creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

대한민국약전과 대한민국약전외 의약품 기준 수재 항생물질의약품 중 azithromycin 및 minocycline hydrochloride의 정량법 개선

LC/UV-based analytical method optimization of azithromycin and minocycline hydrochloride in KP/KPC

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
조 상 우

대한민국약전과 대한민국약전외 의약품 기준 수재 항생물질의약품 중 azithromycin 및 minocycline hydrochloride의 정량법 개선

LC/UV-based analytical method optimization of azithromycin and minocycline hydrochloride in KP/KPC

지도교수 권성원

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2013년 12월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

조 상 우

조상우의 약학석사학위논문을 인준함

2013년 12월

위 원 장	**박 정 일**	(인)
부 위 원 장	**송 준 명**	(인)
위 원	**권 성 원**	(인)

국 문 초 록

2011년 세계 항생제 시장 규모는 약 421억 달러 규모로 연평균 3.5%대의 시장성장률을 보이고 있다. 지역별로는 아시아 지역 항생제 시장이 130억 달러(30.9%)로 가장 큰 비중을 차지하고 있으며, 유럽(112억 달러, 26.6%)과 북미(100억 달러, 23.7%) 지역 시장 비중이 높은 것으로 나타났다. 그러나 현행 의약품 품질관리에 사용되는 대한약전 등 식약처에서 고시한 시험법은 이러한 비용이 충분히 고려되어 있지 않으며, 유사한 의약품의 시험방법도 각기 다른 방식으로 기술되어있다. 이에 2007년,「항생물질의약품기준」 수재 품목 중 우선 85품목을 대한약전 제9개정에 수재하는 것을 시작으로 현재 추가적으로 다 빈도 품목 등을 선별하여 「대한약전(KP)」 및 「대한약전외의약품등기준(KPC)」에 수재함으로써 기준규격통합을 시도하는 과정에 있다.

특히 고시된 항생물질 중 다 빈도로 사용되고 있는 Tetracycline 및 Macrolide계 제제의 경우 유사한 의약품이 다수 포함되었으나 각기 다른 시험법을 사용하고 있다. 대부분의 항목이 원통평판법 또는 액체크로마토그래프법을 정량법으로 하고 있으나 세부적인 내용에서 표준화가 되지 않았기 때문에 공정서의 항생물질 시험법을 체계화하여 유사한 의약품의 시험방법을 표준화함으로서 품질관리의 편의성을 향상 시키고 효율을 높이고자 하였다.

본 연구에서는 의약품공정서인 「대한민국약전」과「대한민국약전외의약품기준」수재 항생물질 의약품의 시험법 의약품 품질관리 대상 macrolide계 20종과 tetracycline계 6종 중 다 빈도 유통품목인 Azithromycin과 Minocycline hydrochloride를 선별하여 시험법을 개정하기로 하였다. LC 컬럼은 어느 실험실에서도 일반적으로 사용할 수 있는 대중적인

Octadecylsilica column (phenomenex Luna C18, 150 x 4.6 mm, 5μm)을 사용하였고, 반응표면분석(Response surface methodology)을 통하여 최적화를 진행하였다. 그리고 확립된 분석법에 대해 식약처에서 배포한 밸리데이션 가이드라인을 수행하였다.

본 연구를 통해 액체크로마토그래프법 등으로 정량법을 표준화할 경우 한 시스템을 통하여 유사한 의약품을 모두 관리할 수 있어 편이성과 효율을 높일 수 있다는 점을 확인할 수 있다.

따라서 본 연구는 국가적 차원에서 표준화된 의약품 품질관리법을 확립하기 위한 시작점이 되었으며 이에 대한 일환으로 의약품 공정서에 수재된 시험법 중 Tetracycline 및 Macrolide계 시험법 표준화 연구뿐만이 아닌 그 외의 다 빈도 사용 품목에서 효율을 최대화하는 시험법 개정 가능성에 대한 기반을 마련하였다.

주요어: Azithromycin, Minocycline hydrochloride, HPLC(High-Performance Liquid Chromatography), UV detector(Ultraviolet detector), Response surface methodology, Method validation

학번: 2012-21621

목 차

국문초록 ····· i
목 차 ····· iii
List of Figures ····· iv
List of Tables ····· vi

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험 ····· 6
1. 시약 및 기기 ····· 6
1-1. 표준품, 시약 및 용매 ····· 6
1-2. 실험 기구 ····· 7
1-3. 분석기기 ····· 7
2. 실험방법 ····· 9
2-1. HPLC/UV 분석조건 최적화 ····· 9
2-2. 시료 전처리 protocol 설정 ····· 12
2-3. 검량선 작성 ····· 14
2-4. 분석법 밸리데이션 ····· 15

Ⅲ. 결과 ····· 17
1. LC/UV 분석조건 최적화 ····· 17
1-1. Azithromycin ····· 17
1-2. Minocycline hydrochloride ····· 26
1-3. 분석조건 최적화 결과 ····· 36
2. 분석법 밸리데이션 ····· 40
2-1. Azithromycin ····· 40
2-2. Minocycline hydrochloride ····· 45

Ⅳ. 결론 ····· 50

Ⅴ. 참고문헌 ····· 51

Abstract ····· 53

List of Figures

Fig 1. 「항생물질의약품기준」 통폐합 진행 ····· 2

Fig 2. 세계 항생제 시장 현황 ····· 3

Fig 3. 지역별 항생제 시장 현황(2011년) ····· 3

Fig 4. Timeline of antimicrobial therapy ····· 4

Fig 5. Azithromycin dihydrate의 구조 ····· 17

Fig 6. 기존 약전에서의 Azithromycin 및 Internal standard의 HPLC-UV 크로마토그램 ····· 18

Fig 7. Phosphate buffer : MeOH (20 : 80, v/v)조건에서 Azithromycin 검출 HPLC-UV 크로마토그래피 ····· 23

Fig 8. 190 ~800 nm에서의 감도 차이 ····· 23

Fig 9. 버퍼의 농도, pH, 컬럼 온도의 변수에 따른 반응표면분석 ··· 24~25

Fig 10. 새롭게 확립된 조건에서의 Azithromycin 및 내부표준액 ····· 25

Fig 11. Minocycline hydrochloride의 구조 ····· 26

Fig 12. 표준품, 캡슐, 연고 조건에서의 Minocycline hydrochloride HPLC-UV 크로마토그램 A)표준품, B)캡슐, C) 치과용 연고 ····· 27

Fig 13. 유량 1.0 mL/min와 유량 1.5 mL/min에서의 머무름 시간 차이 ····· 28

Fig 14. 280 nm와 344 nm에서의 미노사이클린 연고의 감도차이 ····· 33

Fig 15. 암모늄 옥살레이트염의 농도, 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨염의 농도, 컬럼 온도의 변수에 따른 반응표면분석 ····· 34

Fig 16. 새롭게 확립된 조건에서의 Minocycline hydrochloride 및 시스템 성능 시험 ····· 35

Fig 17. Azithromycin의 검량선 ····· 40

Fig 18. 개선된 분석법에서 내부표준액 및 Azithromycin ····· 43

Fig 19. Minocycline hydrochloride의 검량선 ····· 45

List of Tables

Table 1. Azithromycin 컬럼 최적화 ····· 19

Table 2. Azithromycin 이동상 pH 최적화 ····· 19~20

Table 3. Azithromycin 이동상의 buffer strength 최적화 ····· 21

Table 4. Azithromycin 이동상 내 유기용매 최적화 ····· 22

Table 5. Azithromycin 컬럼 온도 최적화 ····· 22

Table 6. Minocycline hydrochloride 이동상 pH 최적화 ····· 28

Table 7. 이동상 내 Ammonium oxalate 농도 최적화 ····· 29

Table 8. 이동상 내 EDTA dihydrogen disodium salt 농도 최적화 ····· 30

Table 9. 이동상 내 N,N-Dimethylformamide 비율 최적화 ····· 31

Table 10. 이동상 내 추가된 Organic solvent 최적화 ····· 32

Table 11. 최적화된 Azithromycin 분석 조건 ····· 36

Table 12. 최적회된 Azithromycin 표준품 및 제제의 Chromatogram ···· 37

Table 13. 최적화된 Minocycline hydrochloride 분석 조건 ····· 38

Table 14. 최적회된 Minocycline hydrochloride 표준품 및 제제의 Chromatogram ····· 39

Table 15. Azithromycin의 기준 농도 ····· 40

Table 16. Azithromycin의 직선식 ····· 40

Table 17. Azithromycin의 정밀성 ····· 41

Table 18. Azithromycin 원료의 회수율 ····· 41

Table 19. 시판품 Azithromycin 제제 시판품 함량 모니터링 ····· 42

Table 20. Azithromycin 반복성 ····· 42

Table 21. Azithromycin 정의 회수율 ····· 44

Table 22. Azithromycin 시럽의 회수율 ····· 44

Table 23. Minocycline hydrochloride의 기준 농도 ····· 45

Table 24. Minocycline hydrochloride의 직선식 ····· 45

Table 25. Minocycline hydrochloride의 정밀성 ····· 46

Table 26. Minocycline hydrochloride의 회수율 ····· 47

Table 27. 시판품 Minocycline hydrochloride 제제 시판품 함량 모니터링 ····· 47

Table 28. Minocycline hydrochloride의 반복성 ····· 48

Table 29. Minocycline hydrochloride 캡슐의 회수율 ····· 48

Table 30. Minocycline hydrochloride 연고의 회수율 ····· 49

Ⅰ. 서론

현재 국내 항생물질 시험법은 「항생물질의약품기준」의 수재 품목을 선별, 개선하여 의약품공정서인 「대한민국약전」과「대한민국약전외의약품 기준」으로 통합하는 과정에 있다. 항생물질의약품은 1954년 약사법 제정당시 '지정의약품'으로 국가검정을 받도록 한 것을 시작으로 1965년부터는 명칭이 '국가검정의약품'으로 변경되어 관리되다가 1994년 1월 7일(1994년 7월 8일 시행) 국가검정의약품에서 삭제되었음에도 불구하고 항생물질의약품을 허가받고자 하는 경우에는 그 제제와 원료의 품질관리 항목, 판정기준과 시험방법 등에 관한 '기준 및 시험방법'이 「항생물질의약품기준」 고시에 등재된 후에야 허가하도록 되어 있었다. 하지만 더 이상 국가검정 대상이 아닌 의약품의 규격을 반드시 별도고시로 국가에서 규격을 모두 관리할 필요가 없어졌으므로 2008년 2월 29일부터 허가 전 「항생물질의약품기준」고시에 반드시 등재해야 하는 허가 방식을 합리적으로 개선하여 다른 의약품과 마찬가지로 외국약전 등 공정서와 제조 또는 수입회사의 자사 규격을 인정하게 되었다. 이에 2007년에「항생물질의약품기준」 수재 품목 중 우선 85품목을 대한약전 제9개정에 수재하는 것을 시작으로 현재 추가적으로 다빈도 품목 등을 선별하여 「대한약전(KP)」 및 「대한약전외의약품등기준(KPC)」에 수재함으로써 기준규격 통합을 시도하는 과정에 있다.

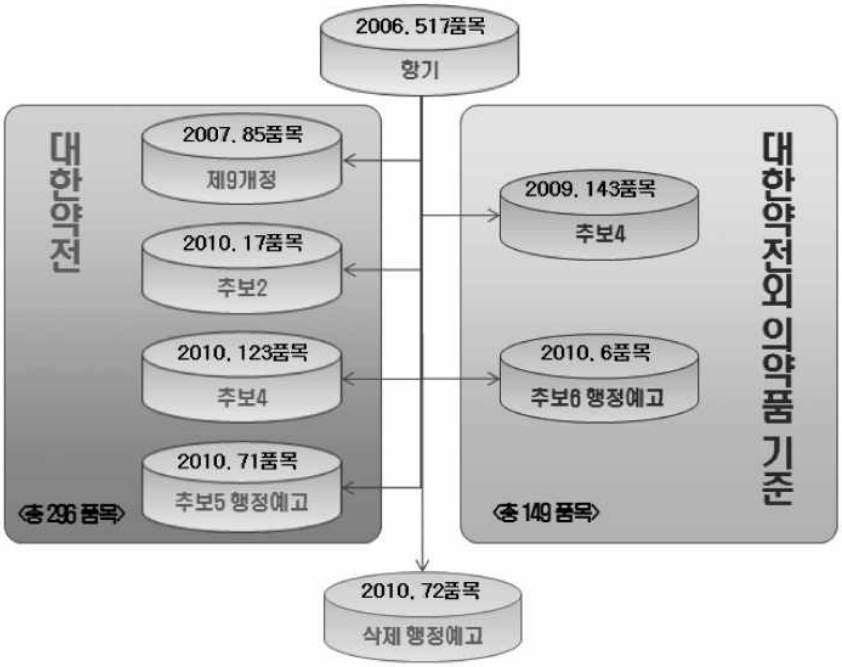
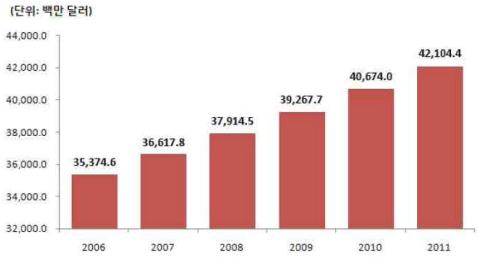


Fig 1. 「항생물질의약품기준」 통폐합 진행
(참고 「항생물질의약품기준」 고시 통합방안, FDC 법제연구)

그림에서 보는 바와 같이 「항생물질의약품기준」수재 517품목(2006년 기준) 중 「대한약전」9개정(2007)에 85종이 포함되었고 211종이 추보로 고시되었음. 또한 「대한민국약전외의약품기준」에 149품목이 포함되었으며 나머지 72품목은 삭제된 것을 알 수 있다(fig 1).

세계 항생제 시장 규모를 살펴본다면 연평균 3.5%대의 시장성장률을 보이고 있으며, 아시아 지역 항생제 시장은 130억 달러(30.9%)로 가장 큰 비중을 차지하고 있는 것을 볼 수 있다(fig 2, fig 3).

연도	시장규모 (백만 달러)
2006	35,374.6
2007	36,617.8
2008	37,914.5
2009	39,267.7
2010	40,674.0
2011	42,104.4
연평균 시장성장률	3.5%

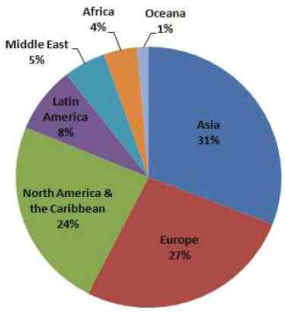


▶ 자료: Icon Group International, Inc.(2010b)

Fig 2. 세계 항생제 시장 현황
(참고;농생명소재산업 국내외 시장 현황 및 연구개발 동향, 농림수산식품기술기획평가원)

(단위: 백만 달러, %)

구분	시장규모	비중
아시아	13,002	30.9
유럽	11,215	26.6
북미 및 캐리비안	9,982	23.7
라틴 아메리카	3,450	8.2
중동	2,159	5.1
아프리카	1,708	4.1
오세아니아	587	1.4
전체 합계	42,104	100.0



▶ 자료: Icon Group International, Inc.(2010b)

Fig 3. 지역별 항생제 시장 현황(2011년)
(참고;농생명소재산업 국내외 시장 현황 및 연구개발 동향, 농림수산식품기술기획평가원)

그러나 이러한 시장규모에 비하여 항생제 또는 그 원료를 관리하는 현행 공정서의 시험법은 표준화, 체계화되어있지 않은 것을 알 수 있다. 따라서 공정서의 항생물질 시험법을 체계회하고 효율을 높일 필요가 있으며, 특히 유사한 의약품의 시험방법을 표준화하여 품질관리의 편의성을 향상하고자 하였다.

Table 1. Timeline[a] of Antimicrobial Therapy

Year[b]	Antibiotics	Year	Antibiotics	Year	Antibiotics	Year	Antibiotics
1910	Salvarsan	1962	Cloxacillin	1980	Piperacillin	1988	Teicoplanin
1912	Neosalvarsan	1962	Fusidic acid	1981	Amoxicillin/clavulanic acid	1989	Cefpodoxime
1935	Prontosil	1963	Fusafungine	1981	Cefperazone	1989	Enrofloxacin
1936	Sulfanilamide	1963	Lymecycline	1981	Cefotiam	1989	Lomefloxacin
1938	Sulfapyridine	1964	Gentamicin	1981	Latamoxef	1989	Moxifloxacin
1939	Sulfacetamide	1966	Doxacycline	1981	Netilmicin	1990	Arbekacin
1940	Sulfamethizole	1967	Carbenicillin	1982	Apalcillin	1990	Cefozidime
1942	Benzylpenicillin	1967	Rifampicin	1982	Ceftriaxone	1990	Clarithromycin
1942	Gramicidin S	1968	Clindamycin	1982	Micronomicin	1991	Cefdinir
1942	Sulfadimidine	1970	Cefalexin	1983	Cefmenoxime	1992	Cefetamet
1943	Sulfamerazine	1971	Cefazolin	1983	Ceftazidime	1992	Cefpirome
1944	Streptomycin	1971	Pivampicillin	1983	Ceftiroxime	1992	Cefprozil
1947	Sulfadiazine	1971	Tinidazole	1983	Norfloxacin	1992	Ceftibufen
1948	Chlortetracycline	1972	Amoxicillin	1984	Cefonicid	1992	Floroxacin
1949	Chloramphenicol	1972	Cefradine	1984	Cefotetan	1992	Loracarbef
1949	Neomycin	1972	Minocycline	1984	Temocillin	1992	Piperacillin/tazobactam
1950	Oxytetracycline	1972	Pristinamycin	1985	Cefpiramide	1992	Rufloxacin
1950	Penicillin G procaine	1973	Fosfomycin	1985	Imipenem/cilastatin	1993	Brodimoprim
1952	Erythromycin	1974	Talampicillin	1985	Ofloxacin	1993	Dirithromycin
1954	Benzathine penicillin	1975	Tobramycin	1986	Mupirocin	1993	Levofloxacin
1955	Spiramycin	1975	Bacampicillin	1986	Aztreonam	1993	Nadifloxacin
1955	Tetracycline	1975	Ticarcillin	1986	Cefoperazone/sulbactam	1993	Panipenem/betamipron
1955	Thiamphenicol	1976	Amikacin	1986	Ticarcillin/clavulanic acid	1993	Sparfloxacin
1955	Vancomycin	1977	Azlocillin	1987	Ampicillin/sulbactam	1994	Cefepime
1956	Phenoxymethylpenicillin	1977	Cefadroxil	1987	Cefixime	1999	Quinupristin/dalfopristin
1958	Colistin	1977	Cefamandole	1987	Roxithromycin	2000	Linezolid
1958	Demeclocycline	1977	Cefoxitin	1987	Sultamicillin	2001	Telithromycin
1959	Virginiamycin	1977	Cefuroxime	1987	Ciprofloxacin	2003	Daptomycin
1960	Methicillin	1977	Mezlocillin	1987	Rifaximin	2005	Tigecycline
1960	Metronidazole	1977	Pivmecillinam	1988	Azithromycin	2005	Doripenem
1961	Ampicillin	1979	Cefaclor	1988	Flomoxef	2009	Telavancin
1961	Spectinomycin	1980	Cefmetazole	1988	Isepamycin		
1961	Sulfamethoxazole	1980	Cefotaxime	1988	Midecamycin		
1961	Trimethoprim	1980	Cefsulodin	1988	Rifapentine		

[a]Data from [http://en.wikipedia.org/wiki/Timeline_of_antibiotics]
[b]The year shown indicates when a given drug was released onto the pharmaceutical market. This is not a timeline of the development of the antibiotics themselves.

Fig 4. Timeline of antimicrobial therapy

주요 항생제를 시중에 유통된 시점을 기준으로 정리한 결과, 현재도 위와 같은 수많은 제제들이 생산, 유통되고 있으며 시험법에 의하여 관리 받고 있다(Fig 4).

하지만 대부분의 항목이 원통평판법 또는 액체크로마토그래프법을 정량법으로 하고 있으나 세부적인 내용에서 표준화가 되지 않았다.

본 연구에서는 기존의 분석법에서 막대한 재원, 장기간의 시간소비, 화학물질의 과도한 사용과 유해물질의 배출을 막고, 유사한 의약품간의 시험법을 표준화하여 효율을 높이고자 하였다. 이번 실험를 통해 액체크로마토그래프법으로 정량법을 표준화하여 한 시스템을 통해 유사한 의약품을 모두 관리할 수 있기 때문에 편의성과 효율을 높일 수 있는 장점이 있다. 특히 고시된 항생물질 중 다빈도로 사용되

고 있는 Tetracycline 및 Macrolide계 제제 중 azithromycin 및 mionocycline hydrochloride의 경우 제제간 각기 다른 시험법을 사용하고 있기에 항생제의 시험법을 표준화 하는 연구를 통하여 공정시험 적용 시 국제적, 지역적 차원에서 효율을 높이고 비용을 낮추는 부분에서 크게 효율이 증가할 것으로 예측할 수 있다.

본 연구에서는 약전의 취지에 걸맞도록 보편성과 대중성, 효율성에 중심을 두었으며 모든 실험실에서 접근하기 좋은 보편적인 방법을 취하기 위한 방법을 모색하였다. 모든 실험실에서 보편적으로 사용하고 내구성이 좋은 Octadecylsilica 컬럼을 사용하여 접근성을 향상시켰으며 컬럼과 기계에 무리가 가지 않는 범위 내의 조건에서 최적의 분석법을 찾기 위해 노력하였다. 또한 기존의 약전의 분석법의 틀에서 크게 벗어나지 않는 범위 내에서 효율성을 증가시키는 방법을 모색하였다. 마지막으로 Response Surface Methodology를 이용한 최적화 단계를 거침으로서 최적의 분석법을 찾았으며, 제제 간 분석법을 통일하였다. Response surface methodology는 독립변수로 채택된 것들의 결과 값에서 실험이 최적화 되는지를 예측하는 것으로서 가장 효과적인 실험법에 대한 고찰이 가능하다. 따라서 Response surface methodology를 통한 결과를 분석함으로서 적합한 반응표면의 결과를 통계적으로 규명이 가능하다는 장점이 있다.

최적화된 분석법으로 azithromycin 및 minocycline hydrochloride를 정량하기 위하여 각각의 USP 스탠다드 및 원료, 3종류 다른 회사제품의 정, 건조시럽, 1종류 3가지 제조번호의 캡슐, 1종류의 연고를 선정하여 분석법을 확립하였고, 정량을 위해 azithromycin의 경우에만 1종의 내부 표준품을 사용하였으며, 확립한 분석법에 대해 식약처에서 배포한 밸리데이션 가이드라인을 기준으로 밸리데이션을 수행하였다.

Ⅱ. 실험

1. 시약 및 기기

1-1. 표준품, 시약 및 용매

Azithromycin 및 Minocycline hydrochloride의 분석법 확립을 위해 USP 표준품과 1종의 내부 표준품을 사용하였다. Azithromycin 및 Minocycline hydrochloride는 United state pharmacopeial convention (Maryland, USA)에서 구입하였고, 내부표준액으로 쓰인 4,4'-Bis(diethylamino)benzophenone은 Sigma aldrich 에서 구입하였다. Azithromycin 시판품으로 사용된 정의 경우, 일동제약의 아지탑스 정 (Seoul, Korea), 한국화이자제약의 지스로맥스 정 (Seoul, Korea), 코오롱제약의 아지로신 정 (Gyeonggi, Korea)을 사용하였고, 시럽의 경우 일동제약의 아지탑스 건조시럽 (Seoul, Korea), 한국화이자제약의 지스로맥스 건조시럽 (Seoul, Korea), 안국약품의 아스맥신 건조시럽 (Gyeonggi, Korea)을 사용하였다. Minocycline hydrochloride 시판품으로 사용된 캡슐의 경우, 3종류의 각기 다른 제조번호의 SK 케미칼 미노씬 캡슐 (Gyeonggi, Korea)을 사용하였고, 연고의 경우 1종류의 미노클린 치과용 연고 (Seoul, Korea)를 사용하였다.

기타 모든 시약은 특급 또는 분석용을 사용하였다.

이동상 및 시료, 표준품 전처리에 사용한 용매 및 시약으로 다음을 사용하였다.

- Acetonitrile (DUKSAN, Korea)
- Water (DUKSAN, Korea)
- Methanol (DUKSAN, Korea)
- Potassium phosphate dibasic (Sigma aldrich, USA)

- ammonium oxalate (Sigma aldrich, USA)
- N,N-Dimethylformamide (Sigma aldrich, USA)
- EDTA dihydrogen disodium salt (Sigma aldrich, USA)
- tetra-butylammonium hydroxide (Sigma aldrich, USA)
- Potassium phosphate monobasic (Samchun, Korea)

1-2. 실험 기구

- Centrifuge tube (2mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Conical tube (15mL, 50mL SPL Life Sciences Co. Ltd)
- Adjust pipette (0.5～10μL, 20～200μL, 100～1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Pipette tips (0.5～10μL, 20～200μL, 100～1000μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Vortex Mixer (Vortex Genie 2)
- Ultrasonicator (Sonics & Material, Inc., USA)
- Speedvac (Micro-CENVAC NB-501CIR, N-BIOTEK)
- Volumetric flask (50, 100, 1000 mL, Schott Duran, Germany)

1-3. 분석기기

- Waters PDA 996 (Waters, USA)
- Waters UV detector 486 (Waters, USA)
- Alliance 2695 HPLC (Waters, USA)
- Columns
  - Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 150 mm, 5 μm)

- Phenomenex Luna C18 (4.6 mm ∗ 250 mm, 5 μm)
- Phenomenex Gemini C18 (4.6 mm ∗ 250 mm, 5 μm)
- Fortis C18 (4.6 mm ∗ 150 mm, 5 μm)
- Waters Shodex C18 PVA (4.6 mm ∗ 250 mm , 4 μm)

2. 실험방법

2-1. HPLC/UV 분석조건 최적화

본 연구에서는 Azithromycin 및 Minocycline hydrochloride 분석을 위한 분석기기로 HPLC는 Waters의 Alliance 2695 HPLC를, UV detector는 Waters의 996 PDA 및 486 UV detector를 사용하였다. 분석 대상은 Azithromycin 및 Minocycline hydrochloride의 표준품 및 제제들이었고, 약전의 분석법과 비교했을 때 이들을 적당한 머무름 시간 내에서 보다 더 최적의 감도로 분석하기 위해 분석법 최적화를 진행하였다.

HPLC에서 최적화를 진행한 변수는 컬럼, 컬럼 온도, 이동상에 첨가하는 buffer strength, 그리고 이동상내 유기용매의 종류 및 유기용매의 비율, 샘플을 녹인 용매, 검출 파장이다.

Azithromycin의 경우 기존의 약전 조건이었던 ODS PVA컬럼의 경우 대중성이 너무 떨어지고, 약전에 기술하기엔 시중에서 구하기가 힘든 컬럼으로서, 보편성과 대중성을 위하여 C18 컬럼인 Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 150 mm, 5 μm), Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 250 mm, 5 μm), Phenomenex Gemini C18 (4.6 mm * 250 mm, 5 μm), Fortis C18 (4.6 mm * 150 mm, 5 µm) 으로 실험하였다. 컬럼 온도는 기존 약전의 조건이었던 40℃를 포함한 30℃부터 50℃를 설정하여 실험하였다. 이동상에 첨가하는 buffer는 기존의 약전 조건이었던 phosphate buffer를 선택하였고, 기존의 약전 조건이었던 pH 11의 경우 분석조건에 무리를 준다고 판단되어 이동상의 pH를 4.5부터 11까지 살펴보았고, 최적의 조건을 잡기 위하여 pH 6.0 ~ 8.0 범위를 잡았다. buffer strength의 경우 10 mM 부터 50

mM 까지 시험하였다. Design expert ver8.의 프로그램을 사용하여 반응표면분석(Response surface methodology)를 진행하였으며, peak shape이나 peak intensity에서 가장 좋은 결과를 보여주는 것을 선택하였다. 또한 첨가한 유기용매의 경우 Acetonitrile 및 MeOH를 사용하여 결과를 살펴보았으며, 비율을 바꿔 첨가하며 최적의 머무름 시간을 결정하였다. 샘플 용매의 조건은 기존 약전 내용의 경우와 같이 이동상과 흡사한 조건을 선택하였으며, 검출 파장의 경우 표준품, 정의 분석조건인 215 nm와 시럽의 분석 조건인 210 nm에서 큰 차이를 보이지 않았기에 표준품의 분석조건인 215 nm로 통일하였다.

Minocycline hydrochloride의 경우 기존 약전 조건이었던 150mm의 C18 컬럼이 보편성과 대중성을 잘 반영하고 있기에 변동사항 없이 Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 150 mm, 5 μm)으로 진행하였다. 컬럼 온도의 경우 기존 약전의 조건이었던 25℃를 포함한 20℃부터 40℃ 중 하나를 선택하였다. 이동상에 첨가하는 buffer의 경우 기존 약전의 조건에서 너무 늦은 머무름 시간이 검출되었기에 최적의 조건을 찾아 조건 변경이 이루어졌다. 기존 약전의 조건의 결과인 약 30분에 걸친 머무름 시간을 앞당기기 위한 방법으로 유기용매의 첨가를 시도하였으나 과포화상태의 이동상에서 염이 석출되는 현상이 발생하여 머무름 시간을 앞당길 수 있는 방법이 전무하였다. 따라서 결과적으로 이동상 내에 포함되어있는 염의 농도를 낮추고 유기용매를 추가함으로서 시스템의 무리를 줄이고, 분석시간을 줄여 효율성을 높이고자 하였다.

문헌을 참고로 했을 시에 암모늄 옥살레이트의 경우 침전된 미노사이클린의 복합체를 재생시키는데 사용되며, 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨시액은 이동상에서 금속이온을 잡음으로서 테트라사이클린 계열과 복합체를 형성하는 것을 막아주고, N,N-디메틸포

름아미드의 경우 약한 염기성 물질을 빠르게 빠져나오게 하며 피크의 끌림을 방지해준다고 알려져 있다. 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨시액의 경우 USP가 0.01 M을 사용하는데 반하여 대한민국약전에서는 0.1 M을 사용하는 것으로 기술되어있기에, 최소 2배 희석된 농도인 0.05 M부터 최대 10배 희석한 0.01 M까지 범위를 잡아서 실험하였으며, 암모늄 옥살레이트의 경우도 마찬가지로 0.02 M부터 0.1M까지의 범위를 시험하였다. 특히 N,N-디메틸포름아미드의 경우 전체 용량의 25%를 초과할 시엔 침전물을 형성한다고 기술되어있다(2). 현재 약전은 25%의 N,N-디메틸포름아미드를 사용하고 있으며, 실험결과에서 살펴보았듯, 25%에서 가장 좋은 피크 모양을 보여주었기 때문에 기존 약전의 농도를 변경하지 않았다. 테트라부틸암모늄히드록사이드 시액의 경우 실라놀기에 대한 영향을 감소시키는 영향을 가지고 있고 향상된 분석능력에 도움이 된다고 기술되어있다(5)(6). 따라서 암모늄 옥살레이트의 농도, 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨의 농도, 컬럼온도 3가지를 변수로 하여 반응표면분석(Response surface methodology)를 진행하여 최적의 조건을 탐색하였다.

희석된 버퍼농도의 이동상에 유기용매를 첨가하며 적당한 머무름시간을 찾았고, Acetonitrile 및 MeOH를 사용하여 최적의 결과를 보이는 조건을 잡았다. 기존 약전 조건에서 샘플 용매의 경우 표준품과 캡슐은 물에 용해시켰으며, 연고의 경우 이동상을 희석한 용매를 사용했다. 하지만 조건 통일을 위하여 약전 내 용해조건을 참조하여 물, 메탄올, 이동상을 선택하여 실험을 진행하였다. 물의 경우 연고에서 성분의 추출률이 좋지 않았고, 메탄올의 경우 연고에서 불순물인 Epiminocycline의 증가로 인한 회수율에 문제가 있었으므로, 이동상을 샘플 용매로 선정하였다. 검출 파장의 경우 표준품, 캡슐의 분석 조건

이었던 280 nm와 연고의 분석조건인 344 nm를 시험해본 결과 큰 차이가 보이지 않았기에 표준품의 분석조건인 280 nm로 통일하였다.

2-2. 시료 전처리 protocol 설정

Azithromycin 표준품의 경우 약전에서는 약 50 mg (역가)씩을 정밀하게 달아 각각 Acetonitrile : Water(3 : 2, v/v)을 넣어 녹여 내부표준액 2 mL 씩을 정확하게 넣은 다음 Acetonitrile : Water(3 : 2, v/v)를 넣어 50 mL로 하여 표준액으로 제조한다고 기술되어있다. 이 샘플 용매 조성의 경우 이동상의 조건과 매우 흡사하지만, 정확하게 일치하지는 않는 경우로서 염이 배제된 비슷한 비율로 제조된 것을 알 수 있다. 정의 경우도 제조시 양만 다를 뿐 비율은 표준품과 같은 것을 알 수 있다. 표준품과 정의 경우는 내부표준액이 첨가되어 샘플이 제조된 것을 알 수 있다.

Azithromycin 시럽의 경우 0.04 mol/L 인산수소이칼륨시액(pH 8.0) : Acetonitrile(4 : 6, v/v)을 넣어 녹여 1 mL 중 0.5 mg (역가)를 함유하는 용액을 만들어 검액으로 제조하는 것으로 기술되어있다. 표준품, 정의 조건과 다르게 샘플 용매에 차이가 있으며, 내부표준액 또한 첨가되어있지 않은 것을 볼 수 있다. 따라서 Azithromycin 표준품 및 제제들 간의 분석 조건을 일치시키기 위하여 분석조건을 개선하였다.

개선된 이동상의 조건에서는 30mM phospate buffer : MeOH (2 : 8, v/v)였으므로, 50 mg (역가)을 정밀하게 달아 MeOH : Water(8 : 2, v/v)를 넣어 녹여 MeOH에 녹인 내부표준액을 2 mL씩 정밀하게 넣은 다음 MeOH : Water(8 : 2, v/v)을 넣어 50 mL로 하여 표준액 및 검액을 제조하는 것으로 개선하였다.

내부표준액의 경우 4,4'-Bis(diethylamino)benzophenone 1.5 g을 4 L의 MeOH에 녹여 제조하였으며 차광하여 보관하였고, 실험 할 때마다 새로 제조하여 사용하였다. 샘플 제조 후, 공경 0.45 μm의 멤브레인필터로 여과하여 여액을 검액으로 하였고 10 μL를 주입하여 결과를 살펴보았다. 따라서 내부표준액이 없던 시럽에도 내부표준액이 추가되었고, 세 가지 제제간의 샘플 용매가 일치되었다.

Minocycline hydrochloride의 경우 표준품에서는 약 50 mg (역가)씩을 정밀하게 달아 물을 넣어 녹여 정확하게 100 mL로 하여 각각 검액 및 표준액으로 제조하는 방식으로 기술되어있다. 캡슐의 경우 50 mg (역가)에 해당하는 양을 정밀하게 달아 물을 넣어 녹여 정확하게 50 mL로 하여 검액으로 제조한다고 기술되어있다. 표준품과 캡슐의 경우 비슷한 조건이지만, 농도가 일치되어있지 않은 것을 확인할 수 있다. Minocycline hydrochloride 치과용 연고의 경우 표시역가에 따라 약 10 mg (역가)을 정밀하게 달아 디메틸포름아미드 10 mL씩을 넣어 녹인 다음 3 회 추출하여 추출액을 합하고 물을 넣어 정확하게 100 mL로 하고 이 액 10 mL를 정확하게 취하여 이동상을 넣어 정확하게 25 mL로 하여 검액으로 한다고 기술되어있다. 연고의 경우는 표준품, 캡슐과는 전혀 동떨어진 샘플 용매의 제조방법이 기술되어있으며, 이는 아마도 추출률과 연관이 되어있는 것으로 보인다. 따라서 약전을 참조하여 Water, MeOH, Mobilie phase로 나눠서 실험을 진행하였으며, 물의 경우 연고의 추출률이 매우 떨어지고, MeOH의 경우 불순물인 Epiminocycline이 특이적으로 연고에서만 높게 나타나 회수율에 문제를 주는 것으로 나타났다. 기존 약전의 샘플 용매의 경우 이동상이 아닌, 결과적으로 이동상을 희석시킨 제조 방식이었으며 이는 기존의 높은 염의 농도였던 이동상을 그대로 썼을 시 salting out으로 인한 샘플 제조에 문제가 생길 것을 우려하여 만들어진 새로운

용매인 것으로 보인다. 결론적으로 약전에서 사용하였던 샘플 용매는 새롭게 개선한 이동상의 조건과 흡사하였으므로 개선된 이동상을 추출용매로 사용하여 실험을 진행하였으며, 역시 Epiminocycline이 연고에서 특이적으로 검출되었으나, 시간의 흐름에 따른 안정도를 보이며 그 값이 크게 증가하지 않았고, 기존 약전의 결과와 비교했을 시에 피크 세기에 흡사한 결과를 보여주었다. 따라서 Minocycline hydrochloride 표준품 및 캡슐의 경우 약 50 mg (역가)씩을 정밀하게 달아 이동상을 넣어 녹여 정확하게 50 mL로 하여 각각 검액 및 표준액으로 한다. 이들 액 10 μL을 주입하여 결과를 살펴보았다, 시럽의 경우 기존 약전의 추출법을 고수하는 동시에 샘플 최종 농도를 이동상으로 맞추기 위하여 표시역가에 따라 약 100 mg (역가)을 정밀하게 달아 디메틸포름아미드 5 mL씩을 넣어 녹인 다음 5 회 추출하여 추출액을 합하고 0.07mol/L 암모늄 옥살레이트 용액 · 0.05mol/L 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨시액혼합액(11:4) 75mL를 넣고 테트라부틸암모늄히드록사이드 시액으로 pH를 6.5로 조정한 후 10 μL을 검액으로 하여 결론적으로 이동상과 같은 조건을 확립하였다. 샘플 제조 후, 공경 0.45 μm의 멤브레인필터로 여과하여 여액을 검액으로 하였다.

2-3. 검량선 작성

Azithromycin의 경우 자체 흡광도가 매우 낮기 때문에, 표준품과 제제들간의 농도를 1000 ppm으로 통일하고 기존의 5 μL였던 주입량을 10 μL로 변경하였다. 표준품을 사용하여 100% 농도인 1000 ppm을 기준으로 80%, 90%, 100%, 110%, 120%의 검량선 작성용 표준품을 준비하였다, 그래프 작성 시 x축을 %농도, y축을 표준품의 피크

면적/내부 표준품의 피크 면적의 비(area ratio)로 하는 그래프에서 검량선을 확보하였다.

Minocycline hydrochloride의 경우 표준품과 제제들간의 농도를 1000 ppm으로 통일하고 주입량을 10 μL로 변경하였다. Minocycline hydrochloride 또한 표준품을 사용하여 100% 농도인 1000 ppm을 기준으로 80%, 90%, 100%, 110%, 120%의 검량선 작성용 표준품을 준비하였다, 그래프 작성 시 x축을 %농도, y축을 표준품의 피크 면적으로 하는 그래프에서 검량선을 확보하였다.

2-4. 분석법 밸리데이션

분석법과 시료 추출법을 확립한 다음 이에 대한 밸리데이션을 진행하였다. linearity, precision, accuracy, recovery, repeatability, resolution, market drug mornitering, 총 7항목에 대해 밸리데이션을 진행하였다. Linearity는 주어진 범위에서 시료 중의 분석물 농도(양)가 분석 결과값과 비례하여 그 농도에 따른 결과치를 예상할 수 있는 능력을 의미하며, 기준 표준액의 80, 90, 100, 110, 120 % 농도 범위에서 검량선을 3회반복 작성하여 상관계수 R ≥ 0.999를 목표로 하였다.

Precision은 반복 실험 시 결과 값이 기대범위에 일관성 있게 포함되는 정도를 의미하며 기준 농도의 80, 100, 120 % 시료를 하루 3회, 3일 간 반복 분석하여 결과값 간 상대표준편차(RSD%)≤1 을 목표로 하였다. Accuracy는 동일 시료에 대하여 동일 방법으로 반복 실험 시 그의 평균치(측정값)가 실제 들어있는 물질의 양에 따른 값(참값)에 가까운 정도를 의미하며 Recovery로서 평가하였다.

Recovery는 표준품과 달리 제제 중 목적성분의 정량은 공존 성분에 의해 방해를 받을 수 있어 이를 시료에 정량의 목적성분을 추가하

여 정량할 때 추가된 양이 정확하게 회수됨을 보임으로서 분석법이 해당 시료에 적용 가능함을 입증하며 기준농도의 80 %가 되도록 시료(시판품)로 조제한 검액에 정량의 표준품으로 조제한 표준액을 가하여 기준농도의 100, 110, 120 %가 되게 한 후 각각 3회 반복 분석하며 회수율 95~105 %, 상대표준편차(RSD%)≤1를 목표로 하였다.

Repeatability는 측정결과의 일관성을 의미하는 것으로 한 시료를 6회 반복 분석하여 상대표준편차(RSD%)≤1 를 목표로 하였다.

Resolution은 한 성분이 서로 인접된 다른 성분과 어느 정도 정량적으로 분리되어 있는가를 나타내는 것으로 HPLC의 결과로 얻는 크로마토그램 상의 피크 중 가장 가까운 피크 간 분리도(resolution) ≥ 1.5를 목표로 하고 이를 6회 반복하여 평균과 표준편차를 계산하며 이를 토대로 95 % 신뢰구간을 산출하였다.

Market drug monitoring은 시판품을 표기된 함량에 기준하여 100 % 기준농도가 되도록 검액을 조제한 후 직선성 항목의 직선식을 이용하여 정량하였으며 3번 반복하여 상대표준편차(RSD%)≤1를 목표로 하였다.

Precision의 경우 같은 시료를 3회 분석하여 얻은 피크 면적의 상대표준편차(RSD)를 구하였다.

Ⅲ. 결과

1. LC/UV 분석조건 최적화

1-1. Azithromycin

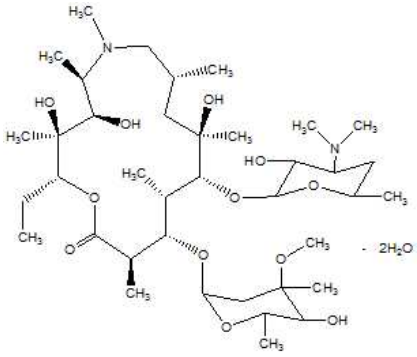


Fig 5. Azithromycin dihydrate의 구조

기존 약전 조건을 먼저 재현해보았다. Waters Shodex C18 PVA (4.6 mm * 250 mm , 4 μm)을 사용하여 기존 약전 조건을 실험해보았을 시에 안정화 시간이 상당히 많이 걸렸으며, 컬럼 자체가 희소하여 대중성이 많이 떨어져 5 μm의 충진재를 구하지 못하고 4 μm로 진행하였다. 높은 pH를 견딜 수 있는 컬럼이지만, Maximum flow rate 0.8 mL/min, recommended flow rate의 경우 0.4 ~ 0.6 mL/min, 최고압력조건이 1800 psi로서 상대적으로 약한 내구성을 볼 수 있다. 또한 현재 약전 조건을 토대로 실험을 진행했을 시에 각기 다른 조건의 이동상과 샘플 용매 조건으로 인하여 머무름 시간의 차이가 보이고 내부표준액의 유무로 인하여 결과가 통일되지 못하였다(fig 6). 또한 절대적인 흡광도를 살펴보았을 때 낮은 감도를 보여, 컬럼 노화에 따른 피크 분리도에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

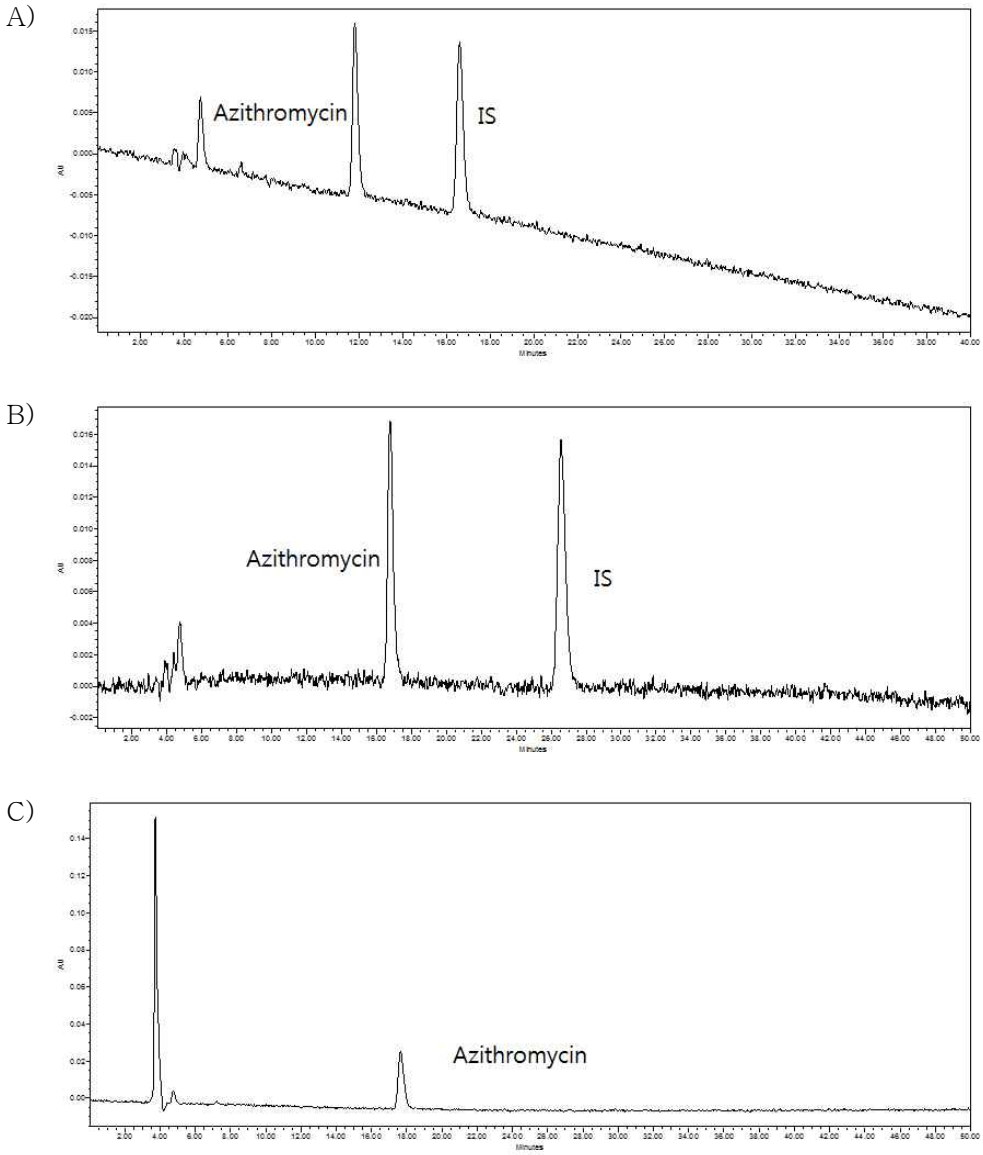
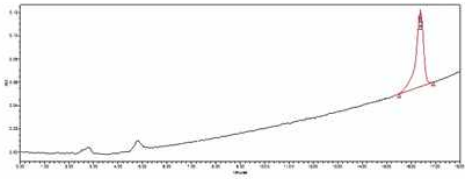
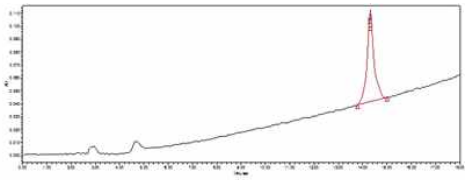
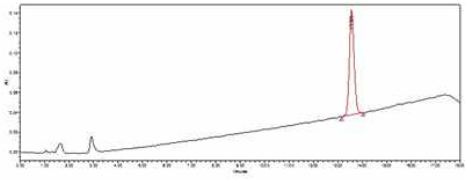


Fig 6. 기존 약전에서의 Azithromycin 및 Internal standard의 HPLC-UV 크로마토그램 A) 표준품 조건, B) 정의 조건, C) 시럽의 조건

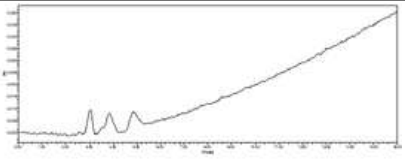
따라서 컬럼을 ODS 컬럼에서도 가능한지 살펴보았으며, Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 150 mm, 5 μm) 컬럼에서 깔끔한 피크 모양을 보여주었다(Table 1).

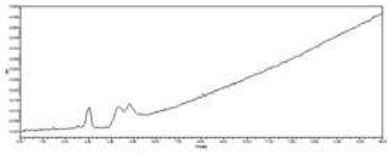
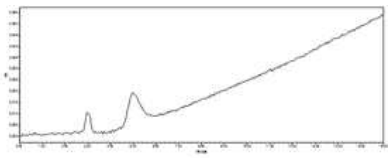
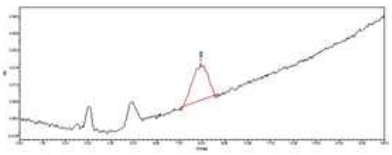
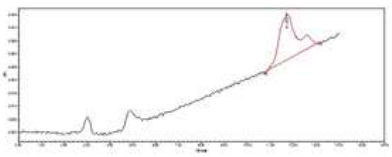
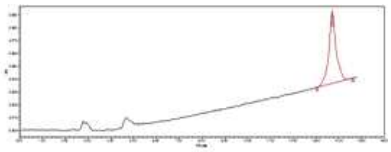
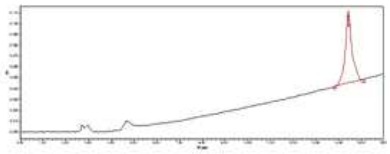
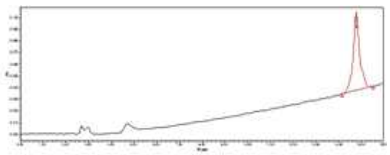
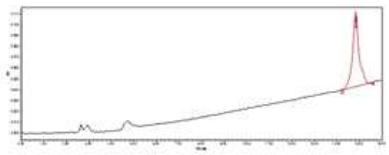
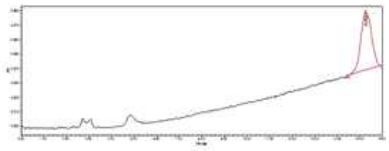
Table 1. Azithromycin 컬럼 최적화

Column	Chromatogram	Area
Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 250 mm, 5 μm)		1409456
Phenomenex Gemini ODS (4.6 mm * 250 mm, 5 μm)		1408714
Phenomenex Luna C18 (4.6 mm * 150 mm, 5 μm)		1408035

이동상 최적화 조건으로 Phosphate buffer로 제조한 pH를 조정했으며 ODS 컬럼에서는 pH 7.5 부근의 중성에서 가장 좋은 피크 세기를 검출할 수 있었다(Table 2).

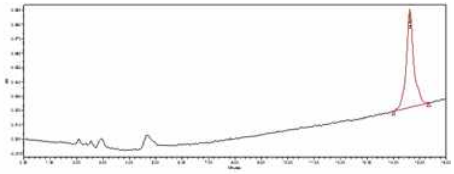
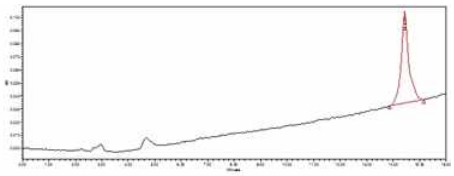
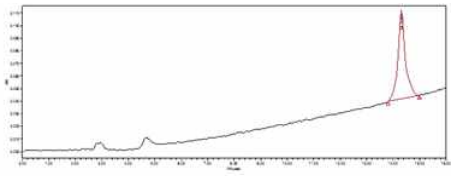
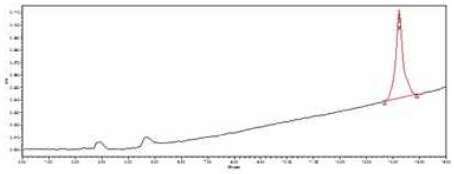
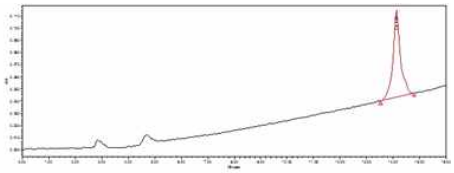
Table 2. Azithromycin 이동상 pH 최적화

pH	Chromatogram	Area
4.5		x

5.0		x
5.5		x
6.0		505101
6.5		962290
7.0		1256456
7.5		1362716
8.0		1300858
8.5		1298609
11.0		1286745

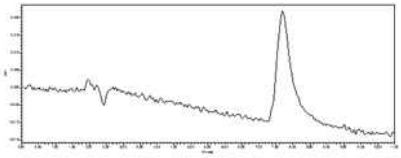
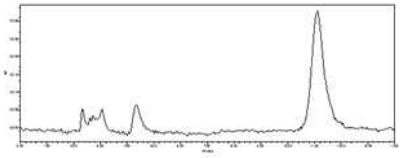
버퍼농도를 살펴보았을 때, 10 mM ~ 50 mM을 시험했으며, 30 mM에서 좋은 피크모양과 피크세기를 보여주었다(Table 3).

Table 3. Azithromycin 이동상의 buffer strength 최적화

Buffer strength (mM)	Chromatogram	Area
10		1325864
20		1394423
30		1408714
40		1394176
50		1383688

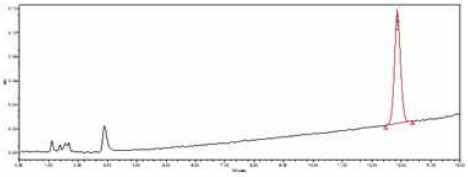
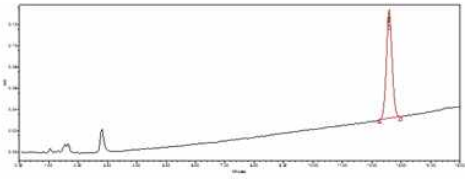
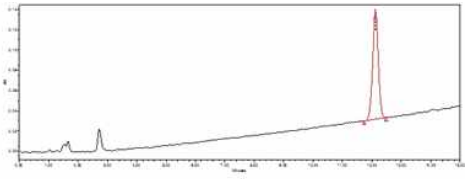
기존의 약전 조건에서 쓰였던 Acetonitrile과 MeOH간의 차이점을 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과 샘플과 이동상에 모두 MeOH을 사용했을 시에 피크의 모양이 더 좋은 것을 알 수 있었다 (Table 4).

Table 4. Azithromycin 분석 이동상 내 유기용매 최적화

Organic mobile phase	Sample solvent	Peak shape
Acetonitrile	Acetonitrile	
MeOH	MeOH	

컬럼 온도를 30 ~50 °C의 범위에서 살펴본 결과 50 °C에서 가장 좋은 피크 세기를 보여주었다(Table 5).

Table 5. Azithromycin 컬럼 온도 최적화

Column temperature (°C)	Peak shape	Area
30		1325593
40		1355978
50		1411652

다음으로 유기용매와 Phosphate buffer의 비율을 조정하여 머무름 시간을 조정하였으며, Phosphate buffer : MeOH (20 : 80, v/v)의 이동상이 결정되었다(Fig 7).

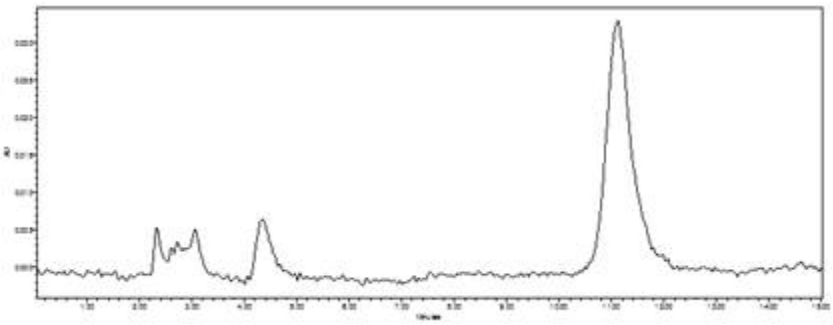


Fig 7. Phosphate buffer : MeOH (20 : 80, v/v)조건에서 Azithromycin 검출 HPLC-UV 크로마토그래피

마지막으로 표준품, 정과 다른 시럽의 검출 파장을 통일하기 위하여 검출 파장을 시험했으며, 표준품, 정 조건인 215 nm와 시럽의 조건인 210 nm에서 큰 차이를 보이지 않았으며 MeOH의 cut off를 고려했을 시 표준품의 조건인 215 nm로 통일하기로 하였다(Fig 8).

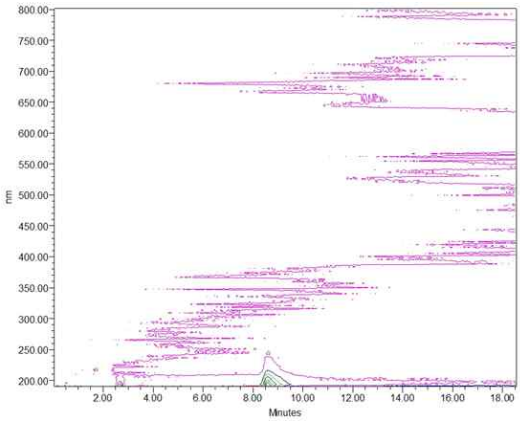
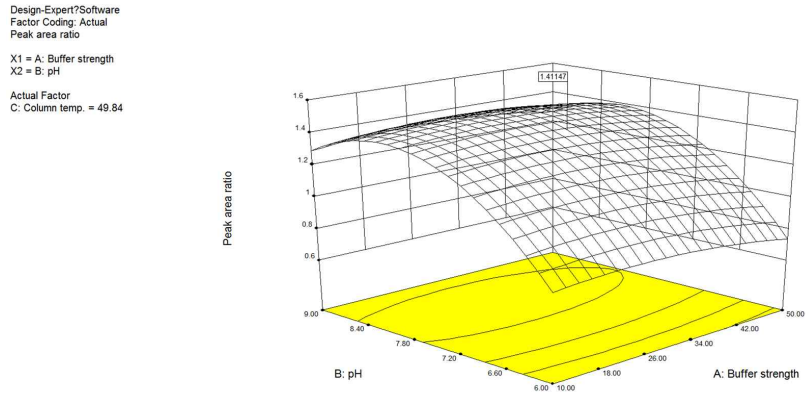
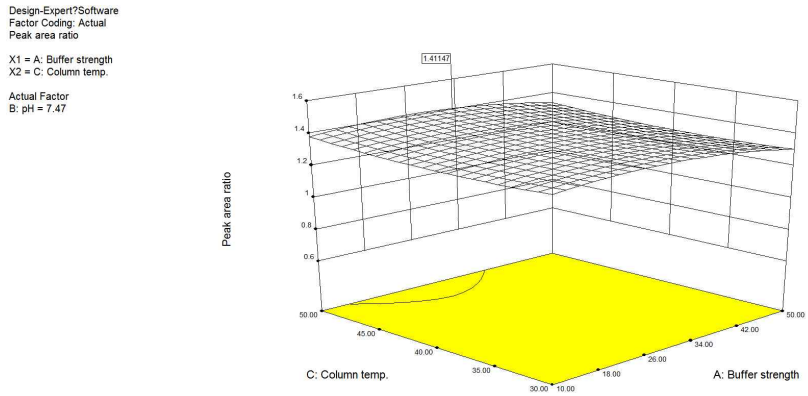


Fig 8. 190 ~800 nm에서의 감도 차이

하지만 전체적인 부분을 한꺼번에 고려했을 시에 대한 고찰을 위하여 Response surface methodology를 진행하였으며, 실험의 결과에 영향을 미치는 변수 세 가지(이동상의 pH, buffer strength, 컬럼 온도)를 설정하여 세 가지 변수를 종합한 최적화 결과를 도출하기로 하였다.

이동상의 pH의 경우 위의 결과를 토대로 6.0, 7.5, 9.0을 잡았으며, Buffer strength의 경우 10, 30, 50 mM을 설정하였고, 컬럼 온도의 경우 30, 40, 50°C를 설정하였다. 그 결과 pH 7.5, Buffer strength 30 mM,, 컬럼 온도 50°C에서 최적의 결과를 보여주었다(Fig 9, Fig 10).





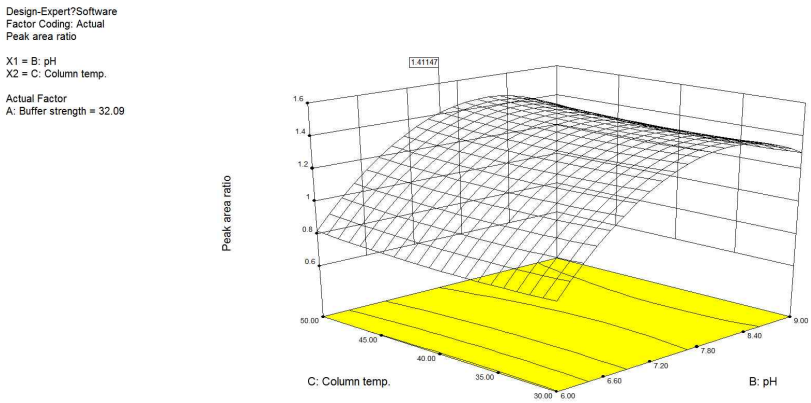


Fig 9. 버퍼의 농도, pH, 컬럼 온도의 변수에 따른 반응표면분석

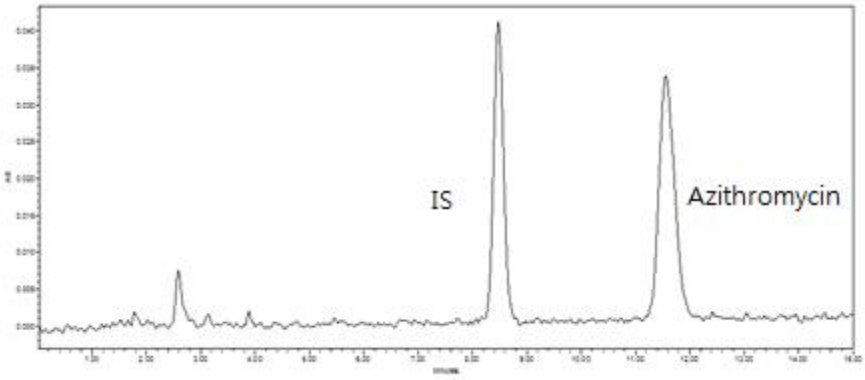


Fig 10. 새롭게 확립된 조건에서의 Azithromycin 및 내부표준액

1-2. Minocycline hydrochloride

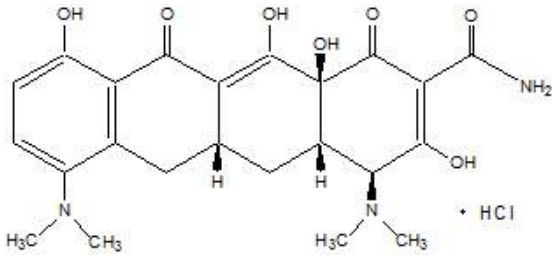


Fig 11. Minocycline hydrochloride의 구조

기존 약전을 재현해보았을 시에 몇 가지 문제점이 발견되었다(Fig 12). 늦은 머무름 시간에 의하여 분석효율이 매우 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 머무름 시간을 앞당기기 위하여 유량을 높이기도 하였지만 현재 약전의 조건에서는 20분 근처가 한계이며(Fig 13), 기계에 무리가 많이 가는 것으로 확인되었다. 따라서 머무름 시간을 앞당기고자 하는 목적을 우선으로 실험을 진행하게 되었다.

현재의 약전에서는 표준액 및 캡슐은 약 0.2 mol/L 농도의 암모늄옥살레이트와 N,N-디메틸포름아미드, 0.1 mol/L 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨용액 혼합액(11 : 5 : 4)에 t-부틸암모늄히드록시드시액으로 pH를 6.5로 맞추게 되어있고, 치과용 연고의 경우 pH 6.2로 맞추게 되어있다. 따라서 조건의 통일과 함께 최적화된 분석법을 마련하기 위해 실험을 진행하였다.

실험은 시스템 성능을 체크하기 위한 Epiminocycline과 Epiminocycline의 혼합물을 사용하였으며, 두 물질의 분리도까지 고려한 최적법을 진행하였다.

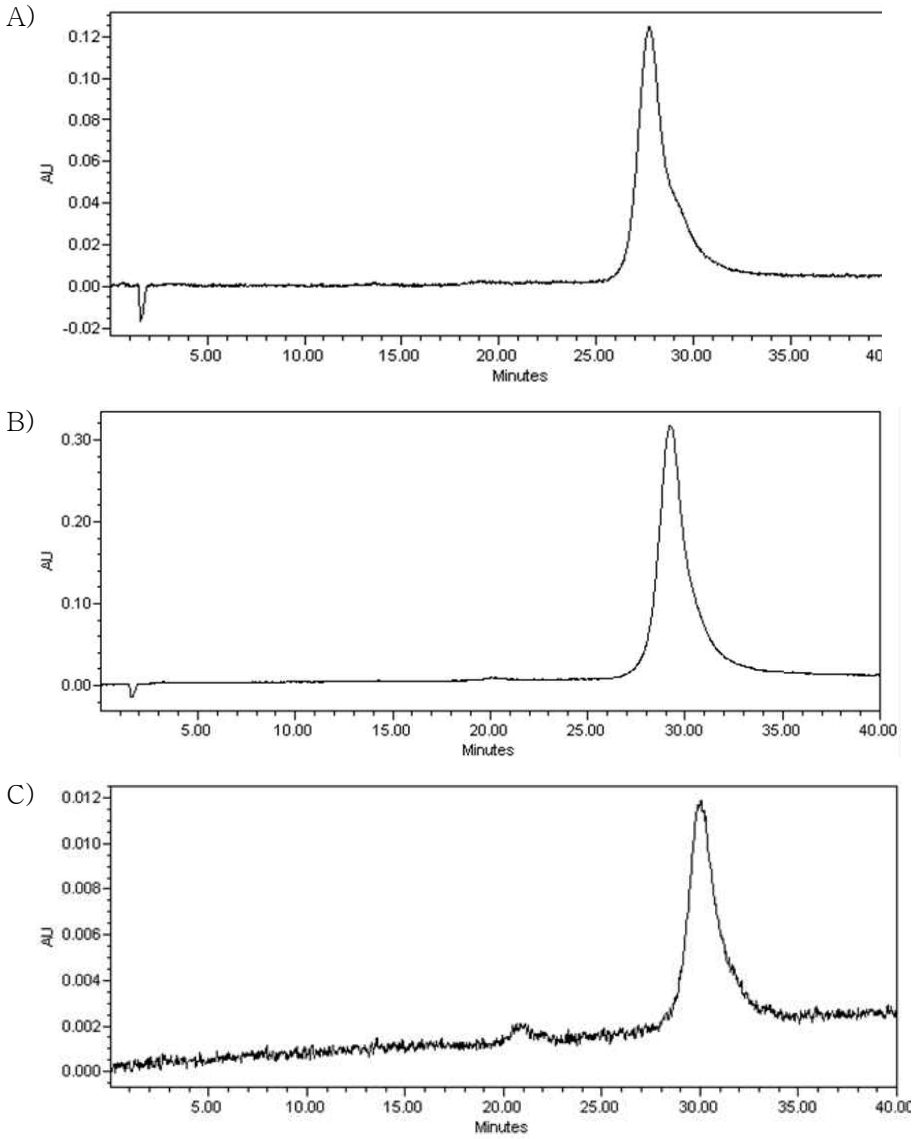


Fig 12. 표준품, 캡슐, 연고 조건에서의 Minocycline hydrochloride HPLC-UV 크로마토그램 A)표준품, B)캡슐, C) 치과용 연고

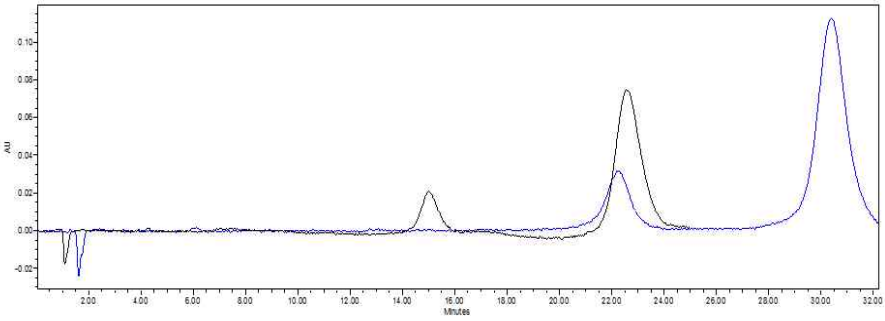
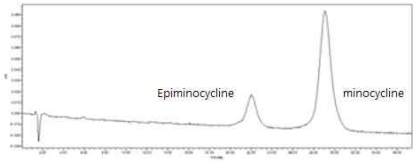
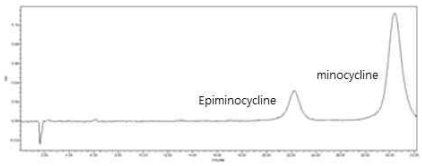


Fig 13. 유량 1.0 mL/min와 유량 1.5 mL/min에서의 머무름 시간 차이

Minocycline hydrochloride을 물로 녹인 후 약전 조건의 이동상으로 단일용리 하여 분석을 수행하였다. 피크검출은 되었으나, 머무름 시간이 길어져 분석에 영향이 있었다. 약전 조건의 머무름 시간을 맞추기에는 유량이 너무 높아지게 되어 기계에 무리를 주었다.

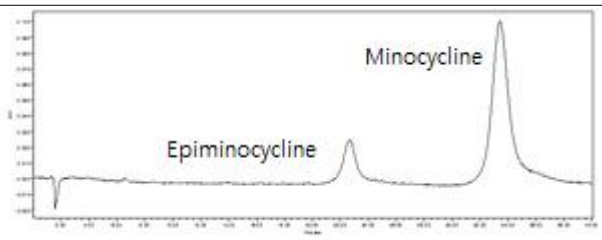
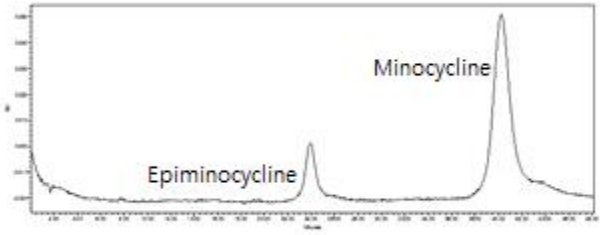
Minocycline hydrochloride과 Minocycline hydrochloride 연고에서 조건의 차이는 오로지 이동상의 pH였다. 이동상의 pH가 결과에 어떠한 영향을 미치는지 알기 위하여 pH 조정을 시도해보았다. 큰 차이점은 보이지 않았으며 pH 6.5에서 좀 더 나은 분리도를 보여주었다 (Table 6).

Table 6. Minocycline hydrochloride 이동상 pH 최적화

pH	Chromatogram
6.2	
6.5	

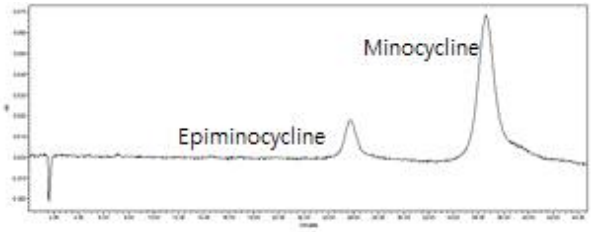
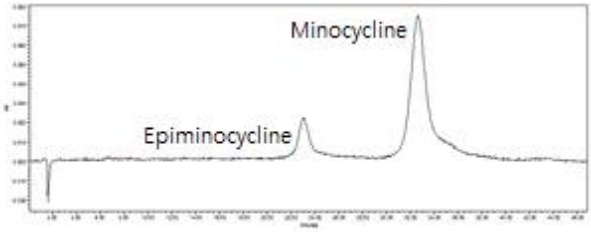
약전에서 기술된 머무름 시간을 맞추기 위해서는 이동상 조건의 변화가 필요했으며, 현재 약전의 조건은 과포화용액으로서 유기용매를 소량만 추가하여도 염이 석출되어 머무름 시간의 조정이 불가능하다. 따라서 염의 농도를 줄여서 결과의 변화를 확인하기 위하여 먼저 암모늄 옥살레이트 용액의 농도를 낮추어보았다. 성능과 감도에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 머무름 시간에 조금의 차이가 발견되었다(Table 7).

Table 7. 이동상 내 Ammonium oxalate 농도 최적화

Ammonium oxalate (mM)	Chromatogram
200	
10	

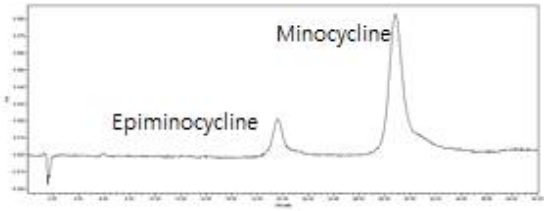
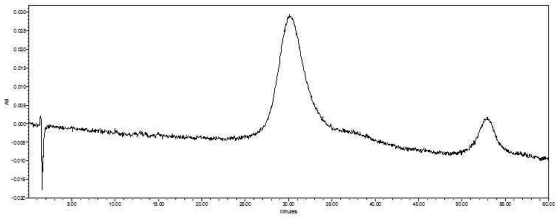
약전에서 기술된 머무름 시간을 맞추기 위해서는 이동상 조건의 변화가 필요했으며, 현재 약전의 조건은 과포화용액으로서 유기용매를 소량만 추가하여도 염이 석출되어 머무름 시간의 조정이 불가능하다. 따라서 염의 농도를 줄여서 결과의 변화를 확인하기 위하여 두 번째로 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨의 농도를 낮추어 보았다. 성능과 감도에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 머무름 시간에 조금의 차이가 발견되었다(Table 8).

Table 8. 이동상 내 EDTA dihydrogen disodium salt 농도 최적화

EDTA dihydrogen disodium salt (mM)	Chromatogram
100	
10	

마지막으로 N,N-디메틸포름아미드의 영향을 알아보기 위하여 기존의 약전보다 농도를 줄여보았다. N,N-디메틸포름아미드가 감소할수록 피크의 세기가 감소하였으며, 테일링이 생겼다. N,N-디메틸포름아미드가 전체 양의 15%에서는 약전에서의 결과와 다른 모습을 보여주었다(Table 9).

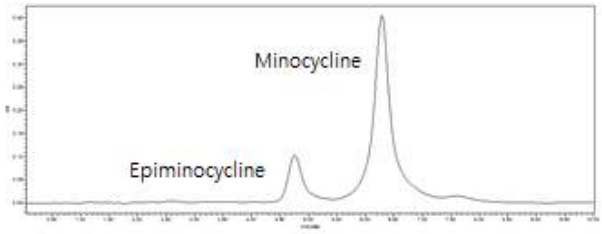
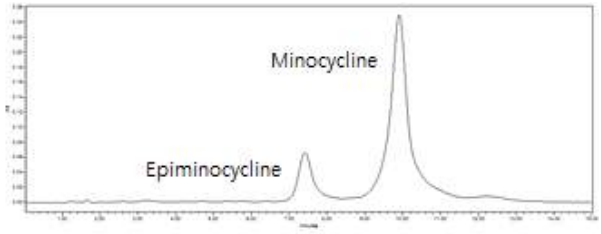
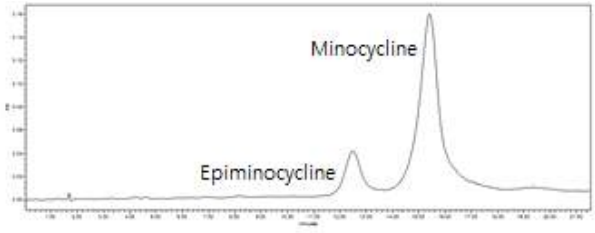
Table 9. 이동상 내 N,N-Dimethylformamide 비율 최적화

N,N-Dimethylformamide (전체에 대한 비율, %)	Chromatogram
25	
15	

낮은 염의 조건에서는 유기용매를 추가하여도 석출이 일어나지 않았으며, 대중적이고 값이 적당한 메탄올과 아세토니트릴을 이용하여 결과를 살펴보았고, 전체용량의 해당하는 양의 차이에 의한 머무름 시간을 확인함으로서 적당한 조건을 탐색했다. 유기용매를 첨가함으로서 머무름 시간은 훨씬 당겨졌으며, 피크의 세기도 증가하였다. 전체 용량의 10% 아세토니트릴에서 적당한 머무름 시간을 보였으며, 메탄올과 비교해보았을 시에 아세토니트릴이 더 적은 양이 추가되면서 더욱 적당한 머무름 시간을 보여주었고 분리도도 뛰어난 것을 확인할 수 있다. Solvent polarity를 찾아보았을 시에도 아세토니트릴이 메탄

올보다 석출의 위험이 더 적은 것으로 확인하였다(Table 10).

Table 10. 이동상 내 추가된 Organic solvent 최적화

추가된 Organic solvent 및 비율	Chromatogram
Acetonitrile 15%	
Acetonitrile 10%	
MeOH 10%	

확립된 이동상의 조건에서 나머지 변수들의 확정을 통하여 최적화를 하기 위하여 반응표면분석을 진행하였다(Fig 13).

전체적인 부분을 한꺼번에 고려했을 시에 대한 고찰을 위하여 Response surface methodology를 진행하였으며, 실험의 결과에 영향을 미치는 변수 세 가지(암모늄 옥살레이트염의 농도, 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨염의 농도, 컬럼 온도)를 설정하여 세 가지 변수를 종합한 최적화 결과를 도출하기로 하였다.

암모늄 옥살레이트염의 농도의 경우 위의 결과를 토대로 0.02, 0.06,

0.1 M을 잡았으며, 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨염의 농도의 경우 0.01, 0.03, 0.05 M을 설정하였고, 컬럼 온도의 경우 20, 30, 40 °C를 설정하였다. 그 결과 암모늄 옥살레이트 농도 0.07 M, 에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨염의 농도 0.05 M, 컬럼 온도 40°C에서 최적의 결과를 보여주었다(Fig 15, Fig 16).

개정된 이동상의 조건에서는 기존 방법을 크게 벗어나지 않는 범위 내에서 머무름 시간이 앞당겨졌다. 또한 기계에 걸리는 압력이 낮아져 무리가 가지 않는 조건으로 바뀜으로서 좀 더 안정적으로 분석을 진행할 수 있는 조건이 확립되었다. 연고의 경우 Minocycline hydrochloride에서 잡은 최적화된 조건으로 통일을 시도했으며, PDA로 파장을 살펴 본 결과, 기존의 344 nm의 파장과 280 nm에서의 차이점이 크게 없었기에, 표준품과 캡슐의 검출 조건인 280 nm로 통일시키는 것으로 결정하였다(Fig 14). 연고에서의 경우만 앞의 에피미노사이클린이 생성되었으며 미노사이클린과 깔끔하게 분리되어 정량을 하는데 있어서 문제가 되지 않았다.

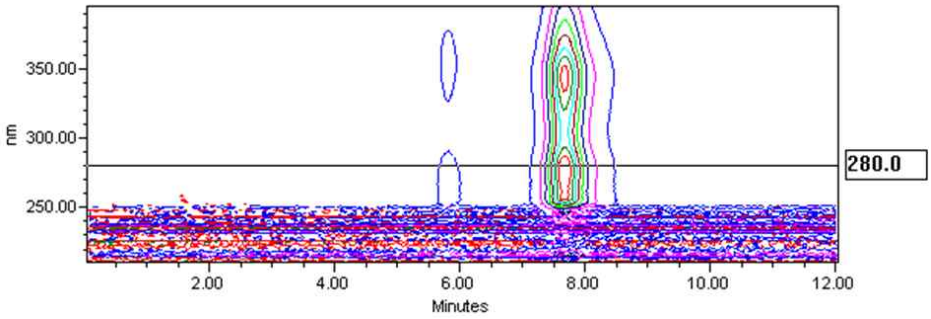


Fig 14. 280 nm와 344 nm에서의 미노사이클린 연고의 감도차이

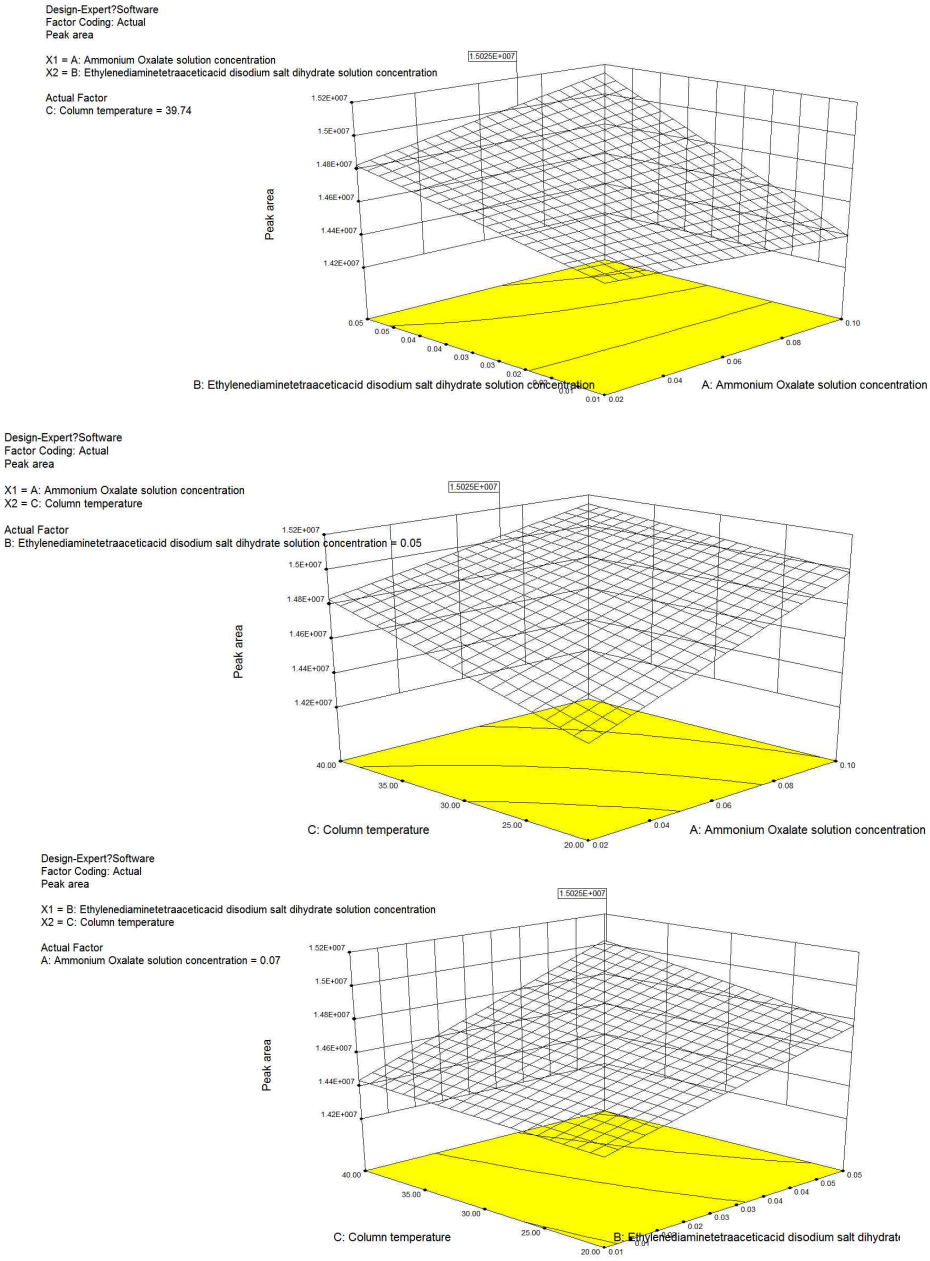


Fig 15. 암모늄 옥살레이트염의 농도,
에틸렌디아민테트라아세트산이수소이나트륨염의 농도, 컬럼 온도의 변수에 따른 반응표면분석

.

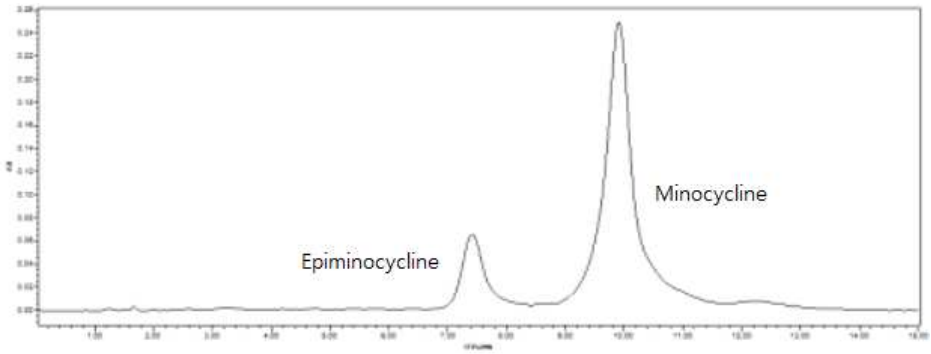


Fig 16. 새롭게 확립된 조건에서의 Minocycline hydrochloride 및 시스템성능 시험

1-3. 분석조건 최적화 결과

LC 및 UV 분석조건을 최적화하여 최종적으로 다음과 같은 분석조건을 확립하였다(Table 11, Table 12, Table 13, Table 14).

Table 11. 최적화된 Azithromycin 분석 조건

- Column : Phenomenex Luna C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)
- Mobile phase :
  30 mM Phosphate buffer solution (pH 7.5)/Methanol = 20/80 (v/v)
- Flow rate : 1.0 mL/min
- Wavelength : 215 nm
- Column temp. : 50 ℃
- Injection vol. : 10 μL

Table 12. 최적화된 Azithromycin 표준품 및 제제의 Chromatogram

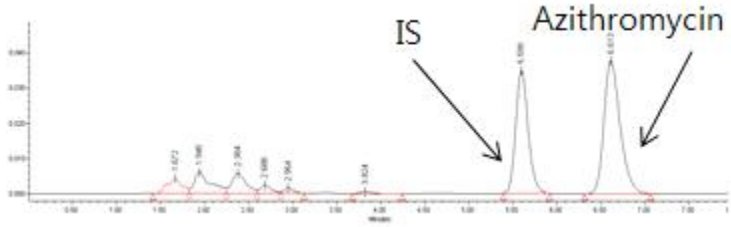
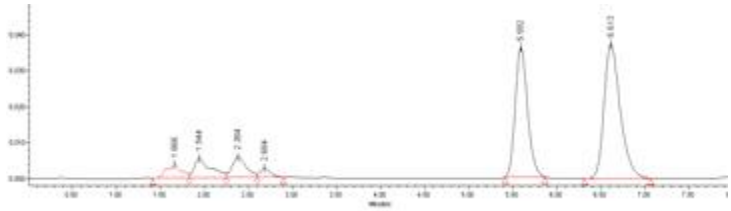
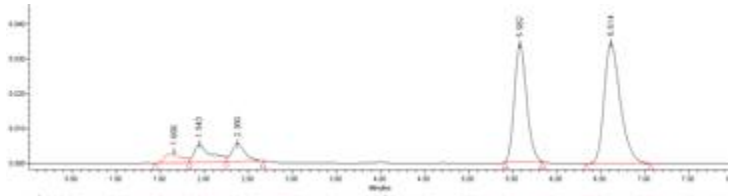
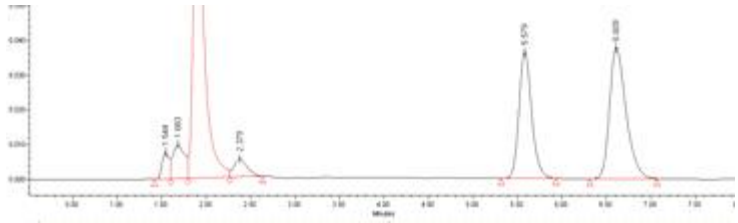
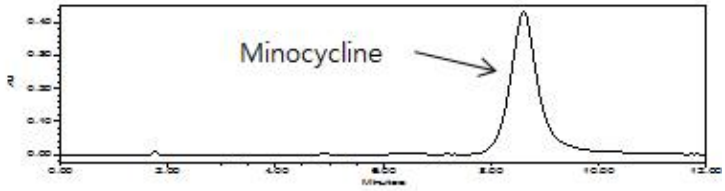
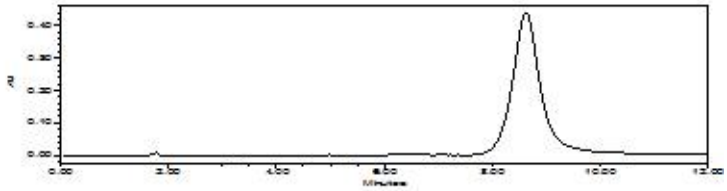
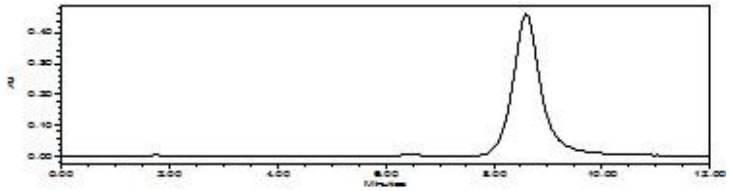
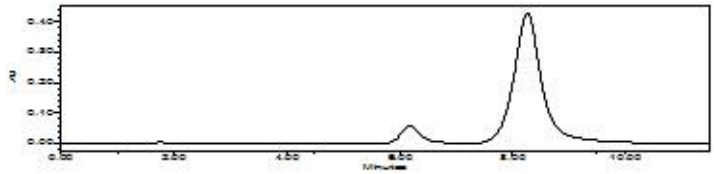
	Chromatogram
표준품	
원료	
정	
시럽	

Table 13. 최적화된 Minocycline hydrochloride 분석 조건

- Column : Phenomenex Luna C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)
- Mobile phase :
0.07 mol/L Ammonium oxalate : N,N-Dimethylformamide : 0.05 mol/L Ethylenediaminetetraaceticacid dihydrogen disodium salt(11 : 5 : 4) adjust in pH 6.5 with tetra-butylammonium hydroxide
Ammonium oxalate solution : Ammonium oxalate dissolved in Water : ACN (6.5 : 1)
Ethylenediaminetetraaceticacid dihydrogen disodium salt solution:
Ethylenediaminetetraaceticacid dihydrogen disodium salt dissolved in Water : ACN (6.5 : 1)
- Flow rate : 1.0 mL/min
- Wavelength : 280 nm
- Column temp. : 40 ℃
- Injection vol. : 10 μL

Table 14. 최적화된 Minocycline hydrochloride 표준품 및 제제의 Chromatogram

	Chromatogram
표준품	
원료	
캡슐	
연고	

2. 분석법 밸리데이션

2-1. Azithromycin

확립한 분석법에 대한 밸리데이션을 수행한 결과 직선성, 정밀성, 정확성, 회수율, 반복성, 분리도, 시판품 함량 모니터링에 대한 총 7항목 밸리데이션을 진행하였다.

Azithromycin에 대하여 표준액의 80, 90, 100, 110, 120%농도 범위에서 3 번씩 분석하여 검량선을 작성한 결과, 본 시험법은 Azithromycin에 대하여 R≥0.999의 양호한 직선성을 나타내었다 (Table 15, Table 16, Fig 17).

Table 15. Azithromycin의 기준 농도 (농도 단위 : μg/mL)

	80%	90%	100%	110%	120%
Azithromycin	800	900	1000	1100	1200

Table 16. Azithromycin의 직선식

	Slope	Intercept	r^2	Range (%)
Azithromycin	0.0123 ± 0.0001	0.1911 ± 0.011	0.9991 ± 0.0001	80 - 120

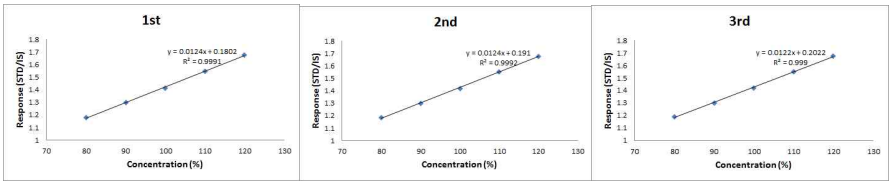


Fig 17. Azithromycin의 검량선

정밀성은 기준 농도의 80, 100, 120%시료를 하루 3 회, 3 일간 반복 분석하여 결과값 간의 상대표준편차 (RSD%)≤1을 목표로 하였다. 실험 결과 0.129 ~ 0.989%로 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」의 기준인 1.00%이하로 적합함을 확인하였다(Table 17).

Table 17. Azithromycin의 정밀성

Validation	Precision (RSD, Relative standard deviation : %)	
	Intra	Inter
Azithromycin	0.376	0.727
	0.148	0.888
	0.129	0.273

회수율은 Azithromycin의 농도가 표준액의 80%가 되도록 한 시료에 표준액을 가하여 합이 100, 110, 120%가 되게 하여 각각 3 회 반복하여 분석하고 표준 농도와 비교하여 확인하였다. 실험 결과 99.221~99.438%를 확인하였다(Table 18).

회수율 (%) = (피크 면적$_{시료+표준액}$ / 피크 면적$_{표준액}$) x 100

Table 18. Azithromycin 원료의 회수율

	Recovery (%)	RSD (%)
100%	99.221	0.188
110%	98.438	0.084
120%	99.237	0.172

시판품 함량 모니터링은 Azithromycin이 들어있는 원료를 선정하

여 3 회 반복하여 분석하고, 직선식에 대입하여 모니터링 하였다. 실험결과 95.095 ~ 95.882%를 확인하였다(Table 19).

Table 19. 시판품 Azithromycin 제제 시판품 함량 모니터링

	Content (%)	RSD (%)
원료	95.581	0.255
정 A	95.170	0.334
정 B	95.882	0.299
정 C	95.794	0.104
시럽 A	95.317	0.031
시럽 B	95.680	0.157
시럽 C	95.095	0.206

반복성은 한 시료를 6 회 반복 분석하였을 때 얻어진 분석값의 상대표준편차 (RSD) 로 확인하였다. 실험결과 0.193%로 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」의 기준인 1.00%이하로 적합함을 확인하였다(Table 20)

.

Table 20. Azithromycin 반복성

	Repeatability (RSD : %)
Azithromycin	0.193

분리도를 계산하기 위해 주성분인 내부표준물질인 4,4'-비스(디에틸아미노)벤조페논과 Azithromycin 간의 분리도를 계산하였다(Fig 18).

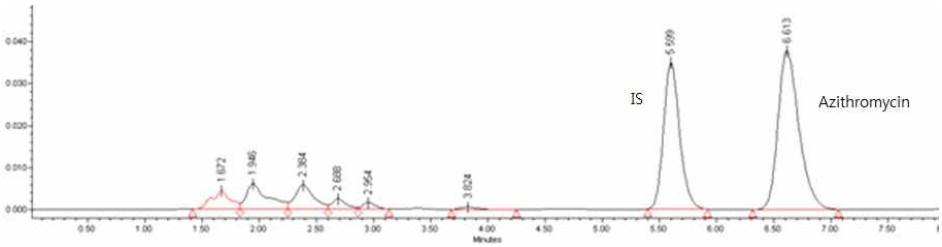


Fig 18. 개선된 분석법에서 내부표준액 및 Azithromycin

$$Rs = 1.18*(t_{Ra} - t_{Rb})/(W_{1/2}a+W_{1/2}b)$$

Rs : 분리도

t_{Ra}, t_{Rb} : 분리도 측정에 쓰는 두 물질의 머무름 시간

$W_{1/2a}$, $W_{1/2b}$: 각각의 피크 높이의 1/2 위치에서의 피크 폭

위 크로마토그램 결과에서 4,4'-비스(디에틸아미노)벤조페논의 머무름 시간은 약 5.591분이며 Azithromycin의 머무름 시간은 약 6.595 분이다. 또한 각 피크 높이의 1/2 위치에서의 4,4'-비스(디에틸아미노)벤조페논의 폭은 약 0.15분이며 Azithromycin의 폭은 0.19분이다. 이에 따라 기준 식을 바탕으로 한 두 피크의 분리도는 약 3.484 이며 같은 방법으로 6회 반복한 결과에 대한 모든 분리도를 산출한 결과 평균은 약 3.485, 표준편차는 약 0.001이었다.

$$95\%\ 신뢰구간 = 평균 \pm (2.571 \times 표준편차) / \sqrt{반복횟수}$$

이를 바탕으로 위 식을 이용하여 95% 신뢰 구간을 계산하였으며 4,4'-비스(디에틸아미노)벤조페논의, Azithromycin의 피크 분리도 95% 신뢰구간은 3.484 ~ 3.487 으로 분리도는 3.48로 설정하였고,「의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」의 기준인 1.5 이상으로 적합함을 확인하였다.

Azithromycin 정 및 시럽의 회수율을 계산하였으며 Azithromycin

정 및 시럽의 농도가 표준액의 80%가 되도록 3 가지 정에 표준액을 가하여 합이 100, 110, 120%가 되게 하여 각각 3 회 반복하여 분석하고 표준 농도와 비교하여 회수율을 확인하였다. 실험 결과 정은 95.164 ~ 104.498%를 확인하였다. 시럽은 95.134~97.57%를 확인하였다(Table 21, Table 22).

Table 21. Azithromycin 정의 회수율

		Recovery (%)	RSD (%)
정 A	100%	104.498	0.079
	110%	95.443	0.558
	120%	95.323	0.144
정 B	100%	95.163	0.026
	110%	95.440	0.439
	120%	97.933	0.027
정 C	100%	97.004	0.094
	110%	96.331	0.060
	120%	99.198	0.055

Table 22. Azithromycin 시럽의 회수율

		Recovery (%)	RSD (%)
시럽 A	100%	96.891	0.137
	110%	97.565	0.070
	120%	95.219	0.052
시럽 B	100%	95.508	0.494
	110%	95.394	0.221
	120%	95.134	0.062
시럽 C	100%	95.505	0.428
	110%	95.619	0.270
	120%	96.231	0.672

2-2. Minocycline hydrochloride

확립한 분석법에 대한 밸리데이션을 수행한 결과 직선성, 정밀성, 정확성, 회수율, 반복성, 시판품 함량 모니터링에 대한 총 6항목 밸리데이션을 진행하였다.

Minocycline hydrochloride에 대하여 표준액의 80, 90, 100, 110, 120%농도 범위에서 3 번씩 분석하여 검량선을 작성한 결과, 본 시험법은 Minocycline hydrochloride에 대하여 R≥0.999의 양호한 직선성을 나타내었다(Table 23, Table 24, Fig 19).

Table 23. Minocycline hydrochloride의 기준 농도 (농도 단위 : μg/mL)

	80%	90%	100%	110%	120%
Minocycline hydrochloride	800	900	1000	1100	1200

Table 24. Minocycline hydrochloride의 직선식

	Slope	Intercept	r^2	Range (%)
Minocycline hydrochloride	460540.3733 ± 33.4586	-445477.0667 ± 20018.1863	0.9998 ± 0.0001	80 - 120

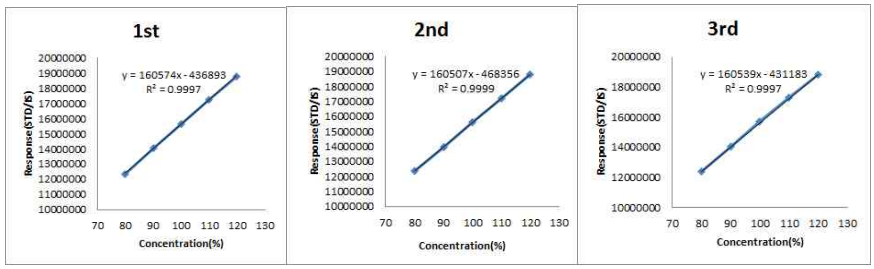


Fig 19. Minocycline hydrochloride의 검량선

정밀성은 기준 농도의 80, 100, 120%시료를 하루 3 회, 3일간 반복 분석하여 결과값 간의 상대표준편차 (RSD%)≤1을 목표로 하였다. 실험 결과 0.061 ~ 0.731%로 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」의 기준인 1.00%이하로 적합함을 확인하였다(Table 25).

Table 25. Minocycline hydrochloride의 정밀성

Validation	Precision (RSD : %)	
	Intra	Inter
Minocycline hydrochloride	0.118	0.360
	0.194	0.731
	0.075	0.061

회수율은 Minocycline hydrochloride의 농도가 표준액의 80%가 되도록 한 시료에 표준액을 가하여 합이 100, 110, 120%가 되게 하여 각각 3 회 반복하여 분석하고 표준 농도와 비교하여 확인하였다. 실험 결과 99.889~100.522%를 확인하였다(Table 26).

$$\text{회수율 (\%)} = (\text{피크 면적}_{\text{시료+표준액}} / \text{피크 면적}_{\text{표준액}}) \times 100$$

Table 26. Minocycline hydrochloride의 회수율

	Recovery (%)	RSD (%)
100%	100.522	0.435
110%	100.124	0.548
120%	99.889	0.576

시판품 함량 모니터링은 Minocycline hydrochloride이 들어있는 원료를 선정하여 3회 반복하여 분석하고, 직선식에 대입하여 모니터링 하였다. 실험결과 96.836 ~ 109.669%를 확인하였다(Table 27).

Table 27. 시판품 Minocycline hydrochloride 제제 시판품 함량 모니터링

	Content (%)	RSD (%)
원료	102.935	0.369
캡슐 A	109.471	0.397
캡슐 B	109.527	0.587
캡슐 C	109.669	0.105
연고 A	102.353	0.315
연고 B	102.699	0.306
연고 C	96.836	0.287

반복성은 한 시료를 6 회 반복 분석하였을 때 얻어진 분석값의 상대표준편차 (RSD) 로 확인하였다. 실험결과 0.189%로 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」의 기준인 1.00%이하로 적합함을 확인하였다(Table 28).

Table 28. Minocycline hydrochloride의 반복성

	Repeatability (RSD : %)
Minocycline hydrochloride	0.189

Minocycline hydrochloride 캡슐 및 연고의 회수율을 계산하였으며 Minocycline hydrochloride 캡슐 및 연고의 농도가 표준액의 80%가 되도록 3 가지 캡슐과 1가지 연고에 표준액을 가하여 합이 100, 110, 120%가 되게 하여 각각 3 회 반복하여 분석하고 표준 농도와 비교하여 회수율을 확인하였다. 실험 결과 캡슐은 99.030～103.583%를 확인하였다. 연고는 97.280～103.063%를 확인하였다(Table 29, Table 30).

Table 29. Minocycline hydrochloride 캡슐의 회수율

		Recovery (%)	RSD (%)
캡슐 A	100%	102.936	0.369
	110%	103.583	0.183
	120%	100.688	0.153
캡슐 B	100%	102.161	0.304
	110%	102.510	0.272
	120%	100.841	0.186
캡슐 C	100%	102.074	0.456
	110%	102.616	0.458
	120%	99.030	0.278

Table 30. Minocycline hydrochloride 연고의 회수율

		Recovery (%)	RSD (%)
연고 A	100%	102.394	0.355
	110%	100.164	0.460
	120%	100.63	0.434
연고 B	100%	103.063	0.314
	110%	100.253	0.342
	120%	101.102	0.551
연고 C	100%	99.743	0.334
	110%	98.341	0.327
	120%	97.280	0.612

Ⅳ. 결론

1. HPLC와 UV를 기반으로 Azithromycin 및 Minocycline hydrochloride 표준품 및 제제간의 분석조건 통일 및 정량법을 최적화하였고, 이에 대해 밸리데이션을 실시하였다.

2. Azithromycin의 경우 이동상의 pH를 감소시켜 컬럼 및 시스템에 무리한 조건이 완화되었으며 컬럼 사용에 있어 대중성과 보편화를 이루게 되었다. 머무름 시간을 앞당겨 분석 효율이 증가하였으며 표준품 및 각 제제의 머무름 시간과 시료 농도를 통일하고 최적화함으로서 분석 시간 및 용매 사용을 단축시키고 경제적으로 효율성을 증가시켰다. 또한 Response surface methodology를 적용한 효율적인 분석 조건 최적화를 통하여 일선에서 적용하기에 적합하도록 간편하고 쉬운 분석법을 확립하여 정확하고 정밀한 정량이 가능해졌다.

3. Minocycline hydrochloride의 경우 이동상 염(Ammonium oxalate와 EDTA)의 농도 저감화로 컬럼 및 시스템의 무리를 완화하였으며 머무름 시간을 앞당기고 시스템 압력을 감소시켜 분석효율을 증가시켰다. 또한 표준품 및 각 제제의 머무름 시간, 시료 농도 통일 및 Response surface methodology를 적용한 효율적인 분석 조건 최적화를 통하여 빠르고 정확 정밀한 정량이 가능해졌다.

4. 따라서 본 연구는 국가적 차원에서 표준화된 의약품 품질관리법을 확립하기 위한 시작이 되었으며, 의약품 공정서에 수재된 시험법 중 Tetracycline 및 Macrolide계 시험법 표준화 연구뿐만이 아닌 다빈도 사용 품목에서 효율을 최대화하는 시험법 개정 가능성에 대한 기반을 마련하였다.

Ⅴ. 참고문헌

1) Fuad Al-Rimawi and Maher Kharoaf, Analysis of Azithromycin and Its Related Compounds by RP-HPLC with UV Detection, Journal of Chromatographic Science, Volume. 48(2), February 2010 pp. 86 - 90

2) Martin Tobkes, Isolation and recovery of calcium chloride complex of 7-dimethylamino-6-dimethyl 1-6-deoxytetracycline hydrochloride, United States Patent, US 4038315 A (1977)

3) Weng Naidong, K. Vermeulen, I. Quintens, E. Roets, J. Hoogmartens, Evaluation of analytical methods. Analysis of minocycline by liquid chromatography, Chromatographia, Volume 33, Issue 11-12, pp. 560-566 (1992)

4) M. Ryba, Dimethylformamide as a mobile phase component in reversed-phase liquid column chromatography on octadecylsilica, Chromatographia, Volume 15, Issue 4, pp. 227-230 (1982)

5) Weng Naidong, K. Vermeulen, I. Quintens, E. Roets, J. Hoogmartens, Evaluation of analytical methods. Analysis of minocycline by liquid chromatography, Chromatographia, Volume 33, Issue 11-12, pp. 560-566 (1992)

6) N.H. Zawillaa, b, J. Dianab, J. Hoogmartensb, E. Adamsb, Improved LC of minocycline drug substance, J Pharm Biomed Anal. 3;40(4), pp. 815 - 21 (2006)

7) Patricia Zubata, Rita Ceresole, Maria Ana Rosasco, Maria Teresa Pizzorno, A new HPLC method for azithromycin quantitation, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 27, pp. 833 - 836

(2002)

8) F.N. Kamau, H.K. Chepkwony, J.K. Ngugi, D. Debremaeker, E. Roets, and J. Hoogmartens, Isocratic Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Azithromycin and Its Structurally Related Substances in Bulk Samples, Journal of Chromatographic Science, Volume 40, pp 529 - 533 (2002)

9) L. Miguel, C. Barbas, LC determination of impurities in azithromycin tablets, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volumn 33, pp 211 - 217 (2003)

Abstract

LC/UV-based analytical method optimization of azithromycin and minocycline hydrochloride in KP/KPC

Jo Sang Woo
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Anaysis
The Graduate School
Seoul National Univerity

The global markets for antibiotics were forecast to reach the market size of $42.1 billion in 2011, showing 3.5% of growth rate on the markets. In regard to the specific continent, Asia-pacific took possesion of $13 billion (30.9%) out of the whole markets, which was the largest one compared with Europe ($11.2 billion, 26.6%) and North america ($10 billion, 23.7%). But although antibiotics were important, quality control procedures of them notified by KFDA didn't consider the efficiency of the analysis, accompanied by the varied procedures on each drug with a same compound. So, to improve the procedures, KFDA have been trying to integrate 'the standards of the antibiotics' into KP and KPC, starting with the adoptation of 85 antibiotics to the 9th KP, followed by adding the standards of high frequency drugs on the KP and KPC.

Especially in case of tetracycline and macrolide antibiotics which

have been used as a main component in various drugs, each drug containing the same component exhibit the diverse analyzing method of microbial assay or liquid chromatography on KP and KPC, that decrease the efficiency of quality control. Thus, an unified method on all the antibiotics containing same compounds was essential.

In this study, I tried to suggest the representative analyzing method of azithromycin and minocycline hydrochloride which were used in high frequency out of 20 kinds of macrolide and 6 of tetracycline antibiotics in KP and KPC using liquid chromatography. LC column was Octadecylsilica column (phenomenex Luna C18, 150 × 4.6 mm, 5 μm) which was universal on many companies or laboratories. Optimization was proceeded by response surface analysis, and validation of determined method was performed based on the FDA validation guideline. With this representative method, quantification of antibiotics with same component could be easily standardized to a single system, and make convenience on quality control of antibiotics. In conclusion, this research can be a starting point of quality control standardization for antibiotics, tetracyclines and macrolides in specific. Furthermore, it showed the possibility of optimizing the quantification method for modifying other inefficient quality control on high frequency drugs.

Keywords: Azithromycin, Minocycline hydrochloride, HPLC(High-Performance Liquid Chromatography), UV detector(Ultraviolet detector), Response surface methodology, Method validation

Student Number : 2011-21621