

비임상시험관리기준 시스템에서 고성능액체크로마토그래피 분석법 정확도 검증의 필요성

양수빈^{1,*} · 김창열^{2,†}

¹대구가톨릭대학교 화학물질독성평가학과, 대학원생

²대구가톨릭대학교 화학물질독성평가학과, 교수

(2024년 2월 29일 접수: 2024년 3월 21일 수정: 2024년 3월 27일 채택)

Necessity of high-performance liquid chromatography validation in good laboratory practice systems

Su Bin Yang^{*} · Changyul Kim[†]

Department of Toxicity Assessment, Daegu Catholic University

(Received February 29, 2024; Revised March 21, 2024; Accepted March 27, 2024)

요약 : 비임상시험관리기준에서 독성시험 전 분석법 밸리데이션은 농도 설정 및 시료 제조 측면에서 중요하다. 시험기관에서는 의뢰받은 시험물질 2종에 대한 밸리데이션을 고성능액체크로마토그래피를 이용하여 수행한 결과 특이성, 시스템 적합성, 직선성, 일내 재현성, 균질성, 안정성, 농도분석, 품질관리를 판정 기준에 만족하는 분석방법을 확립 및 검증하였다. 하지만 의뢰기관의 시험성적서상 표준물질 함량은 시험기관의 결과보다 1.34배, 1.17배 높은 결과로 나타나 비임상시험관리기준에 적합한 분석법 밸리데이션을 통한 결과 도출이 신뢰성과 안정성 확보 측면에서 중요함을 확인하였다.

주제어 : 비임상시험관리기준, 밸리데이션, 품질관리, 신뢰성, 고성능액체크로마토그래피

Abstract : In good laboratory practice (GLP), analytical method validation prior to toxicity testing is important in terms of concentration setting and sample preparation. The testing agency performed validation of the two requested test substances using high-performance liquid chromatography (HPLC), and as a result, the analysis satisfied the criteria for specificity, system suitability, linearity, intra-day reproducibility, homogeneity, stability, concentration analysis, and quality control. The method was established and validated. However, the content of standard substances in the test report of the requesting institution was found to be 1.34 and 1.17 times higher than the results of the testing institution, confirming that deriving results through validation of analysis methods suitable for GLP is important in terms of securing reliability and stability.

[†]Corresponding author

(E-mail: cykim0813@cu.ac.kr)

* This article is a revision of the first author's master's thesis from University.

Keywords : Good laboratory practice, Validation, Quality control, Reliability, high performance liquid chromatography

1. 서론

비임상시험관리기준 또는 우수실험실운영기준 (Good Laboratory Practice, GLP)은 비임상시험 실시기관 등에서 수행하는 시험의 계획, 실행 점검, 기록, 보고되는 체계적 과정과 이와 관련된 관련 사항들을 규정하는 것으로 탈리도마이드 (thalidomide) 사건이 발생한 원인으로 도입된 제도이다[1,2]. 탈리도마이드는 1950년 후반과 1960년 초반에 유럽, 호주, 일본에서 임산부의 메스꺼움을 치료하기 위한 입덧 방지제로 널리 사용되었다[3]. 탈리도마이드를 복용한 임산부가 낳은 1만 명 정도의 신생아에게서 선천적으로 팔 다리가 결손 되거나 짧은 상태로 태어나는 해표 지증(phocomelia)이 나타났으며 시간이 지나 임신기간 중 탈리도마이드 복용이 원인임이 밝혀졌다[4,5]. 그 결과, 탈리도마이드 비극은 미국과 국제 규제 기관이 체계적인 독성시험절차를 개발하도록 하는 촉매 역할을 하면서 약물 독성시험 절차에 있어 중요한 전환점이 되었다. 이렇게 제정된 GLP는 우리나라에도 국제 수준의 의약품 안전성 확보 및 국내 비임상시험의 국제적인 상호인정을 위해 2003년부터 의약품의 경우 비임상시험의 GLP가 의무화되었다[2]. 의약품 이외에도 의약품, 화장품, 의료기기, 건강 기능성식품, 생활화학물질, 농약 등에서 안전성 평가를 위해 시험에 대한 신뢰성을 확보하기 위해 식품의약품안전처, 환경부 및 농촌진흥청으로 인증받아 진행되어야 한다. 또한, 경제협력개발기구(organization for economic cooperation and development, OECD)에서 GLP는 산업용 화학물질 및 조제용 물질의 안전성과 관련된 신뢰할 수 있는 고품질 테스트 데이터 생성을 보장하는 것으로 OECD 회원국이 OECD 시험지침과 GLP 원칙을 준수해 시험 결과를 도출해 낸 경우 생물학적 안전성 시험자료의 국가 간 자료상호인정(mutual acceptance of data, MAD)을 하여 상충되거나 중복되는 국가 요구 사항을 피하고 국가 당국 간의 협력을 위한 공통 기반을 제공한다[6]. OECD

의 GLP 적용 품목은 계속해서 확대되고 있으므로 안전성 확보에 대한 국제적 신뢰성 제고를 위하여 GLP를 적용해야만 하고 이에 따라 시간과 비용을 절감시킬 수 있는 등 GLP에 대한 중요성이 강조된다.

GLP에서는 독성시험, 변이원성, 분석, 기타시험으로 크게 나누어져 있는데 단회투여와 같이 일회성으로 끝나는 시험방법과 여러번 투여하는 반복투여의 경우, 짧게는 4주, 길게는 90일간 장기로 진행하게 된다[7]. 이에 반복투여의 경우, 시험물질을 정량 분석하는 데에 사용되는 방법이 신뢰성과 재현성이 있다는 것을 증명하고 문서화하는 분석법 밸리데이션(validation)을 수행하여 투여물질 조제 횟수를 정하고 시험성적서(certificate of analysis, COA)를 참고하여 지표 물질의 함량 결과를 토대로 투여 농도의 정확성을 확인할 수 있다. 그렇기에 GLP에서는 분석법 밸리데이션이 중요한데 이는 시험물질의 품질관리를 위한 시험방법의 타당성을 미리 확인하는 과정임에도 불구하고 시험물질의 특성 확인을 계약된 시험기관이나 시험의뢰자가 수행할 수 있고 혼합상태의 시험물질 및 대조물질에 대한 분석도 필수가 아니어서 건강기능식품, 의약품 등 안정성 시험자료를 제출할 때 필수 조건이 아니다[8]. 그렇기에 대부분 시험물질에 대한 분석 성적서를 의뢰자가 제공하고 있으나[9] 분석 성적서의 정확성이 보장되지 않으면 시험물질에 포함되어 있는 표준물질에 대한 함량 차이로 인하여 실험동물에게 투여되는 농도가 달라져 결과적으로 정확한 독성시험자료를 생산할 수 없는 문제점이 발생할 수 있다.

따라서, 본 연구는 GLP 기관에 의뢰된 시험물질에 대한 표준품의 함량이 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 의뢰기관에서 수행한 함량 결과와 GLP에서 수행한 함량 결과의 일치성을 확인하고자 하였으며, GLP 시험수행 중 정확성 및 신뢰성 있는 분석법 밸리데이션의 필요성과 중요성을 알리고자 수행하였다.

2. 실험

2.1. 시험물질

의뢰기관에서 받은 시험물질은 건강기능식품으로 부형제인 멸균증류수에 현탁이 되는 물질로 의뢰기관의 비밀 유지에 따라 물질명을 암호화로 알파벳 대문자로 표시하였다. 물질 A는 갈색 분말 형태이고, 물질 B는 녹색 분말 형태이다.

2.2. 시약 및 재료

각 시험물질의 표준품은 암호화한 시험물질의 소문자로 나타내었다. 표준품 a (A의 표준품), phosphoric acid는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 표준품 b (B의 표준품)는 PhytoLab(Vestenbergsgreuth, Germany)에서 구매하여 사용하였다. 이동상으로 사용한 acetonitrile, water, methanol은 J.T.Baker (Avantor, Pennsylvania, USA)에서 구매하였고, formic acid는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)에서 구매하였으며, tetrahydrofuran은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd(Osaka, Japan)에서 사용하였다. 부형제로 멸균증류수는 중외제약사(서울, 한국)의 제품을 사용하였다.

2.3. 표준용액의 조제 및 검량선 시료 조제

2.3.1. 표준품 a

표준품 a를 methanol에 녹여 0.1 mg/ml 용액을 만들고, 계열 희석하여 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ g/ml 농도의 표준용액을 제조하였다. 최종적으로 0.45 μ m 필터로 여과한 후 2 ml 씩 바이알에 담아 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 표준물질의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였다.

2.3.2. 표준품 b

표준품 b를 methanol에 녹여 0.5 mg/ml 용액을 만들고, 계열 희석하여 500, 250, 125, 62.5, 31.25 μ g/ml 농도의 표준용액을 제조하였다. 최종적으로 0.45 μ m 필터로 여과한 후 2 ml 씩 바이알에 담아 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 표준물질의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였다.

2.4. 시료 전처리

2.4.1. 물질 A

농도별 조제물을 50 ml 용량 플라스크에 일정량 채취하여 tetrahydrofuran 5 ml에 용해 후 5분간 초음파처리 후 실온에서 식히고 methanol로 표선까지 맞췄다. 이 용액을 0.45 μ m 나일론 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

2.4.2. 물질 B

농도별 조제물을 50 ml 용량 플라스크에 일정량 채취하고 methanol 48 ml에 용해 후 20분간 초음파처리 후 실온에서 냉각하고 methanol로 표선까지 맞췄다. 이 용액을 0.45 μ m 나일론 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

2.5. HPLC 분석조건

분석에 사용된 HPLC는 Waters(Milford, MA, USA)의 2998 photodiode detector(PDA)가 장착된 Alliance E2695를 사용하였으며, 시험물질 A와 표준품 a의 구체적인 분석조건은 Table 1과 같고, 시험물질 B / 표준품 b의 구체적인 분석조건은 Table 2와 같다.

2.6. 밸리데이션 항목

2.6.1. 특이성(Specificity)

분석대상물질인 조제물이 혼재 상태에서 선택적으로 정확하게 분석할 수 있는 식별능력을 확인하기 위하여 이동상, 희석용매, 부형제 및 조제물을 각 1회 측정하여 분석물질의 머무름시간과 같은 위치에서 간섭 피크의 유무를 확인하여 분석물질의 피크가 정량에 충분한 형상을 나타내며 분석물질과 같은 머무름시간에서 간섭 피크가 없는 것을 확인하였다.

2.6.2. 시스템 적합성(System suitability)

HPLC 시스템의 수행능력을 보증하는데 필수적으로 시험방법의 유형과 환경 조건과 무관하게 시스템이 제대로 기능하여 분석조건에서 분석시료의 측정 가능 여부를 확인하기 위한 것으로 분석물질을 5회 반복 측정하여 피크 면적과 머무름시간 정밀성을 산출하여 피크 면적과 머무름시간의 정밀성을 확인하였으며, 판정기준은 피크 면적과 머무름시간의 정밀성이 5% 이하인 것으로 하였다.

Table 1. Optimized process parameters for chromatographic condition of A

| | | | |
|-------------------------|---|------|------|
| HPLC | Waters Alliance E2695 (2998 PDA), USA | | |
| Column | SYMMETRY 100-5-C18 (4.6*250mm, 5 μ m) | | |
| Column temperature | 35 $^{\circ}$ C | | |
| Mobile phase | Gradient elution | | |
| | (A) 0.1% Formic acid in acetonitrile | | |
| | (B) 0.1% Formic acid in water | | |
| | Time(min) | A(%) | B(%) |
| | 0 | 10 | 90 |
| | 10 | 60 | 40 |
| | 17 | 100 | 0 |
| | 30 | 100 | 0 |
| 35 | 10 | 90 | |
| 40 | 10 | 90 | |
| Flow rate | 0.7 ml/min | | |
| Injection volume | 10 μ l | | |
| Autosampler temperature | Room temperature | | |
| Detector | Photodiode array detector (PDA) | | |
| Wavelength | 450 nm | | |

Table 2. Optimized process parameters for chromatographic condition of B

| | | | |
|-------------------------|---|------|------|
| HPLC | Waters Alliance E2695 (2998 PDA), USA | | |
| Column | waters sunfire C18 (4.6*250mm, 5 μ m) | | |
| Column temperature | 30 $^{\circ}$ C | | |
| Mobile phase | Gradient elution | | |
| | (A) Acetonitrile | | |
| | (B) 0.1% Formic acid in water | | |
| | Time(min) | A(%) | B(%) |
| | 0 | 14 | 86 |
| | 15 | 14 | 86 |
| | 20 | 90 | 10 |
| | 30 | 90 | 10 |
| 30.5 | 14 | 86 | |
| 40 | 14 | 86 | |
| Flow rate | 0.6 ml/min | | |
| Injection volume | 5 μ l | | |
| Autosampler temperature | Room temperature | | |
| Detector | Photodiode array detector (PDA) | | |
| Wavelength | 360 nm | | |

2.6.3. 직선성(Linearity)

분석하고자 하는 시험물질이 농도에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 표준시료를 사용하여 정량한계 농도 이상의 표준용액을 5개 이상의 농도별로 희석하여 각 1회 측정하고 HPLC로 분석한 피크 면적값으로 검량선을 측정하고, 결정계수 R^2 값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 판정 기준은 결정계수 R^2 값이 0.99 이상이고, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

2.6.4. 일내 재현성(Intra-day reproducibility)

분석대상물질의 농도에 대한 재현성을 확인하여 시험방법을 표준화하기 위하여 조제물의 중층에서 3회 채취하여 시료 당 1회 측정하여 정량값의 정밀성과 정확성을 확인하였다. 판정기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

2.6.5. 균질성(Homogeneity)

분석대상물질의 농도에 대한 균질성을 확인하여 정밀성을 평가하기 위하여 조제물의 상층, 중층 및 하층에서 각 3회 채취하여 시료 당 1회 측정하여 정량값의 정밀성과 정확성을 확인하였다. 중층의 결과는 일내 재현성 항목의 분석 결과 및 안정성 항목의 조제 직후 분석 결과로 사용하였다. 판정 기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

2.6.6. 완건성(Robustness)

분석대상물질의 품질 특성 변화를 확인하기 위하여 특정 조건과 시간에서 조제물이 안정하다는 것을 확인하기 위하여 실온, 냉장, 오토샘플러 내에서의 안정성을 확인하였으며, 모든 항목의 판정 기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 초기 농도에 대한 변동율은 $\pm 20\%$ 이내인 것으로 하였다.

2.6.6.1. 실온 안정성

조제물을 실온에서 3시간 이상 방치 후 중층에서 각 3회 채취하고 시료 당 1회 측정하여 안정성을 확인하여 정량값의 정밀성, 초기 농도에 대한 변동율을 확인하였다.

2.6.6.2. 냉장 안정성

조제물을 냉장 조건 ($2\sim 8^{\circ}\text{C}$)에서 3일 및 7일

보관 후, 중층에서 각 3회 채취하고 시료 당 1회 측정하여 안정성을 확인하여 정량값의 정밀성, 초기 농도에 대한 변동율을 확인하였다.

2.6.6.3. 오토샘플러 내에서의 안정성

오토샘플러 내에서의 안정한 시간을 확인하기 위해 일내 재현성 측정에 사용한 시료를 오토샘플러 내에 일정 시간 방치 후 이를 재측정하여 정량값의 정밀성, 초기 농도에 대한 변동율을 확인하였다.

2.7. 농도분석(Analysis of concentration)

투여개시일과 투여 마지막 주 조제물의 농도를 확인하기 위해 조제물의 3 등 분체를 시료 당 1회 측정하여 정량값의 정밀성과 정확성을 확인하였으며, 판정 기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

2.8. 품질관리(Quality control, QC)

기기의 분석조건의 타당성을 보증하기 위해 품질관리 시료를 분석 종료 시에 3회 측정하여 정량값의 정밀성과 정확성을 확인하였다. 판정 기준은 정량값의 정밀성은 10% 이하, 정확성은 85~115%인 것으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 특이성

특이성은 이동상 물질, 희석용매, 부형제 등 분석물질 이외에 분석에 사용되는 모든 용매들이 분석물질과 같은 머무름시간에 간섭피크가 없는 것을 확인하고자 하였으며, 또한 분석물질이 선택적으로 정확하게 분석이 가능한지 확인하기 위해 수행하였다. 이번 연구에서는 이동상인 acetonitrile 및 water, 희석용매인 methanol, 부형제인 멸균 증류수 및 조제물을 각 1회 측정한 결과에서 분석물질의 피크가 정량에 충분한 형상을 나타내었다. 또한, 분석에 사용된 용매의 경우에 분석물질과 같은 머무름시간에서 간섭피크가 없는 것을 확인하였다. 이는 용매에 대한 간섭피크를 확인을 통해 표준물질 및 분석물질에 대한 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있을 뿐만 아니라 특이성을 통해 피크에 대한 결과값의 신뢰성 및 정확성을 제공할 수 있다.

3.2. 시스템 적합성

분석법 밸리데이션을 수행하기 위해서는 HPLC 기계의 정밀성이 반드시 확인되어야 한다. 이는, GLP 규정 지침에 따라 데이터 생성 및 측정 또는 평가에 사용되는 모든 장비는 검증을 거쳐 장비에 대한 적절한 설계와 용량을 갖추고 의도한 대로 일관되게 작동하는지 확인해야만 한다 [10]. 그 중 정밀성이란 균질한 시험물질을 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 측정값들에 대한 근접성을 나타내는 것으로 만약, HPLC 기계의 정밀성이 확인되지 않는다면 측정값에 대한 신뢰성을 확인할 수 없을 것이다. 특히, 피크 면적의 정밀성이 확보되지 않았다면 분석값의 정확성 또한 신뢰할 수 없을 것이다. 그렇기에 시스템 적합성은 QC 시료인 표준품 시료를 5회 연속 측정하여 피크 면적과 머무름시간 확인을 통해 HPLC 기계 성능의 문제가 없을 확인하기 위해 수행되었다. 따라서 시스템적합성은 모든 Batch No.에서 수행되어야 한다. 그 결과, 표준품을 5회 반복 측정하여 정밀

성을 산출 한 결과 물질 A의 피크면적에 대한 정밀성은 0.31~1.55%, 머무름시간에 대한 정밀성은 0.02~0.04%로 나타났다(Table 3). 또한, 물질 B의 피크면적에 대한 정밀성은 0.36~4.40%, 머무름시간에 대한 정밀성은 0.11~0.32%로 나타났다(Table 4). 따라서 A, B 모두 정밀성 5% 이하의 판정 기준을 만족하였다. 다만, 미국 FDA 크로마토그래프법 밸리데이션 지침에 따르면 시스템정밀성의 허용기준을 1%로 권장하고 있으며 유럽약전의 경우 주입횟수에 따라 시스템정밀성의 허용기준을 달리 정하고 있다 [11,12]. 실제, 비임상시험에서 용량 제제 분석, 검증 또는 검체 분석에 대한 규제 지침은 없다 [13]. 우리나라의 경우 정밀성은 비임상기관의 표준작업지침서에 따라 달리 정하고 있기에 보다 정확성 있는 결과값을 도출해내기 위해서는 관련 부처 및 비임상시험기관에서의 토의와 연구를 통해 명확한 가이드라인을 제시해 줄 필요성이 있다.

Table 3. System suitability tests for A

| Batch No. | Classification | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | Mean | Precision(%) |
|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| 1 | Peak area | 1,110,734 | 1,115,157 | 1,117,179 | 1,121,224 | 1,123,322 | 1,117,523 | 0.40 |
| | RT (min) | 22.390 | 22.377 | 22.381 | 22.390 | 22.371 | 22.382 | 0.03 |
| 2 | Peak area | 940,494 | 941,760 | 937,016 | 934,675 | 947,084 | 940,206 | 0.45 |
| | RT (min) | 22.167 | 22.178 | 22.171 | 22.176 | 22.176 | 22.174 | 0.02 |
| 3 | Peak area | 879,373 | 880,126 | 881,091 | 885,955 | 885,190 | 882,347 | 0.31 |
| | RT (min) | 22.191 | 22.168 | 22.176 | 22.182 | 22.169 | 22.177 | 0.04 |
| 4 | Peak area | 1,047,671 | 1,061,381 | 1,061,616 | 1,065,855 | 1,066,395 | 1,060,584 | 0.64 |
| | RT (min) | 22.161 | 22.177 | 22.167 | 22.165 | 22.169 | 22.168 | 0.02 |
| 5 | Peak area | 805,567 | 812,175 | 817,873 | 820,178 | 822,801 | 815,719 | 0.76 |
| | RT (min) | 22.215 | 22.200 | 22.208 | 22.208 | 22.212 | 22.209 | 0.02 |
| 6 | Peak area | 1,061,633 | 1,083,849 | 1,064,073 | 1,033,193 | 1,068,238 | 1,062,197 | 1.55 |
| | RT (min) | 22.272 | 22.256 | 22.261 | 22.243 | 22.251 | 22.257 | 0.04 |

Batch No. 1 : Intra-day reproducibility,

Batch No. 2 : Room temperature and autosampler stability

Batch No. 3 : Refrigerated 4-day stability

Batch No. 4 : Refrigerated 7-day stability

Batch No. 5 : First day of dosing

Batch No. 6 : Last day of dosing

RT : Retention Time

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Table 4. System suitability tests for B

| Batch No. | Classification | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | Mean | Precision(%) |
|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| 1 | Peak area | 1,093,451 | 1,096,335 | 1,094,693 | 1,103,306 | 1,099,459 | 1,097,449 | 0.36 |
| | RT (min) | 11.067 | 11.055 | 11.040 | 11.077 | 11.053 | 11.058 | 0.13 |
| 2 | Peak area | 1,014,852 | 1,022,407 | 1,092,013 | 1,091,548 | 1,114,052 | 1,066,974 | 4.23 |
| | RT (min) | 11.048 | 11.056 | 11.060 | 11.078 | 11.076 | 11.064 | 0.12 |
| 3 | Peak area | 1,040,966 | 1,121,815 | 1,127,504 | 1,041,923 | 1,063,166 | 1,079,075 | 3.95 |
| | RT (min) | 11.158 | 11.219 | 11.196 | 11.200 | 11.215 | 11.198 | 0.22 |
| 4 | Peak area | 1,011,692 | 1,023,460 | 1,030,134 | 1,027,377 | 1,029,185 | 1,024,370 | 0.74 |
| | RT (min) | 11.074 | 11.057 | 11.067 | 11.090 | 11.070 | 11.072 | 0.11 |
| 5 | Peak area | 1,072,519 | 1,070,860 | 1,072,471 | 1,070,984 | 1,069,656 | 1,071,298 | 0.11 |
| | RT (min) | 10.843 | 10.830 | 10.836 | 10.781 | 10.832 | 10.824 | 0.23 |
| 6 | Peak area | 961,225 | 963,670 | 1,048,272 | 1,025,774 | 1,050,949 | 1,009,978 | 4.40 |
| | RT (min) | 10.957 | 10.946 | 10.883 | 10.884 | 10.900 | 10.914 | 0.32 |

Batch No. 1 : Intra-day reproducibility,

Batch No. 2 : Room temperature and autosampler stability

Batch No. 3 : Refrigerated 4-day stability

Batch No. 4 : Refrigerated 7-day stability

Batch No. 5 : First day of dosing

Batch No. 6 : Last day of dosing

RT ; Retention Time

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

3.3. 직선성

표준시료를 활용한 직선성의 경우 상관계수 (R^2)가 1에 가까울수록 독립변수가 종속변수를 설명하는 척도로 활용될 수 뿐만 아니라 표준시료의 희석이라는 항목을 통해 시험을 수행하는 연구원의 숙련도로 같이 확인할수 있는 방법이다. 따라서, 일내 재현성, 상온 안정성, 냉장 4일 안정성, 냉장 7일 안정성, 실험동물 투여 개시일, 투여 마지막날 표준품 a를 매번 칭량 후 희석하여 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 μ g/mL로 검량선 범위로 설정하여 HPLC로 분석하고 피크 면적에 대한 농도의 관계를 나타내는 표준검량선을 작성하였으며 검량선의 상관계수 (R^2)는 0.9978~0.9998, 정확성은 94.3~107.8%로 나타났다(Table 5). 또한 표준품 b를 31.250, 62.500, 125.000, 250.000, 500.000 μ g/mL로 검량선 범위로 설정하여 HPLC로 분석하여 표준검량선을 작성한 결과 R^2 값은 0.9978~1.0000,

정확성은 86.9~106.3%로 나타났다(Table 6). 따라서 A, B 모두 결정계수 R^2 0.99 이상, 정확성 85~115%의 판정 기준을 만족하였다.

3.4. 일내 재현성

일내 재현성은 조제물의 증층에서 3회 채취한 시료를 분석하여 얻어진 값으로 균질성, 상온 안정성 및 오토샘플러 안정성, 냉장 4일 및 7일에 대한 기준값으로 활용된다. 분석물질의 농도에 대한 일내 재현성을 확인한 결과 A의 저농도 및 고농도에 대한 정량값의 정밀성은 각각 0.18% 및 0.09%, 정확성은 각각 90.2% 및 91.3%로 나타났다(Table 7). 또한 B의 저농도 및 고농도에 대한 정량값의 정밀성은 각각 0.04% 및 0.19%, 정확성은 각각 100.5% 및 99.5%로 나타났다(Table 8). 따라서 정밀성 10% 이하, 정확성 85~115%의 판정 기준을 만족하였다.

Table 5. Linearity for A

| Batch No. | Nominal Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | Peak area | Measured Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | Accuracy(%) |
|---|--|-------------|---|-------------|
| 1 | 3.125 | 249585.786 | 3.176 | 101.6 |
| | 6.250 | 530323.703 | 6.086 | 97.4 |
| | 12.500 | 1122986.766 | 12.230 | 97.8 |
| | 25.000 | 2364463.066 | 25.100 | 100.4 |
| | 50.000 | 4899198.509 | 51.376 | 102.8 |
| $y=99510.5428x-94705.1999, R^2=0.9998$ | | | | |
| 2 | 3.125 | 192369.686 | 3.223 | 103.1 |
| | 6.250 | 420425.152 | 5.956 | 95.3 |
| | 12.500 | 917906.470 | 11.919 | 95.4 |
| | 25.000 | 2007599.261 | 24.98 | 99.9 |
| | 50.000 | 4357791.367 | 53.15 | 106.3 |
| $y=89321.5738x-151387.1056, R^2=0.9988$ | | | | |
| 3 | 3.125 | 184215.335 | 3.233 | 103.5 |
| | 6.250 | 404233.646 | 5.919 | 94.7 |
| | 12.500 | 894328.954 | 11.901 | 95.2 |
| | 25.000 | 1957072.264 | 24.872 | 99.5 |
| | 50.000 | 4308077.957 | 53.568 | 107.1 |
| $y=88427.2458x-163692.2563, R^2=0.9984$ | | | | |
| 4 | 3.125 | 236850.351 | 3.184 | 101.9 |
| | 6.250 | 504747.742 | 6.078 | 97.2 |
| | 12.500 | 1067985.442 | 12.161 | 97.3 |
| | 25.000 | 2230829.045 | 24.721 | 98.9 |
| | 50.000 | 4788064.896 | 52.34 | 104.7 |
| $y=97284.7268x-119196.0860, R^2=0.9991$ | | | | |
| 5 | 3.125 | 161434.421 | 3.231 | 103.4 |
| | 6.250 | 372073.320 | 5.953 | 95.2 |
| | 12.500 | 823797.847 | 11.789 | 94.3 |
| | 25.000 | 1832143.837 | 24.818 | 99.3 |
| | 50.000 | 4081523.330 | 53.881 | 107.8 |
| $y=84047.8825x-174223.1717, R^2=0.9980$ | | | | |
| 6 | 3.125 | 224114.041 | 3.122 | 99.9 |
| | 6.250 | 491504.511 | 6.401 | 102.4 |
| | 12.500 | 948386.414 | 12.002 | 96.0 |
| | 25.000 | 1933994.861 | 24.086 | 96.3 |
| | 50.000 | 4264430.215 | 52.657 | 105.3 |
| $y=85927.8383x-92365.8577, R^2=0.9978$ | | | | |

Batch No. 1 : Intra-day reproducibility,

Batch No. 2 : Room temperature and autosampler stability

Batch No. 3 : Refrigerated 4-day stability

Batch No. 4 : Refrigerated 7-day stability

Batch No. 5 : First day of dosing

Batch No. 6 : Last day of dosing

Accuracy(%) = Measured concentration / Nominal concentration \times 100

Table 6. Linearity for B

| Batch No. | Nominal Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | Peak area | Measured Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | Accuracy(%) |
|--|--|-------------|---|-------------|
| 1 | 31.250 | 274420.422 | 30.334 | 97.1 |
| | 62.500 | 553837.995 | 62.591 | 100.1 |
| | 125.000 | 1099261.162 | 125.556 | 100.4 |
| | 250.000 | 2183507.996 | 250.724 | 100.3 |
| | 500.000 | 4338882.514 | 499.545 | 99.9 |
| $y=8662.3404x+11653.5720, R^2 =1.0000$ | | | | |
| 2 | 31.250 | 283036.880 | 27.151 | 86.9 |
| | 62.500 | 565533.063 | 63.276 | 101.2 |
| | 125.000 | 1092013.440 | 130.600 | 104.5 |
| | 250.000 | 2009522.183 | 247.927 | 99.2 |
| | 500.000 | 3979158.373 | 499.796 | 100.0 |
| $y=7820.0929x+70709.7971, R^2 =0.9996$ | | | | |
| 3 | 31.250 | 262965.800 | 28.932 | 92.6 |
| | 62.500 | 496823.911 | 57.651 | 92.2 |
| | 125.000 | 1029181.644 | 123.025 | 98.4 |
| | 250.000 | 2191781.643 | 265.794 | 106.3 |
| | 500.000 | 4044791.506 | 493.348 | 98.7 |
| $y=8143.2003x+27363.8378, R^2 =0.9978$ | | | | |
| 4 | 31.250 | 249234.870 | 30.384 | 97.2 |
| | 62.500 | 514692.000 | 63.373 | 101.4 |
| | 125.000 | 1014137.867 | 125.440 | 100.4 |
| | 250.000 | 2011923.048 | 249.436 | 99.8 |
| | 500.000 | 4029120.788 | 500.117 | 100.0 |
| $y=8046.8848x+4737.7905, R^2 =1.0000$ | | | | |
| 5 | 31.250 | 266935.776 | 33.134 | 106.0 |
| | 62.500 | 521108.537 | 62.383 | 99.8 |
| | 125.000 | 1056791.531 | 124.025 | 99.2 |
| | 250.000 | 2135319.749 | 248.135 | 99.3 |
| | 500.000 | 4333396.050 | 501.073 | 100.2 |
| $y=8690.1492x-21006.0705, R^2 =0.9999$ | | | | |
| 6 | 31.250 | 232069.946 | 30.994 | 99.2 |
| | 62.500 | 495256.751 | 63.020 | 100.8 |
| | 125.000 | 1026981.855 | 127.723 | 102.2 |
| | 250.000 | 2030580.282 | 249.846 | 99.9 |
| | 500.000 | 3998850.043 | 489.356 | 97.9 |
| $y=8020.9834x+2682.2431, R^2 =0.9998$ | | | | |

Batch No. 1 : Intra-day reproducibility,

Batch No. 2 : Room temperature and autosampler stability

Batch No. 3 : Refrigerated 4-day stability

Batch No. 4 : Refrigerated 7-day stability

Batch No. 5 : First day of dosing

Batch No. 6 : Last day of dosing

Accuracy(%) = Measured concentration / Nominal concentration \times 100

Table 7. Intra-day reproducibility of A

| Batch No. | Nominal Concentration (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| Low dose | 50 | 50.293 | 50.257 | 50.271 | 50.274 | 0.04 | 100.5 |
| High dose | 200 | 199.429 | 198.857 | 198.714 | 199.000 | 0.19 | 99.5 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

Table 8. Intra-day reproducibility of B

| Batch No. | Nominal Concentration (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| Low dose | 62.5 | 56.250 | 56.448 | 56.382 | 56.360 | 0.18 | 90.2 |
| High dose | 250 | 228.175 | 228.307 | 228.571 | 228.351 | 0.09 | 91.3 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

3.5. 균질성

일반적으로 실험동물에게 투여 직전 시험물질을 강한 진동으로 혼합액을 섞거나 현탁시켜 투여를 실시한다. 하지만 시험물질을 부형제에 녹였을 때 균질성이 확보되지 않고 시험물질의 높이에 따라 농도 차이가 있다면 채취하는 위치에 따라 실험동물에게 투여되는 농도는 차이가 있을 수 있다. 따라서, 시험물질의 유효성 및 안정성 자료를 확인하기 위해서는 균질성 또한 검토되어야 한다. 혼합물의 층별 균질성을 확인하기 위해 분석물질을 상층, 중층, 하층을 채취 후 분석한 결과 A의 저농도 및 고농도에 대한 정량값의 정밀성은 각각 0.09% 및 0.80%, 정확성은 각각 100.4~100.5% 및 98.5~99.4%로 나타났다(Table 9). 또한 B의 저농도 및 고농도에 대한 정량값의 정밀성은 각각 0.30% 및 0.45%, 정확성은 각각 89.7~90.2% 및 91.6~92.1%로 나타났다(Table 10). 따라서 정밀성 10% 이하, 정확성 85~115%의 판정 기준을 만족하였다.

3.6. 완건성

상온 및 냉장 조건, 오토샘플러 내에서 부형제와 혼합상태에서 안정성을 확인하기 위해 분석물질을 분석한 결과 A의 저농도 및 고농도의 실온 3시간 안정성에 대한 정량값의 정밀성은 각각

0.20% 및 0.06%, 초기 농도에 대한 변동을 각각 -1.3% 및 5.9%로 나타났으며, 냉장 4일 안정성의 정량값의 정밀성은 각각 0.69% 및 0.30%이었고, 초기 농도에 대한 변동률은 각각 -6.1% 및 -10.8%이었으며, 냉장 7일 안정성의 정량값의 정밀성은 각각 0.46% 및 0.19%, 초기 농도에 대한 변동을 각각 3.4% 및 6.0%로 나타났다. 오토샘플러 내에서 안정성 정량값의 정밀성은 각각 0.71% 및 0.03%이었고, 초기 농도에 대한 변동을 각각 -1.6% 및 0.4%로 나타냈다(Table 11). 또한 B의 실온 3시간 안정성에 대한 정량값의 정밀성은 각각 1.02% 및 2.82%, 초기 농도에 대한 변동을 각각 6.8% 및 6.7%로 나타났으며, 냉장 4일 안정성 정량값의 정밀성은 각각 1.14% 및 5.47%이었고, 초기 농도에 대한 변동을 각각 6.0% 및 -1.5%이었으며, 냉장 8일 안정성의 정량값의 정밀성은 각각 0.41% 및 3.41%로 나타났고, 초기 농도에 대한 변동을 각각 6.6% 및 1.4%로 나타났다. 오토샘플러 내에서 안정성 정량값의 정밀성은 각각 1.07% 및 0.78%이었고, 초기 농도에 대한 변동을 각각 8.5% 및 2.5%로 나타냈다(Table 12). 따라서 정밀성 10% 이하, 초기 농도에 대한 변동을 ±20%의 판정 기준을 만족하였다.

Table 9. Homogeneity of A

| Batch No. | Formulated Concentration (mg/mL) | Layer | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|-----------|----------------------------------|--------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| | | | Low dose | 50 | Upper | | | |
| | | Middle | 50.293 | 50.257 | 50.271 | 50.274 | 0.09 | 100.5 |
| | | Lower | 50.193 | 50.286 | 50.257 | 50.245 | 0.09 | 100.5 |
| High dose | 200 | Upper | 200.857 | 200.057 | 200.143 | 198.759 | 0.80 | 99.4 |
| | | Middle | 199.429 | 198.857 | 198.714 | 197.962 | 0.80 | 99.0 |
| | | Lower | 197.571 | 197.343 | 195.857 | 196.924 | 0.81 | 98.5 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

Table 10. Homogeneity of B

| Batch No. | Formulated Concentration (mg/mL) | Layer | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|-----------|----------------------------------|--------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| | | | Low dose | 62.5 | Upper | | | |
| | | Middle | 56.250 | 56.448 | 56.382 | 56.360 | 0.30 | 90.2 |
| | | Lower | 56.217 | 56.151 | 56.316 | 56.228 | 0.30 | 90.0 |
| High dose | 250 | Upper | 228.571 | 228.307 | 229.497 | 229.115 | 0.45 | 91.6 |
| | | Middle | 228.175 | 228.307 | 228.571 | 229.277 | 0.45 | 91.7 |
| | | Lower | 229.497 | 229.762 | 231.349 | 230.203 | 0.45 | 92.1 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

Table 11. Robustness of A.

| Batch No. | Nominal Concentration (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| Initial | 50 | 50.293 | 50.257 | 50.271 | 50.274 | 0.04 | — |
| | 200 | 199.429 | 198.857 | 198.714 | 199.000 | 0.19 | — |
| Room Temperature 3 hrs | 50 | 49.514 | 49.671 | 49.700 | 49.629 | 0.20 | -1.3 |
| | 200 | 210.771 | 210.714 | 210.971 | 210.819 | 0.06 | 5.9 |
| Refrigerator 4 days | 50 | 46.959 | 47.130 | 47.589 | 47.226 | 0.69 | -6.1 |
| | 200 | 176.976 | 177.988 | 177.771 | 177.579 | 0.30 | -10.8 |
| Refrigerator 7 days | 50 | 52.259 | 51.875 | 51.822 | 51.985 | 0.46 | 3.4 |
| | 200 | 210.525 | 211.220 | 211.221 | 210.989 | 0.19 | 6.0 |
| Autosampler 20 hrs | 50 | 49.121 | 49.464 | 49.829 | 49.471 | 0.71 | -1.6 |
| | 200 | 199.800 | 199.686 | 199.800 | 199.762 | 0.03 | 0.4 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

Table 12. Robustness of B

| Batch No. | Nominal Concentration (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| Initial | 62.5 | 56.250 | 56.448 | 56.382 | 56.360 | 0.18 | — |
| | 250 | 228.175 | 228.307 | 228.571 | 228.351 | 0.09 | — |
| Room Temperature 3 hrs | 62.5 | 59.557 | 60.185 | 60.780 | 60.174 | 1.02 | 6.8 |
| | 250 | 244.841 | 250.000 | 236.376 | 243.739 | 2.82 | 6.7 |
| Refrigerator 4 days | 62.5 | 59.061 | 59.821 | 60.417 | 59.766 | 1.14 | 6.0 |
| | 250 | 239.153 | 218.915 | 216.931 | 225.000 | 5.47 | -1.5 |
| Refrigerator 7 days | 62.5 | 60.251 | 60.251 | 59.821 | 60.108 | 0.41 | 6.6 |
| | 250 | 226.984 | 240.608 | 226.852 | 231.481 | 3.41 | 1.4 |
| Autosampler 20 hrs | 62.5 | 60.847 | 61.905 | 60.714 | 61.155 | 1.07 | 8.5 |
| | 250 | 232.407 | 235.979 | 233.466 | 233.951 | 0.78 | 2.5 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

Table 13. Analysis of concentration of A

| Batch No. | Formulated Concentrations of test substance (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|---------------------|---|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| First day of dosing | 50 | 49.673 | 50.185 | 50.559 | 50.139 | 0.89 | 100.3 |
| | 100 | 104.547 | 104.351 | 104.424 | 104.441 | 0.09 | 104.4 |
| | 200 | 212.447 | 210.017 | 211.832 | 211.432 | 0.60 | 105.7 |
| Last day of dosing | 50 | 50.986 | 50.930 | 50.951 | 50.955 | 0.06 | 101.9 |
| | 100 | 95.278 | 98.986 | 97.436 | 97.233 | 1.92 | 97.2 |
| | 200 | 211.801 | 199.826 | 203.912 | 205.180 | 2.97 | 102.6 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

3.7. 농도분석

90일 반복독성시험은 실험동물에게 90일 연속으로 시험물질에 투여한다. 그렇기에 제조되어진 농도의 정확성을 확인하기 위해 농도분석을 수행하여야 하며 농도분석을 한 시험물질을 실험동물에게 투여한다면 농도의 정확성 또한 확보할 수 있을 것이다. 따라서 90일 반복독성을 시작하는 첫주와 마지막주 조제된 시험물질의 농도분석 실시하고 농도의 정확성이 판정기준을 만족한다면 그 사이에 제조한 농도 또한 정확한 농도를 제조해 투여하였다고 가정할 수 있을 것이다. 따라서, 혼합물의 농도 정확성 확인을 위해 투여 개시일

과 투여 마지막 날의 분석물질을 분석한 결과 A의 투여개시일의 정량값의 정밀성은 0.09~0.89%, 정확성은 100.3~105.7%로 나타났고, 투여 마지막 날의 정량값의 정밀성은 0.06~2.97%, 정확성은 97.2~102.6%로 나타났다(Table 13). 또한 B의 투여개시일의 정량값의 정밀성은 0.40~1.85%, 정확성은 94.7~98.4%로 나타났고, 투여 마지막 날의 정량값의 정밀성은 0.23~1.45%, 정확성은 91.4~110.1%로 나타났다(Table 14). 따라서 정밀성 10% 이하, 정확성 85~115%의 판정 기준을 만족하였다.

Table 14. Analysis of concentration of B

| Batch No. | Formulated Concentrations of test substance (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|---------------------|---|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| First day of dosing | 62.5 | 58,896 | 59,292 | 59,325 | 59,171 | 0.40 | 94.7 |
| | 125 | 121,561 | 125,595 | 121,759 | 122,972 | 1.85 | 98.4 |
| | 250 | 238,492 | 245,899 | 239,815 | 241,402 | 1.64 | 96.6 |
| Last day of dosing | 62.5 | 68,618 | 68,485 | 69,378 | 68,827 | 0.70 | 110.1 |
| | 125 | 121,561 | 123,942 | 125,066 | 123,523 | 1.45 | 98.8 |
| | 250 | 227,910 | 228,968 | 228,439 | 228,439 | 0.23 | 91.4 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

Table 15. Quality controls of A

| Batch No. | Nominal Concentration (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|--|-------------------------------|--------------------------------|--------|--------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| Intra-day reproducibility | 12.5 | 12.106 | 12.049 | 11.956 | 12.037 | 0.63 | 96.3 |
| Room temperature and autosampler stability | 6.25 | 5.993 | 5.962 | 5.932 | 5.962 | 0.51 | 95.4 |
| Refrigerated 4-day stability | 12.5 | 12.053 | 11.944 | 11.953 | 11.983 | 0.50 | 95.9 |
| Refrigerated 7-day stability | 12.5 | 12.317 | 12.258 | 12.267 | 12.281 | 0.26 | 98.2 |
| First day of dosing | 12.5 | 12.474 | 12.364 | 12.368 | 12.402 | 0.50 | 99.2 |
| Last day of dosing | 12.5 | 12.632 | 12.506 | 12.008 | 12.382 | 2.66 | 99.1 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

3.8. 품질관리

분석법 밸리데이션에서 마지막 시험 항목으로 품질관리 시료를 3회를 측정하는 이유는 시스템 적합성이 통과되었지만, 이후 직선성 및 시험물질들의 분석 상황 시 기계적인 오류나 혹시 모를 다른 이상이 있는 것을 확인하기 위함이다. 따라서, 마지막에 알고 있는 표준품을 활용하여 얻어진 값의 정확성이 확보된다면 시스템적합성과 품질관리 사이 시험물질의 분석에 이상이 없다는 것을 의미하는 것이며 분석의 결과 또한 신뢰성 있다는 것을 이야기한다. 품질관리 또한 시스템적

합성과 동일하게 모든 Batch, No, 마지막 분석항목으로 수행되어야 한다. 그 결과, 최종적으로 이상 유무를 확인하기 위해 밸리데이션 후, 실험 동물 투여 개시일, 투여 마지막날 분석물질을 표준품을 분석한 결과 A의 정량값의 정밀성은 0.26~2.66%, 정확성은 95.4~99.2%로 나타났다 (Table 15). 또한 B의 정량값의 정밀성은 0.29~6.23%, 정확성은 95.0~106.4%로 나타났다 (Table 16). 따라서 정밀성 10% 이하, 정확성 85~115%의 판정 기준을 만족하였다.

Table 16. Quality controls of B

| Batch No. | Nominal Concentration (mg/mL) | Measured concentration (mg/mL) | | | Mean (mg/mL) | Precision (%) | Accuracy (%) |
|--|-------------------------------|--------------------------------|---------|---------|--------------|---------------|--------------|
| | | No. 1 | No. 2 | No. 3 | | | |
| Intra-day reproducibility | 125 | 123.500 | 126.900 | 126.500 | 125.633 | 1.48 | 100.5 |
| Room temperature and autosampler stability | 125 | 133.400 | 122.700 | 134.100 | 130.067 | 4.91 | 104.1 |
| Refrigerated 4-day stability | 125 | 124.300 | 124.500 | 125.000 | 124.600 | 0.29 | 99.7 |
| Refrigerated 7-day stability | 125 | 128.300 | 128.200 | 142.600 | 133.033 | 6.23 | 106.4 |
| First day of dosing | 125 | 125.700 | 126.300 | 139.900 | 130.633 | 6.15 | 104.5 |
| Last day of dosing | 125 | 117.600 | 118.100 | 120.400 | 118.700 | 1.26 | 95.0 |

Precision(%) = (Standard Deviation, SD) / Mean × 100

Accuracy(%) = Mean of the measured concentration / Nominal concentration × 100

3.9. 분석법 밸리데이션의 중요성 및 의뢰기관과 분석기관의 시험성적서 함량 차이

분석법 밸리데이션은 무엇보다도 다양한 분석 항목을 통해 시험물질의 안정성 확보를 위해 수행되어 진다. 특히, 90일 반복독성 시험수행시 시험물질의 상온 및 오토샘플러 안정성, 냉장 안정성 등이 확보된다면 시험물질의 조제 횟수 및 조제 후 투여 시간을 조정할 수 있을 뿐만 아니라 균질성 확보는 시험물질 채취 위치에 따라 차이나는 농도 오차를 줄일 수 있다. 또한, 90일 투여 시작주에 실시하는 농도분석을 통해 시험물질 농도 정확성을 검증할 수 있을 뿐만 아니라 투여 마지막주 농도분석을 확인하여 13주 동안 조제된 시험물질의 재현성도 확보할 수 있다. 다만, 분석법 밸리데이션은 GLP 시험에서 필수 항목으로 지정되어 있지 않다.

GLP 기관은 시험성적서 결과에 대한 재현성 및 신뢰성을 확보하고자 의뢰자가 제공한 분석 방법에 입각하여 시험을 진행한다. HPLC 기계는 다를지 모르지만 사용된 표준품의 Cat #, 컬럼 종류, 흡광도 등 분석에 필요한 대부분의 항목은 똑같이 수행된다. 이번 분석법 밸리데이션 진행 결과에서 시험물질 A, B 모두 밸리데이션 항목의 판정 기준을 만족하는 결과를 얻었고 A에서는 함량 3.5 mg/g, B에서는 함량 6.3 mg/g를 확인하

였다. 하지만 의뢰기관에서 제공한 시험성적서에서는 A 함량이 4.7 mg/g, B 함량이 7.4 mg/g로 분석기관의 결과와 차이를 보였다. 이는 GLP기관과 의뢰기관의 분석방법에서 한가지 다른 점이 있을 수 밖에 없는데 이것은 시험물질의 전처리 방법으로 의뢰기관에서는 시험물질을 대부분 유기용매에 바로 녹여 여과 후 시험물질을 분석하지만 GLP 기관의 경우 실험동물에게 투여되는 시험물질의 안정성을 확인하기 위해 수행되기 때문에 부형제에 녹여진 시험물질을 채취하여 분석을 수행하여야 한다. 그 결과 유기용매 부피 퍼센트가 차이가 있을 수 밖에 없고 표준물질이 녹는 성상에 따라 함량에 차이가 있을 수도 있다. 함량의 차이는 마지막에 산출 되어진 유효성 및 안정성 결과의 정확성에 대해 영향을 미칠 수 밖에 없다.

미국 FDA 및 OECD에서는 시험물질의 농도를 결정하는데 사용되는 분석법 밸리데이션에 GLP가 적용되지 않고 있지만[14] 비임상에서의 약동학(pharmacokinetic) 및 독성동태학(toxicokinetic) 연구에서도 안전한 의약품의 가용성을 보장하기 위해 GLP 규정을 사용하여 수행되고 있고 국제 GLP 규정에서 투여 전 시험물질의 농도, 균질성/균일성 및 안정성들에 대해 필요성을 요구하고 있다[15,16].

따라서, 시험성적서 정확성 및 신뢰성을 확보하고자 의뢰자가 제공한 분석방법을 통해 시험물질 조제 및 투여가 이루어지는 분석기관인 GLP에서의 분석법 밸리데이션과 농도분석이 필요함을 확인하였다.

4. 결론

본 연구는 GLP에서 분석법 밸리데이션의 중요성을 밝히기 위하여 의뢰기관 2곳에서 각각 의뢰받은 분석시료 A, B와 이에 해당하는 표준품인 a, b를 이용하여 HPLC-PDA를 이용한 분석법 밸리데이션을 수행하였다. 그 결과 특이성, 시스템 적합성, 직선성, 일내 재현성, 균질성, 안정성, 농도분석, 품질관리 모두 GLP 기관 내 표준작업 지침서에 부합 하였지만 의뢰기관에서 분석기관인 GLP에 제출한 시험성적서와 함량 차이를 확인하였다. GLP에서 수행한 결과는 실제 실험동물에게 투여되는 시험물질 전처리를 통해 의뢰기관과 GLP기관 내 재현성을 확인할 수 있는 하나의 방법일 뿐만 아니라 분석법 밸리데이션을 통해 시험물질의 안정성을 확인하여 투여할 때 조제물 채취 위치, 조제 후 투여 시간과 보관 기간, 조제 횟수 등의 신뢰성을 제공할 수 있다. 결론적으로, 시험물질의 표준품의 정확한 시험성적서를 통해 이후 정확성이 있는 유효농도 및 유해성 시험자료를 생산할 수 있을 것이며, 이러한 결과를 확보하기 위해서는 분석법 밸리데이션의 필요성 및 중요성을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국화학물질관리협회 화학물질 안전관리 전문인력 양성 사업의 지원을 받아 수행되었음.

References

1. Ministry of food and drug safety. *Good laboratory practice commentary*. Chungcheongbuk-do, (2017).
2. J. A. Hwang, D. H. Kim, C. C. Shin, E. J. Lee, N. S. Choi, J. S. Gam, "A Study on Establishment of Good Laboratory Practice Guidebook", *Regulatory Research on Food, Drug and Cosmetic*. Vol.15, No.1 pp. 9-18, (2020).
3. H. Kim, A. R. Scialli, "Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease", *Toxicological Sciences*, Vol.122, No.1 pp. 1-6, (2011).
4. J. Y. Han, J. G. Cho, J. M. Oh, "Necessity of Research for Safe Drug use in Pregnant Women", *Journal of the Korean Society of Maternal and Child Health*. Vol.21, No.3 pp. 159-165, (2017).
5. N. Vargesson, "Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms", *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. Vol.105, No.2 pp.140-156, (2015).
6. Good Laboratory Practice (GLP), "<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/good-laboratory-practiceglp.htm>", Organisation for economic co-operation and development, (2024).
7. Ministry of food and drug safety. *KGLP commentary*. Chungcheongbuk-do, (2014).
8. Ministry of food and drug safety, "Guide to preparing submission materials for recognition of functional health food ingredients", Chungcheongbuk-do, (2022).
9. E. Lee, K. Song, I. Yu, "Characterization of test substance in the GLP", *Journal of toxicology and public health*, Vol.23, No.2 pp. 173-177, (2007).
10. K. H. Cho, J. S. Kim, M. S. Jeon, K. H. Lee, M. K. Chung, C. W. Song. "Basic Principles of the Validation for Good Laboratory Practice Institutes", *Toxicological Research*, Vol.25, No.1 pp. 1-8, (2009).
11. U.S. Food&Drug Administration. *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry*. (2015).
12. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures*. (2022).

13. M. L. Whitmire, P. Bryan, T. R. Henry, J. Holbrook, P. Lehmann, T. Mollitor, S. Ohorodnik, D. Reed, H. D. Wietgreffe, "NonClinical dose formulation analysis method validation and sample analysis", *The AAPS Journal*. Vol.12, No.4 pp. 628-623, (2010).
14. M. Whitmire, R. Ross, J. Mwalimu1, L. Porter, M. Whitse, "A Global GLP Approach to Formulation Analysis Method Validation and Sample Analysis", *Pharmaceutica Analytica Acta*. No.S2 pp. 1-7, (2011).
15. U.S. Food&Drug Administration, *Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies*. (2010).
16. D. W. Huntsinger, "OECD and USA GLP applications", *Ann Ist Super Sanita*, Vol.44, No.4 pp. 403-406, (2008).