

## 페노피브레이트 유연물질 표준품 대체시험법 개발

김정현<sup>#</sup> · 김민영 · 권은경 · 이광문 · 최돈웅

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의약품연구과

(Received Marcy 12, 2015; Revised May 28, 2015; Accepted May 31, 2015)

### Development of an Alternative Analytical Method without Related Substance Reference Standards for Fenofibrate in *Korean Pharmacopoeia*

Jung Hyun Kim<sup>#</sup>, Min Young Kim, Eun Kyung Kwon, Kwang Moon Lee and Don Woong Choi

Ministry of Food and Drug Safety, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Drug Research Division, Cheongju 363-700, Korea

**Abstract** — Analytical method for related substances can be categorized into two methods depending on the necessity of reference standard (RS). The analytical method of related substances with RS is fast and accurate, but it's very expensive and technically difficult to synthesize RS due to their complicated structure. Another method is using relative retention time (RRT) and relative response factor (RRF) which are already validated with RS. Validation of this method is not easy and time consuming, but once it has been developed, it can save cost and time. In this study, we developed the analytical method for related substances of fenofibrate using RRT and RRF. We validated the method by evaluating specificity, linearity, accuracy and precision according to the 「Manual for Guideline Application for Validation of Analytical Procedures」 of MFDS. Also, we calculated RRT and RRF between fenofibrate and fenofibrate related substances. The results of this study showed high specificity for fenofibrate and fenofibrate related substances. Correlation coefficient(r) of all substances were more than 0.99, and the recovery of fenofibrate, fenofibrate related substance I, II and III were 99.44%, 100.84%, 99.14% and 101.58%, respectively. Precision of fenofibrate and its related substances were ranged between RSD 0.29% and 0.93%. Quantification limits of fenofibrate, fenofibrate related substance I, II and III were determined to be 0.03 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.04 µg/ml and 0.02 µg/ml, respectively by confirming signal to noise ratio of each chromatogram. The RRT for fenofibrate related substance I, II and III were determined to be 0.35, 0.41 and 1.34, respectively. Also, the RRF for fenofibrate related substance I, II and III were determined to be 1.28, 0.98 and 0.79, respectively. The developed method was applied to determine contents for fenofibrate related substances in commercial fenofibrate (active pharmaceutical ingredient). As a result, developed analytical methods of related substances will be used for revising the monograph of fenofibrate in Korean Pharmacopoeia revision and contribute quality control of drugs by improving cost and time consuming problem of RS.

**Keywords** □ Korean Pharmacopoeia, fenofibrate, related substances, impurity test, reference standard

유연물질시험법은 유연물질표준품을 사용하는 방법과 유연물질표준품을 사용하지 않는 방법이 있다. 유연물질표준품을 사용하는 방법은 빠르고 정확하지만 유연물질의 특성상 그 구조가 복잡하여 별도 합성을 해야 하는 등 확보에 장애(예산, 시간)가 크므로 의약품 품질관리 시 어려움이 있다. 유연물질표준품을 사

용하지 않는 방법은 밸리데이션을 통한 초기 시험법 확립 시 주 성분 표준품 및 유연물질표준품을 사용하여 상대유지시간(Relative Retention Time, RRT) 및 상대반응계수(Relative Response Factor, RRF) 설정을 위한 추가 시험이 필요하나, 시험법 확립 후에는 유연물질표준품을 사용하지 않으므로 유연물질표준품 확보에 따른 장애(비용, 시간)가 사라지는 장점이 있다. 본 연구에서는 페노피브레이트에 대한 상대유지시간과 상대반응계수를 사용하는 페노피브레이트 유연물질 대체시험법을 개발하였다. 시험법 밸리데이션은 대한민국약전 일반정보 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침」<sup>1)</sup>에 따라 페노피브레이트 및 페노피브레이트 유연물질 각각의 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 범위

#### <sup>#</sup>Corresponding Author

Jung Hyun Kim

Ministry of Food and Drug Safety, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Drug Research Division, Cheongju 363-700, Korea

Tel.: 043-719-4608 Fax.: 043-719-4600

E-mail: junghyunkim@korea.kr

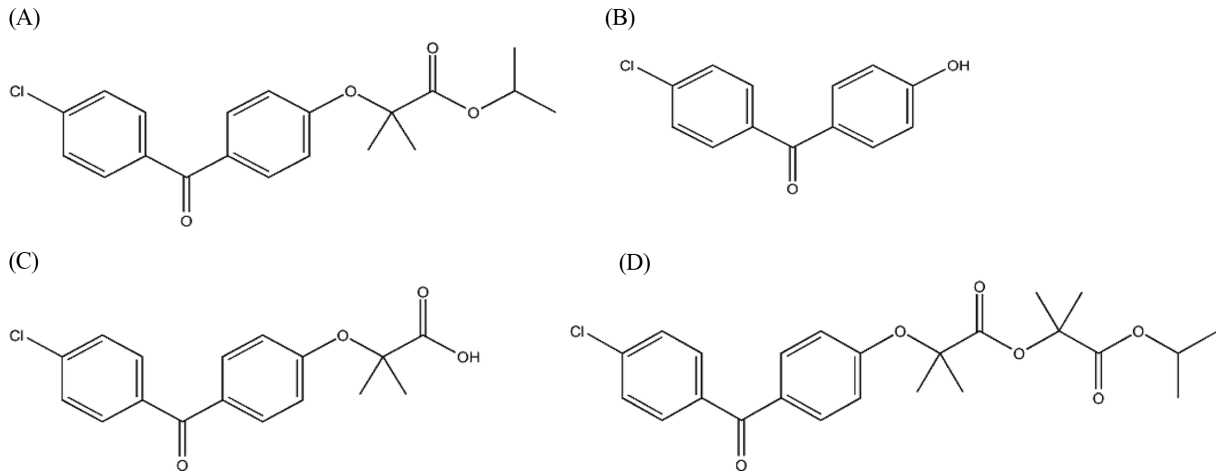


Fig. 1 – Structures of fenofibrate (A), fenofibrate related substance I (B), II (C) and III (D).

및 정량한계를 검증하여 분석법의 타당성을 확보하고, 각 유연물질의 상대유지시간 및 상대반응계수를 설정하여 유연물질표준품 대체시험법을 확립하고자 하였다. 시험 결과 페노피브레이트 및 페노피브레이트 유연물질은 분석 조건에서 높은 특이성을 나타내었고, 각 성분의 상관계수는 모두 0.99 이상이였다. 페노피브레이트, 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III 각각의 회수율은 99.44%, 100.84%, 99.14%, 101.58%였으며, 정밀도는 상대표준편차 0.29~0.93%로 나타났다. 페노피브레이트, 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III 각각의 정량한계가 0.03 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.04 µg/ml, 0.02 µg/ml임을 크로마토그램 상의 신호 대 잡음비로 확인하였다. 페노피브레이트에 대한 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III의 상대유지시간은 각각 0.35, 0.41, 1.34였으며, 상대반응계수는 각각 1.28, 0.98, 0.79였다. 개발한 시험법을 시중 유통 중인 페노피브레이트 원료의약품 중 유연물질 함량 측정에 적용하였다. 실험 결과를 바탕으로 개선된 유연물질시험법은 「대한민국약전」 개정 시 기초자료로 활용될 예정이며, 유연물질 확보를 위한 비용, 시간 절감을 통한 해당 품목의 품질관리에 기여할 것으로 기대된다.

실험방법

시약 및 기기

페노피브레이트, 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III 표준품은 유럽약전 표준품을 사용하였으며, 액체크로마토그래프용 acetonitrile은 Merck(Germany)사로부터, phosphoric acid는 Wako(Japan)에서 구입하여 사용하였다.

액체크로마토그래프는 Agilent Technologies 1260 infinity (USA) 및 Shiseido NANOSPACE SI-2(Japan)를 사용하였으며, 칼럼은 Waters Spherisorb ODS2(C18, 4×250 mm, 5 µm) 및 Phenomenex Luna(C18, 4×250 mm, 5 µm)를 사용하였다.

품목 선정

대한민국약전에 등재된 페노피브레이트(fenofibrate, Propan-2-yl 2-{4-[(4-chlorophenyl)carbonyl] phenoxy}-2-methylpropanoate, C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>4</sub>, MW 360.83)는 peroxisome proliferation-activated receptor α(PPAR-α) agonist로서 고지혈증 치료제로 사용된다. 페노피브레이트의 대사체인 페노피브릭산(fenofibric acid)은 PPAR-α에 작용하여 혈중 중성지방과 LDL(Low density lipoprotein) 콜레스테롤 수치를 감소시키는 효과를 나타낸다 (Fig. 1A).<sup>2-4)</sup> 대한민국약전 페노피브레이트 순도시험에서는 페노피브레이트 유연물질 3종이 설정되어 페노피브레이트유연물질 I 표준품[(4-클로로페닐)(4-히드록시페닐)메탄], 페노피브레이트유연물질 II 표준품[2-[4-(4-클로로벤조일)페녹시]-2-메틸프로파노산] 및 페노피브레이트유연물질 III 표준품 [1-메틸에틸 2-[[2-[4-(4-클로로벤조일)페녹시]-2-메틸프로파노일]옥시]-2-메틸프로파노에이트]를 사용하여 시험한다(Fig. 1B~1D). 페노피브레이트 순도시험 개선 시 유연물질 표준품 3종을 동시에 사용하지 않는 장점이 있어 페노피브레이트를 대상 품목으로 선정하였다.

유연물질시험법 밸리데이션(분석법의 검증)

「대한민국약전」에 등재된 페노피브레이트의 유연물질시험법 조건에 따라 분석법 밸리데이션을 수행하였다(Table I). 페노피

Table I – HPLC analytical condition of impurity test for fenofibrate in KP 11

Detector	UV 286 nm
Column	C18 (4.0×250 mm, 5 µm)
Temperature	Room temperature
Mobile phase	Acetonitrile : DW (Adjust pH 2.5 with phosphoric acid) (70 : 30)
Injection volume	20 µl
Flow rate	1.0 ml/min

브레이트, 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III 각각에 대한 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계 및 범위를 통해 분석조건을 검증하였다.

**특이성** - 직선성에 사용한 표준액 및 공시험액을 Table I 조건에 따라 분석하여 얻은 크로마토그램을 이용하여 주성분 및 각 유연물질 피크의 간섭여부를 확인하였다.

**직선성 및 범위** - 페노피브레이트 표준품 및 페노피브레이트 유연물질 III 표준품을 이동상에 녹여 각각 약 0.30, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 µg/ml 해당액을 조제하여 페노피브레이트 및 페노피브레이트 유연물질 III 각각의 직선성 시험용액 a, b, c, d, 및 e로 하였다. 페노피브레이트 유연물질 I 및 II 표준품을 이동상에 녹여 각각 약 0.30, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 µg/ml 해당액을 조제하여 페노피브레이트 유연물질 I 및 II 각각의 직선성 시험용액 a, b, c, d, 및 e로 하였다. 페노피브레이트, 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III 직선성 시험용액 각각을 대상으로 분석법의 전 조작을 3회 수행하여 각각 직선식을 구하고 각 직선식의 상관계수(r)로부터 직선성을 평가하였다.

**정확성** - 페노피브레이트 표준품을 이동상에 녹여 각각 약 0.30, 1.00, 3.00 µg/ml로 하여 페노피브레이트 정확성 시험용액 a, b 및 c로 하였다. 페노피브레이트 표준품을 이동상에 녹여 2.00 µg/ml로 한 용액에 페노피브레이트 유연물질 I 및 II 표준품을 녹여 각각 약 0.30, 1.00, 2.00 µg/ml로 조제하여 페노피브레이트 유연물질 I 및 II 각각의 정확성 시험용액 a, b 및 c로 하였다. 페노피브레이트 표준품을 이동상에 녹여 2.00 µg/ml로 한 용액에 페노피브레이트 유연물질 III 표준품을 녹여 각각 약 0.30, 1.00, 3.00 µg/ml로 조제하여 페노피브레이트 유연물질 III 정확성 시험용액 a, b 및 c로 하였다. 페노피브레이트, 페노피브레이트 유

연물질 I, II 및 III 정확성 시험용액 각각을 대상으로 분석법의 전 조작을 3회 반복 측정한 결과로부터 회수율(%)을 구하여 정확성을 평가하였다.

**정밀성** - 페노피브레이트, 페노피브레이트 유연물질표준품 I, II 및 III를 각각 이동상에 녹여 페노피브레이트 정밀성 시험용액(약 2.00 µg/ml), 페노피브레이트 유연물질 I 정밀성 시험용액(약 1.00 µg/ml), 페노피브레이트 유연물질 II 정밀성 시험용액(약 1.00 µg/ml) 및 페노피브레이트 유연물질 III 정밀성 시험용액(약 2.00 µg/ml)으로 하였다. 각 정밀성 시험용액을 가지고 분석법의 전 조작을 6회 반복 측정한 결과로부터 상대표준편차(%)를 계산하여 반복성을 평가하였다. 각 정밀성 시험용액을 가지고 실험일, 실험자, 시험장비 등의 변동요인을 달리하여 분석법의 전 조작을 6회 반복 측정한 결과로부터 상대표준편차(%)를 계산하여 실험실내 정밀성을 평가하였다.

**정량한계** - 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하는 방법에 따라 크로마토그램 상 신호 대 잡음비 10:1 부근의 농도를 정량한계로 설정하였다.

#### 원료의약품 적용

국내 유통 원료의약품을 가지고 본 연구에서 설정된 시험법에 따라 시험을 실시하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 유연물질시험법 밸리데이션(분석법의 검증)

**특이성** - 분석법에서 페노피브레이트, 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III 피크의 특이성을 확인하였다(Fig. 2).

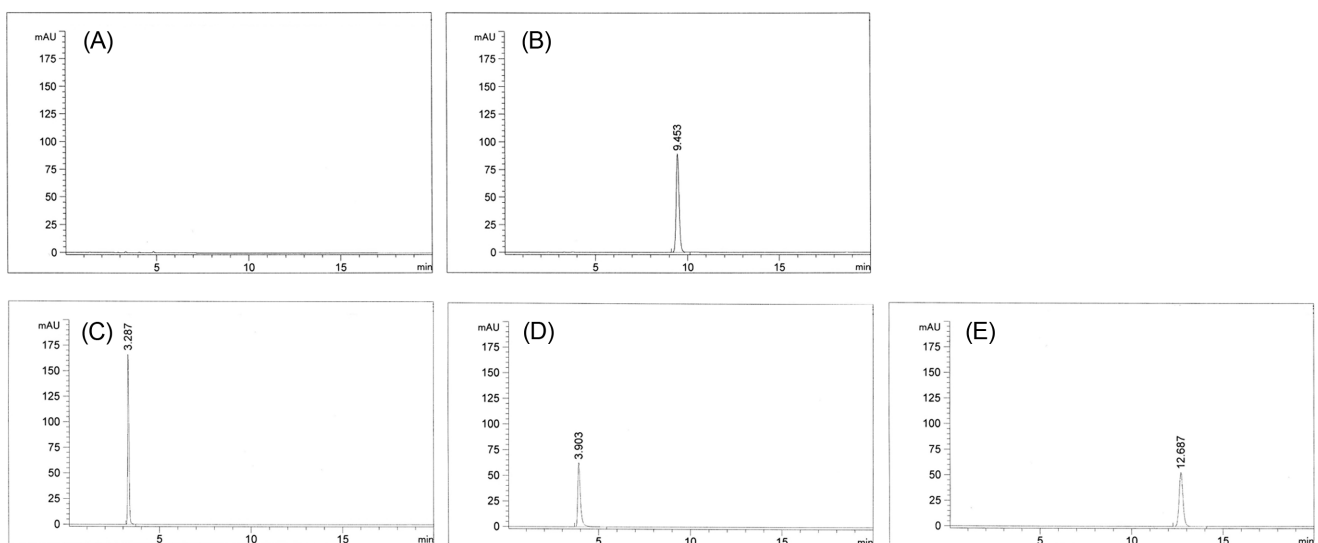


Fig. 2 - Chromatogram of specificity for blank (A), fenofibrate (B), fenofibrate related substance I (C), fenofibrate related substance II (D) and fenofibrate related substance III (E).

**Table II** – Results of linearity test of HPLC analytical condition for fenofibrate

Trials	Test solution	Concentration (µg/ml)	Peak area	Standard curve
1	a	0.32	94.90015	$y=308.86x-8.74$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	158.08537	
	c	1.05	316.46634	
	d	2.10	609.28192	
	e	3.15	982.87286	
2	a	0.32	94.83382	$y=311.25x-7.28$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	158.61273	
	c	1.05	318.90115	
	d	2.10	630.45050	
	e	3.15	983.16150	
3	a	0.32	94.80821	$y=313.18x-8.54$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	159.41679	
	c	1.05	319.04279	
	d	2.10	630.14716	
	e	3.15	989.99286	
Mean of slope		311.10	$y=311.10x-8.18$	
Mean of intercept		-8.18	(y: peak area, x: concentration)	

**Table III** – Results of linearity test of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance I

Trials	Test solution	Concentration (µg/ml)	Peak area	Standard curve
1	a	0.30	124.78477	$y=400.21x+0.65$ $r \geq 0.99$
	b	0.51	205.64331	
	c	1.01	397.99323	
	d	1.52	602.33447	
	e	2.02	814.84924	
2	a	0.30	124.09904	$y=400.42x+3.65$ $r \geq 0.99$
	b	0.51	205.51111	
	c	1.01	412.31836	
	d	1.52	605.78406	
	e	2.02	813.95239	
3	a	0.30	124.13169	$y=398.60x+4.49$ $r \geq 0.99$
	b	0.51	204.82170	
	c	1.01	412.97772	
	d	1.52	603.27197	
	e	2.02	810.93481	
Mean of slope		399.74	$y=399.74x+2.93$	
Mean of intercept		2.93	(y: peak area, x: concentration)	

**직선성 및 범위** – 페노피브레이트 및 페노피브레이트 유연물질 III은 각각 약 0.30~3.00 µg/ml의 범위에서, 페노피브레이트 유연물질 I 및 II는 각각 약 0.30~2.00 µg/ml의 범위에서 상관계수 (r) 0.99 이상을 나타내었다(Table II~V).

**정확성** – 페노피브레이트 정확성 시험용액 a, b, c를 가지고 분석법의 전 조작을 3회 반복 측정된 결과 평균회수율은 99.44%, 표준편차는 2.86%를 나타내었다. 페노피브레이트 유연물질 I 정확성 시험용액 a, b, c를 가지고 분석법의 전 조작을 3회 반복 측정된 결과 평균회수율은 100.84%, 표준편차는 0.93%를 나타내

**Table IV** – Results of linearity test of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance II

Trials	Test solution	Concentration (µg/ml)	Peak area	Standard curve
1	a	0.32	96.18810	$y=303.89x-3.03$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	157.47884	
	c	1.05	308.79440	
	d	1.58	475.30316	
	e	2.10	638.21326	
2	a	0.32	96.28960	$y=303.54x-1.25$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	157.53403	
	c	1.05	317.82654	
	d	1.58	471.30630	
	e	2.10	640.01007	
3	a	0.32	96.33387	$y=303.54x-0.72$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	158.46086	
	c	1.05	318.08566	
	d	1.58	472.81018	
	e	2.10	639.99807	
Mean of slope		303.66	$y=303.66x-1.67$	
Mean of intercept		-1.67	(y: peak area, x: concentration)	

**Table V** – Results of linearity test of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance III

Trials	Test solution	Concentration (µg/ml)	Peak area	Standard curve
1	a	0.32	79.10341	$y=245.51x-0.19$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	128.15445	
	c	1.06	260.78262	
	d	2.12	519.99847	
	e	3.18	780.65979	
2	a	0.32	78.94013	$y=246.48x-0.53$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	128.36328	
	c	1.06	260.43100	
	d	2.12	524.04736	
	e	3.18	782.19855	
3	a	0.32	78.22675	$y=243.81x+0.31$ $r \geq 0.99$
	b	0.53	127.81853	
	c	1.06	258.74506	
	d	2.12	520.45612	
	e	3.18	773.69720	
Mean of slope		245.27	$y=245.27x-0.13$	
Mean of intercept		-0.13	(y: peak area, x: concentration)	

었다. 페노피브레이트 유연물질 II 정확성 시험용액 a, b, c를 가지고 분석법의 전 조작을 3회 반복 측정된 결과 평균회수율은 99.14%, 표준편차는 2.76%를 나타내었다. 페노피브레이트 유연물질 III 정확성 시험용액 a, b, c를 가지고 분석법의 전 조작을 3회 반복 측정된 결과 평균회수율은 101.58%, 표준편차는 0.95%를 나타내었다(Table VI~IX).

**정밀성** – 페노피브레이트 정밀성 시험용액을 가지고 실험일, 시험자, 시험장비 등의 변동요인을 달리하여 분석법의 전 조작을 6회 반복 측정된 결과로부터 구한 상대표준편차는 각각 0.38%

**Table VI** – Accuracy of HPLC analytical condition for fenofibrate

Test solution	Trials	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Peak area	Actual concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Recovery (%)
a	1	0.32	92.59816	0.32	102.84
	2		93.37926	0.33	103.64
	3		92.94566	0.33	103.20
b	1	1.05	311.02887	1.03	97.72
	2		311.86710	1.03	97.98
	3		311.07761	1.03	97.74
c	1	3.15	946.13605	3.07	97.38
	2		945.65094	3.07	97.33
	3		943.29901	3.06	97.09
Total mean value (%)				99.44	
Total standard deviation (%)				2.86	

**Table VII** – Accuracy of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance I

Test solution	Trials	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Peak area	Actual concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Recovery (%)
a	1	0.29	122.43148	0.30	101.68
	2		122.54807	0.30	101.78
	3		122.76379	0.30	101.97
b	1	0.98	398.24283	0.99	100.91
	2		398.41882	0.99	100.96
	3		399.01279	0.99	101.11
c	1	1.96	783.11420	1.95	99.58
	2		786.33392	1.96	99.99
	3		782.88507	1.95	99.55
Total mean value (%)				100.84	
Total standard deviation (%)				0.93	

**Table VIII** – Accuracy of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance II

Test solution	Trials	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Peak area	Actual concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Recovery (%)
a	1	0.32	97.01208	0.32	102.19
	2		97.64320	0.33	102.85
	3		97.89545	0.33	103.11
b	1	1.06	313.56448	1.04	97.94
	2		313.53400	1.04	97.93
	3		314.23633	1.04	98.14
c	1	2.12	618.15350	2.04	96.28
	2		623.15070	2.06	97.06
	3		621.06793	2.05	96.74
Total mean value (%)				99.14	
Total standard deviation (%)				2.76	

**Table IX** – Accuracy of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance III

Test solution	Trials	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Peak area	Actual concentration ( $\mu\text{g}/\text{m}$ )	Recovery (%)
a	1	0.31	76.84997	0.31	102.57
	2		77.17277	0.32	103.00
	3		77.06406	0.31	102.86
b	1	1.02	251.57736	1.03	100.62
	2		252.15489	1.03	100.85
	3		252.33186	1.03	100.92
c	1	3.06	757.25403	3.09	100.92
	2		759.57648	3.10	101.23
	3		759.59104	3.10	101.23
Total mean value (%)				101.58	
Total standard deviation (%)				0.95	

**Table X** – Precision of HPLC analytical condition for fenofibrate

Analyst	Trials	Peak area	Average	Standard deviation	Relative standard deviation
#1	1	641.21185	644.08	2.48	0.38
	2	646.86371			
	3	643.03821			
	4	642.33667			
	5	643.74799			
	6	647.30853			
#2	1	1252274	1242101.67	6222.44	0.50
	2	1244687			
	3	1236210			
	4	1236254			
	5	1238946			
	6	1244239			

**Table XI** – Precision of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance I

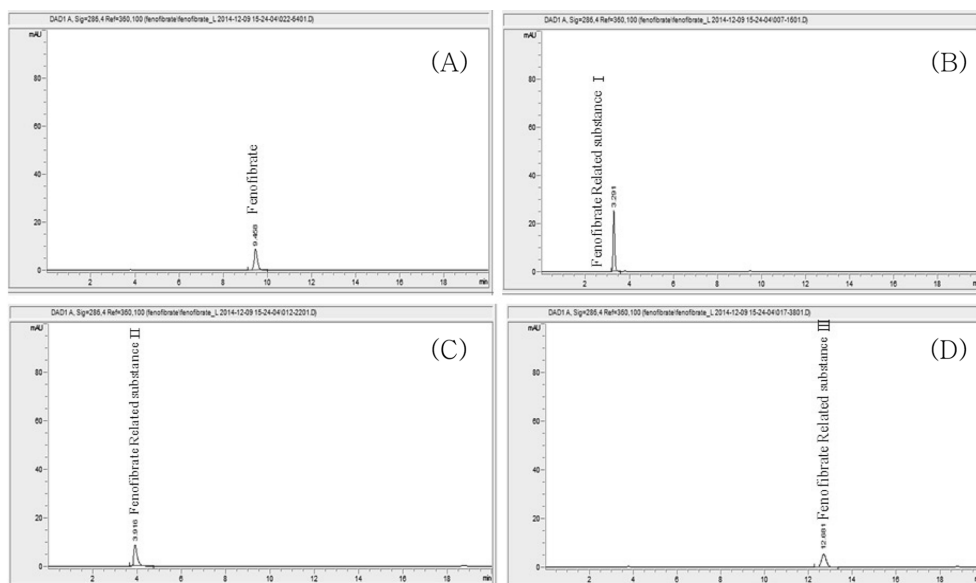
Analyst	Trials	Peak area	Average	Standard deviation	Relative standard deviation
#1	1	416.27	417.48	1.90	0.46
	2	419.35			
	3	419.12			
	4	418.39			
	5	414.39			
	6	417.34			
#2	1	1919862	1917229.83	8731.08	0.46
	2	1912087			
	3	1928872			
	4	1903327			
	5	1917670			
	6	1921561			

**Table XII** – Precision of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance II

Analyst	Trials	Peak area	Average	Standard deviation	Relative standard deviation
#1	1	309.99	310.26	0.91	0.29
	2	311.31			
	3	310.39			
	4	309.95			
	5	308.82			
	6	311.12			
#2	1	1324100	1333594.00	12459.26	0.93
	2	1348986			
	3	1320955			
	4	1325899			
	5	1332876			
	6	1348748			

**Table XIII** – Precision of HPLC analytical condition for fenofibrate related substance III

Analyst	Trials	Peak area	Average	Standard deviation	Relative standard deviation
#1	1	490.58585	494.60	2.75	0.56
	2	495.18903			
	3	497.00040			
	4	496.24387			
	5	491.76282			
	6	496.81909			
#2	1	1868803	1854300.00	15889.28	0.86
	2	1837530			
	3	1868830			
	4	1836829			
	5	1867878			
	6	1845930			



**Fig. 3** – Chromatogram of quantification limits for fenofibrate (A), fenofibrate related substance I (B), II (C) and III (D).

**Table XIV** – Validation results of analytical method for impurity test of fenofibrate

Parameter	Results			
	Fenofibrate	Fenofibrate related substance I	Fenofibrate related substance II	Fenofibrate related substance III
Limit	100.0% (1000 µg/ml)	0.10% (1.00 µg/ml)	0.10% (1.00 µg/ml)	0.20% (2.00 µg/ml)
Range	0.05~0.24%	0.05~0.12%	0.05~0.12 %	0.05~0.24%
Specificity	The analyt chromatographic peak is not attributable to more than one components			
Linearity	r≥0.99	r≥0.99	r≥0.99	r≥0.99
Accuracy (n=9)	99.44±2.66%	100.84±0.93%	99.14±2.76%	101.58±0.95%
Precision (n=6)	RSD #1: 0.38% #2: 0.50%	RSD #1: 0.46% #2: 0.46%	RSD #1: 0.29% #2: 0.93%	RSD #1: 0.56% #2: 0.86%
Limits of quantification	0.03 µg/ml (0.003%)	0.05 µg/ml (0.005%)	0.04 µg/ml (0.004%)	0.02 µg/ml (0.002%)

**Table XV** – Relative retention time and relative response factor for fenofibrate, fenofibrate related substance I, II and III

	Fenofibrate	Fenofibrate related substance I	Fenofibrate related substance II	Fenofibrate related substance III
Relative retention time	1.00	0.35	0.41	1.34
Relative response factor	1.00	1.28	0.98	0.79

및 0.50%였다. 페노피브레이트 유연물질 I 정밀성 시험용액을 가지고, 페노피브레이트 정밀성 시험용액 분석과 동일하게 6회 반복 측정된 결과 상대표준편차는 각각 0.46%였다. 페노피브레이트 유연물질 II 정밀성 시험용액의 분석결과 상대표준편차는 각각 0.29% 및 0.93%였다. 페노피브레이트 유연물질 III 정밀성 시험용액의 분석결과 상대표준편차는 각각 0.56% 및 0.86%였다(Table X~XIII).

**정량한계** – 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하는 방법에 따라 페노피브레이트 0.03 µg/ml, 페노피브레이트 유연물질 I 0.05 µg/ml, 페노피브레이트 유연물질 II 0.04 µg/ml, 페노피브레

이트 유연물질 III 0.02 µg/ml에서 얻은 크로마토그램 상 신호 대 잡음비가 10 : 1 이상임을 확인하였다(Fig. 3).

#### 페노피브레이트 유연물질의 상대유지시간 및 상대반응계수

특이성 크로마토그램을 얻은 페노피브레이트 유연물질의 상대유지시간과 직선성 결과를 통해 얻은 페노피브레이트 유연물질의 상대반응계수는 다음과 같다(Table XV).

확립한 시험법, 상대유지시간 및 상대반응계수를 반영한 페노피브레이트 유연물질시험법 대한민국의약품 개정(안)은 다음과 같다.

### 페노피브레이트 Fenofibrate

**순도시험 6) 유연물질** 이 약 약 100 mg을 이동상에 녹여 정확하게 100 ml로 하여 검액으로 한다. 이 액 1 ml를 정확하게 취하여 이동상을 넣어 정확하게 100 ml로 한다. 이 액 1 ml를 정확하게 취하여 이동상을 넣어 정확하게 10 ml로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 20 ml씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다. 각 액의 각 피크면적을 자동적분법에 따라 측정하고 각 유연물질의 양을 구할 때, 검액에서 얻은 페노피브레이트에 대한 상대유지시간이 0.3인 페노피브레이트 유연물질 I 및 상대유지시간이 0.4인 페노피브레이트 유연물질 II은 0.1% 이하이고, 상대유지시간이 1.3인 페노피브레이트 유연물질 III은 0.1% 이하이다. 또한 개개 미지 유연물질은 0.1% 이하이며, 총 유연물질은 0.5% 이하이다. 다만, 0.05%보다 작은 피크는 제외한다.

$$\text{유연물질의 양(\%)} = 100 \times \frac{C_S}{C_T} \times \frac{A_T}{A_S} \times \text{rf}$$

$C_S$ : 표준액 중 페노피브레이트 농도(mg/ml)  
 $C_T$ : 검액 중 페노피브레이트 농도(mg/ml)  
 $A_T$ : 검액에서 얻은 각 유연물질의 피크면적  
 $A_S$ : 표준액에서 얻은 페노피브레이트 피크면적  
 $rf$ : 페노피브레이트 피크에 대한 각 유연물질 피크의 보정인자  
 페노피브레이트 유연물질 I: 0.78  
 페노피브레이트 유연물질 II: 1.02  
 페노피브레이트 유연물질 III: 1.27  
 기타유연물질: 1.00

**조작조건**

검출기: 자외부흡광도계(측정파장 286 nm)  
 칼 럼: 안지름 약 4.0 mm, 길이 약 25 cm인 스테인레스강관에 5  $\mu$ m의 액체크로마토그래프용옥타데실실릴실리카겔을 충전한다.  
 이동상: 아세트니트릴 · 물(인산으로 pH를 2.5로 조정한다) 혼합액(70 : 30)  
 유 량: 1.0 ml/분  
 시스템적합성  
 검출의 확인: 표준액 5 ml를 정확하게 취하여 이동상을 넣어 정확하게 10 ml로 한다. 이 액 20  $\mu$ l를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 페노피브레이트 피크의 S/N 비가 10 이상임을 확인한다.  
 시스템의 성능: 표준액 20  $\mu$ l를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 페노피브레이트 피크의대칭계수는 0.8~2.0이다.  
 시스템의 재현성: 표준액 20  $\mu$ l씩을 가지고 위의 조건으로 시험을 6회 반복할 때 페노피브레이트의 피크면적의 상대표준편차는 10.0% 이하이다.

**Table XVI** – Impurity test results of KP method and developed method for fenofibrate

	Limit	Standard solution		Sample solution			
		Retention time	Relative retention time	Retention time	Relative retention time	Content (%) of KP method	Content(%) of developed method
Fenofibrate	100.0%	12.121	1.00	12.090	1.00	-	-
Fenofibrate related substance I	0.10%	4.031	0.33	4.034	0.33	N.D.*	N.D.*
Fenofibrate related substance II	0.10%	4.692	0.39	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fenofibrate related substance III	0.20%	16.431	1.36	16.421	1.36	0.07	0.07
Unknown impurity I	0.10%	-	-	7.921	0.66	0.02	0.02
Unknown impurity II	0.10%	-	-	9.733	0.81	0.03	0.03
Total	0.50%	-	-	-	-	0.12	0.12

\*Excluding the peak area according to the KP (less than 0.01%).

**원료의약품 적용**

현재 완제의약품 제조에 사용되는 원료의약품을 대상으로 본 연구에서 설정된 시험법에 따라 시험을 실시한 결과는 다음과 같다(Table XVI).

**결 론**

유연물질표준품을 사용하는 대한민국약전 등재 페노피브레이트 유연물질시험법을 유연물질표준품을 사용하지 않는 방법으로 개선하기 위해 페노피브레이트 유연물질시험법 「의약품등 분석

법의 밸리데이션에 대한 지침」<sup>1)</sup>에 따라 밸리데이션을 수행하였다. 대한민국약전 등재 페노피브레이트 순도시험 분석조건외의 재현성이 우수하여 본 분석조건에서 페노피브레이트 및 페노피브레이트유연물질 각각의 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 정량 한계를 검증하였다. 분석조건에서의 특이성 확인 후, 각 유연물질의 한도기준 및 보고한도를 포함하는 범위 내의 직선성을 측정하여 상관계수(r)가 0.99 이상임을 확인하였다. 주성분 페노피브레이트 존재 하의 각 유연물질의 회수율로 정확성을 측정하였으며, 99.14~101.58%의 결과를 나타내었다. 실험일, 시험자, 시험장비 등의 변동요인을 달리하여 분석법의 전 조작을 6회 반복



측정한 피크면적의 상대표준편차는 0.29~0.93%로 우수한 정밀성을 나타내었다. 크로마토그램 상 신호 대 잡음 비에 근거하여 페노피브레이트 0.03 µg/ml, 페노피브레이트 유연물질 I 0.05 µg/ml, 페노피브레이트 유연물질 II 0.04 µg/ml, 페노피브레이트 유연물질 III 0.02 µg/ml로 정량한계를 확인하였다. 페노피브레이트에 대한 페노피브레이트 유연물질 I, II 및 III의 상대유지시간은 각각 0.35, 0.41, 1.34였으며, 상대반응계수는 각각 1.28, 0.98, 0.79였다. 개발된 시험법과 기존 대한민국약전 시험법에 따라 페노피브레이트 순도시험을 수행한 결과는 동일하였다. 따라서 본 연구에서 도출된 유연물질의 상대유지시간 및 상대반응계수를 「대한민국약전」 페노피브레이트 순도시험 개정 시 기초 자료로 활용 가능하며, 국내 의약품 품질 관리 비용 절감 및 편의성 향상에 기여할 것으로 기대한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2014년도 식품의약품안전처의 연구개발비(14171의

약안160)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### References

- 1) 대한민국약전 제11개정 (2014).
- 2) Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E. and Fruchart, J.-C. : Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* **98**, 2088 (1998).
- 3) Abourbih, S., Filion, K. B., Joseph, L., Schiffrin, E. L., Rinfret, S., Poirier, P., Pilote, L., Genest, J. and Eisenberg, M. J. : Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Am. J. Med.* **122**, 962.e1 (2009).
- 4) Shah, A., Rader, D. J. and Millar, J. S. : The effect of PPAR-alpha agonism on apolipoprotein metabolism in humans. *Atheroscler.* **210**, 35 (2010).