

근적외선 분광광도법을 이용한 페노바르비탈정제의 정량법에 관한 연구

차기원* · 제금련 · 윤미옥 · 이수정 · 최현철 · 김호정 · 김효진*

식품의약품안전청 의약품평가부

*동덕여자대학교 약학과

*인하대학교 화학과

(2002. 1. 17 접수)

Determination of Phenobarbital in Intact Phenobarbital Tablets using NIRS

KI-Won Cha*, Keum Ryon Ze, Mi Ok Youn, Su Jung Lee, Hyun Cheol Choi,
Ho Jung Kim, and Hyo Jin Kim*

Drug Evaluation in Korea Food & Drug Administration

**Department of Pharmacy, Dongduk Women's University*

**Department of Chemistry, Inha University, Incheon 402-751, Korea*

(Received Jan. 17, 2002)

요 약 : 근적외선 분광광도법 (near infrared spectroscopy, NIRS)를 이용하여 의약품의 신속 정확한 분석법을 개발하였다. 제조회사에 따라 약효성분이 같고 유사한 부형제를 갖고 있는 페노바르비탈정제에서 페노바르비탈을 액체크로마토그래피로 분석한 분석치와 투과방식의 NIRS 의 부분최소자승법(partial least squares regression, PLSR) 으로 얻은 데이터와의 상관관계를 이용하여 검정선을 얻었다. 이 방법의 직선성, 정량범위, 재현성 등을 검토하여 본 분석법의 정확성을 검증하였다. 검정선의 상관계수는 0.9983이고 검정의 표준오차(SEC)는 0.14% 이었으며, 이 분석법의 시간별 및 날자별 정밀도인 CV 값은 각각 0.45%과 0.56% 이다.

Abstract : This paper describes a rapid determination of phenobarbital in intact phenobarbital tablets using partial least squares regression(PLSR) method of transmittance spectrum of near infrared (NIR) compared with the analytical data of liquid chromatography. The linearity, concentration range and precision of this analytical method are studied. The correlation coefficient of the calibration curve is 0.9983 and the standard error of calibration(SEC) is 0.14 %. Intra-day precision and Inter-day precision obtained in this method are CV = 0.45, CV =0.56, respectively.

Key words : near infrared spectroscopy, partial least square regression, phenobarbital,

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)32-860-7676 Fax : +82+(0)32-872-2520

E-mail : kwcha@inha.ac.kr

1. 서 론

근적외선 분광광도법은 유기물을 확인하는 분석방법으로서, C-H, N-H, O-H 및 S-H 등 작용기의 신축, 굽힘, 배진동 등에 의한 흡수가 780~2500 nm의 근적외선 영역에서 나타나므로 시료의 물리화학적 특성 등 많은 정보를 얻을 수 있다^{1,2}. 근적외선 영역은 1800년 William Herschel 경에 의해 처음 발견된 이후, 많은 잡음과 약한 신호로 인하여 활발한 연구가 진행되지 못하다. 1968년 미국 농무성의 Karl Norris 등이 처음으로 농산물에서 수분 분석에 근적외선 분광광도법을 이용하였다³. NIRS은 1980년 이후 컴퓨터 및 Chemometrics의 검정기법이 개발되어 새로운 분광광도법으로 주목받게 되었다⁴. 응용분야도 곡류, 육류 및 유제품의 수분, 지방, 단백질, 탄수화물과 섬유질의 정량분석 외에 사료, 섬유, 석유화학, 고분자분야 및 임상분야에서도 그 응용이 확대되고 있다. 제약산업의 적용은 1990년대 이후부터라 할 수 있으며⁵ 원료의 약품의 확인, 의약품의 제조공정, 중량편차, 함량시험 등의 품질관리에 관한 연구가 보고되어 있다⁶⁻²². 국내 제약분야에서의 NIRS 이용은 생약의 확인, 원산지 판별 및 녹용의 품질평가 등에 관한 연구가 보고되어 있다²³⁻²⁷.

지금까지 의약품의 확인, 함량시험 등의 품질관리는 대부분이 흡광광도법, 적외선 스펙트럼측정법, 고성능 액체크로마토그래프(HPLC), 가스크로마토그래프 등이 이용되고 있다. 이는 시료의 전처리로부터 최종 분석에 이르기까지 그 과정이 매우 까다롭고 숙련된 분석기술을 필요로 하고 있다. 또한 시료의 전처리과정에서 인체에 유해하고 고가인 유기용매와 장시간의 분석시간이 필요하다. 이에 비해 근적외선 분광광도법은 시료의 전처리가 거의 필요없이 비파괴적으로 신속하게, 여러 성분을 동시에 반복적으로 측정할 수 있어, 원료의약품의 확인에서부터 의약품 생산단계, 완제품의 품질검사 등에 이용되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 페노바르비탈 정제의 NIR 스펙트럼 특성을 연구하고, 그 결과로부터 페노바르비탈의 분석법을 개발하여 함량균일성 시험 등에 적용하고자 하였다. 내부표준용액을 이용한 HPLC 분석 결과를 기준분석치로 하고 NIR 투과스펙트럼의 부분최소제곱법(PLSR)을 사용하여 정량분석을 위한 최적의 검정선을 개발하고, 이를 의약품 허가등록을 위한 국제제약회의(international

conference of harmonization, ICH)가 권고하는 분석법의 타당성을 검증하였다²⁸. 그리고 본 분석법을 제조회사간 구분없이 생산되는 모든 페노바르비탈 정제에서 페노바르비탈 정량에 이용하고자 하였다.

2. 실험

2.1 시약 및 기기

2.1.1 시료와 시약

시판되는 페노바르비탈정(30 mg)을 각각 2 롯트씩 구입하여 검정선 개발 과 분석법에 대한 검증에 사용하였다. 회사별(D, H, W, S사) 제품조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Compositions of phenobarbital tablets obtained in manufacturers

Manufacturers		D	H	W	S
Active Ingredients	Phenobarbital	30 mg	30 mg	30 mg	30 mg
	Lactose	60 mg	58 mg	58 mg	50 mg
	Corn starch	O	O	O	-
	Magnesium stearate	O	O	O	O
	Carboxymethylcellulose calcium	-	O	O	-
Others Ingredients	Hydroxypropylcellulose	-	O	O	-
	Talc	-	O	O	-
	Microcrystalline cellulose	-	-	-	O
	Total mg phenobabita 1 % (w/w)	100 mg (30.00)	120 mg (25.00)	120 mg (25.00)	120 mg (25.00)

O : present, - : absent

페노바르비탈의 표준시약은 KFDA 표준시약을 사용하였으며, 시료 전처리 및 표준용액 제조 등에 사용된 메탄올은 시약급을, HPLC 이동상으로 사용한 용매는 HPLC급 아세트니트릴과 탈이온수를 사용하였다.

2.1.2 기기

투과도 측정이 가능한 FOSS NIR systems사의 NIR-6500 spectrometer를 사용하였으며, 각 롯트별 정제의 크기와 동일한 알루미늄재질의 sample holder를 주문제작 하였고, 검출기로는 PbS 검출기, 가동 및 통제프로그램은 VISION 2.22를 이용하였다. 또한 기준 분석치를 얻기 위하여 사용한 HPLC system은 UV검출

기와 auto-injector가 장착된 Shiseido사의 Semi-micro HPLC system(model SI-I)을 사용하였으며, 칼럼은 Capcellpak C₁₈(3.5 × 150 mm)을 사용하였다.

2.2 실험방법

시료 페노바르비탈정을 회사별로 롯트 당 각각 20 정씩 취하여 시료로 하였다. 시료 페노바르비탈정 각 1 정씩을 취하여 600~1400 nm 파장에서 NIR 스펙트럼을 측정하는 다음 각각의 무게를 단다. 이를 50 mL 용량 플라스크에 넣고 무수카페인 100 mg을 물에 녹여 100 mL로 묽힌 내부표준용액 5 mL를 정확하게 넣은 다음 약 10 분간 초음파로 진탕하여 녹이고 메탄올로 표선까지 묽힌 용액을 시료용액으로 하였다. 따로 페노바르비탈 표준시약 약 30 mg을 정확하게 달아 50 mL 용량 플라스크에 넣고 시료용액과 같은 방법으로 조작하여 표준용액으로 하였다. 그리고 각 정제를 HPLC를 이용하여 함량 백분율(% w/w)을 구하여 기준 분석치로 하였다. 최적의 검정선을 얻기 위해 총 80개의 시료의 NIR 투과스펙트럼과 기준분석치를 얻었다.

2.3 NIR 스펙트럼의 통계처리(Chemometrics)

일반적으로 NIR 스펙트럼을 이용한 검정선을 얻기 위하여, 함량이 각기 다른 시료정제를 별도로 조제하거나, 함량이 다른 일정범위의 분말 시료를 만들어 사용한다. 그러나 이러한 방법은 검정선의 상관성은 높일 수 있으나, 제조사에 따른 다양한 부형제, 첨가되는 부형제의 양 및 롯트간의 상이성 등과 같은 제품의 물리·화학적 성질이 조금씩 다르기 때문에 이로 인한 데이터의 신뢰성이 부족한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 제조사간의 구별없이 통일된 검정선을 얻기 위하여 검정선용 정제를 별도로 제작하지 않고, 시판되는 4개 회사 제품 중 1 롯트씩 20 정을 가지고 NIR 스펙트럼을 얻었다. 얻은 스펙트럼을 2 차 미분한 다음 PLSR 방법으로 분석한 결과와 각각에 대한 HPLC의 기준 분석치를 가지고 검정선 작성과 검정선 검증에 사용하였다. 80개 시료 스펙트럼 중 50개 시료의 스펙트럼과 그의 기준 분석치를 이용하여 검정선 작성에, 30개 시료의 스펙트럼과 그의 기준 분석치들은 검정선의 정확성을 보는 검증에 사용하였다. 검정선의 예측성능을 평가하기 위하여 검정선 작성에 포함되지 않은 다른 각 롯트의 시료의 스펙트럼과 기준 분석치를 얻어 사용하였다. 모든 통계적 처리는

VISION 2.22 (FOSS NIRSystems, Silver Spring, USA)을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 HPLC에 의한 분석치의 정밀성

시료 정제를 이용하여 검정선을 얻을 때 함량(% w/w)이 비슷한 시료의 HPLC에 의한 기준분석치는 매우 정밀하여야 하므로 내부표준용액을 이용한 재현성 시험을 하였다. 동일 시료를 10회 반복 측정하여 주성분과 내부표준물질에 대한 봉우리 면적비를 계산하여 분석한 결과는 Table 2와 같이 분산계수(coefficient of variance, CV)값이 0.33% 이었다.

Table 2. Reproducibility of HPLC data

run no.	1	2	3	4	5	6
Ratio	1.1460	1.1500	1.1474	1.1463	1.1407	1.1439
run no.	7	8	9	10	CV(%)	
Ratio	1.1393	1.1408	1.1431	1.1420	0.33	

3.2 검정선

검정선에 사용된 NIR 스펙트럼은 투과도 스펙트럼을 얻은 다음 Fig. 1과 같이 흡광도(log 1/T)로 변환하였으며, 이를 2차 미분한 스펙트럼은 Fig. 2와 같다. 투과도 스펙트럼은 시료 입자의 불균일성, 경도의 차이 및 광로길이 등으로 투과도의 차이가 발생할 수 있으나 반사스펙트럼보다는 그 영향이 극히 미미한 것으로 알려져 있다.

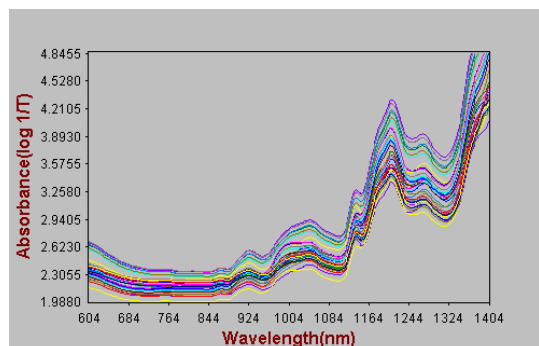


Fig. 1. NIR-spectra of phenobarbital tablets.

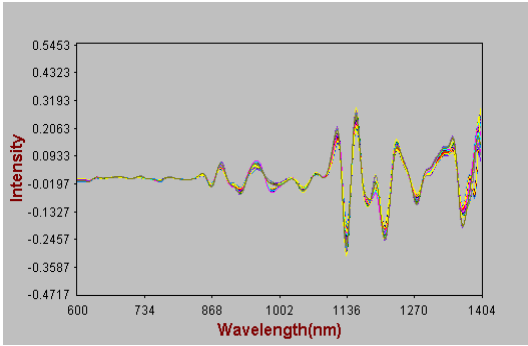


Fig. 2. Second derivative spectra of phenobarbital tablets.

각 회사마다 1 롯트만을 가지고 검정선을 얻은 결과 기준 분석치와의 정확한 상관성이 얻어지지 않았다. 이는 같은 회사 1 롯트만의 경우 검정선에 이용된 시료가 아주 비슷한 함량을 가지기 때문으로, 단일 롯트로 작성된 검정선은 적절한 검정선이 될 수 없는 것으로 사료되었다. 따라서 4개 회사의 제품 중 각 1 롯트씩(57 점)을 가지고 검정선을 작성하였다. 이때 파장영역은 600~1400 nm, Segment size는 2 nm의 조건으로 2차 미분한 다음 PLSR 방법에 따라 분석하였다. 이차미분법은 스펙트럼 곡선에서의 기울기 변화의 특성을 나타내기 때문에 기준선 보정과 함께 계의 잡음 등으로 인한 오차를 제거하는 장점이 있다.

PLSR 방법은 팩터의 수와 PRESS(predicted residual sum of squares) 값을 참조하고 결정계수와 SEC를 비교하여 선정하였다. 최적의 PLSR 법은 먼저 결정계수가 높은 모델을 선정하였으며, 결정계수가 유사한 값을 나타낼 때에는 SEC가 낮은 모델로 선정하였다. 결정계수와 SEC가 유사한 값을 가질 경우에는 팩터 수가 작은 것을 최적모델로 결정하였다.

개발한 검정선은 Fig. 3과 같으며 검정선의 표준오

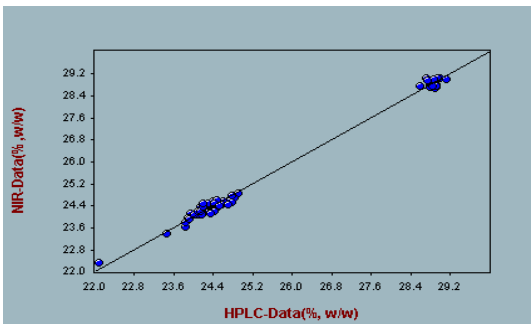


Fig. 3. Calibration curve of phenobarbital tablets.

차(standard error of calibration, SEC)는 (1)식에 넣어 계산 하였다.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{k_i} - Y_{p_i})^2}{n - f - 1}} \quad (1)$$

여기서 n은 검체의 개수이며, f는 파장에 관련된 인자의 값이다. 이 때 검정선의 Y_{k_i} 는 HPLC에 의한 기준 분석치이고 Y_{p_i} 는 NIRS로 분석한치이다. 얻은 검정선의 표준오차가 0.18%, 상관계수, R은 0.9931 으로 매우 직선적인 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 정량범위는 22.0~30.0%로 비교적 좁은 범위로 나타났고 시료들이 일정구역에 몰려 있는 양상을 보이고 있는데 이는 함량이 다른 시료들을 충분히 확보하지 못했기 때문으로 사료된다.

검정선에 대한 검증 결과는 Fig. 4와 같다. 검정선을 바탕으로 검증시 얻어지는 예측표준오차(standard error of prediction, (SEP)는 (2)식을 이용하여 계산 하였다. SEP가 0.21%, 상관계수가 0.9947로 검정선 모델이 매우 양호함을 알 수 있었다. 따라서 본 검정선은 페노바르비탈정에 대한 분석법으로 적절한 것으로 사료된다.

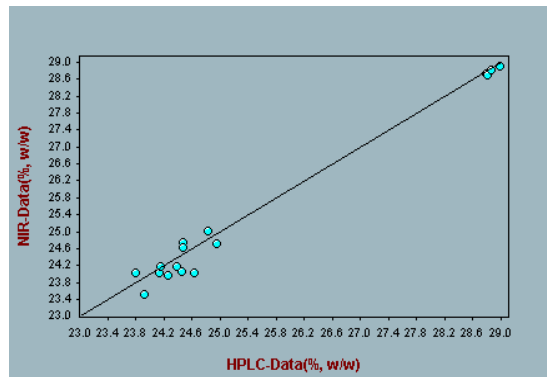


Fig. 4. Valitation curve of calibration curve.

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{k_i} - Y_{p_i})^2}{n}} \quad (2)$$

본 분석법으로 다른 4 롯트의 분석치를 가지고 예측성능을 평가하였다. 그 결과는 Fig. 5와 같으며 SEP가 0.39%, 상관계수가 0.9887로 직선성이 양호하였

으며, HPLC의 기준 분석치와의 편차범위는 -0.77~0.76%로서 표준함량 25.0~30.0%에 대하여는 2.5~3.0%의 상대표준편차를 나타낸다. 이는 의약품 품질관리를 위한 함량분석 기준 허용범위 $\pm 5.0\%$ 안에 들어 간다.

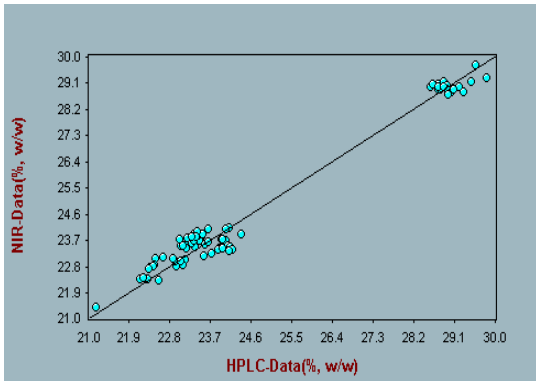


Fig. 5. Prediction curve of 4 Lots.

3.3 정밀도

개발한 검정선을 가지고 1 로트의 제품에 대하여 재현성 시험을 하였다. 10회 반복 시험한 결과는 Table 3과 같으며 CV 값이 0.46%로서 일반적인 허용 한계 1.0%²² 보다 낮아 NIR 기기의 안정성과 측정회수에 의한 기기 감도의 변화 등은 극히 미미한 것으로 나타났다. HPLC에 의한 분석치의 CV 값 0.33%와 비교할 때 큰 차이가 없었다.

Table 3. Reproducibility of NIR data(%)

run no.	1	2	3	4	5	6
results	29.84	29.81	29.61	29.63	29.60	29.52
run no.	7	8	9	10	CV%	
results	29.47	29.59	29.44	29.46	0.46	

분석자간의 차이, 시험 날자 간의 차이에 대한 정밀도 시험을 한 결과는 Table 4 및 Table 5와 같으며 CV 값이 각각 0.45(평균)% 및 0.56(평균)%로 이 시험의 일반적인 허용 한계 2.0% 이하²²로 나타났다. 또 시험날자와 분석자 간의 변화를 2 way-ANOVA를 사용하여 평가하였는데 계통오차를 일으키는 어떤 요인도 나타나지 않아 정밀도가 매우 양호함을 알 수 있

었다.

Table 4. Intra-day precision of NIR data(%)

		Time			CV
		Initial	2 hour	3 hour	
Sample 1	Operator 1	29.65	29.55	29.85	0.48%
	Operator 2	29.42	29.67	29.67	
Sample 2	Operator 1	29.55	29.62	29.59	0.42%
	Operator 2	29.55	29.60	29.88	

Table 5. Inter-day precision of NIR data(%)

		Day			CV
		1 day	2 day	5 day	
Sample 1	Operator 1	28.85	28.92	29.02	0.60%
	Operator 2	29.11	29.16	29.26	
Sample 2	Operator 1	29.31	29.36	29.43	0.53%
	Operator 2	29.13	29.05	29.11	

4. 결 론

근적외선 분광광도법을 이용하여 페노바르비탈정에서 페노바르비탈의 정량에 대한 검정선을 개발하였다. 검정선용 정제를 여러 농도 별로 제작하지 않고, 시중에 유통되는 정제를 검정선용 시료로 사용하였으며, 단일 회사별로 작성한 검정선보다 여러 회사를 통합하여 얻은 검정선이 더 우수한 결과를 얻었다. 본 분석법은 각 회사에서 생산하는 페노바르비탈정의 함량분석을 신속 정확하게 할 수 있는 분석법으로 이용될 수 있다

참고 문헌

1. European Pharmacopoeia, *Near-Infrared Spectrometry*, 43,(1997).
2. British Pharmacopoeia, Volume II, Appendix A II A 126-127,(2000).
3. D. A. Burns, E. W. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis*, 1-4.

4. 정희일, 한국근적외분광분석학회 학술발표회집,31,(2000).
5. 황선주, 박기남, 동덕여자대학교 종합약학연구소 학술심포지움집, 99-112(1998).
6. P. Corti, E. Dreassi, G. Corbini, L. Montecchi and J. Paggi, *Analysis*, **18**(2), 117-121(1990).
8. P. Corti, E. Dreassi, G. Ceramelli and R. Vivianii, *Analysis*, **19**(7), 198-204(1991).
9. W. Plugge and C. Van der Vlies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 797-803(1992).
10. J. W. Hall and A. Pollard, *J. Infrared Spectrosc.* **1**, 127-132(1993)
11. B. R. Buchanan, M. A. Baxter, P. A. Robinson, *Pharmaceutical Research*, **13**, 616-621, 19alytica C96.
12. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch and C. de la Pezuela, *Anal. chemi Acta*, **333**, 147-156(1996)
13. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, C. de la Pezuela, *Analyst*, 761-765(1997).
14. C. I. Gerhausser and Karl-Artur Kovar, *Applied Spectroscopy*, **51**(10)(1997)
15. W. H, T. Byron and J. Sellors, *American Laboratory*, **29**, 20(1997).
16. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch and C.de la Pezuela, *Analyst*, **123**, 135-150(1998).
17. T.G Axon, R. Brown, S.V. Hammond and S.J Maris and F. Ting, *J. Near Infrared Spectrosc.* **6**, A13 - A19(1998).
18. G. Buckton, E. Yonemochi, J. Hammond and A. Moffat, *International Journal of Pharmaceutics*, **168**, 231-241(1998).
19. M. Lanzlinger and A. Zilian, *J. Near Infrared Spectrosc.* **6**, A131(1998).
20. M. Blanco, J. Coello, A. Eustaquio, H. Iturriaga and S. Maspoch, *Journal Pharmaceutical Sciences*, **88**(5), 551-556(1999)
21. A. Candolfi, D.L. Massart, *Applied Spectroscopy*, **54**, 1, 48-53(2000)
22. M. Blanco, A. Eustaquio, J. M. Gonzalez, D. Serrano, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **22**(1), 139-148(2000).
23. H. Chang, H. J. Kim, D. Y. Measng, S. H. Seo and J. H. Cho, *Yakhak Hoeji*. **42**(6), 545-551(1998).
24. Y. A. Woo, C. H. Cho, H. J. Kim, J. W. Cho, S. S. Chung, S. J. Kim and J. H. Kim, *Yakhak Hoeji*. **42**(4), 359-363(1998).
25. H.J. Kim and J. Cho, *Microchemical Journal*, **63**(1)(1999).
26. H. J. Kim, *Analyst*, **124**(1999).
27. 장승엽, 성낙선, 김도훈, 정영자, 이종필, 하광원, 김효진, 남두현, *식품의약품안전청연보*, **3**, 2282-286 (1999).
28. C. Anthony . A.D. Moffat, R.D. Trafford, R D. Jee and P.I Graham, *Analyst*, 1341-1351(2000).