

GC-FPD를 이용한 염산에페드린 및 그 관련물질의 정량

朴萬基 · 曹榮鉉 · 李鎔文 · 魯一協*

서울대학교 약학대학 · *숙명여자대학교 약학대학

(Received September 20, 1986)

Determination of Ephedrine Hydrochloride and its Analogs by GC-FPD

Man-Ki Park, Yung-Hyun Cho, Yong-Moon Lee and Ihl-Hyeob Ro*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151 and *College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140, Korea.

Abstract—A gas chromatographic procedure is described for the quantitative analysis of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride and norephedrine hydrochloride in pharmaceutical preparations. The procedure was based upon the determination of thioureas formed from amines and phenylisothiocyanate. The recoveries of ephedrine, pseudoephedrine and norephedrine from pharmaceutical preparations were 100.7(S.E. 0.9), 99.5(0.8), 99.1(0.8) and 99.1%(0.9), respectively. The high accuracy and precision of this assay were inherent in the flame photometric detectors normally used in gas chromatography.

기관지확장제, 산동제 또는 중추신경흥분제로 이용되는 에페드린, pseudoephedrine 및 노르에페드린을 silyl화^{1,2)} 시키거나 acylation^{3~5)} 시켜 가스 크로마토그래피(GC)로 분석한 예들이 많다. 생체시료나 의약품제제 중에서 이들을 검출분석 하는데 주로 수소불꽃이온화검출기나 전자포획 검출기가 이용되었으나 시료중의 다른성분이나 시약중의 불순물에 의한 방해효과가 종종 나타나고 있다.

1급 또는 2급 아민기를 가진 화합물을 우레아 유도체로 만들어 고속액체 크로마토그래피^{6,7)} 나 GC⁸⁾로 분석하는데 이 유도체는 합성이 쉽고 안정하며 흡습하지 않는 장점이 있다.

저자들은 유황화합물에 대한 선택성이 높은 염광광도검출기(FPD)를 이용하여 의약품제제 중에서 에페드린 및 그 관련화합물들을 추출하여 thiourea 유도체를 만든 후 GC로 분석하였다.

실 험 방 법

시료 및 시약—염산에페드린 및 유당은 KPIV

규격품을, 염산 pseudoephedrine 및 염산노르에페드린은 시판 특급시약(Aldrich 제, 미국)을, 염산 클로르푸로마진은 미국 약전규격품을 사용하였으며, phenylisothiocyanate(Sigma 제, 미국)와 그의 다른 시약은 모두 시판특급을 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

장치 및 조건—FPD(394nm필터)를 내장한 가스 크로마토그래프는 Pye-Unicam GCV 모델 104를 이용하였고, 칼람은 2.0m×4mmφ 크기의 코일형 유리 칼람에 3%OV-1 on Chromosorb WAW-DMCS(80~100mesh)를 충전시켰으며, 칼람온도는 220°C 항온으로 하였다. 각 기체의 유속은 수소 25ml/분, 공기 20ml/분, 질소 50ml/분으로 조정하였고, 검출기 및 주입부의 온도는 모두 250°C로, 증폭기의 감도는 1.28×10⁻⁸ afs로 조정하였다.

질량스펙트럼은 Hewlett-Packard 모델 HP 5840A 가스 크로마토그래프와 연결된 Hewlett-Packard 모델 5985B 스펙트로메타로 기록하였으며, 이때 GC칼람은 OV-101 fused 모세관 칼람

(12m×0.2mmφ)을 이용하였다. 이온화전압은 70eV, 이온화실의 온도는 200°C, 칼람온도는 220°C로 하여 질량스펙트럼을 얻었다.

¹H-NMR 스펙트럼은 Varian FT80A(80MHz)를 이용하여 목적물질을 CDCl₃에 녹여 tetramethylsilane(TMS)를 내부표준물질로 하여 측정하였다.

IR스펙트럼은 KBr 정제법으로 Beckman 모델 IR-20A 스펙트로메타를 이용해서 얻었다.

표준액 및 검액중에서 목적성분의 함량은 丸山등의 방법⁹⁾에 따라 피크높이에 대한 계급근과 그 높이의 반치폭과의 곱으로 부터 산출하였다.

표준액의 조제—에페드린 염산염 약 100.0mg(약 0.5mmol해당량)을 정확히 칭취하여 100ml 용량 플라스크에 넣고 물로 용량을 맞춰 이를 표준모액으로 하였다. 내부표준물질로서 클로르프로마진 염산염 약 178.0mg(약 0.5mmol해당량)을 정확하게 취하여 100ml 용량 플라스크에 넣고 물을 표선까지 채운 것을 내부표준모액으로 하였다.

표준모액을 5, 10, 15, 20 및 25ml씩 정확히 취하여 각각의 100ml 용량플라스크에 넣고 내부표준모액 15ml씩을 취하여 각 100ml용량플라스크에 합한 다음 물을 가하여 정확히 100ml로 하였다. 이액들을 각각 10ml씩 취하여 소형 분액깔대기에 옮기고 3%NaOH액 10ml씩을 가한 다음 디클로로메탄 20ml씩으로 3회 추출하였다. 전 디클로로메탄층을 모아 수포화염화나트륨액 30ml로 세척하고 디클로로메탄으로 적신 선으로 여과하였다. 세척액은 디클로로메탄 20ml로 다시 추출한 다음 디클로로메탄층을 여과하여 앞의 여액과 합하여 100ml용량 플라스크에 넣고 디클로로메탄을 가하여 용량을 맞춘 후 그중 1ml를 취하여 질소기류하에서 완전히 농축하였다. 이 잔사는 N,N'-dimethylformamide(DMF)에 녹여 10ml로 하고 이중 1ml를 취하여 10ml용량의 마개달린 시험관에 옮기고 phenylisothiocyanate 2ml를 가해 80°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이 반응물질들은 질소기류하에서 완전히 농축하고 DMF에 녹여 10ml로 한 것을 에페드린표준액으로 하였다.

염산 Pseudoephedrine과 염산노르에페드린을 약 0.5mmol씩 정확히 칭취하여 진술한 에페드린 표준액의 조제와 똑같이 처리하여 pseudoephedrine 표준액과 노르에페드린 표준액을 각각 조제하였다.

검액의 조제—염산에페드린, 염산 pseudoephedrine 또는 염산노르에페드린을 일정량씩 정확히 칭취하여 유당과 혼합하여 그 함량이 40~100mg/g이 되도록 제제화한 다음 본품 약 20mg을 칭취하여 소형 분액 깔대기에 넣었다. 앞서 조제한 내부표준모액 20ml를 취하여 물로 정확히 200ml로 희석하고 이중 15ml를 취해 소형 분액 깔대기에 합하였다. 여기에 3% NaOH액 10ml를 가한 다음 이하는 “표준액의 조제”항과 동일하게 처리한 것을 검액으로 하였다.

Thiourea 유도체의 순수분취—에페드린 및 그 관련화합물과 phenylisothiocyanate와의 반응물로부터 분취용박층크로마토그래피(TLC)에 의해 thiourea 유도체를 분취하였다. 전개용매는 클로로포름-에틸아세테이드(9:1) 혼합용매, 흡착제는 Kieselgel 60F₂₅₄ (두께 0.5mm)를 사용하였으며, UV254nm에서 검출하였다. 흡착제는 사전에 클로로포름-메탄올(1:1) 혼합용매로 충분히 세척한 후 105°C에서 3시간 건조시킨 후 사용하였다. 분취된 thiourea 유도체를 에칠에델에 녹여 재결정시킨 후 3%OV-1 칼람이 내장된 가스크로마토그래프(수소불꽃이온화검출기로 검출)로 그 순도를 확인하고IR, ¹H-NMR 및 질량스펙트럼을 얻는데 이용하였다.

실험결과 및 고찰

에페드린, pseudoephedrine 및 노르에페드린을 DMF에 녹이고 80°C에서 phenylisothiocyanat와 반응시키면 약 30분후에 거의 정량적으로 thiourea 유도체가 얻어졌다(Fig. 1). 이때 반응용매로써 DMF대신 아세토니트릴을 써도 거의 같은 결과가 나타났으나, 디클로로메탄이나 피리딘을 사용했을때는 그 수율도 낮고 thiourea 유도체외에 다른 물질도 생성되어 반응용매로써 적합하지 않았다.

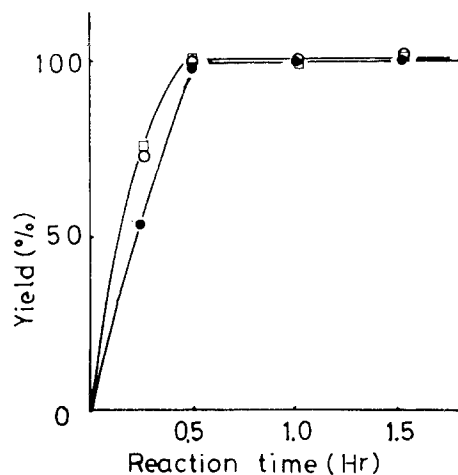


Fig. 1—Thiourea derivatization yields of ephedrine (○—○), pseudoephedrine (□—□) and norephedrine (◆—◆).

분취용 TLC로 얻은 thiourea 유도체들은 모두 흰색결정이었으며, 그 구조는 다음의 I, II 중에서 어느 하나로 예측하고 IR, $^1\text{H-NMR}$ 및 질량스펙트럼으로부터 그 구조를 추정하였다.

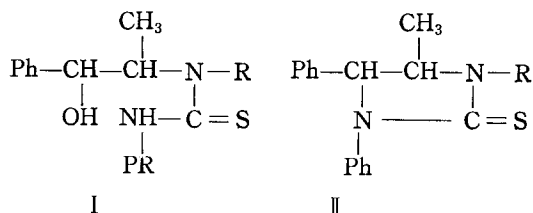


Fig. 2에 나타난 바와 같이 에페드린, pseudoephedrine 및 노르에페드린의 thiourea 유도체에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼상에 thiourea의 proton에 기인하는 피크가 각각 13.2, 13.1, 12.9ppm에서 나타났으며, IR스펙트럼(Fig. 3)에서는 $-\text{NH}$ 와 $-\text{OH}$ 의 신축진동때문에 나타나는 강한 흡수띠가 $3,180\sim 3,200\text{cm}^{-1}$ 에 있었다. 따라서 thiourea 유도체의 구조는 I임을 암시하고 있다. 이 유도체를 N.O-bis(trimethylsilyl) acetamide 로써 실온에서 silyl화시킨 후 3% OV-1 칼럼이 내장된 GC로 분석하였을 때 원래의 thiourea 유도체의 유지시간에 비해 silyl화된 유도체의 유지시간이 짧았다. 일반적으로 완화된 조건에서 thiourea나 우레아의 NH기가 silyl화되지 않는 사

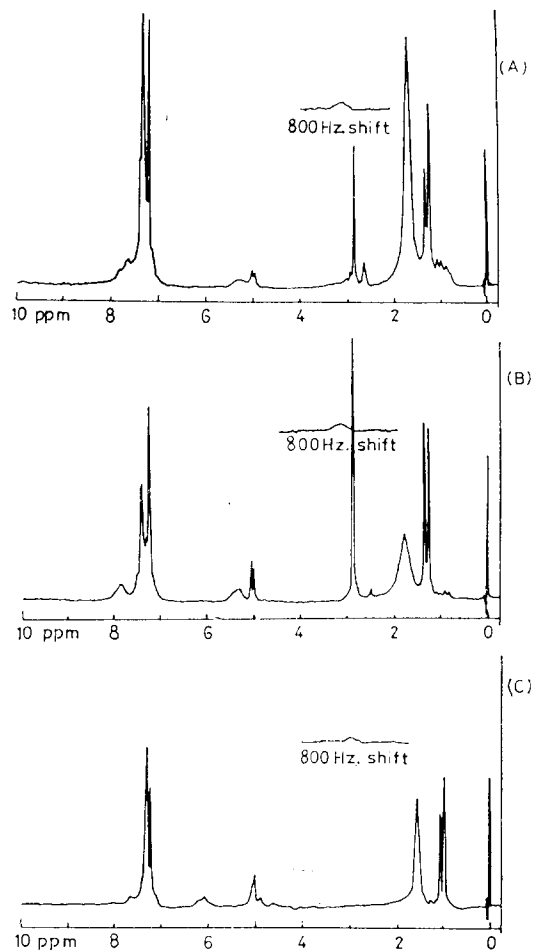
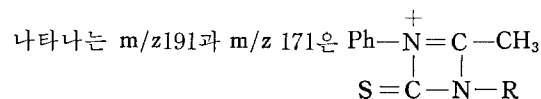


Fig. 2— $^1\text{H-NMR}$ spectra of thiourea derivatives of ephedrine (A), pseudoephedrine (B) and norephedrine (C).

실로부터 이 결과는 thiourea 유도체가 silyl화될 수 있는 관능기, 즉 수산기를 가지고 있음을 나타내고 있다. 따라서 이 유도체의 구조는 I임이 분명하다. 이 사실을 질량스펙트럼(Fig. 4)으로 더욱 확인하였다. 에페드린과 pseudoephedrine의 thiourea 유도체와 노르에페드린의 그것에서



이온에 기인하며, 피크 m/z 122는 $\text{Ph}-\text{CH}=\text{S}^+$ 이온에 기인한 것으로 이들은 모두 앞서 추정한 구조 I 과 부합되며, 이 토막이온들의 생성과정

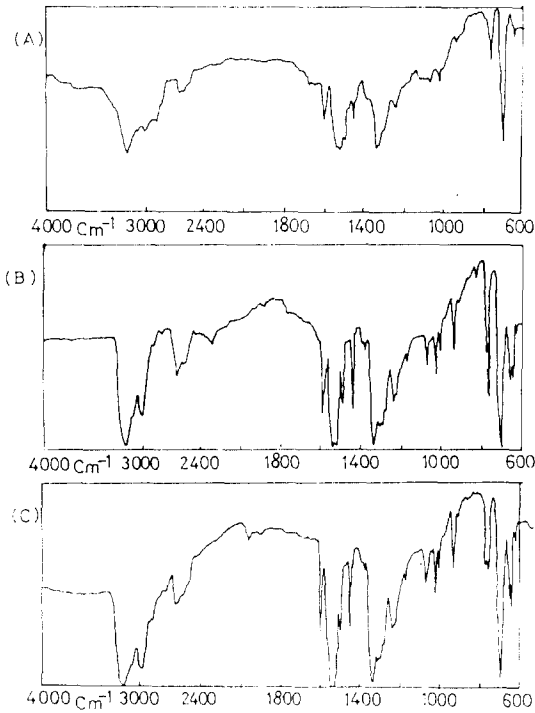


Fig. 3—IR spectra of thiourea derivatives of ephedrine (A), pseudoephedrine (B) and norephedrine (C).

은 Fig. 5에 표시하였다.

Fig. 6은 thiourea 유도체와 내부표준물질 클로르프로마진이 3% OV-1 칼람에서 분리되는 양상

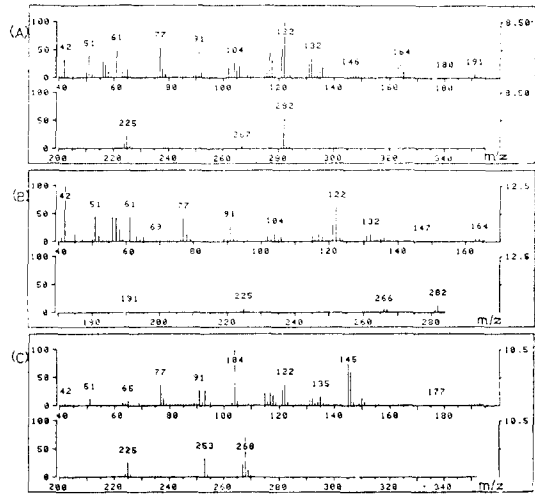


Fig. 4—Mass spectra of ephedrine (A), pseudoephedrine (B) and norephedrine (C).

을 나타낸 가스크로마토그램이다. 내부표준물질에 대한 목적성분의 농도비(mole비)를 X축, 가스크로마토그램상에 나타난 내부표준물질에 대한 목적성분의 보정면적비를 Y축이라 하였을 때 표준액으로부터 구한 이들의 관계식은

에페드린 : $Y=0.998X+0.047(r=0.9984)$

pseudoephedrine :

$Y=1.018 \times -0.083(r=0.9986)$

Table I—Precision and accuracy of gas chromatography method for ephedrine, pseudoephedrine, and norephedrine in pharmaceutical preparations.

Amount added mg/g	Ephedrine found mg/g	Recovery(%)	Pseudoephedrine found mg/g	Recovery(%)	Norephedrine found mg/g	Recovery(%)
40.0	40.3	100.8	40.8	102.0	38.2	95.5
50.0	51.0	102.0	48.1	96.2	51.2	102.4
50.0	47.1	94.2	48.8	97.6	52.1	104.2
50.0	49.7	99.4	50.4	100.8	48.7	97.4
60.0	61.4	102.3	61.5	102.5	59.2	98.7
70.0	72.0	102.9	68.3	97.6	67.9	97.0
70.0	70.9	101.3	72.1	103.0	69.4	99.1
80.0	83.8	104.8	76.7	95.9	80.0	100.0
90.9	89.2	99.1	91.0	101.1	86.3	95.9
100.0	100.3	100.3	98.4	98.4	101.1	101.1
	mean	100.7	mean	99.5	mean	99.1
	s.e.	0.900	s.e.	0.843	s.e.	0.897

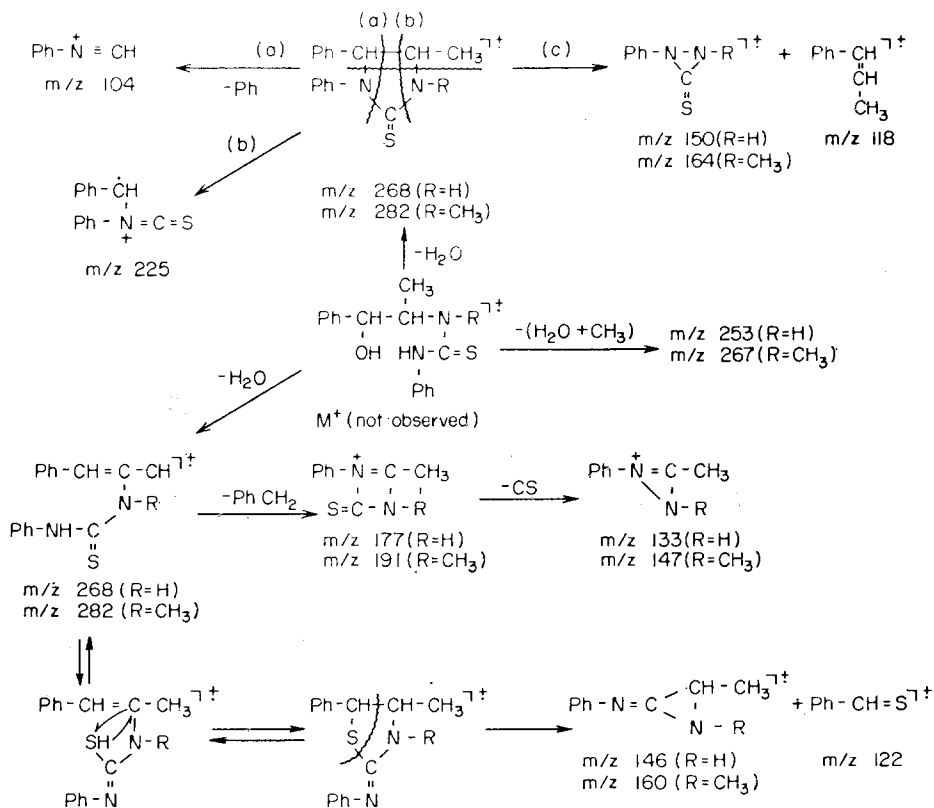


Fig. 5—Possible mass fragmentation of thiourea derivatives.

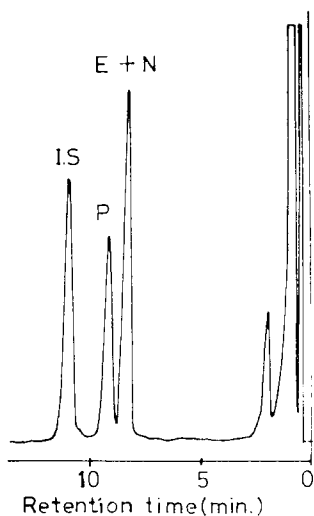


Fig. 6—Gas chromatograms of thiourea derivatives. E: ephedrine, P: pseudoephedrine, N: norephedrine, I.S.: internal standard (chlopromazine).

노르에페드린 :

$$Y = 1.003X + 0.021 (r = 0.9991)$$

이었으며, 이들이 나타낸 상관계수(r)는 검량선이 양호한 직선성임을 보이고 있다.

실험과정의 정확도와 정밀도를 측정하기 위해 에페드린, pseudoephedrine 및 노르에페드린의 염산염으로 조제한 제제중에서 목적성분의 회수율을 GC-FPD로 분석하여 그 결과를 Table I에 기록하였다. 이 표에서 보는 바와 같이 제제에서의 에페드린, pseudoephedrine 및 노르에페드린의 염산염에 대한 회수율은 각각 100.7, 99.5, 99.1%로서 정확도가 비교적 높았으며, 이들의 표준오차(S.E.)는 각각 0.900, 0.843, 0.897로 나타났다. 따라서 본방법에 의해 의약품제제중에서 에페드린 염산염 및 그 관련물질들을 비교적 정밀하고 정확하게 정량할 수 있었으며, 본방법에 의해 주입량으로써 약 2.5×10^{-11} mol까지 검출할 수 있었다.

결 론

감도가 유행의 몰수에 지수함수적으로 증가하는 FPD의 특성으로 인하여 본방법에 의해 내부 표준물질로써 클로르프로마진을 이용하여 작성한 에페드린, pseudoephedrine 및 노르에페드린의 검량선이 보여 주는 바와 같이 일정한 농도범위에서 어느 한 검량선만으로 다른 물질의 정량이 가능하다. 또 GC-FPD는 유행화합물만 선택적으로 검출하므로 의약품제제중에서는 물론 여러가지 성분이 혼재되어 있을 생체시료중에서도 선택적으로 에페드린 및 그 관련물질만 본방법으로 정밀하게 검출분석할 수 있을 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Christophersen, A.S., Hovland, E. and Rasmussen, K.E.: Glass capillary column gas chromatography of phenolalkylamines after flash-heater derivatization using a double injection technique. *J. Chromatogr.* **234**, 107 (1982).
- 2) Donike, M.: N-trifluoroacetyl-O-trimethylsilyl phenoalkylamines preparation and mass specific gas chromatographic estimation. *J. Chromatogr.* **103**, 91 (1975).
- 3) Midha, K.K., Cooper, J.K. and McGiveray, I.J.: Simple and Specific electron-capture GLC assay

for plasma and urine ephedrine concentrations followings single doses. *J. Pharm. Sci.* **68**, 557 (1979).

- 4) Coutes, R.T., Dawe, R., Jones, G.R. and Liu, S. F.: Analysis of perfluoroacyl derivatives of ephedrine, pseudoephedrine and analogues by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **190**, 53 (1980).
- 5) Anthony, G.M., Brooks, C.J.W. and Middleditch, B.S.: Use of boronate derivatives in the characterization of catecholamines and related β -hydroxyamines by gas liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm Pharmacol.* **22**, 205 (1970).
- 6) Noggle, P.T., Jr.: Enhanced detectability and chromatography of some amines by high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal Chem.* **63**, 702 (1980).
- 7) Abrahamsson, M., Groeningsson, K. and Casten-sson, S.: Separation of PTH-amino acids by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **154**, 313 (1978).
- 8) Knights, R.J., Gross, M. and Folk, J.E.: Identification and quantitation analysis of alkyl isocyanates as their urea derivatives. *J. Anal. Biochem.* **77**, 176 (1977).
- 9) Maruyama, M. and Kakemoto, M.: Behavior of organic sulfur compounds in flame photometric detectors. *J. Chromatogr. Sci.* **16**, 1 (1978).