

Understanding and comparative analysis of analytical method validation

Jongsung Noh and Seung-Woon Myung[★]

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea
(Received April 22, 2024; Revised May 16, 2024; Accepted May 17, 2024)

분석법 유효성 확인의 이해와 분야 별 가이드라인 비교

노종성 · 명승운[★]

경기대학교 화학과

(2024. 4. 22. 접수, 2024. 5. 16. 수정, 2024. 5. 17. 승인)

1. 서 론

화학 분석 기기의 발전은 환경, 의약품, 식품, 법과학, 임상 분야에서 다양한 물질을 정확하게 분석할 수 있는 새로운 가능성을 제시해왔다. 이러한 발전은 더 높은 감도, 더 넓은 정량 범위, 더 짧은 분석 시간을 가능하게 해왔으며, 특히 복잡한 매트릭스를 가진 시료에서도 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 수 있게 했다. 기기의 발전 못지않게 분석 목적에 맞는 분석법을 개발하고 적용하는 것 또한 중요하며, 분석법이 의도한 목적에 적합한지 확인하는 절차로 분석법 유효성 확인이 수행되어야 한다. 분석법 유효성 확인(analytical method validation)은 분석법의 신뢰성을 보장하고, 분석 결과에 대한 신뢰도를 높이며, 최종적으로 분석 방법의 확립 및 산업 전반의 품질 관리, 안전 규제 준수에 필수적인 역할을 한다. 분석법 유효성 확인 없이 수행된 결과는 신뢰성에 대한 의심을 받을 수 있으며 잘못된 결론을 내릴 수 있다.^{1,2}

다양한 산업 분야에 따라 분석물질과 매트릭스는 아주 다른 물리적·화학적 성질을 나타내며 품질 관리 및 안전 규제에 대한 기준이 서로 다르기 때문에 한

가지 가이드라인이 다른 분야의 기준을 모두 충족시키기는 어려운 문제점이 있다.

본 연구에서는 다양한 분야에서 사용되고 있는 가이드라인의 분석법 유효성 확인 요소와 절차에 대해 살펴보고자 한다. 먼저, 산업 전반에 걸쳐 공통적인 가이드라인을 제시하는 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), Eurachem, ISO (International Organization for Standardization), ICH (International Council for Harmonization)의 규정을 통해 분석법 유효성 확인의 일반적인 정의들을 살펴본 뒤, 각 분야를 대표하는 가이드라인들을 비교하여 연구 분야별 분석법 유효성 확인 시 고려해야 하는 사항들을 확인하고자 하였다(Table 1).³⁻¹⁸

2. 분석법 유효성 확인의 정의

분석법 유효성 확인은 특정 분석 목적을 충족하기 위해 개발된 분석 방법의 적합성을 체계적으로 평가하고 확인하는 절차를 말한다. 이 과정은 분석 결과의 신뢰성을 보장하며, 실험 결과의 해석과 응용에 대한 확실성을 제공하는 기준이 된다. 산업 전반에 걸쳐 적

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)31-249-9647 Fax : +82-(0)31-249-9647

E-mail : swmyung@kgu.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Summary of the evaluated guidelines for method validation

No.	단체	가이드라인	연구 분야	년도	Ref.
1	IUPAC ¹⁾	Harmonized guidelines for single laboratory validation of method for analysis		2002	[3]
2	Eurachem	The fitness for purpose of analytical methods	Not Specified	2014	[4]
3	ISO ²⁾	ISO/IEC 17025		2017	[5]
4	ICH ³⁾	ICH Q2 (R2)		2022	[6]
5	AOAC ⁴⁾	Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals		2002	[7]
6	MFDS ⁵⁾	식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인	Foods	2016	[8]
7	EC ⁶⁾	SANTE 11312/2021 v2		2021	[9]
8	FAO ⁷⁾	CODEX Alimentarius Commission procedural manual		2023	[10]
9	USFDA ⁸⁾	Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics	Drugs	2015	[11]
10	MFDS ⁵⁾	의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서		2015	[12]
11	WHO ⁹⁾	WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations		2023	[13]
12	USP ¹⁰⁾	USP47-NF42		2024	[14]
13	EMA ¹¹⁾	Guideline on bioanalytical method validation	Biological	2011	[15]
14	USFDA ⁹⁾	Bioanalytical method validation guidance for industry		2018	[16]
15	ICH ³⁾	ICH M10		2022	[17]
16	MFDS ⁵⁾	생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 가이드라인		2023	[18]

- 1) International Union of Pure and Applied Chemistry
- 2) International Organization for Standardization
- 3) International Council for Harmonisation
- 4) Association of Official Agricultural Chemists
- 5) Ministry of Food and Drug Safety
- 6) European Commission
- 7) Food and Agriculture Organization of the United Nations
- 8) United States Food and Drug Administration
- 9) World Health Organization
- 10) United States Pharmacopeia
- 11) European Medicines Agency

용되는 가이드라인들은 유효성 확인에 필요한 인자들을 일관되게 포함하고 있으며, 이 요인들의 정의는 상호 참조를 통해 공통적으로 설명하고 있다. 분석법 유효성 확인에 포함되는 인자들은 일반적으로 정확도 (accuracy), 정밀도 (precision), 선택성 (selectivity), 특이성 (specificity), 검출 한계 (limit of detection, LOD), 정량 한계 (limit of quantification, LOQ), 검량선 (calibration curve), 견고성 (ruggedness)이 있으며, 가이드라인에 따라 적용성 (applicability), 진도 (trueness), 감도 (sensitivity), 적합성 (fit of purpose), 매트릭스 오차 (matrix variation), 측정 불확도 (measurement uncertainty), 회수율 (recovery)을 포함하기도 한다. 분석법 유효성 확인에 포함되는 여러 인자들은 각각 분석 방법의 다른 측면들을 대표하며, 종합적인 평가를 통해 분석 방법의 전반적인 성능과 신뢰성을 확인할 수 있다.¹⁹⁾

2.1. IUPAC 가이드라인³⁾

국제 순수 및 응용화학 연합(IUPAC)에서 발행한 ‘Harmonized Guidelines for Single laboratory Validation of Methods of Analysis’ 가이드라인에서는 국가 및 국제 규정 준수를 위해 모든 분석 분야에서 신뢰할 수 있는 분석 방법이 필요하며 이를 위해 실험실에서 필요한 품질의 데이터를 제공한다는 것을 보장하기 위해 1) 검증된 분석 방법의 사용, 2) 내부 품질 관리 절차 사용, 3) 숙련도 평가 계획 참여, 4) ISO/IEC 17025⁵⁾ 국제 표준을 준수할 것을 제안하고 있다. 식품 분야에서는 전체 분석법 유효성 확인 (full validation)이 수행되어야 하는데, 이는 일반적으로 실험실 간 분석법 유효성 확인을 통해 수행될 수 있으며, 특히 국제적으로 인정받은 가이드라인으로 ISO와 ICH 가이드라인을 언급하고 있다. 하지만 항상 전체 분석법 유효성

Table 2. IUPAC requirements for study of method performance characteristics³

검증 인자	정의
적용성	1) 분석물의 성분 2) 검증된 농도 범위 3) 검증된 매트릭스의 종류 4) 기기, 시약, 시험 방법, 보정, 품질 관리 과정을 포함하는 프로토콜 5) 목적에 맞는 적용 및 불확실성
선택성	· 방해물질이 존재할 때 분석물질을 정확하게 정량할 수 있는 정도
직선성	· 분석 조건에서 농도에 직접 비례하는 감응도
진도	· 실험값과 참값의 일치도
정밀도	· 독립 시험으로 얻은 실험값들의 일치도
회수율	· 시료 전처리 과정의 추출 효율
범위	· 분석물질을 정량할 수 있는 검증된 농도 범위
검출 한계	· 분석물질의 존재여부를 결정할 수 있는 최저 농도
정량 한계	· 재현성과 진도를 보장할 수 있는 최저 농도
감도	· 검량선의 기울기
견고성	· 실험 과정에 명시된 조건들의 변화에 대한 저항성

효성 확인을 제공하는 것은 불필요할 수 있기 때문에 이 가이드라인에서는 단일 실험실 검증(single laboratory validation) 방법에 대해 안내하고 있다. 단일 실험실 검증은 1) 전체 분석법 유효성 확인을 수행하기 전 분석법의 실현 가능성을 확인, 2) 전체 분석법 유효성 확인을 수행할 수 없는 경우 분석법의 신뢰성을 제공, 3) 검증된 방법이 올바르게 사용되고 있는지 확인하기 위해 수행될 수 있다고 규정하고 있다. IUPAC 가이드라인에서 제안하는 단일 실험실 검증 요인은 1) 적용성, 2) 선택성, 3) 직선성, 4) 진도, 5) 정밀도, 6) 회수율, 7) 범위, 8) 검출 한계, 9) 정량 한계, 10) 감도, 11) 견고성, 12) 적합성, 13) 매트릭스 오차, 14) 측정 불확도를 포함하고 있다(Table 2). 이와 같이 IUPAC 가이드라인에서는 다른 기관들에 비해서 다소 많은 검증요인들을 제시하고 있는데 이는 적용성, 적합성, 매트릭스 오차, 측정 불확도 등이 이에 해당된다.

2.2. Eurachem 가이드라인⁴

국제적으로 인정받는 표준 및 가이드라인을 개발하고, 분석화학 연구 및 분석실험실의 품질 보증 시스템을 향상시키는데 기여하고 있는 유럽(EU) 지역에 기반을 둔 기관인 Eurachem의 ‘The Fitness for Purpose of Analytical Methods’ 가이드라인은 IUPAC 가이드라인과 동일하게 단일 실험실 검증에 중점을 두고 있으며 정량 분석에 초점을 두고 있지만 선택성이나 검출 한계와 같은 정성 분석에 해당하는 부분도 포함되어 있다. 확립된 분석법이 있을 경우 해당 분석법을

안내하는 한편, 확립된 분석법이 없을 경우 분석법 유효성 확인에 필요한 과정을 소개하고 직접 분석법 유효성 확인을 수행할 수 있도록 안내하고 있다. Eurachem 가이드라인에서 사용하는 용어들은 International vocabulary of metrology,²⁰ ISO/IEC 17025, IUPAC 가이드라인에서 설명하는 용어들과 동일하게 서술하고 있다. 다른 가이드라인들과 차이점으로 분석법 유효성 확인이 먼저 수행되어야 하며 왜 필수적인지에 대한 추가적인 설명을 담고 있다. 가이드라인에 따르면 분석법 유효성 확인은 1) 개발된 분석법의 분석 목적에 대한 적합성을 제시할 때, 2) 새롭게 개발한 분석법이 기존에 존재하는 분석법과 동등한 결과를 얻을 수 있음을 나타낼 때 수행하는 것으로 되어있다. 분석법 유효성 확인이 필요한 이유로는 검증되지 않은 분석법으로 잘못된 결과를 얻었을 때 식품 분야의 손해 배상, 금지 약물로 인한 징계와 같은 문제들이 발생할 수 있기 때문이다. 신뢰할 수 있는 정확한 분석 결과를 얻기 위해 분석법 유효성 확인을 수행함으로써 분석법의 적합성과 불확실성이 평가되어야 한다. Eurachem 가이드라인에서 제안하는 분석법 유효성 확인 인자들로 1) 선택성, 2) 검출 한계와 정량 한계, 3) 범위, 4) 감도, 5) 진도, 6) 정밀도, 7) 측정 불확도, 8) 견고성을 포함하고 있다(Table 3).

2.3. ISO 가이드라인⁵

ISO의 ISO/IEC 17025 ‘General requirements for the competence of testing and calibration laboratories’ 가

Table 3. Performance characteristics commonly evaluated during method validation in Eurachem⁴

검증 인자	정의
선택성	· 매트릭스 내 유사한 특징을 가진 방해물질로부터 분석물질을 결정할 수 있는 정도 ²¹
검출 한계	· 분석물질의 존재 여부를 유의미하게 인지할 수 있는 농도
정량 한계	· 시험법에 의한 변화에도 수용가능한 정확·정밀도를 나타내는 농도
범위	· 수용 가능한 불확실성을 나타낼 수 있는 농도 구간
감도	· 측정량의 변화에 대한 기기 감응의 변화
진도	· 무한한 수의 결과값 평균치가 참조값에 가까운 정도
정밀도	· 실험값 간의 가까운 정도
측정 불확정도	· 측정 결과에 대한 수용 가능한 오차범위
견고성	· 실험 조건에 대한 의도적인 작은 변화에 영향을 받지 않는 정도

Table 4. General and specific requirements in ISO/IEC 17025⁵

요구 사항	내용
공정성	· 연구는 공정하게 수행되어야 하며 공정성을 보장하기 위해 구조화 및 관리되어야 함 · 실험실은 연구 활동의 공정성에 대해 책임져야 하며, 상업적, 재정적 또는 그 외 다른 압력이 공정성을 저해하지 않도록 해야 함
기밀유지	· 법적으로 집행 가능한 약속을 통해 연구 활동 중 획득 또는 생성한 정보에 대한 관리를 책임져야 함 · 법률 또는 계약에 의해 기밀 정보를 공개해야 하는 경우 법이 금지하지 않는 한 정보를 제공받는 고객 또는 개인에게 통보해야 함
조직구조	· 실험실은 법적 책임을 갖는 법인체 또는 법인체의 일부이어야 함 1) 실험실 조직 및 관리 구조, 조직에서의 속한 위치, 경영, 기술, 지원 부서와의 관계를 명시해야 함 2) 연구 결과에 영향을 미치는 작업을 수행, 관리 또는 검증하는 직원의 책임, 권한, 관계를 명시해야 함 3) 연구의 일관성 및 결과의 유효성을 보장하기 위해 절차를 문서화해야 함
인원	· 모든 직원은 공정 및 유능 해야 하며 실험실 관리 시스템을 따라야 함 · 실험실은 직원의 역량 요구 사항, 직원 선발, 교육, 감독, 인가, 모니터링에 대한 절차와 기록을 보유해야 함
장비	· 연구 활동을 정확하게 수행하기 위한 장비에 접근할 수 있어야 함 · 실험실은 요청, 입찰, 계약 검토를 위한 절차를 갖춰야 함
절차	1) 요구사항은 정의되고 문서화되며 이해되어야 함 2) 실험실은 요구사항을 충족할 수 있는 능력과 자원을 보유해야 함 3) 외부 인원이 포함될 경우, 외부 인원이 수행해야 할 활동을 고객에게 안내하고 동의를 얻어야 함 4) 적합한 방법 또는 절차가 선정되어야 하며, 고객의 요구 사항을 충족해야 함 · 후속 실험 또는 검정을 위해 시료 채취 계획을 세워야 함
시료 채취	1) 시료 또는 장소의 선택 2) 시료 채취 계획 3) 시험 또는 교정에 대한 요구항목을 위한 준비
분석법 유효성 확인	· 표준화되지 않은 방법, 실험실에서 개발한 방법, 기존 목적에 벗어난 실험 방법에 대하여 검증은 해야 함 1) 표준물질 또는 기준물질을 사용한 편향 및 정밀도 보정 2) 결과에 영향을 미치는 인자에 대한 평가 3) 실험 조건 변화를 통한 견고성 시험 4) 다른 검증된 방법과의 비교 5) 실험실 간 비교 6) 시험 방법의 이론적 이해 및 실무 경험을 통한 측정 불확정도 평가

이드라인의 특징은 실험실에서 갖춰야 할 전반적인 요인들에 대한 규정을 안내하고 있으며, 이러한 특징으로 다른 가이드라인들에서 ISO 가이드라인을 참고하도록 안내하고 있다. 공정성(impartiality), 기밀성

(confidentiality)과 같은 일반적인 요구사항부터 조직의 구조, 인적 자원, 실험 기기, 절차(process), 시료 채취에 대한 요구사항들을 포함하고 있다. 분석법 유효성 확인에 관한 규정은 절차 요구사항에 속한 부분으로 다

른 가이드라인들에 비해 포괄적인 내용으로 설명하고 있다. IUPAC, Eurachem 가이드라인과 달리 ISO 가이드라인에서는 실험실 간 비교(interlaboratory comparison) 항목이 포함되어 있으며, 또한 정확도, 측정 불확도, 검출 한계, 정량 한계, 선택성 등 다른 가이드라인에서 규정하는 분석법 유효성 확인 인자들에 대하여 검증 과정에 포함될 수 있으나 반드시 포함되도록 규정하지는 않고 있다(Table 4).

3. 분석법 유효성 확인 가이드라인 비교

IUPAC, Eurachem, ISO 가이드라인들이 산업 전반에 걸쳐 모든 실험실에서 수행되어야 하는 요인들을 안내하고 있다면, 각 연구 분야에 따른 분석 목적, 매트릭스의 조성, 규제 법안 등 서로 다른 기준을 충족시키기 위한 분야별 세부적인 가이드라인 또한 존재한다. 예를 들어, 식품 분야는 식품 내 성분의 조성, 잔류 농약의 허용치 준수, 식품 규제 기준 및 규격 관리,⁷⁻¹⁰ 의약품 분야는 원료와 제품의 품질, 순도, 효능 보장,¹¹⁻¹⁴ 생체 시료 분야는 시료 내 존재하는 분석물질을 정량하는 과정에서 분석 결과의 신뢰성을 보장하기 위해¹⁵⁻¹⁸ 연구가 수행되며 이에 따른 다양한 분석법 유효성 확인 인자들이 요구된다.

3.1. 식품 분석법 유효성 확인 가이드라인⁷⁻¹⁰

식품 분야의 대표적인 분석법 유효성 확인 가이드라인으로 AOAC의 ‘Guidelines for single laboratory validation dietary supplements and botanicals’, EC의 ‘SANTE 11312’, FAO의 ‘CODEX Alimentarius commission’이 사용되고 있으며, 우리나라의 식품의약품안전처에서도 ‘식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인’을 통해 분석법 유효성 확인의 규정을 마련하고 있다. 이들은 모두 식품 시료 분석의 신뢰성을 보증하기 위한 분석법 유효성 확인에 포함되어야 할 인자들을 제안하고 있으면서 조금씩 가이드라인의 성격이 다른 점을 볼 수 있다. AOAC는 성분의 함량, 규제 충족 여부, 구성 요소의 식별을 위해, EC는 EU에 유통되는 식품 및 사료에 존재하는 잔류 농약의 규제를 위해, 식품의약품안전처는 규격 관리와 안전 관리를 위해, CODEX는 소비자의 건강과 공정한 거래에 중점을 두고 있다. 이러한 차이점들로 인해 분석법 유효성 확인에 대하여 공통적으로 포함하고 있는 인자와 특정 가이드라인에서 언급되는 인자가 존재하

Table 5. Comparison of validation parameters for food analysis⁷⁻¹⁰

검증 인자	AOAC	MFDS	EC	CODEX
직선성	+	+	+	+
정밀도	+	+	+	+
정확도	+	+	-	+
진도	-	-	-	+
검출 한계	+	+	-	+
정량 한계	+	+	+	+
감도	+	+	-	+
매트릭스 효과	-	-	+	-
적용성	+	-	-	+
측정 불확정도	+	-	-	-
특이성	-	-	+	-
견고성	-	-	+	-
회수율	-	-	+	+

는 것을 확인할 수 있다(Table 5).

3.2. 의약품 분석법 유효성 확인 가이드라인¹¹⁻¹⁴

의약품 분야에서 분석법 유효성 확인의 목적은 의약품 및 기타 건강 관련 제품의 품질, 순도, 안정성, 일관성을 보장하기 위함으로 의약품의 제조 및 품질 관리에 관한 규제를 준수하도록 규정하고 있다. 대표적인 분석법 유효성 확인 가이드라인으로 USFDA의 ‘Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics’, WHO의 ‘WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparation’, USP의 ‘USP47-NF42’ 가이드라인들이 세계적으로 널리 사용되고 있으며, 식품의약품안전처에서도 ‘의약품등 시험 방법 밸리데이션 가이드라인’을 통해 분석법 유효성 확인 가이드라인을 제시하고 있다. 의약품 분야의 가이드라인들은 모두 동일한 목적을 가지고 있기 때문에 분석법 유효성 확인에 포함된 인자들이 동일하다는 특징을 보인다. 앞서 언급한 4개의 가이드라인 모두 1) 특이성, 2) 선형성, 3) 정확도, 4) 정밀도, 5) 범위, 6) 검출 한계, 7) 정량 한계, 8) 완전성, 9) 시스템 적합성을 제시하도록 규정한다.

3.3. 생체 시료 분석법 유효성 확인 가이드라인¹⁵⁻¹⁸

생체 시료는 성별, 연령, 식습관, 인종, 건강 상태에 따라 다양한 매트릭스의 변화를 나타내는 특징을 가지고 있다. 생체 시료에서의 정량 분석은 신약 개발에 필수적인 약물의 생체이용도(bioavailability), 생물학적 동등성(bioequivalence), 약동학(pharmacokinetic), 독성 동학(toxicokinetic)에 대한 평가는 물론 임상 현장에서

Table 6. Comparison of validation parameters for bioanalytical analysis¹⁵⁻¹⁸

검증 인자	EMA	USFDA	ICH	MFDS
검량선	+	+	+	+
정밀도	+	+	+	+
정확도	+	+	+	+
선택성	+	+	+	+
특이성	+	+	+	+
매트릭스 효과	+	+	+	+
감도	+	+	+	+
QC 시료 ¹⁾	+	+	+	+
안정성	+	+	+	+
캐리오버	+	+	+	+
희석의 타당성	+	+	+	+
회수율	-	+	+	+
재주입 재현성	-	-	+	+

1) Quality control samples for method validation

질병 진단을 위한 생체표지자(biomarker)를 발굴하는데 중요한 역할을 하고 있다. EMA의 ‘Guideline on bioanalytical method validation’, USFDA의 ‘Bioanalytical method validation guidance for industry’, ICH의 ‘ICH M10 – Bioanalytical method validation and study sample analysis’ 문서들이 분석법 유효성 확인을 위한 가이드라인으로 참고되고 있으며, 식품의약품안전처의 ‘생체 시료 분석법 밸리데이션 및 시험검체 분석 가이드라인’을 참고할 수 있다. 전반적으로 동일한 분석법 유효성 확인 인자들을 규정하고 있으며, 회수율과 재주입 재현성(Reinjection reproducibility) 포함 여부의 작은 차이를 보였다(Table 6).

4. 분석법 유효성 확인 기준 비교

모든 분석법 유효성 확인의 목적은 분석법이 의도한 목적에 적합하면서 얻어낸 결과에 대한 신뢰도를 제공할 수 있어야 한다는 것이다. 연구 분야에 따라서 다른 목적을 가지고 있기 때문에 분석법 유효성 확인을 구성하는 인자가 다르게 구성되어 있으며 해당 인자에 대한 허용 기준 또한 다른 모습을 보이고 있다. 그 중 공통적으로 포함되어 있는 대표적인 분석법 유효성 확인 인자들을 살펴보고자 한다.

4.1. 정확도

정확도는 주로 계통오차(systematic error)에 의해 정해지는 검증인자로 모든 기관들에서 분석법 유효성

확인을 위한 검증 인자로 제시하고 있는 바 가이드라인에 따라 진도(trueness)와 같이 혼용되기도 하는 인자로 실험을 통해 얻어낸 측정값이 이미 알고 있는 이론값이나 표준값에 근접한 정도를 말한다. 정확도를 평가하기 위한 방법으로 표준물질(Reference Material, RM) 또는 인증표준물질(Certified Reference Material, CRM)을 이용하는 방법과 실험실에서 제조한 물질을 사용하는 방법이 있다. 인증표준물질을 사용할 경우 안정성, 균질성, 편향(bias)에 대한 정보가 제공된다는 장점을 얻을 수 있지만 상업적으로 구매 가능해야 하며, 비용이 많이 들고, 분석 시료의 매트릭스 또는 농도와 일치하지 않을 수 있다는 단점이 존재한다. 정확도를 나타내는 방법은 주로 두 가지 방법, 회수율(recovery) 또는 편향으로 나타낸다.

$$\text{Accuracy (recovery)} = C_M/C_T \times 100 \%$$

$$\text{Accuracy (bias)} = (C_M - C_T)/C_T \times 100 \%$$

C_M , measured concentration

C_T , true (calculated) concentration

회수율로 표기할 경우 100%에 근접할수록, 편향으로 나타낼 경우 0에 근접할수록 좋은 정확도를 나타낸다. 일반적으로 분석하는 시료의 농도에 따라서 허용되는 정확도의 허용치를 다르게 규정하는데, 1 ppm ($\mu\text{g/g}$)에 대해서 AOAC에서는 75-120%, MFDS에서는 70-110%, CODEX에서는 80-110%로 제시하고 있으며 EC에서는 농도와는 상관없이 70-120%로 제시하고 있다(Table 7). 반면, 다양한 매트릭스에 의하여 영향을 받는 의약품, 생체 시료 분야에서는 더욱 세밀한 허용치를 규정하는 점을 볼 수 있다.

4.2. 정밀도

정밀도는 주로 우연오차에 의해 결정되는 검증인자로써 동일한 조건에서 반복된 측정값들이 서로 얼마나 일관되게 나타나는지 평가하는 항목으로, 측정값들 사이의 변동성을 측정하여 분석 결과의 재현성을 평가하는 지표이다. 이는 Horwitz 곡선에 기반으로 하고 있는데, Horwitz 곡선은 다양한 실험실에서 동일한 시료를 분석할 때 발생하는 결과의 변동성을 예측하여 특정 농도에 따른 예상 RSD값을 제공하고 있다.²² 정밀도는 편차(standard deviation) 또는 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)를 사용하여 나타내며, 값이 작을수록 높은 정밀도를 나타낸다. 정밀도는 가이드라인에서 제시하는 기준에 따라 반복 측정을 통해 얻은 데이터의 분산을 분석함으로써, 동일한 실험

Table 7. Comparison of validation parameter ‘accuracy’ in various guidelines⁷⁻¹⁸

가이드라인	측정 방법	허용치
식품 분야		
AOAC	· 시료 내 예상 농도의 1-2배 수준의 인증물질 또는 표준물질 첨가 · 회수율(%) ¹⁾ = $(C_f - C_u) \times 100 / C_a$	농도
		100 %
		10 %
		1 %
		0.1 %
		0.01 %
		10 µg/g
		1 µg/g
MFDS	· 일정한 양의 분석물질을 포함하는 CRM 분석 · 회수율(%) = 측정된 농도 / 인증값	허용치(%)
		98-101
		95-102
		92-105
		90-108
		85-110
		80-115
		75-120
EC	· 소량 첨가한 시료의 평균 회수율	10 ng/g
		70-125
		잔류 농약 또는 수의학 의약품
		농도 (µg/kg)
		허용치(%)
		≤ 1
		1-10
		60-120
CODEX	· 세부 분야의 가이드라인 허용치 사용 가능	70-120 %
		70-110
		70-110
		70-110
		70-110
		70-110
		70-110
		70-110
USFDA ²⁾	1) 기준물질 비교 - 알려진 순도의 분석물질을 이용하여 측정된 결과와 예상되는 이론값 비교 2) 소량 첨가 - 분석물질이 존재하지 않는 매트릭스에 알고 있는 양의 분석물질을 첨가하여 분석	식품 첨가제
		70-125 %
		70-120 %
		농도
		허용치(%)
		100 %
		98-102
		98-102
WHO	· 특정 농도 범위 내에서 설정 (예시, 3개의 농도에서 3회씩 반복 측정)	≥ 1 %
		97-103
		≥ 0.1 %
		95-105
		100 mg/kg
		90-107
		10 mg/kg
		80-110
MFDS	· 활성 의약 성분의 경우 1) 참값을 알고 있을 경우 - 분석법 유효성 확인을 위한 실험 방법 적용 2) 정확도가 알려진 기존 시험 방법을 사용할 경우 - 분석법 유효성 확인을 위한 실험 방법의 결과와 기존 시험 방법의 결과 비교 · 제형 성분의 경우 - 제형 성분 혼합물에 활성 의약 성분을 첨가하여 분석법 유효성 확인 시료로 사용	1 mg/kg
		80-110
		100 µg/kg
		80-110
		10 µg/kg
		60-115
		1 µg/kg
		40-120
USP	· 최소한 3개의 농도 수준에서 9회 측정 (예시, 3개의 농도에서 3회씩 반복 측정)	1 µg/kg
		40-120
		의약품 분야
		USFDA ²⁾
		WHO
		MFDS
		USP
		생체 시료 분야
EMA, USFDA, ICH, MFDS	1) 실험 내 정확도 · 4개의 QC 농도 ³⁾ 에서 농도 당 최소 5회 반복 측정	· 오차범위 15 % 이내 (LLOQ에서 20 % 이내)
	2) 실험 간 정확도 · 2일 이상 다른 날 4개의 QC 농도 당 최소 3회 반복 측정	

1) C_f, the concentration of the fortified; C_u, the concentration of unfortified; C_a, the calculated (not analyzed) concentration of analyte added
 2) Accuracy evaluate method from ICH Q2 guideline
 3) QC control concentrations, LLOQ, low QC (within three times the LLOQ), medium QC (30-50% of calibration range), high QC (at least 75% of the upper calibration curve range)

Table 8. Comparison of validation parameter 'precision' in various guidelines⁷⁻¹⁸

가이드라인	측정 방법	허용치		
식품 분야				
AOAC	<ul style="list-style-type: none"> · 동일한 날, 다른 시간, 다른 매트릭스, 다른 농도에서 반복 측정 · 다른 시간 동안 10배 정도 농도 차이가 나는 시료 배치 간 반복 분석을 수행 후 표준 편차 계산 (반복 분석 셋트는 서로 다른 날 수행) · $RSD_r^{(1)} = C^{-0.15}$ (C, mass fraction) 	농도		
		100 %	재현성 (RSD _r)	
		10 %	1 %	
		1 %	1.5 %	
		0.1 %	2 %	
		0.01 %	3 %	
		10 µg/g	4 %	
1 µg/g	6 %			
10 ng/g	8 %			
		15 %		
MFDS	<ul style="list-style-type: none"> · 반복성 (RSD_r): 동일한 실험자, 기기, 실험실, 조건으로 단시간 내에 평가 · 재현성 (RSD_R): 다른 실험자, 기기, 실험실에서 동일한 시험 조건으로 평가 	잔류농약 또는 수의학 의약품 농도 (µg/kg)		
		≤1	CV% (실험실 내)	CV% (실험실 간)
		1-10	36	54
		10-100	32	46
		100-1000	22	34
		> 1000	18	25
		분석 횟수	14	19
	≥5	≥3		
	식품첨가제 RSD _r ≤ 20 %, RSD _R ≤ 25 %			
EC	<ul style="list-style-type: none"> · 소량 첨가한 시료의 RSD_r 평가 · 실험실 간 상대표준편차 (RSD_{WR}) 평가 	· RSD _r , RSD _{WR} ≤ 20 %		
CODEX	· RSD _R 평가	ML ¹⁾ ≥ 0.1 mg/kg, HORRAT _r ²⁾ ≤ 2 ML < 0.1 mg/kg, RSD _R < 22 %		
의약품 분야				
USFDA, USP, MFDS	· 시험법 규정하는 범위에 해당하는 농도에서 최소 9회 측정 또는 시험법 규정 농도의 100%에서 최소 6회 측정 (예시, 3개 농도에서 3회 반복 측정)	-		
WHO	<ol style="list-style-type: none"> 1) 반복성 : 동일한 실험자, 기기, 실험실, 조건으로 단시간 내에 평가 2) 중간 정밀도 : 실험실 내에서 다른 실험자, 다른 기기로 측정 3) 재현성 : 실험실 간 정밀도 측정 	· 재현성이 평가된다면 중간 정밀도는 생략할 수 있음		
생체 시료 분야				
EMA, USFDA, ICH, MFDS	<ol style="list-style-type: none"> 1) 실험 내 정밀도 2) 실험 간 정밀도 <ul style="list-style-type: none"> · 4개의 QC 농도에서 농도 당 최소 5회 반복 측정 · 2일 이상 다른 날 4개의 QC 농도 당 최소 3회 반복 측정 	· 오차범위 15 % 이내 (LLOQ에서 20 % 이내)		

1) ML, maximum level

2) Acceptable values for repeatability are between 1/2 and 2 times the calculated values (HORRAT_r)²²

조건에서의 반복성(repeatability), 다른 실험자 또는 다른 기기를 사용하는 조건에서의 재현성(reproducibility) 등 여러 형태로 평가할 수 있다(Table 8). 정확도의 평가와 유사하게 농도에 따른 허용치를 확인할 수 있는데, 1 ppm (µg/g)에 대해서 AOAC에서는 8%, MFDS에서는 14% (실험실 내)와 19% (실험실 간), CODEX에서

는 22%로 제시하고 있으며 EC에서는 농도와는 상관 없이 20%이하로 제시하고 있다. 특히, LLOQ 수준에서 분석을 수행해야 하는 생체 시료 가이드라인의 경우 다른 농도에 비해 낮은 농도에서 나타날 수 있는 불확정도로 인해 LLOQ에서는 허용치를 높게 제안하고 있다.

$$\text{Standard deviation (SD)} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Relative standard deviation (RSD\%)} = (\text{SD}/\bar{x} \times 100 \%)$$

x_i : represents each measured value
 \bar{x} : the mean of the measured values
 n : the number of measurements

4.3. 검량선 범위 및 직선성

검량선은 분석 대상 물질의 농도와 분석 기기의 감응 간의 관계를 나타낸 그래프이다. 정량 분석을 위해서는 검량선의 범위가 지정되어야 하며, 해당 범위 내에서는 신뢰할 수 있는 수준의 정확도, 정밀도, 직선성이 제시되어야 한다. 검량선 제작 시 기울기와 절편 값, 직선의 상관 계수(correlation coefficient), 잔차 제곱의 합(residual sum of square)을 제시하며, 검량선을 작성하는 방법 및 허용치는 가이드라인에서 제시하는 기준을 따를 수 있다(Table 9). 가이드라인 별 검량선을 구성하는 최소한의 농도 수를 제안하고 있는데, 식품 분야인 AOAC와 MFDS에서는 각각 6-8개와 최소 5개 농도, 의약품 분야(USFDA, USP, MFDS)에서는

최소 5개 이상, 생체 시료 분야(EMA, USFDA, ICH, MFDS)에서는 공시료와 LLOQ를 포함한 최소 6개 농도 측정을 요구하고 있다. 또한, 허용치로는 상관계수가 0.99 이상(AOAC), 각 농도별 편차 20% 이하 (EC), 오차범위 15% 이내(EMA, USFDA, ICH, MFDS) 등을 규정하고 있다. 정량 분석의 결과는 항상 검량선 범위 내에서 결과를 얻어야 하며, 선형 구간을 벗어난 경우 외삽(extrapolation)하여 계산할 수 없으며 검량선의 범위를 넓혀 다시 작성해야 한다.

4.4. 검출 한계 및 정량 한계

검출 한계와 정량 한계를 평가하는 방법은 대표적으로 3가지로 구분할 수 있다.^{3,4,6,8,12} 첫 번째는 실험자의 시각적 평가에 근거하는 방법으로, 이미 알고 있는 양의 분석물질이 포함된 시료를 분석한 뒤 분석물질을 확실하게 검출할 수 있을 때와 정확도와 정밀도를 제시할 수 있는 가장 낮은 농도 일 때 각각 검출 한계와 정량 한계로 제시할 수 있다. 두 번째는 신호 대 잡음 비(signal-to-noise ratio, S/N)에 근거하는 방법이다. 바탕선에 잡음이 있는 경우에 사용할 수 있는 방법으로, 바탕선에 나타나는 잡음의 크기와 분석물질

Table 9. Comparison of validation parameter ‘calibration curve and linearity’ in various guidelines⁷⁻¹⁸

가이드라인	측정 방법	허용치
식품 분야		
AOAC	· 농도 범위 내에서 균등하게 분포된 6-8개 농도에서 무작위 순서로 2회씩 반복 분석	· 높은 상관계수 (0.99 이상)
MFDS	· 농도 범위 내 균등하게 분포되고 개별적으로 준비된 최소 5개 농도에서 측정 · 예상치의 0-150% 또는 50-150% 농도 범위 사용	· 직선은 $y = ax + b$ 로 나타내야 함 · 직선성이 낮다면 원인 규명 또는 직선성이 나타나는 농도 범위 사용
EC	· 3개 농도 이상 측정하는 것이 선호 · 보정 모델 (회귀 분석, 가중치) 적용	· 각 농도 별 편차 $\leq 20\%$ · 추출을 마친 바탕시료, 시료와 동일한 매트릭스 사용
의약품 분야		
USFDA, USP, MFDS	· 직선성 평가를 위해 최소 5개 농도 이상 측정 · 직선성은 시각적 평가로 우선 평가 후 통계 모델 적용하여 평가	1) 함량 분석 : 측정 농도의 80-120% 범위 2) 유연물질 시험 : 허용치의 50-120% 범위 3) 균일성 시험 : 시험 농도의 70-130% 범위 4) 용해 시험 : 특정 범위의 $\pm 20\%$ 범위
WHO	· 5-6개 농도에서 절편, 기울기, 상관 계수 측정	-
생체 시료 분야		
EMA, USFDA, ICH, MFDS	· 공시료 ¹⁾ , 영시료 ²⁾ 와 LLOQ를 포함한 최소 6개 농도 측정 · 검량선에 사용되는 매트릭스는 시료의 매트릭스와 동일해야 함 · 농도와 감응도의 관계는 단순 회귀 모델 (simple regression model)에 적합해야 함	· 오차범위 15% 이내 (LLOQ에서 20% 이내) · 측정 농도의 75% 개수 이상, 6개 농도 이상 기준 충족

1) Blank, a sample without analyte and internal standard
 2) Zero calibrator, a blank with internal standard

Table 10. Summary of evaluation methods for 'selectivity and specificity'^{3,9,15}

종류	평가 방법	허용치
크로마토그래피 분해능	$R_s = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ R_s : 분해능 t_1, t_2 : 두 피크의 머무름 시간 (분) W_1, W_2 : 분석물질과 가장 가까운 피크의 너비	일반적으로 $R_s = 1.5$ 값을 목표로 하며, 최소한 $R_s = 1.0$ 일 때 허용
바탕 시료	최소한 6개의 서로 다른 출처로부터 얻은 시료의 매트릭스를 측정	· 공시료와 영시료에서 분석물질 및 내부표준물질의 머무름시간에 대한 방해가 없어야 함 · 공시료에서 내부표준물질에 대한 감응은 검량선 시료 또는 QC 시료의 5%를 초과해서는 안됨 · 최소 이온 수
피크 순도	· LRMS 1) Single MS - 스캔 모드, 제한된 m/z 범위, SIM 2) MS/MS - SRM, MRM, mass resolution for precursor ion isolation equal to or better than unit mass resolution · HRMS - 스캔 모드, 제한된 m/z 범위, SIM, 전구 이온 선택 여부 및 조각화 여부	1) Single MS : 3 ions 2) MS/MS : 2 product ions 3) HRMS : 2 ions (mass accuracy ≤ 5 ppm) · LRMS 시료의 정량 이온과 정성 이온의 상대 비율 오차는 검량선 시료의 비율 30% 이내 · HRMS 분석물질의 precursor 및 product ion 피크는 완전하게 일치해야 함

LRMS, low resolution MS; HRMS, high resolution MS

SIM, selected ion monitoring; SRM, selected reaction monitoring; MRM, multiple reaction monitoring

이 내는 신호의 비를 이용하여 산출한다. 일반적으로, 검출 한계의 경우 $S/N=2-3$ 일 때, 정량 한계의 경우 $S/N=10$ 이상 일 때로 규정한다. 마지막으로 가장 일반적으로 사용되고 있는 방법으로써 통계적 방법에 기초한 표준 편차 (σ)와 기울기 (S)를 이용하는 방법이다. 감응의 표준 편차는 검출 한계로 예상되는 농도를 가진 검체를 7회 분석하여 얻은 결과값의 표준 편차를 의미하며, 기울기는 분석물질의 감응도에 따른 기울기로 몇 가지 농도를 갖는 검량선을 작성하여 기울기를 얻어낼 수 있다. 이 경우에 얻어진 검출 한계와 정량 한계는 이론적인 값이기 때문에 반드시 해당 농도의 표준물질을 시료에 소량 첨가한 후 S/N 을 확인하는 과정(보통 S/N 가 2-3 정도)이 필요한데 값이 너무 큰 경우에는 농도를 낮추어 소량 첨가하여 확인하고, S/N 이 너무 작은 경우 (2 이하)에는 더 높은 농도를 소량 첨가하여 다시 검출 한계와 정량 한계를 설정함이 필요하다.

$$\text{Limit of detection} = 3.3 \times \sigma/S$$

$$\text{Limit of quantification} = 10 \times \sigma/S$$

 σ : the standard deviation of the response S : the slope of calibration curve

4.5. 선택성 및 특이성

시료의 매트릭스, 불순물, 분해 산물, 대사체 등 다

양한 요인들이 방해물질로 간섭을 일으킬 수 있다. 선택성 및 특이성은 분석물질을 정량하는 과정에서 방해물질의 간섭으로부터 분석물질을 구분해낼 수 있는지 평가한다. 해당 신호가 분석물질인지 판단하기 위한 방법으로 크로마토그래피의 분해능(resolution), 질량분석기(mass spectrometer)의 peak purity 시험 등 다양한 방법을 통해 평가가 수행될 수 있다(Table 10). 특히, 의약품 분야에서 방해물질에 대한 평가를 엄격하게 다루고 있으며 방해물질의 표준물질을 사용할 수 있는 경우, 방해물질을 소량 첨가함으로써 평가할 수 있으며 표준물질을 사용할 수 없는 경우에는 가혹 시험과 같은 다른 검증된 시험 방법으로 측정된 결과와 비교하여 나타낼 수 있다(Table 11).²³ 가혹 시험은 가수분해, 산화, 열 분해, 광 분해에 의해 발생하는 의약품 성분 및 제형의 분해 경로를 밝혀내며 생성되는 분해 산물의 구조를 밝히는데 목적이 있다. 신약과 같이 기존에 연구되지 않은 구조를 가진 화합물에 대한 구조의 안정성 및 약품의 안전성에 대한 정보를 얻는데 용이하며, 이를 통해 의약품에 대한 적절한 제형, 보관 조건 및 유통 기한을 선정하는 근거가 될 수 있다.²⁴

4. 결 론

본 연구를 통해 산업 전반에 걸쳐 연구의 기준을

Table 11. Examples for forced degradation studies²³

가혹 시험 종류	실험 방법	보관 조건	실험 기간 (일)
가수 분해	Control API	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	0.1 M HCl	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	0.1 M NaOH	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Acid control	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Base control	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	pH 2, 4, 6, 8	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
산화	3 % H ₂ O ₂	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	Peroxide control	25 °C, 60 °C	1, 3, 5
	AIBN	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
	AIBN control	40 °C, 60 °C	1, 3, 5
빛	Light 1 × ICH ¹⁾	NA	1, 3, 5
	Light 3 × ICH	NA	1, 3, 5
	Light control	NA	1, 3, 5
온도	Heat Chamber	60 °C	1, 3, 5
	Heat Chamber	60 °C / 75 % RH	1, 3, 5
	Heat Chamber	80 °C	1, 3, 5
	Heat Chamber	80 °C / 75 % RH	1, 3, 5
	Heat control	RT	1, 3, 5

1) ICH Q1B stability testing: photostability testing of new drug substances and products

API, active pharmaceutical ingredient; AIBN, azobisisobutyronitrile; NA, not acceptable; RH, relative humidity; RT, room temperature

제시하는 IUPAC, Eurachem, ISO 가이드라인과 함께 식품, 의약품, 생체 시료 분야의 대표적인 가이드라인을 살펴보았다. 산업 전반에 걸친 가이드라인들은 분석법 유효성 확인에 대한 기본적인 틀은 물론 시험 방법뿐만 아니라 시료의 채취부터 조직의 관리까지 폭 넓게 규정하는 특징을 살펴볼 수 있었으며 분야별 세부 가이드라인에서는 특정 산업의 요구사항과 규제 표준을 준수하기 위한 규정들을 살펴볼 수 있었다. 각 세부 분야별 가이드라인의 특징으로 식품 분야에서는 Horwitz ratio를 기반으로 분석물질의 농도에 따른 정밀도에 대한 허용치를 제안하며, 제약 분야에서는 선택성 및 특이성을 명확하게 하기 위한 시험들이 잘 나타났다. 마지막으로 생체 시료 분야에서는 매트릭스에 의한 간섭에 대하여 다른 분야보다 더욱 엄격한 기준을 제안하는 특징을 볼 수 있었다. 이러한 비교를 통해 모든 분야에서 분석법 유효성 확인을 통해 결과의 신뢰성을 보장하고자 하는 공통점과 더불어 각 분야에서 강조하는 검증 인자에 대하여 살펴볼 수 있었다. 분석법 유효성 확인 과정은 지속적인 검토와 함께 분석기술의 발전 및 새로운 규제 환경의 변화에 맞춰 조절되어야 한다. 본 연구를 통해 분석법 유효성 확인의 중요성과 산업 별 가이드라인의 특징을 이해하고 비교하는데 도움이 되어 향후 분석법 개발 및 적

용에 있어 기준이 될 수 있을 것으로 생각한다.

References

1. P. L. Garcia, E. Buffoni, F. P. Gomes, and J. L. V. Quero, 'Analytical Method Validation', InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/21187>
2. 명승운, '분석법검증 지침서 개발 연구', 식품의약품안전청, 2011.
3. IUPAC, 'Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis', IUPAC Technical Report, 2002.
4. Eurachem, 'The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics', Eurachem, 2014.
5. ISO/IEC 17025:2017, 'General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories', International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission, 2017.
6. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 'ICH Harmonised Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2(R2)', 2022.

7. AOAC International, 'Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals', AOAC International, Gaithersburg, MD, 2002.
8. 식품의약품안전평가원, '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인', 2016.
9. European Commission, 'SANTE/11312/2021 v2', 2021
10. Codex Alimentarius Commission, 'Procedural Manual 2023', Codex Alimentarius Commission, 2023.
11. US FDA, 'Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics', 2015.
12. 식품의약품안전평가원, '의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서', 2015.
13. WHO Expert Committee, 'Specifications for Pharmaceutical Preparations', 2019.
14. US Pharmacopeia and national Formulary, 'USP 47-NF 42', United States Pharmacopeial Convention, 2019.
15. European Medicines Agency, 'Guideline on Bioanalytical Method Validation', 2011.
16. US FDA, 'Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry', 2018.
17. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 'ICH M10: Bioanalytical Method Validation', 2022.
18. 식품의약품안전평가원, '생체시료 분석법 밸리데이션 및 시험 검체 분석 가이드라인', 2023.
19. 한국인정기구, '화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침 KOLAS-G-015', 2020.
20. Joint Committee for Guides in Metrology, 'International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms', 3rd ed., JCGM, 2012.
21. J. Vessman, R. I. Stefan, J. F. V. Staden, K. Danzer, W. Linder, D. T. Burns, A. Fajgelj and H. Muller, *Pure Appl. Chem.*, **73**(8), 1381-1386 (2001). <https://doi.org/10.1351/pac200173081381>
22. W. Horwitz and R. Albert, *J. AOAC Int.*, **89**(4), 1095-1109 (2006) <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>
23. M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati and Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.* **4**(3), 159-165 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>
24. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 'ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)', 2003.

Authors' Positions

Jongsung Noh : Graduate Student
 Seung-Woon Myung : Professor