

기체크로마토그래피를 이용한 제제 중의 보글리보스 정량

이재윤 · 안문규[#]

경성대학교 약학과

(Received August 22, 2003; Revised September 22, 2003)

Determination of Voglibose in Pharmaceutical Preparation by Gas Chromatography

Jae-Yoon Lee and Moon-Kyu Ahn[#]

Department of pharmacy, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

Abstract — Voglibose is a new antidiabetic agent currently being developed by the research and development division of Takeda chemical industries Ltd. in Japan. Basic research for the determination of voglibose in pharmaceutical preparation by gas chromatography. This method utilizes voglibose to give its acyl compound with acetyl anhydride in pyridine solution. The calibration curve for voglibose was linear over the concentration range of 0.08–0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ with correlation coefficient of 0.996. The detection limit for voglibose was 0.016 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and the result of recovery test was 101.6% with relative standard deviation of 2.0% by standard addition method.

Keywords □ voglibose, gas chromatography, antidiabetic agent

보글리보스((+)-L,-[1(OH),2,4,5/3]-5-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-ethyl]amino-1-C-(hydroxymethyl)-1,2,3,4-cyclohexanetetrol)(Fig. 1)는 1981년 일본 다케다 약품공업 주식회사에서 합성한 α -glucosidase 저해작용이 있는 화합물¹⁻⁹⁾로 경구투여에 의해 탄수화물의 소화의 최종단계인 2당류로부터 단당류로의 분해를 저해하고 당질의 흡수를 억제·지연시켜 식후 고혈당을 억제하는 새로운 형의 당뇨병 치료제이다.

Sulfonylurea계, biguanide계 등 경구용 혈당강하제는 이미 상승된 혈당치를 저하시키는 것과는 달리 혈당치의 상승을 저해하므로 혈당치 변동이 적어 일정시간 동안 혈당치를 유지시켜 주는 역할을 한다.

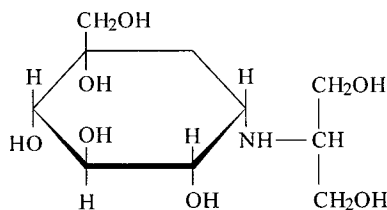


Fig. 1 – Chemical Structure of antidiabetic drug voglibose.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4882 (팩스) 051-628-6540
(E-mail) mkan@star.kyungsoong.ac.kr

이 물질은 제품허가시에 여러가지 물리화학적인 성질로서 적외 흡수스펙트럼, 핵자기공명스펙트럼(¹H), 선풍광 등에 대하여 보고한 바 있고, 또한 유연물질에 대한 순도시험은 액체크로마토그래프법, 0.1N 과염소산 표준액을 사용한 전위차적정, taurine과 NaIO₄ 그리고 강산성이온교환수지를 고정상으로 사용한 HPLC법은 유도체화반응 시액을 동일하게 흘리기 위한 별도의 장비와 이들을 가열시키기 위한 장비가 필요하다는 단점을 가진 정량 법이다.¹⁰⁾

그러나 보글리보스와 같이 당뇨병 치료제이면서 유사구조를 가진 아카보스는 scintillation counter, TLC, capillary electrophoresis, on-line HPLC/ESI-MS에 의한 방법¹¹⁾ 등이 보고되어 있으나 보글리보스에 대하여는 보고된 바 없다.

보글리보스는 휘발성, 흡광성과 형광성이 결여된 성분이므로, 정량 시는 이를 유도체화반응을 시켜야 한다.

이에 본 연구에서는 당 분석 시 일반적인 유도체화반응으로 사용되는 acylation 반응을 pyridine 용액 중에서 시행하여 최적의 gas chromatography(GC) 분석법을 확립하고자 한다.

실험방법

시약

무수초산은 Lancaster사제, 메탄올 및 피리딘은 Merck사제를 사용하였으며, molecular sieves 4 Å 및 무수 카페인인 Sigma 사

제, 보글리보스 표준품은 (주)제일제당에서 기증받아 사용하였다. 그외 시약들은 모두 특급을 사용하였다. 본 시험에 사용된 모든 시액은 탈염된 정제수를 사용하여 제조하였다.

기기

GC는 Agilent 사의 GC 6890 series에 autosampler를 부착하여 사용하였으며, 데이터 수집 및 편집을 위해 Agilent 사의 Chem Station software(Revision Code A.06.03)를 사용하였고, 이동상은 순도 99.999%의 질소를 사용하였다. Column은 Agilent 사의 HP-1(30 m×0.32 mm×0.25 μm)를 사용하였고, 시료전처리를 위해 한일과학산업 사제의 원심분리기(모델명 : HMR-210IV)를 사용하였다.

표준용액

보글리보스 표준품 약 20.0 mg을 정밀하게 취하여 25 ml 갈색 용량플라스크에 옮긴 후 95% MeOH 20 ml를 넣어 녹인 후 표선까지 채워서 혼화하였으며, 필요 시 이를 95% MeOH로서 적절히 희석하여 사용하였다.

유도체화시액

내부표준물질로 사용할 무수카페인 약 5 mg을 정밀하게 취하여 무수피리딘 20 ml에 녹인 용액을 유도체화반응 직전에 2배 용량의 무수초산과 혼화하여 사용하였다.

시료전처리

검체를 곱게 분말화하여 보글리보스로서 약 3~4 mg 해당량을 취하여 원심분리관에 넣은 후 95% MeOH 10 ml 넣고 30분간 강진탕한 다음 이를 6,000 rpm에서 원심분리하였다. 상정액을 25 ml 갈색 용량플라스크에 옮긴 후 원심분리관에 95% MeOH 7 ml를 넣어 남은 잔사를 용해시킨 다음 앞서와 동일하게 전처리하고, 이때 얻은 상정액을 앞서 모은 것과 합하였으며, 95% MeOH 5 ml를 사용하여 1회 추가 반복하였다. 상정액들을 모은 25 ml 갈색 용량플라스크에 95% MeOH를 사용하여 표선까지 채워 혼화한 것을 시험액으로 하였다.

유도체화반응 조작

표준액 및 시험액 일정량을 GC vial에 취하여 70°C에서 증발 건조시킨 후 유도체화시액 0.5 ml를 넣고 강진탕한 후 70°C에서 1시간 동안 항온건조기에 넣었다. 이를 흐르는 물로 식혀서 GC 분석하였다.

재현성 및 회수율

표준액 일정량을 여러 vial에 취하여 유도체화반응 조작에 따라 전처리한 후 GC 분석하여 내부표준물질의 피크 면적에 대한

보글리보스 유도체 피크의 면적 비율을 산출하여 각 농도별 재현성과 검정곡선을 통한 회수율을 살펴보았다.

GC system

시료 주입량은 1 μl로 하였고, split ratio는 5:1로 하였다. 질소를 이동상으로 하여 유속을 1.0 ml/min으로 유지하였고, 처음 오븐 온도를 170°C에서 5분간 유지한 다음 분당 5°C씩 상승시켜 270°C까지 올린 후 5분간 유지하는 temperature programming system을 사용하였다. 검출기는 FID를 사용하였으며, 주입기 온도 260°C, 검출기 온도 290°C로 하였다.

결과 및 고찰

보글리보스 초산 유도체 크로마토그램

보글리보스 0.08 mg 해당량의 표준액을 vial에 취하여 70°C에서 증발건조시킨 것을 유도화반응을 거쳤으며, 이를 공시험 결과와 상호비교하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 9분대에 내부표준물질로 사용된 카페인 피크가 검출되었고, 25분대에 유도화된 보글리보스 피크가 검출되었다.

보글리보스 유도체 피크가 2개인 것은 cyclohexane 구조에서 어느 한 부위의 이성질체화에 따른 분리에 의한 것이 아닌가 사료된다. 앞으로 고정상이나 조건의 검토 등으로 확인코자 한다.

보글리보스 초산 유도체화 반응시간

보글리보스 0.08 mg 해당량의 표준액을 vial에 취하여 70°C에서 증발건조시킨 것을 유도화반응을 거쳤으며, 각 온도별 반응 시간에 따른 내부표준물질인 카페인의 피크에 대한 보글리보스

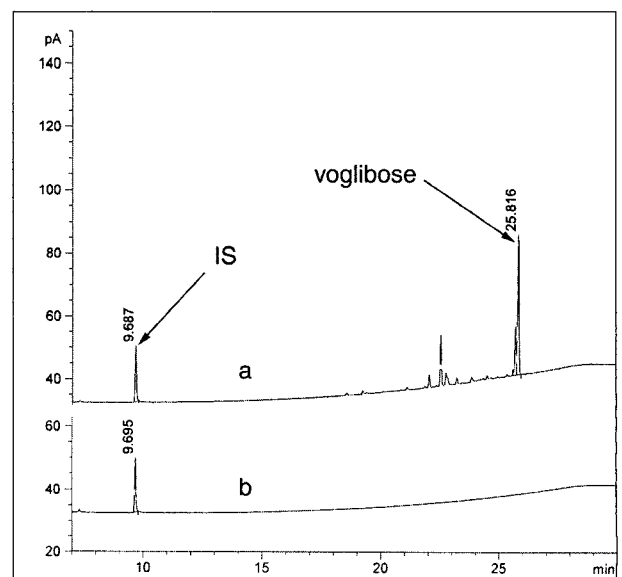


Fig. 2 - Chromatogram of voglibose (a) and blank (b).

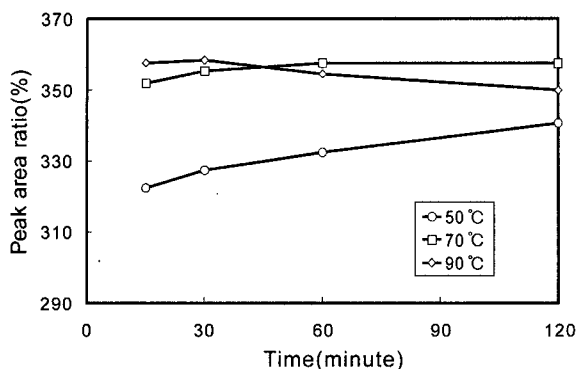


Fig. 3 - Effect of temperature and time on derivatization reaction.

피크의 면적 비율을 구한 결과 Fig. 3와 같았다. 그림에 나타난 바와 같이 50°C의 경우 반응이 완만하면서 느린 결과를 보였고 90°C의 경우 반응이 빨리 진행되었으나 시간에 따라 피크가 감소하는 양상을 보여 고온에 따른 유도체의 불안정성이 우려되었다. 반면 70°C의 경우 15분경에서 약 98% 이상의 반응이 진행되었고, 2시간의 긴 반응에도 안정한 결과치를 보여 이후 유도체 반응 시 70°C에서 1시간 반응시켰다.

보글리보스 초산 유도체의 경시변화

초산 유도체의 경시변화를 살펴본 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 24시간 경과 시 약 99.2%를 보였으나, 48시간 경과 후에는 96.5% 정도를 보이면서 지속적으로 감소하는 양상을 보여 정량적인 분석을 위해서는 유도체 후 24시간 이내에 시행하여야 하는 것으로 나타났다.

검정곡선

보글리보스 표준액을 여러 농도로 취하여 유도화를 거친 후 GC 분석하여 검정곡선을 작성한 결과 Fig. 5와 같으며, 기울기 1164.253, y 절편 -84.443, 상관계수 0.9999로 나타났다. 검정곡선은 0.08~0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 까지 직선성을 보였으며, Splitless 모드로

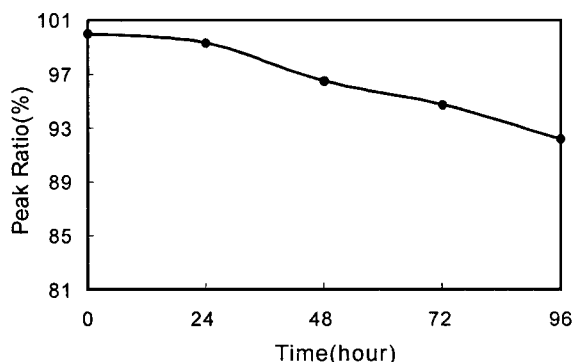


Fig. 4 - Peak ratio of voglibose derivative for variation of time.

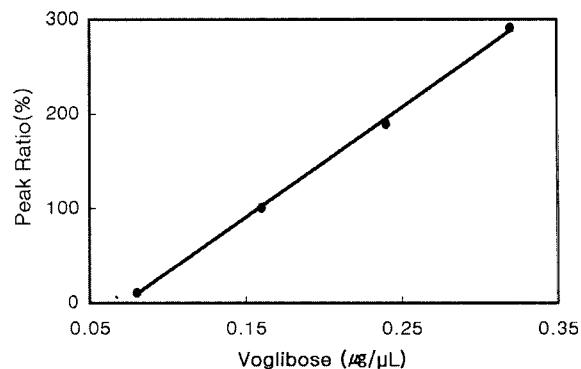


Fig. 5 - Calibration curve for voglibose (0.08 to 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ concentration range).

분석하였을 경우 최소 0.016 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 까지 분석 가능한 것으로 나타났다.

회수율

농도별 회수율을 살펴본 결과는 Table I과 같았다. 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 를 분석하여본 결과 회수율이 97.5%, 상대표준편차 3.4%였으나, 0.24, 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 경우 각각 98.8 ± 2.2 , 101.6 ± 2.0 으로 보다 양호하게 나타났다. 보글리보스는 내복량이 0.2~0.3 mg 정도의 미량이므로 보다 재현성있는 측정을 위해서는 주입량이 많아야 한다. 이 점을 고려, 최소한 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 이상의 농도를 취하여 분석하여야 할 것으로 사료된다.

시료분석

보글리보스 정제를 곱게 분말화하여 보글리보스 약 3~4 mg 해당량을 취한 후 시료전처리방법에 따라 제조한 시험액 1 mL를 바이알에 옮겨 이를 유도화반응 조작법에 따라 유도화 한 것을 GC 분석한 결과 0.2 mg 함유 정제로부터 97.5% 회수율과 상대

Table I - Recovery test for voglibose (n=7)

Added amount ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Found amount ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Recovery (%)	RSD* (%)
0.16	0.156	97.5	3.4
0.24	0.237	98.8	2.2
0.32	0.325	101.6	2.0

*Relative standard deviation.

Table II - Analytical result of voglibose in pharmaceutical dosage form (n=7)

Nominal amount (mg/Tab.)	Found amount (mg/Tab.)	Result (%)	RSD* (%)
0.2	0.195	97.5	2.5
0.3	0.295	98.3	2.4

*Relative standard deviation.

표준편차 2.5%를, 0.3 mg 함유 정제로부터는 98.3% 회수율과 상대표준편차 2.4%(Table II)를 얻었다.

결 론

1. 무수카페인을 내부표준물질로 하여 항온건조기를 통해 반응시킬 때 50°C에선 반응이 느렸으며, 90°C의 경우 짧은 반응시간에 비해 유도체의 불안정으로 반응시간에 따른 결과치가 지속적으로 감소하였으나, 70°C의 경우 1시간 후부터 지속적인 안정성을 보였다.

2. 최적의 유도화 반응으로 얻은 시험액의 경시변화를 살펴본 결과 24시간 경과 시 99.2% 였으나, 48시간 이상 경과 시 96.5% 이하로써 지속적으로 감소하는 양상을 보였다.

3. Split ratio를 5:1로 하여 얻은 검량선은 0.08~0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 까지 직선성을 보였으며, splitless 모드로 분석 시 0.016 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 까지 분석가능할 것으로 사료된다.

4. 0.16, 0.24 및 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 대상으로 회수율(%)를 조사한 결과 각각 97.5, 98.8, 101.6였으며, relative standard deviation는 각각 3.4, 2.2 및 2.0%으로 나타났다.

5. 제제분석에서 0.2, 0.3 mg/정을 분석한 결과 함량(%)이 각각 97.5, 98.3로 나타났으며, 상대표준편차(%)는 각각 2.5, 2.4로 나타났다.

감사의 말씀

이 논문은 경성대학교 2003년도 특별연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Strowing, S. and Raskin, P. : Ellenberg & Rifkin's Diabetes

mellitus. 5th ed., Appleton & Lange, Connecticut pp. 709-733 (1997).

2) Nathan, D. M. : Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus. 5th ed., Appleton & Lange, Connecticut pp. 735-760 (1997).

3) Levovitz, H. E. : Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus. 5th ed., Appleton & Lange, Connecticut pp. 761-788 (1997).

4) LeRoith, D., Taylor, S. I. and Olesky, J. M. : Diabetes mellitus, A fundamental and clinical text. 1st ed., Lipincott-Raven New York (1996).

5) United Kingdom Prospective Diabetes Study Group : United kingdom prospective diabetes study 24, A 6-year, randomized, controlled trial comparing sulfonyleurea, insulin, and metformin therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes that could not be controlled with diet therapy. *Ann. Intern. Med.* **128**, 165 (1998).

6) Schwartz, S., Raskin, P., Fonseca, V. and Graveline, J. F. : Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* **338**, 861 (1998).

7) Inzucchi, S. E., Maggs, D. G. and Spollet, G. R. : Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* **338**, 867 (1998).

8) Maggs, D. G., Buchanan, T. A. and Burant, C. F. : Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **128**, 176 (1998).

9) Horii, S. : Synthesis and α -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives potential oral antidiabetic agents. *J. Med. Chem.* **29**, 1038 (1986).

10) 제일제당제약사업부 : 베이슨 정, 약사위원회 구비 자료 (1995).

11) Cho, H. W. and Myung, S. W. : Carbohydrate drug(Acarbose) analysis using by the on-line HPLC/electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Sci. & Tech.* **15**, 574 (2002).