

# 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서

2015. 12.

이 해설서는 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 풀어 설명한 것으로, 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아님

※ 본 해설서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 의약품심사부 의약품규격과에 문의하시기 바랍니다.

전화 : 043-719-2961

팩스 : 043-719-2950

# 목 차

I. 목 적 .....	1
II. 서 론 .....	1
III. 밸리데이션 된 시험방법의 내용	
1. 원리 .....	2
2. 검체 .....	2
3. 분석장치 및 조건 .....	2
4. 시약 및 시액 .....	2
5. 표준품 .....	2
6. 시스템적합성시험 .....	2
7. 표준액 조제 .....	2
8. 검액 조제 .....	3
9. 시험과정 .....	3
10. 계산 .....	3
11. 결과보고 .....	3
IV. 밸리데이션 파라미터의 해설	
1. 용어정의	
1) 시험방법 .....	4
2) 특이성 .....	4
3) 정확성 .....	4
4) 정밀성 .....	5
5) 검출한계 .....	5
6) 정량한계 .....	5
7) 직선성 .....	6
8) 범위 .....	6
9) 완건성 .....	6

2. 시험방법 밸리데이션의 실시	
1) 특이성 .....	7
2) 직선성 .....	11
3) 범위 .....	14
4) 정확성 .....	16
5) 정밀성 .....	19
6) 검출한계 .....	21
7) 정량한계 .....	24
8) 완전성 .....	26
9) 시스템적합성 시험 .....	27
<b>V. 액체크로마토그래프법의 밸리데이션 실례</b>	
1. 특이성 .....	34
2. 직선성 .....	35
3. 범위 .....	37
4. 정확성 .....	37
5. 정밀성 .....	38
6. 검출한계와 정량한계 .....	40
7. 완전성 .....	43
<b>VI. 크로마토그래프법 조건의 조정</b> .....	46
<b>VII. 시험방법 밸리데이션에 관한 Q&amp;A</b> .....	50
<b>VIII. 참고문헌</b> .....	55

## I. 목적

이 해설서는 「의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인」을 뒷받침하기 위하여 의약품등의 확인, 함량, 순도 및 역가시험 등에 관련된 시험방법의 형식, 내용 및 밸리데이션 자료 작성에 대한 구체적인 가이드라인을 제공하는 것을 목적으로 한다. 이는 밸리데이션 자료 작성 뿐 아니라 의약품의 허가심사를 위한 의약품의 품질관리 및 제조공정에서의 시험방법 밸리데이션 전반에 걸친 이해 및 자료 작성을 돕기 위한 것이다.

## II. 서론

이 해설서는 시험방법의 밸리데이션 수행 시 근거 자료 작성 및 정리에 도움을 주기 위한 것이며, 제시된 밸리데이션의 원칙은 모든 유형의 시험방법에 활용될 수 있다. 다만, 이 해설서의 내용은 생물학적 제제, 생물공학제제 또는 방사성의약품 등 일부 제제의 시험방법에는 적용되지 않을 수 있으며, 생물학적 시험과 면역화학적 시험, 생체 시료를 이용한 시험 및 여러 개의 주성분을 가진 복합제에 대한 시험의 경우에는 적용되지 않는다. 또한, 이 해설서는 원료물질, 중간물질, 첨가제, 용기, 기타 성분의 시험방법과 밸리데이션 자료 작성에 관한 사항을 구체적으로 다루지 않으나 이들 물질의 시험방법 밸리데이션 자료 작성 시 참고자료로서 활용할 수 있다.

## III. 밸리데이션 된 시험방법의 내용

밸리데이션을 시행하여 확립된 시험방법은 시험자가 시험 조건에 따라 시험할 때 일관성 있는 결과를 확보할 수 있도록 상세하게 기술하고, 특히 시험 과정에서 주의가 요구되는 부분을 설명한다. 다만 공정서 수재 시험방법의 경우에는 시험 과정을 상세하게 설명하지 않고 해당 시험방법을 인용할 수 있다.

시험방법은 다음과 같은 정보를 포함한다.

## 1. 원리

시험방법의 원리를 설명한다.

## 2. 검체

검체의 수 (예: 바이알, 정제의 수 등), 검체 사용방법 (예: 개별 또는 혼합), 검체 당 반복 분석 횟수 등을 기술한다.

## 3. 분석 장치 및 조건

사용된 기기 목록 (예: 측정 장치 유형, 검출기, 칼럼 유형, 칼럼 길이 등)과 분석 조건 (예: 유량, 온도, 조작 시간, 측정과장 등)을 포함한다. 일반적으로 사용되는 시험 방법이 아닐 경우, 필요한 경우에 실험 구성을 보여 주는 그림을 제시한다.

## 4. 시약 및 시액

시약 및 시액의 명칭 및 등급(예: USP/NF, ACS 분석 시약) 목록을 포함한다. 시약 및 시액을 조제하여 사용한다면 조제법을 기재하여야 한다. 불안정하거나 위험성이 있는 시약의 경우에는 이를 명시해야 하며 보관 조건, 안전한 사용을 위한 주의 사항, 사용기간에 대한 정보를 제시한다.

## 5. 표준품

사용하는 표준품에 대한 사항을 기재한다.

## 6. 시스템적합성시험

시스템적합성시험에 대한 사항을 기재한다.

## 7. 표준액 조제

모든 표준액(예 : 표준원액, 상용표준액 및 내부표준액)의 조제방법을 기재한다.

## 8. 검액 조제

검액의 조제방법을 전처리과정을 포함하여 명확히 기술한다. 검액의 조제방법이 일반적이지 않은 경우 구체적으로 설명한다(예: 고체상 추출, 유도체화 반응).

## 9. 시험과정

시험과정을 단계별로 자세히 기술한다.

## 10. 계산

기호와 수치를 포함하여 구체적으로 자세히 기술한다.

## 11. 결과보고

보고대상의 유효숫자를 포함한 결과보고형식(예 : %, ppm)을 제시한다.

## IV. 밸리데이션 파라미터의 해설

### 1. 용어 정의

#### 1. 시험방법 (Analytical Procedure)

분석을 하기 위해 필요한 상세히 기술된 일련의 시험 과정을 말한다. 확인시험, 순도시험, 정량시험 등에 사용된 분석대상물질, 검체, 표준품, 시약 및 시액, 분석 장비의 사용, 검량선 작성, 계산식의 이용 등을 포함한다.

- 시험방법 밸리데이션(Validation of Analytical Procedure)이란 의약품등의 품질관리를 위한 시험방법의 타당성을 미리 확인하는 과정을 말한다.
- 확인시험(Identification Test)이란 검체 중 분석대상 물질을 확인하는 시험을 말하며, 일반적으로 검체의 물리화학적 특성(스펙트럼, 크로마토그래프법에서 얻어지는 정보, 화학적 반응성 등)을 표준품의 특성과 비교하는 방법을 이용한다.
- 순도시험(Purity Test)이란 검체 중 유연물질, 중금속, 잔류용매 등 불순물의 존재 정도를 정확하게 측정하는 시험을 말하며 정량시험과 한도시험이 있다.
- 함량 또는 역가시험(Assay: Content or Potency)이란 검체 중에 존재하는 분석대상 물질의 양 또는 역가를 정확하게 측정하는 시험을 말한다. 즉, 원료 또는 제제 중의 주요성분(주성분, 유효성분, 생리활성성분)이나 특정 성분(예: 안정제 또는 보존제 등 첨가제)의 함량을 측정한다. 용출시험 중의 정량 분석과정도 포함된다.

#### 2. 특이성 (Specificity)

특이성(Specificity)이란[주1] 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말한다. 시험방법의 특이성이 부족할 경우 다른 보조적인 시험방법으로 보완될 수 있다.

#### 3. 정확성 (Accuracy)

정확성(Accuracy)이란 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말한다[주2]

#### 4. 정밀성(Precision)

정밀성(Precision)이란 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 검체를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 말한다. 정밀성은 반복성(병행정밀성), 실험실내 정밀성 및 실험실간 정밀성의 세가지로 검토될 수 있다.

- 반복성(병행정밀성, Repeatability)이란 동일 실험실내에서 동일한 시험자가 동일한 장치와 기구, 동일제조번호와 시약, 기타 동일 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 복수의 검체를 짧은 시간차로 반복분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말한다. Intra-assay precision이라고도 한다.
- 실험실내 정밀성(Intermediate Precision)이란 동일 실험실내에서 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말한다.
- 실험실간 정밀성(Reproducibility)이란 일반적으로 표준화된 시험방법을 사용한 공동연구에 적용되는데, 서로 다른 실험실에서 하나의 동일한 검체로부터 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말한다.

#### 5. 검출한계(Detection Limit)

검출한계(Detection Limit)란 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며, 반드시 정량가능할 필요는 없다.

#### 6. 정량한계(Quantitation Limit)

정량한계(Quantitation Limit)란 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 말한다. 분석대상물질을 미량으로 함유하는 검체의 정량시험이나 특히 불순물, 분해생성물 결정에 사용되는 정량시험의 밸리데이션 파라미터이다.

#### 7. 직선성(Linearity)

시험방법의 직선성(Linearity)이란 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다.

## 8. 범위(Range)

범위(Range)란 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질 양(또는 농도)의 하한 및 상한값 사이의 영역을 말한다.

## 9. 완건성(Robustness)

시험방법의 완건성(Robustness)이란 시험방법의 조건이 일부 의도적으로 변경되었을 때 측정값이 영향을 받지 않는지에 대한 척도를 말한다. 시험방법이 통상 사용되는 동안 그 시험방법을 얼마나 신뢰할 수 있는 지에 대한 지표이다.

### <해설>

[주1] 특이성은 시험방법의 식별능력을 나타내며 선택성(Selectivity)이라고도 한다. 시험방법의 가장 기본적인 분석능 중 하나로서 모든 시험방법에서 타당성이 입증되어야 한다.

[주2] 실측치가 참값에 얼마나 가까운가를 말한다.

## 2. 시험방법 밸리데이션의 실시

시험방법 밸리데이션을 위해서는 우선 시험방법의 적정성에 관한 종합적이고 신뢰성 있는 실험계획을 수립하고 밸리데이션 과정에서 얻어진 모든 데이터 및 밸리데이션 파라미터를 이용하여 그 적정성 여부를 평가한다. 밸리데이션의 과정에서 얻어진 모든 관련 데이터 및 밸리데이션 파라미터를 산출하기 위해 사용된 계산공식이 제출되어야 하며 적절히 설명되어야 한다. 확인시험, 순도시험, 정량시험 등의 시험방법별로 설정되어야 할 밸리데이션 파라미터는 별표1과 같다.

밸리데이션 수행 시에 사용하는 표준품은 순도를 포함하여 물리·화학·생물학적 특성이 명확히 설명되어야 한다. 어느 정도 수준의 순도를 가진 표준품이 요구되는지는 시험방법의 사용목적에 따른다.

### 1. 특이성(Specificity)

확인시험, 순도시험 및 정량시험의 밸리데이션에서는 특이성이 평가되어야 한다. 특이성을 입증하기 위한 방법은 시험방법이 적용되는 목적에 따라 다르다.

어떤 시험방법이 특정의 분석대상물질에 대해서 특이적이고, 완벽하게 구별할수 있는 방법임을 입증하는 것이 항상 가능하지는 않다.

이러한 경우에는 분석대상물질을 충분히 구별하기 위해 두 개 혹은 그 이상의 시험방법을 조합하는 것이 권장된다.

#### 가. 확인시험(Identification)

확인시험은 구조적으로 유사한 화합물들이 공존시 이를 식별할 수 있는 방법이어야 한다. 시험방법의 식별 능력은 분석대상물질을 함유한 검체에서 기존의 표준물질과 비교시 양성의 시험결과를 얻고, 분석대상물질을 포함하지 않은 검체에서는 음성의 시험결과를 얻음으로써 확인할 수 있다. 추가적으로 분석대상물질과 구조적으로 유사한 물질 또는 분석대상물질과 밀접한 관련성이 있는 물질에 확인시험을 적용하여 양성의 반응을 얻을 수 없다는 것을 확인해도 된다.[주3] 특이성 검토 시 시험방법을 실시하는데 있어서 일어날 수 있는 간섭을 과학적으로 판단하여, 위와 같이 간섭을 일으킬 수 있는 물질을 선택하여야 한다.

#### 나. 정량시험과 순도시험

크로마토그래프법에서는 특이성을 입증하기 위해 대표성 있는 크로마토그램을 제

시하여야 하며 개개의 성분들이 크로마토그램에 적절하게 표시되어야 한다. 이는 다른 분리 분석법의 경우에서도 마찬가지이다.

크로마토그래프법에서는 성분이 서로 분리되고 있음을 나타내는 분리한계(Critical Separation)가 평가되어야 한다. 특이성을 나타내기 위해서 서로 가장 근접하게 용리하는 2개 성분의 분리도를 이용하여 분리한계를 나타낼 수 있다.[주4]

비특이적인 정량시험(non-specific assay)이 사용될 때는 별도의 보조적 시험방법을 사용하여 종합적으로 특이성을 증명할 수 있다. 예를 들면, 원료의약품의 출하시험으로 실시하는 정량시험에 적정법(titration)이 적용되는 경우에는 그 정량시험에 적당한 순도시험을 실시하여 검토함으로써 특이성을 증명할 수 있다.[주5]

이러한 방법은 정량시험과 순도시험에 동일하게 적용할 수 있다.

#### 1) 유연물질 표준품 보유 시

유연물질 또는 첨가제가 있는 상황에서 정량시험은 분석대상물질에 특이적이어야 한다. 실제로 원료의약품 또는 제제에 적당한 농도의 유연물질이나 첨가제를 첨가했을 때의 정량 시험결과가 이러한 물질이 첨가되지 않을 때의 시험결과와 비교하여 영향을 받지 않는다는 것을 보여줌으로써 특이성을 입증할 수 있다.

순도시험에서는 원료의약품 또는 제제에 적당한 농도의 유연물질을 첨가하여 이들 유연물질이 서로 분리되거나 유연물질이 검체 중에 존재하는 다른 성분으로부터 분리되는 것을 제시함으로써 특이성을 입증할 수 있다.

#### 2) 유연물질 표준품 미보유시

유연물질의 표준품을 확보할 수 없는 경우에는 유연물질을 포함한 검체에 대하여 밸리데이션 하고자 하는 시험방법으로 측정된 결과와 이미 입증된 다른 시험방법으로 측정된 결과를 비교함으로써 특이성을 입증할 수 있다. 여기서 이미 입증된 다른 시험방법의 예로는, 약전에 기재된 방법 또는 다른 밸리데이션된 시험방법이 있다. 필요에 따라서, 유연물질 발생이 가능한 가혹조건(빛, 열, 습도, 산 또는 염기 가수분해 및 산화)에 노출된 검체를 이용할 수도 있다.[주6]

·정량시험에서는 2개의 정량 시험결과를 비교한다.

·순도시험에서는 유연물질 프로파일을 비교한다.

크로마토그램상의 분석대상물질의 피크가 다른 성분들로부터 유래하지 않는다는 것을 입증하기 위해서는 다이오드 어레이(Diode array)나 질량분석기(MS) 등을 검출기로 이용하는 피크순도시험이 유용하다.

### <해설>

[주3] 분석대상물질과 구조적으로 유사한 물질로는 분해생성물, 합성공정에서의 출발물질 또는 부생성물이 있으며, 분석대상물질과 밀접한 관련성이 있는 물질로는 제제 중에 존재하는 첨가제 등이 있다.

[주4] 예를 들면, 적당한 농도의 분석대상물질을 포함한 시료 및 매트릭스만으로 이루어진 시료의 대표적인 크로마토그램을 제시하고 각각의 피크에 식별하기 쉽도록 적절하게 표시한다. 이 중 서로 가장 근접하여 검출되는 두 성분의 분리한계를 설정하는 것이 유용하며 이는 분리도(resolution)와 분리계수(relative retention)로 나타낼 수 있다.

대한약전 기체 및 액체크로마토그래프법에서 피크가 완전히 분리한다는 것은 분리도 1.5 이상을 의미하므로 이것을 피크분리의 기준으로 이용할 수도 있으며, 분리도가 이보다 낮을 경우 타당한 근거자료를 제시하여 특이성을 입증할 수 있다.

[주5] 예를 들면, 원료의약품의 정량시험에서 특이성이 비교적 낮은, 표준품을 사용하지 않는 절대적 시험방법인 적정법을 적용하는 경우가 있는데 이런 경우에는 원료의약품의 순도가 매우 높아 함유하는 불순물의 함량이 매우 낮다는 것이 전제되어야 한다. 그래야만 적정액이 분석하고자 하는 대상성분(원료의약품)에 의해서만 소비되고 있다고 간주할 수 있기 때문이다.

마찬가지로 불순물과 분리가 잘 되지 않는 크로마토그래프법을 정량시험에 이용할 때에도 순도시험을 통하여 불순물의 양이 무시할 수 있는 정도라는 것을 확인할 수 있어야 한다. 즉 불순물의 양이 정량시험의 시험결과에 영향을 미치지 않을 정도임을 확인할 수 있다는 전제를 가지고 있다면 이런 시험방법을 특이성의 관점만으로 배제할 수 없다.

[주6] 이때 주의하여야 할 점은 지나치게 검체를 가혹조건에 노출시키게 되면, 실제 제품의 안정성 시험기간 동안 생성될 수 있는 분해산물이 생성되는 것이 아니라, 과도한 분해과정을 통한 2차 분해산물 등 비정상적인 분해산물(즉, 정상적인 장기보존시험 및 가속시험에서 생성되지 않는 분해산물)이 생성될 수 있다. 이렇게 생성된 비정상적 분해산물은 오히려 시험방법의 밸리데이션을 어렵게 만들 수 있기 때문에 일반적으로 가혹조건에 노출시킬 경우에는 약 10% 정도 분해되도록 조절하는 것이 좋다.

## 2. 직선성(Linearity)

시험방법에서 정하는 모든 범위(3. 범위 참조)에 대해 직선성을 확인하여야 한다. 표준원액을 희석하는 방법으로 원료의약품에 대해 직접적으로 직선성을 증명할 수 있으며 제제 구성성분들을 개별 칭량하여 조제한 혼합물을 가지고 직선성을 증명할 수 있다. 두 번째 방법은 범위 설정시에 고려될 수 있다.[주기]

신호를 분석대상물질의 농도 또는 함량에 대한 함수로 그래프를 작성하여 시각적으로 평가하여야 한다. 직선성이 확인되는 경우, 최소자승법에 의한 회귀직선의 계산과 같은 통계학적 방법을 이용해 측정 결과를 평가한다. 분석 실측치와 검체농도의 직선성을 얻기 위해서 필요시 회귀분석을 하기 전에 측정데이터를 수학적으로 변환시킬 필요가 있을 수 있다.

회귀직선으로부터 얻을 수 있는 정보는 직선성의 정도를 수학적으로 평가할 때 도움이 된다.

상관계수(correlation coefficient),  $y$ -절편, 회귀직선의 기울기 및 잔차제곱의 합(residual sum of square) 등의 결과도 기재하여야 한다. 데이터에 대한 그래프도 작성하여 기재하여야 한다. 실측치와 회귀직선상의 예측치와의 차이를 분석하는 것도 직선성을 평가하는데 있어서 도움이 된다.[주8]

면역측정법(Immunoassay)과 같이 어떤 시험방법은 수학적 변환을 하여도 직선성이 나타나지 않는다. 이러한 경우, 분석결과는 검체 중의 분석대상물질의 농도(또는 함량)에 대하여 적절한 함수(이론식 또는 근사식)로 표현한다.[주9]

직선성을 입증하기 위해서는 적어도 다섯 개 농도의 검체를 사용한다. 그렇지 않은 경우 그 방법의 타당성에 대한 근거를 제시하여야 한다.

### <해설>

#### [주기] ○ 직선성의 검증

직선성의 가장 중요한 목적은 밸리데이션 하고자 하는 시험방법에서 사용하는 검량모델(Calibration model)을 검증하는 것이다.

검량모델의 검증은 직선성의 의미에 따라, 밸리데이션 하고자 하는 시험방법에 대하여 사용하고자 하는 범위 중 분석대상물질의 농도에 대한 반응의 관계를 증명하는 것으로서 두 가지 방법이 사용 될 수 있다.

첫 번째 방법은 분석하고자 하는 물질의 표준품을 이용하여 표준품 원액을 조제하고, 이를 각 농도별로 희석하여 직선성을 평가하는 방법이다.

또 다른 방법은 검체의 구성성분을 포함하는 혼합물을 만들고 여기에 각 농도에 해당하는 표준품을 적절한 방법으로 첨가하여(칭량 혹은 희석) 이를 가지고 검증하는 방법이다.

직선성을 검증시에 가장 염두해 두어야 하는 것은 기질의 영향(Matrix Effect)인데, 기질의 영향(Matrix Effect)이란 시료의 분석대상 물질 이외의 구성성분이 분석대상 물질의 반응에 영향을 주는 것을 의미한다

일반적으로 기질의 영향은 정확성 검증시에 검토되나, 정확성 검증시에 기질의 효과가 밝혀지면, 두 번째 방법을 이용하여 직선성을 검증하여야 한다.

유연물질의 정량시험에 있어 주성분의 반응값을 이용하여 유연물질의 양을 결정하는 방법에서는 주성분의 반응값에 의해 유연물질 양이 결정되기 때문에, 두 번째 방법을 이용하여 기질의 효과를 직선성에서 검증하는 것이 바람직하다.

#### [주8] 직선성의 평가

그림 1과 같은 검량선에서는 상관계수가 0.99이상이나 시각적으로는 위가 불룩한 현상이 관찰되어 직선성이 확립되었다고 판정하기 어렵다.

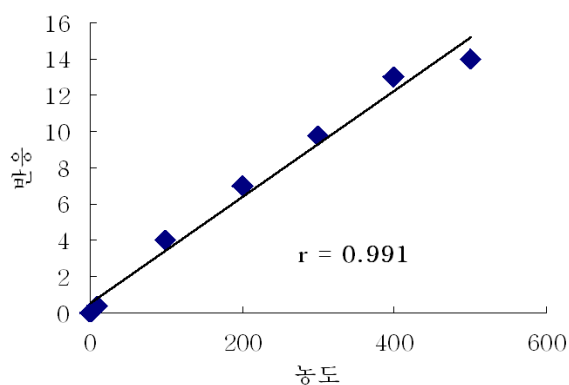


그림 1. 검량선의 예

시각적인 판정 및 상관분석에 의하여 대략적인 직선관계가 확인되면 최소 이승법(최소 자승법, Method of least squares)에 의한 회귀 직선의 계산과 같은 통계학적 방법을 이용해 측정 결과를 평가한다. 분석 실측치와 검체농도의 직선성을 평가하기 위하여 필요 시 회귀분석을 하기 전에 측정 데이터를 수학적으로 변환시킬 필요가 있을 수 있다.

상관계수(correlation coefficient), y-절편, 회귀직선의 기울기 및 잔차제곱의 합(residual sum of square)을 첨부자료에 기재한다. 데이터에 대한 플롯도 첨부한다(그림2). 실측치와 회귀직선 상의 예측치와의 차이, 즉 잔차(residual)를 분석하는 것도 직선성을 평가하는데 있어서 도움이 된다.

잔차 제곱의 합 자체는 반응의 절대치에 따라 좌우되므로 직선성 평가의 기준이라고 할 수 없으나, 잔차분석을 통해 표준화된 잔차(standardized residual)들이 0에 대해 대략적으로 대칭적으로 고르게 분포하고 모든 잔차들이 특별한 경향성을 띠지 않음이 확인되어야 추정회귀직선이 실제 관측결과를 잘 설명해준다고 할 수 있다(그림3)

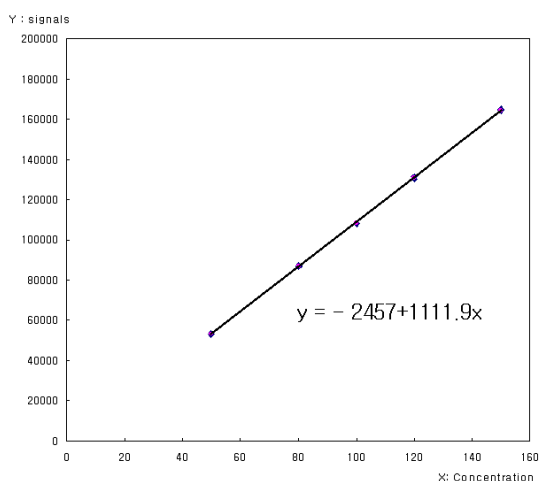


그림 2. 추정회귀직선

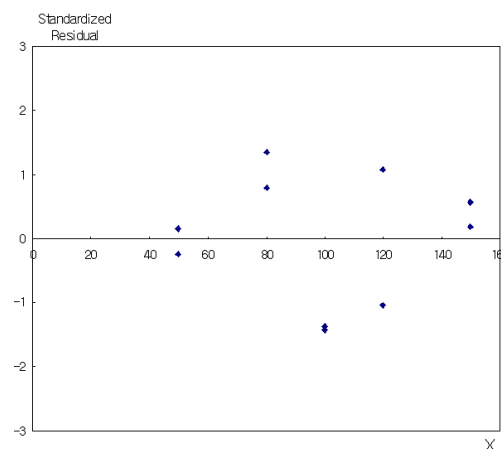


그림 3. 잔차 분포도

추정회귀직선의 타당성이 인정되면 결정계수( $r^2$ , coefficient of determination)를 계산하여 직선성의 판정에 이용할 수 있다. 선형회귀분석에서는 결정계수의 값이 1에 가까울수록 직선성을 가진다고 판정한다.

[주9] 생물학적시험법 등은 분석대상물질의 농도에 대한 반응이 직선적이지 않은 경우가 있다.

### 3. 범위(Range)

일반적으로 범위(Range)는 직선성 평가 시 결정되고, 시험방법이 적용되는 목적에 따라 달라질 수 있다. 규정하는 범위 내 또는 그 범위의 하한 및 상한 농도를 포함한 검체를 이용하여 시험방법의 직선성, 정확성 및 정밀성을 확인함으로써 범위의 타당성을 입증한다.

최소로 규정하는 범위는 다음과 같다.

가. 원료의약품 또는 제제의 정량시험

- 일반적으로 시험농도의 80 ~ 120%.

나. 제제균일성시험

- 정량분무흡입제(metered dose inhalers)등과 같이 제형의 특성에 근거하여 더 넓은 범위를 규정하여야 하는 경우를 제외하고는, 적어도 시험농도의 70 ~ 130%.

다. 용출시험

- 제제의 기준 및 시험방법 중 설정된 용출시험기준 범위의  $\pm 20\%$ .
- 예를 들어, 방출제어제제의 규격이 1시간 후에 20%, 24시간 후에 90%라고 규정되어 있다면 밸리데이션해야 할 범위는 표시량의 0 ~ 110%이다.

라. 유연물질의 정량시험

- 해당 유연물질의 보고수준부터 설정된 기준의 120% 까지

마. 활성이 특히 강하거나 독성 및 예기치 못한 약리 작용을 나타내는 것으로 알려진 유연물질의 검출/정량한계는 그 유연물질이 관리되어야 할 한도를 고려하여 설정되어야 한다. 의약품등의 개발 단계에서 행해지는 순도시험에 이용되는 시험방법을 밸리데이션하는 경우, 예측되는 유연물질의 한도치 근처를 범위로 하여 평가하는 것이 좋다.

바. 유효성분의 정량법과 순도시험이 하나의 시험으로 동시에 행해져 유효성분 표시량의 100%를 함유한 검체만 사용되는 경우, 해당 유연물질의 보고수준부터 함량 시험 기준의 120% 까지 직선성이 평가되어야 한다.

<해설>

○ 하한 및 상한 값은 반드시 해당 분석방법에 요구되는 시험의 허용기준을 반드시 고려하여 설정하여야 하며, 가이드라인에서는 이러한 점을 고려하여 시험항목의 종류에 따라 요구되는 최소 범위를 제시하고 있는데, 이를 표1에 요약하였다.

○ 표1. 시험항목에 따른 권장 최소 범위

시험항목	권장되는 최소 범위
정량시험(Assay)	분석농도의 80~120%
제제균일성시험 (Content Uniformity)	분석농도의 70~130%
용출시험 (Dissolution)	상한 및 하한 기준의 $\pm 20\%$
유연물질	보고수준으로부터 허용기준의 120%* (다만, 허용기준이 보고수준보다 낮은 경우는 정량한계로부터 허용기준의 120%)
- 원료	보고수준 : 0.05%/0.03% (일일복용량 $\leq 2g$ / $> 2g$ )
- 제제	보고수준 : 0.1%/0.05% (일일복용량 $\leq 1g$ / $> 1g$ )
유효성분 표시량의 100%를 함유한 검체만 사용되는 경우	유연물질 보고수준으로부터 주성분 기준의 120%

\* 보고수준은 의약품의 품목허가·신고·심사규정에 따른다.

#### 4. 정확성(Accuracy)

정확성은 시험방법이 규정하는 모든 범위에서 입증되어야 한다.

##### 가. 정량시험

###### (1) 원료의약품

정확성을 결정하기 위해서 다음과 같은 몇 가지의 방법을 이용할 수 있다.

###### (가) 참값을 알고 있는 경우

순도를 이미 알고 있는 검체(예를 들면, 표준품)에 대해서 밸리데이션하려 하는 시험방법을 적용한다.[주10]

###### (나) 정확성이 알려진 기존의 시험방법이 존재하는 경우

밸리데이션하려 하는 시험방법에 의한 시험결과와 정확성이 알려진 기존의 시험방법에 의한 시험결과를 비교한다.[주11]

(다) 정밀성, 직선성 및 특이성이 입증되면, 이로부터 정확성을 추론할 수 있다.

###### (2) 제제

정확성을 평가하기 위하여 다음과 같은 몇 가지의 방법을 이용할 수 있다.[주12]

(가) 제제성분의 혼합물에 분석하는 원료약품의 기지량을 첨가하고 이것을 검체로 하여 밸리데이션하려 하는 시험방법을 적용한다.

(나) 확보 불가능한 제제성분이 있는 경우에는 다음의 어느 방법을 이용해도 좋다.

1) 제제에 기지량의 분석대상물질을 첨가하는방법

2) 제제를 밸리데이션하려 하는 시험방법으로 측정된 결과와 정확성이 알려진 기존의 시험방법으로 측정된 결과를 비교하는 방법

(다) 정밀성, 직선성 및 특이성이 입증되면, 이로부터 정확성을 추론할 수 있다.

##### 나. 유연물질의 정량시험

정확성은 기지량의 유연물질을 첨가한 원료약품 또는 제제 등의 검체를 정량함으로써 평가한다.[주13]

특정 불순물 또는 분해생성물을 확보하는 것이 불가능한 경우에는 밸리데이션하려 하는 시험방법에 의한 시험결과를 정확성이 알려진 기존의 시험방법에 의한

시험결과와 비교해도 된다. 원료의약품의 반응계수(response factor)를 이용할 수도 있다.[주14]

모든 경우 주요 분석대상물질에 대하여 중량백분율 혹은 면적백분율 등 개개의 유연물질 양 또는 유연물질 총량의 결정방법을 명확히 기재하여야 한다.[주15]

#### 다. 제출자료

정확성은 규정된 범위를 포함하여 최소한 3 농도에 대해서 시험방법의 전 조작을 적어도 9회 반복 측정(예를 들면, 3 농도에 대해서 분석법의 전 조작을 각 농도당 3회씩 반복 측정)한 결과로부터 평가한다.

정확성은 기지량의 분석대상물질을 첨가한 검체를 정량하는 경우에는 회수율(%)로서 나타내고, 참값과 비교하는 경우에는 평균값과 참값으로 인증된 값과의 차이를 신뢰구간과 함께 기재한다.

#### <해설>

[주10] 얻은 결과의 평균값과 참값의 차이를 평가하는 방법이다.

[주11] 이 방법은 동일한 시료에 대해, 정확성이 알려진 시험방법과 밸리데이션 하고자 하는 시험방법을 가지고 시험을 하여 얻은 결과값에 대한 차이를 평가하는 것이다. 정확성이 알려진 시험방법으로는 해당 물질에 대한 특이적 반응 등을 이용한 시험방법으로 시험방법의 기전 등이 이미 알려져 있어 해당 분석방법의 정확성이 추정 가능한 경우의 시험방법이다.

[주12] 제제의 정확성 검증시 가장 많이 사용되는 방법은 회수율을 평가하는 것이다. 회수율을 실시 할 때 주의 할 점은, 분석대상물질이 함량 및 순도 등이 잘 규명된 표준품을 사용하여야 하며, 기질(Matrix)의 영향을 고려해야 한다는 점이다.

기질(Matrix)의 영향이란, 분석대상물질 이외의 시료 중에 존재하는 구성성분에 의해 분석대상물질의 분석에 영향을 주는 것을 의미한다. 예를 들면, 제제 중의 주성분의 분석에 있어 주성분 이외의 첨가제에 의해 분석대상성분의 검출을 방해하거나 회수율에 영향을 주기도 한다.

이러한 이유로 인해 기질(Matrix)이 존재하는 시료의 분석에서는 특이성이 높은 시험방법이 정확성 또한 높다는 것을 보증할 수 없다.

분석방법의 정확성을 평가할 때에 시료 중의 구성성분에 의한 기질의 영향이 없는 경우에는 분석대상물질의 표준품으로만 직선성을 평가 할 수 있으나, 기질의 영향이 있을 때에는 기질을 포함하는 표준액을 이용하여 직선성을 평가하여야 한다.

[주13] 원료물질에 대한 유연물질 시험의 경우에는 원료물질 주성분에 분석대상 유연물

질을 첨가하여 회수율을 평가하고, 완제품의 경우는 주성분을 함유하는 완제품에 분석대상 유연물질을 첨가하여 회수율을 측정하여 평가하면 된다.

[주14] 유연물질과 주성분의 반응계수를 구할 때 주의할 점은 반드시 유연물질과 주성분의 농도가 동일하여야 하며, 농도는 정량한계보다 높은 농도에서 실시하는 것이 좋다.

또한 반응계수는 물질의 고유상수로서 반응계수를 구할 때에는 상호간섭 영향을 피하기 위해 유연물질 및 주성분을 따로 시험하는 것이 좋다.

[주15] 유연물질의 양은 주성분의 면적을 100%로 간주하여 이에 대한 유연물질의 양을 계산하는 방법과 주성분을 외부표준물질로 간주하여 유연물질의 양을 계산하는 방법을 통해 계산될 수 있다.

두 가지 방법을 사용하여 유연물질의 양을 결정하는 경우에는 유연물질의 반응계수가 반드시 결정되어야 한다. 유연물질의 반응계수가 주성분의 반응계수와 거의 동일한 수준이어서 그 차이가 무시할 수 있는 수준이라면, 유연물질의 양은 주성분을 유연물질 표준품으로 간주하여 유연물질의 양을 결정할 수 있다

## 5. 정밀성(Precision)

함량시험 및 유연물질의 정량시험을 밸리데이션할 때 정밀성 평가가 포함된다.

### 가. 반복성(병행정밀성, Repeatability)

반복성은 다음과 같은 방법으로 평가할 수 있다.[주16]

- (1) 규정된 범위를 포함한 농도에 대해 적어도 9회 반복하여 측정한다.(예를 들면, 3농도에 대해서 시험방법의 전 조작을 각 농도 3회씩 반복 측정한다.)
- (2) 시험농도의 100 %에 해당하는 농도로 시험방법의 전 조작을 적어도 6회 반복 측정한다.

### 나. 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

실험실내 정밀성의 평가범위는 시험방법이 사용되는 상황에 따라 정해지며 정밀성에 미치는 여러 가지 요인에 대한 영향을 확인할 필요가 있다. 평가가 필요한 대표적인 변동요인은 실험일, 시험자, 시험장비 등이다. 이러한 요인들 각각에 대해 개별적으로 시험을 실시할 필요는 없다.[주17]

### 다. 실험실간 정밀성(재현성, Reproducibility)

재현성은 실험실간 시험(inter-laboratory trial)에 의해 평가된다. 약전에 시험방법을 수재하는 등 시험방법을 표준화할 필요가 있을 경우에는 재현성의 평가가 필요하다.[주18] 실험실간 정밀성 자료는 허가시 제출자료에 포함되지 않는다.

### 라. 제출자료

각각의 정밀성 평가 자료마다 표준편차, 상대표준편차(변동 계수) 및 신뢰구간을 기재한다.

## <해설>

- 의약품의 품질관리를 위한 시험은 일반적으로 하나의 실험실에서 실시되는 경우가 많으므로, 통상적으로 반복성과 실험실내 정밀성을 검토하면 된다. 그러나 다수의 실험실에서 시험을 실시할 경우에는 반복성과 실험실간 정밀성을 검토하거나 실험실 간의 밸리데이션 파라미터가 동등하다는 것을 확인해야 한다.

[주16] 검체 조제시의 칭량, 희석, 추출 등의 조작이 시험방법의 정밀성에 영향을 줄 수 있기 때문에, 반복성은 시험방법에서 규정하고 있는 분석절차를 반복적으로 시행한 결과를 가지고 평가하여야 한다.

정량시험에 규정되어 있는 범위(80 % ~ 120 %)와 같이 농도 범위가 비교적 좁은 경우, 정밀성은 시료 중 분석대상물질 농도에 상관없이 일정한 경우가 많다. 이 경우에는 위의 둘 중 어느 방법을 이용해도 된다. 그러나 순도시험이나 서방성 제제의 용출시험과 같이 범위가 넓은 경우에는 정밀성이 시료 중의 분석대상물질 농도에 따라 좌우될 수 있다. 정밀성의 농도의존성이 의심되는 경우에는 적어도 범위의 상한, 하한 및 중앙부근(혹은 100 % 부근)의 농도에서 (1)의 방법을 이용하여 정밀성을 평가하고 기준을 만족시키는지 확인한다.

[주17] 경우에 따라서는 실험디자인을 이용하여 통계적으로 평가할 수도 있다.

실험실내 정밀성을 평가하기 위한 시험횟수는 일반적으로는 서로 다른 분석자가 각각 장비나 분석일을 다르게 하여 한번에 시험을 실시한다. 분석횟수는 반복성에서 규정하는 방법대로 9회 혹은 6회 반복한 결과를 평가한다.

[주18] 영향을 줄 수 있는 인자로는 장비나 경험 및 숙련도의 차이, 지식수준의 차이 등이 있을 수 있으며, 공동연구에 사용되는 시험방법을 표준화할 경우에도 실험실 간 정밀성이 평가되어야 한다.

실험실 간 정밀성의 결과는 반복성에서 평가하였던 방법을 이용하여, 표준편차, 상대표준편차 등으로 평가 할 수 있다.

## 6. 검출한계(Detection limit)

시험방법이 기기분석인지 아닌지에 따라 검출한계를 구하기 위한 여러 가지 방법들이 사용 가능하다. 따라서 다음에 제시하는 방법 이외의 다른 방법을 이용할 수도 있다.

### 가. 시각적 평가에 근거하는 방법[주19]

기기를 사용하지 않는 시험방법 뿐 아니라 기기 분석법에 대해서도 시각적으로 평가할 수 있다.

검출한계는 기지량의 분석대상물질을 함유한 검체를 분석하고 그 분석대상물질을 확실히 검출할 수 있는 최저의 농도를 확인함으로써 결정된다.

### 나. 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하는 방법

이 방법은 바탕선에 잡음이 있는 경우의 시험방법에 적용한다. 기지의 저농도 분석대상물질을 함유하는 검체와 공시험 검체의 신호를 비교하여 검출할 수 있는 분석대상물질의 최저농도를 설정함으로써 신호 대 잡음비를 구할 수 있다. 검출한계를 산출하는데 있어, 신호 대 잡음비는 일반적으로 3:1 혹은 2:1이 적당하다. [주20]

### 다. 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법

검출한계(DL)를 다음 식에 의해 결정할 수 있다.

$$DL = 3.3 * \sigma / S$$

여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차를,  $S$ 는 검량선의 기울기를 말한다.

기울기  $S$ 는 분석대상물질의 검량선으로부터 구할 수 있다. 표준편차  $\sigma$ 를 구하는 방법은 다음과 같은 여러 가지 방법이 있다.

#### (1) 공시험 검체의 표준편차에 근거하는 방법

적당한 수의 공시험 검체를 분석하여 이 측정값의 표준편차를 계산함으로써 시험방법의 기본(background) 반응 정도를 측정한다.[주21]

## (2) 검량선에 근거하는 방법

검량선은 검출한계에 근접한 분석대상물질을 함유하는 검체를 가지고 작성되어야 한다. 회귀직선에서 잔차의 표준편차(residual standard deviation) 또는 회귀직선(regression line)에서 y 절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 이용할 수 있다.[주22]

### 라. 제출자료

검출한계와 함께 검출한계를 구할 때 사용한 방법을 기재하여야 한다. 시각적 평가 또는 신호 대 잡음비에 의해 검출한계를 결정할 경우에는 그 타당성을 입증할 수 있는 크로마토그램을 제출한다.

계산(calculation) 또는 외삽(extrapolation)에 의해 검출한계를 산출하였을 경우에는 검출한계 농도 혹은 그 부근 농도로 조제한 적당한 수의 검체에 대한 분석을 실시하여 제출값의 타당성을 입증한다.

### <해설>

#### ○ 순도시험에서의 검출한계

순도시험에는 정량시험과 한도시험이 있으며 각각 다른 밸리데이션 파라미터에 대한 검토가 필요하다. 대한약전 일반시험법에 수재되어 있는 시험 중에서 비소시험과 중금속시험, 염화물시험 등이 한도시험에 속한다. 의약품 규격에 설정되어 있는 그 밖의 순도시험도 원칙적으로 한도시험이라고 볼 수 있다. 그러나 안정성시험에서 유연물질의 생성 정도를 시간에 따라 추적하기 위하여 실시되는 순도시험은 같은 시험방법을 이용하더라도 정량시험에 속한다. 대부분의 순도시험은 시료 중의 극소량으로 들어 있는 성분을 분석하는 시험이므로 검출한계와 정량한계의 검토가 매우 중요하다.

또한 한도시험 중에는 크로마토그래프법을 이용하여 '검액에서 얻은 유연물질의 피크 면적이 표준액의 주성분에서 유래하는 피크 면적의 몇 분의 1보다 크지 않다'고 기준을 설정하여 유연물질 함량이 기준치 이하임을 확인하는 방식의 시험이 있다. 이 경우에는 주성분에 대하여 유연물질 기준치에 해당하는 농도부터 표준액 농도까지의 범위에서 직선성이 있음을 보여야 한다. 예를 들어 "검액에서 얻은 유연물질의 피크 면적은 표준액의 주성분에서 유래하는 피크 면적의 0.1 %이하이다"라고 기준이 설정되어 있는 경우에는 주성분 표준액의 농도 0.1 ~ 100 %의 범위에서 직선성이 있음을 보여야 한다는 것이다. 그러므로 이와 같은 한도시험에서는 한도시

험에 요구되는 밸리데이션 파라미터 외에 범위와 직선성 평가가 추가로 필요하다.

[주19] 박층크로마토그래프 등과 같이 시각적 평가를 실시하는 시험방법에서는 이 방법으로 검출한계를 정할 수 있다. 기기를 이용한 시험방법이라 하더라도 피크를 확인하는 등 시각적 평가를 통해 검출한계를 정할 수 있다.

[주20] 신호 대 잡음의 비(S/N)는 아래와 같이 계산된다.

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

## 7. 정량한계(Quantitation limit)

시험방법이 기기분석인지 아닌지에 따라 정량한계를 구하기 위한 여러 가지 방법들이 사용 가능하다. 따라서 다음에 제시하는 방법 이외의 다른 방법을 이용할 수도 있다.

### 가. 시각적 평가에 근거하는 방법

기기를 사용하지 않는 시험방법 뿐 아니라 기기 분석법에 대해서도 시각적으로 평가 할 수 있다.

정량한계는 기지농도의 분석대상물질을 함유하는 검체를 분석하고, 정확성과 정밀성이 확보된 분석대상물질을 정량할 수 있는 최저농도를 설정하는 것이다.

### 나. 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하는 방법

이 방법은 바탕선에 잡음이 있는 시험방법에만 적용할 수 있다. 기지의 저농도 분석대상물질을 함유하는 검체와 공시험 검체의 신호를 비교하여 정량할 수 있는 분석대상물질의 최저농도를 설정함으로써 신호 대 잡음비를 구할 수 있다. 정량한계를 산출하는데 있어, 신호 대 잡음비는 일반적으로 10:1이 적당하다.

### 다. 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법

정량한계(QL)는 다음 식에 의해 결정할 수 있다.

$$QL = 10 * \sigma / S$$

여기서  $\sigma$ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다.

기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구할 수 있다. 표준편차( $\sigma$ )에 대해서는 여러 가지의 측정방법이 있고 그 예는 다음과 같다.

#### (1) 공시험 검체의 표준편차에 근거하는 방법

적당한 수의 공시험 검체를 분석하여 이 측정값의 표준편차를 계산함으로써 시험방법의 기본(background) 반응 정도를 측정한다.[주23]

## (2) 검량선에 근거하는 방법

검량선은 정량한계에 근접한 분석대상물질을 함유하는 검체를 가지고 작성되어야 한다.[주24] 회귀직선에서 잔차의 표준편차(residual standard deviation) 또는 회귀직선(regression line)에서 y 절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 이용할 수 있다.

### 라. 제출자료

정량한계와 함께 정량한계를 구할 때 사용한 방법을 첨부자료에 기재하여야 한다.

계산된 정량한계는 정량한계 혹은 그 부근 농도로 조제된 적당한 수의 검체에 대해 분석을 실시하여 그 값의 타당함을 입증하여야 한다.[주25]

### <해설>

[주23] 적당한 수의 공시험 검체를 분석하여 잡음 피크의 표준편차를 구하고 이 값을 반응의 표준편차로 이용하여 정량한계를 구할 수 있다. 공시험 검체는 일반적으로 이동상을 이용한다.

[주24] 유연물질의 정량시험에서 유연물질의 기준은 정량한계보다 충분히 높아야 한다. 공시험 검체는 일반적으로 이동상을 이용한다.

[주25] 일반적으로는 회수율로서 평가하며, 평균회수율, 표준편차 또는 상대표준편차로서 평가한다.

## 8. 완전성(Robustness)

완전성은 시험방법을 개발하는 단계에서 평가되어야 하며, 그 평가방법은 개발하려고 하는 시험방법의 형태에 따라 다르다. 완전성은 의도적으로 분석조건에 변동을 주었을 때 분석에 대한 신뢰성을 보여야 한다.[주26]

만약, 측정값이 분석조건 변경에 따라 영향을 받기 쉬운 경우라면, 분석조건을 적절히 관리하거나 시험방법 중에 주의 문구를 포함시킬 필요가 있다. 완전성을 평가함에 따라 시스템적합성에 관한 일련의 파라미터(예를 들면, 분리도)를 확립할 수 있다. 이러한 파라미터를 확인함으로써 일상의 분석에서 시험방법의 타당성이 유지되고 있음을 보증할 수 있다.

대표적인 변동인자는 다음과 같다.

가. 여러 가지의 시험방법에 공통되는 변동인자

- 시험용액의 안정성
- 추출시간

나. 액체크로마토그래프법의 대표적인 변동인자

- 이동상의 pH
- 이동상 조성(composition)의 변경
- 컬럼의 변경(different lots or suppliers)
- 온도
- 유량

다. 기체크로마토그래프법의 대표적인 변동인자

- 컬럼의 변경(different lots or suppliers)
- 온도
- 유량

### <해설>

[주26] 완전성은 시험방법 조건의 일부가 의도적으로 약간 변경되었을 때 측정값이 얼마나 영향을 받는지에 대한 척도를 말한다. 이것은 시험방법이 통상 사용되는 동

안 그 시험방법을 얼마나 신뢰할 수 있는 지에 대한 지표이다. 완전성은 표준화된 시험방법에서 시험조건을 변동할 수 있도록 설정해놓은 범위보다 더 넓은 범위를 의도적으로 변동시켜서 검토한다.

## 9. 시스템적합성 시험(System suitability testing)

시스템적합성 시험은 많은 분석법을 포괄하고 있다. 이는 시험장비, 전자공학적 기술, 분석조작 및 검체가 하나의 포괄적인 통합된 시스템을 구성하여 평가될 수 있다는 개념에 기초한다. 시험방법에 대해 확립해야할 시스템적합성의 파라미터는 밸리데이션 하고자 하는 시험방법에 따라 다르다. 추가적인 사항은 약전을 참조한다.

### <해설>

시스템적합성시험은 대부분의 시험방법에 있어서 없어서는 안 될 시험방법의 일부분으로서 분석기기, 분석조작, 분석대상검체 등으로 구성된 전체 시스템이 적절하게 가동 되도록 하기 위한 것이다. 시스템적합성시험은 적절한 허용기준을 정하여 시험방법에 포함시킨다.

대부분의 크로마토그래프법에는 시스템적합성시험의 허용기준 및 시험방법이 포함되어야 한다. 시스템적합성시험은 크로마토그래피 기법과 관련된 것이 아니라, 시험방법의 유형에 관계없이 환경 조건과 무관하게 시스템이 제대로 기능한다는 점을 확인하기 위한 것이므로 시험방법의 한 구성요소로 생각해야 한다.

다음은 크로마토그래프법에서 사용되는 시스템적합성 시험항목들에 대한 설명이다.

### 가. 질량분포비(Capacity factor) ( $K$ )

칼럼에 주입된 혼합물은 각 성분이 고유한 비율  $k$ 로 이동상 및 고정상에 분포한다.

$$k = \frac{\text{고정상에 존재하는 양}}{\text{이동상에 존재하는 양}}$$

이 비율  $k$ 는 액체크로마토그래프법에서는 질량분포비  $K$ 로 부른다.

$$t_R = (1+k)t_0$$

$t_R$  : 유지시간(검체를 주입한 때부터 피크 정점까지의 시간)

$t_0$  : 이동상의 칼럼통과시간 ( $k=0$ 인 물질을 주입한 때부터 그 물질의 피크정점까지의 시간)

질량분포비는 관련 없는 화합물의 피크 검출 시간에 대한 분석대상물질 피크의 위치에 대한 척도이다. 피크는 다른 피크와 무효부피(void volume)로부터 잘 분리되어야한다. 일반적으로  $k$ 의 값은 2이상이다.

나. 정밀성(Precision)과 주입 반복성(Injection repeatability)

상대표준편차(RSD : Relative standard deviation)로 표시되는 주입 반복성은 검체를 분석할 때 배관, 칼럼 및 환경상태를 포함하는 크로마토그램의 성능을 나타낸다. 이 때 검체 전처리와 제조공정 중의 편차는 고려하지 않았음을 주의해야 한다. 6회 이상 반복 주입에 대해 1% 이하의 RSD를 권장한다. %상대표준편차(RSD%)는 시료나 표준액을 연속 주입, 측정하여 구하며, 다음 식으로 계산한다.

$$RSD(\%) = \frac{100}{\bar{X}_r} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_r} (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$x_i$  : 측정값

$\bar{X}$  : 측정값의 평균값

$n$  : 측정회수

다. 분리계수 ( $\alpha$  : Relative retention)

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

$t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  : 분리도 측정에 쓰는 2개의 물질의 유지시간. 다만  $t_{R1} < t_{R2}$

$t_0$  : 이동상의 칼럼 통과시간 ( $k = 0$ 인 물질을 주입한 때부터 그 물질의 피크정점까지의 시간)

분리계수는 두 피크의 상대적인 위치에 대한 척도이다. 그러나 시험방법에 분리도( $R_s$ )에 대하여 서술되어 있는 경우에는 필수적인 파라미터는 아니다.

라. 분리도 ( $R_s$  : Resolution)

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}}$$

$t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  : 분리도 측정에 쓰는 두 개의 물질의 유지시간. 다만  $t_{R1} < t_{R2}$

$W_{0.5h1}$ ,  $W_{0.5h2}$  : 각각의 피크높이의 1/2 위치에서의 피크폭. 다만  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ ,  $W_{0.5h1}$  및  $W_{0.5h2}$  는 같은 단위를 쓴다.

분리도는 두 피크가 얼마나 잘 분리되었는지를 나타내는 척도이다. 신뢰성 있는 정량을 위해서 잘 분리된 피크는 필수적이다. 만약 잠재적인 간섭피크가 고려되어야 하는 경우 분리도는 매우 유용한 파라미터로서, 분석대상물질 및 분석대상물질에서 가장 피크유지시간이 가까운 피크에 대한 분리도 기준을 설정한다. 내부표준물질을 사용하는 경우에는 내부표준물질과 하나 이상의 활성성분 사이의 최소 허용 분리도를 규정해야 한다. 불순물 수준을 관리하기 위한 시험방법이라면, 활성성분과 가장 근접해서 용리되는 불순물 사이의 최소 분리도 또는 서로 밀접하게 용리되는 2개 피크 사이의 최소 분리도를 제시해야 한다. 분석대상물질 피크와 가장 가까운 잠재적 간섭피크(불순물, 첨가제, 분해산물, 내부표준물질 등) 사이의 분리도는 1.5 이상으로 설정하는 것이 바람직하다.

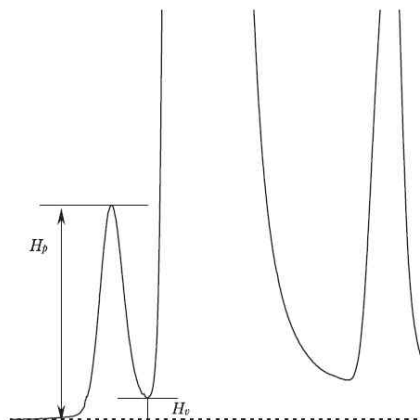
마. 피크 대 골짜기 비율 (Peak-to-valley ratio)

피크 대 골짜기 비율( $p/v$ )은 유연물질 시험에서 두개의 피크사이에 기준(baseline) 분리가 이루어지지 않았을 때 시스템적합성 요구조건으로 사용될 수 있다.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

$H_p$  : 크로마토그램의 작은 피크의 바탕선으로부터의 피크높이

$H_v$  : 크로마토그램의 큰 피크와 작은 피크 사이의 가장 낮은 지점(피크의 밸리)의 바탕선으로부터의 높이



바. 대칭계수 (S : Symmetry factor)

$$S = \frac{W_{0.05h}}{2f_r}$$

$W_{0.05h}$  : 피크의 기선에서부터 피크높이의 1/20의 높이에서의 피크폭

$f$  :  $W_{0.05h}$ 의 피크폭을 피크의 정점에서 기록지의 가로축에 내린 수직선으로 2등분할 때의 피크의 올라가는 쪽의 거리. 다만  $W_{0.05h}$  및  $f$ 는 같은 단위를 쓴다.

적분기는 피크가 끝난 곳 또는 끝날 때를 결정하고 피크 면적을 계산하기 때문에 정량의 정확성은 피크 끝림이 증가함에 따라 감소한다. 적분기 변수(variables)는 분석대상 피크 면적을 최적으로 계산하기 위해 시험자가 미리 설정한다. 보통 대칭계수는 2 이하로 설정하는 것을 권장한다.

사. 이론단수 (N : Theoretical plate number)

이론단수는 칼럼의 효율성, 즉 얼마나 많은 피크가 크로마토그램의 단위 분석시간당 위치할 수 있는가에 대한 척도로서 이론단수는 고정된 조작조건에서 크로마토그램의 각 피크에 대하여 일정한 상수 값이다. 이것은 칼럼에서 물질의 밴드가 넓어지는 정도를 나타낸다.

$$N = 5.54 \times \frac{t_R^2}{W_{0.5h}^2}$$

$t_R$  : 물질의 유지시간

$W_{0.5h}$  : 피크높이의 1/2 위치에서의 피크폭. 다만  $t_R$  및  $W_{0.5h}$ 는 같은 단위를 쓴다.

이론단수는 아래의 식을 이용해 계산할 수도 있다.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 = \frac{L}{H}$$

$t_R$  : 물질의 유지시간

$W$  : 피크폭

$L$  : 칼럼의 길이

$H$  : 이론단수에 상당하는 높이는 칼럼의 단위 길이 당 효율성. HETP (Height equivalent of a theoretical plate)

이론단수나 HETP에 영향을 줄 수 있는 파라미터는 피크 위치, 칼럼입자의 크기, 이동상의 유량, 칼럼 온도, 이동상의 점성, 분석대상물질의 분자량 등이다. 이론단수는 피크 검출시간에 의존하고 일반적으로 2000 이상이다.

## 아. 조정변수

공시험액, 시스템적합성시험용 표준액, 내부표준용액 및 검액의 주입 순서를 규정한다. 필요한 경우 시약 투입 순서와 가스 제거 및 여과 방법을 포함하여 이동상의 조제 방법을 상세하게 설명하고 이동상 조성의 조정이 피크유지시간에 미치는 영향을 시험 방법에 포함시켜 설명한다. 프리 칼럼 또는 가드 칼럼을 사용했다면 사용 근거를 제시하고 그 타당성을 설명한다. 비활성 튜빙 및 주입 밸브의 사용 등 특별한 조작조건이 있으면 구체적으로 제시한다.

## 자. 일반적 권고사항

시스템적합성시험은 크로마토그래피 시스템의 수행능력의 보증하는데 필수적이다. 요구되는 시스템적합성 항목은 시험방법의 목적에 따라 다르다.

절대검량선법을 사용하는 경우, 최소한의 시스템적합성시험항목으로 질량분포비( $k'$ ), 대칭계수(S), 및 상대표준편차(RSD)를 권장한다.

또한 내부표준법을 사용하는 경우, 기준규격 시험법, 출하시험, 안정성시험 또는 유연 물질시험의 경우에는 질량분포비( $k'$ ), 대칭계수(S), 분리도( $R_s$ ) 및 상대표준편차(RSD)를 최소한의 파라미터로 권장한다.

실제로 밸리데이션을 위해 작성된 각 방법은 그 시스템의 필수적인 특징을 나타내는 적절한 시스템적합성 시험항목을 포함한다.

## 차. 일반적으로 고려할 점

- 1) 검체와 표준품을 이동상에 녹이는 것이 바람직하다. 만약 이동상에 녹이는 것이 용이하지 않은 경우 이동상의 유기용매 비율과 비교하여 희석액의 유기용매 비율이 높아지지 않도록 한다. 희석액의 유기용매 비율이 더 높아질 경우, 양호한 피크를 얻지 못할 가능성이 있다.
- 2) 검액과 표준액은 그 농도를 되도록 같게 한다.
- 3) 검체 분석 전후로 표준품을 분석하도록 분석순서를 설정하여 검체 분석이 제대로 이루어지고 있는지 확인해야 한다.

## <참고> 재밸리데이션(Revalidation)

재밸리데이션은 시험방법이 특이성을 유지하며 의약품의 생체이용률과 활성 및 의약품의 확인, 함량, 품질, 순도, 역가를 계속적으로 보증할 수 있음을 증명하기 위하여 실시한다. 재밸리데이션은 일반적으로 일정 주기에 따라 필요성을 평가하고 필요 시 실시한다. 또한 시험방법, 주성분의 합성경로 또는 제제 중 원료의약품의 성분과 양을 변경하고자 하는 경우에 실시하기도 한다. 재밸리데이션의 정도는 변경의 특성에 따라 결정되며 다른 시험방법으로 대체하는 경우(예 : 적정법을 액체크로마토그래프법으로 대체)에는 새로운 시험방법에 대해 전체 밸리데이션(full validation)을 실시한다. 또한, 시험 중에 시험방법에 명시된 조건을 반복적으로 조정해야만 그 시험방법이 확정된 시스템적합성 기준을 충족시킬 수 있다면 시험방법을 재평가하고 수정하여 재밸리데이션하여야 한다. 일반적으로 다음과 같은 경우에 시험방법에 대한 재밸리데이션을 검토하여야 한다.

가. 주성분의 제조원 또는 제조방법을 변경하는 경우

나. 제제의 조성을 변경하는 경우

다. 시험방법을 변경하는 경우

재밸리데이션의 범위와 정도는 어떠한 변경에 따라 어떤 밸리데이션 파라미터가 영향을 받을 것인지를 고찰함으로써 결정할 수 있다. 가 또는 나 의 경우에는 혼입되는 불순물이나 첨가제의 조성이 변경되므로 특이성을 검토하여야 한다. 특이성에 변화가 없는 경우에는 다른 시험방법 파라미터에 영향을 미치는 것이 적다고 판단되므로 다른 시험방법 파라미터를 재검토 할 필요는 별로 없다. 또한 다에서 크로마토그래프법의 시험조건을 변경하는 경우에는 특이성을 검토하여야 하지만 정확성과 정밀성 등에 영향을 미치지 않는다고 판단되면 검토하지 않아도 된다. 다만, 극단적으로 피크유지시간이 변경되는 경우에는 정확성과 정밀성에 영향을 미칠 수 있으므로 주의한다. 순도시험 등에서는 크로마토그래프법의 시험조건이 변하면 검출한계나 정량한계가 달라질 수 있다. 또한 시험방법에서 추출용매를 바꾼 경우와 같이 밸리데이션 파라미터 전체에 영향을 끼칠 수 있는 변경이 있는 경우, 특이성 검토를 비롯한 전체 밸리데이션이 필요하다.

## V. 액체크로마토그래프법의 밸리데이션 실례

액체크로마토그래프법에는 많은 종류가 있으나 가장 흔히 사용되는 시험방법인 자외부흡광광도계 검출기를 포함한 역상액체크로마토그래프법(reversed-phase HPLC)를 실례로 들고자 한다. 이 시험방법의 밸리데이션에 대한 기준은 크로마토그래프법을 사용하는 다른 검출시험법 등에 적용될 수 있다.

### 1. 특이성

분석대상물질은 다른 물질과 상호작용이 없어야 하고 잘 분리되어야 한다. 대표적인 크로마토그램이나 프로파일을 제공하여야 하며, 가혹시험에 의해 밝혀진 분해생성물의 피크나 검체 중 첨가제에 의한 부피크가 분석대상물질과 분리된다는 것을 보여주어야 한다.

- 원료물질 또는 원료의약품 중 고려해야 할 유연물질은 합성과정에서 유래된 부반응물 및 분해생성물(이성질체 불순물을 포함한다), 잔류농약, 잔류용매 및 천연물 기원의 추출물로 인한 다른 외인성 화합물이다.
- 완제의약품의 경우 유연물질은 활성성분 중에 존재하는 불순물, 분해생성물, 첨가제와 활성성분과의 상호작용에 의한 화합물, 첨가제 또는 제조과정 중의 잔류용매와 같은 외인성 화합물, 제조과정이나 용기 또는 마개 시스템으로 인한 침전물 또는 추출물이 될 수 있다.

특이성 입증을 위하여 원료의약품을 가지고 산·염기 가수분해, 온도, 광분해, 산화를 통한 가혹시험을 한 자료가 요구되기도 한다. 유연물질 및 보존제시험에서는 가혹 및 비가혹 처리된 검액과 공시험액에 대한 크로마토그램을 함께 제시하는 것이 권장된다. 순도시험의 경우, 요구되는 검출 및 정량한계 농도에서 불순물의 피크가 크로마토그램에서 반드시 확인되어야 하고, 크로마토그램은 명료하게 표기되어야 하며 검체주입시간(injection time) 및 조작시간(running time)이 표시되어야 한다.

가혹시험에 관한 자료 작성 시 유의할 점은 다음과 같다.

- 가혹조건을 통해서 유래되는 부피크는 원료의약품의 안정성을 평가할 수 있는 수준이어야 하므로 부피크가 적당한 크기로 관찰될 수 있도록 시험액 농도를 증가시

키거나 기기 조건을 조정해야한다.

피크의 순도는 포토다이아드어레이 검출기로 결정할 수 있으나 분석대상물질에 존재하는 저농도의 부성분이 분석대상물질의 자외부흡광광도계 스펙트럼에 영향을 주거나, 간섭을 일으키지 않아야 한다. 검출과장 220 nm 이하에서는 화합물에 대한 자외부흡광광도계의 특이성이 낮으므로 주의해야 한다.

## 2. 직선성

일반적으로 직선성은 밸리테이션 하고자 하는 시험방법에서 규정한 농도 범위에서 최소 5개 이상의 표준액을 조제하여 검증한다.

다음은 60~140% 범위에서 직선성을 실시한 사례이다.

표2. 직선성 실시 예

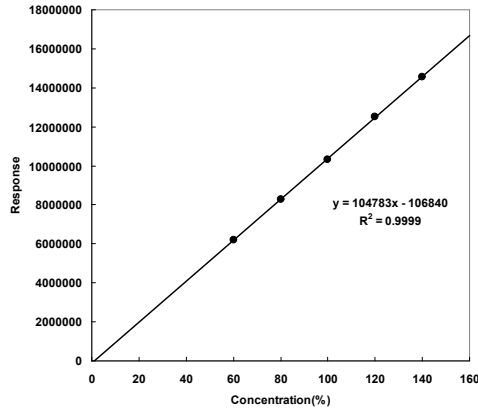
Sample No.	농도(%)	Peak Area
1	60	6183364
2	80	8284573
3	100	10329114
4	120	12512634
5	140	14547638

Linear Regression:  $y=a+bx$

Slope(b)	104,783
y-절편(a)	-106,840 (-1.03%)
잔차제곱의 합(RSS)	4,181,347,667
상관계수(r)	0.999952

회귀분석을 실시한 결과에서 알 수 있듯이 반응값(여기서는 피크면적)의 절대치가 큰 분석장비의 경우에는 회귀분석에서 얻어진 수치들이 크게 표시된다.

y-절편의 경우 -106,840으로서 '0'으로부터 상당히 벗어나 있는 것처럼 보이지만, 실제 분석농도 100% 기준으로 환산시에는 -1.03% 로서, 크게 벗어나지 않음을 알 수 있다.



아래 표3은 표 2의 시험결과에 대한 잔차 분석을 실시한 것이다. 잔차분석은 실제 측정값과 회귀분석을 통해 얻은 이론값 간의 차이로서 잔차의 합은 항상 '0'이다.

아래 그림에서와 같이, 밸리데이션하고자 하는 시험방법이 직선성을 나타낸다면, 그래프상의 점(Point)들은 '0' 부근에서 불규칙한 분포(Random Scattering)를 나타낸다.

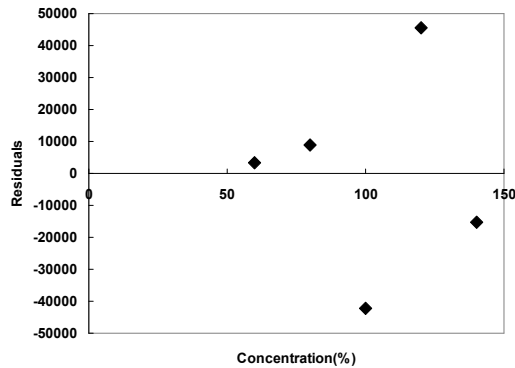


표3. 잔차분석 실시 예

Sample No.	농도(%)	잔차(Residual)
1	60	3221.2
2	80	8769.3
3	100	-42350.6
4	120	45508.5
5	140	-15148.4

### 3. 범위

범위는 밸리데이션을 시행한 시험방법에서 검량선을 작성할 때 직선성이 입증되는 분석물질의 높은 농도와 낮은 농도 사이의 간격이다. 범위는 정확성 및 정밀성 시험을

실시한 농도를 포함하여야 한다. 정확성 및 직선성 영역에서 다루었던 범위는 보존제 시험과 같은 다른 시험방법에도 적용될 수 있다.

또한 이미 밸리데이션 되어있는 품목과 제형 및 시험방법은 동일하나 주성분의 함량이 다른 품목에 대한 밸리데이션을 실시해야 할 경우, 표준액 및 검액 농도가 동일한 밸리데이션 범위를 가지는 경우에 한하여 시험방법 밸리데이션을 생략할 수 있다.

#### 4. 정확성

##### 1) 원료시험의 정확성

원료 시험의 정확성은 순도를 이미 알고 있는 검체(예를 들면, 표준품)에 대해서 밸리데이션하려 하는 시험방법을 적용하거나, 밸리데이션하려 하는 시험방법에 의한 시험결과와 정확성이 알려진 기준의 시험방법에 의한 시험결과를 비교하여 결정할 수 있다.

또한 정밀성, 직선성 및 특이성이 입증되면, 이로부터 정확성을 추론할 수 있다.

##### 2) 완제품 및 유연물질 시험의 정확성

완제품 및 유연물질 시험의 정확성의 경우는 일반적으로 회수율을 많이 사용한다. 회수율은 3가지 농도에서 3회 측정하는 3×3 방법을 많이 사용하며, 정확성의 범위는 직선성의 범위와 동일하여야 한다. 회수율 평가시에 주의하여야 할 점은 시험검체에 분석대상물질 이외의 검체를 구성하는 모든 구성성분이 포함되어야 한다는 것이다.

다음은 80, 100, 120% 3가지 농도에서 3회 반복 실험하여 회수율을 평가한 사례이다.

표5. 회수율 평가 예

No.	added[mg]	founded[mg]	회수율(%)
1	79.95	80.05	100.12
2	79.97	80.06	100.11
3	81.05	80.83	99.72
4	99.96	98.51	98.54
5	100.06	98.93	98.87
6	100.44	99.25	98.81
7	119.85	118.71	99.04
8	120.03	119.46	99.52
9	120.29	119.74	99.54
평균회수율			<b>99.36</b>
95% 신뢰구간		<b>98.54 ~ 100.12 %</b>	

정확성에서 회수율이 낮거나, 높은 경우에는 기질의 영향을 의심하여야 하며, 이는 직선성 평가시에도 반영이 되어야 한다.

## 5. 정밀성

### 1) 시스템 정밀성(System Precision)

시스템 정밀성은 동일한 검액을 반복 주입하였을 때의 시스템의 오차를 측정하는 것이다.

미국 FDA 크로마토그래프법 밸리데이션에 대한 지침에 따르면, 시스템 정밀성의 허용기준을 1% 로 권장한다.

유럽약전의 경우는 아래표와 같이 원료의 상한기준값(B)과 주입횟수에 따라 시스템 정밀성의 허용기준을 달리 정하고 있다.

표 6. 유럽약전의 시스템 정밀성 허용기준

	Number of individual injections			
	3	4	5	6
B (per cent)	Maximal permitted relative standard deviation			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27

B : 유럽약전에 수재된 원료의 함량기준의 상한기준 값을 의미한다. 예를 들면 원료A의 함량기준이 98.0~102.0% 인 경우에는 B 값이 2.0이 된다. 따라서, 3회 반복주입 하였을 때에는 0.41% 이하이어야 한다.

미국약전(USP)의 경우는 반복주입에 따른 시스템 정밀성의 허용기준을 2% 이하로 설정하고 있으나, 일반적으로 시험방법 밸리데이션에 있어서는 시스템 정밀성의 경우 1% 이하로 설정하는 것이 바람직하다.

### 2) 반복성

반복성은 100% 농도에 해당하는 동일 검체에 대해 밸리데이션 하고자 하는 시험절차에 따라 조제된 검액들을 분석하여 정밀성을 평가한다. 정밀성은 표준편차 또는 상대 표준편차로 평가한다.

다음 표는 반복성을 평가한 사례이다.

표 7. 반복성 평가 예

검체번호	함량(ug/mg)
	895.19
	904.93
	898.30
	902.44
	903.70
	903.69
평균	901.37
	3.80
	0.42

위의 표에서는 HPLC에서 얻어진 결과를 함량으로 변환하여 나타내었으나, 피크면적으로 표시하여도 무방하다. 상대표준편차를 이용하면 결과는 동일하기 때문이다.

### 3) 실험실내 정밀성

실험실내 정밀성에 영향을 주는 인자는 시험일, 시험자, 시험장비 등이다.

일반적으로 실험실내 정밀성은 서로 다른 시험자가 시험장비, 칼럼, 시험일을 서로 다르게 적용하여 분석한 결과를 가지고 평가한다.

아래 결과는 서로 다른 시험자가 시험장비, 시험일을 다르게 하여 실험실내 정밀성을 평가한 것이다.

표 8. 실험실내 정밀성 평가 예

검체번호	함량(ug/mg)	
	분석자 A	분석자 B
1	895.19	905.63
2	904.93	903.07
3	898.30	912.03
4	902.44	908.58
5	903.70	906.42
6	903.69	907.26
평균	901.37	907.16
표준편차	3.80	3.01
RSD	0.42	0.33
총평균	904.27	
표준편차	4.45	
RSD	0.49	

위의 결과는 전체 결과에 대한 표준편차 및 상대표준편차를 계산하여 실험실내 정밀성을 평가한 것이다.

#### 4) 실험실간 정밀성

실험실간 정밀성은 공동연구 중에 있는 실험실 사이의 정밀성을 나타낸다. 실험실내 정밀성이 수립되었으면 보통 실험실간 정밀성은 요구되지 않는다.

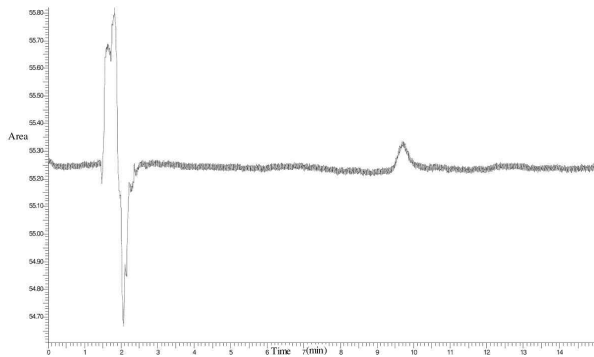
예를 들어 원개발사, 연구소, 원료약품 공급원 등에서 밸리데이션된 시험방법의 기술 이전을 위해서 실험실간 정밀성이 요구된다.

### 6. 검출한계와 정량한계

#### 1) 신호 대 잡음비를 이용한 정량한계의 설정

다음은 신호 대 잡음 비를 이용하여 주성분 A의 정량한계를 설정한 사례이다. 보고수준에 해당하는 0.05%를 정량한계로 임의로 설정하고 이에 해당하는 용액을 조제한 후 6회 반복 주입을 하였다. 이에 대한 대표적 크로마토그램은 아래에 나타냈으며, 반복 주입에 따른 피크면적 및 신호 대 잡음비(S/N)를 측정하였다.

표 9. 신호 대 잡음비를 이용한 정량한계 설정 예



검체번호	피크면적	S/N
1	2184	16.8
2	2108	15.4
3	1981	15.9
4	2026	16.5
5	2175	16.4
6	2341	17.5
평균	2135.8	16.4
상대표준편차 (%)	6.0	4.4

6회 반복 주입하였을 때, 피크면적의 상대표준편차는 6.0%이고, 신호 대 잡음비의 평균은 16.4이고 상대표준편차는 4.4 % 이었다. 따라서, 신호 대 잡음비가 10 이상을 만족하므로 0.05%를 정량한계로 설정하였다.

#### 2) 검량선으로부터의 검출한계와 정량한계의 계산

검량선으로부터 검출한계와 정량한계를 구할 때 가장 주의하여야 할 점은 충분히 낮은 검출한계와 정량한계를 구할 수 있을 정도로 검량선의 농도가 낮아야 한다는 것이다. 그 이유는 검출한계와 정량한계를 계산할 때 기울기와 반응의 표준편차가 사용되는데, 반응의 표준편차는 y-절편의 표준편차 또는 잔차의 표준편차가 이용 될 수 있다.

y-절편의 표준편차 또는 잔차의 표준편차는 분석대상물질의 농도에 따른 반응의 절대치가 크면 일반적으로 커지는 경향이 있다. 따라서, 검출한계 및 정량한계를 계산할 때, 높은 농도에서 작성한 검량선을 이용하면 검출한계 및 정량한계도 높은 값을 보인다.

다음은 주성분 A의 정량시험의 검출한계와 정량한계를 구한 사례이다. 이때 주성분 A의 농도에 따른 검출한계와 정량한계의 변화를 관찰한 것이다.

표 10. 고농도에서의 검출한계와 정량한계

Concentration(ug/mL)	Peak area(Au)
5.0	111239
10.0	225029
15.0	336667
20.0	451474
25.0	563645
기울기	22,625
잔차의 표준편차	772.91
y-절편의 표준편차	810.63
잔차의 표준편차으로 구한 경우	
DL	0.11(ug/ml)
QL	0.34(ug/ml)
y-절편의 표준편차로부터 구한 경우	
DL	0.12(ug/ml)
QL	0.36(ug/ml)

표11. 저농도에서의 검출한계와 정량한계

Concentration(ug/mL)	Peak area(Au)
0.3869	8659
0.5804	13034
0.7739	17756
0.9674	21659
1.1609	26251
기울기	22,640
잔차의 표준편차	203.66
y-절편의 표준편차	273.21
잔차의 표준편차으로 구한 경우	
DL	0.03(ug/ml)
QL	0.09(ug/ml)
절편의 표준편차로부터 구한 경우	
DL	0.04(ug/ml)
QL	0.12(ug/ml)

표10과 표11에서 알 수 있듯이 저농도의 표준액을 사용하는 경우 검출한계와 정량한계가 고농도와 비교시 3배 이상 차이가 나는 것을 알 수 있다.

또한 잔차의 표준편차의 값을 사용할 때와 y-절편의 표준편차의 값을 사용할 때의 검

출한계와 정량한계값이 달라 질 수 있다. 따라서, 보고서에는 어떤 방법으로 계산하였는지 정확히 표시하여야 한다.

2) 검출한계와 정량한계의 검증

계산된 검출한계와 정량한계는 반드시 검증을 실시하여야 한다.

일반적으로 검출한계의 검증은 계산된 검출한계 농도의 검액을 조제하여 분석하였을 때 S/N 가 2~3 이상이어야 하며, 정량한계의 경우는 정량한계 농도의 검액을 조제하여 분석하였을 때 S/N가 10 이상이어야 한다. 또한 정량한계의 경우 정량한계 농도의 검액을 조제하여 이를 분석하여 회수율도 평가하여야 한다.

다음은 위 표11에서 구한 검출한계 및 정량한계를 검증한 것이다. 계산으로부터 얻어진 검출한계 0.04 ug/ml 이었으나, 실제 해당 농도의 검체를 주입하였을 때 S/N가 만족스럽지 못하였다. 이에 따라 검출한계를 0.1 ug/ml로 상향하였으며, 이 농도로 검액을 3개 조제하여 분석하였을 때 피크의 S/N는 아래 표 12과 같았다.

표12. 검출한계의 검증

Sample No.	S/N
1	5.1
2	3.9
3	5.1
평균	4.7

계산으로부터 구한 정량한계는 0.12 ug/ml 이었으나, 실질적으로 해당 농도로 검액을 조제하여 S/N와 회수율을 검정하였을 때 만족스럽지 못하였다. 이에 따라 정량한계를 0.3 ug/ml로 상향 조정하였다. 0.3 ug/ml로 검액을 6개 조제하여 S/N와 회수율을 평가하였다.

표13. 정량한계의 검증

No	added	founded	Recovery	S/N
1	0.290008	0.285708	98.51	13.7
2	0.293455	0.292808	99.77	12.4
3	0.301038	0.288365	95.79	11.9
4	0.295293	0.280699	95.05	13.2
5	0.290008	0.284401	98.06	12.4
6	0.298051	0.291023	97.64	13.4
평균			97.47	12.8

## 7. 완전성

시험방법에 따라 전처리한 후 검액의 안정성을 시험방법에 따라 검토해야한다. 대부분 실험실에서 밤새도록 자동주입장치(auto sampler)를 이용하여 검액을 주입하여 분석하므로 분석이 이루어지기 전에 실험실에서 여러 시간 동안 용액상태로 존재하게 된다. 따라서 가수분해, 광분해 또는 유리제품에의 점착에 의해 분해될 수 있는 의약품의 경우에는 검토가 필요하다.

통상적으로 시험에 소요되는 시간(예 : 24시간) 동안 실험실 환경에서 검액의 안정성이 유지되는지 여부가 검토되어야 하며, 검체 전처리와 용액 보관에 24시간 이상의 많은 시간이 필요한 예외적인 경우에는 검액이 안정한 기간을 설정하여야 한다.

### 1) 용액의 안정성

다음은 용액의 안정성을 실시한 사례로서, HPLC 분석조건을 상온 및 2~4℃ 조건으로 하였을 때의 결과를 평가한 것이다. 평가는 % 차이로 하였으나, 상대표준편차(RSD)를 이용하여도 무방하다.

표 14. 용액의 안정성 실시예

시간(h)	상온조건		냉장조건	
	피크면적	% 차이	피크면적	% 차이
Initial	10078652	-	10097585	-
10	10061332	0.17	10115026	0.17
20	10038841	0.40	10100467	0.03
24	10028198	0.50	10111610	0.14

결과에서 알 수 있듯이 검액은 24시간 동안은 상온 및 냉장조건에서 안정하나, 냉장조건에서 분석하는 것이 분석오차를 보다 감소시킬 수 있는 조건이다.

다음은 일반적으로 수용액 상태에서 안정성이 좋지 않다고 알려진 항생물질의 표준품 및 검액의 안정성을 상온 및 냉장조건에서 분석한 결과이다.

표 15. 상온보관에서 표준액 및 검액의 안정성

Time	표준액 (%Difference)		검액 (%Difference)	
	Initial	99.83	-	101.23
4h	99.65	0.18	101.14	0.09
8h	99.80	0.03	100.87	0.36
20h	98.70	1.13	100.26	0.96
24h	98.17	1.66	99.56	1.65

표 16. 냉장보관(2~4℃) 조건에서 표준액 및 검액의 안정성

Time	표준액 (%Difference)		검액 (%Difference)	
	Initial	99.83	-	101.23
4h	99.59	0.24	100.90	0.33
8h	99.75	0.08	100.89	0.33
20h	99.74	0.09	100.63	0.59
24h	98.64	1.19	100.01	1.21

상온 및 냉장조건에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 약 24시간 정도 경과되면, 분해되는 정도가 커지므로, 최대한 표준액 및 검액을 용시조제하여 분석하여야 한다.

## 2) 칼럼의 영향

다음은 칼럼을 변경 하였을 때의 영향성을 평가 한 사례이다.

표 17. 칼럼의 영향평가 실시 예

칼럼	입자크기 ( $\mu\text{m}$ )	칼럼길이 (cm)	분리도*	테일링계수**
칼럼 1 C18	5	25	3.84	1.89
칼럼 2 C18	5	25	1.91	1.71
칼럼 3 C18	5	25	4.90	1.95
칼럼 4 C18	5	25	6.04	1.78
칼럼 5 C18	5	25	7.26	1.42
칼럼 6 C18	5	25	6.08	1.20
칼럼 7 C18	5	25	3.66	1.03

\*주성분과 유연물질과의 분리능

\*\*주성분의 테일링 계수

## 3) 완충액, pH, 온도의 영향 평가

다음은 2)의 칼럼의 영향성 평가에서 선정된 칼럼 6에 대해 시험방법에 명시된 완충

액의 조성비율, 완충액의 pH, 분석온도를 변경하였을 때의 영향성을 평가한 것이다.

표 18. 완충액의 조성비율, 완충액의 pH, 분석온도의 영향평가 실시 예

분석변수	분석조건	분리능
pH	3.8	25
	4.3	26
	5.3	22
	6.3	-
온도	23℃	
	26℃	24
	30℃	26
	39℃	22
완충액의 조성비율	15%	20
	20%	26
	26%	28
	31%	25

## VI. 크로마토그래프법 조건의 조정

크로마토그래프법의 다양한 조작조건은 기본적으로 시스템적합성 기준에 변동이 없을 때 그 기준을 만족시키기 위해서 조정될 수 있으며 그에 대한 정보는 아래에 기술되어 있다. 시스템적합성시험은 정량시험이나 순도시험 등에서 시험방법의 타당성 입증에 요구되는 분리도를 보장하기 위해 포함되어야 한다. 그럼에도 불구하고, 크로마토그래프법 조건의 조정은 규정된 시스템적합성 요구조건에 맞추기 위해 필요할 수도 있다. 특히, 역상 액체크로마토그래프 법에서 다양한 파라미터를 부분적으로 조정하는 것이 항상 만족스러운 크로마토그래프 결과를 나타내는 것은 아니므로 이런 경우 원하는 크로마토그래프 양상을 나타내는 동종의 다른 칼럼으로 대체하는 것이 필요할 수 있다.

중요한 파라미터에 대한 조정은 시스템적합성을 보장하기 위하여 의약품의 시험방법에 명백하게 기술해야 한다. 또한 시스템의 성능에 누적된 영향을 줄 수 있는 다중 조정은 피해야 한다.

### 가. 박층크로마토그래프법 및 여지크로마토그래프법

- 이동상의 조성

다음의 조정 한도는 이동상 중 더 적은 조성을 가진 용매(minor solvent, 50 % 혹은 그 이하)에 한하여 적용한다. 이 용매의 양은 상대비로서  $\pm 30\%$ , 절대비로서  $\pm 2\%$  중 더 큰 범위까지 조정할 수 있으며, 용매의 모든 조정은 전체 이동상에 대한 절대비로서  $\pm 10\%$ 를 초과할 수 없다. 아래 표에서 보듯이 이동상의 10%에 해당하는 용매의 경우,  $\pm 30\%$  상대조정범위는 7 ~ 13 %이고,  $\pm 2\%$  절대조정범위는 8~12 % 이므로 상대조정범위까지 적용할 수 있다. 또 다른 예로 용매양이 이동상의 5%에 해당한다면, 상대비로서 3.5 ~ 6.5 % 및 절대비로서 3 ~ 7 % 에 해당하므로, 이 경우에는 절대조정범위까지 적용할 수 있다.

표 1. 이동상 용매비의 조정가능 범위 예시

이동상 조성비	이동상 비율 조정 허용 범위	용매의 허용범위
90:10	93:7~ 87:13	7~13 %(상대비)
95:5	97:3~ 93:7	3~7 %(절대비)
65:35	75:25~ 55:45	25~45 %(절대비) ※ 상대비로서 $\pm 10.5\%$ 이나 조정한도초과로 $\pm 10\%$ 까지 가능

- 이동상 중 수용액 성분의 pH : 의약품 규격에서 따로 규정된 것이 없다면  $\pm 0.2$  pH. 또는 중성물질이 시험되는 경우는  $\pm 1.0$  pH
- 이동상 중 포함된 완충액의 염 농도 :  $\pm 10\%$
- 적용부피 : 미세한 입자크기 판(2 ~ 10  $\mu\text{m}$ )을 사용한다면 규정된 부피의 10~20 %

나. 액체크로마토그래프법 (등용매 용리)

- 이동상의 조성 : 이동상 중 더 적은 조성을 가진 용매(minor solvent)의 양은 상대비로서  $\pm 30\%$ , 절대비로서  $\pm 2\%$  중 더 큰 범위까지 조정할 수 있으며(위의 예 참고), 용매의 모든 조정은 전체 이동상에 대한 절대비로서  $\pm 10\%$ 를 초과할 수 없다
- 이동상 중 수용액 성분의 pH : 각조에서 따로 규정된 것이 없다면,  $\pm 0.2$  pH, 중성물질이 시험될 때는  $\pm 1.0$  pH
- 이동상의 완충액 성분 중 염 농도 :  $\pm 10\%$
- 유량 :  $\pm 50\%$ . 칼럼 내경의 변화에 따른 증가는 허용된다(아래 식 참고)

- 검출기 파장 : 조정 불가.
- 고정상 : 치환기 조정 불가
  - 칼럼 길이  $\pm 70 \%$
  - 칼럼 내경  $\pm 25 \%$
  - 입자 크기 최대한 50 %까지 축소가능하고, 증가는 허용되지 않음.
- 온도 : 조작온도가 명시되어 있고 각조에서 따로 규정된 것이 없다면  $\pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$
- 주입량 : 측정하기 위해 제공된 검출과 피크의 반복성이 만족된다면 감소할 수 있다.

칼럼 내경이 변화된 경우 다음 식을 이용하여 유량을 조정한다.

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

$F_1$  = 각조에 제시된 유량, mL/min

$F_2$  = 조정할 유량, mL/min

$l_1$  = 각조에 제시된 칼럼의 길이, mm

$l_2$  = 사용한 칼럼의 길이, mm

$d_1$  = 각조에 제시된 칼럼의 내경, mm

$d_2$  = 사용한 칼럼의 내경, mm

#### 다. 액체크로마토그래프법 (기울기 용리)

기울기용리 크로마토그래프 조건의 조정 시 등용매 용리 시스템보다 더 주의하여야 한다.

- 이동상/기울기 용리의 조성 : 다음과 같은 경우에는 이동상 및 기울기 용리의 조성의 미세한 조정은 허용된다.
  - 시스템적합성 시험에 적합한 경우,
  - 제시된 유지시간의  $\pm 15 \%$ 에 피크가 유출되는 경우,
  - 이동상의 최종 조성이 기존 조성의 elution power 보다 약하지 않을 경우
- 이동상중 수용액 성분의 pH : 조정 불가
- 이동상의 완충액 성분 중 염 농도 : 조정 불가

- 검출기 파장 : 조정 불가
- 고정상 : 치환기 조정 불가
  - 칼럼 길이  $\pm 70 \%$
  - 칼럼 내경  $\pm 25 \%$
  - 입자 크기 조정 불가
- 온도 : 조작온도가 명시되어 있고 각조에서 따로 규정된 것이 없다면  $\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$
- 주입량 : 측정하기 위해 제공된 검출과 피크의 반복성이 만족된다면 감소할 수 있다.
- 유량 : 칼럼 내경의 변화에 따라 조정 가능

칼럼 내경이 변화된 경우 다음 식을 이용하여 유량을 조정한다.

$$F_2 = F_1 \frac{l_2 d_2^2}{l_1 d_1^2}$$

$F_1$  = 각조에 제시된 유량, mL/min

$F_2$  = 조정할 유량, mL/min

$l_1$  = 각조에 제시된 칼럼의 길이, mm

$l_2$  = 사용한 칼럼의 길이, mm

$d_1$  = 각조에 제시된 칼럼의 내경, mm

$d_2$  = 사용한 칼럼의 내경, mm

#### 라. 기체크로마토그래프법

- 고정상 : 칼럼 길이  $\pm 70 \%$ 
  - 칼럼 내경  $\pm 50 \%$
  - 입자크기 최대 50 %까지 축소가능하고 증가는 허용하지 않음.(충진칼럼)
  - 막두께 - 50 % ~ + 100 %
- 유량 :  $\pm 50 \%$
- 온도 :  $\pm 10 \%$
- 주입량 : 검출과 반복성이 만족된다면 조정 가능

## VII. 시험방법 밸리데이션에 관한 Q&A

Q1. 상용표준액을 조제하여 사용하는데 이틀에 한번 정도 쓰기 때문에 한번 사용하고 버리기에는 너무 많은 양을 버리는 것 같고, 매번 조제하는 것도 번거롭습니다. 상용표준액에 대하여 일정기간 유효기간을 설정해보려고 하는데, 자체적으로 밸리데이션을 실시해서 함량이 동일하다는 것을 증명하면 되나요?

A1. 상용표준액의 유효기간을 설정하기 위해서는 조제한 표준액의 안정성을 확인하여야 합니다. 이 때 안정성시험은 밸리데이션을 통하여 확립되어야 하고, 표준액을 조제한 후 일정시간이 경과하여도 함량(역가)이 동일하다는 것과 분해생성물 또는 불순물의 증가가 없다는 것을 입증하여 표준액의 조제 후 사용할 수 있는 기간을 정할 수 있습니다.

Q2. 의약품의 용출시험 밸리데이션을 수행할 때 직선성, 정확성, 정밀성을 확인하기 위해서는 모든 항목에서 매트릭스와 표준품을 혼합한 검액으로 실시하여야 하는지, 아니면 표준품을 희석한 검액만으로 실험을 할 수 있는지요?

A2. 일반적으로 의약품의 용출시험 밸리데이션에서 직선성 및 정밀성 시험은 검액과 같은 조건으로 조제한 표준액에 대하여 실시하며, 정확성 시험은 매트릭스를 포함한 표준액을 사용하여 회수율을 측정하는 것이 바람직합니다.

Q3. 미국약전에 수재된 품목에 대한 정량시험을 미국약전에 따라 시험하였으나(액체크로마토그래프법), 시험 결과 표준액 및 검액 조제에 사용된 희석액에서 검출된 피크가 주피크의 유지시간과 동일시간대에 검출되고 주피크의 이론단수가 매우 낮아 희석액을 이동상으로 변경하고자 합니다. 이 때 밸리데이션의 범위 및 방법은?

A3. 일반적으로 시험방법 밸리데이션의 파라미터(특이성, 정밀성, 정확성, 검출한계, 정량한계, 직선성, 범위 및 완전성)는 시험방법의 목적에 따라 선정하여 평가하고 있습니다. 또한, 밸리데이션한 시험방법을 변경하고자 하는 경우 재밸리데이션을 실시하여야 하며, 재밸리데이션 정도는 변경사항 및 정도에 달라질 수 있습니다. 위의 변경은 재밸리데이션을 실시하여야 하는 수준이며, 그 범위는 정확성(회수율 포함), 직선성 등 시험방법에 영향을 미치는 정도에 따라 달라질 수 있으므로 타당한 밸리데이션 파라미터를 선정하여 밸리데이션을 실시하여야 합니다.

Q4. 정량시험의 시험방법 밸리데이션 자료 작성 시 공시험액, 표준액, 검체의 크로마토그램을 첨부하여 특이성을 확인한 바 있습니다만, 크로마토그램만으로 특이성을 확인할 수 있는지요? 만약 분리도를 확인해야 한다면, 단일 피크만이 존재할 때는 분리도를 확인하는 것이 무의미한 것은 아닌가요? 분석대상물질이 다른 성분들로부터 유래하지 않는다는 것을 입증해야 하는 경우는 어떤 것들이 있으며, 모든 시험방법 밸리데이션 중 특이성 확인을 위해서는 꼭 이 자료를 첨가해야 하는지요?

만약 모든 경우에 첨가를 해야 한다면 다이오드어레이 또는 질량분석기 검출기 외에 다른 방법은 없나요?

A4. 정량시험을 크로마토그래프법으로 실시하는 경우 다이오드어레이(Diode array)나 질량분석기 등을 검출기로 이용한다면 크로마토그램만으로 특이성을 확인할 수 있습니다. 또한 단일 피크만 존재할 때도 분리도를 확인하는 것이 권장되며 이 경우 제제에 적당한 농도의 유연물질을 첨가하여 불순물이 공존하는 상황에서 분석대상물질의 특이성을 입증하시면 됩니다. 확인시험, 순도시험, 정량시험에서는 특이성이 반드시 입증되어야 합니다. 또한, 다이오드어레이(Diode array)나 질량분석기 검출기 이외에도 분석대상물질의 특이성을 확인할 수 있는 방법이면 가능합니다.

Q5. 원료 또는 제품의 확인시험에서 단순 반응시험(A검체에 B시약을 넣어 C색 또는 침전발생)에도 시험방법 밸리데이션을 실시해야 하나요?

A5. “의약품등 밸리데이션 실시에 관한 규정(식약청고시)” 제5조제1항에 원료 규격이 설정된 화학적 합성의약품 등에 대한 확인시험에 대하여 시험방법 밸리데이션을 실시토록 하고 있으며, 확인시험은 특이성을 검토합니다.

Q6. 신약의 시험법 밸리데이션 실시에 확인시험도 포함되나요?

A6. “의약품등 밸리데이션 실시에 관한 규정(식약청고시)” 제5조제1항제1호에 따라 확인시험은 시험방법 밸리데이션 실시항목 중의 하나이며, 확인시험의 목적에 맞는 밸리데이션 파라미터를 선정하여 평가하면 됩니다.

Q7. 공정서에 등재되어 있는 A성분 및 B성분을 이용하여 복합제 개발 중입니다. 이 복합제의 함량 및 유연물질 기준 및 시험방법은 동시분석이 아닌 각각을 따로 분석하는 방법으로 설정하려고 합니다. 즉 A와 B의 복합제 중 A성분의 함량시험은 공정서의 A 함량시험방법으로, B성분 함량시험은 공정서의 B의 함량시험방법에 따라 시험을 각각하게 되면 시험방법 밸리데이션을 생략해도 되나요?

A7. 개발하는 해당 복합제(완제의약품)가 일부 성분만 공정서에 실려 있는 경우에는 시험방법 밸리데이션을 일부 생략할 수 있으나, 함량시험의 경우 특이성과 정확성, 유연물질의 경우 특이성과 정확성, 정량한계 등은 반드시 확인하셔야 합니다.

Q8. 공정서에 등재된 원료약품의 검체주입량만 변경을 하려고 합니다. 이 경우 시험방법 밸리데이션을 실시해야 하나요?

A8. “의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 해설서” 크로마토그래프법 조건의 조정 중 나 및 다항의 액체크로마토그래프법나 기체크로마토그래프법에 해설사항에 따라 ‘검체량은 검출과 반복성이 만족된다면 줄일 수 있다’

로 되어 있으므로, 검출과 반복성을 확인하시기 바랍니다.

Q9. 허가증 및 공정서에서 HPLC 시험의 경우 칼럼의 상표와 규격이 정하여있다면 꼭 허가증 및 공정서에 등재되어 있는 상표와 규격의 칼럼을 사용해야 하나요?

A9. 칼럼의 상표가 달라도 칼럼의 규격, 재질, 파라미터 등 동등하다고 판단될 경우 밸리데이션을 반드시 수행할 필요가 없습니다. 다만, 변경 이전의 시스템적합성 기준을 만족하는 지 확인한 후 이를 만족하는 경우 다시 밸리데이션 하지 않아도 되며 시스템 적합성 기준을 만족하지 않는다면 시험법에 대한 밸리데이션이 필요합니다.

Q10. A성분 500mg/B성분 7.5mg 복합제의 밸리데이션이 완료되었다면, A성분 500mg/B성분 15mg 의 밸리데이션 자료는 생략할 수 있나요?

A10. “의약품등 밸리데이션 실시에 관한 규정(식약청고시)” 제5조제4항제4호에 따라 밸리데이션을 실시한 품목과 제형 및 검액 농도 등을 포함한 시험방법이 동일하고, 원료약품 분량에 비례적인 유사성이 인정될 경우 시험방법 밸리데이션을 생략할 수 있습니다.

Q11. 시험방법 밸리데이션을 진행하려고 하는데 이 중 한 가지 제품의 시험방법 밸리데이션을 실시함으로써 다른 두 제품의 시험방법 밸리데이션을 대신할 수 있나요?

- 주성분의 종류와 양이 같으며 시험방법도 동일한 산제, 캡슐제, 정제
- 제형이 다르기 때문에 첨가제의 종류는 다름

A11. 이미 허가받은 의약품과 원료약품의 종류, 제형, 시험방법은 동일하나 주성분의 분량만 다른 경우에 한하여, 검액 및 표준액의 농도를 포함한 모든 시험방법이 동일할 때, 시험방법 밸리데이션 자료를 면제할 수 있습니다. 원료약품의 종류와 제형이 상이한 경우에는 전처리 과정과 매트릭스 등이 달라지기 때문에 제품별로 시험방법 각각을 밸리데이션 하여야 합니다.

Q12. 유연물질 시험법 밸리데이션을 진행하고 있습니다. 미지의 유연물질에 대해서도 밸리데이션을 실시하여야 하는 것이지요?

A12. 미지의 유연물질에 대해서도 시험방법 밸리데이션을 수행하는 것이 바람직합니다. 표준물질을 확보한 유연물질은 해당 표준물질을 이용해 시험방법 밸리데이션을 수행하고, 미지의 유연물질은 주성분 표준물질로 시험방법 밸리데이션을 실시하시기 바랍니다.

Q13. 함량시험 밸리데이션을 진행하는데 있어 함량시험, 제제균일성시험, 용출시험의 분석법이 동일하다면 세 항목 중 한 가지 항목만 밸리데이션 실시 가능한가요?

A13. 함량시험과 동일한 시험법을 사용할 경우 밸리데이션 면제가 가능합니다. 다만, 제제균일성시험은 함량시험과 비교할 때 검액의 농도가 다를 수 있고, 용출시험은 함량시험과 비교할 때 희석액 및 밸리데이션 범위가 다를 수 있으므로, 이에 대한 밸리데이션이 필요합니다.

시험방법의 밸리데이션의 면제는 동일한 시험방법을 사용하는 경우에만 가능합니다. 여기서 말하는 동일한 시험방법이란, 시험방법에 사용하는 검액 및 표준액의 농도, 검액의 조제방법, 분석조건, 용출액 및 희석액의 조제법 등 모든 방법 및 조건이 일치하는 것을 말하며, 일부가 달라진다면 이에 대한 밸리데이션이 필요합니다.

Q14. 시험방법에 따라 평가해야 할 밸리데이션 파라미터 중에서 시스템적합성은 없는데 HPLC 분석법에서는 해야 하는 파라미터인가요? 해야 한다면 시스템적합성 시험방법은 표준품이나 시험용액 6회 주입하는 방법으로 해도 되나요?

A14. 고속액체크로마토그래프법 등 정확성과 정밀성 확보가 필수적인 시험항목에 대하여는 기본적으로 크로마토그래프시스템의 성능을 확보하여야 함을 알려드립니다. 일반적으로 시스템적합성(정밀성과 주입반복성)을 확인함에 있어 6회 이상 반복 주입에 대해 1% 이하의 상대표준편차를 권장하며, 필요에 따라 분리도 등 시험항목의 성격에 적합한 시스템적합성을 실시하시기 바랍니다.

Q15. 제제의 시험법이 자사기준인데 공정서의 일반시험법에 따라 시험하도록 되어 있을 경우(예, 확인시험 : 나트륨염의 정성반응 등)에는 시험방법 밸리데이션 생략이 가능한가요?

A15. 예로 든 확인시험 중 나트륨염의 정성반응의 경우에는 별도의 밸리데이션이 필요하지 않지만, 그 외 시험항목에 대하여는 특이성 등의 밸리데이션이 요구될 수 있습니다.

Q16. 순도시험에서 정량한계 및 검출한계를 표준편차와 기울기로 구한 경우, 구해진 농도로 재확인할 필요는 없는지요?

A16. 순도시험 중 정량시험에서 정량한계 및 검출한계를 구할 경우 시험방법 밸리데이션 가이드라인에 따라 검출한계 또는 정량한계 농도 또는 그 부근 농도의 검체에 대한 분석을 실시하여 제출값의 타당성을 입증해야 합니다.

Q17. 직선성에서 y절편에 대한 신뢰구간 설정이 필요한지? 꼭 0점을 지나야 하나요?

A17. 신뢰구간을 설정하여 확인하는 것이 타당할 것으로 사료되며, 직선식이 꼭 0점을 지나야 되는 것은 아닙니다.

## VIII. 참고문헌

1. 의약품 등 밸리데이션 실시에 관한 규정(식약처고시 제2014-181호, 2014.11.10.)
2. 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인(식품의약품안전처)
3. Q2 : Validation of analytical procedures : Text and methodology(ICH, 2005.11)
4. Guidance for industry - Analytical procedures and method validation : chemistry, manufacturing and controls documentation(draft guidance) (FDA CDER & CBER, 2000.8)
5. Reviewer Guidance - Validation of Chromatographic Methods (FDA CDER, 1994)
6. 대한민국약전 제11개정(식품의약품안전처, 2014) 중 일반시험법
7. 유럽약전 7.8 - General chapters, methods analysis, physical and physicochemical methods, chromatographic separation techniques
8. Statistics and Chemometrics for analytical Chemistry. James N. Miller, Jane C. Miller. England. Pearson Education Limited, 2000.
9. PHARMEUROPA Vol. 11, No. 3 (1999.9.)

## 제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	C0-2012-2-005	2012.9.	제정
2	C0-2015-2-017	2015.12.	해설서 명칭변경, 법적효력 문구 통일, 양식표준화, 연락처 현행화

## “의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서”

---

발 행 일 2015월 11 월

발 행 인 손 여 원

편 집 위 원 장 이 선 희

편 집 위 원 (의약품심사부 의약품규격과)

김은정, 양성준, 이경신, 김선미, 윤나영, 강나루, 유지혜,  
서재욱, 김지예, 지정은, 정혜선

발 행 처 식품의약품안전평가원 의약품심사부 의약품규격과

---