

고성능 액체크로마토그래피를 이용한 Biotin의 정량

김동수^{*} · 이영자^{**} · 정동윤^{**} · 이동엽 · 안문규^{*}
경성대학교^{*} 식품공학과, 약학과
(2003. 8. 18. 접수, 2003. 10. 21 승인)

Determination of Biotin by HPLC

Dong-Soo Kim^{*}, Young-Ja Lee^{**}, Dong-Youn Jeong^{**}, Dong-Yup Lee
and Moon-Kyu Ahn^{*}

^{*}Department of food science and technology and Department of pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea
(Received Aug. 18, 2003, Accepted Oct. 21, 2003)

요 약 : Biotin을 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin (BrMDMC), 18-crown-6와 K₂CO₃를 사용하여 형광성 유도체로 만들어 (들뜸 파장 360 nm, 방출파장 410 nm에서) 기울기 용리 HPLC 분석을 하였다. 검정선의 농도범위는 5 ~ 400 ng, 검출한계는 2 ng, 회수율 98.75%, 그리고 상대표준편차는 1.1% 이었다. 시료의 전처리는 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하였고, 유도체 제조의 중탕온도는 50 °C에서 30분간 시행하였다.

Abstract : A high performance liquid chromatography gradient elution method with fluorescence detection for the determination of biotin in pure form and pharmaceutical preparations has been developed. BrMDMC gives intense fluorescence and the fluorescence was monitored with excitation at 360 nm and emission at 410 nm. The calibration curve for biotin shows good linearity over the range of 5 ~ 400 ng with correlation coefficient of 0.999. The detection limit of biotin was 2 ng and the result of recovery was 98.75% with relative standard deviation of 1.1%.

Key words : Biotin, BrMDMC, HPLC, Fluorescence detection

1. 서 론

Biotin(hexahydro-2-oxo-1H-thieno[3,4]imidazole-4-pentanoic acid)은 수용성 비타민으로서 비타민 H로도 알려져 있으며, 모든 생체세포내에 존재하고 각종 박테리아나 고등 식물에서 생합성되어진다.¹

Biotin의 생체내 역할과 이의 결핍에 따른 심각한 증세 등으로 인해 식품, 건강보조식품 및 의약품 중의 biotin 분석이 중요시 되어, 미생물학적, 물리화학적 및 생화학적 정량법 등의 여러가지 분석법이 개발되고 있다.^{2~10}

미생물배양법은 감도는 우수하나 전처리 및 균에 따라 배양시간이 18 ~ 22시간 정도 소요되는 단점을 가지고 있다. HPLC법의 경우 Baker 및 Collins 등¹¹에 의해 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin (BrMMC)가 형광

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)51-620-4882 Fax : +82+(0)51-628-6540

E-mail : mkan@star.kyungsung.ac.kr

성 유도체화시약으로 개발되면서 carboxyl group을 가진 지방산이나 방향족 화합물, 살충제, 바비탈 류 의약품 등의 분석에 많이 이용되고 있다. Biotin의 분석은 Desbene 등¹²이 BrMMC를 이용하여 처음 시도하였으며, 최근 Toyo'oka¹³는 BrMMC 계열 유도화시약 중 4-bromomethyl-6,7-methylenedioxcoumarin과 BrMDC가 BrMMC보다 높은 감도를 보였다고 보고한 바 있다. 이에 본 연구에서는 BrMDC를 biotin 정량에 응용하면서 유도화 반응에 대한 변수 등을 살펴, biotin 정량을 위한 최적 조건을 조사하여 기존의 연구결과와 상호비교, 검토하여 보고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

BrMDC, K₂CO₃ 등은 Aldrich 사제, 18-crown-6 (1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane), biotin 등은 Fluka 사제, 아세톤, 아세토니트릴 및 메탄올 등은 Merck 사제 (HPLC급)를 사용하였다. 그외 시약들은 모두 시판 특급을 사용하였다. 본 실험에서 사용되는 모든 수용액은 탈염된 정제수를 사용하여 제조하였다.

2.2. 기기

HPLC system은 Jasco 사제의 Jasco FP-1580 intelligent HPLC pump, Jasco FP-1520 intelligent fluorescence detector, Jasco DG-1580-54 4-Line degasser, Jasco LG-1580-04 quaternary gradient unit를 사용하였고, column은 Waters 사의 Waters Cosmosil packed C₁₈ (4.6×150 mm)를 사용하였다.

2.3. 표준용액

Biotin 20.0 mg을 정밀하게 취하여 100 mL 메탄올로 녹여 표준액으로 하였으며, 필요시 메탄올로 희석하여 사용하였다.

2.4. 유도체화 시액

BrMDC 120 mg, 18-crown-6 100 mg을 25 mL 아세톤에 녹여 유도체화 용액으로 사용하였다.

2.5. 시료 전처리

시료중의 여러 성분으로부터 biotin을 효율적으로 분리 및 농축하기 위해 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 사용하

여 전처리하였다. 먼저 포화 NaHCO₃ 용액으로 시료를 녹인 후 5000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 그 상정액 5 mL를 취하여 미리 메탄올 및 물 5 mL 씩으로 활성화시킨 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 통과시켰다. 거른액은 폐기하고, 2% 메탄올 5 mL를 통과시킨 거른액을 모은 후 4 M HCl 수방울로 산성화하여 새로 활성화시킨 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 통과시켰다. 거른액은 폐기하고, 5% 메탄올 5 mL로 Sep-Pak C₁₈를 세척한 후 15% 메탄올 5 mL를 통과시켜 biotin 부위를 등근플라스크에 채취하였다. 등근플라스크에 아세톤 5 mL 넣고 혼합한 후 감압증발건조시킨 다음 메탄올 일정량을 넣어 녹인 것을 시험액으로 하였다.

2.6 유도체 합성 반응

표준용액 및 Sep-Pak C₁₈로 전처리된 시험액 일정량 (0.5~1.0 mL)을 vial에 취하여 80 °C 건조기에서 증발건조시킨 다음 K₂CO₃ 35 mg, 아세톤 800 μ l 및 유도화 시액 200 μ l를 넣고 capping, 50 °C에서 30분간 증탕한 후 흐르는 물로 식히고, 이를 주사기 필터 (재질 : PTFE)로 여과한 것 10 μ l를 column에 주입하여 HPLC로서 분석¹³하였다.

2.7. HPLC System

이동상으로서 물과 아세토니트릴을 사용하여 기울기 용리를 이용하여 Table 1과 같은 조성의 용리액으로 유속은 1.0 mL/min으로 하고, 시료 주입량은 10 μ l로 하였으며, 형광검출기의 최대 방출파장과 들뜸파장을 각각 410 nm, 360 nm으로 하여 분석하였다.

Table 1. Mobile phase component for gradient elution method

Elution time (min)	Acetonitrile (%)	Water (%)
0.00	10.0	90.0
1.00	15.0	85.0
2.00	15.0	85.0
4.00	25.0	75.0
5.00	28.0	72.0
6.00	30.0	70.0
13.00	30.0	70.0
14.00	10.0	90.0
15.00	10.0	90.0

2.8. 회수율

표준액 일정량을 여러 vial에 취하여 2.6에 따라 유도화를 한 후 HPLC 분석하여 재현성을 살펴보았다 (Table 2). 또한, 시료를 2.5의 방법으로 전처리하고, 유도화하여 HPLC로 분석하여 회수율을 계산하였다 (Table 3).

Table 2. Results of recovery test for biotin

No.	Amount (μg)		Recovery (% \pm R.S.D*)
	Added	Found	
1	50.0	47.52	95.02 \pm 1.8
2	100.0	97.61	97.63 \pm 1.8
3	200.0	197.4	98.75 \pm 1.1

* Relative Standard Deviation (n=7)

Table 3. Determination of biotin in pharmaceutical samples

Products	Nominal content(μg)	Found (% \pm R.S.D)*
Tablet 1	45.05	103.5 \pm 2.6
Tablet 2	45.02	97.61 \pm 3.9
Injection 1	100.0	106.4 \pm 1.7
Injection 2	250.0	106.1 \pm 1.0

* Relative standard deviation (n=5)

3. 결과 및 고찰

3.1. MDMC-biotin 크로마토그램

Biotin을 메탄올에 녹여 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 한 후, 200 μl 를 vial에 취하여 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 증발건조시킨 것을 유도화반응을 거친 용액과, biotin 용액을 넣지 않고 동일하게 전처리한 바탕시험액의 크로마토그램을 구한 결과, BrMDMC 피크 바로 뒤에 MDMC-Biotin 피크가 검출되었다(Fig. 1).

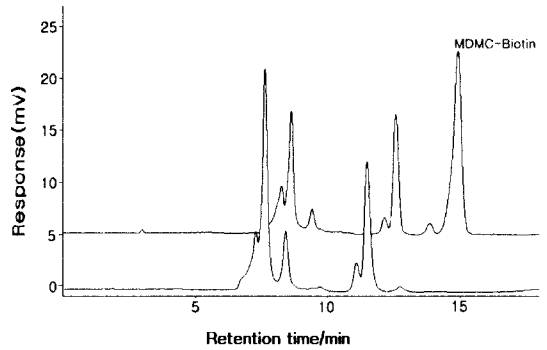


Fig. 1. Chromatogram of blank(below) and test(above) solution. Injected biotin was 400 ng.

3.2. 유도화시 온도별 증탕시간에 대한 영향

Biotin을 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 증발건조시킨 후 유도화반응을 거칠 때, 각 온도에서 증탕시간에 따른 MDMC-biotin 피크의 면적 변화를 살펴보았다(Fig. 2). 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 1시간까지는 거의 일정하였으나 그 이후 서서히 피크 면적이 증가하는 양상을 보였으며, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 일정한 결과치를 보이지 않고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에 비해 높은 결과치를 보였다. 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 완만하게 상승하고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에 비해 낮은 면적을 나타냈다. 이는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 유도화가 전부 이루어지지 않았기 때문인 것 같다.

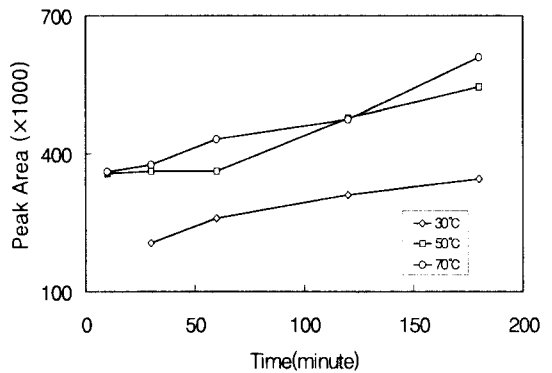


Fig. 2. Effect of heating time on the main peak area of MDMC-biotin when MDMC-biotin reacts.

3.3. 증탕 후 방치시간에 대한 영향

그림2에서 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 증탕 시 1시간까지는 일정한 수치를 보였으나 그 이후 증가추세를 보였으므로, BrMDMC의 안정성을 살펴보기 위하여 바탕시험액을

30분간 중탕한 것을 상온으로 내리고 방치 시간별로 분석한 결과 1시간 이후 증가하는 추세를 보였다. 중탕한 것을 4 ℃로 유지하면서 시간별로 분석한 결과 2시간 이후부터 피크면적이 지속적으로 증가하는 양상을 보였다. 이때 2시간, 4시간, 6시간 및 8시간 경과한 마당시험액에서 검출된 피크에 대하여 검정선으로 부터 산출한 값은 각각 1.4, 8.3, 13.4 및 19.5 ng 등으로 나타나 유도화 반응 후 즉시 분석 해야함을 알았다.

3.4. 중탕 후 여과에 대한 영향

BrMDMC 등의 bromoalkyl형 유도화 시약은 촉매제 (K_2CO_3) 및 상 이동매체 (18-crown-6)의 공존하에 아세톤 등의 비양성자성 유기용매 중에서 유도화 반응을 일으킨다. Biotin의 carboxyl group이 K_2CO_3 와의 중화반응으로 형성된 potassium염이 18-crown-6의 K^+ 에 대한 host-guest complex 형성으로 아세톤에 대한 용해도가 증가되면서 시약중의 BrMDMC와의 에스테르화 반응이 촉진된다. Hahn 등¹⁴은 18-crown-6 및 K_2CO_3 의 첨가 대신 triethylamine 및 tetrabutyl ammonium hydroxide 용액을 사용하여 dicarboxylic acid 화합물의 유도화를 시도하였으나, 이 경우 용존하는 물에 의한 역반응과 상 이동매체의 부재에 따른 낮은 유도화 반응 등의 문제점이 나타났다.

그러므로 유도화 시약은 수분 및 빛 등에 불안정한 성질을 가지는 단점이 있어 세심한 주의와 숙련을 필요로 한다. Hahn 등¹⁴도 장기간의 유도화 반응에 따른 부산물의 지속적인 증가로 낮은 회수율을 보인다고 하였다. Wolf 및 Korf 등^{15,16}은 이러한 유도화 시약의 단점을 보완하기 위해 촉매제 및 상 이동매체와 혼합된 시료액과 유도화 시약을 별도로 주입, 혼합시킨 후 가열된 coil을 지나면서 유도화 반응이 일어나도록 자동 시료 주입기를 이용한 자동화를 시도하여 시료 전처리 시 시약의 변질 등의 부반응에 따른 재현성의 저하를 방지하려고 하였다. 본 연구에서는 공시험액을 50 ℃, 30분간 중탕한 후 냉장 보관을 하여도 MDMC-Biotin의 피크와 동일한 시간에 나타나는 미지의 피크의 발생 원인을 살펴보기 위해, 중탕 후 흐르는 물로 냉각시킨 것을 즉각 주사기 필터를 사용하여 거른 것을 방치하여 보았다. 그 결과 7일간 경과되어도 미지의 피크가 형성되지 않았을 뿐만 아니라 거르지 않은 시료액의 경우 지속적인 변색과 함께 미지의 피크의 지속적인 상승이 일어나는 것으로 보아 K_2CO_3 등에 의

한 부반응이 일어난 것으로 추정되었다. 이에 Hahn 등¹⁴이 시도한 triethylamine 혹은 tetrabutylammonium hydroxide를 사용한 방법은 수분 및 느린 반응속도 문제 이외에, 부반응을 방지하기 위한 거름과정을 거칠 수 없어 Wolf 등^{15,16}의 자동화 방법이 아닌 경우, 부적절한 것으로 사료된다. 이후 모든 전처리에서 50 ℃에서 30분간 중탕하고 냉각시킨 것을 주사기 필터를 이용하여 거른 것을 사용하였다.

3.5. 검정선

Biotin 표준용액과 이를 10배 희석한 용액 일정량을 vial에 취하여 80 ℃에서 증발건조시킨 후 2.6의 방법에 따라 유도화한 것을 HPLC로 분석한 결과, 5~400 ng까지의 농도에서 기울기 3673.0, Y 절편 7162.2, 상관관계수 0.999로 나타나 매우 양호한 직선을 얻었다. S/N=3을 기준으로 할 때 검출한계는 2 ng이었다.

3.6. 시료분석

Biotin 함유 시판 의약품을 분석하였다. Biotin으로서 30~60 μ g 해당량을 50 mL 용량 플라스크에 넣고 포화 $NaHCO_3$ 용액 30 mL를 넣고 10분간 강진탕한 후, 포화 $NaHCO_3$ 용액으로 표선까지 채웠다. 이를 2.5 시료전처리 과정을 밟아 농축한 후 MeOH에 녹인 것을 vial에 옮겨 2.6 유도화 반응 조작에 따라 유도화한 후 HPLC로써 분석하였다(Table 3). Tablet 2를 제외한 모든 제제 중 함량은 모두 표시량 이상으로 나타났으며, 제제마다 다르지만 낮은 상대표준편차를 보였다.

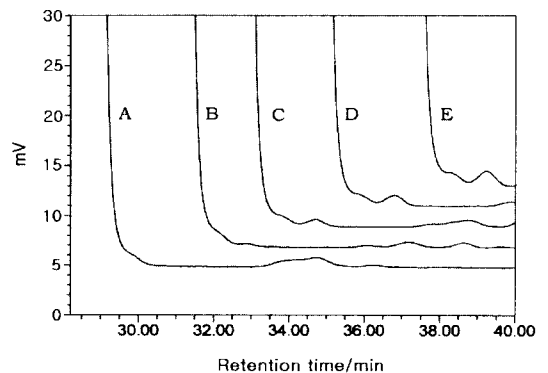


Fig. 3. Effect of standing time of blank solution. (A : 0 hour, B : 2 hour, C : 4 hour, D : 6 hour and E : 8 hour)

4. 결 론

1. Biotin 제제로부터 biotin을 Sep-Pak C₁₈ cartridge 로써 처리하여 분리취하였다.
2. Biotin의 유도화는 BrMDC와 촉매로써 18-crown-6와 K₂CO₃를 사용하고, 반응온도는 50 °C에서 30 분간 중탕하였다.
3. 이동상은 아세토니트릴과 물의 혼합액으로 이를 1 mL/min.의 유속으로 기울기 용리로 분리하였다.
4. 검정선의 직선범위는 5 ng~400 ng이었으며, 상관계수는 0.999이었다.
5. Biotin 순품에 대하여 실험한 결과 회수율 98.75%, 변동계수 1.1% 이었다.
6. 시판제제 중 정제 (tablet)와 주사제 (injection)를 분석한 결과 97.63%, 106.4%의 함량과 3.9%, 1.7%의 변동계수를 각각 나타내었다.

참고 문헌

1. A. L. Lehninger, Principles of biochemistry, Worth Publishers Inc., p767(1982).
2. 日本ビタミン學會編, ビタミン學實驗法 II-水溶性ビタミン, 東京化學同人, p475(1985).
3. E. Livaniou, D. Costopoulou, I. Vassiliadou, L. Leondiadis, J. O. Nyalala, D. S. Ithakissios, G. P. Evangelatos, *J. Chromatogr. A*, **881**, 331 (2000).
4. A. E. Ekpe, C. Hazen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16**, 1311(1998).
5. T. Yokoyama, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **542**, 365(1991).
6. S. Nojiri, K. Kamata, M. Nishijima, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16**, 1357(1998).
7. T. Yoshida, A. Uetake, C. Nakai, N. Nimura, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **456**, 421(1988).
8. S. Lahely, S. Ndaw, F. Arella, C. Hasselmann, *Food Chem.*, **65**, 253(1999).
9. F. Delgado Reyes, J.M.F. Romero, M.D.L. de Castro, *Anal. Chim. Acta*, **436**, 109(2001).
10. S. Tanaka, K. Komada, M. Mori, *Bunseki*, **46**, 503(1997).
11. W. Baker, C.B. Collis, *J. Chem. Soc.* p12 (1949).
12. P.L. Desbene, S. Coustal, F. Frappier, *Anal. Biochem.*, **128**, 359(1983).
13. T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta*, **465**, 111 (2002).
14. J. Stein, A. Hahn, B. Lembcke, G. Rehner, *Anal. Biochem.*, **200**, 89(1992).
15. J.H. Wolf, V. Van Der Duin, J. Korf, *J. Chromatogr.*, **487**, 496(1989).
16. J.H. Wolf, J. Korf, *J. Chromatogr.*, **436**, 437 (1988).