

Gas-liquid Chromatography 를 利用한 Vitamin 製劑의 分析

嚴 泰 潤

(Received April 7, 1974)

Tae Yoon Eom: Analysis of Vitamins Preparations
by Gas-liquid Chromatography.

현재 공정서에 올라있는 vitamin 제제의 분석방법들은 일부 개개의 vitamin 에 대한 이화학적방법에 의한 정량법이 확립되어 있으며 대부분의 비타민에 대해서는 생물학적방법에 의한 시험법이 공정시험법으로 되어 있다.¹⁾ 생물학적방법에 의한 정량은 아직도 우리나라에 서는 극히 소수의 연구소나 실험실에서 만이 실험이 가능한 실정이며 이화학적방법에 의한 개개의 vitamin 의 정량은 vitamin 에 따라 다르기 시료의 전처리조작을 행하여야 하며, 특히 지용성비타민들인 vitamin A, D group, tocopherol 들은 그 전처리 과정이 더욱 복잡하고 많은 시간이 소요되며 또한 column chromatography 등의 숙달된 기술을 요하는 정제과정이 필요한 등의 많은 어려움이 따르고 있다(Table I).

최근에 gas-liquid chromatography (GLC)의 이용이 급격히 늘어나고 많은 약품의 정량이 GLC 를 사용함으로써 더욱 정확하고 보다 간편한 조작으로 짧은 시간내에 목적을 달성하고 있으며 vitamin 제제의 분석에 관하여도 많은 연구가 진행되어 제제중에서 vitamin 들의 분리정량이 많이 발표되고 있다. 그러나 지금까지는 한정된 일부 vitamin 들에 대해서만이 GLC 를 이용한 정량이 가능한 단계에 있으므로 앞으로 더욱 많은 노력이 이 분야의 연구에 경주되어야 할 것이라 생각된다.

GLC 를 이용한 vitamin 들의 분석은 직접 시료중의 vitamin 을 추출하여 GLC 를 행할 수 있는 경우도 있으며 또 trimethylsilane 화하여 이들의 volatility 를 높여 GLC 를 하여야 하는 경우도 있다. 일반적으로 trimethyl silyl agent 의 사용은 TMS 시약의 고가로 어려움이 있으나 짧은 시간에 정확한 결과를 얻을 수 있으며 여러종류의 vitamin 들을 동시에 분

From the Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

Table I—Official methods available for vitamin assay.

Vitamins	Spectroscopy			Titrat.	Remarks
	UV	Visible	Fluorosc.		
Vitamin A	0	0		0	*
Vitamin B ₁			0		*
Vitamin B ₂			0		
Niacin	0				**
Pantothenic acid					**
Vitamin B ₆					**
Folic acid		0			**
Biotin					**
Vitamin B ₁₂					**
Ascorbic acid		0		0	
Vitamin D	0	0			*
Tocopherols		0			**
Menadione		0			*
Inositol					**
Cholin		0			**

* Special technique is needed.

** Bioassay available

리정량할 수 있다는 이점도 있다. 또 TMS 이외에 다른 유도체, 예를 들면 acetylation, esterification 등으로 volatility를 높여 이용 가능한 방법등이 있으므로 더욱 많은 연구가 필요하리라 본다.

Tocopherols—GLC를 이용하여 제제중에서 tocopherol 유도체들의 분석은 1964년 이래 많은 연구자들에 의해 연구되었으며²⁻⁴⁾ 그 결과 간편한 분리조작만을 한후에 직접 GLC를 할 수 있는 방법들이 알려져 있으며 현재 사용되고 있는 Emmerie-Engel method보다 정확성이 좋다고 보고되었다(Table II).

이화학적 방법에 필수적인 시료의 전처리 조작인 saponification, extraction (분리조작), hydrogenation, column chromatography (정제조작) 등의 복잡한 과정이 필요없이 단지 제제를 잘 분쇄하여 *n*-hexane으로 추출하여 GLC를 행할 수 있다. 사용되는 column은 SE-30, OV-17, carbowax 20m 등이 있으나 현재까지는 SE-30을 사용하는 방법이 tocopherol과 tocopherol acetate의 분리에 좋은 점이 있으며 단지 tocopherol acetate와 tocopherol succinate가 분리되지 않은 단점이 있으나 위 두가지 물질이 함께 들어 있는 제제는 드물므로 별 문제가 되지 않으리라 생각된다. Tocopherol들의 분리에 사용된 대표적인 예와 그 조작조건은 아래와 같다.

Vitamin D group—Vitamin D들은 다른 fat-soluble vitamin들에 비하여 비교적 소량

Table II— Comparison of method on vitamin E.

Sample	Declared potency (mg)	USP XVII		CGL	
		mg	St. dev.	mg	St. dev.
1	12.4	11.8	3.0	9.3	0.6
2	5.0	3.4	2.4	2.4	0.6
3	200.0	170.8	32.3	199.3	9.6
4	2.0	2.0	0.6	1.8	0.3
5	73.5	73.7	8.5	79.9	3.2
6	73.5	74.1	10.8	81.2	8.3
7	2.0	1.7	0.5	2.4	0.1
Mean coefficient of variation		28.6		10.2	

Coefficient of variation=100 Sd/x

Ref: J, AOAC 52, 3 (1969)

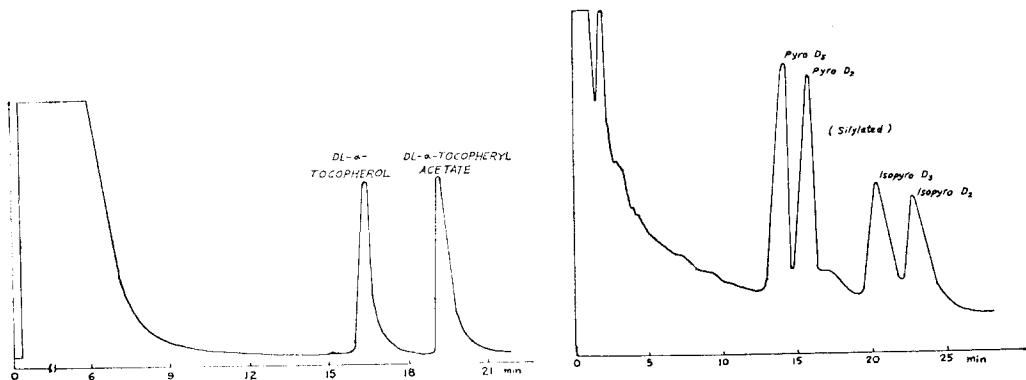


Fig. 1—Separation of tocopherols

Column: 5'×1/8" 3% SE-30-onaeropak 30 (100—120)
 Column temp: 225° isothermal
 Detector: FID N₂ as carrier gas

Fig. 2—Gas chromatogram of silylated vitamin D₃ and vitamin D₂ in a mixture of USP standards.

Column: 6'×1/4 OD 3% OV-210 on Chromosorb W(80—100)
 Column temp: 250°, Detector: 300° FID
 Injector: 280° N₂ as carrier gas

이 제제중에 들어 있으며 따라서 비색법이나 자외선흡수를 이용한 분석을 행함에 있어서 그 전에 더욱 완전한 정제과정 (clean-up procedures)을 거쳐야 한다.⁶⁻¹⁵⁾ 즉 saponification, extraction 후에도 2회의 column chromatography를 행하여 완전히 정제한 후에 정량을 하여야 하는 어려움이 있다(U.S.P. XVII). 그러나 GLC를 이용하여 vitamin D를 분석하는 경우 많은 조작이 생략되나 지금까지는 완전한 정량은 이루어 지지 않고 있으며 silylation을 하여서도 pyro-D group들이 나타나는 등 많은 문제점이 있는 실정이다.¹⁶⁻²⁴⁾ 그러나 A.O.A.C. 방법과 비교하여 볼 때 보다 정확한 분석결과를 얻을 수 있고 (Table III) vitamin

D₂ 와 D₃ 의 분리 정량이 가능한 이점이 있으므로 앞으로 더욱 많은 연구가 이루어져야 할 것이다(Fig. 2).

Table III—Comparison of method on vitamin D

No.	Theoretical I.U.	GLC		USP	
		X	CV%	X	CV%
1	125,000	123,000	1.3	86,000	8.9
2	642	786	3.5	636	9.3
3	125,000	115,000	16.3	76,600	12.8
4	913	961	6.7	803	14.5
5	125,000	122,100	5.4	101,000	8.9
6	640	608	5.0	486	8.7

Ref : *J.AOAC*, 53, 2(1970)

Pyridoxin, Ascorbic acid and Niacine— Pydoxin 과 ascorbic acid, niacine 은 쉽게 trimethylsilyl 유도체로 될 수 있으며 이 유도체들의 GLC 가 보고 되어 있으나²⁵⁻²⁸⁾ 이들은 순수한 시료에 대한 연구들이 있으며 최근에 이르러 제제중에서 이들의 동시 분리정량이 보고 되었다.²⁹⁾ Silylation agent 는 N,O-(bistrimethylsilyl)-acetamide (BSA)를 사용하여 시료를 잘 분쇄하여 methanol 로 추출하고 N₂ 기류로 용매를 날려 보낸 다음 internal standard 로 phenanthrene 을 사용하여 silylation 을 하고 GLC 를 행하였다. 기기조건은 아래와 같다. (Fig. 3)

Column: 8' × 1/8" OD 151% Dow corning high vacuum silicone grease on Gas chrom Q(60-80), Column temp.: 175° isothermal, detector: 200°, Injector temp: 200°, Carrier gas: He, Detector: Thermal conductivity detector.

위의 조건으로 GLC 를 행한 결과 보다 정확한 값으로 이들의 동시 정량이 가능하였으며 특히 pyridoxin 의 경우 이제까지 좋은 이화학적방법이 없어 정량이 불가능한 실정이었으나 앞으로 많은 응용이 기대되고 있다(Table IV).

Pantothenate 와 Panthenol—Pantothenic acid 또는 그 염류들과 panthenol 은 poly-hydroxy carboxylic organic compound 로 유기용매에 대한 용해도가 좋지 않고 열에 불안정한 화합물로서 또한 이들의 이화학적방법에 의한 정량법이 따로이 없어 생물학적방법에 의한 분석만이 유일한 방법이었다. 최근에 이들을 acetylation, trifluoroacetylation 또는 trimethylsilylation 등의 유도체로 만들어 GLC 를 행함으로써 이들의 정량이 가능하여 졌다.³⁰⁻³⁴⁾

이 유도체들의 합성방법을 요약하면 아래와 같다.^{35,36)}

1. Esterification 시료를 2.5%(W/W) methanolic HCl 또는 ethanolic-HCl 용액중에서

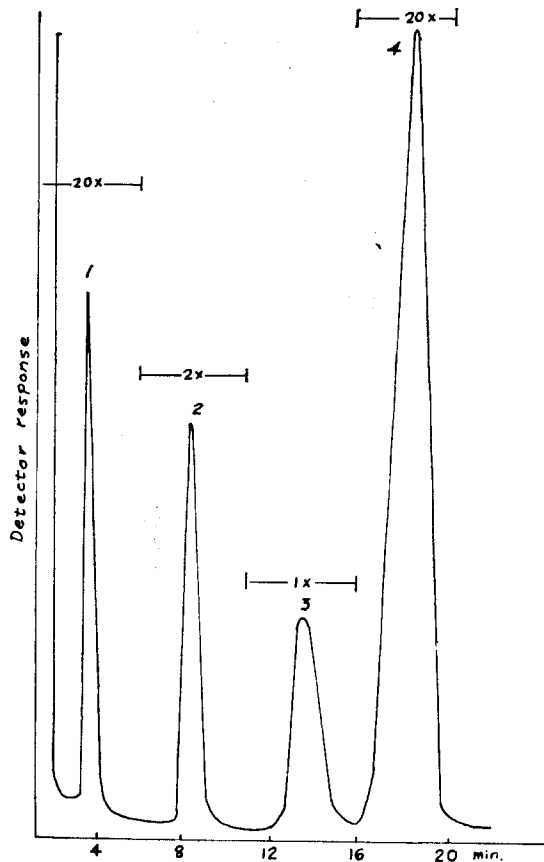


Fig. 3—Chromatogram of a vitamin preparation.

1 : Nicotinamide-TMS 2 : Phenanthrene 3 : Pyridoxine-TMS
4 : Ascorbic acid-TMS

Column: 8'×1/8'' OD 15% Dow Corning high vacuum
Silicone grease on gas chrom. Q (60—80)

Column temp: 175° isothermal detector 200°

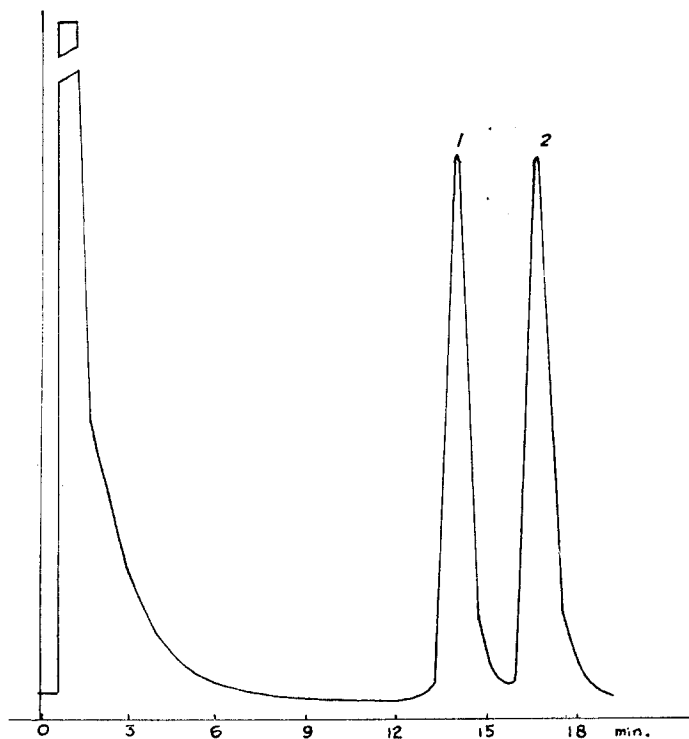
Injector 200°: He as carrier gas

실온에서 잘 저으며 반응시키고 용매를 진공농축기 (flash evaporator) 내에서 날려 보낸다.

2. Acetylation—위에서 만든 methyl 또는 ethyl ester 를 acetic anhydride-pyridine(1 : 1) 용액중에서 reflux하여 acetyl 화하고 용매를 날려 보낸다.
3. Trifluoroacetylation—1. 에서 만든 methyl 또는 ethyl ester 를 trifluoroacetic anhydride-pyridine 용액중에서 실온에서 반응시킨 다음 용매를 날려 보낸다.
4. Trimethylsilation—Ethyl ester 를 acetonitril B.S.A-TMCS(trimethylchloro silane)

Table IV—Comparison of methods on niacin, pyridoxin and ascorbic acid.

Component	Amount declared (mg)	% Found	
		GC	USP
Niacin	50	98	106
Pyridoxin	5	106	108
Ascorbic acid	300	107	109
Niacin	50	102	112
Pyridoxin	5	105	106
Ascorbic acid	300	110	108

Ref: *Anal. Chem.*, 41, 1 (1969)**Fig. 4**—Chromatogram of Ca-pantothenate as (1) ethyl pantothenate diacetate and panthenol as the (2) triacetate.

Column: 244cm × 0.3cm 2.5%, NPGS 10% SE 30(w/w) on diatomaceous earth (100–120) Column temp: 225°,
 Detector: 280°, Injector: 280°

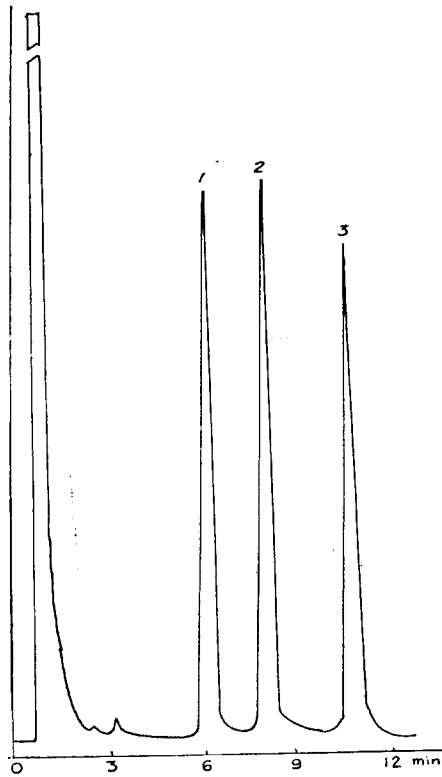


Fig. 5—Chromatogram of Ca-pantothenate as ethyl pantothenate diacetate (1) and panthenol as the triacetate (2), Column : 2.0% NPG Sb on Anachrm ABS (110—120), Column temp: 230°

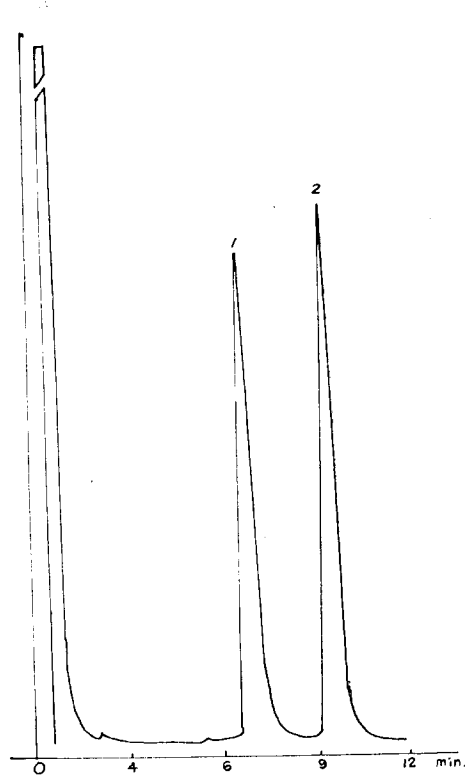


Fig. 6—Chromatogram of pyridoxol as the triacetate (1), Ca-pantothenate as ethyl pantotenate diacetate (2) and panthenol as the triacetate (3), on 2% NPG Sb.

(5 : 5 : 1) 용액으로 50°에서 반응시켜 얻는다.

위에 적은 방법들로써 얻은 pantothenic acid 유도체와 panthenol 유도체의 GLC 결과는 아래와 같다. (Fig. 4—6)

Fig. 4.5 및 6에서 나타난 바와 같이 이 두화합물의 분리는 아주 우수하며 또한 물층의 어떤 liquid phase를 사용하여도 무방하나 이 방법의 제제분석에의 응용은 다른 수용성 vitamin들인 ascorbic acid, niacin 등의 영향, 다른 방해물질들의 제거에 대한 연구등 앞으로 해결되어야 할 문제가 많은 것으로 알려져 있다.

그러나 지금까지의 연구결과는 적당한 이화학적방법이 없는 pantothenic acid의 정량에 GLC를 이용하면 우수한 결과를 얻을 수 있으리라 기대되는 바이다.

Menadions—Menadione 제제의 분석은 산화환원반응을 이용한 적정법이 공정시험법으로 되어 있으나 1965년 이래 GLC 를 이용한 방법들이^{37,38)} 보고되어 있으며 복합 제제중에서의 분리 정량도 가능하여 졌다.

방법을 약술하면 제제를 잘 분쇄하여 ether로 추출하고 용매를 날려 보낸 다음 hexane 중에 녹여 아래의 조건으로 GLC 를 행한다.

Column 6'×3mm I.D. pyrex glass column, 1% neopentylglycolsuccinate on gas chrom. Column temp: 135° isothermal, Detector temp: 200°, F.I.D., Injector temp: 215° 이상의 조건으로 실험한 결과는 아래와 같다 (Table V).

Table V—Comparison of method on vitamin K.

Declared potency	Found	
	NF	GLC
1mg/caps	1.10	1.02
1.34mg/tab	1.05	0.93
0.1mg/tab	0.1	0.1
5mg/tab	5.2	5.3
72mg/10ml	78.4	82.3
10mg/ml	11.4	11.3
5mg/ml	5.9	6.0
5mg/ml	5.5	5.6

Ref: *J.AOAC* 51, 1 (1968)

Biotin—Biotin 의 분석은 microbiological method 가 공정시험방법으로 되어 있으나 1969년 colorimetry를 이용하여 상당히 우수한 결과를 보고하고 있다.⁴⁰⁾ 또한 최근에 GLC 를 이용하여 *d*-biotin 의 trimethylsilyl 유도체로써 분석이 가능하여 졌으며 제제중에서도 좋은 결과를 나타내고 있다⁴¹⁾ (Table VI).

실험조작은 시료를 methanol로 추출하여 trimethylsilyl agent 로 B.S.A 를 사용하였으며 기기조건은 아래와 같다.

Column: 4'×1/8" 2% OV-17 on chromosorb G (70-80), Column temp: 190° isothermol, Injector: 275°, Detector: 275° FID N₂ as carrier gas.

위의 조건으로 행한 GLC 결과는 아래와 같다. (Fig. 7)

이상으로 지금까지 GLG 를 이용하여 vitamin 제제중의 tocopherols, vitamin D, ascorbic acid, niacin, pantothenic acid, pyridoxin, menadione, biotin 등의 분석방법들을 검토하고 그 결과를 현재 사용되고 있는 이화학적방법들과 비교하여 보았다. 최근에 GLC 를 이용하는 분석방법들이 더욱 개발되고 또한 우리나라에서도 이 기기를 보유한 실험실이 점차 늘어나고 있는 실정으로 볼 때 GLC 를 이용한 vitamin 들의 분석이 더욱 많이 연구되고 보다

Table VI—Comparison of methods on biotin.

Amount declared(mg)	Found		
	GLC.	Microbiol.	Colorimetry
10	9.5	11.7	9.2
10	11.1	11.6	10.8
10	10.9	11.9	10.4
10	10.9	11.4	10.2
10	10.1	10.9	10.2
10	10.1	10.0	9.2
10	10.8	10.4	10.8
10	10.4	10.3	10.5
10	10.7	11.2	10.7

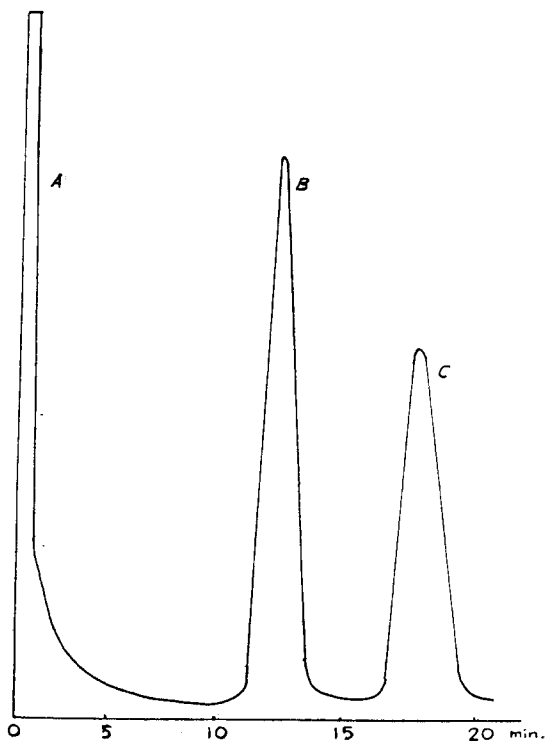
Ref: *J.Pharm. Sci.*, 59, 3 (1970)

Fig. 7—Standard chromatogram showing relative retention times of biotin TMS derivative and internal standard
 Key: A: solvent, B: biotin TMS: and C: *n*-octacosane
 Column: 4' × 1/8'' 2% OV-17 on Chromosorb G(70—80) Column temp: 190° Injector: 275°, Detector: 275° FID N₂ as carrier gas

좋은 방법이 확립되면 모든 실험실에서 보다 신속하고 간편한 방법으로 정확한 결과를 얻을 수 있으리라 생각되며 앞으로 더욱 많은 연구가 이 분야에서 행하여 질 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. The Association of Vitamin Chemists, Inc., *Methods of Vitamin Assay*, 3rd Ed. Interscience Publishers, 1966
2. D. A. Libby and A. J. Sheppard, *J. AOAC*, **47**, 371 (1964)
3. H. C. Pillsbury, A. J. Sheppard and D. A. Libby, *Ibid.*, **50**, 809 (1967)
4. P. B. Bowman and W. E. West, *J. Pharm. Soc.*, **57**, 470 (1968)
5. A. J. Sheppard, W. D. Hubbard and A. R. Prosser, *Ibid.*, **59**, 3 (1969)
6. R. K. Baura and M. V. K. Rao, *Analyst*, **89**, 534 (1964)
7. R. K. Baura and M. V. K. Rao, *Ibid.*, **90**, 571 (1965)
8. A. W. Norman and H. F. Deluca, *Anal. Chem.*, **35**, 1247 (1963)
9. F. Said, M. K. Salah and P. Girgis, *Analyst*, **87**, 459 (1966)
10. F. J. Mulder, E. J. de Baries and K. Keuning, *J. Pharm. Weekblad*, **100**, 1457 (1965)
11. G. M. Shue, *J. AOAC*, **48**, 855 (1965)
12. H. G. Leeman and K. Stich, *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1275 (1962)
13. L. T. Heaysman and E. R. Sawver, *Analyst*, **89**, 529 (1964)
14. G. Ponchon and F. X. Fellers, *J. Chromtog.*, **35**, 53 (1968)
15. K. H. Hanewald, F. J. Mulder and K. J. Keuring, *J. Pharm.Sci.* **57**, 124 (1968)
16. J. Vessman and G. Ahlen, *Acta. Pharm. Suecica*, **1**, 209 (1964)
17. T. K. Murray, K. C. Day and E. Kodicek, *Biochem. J.*, **98**, 293 (1966)
18. T. K. Murray, P. Erdody and T. Panalaks, *J. AOAC*, **51**, 839 (1968)
19. P. P. Nair, C. Bucana, S. de Leon and D. A. Turner, *Anal. Chem.*, **37**, 631 (1965)
20. P. P. Nair and S. de Leon, *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 663 (1968)
21. L. V. Avioli and S. W. Lee, *Anal. Biochem.*, **16**, 193 (1966)
22. A. J. Sheppard, D. E. Lacroix and A. R. Prosser, *J. AOAC*, **51**, 834 (1968)
23. P. W. Wilson, D.E.M. Lawson and E. Kodicek, *J. Chromatog.*, **39**, 75 (1969)
24. D. O. Edlund and J. R. Anfinsen, *J. AOAC*, **53**, 287 (1970)
25. L. T. Sennello, F. A. Kummerow and C. J. Argoudelis, *J. Heterocycl. Chem.*, **4**, 295 (1967)
26. W. Richter, M. Vecchi, W. Vetter and W. Walther, *Helv. Chem. Acta*, **50**, 364 (1967)
27. W. Korytnyk, G. Fricke and B. Paul, *Anal. Biochem.*, **17**, 66 (1966)
28. M. Vecchi and K. Kaiser, *J. Chromatog.*, **26**, 22 (1967)
29. L. T. Sennello and C. J. Argoudelis, *Anal. Chem.*, **41**, 1 (1969)
30. A. R. Prosser and A. J. Sheppard, *Federation Proc.*, **25**, 669 (1966)
31. A. R. Prosser, A. J. Sheppard and D. A. Libby, *J. AOAC*, **50**, 1348 (1967)
32. T. Imanari and Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **15**, 867 (1967)
33. A. R. Prosser and A. J. Sheppard, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1004 (1968)
34. Y. Ohnishi, Z. Hori, and M. Makita, *Yakugaku Zasshi*, **87**, 747 (1967)
35. W. Stoffel, F. Chu and E. H. Ahrens, Jr., *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959)
36. A. R. Prosser and A. J. Sheppard, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 718 (1969)

37. D. A. Libby and A. J. Sheppard, *J. AOAC*, **48**, 973 (1965)
38. H. C. Pillsbury, A. J. Sheppard and D. A. Libby, *J. AOAC*, **50**, 809 (1967)
39. W. D. Hubbard and A. J. Sheppard, *J. AOAC*, **51**, 15 (1968)
40. C. Plinton, F. P. Mahn, M. Hawrylyshyl, V. S. Venturella and B. Z. Senkowski, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 875 (1969)
41. V. Viswanathan, F. P. Mahn, V. S. Venturella and B. Z. Senkowski, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 400 (1970)