

HPLC 를 이용한 제제중의 레티놀 유도체 정량

안문규[#] · 문현숙 · 허문희* · 김대병** · 박승희**

경성대학교 약학대학, *부산지방식품의약품안전청, **식품의약품안전청

(Received June 12, 2001 Revised July 5, 2001)

Determination of Retinols in Pharmaceutical Preparations by HPLC

Moon Kyu Ahn[#], Hyun Sook Moon, Moon Hye Hur*,
Dae Byung Kim** and Sung Hee Park**

Department of Pharmacy, Kyungsung Univ. 608-736, Pusan, Korea

*Pusan regional Food & Drug Administration, 608-080, Pusan, Korea

**Korea Food & Drug Administration, 122-704, Seoul, Korea

Abstract — A simple and rapid determination of total retinol from various pharmaceuticals containing retinol derivatives was described. Retinol derivatives were hydrolyzed with alcoholic KOH to alcoholic retinol, which was determined by HPLC. Pretreatments and HPLC conditions depend on the kind of retinols and preparation forms. The total amount of alcoholic retinol could be determined with this method from many pharmaceutical preparation of retinol derivatives. Treating time of KOH, acidic reagents and HPLC conditions were investigated.

Keywords □ Retinol, retinol derivatives, HPLC

비타민 A(레티놀)는 질병에 대한 저항을 증가시키고, 상피조직의 유지, 골, 치아의 성장에 필요하며 성장촉진작용을 하는 등 여러 가지 중요한 작용을 한다. 그러므로 각종 영양제, 연고제나 피부 재생용 화장품 등에 많이 이용되고 있다. 레티놀은 공기 및 빛에 민감하여 그 자체로 사용하기 보다는 합성 레티놀이거나 비타민 A 유 등이 많이 사용되고 있다. 식품,^{1,2)} 혈액^{3,4)} 및 제제⁵⁾중 지용성 비타민은 HPLC를 이용하여 분석하여왔다. 특히 식품 및 제제중의 지용성 비타민을 Kim 등¹⁾은 효소 분해법으로 처리한 후 용매 추출하여 분석한 방법과 Thompson의 알칼리 가수분해법과 용매 추출법, Barnett 등의 용매 추출법을 비교 검토한 바 있다. 이들 방법들은 제제분석에 이용시 전처리 과정이 길다는 단점이 있다. 의약품의 경우에는 식용유 등 식품 중 비타민 분석과는 달리 매질이나 방해물질

의 영향이 약하며, liquid paraffin 계열 기체를 사용한 연고제제의 경우 클로로포름 등에 녹여야 하므로 용매 추출법을 이용하기는 어렵다.

따라서 본 연구에서는 다양한 제제 중의 지방산 에스테를 알코올성 KOH로 가수분해시킨 후 용매추출과정을 거치지 않고 HPLC로 분석하여, 레티놀로서의 정량을 시도하여 보았다.

실험방법

시약 — All-trans 레티놀, 초산 레티놀 및 팔미탄산 레티놀 등은 Fluka사제, 아세토니트릴 및 메탄올은 Ridel-deHaen 사제, 에탄올은 Hayman Limited사제를 사용하였으며, 그외는 시약 특급을 사용하였다.

기기 — HPLC system으로 Waters Associates사의 Alliance 2690, 996 PDA 검출기 및 Millennium software를 사용하였고, 분석칼럼은 Nacalai tesque사제의 Cosmosil(4.6×150 mm, type 5C18-AR)를 사용

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-620-4882 (팩스) 051-628-6540

하였다. 시험액 주입은 시료 자동 주입기를 이용하여 10 µL 주입하였다. 이동상은 물과 아세토니트릴(1:9) 혼합액을 사용하여 유속 1.0 mL/min으로 하였고, 파장은 326 nm로 하였다.

표준용액 - 레티놀 계열 표준품을 에탄올로 40~200 µg/mL 농도로 녹여 표준원액으로 한 후 적절히 희석하여 326 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 Merck Index⁶⁾에 따라 비흡광도 1835(레티놀), 1550(초산 레티놀), 975(팔미틴산 레티놀)로부터 순도를 산출하였다. 표준원액은 갈색 용기에 냉장보관하였으며 매 실험 때마다 이를 희석하여 사용하였다.

시료전처리 - 표준용액 및 시료 일정량을 100 mL 갈색 용량 플라스크에 넣고 에탄올 30 mL를 넣어 충분히 초음파 처리한 후 20% 알코올성 KOH 2 mL를 넣어 60분간 상온 방치를 하였다. 초산 1 mL를 넣어 산성화하고 메탄올로 표전까지 채우고 혼화한 후 0.45 µm 여과막으로 여과한 후 HPLC를 시행하였다. 단, liquid paraffin 기체를 사용한 연고의 경우 클로로포름 20 mL에 용해시키고 20% 알코올성 KOH 2 mL를 넣어 30분간 상온에서 가수분해시키고 초산 1 mL 넣은 다음 시험액을 흔들면서 메탄올을 점진적으로 첨가하여 paraffin 기체가 서서히 응결되게 하였다.

결과 및 고찰

알코올성 KOH 처리에 따른 분해 - Fig. 1에 나타난 바와 같이, 초산 레티놀 및 팔미틴산 레티놀을 알코올성 KOH로 처리한 결과 레티놀과 같은 시간대에 피크를 보였으며, 알코올성 KOH로서 처리하지 않은 것은

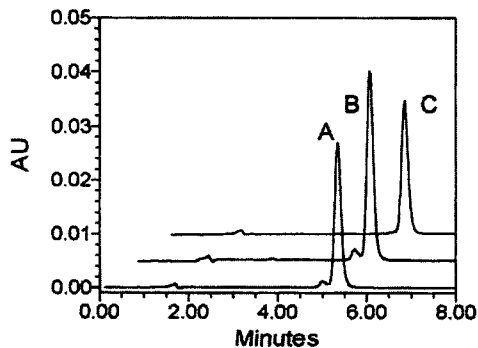


Fig. 1 - Chromatogram of retinol derivatives, treated with alcoholic KOH. A: retinol acetate, B: retinol palmitate, C: retinol

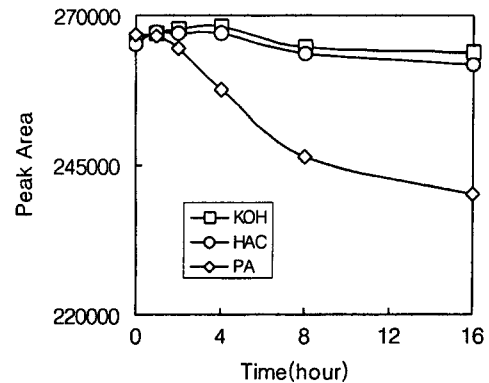


Fig. 2 - Effect of acidic agents on decomposition of retinol. It take only 5 minutes for HCl to decompose all retinol. There were no difference from treating or not treating acetic acid (HAC). PA: phosphoric acid.

레티놀이 검출되지 않았다.

산성화 시액의 영향 - 알코올성 KOH로서 가수분해시킨 후 산성화 시액의 영향을 살펴보기 위하여 인산 0.4 mL 혹은 초산 1 mL 함유하는 0.16 mg/dL 레티놀 용액과 이들 산성화 시액을 넣지 않은 레티놀 용액에 대하여 HPLC를 시행하여 레티놀 함량의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 2와 같았다. 인산을 넣은 경우 시간에 따라 일정한 비율로 레티놀 함량이 감소하였으나 초산의 경우 약 16시간 경과하여도 함량이 약 99.2%로 나타나는 등 안정한 결과를 보였다. 또한 알코올성 KOH 처리 후 인산을 넣을 경우 침전이 생성하였으나, 초산의 경우 침전 형성이 없어 공침에 의한 오차 발생이 적은 장점이 있었다. 10% 염산 3 mL를 사용한

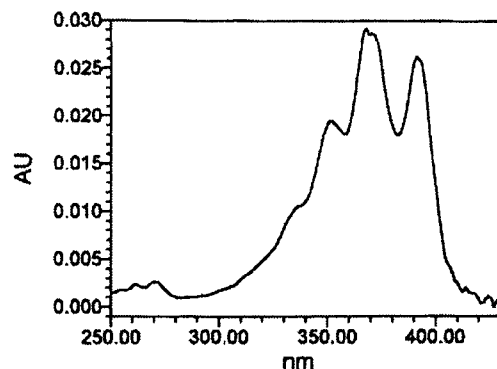


Fig. 3 - Absorption spectrum of retinol decomposed by HCl. It's spectrum was very different with retinol spectrum (refer to Fig. 6). It's HPLC peak found at about 12 minutes.

경우 크로마토그램상에서 레티놀의 머무름시간(5분대)과는 다른 12분대에 피크가 나타났고, 자외부에서의 흡수스펙트럼이 변하였으며(Fig. 3), 5분대 피크는 염산 첨가 후 5분내에 완전히 없어졌다. 이에 본 실험에서 알코올성 KOH 처리후 산성화 시약으로는 초산을 선택하였다.

알코올성 KOH 처리 시간의 영향 - 알코올성 KOH 처리 시간에 따른 영향을 살펴보기 위해 25 mL 갈색 용량 플라스크에 20 µg/mL 레티놀, 45 µg/mL 초산 레티놀 혹은 60 µg/mL 팔미틴산 레티놀 2 mL과 알코올성 KOH 0.5 mL를 넣은 후 일정 시간 경과 후 초산 250 µL를 넣고 메탄올로 표선을 맞춘 후 HPLC를 시행하여보았다. 초산 및 팔미틴산 레티놀의 경우 20분대 이후 거의 분해가 완료된 것으로 나타났고, 정제 및 액체 시료에 대해서도 유사한 결과를 보였으나, 팔미틴산 레티놀을 함유하는 liquid paraffin 기체 연고를 실험한 결과 표준액과는 달리 약 50분에서 완전 분해된 것으로 나타났다(Fig. 4). 이후 알코올성 KOH 처리 시간은 모두 60분으로 하였다.

이성질체 - 합성 레티놀 표준품을 알코올성 KOH로 분해하였을 때 레티놀 피크 바로 앞에 조그만 피크가 나타났다(Fig. 1, 5). Heger 등⁷⁾은 초입계유체크로마토그래프를 이용하여, Panfili 등⁸⁾은 순상 HPLC를 통해 all-trans 레티놀 옆에 위치한 cis 형 이성질체 피크를 얻었다. 그러나 역상의 경우 순상의 경우보다 분리도가 매우 낮게 나타났다.⁸⁾ 시험성 액체를 전처리하여 분석한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 이성질체로

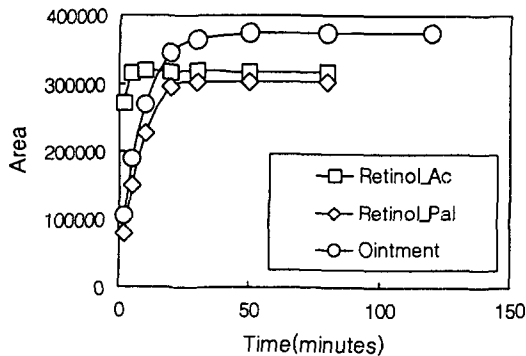


Fig. 4 - Effect of time on the hydrolysis of retinol esters to retinol by alcoholic KOH. Retinol ester in ointment was more slowly hydrolyzed to retinol than standard retinol acetate (Retinol_Ac) and retinol palmitate (Retinol_Pal).

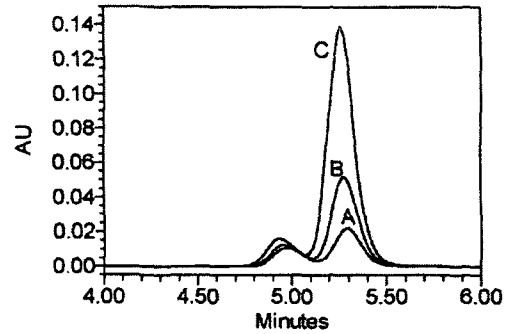


Fig. 5 - Chromatogram of liquid sample containing retinol palmitate, which was treated with alcoholic KOH for 1 hour. Standard retinol palmitate solution was added to sample solution B and C, except A.

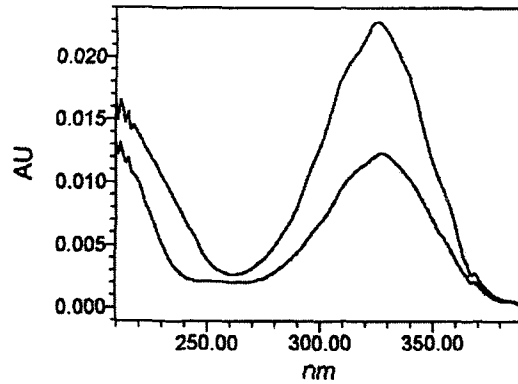


Fig. 6 - Absorption spectra of retinol and unknown peak. They were very similar to each other.

간주되는 피크가 all-trans 레티놀 피크 앞에 크게 나타났으며, 두 피크의 흡수스펙트럼(Fig. 6)은 동일하게 나타나 cis 형 이성질체일 것으로 추정되었다. 정제, liquid paraffin 기체 연고의 경우 점차 그 크기가 작아지는 것으로 나타났다. Liquid paraffin 연고의 경우 점도가 매우 높은 비활성 기체여서 화학적 변성과정이 일어날 확률이 극히 적어 합성 레티놀 에스테르 화합물이 이성질체화되지 않은 것으로 생각된다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 복합 비타민 제제의 검액에 검출된 양과 유사하거나 10배 많은 양의 팔미틴산 레티놀을 첨가하여도 앞의 피크가 증가되지 않는 것은 알코올성 KOH에 의한 분해과정에서 검체중의 각종 유·무기질이 이성질체화를 촉진한 것이 아님을 알 수 있었다. Rowley 등³⁾의 보고에 의하면 레티놀은 차광하지 않은 채 상온에서 3일동안은 안정한 것으로 보고한 바 있으나, 분석조건이 레티놀의 k가 매우 작게 설정되어 있어 두 피크의 분리를 이루지 못한 것으로 추정되었다.

Table I – Recovery test for retinol derivatives in various of pharmaceutical preparations(all treated with alcoholic KOH)

		Found (mg/Unit [#] ± RSD*)	Added retinol ester (mg)	Recovery (mean ± RSD*)
Tablet	1 ^a	1.182 ± 2.09	0.373	98.8 ± 1.12
	2 ^b	ND	0.305	101.2 ± 0.31
Liquid	1 ^{b,c}	0.759 ± 0.36	0.305	102.4 ± 0.42
	2 ^{b,d}	1.758 ± 0.81	0.305	102.9 ± 0.79
Ointment	1 ^b	1.033 ± 2.36	0.305	97.7 ± 1.58

[#]: Pharmaceutical preparation unit (tablet, mL, g)

*: Relative standard deviation (n=5).

ND: Not detected.

^a: Sample containing retinol palmitate.

^b: Sample containing retinol acetate.

^c: Injection form.

^d: Syrup form.

이성질체중 많이 존재하는 13-*cis* 이성질체의 경우 *all-trans* 레티놀 생리활성의 약 75%를 가지고 있는 것으로 알려져 있어, 레티놀 함량 분석 시 이들 두 피크의 합으로 산출하였다.

회수율 시험 – 정제, 액제 및 liquid paraffin 기체 연고 등을 레티놀로서 약 0.4 µg/mL 농도가 되게 취하여 전처리한 후 레티놀 함량을 구하고, 별도로 검체에 일정량의 레티놀 에스테르 표준액을 첨가하여 동일하게 전처리한 후 레티놀 함량을 구하여 다음 식에 따라 회수율을 구한 결과 97.7~102.9%의 회수율을 보였고 상대표준편차가 0.31~1.58%여서 매우 양호한 결과를 얻었다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{표준액 첨가된 시료용액에서의 검출량} - \text{표준액 미첨가된 시료용액에서의 검출량}}{\text{첨가된 표준액 양}} \times 100$$

결 론

레티놀의 지방산 에스테르 화합물별로 분석하는 대신, 알코올성 KOH로 상온에서 전처리하여 주요 생리활성 물질인 레티놀로 가수분해시킨 후 초산으로 산성화시켜 HPLC로 분석한 결과 표준액과 액제 및 정제의 시료에서는 20분만에 모두 레티놀로 가수분해되었으며, 팔미틴산 레티놀을 함유한 liquid paraffin 기체 연고의 경우 50분만에 모두 가수분해되었다. 정제 및 액제 시료에서 *all-trans* 레티놀 피크 앞부분에 *cis* 형 레티놀

로 추정되는 이성질체의 피크가 검출되었으며 *all-trans* 레티놀과 동일한 흡수스펙트럼을 보였다. Rowley 등³⁾에 의하면 3일간 상온에서 차광하지 않고 보관하여도 무방하다고 발표하였으나 그 분석 조건에서 *k*가 매우 작아 이성질체 피크가 검출되지 않은 것으로 추정되며, 복합 비타민 제제에 표준액을 첨가하여 전처리한 결과 추가적으로 이성질체 피크가 형성되지 않은 점으로 볼 때 검액중의 유, 무기질의 영향과는 무관한 것으로 생각된다. 또한 liquid paraffin 기체 연고의 경우 이성질체의 피크가 표준액의 경우와 크기가 유사하게 나타나는 등 제제마다 피크 양상이 다르게 나타났다. 이성질체중 많이 존재하는 13-*cis* 형 레티놀이 *all-trans* 레티놀에 대하여 75% 생리활성을 가지는 점을 감안하여 제제별로 이성질체 피크 양상과 그 형성 원인, *all-trans* 레티놀로서의 생리활성도를 근거로 한 정량법 등에 대하여 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 *all-trans* 레티놀과 이성질체간의 화학적 동등성을 가정하여 두 피크의 면적 합을 통해 함량 측정을 한 결과 정제, 액제 및 연고제제를 대상으로 회수율 97.7~102.9%, 상대표준편차 0.31~1.58%로 나타나 좋은 결과를 보였다.

문 헌

- 1) Kim, P.Z. and Kim, C. H. : A study on the simultaneous analysis of fat-soluble vitamins in food stuffs and vitamin products by high performance liquid chromatography. *J. Kor. Chem. Soc.* **33**, 46 (1989).
- 2) Panfili, G., Manzi, P. and Pizzoferrato, L. : Normal and Reversed-Phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in dairy product. *Chromatographia* **43**, 89 (1996).
- 3) Rowley, K. G., Su, Q. and O'Dea, K. : Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. *J. Chromatogr. B.* **729**, 191 (1999).
- 4) Abahusain, M. A., Wright, J., Dickerson, J. W. T., El-Hazmi, M. A. and Enein, H. Y. A. : Determination of retinol, α -tocopherol, α - and β -carotene by direct extraction of human serum using High Performance Liquid Chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **12**, 89 (1998).

- 5) Olszanowski, A. and Wielinski, S. : Simultaneous determination of retinol acetate, retinol palmitate, cholecalciferol, α -tocopherol acetate and alphacalcidol in capsules by non-aqueous reversed-phase HPLC and column backflushing. *Chromatographia* **50**, 109 (1999).
- 6) Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E. and Kinneary, J. F. : *Merk Index*. 12th Ed., Merck & Co., p1709 (1996).
- 7) Heger, R. and Runge, F. E. : Use of microcalorimetry in monitoring stability studies. Example: vitamine A esters. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 47 (2000).
- 8) 日本ビタミン學會 : ビタミン學實驗法 I, 脂溶性ビタミン, 東京化學同人, p. 11 (1983).