

# Analytical Method Validation for Bioequivalence Test : A Practical Approach

Chong-Kook Kim (Seoul Natural University, Korea)

의약품을 인체에 적용하기 위해서는 원료가 되는 약리 활성 물질 및 그 제제가 효과적이며 안전하다는 것을 입증해야 한다. 의약품의 효과 및 안전성을 입증하는 한 단계로서 원료 물질이나 제제가 필요한 약리활성물질을 목적하는 양 만큼 함유하고 있으며, 인체에 적용할 수 있는 순도를 가지고 있다는 것을 증명하기 위한 분석 과정이 포함된다. 이러한 약물 분석을 성공적으로 수행하기 위해서는 선택성(selectivity) 및 감도(sensitivity)가 우수한 분석법이 필수적이다. 따라서 약물 분석 시에는 분석법의 신뢰성을 확보하는 것이 우선 과제이다. 어떤 물질의 분석에 채택된 특정 방법의 타당성 및 신뢰성을 증명하는 과정을 총칭하여 분석법 검증(analytical method validation)-이라고 한다. 따라서, 분석법 검증은 어떤 물질에 대해 설정된 분석법이 그 물질의 확인이나 불순물 검출, 정량 등에 가장 적합한 것인지를 확인하는 것이 그 목적이라고 할 수 있다.

분석법 검증 시 검토해야 할 항목으로는 특이성(specificity), 정량 범위(range), 직선성(linearity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 검출 한계(LOD), 정량 한계(LOQ), 확신성(robustness) 등 여러 가지가 있다. 이러한 항목들은 항상 고정되어 있는 것이 아니다. 즉, 분석의 유형에 따라 평가 항목이 가감될 수 있으며 한 항목의 평가 기준도 달라질 수 있다. 분석법 검증에는 그 방법이 분석의 목적에 적합하고 신뢰할 만하다는 것을 입증하는 실험 연구 자료가 포함되어 있어야 한다. 분석 데이터의 수용 여부는 분석 과정이 그 분석법의 검증 시 채택한 기준에 부합되는지에 따라 결정된다.

특정 분석법을 검증하는 과정은 (1) 표준품(reference standard)의 제조, (2) 분석법 개발과 확립을 위한 연구 전 검증(pre-study validation), (3) 연구 수행, 약물 분석을 포함하는 연구 시 검증(in-study validation), (4) 문서화(documentation)로 나눌 수 있다.

공식적으로 확립된 분석법도 분석을 수행하는 실험실의 필요에 따라 변형하는 경우가 종종 있다. 이러한 경우에는 변형된 부분에 관한 검증이 필요하며, 분석자는 어느 정도의 추가 검증이 필요한지 판단해야 한다. 크로마토그래피에서 좀 더 좋은 분리 결과를 얻기 위해 용출액 조성비나 완충계(buffer system), 매질의 추출 횟수를 변화시키거나 컬럼 온도를 소폭 조정하는 등 원래의 방법에 약간의 변화만 가한 경우에는 필요한 부분에 대해 일부만 검증해도 된다. 그러나 기구,

용매계(solvent system), 검출기, 온도 등에 변화를 주어 원래의 방법과 크게 달라진 경우에는 변형된 방법 전체를 검증해야 한다.

분석을 실시하는 실험실은 분석법의 완전성을 보증할 수 있는 표준 작업 지침서(standard operating procedures; SOPs)를 문서화하여 가지고 있어야 한다. 표준 작업 지침서는 시료가 실험실에 도착한 순간부터 분석 결과를 보고하기까지 분석의 모든 과정을 포함해야 한다. 또한 표준 작업 지침서는 기록 관리, 시료 보관의 안전성, 시료 제조, 그리고 분석 도구(방법, 시약, 장비, 기구, 품질 관리 결과를 입증하는 실험과정 등) 등의 내용도 포함해야 한다.

본 발표에서는 약물 분석 중 특히 생체 매질을 이용하여 임상약리학적 연구나 생체 내 이용률(bioavailability) 연구, 생물학적 동등성(bioequivalence) 연구를 하는 경우의 분석법 검증(bioanalytical method validation)에 대하여 상세히 설명하고자 한다.

## Bioanalytical Method Validation

생체 내 이용률, 생물학적 동등성 및 약물체내속도론적 연구를 위해서는 우선 생체 시료에서 약물 및 그 대사체를 정량 분석하는 방법이 제대로 확립되어야 한다. 즉, 완벽하게 검증되고 특성화된 분석법을 도입하여 신뢰할 만한 데이터를 얻은 후에야 그 데이터를 평가하고 해석한 결과가 의미를 가지게 된다. 이 항목에서는 임상약리학 및 생체 내 이용률(bioavailability), 생물학적 동등성(bioequivalence), 약물체내속도론(pharmacokinetics) 연구 시 사용하는 분석법의 검증에 대하여 서술하였다. 이 항목은 다시 일반적인 약물 분석을 위한 화학적 분석법(chemical assay)과, 면역학적 및 미생물학적 분석법(immunological and microbiological assay)으로 구분하였다.

### 1. 일반적인 약물 분석법의 검증 : 화학적 분석법 (Chemical Assay)

#### A. 표준품 (Reference Standard)

생체 매질 내의 약물이나 대사체를 분석할 경우에는 항상 검량선용 표준 물질(calibration standard)로 제조한 시료와 품질관리시료(quality control sample; QC sample)를 사용한다. 표

준 물질 시료 제조에 사용하는 표준품의 품질은 연구 결과에 영향을 줄 수 있다. 따라서 인증된 표준품을 사용하여 기지 농도의 시료를 제조해야 한다. 표준품은 가능하면 분석 목적 물질과 동일해야 하나, 이것이 불가능한 경우에는 순도를 알고 있는 기존의 물질(established chemical form)(free base나 acid, salt, ester)을 대체품으로 사용할 수 있다. 일반적으로 다음과 같은 3가지 형태의 표준품을 사용한다.

- (1) 허가된(certified) 표준품 (예: USP에 기재된 표준 물질(USP compendial standard))
- (2) 신용 있는 출처로부터 구입한 시판용 표준품
- (3) 분석실험실이나 다른 비영리기관에 주문 합성한 것으로 순도가 입증된 물질

각 표준품에 대해서는 공급처와 제조번호(lot number), 가능한 경우 분석증명서, 또는 내부나 외부에서 발행한 확인서(identity)와 순도 증명서를 제출해야 한다. 각 표준품에 대해서는 master standard(identity와 순도가 명확히 입증된 합성 군(batch))가 있어야 한다. 그 후에 합성된 모든 군(batch)은 크로마토그래피를 사용하여 master standard와 비교해야 한다. 모든 표준품(reference material)은 사전에 목적 연구에서 사용할 방법으로 분석하여 분석 목적 물질이나 내부표준물질의 머무름 시간에서 유의성 있는(significant) 간섭이 있는지를 먼저 확인해야 한다.

#### B. 연구 전 검증 (Pre-Study Validation): 분석법 개발 - 방법확립

연구 전 검증은 새로운 분석법을 개발하거나 또는 특정 연구소에서 기존의 분석법을 확립하는 단계에서의 분석법 검증을 의미한다.

- ✓ 분석법을 확립하기 위해서는 우선 분석법에 대해 명확하고 자세하게 설명하고 프로토콜을 기술해야 한다(standard operating procedure; SOP).
- ✓ 시료 채취 시점부터 분석 완료 시점까지 주변환경, 매질, 시료, 분석 과정상의 변수들이 매질 내의 분석 목적 물질에 어느 정도 영향을 미치는가를 분석 단계별로 조사하여 결정해야 한다. 생리적 상태에 따른 매질의 변동도 고려해야 한다.
- ✓ 분석법을 사용하기 위해서는 적절한 프로토콜을 사용하여 검증해야 한다. 분석법의 타당성을 주장하거나 그 결론을 이끌어내기 위해 사용한 모든 실험을 보고서에 제시해야 한다 (method validation report).

- ✓ 가능하면 목적 시료와 동일한 생체 매질을 사용하여 분석법을 검증해야 한다. 골수와 같이 얻기 힘든 조직의 경우에는 생리학적으로 적절한 대체 매질(proxy matrix)을 사용해도 무방하다.
- ✓ 시료 분석에 앞서 시료채취기간 및 시료보관기간 동안 분석 목적 물질(약물 또는 대사체)이 매질에서의 안정한가를 우선적으로 검토해야 한다. 약물을 투여한 피험자로부터 얻은 매질에서의 분석 목적 물질의 안정성을 확인할 것을 권장하고 있다.
- ✓ 내인성물질, 대사체, 알려진 분해산물에 대한 분석법의 특이성, 정확도, 정밀도, 재현성, 반응 계수(response function)는 생체 매질을 기준으로 확립해야 한다. 특이성의 경우에는 정량하는 물질이 분석 목적 물질이라는 증거가 있어야 한다.

#### (1) 특이성 (특이성)

생체 매질로 연구하는 경우에는 특히 생체 매질에 존재하는 내인성물질, 영양소, 대사체, 분해 산물이 간섭을 일으키지 않음을 증명해야 한다. 따라서 특이성을 시험하기 위해서는 적당한 생체 매질(plasma, urine 등)의 공시료(blank sample)가 필요하다. 공시료는 하루중의 시간, 음식 등 연구에 영향을 주는 인자들을 고려하여 제한된 조건 하에서 적어도 6개체로부터 얻어야 한다. 각 공시료는 주어진 추출과정과 크로마토그래피 또는 분광분석 조건을 적용하여 간섭이 있는지 시험한다. 그 결과는 정량 한계(LOQ) 근처 농도로 제조한 분석 목적 물질의 수용액과 비교한다.

약물이나 대사체, 또는 내부표준물질(internal standard)의 머무름 시간(retention time)에서 유의성 있는(significant) 간섭을 나타내는 공시료는 사용하지 않도록 한다. 공시료의 10% 이상에서 간섭이 나타나면 다른 매질의 공시료를 시험해 본다. 만약 다른 공시료도 여전히 10% 이상 간섭을 보인다면 간섭이 나타나지 않는 다른 분석법으로 바뀌어야 한다.

생체매질에 존재할 수 있는 간섭물질로는 매질의 내인성 성분, 대사체, 분해산물, 공존 약물 등이 있다. Nicotine, OTC 약물(caffeine, aspirin, acetaminophen, ibuprofen 등) 및 그 대사체는 항상(routinely) 검사해야 한다. 둘 이상의 분석물을 동시에 정량하는 경우에는 각각의 분석물을 따로 주입(injection)하여 머무름 시간을 정하고, 한 분석물로부터 나온 불순물과 다른 분석물의 머무름 시간이 같지 않다는 것을 확인해야 한다.

## (2) 정량범위 및 검량선 (Range and Calibration curve)

정량 분석 시 농도 범위는 그 범위의 표준 시료(standard sample)를 사용하여 평가하여 통계적 편차와 함께 제시해야 한다. 이것은 검량선(calibration/standard curve)을 규정짓는다. 따라서 검량선은 매질 내에서 분석물을 신뢰성 있게(reliably) 정량할 수 있는 농도 범위를 보인다고 할 수 있다. 검량선은 분석 날짜마다 작성해야 하며, 검량선의 일내 및 일간 변동(within- and between-day variability)과 변동계수(coefficient of variation; CV)를 함께 제시해야 한다. 이 항목들은 그 검량선의 수용 여부를 결정할 때 사용된다. 검량선은 적당한 방정식을 사용하여 표시해야 한다.

검량선(calibration)은 분석물의 농도와 기계의 반응 사이의 관계를 의미한다. 따라서 검량선은 시료 중의 각 분석물에 대해 작성해야 한다. 농도와 반응 사이의 관계는 지속적이고 재현성이 있어야 한다. 적절한 농도와 반응 사이의 관계를 얻기 위해서는 충분한 수의 표준 시료(standard)가 필요하다. 표준 시료는 연구에서 사용할 시료와 동일한 생체 매질에 기지 농도의 분석 목적 물질을 넣어 제조한다. 검량선 작성 시 필요한 표준 시료의 수는 예상하는 분석값의 범위와 분석물/반응 관계의 성격에 따라 달라지게 된다. 표준 시료의 농도는 그 연구에서 예상하는 농도 범위에 근거하여 선택해야 한다.

검량선 작성 시에는 공시료(내부표준물질을 넣지 않은 매질 시료), zero 시료(내부표준물질을 넣은 매질 시료), 그리고 정량 한계 및 예상 농도 범위를 포괄하는 5~8개의 non-zero 시료를 사용한다. 이 중 공시료와 standard zero 시료는 검량선 함수 결정에는 사용하지 않고 간접 평가에만 이용한다.

검량선으로부터 조사할 수 있는 다른 항목으로는 정량 한계와 직선성이 있다.

## (3) 정량 한계 (Limit Of Quantitation ; LOQ)

정량 한계는 표준 시료와는 별개인 시료를 적어도 5개 사용하며, 변동계수(coefficient of variation) 또는 적절한 신뢰구간(confidence interval)을 구하여 결정한다. 보통 20% 이내의 일내 및 일간 변동계수(intra- and inter-day coefficient of variation)로 정량이 가능한 최소 농도를 정량 한계로 생각한다.

다음과 같은 조건을 만족하는 경우 검량선 작성에 사용된 표준 시료 농도 중 최저 농도를 정량 한계로 사용할 수 있다.

- ✓ 공시료에서 분석 목적 물질의 머무름 시간에 간섭이 없거나, 또는 이 농도의 분석 목적 물질의 반응(response)이 공시료에 있는 간섭물질보다 5배 이상 큰 경우
- ✓ 분석 피크/반응을 20%의 정밀도와 80~120%의 정확도로 분석 목적 물질이라고 증명할 수 있으며(identifiable) 다른 물질과 구별되고(discrete) 재현성이 있는(reproducible) 경우

#### (4) 직선성 (Linearity)

직선성은 검량선으로부터 조사할 수 있다.

직선성 검토 시에는 가중치가 없거나 최소인 가장 간단하면서도 유효한 회귀방정식을 사용해야 한다. 가중치를 사용하거나 다중회귀방정식을 선택할 경우에는 충분한 근거를 제시해야 한다.

검량선 작성 시 다음과 같은 4가지 조건을 만족시켜야 직선성을 증명할 수 있다.

- ✓ 정량 한계 측정치와 이론적인(nominal) 농도의 편차는 20% 이내이어야 한다.
- ✓ 정량 한계 이외의 표준 시료의 측정 농도와 이론적인(nominal) 농도의 편차는 15% 이내이어야 한다.
- ✓ 정량 한계와 최고 농도의 표준 시료를 포함하여 6개의 non-zero standard 중 적어도 4개는 기준(criteria)에 맞아야 한다.
- ✓ 상관계수(r)는 0.95 이상이어야 한다.

#### (5) 정밀도, 정확도 및 회수율 (Precision, Accuracy and Recovery)

정밀도는 한 농도 당 최소 5번 정량하여 평가해야 한다. 예상 범위 내에서 최소 3개의 농도(정량 한계 부근, 검량선의 중간 부근, 검량선의 고농도 부근)를 사용하는 것이 권장된다. 정량 한계를 제외하고는 각 농도에서 측정된 정밀도가 15% 변동계수(coefficient of variation; CV)이내이어야 하며, 정량 한계에서는 20% 변동계수를 초과해서는 안된다.

정확도는 기지량의 분석물을 포함하는 시료의 반복(replicate) 분석에 의해 결정한다. 예상되는 농도 범위에서 최소 3개의 농도(정량 한계 부근, 검량선의 중간 부근, 검량선의 고농도

부근)에 대해 각각 최소 5번의 정량을 실시해야 한다. 평균값은 정량 한계를 제외하고는 실제 참값의 15% 이내에 들어야 한다. 정량 한계에서는 20% 이상을 벗어나서는 안된다. 참값으로부터의 편차를 정확도의 척도로 사용한다.

회수율은 분석 목적 물질을 생체매질에 첨가한 후 회수하여 분석하였을 때 측정된 반응(response)을, 순수한 인증 표준 물질의 반응과 비교하여 평가한다. 회수율은 변동(variability)의 한도 내에서 분석 방법의 추출 효율과 관계된다. 회수율은 100%에 가까울수록 바람직하지만, 측정된 회수율이 정밀하고 정확하며 재현성이 있다면 분석 목적 물질이나 내부표준물질의 경우에는 50~60% 정도로 낮을 수도 있다. 회수율은 3 농도(저농도, 중간 농도, 고농도)의 시료를 추출하여 분석한 결과를, 추출하지 않은 같은 농도의 표준 시료(100% 회수율)의 분석결과와 비교하여 평가한다.

#### (6) 품질관리시료 (Quality Control Samples ; QC Samples)

연구 전 검증은 각각 기원이 다른 적어도 3군의 생체 매질을 사용하여 수행한다. 각 군(batch)에는 i) 공시료, zero 시료, 그리고 5~8개의 non-zero 시료를 사용하여 작성한 검량선, ii) 정량 한계의 품질관리시료(LOQ QC sample), iii) 저농도의 품질관리시료(Low QC sample), iv) 중간 농도의 품질관리시료(Medium QC sample), v) 고농도의 품질관리시료(High QC sample), vi) 매질의 공시료, vii) 표준품(reference standard)이 포함되어야 한다. 다음에 열거한 품질관리시료는 표준 시료 제조에 사용한 것과는 다른 별도의 원액(stock solution)을 사용하여 제조해야 한다.

*LOQ QC sample* : 가장 낮은 농도의 non-zero 시료와 같은 농도

*Low QC sample* :  $\leq 3 \times \text{LOQ}$

*Medium QC sample* : 고농도의 품질관리시료와 저농도의 품질관리시료의 중간 농도

*High QC sample* : 검량선의 최고농도의 75~90%

첫번째 군(first batch)으로 검량선용 표준 시료와 품질관리시료를 정확하게 제조하였는지 검토해야 한다. 일내 정밀도(Intra-day(within batch) precision)[=반복성(repeatability)], 일간 정밀도(inter-day(between batch) precision)[=중간 정밀도(intermediate precision)], 정확도, 회수율은 품질관리시료의 반복(replicate) 분석 및 표준 시료의 2회(duplicate) 분석 데이터를 이용하여 구한다.

군내 데이터(Within-batch data)는 각 군의 품질관리시료 농도 각각에 대해 평균, 표준편차, 변동계수(CV)를 구하여 얻는다. 군간 데이터(Between-batch data)를 얻기 위해서는 3군의 동일 농도의 품질관리시료 전체에 대해 평균, 표준편차, 변동계수를 계산해야 한다. 정밀도는 %CV로 표시하며, % 정확도는 측정된 품질관리시료의 평균 농도를 이론적인(nominal) 농도로 나누고 100을 곱해 구한다.

#### (7) 안정성 (Stability)

체액에서의 약물의 안정성은 저장 조건, 약물의 화학적 성질, 매질, 그리고 보관 시스템(container system)의 함수이다. 특정 매질이나 보관 시스템에서의 분석물의 안정성은 오직 그 매질과 보관 시스템에만 국한되며 다른 매질이나 보관 시스템에까지 연장하여 적용해서는 안된다. 안정성 시험에서는 장기간 보관(목적한 저장 온도와 조건에서 열려서 보관) 혹은 단기간 보관(실내 온도 및 조건에서 보관)한 시료에 대해 냉동 및 해동을 반복하고 분석과정을 거친 다음 체액에 있는 분석물의 안정성을 평가한다. 안정성 시험에는 또한 원액(stock solution)에서의 분석물의 안정성도 포함된다.

모든 안정성 시험에서는 분석 목적 물질 및 간섭물질이 없는 적절한 생체매질로 분석물의 원액을 새로 만들고, 이 원액으로 일련의 표준물질 시료를 제조하여 사용한다. 안정성 평가에 사용되는 원액은 SOP에 규정된 농도로 제조한다. 안정성 검증에 대한 상세한 내용은 다음의 5개 항목과 같다.

##### i) 냉동 및 해동 안정성 (Freeze and Thaw Stability)

냉동 및 해동에 대한 분석 목적 물질의 안정성은 3번의 냉동과 해동을 반복하여 결정한다. 저농도와 고농도 시료를 각각 3개씩 사용한다. 시료를  $-20^{\circ}\text{C}$ 나 또는 원하는 보관 온도에서 24시간 동안 저장하고 실온에서 자연 해동한다. 완전히 해동이 되면 시료를 다시 원래의 냉동고에서 12~24시간 동안 재냉동한다. 해동과 냉동을 한 번 더 반복하고 3번째 해동이 끝난 후 시료를 분석한다. 분석물이  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 불안정하면  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 시험한다.

##### ii) 단기 실온 안정성 (Short-Term Room Temperature Stability)

저농도와 고농도 시료를 각각 3개씩 사용한다. 시료를 실온에서 해동하고 4~24시간(목적 연구에서 예상되는 시료의 실온 보존 시간에 근거를 둠) 동안 방치한 후 분석한다.



iii) 장기 안정성 (Long-Term Stability)

장기 안정성 평가 시 시료의 보존 기간은 최초의 시료 채취 시점부터 시료 분석 완료 시점까지의 기간보다 길게 잡아야 한다. 장기 안정성은 저농도와 고농도 시료를 각각 적어도 3개씩 사용하여 연구에서와 같은 조건으로 보관하여 시험한다. 생체매질에서 대부분의 약물과 대사체의 보관 온도로는  $-20^{\circ}\text{C}$ 가 권장되나, 약물이 분해되는 경우에는 더 낮은 온도(예:  $-70^{\circ}\text{C}$ )도 무방하다. 각 시료의 부피는 모두 충분히 분석할 정도가 되어야 한다. 안정성 시험을 거친 시료의 농도를, 표준 물질에 대해 시험 첫날으로부터 역으로 계산한 농도의 평균값과 비교한다.

iv) 원액의 안정성 (Stock Solution Stability)

약물과 내부표준물질의 원액은 우선 실온에서 최소 6시간 방치하여 안정성을 평가한 후, 7~14일 또는 다른 적절한 기간 동안 냉장보관하거나 냉동보관한다. 예정한 보관 기간이 지나면 새로 제조한 용액의 response와 비교하여 안정성을 평가한다.

v) 자동시료주입기 안정성 (Autosampler Stability)

자동시료주입기에서 조작하는 시료는 목적 연구에서 지정한 자동시료주입기 온도에서 안정성 시험을 해야 한다. 자동시료주입기 온도는 보통 실온이지만 경우에 따라 더 낮은 온도(예: 냉각시킨 자동시료주입기를 사용하는 경우)가 될 수도 있다. 또한 자동시료주입기 안정성은 목적 연구에서 예상되는 분석 수행 시간(run time)에 걸쳐 조사해야 한다. 약물과 내부표준물질 모두 검량선을 근거로 농도를 산정하여 안정성을 평가한다.

여기에서는 분석물의 안정성 평가 방법으로 저장 시료의 분석 결과를 새로 제조한 시료와 비교하는 전통적인 접근법을 언급하였지만, 신뢰한계(confidence limit)에 근거를 둔 통계학적인 접근법도 SOP 개발 시 사용할 수 있다. 어떤 접근법을 사용하든, 사용한 통계학적 방법과 규칙(rule)은 SOP에 분명하게 상술해야 한다.

(8) 채택 기준 (Acceptance Criteria)

분석법이 다음의 기준을 충족시키면 그 분석법은 완전히 검증된 것으로 생각한다.

**정밀도** : 저농도, 중간농도, 고농도에서의 between-batch CV는 15% 이내이어야 하며, LOQ QC는 20% 이내이어야 한다.

**정확도** : 저농도, 중간농도, 고농도에서의 between-batch 평균값은 이론값(nominal value)의 15% 이내이어야 하며, LOQ에서는 20% 이상의 편차가 나면 안된다.

**강도** : LOQ QC에서의 between-batch CV가 20% 이내인 경우, 가장 낮은 표준 물질 농도가 LOQ로 인정된다.

**특이성** : 분석 목적 물질의 머무름 시간에서 피크가 나타나는 간섭물질은 그 반응 크기가 LOQ standard의 20% 이내이어야 한다. 내부표준물질의 머무름 시간에서 피크가 나타나는 간섭물질은 그 반응 크기가 내부표준물질(연구에서 사용하는 농도)의 5% 이내이어야 한다.

**안정성** : 장기, 단기, 냉동 및 해동, 저장용액, 자동시료주입기 안정성 결과는 SOP에 명시된 기준을 만족시켜야 한다.

### C. 연구 시 검증(In-Study Validation) : 실제 분석에의 적용

연구 시 검증을 하는 경우에도 연구 전 검증의 검증 원리 대부분이 적용된다.

분석 목적 물질이 생체 매질에 있는 시료는 안정성이 입증된 기간 내에 분석을 완료해야 한다. 일반적으로 생체 시료의 분석에서는, 분석법의 정확도와 정밀도가 허용오차 내에 있으면 중복(duplicate) 또는 반복(replicate) 분석을 하지 않고 한 번의 정량만으로 결과를 얻는다. 그러나, 불안정한 분석물을 분석하는 경우에는 우수한 정밀도와 정확도를 얻기 힘들기 때문에 좋은 분석 결과를 얻기 위해서는 2회 또는 3회의 반복(replicate) 분석을 하는 것이 좋다. 검량선은 각 분석 주기(analytical run)마다 모든 분석물에 대해 작성하여 미지 시료 중의 분석 목적 물질 농도 계산에 사용한다. 한 분석 주기는 한 군(batch)으로 분석할 시료 전체가 될 수도 있고, 1명 또는 그 이상의 지원자의 미지시료, 품질관리시료, 검량선으로 구성된 한 군으로 이루어질 수도 있다.

검량선은 정량 한계와 미지 시료의 예상 농도 범위를 포괄해야 한다. 정량 한계 이하나 검량선의 최고농도 이상으로 외삽하여 미지 시료의 농도를 구하는 것은 바람직하지 않다. 이런 경우에는 검량선을 다시 작성하거나, 또는 고농도 시료의 경우 희석하여 분석해야 한다. 피험자로부터 얻은 모든 연구용 시료는 한 번 분석하도록 한다.

일단 분석법이 통상적으로 사용될 수 있도록 검증이 되면, 정확도와 정밀도를 정기적으로 조사하여 확인해야 한다. 이를 위해서는 전체 시료 수에 근거하여 어느 정도 간격을 두고, 별도로 제조한 품질관리시료와 시험용 시료를 함께 분석해야 한다. 각 분석주기마다 품질관리시료를 3농도(정량 한계 근처(예:  $\leq 3 \times LOQ$ ), 중간 범위, 고농도 끝 부근)에서 중복 측정하도록 한다. 품질관리시료의 측정 결과는 그 분석주기 데이터의 수용여부를 결정하는 근거를 제공해 준다. 6개 품질관리시료 중 적어도 4개는 각각의 이론값(nominal value)의  $\pm 20\%$  이내에 들어야 한다. 6개 품질관리시료 중 2개는 각각의 이론값(nominal value)의  $\pm 20\%$ 를 벗어날 수 있다. 단, 2개의 시료가 같은 농도이면 안된다.

#### D. 문서화(Documentation)

실험적 연구를 통해 분석법이 확립되면 그 과정 및 결과를 분석법 검증 보고서로서 문서화해야 한다. 분석 결과가 연구 목적에 부합하는 경우 자세한 방법을 기술한 프로토콜이 매우 중요하다. SOP를 작성하고 자료를 보관하는 것은 분석법 검증의 필수적인 부분이다. 분석 프로토콜 및 SOP는 실험실 관리자에게 결재를 받고 정기적으로 보완해야 한다. 시료의 재분석이 허가된 경우 SOP에 재분석 조건을 기재해야 한다. 재분석은 3번 반복하여 실시한다. 연구 전 검증의 실험 과정 및 그 결과는 실험 노트에 기록해야 한다. 실험실 관리자는 이 전 과정을 감독, 관찰하고 결재를 해야 한다.

연구 전 검증 문서에 포함되어야 할 사항

- ✓ 분석법에 대한 설명
- ✓ 안정성 시험 결과 및 근거 자료
- ✓ 정확도, 정밀도, 회수율, 특이성, 직선성, 정량 한계 결정을 위해 수행한 실험 및 실험으로부터 얻어진 관련 자료
- ✓ 일내 및 일간 정밀도(반복성 및 중간 정밀도) 및 정확도 도표
- ✓ 분석법 검증 시 사용한 약물의 표준 시료, 대사체, 내부표준물질의 순도 증명 자료

In-study validation 문서에 포함되어야 할 사항

- ✓ 시료 분석과 일내 정확도 및 정밀도 측정에 사용한 검량선
- ✓ 품질관리시료의 일내 수치에 관한 정보, 검량선과 품질관리시료로부터 얻은

일간 정확도 및 정밀도에 관한 자료

- ✓ 재분석 방법, 재분석의 이유, 재분석 시료의 채택 기준
- ✓ 제외된 시료가 있는 경우 그 이유
- ✓ 모든 미지 시료를 반복 분석한 경우 보고한 측정값을 채택한 이유
- ✓ 분석 프로토콜이나 SOP에서 벗어난 경우 그 이유 및 근거

기관에 제출하는 문서에 포함되어야 할 사항

- ✓ 연구 전 검증 데이터
- ✓ 검량선, 방정식, 사용한 가중치
- ✓ 연구 시 검증 데이터
- ✓ 표준 시료와 품질관리시료 및 피험자(subject)의 20%에 대한 완전한 크로마토그램
- ✓ 전체 SOP, 원 데이터(raw data), 농도 계산 결과, 재분석 시료 세트