

# 근적외부스펙트럼 측정법을 이용한 록소프로펜의 정량화 및 밸리데이션

최성업<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>동남보건대학교 식품생명과학과

## The Quantification and Validation of Loxoprofen using Near-infrared(NIR) Spectrum Method

Sung-Up Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Dongnam Health College

**요약** 본 논문에서는 록소프로펜 제제의 분석 시간을 단축하고 제품 출하 속도를 향상시키기 위하여 근적외부(NIR) 스펙트럼 측정법을 이용하여 기존에 사용하던 HPLC 방법과 상호 비교해 보고자 하였다. 제제학적으로 사용되는 다른 첨가제들과 함께 록소프로펜 혼합시료를 제조하고, NIR 분광광도계와 HPLC로 록소프로펜을 정량하고 평가하였다. 두 시험법의 밸리데이션 항목으로 특이성, 정확성 및 정밀성을 실시하였다. NIR 측정법이 검증되었고, 제약산업 분야의 제조공정 중 품질관리를 위한 적합한 결과를 얻었다. 결론적으로 록소프로펜을 분석하는데 있어서 NIR 측정법을 사용하면 기존의 HPLC 정량법을 NIR의 결과로 대체할 수 있을 것이다.

**Abstract** In this study, we used NIR spectrum method instead of conventional HPLC method to shorten the analysis and manufacturing time of the loxoprofen products. Loxoprofen mixtures with other pharmaceutical additives were prepared and evaluated by the NIR spectrometer and the HPLC system. Validation of both methods was performed for specificity, accuracy and precision. NIR spectrometer method was validated and revealed proper results for the in-process quality control in the pharmaceutical field. In conclusion, NIR spectrometry can be replaced by HPLC method.

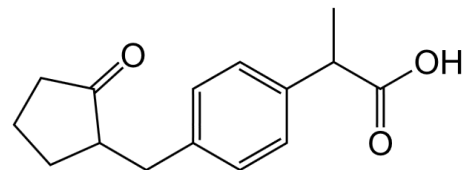
**Key Words** : HPLC, NIR, Loxoprofen, Quantification, Validation

### 1. 서론

loxoprofen (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>, MW. 246.302, Fig. 1)은 비스테로이드성 항염증제로서[1-3], 일반적으로 정제의 형태로 생산현장에서 제조되어 품질관리 부서에서 HPLC로 정량분석을 실시하여 품질 평가를 하고 있다[4-6]. HPLC 분석 방법은 지금까지의 분석 방법 중에서 그 정확성 및 재현성이 우수한 장점으로 인하여 대부분의 품질관리에서 가장 일반적으로 사용되는 방법이다. 그러나, 다수의 장비 및 분석소모품 필요, 이동상의 제조 및 분석 시간이 오래 소요되기 때문에 분석 결과가 나오기까지 제품의 출하가 그만큼 지연되는 단점을 가지고 있어, 인건비 및 생산단가의 절감을 위해 새로운 분석 방법의 도입이

절실하게 요구되고 있다.

이에 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 새로운 기술로서 근적외부(NIR, Near-Infrared) 스펙트럼 측정법을 이용한 정량화의 방법을 도입하고 있는데, NIR 분석법이란 물질이 각기 특정한 파장의 빛만을 흡수하는 성질을 이용하여 분석하는 방법이다[7-9].



[Fig. 1] Chemical structure of loxoprofen

\*Corresponding Author : Sung-Up Choi(Dongnam Health College)

Tel: +82-10-5475-6400 email: pxchoi@gmail.com

Received November 5, 2013

Revised (1st November 20, 2013, 2nd January 8, 2014)

Accepted January 9, 2014

NIR 분석법은 대량의 시약, 용매 등의 화학약품을 사용하는 종래의 화학분석법에 비해, 별도의 시약 및 용매 등을 필요로 하지 않으며, 특별한 전처리가 없어 시료의 조제가 간편하며, 같은 시료를 측정할 때 오차를 최소화 하면서, 여러 가지 성분을 동시에 측정할 수 있으며, 동일 시료의 손상없이 여러 번 반복 측정할 수 있고, 제조 공정 중에서 on-line으로 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있다[9,10]. 즉, 시료의 화학적 성분을 신속하고, 재현성 있게, 비파괴적 측정이 가능한 분석기법이다[10-12].

HPLC 방법을 NIR 분석방법으로 대체하는 데 있어 가장 큰 걸림돌은 기존의 HPLC 방법과 새로이 도입되는 NIR 분석방법이 완벽하게 서로 상호 호환 가능한 분석방법인지를 검증 할 수 있는나이다[13-15].

본 연구는 기존의 HPLC 분석방법 대신 최근 품질관리 분야에서 분석방법의 하나로써 새로운 기술로 대두되고 있는 NIR의 방법을 이용하여 HPLC 분석방법과의 상호 비교 및 밸리데이션을 통해 실제 제약 현장에서 생산되고 있는 loxoprofen의 분석시간을 단축시켜 제품 출하 속도 향상에 기여할 수 있는지 확인해 보고자 하였다. 이를 위하여 loxoprofen을 실제 제약 현장에서 생산되고 있는 방법으로 제조해 보고 근적외선 분광광도법(NIR)으로 혼합시료를 분석한 후, 기존의 분석법인 HPLC 방법과 상호 비교하여 정확한 분석결과를 도출해 내 보고자 하였으며, 정확한 분석 결과 도출을 위하여 분석법 밸리데이션의 주요 인자인 특이성, 정확성 및 정밀성들을 측정하여 타당성 있는 결과가 나오는지 검증하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 시약 및 기기

시약은 loxoprofen sodium(Daehi Chem, Korea), lactose(SAMCHUN, Korea), L-HPC®(low-substituted hydroxypropyl cellulose, Japan), magnesium stearate (SAMCHUN, Korea)와 용매로써 methanol(HPLC Grade, SAMCHUN, Korea), acetic acid 99.5%(SAMCHUN, Korea), triethanolamine(DAE-JUNG, Korea), water(3차 증류수)를 사용하였고, 분석기기로는 HPLC(Alliance 2690, Waters, USA), NIR(NIRFlex Solids, Buchi, Switzerland) 등을 사용하였다.

### 2.2 검체제조방법

검체 제조를 위하여 loxoprofen의 함량이 80%, 90%, 100%, 110%, 120%가 되도록, loxoprofen sodium,

lactose, L-HPC®, magnesium stearate를 각각 칭량, 혼합 하였다(Table 1). 검체는 밸리데이션 검증을 위하여 각 3 로트씩 조제하고 대조군으로는 loxoprofen sodium을 제외한 100% 혼합분말을 각 3로트씩 조제하여 이를 placebo로 하였다. 각 제조 검체의 양 및 농도(%)는 Table 1과 같다.

[Table 1] Amount and concentration ratio of loxoprofen sodium sample(g)

Conc. of loxoprofen	80%	90%	100%	110%	120%
Loxoprofen Sodium	2.18	2.45	2.72	2.99	3.28
Lactose	5.32	5.12	4.94	4.75	4.58
L-HPC	2.41	2.32	2.24	2.17	2.07
Magnesium Stearate	0.11	0.10	0.1	0.09	0.93

### 2.3 검액 및 표준액 제조

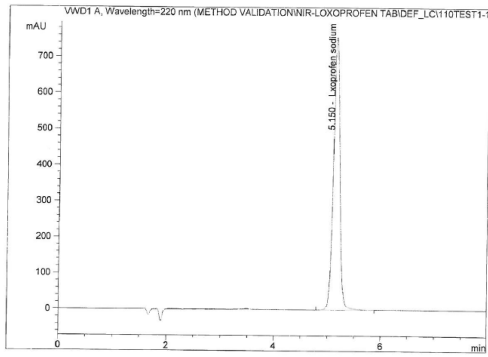
loxoprofen sodium 표준품 6 mg을 정밀하게 달아 60% methanol을 넣어 20 ml로 하여 검액으로 하고, 제조한 검체를 loxoprofen sodium 표준품의 6 mg에 해당하는 양을 계산해 정밀하게 달아 60% methanol을 넣어 20 ml로 하고 이를 검액으로 한다. 각 표준액과 검액을 1 ml syringe로 취해 PVDF membrane filter를 이용하여 HPLC vial에 담아 검액 및 표준액을 제조하였다.

### 2.4 HPLC의 분석

loxoprofen의 분석은 HPLC를 사용하였다. 검출기는 자외부 흡광 광도계로써 220 nm의 파장에서 측정하며, 40℃에서 C18 컬럼(안지름 4 mm, 길이 25 cm, 5 μm)을 이용하여 분석하였다. 이동상의 조성 비율은 methanol : water : acetic acid : triethanolamine = 600 : 400 : 1 : 1로 하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하고, 준비한 표준액 및 검액을 HPLC로 분석 하였다[4,5].

### 2.5 NIR의 분석

HPLC로 분석한 결과와의 상호 검증을 위하여, 조제된 검체를 NIR 전용 petri dish에 옮겨 담은 후, NIR 측정부에 올려 놓고 1개의 검체 당 각 3번 씩 측정하여 3개의 스펙트럼을 얻은 후 그 스펙트럼을 분석하고 정확한 분석결과가 도출되는지 확인하였다[16].



[Fig. 2] The chromatogram of loxoprofen for the specificity test

### 2.6 밸리데이션

분석법의 정확성을 검증하기 위하여 분석법 밸리데이션을 시행하였다. 특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석 물질을 분리하고 정량하는 분석 능력으로서 100% loxoprofen 검체와 placebo의 스펙트럼을 비교하여 두 스펙트럼이 겹치지 않고 완벽하게 분리되는지 여부를 검토하는 것이며, 정확성은 분석물질의 참값에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균 시험결과에 얼마나 근접성을 가지는지를 의미한다. 실험방법은 각 3개의 혼합검체를 채취해 HPLC로 시험하여 함량을 확인한 후 표준액 분석에서 얻어진 값 대비 각 3회 측정된 평균값으로 하는 NIR로 예측된 값의 회수율을 구하여 그 값을 구하여 보았다. 정밀성은 하나의 균질화된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체로 반복 분석 했을 때 분석물질에 대한 개개 측정치 사이에 얼마나 근접성을 가지는지를 의미하며, 연속적인 분석으로 얻은 결과 간의 상대표준편차(RSD)를 계산하여 검증하였다[17].

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 HPLC 분석법 밸리데이션

[Table 2] The assay of loxoprofen sodium for the accuracy test by HPLC

Test	Area	Assay(%)
Test 1	1067.9	98.1
Test 2	1188.6	101.5
Test 3	1270.6	101.8
mean		100.69
sd		1.07

### 3.1.1 특이성

loxoprofen을 함유한 혼합시료와 loxoprofen을 함유하지 않는 혼합시료(placebo)를 HPLC를 이용하여 220 nm에서 표준물질 머무름시간(약 5분대)에 피크가 나오는지 확인한 결과, Fig. 2에서 보이는 것처럼 크로마토그램이 겹침이나 간섭 없이 깨끗하게 분리되어 loxoprofen의 특이성이 성립된다는 것을 확인 할 수 있었다.

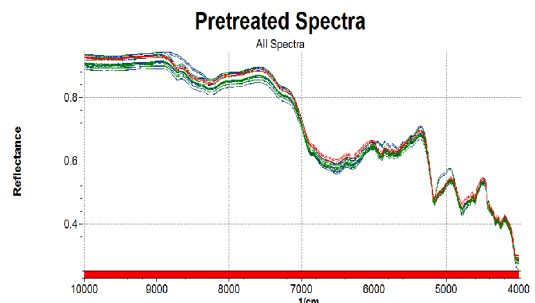
### 3.1.2 정확성

정확성 평가항목의 허용기준은 loxoprofen 원료의약품의 경우 회수율이 97.0~103.0%이어야 하는데 Table 2에서 알 수 있듯이 회수율(%)로서 그 정확도를 평가하여 보았을 때 정확도가 100.69±1.07%이었으므로 정확성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

## 3.2 NIR 스펙트럼 분석법 밸리데이션

### 3.2.1 특이성

NIR 스펙트럼 방법을 이용하였을 경우, 특이성을 가지고 있는지 검증해 보기 위하여 주성분인 loxoprofen을 포함하여 제품을 구성하고 있는 모든 원료(혼합시료)를 10000~4000 cm<sup>-1</sup>에서 측정하여 수화적인 전처리(pretreatment)를 하지 않은 스펙트럼을 비교하여 보았다. Fig. 3에서 확인할 수 있는 것처럼 주성분과 그 외 첨가제들의 스펙트럼이 겹치지 않는 것을 확인 할 수 있어 NIR 스펙트럼을 이용한 분석법에서도 특이성이 있음을 확인할 수 있었다. 스펙트럼이 겹치지 않는다는 것은 주성분과 첨가제 사이에 서로 간섭현상이 없는 것을 의미하는 것으로 NIR 스펙트럼을 이용한 정성 및 정량화가 가능하다는 것을 의미한다.

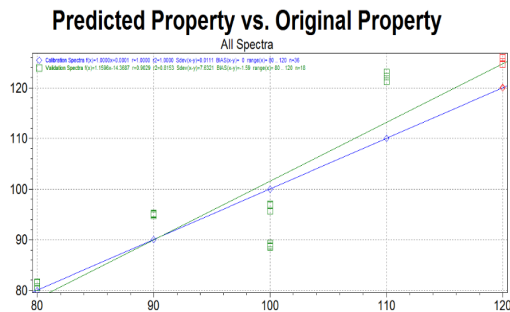


[Fig. 3] NIR original spectra for the specificity test

### 3.2.2 직선성 및 범위

직선성 및 범위를 알기 위하여 NIR 스펙트럼 분석법

에 의해 실험을 진행하였다. NIR 측정법의 검량선 예측 가능한 농도 범위 내에서 선형 회귀 분석을 실시하였으며, 표준값과 NIR 측정법에 의한 예측값의 두 세트 값의 선형적 관계로 표현하고 선형 관계를 회귀선 상관계수로 표현하여 보았다. 통계적으로 신뢰할 수 있는 범위를 산출해본 결과 81.2~122.5% 범위에서 Fig. 4와 같은 spectra curve를 얻을 수 있었다. 이러한 결과로부터 유추하여 보았을 때 혼합공정의 경우, 기준분석값에 대한 예측값의 검량용 검체는 0.986, 밸리데이션용 검체는 0.994의 회귀선 상관계수를 나타냄을 알 수 있어 NIR스펙트럼 분석법으로 loxoprofen을 정량화 하였을 때도 직선성이 있음을 확인 할 수 있었다[Fig. 4].



[Fig. 4] NIR original spectra for the linearity test

이로써 loxoprofen 성분의 NIR 측정법이 제약산업의 품질관리 분야에 적용 가능함을 확인하였으며 최종 결과 Data는 아래 Table 3과 같았다.

[Table 3] The NIR result data of loxoprofen sodium

	Data	Result
Specificity	R.T 5 min	complies
Accuracy	100.69±1.07%	complies
Coefficient of correlation	0.986 (predicted)	complies
Range	81.2 - 122.5%	complies

제약산업에서 혼합공정은 매우 중요한 단위 공정 중 하나이다. 혼합공정에서 가장 중요한 점은 주성분의 혼합 균질도이다[18]. 혼합균질도를 확인하기 위한 방법으로 현재까지 품질관리부서에서 주로 사용되는 방법은 HPLC로 정량 분석 하는 방법이며 대개 HPLC 시험법이 공정서에 규정되어 있다. 그러나 HPLC 분석법은 시료전처리, 분석소모품의 사용, 상대적으로 긴 분석시간 등으로 인하여

분석결과를 얻기 전까지 제조공정이 일시적으로 중단되는 단점이 있다. 혼합 공정이 완료된 이후 균질한 혼합 시험 결과를 얻기 전까지 그 다음 공정인 타정을 진행하지 않는 것이 일반적이다. NIR은 시료의 전처리 없이 혼합공정 중 실시간 분석이 가능하며[18,19], 고형 분말 혼합물 뿐만 아니라 액상 혼합물에서도 적용이 가능하여[20,21], 제약 제조공정 중 그 사용범위가 넓어지고 있다. 따라서 본 연구에서 얻어진 loxoprofen 혼합물의 NIR 측정법 결과가 제약현장에 적용된다면 실시간 분석이 가능하여 신속한 분석으로 인하여 제조공정의 중단없이 진행되어 제품 생산에 소요되는 인건비, 제품 출하 기간 및 생산단가를 낮출 수 있을 것이다.

#### 4. 결론

본 실험은 소염 진통에 효능이 있는 약물인 loxoprofen의 정량화 및 시험법 밸리데이션을 위하여, 기존에 사용되어지고 있지만 많은 문제점을 가지고 있는 HPLC 분석법 대신, 최근 각광을 받고 있는 NIR 스펙트럼 분석법을 사용하여 짧은 시간 안에 정확한 분석결과를 도출해 내는데 그 목적이 있었으며, loxoprofen정의 조성을 실제 생산 공정과 동일하게 설정하여 혼합 한 후 정량분석에 적용하고 또한 분석방법 밸리데이션을 적용하여 실험방법의 정확성을 확인하여 그 결과를 HPLC의 분석 방법과 비교해 보고자 하였다. 위 실험에 사용한 HPLC의 분석 방법과 NIR 스펙트럼 분석 방법 모두 분석법 밸리데이션의 파라미터(특이성, 정확성, 직선성 등)를 만족하여 기존의 HPLC 분석방법 이외에도 NIR 스펙트럼 방법을 loxoprofen의 정량화에 적용할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 결론적으로, 용매의 조성을 찾는 어려움이나 긴 분석시간 등의 단점을 가진 기존의 분석방법인 HPLC 방법 대신 새로운 분석 방법인 NIR 분석법을 적용할 수 있음이 확인 되었고 이러한 결과를 기반으로 NIR 스펙트럼 분석방법을 활용한다면 제조공정 중 실시간으로 정확한 정량분석이 가능하며 제품 출하 속도를 향상 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

#### References

[1] H. I. Shin, B. H. Kim, H. S. Chang, C. H. Park, C. I. Kim, "Long-term effect of loxoprofen sodium on nocturia in patients with benign prostatic hyperplasia", Korean J Urol, Vol. 52(4), pp. 265-268, 2011.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.4111/kju.2011.52.4.265>
- [2] M. Hamaguchi, T. Seno, A. Yamamoto, M. Kohno, M. Kadoya, H. Ishino, E. Ashihara, S. Kimura, Y. Tsubakimoto, H. Takata, T. Yoshikawa, T. Maekawa, Y. Kawahito, "Loxoprofen sodium, a non-selective NSAID, reduces atherosclerosis in mice by reducing inflammation", *J Clin Biochem Nutr*, Vol. 47(2), pp. 138-47, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3164/jcfn.10-33>
- [3] M. Sekiguchi, M. Shirasaka, S. Konno, S. Kikuchi, "Analgesic effect of percutaneously absorbed non-steroidal anti-inflammatory drugs: an experimental study in a rat acute inflammation model", *BMC Musculoskelet Disord*, Vol. 9:15, 2008 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/9/15>).
- [4] P. Loya, A. A. Kshatriya, M. N. Saraf, "Bioequivalence study of two brands of loxoprofen tablets in healthy volunteers", *Int J PharmTech Research*, Vol. 3(4), pp. 2038-2046, 2011.
- [5] J. H. OH, M. H. Lee, L. M. Shaw, S. E. Lee, J. H. Park, J. S. Kang, "Pharmacokinetics and bioequivalence study of two brands of loxoprofen tablets in healthy volunteers", *Arzneimittelforschung*, Vol. 57(8), pp. 542-546, 2007.
- [6] N. Yamakawa, S. Suemasu, H. Watanabe, K. Tahara, K. Tanaka, Y. Okamoto, M. Ohtsuka, T. Maruyama, T. Mizushima, "Comparison of pharmacokinetics between loxoprofen and its derivative with lower ulcerogenic activity, fluoro-loxoprofen", *Drug Metab Pharmacokinet*, Vol. 28(2), pp. 118-124, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-050>
- [7] M. J. Maltesen, M. van de Weert, H. Grohgan, "Design of experiments-based monitoring of critical quality attributes for the spray-drying process of insulin by NIR spectroscopy", *AAPS PharmSciTech*, Vol. 13(3), pp. 747-755, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-012-9796-1>
- [8] K. Aaljoki, "Automated quality assurance of online NIR analysers", *J Autom Methods Manag Chem*, Vol. 2005(2), pp. 44-49, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/JAMMC.2005.44>
- [9] C. Schaefer, C. Lecomte, D. Clicq, A. Merschaert, E. Norrant, F. Fotiadu, "On-line near infrared spectroscopy as a Process Analytical Technology (PAT) tool to control an industrial seeded API crystallization", *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 83, pp. 194-201, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.015>
- [10] A. Burggraeve, A. F. Silva, T. van den Kerkhof, M. Hellings, C. Vervaet, J. P. Remon, Y. van der Heyden, T. De Beer, "Development of a fluid bed granulation process control strategy based on real-time process and product measurements", *Talanta*, Vol. 100, pp. 293-302, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.054>
- [11] S. H. Lee, J. H. Lee, S. Cho, S. H. Do, Y. A. Woo, "End point determination of blending process for trimebutine tablets using principle component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) regression", *Arch Pharm Res*, Vol. 35(9), pp. 1599-1607, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-012-0911-3>
- [12] J. G. Rosas, M. Blanco, J. M. González, M. Alcalá, "Real-time determination of critical quality attributes using near-infrared spectroscopy: a contribution for Process Analytical Technology (PAT)", *Talanta*, Vol. 97, pp. 163-170, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.012>
- [13] E. T. Skibsted, H. F. Boelens, J. A. Westerhuis, D. T. Witte, A. K. Smilde, "Simple assessment of homogeneity in pharmaceutical mixing processes using a near-infrared reflectance probe and control charts", *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 41(1), pp. 26-35, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.10.009>
- [14] Y. A. Woo, "Content uniformity in granules for aceclofenac controlled release (CR) tablets determined using near-infrared spectroscopy and wide area illumination (WAI) Raman spectroscopy", *Arch Pharm Res*, Vol. 35(2), pp. 351-358, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-012-0216-6>
- [15] M. Blanco, A. Peguero, "Influence of physical factors on the accuracy of calibration models for NIR spectroscopy", *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 52(1), pp. 59-65, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2009.12.009>
- [16] Y. H. Kim, B. R. Choi, H. Y. Baek, Y. S. Lee, "Quantification of icariin contents in Epimedium koreanum N. by using a Near Infrared Reflectance Spectroscopy", *J Kor Medical Crop Sci*, Vol. 10(5), pp. 340-343, 2002.
- [17] J. U. Chun, K. S. Choi, "Nondestructive and rapid method for measurement of catechin contents in green tea products using NIRS", *J Kor Tea Soc*, Vol. 13(3), pp. 99-112, 2007.
- [18] C. R. Park, A. Y. Kim, M. J. Lee, H. E. Lee, D. Y. Seo, S. Shin, Y. Choi, B. S. Kwon, K. H. Bang, H. K. Kang, C. K. Kim, S. K. Lee, G. J. Choi, "In-line monitoring of fluid-bed blending process for

- pharmaceutical powders using fiber optics probe and NIR spectroscopy", J Kor Pharm Sci, Vol. 39(1), pp. 29-36, 2009.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4333/KPS.2009.39.1.029>
- [19] D. H. Kim, Y. A. Woo, H. J. Kim, "Quantitative analysis of indomethacin by the portable near-infrared (NIR) system", Yakhak Hoeji, Vol. 47(5), pp. 261-265, 2003.
- [20] C. H. Cho, H. J. Kim, D. Y. Meang, S. H. Seo, J. H. Cho, "Quantitative analysis of taurine using near infrared spectrometry (NIRS)", Yakhak Hoeji, Vol. 42(6), pp. 545-551, 1998.
- [21] J. H. Baek, N. Kang, Y. A. Woo, H. J. Kim, "Aqueous glucose solution measurement by three types NIR spectrometer", Yakhak Hoeji, Vol. 47(6), pp. 461-468, 2003.

---

**최 성 업(Sung-Up Choi)**

[정회원]



- 1992년 2월 : 중앙대학교 약학과 (약학사)
- 1997년 8월 : 중앙대학교 대학원 약학과 (약학석사)
- 2004년 2월 : 중앙대학교 대학원 약학과 (약학박사)
- 2007년 4월 : University of Washington, Research Associate
- 2012년 2월 ~ 현재 : 동남보건대학교 식품생명과학과 조교수

<관심분야>

약물전달체, 서방성제제, 동물용의약품 개발, 의약품분석법 개발