Vis 약전 절차를 검증하는 방법을 보여주었습니다. Agilent Cary WinUV 소프트웨어와 18셀 체인저로 USP 검증 테스트에 필요한 다중 반복 측정을 자동화하여 작업자의 부담을 줄였습니다. 검증 테스트에는 측정 정확도, 정밀도, 특이성에 대한 확인과 정량 한계 측정이 포함되었습니다.

분석법을 검증한 후, Cary 60 UV-Vis를 사용하여 USP 황산 마그네슘 약전 절차에 따라 두 황산 마그네슘 시료의 철 함량을 측정했습니다. 결과는 해당 물질에 대한 허용 기준인 <math>< 0.5\mu\text{g/g}</math> 내에 있었습니다.

Cary 60 UV-Vis는 일상적인 제약 품질 보증/품질 관리(QA/QC) 워크플로와 R&D 응용에 이상적입니다. 또한, US FDA 21 CFR Part 11, EU Annex 11 및 이와 유사한 국가 전자 기록 규정을 준수하는 Agilent Cary WinUV Pharma 소프트웨어도 옵션으로 제공됩니다.

참고 자료

1. United States Pharmacopeia. General Chapter, <1226> Verification of Compendial Procedures. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_01
2. United States Pharmacopeia. General Chapter, <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2022**. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M3209_03_01
3. Spectroscopy Solutions for Pharmaceuticals: Confidence in Compliance to USP <857> Using the Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, *Agilent Technologies 백서*, 발행 번호 5991-7269EN, **2016**.
4. United States Pharmacopeia. USP Monographs, Magnesium Sulfate. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M47040_06_01.html
5. Improved Lab Efficiency with the Agilent 18-Cell Changer Accessory, *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5994-7250EN, **2024**.

추가 정보

- Cary 60 UV-Vis 분광 광도계
- UV-Vis 응용을 위한 Cary WinUV 소프트웨어
- UV-Vis 분광법 및 분광 광도계 FAQ

www.agilent.com

DE-001364

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 11월 12일, 한국에서 발행
5994-6929KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DF타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090(고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com