

HPLC를 利用한 Phenylpropanolamine HCl과 複合된 Ascorbic acid의 同時分析 및 Ascorbic acid의 分析時間에 따른 含量 變化에 관한 研究

藥品分析科

姜正美 · 李弘洙 · 李美玉 · 閔尙基 · 文責任 · 嚴柱吾

Simultaneous analysis of phenylpropanolamine HCl
and ascorbic acid, and survey on a change of content
of ascorbic acid with time by HPLC in drugs.

Drug Analysis Division

J.M.Kang, H.S.Lee, M.O.Lee, S.G.Min, G.I.Moon, J.O.Um

Abstract

Simultaneous analysis of phenylpropanolamine HCl and ascorbic acid, and survey on a change of content of ascorbic acid with time by HPLC in drugs investigated.

The results obtained were as followed ;

1. Ascorbic acid preparation was degraded rapidly within 6 to 24 hrs..
2. The standard preparation and the sample preparation with 0.5% sorbitol solution were stable for 24hrs..
3. The conditions of simultaneous analysis were as followed ;

* Mobile phase—Add methanol 500ml, tetrahydrofuran 40ml, ion-pair chromatography

reagent B7 25ml and mix. Add water to 1000ml and degas this solution prior to use.

* Chromatographic system-The liquid chromatograph is equipped with a 254nm detector and μ -Bondapak C₁₈(3.9×300mm) column. The flow rate is about 1ml per minute.

I. 緒 論

經濟水準의 向上과 더불어 食生活의 豊饒로 現代人의 攝取칼로리가 消費칼로리를 웃돌며, 過剩熱量攝取로 인해 身體의 均衡이 깨어져 肥滿症이 增加하는 趨勢이다. 醫學的으로 肥滿症은 各種 疾患의 重要한 要人으로 지적되고 있다.

비만의 減소를 위하여 다양한 Diet 방법들이 소개되고 있으며, 체중감소의 주요 해결 Key는 섭취칼로리 제한에 있다. 칼로리 제한의 한 方法으로 칼로리 制限 食餌와 食욕억제제를 병행하는 方法이 있다.

시중에 시판되는 食욕억제제중에서 臨床實驗을 통해 그 有效性이 立證되어 O.T.C.(一般賣藥)로 分類되어 販賣되고 있는 Phenylpropanolamine HCl 製劑가 그 代表的인 것이다.

市販 Phenylpropanolamine HCl 製劑中에는 低칼로리 食餌로부터 缺乏되기 쉬운 營養소를 보충하기 위한 目的으로서 비타민등을 添加시킨 複合製劑들이 있다.

代表的인 것으로 Ascorbic acid를 複合시킨 製劑를 들수있다. 대부분의 食욕억제제의 경우 그 효능은 製劑의 부작용을 이용하는 것이므로 精確한 用法및 容量을 사용할 必要가 있으며, 이들 製劑의 有效의 藥品 定量試驗도 重要시 된다.

이 製劑의 檢定時 製造源에서 提示한 試驗 基準 및 試驗方法書, U.S.P.xxii등을 參照로 하며 其他 HPLC를 利用한 醫藥品 分析方法集 등에 手錄된 試驗方法을 應用하고 있다. 이 試驗方法들은 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid를 各各 別途의 定性 定量하는 方法을 採擇하고 있다.

따라서 試料를 各各의 成分을 定性 定量하기 위하여 두 번 前處理하여야 하는 번거로움이 있으며, Ascorbic acid의 경우는 U.S.P.xxii에 따라 定量할 경우 實驗過程이 HPLC를 利用하는 것보다 操作이 複雜하고 時間이 많이 걸린다.

短時間內에 두 成分을 同時에 分析할 수 있는 方法과 그 根據를 밝힐 必要가 있었다. 本實驗은 이러한 必要性에 따라서 HPLC를 利用한 同時 分離 定性 分量資料를 얻어 보았다.

II. 材料 및 方法

標準品으로 使用되는 Phenylpropanolamine HCl은 國立保健院에 送付된 것을 使用하였으

며 Ascorbic acid는 Junsei Chemical Co., Ltd. 製品이고, Water, Methanol은 Merck Co. 製品이며 D-Sorbitol은 Hayashi Pure Chemical Industries. Ltd. (임순화공업 주식회사). Ion-Pair Chromatography reagent B7은 Alltech Associates. Inc., Tetrahydrofuran은 J.T.Baker Chemical Co.의 HPLC용을 사용하였고 前處理 過程에서 사용된 Millipore filter는 Waters 社의 Millex-HV 0.45 μ m filter unit를 사용하였다.

檢體는 市販되고 있는 A社의 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid가 複合된 Capsule製劑를 사용하였다.

機器分析에 사용한 HPLC 機種은 Waters社製, Waters 510 HPLC pump, Automated gradient controller, 484 Tunable absorbance detector, 746 Data module, U6K injector와 Spectra-Physics社製, Spectra system P2000 pump, Spectra FOCUS forward optical scanning detector, Spectra system FL2000, Spectra 386을 사용하였고 Column은 μ -Bondapak C₁₈(3.9 \times 300mm, Waters Associates, Inc.)를 사용하였다.

標準液은 各各 세 種類로 調劑하였다. Phenylpropanolamine HCl 標準液은 約 500 μ g/ml의 濃度로 調劑했으며, Ascorbic acid 標準液은 0.5% Sorbitol 溶液으로 Ascorbic acid가 約 500 μ g/ml의 濃度가 되도록 調劑했으며, 나머지 한가지는 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid가 各各 約 225 μ g/ml, 540 μ g/ml의 濃度가 되도록 0.5% Sorbitol 溶液에 녹여 調劑하였다.

檢液은 A社 Capsule劑의 內容物을 잘 粉碎하여 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 濃度가 各各 約 225 μ g/ml, 540 μ g/ml의 濃度가 되도록 0.5% Sorbitol 溶液에 녹여 밀리포아濾過하여 調劑하였다.

III. 結果 및 考察

一般적으로 Phenylpropanolamine HCl을 定性 定量할 경우 HPLC 分析法을, Ascorbic acid는 2,6-Dichlorophenol-indophenol에 의한 測定法 또는 誘導體化 過程 없이도 다른 物質의 妨害를 받지 않는 HPLC 分析法을 利用한다. 이러한 경우 두 成分을 分析하는 HPLC 分析條件이 相異함으로써 分析時間이 二倍로 所要되며 檢液의 調劑도 各各 달리하여야 하는 短點이 있다.

本研究에서는 檢液을 0.5% Sorbitol 溶液에 녹여 調劑함으로써 Ascorbic acid를 Phenylpropanolamine HCl과 同時에 Phenylpropanolamine HCl의 HPLC 分析條件으로 定性 定量할 수 있었다. 또한 Ascorbic acid를 HPLC로 分析할 때 分析時間 및 抗酸化劑의 添加與否에 따른 經時變化를 함께 밝힘으로써 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 HPLC에 의한 同時分析 最適條件을 밝혔다.

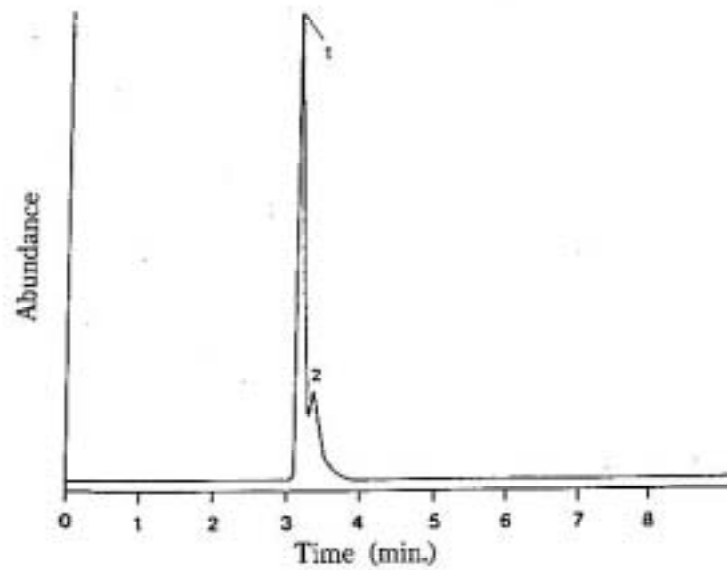


Fig. 1. HPLC chromatogram of the assay preparation at 254nm.

1. Ascorbic acid
2. Phenylpropanolamine HCl

Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid을 同時分析하기 위해 HPLC, column : μ -Bondapak C₁₈, wavelength : 254nm, flow rate : 1.0ml/min. mobile phase : methanol 500ml, tetrahydrofuran 40ml, phosphoric acid 1ml를 取한 後 H₂O로 1000ml로 맞추는 등의 條件으로 分析한 結果 Fig.1, 2와 같이 두 成分의 peak가 거의 중첩되어 檢出되었다.

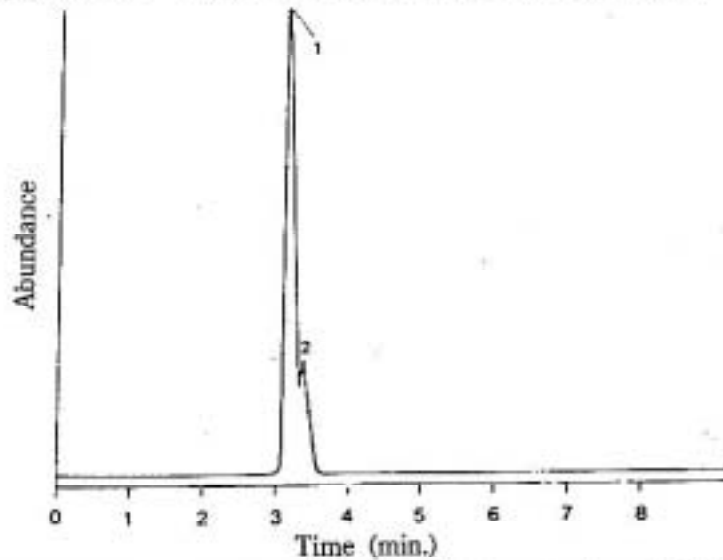


Fig. 2. HPLC chromatogram of the standard preparation at 254nm.

1. Ascorbic acid
2. Phenylpropanolamine HCl

그리고 Phenylpropanolamine HCl의 peak가 완전히 分離되지 않아 peak area가 integrator에 數值로 나타나지 않았다. 따라서 定量條件에 問題가 있었다.

앞의 HPLC 條件에서 mobile phase를 methanol 500ml, tetrahydrofuran 40ml, Ion-Pair Chromatography reagent B7 25ml에 H₂O를 加하여 1000ml로 맞추는 것으로 바꾼 後 分析한 結果는 다음과 같았다.

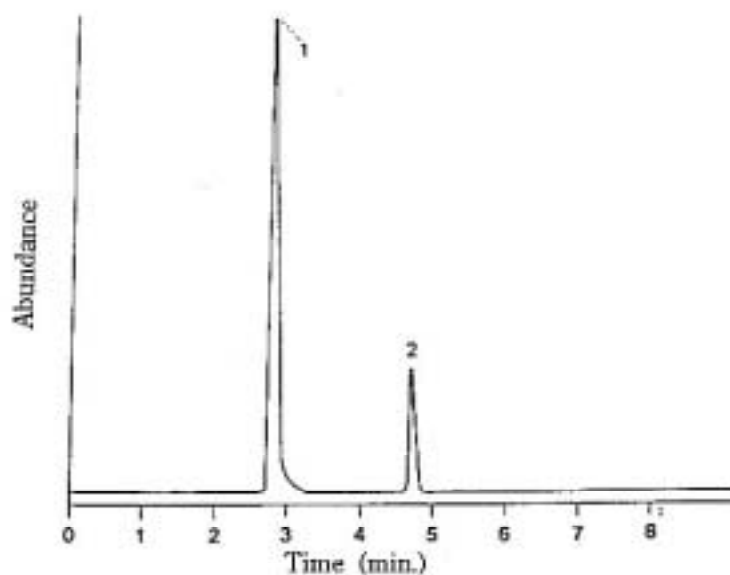


Fig. 3. HPLC chromatogram of the standard preparation at 254nm.

1. Ascorbic acid
2. Phenylpropanolamine HCl

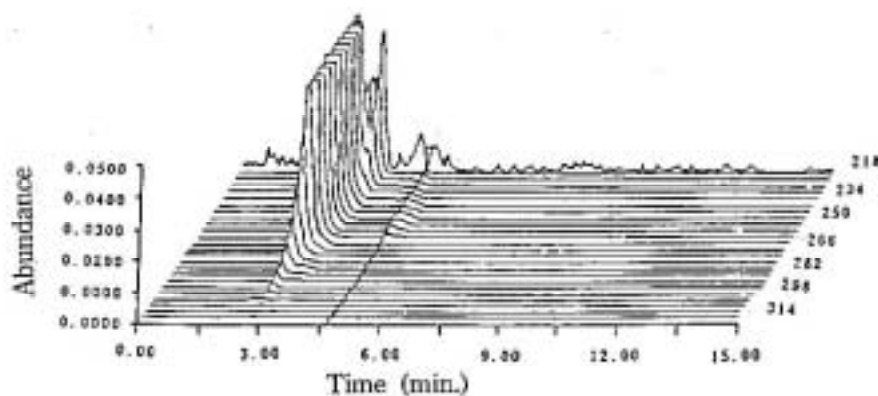


Fig. 4. HPLC chromatogram of the standard preparation at 214-320nm.

1. Ascorbic acid
2. Phenylpropanolamine HCl

Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 混合標準液의 HPLC Chromatogram은 各各 Fig. 3, 4에서 보는 바와 같이 두 개의 peak가 뚜렷하게 分離되었다. 이러한 結果는 mobile phase에 Ion-Pair Chromatography reagent B7을 添加했기 때문인 것으로 믿어진다.

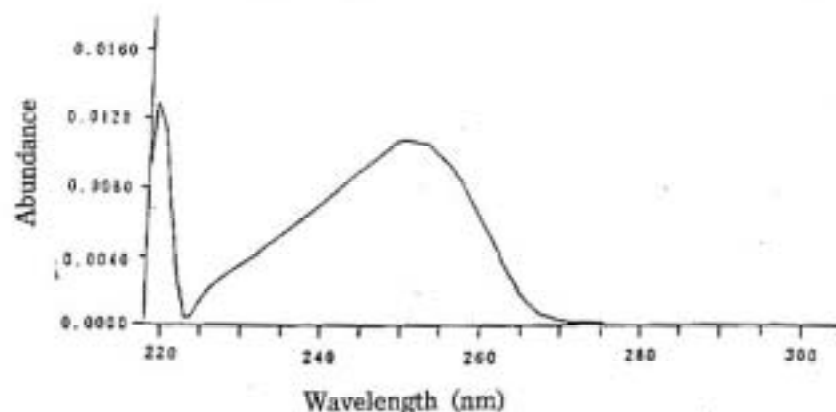


Fig. 5. Spectra display of the standard preparation

Fig. 4를 wavelength, abundance의 2次元으로 再構成한 Fig. 5에서 알 수 있듯이 Phenylpropanolamine HCl의 最大級收波長은 251nm부근이며 Ascorbic acid의 最大級收波長은 219 nm 부근이다.

또한 檢液中の Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 HPLC Chromatogram은 Fig. 6에 나타내었다.

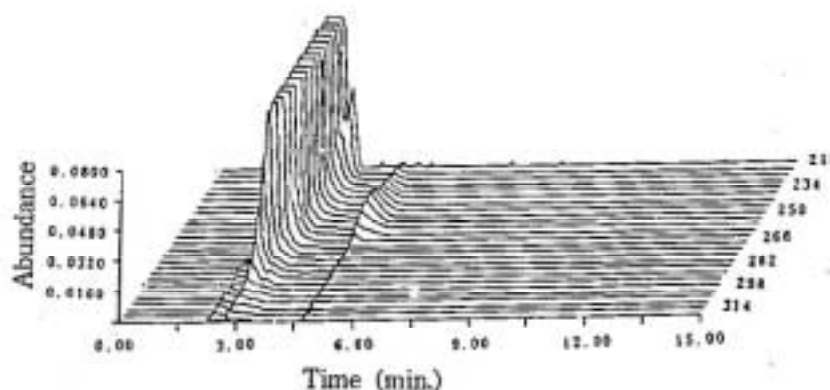


Fig. 6. HPLC chromatogram of the assay preparation at 214-320n.

1. Ascorbic acid
2. Phenylpropanolamine HCl

한편 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid 複合製劑의 同時分析時 抽出溶液, 時間에 따른 Ascorbic acid의 經時變化를 調査하였다. 그 結果를 Fig. 7, 8에 나타내었다.

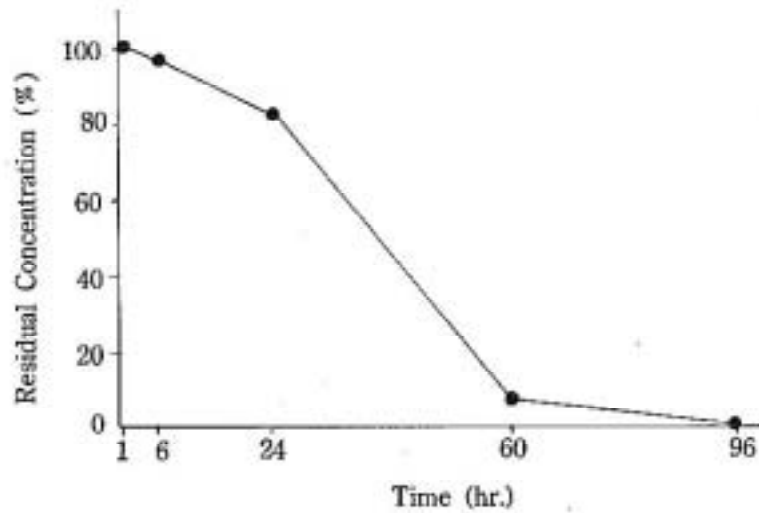


Fig. 7. Residual concentration of ascorbic acid in water during time course

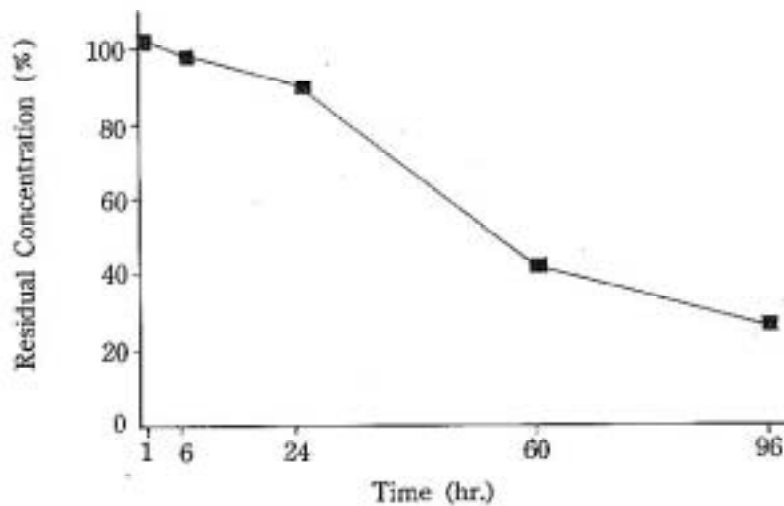


Fig. 8. Residual concentration of ascorbic acid ST in 0.5% sorbitol solution during time course

檢體를 H₂O에 녹여 調製했을 때, 調製 卽時 試驗한 含量을 100%라고 하면 1, 6, 24, 60, 96 hr. 經過된 後 定量分析한 含量은 各各 102.1, 98.1, 83.0, 8.2, 0.9%였다. H₂O 대신 抗酸化劑로써 sorbitol을 0.5% 濃度로 만들어 檢體를 調製한 境遇의 結果는 103.6, 99.0, 91.2, 43.2, 27.6%였다. 따라서 檢體를 0.5% sorbitol에 녹여 調製하는것보다 물에 녹여 調製하는 것이 Ascorbic acid가 多少 時間이 經過하더라도 安定的이었다. 한편 0.5% sorbitol에 Ascorbic acid 標準品을 溶解 調製하여 1, 6, 24, 60, 96 hr. 經過時 含量變化를 分析한 結果 各各 103.0, 96.7, 86.2, 60.4, 58.2%였다.

따라서 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid 複合製劑를 0.5% sorbitol溶液으로 調製하여 當日 定量分析하는 것이 가장 좋지만 Ascorbic acid 標準溶液도 時間이 지남에 따라 含量減少를 나타내므로 定量分析時 이러한 點도 勘案될 수 있다.

結論으로 Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 同時分析이 可能하며 같은 條件으로 Ascorbic acid 外 그 밖의 水溶性비타민의 同時分析도 可能할 것이다.

要 約

Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid 複合製劑 中 Ascorbic acid의 HPLC에 의한 分析時間에 따른 含量의 變化 및 Phenylpropanolamine HCl과의 同時分析條件은 아래와 같았다.

1. Ascorbic acid는 물로 調製했을 경우 調製 6時間 後부터, 0.5% sorbitol 溶液으로 調製했을 境遇는 24期間 後 부터 급격히 含量이 減少하였다.
2. Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 同時分析을 하기위해 0.5% sorbitol 溶液에 檢體 및 標準品을 녹여 調製하면 물로 調製한 것보다 Ascorbic acid 含量이 時間이 經過하여도 多少 安定的이다.
3. Phenylpropanolamine HCl과 Ascorbic acid의 HPLC를 使用한 同時分析條件은 column: μ -Bondapak C₁₈, wavelength: 254nm, flow rate: 1.0ml/min. 이며, mobile phase는 methanol 500ml, tetrahydrofuran 40ml, Ion-Pair Chromatography reagent B7 25ml에 H₂O를 加하여 1000ml로 하여 分析하면 同時分析이 可能하였다.

參 考 文 獻

1. The United States Pharmacopeia xx ii. (1990)
2. 最新 高速液體 크로마토그래피/ 應用編 1. (昭和 58.11)