

# 크라운 에테르에서 유도된 키랄 컬럼을 사용한 레보티록신 나트륨 의약품의 광학순도 모니터링

전소희 · 이원재\*

조선대학교 약학대학 약학과

## Monitoring of the Optical Purity for Levothyroxine Sodium in Pharmaceuticals Using Crown Ether Derived Chiral Columns

So Hee Jeon and Wonjae Lee\*

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea

**Abstract** L-Thyroxine possessing a chiral center, the naturally occurring thyroid hormone has been used for the treatment of thyroid dysfunctions and marketed as levothyroxine (L-thyroxine) sodium salt. In this study, after extraction of levothyroxine tablet as a pre-treatment process, direct enantiomer separation of thyroxine on crown ether derived chiral columns for determination of optical purity was performed using reversed mobile phase with acid additive. The chromatographic method developed in this study was applied in the determination of optical purity of several current domestic and foreign commercialized levothyroxine tablets. Optical purity values of these commercialized L-thyroxine sodium tablets except one were higher than 99 percents.

**Keywords:** Enantiomer separation, Thyroxine, Chiral column, Optical purity

### 서 론

키랄 화합물을 구성하는 두 개의 광학이성질체 중 하나의 광학이성질체는 원하는 생리활성을 나타내고 다른 광학이성질체는 다른 활성을 나타내는 경우가 많다 [1]. 그러므로 키랄 의약품을 위한 편리하고 신뢰성 있는 광학분리 방법을 개발하는 것은 생리학이나 약물학 연구에서 뿐만 아니라 제약회사에서도 큰 관심분야로 되어있다. L-티록신 (L-T4)는 생체내 존재하는 갑상선 호르몬으로 갑상선 기능장애 치료제로 사용되나 D-T4는 갑상선 자극 호르몬 분비를 억제하는 생리활성이 보고되고 있으며 또한 고지방혈증 치료에 사용되어 졌던 것으로 알려져 있다 [2-4]. 여러 광학분리 방법중에 키랄고정상 (chiral stationary phase: CSP)을 이용한

분석법이 매우 편리하고 정확하여 가장 널리 사용되고 있지만 키랄고정상을 이용한 티록신의 직접적인 광학분리법 연구는 현재까지 몇 개의 결과만이 보고되어 있다 [3-6]. 직접적인 광학분리법의 첫 연구보고로, ovomucoid 단백질을 기초로 한 키랄고정상에서 여러 완충용액을 사용한 실험 조건에서 티록신을 광학분리하는 좋은 결과를 얻어 ( $\alpha=1.32$ ,  $R_s=2.20$ ) 이 분석법을 이용해 L-T4 sodium 약품의 정량분석에 응용하였지만 이를 위해서는 50여분에 이르는 매우 긴 분석시간을 필요로 하였다 [3]. 크라운 에테르형태의 키랄 고정상을 사용하여 티록신의 좋은 광학분리 결과가 발표되었지만 ( $\alpha=2.08-3.11$ ,  $R_s=1.00-2.60$ ) 이 연구는 분석법 개발로만 한정되었고 최근에도 인체 플라스마에서의 D-와 L-티록신을 동시분석하는 분석법이 개발되었으나 실제적인 응용연구는 하지 않았다 [5,6]. Quinine으로부터 유도된 키랄고정상을 이용하여 역상수용액에서 좋은 광학분리 결과를 얻었고 ( $\alpha=1.28$ ,  $R_s=2.32$ ) 이를 레보티록신 나트륨 제제의 정량분석과 광학순도 분석에 응용한 연구결과가 보고된

### \*Corresponding author

Tel: +82-62-230-6376, Fax: +82-62-222-5414

e-mail: wlee@chosun.ac.kr

적이 있다 [4]. 아미노산 구조형태의 티록신은 생체내에서 L-이성질체로 존재하는 호르몬이고, 시판하는 약물은 L-T4 sodium 형태로 제조되고 있다. 키랄고정상을 이용하는 직접적인 광학분리 방법은 매우 편리하고 정확성이 높아 가장 많이 응용되고 있지만 이러한 직접적 광학분리 분석법을 이용하여 시판하고 있는 레보티록신 나트륨의 광학순도를 측정하는 연구결과는 현재까지 단지 한 연구팀에 의해서만 보고되어 있다 [4]. 그러므로 시판되는 L-T4의 품질을 확인하여 광학적으로 순수한 양질의 의약품 생산토록 유도하기 위해서 이들 의약품의 신속하고 정확한 광학순도 측정을 위한 분석법개발과 이에 대한 모니터링이 필요하다. 본 연구에서는 국내외에서 시판되고 있는 여러 레보티록신 나트륨 정제 (tablet)의 광학순도 측정을 위하여 아미노산의 광학분리에 유용한 크라운 에테르 형태의 키랄고정상에서 [7-11] 티록신의 직접적인 광학분리 분석법과 전처리 과정을 새롭게 개발하였고 이를 적용하였다.

## 재료 및 실험방법

### 실험 기기 및 시약

액체크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. HPLC 구성 기기로 Waters model 1525 binary pump, 20  $\mu$ L loop를 가진 Rheodyne model 7125 주입기, dual absorbance detector (Waters 2487 detector)를 사용하였다. Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 HPLC용 column으로 (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18-C-6-TA)으로부터 유도된 CSP 1와 (-)-18-C-6-TA 으로부터 유도된 CSP 2 (250 mm L  $\times$  4.6 mm I.D. 대전, RS Technologies)을 사용하였다 [7-9]. HPLC에서 사용하는 용매는 J. T Baker (Phillipsburg, NJ)에서 D-와 L-thyroxine은 각각 Fulka (Switzerland)와 Acros (Belgium)에서 DL-thyroxine과 황산은 TCI (Japan)회사로부터 구입하였다. 레보티록신 나트륨이 주성분으로 현재 국내, 미국과 중국에서 시판중인 여러 제약회사의 정제들을 구입하였다. HPLC에서 분석하기 위한 전처리과정으로, 이들을 각각 막자사발에서 잘게 부순 다음에 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포함된 methanol을 가한 후 추출하였다. 추출한 용액을 원심분리기를 (VS-15000, Vision Scientific Co., Korea) 사용하여 윗 층을 분리한 후 여과한 다음에 얻은 용액을 HPLC에

직접 주입하였다.

## 결과 및 고찰

시판되고 있는 여러 제약회사의 레보티록신 나트륨 정제의 광학순도 측정을 위한 적합한 분석조건을 찾기위해 여러 이동상 조건에서 라세미 (racemic) 티록신의 광학분리 실험을 수행하였다. 인체 플라즈마에서의 D-와 L-티록신을 동시 분석하는 광학분리의 경우에는, 플라즈마에 존재하는 매트릭스 불순물과 겹치지 않는 분석조건을 선택하여 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>이 포함된 90% ethanol/H<sub>2</sub>O (V/V) 역상 (reversed) 이동상을 사용하였다 [6]. 그러나 본 연구의 레보티록신 나트륨 정제 (tablet)에는 색소나 첨가물이 함유되어 있어 이들의 피크와 겹치지 않도록 앞의 실험과 다른 이동상으로 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>이 포함된 100% methanol 용액을 이용하는 이동상을 가장 적절한 분석조건으로 선택하였다. 본 연구에서 HPLC column으로 (+)-18-C-6-TA으로부터 유도된 CSP 1와 (-)-18-C-6-TA 으로부터 유도된 CSP 2을 각각 사용하였는데 라세미 티록신을 광학분리할 때 CSP 1에서는 L-티록신이 먼저 용리되거나 CSP 2에서는 D-티록신이 먼저 용리됨으로 용리 순서 (elution order)를 뒤바꾸게 할 수 있는 장점이 있다 [9]. 매우 미량인 광학순도분석을 할 경우나 매트릭스가 포함되어 있는 정제 (tablet)에서 원하지 않는 불순물과 측정하고자 하는 피크와 겹치게 될 때 용리순서를 바꿈으로 유용하고 효과적인 분석을 할 수 있다 [12]. 현재 국내에서 판매되고 있는 레보티록신 나트륨 주성분의 의약품 정제를 모두 구입하였고 이들 외에 국외에서 시판하는 정제까지 앞에서 찾은 최적의 분석조건을 이용하여 이들의 광학순도를 측정하고자 하였다. 전처리작업으로, 시판하는 레보티록신 나트륨 정제에 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포함된 100% methanol을 가하여 티록신을 추출한 후 얻은 용액을 유도체화 과정없이 직접 HPLC injector에 주입하여 사용하였다.

효과적인 전처리과정임을 확인하기 위해, 전처리에서 사용되는 추출용매인 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 포함한 100% methanol에서 티록신 시료에 대한 안정도 실험을 수행하였다. Table 1은 위의 전처리 추출용매에 녹인 D-티록신과 L-티록신 시료를 상온에서 보관한 기간에 따른 광학순도 측정실험 결과이다. 새롭게 제조한 시료의 경우라 하더라도, 시판하고 있는 L-티록신 (Fluka 회사) 시약의 광학순도는 99.8%를 보이지만 D-티록신 (Acros 회사) 시약의 경우에는 94.5%의 광학순

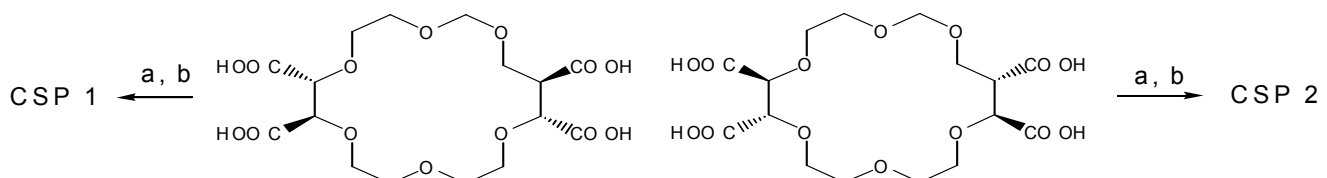


Fig. 1. Covalently-bonded CSP 1 and CSP 2 derived from (+)- and (-)-18-C-6-TA, respectively; (a) acetyl chloride (b) aminopropyl silica gel, triethylamine.

도를 보이는 것에 유의해야 한다. 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 포함한 100% methanol에 녹인 D-와 L-티록신 시료를 상온에서 보관했을 때 시간이 지남에 따라 라세미화가 아주 조금씩 진행됨을 보여주었으나 4°C 에서는 한 달이상 냉장보관하여도 라세미화가 전혀 진행되지 않았음을 관찰하였다. 티록신 시료 용액의 안정성에 대한 구체적인 명시가 없는 기존 연구에서 이 결과는 티록신 시료를 상온에서 보관하는 것이 바람직하지 않음을 입증하는 구체적인 처음 연구결과이다 [3,4]. 기존에 발표된 연구결과의 경우, 전처리에서 사용하는 용매로 2.0% (670 mM) HCl/ethanol나 10 mM NaOH : methanol = 1 : 1 또는 1N NaOH : methanol = 1 : 4를 사용하였던 것과 비교할 때, 본 연구의 전처리 실험조건은 훨씬 더 온화 (mild) 하므로 라세미화가 방지할 수 있는 더욱 효과적인 전처리 분석과정이라 보아진다 [3,4,13].

**Table 1.** Determination of the optical purity data of D-thyroxine (Fluka reagent: left) and L-thyroxine (Acros reagent: right) dissolved in 100% methanol containing 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on CSP 2 as a stability test at room temperature

Storage period	D : L ratio <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	Storage period	D : L ratio <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>
0 Day	94.5 : 5.5	1.5%	0 Day	0.2 : 99.8	1.3%
1 Day	94. : 5.8	0.8%	1 Day	0.3 : 99.7	0.5%
2 Day	94. : 5.9	0.5%	2 Day	0.4 : 99.6	0.6%
3 Day	94.0 : 6.0	0.6%	3 Day	0.5 : 99.4	0.6%
4 Day	93.9 : 6.1	0.2%	4 Day	0.6 : 99.4	1.0%

Mobile phase: 100% methanol containing 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Flow rate: 1 mL/min. Detection UV 210 nm.

<sup>a</sup>Average value of three times determined.

<sup>b</sup>Relative standard deviation.

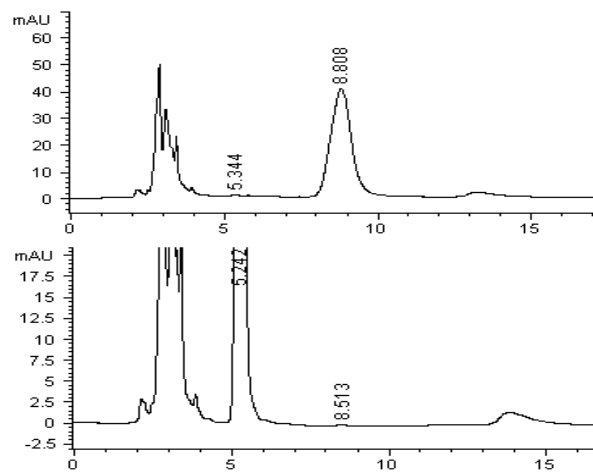
국내외에서 시판되고 있는 여러 레보티록신 나트륨 의약품들을 대상으로 앞에서의 전처리과정을 거친 후 얻은 각 시료들을 대해 각각 3회 이상씩 크로마토그래피 분석을 실시하여 평균값을 구하였고 이들의 분석결과를 Table 2에 정리하였다. 하나의 시료를 제외한 국내외에서 시판되고 있는 레보티록신 나트륨의 모든 시료의 광학순도는 전체적으로 99% 이상의 높은 순도를 나타내었다. 그러나 F시료의 경우에는 다른 광학순도보다 매우 낮게 나타나 CSP 1과 CSP 2에서 각각 97.8%, 97.6% 결과를 보였다. 또한 광학순도를 측정할 때 RSD로 조사한 오차는 전체적으로 0.5-5.0%로 상당히 양호한 측정결과와 신뢰도를 보여주었고 CSP 1에서 보다 CSP 2에서 더 좋은 신뢰도를 보여주었다. 흥미로운 것은 Table 2에서 CSP 1에서의 광학순도가 CSP 2에서보다 0.1-0.3% 정도 더 높게 나타난 결과이다. 광학분리의 경우 먼저 용리되는 광학이성질체의 피크보다 두 번째 용리되는 광학이성질체의 피크가 더욱 넓게 (broad) 나타난다 [12]. 광학순도를 측정하는 실험에서, 첫 번째 용리되는 광학이성질체가 매우 미량인 경우보다 두 번째 용리되는 광학이성질체가 매우 미량인 경우가 피크 끌림 (peak tailing)이 더 심하게 일어나는 기하학적인 이유로 전자와 후자의 광학순도의 결과가 아주 작지만 조금 다르게 나타날 수 있다. 실제로 본 연구에서 광학순

도를 알고 있는 L-티록신 시료를 광학분리하였을 때, CSP 1에서의 측정된 광학순도는 99.0%, 표준편차는 1.4%이었지만 CSP 2에서는 98.9%, 표준편차는 0.6% 결과를 가져와 CSP 1에서의 광학순도가 CSP 2에서보다 조금 더 높게 나타나고 덜 정밀하였다. 따라서 본 실험의 경우에도 분석하고자 하는 L-T4가 주성분이고 D-T4가 미량성분이므로 CSP 1을 사용하는 것보다는 CSP 2를 사용하는 것이 더 정밀하고 더 정확한 실험 결과를 제공한다고 말할 수 있다. 또한 본 연구 결과에서 보여준 것처럼 CSP 1에서 두 번째 용리되는 광학이성질체가 매우 미량인 광학분리의 경우에, 두 번째 용리되는 광학이성질체의 피크 끌림 (peak tailing)으로 인해 CSP 1에서 얻어진 광학순도 값은 CSP 2에서 얻어진 결과보다 약간 더 높게 나오게 됨에 유의할 필요가 있다. 그래서 본 실험과 같이 용리순서를 바꿀 수 없고 CSP 1과 같은 용리순서로만 광학순도결과를 얻게 될 경우, 분석물질의 광학순도는 0.1-0.3% 정도 더 높게 나타날 수 있음을 고려해야 할 것이다.

**Table 2.** Optical purity data of commercially available levothyroxine (L-thyroxine) sodium on CSP 1 and CSP 2

Sample	CSP 1		CSP 2	
	D : L ratio <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>	D : L ratio <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>
A	0.2 : 99.8	1.6%	0.5 : 99.5	1.0%
B	0.3 : 99.7	1.7%	0.5 : 99.5	1.5%
C	0.2 : 99.8	1.5%	0.3 : 99.7	0.6%
D	0.2 : 99.8	2.1%	0.4 : 99.6	0.6%
E	0.3 : 99.7	1.5%	0.6 : 99.4	1.0%
F	2.2 : 97.8	5.0%	2.4 : 97.6	1.7%
G	0.2 : 99.8	1.1%	0.3 : 99.7	0.8%
H	0.5 : 99.5	0.8%	0.7 : 99.3	0.5%
I	0.2 : 99.8	0.7%	0.5 : 99.5	0.5%

Mobile phase; 100% methanol (V/V) containing 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Flow rate = 1 mL/min ; Detector 210 nm; <sup>a</sup>Average value of more than three times determined. <sup>b</sup>Relative standard deviation.



**Fig. 2.** Typical chromatograms of enantiomer separation of levothyroxine sodium tablet (G sample) on CSP 1 (the top) and CSP 2 (the bottom). Mobile phase: 100% methanol containing 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Flow rate: 1 mL/min. Detection UV 210 nm.

결론적으로 Table 2의 CSP 2에서 얻어진 결과에서 보여주는 것과 같이, 국내외에서 시판되고 있는 레보티록신 나트륨의 광학순도는 하나의 제품인 F시료가 97.6%를 나타내는 것을 제외하고는 99.3%-99.7%의 높은 광학순도 값을 나타내었다 (D-T4의 광학이성질체 불순물: 0.3-0.7%). 99% 이상의 광학순도를 보이는 시료중에서는 C와 G시료가 99.7%의 가장 높은 광학순도를 보였고 H시료가 99.3%의 가장 낮은 광학순도를 보였다. 본 연구에서 측정된 레보티록신 나트륨 정제의 광학순도 측정결과는 직접적인 광학분리 분석법으로 다른 연구팀에 의해 보고되었던 92.7-99.9%의 결과와 (D-T4의 광학이성질체 불순물: 0.1-7.3%) 비교해 볼 때 대체적으로 양호하다고 말할 수 있다 [4]. Fig. 2는 레보티록신 나트륨 G의 동일 시료를 CSP 1 (D : L = 0.2 : 99.8)과 CSP 2 (L : D = 99.7 : 0.3)에서 각각 광학분리한 대표적인 크로마토그램을 보여주고 있다.

## 요 약

크라운 에테르로부터 유도된 키랄고정상에서 역상용매를 이동상으로 사용하여 국내외에서 시판되고 있는 광학이성질체 의약품인 레보티록신 나트륨의 광학순도 측정을 위한 새로운 직접적인 광학분리 분석법을 개발하여 매우 좋은 결과를 얻었다 ( $\alpha = 2.15$ ,  $R_s = 4.05$ ). 시판하고 있는 레보티록신 나트륨의 광학순도를 키랄고정상을 이용하여 직접적인 광학분리방법으로 측정하는 실험은 현재까지 한 편의 연구결과 외에는 보고되어 있지 않는데 [4] 본 연구에서 새롭게 개발한 전처리과정과 HPLC 분석조건을 이용하여 현재 국내외에서 판매되고 있는 레보티록신 나트륨 주성분의 의약품 정제의 광학순도를 측정하였다. 레보티록신 나트륨의 광학순도를 측정할 광학분리 실험결과에서 하나의 제품을 제외하고는 99% 이상의 높은 광학순도를 보여주고 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구의 편리하고 용이한 신규 광학분리 분석법이 국내외에서 상용되는 레보티록신 나트륨 제품의 품질 확인과 양질의 키랄의약품을 개발하고 제품을 관리하는데 매우 도움이 되리라 기대한다.

## 감 사

이 논문은 2009년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. 2009-0072897).

접수 : 2010년 9월 10일, 게재승인 : 2010년 10월 23일

## REFERENCES

1. Francotte, E. and W. Lindner, (Ed.) (2006) *Chirality in Drug Research*. Wiley-VCH, Weinheim.
2. Bantle, J., J. Oppenheimer, H. Schwartz, D. Hunninghake, J. Probstfeld and R. Hanson (1981) TSH response to TRH in euthyroid, hypercholesterolemic patients treated with graded doses of dextrothyroxine. *Metabolism* 30: 63-66.
3. Abou-Basha, L. I. and H. Y. Aboul-Enein (1995) Enantiomeric separation and optical purity determination of thyroxine enantiomers in bulk and pharmaceutical formulations. *Pharm. Acta Helv.* 70: 237-240.
4. Gika, H., M. Lämmerhofer, I. Papadopoulos and W. Lindner (2004), Direct separation and quantitative analysis of thyroxine and triiodothyronine enantiomers in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 800: 193-201.
5. Aboul-Enein, H. Y., I. Ali, M. H. Hyun, Y. J. Cho, and J. S. Jin (2002) Effect of acidity on the enantiomeric resolution of thyroxine and tocainide by HPLC on a (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid column. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 54: 407-413.
6. Jin, J. Y., C.-S. Baek, and W. Lee (2007) Development of a validated HPLC method for the simultaneous determination of D- and L-thyroxine in human plasma. *Bull. Kor. Chem. Soc.* 28: 1070-1072.
7. Hyun, M.H., J. S. Jin, and W. Lee (1998) Liquid chromatographic resolution of racemic amino acids and their derivatives on a new chiral stationary phase based on crown ether. *J. Chromatogr. A* 822: 155-161.
8. Lee, W., J. Y. Jin and C.-S. Baek (2005) Comparison of enantiomer separation on two chiral stationary phases derived from (+)-18-crown-6-2,3,11,12-tetracarboxylic acid of the same chiral selector. *Microchemical Journal* 80: 213-217.
9. Jin, J. Y., W. Lee, and M. H. Hyun (2006) Development of the antipode of the covalently-bonded crown ether type chiral stationary phase for the advantage of the reversal of elution order. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* 29: 841-848.
10. Jin, J. Y. and W. Lee (2007) Liquid chromatographic enantiomer resolution of *N*-hydrazide derivatives of 2-aryloxypropionic acids on a crown ether derived chiral stationary phase, *Chirality* 19: 120-123.
11. Lee, T., W. Lee, M. H. Hyun, and J. H. Park (2010) Enantioseparation of native  $\alpha$ -amino acids on an 18-crown-6-tetracarboxylic acid-bonded silica by capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 1217: 1425-1428.
12. Perry, J. A., J. D. Rateike, and T. J. Szczerba (1987) Eluting trace components before major constituents : I. Sensitivity enhancement in analytical determinations of optical purity. *J. Chromatogr.* 389: 57-64.
13. Jin, D., M. Zhang, S. Jin, M. Lee, G. Song, G. Back and Y. Lee (2007) Enantioselective resolution of thyroxine hormone by high-performance liquid chromatography utilizing a highly fluorescent chiral tagging reagent. *Chirality* 19: 625-631.