

고성능 액체크로마토그래프 기기의 성능검증을 위한 밸리데이션 가이드라인에 대한 연구

윤원남 · 이범규* · 이원재#

조선대학교 약학대학, *조선대학교 화학과

(Received August 27, 2013; Revised October 22, 2013; Accepted October 22, 2013)

Investigation of Validation Guidelines for Performance Verification of High Performance Liquid Chromatograph

Won Nam Yun, Beom-Gyu Lee* and Wonjae Lee#

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-709, Korea

*Department of Chemistry, Chosun University, Gwangju 501-709, Korea

Abstract — High performance liquid chromatograph (HPLC) is the most frequently used analytical instrument in analytical laboratories for pharmaceutical analysis. In order to provide a high level of assurance for reliable data generated from the HPLC analysis, the performance qualification of the HPLC system is required. For this purpose, the performance of HPLC system should be regularly monitored by examining the key functions of the typical HPLC system (solvent delivery system, injector system, column oven, UV-VIS detector system). We have investigated the validation guidelines of the performance verification of these key modules for HPLC system. And we proposed and evaluated its validation guidelines and the related verification methods for pharmaceutical analysis that could be practically applied in Korea.

Keywords □ high performance liquid chromatograph, validation, guideline, performance verification

현재까지 혼합물을 분리하는 분석방법들 중에서 높은 신뢰성을 가지고 있어 가장 많이 사용되는 분리방법이 크로마토그래피(chromatography)이다. 크로마토그래피는 혼합물의 각 성분들이 분리관내에서 고정상(stationary phase)과 이동상(mobile phase)에 다르게 분포하게 되는데 이러한 차이로 인해 시료의 성분들 사이에 이동속도의 차이가 발생하게 되고 각각의 단일 성분들로 분리가 이루어진다.¹⁾ 1970년 대에 HPLC 기기가 개발되면서 분리되는 물질에 대한 정성, 정량분석 및 분리성분의 분취를 통한 정제 등의 목적으로 매우 유용하게 사용되어 왔다. HPLC 기기는 사용하기에 매우 용이하고 다양한 형태의 물질을 분석할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 의약품 및 생명공학의 연구분야에서 가장 많이 사용되고 있는 분석기기 중 하나이다.¹⁻³⁾ 거의 모든 분석분야에 이용되어 그 응용범위는 일반분석에서부터 의약품, 고분자 화합물, 농약 등의 합성 및 분석, 각종 환경시료 및 생체시료 중의 미량 성분의 검출 및 정량 등 각종 제품의 품질

관리까지 다양하게 활용되고 있다. 특히 의약품분석에 있어서도 높은 신뢰성을 주기 때문에 HPLC 기기가 다양한 물질의 분리 분석을 위해 의약품 제조공정이나 산업체 현장에서 가장 널리 사용되어 왔지만, 신뢰할 만한 분석결과를 위한 HPLC 기기 검증(validation) 자체에 대해서는 큰 관심을 기울이지 않았다. 그러나 의약품품질관리에서 HPLC 기기를 이용한 약품분석의 규제요건을 더욱 온전하게 충족시키기 위해 HPLC 분석기기를 대상으로 적절한 기기 검증이 필요하고 이에 대한 지침(guideline)이 필요한 것으로 나타났다.^{2,3)}

현재 의약품 품질관리가 의약품분석과 관련되어 국내 공정서에 의약품 분석장비로서의 HPLC 기기의 검증 지침이 제시되어 있지 않는 상황이다. 본 논문에서는 더욱 신뢰받는 의약품 품질관리를 목적으로 매우 유용하게 사용되는 HPLC 기기의 성능검증의 검증 지침에 관련된 연구를 위하여, 각국의 공정서나 여러 발표된 문헌에서 제시하고 있는 의약품 분석장비로서의 HPLC 기기의 검증 자료를 조사하고, 또한 대표적인 HPLC 기기회사에서 사용되고 있는 검증에 관련된 여러 자료를 비교, 분석하고자 한다. 그리고 앞에서 조사한 여러 자료를 기초로 하여 국내 의약품 제조공정이나 산업체에서 사용되는 HPLC 기기를 위해 국내

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-230-6376 (팩스) 062-222-5414
(E-mail) wlee@chosun.ac.kr

상황에 적절한 HPLC 기기 검증 지침을 제안하고자 한다. 또한 본 연구에서 제안한 기기 검증 지침을 의약품 관련회사나 약품 연구소에서 현재 사용하고 있는 HPLC 기기에 적용함으로써 기기 성능을 올바르게 유지하면서 신뢰할 만한 분석실험 결과를 제공할 수 있는지에 대한 성능검증 시험을 하고자 한다. 그리하여 본 논문에서 기술하는 HPLC 기기 검증 지침과 이에 관련된 연구가 HPLC 분석기기를 이용한 의약품분석의 규제요건을 제정하는데 필요한 자료로 제공되고자 한다.

실험방법

실험기기 및 방법

HPLC 기기의 검증 실험을 위해 먼저 용매전달 장치(solvent delivery system)의 유속(flow rate) 정확성(accuracy)을 점검한다. 이동상으로 물을 사용하여 유속을 1 ml/min로 한 후 5 ml 용량플라스크를 채우는 시간을 3회 이상 측정한다. 주입기 장치(injector system)에서 주입량(injection volume)의 정밀성(precision) 실험을 위해 1 ml/min 유속에 메탄올/물(methanol/water)=3/7(V/V)을 이동상을 하여 메탄올에 녹인 caffeine 용액(~0.1 mg/ml) 10 µl를 주입하여 UV 272 nm에서 HPLC C18 칼럼을 통과한 피크의 면적을 측정한다. 칼럼오븐에서 온도 정확성 점검은 오븐 온도를 50°C로 조정한 후 인증된 온도계를 사용하여 오븐의 온도를 측정한다. UV-VIS 검출기(detector) 장치에서 파장(wavelength) 정확성의 점검은 메탄올에 녹인 caffeine 용액(2 mg/100 ml)을 사용하여 흡수최대파장(λ_{max})을 측정한다. UV-VIS 검출기의 baseline noise를 측정하기 위해 UV 250 nm

에서 메탄올 용매를 1 ml/min로 흘리면서 baseline의 흡광도를 기록한다. 상기 4가지 항목의 검증 실험을 위한 구체적인 시험 방법은 본문 내에 자세하게 기술하였다. 본 연구에서 제안한 HPLC 기기 검증 지침에 따른 성능검증을 위해 광주소재 약학 연구소에서 사용하고 있는 대표적인 HPLC 기기 3대를 대상으로 검증 시험을 수행하였다.

실험결과 및 고찰

여러 문헌에서 제시한 HPLC 기기의 검증 항목

의약품 제조공정이나 의약품 품질관리의 크로마토그래피 분석 장비 가운데 대표적 기기인 HPLC의 기기 검증에 대한 자료를 수집하였다. 이를 위해 각국 공정부서에서 현재까지 발표된 여러 문헌에서 제시하고 있는 의약품 분석장비로서의 HPLC 기기 검증에서 필요로 하는 여러 항목과 허용한도 등에 관련된 내용을 조사하였다. 의약품 분석기기에서 UV-VIS spectrophotometer 기기의 경우, 미국 등을 포함한 여러 선진국가의 약전에 기기 검증에 대한 내용이 기술되고 있는 것과는 달리, HPLC를 포함한 각종 크로마토그래피 기기 검증에 대한 내용은 기술되지 않고 있다.⁴⁾ 그러나 유럽 의약품 품질위원회(European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, EDQM)에서는 의약품 품질관리를 위한 Official Medicines Control Laboratories (OMCL)의 여러 규제가운데 HPLC 기기 대상으로 HPLC 기기 검증 지침에 대한 부분을 허용한도와 실험방법까지 매우 상세하게 명시하고 있다.^{5,6)} 유럽 의약품 품질위원회의 OMCL에서 HPLC 기기 지침으로 제시한 여러 항목들 중에서 HPLC 기기

Table I – Validation items and their tolerance limits by European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare⁶⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of volumetric measurement: no column (open end), water (mobile phase), flow rate; 0.5~3.0 ml/min	< ±5%
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (20 µl, 10 injections) using parabene solutions: Lichrospher 100 RP8 column, methanol/water=60/40 (V/V), 1 ml/min, UV 254 nm	<1.0% (RSD)
3 Column oven	Temperature accuracy of column oven at 40°C	< ±2°C
4 UV-VIS detector system	Wavelength accuracy: λ_{max} determination using anthracene in water solution, RP18 column, 15% acetonitrile/water (mobile phase), 1 ml/min, UV 251 nm, 20 µl injection	< ±2 nm

Table II – Validation items and their tolerance limits by Maldner⁷⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of volumetric measurement from the required value	< ±5%
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (for >10 µl)	<0.5% (RSD)
3 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy measurement - Background noise determined from chromatograms: RP 18 column, methanol (mobile phase), 1 ml/min, UV 250 nm	< ±2 nm < ±0.04 mAU

Table III – Validation items and their tolerance limits by Parriott⁸⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of volumetric measurement from the required value: RP column, methanol/water=1/1 (V/V) (mobile phase), 1 ml/min and 5 ml/min	-
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (10 μ l, 10 injections) using caffeine in methanol solution: C18 column, methanol/water=3/7 (V/V), 1 ml/min, UV 272 nm	<0.5~1.0% (RSD)
3 Column oven	Temperature accuracy of column heater using Thermocouple (>10°C above room temperature)	< \pm 2°C
4 UV-VIS detector system	Wavelength accuracy: max and λ min determination using caffeine in methanol solution (2 mg/100 ml)	< \pm 5 nm (λ max 272 nm, λ min 245 nm)

Table IV – Validation items and their tolerance limits by Hall⁹⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of 10 ml volumetric measurement using 0.005 inch ID tubing: water (mobile phase), 1 ml/min	< \pm 1.0%
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (10 μ l, 6 injections) using anthracene mixture solution: C18 column, methanol/water=75/25 (V/V), 1 ml/min, UV 260 nm	<1.0% (RSD)
3 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy: λ max determination using anthracene solution (251 nm) - Baseline noise	< \pm 2 nm -

Table V – Validation items and their tolerance limits by Herman¹⁰⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of volumetric measurement from the required value at several flow rates	< \pm 1%
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (10~20 μ l, 6 injections) using caffeine solution: C18 column, acetonitrile/water=15/85 (V/V), 2 ml/min, UV 272 nm	<1.0% (RSD)
3 Column oven	Temperature accuracy of column oven at 40°C and 60°C	< \pm 2°C
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy: λ max determination using aqueous caffeine solution (λ max: UV 272, 205 nm; λ min: UV 244 nm) or KMnO ₄ solution - Baseline noise determined for 15 min: methanol (mobile phase), 1 ml/min, UV 254 nm	< \pm 2 nm < \pm 0.01 mAU

구성단위(module) 4가지(용매전달 장치, 주입기 장치, 칼럼오븐, UV-VIS 검출기 장치)가 주요 내용이 되는데 이를 중심으로 Table I에 정리하였다.⁶⁾

이외에도 전부터 HPLC 기기의 성능검증을 위한 기기 검증에 대한 여러 논문들이 보고되어 왔는데, 이들 논문의 대부분은 용매전달 장치, 주입기 장치, 칼럼오븐, UV-VIS 검출기 장치의 4가지 검증 지침 항목으로 기술되어 있다.⁷⁻¹³⁾ 특히 Maldner, Parriott, Hall, Herman은 Table II~V에 정리된 바와 같이 HPLC 기기의 검증 지침을 자세하게 언급하며 이들 항목의 허용도까지 제시하고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 한편, Table II, IV에서는 HPLC 기기의 검증 항목 중에서 가장 일반적인 항목들이면서 소단위 연구실에서도 간단하게 성능검사를 할 수 있는 용매전달 장치, 주입기 장치, UV-VIS detector system 3가지 module만을 지정하고 있으며,^{7,9)} 특히 Herman은 4가지 항목의 검증 허용도와 실험방법까지 자세하게 기술하고 있다.¹⁰⁾ 대부분의 문헌자료에서 용매전달 장치, 주입기 장치, 칼럼오븐, UV-VIS 검출기 장치의 4가지 항목의 내용으로 유속의 정확도, 주입량 점검, 칼럼 가열기

의 정확도, UV-VIS 파장의 정확도 등의 검증 성능시험을 명시하고 있어 유럽 의약품 품질위원회의 OMCL에서와 같이 비슷하게 다루어지고 있음을 볼 수 있다.⁶⁾ 이것들 외에도 펌프에서의 gradient의 정확도와 압력시험, 주입기의 직선성과 carryover, 검출기의 반응 직선성과 noise, drift 시험들도 언급되고 있으며 data processor의 정확성, 컴퓨터 프로그램 코드의 정확성 등의 검사항목까지 제시되어 있다.⁷⁻¹³⁾ 또한 HPLC 기기 검증을 위해 사용되는 표준물질과 이동상 등의 실험방법 차이나 검증의 결과에 대한 허용범위도 조금씩 다르게 기술되어 있다.

HPLC 기기의 주요 회사에서 규정한 검증 항목

또한 현재 HPLC 기기를 취급하는 대표적인 주요 회사인 Agilent, Waters, Shimadzu에서 사용하는 HPLC 기기성능 점검을 위한 검증 자료를 수집하여 조사하였다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 각 HPLC기기 회사에서 사용하는 기기 검증 자료는 앞서 조사한 HPLC기기 검증 문헌들의 자료뿐만 아니라, 유럽 의약품 품질위원회에서 검증 지침으로 명시한 것보다 훨씬 구체적이고 자세하게 기술되어

있다.⁶⁻¹⁰ 전체적으로 HPLC 기기 검증 주요 항목은 앞에서 언급한 4개의 범주(category)로 동일하게 되어있으나 이에 대한 내용들은 보다 구체적이고 다양하다. 예를 들어 용매전달 장치의 경우에 유속 정확성/정밀성, gradient 정확성/정밀성 등이 명시되어 있고, 주입기 장치의 경우에도 주입량의 정확성 또는 정밀성과 함께 직선성 등도 명시되어 있다.¹⁴⁻¹⁷ 그러나 이러한 모든 내용을 본 연구에 적용하기는 실제적이지 않고 지침으로 제시하기에도 적절하지 않기 때문에 앞에서 기술되었던 공통된 4가지의 가장 중요한 검증 범주에서(용매전달 장치, 주입기 장치, 칼럼오

븐, UV-VIS 검출기 장치) 유속의 정확성, 주입량 점검, 칼럼 가열기의 정확도, UV-VIS 파장의 정확도 등의 항목을 중심으로 Agilent, Waters, Shimadzu에서 사용하는 HPLC 기기 검증 내용을 Table VI~VIII에 정리하였다.

앞에서의 언급한 검증 항목의 내용의 경우에도 세 기기회사에서 사용하는 Table VI~VIII의 검증 지침은 Table I~V에서 제시한 것보다 약간씩 다르면서 세밀하게 검증을 수행하고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 예를 들어 Table VI의 경우, 용매전달 장치 항목의 유속의 정확도 측정을 위해 0.5 ml/min와 5 ml/min 두 영역에서 측정하도록

Table VI – Validation items and their tolerance limits for Agilent HPLC¹⁵⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of volumetric measurement: water (mobile phase), flow rate 0.5 and 5 ml/min	< ±5.00%
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (20 µl, 6 injections) using standard solution on C18 column; determination of %RSD (peak area/ height)	<1.00% (area RSD) <2.00% (height RSD)
3 Column oven	Temperature accuracy (determined 6 times) of column oven at 40°C and 80°C	80°C < ±3°C 40°C < ±2°C
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy: λmax and λmin determination using caffeine in methanol solution, 1 ml/min, UV 272 nm - Baseline noise determined from chromatograms: water (mobile phase), 1 ml/min, UV 254 nm	< ±2 nm (λmax 205, 272 nm, λmin 245 nm) < ±0.05 mAU

Table VII – Validation items and their tolerance limits for Waters HPLC¹⁶⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of 10 ml volumetric measurement: methanol (mobile phase), 1 ml/min	< ±1.5~3%
2 Injector system	- Accuracy of injection volume (50 µl; 6 injections, 12 µl; 16 injections) using standard sample on C18 column; determination of %RSD (peak area) - Reproducibility of injection volume (5 µl, 10 injections) using standard sample on C18 column; determination of %RSD (peak area)	For 50 µl (6 injections) < ±2.0% For 12 µl (16 injections) < ±8.3% <1.0% (RSD)
3 Column oven	Temperature accuracy of column oven at rt-60°C	< ±2°C
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy: λmax determination using erbium perchlorate or pyrene in methanol solution, 1 ml/min, UV 333 nm - Baseline noise determined from chromatograms: water (mobile phase), 1 ml/min, UV 254 nm	< ±2 nm < ±0.05 mAU

Table VIII – Validation items and their tolerance limits for Shimadzu HPLC¹⁷⁾

Validation items	Validation description	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of 5 ml volumetric measurement using tubing (4 m×0.1 mm ID): water (mobile phase), 1 ml/min	< ±2~5%
2 Injector system	Accuracy of injection volume (50 µl; 10 injections) using water sample on restrictor tubing column (4 m×0.1 mm ID)	< ±4~5%
3 Column oven	Temperature accuracy of column oven at 40°C and 50°C	< ±2°C
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy: λmax determination using Hg lamp (254 nm, 436 nm) or caffeine in methanol solution (272 nm), 1 ml/min, UV 272 nm - Baseline noise determined from chromatograms: methanol (mobile phase), 1 ml/min, UV 250 nm	For use of Hg lamp (< ±1 nm) or caffeine solution (< ±2 nm) < ±0.02 mAU

되어 있고, 칼럼오븐 온도 정확도 시험은 80°C와 40°C에서 하도록 되어 있다.¹⁵⁾ Table VII의 경우, 주입기 장치 항목의 주입량 측정에서도 정밀도 실험 외에 50 μ l, 12 μ l에서 정확도 실험을 수행하도록 되어 있으며, UV-VIS 파장 정확도를 위해서는 일반적으로 사용되고 있는 caffeine 용액 대신 erbium perchlorate 이나 pyrene 용액을 사용하도록 되어 있다.¹⁶⁾ Table VIII의 경우 주입량 측정이 50 μ l에서 정확도 실험만을 수행하도록 되어 있고, 칼럼오븐 온도에 대한 정확도 시험도 40°C와 50°C에서 하도록 되어 있다.¹⁷⁾ 그 외에 각 HPLC 기기 회사의 검증 항목의 허용 한도도 각 회사의 기기 성능에 따라 조금씩 다르게 제시하고 있다.

본 연구에서 제정한 HPLC 기기의 검증 항목

앞서 발표된 문헌들에서 제시한 검증과 HPLC 기기를 취급하는 주요 회사들에서 사용하는 검증 자료를 비교 검토하여, 국내의 제약회사나 약품연구소에서 적용하여 사용할 수 있는 HPLC 기기 검증 지침을 제안하였다. Table IX에 보여주고 있는 바와 같이, 상기 기술한 문헌과 기기회사 가이드라인에서 공통적으로 다루는 용매전달 장치, 주입기 장치, 칼럼오븐, UV-VIS 검출기 장치의 4가지 범주를 중심으로 유속의 정확도, 주입량 점검, 칼럼 가열기의 정확도, UV-VIS 파장의 정확도 등을 필수적인 성능시험을 위한 기기 검증 항목으로 제시하였다. 이와 더불어 국내에서 적용하여 사용하는데 적절하게 각 항목의 검증 허용한도를 제시하였다. 또한 각 항목을 시행하기 위한 자세한 검증 지침 시험방법은 상기 자료들을 참조하여 아래와 같이 제정하였다.

용매전달 장치 점검 - HPLC 펌프의 유속의 정확도를 점검하기 앞서 펌프의 plungers, seal, check valves 등을 점검하여 누액 및 압력과다가 있는지를 확인하고 이에 이상이 없는 경우 pump outlet에 stainless steel tubing(0.1 mm ID×4 m)을 연결하고[tubing 대신 HPLC C18 column 사용가능] 이동상을 물로 바꾼 후 10분 정도 이동상을 흘려준다. 그런 다음 유속을 1 ml/min로 한 후 5 ml 용량플라스크를 이용하여 정확히 표선까지 채우는 시간을 측정한다. 이를 3회 이상을 측정하여 평균을 계산한 후 허용한도가 $\pm 5\%$ 이내인지를 점검한다.

주입기 장치 점검 - 주입기 장치에서 주입량의 재현성 실험을 위해 1 ml/min 유속에 메탄올/물=3/7(V/V)을 이동상으로 하여 메탄올에 녹인 caffeine 용액(~ 0.1 mg/ml) 10 μ l를 주입하여 UV 272 nm에서 HPLC C18 칼럼을 통과한 피크의 면적을 측정하고, 10회 시행한 주입량의 정밀도 허용한도가 RSD 1.0% 이내인지를 점검한다.

칼럼오븐 점검 - 칼럼오븐의 설정온도를 측정하기 위해 인증된 Thermocouple이나 Digital 온도계를 사용하는데 Digital 온도계를 사용할 경우 온도계 sensor가 heat block type의 칼럼오븐에 잘 부착되도록 유의한다. HPLC 시스템을 이용하여 칼럼오븐의 온도를 50°C로 조정후 20분을 기다려 오븐의 온도를 측정후 허용한도가 $\pm 2^\circ\text{C}$ 이내인지를 점검한다.

UV-VIS 검출기 장치 점검 - UV-VIS 검출기의 파장 정확도를 위해 plunger를 사용하여 detector flow cell에 직접 메탄올을 주입한 다음 flow cell을 sealing 한 후 흡광도가 auto zero가 되게 한다. 메탄올에 녹인 caffeine 용액(2 mg/100 ml)을 plunger를 사용하여 직접 flow cell에 주입한 후 sealing 한다. 파장을 266 nm 부터 1 nm 간격으로 277 nm까지 바꿔주면서 흡광도 값을 기록하여 최대흡광도를 보이는 파장을 측정하고 λ_{max} 값이 272 ± 2 nm 인지를 판별한다. UV-VIS 검출기의 noise 측정하기 위해 주입기와 검출기 사이에 stainless steel tubing(0.1 mm ID×4 m)을 연결한다. UV 250 nm에서 메탄올 용매를 1 ml/min로 15분간 흘리면서 baseline의 noise를 기록하여 최대폭이 ± 0.05 mAU 이내인지를 점검한다.

본 연구에서 제안한 HPLC 기기의 검증 지침에 따른 성능검증 시험

앞의 Table IX에서 제정하여 제안한 HPLC 기기 검증 지침의 각 항목을 현재 약품연구소에서 사용되고 있는 HPLC 기기를 대상으로 적용하고자 검증 시험을 수행하였다. Table X~XII에서 이들 검증 결과가 보여주고 있는 것처럼, 검증 시험이 시행된 3대의 HPLC 기기가 본 연구에서 제정한 HPLC 검증 지침의 허용범위를 모두 통과하였다. Table XII의 C 기기는 각 항목에서 제정한 검증 지침의 허용범위를 모두 통과하였지만, Table X, XI

Table IX - Proposed validation guidelines of HPLC and their tolerance limits

Validation items	Validation methods	Tolerance limits
1 Solvent delivery system	Flow rate accuracy of 5 ml volumetric measurement (more than 3 times): water (mobile phase), 1 ml/min	$< \pm 5\%$
2 Injector system	Reproducibility of injection volume (10 μ l, 10 injections) using caffeine in methanol solution: C18 column, methanol/water=3/7 (V/V), 1 ml/min, UV 272 nm	$< 1.0\%$ (RSD)
3 Column oven	Temperature accuracy of column oven at 50°C	$< \pm 2^\circ\text{C}$
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy: λ_{max} determination using caffeine in methanol solution (272 nm), 1 ml/min, UV 272 nm - Baseline noise determined from chromatograms: methanol (mobile phase), 1 ml/min, UV 250 nm	$< \pm 2$ nm $< \pm 0.05$ mAU

Table X – Validation results of A instrument performed by proposed validation guidelines

Validation items	Results	Tolerance limits	Validation results
1 Solvent delivery system	Average; 5 min 1.1 sec Flow rate; 0.996 ml/min Flow rate accuracy; -0.4%	< ±5%	Pass
2 Injector system	Injection volume (10 µl) precision; 0.84% (RSD)	<1.0% (RSD)	Pass
3 Column oven	Observed temperature; 49.2°C	< ±2°C	Pass
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy of caffeine solution; λ _{max} 273 nm observed - Baseline noise; max. -0.026 mAU	272±2 nm < ±0.05 mAU	Pass

Table XI – Validation results of B instrument performed by proposed validation guidelines

Validation items	Results	Tolerance limits	Validation results
1 Solvent delivery system	Average; 4 min 59.8 sec Flow rate; 1.001 ml/min Flow rate accuracy; +0.1%	< ±5%	Pass
2 Injector system	Injection volume (10 µl) precision; 0.63% (RSD)	<1.0% (RSD)	Pass
3 Column oven	Observed temperature; 50.9°C	< ±2°C	Pass
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy of caffeine solution; λ _{max} 274 nm observed - Baseline noise; max. -0.014 mAU	272±2 nm < ±0.05 mAU	Pass

Table XII - Validation results of C instrument performed by proposed validation guidelines

Validation items	Results	Tolerance limits	Validation results
1 Solvent delivery system	Average; 5 min 4.0 sec Flow rate; 0.987 ml/min Flow rate accuracy; -1.3%	< ±5%	Pass
2 Injector system	Injection volume (10 µl) precision; 0.91% (RSD)	<1.0% (RSD)	Pass
3 Column oven	Observed temperature; 48.4°C	< ±2°C	Pass
4 UV-VIS detector system	- Wavelength accuracy of caffeine solution; λ _{max} 273 nm observed - Baseline noise; max. -0.023 mAU	272±2 nm < ±0.05 mAU	Pass

의 A, B기기에 비해 유속의 정확도, 주입량 정밀도, 칼럼 가열기의 정확도에 있어서 편차가 상당히 크게 나타남을 볼 수 있다. HPLC 기기 검증의 주기는 보통 6~12개월로 되어 있는데, C 기기의 경우 허용범위 내에 있기는 하지만 다른 기기에 비해 낮은 성능시험 결과를 보인 것을 고려할 때 이 기기에 대한 지속적인 관리가 필요한 것으로 보인다.²⁾

결 론

HPLC 기기는 의약품 개발하는 제약산업체나 약품연구소에서 정성, 정량분석 및 분리성분의 분취를 목적으로 사용되는 가장 필수적인 분석기기 중 하나이다. 의약품 개발과정에서 HPLC 기기를 사용하여 분석을 수행할 때 더욱 신뢰할 만한 결과를 제공하기 위해서 국내의 의약품품질관리 관련규정에 의약품 분석 장비로서의 HPLC 기기의 검증 지침이 명시되는 것이 바람직한

것으로 생각되었다. 이를 위해 본고에서 여러 문헌들과 주요 HPLC 기기회사의 검증 자료를 조사하여 이들을 바탕으로 HPLC 기기의 검증 지침을 제정하여 제안하였고, 이들을 이용하여 기기 검증 시험검사를 시행하였다. 본 논문에서 제안한 HPLC 기기의 검증 지침을 참고로 하여 국내 의약품 개발산업의 상황에 적절한 HPLC 기기의 검증과 관련된 시행규칙을 제도화하고 이를 통해 더욱 신뢰할 만한 의약품분석결과를 제공함으로써 국내 의약품 품질관리 수준을 더욱 높일 수 있으리라 기대한다.

참고문헌

- 1) Watson, D. G. : *Pharmaceutical Analysis*, 2nd Edition, Elsevier, Toronto (2005).
- 2) Chan, C. C., Lam, H., Lee, Y. C. and Zhang, X.-M. : *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, John Wiley & Sons, New York (2004).

- 3) Huber, L. : *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Interpharm Press, Buffalo Grove (1999).
- 4) Jin, J. Y., Kang, Y. K. and Lee, W. : The proposed validation guidelines and their application for performance verification of UV-VIS spectrophotometer. *Yakhak Hoeji* **50**, 154 (2006).
- 5) European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM) internet site; <http://www.edqm.eu/en/General-european-OMCL-network-46.html>.
- 6) European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, OMCL Network of the Council of Europe Quality Management Document, Qualification of Equipment Annex 1: Qualification of HPLC equipment, PA/PH/OMCL (2011).
- 7) Maldner, G. : Requirements and tests for HPLC apparatus and methods in pharmaceutical quality control. *Chromatographia* **28**, 85 (1989).
- 8) Parriott, D. : Performance verification testing of high performance liquid chromatography equipment. *LC-GC* **12**, 132 (1994).
- 9) Hall, G. and Dolan, J. W. : Performance qualification of LC systems. *LCGC North America* **20**, 842 (2002).
- 10) Herman, L. : Performance verification of HPLC, Laboratory *Focus-Gazette Edition* (2002).
- 11) Wiggins, D. E. : System suitability in an optimized HPLC system. *J. Liq. Chromatogra.* **14**, 3045 (1991).
- 12) Furman, W. B., Layoff, T. P. and Tetzlaff, R. F. : *Validation of computerized liquid chromatographic systems. J. AOAC Inter.* **77**, 1314 (1994).
- 13) Grisanti, V. and Zachowski, E. J. : Operational and performance qualification. *LCGC North America* **20**, 356 (1994).
- 14) Dionex Corporation; *Operational Qualification/ Performance Qualification for HPLC Instruments* (2008).
- 15) Agilent Technologies; *Equipment Qualification Plan* (2012).
- 16) Waters Corporation; *HPLC Qualification Workbook* (2011).
- 17) Shimadzu Ltd.; *Shimadzu HPLC system Operational Qualification* (2010).