

## HPLC에 의한 Xanthinol Nicotinate의 定量

韓 初 德

梨花女子大學校 藥學大學

(Received November 5, 1984)

### High Performance Liquid Chromatographic Determination of Xanthinol Nicotinate

Cho Duk Han

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea

**Abstract**—A HPLC determination method of xanthinol nicotinate(I) was developed for study of its stability and characteristics in solutions. I was determined using an  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column with a mobile phase of methanol: H<sub>2</sub>O (1:1) and UV absorbance detection at 254nm. The results revealed that the method was enough to use as stability indicating determination with the mean of 99.9% and standard deviation of  $\pm 1.42\%$  when analyzed 10 times for standard solution.

末梢血管擴張劑로서 高血壓 치료에 널리 사용되고 있는 xanthinol nicotinate(Fig. 1)는 分子構造에 있어서 xanthinol과 nicotinic acid와의 分子結合體로서, 그 定量法으로 현재까지는 TLC를 이용하여 分離한 후 UV spectrometry를 이용한 定量法<sup>1-3)</sup>, copper ion과의 複合체 형성을 이용한 비색법<sup>4)</sup> 등이 있는데, 製劑 또는 水溶液 중에서 xanthinol과 nicotinic acid로 分解될 경우, 이러한 分解產物과의 분리 精량을 위하여서는 TLC나 칼럼 크로마토그래피등 조작이 複合된 분리 방법이 先行되어야 하므로 精량오차가 크고 또한 조작시간이 길다. 따라서 製劑 중에서의 安定性 연구 및 수용액 중에서의 舉動을 연구하기 위한 선택적인 定量法으로서 HPLC에 의한 分離 定量法을 연구 검토하였다.

### 實驗 方法

**試料 및 試藥**—Xanthinol nicotinate(Wuelfing Co.의 製품을 ethanol로 재결정한 것, 이하 I로 略함.), methanol(Merck, HPLC용), caffeine(삼풍화학, KP), 증류수(Wako, HPLC용)의 시약은 和光 純藥(一級)의 시약을 사용하였다.

**機器**—High performance liquid chromatograph(Waters Associates, Model 440) 및 UV 검출기를 사용하였다.

**定量 條件**—HPLC 機器조건은 固定相으로  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 칼럼을 사용하였고, 移動相은 methanol: 물(1:1) 混液을 사용하였으며, 검출은 UV 검출기(254nm)를 사용하였다. 조작 조건은 移動相의 流速를 1.0ml/min, 검출기의 감도는 0.2 aufs로 하였고 caffeine을 内部 표준물질로 사용하여 定量하였다(Table I).

**檢量線의 作成**—I의 표준품 50.0mg을 精밀하게 稱량하고, 내부 표준물질인 caffeine을 10w/v%의 농도로 함유한 증류수를 가하여 용해하고 精確히 50.0ml로 하였다. 이 液을 20.0, 40.0, 및

Table I—Conditions of HPLC.

|              |                                 |             |           |
|--------------|---------------------------------|-------------|-----------|
| Column       | $\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> | Flow rate   | 1.0ml/min |
| Detector     | UV 254nm                        | Sensitivity | 0.2aufs   |
| Mobile phase | MeOH : H <sub>2</sub> O(1 : 1)  |             |           |

60.0ml씩 취하고 caffeine을 함유한 증류수로 희석하여 100.0ml로 하여 표준액 10.0으로 하였다. 上記 각 농도 별 표준액에 대하여 정량조건에서와 같은 조건으로 10 $\mu$ l씩 injection하여 HPLC 크로마토그램을 얻은 후, 크로마토그램에서 caffeine의 피크의 높이에 대한 I의 피크의 높이의 비를 구하여 檢量線을 얻었다.

**實驗 操作**—試料 중 I로서 20mg에 해당하는 양을 정밀히 평량하여 檢量線 작성에서 사용한 caffeine을 함유한 증류수에 용해하고 millipore 필터(pore size 0.45 $\mu$ m)로 여과한 후 정확하게 100.0ml로 하고 上記 定量 條件으로 HPLC를 행하여 얻은 크로마토그램에서 I과 caffeine의 피크 높이의 비를 구하여 檢量線으로부터 I의 함량을 계산하였다.

### 實驗 結果 및 考察

上記 實驗方法 중 定量 조건에서 얻은 I의 標準 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1과 같고, I과 內部 標準物質인 caffeine의 retention 시간은 각각 0.2min 및 3.6min이었으며 I과 caffeine의 resolution을 1식<sup>5)</sup>

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{1.70(wh_1 + wh_2)} \quad (\text{Eq. 1})$$

( $t_1, t_2$  : I 및 caffeine의 유지시간,  $wh_1, wh_2$  : I 및 caffeine 피크 높이의 중점에서의 피크 幅)

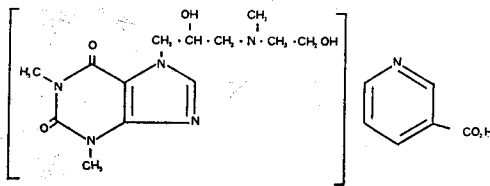
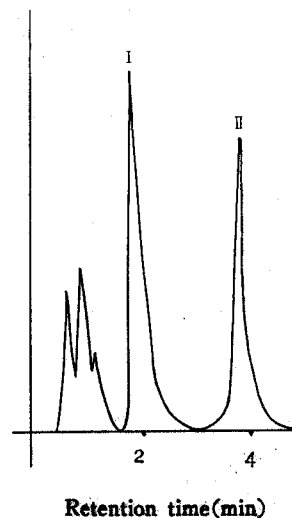


Fig. 1—Molecular structure of xanthinol nicotinate(I).

Fig. 2—HPLC chromatogram of xanthinol nicotinate and caffeine. I, xanthinol nicotinate. II, caffeine.



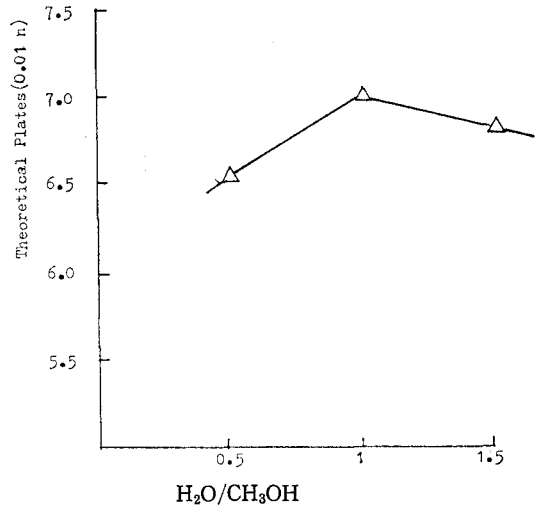
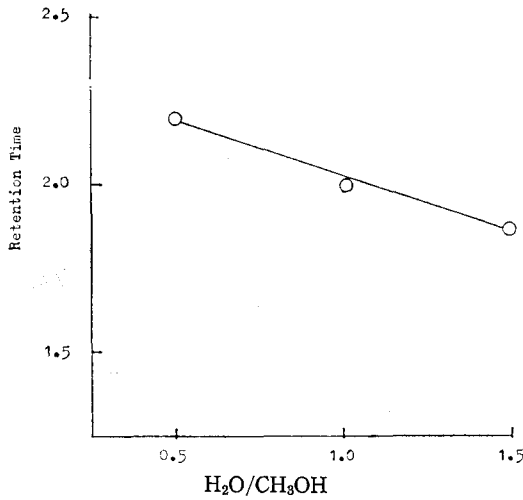


Fig. 3—Effect of mobile phase to retention time.

Fig. 4—Effect of mobile phase to theoretical plates.

에서 구하면 약 2.7로써 caffeine을 충분히 内部 標準物質로 사용 가능함을 알 수 있었다.

사용한 칼럼에 대한 검토로서 I에 대한 理論段數를  $n = 16 \times \frac{t}{1.70wh}$  으로부터 구하면<sup>5)</sup> 약 700인 것으로부터 이 약의 分離에 충분히 사용할 수 있음을 이론적으로도 알 수 있었다.

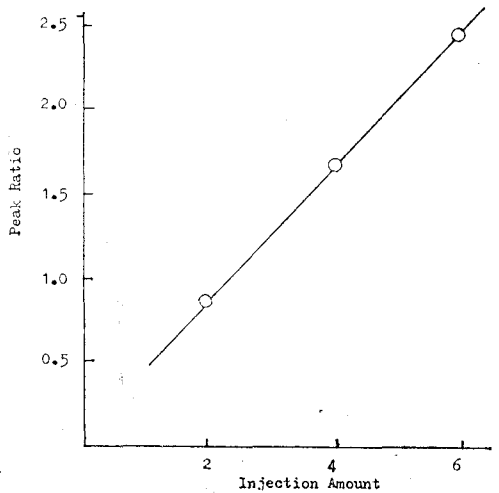


Fig. 5—Calibration curve of xanthinal nicotine.

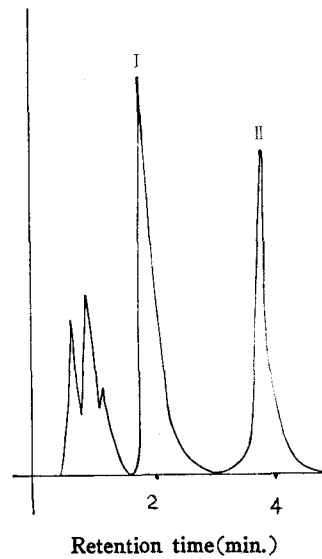


Fig. 6—HPLC chromatogram of sample preparation (Table III).

I, xanthinal nicotine. II, caffeine

**Table II**—Reproducibility of xanthinol nicotinate.

| No. of sample | Found(%) |
|---------------|----------|
| 1             | 99.5     |
| 2             | 98.9     |
| 3             | 102.0    |
| 4             | 97.9     |
| 5             | 101.6    |
| 6             | 99.4     |
| 7             | 101.5    |
| 8             | 100.3    |
| 9             | 99.1     |
| 10            | 98.5     |
| Mean          | 99.9     |
| SD            | 1.42     |
| RSD           | 1.42     |

移動相의 적합성 검토로서 methanol과 물의 비율을 달리 했을 때의 retention 시간과의 관계는 Fig. 3과 같으며 물의 혼합 비율이 클수록 retention 시간이 짧아지는 것을 알 수 있고, Fig. 4에는 methanol과 물과의 혼합비율을 달리했을 때의 理論段數와의 관계를 나타내었는데, 이 때 methanol과 물과의 혼합비율이 1:1일 경우 가장 좋은 조건인 것을 알 수 있다.

또한 Fig. 2의 I의 피크는 하나이고, 이것으로부터 물-methanol 혼합용매(1:1)에서 xanthinol과 nicotinic acid가 분리되지 않는다는 것을 예측할 수 있으며, 수용액에서의 I의 거동 및 安定性 연구를 목적으로 하는 分離 定量法으로 사용 가능하다는 것을 示唆해 준다. 2, 4, 6 $\mu$ g을 함유하는 표준액으로 검량선을 작성하면 Fig. 5와 같고, injection의 양이 I의 양으로 0.5~8 $\mu$ g 범위 내에서 직선성을 나타내었으며 최소자승법으로 직선식  $y=1.2965x+0.0433$ ( $y$ : 피크의 높이의 비,  $x$ : injection양)을 얻었다. 再現性 검토를 위하여 同一 試料 同一量을 injection하여 함량을 구한 결과, 평균 99.9%, 상대 표준편차 1.42로서 定量法으로 충분히 이용할 수 있었다(Table II).

複合 製劑에서의 分離 定量法을 검토하기 위하여 시험 처방의 분말(Table III)에 대하여 上記 定量 條件에서와 同一한 定量 操作法으로 定量하였을 때의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 6과 같고, 同一 試料에 대한 10回 반복 시험 결과 Table IV에서와 같이 평균 101.5%, 상대 표준 편차 1.78로 複合 製劑에서의 分離 定量法으로 이용할 수 있다고 思料된다.

**Table III**—Composition of xanthinol nicotinate preparation.

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Xanthinol nicotinate | 250mg     |
| Thiamine-HCl         | 2mg       |
| Pyridoxine-HCl       | 10mg      |
| Nicotinamide         | 10mg      |
| Calcium pantothenate | 2mg       |
| Cyanocobalamine      | 2 $\mu$ g |
| Riboflavin           | 2mg       |

**Table IV**—Recovery data of xanthinol nicotinate in sample preparation.

| No. of test | Found(%) |
|-------------|----------|
| 1           | 102.3    |
| 2           | 99.7     |
| 3           | 101.8    |
| 4           | 103.0    |
| 5           | 97.5     |
| 6           | 99.4     |
| 7           | 103.2    |
| 8           | 102.0    |
| 9           | 103.7    |
| 10          | 102.4    |
| Mean        | 101.5    |
| S.D.        | 1.78     |

## 結 論

HPLC法으로 xanthinol nicotinate의 분리 정량법을 확립하였다. 이 定量法은 xanthinol nicotinate의 量으로 0.5~8 $\mu$ g 범위에서 직선성이 있었으며, 원료에 대하여 회수율 99.9%, 상대 표준 편차 1.42였고, 複合 製劑로 된 시험 처방에 대하여는 회수율 101.5%, 상대 표준편차 1.78이었다.

## 文 獻

1. E.C.G. Clarke, *Isolation and Identification of Drugs*, vol. 2 (1980).
2. M. Stanojic, D. Agbada and D. Radulovic, *Arch. Farm.* **31**, 345 (1981).
3. Z. Blagojevic, M. Stanojic and D. Agbada, *Arch. Farm.* **29**, 91 (1979).
4. J. Krajek, *Chem. Anal.* **24**, 643 (1979).
5. H.H. Willard, L.L. Merrit, Jr., J.A. Dean and F.A. Settle, Jr., *Instrumental Method of Analysis*. Litton Education Publishing, Inc., 1981, p. 436.