

아미노산 分析機에 의한 製劑中 Taurine의 分離 定量에 관한 研究

朴 萬 基·韓 達 洙

서울대학교 藥學大學

(Received October 8, 1983)

Man Ki Park and Dal Soo Han

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Determination of Taurine in Preparations by Amino Acid Autoanalyzer

Abstract—High performance amino acid analyzing method has been developed for the routine analysis of taurine in preparations. Ion-exchange resin #2619 Hitachi Custom Ion-Exchange Resin, 2.6(I.D.) ×150 (length)mm was used as column, buffer I, pH 3.3 as mobile phase. The retention time of taurine was 7 minutes. Calibration curve by peak height for standard taurine was linear from 2.5ppm to 25ppm. The reproducibility showed relative standard deviation ±1.9% when analyzed 10 times for standard solution. The samples could be continuously analyzed without regenerating the resin between samples. Five samples were applied to column every 12 min. and then the resin was regenerated for 30 min. during one analyzing cycle time, 90 min. The automatic amino acid analyzer has made it possible to assay multiple samples in a relatively short period of time using the analytical magnetic program card. The high sensitivity and specificity of the analytical column of the automatic amino acid analyzer permits the routine analysis of taurine in preparations.

Taurine의 分析法으로는 column¹⁾이나 thin layer²⁾, paper chromatographic procedure³⁻⁵⁾나 high voltage paper electrophoresis⁶⁾등으로 分離한 다음 ninhydrin과의 反應을 利用한 方法이 있고 paper chromatographic procedure로 分離한 다음 o-phthalaldehyde와의 反應을 利用한 方法⁷⁾, dinitrophenol유도체를 利用한 方法^{8, 9)}등이 있으나 이 비색법들은 感度가 낮은 결점이 있다. 최근의 感度가 좋은 方法으로는 radiometric method¹⁰⁻¹³⁾, fluorometric method¹⁴⁻¹⁶⁾, enzymatic method¹⁷⁾등이 있다. 또한 gas chromatography¹⁸⁾, GC-mass¹⁹⁾, HPLC²⁰⁻²²⁾, 아미노산 自動 分析機²³⁻²⁴⁾를 利用한 方法들이 있다. 그러나 이상의 方法들은 感度는 좋으나 시간이 많이 걸리고 전처리 가 복잡한 점이 있어 일반 제제에 적용하기에는 어려운 점이 있었다. 따라서 저자들은 taurine이 硫黃含有非蛋白아미노산인 점에 착안하여 고압 아미노산 분석기에 적용하여 분배 전처리가 간단하고 신속한 方法을 얻었다.

實驗 方法

機器—High speed amino acid analyzer, 835(Hitachi, LTD) 및 기타 ultrasonic pot, micro syringe등을 使用하였다.

試料 및 試藥—Taurine은 종근당(株)製, 증류수, sodium citrate, sodium chloride, citric acid, ninhydrin, sodium acetate anhydrous, glacial acetic acid 등은 和光純藥 製品을 使用하였고 BRIJ-

35는 Hayashi製를 使用하였고 그밖의 試藥은 모두 特級品을 使用하였다.

分析條件—Column은 $2.6 \times 150\text{mm}$, 이온교환수지는 #2619 Hitachi Custom 이온교환수지, 分析時間은 90分, buffer 流速은 0.225ml/min. , ninhydrin 流速은 0.3ml/min. , column 압력은 $80 \sim 130\text{kg/cm}^2$, ninhydrin 압력은 $15 \sim 35\text{kg/cm}^2$, column 온도는 53°C , 試料量은 $30\mu\text{l}$, N_2 gas 압력은 0.28kg/cm^2 , 범위는 0.2mV at W/L 570nm , 차트속도는 5mm/min. 이고 buffer는 pH 3.3 step I 만을 使用하였다.

試料溶液의 調劑—Taurine으로서 60mg에 해당하는 量의 試料를 精밀히 取하여 50ml메스 플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 채웠다. ultrasonic pot에서 진탕후 여과한 다음 그여액 1ml를 취하여 100ml 메스 플라스크에 넣은후 0.02N HCl로 표선까지 채웠다.

實驗結果 및 考察

分析條件의 確立—아미노산 분석조건을 그대로 사용시 buffer pH 3.3에서 retention time은 약 7分이었다. 따라서 연속적으로 buffer를 흘려주고 12분 간격으로 시료를 주입하여 5회분석하고 column을 재생하도록 하였다. 이때의 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

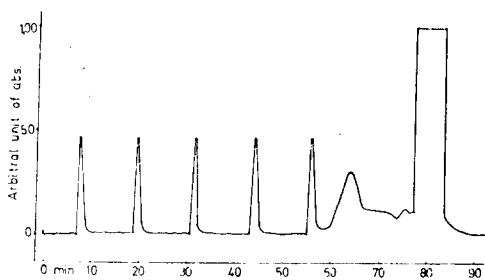


Fig. 1—Chromatogram of taurine by five successive analysis for one analysis cycle, 90 min.

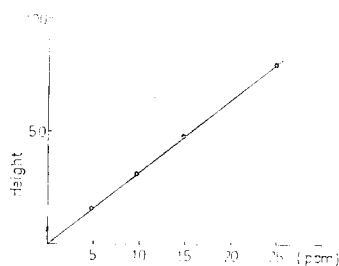


Fig. 2—Calibration curve of taurine.

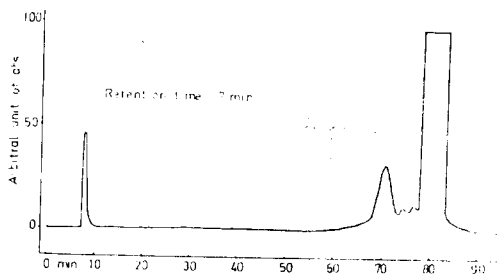


Fig. 3—Retention time and effect of other components.

Table I—Composition of taurine preparation.

Hemoglobin	1,000mg
Pyridoxine·HCl	40mg
Nicotinamide	200mg
Folic acid	10mg
D-panthenol	100mg
Cyanocobalamine	$80\mu\text{g}$
Taurine	2,000mg
Inositol	500mg
Liver ext.	200mg
Total volume	100ml

檢量線의 作成—표준용액을 使用하여 檢量線을 作成한 結果 Fig. 2와같이 2.5~25ppm사이에서 양호한 직선성을 나타내었다.

再現性에 對한 檢討—Two cycle 동안의 10회의 시료에대한 재현상을 검토한 결과 상대표준편차 $\pm 1.9\%$ 의 양호한 결과를 얻을수 있었다.

共存物質의 影響—Table I에서 보는 바와같이 일반 시판품의 조현영양제의 타공존 성분에 대해서 檢討한 결과 baseline에 어떠한 영향도 없었으며 이때의 chromatogram은 Fig. 3과 같다.

回收率에 대한 檢討—실험실적으로 조제한 시료에 대한 taurine의 회수율은 평균치 101.9% 표준편차 0.38%로서 양호하였다.

結 論

본 定量法은 전처리 없이 바로 자동아미노산 분석기로 定量하는 方法으로 매우 신속하고 간편하며 재현성이 비교적 양호하므로 시판 taurine 제제의 품질관리 목적에 적합한 방법이라고 사료된다.

文 獻

1. M.A. Anzano, and J.O. Nacwbanij, *A.J. Lamb, Clin. Chem.* **24**, 321 (1978).
2. A. Guidotti and G. Pepeu, *J. Neurochem.* **19**, 431 (1972).
3. C. Wu, *J. Biol. Chem.* **207**, 775 (1954).
4. J. Awapara, *J. Biol. Chem.* **218**, 571 (1956).
5. C.E. Dent *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).
6. C.C. Mabry and W.R., Todd, *J. Lab. Clin. Med.* **61**, 146 (1963).
7. G. Curzon and J. Giltrow, *Nature* **173**, 314 (1954).
8. N. Ling, *J. Clin. Pathol.* (Lond). **10**, 100 (1957).
9. R.P. Shank, and M.H. Aprison, *Anal. Biochem.* **35**, 136 (1970).
10. B.E. Leonard, V. Neuhoff and S.R. Tonge, *Z. Naturforsch.* **29C**, 184 (1974).
11. M.H. Joseph and J. Halliday, *Anal. Biochem.* **64**, 389 (1975).
12. R. Huxtable and R.J. Bresler, *Nutr.* **102**, 805 (1972).
13. E. Schulze, V. Neuhoff and Z. Hoppe-Seyler's, *Physiol. Chem. Bd.* **357**, 593 (1976).
14. K. Yoshikawa and K. Kuriyama, *Japan, J. Pharmacol.* **26**, 649 (1967).
15. S. S. Bohlen and P. Stone, *J. Biochem. Biophys.* **155**, 202 (1973).
16. H.T., Orr, A.I. Cohen, and O.H. Lowry, *J. Neurochem.* **26**, 609 (1976).
17. J.B. Lombardini, *J. Pharmacol, Exp. Ther.* **193**, 301 (1975).
18. M.H. Aprison, *J. Neurochem.* **21**, 87 (1973).
19. F.P. Abramson and M.W. Macamen, *Anal. Biochem.* **57**, 482 (1974).
20. B.R. Lassen and D.S. Grosso, *J. Chromatographic Science* **18**, 233 (1980).
21. J.C. Krusz and R.K. Dix, *Fed. Proc.* **37**, 907 (1978).
22. J.D. Stuart and T.D. Wilson, *J. Liquid Chromatogr.* **2**, 809 (1979).
23. D.H. Spackman, *Methods Enzymol.* **11**, 3 (1967)
24. K.H. Tachiki, H.C. Heudrie and J. Kellams, *Clinica Chimica Acta* **75**, 455 (1977).