

Agilent 7850 ICP-MS를 이용한 액상 외용도포제의 금속(원소) 불순물 (Elemental Impurities)의 분석 및 시험법 검증(Method Validation) 과정의 소개

저자

한철우, 김도현
김영진, 최혜원
한국애질런트테크놀로지스(주)

개요

안전한 의약품의 제조를 위해 국내 뿐만 아니라 세계적으로도 대부분의 나라에서 의약품에 대한 시험법(이하 “약전”이라고 함)을 개정하고 있으며, 특히 최근 중금속에 관한 이슈가 커지면서 각 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 국내에서도 국제조화를 통한 국내 의약품 안전성 확보 및 국제경쟁력 강화를 위하여 식품의약품안전처에서는 2019년 11월 대한민국 약전 12개정(식약처 고시 제2019-102호)을 통해 금속(원소)불순물 시험법을 신설하여 완제의약품 중 금속(원소) 불순물 분석에 대한 경구, 비경구, 흡입 투여경로에 대해 24개 금속불순물(Elemental Impurities)의 1일노출허용량을 제시합니다. 하지만 피부와 경피 적용 제품은 금속불순물의 PDE가 공식적으로 설정되어 있지 않았지만 가장 중요한 분야로 여겨져 왔으며, Q3D 개발과정에서 피부 및 피하경로 PDE 개발에 관심이 발생하여 2022년 3월 해당 내용의 가이드라인을 발표하였습니다.

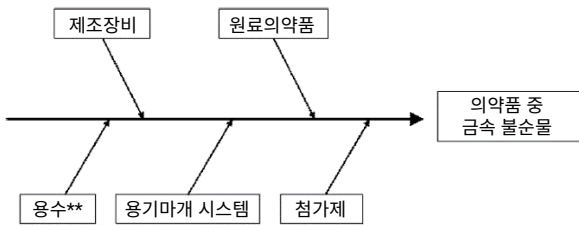
이에 맞춰 한국애질런트에서는 추가된 가이드라인의 내용을 보다 쉽고 빠르게 이해하고 수행할 수 있도록 실제 액상 외용도포제 시료를 이용하여 시험법을 작성하였습니다.

서론

금속불순물의 기원

식품의약품안전처에서는 2019년 11월 대한민국약전 12개정 (식약처고시 제2019-102호)을 통해 금속(원소)불순물 시험법을 신설하여 완제의약품 중 금속(원소) 불순물 분석에 대한 분석방법 및 시험법 검증(Method Validaton)을 발표하였습니다.

의약품에 존재하는 금속(원소)불순물의 출처는 우리가 생각하는 것보다 다양합니다. 원료의약품을 합성하는 과정에서 의도적으로 투입된 촉매제의 잔류물이거나, 불순물(공정 장비나 용기마개시스템과의 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 있습니다.

** 정제수나 주사용수가 제조공정에 사용될 경우 공정서(예, 유럽약전, 일본약전, 미국약전)의 용수 품질 요건을 준수함으로써 용수에 의한 금속 불순물 혼입 위험을 감소시킬 수 있습니다.

그림 1. 완제의약품 제조에 사용되는 일반적인 원자재, 장비, 구성성분의 예.

위의 그림 1에서 보이는 것과 같이 금속(원소)불순물은 어디에서나 유래될 수 있으며, 평소 시험자들이 신경 쓰지 않았던 부분에서도 충분히 유래될 수 있습니다. 특히 제조장비 부분에서는 공장 내의 제조시설이 대부분 스테인레스 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 주 원료 뿐만 아니라 모든 제조 과정 및 포장용기에 이르기까지 모든 경로를 배제하지 않고 검토하는 것이 필요합니다.

2019년 9월에 발간된 “의약품 금속불순물 관리 질의응답집”에 따르면 금속(원소) 불순물은 “합성과정에서 의도적으로 사용된 촉매 등의 잔류, 제조장비나 용기마개와의 반응으로 침출·생성되거나 원료약품의 오염물질”로 정의하고 있습니다. 따라서 잔류물이나 오염물이 아닌 금속물질에 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 투입되는 무기시약에서 유래되는 금속(원소) 불순물에 대해서는 위해평가대상에 포함되어야 합니다.

금속(원소) 불순물 규제의 적용범위

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

“새로운 완제의약품(ICH Q6A와 Q6B의 정의에 따름)과 기존 원료의약품을 함유하는 새로운 완제의약품에 적용합니다. 정제 단백질과 폴리펩타이드(재조합 유래와 비재조합 유래의 단백질과 폴리펩타이드 포함) 및 이들의 유도체를 함유하는 완제의약품, 그리고 이 유도체를 구성성분(예, 접합체)으로 포함하는 완제의약품이 적용 대상입니다. 또한 합성 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 올리고사카라이드를 함유 함유하는 완제의약품도 적용 대상에 속합니다.

생약제제, 방사성의약품, 백신, 세포대사물질, DNA 제제, 알레르기 유발 추출물, 세포, 전혈, 세포성 혈액성분 또는 혈장과 혈장 유래물질을 포함하는 혈액제제, 전신 순환 용도가 아닌 투석액, 치료 효과를 위하여 의약품에 의도적으로 투입된 금속을 함유하는 제제에 적용되지 않습니다. 또한 유전자 기반 제제(유전자 치료제), 세포 기반 제제(세포 치료제), 조직 기반 제제(조직 공학)도 적용 대상이 아닙니다.”

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

또한 원료의약품은 해당 규제에 포함되지 않습니다. 하지만 USP232에서 기술하고 있는 바와 같이 대부분의 완제의약품내의 금속(원소) 불순물은 그 주원료에서 유래될 수 있으며, 그러므로 완제의약품 제조자는 사용하는 원료의 정확한 함량과 그 원료내의 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 계산값을 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 제조사에서 원료생산회사에 제공받고 있는 원료에 대해 금속(원소) 불순물에 대한 성적서를 요청받고 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 함유하고 있는 높은 순도의 원료 및 부자재는 그렇지 않은 원료 및 부자재보다 단가가 높을지라도 완제품 제조자가 규제를 대응하는데 있어서는 경쟁력이 높다는 것은 제약산업 뿐만 아니라 식품이나 화장품 등 다른 산업분야에서 이미 검증되어 있는 부분이기 때문입니다.

피부 및 경피 경로 금속불순물 한계에 대한 개요

2014년 12월 ICH는 전문가위원회에서 개발한 ICH Q3D 금속불순물 가이드라인을 승인하였으며, 그 안에서 경구, 비경구, 흡입 투여경로에 대해 24종의 금속불순물의 PDE를 제시하였습니다. 이전 애질런트에서 발간한 금속불순물관련 응용 자료에서도 해당 내용의 자세한 사항과 PDE 설정 원칙이 기술되어 있습니다.

여러가지 복용법에 관련한 내용이 모두 기술되어 있었지만 피부 및 경피 적용 제품은 금속불순물의 PDE가 공식적으로 설정되어 있지 않은 가장 중요한 분야로 Q3D 개발 과정에서 피부 및 피하 경로 PDE 개발에 관심이 발생하게 되었습니다.

피부와 경피투여 한계를 설정하는데 있어 피부가 하는 역할이 매우 많다는 것을 알 수 있으며, 피부는 외피와 진피로 구성되고 각각은 여러 세포층으로 구성되어 있어 진피 또는 경피에 대한 흡수는 화학물질이 피부 외부표면에서 전신순환으로 이동하는 것으로써 피부의 특징, 해부학적 부위, 적용되는 화학물질의 특성, 적용의 특징에 따라 달라질 수 있습니다.

흡수의 1차 장벽은 가장 바깥층인 외피(각질층)로 일반적으로 15~20층의 비생존 세포로 구성됩니다. 각질층은 금속이온과 같은 대전 분자와 소수성 화합물에 대한 매우 효과적인 장벽 역할을 합니다. 이러한 이유로 API등 물질의 전신순환으로 경피 전달에는 일반적으로 주성분의 경피 흡수를 돕는 물리적, 화학적 인자(예: 침투증진제)가 필요합니다.

“침투 증진제”의 경우 API 침투를 증진시키는 인자가 물리화학적 특성이 근본적으로 다르기 때문에 금속불순물에 대개는 적용할 수 없으며, 피부에 적용되는 금속불순물의 전신흡수를 평가하는 연구가 많이 수행되지 않았습니

다. 피부층의 여러 특성은 여러 문헌자료에서 기술하는 바와 같이 전신노출에 대한 중요한 장벽 역할을 합니다. 이러한 전신노출은 해당 가이드라인 범위에 속하는 평가된 금속불순물 대부분의 1% 미만 흡수인것으로 보고되었습니다.

본 응용 자료에서 참조한 가이드라인에 포함된 금속은 과학 저널, 정부 연구 보고서 및 연구, 규제당국 연구 및 평가 보고서에 포함된 공개적으로 이용가능한 자료를 검토하여 평가한 것입니다. 일반적으로 과학 문헌의 연구는 경피 흡수 보다 피부층에서 금속불순물의 소멸을 단순히 보고한 것이며, 거기에 더해 경피 경로에 대한 위해평가에 대한 직업적 노출을 평가하는 적합한 표준이 없어 결론적으로 금속마다 한계를 설정하는 일반 접근법을 채택했습니다.

피부 및 경피 경로 금속불순물 한계에 대한 범위

Q3D의 해당 내용은 국소 또는 전신 효과를 의도한 피부 및 경피 의약품에 적용됩니다.(해당 내용은 “피부제품(Cutaneous products)”으로 칭함). 점막투여(경구, 비강, 질내), 국소 점안, 직장 또는 피하 및 경피하 투여 경로에는 적용되지 않습니다.

규제원소의 분류 및 복용법에 따른 규제치의 분류

대한민국약전 12개정에 따르면 규제 원소는 아래의 그림 2와 같이 총 24종의 원소로 나뉘어져 있으며, 그 원소들은 그 일반적인 절대농도치가 아닌 상대적 독성수준(Permitted Daily Exposures, PDE) 및 완제의약품 중에 혼입될 가능성에 따라 3가지 분류로 분류됩니다. 또한 해당 그림에서는 피부제품에 대한 PDE값도 함께 제시하고 있으며, 피부제품에 대한 안전성 평가원칙, 금속불순물 경피흡수에 관한 내용, 진피에 직접 적용하는 제품의 PDE와 함께 피부제품 1일 노출 허용량의 결정 및 산출에 대한 자세한 내용은 식품의약품안전처 가이드라인에 자세하게 기술되어 있습니다.

그림 2에서는 기존 가이드라인과 달리 20개의 원소만을 표기하고 있습니다. 이러한 부분은 팔라듐(Pd)의 PDE 값이 이리듐(Ir), 오스뮴(Os), 로듐(Rh), 루테튬(Ru)에 동일하게 적용되기에 표기되지 않은 것입니다. 시험 시 반드시 24종 모두 시험에 임해야 합니다. 또한 아래의 그림 2에서 표기된 것과 같이 Class 2B의 금속과 피부 PDE가 500µg/day인 Class3 금속은 위해성평가를 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 경우는 반드시 평가 항목에 포함되어야만 합니다.

그림 3에서는 PDE를 1일 용량 10g을 사용하여 산출하여 농도기준으로 표현한 표입니다. 해당 표에는 피부 및 경피 농도 제한(CTCL)에 대해 코발트(Co)와 니켈(Ni)에 관해 언급되어 있으며, 자세한 내용은 해당 가이드라인에 언급되어 있습니다. 피부 PDE와 CTCL의 규제가 모두 있는 금속의 경우 두 제한값을 모두 충족해야 합니다. 두 결과가 상충하는 경우 그 중 최저값이 적용되어야 합니다. 예를 들어 코발트(Co)의 경우 10g 용량일 때 산출된 피부 농도는 5µg/g입니다. 하지만 1g 용량일때는 1일 농도는 50µg/g으로 CTCL 35µg/g을 초과하므로 이런 경우에는 CTCL값이 사용되어야 합니다.

| 금속 | 분류 | 비교용 ICH Q3D(R1) 자료 PDE(µg/day) | | | 피부 제품 | | |
|-----------------|----|-----------------------------------|------|-----|--------------|-----------------|---|
| | | 경구 | 비경구 | 흡입 | PDE (µg/day) | 감작발생 CTCL(µg/g) | 의도적으로 첨가되지 않은 경우 위해 평가에 포함 ^{1,2,3} |
| Cd | 1 | 5 | 2 | 3 | 20 | - | 예 |
| Pb | 1 | 5 | 5 | 5 | 50 | - | 예 |
| As | 1 | 15 | 15 | 2 | 30 | - | 예 |
| Hg | 1 | 30 | 3 | 1 | 30 | - | 예 |
| Co | 2A | 50 | 5 | 3 | 50 | 35 | 예 |
| V | 2A | 100 | 10 | 1 | 100 | - | 예 |
| Ni | 2A | 200 | 20 | 6 | 200 | 35 | 예 |
| Tl | 2B | 8 | 8 | 8 | 8 | - | 아니오 |
| Au | 2B | 300 | 300 | 3 | 3000 | - | 아니오 |
| Pd ⁴ | 2B | 100 | 10 | 1 | 100 | - | 아니오 |
| Se | 2B | 150 | 80 | 130 | 800 | - | 아니오 |
| Ag | 2B | 150 | 15 | 7 | 150 | - | 아니오 |
| Pt | 2B | 100 | 10 | 1 | 100 | - | 아니오 |
| Li | 3 | 550 | 250 | 25 | 2500 | - | 아니오 |
| Sb | 3 | 1200 | 90 | 20 | 900 | - | 아니오 |
| Ba | 3 | 1400 | 700 | 300 | 7000 | - | 아니오 |
| Mo | 3 | 3000 | 1500 | 10 | 15000 | - | 아니오 |
| Cu | 3 | 3000 | 300 | 30 | 3000 | - | 아니오 |
| Sn | 3 | 6000 | 600 | 60 | 6000 | - | 아니오 |
| Cr | 3 | 11000 | 1100 | 3 | 11000 | - | 아니오 |

그림 2. 피부제품에 대한 금속(원소) 불순물의 PDE값 및 위험평가 대상금속.

| 금속 | 분류 | 피부 PDE (µg/day) | 1일 용량 10g 피부 농도 ¹ (kg/g) | 감작 발생 CTCL (µg/g) |
|-----------------|----|-----------------|-------------------------------------|-------------------|
| Cd | 1 | 20 | 2 | - |
| Pb | 1 | 50 | 25 | - |
| As | 1 | 30 | 3 | - |
| Hg | 1 | 30 | 3 | - |
| Co | 2A | 50 | 5 ^b | 35 |
| V | 2A | 100 | 10 | - |
| Ni | 2A | 200 | 20 ² | 35 |
| Tl | 2B | 8 | 0.8 | - |
| Au | 2B | 3000 | 300 | - |
| Pd ³ | 2B | 100 | 10 | - |
| Se | 2B | 800 | 80 | - |
| Ag | 2B | 150 | 15 | - |
| Pt | 2B | 100 | 10 | - |
| Li | 3 | 2500 | 250 | - |
| Sb | 3 | 900 | 90 | - |
| Ba | 3 | 7000 | 700 | - |
| Mo | 3 | 15000 | 1500 | - |
| Cu | 3 | 3000 | 300 | - |
| Sn | 3 | 6000 | 600 | - |
| Cr | 3 | 11000 | 1100 | - |

그림 3. 피부 PDE 및 10g 용량인 경우 농도제한.

대한민국약전의 일반시험법에 따르면 “금속(원소) 불순물 시험법은 유도결합 플라즈마(Inductively coupled plasma, ICP) 시험법(분광시험법(OES 또는 AES), 질량시험법(MS))으로 의약품 중에 혼재하는 금속(준금속 원소 및 비금속 원소 포함) 불순물의 양을 측정하는 방법입니다. 유도결합 플라즈마 시험법에 따라 시험하는 경우 시험 결과에 영향을 미치지 않는 것이 입증되면 원자흡광광도법(AAS)을 적용하여 시험할 수 있습니다.”라고 기술되어 있습니다.

기존의 약전에서는 분석이 필요한 경우 기기의 종류가 모두 선정되어 있는 것이 일반적이었으나, 서두에 기술한대로 시험법을 약전에서 제안하기에는 한계가 존재하다보니 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 과정에서도 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 Semiconductor grade를 사용하였으며, Mix 표준품은 대한약전에 기술된대로 공인된 기관에서 인증 받은 금속불순물이 내재되어 있지 않은 표준품(부품 번호: Inorganic Ventures I V-45526_A, IV-48994-A, IV-69597-B, PARMA-568, PARMA-569)을 사용하였습니다. 희석에 사용하는 증류수는 초순수를 사용하였습니다.

규제에 대한 검량선은 시료정보와 같이 작성하였고 본 응용 자료에서는 가이드라인과 같이 CTCL에 대해서는 적용하지 않았습니다.

표 1. 시료 정보.

| 시료정보 | 검량선용 표준용액 |
|--|------------|
| 휘발성이 있고 멘톨향이 진한 액상의 외용도포제 | 각 원소별 바탕시료 |
| 하루최대투여량 (Maximum daily dose): 10g | 각 원소별 0.5J |
| 추가 희석배수: 샘플 0.1g/ 질산4%+염산1% 50g → 500배 | 각 원소별 1.0J |
| J value : 피부제품규제치/10/500 | 각 원소별 1.5J |

표 2. 검량선 작성을 위한 표준용액 농도제조(단위: ppb).

| 원소 | 질량 수 | Std1 (바탕시료) | Std2 (0.5J) | Std3 (1.0J) | Std3 (1.0J) |
|----|------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Li | 7 | 0 | 250 | 500 | 750 |
| V | 51 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Cr | 53 | 0 | 1100 | 2200 | 3300 |
| Co | 59 | 0 | 5 | 10 | 15 |
| Ni | 60 | 0 | 20 | 40 | 60 |
| Cu | 63 | 0 | 300 | 600 | 900 |
| As | 75 | 0 | 3 | 6 | 9 |
| Se | 78 | 0 | 80 | 160 | 240 |
| Mo | 95 | 0 | 1500 | 3000 | 4500 |
| Ru | 101 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Rh | 103 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Pd | 105 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Ag | 107 | 0 | 15 | 30 | 45 |
| Cd | 111 | 0 | 2 | 4 | 6 |
| Sn | 118 | 0 | 600 | 1200 | 1800 |
| Sb | 121 | 0 | 90 | 180 | 270 |
| Ba | 137 | 0 | 700 | 1400 | 2100 |
| Os | 189 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Ir | 193 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Pt | 195 | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Au | 197 | 0 | 300 | 600 | 900 |
| Hg | 201 | 0 | 3 | 6 | 9 |
| Tl | 205 | 0 | 0.8 | 1.6 | 2.4 |
| Pb | 208 | 0 | 5 | 10 | 15 |

사용기기 및 조건

빠르고 정확한 분석을 위하여 Agilent 7850 ICP-MS 시스템을 사용하였으며, 샘플 도입부는 SPS4 autosampler를 포함하여 white-white sample tubing, micromist nebulizer, double pass spray chamber를 사용하였습니다. 또한 효율적인 시료 분석 및 획득된 데이터의 보다 빠르고 편리한 처리를 위하여 Agilent Masshunter Acquisition(ver. 5.2) 및 Masshunter Quantitative Analysis 소프트웨어를 사용하였습니다.

표 3. 사용기기 및 조건(튜닝 파라미터).

| 파라미터 | | 값 |
|--------|---------------------------|------------|
| 툰 모드 | | 헬륨 충돌 모드 |
| Plasma | RF Power | 1,550W |
| | RF Matching | 1.8V |
| | Sample Depth | 8.0mm |
| | Nebulizer Gas | 1.05L/min |
| | Nebulizer Pump | 0.1 rps |
| | Spray chamber temperature | 2 |
| Lenses | Extract 1 | 0.0 V |
| | Extract 2 | -190.0 V |
| | Omega bias | -100 V |
| | Omega Lens | 9.0 V |
| | Cell Entrance | -50 V |
| | Cell Exit | -70 V |
| | Deflect | 0.0 V |
| | Plate bias | -60 V |
| Cell | Used Gas | Helium |
| | He flow rate | 5.0 ml/min |
| | OctP Bias | -18.0 V |
| | Octp RF | 190 V |
| | Energy Discrimination | 3 V |

시험법 검증(Method validation)의 과정

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

대한민국약전 12개정에서는 시험법의 밸리데이션의 요건으로 “시험법의 목적에 따라 한도시험 또는 정량시험을 사용할 수 있으며, 모든 시험법은 아래의 밸리데이션 요건에 적합함을 입증합니다.” 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(System Suitability, SST)

시스템 적합성 단계는 장비의 종류에 관계없이 현재 분석하고 있는 장비가 모든 시료를 분석하기에 적합한지에 대한 시험이며, 약전에 모두 기록되어 있는 내용으로 검액주입 전/후에 분석한 표준액 1(1.5J)의 결과를 비교하여 각 금속별 드리프트(drift)가 20% 미만이어야 합니다. 쉽게 도식화 하면 아래의 그림 4의 두 개의 샘플의 데이터의 드리프트가 20% 미만이어야 합니다.



그림 4. 시스템 적합성 예시그림.

2) 정확도(Accuracy)

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

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

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

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

아래 그림 5에서 예시를 보이는것과 같이 시료를 제조하여 정확도를 시험합니다. 본 응용자료에서는 0.3J, 0.5J, 1.0J, 1.5J까지 총 4개의 농도를 이용하여 시험조건의 정확도를 더 향상시켰습니다.

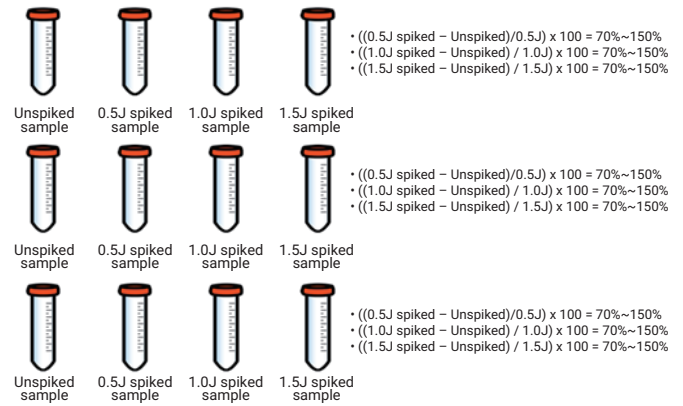


그림 5. 정확도 시험 예시그림.

3) 정밀도(Precision)

정밀도 시험은 앞에서 수행한 정확도 시험을 통해 시험자가 설정한 시험법이 얼마나 재현성 있게 분석이 되는 좋은 방법인지를 확인하는 과정입니다. 본 과정에서는 대한민국약전에 기록되어 있는 것과 같이 반복성과 실험실내 정밀도 두가지 모두 시험해야 합니다.

i. 반복성(Repeatability)

반복성 시험은 대한민국약전에 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 6에서 쉽게 파악해 볼 수 있습니다.

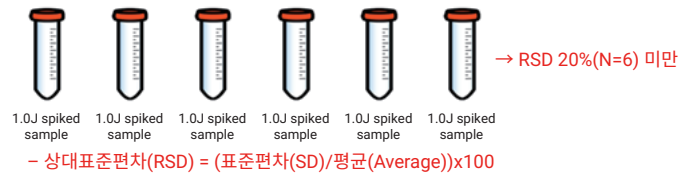


그림 6. 정밀도 시험 중 반복성 시험의 예시그림.

ii. 실험실내 정밀도(Intermediate Precision(Ruggedness))

실험실내 정밀도는 본 시험법 밸리데이션을 진행한 시험자 뿐만아니라 다른 상황이나 다른 시험자가 같은 실험을 진행하여도 동일한 결과를 얻어낼 수 있을 정도로 좋은 시험법인지를 알아보는 과정입니다.

대한민국약전에서는 “다른 일자, 다른 시험장비, 다른 시험자, 또는 이들을 조합하여 반복성 시험을 재실시합니다. 반복성의 결과와 통합하여 총 분석횟수가 12회가 되도록 합니다.”라고 기록하고 있으며, 추가로 6개의 시료를 분석하게 되며, 그 결과 아래의 그림 7과 같이 미만으로 상대표준편차가 25% 미만으로 분석되어야 합니다.

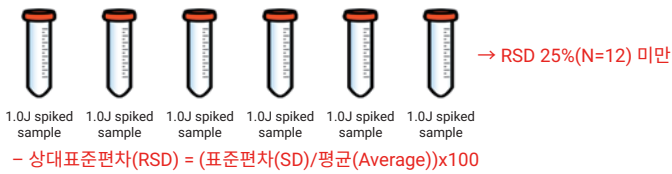
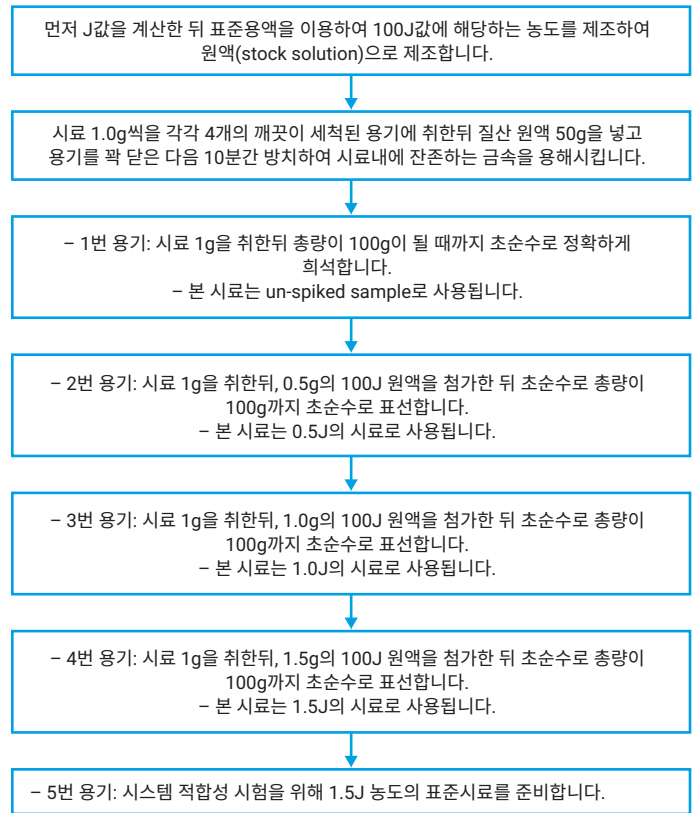


그림 7. 정밀도 시험 중 실험실내 정밀도 시험의 예시그림.

하지만 이러한 시험의 과정은 많은 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 받아들 수 있습니다.

그 대표적으로 본 응용자료에서는 간단한 전처리법으로 시험할 수 있는 기타제제로 분류되어 있는 제품 중 하나인 인공눈물에 대해 시험법 밸리데이션을 직접 수행하여 본 응용자료를 구독하는 시험자들에게 쉽고 빠르게 이해시켜주는데 목적이 있습니다.

시료의 전처리 및 시험법 검증(method validation) 준비



결과

검량선의 작성

표 4. 검량선 작성 및 실측 농도값에 따른 검출한계 산출(단위: ppb).

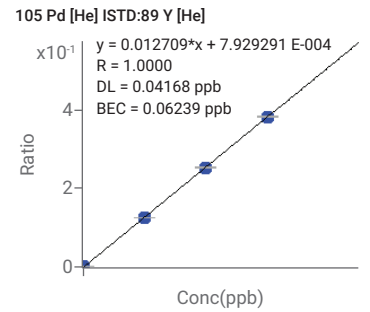
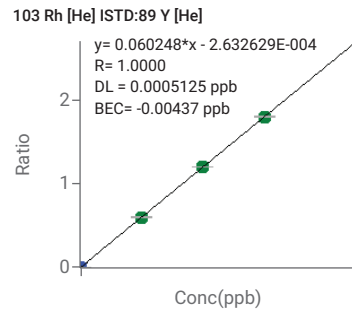
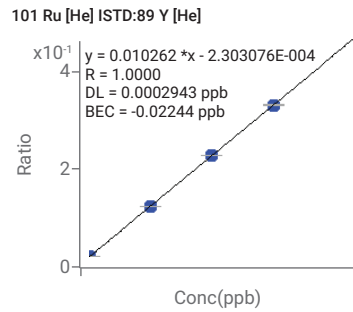
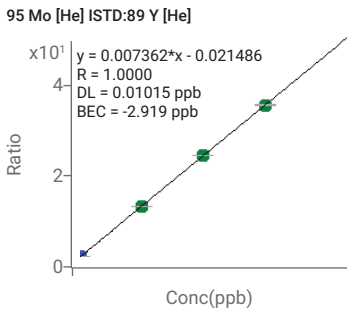
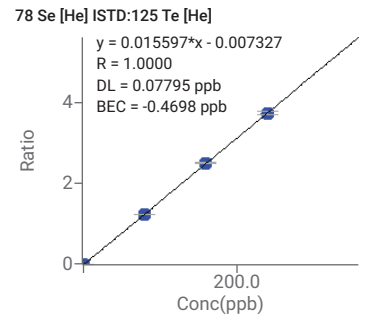
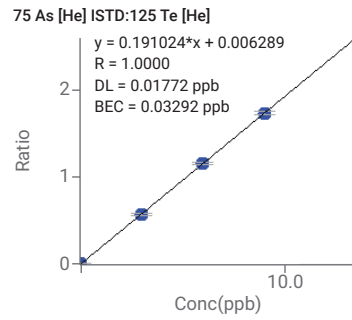
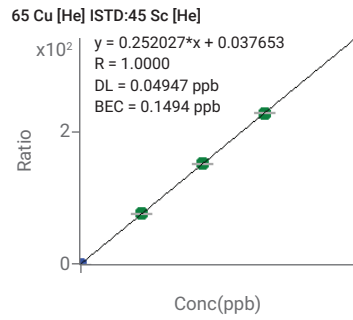
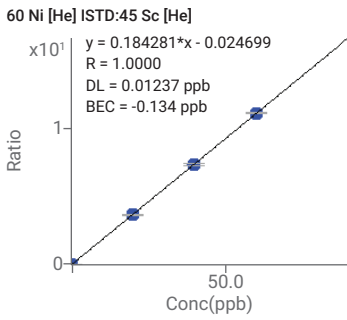
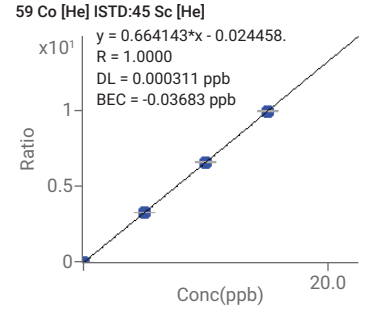
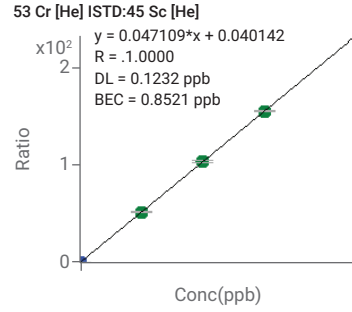
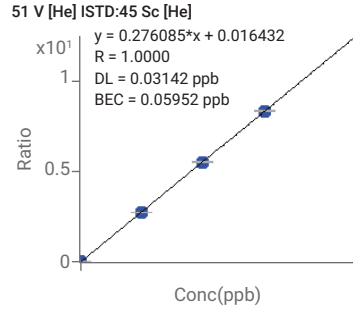
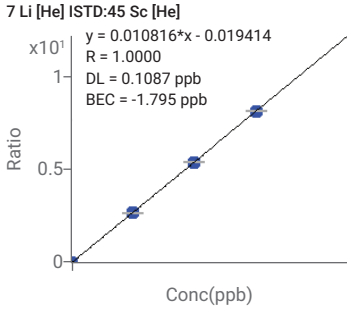
| | 원소 | 질량 수 | DL | BEC | R | STD 1 | STD 2 | STD3 | STD4 |
|----|----|------|-------|--------|---------|--------|----------|----------|----------|
| 1 | Li | 7 | 0.109 | -1.795 | 0.99998 | 0.14 | 248.187 | 503.208 | 748.466 |
| 2 | V | 51 | 0.031 | 0.060 | 0.99996 | 0.027 | 9.871 | 20.177 | 29.925 |
| 3 | Cr | 53 | 0.123 | 0.852 | 1.00000 | <0.000 | 1097.974 | 2219.133 | 3287.92 |
| 4 | Co | 59 | 0.000 | -0.037 | 0.99998 | 0.017 | 4.92 | 10.108 | 14.954 |
| 5 | Ni | 60 | 0.012 | -0.134 | 0.99997 | 0.054 | 19.804 | 40.228 | 59.913 |
| 6 | Cu | 63 | 0.049 | 0.149 | 0.99999 | <0.000 | 299.307 | 601.93 | 898.944 |
| 7 | As | 75 | 0.018 | 0.033 | 0.99999 | <0.000 | 2.993 | 6.026 | 8.985 |
| 8 | Se | 78 | 0.078 | -0.470 | 0.99996 | 0.529 | 78.168 | 162.078 | 239.225 |
| 9 | Mo | 95 | 0.010 | -2.919 | 1.00000 | <0.000 | 1492.351 | 3025.965 | 4485.24 |
| 10 | Ru | 101 | 0.000 | -0.022 | 1.00000 | <0.000 | 9.951 | 20.219 | 29.87 |
| 11 | Rh | 103 | 0.001 | -0.004 | 1.00000 | <0.000 | 9.953 | 20.325 | 29.799 |
| 12 | Pd | 105 | 0.042 | 0.062 | 0.99998 | <0.000 | 9.871 | 20.267 | 29.865 |
| 13 | Ag | 107 | 0.004 | -0.028 | 0.99999 | <0.000 | 9.933 | 20.164 | 29.913 |
| 14 | Cd | 111 | 0.001 | 0.023 | 0.99995 | <0.000 | 2.008 | 4.019 | 5.985 |
| 15 | Sn | 118 | 0.021 | 0.050 | 0.99999 | <0.000 | 596.031 | 1211.903 | 1793.388 |
| 16 | Sb | 121 | 0.001 | 0.121 | 0.99999 | <0.000 | 89.835 | 182.617 | 268.31 |
| 17 | Ba | 137 | 0.003 | 4.226 | 0.99998 | <0.000 | 701.191 | 1405.361 | 2096.029 |
| 18 | Os | 189 | 0.001 | -0.027 | 0.99998 | 0.028 | 9.906 | 20.104 | 29.962 |
| 19 | Ir | 193 | 0.002 | -0.105 | 0.99995 | 0.065 | 9.894 | 20.017 | 30.024 |
| 20 | Pt | 195 | 0.001 | -0.054 | 0.99999 | 0.043 | 9.905 | 20.061 | 29.991 |
| 21 | Au | 197 | 0.041 | -2.297 | 0.99979 | 2.392 | 97.443 | 197.939 | 302.227 |
| 22 | Hg | 201 | 0.002 | -0.008 | 0.99990 | 0.021 | 2.978 | 5.98 | 9.02 |
| 23 | Tl | 205 | 0.000 | -0.019 | 0.99980 | 0.013 | 0.776 | 1.608 | 2.403 |
| 24 | Pb | 208 | 0.001 | 0.027 | 0.99995 | 0.01 | 4.978 | 10.013 | 14.999 |

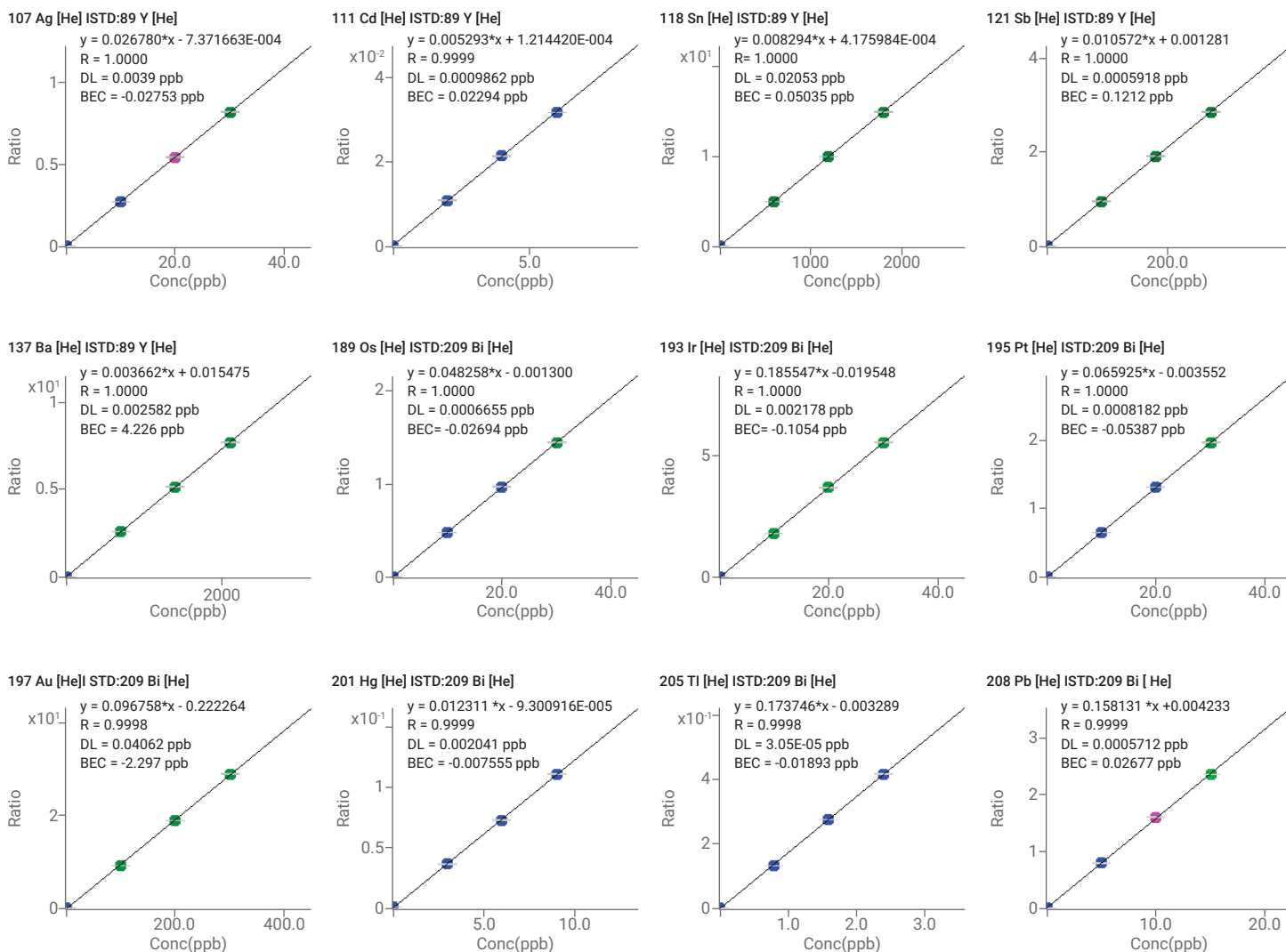
Agilent 7850 ICP-MS는 위의 표4와 같이 대한 약전에서 제시하는 24종 원소에 대해 모두 낮은 검출한계까지 분석할 수 있습니다.

검량선은 J값에 따라 계산되어 작성되었으며, R값에 보이는 것과 같이 모두 0.999이상의 직선성을 보이는 것을 알 수 있습니다.

이러한 결과를 통해 시험자는 “정량한계, 직선성, 특이성” 등을 모두 한꺼번에 확인할 수 있어, 대한약전에서 표기되어 있는 것처럼 시험법 검증과정의 규제를 만족한다면 위의 세가지의 시험은 따로 하지 않아도 만족한 것으로 판단할 수 있습니다.

원소별 검량선 데이터





정확도(Accuracy) 시험

실제 시료를 포함하여 각 표준용액 농도에 맞게 첨가하여 대한약전에 수록된 대로 3회 반복 측정하여 첨가한 농도의 회수율(Recovery)을 통해 정확도(Accuracy)를 시험하여야 합니다.

본 문서에서는 정확도 시험에 대해서는 이전에 작성된 응용 자료(Agilent 7850 ICP-MS를 이용한 점안제의 금속(원소) 불순물 분석 및 시험법 검증 과정 소개, 5994-4161KOKR)에서 기기에 대한 검증 및 시험법에 대한 검증이 완료되었다고 판단하여 진행하지 않았습니다.

정밀도(Precision)시험

정확도 시험이 마무리되면 모든 시험법은 반복하여 실험한 뒤 그 정확도의 정밀도를 확인하는 시험을 진행하게 됩니다. 본 금속불순물 시험법은 정밀도 뿐만 아니라 세가지의 조건(다른 사람, 다른 날짜, 다른 장비)을 제시하면서 한번 더 분석을 시도하여 실험실내 재현성까지도 확인하게 하는데 그 목적이 있습니다. 본 시험 노트에서는 정밀도 시험(표5)만 진행하였으며, 실내 정밀도 시험에 대해서는 정확도 시험과 같은 이유로 생략하였습니다.

표 5. 정밀도 시험 데이터(spiked 1.0J).

| | 원소 | 질량 수 | 1회 | 시료+1.0J(ppb) | | | | | 평균 | 회수율(%) | RSD(%), n=6 |
|----|----|------|---------|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|-------------|
| | | | | 2회 | 3회 | 4회 | 5회 | 6회 | | | |
| 1 | Li | 7 | 498.13 | 493.88 | 495.98 | 495.15 | 489.63 | 487.88 | 494.52 | 98.27 | 0.79 |
| 2 | V | 51 | 20.38 | 20.20 | 20.14 | 20.29 | 20.09 | 20.13 | 20.17 | 99.96 | 0.55 |
| 3 | Cr | 53 | 2232.03 | 2226.74 | 2219.80 | 2230.70 | 2219.61 | 2235.84 | 2228.72 | 100.43 | 0.30 |
| 4 | Co | 59 | 10.12 | 10.05 | 10.08 | 10.06 | 10.03 | 10.11 | 10.07 | 99.64 | 0.34 |
| 5 | Ni | 60 | 40.55 | 40.28 | 40.41 | 40.12 | 40.10 | 40.52 | 40.34 | 100.29 | 0.49 |
| 6 | Cu | 63 | 617.32 | 612.58 | 612.26 | 611.23 | 610.29 | 614.14 | 612.42 | 101.74 | 0.41 |
| 7 | As | 75 | 6.00 | 5.82 | 5.92 | 5.91 | 5.91 | 6.06 | 5.92 | 98.21 | 1.39 |
| 8 | Se | 78 | 193.62 | 190.63 | 190.90 | 194.58 | 194.63 | 195.29 | 194.10 | 119.76 | 1.04 |
| 9 | Mo | 95 | 2994.66 | 3009.65 | 3016.04 | 2980.14 | 3021.84 | 2995.83 | 3002.74 | 99.23 | 0.52 |
| 10 | Ru | 101 | 19.82 | 20.00 | 19.98 | 19.81 | 19.98 | 19.87 | 19.92 | 98.54 | 0.44 |
| 11 | Rh | 103 | 19.90 | 20.16 | 20.16 | 19.97 | 20.18 | 20.14 | 20.15 | 99.12 | 0.59 |
| 12 | Pd | 105 | 19.86 | 20.07 | 19.98 | 19.89 | 20.05 | 19.97 | 19.97 | 98.55 | 0.41 |
| 13 | Ag | 107 | 19.94 | 20.16 | 20.17 | 20.03 | 20.13 | 20.14 | 20.14 | 99.86 | 0.45 |
| 14 | Cd | 111 | 3.99 | 4.00 | 4.03 | 3.93 | 3.98 | 3.97 | 3.99 | 99.17 | 0.85 |
| 15 | Sn | 118 | 1189.21 | 1200.50 | 1194.55 | 1183.74 | 1199.67 | 1203.38 | 1197.11 | 98.78 | 0.63 |
| 16 | Sb | 121 | 181.58 | 184.11 | 182.79 | 181.56 | 183.68 | 183.19 | 182.99 | 100.21 | 0.58 |
| 17 | Ba | 137 | 1379.73 | 1397.64 | 1392.03 | 1384.16 | 1389.90 | 1386.36 | 1388.13 | 98.77 | 0.45 |
| 18 | Os | 189 | 20.15 | 20.30 | 20.38 | 20.37 | 20.34 | 20.31 | 20.33 | 101.10 | 0.41 |
| 19 | Ir | 193 | 20.19 | 20.12 | 20.19 | 20.18 | 20.15 | 20.15 | 20.16 | 100.74 | 0.15 |
| 20 | Pt | 195 | 19.92 | 20.03 | 19.92 | 20.09 | 20.02 | 19.99 | 20.01 | 99.73 | 0.34 |
| 21 | Au | 197 | 196.77 | 201.71 | 201.86 | 202.47 | 203.41 | 202.40 | 202.13 | 102.12 | 1.17 |
| 22 | Hg | 201 | 5.96 | 5.93 | 5.94 | 5.99 | 5.97 | 5.96 | 5.96 | 99.63 | 0.35 |
| 23 | Tl | 205 | 1.55 | 1.58 | 1.59 | 1.59 | 1.60 | 1.60 | 1.59 | 98.97 | 1.06 |
| 24 | Pb | 208 | 10.04 | 10.05 | 9.99 | 10.07 | 10.00 | 10.04 | 10.04 | 100.25 | 0.30 |

위와 같이 모든 데이터의 RSD값이 대한약전에서 제안하는 규제치인 정밀도시험 RSD 20% 이내를 모두 만족할 뿐만 아니라 모든 데이터가 2% 이내의 RSD를 보이며 높은 재현성 데이터를 Agilent 7850 ICP-MS를 통해 얻을 수 있습니다.

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 6을 통해 알 수 있으며, 이 또한 대한약전에서 제시하는 드리프트 20% 이내에 적합한 것을 확인할 수 있습니다.

시스템 적합성 평가

표 6. 시스템 적합성 시험결과.

| | 원소 | 질량 수 | MV 수행 전 SST 1.5J(ppb) | MV 수행 후 SST 1.5J(ppb) | 드리프트 (%) |
|----|----|------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| 1 | Li | 7 | 753.51 | 729.45 | 1.03 |
| 2 | V | 51 | 30.16 | 30.05 | 1.00 |
| 3 | Cr | 53 | 3338.30 | 3289.15 | 1.01 |
| 4 | Co | 59 | 15.10 | 14.97 | 1.01 |
| 5 | Ni | 60 | 60.62 | 59.76 | 1.01 |
| 6 | Cu | 63 | 908.15 | 895.08 | 1.01 |
| 7 | As | 75 | 9.12 | 9.13 | 1.00 |
| 8 | Se | 78 | 244.57 | 252.70 | 0.97 |
| 9 | Mo | 95 | 4486.50 | 4434.52 | 1.01 |
| 10 | Ru | 101 | 29.79 | 29.54 | 1.01 |
| 11 | Rh | 103 | 29.68 | 29.65 | 1.00 |
| 12 | Pd | 105 | 29.83 | 29.63 | 1.01 |
| 13 | Ag | 107 | 29.79 | 29.73 | 1.00 |
| 14 | Cd | 111 | 5.90 | 5.86 | 1.01 |
| 15 | Sn | 118 | 1786.12 | 1772.68 | 1.01 |
| 16 | Sb | 121 | 269.50 | 266.36 | 1.01 |
| 17 | Ba | 137 | 2093.06 | 2093.24 | 1.00 |
| 18 | Os | 189 | 30.00 | 29.78 | 1.01 |
| 19 | Ir | 193 | 30.26 | 29.94 | 1.01 |
| 20 | Pt | 195 | 30.47 | 29.71 | 1.03 |
| 21 | Au | 197 | 304.25 | 294.37 | 1.03 |
| 22 | Hg | 201 | 9.04 | 8.88 | 1.02 |
| 23 | Tl | 205 | 2.46 | 2.38 | 1.03 |
| 24 | Pb | 208 | 15.15 | 14.99 | 1.01 |

샘플시험 평가

표 7. 실제시료 시험결과 및 규제농도와의 비교.

| | 원소 | 질량 수 | J value 농도 | 피부제품 시료 | | |
|----|----|------|---------------|---------|--------|--------|
| | | | | 1회 | 2회 | 3회 |
| 1 | Li | 7 | 4 | 0.38 | 0.24 | 0.15 |
| 2 | V | 51 | 10 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| 3 | Cr | 53 | 6 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 4 | Co | 59 | 6 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| 5 | Ni | 60 | 10 | 0.06 | 0.06 | 0.05 |
| 6 | Cu | 63 | 20 | 0.23 | 0.22 | 0.21 |
| 7 | As | 75 | 40 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 8 | Se | 78 | 1.6 | 0.45 | 0.49 | 0.44 |
| 9 | Mo | 95 | 600 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 10 | Ru | 101 | 20 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 11 | Rh | 103 | 20 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 12 | Pd | 105 | 20 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 13 | Ag | 107 | 20 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 14 | Cd | 111 | 20 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 15 | Sn | 118 | 160 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 16 | Sb | 121 | 30 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 17 | Ba | 137 | 20 | <0.000 | <0.000 | <0.000 |
| 18 | Os | 189 | 500 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| 19 | Ir | 193 | 180 | 0.07 | 0.07 | 0.06 |
| 20 | Pt | 195 | 1400 | 0.04 | 0.04 | 0.04 |
| 21 | Au | 197 | 3000 | 2.67 | 2.39 | 2.16 |
| 22 | Hg | 201 | 600 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |
| 23 | Tl | 205 | 1200 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |
| 24 | Pb | 208 | 2200 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |

위의 표7과 같이 MV 진행 후 실제 시료를 분석한 결과 규제농도 대비 금속불순물의 검출이 거의 되지 않는 것을 확인할 수 있었습니다.

결론 및 고찰

본 문서에서는 대한약전 및 전세계의 대부분의 약전에서 제시하고 있는 “완제의약품 내의 금속(원소) 불순물 시험법” 내용 중 피부와 경피제품에 대한 규제에 대해서 전반적인 내용과 그에 따른 시험법 작성 및 검증에 대해 알아보았습니다.

분석결과 모든 데이터가 약전에서 제시하고 있는 정확도, 정밀도 그리고 실내 재현성까지 모두 만족하는 것을 볼 수 있었고, 또한 시스템 적합성까지 확인할 수 있었습니다.

그리고 본 검증을 통해 해당 피부제품 시료는 규제에 만족하는 것을 확인할 수 있습니다.

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

관련 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. 대한민국약전 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.
10. 의약품 금속불순물 평가 및 관리 가이드라인(민원인 안내서), 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의약품심사부, 2022년 3월.

www.agilent.com/chem

DE60120991

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023
2023년 8월 4일, 한국에서 발행
5994-6567KO

한국애질런트테크놀로지스(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

