

생물학적제제의 치메로살 함량 정량을 위한 가열기화 아말감 흡광도법의 확립 및 검증

김병철 · 김도근 · 홍성화 · 김연희 · 임종미 · 원윤정 · 김석환 · 홍지영 · 윤영민 · 김재옥[#]

식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 국가검정센터

(Received July 27, 2011; Revised July 28, 2011; Accepted August 6, 2011)

Establishment and Validation of Gold Amalgamation Method for the Quantitation of Thimerosal in Biological Products

Byung Chul Kim, Dokeun Kim, Sung Hwa Hong, Yeon Hee Kim, Jong-Mi Lim, Yun Jung Won,
Seok Hwan Kim, JiYoung Hong, Young Min Yun and Jaeok Kim[#]

National Center for Lot Release, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
Korea Food & Drug Administration, Osong 363-951, Korea

Abstract — The test method for biologics of lot release system is based on 'Test procedure and specification for biological products,' generally, thimerosal content is measured by chemical analysis using O.D. In this study, the comparative analysis was carried out using the gold amalgamation method for thimerosal content was compared to the existing methods, which are described above. The gold amalgamation method, which uses atomic absorption spectrophotometry, was meets all the method validation acceptance criteria. It is considered to be proper as the assay and identification test for thimerosal. In this study, the comparative analysis was performed three times. As a result, gold amalgamation method is more convenient and easy to perform as this assay doesn't have pre-treatment procedure. Also this assay showed good precision and reproducibility compared to the conventional method. Therefore, it is appropriate to alternate the assay method of thimerosal from the conventional chemical analysis to gold amalgamation method to improve the credibility of lot release system and the quality control of biologics, by standardizing test method.

Keywords □ thimerosal, amalgamation, atomic, biological products, vaccine

생물학적제제는 생물체에서 유래된 물질 또는 이를 이용하여 생산된 물질을 함유한 의약품으로 물리적, 화학적 시험함으로써 그 역가와 안전성을 평가할 수 없는 백신, 혈장분획제제 및 항독소를 말한다.^{1,2)} 생물학적제제는 복잡한 단백질 구조를 지니고 있어 의약품 제조시 제조단위별로 동일한 품질을 유지하는 것이 어려우므로, 세계보건기구(WHO)에서는 제조단위별로 각국의 규제기관이 관리하는 것을 권고하고 있는데 이 중 제조단위별 출하승인(Lot Release)이 포함되어 있다. 우리나라의 경우 약사법에 따라 생물학적제제에 대하여 제조단위별로 국가기관인 식품의약품안전청에서 국가검정을 실시하도록 되어 있으며 그 중 보존제로 치메로살을 함유한 제품의 경우, 식품의약품안전청 고시³⁾에

따라 치메로살 함량시험을 실시하게 된다. 생물학적제제의 치메로살정량법은 일반적으로 '생물학적제제 기준 및 시험방법'의 일반시험법 중 화학정량법을 이용한다.^{4,5)}

다회 접종용 백신에서는 치메로살의 사용이 필수적이지만 백신의 제조 및 시설 등에 대한 관리 강화 및 치메로살에 대한 노출을 줄이고자 하는 국제적인 추세에 따라 식품의약품안전청에서도 2005년 치메로살 감량(미함유)백신을 공급하도록 권고하였다.⁶⁾ 왜냐하면 치메로살은 에칠수은을 함유하고 있는 유기수은 제제로서 1999년부터 백신에서의 안전성 문제가 거론되기 시작하였기 때문이다.⁷⁾ 적극적인 저감화 정책으로 제조업소별·품목별 제거 또는 감량화 작업이 이루어져, 현재 국내에서 공급되는 소아용 백신의 치메로살 최대 함유량은 40 ppm이며 대부분 0~10 ppm이 함유되어 있다.⁸⁾ 따라서 시료의 농도에 따른 비색반응을 이용하여 흡광도를 측정하는 기존의 화학정량법은 미량의 치메로살 함량을 측정하는데 측정 한계가 있고 전처리 시에 암모니

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-719-5430 (팩스) 043-719-5400
(E-mail) kimjo70@korea.kr

아 및 황산의 유해가스 발생으로 시험자의 안전에 위험을 줄 수 있으며 과량의 시료가 소요되고 모든 분석 과정이 수작업으로 이루어져 정확성과 재현성 저하가 야기될 수 있는 단점이 있다. 반면 수은분석기를 이용한 가열기화 아말감 흡광도법은 원자흡광도법의 일종으로서 나노그램 단위의 정량 감도와 일체의 전처리 없이 자동화기기를 이용, 검체를 기기 내에서 직접 연소하여 수은증기를 아말감으로하여 포집 후, 재가열 기화시켜 수은의 증기를 흡수 셀 내에 이끌어 254 nm 고정과장⁹⁾에서 그 흡광도를 측정하여 수은 함량을 정량할 수 있는 방법이다.

따라서 본 연구에서는 자동수은분석기를 이용하여 생물학적체제 중의 보존제 성분인 치메로살의 함량을 정량할 수 있는 가열기화 아말감 흡광도법을 개발하고 밸리데이션을 통해 분석법을 확립하고자 하였다. 또한 기존에 사용하던 화학정량법과 비교를 통하여 국가검정 시험방법으로서 적절성을 찾고자 하였다.

실험방법

실험재료 및 기기

국내에서 유통되고 있는 생물학적체제 중 과상풍독소이드, DTaP 백신(흡착디프테리아, 과상풍독소이드 및 정제백일해 혼합 백신), 신증후출혈열 백신, 일본뇌염 사백신, 신종인플루엔자 백신, DTaP-HepB 백신(흡착디프테리아, 과상풍독소이드, 정제백일해 및 B형간염 혼합 백신), 항과상풍 사람면역글로불린, 수두 사람면역글로불린의 8개 제제 11개 제품을 사용하였으며, 실험에 사용된 표준품은 치메로살(Sigma, U.S.A.)을 이용하였다.

가열기화 아말감 흡광도법의 기기로는 EPA(U.S.A.)에서 인증한 자동수은분석기(DMA-80, Milestone Inc., Italy)¹⁰⁾를 사용하였다.

시료의 조제

생물학적체제 11개 제품은 제품내 함량 편차를 줄이기 위해 각각의 제품을 10바이알씩 1개의 튜브에 모은 후 치메로살 보존제 표시량을 기준으로 정제수에 희석하여 5 ppm 농도로 동일하게 준비하였고 이 때, 정제수는 Arium 611VF(Satorius, Germany)를 이용하여 제조하였다.

분석방법의 확립 및 밸리데이션¹¹⁻¹³⁾

자동수은분석기의 검출과장은 254 nm, 검출기는 silicon UV photodetector, 데이터 처리장치로는 control terminal 640을 사용하였다. 이 때 이동상은 산소로 압력은 4 bar(60 psi)이었다. 분석은 석영 또는 니켈 보트 위에 시료 100 μ l를 올리고 무게를 측정 후 바로 자동수은분석기 auto sampler 위에 두면 기기 내에서 후속 과정이 전자동으로 이루어진다. 기기 내 분석과정은 시료 내 수분제거(drying)→시료의 열분해 및 원자화(decomposition)→

수은을 제외한 타원자 방출(waiting)→금(gold) 포집기에 흡착된 수은을 고온가열로 탈착(amalgam)→흡수셀에서 수은 흡광도 측정 및 기록(recording) 순으로 이루어진다. 최적의 분석조건을 확립하고자 분석과정 각 단계별 시간과 온도를 달리하였다. 또한 기기내 잔류 수은 증기에 의한 간섭을 최소화하고 모든 종류의 생물학적체제에서 치메로살 성분을 검출할 수 있는 분석법을 확립하고자 하였다.

자동수은분석기를 이용한 가열기화 아말감 흡광도법의 타당성을 확보하고자 밸리데이션 파라미터로서 ICH 가이드라인에 따라 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성을 검사하였다.

특이성

생물학적체제에 포함된 대표적 부형제 성분인 알루미늄(1 mg/ml), 알루미늄(1 mg/ml)과 완충액인 PBS(1 mg/ml) 그리고 시료 희석액인 정제수(blank)와 치메로살 표준액(0.75 ppm)을 준비하였다. 앞에 기술된 분석방법에 따라 시험한 후 측정된 흡광도 피크 면적(peak area)을 서로 비교하였다.

직선성

치메로살 표준품 적당량을 정밀저울에 정확히 달아 정제수에 녹여 200 ppm 농도로 표준원액을 만들었다. 유의성 있는 검량선을 얻기 위해 희석한 표준원액을 0.75~10.0 ppm 범위에서 8개의 농도별 표준액을 만들고, 분석 후 피크 면적 비를 구하여 검량선을 구하였다. 직선성은 3회 반복 실험하였으며, 직선성의 상관계수 R²의 값이 0.99 이상인 경우 해당 검량선으로부터 치메로살 함량을 구하였다.

정확성

직선성 시험에 사용한 함량을 알고 있는 8개의 농도별 표준액을 이용하였다. 즉, 희석 후 해당농도의 이론값에 대해 검량선으로부터 산출한 측정값을 3회 비교하여 회수율을 계산하였다.

정밀성

반복성은 치메로살 표준품 정량을 정제수에 녹여 희석하여 직선성이 확인된 구간의 3가지 농도를 만들고 각 농도 3회씩 반복 측정하여 확인하였다. 실험실내 정밀성은 직선성이 확인된 구간에서 3가지 농도를 기준으로 실험자를 달리하여 각 농도를 3회씩 반복 측정하여 확인하였다. 반복성과 실험실내 정밀성 모두 피크면적의 상대표준편차를 구하여 기준에 적합한지 평가하였다.

실험결과 및 고찰

분석방법의 확립

분석시간은 시료 측정방법(standard method) 6분52초, 공시료

Table I – Instrument conditions for analytical method

Step	Standard method (Total 6 : 52)		Cleaning method (Total 4 : 02)	
	(min : sec)	°C	(min : sec)	°C
Drying	1 : 10	200	0 : 20	200
Decomposition	4 : 00	650	2 : 00	650
Waiting	1 : 00	615	1 : 00	615
Amalgam	0 : 12	900	0 : 12	900
Recording	0 : 30	125	0 : 30	125

측정방법(cleaning method) 4분2초로 분리하여 최적화하였고 이에 대한 분석조건은 Table I에 정리하였다.

수은분석기 내에는 2개의 Cell(Long & Short cell) slot이 장착되어 있다. 모든 농도의 수은 증기는 2개의 cell을 동시에 지나고, 저농도는 흡수셀의 길이가 긴 Cell 1에서 흡광도 피크가 검출 및 피크 면적값이 측정되지만 고농도는 Cell 1에서 피크가 over range된 후 그 면적에 해당하는 흡광도 피크가 Cell 2에서 검출된 후 Cell 2 피크 면적값이 측정된다. 실험을 통해 치메로살 농도 약 0.7 ppm을 기준으로 Long cell(Cell 1)에서는 0.7 ppm 미만이, Short cell(Cell 2)에서는 0.7~10 ppm이 측정되는 것을 확인하였다. 현재 국가검정이 수행되는 생물학적체제에 함유된 치메로살 최소량이 4 ppm임을 고려하였을 때, Cell 2 농도 구간이 치메로살 정량을 위한 최적의 분석 범위로 판단되었다. 또한 매 분석 시작마다 공시료 측정으로 피크 높이 0.0030 이하를 확인하고 한 번의 시료분석 후에는 두 번의 공시료(cleaning)를 병행해서 측정하는 방법이 기기내 잔류 수은 증기에 의한 측정 오류를 최소화하는 것으로 확인하였다.

특이성

알부민과 알루미늄의 부형제, PBS 완충액 모두 시료 희석액인 정제수 수준으로 Fig. 1과 같이 Cell 1에서만 측정되었다. 치

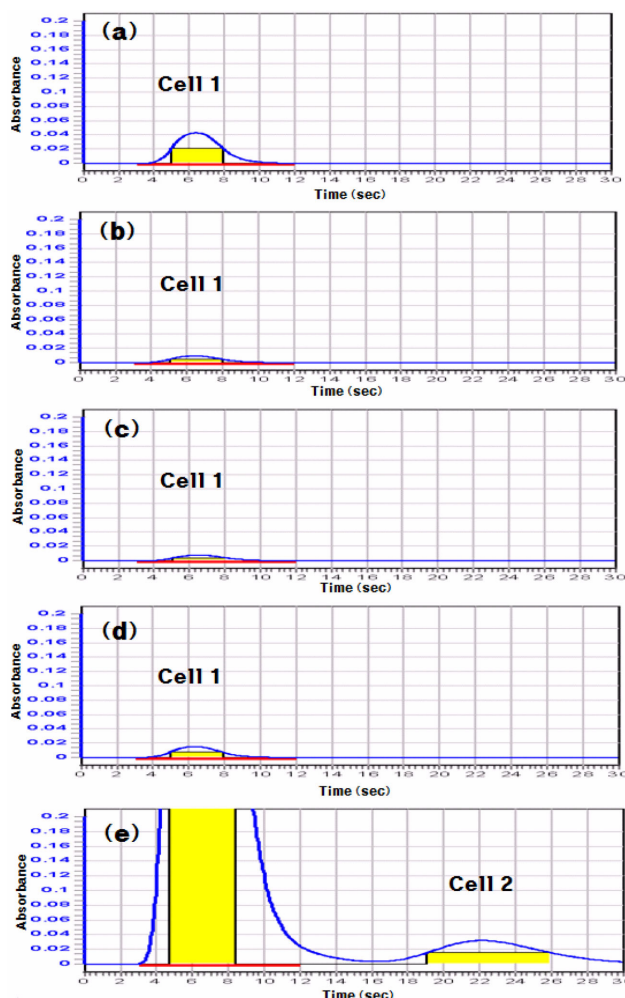


Fig. 1 – DMA-80 chromatogram of (a) albumin (b) aluminum (c) PBS (d) blank (e) standard of thimerosal by gold amalgamation method.

메로살 표준액은 이들 성분과 구분되는 Cell 2 농도 구간에서 확연히 분리되어 측정되었다.

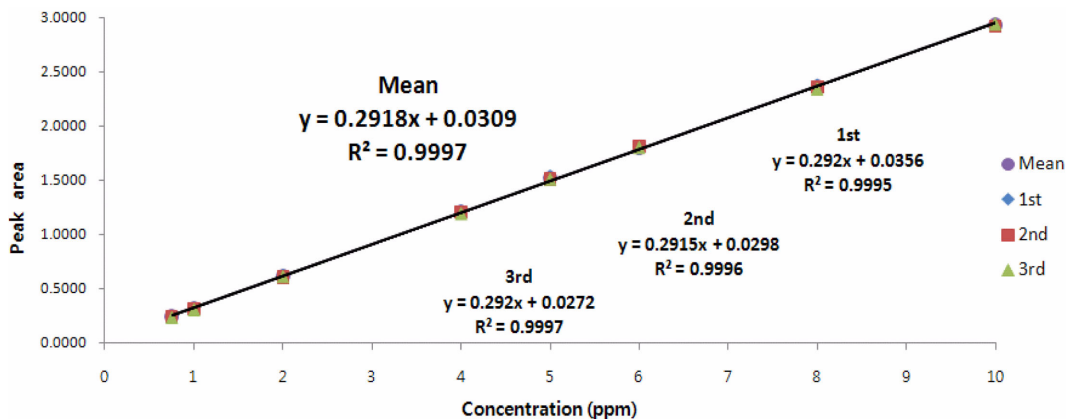


Fig. 2 – Linearity of the standard calibration curve of thimerosal by gold amalgamation method.

직선성

치메로살 농도 0.75~10.0 ppm 구간에서 직선성은 R²값이 직선성 기준 0.99 이상을 모두 만족하였고 3회 측정된 검량선 기울기 차이가 서로 미미함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 해당 직선성 구간은 Cell 2에서 측정되므로 Cell 1에서만 측정된 blank와 부형제 및 완충액에 의한 간섭이 거의 없었다.

정확성

표준액 농도 구간 0.75~10.0 ppm에서 정확성을 측정한 결과 Table II에서와 같이 회수율 95~102%로 허용기준 80~120%를 만족하였으며 이때 상대 표준편차는 2% 이하였다.

Table II – Accuracy (recovery) of the gold amalgamation method (Mean±SD, n=3)

Conc. (ppm)	Recovery (%)	RSD (%)
0.75	94.51±1.46	1.55
1.00	95.44±1.22	1.27
2.00	99.85±0.97	0.97
4.00	100.50±0.57	0.56
5.00	101.94±0.71	0.70
6.00	101.10±0.86	0.85
7.00	99.68±0.58	0.58
10.0	99.51±0.70	0.70

정밀성

직선성이 확인된 농도 구간 중, 3가지 농도를 기준으로 시료를 3회 반복 측정하여 정밀성을 확인한 결과, Table III과 같이 반복성(repeatability)은 기준인 상대표준편차 5% 이하를, 실험자간 실험실내 정밀성(intermediate precision)은 기준인 상대표준편차 10% 이하를 모두 만족하였다.

새롭게 개발된 치메로살 정량법의 적용

새로 개발된 가열기화 아말감 흡광도법과 현재 국가검정에 적용 중인 화학정량법으로 생물학적체제에 대한 3회 비교 분석 실험을 실시하였다. 두 방법 모두 치메로살 보존제가 포함된 11개 제품에 대해 '생물학적체제 기준 및 시험방법'에서 규정한 표시량 판정기준 80~120%를 만족하였다. 하지만 Table IV와 같이 3회 비교 분석에 대한 상대표준편차가 화학정량법은 2.91~14.18%, 가열기화 아말감 흡광도법은 0.22~1.01%로 가열기화 아말감 흡광도법이 상대적으로 매우 높은 재현성을 보였다.

결과적으로 자동수은분석기를 이용한 가열기화 아말감 흡광도법이 생물학적체제에 포함된 치메로살을 정량 및 확인하는 분석 방법으로 타당할 뿐만 아니라 기존 화학정량법에 비해 복잡한 전처리 과정없이 바로 측정가능하다는 편리성과 신속성을 지닌과 동시에 측정결과에 대한 정확도와 재현성이 우수함을 확인할 수 있었다.

Table III – Precision of the Gold amalgamation method

Conc. (ppm)	Repeatability (n=3)				Intermediate precision (n=6) Analyst I & II	
	Analyst I		Analyst II		Accuracy (%)	RSD (%)
	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)		
4.00	104.18	0.69	102.87	0.86	103.52	0.97
5.00	101.75	0.33	103.74	1.24	102.74	1.32
6.00	101.10	0.58	102.15	3.19	101.63	2.13

Table IV – Thimerosal contents of the gold amalgamation method compared with chemical analysis method in biological products (Mean±SD, n=3)

Biological products	Indicated conc. (ppm)	Spec. range	Gold amalgamation		Chemical analysis	
			Detected conc. (ppm)	RSD (%)	Detected conc. (ppm)	RSD (%)
Absorbed tetanus toxoid	100	80~120	88.95±0.81	0.91	102.09±3.23	3.16
DTaP vaccine (sample A)	5	4~6	4.67±0.05	1.01	4.78±0.15	3.05
DTaP vaccine (sample B)	10	8~12	10.11±0.03	0.32	10.30±0.31	3.06
Hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine	100	80~120	85.78±0.61	0.71	87.99±2.56	2.91
Japanese encephalitis vaccine (sample A)	15	12~18	14.38±0.13	0.89	15.47±1.49	9.63
Japanese encephalitis vaccine (sample B)	40	32~48	40.32±0.39	0.97	42.33±2.78	6.57
Influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccine	200	160~240	199.13±0.91	0.45	212.02±13.01	6.14
DTaP-HepB vaccine	40	32~48	40.17±0.35	0.87	41.06±2.94	7.16
Human tetanus immunoglobulin (sample A)	100	80~120	93.65±0.80	0.86	98.58±13.98	14.18
Human tetanus immunoglobulin (sample B)	100	80~120	93.65±0.20	0.22	85.72±6.40	7.47
Human varicella immunoglobulin	100	80~120	84.82±0.42	0.49	82.78±2.97	3.59

결 론

본 연구에서 원자흡광도법의 일종인 가열기화 아말감 흡광도법은 밸리데이션 수행 결과 직선성, 정확성, 정밀성의 모든 허용 기준을 만족하였다.

이에 따라, 가열기화 아말감 흡광도법은 치메로살 정량 및 확인 시험방법으로 적절할 것으로 판단하여 치메로살을 함유한 생물학적제제 중 제조사 등을 고려하여 대표적인 제제를 시료로 하여 기존 시험방법과 3회 비교 분석 실험을 실시 하였다. 그 결과가 분석법이 전처리 과정 없이 바로 측정가능하다는 편리성과 신속성을 지니면서도 기존 화학정량법에 비하여 상대표준편차(%RSD)가 2% 미만으로 우수한 재현성을 보임으로써 정밀성이 높음을 확인할 수 있었다.

따라서, 시험법 표준화에 따른 생물학적제제 품질관리 및 국가검정 신뢰도 향상이라는 측면에서 생물학적제제 기준 및 시험방법에 치메로살 시험법을 기존 화학정량법과 별도로 가열기화 아말감 흡광도법을 추가하는 것이 타당하다고 사료된다.

또한 화학정량법에 사용하는 시약인 사염화탄소가 오존층파괴 물질에 관한 몬트리올 의정서(Montreal Protocol on Substances That Deplete the Ozone Layer)상 오존파괴물질 감축일정에 따라 2010년부터 시약 제조사에서 생산 중단¹⁴⁾에 돌입하였기에 현 시점에서 각 제조업소에서 치메로살 화학정량법의 개선 · 대안은 매우 절실하며 필연적인 상황이었다.

따라서 본 '가열기화 아말감 흡광도법'을 통해 식품의약품안전청이 선도적으로 의약품 제조업체에 분석법 개선 및 대안을 제시하고 국제환경협약 및 규제를 주도적으로 준수하면서 생물학적제제의 일관성 있는 품질관리 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 식품의약품안전청 자체연구개발과제(10201 생물안304)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 본 연

구를 위해 많은 도움을 주신 식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 국가검정센터의 많은 분들께 감사의 인사를 드립니다.

참고문헌

- 1) 약사법 시행규칙(보건복지가족부령 제77호) [별표3] 생물학적제제 등 제조 및 품질관리기준 (2008).
- 2) 생물학적제제 등의 품목허가심사 규정(식품의약품안전청 고시 제 2008-17호, 2008.12.8.).
- 3) 국가검정 대상 의약품 지정 등에 관한 규정(식품의약품안전청 고시 제2008-50호, 2008.8.8).
- 4) 생물학적제제 기준 및 시험방법(식품의약품안전청 고시 제2010-39호, 2010.6.3).
- 5) 대한약전 제9개정(식품의약품안전청 고시 제2007-89호, 2007.12.18).
- 6) 식품의약품안전청 : 백신 중 치메로살의 감량 등 허가 및 심사 가이드라인(2005).
- 7) Hornig, M., Chian, D. and Lipkin, W. L. : Neurotoxic effect of postnatal thimerosal are mouse strain dependent. *Molecular Psychiatry* **9**, 1 (2004).
- 8) 2007 식품의약품안전백서(식품의약품안전청 행정간행물등록번호 제11-147000-000139-10, 2007.8).
- 9) Blood mercury flow injection cold vapor atomic absorption (U.S. CDC Method ITB003A, 2004.9).
- 10) Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry (U.S. EPA Method 7473, 2007.2).
- 11) Darling, A. J., Boose, J. A. and Spaltro, J. : Virus assay methods, accuracy and validation. *Biologicals*. **26**, 105 (1998).
- 12) 식품의약품안전청 : 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인 (2004).
- 13) ICH Topic Q2(R1) Validation of Analytical Procedure : Text and Methodology (2005).
- 14) 한국생산기술연구원 국가청정생산지원센터 : 주요 국제환경 협약 및 환경규제 연구보고서 (2004).