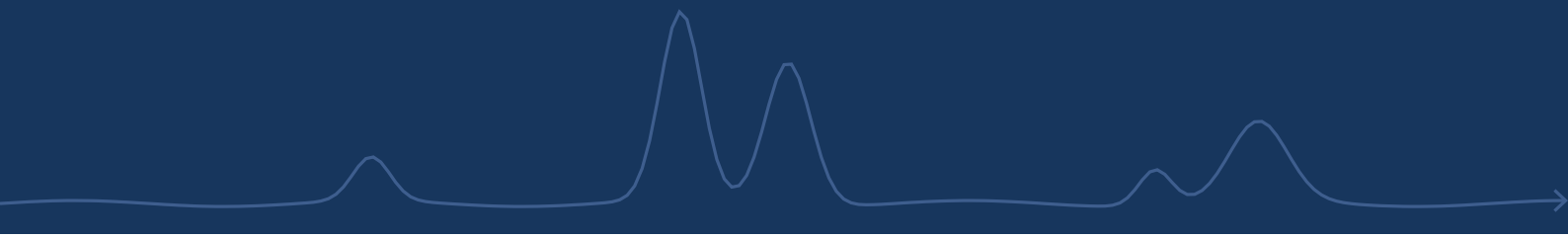
Sykam 자동 아미노산 분석기 S 633을 활용한

유럽 약전에 따른 Lysine 제제 내 닌히드린 양성 물질 시험 시연

Ninhydrin-Positive Substances Test in L-Lysine Hydrochloride According to the European Pharmacopoeia



KEY POINTS

01 **European Pharmacopoeia 11**
Ph. Eur. 11.0 Lysine hydrochloride (0930) 시험법 적용
SST 적합
Ile/Leu 분리도 기준 1.5 이상

02 **High Resolution**
Isoleucine/Leucine, Lysine/Ammonium 완전 분리
Ile/Leu Rs 2.049
Lysine/Ammonium Rs 3.020

03 **Better Sample Throughput**
기존 Extended Hydrolysate Program 대비 주입 주기 단축
81 → 56 min
시료당 분석 시간 약 31% 단축

A·JOO SCIENTIFIC (주)아주과학

서문

제약 산업에서 아미노산 원료는 건강기능식품, 원료 의약품, 의약완제품 등 다양한 형태로 폭넓게 사용됩니다. 제품의 품질과 신뢰도를 확보하려면 원료 아미노산의 순도 관리가 필수적이며, 일반적으로 유럽 약전(Ph. Eur.; European Pharmacopoeia)의 닌히드린 양성 물질(Ninhydrin-positive Substances) 시험으로 평가합니다. 이 시험은 높은 농도의 원료를 주입한 뒤 닌히드린 양성 반응을 보이는 피크의 면적을 참조용액과 비교해 불순물의 양을 결정합니다.

L-라이신(L-Lysine)은 제약 산업 전반에서 활용되는 대표적인 아미노산으로, 단백질의 가수분해나 미생물 발효로 생산됩니다. 일반적으로 안정한 염 형태인 Lysine Hydrochloride로 사용되며, 유럽 약전에 따른 순도 검사가 이뤄지는 대표적인 아미노산 원료입니다.

닌히드린 양성 물질 시험은 흔히 유리 아미노산 분석 시스템이라고도 하는 리튬 이온 기반의 유리 아미노산 분석 시스템에서 수행됩니다. 이 시스템은 높은 분리도를 제공하지만 분석 시간이 길다는 단점이 있습니다. 이 때문에 많은 제약 회사에서는 소듐 이온 기반의 구성 아미노산 분석 시스템으로 순도 검사를 진행합니다.

유럽 약전은 시스템 적합성 평가(SST; System Suitability Test) 항목으로 Isoleucine과 Leucine의 분리도가 1.5 이상일 것을 요구합니다.[1] 두 아미노산의 분리는 이동상 조성과 컬럼 오븐 온도에 크게 영향을 받으며, 지금까지는 A-4/A-5/B-1/Reg. Sol. 네 가지 이동상으로 23종 이상의 아미노산을 분리하는 Extended Hydrolysate Program이 주로 사용됐습니다. 이 분석법은 Isoleucine과 Leucine의 분리도를 1.7 이상으로 확보하지만 시료 주입 주기가 81분으로 시료 처리 시간이 깁니다.

본 어플리케이션 노트에서는 유럽 약전에 따른 아미노산 제제의 닌히드린 양성 물질 분석을 위한 새로운 분석법을 제시합니다. A-5/B-1/Reg. Sol. 이동상을 사용하는 이 분석법은 시료 주입 주기가 약 56분으로 기존의 81분 대비 시료 처리 속도가 훨씬 더 빨라졌으며 매우 우수한 Isoleucine/Leucine 분리도를 제공합니다.

분석 시스템

본 어플리케이션 노트에는 Sykam S 633 자동 아미노산 분석 시스템이 사용됐습니다. Sykam S 433 등 동등한 자동 아미노산 분석 시스템으로 대체할 수 있습니다.

표1. 분석 시스템 구성표

종류	제품명
펌프 시스템	S 633P Dual Pump Module
시료 주입 시스템	S 633A Autosampler
항온 시스템	S 633R Reaction Module
시약 보관 시스템	S 7130 Reagent Organizer
분리 컬럼	LCA K13/Na, Separation Column, 4.6 × 175 mm
필터 컬럼	LCA K04/Na, Ammonium Filter Column, 4.6 × 100 mm

이동상 및 반응액

분석에 사용된 이동상과 반응액은 (주)아주과학의 제품이며, 이동상은 소듐 시트레이트 완충액 기반입니다.

표2. 이동상 및 반응액 목록

종류	제품명
이동상 1	Sodium Citrate Buffer A-5
이동상 2	Sodium Citrate Buffer B-1
이동상 3	Regeneration Solution/Na
희석액	Sample Dilution Buffer/Na
반응액	Ninhydrin Reagent
반응로 세척액	Water : IPA : EtOH = 50 : 25 : 25
오토샘플러 세척액	0.1 g/L NaN_3*

** 증류수를 사용할 경우 일주일마다 교체가 권장됩니다.*

시약 및 표준품

희석 원액으로 사용된 염산과 분석에 사용된 표준품은 모두 Merck에서 구매했습니다.

표3. 시약 및 표준품 정보

제품명	제품 번호
Hydrochloric acid, 36 %	1.15186
L-Lysine monohydrochloride	L8662
L-Proline	P5607
L-Isoleucine	PHR1099
L-Leucine	PHR1105
Ammonium Standard for IC, TraceCERT®	G3126

참조용액 및 검액 준비

시료는 L-Lysine monohydrochloride, Merck(L8662)와 옥수수 전분 가수분해액을 균주 발효 및 정제한 시료 한 개, 총 두 개의 시료가 준비됐습니다. 정제물에 대한 자세한 시료 정보는 제공되지 않았습니다. 검액(Test Solution) 및 참조용액(Reference Solution) 준비에 사용한 희석 용매(Solution A)는 동일한 배치의 Sample Dilution Buffer/Na(이하 SDB/Na)가 사용됐습니다.

검액 제조를 위해 각 시료는 30.0 ± 3.0 mg을 저울에 달아 준비했습니다. 두 시료는 각각 30.1, 30.0 mg을 취했으며, 두 시료 모두 Class A 등급의 50 mL 부피 플라스크에 투입 후 약 30 mL의 SDB/Na를 넣어 잘 녹였습니다. 이후 표선에 맞게 다시 시료 희석 용매를 부어 정용·밀봉한 후 10분간 약 100-200 rpm으로 교반하였습니다. 이렇게 준비된 용액을 검액이라고 합니다.

참조용액(Reference Solution) (a)는 각 검액을 500배 희석하여 준비했으며 참조용액 (b)와 (c)는 각각 Proline과 암모늄 이온(NH_4^+)의 농도가 1.2, 0.12 mg/L가 되도록 제조했습니다.
시스템 적합성 평가 용액인 참조용액 (d)는 Isoleucine과 Leucine(Impurity A)의 농도가 각각 1.5 mg/L가 되도록 제조했습니다. 유럽 약전에서는 아미노산 용액 준비를 위해 사용하는 희석 용매로 물 혹은 장비 제조사에서 제시하는 적합한 희석 용매를 사용하라고 지시합니다. 타사의 경우 0.01–0.02 M 염산을 희석 용매로 권장합니다. 염산 용액은 간편하며 저렴하게 준비할 수 있지만, 취급시 위험하고 완충 성능을 제공하지 못합니다. 두 용액의 비교를 위해 0.01 M 염산 용액을 다른 공시험액으로 준비하였습니다.

분석 시스템 준비

일정하고 재현성 있는 분석 결과를 얻으려면 아미노산 분석기를 적합한 절차로 안정화해야 합니다. 사용하던 이동상에 새로 개봉한 이동상을 섞으면 완충 용액의 평형화가 서서히 일어나 분석 도중 조건이 미세하게 변할 수 있습니다. 이는 각 피크의 머무름 시간에 영향을 줄 수 있습니다. 따라서 기존 용액은 비운 뒤 새 용액으로 준비하는 것이 권장됩니다.
닌히드린 반응액은 1 L에 제공된 활성액 1 mL를 첨가한 뒤 약 5분간 질소 가스로 버블링(퍼징)하여 잔존 산소를 제거합니다. 자동 시료 주입 장치의 세척액으로 0.1 g/L NaN_3 용액을 사용했으며, 반응액 펌프의 세척 용액으로는 물, 이소프로필알코올, 에탄올을 50:25:25로 혼합해 탈기한 용액을 사용했습니다. 이후 드레인 밸브를 열어 각 용액을 20 mL 이상 흘려보냈습니다. 자동 시료 주입 장치 세척액 및 반응액 펌프 세척액은 모두 3차 증류수로 대체할 수 있습니다. 용액을 교체했다면 주입 니들 워시 8회가 권장되며, 증류수는 일주일마다 교체하는 것을 권장합니다.

크로마토그래피 조건

본 분석에 사용된 크로마토그래피 조건은 다음과 같습니다.

표4. 공통 조건표

항목	조건
이동상	Sodium Citrate Buffer A-4/A-5/B-1/Reg. Sol.
분리 컬럼	LCA K13/Na, 4.6 × 175 mm
이동상 유속	0.450 mL/min
반응액 유속	0.250 mL/min
컬럼 온도	50-70 °C (표6)
반응로 온도	130 °C
주입량	50 µL
시료 보관 온도	10 °C
검출 파장	570, 440 nm
주입 라인 세척	주입 포트 - 주입 전 1회, 주입 후 3회
반응액 밸브	46.0분에 Wash로 전환

표5. 이동상 그래디언트 조건

시간 [min]	A-4/Na* [%]	A-5/Na [%]	B-1/Na [%]	Reg. Sol. [%]
Initial	0.0	100.0	0.0	0.0
6.00	0.0	100.0	0.0	0.0
6.10	0.0	82.0	18.0	0.0
26.00	0.0	82.0	18.0	0.0
26.10	0.0	22.0	78.0	0.0
31.00	0.0	22.0	78.0	0.0
31.10	0.0	0.0	100.0	0.0
40.00	0.0	0.0	100.0	0.0
40.10	0.0	0.0	0.0	100.0
43.00	0.0	0.0	0.0	100.0
43.10	0.0	100.0	0.0	0.0
56.00	0.0	100.0	0.0	0.0

** A-4는 배치만 됐으며 사용되지 않았습니다.*

표6. 컬럼 온도 조건

시간 [min]	온도 [°C]
Initial	50.0
30.0	50.0
31.0	70.0
40.0	70.0
41.0	50.0
50.0	50.0

분석 시퀀스

분석 시퀀스는 다음과 같습니다.

표7. 시퀀스 테이블

순서	시료명	시료 타입	목적
1	Equilibration	Bypass	안정화
2	Baseline Check	Bypass	베이스라인 체크
3	공시험액 (SDB/Na)	Blank	본 분석
4	0.01 M HCl	Blank	공시험액 비교
5	참조용액 (d)	Standard	본 분석
6	참조용액 (b)	Standard	본 분석
7	참조용액 (c)	Standard	본 분석
8	참조용액 (a) #1	Standard	본 분석
9	검액 #1	Unknown	본 분석
10	공시험액	Blank	캐리오버 방지
11	참조용액 (a) #2	Standard	본 분석
12	검액 #2	Unknown	본 분석
13	공시험액	Blank	캐리오버 방지
14	검액 #1	Unknown	캐리오버 테스트 #1
15	공시험액	Blank	캐리오버 테스트 #1
16	검액 #1	Unknown	캐리오버 테스트 #2
17	공시험액	Blank	캐리오버 테스트 #2
18	System Wash	Bypass	장비 세척 및 종료

시스템 안정화와 베이스라인 확인을 위해 Bypass run 2회를 진행했으며 이어서 공시험액이 주입됐습니다. 참조용액은 (d), (b), (c) 순서대로 주입하였습니다. 이후 각 검액을 희석해 제조한 참조용액 (a) – 검액 – 공시험액 순서로 주입됐습니다. 검액 주입 후 공시험액 주입은 시스템의 Carry-Over를 방지하기 위해서입니다. 본 분석 시퀀스가 끝난 후, 검액 #1과 공시험액을 교차로 두 번씩 각각 다른 세척 프로그램으로 주입해 캐리오버를 평가했습니다.
모든 분석이 끝난 뒤 세척 메소드를 통해 시스템 세척이 진행됐습니다.

결과 및 논의

– 참조용액, 공시험액 주입 결과

먼저 시스템 적합성 평가를 위한 참조용액 (d)의 570 nm 채널 크로마토그램과 베이스라인 확인을 위한 Bypass run의 크로마토그램은 다음과 같습니다.
가시성을 위해 참조용액 (d)의 570 nm 채널 크로마토그램에는 +50 mAU의 오프셋이 적용됐습니다.

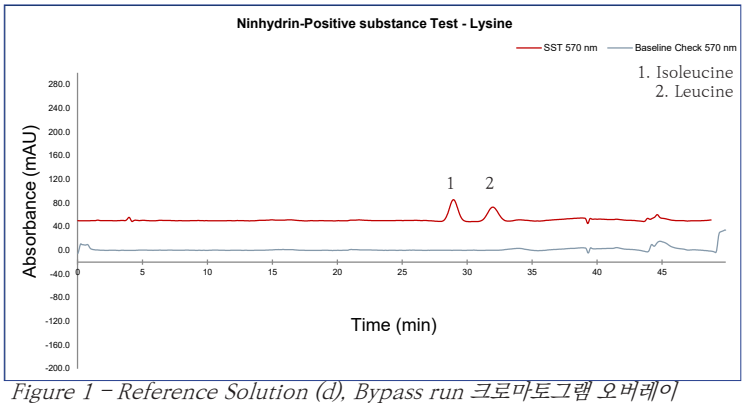


Figure 1 – Reference Solution (d), Bypass run 크로마토그램 오버레이

표 8. 참조용액 (d) - 시스템 적합성 평가

순서	Ret. Time [min]	Name	Peak Area [mAU·s]	Peak Height [mAU]	Resolution
1	29.003	Isoleucine	1933.611	38.970	[-]
2	32.037	Leucine	1705.890	27.137	2.049

유럽 약전에서 제시하는 시스템 적합성 평가 조건은 Isoleucine/Leucine 분리도 1.5 이상이며 2.049는 이를 만족하는 뛰어난 분리도입니다. Isoleucine/Leucine의 분리도는 분리 이동상의 극성과 컬럼 온도에 영향받으며, 보편적인 구성 아미노산 분리에 사용되는 A-1 버퍼 대비 A-5 버퍼는 극성이 낮게 설계된 버퍼이기 때문에 이런 분리도를 얻을 수 있었습니다.

다음은 참조용액 (a) #1, (b), (c) 및 공시험액 크로마토그램입니다. 참조용액 (a), (c) 및 공시험액은 570 nm 채널, 참조용액 (b)는 440 nm 채널 크로마토그램만 표시됐습니다.
마찬가지로 가시성을 위해, 참조용액 (a) #1, (c), (b) 및 공시험액 크로마토그램은 각각 +100, +50, −50, 0 mAU의 오프셋이 적용됐습니다.

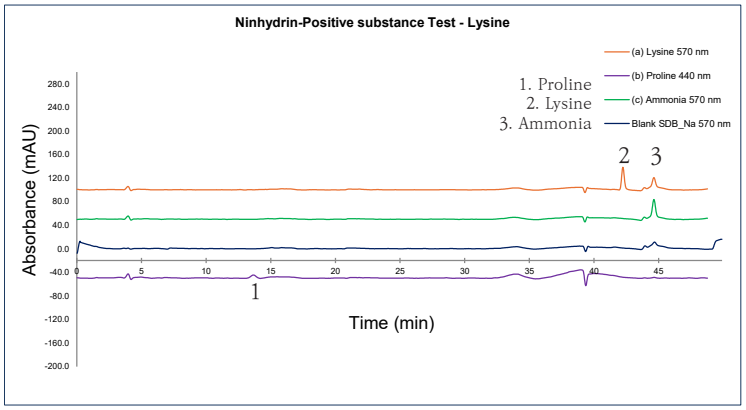


Figure 2 – 참조용액 (a) #1, (b), (c) 및 공시험액 크로마토그램, 참조용액 (a) #2는 표기되지 않음.

각 피크 정보는 다음과 같습니다.

표 9. Peak information

순서	Ret. Time [min]	Name	Peak Area [mAU·s]	Peak Height [mAU]
1	13.683	Proline	174.072	5.898
2	42.317	Lysine - 참조용액 (a) #1	588.610	42.283
2*	42.319	Lysine - 참조용액 (a) #2	566.061	41.270
3	44.727	Ammonium	481.225	31.183

** 참조용액 (a) #2의 크로마토그램은 생략됐습니다.*

주입된 모든 용액에서는 암모늄이 검출됐는데, 각 용액별 검출된 암모늄은 다음과 같습니다.

표 10. Measured Ammonium peak information

순서	용액명	Ret. Time [min]	Peak Area [mAU·s]	Peak Height [mAU]
1	참조용액 (c)	44.727	481.225	31.183
2	참조용액 (a) #1	44.723	267.013	17.207
3	참조용액 (a) #2	44.726	261.112	17.113
4	SDB/Na	44.780	75.958	5.460
5	0.01 M HCl	44.750	40.217	3.135

시료 희석 용매는 산성 조건이기 때문에, 공기 중의 암모니아를 지속적으로 흡수할 수 있습니다. 따라서 암모늄 함량이 0%인 결과를 얻는 것은 실무적으로 어렵습니다. 이를 고려해 유럽 약전에서도 검액 내 암모늄 함량뿐만 아니라 공시험액에서 검출된 암모늄 피크 면적과의 비교도 요구합니다.
시료 희석 용매(Solution A)로 사용한 SDB/Na와 0.01 M HCl 용액 내 검출된 각 암모늄 피크의 면적은 참조용액 (c)의 암모늄 피크 면적의 15.8%, 8.4%의 비율로 검출됐습니다. SDB/Na는 개봉 후 3개월이 지난 용액이고, 0.01 M HCl 용액은 제조 후 바로 주입된 용액입니다. 두 용액 모두 여전히 참조용액 대비 상대적으로 낮은 암모늄이 검출됐습니다.

결과 및 논의

– 검액 내 불순물 및 암모늄 함량

검액 주입 크로마토그램 확인에 앞서, 검액 내 불순물의 Reporting Threshold는 검액 함량의 0.05%입니다. 하지만 검액 내 높은 주성분 농도 때문에 주성분 피크는 고농도 주입에 의해 Cut-Off가 발생하는 경우가 많습니다. 이를 고려해, 실무적으로는 참조용액 (a), (b)에서 얻은 각 Lysine, Proline 피크 면적의 25% 혹은 참조용액의 25% 농도 용액을 추가로 제조 및 주입해 얻은 피크 면적과 동일한 값으로 설정합니다. 본 어플리케이션 노트에서는 참조용액 (a), (b)에서 얻은 피크 면적의 25%를 Reporting Threshold로 사용하였습니다.

다만, 검출되는 피크의 개수, 머무름 시간, 면적 등을 보다 자세하게 확인하기 위해 본 문서에서 검액 크로마토그램의 적분 테이블에는 별다른 피크 면적 최솟값을 설정하지 않았으며, 확인된 모든 피크 정보를 개별 정리하였습니다.

다음은 검액 #1의 크로마토그램입니다. 이 용액은 Merck에서 구매한 L-Lysine monohydrochloride 제품입니다.
전체 크로마토그램과 피크 확인을 위한 30-48분 확대 크로마토그램이 첨부됐습니다.

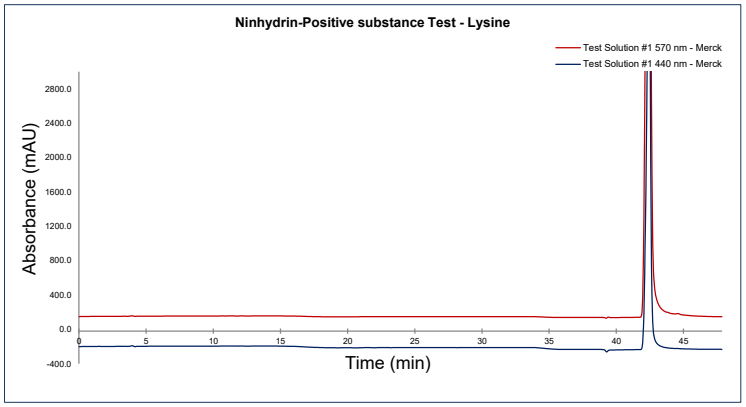


Figure 3 – 검액 #1의 전체 크로마토그램

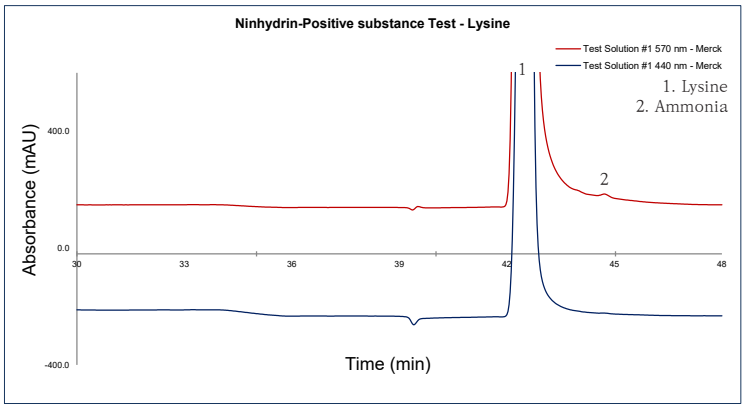


Figure 4 – 검액 #1의 30-48분 확대 크로마토그램

먼저 주 피크인 Lysine은 42.593분에 검출됐으며, 피크의 높이가 3 AU를 넘어 Peak Cut-Off가 발생했습니다. 약 4.0분에 보이는 피크는 주입 피크이며 39.3분에 보이는 피크는 피크가 아닌 이동상 조성 변화에 따른 베이스라인 변화로, 이 현상은 Bypass 크로마토그램에서도 동일한 크기로 발견됩니다. Ammonium 피크는 44.667분에 검출됐습니다. 암모늄 피크의 면적과 높이는 각각 128.979 mAU·s, 8.911 mAU입니다.
암모늄 피크는 Lysine 피크 꼬리에 올라탄 형태를 보였지만, Lysine/Ammonium 분리도는 3.020이며 적분에 아무런 문제가 없었습니다.
보다 민감한 적분 조건을 위해 Minimum Height 1 mAU, Global Threshold 3 mAU의 적분 조건이 적용됐으며 이 기준 하에 암모늄을 제외하고 검출된 불순물 피크는 없었습니다.

다음은 검액 #2 크로마토그램입니다. 이 용액은 옥수수 전분과 세균을 통해 발효 및 정제된 시료입니다.
검액 #1과 동일한 조건의 적분 테이블이 적용됐으며 전체 크로마토그램과 30-48분 확대 크로마토그램이 첨부됐습니다.

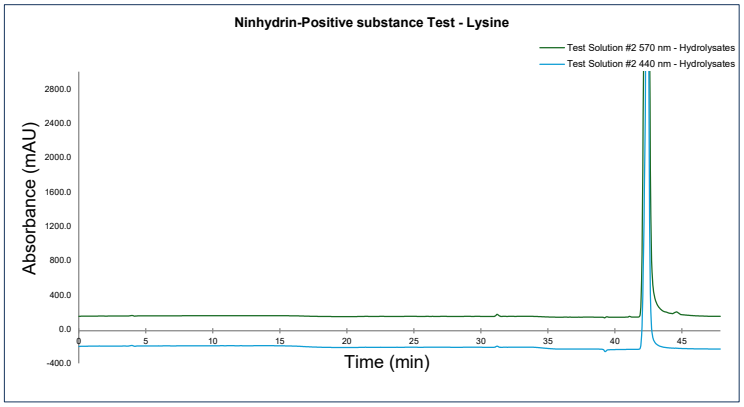


Figure 5 – 검액 #2의 전체 크로마토그램

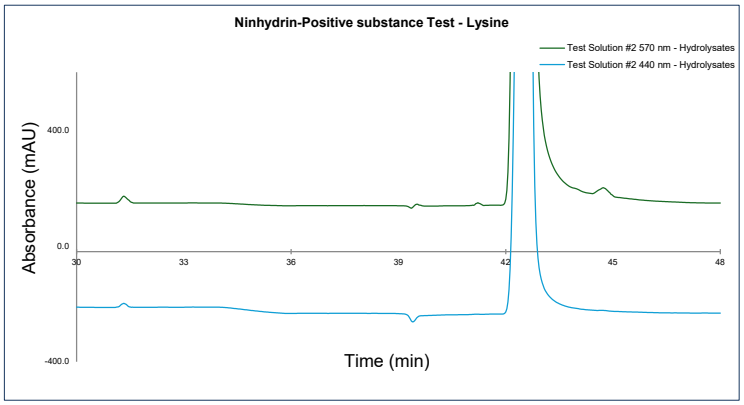


Figure 6 – 검액 #2의 30-48분 확대 크로마토그램

Lysine 피크는 42.553분에 검출됐으며 검액 #1 크로마토그램과 동일하게 Peak Cut-Off가 발생했습니다. 마찬가지로 약 4.0분, 39.3분에 각각 주입 피크 및 베이스라인 변화가 관찰됐습니다. 적분 테이블 조건은 동일하게 Minimum Height 1 mAU, Global Threshold 3 mAU가 적용됐습니다.

검액 #1과는 다르게 검액 #2에서는 570 nm 채널에서 31.912분, 40.287분, 41.113분에 피크가 검출됐습니다. Ammonium은 44.701분에 검출됐습니다. 440 nm 채널에서는 검출된 피크가 없었습니다.
검출된 각 피크의 상세 정보는 아래 표와 같습니다.

표 11. 검액 #2에서 검출된 피크 정보

순서	Peak Name	Ret. Time [min]	Peak Area [mAU·s]	Peak Height [mAU]
1	Unknown #1	31.912	120.193	2.371
2	Unknown #2	40.287	28.129	1.029
3	Unknown #3	41.113	101.915	2.011
4	Ammonium	44.701	198.951	12.460

아미노산 표준품 크로마토그램의 머무름 시간과 비교했을 때, Unknown #1, #2, #3은 각각 Leucine, 1-Methylhistidine, Tryptophan으로 추정되지만, 별도로 표기하지는 않았습니다.

각 검액에서 검출된 불순물 및 암모늄 피크에 대한 계산표는 다음과 같습니다. 암모늄 함량은 검액 내 암모늄 피크 보정 면적 값이 참조용액 내 암모늄 피크 보정 면적 값보다 낮으면 됩니다.

표 12. 검액 #1 중 불순물 및 암모늄 함량 계산

순서	채널	기준 피크	피크 면적 [mAU·s]	Reporting Threshold [mAU·s]
1	570 nm	Lysine	588.610	147.153
2	440 nm	Proline	174.072	43.518

물질명	용액 종류	피크 면적 [mAU·s]	보정 면적 [mAU·s]	적합 여부
Ammonium	공시험액	75.958	[-]	PASS
	참조용액	481.225	405.267	
	검액 #1	128.979	53.021	

참조용액 (a) #1의 Lysine 피크 면적 및 참조용액 (b)의 Proline 피크 면적은 각각 588.610, 174.072 mAU·s이므로, Reporting Threshold는 147.153, 43.518 mAU·s가 됩니다. 공시험액 (SDB/Na) 내 검출된 암모늄 피크 면적은 75.958 mAU·s이며, 보정 면적은 각 용액의 암모늄 피크 면적에서 공시험액의 암모늄 피크 면적을 뺀 값입니다. 예를 들어 참조용액 (c)에서 검출된 암모늄 피크 면적은 481.225 mAU·s이므로 보정 면적은 481.225 – 75.958 = 405.267 mAU·s입니다.
검액 #1에서는 570, 440 nm 채널에서 검출된 불순물 피크가 없으므로 별도의 불순물 함량 계산은 이뤄지지 않았습니다.

다음은 검액 #2 중 불순물 및 암모늄 함량 계산표입니다.

표 13. 검액 #2 중 불순물 및 암모늄 함량 계산

순서	채널	기준 피크	피크 면적 [mAU·s]	Reporting Threshold [mAU·s]
1	570 nm	Lysine	566.061	141.515
2	440 nm	Proline	174.072	43.518

순서	Peak Name	Ret. Time [min]	Peak Area [mAU·s]	환산 추정치 [wt%]
1	Unknown #1	31.912	120.193	0.042
2	Unknown #2	40.287	28.129	0.010
3	Unknown #3	41.113	101.915	0.036

물질명	용액 종류	피크 면적 [mAU·s]	보정 면적 [mAU·s]	적합 여부
Ammonium	공시험액	75.958	[-]	PASS
	참조용액	481.225	405.267	
	검액 #2	198.951	122.993	

세 개의 불순물 피크 모두 Reporting Threshold 값 이하의 면적이기 때문에 보고 대상 불순물 함량 합계에서 제외할 수 있습니다.
다만 본 노트에서는 각 피크의 추정 함량비를 계산했습니다. 참조용액 (a) 내 Lysine 함량은 0.2%이므로, 불순물 피크의 면적비를 통해 계산했을 때, 총합은 약 0.088%로 추정됩니다.

추가 논의

– 베이스라인

Sykam GmbH에서 제시하는 아미노산 분석기의 운전 적격성 평가(OQ; Operational Qualification)[2]에는 베이스라인 안정성 평가가 있습니다. 이 평가는 Buffer A 및 Ninhydrin Reagent 표준 조건 하에서 10-20분 구간의 ASTM Noise[3]와 Drift를 측정합니다. 다음은 이 방법에 따라 측정된 베이스라인입니다. ASTM Noise 측정 주기는 0.5 min입니다.

표 14. 베이스라인 노이즈 및 드리프트 평가표

채널	10-20 min ASTM Noise [mAU]	Noise Limit [mAU]
570 nm	0.1742	1.000
440 nm	0.1996	1.000

채널	10-20 min Drift Rate [mAU/h]	Drift Rate Limit [mAU/h]
570 nm	0.5012	20.000
440 nm	0.5998	20.000

추가로 실제 분석 메소드를 Bypass run하여 얻은 크로마토그램에서 피크가 검출되는 특정 구간의 ASTM Noise는 다음과 같습니다. 각 구간은 인젝션 피크, 그래디언트 조성 변화에 따른 베이스라인 변화 구간을 피한 구간과 주요 피크들이 용리되는 구간을 선별하였습니다.

표 15. 분석 메소드 상 구간별 ASTM 노이즈 측정표

채널	ASTM Noise 측정 구간 [min]	ASTM Noise [mAU]
570 nm	0.5-3.0	0.3082
570 nm	5.0-14.0	0.2633
570 nm	23.0-33.0	0.2072
570 nm	36.0-38.0	0.1715
570 nm	40.0-43.0	0.2688
440 nm	5.0-14.0	0.4016
440 nm	23.0-33.0	0.2664
440 nm	36.0-38.0	0.2694

실제 분석 메소드 베이스라인에서 얻은 ASTM Noise의 범위는 570 nm 채널은 0.1715–0.3082 mAU, 440 nm 채널은 0.2664–0.4016 mAU로 측정됐습니다. 유럽 약전 등을 포함해 일반적으로 검출 한계 혹은 정량 한계 측정 방법으로 노이즈 레벨과 피크 높이를 이용한 S/N Ratio를 사용합니다. 위 두 표에서 측정한 것은 특정 구간의 Noise가 아닌 구간의 평균 Noise인 ASTM Noise를 측정하였기 때문에 이 값을 그대로 S/N Ratio에 사용할 수는 없지만, 이 값을 통해 피크 높이가 약 1 mAU 근처일 때도 여전히 베이스라인과 분리해 검출할 수 있음을 유추할 수 있습니다. 실제로 검액 #2에서는 피크 높이가 1.029 mAU인 불순물 피크가 검출되었습니다.

추가 논의

– 캐리오버

유럽 약전의 닌히드린 양성 물질 검사에서 구체적인 캐리오버 기준을 제시하지는 않지만, 베이스라인과 같이 운전 적격성 평가에서 장비를 평가할 때 캐리오버에 대한 수치를 제시합니다. 이 수치는 일반적으로 0.05–0.2%를 기준으로 합니다.

이 수치는 시료의 특성과 주입 장치의 세척 프로그램에 크게 영향받습니다. 이를 비교하기 위해, 두 번의 캐리오버 테스트가 진행됐으며, 첫 번째 테스트는 주입 전·후 1회 세척, 두 번째 테스트는 주입 전 1회, 주입 후 3회 세척과 니들 워시 1회 진행됐습니다.

캐리오버 평가 방법은 검액 #1 분석 직후 공시험액을 주입하여 확인합니다. 정확한 캐리오버의 측정은 검액 #1 분석 후 두 번의 공시험액 주입을 통해 공시험액에 존재할 수 있는 Lysine 성분을 고려해야 하지만, 이 부분은 이미 처음 공시험액 주입에서 확인됐으므로 한 번만 주입됐습니다.

다음은 캐리오버 평가를 위해, 세척 조건별 Blank 크로마토그램입니다. Blank–Comparison은 처음 주입된 Blank 크로마토그램입니다.

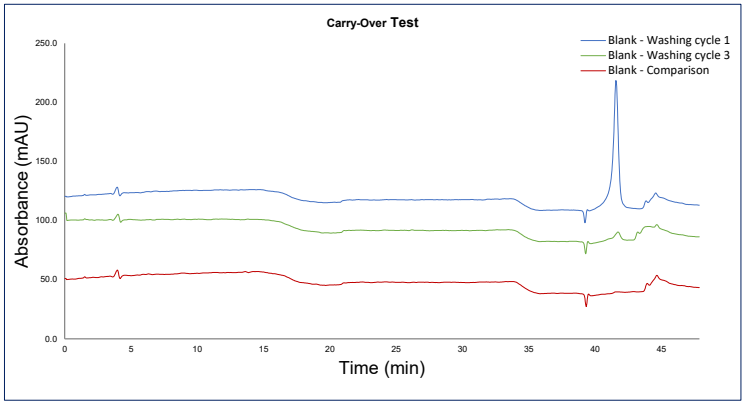


Figure 7 – 세척 조건에 따른 Blank 크로마토그램

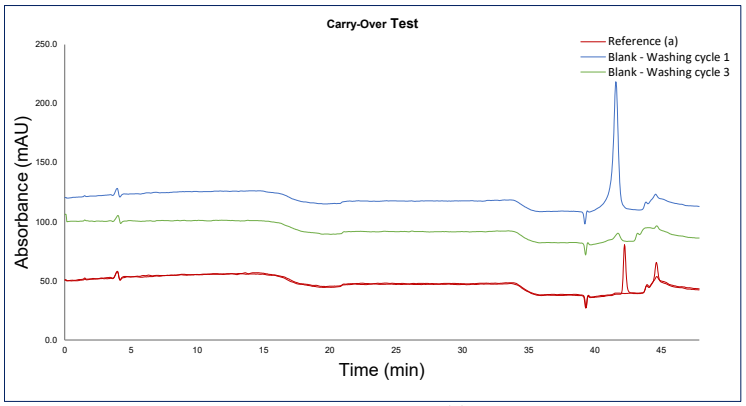


Figure 8 – Carry-Over 비교를 위한 참조용액 (a) 크로마토그램 오버레이

특이한 점은 참조용액 (a)의 Lysine 피크 머무름 시간이 42.317분인 데 비해, 세척 조건별 공시험액에서 검출된 피크의 머무름 시간은 각각 41.817, 41.617분으로 다소 빠르게 나타났으며 심한 peak fronting이 관찰됐습니다. 머무름 시간과 피크 형태가 참조용액의 Lysine 피크와 다르지만, 검액 주입 후 공시험액에서만 이러한 피크가 관찰됐기 때문에 검액에서 유래한 잔류 성분일 가능성이 있다고 판단했습니다.

보수적인 잔류량 평가를 위해 두 피크의 적분 시작점을 모두 39.650분으로 설정하여 가능한 한 넓은 면적을 적분했습니다. 이 면적을 참조용액 (a)의 Lysine 피크 면적과 비교해 검액 대비 추정 잔류율을 계산했습니다. 따라서 계산 결과는 잠정적인 잔류율 추정값으로 해석하는 것이 타당하며, 본문에서는 편의상 이를 캐리오버로 지칭했습니다.

다음은 캐리오버를 계산한 표입니다.

표 16. 세척 조건에 따른 캐리오버* 평가표

크로마토그램	Peak Area [mAU·s]	Carry-Over* [%]
참조용액 (a)	588.610	[-]
Washing Cycle 1	2820.061	0.958
Washing Cycle 3	102.773	0.035

** 검액 주입 후 잔류율*

Washing Cycle이 1회인 경우 검출된 피크 면적은 2820.061 mAU·s이며 3회인 경우 102.773 mAU·s로 측정됐습니다. 참조용액 (a) 피크의 면적이 588.610 mAU·s이고, 이 함량이 검액의 0.2%이므로 이를 통해 잔류율을 계산하면 각각 0.958%, 0.035%로 계산됩니다. 일반적으로 주입 후 세척 1회도 충분한 세척을 제공하지만, 본 분석에서는 다소 큰 잔류율이 측정됐으며 이는 주입 밸브 로터씰(Rotor Seal), 주입 니들, 에어 니들의 수명과 연관이 있다고 추측됩니다. 실제로 해당 소모품들은 교체 후 약 6,500회의 주입이 이뤄져 권장 교체 주기인 3,000회를 넘은 주입이 이뤄졌지만, 여전히 충분한 세척 과정 확장을 통해 뛰어난 잔류율 감소를 보였습니다.

추가 논의

– 피크 퍼포먼스와 분리도

본 분석법에서 얻은 Isoleucine/Leucine의 분리도는 2.049입니다. 이는 보편적으로 액체 크로마토그래피에서 피크가 완전히 분리됐다고 평가하는 분리도 값인 1.5보다 높은 분리도입니다. 하지만, 각 피크의 50% 높이 폭(W05; Full Width at Half Maximum)은 0.69, 0.88 min으로, 다소 피크가 broad하게 용리됐다고 느낄 수 있습니다. 이를 고려해, 분리도가 조금 감소하지만 피크 폭을 줄이고 보다 나은 S/N Ratio를 얻기 위해 다음과 같은 분석법을 시도해 볼 수 있습니다.

표 17. 피크 폭 개선을 위한 메소드

시간 [min]	A-4/Na [%]	A-5/Na [%]	B-1/Na [%]	Reg. Sol. [%]
Initial	0.0	100.0	0.0	0.0
6.00	0.0	100.0	0.0	0.0
6.10	0.0	75.0	25.0	0.0
26.00	0.0	75.0	25.0	0.0
26.10	0.0	22.0	78.0	0.0
31.00	0.0	22.0	78.0	0.0
31.10	0.0	0.0	100.0	0.0
40.00	0.0	0.0	100.0	0.0
40.10	0.0	0.0	0.0	100.0
43.00	0.0	0.0	0.0	100.0
43.10	0.0	100.0	0.0	0.0
56.00	0.0	100.0	0.0	0.0

이 외 컬럼 오븐 등의 조건은 동일합니다.

다음은 실제로 얻은 크로마토그램의 비교입니다. 가시성을 위해 기존 분석법으로 얻은 크로마토그램은 +100 mAU 오프셋이 적용됐습니다.

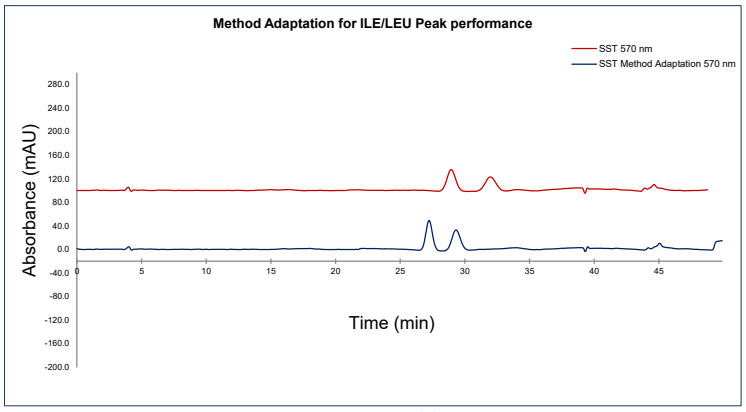


Figure 9 – 분리 조건 조절에 따른 참조용액 (d) 크로마토그램 오버레이

다음 표는 각 피크의 세부 정보입니다.

표 18. 분리 조건 조절에 따른 피크 비교

조건	Ret. Time [min]	Name	Peak Area [mAU·s]	Peak Height [mAU]	Resolution
기존	29.003	Isoleucine	1933.611	38.970	[-]
	32.037	Leucine	1705.890	27.137	2.049
변경	27.283	Isoleucine	1918.578	52.402	[-]
	29.370	Leucine	1765.023	36.580	1.865

항목	변경 전	변경 후	변화
분리도	2.049	1.865	8.98% 감소
Isoleucine W05	0.69 min	0.51 min	26.1% 감소
Leucine W05	0.88 min	0.71 min	19.3% 감소
W05 합계	1.57 min	1.22 min	22.3% 감소

변경 후 Isoleucine과 Leucine의 분리도는 2.049에서 1.865로 8.98% 감소했지만, 여전히 유럽 약전의 시스템 적합성 기준인 1.5 이상을 충족했습니다. Isoleucine과 Leucine의 $W_{0.5}$는 각각 0.69 min에서 0.51 min으로 26.1%, 0.88 min에서 0.71 min으로 19.3% 감소했습니다. 피크 면적 변화는 각각 -0.78%와 +3.47%로 크지 않았으며, 피크 높이는 각각 34.5%와 34.8% 증가했습니다. 따라서 변경 조건은 시스템 적합성을 유지하면서 피크 폭을 줄이고 피크 높이를 증가시켜 더 나은 신호 대 잡음비를 기대할 수 있는 조건으로 판단됩니다.

추가 논의

– Lysine과 암모늄의 분리도

Lysine과 암모늄의 분리는 컬럼의 길이에도 크게 영향받습니다. 특히 검액 내 높은 Lysine 농도에 의해 암모늄 피크가 묻히는 경우가 발생할 수 있습니다. 이러한 현상은 컬럼 길이가 60 mm 이하인 경우 보고되는 문제 중 하나입니다. 본 어플리케이션 노트에서 사용된 LCA K13/Na 컬럼은 175 mm의 길이를 통해 높은 분리도를 제공합니다. 이에 기반해 검액 내 Lysine/Ammonium 분리도는 3.020을 얻었으며, Ammonium은 Lysine 피크 말단에 올라탄 형태지만 여전히 잘 분리 및 적분됐습니다.

요약 및 결론

본 어플리케이션 노트에서는 Sykam GmbH의 자동 아미노산 분석기 S 633을 이용해 유럽 약전의 Lysine 제제 내 닌히드린 양성 물질 시험을 시연했습니다. 시스템 적합성 평가 조건을 위해 기존에 사용하던 81분의 분석 메소드의 긴 분석 시간을 고려해 56분으로 단축된 메소드를 사용했으며, 이를 통해 매우 우수한 Isoleucine/Leucine 분리도를 확보할 수 있었습니다. 동시에 실제 불순물 피크가 검출되는 구간에서 0.5 mAU 이하의 낮은 베이스라인 노이즈를 얻었으며, 이에 기반해 피크 높이가 1 mAU 근처일 때도 베이스라인과 구분 및 검출할 수 있음을 유추했습니다.

제공된 두 시료 모두 Reporting Threshold 이상의 피크는 검출되지 않았습니다. 더 나아가 검액 주입 후 공시험액 주입을 통해 분석 시스템의 캐리오버를 간접적으로 평가하였으며, 권장 수명을 지났어도 주입 라인 세척 확장을 통해 시료 잔류량을 억제할 수 있었습니다.

분리에 사용된 LCA K13/Na 컬럼은 우수한 분리도를 통해 안정적이며 뛰어난 분리 성능을 제공했으며, 분리 조건 변경을 통해 피크 퍼포먼스를 조절할 수 있음을 보였고, 높은 분리도를 유지한 상태로 보다 좁은 피크 폭을 얻을 수 있었습니다.

본 시연을 요청한 고객사는 컬럼 길이가 다소 짧은 타사 컬럼과 시스템을 사용하고 있었습니다. 해당 시스템으로는 컬럼을 교체하여도 Lysine과 같이 암모늄 피크와 유사한 시간대에 용리되는 제제 분석 시 주성분 피크에 의해 암모늄 피크가 검출되지 않는 문제를 겪고 있었습니다. Sykam 아미노산 분석 시스템은 이러한 문제 없이 검액 내 주성분과 암모늄 피크를 3 이상의 분리도로 완전히 분리하였습니다.

참조

1 European Pharmacopoeia 11.0, Lysine hydrochloride (0930), EDQM, Council of Europe.
2 Sykam GmbH, Operational Qualification for Amino Acid Analyzer S 633, SOP-4154 1.0, 2024.
3 ASTM E685-93(2021), Standard Practice for Testing Fixed-Wavelength Photometric Detectors Used in Liquid Chromatography, ASTM International.

© 2026 (주)아주과학 모든 권리 보유. 허가되지 않은 수정 및 배포는 금지됩니다.
본 정보는 Sykam GmbH 및 (주)아주과학의 제품 성능을 보여주는 예시입니다.
사양, 조건 및 가격은 변경될 수 있습니다.