

HPLC에 의한 벤포티아민의 분석법에 대한 연구

독성약품과

김 장 희·정 애 희·오 세 종

Advanced Method for analysis of Benfotiamine by HPLC

Division of Toxicopharmaceutics

Jang Hee Kim, Ae Hee Jung and Sea Jong Oh

= Abstract =

The study was performed to find the analytical conditions for determination benfotiamine by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The direct quantification was examined using μ -bondapak C₁₈ column, 254nm UV detector and 50% MeOH (with Pic B₆) as mobile phase.

The calibration curve ranging from 0.25mg/ml to 1.0mg/ml showed good linearity($r=0.999$) and the recovery was greater than 98.3%.

緒 論

비타민은 포유동물의 정상적인 신진대사 및 성장에 필수적으로 요구되는 미량 영양소이다. 비타민이라는 용어는 라틴말의 생명을 의미하는 'vita' (life)와, 생명과 관련된 매우 중요한 성분인 'amine'을 합성하여 1912년 Funk.C에 의해 'vitamine'이라고 명명되었으나 일부 비타민에서는 'amine' 성분이 없는 것이 그 후 발견되어 지금은 공식적으로 "vitamin"이라 부르고 있다.

비타민은 대부분 단일물질이 아닌 다양한 화학 조성을 가진 물질의 그룹으로 그 화학적 형태에 있어 하나 이상으로 존재하거나 (예, pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine) 또는 전구물질로 존재할 경우에는

(예, carotene은 비타민A의 전구물질) 이러한 동족체를 vitamer라고 부르기도 한다.

지금까지 알려진 비타민류는 1897년에 제일 먼저 발견된 thiamine을 비롯하여 비타민 유사체까지 합하면 약 20여종에 달한다. 이중 비타민 B₁(thiamine)은 acetyl CoA를 이용하는 대사과정, 즉 당대사, 지질대사 및 아미노산 대사에 매우 중요하며 TPP를 이용하는 5탄당과 6탄당의 전환에도 결정적인 역할을 하고 있다¹⁾. Benfotiamine은 이 비타민 B₁의 활성형으로서 향신경성 물질로 인식되며²⁾ 지용성인 Benfotiamine이 수용성인 thiamine염에 비해 생체 흡수율이 뛰어나고³⁻⁴⁾ 생물학적 이용효능(Bioavailability)이 우수하여⁵⁻⁶⁾ 초반의 당뇨병 다발신경병과⁷⁻⁹⁾ 알콜성 다발신경병에¹⁰⁾ 효과가 있다고 보고되었으며, riboxin등 다른 물질과 병용하여 면역 조절 작용도 있

음이 보고되었다¹¹⁻¹²⁾.

Benfotiamine의 투여방법은 탁월한 흡수성 때문에 경구투여가 가장 효과적이며¹³⁾ 인슐린 의존성 당뇨병 환자에게 inosine, pyridoxal phosphate를 병용투여하면 심근수축과 혈액응태 이상이 감소한다¹⁴⁾ 고도 하며, 노인에게는 silk fibroin gel제제로 투여함이 효과가 좋다는 보고¹⁵⁾도 있다.

Benfotiamine의 품질관리의 방법으로는 공정서에¹⁶⁾ 형광광도법에 따라 시험하게 되어 있으나, 그 조작 방법이 복잡하고 까다로워 많은 시간과 숙련된 기술이 요구된다. 따라서 실제 검정 업무에 적합하도록 Benfotiamine의 분석방법을 확립코자 본 실험을 시행하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

시중에서 유통되고 있는 1998년도에 본연구원에 수거된 검체 10종을 사용하였다.

2. 試 藥

benfotiamin과 1-hexanesulfonic acid는 sigma 제품을, methanol은 HPLC용 Tedia 제품을 사용하였고, 증류수는 역삼투 시스템과 초순수 시스템(Barnstead사)을 통과시킨 증류수를 사용하였다.

3. 機 器

HPLC (Waters/Table 2 참조), Millipore 여과 장치 (Waters), Ultra sonicator (Branson) 를 이용하였다.

4. 實驗方法

1) 표준액의 조제

Benfotiamine에 이동상을 가하여 1.0mg/ml의 농도가 되도록 조제하고 stock solution 으로 하였다.

2) 검량선 작성

위의 stock solution을 각각 희석하여 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 0.75mg/ml, 1.0mg/ml의 네가지 농도 표준액 10 μ 씩을 HPLC system에 주입하여 얻은 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였다.

3) 검액의 조제

각각의 검체 100mg을 100ml 용량플라스크에 넣고 70% 메탄올을 가하여 Ultra sonicator로 30분간 추출하고 2배 희석하여 검액으로 하여 5-B 여과지로 여과하고 0.45 μ m syringe filter 를 통과시킨 다음 검액으로 하였다.

4) 회수율 측정

일정량의 표준 benfotiamine을 일정량의 시료에 가한후 검액의 조제와 같은 방법으로 추출하여 회수율을 측정하였다.

5) 정량

위의 방법에 따라 조제된 표준액 및 검액을 Table 1 의 조건에 따라 10 μ 씩을 HPLC system 에 주입하여 얻은 peak area를 이용하여 각 시료중에 함유된 각각의 Benfotiamine의 함량을 얻었다.

結果 및 考察

Table 1. Analytical Condition of HPLC.

Column	μ Bondapak C ₁₈
Detector	Waters 484 (UV 254nm)
Injector	U6k Injector
Pump	Waters 510
Flow rate	1.0 ml/min
Data module	Waters 746
Injection volume	10 μ l
Mobile phase	50% MeOH with Pic B ₆
Chart speed	0.1 cm/min

벤포티아민은 식품의약품안전본부의 기준및시험법에 따라 품질관리되고 있다. 최근 정량법등은 새로운 분석기기의 도입과 간편한 시료 전처리를 통한 신속정확한 실험법으로 대체되어 가고있는 추세이다. 기존의 벤포티아민 정량은 다단계의 전처리 과정을 거쳐 형광광도법으로 실험하나 그 방법으로는 실험상 오차가 커질 가능성이 높아 본실험에서는 특별한 전처리 없이도 확인과 함량을 동시에 수행할 수 있는 HPLC법을 적

Table 2. Recovery rate of benfotiamine in spiked sample

	1	2	3	4	5	mean	SD
add(mg)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0		
found(mg)	9.94	9.89	9.87	9.92	9.96	9.92	0.04
recovery rate(%)	99.4	98.9	98.7	99.2	99.6	99.2	0.37

용해 보고자 하였다.

HPLC법에 있어서 이동상은 물에 대한 메탄올의 비율을 20-80% 변화시켜가면서 분리능이 좋은 조건을 선택하였다. 검출파장은 극대흡수파장으로 254nm를 선택하였고 추출용매는 비교적 용해가 잘되는 70% 메탄올을 사용하여 HPLC 최적 분석조건으로 컬럼은 μ Bondapak C₁₈, 파장은 UV 254nm, 이동상은 50%MeOH with Pic B₆로 하였을 때 벤포티아민은 retention time 4.5분에서 검출되었다. benfotiamine 표준액 0.25-1.0mg/ml의 농도범위에서 검량선은 Fig.1에 제시된 바와 같이 r=0.9999로 양호한 직선을 나타내었고 회수율 실험은 Table 2에서 보는 바와 같이 5회의 회수율이 98.7에서 99.6%의 범위(mean 99.2%)로 매우 양호하였다 (Table 2). 10개의 시료를 취하여 측정된 벤포티아민의 함량은 함량범위인 97.6-100.6% 이내로 모두 적합하였고 평균 함량은 99.5%였다.

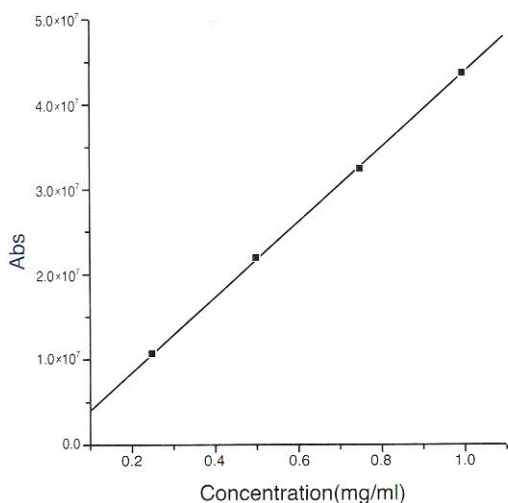


Fig. 1. Calibration curve of Benfotiamine

Table 3. Analytical results of Benfotiamine

sample	content of benfotiamine (%)			mean	SD
	No. of experiment				
	1	2	3		
1	98.9	99.2	98.3	98.8	0.5
2	97.9	98.9	98.2	98.3	0.5
3	99.1	99.4	98.2	98.9	0.6
4	98.6	100.6	100.5	99.9	1.1
5	97.9	98.4	99.1	98.5	0.6
6	100.5	100.1	99.2	99.9	0.7
7	100.3	99.6	99.8	99.9	0.4
8	100.4	100.5	99.6	100.2	0.5
9	100.1	98.6	99.3	99.3	0.7
10	100.2	99.5	98.3	99.3	1.0

結 論

98년도에 시험용으로 수거된 benfotiamin을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 10종의 시료에서 함량시험을 한 결과는 다음과 같다.

1. 식품의약품안전본부고시법인 형광광도법보다 신속하면서도 정확한 HPLC법의 적용이 가능하였고 Benfotiamine 정량시 HPLC 최적 조건으로 μ Bondapak C₁₈, 컬럼을 사용하고 파장 254nm, 50% MeOH Pic B₆를 이동상으로 하였으며 retention time 은 4.6분대 였다.
2. Benfotiamine의 검량선 작성시 0.25~1.0mg/ml의 농도에서 직선성을 나타내었다.
3. 일정량의 표준품을 일정량의 시료에 가한후 검액의 조제와 같은 방법으로 추출하여 회수율을 측정한 결과는 98.7% 이상이었으며 5회의 평균회수율은 99.2%로 양호하였다.
4. 약품원료 benfotiamine을 본 실험조건으로 분석한 결과, 함량 범위인 97.0%~101.0% 이내로 모두 적합하였고 평균함량은 99.3%였다.

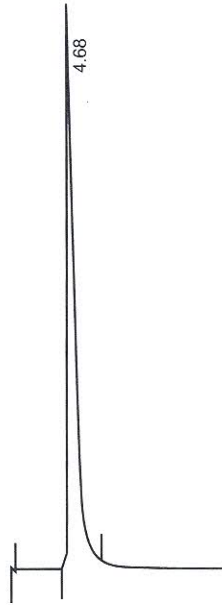


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Benfotiamine preparation

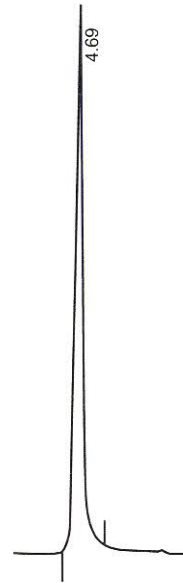


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Benfotiamine standard

參 考 文 獻

1. 대한약사회지 vol.8, No.1. (1997)
2. The effectiveness of the neurotropic agents : benfotiamin combinations. Internist (Berl) 36(2 Suppl Wirksamkeit) (1995)
3. Loew, D. : Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine. Int J Clin Pharmacol Ther. 34(2):47 (1996)
4. Hilbig, R. Rahmann, H. : Comparative autoradiographic investigations on the tissue distribution of benfotiamine versus thiamine in mice. Arzneimittelforschung 48(5):461 (1998)
5. Bitsch, R. Wolf, M. Moller, J. Heuzeroth, L. Gruneklee, D. : Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. Ann Nutr Metab 35(5):292 (1991)
6. Schreeb, KH. Freudenthaler, S. Vormfelde, SV. Gundert-Remy, U. Gleiter, CH. : Comparative bioavailability of two vitamin B1 preparation: benfotiamine and thiamine mononitrate. Eur J Clin Pharmacol 52(4):319 (1997)
7. Simeonov, S. Pavlova, M. Mitkov, M. Mincheva, L. Troev, D. : Therapeutic efficacy of "Milgamma" in patients with painful diabetic neuropathy. Folia Med 39(4):5 (1997)
8. Sadekov, RA. Danilov, AB. Vein, AM. : Diabetic polyneuropathy treatment by milgamma-100 preparation. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova 98(9):30 (1998)
9. Stracke, H. Lindemann, A. Federlin, K. : A benfotiamine-vitamin B combination in treatment of diabetic polyneuropathy. Exp Clin Endocrinol Diabetes 104(4):311 (1996)
10. Woelk, H. Lehl, S. Bitsch, R. Kopcke, W. : Benfotiamin in treatment of alcoholic polyneuropathy : an 8-week randomized controlled study(BAP 1 Study). Alcohol

- Alcohol 33(6):631 (1998)
11. Nikolaeva, IA. Prokopenko, LG. : Immunomodulating action of energizing drugs during dosed fasting. Patol Fiziol Eksp Ter (3):12 (1998)
 12. Laskova, IL. Uteshev, BS. : The immunomodulating action of energizing preparations under physical loading. Eksp Klin Farmakol 58(2):44 (1995)
 13. Greb, A. Bitsch, R. : Comparative bioavailability of various thiamine derivatives after oral administration. Int J Clin Pharmacol Ther 36(4):216 (1998)
 14. Kolomoiskaia, MB. Degonskii, AI. Grishina, RA. : The myocardial contractile function and central hemodynamics of patients with insulin-dependent diabetes mellitus during treatment. Probl Endokrinol (Mosk) 35(4):12 (1989)
 15. Hanawa, T. Watanabe, A. Tsuchiya, T. Ikoma, R. Hidaka, M. Sugihara, M. : New oral dosage form for elderly patients. II. Release behavior of benfotiamine from silk fibroin gel. Chem Pharm Bull(Tokyo) 43(5):872 (1995)
 16. 식품의약품안전청고시.(1990)