약학회지 제 47 권 제 5 호 261~265 (2003)
Yakhak Hoeji Vol. 47, No. 5

藥學會誌

근적외분광분석법을 이용한 인도메타신의 정량분석

김도형 · 우영아 · 김효진#
동덕여자대학교 약학대학

(Received June 18, 2003; Revised September 3, 2003)

Quantitative Analysis of Indomethacin by the Portable Near-Infrared (NIR) System

Do Hyung Kim, Young Ah Woo and Hyo Jin Kim#
College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Wolgok-Dong 23-1, Sungbuk-Gu, Seoul 136-714, Korea

Abstract — Near-infrared (NIR) system was used to determine rapidly and simply indomethacin in buffer solution for a dissolution test of tablets and capsules. Indomethacin standards were prepared ranging from 10 to 50 ppm using the mixture of phosphate buffer (pH 7.2) and water (1 : 4). The near-infrared (NIR) transmittance spectra of indomethacin standard solutions were collected by using a quartz cell in 1 mm and 2 mm pathlength. Partial least square regression (PLSR) was explored to develop calibration models over the spectral range 1100~1700 nm. The model using 1 mm quartz cell was better than that using 2 mm quartz cell. The PLSR models developed gave standard error of prediction (SEP) of 0.858 ppm. In order to validate the developed calibration model, routine analysis was performed using another standard solutions. The NIR routine analysis showed good correlation with actual values. Standard error of prediction (SEP) is 1.414 ppm for 7 indomethacin samples in routine analysis and its error was permeable in the regulation of Korean Pharmacopoeia (VII). These results show the potential use of the real time monitoring for indomethacin during a dissolution test.

Keywords □ near-infrared spectroscopy, indomethacin, partial least square regression

이 실험에서 사용한 인도메타신은 비스테로이드성 소염진통제로서 류마티스성 관절염, 강직성 척추염, 골관절염(퇴행성 관절질환) 급성통풍성 관절염에 사용하며, 물에 난용성인 약물로 약물의 용출속도에 의해 생체이용률이 제한되는 제제이다. 약물의 용출특성은 약물의 흡수, 생물학적 이용에 크게 영향을 미치므로 약제의 유효성에도 중요한 인자이다. 따라서 의약품의 유효성, 안전성을 확보하기 위해서 생체이용률이 현저히 낮을 가능성이 있는 제제를 미리 배제하기 위해 용출시험을 실시한다. 인도메타신에 대한 용출시험법에는 자외선분광법을 사용하고 있으나 전처리 시간이 길고 시료의 손실이 큰 단점이 있다.[1] 근적외분광분석법을 도입함으로써 이러한 단점을 보완함과 동시에 실시간 분석이 가능하게 되어 보다 신속하고 효율적인 분석을 할 수 있다. 근적외분광분석법(Near Infrared Spectroscopy, NIRS)은 전처리가 최소화되기 때문에 정량의 재현성 및 정확도의 증가, 공정 중 직접분석, 검체 및 분석시간의 절감 등 많은 이점을 제공한다. 또한 대량의 시약, 용매 등을 사용하는 기존의 분석법에 비해 시약 및 용매 등을 거의 필요로 하지 않으며 시료의 조제가 간편하고, 신속한 측정 및 다성분의 동시분석과 반복측정이 가능한 비파괴적 분석방법이다. 근적외분광분석법에서는 다변량적 교정 기술인 부분최소자승회귀분석법(partial least squares regression, PLSR) 등을 이용하여 다양한 약품내의 활성성분을 분석한다. 정량분석시 검체의 물리적 특성에서 유래한 오차는 스펙트럼의 전처리를 통해서 최소화시킬 수 있다. 근적외분광분석법은 단시간에 연속 측정을 통한 on-line 분석이 가능하므로 다양한 산업분야에서 유용하게 사용되고 있다.[2,3] 제약분야에 있어서는 정제, 과립 등의 확인 및 정량에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며,[4-10] 더 나아가 다른 기기에의 적용 가능성이 연구된바 있다.[11] 그 외에 경구용 액제의 정량,[12] 분말 혼합도의 평가,[13-15] 주성분 이외의 첨가물질 평가[16-18] 등의 연구도 수행되고 있다. 이러한 연구들에 이어 근적외분광분석법을 제약분야에 응용하기 위한 기준에 관한 연구와 검증도 이루어지고 있다.[19,20]

그러므로 본 실험에서는 근적외분광분석법을 의약품의 품질관리분야인 용출시험에의 응용을 목적으로 스펙트럼을 수집하고 정량 모델을 만든 후 그 정량모델의 검증을 실시하였으며 일상분석을 통하여 실제적인 적용의 가능성을 살펴보았다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4525 (팩스) 02-943-9578
(E-mail) hyojkim@dongbuk.ac.kr

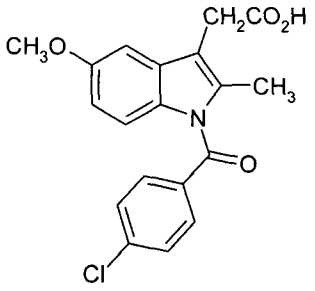

Fig. 1 – Structure of indomethacin.

실험방법

시약

실험물질로는 인도메타신 표준품(ICN Biomedicals Inc.)을 사용하였고, 인산이수소칼륨(potassium phosphate monobasic)과 수산화나트륨(soduim hydroxide) 시약을 사용하여 pH 7.2의 완충용액을 조제하였다. 인도메타신 시약의 화학 구조는 Fig. 1과 같다. 인도메타신 완충용액의 정량모델 개발 및 평가를 위해서 10~50 ppm의 수용액으로 2 ppm 간격으로 조제하였다. 인도메타신의 광분해를 최소화하기 위하여 21개의 시료를 제조와 동시에 두 번씩 측정하였고, 차광 용기를 사용하였다.

기기

인도메타신 완충용액의 투과 스펙트럼의 측정은 근적외선분광광도계(Handheld HN1100, Spectron Tech. Co., Ltd., Korea)를 이용하였다. 근적외선분광광도계는 반사도 및 투과도를 측정할 수 있으며, 시료의 종류에 따라 각각 다른 모듈을 설치하여 사용할 수 있다. 이 실험에서는 FHSA-TTL Filter/Cuvette-Holder (Avantes Co., Ltd., The Netherlands)에 투과거리가 1 mm인 석영셀을 장착하여 인도메타신 시료의 투과 스펙트럼을 측정하였다.

1100~1750 nm의 파장 범위에서 30회 측정하여 평균 스펙트럼을 얻었으며 스펙트럼 당 2 nm 간격으로 326 data points를 수집하도록 설정하였다. 근적외선분광분석의 측정은 ChemoHN1100 software(Spectron Tech. Co., Ltd., Korea)를 이용하여 기록하였다.

Pathlength의 결정

각각 투과거리 1 mm와 2 mm의 석영셀을 사용하여 투과법으로 스펙트럼을 측정하였고, PLSR을 이용하여 분석하였다. 용해도 모델을 구축하기 위한 검체로 인도메타신(M.W.=357.18) 표준품을 물 · 인산(4 : 1) 완충용액에 녹여 15에서 50 ppm까지 5 ppm 간격으로 조제하여 1 mm와 2 mm 석영셀을 사용하여 각각 9개의 스펙트럼을 얻었다.

데이터 처리

모델 개발 및 평가는 PLSR(partial least square regression)을 사용하여 수행되었다. PLS 모델의 적정 factor 수는 SEC 및 SEP 값을 고려하여 factor에 따라 계산한 SEC와 SEP가 모두 최소를 나타내는 최초의 factor를 최적 factor로 결정하였다. 조제 과정에서 알고 있는 인도메타신의 농도값을 기준으로 하여 검량식을 작성하였다. 총 42개의 스펙트럼 중 정량 모델의 개발에는 25개, 개발한 정량 모델의 검증을 위해서는 17개를 무작위로 선택하여 사용하였다. 데이터의 수학적 전처리로는 일차 미분을 사용하였다. 모든 통계적 처리는 ChemoHN1100 software(Spectron Tech., Co., Ltd., Korea)를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

Fig. 2(a)에는 투과거리 1 mm 석영셀을 이용한 스펙트럼의 검

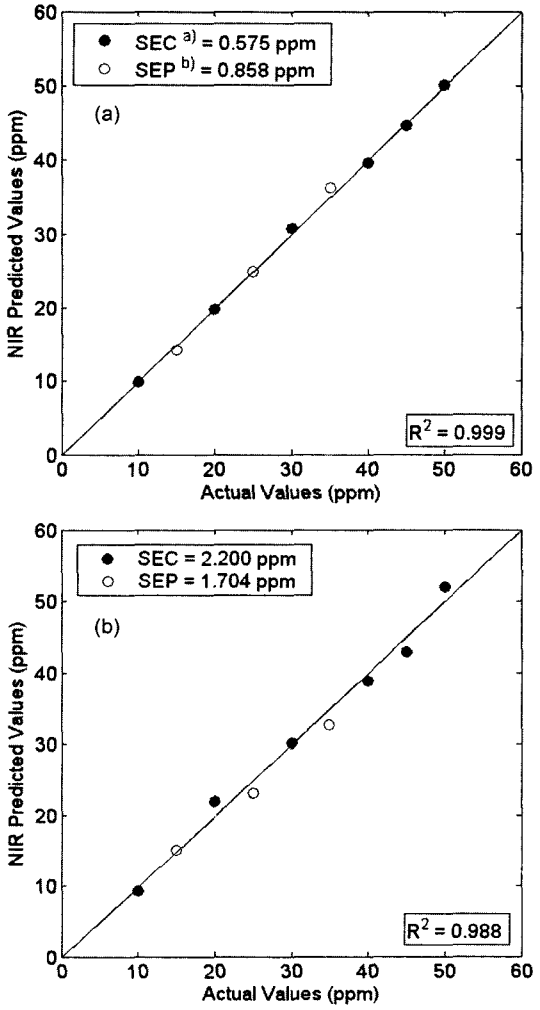

Fig. 2 – Scatter plot (a) with 1 mm quartz cell (b) with 2 mm quartz cell. a) Standard error of calibration b) Standard error of prediction.

량선을 Fig. 2(b)에는 투과거리 2 mm 석영셀을 이용해 측정한 스펙트럼으로 작성한 검량선을 나타내었다. 1 mm 석영셀을 사용한 검량선의 R^2(R: correlation coefficient) 값이 0.999로 매우 좋은 직선성을 나타내었고 SEC(standard error of calibration) 값과 SEP(standard error of prediction) 값 역시 0.575 ppm과 0.858 ppm으로 더 좋은 결과를 나타내었다. 이것은 투과거리가 길어지면서 산란되는 빛이 많아지기 때문이다. 또한 투과거리가 길어지면 측정에 필요한 시료의 양이 많아지는 단점이 있다. 따라서 이후의 실험에서는 1 mm 석영셀만을 사용하여 실험하였다.

인도메타신은 OH기들 중 COOH에 있는 OH기만을 가지고 있으므로 CH 신축에 의한 배음이 두드러지는데 이 배음의 근원은 IR Raman 스펙트럼상에서 2800에서 3100 cm^{-1} 사이에서 나타난다. NIR 영역의 스펙트럼은 infrared 영역에서 나타나는 CH, NH, OH 결합 진동의 배음(overtone)이나 결합음(combination band)으로서 infrared 영역보다 약하고 폭이 넓은 신호를 나타낸다. 그러므로 첫 번째 배음은 1610에서 1785 nm 사이에 두 번째 배음은 1075에서 1190 nm에서 나타난다. 분말상태의 인도메타신 표준품으로부터 얻은 스펙트럼인 Fig. 3에서 첫 번째 배음과 두 번째 배음을 확인할 수 있다. 피크를 좀 더 확실히 확인하기 위해 2차 미분한 스펙트럼을 Fig. 4에 나타내었다. 이 관계는 분자 내부의 힘으로 유발되는 비조화성(anharmonicity) 때문에 정확하지 않지만 첫 번째와 두 번째 배음은 분명히 나타난다. 세 번째 영역은 많은 중첩된 결합음으로 구성되는데 이는 2100 nm 이상에서 나타나므로 여기에서는 확인할 수 없다.

1100~1750 nm 영역에서 10에서 50 ppm 함량의 21개 인도메타신 완충용액을 근적외선분광기로 측정하여 얻은 42개의 NIR 스펙트럼을 Fig. 5(a)에 타나내었다. Fig. 5(a)에서 1450 nm에서 보이는 크고 넓은 피크는 용출에 사용된 물의 OH기에 의한 것으로 인도메타신 구조에 의한 신호들이 중첩되어 있는 상태이다. 수분피크에 가려진 피크들을 확인하기 위해 검량식 작성 시 전처리 과정으로 일차미분을 사용하였다. 일차미분을 사용하므로써 각 스펙트럼의 상수항이 제거되어 절편오차가 보정된다. NIR 스펙트럼의 일차 미분 스펙트럼은 Fig. 5(b)와 같으며 약물의 함량이 매우 적으므로 미세한 피크의 변화를 관찰할 수 있었다. 다

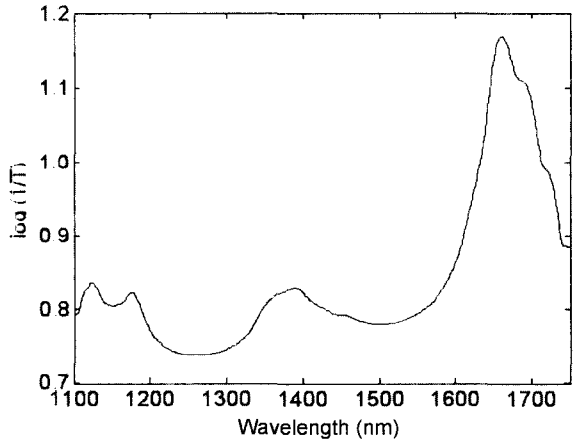

Fig. 3 – Raw spectra of indomethacin powder by Near-infrared spectroscopy.

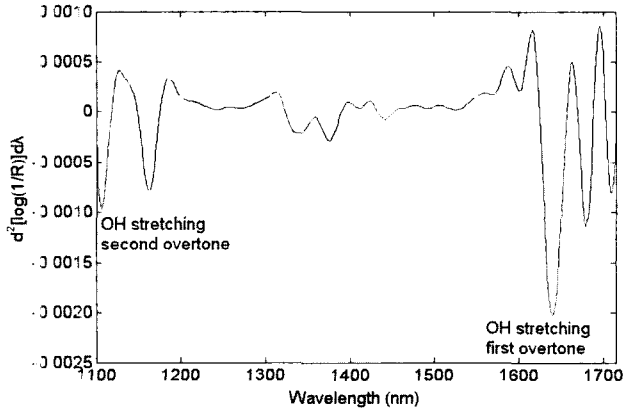

Fig. 4 – Second derivative spectra of indomethacin powder for peak assignment by Near-infrared spectroscopy.

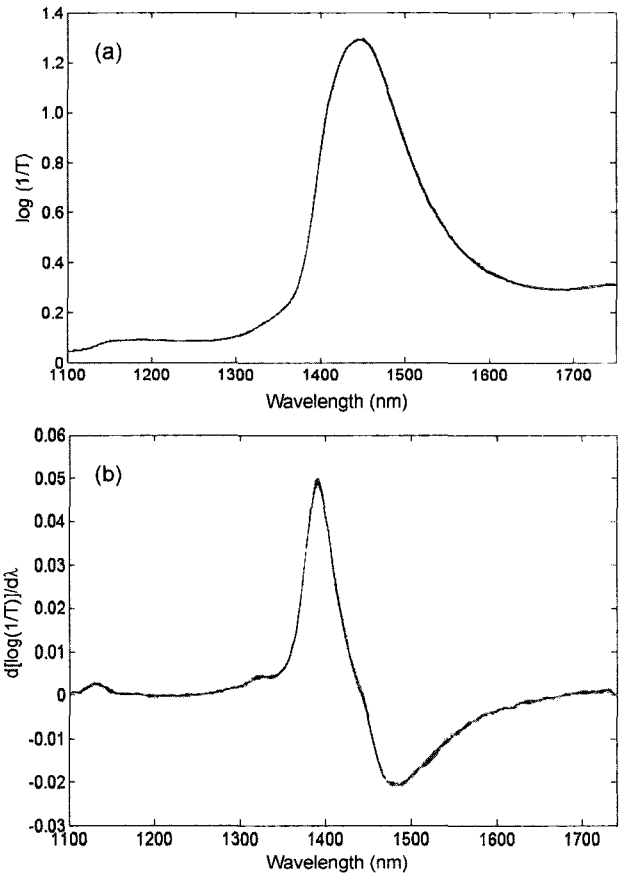

Fig. 5 – Spectra of indomethacin buffer solution with different indomethacin concentration by NIRS at 1100~1700 nm. (a) Raw spectra (b) First derivative spectra.

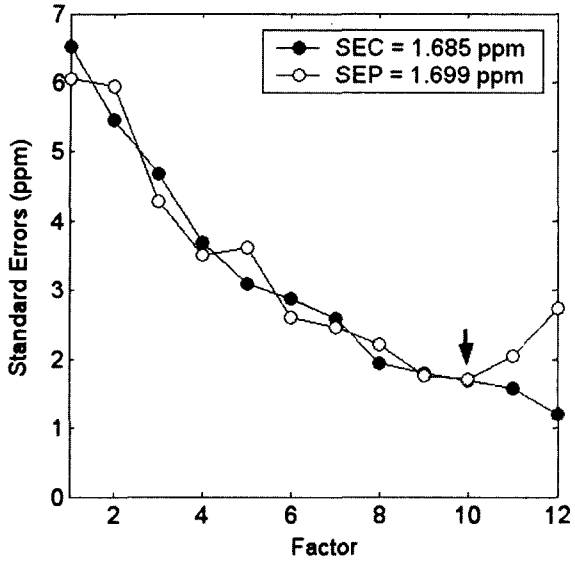

Fig. 6 – Standard errors according to factors using PLSR.

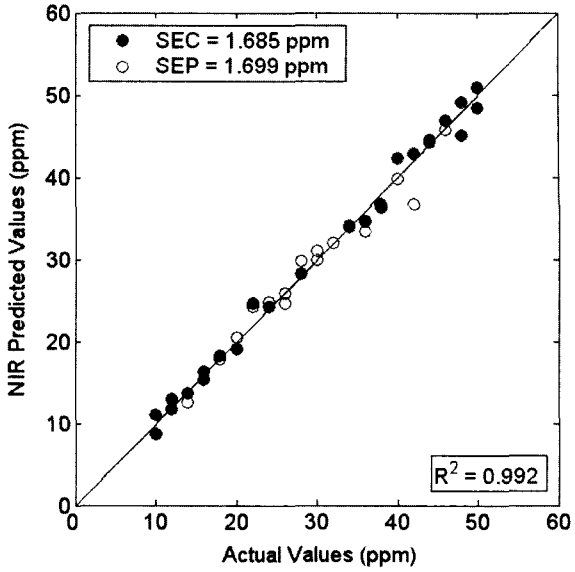

Fig. 7 – Scatter plots showing correlation between NIR predicted values and reference values for indomethacin buffer solution.

변량보정법(multivariate calibration) 중 알고 있는 농도와 기기의 신호를 연관 지우는 모델을 이용하는 방법인 직접보정법과 PLSR(modified partial least squares regression) 방식을 이용하여 검량식을 작성하였다. Factor수에 따른 SEP와 SEC 값의 변화는 Fig. 6에 나타내었으며, SEP가 최소를 나타내도록 10개의 factor를 사용하였다.

$$SEC = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(c_{pred,i}-c_{ref,i})^2}}{n-k}$$

이 때 n은 검체의 개수이고, k는 파장이나 factor의 개수이다. $c_{pred,i}$는 i번째 시료의 NIR 측정치이고 $c_{ref,i}$는 조제를 통해 알고 있는 i번째 시료의 농도값이다.

$$SEP = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(c_{pred,i}-c_{ref,i})^2}}{p}$$

여기서 p는 검증에 사용된 시료의 개수이다.

Fig. 7은 실제 시료의 측정을 위하여 검량곡선을 작성한 것으로 실험실에서 조제한 시료의 함량을 X축으로, 근적외분광분석법으로 측정한 결과를 Y축으로 나타내었다. 시료조제 함량 범위는 10~50 ppm으로 인도메타신 25 mg을 함유하는 캡슐 제제의 용출실험시 900 mℓ의 완충용액을 사용하는 것을 기준으로 하여 factorial design에 따른 78%에서 121%를 포함하도록 광범위하게 선정하였다. 이 때 얻어진 결과는 R^2 값이 0.992로 양호한 직선성을 나타내었고, calibration set의 실제 값과 근적외선 분광분석법으로 분석한 값과의 차이인 residual로부터 계산된 SEC 값이 1.685 ppm을 나타내었다. 이 때의 SEP는 1.699 ppm이다.

Table I – Results obtained in the routine analysis by the model

Actual values (ppm)	NIR predicted values (ppm)	Residual (ppm)
22.00	23.53	-1.53
24.00	22.14	1.86
26.00	23.27	2.73
28.00	27.56	0.44
30.00	29.57	0.43
32.00	32.57	-0.57
34.00	34.19	-0.19

Fig. 7에서 구한 검량식을 이용하여 기지의 시료를 분석하여 정확도를 측정한 결과를 Table I에 비교하였다. 시료는 모두 7종으로 농도범위는 22~34 ppm이다. 일상분석에 대한 SEP 값은 1.414 ppm이었으며, 근적외분광분석법에 의한 결과의 평균과 분산을 비교하기 위해 쌍체비교(paired t-test)를 실시하였다. 그 결과 95% 유의수준에서 반복측정값의 유의적인 차이가 없었으며, 양호한 반복성을 나타내었다.

결 론

인도메타신 용출액의 농도 측정을 위한 모델의 개발 및 평가는 Fig. 7에서 나타나는 것처럼 좋은 상관성을 보였으며, 실험실에서 조제한 시료에 일상분석을 적용한 결과 오차의 척도인 SEP가 1.414 ppm으로 나타났다. 이것은 의약품의 품질관리를 하는 과정에서 on-line 또는 at-line 측정으로 신속하고 효율적인 관리의 가능성을 보여주는 것으로 앞으로 시판되어있는 캡슐 제제에

대한 적용이 가능한지를 평가할 필요성이 있다.

문 헌

1) 대한약전 제7개정, 대한보건공정서협회 157 (1998).
2) Berkert, T., Prinz, H. and Kovar, K. : One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near-infrared spectroscopy on the packaging line. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **51**, 9 (2001).
3) Marten, G. C., Shenk, J. S. and Barton, F. E. : Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality, US Department of Agriculture, Washington, DC, vol. *Agriculture Handbook* **643**, 110 (1989).
4) Blanco, M., Coello, J., Eustaquio, A., Itturriaga, H. and Maspoch, S. : Development and validation of methods for the determination of miokamycin in various pharmaceutical preparations by use of near infrared reflectance spectroscopy. *Analyst.* **124**, 1089 (1999).
5) Blanco, M., Eustaquio, A., Gonzalez, J. M. and Serrano, D. : Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near-infrared spectroscopy: validation of the procedure. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**, 139 (2000).
6) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S. and Serrano, D. : Near-infrared analytical control of pharmaceuticals. A single calibration model from mixed phase to coated tablets. *Analyst.* **123**, 2307 (1998).
7) Blanco, M., Coello, J., Eustaquio, A., Iturriaga, H. and Maspoch, S. : Development and validation of a method for the analysis of a pharmaceutical preparation by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **88**, 551 (1999).
8) Trafford, A. D., Jee, R. D., Moffat, A. C. and Graham, P. : A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy. *Analyst.* **124**, 163 1999).
9) O'Neil, A. J., Jee, R. D. and Moffat, A. C. : The application of multiple linear regression to the measurement of the median particle size of drugs and pharmaceutical excipients by near-infrared spectroscopy. *Analyst.* **123**, 2297 (1998).
10) Merckle, P. and Kovar, K. A. : Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 365 (1998).
11) Smith, M. R., Jee, R. D. and Moffat, A. C. : The transfer between instruments of a reflectance near-infrared assay for paracetamol in intact tablets. *Analyst.* **127**, 1682 (2002).
12) Broad, N. W., Jee, R. D., Moffat, A. C., Eaves, M. J., Mann, W. C. and Dziki, W. : Non-invasive determination of ethanol, propylene glycol and water in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Analyst.* **125**, 2054 (2000).
13) Gonzalez, F. and Pous, R. : Quality control in manufacturing process by near infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**, 419 (1995).
14) Sekulic, S. S., Wakeman, J., Doherty, P. and Hailey, P. A. : Automated system for the on-line monitoring of powder blending processes using near-infrared spectroscopy. Part II. Qualitative approaches to blend evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1285 (1998).
15) El-Hagrasy, A. S., Morris, H. R., D'Amico, F., Lodder, R. A. and Drennen, J. K. 3rd. : Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. *J. Pharm. Sci.* **90**, 1298 (2001).
16) Yoon, W. L., Jee, R. D. and Moffat, A. C. : Optimisation of sample presentation for the near-infrared spectra of pharmaceutical excipients. *Analyst.* **123**, 1029 (1998).
17) Candolfi, A., De Maesschalck, R., Massart, D. L., Hailey, P. A. and Harrington, A. C. : Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 923 (1999).
18) Andersson, M., Folestad, S., Gottfries, J., Johansson, M. O., Josefson, M. and Wahlund, K. G. : Quantitative analysis of film coating in a fluidized bed process by in-line NIR spectrometry and multivariate batch calibration. *Anal. Chem.* **72**, 2099 (2000).
19) Ritchie, G. E., Roller, R. W., Ciurczak, E. W., Mark, H., Tso, C. and MacDonald, S.A. : Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure. Part B: Application to alternate content uniformity and release assay methods for pharmaceutical solid dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 159 (2002).
20) Mark, H., Ritchie, G. E., Roller, R. W., Ciurczak, E. W., Tso, C. and MacDonald, S. A. : Validation of a near-infrared transmission spectroscopic procedure, part A: validation protocols. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28**, 251 (2002).