

## 고시의약품 시험에 사용되는 유해시약 대체 시험법 개발

김희연 · 강현경\* · 최선희<sup>#</sup> · 방수진 · 한경진 · 최승희 · 김진희 · 이화정\*\* · 강찬순\*\*\*

서울지방 식품의약품안전청 유해물질분석과, \*식품의약품안전평가원 생물약품연구과,

\*\*식품의약품안전평가원 식품감시과학팀, \*\*\*부산지방 식품의약품안전청 시험분석센터

(Received September 22, 2009; Revised March 20, 2010; Accepted March 20, 2010)

### Development of Alternative Testing Methods without Hazardous Reagents used in Korean Pharmaceutical Codex

Hee Yun Kim, Hyun Kyung Kang\*, Seon Hee Choi<sup>#</sup>, Su Jin Bang, Kyung Jin Han,  
Sung Hee Choi, Jin Hee Kim, Hwa Jung Lee\*\* and Chan Soon Kang\*\*\*

*Hazardous Substances Analysis Division, Seoul Regional Korea Food and Drug Administration, Seoul 158-050, Korea*

*\*Biologics Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea*

*\*\*Food Investigation Science Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea*

*\*\*\*Center for Food and Drug Analysis, Busan Regional Korea Food and Drug Administration, Busan 608-080, Korea*

**Abstract** — Development of alternative testing methods for the replacement of hazardous reagents with less hazardous ones is strongly enforced because exposure of human and environment to hazardous reagents are restricted and hazardous reagents are gradually prohibited from using in various testing methods. Thus, in this study, we developed 8 monographs from the Korean Pharmaceutical Codex by substituting the use of the hazardous reagents including ICH class 1 such as benzene, chloroform and dioxane to the use of less toxic ones like ICH class 2 or 3 reagents. We also improved their qualification and quantification performance. Among 8 monographs, the 6 newly developed TLC methods for the identification of nifedipine, oxolamine citrate, ketoprofen lysinate, chlorquinaldol, retinol acetate, and riboflavin showed a clear spot of corresponding material without any interference in spite of the replacement with ICH class 2 or 3 reagents. For the quantification of domperidone and trimebutine, HPLC methods were developed for the substitution of UV/VIS spectrometry and titrimetry, respectively. These HPLC methods were validated for the linearity, recovery, reproducibility, and inter-laboratory variations. In conclusion, the newly developed methods could be expected to become valuable tools for revising the Korean Pharmaceutical Codex.

**Keywords** □ Korean pharmaceutical codex, hazardous reagents, alternative testing methos

화학물질에 의해 나타나는 인체 독성 및 환경오염에 대한 국민들의 관심이 증가됨에 따라 현행 의약품 시험법에 사용되는 유해시약의 대체 필요성이 더욱 커지고 있다. 국내에서는 이미 "유해물질관리법"을 제정하여 인체 및 환경에 유해한 화학물질의 제조, 유통, 보관 등을 관리하고 있으며, 동법 제4조에는 "국가는 유해화학물질로 인한 국민보건 또는 환경의 위해를 방지하기 위하여 유해화학물질의 적정관리를 위한 기술을 개발하고 교육 및 홍보시책을 개발하여야 한다."고 명시되어있다. 또한 국제적으로도 환경 및 인체에 유해한 시약에 관해 국가 간 협조를 통하여

관리 및 규제를 강화하고 있는 실정이다. 의약품 중 유해시약에 관하여는 International Conference on Harmonization(ICH)의 잔류용매지침<sup>1)</sup>에서 용매별로 유해성에 따라 Class 1, 2, 3 및 기타용매로 분류하여 그 잔류량을 규제하고 있다. 특히 Class 1에 속하는 벤젠, 사염화탄소 등은 발암원성, 환경유해성 물질로서 원칙적으로 사용이 금지되고 있는 실정<sup>2)</sup>이며, 환경부 지정 "환경 및 인체 유해시약의 목록"에도 수재되어 있다. 대한약전 제9개정 원안 작성 지침<sup>3)</sup>에는 "「유해하여 시험자에 대한 노출이 우려되는 시약」, 「유해작용 및 잔류성 등으로 환경에 부하가 큰 시약」 등에 대하여는 사용을 피하거나 사용량을 최소한으로 한다."라고 기재되어 있다. 구체적으로는 "수은화합물, 시안화합물, 벤젠, 사염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 1,1,1-트리클로로에탄 등은 원칙적으로 사용하지 않고 할로겐화합물(클로로포름, 디클로로메탄)과

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-2640-1473 (팩스) 02-2640-1364  
(E-mail) csh0429@korea.kr

이황화탄소 등은 사용 시 신중히 검토한다."라고 명시되어 있다. 그 뿐 아니라 「의약품등 기준 및 시험방법 심사의뢰서 심사 규정」에서도 "인체 및 환경에 유해한 시약(수은화합물, 벤젠, 사염화탄소, 1,4-디옥산 등)은 사용해서는 아니 된다."라고 말하고 있다.

그러나 국가공정서 중 하나인 '대한약전 외 의약품등 기준'(이하 고시)<sup>4)</sup>에는 여전히 이러한 유해시약을 사용하는 많은 시험법이 수재되어 있으며, 이들은 각 품목을 생산하는 제조업소의 품질관리과정에서 사용되고 있다. 유해시약이 포함된 시험법은 의약품 제조업소 및 의약품을 분석하는 국가기관 등에서 환경과 보건 문제를 야기하는 원인이 될 뿐만 아니라 의약품 제조 및 관리과정의 선진화를 도모하고 있는 국가정책에도 맞지 않으므로 시급히 개선되어야 한다. 과거에는 유해시약에 대한 인식이 부족하여 대한약전,<sup>5)</sup> 대한약전외 의약품등 기준,<sup>4)</sup> 생약규격집<sup>6)</sup> 등의 공정서에 각종 유해시약을 사용하는 시험법이 많이 수재되어 있었다. 현재 유해시약 제한에 대한 국제적 인식이 확대됨에 따라 유해시약 사용이 감소되고 있으나, 이전의 시험법에 대한 검토나 정비가 이루어지지 않아 계속 사용되고 있는 경우도 있다. 산업재해, 환경오염과 관련된 각종 시약의 유해성 및 안전성에 대한 보고가 계속 이루어지고 있으며, 이에 대한 국민의 관심도 계속적으로 증가하고 있으므로 유해시약 사용을 지양하는 정책이 요구된다.

이에, 본 연구를 통해 의약품 품질관리에 사용되는 유해시약을 사용한 시험법에 대한 보다 안전하고 효율적인 대체시험법을 개발하여 제조업소 및 국가기관에서 안전하고 효율적인 시험을 수행하는데 기여하고자 한다.

## 시험방법

고시 수재 의약품 시험법 중 벤젠, 사염화탄소, 1,2-디클로로에탄, 1,1,1-트리클로로에탄, 초산수은시액, 시안화합물, 디옥산, 클로로포름을 사용하는 시험법을 검색한 결과 약 200여개의 유해시약 사용 시험법을 찾아내었다. 이 중 일부 품목에 대해 기존의 시험법보다 유해성이 적은 시약을 사용하는 대체시험법을 개발하였다. 박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)법의 경우 적절한 전개용매 선택을 위해 Hildebrand solubility parameter 법, Snyder's solvent selectivity triangle 법, solvatochromic solvent selectivity parameter와 Abraham's solvation parameter 법 등을 참고하여<sup>7)</sup> 목적 성분에 대한 Rf가 0.3~0.7 범위에 들고, 가능하면 적은 수의 용매를 사용하며, 실리카겔 등과 같이 흔하게 쓰이는 재료에서 양호한 분리가 일어나는 조건으로 검토하였다. 새로 개발된 대체시험법은 대한약전 제 9개정 일반정보 중 "의약품등 분석법의 벨리테이션에 대한 지침"<sup>8)</sup>에 따라 유효성을 검증하였다.

## 시약

표준품으로는 니페디핀, 구연산옥술라민, 케토프로펜리신, 클로르퀴날돌, 초산레티놀, 리보플라빈, 돔페리돈, 트리메부틴을 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다. 검액, 전개 용매, HPLC 용 이동상 제조에 사용한 아세톤, 에탄올, 아세트니트릴 등은 모두 HPLC 등급 이상이였다. 각 시험법 확인에는 시판 의약품을 품목별로 3건 이상씩 구입하여 사용하였다.

## 기기 및 재료

박층크로마토그래피법(TLC)에 사용하는 정지상으로는 TLC 실리카겔 60F<sub>254</sub>(Merck, Germany), TLC 실리카겔 G(Whatman, England)를 사용하였다. 고성능박층크로마토그래피(HPTLC) 장비는 CH/Reprostar3(Camag, Switzerland)를 사용하였고, 고성능액체크로마토그래피(HPLC)에는 US/HP 1100(Hewlett Packard, USA) 기기를 썼다.

## 니페디핀 정 중 니페디핀의 확인시험

고시법에 따라 시험한 결과와 비교함으로써 대체시험법을 검증하였다. 고시시험법은 니페디핀 10 mg 해당량의 검체 또는 니페디핀 표준품 10 mg을 5 ml의 클로로포름에 녹여 검액 또는 표준액으로 하고, 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 클로로포름·디옥산 혼합액(14:1)을 이용하여 전개했다. 발색은 254 nm 파장의 자외선을 이용했다.

대체시험법은 니페디핀 20 mg 해당량을 5 ml의 아세톤에 녹여 검액으로 하고, 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 초산에칠·시클로hexan 혼합액(50:50)을 이용하여 전개했다. 고시시험법에 비해 감도가 낮아서 니페디핀 20 mg 해당량의 검체 또는 니페디핀 표준품 20 mg을 검액 또는 표준액 제조에 사용했다. 발색은 고시법과 동일하게 254 nm 파장의 자외선을 이용했다.

## 구연산옥술라민의 확인시험

고시시험법은 검체 또는 구연산옥술라민 표준품 0.5 g을 취하여 물 1 ml, 25% 수산화알루미늄용액 0.15 ml를 넣은 후 전량이 10 ml가 되도록 메탄올을 넣고 녹여서 검액 또는 표준액을 만든 후, 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 벤젠·트리에칠아민 혼합액(95:5)을 이용하여 전개했다. 발색은 254 nm 파장의 자외선을 이용했다.

대체시험법은 검체 또는 표준품 50 mg을 취하여 고시법과 동일한 과정을 거쳐 검액 또는 표준액을 만들고, 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 hexan·초산에칠·트리에칠아민 혼합액(95:5:5)을 이용하여 전개했다. 발색은 고시법과 동일하게 254 nm 파장의 자외선을 이용했다.

## 케토프로펜리신의 확인시험

고시시험법은 검체 또는 케토프로펜리신 표준품 50 mg을 취

하여 증류수 5 ml를 넣고 녹여서 검액 또는 표준액을 만들고 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 이소옥탄·디옥산·빙초산 혼합액(20 : 10 : 0.1)을 이용하여 전개했다. 발색은 254 nm 파장의 자외선을 이용했다.

대체시험법은 검체 또는 표준품 2 mg을 취하여 증류수 10 ml를 넣고 녹여서 검액 또는 표준액을 만든 후 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 이소옥탄·n-부탄올·빙초산 혼합액(10.5 : 4.5 : 0.05)을 이용하여 전개했다. 발색은 고시법과 동일하게 하였다.

#### 클로르퀴날들의 확인시험

고시시험법은 검체 또는 클로르퀴날들 표준품 5 mg을 취하여 메탄올 1 ml를 넣고 녹여서 검액 또는 표준액을 만들고 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 벤젠·메탄올·빙초산 혼합액(13 : 6 : 1)을 이용하여 전개했다. 발색은 254 nm 파장의 자외선을 이용했다.

대체시험법은 검체 또는 표준품 5 mg을 취하여 메탄올 10 ml를 넣고 녹여서 검액 또는 표준액을 만든 후 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 tert-부틸메틸에틸·헵탄·빙초산 혼합액(13 : 6 : 1)을 이용하여 전개했다. 발색은 고시법과 동일하게 하였다.

#### 초산레티놀의 확인시험

고시시험법은 초산레티놀 표준품 2,500 IU를 메탄올 30 ml, 수산화칼륨용액(1→2) 3 ml에 넣고 환류냉각기를 달아 90°C에서 30분간 검화한 후 식혀서 에틸로 3회 추출하였다. 추출액은 탈수 후 에틸을 날려 보낸 다음 잔사를 클로로포름 5 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 또한 검체의 경우에는 초산레티놀 2,500 IU 해당량을 취하고 표준품과 동일하게 조작하여 검액으로 하였다. 준비된 검액과 표준액은 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 시클로헥산·에틸·초산에틸 혼합액(75 : 20 : 5)을 이용하여 전개했고, 오염화안티몬 시액(오염화안티몬 2 mg/클로로포름 8 ml)을 이용하여 발색시켰다.

대체시험법은 잔사를 시클로헥산 5 ml에 녹이는 것을 제외하고 고시법과 동일한 과정을 거쳐 검액 또는 표준액을 만들었다. 고시법과 동일한 전개조건으로 전개 후 삼염화안티몬시액(10% 삼염화안티몬/디클로로메탄 용액을 105°C에서 5분간 가열한 후 사용)을 이용하여 발색했다.

#### 리보플라빈의 확인시험

고시시험법은 리보플라빈으로서 약 5 mg 해당량의 검체 또는 리보플라빈 표준품 약 5 mg을 5 ml의 빙초산에 녹여 검액 또는 표준액으로 하고, 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 빙초산·아세톤·메탄올·벤젠 혼합액 (5 : 5 : 20 : 70)을 이용하여 전개했다. 발색은 365 nm 파장의 자외선을 이용했다.

대체시험법은 리보플라빈으로서 약 2.5 mg 해당량의 검체 또는 리보플라빈 표준품 약 2.5 mg을 100 ml의 빙초산에 녹여 검액 또는 표준액으로 하고, 실리카 겔 60F<sub>254</sub>과 묽은 초산·에탄올·초산에틸 혼합액(1 : 1 : 4)을 이용하여 전개했다. 발색은 고

시법과 동일하게 365 nm 파장의 자외선을 이용했다.

#### 돔페리돈 현탁액의 함량시험

검체 10 ml 또는 돔페리돈 표준품 10 mg을 취하여 0.1 M 염산 용액 1 ml와 메탄올 50 ml를 넣고 초음파 추출하여 식힌 후 메탄올을 가하여 100 ml로 정용한 액을 검액 또는 표준액으로 했다. HPLC 분석용 컬럼은 Capcellpak UG 120 C8 컬럼(3 μm, 4.6×250 mm, Shiseido, Japan)을 사용하였고, 이동상은 5 g/l 초산암모늄 수용액·메탄올 혼합액(4 : 6)이었다. 유속은 1.0 ml/분, 검체 주입량은 20 μl, 검출기는 자외부흡광도계(측정파장 280 nm), 컬럼 온도는 실온으로 하여 분석하였다.

새로 확립한 분석법의 밸리데이션은 대한약전 제9개정 "의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침"을 따랐다. 7개 농도(60 μg/ml, 70 μg/ml, 80 μg/ml, 90 μg/ml, 100 μg/ml, 110 μg/ml, 120 μg/ml)로 준비한 돔페리돈 표준액을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선식의 상관계수를 구하여 직선성(linearity)을 검토하였다. 일정농도의 표준액을 10회 주입하여 측정된 머무름 시간 및 피크면적의 상대표준편차(%)를 검토하여 정밀성을 구하였다. 시료에 표시 농도의 80, 100, 120%가 되는 표준액을 각각 첨가하고 각 농도별 3회 조제 및 분석한 결과에 대하여 회수율(%) 및 상대표준편차(%)를 계산하였다. 또한 확립된 HPLC 분석방법을 가지고 시판품 동일시료에 대해 2개 기관에서 분석을 하여 실험실간 재현성도 평가하였다.

#### 트리메부틴 시럽의 함량시험

트리메부틴으로서 20 mg 해당량의 검체 또는 트리메부틴 표준품 20 mg을 취하여 0.01 M 염산·아세트니트릴 혼합액(13 : 7)에 녹여 100 ml로 한 액을 검액 또는 표준액으로 했다. HPLC 분석용 컬럼은 Capcellpak UG 120 C18 컬럼(5 μm, 4.6×250 mm, Shiseido, Japan)을 사용하였고, 이동상은 묽은 과염소산(17→20,000)에 초산암모늄용액(1→1,000)을 넣어 pH를 3.0으로 조정한 액 650 ml에 1-펜탄설폰산나트륨 1g을 넣어 녹여 멤브레인 필터를 써서 여과한 액 650 ml에 아세트니트릴 350 ml를 넣은 용액이었다. 유속은 1.0 ml/분, 검체 주입량은 20 μl, 검출기는 자외부흡광도계(측정파장 254 nm), 컬럼 온도는 실온으로 하여 분석하였다.

새로 확립한 분석법의 밸리데이션을 위해 트리메부틴 표준품 16, 18, 20, 22, 24 mg을 각각 정밀하게 달아 0.01 M 염산·아세트니트릴 혼합액(13 : 7)에 녹여 100 ml로 한 표준액을 가지고 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 회귀직선식의 상관계수를 구하여 직선성을 검토하였다. 시료에 표시 농도의 50, 100, 150%가 되는 트리메부틴 표준액을 각각 첨가하고 각 농도별 3회씩 반복실험한 후 상대표준편차(%) 및 회수율을 구하였다. 확립된 HPLC 분석방법으로 표준액 및 시판품을 이용하여 준비한 검액

을 가지고 대한약전 일반시험법 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 함량을 구하였다. 또한 확립된 HPLC 분석방법을 이용해 동일 시료를 2개 기관에서 분석함으로써 실험실간 재현성도 평가하였다.

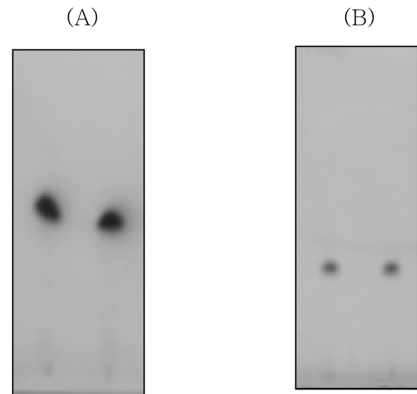
**실험결과**

**니페디핀 정 중 니페디핀의 확인시험**

고시시험법은 Rf 값은 양호했으나(Rf 0.54), 스팟의 크기가 전체 전개 길이의 10% 정도로 다소 넓었다(Fig. 1A). 또한 검액과 전개 용매에 클로로포름과 디옥산을 사용하도록 되어 있어 대체 물질을 찾아보았다. 검액 조제에 쓰이는 클로로포름을 아세톤으로 대체하고, 전개 용매 조성을 클로로포름과 디옥산에서 초산에칠과 시클로헥산으로 바꾸어도 잘 정의된 스팟이 Rf 값 0.45에서 관찰되었다(Fig. 1B). 실제 의약품에서도 다른 물질의 간섭 없이 깨끗한 스팟이 관찰되어 확인시험에 적절한 조건임을 확인할 수 있었다. 10 µg/ml~1,000 µg/ml의 다양한 농도로 준비된 시험액을 10 µl씩 점적하고 전개를 한 결과 모든 농도에서 잘 정의된 스팟이 관찰되었으며, 검출한계는 20 µg/ml이었다. Rf 0.62에서 관찰되는 희미한 스팟은 시간이 지나면서 세기가 증대되었는데, 이는 니페디핀이 용액 상태에서 빛에 민감하여 새로운 유도체를 만들기 때문인 것으로 보였다. 따라서 검액과 표준액은 시험 직전 준비할 필요가 있다고 판단되었다.

**구연산옥솔라민의 확인시험**

고시시험법으로 실험했을 때 양호한 Rf 값을 가지며, 잘 정의된 스팟이 관찰되었으나(Fig. 2A), 전개용매로 사용된 벤젠을 대체하기 위하여 헥산, 초산에칠, 트리에칠아민을 사용하여 새로이



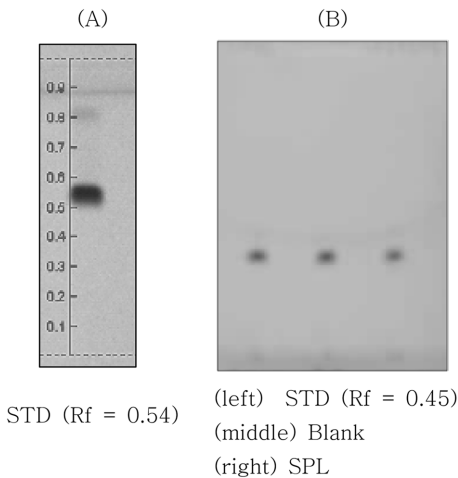
(left) STD (Rf = 0.55) (right) SPL (left) STD (Rf = 0.35) (right) SPL

**Fig. 2** – Thin layer chromatography identifying oxolamine citrate. (A) KPC method, (B) alternative method. STD: standard, SPL: sample.

전개용매를 구성하였을 때에도 Rf 0.35에서 잘 정의된 스팟이 나타났다(Fig. 2B). 구연산옥솔라민의 농도를 50 µg/ml에서 5,000 µg/ml까지 다르게 하여 전개하였을 때 검출한계는 100 µg/ml이었다(10 µl 점적 시).

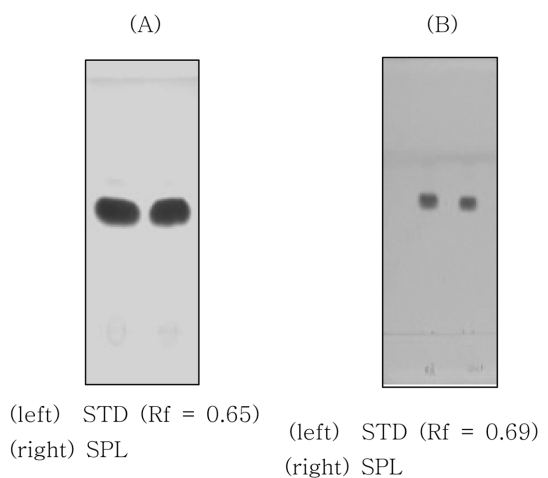
**케토프로펜리신의 확인시험**

고시시험법으로 실험했을 때 양호한 Rf 값을 가지며, 잘 정의된 스팟이 관찰되었으나(Fig. 3A), 고시시험법의 전개 용매 중의 디옥산을 대체하여 이소옥탄 · n-부탄올 · 빙초산 혼합액(10.5 : 4.5 : 0.05)을 전개 용매로 사용하여 시험했을 때에도 잘 정의된 스팟이 관찰되었다. 10 µg/ml에서 1,000 µg/ml까지의 다양한 농도로 실험한 결과 검출한계가 25 µg/ml이었으며, 농도가 500 µg/



STD (Rf = 0.54) (left) STD (Rf = 0.45) (middle) Blank (right) SPL

**Fig. 1** – Thin layer chromatography identifying nifedipine in nifedipine tablets. (A) KPC method, (B) alternative method. STD: standard, SPL: sample.



(left) STD (Rf = 0.65) (right) SPL (left) STD (Rf = 0.69) (right) SPL

**Fig. 3** – Thin layer chromatography identifying ketoprofen lysine. (A) KPC method, (B) alternative method. STD: standard, SPL: sample.

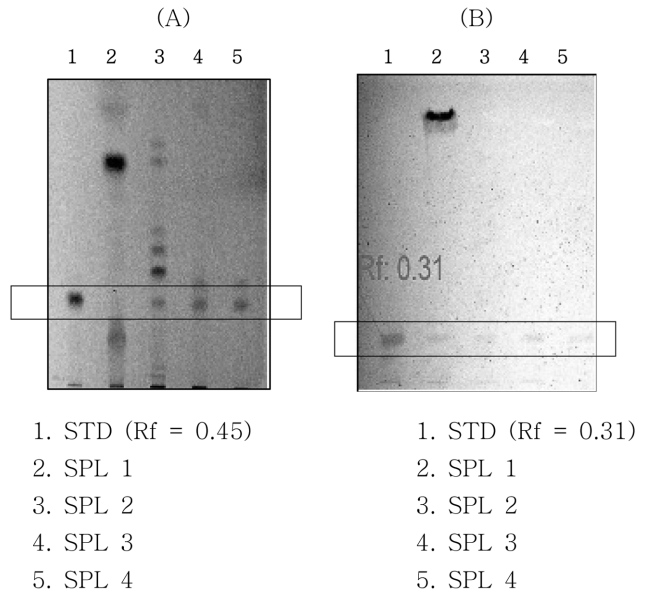
ml 이상인 경우에는 스팟이 일그러지는 현상이 나타났다. 농도가 200 µg/ml일 때 표준품과 시료 모두 Rf 0.69인 잘 정의된 스팟을 보여주었다(Fig. 3B).

**클로르퀴날돌의 확인시험**

고시시험법에 따라 시험했을 때 클로르퀴날돌의 스팟이 잘 정의되지 않았다(Fig. 4A). 벤젠을 대체하기 위하여 tert-부틸 메칠에텔, 헵탄, 빙초산 혼합액(13 : 6 : 1)으로 새로운 전개 용매 조건을 구성하였을 때 Rf 0.70의 스팟이 형성되었다. 클로르퀴날돌의 농도를 25 µg/ml에서 1,000 µg/ml까지 달리하여 10 µl씩 점적한 후 스팟을 관찰했을 때 검출한계는 50 µg/ml이었으며 500 µg/ml 농도에서도 양호한 스팟을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B).

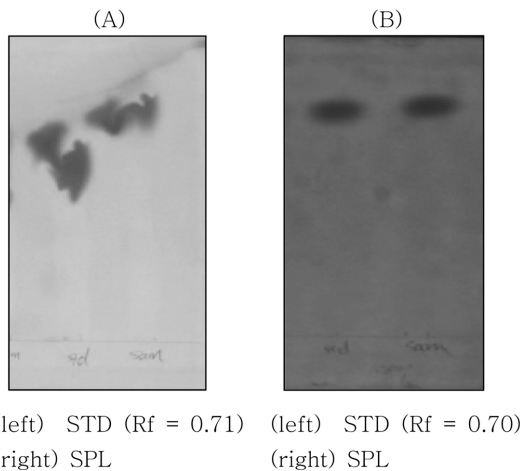
**초산레티놀의 확인시험**

고시의 일반시험법 중 비타민시험법에 따라 시험하였으며, 미국약전(USP)의 "dietary supplements"에 분류되어 있는 다양한 비타민 제형(oil and water soluble vitamins capsule, oil and water soluble vitamins with mineral tablet, oil and water soluble vitamins with mineral capsule, oil and water soluble vitamins with mineral soft capsule)<sup>9)</sup>에 해당하는 검체를 제형별로 모두 구하여 다양한 제제형태에서 모두 확인 가능한 분석 조건을 찾고자 하였다. 고시시험법에 따라 실험했을 때 레티놀 스팟은 Rf 0.45로 양호한 값을 가졌고 분리능도 양호했다(Fig. 5A). 그러나 고시법에서 발색제로 명시되어 있는 오염화안티몬은 부식성과 휘발성이 강하여 발색제로 사용하기에 부적합했으며, 검액 조제와 발색제의 용매로 클로로포름을 사용하도록 하여 대체시험법을 개발하였다. 검액 조제에 클로로포름 대신 시

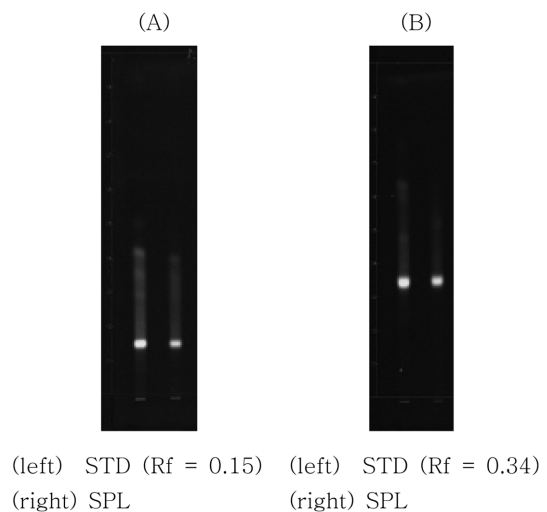


**Fig. 5** – Thin layer chromatography identifying retinol. Retinol spots are marked with box. SPL 1~4 has different pharmaceutical formulations with each other. (A) KPC method, (B) alternative method. STD: standard, SPL: sample.

클로록산을 사용하고, 발색제를 오염화안티몬에서 삼염화안티몬으로 변경하였다. 또한 발색제의 용매로는 클로로포름 대신 디클로로메탄을 사용했다. 대체시험법으로 실험한 결과 Rf 0.31에서 잘 정의된 스팟이 관찰되었고, 다양한 제형의 검체에서 분리가 잘 된 스팟을 확인할 수 있었다. 농도를 10 IU/ml에서 1,000 IU/ml까지 달리하여 실험한 결과 검출한계가 25 IU/ml로 관찰되었다(Fig. 5B)(5 µl 점적 시).



**Fig. 4** – Thin layer chromatography identifying chlorquinaldol. (A) KPC method, (B) alternative method. STD: standard, SPL: sample.



**Fig. 6** – Thin layer chromatography identifying riboflavin. (A) KPC method, (B) alternative method. STD: standard, SPL: sample.

**리보플라빈의 확인시험**

리보플라빈의 경우, 고시법에 따라 시험했을 때 표준액의 스팟이 낮은 Rf값을 가지며 표준액의 농도가 너무 높아(1,000 µg/ml) 단일 스팟을 보기 어려웠다(Fig. 6A). 전개 용매에 쓰이는 벤젠을 대체하기 위하여 묽은 초산, 에탄올 및 초산에칠을 혼합하여 용매조건을 조절하였다. 1 µg/ml에서 100 µg/ml까지 농도를 달리하여 실험한 결과 검출한계는 1 µg/ml 이하임을 확인할 수 있었고 농도가 25 µg/ml일 때 표준품과 시료 모두에서 잘 정의된 스팟이 Rf 0.34로 양호하게 관찰되었다(Fig. 6B)(10 µl 점적 시).

**돔페리돈 현탁액의 함량시험**

클로로포름을 사용하고, 여러 단계의 추출과정을 거쳐 자외가 시부 흡광도법으로 측정하도록 규정한 돔페리돈의 확인 및 함량 시험법을 유해성이 더 적은 시약을 이용하여 보다 간편하게, 기질의 영향을 적게 받으면서 분석할 수 있는 HPLC법으로 대체하고자 했다.

실험방법에 기술한 HPLC 조건으로 분석하였을 때 Fig. 7과 같은 대표적인 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 또한 대체시험법은 돔페리돈 60~120 µg/ml의 범위에서 회귀방정식  $y=29875x-39.594$ , 상관계수( $R^2$ ) 0.999를 나타내어 양호한 직선성을 나타내었고, 일정농도의 표준액을 10회 주입하여 측정된 결과의 머무름 시간 및 피크면적에 대한 상대표준편차(%)를 검토하여 정밀성을 구한 결과 상대표준편차(%)가 2.0% 이하로 ICH 및 USP 기준에 적합하였다. 회수율은 97.14~99.92% 정도로 양호한 정확성을 보였다. 정밀성(precision) 측정 시 크로마토그램의 피크면적 및 피크유지시간의 상대표준편차(%)를 검토하였을 때 모두

**Table I** – Alternative method of domperidone assay by HPLC

(A) Precision results (repeatability of domperidone)

Observed ingredient	Peak area RSD (%)	Retention time (min) ±S.D.
Domperidone	0.30	9.08±0.07

(B) Recovery of domperidone in concentration-known solutions

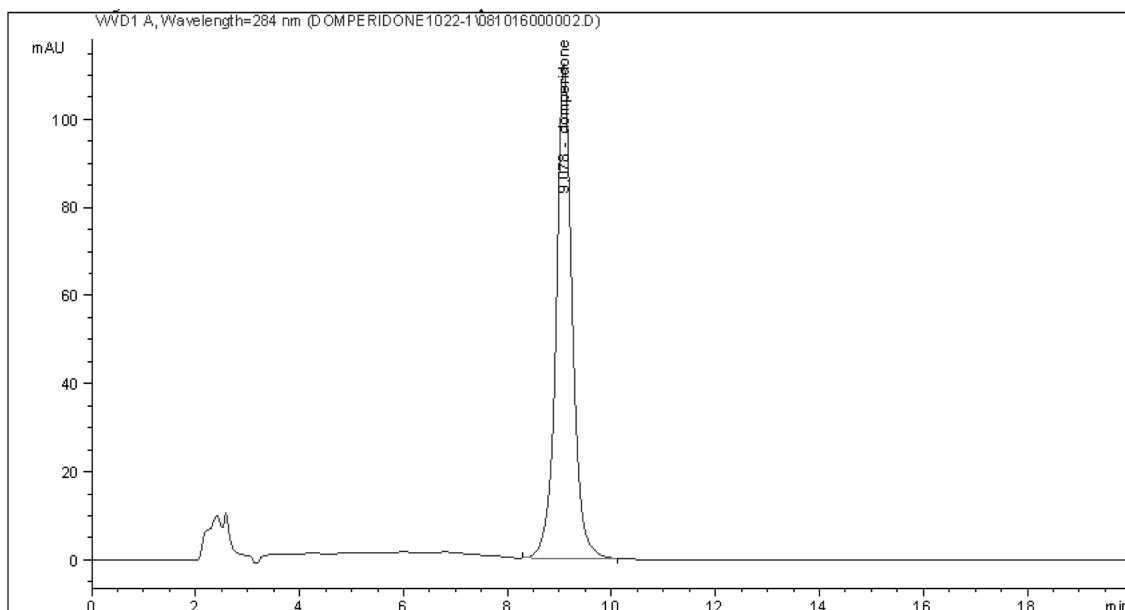
Observed ingredient	Added STD level (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)
Domperidone	80	99.84	0.12
	100	97.63	0.86
	120	98.63	1.16

(C) Interlaboratory collaborative study on assay of domperidone ingredient in commercial preparations

Sample No.	The contents (%) of domperidone	
	A Laboratory	B Laboratory
1	99.42	100.49
2	98.68	100.76
3	100.83	100.97
4	99.61	100.81
5	101.02	101.10
Mean	99.91	100.83
RSD (%)	0.99	0.23
SEM*	0.07 (n=10, p>0.05)	

\*: standard errors of mean.

2.0% 이하였고 USP tailing factor를 기기 내 프로그램으로 스크리닝했을 때 기준값(2.0 이하)을 벗어나는 경우는 없어 좋은 시스템적합성을 나타내었다(data not shown). 이상의 방법에 따라 확립한 HPLC 분석조건으로 시판의약품에 대해 실험실간 교차



**Fig. 7** – HPLC chromatogram of domperidone.

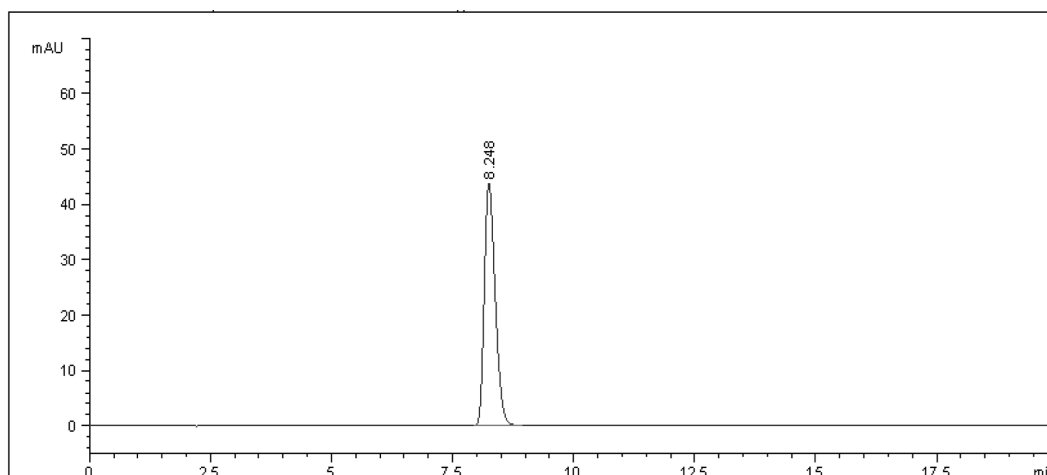


Fig. 8 – HPLC chromatogram of trimebutine.

시험을 한 결과, 두 기관간에 통계학적으로 유의한 차이가 없어 실험실간 재현성을 확인할 수 있었다(Table I).

#### 트리메부틴 시립의 함량시험

고시시험법의 경우 이 약 일정량을 취하여 염산과 물에 녹여 클로로포름을 가한 뒤 메칠엘로우 지시액을 가하고 0.01 mol/라 우릴황산나트륨액으로 클로로포름 층이 등황색으로 변할 때까지 적정하도록 되어있다. 적정법의 경우 첨가물에 의해 영향을 받는다고 알려져 있으며 유해시약인 클로로포름을 사용하기 때문에 이를 HPLC 시험법으로 대체하고자 하였다.

Table II – Alternative method of trimebutine assay by HPLC

#### (A) Recovery of trimebutine in concentration-known solutions

Observed ingredient	Added STD level (%)	Recovery rate (%)	RSD (%)
Trimebutine	50%	100.30	0.75
	100%	100.64	0.53
	150%	100.27	0.43

#### (B) Interlaboratory collaborative study on assay of trimebutine ingredient in commercial preparations

Sample No.	The content (%) of trimebutine	
	A Laboratory	B Laboratory
1	101.02	103.48
2	102.45	103.30
3	104.35	99.83
4	103.21	99.94
5	101.76	103.60
Mean	102.56	102.03
RSD (%)	1.26	1.92
SEM (n=10)	0.63 (n=10, p>0.05)	

\*: standard errors of mean.

실험방법에 기술한 HPLC 조건으로 분석하였을 때 Fig. 8과 같은 대표적인 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 트리메부틴의 피크유지시간은 8.22분이었으며, 용매 피크의 영향 없이 분석할 수 있었다. 5개 농도의 트리메부틴 표준액 분석을 통해 얻어진 회귀직선은 회귀방정식  $y=66.88x+8.89$ , 상관계수( $R^2$ ) 0.999를 나타내어 양호한 직선성을 나타내었다. 트리메부틴을 각 농도별로 3회씩 실험하여 재현성을 측정된 결과 99.2~101.3%의 회수율과 상대표준편차 2.0% 이하의 결과를 나타내어 ICH의 기준을 만족하였다. 시판 트리메부틴 시립제를 가지고 새로 확립된 HPLC 방법으로 실험실간 교차시험을 한 결과, 두 기관간에 통계학적으로 유의한 차이가 없어 실험실간 재현성을 확인할 수 있었다 (Table II).

## 고 찰

최근 식품의약품안전청은 '의약품 규격의 국제화사업'을 통해 의약품분석법을 보다 간편하고 정확한 시험법으로 변경하려는 노력을 하고 있으며, 이 과정에서 개발되는 시험법은 유해시약의 사용을 제한<sup>10,11</sup>하고 있다. 미국 약전 위원회에서도 "monographs needing improvement"<sup>12</sup> 항목 중 Class 1 시약을 사용하는 의약품시험법에 대해 대체시험법 개발을 위한 연구를 진행하고 있는 실정이다. 또한 미국 플로리다 주의 폐기물 저감 가이드에서는 유해한 화학 폐기물을 저감하기 위한 대책으로 배출량 감소, 재활용, 처리 등을 제시하고 있는데, 그 중 배출량 감소의 한 가지 방법으로 유해성이 덜하거나 유해하지 않는 시약을 쓰는 과정을 도입하는 것이 가능한지 평가할 것을 권고하고 있다.<sup>13</sup>

아울러, 유해시약을 사용하는 시험법에 대한 검토와 함께 1985년부터 누적되어 온 고시 품목의 시험법에 대하여 보다 간편하고 효율적인 시험법이 새로 개발되고 있지만, 모든 품목에 적용

**Table III** – Pharmaceuticals and hazardous reagents of KPC investigated in this work

Pharmaceuticals	Ingredient	Experiment object	Hazardous reagents in KPC methods
Nifedipine tablets	Nifedipine	Identification	Chloroform dioxane
Oxolamine citrate (material)	Oxolamine citrate	Identification	Benzene
Ketoprofen lysinate (material)	Ketoprofen lysinate	Identification	Dioxane
Chlorquinaldol (material)	Chlorquinaldol	Identification	Benzene
Retinol acetate	Retinol	Identification	Chloroform
Riboflavin	Riboflavin	Identification	Benzene
Domperidone oral suspension	Domperidone	Quantification	Chloroform
trimebutine syrup	Trimebutine	Quantification	Chloroform

하지 못하고 과거에 설정된 시험법이 여전히 수재되어 있어 품목이나 시험법에 대하여 조금 더 효율적인 시험법으로 개선하는 방법 탐색과 품목의 정비, 용어의 정립 등에 대한 필요성이 대두되었다. 본 연구에서는 벤젠, 디옥산, 클로로포름의 3가지 유해시약을 사용하는 고시시험법 중 일부에 대하여 대체시험법을 개발하고 확립된 시험법으로 시판의약품을 실제로 분석하여 시험법의 유효성을 검증하고자 하였다(Table III). 앞으로 본 연구내용이 유해시약을 사용하는 많은 고시시험법에 대한 대체시험법 개발 활성화에 기여하고, 자사기준의 의약품 기준 및 시험방법 작성 시 사용시약 선택의 지침이 되었으면 한다. 또한, 유해시약 사용 시험법 대체를 통한 실험자의 건강유해요인 제거 및 친환경적 시험법 개발을 통한 의약품 기준 및 시험방법 선진화의 초석 마련에 도움이 되기를 바란다.

**참고문헌**

- 1) ICH Guideline. Q3C(R3) : Impurities : Guideline for residual solvents Q3C(R3) in ICH harmonised tripartite guideline.
- 2) Overall evaluations of carcinogenicity to humans: list of all

- agents, mixtures and exposures evaluated to date (2008). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthallist.php>.
- 3) 한국보건공정서연구회, 대한약전포럼 1(1), 3 (2004).
- 4) 식품의약품안전청, 대한약전의 의약품등 기준 제3개정 (2007).
- 5) 식품의약품안전청, 대한약전 제9개정 (2007).
- 6) 식품의약품안전청, 대한약전의 생약(한약)규격집 (2002).
- 7) Poole, C. F and Dias, N. C. : Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, **892**, 123 (2000).
- 8) 식품의약품안전청, 대한약전 제9개정 일반정보, 1368 (2007).
- 9) The United States Pharmacopoeia 31-NF26 (2008).
- 10) 최선희, 이승경, 광효선, 문혜영, 최민정, 채갑용 : 의약품규격의 국제화 사업(I), 식품의약품안전청연구보고서 **7**, 450 (2003).
- 11) 강찬순, 최돈용, 최장덕, 오금순, 박성국, 최선희, 이주현, 진중성, 한지성, 정희수, 이진 : 의약품규격의 국제화 사업(II), 식품의약품안전청연구보고서 **8**(1), 433 (2004).
- 12) <http://www.usp.org/USPNE/submitMonograph/improveMon.html>.
- 13) Hazardous waste minimization guide, University of Florida, Office of Administrative Affairs, Division of Environmental Health & Safety.