행 정 간 행 물 번 호
11-1471000-000028-01

생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인

Guideline on Bioanalytical Method Validation

2013.12.

식품의약품안전처
MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY

이 가이드라인은 생체시료 분석법 밸리데이션에 대해 가장 적절한 방법을 제시한 것입니다.

이것은 현재까지의 경험과 과학적 사실에 근거한 것이므로 새로운 과학적 근거가 있을 경우 언제든지 개정될 수 있으며 이러한 사항이 있을 경우 식품의약품안전처에 의견을 제시하여 주시기 바랍니다.

또한, 이 가이드라인은 법적인 책임을 가지지 않으며 단지 생체시료 분석법 밸리데이션에 대한 식품의약품안전처의 최근 입장을 기술하고 있는 것으로서 특별하게 규정하거나 법적으로 요구하고 있는 사항은 아니며 단지 권고사항입니다. 이 가이드라인에서 제시하는 내용은 식품의약품안전처가 제안하거나 권고하는 것을 의미하며, 반드시 요구하는 것은 아닙니다.

※ 이 가이드라인에 대하여 의견이 있는 경우 아래로 문의하시기 바랍니다.

식품의약품안전처 의약품안전국 의약품정책과	Tel : 043-719-2641	Fax : 043-719-2606
식품의약품안전평가원 의약품심사부 약효동등성과	Tel : 043-719-3163	Fax : 043-719-3150

개정 이력서

생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인

제·개정번호	승인일자	주요 내용
11-1470129-000073-01	2003.5.	생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인 제정
B1-2010-2-016	2010.6.	생체시료 분석법 밸리데이션 해설서 제정
B1-2013-2-004	2013.3.	검체검증 분석 가이드라인 제정
B1-2013-2-007	2013.12.	생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인 개정 * 검체검증 분석 가이드라인 통합

머 리 말

생물학적동등성시험, 생체이용률시험 등 인체를 대상으로 한 임상시험의 신뢰성을 확보하기 위해서 생체시료 분석법이 타당하게 설정되었는지 확인하는 밸리데이션(validation) 절차가 필수적입니다.

지난 2003년 국립독성연구원(현, 식품의약품안전평가원)에서는 미국 FDA의 가이드라인(2001.5) 등 국외정보를 바탕으로 생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인을 제정하였고, 2010년에 '생체시료 분석법 밸리데이션 해설서'를 마련하여 상세한 설명을 수록하였습니다.

그러나, 최근 유럽 EMA(2011.7)에서 생체시료 분석법에 대한 가이드라인을 새롭게 발표하는 한편, 일본 MHLW(2013.4) 및 미국 FDA (2013.9)에서도 잇달아 가이드라인 개정안을 제시함에 따라, 우리 처에서도 종전 가이드라인을 국제조화 할 필요가 있습니다.

이에 그 동안 별도 가이드라인으로 운영하던 「검체검증 분석 가이드라인」의 내용을 통합하고 학계, 제약업계 및 생동성시험기관 등 전문가 의견을 수렴하여 「생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인」을 개정하게 되었습니다.

이 가이드라인은 생체시료 분석법 밸리데이션에 필요한 항목을 정의하고, 국제조화 된 각각의 판정기준 및 시험방법을 제시하고 있습니다. 앞으로 이 가이드라인이 생체시료 분석을 수행하는 시험기관에서 실질적으로 도움이 되기를 기대합니다.

2013. 12.

식품의약품안전처 의약품안전국장 **유 무 영**

목 차

1. 서 론 ····· 1
1.1. 목적 ····· 1
1.2. 배경 ····· 1

2. 표준품 ····· 2

3. 분석법 밸리데이션 ····· 3
3.1. 전체 밸리데이션 ····· 3
3.1.1. 선택성 ····· 3
3.1.2. 생체시료효과 ····· 4
3.1.3. 캐리오버 ····· 5
3.1.4. 최저정량한계 ····· 5
3.1.5. 검량선 ····· 6
3.1.6. 정확성 ····· 6
3.1.7. 정밀성 ····· 7
3.1.8. 회수율 ····· 8
3.1.9. 희석의 타당성 ····· 8
3.1.10. 안정성 ····· 9
3.1.10.1. 표준원액 및 표준용액 안정성 ····· 9
3.1.10.2. 냉·해동 안정성 ····· 10
3.1.10.3. 단기 안정성 ····· 10
3.1.10.4. 장기 안정성 ····· 10
3.1.10.5. 전처리 시료의 안정성 ····· 10
3.2. 부분 밸리데이션 ····· 10
3.3. 교차 밸리데이션 ····· 11

4. 시험시료분석 ····· 13
4.1. 일반사항 ····· 13
4.1.1. 시스템적합성 ····· 13
4.1.2. 검량선 ····· 14
4.1.3. 품질관리시료 ····· 15
4.2. 주의사항 ····· 15
4.2.1. 재분석 ····· 16
4.2.2. 재주입 ····· 17
4.2.3. 재적분 ····· 17

5. 검체검증분석 ····· 18
5.1. 검체검증분석 실시 ····· 18
5.2. 검체검증분석 유의사항 ····· 19

6. 문서 ····· 21
6.1. 밸리데이션 보고서 ····· 21
6.2. 시료분석 보고서 ····· 22
6.3. 기타 정보 ····· 23

7. 용어해설 ····· 24

8. 참고문헌 ····· 30

부록 1. 부분 밸리데이션 항목 예시 ····· 32
부록 2. 검체검증분석 방법 ····· 40

1. 서론

1.1. 목적

이 가이드라인은 신약, 자료제출의약품 및 제네릭의약품의 허가신청을 위해 인체를 대상으로 한 임상약리시험, 생체이용률시험, 생물학적동등성시험에서 사용된 생체시료 분석법의 밸리데이션 절차 및 방법에 관한 정보를 제공한다.

이 가이드라인은 일반적으로 전혈, 혈청, 혈장 또는 뇨와 같은 생체시료 중에 분석하고자 하는 약물 또는 그 대사체(이하, '분석물질'이라 한다)를 정량할 때 기체크로마토그래피(gas chromatography, GC), 액체크로마토그래피(liquid chromatography, LC), GC 또는 LC와 질량분석기(mass spectrometer, MS)의 조합(LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, GC-MS-MS 등) 등 분석기기를 이용하여 생체시료를 분석하는 과정에 적용된다.

이 가이드라인은 생체시료 분석법 밸리데이션을 위한 일반적인 권장사항이며, 이 권장사항은 사용되는 분석법에 따라 변경될 수 있다.

1.2. 배경

분석물질을 정량하기 위해 선택적이고 감도가 우수한 분석법을 확립하는 것은 생물약제학적 그리고 임상약리학적 연구를 성공적으로 수행하는 데 있어 중요하다. 생체시료 분석법 밸리데이션은 생체시료 중의 분석물질을 정량 분석하는 데에 사용되는 방법이 신뢰성과 재현성이 있다는 것을 증명하는 모든 과정을 포함하며, 이러한 밸리데이션을 위한 기본적인 파라미터로는 선택성, 정확성, 정밀성, 안정성이 포함된다. 분석법 밸리데이션은 특정 실험실에서, 특정 분석법이 적합하고 신뢰할 만하다는 것을 문서화하는 과정을 포함하여야 한다.

또한, 이미 밸리데이션된 분석법을 변경하는 경우 추가적인 밸리데이션이 필요할 수 있다. 예를 들어 공인된 분석법은 실제 시험을 수행할 때 실험실의 특성에 적합하도록 종종 변경되기도 하고 이미 개발된 분석법이라 하더라도 약물을 개발하는 과정 중에 수차례 변경되기도 한다. 이 때 변경된 분석법이 적합하다는 것을 보증하기 위하여 밸리데이션이 추가로 요구될 수 있다.

2. 표준품

분석물질은 생체시료(biological matrix)에 표준품으로 조제한 검량선용 시료(calibration standard)와 품질관리시료(quality control sample, QC sample)를 이용하여 분석하고, 적절한 내부표준물질(internal standard, IS)을 이용할 수도 있다.

생체시료에 첨가되는 표준품의 순도는 시험 결과에 영향을 미치므로, 성분이 확인되고 순도가 인증된 표준품을 사용하여야 한다. 표준품은 가능한 한 분석물질과 동일해야 하고 동일하지 않은 경우, 순도가 확인된 화합물(산·염기가 제거된 형태, 염 또는 에스테르 형태)을 사용하여야 한다. 일반적으로 공인된 표준품[예: 미국약전(USP), 유럽약전(EP), WHO 표준품 등], 품질이 확보된 시판 표준품, 분석실 또는 다른 비영리 단체에 의해 합성된 순도가 입증된 표준품이 사용된다. 각 표준품 및 내부표준물질은 제조원, 제조번호, 사용(유효)기한, 가능한 경우 시험성적서, 그리고 (또는) 입증된 확인시험 및 순도시험자료가 구비되어야 한다. 이 때, 분석에 영향이 없는 경우 내부표준물질의 시험성적서는 요구되지 않는다. 만약 사용하려는 표준품 또는 내부표준물질의 사용(유효)기한이 끝난 경우라면, 동일 제조번호로 만든 표준원액의 순도는 다시 확립되어야 한다.

질량분석기를 이용하여 분석하는 경우 가능한 한 안정된 동위원소로 표지된 내부표준물질을 사용하는 것이 바람직하다. 표지된 표준품은 동위원소 순도가 매우 높고 동위원소 교환반응이 일어나지 않아야 한다. 아울러, 표지되지 않은 분석물질이 있는지 확인하고, 분석법 밸리데이션을 실시하는 동안 분석법에 잠재적인 영향을 미치는지에 대해 평가하여야 한다.

3. 분석법 밸리데이션

3.1. 전체 밸리데이션

전체 밸리데이션(full validation)은 새로운 분석법을 개발할 때 수행된다.

생체시료 분석법의 밸리데이션은 시험시료(study sample)와 동일한 생체시료를 가지고 수행하여야 하고 항응고제를 사용하는 경우 시험시료와 동일한 종류의 항응고제를 사용하여야 한다. 대체 생체시료(예: 합성하여 제조한 뇌척수액 등)를 사용하고자 할 경우에는 그 타당성을 입증하여야 한다.

일반적으로 전체 밸리데이션에서 입증하여야 할 항목들은 선택성, 생체시료 효과, 캐리오버, 최저정량한계, 검량선, 정확성, 정밀성, 회수율, 희석의 타당성 및 안정성이다.

3.1.1. 선택성

선택성(selectivity)이란 분석물질과 내부표준물질을 시료 내에 존재하는 다른 물질과 분리하여 정량하는 분석 능력을 말한다. 선택성은 최소 6 가지 이상의 서로 다른 기원의 적절한 생체시료(예: 여섯 사람으로부터 채취한 생체시료)로 수행하여야 한다. 다만, 확보가 어려운 생체시료의 경우 6 가지보다 적은 수의 생체시료를 사용할 수 있다. 이 때, 간섭물질의 반응은 일반적으로 분석물질의 최저정량한계의 20 % 이하, 내부표준물질의 5 % 이하여야 한다.

생체시료 내에 존재 가능한 간섭물질로는 내인성물질, 대사체, 시료 전처리 과정에서 기인한 분해산물 등이 있으며, 실제 연구 시에는 병용투여 약물과 다른 외인성물질 등도 존재할 수 있다. 만약 해당 분석법이 한 가지 이상의 분석물질을 정량하고자 하는 경우에는 각각의 분석물질이 간섭물질의 영향을 받지 않음을 입증하여야 한다.

또한, 일련의 분석과정에서 대사체가 모체 약물로 역변환될 가능성이 있을 경우 이를 평가하여야 한다. 즉, 산성 대사체의 에스테르화, 불안정한 N-oxide 또는 glucuronide 포합체, 락톤(lactone) 고리 구조와 같이 역변환 현상에 대한 확인이 필요한 경우에는 역변환 정도를 확립하고, 시험 결과에 미치는 영향에 대해서도 평

가하여야 한다. 초기 신약 개발 단계와 같이 아직 약물대사가 입증되지 않은 경우 이러한 역변환 가능성에 대한 평가가 가능하지 않을 수 있다. 하지만 약물 개발 과정 중 모체 약물의 대사에 대한 추가적인 정보를 얻는다면, 역변환 가능성을 고려하고 적절한 부분 밸리데이션을 할 수 있다. 대사체를 구하기 어려운 경우 검체검증분석을 통해서 역변환을 확인할 수 있지만, 이 경우 전처리 과정에서 일어나는 역변환 가능성을 배제하지 않는 것이 바람직하다.

3.1.2. 생체시료효과

생체시료효과(matrix effect)란 생체시료 내의 물질이 직접 또는 간접적으로 분석물질 또는 내부표준물질의 반응에 미치는 영향을 말한다. 생체시료효과상수(matrix factor, MF)를 계산하여 평가할 수 있으며 이 생체시료효과상수는 생체시료의 유무에 따른 분석결과의 비율로 계산할 수 있다.

생체시료효과는 품질관리시료를 분석하여 평가한다. 6 개의 서로 다른 기원의 생체시료를 가지고 낮은 농도(최저정량한계의 최대 3 배)와 높은 농도 (최고정량한계 부근)의 품질관리시료를 측정하고 이 때 구한 농도값의 변동계수(coefficient of variation, CV)는 15 % 이내여야 한다.

생체시료효과는 분석물질의 생체시료효과상수를 내부표준물질의 생체시료효과상수로 나누어 구한 내부표준물질 표준화 생체시료효과상수(IS normalized MF)로도 평가할 수 있다. 이 때, 평가기준은 6 개의 생체시료에서 구한 내부표준물질 표준화 생체시료효과상수의 변동계수가 15 % 이내여야 한다.

구하기 힘든 생체시료의 경우 6 개보다 적은 수의 생체시료를 사용할 수 있고 생체시료효과는 대부분 시료처리 방법, 분석조건 변경 등을 통해 감소시킬 수 있다.

주사제의 경우에 폴리에틸렌글리콜, 폴리소르베이트와 같이 생체시료효과가 있다고 알려진 첨가제에 대해 이러한 첨가제가 포함되어 있는 생체시료와 포함되어 있지 않은 생체시료에서의 생체시료효과 시험을 수행하는 것이 바람직하다. 첨가제가 생체 내에서 대사되지 않거나 변형되지 않음을 입증하지 못하는 경우, 생체시료효과를 평가하기 위해 사용되는 생체시료는 첨가제를 사

람이나 동물에게 투여하여 얻어야 한다. 첨가제의 생체시료효과는 생체시료효과상수로서 평가할 수 있고, 고농도의 시험시료를 첨가제가 포함되지 않은 생체시료로 희석하여 평가할 수 있다.

필요한 경우 생체시료효과는 일반 생체시료 뿐만 아니라 용혈(haemolysed)된 혈장이나 고지질(hyperlipidaemic) 혈장과 같은 생체시료에서도 시험하는 것이 바람직하다. 만약 특수군(예: 신장애 또는 간장애 환자군 등)을 대상으로 시험을 진행할 때에는 생체시료효과 역시 이러한 특수군에서 얻은 생체시료를 사용하는 것이 바람직하다.

3.1.3. 캐리오버

캐리오버(carry-over)란 시료를 연속하여 측정 할 때 분석기기 내에서 바로 전에 주입된 시료의 잔류된 분석물질 또는 내부표준물질이 다음 시료 주입 시에 나타나는 반응을 말한다. 캐리오버 시험은 고농도의 시료나 최고정량한계 농도의 검량선용 표준시료 주입 후 공시료(blank sample)를 주입하여 수행한다. 이 때 공시료에서 분석물질은 최저정량한계의 20 % 이하, 내부표준물질은 5 % 이하여야 한다.

밸리데이션이나 시험시료 분석 시 캐리오버를 피할 수 없을 때에는, 높은 농도로 예상되는 시료 주입 후에 공시료를 주입하는 방법 등을 고려하여야 한다.

3.1.4. 최저정량한계

최저정량한계(lower limit of quantification, LLOQ)란 정확성과 정밀성이 입증된 범위에서 분석물질을 정량할 수 있는 가장 낮은 농도 즉, 감도(sensitivity)를 말하며, 일반적으로 검량선의 가장 낮은 농도를 의미한다. 최저정량한계에서 분석물질의 신호(signal)는 공시료와 비교할 때 최소 5 배 이상이어야 한다.

최저정량한계는 예측되는 농도와 연구목적에 맞게 타당하게 설정하여야 한다. 예를 들어 생물학적동등성시험의 경우에는 최저정량한계를 최고혈중농도(C_{max})의 5 % 이하로 설정하여야 한다.

3.1.5. 검량선

검량선(calibration curve)이란 이미 알고 있는 분석물질의 농도와 기기의 반응과의 관계를 말한다. 검량선용 표준시료는 시험시료와 동일한 생체시료를 사용하여 생체시료에 이미 알고 있는 농도의 분석물질을 첨가하여 조제하며, 검량선은 배치 별로 작성하여야 한다. 검량선용 표준시료의 수는 측정값의 예상 범위와 분석물질의 농도-반응 상관관계에 따라 결정되어야 한다. 검량선은 일반적으로 공시료, 영시료(zero sample), 그리고 최저정량한계를 포함한 최소 6 가지 이상 농도의 검량선용 표준시료로 구성된다.

검량선을 그릴 때에는 공시료와 영시료를 제외하여 농도-반응 관계를 적절히 기술하는 가장 간단한 모델이 사용되어야 한다. 검량선으로부터 역계산한 검량선용 표준시료의 정확성은 최저정량한계에서 이론값의 20 % 이내여야 하며, 최저정량한계를 제외하고는 이론값의 15 % 이내여야 한다. 이 때 최소 75 % 이상의 검량선용 표준시료가 적합하여야 한다. 반복분석을 하는 경우에는 검량선의 농도별로 최소 50 % 이상의 검량선용 표준시료가 각 평가기준(±15 % 이내, 최저정량한계는 ±20 % 이내)을 만족하여야 한다. 검량선용 표준시료가 기준을 만족하지 못하는 경우에는 이를 제외하고 검량선을 재작성하여야 한다. 만약 최저정량한계나 최고정량한계 검량선용 표준시료의 반복분석 결과가 모두 기준을 만족하지 못하는 경우에는 해당배치는 제외시켜야 하고, 이러한 현상에 대한 원인 고찰이 필요하며 필요한 경우에는 분석법을 변경할 수도 있다. 하지만, 밸리데이션 배치에서 연속적으로 위 평가기준을 만족하지 못한다면 분석법을 변경해야 한다.

3.1.6. 정확성

정확성(accuracy)이란 분석물질의 이론값과 분석법에 의해 얻어진 측정값의 근접한 정도를 말한다. 정확성은 품질관리시료로서 평가할 수 있으며 품질관리시료는 검량선용 표준시료와 독립적인 표준원액에서 준비하는 것이 바람직하다. 품질관리시료에 대하여 시험 내(within-run) 및 시험 간(between-run) 정확성을 평가하여야 한다. 한 배치에서의 분석 경향을 평가하기 위해서 적어도

한 번은 실제 시료분석 배치사이즈와 동등한 수 이상의 품질관리시료에 대하여 정확성 및 정밀성을 확인하는 것이 바람직하다.

· **시험 내 정확성**

시험 내 정확성은 최저정량한계, 저농도(최저정량한계의 3 배 정도의 농도), 중간농도(검량선의 중간 정도의 농도) 및 고농도(검량선의 최고정량한계 부근으로서 적어도 최고정량한계의 75 %이상의 농도)를 포함하여 검량선 범위 내 최소 4 가지 농도에 대해 최소 5 번 반복 분석하여 평가할 수 있다. 이 때, 평균값은 최저정량한계에서 이론값의 20 % 이내여야 하며, 최저정량한계를 제외하고는 이론값의 15 % 이내여야 한다.

· **시험 간 정확성**

시험 간 정확성은 최저정량한계, 저농도, 중간농도 및 고농도 품질관리시료를 최소 서로 다른 2 일 이상에 걸쳐 최소 3 번 반복 분석하여 평가할 수 있다. 이 때, 평균값은 최저정량한계에서 이론값의 20 % 이내여야 하고, 최저정량한계를 제외하고는 이론값의 15 % 이내여야 한다.

3.1.7. 정밀성

정밀성(precision)이란 하나의 시료로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성을 말한다. 정밀성은 최저정량한계, 저농도, 중간농도 및 고농도 품질관리시료에 대하여 시험 내 및 시험 간 정밀성을 평가하며, 일반적으로 정확성을 입증하기 위한 시험결과를 사용하여 평가할 수 있다.

· **시험 내 정밀성**

시험 내 정밀성은 최저정량한계, 저농도, 중간농도, 고농도 품질관리시료를 검량선 범위 내 최소 4 가지 농도에 대해 최소 5 번 반복 분석하여 평가할 수 있다. 이 때, 변동계수는 최저정량한계에서 20 % 이내여야 하고, 최저정량한계를 제외하고는 15 % 이내여야 한다.

· 시험 간 정밀성

시험 간 정밀성은 최저정량한계, 저농도, 중간농도, 고농도 품질관리시료를 최소 서로 다른 2 일 이상에 걸쳐 최소 3 번 반복 분석하여 평가할 수 있다. 이 때, 변동계수는 최저정량한계에서 20 % 이내여야 하고, 최저정량한계를 제외하고는 15 % 이내여야 한다.

3.1.8. 회수율

회수율(recovery)이란 생체시료로부터 분석과정을 통해 분석물질이 회수되는 정도를 말한다. 회수율은 생체시료를 추출한 후 분석물질을 첨가한 시료와 생체시료에 분석물질을 첨가한 다음 추출한 시료의 반응을 비교하여 측정하며, 세 가지 농도(저농도, 중간농도, 고농도)에서 최소 3 번 반복 분석하여 평가할 수 있다. 이 때, 회수율은 100 %가 될 필요는 없으나 일관성과 재현성이 있어야 한다.

3.1.9. 희석의 타당성

희석의 타당성(dilution integrity)이란 시료의 농도가 최고정량한계 농도를 초과하거나 분석에 사용되는 시료의 양이 충분하지 못한 경우에 동일한 생체시료를 가하여 희석하여도 분석에는 영향이 없음을 입증하는 것을 말한다. 최고정량한계 농도를 초과하는 시료를 생체시료로 희석하여 각 희석배수마다 5 번 이상 반복 분석하여 평가하며 희석한 시료의 농도는 검량선 범위 이내여야 한다. 이 때, 정확성과 정밀성은 15 % 이내여야하며, 시험시료의 희석배수는 희석의 타당성이 입증된 희석배수 범위 이내여야 한다. 희석의 타당성에 대한 평가는 부분 밸리데이션에서 확인할 수 있다. 다른 생체시료로 희석을 하고자 하는 경우에는, 분석물질의 정확성과 정밀성에 영향이 없음을 입증하여야 한다.

3.1.10. 안정성

안정성(stability)이란 특정 조건과 시간 동안에서 생체시료 내 분석물질이 안정하다는 것을 말한다. 안정성은 생체시료의 준비, 분석의 모든 단계 및 저장 조건이 분석물질의 농도에 영향을 주지 않음을 확신할 수 있도록 평가되어야 한다. 안정성은 실제 시험에 사용한 생체시료와 유사한 조건(생체시료 기원, 항응고제, 용기 재질, 보관 및 분석조건 등)에서 실제 시료분석 기간 이상의 기간 동안 수행되어야 하며 문헌자료만으로는 충분치 않다.
일반적으로 다음의 안정성 시험을 평가하여야 하고, 각각의 저장조건을 만족하는 저농도와 고농도의 시료를 최소 3번 반복 분석하여야 한다. 이 때 각 농도별 평균값은 이론값의 15% 이내이여야 한다.

· 분석물질과 내부표준 물질의 표준원액과 표준용액의 안정성
· 생체시료 내 분석물질의 냉·해동 안정성(냉동 조건으로부터 실온 또는 전처리 온도 조건으로 해동)
· 생체시료 내 분석물질의 실온 또는 전처리 온도에서의 단기 안정성
· 생체시료 내 분석물질의 냉동 보관조건에서의 장기 안정성
· 전처리 시료의 안정성
- 실온 또는 시험기간 동안 보관 조건에서의 안정성
- 자동주입기 등 장비 내에서의 안정성

분석물질이 여러 개인 경우, 해당 분석물질의 안정성은 모든 분석물질을 포함한 생체시료에서 평가하는 것이 바람직하다.

3.1.10.1. 표준원액 및 표준용액의 안정성

표준원액 및 표준용액의 안정성(stock and working solution stability)은 각 용액을 분석물질의 반응 정도가 검량선 범위 이내로 측정되도록 희석하여 분석한다. 만약 표준원액이 해당 기간 동안 냉장 또는 냉동 보관된다면 이에 대한 안정성 평가도 이루어져야 한다. 표준용액의 안정성은 각 농도별로 확인할 필요는 없으며, 일반적으로 저농도와 고농도에서 평가하도록 한다.

3.1.10.2. 냉·해동 안정성

냉·해동 안정성(freeze and thaw stability) 시험에서 냉·해동 반복 횟수는 실제 시료분석 시 냉·해동 횟수와 같거나 더 많아야 한다. 품질관리시료를 설정된 저장온도에서 냉동하고 실온 또는 전처리 온도에서 해동하며, 완전히 녹은 다음 다시 같은 조건으로 최소 12 시간 동안 동결한다.

3.1.10.3. 단기 안정성

단기 안정성(short term stability)은 품질관리시료를 실온에서 해동하고 방치한 다음 분석하여 평가한다. 실온에서 방치하는 시간은 해당 연구 과정에서 시료가 실온에서 방치되는 시간을 고려하여 결정한다. 여기서 실온은 일반적인 실험실 온도를 의미한다.

3.1.10.4. 장기 안정성

장기 안정성(long term stability) 시험에서 저장 기간은 초회 시료 채취일로부터 시료 분석 종료일까지의 기간보다 길어야 하고, 장기 안정성 시험용 품질관리시료는 시험시료와 동일 조건하에서 저장 하여야 하며, 시료 분석 보고서가 발행되기 전에 평가되어야 한다.

3.1.10.5. 전처리 시료의 안정성

전처리 시료의 안정성(processed sample stability)은 분석기기의 주입기 내에 머물러 있는 시간을 포함하여 평가한다. 분석물질과 내부표준물질의 안정성은 실제 시료분석배치의 예상소요시간을 고려하여 평가한다.

3.2. 부분 밸리데이션

부분 밸리데이션(partial validation)은 이미 밸리데이션된 생체시료 분석법에서 변경이 있는 경우에 실시한다. 부분 밸리데이션은 시험 내 정확성 및 정밀

성 시험만 필요한 경우에서부터 전체 밸리데이션이 필요한 경우까지를 포함한다. 일반적으로 다음과 같은 경우 부분 밸리데이션을 실시하여야 한다.

· 실험실 또는 시험자의 변경
· 분석법의 변경(예: 검출기 변경 등)
· 생체시료 채취 시 항응고제의 변경(예: 헤파린에서 EDTA로 변경 등)
· 생체시료의 변경(예: 사람 혈장에서 사람 뇨로 변경 등)
· 시료 전처리 과정의 변경
· 보관조건의 변경
· 농도 범위의 변경(예: 검량선용 표준시료의 농도 변경 등)
· 기기 또는 소프트웨어 제어장치의 변경
· 시료 용량이 제한된 경우(예: 소아 관련 임상 연구 등)
· 희귀한 생체시료인 경우
· 타 약물의 공존 시 분석물질의 선택성을 증명해야 하는 경우

분석법이 변경되는 경우 변경 정도를 고려하여 분석법 밸리데이션 수준을 결정하여야 한다. 변경 정도에 따라 요구되는 분석법 밸리데이션 수준은 *부록 1*을 참고할 수 있다. 모든 변경은 기록되어야 하고, 재밸리데이션(revalidation) 또는 부분 밸리데이션 범위의 타당성을 검토하여야 한다. 생체시료 분석법 밸리데이션을 바탕으로 부분 밸리데이션을 실시하는 경우 보고서에 전체 밸리데이션과 부분 밸리데이션의 결과를 모두 기재하는 것이 바람직하다.

3.3. 교차 밸리데이션

교차 밸리데이션(cross validation)이란 두 개 이상의 분석법에 의해서 얻어진 밸리데이션 평가항목을 비교하는 것을 말한다. 시험 내 또는 시험 간에 서로 다른 분석법으로 시험결과를 얻거나 서로 다른 기관(또는 실험실) 간에 동일한 분석법이 적용되어 시험결과를 얻을 경우, 해당 시험결과를 비교해야 하며 이때 해당 시험에 사용된 분석법에 대한 교차 밸리데이션이 수행되어야 한다.

교차 밸리데이션은 시료분석 이전에 수행하는 것이 바람직하고 교차 밸리데이션을 위해 동일한 품질관리시료나 동일한 시험시료를 이용하여 분석하여야 한다. 품질관리시료를 사용하는 경우, 서로 다른 분석법에 의해 얻어진 평균 정확성은 각 분석법 별로 15 % 이내여야 하고 만약 15 % 이상을 적용하고자 하는 경우에는 그 타당성을 입증하여야 한다. 시험시료를 사용하는 경우, 얻어진 두 값의 차이가 평균값의 20 % 이내여야 하며 최소 67 % 이상의 시료가 만족해야 한다.

4. 시험시료분석

4.1. 일반사항

시험시료는 전체 분석법 밸리데이션이 확립된 후 분석을 수행하고 시료의 안정성이 확보된 기간 내에 완료한다. 일반적으로 시험시료의 분석결과가 밸리데이션된 결과 내에서의 변동범위를 가진다면 두 번 이상 분석하지 않고 한 번만 측정하여 분석할 수 있다. 이는 정밀성과 정확성의 변동범위가 허용한계 이내인 경우에 적용된다. 불안정한 분석물질로 인해 정밀성과 정확성을 확보하기 어려운 경우, 보다 정확한 측정값을 얻기 위해 2 회, 또는 3 회 이상의 반복 분석을 수행할 수도 있다.

하나의 분석은 공시료, 영시료, 최소 6 가지 농도의 검량선용 표준시료, 최소 3 가지 농도의 품질관리시료, 그리고 한 배치로서 분석될 모든 전처리된 시험시료로 구성된다. 한 분석배치 내 표준시료와 품질관리시료의 분석 순서는 시험하는 동안의 분석 동향을 파악할 수 있도록 하여야 한다.

시험시료 분석 시 분석배치의 적합 기준은 시험계획서 또는 표준작업지침서에 미리 정하도록 하여야 한다. 전체 분석이 여러 배치로 구성될 경우 적합기준은 전체 분석과 개별 배치 분석 모두에 적용되어야 하며, 비록 하나의 배치가 부적합할지라도 전체 분석이 적합할 수 있다.

4.1.1. 시스템적합성

시료분석에 사용되는 분석기기는 적절하게 유지 및 관리되어야 하며, 시스템적합성(system suitability)을 평가하기 위한 표준작업지침서가 있어야 한다. 분석기기의 분석물질과 내부표준물질에 대한 반응은 일정하고 재현성이 있어야 한다. 따라서 밸리데이션 시료 또는 시험시료를 분석하기 전에 시스템의 적합성을 확인하는 것이 바람직하며, 시스템적합성 확인을 위한 시료는 분석시료, 검량선용 표준시료, 품질관리시료와 별도로 전처리하여 준비하여야 한다.

4.1.2. 검량선

검량선은 각각의 분석배치 내에서 각 분석물질별로 작성하여 시험시료 내 분석물질의 농도를 계산하는데 사용된다. 검량선에는 최저정량한계의 검량선용 표준시료뿐만 아니라, 시험시료의 예상되는 농도를 포함하여 작성되어야 한다. 시험시료의 농도는 검량선의 최저정량한계 미만 또는 최고정량한계를 초과하여 외삽 하는 방식으로 계산해서는 안 된다. 이러한 경우에는 검량선을 재작성하거나, 고농도 시료의 경우 희석한 다음 재분석하여야 한다. 최고정량한계를 초과하는 시료는 3.1.9.에 따라 희석의 정확성 및 정밀성을 확인하여야 한다.

분석배치의 검량선은 밸리데이션에서 검증된 농도범위 및 기준을 적용한다. 공시료 및 영시료를 제외하고 전범위에 걸쳐 최소 6 가지 검량선용 표준시료로 1 회 또는 반복 분석하여 작성한다. 검량선으로부터 역계산한 검량선용 표준시료의 정확성은 최저정량한계에서 이론값의 20 % 이내여야 하며, 최저정량한계를 제외하고는 이론값의 15 % 이내여야 한다. 이 때 최소 75 % 이상의 검량선용 표준시료가 적합하여야 한다. 기준을 만족하지 못하는 농도의 검량선용 표준시료는 제외하여 검량선을 재작성할 수 있다. 만약 최저정량한계의 검량선용 표준시료가 기준을 만족하지 못하는 경우 최저정량한계에서 그 다음 농도의 검량선용 표준시료가 그 분석배치의 최저정량한계가 된다. 마찬가지로 최고정량한계의 검량선용 표준시료가 기준을 만족하지 못하는 경우 최고정량한계에서 그 전 농도의 검량선용 표준시료가 그 분석배치의 최고정량한계가 된다. 다만, 재작성된 검량선 범위는 반드시 모든 품질관리시료가 포함되도록 설정하여야 한다.

일반적으로 밸리데이션 중에 설정한 최적의 검량선 조건을 해당 시험시료 분석에 동일하게 적용하여야 한다. 이러한 반응함수(response function)는 밸리데이션 과정 동안 얻어진 검량선용 표준시료의 실측치를 바탕으로 적절한 통계학적 방법이 적용되어 결정된다. 밸리데이션과 시험시료분석 시 반응함수가 달라지는 경우는 분석법에 문제가 있음을 의미한다. 내부표준물질의 변동(drift)은 모니터링 되어야 하고 내부표준물질의 변동가능성과 관련한 사항은 표준작업지침서에 미리 기술되어야 한다.

4.1.3. 품질관리시료

품질관리시료는 분석물질을 생체시료에 첨가한 것으로 검량선과 시료를 분석하는데 사용된 분석법의 유효성을 평가하기 위하여 사용된다. 품질관리시료는 검량선용 표준시료와 독립적인 표준원액에서 준비하는 것이 바람직하지만, 표준원액의 안정성과 정확성이 확인된 경우에는 동일한 표준원액으로부터 조제할 수 있다. 또한, 생체시료효과가 없다고 입증된 경우에는 한 가지 기원의 생체시료를 사용할 수 있다. 품질관리시료는 검량선 범위 내에서 최소 각 농도 당 2 개씩, 3 가지 농도(최저정량한계의 3배 농도, 중간 농도 및 최고정량한계 부근의 농도)로 준비하여 각 시험 과정에 포함되도록 하여야 한다. 품질관리시료의 개수는 시험시료의 개수를 토대로 결정하고, 각각 조제한 품질관리시료를 일정한 간격을 두고 시험시료와 함께 분석하여야 한다. 하나의 분석배치에서 측정하여야 하는 품질관리시료의 수는 최소 6 개 이상이거나 미지농도의 시험시료의 5 % 이상 중 많은 수여야 한다. 이 때, 최소 67 %의 품질관리시료와 각 농도에서의 최소 50 %의 품질관리시료는 이론값의 15 % 이내여야 한다.

4.2. 주의사항

분석법 밸리데이션이 완료 된 다음 해당 분석법이 적절히 수행되고 있음을 입증하기 위하여 정확성 및 정밀성에 대해 정기적으로 검토하여야 한다.

생물학적동등성시험의 경우에는 한 시험대상자의 시료는 결과의 변동성을 줄이기 위하여 한 분석배치에서 한꺼번에 분석하는 것이 바람직하다.

임상시험 중 특이하게 높은 농도의 대사체가 발견된다면, 그 활성에 따라 대사체 분석법을 전체 밸리데이션 할 필요가 있다.

여러 분석물질을 동시에 분석하는 경우, 각 분석물질에 대한 각각의 검량선을 작성하여야 한다. 만약 한 분석에서 하나의 분석물질만 적합하고 다른 분석물질은 부적합하다면 적합한 분석물질의 데이터는 사용될 수 있으나, 부적합한 분석물질의 경우 시료를 다시 전처리하여 분석하여야 한다.

부적합한 분석배치로부터 얻은 결과는 문서화할 필요는 없으나, 그 분석이 부적합으로 평가된 사실과 함께 부적합 사유가 보고되어야 한다.

재분석, 재주입 및 재적분의 경우 아래와 같은 사항을 고려하여야 하며, 재분석 사유 및 채택값의 선택기준은 표준작업지침서나 시험계획서 등에 미리 정의되어 있어야 한다.

4.2.1. 재분석

재분석(reanalysis)이란 분석한 시료를 다시 전처리하여 분석하는 것으로서 통계분석 이전에 완료하여야 한다. 또한 전체 시료 개수 중 재분석 된 시료 개수의 비율은 시료분석보고서에 기술되어야 한다. 일반적인 재분석 사유는 다음과 같다.

- 검량선 또는 품질관리시료의 기준 부적합
- 내부표준물질의 반응이 검량선과 품질관리시료와 유의적으로 차이가 나는 경우(이 기준은 표준작업지침서에 미리 설정되어 있어야 한다.)
- 시료주입 오류
- 시료처리과정의 문제
- 기기 고장(예: 기기 하드웨어 고장, 소프트웨어 오작동 등)
- 측정된 농도가 최고정량한계를 초과하는 경우
- 최저정량한계 이하로 측정된 농도의 시료 중 검량선용 표준시료의 가장 낮은 농도 값의 부적합으로 인해 다른 배치와 비교 시 최저정량한계가 높게 설정된 경우
- 정량이 되지 않을 정도의 농도의 시료(예: 공시료)에서 분석값이 측정되는 경우
- 크로마토그램 이상[예: 테일링(tailing), 숄더(shoulder), 갈라짐(splitting) 등]
- 비정상적인 결과값에 대해 인과 관계 조사가 필요한 경우

생물학적동등성시험에서는 시험 결과에 영향을 미치는 비뚤림(bias)이 있을 수 있기 때문에, 약동학적 의심으로 인한 재분석 및 결과값의 교체는 일반적으로 허용되지 않는다.

4.2.2. 재주입

재주입(re-injection)이란 분석한 시료를 분석기기에 다시 주입하여 분석하는 것으로 기기고장에 의한 재주입의 경우 밸리데이션 시 재현성과 시료주입기 내의 안정성(전처리 시료의 안정성)이 입증된 경우에 수행될 수 있다. 분석적인 사유의 확인 없이 단순히 검량선용 표준시료나 품질관리시료가 허용범위를 벗어났다는 이유로 전체 분석배치를 재주입하거나 개별적인 검량선용 표준시료나 품질관리시료를 재주입하는 것은 허용되지 않는다.

4.2.3. 재적분

재적분(re-integration)이란 분석한 시료의 크로마토그램을 변경된 적분 파라미터로 다시 적분하여 농도를 산출하는 것으로 재적분이 이루어진 경우 원래의 데이터와 재적분 데이터가 모두 보고되어야 한다.

5. 검체검증분석

분석법 밸리데이션 시 사용하는 검량선용 표준시료와 품질관리시료는 시험시료의 분석을 반영하지 못할 수 있다. 시험시료가 보관 및 분석 과정을 거치는 동안의 안정성 문제(예: 시약의 pH 영향, 모체 약물의 대사체로의 변환, 대사체의 역변환, 대사체의 불안정성, 이성체 변환 등), 생체시료 중 단백결합의 차이, 생체시료효과, 병용약물, 시험시료 전처리 과정의 불균일성, 시험시료 전처리 시 회수율, 내부표준물질 반응의 편차, 분석 시 사용되는 시약 및 분석기기의 영향, 시험자의 실수 등의 이유로 시험시료 내의 분석물질 농도의 정확성과 정밀성에 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 시험시료의 일부 즉, 검체를 재분석함으로써 생체시료 분석법의 정확성 및 신뢰성을 평가할 필요가 있다.

5.1. 검체검증분석 실시

검체검증분석(incurred sample reanalysis, ISR)은 검체의 안정성이 확보된 기간 내에 최초 분석과 서로 다른 날, 서로 다른 배치에서 실시되어야 한다.

검체검증분석의 검체 수는 전체 검체의 개수에 따라 달라진다. 전체 검체 수가 1,000 개 이하인 경우, 검체검증분석은 전체 검체 수의 10 %에 해당하는 수만큼 검체를 선정한다. 그리고 전체 검체 수가 1,000 개를 초과한 경우, 1,000 개의 10 %에 해당하는 수와 1,000 개를 제외한 나머지의 5 %에 해당하는 수만큼 검체를 선정한다.

검체검증분석 대상 검체는 최고혈중농도(C_{max}) 및 소실기 부근에서 무작위 추출한다. 이 때 되도록 많은 시험대상자의 검체가 포함될 수 있도록 선정하는 것이 바람직하다.

검체검증분석의 시기, 검체 수 결정 및 대상 검체 선정의 방법과 기준에 대해서는 합리적이고 객관적인 표준작업지침서를 마련한다.

검체검증분석을 위한 분석법은 생체시료 분석법 밸리데이션 및 검체 분석법과 동일하여야 한다.

검체검증분석 결과를 최초분석결과와 비교하여 분석법의 정확성 및 신뢰성을 평가하여야 한다. 검체검증분석 결과와 최초분석 결과간의 편차를 다음의 수식에 따라 구한다.

$$\text{편차}(\%) = \frac{\text{검체검증분석값} - \text{최초분석값}}{\text{검체검증분석값과 최초분석값의 평균값}} \times 100$$

이 때, 검체검증분석 검체의 최소 67 %는 위 수식으로 얻어진 두 값의 차이가 평균의 20 % 이내에 들어야 한다. 검체검증분석 결과가 적합 판정 기준을 벗어난 경우, 먼저 그 원인에 대한 조사가 필요하며 부정확성 및 비정밀성이 최소화될 수 있는 적절한 단계의 과정들이 수행되어야 한다.

검체검증분석 수행에 관한 문서에는 다음과 같은 사항이 포함되어야 하고 시험기초자료와 함께 보관하여야 한다.

- 검체 선정 기준
- 최초분석결과 및 검체검증분석 결과
- 편차(%)
- 검체검증분석 결과가 적합 판정 기준을 벗어난 경우, 그 원인에 대한 고찰, 해결방안 및 후속조치 등

5.2. 검체검증분석 유의사항

전처리 시 검체가 튜브에 가득 담겨 있으면 전처리에 사용되는 시약과 균일하게 혼합되지 않는다. 따라서 검체의 용량을 고려하여 충분한 크기의 튜브에 담아 전처리 한다.

전처리 과정 중 사용되는 시약의 pH 조건이 분석 물질을 불안정하게 하는 경우, 최초 분석 결과와 검체검증분석 결과가 달라질 수 있다. 따라서 분석법 개발 시 다양한 pH 조건에서 분석물질의 안정성을 검토하여 불안정한 조건을 피하는 것이 바람직하다.

생체시료 내 모체 약물이 대사체로 전환 되는 경우, 최초 분석 결과와 검체검증분석 결과가 달라질 수 있다. 따라서 분석 물질의 안정성 시험 결과를 토대로 적절한 시기에 검체검증분석을 실시하는 것이 바람직하다.

대사체가 모체 약물로 역변환 되는 경우에도 모체 약물의 검체검증분석 결과값이 최초 분석값과 달라질 수 있다. 또한 포합체의 불안정성으로 인하여 포합체가 다시 모체 약물로 변환되는 경우에도 이와 같은 결과가 발생할 수 있다. 산성 대사체의 에스테르화, 불안정한 N-oxide 또는 glucuronide 포합체, 락톤(lactone) 고리 구조와 같이 대사체의 안정성 확인이 필요한 경우에는 안정성 시험 시 표준액에 대사체를 함께 첨가하여 안정성 평가를 실시하는 것이 바람직하다.

일부 대사체의 경우, 특정 온도 조건에서 분해되어 다른 대사체를 생성하므로 검체검증분석 결과가 최초분석결과와 달라질 수 있다. 그러므로 모체 약물뿐만 아니라 대사체를 동시에 정량하는 경우, 다양한 온도 조건에서 대사체의 안정성을 검토한 후 검체 전처리 및 분석법을 확립하는 것이 바람직하다.

6. 문서

생체시료 분석의 충분한 재현성과 신뢰성을 보장하기 위하여, 공통 및 특정 표준작업지침서 뿐만 아니라 분석법 밸리데이션 및 일상적인 시험시료분석에서 얻어진 결과는 밸리데이션 보고서 및 시료 분석 보고서로 문서화되어야한다. 분석법 밸리데이션 및 시료분석 보고서 등 모든 보고서에는 총괄 요약표 뿐만 아니라 각종 기록 [예: 부적합 분석 배치, 표준품과 공시료에 대한 기록(영수증, 사용일지, 보관), 시료에 대한 기록(영수증, 반출기록, 준비기록, 보관), 분석 기록, 기기에 대한 기록(기기 점검일지), 일탈 기록 등] 이 기술되어야 하고 크로마토그램과 같은 시험기초자료와 함께 보관되어야 한다.

6.1. 밸리데이션 보고서

밸리데이션 보고서에는 분석법의 개발과 확립에 관한 다음의 사항이 포함되어야 한다.

- 요약정보
- 분석법 작업 절차에 관한 기술
- 분석법 밸리데이션 실험에 사용한 약물 표준품 및 대사체 표준품, 내부표준물질에 관한 자료(제조원, 제조번호, 사용(유효)기한, 시험성적서, 안정성, 보관 조건 등)
- 밸리데이션 항목(정확성, 정밀성, 회수율, 선택성, 정량한계, 검량선 및 안정성) 및 판정 기준
- 밸리데이션 항목을 평가하기 위해 수행된 실험에 관한 기술과 그 결과
- 크로마토그램, 질량 스펙트로그램 등 시험기초자료
- 표준작업지침서, 시험계획서, 또는 GLP(해당되는 경우)에서 벗어난 경우 이탈 사항 및 정당화 방법
- 참고문헌 및 관련 표준작업지침서 또는 시험계획서

6.2. 시료분석 보고서

시료분석 보고서에는 밸리데이션된 분석법을 일상적 약물 분석에 적용하기 위하여 다음의 사항이 포함되어야 한다.

· 요약정보
· 일상적 분석을 수행하는 동안 사용한 약물 표준품, 대사체 표준품과 내부 표준물질에 관한 자료(제조원, 제조번호, 사용(유효)기한, 시험성적서, 안정성, 보관 조건 등)
· 시료 전처리와 보관에 관한 정보를 포함한 요약표. 이 표에는 시료명, 채취일, 배송 전 보관, 배송 로트에 관한 정보와 분석전의 보관에 관한 사항이 포함되어야 한다. 각각의 정보는 날짜, 시간, 시료 조건과 시험계획서에서 벗어난 경우 이탈에 관한 사항을 포함한다.
· 임상 시료 분석에 관한 요약표. 이 표에는 시험법명, 분석일자, 분석시간, 시험법, 시험자, 시작과 종료시간, 기간, 장비 및 시료의 변경, 그리고 확립된 분석법의 잠재적 문제나 이탈 사항을 포함한다.
· 결과를 역계산하는 데 사용한 등식
· 시료분석에 사용한 검량선 결과표와 검량선 요약결과
· 분석배치 시험 과정의 적부 평가 시 사용된 품질관리시료의 시험내/시험간 분석값과 검량선으로부터의 시험내/시험간 정확성과 정밀성에 관한 데이터의 요약 정보. 기초자료와 통계처리에 대한 요약뿐만 아니라 품질관리 그래프(QC graph) 및 추이 분석(trend analyse)에 대해 기술 한다.
· 임상 시료의 분석 결과표. 이 표에는 시험법명, 시료명, 기초자료와 역계산된 결과, 데이터 적분 확인 코드 또는 기타 보고서 확인 코드가 포함된다.
· 시료 분실 사유
· 재분석에 관한 자료. 이 자료에는 초회 분석 결과와 재분석의 결과, 보고된 결과, 시험법명, 재분석 사유 및 채택 기준, 재분석 요청자, 그리고 재분석 승인자에 관한 내용이 포함되어야 한다. 임상 시료의 재분석은 반드시 사전에 설정된 표준작업지침서에 따라 수행되어야 한다.

· 재적분에 관한 자료. 이 자료에는 초회 적분 결과 및 재적분 결과, 재적분 시 사용된 방법, 보고된 결과, 시험법명, 재적분 사유 및 채택 기준, 재적분 요청자, 그리고 재적분 승인자에 관한 내용이 포함되어야 한다. 임상 시료의 재적분은 반드시 사전에 설정된 표준작업지침서에 따라 수행되어야 한다.
· 분석 관련 시험계획서 또는 표준작업지침서에서 이탈된 경우 그 사유와 평가 및 조치 내용
· 참고문헌 및 관련 표준작업지침서 또는 시험계획서

6.3. 기타 정보

분석법 개발과 확립 또는 일상적인 시료 분석에 적용되는 기타 정보로는 다음과 같은 사항이 포함된다.

· 약어 및 시료 조건 코드, 데이터 적분 코드, 보고서 코드 등을 포함한 기타 코드 목록
· 다음과 관련된 표준작업지침서 또는 시험계획서
- 임상 시료 코드와 생체시료 분석용 시료 코드를 포함한 시료 코드번호 부여 체계
- 배치 분석을 위한 임상 시료의 배정 방법

7. 용어해설

검량선(Calibration curve)

실험적 반응 수치와 분석물질 농도 간의 상관관계

검량선용 표준시료(Calibration standard)

이미 알고 있는 농도의 분석물질을 생체시료에 첨가한 시료로서 검량선을 작성하는데 사용되고, 이 검량선으로부터 품질관리시료 및 시험시료 내 분석물질의 농도가 결정됨

검출 한계(Limit of Detection, LOD)

생체시료 분석법 과정으로 배경 노이즈와 확실하게 구분되어지는 분석물질의 최저 농도

검체(Incurred sample)

검체검증을 위해 시험시료로부터 선택한 시료

검체검증분석(Incurred sample reanalysis, ISR)

최초 분석 결과의 재현성 여부를 확인하기 위해 검체 중 일부를 재분석하는 과정

단백결합(Protein binding)

약물이 혈장 내의 단백질과 결합하는 것으로서 단백결합에 따라 생체 내에서 약물의 동태 및 약효의 변화가 생길 수 있음

내부표준물질(Internal standard)

목표로 하는 분석물질의 정량시험을 위해 이미 알고 있는 일정 농도로 검량선용 표준시료와 시험시료에 첨가하는 시험 물질(예: 구조적으로 유사한 유도체, 안정하다고 알려진 물질)

분석물질(Analyte)

측정되는 특정 화학 물질로서, 생체시료 내 약물자체이거나 생분자, 유도체, 대사체, 분해산물이 될 수 있음

분석배치(Analytical Run or Batch)

밸리데이션을 위해 적절한 수의 검량선용 표준시료와 품질관리시료 및 분석시료의 한 세트. 수 개의 배치가 하루에 분석될 수도 있고, 한 배치가 수일에 걸쳐 분석될 수도 있으며 분석배치의 시료(unknown sample)는 해동에서 전처리까지 일괄 처리되어 같은 검량선을 사용함

밸리데이션(Validation)

생체시료 분석법이 미리 설정되어 있는 판정기준에 맞는 결과를 일관되게 도출한다는 것을 검증하고 이를 문서화하는 것

전체 밸리데이션(Full validation) : 새로운 생체시료 분석법을 개발할 때 실시하는 밸리데이션

부분 밸리데이션(Partial validation) : 이미 밸리데이션 된 생체시료 분석법에서 변경이 있는 경우 실시하는 밸리데이션

교차 밸리데이션(Cross validation) : 동일시험 내 또는 여러 시험 간에 사용된 두 개 이상의 분석법의 밸리데이션 평가항목을 비교하기 위하여 실시하는 밸리데이션

생체시료(Biological matrix)

생체에서 분리된 물질(예: 전혈이나 혈청, 혈장, 뇨, 변, 타액, 객담, 기타 다양한 분리 조직)

생체시료효과(Matrix effect)

생체시료 내의 물질이 직접 또는 간접적으로 분석물질 또는 내부표준물질의 반응에 미치는 영향

생체시료효과상수(Matrix factor, MF)

생체시료 유무에 따른 분석결과의 비율

소실기(Elimination phase)

생체에 약물을 투여하고 얻은 혈중농도-시간 곡선의 마지막 부분으로 일정 소실 속도(elimination rate)로 혈중농도가 감소하는 부분

선택성(Selectivity)

분석물질과 내부표준물질을 시료 내 존재하는 다른 물질과 분리하여 정량하는 분석 능력을 말함. 선택성은 종종 특이성(specificity)과 혼용되는데, 특이성은 선택성을 내포하는 의미로서 구별될 필요성이 있음. 특이성은 일반적으로 단일 성분을 측정하는 능력인데 반해, 선택성은 어떤 특성을 갖는 일련의 물질을 측정하는 능력을 의미함. 즉, 선택성은 다른 물질로부터 분석물질 및 내부표준물질을 분리하여 측정할 수 있는 능력을 의미함

시료(Sample)

공시료, 시험시료, 그리고 전처리시료 등을 포함한 일반적인 용어

공시료(Blank sample) : 분석시료나 내부표준물질을 가하지 않은 생체시료를 전처리한 시료

시험시료(Study sample) : 임상시험으로부터 얻은 분석대상이 되는 생물학적 시료

영시료(Zero sample) : 공시료에 내부표준물질만 첨가한 시료

전처리시료(Processed sample) : 분석을 위해 다양한 기법(예: 추출, 희석, 농축)으로 처리된 시료

품질관리시료(Quality control sample, QC sample) : 생체시료에 분석물질을 첨가한 시료로서 생체시료 분석법의 성능을 검사하고 각각의 분석배치에서 분석되는 시험시료 분석 결과의 타당성 평가에 사용함

시스템 적합성(System suitability)

분석 배치를 시험하기 전에 표준품을 분석함으로써 기기 성능(예: 감도, 피크 유지시간 등)을 평가

안정성(Stability)

주어진 기간 동안 특정 조건하에서 주어진 생체시료 내 분석물질의 안정성

재현성(Reproducibility)

서로 다른 실험실 간 또는 단기간동안 동일 조건에 따라 측정하였을 때의 정밀성

정량범위(Quantification range)

농도-반응 관계를 이용해서 정확도와 정밀도를 가지고 신뢰성 있고 재현성 있게 정량할 수 있는 농도 범위로서 최고정량한계와 최저정량한계를 포함함

정밀성(Precision)

균질한 시료를 여러 번 채취하여 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)

정확성(Accuracy)

설정된 조건하에서 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도

재분석(Reanalysis)

분석한 시료를 다시 전처리하여 분석하는 것

재적분(Re-integration)

분석한 시료의 크로마토그램에 대해 적분 파라메타를 변경하여 다시 농도를 산출하는 것

재주입(Re-injection)

분석한 시료를 분석기기에 다시 주입하여 분석하는 것

최고혈중농도(C_{max}, Peak Plasma Concentration)

생체에 약물을 투여하고 얻은 혈중농도-시간 곡선에서 가장 높은 혈중농도

최고정량한계(Upper Limit of Quantification, ULOQ)

적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 시료 내 분석물질의 최고량

최저정량한계(Lower Limit of Quantification, LLOQ)

적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 시료 내 분석물질의 최소량

캐리오버(Carry-over)

시료의 연속 측정 시 분석기기 내에 잔류된 분석물질 또는 내부표준물질이 다음 시료 주입 시에 나타나는 반응

특이성(Specificity)

선택성 부분 참고

표준작업지침서(Standard Operating Procedure, SOP)

특정 업무를 표준화된 방법에 따라 일관되게 실시할 목적으로 해당 절차 및 수행 방법 등을 상세하게 적은 문서

표준품(Reference standard)

분석물질을 정량하기 위하여 표준으로 사용되는 물질. 주로 검량선용 시료와 품질관리시료 조제에 사용

표준원액(Stock solution)

표준품을 일정한 농도(예: 1 mg/mL)로 녹인 용액

표준용액(Working solution)

표준원액을 희석한 용액. 주로 검량선용 시료와 품질관리시료 조제에 사용

희석의 타당성(Dilution integrity)

희석 과정이 분석물질의 농도를 측정하는 데 영향을 주지 않음을 입증하는 것

회수율(Recovery)

시료 전처리 과정을 통해 분석물질이 회수되는 정도

8. 참고문헌

1. 생체시료분석법 Validation(국립독성연구원, 2003)
2. 의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 해설서(식품의약품안전청, 2008)
3. 생체시료분석법 밸리데이션 해설서(식품의약품안전청, 2010)
4. Surendra Bansal et al., Key Elements of Bioanalytical Method Validation for S mall Molecules, *AAPS Journal*, **9**(1) Article 11, E109-E114 (2007)
5. C.T. Viswanathan et al., Workshop/Conference Report - Quantitative Bioanalytic al Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays, *AAPS Journal*, **9**(1) Article 4, E30-E42 (2007)
6. B.K. Matuszewski et al., Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Qua ntitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS, *Anal Chem*, **75**, 3019 -3030 (2003)
7. Nicola C. Hughes et al., Determination of Carryover and Contamination for Ma ss Spectrometry-Based Chromatographic Assays, *AAPS Journal*, **9**(3) Article 42, E353-E360 (2007)
8. FDA, Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation (2001)
9. FDA, Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation(Draft) (2013)
10. ICH, VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METH ODOLOGY Q2(R1) (2005)
11. ICH, NOTE FOR GUIDANCE ON GOOD CLINICAL PRACTICE (2005)
12. Yadav M., Shrivastav P.S. Incurred sample reanalysis(ISR): a decisive tool in bioanalytical research. *Bioanalysis* **3**(9), 1007-24 (2011)
13. EMA, Guideline on bioanalytical method validation (2011)
14. MHLW, Draft Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development (2013)

15. Fabio G., Workshop report - The Canadian Workshop on the Crystal City AA PS/FDA White Paper(Montreal, QC, Canada) (2007)
16. Fast D.M. et al., Workshop report and follow-up - AAPS Workshop on curre nt topics in GLP bioanalysis: Assay reproducibility for incurred samples - imp lications of Crystal City recommendations. *AAPS Journal* **11**(2), 238-41 (2009)
17. Christopher T., Highlights of 4th Regulated Bioanalysis Workshop: Discussing, Reviewing, Sharing Perspectives, Providing Potential Solutions and Agreeing u pon a Consistent Approach on the Recent Issues in Regulated Bioanalysis. *Qu ality Matters-Special Supplement* **2**(26), 1-18 (2010)
18. Fu Y. et al., An investigation of incurred human urine sample reanalysis failu re. *Bioanalysis* **3**(9), 967-72 (2011)
19. Voicu V. et al., Incurred sample reanalysis: different evaluation approaches on data obtained for spironolactone and its active metabolite canrenone. *Bioanalys is* **3**(12), 1343-56 (2011)
20. Savoie N. et al., 2010 White Paper on recent issues in regulated bioanalysis & global harmonization of bioanalytical guidance. *Bioanalysis* **2**(12), 1945-60 (2010)
21. Rocci M.L. Jr., Investigation and resolution of incurred sample reanalysis failu res – two case studies. Presented at: The CVG 4th Workshop on Recent Issue s in Regulated Bioanalysis(Montreal, QC, Canada). (2010)
22. Philip T. et al. Incurred sample reproducibility: views and recommendations b y the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis* **1**(6), 1049-56 (2009)
23. William Nowatzke and Eric Woolf., Best Prectices During Bioanalytical Metho d Validation for the Characterization of Assay Reagents and the Evaluation of Analyte Stability in Assay Standards, Quality Controls, and Study Samples. *A APS Journal,* **9**(2) Article 13 (2007)

부록 1 부분 밸리데이션 항목 예시

시험항목 / 변경 항목	선택성	최저정량한계	검량선	정확성 및 정밀성		회수율	안정성	비고
				시험내	시험간			
1. 절차								
가. 시약								
1) 재용해 용매 변경	○	○	○	○	×	○	○	
2) 재용해 용매량 변경	○	○	○	○	×	○	×	
3) 표준원액 제조 시 사용된 용매 변경	×	×	×	×	×	×	○	
4) 표준용액 조제 시 사용된 용매 변경	○	○	○	○	×	×	○	
5) 내부표준액의 농도나 첨가량 변경	○	○	○	○	×	×	×	
6) 시약 조제 방법 변경	×	×	×	×	×	×	×	
7) 고체상 추출카트리지의 활성화액, 세척액, 용출액의 변경	○	○	○	○	×	○	○	
8) 단백침전 과정에 첨가되는 시약	○	○	○	○	×	○	○	
9) 액상추출과정에 첨가되는 용매 및 시약의 변경	○	○	○	○	×	○	○	
10) 유도체화 시약의 변경	○	○	○	○	○	○	○	
나. 방법								
1) 질소 증발 건고 방법 변경	×	×	×	×	×	×	×	
2) 질소와 진공 증발건고 방법 간의 변경	○	○	○	○	×	×	×	
3) 증발 건고 온도 변경	○	○	○	○	×	×	×	
4) 혼합 방법 변경(흔듦, 진탕혼합, 회전 등)	○	○	○	○	×	×	×	
5) 상분리를 위한 원심분리 용기 또는 가속도 (설정치의 이내)	×	×	×	×	×	×	×	
6) 상분리를 위한 원심분리 용기 또는 가속도 (설정치의 미만)	○	○	○	○	×	×	×	

7) 원심분리 온도(설정치의 이내)	×	×	×	×	×	×	×	
8) 원심분리 온도(설정치의 미만)	○	○	○	○	×	×	×	
9) 고체상 추출카트리지의 용출 방법 변경	○	○	○	○	×	○	×	
10) 액-액 추출법(LLE) 추출 용매의 변경	○	○	○	○	○	○	○	
11) 유도화제를 중성화하거나 제거	○	○	○	○	×	×	×	
12) 수동 및 자동 절차간의 변경	○	○	○	○	×	×	×	
13) 추출 전 시료의 원심분리 변경	○	○	○	○	×	×	×	
14) 주입 전 추출액을 원심분리하거나 여과하는 과정 변경	○	○	○	○	×	○	×	
15) 액상 추출(액체-액체)과 고체상 추출 간의 변경	○	○	○	○	○	○	○	
16) 분석자의 변경	×	○	○	○	○	×	×	
17) 밸리데이션과 시료분석 사이에 다른 성분의 분석	×	○	○	○	○	×	×	
다. 시간								
1) 증발 건고 시간	○	×	○	○	×	×	×	
2) 추출(혼합) 시간	○	×	○	○	×	○	×	
3) 원심분리 시간	○	×	○	○	×	×	×	
* ○: 평가 항목, ×: 면제 항목								

가. '시약'란 중

1. '1) 재용해 용매 변경'

재용해 용매 변경은 증발건조 후 잔사의 재용해에 사용하는 용매의 변경을 뜻한다. 재용해 용매는 회수율의 재현성, 전처리 시료의 안정성, 공시료 크로마토그램, 피크 모양, MS 검출기의 경우 검출기의 반응성 변화에 의한 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성, 회수율, 안정성에 영향을 줄 수 있다.

2. '2) 재용해 용매량 변경'

재용해 용매량의 변경은 회수율의 재현성, 공시료 크로마토그램에 영향을 줄 수 있으며 주입량이 동일한 경우 선택성과 최저정량한계에 영향을 줄 수 있으므로 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성, 회수율의 재현성 시험이 필요하다.

3. '3) 표준원액 조제 시 사용된 용매 변경'

표준원액이 검량선용 표준시료의 조제에 직접 사용되는 경우에는 '1.절차 가.시약 4)표준용액의 조제 시 사용된 용매 변경'의 예시에 따라야 한다. 반면 표준원액이 검량선용 표준시료의 조제에 직접 사용되지 않는 경우에는 표준원액의 안정성과 장기 안정성 시험이 필요하다.

4. '4) 표준용액 조제 시 사용된 용매 변경'

공시료에 소량(일반적으로 1.0% 이하)의 표준용액을 가하여 검량선용 표준시료를 조제하였다면 생체시료의 성질이

유지되었다고 간주할 수 있다. 그러나 5~10%의 표준용액을 가하여 조제하였다면 검량선용 표준시료와 시료의 성질이 동일하다고 보기 어려우며, 이 경우 표준용액 용매의 변경은 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성에 영향을 줄 수 있다. 표준용액의 용매가 표준원액의 용매와 동일한 경우 표준용액 안정성, 장기 안정성 시험은 표준원액 안정성, 장기 안정성 시험으로 대체할 수 있다.

5. ‘6) 시약 조제 방법 변경’은 암실조건, 조제실 온도, 습도 등 주변 환경의 변경을 뜻한다.

6. ‘ 7) 고체상 추출카트리지의 활성화액, 세척액, 용출액의 변경’

시험시료의 고체상 추출카트리지의 활성화액, 세척액, 용출액의 변경은 선택성, 검량선, 정확성, 정밀성, 회수율에 영향을 줄 수 있다. 특히 용출액을 직접 주입하는 경우에는 전처리 시료의 안정성도 확인되어야 한다. 다만, 용출액을 건고하여 재용해하는 방법에서 건고 시 잔류되는 성분이 용출액에 첨가되지 않았다면 전처리 시료의 안정성은 불필요하다.

7. ‘8) 단백침전 과정에 첨가되는 시약 ’

시험시료의 단백침전 과정에서 첨가되는 시약의 변경은 선택성, 검량선, 최저정량한계, 시험 내 정확성 및 정밀성, 회수율 및 전처리 시료의 안정성에 영향을 미치므로 이에 대한 평가를 다시 해야 한다. 다만, 단백침전 상등액을 건고하여 재용해하는 방법에서 건고 시 잔류되는 성분이 첨가되지 않았다면 전처리 시료의 안정성은 불필요하다.

8. ‘9) 액상추출 과정에 첨가되는 용매 및 시약의 변경’

시험시료의 액상추출 과정에서 첨가되는 시약의 변경은 선택성, 검량선, 최저정량한계, 시험 내 정확성 및 정밀성, 회수율 및 전처리 시료의 안정성에 영향을 미치므로 이에 대한 평가를 다시 해야 한다. 다만, 건고하여 재용해하는 방법에서 건고 시 잔류되는 성분이 첨가되지 않았다면 전처리 시료의 안정성은 불필요하다.

9. ‘10) 유도체화 시약의 변경 ’

유도체화 시약의 변경은 안정성을 제외한 모든 시험 항목에 영향을 줄 수 있으므로 안정성을 제외한(단, 전처리 시료의 안정성은 포함) 전체 밸리데이션이 필요하다.

나. ‘방법’란 중

1. '1) 질소 증발 건고 방법 변경‘은 건고시간, 질소기류의 양의 변경을 뜻한다.

2. ‘6) 상 분리를 위한 원심분리 용기 또는 가속도 ’

원심분리의 가속도 범위를 벗어나거나 (예: 설정치의 80% 미만) 모양이나 직경이 다른 용기를 사용하는 경우에는 동일한 가속도가 주어진다 하더라도 상 분리 정도가 동일하다고 볼 수 없으므로 원심분리 용기의 변경에는 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성 시험이 필요하다.

3. ‘15) 액상 추출(액체-액체)과 고체상 추출 간의 변경’

추출 방법의 변경은 안정성을 제외한 모든 시험 항목에 영향을 줄 수 있으므로 안정성을 제외한(단, 전처리 시료의 안정성은 포함) 전체 밸리데이션이 필요하다.

4. ‘16) 분석자의 변경’

분석자를 변경하는 경우 최저정량한계, 검량선, 정확성 및 정밀성 시험이 필요하다. 단, 분석방법 및 조건의 변경이 있을 경우 변경항목에 따라 추가적인 밸리데이션이 필요할 수 있다.

5. ‘17) 밸리데이션과 시료분석 사이에 다른 성분의 분석’

밸리데이션과 시료분석 사이에 다른 성분의 분석이 이루어진 경우(예: A성분 밸리데이션 후 B성분의 분석을 진행한 후 다시 A성분의 시험시료를 분석하는 경우) 최저정량한계, 검량선, 정확성 및 정밀성 시험이 필요하다. 단, 분석방법 및 조건의 변경이 있을 경우 변경항목에 따라 추가적인 밸리데이션이 필요할 수 있다.

다. ‘시간’란 중

1. '2) 추출(혼합) 시간‘

추출 시간의 변경은 분석물질과 내부표준물질의 회수율에 영향을 줄 가능성이 크다. 회수율이 최초 밸리데이션 시와 동등하지 않다면 추출은 평형에 도달하지 않았다고 볼 수 있으므로, 만일 변경 전의 추출률이 크다면 변경 전의 추출시간을 사용하여야 하며 변경 후의 추출률이 크다면 안정성을 제외한 전체 밸리데이션이 필요하다.

시험항목 / 변경 항목	선택성	최저정량한계	검량선	정확성 및 정밀성		회수율	안정성	비고
				시험내	시험간			
2. 시스템								
가. 기기								
1) 검출기 변경	○	○	○	○	○	×	×	
2) 분석기기 변경	○	○	○	○	○	×	×	
3) 측정 파라메타 변경	○	○	○	○	×	×	×	
4) 기기 변경	○	○	○	○	×	×	×	
5) 주입량 변경	○	○	○	○	×	×	×	
6) 실린지 세척액 변경								캐리오버시험
7) 주입포트 라이너/처리/Septum								캐리오버시험
8) 분석 시간 변경	○	○	○	○	×	×	×	
나. 컬럼								
1) 이동상 변경	○	○	○	○	×	×	×	
2) 캐리어가스 변경	○	○	○	○	×	×	×	
3) 컬럼 온도나 온도 램프 파라메타의 변경	○	○	○	○	×	×	×	
4) 컬럼 충전물 변경 또는 동일 형태의 컬럼 제조처 변경	○	○	○	○	○	×	×	
5) 컬럼 직경 또는 길이의 변경	○	○	○	○	×	×	×	
6) 입자크기 변경	○	○	○	○	×	×	×	
7) 필름두께 변경	○	○	○	○	×	×	×	
다. 데이터 처리(인식)								
1) 질량분석기에 대한 데이터인식 파라미터 변경	○	○	○	○	×	×	×	
2) 크로마토그래프법에 대한 데이터인식 파라미터 변경								측정농도 값 재계산
3) 데이터처리 하드웨어나 소프트웨어 변경								측정농도 값 재계산
* ○: 평가 항목, ×: 면제 항목								

가. ‘기기’란 중

1. ‘1) 검출기 변경’

검출기가 변경(예: FLD에서 UV로의 변경)되면 선택성, 최저정량한계, 검량선, 정확성, 정밀성에 영향을 미치므로 이에 대한 평가를 다시 해야 한다.

2. ‘2) 분석기기 변경’

분석기기의 변경(예: LC에서 GC로의 변경)은 시료의 모든 전처리 등의 방법이 동일 할 경우, 선택성, 최저정량한계, 검량선, 정확성, 정밀성에 영향을 미치므로 이에 대한 평가를 다시 해야 한다.

3. ‘3) 측정 파라미터 변경’

측정 파라미터 변경(예: 검출 조건, 피크인식 조건, 분무가스 온도, 유량 등 기기 설정 변경)이 있을 경우 전 항목에 영향을 미치므로 재 밸리데이션 해야 한다. 다만 회수율과 안정성은 시료 자체에 대한 기본적인 문제이므로 생략될 수 있으며 Mass 이온의 소수점 자리 변경 등과 같은 기기 상태에 의한 변경 항목은 검량선과 적합성을 확인함으로 평가할 수 있다.

4. ‘ 4) 기기 변경’

기기 제조업체에 따라 또는 동일한 제조업체라도 타 모델은 물론, 동일한 모델에서 감도 등이 달라지므로 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성에 영향을 미치므로 이에 대한 평가를 다시 해야 한다.

5. ‘5) 주입량 변경’

주입량을 변경할 시 피크형태가 완전히 달라지므로 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성 등에 영향을 미치는지에 대한 평가를 다시 해야 한다.

6. ‘8) 분석 시간 변경’

분석시간을 줄이는 경우 아직 용출 되지 않은 성분이 다음 분석 시 겹쳐 나올 수 있다. 따라서 분석 시간 변경 시 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성을 시험해야 한다. 이때 품질관리시료를 여러 번 반복 주입하여 확인해야 한다.

나. ‘컬럼’란 중

1. ‘1) 이동상 변경’

이동상의 조성 또는 비율 변경 시 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성을 시험해야 한다. 이동상 조성 비율이 낮은 용매의 양은 상대비로서 ± 30 %, 절대비로서 ± 2 % 중 더 큰 범위까지 조정할 수 있으며, 용매의 모든 변경은 전체 이동상에 대한 절대비로서 ± 10 %를 초과할 수 없다.

2. ‘2) 캐리어가스 변경’

캐리어가스의 종류를 변경하면 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성에 대해 영향을 미칠 수 있으므로 이에 대한 재평가를 해야 한다.

3. ‘3) 컬럼 온도나 온도 램프 파라미터의 변경’

± 10% 이내에서 필요에 따라 변경 가능하고 이 범위를 벗어나면 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성 등에 대해 재평가를 해야 한다.

4. ‘4) 컬럼 충전물 변경 또는 동일 형태의 컬럼 제조처 변경’

컬럼 충전물의 입자 크기 또는 관능기가 다르거나 동일 형태의 컬럼 제조처가 변경되는 경우 선택성, 최저정량한계, 검량선, 정확성, 정밀성 등에 영향을 미치므로 이에 대한 평가를 다시 해야 한다.

5. ‘5) 컬럼 직경 또는 길이변경’

컬럼의 길이가 변경 되면 피크유지시간이 달라지고 컬럼 직경이 변경되면 분리능이 감소될 수 있으므로 선속도를 조절해야 한다. 따라서 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성 시험이 요구된다.

6. ‘6) 입자크기 변경’

최대 50 %까지 축소가능하고, 증가는 허용되지 않는다.

7. ‘7) 필름두께 변경’

GC의 경우, 필름두께가 두꺼워지면 피크의 형태가 넓어지며 감도가 떨어지므로 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성 시험을 수행하여야 한다.

다. '데이터 처리(인식)'란 중

1. '1) 질량분석기에 대한 데이터인식 파라미터 변경'

데이터 인식 파라미터란, 시그널을 얻을 때까지의 파라미터 또는 측정 파라미터를 의미한다. 선택성, 최저정량한계, 검량선, 시험 내 정확성 및 정밀성 등의 항목에 영향을 미칠 수 있으므로 이에 대한 재평가를 한다.

2. '2) 크로마토그래프법에 대한 데이터인식 파라미터 변경'

적분법, 면적-높이 데이터 처리방법의 변경(예: 밸리데이션 시료와 시험시료에 있어 피크유지시간, 대사체의 존재유무 등의 이유로 적분법을 변경시켜야하는 경우)과 같은 재계산을 의미한다. 변경 사유를 문서화 하고 만약 분석종료 후인 경우 데이터를 재처리하여 재계산한다. 단, 변경된 파라미터는 분석 전 과정에 걸쳐서 동일하게 적용 되어야 한다.

3. '3) 데이터처리 하드웨어나 소프트웨어 변경'

하드웨어의 변경은 상관없으나(단, 소프트웨어의 정상 설치 및 작동을 확인), 소프트웨어의 변경(예: 버전 변경)은 데이터인식 파라미터의 변경과 같은 것으로 변경 사유를 문서화 하고 만약 분석종료 후인 경우 데이터를 재처리하여 재계산한다. 단, 변경된 파라미터는 분석 전 과정에 걸쳐서 동일하게 적용 되어야 한다.

시험항목 / 변경 항목	선택성	최저정량한계	검량선	정확성 및 정밀성		회수율	안정성	비고
				시험내	시험간			
3. 규격								
1) 검량선 농도 범위 변경								
가) 범위 확대	○	○	○	○	○	○	○	
나) 범위 축소			○					시스템 적합성평가
2) 회귀분석법 변경								측정농도 값 재계산
3) 내부표준물질-외부표준물질 상호간 변경								측정농도 값 재계산
4) 면적-높이 상호간 변경								측정농도 값 재계산
5) 복합성분 분석법을 단일성분 분석에 적용	×	×	×	×	×	×	×	
6) 환경요소(빛, 온도 등)	×	×	×	×	×	×	○	
* ○: 평가 항목, ×: 면제 항목								

3. '규격'란 중

1. '1) 검량선 농도 범위 변경'

범위를 확대하는 경우 전체 밸리데이션을 해야 하지만 범위를 축소(예: 혈액 중 약물 농도를 측정할 때 시험 범위를 넓게 설정한 다음 범위를 점점 줄여서 측정)하는 경우 검량선과 시스템적합성을 확인함으로서 평가할 수 있다.

2. ‘2) 회귀분석법 변경’
회귀분석모델(예: 가중치)을 변경 할 경우, 새로 얻어진 회귀방정식을 이용하여 측정농도를 재계산하여 재평가를 실시한다.
3. ‘5) 복합성분 분석법을 단일성분 분석에 적용’
복합성분 분석법을 단일성분 분석에 적용할 경우 별도의 밸리데이션이 필요하지 않다.

변경 항목 \ 시험항목	선택성	최저정량한계	검량선	정확성 및 정밀성		회수율	안정성	비고
				시험내	시험간			
4. 생체시료								
가. 기원								
1) 공급업체 변경	○							
2) 형태 변경(혈장, 혈청, 뇨 등)	○	○	○	○	○	○	○	
3) 유사 생체시료 변경	○	○	○	○	○	○	○	
나. 처리								
1) 보존제 변경	○	○	○	○	○	○	○	
2) 항혈액응고제 변경	○	○	○	○	○	○	○	
3) 항혈액응고제에 대한 카운터 이온 변경	×	×	×	×	×	×	×	
4) 채취 방법 변경	×	×	×	×	×	×	×	
5) 채취 용기 변경	×	×	×	×	×	×	×	
6) 보관 용기 변경	×	×	×	×	×	×	×	
7) 보관 온도를 높게 변경	×	×	×	×	×	×	○	
8) 보관 온도를 낮게 변경	×	×	×	×	×	×	×	
9) 열처리	×	×	×	×	×	×	○	
* ○: 평가 항목, ×: 면제 항목								

가. ‘기원’란 중
1. ‘3) 형태 변경(혈장, 혈청, 뇨 등)’
같은 물질을 분석하더라도 생체시료의 형태(혈장, 혈청, 뇨 등)에 따라 전처리 방법(예: 혈장의 경우에는 재단백, 뇨의 경우에는 LLE)이 달라지는 경우가 많다. 따라서 전체 밸리데이션이 요구된다.

2. ‘4) 유사 생체시료 변경’

‘유사생체 시료 변경‘이라 함은 밸리데이션을 수행하기에 충분한 시료를 얻을 수 없는 경우 이를 대신할 만한 다른 형태의 생체시료를 이용함을 뜻한다. 유사 생체 시료로 변경하는 경우, 생체 시료 내에서의 안정성, 생체시료효과 등이 다르게 나타나 분석법에 영향을 줄 수 있으므로 전체 밸리데이션을 수행해야 한다.

시험항목 / 변경 항목	선택성	최저정량한계	검량선	정확성 및 정밀성		회수율	안정성	비고
				시험내	시험간			
5. 시약 및 재료								
1) 시약 제조처 변경	×	×	×	×	×	×	×	
2) 시약 등급 품질의 상향 변경	×	×	×	×	×	×	×	
3) 시약 등급 품질의 하향 변경	○	○	○	○	×	×	×	
4) 내부표준물질 변경	○	○	○	○	○	○	○	
5) 표준품 제조원 변경	○	○	○	○	○	×	×	
6) 시험법에 사용된 마개의 변경(예 : 플러그와 스크류)	×	×	×	×	×	×	×	
7) 튜브 구성성분의 변경(예 : 플라스틱과 유리)	○	○	○	○	×	×	×	
8) 초자류 관리방법 변경	○	○	○	○	×	×	×	
9) 고체상추출카트리지(SPC)의 로트번호 변경	×	×	×	×	×	×	×	
10) 고체상추출카트리지의 제조처 변경	○	○	○	○	×	○	×	
11) 고체상추출카트리지의 정지상 변경	○	○	○	○	×	○	×	
12) 고체상추출카트리지에 충전물질의 양 변경	○	○	○	○	×	○	×	
- 로딩 가능한 시료(혈장, 혈청, 뇨 등)의 양 변경인 경우	○	○	○	○	○	○	×	
* ○: 평가 항목, ×: 면제 항목								

5. ‘시약 및 재료’란 중

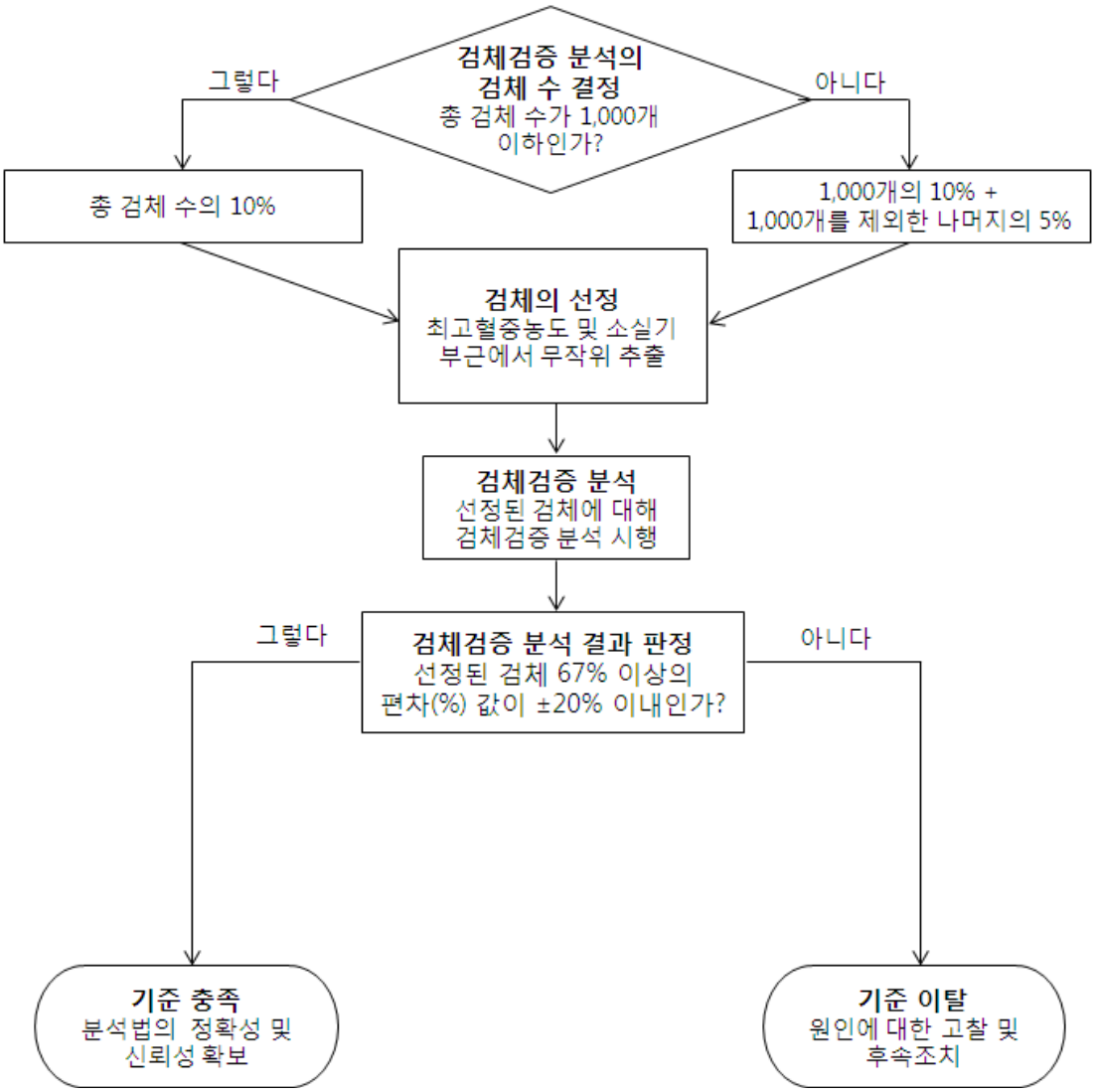
1. '4) 내부표준물질 변경'

내부표준물질 변경은 내부표준물질의 농도 또는 종류의 변경을 의미한다. 농도 변경의 경우 선택성, 최저정량한계, 검량선, 정확성, 정밀성, 회수율 시험이 요구되며 종류 변경의 경우 추가적으로 내부표준물질의 안정성 시험이 요구된다.

2. ‘5) 표준품 제조원 변경’

표준품 제조원 변경 시에는 순도, 염 등이 바뀔 수 있으므로 선택성, 최저정량한계, 정확성 및 정밀성이 요구된다.

부록 2 검체검증분석 방법



생체시료 분석법 밸리데이션 가이드라인

발 행 일 2013월 12월

발 행 인 의약품안전국장 유무영
의약품심사부장 이선희

발행위원 의약품안전국 의약품정책과
김성호, 김명호, 옥기석, 오정원, 유대규, 왕소영, 박희영, 안명수, 임상우, 김지연, 현미영, 정명훈, 박선임, 박원영, 한기태, 전보명, 김규서

의약품심사부 약효동등성과
서경원, 홍정희, 조창희, 박현주, 이윷모, 정신애, 김미애, 김지명, 엄소영, 배수영, 박윤상, 손추영

발 행 처 식품의약품안전처 의약품안전국 의약품정책과
식품의약품안전평가원 의약품심사부 약효동등성과

의약품정책과 : T. 043-719-2641 / F. 043-719-2606

약효동등성과 : T. 043-719-3163 / F. 043-719-3150

청렴韓세상
Korea, a country of integrity

직무와 관련된 금품 · 향응을
주고받지 맙시다.

행복한
대한민국을 여는
정부 3.0
[개방 · 공유 · 소통 · 협력]

식품의약품안전처
MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY