

UV-Vis 측정에서 데이터 무결성 개선 및 분석 변수 제거

Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계는 표준
검량선과 여러 시료를 동시에 측정합니다



저자

Dr. Matthew Quinn
Agilent Technologies, Inc.
Melbourne, Victoria, Australia

서론

제약 환경에서 일반적인 품질 보증/품질 관리(QA/QC) 절차를 수행하려면 생산 과정과 생산 후 의약품 활성 화합물 및 부형제를 정기적으로 모니터링해야 합니다. 안정적인 접근법 중 하나는 검량선을 사용하여 UV-Vis 분광 광도법을 통해 농도를 확정하는 것입니다. 이 접근 방식의 신뢰도가 높지만 데이터 품질을 저하시킬 수 있는 일부 가변성이 도입될 수 있습니다. 이러한 유형의 변수는 기기, 환경에 기반한 오류 또는 작업자 오류에 기인하는 경우가 많습니다.

Acetylsalicylic acid (ASA)는 일반적으로 항류머티즘, 항염증 및 진통제로 쓰이는 아스피린의 유효 성분입니다(1). Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계에서만 적용 가능한 접근 방식을 입증하기 위해 이 화합물을 사용하였습니다. 많은 일반적인 의약품과 마찬가지로 정제의 대부분은 원료 의약품(API) 외에 바인더(binder), 착색제, 가용화제와 같은 비활성제로 구성됩니다.

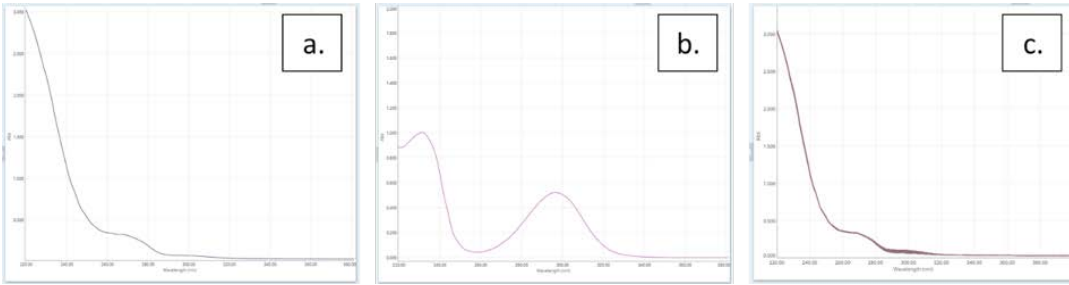


그림 1. 25°C에서 4시간 거친 후 (a.) ASA (b.) SA의 흡광 스펙트럼과 (c.) ASA 시료의 흡광도 신호를 통해 가수분해 반응이 진행됨을 보여줍니다.

ASA의 조성 비율은 ASA를 탈아세틸화된 형태인 salicylic acid (SA)로 가수분해함으로써 쉽게 측정할 수 있습니다. 이어서 UV-Vis 흡광도를 측정하고 검량선을 참조하여 SA를 정량합니다.

환경 기반 오류는 많은 원인에서 유래될 수 있습니다. 그 중 작은 온도의 변화 또는 물과의 접촉만으로 흡광도 신호가 현저하게 변화하는 현상이 이에 포함됩니다. ASA는 물과 접촉할 때 매우 불안정하며 실온에서도 SA로 가수분해되어(그림 1) 흡광도 프로파일이 크게 달라지는 결과로 이어집니다.

이러한 불안정성은 기존의 UV-Vis 분광 광도계를 사용한 분석을 특정 pH 조건과 특정 온도에서 매우 빠르게 수행해야 함을 의미합니다. 또는 농도를 측정하기 전에 ASA는 SA로 전환될 수도 있습니다. 이 접근 방식은 애초에 유리 SA가 없다는 것을 가정하였지만 이전의 연구에는 이미 이 가정을 뒤집었습니다(2). 가수분해는 그림 2에 나타난 바와 같이 온도가 상승함에 따라 중요한 convoluting 요인이 될 수 있습니다. 따라서 이러한 시료에서는 잠재적인 환경 오류 최소화를 중요하게 고려해야 합니다.

많은 실험 설계에는 작업자 오류를 피하기 위한 수단으로 반복 분석을 수행하는 내용이 포함됩니다. 기타 오류는 의도하거나 의도치 않은 시료 전처리의 편향 또는 시료 측정 간에 발생할 수 있는 사고 등으로 인해 발생할 수 있습니다. Cary 3500 Multicell

을 사용하면 8개의 큐벳 위치를 동시에 측정할 수 있습니다. 정확히 동일한 조건에서 총 7가지의 표준물질과 시료(및 하나의 참조 시료)를 정확히 동시에 분석할 수 있습니다. Cary 3500 Multicell은 시료, 표준물질 및 대조군을 동시에 측정하여 데이터 무결성을 얻는 새로운 방법을 제공합니다. 이러한 성능을 활용함으로써 환경과 작업자에 기인한 분석 변수와 이로 인한 데이터 정확도 저하의 위험을 제거할 수 있습니다.

Cary 3500에는 기기에서 도입되는 가변성을 최소화하는 몇 가지 주요 기능이 있습니다. 이 기기에는 언라인먼트가 필요한 구동부위가 없기 때문에 올바르게 맞지 않는 시료 홀더의 언라인먼트로 인한 오류를 방지할 수 있습니다. 이 기기는 또한 시료와 표준물질을 동시에 측정할 수 있습니다. 따라서 시간이 지남에 따라 변화하는 기기 성능과 검량으로 인한 오류를 피할 수 있습니다. 이러한 방식으로 Cary 3500은 기기 오류로 인한 가변성을 최소화합니다.

본 응용 자료에서 시판 아스피린 시료의 조성 비율은 확정되어 있습니다. 염기 가수분해 분석을 진행한 후 296nm에서 흡광도를 측정했습니다. 6가지 표준물질과 한 시료를 동시에 측정함으로써 가능한 환경, 작업자 및 기기로 인한 오류를 최소화하였습니다.

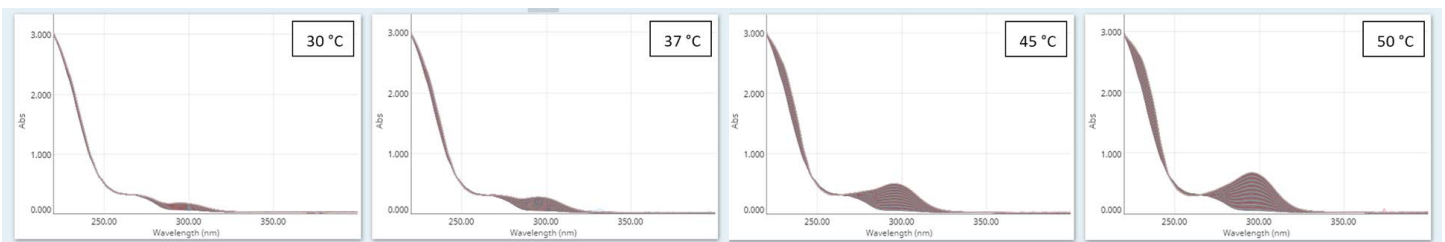


그림 2. 4시간 동안 30, 37, 45 및 50°C에서 ASA가 SA로 전환될 때 온도에 따라 반응 속도가 증가하는 것을 볼 수 있습니다.

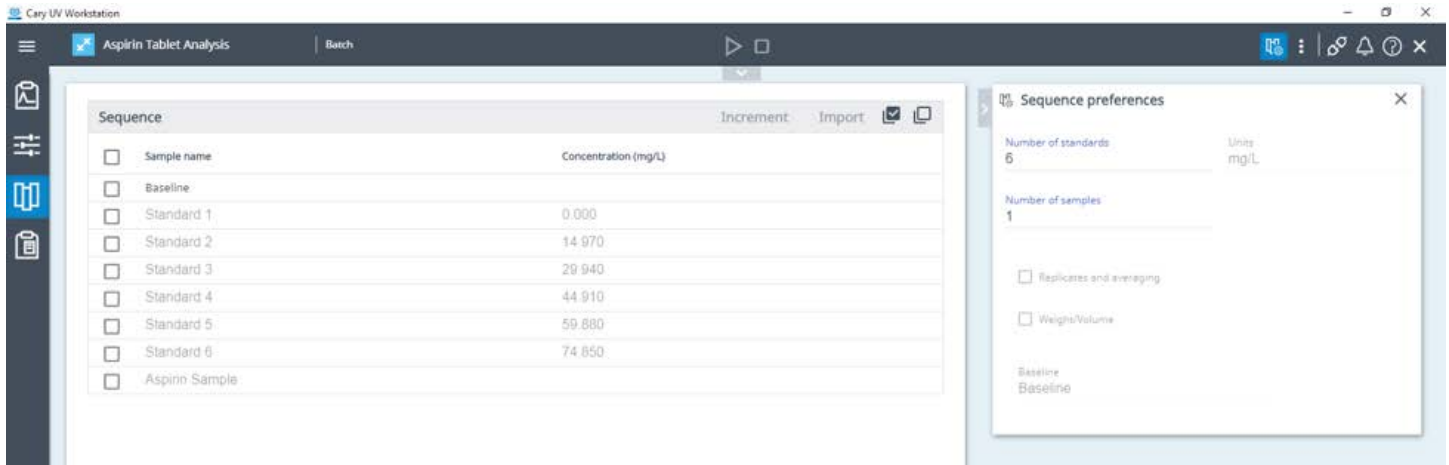


그림 3. 베이스라인 선택, 표준물질과 시료 수, 단위 선택 및 표준물질 농도를 보여주는 Cary UV Workstation Concentration 응용 프로그램의 시퀀스 페이지

실험

표준 용액 준비

Milli-Q 여과수로 전처리한 인산염 완충액(PBS)에 0.2g의 순수한 SA를 용해시키고 pH를 7.5로 조정 후 SA의 표준 검량선을 작성했습니다. 표준 검량선은 약 0 ~ 2의 흡광도 단위의 흡광도 범위가 유지되도록 표 1에 따라 작성했습니다.

표 1. 제조된 표준물질의 농도

| 표준물질 ID | 농도(mg/L) |
|---------|----------|
| 표준물질 1 | 0 |
| 표준물질 2 | 14.97 |
| 표준물질 3 | 29.94 |
| 표준물질 4 | 44.91 |
| 표준물질 5 | 59.88 |
| 표준물질 6 | 74.85 |

시판 아스피린 정제 염기 가수분해

시판 아스피린 정제 시료를 구입했습니다. 정제의 중량은 163.7mg 이었습니다. 이를 75°C의 Milli-Q 여과수에 용해시켰습니다. 1M 수산화나트륨을 이용해 pH를 약 12로 조정하였습니다. ASA 산이 SA로 완전히 가수분해될 수 있도록 시료를 이러한 조건에서 1시간 동안 유지시켰습니다.

시료를 1L로 전처리한 다음 검량 범위 내에 있도록 희석시키고 pH를 7.5로 조정했습니다.

기기

본 연구에서는 동시에 8개의 큐벳을 측정할 수 있는 Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계를 선택했습니다. 이 기기의 기능은 각 시료를 동일한 조건에서 측정할 수 있도록 확보합니다.

표 2. 기기 파라미터

| 파라미터 | 설정 |
|--------------|-----------|
| 파장 범위(nm) | 400 ~ 250 |
| 스펙트럼 대역폭(nm) | 2 |
| 신호 평균 시간(s) | 0.4 |
| 데이터 간격(nm) | 1 |
| 슬라이스 파장(nm) | 296 |
| 구역 구성 | 1 구역 |

스캔을 수행하기 위해 각 표준물질 및 시료 2.5mL를 Milli-Q 여과수 참조 시료와 함께 3.5mL 석영 큐벳으로 옮겼습니다. Cary UV Workstation 소프트웨어의 Concentration 응용 프로그램을 사용하여 모든 7개의 시료가 단일 참조 시료와 동시에 측정될 수 있도록 단일 구역을 선택했습니다. 표 2에 요약된 파라미터를 사용했습니다.

제조된 표준물질의 농도를 입력하고 베이스라인을 적용했습니다 (그림 3). 검량선을 구축하기 위해 아스피린 정제 시료와 함께 총 6가지의 표준물질을 선택했습니다.

각 큐벳 위치에 대해 베이스라인을 수집했습니다. 그런 다음 표준물질과 시료를 한 번에 동시 측정했습니다.

결과 및 토의

표준 검량선 및 정제 시료의 동시 분석

400 ~ 250nm의 파장 스캔을 수행하여 SA 피크에 대한 정성 및 정량 분석을 수행하였습니다. 피크 최대값은 296nm에 위치하는 것으로 확인되었습니다. Cary 3500 Multicell을 사용하여 모든 표준물질과 시료를 동시에 분석했습니다. 이는 모든 표준물질과 시료가 동시에, 그리고 정확히 동일한 조건에서 측정됨을 의미합니다.

6가지의 표준물질 및 시료에 대한 파장 스캔을 수행한 후 각각에 대해 296nm에서의 흡광도 판독값을 측정하였습니다. 이 데이터를 이용하여 표준 검량선을 작성하고 정제 시료의 농도를 계산했습니다. 아스피린 정제 시료에서 SA의 농도는 7.755mg/L (희석 인자를 고려할 때 77.55mg/L)인 것으로 확인되었습니다. 이 농도는 정제 내의 101.15mg인 ASA에 해당합니다(그림 4).

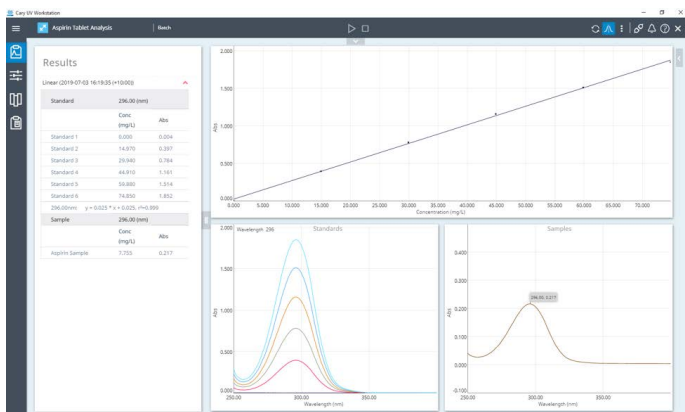


그림 4. Cary UV Workstation 소프트웨어는 SA 표준 검량선(상단 중간)과 표준물질 (하단 중간) 및 정제 시료(오른쪽 하단)에 대한 관련 스캔을 보여줍니다. 왼쪽에는 296nm에서의 원시값과 선형 방정식 및 상관계수가 나와 있습니다.

측정된 시료 정제의 질량으로부터 조성 비율을 계산할 수 있습니다. 저함량 아스피린 정제 전체의 질량은 163.7mg이었으며 정제에서 ASA의 질량은 101.15mg으로 정제 조성의 61.70%인 것으로 확정되었습니다.

결론

시판 아스피린 정제를 구입하여 염기 가수분해 반응을 수행하였습니다. 최종 용액으로부터 SA의 농도를 측정 후 ASA 농도를 측정하였습니다. SA의 표준 검량선을 작성하고, 모든 표준물질과 시료를 동시에 분석하였습니다. 이 접근 방식을 통해 결과에 영향을 미치는 환경, 기기 또는 작업자 오류가 도입될 위험을 제거하였습니다. 정제에서 ASA의 질량은 101.15mg으로 정제 조성의 61.70%인 것으로 확정되었습니다.

Cary 3500 Multicell은 시료, 표준물질 및 대조군을 동시에 측정하여 데이터 무결성을 얻는 새로운 방법을 제공합니다. 이러한 성능을 활용함으로써 환경과 작업자에 기인한 분석 변수와 이로 인한 데이터 정확도 저하의 위험을 제거할 수 있습니다.

참고문헌

1. Erkan D, Harrison MJ., Levy R., Peterson M., Petri M., Sammiriatno L., Unalp-Arida A., Vilela Y., Yazici Y., Lockshin MD. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals, *Arthritis Rheum*, 2007, 7, 2382-91.
2. Wang Y, Xu P, Li X., Nie K., Tuo M., Kong B., Chen J. Monitoring the hydrolyzation of aspirin during the dissolution testing for aspirin delayed-release tablets with a fiber-optic dissolution system, *J Pharm Analysis*, 2012, 2, 386-389.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 8월 12일, 한국에서 인쇄
5994-1206KO

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

 **Agilent**
Trusted Answers