

가스크로마토그래피—炎光光度검출기에 의한 혈장중 카르복실기 함유 약물의 정량

朴萬基 · 曹榮鉉 · 劉武永 · 康拆林*

서울대학교 약학대학 · 대전대학 한의과*

(Received June 19, 1986)

Determination of Carboxyl Drugs by Gas Chromatography-Flame Photometric Detector

Man-Ki Park, Yung Hyun Cho, Moo Young You and Tak Lim Kang*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151 and

*Department of Oriental Medicine, Dae-Jeon College, Dae-Jeon 300, Korea

Abstract—Such carboxyl drugs as mefenamic acid, alclofenac, ketoprofen, cicloxilic acid and tolfenamic acid in rat plasma were determined by the gas chromatography flame photometric detector (GC-FPD). After methylthiomethyl (MTM) esterification with MTM-chloride in 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU) catalyst, determination of these drugs by this method was tried and compared with that by the GC-flame ionization detector (FID) method in respect to sensitivity and effect of interferences.

The results showed it was possible to analyze with accuracy by this method because of specificity of the FPD, although these drugs were not separated from interferences in plasma on GC column. The GC-FPD method was more sensitive than GC-FID method and the minimum detectable amount of monocarboxylic drugs on 3% QF-1 column was about 15fmol/injection.

단일카르복실기를 지닌 약물인 mefenamic acid, alclofenac, ketoprofen, cicloxilic acid 및 tolfenamic acid 등을 분석할 때, a) 흡광도법¹⁾, b) TLC 혹은 여지크로마토그래프법^{2,3)}, c) 형광분석법⁴⁾, d) 플라로그래프법⁵⁾, e) 방사성동위원소추적법⁶⁾, f) GC-FID, GC-ECD 혹은 GC-Mass 법⁷⁻¹⁰⁾, 그리고 g) 고속액체크로마토그래프법^{10,11)}에 의한 방법이 보고되어 있다. 위의 a)~d)에 의한 분석방법은 일반적으로 정량오차가 크며, e)의 방법은 高感度분석할 수 있는 장점은 있으나 조작이 불편하다. 최근에 f)와 g)에 의한 방법이 많이 시도되고 있으나 생체시료 성분에 의한 방해효과가 있는 경우가 종종 나타나고 있다. 저자들¹²⁻¹⁴⁾이 앞서 보고한 바와 같이 유효화합물만 선택적으로 검출분석할 수 있는 가스크로마토그래피—炎光光度檢出器(GC-FPD)를 써서 카르복실기를 지닌 약물에 유효원자를 도입한 후 분석함으로써 f)와 g)의 방법에서 나

타날 수 있는 단점을 보완하고자 하였다.

유효導入시약으로 카르복실기를 에스테르화시키는 여러가지 방법¹⁵⁻¹⁹⁾이 알려져 있으나, 이중 Ono 등¹⁹⁾의 방법이 촉매로 사용된 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene(DBU)의 재생·회수가 쉽고 입체장애를 받는 산에 대해서 높은 수율을 보이고 있다. 따라서 이 방법으로 시료를 정량적으로 methylthiomethyl(MTM)에스테르화시키고 GC-FPD로 분석한 결과 plasma중에서 약 15fmol까지 간편하게 정량할 수 있었다.

실 험 방 법

시료 및 시약—mefenamic acid, alclofenac(이상 E. Merck제, 독일), Ketoprofen, tolfenamic acid, DBU(이상 Sigma제, 미국), Methylthiomethyl chloride(MTM-Cl, Aldrich제, 미국) 및 benzene(일본和光제)은 특급시약을 그대로 사용

하였고, cicloilic acid는 원료의약품을 정제하여 사용하였다.

표준액의 조제—mefenamic acid, alclofenac, ketoprofen, tolfenamic acid 및 cicloilic acid를 약 100 μ mol씩 정확히 취하여 50ml 용량후라스크에 넣고 benzene-DBU혼합액(25:1)으로 표선을 맞춰 母液으로 하였다. 이중 0, 10, 20, 30, 40, 50 μ l씩을 취하여 반응용기에 넣고 질소기류하에서 용매를 완전히 날려 보낸 후 벤젠 5ml에 녹였다. 이액에 MTM-Cl 100 μ l와 DBU 100 μ l를 가하고 완전히 밀봉시킨 다음 80°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응물을 실온까지 식히고 0.1N-HCl 2ml와 증류수 2ml씩으로 차례로 씻은 다음 benzene층을 취해 소량의 무수망초를 가하고 감시 방치하였다. 상정액을 취하여 GC분석에 이용하였다.

Plasma중 정량조작—“표준액의 조제”란에서 만든 모액을 0, 10, 20, 30, 40, 50 μ l씩 정확히 취하여 15ml 원심분리관에 넣고 용매를 질소기류로 날려 보냈다. 각 원심분리관에 Wister rat(수컷, 체중약 300~320g)에서 얻은 혈장 1ml씩 가하고 Vortex진탕기로 15초간 흔들고 1N-HCl 2ml와 벤젠 5ml를 가해 잘 섞고 마개를 한 다음 3,000 rpm에서 4~5분간 원심분리시켰다. 이 상정액을 취해 10ml시험관에 옮기고 소량의 무수망초로 탈수시킨후, 이액을 정확히 3ml만 취해 반응용기에 옮기고 다음은 “표준액의 조제”란의 “이액에 MTM-Cl 100 μ l와...” 이하에 따라 처리하였다. rat혈장에서 mefenamic acid를 추출할 때 사용한 용매는 1N-HCl과 benzene대신 0.2M-인산 완충액(pH 5.5)와 benzene-DBU혼합액(20:1)을 사용하였다.

장치 및 분석조건—FPD(394nm filter)와 FID를 내장한 가스크로마토그래프는 Pye-Unicam GCV model 104를 사용하였다. 칼람은 3% QF-1 on Chromosorb WAW-DMCS(80~100mesh)를 나선형 유리제칼람(길이 1.5m×내경 4mm)에 충전시켜 사용하였으며, 칼람온도는 처음 140°C에서 2분간 유지한 후 7.5°C/min 속도로 250°C까지 승온시켰다. 운반기체(N₂)의 유속은 30ml/min으로 하였고, 검출기 및 주입부의 온도는 모

두 280°C로 하였다. 수소 및 공기의 유속은 각각 FPD의 경우 28ml/min, 20ml/min으로, FID의 경우 20ml/min, 100ml/min으로 조정하였다.

가스크로마토그램상에 나타난 피크면적은 FPD의 경우는 丸山 등²⁰의 방법으로 FID의 경우는 半値幅法으로 산출하였다.

GC-Mass System(Hewlett Packard model 5895 B)은 용융실리카 OV-101 캐필러리칼람(12m×0.2mmi.d.)을 140°C에서 270°C까지 6°C/min으로 승온조작하여 분리되는 성분을 70eV로 이온화시켜 질량스펙트럼을 얻었다. 藥物 MTM ester 化合物의 주요 m/z와 그 이온강도는 다음과 같다.

mefenamic acid MTM ester; m/z 301(M⁺, 32.4%), m/z 254(M⁺-SCH₃, 97.1%), m/z 224(M⁺-OCH₂SCH₃, 71.2%), m/z 61(CH₂=S⁺-CH₃, 100.0%).

alclofenac MTM ester; m/z 286(M⁺, 5.6%), m/z 209(M⁺-OCH₂SCH₃, 0.8%), m/z 181(m/z 209-CO, 100.0%), m/z 61(CH₂=S⁺-CH₃, 69.5%).

Ketoprofen MTM ester; m/z 314(M⁺, 0.0%), m/z 237(M⁺-OCH₂SCH₃, 1.0%), m/z 209(M⁺-C₆H₅CO, 100.0%), m/z 61(46.1%).

tolfenamic acid MTM ester; m/z 321(M⁺, 12.0%), m/z 274(M⁺-SCH₃, 47.1%), m/z 244(M⁺-OCH₂SCH₃, 26.8%), m/z 216(m/z 244-CO, 10.2%), m/z 61(100.0%).

cicloilic acid MTM ester; m/z 280(M⁺, 2.1%), m/z 203(M⁺-OCH₂SCH₃, 42.7%), m/z 61(100.0%).

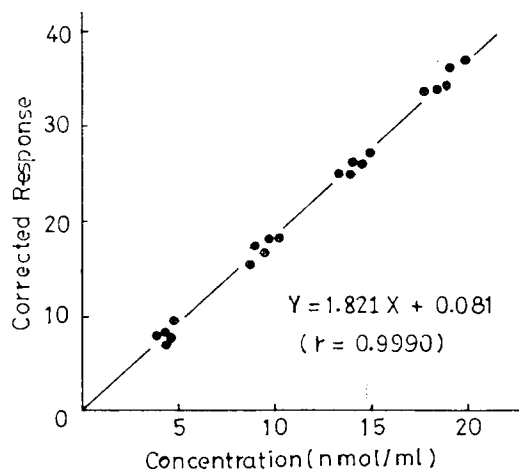
실험결과 및 고찰

mefenamic acid, alclofenac, cicloilic acid, tolfenamic acid 및 ketoprofen은 10배당량 이상의 MTM-Cl과 DBU에 의해 거의 정량적으로 MTM ester화 되었다. 이들의 표준액을 0~20nmol/ml 농도의 범위에서 검량선을 작성하여 Table I에 기록하였다. 이 검량선들은 0~20nmol/ml 농도의 범위에서 모두 좋은 직선성(상관계수(r=

Table I-Calibration data* (n=6)

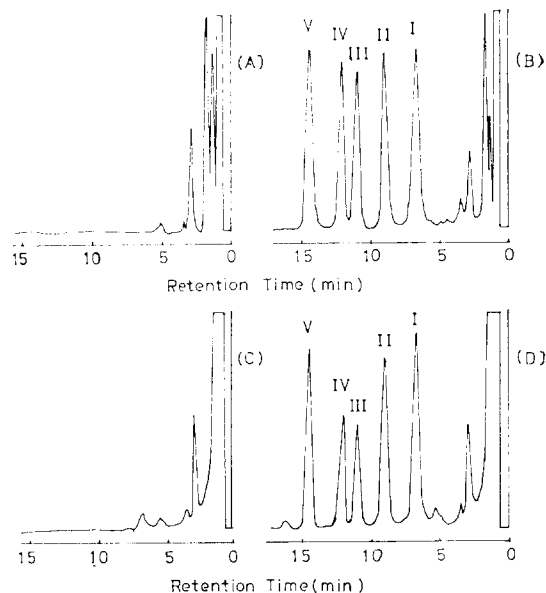
Compound	Slope (S.E. %)	Y-intercept	r
Cicloxicilic acid	1.831(3.0)	0.132	0.9994
Mefenamic acid	1.793(2.2)	0.149	0.9997
Alclofenac	1.886(2.3)	0.080	0.9997
Tolfenamic acid	1.834(4.3)	-0.081	0.9989
Ketoprofen	1.785(1.1)	0.226	0.9999

* Calculated by the method of least squares(21).

**Fig. 1**-Calibration curve

0.9989~0.9999)을 나타내고 있으며, 이들의 기울기와 Y절편이 모두 같지 아니하였으나, 이 차이를 F-검정²¹⁾하였을 때 유의성이 없었다 ($F_0(5, 26; \alpha) = 1.14$). 따라서 어느 한가지의 표

준액으로 다른 4가지의 시료액을 정량할 수 있게 되어 신속간편한 분석이 가능하다. Fig. 1은 5종 약물의 검량선을 작성한 모든 데이터(30개)를 축소모형으로 적합(適合)시키고 얻은 검량선으로 농도와 면적의 관계식은 $Y = 1.821X + 0.081$ 이었고, 상관계수(r)는 0.9990으로서 모든 데이

**Fig. 2**-Gas chromatograms of control rat plasma (A,C) and rat plasma (B,D) contained about 16nmol/ml of cicloxicilic acid (I), alclofenac (II), mefenamic acid(III), tolfenamic acid (IV) and ketoprofen(V).

A,B; GC-FPD, 1 μ l/injection of plasma sample
C,D; GC-FID, 3 μ l/injection of plasma sample

Table II-Extraction recovery from rat plasma

Amount added (nmol/ml)	Amount measured (nmol/ml)				
	Cicloxicilic acid	Alclofenac	Mefenamic acid	Tolfenamic acid	Ketoprofen
0	0	0	0	0	0
20	19.2	20.77	17.02	18.48	18.65
40	40.05	39.74	31.00	38.38	39.16
60	60.16	61.74	47.79	52.25	59.35
80	79.90	47.79	53.25	59.35	78.04
100	98.90	102.10	78.89	92.89	96.41
*Mean \pm SD	99.52 \pm 1.80	101.60 \pm 2.69	79.07 \pm 2.74	92.95 \pm 5.06	79.28 \pm 2.63

*Percentage of slope calculated by the method of least squares.

타가 검량선상에 거의 근접되어 있으며 각 약물의 농도범위가 0~20nmol/ml에서 농도와 면적간의 관계가 양호한 직선성을 이루고 있었다.

각 약물을 첨가한 plasma와 대조혈장으로부터 얻은 크로마토그램은 Fig. 2와 같다. 각 약물의 MTM ester는 3% QF-1에서 15분내로 모두 분리되었으며, 혈장 자체의 성분중에서 비록 작지만 cicloilic acid와 거의 겹치는 피크가 FID크로마토그램에서 나타나는데 반해 FPD크로마토그램에서는 나타나지 않았다. 따라서 FPD가 FID에 비해 선택성이 우수함을 알 수 있다.

혈장에서 각 약물의 회수율을 Table II에 표시하였다. mefenamic acid의 회수율이 저조한 것은 benzene-DBU 혼합액에 용해성이 좋기는 하나 주용매인 벤젠에 mefenamic acid가 좀처럼 녹지 않기 때문으로 생각된다.

결 론

GC로 분리한 약물을 FID나 ECD로 검출분석할 때 나타나는 방해물질은 목적성분과 분리정제하거나 분석조건의 변경 등이 필요한데 비해서 본 방법은 그 방해물질이 유황화합물이 아닌 경우에 그 분리가 불필요하다는 장점이 있으며, 0~20nmol/ml 농도의 범위에서 단일 카르복실기를 가진 약물의 표준액 1가지로 다른 유사한 구조를 가진 약물을 신속간편하게 분석할 수 있었다.

문 헌

- Ballerni, R., Cambi, A. and Del Soldato, P.: New and simple method for determination of 2-(3-benzoylphenyl) propionic acid. *J. Pharm. Sci.* **66**, 281 (1977).
- Demetriou, B. and Osborne, B.G.: Detection of mefenamic acid and its metabolites in urine by thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* **90**, 405 (1974).
- Mitchell, W.S. and Scott, P.: Gas chromatography of sulfonyl trimethylsilyl esters of phenolic acids. *Curr. Med. Res. Op.* **3**, 423 (1975).
- Glazko, A.J.: Species difference in the metabolism of diphenhydramine (Benadryl). *Ann. Phys. Med. Suppl.* **9**, 23 (1967).
- Populaire, P., Terlain, B., Pascal, S., Decouvelaere, B., Lebreton, G., Renard, B. and Thomas, J.T.: Determination of (3-benzoylphenyl)-2-propionic acid of ketoprofen in biological media. *Ann. Pharm. Fr.* **31**, 679 (1973).
- Delbarre, F. and Roucayrol, J.C.: On the possible antirheumatic effects (immuno-effector?) of imidazole derivatives. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* **14**, 45 (1976).
- Sennello, L.T., Chu, S.Y. and Boucherding, J.W.: Gas chromatographic method for determination of alclofenac in plasma and urine. *J. Chromatogr.* **147**, 485 (1978).
- Bland, S.A., Blake, J.W. and Ray, R.S.: Detection of methylphenidate and methamphetamine in equine body fluids by gas chromatographic analysis of an electron capturing derivative. *J. Chromatogr. Sci.* **14**, 201 (1976).
- Dusci, L.J. and Hackett, L.P.: Gas-liquid chromatographic determination of mefenamic acid in human serum. *J. Chromatogr.* **161**, 340 (1978).
- Eannier, A., Brazier, J.L. and Ribon, B.: Determination of ketoprofen in plasma using high-performance liquid chromatography. Comparison with Gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **155**, 371 (1978).
- Pedersen, S.B. Alhede, B., Buchardt, O., Moller, J. and Bock, K.: Tolfenamic acid. Detection and structure of urinary metabolites. *Arzneim.-Forsch.* **31**, 1944 (1981).
- 金敬鎭, 朴萬基, 曹榮鉉, 李王圭: Determination of sulfur-containing drugs by gas chromatography with flame photometric detector, *Arch. Pharm. Res.* **6**, 103 (1983).
- 朴萬基, 曹榮鉉, 楊貞善: GC-FPD를 이용한 β -락탐계 항생물질의 분석(I), *藥學會誌*, **28**, 25 (1984).
- 曹榮鉉, 朴萬基, 李淑淵: 가스 크로마토그래피-염광도검출기를 이용한 지방산의 신속간편한 정량. *藥學會誌* **29**, 227 (1985).
- Yamada, S., Yokoyama, Y. and Shiori, T.: A

- new synthesis of thiol esters, *J. Org. Chem.* **39**, 3302 (1974).
- 16) Wade, L.G., Gerdes, J.M. and Wirth, R.P.: Protection of carboxylic acids as methylthiomethyl esters. *Tetrahedron Lett.* 731 (1978).
- 17) Grieco, P.A., Yokoyama, Y. and Williams, E.: Aryl Selenocyanates and aryl thiocyanates: Reagents for the preparation of activated esters. *J. Org. Chem.* **43**, 1283 (1978).
- 18) Dossena, A., Marchelli, R. and Casnati, G.: t-Butyl bromidedimethyl sulphoxide reactions. Pummerer-like reaction with carboxylic acids and N-protected amino acids. *J.C.S. Perkin I.* 2737 (1981).
- 19) Ono, N., Yamata, T., Saito, T., Tanaka, K. and Kaji, A.: A convenient procedure for esterification of carboxylic acids. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **51**, 2401 (1978).
- 20) Maruyama, M. and Kakemoto, M.: Behavior of organic sulfur compounds in flame photometric detectors. *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 1 (1978).
- 21) 朴聖炫: 回歸分析(改訂版), 大英社, 서울, p. 76, p. 261 (1985).