



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0010264
(43) 공개일자 2017년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/33 (2006.01) A61K 47/38 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) G01N 1/38 (2006.01)
G01N 1/42 (2006.01) G01N 21/77 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 21/33 (2013.01)
A61K 47/38 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0101717

(22) 출원일자 2015년07월17일

심사청구일자 2015년07월17일

(71) 출원인

대화제약 주식회사

강원도 횡성군 횡성읍 한우로 495

(72) 발명자

양재권

경기도 성남시 분당구 중앙공원로 17 313동 405호
(서현동, 시범단지한양아파트)

조영우

서울특별시 송파구 중대로 121, 404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 19 항

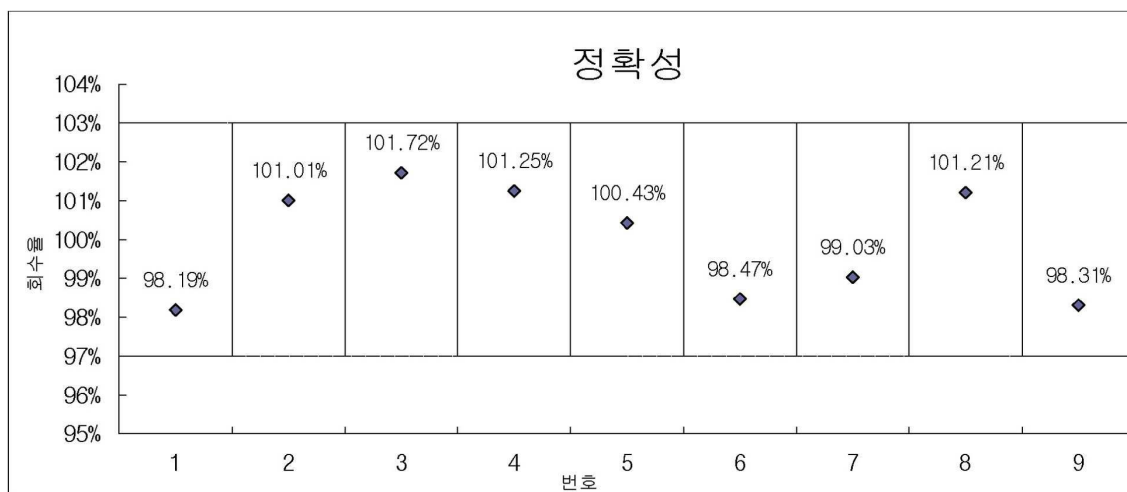
(54) 발명의 명칭 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 개선된 정량방법

(57) 요약

본 발명은 유리마개 시험관에 검액 및 표준액을 별도로 준비한 반응 용액과 일정한 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하는 단계; 상기 방법으로 처리한 검액 및 반응액의 흡광도를 측정하는 단계; 및 측정된 흡광도를 수식에 대입하여 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



함량비를 도출하는 단계를 포함하는, 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법, 상기 정량방법에 따라 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 결정하는 단계; 및 상기 결정된 함량비를 기준값과 비교하여 제제의 품질을 판단하는 단계를 포함하는, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 포함하는 제제의 품질보증(quality assurance; QA) 방법, 및 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 소정의 범위에서 선택되는 복수의 기지 농도의 표준액을 준비하는 단계; 특정 과정에서 상기 복수의 표준액에 대해 측정된 흡광도로부터 검정곡선을 작성하여 농도에 따른 흡광도의 일차방정식을 도출하는 단계; 및 상기 도출된 방정식에 상기 표준액에서와 동일한 과정에서 측정된 검액의 흡광도를 대입하여 상응하는 농도값을 계산하여 이를 검액의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도로 결정하는 단계를 포함하는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법을 제공하는 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

G01N 1/38 (2013.01)

G01N 1/42 (2013.01)

G01N 21/77 (2013.01)

G01N 2001/386 (2013.01)

(72) 발명자

이연주

인천광역시 서구 건지로311번길 40 (석남동)

추성남

강원도 횡성군 횡성읍 북천서로15번길 27 2동 202호 (북천리, 태우아파트)

이지은

경상북도 경산시 백천동로 77 (백천동)

임훈재

광주광역시 광산구 우산로95번길 60 102동 1107호 (우산동, 대광로제비앙)

최소라

강원도 원주시 홍양로 64 102동 734호 (태장동, 두진백로아파트)

이현구

강원도 횡성군 횡성읍 한우로307번길 16 307호 (읍상리, 스위트원룸)

오지훈

경기도 이천시 백사면 이여로 260-8 103동 1305호 (조읍리, 한솔아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법에 있어서,

1.5 내지 4.5% w/v 농도로 디페닐아민을 빙초산에 용해시키고, 상기 사용한 빙초산 부피의 0.36 내지 0.75배 부피의 염산을 첨가하여 용액 A를 제조하는 제1단계;

카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 함유하는 제제를 표시량을 기준으로 기지의 양의 물에 용해 또는 소정의 비율로 추가 희석시켜 검액을 준비하는 제2단계;

카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 상기 제제의 표시량을 참고하여 제2단계로부터 검액과 동일한 농도가 되도록 물에 용해 또는 희석시켜 제1표준액을 준비하는 제3단계;

유리마개 시험관에 상기 제2단계 및 제3단계에 따라 각각 준비한 검액 및 표준액을 제1단계에 따라 준비한 용액 A와 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 반응시킨 후 냉각하는 제4단계; 및

상기 용액 A와 혼합하여 열처리한 검액 및 표준액의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 측정하고, 0.2 이상의 흡광도를 나타내는 소정의 파장에서의 흡광도를 하기 방정식 1에 대입하여 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 도출하는 제5단계를 포함하는 정량방법:

[방정식 1]

$$\text{함량비}(\%) = \frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s}{W_t} \times \frac{\text{제제의 평균무게}(mg)}{\text{표시량}(mg)} \times \text{표준품의 순도}$$

상기 식에서,

A_s 는 표준액의 흡광도;

W_t 및 W_s 는 각각 검체 채취량(mg) 및 주성분 표준품 채취량(mg); 및

A_t 는 검액 중 카르복시셀룰로오스 나트륨의 흡광도를 나타냄.

청구항 2

제1항에 있어서,

제제에 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 이외에 UV-Vis 영역에서 흡수를 나타내는 추가 성분을 포함할 경우, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 표시량의 해당 성분을 포함하는 제2표준액을 준비하는 제3-1단계를 추가로 포함하는 것인 정량방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 이외에 UV-Vis 영역에서 흡수를 나타내는 추가 성분은 알긴산 또는 이의 염인 것인 정량방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 제2표준액 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도는 제3단계에 따른 제1표준액에서와 동일한 농도인 것인 정량방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

A_1 는 검액의 흡광도-(제2표준액의 흡광도-제1표준액의 흡광도)인 것인 정량방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

유리마개 시험관에 물과 제1단계에 따라 준비한 용액 A를 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하여 공시험액을 준비하는 제4-1단계를 추가로 포함하는 정량방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

A_s 및 A_t 는 동일한 파장에서 공시험액에 대해 측정된 흡광도로 보정된 것인 정량방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

검액, 제1표준액 및 존재하는 경우, 제2표준액의 농도는 제5단계에서 선택된 파장에서의 흡광도 값이 1을 초과하지 않도록 조절된 것인 정량방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제제는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 염; 및 알긴산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 정제인 것인 정량방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

제4단계의 90 내지 105℃에서 처리하는 과정은 오븐을 이용하여 수행하는 것인 정량방법.

청구항 11

제1항에 따른 정량방법에 따라 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 결정하는 제1단계; 및

상기 제1단계로부터 결정된 함량비를 기준값과 비교하여 제제의 품질을 판단하는 제2단계를 포함하는, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 포함하는 제제의 품질보증(quality assurance; QA) 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 제제가 원료의약품이고, 제1단계로부터 도출된 함량비가 99.0 내지 100.0%이면 정상품으로 판단하는 것인 품질보증 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 제제가 외용제를 제외한 단일제제이고, 제1단계로부터 도출된 함량비가 95.0 내지 105.0%이면 정상품으로 판단하는 것인 품질보증 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 제제가 복합제제이거나, 외용제인 단일제제이고, 제1단계로부터 도출된 함량비가 90.0 내지 110.0%이면 정상품으로 판단하는 것인 품질보증 방법.

청구항 15

카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법에 있어서,

1.5 내지 4.5% w/v 농도로 디페닐아민을 빙초산에 용해시키고, 상기 사용한 빙초산 부피의 0.36 내지 0.75배 부피의 염산을 첨가하여 용액 A를 제조하는 제1단계;

제1검액으로써 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 미지농도로 함유하는 수용액을 준비하는 제2단계;

카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 3개 이상의 농도로 물에 용해시켜 제1 내지 제m표준액(m은 3이상의 정수)을 준비하는 제3단계;

유리마개 시험관에 상기 제2단계 및 제3단계에 따라 각각 준비한 검액 및 표준액들을 제1단계에 따라 준비한 용액 A와 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하는 제4단계;

상기 용액 A와 혼합하여 열처리한 검액 및 표준액의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 측정하고, 0.2 이상의 흡광도를 나타내는 소정의 파장을 선택하는 제5단계;

상기 제5단계로부터 선택된 파장에서 제1 내지 제3표준액의 흡광도로부터 검정곡선을 작성하여 농도에 따른 흡광도의 일차방정식을 도출하는 제6단계; 및

상기 제6단계로부터 도출된 방정식에 제5단계로부터 선택된 파장에서 검액의 흡광도를 대입하여 상응하는 농도값을 계산하여 제1검액의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도로 결정하는 제7단계를 포함하는 정량방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

제1검액을 소정의 비율로 희석하여 제2 내지 제n검액(n은 0 이상의 정수)을 준비하는 제2-1단계를 추가로 포함하는 것인 정량방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

제1검액의 흡광도가 1 초과인 경우 제2 내지 제n검액 중 흡광도가 0.2 이상 1 이하인 검액의 흡광도를 이용하여 농도를 산출하고 상응하는 희석 비율로 환산하여 제1검액의 농도를 결정하는 것인 정량방법.

청구항 18

제15항 또는 제16항에 있어서,

유리마개 시험관에 물과 제1단계에 따라 준비한 용액 A를 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하여 공시험액을 준비하는 제4-1단계를 추가로 포함하는 정량방법.

청구항 19

제15항 또는 제16항에 있어서,

제1 내지 제n검액 및 제1 내지 제3표준액의 흡광도는 동일한 파장에서 공시험액에 대해 측정된 흡광도로 보정된 것인 정량방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유리마개 시험관에 검액 및 표준액을 별도로 준비한 반응 용액과 일정한 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하는 단계; 상기 방법으로 처리한 검액 및 반응액의 흡광도를 측정하는 단계; 및 측정된 흡광도를 수식에 대입하여 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 도출하는 단계를 포함하는, 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법, 상기 정량방법에 따라 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 결정하는 단계; 및 상기 결정된 함량비를 기준값과 비교하여 제제의 품질을 판단하는 단계를 포함하는, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 포함하는 제제의 품질보증(quality assurance; QA) 방법, 및 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 소정의 범위에서 선택되는 3개 이상의 기지 농도의 표준액을 준비하는 단계; 특정 파장에서 상기 3개 이상의 표준액에 대해 측정된 흡광도로부터 검정곡선을 작성하여 농도에 따른 흡광도의 일차방정식을 도출하는 단계; 및 상기 도출된 방정식에 상기 표준액에서와 동일한 파장에서 측정된 검액의 흡광도를 대입하여 상응하는 농도값을 계산하여 이를 검액의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도로 결정하는 단계를 포함하는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법을 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] 시판되는 제제는 개별 성분의 함량을 표시하고 있으며, 개개의 제제에 대하여 일정한 치료효과를 보증하기 위하여 제제 중의 유효성분의 함량이 표시량을 중심으로 하여 바람직한 범위 내에 들어있음을 보증하기 위하여 제제 균일성 시험을 수행하여야 한다. 예컨대, 약물의 투여량을 제제의 표시량을 기준으로 설정함으로 고려할 때에, 함량이 표시량으로부터 크게 미달되는 경우 유효성분의 부족한 투여로 원하는 약효를 발휘할 수 없으며, 함량이 표시량으로부터 크게 초과하는 경우에는 과다복용으로 인한 부작용 등을 수반할 수 있으므로 개별 제제가 주성분 함량을 균일하게 유지하는 것은 중요하다. 따라서, 제제의 생산라인에서 주기적으로 또한 임의로 선택된 제제의 유효성분 함량을 확인하여 표시량과 비교함으로써 제제균일성을 시험하는 것은 매우 중요하다.

[0003] 따라서, 대한민국약전은 제형에 따른 일반시험법들을 규정하고 있으며, 식품의약품안전청은 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인을 통해 의약품/의약외품의 제조/수입품목허가(신고)신청 및 품질관리를 위하여 필요한 분석법에 대한 밸리데이션 실시방법을 구체적으로 제시하고 있다. 예컨대, 원료약품 또는 제제의 정량시험에 있어서는 일반적으로 시험농도의 80 내지 120%, 함량균일성 시험에 있어서 정량분무흡입제(metered dose inhalers)와 같이 제형의 특성에 근거하여 보다 넓은 범위를 규정하여야 하는 경우를 제외하고는 적어도 시험농도의 70 내지 130%의 범위에 들어야 함을 규정하고 있다.

- [0004] 한편, 식품의약품안전평가원에서 제공하는 지방청 의약품 등 기준 및 시험방법 심사 매뉴얼에 따르면 원료의약품 및 완제의약품의 함량 또는 역가의 기준은 표시량 또는 역가에 대하여 일반기준에서 원료의약품은 99.0% 이상, 단일제제는 95.0 내지 105.0%(단, 외용제는 90.0 내지 110.0%), 복합제제는 90.0 내지 110%일 것을 규정하고 있다.
- [0005] 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose; CMC)는 경구투여(oral), 국소투여(topical) 및 몇몇 비경구투여용(parenteral) 제제에 사용되며, 화장품(cosmetics), 세면용품(toiletries) 및 식품(food products)에도 사용되는 비독성 및 비자극성 물질이다. 그러나, 과량을 경구투여할 경우 완하제 효과(laxative effect)를 가질 수 있다. WHO는 목적하는 효과를 달성하기 위해 요구되는 수준이 건강에 해롭다고 판단하지 않으므로 식품 첨가제로서 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 허용가능한 일일 복용량을 규정하고 있지는 않다. 그러나, 동물실험에서 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 피하 투여는 염증을 야기할 수 있으며, 몇몇 반복적으로 주사한 경우 주사한 부위에서 섬유육종이 관찰된 케이스도 있다. 또한, 소와 말류에서 백신이나 페니실린과 같은 비경구 제제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨에 의한 과민(hypersensitivity) 및 초과민반응(anaphylactic reaction)이 발생한 경우도 있다. 주로 광택제, 증량제, 증점제 등의 식품 첨가제로 사용되고 있으나, 약학적으로는 점안제 또는 팽창성 설사제의 성분으로 사용되기도 한다. 또한 알긴산과 함께 비만치료제로 사용되기도 한다.
- [0006] 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 포함하는 제제에 있어서, 종래 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 함량을 확인하는 방법으로는 1) 식약처 의약품 등 기준 및 시험방법 제2개정에 개시된, pH 조절을 이용한 침전법에 의해 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 알긴산을 포함하는 정제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량하는 방법 및 2) 영국약전에 개시된, 디페닐아민 용액과 혼합한 용액을 검액 및 표준액과 0.1℃ 이내로 온도변화가 엄격히 조절된 조건에서 반응시키는 방법을 이용하는 점안제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량하는 방법 등이 있다. 그러나, 침전법을 이용하는 경우 시험방법이 복잡하며, 침전물 회수의 재현성이 낮아 편차가 발생하는 단점이 있고, 영국약전에 개시된 방법은 105 내지 110℃에서 30분 동안 처리하되 온도변화를 0.1℃ 이내로 제어해야 하므로, 이와 같은 엄격한 온도조절을 위하여 특별한 장치를 필요로 하며 온도조절에 실패할 경우 측정값의 신뢰도가 크게 떨어지는 단점이 있다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 용액상에서 반응시키고 흡광도를 측정하고 표준품에 대한 값과 비교하여 제제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량을 분석하되, 용액상에서 0.1℃ 이내로 온도를 엄격히 조절하면서 반응시키는 등의 복잡한 장치나 과정을 필요로 하지 않는 개선된 정량방법을 발굴하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 종래 영국약전에 개시된 방법과 유사한 방법으로 수행하되, 90 내지 105℃에서 처리할 때, 검액과 표준액을 동시에 처리하여 동일한 반응조건을 제공하는 한 온도편차에 무관하게 높은 정확도로 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 유리마개 시험관에 검액 및 표준액을 별도로 준비한 반응 용액과 일정한 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하는 단계; 상기 방법으로 처리한 검액 및 반응액의 흡광도를 측정하는 단계; 및 측정된 흡광도를 수식에 대입하여 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 도출하는 단계를 포함하는, 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 정량방법에 따라 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 결정하는 제1단계; 및 상기 제1단계로부터 결정된 함량비를 기준값과 비교하여 제제의 품질을 판단하는 제2단계를 포함하는, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 포함하는 제제의 품질보증(quality assurance; QA) 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 소정의 범위에서 선택되는 3개 농도로 물에 용해시켜 제1 내지 제3표준액을 준비하는 단계; 특정 파장에서 상기 3개 표준액에 대해 측정된 흡광도로부터 검정곡선을 작성하여 농도에 따른 흡광도의 일차방정식을 도출하는 단계; 및 상기 도출된 방정식에 상기 표준액에서와 동일한 파장에서 측정된 검액의 흡광도를 대입하여 상응하는 농도값을 계산하여 이를 검액의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도로 결정하는 단계를 포함하는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법을 제공하

는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 제1양태는 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법에 있어서, 1.5 내지 4.5% w/v 농도로 디페닐아민을 빙초산에 용해시키고, 상기 사용한 빙초산 부피의 0.36 내지 0.75 배 부피의 염산을 첨가하여 용액 A를 제조하는 제1단계; 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 함유하는 제제를 표시량을 기준으로 기지의 양의 물에 용해 또는 소정의 비율로 추가 희석시켜 검액을 준비하는 제2단계; 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 상기 제제의 표시량을 참고하여 제2단계로부터 검액과 동일한 농도가 되도록 물에 용해 또는 희석시켜 제1표준액을 준비하는 제3단계; 유리마개 시험관에 상기 제2단계 및 제3단계에 따라 각각 준비한 검액 및 표준액을 제1단계에 따라 준비한 용액 A와 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 반응시킨 후 냉각하는 제4단계; 및 상기 용액 A와 혼합하여 열처리한 검액 및 표준액의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 측정하고, 0.2 이상의 흡광도를 나타내는 소정의 파장에서의 흡광도를 하기 방정식 1에 대입하여 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 도출하는 제5단계를 포함하는 정량 방법을 제공한다:

[0012] [방정식 1]

$$\text{함량비}(\%) = \frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s}{W_t} \times \frac{\text{제제의 평균무게}(mg)}{\text{표시량}(mg)} \times \text{표준품의 순도}$$

[0013]

[0014] 상기 식에서,

[0015] A_s 는 표준액의 흡광도;

[0016] W_t 및 W_s 는 각각 검체 채취량(mg) 및 주성분 표준품 채취량(mg); 및

[0017] A_t 는 검액 중 카르복시셀룰로오스 나트륨의 흡광도를 나타냄.

[0018] 본 발명은 종래 복잡한 과정을 통해 수행되거나, 특별한 장치를 사용하여 엄격한 조건을 충족시키면서 수행되어야 하는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법을 개선하기 위하여 고안된 것으로, 침전을 형성하고 이를 회수하여 정량하는 등의 과정없이 수용액상에서 반응 및 검출을 진행하므로 정확도 및 재현성이 향상되고, 엄격한 온도조절을 필요로 하지 않으므로 특별한 장치 등을 필요로 하지 않는 시험의 편의성을 개선된 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법을 제공할 수 있는 시료 처리조건을 최초로 발굴한 것이 특징이다.

[0019] 예컨대, 상기 제제는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 이외의 성분을 추가로 포함하는 복합제일 수 있으며, 해당 성분은 그 종류에 따라 UV-Vis 영역에서 흡수를 나타내어 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 측정값에 오차를 야기할 수 있다. 따라서, 상기 추가적인 성분에 의한 측정값의 오차를 최소화하기 위해서는 해당 성분의 흡광도 값에 대해 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 측정된 흡광도 값을 보정할 필요가 있다. 이를 위하여, 제제에 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 이외에 UV-Vis 영역에서 흡수를 나타내는 추가 성분을 포함할 경우, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 표시량의 해당 성분을 포함하는 제2표준액을 준비하는 제3-1단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 예컨대, 상기 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 이외에 UV-Vis 영역에서 흡수를 나타내는 추가 성분은 알긴산 또는 이의 염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] "카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethyl cellulose; CMC)"는 경구투여(oral), 국소투여(topical) 및 몇몇 비경구투여용(parenteral) 제제에 사용되며, 화장품(cosmetics), 세면용품(toiletries) 및 식품(food products)에도 사용되는 비독성 및 비자극성 물질이다. 그러나, 과량을 경구투여할 경우 완하제 효과(laxative effect)를 가질 수 있다. WHO는 목적하는 효과를 달성하기 위해 요구되는 수준이 건강에 해롭다고 판단하지 않으므로 식품 첨가제로서 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 허용가능한 일일 복용량을 규정하고 있지는 않다. 그러나, 동물실험에서 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 피하 투여는 염증을 야기할 수 있으며, 몇몇 반복적으로 주사한 경우 주사한 부위에서 섬유육종이 관찰된 케이스도 있다. 또한, 소와 말류에서 백신이나 페니실린과 같은 비경구 제제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨에 의한 과민(hypersensitivity) 및 초과민반응(anaphylactic reaction)이 발생한 경우도 있다. 주로 광택제, 증량제, 증점제 등의 식품 첨가제로 사용되고 있으나, 약학적으

로는 점안제 또는 팽창성 설사제의 성분으로 사용되기도 한다. 또한 알긴산과 함께 비만치료제로 사용되기도 한다.

- [0022] 알긴산(alginic acid)은 물과의 결합을 통해 점성 고무(viscous gum)를 형성하는 음이온성 다당류로, 알긴(algin) 또는 알지네이트(alginate)라고도 한다. 약화조성물에 정제 바인더 및 유화제로도 사용되며, 항과민증 효과를 나타내며, 염증성 사이토카인을 억제하는 것으로도 알려져 있다(Clin. Exp. Allergy., 2006, 36(6): 785-94). 알긴산은 장운동을 활성화하여 변통을 좋게 하고, 대장관련 질환을 예방하며, 특히 장내 염분을 체외로 배설하여 식염이 체내에 수용되는 것을 억제함으로써 고혈압을 막고 뇌졸중 예방에도 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 소화불량, 상복부통증, 속쓰림 등의 증상에 사용한다. 그러나, 부작용으로 설사 또는 변비 등의 증상을 유발할 수 있으며, 극심하고 비가역적인 경우 심부전을 나타내기도 한다.
- [0023] 예컨대, 상기 제2표준액 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도는 제3단계에 따른 제1표준액에서와 동일한 농도일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 예컨대, 전술한 바와 같이, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 이외의 성분을 추가로 포함하는 경우 추가성분의 흡광도는 기지농도로 해당 성분을 더 포함하도록 준비한 제2표준액의 흡광도로부터 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨만을 포함하는 제1표준액의 흡광도를 뺀 값에 상응하며, 이를 측정된 검액의 흡광도로부터 감하여 보정할 수 있다. 구체적으로, A_t 는 검액의 흡광도-(제2표준액의 흡광도-제1표준액의 흡광도)일 수 있다.
- [0025] 보다 정확성을 높이기 위하여 유효성분을 포함하지 않는 공시험액을 사용할 수 있다. 구체적으로, 유효성분 즉, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및/또는 추가적인 성분을 포함하는 수용액을 대신하여 동일한 양의 물을 사용하여 검액 및 표준액과 동일한 방법으로 용액 A와 반응시켜 공시험액을 준비하고, 이에 대한 흡광도 값을 바탕으로 검액 및 표준액의 흡광도 값을 보정함으로써 보다 정확한 정량을 가능하게 할 수 있다. 예컨대, 유리마개 시험관에 물과 제1단계에 따라 준비한 용액 A를 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하여 공시험액을 준비하는 제4-1단계를 추가로 포함하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 예컨대, A_s 및 A_t 는 동일한 과정에서 공시험액에 대해 측정된 흡광도로 보정된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 보정은 검액 및 표준액에 대해 측정된 흡광도로부터 공시험액에 대해 측정된 흡광도를 감하여 달성할 수 있다.
- [0027] 예컨대, 검액, 제1표준액 및 제2표준액의 농도는 제5단계에서 선택된 과정에서 흡광도 값이 1을 초과하지 않도록 조절할 수 있다. 일반적으로 분광학적 분석에 있어서, 흡광도가 투과율의 역수의 로그값($\log_{10} 1/T = -\log_{10} T$)으로 정의되는 것을 고려할 때, 흡광도 값이 1을 초과하는 경우 측정된 흡광도 값이 농도와 비례하지 않을 수 있다. 즉, 본 발명의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법은 최종 측정되는 흡광도 값이 1 이하로 조절되는 한, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도에 제한되지 않고 이를 함유하는 용액의 분석에 적용할 수 있으며, 측정된 흡광도 값이 1을 초과하는 경우에는 검액과 표준액 및 공시험액을 동일한 비율로 일체화 희석시킨 후 다시 흡광도를 측정하는 방법이나, 검액 및 표준액을 준비하는 제2 및 제3단계에서 동일한 비율로 추가적인 희석을 실시하여 최종 흡광도 값을 1 이하로 낮추어 분석하는 방법을 사용할 수 있다.
- [0028] 예컨대, 상기 제제는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨; 및 알긴산 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 정제일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 함량이 표시된 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨만을 포함하는 점안제에도 적용할 수 있음은 자명하다.
- [0029] 예컨대, 제4단계에서 90 내지 105℃에서 처리하는 과정은 오븐을 이용하여 수행할 수 있으나, 상기 범위의 온도 조건을 제공할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다. 종래 영국약전에 개시된 점안제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량하는 방법에서는 105 내지 110℃로 유지하되 온도 편차를 0.1℃ 이내로 제어하기 위하여 유욕 상에서 수행하며 특별한 장치를 이용해야만 하나, 본 발명의 정량방법은 이와 같은 엄격한 온도제어를 필요로 하지 않으므로 특별한 장비 없이도 일반적으로 사용되는 오븐을 이용하여 수행할 수 있다. 따라서, 공간이 허용하는 한, 많은 수의 시료를 동시에 처리할 수 있는 장점이 있다.
- [0030] 위와 같이 용액 A로 처리한 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨은 UV-Vis 영역에서 흡광도가 상기 처리 온도에 따라 급격히 변화하며, 처리 온도가 증가함에 따라 흡광도가 증가하는데, 처리 온도가 90℃ 미만인 경우 측정된 흡광도가 0.2 미만으로 낮아 검출이 어려울 뿐만 아니라 측정 결과를 신뢰하기 어려우며, 처리 온도가 105℃를 초과하는 경우 측정된 흡광도가 1을 초과하여 일반적인 분광학적 분석방법을 고려할 때 측정된 흡광도가 농도와 선

형적으로 비례하지 않을 수 있으므로 부정확한 결과 또는 재현성이 낮은 결과를 도출할 수 있다.

- [0031] 본 발명의 제2양태는 상기 본 발명의 제1양태에 따른 정량방법에 따라 제제 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표시량에 대한 함량비를 결정하는 제1단계; 및 상기 제1단계로부터 결정된 함량비를 기준값과 비교하여 제제의 품질을 판단하는 제2단계를 포함하는, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 포함하는 제제의 품질보증(quality assurance; QA) 방법을 제공한다.
- [0032] 예컨대, 상기 제제가 원료의약품이고, 제1단계로부터 도출된 함량비가 99.0 내지 100.0%이면 정상품으로 판단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 예컨대, 상기 제제가 외용제를 제외한 단일제제이고, 제1단계로부터 도출된 함량비가 95.0 내지 105.0%이면 정상품으로 판단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 예컨대, 상기 제제가 복합제제이거나, 외용제인 단일제제이고, 제1단계로부터 도출된 함량비가 90.0 내지 110.0%이면 정상품으로 판단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 그러나, 상기 품질을 판별하는 기준은 지방청 의약품 등 기준 및 시험방법 심사 매뉴얼에 개시된 허가 기준을 예시한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니며, 제제의 생산 유통되는 지역 및 해당 관청의 규정 에 따라 상기 허용 범위는 상이할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 제3양태는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법에 있어서, 1.5 내지 4.5% w/v 농도로 디페닐아민을 빙초산에 용해시키고, 상기 사용한 빙초산 부피의 0.36 내지 0.75배 부피의 염산을 첨가하여 용액 A를 제조하는 제1단계; 제1검액으로써 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 미지농도로 함유하는 수용액을 준비하는 제2단계; 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 표준품을 3개 이상의 농도로 물에 용해시켜 제1 내지 제m표준액(m은 3 이상의 정수)을 준비하는 제3단계; 유리마개 시험관에 상기 제2단계 및 제3단계에 따라 각각 준비한 검액 및 표준액들을 제1단계에 따라 준비한 용액 A와 1:2 내지 3의 부피비로 투입하여 혼합하고, 즉시 90 내지 105℃에서 2시간 동안 처리한 후 냉각하는 제4단계; 상기 용액 A와 혼합하여 열처리한 검액 및 표준액의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 측정하고, 0.2 이상의 흡광도를 나타내는 소정의 파장을 선택하는 제5단계; 상기 제5단계로부터 선택된 파장에서 제1 내지 제3표준액의 흡광도로부터 검정곡선을 작성하여 농도에 따른 흡광도의 일차방정식을 도출하는 제6단계; 및 상기 제6단계로부터 도출된 방정식에 제5단계로부터 선택된 파장에서 검액의 흡광도를 대입하여 상응하는 농도값을 계산하여 제1검액의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 농도로 결정하는 제7단계를 포함하는 정량방법을 제공한다.
- [0037] 예컨대, 제1검액을 소정의 비율로 희석하여 제2 내지 제n검액(n은 0 이상의 정수)을 준비하는 제2-1단계를 추가로 포함하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 전술한 바와 같이, 측정된 흡광도가 1을 초과하는 경우 농도와의 엄격한 비례관계가 성립하지 않은 수 있으므로, 보다 정확한 분석을 위하여, 제1검액의 흡광도가 1 초과인 경우 제2 내지 제n검액 중 흡광도가 0.2 이상 1 이하인 검액의 흡광도를 이용하여 농도를 산출하고 상응하는 희석 비율로 환산하여 제1검액의 농도를 결정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 상기 본 발명의 제1양태에서와 마찬가지로 보다 정확한 분석을 위하여 공시험액을 제조하고, 이의 흡광도를 측정하여 검액 및 표준액의 흡광도를 보정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 정량방법은 종래 영국약전에 개시된 방법과 유사한 방법으로 수행하되, 90 내지 105℃에서 처리할 때, 검액과 표준액을 동시에 처리하여 동일한 반응조건을 제공함으로써 상기 처리 온도를 엄격히 제어하지 않고도 높은 정확도로 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량할 수 있으므로 별도의 장비 없이 수행할 수 있으므로 많은 수의 검액을 동시에 테스트할 수 있는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명의 방법은 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 함유하는 제제의 생산라인의 품질보증에 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 표준품의 농도에 대한 흡광도 검정곡선이 높은 선형성을 나타내므로 미지 농도의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량에도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 본 발명에 따른 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 정량방법의 정확성 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 정량방법에 있어서 검출한계를 검증하기 위한 시각적 검출 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **비교예 1: 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 점안제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량법(영국약전)**
- [0044] **단계 1:** 빙초산(glacial acetic acid) 150 ml에 디페닐아민 3.75 g을 용해시키고, 염산 90 ml을 첨가한 후 잘 혼합하여 용액 A를 조제하였다.
- [0045] **단계 2:** 하기의 방법으로 검액을 조제하였다. 구체적으로, 시판되는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 점안제(Carmellose Sodium Eye Drops)를 물로 희석하여 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨이 0.01% w/v가 되도록 하였다. 유리마개 시험관에 상기 희석한 용액 2 ml을 넣고 단계 1에서 준비한 용액 A 5 ml을 첨가하여 혼합하고, 즉시 105 내지 110℃로 유지된 유욕상에 넣어 30분 동안 유지하였다. 이때, 욕조의 온도는 0.1℃ 이내에서 일정하게 유지되도록 하였다. 반응이 완료된 후, 냉각 수조에 담귀 1시간 이내에 실온이 되도록 냉각하였다.
- [0046] **단계 3:** 하기의 방법으로 표준액을 조제하였다. 구체적으로, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 표준품을 물에 희석하여 0.01% w/v가 되도록 하였다. 유리마개 시험관에 상기 용액 2 ml을 넣고 단계 1에서 준비한 용액 A 5 ml을 첨가하여 혼합하고, 즉시 105 내지 110℃로 유지된 유욕상에 넣어 30분 동안 유지하였다. 이때, 욕조의 온도는 0.1℃ 이내에서 일정하게 유지되도록 하였다. 반응이 완료된 후, 냉각 수조에 담귀 1시간 이내에 실온이 되도록 냉각하였다.
- [0047] **단계 4:** 하기의 방법으로 공시험액을 조제하였다. 구체적으로, 유리마개 시험관에 물 2 ml을 넣고 단계 1에서 준비한 용액 A 5 ml을 첨가하여 혼합하고, 즉시 105 내지 110℃로 유지된 유욕상에 넣어 30분 동안 유지하였다. 이때, 욕조의 온도는 0.1℃ 이내에서 일정하게 유지되도록 하였다. 반응이 완료된 후, 냉각 수조에 담귀 1시간 이내에 실온이 되도록 냉각하였다.
- [0048] **단계 5:** 상기 단계 2 및 3에 따라 각각 조제한 검액 및 표준액을 가지고 상기 단계 4에 따라 제조한 공시험액을 대조로 하여 UV-Vis 흡광도 측정법에 따라 635 nm 파장에서 흡광도 A_t 및 A_s 를 측정하였다. 상기 검액의 흡광도 A_t 및 표준액의 흡광도 A_s 는 실제 측정된 흡광도로부터 공시험액에 대해 측정된 흡광도를 감하여 도출하였다.
- [0049] **비교예 2: 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 · 탄산수소나트륨 · 알긴산정 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량법(침전법)**
- [0050] 표시량의 90.0 내지 110.0%에 해당하는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 탄산수소나트륨을 함유하는 시판되는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 · 탄산수소나트륨 · 알긴산정 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 다음과 정량하였다. 구체적으로, 상기 약물 20정 이상의 무게를 정밀하게 달고 분말화하였다. 표시량을 기준으로 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨으로서 50 mg에 해당하는 양을 정밀하게 칭량하여 물 50 ml을 첨가하여 50 내지 60℃ 수욕상에서 20분 동안 가온하면서 교반하여 용해시킨 후, pH를 6.0 내지 6.5로 조절하였다. 상기 반응 용액에 10% 염화칼슘 용액을 넣어 방치하고 여과하였다. 여액에 10% 염화제이구리 용액을 넣어 pH를 4.1 내지 4.2로 조절하고 석출되는 침전물을 70% 메탄올로 세척하였다. 세척한 침전물에 10% 암모니아수를 첨가하여 녹이고 정확하게 100 ml이 되도록 하여 물을 더 첨가하여 검액을 준비하였다. 이와 별도로 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 표준품 50 mg을 정밀하게 칭량하여 물 50 ml에 용해시키고 이하 검액과 동일하게 조작하여 표준액을 준비하였다. 공시험액에는 물을 사용하였다.
- [0051] 준비한 검액, 표준액 및 공시험액 각 1 ml씩 정확하게 취하여 0.01% 2,7-디히드록시나프타렌황산용액 20 ml에 넣고 수욕상에서 30분 동안 가온한 다음 실온에 방치하고 공시험액(물을 첨가한 2,7-디히드록시나프타렌황산용액)을 대조군으로하여 540 nm 파장에서 검액 및 표준액의 흡광도 A_t 및 A_s 를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 하기 수식에 대입하여 정제 중에 함유된 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 양을 계산하였다.

$$\text{카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 양}(mg) = \text{카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 표준품의 양}(mg) \times \frac{A_t}{A_s}$$

[0052]

[0053] 실시예 1: 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨·알긴산 복합제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 개선된 정량법

[0054] 영국약전에 개시된 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 함유 점안제(Carmellose Sodium Eye Drops) 중 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량하는 방법을 이용하되 검액 및 표준액 조제시 유육상에서 105 내지 110℃에 30분 동안 유지하되 0.1℃의 온도 편차를 지켜야 하는 번거로움을 극복하기 위하여, 전처리 조건을 다양하게 변경하면서 상기와 같이 엄격하게 온도를 제어하지 않고도 높은 정확도로 정량할 수 있는 최적화된 처리 조건을 발굴하였다.

[0055] 구체적으로, 상기 비교예 1의 단계 1과 동일한 조건으로 용액 A를 준비하였다. 또한 비교예 1의 단계 2 내지 4와 유사한 방법으로 검액, 표준액 및 공시험액을 조제하되 0.1℃ 이내의 편차로 유육상에서 105 내지 110℃에 30분 동안 유지하는 대신에 90 내지 105℃로 셋팅된 건조오븐에 넣어 2시간 동안 유지하였다. 다만, 다소간의 온도의 편차가 발생하더라도 높은 정확도로 정량할 수 있도록 검액, 표준액 및 공시험액이 동일한 온도 조건으로 처리될 수 있도록 동일한 오븐에 넣어 동시에 열처리하였다.

[0056] 검체로는 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨과 알긴산을 유효성분으로 포함하는 고형의 정제(대화제약 복합제)를 사용하였으므로 검액은 상기 비교예 2에서와 유사한 방법으로 준비하였다. 구체적으로 복합제 10정 이상을 분말화한 후 표시량을 참조하여 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨으로서 50 mg이 되도록 정밀히 칭량하여 플라스크에 넣고 소정량의 물을 넣어 용해시키고 총 부피가 50 ml이 되도록 물을 더 첨가하였다. 상기 용액 1 ml을 취하여 용량 플라스크에 넣고 총 부피가 20 ml이 되도록 물을 첨가하여 희석하였다. 비교예 1의 단계 2에서와 같이 유리마개 시험관에 상기 용액 2 ml을 넣고 용액 A 5 ml을 첨가하여 혼합한 후, 즉시 90 내지 105℃ 범위로 온도가 조절된 건조오븐에 넣어 2시간 동안 방치하였다. 반응이 완료된 후에는 유리마개 시험관 채로 냉수에 넣어 냉각시켰다.

[0057] 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨으로서 50 mg에 상응하는 분량의 분말화한 제제를 사용하는 대신에 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 표준품 50 mg을 정밀히 칭량하여 사용하는 것을 제외하고는 상기 검액을 제조하는 것과 동일한 방법으로 표준액 A를 제조하였다.

[0058] 한편, 상기 정량 대상이 되는 복합제는 알긴산을 더 포함하므로 시료 중의 알긴산에 의한 간섭을 배제하기 위하여 상기 표준액 A를 제조하는 것과 동일한 방법으로 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 50 mg에 정밀히 측량한 알긴산 표준품 100 mg을 더 첨가하여 표준액 B를 제조하였다.

[0059] 또한, 물 2 ml에 용액 A 5ml을 유리마개 시험관에 넣어 위와 동일한 방법으로 공시험액을 제조하였다.

[0060] UV-Vis 분광광도계를 사용하여 상기 검액, 표준액 A, 표준액 B 및 공시험액의 흡광도를 측정하였다. 635 nm 파장에서의 흡광도를 하기 수식에 대입하여 복합제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 정량하였다. 사용한 흡광도 값은 검액, 및 표준액 A 및 B에 대해 측정된 흡광도 값에서 공시험액의 흡광도 값을 뺀 값을 사용하였다.

$$\text{주성분의 함량비}(\%) = \frac{A_t}{A_s} \times \frac{W_s}{W_t} \times \frac{1\text{정 평균무게}(mg)}{\text{주성분 표시량}(mg)} \times \text{표준품의 순도}$$

[0061]

[0062] 이때, A_s 는 표준액의 흡광도를, W_t 및 W_s 는 각각 검체 채취량(mg) 및 주성분 표준품 채취량(mg)을 나타내며, A_t 는 검액 중 알긴산을 배제한 카르복시셀룰로오스 나트륨의 흡광도에 상응하는 것으로, 측정된 검액의 흡광도로부터 표준액 B의 흡광도와 표준액 A의 흡광도 차이를 뺀 값, 즉, 검액의 흡광도-(표준액 B의 흡광도-표준액 A의 흡광도)로 정의하였다.

[0063] 실험예 1: 전처리 온도에 따른 흡광도 변화

[0064] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 시료를 준비하고 흡광도를 측정하여 정량하되, 전처리 시 건조오븐의 온도를 각각 80℃, 90℃, 100℃ 및 110℃로 하여 전처리 온도에 따른 흡광도의 변화를 확인하였다. 각 온도에서 2시간 동안 반응시킨 후 측정된 흡광도를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

전처리온도	80℃		90℃		100℃		110℃	
시료	공시험액	CMC-Na	공시험액	CMC-Na	공시험액	CMC-Na	공시험액	CMC-Na
흡광도	0.0000	0.0627	0.0002	0.4852	-0.0002	0.5426	-0.0001	1.3070

[0065]

[0066] 표 1에 나타난 바와 같이, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 함유하는 검액에 대해 측정된 흡광도는 80℃에서는 0.1 미만으로 낮았으며, 110℃에서는 1을 초과하는 높은 값을 나타내었다. 이들 흡광도 범위에서는 일반적으로 검정곡선 작성시 선형성을 벗어나는 것을 고려하여 90 내지 105℃를 적정한 전처리 온도 범위로 설정하였다.

[0067] **실험예 2: 전처리 도중 온도 변화에 따른 효과**

[0068] 상기 실험예 1에서 확인된 바와 같이, 전처리 온도에 따라 흡광도 값이 크게 변화하였다. 따라서, 전처리시 온도 변화가 정량분석의 정확도에 미치는 효과를 확인하고자, 전처리 도중 온도를 변화시키면서 정량분석을 실시하였다. 구체적으로, 실시예 1과 같이 검액, 표준액 및 공시험액을 준비하여 시료를 준비하되 전처리시 오븐의 온도를 100℃로 셋팅하고 반응시키는 도중 오븐의 문을 열어 온도 변화를 유발하면서 2시간 동안 반응시켰다. 반응을 완료하고 냉각시켜 흡광도를 측정하여 상기 수식에 대입하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

$$\frac{(0.4944-0.1234)}{0.3684} \times \frac{80 \mu\text{g/ml}}{80 \mu\text{g/ml}} \times 100 = 100.7\%$$

[0069]

[0070] 상기한 바와 같이, 측정된 함량은 100.7%로 표시량과 높은 일치도를 나타냄을 확인하였다. 이는 시료 전처리시 0.1℃ 이내로 엄격히 온도가 제어되어야 하는 영국약전에 개시된 분석방법과는 달리, 전처리시 온도가 변화하더라도 검액과 표준액을 동일한 조건으로 처리하는 한, 높은 정확도로 정량할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0071] **실험예 3: 빙초산에 대한 디페닐아민의 중량비 및 염산 비율에 따른 효과**

[0072] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 시료를 준비하되, 하기 표 2에 개시한 조성으로 조제한 용액 A를 사용하였다. 하기 표 2에 개시한 각 조성으로 조제한 용액 A를 사용하여 준비한 시료를 100℃로 세팅된 오븐에서 2시간 동안 반응시킨 후 흡광도를 측정하고 그 결과를 하기 표 2에 함께 나타내었다.

표 2

[0073]

용액 A의 조제		STD A 흡광도	STD B 흡광도	SA 흡광도	함량
디페닐아민 1.5% w/v	염산 0.6배	0.3438	0.3971	0.3727	92.90
디페닐아민 3.5% w/v	염산 0.6배	0.3854	0.4155	0.3891	93.15
디페닐아민 4.5% w/v	염산 0.6배	0.3752	0.4137	0.3845	92.22
디페닐아민 2.5% w/v	염산 0.36배	0.3864	0.4125	0.3902	94.23
디페닐아민 2.5% w/v	염산 0.75배	0.4026	0.4367	0.4006	91.03

[0074] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 염산의 사용량을 일정하게 유지(0.6배)하고 빙초산에 용해시킨 디페닐아민 함량을 1.5 내지 4.5% w/v 농도 범위에서 변화시키면서 제조한 용액 A 및 디페닐아민의 농도를 고정(2.5% w/v)시키고 염산의 사용량을 0.36배로부터 0.75배까지 변화시키면서 제조한 용액 A를 사용한 경우, 모두에서 측정된 검액의 함량은 90 내지 110% 이내로 허용가능한 범위 내에 존재하였다.

[0075] **실험예 4: 본 발명에 따른 정량방법의 검증**

[0076] **1) 특이성**

[0077] 질량편차(mass variation) 항목으로서, 제제에 함유된 유효성분 즉, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 알긴산 이외의 성분 예컨대, 부형제 등의 영향을 확인하기 위하여, 공시험액 및 유효성분을 불포함하는 것을 제외하고는 사용한 제제에 포함된 다른 성분들을 동일한 수준으로 포함하는 플라시보를 시료와 동일하게 처리하여 흡광도를 측정하고, 그 결과를 하기 표3에 나타내었다. 또한, 알긴산 표준품을 이용하여 표준액 B와 동일한 농도로 알긴산만을 포함하는 알긴산액을 별도로 준비하여 이에 대해서도 동일한 실험을 수행하였다.

표 3

	1회	2회	3회
공시험액	-0.0010	-0.0010	-0.0006
플라시보	-0.0017	-0.0018	-0.0015
표준액 A	0.1992	0.1995	0.1995
표준액 B	0.2917	0.2919	0.2923
알긴산액	0.0912	0.0905	0.0895
표준액 B-알긴산액	0.2005	0.2014	0.2028
검액	0.2872	0.2872	0.2868

상기 표 3에 나타난 바와 같이, 공시험액은 물론 플라시보 용액 역시 검액 및 표준액의 흡광도를 측정하는 파장인 635 nm에서 간섭현상을 나타내지 않았다. 각각의 수행에서 도출된 (표준액 A의 흡광도)와 (표준액 B의 흡광도-알긴산액의 흡광도)의 차이는 각각 0.65%, 0.94% 및 1.63%로 분석방법을 검증하는 기준이 되는 $\pm 3.0\%$ 이내의 범위에 존재하였다. 한편, 검액의 흡광도와 표준액 B의 흡광도 차이는 각각 1.54%, 1.61% 및 1.88%로 이들 값 모두 기준이 되는 $\pm 3.0\%$ 이내의 범위에 존재하였으며, 이는 본 발명의 정량방법이 알긴산과의 복합 정제 중의 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량에 사용될 수 있는 기준을 만족시키는 적합한 방법임을 나타내는 것이다.

2) 직선성

카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 표준품의 농도를 30 내지 70 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 단위로 변화시켜 시료를 준비하고, 상기 실시예 1에서와 동일한 방법으로 용액 A와 반응시켜 준비한 일련의 표준액에 대해 635 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도에 대한 검정곡선을 도출하였다. 이때, 상기 측정된 흡광도 역시 공시험액에 대한 흡광도를 이용하여 보정된 값을 이용하였다. 도출된 검정곡선은 일차방정식으로 최적화하였으며, 이때 얻어진 R^2 값은 0.99 이상으로 나타났으며, 이는 상기 농도에 대한 검정곡선이 높은 선형성을 가짐을 나타내는 것이다. 즉, 측정되는 흡광도 값이 농도에 정비례하므로 상기 검정곡선은 미지 농도로 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨을 함유하는 용액의 농도 결정에 유용하게 사용될 수 있다. 각각의 농도에 대해 3회 반복하여 측정하였으며, 모든 수행 회차에서 결정된 각각의 R^2 값은 0.99 이상이었으며, 이는 상기 실험이 높은 재현성을 가짐을 나타낸다.

표 4

CMC-Na 농도	표준액 A의 흡광도			표준액 B의 흡광도		
	1회	2회	3회	1회	2회	3회
30 $\mu\text{g/ml}$	0.1294	0.0843	0.0852	0.1932	0.1220	0.1495
40 $\mu\text{g/ml}$	0.1688	0.1610	0.1466	0.2418	0.2294	0.2353
50 $\mu\text{g/ml}$	0.2007	0.2223	0.2273	0.2933	0.2917	0.3200
60 $\mu\text{g/ml}$	0.2272	0.3342	0.3093	0.3291	0.3876	0.4219
70 $\mu\text{g/ml}$	0.2729	0.4178	0.3847	0.3789	0.4943	0.5397
R^2	0.9932	0.9914	0.9978	0.9972	0.9935	0.9946

3) 정확성

본 발명에 따른 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨의 정량방법의 정확성을 확인하기 위하여, 각각의 농도(40, 50 및 60 $\mu\text{g/ml}$)에서 3회 반복하여 회수율을 측정하고 평균 및 표준편차를 계산하였다(표 5, 도 1) 측정된 개별 및 평균 회수율은 모두 97 내지 103% 범위에 속하였으며, %RSD 역시 3.0% 이하로 높은 정확성을 나타내었다.

표 5

농도(%)	NO.	회수율(%)	평균 회수율(%)	SD	RSD%	95% 신뢰구간	
40 $\mu\text{g/ml}$	1	98.19	100.31	0.019	1.8600	최대	최소
	2	101.01				104.96	95.66
	3	101.72					
50 $\mu\text{g/ml}$	1	101.25	100.05	0.014	1.4300	최대	최소

60 $\mu\text{g/ml}$	2	100.43	99.52	0.015	1.5200	103.60	96.50
	3	98.47				최대 103.27	최소 95.77
	1	99.03					
	2	101.21					
	3	98.31					

4) 검출한계

본 발명에 따른 정량방법의 검출한계를 일차적으로 시각적 평가에 근거하여 설정하였다. 표준액 A, 표준액 B 및 검액을 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 4.0 $\mu\text{g/ml}$, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 준비하여 실시예 1의 방법으로 반응시킨 후 색상으로 육안으로 확인하고 이를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 시험한 가장 낮은 농도인 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 에 대해서도 용액이 과란 색을 띄는 것을 육안으로 쉽게 확인할 수 있었다. 이로부터 육안으로 식별가능한 일차적인 검출한계는 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 설정하였다.

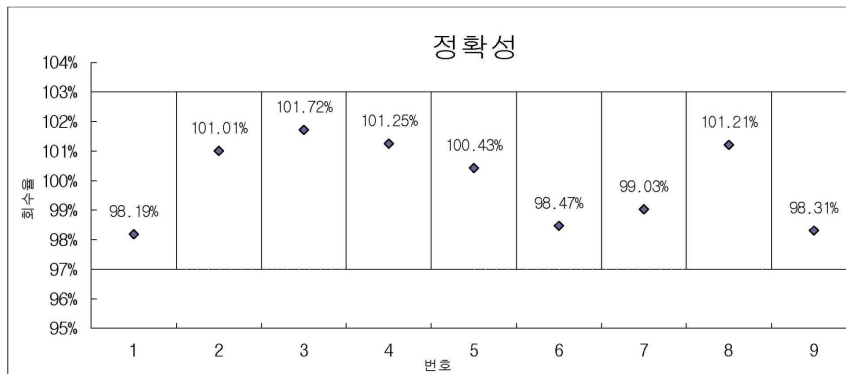
나아가 정량한계는 상기 시각적 평가에 근거하여 5.0 $\mu\text{g/ml}$, 7.5 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 나타내는 시료가 정밀성을 나타내는 최저농도로 설정하였다. 표준액 A, 표준액 B 및 검액의 분석값은 시험한 모든 농도에서 %RSD 3.0% 이하였다. 예컨대, 검액의 흡광도와 표준액 B의 흡광도 차이는 10% 농도에서 -0.37%, 15% 농도에서 -0.17%, 20% 농도에서 1.36%로 이들 수치는 허용가능한 기준인 $\pm 3.0\%$ 이내에 있으므로 이로부터 반복성을 확인하였다. 이로부터 최저농도인 10%, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 가 정량한계임을 확인하였다.

분석의 정밀성은 표준액 A 및 표준액 B의 분석값과 검액의 분석값이 %RSD 3.0% 이하이고, 검액의 흡광도와 표준액 B의 흡광도 차이가 -0.35%로 기준이 되는 3.0% 이내에 있는 것으로 반복성(또는 재현성)을 입증하였다.

분석의 안정성은 표준액 A 및 표준액 B의 분석값과 검액의 분석값이 %RSD 3.0% 이하이고, 분석시간이 경과한 후 표준액과 검액의 초기 흡광도와와의 차이가 3.0% 이내인 것으로 2시간 동안 용액의 안정성을 입증하였다.

도면

도면1



도면2

검출한계	공시험액	2.5 $\mu\text{g/ml}$	4.0 $\mu\text{g/ml}$	5.0 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
표준액 A					
표준액 B					
검액					