

피리도스티그민 정제의 함량 측정을 위한 HPLC 분석법

피택산 · 조 영 · 석대은[†] · 차승희 · 정윤수

국방과학연구소
(1991년 8월 20일 접수)

Quantitative Analysis of Pyridostigmine Bromide in Tablets by HPLC

Taek-San Phi, Young Cho, Dae-Eun Sok[†], Seung-Hee Cha, Yun-Su Chung

Agency for Defence Development, Daejeon, 300-600, Korea

(Received August 20, 1991)

A reverse-phase, ion-pair high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the simultaneous quantitative determination of pyridostigmine and its hydrolytic product, 3-hydroxy-N-methylpyridinium (HMP), is described. The assay of pyridostigmine and HMP was linear in the range of amount from 24 to 60 mg/tablet and from 2.4 to 12.0 mg/tablet, respectively, with coefficient of variation (C.V.) of 0.05-0.12% (n=7) and 0.25-0.52% (n=5), respectively, and applicable conveniently even in the case of the mixture of pyridostigmine and HMP. Meanwhile, the conventional UV method gave inaccurate results for the aged pyridostigmine tablets. In the extraction of pyridostigmine from tablets prior to be assayed by HPLC, methanol was found to be more effective than ethanol or distilled water. Multiple extraction (four times) with methanol resulted in the full recovery of pyridostigmine, whereas ethanol gave 95% recovery even after four times extraction. Based on these results, the present method would be very useful for the accurate determination of pyridostigmine in the aged pyridostigmine tablets.

Keywords—pyridostigmine, ion-pair HPLC, pyridostigmine tablet

피리도스티그민 (3-[[[(dimethylamino)carbonyl]oxy]-1-methylpyridinium]은 carbamate 계열의 4급 암모늄 화합물(Fig. 1)로 생체내의 신경절(ganglia)과 신경말단(synaptic terminals)에 존재하는 acetylcholinesterase를 가역적으로 저해하여 콜린성 효과를 증대시키는 화합물로서, 신경전달물질인 아세틸콜린의 농도가 저하되어 있는 중증근무력증 환자(myasthenia gravis)의 경우 체내 아세틸콜린의 농도를 증가시켜 근육의 활력을 회복시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며,¹⁾ 또한 neuromuscular disorder의 치료로도 사용되는 약물이다. 현재 중증근무력증 환자의 치료용으로 사용되고 있는 피리도스티

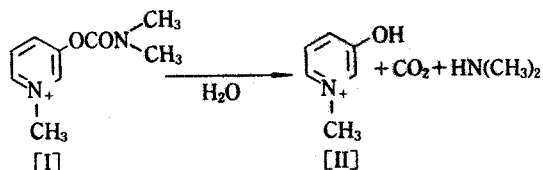


Figure 1—Hydrolytic decomposition of pyridostigmine into HMP ([I]: pyridostigmine, [II]: 3-hydroxy-N-methylpyridinium: HMP).

그민 정제는 보통 유효기간이 3년으로 규정되어 있는데 이와 같은 안정성의 한계는 피리도스티그민 자체가 수분에 의해 가수분해되어 3-hydroxy-N-methylpyridinium bromide(HMP) 등으로 변하기 때

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

문으로 보고되어 있다(Fig. 1).²⁾

피리도스티그민의 정량분석법으로는 주로 혈중농도분석을 위한 방법으로서 이미 보고된 바 있는데, 가스크로마토그래피(electron-capture)의 경우 감도는 우수하나 specificity가 결여되는 문제점이 있고,³⁾ 자외선 분광광도법은 감도가 낮고 오차도 크며,⁴⁾ 효소를 사용하는 bioassay의 경우는 감도는 우수하나 역시 specificity에서 문제가 있는 것으로 보고된 바 있다.⁴⁾

실제로 가장 흔히 사용되는 분석법으로 고압액체 크로마토그래피(HPLC)가 많이 적용되고 있으나,⁴⁻⁸⁾ 정제로부터 분석하는 HPLC 방법은 아직 보고된 바가 없는 실정이다. 현재 피리도스티그민 정제 중 피리도스티그민의 함량분석은 미국약전(U.S.P, 21 판)에 수록된 함량분석법에 준하여 실시하도록 규정되어 있다. 그러나 미국약전에 수제되어 있는 피리도스티그민 정제의 피리도스티그민 함량분석 방법인 자외선 분광광도계법은 두 가지 점에서 문제가 지적되는 바, 첫째는 미국약전에 명시된 흡수최대 파장 269 nm에서 pyridostigmine bromide의 흡광도를 측정시 주분해산물인 HMP의 흡수스펙트럼(λ_{max} 287.5 nm)과 유의성있는 중첩현상으로 정확한 피리도스티그민의 함량분석이 불가능하기 때문에 피리도스티그민 정제의 함량분석에 실제 적용하는데 문제점이 대두된다. 이와 관련하여 1980년 Patel 등은⁹⁾ 영국약전에 명시된 분석법(자외선분광광도법)의 제한사항(분해산물에 의한 방해)을 해소시키기 위하여 HMP를 별도로 습식정량하여 상쇄시키는 방법을 제안한 바 있으나 이 방법은 복잡하고 정확성이 결여되어 실제 적용하기가 어렵다. 또한 앞서 언급한 HPLC에 의한 혈중 피리도스티그민 함량 측정법은 정제의 함량 측정법으로 직접 적용하기에는 제한점이 있고, 더군다나 HMP의 정량분석법은 별도로 보고된 바 없어 이에 대한 분석법의 설정이 요구된다. 한편, 다른 문제점으로는 피리도스티그민 함량분석시 정제로부터 피리도스티그민을 추출하는 전단계 과정에서 미국약전에는 무수에탄올을 추출 용매로 사용하도록 규정⁹⁾되어 있으나 회수율에 있어서 문제점이 있어 실제 적용상 어려움이 있다.

따라서 본 연구에서는 이와 같은 문제점들을 확인하고, 주성분과 분해산물을 완전히 분리, 각각 정량이 가능하도록 역상-이온쌍 고압액체크로마토그

라피(reverse-phase, ion-pair HPLC) 방법을 적용하여 피리도스티그민 정제의 함량분석법을 확립하고자 하며, 아울러 추출과정에서 저조한 회수율을 증대시키기 위한 별도의 추출조건을 설정하여 정제 중의 정확한 피리도스티그민 함량분석법을 확립하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

표준품 pyridostigmine bromide는 Hoffman-Roche사 제품을, 내부표준물질인 edrophonium chloride는 Sigma사 제품을 각각 사용하였으며, acetonitrile, hexane sulfonic acid(sodium salt), 3-hydroxypyridine, methyl iodide는 Aldrich사 제품을 사용하였다.

HPLC는 Waters사 모델 484 detector를 사용하였고, UV분광계는 Varian 모델 DMS 200을 사용하였다.

HMP의 합성

HMP(3-Hydroxy N-methylpyridinium bromide)의 합성은 먼저 3-hydroxypyridine 3g을 EtOH(30 ml)에 용해시키고, 다시 methyl iodide 3g을 용해시킨 후 상온에 방치한다. 용매를 제거시킨 후 같은 부피의 에틸에 용해시키고 상온에서 방치 후 침전물을 얻은 다음 침전물 2.37g을 증류수 50 ml에 녹이고, silver bromide 2.77g을 용해시켜 12시간 교반 후 HMP의 브롬화염으로 제조하였다.

합성품의 확인동정은 IR 스펙트럼과 ¹H-NMR 스펙트럼 분석으로 실시하였다. 최대흡수파장은 287.5 nm(Fig. 7)로서 피리도스티그민의 269 nm보다 더 길어진 것으로 수산기의 전자공급으로 인한 chromophor 형성이 더 용이해진 때문으로 풀이된다. IR 스펙트럼은 표준 IR 스펙트럼¹⁰⁾과 일치하였고 ¹H-NMR spectrum(D₂O, 80 MHz)의 특징적 피크 위치는 4.4 ppm(3H, s, -CH₃), 8.0 ppm(2H, m, C_{4,5} in pyridine), 8.4 ppm(2H, m, C_{2,6} in pyridine)으로서 표준 NMR 스펙트럼¹¹⁾과 정확히 일치하였다.

HPLC 분석조건

칼럼은 μ -Bondapak C₁₈(10 μ m, 3.9 mm×300 mm), 검출기는 Waters 484(UV 280 nm, 0.1 AUFS),

이동상은 15% acetonitrile(acetonitrile : water = 15 : 85, 5 mM hexane sulfonic acid, 0.1% acetic acid)을 사용하였으며 유속은 1.0 ml/min로 하였고 내부표준물질로는 edrophonium chloride를 사용하였다.

피리도스티그민 및 HMP의 표준검량선

피리도스티그민 표준액(1.50g pyridostigmine bromide/500 ml 메탄올)을 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ml씩 취하여 100 ml 용량 플라스크에 넣어 내부표준용액(4.0g edrophonium chloride/1000 ml 물)을 5.0 ml씩 각각 넣은 후 0.1 N-HCl 용액으로 표선까지 채워 표준액으로 하였다. 이 표준액을 25 μ l씩 취하여 HPLC 분석법에 따라 분석하고 pyridostigmine bromide와 edrophonium chloride 피크 면적비로부터 표준검량선을 작성하였다.

HMP의 표준검량은 브롬화 HMP 표준액(0.150g HMP/500 ml 메탄올)을 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ml씩 취하여 피리도스티그민의 표준검량과 같은 방법으로 실시하였으며 HMP와 edrophonium chloride 피크 면적비로부터 표준검량선을 구하였다.

정제로부터 검액 조제

피리도스티그민 정제로부터 피리도스티그민 추출 방법은 미국약전에 명시된 추출방법을 수정 보완하여 실시하였는데, 먼저 피리도스티그민 정제 20정을 취하여 유발을 사용하여 분말화하고 5정(pyridostigmine bromide로서 300 mg에 해당)에 해당하는 분말을 정확히 칭량하여 50 ml 원심분리관에 넣었다. 여기에 약 25 ml의 무수 메탄올을 넣어 진탕기로 10분간 강하게 흔들어서 다음 3,600 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 100 ml 용량 플라스크에 옮겨 넣고 약 20 ml의 무수 메탄올로 3번 더 추출한 다음, 상기의 100 ml 용량 플라스크에 모으고 무수 메탄올로 표선까지 채웠다. 이 액 5 ml를 취하여 100 ml 용량 플라스크에 옮겨 넣은 다음 내부표준액(4.0g edrophonium chloride/1000 ml 물) 5.0 ml를 정확히 취하여 100 ml 용량 플라스크에 넣고 0.1 N HCl 용액으로 표선까지 채워 검액으로 사용하였다. 이 액 25 μ l를 취하여 HPLC로 분석하였다.

본 시험방법 중 추출용매로서 미국약전에 명기된 무수 에탄올 대신 무수 메탄올을 사용하였으며 추출시간은 5분 대신 10분으로 하였다. 한편 UV 분석법에 따른 함량분석은 추출시간만 각각 10분으로

하여 미국약전 방법대로 실시하였다.

추출용매별 회수율 비교시험

추출용매에 따른 회수율을 비교하기 위하여 국내 시판되는 피리도스티그민 정제 20정을 시트르산의 추출용매로서 무수 에탄올, 무수 메탄올, 증류수를 각각 사용 위와 동일하게 처리하여 실시하였다. 별도로 colloidal silicon dioxide 함유량별 회수율을 비교 하기 위하여 마찬가지로 국내 시판 중인 피리도스티그민 정제 20정을 분말화하고 5정에 해당되는 분말을 각각 취하여 colloidal silicon dioxide를 0-0.3g까지 각각 첨가하고 전술한 방법에 의거 검액을 제조한 후 HPLC법으로 분석하였다.

피리도스티그민 함량 측정시 HPLC 분석법과 UV 분석법의 비교

피리도스티그민의 분해로 생성되는 HMP가 피리도스티그민의 함량분석에 미치는 영향을 알아보기 위하여 표준품 피리도스티그민 일정농도(30 mg/100 ml)에 HMP를 첨가(6 mg까지)시킨 검액을 사용하여 HPLC와 UV법으로 각각 분석비교하였다. 또한 실제로 본 HPLC 분석방법의 정확성을 입증하기 위하여 국내 제조된 피리도스티그민 정제를 20일간 고온저장(90°C)하여 피리도스티그민의 함량을 UV법과 비교시험하였다.

결과 및 고찰

피리도스티그민 및 HMP의 HPLC 표준검량선

Pyridostigmine bromide 및 자체 합성한 HMP를 역상 이온쌍 크로마토그래피법에 의해 분석하였을 때의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 2에서와 같이 retention time 6분대에서 HMP의 피크가, 8분대에서 피리도스티그민의 피크가, 11분대에서 내부표준물질의 peak가 각각 나타났다. 이러한 결과는 HMP가 피리도스티그민보다 친수성이 더 크다는 것과 잘 일치되는 것이다.

피리도스티그민과 HMP의 피크 면적과 내부표준물질의 피크 면적의 비율로 구한 검량곡선은 $y = 0.34465x + 0.04976$ (Fig. 3)과, $y = 0.660x + -0.0023$ (Fig. 4)로 각각 나타났으며 측정된 피리도스티그민 및 HMP의 농도범위내에서 상관계수가 양쪽다 0.9999로 매우 좋은 직선성을 나타냈다. 일찌기 Ellin⁴ 등은 피리도스티그민 함량측정을 위해 내부표준물

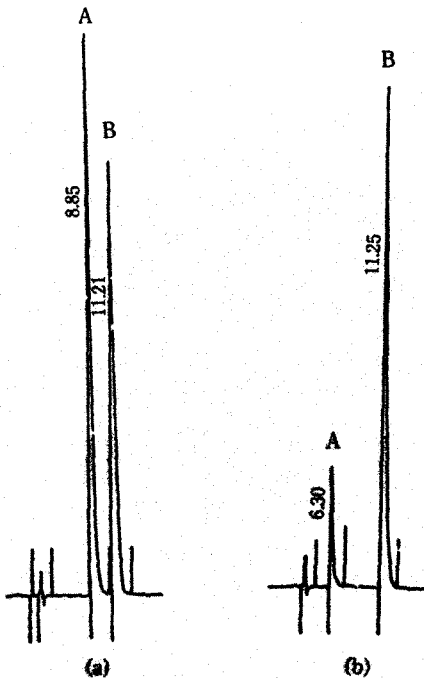


Figure 2—(a) HPLC chromatogram of pyridostigmine (A) and internal standard (B) on μ -Bondapak C₁₈ column (10 μ m 3.9 \times 300 nm). (b) HPLC chromatogram of HMP (A) and internal standard (B)

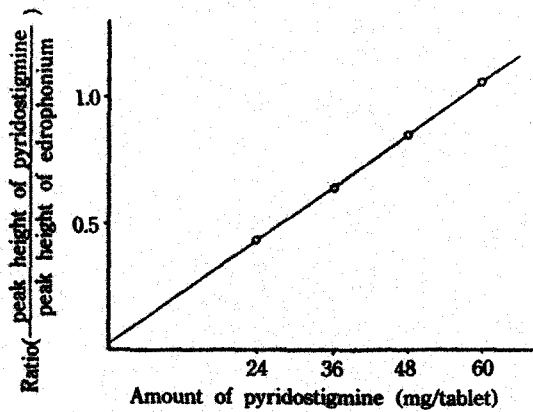


Figure 3—Calibration curve of pyridostigmine by HPLC assay ($Y=0.34465x+0.04976$, $r=0.9999$).

질로서 methylparaben을 사용한 HPLC법을 보고한 바 있으나, 이는 혈중내 피리도스티그민 함량측정을 위한 것이었고, 더군다나 분해산물 HMP의 정량분석은 수행되지 않았다. 그러나 본 실험에서 수행된 분석조건하에서는 피리도스티그민과 HMP가 완전히

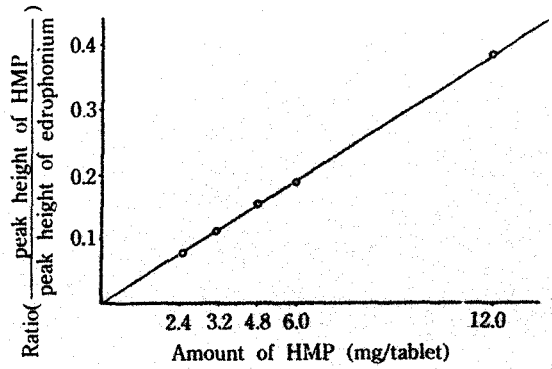


Figure 4—Calibration curve of HMP by HPLC assay ($Y=0.0660x-0.0023$, $r=0.9999$).

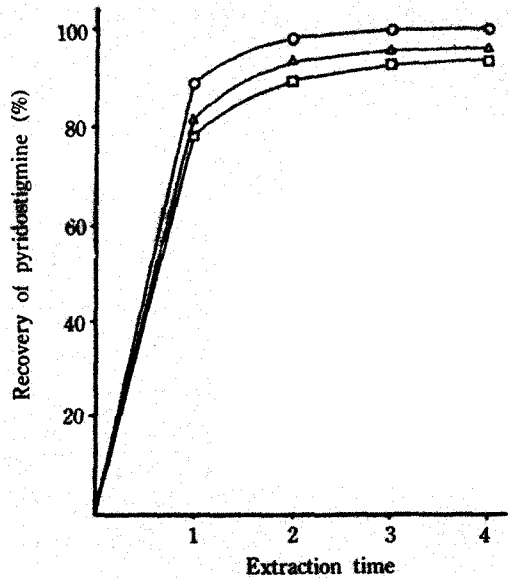


Figure 5—Extraction of pyridostigmine from pyridostigmine tablet by solvent (O: MeOH, Δ : H₂O, \square : EtOH) treatment (The test was carried out three times and mean standard deviation was within 0.5%).

분리되어 동시에 두 물질을 분석 가능하며, 상대표준편차는 피리도스티그민 검량선에서 0.05-0.12% (n=7), HMP 검량선에서 0.25-0.52% (n=5)로 재현성이 우수하였다. 본 연구결과는 안정성 연구와 관련한 가속노화된 정제나 장기간 저장된 시료의 함량분석시 매우 유용하게 응용될 수 있는 것으로 사료된다. 또한 분석 가능한 최소량은 50 ng으로서 기존 UV 분석법보다 약 100배 이상 감도가 더 좋았다.

정제로부터 피리도스티그민 추출시 용매별 회수율

Table II—Quantitative analysis of pyridostigmine tablets by UV or HPLC method

Products	Type A		Type B	
	HPLC	UV	HPLC	UV
0 (Storage time, days)	58.6(2.0)	60.8	59.2(0.4)	59.6
5	53.0(8.0)	57.8	52.2(4.0)	55.2
10	41.2(8.8)	46.2	51.8(4.6)	54.6
20	42.2(9.6)	48.4	51.6(6.0)	56.8

269 nm)과 HMP의 흡수 스펙트럼(λ_{max} 287.5 nm)이 중첩되기 때문에 약전에 명시된대로 269 nm에서 흡광도를 측정하여 피리도스티그민을 정량할 경우 HMP의 첨가량과 비례하여 269 nm에서의 흡광도가 피리도스티그민 자체에 의한 흡광도 이상으로 증가되기 때문으로 해석되며, 이처럼 UV 분석법은 정제 중 피리도스티그민 함량 측정상 문제가 있음을 알 수 있다. 이어서, 본 HPLC 분석방법의 정확성을 실제 입증하기 위하여 국내 제조된 시중의 피리도스티그민 정제를 20일간 고온저장하여 가속노화시킨 후 피리도스티그민 함량을 HPLC와 UV법으로 동시 분석 비교하였다.

즉 Table II와 같이 고온저장 수행 직전에 분석한 함량은 두 방법의 경우 모두 거의 일치하였으나, 저장기일이 경과됨에 따라 분해산물인 HMP의 농도가 증가되고 피리도스티그민의 농도가 감소됨이 HPLC 분석결과로부터 나타났으나, UV 분석결과에서는 피리도스티그민의 함량감소 현상이 실제보다 매우 미약하게 측정됨으로서 정제의 가속노화가 진행됨에 따라 상당한 오차가 발생하였다. 따라서 정확한 피리도스티그민 함량분석을 위하여 HPLC 방법이 월등히 우수함을 알 수 있었고, 아울러 주성분 피리도스티그민과 분해산물인 HMP 함량의 정량분석이 동시에 가능함으로서 피리도스티그민 원료분말의 품질과 국내 시판 중인 피리도스티그민 정제의 유효기간 적합여부의 평가에도 큰 도움이 될 것으로 사료된다. 또한 별도 수행된 분해 과정 파악을 위한 실험에서 정제내 함유된 피리도스티그민의 분해산물 중 약 90%는 hydroxy form(HMP)으로 가수분해되는 것으로 파악되었고, 나머지 10%는 다른 분해산물로 전환되는 것으로 파악되었는데, 이와 같은 결과는 피리도스티그민의 분해과정이 주로 가수분해 과정^{2,4)}임을 의미하는 것으로 정제내 함유된 수분함

량이 피리도스티그민의 장기 안정성에 크게 관여할 것으로 사료된다.

결 론

미국약전(21개정판)에 제시된 피리도스티그민 함량분석방법(UV 분광광도법)은 주분해산물(HMP)이 없을 경우 피리도스티그민 정제의 함량분석이 가능하지만, HMP가 함유되었을 경우, 즉 유효기간이 경과됨에 따라 HMP가 생성되었을 경우는 실제 피리도스티그민 농도보다 높게 측정되므로 유효기간 설정 및 안정성시험을 위한 피리도스티그민 정제의 유효성분(주성분) 함량분석 방법으로는 부적합한 것으로 사료된다.

본 HPLC 방법은 피리도스티그민 정제의 주성분 함량분석을 목적으로 창안된 방법으로서 주성분과 분해산물을 분리하여 양쪽 모두를 동시에 정량할 수 있고 재현성이 우수하여 과거 보고된 방법⁹⁾보다도 간편하며 정확하다. 아울러 피리도스티그민 정제로부터 피리도스티그민의 효과적인 추출을 위한 용매로서 무수 에탄올 또는 증류수보다 무수 메탄올 사용시 효과적임을 알 수 있었고 이 경우 100%의 회수율을 달성하였다. 따라서 본 분석방법은 피리도스티그민 정제의 정확한 품질관리, 유효기간 판정, 나아가서는 안정화 연구 등에 도움이 될 것으로 기대된다.

문 헌

- 1) Flacke, W., Treatment of myasthenia gravis, *N. Engl. J. Med.*, **288**, 27 (1973).
- 2) C. Patel, J.B. Stanford, and J.K. Sugden, Effect of light on the stability of aqueous solutions of pyridostigmine bromide, *Pharm. Acta Helv.*, **55**(5), 138-140 (1980).
- 3) Pohlmann, J.L.W. and Cohan, S.L., Simplified detection of quaternary ammonium compounds by gas chromatography, *J. Chromatogr.*, **31**, 297 (1977).
- 4) Robert I. Ellin, Peter Zvirblis, and Michael R. Wilson, Method for isolation and determination of pyridostigmine and metabolites in urine and blood, *Journal of Chromatography*,

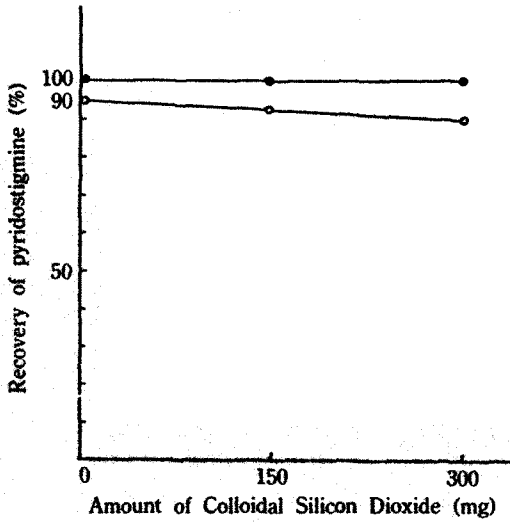


Figure 6—Extraction of pyridostigmine from tablet with various concentrations to colloidal silicon dioxide.

비교시험

정제로부터 피리도스티그민 추출을 위한 최적 용매를 선정하기 위하여 본 실험에서는 무수 에탄올 외에 증류수, 무수 메탄올을 각각 사용 추출한 후 HPLC 분석법에 의거하여 회수율을 각각 비교하였다. Fig. 5에서 나타난 바와 같이 무수 에탄올의 경우는 추출횟수를 4회까지 반복하였을 경우 94%까지 피리도스티그민의 회수가 가능하였으나 오히려 증류수로 추출한 경우(96%)보다 결과가 저조하였다. 반면에 무수 메탄올로 추출한 경우는 동일조건에서 100%의 회수율을 나타내었다.

이러한 결과는 피리도스티그민 추출시 용매의 극성이 매우 중요하다는 것을 의미하는 것이다. 특히 피리도스티그민 정제 중 피리도스티그민 함량기준이 미국약전에 의하면 95-105%로서 규정되어 있으나, 미국약전에 규정된 dehydrate alcohol에 의한 추출시 회수율은 94%에 해당하므로 실제 함량분석에 적용하기에 부적합한 것으로 사료된다. 상기 결과와 관련 무수 에탄올에 의한 회수율 저하원인으로서, 부형제와 피리도스티그민간의 상호 반응성이 크게 관여될 것으로 사료되어, 첨가제인 colloidal silicon dioxide의 영향에 관한 실험을 수행하게 되었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 첨가제 중의 silicon dioxide 함량이 증가함에 따라 회수율이 저조함을 파악할 수가 있었다. 반면에 무수 메탄올을 사용할 경우는

Table I—Quantative determination of the mixture of pyridostigmine and HMP by UV or HPLC method.

No	Composition of Sample		Analytical methods	
	Pyridostigmine (mg)	HMP (mg)	UV (mg)	HPLC (mg)
A	30	0	29.89±0.12	29.93±0.12
B	30	1.5	30.98±0.11	29.98±0.11
C	30	3.0	31.97±0.12	30.18±0.11
D	30	6.0	33.77±0.13	29.95±0.10
E	0	6.0	ND	ND

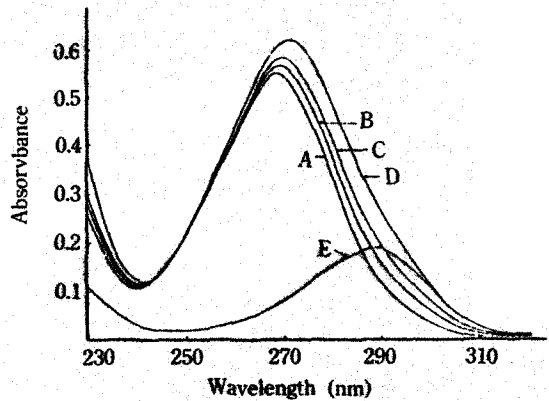


Figure 7—UV spectra of pyridostigmine and HMP (The composition of mixture was represented in Table I).

첨가제의 방해현상과는 무관하게 주성분의 100% 추출이 가능하였다. 이 결과는 피리도스티그민과 silicon dioxide간의 상호 반응성을 뚜렷이 보여주는 결과로서, 피리도스티그민의 분리를 용이하게 하기 위해서는 극성이 적당한 용매 즉 메탄올이 효과적임을 나타내주는 것이다.

피리도스티그민 함량 측정시 HPLC 분석법과 UV 분석법의 비교

두 가지 분석방법의 정확성을 검토하기 위하여 피리도스티그민과 HMP의 혼합액에 대하여 두 가지 측정법에 의한 각각의 함량분석 결과를 비교 검토하였다. Table I과 같이 피리도스티그민 30 mg에 HMP 1.5-6.0 mg을 첨가한 혼합액 중 피리도스티그민 농도의 HPLC 분석결과는 실제 첨가한 피리도스티그민의 함량과 거의 일치하였으나 UV법 분석결과는 HMP 첨가량과 비례하여 피리도스티그민의 농도가 증가되는 결과를 관찰하였다. 이러한 이유는 Fig. 7과 같이 피리도스티그민의 흡수 스펙트럼(λ_{max}

- 228, 235-244 (1982).
- 5) De Ruyter, M.G.M., Cronelly, R. and Castagnoli, N. Jr., Reversed-phase, Ion-pair liquid chromatography of quaternary ammonium compounds; Determination of pyridostigmine, neostigmine, and edrophonium in biological fluids, *J. Chromatogr.*, **183**, 193-201 (1980).
 - 6) Ursula Breyer-Pfaff and Ulrich Maier, M. S., Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **37**, 495-501 (1985).
 - 7) Matsunaga H., Suehiro T. High performance liquid chromatography determination of pyridostigmine in plasma, *J. Chromatogr.*, **422**, 353-355 (1987).
 - 8) Olivia Yturralde, Rai-Yun Lee, Leslie Z. Benet, Lawrence fleckenstein, and Emil T.L. Lin, Ion-paired liquid chromatographic method for the analysis of pyridostigmine in plasma, *Journal of Liquid Chromatography*, **10** (10), 2231-2246 (1987).
 - 9) U.S. Pharmacopeia, twenty-first revision, United states Pharmacopeial convention, Inc. (1985).
 - 10) The Sadtler standard I.R. spectra, 52, 51195 K (1977).
 - 11) The Sadtler standard N.M.R. spectra, 38, 23536 M (1976).