

HPLC를 이용한 시판 아테놀롤 원료 및 제품 중 유연물질의 분석

뉴엔탄동 · 강지연 · 정영희 · 임은희 · 황기서* · 강찬순** · 김은정** · 강종성†

충남대학교 약학대학, *경원대학교 한의과대학, **식품의약품안전청

(2004년 9월 30일 접수 · 2004년 10월 15일 승인)

Analysis of Related Compounds from Commercial Atenolol Raw Materials and Preparations by High-Performance Liquid Chromatography

Nguyen Thanh Dong, Ji Youn Kang, Young Hee Jung, Eun Hee Lim, Gwi Seo Hwang*,
Chan Soon Kang**, Eun Jung Kim** and Jong Seong Kang†

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*College of Medicine, Kyungwon University, Sunghnam 461-701, Korea

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

(Received September 30, 2004 · Accepted October 15, 2004)

ABSTRACT—Atenolol and related compounds found in raw materials and commercial products were analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. A mixed solution of phosphate buffer (3.4 g/l, pH 3.0), tetrahydrofuran and methanol (800:20:180, v/v/v) including sodium octanesulfonate (1 g/l) and tetrabutylammonium-hydrogensulfate (0.4 g/l) was used as mobile phase at the flow rate of 0.25 ml/min. Detection was carried out at UV 226 nm. Atenolol related compounds, such as bis ether, tertiary amine and blocker acid were identified by comparing the retention time of the standard. The within-day and between-day precisions of the separated compounds were less than 1.2% and 3.4%, respectively. The contents of related compounds of the tested samples were under the limit prescribed in the European Pharmacopoeia. The pattern of the related compounds showed that atenolol raw materials and products could be classified in three different groups, indicating that the materials originated from different source or treated in different way.

Key words—Atenolol, Related compounds, Bis ether, Tertiary amine, Blocker acid, HPLC

의약품에는 주성분외에 무기물, 잔류용매, 수분 등의 일반 불순물 뿐 아니라 약품의 합성, 정제 및 보존시 생성되는 유연물질이 필연적으로 존재하게 된다. 그래서 의약품 공정에서는 의약품 중에 혼재할 수 있는 불순물의 종류 및 그 양을 규제하고 있는데 특히 유연물질은 주성분과 구조가 아주 유사한 물질로 주성분과 분리하기가 어렵다. 대한약전과 일본약전은 순도시험항의 유연물질로,^{1,2)} 미국약전은 related compounds 또는 chromatographic purity로,³⁾ 유럽약전과 영국약전은 related substances로 유연물질의 종류와 양을 규제하고 있다.^{4,5)} 신약원료 및 제제의 불순물 규격에 대해 ICH guideline에 일반적인 사항이 설명되어 있고,^{6,9)} 우리나라에서는 원료 약품 중에 0.1% 이상 함유되어 있는 유연물질 및 0.1% 미만이라도 강한 독성 또는 약리작용이 예측되는 유연물질은 가능한 한 그 화학구조를 명확하게 기재하며 구조결

정을 할 수 없는 경우에는 그 검토과정을 기재하도록 규정하고 있다.¹⁰⁾

아테놀롤은 주로 고혈압, 협심증에 사용되며 그 작용기전은 β -차단효과이다. 보통 성인 1일 1회 50~100 mg 단독 또는 이뇨제와 병용 투여하는데 발진, 가려움, 시각장애, 서맥 등의 부작용을 나타낸다. 시판 제제는 정제로서 25, 50 및 100 mg 등이 있고 국내 50여개 회사에서 70여개의 제품을 생산, 판매하고 있다.¹¹⁾ 영국약전에는 아테놀롤의 유연물질 8개가 알려져 있으며, 그 중 2,2'-[2-hydroxypropane-1,3-diylbis(oxy-4,1-phenylene)]diacetamide, 2,2'-[(1-methylethyl)iminobis (2-hydroxypropane-3,1-diyloxy-4,1-phenylene)]diacetamide), (2-[4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy] phenyl]acetic acid)가 주요 유연물질인데, 이것을 영국약전에서는 각각 bis ether, tertiary amine, blocker acid로 명명하고 있다(Figure 1).

아테놀롤로부터 미량의 불순물 및 유연물질을 분석, 확인하기 위하여 heart-cut을 이용한 LC-LC-MS법,¹²⁾ 모세관 등

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)821-5928, E-mail : kangjss@cnu.ac.kr

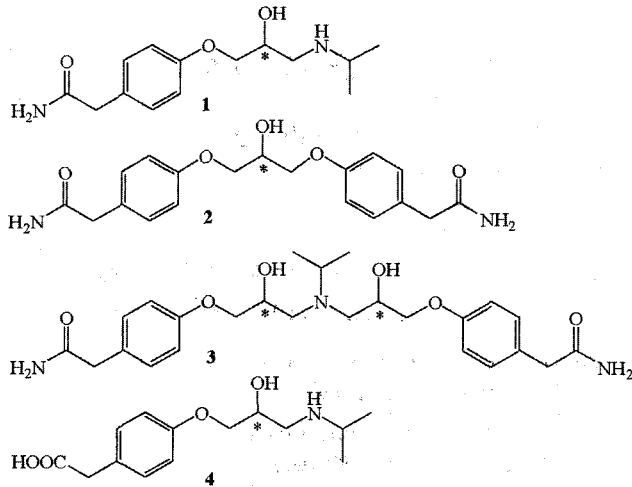


Figure 1—The structures of atenolol (1) and its related compounds, bis ether (2), tertiary amine (3) and blocker acid (4). The chiral center is marked with asterisk.

전집중-핵자기공명법,¹³⁾ 마이크로에멀션 전기동역학 (microemulsion electrokinetic) 크로마토그래피법,¹⁴⁾ 모세관 전기영동법,^{15,16)} 및 HPLC법¹⁷⁾ 등이 많이 이용되고 있다. 대한약전, 미국약전, 영국약전 및 유럽약전에서는 HPLC법을 이용하여 아테놀롤의 유연물질을 분석하도록 규정되어 있는데 대한약전과 미국약전에 수재된 방법은 동일하다. 유럽약전 및 영국약전에 수재된 유연물질의 분석법은 타 약전에 수재된 방법에 비해 향상된 것으로 아테놀롤 유연물질의 분석에 더 유용할 것으로 판단된다. 이에 본 연구는 영국약전에 수재된 방법을 이용하여 국내 유통되고 있는 아테놀롤 원료 및 제품으로부터 유연물질 및 불순물을 모니터링하여 국내 의약품관리의 자료로 활용하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

아테놀롤 유연물질 bis ether, tertiary amine, blocker acid 혼합 표준품은 영국약전위탁실험실(BPCL, 영국)에서, 옥탄설폰산나트륨, 사부틸암모늄수소황산, 이수소인산칼륨은 시그마사(MI, 미국)에서 각각 구입하였다. 그 외의 시약은 국내의 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 실험에 사용된 HPLC는 Shimadzu 제품으로(Kyoto, 일본) 시스템컨트롤러(SCL-10A), 고압펌프(LC-10AD), 자외-가시부 검출기(SPD-10AVP), 컬럼오븐(CTO-10AVP), 자동주입기(SIL-10ADVP)로 구성되었다. pH의 측정에는 ATI 370(Orion, MA, 미국)을 3차 증류수의 제조에는 Milli-Q Apparatus(Millipore, MA, 미국)를 사용하였다.

검체

검체로 사용한 아테놀롤 원료는 국내 6개 제약회사로부터 제공받았고, 시판 아테놀롤 제품은 국내 도매상 및 약국을 통하여 국산 25종, 독일 소재 약국에서 1종을 각각 구입하였다. 원료는 R1-R6, 제품은 P1-P26의 번호를 부여하여 충남대학교 약학대학 약품분석실에 보관하였다.

크로마토그래피

아테놀롤 50 mg에 해당하는 검체를 이동상에 용해시켜 25 ml로 하였다. 부형제 또는 타 첨가물질로 인해 용액이 흐린 경우는 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 상정액을 검액으로 사용하였다. 아테놀롤 표준액(2 mg/ml) 0.5 ml를 이동상으로 희석하여 100 ml로 한 용액을 대조액으로 하였다. 유연물질 혼합표준품을 이동상에 2 mg/ml의 농도로 녹여 유연물질 표준액으로 하고 이액은 검액 중 유연물질의 확인을 위하여 사용되었다. HPLC 고정상으로는 Zorbax XDB-C₁₈(2.1×150 mm, HP, CA, 미국)을 사용하였고, 테트라히드로푸란, 메탄올, 인산완충액(3.4 g/l, pH 3.0) 혼합액(20:180:800, v/v/v) 1 l에 옥탄설폰산나트륨 1 g과 사부틸암모늄수소황산 0.4 g을 용해시킨 액을 이동상으로 하였다. 이동상의 유속은 분당 0.25 ml로 유지시켰고, 시료의 주입량은 5 μl로 하였다. 시료는 UV 226 nm에서 검출하였다. 대조액과 유연물질 표준액을 5회 반복하여 분석하고 얻어진 피크의 면적과 5일간 동일 조건으로 분석하여 얻어진 피크의 면적으로부터 주입하여 일내정밀도와 일간정밀도를 각각 측정하였다.

결과 및 고찰

아테놀롤 및 유연물질의 분리와 확인

Figure 2a는 아테놀롤 대조액의 크로마토그램으로 아테놀롤의 유지시간은 약 6분으로 나타났다. 본 실험에서 제시한 방법으로 분석한 유연물질 표준액의 크로마토그램에서 아테놀롤과 세가지 유연물질의 유지시간으로 이들 화합물의 확인이 가능하였고, 또한 이들 화합물은 분석이 충분할 정도로 분리되었다(Figure 2b). 실제 시료의 분석에서는 이들 세 가지 유연물질 외에 불순물로 보이는 몇 가지 화합물의 피크가 관찰되었다(Figure 2c). 유연물질 중 tertiary amine은 Figure 1에서 보는 바와 같이 분자 중에 두개의 부재탄소가 존재하고, 이에 의한 두쌍의 부분입체이성질체(diastereomer)가 완전히 분리되지 않은 두개의 피크로 나타났다.

시험방법의 정밀도

대조액과 유연물질 표준액을 분석하여 얻어진 피크의 면적

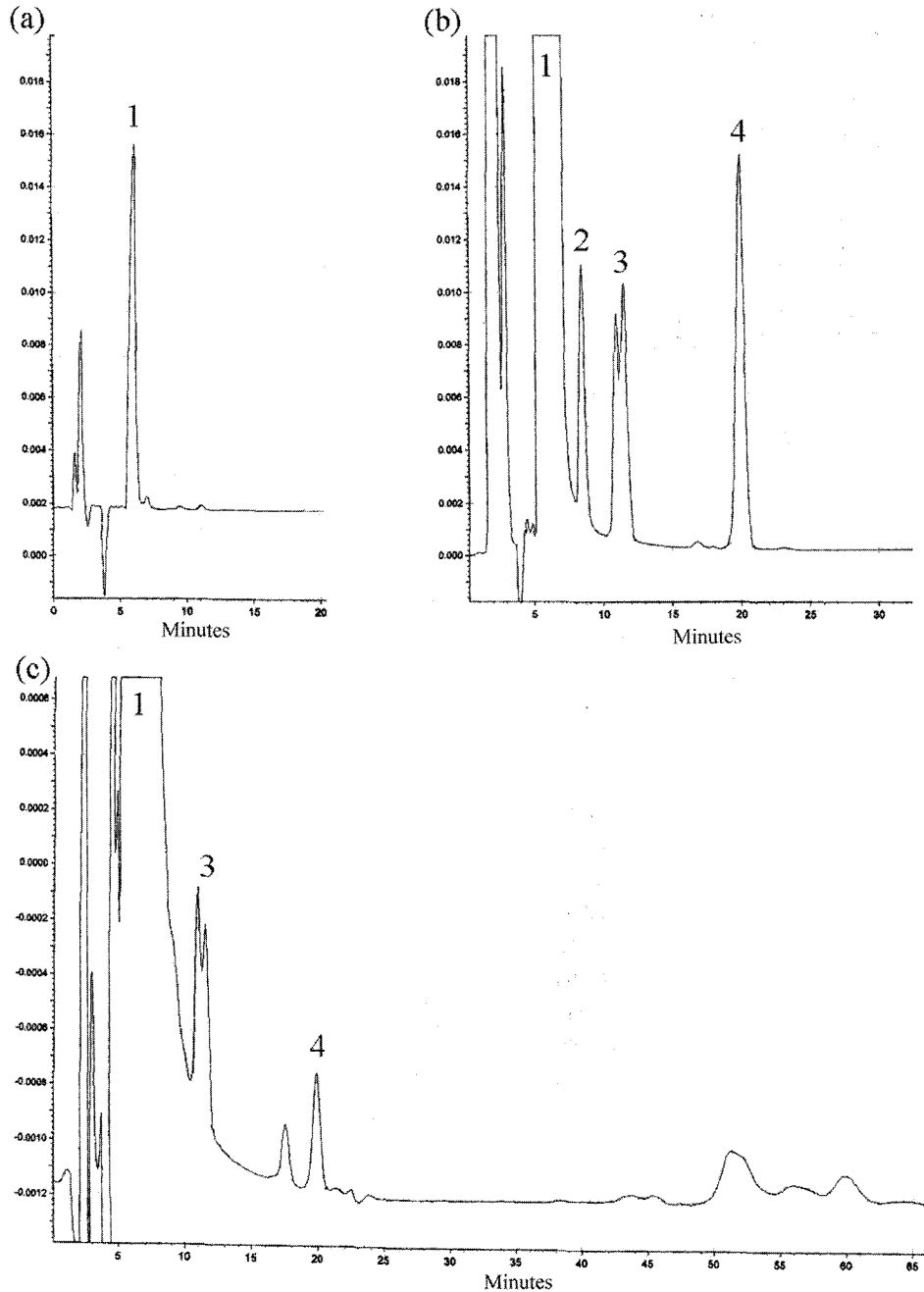


Figure 2—Chromatograms of atenolol reference solution (a), standard solution of related compounds (b), and preparation P19 (c). Peaks: 1. Atenolol, 2. Bis ether, 3. Tertiary amine, 4. Blocker acid.

으로부터 계산된 일내 및 일간정밀도는 Table I과 같았다. 아테놀롤 대조액 및 유연물질의 일내정밀도는 0.85%~1.24%, 일간정밀도는 1.09%~3.44%로 양호한 수준이었으며, 이 방법은 아테놀롤의 유연물질 분석법으로 적합한 것으로 판단되었다.

시판 아테놀롤 중 유연물질의 분석

시판 아테놀롤 원료 및 제품 중 유연물질을 분석한 결과

는 Table II와 같다. 영국약전에 의하면 검액의 크로마토그램에서 주피크를 제외한 어떤 피크의 면적도 0.25%를 초과할 수 없고, 총면적은 0.5%를 초과할 수 없는 것으로 명시되어 있다. 조사된 모든 아테놀롤 원료 및 제품에 대한 bis ether, tertiary amine 및 blocker acid의 최고함량은 각각 0.08, 0.15 및 0.10%로 약전규정을 만족하는 것으로 나타났다. 한편, tertiary amine과 blocker acid가 거의 모든 원료

Table I—Within-day and between-day precisions of atenolol reference solution and standard solution of related compounds

Test solution	Compounds	Precision	
		Within-day	Between-day
Reference solution	Atenolol	1.00%	3.44%
Mixed standard	Bis ether	1.24%	1.47%
"	Tertiary amine	0.85%	1.17%
"	Blocker acid	0.93%	1.09%

Table II—Concentration of related compounds (%) in commercial raw material (R1-R6) and preparations (P1-P26) of atenolol

No.	Bis ether (0.15%)	Tertiary amine (0.25%)	Blocker acid (0.25%)
R1		0.049	0.019
R2		0.035	0.016
R3		0.028	0.010
R4		0.146	0.010
R5			0.054
R6		0.079	0.022
P1		0.022	0.020
P2		0.042	0.058
P3			
P4		0.025	0.026
P5	0.075		0.085
P6			0.061
P7		0.026	0.024
P8		0.025	0.032
P9			0.063
P10		0.039	0.104
P11		0.019	0.058
P12		0.039	0.050
P13		0.018	0.023
P14		0.114	0.032
P15		0.080	0.013
P16		0.049	0.028
P17		0.031	0.028
P18			0.016
P19		0.024	0.035
P20		0.074	0.042
P21	0.012	0.141	0.014
P22		0.018	0.022
P23			0.030
P24		0.128	0.015
P25			0.067
P26		0.039	0.052

및 제품에서 발견되는 것과는 대조적으로 bis ether는 오직 두개의 제품에서 아주 낮은 농도로 나타났다. 검체 중 bis

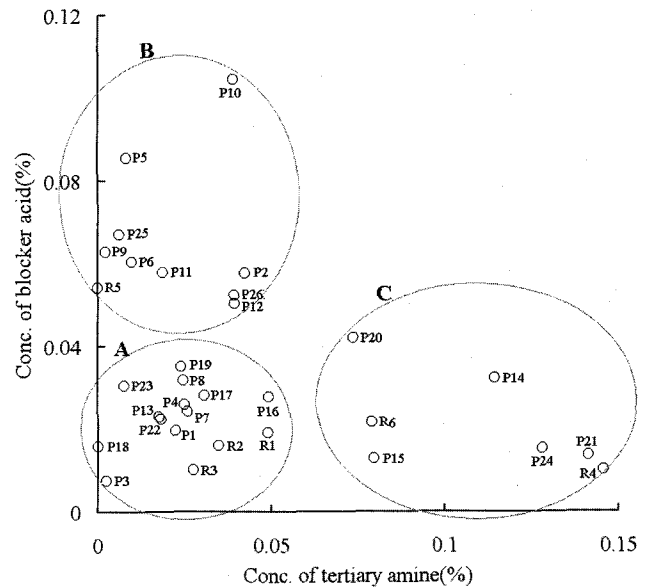


Figure 3—Two-way scatter plot for concentration of tertiary amine versus blocker acid in atenolol raw materials and products. The raw materials and preparations can be classified in three groups (A, B and C) depending on the concentration of related compounds.

ether의 함량이 0.15% 이상이면 재시험을 하도록 규정되어 있는데 국내 시판품의 경우 재시험이 필요하지 않았으며 이것으로 보아 제품 중 bis ether의 함량은 문제가 되지 않을 것으로 생각되었다. 제품에 대한 크로마토그래피를 90분까지 실행했을 경우 일부 제품에서 bis ether, tertiary amine 및 blocker acid 이외에 불순물로 판단되는 피크가 발견되었지만 대부분 0.05% 이내로 무시할 수 있는 것들이었다. 드물게 무시할 수 없을 정도의 피크가 나타나는 경우도 관찰되었는데 유럽약전에서 규정한 분석시간인 아테놀롤 유지시간의 4배 이후에 나타나므로 법적인 문제점은 없으나 조사 연구의 필요성이 있을 것으로 생각되었다. Figure 3은 유연물질 중 blocker acid의 함량을 y축, tertiary amine의 함량을 x축으로하여 구성한 이원산점도인데, 이를 보면 실험에 사용된 아테놀롤 원료 및 제품은 유연물질의 함량에 따라 세 개의 그룹으로 대별된다. 즉, 유연물질 함량 0.05%를 기준으로 하여, blocker acid와 tertiary amine 함량이 모두 낮은 경우(A 그룹), tertiary amine 함량만 낮은 경우(B 그룹), blocker acid 함량만 낮은 경우(C 그룹) 등으로 나눌 수 있었고, blocker acid와 tertiary amine의 농도가 모두 높은 경우는 발견되지 않았다.

결 론

HPLC를 이용하여 시판 아테놀롤 원료 및 제품 중 유연

물질의 양을 분석하였다. 고정상으로는 Zorbax XDB-C₁₈, 이동상으로 테트라히드로푸란, 메탄올, 인산완충액(3.4 g/l, pH 3.0) 혼합액(20:180:800, v/v/v) 1 l에 옥탄설폰산나트륨 1 g과 사부틸암모늄수소황산 0.4 g을 용해시킨 액을 사용하였을 경우 분리도 및 선택성이 유연물질인 bis ether, tertiary amine 및 blocker acid를 분석할 수 있을 정도로 충분하였다. 시판 아테놀롤 원료 및 제품 중 유연물질을 분석한 결과 bis ether, tertiary amine 및 blocker acid의 최고함량은 각각 0.08, 0.15 및 0.10%로 약전규정을 만족하는 것으로 나타났다. 실험에 사용된 아테놀롤 원료 및 제품은 유연물질의 함량에 따라 blocker acid와 tertiary amine 함량이 모두 낮은 그룹, tertiary amine 함량만 낮은 그룹, blocker acid 함량만 낮은 그룹 등으로 나눌 수 있었고, blocker acid와 tertiary amine 함량이 모두 높은 경우는 관찰되지 않았다.

문 헌

- 1) 대한약전, 제8개정 (2002).
- 2) 日本藥局方, 第十四改定 (2002).
- 3) The United State Pharmacopoeia, 26th Ed. (2003).
- 4) European Pharmacopoeia 4th Ed. (2002).
- 5) British Pharmacopoeia (2002).
- 6) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, ICH TOPIC Q3A(R) *Impurities testing guideline: Impurities in new drug substances*. London (2002).
- 7) U.S. Department of Health and Human Services, Guidance for industry Q3B(R) *Impurities in new drug products*. (2003).
- 8) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, ICH TOPIC Q3C(M) *Maintenance of note for guidance on impurities: Residual solvents*. London (2002).
- 9) International Conference on Harmonisation, Q6A *Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances*. (1999).
- 10) 식품의약품안전청 고시 제 2001-9 호, *의약품동기준및시험방법심사의뢰서심사규정* 제3조 (2001).
- 11) 대한약학정보화재단, *Drug Information in Korea*, pp. 60-62 (2002).
- 12) E.M. Sheldon, Development of a LC-LC-MS complete heart-cut approach for the characterization of pharmaceutical compounds using standard instrumentation, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 1153-1166 (2003).
- 13) A.M. Wolters, D.A. Jayawickrama, C.K. Larive and J.V. Sweedler, Capillary isotachopheresis/NMR: extension to trace impurity analysis and improved instrumental coupling, *Anal. Chem.*, **74**, 2306-2313 (2002).
- 14) K.D. Altria, Application of microemulsion electrokinetic chromatography to the analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients, *J. Chromatogr. A*, **844**, 371-386 (1999).
- 15) A. Shafaati and B.J. Clark, Development and validation of a capillary zone electrophoretic method for the determination of atenolol in presence of its related substances in bulk and tablet dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 1547-1554 (1996).
- 16) A. Shafaati and B.J. Clark, Development of a capillary zone electrophoresis method for atenolol and its related impurities in a tablet preparation, *Anal. Proc.*, **30**, 481-483 (1993).
- 17) Z. Pawlak and B.J. Clark, The assay and resolution of the beta-blocker atenolol from its related impurities in a tablet pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**, 329-334 (1992).