

Development of alternative titration method without mercuric acetate for the assay of difemerine hydrochloride in Korean Pharmaceutical Codex

Sang-Seol Jeon and Kyeong Ho Kim[★]

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 192-1, Korea

(Received March 7, 2014; Revised July 15, 2014; Accepted July 15, 2014)

디페메린염산염 시험에 사용되는 유해시약인 수은 대체 시험법의 개발

전상설 · 김경호[★]

강원대학교 약학대학

(2014. 3. 7. 접수, 2014. 7. 15. 수정, 2014. 7. 15. 승인)

Abstract: Currently nonaqueous titration method for the assay method using the hazardous reagent, mercury acetate for difemerine hydrochloride has been used in Korean Pharmaceutical Codex. We developed an alternative titration assay method by substituting the use of the hazardous reagent, mercury acetate to the use of less toxic ones like ethyl alcohol. The linearity of the calibration curves in the desired concentration range was good ($r > 0.999$). Precision was less than 0.64%. Accuracy was obtained with recoveries in range of 99.10% and 99.71%. The developed assay could be expected to become valuable tools for revising the Korean Pharmaceutical Codex.

요 약: 국가 공정서 중 하나인 대한민국약전외의약품 기준에는 디페메린염산염의 정량법으로 유해시약인 아세트산수은을 사용하는 비수적정법이 수재되어 있다. 본 연구에서는 디페메린염산염의 환경 친화적인 대체 시험법으로 보다 안전하고 효율적인 친환경용매인 에탄올을 사용하는 중화적정법을 개발하고, 분석법을 검증하였다. 디페메린염산염의 직선성은 상관계수(r)가 0.999 이상을 나타내었고, 정확도는 99.10~99.71%, 정밀도는 0.64% 이하로 나타났다. 개발된 시험법은 대한민국약전외의약품 기준의 개정에 기여가 될 것이다.

Key words: Korean Pharmaceutical Codex, hazardous reagents, alternative testing methods, validation, titration

1. 서 론

최근 의학의 발전으로 인구가 고령화되고 노인성

질환 및 환경 문제에 따른 만성질환이 증가하면서 제약산업이 급속도로 성장하였으며, 의약품 수요가 확대되었다. 제약산업은 정밀화학 산업 중에서도 환경오염

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)33-250-6918 Fax : +82-(0)33-255-7865

E-mail : kyeong@kangwon.ac.kr

유발도가 가장 높은 업종 중 하나로, 단위 생산 당 폐기물 발생량이 타 정밀화학 업종에 비해 510 배가 높고, 의약품 제조 및 품질관리 등의 작업에서 다양한 폐기물들이 발생한다. 의약품 중 유해시약에 관하여는 International Conference on Harmonization (ICH)의 잔류용매지침¹에서 용매별로 유해성에 따라 Class 1, 2, 3 및 기타용매로 분류하여 그 잔류량을 규제하고 있다. 특히 Class 1에 속하는 수은화합물, 벤젠, 사염화탄소 등은 발암원성, 환경유해성 물질로서 원칙적으로 사용이 금지되고 있는 실정이다. 또한 Pfizer사의 Environment, Health and Safety (EHS) 연구팀은 2008년 문헌을 통하여 의약계열 화학 분야에 널리 사용되는 용매들을 대상으로 worker safety, process safety 및 environmental and regulatory consideration 등의 항목을 평가하여 친환경 용매, 사용할 수 있지만 비친환경 용매 및 사용이 권장되지 않는 비친환경 용매의 3 가지 군으로 용매를 나누었다.²

대한약전 제10개정원안 작성 지침³에는 “「유해하여 시험자에 대한 노출이 우려되는 시약」, 「유해작용 및 잔류성 등으로 환경에 부하가 큰 시약」 등에 대하여는 사용을 피하거나 사용량을 최소한으로 한다.”라고 기재되어 있다.

그러나 국가공정서인 대한민국약전의약품 기준⁴과 대한민국약전⁵에는 여전히 이러한 유해시약을 사용하는 많은 시험법이 수재되어 있으며, 이들은 각 품목을 생산하는 제조업소의 품질관리과정에서 사용되고 있다. 이러한 현 제약분야 의약품 품질관리 시험법은 인체·환경 유해 시약 및 유기용매들이 다양하게 사용되어, 이로 인한 환경오염, 잔류용매로 인한 독성문제, 폐용매 처리 문제 등의 많은 문제점을 안고 있다. 제약산업의 각 공정은 막대한 재원과 장기간의 시간을 요하며 화학물질의 사용량이 많고, 유해물질 배출도 많다. 특히 1,4-dioxane 등의 유해시약 및 독성 유기용매의 사용이 많은 의약품 품질관리 측면에서의 그린기술 적용이 시급하다. 따라서 국가적 차원에서 그린시험법을 적용한 의약품 품질관리법을 확립하기 위한 노력을 기울여야 하고, 이에 대한 일환으로 의약품 공정서에 수재된 시험법 중 인체·환경 유해 시약 대체 시험법 개발과 의약품 다빈도 사용품목 시험에서 유기용매 양을 최소화하는 시험법 확립이 선행되어야 한다.

디페메린(α -Hydroxy- α -phenylbenzeneacetic acid 2-(dimethylamino)-2-methyl propyl ester hydrochloride)⁶은 프랑스 Laboratories UPSA에서 개발한 진경진통제로서 부작용이 적고 심박동수 및 혈압에 영향을 미치

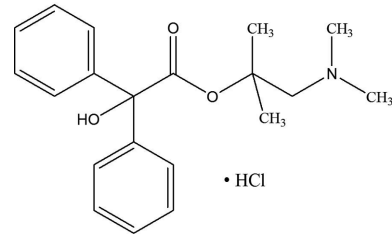


Fig. 1. Chemical structure of difemerine hydrochloride.

지 않으며 다른 제제에 비해서 내약성, 안전성이 높다 (Fig. 1). 디페메린은 항콜린제로서 내장평활근에 대해 아세틸콜린작용을 상경적으로 차단하여 진경효과를 나타낸다. 이러한 약리효과로 인해 위장관질환, 직장질환, 남낭 및 췌장질환, 뇨로질환, 산부인과질환, 소화기계 및 비뇨기계의 기기 방사능 진단검사에 사용된다.^{7,8} 흰색의 결정성 가루로 냄새는 없고 맛은 약간 쓰다. 그리고 물, 에탄올 또는 클로로포름에 잘 녹고 이소프로판올에는 조금 녹는다. 이 약의 수용액의 pH는 4.0~5.0이다.

본 연구의 목적은 ‘대한약전의약품등 기준’에서 유해시약을 사용하는 정량법으로 수재되어 있는 디페메린염산염에 대하여 보다 안전하고 효율적인 대체 시험법을 개발하는 것이다. 대한민국약전의약품기준에는 디페메린염산염의 정량법으로 수은을 사용한 비수적정법이 수재되어 있다. 본 연구에서는 디페메린염산염에 대하여 보다 안전하고 효율적인 친환경용매를 사용하는 정량법을 확립하고, KFDA의 밸리데이션 프로토콜^{9,10}에 준하여 분석법 검증과정을 실시하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 시료

분석에 사용되는 디페메린염산염 표준품은 경동제약(주)에서 제공 받았다. 전처리 및 실험에 필요한 아세트산, 아세트산탈수물, 에탄올, 수산화나트륨, 염산, 수산화나트륨은 덕산약품공업(주)에서 구입하여 사용하였다. 아세트산제이수은은 Alfa Aesar사 (Heysham, England)에서 구입하여 사용하였고, 표정에 필요한 설파민산과 프탈산수소칼륨은 대정화학에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 기기 및 측정 조건

전위차적정기는 Mettler Toledo T50 Automatic Titrator (Greifensee, Switzerland)를 사용하였다. 전극은 Mettler Toledo의 DGi-115, DGi-113 (Greifensee, Switzerland), 프

로그랩은 LabX Pro Titration ver3.1(Mettler Toledo AG 2009)을 사용하였다. 대한민국약전외의약품기준 시험법에서 디페메린염산염은 0.1 mol/L 과염소산으로 적정하였고, 개선된 시험법에서의 디페메린염산염은 0.1 mol/L 수산화나트륨으로 적정하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 용액 제조

아세트산수은(II)시액은 아세트산수은(II) 5 g에 아세트산을 넣어 녹여 100 mL로 한 용액을 사용하였다. 0.01 mol/L 염산시액은 염산 0.236 mL에 물을 넣어 100 mL로 한 용액을 사용하였다. 0.1 mol/L 과염소산은 과염소산 8.7 mL를 아세트산 1000 mL중에 약 20로 유지하면서 천천히 넣어 만든 후 24 시간 방치한 용액을 프탈산수소칼륨용액으로 표정한 용액을 사용하였다. 프탈산수소칼륨용액은 프탈산수소칼륨을 105 °C에서 4 시간 건조 후 데시케이터에서 방냉한 후, 0.1 g을 달아 아세트산 80 mL에 녹여서 만들었다. 0.1 mol/L 수산화나트륨시액은 수산화나트륨 4.5 g을 달아 1 물 950 mL를 넣어 녹여 제조 한 용액을 1,000 mL로 한 용액을 설펜산용액으로 표정한 용액을 사용하였다. 설펜산용액은 설펜산을 데시케이터(감압, 실리카겔)에서 48 시간 건조하고 0.1 g을 물 25 mL를 넣어 녹여서 사용하였다.

2.3.2. 대한민국약전외의약품기준 시험법

디페메린염산염 0.2 g을 정밀하게 달아 아세트산 30 mL, 아세트산탄수물 20 mL를 넣어 녹였다. 여기에 아세트산제이수은시액 5 mL를 넣은 다음 0.1 mol/L 과염소산시액으로 적정(Fig. 2)하였다(적정종말점검출법 중 전위차적정법). 정량시에는 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$0.1 \text{ mol/L 과염소산 } 1 \text{ mL} = 36.388 \text{ mg } \text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_3\cdot\text{HCl}$$

2.3.3. 개선된 시험법

디페메린염산염 0.2 g을 정밀하게 달아 에탄올 50 mL와 0.01 mol/L 염산시액 5 mL에 녹여 0.1 mol/L 수산화나트륨시액으로 적정하여 제 1 당량점과 제 2 당량점 사이에 해당하는 부피를 측정(Fig. 3)하여 정량하였다(적정종말점검출법 중 전위차적정법). 정량시에는 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$0.1 \text{ mol/L 수산화나트륨시액 } 1 \text{ mL} \\ = 36.388 \text{ mg } \text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$$

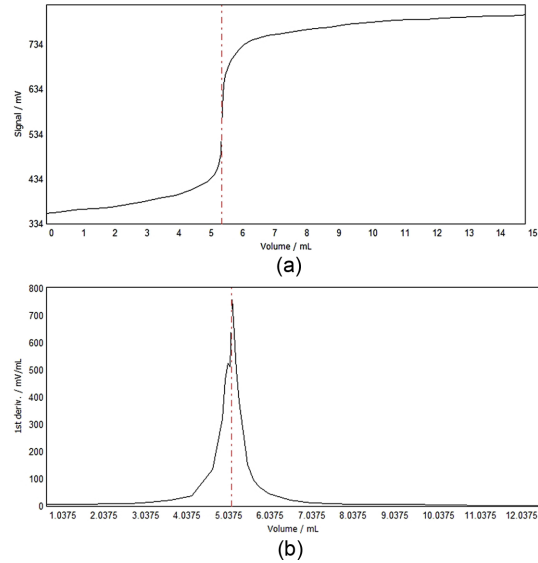


Fig. 2. Potentiometric titration curves of difemerine hydrochloride in Korean Pharmaceutical Codex method. (a) normal titration curve, (b) first derivative titration curve.

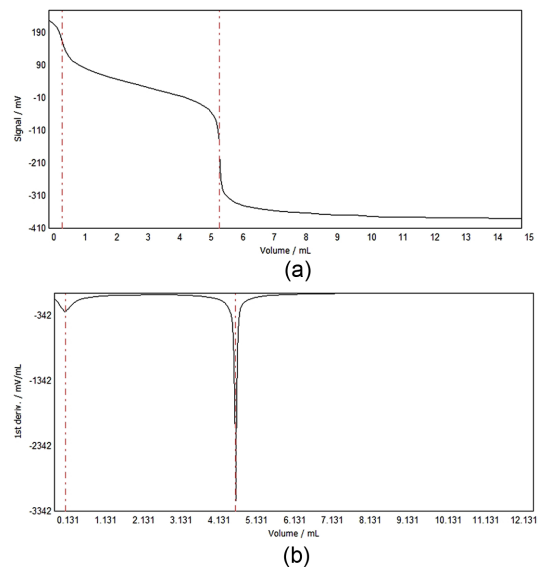


Fig. 3. Potentiometric titration curves of difemerine hydrochloride in alternative method. (a) normal titration curve, (b) first derivative titration curve.

2.3.4. 분석법의 검증

개선된 시험법의 경우 160, 180, 200, 220, 240 mg에서 정량값을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 검량선의 상관계수(Coefficient of correlation, r)를 구하였

다. 회수율을 검토하기 위해 디페메린염산염의 80, 100, 120% (저, 중, 고농도)의 디페메린염산염을 분석하였다. 저, 중, 고농도에서 5회 반복하여 시험을 수행하여 함량평균과 상대표준편차를 구하였다.

2.3.5. 기존 대한민국약전외의약품기준 정량법과 개선한 정량법의 비교

기존 대한민국약전외의약품기준의 디페메린염산염 정량법과 본 연구에서 수행한 대체시험법을 비교하기 위하여 t-검정을 이용하였다. 200 mg의 디페메린염산염을 50 mL의 아세트산/아세트산탈수물(3:2 v/v)용액에 녹인 것을 0.1 mol/L 과염소산시액으로 적정한 방법(대한민국약전외의약품기준)과 에탄올 50 mL와 0.01 mol/L 염산시액 5 mL에 녹인 용액을 0.1 mol/L 수산화나트륨시액으로 적정한 방법(대체시험법)을 비교했고, 두 시험법의 종말점은 전위차적정법으로 측정하였다. 두 적정법간 등가성의 통계학적 분석은 F-검정과 t-검정에 의해 얻을 수 있었고, 유의수준은 0.05로 정하였다. 분석 프로그램은 Microsoft®Excel version 2010 (Microsoft, Redmond, USA)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

디페메린염산염은 대한민국약전외의약품기준에서 수산화합물을 사용하는 정량법으로 수제된 품목이다. 이러한 유해시약에 대한 유해성 및 안전성에 대한 염려가 증가되므로 보다 안전하고 효율적인 대체 시험법을 개발하고자 하였다. 이 실험의 목적은 개선된 디페메린염산염 함량 시험법이 재현성 있게 유의미한 결과를 나타내는지 확인하기 위한 밸리데이션에 있다. 대한민국약전외의약품기준에 수록된 약물의 분석방법은 보통 현재 생산중인 약물에 대한 분석방법이기 때문에 간단하고 값싸면서 완전성있는 시험 방법이 좋다. 유해시약을 대체하기 위한 시험방법으로 전처리과정에서 수운을 제외하고 용매로 에탄올을 사용하고 수산화나트륨

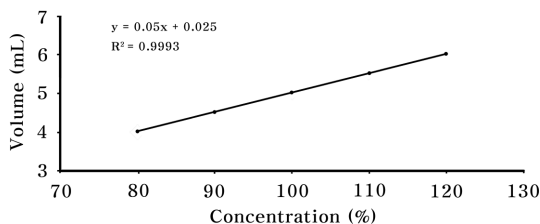


Fig. 4. Calibration curve of difemerine hydrochloride.

으로 적정하는 중화적정법을 사용하였다.

3.1. 직선성

160, 180, 200, 220, 240 mg으로 함량을 다르게 한 디페메린염산염 표준용액을 전위차적정기로 분석하여 검량선을 작성하였다(Fig. 4). 검량선의 상관계수(r)는 0.999 이상으로 높은 직선성을 보였다.

3.2. 정밀성 정확성

디페메린염산염 함량의 80, 100, 120% 해당량의 디페메린염산염을 사용하여 정밀성과 정확성을 측정하였다. 이 실험은 5회 반복하여 실시하였고, 정밀성은 상대표준편차(%RSD)로 표현했고 정확성은 퍼센트로 표현되었다. 실험 결과 정밀성은 0.37~0.64%, 정확성은 99.10~99.71%로 나타났다(Table 1).

3.3. 대체시험법에 의한 디페메린염산염 원료의 정량

디페메린염산염 원료 200 mg을 개발한 대체시험법으로 함량을 측정하였다. 6회 반복하여 실시한 결과 평균값은 99.14%, RSD는 0.58%로 나타났다(Table 2).

3.4. 대한민국약전외의약품기준에 의한 디페메린염산염 원료의 정량

디페메린염산염 원료 200 mg을 기존 대한민국약전

Table 1. Precision and Accuracy result of difemerine hydrochloride (n = 5)

Nominal Conc. (%)	Found Conc. (%)	Precision RSD (%)	Accuracy (%)
80	79.76	0.37	99.71
100	99.10	0.64	99.10
120	119.30	0.42	99.42

Table 2. Assay of difemerine hydrochloride in alternative method

Sample No.	Weight (g)	Contents (%)
1	0.2011	99.19
2	0.1995	99.25
3	0.2016	99.34
4	0.1998	98.03
5	0.2002	99.71
6	0.2014	99.31
Mean		99.14
RSD (%)		0.58

Table 3. Assay of difemerine hydrochloride in Korean Pharmaceutical Codex method

Sample No.	Weight (g)	Contents (%)
1	0.2005	99.94
2	0.2001	99.06
3	0.2001	98.70
4	0.1994	100.67
5	0.2012	98.99
6	0.2010	99.90
Mean		99.54
RSD(%)		0.75

Table 4. Korean Pharmaceutical Codex method and alternative method statistical t-test results for difemerine hydrochloride

Methods	Difemerine hydrochloride content (%)	RSD (%)	t-test	p-value
Korean Pharmaceutical Codex method	99.54	0.75	-1.05	0.32
Alternative method	99.14	0.58		

외의약품기준 방법으로 함량을 측정하였다. 6회 반복하여 실시한 결과 평균값은 99.54%, RSD는 0.75%로 나타났다(Table 3).

3.5. 기존 대한민국약전외의약품기준 정량법과 개선한 정량법의 비교(t-검정)

디페메린염산염 원료 200 mg을 대상으로 함량을 측정 후 기존 대한민국약전외의약품기준 방법과 개발한 방법간의 통계적 유의성을 검정하기 위하여 t-검정을 이용하였다. 먼저 두 시험법간에 유의한 차이가 있는지를 판정하기 위해 분산에 대한 두 집단에 대해 F-검정을 시행 한 후, t-검정을 시행했다. F-검정 결과, p 값은 0.29로 나타나 유의수준을 고려하였을 때 두 시험법간의 분산에는 차이가 없는 것으로 확인되었다. t-검정을 실시한 결과에서도 p 값은 0.32로 나타나 유의수준을 고려하였을 때 두 시험법간의 함량에는 통계학적 차이는 없었다(Table 4).

결 론

본 연구에서는 유해시약인 수은을 사용하는 대한민국약전외의약품등기준에 수재된 디페메린염산염의 정량법에 대하여 대체시험법을 개발하고, 분석법을 검증

하였다. 직선성 실험에서는 회귀방정식 $y=0.05x+0.025$, 상관계수(r)가 0.9993을 나타내었다. 디페메린염산염을 80, 100, 120%의 각 농도별로 5회 반복 실험하여 재현성을 측정한 결과 99.10~99.71%의 정확도와 2.0% 이하의 정밀도를 나타내었다. 대한민국약전외의약품등기준의 시험법과 개선된 시험법간의 t-검정을 수행한 결과 두 시험법이 유의한 차이가 없었다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 디페메린염산염 원료의 함량을 분석하기 위한 공정 시험법으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발과제의 연구개발비 지원(13172의약안216)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Reference

1. ICH Guideline. Q3C(R4) : Impurities : Guideline for residual solvents Q3C(R4) in ICH harmonised tripartite guideline (2009).
2. K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn, T. Fevig, S. Jennings, T. A. Johnson, H. P. Kleine, C. Knight, M. A. Nagy, D. A. Perry and M. Stefaniak, *Green Chem.*, **10**, 31-36 (2008).
3. Ministry of Food and Drug Safety, 11-1470000-002440-01, **56**, 2, Republic of Korea (2011).
4. Ministry of Food and Drug Safety No. 2012-142, Republic of Korea (2012).
5. Ministry of Food and Drug Safety, No. 2012-129, 1368, Republic of Korea (2012).
6. S. Buduari, Merck index 13th ed., Merck & Co., Inc (2001).
7. Difemerine HCl, http://www.health.kr/drug_info/base-drug/list.asp, Assessed 18 Jul (2014).
8. JEF. Reynolds, Martindale the extra pharmacopoeia 13th Ed., Pharmaceutical press (1993).
9. Ministry of Food and Drug Safety No. 2009-173, Republic of Korea (2009).
10. Ministry of Food and Drug Safety No. C0-2012-2-005, Republic of Korea (2012).