

기체크로마토그래피법에 의한 티아민 분석

유지상·문동철·홍성화·한 건·김박광*

충북대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(Received April 10, 1989)

Determination of Thiamin by Gas-chromatography

Ji-Sang Yoo, Dong-Cheul Moon, Sung-Hwa Hong, Kun Han and Bak-Kwang Kim*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju Chungbuk 363-763, Korea and

*College of Pharmacy Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—A gas-chromatographic determination method of thiamin which use a quantitative cleavage of thiamin to 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl)thiazol [I] and solvent extraction of the analyte prior to GC injection was modified. A column chromatographic procedure using a reversed phase, high capacity solid phase cartridge was applied to the clean-up of the analyte. Thiazol derivative[I] was quantitatively recovered upon the column method. Acetanilide, an internal standard, has a good recovery through the analytical procedure. The method has analytical precision of 2% or less in the coefficient of variation.

Keywords □ Thiamin, gas-chromatographic determination, column clean-up, acetanilide

티아민의 공정분석법으로 thiochrome 유도체 형성반응을 이용한 분석법 등^{1,2)}이 이용되고 있으나 전처리 조작이 복잡하고 불순물에 의한 방해영향이 심한 단점이 있다.

기체크로마토그래피를 이용한 티아민 분석은 trifluoroacetylation 화에 의해 처음 시도되었다.³⁾ 한편, Dwivedi 등은 티아민이 NaHSO₃에 의해 휘발성인 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl) thiazole [I]로 정량적으로 분해되는 반응⁴⁾을 처음 이용하여 티아민 분석을 시도하였다. Echols 등은 그 방법을 개선할 목적으로 내부표준물질과 추출용매 등을 검토하여 제제 및 심품들 중 티아민 분석법을 확립 보고하였다.⁵⁻⁷⁾ 그러나 Echols 등의 방법도 티아민 분해 반응물로부터 thiazole 유도체[I]의 분리에 다량의 발암성 용매인⁸⁾ CHCl₃을 사용해야 하는 등 전처리 조작시의 번거러움을 피할 수 없다.

따라서 저자들은 thiazol 유도체[I]의 분리 및 전처리에 기존방법인 용매추출법 대신에 solid phase extraction cartridge 를 컬럼으로 이용하여 GC 분석의 전처리에 응용하였고 내부표준물질로 aceta-

nilide의 사용 가능성을 검토하여 정확도 및 재현성 면에서 양호한 분석결과를 얻었다.

실험방법

시약 및 재료—본 실험에서 사용한 모든 시약은 시판 분석급 시약을 정제없이 그대로 사용하였다. 티아민 표준용액은 염산티아민(Fluka A6, Switzerland)을 물에 녹여 5.0 mg/ml의 보존용액을 만들어 냉암소에 보관하고 필요시마다 희석하여 사용하였다. 내부표준물질, acetanilide 표준용액은 물에 녹여 1.5 mg/ml로 하였다. 분석시료로는 시판품인 정제, 시럽제, 캡슐제, 음료식품 등을 사용하였다.

기기 및 측정조건—본 실험에 사용한 기체크로마토그래피는 shimadzu® model GC-4CPTF이며 기록기는 shimadzu® model R112를 이용하였다.

기체 크로마토그래피의 측정조건은 본 컬럼(OV-17, 3% on AW DMCS, chromosorb W 60/80 mesh, 2.6 mm(i. d.)×2 m, stainless

steel)을 사용하여 티아졸유도체(I) 및 내부표준물의 머무름시간, 분리능, 측정감도 등을 고려하여 최적조건을 선택하였다. 질소기체의 유속은 45 ml/min, 수소유속은 80 ml/min, 공기유속은 1.0 l/min로 하고 컬럼온도는 130°C에서 210°C까지 5°C/min로 승온조작하였다. 주입부와 검출기 온도는 225°C로 각각 유지하였다. 정량시 FID 감도와 증폭기의 범위값을 기록계에서의 감도로 환산할 때 6.4×10^{-10} a. f. s 로 유지하였다.

컬럼 clean-up 장치—시료분해물의 전처리에 이용한 컬럼 크로마토그래피 시스템은 Moon 등의 방법⁹⁾에 따라 Fig. 1에서와 같이 구성하고 컬럼물질로서는 solid phase cartridge(Baker®, C18, capacity 6 ml; sorbent amount, 1000 mg)를 사용하였다. peristaltic pump(LKB® model 2132)를 이용하여 컬럼에서의 산성분해물과 염류 등을 씻어 내린 다음 ODS 컬럼에 보다 강하게 결합된 티아졸유도체[I]를 MeOH로서 용출하였다. 용리성분들의 검출은 UV monitor(LKB® model 2238)를 이용, 254 nm에서 하였고, 기록계는 LKB® model 2210을 이용하였다. 위 장치의 구성에 폴리에틸렌제 용기와 테프론관(i. d. 1mm)을 사용하였다. 본 장치의 void volume은 5회 측정시 2.0 ± 0.1 ml 이고 컬럼 capacity(up to 20 mg of sample)⁹⁾가 크므로 본 분석법에서의 시료처리량으로 볼 때 breakthrough volume은 측정하지 않았

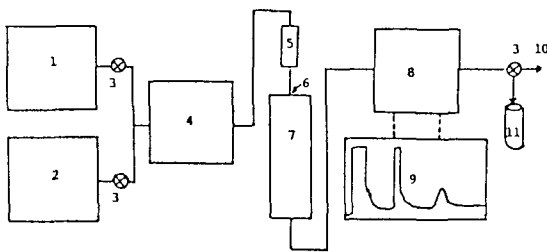


Fig. 1—Schematic diagram of a low-pressure mini-column chromatography system for sample clean-up.

1. polyethylene solvent reservoir(degassed water);
2. polyethylene reservoir(degassed MeOH);
3. three-way valve;
4. peristaltic pump;
5. damper;
6. site of sample introduction;
7. column (65 mm × 13 mm i.d.);
8. UV monitor;
9. recorder;
10. drain;
11. collecting tube.

다.

정량법—티아민 분석의 전처리 조작은 Fig. 2에서와 같이 표준조작법에 준하여 처리하였고 내부표준물질 일정량(acetanilide, 1.5 mg)에 대한 티아민 양을 증가함에 따른 thiazol 유도체[I]와 내부표준물질의 GC 피크 면적비 변화로부터 구한 Fig. 3에서의 검량선으로부터 티아민함량을 계산하였다. 함

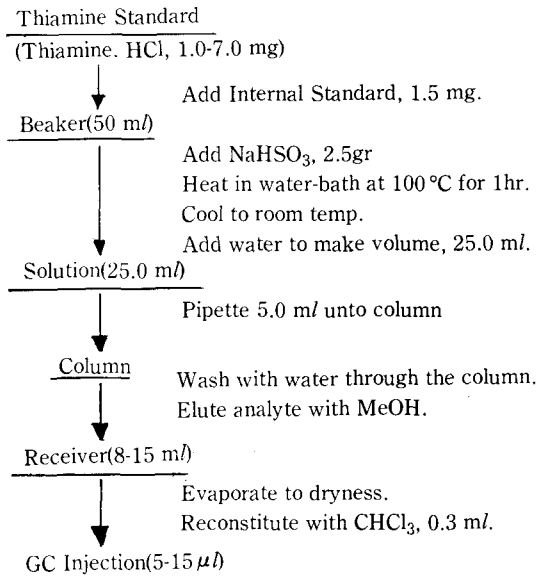


Fig. 2—Typical analytical procedure of thiamin.

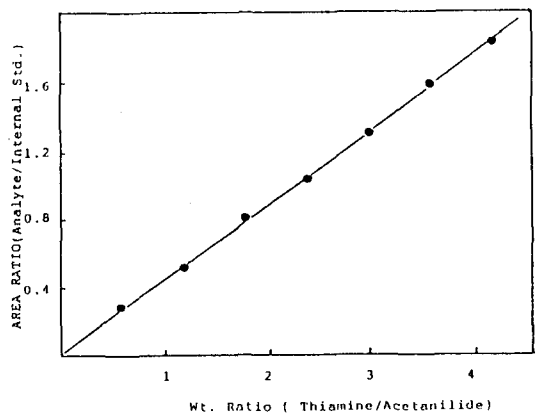


Fig. 3—Calibration graph for the determination of thiamin.

amt. of acetanilide, 1.5 mg; amt. of thiamin. HCl, 1-7 mg; The best straight line is defined by the eq., $y = 0.0266 + 0.4346 x$ ($r = 0.9997$).

량 계산은 다음식과 같다.

$$\text{amt. of thiamin, mg} = \left[\frac{\text{observed peak response} - 0.0226}{0.4346} \right]$$

시판 비타민 복합제제 분석 예—1캡셀 또는 2정을 분석시료로 하고 액체시료의 경우 약 10ml에 해당되는 양을 정확히 달아서 0.1ml HCl 40ml를 가하여 수용상에서 가열, 분해시킨 다음 내부표준액 1.0ml와 NaHSO₃ 3g을 가하고 100°C 수용상에서 60분간 계속 가열하였다. 반응액을 실온으로 냉각한 다음 여과하고 여액을 용량플라스크에 취하고 물을 가하여 정확히 50.0ml로 하고 이 중 5.0ml를 취하여 컬럼에 주입하고 이하 표준조작법에 따라서 처리하고 검량선으로부터 티아민 함량을 구하였다.

시판 비타민 강화음료 및 발효식품의 분석 예—시료 약 40ml에 해당되는 양을 정확히 취하여 진한 HCl(36%) 4ml를 첨가, 가열한 다음 실온으로 냉각여과하고 여액에 물을 가하여 50.0ml로 한 다음 이 중 5.0ml를 취하여 위의 방법대로 분석하였다.

결과 및 고찰

컬럼법에 의한 clean-up 및 티아졸유도체(I)의 회수율 검토—티아민에 Na₂SO₃ 또는 NaHSO₃를 첨가하여 가열분해시 휘발성인 (130°C/2mmHg), 4-methyl-5-(2-hydroxyethyl)thiazol (I)과 산성분해물 2-methyl-4-amino-5-methylene pyrimidine sulfonic acid (II)로 분해된다고 보고되고 있다.⁴⁾ 그러나 티아졸유도체 (I)가 물에서의 용해도가 높기 때문에 용매추출법의 적용시 추출용매량이 과량이야 되고 (약 150 ml/30 μg, analyte), 정량적 추출 회수율을 얻기 위해서는 추출시 액성을 강한 염기성으로 하고 또한 다량의 염 (NaCl 2~3g/30 μg, analyte)을 첨가해야 한다.⁵⁻⁷⁾ 따라서 저자들은 column clean-up법을 검토하기 위해 본 low pressure mini-column chromatography system에서의 티아졸유도체 (I)의 용출 및 그 회수율을 검토하였다.

염산티아민 1~7mg을 표준조작법대로 처리하고

컬럼에서 다량의 염류와 산성분해물 (II)을 물로써 먼저 흘려 내린 다음 용리액을 MeOH로 바꾸어 흘렸을 때 티아졸유도체 (I)는 용리액 약 8~15ml 사이에서 완전히 용리되었다. 용출크로마토그램은 Fig. 4에서와 같다.

한편, 티아졸유도체 (I)의 회수율 검토를 위해 염산티아민 2mg (티아졸유도체 (I) 이론치 0.85 mg) 씩을 각각 취하여 본 컬럼법과 Echols 등의 용매추출법으로 6회씩 각각 분석조작하여 얻어진 GC 피크 면적을 t 검정한 결과 그 값이 0.34 (d. f. = 10)으로 나타났다. 따라서 티아졸유도체 (I)의 정량적 회수율 면에서 본 컬럼법은 용매추출법과 유의한 차가 없다고 (유의수준 1% 및 5%) 결론내렸다.

내부표준물질의 검토—acetanilide는 b. p.가 304-305°C로 증발 농축 등에 의한 휘발가능성이 없고 본 GC 측정조건에서 머무름시간이 6분 (sep. n. factor, 1.57)으로 분리능이 양호하고 재현성도 RSD 5% 미만으로 만족할 만하였다. 한편 본 clean-up 컬럼에서도 물로써는 용출되지 않고 티아졸유도체 (I)와 함께 MeOH에 의해 용리되었다.

그러나 전처리 내부표준물질로써의 사용가능성 검토를 위해 처음부터 티아민 표준액에 첨가, 분해반응을 거친 다음 이후 조작에 따라 분석한 경우 (step 1)와 NaHSO₃에 의한 티아민 분해반응 이후 첨가하여 동일방법으로 처리한 경우 (step 2) 및 티아민

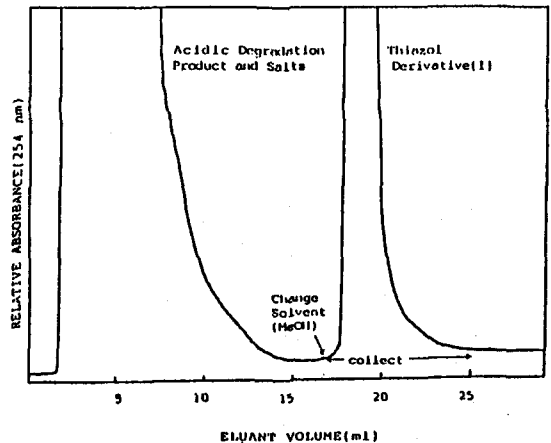


Fig. 4—A column chromatogram of thiamin degradation product. thiamin. HCl, 7 mg was degraded according to the standard analytical procedure.

Table I—Recovery of Acetanilide

Step	Area Ratio* (Mean ± S.D.)	Recovery ± S.D.
1.	4.77 ± 0.07	98.7 ± 1.7
2.	4.72 ± 0.07	97.1 ± 1.5
3.	4.85 ± 0.12	100

step 1. acetanilide was added from first; step 2. acetanilide was added after degradation of thiamin; step 3. acetanilide was added prior to GC injection; calculated amt. of acetanilide in final solution, 30 μg.

* area ratio is the peak area ratio of acetanilide to that of thiazol derivative (I) in GC chromatogram; Mean is that of triplicate determinations.

Table II—Analytical results of Commercial Vitamin Preparations

Sample	Reported amount	Observed Value*
Thiamine Preparation	9.19 mg/capsule	8.81 ± 0.85 mg/cap.
Multi-vitamin Preps	8.92 mg/cap.	9.27 ± 0.47 mg/cap.
Multi-vitamin Preps (liquor)	0.27 mg/ml	0.26 ± 0.01 mg/ml
Multivitamin-multi-mineral Preps.	1.84 mg/tab.	2.19 ± 0.04 mg/tab.
Multi-vitamin liquor	NR**	0.013 ± 0.002 mg/ml
Fermented multivitamin liquor	NR	0.051 ± 0.004 mg/ml

* Mean of 9 determinations; Confidence interval, 99%

** NR: not reported

분석조작 후 GC 주입시에 spike 하여 분석한 경우 (step 3)의 각각에 대해 3회씩 각각 실험하여 티아졸유도체 (I) 피크와 acetanilide 피크면적비를 구한 결과는 Table I에서와 같다. 각 3군의 경우 유의수준 5%에서 유의한 차가 없으며 따라서 acetanilide는 본 분석법에서 pretreatment 내부 표준물질로써 유효하게 이용될 수 있다고 결론내렸다. 한편, acetanilide를 시료에 처음부터 가하여 내부표준법에 의한 분석시 측정의 재현성은 CV 1.5% (n=10회)로 나타났다. 기존 용매추출법 적용시 acetanilide의 회수율은 96.3 ± 0.6% S.D. (n=3)로써 나타났으며 따라서 내부표준물질로써 적당하지 않다고 사려되었다.

시판 의약품들 분석 예—본 분석법을 이용하여 시

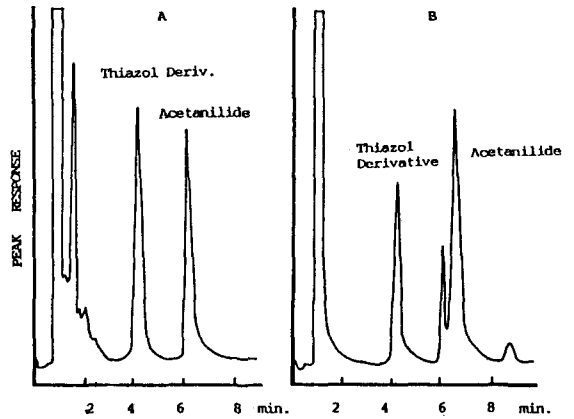


Fig. 5. Typical gas-chromatograms for the determination of thiamin in samples.

A. foodstuff; B. vitamin syrup; FID; column temp., 130-210 °C (5 °C/min); Inj. temp., 225 °C; Det. temp., 225 °C.

판 몇가지 고형 및 액체제제들과 음료제품들 중 티아민 함량을 구한 결과는 Table II에서와 같다. 형광 및 비색분석법을 이용한 비타민 제제들의 분석결과가 Martens 등¹¹⁾에 의해 표시함량의 95-104% 수준으로 보고된 바와 같이 본 분석결과에 있어서도 표시량과 거의 잘 일치함을 알 수 있다. 그러나 특정사 제품의 유의한 분석결과에 대해서는 재검토가 이루어져야 되리라 사려된다. 한편 시료 중 티아민 분석의 대표적인 GC chromatogram은 Fig. 5에서와 같다.

결 론

기체크로마토그래피법에 의한 티아민의 분석에 있어서 티아민의 정량적 분해물인 티아졸유도체 (I)의 clean-up에 solid phase extraction용 C18 cartridge를 이용한 저압 컬럼크로마토그래피법을 적용한 결과 그 회수율이 정량적임을 보였다.

전처리 내부표준물질로 사용한 acetanilide는 본 분석방법에 있어서 그 회수율이 100%로 정량적임을 나타내었다. 따라서 내부표준법에 의한 본 분석 방법은 시료주입량, 회석도 등에 관계없이 티아민 함량을 간편히 구할 수 있으며 분석의 정밀성은 CV 값으로 표시할 때 2% 이내였다. 본 분석법은 여러 형태의 시판 비타민 제제들 중 티아민 분석에 유용하게 활용되리라 사려된다.

문헌

- 1) *National Formulary XII*, American Pharmaceutical Association, Washington D.C. (1970).
- 2) William Horwitz (ed): *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. 740 (1980).
- 3) Knapp, D.R.: *Handbook of Analytical Derivatization Reaction*, John Wiley & Sons, NewYork, p. 119 (1979).
- 4) Williams, R., Waterman, R.E., Keresztesy, J.C., and Buchman, E.R.: Studies of Crystalline Vitamin B1. III. Cleavage of Vitamin with Sulfite. *J. Am. Chem. Soc.* **58**, 536 (1934).
- 5) Echols, R.E., Harris, J., and Miller, R.H.: Modified procedure for determining vitamin B1 by gas chromatography. *J. of Chromatography* **193**, 470 (1980).
- 6) Echols, R.E., Miller, R.H., Winzer, W., Carmen, D.J., and Ireland, Y.R.: Gas Chromatographic Determination of Thiamine in Meats, Vegetables and Cereals with a Nitrogen Phosphorus Detector. *J. of Chromatography* **262**, 257 (1983).
- 7) Echols, R.E., Miller, R.H., and Thompson, L.: Evaluation of Internal Standards and Extraction Solvents in the Gas Chromatographic Determination of Thiamine. *J. of Chromatography* **347**, 89 (1985).
- 8) Proctor, N.H., and Hughes, J.P.: *Chemical Hazards of the Work Place.*, J.P. Lippin Cott., Philadelphia, PA., p. 167, **342**, 344 (1978)
- 9) Moon, D.C., and Kelley, J.A.: A Simple Desalting Procedure For Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **17**, 229 (1988).
- 10) Majors, R.E.: Sample Preparation for HPLC and Gas Chromatography Using Solid Phase Extraction. *LC-GC* **4**, 972 (1987).
- 11) Martens, M., Martens, F., Maenhout, p., and Heyndrickx, A.: Systematic Identification of Unknown Drugs in Powder Form by Means of Ultraviolet Spectrophotometry in Forensic Toxicology. *Anal. Chem.* **47**, 458 (1975).