

## Development of alternative assay method without hazardous reagent, carbon tetrachloride, for cefroxadine capsules in Korean Pharmaceutical Codex

Narae Seo, Yeoul Kang, Yeong Shin Park, Jong Min Lee, Myung Jin Jeong,  
Sang Seol Jeon, Jae Hyung An and Kyeong Ho Kim<sup>★</sup>

*College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 192-1, Korea*

(Received February 24, 2014; Revised June 7, 2014; Accepted June 7, 2014)

### 세프록사딘 캡슐 시험에 사용되는 유해시약인 사염화탄소 대체 공정시험법 개발

서나래 · 강여울 · 박영신 · 이종민 · 정명진 · 전상설 · 안재형 · 김경호<sup>★</sup>

강원대학교 약학대학

(2014. 2. 24. 접수, 2014. 6. 7. 수정, 2014. 6. 7. 승인)

**Abstract:** Currently oxidation-reduction titration method for the assay method using the hazardous reagent, carbon tetrachloride, for cefroxadine capsules has been used in Korean Pharmaceutical Codex. We developed and validated an alternative HPLC assay method by substituting the use of the hazardous reagent, carbon tetrachloride, to the use of less toxic ones like acetonitrile. The linearity of the calibration curves in the desired concentration range was good ( $r^2 > 0.999$ ). Relative standard deviations of intra-day precision were ranged between 0.30% and 0.69% and inter-day precision were ranged between 0.47% and 0.82%. Accuracy was obtained with recoveries in range of 100.20% and 100.56%. Developed method was applied to the determination of cefroxadine in commercial cefroxadine capsule and could be expected to become valuable tools for revising the Korean Pharmaceutical Codex.

**요 약:** 국가공정서 중 하나인 대한민국약전외의약품기준에는 세프록사딘 캡슐의 정량법으로 유해시약인 사염화탄소를 사용하는 산화환원분석법이 수재되어 있다. 세프록사딘 캡슐의 환경 친화적인 대체 시험법으로 보다 안전하고 효율적인 친환경용매를 사용하는 HPLC 분석법을 개발하고, 이를 검증하였다. 직선성은 상관계수( $r^2$ )가 0.999이상으로 우수하였다. 일내 정밀도는 상대표준편차 0.30~0.69%, 일간 정밀도는 0.47~0.82%로, 회수율은 100.20~100.56%로 나타났다. 개발한 시험법을 이용하여 시중 유통 중인 세프록사딘 캡슐 중 세프록사딘의 함량측정에 응용하였다. 개발된 시험법은 대한민국약전외의약품기준의 개정에 기여가 될 것이다.

**Key words:** Korean Pharmaceutical Codex, hazardous reagents, alternative testing methods, validation, high performance liquid chromatography

<sup>★</sup> Corresponding author

Phone : +82-(0)33-250-6918 Fax : +82-(0)33-259-5631

E-mail : kyeong@kangwon.ac.kr

## 1. 서 론

최근 의학의 발전으로 인구가 고령화되고 노인성 질환 및 환경 문제에 따른 만성질환이 증가하면서 제약산업이 급속도로 성장하였으며, 의약품 수요가 확대되었다. 제약산업은 정밀화학 산업 중에서도 환경오염 유발도가 가장 높은 업종 중 하나로, 단위 생산 당 폐기물 발생량이 타 정밀화학 업종에 비해 510 배가 높고, 의약품 제조 및 품질관리 등의 작업에서 다양한 폐기물들이 발생한다. 의약품 중 유해시약에 관하여는 International Conference on Harmonization (ICH)의 잔류용매지침<sup>1</sup>에서 용매 별로 유해성에 따라 Class 1, 2, 3 및 기타용매로 분류하여 그 잔류량을 규제하고 있다. 특히 Class 1에 속하는 벤젠, 사염화탄소 등은 발암원성, 환경유해성 물질로서 원칙적으로 사용이 금지되고 있는 실정이다. 또한 Pfizer사의 Environment, Health and Safety (EHS) 연구팀은 2008년 문헌을 통하여 의약품 열 화학 분야에 널리 사용되는 용매들을 대상으로 worker safety, process safety 및 environmental and regulatory consideration 등의 항목을 평가하여 친환경 용매, 사용할 수 있지만 비 친환경 용매 및 사용이 권장되지 않는 비 친환경 용매의 3 가지 군으로 용매를 나누었다.<sup>2</sup>

미국 FDA에서는 주로 미국약전의 각조에 수재된 의약품을 대상으로 친환경시험법을 개발 중이며, EU 국가들도 유럽약전에 수재된 의약품들에 대한 품질관리 시험법의 개선책이 마련하고 있다. 특히 EU 국가들은 비선광도, 확인시험 및 정량법 등의 항목에서 디옥산을 에탄올로, 클로로포름을 메탄올이나 디클로로메탄 등으로 변경하거나, 클로로포름, 피리딘을 사용하지 않는 시험법을 개발하고 있다.

대한민국약전 제10개정원안 작성 지침<sup>3</sup>에는 “「유해하여 시험자에 대한 노출이 우려되는 시약」, 「유해작용 및 잔류성 등으로 환경에 부하가 큰 시약」 등에 대하여는 사용을 피하거나 사용량을 최소한으로 한다.”라고 기재되어 있다.

그러나 국가공정서 중 하나인 대한민국약전의약품 품질기준<sup>4</sup>에는 여전히 이러한 유해시약을 사용하는 많은 시험법이 수재되어 있으며, 이들은 각 품목을 생산하는 제조업소의 품질관리과정에서 사용되고 있다. 이러한 현 제약분야 의약품 품질관리 시험법은 인체·환경 유해 시약 및 유기용매들이 다양하게 사용되어, 이로 인한 환경오염, 잔류용매로 인한 독성 문

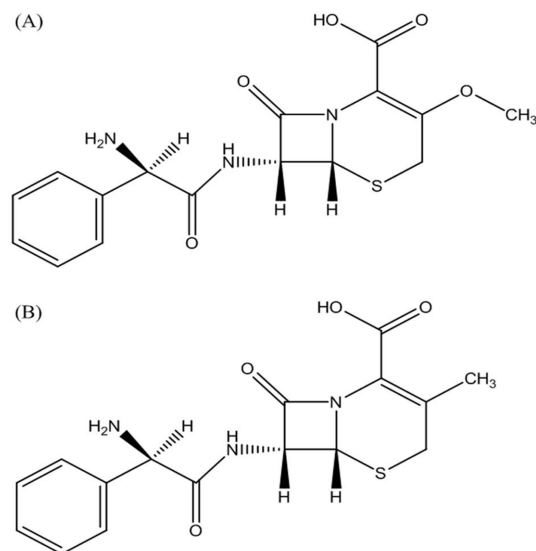


Fig. 1. Chemical structures of (A) cefroxadine and (B) cefalexin (I.S.).

제, 폐용매 처리 문제 등의 많은 문제점을 안고 있다. 제약산업의 각 공정은 막대한 재원과 장기간의 시간을 요하며 화학물질의 사용량이 많고, 유해물질 배출도 많다. 특히 디옥산, 사염화탄소 등의 유해시약 및 독성 유기용매의 사용이 많은 의약품 품질관리 측면에서의 그린기술 적용이 시급하다. 따라서 국가적 차원에서 그린시험법을 적용한 의약품 품질관리법을 확립하기 위한 노력을 기울여야 하고, 이에 대한 일환으로 의약품 공정서에 수재된 시험법 중 인체·환경 유해 시약 대체 시험법 개발이 선행되어야 한다.

세프록사딘은 광범위한 항균 스펙트럼을 가지는 3세대 세팔로스포린계 항생제이다(Fig. 1).<sup>5-7</sup> 대한민국약전의약품기준에서는 세프록사딘 캡슐의 정량법으로 유해시약인 사염화탄소를 사용하는 산화환원적정법이 수재되어 있다.<sup>4</sup> 사염화탄소는 ICH의 잔류용매지침에서 Class 1에 속한 발암원성 용매로서 2013년도부터 국내에서 사용이 금지되었다. 따라서 공정서에 수재된 현행 정량법을 대체할 분석법을 개발할 필요가 대두되었다.

본 연구에서는 세프록사딘 캡슐에 대하여 보다 안전하고 효율적인 친환경용매를 사용하는 HPLC 분석법을 확립하고, KFDA의 밸리데이션 프로토콜<sup>8,9</sup>에 준하여 분석법 검증과정을 실시하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 시료

분석에 사용되는 세프록사딘 표준품은 삼진제약(주)에서 제공 받았고, 내부표준물질인 세파렉신 수화물은 (주)한국코러스제약에서 제공받아 사용하였다. 이동상 제조에 사용한 황산암모늄은 덕산약품공업(주)에서 구입하여 정제수에 용해하여 사용하였고, 아세트니트릴은 HPLC 등급 이상으로 대정화금(주)에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용되는 아세트산과 인산은 대정화금(주)에서 구입한 것을 사용하였다.

### 2.2. 기기 및 측정조건

고성능액체크로마토그래피(HPLC)는 Agilent 1100 series G1379A Degasser, G1312A Bin Pump, G1313A ALS, G1316 colcom, G1313A VWD (Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. HPLC 컬럼은 Luna (C<sub>18</sub>, 150 × 4.6 mm, 5 μm) column을 사용하였으며, 자외 흡광검출기의 파장은 254 nm로 하였다. 이동상으로는 황산암모늄 용액(1→100)과 아세트니트릴 혼합액(91.5:8.5, v/v)을 사용하였다. 시료는 10 μL를 주입하였고 유속은 1.0 mL/min로 하여 분석하였다.

### 2.3. 표준용액의 조제

세프록사딘 표준품은 물·아세트산·인산 혼합액(27:12:1, v/v/v)에 녹여 2500 μg/mL의 농도로 표준원액을 만들어 냉장 보관하였다. 그리고 내부표준물질인 세파렉신 표준품은 물·아세트산·인산 혼합액(27:12:1, v/v/v)에 녹여 2500 μg/mL의 농도로 내부표준원액을 만들어 냉장 보관하였다. 표준원액에 물·아세트산·인산 혼합액(27:12:1, v/v/v)을 가하여 세프록사딘의 농도는 각각 50, 100, 200, 300, 400, 500 μg/mL이고 내부표준물질의 농도는 250 μg/mL가 되도록 하여 표준용액을 제조하였다. QC (quality control) 용액은 세프록사딘 농도 200, 250, 300 μg/mL, 내부표준물질 250 μg/mL의 농도로 표준용액과 같은 방법으로 만들어서 냉장 보관하였다.

### 2.4. 분석법의 검증(Validation)

세프록사딘 표준원액을 물·아세트산·인산 혼합액(27:12:1, v/v/v)으로 희석한 것을 표준용액으로 하여 직선성, 정확성 및 정밀성, 반복성, 시스템적합성, 재현성, 완전성 등을 측정하였다. 직선성은 5 회 반복 실험하여 평가하였다. 세프록사딘 50, 100, 200, 300,

400, 500 μg/mL 농도에서 세프록사딘과 내부표준물질의 피크면적 비율을 이용하여 검량선을 작성하고, 각 검량선의 상관계수(Coefficient of correlation, r<sup>2</sup>)를 구하였다. 정확성과 정밀성은 하루에 실험을 6 번 시행하여 일내(Intra-batch) 정밀성, 정확성을 구하였고, 3 일간 실험을 행하여 일간(Inter-batch) 정밀성을 구하였다. 회수율은 표준품 첨가법(standard addition)을 사용하여 검토하였다. 세프록사딘 한 캡슐 당 표시량에 해당하는 내용물에 그의 80, 100, 120%(저, 중, 고농도)의 세프록사딘 표준품을 가하여 분석하였다. 저, 중, 고농도에서 3 회 반복하여 시험한 후 표준품을 가한 세프록사딘 시료에서 측정된 세프록사딘의 양과 세프록사딘 시료 자체에서 측정된 세프록사딘 양을 비교하여 회수율을 평가하였다.

### 2.5. 유통 중인 세프록사딘 캡슐 내 세프록사딘의 정량

이 약 20 캡슐 이상의 내용물을 꺼내어 그 질량을 정밀하게 달아 세프록사딘 약 25 mg에 해당하는 양을 취하였다. 여기에 내부표준용액 5 mL와 물·아세트산·인산 혼합액(27:12:1, v/v/v)을 넣어 정확하게 100 mL로 한 용액을 검액으로 하였다. 따로 세프록사딘 표준품 25 mg을 취하여 내부표준용액 5 mL와 물·아세트산·인산 혼합액(27:12:1, v/v/v)을 넣어 정확하게 100 mL로 한 용액을 표준액으로 하였다. 이들 액 10 μL씩을 가지고 HPLC 분석을 실시하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 세프록사딘의 피크면적비 Q<sub>T</sub> 및 Q<sub>S</sub>를 구하였다. 세프록사딘 캡슐 내의 세프록사딘의 함량은 아래의 식으로 구하였다.

$$\begin{aligned} & \text{세프록사딘 (C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S)의 역가}(\mu\text{g}) \\ & = \text{세프록사딘표준품의 역가}(\mu\text{g}) \times \frac{Q_T}{Q_S} \end{aligned}$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. HPLC 정량법의 확립

공정서에 수록된 약물의 시험법은 보통 현재 생산 중인 약물에 대한 분석방법이기 때문에 간단하고 값싸면서 완전성있는 시험 방법이 바람직하다. 유효시약을 대체하기 위한 시험방법으로 역상 HPLC를 선택하였으며 이동상으로는 황산암모늄 용액(1→100)과 아세트니트릴의 혼합액(91.5:8.5, v/v)을 사용하였다. 자외선 흡광광도계로 254 nm에서 측정하였으며, 위의 이동상으로 HPLC를 시행했을 때 세프록사딘은 8.40

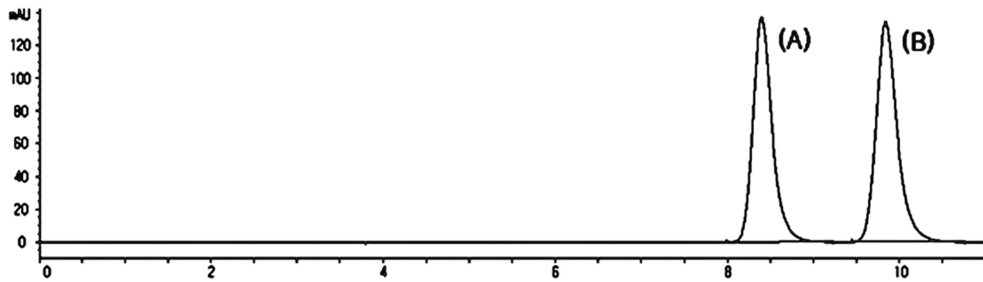


Fig. 2. HPLC-UV chromatogram of (A) cefroxadine and (B) cefalexin.

분, 내부표준물질인 세파렉신은 9.85 분에 피크가 관찰되었다(Fig. 2).

### 3.2. 직선성(Linearity)

50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 단계적으로 희석한 세프록사딘 표준용액을 HPLC로 5 회 반복 분석하여 검량선을 작성하였으며(Table 1), 검량선의 상관계수( $r^2$ )가 0.999 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다.

### 3.3. 정밀성(Precision)

세프록사딘의 농도가 각각 200, 250, 300  $\mu\text{g/mL}$ 이고 내부표준물질의 농도는 250  $\mu\text{g/mL}$ 으로 일정한 표준용액을 하루에 6 회씩, 3 일간 분석하여 정밀성을 측정하였을 때, 일내 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차가 0.30~0.69%, 일간 정밀성은 상대표준편차가 0.47~0.82%를 나타내었다(Table 2).

Table 1. Results of linearity test. slope, y-intercept and  $r^2$  of calibration curves

Trials	Slope	y-intercept	$r^2$
1	0.0029	0.0014	0.9998
2	0.0029	0.0024	0.9999
3	0.0029	0.0026	1.0000
4	0.0029	0.0007	1.0000
5	0.0029	0.0060	0.9994
Average	0.0029	0.0000	1.0000
STDEV <sup>a</sup>	0.0000	0.0020	0.0002

<sup>a</sup>:STDEV: standard deviation

### 3.4. 회수율(Recovery)

세프록사딘 의약품 정제 중 세프록사딘 함량의 80, 100, 120%가 첨가되도록 세프록사딘 표준품을 가하고 재현성을 확인해 보았다(Table 3). 이 실험을 3 회 실시한 결과 회수율은 100.20~100.56%으로 나타내었다.

### 3.5. 시스템 적합성(Repeatability)

100% 용액을 12 번 반복 분석하여 머무름시간, 피크면적, 이론단수(N), 비대칭계수(As), 분리도(R)를 측정하였다(Table 4). 세프록사딘과 내부표준물질인 세파렉신의 피크면적의 상대표준편차는 각각 0.18%,

Table 2. Results of precision intra/inter-day validations of the HPLC-UV method

Con. $\mu\text{g/mL}$	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=3)	
	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
200	0.30	99.38	0.47	99.86
250	0.52	99.52	0.82	99.39
300	0.69	100.22	0.73	99.21

Table 3. Recovery tests for commercial drug (n=3) using HPLC-UV method

Added contents (%)	Recovery (%)	RSD <sup>a</sup> (%)
80	100.24	0.25
100	100.20	0.95
120	100.56	0.78

<sup>a</sup>RSD: relative standard deviation

Table 4. Results of system suitability validation (n=12)

	Retention time (RSD%)	Peak area (RSD%)	Plate number	Asymmetry factor	Resolution
Cefroxadine	0.04	0.18	22787.64	0.77	5.67
IS	0.08	0.25	24946.42	0.66	

Table 5. Results of intermediate precision validation (n=12)

Contents (%)	Intermediate precision (RSD%)	
	Cefroxadine	
100	0.13	

0.25%, 머무름시간의 상대표준편차는 각각 0.04%, 0.08%, 이론단수(N)는 각각 22083.73, 21946.42, 비대칭계수(As)는 각각 0.77, 0.66, 그리고 세프록사딘과 내부표준물질인 세파렉신의 분리도(R)는 5.67로 나타났다.

### 3.6. 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

다른 실험기기인 Shimadzu LC-20AD HPLC를 사용하여 분석법의 전 조작을 12 회 반복하여 측정하였을 때, 세프록사딘과 내부표준물질의 피크면적비의 상대표준편차는 0.13%로 나타났다(Table 5).

### 3.7. 완건성(Robustness)

이동상의 조성, 유속을 변경시켜 분석하였을 때, 머무름 시간과 피크 면적은 세프록사딘의 경우 각각 상대표준편차는 0.21~0.36%, 0.10~0.41%이고 내부표준물질인 세파렉신의 경우는 각각 상대표준편차가 0.09~0.58%, 0.17~0.33%로 나타났다(Table 6).

### 3.8. 유통 중인 세프록사딘 캡슐 내 세프록사딘의 정량

본 시험법의 검증과정을 통하여 세프록사딘에 대한 상기 HPLC 분석법이 세프록사딘 캡슐 내의 세프록사딘의 정량에 이용될 수 있는 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 시중에 유통되는 세프록사딘 캡슐 제제를 대상으로 6 회 반복 실험하여

세프록사딘 캡슐 중 세프록사딘의 함량을 측정된 결과 캡슐 중 세프록사딘 함량의 평균은 98.42%, 상대표준편차는 3.91% 이었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 유태시약을 사용하는 대한민국약 전외의약품기준 중 사염화탄소를 사용하는 세프록사딘 정량법에 대하여 대체시험법을 개발하였고, 확립된 시험법으로 시중에 유통되는 세프록사딘 캡슐 제제를 실제로 분석하여 시험법의 유효성을 검증하였다. 개발한 분석법의 검증은 직선성, 정확성 및 정밀성, 반복성, 실험실내 정밀성, 회수율, 그리고 완건성 시험 등을 통하여 평가하였다. 본 실험결과 시스템적합성에서 정밀도(RSD%) 0.15%이하, 이론단수 22788, 비대칭계수 0.77, 그리고 분리도 5.67을 나타내었다. 정밀도실험은 일내 정밀성과 일간 정밀성으로 나누어 확인하였다. 일내 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차가 0.30~0.69%, 일간 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차가 0.47~0.82%로 나타내었다. 그리고 직선성 실험에서는 상관계수( $r^2$ )가 0.9999로 양호한 직선성을 나타내었다. 정확도 실험에서는 회수율시험으로서 최소 100.20%, 최대 100.56%로 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 세프록사딘 캡슐 중 세프록사딘의 함량을 분석하기 위한 공정 시험법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발과제의 연구개발비 지원(13172의약안216)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Table 6. Results of robustness validation (n=12)

Parameters		Cefroxadine		Cefalexin (Internal standard)	
		$t_R$ (RSD, %)	Peak area (RSD, %)	$t_R$ (RSD, %)	Peak area (RSD, %)
Flow rate (mL/min)	0.90	0.41	0.33	0.58	0.29
	1.05	0.10	0.36	0.09	0.17
Mobile phase (Acetonitrile%)	8.0	0.18	0.21	0.27	0.33
	9.0	0.15	0.33	0.19	0.25

### 참고문헌

1. ICH Guideline. Q3C(R4): Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R4) in ICH harmonised tripartite guideline (2009).
2. K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn, T. Fevig, S. Jennings, T. A. Johnson, H. P. Kleine, C. Knight, M. A. Nagy, D. A. Perry and M. Stefaniak, *Green Chem.*, **10**, 31-36 (2008).
3. Ministry of Food and Drug Safety, No. B1-2011-2-031 (2011.01.01), Republic of Korea.
4. Ministry of Food and Drug Safety, No. 2012-142 (2012.03.07), Republic of Korea.
5. N. Iwai, A. Sasaki, Y. Taneda, K. Inokuma and H. Nakamura, *J. Antibiot.*, **34**, 1663-1678 (1981).
6. O. Zak, W.A. Vischer, W. Tosch and F. Kradolfer, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **1**, 11-20 (1977).
7. D. Greenwood, *J. Antibiot.*, **31**, 697-702 (1978).
8. Ministry of Food and Drug Safety No. 2009-173 (2009.12.15), Republic of Korea.
9. Ministry of Food and Drug Safety, No. C0-2012-2-005 (2012.09.19), Republic of Korea.