ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol.15, No.6, 574-579, 2002
Printed in the Republic of Korea

On-line HPLC/ESI-MS를 이용한 탄수화물제제 (Acarbose) 분석연구

조현우* · 명승운★
*경기대학교 이과대학 화학과
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터
(2002. 5. 30 접수)

Carbohydrate Drug (Acarbose) Analysis using by the On-line HPLC/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry

Hyun-Woo Cho* and Seung-Woon Myung★
**Department of Chemistry, KyongGi University, Suwon, Kyonggi-do 442-760, Korea*
Donping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 136-791, Korea
(Received May. 30, 2002)

요 약 : 탄수화물 형태의 당뇨치료제인 acarbose 및 그 대사체를 LC/MS를 사용하는 간편하고 감도 좋은 분석방법을 개발하였다. 혈장시료를 주사기 필터로 거른 후 다른 시료전처리과정 없이 LC/MS에 직접 주입하여 분석하였다. Acarbose에 대한 검정곡선은 0.1 ~ 10 ㎍/㎖ 농도범위에서 r^2=0.9963의 선형성을 나타내었다. α-Amylase와 β-amylase를 사용한 *in vitro* 배양 시험을 통해서 생성된 대사체 component-I과 component-II도 정성적으로 확인 가능하였다. 이러한 LC/MS 분석법은 acarbose의 약동력학적 연구는 물론이며 다른 탄수화물 형태 약물의 연구에도 활용이 가능할 것이다.

Abstract : A sensitive and easy high performance liquid chromatograph (HPLC) / electrospray ionization (ESI)-mass spectrometric (MS) method has been developed for the quantitative and qualitative analyses of acarbose and its metabolites. After plasma samples were simply filtered with a syringe filter, the filtered plasma was analyzed by LC/MS. The standard calibration curve for acarbose was linear (r^2=0.9963) over the concentration range 0.1 ~ 10 ㎍/㎖ in plasma. The metabolite component-I and II, which were metabolized by the α-amylase and β-amylase, were found also by in vitro incubation. The developed method can be utilized to study acarbose and the other carbohydrates.

Key words : Carbohydrate, Acarbose, LC/ESI-MS

1. 서 론

Acarbose는 *Actinoplans utahensis* 배양액에서 얻어진 비흡수성 복합 올리고당류로서 분자량은 645이며 치환된 cyclogexene ring과 4,6-dieoxyamino-p-glucose unit (acarviosine으로 통칭되고 있음)로 구성된 활성 부위를 가지고 있으며 구조는 *Fig.* 1과 같다.

Acarbose (O-4,6-dioxy-4-[(1S, 4R, 5S, 6S)-4, 5, 6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-α-D-glucopyranosyl- (1→4)-D-glucopyranose)는 미생물에서 유래하는 유사 4당

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-958-5104 Fax : +82+(0)2-958-5059
E-mail : swmyung@kist.re.kr

류이며 이는 장내 효소의 일종인 α-glucosidase에 의한 탄수화물의 소화를 억제함으로써 장내 포도당의 흡수를 지연시켜준다.[1] Sulphonylurea 계, buguanide 계 등 경구용 혈당강하제가 이미 상승된 혈당치를 떨어뜨리는 것과는 달리 혈당치의 상승을 저해하기 때문에 혈당치 변동이 적어 일정시간 동안 혈당치를 유지시켜주므로 당뇨병 치료제로 개발되어 사용되고 있으며 국내에서는 1994년부터 시판되고 있다.

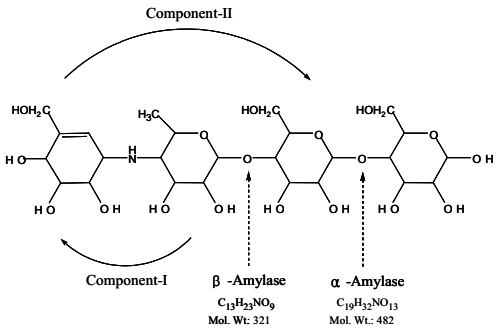

Fig. 1. Structure of **acarbose** and its metabolites (**component-I** and **II**).

Acarbose는 소장의 brush-border에 있는 α-glucosidase들의 상경적 가역적 저해에도 이들 효소에 대한 저해효과는 glucoanylase > sucrase > maltase > isomaltase의 순으로 강하고 주로 sucrase에 대한 저해로 약효를 나타낸다. 이들 효소는 비흡수성 전분과 서당을 흡수되기 쉬운 단당류 (포도당)로 전환시키는데 이들 효소의 억제로 이 전환이 지연되어 포도당의 흡수가 느려지고 결과적으로 혈당량이 감소된다.

경구투여 후 acarbose는 다양한 amylase들에 의해 glucosidic linkage들이 가수분해되는데 α-amylase에 의해 acarbose의 1/3의 활성을 갖는 component-Ⅱ가 생산되고 β-amylase에 의해 불활성화 된 component-Ⅰ이 생산되며 maltose 잔기를 남긴다. Acarbose와 component-Ⅱ는 배변을 통해서 완전히 배설되고 용량의 5%만 component-Ⅰ의 형태로 배변을 통해 배설된다. 또한 2%미만이 미변화체로 뇨로 배설된다.[2-6]

그 동안 acarbose는 scintillation counter, TLC, CE (capillary electrophoresis)등[7]에 서만 분석되어왔는데 본 연구에서는 LC/MS를 이용하여 뇨나 혈액등 생체물질로부터 α-amylase와 β-amylase에 의해 대사되는 대사체인 component-I과 Ⅱ 및 어미약물 (parent drug)인 acarbose를 분석하는 법을 제시하고자 한다.

2. 실 험

2.1 분석기기 및 시약

본 실험에서 acarobose 및 대사체 분석을 위해 사용된 기기는 Agilent 1100 Series HPLC system (Agilent, Palo Alto, CA, USA)과 전자분무 이온화원 (ESI)을 갖춘 LC/MS ion trap mass spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며 분석에 사용된 HPLC 컬럼은 YMC사의 YMC-Pack ODS-AQ (4.6×250 ㎜, 5 ㎛)를 사용하였으며 0.5 ㎖/min의 유속으로 15분 동안에 아세트니트릴 이동상이 0%→40%, 물 이동상이 100%→60%가 되도록 용매 기울기를 유지하여 분석하였다.

질량분석기의 이온화 방법은 ESI (electrospray ionization) 양이온 모드로써 분무 기체 (50 psi)와 건조 기체 (10 ℓ/min)로써 질소를 사용하였으며 건조 기체의 온도는 350 ℃를 유지하였다. 질량범위는 m/z 250-800이었다.

α-Amylase와 β-amylase는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였으며 이동상 용매인 아세트니트릴은 J.T. Baker사, 물은 3차 증류수를 사용하였다.

2.2 효소에 의한 배양실험

2.2.1 α-Amylase

Acarbose를 최종 농도 50 ㎍/㎖가 되도록 pH 6.9의 50 mM phosphate buffer 300 ㎕에 spike하였다. α-Amylase (30 ㎎ prot./㎖, 790 units/㎎ prot.) 250 unit (10 ㎕)을 넣고 37 ℃ water bath에서 2시간동안 배양하였다. 배양 후 최종 부피가 1 ㎖되도록 물로 채우고 LC/MS에 20 ㎕를 주입하였다.

2.2.2 β-Amylase

Acarbose를 최종 농도 50 ㎍/㎖가 되도록 pH 4.8의 50 mM phosphate buffer 300 ㎕에 spike하였다. β-Amylase (26 ㎎ prot./㎖, 880 units/㎎ prot.) 250 unit (10 ㎕)을 넣고 37 ℃ water bath에서 2시간동안 배양하였다. 배양 후 최종 부피가 1 ㎖되도록 물로 채우고 LC/MS에 20 ㎕ 주입하였다.

2.3 표준물질의 검정곡선

시료에 acarbase 표준물질을 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5, 10 ㎍/㎖이 되도록 spike 한 후 syringe filter를 사용하여 여과한 후 LC/MS에 주입하였다.

2.4 추출방법

시료(혈장)중의 시료를 분석하기 위해서는 별다른 농축이나 clean-up 과정을 거치지 않고 시료를 syringe filter를 사용하여 필터 후 바로 LC/MS 시스템에 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

실험 조건에 명시된 HPLC 조건으로부터 얻은 acarbose 표준물질에 대한 LC 크로마토그램과 ESI-MS 질량스펙트럼은 *Fig.* 2와 같다. 어미약물 (parent drug)인 acarbose는 12.9분에서 검출되었으며 m/z 646에서 $[M+H]^+$ 가 m/z 684에서 $[M+K]^+$ 가 유사분자이온으로 나타났다(*Fig.* 2 (d)). M/z 304는 component-I에 해당하는 토막이온을 나타내며 ESI 모드 질량 스펙트럼에서 기준 피이크 (base peak)로 나타났다. 한편, *Fig.* 2의 (a)는 LC/MS로부터 생성된 TIC이며 (b)와 (c)는 m/z 646과 m/z 684에 대한 extracted ion chromatogram (EIC)로서 정량에 사용되었다.

한편, α-amylase에 의한 배양실험을 통해서 생성된 대사체인 component-II (*Fig.* 1)는 13.0분에서 검출되었는데 이는 UV-Vis, RI등 검출기에서는 어미약물(acarbose)과 크로마토그래프에서는 거의 분리가 되지 않고 겹쳐서 검출되기 때문에 정량에 문제가 생길 수 있다. 하지만, α-amylase에 의하여 생성된 대사체는 ESI-MS의 full scan 스펙트럼(*Fig.* 3)에서 m/z 484 $[M+H]^+$, m/z 506 $[M+Na]^+$ 및 m/z 522 $[M+K]^+$가 특성

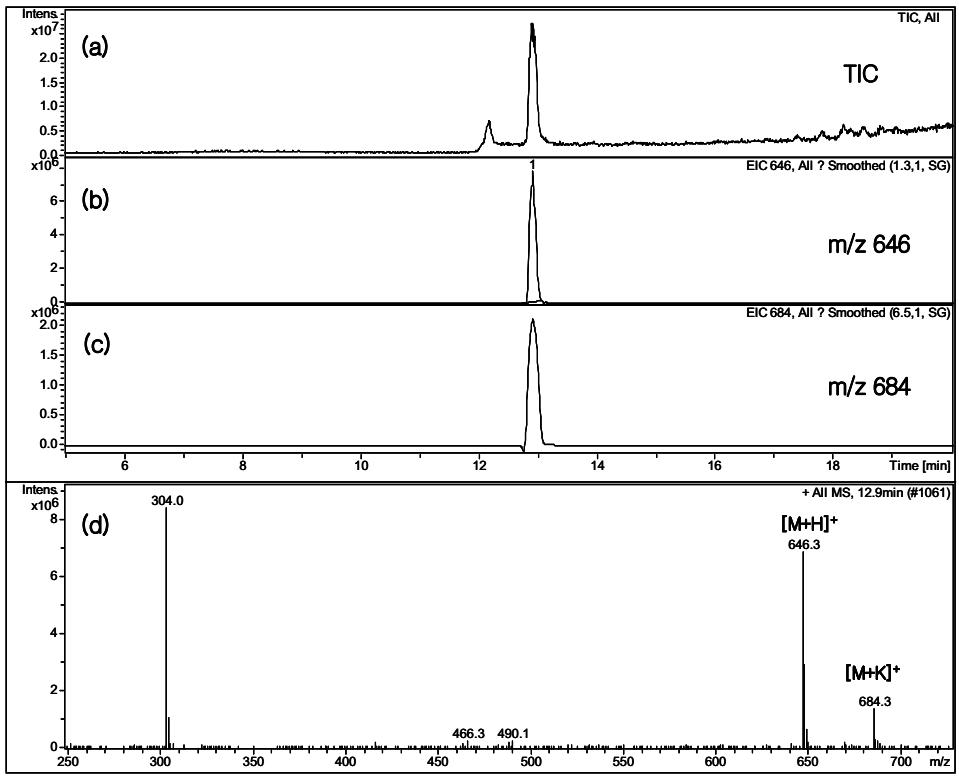

Fig. 2. ESI mass chromatograms and spectrum of **acarbose** ; (a) total ion chromatogram ; (b) and (c) extracted ion chromatograms ; (d) full scan mass spectrum.

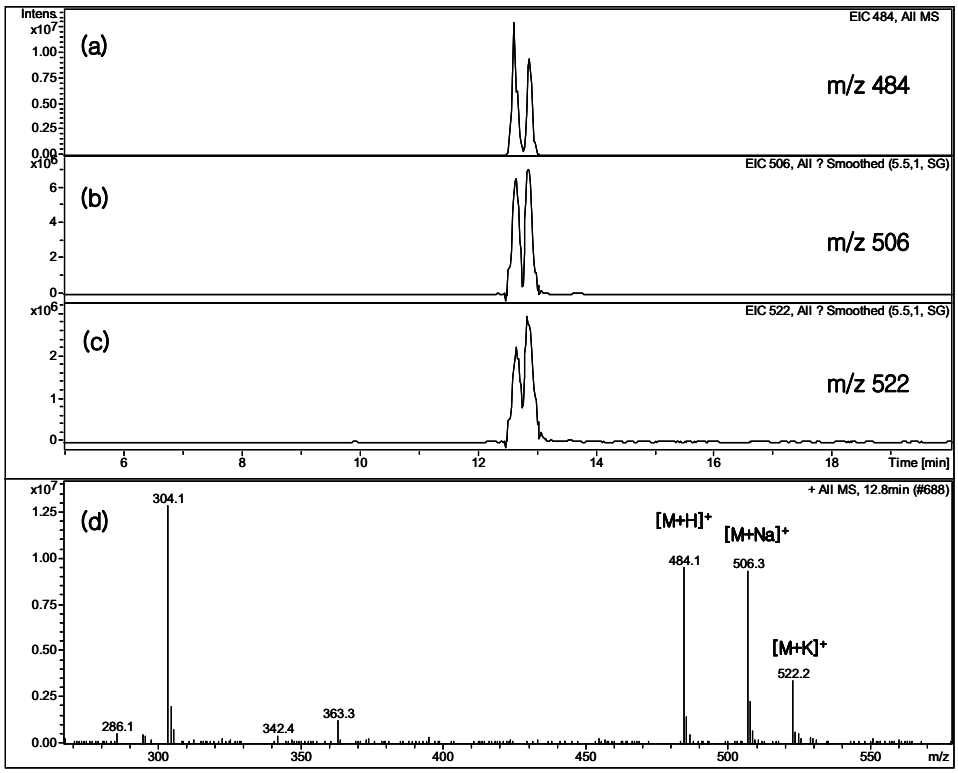

Fig. 3. ESI mass chromatograms and spectrum of **Component-II** ; (a)~(c) extracted ion chromatograms ; (d) full scan mass spectrum.

이온으로 검출되기 때문에 acarbose의 full scan spectrum에서는 나타나지 않는 m/z 484에 대한 extracted ion chromatogram (*Fig.* 3 (a)~(c))을 그린 후 integration하면 비록 full scan spectrum에 의해서 생성된 total ion chromatogram (TIC)에서는 두 화합물이 겹칠지라도 정량에서는 문제가 없게 된다. 이는 GC/MS나 LC/MS를 사용하여 화합물을 정량할 경우 ^{1}H대신에 ^{2}D를 ^{12}C 대신에 ^{13}C이 치환된 동위원소 화합물을 내부표준물질로 사용하여 정량하면 보다 향상된 정량이 가능하다는 사실과 동일한 맥락에서 설명될 수 있을 것이다.

Acarbose의 다른 주 대사체인 component-I (*Fig.* 1)은 β-amylase에 의해서 대사가 이루어져 생성된 화합물인데 이는 12.2분에서 검출되었다. Component-I은 어미약물인 acarbose 및 대사체 component-II와 HPLC 크로마토그램에서 완전히 분리가 가능하므로 정량에 있어서 문제는 없다. 하지만, 혈액이나 소변과 같은 생체 유출물질들에는 다수의 방해 메트릭스가 존재하므로 질량분석법의 selected ion monitoring (SIM) 방법이나 full scan 검출 후 extracted ion chromatogram 방법을 이용한 특성적인 (specific) 검출방법이 유리하다. β-Amylase에 의한 생성 대사체인 component-I는 *Fig. 4*에서 보여지는 바와 같이 분자이온인 m/z 322 $[M+H]^+$는 약하게 검출되었고 m/z 304 $[M+H-H_2O]^+$가 기준 피이크로 검출되었으며 m/z 286 $[M+H-2H_2O]^+$도 토막이온으로 검출되었다. 기준 이온인 토막이온 m/z 304 이온은 어미약물인 acarbose와 대사체 component-II의 질량 스펙트럼에서도 검출되었기 때문에 머무름 시간에서 차이가 있기 때문에 문제는 되지 않지만 다른 메트릭스들이 같은 위치에서 방해물질로 작용할 수 있기 때문에 질량분석법을 이용하면 보다 나은 정량분석 결과를 얻을 수 있게 된다.

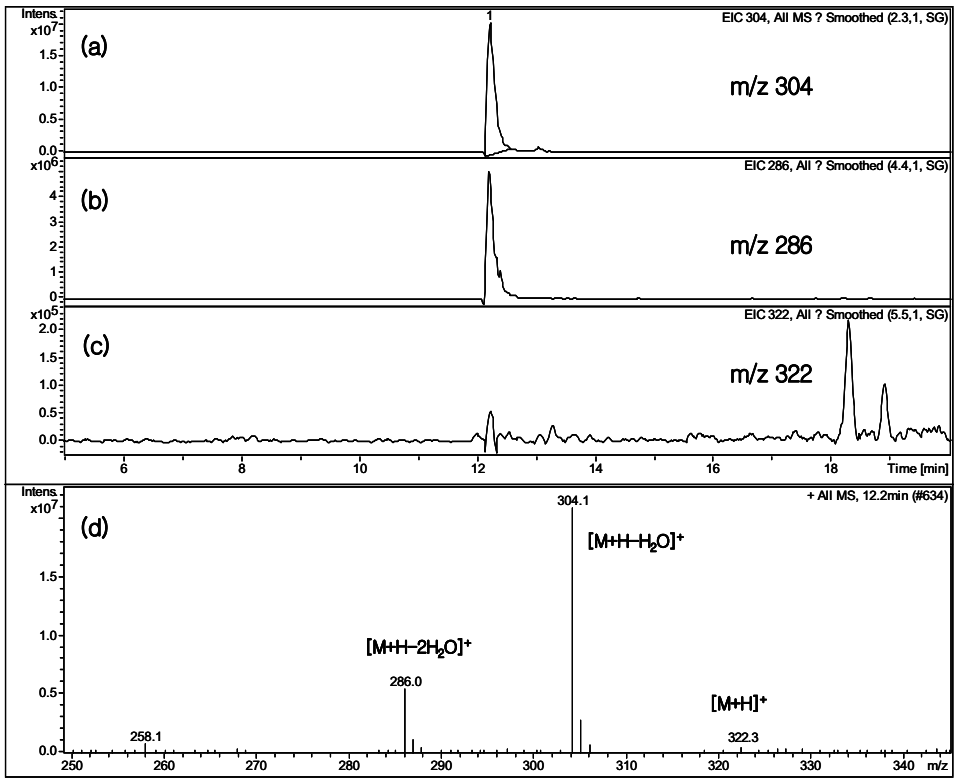

Fig. 4. ESI mass chromatograms and spectrum of **Component-I** ; (a)~(c) extracted ion chromatograms ; (d) full scan mass spectrum.

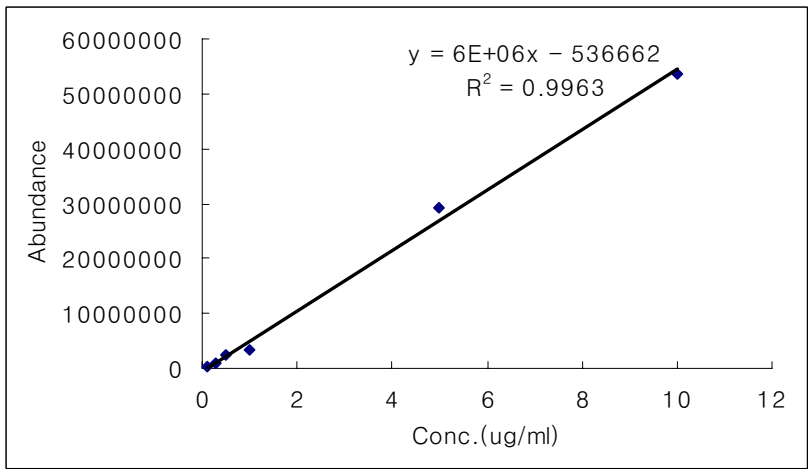

Fig. 5. Calibration curve for the quantitative analysis of acarbose.

혈액이나 뇨 중에 존재하는 acarbose의 양을 측정하기 위해서 0.1~10 ㎍/㎖의 농도에 대해서 acarbose 표준물질을 증류수에 spike한 후 앞에서 언급된 시료 전처리 방법에 따라서 검정곡선을 구하였는데 *Fig.* 5와 같으며 정량한계는 0.1 ㎍/㎖이었다. 검정곡선은 $y=6\times10^6x-536662$의 직선식과 $r^2=0.9963$의 선형관계를 얻을 수 있었으므로 acarbose를 혈액이나 뇨중의 acarbose를 정량하기에는 적절한 분석법으로 사용될 수 있을 것이다.

1 ㎍/㎖ 농도에 대해서 상대표준편차 (RSD)는 6.5% (n=3)로써 비교적 좋은 정밀도를 나타내었으며, 상대오차가 0.1 ~ 10 ㎍/㎖ 농도 범위에서 대부분 10% 미만을 나타내었다.

4. 결 론

친수성이 매우 강해서 뇨나 혈액과 같은 생체물질로부터 acarbose 및 그 대사체를 추출하기란 매우 힘든 작업이기 때문에 이를 분석하기 위해서는 생체 유출물을 냉동 건조시킨 후 발색단이 있기는 하지만 UV-Vis 검출기에 감도가 매우 낮기 때문에 유도체화 반응을 시켜서 모세관 전기영동 크로마토그래프 (CE)[7]나 HPLC로 분석하거나 TLC[2,5]로 분석하는 방법을 사용하였다. 하지만, 본 연구에서 확립한 HPLC/ESI-MS에 의한 acarbose 제제의 생체 함유량 측정방법은 기존의 방법에 비하여 간편하고 감도가 좋고 정밀도 및 정확도가 향상된 방법이라 사료된다.

HPLC/ESI-MS를 이용한 확립된 실험방법을 통해서 뇨나 혈액중에 존재하는 낮은 농도범위 (0.1~10 ㎍/㎖)에서의 acarbose의 확인 및 농도 측정이 가능하며 아울러 그 대사체인 component-Ⅰ 및 component-Ⅱ의 존재도 확인 할 수 있을 것이다. 따라서 탄수화물 제제인 acarbose 분석 조건 및 방법을 통하여 acarbose의 약동력학적 연구는 물론이며 다른 탄수화물 물질들에 대한 연구에도 활용이 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2000학년도 경기대학교 학술연구비(일반연구과제)지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. H. J. Ahr, M. Boberg, H. P. Krause, W. Maul, F. O. Müller, H. J. Ploschke, H. Weber, and C. Wünsche, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **39**, 1254-1260(1989).
2. M. -Y. Kim, S. -B. Lee, H. -S. Lee, S. -Y. Lee, J. -S. Baek, D. Kim, T. -W. Moon, J. F. Robyt, and K. -H. Park, *Arch. Biochem. Biophy*., **371**, 277-283(1999).
3. M. Qian, R. Haser, G. Buisson, E. Duée, and F. Payan, *Biochemistry*, **33**, 6284-6294(1994).
4. S. P. Clissold and C. Edwards, *Drugs*, **35**, 214-243(1988).
5. S. -B. Lee, K.-H. Park, and J. F. Robyt, *Carbohydr. Res.*, **331**, 13-18(2001).
6. L. Sangiorgio, T. Attardo, L. Condorelli, and M. Lunetta, *Arch. Geron. Geria*., **31**, 27-34(2000).
7. I. Rethfeld and G. Blaschke, *J. Chromatogr. B*, **700**, 249-253(1997).