

근적외선 분광법을 이용한 디아제팜정에서 디아제팜의 정량

최현철 · 강신정 · 윤미옥 · 이수정 · 김호정 · 김지연 · 차기원*

식품의약품안전청 의약품평가부

*인하대학교 화학과

(2002. 4. 16 접수)

Determination of Diazepam in Intact Diazepam Tablets Using Near Infrared Spectroscopy

Hyun Cheol Choi, Shin Jung Kang, Mi Ok Youn, Su Jung Lee,

Ho Jung Kim, Ji Yeon Kim, and Ki Won Cha*

Drug Evaluation in Korea Food & Drug Administration

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

(Received Apr. 16, 2002)

요 약 : 인근적외선 분광법(Near infrared spectroscopy, NIRS)으로 얻은 디아제팜정의 스펙트럼을 부분최소자승법(Partial least squares regression, PLSR)으로 처리하여 디아제팜정에서 디아제팜을 신속하고 간단하게 분석하는 방법을 연구하였다. 2 mg 및 5 mg 의 디아제팜정을 이용하여 검정선을 작성하고, 이 검정선의 직선성, 정량범위, 재현성 등을 검토하여 본 분석법의 정확성을 검증하였다. 2 mg의 디아제팜의 검정선의 상관계수는 0.9416이고, 검정선 표준오차(SEC)는 0.018%이었다. 5 mg의 디아제팜의 검정선의 상관계수는 0.9157이고, 검정선오차는 0.032%이었다.

Abstract : A rapid and simple determination of diazepam in intact diazepam tablets has been investigated using the near infrared spectroscopy(NIRS) combined with partial least squares regression. The separate calibration curves of 2 mg and 5 mg diazepam tablets were studied, as well as the linearity, concentration range and reproducibility of those calibration curves were evaluated. The correlation coefficients of calibration curves of 2 mg and 5 mg diazepam tablets are 0.9416 and 0.9159, respectively and the standard errors of calibration curves(SEC) are 0.018% and 0.032%, respectively.

Key words : NIR spectroscopy, partial least squares regression, diazepam, pharmaceutical analysis

1. 서 론

근적외선 분광법(NIRS)은 유기물질의 분자진동에 따른 물질의 흡수에 관한 정보를 이용하는 분광법이다. 근적외선 분광법은 1960 년대에 Norris 등이 농산물의 수분, 단백질, 지방 등의 분석에 이용한 후 실용

화 되기 시작하였다^{1,2}. 제약산업의 이용은 1990 년대 부터 이며^{3,4} 의약품의 원료, 제조공정, 함량분석 등의 품질관리에 이용되고 있다⁵⁻⁷. 국내서는 제약분야에서 생약의 확인, 원산지 판별 및 녹용의 품질 관리에 관한 연구보고가 있다^{8,9}. 의약품의 함량분석 및 확인은 대부분 고성능액체크로마토그래피법이 이용되어 왔는데 이 분석법은 시료의 전처리부터 최종 분석까지 그 과정이 복잡하고 숙련된 분석기술과 장시간의 분석시간이 필요하다. 근적외선 분광광도법은 비파괴적이고

★ Corresponding author

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

E-mail : kwcha@inha.ac.kr

신속한 분석법이라 할 수 있다. 따라서 유럽의 여러 선진국에서는 의약품의 정량 및 관리에 근적외선 분광법을 이용하고 있다. 저자들은 NIRS를 이용하여 페노바르비탈정에서 페노바르비탈을 정량하는 연구¹⁰을 발표한 바도 있다. 본 연구에서는 근적외선 분광법을 이용하여 디아제팜정에서 디아제팜을 정량하는 연구를 하여 이 약품의 품질관리¹¹⁻¹³에 이용하고자 하였다.

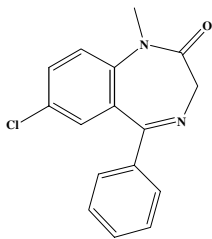
2. 실험

2.1 시약 및 기기

시료와 시약 : 시판되는 2 mg 및 5 mg의 디아제팜정을 각 제조회사별로 두 로트 이상을 구입하여 검정선 작성과 이 분석법의 타당성 검증에 사용하였다. 각 회사별 디아제팜 1정의 무게와 함량은 Table 1과 같다.

디아제팜 표준시약은 KFDA 표준시약을 사용하였으며, 메탄올은 시약급을, HPLC의 이동상으로 사용하는 아세토니트릴과 탈이온수는 HPLC급을 사용하였다. 디아제팜 표준용액은 약 20 mg의 디아제팜 표준시약을 정확히 달아 100 mL 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선까지 묽힌 용액을 저장용액으로 준비하였다. 필요에 따라 이 용액 일정량을 취해 50 mL용량플라스크에 넣고, 여기에 내부표준물질로 이소프로펜 약 2 g을 2 L 메탄올에 녹인 용액 4 mL를 취해 넣고 메탄올로 표선까지 묽혀 여러농도의 표준용액을 준비한다.

기기 : 투과도 측정이 가능한 Foss NIRSystems사의 NIR-600 Spectrometer(Silver Spring, USA)를 사용하였으며, 각 로트별 정제 크기와 같은 알루미늄 재질의 Sample holder(통과거리 = 0.5 Cm)를 제작하였고 검출기는 PbS 검출기, 가동 및 통계프로그램은 VISION 2.22를 이용하였다. 기준분석치를 얻기위해 사용한 HPLC 계는 UV검출기와 Auto-injector가 달린 Shiseido사의 Semi-micro HPLC system(model SI-1)이며 칼럼은 Capcellpak C₁₈(4.6 x 250 mm)을 사용하였다.



Schemel. Structure of Diazepam

Table 1. Compositions of Diazepam tablets

Manufacturers	A	B	C	D	E
Diazepam	2 mg				
Total (mg)	160	150	175	179	170
Diazepam %	1.25	1.33	1.14	1.11	1.18
Manufacturers	A	B	C	D	E
Diazepam	5 mg				
Total (mg)	160	170	175	170	170
Diazepam %	3.12	2.94	2.86	2.94	2.94

2.2 실험방법

시료인 2 mg 및 5 mg 디아제팜정을 각 회사별로 로트당 각각 15 정씩을 취하여 시료로 하였다. 시료 디아제팜 1 정씩을 각각 취하여 800 - 1400 nm 파장 영역에서 NIR 스펙트럼을 측정 후 각각의 무게를 단다. 스펙트럼은 2 nm 간격으로 32 회 주사하여 투과도를 측정 후 흡광도로 변환하여 컴퓨터의 파일에 저장하였다. 기준스펙트럼은 Sample holder를 제거한후 공기 중에서 투과방식으로 측정하였다. 스펙트럼을 찍고난 각각의 시료들을 50 mL 용량플라스크에 넣고 내부표준용액 4 mL를 가하고 초음파로 10 분간 녹인 다음 메탄올로 표선까지 묽혀 시료용액으로 하였다. 이 용액들을 HPLC에 주입하여 디아제팜의 표준용액의 HPLC Data와 비교하여 디아제팜의 함량(%)을 구하여 기준분석치로 하였다. 2 mg 및 5 mg의 디아제팜정 각각 100 여정의 NIR data와 이들의 기준분석치 중 50 %는 정확한 검정선을 얻기 위해 사용하고 30 %는 이 분석법의 정확성 검증에, 나머지 20 %는 정밀도 측정에 사용하였다.

2.3 NIR 스펙트럼의 통계처리(Chemometrics)

일반적으로 NIR 스펙트럼을 이용하여 검정선을 얻기 위하여 함량이 다른 시료정제를 별도로 조제하여 사용하나 이런방법은 검정선의 상관성은 높일 수는 있으나 제조회사 간의 부형제의 종류와 양에 따른 상이성 등의 차이 때문에 데이터의 신뢰성이 부족한 것으로 생각된다. 본 연구에서는 이런 단점을 피하기위해 별도의 검정선용 정제를 만들지 않고 시판되는 5 개 회사 제품 중 1 로트당 15 정씩을 가지고 NIR 스펙트럼을 얻었다. 얻은 스펙트럼을 3 차 미분한 다음 PLSR(partial least squares regression) 방법으로 분석한

결과와 각각에 대한 HPLC의 기준 분석치를 가지고 검정선 작성과 검정선의 검증 및 정밀성 평가에 사용하였다. 모든 통계처리는 VISION 2.22를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 HPLC에 의한 분석치의 정밀성

시료정제를 이용하여 검정선을 얻을 때 HPLC로 얻은 기준 분석치는 매우 정밀하여야 함으로 내부표준물을 이용한 정밀성 실험을 하였다. 동일 시료용액을 10회 반복 측정하여 주성분과 내부표준물의 봉우리 면적비를 계산한 결과는 Table 2와 같다. 분산계수(CV)가 모두 0.19 %로 좋은 재현성을 나타냈다.

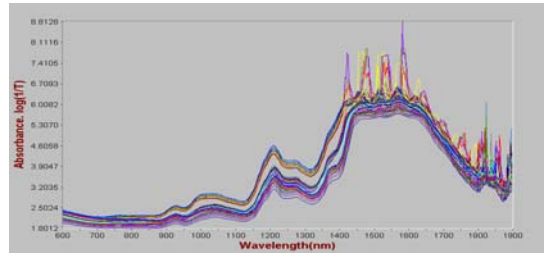
Table 2. Reproducibility of diazepam measurements using HPLC

Run No.	1	2	3	4	5	6
2 mg	1.011	1.009	1.005	1.007	1.007	1.006
5 mg	1.010	1.014	1.012	1.011	1.009	1.012
Run No.	7	8	9	10	CV	
2 mg	1.007	1.009	1.009	1.010	0.19	
5 mg	1.009	1.010	1.009	1.011	0.16	

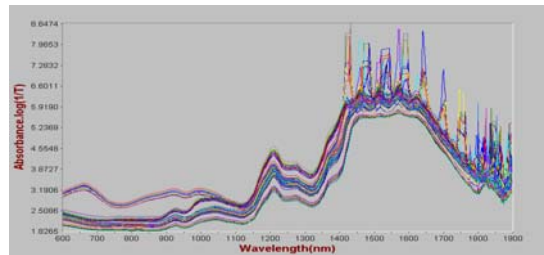
3.2 검정선

검정선에 사용한 NIR 스펙트럼은 투과도 스펙트럼을 얻은 후 Fig. 1과 같이 흡광도로 변환하고 이를 Fig. 2와 같이 3차미분하여 사용하였다. Fig. 1에서 1400 - 1900 nm에서는 수분에 의한 잡음이 커서 이 부분의 스펙트럼은 제외하고 800 -1400 nm 사이의 스펙트럼을 이용하였다. 3차미분 스펙트럼이 2차미분 스펙트럼보다 상관성이 크기 때문에 3차미분 스펙트럼을 이용하였다. 2 mg 및 5 mg의 디아제팜정을 가지고 통합 검정선을 얻은 결과는 적용 농도범위는 크지만 편차가 커서 상관계수가 감소하였다. 따라서 2 mg과 5 mg의 디아제팜정을 따로 분리하여 각각의 검정선을 얻은 결과는 Fig. 3과 같다. 그림에서 보는 것과 같이 직선성은 좋으나 적용 농도범위가 좁은 단점이 있다. 2 mg 및 5 mg 검정선의 상관계수는 각각 0.9416과 0.9157이고, 검정선의 표준오차(Standard error of calibration, SEC)는 각각 0.018%와 0.032% 이었다. 검정선에 대한 검증을 위해 2 mg 및 5 mg의 디아제팜정제 30정을 가지고 검증선을 얻은 결과는 Fig. 4와

같다. 검정선을 바탕으로 검증시 얻은 예측표준오차 (Standard error of prediction, SEP)¹⁰ 는 각각 2.02%와 1.98% 이었다. 이 값들은 SEC 값보다 크지만 의약품의 품질관리를 위한 허용오차범위 ±5% 안에 들어 있으며 시료가 다른데서 오는 결과로 생각된다.

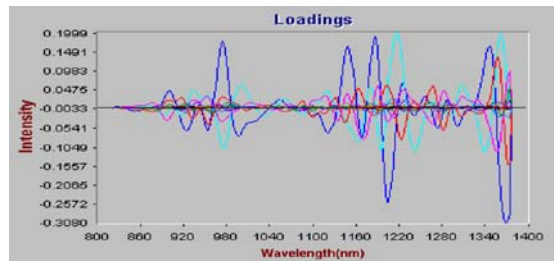


a

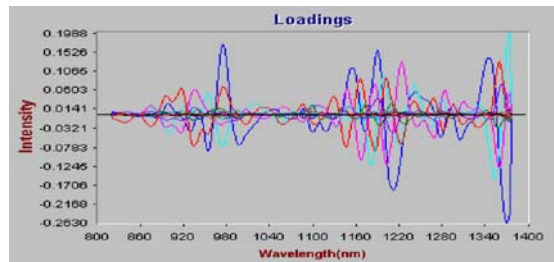


b

Fig. 1. NIR spectra of Diazepam tablets
a. Diazepam 2mg, b. Diazepam 5mg



a



b

Fig. 2. Third derivative spectra of Diazepam tablets
a : Diazepam 2 mg, b : Diazepam 5 mg

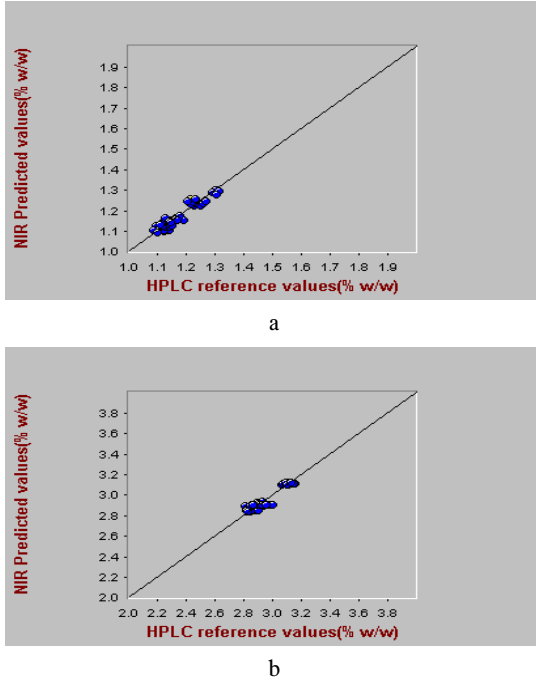


Fig. 3. Calibration curves of Diazepam tablets
a : Diazepam 2 mg, b : Diazepam 5 mg

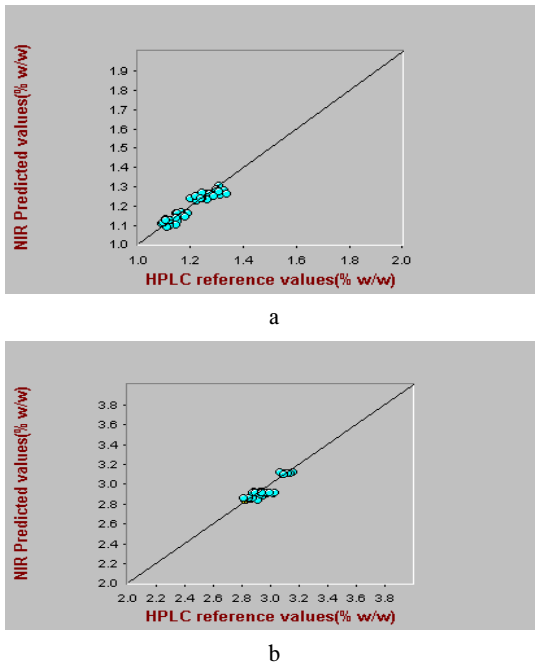


Fig. 4. Validation results of calibration curves of Diazepam
a : Dizepam 2 mg, b : Diazepam 5 mg

3.3 정밀도

본 연구에서 얻은 검정선을 이용하여 2 mg 및 5 mg 의 디아제팜정의 분석치의 재현성을 평가하였다. 같은 시료를 10회 반복 측정된 결과는 Table 3과 같다. 각각의 시료의 CV값이 0.42%와 0.19% 로 NIR 분석법의 재현성이 양호함을 알수 있다. 분석자 간의 차이와 분석시간의 차이에 관한 정밀도를 측정된 결과는 Table 4와 같다. 이에 대한 분산계수는 각각 0.61% 및 0.41%로 일반적인 분산계수 2.0% 미만으로 만족함을 알수 있다.

Table 3. Reproducibility of NIR measurements of diazepam (%)

Run No.	1	2	3	4	5	6
2 mg	1.148	1.153	1.139	1.151	1.135	1.129
5 mg	2.912	2.913	2.909	2.918	2.922	2.914
Run No.	7	8	9	10	CV	
2 mg	1.134	1.137	1.142	1.141	0.42	
5 mg	2.911	2.908	2.911	2.920	0.19	

Table 4. Inter-day and inter-operator precision of NIR data

Sample	Operator	NIR(%)			CV
		1 day	2 day	3 day	
2 mg	Operator 1	1.148	1.151	1.144	0.61
	Operator 2	1.142	1.159	1.158	
5 mg	Operator 1	2.823	2.818	2.825	0.41
	Operator 2	2.849	2.819	2.831	

4. 결 론

NIR을 이용하여 디아제팜정에서 디아제팜을 분석하는 방법을 연구하였다. 검정선용 정제를 별도로 만들지 않고 시판되는 정제를 HPLC로 분석한 기준 분석치를 이용하여 검정선을 얻었다. 개발한 검정선의 정확성과 정밀성을 검증하여 시판되는 디아제팜정의 분석에 이용하였다.

참고 문헌

1. D.A. Bums, E.W. Ciurczak, *Handbook of Near-infra*

- Analysis*, 1-4 (1997).
2. European Pharmacopoeia, *Near-infrared Spectroscopy*, **43**(1997).
 3. P. Corti, E. Dreassi, G. Corbini, L. Montecchi, J. Paggi, *Analysis*, **18**(2)b117 (1990).
 4. P. Corti, E. Dreassi, G. Corbini and R. Vivia, *Analysis*, **19**(7), 198 (1999).
 5. C. I. Gerhausser and Karl- Artur Kovar, *Applied Spectroscopy*, **51**(10)(1997).
 6. W. H. T. Byron and J. Sellors, *American Laboratory*, **29**, 20 (1997).
 7. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga and S. Maspoeh, *Analyst*, **123**, 135 (1998).
 8. H. Chang, H. J. Kim, D.Y. Meang, and J. H. Cho, *Yachak Hoeji*, **42**(6) 545(1998).
 9. H.J. Kim, *Analyst*, **124**,203 (1999).
 10. K.W. Cha, K. R. Ze, M. O. Youn, H. C. Choi and H. J. Kim, *Analytical Science & Technology*, **15**(2),392 (2002).
 11. A. C. Moffst, "Meeting the International Conference on Harmonisation Guidelines on Validation of Analytical Procedures", **20th, June (2000)**.
 12. B. R. Buchanan, M. A. Baxter, and P. A. Robinson, *Parmaceutical Research*, **13**, 4 (1996).
 13. C. I. Gerhausser and K. A. Kovar, *Applid Spectroscopy* , **51**, 10 (1997).