

Development of high performance liquid chromatography assay method of diosmin capsules

Dae Hyun Shim¹, Dong Han Shin¹, Quoc Ky Truong¹, Xuan Lan Mai¹, Jong-Seong Kang², Mi Hee Woo³, Dong-Hee Na⁴, In-Koo Chun⁵ and Kyeong Ho Kim¹, ★

¹College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

³College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 38430, Korea

⁴College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

⁵The Society of Korean Official Compendium for Public Health, Seoul 03397, Korea

(Received October 17, 2016; Revised November 29, 2016; Accepted December 8, 2016)

디오스민 캡슐의 HPLC 분석법의 개발

심대현¹ · 신동한¹ · 프엉콕끼¹ · 마이수안란¹ · 강종성² · 우미희³ · 나동희⁴ · 전인규⁵ · 김경호¹, ★

¹강원대학교 약학대학, ²충남대학교 약학대학, ³대구가톨릭대학교 약학대학,

⁴경북대학교 약학대학, ⁵(재)한국보건공정서연구회

(2016. 10. 17. 접수, 2016. 11. 29. 수정, 2016. 12. 8. 승인)

Abstract: British Pharmacopoeia (BP 2013), the United States Pharmacopoeia (USP 39) and the Korean Pharmacopoeia (KP XI) contain monographs for the quality control of raw diosmin using high performance liquid chromatography (HPLC). However, official monographs detailing pharmaceutical formulations for diosmin are not available in foreign pharmacopoeias. In the KP XI, ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy—which is less specific than HPLC—is reported for the testing of diosmin capsules. In this study, we present an alternative HPLC assay for such testing that is more specific than UV-Vis methods. Method validation was performed to determine linearity, precision, accuracy, system suitability, and robustness. The linearity of calibration curves in the desired concentration range was high ($r^2 > 0.999$), while the RSDs for intra- and inter-day precision were 0.15-0.29 % and 1.05-1.74%, respectively. Accuracies ranged from 101.2-103.2 %, while the retention time and peak area RSDs were 0.37 % and 0.06 %, respectively. Additionally, the plate number and asymmetry factor values for diosmin were 3591.293 and 1.35, respectively. Since the intermediate-precision and robustness of the assay were satisfactory, this method will be a valuable addition to the Korean Pharmacopoeia (KP XI).

요 약: 영국약전(BP 2013), 미국약전(USP 39) 그리고 대한민국약전 (KP XI)에 디오스민 원료의 정량법으로 HPLC법이 수재되어 있다. 그러나 위의 외국약전들에는 디오스민 제제의 정량법이 수재되어 있지 않으며 대한민국약전 (KP XI)에는 디오스민 캡슐의 정량법으로 HPLC법보다 덜 특이적인 자외가시부흡광도측정법이 수재되어 있다. 이 실험에서는 최근의 추세에 따라 원료의 정량법과 같고 특이성이 좋은

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)33-250-6918 Fax : +82-(0)33-259-5630

E-mail : kyeong@kangwon.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

HPLC 분석법으로 디오스민 캡슐의 정량법을 개발하였고 이를 검증하였다. HPLC 분석법의 검증을 위해 직선성, 정밀성, 정확성, 시스템 적합성, 실험실내 정밀성과 완전성 실험을 실행하였다. 직선성은 결정계수(r^2)가 0.999 이상으로 우수하였다. 일내 정밀도는 상대표준편차 0.15~0.29%, 일간 정밀도는 1.05~1.74%로, 회수율은 101.2~103.2%로 나타났다. 시스템적합성에서는 머무름시간 상대표준편차(RSD%) 0.37%, 피크면적 상대표준편차(RSD%) 0.06%, 이론단수 평균값 3591.293 그리고 비대칭계수 평균값 1.35을 나타내었다. 개발한 시험법을 이용하여 시중 유통 중인 디오스민 캡슐 중 디오스민의 함량측정에 응용하였다. 개발된 시험법은 대한민국약전의 개정에 기여할 것이다.

Key words: Korean Pharmacopoeia(KP XI), diosmin capsule, assay, validation, high performance liquid chromatography

1. 서 론

최근 과학 기술 발전으로 물질에 대한 분석기술이 획기적으로 향상되었고, 이에 따라 대한민국 약전의 최근 연구동향 선진화 및 의약품 품질 기준 국제조화 연구에 대한 필요성이 제기되었다. 기존의 화학적 반응에 기반을 둔 확인시험 또는 적정법 등은 가능한 한 지문 정보를 제공할 수 있는 분광분석법 및 자동화 분석이 적용된 각종 크로마토그래피법(High Performance Liquid Chromatography, Ultra Performance Liquid Chromatography, Capillary Gas Chromatography, High Performance Thin Layer Chromatography 등) 및 크로마토그래피법과 검출기로서 분광기 또는 질량 분석기 등을 사용한 기기분석법(Hyphenated Techniques) 그리고 미량분석이 가능한 전기화학적 분석법 및 자동적정기를 사용한 적정법 등으로 교체하는 방안이 요구되었다.

대한민국약전 제11개정 의약품각조에 수재되었던 품목은 1958년 대한민국약전 초판 제정 이래 2016년까지 11차례의 개정을 거듭하면서 ‘의약품등의 성질과 상태, 품질 및 저장 방법 등의 적정을 기하여 안전성과 유효성이 확보된 의약품의 공급을 목적’으로 대한민국약전의 취지에 맞게 기준규격이 과학화되고 국제

조화에 부응해 개정되어 왔다. 그러나 여전히 밸리데이션이 확보되지 않은 시험법이 존재하며, 약전이 본래 기능을 잘 발휘할 수 있도록 의약품에 대한 시험법의 적절성 검토가 요구되었다. 비특이적 확인시험의 배제, 오래된 분석법의 사용, 최신 분석법의 개발, 실험실/실험자 안전 및 환경 문제 등과 같이 시험법에 대한 개정이 필요한 의약품은 새로운 시험법의 개발이 시급화되었다.¹

디오스민(5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxochromen-4-one) (Fig. 1)은 정맥의 순환을 원활하게 하고, 모세혈관의 투과성을 감소시켜 항부종, 항울혈작용을 나타내어서 정맥혈관 및 모세혈관의 저항성을 강화시켜 출혈을 억제하는 혈관보강제로써 치질, 정맥류 등 여러 적응증에 쓰인다.² 그리고 이 약은 연한 회황색 또는 밝은 노란색의 가루이다. 디메틸설폭사이드에 녹으며 물 또는 에탄올에는 거의 녹지 않는다. 그리고 묽은 수산화나트륨시액에 녹고, 흡습성이다.³

대한민국약전 11개정에는 원료의약품인 디오스민의 정량법으로 HPLC법, 디오스민 캡슐의 정량법으로는 자외가시부흡광도측정법을 사용하였다.² 또한 영국약

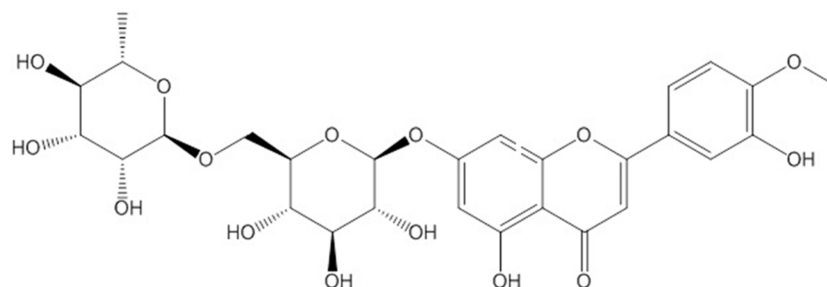


Fig. 1. Chemical structure of diosmin.

전 7개정과 미국약전 USP 39에서도 디오스민의 유연 물질 시험법과 정량법으로 HPLC법이 수재되어 있다.^{4,5} 이와같이 외국약전과 대한민국 약전에서는 원료 및 제제의 시험법으로 특이성이 높은 HPLC법이 사용되는 추세이다. 그러나 디오스민 캡슐의 경우 여전히 자외가시부흡광도측정법이 사용되고 있어, 자외가시부흡광도측정법보다 특이성이 더 높은 HPLC 분석법을 개발할 필요성이 대두되었다.

본 연구에서는 디오스민 캡슐에 대하여 보다 빠르고 정확한 HPLC 분석법을 확립하고, KFDA의 밸리데이션 프로토콜^{11,12}에 준하여 분석법 검증과정을 실시하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 시료

분석에 사용되는 디오스민 캡슐은 한울바이오파마(주)(Daejeon, Korea)의 베노론캡슐(디오스민 300 mg)을 사용하였고, 디오스민 표준품은 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)의 디오스민(94%)을 사용하였다. 이동상 제조에 사용한 메탄올과 아세트산 그리고 아세트니트릴은 대정화금(주)(Siheung, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용되는 디메틸설폭시드는 HPLC 등급 이상으로 JUNSEI(주)(Tokyo, Japan)에서 구입한 것을 사용하였다.

2.2. 기기 및 측정조건

고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography:HPLC)는 DGU-20A5R degasser from Shimadzu (Kyoto, Japan), LC-20AD pumps from Shimadzu (Kyoto, Japan), SIL-20A auto sampler from Shimadzu (Kyoto, Japan), SPD-20A UV-Vis detector from Shimadzu (Kyoto, Japan), CBM-20A communications bus module from Shimadzu (Kyoto, Japan), CO-965 Column Oven from Jas.co를 사용하였다. HPLC 컬럼은 Luna (C₁₈, 100×4.6 mm, 3 μm) column을 사용하였으며, 자외부흡광검출기의 파장은 275 nm로 하였다. 이동상으로는 물, 메탄올, 아세트산과 아세트니트릴 혼합액(66:28:6:2)을 사용하였다. 시료는 10 μL를 주입하였고 유속은 1.5 mL/min로 하여 분석하였다.

2.3. 표준용액의 조제

디오스민 표준품을 디메틸설폭시드에 녹여 10.0 mg/mL의 농도로 표준원액을 만들어 냉장 보관하였다.

표준원액에 디메틸설폭시드를 가하여 디오스민의 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL가 되도록 하여 표준용액을 제조하였다. QC (quality control) 용액은 디오스민 농도 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL의 농도로 표준용액과 같은 방법으로 만들어서 냉장 보관하였다.

2.4. 분석법의 검증(Validation)

디오스민 표준원액을 디메틸설폭시드로 희석한 것을 표준용액으로 하여 직선성, 정밀성, 정확성, 시스템 적합성, 실험실내 정밀성과 완전성 등을 측정하였다. 직선성은 6회 반복 실험하여 평가하였다. 디오스민 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL 농도에서 디오스민의 피크면적을 이용하여 검량선을 작성하고, 각 검량선의 결정계수(Coefficient of determination, r²)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 검토하였다. 디오스민 한 캡슐 당 표시량에 해당하는 내용물에 그 표시량의 80, 100, 120% (저, 중, 고농도)에 해당하는 디오스민 표준품을 가하여 분석하였다. 저, 중, 고농도에서 3회 반복하여 시험한 후 표준품을 가한 디오스민 시료에서 측정된 디오스민의 양과 디오스민 시료 자체에서 측정된 디오스민 양을 비교하여 회수율을 평가하였다.

2.5. 유통 중인 디오스민 캡슐 내 디오스민의 정량

이 약 20 캡슐 이상의 내용물을 꺼내어 그 질량을 정밀하게 달아 디오스민 약 25 mg에 해당하는 양을 취하였다. 여기에 디메틸설폭시드를 넣어 정확하게 25 mL로 하고 혼화한 액을 검액으로 하였다. 따로 디오스민 표준품 25 mg을 취하여 디메틸설폭시드를 넣어 정확하게 25 mL로 하고 혼화한 액을 표준액으로 하였다. 이들 액 10 μL씩을 가지고 HPLC 분석을 실시하여 각 액의 디오스민의 피크면적 A_T 및 A_S를 구하였다. 디오스민 캡슐 내의 디오스민의 함량(%)은 아래의 식으로 구하였다.

$$\begin{aligned} & \text{디오스민 (C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}\text{)의 역가(mg)} \\ & = \text{디오스민 표준품의 양(mg)} \times (A_T/A_S) \end{aligned}$$

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계(측정파장 275 nm)

칼럼 : 안지름 약 4.6 mm, 길이 약 10 cm인 스테인

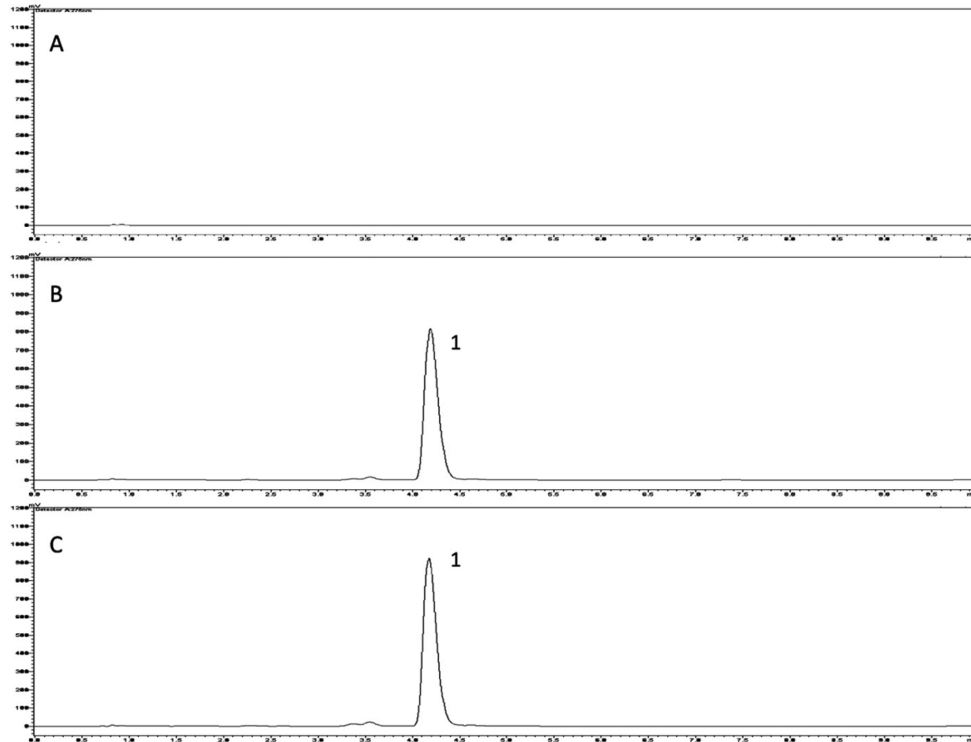


Fig. 2. HPLC-UV chromatograms of (A) blank, (B) diosmin standard solution (1.0 mg/mL), (C) diosmin sample solution prepared from capsules. Peak 1: Diosmin

레스강관에 3 μm 의 액체크로마토그래프용옥타데실실릴실리카겔을 충전한다.

칼럼온도 : 40 $^{\circ}\text{C}$

이동상 : 물·메탄올·아세트산·아세토니트릴혼합액 (66 : 28 : 6 : 2)

유량 : 1.5 mL/분

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC 정량법의 확립

공정서에 수록된 약물의 시험법은 보통 현재 생산 중인 약물에 대한 분석방법이기 때문에 재현성 있고 선택성 있으며 완전성 있는 시험 방법이 바람직하다. 이 실험에서는 특이성이 높은 디오스민 캡슐에 대한 정량법을 확립하기 위해 역상 HPLC를 선택하였다.

이동상으로는 현재 대한민국 약전과 영국약전의 디오스민 원료에 대한 이동상 조건으로 물, 메탄올, 아세트산과 아세토니트릴 혼합액(66:28:6:2)을 사용하였다. 자외선 흡광광도계로 275 nm에서 측정하였으며, 위의 이동상으로 HPLC를 시행했을 때 디오스민은

4.82분에 피크가 관찰되었다(Fig. 2).

3.2. 직선성(Linearity)

0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL 로 단계적으로 희석한 디오스민 표준용액을 HPLC로 6회 반복 분석하여 검량선을 작성하였으며(Table 1), 검량선의 결정계수(r^2)가 0.999 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다.

Table 1. Results of linearity test, slope, y intercept and r^2 of calibration curves

Parameter	Diosmin
Regression equation	$y = 8296.7x + 149106$
Range (mg/mL)	0.2 – 2.0
Coefficient of determination (r^2)	0.9998
Number of data points	6
Slope \pm SD	8296.7 ± 11.36
Intercept \pm SD	149106 ± 5495.79
LOD/LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0.02/0.05

SD: standard deviation

Table 2. Results of precision Intra/inter-day validation of the HPLC-UV method

Con. (mg/mL)	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=9)	
	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)
0.8	0.15	100.9	1.74	101.2
1.0	0.17	100.6	1.43	100.8
1.2	0.29	101.0	1.05	101.3

3.3. 정밀성(Precision)

디오스민의 농도가 각각 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL인 표준용액을 하루에 6회 측정하여 일내 정밀성을 분석하고, 3일간 측정하여 일간 정밀성을 분석하였을 때, 일내 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차가 0.15~0.29%, 일간 정밀성은 상대표준편차가 1.05~1.74%를 나타내었다(Table 2).

3.4. 정확성(Accuracy)-Recovery

디오스민 의약품 캡슐 중 디오스민 함량의 80, 100, 120%가 첨가되도록 디오스민 표준품을 가지고 회수율을 확인해 보았다(Table 3). 이 실험을 3회 실시한 결과 회수율은 101.2~103.2%으로 나타내었다.

3.5. 시스템 적합성(repeatability)

100% 용액을 12번 반복 분석하여 머무름시간, 피크면적, 이론단수(N), 비대칭계수(As)를 측정하였다(Table 4). 디오스민 피크면적의 상대표준편차는 각각 0.06%, 머무름시간의 상대표준편차는 각각 0.37%, 이론단수(N)는 3591.293, 비대칭계수(As)는 1.35로 나타내었다.

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

Add contents (%)	Recovery (%)	RSD (%)
80	103.2	0.34
100	102.7	0.25
120	101.2	0.33

RSD: relative standard deviation

Table 4. Results of system suitability validation (n=12)

Retention time (RSD%)	Peak area (RSD%)	Plate number	Asymmetry factor
0.37	0.06	3591.293	1.35

Table 5. Results of Intermediate precision validation (n=12)

Contents (%)	Intermediate Precision (RSD%)	
	Diosmin	
100	0.25	

Table 6. Results of robustness validation (n=6)

Compound	Diosmin		
	Parameter	t _r (RSD%)	Peak area (RSD%)
Flow rate (mL/min)	1.45	0.11	0.03
	1.55	0.17	0.02
Mobile phase (Acetonitrile%)	1.8	0.01	0.03
	2.2	0.08	0.05

3.6. 실험실내 정밀성(Intermediate precision)

다른 실험기기인 Agilent 1100 HPLC (Santa Clara, USA)를 사용하여 분석법의 전 조작을 12회 반복하여 측정하였을 때, 디오스민 피크면적의 상대표준편차는 0.25%로 나타났(Table 5).

3.7. 완건성(Robustness)

이동상의 조성, 유속을 변경시켜 분석하였을 때, 디오스민의 머무름 시간과 피크 면적의 상대표준편차는 0.01~0.17%, 0.02~0.05%로 나타났(Table 6).

3.8. 유통 중인 디오스민 캡슐 내 디오스민의 정량

본 시험법의 검증과정을 통하여 디오스민 캡슐에 대한 상기 HPLC 분석법이 디오스민 캡슐 내 디오스민의 정량에 이용될 수 있는 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 시중에 유통되는 디오스민 캡슐 제제를 대상으로 6회 반복 실험하여 디오스민 캡슐 중 디오스민의 함량을 측정한 결과 캡슐 중 디오스민 함량의 평균은 104.0%, 상대표준편차는 0.15% 이었다.

대한민국약전 11개정, 영국약전 7개정과 미국약전 39개정에는 디오스민 원료의약품의 유연물질 시험법과 정량법으로 같은 조건의 HPLC법이 수재되어 있다. 디오스민 원료의약품의 HPLC정량법의 조건을 이용하여 디오스민 캡슐의 정량법을 개발하였으며 검증을 실시하였고 실제 유통 중인 디오스민 캡슐 중의 디오스민의 정량에 잘 적용됨을 확인하였다. 또한 이 HPLC법의 디오스민의 머무름시간은 디오스민 캡슐의 확인시험법으로도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 대한민국약전 11개정 중 자외가시부 흡광도측정법을 사용하는 디오스민 캡슐 정량법에 대하여 대체시험법을 개발하였고, 확립된 시험법으로 시중에 유통되는 디오스민 캡슐 제제를 실제로 분석하여 시험법의 유효성을 검증하였다. 개발한 분석법의 검증은 직선성, 정확성 및 정밀성, 반복성, 실험실내 정밀성, 회수율, 그리고 완전성 시험 등을 통하여 평가하였다. 본 실험결과 시스템적합성에서 피크면적과 머무름시간의 RSD는 각각 0.06%와 0.37%, 이론단수 3591.293, 그리고 비대칭계수 1.35를 나타내었다. 일내 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차가 0.15~0.29%, 일간 정밀성은 피크면적비의 상대표준편차가 1.05~1.74%로 나타내었다. 그리고 직선성 실험에서는 결정계수 (r^2)가 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 정확도 실험에서는 회수율시험으로서 최소 101.2%, 최대 103.2%로 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 디오스민 캡슐 중 디오스민의 함량을 분석하기 위한 공정 시험법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처 연구개발과제(16172의약안152)의 연구개발비와 2016년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(관리번호-520160127) 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Ministry of Food and Drug Safety, No. A0-2015-2-006 (2015.07.20), Republic of Korea.
2. Korea Pharmaceutical Information Center, http://www.health.kr/ingd_info/ingd_group/show_detail.asp?idx=632, Assessed 26 Jul 2016.
3. Ministry of Food and Drug Safety, *The Korean Pharmacopoeia*, **11th Edition**, (2016), Republic of Korea.
4. Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency, *British Pharmacopoeia*, **7th Edition**, (2013), United Kingdom.
5. The United States Pharmacopoeial Convention, *The United States Pharmacopoeia*, USP 39 NF **34** (2016), United States.
6. M. K. Anwer, S. Jamil, M. J. Ansari, R. Al-Shdefat and M. S. Abdel-Kader, *Int. J. Biol. Sci.*, **3**, 41-46 (2014).
7. I. Saeidi, M. R. Hadjmohammadi, M. Peyrovi, M. Iran-shahi, B. Barfi, A. B. Babaei and A. M. Dust, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 419-422 (2011).
8. M. A. Campanero, M. Escolar, G. Perez, E. Garcia-Quetglas, B. Sadaba and J. R. Azanza, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 875-881 (2010).
9. F. I. Kanaze, C. Gabrieli, E. Kokkalou, M. Georgarakis and I. Niopas, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 243-249 (2003).
10. A. M. El-Shafae and M. M. El-Domiaty, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **26**, 539-545 (2001).
11. Ministry of Food and Drug Safety No. 2009-173 (2009. 12. 15), Republic of Korea.
12. Ministry of Food and Drug Safety, No. C0-2012-2-005 (2012. 09. 19), Republic of Korea.