

근적외분광분석법을 사용한 암브록솔 정제의 비파괴적 정량분석

임현량 · 우영아 · 김도형 · 김효진[#] · 강신정* · 최현철* · 최한곤**

동덕여자대학교 약학대학, *식품의약품 안전청 마약시험과, **영남대학교 약학대학

(Received October 9, 2003; Revised December 15, 2003)

Nondestructive Quantification of Intact Ambroxol Tablet using Near-infrared Spectroscopy

Hun Rang Lim, Young Ah Woo, Do Hyung Kim, Hyo Jin Kim[#], Shin Jung Kang*, Hyun Chul Choi* and Han Gon Choi**

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

*Division of Narcotics Analysis., Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

**College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyeongbuk 712-749, Korea

Abstract — Near-infrared (NIR) spectroscopy was used to determine rapidly and nondestructively the content of ambroxol in intact ambroxol tablets containing 30 mg (12.5% m/m nominal concentration) by collecting NIR spectra in range 1100~1750 nm. The laboratory-made samples had 10.3~15.9% m/m nominal ambroxol concentration. The measurements were made by reflection using a fiber-optic probe and calibration was carried out by partial least square regression (PLSR) with autoscaling. Model validation was performed by randomly splitting the data set into calibration and validation data set (7 samples as a calibration data set and 5 samples as a validation data set). The developed NIR method gave results comparable to the known values of tablets in a laboratorial manufacturing process, standard error of calibration (SEC) and standard error of prediction (SEP) being 0.49% and 0.49% m/m respectively. The method showed good accuracy and repeatability. NIR spectroscopic determination in intact tablets allowed the potential use of real time monitoring for a running production process.

Keywords □ near-infrared spectroscopy, intact tablet, partial least square regression

제약 산업에서는 원료 의약품 및 생산 의약품의 품질을 관리하고 있으며, 적절한 품질 관리를 위해서는 분석과정에서 몇 가지 특징이 요구된다. 충분히 정확하고 정밀해야하고 전처리 과정이 최소화 되어야 한다. 또한 다성분의 분석이 가능하고 제조 공정 중에 신속한 성분의 조절이 가능해야한다. 근적외분광분석법은 이러한 원칙을 만족시키는 분석법 중 하나로 정제의 비파괴적인 정량을 가능하게 한다.^{1,2)}

미국의 FDA(food and drug administration)의 Sherken은 근적외분광분석법을 사용하여 정제를 분말화한 혼합물에서 메프로바메이트를 분석하였다.³⁾ 그 이후로 제약 산업에서 근적외분광분석법의 제조 현장 및 실험실에서의 용도가 증가하고 있으며 분말 혼합물, 과립, 파쇄된 정제 등 그 적용 범위도 확대되고 있다. 1987년, Lodder 등은 근적외분광분석법을 사용해서 불순품 캡슐제와 순품 캡슐제를 직접 분석하였으며,⁴⁾ 최근에는 정제의 활성

성분을 확인하였다.⁵⁾

정상적인 공장 생산품은 정량 모델을 수립할 수 있는 충분한 농도 범위를 제공하지 못하는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 정량모델의 농도 범위를 확장시키는 방법이 있는데, 첫째로는 실험 공장(pilot plant)에서 저용량 및 고용량 정제를 제조하는 방법,⁶⁾ 둘째는 실험실에서 제조한 분말형 시료를 사용하는 방법이다. 이 방법은 공장 생산품의 제조 환경과 동일하지 않을 때 다소 오차가 발생하지만 이 방법을 사용하여 얻은 매우 만족스러운 결과가 보고 된 바 있다.^{7,8)}

정제의 스펙트럼을 수집하는 방법으로 투과법 및 반사법이 있다. 투과법은 빛이 정제를 완전히 통과한 후 검출기에 도달하는 빛을 사용하기 때문에 정제의 전체 두께에 걸쳐 목표성분을 측정할 수 있지만 800~1400 nm 파장영역만이 사용가능하다. 반사법은 화학적 정보가 정제의 표면에서 유래하지만 투과법보다 훨씬 넓은 파장영역인 400~2500 nm를 사용할 수 있다. 반사법으로 측정 시에는 일반적으로 광섬유 프로브를 사용할 수 있는데, 광섬유 프로브는 원료 물질의 확인 작업에 주로 사용되나 근래에는 이를 이용한 생산품의 정량 분석적 연구가 보고 되고 있

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

다.^{1,2,7,9,10}) 이렇게 수집된 스펙트럼은 부분최소자승회귀분석법 (partial least square regression, PLSR)과 같은 다변량적 정량 분석 기술을 이용해서 복합 성분 내에서 분석하고자 하는 활성 성분이나 기타의 첨가제를 분석한다. 정량분석에서 시료의 물리적 특성에서 기인하는 스펙트럼의 변화는 스펙트럼의 전처리를 통해서 최소화시킬 수 있다.

본 연구에서는 암브록솔 정제를 광섬유 프로브를 사용하여 반사법으로 근적외선 스펙트럼을 수집하고 부분최소자승회귀분석법을 이용하여 정량 모델을 만든 후 그 정량 모델을 검증하고 실제로 미지의 정제시료에 대한 정량 분석을 시도하였다.

실험방법

분말상 암브록솔 및 첨가제를 사용한 기초실험

의약품의 정량 모델을 구축하기 위한 시료로 암브록솔 정제를 선택하였는데 암브록솔을 정제 형태로 실험하기 전에 분말 형태로 기초 실험을 실시하였다. 암브록솔 정제(240 mg)는 주성분인 암브록솔을 13%, 결합제인 옥수수 전분을 15%, 부형제인 유당을 71% 가량 함유하며 붕해제인 콜로이드 실리코나와 활택제인 스테아린산 마그네슘을 소량 함유하고 있다. 이 중 암브록솔과 부형제인 유당만으로 주성분의 함량이 70%~130% 가 되도록 하였고, 각각 무게는 2.0 g이 되도록 타정하였다. 실험에 사용한 암브록솔과 유당은 제약급 원료 의약품을 사용하였다.

암브록솔과 유당의 측정은 근적외선 분광광도계(Handheld HN1100, SpectronTech Co., Ltd, Korea)를 이용하였다. 실험에 사용한 분광광도계는 1100~1750 nm의 파장 범위에서 매 회 30 번 측정하여 평균 스펙트럼을 얻었고 스펙트럼 당 2 nm 간격으로 326 data point를 수집하도록 설정되었다. 근적외분광분석의 측정은 ChemoHN1100(SpectronTech Co., Ltd., Korea)을 이용하여 기록하였고 ChemoHN1100에 포함된 소프트웨어를 사용하여 수집한 스펙트럼을 PLSR로 다변량분석하였다. 본 연구에서는 확산반사 모드로 광섬유 프로브를 사용하여 측정하였다. 두 가지 분말을 막자와 막자 사발을 이용하여 충분히 혼합하고 10 ml 비커에 담아 vortex mixer로 1분 동안 혼합한 후 3개의 각각 다른 부위를 측정하여 평균한 스펙트럼을 수집하였다. 측정 사이마다 vortex mixer로 30초 동안 혼합하여 두 물질이 충분히 혼합되도록 조작하였다.

암브록솔 정제를 사용한 정량분석

암브록솔 정제는 당피 코팅이 되어 있는 타원형의 흰색 정제이다. 광섬유 프로브를 스탠드에 고정시키고 정제 밑에 스폰지를 깔고 측정하였다(Fig. 1). 측정하는데 사용된 분광기와 측정조건은 분말 실험과 같이 하였다. 수집한 정제는 전체 정제의 함량에 대해 암브록솔을 10.3~15.9%를 함유하도록 타정하였다. 총

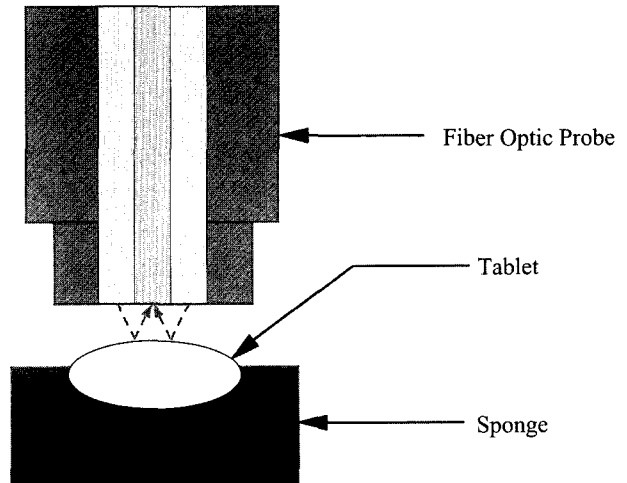


Fig. 1 – Measurement method of the tablet.

12개의 정제 중에서 정량 모델 개발에 7개, 개발한 정량 모델의 검증을 위해서 5개를 무작위로 선택하여 사용하였다.

분석법 Validation

정량법의 검증에 필요한 항목들에 관한 실험을 실시하였다. 암브록솔 정제에 대해 정밀도와 정확도에 관한 실험을 적용시켰다. 정밀도를 측정하기 위해 반복성 시험을 하였으며 변동계수 (coefficient of variation, CV)를 중심으로 검토하였다. 반복성 시험은 일정한 시간을 두고 동일한 실험자가 같은 시료에 대해 6 회 반복 시험하여 변동계수를 계산하였다.

정확도 시험은 모델의 개발이나 검증에 사용하지 않은 새로운 10개의 시료에 대해 기존값과 근적외분광분석법 실험값을 비교 하였다. 근적외분광분석법에 의한 값과 기존 값을 쌍체 비교 (paired t-test)하여 두 실험 방법에 의한 결과 간에 유의성 있는 차이가 있는지 검토하였다.

실험결과 및 고찰

분말상 암브록솔 및 첨가제를 사용한 기초실험

본 실험에 들어가기 전에 암브록솔과 유당의 피크를 확인하기 위해서 순수한 분말 상태의 두 물질을 각각 측정하였다. 암브록솔과 유당의 구조적인 차이를 Fig. 2에 나타내었다. 유당에는 없는 질소와 이중결합이 암브록솔 구조에 존재하는 것을 확인할 수 있다. Fig. 3은 암브록솔과 유당 분말의 원래 스펙트럼으로, 암브록솔과 유당의 분말은 육안상 큰 차이가 없으나 물질을 근적외 분광분석법으로 측정한 스펙트럼에는 현저한 차이가 나타난다. Fig. 4에서는 원래 스펙트럼상의 미세한 피크들을 확인하기 쉽도록 이차미분하였다. 가장 주목할 만한 암브록솔 피크는 1644 nm에서 나타나는데 이 피크는 탄소의 이중결합으로 인한 진동에

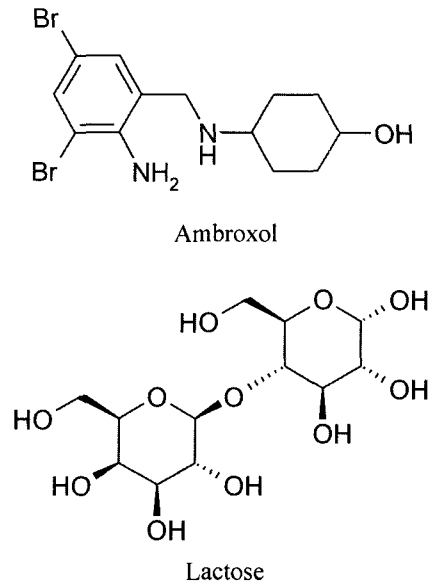


Fig. 2 – Structures of ambroxol and lactose.

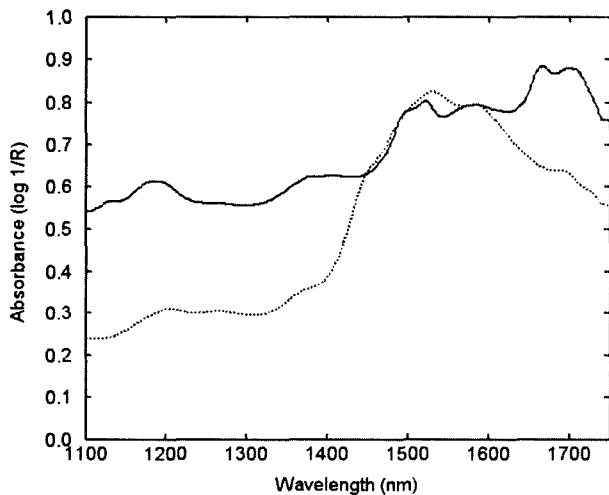


Fig. 3 – Raw spectra of ambroxol (a solid line) and lactose (a dotted line) in powder form.

너지의 흡수에 기인한 것으로 보인다.

Fig. 5는 암브록솔 함량을 70~130%가 되도록 조절하여 혼합한 분말을 광섬유 프로브의 위치를 다르게 하면서 3회 측정하여 평균낸 13개의 스펙트럼이다. 유당의 양이 암브록솔에 비해 많기 때문에 스펙트럼의 전체적인 패턴은 유당과 유사함을 알 수 있다. 미세한 피크들을 관찰하기 위해서 Fig. 5를 이차미분하였고 스펙트럼의 변화를 관찰할 수 있는 1644 nm 부근을 확대하여 Fig. 6를 얻었다. 이 스펙트럼은 이차미분 스펙트럼이므로 스펙트럼의 골짜기 부분에 해당하는 1644 nm가 원래의 스펙트럼의 피크에 해당한다. 1644 nm에서 나타나는 피크는 농도가 증가함에 따라서 피크의 크기가 증가하고 있음을 확인할 수 있다.

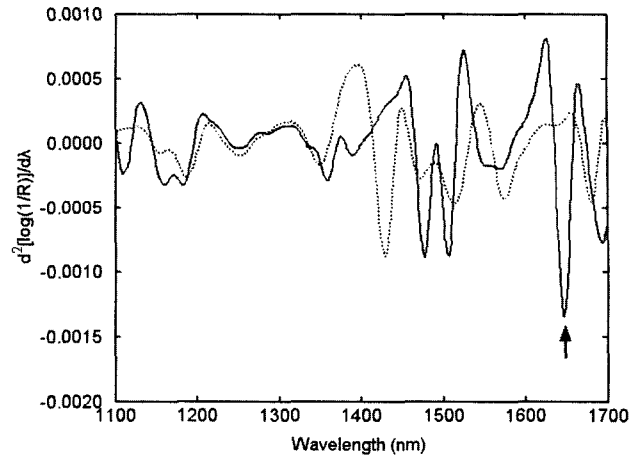


Fig. 4 – Second derivatives spectra of ambroxol (a solid line) and lactose (a dotted line) in powder form.

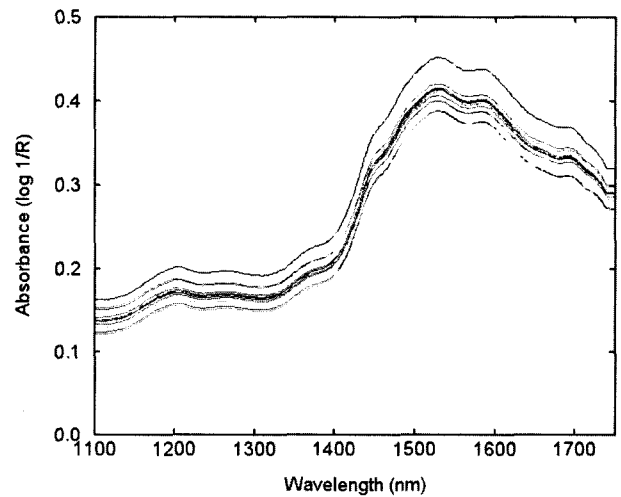


Fig. 5 – Raw spectra measuring 70~130% ambroxol/lactose in powder form.

여러 가지 수학적 전처리를 실시해 본 결과, 원래 스펙트럼을 autoscaling 하였을 때 분말의 밀도, 입자크기, 온도 등의 차이로 인한 바탕선 변화를 효과적으로 보정하여 가장 좋은 정량 분석 모델을 개발할 수 있었다. Fig. 7은 X 축에는 제조 과정에서 알고 있는 주성분의 함량 %값, Y축에는 PLSR로 추정된 %값을 plot한 그림이다. Fig. 7에서 확인할 수 있듯이 상관계수는 0.97이며 SEC는 4.6%, SEP도 4.6%로 좋은 결과를 얻었다.

이와 같이 분말을 사용하여 암브록솔의 정량분석 가능성을 확인한 결과, 암브록솔 정제의 정량분석에도 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

암브록솔 정제를 사용한 정량분석

정제를 측정된 스펙트럼은 정제 내에 암브록솔과 유당 외에 소량의 다른 성분을 함유하고 있음에도 불구하고 암브록솔과 유

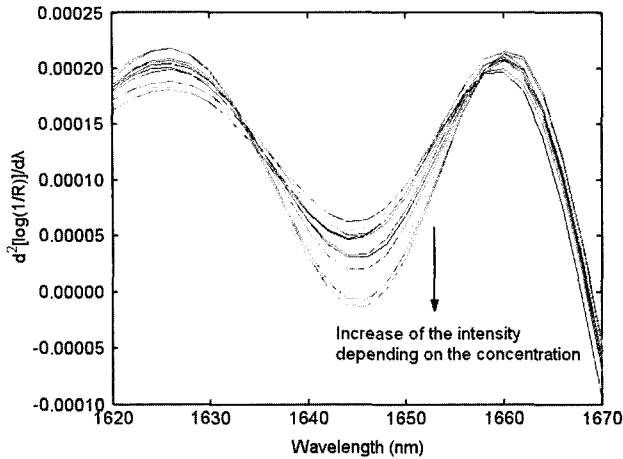


Fig. 6 – The variation of absorption at 1644 nm in second derivatives spectra.

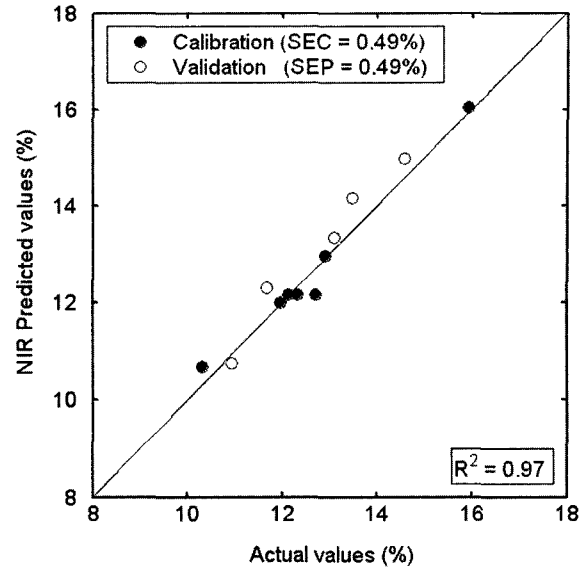


Fig. 8 – Scattering plot of NIR predicted values and actual values for ambroxol tablets.

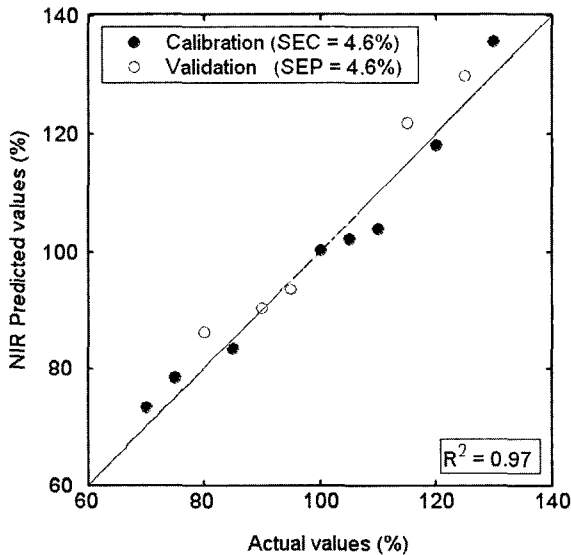


Fig. 7 – Scattering plot of NIR predicted values and actual values for 70~130% ambroxol/lactose in powder form using PLSR.

당의 혼합 분말을 측정 한 스펙트럼과 유사하였다. 그러나 정제를 측정 한 스펙트럼에는 산란에 의한 바탕선의 상승이 두드러지는데 그 이유는 정제가 당으로 코팅되어 있고 분말의 압착 정도가 다른 점과 표면이 완만한 곡선을 이루고 있어 광섬유 프로브와 완전한 접촉이 힘들었던 점을 들 수 있다. 여러 가지 수학적 전처리를 실시해 본 결과, 분말상 암브록솔과 유당의 기초 실험과 마찬가지로 원래 스펙트럼을 autoscaling 하였을 때 정제의 압착 정도, 온도, 산란 등의 차이로 인한 바탕선의 변화를 효과적으로 보정하여 좋은 정량 분석 모델을 개발할 수 있었다. 그 모델의 상관계수는 0.97이었고 SEC 0.49%, SEP 0.49%를 얻었다. Fig. 8은 X 축에는 타정 시 사용된 주성분의 질량을 측정하여 얻은 %, Y축은 이에 대응하는 PLSR로 추정 한 값을 plot한

Table I – Study of repeatability for ambroxol content in an intact ambroxol tablet

unit : w/w%							
Time	1	2	3	4	5	6	CV (%)
Prediction	11.73	11.61	11.86	11.70	11.63	11.57	0.90

Table II – Study of accuracy for ambroxol content in an intact ambroxol tablet

unit : w/w%			
No.	Reference value	NIR value	Residual
1	14.58	14.39	0.19
2	12.50	12.51	-0.01
3	10.94	10.92	0.02
4	12.89	12.96	-0.07
5	12.89	12.63	0.26
6	13.46	13.38	0.08
7	12.48	12.44	0.04
8	12.47	12.28	0.19
9	12.52	12.66	-0.14
10	12.49	12.45	0.04

그림이다.

정량 모델의 검증

Table I은 반복성시험 결과이다. 근적외분광분석법은 변동계수가 0.90%으로 통용되는 허용한계치인 1.0% 이하를 나타냈다.

Table II는 정확도를 검증한 결과이다. 새로 10개의 정제 시료를 측정하여 스펙트럼을 얻었고, 5% 유의수준에서 쌍체비교한 결과 그 통계량 $t_{exp} < t_{tab}$ 으로 나타나 근적외분광분석법에 의한 시험값과 질량을 칭량하여 얻은 값은 유의한 차이가 없었다.

결 론

분말상 암브록솔 및 첨가제를 근적외분광분석법으로 측정하여 암브록솔 정제에 대한 정량분석 가능성을 확인하였다. 암브록솔과 주 첨가제인 유당의 혼합농도를 변화시켜 얻은 이차미분 스펙트럼의 1644 nm에서 암브록솔의 농도에 따른 변화를 확인할 수 있다. 이는 암브록솔이 유당에 비하여 상대적으로 적은 양이지만 근적외분광분석법으로 정량분석 가능한 농도정보를 제공하고 있음을 보여준다. 실제 정제의 정량분석에 적용한 경우에도 분말상 암브록솔과 유당을 혼합하여 얻은 농도값과 근적외분광분석법으로 예상한 값은 좋은 상관관계를 보여주었다. 또한 정확도와 반복성 시험에서 만족할만한 값을 얻을 수 있었고, 근적외분광분석법에 의해 개발된 정량모델을 이용하여 새로운 암브록솔 정제 시료의 암브록솔 함량을 정확히 예측하는데 성공하였다.

문 헌

- 1) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. and Pezuela, C. : Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst* **123**, 135R (1998).
- 2) Corti, P., Dreassi, E. and Lonardi, S. : Near infrared reflectance analysis: features and applications in pharmaceutical and biomedical analysis. *Farmaco* **48**, 3 (1998).
- 3) Sherken, S. : Rapid near-infrared spectroscopic method for determination of meprobamate in meprobamate tablets. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **51**(3) (1968).
- 4) Lodder, R. A., Selby, M. and Hieftje, G. M. : Detection of capsule tampering by near-infrared reflectance analysis. *Anal. Chem.* **59**, 1921 (1987).
- 5) Khan, P. R., Jee, R. D., Watt, R. A. and Moffat, A. C. : Near-infrared spectroscopy: applications in the analysis of tablets and solid pharmaceutical dosage forms. *Pharm. Sci.* **3**, 447 (1997).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. and Pezuela, C. : Strategies for constructing the calibration set in the determination of active principles in pharmaceuticals by near infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Analyst* **122**, 761 (1997).
- 9) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. and Pezuela, C. : Quantitation of the active compound and major excipients in a pharmaceutical formulation by near infrared diffuse reflectance spectroscopy with fibre optical probe. *Anal. Chim. Acta* **333**, 147 (1996).
- 10) MacDonald, B. F. and Prebble, D. A. : Some applications of near-infrared reflectance analysis in the pharmaceutical industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 1077 (1999).