

## HPLC에 의한 복합비타민제제중 Folic acid의 분리정량

약품화학과

황 인 숙 · 김 유 경 · 채 영 주

### Analysis on Contents of Folic acid in Multivitamin Preparations by HPLC

*Division of Pharmaceutical Chemistry*

In Sook Hwang, Yoo kyung Kim and Young Zoo Chae

#### = Abstract =

This study was performed to analyze the contents of folic acid in multivitamin preparations. The experimental samples included 10 kinds of multivitamin preparations were collected in the Seoul area. A rapid and simple method for determination was based on the HPLC separation of the components on a  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column with 20% methanol with 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as a mobile phase at 280 nm. Folic acid was successfully separated about 11 minutes.

1. It was good linearity ( $r=0.999$ ) in 4~50 ppm of folic acid.
2. The recovery rate was greater than 97%.

#### 緒 論

영양제는 일반적으로 많이 복용되고 있고 한 종류 정도의 영양제는 바쁜 현대의 식습관에 있어 필요하다고 할 수 있으며, 현재 시중에서 시판되고 있는 영양제는 1일 1회 용법으로 간편하게 복용할 수 있도록 하는 제제가 일반화 되어 있다. 일반적으로 사람들이 널리 복용하고 있는 복합비타민제제는 지용성 비타민, 수용성 비타민, 그 외 제제에 따라 각종 무기질 등이 처방되어 있으며 제품에 따라 그 양은 조금씩 다르다. 지용성 비타민류에는 비타민 A, D, E 등이, 수용성에는 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, 아스코르빈산, 니코틴아마이드, 엽산 등이 속한다. 그 중 엽산은 철, 시아노코발라민과 더불어 조혈제<sup>1,2)</sup>로 쓰이고 있으며 또한 세포대사에 관여하여 체내 아미노산과 DNA형성<sup>3,4)</sup>에 관여한다. 어린이, 임신부, 수유부에게는

성인에 비해 더 많은 섭취가 요구되며 출혈환자에게도 다른약물과 더불어 투여가 필요하다. 음식으로는 신선한 녹색 야채, 간, 효모, 과일 등으로 섭취가능하며 1일 권장량은 50~1000  $\mu$ g 정도이고 알콜중독자나 항암제, 항응고제, 경구용 피임제를 투여, 복용하고 있는 환자는 혈장내 엽산의 농도가 낮아져 거대적아구성 빈혈 상태에 빠지기 쉽다.<sup>5,6)</sup> 국내에서 생산되고 있는 여러종류의 복합비타민제제를 검토해 본 결과 대개 엽산 투여량은 0.3~1.0 mg/day이었으므로 다른 비타민류에 비하여 미량이 함유되어 있다. 이들 제제는 그 성분이 다양하여 분석을 행하는데 있어 많은 시간과 수고가 요구된다. 지금까지 많은 연구로 대부분 비타민의 확인 및 함량시험 등이 공정서에 나와있고, 특히 HPLC을 이용하여 빠른 시간에 지용성 비타민류 및 수용성 비타민류를 분리 정량할 수 있는 조건들이 최근 국립보건원 고시에 수재 되었다.<sup>7)</sup> 그러나 그 중 엽산의 정량조건 (미국약전<sup>8)</sup>과 동일)으로는

단일체제나 간단한 제제중에서의 정량은 가능하나, 다양한 비타민이 동시 처방되어 있는 영양제중에서의 엽산은 리보플라빈과 분리가 되지 않는 경향이 있어 품질관리를 하는데 많은 어려움이 있어 왔다. 이에 저자 등은 HPLC를 이용하여 복합비타민제중 적절한 엽산의 분리 조건을 찾아 실제 검정업무에 활용하고자 본 연구를 시도하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 材 料

시중에서 유통되고 있는 복합비타민제 10종을 사용하였다.

### 2. 試 藥

Folic acid (Sigma), Potassium Dihydrogen Phosphate (GR, キンタ 화학주식회사), Ammonium hydroxide (AR), Phosphoric acid (GR), Methanol (HPLC용, Labguard사), 증류수는 reverse osmosis/tank system과 ultrapure water system (Barnstead사)을 통과시킨 정제수를 사용하였다.

### 3. 機 器

High performance liquid chromatograph (waters/Table 1 참조), Millipore 여과장치 (waters), 교반기 (한미하이테크 주식회사)를 이용하였다.

Table 1. Analytical Condition of HPLC.

Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>
Detector	Waters 484 (UV 280 nm)
Injector	U6k Injector
Pump	Waters 510
Flow rate	1.0 ml/min.
Data module	Waters 746
Injection volume	20 $\mu$ l
Mobile phase	Methanol/0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (20/80)
Chart speed	0.25 cm/min.

### 4. 實驗方法

#### 1) 標準液의 調製

Folic acid를 약 20 mg을 정밀히 취하여 100 ml 용량 플라스크에 넣고 1% ammonium hydroxide solution 80 ml을 가하여 녹인 다음 17.2 w/v% 인산용액으로 중성으로 조절한 후 증류수로 표선까지 채워 stock

solution으로 하였다.

#### 2) 檢量線 作成

위의 stock solution을 각각 2.0, 5.0, 10.0, 25.0 ml씩 취하여 100 ml 용량 플라스크에 가한 후 증류수로 표선까지 채웠다. 이들은 각각 약 4, 10, 20, 50 ppm의 농도를 나타내며 이들 표준액 20  $\mu$ l씩을 HPLC system에 주입하여 얻은 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였다 (Fig. 1).

#### 3) 檢液의 調製

각각의 검체 20개를 제피를 하여 제제당 표기량을 기록하고 곱게 갈아 가루로 하여 약전 100호체를 통과시킨 다음, 엽산으로서 0.5 mg 해당량을 취하여 100 ml 용량 플라스크에 넣고 1% 암모니아 용액 80 ml를 가하여

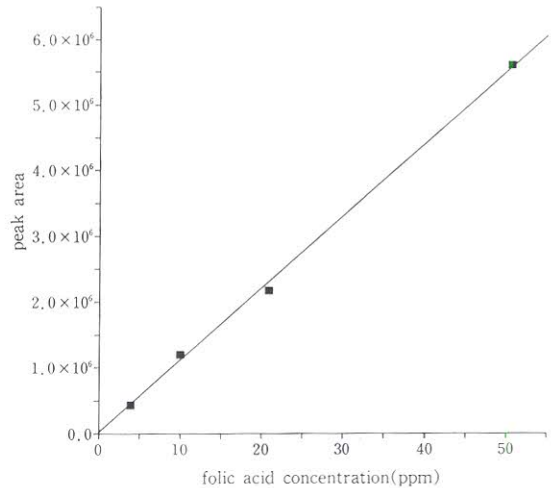


Fig. 1. The Calibration curve of folic acid standard solution.

Table 2. Recovery Rate of Folic acid in Spiked Samples.

	add (mg)	found (mg)	recovery rate (%)
1	1.035	1.020	98.6
2	1.035	0.981	94.8
3	1.035	0.998	96.4
4	1.035	1.005	97.1
5	1.035	1.020	98.6
mean		1.005	97.1
SD		0.016	1.603
RSD		1.631	* 1.651

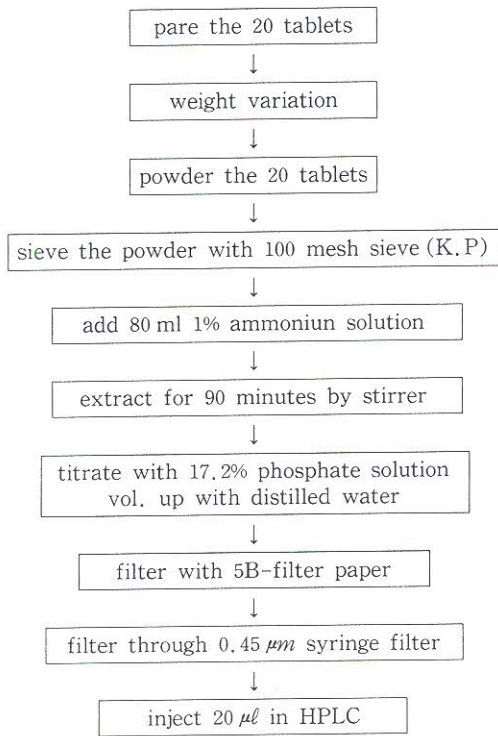


Fig. 2. Procedure of sample extraction method.

교반기로 90분간 추출하였다. 17.2 w/v% 인산용액으로 중화한 후 증류수로 표선까지 채운다음 5B-filter paper 로 여과하고 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter를 통과시킨 다음 검액으로 하였다 (Fig. 2).

#### 4) 回收率 側定

일정량의 folic acid 표준원액을 일정량의 시료에 가한 후 검액의 조제와 같은 방법으로 추출하여 회수율을 측정 하였다 (Table 2).

#### 5) 定 量

상기 방법에 따라 조제된 표준액 및 검액을 Table 1

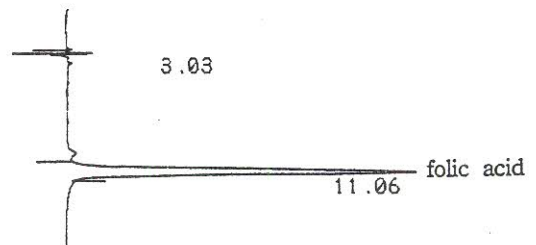


Fig. 3. HPLC chromatogram of folic acid standard solution.

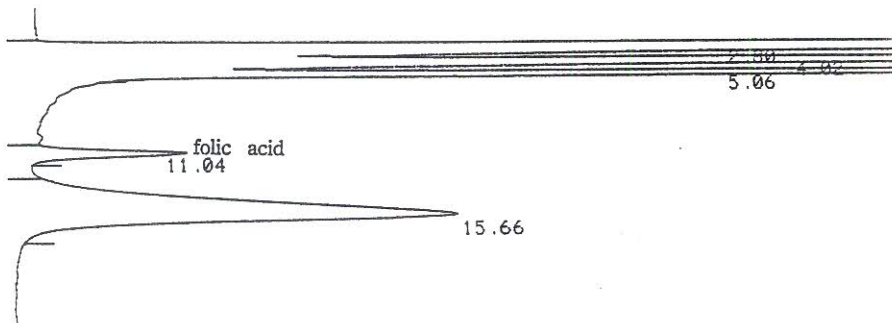


Fig. 4. HPLC chromatogram of sample solution.

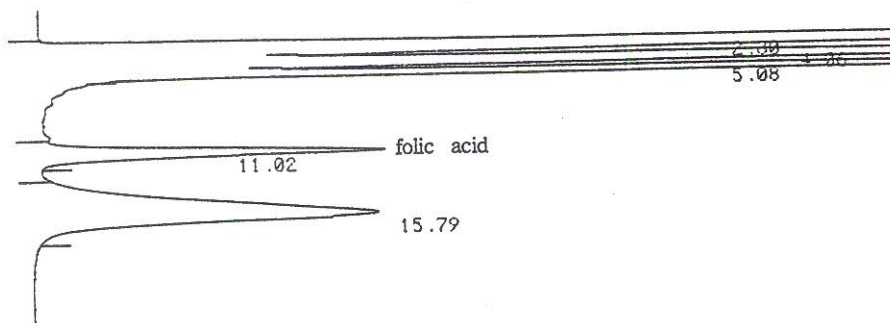


Fig. 5. HPLC chromatogram of folic acid spiked sample solution.

**Table 3.** Analytical Results of Folic acid in Multivitamin Preparations.

Sample	Labeled amount (mg/tablet)	Contents of Folic acid (%)				RSD
		No. of Experiment	1	2	3	
A	1.0	118.6	113.0	117.7	106.7	1.73
B	0.5	104.5	102.3	100.3	102.4	2.05
C	0.4	110.2	106.9	101.7	106.3	4.03
D	1.0	104.2	100.2	107.0	103.8	3.29
E	0.4	101.4	100.2	97.7	100.7	3.26
F	0.4	99.4	102.2	98.7	100.1	1.85
G	0.4	92.0	90.6	91.5	91.4	1.09
H	0.3	101.5	101.3	98.1	100.3	1.90
I	0.4	108.6	104.9	106.7	106.7	1.73
J	0.2	141.1	139.8	137.4	139.4	1.35

의 조건에 따라 각 시료 중에 함유된 각각의 folic acid의 양을 HPLC로 정량하였다. Fig. 3~5는 HPLC로부터 얻은 표준액 및 검액의 chromatogram이다.

### 結果 및 考察

복합비타민제제의 성분은 주로 지용성 비타민, 수용성 비타민, 그 외 제제에 따라 각종 무기질 등이 함유되어 있으며 그 중 수용성비타민에는 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, 아스코르빈산, 니코틴아마이드, 엽산 등이 들어있다. 이제까지 엽산을 제외한 다른 비타민성분을 정량하는데 있어서는 많은 분석방법이 있어왔으나 미량으로 함유된 엽산의 분석을 행하는데 있어 공정서(국립보건원 고시, 미국약전)에 수재되어 있는 방법으로는 리보플라빈의 방해로 받아 분리에 어려움을 겪어왔다. 특히 함유량이 있어 리보플라빈은 2~20 mg/day로 엽산의 수십배에 다다른다. 따라서 기존 조건으로 분석하면 리보플라빈 peak에 엽산이 겹쳐서 분리가 어려웠다. 물론 HPLC기종에 따라 gradient system이 갖추어져 있으면 이동상에 증류수나 methanol의 비율을 약간씩 변화시키면서 분석하는 것도 가능하겠지만 이동상 자체를 만드는 데도 시약, 시간이 많이 필요하다.

이에 본 저자 등은 간단히 만들 수 있는 이동상으로 다양한 성분이 함유되어 있는 복합비타민제중 엽산의 분리정량을 시도하였다. 추출용매선택에 있어 엽산은 메탄올, 증류수 모두에 난용이어서 잘 용해되는 알칼리 용매인 암모니아를 이용하였다. Fig. 1에 제시된 바와 같이 folic acid standard solution은 4~50 ppm까지 양호한 직선을 나타내었다. 일정량의 folic acid 회색액을 시료에 첨가하여 회수율을 측정된 결과는 Table 2에서 보

는 바와 같이 5회의 평균 회수율이 97% 이상으로 양호하였다. 표준액과 검액의 HPLC chromatogram은 Fig. 3~5와 같다. 10종의 시료를 가지고 실험한 결과는 Table 3과 같았다. 제제당 엽산의 함유량은 표기량 0.3~1.0 mg에 대해 허용기준 90.0~150.0%에 모두 적합하였다. 단일제제 또는 철, 시아노코발라민과 더불어 처방되어 있는 단순 조혈 제제와는 달리 리보플라빈 등 다양한 비타민류와 혼합처방되어 있는 복합비타민제제가 대부분인 영양제의 품질관리를 행하는데 있어 1994년 비타민 및 무기질시험법이 보건원 고시에 공정시험법으로 게재됨에 따라 그 방법이 실제 검정업무에 많은 기여를 함은 사실이나 복합영양비타민제중 미량으로 들어있는 엽산을 분리 정량하기에는 어려움이 있어 왔다.

이에 본 저자 등은 소정의 간단한 추출방법과 빠르고 새로운 조건으로 정량방법을 시도한 바 약간의 결과를 얻었기에 실험실적 품질관리를 하는데 있어 도움이 되었으면 한다.

### 結 論

시중에서 유통되고 있는 복합비타민제제중의 엽산의 분리정량을 시도하였다. 다양한 비타민제중 미량으로 존재하고 있는 엽산을 간편한 추출방법을 통하여 HPLC로 정량하는 방법을 검토하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 엽산 정량시 암모니아로 추출하고 HPLC의 최적 분석 조건으로  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column을 사용하여 파장은 UV 280 nm, Methanol/0.05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20/80)을 이동상 용매로 하였으며 retention time은 11분 정도였다.
2. 각 복합 비타민제중 검출된 folic acid의 양은 0.3~1.0 mg/T 정도였다.
3. 비타민제의 허용기준은 표기량에 대해 90.0~150.0%인데 검체 모두 적합하였다.
4. 검체에 표준액을 일정량 첨가하여 동일한 추출조작을 하여 얻은 회수율은 97% 이상이었다.

### 參 考 文 獻

1. Chamarin, I., Hutchinson, M. and Maclean, N. : Hepatic Folate in Man, Br. Med. J. 1:396(1966).
2. Stebbins, R., Scott, J. and Herbert, V. : Drug-Induced Megaloblastic Anemias, Semin. Hematol. 10:235(1973).

3. Tamura, T. and Stokstad, E.L.R. : The Availability Of Food Folate in Man, Br. J. Hematol. 25: 513(1973).
4. Weir, D.G. and Scott, J.M. : Interrelationships of Folates and Cobalamines, Churchill Livingstone, New York 121(1983).
5. Lindenbaun, J. : Folic acid Requirement in Situations of Increased Need, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 256(1977).
6. Stebbins, R. and Bertino, J.R. : Megaloblastic Anemia Produced by Drugs, Clin. Hematol. 5:619 (1976).
7. 국립보건원 : 의약품 기준 및 시험방법, 후보 8, p.152 (1994).
8. US Pharmacopeia XXIII. p.1740(1995).