

우라자미드 정의 유해시약 대체 시험법의 개발

이유림 · 김현지 · 서나래 · 김경호[#]

강원대학교 약학대학

(Received March 4, 2014; Revised March 26, 2014; Accepted March 28, 2014)

Development of Alternative Assay Method without Hazardous Reagent, Chloroform for Urazamide Tablets in Korean Pharmaceutical Codex

Yoo Rim Lee, Hyun Ji Kim, Narae Seo and Kyeong Ho Kim[#]

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — We developed an alternative assay method without hazardous reagent of chloroform for urazamide tablets in Korean Pharmaceutical Codex. The HPLC analytical method was validated by system suitability, linearity, precision, accuracy and robustness. The linearity of the calibration curves in the desired concentration range is good ($r^2 > 0.999$). Precision was obtained less than RSD 1.17%. Accuracy was obtained with recoveries in range of 98.12% and 99.47%. The developed assay could be expected to become valuable tools for revising the Korean Pharmaceutical Codex.

Keywords □ KPC, hazardous reagents, alternative methods, validation, HPLC

최근 의학의 발전으로 인구가 고령화되고 노인성 질환 및 환경 문제에 따른 만성질환이 증가하면서 제약산업이 급속도로 성장하였으며, 의약품 수요가 확대되었다. 제약산업은 정밀화학 산업 중에서도 환경오염 유발도가 가장 높은 업종 중 하나로, 단위 생산 당 폐기물 발생량이 타 정밀화학 업종에 비해 5~10배가 높고, 의약품 제조 및 품질관리 등의 작업에서 다양한 폐기물들이 발생한다. 의약품 중 유해시약에 관하여는 International Conference on Harmonization(ICH)의 잔류용매지침¹⁾에서 용매 별로 유해성에 따라 Class 1, 2, 3 및 기타용매로 분류하여 그 잔류량을 규제하고 있다. 특히 Class 1에 속하는 벤젠, 사염화탄소 등은 발암원성, 환경유해성 물질로서 원칙적으로 사용이 금지되고 있는 실정이다. 또한 Pfizer사의 Environment, Health and Safety(EHS) 연구팀은 2008년 문헌을 통하여 의약계열 화학 분야에 널리 사용되는 용매들을 대상으로 worker safety, process safety 및 environmental and regulatory consideration 등의 항목을 평가하여 친환경 용매, 사용할 수 있지만 비 친환경

용매 및 사용이 권장되지 않는 비 친환경 용매의 3가지 group으로 용매를 나누었다.²⁾

대한민국약전 제10개정원안 작성 지침³⁾에는 "「유해하여 시험자에 대한 노출이 우려되는 시약」, 「유해작용 및 잔류성 등으로 환경에 부하가 큰 시약」 등에 대하여는 사용을 피하거나 사용량을 최소한으로 한다."라고 기재되어 있다.

그러나 국가공정서 중 하나인 대한민국약전외의약품기준⁴⁾에는 여전히 이러한 유해시약을 사용하는 많은 시험법이 수재되어 있으며, 이들은 각 품목을 생산하는 제조업소의 품질관리과정에서 사용되고 있다. 이러한 현 제약분야 의약품 품질관리 시험법은 인체·환경 유해 시약 및 유기용매들이 다양하게 사용되어, 이로 인한 환경오염, 잔류용매로 인한 독성 문제, 폐용매 처리 문제 등의 많은 문제점을 안고 있다. 제약산업의 각 공정은 막대한 자원과 장기간의 시간을 요하며 화학물질의 사용량이 많고, 유해물질 배출도 많다. 특히 1,4-dioxane, 사염화탄소 등의 유해시약 및 독성 유기용매의 사용이 많은 의약품 품질관리 측면에서의 그린기술 적용이 시급하다. 따라서 국가적 차원에서 그린시험법을 적용한 의약품 품질관리법을 확립하기 위한 노력을 기울여야 하고, 이에 대한 일환으로 의약품 공정서에 수재된 시험법 중 인체·환경 유해 시약 대체 시험법 개발이 선행되어야 한다.

우라자미드(5-amino-4-imidazolcarboxamide ureidosuccinate)는 동량의 ureidosuccinic acid 또는 N-carbamoylaspartic

[#]Corresponding Author

Kyeong Ho Kim

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel.: 033-250-6918 Fax.: 033-255-7865

E-mail: kyeong@kangwon.ac.kr

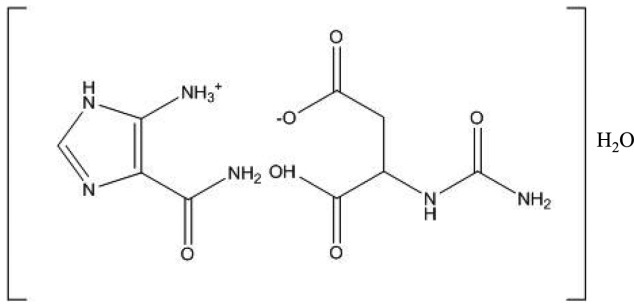


Fig. 1 – Chemical structure of urazamide.

acid(Carba)와 5-amino-4-imidazolcarboxamide(Aica)가 섞여 있는 약물로써 화학적 성상으론 분자량 302.24, 녹는점 130~135°C인 흰색 결정상의 가루로 되어있다. 또한 우라자미드(urazamide)는 단백 생합성 및 생체 내제반응에 중요한 역할을 하는 ATP 생합성의 작용기전에 관여하여 간세포 기능 및 에너지 생성작용을 촉진시켜 급성간염, 만성간염, 간경변, 지방간 등의 간장질환 치료보조제로서 탁월한 효과를 나타낸다고 보고되어 있다(Fig. 1).⁵⁻⁸⁾ 대한민국약전의외약품기준에서는 우라자미드 정의 정량법으로 유해시아인 클로로포름을 사용하는 정량법이 수재되어 있다.⁴⁾

본 연구에서는 우라자미드에 대하여 보다 안전하고 효율적인 친환경용매를 사용하는 HPLC 분석법을 확립하고, KFDA의 벨리테이션 프로토콜^{9,10)}에 준하여 분석법 검증과정을 실시하고자 하였다.

실험방법

시약 및 시료

분석에 사용한 우라자미드 표준품은 (주)유한양행에서 제공받았다. 이동상으로 사용한 라우릴황산나트륨은 Hayashi(Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd., Japan)에서 구입하여 정제수에 용해시켜 사용하였으며, 아세트산은 대정화금(주)에서 구입하였다. 실험에 사용한 메탄올과 이동상의 pH를 조절했던 과염소산은 대정화금(주)에서 구입하여 사용하였다.

기기 및 측정조건

고성능액체크로마토그래피(HPLC)는 Agilent 1100 series G1379A Degasser, G1312A Bin Pump, G1313A ALS, G1316colcom, G1314AVWD(Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. HPLC 컬럼은 Luna C18(2)(5 μm, 4.6×150 mm)을 사용하였으며, 자외부흡광검출기의 파장은 266 nm로 하였다. 이동상으로는 라우릴황산 나트륨 2g을 달아 메탄올·아세트산·정제수 혼합액(60:1:40)으로 녹여 1l를 만들고 10% 과염소산으로 pH를 3.0±0.1 이내로 조정된 것을 사용하였다. 시료는 10 μl를 주입하였고 유속은 1.0 ml/min로 하여 분석하였다.

표준용액의 조제

우라자미드 표준품은 50% 메탄올에 녹여 1000 μg/ml의 농도로 표준원액을 만들어 냉장 보관하였다. 표준원액에 50% 메탄올을 가하여 우라자미드의 농도는 각각 20, 40, 80, 120, 160, 200 μg/ml가 되도록 하여 표준용액을 제조하였다. QC(quality control) 용액은 우라자미드 농도 80, 100, 120 μg/ml의 농도로 표준용액과 같은 방법으로 만들어서 냉장 보관하였다.

분석법의 검증(Validation)

우라자미드 표준원액을 50% 메탄올로 희석한 것을 표준용액으로 하여 직선성, 정확성 및 정밀성, 반복성, 시스템적합성, 재현성, 완전성 등을 측정하였다. 직선성은 5회 반복 실험하여 평가하였다. 우라자미드 20, 40, 80, 120, 160, 200 μg/ml 농도에서 우라자미드의 피크면적을 이용하여 검량선을 작성하고, 각 검량선의 상관계수(Coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 정확성(%)과 정밀성(Coefficient of Variation, C.V.)은 하루에 실험을 6번 시행하여 일내(Intra-batch) 정밀성, 정확성을 구하였고, 3일간 실험을 행하여 일간(Inter-batch) 정밀성을 구하였다. 회수율은 표준품 첨가법(standard addition)을 사용하여 평가하였다. 우라자미드 정에 그의 80, 100, 120%(저, 중, 고농도)의 우라자미드 표준품을 가하여 분석하였다. 저, 중, 고농도에서 3회 반복하여 시험한 후 표준품을 가한 우라자미드 시료에서 측정된 우라자미드의 양과 우라자미드 시료 자체에서 측정된 우라자미드 양을 비교하여 회수율을 평가하였다.

유통 중인 우라자미드 정 내 우라자미드의 정량

이 약 20 정 이상을 가지고 그 질량을 정밀하게 달아 가루로 하였다. 우라자미드 ($C_9H_{14}N_6O_6$) 약 0.2g에 해당하는 양을 50% 메탄올을 넣어 녹여 정확하게 100 ml로 하였다. 이 액 5 ml를 취해 50% 메탄올을 넣어 100 ml로 하고 혼합한 액을 검액으로 하였다. 따로 우라자미드 표준품 약 20 mg을 50% 메탄올을 넣어 녹여 정확하게 200 ml로 하여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 10 μl씩을 가지고 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각 액의 우라자미드의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정하였다. 우라자미드 정 내의 우라자미드의 함량(%)은 아래의 식으로 구하였다.

우라자미드 ($C_9H_{14}N_6O_6$)의 양 (mg)

$$= \text{우라자미드표준품의 양(mg)} \times \frac{A_T}{A_S}$$

실험결과

HPLC 정량법의 확립

공정서에 수록된 약물의 시험법은 보통 현재 생산중인 약물에 대한 분석방법이기 때문에 간단하고 값싸면서 완전성있는 시험

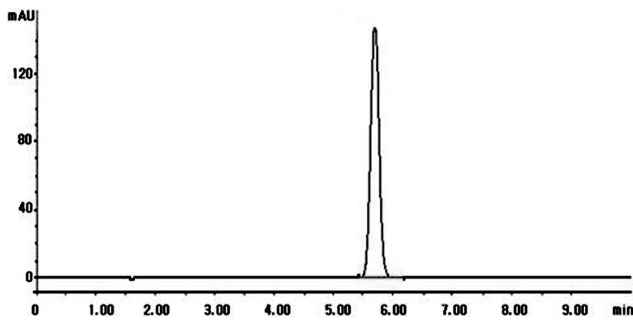


Fig. 2 – HPLC-UV chromatogram of urazamide.

방법이 바람직하다.

기존의 대한민국약전외의약품기준에 수재된 우라자미드 정 의 정량법인 역상 HPLC분석법으로 옥타데실실릴실리카겔 컬럼과 이동상으로 메탄올·물·아세트산혼합액(60 : 38 : 2)를 사용하여 분석하였을 때 용량계수(k')가 약 0.04로 우라자미드가 컬럼에 거의 머무르지 않음을 알 수 있었다. 또 이동상의 조성 중 메탄올 의 함량을 60%에서 55%와 50%로 변경시켰을 때에도 용량계수 의 변화가 없음을 확인하였다. 즉, 기존의 대한민국약전외의약품 기준에 수재된 우라자미드 정 의 정량법으로는 우라자미드 정 중 우라자미드의 정량이 부적합함을 알 수 있었다.

이에 이온성 물질인 우라자미드의 HPLC 분석법으로 이온쌍 시약을 사용한 이온쌍 액체크로마토그래피를 검토하였다. 이 온쌍 시약으로 라우릴황산 나트륨을 사용하여 양호한 결과를 얻 을 수 있었다. 이동상으로는 라우릴황산 나트륨 2 g을 달아 메탄 올·아세트산·정제수 혼합액(60 : 1 : 40)으로 녹여 1 l를 만들고 10% 과염소산으로 pH를 3.0±0.1 이내로 조정된 것을 사용하였 다. 자외선 흡광도계로 266 nm에서 측정하였으며, 위의 이동 상으로 10분간 HPLC를 시행했을 때 우라자미드는 5.68분에 피 크가 관찰되었고(Fig. 2) 이 때의 용량계수는 1.65로 향상되었다.

직선성(Linearity)

20, 40, 80, 120, 160, 200 µg/ml로 단계적으로 희석한 우라자 미드 표준용액을 HPLC로 5회 반복 분석하여 검량선을 작성하

Table I – Results of linearity test. Slope, y intercept and r² of calibration curves

Trial	Slope	y intercept	r ²
1	14.14	114.5	0.9991
2	13.70	10.29	0.9999
3	14.03	29.40	0.9998
4	13.92	19.49	0.9997
5	13.85	7.197	0.9998
6	13.35	21.00	0.9991
Average	13.831	33.646	0.9995
STDEV ^a	0.279	40.399	0.0003

a: STDEV: standard deviation.

Table II – Results of precision intra/inter-day validation of the HPLC-UV method

Con. µg/ml	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=3)	
	RSD ^a (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
80	0.46	100.94	0.96	100.12
100	0.23	99.71	1.17	100.10
120	0.61	99.96	0.89	99.15

a; RSD: relative standard deviation.

Table III – Recovery tests for commercial drug (n=3) using HPLC-UV method

Add contents (%)	Recovery (%)	RSD ^a (%)
80	98.32	1.43
100	99.47	1.87
120	98.12	0.58

였으며(Table I), 검량선의 상관계수(r²)가 0.999 이상으로 우수 한 직선성을 나타내었다.

정밀성(Precision)

우라자미드의 농도가 각각 20, 25, 30 µg/ml인 표준용액을 하 루에 6회씩, 3일간 분석하여 정밀성을 측정하였을 때, 일내 정밀 성은 피크면적비의 상대표준편차 0.23~0.61%, 일간 정밀성은 상 대표준편차 0.89~1.17%를 나타내었다(Table II).

정확성(Accuracy) - recovery

우라자미드 정 중 우라자미드 함량의 80, 100, 120%가 첨가 되도록 우라자미드 표준품을 가지고 재현성을 확인해보았다(Table III). 이 실험을 3회 실시한 결과 회수율은 98.12~99.47%으로 나 타내었다.

시스템 적합성(repeatability)

100% 용액을 12번 반복 분석하여 머무름 시간, 피크면적, 이 론단수(N), 비대칭계수(As)를 측정하였다(Table IV). 우라자미드 피크면적의 상대표준편차는 0.54%, 머무름시간의 상대표준편차 는 0.70%, 이론단수(N)는 8548, 그리고 비대칭계수(As)는 0.73 로 나타내었다.

실험실내 정밀성(Intermediate precision)

다른 실험기기인 Shimadzu LC-20AD HPLC를 사용하여 분 석법의 전 조작을 12회 반복하여 측정하였을 때, 우라자미드 피

Table IV – Results of system suitability validation (n=12)

	Retention time (RSD%)	Peak area (RSD%)	Plate number	Asymmetry factor
Urazamide	0.70	0.54	8548	0.73

Table V – Results of intermediate precision validation (n=12)

Contents (%)	Intermediate precision (RSD%)
100	0.08

Table VI – Results of robustness validation (n=12)

Parameter	t_R (RSD%)	Peak area (RSD%)
Flow rate (ml/min)	- 0.05	0.40
	+ 0.05	1.14
Mobile phase (pH)	- 0.20	1.29
	+ 0.20	0.11

크면적의 상대표준편차는 0.08%로 나타났다(Table V).

완건성(Robustness)

이동상의 조성, 유속을 변경시켜 분석하였을 때, 우라자미드의 머무름 시간과 피크 면적의 상대표준편차는 각각 0.11~1.29%, 0.16~0.33%로 나타났다(Table VI).

유통 중인 우라자미드 정 내 우라자미드의 정량

본 시험법의 검증과정을 통하여 우라자미드 정에 대한 상기 HPLC 분석법이 우라자미드 정제 내 우라자미드의 정량에 이용될 수 있는 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 시중에 유통되는 우라자미드 정을 대상으로 6회 반복 실험하여 우라자미드 정제 내 우라자미드의 함량을 측정하고 정제 내 우라자미드 함량의 평균은 98.76%, 상대표준편차는 1.64%이었다.

결 론

본 연구에서는 유효시약을 사용하는 대한민국약전외의약품기준 중 클로로포름을 사용하는 우라자미드 정의 정량법에 대하여 대체시험법을 개발하였고, 확립된 시험법으로 시중에 유통되는 우라자미드 정을 실제로 분석하여 시험법의 유효성을 검증하였다. 개발한 분석법의 검증은 직선성, 정확성 및 정밀성, 반복성, 실험실내 정밀성, 회수율, 그리고 완건성 시험 등을 통하여 평가하였다. 본 실험결과 시스템적합성에서 우라자미드 피크면적의 상대표준편차는 0.54%, 머무름시간의 상대표준편차는 0.70%, 이론단수(N)는 8548, 그리고 비대칭계수(As)는 0.73로 나타났다. 정밀도실험은 일내 정밀성과 일간 정밀성으로 나누어 확인하였

다. 일내 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차 0.23~0.61%, 일간 정밀성은 상대표준편차 0.89~1.17%로 나타났다. 그리고 직선성 실험에서는 상관계수(r^2)가 0.999 이상으로 우수하였다. 정확도 실험에서는 회수율시험으로 최소 98.12%, 최대 99.47%로 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 우라자미드 정제 내 우라자미드의 함량을 분석하기 위한 공정 시험법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발과제의 연구개발비 지원(13172의약안216)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- 1) ICH Guideline. Q3C(R4) : Impurities : Guideline for residual solvents Q3C(R4) in ICH harmonised tripartite guideline (2009).
- 2) Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P. J., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T. A., Kleine, H. P., Knight, C., Nagy, M. A., Perry, D. A. and Stefaniak, M. : Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chem.* **10**, 31 (2008).
- 3) Ministry of Food and Drug Safety, NO. B1-2011-2-031 (2011.01.01).
- 4) Ministry of Food and Drug Safety, NO. 2012-142 (2012.03.07).
- 5) 이재호, 안광무, 함준수, 이민호, 기준석 : 만성 간질환 환자에 있어서 Urazamide(Recover[®])의 치료효과. *최신의학* **30**, 89 (1987).
- 6) Carminati, G. M. : Pharmacology of 5-amino-4-imidazolcarboxamide ureidosuccinate (CARBAICA), a new hepatotrophic drug. *Drug Exptl. Clin. Res.* **6**, 471 (1980).
- 7) Chanoine, F. : Clinical study of AICA orotate in hepatitis and cirrhosis. *Acta Gastroenterol Belg.* **32**, 383 (1969).
- 8) Roda, E., Sama, C. and Festi, D. : Controlled clinical evaluation of the therapeutic effectiveness of AICA orotate in chronic hepatitis. *Clin. Ter.* **89**, 489 (1979).
- 9) Ministry of Food and Drug Safety NO. 2009-173 (2009.12.15).
- 10) Ministry of Food and Drug Safety, NO. C0-2012-2-005 (2012.09.19).