

GC에 의한 의약품 중의 메칠 살리실산, 멘톨 및 캄파의 동시분석법 확립

Validation of simultaneous analysis method for methyl salicylate, menthol and camphor in pharmaceuticals by gas chromatography

조영호, 이계원(건양대학교)

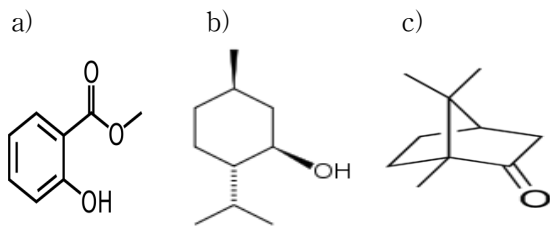
차 례

1. 서론
2. 기기 및 시약
3. 실험방법
4. 결과 및 고찰
5. 결론

■ keyword : | 메칠 살리실산, 멘톨, 캄파, GC, 밸리데이션 |

1. 서론

많은 의약품에서 멘톨, 메칠 살리실산 및 캄파는 진통과 항염효과를 가지므로 일반적으로 관절염 등에 바르거나 뿌리는 진통제로 많이 사용되고 있어 파스제형에 많이 포함되어 있는 주요 활성성분이다[1][그림 1].



▶▶ 그림 1. Structure of methyl salicylate, menthol and camphor

메칠 살리실산은 에탄올, 에테르, 클로로포름 등과 같은 유기용매에는 잘 녹는다. 진통, 해열, 소화 작용이 있어 의료용으로 이용되며, 살리실산메틸이 분해 시 메탄올과 살리실산이 생성되는데 내복하는 경우 체내에서 휘발되지 못하여 포름알데히드를 생성하므로 파스나 연고 등의 외용제의 주로 형태로 사용된다. 1일 허용 섭취량(ADI)은 50 kg 성인기준으로 25 mg 이내이고, 24시간이내 500 mg 이하이다. 단기간 다량 섭취 시 이명, 구토, 현

기증, 시각장애, 경련 등의 부작용이 있을 수 있으며 장기 섭취 시 발진, 간의 이상을 유발한다.

멘톨은 에탄올 또는 에테르에 썩 잘 녹으며 물에는 매우 녹기 어렵다. 국소 소염 및 살균, 방부작용이 있으며, 과량을 복용하면 혈압이 상승하고 장에서 과량이 흡수되면 처음에 중추신경계를 흥분시킨다.

캄파는 에탄올, 에테르에 잘 녹으며 물에는 녹기 어렵다. 국소작용으로 국소자극과 방부작용이 있으며 부작용이 적으나 대량 사용 시 중추신경의 강한 흥분을 일으킨다.

Method validation 이란 분석시험이 의도한 목적에 따라 일정하게 수행되는가를 보증하기 위해 문서화된 증거를 확립하는 행위로서 나라마다 약간 다르게 규정되어 있다[2][3]. 즉 USP 23에는 ‘의약품 품질을 보증하기 위해 시행되는 시험법에는 각각 적절한 분석법이 사용되고 있다. 분석법에는 신뢰성이 있는 결과를 주는 것이 기대되며 분석법의 신뢰성을 예상하는 작업, 확인하는 작업이 분석법 검증이다.’ 라고 명시되어 있다. 또한 JP 13에는 ‘분석법 밸리데이션이란 의약품의 분석에 사용되는 분석법이 분석법을 사용하는 의도로 합치된다는 것 즉 분석법의 오차가 원인이 되어 생기는 시험 판정의 잘못된 확률이 허용되는 정도라는 것을 과학적으로 입증하는 것이다’라고 정의되어 있다.

Method validation은 식약청에서 고시한 ‘의약품 등 기준 및 시험방법 심사의뢰서 심사규정’에서 요구하고 있는 사항으로 약에서의 유효성분의 함량이 기준치보다 초과되거나 미달되는 것은 자칫 소비자에게 부작용을 초래하는 사항으로 이어질 수 있기에 제약업계에서의 분석 시험은 주요 업무 중의 하나라고 할 수 있다[4, 5].

파스류의 주요 활성 성분들인 이들 세 가지 성분은 끓는점(메틸 살리실산 223.3 °C, 멘톨 219 °C, 캄파 204 °C) 과 용해도와 같은 물리화학적 성질이 비슷하기 때문에 같은 제제 안에 포함되어 있을 경우 분석하는 것이 어렵다. 또한 분석할 때 감도가 서로 달라 일정하게 맞추는 것이 어려운 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 안티푸라민 같은 크림 제형으로 제조 시 성분의 영향을 받을 수 있어 분석하기에 어려움을 겪고 있는 물질들이다[6].

따라서 본 연구에서는 파스나 크림제형에 함유되어 있는 캄파, 멘톨, 메틸 살리실산 성분을 GC를 이용하여 동시에 분석할 수 있는 방법을 확립하여 의약품에 적용하고자 하였다.

2. 기기 및 시약

시약으로는 메틸살리실산, 메탄올 및 디클로로메탄은 Samchun사(Korea)에서, DL-캄파는 D.S.P사(Korea)에서, 클로르포름은 Daejung사(Korea)에서 그리고 DL-멘톨은 Acros organics사(Belgium)에서 구입하여 사용하였다. 또한 제제는 안티푸라민 연고(유한양행, Korea), 멘덤쿨 로오션(신신제약, Korea)를 구입하여 사용하였으며, 시약 및 가스는 특급 또는 고순도 질소가스(99.999%, 세종산업 가스)을 사용하였다.

기기로는 GC(GC-17, Shimadzu, Japan), Injector는 AOC-20I(Shimadzu, Japan), Detector는 FID를 선택하여 사용하였다.

3. 실험방법

3.1 분석기기의 조건

실험에 사용한 GC 조건은 표 1과 같았다.

표 1. GC Condition

	Condition
Instrument	GC 17A
Detector	FID
Column	DB-1(30 m X 0.25 mm X 0.25 μm, Agilent, USA)
Oven Tem.	80 °C(1 min) → 110 °C(3 °C/min, 3 min) → 290 °C(50 °C/min, 1 min)
Flow rate	38.0 ml/min
Mobile phase	N ₂ (99.999%)
Injection Volume	1 μl

3.2 분석조건의 검토

GC를 통한 분석법의 타당성은 특이성, 직선성, 검출한계와 정량한계를 이용하여 검토하였다[7-9].

3.2.1 특이성

특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석물질을 분리하고 정량하는 분석 능력으로서 같은 주성분을 가진 안티푸라민과 멘덤 쿨 로오션에 각각 기지농도의 메틸살리실산(200 μg/ml), 멘톨(100 μg/ml) 그리고 캄파(100 μg/ml)을 섞어 정량적으로 늘어나는지의 여부를 확인하였다. 즉 적당량의 안티푸라민과 멘덤쿨 로오션을 취하여 메틸 살리실산(100 μg/ml), 멘톨(50 μg/ml) 그리고 캄파(50 μg/ml)의 농도가 되도록 메탄올을 가하거나 기지 농도의 표준품 용액을 가하여 15초간 vortexing한 다음 syringe filter로 여과하여 1 μl를 GC에 주입하여 검토하였다.

3.2.2 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

메틸살리실산, 멘톨, 캄파 표준품을 각각 100, 100 및 200 mg씩 정밀히 달아 메탄올에 녹여 정확히 10 ml로 하여 10000 μg/ml으로 하여 이 용액을 표준원액으로 하였다.

각각의 표준원액을 캄파와 멘톨은 0.1 ml, 메틸살리실산은 0.2 ml을 취한 후 정확히 10 ml로 메탄올을 채워 100, 100 및 200 μg/ml으로 제조하였다. 캄파와 멘톨은 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 및 1.5625 μg/ml으로, 메틸 살리실산은 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 및 3.125 μg/ml의 농도로 계열 희석하여 각 농도별 표준액에 대하여 분석조건에 의한 피크 면적 비를 구하여 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선식의 상관계수 (기준: R²=0.99 이상)를 구하여 직선성을 검토 하였고, 3번 반복 실험하

여 평가하였다.

검량선의 직선성 범위가 좋은 부분을 이용하여 검출한계(LOD, Limit of detection)와 정량한계(LOQ, Limit of quantitation)을 다음과 같은 식을 이용하여 측정하였다.

$$\text{LOD} : 3.3\sigma/s (S/N=3)$$

$$\text{LOQ} : 10\sigma/s (S/N=10)$$

여기에서 σ 는 검량선에서 얻어진 회귀직선에서 절편의 평균표준편차이고 s 는 기울기의 평균이다.

3.2.3 정확성과 정밀성

정확성은 분석물질의 참값(농도)에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균 시험결과의 근접성을 의미하며, 기지량의 분석물질을 함유한 시료를 반복적으로 분석함으로써 구해진다. 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체(Aliquots)로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 의미한다.

정확성과 정밀성은 미리 결정되어진 정량한계의 2배농도, 검량선 작성 시 최고농도의 70~80% 농도 및 이들 두 가지 농도의 중간농도를 제조하여 측정하였다. 즉 메틸 살리실산, 멘톨 및 캄파를 각각 9.99, 79.99 및 150, 10.29, 42.64 및 75 그리고 9.30, 42.15 및 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세 가지 농도 범위에서 각각 6회 측정하여 정확성을 측정하였으며 정밀성은 동일한 농도범위를 가지고 상대표준편차(% RSD)를 이용해 산출하였다. 또한 3일 동안 하루에 실험을 6회 실시하여 일내 재현성을 구현하고 연속으로 3일간 실험을 행하여 일간 재현성을 측정하였다.

3.3 파스제형으로부터 분석

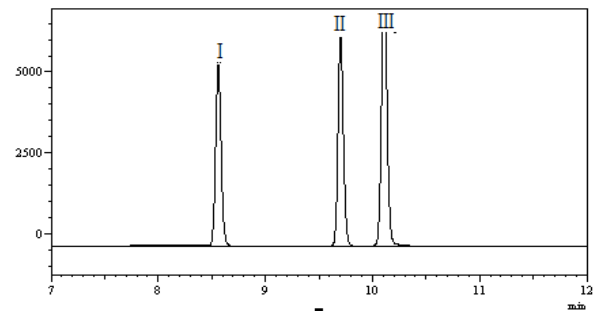
타당성이 검증된 분석방법을 이용하여 안티푸라민과 멘덤클 로오션 적당량을 취하여 메탄올을 가해 희석하여 15초간 vortexing 한 다음 syringe filter로 여과하여 1 μL 를 GC에 주입하여 메틸살리실산, 멘톨 및 캄파의 양을 3회씩 검토하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 분석기기조건

GC를 이용해 파스제의 주성분의 물리화학적 성질이 비슷하므로 승온 프로그램을 이용하여 가장 적합한 조건을 확립하였다. 즉 주입구의 온도를 220 $^{\circ}\text{C}$ 로, 검출기는 불꽃이온화검출기를 이용해 250 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 유지하였다. 컬럼은 검체를 주입한 후 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 유지한 뒤 110 $^{\circ}\text{C}$ 까지 분당 3도씩 상승시켜 3분간 유지하였다. 그 뒤 240 $^{\circ}\text{C}$ 까지 분당 50 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 상승시킨 후 1분간 유지하였을 때 세 물질의 분리가 가장 양호하게 되었음을 확인할 수 있었다[그림 2].

이 때 캄파, 멘톨 및 메틸 살리실산의 유지시간은 각각 8.561, 9.703 및 10.110분이었다[표 2]. 특히 표준액과 다르게 시판되는 제품에는 주성분 이외 다수의 부형제가 첨가되어 있기 때문에 standard의 승온법과 다르게 290 $^{\circ}\text{C}$ 까지 승온하여 부형제가 GC 내 컬럼에 남아있지 않도록 하였다.



▶▶ 그림 2. Chromatogram of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.
Key : I-Camphor, II-Menthol, III-Methyl salicylate

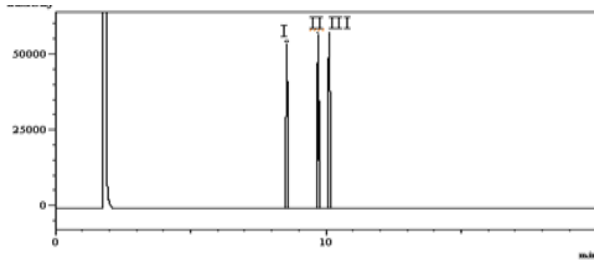
표 2. Retention time of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.

	Compound	Retention time (min)
I	Camphor	8.561
II	Menthol	9.703
III	Methyl salicylate	10.110

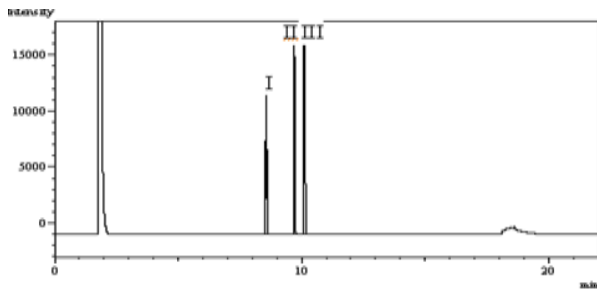
4.2 분석 조건의 검토

4.2.1 특이성

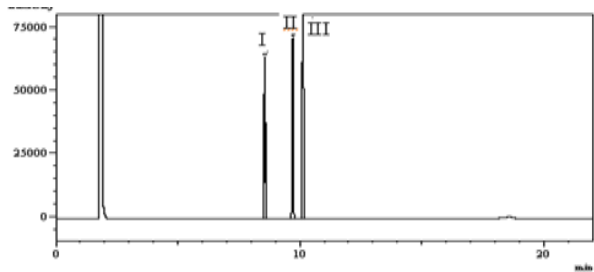
특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석물질을 분리하고 정량하는 분석 능력으로서 검체를 전처리하여 GC로 분석하였을 때 얻어진 멘톨, 캄파 및 메틸 살리실산의 크로마토그램은 그림 3, 4, 5, 6 및 7과 같았다.



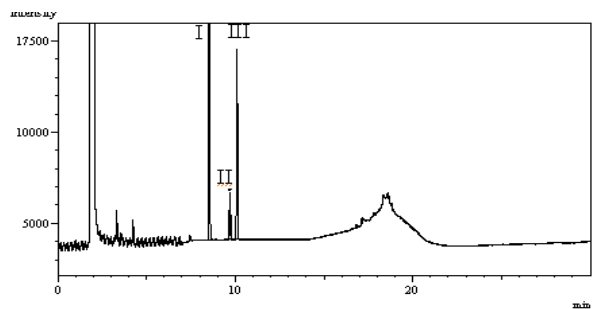
▶▶ 그림 3. Standard chromatogram of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.
Key : I-Camphor, II-Menthol, III-Methyl salicylate



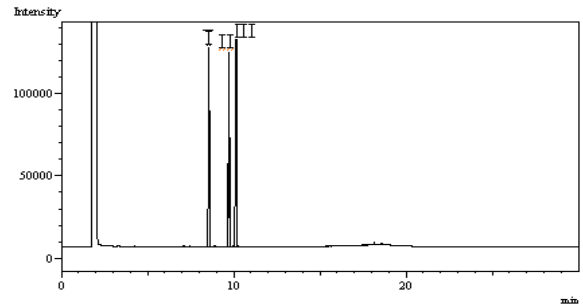
▶▶ 그림 4. Lotion sample chromatogram of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.
Key : I-Camphor, II-Menthol, III-Methyl salicylate



▶▶ 그림 5. Lotion sample + standard chromatogram of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.
Key : I-Camphor, II-Menthol, III-Methyl salicylate



▶▶ 그림 6. Ointment sample chromatogram of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.
Key : I-Camphor, II-Menthol, III-Methyl salicylate



▶▶ 그림 7. Ointment sample + standard chromatogram of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.
Key : I-Camphor, II-Menthol, III-Methyl salicylate

이 때 위의 분석조건에서 기타 다른 성분들과 명확히 분리되고, 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인하였다. 즉 spiking한 검체에서 각 성분의 면적의 합은 표준용액과 검체 중의 멘톨, 캄파 및 메틸 살리실산의 면적과 2% 이하의 차이를 나타내므로 다른 물질의 영향 없이 캄파, 멘톨 및 메틸 살리실산 성분을 측정할 수 있는 분석방법임을 확인하였다[표 3].

표 3. Specificity of camphor, menthol and methyl salicylate in GC analysis.

Type	Area			
	Camphor	Menthol	Methyl Salicylate	
Lotion	Standard	180284	206284	279051
	Sample	34405	49107	119999
	Sample+ Standard	214689	255391	399050
	sample added standard	219117	258102	396701
	RSD(%)	2.021	1.050	0.592
Ointment	Standard	180284	206284	279051
	Sample	36887	4637	18525
	Sample+ Standard	219710	214865	301484
	sample added standard	217171	210921	297576
	RD(%)	1.155	1.835	1.296

4.2.2 직선성, 검출한계 및 정량한계

각 농도별 표준액에 대하여 분석조건으로 얻은 피크면적을 Y축, 표준액의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하였고 검량선으로부터 직선식의 상관계수 (기준: $R^2=0.99$ 이상)를 구하여 직선성을 검토한 결과 모두 0.99 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다[표 4].

가장 직선성이 좋은 부분을 이용해 검출한계와 정량한

표 4. Calibration curves expression of camphor, menthol and methyl salicylate.

Compound	1회		2회		3회	
	Expression	R ²	Expression	R ²	Expression	R ²
Camphor	y=425.51x	0.9991	y=388.75x	0.9987	y=469.05x	0.9976
	493.02		180.41		123.24	
Menthol	y=481.16x	0.9992	y=439.01x	0.9988	y=529.54x	0.9974
	593.21		137.64		98.231	
Methyl salicylate	y=315.23x	0.999	y=287.05x	0.9988	y=347.05x	0.9974
	873.37		495.02		219.25	

계를 구한 결과를 표 5에 나타내었다. 즉 세 가지 성분 모두 비슷한 값을 나타내어 캄파, 멘톨 및 메틸 살리실산의 검출한계와 정량한계는 각각 1.535와 4.659, 1.699와 5.149 그리고 1.648과 4.995 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

표 5. LOD and LOQ of by camphor, menthol and methyl salicylate.

Components	LOD($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LOQ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Camphor	1.535	4.653
Menthol	1.699	5.149
Methyl salicylate	1.648	4.995

4.2.3 정확성, 정밀성

정량한계의 2배 농도, 검량선 작성 시 최고농도의 70~80% 농도 및 이들 두 가지 농도의 중간농도를 제조하여 측정하여 얻은 재현성 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6. Reproducibility data for the GC analysis of camphor, menthol and methyl salicylate (mean \pm SD, n=6).

Con.($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Accuracy(%)		% RSD	
	Intra	Inter	Intra	Inter
75	103.01	100.95	1.96	2.61
	\pm	\pm		
	2.02	2.97		
	107.32	108.09		
	\pm	\pm		
	3.20	0.83		
9.30	108.57	108.77	3.63	3.63
	\pm	\pm		
	1.96	0.17		
	102.45	100.62		
	\pm	\pm		
	75	100.62		
75	\pm	\pm	3.16	3.16
	4.69	6.48		
	91.97	90.49		
	\pm	\pm		
	4.09	1.34		
	92.10	92.53		
10.29	\pm	\pm	0.99	3.03
	3.79	0.395		
	102.00	105.22		
	\pm	\pm		
	4.53	2.78		
	150	105.22		
150	\pm	\pm	1.11	2.21
	85.24	85.94		
	\pm	\pm		
	4.77	2.14		
	97.17	97.38		
	9.99	97.38		
9.99	\pm	\pm	2.19	3.17
	1.77	1.63		

정확성 허용오차는 평균값이 최저정량한계를 제외하고는 실측값의 15%이내여야 하고, 최저 정량한계에서도 20%를 넘어서는 안 된다. 또한 정밀성 허용오차는 상대 표준편차가 15%를 초과해서는 안 되며, 최저 정량한계에서는 20%를 넘지 않도록 규정되어 있다. 이 때 분석 방법의 정밀성은 모든 표준품에서 일내와 일간 정밀성은 0.99~3.63과 2.21~4.41%이었고 정확성은 85.24~108.77%로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 GC를 이용한 메틸 살리실산, 멘톨 및 캄파 분석법은 의약품 중에서 적용할 수 있는 적합한 정밀성과 정확성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

4.3 제품에서의 분석

타당성이 검증된 분석법을 이용하여 안티푸라민 연고와 멘텀콜 로오션에 적용하여 분석한 결과를 표 7에 나타내었다. 즉 모든 샘플에서 들어간 함량 범위이내에서 분석되었다.

표 7. The amount of camphor, menthol and methyl salicylate in pharmaceuticals(Mean \pm SD, n=3).

Components	Content(%)	
	Lotion	Ointment
Camphor	93.24 \pm 0.74	92.73 \pm 0.33
Menthol	97.45 \pm 0.54	94.59 \pm 0.43
Methyl salicylate	102.21 \pm 2.61	96.47 \pm 1.30

5. 결론

파스나 크림제형에 함유되어 있는 캄파, 멘톨, 메틸 살리실산 성분을 GC를 이용하여 동시에 분석할 수 있는 분석 방법을 확립하여 의약품에 적용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GC의 분석조건은 DB-1 컬럼과 FID 검출기를 사

용하여 검출기 250 °C, 컬럼의 온도는 80 °C에서 1분간 유지 후 1분에 3 °C씩 상승시켜 110 °C에서 3분간 유지, 1분에 50 °C씩 상승시켜 220 °C에서 1분간 유지하고 주입구의 온도는 220 °C로 하였을 때 세 물질이 양호하게 분리되었다.

2. 캄파, 멘톨 및 메틸 살리실산의 유지시간은 8.561, 9.703 및 10.110분이었다.
3. 캄파, 멘톨 및 메틸 살리실산 모두 검량선의 상관계수가 0.99이상으로 양호한 직선성을 나타내었다
4. 캄파, 멘톨 및 메틸 살리실산의 LOD와 LOQ는 1.535와 4.659, 1.699와 5.149 그리고 1.648과 4.995 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.
5. 일내와 일간 정밀성은 0.99~3.63과 2.21~4.41%이었고 정확성은 85.24~108.77%이었다.
6. 시판되고 있는 파스 제품을 본 시험법에 적용하였을 때, 세 가지 성분 모두 함량기준 이내로 정량성 있게 검출되었다.

참고문헌

- [1] J. Krezak, J.S Czekaj and W. Rzeszutko, Validation of a method for simultaneous determination of menthol and methyl salicylate in pharmaceuticals by capillary gc with cool on-column injection, Vol. 60(5). 2002년
- [2] U.S. Pharmacopeia National Formulary, USP 26-NF 21, 3th Ed., Mack printing Company: Easton U.S.A., pp. 2439, 2003년
- [3] 백우현 외, "Validation의 이론과 실제", 한국 PDA, GMP자료 제2집 제1권
- [4] 식품의약품안전청, 의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 해설서, 2008년
- [5] 대한약전 제 9 개정, "의약품 등 분석법 Validation에 대한 지침", pp. 1366
- [6] Global health care, GC를 이용한 용뇌 중 보르네올 및 멘톨의 동시분석법, 정량분석 10110804 (2010)
- [7] G. Beving : Validation of analytical methods, Validation seminar, Istambul, 31 May-01 June, 2001년
- [8] C.M. Reiley and F. Fell : Development and validation of analytical methods, Prog. Pharm. Biomed. Anal. 3, pp. 20, 1996년
- [9] W.S. Kim, B.K. Lim, Baek, I.W. Park, Y.H Lim, Y.A Ji and K.J. Jo, Studies on simultaneous Analysis of Preservatives by Gas Chromatography, pp. 49-52, 1992년

저자소개

● 조 영 호(Yong-Ho Cho)



- 1991년 2월 : 대구대학교 공과대학 공학사 (생물공학)
- 1993년 2월 : 건국대학교 축산대학 농학석사 (생화학)
- 2004년 2월 : 대구대학교 공과대학 공학박사 (생물공학)

• 2007년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 제약생명공학과 부교수

<관심분야> : 기능성 화장품 소재 및 화장품 개발, 피부 면역 증진 소재 및 제형 개발, 난용성 생리활성 물질의 가용화 기술 및 제제 개발

● 이 계 원(Gye-Won Lee)



- 1989년 2월 : 충남대학교 약학대학 약학사
- 1992년 2월 : 충남대학교 약학대학 약학석사 (약제학)
- 1995년 8월 : 충남대학교 약학대학 약학박사 (약제학)
- 2002년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 제약공학과 부교수

<관심분야> : 약물 전달 시스템(DDS), NLC, 약물의 가용화 및 나노제제 기술, Method validation development