

## 자외부 흡광 유도체를 이용한 염산 DL-카르니틴의 분석

박준규 · 신희종<sup>†</sup> · 김정우

중근당 종합연구소  
(1996년 3월 5일 접수)

### Determination of DL-Carnitine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparation by HPLC using UV Absorption Derivatives

Jun-Kyu Park, Hee-Jong Shin<sup>†</sup> and Jung-Woo Kim

Chong Kun Dang Research Institute, 410 Shindorim-Dong Kuro-Gu, Seoul, 152-070, Korea  
(Received March 5, 1996)

A reverse-phase HPLC method to determine DL-Carnitine Hydrochloride in pharmaceutical preparation is described. UV absorption derivatives of DL-Carnitine Hydrochloride were formed with p-Bromophenacyl Bromide in an essentially quantitative manner using crown ether as catalyst. The DL-Carnitine-bromophenacyl ester absorbed UV radiation strongly at 254nm, allowing the detection of as small a quantity as 12.5ng of DL-Carnitine Hydrochloride. A linear detection range was  $5 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-7}M$  of DL-Carnitine Hydrochloride. And the linear regression at various drug concentration was =0.999 (n=10). The DL-Carnitine Hydrochloride in pharmaceutical preparation was successfully derivatized and separated from other constituents by reverse phase HPLC with detection at 254 nm.

**Keywords**—DL-Carnitine Hydrochloride, HPLC, UV Absorption Derivative, P-Bromophen- acyl Bromide

카르니틴은 생체내에서 지방산의 대사에 필수 보조성분으로 작용하는 아미노산 유도체이며 L-이성체 또는 DL-이성복합체가 의약품으로 사용된다.<sup>1)</sup> 염산 DL-카르니틴의 구조중 (Chart 1) 4급 암모늄기는 항상 전하를 가지고 있으므로 음이온과 쌍을 이루고 있으며 카르복실기는 용액의 pH 에 따라서 전하를 띠거나 띠지 않는 상태로 존재한다. 염산 DL-카르니틴의 분석방법으로는 생체시료에 대한 방사선흡수를 이용하는 방법<sup>2)</sup>, 자외선중 단파장 (210nm)을 이용한 HPLC<sup>3)</sup>, GC<sup>4)</sup> 등의 방법이 있으며, 보다 미량을 검출하기 위한 방법으로 LC/MS<sup>5)</sup> 등의 방법도 사용되었다. 염산 DL-카르니틴을 UV 검출기를 사용하여 HPLC로 분석할 때 문제가 되는 것은 분자구조에서 흡광 가능한 부분이 카르복실기이나 자외부 흡광이 거의 없기 때문에 단파장 (210 nm 이하)을 사용하게 됨에 따라 소량의 방해 물질이 공존하는 경우 분리 검출이 어렵다는 점과 극성이 매우 크기 때문에 일반적인 역상 HPLC 칼럼에서 다른 물질과의 분리가 어렵다는 점이다.

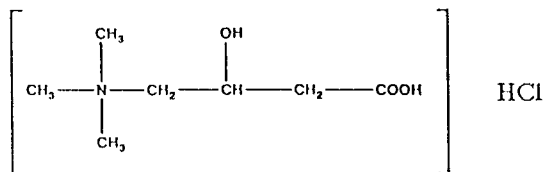


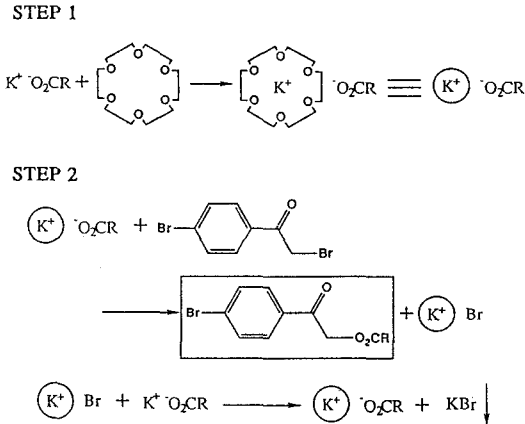
Chart 1—Structure of DL-carnitine hydrochloride

이와 같은 자외부 흡광이 없거나 약하여 UV 검출기에 의한 분석이 어려운 물질의 분석을 위하여 유도체 제조에 대한 연구가 보고되었다.<sup>6,7)</sup>

Fitzpatrick과 Siggia는<sup>8)</sup> hydroxysteroids의 검출을 위하여 자외부 흡광을 가지는 화합물을 만들었으며 17-keto steroids의 유도체 합성을 위하여 2,4-dinitro-phenylhydrazine을 사용하였다.

Papa와 Turner<sup>9)</sup>은 2,4-dinitrophenylhydrazine 유도체를 이용하여 카르보닐화합물을 분석하였으며 Carey와 Persinger<sup>10)</sup> 등은 이와같은 화합물을 dinitrophenyl 유도체를 이용하여 40 ppm까지 검출

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로



**Chart 2**—Derivatization procedure of DL-carnitine-p-bromophenacyl ester (RCOOH : DL-carnitine)

하였다고 보고하였다. 또한 Porcaro와 Shubiak<sup>11)</sup>은 p-methoxybenzoate 유도체를 이용하여 hexachlorophene을 ng 수준까지 분석하였다.

한편 카르니틴은 4급 암모늄기에 chromophoric anions의 복합체를 형성시켜 분광학적 방법으로 분석하는 방법이 연구되었으며 Paul<sup>12)</sup> 등은 4'-bromophenacyl ester 유도체를 합성하여 HPLC로 분석하였다. 그러나 지금까지의 연구에서는 생약제제와 같이 다수의 성분이 함유된 복합제제에서 UV 흡수 유도체를 이용한 분석방법은 보고된 바 없다.

연구자들은 생약함유 액제와 같이 다수의 복합성분이 존재하는 제제에서 염산 DL-카르니틴을 자외부 검출기로 검출할 수 있게 하며, 극성을 감소시켜 분리가 좀 더 용이하게 할 목적으로 자외부흡광유도체화를 시도하였다. 본 연구에서는 우선 제제중에 존재하는 성분들이 카르니틴의 유도체화 반응에 영향을 주는 것을 방지할 목적으로 강산성 양이온수지를 사용하여 전처리하였으며 염산 DL-카르니틴과 반응할 수 있는 시약 가운데 자외부 흡광 계수가 큰 p-bromophenacyl bromide (분자 흡광 계수 18000, 260 nm) 를 사용하여 염산 DL-카르니틴과 자외부 흡광 유도체를 형성하는 최적의 조건을 검토하고, 염산 DL-카르니틴을 주성분으로 하는 시판생약함유제제에 적용시켜 분석법을 확립하였다.

### 실험 방법

#### 시 약

염산 DL-카르니틴 (Sigma Chemical Co.), p-bromophenacyl bromide (Tokyo Kasei), 18-crown-6-ether (Tokyo Kasei) 수산화칼륨(Sinyo Chemical), 라우릴 황산 나트륨 (Sigma Chemical Co.), 인산이수소 나트륨, 인산 (Duksan Pharmaceutical Co.), HPLC 용 아세토니트릴 (Merck Co.), 실리카겔 TLC plate (precoated, GF-254, 두께 1 mm) (Merck Co.), IR-120 이온 교환 수지 (Supelco Co.) 등이 사용되었으며 구입한 후 더이상 정제하지 않고 사용하였다. 또한 물은 역삼투수를 여과하여 사용하였고, 시판 생약함유 액제로는 S액 (종근당) 을 사용하였다.

#### 기 기

HPLC 는 Waters HPLC system (510 HPLC pump, U6K injector, 486 tunable absorbance detector, 746 data module) 또는 Spectra Physics HPLC System ( 8100 liquid chromatograph, 8400 UV/VIS variable wavelength detector, 4200 computing integrator) 를 사용하였으며, 분자량 측정을 위한 Mass spectrophotometer 는 VG 70-SEQ (low resolution) 을 사용하였다.

HPLC 이동상은 0.5 mM 라우릴 황산 나트륨, 2 mM 인산 이수소 나트륨, 0.1% 인산을 함유하는 물과 아세토니트릴의 (25:75) 혼액을 사용하였으며, 유속은 1.5 ml/min, 칼럼은 Spherisorb ODS-1 10 m, 4.6 mm×250 mm (Alltech) 를 사용하였고, 검출기의 파장은 254 nm 를 사용하였다.

#### 유도체화 반응

염산 DL-카르니틴을 1 mg/ml (5.06 mM) 의 농도가 되게 메탄올에 용해시켰다. 따로 수산화칼륨을 취하고 메탄올을 가하여 용해하여 10.12 mM 의 용액을 제조하였다. p-bromophenacyl bromide와 18-crown-6-ether은 10:1 의 비율로 하나의 용액을 제조하였는데 각각 10 mM 과 1 mM 의 농도가 되게 아세토니트릴을 용매로 하여 유도체화 반응시약을 제조하였다. 유도체화 반응을 시키기 위해서 염산 DL-카르니틴용액을 수산화칼륨·메탄올 용액을 사용하여 중화하였으며 이 때 지시약으로는 페놀프탈레인 용액을 사용하였다. 중화된 염산 DL-카르니틴의 칼륨염 용액은 감압 농축하여 건조시킨 후 유도체화 반응시약을 넣고 80°C에서 반응시킨 후 바로 HPLC 로 분석하거나 메탄올로 희석한 후 HPLC 로 분석하였다.

**유도체의 확인**

유도체의 형성을 확인하기 위하여 염산 DL-카르니틴 30 mg 을 반응시켜서 클로로포름 · 메탄올 · 아세트 니트릴 (5:1:1) 를 전개용매로 하여 실리카겔 박층 크로마토그래피를 행하여 Rf 값이 0.2 이며 자외부 흡광이 있는 물질을 분리하였으며 이것을 시료로 하여 Mass Spectrometry 로 분자량을 확인하였다.

**반응조건의 최적화**

**염산 DL-카르니틴과 수산화칼륨과의 염 형성정도에 따른 변화**—염산 DL-카르니틴 용액 1 ml (5.06 mM, 이하 농도는 동일)에 대해서 수산화칼륨 · 메탄올 용액 (10.12 mM, 이하 농도는 동일) 의 양을 변화시키며 첨가하여 pH 를 측정하고 농축한 후 유도체화 반응시약 2 ml 를 첨가하여 80°C에서 30 분간 반응시키고 HPLC 로 유도체의 양을 측정하였다.

**농축 후 반응시 물 또는 메탄올의 존재에 의한 변화**—염산 DL-카르니틴 용액 1 ml에 수산화칼륨 · 메탄올 용액을 500 µl 첨가하고 완전히 건조시킨 후 물 또는 메탄올을 100 µl에서 400 µl까지 첨가하고 반응시약 2 ml를 가하여 80°C에서 30 분간 반응시키고 HPLC 로 유도체의 양을 측정하였다.

**염산 DL-카르니틴 에 대한 p-bromophenacyl bromide의 비율에 따른 변화**—염산 DL-카르니틴용액 1 ml에 수산화칼륨 · 메탄올 용액을 500 µl 첨가하여 건조시키고, 첨가하는 반응시약의 양을 변화시켜 반응시킨 후 메탄올로 희석하여 10 ml 로 한후 HPLC 로 유도체의 양을 확인하였다.

**반응시간과 온도에 대한 변화**—염산 DL-카르니틴 용액 1 ml에 대해서 수산화칼륨 · 메탄올 용액 500 µl를 첨가하여 건조시키고 반응 시액 2 ml를 첨가하여 반응시켰으며, 이때 반응 온도를 상온(20°C)에서 80°C 까지 변화시키고 반응 시간도 0 분에서 1 시간 까지 변화시키며 HPLC 로 유도체의 양을 측정하였다.

**염산 DL-카르니틴 유도체의 검량선 작성**

염산 DL-카르니틴을 1 mg/ml 의 농도가 되게 메탄올에 용해시킨 다음 염산 DL-카르니틴으로서 0.1 mg-1.0 mg 에 해당하는 양을 취하여 시험관에 각각 넣고 메탄올로 1 ml가 되게 표선한 후 페놀프탈레인 용액을 지시약으로 넣고 수산화칼륨 · 메탄올 용액으로 중화하였다. 중화된 액을 감압 농축하여 건조시킨 후 p-bromophenacyl bromide와 18-crown-6-ether 용액(각각 10 mM 와 1 mM)을 2 ml씩 넣어

80°C에서 15분간 반응시켰다. 이 반응액에 메탄올을 추가하여 10 ml로 한 후 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였다.

**시판 제품에 대한 응용**

염산 DL-카르니틴을 주성분으로 함유하는 생약액제 소화제중 S 액(S 액 100 ml 중 염산 DL-카르니틴 133.33 mg 함유)을 대상으로 적용가능성을 검토하였다. 제품중의 여타 성분이 유도체화 반응에 영향을 주는 것을 방지하기 위해 전처리가 필요하였으며, 강산성 양이온 교환 수지인 IR-120 (-SO<sub>3</sub> type) 을 사용하여 전처리하였다. 이온교환 수지는 4N 암모니아수로 세척한 후에 2N 염산용액으로 재생하여 사용하였으며 S 액 75 ml에 대해서 이온 교환 수지의 양은 50 g (수분 함유 중량) 을 사용하였다.

S 액 75 ml를 삼각 플라스크에 넣고 이온 교환 수지를 넣은 후 교반하고, S 액을 제거한 후 탈이온수 100 ml를 넣고 30 분간 교반하여 세척하였다. 세척하는 조작을 3 회 반복한 후 4N 암모니아수 50 ml를 넣고 30 분동안 교반하고 이 액을 200 ml 용량 플라스크에 모았다. 이 조작을 3 회 반복하여 액을 모은 후 탈이온수로 200 ml로 표선하였다. 이 중에서 20 ml를 취해서 100 ml 등근 플라스크에 옮긴 후 증발건고시키고 탈이온수를 용매로 하여 20 ml로 표선하였다. 이 액중 1 ml를 취하여 앞의 방법에 따라 유도체화 반응을 시킨 후 HPLC 로 정량하였다.

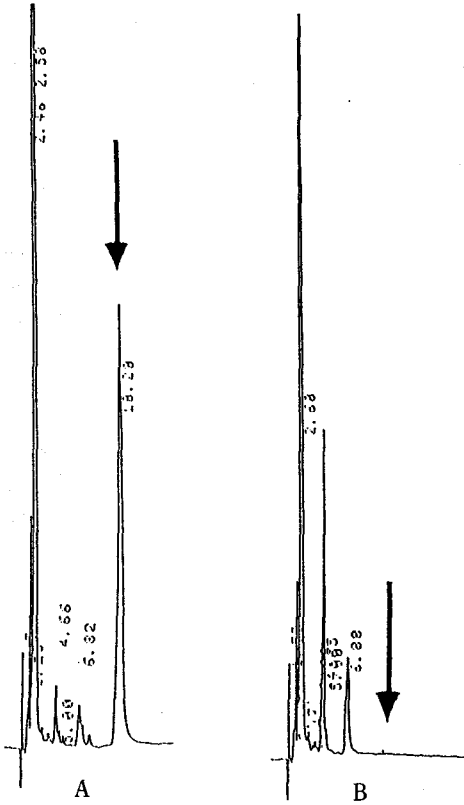
S 액중 염산 DL-카르니틴을 이온 교환 수지로 추출할 때 추출시간에 따른 변화를 검토하기 위하여 동일하게 처리한 이온교환수지로 추출시간을 0.5 시간부터 10 시간까지 변화시키되 이외의 조작을 동일하게 하여 함량을 확인하였다.

전처리 조작과 유도체화 반응을 통한 S 액중의 염산 DL-카르니틴의 정량에 있어서 실험 조작의 오차범위를 구하기 위해서 함량을 동일하게 한 S 액에 대해서 동일하게 재생시킨 이온 교환 수지를 사용하여 처리한 후 유도체화 반응을 거쳐 HPLC 로 정량하여 그 값을 상호비교하였다.

**결과 및 고찰**

**유도체의 확인**

염산 DL-카르니틴 유도체의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1와 같이 유지시간 10.20분에서 양호하게 분리되었으며 다른 피이크와 뚜렷이 구분되는 피이크를



**Figure 1**—HPLC chromatogram of DL-carnitine-p-bromophenacyl ester  
 A : DL-carnitine-p-bromophenacyl ester  
 B : Blank

확인하였다. 이 피이크는 공시험액을 반응시켰을 때는 나타나지 않았다. 이 유도체를 preparative TLC로 분리하여 질량분석 스펙트럼을 측정한 결과 Fig. 2에 나타난바와 같이 m/z =394 (molecular ion peak)와 278 (M-Br)의 피이크를 확인하였다.

**반응조건의 검토**

**수산화칼륨과의 염 형성 정도에 따른 변화**—수산화칼륨을 첨가한 후의 용액의 pH와 반응 완결 후 유도체의 양의 상관 관계를 비교하였을 때 Fig. 3에서와 같이 약 pH = 6 이상에서는 유도체의 양이 거의 일정하였다. 이 결과로 보아 수산화칼륨과의 염 형성 정도는 pH 지시약을 사용하여 pH가 중성이상인 것만 확인하면 될 것으로 생각되었으며, 이에 따라 실제 시료에 적용시에는 pH 8-10의 변색범위를 가지는 페놀프탈레인 시액을 지시약으로 사용하였다.

**농축 후 반응시 수분 또는 메탄올의 존재에 따른 영향**—수산화칼륨과 염을 형성한 후 감압건고하고 다시

반응시액을 넣어 반응시키는데 있어서, 감압 건고할 때 수분 또는 메탄올이 완전히 제거되지 않을 때의 영향을 보고자 하였다. 일단 감압건고시키고, 질소로 purge하여 완전히 건조시킨 후 물 또는 메탄올을 100-400 μl 넣고 반응시액 2ml를 넣어 반응시켰을 때, Fig. 4에서와 같이 수분이나 메탄올이 모두 반응에 영향을 거의 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 감압건고할 때 완전히 건조시킬 필요는 없는 것으로 보였다.

**염산 DL-카르니틴에 대한 p-bromophenacyl bromide의 비율의 영향**—Fig. 5에서 알 수 있는바와 같이 염산 DL-카르니틴에 대한 p-bromophenacyl bromide의 비율을 검토한 결과 Mole비율이 1:2 이상이면 거의 일정한 양의 유도체를 생성하는 것으로 나타났다.

**반응 시간과 온도에 의한 변화**—Fig. 6에서 나타난 바와 같이 반응시간과 온도에 의한 영향을 상온(20°C)에서 80°C까지, 0분에서 60분까지 검토한 결과 상온에서는 30분 정도에 반응이 완결되었으며, 온도가 높아짐에 따라 반응에 소요되는 시간은 감소하여 80°C에서는 5분이면 반응이 완결되었다. 그리고 80°C에서 계속 가열하여도 유도체의 분해는 일어나지 않았다.

**검량선의 작성**

검액중 염산 DL-카르니틴의 농도와 HPLC 피이크의 면적과의 그래프 (Fig. 7)는  $5 \times 10^{-6} M \sim 5 \times 10^{-7} M$  범위에서 직선관계를 나타냈으며 상관계수는 0.999 (n=10)로 나타났다.

**시판 제품에 대한 응용**

시판 생약함유액제인 S액을 대상으로 유도체화 반응을 이용하여 염산 DL-카르니틴의 양을 정량하였다.

S액에는 다수의 생약성분들과 당류 성분이 혼재하여 S액을 직접 유도체화 반응을 시도하였을 때 여타 성분들, 특히 당류의 방해로 인해 반응이 원활하게 진행되지 않았다. 따라서 S액의 전처리 방법을 검토하였으며 염산 DL-카르니틴이 4급 암모늄이므로 어떠한 조건에서도 전하를 가진 형태로 존재하는 점에 착안하여 강산성 양이온 교환 수지인 IR-120을 사용하여 전처리하였다.

**추출시간에 대한 검토**—이온 교환 수지로 염산 DL-카르니틴을 추출하는 시간을 30분에서 10시간까지로 변화시켰을 때 Fig. 8에서 알 수 있듯이 30분이상에서 거의 차이가 없었다. 따라서 재현성 시험에서는

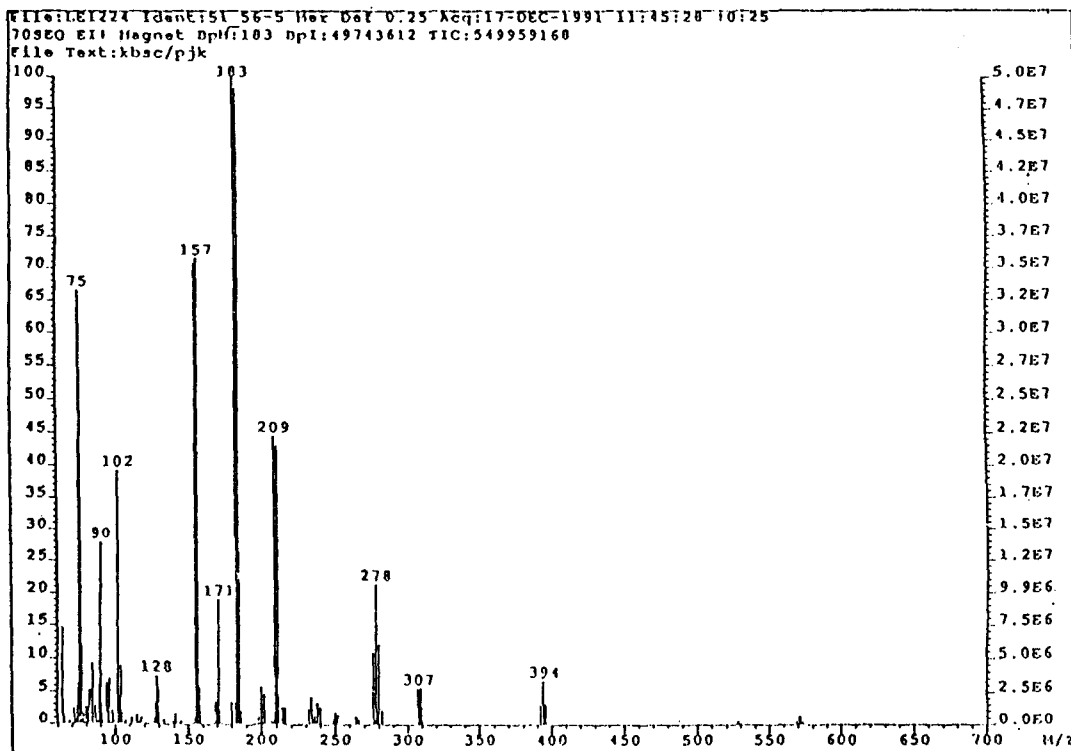


Figure 2—Mass spectrum of DL-carnitine-p-bromophenacyl ester

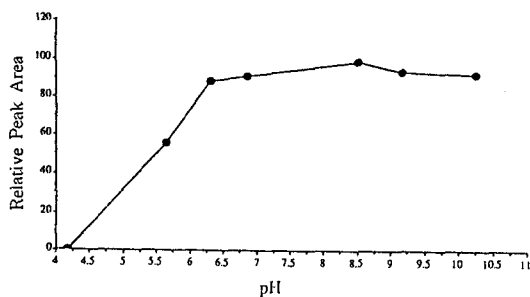


Figure 3—Effects of salt formation on the derivatization of DL-carnitine hydrochloride

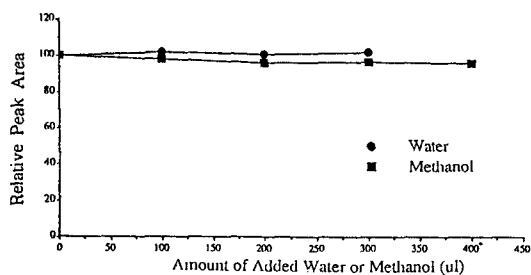


Figure 4—Effects of residual water or methanol on the derivatization of DL-carnitine hydrochloride

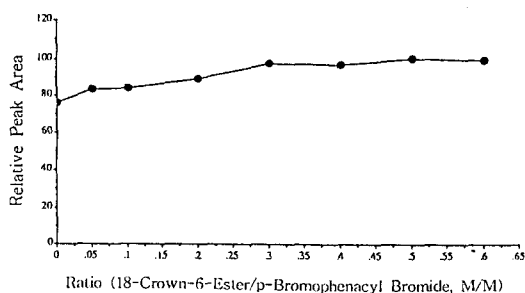


Figure 5—Effects of ratio of p-bromophenacyl bromide and 18-crown-6-ether on derivatization of DL-carnitine HCl

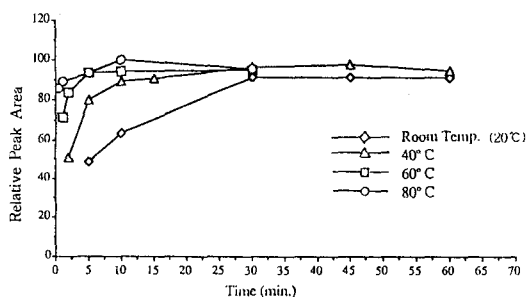


Figure 6—Effects of temperature and time on the derivatization of DL-carnitine hydrochloride

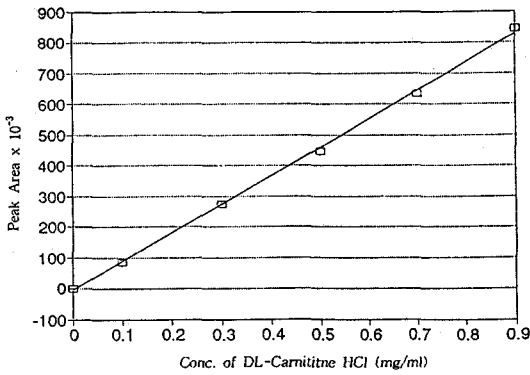


Figure 7—Effects of amount of p-bromophenacyl bromide

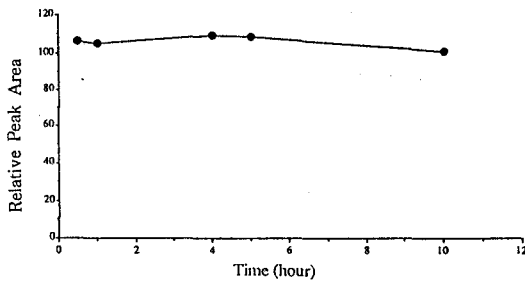


Figure 8—Effects of mixing time with ion exchange resin in S-solution

Table 1—Recovery of DL-Carnitine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparation (S-Solution)

sample	Recovery(%)
n=1	97.1
n=2	107.1
n=3	105.4
n=4	101.4
n=5	108.8
Mean	104.0
S.D.	4.2

추출시간을 30분으로 하였다.

재현성 검토—S 액중 염산 DL-카르니틴의 함량을 5 회에 걸쳐서 측정하여 재현성을 검토했다. Table 1에서와 같이 평균 함량은 104.0% 였으며 표준편차는 4.2% 로 나타났다.

### 결 론

염산 DL-카르니틴의 분석을 위하여 18-crown-6-ether를 촉매로 사용하고 p-bromophenacyl bro-

mide를 유도체화 반응 시약으로 하여 80°C에서 15분 간 반응시켜 자외부 흡수가 있는 DL-Carnitine-p-bromophenacyl 유도체를 생성시킨 후 분리하여 구조를 확인하였으며 UV 검출기를 사용하여 HPLC 분석 방법을 확립하였다. 이 분석법을 생약함유 제제 S 액에 적용시키기 위해서는 시료의 전처리가 필요하였으며, 이는 강산성 양이온 교환 수지인 IR-120 을 사용하여 30분 추출함으로써 가능하였다. S 액중의 염산 DL-카르니틴의 함량을 시험한 결과 함량평균이 104.0%, 표준 편차가 4.2%로 나타났다.

### 참고문헌

- 1) Martindale, "The Extrapharmacopeia", The Pharmaceutical Press, p 1257 (1989).
- 2) A.Daveluy, R.Parvin and S.V.Pande, Enzymatic Synthesis of Radioactive (-)-Carnitine from Butyrobetaine Prepared by the Methylation of Aminobutyric Acid, *Anal. Biochem.*, **119**, 286 (1982).
- 3) Charles L. H., Eric P.B., Austin P.G. and Julia S.T., Separation of Acylcarnitines from Biological Samples Using High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Biochem.*, **156**, 111 (1986).
- 4) L.M. Lewin, A.Peshin and B.Sklarz, A Gas Chromatographic Assay for Carnitine, *Anal. Biochem.*, **68**, 531 (1975).
- 5) Aifred L. Y., Daniel J. L. and David S. M., Thermospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of L-Carnitine and its Short-Chain Acyl Derivatives, *Anal. Biochem.*, **139**, 278 (1984).
- 6) Danielson N. D., Targove M. A. and Miller B.E., Pre-and Postcolumn Derivatization Chemistry in Conjunction with HPLC for Pharmaceutical Analysis, *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 362 (1988).
- 7) Kiyoshi T. and Walter M., "GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents, part I", Dekker, Chaper 5 (1980).
- 8) F.A. Fitzpatrick and S. Siggin, High Speed Liquid Chromatography of Derivatized Urinary 17-Keto Steroids, *Anal. Chem.*, **44**, 2211 (1972).
- 9) L.J. Papa and L.P. Turner, Chromatographic Determination of Carbonyl Compounds as Their 2,4-Dinitrophenylhydrazones, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 747 (1972).

- 10) M.A. Carey and A.F. Persinger, Liquid Chromatographic Determination of Traces of Aliphatic Carbonyl Compounds and Glycols as Derivatives That Contain the Dinitrophenyl Group, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 537 (1972).
- 11) P.J. Porcaro and P. Shubiak, Detection of Nanogram Quantities of Hexachlorophene by Ultraviolet Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **44**, 1865 (1972).
- 12) Paul, E. Minkler., Stephen T. Ingalls, Determination of Carnitine, Butyrobetaine, and Betaine as 4'-Bromophenacyl Ester Derivatives by HPLC, *J. Chromatogr.*, **336**, 271 (1984).