[UCI]I804:24011-200000232694

Collection @ chosun

2006年 2月

碩士學位論文

HPLC를 이용한 경구용 당뇨병 치료제의 신속한 동시분석

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 醫 藥 學 科

金 志 姸

Collection @ chosun

HPLC를 이용한 경구용 당뇨병 치료제의 신속한 동시분석

Rapid simultaneous analysis of oral anti-diabetic drugs by HPLC

2006 年 2 月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 醫 藥 學 科

金 志 姸

Collection @ chosun

HPLC를 이용한 경구용 당뇨병 치료제의 신속한 동시분석

指導敎授　李　元　宰

이 論文을 食品醫藥學 碩士學位申請 論文으로

提出함

2005 年　10 月　　日

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

食 品 醫 藥 學

金　志　姸

Collection @ chosun

金志姸의 碩士學位論文을 認准함

委員長	朝鮮大學校 敎 授	白 采 善	印
委 員	서울食藥廳 課 長	姜 讚 淳	印
委 員	朝鮮大學校 敎 授	洪 俊 憙	印
委 員	朝鮮大學校 敎 授	李 元 宰	印

2005 年 11 月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

Collection @ chosun

目　　次

Abstract

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 실험방법 ····· 7

2.1. 시료 및 시약 ····· 7

2.2. 실험기기 ····· 7

Ⅲ. 실험결과 및 고찰 ····· 8

3.1. 당뇨병 치료제의 초기 분석조건의 접근 ····· 8

3.2. 12종 당뇨병 치료제의 동시분석법 확립 ····· 13

3.3. 동시분석법에서의 문제점 ····· 16

Ⅳ. 결론 ····· 31

Ⅴ. 참고문헌 ····· 32

Collection @ chosun

表 目 次

표 1 당뇨병 진단 수치 ····· 3

표 2 당뇨병의 분류 및 주된 특징 비교 ····· 3

표 3 현재 우리나라에 유통되고 있는 당뇨병 치료제 종류 ····· 4

표 4 기울기용리 조건을 사용한 분석조건Ⅰ ····· 7

표 5 기울기용리 조건을 사용한 분석조건Ⅱ ····· 12

표 6 기울기용리 조건을 사용한 분석조건Ⅲ ····· 13

표 7 혼합수용액의 조성변화에 따른 Metformin의 머무름시간 Ⅰ ····· 17

표 8 혼합수용액의 조성변화에 따른 Metformin의 머무름시간 Ⅱ ····· 20

표 9 혼합수용액의 조성변화에 따른 Glibenclimide와 Nateglinide의 머무름시간 ····· 25

표 10 이동상의 혼합비율에 따른 4성분 용리순서 및 머무름시간 ····· 29

Collection @ chosun

圖 目 次

그림 1 당뇨병 치료제 성분들의 구조식 ····· 6

그림 2 당뇨병치료제 6종의 초기 동시분석 크로마토그램 ····· 8

그림 3 용매비율에 따른 Chlorpropamide와 Glipizide의 크로마토그램 · 9

그림 4 6종 표준품의 동시분석 크로마토그램 ····· 10

그림 5 기울기용리 조건을 사용한 분석조건 I 에서의 크로마토그램 ··· 11

그림 6 기울기용리 조건을 사용한 분석조건 II 에서의 크로마토그램 ··· 12

그림 7 12종 표준품의 동시분석 크로마토그램 ····· 14

그림 8 Group1 표준품의 동시분석 크로마토그램 ····· 15

그림 9 Group2 표준품의 동시분석 크로마토그램 ····· 15

그림 10 Metformin 표준품의 크로마토그램과 PDA 스펙트럼 ····· 17

그림 11 Metformin 주입량에 따른 side피크 변화를 나타내는 크로마토그램 ····· 18

그림 12 12종 혼합액과 말레인산의 크로마토그램 비교 ····· 19

그림 13 0.01M KH_2PO_4 에서 Metformin 분석과 용매별 UV-VIS 스펙트럼 ····· 21

Collection @ chosun

그림 14 0.01M KH_2PO_4 에서 Metformin의 크로마토그램 ····· 21

그림 15 12종 혼합액과 Tolbutamide 및 Glipizide의 크로마토그램 ···· 23

그림 16 좋은 분리능을 나타내는 Tolbutamide 와 Glipizide의 혼합 표준액의 크로마토그램 ····· 24

그림 17 12종 혼합액과 Glibenclimide 및 Nateglinide의 개별 크로마토그램 ····· 26

그림 18 좋은 분리능을 나타내는 Glibenclimide 및 Nateglinide의 혼합 표준액의 크로마토그램 ····· 27

그림 19 12종 혼합액의 7분에서 22분까지의 크로마토그램 ····· 29

그림 20 이동상의 혼합비율에 따른 4성분의 크로마토그램 ····· 30

Collection @ chosun

ABSTRACT

Rapid simultaneous analysis of oral anti-diabetic drugs by HPLC

Jiyeon Kim
Advisor : Prof. Wonjae Lee, Ph. D.
Department of Food and Pharmacy,
Graduate School of Chosun University

The rapid simultaneous analysis was described of oral anti-diabetic drugs such as Metformin, Rosiglitazone malate, Pioglitazone, Chlorpropamide, Tolbutamide, Repaglinide, Glipizide, Gliclazide, Glibenclamide, Nateglinide, Glimepiride and Gliquidone by HPLC.

These drugs were gradiently analyzed on a reverse phase column C_{18} capcellpak(4.6 x 150 mm I.D) with mobile phases system of acetonitrile and 5mM Pic B_6(1-hexansulfonate Na) containing 0.1% phosphoric acid at a flow rate of 1 ml/min and UV 210nm detection.

The problems caused by proposed simultaneous analysis are 1) appearance of Metformin peak at a front of solvent peak due to its short retention time, 2) overlapping of peaks of Tolbutamide and Glipizide, 3) low separation of Glibenclimide and Nateglinide, respectively.

In order to solve the problem Therefore, the optimal analysis method using some isocratic conditions was developed.

This developed method is expected to be used for the rapid analysis of oral anti-diabetic drugs and monitoring the related illegal drugs.

Collection @ chosun

Ⅰ. 서 론

당뇨병(Diabetes Mellatus; DM)이란 인슐린 량(量)의 부족으로 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환이다. 췌장의 랑게르한스섬의 β세포에서 분비되는 인슐린의 부족, 뇌하수체전엽 · 부신(副腎) · 갑상선 등의 내분비선 기능항진(機能亢進), 중추신경 특히 시상하부(視床下部)의 병변 등을 들 수 있는데, 이들 인자(因子)가 합쳐져서 발병한다.

병인(病因)으로는 유전적 소인(素因)이 중요하며, 특히 소아나 나이 어린 환자의 경우에는 대부분이 유전과 관계가 있다고 볼 수 있다. 식생활도 발병과 밀접한 관계가 있다. 이것은 제2차 세계대전 중에 식량사정이 좋지 않았을 때 당뇨병의 발병이 적었던 것으로도 알 수 있지만, 총칼로리 · 고단백 · 고지방식이 관계하는 것으로 보고 있다. 더욱이 환자의 1/3에서 반수 가까이가 비만증이라는 점에서 비만과의 관계가 주목되고 있다.

한편, 젊은층의 당뇨병 환자 중에는 야윈 사람이 많고, 중년 이후의 비만자의 당뇨병이 체중의 조절만으로 가볍게 낫는 점으로 미루어 비만의 병인적 의의에 대해서는 의론의 여지가 있으며, 일부 학자는 반대로 당뇨병이 비만의 원인이라고 보고 있다. 임신을 계기로 발병하는 경우도 있어 임신도 어떤 메커니즘에 의하여 당뇨병을 일으키는 한 인자가 되는 것으로 보고 있다.
발병하는 연령은 대부분이 중년 이후로서 특히 40~60대에 많다. 발생빈도는 연령이 증가함에 따라 발병률이 커지고, 여성보다 남성에게 많으며, 육체 노동자보다 정신 노동자에게 많다.

Collection @ chosun

이러한 당뇨병은 다음 표1과 같이 공복시 혈장glucose의 농도를 측정함으로써 진단되어진다. 또한 당뇨병은 발병인자 · 역학적 특징 등 두드러진 두 가지 형태로 나누어지기 때문에 Type1, Type2로 분류되며 이들을 간략히 비교해 보면 표2와 같다. 당뇨병의 치료는 식사요법과 운동으로 시작이 되며 이 두가지로 혈당조절이 안될 때 약물요법을 사용한다.

현재까지 사용되고 있는 당뇨병 치료제는 그들의 화학구조에 따라 표3과 같이 분류할 수 있으며 이들 각각 체내의 기전이 다르기 때문에 적응증에 따라 선택하여 사용하여야 한다.

Collection @ chosun

단계	공복시 혈장 glucose	Random glucose	OGTT
당뇨	126 <	200 <	200 < 2hr
손상	110 < and <126		140 < 2hr < 200
정상	< 110		2hr <140

표1. 당뇨병 진단 수치 (단위는 mg/dL)

분 류	Type1	Type2
명 명	인슐린 의존성 당뇨 (Insulin Dependent MD ; IDDM)	인슐린 비의존성 당뇨 (Non Insulin Dependent MD ; NIDDM)
발병시기	소아	성인
원 인	췌장의 beta-cell의 파괴로 인해 절대적 인슐린 부족	인슐린 저항성에 기인한 상대적 인슐린 부족
위험인자	유전적 소인, 환경적 인자(바이러스, 화학약품 등), 자가면역 반응	비만, 고혈압, 4kg이상의 아이 출산
외 형	마른 체형, 체중 감소	비만 체형
검 진	건강한 성인에 대한 screening 불필요	45세 이상의 모든 성인에 대한 screening 필요(정상의 경우 3년 마다 재검사)
3대 증상	다음(polyphagia), 다뇨(polyuria), 다갈(polydipsia)	
주된 합병증	신장병, 망막증, 신경염	
치 료	식이요법, 운동, 약물요법	

표2. 당뇨병의 분류 및 주된 특징 비교

Collection @ chosun

분류	기전	성분명	적용대상	복용법	부작용
Insulin 제제 (주사제)	체내 인슐린과 동일한 기능	Insulin	Type1DM	식사량에 따라 조절	Dawn현상 · Somogy현상
Sulfonylurea 계	베타-셀 자극으로 인슐린분비 촉진	Chloropropamide Glipizide Gliclazide Glyburide (Glibenclamide) Glimepiride Gliqudione	Type2DM	아침식사 30분전 복용	저혈당
		Tolbutamide	심혈관계 부작용으로 인해 사용금지		
Meglitinide	베타-셀 자극으로 인슐린분비 촉진	Repaglinide	Type2DM 중 불규칙한 식사습관인 환자	식사 바로 전 복용	비교적 적은 저혈당
Nateglinide	베타-셀 자극으로 인슐린분비 촉진	Nateglinide	Type2DM 중 불규칙한 식사습관인 환자	식사 바로 전 복용	비교적 적은 저혈당
Biguanide	인슐린에 대한 몸의 감수성 증대	Metformine	Type2DM 중 비만인 환자	식사 직후 투여	설사, 오심, 구토, 산혈증
Thiazolidione	인슐린의 저항성 개선	Rosiglitazone Pioglitazone	Type2DM 환자 중 인슐린 투여환자	식사와 관계없이 투여	간독성, 부종, 빈혈
Alpha-Glucos Inhibitor	당이 포도당으로 분해하는 효소의 작용 억제	Acarbose Voglibose	Type2DM	식사와 함께 투여	방귀, 더부룩

표3. 현재 우리나라에 유통되고 있는 당뇨병 치료제 종류

Collection @ chosun

당뇨병은 3500년의 긴 역사를 가진 병이지만, 당뇨병을 치료할 수 있는 인슐린이 발견된 것은 80년 전에 불과하다. 1926년 인슐린의 결정체가 분리된 이후로 과학기술의 급격한 발달로 합성 화학물질이 개발되기 시작하였고, 앞서 기술하였듯이 현재는 14개의 성분이 경구용 당뇨병 치료제로서 존재한다.

이들 성분들은 단일성분이 아닌 여러 첨가제들과 또는 다른 활성성분과 함께 하나의 제제를 이루어 상업적으로 판매되고 있다. 여러 첨가제들로부터 또는 다른 활성성분으로부터 이들 성분을 분석해 내야지만 정확한 용량으로 부작용을 줄이면서 치료효과를 극대화 할 수 있다.

또한 위조(가짜) 의약품으로 조제되어 판매되는 부정의약품의 유통을 차단하기 위하여 이들 성분 각각의 분석법뿐 만 아니라 여러 성분을 효과적으로 동시에 분석하는 동시분석법 또한 개발되어야 한다.

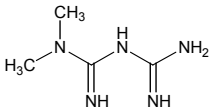
현재 [Ref1~13] 각각의 성분에 대하여는 분석법이 확립되어 있고, HPLC를 이용하여 [Ref14] 7종(Chlorpropamide, Glipizide, Tolbutamide, Gliclazide, Glimepiride, Glibenclamide, Gliquidone)의 당뇨병 치료제를 동시분석 할 수 있는 분석법이 개발되어 있으나 이는 마지막으로 용출되어 나오는 성분인 Gliquidone의 용출시간이 55분을 넘을 뿐 아니라 기준선이 불안정하고 현재 시판되는 모든 당뇨병 치료제의 성분을 동시분석 하지 못한다는 한계를 지니고 있다.

모든 성분을 동시에 분석할 수 없다면 부정의약품을 스캐닝 하는데는 많은 시간과 노력이 필요하므로, 보다 효율적으로 현재까지 개발된 활성성분을 모두 동시에 분석할 수 있는 분석법이 필요하다.

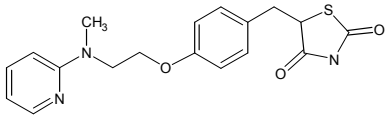
이에 본 연구에서는 당뇨병치료제로서의 활성성분인 12종(시판되는 당뇨병 치료제의 성분 14종에서 당류 2종을 제외한 것임)의 표준품을 동시에 분석할 수 있는 동시분석법 개발을 하고자 하였다.

다음의 그림은 본 연구에서 사용한 당뇨병치료제의 성분 별 화학구조 및 칼럼내 머무름시간을 나타낸 것이다.

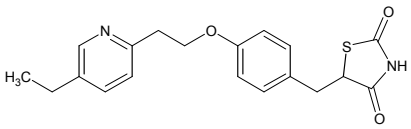
Collection @ chosun



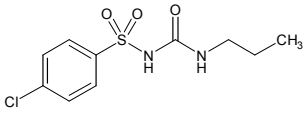
1. Metformin



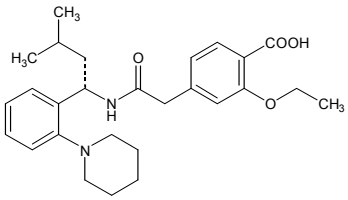
2. Rosiglitazone



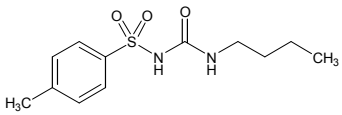
3. Pioglitazone



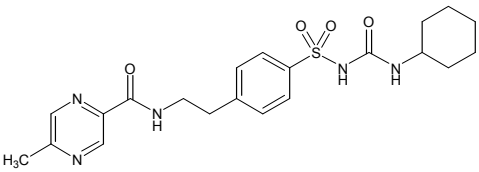
4. Chlorpropamide



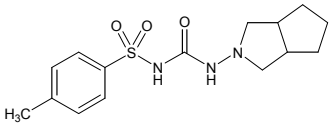
5. Repaglinide



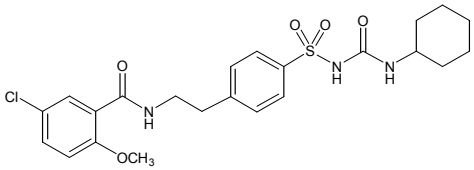
6. Tolbutamide



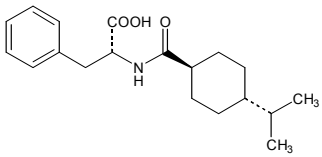
7. Glipizide



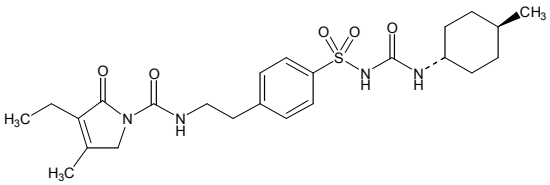
8. Gliclazide



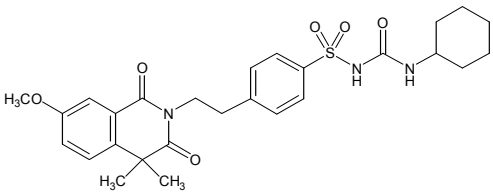
9. Glibenclamide



10. Nateglinide



11. Glimepiride



12. Gliquidone

그림1. 당뇨병 치료제 성분들의 구조식

Collection @ chosun

Ⅱ. 실험방법

2.1. 시료 및 시약

사용된 당뇨병치료제의 성분 12종은 식품의약품안전청 표준품센타의 표준품을, 모든 용매는 HPLC급을 그 외에 모든 시약은 시약급을 사용하였다. Metformin, Rosiglitazone malate, Pioglitazone, Chlorpropamide, Tolbutamide, Repaglinide, Glipizide, Gliclazide, Glibenclamide, Nateglinide,. Glimepiride, Gliquidone (식품의약품안전청 표준품센터의 표준품), 아세토니트릴 (Merck Co.), 메탄올(Merck. Co.), 인산 (Wako Chemical Co.), 1-헥산설폰산나트륨염 용액 (Pic B_6, Fluka), 빙초산(Junsei Chemical Co.).

2.2. 실험기기

본 연구는 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. 우선 초기 스크리닝 단계에서 6종(Chlorpropamide, Glipizide, Glibenclamide, Glimepiride, Gliquidone, Glyclazide 등)의 당뇨병 치료제 성분을 분석하기 위하여 Waters model 510 Pump, Auto Sampler, UV-Vis Detector, C_{18} Column(4.6 x 150 mm I.D, Capcellpak, Shiseido, Japan)의 기기를 이용하였으며, 최종적인 분석법 확립하고자 12종(상기 6종에 Metformin, Rosiglitazone, Pioglitazone, Tolbutamide, Repaglinide 추가)의 당뇨병 치료제의 분석을 위하여는 Waters 2690 separation module series, Photodiode Array Detector Waters 996 및 UV-Vis Detector, C_{18}(4.6 x 150 mm I.D, Capcellpak, Shiseido, Japan)의 기기를 이용하였다.

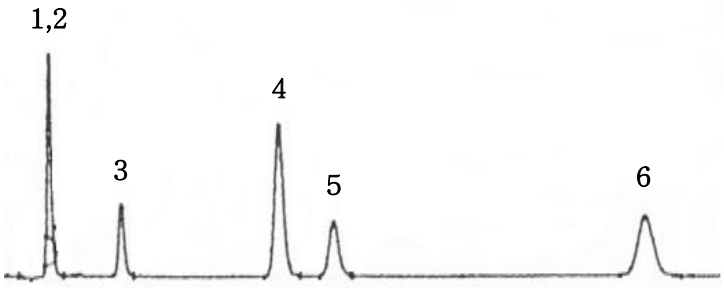
Collection @ chosun

Ⅲ. 실험결과 및 고찰

3.1. 당뇨병 치료제의 초기 분석조건의 접근

손쉽게 구할 수 있는 당뇨병 치료제 성분(Chlorpropamide, Glipizide, Glibenclamide, Glimepiride, Gliquidone, Glyclazide등) 6종을 메탄올에 녹여 약 50mg/mL 각각의 농도로 표준액을 만들어 먼저 액체크로마토그래피법에 따라 적당한 동시분석 분석조건을 찾고자 하였다.

이동상은 의약품의 정성 또는 정량분석에 많이 사용하는 0.1% 인산을 함유하는 5mM Pic B_6(1-헥산설폰산나트륨염) 용액을 수용매로 사용하였으며 유기용매는 아세토니트릴을 선택하였다. 칼럼은 C_{18}고정상이 충진 된 소수성 칼럼(150 x 4.6 mm I.D)으로 분리하고자 하였으며, 검출기로는 UV 210nm를 사용하여 10㎕를 유속 1.0mL/min의 조건으로 분석하였다.



[6종의 성분]

1. Chloropropamide* 4.12
2. Glipizide 4.44
3. Gliclazide 7.15
4. Glibenclamide 13.18
5. Glimepiride 15.26
6. Gliquidone 27.15

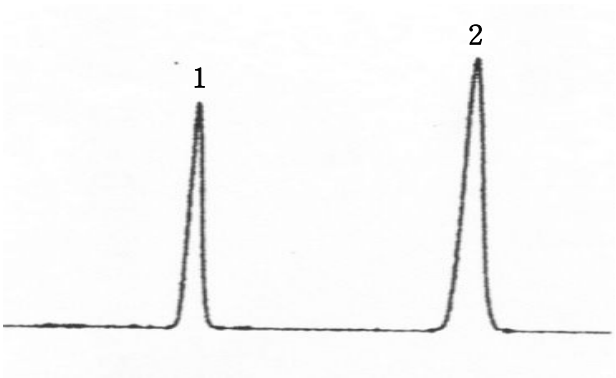
그림2. 당뇨병치료제 6종의 초기 동시분석 크로마토그램

- Mobile phase: 단일조건(Isocratic condition) 45% 아세토니트릴/0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6(v/v), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚, * 머무름시간

dCollection @ chosun

이러한 조건에서 분석하였을 때, 그림2와 같이 Chlorpropamide와 Glipizide의 두 피크는 서로 겹치어 나타났으나, 나머지 성분들은 대체적으로 양호하게 분리되었다. 이 과정에서 각 성분들의 칼럼에서 용리되는 순서는 개별 표준액의 칼럼내 머무름시간을 비교하여 알 수 있었다.
따라서 겹침이 일어나는 두 성분의 완전한 분리를 위하여 유기용매의 농도를 30%로 줄여서 분리하고자 하였더니 두 성분이 완전히 분리되는 그림3의 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

그러나 이러한 조건은 두 성분의 칼럼내 머무름시간이 너무 길어 동시분석에서는 적절하지 않을 것으로 판단되어 기준선 분리가 되는 유기용매의 최적의 농도를 찾고자 40% 및 35%의 유기용매를 사용하여 크로마토그램을 비교하였다. 35%의 유기용매를 사용하였을 때 두 성분의 가장 적절한 기준선 분리된 크로마토그램을 얻을 수 있었기에 동시분석에서 최적의 이동상 농도로 결정할 수 있었다.



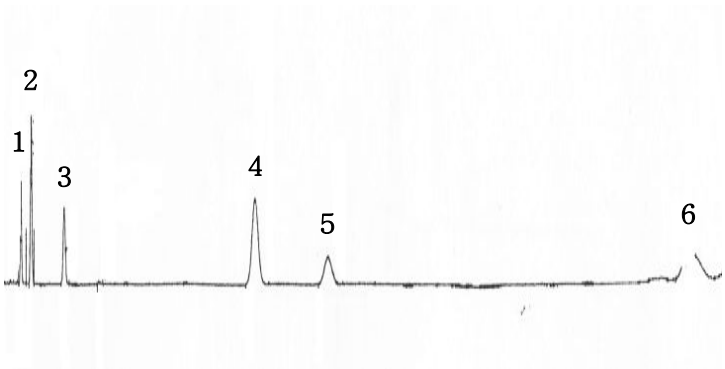
[2종의 성분]

1. Chlorpropamide

2. Glipizide

그림3. 용매비율에 따른 Chlorpropamide와 Glipizide을 분리한 크로마토그램
- Mobile phase: 단일조건(Isocratic condition) 35% 아세토니트릴/0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6(v/v), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚.

Collection @ chosun



[6종의 성분]

1. Chloropropamide* 5.28
2. Glipizide 6.64
3. Gliclazide 10.33
4. Glibenclamide 32.54
5. Glimepiride 41.04
6. Gliquidone 83.95

그림4. 6종 표준품의 동시분석 크로마토그램

- Mobile phase: 단일조건(Isocratic condition) 35% 아세토니트릴/0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6(v/v), Flow rate=1.5㎖/min, UV=210㎚.

그러나 그림4에서 볼 수 있듯이 35% 유기용매의 농도에서는 사용한 6종 성분의 기준선 분리는 완전하게 이루어졌지만 Gliquidone의 칼럼내 머무름시간(83.95 min)이 너무 길어서 단일용리(isocratic) 유기용매의 조건 보다 유기용매의 농도를 점차적으로 증가시키는 기울기용리(gradient) 조건으로 복합성분의 동시분석을 하는 것이 더 효율적일 것으로 판단하였다.

우선 Chloropropamide 와 Glipizid의 완전한 분리를 위하여 초기에서부터 Gliclazide의 머무름 시간까지는 위의 조건을 유지하였으며, 15분 이후의 긴 머무름시간을 줄이기 위하여 분석 시작 후 15분이 경과한 후 유기용매의 농도를 50%로 높여주었고, 분석시간을 단축하기 위하여 이동상의 유속은 1.5mL/min으로 하였으며, 이동상의 변화는 수용매와 유기용매의 조성 변화를 서서히 바뀌도록 하였을 때(Gradient Curve number : 6), 6성분 모두 기준선 분리는 되었지만, 크로마토그램 상에서 초기 머무름시간 동안에는 기준선(Base line)이 불안정하게 나타났다. 따라서 이동상의 조성을 바로 바꾸는 변화를 하였을 때(Gradient Curve number : 11), 15분경에 크로마토그램의 기준

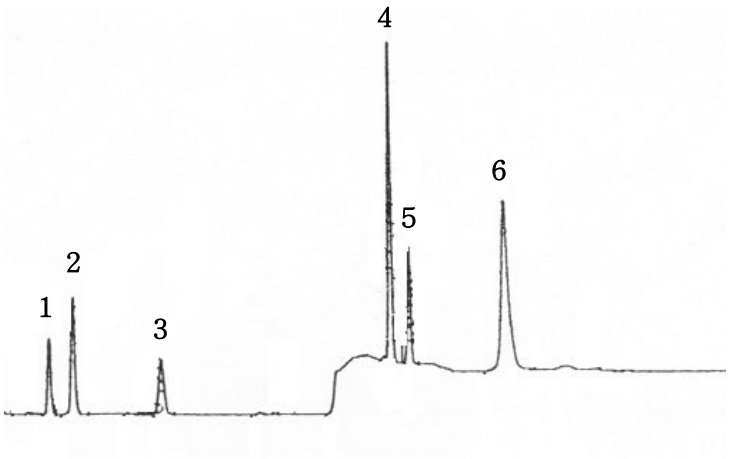
Collection @ chosun

선은 전체적으로 높아졌지만 그림5의 크로마토그램에서 볼 수 있듯이 5.45분의 Chloropropamide부터 26.00분의 Gliquidone 까지 좋은 분리능으로 기준선이 안정된 상태의 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

구분	유기용매*	수용매**	용매조성 변화 방법	유속
초기	35	65		
15분	50	50	Curve No : 11	1.5mL/min
40분	35	65	Curve No : 11	

표4. 기울기용리 조건을 사용한 분석조건 I

- Mobile phase: 기울기조건(Gradient condition), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚. * 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6



[6종의 성분]

1. Chloropropamide* 5.45
2. Glipizide 6.51
3. Gliclazide 10.52
4. Glibenclamide 20.85
5. Glimepiride 21.72
6. Gliquidone 26.00

그림5. 기울기용리 조건을 사용한 분석조건 I 에서의 크로마토그램

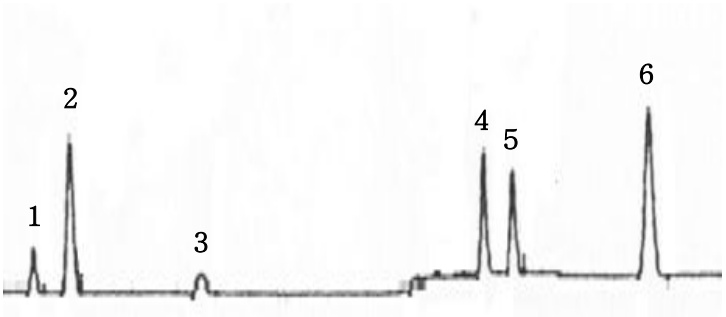
Collection @ chosun

이 과정에서 파장이 분석에 미치는 영향을 알아보기 위하여 검출기의 긴 파장을 선택하고, 이동상의 조성변화를 좀 더 많은 과정을 주어 좋은 분리능과 안정화가 된 Chloropropamide(5.42), Glipizide(6.53), Glyclazide(10.50), Glibenclamide(19.21), Glimepiride(20.09) 및 Gliquidone(24.30)의 순서로 이상적인 분석이 되는 크로마토그램을 그림6과 같이 얻었다.

구분	유기용매*	수용매**	용매조성 변화 방법	유속
초기	35	65	-	
12분	35	65	Curve No : 6	
14분	50	50	Curve No : 6	1.5mL/min
30분	50	50	Curve No : 11	
35분	35	65	Curve No : 6	

표5. 기울기용리 조건을 사용한 분석조건Ⅱ

- Mobile phase: 기울기조건(Gradient condition), Flow rate=1.5㎖/min, UV=254㎚. * 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6



[6종의 성분]

1. Chloropropamide* 5.42
2. Glipizide 6.53
3. Gliclazide 10.50
4. Glibenclamide 19.21
5. Glimepiride 20.09
6. Gliquidone 24.30

그림6. 기울기용리 조건을 사용한 분석조건Ⅱ에서의 크로마토그램

Collection @ chosun

3.2. 12종 당뇨병치료제의 동시분석법 확립

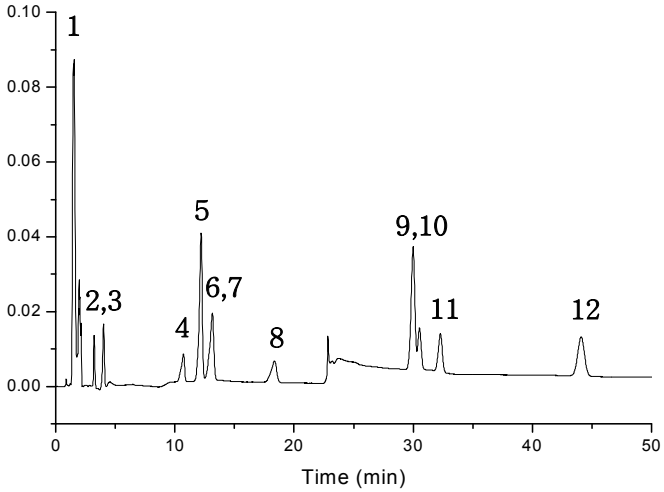
상기 실험결과를 바탕으로 당뇨병 치료제로 사용되고 있는 12종을 분석하고자 그림1의 화학적 구조를 갖는 각각의 표준품을 약 20mg씩 취하여 메탄올로 개별 표준품의 농도를 약 100mg/mL하여 칼럼[C_{18} (4.6 x 150 mm I.D, Capcellpak, shiseido)]이 장착된 HPLC에 주입하였다. 이동상은 앞서 기술한 분석법과 동일하게 유기용매로 아세토니트릴을 사용하고 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B6을 수용매로 사용하였으며 상기 분석조건Ⅱ를 시간별로 좀 더 세분화하여 이들의 농도가 점차적으로 변화되도록 흘려주었으며 마지막으로 용리되어 나오는 성분의 칼럼 내 머무름시간을 1시간 이내로 하고자 표5의 조건으로 분석하였다. 아울러 6종의 성분들을 분리할 때보다 더 up-grade된 기기조건에서 실험하여 그림7의 크로마토그램을 얻었다.

시간	유기용매*	수용매**	용매조성 변화 방법	유속
초기	30	70		
6분	30	70	Curve No : 6	
7분	35	65	Curve No : 6	
20분	35	65	Curve No : 6	1.0mL/min
21분	45	55	Curve No : 6	
50분	45	55	Curve No : 6	
51분	30	70	Curve No : 6	

표6. 기울기용리 조건을 사용한 분석조건Ⅲ

- Mobile phase: 기울기조건(Gradient condition), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚. Column Temperature : 30 °C, * 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6

Collection @ chosun



[12종의 성분]

1. Metformin * 1.53
2. Rosiglitazone 3.17
3. Pioglitazone 4.00
4. Chloropropamide 10.65
5. Repaglinide 12.17
6. Tolbutamide 13.02
7. Glipizide 13.12
8. Gliclazide 18.25
9. Glibenclamide 29.90
10. Nateglinide 30.47
11. Glimepiride 32.22
12. Gliquidone 43.92

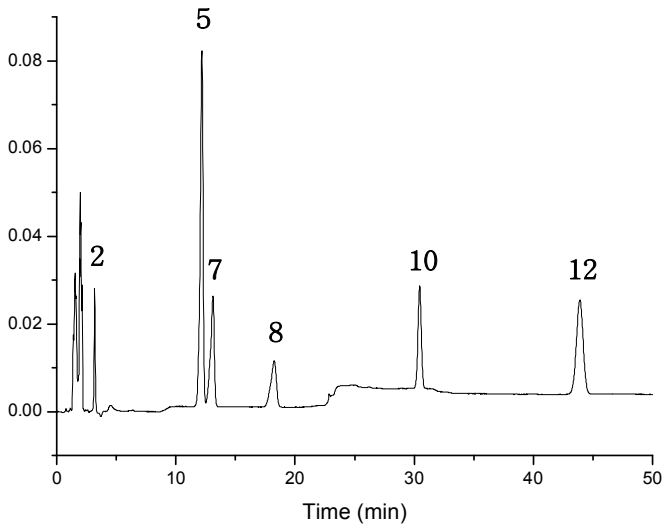
그림7. 12종 표준품의 동시분석 크로마토그램

- 분석조건Ⅲ의 기울기용리 조건, * 칼럼 내 머무름시간

12종 당뇨병 치료제 성분의 동시분석으로 개별 피크가 나타났지만 개별 피크는 완전하게 기준선 분리가 이루어지지 않았다. 이들 성분의 용리순서는 각각의 표준액을 동일한 분석조건으로 실험하여 12종의 동시분석 과정에서 나타난 피이크와 UV-Vis 영역에서 흡수파장을 비교하는 PDA를 통하여 확인하였다.

다음으로 각 성분들의 기준선 분리를 위하여, 용리순서에 따라 두부류로 나누어 각각 6종의 표준액을 12종의 표준액과 비슷한 농도와 동일한 분석조건으로 분리하였으며 그 결과는 그림8 및 9의 크로마토그램을 얻었다.

Collection @ chosun

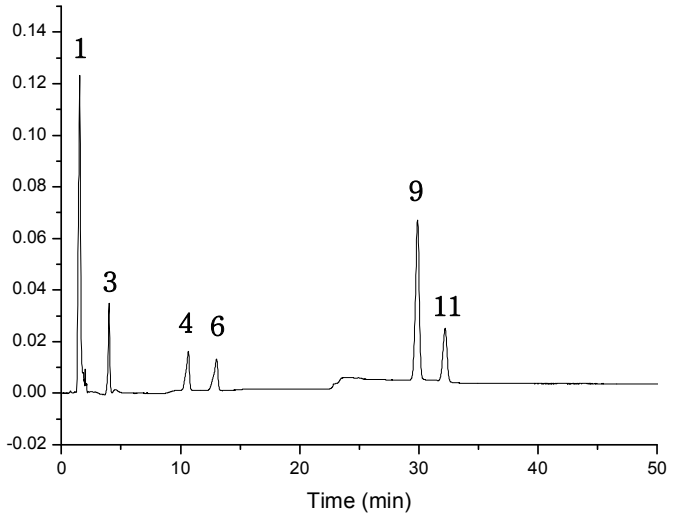


[Group1의 성분]

2. Rosiglitazone * 3.17
5. Repaglinide 12.17
7. Glipizide 13.12
8. Gliclazide 18.25
10. Nateglinide 30.47
12. Gliquidone 43.92

그림8. Group1 표준품의 동시분석 크로마토그램

- 분석조건Ⅲ의 기울기 조건, * 칼럼 내 머무름시간



[Group2의 성분]

1. Metformin * 1.53
3. Pioglitazone 4.00
4. Chloropropamide 10.65
6. Tolbutamide 13.02
9. Glibenclamide 29.90
11. Glimepiride 32.22

그림9. Group2 표준품의 동시분석 크로마토그램

- 분석조건Ⅲ의 기울기 조건, * 칼럼 내 머무름시간

Collection @ chosun

3.3. 동시분석법에서의 문제점

이와 같이 개별 표준액과 Group1 과 2의 6종 혼합 표준액의 분석결과로 12종의 크로마토그램을 해석하면 처음으로 용리되어 나오는 Meformin은 Solvent front에서 피크가 나타났으며 피이크의 쪼개짐이 나타남을 알 수 있다.
그리고 Tolbutamide와 Glipizide는 두 피이크가 겹치어 기준선 분리 되지 않았다. PDA를 이용한 UV-Vis 스펙트럼을 통하여 두 성분이 겹침을 알 수 있었으며, 두 성분의 개별 스펙트럼과 비교하여 볼 때 Tolbutamide가 약간 먼저 용리됨을 알 수 있다.
또한 Glibenclimide와 Nateglinide는 부분적으로 분리되었기 때문에 확인시험은 가능하지만 정량분석을 위해서는 분해능을 높이는 다른 조건을 찾아야 한다.

따라서 분석조건Ⅲ의 기울기 조건으로 12종 당뇨병치료제 성분들을 동시분석하였을 때 나타나는 3가지 문제점 즉 1) Metformin의 짧은 머무름시간으로 피크가 Solvent front에 나타나는 문제, 2) Tolbutamide와 Glipizide 두 피크의 겹침, 3) Glibenclamide와 Nateglinide 두 피크의 낮은 분해능 등을 해결하기 위하여 다음과 같은 추가적인 실험을 실시하였다.

Collection @ chosun

3.3.1. Metformin의 분석

Metformin을 메탄올에 녹여 약50ppm으로 만들어 상기 기울기 분석조건Ⅲ로 분석하였다. 그림7의 12종 성분 동시분석 크로마토그램과 단일 표준품 Metformin의 크로마토그램인 그림9에서 볼 수 있듯이, Metformin의 칼럼내 짧은 머무름시간으로 인하여 여러 개의 피크가 뭉쳐 있으므로 Metformin을 확인할 수 없는 문제점이 있다.

따라서 칼럼내 머무름시간을 길게 하기 위하여 유속을 늦추고, 수용매의 농도를 증가하고 상대적으로 유기용매의 농도를 감소시키면서 실험하였으며 실험결과는 다음과 같았다.

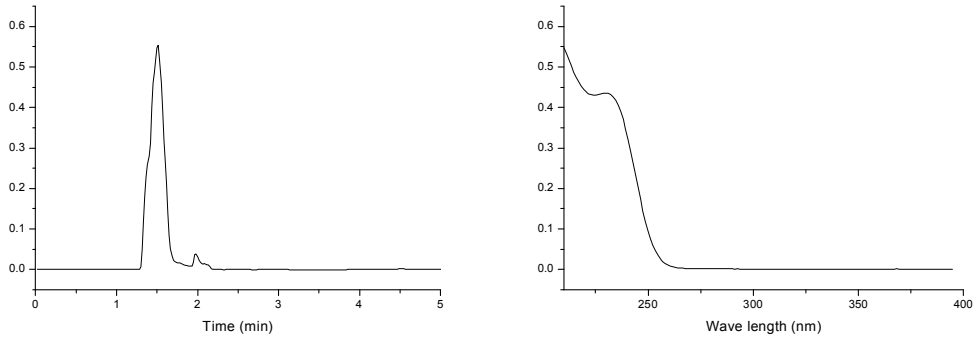


그림10. Metformin 표준품의 크로마토그램과 PDA 스펙트럼

- 분석조건Ⅲ의 기울기 조건

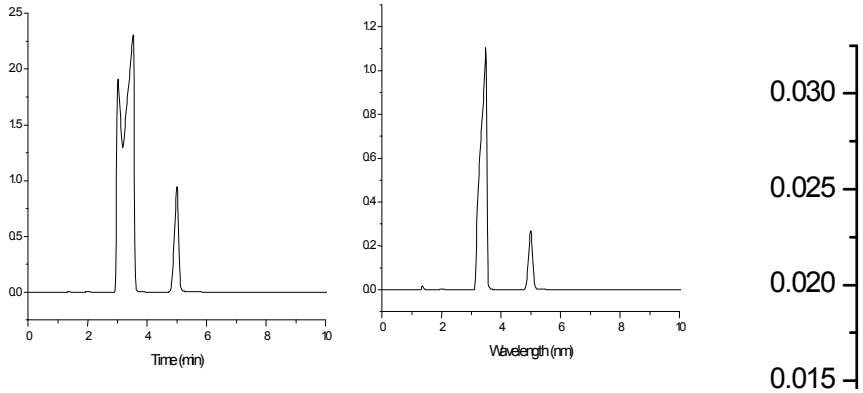
유기용매* : 수용매**	30 : 70	25 : 75	10 : 90	5 : 95	0 : 100
칼럼 내 머무름시간(min)	4.514	4.736	5.097	5.134	5.308

표7. 혼합수용액의 조성변화에 따른 Metformin의 칼럼내 머무름시간 I

- Mobile phase: 단일 조건(Isocratic condition), Flow rate=0.5㎖/min, UV=210㎚. * 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6

Collection @ chosun

그러나, 표7에서 볼 수 있듯이 Metformin의 머무름시간은 용매의 혼합조성을 변화하여도 머무름시간에는 큰 영향을 나타내지 않았으며 피크의 쪼개짐도 그대로 나타내었다. 피크의 쪼개짐을 없애기 위하여 Metformin을 이동상으로 용해시켜 주입시료의 농도를 줄여가며 실험하였을 때, 그림11에서 볼 수 있듯이 Metformin의 농도가 줄어들수록 가장 앞쪽의 피이크의 크기와 마지막 피이크는 그 크기가 줄어들었다. 이것은 아마도 pH의 영향으로 Pic B_6의 이온짝지움이 구아니딘에 완벽하게 일어나지 않은 것으로 추론한다. 그러나 이것은 최종 확인하지 않았으며 앞으로 변화하는 피크를 분리하는 등의 보충실험이 필요할 것이다.



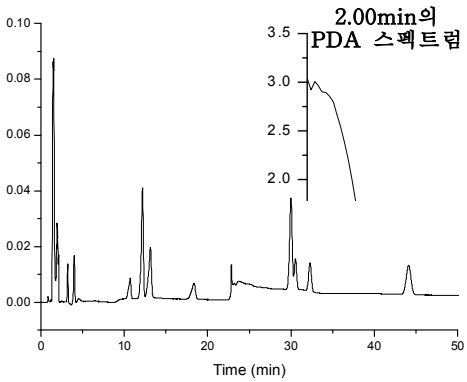
가. 540mg/mL　　나. 134 mg/mL　　다. 13.4 mg/mL

그림11. Metformin의 주입량에 따른 side피크의 변화를 나타내는 크로마토그램 - Mobile phase: 단일 조건(Isocratic condition), 유기용매 : 수용매 = 10 : 90, Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚. Column Temperature : 30 ℃, 이동상에 녹인 샘플의 농도: 가, 나, 다

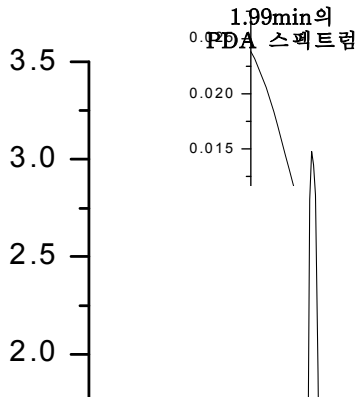
아울러 Metformin이 용리되어 나오는 시간에 12종 혼합시료 중에 존재하는 말레인산이 크로마토그램 상에서 나타나는지 여부를 확인하기 위하여 말레인

Collection @ chosun

산을 같은 조건에서 컬럼내 머무름시간을 그림12과 같이 비교해 본 결과 solvent front에 나타나는 피크는 말레인산염에 의한 피크임을 알 수 있었다.



가. 12종 혼합액의 크로마토그램과 PDA 스펙트럼



나. 말레인산의 크로마토그램과 PDA 스펙트럼

그림12. 12종 혼합액과 말레인산의 크로마토그램 비교

- 분석조건Ⅲ의 기울기 조건

Ref16) 에 따르면 이동상으로 KH_2PO_4(aq) : 아세토니트릴 = 60 : 40 의 조건으로 Metformin을 분리 분석하였다. 따라서 본 실험에서도 동일한 조건으로 실험하였으나 컬럼 내 머무름시간은 1.301분으로 역시 짧았다. KH_2PO_4(aq)의 농도를 증가시키면서 실험하였을 때 Metformin의 머무름시간은 표8에서 볼수 있듯이 컬럼 내 머무름시간은 증가함을 볼 수 있다. 수용매로 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6을 사용하였을 때와 달리 피크의 쪼개짐도 나타나지 않았으며 그림13의 피이크 PDA 스펙트럼은 UV-Vis Spectrophotometer를 이용하여 나타난 Metformin의 스펙트럼과 동일하게 나타남을 확인하였다.

그림13에서 볼 수 있듯이 Metformin은 수용매로서 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6를 사용하였을 때와 KH_2PO_4를 사용하였을 때 각각 두 UV-Vis의 흡수

Collection @ chosun

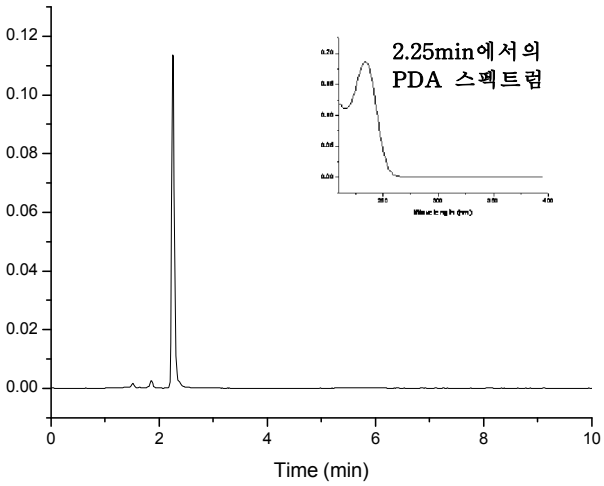
파장이 다르게 나타났다. UV-Vis 흡수스펙트럼에서 보듯이 KH_2PO_4를 이동상에 첨가하였을 때 더 좋은 흡수극대를 나타낼 수 있음을 알 수 있다. 또한 Metformin의 컬럼 내 머무름시간을 충분히 늦추기 위하여 용매의 흐름속도를 0.5mL/min으로 낮추어 그림14과 같은 좋은 분리능을 나타내는 크로마토그램을 얻었다.

유기용매* : 수용매**	40 : 60	10 : 90	2 : 98	0 : 100
칼럼 내 머무름시간(min)	1.301	1.509	1.873	2.258

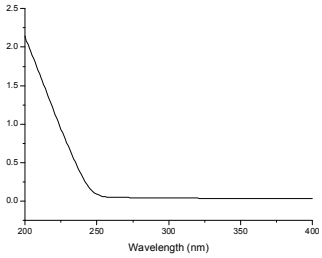
표8. 혼합수용액의 조성변화에 따른 Metformin의 칼럼내 머무름시간 Ⅱ

- Mobile phase: 단일 조건(Isocratic condition), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚. Column Temperature : 30 ℃, 샘플의 농도: 13.5ppm, * 아세토니트릴, ** 0.01M KH_2PO_4

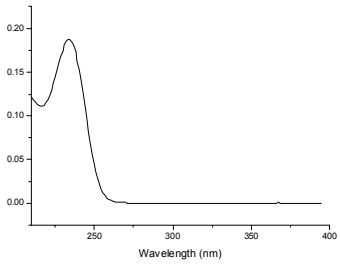
Collection @ chosun



가. 이동상 0.01M KH_2PO_4 에서 Metformin의 크로마토그램과 PDA 스펙트럼

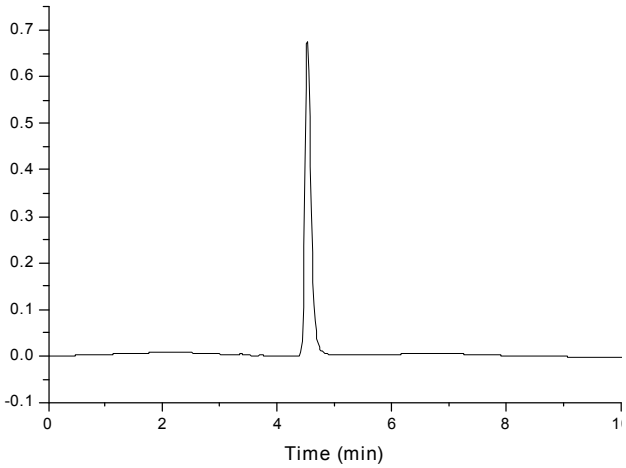


나. 메탄올에 녹인 Metformin의 UV-VIS 스펙트럼



다. 0.01M KH_2PO_4에 녹인 Metformin의 UV-VIS 스펙트럼

그림13. 0.01M KH_2PO_4 에서 Metformin 분석과 용매별 UV-VIS 스펙트럼



- Mobile phase: 단일 조건 (Isocratic condition), 0.01M KH_2PO_4, UV=210㎚. Column Temperature : 30 ℃, 샘플의 농도: 13.5ppm, Flow rate: 그림13 :1.0㎖/min, 그림14 :0.5㎖/min

그림14. 0.01M KH_2PO_4 에서 Metformin의 크로마토그램

Collection @ chosun

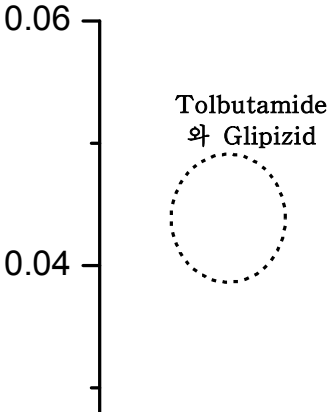
3.3.2. Tolbutamide(13.02 min)와 Glipizide(13.12 min)의 분리

분석조건Ⅲ의 기울기 조건으로 12종 당뇨병치료제 성분들을 동시분석 하였을 때 그림15와 같이 Tolbutamide와 Glipizide는 피이크의 겹침으로 인하여 확인시험으로는 위 조건이 적절하지 않다.

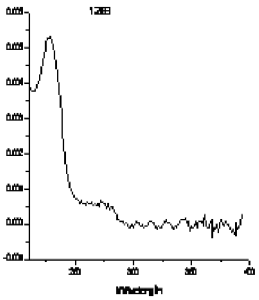
이에 Tolbutamide와 Glipizide의 기준선 분리를 위하여 두 성분의 개별 표준액을 각각 약 50ppm으로 만든 후 이들을 혼합하여 두 성분의 혼합 표준액을 만들고 상기 분석조건Ⅲ와 동일하게 유기용매로 아세토니트릴을 수용매로 0.1% 인산을 함유하는 5mM Pic B_6 용액을 사용하였다. 수용매를 70%, 72%, 75%로 증가시키면서 실험을 하였으며 개별 피이크는 개별 UV-Vis Spectrum 과 비교하여 확인하였다. 수용매가 70%일 때는 불완전한 기준선 분리가, 75%일 때는 완전히 기준선 분리가 되었지만 40분을 넘는 머무름 시간으로 인해 신속한 분석법으로는 좋지 않다.

따라서 Tolbutamide와 Glipizide를 분리시킬 수 있는 가장 최적의 분석조건은 72%의 수용매를 사용한 경우로 크로마토그램은 그림16과 같다.

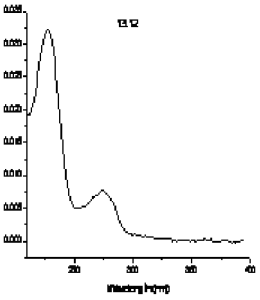
Collection @ chosun



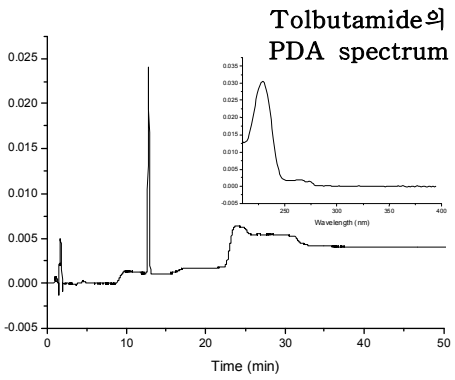
가. 12종 혼합표준액의 크로마토그램



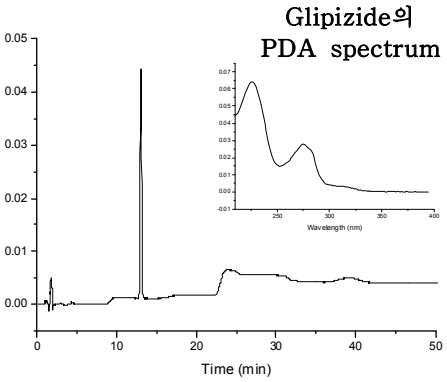
나. 12.88min 에서의 PDA spectrum



다. 13.12min 에서의 PDA spectrum



라. Tolbutamide의 크로마토그램



마. Glipizide의 크로마토그램

그림15. 12종 혼합액과 Tolbutamide 및 Glipizide의 개별 크로마토그램
- 분석조건Ⅲ의 기울기 조건

Collection @ chosun

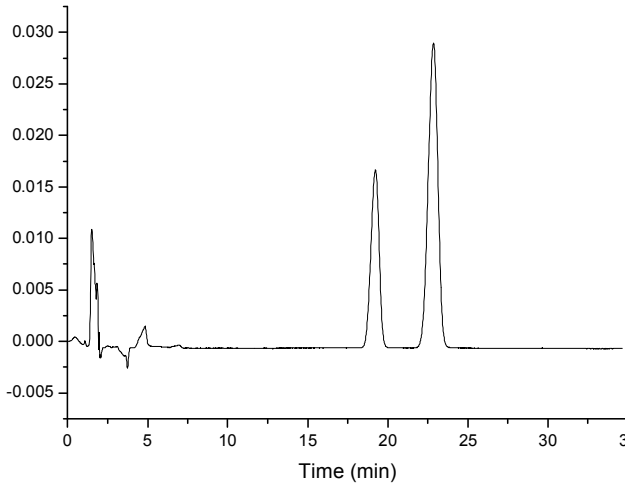


그림16. 좋은 분리능을 나타내는 Tolbutamide 와 Glipizide의 혼합 표준액의 크로마토그램

- Mobile phase: 단일용리 조건(Isocratic condition), 유기용매 : 수용매 = 28 : 72, Flow rate: 1.0㎖/min, UV =210㎚. Column Temperature : 30 ℃.

Collection @ chosun

3.3.3. Glibenclamide(29.90min) 와 Nateglinide(30.47min)의 분리

그림17과 같이 기울기 분석조건Ⅲ에서 Glibenclamide와 Nateglinide는 부분적으로 분리되기 때문에 상기 분석조건으로는 확인시험은 가능하지만 정량분석이 불가능하다. 이를 위해서 두 성분의 기준선 분리를 위한 다른 조건을 찾아야 한다.

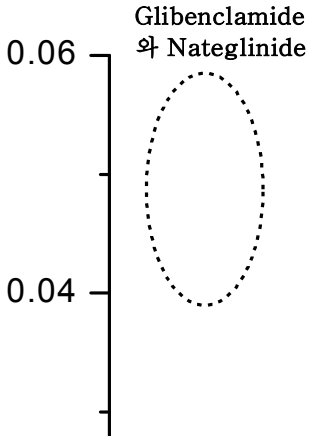
PDA spectrum 비교 결과 확인 된 Glibenclamide와 Nateglinide 두 피크의 낮은 분해능을 해결하고자 두 성분의 개별 표준액을 각각 약 50ppm으로 만든 후 이들을 혼합하여 두 성분의 혼합 표준액을 만들고, 상기 분석조건Ⅲ에서 사용한 유기용매와 수용매를 동일하게 사용하여 이들의 비율을 달리하면서 분해능을 확인해보았다. 표9와 같이 수용매의 비율을 증가시킬수록 컬럼내 머무름시간은 증가하였으며 유기용매 와 수용매의 비율이 55 : 45 이었을 때 짧은 시간으로 좋은 분해능을 나타내었다.

유기용매* : 수용매**	70 : 30	60 : 40	55 : 45	43 : 57
R_1	2.679	3.922	5.199	14.726
R_2	2.943	4.310	5.679	15.656

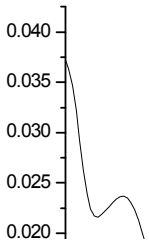
표9. 혼합수용액의 조성변화에 따른 Glibenclimide와 Nateglinide의 칼럼내 머무름시간

- Mobile phase: 단일 조건(Isocratic condition), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚. Column Temperature : 30 °C, * 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6, R_1 Glibenclamide의 컬럼내 머무름시간, R_2 Nateglinide의 컬럼내 머무름시간

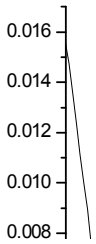
Collection @ chosun



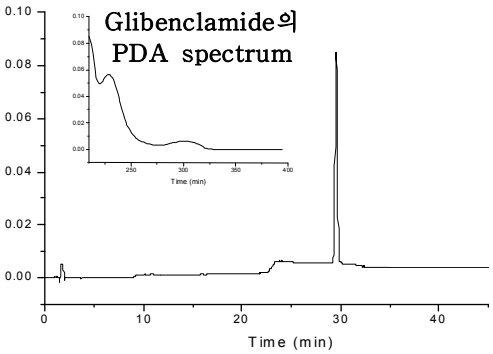
가. 12종 혼합표준액의 크로마토그램



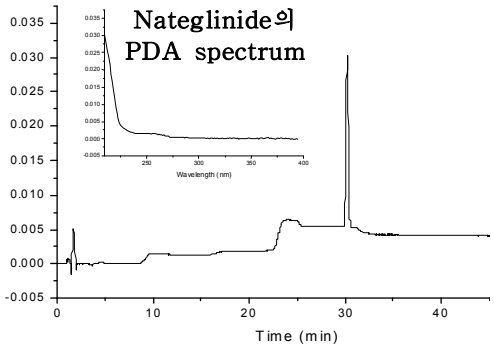
나. 30.00min 에서의 PDA spectrum



다. 30.50min 에서의 PDA spectrum



라. Glibenclamide의 크로마토그램



마. Nateglinide의 크로마토그램

그림17. 12종 혼합액과 Glibenclamide 및 Nateglinide의 개별 크로마토그램 - 분석조건Ⅲ의 기울기 조건

Collection @ chosun

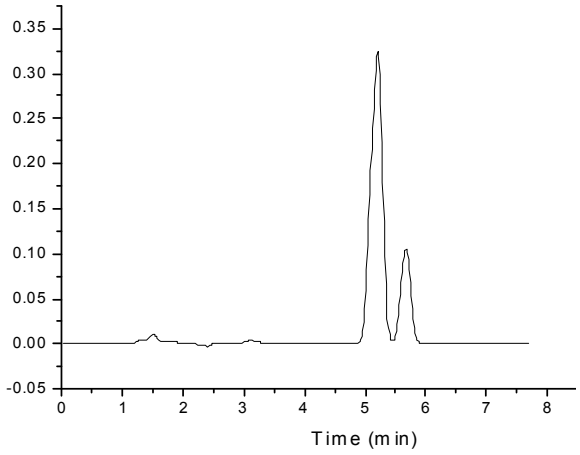


그림18. 좋은 분리능을 나타내는 Glibenclamide 및 Nateglinide의 혼합 표준액의 크로마토그램

- Mobile phase: 단일용리 조건(Isocratic condition), 유기용매 : 수용매 = 55 : 45, Flow rate: 1.0㎖/min, UV =210㎚. Column Temperature : 30 °C.

Collection @ chosun

3.3.4. Chlorpropamide, Tolbutamide, Repaglinide 및 Glipizide의 분리

그림19과 같이 12종의 당뇨병 성분을 동시분석 할 때 4번째부터 7번째의 용리순서를 나타내는 Chlorpropamide, Tolbutamide, Repaglinide 및 Glipizide는 분리능이 좋지 않으므로 단일용리 조건으로 좋은 분리능을 나타내는 조건을 알아내고자 하였다.

개별 표준품을 50ppm의 농도로 만들어 1mL씩 혼합하여 만든 혼합 표준액을 이용하여 분석조건Ⅲ와 동일하게 유기용매로 아세토니트릴을 사용하였고 수용매로 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6 용액을 사용하여 유기용매와 수용매의 비율을 달리하면서 분석하였다. 각각의 개별 피이크는 PDA 스펙트럼을 이용하여 확인하였다.

단일용리 조건으로 우선 유기용매와 수용매의 비율이 35 : 65 인 조건에서는 7.57분부터 9.63분 까지 Chlorpropamide와 Repaglinide는 완전히 겹쳐서 나타나며, Glipizide와 Tolbutamide 역시 좋지 않은 분리능을 나타낸다. 따라서 유기용매의 양을 점차적으로 줄여가며 분리해 보고자 하였다.

유기용매의 비율을 줄여 그 비율을 30 : 70으로 하였을 때, 컬럼내 머무름 시간이 Chlorpropamide는 11.49분, Tolbutamide 및 Repaglinide는 동시에 15.90분 그리고 Glipizide는 17.32분을 나타났다. 즉 혼합용매의 비율이 35 : 65의 조건에서 분리되지 않았던 Chlorpropamide와 Repaglinide는 완전하게 분리되었지만 동 조건에서 가장 나중에 나왔던 Tolbutamide가 Repaglinide와 동시에 용리되었고 Glipizide가 가장 나중에 용리되었다.

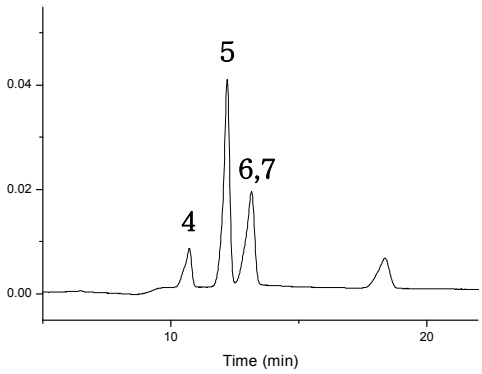
또한 혼합용매의 비율을 28 : 72로 하였을 때는, Chlorpropamide와 Tolbutamide는 완전히 기준선 분리 되었으나 Repaglinide 및 Glipizide는 역시 약간의 어깨를 갖는 피이크 모양을 나타내었다. 따라서 이동상에 아세토니트

Collection @ chosun

릴의 농도를 25%로 더 낮추어 실험하였더니 Chlorpropamide, Tolbutamide, Glipizide, Repaglinide 순서로 완전히 기준선 분리가 된 좋은 크로마토그램을 나타내었다. 그런데 이 조건에서 용리순서는 앞에서의 조건과는 달리 Repaglinide가 가장 나중에 용리되었다. 이러한 결과들은 표10, 그림19 및 20에 4성분의 용리 순서, 칼럼내 머무름시간 및 크로마토그램을 나타내었다.

유기용매* : 수용매**	용리순서 및 칼럼내 머무름시간			
35 : 65	Chlorpropamide, Repaglinide 7.574	7.574	Glipizide 9.202	Tolbutamide 9.603
30 : 70	Chlorpropamide 11.493	Tolbutamide, Repaglinide 15.903	15.903	Glipizide 17.315
28 : 72	Chlorpropamide 14.034	Tolbutamide 19.861	Repaglinide, Glipizide 23.008	23.008
25 : 75	Chlorpropamide 19.669	Tolbutamide 29.257	Glipizide 40.272	Repaglinide 43.783

표10. 이동상의 혼합비율에 따른 4성분의 용리순서 및 칼럼내 머무름시간
* 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6



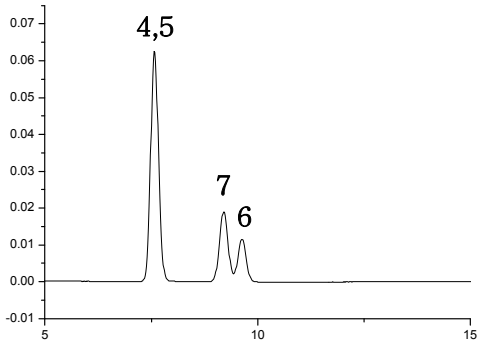
[4종의 성분]

4. Chloropropamide * 10.65
5. Repaglinide 12.17
6. Tolbutamide 13.02
7. Glipizide 13.12

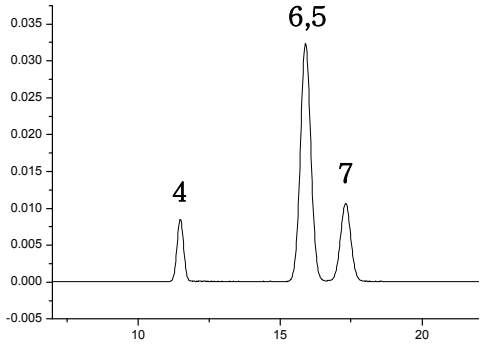
- 분석조건Ⅲ의 기울기 조건
  * 칼럼 내 머무름시간

그림19. 12종 혼합액의 7분에서 22분까지의 크로마토그램

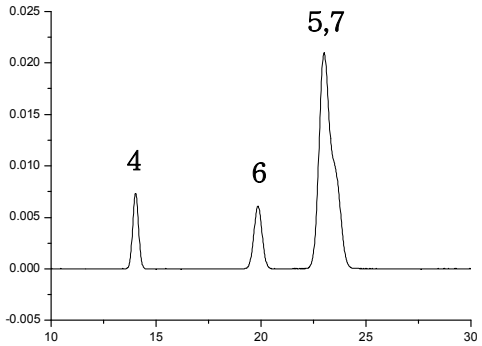
Collection @ chosun



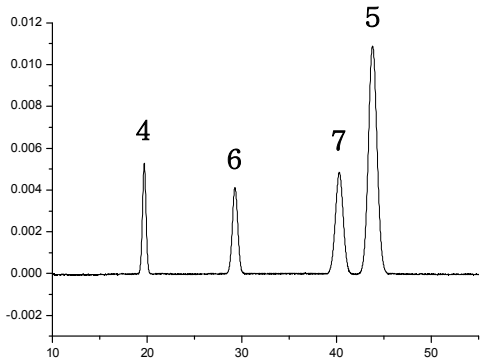
가. 유기용매*: 수용매** = 35 : 65



나. 유기용매 : 수용매 = 30 : 70



다. 유기용매 : 수용매 = 28 : 72



라. 유기용매 : 수용매 = 25 : 75

그림20. 이동상의 혼합비율에 따른 4성분의 크로마토그램

- Mobile phase: 단일용리 조건(Isocratic condition), Flow rate=1.0㎖/min, UV=210㎚. Column Temperature : 30 °C, * 아세토니트릴, ** 0.1% 인산을 함유한 5mM Pic B_6, 4 Chlorpropamide, 5 Repaglinide, 6 Tolbutamide, 7 Glipizide.

Collection @ chosun

Ⅳ. 결 론

당뇨병은 1980년대부터 꾸준히 증가하여 현재 우리나라 인구의 5%에 해당하는 만성질환으로 병 치료와 예방에 대한 중요도가 부각되고 있다. 이에 당뇨병 치료제에 대한 개발과 분석 또한 매우 중요한 관심사가 되고 있다.

기존의 분석법은 긴 분석 시간과 단지 몇 종의 동시분석법 개발이라는 한계가 있는 반면, 본 연구는 수용매와 유기용매의 최적 비율을 이용하여 Gradient System으로 분석시간을 최소화 시키면서 현재 시판되고 있는 12종 (Metformin, Rosiglitazone malate, Pioglitazone, Chlorpropamide, Tolbutamide, Repaglinide, Glipizide, Gliclazide, Glibenclamide, Nateglinide,. Glimepiride, Gliquidone) 경구용 당뇨병 치료제의 동시 분석법을 개발하였다.

더욱이 12종 성분의 동시분석법에서 나타난 불완전한 분리 등의 문제점을 보완하여 각 개별 성분 또는 컬럼 내 머무름 시간이 비슷한 성분들의 최적 분석법을 제시함으로써 신속하면서 정확한 분석을 하고자 하였다.

서론에서 기술하였듯이 당뇨병 치료제는 각 성분별로 적응증 및 복용법, 부작용 등이 다르기 때문에 단일제가 아닌 복합제인 당뇨병 치료제일 경우 이들 성분의 정확한 분리가 이루어지지 않는다면 치료효과를 볼 수 없을 뿐 만 아니라 심각한 부작용을 초래 할 수 있다. 또한 우리나라에 유통되는 부정·불량의약품의 근절을 위하여서도 이들 성분의 정확한 분석법이 필요하다.

본 연구는 복합제 형태의 당뇨병 치료제 분석과 부정·불량의약품을 모니터링하는데에 상당한 의의가 있는 것으로 예상된다.

Collection @ chosun

Ⅴ. 참고문헌

1. J.V. Santurio and E.G. Porto, *Journal of Chromatograpy B*, 682 (1996) 364-370.
2. I. Niopas and A.C. Daftsios, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 653-657.
3. B.M. Chen, Y.Z. Liang, F.Q. Guo, L.F. Huang, F.L. Deng, X. Chen and Y.L. Wang, *Analytica Chimica Acta*, 514 (2004) 185-191.
4. S. Altinoz and D. Tekeli, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 (2001) 507-515.
5. M.R. Rouini, A. Mohajer and M.H. Tahami, *Journal of Chromatograpy B*, 785 (2003) 383-386.
6. E. Ayano, H. Kanazawa, M. Ando and T. Nishimura, *Analytica Chimica Acta*, 507 (2004) 211-218.
7. T. Radhakrishna, J. Satyanarayanaand A. Satyanarayana, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 29 (2002) 873-880.
8. Z.J. Lin, D. Desai-Krieger and L. Shum, *Journal of Chromatograpy B*, 801 (2004) 265-272.
9. B.L. Kolte, B.B. Raut, A.A. Deo, M.A. Bagool and Shinde, *Journal of Chromatograpy B*, 788 (2003) 37-44.
10. Z.J. Lin, W. Ji, D. Desai-Krieger and L. Shum, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33 (2003) 101-108.
11. S. Bauer, E. Stormer, J. Kirchheiner, Claudia Michael, J. Brockmoller and Ivar Roots, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31 (2003) 551-555.
12. A.M. Muxlow, S. Fowles and P. Russell, *Journal of Chromatograpy B*,

Collection @ chosun

752 (2001) 77-84.

13. A. Zarghi, S.A. Foroutan, A. Shafaati and A. Khoddam, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31 (2003) 197-200.
14. 식품의약품안전청연구보고서 제8-1권, *The Annual Report of KFDA*, VOL. 8-1, 470～484, 2004.
15. Emmie N.M. Ho, enneth C.H. Yiu, Terence S.M. Wan, Brian D. Stewart and Keith L. Watkins, *Journal of Chromatograpy B*, 811 (2004) 65-73.
16. K.H. Yuen and K.K. Peh, *Journal of Chromatograpy B*, 710 (1998) 243-246.