



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097307
(43) 공개일자 2017년08월28일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 30/74</i> (2006.01) <i>G01N 21/31</i> (2006.01)
 <i>G01N 30/06</i> (2006.01) <i>G01N 30/86</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/15</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 30/74</i> (2013.01)
 <i>G01N 21/31</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0018886
 (22) 출원일자 2016년02월18일
 심사청구일자 2016년02월18일</p> | <p>(71) 출원인
 건양대학교산학협력단
 충청남도 논산시 대학로 121 (내동)</p> <p>(72) 발명자
 김영일
 전라북도 전주시 완산구 강변로 210 광진라미안아파트 103-706</p> <p>(74) 대리인
 권두상</p> |
|---|--|

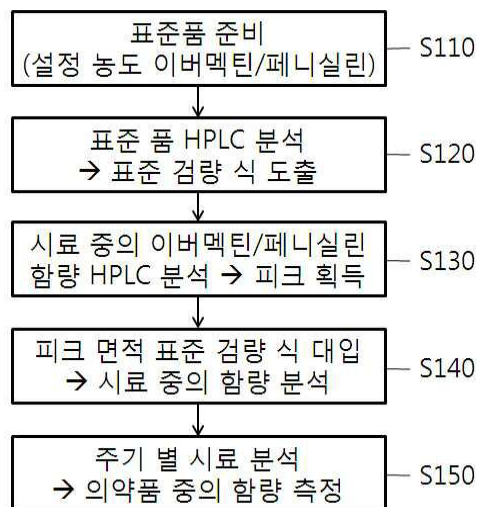
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **의약품의 품질 관리 및 평가 방법**

(57) 요약

본 발명은 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린에 대하여 HPLC를 이용하여 그 함량을 분석하여 검량식을 도출하고, 이버멕틴 및/또는 페니실린을 함유하는 의약품에 대하여 동일한 HPLC를 이용하여 의약품 중에 함유된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 분석한 뒤, 분석된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 사전에 도출된 검량식에 대입하는 방법으로 이버멕틴 및/또는 페니실린을 함유하는 의약품의 안정성을 평가하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따라 의약품 중에 함유된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 정량적으로 분석하여, 해당 의약품의 유효 기간을 도출할 수 있을 뿐만 아니라 해당 의약품을 보존할 때 잔존하는 이버멕틴 및/또는 페니실린 함량을 효율적으로 예측할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 30/06 (2013.01)

G01N 30/8603 (2013.01)

G01N 30/8631 (2013.01)

G01N 33/15 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-B-0014-010116

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학공동기술개발지원사업

연구과제명 제품 중 ivermectin의 품질관리 방법의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

이버멕틴(Ivermectin) 또는 페니실린(Penicillin)을 함유하는 의약품의 품질을 관리하는 방법으로서,

- a) 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린을 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)로 분석하여, 상기 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대한 표준 검량식을 도출하는 단계;
- b) 이버멕틴 또는 페니실린을 함유하는 의약품을 HPLC로 분석하여 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린에서 유래된 피크를 얻는 단계; 및
- c) 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린에서 유래된 피크 면적을 적분하고, 상기 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대하여 도출된 상기 표준 검량식에 대입하여 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린의 함량을 분석하는 단계를 포함하는 의약품의 품질을 관리하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a) 단계 및 상기 b) 단계에서 상기 HPLC로 분석할 때, 이동상 용매는 물·메탄올·아세토니트릴(ACN)·인산이수소나트륨($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 이동상 용매가 사용되는 의약품의 품질을 관리하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 a) 단계 및 상기 b) 단계에서 상기 HPLC로 분석할 때, 검출기로서 UV/VIS(적외선/가시광선) 검출기가 사용되는 의약품의 품질을 관리하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 a) 단계는 상기 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대하여 HPLC에 의해 분석된 피크(peak) 면적의 평균값에 근거하여 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대한 검량선을 작성하는 단계와, 상기 작성된 검량선에 대하여 직선 형태의 검량식을 도출하는 단계를 포함하는 의약품의 품질을 관리하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 a) 단계 이전에 상기 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린을 C1-C5 알코올 또는 증류수를 사용하여 희석하는 단계를 더욱 포함하고, 상기 b) 단계와 상기 c) 단계는 상기 이버멕틴 또는 페니실린을 함유하는 상기 의약품에 대하여 주기적으로 수행되어, 상기 주기적 수행에 의하여 얻어진 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린의 함량 변화를 평가하는 단계를 포함하는 의약품의 품질을 관리하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 의약품의 품질을 관리하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이버멕틴(Ivermectin) 또는 페니실린을 함유하는 의약품 중에 함유된 유효 성분의 농도를 정량적으로 분석하여 해당 의약품의 안정성과 관련한 품질을 관리·평가하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기생충(Parasite)은 인간 또는 가축과 같은 동물의 신체에 기생생활을 하는 무척추동물이다. 기생충은 인간 또는 동물과 같은 숙주의 체표 또는 체내에 머물면서 영양을 얻고 숙주에 다양한 질병을 유발하는 등 해를 미치는 기생생활을 영위한다. 기생충은 중간 숙주를 필요로 하는 지의 여부에 따라 최종 숙주에 충란이나 유충으로 직접 감염하는 것, 최종 숙주에 기생하기까지의 단계에서 1종 또는 2종의 중간 숙주(Intermediate host)를 필요로 하는 것으로 구분되기도 한다. 중간 숙주는 보통 곤충류나 어패류 등으로부터 포유동물도 있다.

[0003] 기생충 중에서도 심장사상충(*Dirofilaria immitis*)은 모기를 매개로 하여 개나 고양이와 같은 애완동물에 주로 기생하는 기생충이다. 심장사상충에 감염된 개의 혈액을 모기가 흡혈하면 숙주의 혈중이나 조직 내에 있는 심장사상충의 제1기 자충인 마이크로필라리아(*Microfilaria*)가 모기의 몸속으로 들어간다. 모기의 몸속에서 마이크로필라리아가 3번의 변태 과정을 거쳐 L3 상태의 유충이 되면 L3 유충은 모기의 타액을 저장하는 침샘으로 이동하여 다른 숙주를 감염시킬 수 있는 상태가 된다. 마이크로필라리아가 L3 유충으로 성장하기까지 약 14일의 시간이 필요하면 이 과정에서 14℃ 이상의 온도가 유지되어야 하며, 그렇지 않은 경우 L3 유충으로 변태하지 못하고 도태된다.

[0004] 심장사상충에 감염된 모기가 숙주를 흡혈하면 흡혈한 구멍 주위에 타액을 뿌려 놓는데, 이 타액에는 L3 단계의 심장사상충 유충이 존재한다. 타액에 들어 있던 심장사상충의 L3 유충은 모기의 흡혈에 의해 형성된 구멍을 헤엄쳐서 숙주의 몸속으로 침투한다. 숙주의 몸속에 침투한 L3 유충은 숙주의 피하지방에서 기생하고, 약 2주의 시간이 걸려서 L4 유충으로 진화하고 L5 단계의 유충으로 성장하는 동안에 숙주의 피하지방에 머무른다. 2-3개월 정도의 시간이 걸려 L5 단계의 유충으로 성장하면, 피하지방을 떠나 숙주의 혈관으로 이동하고 최종적으로 폐동맥과 심장조직(주로 우심방)에 기생한다. 마지막 변태를 거쳐 L6 단계가 되면 성충이 되는데, 이 성충은 숙주의 몸에 침투한 지 5-7개월 후에 짝짓기를 하여 마이크로필라리아가 다시 생성된다. 다른 감염된 모기의 L3 유충이 숙주의 체내에 재-감염되지 않으면 이 성충들은 자신의 수명인 2년의 수명을 다하고 죽는다. 마이크로필라리아 역시 모기에게 흡혈되지 않는다면 자신의 수명을 다하고 죽는다. 이처럼 심장사상충이 성충으로 자라기 위해서는 중간 숙주인 모기가 필요하다.

[0005] 심장사상충을 비롯하여 다양한 기생충에 의하여 야기되는 질병을 치료하기 위한 화합물로서 잘 알려진 물질 중의 하나가 이버멕틴이다. 이버멕틴(Ivermectin)은 일본의 미생물 연구소에서 신약 개발을 위해 채취한 골프장 흙에 서식하는 균류가 분비하는 물질이 강력한 선충 치료제로 판명되어 그 의약적 용도가 규명된 아버멕틴(Avermectin) 유도체이다. 이버멕틴은 심장사상충을 비롯하여 회충·구충·편충 등의 대부분의 선충류의 기생충은 물론이고, 이(Head lice)·옴과 같은 곤충류의 체외 기생충에도 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.

[0006] 특히 모기의 살충제 저항력이 극에 달한 지역에서 다른 장내 기생충 치료제와 병용하여 이버멕틴이 잠재적으로 체외기생충이나 모기 억제에도 사용될 수 있다. 또한 이버멕틴은 말라티온(Malathion)이나 페메트린(Permethrin)과 같이 흔히 사용되는 살충제와는 다른 살충 기전을 나타내므로, 살충제에 저항을 보이는 다양한 곤충에도 적용될 수 있으며, 숙주의 혈액을 통하여 곤충에 주입되는 형태가 아니고 체외로 로션 형태로 도포하여도 충분한 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 특히 이버멕틴은 가격이 매우 저렴하고 다른 살충제와 달리 인체 독성이 상대적으로 낮고 부작용이 적으며, 기생충 박멸을 위한 다른 약품과 병용해서 사용할 수 있는 이점이 있다.

[0007] 기생충에 의한 감염에 의하여 야기되는 질병을 치료하는데 사용되는 이버멕틴은 22,23-dihydroavermectin B1a(H2 B1a)와 22,23-dihydroavermectin B1b(H2 B1b)가 혼합된 유효 성분을 사용한다. 예를 들어 유효 성분으로서의 이버멕틴 중에서 H2 B1a는 80% 이상, H2 B1b는 20% 이하로 사용되는 게 일반적이다.

[0008] 한편 페니실린(Penicillin)은 푸른곰팡이(*Penicillium notatum*) 등의 페니실리움(*Penicillium*)속에 속하는 곰

팡이에서 얻은 β -락탐계 항생제이다. 페니실린의 모핵은 6-아미노페니실란산(6-aminopenicillanic acid; 6-APA)인데, 치환기를 화학적으로 변형시켜, 페니실린의 β -락탐 고리를 개환해서 불활성의 페니실린산(penicillic acid)으로 변화시키는 효소인 β -락타마아제(β -lactamase)에 의해 활성이 상실되지 않는 유도체인 반-합성 페니실린이 많이 개발되어 있다. 페니실린은 박테리아의 세포벽에만 존재하는 펩티도글리칸의 합성을 저해하는 방법으로, 박테리아의 세포벽을 자라지 못하게 함으로써 박테리아가 용균(lysis)되게 하여, 박테리아의 성장을 억제한다. 페니실린은 매독·뇌막염·폐렴과 같은 그람 양성 세균성 질병을 치료하는 데에는 효과가 있다.

[0009] 페니실리움속 곰팡이에 의해 합성되는 페니실린은 그 발효 과정에서 생성되는 생합성 페니실린과 모든 페니실린의 공통 화학물질인 6-아미노페니실린산의 화학 구조를 변화시켜 얻어지는 반-합성 페니실린으로 구분되고 이들은 치료 목적에 따라 다르게 생산된다. 현재까지 생합성 페니실린으로는 벤질페니실린(benzyl penicillin, penicillin G)이 유일하게 임상적으로 사용되고 있는데, 벤질페니실린은 산에 취약하여 구강 투여하였을 경우 위를 통과하면서 대부분 분해되기 때문에 근육내 주사로 투여(intramuscular injection)하고 있다. 특히 낮은 역가에서 항균 효과가 필요한 경우에 벤질페니실린에 다른 성분을 혼합한 복합 현탁 제제는 장기간 효능을 발휘할 수 있기 때문에 특히 동물용 항생제로서 널리 사용되고 있다.

[0010] 이버멕틴이나 페니실린은 다른 항-기생충제나 항생제에 비하여 부작용이 적은 것으로 알려져 있으나, 적절한 투여량을 초과하는 경우에는 이버멕틴 독성을 야기할 수도 있다. 동물용 항-기생충제나 항생제로 사용되는 이버멕틴이나 벤질페니실린 복합 현탁 제제와 같은 유효 성분이 함유된 의약품은 동물에 투여하기 전에 장기간 보관된다. 그런데 이들 유효 성분은 보관 중에 분해되기 때문에 이버멕틴이나 페니실린의 역가가 저하되어 원하는 치료적 효과를 거둘 수 없는 문제가 발생할 수 있다.

[0011] 이와 같이 이버멕틴이나 페닐리신을 유효 성분으로 함유하는 의약품의 보관에 따라 유효 성분의 함량이 저하되기 때문에 의약품에 포함된 이들 유효 성분의 함량을 적절하게 분석할 필요가 있다. 이들 유효 성분의 장기간 보관에 따라 유효 성분이 분해되어 역가가 저하되었음에도 불구하고 표시된 원래의 함량에 따라 이들 약품을 투여하였을 경우에 치료 효과가 미비할 수 있다. 반면 장기 보관된 의약품 중에 함유된 이들 유효 성분의 실제 함량보다 훨씬 낮다고 판단하여 과량을 투여할 경우에는 이버멕틴 독성과 같은 부작용을 야기할 우려가 있다. 예를 들어 동물을 대상으로 한 임상 연구에서 이버멕틴을 과량 투여할 경우에 떨림 현상이나, 우울증·기능 장애·시각 장애 등의 부작용이 보고되었다.

[0012] 이러한 부작용을 방지하기 위해서는 해당 의약품의 장기 보관에 따라 저하되는 이버멕틴이나 페니실린과 같은 유효 성분의 함량을 정확하게 평가하여, 해당 약품의 안정성과 같은 품질을 관리·평가하여야 한다. 예를 들어 해당 의약품 중에 이버멕틴이나 페니실린의 유효 성분이 실제로 치료 효과를 충분히 발휘할 수 있을 정도로 함유되어 있는지를 분석함으로써 이들 의약품의 품질을 정확하게 관리·평가·분석할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0544732호(2006. 01. 12. 등록)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0600406호(2004. 01. 31. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 제안된 것으로, 본 발명의 목적은 의약품 중에 함유된 유효 성분인 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 정량적으로 분석하여, 해당 의약품의 유효 보관 기간이나 안정성과 같은 품질을 관리·평가·분석할 수 있는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 분석 대상인 의약품 중에 함유된 유효 성분인 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 정량적으로 분석하여, 해당 의약품의 과량 투여나 소량 투여로 인한 문제점을 해결할 수 있는 의약품의 품질을

관리·평가·분석할 수 있는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 전술한 목적을 가지는 본 발명은 이버멕틴(Ivermectin) 또는 페니실린(Penicillin)을 함유하는 의약품의 품질을 관리하는 방법으로서, a) 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린을 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)로 분석하여, 상기 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대한 표준 검량 식을 도출하는 단계; b) 이버멕틴 또는 페니실린을 함유하는 의약품을 HPLC로 분석하여 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린에서 유래된 피크를 얻는 단계; 및 c) 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린에서 유래된 피크 면적을 적분하고, 상기 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대하여 도출된 상기 표준 검량 식에 대입하여 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린의 함량을 분석하는 단계를 포함하는 의약품의 품질을 관리하는 방법을 제공한다.
- [0017] 예를 들어 상기 a) 단계 및 상기 b) 단계에서 상기 HPLC로 분석할 때, 이동상 용매는 물·메탄올·아세트오니트릴(ACN)·인산이수소나트륨($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택될 수 있다.
- [0018] 또한 상기 a) 단계 및 상기 b) 단계에서 상기 HPLC로 분석할 때, 검출기로서 UV/VIS(적외선/가시광선) 검출기가 사용될 수 있다.
- [0019] 선택적으로 상기 a) 단계는, 상기 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대하여 HPLC에 의해 분석된 피크(peak) 면적의 평균값에 근거하여 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대한 검량 선을 작성하는 단계와, 상기 작성된 검량 선에 대하여 직선 형태의 검량 식을 도출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0020] 하나의 예시적인 실시형태에서, 상기 a) 단계 이전에 상기 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린을 C1-C5 알코올 또는 증류수를 사용하여 희석하는 단계를 더욱 포함하고, 상기 b) 단계와 상기 c) 단계는 상기 이버멕틴 또는 페니실린을 함유하는 상기 의약품에 대하여 주기적으로 수행되어, 상기 주기적 수행에 의하여 얻어진 상기 의약품 중에 함유된 이버멕틴 또는 페니실린의 함량 변화를 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따르면, 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린에 대한 HPLC 분석을 통하여 특정 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린에 대한 표준 검량 식을 도출하고, 의약품 중에 함유된 유효 성분인 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 분석한 뒤, 분석된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 표준 검량식에 대입하여 해당 의약품 중에 함유된 이들 유효 성분의 예상 농도를 도출하여 해당 의약품의 안정성과 같은 품질을 관리·평가·분석할 수 있다.
- [0022] 예를 들어 본 발명에 따른 방법을 통하여, 의약품 중에 함유된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 농도가 소정 농도 이하로 저하되어 더 이상 의약품으로 활용될 수 없는 시기를 정량적으로 예측·분석함으로써 해당 의약품의 품질을 정확하게 관리·평가·분석할 수 있다.
- [0023] 이처럼 본 발명의 방법을 통하여 해당 의약품 중의 이버멕틴 및/또는 페니실린의 유효 함량을 분석·평가할 수 있으며, 해당 의약품 중의 유효 성분의 투여 농도를 정확하게 예측할 수 있다. 따라서 해당 의약품 중에 함유된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 과량 투여로 인한 이버멕틴 및/또는 페니실린 독성이나 이버멕틴 및/또는 페니실린의 적정량 이하의 소량 투여로 인한 비효율적인 질병 치료의 문제점을 해결할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 페니실린 및/또는 이버멕틴을 함유하는 의약품의 품질을 관리·평가·분석하는 과정을 개략적으로 도시한 순서도이다.
- 도 2a 및 도 2b는 각각 본 발명의 예시적인 실시례에 따라 표준품으로 설정된 페니실린 G에 대한 HPLC 분석 결과를 도시한 크로마토그램 그래프 및 이를 토대로 작성된 표준 검량식을 도시한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 분석 대상인 페니실린 G 함유 시료 검액에 대한 HPLC 분석 결과를 도시한 크로마토그램 그래프이다.

도 4a 내지 도 4f는 각각 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 분석 대상인 페니실린 G 함유 시료 검액에 대하여 시기별로 분석된 페니실린 G의 함량을 평가·분석한 결과를 도시한 그래프이다. 도 4a는 7월 분석 결과, 도 4b는 8월 분석 결과, 도 4c는 9월 분석 결과, 도 4d는 10월 분석 결과, 도 4e는 11월 분석 결과이고, 도 4f는 이들 결과를 종합적으로 표시한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 표준품인 설정 농도의 이버멕틴을 메탄올을 이용하여 희석하는 과정을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 6a 및 도 6b는 각각 본 발명의 예시적인 실시예에 따라 표준품인 설정 농도의 이버멕틴에 대한 HPLC 분석 결과를 도시한 크로마토그램 그래프 및 이를 토대로 작성된 표준 검량식을 도시한 그래프이다.

도 7은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 분석 대상인 이버멕틴 함유 시료 검액에 대한 HPLC 분석 결과를 도시한 크로마토그램 그래프이다.

도 8은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 분석 대상인 이버멕틴 함유 시료 검액에 대하여 시기별로 분석된 이버멕틴의 함량을 평가·분석한 결과를 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하 필요한 경우에 첨부하는 도면을 참조하면서 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0026] 도 1은 본 발명의 예시적인 실시형태에 따라 페니실린 및/또는 이버멕틴을 함유하는 의약품의 품질을 관리·평가하는 과정을 개략적으로 도시한 순서도이다. 도 1에 도시한 바와 같이, 페니실린 및/또는 이버멕틴을 함유하는 의약품의 품질을 관리·평가·분석하는 방법은 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린 표준품을 준비하는 단계(S110 단계), 표준품에 대한 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 분석에 의하여 표준 검량식을 도출하는 단계(S120 단계), 유효 성분으로서 이버멕틴 및/또는 페니실린을 함유하는 검액 시료, 예를 들어 의약품을 HPLC로 분석하여 시료 중의 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 분석하여 해당 유효 성분에 대한 피크를 획득하는 단계(S130 단계), 유효 성분의 피크 면적을 표준 검량 식에 대입하여 해당 시료 중의 유효 성분의 함량을 분석하는 단계(S140 단계)를 포함하고, 선택적으로 상기 S130 단계와 S140 단계를 주기별로 수행하여, 의약품 중의 유효 성분의 함량을 측정하는 단계(S150)를 포함할 수 있다.
- [0027] 표준품을 준비하는 단계(S110 단계)에서 설정 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린을 사용한다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 표준품으로 사용되는 이버멕틴은 22,23-dihydroavermectin B1a (H2 B1a), 22,23-dihydroavermectin B1b (H2 B1b) 또는 이들의 조합을 사용할 수 있다. 다른 예시적인 실시형태에서 표준품으로 사용되는 페니실린은 변형되지 않은 페니실린은 물론이고, 페니실린 G procaine, 페니실린 G benzatine과 같은 페니실린 G의 염일 수 있으며, 이들 이외에도 페니실린계에 속하는 항생 물질 및 이들의 염을 포함할 수 있다.
- [0028] 하나의 예시적인 실시형태에서 표준품으로 사용되는 이버멕틴 및/또는 페니실린은 적절한 용매, 예를 들어 C₁-C₅의 알코올, 바람직하게는 메탄올 및/또는 에탄올이나 증류수를 사용하여 희석할 수 있다. 희석 농도는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 희석 처리에 의하여 표준품으로 사용되는 이버멕틴 및/또는 페니실린은 1 내지 1000μg/ml의 농도로 희석될 수 있다.
- [0029] 필요한 경우 표준품으로 설정된 이버멕틴 및/또는 페니실린을 후술하는 HPLC로 분석하기 전에 전-처리하여 시료의 오염을 막을 수 있다. 이에 따라 HPLC 컬럼을 보호하고 HPLC 분석의 재현성과 감도를 향상시킬 수 있다. 전-처리 과정의 예로서 여과(filter) 공정을 진행할 수 있는데, 여과 장치는 실린지 타입과 스펀 타입 등을 사용할 수 있다.
- [0030] 표준품이 준비되면 해당 표준품에 대하여 HPLC로 분석하여, 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린에 대한 표준 검량 식을 도출한다(S120 단계). 크로마토그래피 시스템은 크게 가스 크로마토그래피(Gas chromatography, GC), 젤 크로마토그래피(Gel chromatography), 액체 크로마토그래피(Liquid chromatography, LC) 등으로 분류할 수 있다.
- [0031] 특히 HPLC는 천연물을 비롯하여 식품·농약·생명공학·의약 등 다양한 분야에서 응용되고 있다. 가스 크로마토그래피와 마찬가지로 HPLC를 포함하는 액체 크로마토그래피는 고정상(stationary phase)과 시료(sample) 및 이동상(mobile phase)과의 상호작용에 의하여 시료를 분리·분석할 수 있으며, 특히 가스크로마토그래피와 달리

분석 가능한 분자량의 제한이 없는 이점이 있다. 즉 HPLC는 GC에 비하여 상대적으로 분자량이 크거나 비-휘발성 시료를 분석할 수 있으며, 분석 시료의 회수가 가능한 이점이 있다.

- [0032] 통상적으로 HPLC 시스템은 i) 이동상 중의 용존 산소·질소·기포 등을 제거하기 위한 탈기 장치(Degasser), ii) 이동상인 용매(Eluents)를 운송하기 위한 고압 펌프(pump), iii) 시료를 주입하기 위한 주입 장치(Injector), iv) 혼합된 시료의 분배가 일어나는 컬럼(column), v) 성분의 검출을 위한 검출기(Detector), vi) 기기 제어 및 시그널을 수집·분석하는 제어 시스템(Integrator: 컴퓨터 + 소프트웨어)를 필요로 한다.
- [0033] HPLC 분석을 위한 탈기장치는 이동상 중의 용존산소·질소·기포 등을 제거하여 컬럼 내에서 이동상(mobile phase)에 대한 댄핑 현상을 줄여주는 장치이다. 탈기 방법으로는 이동상 용매에 헬륨 가스를 주입하여 용존된 기포 등을 제거하는 헬륨 퍼징(Helium sparging)하는 방법, 혼합된 이동상 용매를 멤브레인 필터를 이용하여 여과(membrane filtering vacuum filtration) 방법, 강력한 초음파를 이용하여 탈기하는 방법(ultra-sonication) 등이 사용될 수 있다.
- [0034] 필요한 경우 HPLC 시스템의 펌프에 직접 연결되는 온라인(on-line) 탈기장치를 채택할 수 있다. 온라인 탈기장치는 용매가 일정한 진공상태가 유지되는 챔버 속에 장착된 멤브레인 튜브(membrane tube)를 지나가도록 하여 가스가 멤브레인 튜브 밖으로 배출되고 용매만 통과하여 후술하는 펌프로 공급하는 방식이어서 탈기 효율이 우수하다.
- [0035] HPLC 시스템에서 펌프는 이동상으로 사용되는 용매를 저장 용기로부터 시료주입기를 거쳐 컬럼으로 연속적으로 보내어 최종적으로는 검출기를 통과한 후 이동상인 용매와 시료 주입기를 통해 주입된 시료가 밖으로 나올 수 있도록 압력을 가해 주는 장치이다. 따라서 펌프는 일정한 압력과 유속을 유지할 수 있도록 기능하여야 하며, 다양한 용매를 사용할 수 있으며, 또한 용매에 대한 내구성이 뛰어나야 한다. 펌프의 종류에는 Isocratic pump (단일용매펌프)와 Gradient pump(농도구배펌프)가 있다. 단일용매펌프는 HPLC 분석 과정에서 이동상 용매 조성의 변화가 없으며, 농도구배펌프는 HPLC 분석 과정에서 이동상 용매 조성의 변화를 조절할 수 있는데, 2개 용매를 사용하는 펌프(Binary pump), 3개 이상의 용매를 사용하는 펌프, 예를 들어 4개 용매를 사용하는 펌프(Quaternary pump) 등으로 구성될 수 있다. 바람직하게는 다양한 용매의 기울기를 보정하여 분석시간 동안 이동상의 조성을 시간의 흐름에 따라 조절함으로써 분석조건을 향상시킬 수 있는 농도구배펌프가 사용될 수 있지만, 본 발명이 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 시료주입기는 분석하고자 하는 시료를 용매의 흐름에 실어주는 것으로써 시료를 주입하는 방식에 따라 크게 자동시료주입기 (Auto Injector/Autosampler)와 수동시료주입기(Manual Injection)로 구분할 수 있다. 자동시료주입기는 많은 양의 시료에 대한 연속적인 주입 및 사용의 편의성을 확보할 수 있으며, 샘플 루프에 분석하고자 하는 시료를 채운 후 밸브를 회전하여 포트를 변경함으로써 이동상으로 사용되는 용매의 흐름에 실어주는 역할을 한다.
- [0037] 컬럼은 관 모양의 용기에 충전제를 채워서 사용하도록 구성되어 있으며, 분석 시료의 종류에 따라 컬럼의 크기 및 충전제의 종류를 선택하여 사용한다. HPLC에서 컬럼은 혼합 상태의 시료를 화학적/물리적 특성에 따른 머무름(retention) 정도의 차이에 의해 혼합성분을 단일성분으로 분리한다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 컬럼의 종류는 특별히 한정되는 것은 아니며, 순상·역상·이온, 크기배제 컬럼 등이 사용될 수 있다. 예를 들어 HPLC는 고정상의 종류에 따라 분배 크로마토그래피 또는 액체-액체 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피 또는 액체-dhcp 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 또는 이온 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피, 친화 크로마토그래피 등으로 분류될 수 있다. 컬럼을 선택할 때는 충전제의 재질, 충전제의 입자 크기, 충전제의 형태, 충전제의 기공 크기(pore size) 등을 고려할 필요가 있다.
- [0038] 컬럼 크기(column dimensions)는 표준으로서 4.6 x 250mm 크기의 컬럼이 사용될 수 있으며, 길이 및 내경을 바꿀 경우 다음과 같은 점을 고려할 수 있다. short (30-50mm) 컬럼은 short run times, low back pressure, Long (250-300mm) 컬럼은 higher resolution, long run times, Narrow ($\leq 2.1\text{mm}$) 컬럼은 higher detector sensitivity, Wide (10-22mm) 컬럼은 high sample loading의 특징을 갖는다.
- [0039] 충전제의 형태는 통상적으로 구형의 입자가 back pressure가 적게 걸리고 컬럼 수명이 길다. 또한 충전제의 입자 크기가 작을수록 분리 효율은 증가하지만 Back pressure도 증가한다. 높은 분리 효율과 적합한 작동 압력을 제공할 수 있는 분석용 컬럼에 사용되는 충전제는 대략 1 ~ 20 μm , 바람직하게는 3 ~ 10 μm 의 입자 크기를 가질 수 있다. 충전제의 입자가 작아질수록 유속에 따른 이론단의 높이 변화가 적어 컬럼 효율이 향상된다. 또한 충전제 입자의 바깥과 기공의 표면을 합친 표면적이 클수록 분리기능이 좋아지고 retention이 커지는 반면

gradient 분석할 때 평형 시간이 길어질 수 있다.

- [0040] 충전제의 기공 크기(Pore size)는 보통 60-10,000Å까지 있으면, 분석용 컬럼의 대부분은 150Å 이하이다. 분석 대상인 시료의 분자량이 클수록 기공 크기는 커져야 한다.
- [0041] 한편 역상 컬럼을 사용하는 경우, 함유된 carbon의 함량을 백분율로 나타내는 carbon Load를 고려할 필요가 있다. Carbon load가 커질수록 분리능이 향상될 수 있다. 예를 들어 PerkinElmer에서는 27%의 높은 carbon load를 가진 C18 컬럼을 제공하고 있다. C18 컬럼의 경우 반응하지 않은 실란올기(silanol group)이 표면에 잔류하여 secondary interaction의 원인이 된다. 이를 방지하기 위해 화학적 처리(endcapping)가 필요할 수 있다. 또한 HPLC column은 모두 사용 가능한 pH range가 정해져 있다. 분석 방법의 이동상의 pH를 컬럼이 견딜 수 있는지 반드시 확인할 필요가 있다.
- [0042] 아울러 컬럼을 선택할 때에는 분석 대상 시료의 물리/화학적 특성, 분리에 적합한 컬럼 선택(충전제의 극성도, 입경, 컬럼의 내경 및 길이를 고려), 표준품을 이용한 크로마토그램 획득, 최적 효율의 분리를 위한 용매의 조성비 결정, 피크의 분리간격 최적화, 피크의 분리가 적합하지 않은 경우 컬럼 변경 등을 고려할 필요가 있을 것이다.
- [0043] 한편 분리능 향상 및 분석 결과의 재현성을 보장하기 위하여 컬럼 온도를 적절하게 설정 유지할 수 있도록 컬럼 온도 조절기(Column Temperature Control Oven)가 부착될 수 있다. 1개의 컬럼 장착용 또는 여러 개의 컬럼을 장착할 수 있는 제품도 있으며 대부분의 제품은 최대 80 ~ 90℃ 온도 범위에서 0.1℃ 단위로 제어가 가능하다. 또한 멀티 컬럼 오븐의 경우 컬럼 스위칭 기능을 가진 제품도 있으며, 컬럼 인식 기능을 가진 제품이 사용이 편리하다.
- [0044] 검출기는 컬럼에서 분리된 시료가 일정한 간격으로 검출기를 통과할 때 시료의 존재 및 양을 일정한 규칙에 의해 인식하여 전기적인 신호로 바꾸어 준다. 사용될 수 있는 검출기의 종류는 자외선/가시광선 검출기(Ultraviolet/visible, UV/VIS Detector), 가변파장 검출기(Variable Wavelength Detector), 다이오드 어레이 검출기(Diode-Array Detector), 형광 검출기(Fluorescence Detector), 굴절률 검출기(Refractive Index Detector), 전기화학 검출기(electrochemical Detector) 및 전도도 검출기(Conductivity Detector) 등을 사용할 수 있다.
- [0045] 예를 들어 자외선/가시광선 검출기(UV/VIS Detector)는 HPLC 시스템과 관련해서 가장 많이 사용되고 있는 검출기로써 화합물이 빛을 흡수하는 성질을 이용한 방법이다. 즉 화합물들 중에는 자외선 혹은 가시광선 영역의 빛을 흡수하는 성질을 가진 화합물들이 있는데, 이들이 검출기의 셀을 지나면서 흡수한 빛의 양을 전기적인 신호로 바꾸어 주는 원리를 이용한 것이다. UV-Vis 검출기는 약품·식품·향료·펩타이드와 단백질 및 비타민 등의 다양한 분야에서 폭넓게 사용되고 있다.
- [0046] UV/VIS 검출기의 예로서 고정형 흡광도 검출기(Absorbance Detector)는 측정하고자하는 파장이 필터에 따라 결정이 되어 있어서 몇 개의 고정된 형태(214, 229, 254, 265, 280, 313, 405, 436, 536nm)의 파장만을 사용할 수 있다. 가변형 흡광도 검출기(Variable wavelength Detector: VWD): 일반적으로 190 ~ 600nm 사이의 파장 중에서 원하는 파장을 선택하여 사용함으로써, 고정형에 비하여 다양한 파장을 선택할 수 있으며, 2~5개의 파장을 동시에 선택할 수도 있어서 매우 편리하다. 광다이오드 배열 검출기(Photo-Diode Array Detector: DAD): 흡수셀을 통과한 빛을 다이오드 배열판으로 반사시켜서 190 ~ 900nm까지의 전 파장을 동시에 검출할 수 있다. DAD 검출기는 신속하게 모든 파장의 스펙트럼 확인 및 다파장 검출이 가능하고, 탁월한 파장 재현성을 갖는다. 또한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 수집한 결과를 3차원적인 크로마토그램의 해석이 가능하다.
- [0047] 한편 형광 검출기(Fluorescence Detector)는 분자는 외부로부터 에너지를 흡수하게 되면 들뜬 상태로 되었다가 안정화되기 위하여 에너지를 방출하면서 기저상태로 돌아가려는 성질을 가지고 있는데, 이러한 과정에서 빛이나 열 혹은 소리 등을 발생시킨다. 형광 검출기는 이러한 에너지 평형상태 중에 형광을 발생하는 화합물을 특이적으로, 검출하는 검출기로써 흡광도 검출기에 비하여 10-100배 이상의 우수한 감도를 가진다. 광원(Light Source)은 주로 수은등을 사용하는데, 연속광원인 크세논을 사용하는 분광형광 검출기도 있으며, 레이저를 광원으로 사용하여 감도를 더욱 향상시킨 제품도 생산되고 있다. 형광 검출기는 제약분야의 임상시험 시료나 생명과학 분야에서 아미노산 분석을 비롯한 환경·식품 등 다양한 분야에서 사용되고 있다.
- [0048] UV/Vis 검출기에서 분석하고자 하는 물질은 이 검출기에서 흡광도를 가져야 한다. 모든 물질이 자외선 및 가시광선부에서 빛을 흡수하는 것이 아니므로 각 물질의 분자 구조 중에 대표적인 흡수 스펙트럼을 가지는 구조가 존재하는지를 먼저 조사하여야 한다. 발색단의 구조 및 최대 흡광 파장(λ_{max} , nm)은 알려져 있는데, 아민기(-

NH₂)는 195, 에틸렌기(-C=C-)는 190, 케톤기(-C=O)는 195, 에스테르기(-COOR)는 205, 알데하이드기(-CHO)는 210, 카르복시기(-COOH)는 200~210, 니트로기(-NO₂)는 310, 페닐기는 202, 255, 나프틸기는 220, 275이다.

[0049] 굴절률 검출기(Refractive Index Detector)는 시료가 가지는 농도의 변화에 따르는 빛의 굴절률의 차이를 측정하는 것이다. 셀은 시료가 통과하는 샘플셀(sample cell)과 이동상만으로 채워진 기준셀(reference cell)로 구성되어 있으며, 분석시간 동안 reference cell은 이동상만으로 채워지고, 시료를 포함한 이동상은 sample cell을 통과하여 흐른다. 이때 두 cell의 농도 차에 의한 굴절률의 차이가 발생하는데, 이를 전기적인 신호로 나타내어 크로마토그램으로 화면에 나타난다. 굴절률 검출기는 거의 모든 화합물에 대하여 감도를 나타내지만, 흡광도 검출기나 형광 검출기에 비하여 감도가 낮고, 이동상의 유속과 온도에 대해서 매우 민감하게 반응한다. 굴절률 검출기는 흡광도 검출기나 전기전도도 검출기에서 검출되지 않는 고분자 화합물이나 당 등의 분석에 주로 이용된다.

[0050] 전기화학 검출기(electrochemical Detector)는 정전위 전기분해가 가능한 화합물을 선택적으로 검출할 수 있다. 셀의 내부로 들어간 시료는 일정한 전압이 걸린 기준전극의 전위를 기준으로 하여 작업 전극과 보조전극의 전기화학반응 즉 산화환원반응에 의한 전자의 이동이 일어나며, 이때 발생하는 전류의 양을 측정하여 크로마토그램으로 시각화하는 방법으로 정량 분석이 가능하다. 전기화학 검출기는 제약 및 생명과학 분야에서 catecholamine류 및 tryptophan 대사물 등의 분석과 환경 분야의 페놀이나 무기 및 유기금속 화합물류 분석, 식품중의 당 분석 등에 이용된다.

[0051] 전기전도도 검출기(Conductivity Detector)는 두 전극 사이의 전기전도도 차이를 이용한 것으로 이동상만이 흐르던 셀의 내부로 용해된 시료가 통과하게 되면 두 전극 간의 저항 값이 달라져서, 이러한 차이를 전기적인 신호로 바꾸어서 크로마토그램으로 해석할 수 있다.

[0052] 한편 HPLC 분석을 위한 이동상 용매는 HPLC 시스템에서 용매는 이동상으로써의 역할 뿐만 아니라 고정상과 시료와의 친화도에 영향을 미치는 주요한 인자로서 기능한다. 이동상 용매로 사용되는 모든 용매는 HPLC용으로 만들어진 HPLC grade를 사용하는 것이 바람직하다. 또한 극성도를 조절하기 위해서 사용하는 물 또한 저항 값이 18MΩ 이상인 초순수 등급 물을 사용해야 한다. 또한 용매들은 분리하고자 하는 시료를 녹일 수 있어야 하며 측정하고자 하는 파장보다 낮은 UV cutoff 값을 가지고 있어야 한다. HPLC 용매에서 사용되는 용매의 UV cutoff 값은 잘 알려져 있는데, 예를 들어 물은 180, n-헵탄은 197, 메탄올은 210, 사이클로헥산은 200, n-프로판올은 205, 카본 테트라클로라이드는 265, 아세토니트릴은 190, 클로로포름은 245, THF는 230, 벤젠은 280, 아세톤은 330, 톨루엔은 285, 메틸아세테이트는 260, 메틸렌클로라이드는 232, 에틸아세테이트는 260, 테트라클로로에틸렌은 280, 니트로메탄은 380, 1,2-디클로로에탄은 235이다. 아울러 용매를 선택할 때는 용매의 세기, 용매의 섞임성, 용매의 여과 등을 고려하여야 한다.

[0053] 용매의 강도는 역상(Reverse phase) 그리고 순상(normal phase)에 따라 서로 반대의 강도를 가지게 되는데, 역상에서는 유기용매와 물의 혼합시에 물의 함량이 많아질수록 성분의 머무름 시간(retention time)은 길어지게 된다.

[0054] 또한 HPLC에서 단일 용매를 사용하는 경우는 거의 없고, 대부분 혼합 용매를 사용하기 때문에 용매는 섞임성이 있어야 한다. 또한 사용하는 컬럼의 종류에 따라서 이동상으로 사용하는 용매의 극성도와 이온화 정도 및 친유성·친수성 등을 고려하여야 한다. 서로 섞이지 않는 용매를 동일한 HPLC 시스템에 사용하게 되면 컬럼의 치명적인 손상을 초래할 뿐 아니라 전체 시스템에서 막힘 현상이나 염의 석출 등이 발생하게 되므로 주의하여야 한다. 따라서 섞임성이 없는 용매를 교환하고자 할 경우에는 컬럼을 제거한 후 isopropyl alcohol 또는 tetrahydrofuan 등의 양성 용매로 충분히 세척한 후에 원하는 용매를 흘려주어야 한다.

[0055] 즉 HPLC 분석에 사용되는 용매로서는 점도가 낮고 혼합 용매를 사용할 경우 혼합비가 낮으며, 용매에 의한 충전물이 녹아서는 안 되고, 분석 물질은 반드시 용매에 용해되어야 하고, 용매의 UV cutoff 값이 낮고, 비등점이 낮아야 한다.

[0056] 용매의 여과와 관련해서, HPLC에 사용되는 컬럼은 수 μm 단위의 매우 미세한 입자로 충전되어 있기 때문에 이동상에 포함된 미세입자들이 컬럼을 막는 경우를 방지하기 위하여 이동상 및 시료 등은 반드시 여과하여 사용하여야 한다. 여과장치와 필터를 이용하여 여과하며, 용매 저장 용기에는 금속 필터를 이용하여 미세입자가 컬럼 내부로 유입되는 것을 방지해 주어야 한다. 시료를 용매에 주입하기 전에 사용하는 필터의 경우 지용성과 수용성이 있으므로 적절하게 선택해서 사용해야 하며, 여과하는 시료의 오염 정도와 양에 따라서 적당한 필터의 직경을 선택하여 사용해야 한다.

- [0057] 이동상 용매의 제조와 관련해서, 이동상으로서의 조건을 만족하는 용매를 선정하고, 미세먼지 등의 이물질을 제거한 용매는 이동상으로서 좋은 분리능을 가질 수 있는 알맞은 조성비로 섞어주게 된다. 대부분의 실험실에서는 용매를 기기분석실 내부에 저장하기 보다는 외부의 용매 저장소에 저장하는 경우가 많은데, 외부의 온도는 실험실의 온도와는 차이가 나는 경우가 있다. 이 경우 이동상으로 사용할 용매를 용매 저장고로부터 가져와서 곧바로 혼합하게 되면 온도의 차이에 따라서 용매 부피의 비율이 달라지는 경우가 있으므로 실험실에서 충분한 시간을 방치한 후 혼합하도록 한다. 혼합할 때에는 각각의 용매를 부피 대 부피로 계량한 후 곧 바로 혼합한다. 각각의 용매를 부피의 비율로 섞지 않고 한 용매에 다른 용매를 섞으면서 용량을 맞추는 경우도 있는데, 이 경우 용매의 성질에 따라서 흡열 및 발열반응이 일어나며 부피의 비가 달라질 수 있다. 또한 용매의 섞임성이 일정하지 않아서 다음에 분석할 경우에 분석의 재현성이 떨어진다.
- [0058] 아울러 분석하고자 하는 시료가 이온성 시료일 경우에는 이온의 억제나 이온쌍의 형성을 위하여 완충용액(Buffer solution)을 사용하는 경우가 있다. 이외에도 생리활성 물질 등을 순수분리하거나 정제할 때, 또는 pH를 조절할 목적, 이온성 물질을 분리할 때 이온강도를 조절할 목적으로 완충용액을 사용한다. 예를 들어 사용될 수 있는 완충용액은 염화나트륨·황산마그네슘·염화칼슘·이탄산나트륨(sodium bicarbonate)·염화칼륨·황산나트륨 이염기(Sodium phosphate dibasic)·황산칼륨 일염기(Potassium phosphate monobasic)·포도당(glucose) 및 이들의 조합으로 구성되는 군에서 선택될 수 있지만, 본 발명이 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 아울러 HPLC 시스템에서 분석된 데이터의 처리 및 제어를 위한 소프트웨어가 사용될 수 있다. HPLC 시스템의 제어는 크게 HPLC 시스템 본체의(최근에는 터치 스크린방식)에서 제어 또는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 편리하게 제어, 데이터 수집, 결과 도출, 성적서 출력까지 할 수 있다.
- [0060] 다시 도 1을 참조하면, S120 단계에서 전술한 HPLC 시스템을 이용하여 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린을 분석하여 크로마토그램을 얻을 수 있으며(도 2a 및 도 6a 참조), 얻어진 크로마토그램을 이용하여 표준품으로 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린에 대한 표준 검량식을 도출할 수 있다. 하나의 예시적인 실시형태에서, 표준품인 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대한 HPLC 분석에 의한 크로마토그램의 피크 면적의 평균값에 근거하여 설정된 농도의 이버멕틴 또는 페니실린에 대한 검량 선을 작성할 수 있으며(도 2b 및 도 6b 참조), 작성된 검량 선에 대하여 직선 형태의 검량 식을 도출할 수 있다. 놀랍게도 본 발명의 예시적인 실시형태에 따르면, 이러한 방법에 의하여 도출된 검량 식은 상당한 직선성을 보여주었다.
- [0061] 표준품에 대한 HPLC 분석에 의하여 표준품인 설정 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린에 대한 표준 검량식이 도출된 뒤, 이버멕틴 및/또는 페니실린을 유효 성분으로 함유하는 시료, 예를 들어 이들 유효 성분을 함유하는 의약품을 S120 단계와 동일한 절차에 따라 HPLC로 분석한다(S130 단계). 하나의 예시적인 실시형태에서 이버멕틴 및/또는 페니실린을 함유하는 시료는 동물용 또는 인체용으로 사용되는 주사제 형태와 같은 비경구형 또는 정제 등의 구강투여용 의약품일 수 있다.
- [0062] 일례로 이버멕틴을 함유하는 의약품의 유효 성분은 22,23-dihydroavermectin B1a(H2 B1a)와 22,23-dihydroavermectin B1b(H2 B1b)가 단독 또는 혼합된 것일 수 있다. 하나의 선택적인 실시형태에서 유효 성분으로서의 이버멕틴 중에서 H2 B1a는 80% 이상, H2 B1b는 20% 이하로 혼합될 수 있다.
- [0063] 이버멕틴을 함유하는 의약품의 비제한적인 예로는 본제 1mL 중에 이버멕틴이 1.0%(W/V)로 함유된 주사제인 이보맥(Ivomec 1% injection), 본제 1kg 중에 이버멕틴이 6.120g 함유된 이보맥-프리믹스(Ivomec-Premix 0.6%)는 물론이고, 정제(노란색 정제의 경우 284mg 중에 이버멕틴 함량 68mcg; 녹색 정제의 경우 658mg 중에 이버멕틴 함량 136mcg; 분홍색 정제의 경우 1136mg 중에 이버멕틴 함량 272mcg), 츠어블 정제(다이로하트 츠어블 정제의 경우, 초소형은 정제 230mg 중에 이버멕틴 함량 34.0mcg, 소형은 정제 450mg 중에 이버멕틴 함량 68mcg, 중형은 정제 750mg 중에 이버멕틴 함량 136mcg, 대형은 정제 750mg 중에 이버멕틴 함량 272 mcg), 모넨신이나 펠렌제스 테를 제제를 펠렛 제형으로 조제한 이버멕틴 펠렛(대한뉴팜) 등을 사용할 수 있지만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 한편 페니실린을 함유하는 의약품으로는 변형되지 않은 페니실린은 물론이고, 페니실린 G procaine, 페니실린 G benzatine과 같은 페니실린 G의 염일 수 있으며, 이들 이외에도 페니실린계에 속하는 항생 물질 및 이들의 염을 유효성분으로 함유하는 항생제를 들 수 있다.
- [0065] 표준품과 동일한 절차를 진행하여 시료에 대한 HPLC 분석을 수행하는 경우, HPLC 분석에 의하여 얻어지는 크로마토그램 중에서 표준품으로 사용된 설정된 농도의 이버멕틴 및/또는 페니실린으로부터 얻어진 피크 검출 시간과 유사한 시간대의 피크가 이버멕틴 및/또는 페니실린으로부터 유래된 피크이다(도 3 및 도 7 참조).

- [0066] 이어서 예를 들어 의약품인 검출 시료에 함유된 이버멕틴 및/또는 페니실린에서 유래된 HPLC 크로마토그램 상의 피크 면적을 적분하고, 전술한 S120 단계에서 얻은 표준 검량 식에 대입한다(S140 단계). 전술한 것과 같이 표준품의 HPLC 분석에 의하여 얻어진 표준 검량식에 따르면 피크 면적과 설정 농도 사이에 상당한 직선성을 보인다. 따라서 검출 시료에 대한 HPLC 분석에서 얻어진 크로마토그램에서의 유효 성분인 이버멕틴 및/또는 페니실린에서 유래된 피크 면적으로부터 해당 검출 시료 중의 이들 유효 성분의 농도를 정확하게 분석·평가할 수 있다.
- [0067] 이버멕틴이나 페니실린을 함유하는 의약품은 제조일로부터 장기간 보관되는데, 보관 과정에서 유효 성분이 분해되어 그 함량이나 농도가 저하된다. 본 발명에 따르면, 이들 의약품 시료 중에 함유된 유효 성분의 농도를 직접 분석하지 않고, 표준품에 대한 HPLC 분석에 의한 표준 검량 식에 해당 의약품 시료에서 HPLC 분석에 의하여 얻어진 피크 면적을 대입하는 방법으로 해당 의약품 시료 중의 유효 성분인 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 정확하게 분석·평가할 수 있다. 이처럼 본 발명에 따르면 의약품 시료 중에 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량을 정확하게 분석할 수 있으므로, 해당 의약품 중에 유효 성분이 안정적으로 함유되어 있는지를 평가함으로써 해당 의약품의 품질을 정확하게 관리할 수 있다.
- [0068] 한편 선택적으로 상기 S130 단계와 S140 단계는 일정 주기에 따라 반복적으로 수행할 수 있다(S150 단계). 예를 들어 S130 단계와 S140 단계는 1주일 간격, 1개월 간격, 분기 간격으로 반복적으로 수행될 수 있다. 이러한 주기적인 분석 및 평가에 의하여, 예를 들어 의약품 시료 중에 함유된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량 변화를 측정할 수 있다(도 4a 내지 도 4f 및 도 8 참조). 일정 주기에 따라 분석·평가된 이버멕틴 및/또는 페니실린의 함량 변화에 기초하여, 해당 의약품 중에 유효 성분인 이버멕틴 및/또는 페니실린이 의약품으로서 효율을 발휘하기 위한 최소 함량(예를 들어 원래의 90% 이상)이 되는 시기를 예측할 수 있으며, 해당 의약품의 보관 시기를 효율적으로 평가·분석하는 방법으로 해당 의약품의 품질을 관리할 수 있다.
- [0069] 이하 예시적인 실시례를 참조하면서 본 발명을 설명하지만, 본 발명이 하기 실시예에 기재된 기술사상으로 한정되는 것은 아니다.

[0070] **실시례 1 : 페니실린 함유 의약품의 품질 평가**

- [0071] 본 실시례에서는 페니실린을 함유하는 의약품의 품질을 평가·분석하였다. 시약으로는 표준품으로서 페니실린 G 포타슘(Penicillin G potassium)을 사용하였고, 페니실린을 함유한 의약품 시료로서 B.P.S.-LA 주사제(penicillin G procaine, penicillin G benzatime, (주)유니바이오테크)를 사용하였고, 그 외에는 모두 HPLC grade의 시약을 사용하였다. 이들 표준품과 시료 중에 함유된 페니실린의 함량을 분석하기 위하여 Incubator (N-Biotech), HPLC 기기(Waters Alliance 2695)를 사용하였으며, 검출기로는 UV/VIS spectrophotometer (WATERS 2489)를 사용하였다.
- [0072] 먼저 하기 표 1과 같은 방법으로 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 정밀하게 측정하여 3차 증류수에 녹인 뒤에 ACN으로 표선을 맞추어 혼합하는 방법으로 HPLC 분석을 위한 용매를 제조하였으며, 분석 조건을 설정하였다.
- [0073] 표준액의 제조를 위한 표준품으로 penicillin G potassium을 사용하였고, 약 50.0 mg을 정밀하게 측정하여 50 ml 메스플라스크에 넣고, 이동상으로 표선까지 채워 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 표준액을 제조하였다. 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 표준액을 각각 1, 2.5, 5, 6, 8 ml씩 취하여 10 ml 메스플라스크에서 희석하여 100, 250, 500, 600, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 표준액을 제조하였다.

[0074] 표 1: 페니실린 분석을 위한 HPLC 분석 조건

Ingredient	Stationary Phase	Mobile phase	Wave	Flow
			-length (nm)	rate (ml/min)
Penicillin	4.6 × 250 mm C18 ODS column	H ₂ O : Na ₂ H ₂ PO ₄ : ACN = 700 : 10.92g : 300	229	1.0

[0075]

[0076] 실험에서 사용할 현탁 주사제인 동물의약품 B.P.S.-LA의 주성분의 함량은 다음과 같다. 제품 1ml 중에 Procaine penicillin G 100,000IU, penicillin G benzatine 100,000IU, dihydrostreptomycin sulfate 200mg (Act.). 제조일별로 각각 A, B, C, D로 처방하였다(표 2 참조).

[0077] 표 2 : B.P.S. 주사 처방

처방	제조일
A	2013.06.18
B	2013.10.11
C	2014.07.04
D	2015.04.14

[0078]

[0079] 검체를 취하기 전에 잘 흔들어 충분히 균일하게 한 후 처방별로 각각 0.5ml를 정밀히 달아 50ml 메스플라스크에 넣고 이동상으로 표선까지 채워 검액으로 하였다. 같은 방법으로 처방별로 3개씩 샘플을 제조하여 incubator에서 70℃, 상대습도 70%의 가혹조건에서 보관하였다.

[0080] 표준품과 검액을 정량적으로 분석하기 위하여, 표준액과 검액을 0.45μm 필터로 거른 다음, 표 1의 분석 조건에 따라 고성능 액체크로마토그래피법에 따라 분석하였다. 이어서 표준 농도 100, 250, 500, 600, 800, 1000μg/ml 표준액에 대한 검량 곡선을 작성하고 상관관계로 직선성을 확인한 후, 각각의 처방별로 피크면적에 대하여 함량을 계산하고 유효한지를 판단하였다.

[0081] 먼저 표준 농도의 penicillin G potassium으로 제조한 농도별 표준액을 HPLC로 분석하였다. 분석 결과 penicillin G의 피크가 5.122분에 검출된 것을 확인하였다(도 2a 참조). 분석 결과 나온 피크의 면적별 평균값을 이용하여 표준 검량 선을 작성하였다(도 2b 참조). 검량 선 작성 결과 검량 선에 따른 표준 검량 식은 $y=3316.9x+80266$ 으로 나타났으며, 각각의 표준 농도와 피크 면적그래프에서 상관계수가 0.9964로 높은 직선성(linearity)을 보였다.

[0082] 이어서 제조일에 따라 처방된 4개의 검액의 함량을 표준액과 동일한 방법에 따라 분석하였다. HPLC 분석 결과 검액의 크로마토그램에는 2개의 피크가 나타났다(도 3 참조). 첫 번째 피크는 3.173분, 두 번째 피크는 5.159분의 retention time을 보여주었다. 2개의 피크 중에서 표준액의 피크와 비슷한 시간에 검출된 두 번째 피크가 penicillin G의 피크로 판단하였다. 검액 중 3.173분에 검출된 피크는 검액 중에 포함된 procaine의 피크인 것을 확인하였다. 따라서 검액에 포함되어 있는 penicillin G가 순수한 penicillin G가 아닌 procaine, benzatine 등에 결합되어 있는 형태로 함유되어 있어 이동상에서 해리되었을 것으로 생각되었다.

[0083] 도 3에서 얻은 크로마토그램으로 피크의 면적을 적분한 후 피크면적-농도 그래프인 검량 선(도 2b 참조)을 이용하여 7월 중에 penicillin G의 함량을 계산하였다. 검액 중에서 D를 제외한 모든 검액의 penicillin G의 함량이 90%에 못 미치는 것을 확인하였다(도 4a 참조). A 처방액에서 penicillin G의 함량은 74.0(±0.62)%, B 처방액에서 penicillin G의 함량은 75.2(±0.85)%, C 처방액에서 penicillin G의 함량은 82.4(±1.22)%, D 처방액에

서 penicillin G의 함량은 $92.7(\pm 1.05)\%$ 로 분석되어, 제조일이 오래될수록 penicillin G의 함량이 낮았다.

- [0084] 계속해서 1개월을 주기로 하여 해당 처방액에서 penicillin G의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 구체적으로 7월 중의 함량 평가 후에 각각의 처방액을 70°C , 상대습도 70%인 가혹조건 하에서 보관한 뒤 매달 penicillin G의 함량을 평가·분석하였다.
- [0085] 8월에 실시한 penicillin G의 함량 측정 결과, A 처방, B 처방, C 처방 및 D 처방 중의 penicillin G의 함량은 각각 $72.8(\pm 0.87)\%$, $74.6(\pm 1.10)\%$, $81.5(\pm 0.52)\%$, $91.0(\pm 1.66)\%$ 로 나타났다(도 4b).
- [0086] 9월에 실시한 penicillin G의 함량 측정 결과, A 처방, B 처방, C 처방 및 D 처방 중의 penicillin G의 함량은 각각 $68.5(\pm 1.12)\%$, $70.4(\pm 1.15)\%$, $80.9(\pm 1.57)\%$, $88.7(\pm 1.79)\%$ 로 나타나 가혹조건 하에서 저장한 지 2개월이 경과된 시점에서 처방 D에서 penicillin G의 함량도 90% 이하로 저하된 것을 확인하였다(도 4c 참조).
- [0087] 10월에 실시한 penicillin G의 함량 측정 결과, A 처방, B 처방, C 처방 및 D 처방 중의 penicillin G의 함량은 각각 $68.7(\pm 1.75)\%$, $69.2(\pm 1.40)\%$, $79.8(\pm 1.35)\%$, $88.3(\pm 0.97)\%$ 로 나타났다(도 4d).
- [0088] 11월에 실시한 penicillin G의 함량 측정 결과, A 처방, B 처방, C 처방 및 D 처방 중의 penicillin G의 함량은 각각 $66.1(\pm 0.92)\%$, $66.4(\pm 0.81)\%$, $79.4(\pm 1.40)\%$, $87.5(\pm 1.59)\%$ 로 나타났다(도 4e).
- [0089] 매달 처방 검액에서 penicillin G의 함량 변화를 분석한 결과, 눈에 뵈 정도로 큰 차이를 보이지는 않았으나 전반적으로 시간이 지남에 따라 penicillin G의 함량이 낮아진 것을 확인하였다(도 4f 참조).
- [0090] 이러한 함량 변화의 자료를 토대로 처방 D에 대하여 제조사에서의 자체적인 제품 함량 평가와 본 실시례에서의 함량 평가를 비교하였다. 제조사에서의 함량 평가 결과 처방 D의 penicillin G의 함량이 본 실시례에서 처방 D에서 penicillin G의 함량과 큰 차이가 없는 것을 확인하였다(표 3).

[0091] 표 3 : 페니실린 G의 함량 비교

Laboratory	contents (%)
Lab A	88.03
Lab B	87.50

[0092]

[0093] * Lab A: UNI BIOTECH CO.; Lab B: 본 실시례

[0094] 실시례 2 : 이버멕틴 함유 의약품의 품질 평가

- [0095] 본 실시례에서는 이버멕틴을 함유하는 의약품의 품질을 평가·분석하였다. 표준품과 시료 중에 함유된 이버멕틴의 함량을 분석하기 위하여 HPLC 기기(Waters, Alliance, 2695)를 사용하였고, 검출기로는 UV/VIS spectrophotometer(Waters 2489)를 사용하였다. 검량선 작성을 위한 표준품으로 Ivermectin(CAS-70288-86-7, 제이켄상사)을 사용하였고, 시료로 하트웜 솔루션 츠어블 정[chewable, 소형, (주)유니바이오테크]을 사용하였다. 그 외에는 HPLC grade의 시약을 사용하였다.
- [0096] HPLC 이동상으로서 하트웜 솔루션 츠어블 제조회사인 (주)유니바이오테크에서 이버멕틴 분석에 이용하는 표 4와 같은 조성의 이동상을 사용하였다.

[0097] 표 4 : 이버멕틴 분석을 위한 이동상 조성

Mobile phase	ACN	MeOH	H ₂ O
A	500	450	50
B	530	275	195

[0098]

[0099] 표준액의 제조를 위한 표준품으로 이버멕틴(CAS-70288-86-7)을 사용하였고, 도 5와 같은 방법으로 희석하여 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 검량선 그래프를 작성하였다. 한편 실험에서 사용할 검액인 동물 의약품 하트웜 솔루션 주어블[(주)유니바이오테크]의 이버멕틴 함량은 표 5와 같다.

[0100] 표 5 : 이버멕틴과 태블릿의 함량

Size	Tablet weight(g)	Ivermectin Content(mg)
Small	3.5	0.06202
Medium	5.0	0.08860

[0101]

[0102] small tablet을 분쇄하여 8정 분량(0.49616 μg)을 정확히 취해 MeOH를 용매로 하여 100ml로 mass up하였다. 초음파 분해(sonication) 10분 뒤에 입구를 막아 상온 보관하며 매달 15일에 0.45 μg filter로 여과하여 HPLC로 그 함량을 측정하였다. 이동상으로서 A(ACN : MeOH : H₂O = 500 : 450 : 50)를 사용하였을 때 파장 245nm에서 8.529분대에 peak가 관찰되었고, 이동상으로서 B(ACN : MeOH : H₂O = 530 : 275 : 195)를 사용하였을 때 11.586분대에 peak가 관찰되어 빠른 시간대에 검출되는 이동상 A를 선택하였다(도 6a 참조).

[0103] 이버멕틴으로 제조한 농도별 표준액을 HPLC로 분석하였다. 분석 결과 이버멕틴의 피크가 8.528 분대에 검출된 것을 확인하였다. 이 분석 결과 나온 피크 면적의 평균값으로 검량선을 작성하였다. 검량선 작성 결과, 검량선의 식은 $y=191.38x+9423.7$ 로 나타났으며, 농도와 피크 면적그래프에서 상관계수가 0.0003으로 높은 직선성을 보여주었다(도 6b 참조).

[0104] 이어서 검액의 함량을 평가하였다. 하트웜 솔루션 주어블 소형 8정(496.16 μg)을 각각 3개로 나누어 동일한 HPLC 조건에서 분석하여, 검액의 크로마토그램에서 3개의 peak를 확인하였다. 이버멕틴 표준품으로 peak를 찍었을 때 8분대에서 peak가 나온 것을 토대로, 3번째에 있는 peak를 이버멕틴이라고 판단하였다(도 7 참조). 8분대에 검출된 peak의 면적을 적분한 후, peak 면적-농도그래프인 검량선을 이용하여 이버멕틴의 함량을 계산하였다. 3월부터 9월까지 매달 15일에 해당 검액에 대한 함량 평가를 수행하였으며, 그 평가 및 분석 결과는 표 6 및 도 8에 표시되어 있다. 눈에 뵈는 정도로 큰 차이를 보이지는 않았으나 전반적으로 시간이 경과함에 따라 이버멕틴의 함량이 감소하여 3월부터 9월까지 시료 검액 중의 이버멕틴 함량은 약 1.75% 감소하였음을 알 수 있었다. 그래프의 검량선 식으로 계산해 본 결과 약 34개월 후 처음 함량의 90%에 도달할 것으로 예측되었으며, 향후 27개월은 안정할 것으로 예측되었다.

[0105] 표 6 : 이버멕틴 함량 분석

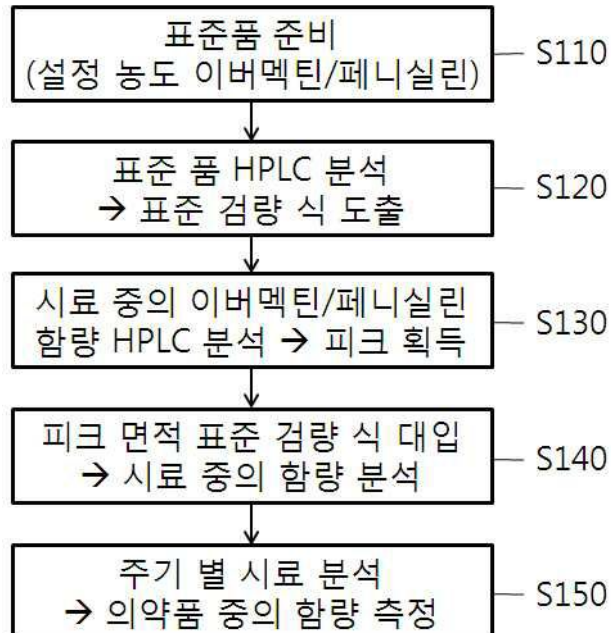
Months	Ivermectin ($\mu\text{g/ml}$)
3	4960 $\pm$ 4.4
4	4950 $\pm$ 6.9
5	4930 $\pm$ 10.2
6	4920 $\pm$ 10.9
7	4900 $\pm$ 7.8
8	4890 $\pm$ 4.9
9	4870 $\pm$ 3.5

[0106]

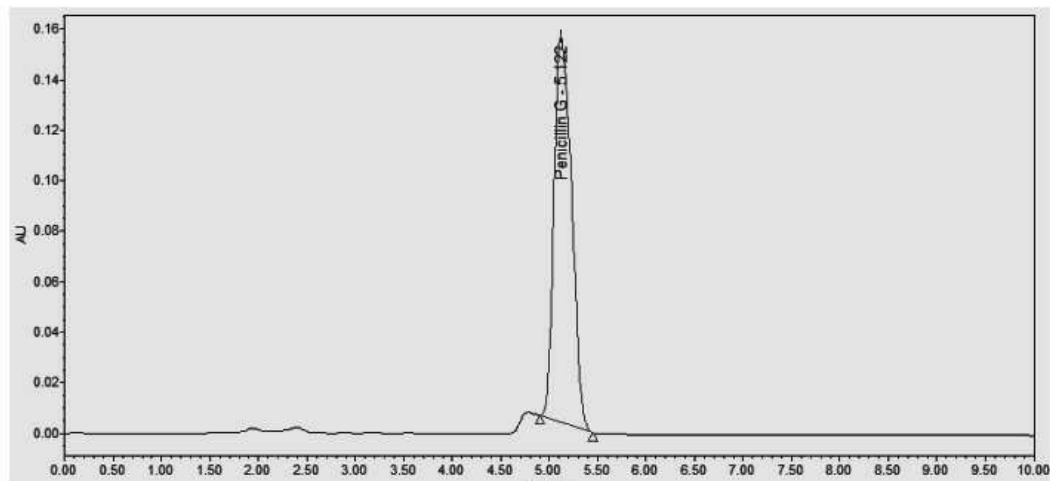
[0107] 상기에서는 본 발명의 예시적인 실시형태 및 실시례에 기초하여 본 발명을 설명하였으나, 본 발명이 상기 실시 형태 및 실시례에 기재된 기술사상으로 한정되지 않는다. 오히려 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자라면 전술한 실시형태 및 실시례에 기초하여 다양한 변형과 변경을 용이하게 추고할 수 있다. 그러나 이러한 변형과 변경은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 사실은 첨부하는 청구의 범위를 통하여 더욱 분명해질 것이다.

도면

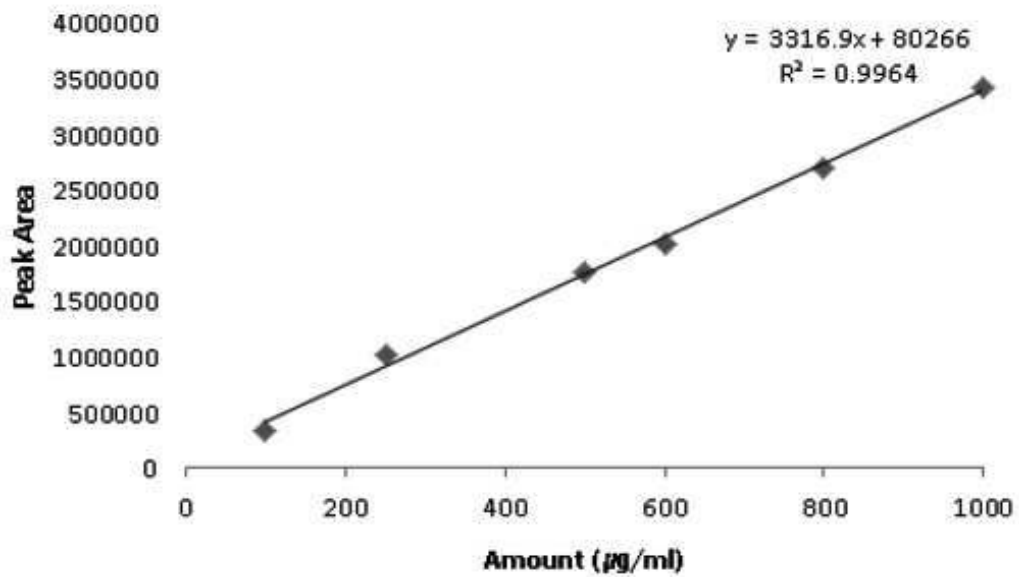
도면1



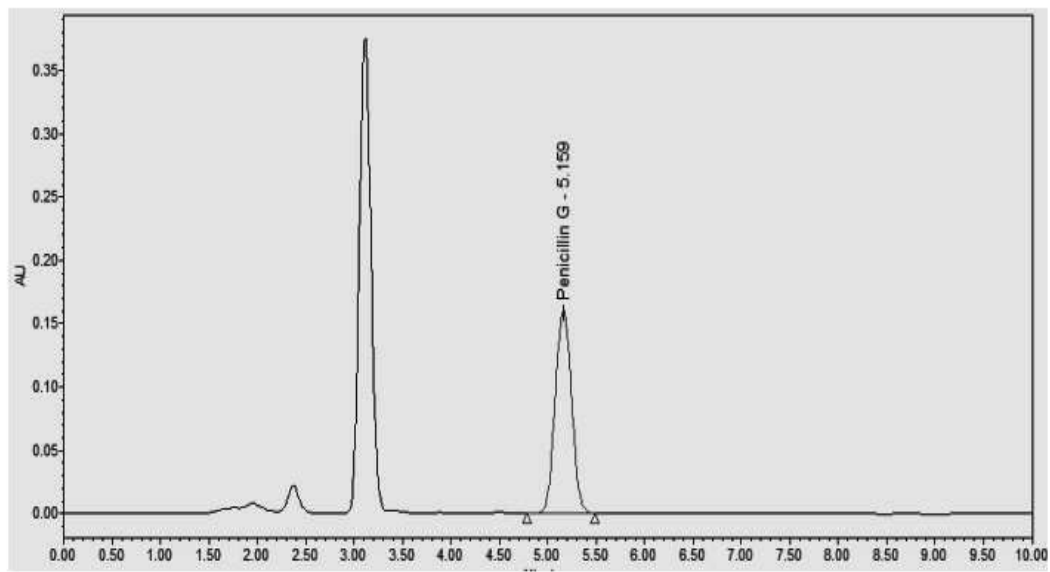
도면2a



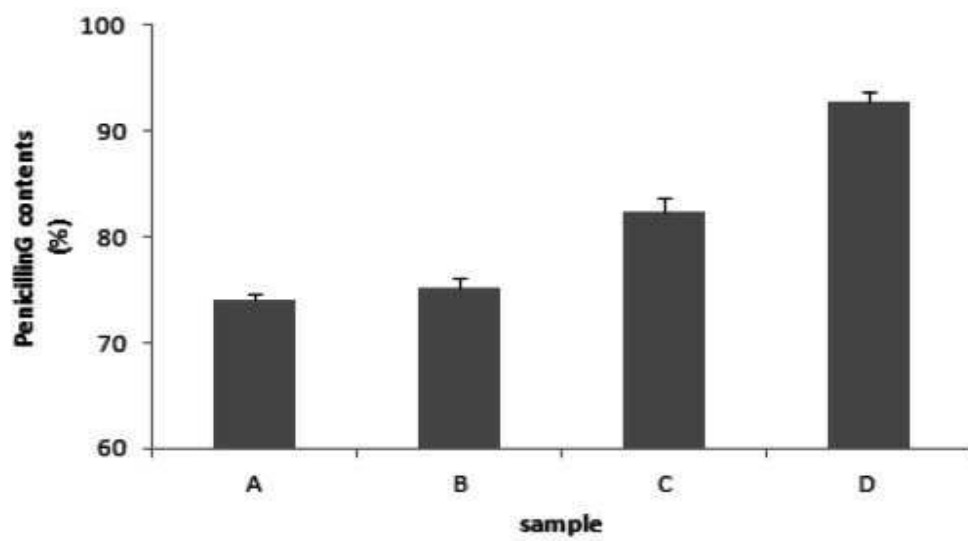
도면2b



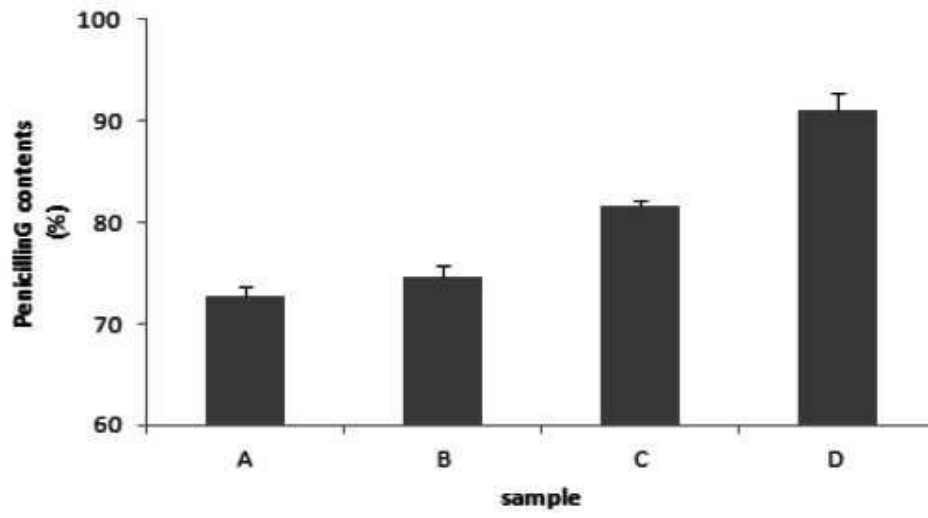
도면3



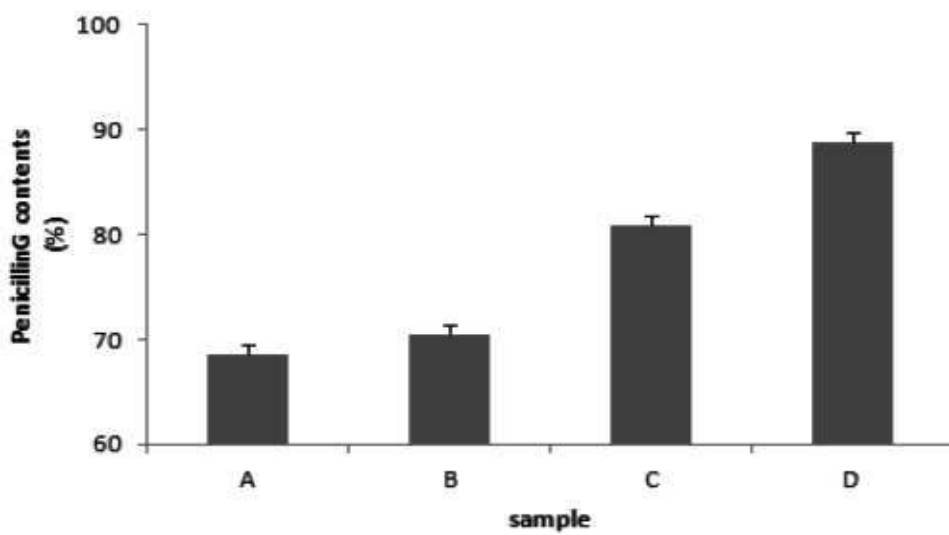
도면4a



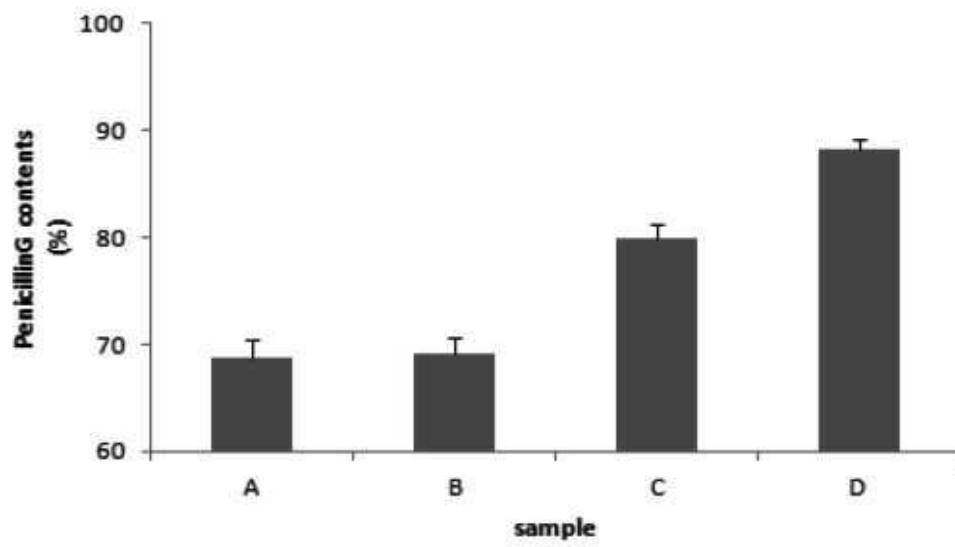
도면4b



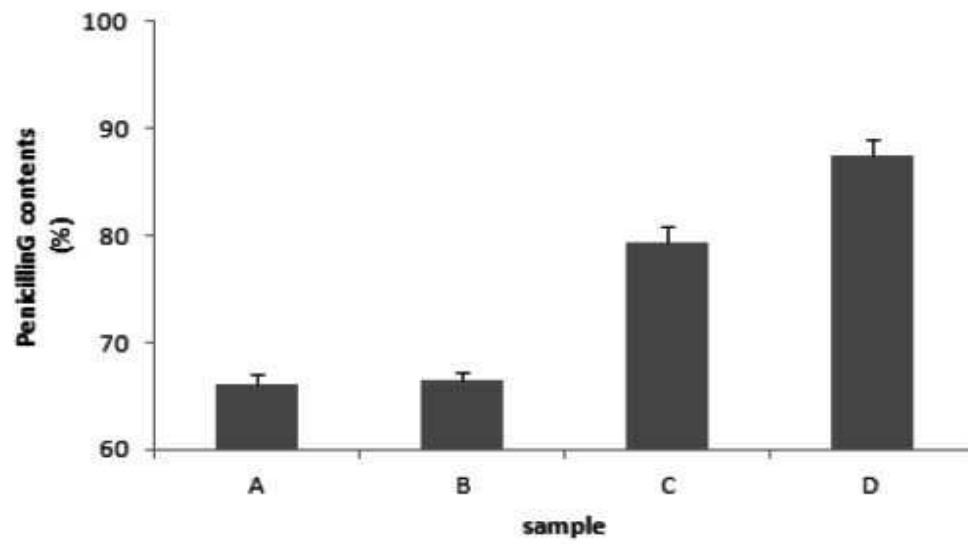
도면4c



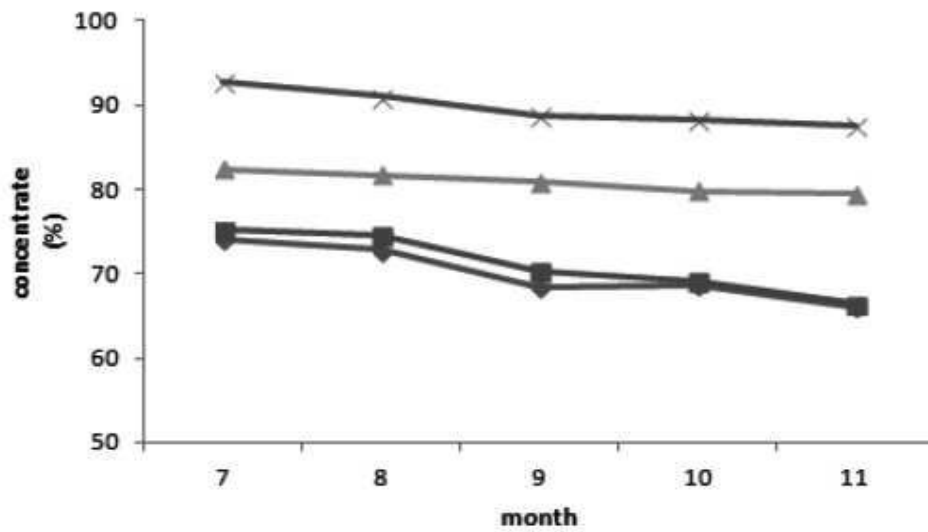
도면4d



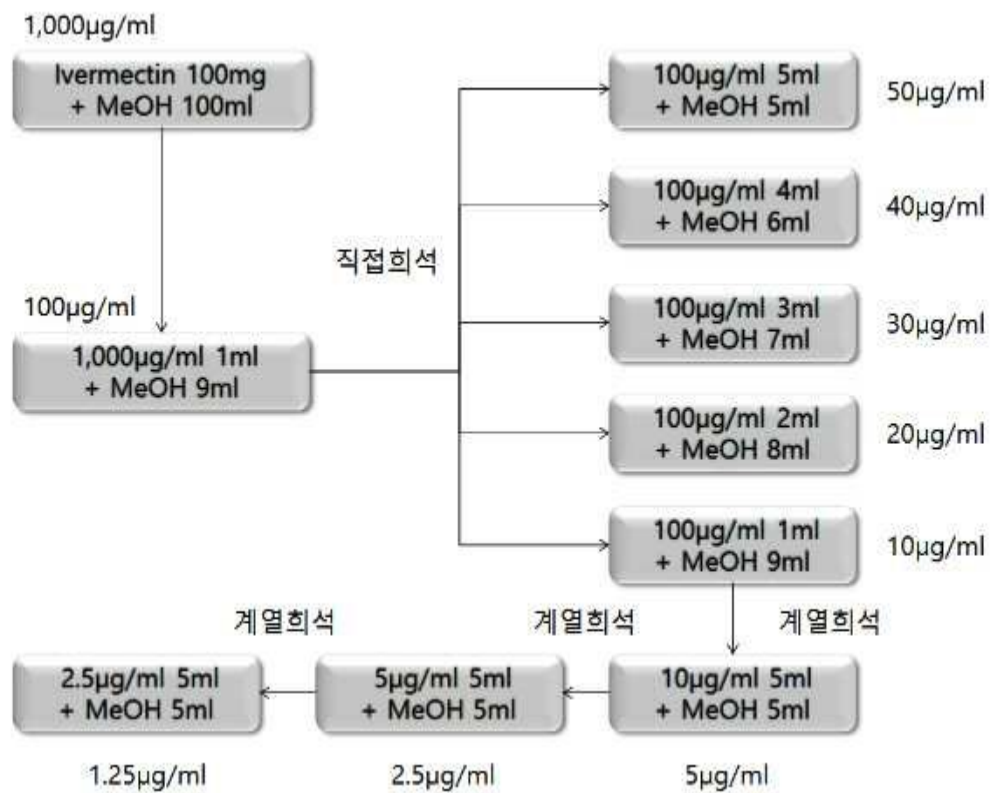
도면4e



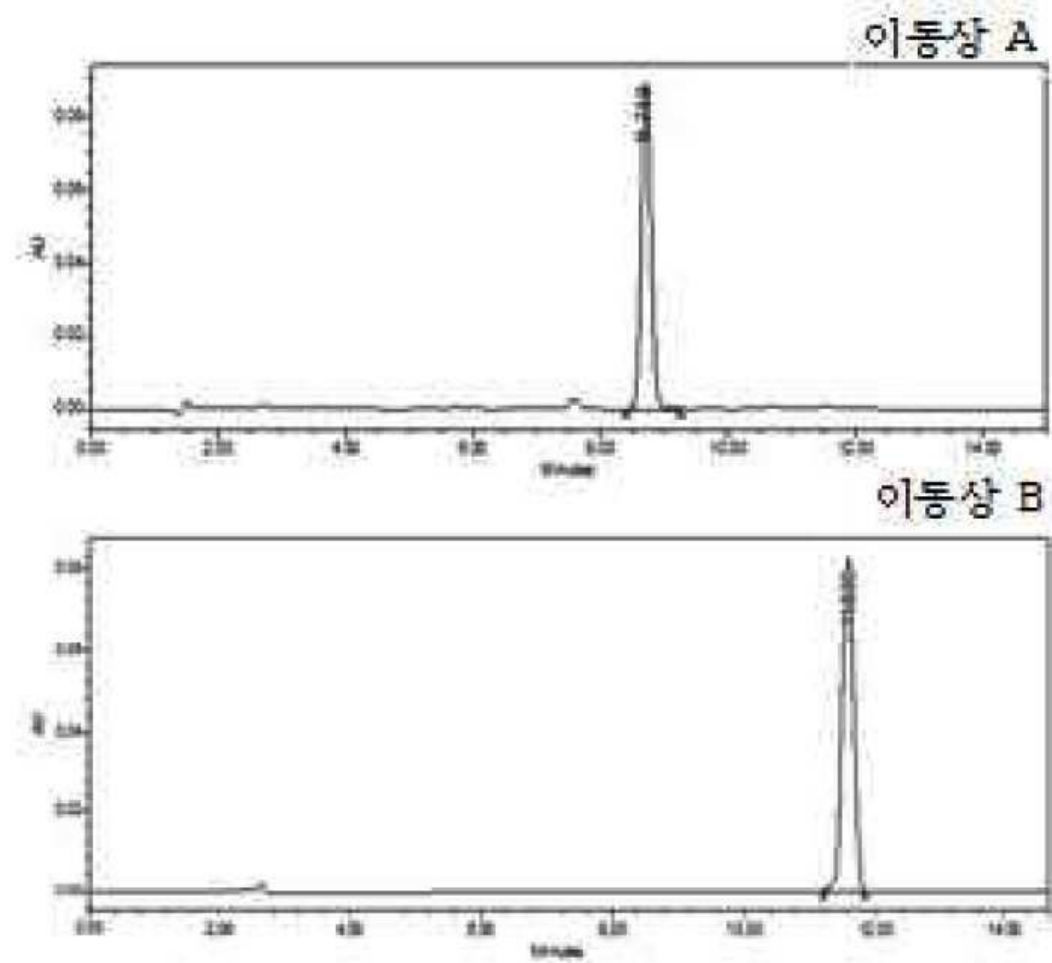
도면4f



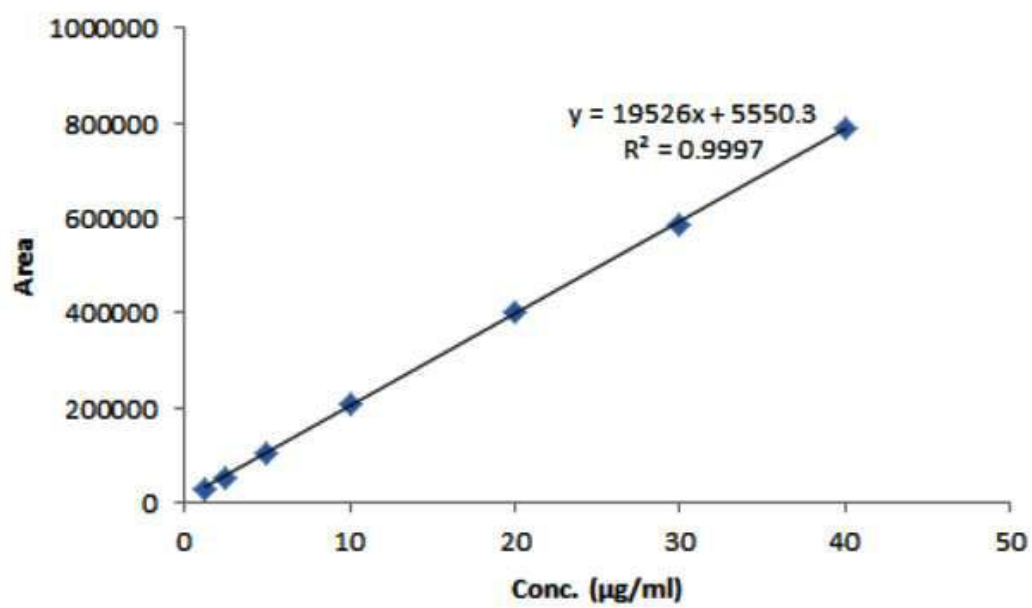
도면5



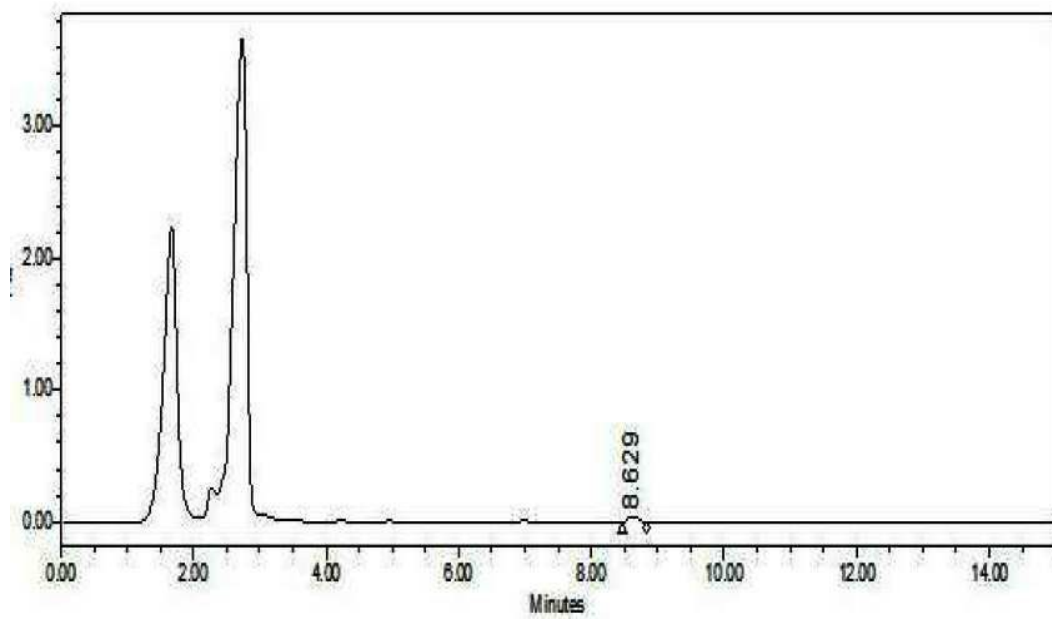
도면6a



도면6b



도면7



도면8

