

등록번호

안내서-1044-01



한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례집 | [민원인 안내서]

2020. 08.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

바이오생약심사부 생약제제과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례집 I (민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2020년 08월 20일 <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> 담당자 확 인(부서장) </div> <div style="text-align: center;"> 이 재 준 박 주 영 </div> </div>		

이 안내서는 '한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례'에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술 방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2020년 08월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전처 식품의약품 안전평가원 바이오생약심사부 생약제제과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-3558

팩스번호: 043-719-3550



"청렴한 식약처 국민 안심의 시작"

공익신고자 보호제도란?

-공익신고자등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익보호조치, 신변보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과
전화 044-200-7773 / 팩스 044-200-7949

제·개정 이력

한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례집 I (민원인 안내서)

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1044-01	2020.08.20.	한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례집 I 제정

목 차

I. 서 론	6
II. 표준성분프로파일 확립	8
III. 한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례	12
1. 당귀추출물	12
2. 갈근추출물	20
3. 산사추출물	28
4. 오미자추출물	36
5. 길경추출물	44
6. 지실추출물	52
7. 백지추출물	60
8. 복령추출물	67
IV. 관련용어	72

I. 서론

한약(생약)제제의 품질관리는 유효성분이 알려져 있을 경우, 그 유효성분의 함량을 관리하고, 유효성분이 알려지지 않았거나, 유효성분이 알려져 있더라도 전체 품질을 보증할 수 있을 정도의 분석적 민감도와 정확도를 확보할 수 없는 경우에는 분석적으로 유용한 지표성분을 지정하여 관리하는 방법을 사용하고 있다. 그러나, 적절한 지표성분을 설정하는 것 자체가 거의 불가능 하거나, 몇몇 지표성분의 함량 평가만으로는 전체 약효를 적절히 대변하지 못하는 경우에는 한약(생약)제제의 화학적 특징에 대한 포괄적이고 일관된 정보가 포함된 ‘성분 프로파일 (Chemical profile)’ 을 통해 품질 일관성을 확보하는 것이 필요하다.

성분프로파일(Chemical profile)은 한약(생약)제제 중에 함유되어 있는 다양한 화합물들의 조성과 비율을 일정하게 유지함으로써 의약품의 약효를 보증하고자 하는 것으로, 2010년 처음 성분프로파일 설정 가이드라인을 발간하여 제조업체에서 자체적으로 관리할 것을 권장하였고, 2016년 「한약(생약)제제 등의 품목허가·신고에 관한 규정」 개정을 통해 품목허가 시 의무적으로 표준성분프로파일에 관한 자료를 제출하도록 하였다.

성분프로파일자료 제출을 의무화한 초기에는 많은 업체들이 자료 준비에 어려움을 겪었다. 특히 주성분의 개수가 많고 물추출물을 사용하는 복합제의 경우 「한약(생약)제제 성분프로파일 설정 가이드라인」의 요구사항을 충족하는 분석조건을 설정하는 것이 쉽지 않으므로 사례집을 마련해 달라는 건의도 있었다. 이에, 우리 처에서는 원료의약품(추출물)의 성분프로파일 설정 사례를 추가하여 「한약(생약)제제 성분프로파일 설정 가이드라인」을 개정하였고, 찾아가는 성분프로파일 교육을 도입하여 직접 업체를 방문하여 시험자료를 보면서 성분프로파일 설정방법에 대한 자문을 하는 등 업체의 애로사항을 해소하기 위해 노력하였다. 또한 사례집 마련을 위해 2019년부터 3년에 걸쳐 조건 설정에 어려움이 많은 물추출물을 대상으로 성분프로파일 연구를 시작하였다.

이번 「한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례집 I」은 동 연구사업의 1차년도 연구결과를 토대로 당귀물추출물 등 8개 원료의약품(추출물)의 성분프로

파일 설정 사례를 제시하고 있다. 사례별로 표준시료 정보와 전처리방법, 분석 방법을 개발한 과정을 설명하고, 분석방법 밸리데이션을 위해 특이성, 반복성, 실험실내 정밀성을 확인하여 표준성분프로파일을 확립한 내용을 소개하였다. 또한 유통중인 다른 검체를 확보하여 확립된 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 대표성을 확인하였다. 아무쪼록 동 사례집이 성분프로파일 자료를 준비하는 분들의 시행착오를 줄여 한약(생약)제제 품목허가 및 품질관리 업무에 도움이 되고 나아가 한약(생약)제제의 품질 일관성을 확보하는데 도움이 되기를 기대한다.

II. 성분프로파일 확립

표준 성분프로파일 확립의 일반적 절차는 다음과 같다.

‘한약(생약)제제의 성분프로파일 설정 가이드라인(2016.12)’

1. 표준시료 선택

표준성분프로파일은 품질 관련 평가의 기준이 될 수 있다. 따라서 표준성분프로파일은 설정하는 품목의 유효성 및 안전성과 관련된 화학적 특성을 최대한 반영할 수 있어야 한다. 또한, 한약(생약)제제의 경우 다양한 원인에 의해 성분프로파일이 영향을 받을 수 있다. 예를 들면, 규격에 적합한 원료생약 (Raw material)을 사용하고 한약(생약)추출물 제조 공정이 동일할지라도 일부 조건의 차이에 의해서 로트별로 변동이 발생할 수 있다. 원료생약의 구성 성분 비율을 일정하게 관리하기 위해, 별도의 기준을 설정하여 기원, 사용부위, 채집시기, 재배이력, 가공방법 등에 대한 관리가 필요하며, 제조공정의 경우 주요 공정에 대한 공정관리 (In-process Control)를 통해 일정한 품질의 원료의약품(추출물)을 생산할 수 있다. 원료 한약(생약) 또는 공정상 발생할 수 있는 허용 가능한 범위의 변동을 포함할 수 있는 표준성분프로파일을 확보하기 위해서는 다양한 시료를 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 규격에 부적합한 원료 한약(생약)이 사용될 가능성도 고려하여 이들을 구분할 수 있는 수준의 표준성분프로파일을 확보하여야 한다.

2. 분석방법 개발

분석방법은 일차적으로 HPLC 등을 이용하여 크로마토그램을 얻는 것을 원칙으로 한다. 가장 일반적으로 HPLC-UV/DAD를 사용할 수 있으며 분석 대상의 특징에 따라 지표성분이 UV에 잘 검출되지 않는 경우에는 ELSD 및 MS와 같은 다양한 검출기를 적용할 수 있다. 또한 정유 같은 낮은 극성의 휘발성 성분을 다량 함유하고 있는 시료는 기체크로마토그래프법 (이하 GC)를 사용할 수 있다. 반대로 크로마토그래프법으로 시료의 특성을 명확하게 반영할 수 없는 경우 (예 : 일차 대사산물 위주의 조성을 갖는 시료) NMR을 사용할 수도

있다. NMR을 활용한 성분프로파일의 경우 분석방법의 특성상 크로마토그램으로부터 분리된 단일성분(피크)의 특성을 확인할 수 없고, 다성분에서 유래된 스펙트럼으로부터 성분프로파일을 작성하기 때문에 이에 대한 충분한 근거자료가 같이 제시되어야 한다.

분석조건은 시료의 화학적 특성을 가장 잘 반영할 수 있는 크로마토그램을 얻을 수 있도록 최적화되어야 한다. 문헌자료 등을 통해 분석 시료 대상의 구성 성분 및 분석조건에 대한 정보를 확보할 수 있을 경우, 해당 성분(군)이 안전성 또는 유효성과 관련된 물질(군), 함량 비율이 높은 주요 성분(군) 또는 대상 시료의 대표성을 가장 적절히 나타낼을 입증하거나, 다른 성분(군)들에 대한 정보도 포함할 수 있는 분석방법을 개발해야 한다. 이 때 시료의 화학적 특성을 최대한 반영할 수 있는 분석방법을 개발하도록 하며, 특정 성분의 피크가 과도하게 큰 면적을 차지하지 않도록 하는 것이 바람직하다. 단, 부득한 경우 (예 : 센텔라정량추출물 등) 특정 피크의 면적이 과도하게 큰 경우 이에 대한 타당한 사유 및 근거 자료를 제출하여야 한다.

성분프로파일에 적용되는 분석방법이 성분프로파일의 적절성 및 대표성을 결정하므로 다양한 전처리 방법, 이동상 및 고정상, 검출기 등을 적용하여 화학적 특징을 가장 잘 나타낼 수 있는 분석방법을 도출하도록 한다. 필요한 경우 내부 표준물질 (IS, Internal Standard)을 사용하여 분석방법상 발생 가능한 오차를 최소화할 수 있다. 특히, 원료생약의 경우 분석을 위한 시료 전처리 과정에서 오차가 발생할 수 있으며 내부표준물질을 활용할 경우 이에 대한 보정이 가능하다.

3. 분석방법 밸리데이션

분석방법의 타당성을 평가하기 위해 『대한민국약전』 일반정보 중 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인’에 따라 밸리데이션을 실시한다. 밸리데이션은 특이성 (Specificity)과 정밀성 (Precision)을 수행하며, 정밀성 지표로서는 반복성(Repeatability) 및 실험실내 정밀성 (Intermediate precision)을 확보하도록 한다. 특이성은 크로마토그램 상 해당 피크가 다른 피크의 간섭을 받지 않음을 증명해야 한다.

크로마토그래프법에서는 다양한 원인에 의해서 피크 유지시간 변동

(Retention time shift)이 발생할 수 있으며 이는 성분프로파일의 확인 및 평가에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 반복성과 실험실내 정밀성은 크로마토그램 상의 피크면적뿐 아니라 피크 유지시간에 대해서도 밸리데이션이 수행되어야 한다. 이 때 각 항목에 대해 상대표준편차 (RSD)는 5% 이하가 되도록 하는 것이 바람직하다. 필요한 경우 내부표준물질을 사용하여 정밀성을 확보할 수 있다.

4. 성분프로파일 설정

각 표준시료로부터 얻어진 크로마토그램으로부터 해당 시료의 특징을 가장 잘 반영할 수 있는 다수의 피크를 선정하여 성분프로파일을 설정한다. 해당 시료의 안전성 및 유효성과 관련하여 알려진 정보가 부족할 경우 가급적 많은 수의 피크를 선정하는 방법이 권장된다.

성분프로파일을 구성하는 피크 선택 시 다음 사항을 고려한다.

- 1) 유효성과 관련 있는 중요한 성분이 알려져 있는 경우에는 면적비와 관계 없이 가능한 이들 피크는 선택한다.
 - 단일제의 경우 최대한 많은 수의 피크가 고려되어야 하고, 가능한 크로마토그램 상 전체 피크면적의 합 대비 1 % 이상의 값을 갖도록 하고, 특정 성분의 피크가 과도하게 큰 면적을 차지하지 않도록 한다.
 - 복합제의 경우 각 주성분별로 1개 이상의 특정 피크가 포함되어야 한다.
- 2) 크로마토그램 상에서 반복성, 실험실내 정밀성이 확보되는 ($RSD < 5\%$) 피크들을 선택한다. 이때 이들 면적의 합은 전체 피크 면적 합의 50% 이상인 것이 바람직하다.
- 3) 최종 선정된 피크들의 면적은 표준시료 간 $RSD \leq 25\%$ 이내인 것이 바람직하다. 단, 표준성분프로파일과 비교하여 피크의 생성 또는 피크의 소멸 등 크로마토그램 패턴의 변화가 없어야 한다.
- 4) 성분프로파일에 선택된 피크들에 대해서는 각각의 특징을 나타낼 수 있는 UV 스펙트럼 또는 분자량 등에 대한 정보가 제시되어야 한다.

5. 표준성분프로파일 확립

각각의 표준시료들로부터 성분프로파일을 확보하고 그 피크면적 및 유지시간의 평균값 (mean)을 구함으로써 표준성분프로파일에 대한 수치값을 확보한 다음, 표준시료들의 크로마토그램을 중첩하여 표준성분프로파일을 확립한다.

표준성분프로파일은 다양한 표준시료에 대해서 시험한 후 얻어지는 분석 결과를 기반으로 확보하여 대표성을 갖도록 한다.

표준성분프로파일 설정을 위한 분석조건과 특정 피크 선택에 대한 근거 및 타당성 등 다음의 자료가 확보되어야 한다.

- 표준시료 선정 기준 및 관련 자료
- 피크선정 근거 (특정 성분군인 경우 관련 문헌 등)
- 분석방법에 대한 근거자료 (문헌, 시험분석자료 등)

6. 표준성분프로파일의 검증

표준성분프로파일의 대표성을 검증한다. 평균값을 만들기 위해 사용되어진 각 표준시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일 간에 큰 차이가 있는 경우, 예를 들어 표준시료 각 피크의 표준성분프로파일 대비 증감치 $\pm 50\%$ 이상인 경우에는 그 원인을 제시하여야 한다. 필요한 경우, 표준성분프로파일 피크들 간의 비율이 표준시료 성분프로파일 피크들의 비율과 유사한지 비교한다. 또한, 규격에 부적합한 시료 또는 위품 등의 성분프로파일과 비교하여 구별이 가능한지 여부도 판단할 필요가 있다.

Ⅲ. 한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례

사례 1. 당귀추출물

1. 표준시료 선택

1) 원료 한약재 및 물추출물 정보

한약재 기원	<i>Angelica gigas</i> Nakai의 뿌리
한약재 함량기준	환산한 건조물에 대하여 노다케닌($C_{20}H_{24}O_9$: 408.40) 및 총데쿠르신($C_{19}H_{20}O_5$: 328.36) 및 데쿠르시놀안젤레이트($C_{19}H_{20}O_5$: 328.36)의 합 6.0% 이상.
한약재 확인시험	표준생약 추출물과 TLC 비교
물추출물 함량기준	이 약은 정량할 때 표시량의 90.0 % 이상에 해당하는 당귀를 함유
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 230 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 당귀 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	AG_1	AG_2	AG_3	AG_4	AG_5	AG_6	AG_7
ANGI2009	-	AG1 (강원 평창)	AG2 (강원 평창)	AG3 (강원 평창)	AG4 (강원 평창)	AG5 (강원 평창)	AG6 (강원 평창)	AG7 (강원 평창)
AG_1	경북 영주							
AG_2	중국산							
AG_3	강원 평창							
AG_4	강원 평창							
AG_5	경북 봉화							
AG_6	중국산							
AG_7	강원 평창							

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃ 에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약(g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
AG_1	10.03	10.36	10.07	3.27	2.87	2.56	32.60	27.70	25.42	28.58	3.67
AG_2	10.10	10.20	10.15	3.07	2.69	2.29	30.40	26.37	22.56	26.44	3.92
AG_3	10.01	10.05	10.02	2.90	2.63	2.27	28.97	26.17	22.65	25.93	3.16
AG_4	10.23	10.17	10.20	2.19	2.66	2.57	21.53	26.08	25.20	24.27	2.41
AG_5	10.32	10.00	10.16	2.61	2.74	3.11	26.10	26.97	30.61	27.89	2.39
AG_6	10.25	10.01	10.13	4.24	2.34	2.87	42.36	23.10	28.33	31.26	9.96
AG_7	10.09	10.25	10.16	2.76	2.43	2.52	26.93	23.92	24.80	25.22	1.55
표준 생약	3.0			0.66			22.00			-	-

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 50% 메탄올 수용액 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 상층액을 취하여 0.2 μ m nylon filter로 여과한다.
- ⑤ 최종농도를 10 mg/mL로 희석한다.

2. 분석방법 개발

참고문헌(*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 (2008) 258-266)의 당귀 정량분석법을 참고하여 Agilent 1290 HPLC system을 사용해 아래와 같은 분석조건을 개발하였다. 기존 참고문헌의 총 50분 gradient 조건을 단축하고자 cleaning 시간을 없앴으며 분리능과 크로마토그램의 베이스라인 안정화를 위해 물 용매에 0.1 % 포름산을 넣어 최적 분석조건을 도출하였다. 고정상을 선택하기 위해, Thermo Scientific Hypersil GOLD C18 (250 × 4.6 mm, 5 μ m), Waters symmetry 3000 C18 (250 × 4.6 mm, 5 μ m), YMC hydrosphere C18 (250 × 4.6 mm, 5 μ m)으로 분석을 수행하였으며, 이 중 가장 높은 분리능을 보인 Thermo Scientific

Hypersil GOLD C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)을 고정상으로 하였다. 검출파장을 최적화하기 위해 210, 230, 254, 330 nm 4개의 UV 파장을 적용한 크로마토그램을 비교하였으며 당귀 물추출물의 피크가 가장 잘 관찰되는 조건을 찾아 최적 검출 파장을 330 nm로 설정하였다. (표 1)

HPLC conditions			
HPLC system		Agilent 1290 HPLC system	
Column		ThermoScientific Hypersilgold C18 (250×4.6, 5 μm)	
mobile phase	time	(A) 0.1% FA in Water	(B) MeCN
	0	85	15
	3	85	15
	8	75	25
	20	75	25
flow rate		1.0 mL/min	
Injection volume		10 μL	
Detection		330 nm	

표 1. HPLC-DAD 분석조건

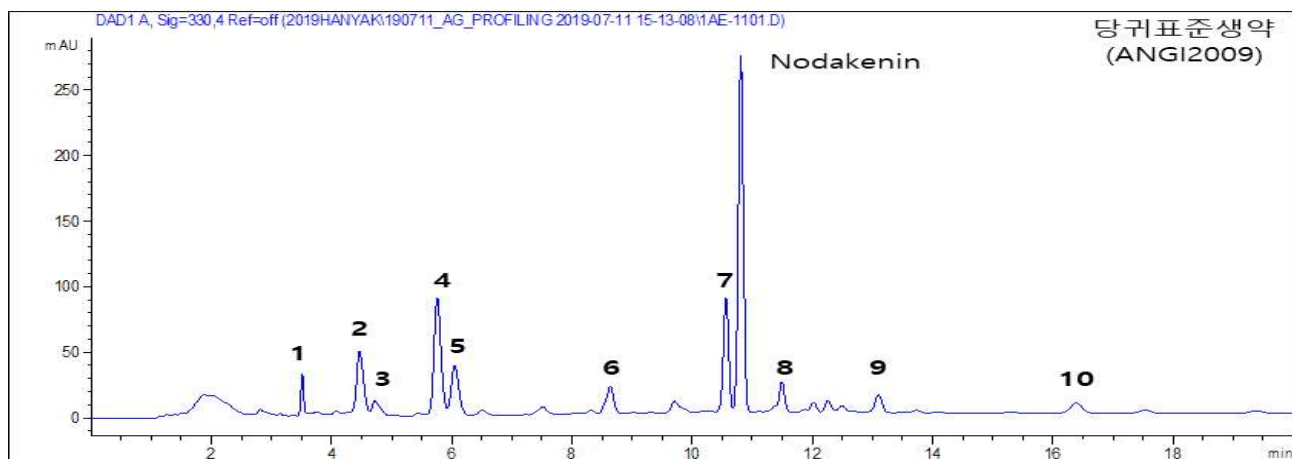


그림 1. 시료의 크로마토그램

본 시료의 경우 크로마토그램 상에서 전체 피크 면적 합의 1% 이상의 값을 갖는 10개의 피크를 확인할 수 있었으며 그 외의 다른 피크는 관찰되지 않았다. (그림 1) 성분프로파일 대상 피크로 선택된 각 피크에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였다. 또한 이들 10개 피크 면적의 합이 전체 피크 면적의 90% 이상임을 확인하였다.

3. 분석방법 밸리데이션

1) 특이성 (Specificity)

확립된 분석조건으로 표준시료의 크로마토그램을 확보하고, 10개 피크 각각에 대한 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며, 다른 당귀 시료의 크로마토그램에서도 해당 피크의 UV 스펙트럼이 동일함을 확인하였다. (그림 2)

피크	유지시간	성분확인
1	3.511	unknown
2	4.466	unknown
3	4.721	unknown
4	5.758	unknown
5	6.049	unknown
6	8.638	unknown
7	10.563	unknown (coumarin)
8	11.493	unknown
9	13.099	unknown
10	16.389	unknown

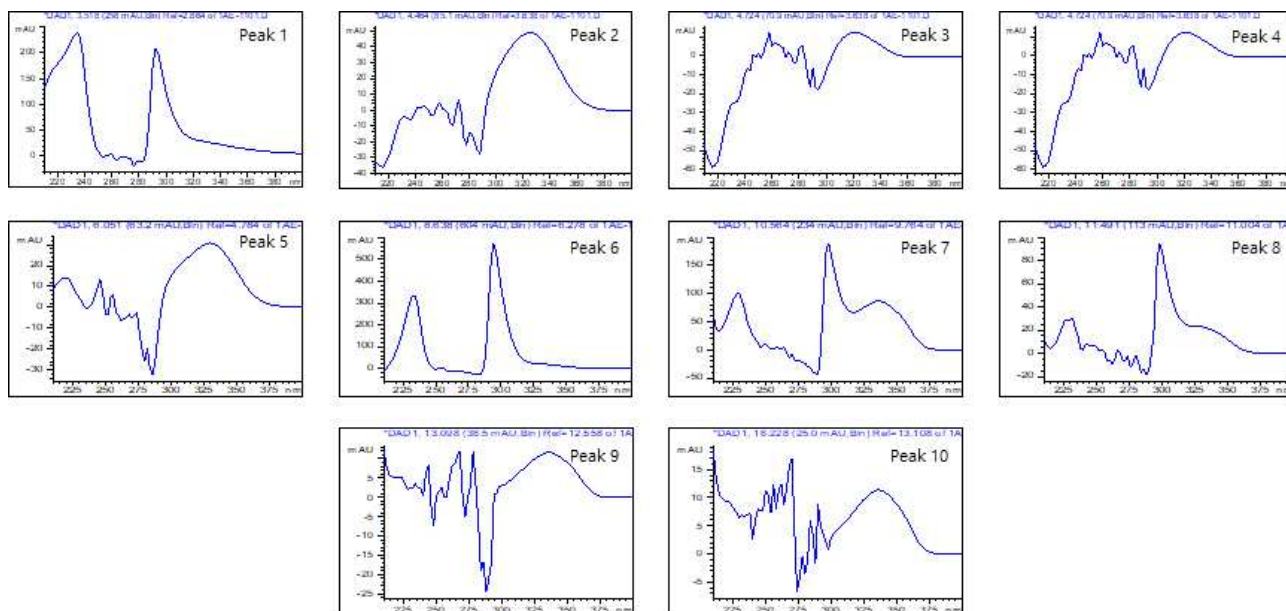


그림 2. 표준성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

2) 반복성 (Repeatability)

표준시료에서 반복성 확인을 위해 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해 분석을 수행하였다. 이들 크로마토그램에서 피크 유지시간과 피크면적을 확보하였으며 선정된 10개 피크의 가장 넓은 피크

면적을 보이는 4번째 피크를 기준으로 하여 상대유지시간 (Relative Retention Time, RRT)과 상대피크면적 (Relative Peak Area, RPA)도 계산하였다. 유지시간과 피크면적의 측정값과 RRT, RPA 모두에 대해 평균, 표준편차, 상대표준편차를 계산하여 적합한 반복성을 나타내는지 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 (RSD < 5%) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 2 및 표 3)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	평균(min)	표준편차 (Std)	상대표준 편차(%RSD)	평균(min)	표준편차 (Std)	상대표준 편차(%RSD)
1	3.511	0.001	0.015	0.605	0.003	0.521
2	4.490	0.016	0.357	0.774	0.001	0.165
3	4.747	0.018	0.377	0.818	0.001	0.150
4	5.803	0.030	0.521	1.000	0.000	0.000
5	6.100	0.034	0.553	1.051	0.000	0.033
6	8.675	0.024	0.276	1.495	0.004	0.248
7	10.595	0.019	0.182	1.826	0.006	0.344
8	11.521	0.017	0.151	1.985	0.007	0.373
9	13.147	0.029	0.220	2.266	0.007	0.313
10	16.510	0.076	0.460	2.845	0.003	0.096

표 2. 유지시간 및 상대유지시간(RRT)의 반복성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	97.6	1.729	1.772	0.132	0.003	2.152
2	386.8	4.278	1.106	0.525	0.007	1.330
3	100.0	3.101	3.101	0.136	0.004	2.956
4	736.6	5.269	0.715	1.000	0.000	0.000
5	336.5	1.924	0.572	0.457	0.001	0.278
6	186.2	1.810	0.972	0.253	0.003	1.017
7	534.7	2.190	0.410	0.726	0.005	0.735
8	168.4	3.339	1.983	0.229	0.004	1.939
9	113.8	1.121	0.985	0.155	0.002	1.012
10	111.2	3.609	3.244	0.151	0.005	3.073

표 3. 피크면적 및 상대피크면적(RPA)의 반복성

3) 실험실 내 정밀성 (Intermediate Precision)

실험실 내 정밀성 확인을 위해 동일 로트의 표준 시료에서 1일, 3일, 5일째 각각 시료를 취하여 각각 다른 사람이 검액을 조제하고 분석을 수행하여 실험실내 정밀성을 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 4 및 표 5)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	Avg(min)	Std	%RSD	Avg(min)	Std	%RSD
1	3.510	0.001	0.028	0.613	0.003	0.526
2	4.451	0.015	0.336	0.778	0.002	0.209
3	4.720	0.011	0.241	0.825	0.003	0.311
4	5.725	0.031	0.545	1.000	0.000	0.000
5	6.002	0.040	0.659	1.048	0.001	0.113
6	8.597	0.032	0.376	1.502	0.003	0.172
7	10.558	0.016	0.153	1.844	0.007	0.392
8	11.486	0.016	0.137	2.006	0.008	0.408
9	13.040	0.040	0.304	2.278	0.006	0.245
10	16.344	0.065	0.398	2.855	0.004	0.154

표 4. 유지 시간(RT) 및 상대유지시간(RRT)의 실험실 내 정밀성

Peak	피크면적			상대 피크면적		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	98.2	1.012	1.030	0.133	0.001	0.952
2	391.8	7.229	1.845	0.530	0.010	1.932
3	100.2	2.227	2.223	0.135	0.003	2.308
4	739.5	0.656	0.089	1.000	0.000	0.000
5	341.9	1.007	0.294	0.462	0.001	0.283
6	183.0	1.450	0.792	0.248	0.002	0.761
7	532.6	0.611	0.115	0.720	0.001	0.130
8	175.0	3.083	1.761	0.237	0.004	1.849
9	113.2	0.252	0.222	0.153	0.000	0.134
10	119.2	0.306	0.256	0.161	0.001	0.341

표 5. 피크 면적(PA) 및 상대피크면적(RPA)의 실험실 내 정밀성

4. 표준성분프로파일 확립

8개의 당귀 시료의 표준 시료에서 3반복 실험하여 얻어진 총 24개의 크로마토그램과 피크 유지시간, 피크면적 등을 종합하여 다음과 같은 특징을 갖는 표준 성분프로파일을 확립하였다. 표준성분프로파일에서 선정된 10개의 피크 중 가장 큰 면적을 갖는 피크 4의 경우 전체 면적의 30%를 넘지 않아 제시된 성분프로파일이 시료의 화학적 특성을 최대한 반영하는 것으로 판단하였다. (그림 3, 표 6)

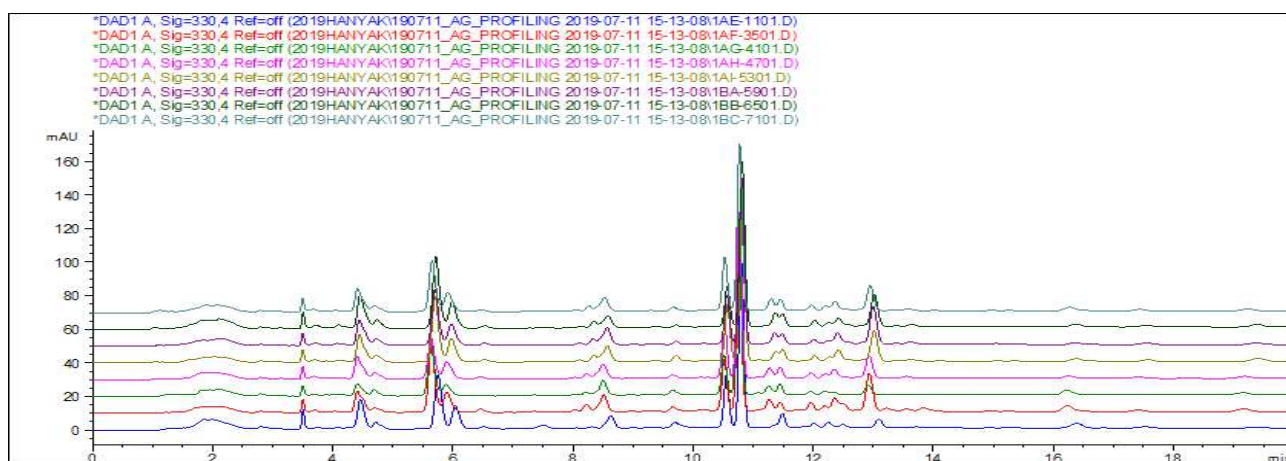


그림 3. 표준시료들의 중첩 크로마토그램

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RT	3.508	4.434	4.716	5.680	5.945	8.548	10.549	11.474	12.976	16.301
RRT	0.618	0.781	0.830	1.000	1.047	1.505	1.857	2.020	2.285	2.870
PA	93.3	420.6	115.7	908.7	383.9	284.8	614.6	141.3	422.6	106.4
RPA	0.103	0.463	0.127	1.000	0.422	0.313	0.676	0.156	0.465	0.117
PEAK (%)	2.7	12.0	3.3	26.0	11.0	8.2	17.6	4.0	12.1	3.0

표 6. 표준 성분프로파일의 각 피크의 유지시간 및 피크면적

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

24개 크로마토그램으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 8개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.93 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 당귀 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다. (표 7)

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	R ²
표준성분 프로파일	93.3	420.6	115.7	908.7	383.9	284.8	614.6	141.3	422.6	106.4	
표준시료	98.6	453.9	100.8	1131.9	430.4	341.0	705.2	112.9	658.0	182.5	0.98
	5.7%	7.9%	-12.9%	24.6%	12.1%	19.7%	14.7%	-20.1%	55.7%	71.5%	
AG_1	79.8	236.5	105.3	914.5	252.3	301.9	536.5	171.7	171.7	148.6	0.93
	-14.5%	-43.8%	-9.0%	0.6%	-34.3%	6.0%	-12.7%	21.5%	-59.4%	39.6%	
AG_2	94.2	458.1	131.8	732.5	404.0	320.2	746.3	152.1	410.3	80.8	0.96
	1.0%	8.9%	13.9%	-19.4%	5.2%	12.4%	21.4%	7.6%	-2.9%	-24.0%	
AG_3	106.9	561.6	144.0	1251.5	534.8	359.7	813.1	177.0	601.2	107.2	1.00
	14.6%	33.5%	24.4%	37.7%	39.3%	26.3%	32.3%	25.3%	42.3%	0.7%	
AG_4	87.9	474.8	124.0	919.3	411.2	338.5	599.5	133.0	647.6	36.1	0.96
	-5.7%	12.9%	7.2%	1.2%	7.1%	18.8%	-2.5%	-5.9%	53.3%	-66.0%	
AG_5	77.6	390.7	104.2	787.0	320.3	161.5	333.9	103.9	364.2	65.5	0.96
	-16.8%	-7.1%	-9.9%	-13.4%	-16.6%	-43.3%	-45.7%	-26.4%	-13.8%	-38.5%	
AG_6	91.8	409.5	109.6	805.3	380.3	270.1	648.3	138.5	414.7	112.1	0.99
	-1.6%	-2.6%	-5.3%	-11.4%	-0.9%	-5.2%	5.5%	-2.0%	-1.9%	5.3%	
AG_7	109.4	379.5	105.9	727.2	337.8	185.9	534.0	141.4	112.9	118.6	0.93
	17.3%	-9.8%	-8.5%	-20.0%	-12.0%	-34.7%	-13.1%	0.1%	-73.3%	11.5%	

표 7. 표준 성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

사례 2. 갈근추출물

1. 표준시료 선택

1) 원료 한약재 및 물추출물 정보

한약재 기원	<i>Pueraria lobata</i> Ohwi의 뿌리
한약재 함량기준	환산한 건조물에 대하여 푸에라린 ($C_{21}H_{20}O_9$: 416.38) 2.0 % 이상 및 다이드진 ($C_{21}H_{20}O_9$: 416.38) 0.3 % 이상
한약재 확인시험	표준생약 추출물과 TLC 비교
물추출물 함량기준	갈근으로서 1 g 중 푸에라린($C_{21}H_{20}O_9$: 416.38) 3.9 mg 이상을 함유
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃ 에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 284 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 갈근 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	갈근_1	갈근_2	갈근_3	갈근_4	갈근_5	갈근_6
PULO2008	-						
갈근_1	경남 거창						
갈근_2	경남 거창						
갈근_3	경북 경주						
갈근_4	중국						
갈근_5	중국						
갈근_6	중국						

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃ 에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약(g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
갈근_1	10.0	10.0	10.0	3.4	3.9	3.4	34.0	39.0	34.0	35.7	2.36
갈근_2	10.0	10.0	10.0	3.2	3.9	3.7	32.0	39.0	37.0	36.0	2.94
갈근_3	10.0	10.0	10.0	3.2	3.6	3.3	32.0	36.0	33.0	33.7	1.70
갈근_4	10.0	10.0	10.0	3.3	3.1	3.0	33.0	31.0	30.0	31.3	1.25
갈근_5	10.0	10.0	10.0	3.5	3.6	3.5	35.0	36.0	35.0	35.3	0.47
갈근_6	10.0	10.0	10.0	1.7	2.0	2.2	17.0	20.0	22.0	19.7	2.05
표준 생약	3.0			1.8			60			-	-

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 2 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 물/메탄올(90/10, v/v) 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 시린지로 용액 일부를 취하여 0.2 μ m PTFE filter로 여과한다.
- ⑤ 최종농도를 2 mg/mL로 희석한다.

2. 분석방법 개발

참고문헌(*Journal of Chromatography A* 855 (1999) 709-713)의 갈근 정량분석법을 참고하여 Agilent 1260 HPLC system을 사용해 아래와 같은 분석조건을 개발하였다. 고정상을 선택하기 위해, XBridge C18 (4.6 x 150 mm, 5 μ m), Allure Biphenyl (4.6 x 250 mm, 5 μ m), Kinetex C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)으로 분석을 수행하였으며, 이 중 가장 높은 분리능을 보인 Kinetex C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)을 고정상으로 선택하였다. 검출파장을 최적화하기 위해 220, 254, 290 nm 3개의 UV 파장을 적용한 크로마토그램을 비교하였으며 갈근 물추출물의 피크가 가장 잘 관찰되는 조건을 찾아 최적 검출 파장을 220 nm로 설정하였다. (표 8)

HPLC conditions			
HPLC system		Agilent 1260 HPLC system	
Column		Phenomenex Kinetex C18 (250 × 4.6 mm, 5um)	
mobile phase	time	(A)Water	(B) MeOH
	0	90	10
	2	90	10
	5	80	20
	35	65	35
	40	50	50
	45	50	50
	46	90	10
	55	90	10
flow rate		1.0 mL/min	
Injection volume		10 uL	
Detection		220 nm	

표 8. HPLC-DAD 분석조건

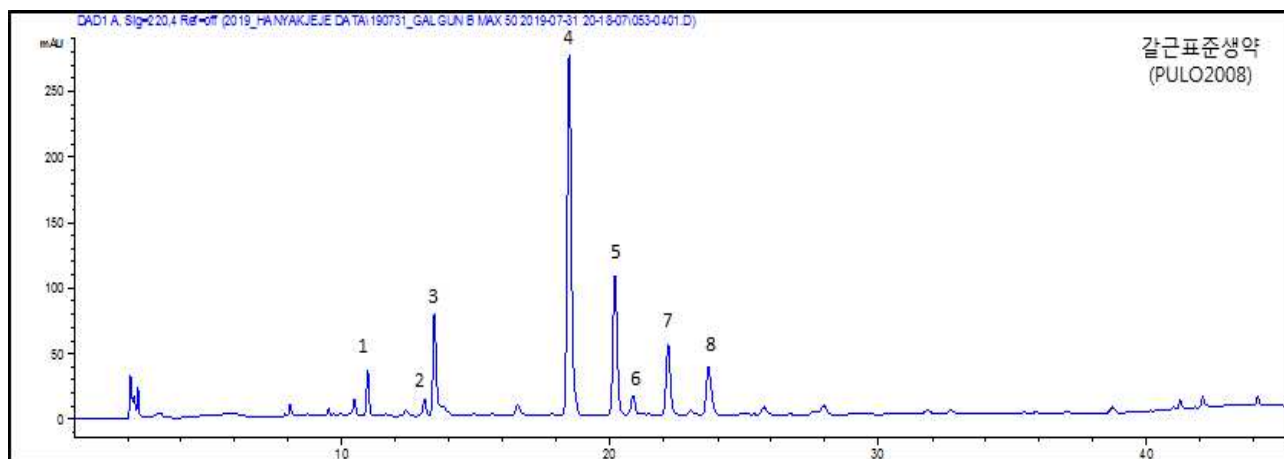


그림 4. 시료의 크로마토그램

본 시료의 경우 크로마토그램 상에서 전체 피크 면적 합의 1% 이상의 값을 갖는 8개의 피크를 확인할 수 있었으며 그 외의 다른 피크는 관찰되지 않았다. (그림 4) 성분프로파일 대상 피크로 선택된 각 피크에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였다. 또한 이들 8개 피크 면적의 합이 전체 피크 면적의 90% 이상임을 확인하였다.

3. 분석방법 밸리데이션

1) 특이성 (Specificity)

확립된 분석조건으로 표준시료의 크로마토그램을 확보하고, 8개 피크 각각에 대한 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며, 다른 같은 시료의 크로마토그램에서도 해당 피크의 UV 스펙트럼이 동일함을 확인하였다. (그림 5)

피크	유지시간	성분확인
1	10.964	unknown (flavonoid)
2	13.078	unknown (flavonoid)
3	13.444	unknown (flavonoid)
4	18.470	Puerarin
5	20.181	unknown (flavonoid)
6	20.852	unknown (flavonoid)
7	22.165	unknown (flavonoid)
8	23.671	daidzin

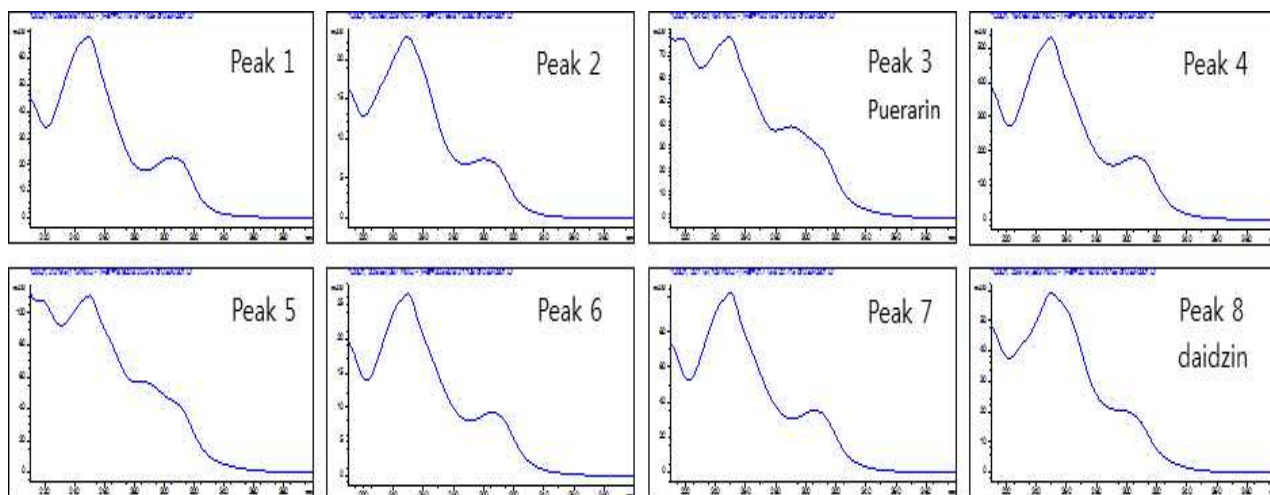


그림 5. 표준성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

2) 반복성 (Repeatability)

표준시료에서 반복성 확인을 위해 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해 분석을 수행하였다. 이들 크로마토그램에서 피크 유지시간과 피크면적을 확보하였으며 선정된 8개 피크의 가장 넓은 피크 면적을 보이는 4번째 피크(Puerarin)를 기준으로 하여 상대유지시간 (Relative Retention Time, RRT)과 상대피크면적 (Relative Peak Area, RPA)도 계산하였다.

유지시간과 피크면적의 측정값과 RRT, RPA 모두에 대해 평균, 표준편차, 상대표준편차를 계산하여 적합한 반복성을 나타내는지 확인하였다. 분석결과 측정값(유지시간, 피크면적)과 상대값(상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 9 및 표 10)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	평균(min)	표준편차(Std)	상대표준편차(%RSD)	평균(min)	표준편차(Std)	상대표준편차(%RSD)
1	10.964	0.005	0.047	0.594	0.000	0.043
2	13.078	0.004	0.027	0.708	0.000	0.020
3	13.444	0.003	0.023	0.728	0.000	0.014
4	18.470	0.002	0.009	1.000	0.000	0.000
5	20.181	0.003	0.012	1.093	0.000	0.015
6	20.852	0.003	0.012	1.129	0.000	0.016
7	22.165	0.004	0.017	1.200	0.000	0.022
8	23.671	0.004	0.015	1.282	0.000	0.020

표 9. 유지시간 및 상대유지시간(RRT)의 반복성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	222.8	4.090	1.836	0.076	0.000	0.158
2	106.9	1.906	1.783	0.036	0.000	0.124
3	523.4	6.261	1.196	0.177	0.003	1.819
4	2949.5	49.535	1.679	1.000	0.000	0.000
5	1154.9	19.984	1.730	0.392	0.000	0.051
6	147.6	2.761	1.871	0.050	0.000	0.565
7	606.5	10.952	1.806	0.206	0.000	0.148
8	484.9	8.646	1.783	0.164	0.000	0.174

표 10. 피크면적 및 상대피크면적(RPA)의 반복성

3) 실험실 내 정밀성 (Intermediate Precision)

실험실 내 정밀성 확인을 위해 동일 로트의 표준 시료에서 1일, 3일, 5일째 각

각 시료를 취하여 각각 다른 사람이 검액을 조제하고 분석을 수행하여 실험실내 정밀성을 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 11 및 12)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	Avg(min)	Std	%RSD	Avg(min)	Std	%RSD
1	10.865	0.135	1.239	0.590	0.001	0.121
2	12.934	0.175	1.354	0.703	0.002	0.277
3	13.495	0.047	0.351	0.733	0.008	1.040
4	18.399	0.206	1.118	1.000	0.000	0.000
5	20.068	0.235	1.172	1.091	0.001	0.056
6	20.719	0.248	1.195	1.126	0.001	0.078
7	22.050	0.253	1.146	1.198	0.000	0.029
8	23.602	0.213	0.903	1.283	0.003	0.241

표 11. 유지 시간(RT) 및 상대유지시간(RRT)의 실험실 내 정밀성

Peak	피크면적			상대 피크면적		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	379.2	2.093	0.552	0.078	0.001	0.720
2	170.6	1.515	0.888	0.035	0.001	1.882
3	523.2	5.689	1.087	0.107	0.001	1.149
4	4890.9	55.347	1.132	1.000	0.000	0.000
5	1077.2	37.743	3.504	0.220	0.006	2.724
6	239.8	0.259	0.108	0.049	0.001	1.180
7	1007.3	14.582	1.448	0.206	0.004	2.063
8	675.9	9.987	1.478	0.138	0.001	0.514

표 12. 피크 면적(PA) 및 상대피크면적(RPA)의 실험실 내 정밀성

4. 표준성분프로파일 확립

7개의 같은 시료의 표준시료에서 3반복 실험하여 얻어진 총 21개의 크로마토그램과 피크 유지시간, 피크면적 등을 종합하여 아래와 같은 표준성분프로파일을 확립하였다. 피크 4(Puerarin)의 경우 피크면적이 성분프로파일에 포함된 피크들의

면적 합의 30% 이상으로 나타났다. 식품의약품안전평가원 발행 「한약(생약)제제의 성분프로파일 설정 가이드라인」의 예시에 언급된 바와 같이 해당 피크로 인해 동등상관계수가 크게 영향을 받을 수 있으므로 해당 피크를 제외하여 성분프로파일을 설정하고자 하였다. 해당 피크를 제외하고 성분프로파일을 설정할 경우 피크 4의 피크 면적이 성분프로파일에 포함된 피크들의 면적합의 30% 이상이 되고, 성분프로파일에 포함된 피크들의 면적값 합의 전체 크로마토그램 상의 피크 면적의 합(50% 이상) 기준에 부합하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 해당 피크 모두를(피크4, 피크5) 포함시켜 표준성분프로파일을 확립하였다. 이 표준성분프로파일로 동등성 평가를 할 경우 피크 4를 포함한 경우와 제외한 경우를 모두 비교하여 동등성을 검토하는 것이 필요하다. (그림 6, 표 13)

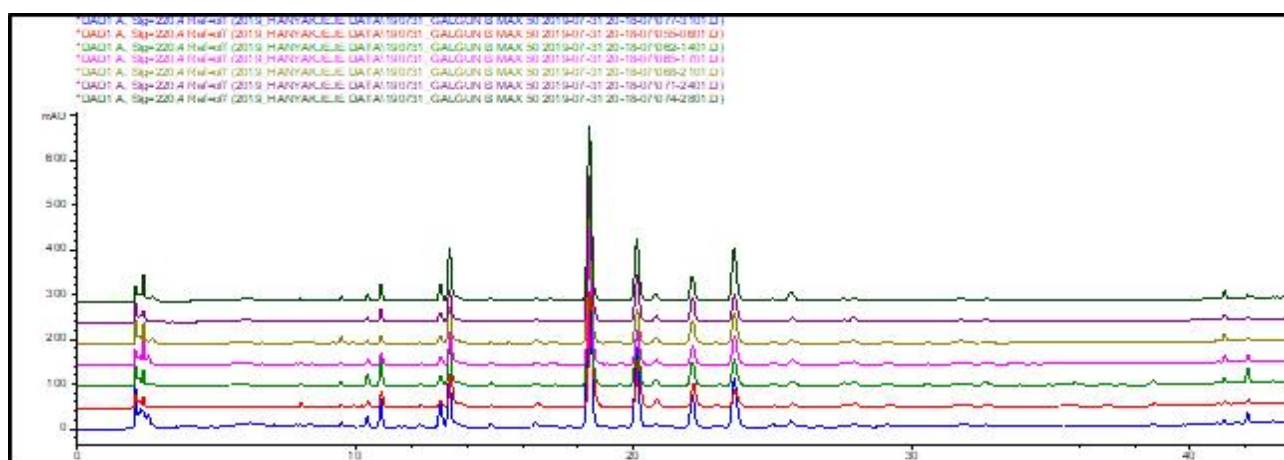


그림 6. 표준시료들의 중첩 크로마토그램

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8
RT	10.961	13.064	13.399	18.424	20.132	20.809	22.159	23.628
RRT	0.595	0.709	0.727	1.000	1.093	1.129	1.203	1.283
PA	257.4	200.6	668.8	3925.5	1243.3	140.4	588.3	930.4
RPA	0.066	0.051	0.170	1.000	0.317	0.036	0.150	0.237
PEAK (%)	3.2	2.5	8.4	49.3	15.6	1.8	7.4	11.7

표 13. 표준 성분프로파일의 각 피크의 유지시간 및 피크면적

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

21개 크로마토그램으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 7개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.99 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 같은 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다. (표 14)

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	R ²
표준성분 프로파일	257.4	200.6	668.8	3925.5	1243.3	140.4	588.3	930.4	
표준시료	222.8	106.9	523.4	2949.5	1154.9	147.6	606.5	484.9	0.99
	-13.4%	-46.7%	-21.7%	-24.9%	-7.1%	5.1%	3.1%	-47.9%	
같은_1	441.3	186.9	716.8	5039.7	1334.9	155.8	597.5	719.7	0.99
	71.5%	-6.9%	7.2%	28.4%	7.4%	11.0%	1.6%	-22.6%	
같은_2	169.0	143.8	550.1	3332.4	851.3	115.4	459.6	819.6	1.00
	-34.3%	-28.3%	-17.8%	-15.1%	-31.5%	-17.8%	-21.9%	-11.9%	
같은_3	116.5	119.7	609.2	3660.6	834.4	149.7	577.0	847.3	1.00
	-54.7%	-40.3%	-8.9%	-6.7%	-32.9%	6.6%	-1.9%	-8.9%	
같은_4	204.4	175.7	545.0	3511.0	1131.9	149.6	420.6	779.2	1.00
	-20.6%	-12.4%	-18.5%	-10.6%	-9.0%	6.6%	-28.5%	-16.2%	
같은_5	228.3	263.1	893.8	4059.1	1473.8	160.6	616.4	1442.3	0.99
	-11.3%	31.1%	33.6%	3.4%	18.5%	14.4%	4.8%	55.0%	
같은_6	419.2	408.2	843.5	4926.1	1922.1	104.2	840.7	1419.5	1.00
	62.9%	103.5%	26.1%	25.5%	54.6%	-25.8%	42.9%	52.6%	

표 14. 표준 성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

사례 3. 산사추출물

1. 표준시료 선택

1) 원료 한약재 및 물추출물 정보

한약재 기원	<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge 및 그 변종 (장미과 Rosaceae)의 잘 익은 열매
한약재 함량기준	별도 규정 없음
한약재 확인시험	표준생약 추출물과 TLC 비교
물추출물 함량기준	표시량의 90.0 % 이상에 해당하는 산사를 함유
물추출물 확인시험	생규 산사엑스 산의 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃ 에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 217 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 산사 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	산사_1	산사_2	산사_3	산사_4	산사_5	산사_6	산사_7
CRPI2016	—							
산사_1	강원 평창							
산사_2	경북 봉화							
산사_3	경북 영주							
산사_4	중국							
산사_5	중국							
산사_6	중국							
산사_7	중국 북경							

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃ 에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약(g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		

산사_1	10.0	10.0	10.0	2.8	2.9	2.7	28.0	29.0	27.0	28.0	0.82
산사_2	10.0	10.0	10.0	3.1	3.0	3.2	31.0	30.0	32.0	31.0	0.82
산사_3	10.0	10.0	10.0	2.6	2.6	2.5	26.0	26.0	25.0	25.7	0.47
산사_4	10.0	10.0	10.0	4.5	4.6	4.6	45.0	46.0	46.0	45.7	0.47
산사_5	10.0	10.0	10.0	4.9	4.6	4.3	49.0	46.0	43.0	46.0	2.45
산사_6	10.0	10.0	10.0	4.6	4.3	4.6	46.0	43.0	46.0	45.0	1.41
산사_7	10.0	10.0	10.0	5.3	5.2	5.3	53.0	52.2	53.5	52.9	0.54
표준 생약	3.0			0.7			23.3			-	-

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 5 mM H₂KPO₄ (pH2)/아세트니트릴/메탄올 (95/4/1, v/v/v) 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 시린지로 용액 일부를 취하여 0.2 μm PTFE filter로 여과한다.
- ⑤ 최종농도를 10 mg/mL로 희석한다.

2. 분석방법 개발

참고문헌(*J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4574-4581)의 산사 정량분석법을 참고하여 Agilent 1260 HPLC system을 사용해 아래와 같은 분석조건을 개발하였다. 당성분이 많은 대표 화합물의 정량분석을 위한 기존 분석조건과 달리 물에 5 mM H₂KPO₄ (pH 2)를 넣어 최적 분석조건을 도출하였다. 고정상을 선택하기 위해, Kinetex C₁₈ (4.6 x 250 mm, 5 μm), Phenomenex Gemini-NX C₁₈ (250 x 4.6, 5 μm)으로 분석을 수행하였으며, 이 중 가장 우수한 분리능을 보인 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ (250 x 4.6, 5 μm)을 고정상으로 선택하였다. 검출파장을 최적화하기 위해 210, 220, 230, 280 nm 4개의 UV 파장을 적용한 크로마토그램을 비교하였으며 산사 물추출물의 피크가 가장 잘 관찰되는 조건을 찾아 최적 검출 파장을 220 nm로 설정하였다. (표 15)

HPLC conditions			
HPLC system		Agilent 1260 HPLC system	
Column		Phenomenex Gemini-NX C18 (250×4.6, 5 μm)	
mobile phase	time	(A) 5 mM H ₂ KPO ₄ (pH 2)	(B) MeCN/MeOH (4/1, v/v)
	0	95	5
	60	60	40
	65	50	50
	70	50	50
	71	95	5
	80	95	5
flow rate		0.6 mL/min	
Injection volume		10 uL	
Detection		210 nm	

표 15. HPLC-DAD 분석조건

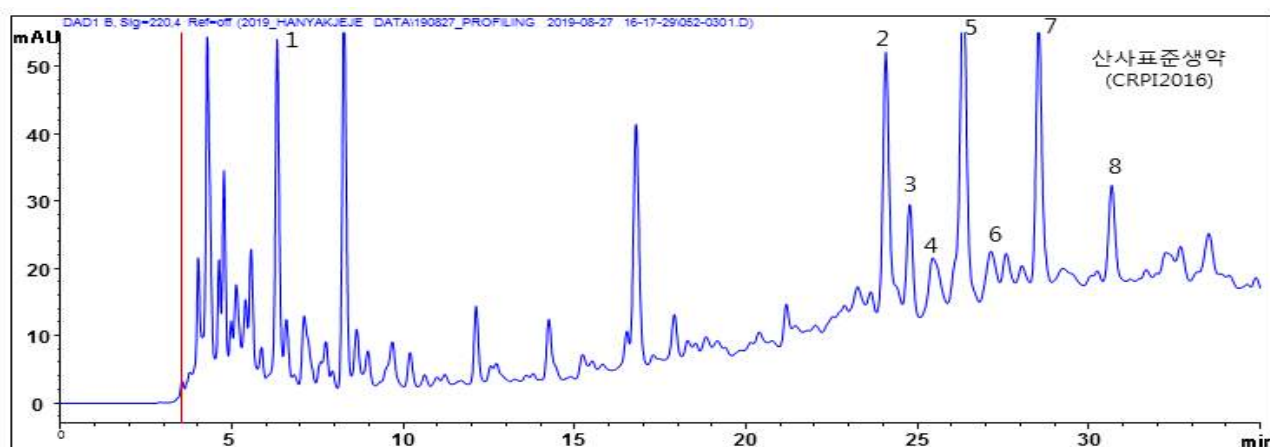


그림 7. 시료의 크로마토그램

본 시료의 경우 크로마토그램 상에서 전체 피크 면적 합의 1% 이상의 값을 갖는 8개의 피크를 확인할 수 있었으며 그 외의 다른 피크는 관찰되지 않았다. (그림 7) 성분프로파일 대상 피크로 선택된 각 피크에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였다. 또한 이들 8개 피크 면적의 합이 전체 피크 면적의 90% 이상임을 확인하였다.

3. 분석방법 밸리데이션

1) 특이성 (Specificity)

확립된 분석조건으로 표준시료의 크로마토그램을 확보하고, 8개 피크 각각에 대한 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며, 다른 산사 시료의 크로마토그램에서도 해당 피크의 UV 스펙트럼이 동일함을 확인하였다. (그림 8)

피크	유지시간	성분확인
1	6.343	unknown
2	21.144	unknown
3	23.990	unknown
4	24.731	unknown
5	25.505	unknown
6	26.275	unknown
7	28.520	(-)-epicatechin
8	30.567	unknown

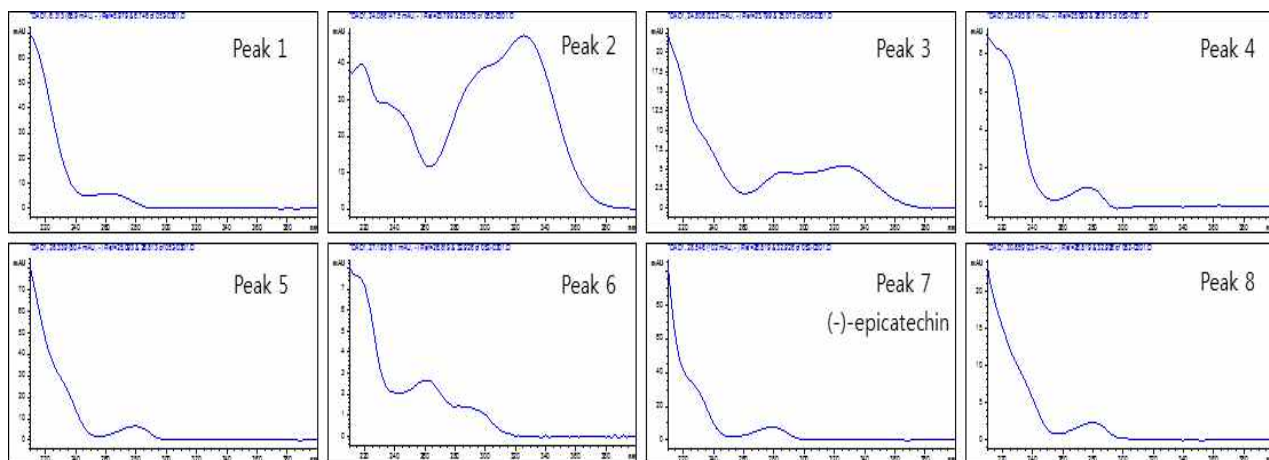


그림 8. 표준성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

2) 반복성 (Repeatability)

표준시료에서 반복성 확인을 위해 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해 분석을 수행하였다. 이들 크로마토그램에서 피크 유지시간과 피크면적을 확보하였으며 선정된 8개 피크의 가장 넓은 피크면적을 보이는 7번째 피크를 기준으로 하여 상대유지시간 (Relative Retention Time, RRT)과 상대피크면적 (Relative Peak Area, RPA)도 계산하였다. 유지시간과 피크면적의 측정값과 RRT, RPA 모두에 대해 평균, 표준편차, 상대표준편차를 계산

하여 적합한 반복성을 나타내는지 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 16 및 표 17)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	평균(min)	표준편차(Std)	상대표준편차(%RSD)	평균(min)	표준편차(Std)	상대표준편차(%RSD)
1	6.343	0.003	0.043	0.222	0.000	0.030
2	21.144	0.010	0.049	0.741	0.000	0.010
3	23.990	0.009	0.037	0.841	0.000	0.019
4	24.731	0.011	0.043	0.867	0.000	0.010
5	25.505	0.011	0.045	0.894	0.000	0.007
6	26.275	0.012	0.045	0.921	0.000	0.009
7	28.520	0.014	0.048	1.000	0.000	0.000
8	30.567	0.015	0.048	1.072	0.000	0.007

표 16. 유지시간 및 상대유지시간(RRT)의 반복성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	1285.8	24.419	1.899	0.481	0.008	1.759
2	364.1	3.791	1.041	0.136	0.001	1.062
3	976.4	5.972	0.612	0.365	0.002	0.596
4	569.5	4.046	0.711	0.213	0.002	0.851
5	493.4	2.437	0.494	0.184	0.001	0.515
6	2606.7	11.657	0.447	0.974	0.003	0.280
7	2675.8	7.393	0.276	1.000	0.000	0.000
8	697.1	8.242	1.182	0.261	0.003	1.273

표 17. 피크면적 및 상대피크면적(RPA)의 반복성

3) 실험실 내 정밀성 (Intermediate Precision)

실험실 내 정밀성 확인을 위해 동일 로트의 표준 시료에서 1일, 3일, 5일째 각각 시료를 취하여 각각 다른 사람이 검액을 조제하고 분석을 수행하여 실험실내 정밀성을 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지

시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 (RSD < 5%) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 18 및 19)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	Avg(min)	Std	%RSD	Avg(min)	Std	%RSD
1	6.339	0.004	0.055	0.222	0.000	0.026
2	21.135	0.015	0.070	0.741	0.000	0.010
3	23.983	0.010	0.043	0.841	0.000	0.019
4	24.723	0.013	0.054	0.867	0.000	0.013
5	25.494	0.016	0.065	0.894	0.000	0.009
6	26.262	0.017	0.065	0.921	0.000	0.006
7	28.508	0.018	0.062	1.000	0.000	0.000
8	30.557	0.017	0.055	1.072	0.000	0.012

표 18. 유지 시간(RT) 및 상대유지시간(RRT)의 실험실 내 정밀성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	1303.8	5.418	0.416	0.486	0.001	0.217
2	359.4	6.427	1.788	0.134	0.003	2.002
3	977.4	1.886	0.193	0.365	0.001	0.233
4	564.2	6.574	1.165	0.211	0.003	1.371
5	491.8	2.924	0.595	0.183	0.001	0.791
6	2611.2	8.350	0.320	0.974	0.001	0.123
7	2680.1	5.684	0.212	1.000	0.000	0.000
8	691.8	4.174	0.603	0.258	0.002	0.807

표 19. 피크 면적(PA) 및 상대피크면적(RPA)의 실험실 내 정밀성

4. 표준성분프로파일 확립

8개의 산사 시료의 표준 시료에서 3반복 실험하여 얻어진 총 24개의 크로마토그램과 피크 유지시간, 피크면적 등을 종합하여 다음과 같은 특징을 갖는 표준 성분프로파일을 확립하였다. 표준성분프로파일에서 선정된 8개의 피크 중 가장 큰 면적을 갖는 피크 7의 경우 전체 면적의 30%를 넘지 않아 제시된 성분프로파일이 시료의 화학적 특성을 최대한 반영하는 것으로 판단하였다. (그림 9, 표 20)

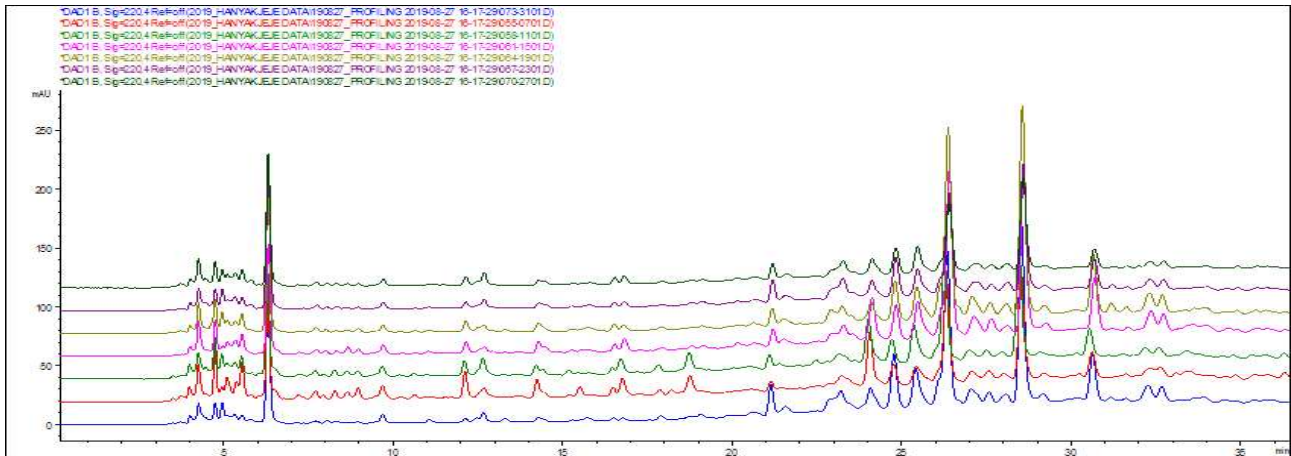


그림 9. 표준시료들의 중첩 크로마토그램

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8
RT	6.318	24.101	24.804	25.453	26.370	27.200	28.557	30.655
RRT	0.221	0.844	0.869	0.891	0.923	0.952	1.000	1.073
PA	833.2	384.8	338.7	379.9	1312.8	169.4	1345.5	389.7
RPA	0.619	0.286	0.252	0.282	0.976	0.126	1.000	0.290
PEAK (%)	16.1	7.5	6.6	7.5	25.7	3.3	25.8	7.5

표 20. 표준 성분프로파일의 각 피크의 유지시간 및 피크면적

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

24개 크로마토그램으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 8개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.90 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 당귀 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다. (표 21)

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	R ²
표준성분 프로파일	1248.3	324.9	444.0	514.8	445.6	2626.6	3332.3	620.0	
표준시료	1299.4	367.3	972.1	568.7	492.0	2599.3	2674.2	702.1	0.97
	4.1%	13.0%	118.9%	10.5%	10.4%	-1.0%	-19.8%	13.2%	
산사_1	934.8	169.3	605.3	332.2	365.0	2116.5	2606.3	449.8	0.93
	-25.1%	-47.9%	36.3%	-35.5%	-18.1%	-19.4%	-21.8%	-27.4%	
산사_2	169.3	605.3	332.2	365.0	2116.5	2606.3	449.8	0.98	0.96
	-25.1%	-47.9%	36.3%	-35.5%	-18.1%	-19.4%	-21.8%	-27.4%	
산사_3	1015.2	311.9	504.1	523.4	514.9	3460.7	3994.4	866.4	1.00
	-18.7%	-4.0%	13.5%	1.7%	15.5%	31.8%	19.9%	39.7%	
산사_4	249.4	522.5	374.1	505.2	2078.1	2676.7	458.8	0.99	0.96
	-18.7%	-23.2%	17.7%	-27.3%	13.4%	-20.9%	-19.7%	-26.0%	
산사_5	1554.7	395.6	230.5	582.2	370.1	2134.1	3103.4	488.0	0.96
	24.6%	21.8%	-48.1%	13.1%	-17.0%	-18.8%	-6.9%	-21.3%	
산사_6	311.9	504.1	523.4	514.9	3460.7	3994.4	866.4	0.98	0.99
	-18.7%	-4.0%	13.5%	1.7%	15.5%	31.8%	19.9%	39.7%	
산사_7	1308.8	533.3	294.2	771.0	509.4	3179.0	4322.5	754.8	0.93
	4.8%	64.1%	-33.7%	49.8%	14.3%	21.0%	29.7%	21.7%	

표 21. 표준 성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

사례 4. 오미자추출물


1. 표준시료 선택

1) 원료 한약재 및 물추출물 정보

한약재 기원	오미자과 <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baillon 의 잘 익은 열매
한약재 함량기준	이 약을 건조한 것은 정량할 때 쉬잔드린 ($C_{24}H_{32}O_7$: 432.51), 고미신A ($C_{23}H_{28}O_7$: 416.46) 및 고미신N ($C_{23}H_{28}O_6$: 400.47)의 합 0.7 % 이상을 함유
한약재 확인시험	표준생약 추출물과 TLC 비교
물추출물 함량기준	이 약은 정량할 때 표시량의 90.0 % 이상에 해당하는 오미자를 함유
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃ 에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 180 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 오미자 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	오미자_1	오미자_2	오미자_3	오미자_4	오미자_5
SCCH2008	—					
오미자_1	강원 삼척					
오미자_2	경북 상주					
오미자_3	경북 영천					
오미자_4	경북 의성					
오미자_5	중국					

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃ 에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약(g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
오미자1	10.00	10.00	10.00	3.86	3.74	3.76	3.86	37.40	37.60	37.87	0.52
오미자2	10.00	10.00	10.00	3.34	3.90	3.84	3.34	39.00	38.40	36.93	2.51
오미자3	10.00	10.00	10.00	3.49	3.21	3.05	3.49	32.10	30.50	32.50	1.82
오미자4	10.00	10.00	10.00	3.41	3.67	3.43	3.41	36.70	34.30	35.03	1.18
오미자5	10.00	10.00	10.00	3.05	2.90	2.96	3.05	29.00	29.00	29.50	0.71
표준 생약	3.0			1.1			36.7			-	-

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 0.05% TFA/물/아세트나이트릴 (95/5, v/v) 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 상층액을 취하여 0.2 μ m nylon filter로 여과한다.
- ⑤ 최종농도를 10 mg/mL로 희석한다.

2. 분석방법 개발

참고문헌(*Food Chemistry Volume* 120.4 (2010) 1224-1228)의 오미자 정량분석법을 참고하여 Agilent 1260 HPLC system을 사용해 아래와 같은 분석조건을 개발하였다. 베이스라인 안정화를 위해 물과 아세트나이트릴 용매에 0.05 % TFA를 넣어 최적 분석조건을 도출하였다. 고정상을 선택하기 위해, Phenomenex Gemini-NX C₁₈ (250 × 4.6, 5 μ m), Kinetex C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)으로 분석을 수행하였으며, 이 중 가장 분리능을 보인 Kinetex C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)을 고정상으로 선택하였다. 검출파장을 최적화하기 위해 250, 254, nm 2개의 UV 파장을 적용한 크로마토그램을 비교하였으며 오미자 물추출물의 피크가 가장 잘 관찰되는 조건을 찾아 최적 검출 파장을 250 nm로 설정하였다. (표 22)

HPLC conditions			
HPLC system		Agilent 1260 HPLC system	
Column		Phenomenex Kinetex C18 (250 × 4.6, 5 μm)	
mobile phase	time	(A) 0.05% TFA in Water	(B) 0.05% TFA in MeCN
	0	95	5
	3	95	5
	60	5	95
	65	5	95
	66	95	5
	75	95	5
flow rate		1.0 mL/min	
Injection volume		10 uL	
Detection		250 nm	

표 22. HPLC-DAD 분석조건

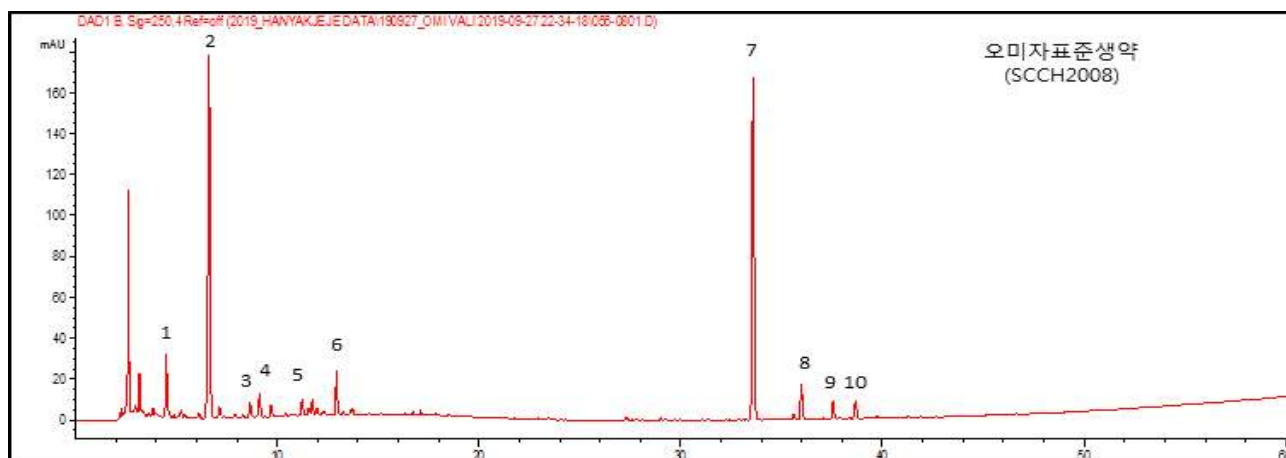


그림 10. 시료의 크로마토그램

본 시료의 경우 크로마토그램 상에서 전체 피크 면적 합의 1% 이상의 값을 갖는 10개의 피크를 확인할 수 있었으며 그 외의 다른 피크는 관찰되지 않았다. (그림 10) 성분프로파일 대상 피크로 선택된 각 피크에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였다. 또한 이들 10개 피크 면적의 합이 전체 피크 면적의 90% 이상임을 확인하였다.

3. 분석방법 밸리데이션

1) 특이성 (Specificity)

확립된 분석조건으로 표준시료의 크로마토그램을 확보하고, 10개 피크 각각에 대한 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며, 다른 오미자 시료의 크로마토그램에서도 해당 피크의 UV 스펙트럼이 동일함을 확인하였다. (그림 3)

피크	유지시간	성분확인
1	4.489	unknown
2	6.597	unknown
3	8.632	unknown
4	9.102	unknown
5	11.222	unknown
6	12.923	unknown
7	33.588	schisandrin
8	35.987	gomisin A
9	37.561	unknown
10	38.678	unknown

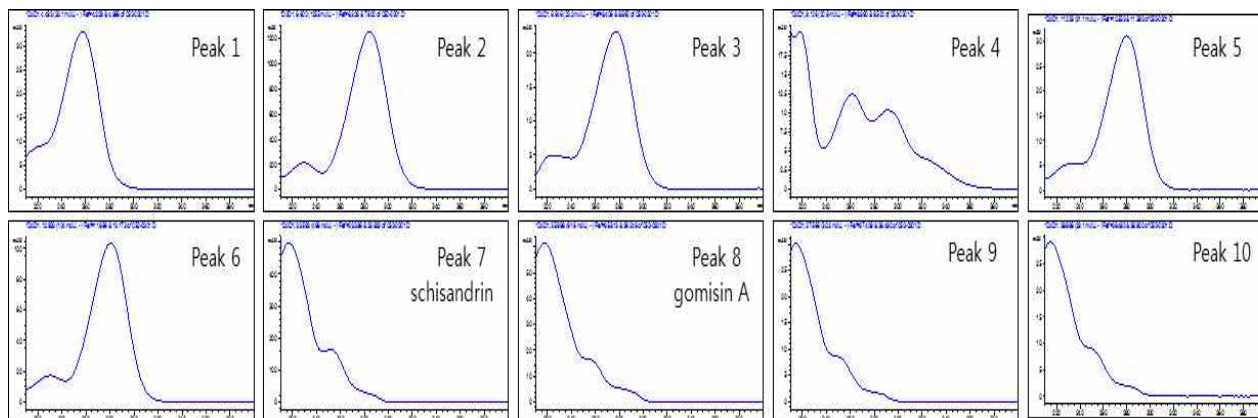


그림 11. 표준성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

2) 반복성 (Repeatability)

표준시료에서 반복성 확인을 위해 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해 분석을 수행하였다. 이들 크로마토그램에서 피크 유지시간과 피크면적을 확보하였으며 선정된 10개 피크의 가장 넓은 피크 면적을 보이는 8번째 피크를 기준으로 하여 상대유지시간 (Relative Retention Time, RRT)과 상대피크면적 (Relative Peak Area, RPA)도 계산하였다. 유지시간과

피크면적의 측정값과 RRT, RPA 모두에 대해 평균, 표준편차, 상대표준편차를 계산하여 적합한 반복성을 나타내는지 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 23 및 표 24)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	평균(min)	표준편차(Std)	상대표준편차(%RSD)	평균(min)	표준편차(Std)	상대표준편차(%RSD)
1	4.489	0.002	0.034	0.125	0.000	0.029
2	6.597	0.002	0.026	0.183	0.000	0.027
3	8.632	0.001	0.012	0.240	0.000	0.006
4	9.102	0.000	0.000	0.253	0.000	0.006
5	11.222	0.003	0.027	0.312	0.000	0.031
6	12.923	0.001	0.004	0.359	0.000	0.010
7	33.588	0.002	0.005	0.933	0.000	0.003
8	35.987	0.002	0.006	1.000	0.000	0.000
9	37.561	0.003	0.007	1.044	0.000	0.001
10	38.678	0.003	0.007	1.075	0.000	0.002

표 23. 유지시간 및 상대유지시간(RRT)의 반복성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	179.5	3.606	2.009	0.159	0.002	1.282
2	1170.1	26.243	2.243	1.035	0.017	1.657
3	50.3	1.677	3.330	0.045	0.002	3.466
4	74.1	1.533	2.069	0.066	0.001	1.291
5	43.9	0.719	1.637	0.039	0.001	2.829
6	116.8	2.298	1.967	0.103	0.001	0.937
7	1130.0	16.261	1.439	1.000	0.000	0.000
8	118.0	1.328	1.125	0.104	0.001	1.249
9	58.9	0.798	1.356	0.052	0.001	1.448
10	63.2	1.206	1.910	0.056	0.001	2.412

표 24. 피크면적 및 상대피크면적(RPA)의 반복성

3) 실험실 내 정밀성 (Intermediate Precision)

실험실 내 정밀성 확인을 위해 동일 로트의 표준 시료에서 1일, 3일, 5일째 각각 시료를 취하여 각각 다른 사람이 검액을 조제하고 분석을 수행하여 실험실내 정밀성을 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 25 및 표 26)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	Avg(min)	Std	%RSD	Avg(min)	Std	%RSD
1	4.490	0.001	0.013	0.134	0.000	0.009
2	6.603	0.006	0.092	0.197	0.000	0.104
3	8.637	0.004	0.042	0.257	0.000	0.052
4	9.103	0.002	0.023	0.271	0.000	0.045
5	11.225	0.004	0.036	0.334	0.000	0.055
6	12.922	0.002	0.012	0.385	0.000	0.027
7	33.586	0.008	0.022	1.000	0.000	0.000
8	35.983	0.008	0.022	1.071	0.000	0.006
9	37.557	0.008	0.021	1.118	0.000	0.004
10	38.673	0.009	0.023	1.126	0.044	3.932

표 25. 유지 시간(RT) 및 상대유지시간(RRT)의 실험실 내 정밀성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	176.0	1.691	0.961	0.159	0.002	1.209
2	1138.4	14.156	1.243	1.027	0.009	0.916
3	46.7	1.666	3.567	0.042	0.001	2.874
4	73.1	0.715	0.977	0.066	0.001	1.767
5	44.3	0.309	0.698	0.040	0.001	2.435
6	115.4	0.729	0.632	0.104	0.002	1.533
7	1109.0	22.085	1.991	1.000	0.000	0.000
8	116.0	3.347	2.885	0.105	0.001	0.895
9	57.7	2.007	3.482	0.052	0.001	1.490
10	62.1	2.549	4.106	0.056	0.001	2.129

표 26. 피크 면적(PA) 및 상대피크면적(RPA)의 실험실 내 정밀성

4. 표준성분프로파일 확립

6개의 오미자 시료의 표준시료에서 3반복 실험하여 얻어진 총 18개의 크로마토그램과 retention time, peak area 등을 종합하여 아래와 같은 표준성분프로파일을 확립하였다. 피크 7(schisandrin)을 포함하여 성분프로파일을 설정할 경우 해당 피크가 성분프로파일에 포함된 피크 면적 합의 30% 이상으로 나타났다. 이 경우에 식품의약품안전평가원 발행 「한약(생약)제제의 성분프로파일 설정 가이드라인」의 예시에서 언급된 바와 같이 해당 피크로 인해 동등상관계수가 크게 영향을 받을 가능성이 있으므로 해당 피크를 제외한 성분프로파일을 검토하였다. 해당 피크를 제외한 성분프로파일에서는 피크2의 면적이 성분프로파일에 포함된 피크면적 합에 대해서 30% 이상이 되고, 선정 피크들의 면적값 합이 전체 피크면적의 합(50% 이상) 기준에 부합하지 않았다. 따라서 해당 피크 모두를(피크7, 피크2) 포함하여 표준성분프로파일을 확립하였다. 이 표준성분프로파일을 이용하여 동등성 평가를 적용할 경우 피크 7을 포함한 경우와 배제한 경우 모두를 비교하여 검토하는 것이 필요하다. (그림 12, 표 27)

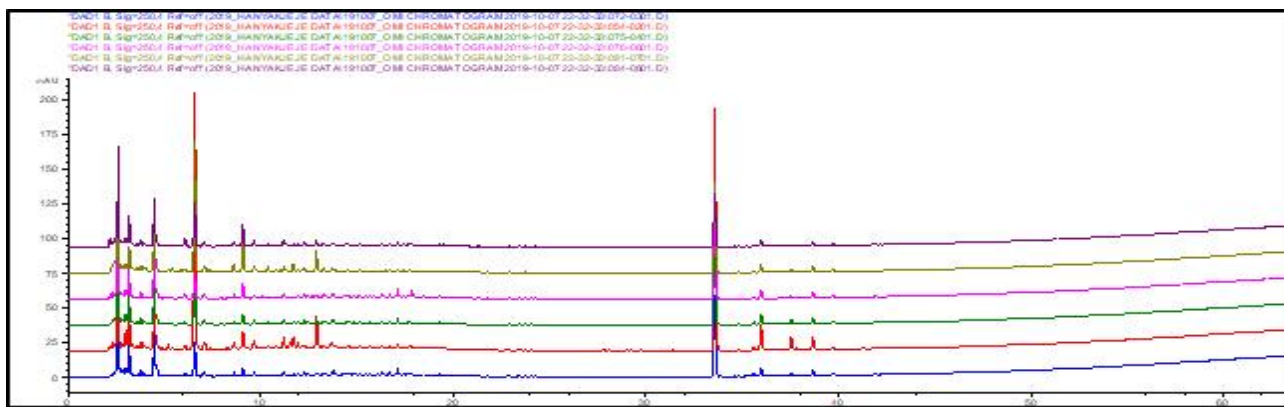


그림 12. 표준시료들의 중첩 크로마토그램

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RT	4.508	6.592	8.628	9.090	11.208	12.923	33.597	35.990	37.564	38.681
RRT	0.134	0.196	0.257	0.271	0.334	0.385	1.000	1.071	1.118	1.151
PA	171.4	394.1	26.9	81.0	22.2	39.7	517.8	54.3	21.0	35.1
RPA	0.331	0.761	0.052	0.156	0.043	0.077	1.000	0.105	0.041	0.068
PEAK (%)	12.6	28.9	2.0	5.9	1.6	2.9	38.0	4.0	1.5	2.6

표 27. 표준 성분프로파일의 각 피크의 유지시간 및 피크면적

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

18개 크로마토그램으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 6개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.90 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 오미자 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다. (표 28)

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	R ²
표준성분 프로파일	171.4	394.1	26.9	81.0	22.2	39.7	517.8	54.3	21.0	35.1	
표준시료	180.4	1170.1	50.3	74.1	43.9	116.8	1130.0	118.0	58.9	63.2	0.97
	5.3%	196.9%	87.3%	-8.5%	97.8%	194.0%	118.3%	117.2%	180.3%	80.2%	
오미자_1	151.9	152.4	15.7	34.8	19.2	8.9	385.8	39.5	12.2	30.9	0.94
	-11.4%	-61.3%	-41.5%	-57.1%	-13.4%	-77.7%	-25.5%	-27.3%	-42.1%	-11.9%	
오미자_2	146.0	160.5	14.7	41.0	17.3	12.1	461.2	52.8	21.4	31.4	0.93
	-14.8%	-59.3%	-45.5%	-49.3%	-22.3%	-69.6%	-10.9%	-2.8%	2.0%	-10.5%	
오미자_3	181.1	134.6	17.5	66.3	14.2	10.9	455.5	48.5	12.1	35.4	0.90
	5.7%	-65.9%	-34.7%	-18.2%	-36.0%	-72.6%	-12.0%	-10.7%	-42.5%	1.0%	
오미자_4	183.1	554.4	41.4	177.0	19.9	71.8	421.5	39.0	13.6	28.8	0.93
	6.8%	40.6%	54.1%	118.6%	-10.2%	80.7%	-18.6%	-28.2%	-35.4%	-17.9%	
오미자_5	185.7	192.9	21.6	92.8	18.7	17.9	252.6	28.1	7.9	20.7	0.93
	8.3%	-51.1%	-19.7%	14.5%	-15.8%	-54.8%	-51.2%	-48.2%	-62.3%	-40.9%	

표 28. 표준 성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

사례 5. 길경추출물

1. 표준시료 선택

1) 원료 한약재 및 물추출물 정보

한약재 기원	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle의 뿌리
한약재 함량기준	별도 규정 없음
한약재 확인시험	표준생약 추출물과 TLC 비교
물추출물 함량기준	이 약은 정량할 때 표시량의 90.0 % 이상에 해당하는 길경을 함유
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃ 에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 270 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 길경 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	길경_1	길경_2	길경_3	길경_4	길경_5	길경_6	길경_7	길경_8	길경_9
PLGR2013	—									
길경_1	강원 영월									
길경_2	강원 원주									
길경_3	경북 영주									
길경_4	경북 영주									
길경_5	경북 영천									
길경_6	중국									
길경_7	중국									
길경_8	중국									
길경_9	중국 동북									

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃ 에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약(g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
길경_1	10.00	10.00	10.00	4.24	3.75	4.49	42.40	37.50	44.90	41.60	3.07
길경_2	10.00	10.00	10.00	3.36	3.12	3.36	33.60	31.20	33.60	32.80	1.13
길경_3	10.00	10.00	10.00	3.43	3.07	3.91	34.30	30.70	39.10	34.70	3.44
길경_4	10.00	10.00	10.00	3.76	3.67	3.96	37.60	36.70	39.60	37.97	1.21
길경_5	10.00	10.00	10.00	3.65	3.28	3.66	36.50	32.80	36.60	35.30	1.77
길경_6	10.00	10.00	10.00	4.84	4.78	5.50	48.40	47.80	55.00	50.40	3.26
길경_7	10.00	10.00	10.00	5.68	4.72	4.56	56.80	47.20	45.60	49.87	4.95
길경_8	10.00	10.00	10.00	4.58	4.89	5.45	45.80	48.90	54.50	49.73	3.60
길경_9	10.00	10.00	10.00	4.23	5.38	4.23	42.70	53.80	42.30	46.27	5.33
표준 생약	3.0			1.9			63			-	-

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 5 mM H₂KPO₄ (pH 3) 물/아세트나이트릴 (95/5, v/v) 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 상층액을 취하여 0.2 µm nylon filter로 여과한다.
- ⑤ 최종농도를 10 mg/mL로 희석한다.

2. 분석방법 개발

참고문헌(*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (2006) 858-864)의 길경 정량분석법을 참고하여 Agilent 1260 HPLC system을 사용해 아래와 같은 분석조건을 개발하였다. 당성분이 많은 대표 화합물의 정량분석을 위한 기존 분석조건과 달리 물에 5 mM H₂KPO₄ (pH 3)를 넣어 최적 분석조건을 도출하였다. 고정상을 선택하기 위해, XBridge C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm), Kinetex C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm)으로 분석을 수행하였으며, 이 중 H₂KPO₄ 조건에서 가장 높은 분리능을 보인 Kinetex C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm)을 고정상으로 선택하였다. 검출 파장을 최적화하기 위해 205, 210 nm 2개의 UV 파장을 적용한 크로마토그램을 비교하였으며 길경

물추출물의 피크가 가장 잘 관찰되는 조건을 찾아 최적 검출 파장을 205 nm로 설정하였다. (표 29)

HPLC conditions			
HPLC system		Agilent 1260 HPLC system	
Column		Phenomenex Kinetex C18 (250 x 4.6, 5 μ m)	
mobile phase	time	(A) 5 mM H ₂ KPO ₄ (pH 3)	(B) MeCN
	0	95	5
	3	95	5
	12	85	15
	13	76	24
	30	65	35
	35	20	80
	40	20	80
	41	95	5
	50	95	5
flow rate		1.0 mL/min	
Injection volume		10 μ L	
Detection		210 nm	

표 29. HPLC-DAD 분석조건

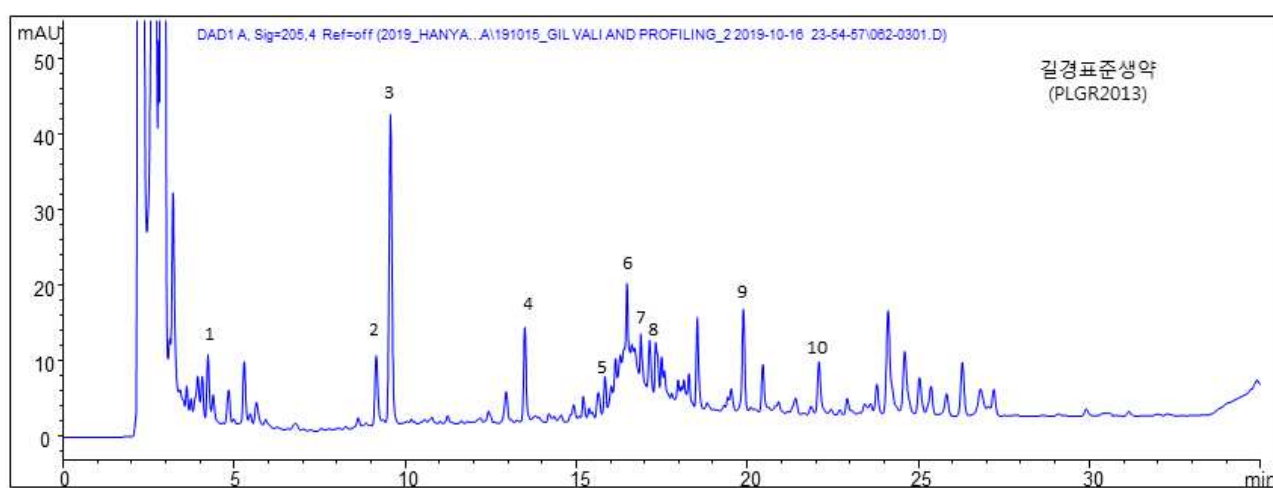


그림 13. 시료의 크로마토그램

본 시료의 경우 크로마토그램 상에서 전체 피크 면적 합의 1% 이상의 값을 갖는 10개의 피크를 확인할 수 있었으며 그 외의 다른 피크는 관찰되지 않았다. (그림 13) 성분프로파일 대상 피크로 선택된 각 피크에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였다. 또한 이들 10개 피크 면적의 합이 전체 피크 면적의 90% 이상임을 확인하였다.

3. 분석방법 밸리데이션

1) 특이성 (Specificity)

확립된 분석조건으로 표준시료의 크로마토그램을 확보하고, 10개 피크 각각에 대한 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며, 다른 길경 시료의 크로마토그램에서도 해당 피크의 UV 스펙트럼이 동일함을 확인하였다. (그림 14)

피크	유지시간	성분확인
1	4.243	unknown
2	5.307	unknown
3	9.150	unknown
4	9.559	unknown
5	13.485	unknown
6	15.838	unknown
7	16.485	unknown
8	17.329	unknown
9	19.894	unknown
10	22.113	unknown

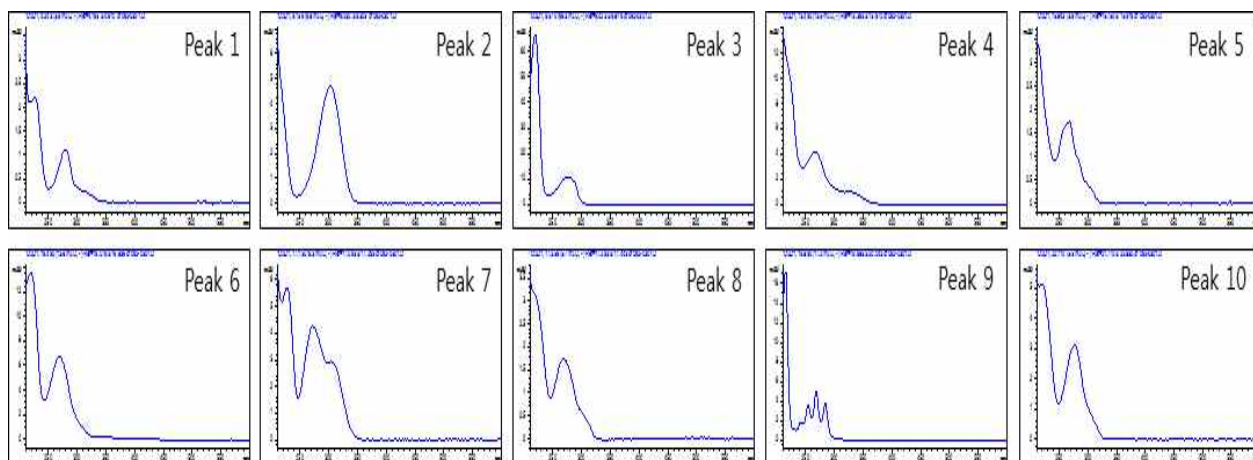


그림 14. 표준성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

2) 반복성 (Repeatability)

표준시료에서 반복성 확인을 위해 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해 분석을 수행하였다. 이들 크로마토그램에서 피크 유지시간과 피크면적을 확보하였으며 선정된 10개 피크의 가장 넓은 피크 면적을 보이는 3번째 피크를 기준으로 하여 상대유지시간 (Relative Retention Time, RRT)과 상대피크면적 (Relative Peak Area, RPA)도 계산하였다. 유지시간과 피크면적의 측정값과 RRT, RPA 모두에 대해 평균, 표준편차, 상대표준편차를 계산하여 적합한 반복성을 나타내는지 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 30 및 표 31)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	평균(min)	표준편차 (Std)	상대표준 편차(%RSD)	평균(min)	표준편차 (Std)	상대표준 편차(%RSD)
1	4.243	0.001	0.014	0.464	0.000	0.026
2	5.307	0.002	0.033	0.580	0.000	0.053
3	9.150	0.002	0.022	1.000	0.000	0.000
4	9.559	0.001	0.012	1.045	0.000	0.013
5	13.485	0.004	0.031	1.474	0.001	0.049
6	15.838	0.005	0.031	1.731	0.001	0.051
7	16.485	0.002	0.011	1.802	0.001	0.031
8	17.329	0.003	0.015	1.894	0.001	0.036
9	19.894	0.006	0.030	2.174	0.001	0.052
10	22.113	0.005	0.023	2.417	0.001	0.044

표 30. 유지시간 및 상대유지시간(RRT)의 반복성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	41.9	0.317	0.757	0.175	0.001	0.617
2	52.4	0.483	0.922	0.219	0.002	0.781
3	239.2	0.340	0.142	1.000	0.000	0.000

4	62.9	2.309	3.673	0.263	0.010	3.771
5	68.6	1.024	1.493	0.287	0.004	1.389
6	18.7	0.226	1.205	0.078	0.001	1.344
7	90.2	0.641	0.710	0.377	0.003	0.815
8	35.0	0.200	0.571	0.146	0.001	0.611
9	71.1	0.078	0.109	0.297	0.001	0.193
10	48.8	0.026	0.053	0.204	0.000	0.143

표 31. 피크면적 및 상대피크면적(RPA)의 반복성

3) 실험실 내 정밀성 (Intermediate Precision)

실험실 내 정밀성 확인을 위해 동일 로트의 표준 시료에서 1일, 3일, 5일째 각각 시료를 취하여 각각 다른 사람이 검액을 조제하고 분석을 수행하여 실험실내 정밀성을 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 ($RSD < 5\%$) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 4 및 표 5)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	Avg(min)	Std	%RSD	Avg(min)	Std	%RSD
1	4.242	0.001	0.024	0.464	0.000	0.066
2	5.308	0.003	0.047	0.580	0.000	0.064
3	9.148	0.007	0.072	1.000	0.000	0.000
4	9.560	0.003	0.026	1.045	0.001	0.057
5	13.485	0.004	0.031	1.474	0.001	0.045
6	15.838	0.005	0.031	1.731	0.001	0.048
7	16.488	0.004	0.025	1.802	0.002	0.092
8	17.329	0.004	0.020	1.894	0.001	0.068
9	19.897	0.011	0.057	2.175	0.002	0.085
10	22.116	0.003	0.016	2.418	0.002	0.086

표 32. 유지 시간(RT) 및 상대유지시간(RRT)의 실험실 내 정밀성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	41.9	0.317	0.757	0.175	0.001	0.617
2	52.4	0.483	0.922	0.219	0.002	0.781

3	239.2	0.340	0.142	1.000	0.000	0.000
4	62.9	2.309	3.673	0.263	0.010	3.771
5	68.6	1.024	1.493	0.287	0.004	1.389
6	18.7	0.226	1.205	0.078	0.001	1.344
7	90.2	0.641	0.710	0.377	0.003	0.815
8	35.0	0.200	0.571	0.146	0.001	0.611
9	71.1	0.078	0.109	0.297	0.001	0.193
10	48.8	0.026	0.053	0.204	0.000	0.143

표 33. 피크 면적(PA) 및 상대피크면적(RPA)의 실험실 내 정밀성

4. 표준성분프로파일 확립

10개의 길경 시료의 표준 시료에서 3반복 실험하여 얻어진 총 30개의 크로마토그램과 피크 유지시간, 피크면적 등을 종합하여 다음과 같은 특징을 갖는 표준 성분프로파일을 확립하였다. 표준성분프로파일에서 선정된 10개의 피크 중 가장 큰 면적을 갖는 피크 3의 경우 전체 면적의 30%를 넘지 않아 제시된 성분프로파일이 시료의 화학적 특성을 최대한 반영하는 것으로 판단하였다. (그림 15, 표 34)

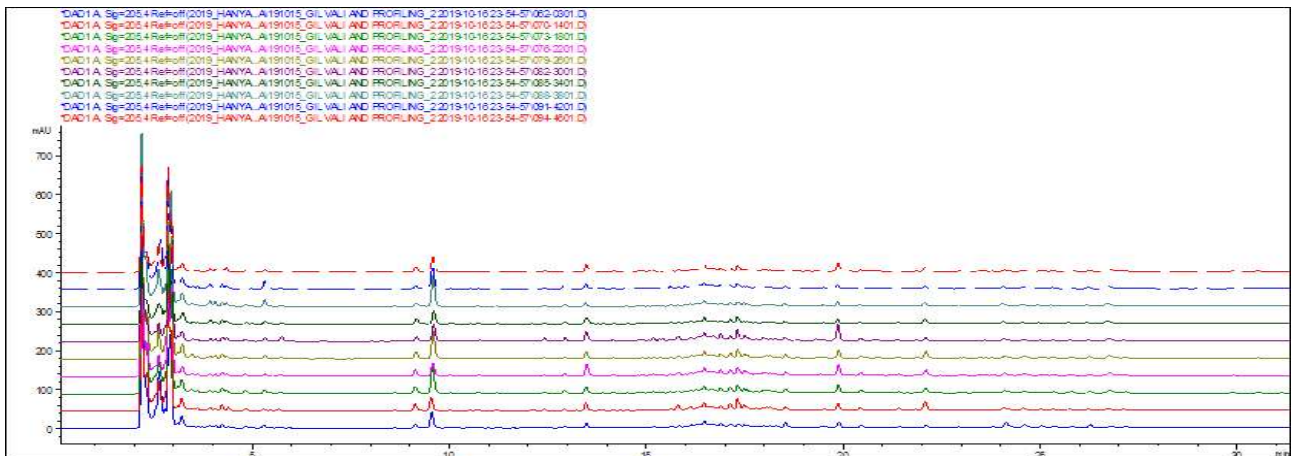


그림 15. 표준시료들의 중첩 크로마토그램

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RT	4.200	9.152	9.583	13.480	15.800	16.479	17.100	17.320	19.878	22.093
RRT	0.439	0.955	1.000	1.408	1.408	1.650	1.650	1.721	1.786	1.809
PA	43.9	83.2	259.7	94.5	31.7	70.6	42.7	76.0	94.0	77.6
RPA	0.169	0.320	1.000	0.364	0.122	0.272	0.164	0.293	0.362	0.299

PEAK (%)	5.0	9.5	29.7	10.8	3.6	8.1	4.9	8.7	10.8	8.9
----------	-----	-----	------	------	-----	-----	-----	-----	------	-----

표 34. 표준 성분프로파일의 각 피크의 유지시간 및 피크면적

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

30개 크로마토그램으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 10개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.90 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 길경 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다. (표 35)

Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	R ²
표준성분 프로파일	43.9	83.2	259.7	94.5	31.7	70.6	42.7	76.0	94.0	77.6	
표준시료	41.6	52.0	238.9	63.1	18.4	90.0	34.9	71.1	48.8	31.0	0.95
	-5.2%	-37.5%	-8.0%	-33.3%	-42.0%	27.4%	-18.2%	-6.5%	-48.1%	-60.1%	
길경_1	72.0	106.0	221.1	110.1	75.1	98.4	114.9	89.4	138.1	65.1	0.90
	64.0%	27.4%	-14.9%	16.4%	136.8%	39.4%	169.2%	17.6%	47.0%	-16.0%	
길경_2	60.3	107.6	350.5	93.0	28.5	91.7	77.0	105.1	94.0	57.0	0.97
	37.3%	29.3%	35.0%	-1.6%	-10.1%	29.9%	80.6%	38.3%	0.0%	-26.5%	
길경_3	42.8	97.4	204.8	137.4	41.1	72.2	49.7	86.9	116.2	91.6	0.94
	-2.4%	17.0%	-21.1%	45.3%	29.7%	2.2%	16.4%	14.2%	23.7%	18.1%	
길경_4	49.2	106.6	316.9	99.9	11.7	64.0	97.7	107.9	109.0	54.5	0.96
	12.2%	28.1%	22.0%	5.6%	-63.1%	-9.4%	128.9%	41.8%	16.0%	-29.7%	
길경_5	46.0	74.0	258.7	113.3	60.3	69.1	58.0	96.1	172.0	57.7	0.91
	4.8%	-11.1%	-0.4%	19.8%	90.2%	-2.1%	35.9%	26.3%	83.1%	-25.6%	
길경_6	44.6	87.9	196.3	108.3	49.7	55.7	77.5	51.2	74.7	46.0	0.92
	1.6%	5.7%	-24.4%	14.5%	56.8%	-21.1%	81.6%	-32.7%	-20.5%	-40.7%	
길경_7	38.3	59.5	268.4	51.7	9.4	55.0	43.4	54.3	56.9	31.9	0.97
	-12.6%	-28.5%	3.3%	-45.4%	-70.3%	-22.1%	1.8%	-28.6%	-39.5%	-58.9%	
길경_8	46.7	66.7	316.9	65.3	15.9	53.6	59.5	64.9	32.3	31.3	0.95
	6.5%	-19.8%	22.0%	-30.9%	-50.0%	-24.2%	39.4%	-14.7%	-65.6%	-59.6%	
길경_9	33.2	74.3	224.7	103.6	29.6	56.4	72.6	107.4	72.7	34.8	0.92
	-24.3%	-10.7%	-13.5%	9.6%	-6.5%	-20.1%	70.1%	41.2%	-22.7%	-55.1%	

표 35. 표준 성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

사례 6. 지실추출물

1. 표준시료 선택

1) 원료 한약재 및 물추출물 정보

한약재 기원	탱자나무 <i>Poncirus trifoliata</i> Rafinesque (운향과 Rutaceae)의 익지 않은 열매
한약재 함량기준	폰시린 ($C_{28}H_{34}O_{14}$: 594.28) 2.0 % 이상 및 나린진 ($C_{27}H_{32}O_{14}$: 580.55) 0.7 % 이상
한약재 확인시험	표준생약 추출물과 TLC 비교
물추출물 함량기준	이 약은 정량할 때 표시량의 90.0 % 이상에 해당하는 지실을 함유
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃ 에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 180 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 지실 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	지실1	지실2	지실3
POTR2008-1	-			
지실1	경북 봉화			
지실2	중국산			
지실3	중국산			

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃ 에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약 (g)			동결건조물 (g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
지실1	10.0	10.0	10.0	1.77	1.81	1.84	17.7	18.1	18.4	18.1	0.027

지실2	10.0	10.0	10.0	2.11	2.08	2.15	21.1	20.8	21.5	21.1	0.029
지실3	10.0	10.0	10.0	2.44	2.53	2.48	24.4	25.3	24.8	24.8	0.032
표준 생약	3.0			1.36			45			-	-
지실의 생약규격집 의약품각조 제3부 수율 규정: 1kg을 추출하여 감압농축하여 건조엑스 약 180 g (18 %)											

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 50% 메탄올 수용액 1.0 mL를 넣고, 30분간 초음파 추출한다.
- ④ 상층액을 취하여 0.2 μ m PTFE-D filter로 여과한다.
- ⑤ 최종농도를 10 mg/mL로 희석한다.

2. 분석방법 개발

참고문헌(*Archives of Pharmacal Research* 38 (2015) 1512-1520)과 대한민국약전 수록 정량 시험법을 참조하여 *Poncirus* 속 생약들의 주요성분이 naringin, poncirin 등 flavonoid 계열의 물질임을 확인하였었으며 Agilent 1260 HPLC system을 이용하여 다음과 같은 분석조건을 확립하였다. 최대한 많은 피크 분석을 위해 분석 gradient 조건을 아래 표와 같이 조절하여 이동상 조건을 확립하였다. Flavonoid 계열의 물질의 주요 분석 파장인 254nm, 280nm를 사용하여 분석을 시도하였으나 특정 피크들이 지나치게 크게 나타났기 때문에 200~380nm까지 다양한 파장대로 실험을 수행하여 성분프로파일에 적합한 파장으로 372 nm를 선택하여 분석법을 개발하였다. (표 36)

HPLC conditions			
HPLC system		Agilent 1260 HPLC system	
Column		HECTOR-C18 (250 × 4.6, 5 μm)	
mobile phase	time	(A) 0.1% FA in Water	(B) Acetonitrile
	0	95	5
	20	95	5
	30	85	15
	45	70	30
	60	60	40
	70	20	80
	80	20	80
flow rate		1 ml/min	
Injection volume		10 μL	
Detection		372 nm	

표 36. HPLC-DAD 분석조건

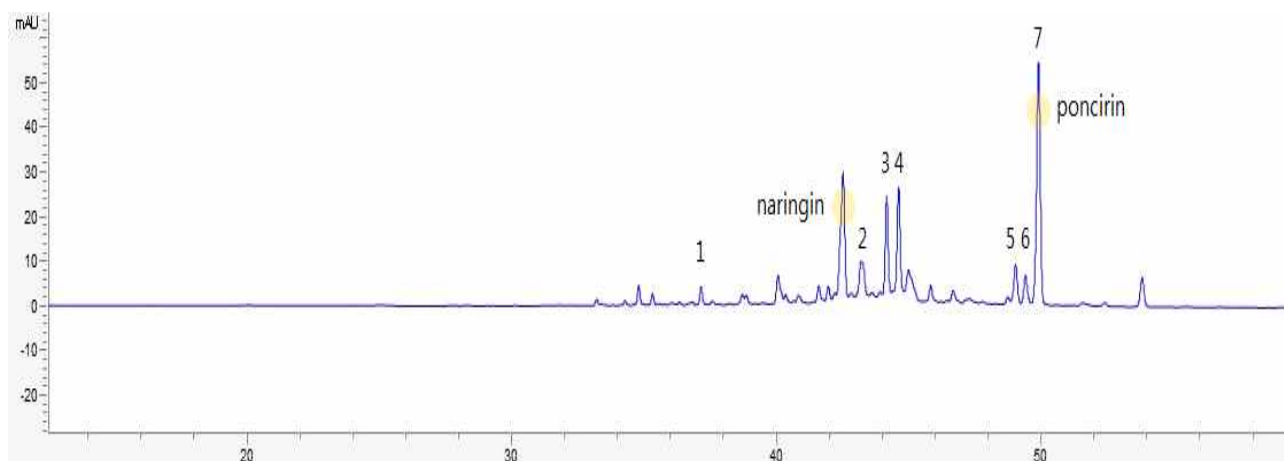


그림 16. 시료의 크로마토그램

본 시료의 경우 크로마토그램 상에서 전체 피크 면적 합의 1% 이상의 값을 갖는 7개의 피크를 확인할 수 있었으며 그 외의 다른 피크는 관찰되지 않았다. (그림 16) 성분프로파일 대상 피크로 선택된 각 피크에 대한 UV 스펙트럼을 확보하였다. 또한 이들 7개 피크 면적의 합이 전체 피크 면적의 90% 이상임을 확인하였다.

3. 분석방법 밸리데이션

1) 특이성 (Specificity)

확립된 분석조건으로 표준시료의 크로마토그램을 확보하고, 7개 피크 각각에 대한 특이성을 확인할 수 있는 UV 스펙트럼을 확보하였으며, 다른 지실 시료의 크로마토그램에서도 해당 피크의 UV 스펙트럼이 동일함을 확인하였다. (그림 17)

피크	유지시간	성분확인
1	37.15	unknown (flavonoid)
2	43.22	unknown (flavonoid)
3	44.17	unknown (flavonoid)
4	44.63	unknown (flavonoid)
5	49.05	unknown (flavonoid)
6	49.43	unknown (flavonoid)
7	49.91	poncirin

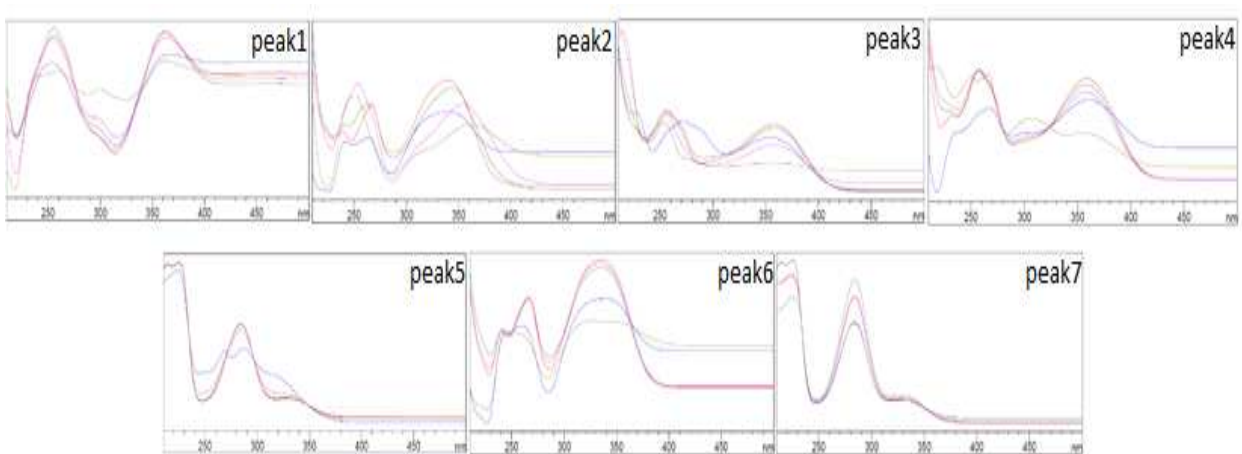


그림 17. 표준성분프로파일 확보를 위해 선정된 피크들의 UV 스펙트럼

2) 반복성 (Repeatability)

표준시료에서 반복성 확인을 위해 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해 분석을 수행하였다. 이들 크로마토그램에서 피크 유지시간과 피크면적을 확보하였으며 선정된 7개 피크 중 1번째 피크를 기준으로 하여 상대유지시간 (Relative Retention Time, RRT)과 상대피크면적 (Relative Peak Area, RPA)도 계산하였다. 유지시간과 피크면적의 측정값과 RRT, RPA 모두에 대해 평균, 표준편차, 상대표준편차를 계산하여 적합한 반복성을 나타내는지 확인

하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를 확인한 결과 (RSD < 5%) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 37 및 표 38)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	평균(min)	표준편차 (Std)	상대표준 편차(%RSD)	평균(min)	표준편차 (Std)	상대표준 편차(%RSD)
1	37.149	0.006	0.017	1.000	0.000	0.000
2	43.199	0.006	0.013	1.163	0.000	0.006
3	44.170	0.005	0.012	1.189	0.000	0.009
4	44.623	0.006	0.013	1.201	0.000	0.012
5	49.913	0.006	0.012	1.320	0.000	0.013
6	49.422	0.007	0.013	1.330	0.000	0.013
7	49.913	0.007	0.015	1.344	0.000	0.011

표 37. 유지시간 및 상대유지시간(RRT)의 반복성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	39.3	0.755	1.924	1.000	0.000	0.000
2	116.1	0.465	0.400	2.960	0.068	2.287
3	186.1	0.532	0.286	4.742	0.104	2.196
4	215.4	0.818	0.380	5.490	0.124	2.253
5	101.9	0.903	0.887	2.597	0.070	2.680
6	65.7	0.386	0.588	1.675	0.041	2.454
7	526.0	1.515	0.288	13.406	0.278	2.075

표 38. 피크면적 및 상대피크면적(RPA)의 반복성

3) 실험실 내 정밀성 (Intermediate Precision)

실험실 내 정밀성 확인을 위해 동일 로트의 표준 시료에서 1일, 3일, 5일째 각각 시료를 취하여 각각 다른 사람이 검액을 조제하고 분석을 수행하여 실험실내 정밀성을 확인하였다. 분석결과 측정값 (유지시간, 피크면적)과 상대값 (상대 유지시간, 상대 피크면적) 모두에 대해서 유지시간과 피크 면적의 상대표준편차를

확인한 결과 (RSD < 5%) 반복성을 가지는 것으로 확인하였다. (표 39 및 40)

Peak	유지시간(RT)			상대유지시간(RRT)		
	Avg(min)	Std	%RSD	Avg(min)	Std	%RSD
1	37.710	0.011	0.030	1.000	0.000	0.000
2	43.799	0.012	0.027	1.161	0.000	0.006
3	44.695	0.012	0.027	1.185	0.000	0.009
4	45.163	0.009	0.020	1.198	0.000	0.013
5	49.581	0.014	0.028	1.315	0.000	0.015
6	49.970	0.011	0.022	1.325	0.000	0.015
7	50.450	0.014	0.027	1.338	0.000	0.013

표 39. 유지 시간(RT) 및 상대유지시간(RRT)의 실험실 내 정밀성

Peak	피크면적(PA)			상대피크면적(RPA)		
	Avg	Std	%RSD	Avg	Std	%RSD
1	25.200	0.141	0.561	1.000	0.000	0.000
2	109.150	0.212	0.194	4.331	0.016	0.367
3	148.200	1.308	0.882	5.851	0.041	0.705
4	176.533	1.097	0.621	6.980	0.039	0.561
5	90.667	2.376	2.620	3.544	0.031	0.878
6	56.833	1.429	2.515	2.224	0.013	0.574
7	468.100	6.322	1.351	18.440	0.026	0.139

표 40. 피크 면적(PA) 및 상대피크면적(RPA)의 실험실 내 정밀성

4. 표준성분프로파일 확립

4개의 지실 시료의 표준 시료에서 3반복 실험하여 얻어진 총 12개의 크로마토그램과 피크 유지시간, 피크면적 등을 종합하여 아래와 같은 표준성분프로파일을 확립하였다. 피크 7(Poncirin)의 경우 피크면적이 성분프로파일에 포함된 피크들의 면적 합 30% 이상으로 나타났다. 식품의약품안전평가원 발행 「한약(생약)제제의 성분프로파일 설정 가이드라인」의 예시에 언급된 바와 같이 해당 피크로 인해 동등상관계수가 크게 영향을 받을 수 있으므로 해당 피크를 제외하여 성분프로파일을 설정하고자 하였다. 해당 피크를 제외하고 성분프로파일을 설정할 경우

피크 7의 피크 면적이 성분프로파일에 포함된 피크들의 면적합의 30% 이상이 되고, 성분프로파일에 포함된 피크들의 면적값 합이 전체 크로마토그램 상의 피크 면적의 합(50% 이상) 기준에 부합하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 해당 피크 모두를(피크4, 피크5) 포함시켜 표준성분프로파일을 확립하였다. 이 표준성분프로파일로 동등성 평가를 할 경우 피크 4를 포함한 경우와 제외한 경우를 모두 비교하여 동등성을 검토하는 것이 필요하다. (그림 18, 표 41)

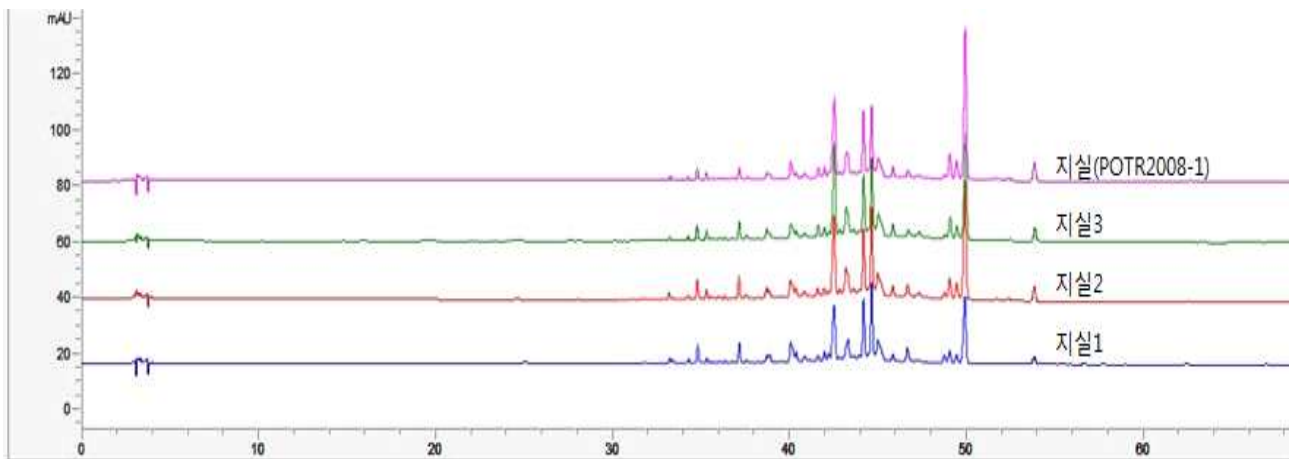


그림 18. 표준시료들의 중첩 크로마토그램

Peak	1	2	3	4	5	6	7
RT	37.148	43.214	44.174	44.630	49.052	49.433	49.913
RRT	1.000	1.163	1.189	1.201	1.320	1.331	1.344
PA	52.3	121.4	182.7	239.8	72.5	46.3	395.1
RPA	1.000	2.320	3.491	4.582	1.386	0.885	7.550
PEAK (%)	4.7	10.9	16.5	21.6	6.5	4.2	35.6

표 41. 표준 성분프로파일의 각 피크의 유지시간 및 피크면적

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

12개 크로마토그램으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 4개 시료 모두 0.93 이상의 높은 동등상관계수를 나타

내어 표준성분프로파일이 다양한 지실 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다. (표 42)

Peak	1	2	3	4	5	6	7	R ²
표준성분 프로파일	52.3	121.4	182.7	239.8	72.5	46.3	395.1	
표준시료	35.7	116.0	185.9	215.1	101.8	65.7	525.5	0.97
	-31.7%	-4.5%	1.8%	-10.3%	40.4%	41.9%	33.0%	
지실1	50.8	97.0	179.6	239.5	41.1	28.5	252.3	0.93
	-2.9%	-20.1%	-1.7%	-0.1%	-43.4%	-38.5%	-36.1%	
지실2	77.4	137.7	182.1	252.8	63.6	49.3	420.7	1.00
	47.9%	13.4%	-0.3%	5.4%	-12.3%	6.4%	6.5%	
지실3	45.4	134.9	183.1	251.7	83.6	41.7	381.7	1.00
	-13.2%	11.1%	0.2%	5.0%	15.3%	-9.8%	-3.4%	

표 42. 표준 성분프로파일과 비교 대상 시료의 피크면적 및 동등상관계수 확보

사례 7. 백지추출물


1. 표준시료 선택

1) 물추출물 원료 한약재 정보

한약재 기원	구릿대 <i>Angelica dahurica</i> Bentham 또는 항백지 <i>Angelica dahurica</i> Bentham (산형과 Umbelliferae)의 뿌리
한약재 함량기준	이 약을 건조한 것은 정량할 때 옥시퓨세다닌 ($C_{16}H_{14}O_5$: 286.29) 및 임페라토린 ($C_{16}H_{14}O_4$: 270.29) 및 이소임페라토린 ($C_{16}H_{14}O_4$: 270.29)의 합 0.7 % 이상을 함유
한약재 확인시험	TLC 확인시험법
물추출물 함량기준	이 약은 정량할 때 표시량의 90.0 % 이상에 해당하는 백지를 함유
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 217 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 백지 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	AD_1	AD_2	AD_3	AD_4	AD_5	AD_6	AD_7
ANFO2009	-							
ANDA2009	-							
AD_1	경북 봉화							
AD_2	경북 영양							
AD_3	국내산							
AD_4	경북 봉화							
AD_5	중국산							
AD_6	경북 영주							
AD_7	중국 안휘							

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료번호	원생약 (g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
AD_1	10.14	10.10	10.22	4.44	2.46	2.52	43.79	24.36	24.66	30.93	11.13
AD_2	10.13	10.40	10.05	3.79	3.68	3.77	37.41	35.38	37.51	36.77	1.20
AD_3	10.07	10.33	10.07	2.52	3.04	3.24	25.02	29.43	32.17	28.88	3.61
AD_4	10.17	10.20	10.21	3.70	5.70	8.03	36.38	55.88	78.65	56.97	21.15
AD_5	10.23	10.02	10.39	4.08	4.78	6.18	39.88	47.70	59.48	49.02	9.87
AD_6	10.16	10.14	10.41	4.29	2.22	2.06	42.22	21.89	19.79	27.97	12.39
AD_7	10.05	10.17	10.11	3.43	4.11	3.30	34.13	40.41	32.64	35.73	4.13
표준생약 (ANFO2009)	3.0			0.42			14.00			-	-
표준생약 (ANDA2009)	3.0			1.04			34.67			-	-
백지의 공정서상 수율 규정: 1kg을 추출하여 감압농축하여 건조엑스 약 217 g											

3) 시료 전처리 방법

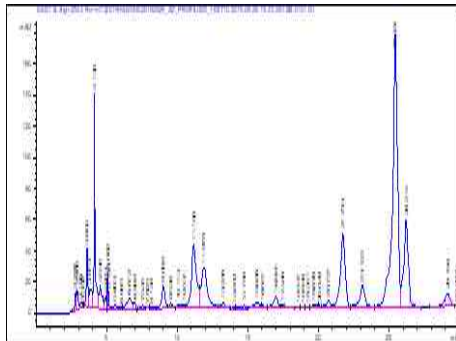
- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 0.05% DSS(4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid)가 포함된 중수(D₂O) 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 원심분리한 후 상층액 600 μ L을 NMR tube에 담는다.

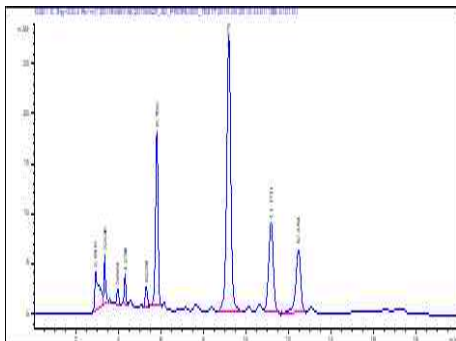
2. 분석 조건 확립

백지 물 추출물의 성분프로파일 확보를 위한 분석법 개발을 위해 대한민국약전 수록 정량법 분석법 및 기존 HPLC 분석법을 참고하여 분석법을 개발하고자 하였으나 해당 조건들은 열수추출물이 아닌 알코올 추출물에 주로 포함된 coumarin 계열 물질들을 분석하기 위한 것이었다. 따라서 해당 분석조건에서 최적화된 성분프로파일을 얻을 수 없었다. 실험실에서 보유하고 있는 column (Thermo Scientific Hypersil GOLD C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μ m), Waters symmetry 3000 C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μ m), YMC hydrosphere C₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μ m)에 다양한 이동상

및 검출조건을 적용하였으나 성분프로파일 설정이 가능한 수준의 peak intensity가 확보되는 적합한 분석조건을 확립하지 못했다. Coumarin 계열 물질을 주성분으로 하는 알코올 추출물과 달리 열수추출물의 주성분은 일차대사산물일 가능성이 높다고 판단하여 $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy를 활용한 분석법을 설정하였다.

HPLC conditions				HPLC chromatogram
HPLC system		Agilent 1290 HPLC system		

HPLC conditions				HPLC chromatogram	
HPLC system		Agilent 1290 HPLC system			
Column		YMC hydrosphere C ₁₈ (250 × 4.6, 5 μm)			
mobile phase	time	(A) 1% AA in Water	(B) 1% AA in MeCN		
		0	93		7
		20	93		7
flow rate		1.0 mL/min			
Injection volume		10 μL			
Detection		254 nm			

HPLC conditions				HPLC chromatogram
HPLC system		Agilent 1290 HPLC system		
Column		Waters symmetry 3000 C18 (250 × 4.6, 5 μm)		
mobile phase	time	(A) 1% AA in Water	(B) 1% AA in MeCN	
	0	93	7	
	20	93	7	
flow rate		1.0 mL/min		
Injection volume		10 μL		
Detection		330 nm		

¹ H-NMR conditions	
NMR system	Bruker Avance III 600 MHz
Pulse sequence	1D NOESY presat

3. 분석방법 밸리데이션

표준시료에서 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해서 분석을 수행하였다. 이들 스펙트럼을 내부표준물질인 DSS 의 chemical shift 0.00 ppm의 intensity값을 10,000으로 고정하여 각 스펙트럼을 normalization한 후 표준시료와 같은 방법으로 bucketing 하여 얻은 프로파일 간의 동등상관계수를 계산한 결과 모두 동등상관계수가 0.99 이상으로 반복성을 확보한 것을 확인하였다.

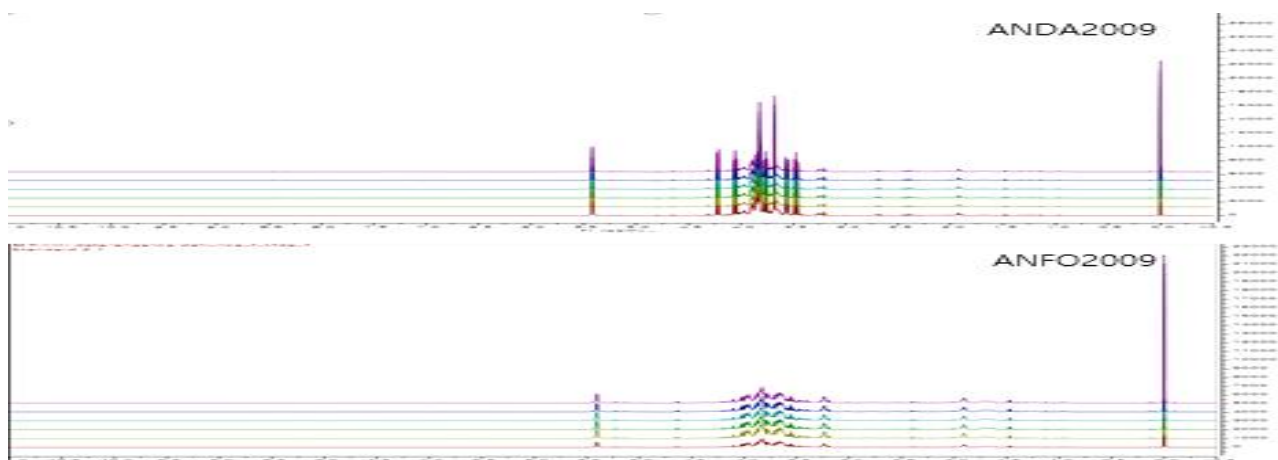


그림 32. 표준시료 ANDA2009, ANFO2009 의 ¹H NMR 반복성 중첩스펙트럼

ANDA2009	1회	2회	3회	4회	5회	6회
1회	1.0000					
2회	0.9982	1.0000				
3회	0.9989	0.9999	1.0000			
4회	0.9983	1.0000	0.9999	1.0000		
5회	0.9993	0.9994	0.9997	0.9994	1.0000	
6회	0.9989	0.9997	0.9998	0.9997	0.9999	1.0000

ANFO2009	1회	2회	3회	4회	5회	6회
1회	1.0000					
2회	0.9999	1.0000				
3회	0.9988	0.9998	1.0000			
4회	0.9998	0.9998	1.0000	1.0000		
5회	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	1.0000	
6회	0.9996	0.9993	0.9998	0.9998	0.9996	1.0000

표 64. 표준시료 ANDA2009, ANFO2009 의 반복성 결과에 따른 동등상관계수

4. 표준성분프로파일 설정

1) 백지 표준시료 스펙트럼

백지 표준시료의 스펙트럼을 얻고, 해당 스펙트럼에서 시그널이 관찰된 δ -0.50~11.00 ppm 영역을 0.02 간격으로 bucketing하여 얻은 data point를 갖는 벡터를 성분프로파일로 사용한다.

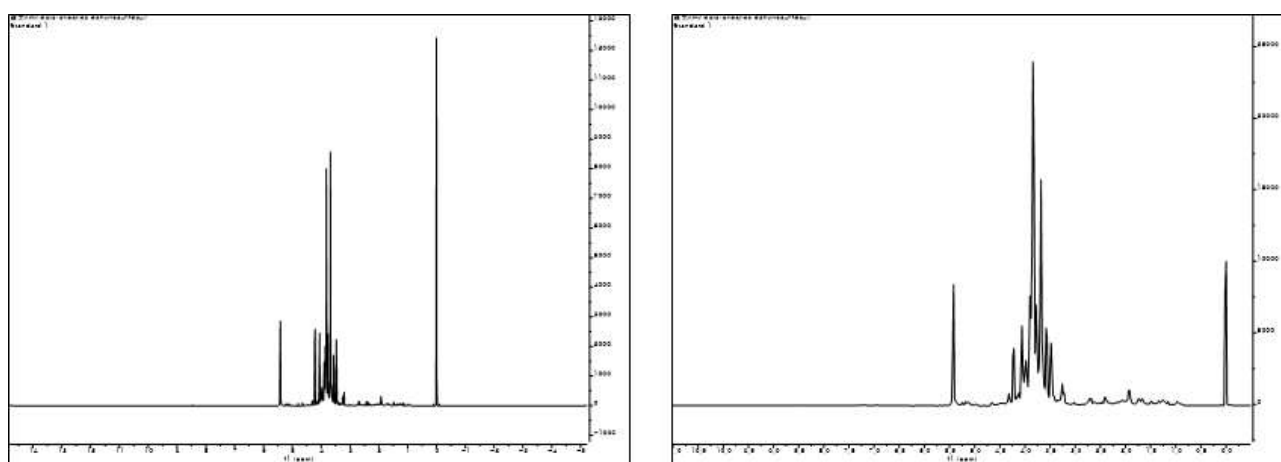


그림 33. 표준시료의 ^1H NMR 스펙트럼

2) 백지 표준성분프로파일 확립

9개의 백지 물추출물 시료의 스펙트럼을 종합하여 아래와 같은 표준성분프로파일을 확립하였다. 성분프로파일 각각의 data point를 평균하여 얻은 벡터를 표준 성분프로파일로 한다. (벡터의 크기상 성분프로파일의 raw data는 생략한다.)

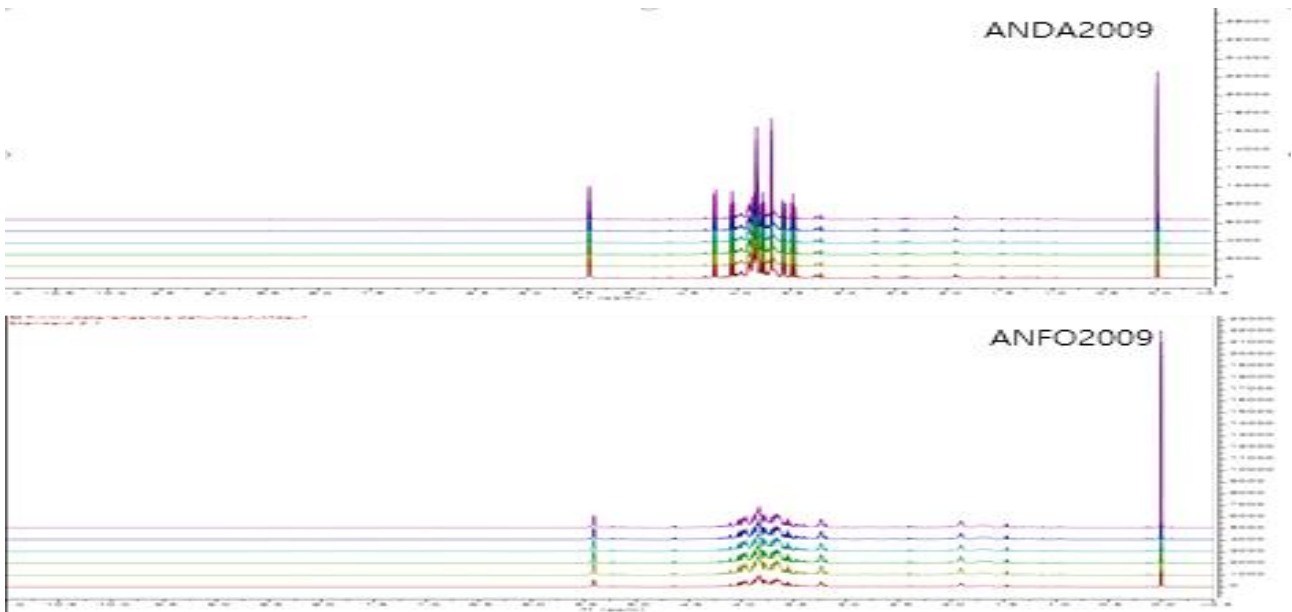


그림 34. 표준성분프로파일의 구성 시료들의 중첩 스펙트럼

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

9개 스펙트럼으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 9개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.90 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 백지 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다.

	AD_1	AD_2	AD_3	AD_4	AD_5	AD_6	AD_7	ANDA 2009	ANFO 2009	표준
AD_1	1.000									
AD_2	0.999	1.000								
AD_3	0.999	1.000	1.000							
AD_4	0.994	0.996	0.997	1.000						

AD_5	0.997	0.995	0.997	0.996	1.000					
AD_6	0.998	0.997	0.997	0.988	0.992	1.000				
AD_7	0.999	0.998	0.983	0.980	0.970	0.978	1.000			
ANDA2009	0.980	0.986	0.983	0.980	0.970	0.978	0.979	1.000		
ANFO2009	0.761	0.765	0.756	0.736	0.734	0.762	0.746	0.837	1.000	
표준	0.999	1.000	0.999	0.996	0.996	0.996	0.999	0.987	0.775	1.000

표 65. 표준성분프로파일 및 비교자료의 동등상관계수 비교

사례 8. 복령추출물





1. 표준시료 선택

1) 물추출물 원료 한약재 정보

한약재 기원	<i>Poria cocos</i> 의 균핵
한약재 함량기준	별도 규정 없음
한약재 확인시험	정색반응 확인시험법
물추출물 함량기준	별도 규정 없음
물추출물 확인시험	생약 확인시험법 및 함량시험법 적용
물추출물 제법	물 5~10배량을 넣어서 80~100℃에서 2~3시간 추출한 다음 여과한다. (1 kg → 10 g)

2) 시료 확보 및 추출물 제조

- ① 복령 물추출물의 표준성분프로파일 설정을 위해 다음과 같은 분석 대상 시료를 확보하였다.

샘플번호	원산지	PC_1	PC_2	PC_3	PC_4
POCO2016	-				
PC_1	중국산				
PC_2	중국산				
PC_3	경북 의성				
PC_4	강원 영월				

- ② 확보된 시료에 10배수의 정제수를 가하여 80~100℃에서 2~3시간 추출하여 다음과 같은 수율로 추출물을 확보하였다.

시료 번호	원생약(g)			동결건조물(g)			수율 (%)			평균 수율 (%)	표준 편차
	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3	Lot1	Lot2	Lot3		
PC_1	30.3	30.3	30.4	0.15	0.17	0.45	0.50	0.56	1.48	0.9	0.6
PC_2	30.1	30.0	30.2	0.22	0.22	0.33	0.73	0.72	1.09	0.9	0.2
PC_3	30.7	30.8	30.7	0.41	0.06	0.43	1.32	0.20	1.40	1.0	0.7
PC_4	30.3	30.7	30.1	0.21	0.11	0.16	0.69	0.36	0.53	0.5	0.2

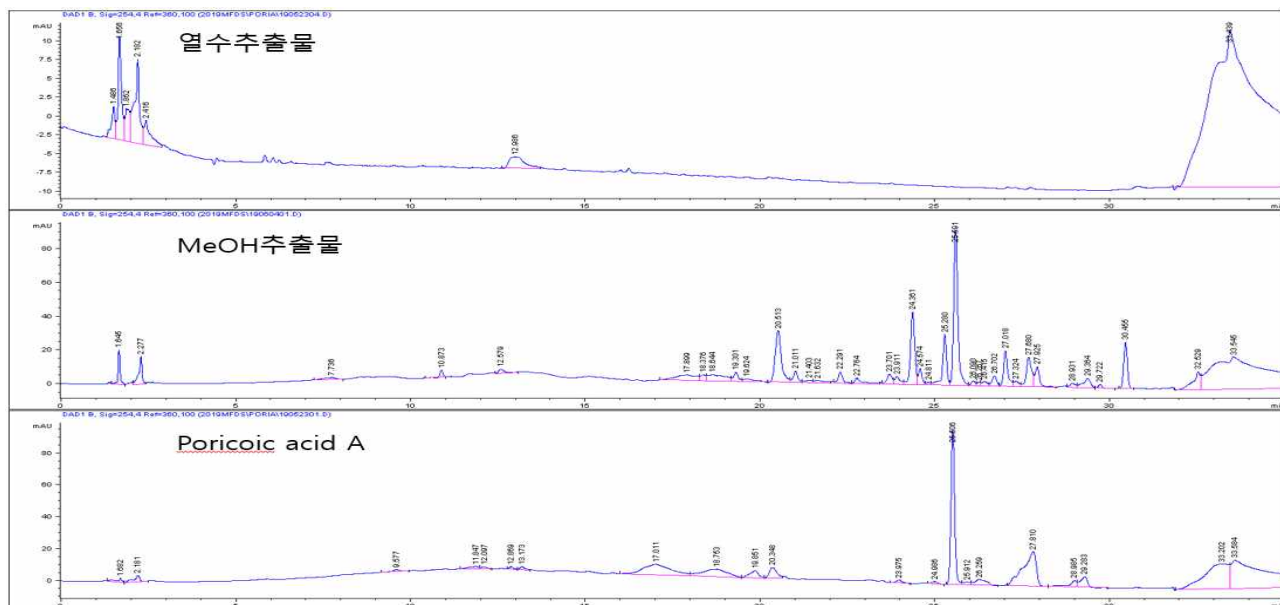
표준 생약	3.0	0.05	1.66	-	-
----------	-----	------	------	---	---

3) 시료 전처리 방법

- ① 건조한 검체를 균질하게 분쇄한다.
- ② 시료 10 mg을 정밀하게 채취한다.
- ③ 0.05% DSS(4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid)가 포함된 중수(D₂O) 1.0 mL를 넣고 녹인다.
- ④ 원심분리한 후 상층액 600 μ L을 NMR tube에 담는다.

2. 분석 조건 확립

Triterpenoid를 주성분으로 하는 복령의 특성상 열수추출 조건에서 대부분의 성분이 추출되지 않을 것으로 예상되며, 아래와 같이 실제로 HPLC로 분석할 때 복령 메탄올 엑스와는 다르게 어떠한 피크도 관찰되지 않았다. 이에 기초하여 ¹H-NMR spectroscopy를 활용한 분석법을 설정하였다.



¹ H-NMR conditions	
NMR system	Bruker Avance III 600 MHz
Pulse sequence	1D NOESY presat

3. 분석방법 밸리데이션

표준시료에서 6회 시료를 취하여 같은 농도로 분석용 시료를 제조하고 연속하여 이들 검액에 대해서 분석을 수행하였다. 이들 스펙트럼을 내부표준물질인 DSS 의 chemical shift 0.00 ppm의 intensity값을 10,000으로 고정하여 각 스펙트럼을 normalization한 후 표준시료와 같은 방법으로 bucketing 하여 얻은 프로파일 간의 동등상관계수를 계산한 결과 모두 동등상관계수가 0.97 이상으로 반복성을 확보한 것을 확인하였다.

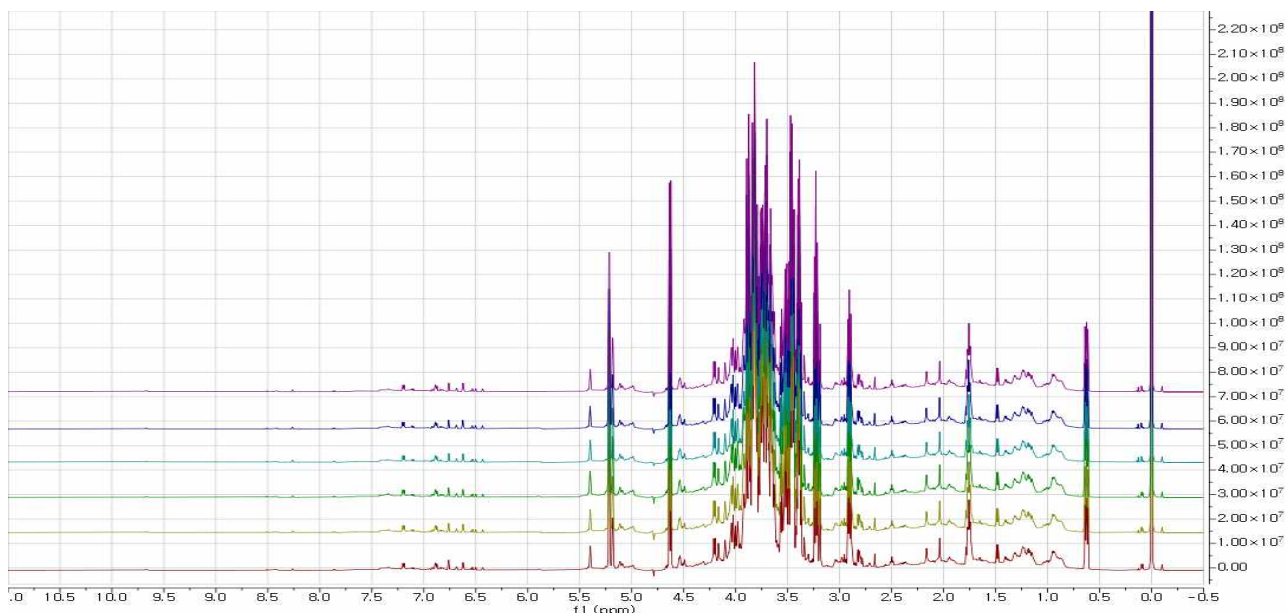


표 35. 표준시료 ANDA2009, ANFO2009 의 ^1H NMR 반복성 중첩스펙트럼

	1회	2회	3회	4회	5회	6회
1회	1.0000					
2회	0.9994	1.0000				
3회	0.9991	0.9996	1.0000			
4회	0.9993	0.9999	0.9991	1.0000		
5회	0.9774	0.9813	0.9783	0.9827	1.0000	
6회	0.9993	0.9999	0.9992	1.0000	0.9826	1.0000

표 66. 표준시료 ANDA2009, ANFO2009 의 반복성 결과에 따른 동등상관계수

4. 표준성분프로파일 설정

1) 복령 표준시료 스펙트럼

복령 표준시료의 스펙트럼을 얻고, 해당 스펙트럼에서 시그널이 관찰된 δ -0.50~11.00 ppm 영역을 0.02 간격으로 bucketing하여 얻은 575개의 data point를 갖는 벡터를 성분프로파일로 사용한다.

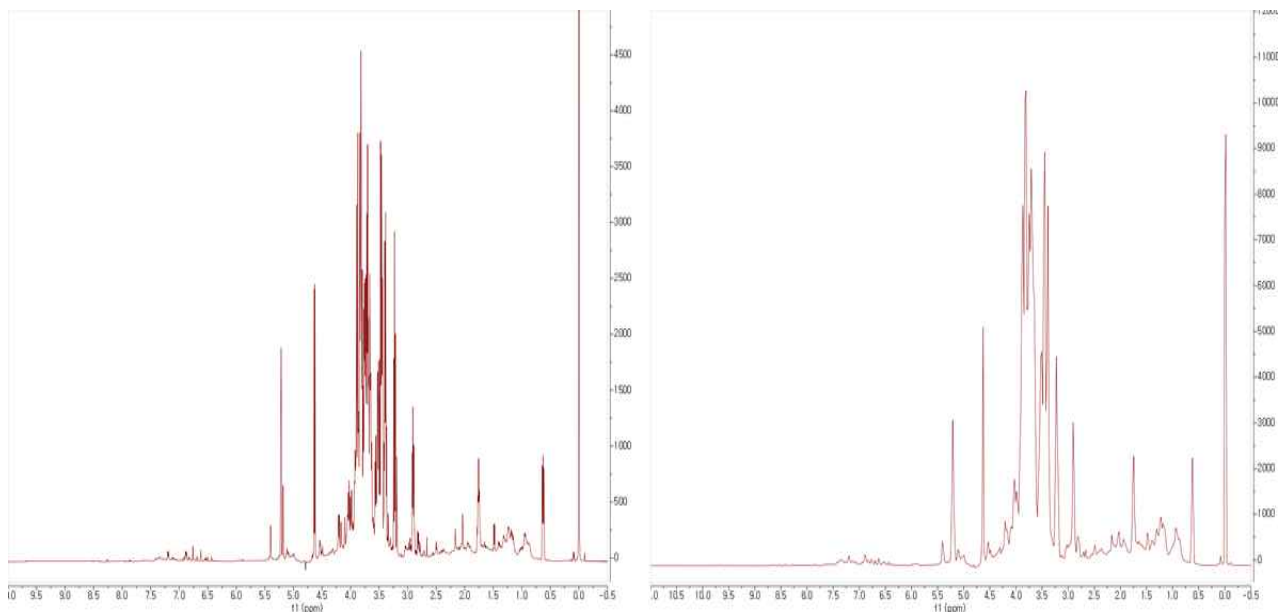


그림 36. 표준시료의 ^1H NMR 스펙트럼

2) 백지 표준성분프로파일 확립

5개의 복령 물추출물 시료의 스펙트럼을 종합하여 아래와 같은 표준성분프로파일을 확립하였다. 성분프로파일 각각의 data point를 평균하여 얻은 벡터를 표준 성분프로파일로 한다. (벡터의 크기상 성분프로파일의 raw data는 생략한다.)

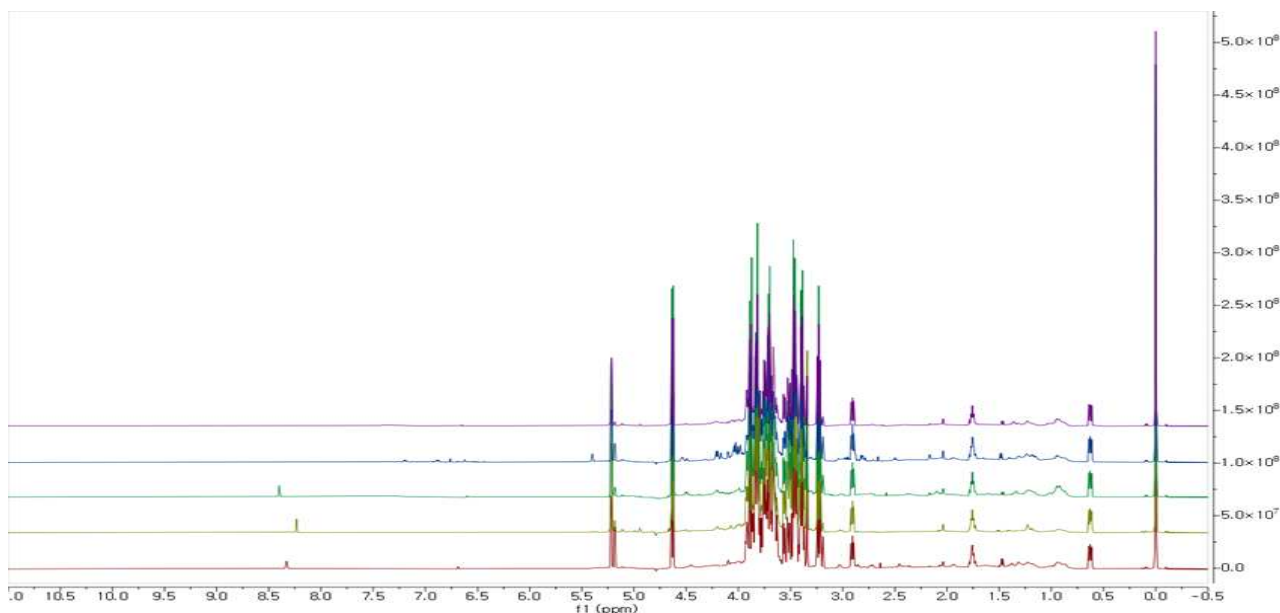


그림 37. 표준성분프로파일의 구성 시료의 중첩 스펙트럼

5. 동등 대상 시료의 성분프로파일 및 평가

5개 스펙트럼으로부터 얻은 표준성분프로파일과 개별 시료간의 동등성을 평가하여 표준성분프로파일이 다양한 시료들의 특징을 반영할 수 있는 대표성을 가지고 있는지 검토하였다. 5개 시료의 성분프로파일과 표준성분프로파일이 모두 0.90 이상의 높은 동등상관계수를 나타내어 표준성분프로파일이 다양한 복령 시료의 화학적 특징을 반영하고 있음을 확인하였다.

	PC_1	PC_2	PC_3	PC_4	POCO2016	표준
PC_1	1.0000					
PC_2	0.9758	1.0000				
PC_3	0.9499	0.9802	1.0000			
PC_4	0.9751	0.9685	0.9398	1.0000		
POCO2016	0.9720	0.9826	0.9790	0.9728	1.0000	
표준	0.9848	0.9945	0.9858	0.9792	0.9931	1.0000

표 67. 표준성분프로파일 및 비교시료의 동등상관계수 비교

7. 관련용어

1. 표준시료 : 표준성분프로파일 설정에 사용된 규격에 적합한 시료
2. 성분프로파일(Chemical profile) : 원료의약품(추출물 등)이나 그 제품의 화학적 특징, 즉 다양한 성분의 조성과 면적비를 포괄적으로 보여주는 크로마토그램 패턴으로 액체크로마토그래프법 (이하 HPLC) 및 핵자기공명분광법 (이하 NMR) 등 다양한 분석 기술을 활용한 결과물
3. 표준성분프로파일(Standard chemical profile) : 규격에 적합한 시료들의 성분 프로파일로부터 얻어진 대표성을 갖는 성분프로파일로서 비교하고자 하는 대상 시료의 확인, 조성 또는 품질 일관성(Quality consistency)을 평가하는 기준이 됨
4. 동등상관계수(Correlation coefficient) : 표준성분프로파일 중의 각 피크의 면적과 비교대상 성분프로파일 중 대응하는 피크의 면적 사이의 상관관계를 나타내는 계수로 시료간의 화학적 유사도를 나타냄

※ 참고

동 민원인 안내서는 2019년도 식품의약품안전처 연구개발사업(19172한생약192)의 결과를 바탕으로 작성되었습니다.

한약(생약)제제 주성분별 성분프로파일 사례집 I (민원인 안내서)

발행일	2020년 08월
발행인	식품의약품안전평가원장 이동희
편집위원장	바이오생약심사부장 박인숙
편집위원	박주영, 심영훈, 황순이, 이재준, 이태웅, 황인선, 김난영, 전미나, 이가영, 정다현
발행처	식품의약품안전평가원 바이오생약심사부 생약제제과
