

# 컬럼스위칭 액체크로마토그래피를 이용한 뇨중 플루비프로펜의 광학이성질체의 미량분석

최현철 · 강신정 · 윤미옥 · 이수정 · 김호정 · 박창훈 · 차기원\*\*

식품의약품안전청 의약품평가부, \*인하대학교 화학과  
(2002. 8. 21 접수)

## Trace Analysis of Racemic Isomers of Flurbiprofen in Human Urine using Column Switching-HPLC

Hyun-Cheol Choi, Sin-Jung Kang, Mi-Ok Youn, Su-Jung Lee, Ho-Jung Kim, Chang-Hun Park and Ki-Won Cha\*\*

Drug Evaluation in Korea Food & Drug Administration

\*Department of chemistry, Inha university

(Received Aug. 21, 2002)

**요 약 :** 광학이성질체 분리 컬럼, 시료처리 및 농축 컬럼이 부착된 컬럼스위칭-HPLC를 이용하여 뇨시료에서 미량의 플루비프로펜 광학이성질체를 분리 정량하는 방법을 연구하였다. 분리된 각 이성질체의 고유광회전도를 구하고, *d*-이성질체 및 *l*-이성질체를 확인하였다. 이들의 검정선의 농도범위는 각각 0.11 ~ 5.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 검출한계는 *d*-이성질체의 경우 0.027  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고, *l*-이성질체의 경우 0.031  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, 날자간 및 날자내의 정밀도의 CV값은 각각 1.84% 이하였다. 본 분석법은 플루비프로펜 약물을 복용한 사람의 뇨중에 존재하는 플루비프로펜의 분석에 적용하였다.

**Abstract :** The separation and determination method of racemic isomers of flurbiprofen in urine samples have been investigated using column switching- HPLC, which include the sample treatment and concentration column. The optical rotation of two isomers separated were measured to identify *d*-form and *l*-form. The calibration curves are linear in the ranges of 0.11-5.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for both *d*-form and *l*-form. The detection limits were 0.031  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *l*-isomers and 0.027  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *d*-isomer. The coefficients of variation of intra-day and inter-day precision of this method were about 1.8%. The present method was applied to determine the concentration of racemic isomers in urine sample from human eating the drug.

**Key words :** Column - Switching HPLC, Racemic compound, Flurbiprofen, Specific rotation

### 1. 서 론

일반적으로 광학이성질체를 갖는 약물은 각각의 이

성질체의 약효 및 대사과정이 현저한 차이가 나기 때문에 최근 의약품 원료합성이나 신약개발에서 이런 연구가 병행되고 있다. 대체로 이런 약물들의 이성질체는 물리·화학적 성질들이 서로 비슷하여 일반적인 분리조건으로 분리가 거의 불가능하다. 박층크로마토그래피법(TLC)<sup>1)</sup>, 가스크로마토그래피법(GC)<sup>2)</sup> 등이 이

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)32-860-7676 Fax : +82+(0)32-872-2520

E-mail : kwcha@inha.ac.kr

용되어 왔으며 최근에는 모세관전기영동시스템(CE)<sup>3)</sup>,<sup>4)</sup> 및 고성능액체크로마토그래피법(HPLC)<sup>5)</sup>,<sup>6)</sup>에 의한 연구가 이루어지고 있다. 특히 HPLC법의 경우 최근 시판되는 이성질체분리용 컬럼의 충전 물질은 실리카 겔에 polysaccharide (cellulose ester 유도체, cellulose carbamate 유도체, amylose carbamate 유도체, polymethacrylate 등)를 코팅한 형태로 되어 있으나 이들 대부분의 이성체 분리용 컬럼들은 이동상을 선택하는데 많은 제한이 있다. 즉 이동상에 따라 컬럼내 충전물질의 부피의 변동으로 펌프압력의 변화가 생기고, 또한 비극성이동상(순상)을 사용할 때는 극성이 큰 약물의 분리가 어려울 때가 자주 있다. 대부분의 이성질체 분리용 컬럼은 봉우리가 넓어 분리능이 떨어져 미량분석이 요구되는 생체시료에서는 효과적인 전처리와 높은 감도가 요구된다. 지금까지 컬럼스위칭<sup>7)</sup>,<sup>8)</sup>,<sup>9)</sup>은 생체 시료분석에 매우 유용한 방법으로 연구되어져 왔다. 본 연구에서는 컬럼스위칭-HPLC를 사용하여 뇨시료 중에 플루비프로펜의 각 이성체를 시료 전처리과정 없이, 미량까지 일괄 분석하는 분석법을 개발하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1 시약 및 기기

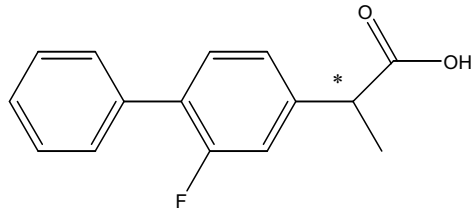
#### 1) 시료 및 시약

플루비프로펜(광학이성질체 화합물)의 표준용액은 300 mg의 특급(EP급) 플루비프로펜을 정확히 달아 100 mL 용량플라스크에 넣고 메탄올로 녹인 후 눈금까지 메탄올로 묽혀 저장용액으로 준비하고 필요에 따라 묽혀 사용하였다. 표준용액 제조 및 이동상 제조에 사용된 용매는 HPLC급 메탄올 및 탈이온수를 사용하였다. 뇨시료는 멤브레인 거르개로 걸은 후 그대로 사용하였다.

#### 2) 컬럼스위칭계

컬럼스위칭-HPLC계는 두 개의 펌프와 밸브, UV-VIS 검출기, 100 µL의 주입루프가 장착된 Auto-Sampler를 갖는 Shiseido사의 SI-II시스템을 사용하였다. 이때 사용된 컬럼은 시료 전처리용으로 MF Ph-1 precolumn (10 X 4 mm i.d., Shiseido), 농축용으로 Capcellpak C<sub>18</sub> UG (35 X 2 mm i.d., Shiseido Co.), 이성질체 분리 컬럼은 수용매의 사용이 가능한 Capcellpak Chiral Ru-2 (300 X 4.6 mm i.d.,

Shiseido Co.)를 사용하였다. UV spectrophotometer는 UV 2101 PC (Shimadzu Co.)이며 광회전도 측정을 위한 polarimeter는 Park IA43 (Perkin-Elmer Co.)를 사용하였다.



Scheme : Structure of Flurbiprofen.

### 3) 컬럼스위칭 방법

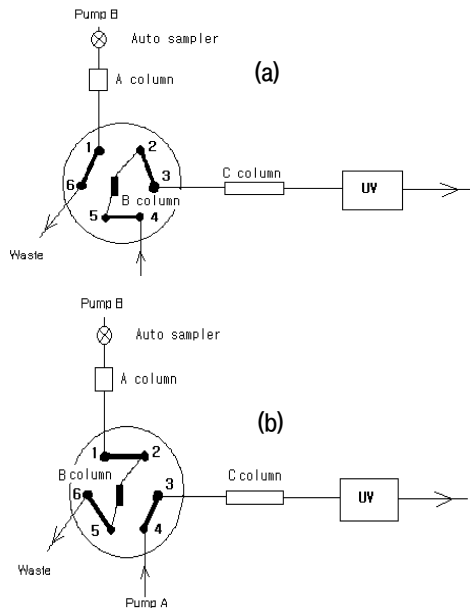


Fig. 1. Schematic diagrams of Column-Switching system.

(a) : valve position a, (b) : valve position b

Valve position a (Fig. 1의 a)에서 MF Ph-1 예비컬럼(A 컬럼)을 이용하여 펌프 B로 시료속에 플루비프로펜은 흡착되어 있고 단백질 같은 분자량이 큰 성분은 최적 머무는 시간인 4.5 분 내에 용리되도록 용리액을 선택한다(1 단계). 용리시간 4.5 분 후에 valve position b (Fig. 1의 b)로 회전시켜 9.5 분까지 MF Ph-1 컬럼에 흡

착되어 있던 플루비프로펜 성분을 농축용 컬럼 (B 컬럼)으로 펌프 B를 이용하여 용리시켜 농축시킨다(2 단계). 마지막으로 다시 밸브를 원상태 (valve position a)로 회전시켜, 농축되어 있던 플루비프로펜 성분을 분리용 컬럼 (C 컬럼)으로 펌프 A를 이용하여 이동시킨 후 이성질체를 분리분석 하였다(3 단계).

**2-2 각 이성질체의 확인 및 고유 광회전도 측정**

3.0 mg/mL 농도의 플루비프로펜 용액을 제조하여 위에서 설명한 컬럼스위칭 조건으로 분석하였을 때 크로마토그램 상에서 용출되는 두 봉우리의 성분을 각각 분취하여 농축한 후 에틸아세테이트로 용매-용매추출하였다. 용매를 휘발하고 건조한 다음 메탄올로 녹이고, 대한약전 선광도 측정법에 따라 각 봉우리 성분의 이성질체를 확인하였다. 그리고 회전도 (α)를 이용하여 각 이성질체의 고유 광회전도 ([α]<sup>20</sup><sub>D</sub>)를 계산하였다.

Table 1. HPLC conditions.

Compositions of mobile phase	pump A	Methanol : H <sub>2</sub> O : HAC* = 90 : 9 : 1
	pump B	Methanol : H <sub>2</sub> O : HAC = 31 : 68 : 1
Flow rate	pump A	0.8 mL/min
	pump B	1.0 mL/min
Detection	246 nm	
Injection volume	240 μL	
Oven temperature	40 °C	

\* acetic acid

**3. 결과 및 고찰**

**3-1 분리조건**

각 컬럼에서 최적의 분리조건을 얻기 위해, 먼저 표준용액을 MF Ph-1 컬럼에 주입한 후 이동상의 유기용매의 비율을 조금씩 변화시켜 최적의 봉우리 유지시간 (5-6 분)이 되도록 하였다. 이때 이동상의 조성은 부피비로 31% MeOH + 68% H<sub>2</sub>O + 1% HAC 이었다. 그리고 이성질체 분리용 컬럼을 펌프 A에 연결하여 이동상의 조성을 변화시키며 최적의 분리조건을 얻은 결과 90% MeOH + 9% H<sub>2</sub>O + 1.0% 아세트산의 혼합용액에서 최적의 분리능을 나타내었다(Fig. 2 (a)). 뇨에 플루

비프로펜을 spiking한 시료를 컬럼스위칭을 쓰지 않고 분리용 컬럼 (Ru-2 컬럼)에 주입하고 90% MeOH + 9% H<sub>2</sub>O + 1.0% 아세트산의 혼합용액으로 용리한 결과는 Fig. 2 (b)이다. Fig. 2 (b)에서 4-5 분에서 용리된 물질은 뇨에 포함되어 있던 단백질 같은 물질이고 8-16 분에 용리된 두 봉우리는 플루비프로펜의 이성질체이나 완전 분리가 이루어지지 않았다. 최종적으로 컬럼스위칭 과정을 통해 뇨 및 여기에 플루비프로펜을 spiking한 시료를 각각 분리한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

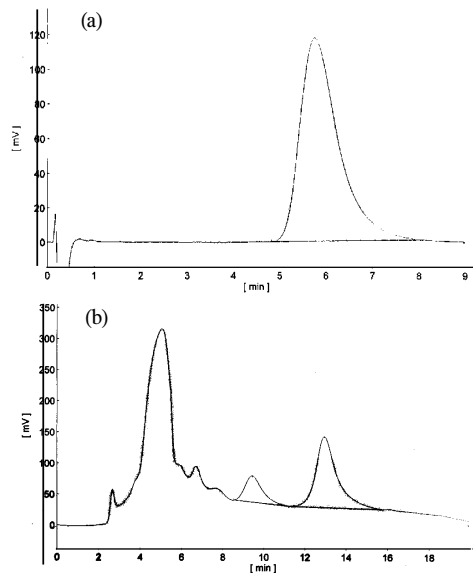
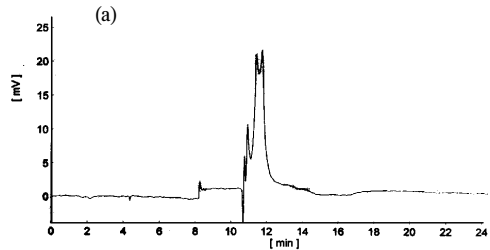


Fig. 2. (a) Chromatograms of Flurbiprophen in MF Ph-1 column without switching. Eluent; 31% MeOH + 68% H<sub>2</sub>O + 1% HAC (b) Chromatograms of Urine spiked Flurbiprophen in Chiral Ru-2 column without switching. Eluent ; 90% MeOH + 9% H<sub>2</sub>O 1% HAC



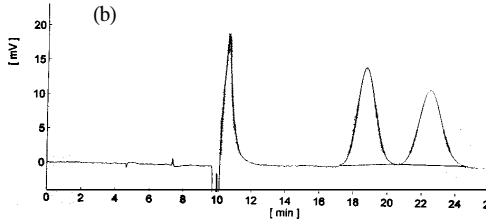


Fig. 3. (a) Chromatograms of blank urine  
(b) Chromatograms of blank urine spiked flurbiprophen

Fig. 3에서 10분까지는 펌프 B 용리액으로 용리하고 그 후부터는 펌프 A 용리액으로 용리한 결과이다. 12분에서 나타난 봉우리는 용리액을 바꾸는데서 온 신호 봉우리이다. Fig. 3 (b)에서 16-24분에 나타난 두 봉우리는 두 이성질체의 봉우리로 완전 분리가 이루어졌다.

3-2 각 이성질체의 확인

분리된 각 이성질체를 분취하여 농축한 후 광회전도를 측정 한 결과 앞부분 (18-20 분)에 용출된 봉우리 성분은 고유 광회전도 ( $[\alpha]_D^{20}$ )가 - 63.49로 나타났고, 나중 (22-24 분)에 용출되는 성분의 고유 광회전도 ( $[\alpha]_D^{20}$ )는 + 60.98로 나타났다. 따라서 크로마토그램상의 앞에 나타난 봉우리 성분은 *l*-플루비프로펜이고, 뒤에 용출되는 성분은 *d*-플루비프로펜 이성질체임을 알 수 있었다.

3-3 직선성, 정량한계 및 검출한계

본 분석법으로 얻은 각 이성질체의 검정선은 Fig. 4와 같이 각각의 농도범위가 0.11 ~ 5.4  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 이때 검출한계는 S/N비가 3:1을 기준으로 측정 한 결과 *l*-이성질체가 0.031  $\mu\text{g/mL}$  이고 *d*-이성체는 0.027  $\mu\text{g/mL}$ 임을 알 수 있었다.

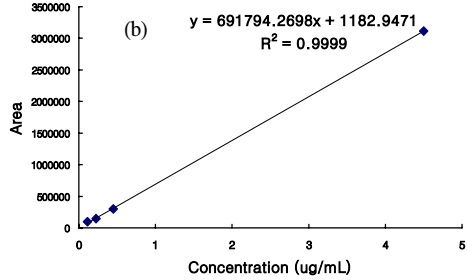
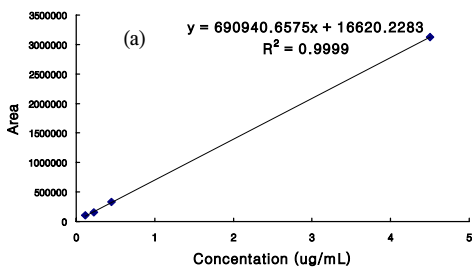


Fig. 4. Calibration curves of flurbiprofen ;  
(a) (*l*)-Enantiomer, (b) (*d*)-Enantiomer

3-4 정밀도

본 분석법의 날자간 그리고 날자내의 정밀도를 측정 한 결과 Table 2와 같이 상대표준편차 (RSD)가 1.84% 이하로 매우 정밀한 결과를 얻었다.

Table 2. Intra-day and Inter-day reproducibility for the quantitation of *l*- and *d*-flurbiprofen in human urine

Nominal concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>(l)</i> -enantiomer		<i>(d)</i> -enantiomer	
	Assayed value ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)	Assayed value ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)
<i>Intra-day repeatability</i> (n=5)				
1.35	1.35	0.95	1.35	0.96
2.70	2.70	0.92	2.70	1.07
5.40	5.35	0.80	5.35	0.79
<i>Inter-day repeatability</i> I (n=5)				
1.35	1.35	0.68	1.35	0.73
2.70	2.70	1.56	2.70	1.60
5.40	5.40	0.65	5.40	0.71

3-4 응용

플루비프로펜정 40 mg을 건강한 사람에게 경구 투여한 후 배출되는 뇨를 1, 2, 4, 6, 8시간 간격으로 채취하여 본 분석방법에 따라 분석한 플루비프로펜의 배출량은 Fig. 5에서와 같이 먹은 지 4시간만에 가장 많이 배출되었다. 각 이성질체의 요로 배출되는 양이 투여한 양과 동일함을 알 수 있었다.

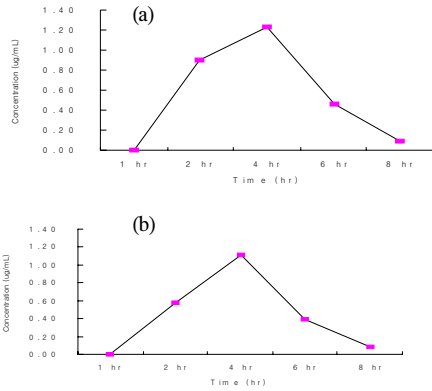


Fig. 5. Analysis of flurbiprofen in urine obtained from the man eaten the drug. (a) (l)-Enantiomer, (b) (d)-Enantiomer

#### 4. 결 론

예비 및 농축 컬럼과 이성질체분리컬럼을 갖는 컬럼스위칭-HPLC법으로 사람 뇨 중 플루비프로펜 이성질체를 미량까지 신속하고 정확하게 분석하였다. 본

분석법은 시료의 전처리 없이 직접 시료를 주입하고, 농축컬럼을 통한 고감도의 분석법이다. 각 이성질체의 검출한계는 약 30 ng/mL이고 재현성이 양호하였다. 본 분석법의 임상학적인 응용면에서 동 약물을 복용했을 경우 대부분이 동일한 이성질체비로 뇨로 배출됨을 알 수 있었다.

#### 5 . 참고 문헌

1. D. W. Armstrong, J. R. J Faulkner, S. M. Han, J. Chromatogr. 452, 323(1988).
2. N. H. Singh, F. N. Pasutto, R. T. Coutts, F. Jamali, J. Chromatogr. 378, 125(1986).
3. S. Fanali et al. J. Chromatogr. A 772, 185(1997).
4. S. Fanali, J. Chromatogr. A 735, 77(1996).
5. J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak, J. Chromatogr. 282, 83(1983).
6. G. Blaschke, J. Liq. Chromatogr. 9, 341(1986).
7. O. Shirota, J. Microcol. 7, 29(1995).
8. O. Shirota, Chromatography, 17, 189(1996).
9. H. S. Lee, Chromatographia, 48, 365(1998).