

Agilent 7850 ICP-MS를 이용한 점안제의 금속(원소) 불순물 분석 및 분석법 검증 과정 소개

저자

한철우, 김도현
한국애질런트테크놀로지스(주)

개요

안전한 의약품의 제조를 위해 국내뿐만 아니라 세계적으로도 대부분의 나라에서 의약품에 대한 시험법(이하 '약전')을 개정하고 있으며, 특히 최근 중금속에 관한 이슈가 커지면서 국가마다 문화에 따른 시험법을 직접 개정함과 달리 2014년에 승인된 ICH(International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 의약품규제조화위원회) 가이드라인에 맞추어 2018년 1월 1일부터 미국의 USP(United States Pharmacopoeia)와 유럽의 EP(European Pharmacopoeia) 등 많은 나라에서 기존에 수행하던 비색법에 의한 중금속 시험법을 발달된 분석 기술이 반영된 금속(원소) 불순물 시험법으로 전환하고 있습니다.

이에 따라 일본, 중국 등 대부분의 아시아 국가들에서도 최근 약전 개정이 이루어졌으며, 국내에서도 이에 발맞추어 국제조화를 통한 국내 의약품 안전성 확보 및 국제 경쟁력 강화를 위해 2017년 4월, '의약품 금속 불순물 평가 및 관리 가이드라인'을 발간하였으며 또한, '의약품의 품목 허가·신고·심사 규정'을 개정함과 동시에 식품의약품안전처에서는 2019년 11월, 대한민국 약전 12개정(식약처 고시 제2019-102호)을 통해 금속(원소) 불순물 시험법을 신설하여 완제의약품 중 금속(원소) 불순물 분석에 대한 시험 방법 및 분석법 검증(Method Validation) 요건을 제시하고 있습니다.

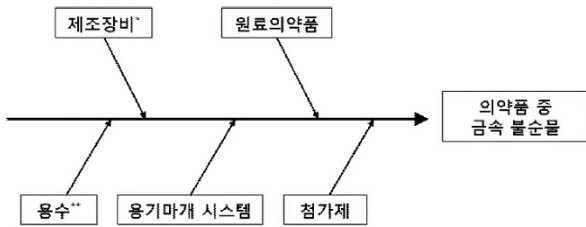
이에 맞춰 한국애질런트에서는 개정된 대한민국 약전의 내용을 더욱 쉽고 빠르게 이해하고 분석을 수행할 수 있도록 실제 점안제 시료를 이용하여 시험법을 작성하였습니다.

서론

금속 불순물의 기원

식품의약품안전처에서는 2019년 11월 대한민국 약전 12개정(식약처 고시 제2019-102호)을 통해 금속(원소) 불순물 시험법을 신설하여 완제의약품 중 금속(원소) 불순물 분석에 대한 시험 방법 및 분석법 검증에 대해 발표하였습니다.

의약품에 존재하는 금속(원소) 불순물의 출처는 우리가 생각하는 것보다 다양합니다. 원료의약품을 합성하는 과정에서 의도적으로 투입된 촉매제의 잔류물이거나, 불순물(공정 장비나 용기 마개 시스템과의 반응에 의해 생성되거나, 완제의약품의 원료약품 중 존재 등)일 수도 있습니다.



- * 공정 이해, 장비 선정, 장비 적격성평가, GMP 등을 통해 금속불순물 혼입 위험을 감소시킬 수 있다.
- ** 정제수나 주사용수가 제조공정에 사용될 경우 공정서(예, 유럽약전, 일본약전, 미국약전)의 용수 품질요건을 준수함으로써 용수에 의한 금속불순물 혼입 위험을 감소시킬 수 있다.

그림 1. 완제의약품 제조에 사용되는 일반적인 원자재, 장비, 구성 성분의 예.

그림 1에서와 같이 금속(원소) 불순물은 어디서나 유래될 수 있으며, 평소에 시험자들이 신경 쓰지 않았던 부분에서도 충분히 유래될 수 있습니다. 특히 제조 장비 부분에서는 공장 내의 제조시설이 대부분 스테인리스 스틸 재질로 되어 있어 그로 인해 유래될 수 있는 금속 불순물도 무시할 수 있는 상황은 아닙니다.

따라서 만일 품질관리 시 금속(원소) 불순물이 허용치 이상으로 검출될 경우 유래 원인의 규명을 위한 검토 시 주원료 뿐만 아니라 모든 제조 과정 및 포장 용기에 이르기까지 모든 경로를 배제하지 않고 검토하는 것이 필요합니다.

2019년 9월에 발간된 '의약품 금속 불순물 관리 질의응답집'에 따르면 금속(원소) 불순물은 '합성과정에서 의도적으로 사용된 촉매 등의 잔류, 제조 장비나 용기 마개와의 반응으로 침출·생성되거나 원료약품의 오염물질'로 정의하고 있습니다. 따라서 잔류물이나 오염물이 아닌 금속 물질에 대해서는 그에 대한 의학적 근거와 함께 위해성 자료를

함께 제출하여 식약처의 승인을 거쳐 방안을 마련하여야 합니다. 하지만 주 원재료가 아닌 촉매나 2차 혹은 3차 제조 시에 의도적으로 주입되는 무기 시약에서 유래되는 금속(원소) 불순물에 대해서는 위해평가 대상에 포함되어야 합니다.

금속(원소) 불순물 규제의 적용 범위

먼저 시험자가 생산하고 있는 제품이 본 금속(원소) 불순물 규제에 해당하는 제품인지를 먼저 확인하는 것이 중요하며, 해당 규제의 적용 범위는 아래와 같습니다.

'새로운 완제의약품(ICH Q6A와 Q6B의 정의에 따름)과 기존 원료의약품을 함유하는 새로운 완제의약품에 적용한다. 정제 단백질과 폴리펩타이드(재조합 유래와 비 재조합 유래의 단백질과 폴리펩타이드 포함) 및 이들의 유도체를 함유하는 완제의약품, 그리고 이 유도체를 구성 성분(예, 접합체)으로 포함하는 완제의약품이 적용 대상이다. 또한, 합성 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 올리고사카라이드를 함유하는 완제의약품도 적용 대상에 속한다. 생약제제, 방사성의약품, 백신, 세포대사 물질, DNA 제제, 알레르기 유발 추출물, 세포, 전혈, 세포성 혈액 성분 또는 혈장과 혈장 유래 물질을 포함하는 혈액제제, 전신 순환 용도가 아닌 투석액, 치료 효과를 위하여 의약품에 의도적으로 투입된 금속을 함유하는 제제에 적용되지 않는다. 또한 유전자 기반 제제(유전자 치료제), 세포 기반 제제(세포 치료제), 조직 기반 제제(조직 공학)도 적용 대상이 아니다.'

위와 같은 내용에 따라 합성된 원료의약품으로 제조된 완제의약품은 거의 다 적용된다고 판단되며, 성분을 완벽하게 판단하기 어려운 몇몇 생약 및 DNA 제제 등에 대해서는 규제하지 않는 것으로 기록되어 있습니다. 하지만 보다 정확한 판단을 위해 자체적인 판단이 어려운 생약제제의 경우에는 식품의약품안전처에 문의하여 해당 규제항목에 포함되는 제품인지에 대한 여부를 확인 후 대응하는 것이 바람직합니다.

또한 원료의약품은 해당 규제에 포함되지 않습니다. 하지만 USP 232에서 기술하고 있는 바와 같이 대부분의 완제의약품 내의 금속(원소) 불순물은 그 주원료에서 유래될 수 있으며, 그러므로 완제의약품 제조자는 사용하는 원료의 정확한 함량과 그 원료 내의 금속(원소) 불순물의 농도를 확인하여 허용기준 농도를 초과하지 않도록 관리하는 작업이 반드시 필요합니다. 이러한 위해성 평가 시 완제의약품 제조자는 원료나 첨가제를 제공하는 회사에서 분석하고 발행한 분석 데이터를 이용하여 함량별 계산 값을 통해 위해성에 대해 평가할 수도 있습니다.

따라서 원료에 대한 금속(원소) 불순물의 규제가 없다고 하더라도 원료나 첨가제를 생산하는 회사에서 금속(원소) 불순물에 대한 분석을 안 할 수는 없는 상황이며, 실제로도 많은 완제의약품 제조사에서는 원료생산회사에서 제공받고 있는 원료에 대한 금속(원소) 불순물에 대한 성적서를 요청하고 있습니다. 특히 지금까지는 모든 제약회사가 약전에 따라 분석을 해왔다면, 새롭게 개정된 금속(원소) 불순물의 경우에는 완제의약품 제조자는 약전에 대응하기 위해서 분석을 하지만 원료 제조자는 제품의 경쟁력이나 제조사의 비즈니스를 위한 분석이 이루어질 경우가 많아질 것으로 보입니다. 당연히 낮은 함량의 불순물을 함유한 높은 순도의 원료 및 부자재는 그렇지 않은 원료 및 부자재보다 단가가 높을지라도 완제품 제조자가 규제를 대응하는데 있어서는 경쟁력이 높다는 것은 제약산업뿐만 아니라 식품이나 화장품 등 다른 산업 분야에서 이미 검증된 부분이기 때문입니다.

규제원소의 분류 및 복용법에 따른 규제치의 분류

대한민국 약전 12개정에 따르면 규제원소는 아래의 표 1과 같이 총 24종의 원소로 나누어져 있으며, 그 원소들은 그 일반적인 절대 농도치가 아닌 상대적 독성수준(Permitted Daily Exposures, PDE) 및 완제의약품 중에 혼입될 가능성에 따라 3가지로 분류됩니다. 혼입 가능성은 제조과정 중 사용될 가능성, 제조공정에 사용되는 원료약품 다른 금속(원소) 불순물과 함께 분리되는 불순물일 가능성, 자연적 존재량과 환경 분포도를 포함한 여러 가지 요소를 토대로 결정되었습니다. 또한, 기존의 규제와 다른 점은 모든 제품이 같은 규제치를 가지고 있는 것이 아니라 경구투여, 비경구투여, 흡입투여 총 3가지의 복용법에 따라 규제농도가 각각 다르게 적용되는 것을 알 수 있습니다. 이러한 부분은 복용하는 방법에 따라 인체에 미치는 영향에 대해 상대적인 규제치를 적용한 것이며, 자세한 내용은 ICH Q3D 부록 1을 포함하여 자세하게 기술되어 있습니다.

또한 아래의 표 2에서 표기된 것과 같이 위해성 평가를 통해 검증한 값이 불검출로 판명이 되고, 또한 제조 시 의도적으로 투입하지 않았다면, 위해평가 시 고려하지 않아도 됩니다.

하지만 원료를 제조하거나 완제의약품을 제조할 시 의도적으로 주입한 금속 성분의 경우에는 반드시 평가 항목에 포함되어야 합니다.

표 1. 금속(원소) 불순물의 PDE.

금속	분류	경구 PDE (µg/day)	비경구 PDE (µg/day)	흡입 PDE (µg/day)
Cd	1	5	2	2
Pb	1	5	5	5
As	1	15	15	2
Hg	1	30	3	1
Co	2A	50	5	3
V	2A	100	10	1
Ni	2A	200	20	5
Tl	2B	8	8	8
Au	2B	100	100	1
Pd	2B	100	10	1
Ir	2B	100	10	1
Os	2B	100	10	1
Rh	2B	100	10	1
Ru	2B	100	10	1
Se	2B	150	80	130
Ag	2B	150	10	7
Pt	2B	1000	10	1
Li	3	550	250	25
Sb	3	1200	90	20
Ba	3	1400	700	300
Mo	3	3000	1500	10
Cu	3	3000	300	30
Sn	3	6000	600	60
Cr	3	11000	1100	3

표 2. 위해 평가 대상 금속.

금속	분류	의도적으로 첨가된 경우		의도적으로 첨가되지 않는 경우	
		(모든 투여 경로)	경구	비경구	흡입
Cd	1	필요	필요	필요	필요
Pb	1	필요	필요	필요	필요
As	1	필요	필요	필요	필요
Hg	1	필요	필요	필요	필요
Co	2A	필요	필요	필요	필요
V	2A	필요	필요	필요	필요
Ni	2A	필요	필요	필요	필요
Tl	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Au	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Pd	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Ir	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Os	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Rh	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Ru	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Se	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Ag	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Pt	2B	필요	불필요	불필요	불필요
Li	3	필요	불필요	필요	필요
Sb	3	필요	불필요	필요	필요
Ba	3	필요	불필요	불필요	필요
Mo	3	필요	불필요	불필요	필요
Cu	3	필요	불필요	필요	필요
Sn	3	필요	불필요	불필요	필요
Cr	3	필요	불필요	불필요	필요

대한민국 약전의 일반시험법에 따르면 '금속(원소) 불순물 시험법은 유도결합 플라즈마(Inductively coupled plasma, ICP) 분석법(분광분석법(OES or AES), 질량분석법(MS))으로 의약품 중에 혼재하는 금속(준금속 원소 및 비금속 원소 포함) 불순물의 양을 측정하는 방법이다. 유도결합 플라즈마 분석법에 따라 시험하는 경우 시험 결과에 영향을 미치지 않는 것이 입증되면 원자흡광광도법(AAS)을 적용하여 시험할 수 있다.'라고 기술되어 있습니다.

기존의 약전에서는 분석이 필요한 경우 기기의 종류가 모두 선정된 것이 일반적이었으나, 서두에 기술한 대로 분석법을 약전에서 제한하기에는 한계가 존재하다 보니 금속(원소) 불순물 시험이 가능한 장비는 모두 약전에 기술되어 있습니다. 이에 따라 시험자는 본 시험을 준비하기 전에 먼저 시험자에게 알맞은 장비를 선정해야 하며, 많이 사용하는 크로마토그래피 장비와 달리 본체에 검출기가 추가되는 형태가 아닌 전혀 다른 시스템의 장비이기 때문에 기기를 검토하는 과정에서 시험자의 신중한 선택이 요구됩니다.

본 시험은 ICP-MS를 사용하여 분석한 자료이며, 앞에서 언급한 대로 장비 구매 예정의 시험자는 애질런트와 상의하여 신중하게 선택할 필요가 있습니다.

실험

시료 정보

실험에 사용된 모든 산 및 희석액 등에 사용하는 시약은 반도체급을 사용하였으며, Mix 표준품은 대한민국 약전에 기술된 대로 공인된 기관에서 인증받아 금속 불순물이 내재되어 있지 않은 표준품(part number: 5191-4536, Agilent ICH USP 232 Parenteral Kit includes 4 standards)을 사용하였습니다. 희석에 사용하는 증류수는 초순수를 사용하였습니다.

표 3. 시료 정보.

시료 정보	검량선용 표준용액
인공눈물	각 원소별 Blank
하루 최대 투여량 (Maximum daily dose): 10g	각 원소별 0.3J
추가 희석배수: 샘플 0.1g/초순수 50g → 500배	각 원소별 0.5J
	각 원소별 1.0J
	각 원소별 1.5J

표 4. 검량선 작성을 위한 표준용액 농도 제조(단위: ppb).

원소	질량	표준용액 1 (Blank)	표준용액 2 (0.3J)	표준용액 3 (0.5J)	표준용액 4 (1.0J)	표준용액 5 (1.5J)
Li	7	0	37.5	62.5	125	187.5
V	51	0	1.5	2.5	5	7.5
Cr	53	0	165	275	550	825
Co	59	0	0.75	1.25	2.5	3.75
Ni	60	0	3	5	10	15
Cu	63	0	45	75	150	225
As	75	0	2.25	3.75	7.5	11.25
Se	78	0	12	20	40	60
Mo	95	0	225	375	750	1125
Ru	101	0	1.5	2.5	5	7.5
Rh	103	0	1.5	2.5	5	7.5
Pd	105	0	1.5	2.5	5	7.5
Ag	107	0	1.5	2.5	5	7.5
Cd	111	0	0.3	0.5	1	1.5
Sn	118	0	90	150	300	450
Sb	121	0	13.5	22.5	45	67.5
Ba	137	0	105	175	350	525
Os	189	0	1.5	2.5	5	7.5
Ir	193	0	1.5	2.5	5	7.5
Pt	195	0	1.5	2.5	5	7.5
Au	197	0	15	25	50	75
Hg	201	0	0.45	0.75	1.5	2.25
Tl	205	0	1.2	2	4	6
Pb	208	0	0.75	1.25	2.5	3.75

분석 기기 및 조건

빠르고 정확한 분석을 위하여 Agilent 7850 ICP-MS 시스템을 사용하였으며, 시료 도입부는 SPS4 자동 시료 주입기를 포함하여 white-white sample tubing, 마이크로미스트 네블라이저, double pass 스프레이 챔버를 사용하였습니다. 또한 효율적인 시료 분석 및 획득된 데이터의 보다 빠르고 편리한 처리를 위하여 Agilent MassHunter Acquisition(ver. 5.1) 및 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어를 사용하였습니다.

표 5. 분석 기기 및 조건(튜닝 파라미터).

파라미터		값
튠 모드		헬륨 충돌 모드
플라즈마	RE Power	1,550W
	RF Matching	1.4V
	Smpl Depth	8.0mm
	네블라이저 가스	1.05L/min
	네블라이저 펌프	0.1rps
	S/C 온도	2°C
렌즈	Extract 1	0.0V
	Extract 2	-190.0V
	Omega Bias	-105V
	Omega 렌즈	8.8V
	셀 Entrance	-40V
	셀 Exit	-60V
	Deflect	0.0V
	Plate bias	-55V
셀	사용 가스	헬륨
	헬륨 유속	4.5ml/min
	OctP Bias	-18.0V
	OctP RF	200V
	Energy Discrimination	5V

분석법 검증의 과정

많은 시험자들 사이에서 큰 이슈가 되고 있는 MV(method validation)라고도 불리는 분석법 검증 단계이며 이 단계를 거쳐 시험법을 정립하고 SOP를 작성합니다.

대한민국 약전 12개정에서는 시험법의 밸리데이션의 요건으로 '시험법의 목적에 따라 한도시험 또는 정량시험을 사용할 수 있으며, 모든 시험법은 아래의 밸리데이션 요건에 적합함을 입증한다.'라고 기록되어 있습니다. 전체적으로 보았을 때, 정량시험의 범위가 한도시험의 범위보다 더 넓은 농도 범위의 시험을 수행하고 있으며, 또한 정량시험을 통해 모든 밸리데이션 요건에 만족한다면 한도시험 요건에는 충분히 만족할 수 있는 요건을 갖추고 있다고 할 수 있습니다.

1) 시스템 적합성 평가(System Suitability Testing, SST)

시스템 적합성 단계는 장비의 종류에 관계없이 현재 분석하고 있는 장비가 모든 시료를 분석하기에 적합한지에 대한 시험이며, 약전에 모두 기록되어 있는 내용으로 검액 주입 전/후에 분석한 표준액(1.5J)의 결과를 비교하여 각 금속별 신호이동(drift)이 20% 미만이어야 합니다. 쉽게 도식화하면 아래의 그림 2의 두 개의 시료 데이터의 신호이동이 20% 미만이어야 합니다.



그림 2. 시스템 적합성 예시 그림.

2) 정확성(Accuracy)

정확성 시험은 전처리 과정에서 시험자가 분석하고자 하는 항목의 원소가 손실되거나 변형이 일어나지는 않는지, 혹은 전처리가 안전하게 이루어지지 않아 시료로부터 금속(원소) 불순물들이 완전히 녹아 나오지 못했을 경우까지도 고려하여 시험자가 설정한 전처리법이 정확하게 시료를 분석할 수 있는지에 대한 적합성을 판단하는 과정입니다.

정확성을 판단하는 과정은 기존에 많은 검증법에서 사용한 방법과 유사하게 시료 전처리 전에 알고 있는 농도(0.5J~1.5J 중 0.5J를 반드시 포함해야 하며, 3개 이상의 농도를 제조한다)의 표준품을 기지량만큼 첨가하여 전처리 후 회수율을 측정하는 방법을 사용합니다.

따라서 정확성 시험은 실제 시료를 이용하여 검증하는 과정이며 실제 시료내에도 금속 불순물이 존재할 수 있기 때문에 바탕시료가 될 수 있도록 표준액을 첨가하지 않은 시료까지도 측정하여 회수율을 측정합니다.

대한민국 약전에서는 24종 원소의 회수율은 각 농도별로 3회 반복 측정하여 70%~150% 이내로 들어와야 한다고 지정하고 있습니다.

아래 그림 3과 같이 시료를 제조하여 정확성을 시험합니다. 본 응용자료에서는 0.3J, 0.5J, 1.0J, 1.5J까지 총 4개의 농도를 이용하여 시험 조건의 정확성을 더 향상시켰습니다.

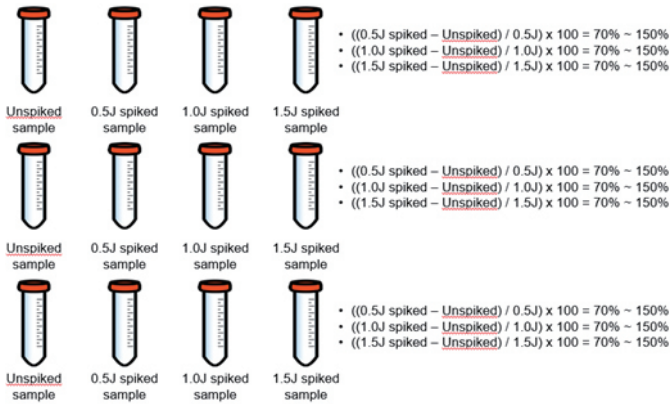


그림 3. 정확성 시험 예시 그림.

3) 정밀도(Precision)

정밀도 시험은 앞에서 수행한 정확도 시험을 통해 시험자가 설정한 시험법이 얼마나 재현성 있게 분석이 되는 좋은 방법인지를 확인하는 과정입니다. 본 과정에서는 대한민국 약전에 기록되어 있는 것과 같이 반복성과 실험실 내 정밀성 두가지를 모두 시험해야 합니다.

i. 반복성(Repeatability)

반복성 시험은 대한민국 약전에 기록된 대로 '표준품을 이용해 각 금속의 허용한도로 기지량을 첨가하여 독립적으로 조제한 검액 6개(동일 로트로부터 채취)'를 분석하여 상대표준편차가 20% 미만으로 들어와야 하는 시험입니다. 이는 한도시험의 표준품 1과 같으며 시료별 1.0J 값에 해당하며 아래의 그림 4에서 쉽게 파악해 볼 수 있습니다.

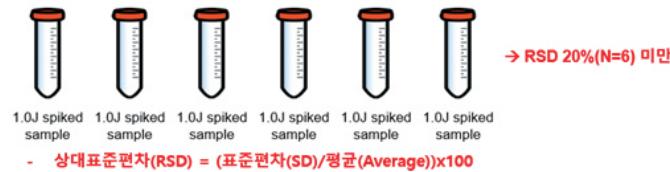


그림 4. 정밀도 시험 중 반복성 시험의 예시 그림.

ii. 실험실 내 정밀성(Intermediate Precision, Ruggedness)

실험실 내 정밀성은 본 시험법 밸리데이션을 진행한 시험자뿐만 아니라 다른 상황이나 다른 시험자가 같은 실험을 진행하여도 동일한 결과를 얻어낼 수 있을 정도로 좋은 시험법인지를 알아보는 과정입니다.

대한민국 약전에서는 '다른 일자, 다른 시험장비, 다른 시험자, 또는 이들을 조합하여 반복성 시험을 재실시한다. 반복성의 결과와 통합하여 총 분석횟수가 12회가 되도록 한다.'라고 기록하고 있으며, 추가로 6개의 시료를 분석하게 되며, 그 결과 아래의 그림 5과 같이 상대표준편차가 25% 미만으로 분석되어야 합니다.

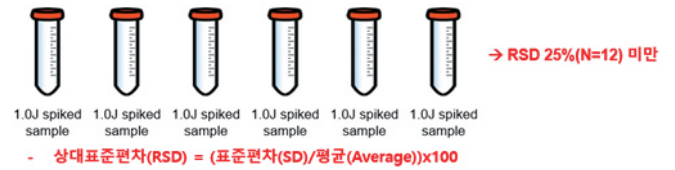
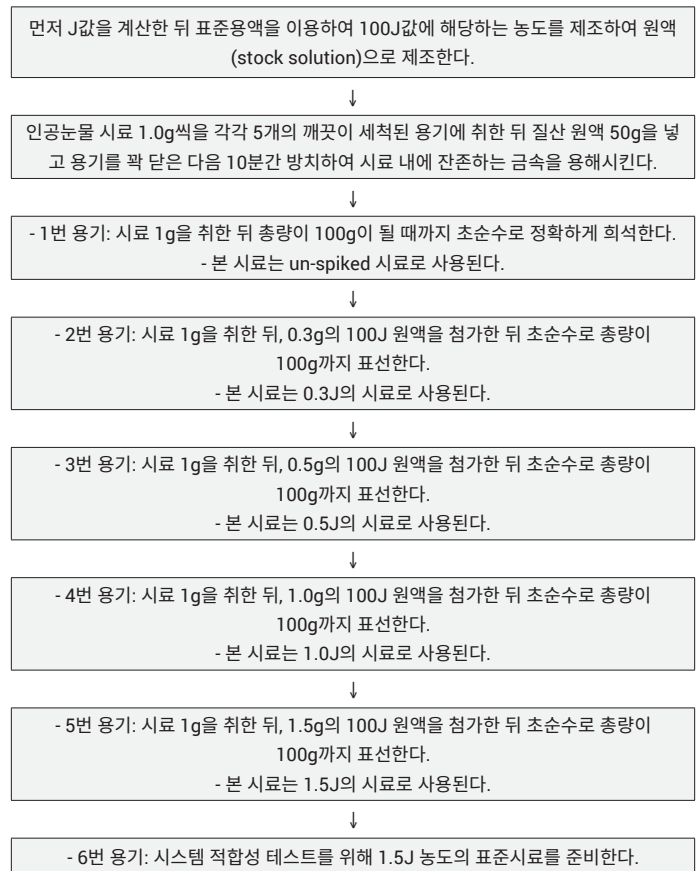


그림 5. 정밀도 시험 중 실험실 내 정밀성 시험의 예시 그림.

하지만 이러한 시험의 과정은 오차를 일으킬 수 있는 요인이 많으며, 그로 인해 데이터가 잘못 분석되는 것을 방지하기 위해 애질런트에서는 많은 경험을 바탕으로 최적의 솔루션을 제공하고 있으며, 애질런트 장비를 보유한 제약회사에서는 다음과 같이 다양한 시료에 대한 솔루션을 함께 받아 보실 수 있습니다.

그 대표적으로 본 응용자료에서는 간단한 전처리법으로 시험할 수 있는 기타제제로 분류되어 있는 제품 중 하나인 인공눈물에 대해 분석법 검증을 직접 수행하여 본 응용 자료를 구독하는 시험자들에게 그 과정을 쉽고 빠르게 설명하는데 목적이 있습니다.

시료 전처리 및 분석법 검증 준비



결과

검량선의 작성

표 6. 검량선 작성 및 실측 농도 값에 따른 검출한계 산출(단위: ppb).

	원소	질량	검출한계	BEC	R ²	표준용액 1	표준용액 2	표준용액 3	표준용액 4	표준용액 5
1	Li	7	0.054	1.592	0.9999	<0.000	38.821	63.109	125.324	186.817
2	V	51	0.016	0.135	0.9998	<0.000	1.564	2.527	5.028	7.460
3	Cr	53	0.003	12.024	0.9996	<0.000	173.478	280.256	554.597	818.487
4	Co	59	0.001	0.044	0.9998	<0.000	0.776	1.271	2.524	3.722
5	Ni	60	0.007	0.212	0.9998	<0.000	3.125	5.038	10.059	14.923
6	Cu	63	0.009	2.759	0.9998	<0.000	47.467	76.148	149.607	224.386
7	As	75	0.043	0.261	0.9995	<0.000	2.396	3.815	7.319	11.320
8	Se	78	0.143	1.360	0.9996	<0.000	12.292	20.985	39.979	59.627
9	Mo	95	0.017	15.406	0.9997	<0.000	236.841	382.145	753.373	1118.001
10	Ru	101	0.000	0.069	0.9999	<0.000	1.562	2.525	5.007	7.474
11	Rh	103	0.000	0.017	1.0000	<0.000	1.547	2.470	5.000	7.501
12	Pd	105	0.000	0.071	0.9999	<0.000	1.556	2.540	4.996	7.478
13	Ag	107	0.013	0.078	0.9999	<0.000	1.545	2.491	4.967	7.516
14	Cd	111	0.005	0.015	0.9998	<0.000	0.321	0.497	0.997	1.499
15	Sn	118	0.003	4.939	0.9998	<0.000	94.499	152.252	299.488	448.691
16	Sb	121	0.005	0.516	0.9998	<0.000	13.528	22.973	45.462	67.029
17	Ba	137	0.011	-0.468	0.9995	0.479	109.090	174.711	339.326	531.394
18	Os	189	0.000	0.028	1.0000	<0.000	1.532	2.509	4.988	7.498
19	Ir	193	0.000	-0.001	1.0000	0.002	1.516	2.465	5.028	7.490
20	Pt	195	0.000	0.045	0.9999	<0.000	1.535	2.520	5.010	7.479
21	Au	197	0.017	0.098	1.0000	<0.000	15.096	25.099	49.784	75.092
22	Hg	201	0.001	0.011	1.0000	<0.000	0.457	0.758	1.489	2.253
23	Tl	205	0.005	0.060	0.9999	<0.000	1.228	2.037	4.004	5.979
24	Pb	208	0.019	0.097	1.0000	<0.000	0.763	1.249	2.511	3.741

- Agilent 7850 ICP-MS는 위의 표 6과 같이 대한민국 약전에서 제시하는 24종 원소에 대해 모두 낮은 검출한계까지 분석할 수 있음
- 검량 곡선은 J값에 따라 계산되어 작성되었으며, R²값이 보이는 것과 같이 모두 0.999이상의 직선성을 보이는 것을 알 수 있음
- 이러한 결과를 통해 시험자는 '정량한계, 직선성, 특이성' 등을 모두 한번에 확인할 수 있어, 대한민국 약전에서 표기되어 있는 것처럼 시험법 검증 과정의 규제를 만족한다면 위의 세 가지의 시험은 따로 하지 않아도 만족한 것으로 판단할 수 있음

원소별 검량 곡선 데이터

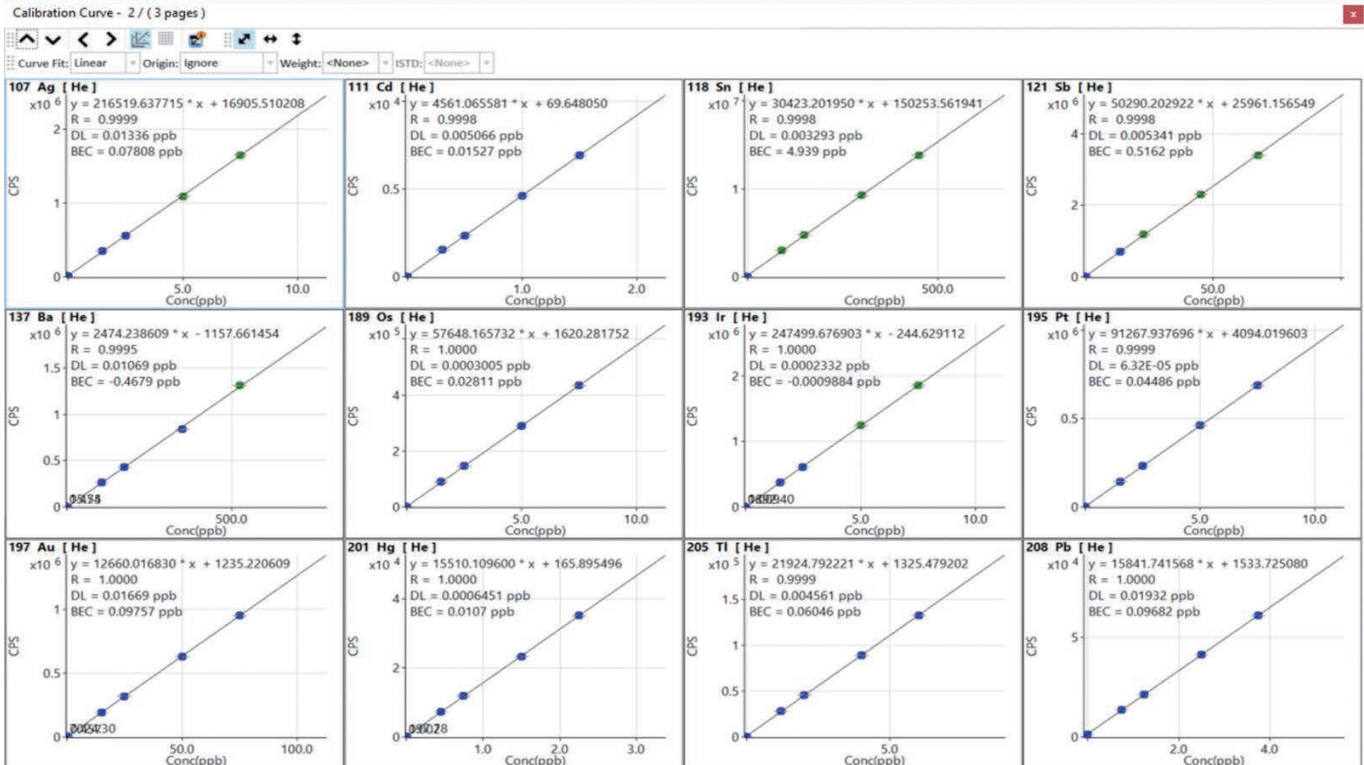
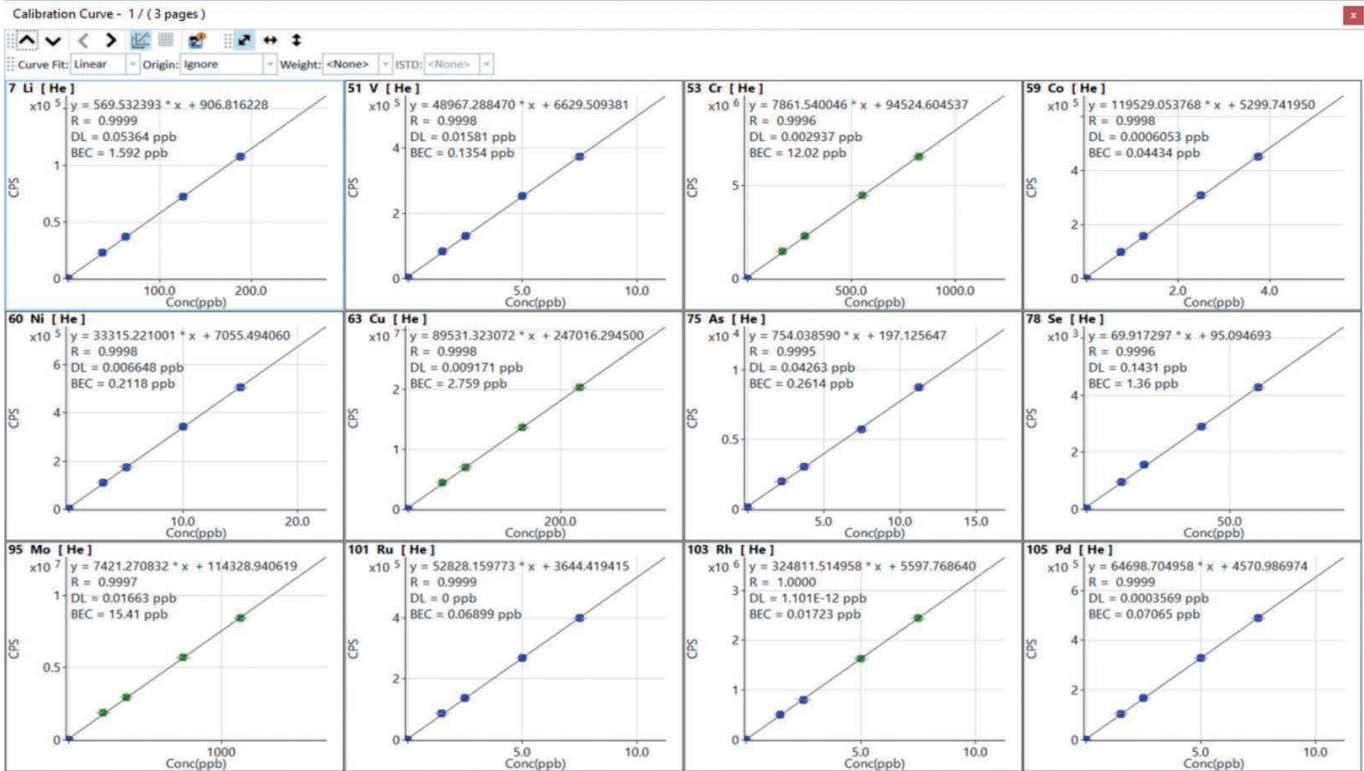


그림 6. 원소별 검량 곡선 데이터

정확성(Accuracy) 시험

실제 시료를 포함하여 각 표준용액 농도에 맞게 첨가하여 대한민국 약전에 수록된 대로 3회 반복 측정하여 첨가한 농도의 회수율(Recovery)을 통해 정확성을 시험합니다.

표 7. 정확성 시험 데이터(시료, Spiked 표준용액 2).

	원소	질량	시료(ppb)			시료 + 0.3J(ppb)			평균	회수율(%)
			1회	2회	3회	1회	2회	3회		
1	Li	7	<0.00	<0.00	<0.00	35.333	35.810	35.757	35.634	99.2
2	V	51	<0.00	<0.00	<0.00	1.407	1.404	1.416	1.409	101.1
3	Cr	53	<0.00	<0.00	<0.00	156.863	156.981	155.420	156.421	102.0
4	Co	59	<0.00	<0.00	<0.00	0.697	0.702	0.701	0.700	99.1
5	Ni	60	<0.00	<0.00	<0.00	2.781	2.771	2.781	2.778	99.3
6	Cu	63	<0.00	<0.00	<0.00	42.581	42.285	42.368	42.411	100.2
7	As	75	<0.00	<0.00	<0.00	2.269	2.219	1.959	2.149	100.0
8	Se	78	<0.00	<0.00	<0.00	11.417	11.163	11.290	11.290	101.4
9	Mo	95	<0.00	<0.00	<0.00	214.081	216.018	219.081	216.393	103.0
10	Ru	101	<0.00	<0.00	<0.00	1.388	1.406	1.412	1.402	98.0
11	Rh	103	<0.00	<0.00	<0.00	1.384	1.392	1.393	1.390	93.8
12	Pd	105	<0.00	<0.00	<0.00	1.382	1.395	1.391	1.389	97.3
13	Ag	107	<0.00	<0.00	<0.00	1.336	1.342	1.343	1.340	92.6
14	Cd	111	<0.00	<0.00	<0.00	0.276	0.295	0.276	0.282	98.8
15	Sn	118	<0.00	<0.00	<0.00	86.960	87.234	88.505	87.566	102.8
16	Sb	121	<0.00	<0.00	<0.00	12.344	12.371	12.443	12.386	95.1
17	Ba	137	<0.00	<0.00	<0.00	99.238	99.645	100.759	99.881	94.7
18	Os	189	<0.00	<0.00	<0.00	1.430	1.448	1.456	1.444	98.0
19	Ir	193	<0.00	<0.00	<0.00	1.412	1.419	1.418	1.416	93.8
20	Pt	195	<0.00	<0.00	<0.00	1.422	1.421	1.441	1.428	98.0
21	Au	197	0.457	0.314	0.241	14.177	14.711	14.930	14.606	95.1
22	Hg	201	<0.00	<0.00	<0.00	0.434	0.446	0.438	0.439	97.6
23	Tl	205	<0.00	<0.00	<0.00	1.109	1.122	1.139	1.123	97.8
24	Pb	208	<0.00	<0.00	<0.00	0.683	0.676	0.671	0.677	98.7

표 8. 정확성 시험 데이터(Spiked 표준용액 3, Spiked 표준용액 4).

	원소	질량	시료 + 0.5J(ppb)			평균	회수율(%)	시료 + 1.0J(ppb)			평균	회수율(%)
			1회	2회	3회			1회	2회	3회		
1	Li	7	63.085	63.318	63.119	63.174	103.6	128.633	127.665	128.929	128.409	104.0
2	V	51	2.531	2.504	2.499	2.511	104.1	5.045	4.964	4.946	4.985	101.5
3	Cr	53	280.065	279.213	276.069	278.449	105.6	556.620	545.878	550.661	551.053	102.4
4	Co	59	1.254	1.247	1.233	1.245	103.1	2.511	2.491	2.474	2.492	101.4
5	Ni	60	5.024	4.987	4.977	4.996	103.9	10.023	9.886	9.886	9.932	101.3
6	Cu	63	75.234	74.614	75.048	74.965	103.5	151.025	148.563	148.225	149.271	101.3
7	As	75	3.883	3.754	3.747	3.795	103.9	7.351	7.279	7.400	7.343	100.3
8	Se	78	20.381	19.332	19.968	19.894	103.9	41.076	38.946	40.552	40.191	100.3
9	Mo	95	384.968	383.734	382.035	383.579	106.4	760.511	755.266	745.429	753.736	102.5
10	Ru	101	2.505	2.483	2.477	2.488	102.3	5.022	5.008	4.996	5.009	101.5
11	Rh	103	2.440	2.428	2.414	2.428	97.8	5.063	5.041	5.072	5.059	101.5
12	Pd	105	2.491	2.484	2.490	2.488	102.3	5.036	4.990	5.005	5.010	101.6
13	Ag	107	2.389	2.388	2.382	2.386	97.4	4.964	4.905	4.915	4.928	99.5
14	Cd	111	0.488	0.499	0.493	0.493	101.5	0.984	1.013	0.996	0.998	101.2
15	Sn	118	154.205	153.319	153.574	153.700	105.8	300.932	300.248	296.932	299.371	101.4
16	Sb	121	23.136	23.067	23.006	23.070	104.5	45.848	45.785	45.944	45.859	102.9
17	Ba	137	174.086	173.357	172.018	173.154	98.0	344.243	341.399	340.216	341.953	97.6
18	Os	189	2.564	2.539	2.545	2.549	102.8	5.143	5.108	5.091	5.114	102.8
19	Ir	193	2.492	2.478	2.467	2.479	98.8	5.116	5.164	5.223	5.168	103.2
20	Pt	195	2.543	2.534	2.538	2.538	103.3	5.109	5.107	5.143	5.120	103.3
21	Au	197	25.578	26.145	26.088	25.937	102.4	51.105	52.074	52.295	51.825	103.0
22	Hg	201	0.774	0.777	0.773	0.775	103.3	1.564	1.558	1.575	1.566	104.4
23	Tl	205	1.996	2.029	2.013	2.012	103.1	4.090	4.050	4.092	4.077	103.2
24	Pb	208	1.240	1.229	1.221	1.230	103.5	2.552	2.497	2.518	2.522	103.4

표 9. 정확성 시험 데이터(Spiked 표준용액 5).

	원소	질량	시료 + 1.5J(ppb)			평균	회수율(%)
			1회	2회	3회		
1	Li	7	189.071	188.194	189.268	188.844	101.6
2	V	51	7.330	7.334	7.318	7.327	98.9
3	Cr	53	802.331	800.871	799.473	800.892	98.5
4	Co	59	3.618	3.600	3.632	3.617	97.6
5	Ni	60	14.421	14.398	14.426	14.415	97.4
6	Cu	63	216.297	215.418	218.433	216.716	97.5
7	As	75	10.923	11.061	10.897	10.960	100.4
8	Se	78	58.180	58.069	58.005	58.085	100.4
9	Mo	95	1098.945	1115.649	1103.102	1105.899	99.6
10	Ru	101	7.224	7.281	7.275	7.260	97.7
11	Rh	103	7.254	7.406	7.299	7.319	97.8
12	Pd	105	7.208	7.280	7.248	7.245	97.5
13	Ag	107	7.149	7.239	7.104	7.164	96.2
14	Cd	111	1.453	1.462	1.462	1.459	98.2
15	Sn	118	443.733	445.464	445.096	444.764	99.9
16	Sb	121	66.989	66.606	66.866	66.821	99.6
17	Ba	137	518.784	519.120	525.342	521.082	99.2
18	Os	189	7.464	7.442	7.467	7.458	99.8
19	Ir	193	7.574	7.480	7.573	7.542	100.4
20	Pt	195	7.494	7.546	7.499	7.513	100.8
21	Au	197	75.621	77.042	77.021	76.561	101.6
22	Hg	201	2.293	2.334	2.294	2.307	102.5
23	Tl	205	5.868	5.928	5.925	5.907	99.3
24	Pb	208	3.660	3.688	3.674	3.674	99.7

위의 표 7~9와 같이 24종 규제원소에 대한 표준액의 첨가 및 그에 따른 회수율을 이용한 정확성 시험을 진행했을 때, 모두 대한민국 약전에서 요구하는 70~150% 이내에 적합한 것을 알 수 있습니다. 뿐만 아니라 Agilent 7850 ICP-MS로 시험한 모든 정확성 시험 데이터는 그 회수율이 90~110% 이내에 들어오는 것을 확인할 수 있어 그 정확도가 매우 높다고 할 수 있습니다.

이러한 방법을 통해 정확도 시험을 완료하면 정밀도 및 실험실 내 정밀성 시험을 진행할 수 있습니다.

정밀도 시험 및 실험실 내 정밀성 시험

정확도 시험이 마무리되면 모든 시험법은 반복하여 실험한 뒤 그 정확도의 정밀성을 확인하는 시험을 진행하게 됩니다. 본 금속 불순물 시험법은 정밀도뿐만 아니라 세 가지의 조건(다른 사람, 다른 날짜, 다른 장비)을 제시하면서 한 번 더 분석을 시도하여 실험실 내 정밀성을 확인하는데 그 목적이 있습니다. 본 응용 자료에서는 정밀성 시험(표 10) 뒤 추가적으로 다른 시험자가 바로 정밀성 시험을 한 번 더 시도하여 실험실 내 정밀성 시험(표 11)을 진행하였으며, 표 11의 RSD 값은 정밀성 데이터와 추가 실험 데이터를 모두 합쳐 총 시료 수를 12개를 맞추어 계산한 데이터입니다.

표 10. 정밀성 시험 데이터(spiked 1.0J).

	원소	질량	시료 +1.0J(ppb)						평균	회수율(%)	상대표준편차(%), n=6
			1회	2회	3회	4회	5회	6회			
1	Li	7	128.738	130.160	128.403	130.481	130.195	129.225	129.534	103.1	0.7
2	V	51	4.934	4.931	4.884	4.962	4.908	4.946	4.928	98.4	0.6
3	Cr	53	539.976	544.803	544.616	546.820	546.258	551.002	545.579	99.4	0.7
4	Co	59	2.447	2.461	2.440	2.458	2.455	2.464	2.454	97.6	0.4
5	Ni	60	9.802	9.780	9.781	9.864	9.835	9.896	9.826	98.4	0.5
6	Cu	63	148.331	148.065	147.461	148.476	148.155	148.905	148.232	99.5	0.3
7	As	75	7.348	7.192	7.102	7.407	7.239	7.391	7.280	101.0	1.7
8	Se	78	39.709	37.786	37.357	38.263	39.010	39.820	38.657	99.6	2.6
9	Mo	95	745.758	743.623	746.603	747.743	753.359	756.218	748.884	100.4	0.6
10	Ru	101	4.931	4.950	4.936	4.957	4.953	4.945	4.945	98.8	0.2
11	Rh	103	4.961	5.028	5.009	5.021	5.047	5.070	5.022	101.4	0.7
12	Pd	105	4.942	4.995	4.919	4.990	4.967	4.975	4.964	99.6	0.6
13	Ag	107	4.878	4.892	4.874	4.901	4.902	4.863	4.885	97.9	0.3
14	Cd	111	1.015	0.954	0.982	0.966	0.972	0.993	0.980	99.6	2.2
15	Sn	118	298.656	299.129	298.070	300.731	298.601	299.996	299.197	100.2	0.3
16	Sb	121	45.832	45.540	46.110	45.934	45.792	45.808	45.836	100.8	0.4
17	Ba	137	339.115	338.108	338.480	340.942	338.811	339.563	339.170	100.1	0.3
18	Os	189	5.103	5.088	5.086	5.111	5.076	5.097	5.093	102.2	0.2
19	Ir	193	5.166	5.128	5.164	5.134	5.170	5.206	5.161	103.5	0.5
20	Pt	195	5.128	5.122	5.096	5.122	5.085	5.150	5.117	102.8	0.5
21	Au	197	51.317	52.315	52.572	52.806	52.938	53.174	52.520	106.8	1.3
22	Hg	201	1.576	1.559	1.570	1.588	1.574	1.564	1.572	105.1	0.6
23	Tl	205	4.047	4.078	4.007	4.072	4.074	4.105	4.064	102.5	0.8
24	Pb	208	2.498	2.527	2.508	2.510	2.534	2.522	2.517	100.5	0.5

표 11. 실내 정밀성 시험 데이터(spiked 1.0J, 다른 시험자가 분석).

	원소	질량	시료 + 1.0J(ppb)						평균	회수율(%)	상대표준편차(%), n=12
			1회	2회	3회	4회	5회	6회			
1	Li	7	127.244	129.425	129.087	129.403	128.811	128.265	128.706	102.3	0.7
2	V	51	4.882	4.962	4.921	4.970	4.951	4.948	4.939	98.4	0.6
3	Cr	53	545.819	549.612	544.202	551.345	553.600	552.464	549.507	99.6	0.7
4	Co	59	2.464	2.474	2.466	2.472	2.468	2.464	2.468	97.6	0.4
5	Ni	60	9.853	9.862	9.865	9.893	9.915	9.854	9.874	98.0	0.4
6	Cu	63	147.730	148.354	148.372	148.763	148.668	148.128	148.336	99.0	0.3
7	As	75	7.218	6.968	7.283	7.348	7.065	7.089	7.162	96.9	2.0
8	Se	78	38.867	38.914	38.692	39.487	39.534	39.836	39.222	99.6	2.1
9	Mo	95	750.430	748.476	755.884	759.524	753.301	750.896	753.085	99.7	0.6
10	Ru	101	4.950	4.931	4.976	4.976	4.998	4.971	4.967	99.3	0.4
11	Rh	103	5.004	5.025	4.984	5.083	5.074	5.074	5.041	101.5	0.8
12	Pd	105	4.931	4.940	4.934	4.958	4.983	4.971	4.953	99.5	0.5
13	Ag	107	4.847	4.826	4.897	4.815	4.896	4.909	4.865	98.8	0.6
14	Cd	111	0.987	0.974	1.026	0.969	0.982	0.974	0.986	97.8	2.1
15	Sn	118	299.822	299.667	300.869	303.657	300.522	299.547	300.681	100.0	0.5
16	Sb	121	45.561	45.838	46.196	46.160	46.479	45.946	46.030	101.1	0.6
17	Ba	137	336.233	337.454	340.000	340.051	341.593	339.569	339.150	100.1	0.4
18	Os	189	5.063	5.095	5.137	5.109	5.128	5.119	5.108	102.6	0.4
19	Ir	193	5.154	5.231	5.183	5.153	5.244	5.181	5.191	103.0	0.7
20	Pt	195	5.112	5.148	5.124	5.124	5.150	5.165	5.137	103.1	0.5
21	Au	197	50.609	52.237	52.367	52.828	53.353	53.182	52.429	106.8	1.5
22	Hg	201	1.580	1.568	1.578	1.596	1.594	1.560	1.579	104.8	0.8
23	Tl	205	4.031	4.064	4.066	4.083	4.069	4.114	4.071	102.8	0.7
24	Pb	208	2.489	2.524	2.488	2.526	2.504	2.521	2.509	100.4	0.6

위와 같이 모든 데이터의 상대표준편차가 대한민국 약전에서 제안하는 규제치인 정밀도 시험 상대표준편차 20%이내와 실내 정밀성 상대표준편차 25%이내를 모두 만족할 뿐만 아니라 모든 데이터가 3% 이내의 상대표준편차를 보이며 높은 재현성 데이터를 Agilent 7850 ICP-MS를 통해 얻을 수 있습니다.

시스템 적합성 평가

또한 모든 시험을 시작하기 전 시스템 적합성 평가를 위해 1.5J값의 표준액을 측정하고, 모든 시험을 마무리한 뒤와 다시 같은 시료를 측정하였을 때 측정값을 통해 시스템이 많은 시료를 측정해도 데이터의 변화가 거의 없는 것을 아래의 표 12를 통해 알 수 있으며, 이 또한 대한민국 약전에서 제시하는 신호이동 20%이내에 적합한 것을 확인할 수 있습니다.

표 12. 시스템 적합성 시험 결과.

	원소	질량	SST 1.5J, MV 전(ppb)	SST 1.5J, MV 후(ppb)	신호이동(%)
1	Li	7	187.463	194.279	3.64
2	V	51	7.396	7.403	0.09
3	Cr	53	803.303	813.567	1.28
4	Co	59	3.708	3.700	0.20
5	Ni	60	14.943	14.916	0.18
6	Cu	63	221.391	224.719	1.50
7	As	75	10.856	11.046	1.75
8	Se	78	57.640	57.815	0.30
9	Mo	95	1113.199	1122.200	0.81
10	Ru	101	7.398	7.447	0.67
11	Rh	103	7.480	7.504	0.33
12	Pd	105	7.438	7.476	0.51
13	Ag	107	7.315	7.399	1.15
14	Cd	111	1.487	1.474	0.89
15	Sn	118	446.558	452.386	1.30
16	Sb	121	67.462	68.151	1.02
17	Ba	137	522.976	541.997	3.64
18	Os	189	7.429	7.634	2.76
19	Ir	193	7.600	7.812	2.79
20	Pt	195	7.514	7.683	2.24
21	Au	197	76.917	77.995	1.40
22	Hg	201	2.257	2.354	4.32
23	Tl	205	6.020	6.190	2.83
24	Pb	208	3.691	3.841	4.05

결론 및 고찰

본 응용 자료에서는 대한민국 약전 및 전 세계의 대부분의 약전에서 제시하고 있는 '완제의약품 내의 금속(원소) 불순물 시험법'에 대해서 전반적인 내용과 그에 따른 시험법 작성 및 검증에 대해 알아보았습니다.

분석결과 모든 데이터가 약전에서 제시하고 있는 정확성, 정밀성 그리고 실험실 내 정밀성까지 모두 만족하는 것을 볼 수 있었고, 또한 시스템 적합성도 확인할 수 있었습니다.

그리고 본 검증을 통해 해당 인공분물 시료는 규제에 만족하는 것을 확인할 수 있었습니다.

마지막으로 Agilent 7850 ICP-MS는 이 모든 규제를 수행하는데 전혀 문제가 없음을 확인하였으며, 보다 빠르고 정확한 분석법을 시험자의 시료에 맞게 지원하고 있어 시험자는 큰 어려움 없이 규제를 수행할 수 있습니다.

참고 문헌

1. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Resistration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities, Q3D Step 4 version, 16, December 2014.
2. 의약품 금속불순물 평가 및 관리 가이드라인[민원인안내서], 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의약품심사부, 2017년 4월.
3. 의약품의 품목허가 신고 심사 규정, 식품의약품안전처 의약품정책과, 식품의약품안전처고시 제2019-26호, 2019. 03. 29.
4. 대한민국 약전 제12개정(식품의약품안전처고시제2019-102호,2019.11.06.), 식품의약품안전처.
5. 의약품 금속불순물 관리 질의응답집(안)[민원인안내서], 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의약품심사부, 2019년 9월.
6. United States Pharmacopeia(USP) 40-NF 35, <232> Elemental Impurities-Limits.
7. United States Pharmacopeia(USP) 38-NF 33, <232> Elemental Impurities-Procedures.

8. O. Chahrouret al., Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient(API) according to USP 232/233, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 145, (2017), 84-90.
9. 의약품 내 금속(원소)불순물 관리를 위한 시험법 및 분석 시 유의점, 대한약전포럼, 40~64p, Vol.17, No.1, June 2020 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원.1) 식품의 기준 및 규격 고시전문, 식약처 고시 제2021-26호(2021.3.25).

www.agilent.com/chem

DE44412.9938773148

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2021
2021년 10월 20일, 한국에서 발행
5994-4161KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com