기기분석 실험

의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 적용을 위한 해설서

시험 방법　　특이성

직선성　　정확성

정밀성　　검출한계

정량한계　　완건성

시스템적합성 시험

시스템적합성 시험(System suitability testing)

- 시스템적합성 시험은 많은 분석법을 포괄하고 있다.
- 이는 시험장비, 전자공학적 기술, 분석조작 및 검체가 하나의 포괄적인 통합된 시스템을 구성하여 평가될 수 있다는 개념에 기초한다.
- 시험방법에 대해 확립해야 할 시스템적합성의 파라미터는 밸리데이션 하고자 하는 시험방법에 따라 다르다.
- 추가적인 사항은 약전을 참조한다
- 대부분의 시험방법에 있어서 없어서는 안 될 시험방법의 일부분으로서 분석기기, 분석조작, 분석대상 검체 등으로 구성된 전체 시스템이 적절하게 가동 되도록 하기 위한 것이다.
- 적절한 허용기준을 정하여 시험방법에 포함시킨다.
- 대부분의 크로마토그래프법에는 시스템적합성 시험의 허용기준 및 시험방법이 포함되어야 한다.
- 크로마토그래피 기법과 관련된 것이 아니라, 시험방법의 유형에 관계없이 환경 조건과 무관하게 시스템이 제대로 기능한다는 점을 확인하기 위한 것이므로 시험방법의 한 구성요소로 생각해야 한다.
- 다음은 크로마토그래프법에서 사용되는 시스템적합성 시험항목들에 대한 설명이다

크로마토그래프법에서 사용되는 시스템적합성 시험항목들

정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)

분리계수 (α : Relative retention)

분리도 (Rs : Resolution)

대칭계수 (S : Symmetry factor)

이론단수 (N : Theoretical plate number)

시스템적합성 시험항목들

정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)

분리계수 (a : Relative retention)

분리도 (Rs : Resolution)

대칭계수 (S : Symmetry factor)

이론단수 (N : Theoretical plate number)

정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)

- 상대표준편차(RSD : Relative standard deviation)로 표시되는 주입 반복성은 검체를 분석할 때 배관, 칼럼 및 환경상태를 포함하는 크로마토그램의 성능을 나타낸다.

- 이 때 검체 전처리와 제조공정 중의 편차는 고려하지 않았음을 주의해야 한다.

- 6회 이상 반복 주입에 대해 1% 이하의 RSD를 권장한다.

- %상대표준편차(RSD%)는 시료나 표준액을 연속 주입, 측정하여 구하며, 다음 식으로 계산한다.

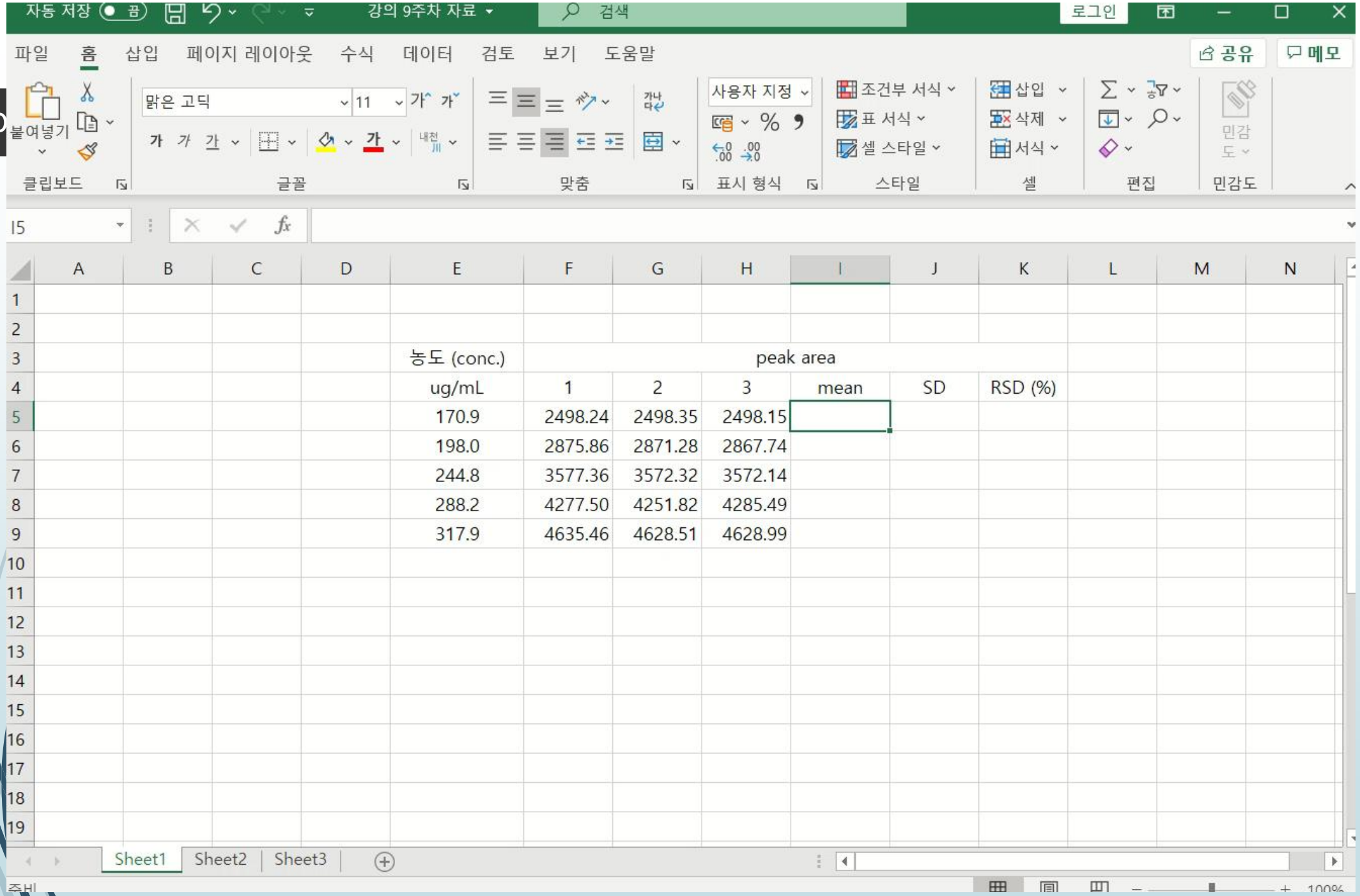
$$RSD(\%) = \frac{100}{\overline{X}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

x_i : 측정값

$\overline{X}$: 측정값의 평균값

n : 측정회수

밸리데이



	농도 (conc.)	peak area					
	ug/mL	1	2	3	mean	SD	RSD (%)
	170.9	2498.24	2498.35	2498.15			
	198.0	2875.86	2871.28	2867.74			
	244.8	3577.36	3572.32	3572.14			
	288.2	4277.50	4251.82	4285.49			
	317.9	4635.46	4628.51	4628.99			

시스템적합성 시험항목들

정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)

분리계수 (a : Relative retention)

분리도 (Rs : Resolution)

대칭계수 (S : Symmetry factor)

이론단수 (N : Theoretical plate number)

분리계수 (a : Relative retention)

- 분리계수는 두 피크의 상대적인 위치에 대한 척도이다.
- 그러나 시험방법에 분리도(Rs) 에 대하여 서술되어 있는 경우에는 필수적인 파라미터는 아니다.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

t_{R1} , t_{R2} : 분리도 측정에 쓰는 2개의 물질의 유지시간. 다만 $t_{R1} < t_{R2}$

t_0 : 이동상의 칼럼 통과시간 ($k = 0$인 물질을 주입한 때부터 그 물질의 피크정점까지의 시간)

분리도 (Rs : Resolution)

- 분리도는 두 피크가 얼마나 잘 분리되었는지를 나타내는 척도이다.
- 신뢰성 있는 정량을 위해서 잘 분리된 피크는 필수적이다.
- 분석대상물질 및 분석대상물질에서 가장 피크유지 시간이 가까운 피크에 대한 분리도 기준을 설정한다.
- 분석대상물질 피크와 가장 가까운 잠재적 간섭피크(불순물, 첨가제, 분해산물, 내부표준물질 등) 사이의 분리도는 1.5 이상으로 설정하는 것이 바람직하다.

$$R_S = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}}$$

t_{R1}, t_{R2} : 분리도 측정에 쓰는 두 개의 물질의 유지시간. 다만 $t_{R1} < t_{R2}$

$W_{0.5h1}$, $W_{0.5h2}$: 각각의 피크높이의 1/2 위치에서의 피크폭. 다만 t_{R1} , t_{R2}, $W_{0.5h1}$ 및 $W_{0.5h2}$ 는 같은 단위를 쓴다.

시스템적합성 시험항목들

정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)

분리계수 (a : Relative retention)

분리도 (Rs : Resolution)

대칭계수 (S : Symmetry factor)

이론단수 (N : Theoretical plate number)

대칭계수 (S : Symmetry factor)

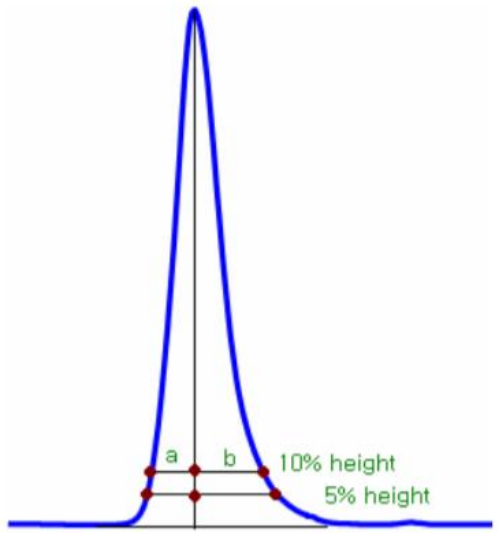
- 피크가 끝난 곳 또는 끝날 때를 결정하고 피크 면적을 계산하기 때문에 정량의 정확성은 피크 끌림이 증가함에 따라 감소한다.
- 보통 대칭계수는 2 이하로 설정하는 것을 권장한다.

$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f}$$

$W_{0.05h}$: 피크의 기선에서부터 피크높이의 1/20의 높이에서의 피크폭

f : $W_{0.05h}$의 피크폭을 피크의 정점에서 기록지의 가로축에 내린 수직선으로 2등분할 때의 피크의 올라가는 쪽의 거리. 다만 $W_{0.05h}$ 및 f는 같은 단위를 쓴다.

$$\text{Tailing factor} = \frac{a + b}{2a} \qquad As = \frac{b}{a}$$



시스템적합성 시험항목들
정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)
분리계수 (a : Relative retention)
분리도 (Rs : Resolution)
대칭계수 (S : Symmetry factor)
이론단수 (N : Theoretical plate number)

이론단수 (N : Theoretical plate number)

- 이론단수는 칼럼의 효율성, 즉 얼마나 많은 피크가 크로마토그램의 단위 분석시간당 위치할 수 있는가에 대한 척도로서 이론단수는 고정된 조작조건에서 크로마토그램의 각 피크에 대하여 일정한 상수 값이다.
- 이것은 칼럼에서 물질의 밴드가 넓어지는 정도를 나타낸다.

$$N = 5.54 \times \frac{{t_R}^2}{{W_{0.5h}}^2}$$

t_R : 물질의 유지시간

$W_{0.5h}$: 피크높이의 1/2 위치에서의 피크폭. 다만 t_R 및 $W_{0.5h}$는 같은 단위를 쓴다.

시스템적합성 시험항목들
정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)
분리계수 (a : Relative retention)
분리도 (Rs : Resolution)
대칭계수 (S : Symmetry factor)
이론단수 (N : Theoretical plate number)

이론단수 (N : Theoretical plate number)

이론단수는 아래의 식을 이용해 계산할 수도 있다.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = \frac{L}{H}$$

t_R : 물질의 유지시간
W : 피크폭
L : 칼럼의 길이
H : 이론단수에 상당하는 높이는 칼럼의 단위 길이 당 효율성. HETP(Height equivalent of a theoretical plate)

- 이론단수나 HETP에 영향을 줄 수 있는 파라미터는 피크 위치, 칼럼입자의 크기, 이동 상의 유량, 칼럼 온도, 이동상의 점성, 분석대상물질의 분자량 등이다.
- 이론단수는 피크 검출시간에 의존하고 일반적으로 2000 이상이다.

밸리데이션

HPLC를 이용한 차와 커피에 함유된 카페인의 함량 조사와 카페인이 흰 쥐의 행동에 미치는 영향 연구

커피는 가장 많이 거래되는 작물 음료 중 하나이고, 차는 물 다음으로 많이 소비되는 음료이다.[1,2] 카페인은 커피와 차에 함유된 주 성분 중 하나로,[3] 세계적으로 가장 널리 소비되는 흥분제이며 커피와 차 뿐만 아니라 소다음료, 초콜릿, 의약품 등에 광범위하게 함유되어 있다.[4]

사람들이 카페인을 섭취하는 이유는 다양하며, 흔히 카페인은 사람들의 에너지 상태에 영향을 끼친다고 생각된다.[5] 카페인은 고전적 흥분제인 코카인, 암페타민처럼 운동활성, 각성, 강화효과와 같은 행동적 효과를 나타내고,[6] 피로를 감

시험방법

카페인 함량 분석

재료 및 시약

카페인 함량 분석에 사용된 재료는 티백홍차 3품목, 티백녹차 1품목, 티백국화차 1품목, 캔홍차 1품목, 캔녹차 1품목, 캔우롱차 1품목, 가루홍차 1품목, 커피믹스 6품목, 인스턴트커피 1품목으로 총 9종 16품목이었다. 시약으로는 카페인 표준품은 순도 99%의 Sigma-Aldrich 사(USA) 제품을 사용하였고, 내부표준물질로 사용한 아세트아미노펜 표준품은 순도 ≥99%의 Sigma-Aldrich 사(USA) 제품을 사용하였다. Methanol은 Merck사(Germany)의 HPLC 등급을 사용하였고, phosphoric acid는 85%의 Samchun Pure Chemical 사(Korea) 제품을 사용하였으며, water는 증류수를 사용하였다.

밸리데이션

카페인 표준용액의 조제 및 검량선 시료 조제

카페인 표준품을 증류수에 용해시켜 5 mg/ml 용액을 만들고, 동일 용매로 계열 희석하여 50, 250, 500, 1000, 2500, 5000 μg/ml 농도의 표준용액을 제조하였다. 탈카페인 커피 160 μl에 250, 500, 1000, 2500, 5000 μ/ml의 카페인 표준용액을 40 μ씩을 각각 정확히 가하여 50, 100, 200, 500, 1000 μg/ml의 표준커피시료를 만들었다. 마찬가지로 카페인이 함유되지 않은 국화차 160 μl에 50, 250, 500, 1000, 2500 μg/ml의 카페인 표준용액을 40 μl씩을 각각 정확히 가하여 10, 50, 100, 200, 500 μg/ml의 표준차시료를 만들었다. 커피의 카페인 검량선 작성을 위해 제조한 표준커피시료 200 μl에 증류수를 가하여 50배 희석하였다. 이 용액 1 ml에 아세트아미노펜(50 μg/ml, 내부표준물질) 1 ml를 정확히 가한 후 교반하였다. 마찬가지로 차의 카페인 검량선 작성을 위해 제조한 표준차시료 200 μl에 증류수를 가하여 20배 희석하였다. 이 용액 1 ml에 아세트아미노펜 1 ml를 정확히 가해 교반하였다. 최종적으로 0.45 um 필터(Uniflo RC, 13 mm syringe filters, Whatman, UK)로 여과한 후 50 μl를 취하여 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 카페인의 피크 면적비를 이용하여 검량선을 작성하였다.

시료의 전처리 과정

카페인 시료샘플의 양은 실제 음용하는 상태로의 카페인 함량을 분석하기 위하여 티백차는 1티백, 가루홍차는 18.0 g, 1회용 봉지로 포장된 커피믹스는 1봉지, 인스턴트커피는 2.0 g으로 하였으며, 캔 음료는 그대로 사용하였다. 각 시료에 대하여 티백 차는 80°C의 물 100 ml에 5분간 침출하고, 가루홍차는 80°C의 물 100 ml에 용해하였다. 커피믹스와 인스턴트커피는 80°C의 물 100 ml에 용해하였다. 각 시료를 200 μl 취하여 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리한 후 HPLC에 주입하였다.

밸리데이션

카페인의 HPLC 분석조건

전처리된 시료는 다음의 HPLC 조건에서 정량하였다. 장치로는 Shimadzu 10 AVP사(Japan)의 HPLC를, 검출기로는 UV detector(275 nm)를, column은 C18u Bondapak(4.6 mm i.d×150 mm; 10 um)을 사용하여 처리한 샘플을 분석하였다. Column의 온도는 항상 30°C로 유지하였고, 데이터 처리장치로는 Schimadzu사의 CLASS-VP를 사용하였다. 이동상으로는 0.1% phosphoric acid : methanol(65:35 v/v) 혼합용액을 사용하였고, 유속 1 ml/min에서 정량하였다.

밸리데이션 항목

밸리데이션 항목으로 직선성, 일내(intra-day) 정확성 및 정밀성, 일간(inter-day) 정확성 및 정밀성, 회수율의 4가지 항목으로 나누어 평가하였다. 최저정량한계는 분석물질의 반응이 공시료의 반응과 비교할 때 최소 5배 이상이 되도록 설정하였다. 표준커피시료의 경우 50, 100, 200, 500, 1000 μg/ml의 5농도, 표준차시료의 경우 10, 50, 100, 200, 500 μg/ml의 5농도에 대하여 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내 정확도와 정밀도(CV %)를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간 정확도와 정밀도(CV %)를 구하였다. 또한 표준커피시료의 경우 50, 200, 1000 μg/ml의 3농도, 표준차시료의 경우 10, 100, 500 μg/ml의 3농도를 이용하여 회수율을 측정하였다.[14-16)]

밸리데이션

결 과

Table 1. Intraday and interday precision, accuracy, and recovery for caffeine in coffee and tea (mean±SD, n=3)

	Added caffeine (μg/ml)	Intraday (n=3)			Interday (n=3)			Recovery (%)
		Measured (μg/ml)	CV (%)	Accuracy (%)	Measured (μg/ml)	CV (%)	Accuracy (%)	
Coffee	50	54.7±0.6	14.7	109.4±1.1	47.6±0.5	11.4	95.3±0.9	93.4±11.7
	100	111.7±3.3	5.3	111.7±3.3	113.2±9.2	12.2	112.4±9.2	Nt*
	200	187.3±18.4	13.5	93.7±9.2	185.8±3.9	2.8	92.9±1.9	98.2±11.3
	500	490.3±16.9	3.8	98.1±3.3	500.4±10.4	2.3	100.1±2.1	Nt*
	1000	1005.9±16.1	1.7	100.6±1.6	933.9±17.9	1.9	99.4±1.8	101.9±5.1
Tea	10	11.2±0.6	8.6	113.3±5.9	10.7±0.8	9.5	107.3±7.7	115.2±6.3
	50	50.1±3.4	9.2	100.6±6.7	46.8±4.2	13.1	105.9±10.4	Nt*
	100	90.6±5.2	6.9	90.8±5.3	100.6±14.0	14.9	100.6±13.1	97.6±6.8
	200	180.1±12.7	7.7	90.5±12.7	181.1±19.9	11.5	90.5±9.9	Nt*
	500	509.1±7.6	1.5	101.7±1.5	507.1±0.6	0.2	101.5±0.2	101.9±1.9

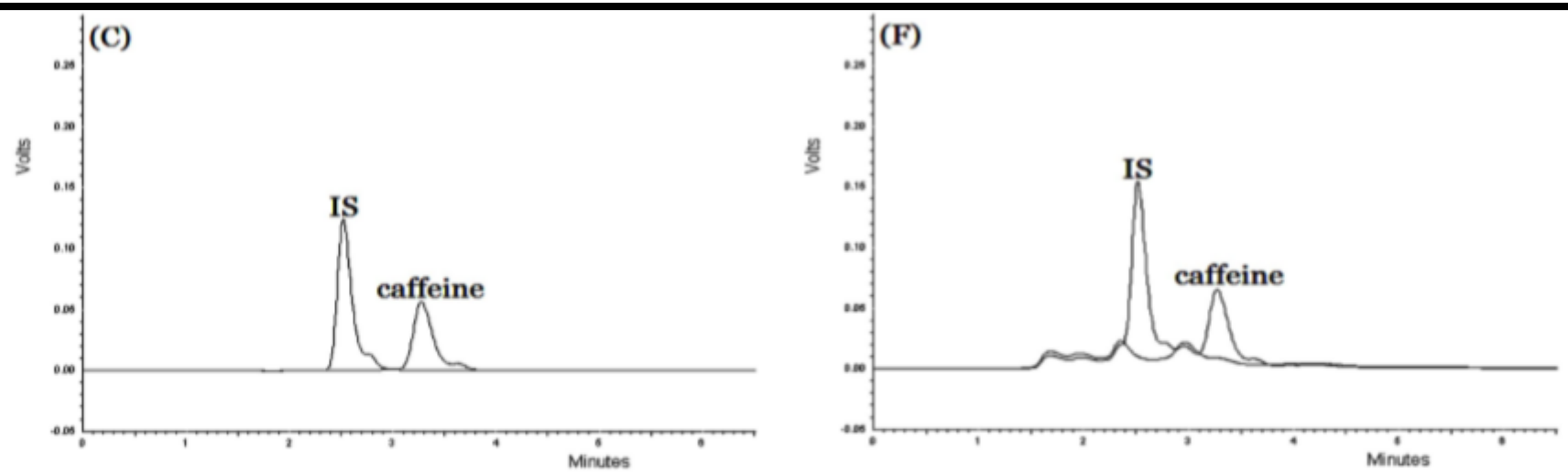


Fig. 1. Chromatograms of tea and coffee at different conditions.
(A) Double blank of standard tea, (B) Zero blank of standard tea, (C) Double blank of standard tea and Earl grey black tea, (D) Double blank of standard coffee, (E) Zero blank of standard coffee, (F) Double blank of standard coffee and Maxim coffee

고 찰

HPLC를 이용하여 분석한 결과, 표준커피시료와 표준차시료에서 r^2은 각각 0.99 이상으로 직선성을 확인할 수 있었다. 차와 커피 모두 일내, 일간 정확도 및 정밀도가 ±15% 안에 포함되었고, 회수율도 120% 안에 포함되었다. 이로부터 차와 커피에 함유된 카페인에 대한 본 분석법은 충분한 직선성과 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있다.

참고문헌

1. Huck CW, Guggenbichler W, Bonn GK. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS) compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 2005; 538: 195-203.

시약 및 실험 기기 정보

제품정보

No.	점검 항목 (Check Feature)	내용 (Description)	비고 (Remark)
1	제 품 명		
2	주성분명		
3	제조번호		
4	제조일자		

No.	점검 항목 (Check Feature)	내용 (Description)	비고 (Remark)
1	제 품 명		
2	주성분명		
3	제조번호		
4	제조일자		

표준품

No	표준품명 (Name)	관리번호	구분	보관조건	유효기간
1					

시험 장비

기기관리 번호	기 기 명	제조사	모델명	제조국	비고

3.2.P.5.3.1.2 시험법 밸리데이션 기준 및 결과

No	항목명	기준	결과
1	특이성 (Specificity)		
2	직선성 (Linearity)	$R^2 \geq 0.998$	
3	정밀성 (Repeatability)	RSD(%) ≤ 2.0	
4	실험실내 정밀성 (intermediate precision)	RSD(%) ≤ 2.0	
5	정확성 (Accuracy)	평균회수율: 98.0 ~ 102.0 (%)	
6	시스템적합성 (System Suitability Test)	Peak area RSD(%) ≤ 2.0 Theoretical Plates(N) ≥ 2000	
7	완건성 (Robustness)	RSD(%) ≤ 2.0	
8	용액안정성 (Solution Stability)	초기 검액과 시간 경과 검액의 피크면적의 차이는 2.0% 이내이다.	

시험방법

<표준액 조제>

표준품 24.5 mg 을 정밀하게 취하여 희석액[주1]으로 녹여 100 mL 한다.

<검액 조제>

이 약 20 정을 취하여 희석액 400 mL 에 넣고 30 분간 초음파진탕을 하고 실온에 방치 후 희석액을 넣어 500 mL 로 한다. 이 액 5 mL 를 정확하게 취하여 희석액을 넣어 200 mL 로 한 후 이 액을 여과하여 검액으로 한다.

<시스템적합성>

- 피크의 이론단수는 2500 이상이다.
- 피크의 테일링계수는 2.0 이하이다.
- 표준액 6 회 반복주입시 피크면적의 상대표준편차는 2.0%이하이다.

밸리데이션

밸리데이션 시험방법 및 결과

특이성

주성분의 피크는 검액 및 공시험액의 영향을 받지 않으며 표준액에서 얻은 주성분 피크와 검액에서 얻은 주성분 피크의 유지시간을 비교하였을 때 동일함을 확인한다.

결과

공시험액, 표준액, 위약검액, 검액을 가지고 HPLC 조작조건으로 시험하여 본 시험법의 특이성을 확인하였다. 그 결과, 표준액 및 검액에서
의 머무름시간은 분, 분으로 동일하였고 공시험액 및
피크에 간섭을 받지 않았다.

직선성

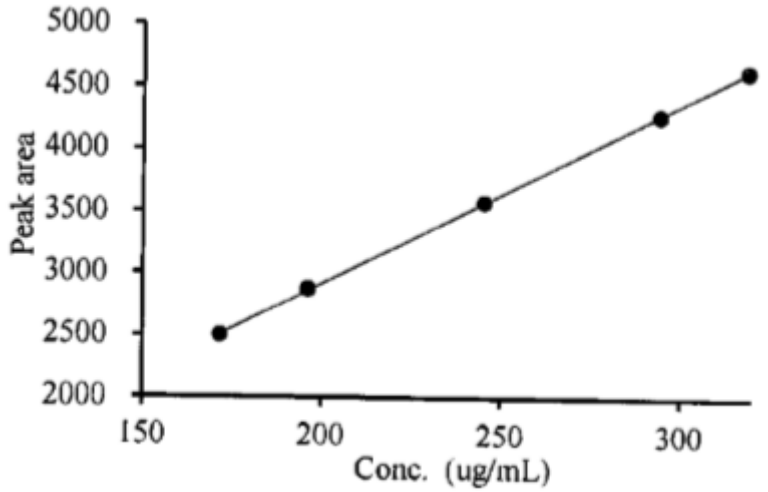
1 기준

표준액으로 3 회 검량선을 구했을 때 회귀계수(R^2)값은 0.998 이상이다.

시험액 조제

시험결과

0.171 mg/mL ~ 0.318 mg/mL 범위에서(70% ~ 130%) 3 회 시험하여 회귀계수를 구하였다. 그 결과, 0.998 이상의 회귀계수를 나타내어 시험방법의 직선성을 검증하였다.



밸리

정확성

기준

범위(Range) 이내의 3 농도로 3 회 시험을 진행하여 평균 회수율은 98.0% ~ 102.0% 이다.

시험액 조제

시험결과

저, 중, 고(70%, 100%, 130%)에서 각 3 회씩 정확성을 수행하였다. 3 농도의 평균 회수율은 99.9%이며, 95% 신뢰구간에서 99.7 ~ 100.1%의 정확성을 나타내었다.

병행정밀성

1 기준

동일 농도의 시험액을 6 회 조제 후 주입하였을 때 함량의 상대표준편차(%)는 2.0% 이하이다.

시험액 조제

시험결과

검액의 평균 함량은 99.9%이며, 6 회 측정한 함량의 RSD(%) 0.16%의 정밀성을 나타내었다.

실험실내 정밀성

기준

분석장비, 시험자, 시험일자 변경 후 반복성 시험을 통한 함량 결과값의 RSD(%)는 2.0% 이하이다.

Test Name / Internal Change	Repeatability (Operating Condition)	Intermediate Precision Second
Equipment (Code No.)		
Analyst		–
Test Date		–

시험액 조제

시험결과

분석장비, 시험일자, 시험자를 변경하여 시험한 결과, 일내 평균 함량은 100.5%이고 6 회 측정한 함량의 RSD(%)는 0.04%이었다. 또한 일간 평균 함량은 100.2%이고 12 회 측정한 평균함량의 RSD(%)는 0.41%의 실험실내정밀성을 나타내었다.

완건성

1 기준

분석조건 변경 후 반복성 시험을 통한 함량 결과값의 RSD(%)는 2.0% 이하이다.

시험결과

HPLC 분석 조건 중 유량, 칼럼온도, 이동상 조성을 변경하여 완건성을 검증하였다. 각 조건 변경 전/후의 함량에 대하여 RSD(%)로 완건성을 평가하였고, 그 결과 유량, 칼럼온도, 이동상 조성 변경 시 RSD(%)는 각각 0.10%, 0.16%, 0.13%이였다.

시스템적합성

기준

1) 피크의 이론단수는 2500 이상이다

2) 테일링 계수는 2.0 이하이다.

3) 표준액을 6 회 반복주입시 피크면적의 상대표준편차는 2.0 %이하이다.

시험결과

함량시험의 HPLC 시스템의 성능을 확인하기 위하여 적절하게 수행된 밸리데이션 중 "병행정밀성" 결과로 시스템적합성을 설정하였다. 표준액을 6 회 주입하였을 때, 피크면적의 RSD(%) 0.06%, 이론단수는 8,000 이상, 테일링 계수(USP)는 1.3 이었다.

용액안정성

기준

검액의 피크면적은 시간 경과에 따른 유의적인 변화가 없어야 한다.

- 피크면적의 차이는 2.0% 이내이다.
- 시간경과에 따른 피크면적의 경향성(증가 또는 감소)이 없다.

시험결과

70% ~ 130% 범위에서 용액안정성을 평가한 결과, 피크면적값이 25 시간 이내에서 초기값대비 2.0% 이내의 차이를 나타내어 기준을 만족하였고, 피크면적 증가 또는 감소의 경향성은 없었다.

결론

mg 의 함량시험 분석법을 액체크로마토그래피법으로 밸리데이션을 실시하였다. 그 결과, 각 항목별(특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 용액안정성, 완건성) 시험 기준에 적합하였다. 따라서 본 보고서에 기술된 분석법으로 mg 의 함량시험을 수행하는데 근거자료로 활용될 것이다.