

Application News

No.LC-119K

LC

Liquid Chromatograph Nexera™ Series

HPLC를 이용한 Hydroxychloroquine Sulfate 품질 분석
(Application of HPLC in Quality Analysis of Hydroxychloroquine Sulfate)

■ 요약

이 연구는 유럽약전(EP 10.0)의 hydroxychloroquine sulfate와 유연물질 및 미국약전(USP 43)의 알약(Tablet) 중 hydroxychloroquine sulfate의 함량 측정 방법을 수립하고자 하였다. 유럽 약전에 따라 시마즈 UHPLC 시스템을 이용하여 분석했을 때, hydroxychloroquine sulfate와 유연물질 C 뿐만 아니라 유연물질 B와 유연물질 C 사이에서의 분리도도 우수한 것으로 나타났으며, 미국 약전에 따라 알약(Tablet)에서의 hydroxychloroquine을 분석했을 때도 시마즈 UHPLC 시스템은 우수한 피크 분리와 재현성을 보여주었다.

Keyword : hydroxychloroquine sulfate, HPLC, 유럽약전(European Pharmacopoeia, EP), 미국약전(US Pharmacopoeia, USP)

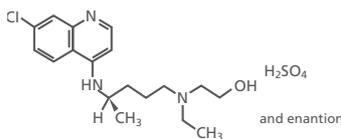
■ 서론

Hydroxychloroquine sulfate (CAS# : 747-36-4)는 1955년 미국에서 처음으로 판매되었다. 현재까지 캐나다, 프랑스, 독일, 호주, 중국과 일본 등을 포함하여 70 개국 이상에서 승인되었다. Hydroxychloroquine sulfate는 말라리아 치료제로 처음 사용되었으며, 이 약은 임상 사용시 면역억제와 면역조절 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이 때문에 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus (SLE)), 결합조직병(connective tissue disease (CTD)) 등과 같은 다양한 질병치료에 널리 사용되고 있다. 현재 새로운 코로나 바이러스(COVID-19)가 세계적으로 대유행을 하고 있는 가운데 기존의 일부 약물이 주목받고 있으며, hydroxychloroquine sulfate도 이러한 약물 중의 하나이다.

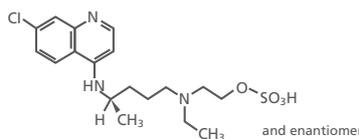
세포 생물학 스크리닝 연구에 따르면 hydroxychloroquine sulfate는 코로나바이러스 사스/메르스에 상당한 억제효과를 보이는 것으로 알려져 있으며, 분자생화학 증거들 또한 코로나바이러스 수용체 ACE2의 글리코실화 단계에 미치는 상당한 영향이 이를 뒷받침한다. 최근에, hydroxychloroquine sulfate를 이용하여 코로나바이러스 질병에 대해 안정성과 효과성 평가를 위한 임상시험이 세계 많은 나라에서 긴급하게 시작되었다.

약의 품질은 임상시험의 결과를 보장하는 기본적인 요인으로 유럽약전(EP)과 미국약전(USP)에서는 hydroxychloroquine sulfate와 유연물질의 조사 및 알약(Tablet)에서의 hydroxychloroquine sulfate 함량을 측정하는 방법과 기준을 설명하고 있다.

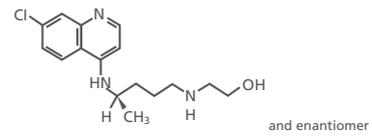
이 실험은 hydroxychloroquine sulfate와 유연물질을 시마즈 UHPLC로 유럽약전(EP)에 따라 분석하였으며, 알약(Tablet)에서의 hydroxychloroquine sulfate 함량은 hydroxychloroquine sulfate 알약(Tablet) 제품의 품질에 대한 종합적인 모니터링과 평가를 제공하기 위해 미국약전(USP)을 참고하여 측정하였다.



Hydroxychloroquine sulfate
C₁₈H₂₈ClN₃O₅S MW 433.95
CAS# : 74736-4



EP Impurity B
C₁₈H₂₆ClN₃O₄S MW 415.95
CAS# : 103152-84-7



EP Impurity C
C₁₆H₂₂ClN₃O MW 307.82
CAS# : 4298-15-1

■ 실험

1.1 분석 기기

이 연구에서는 시마즈 UHPLC 시스템 LC-30A와 HPLC 시스템 LC-2040C 3D를 사용하였으며, 소프트웨어는 LabSolutions™ DB ver 6.87, 크로마토그래피 워크스테이션을 사용하였다.

1.2 분석 조건

- 유럽약전(EP) (LC-30A UHPLC System)

LC	LC-30A
Workstation	LabSolutions™ DB ver 6.87
Column	EP 10.0 01/2017:2849, C18 (50 X 2.1 mm I.D., 1.7 µm)
Mobile phase.	A - Methanol / Buffer (10:90 v:v) B - Methanol / Buffer (85:15 v:v)
Flow rate	0.7 mL/min
Injection volume	4 µL
Column Temperature	40 °C
Autosampler temperature	6 °C
Elution mode	0 % B (1 min) – 100 % B (11 min) – 0 % B (11.1 – 12.5 min) * Buffer is described in the monograph in the EP 10.0

- 미국약전(USP) (LC-2040C 3D HPLC System)

LC	LC-2040C 3D
Workstation	LabSolutions™ DB ver 6.87
Column	Shim-pack™ GIST C18 (250×4.6mmI.D., 5 µm) (PN: 227-30017-08)
Mobile phase.	Water/MeOH/ACN/phosphoric acid (800mL/100mL/100mL/2mL), containing 96 mg Sodium 1-pentanesulphonate
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 µL
Column Temperature	40 °C
Autosampler temperature	6 °C
Elution mode	Isocratic gradient

1.3 시료 전처리

시료의 전처리는 유럽약전(EP 10.0)과 미국약전(USP 43)에 기술된 방법을 사용하였다.

■ 결과 및 고찰

2.1 유럽약전(EP)에 따른 hydroxychloroquine sulfate 유연물질의 분석

유럽약전(EP)에 따르면 피크의 분리도는 유연물질 C와 hydroxychloroquine sulfate 및 유연물질 B와 C사이의 분리도가 3.0 이상이어야 한다.

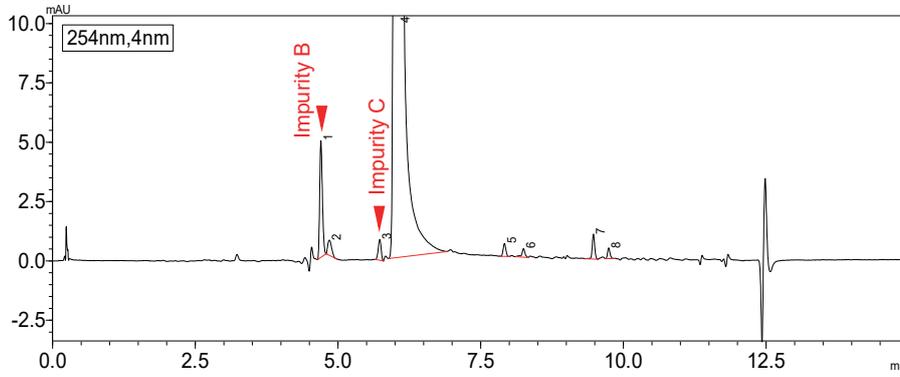


그림 1. Hydroxychloroquine sulfate 유연물질 크로마토그램

표 1. Hydroxychloroquine sulfate (HCQ)와 유연물질의 피크 정보

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Resolution (EP)
1 (Impurity B)	4.701	16191	4885	0.251	/
2	4.849	3007	642	0.047	1.337
3 (Impurity C)	5.732	3041	869	0.047	7.769
4 (HCQ)	6.050	6421680	1570520	99.537	3.050
5	7.917	1770	542	0.027	18.378
6	8.251	1377	355	0.021	3.624
7	9.475	3153	1040	0.049	13.984
8	9.742	1333	449	0.021	3.206
Total	8.242	6451552	1579303	100.000	3.889

〈표 1〉에서 보면 유연물질 C와 hydroxychloroquine sulfate, 그리고 유연물질 B와 유연물질 C사이의 분리도가 3.0 이상으로 유럽약전(EP)에 명시된 기준을 충족하는 것을 확인할 수 있다.

2.2 미국약전(USP)에 따른 알약(Tablet)에서의 hydroxychloroquine sulfate 함량 측정

2.2.1 분리도 결과

이 실험에서 얻어진 분리도는 3.728로 미국약전(USP)에서 요구하는 chloroquine phosphate (CQ)와 hydroxychloroquine sulfate (HCQ)의 분리도인 최소 1.8 이상의 기준을 만족하였다.

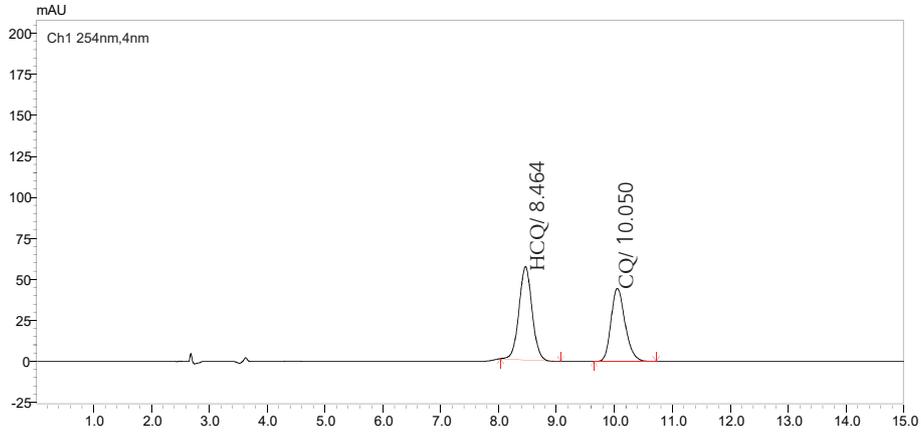


그림 2. Hydroxychloroquine sulfate (HCQ)와 chloroquine phosphate (CQ)의 크로마토그램

표 2. hydroxychloroquine sulfate (HCQ)와 chloroquine phosphate (CQ)의 분리도 결과

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Theoretical Plate Number	Width (USP)/min	Resolution (USP)
HCQ	8.464	888,481	56,853	8107	0.410	/
CQ	10.050	751,613	44,490	8332	0.441	3.728 (>1.8)

2.2.1 재현성

미국약전(USP)에 따르면 피크 면적 RSD%가 1.5 % (n=5) 미만을 요구하고 있다. 이에 이 실험에서는 hydroxychloroquine sulfate 표준용액 (50 µg/mL)을 5회 주입하여, 용출시간과 얻어진 피크의 면적으로 RSD%를 계산하였다. 그 결과, <표 3>에서 보는 것과 같이 hydroxychloroquine sulfate 의 면적에 대한 RSD%가 0.03 % (n=5)로 USP 기준인 1.5 % 이하를 만족하는 것으로 나타났다.

표 3. 재현성 테스트 결과 (n=5)

Sample concentration	Retention Time (min)	Peak Area
Hydroxychloroquine sulfate (50 µg/mL)	8.233	888,721
	8.234	888,407
	8.237	888,412
	8.240	888,213
	8.244	888,879
Average	8.238	888,526
SD	0.0047	268.15
RSD%	0.06	0.03

2.2.1 시료 분석

약국에서 구입한 hydroxychloroquine sulfate 알약(Tablet) (알약 1개당 0.1 g 포함) 20정을 미국약전(USP)에 따라 전처리와 분석을 수행하였다. 결과는 <표 4>와 같으며, 함량은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Result} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = Peak area of sample r_S = Peak area of standard
 C_S = Conc. of standard (mg/mL) C_U = Conc. of sample (mg/mL)

표 4. 표시된 함량과 실제 함량의 비교 결과

	Peak Area of Standard	Peak Area of Sample	Conc. of Std. (mg/mL)	Conc. of Sample (mg/mL)	Content (%)
hydroxychloroquine sulfate	888,526	888,481	0.05000	0.05002	99.95
		888,904		0.05000	100.04
		888,879		0.05003	99.98
Average SD RSD%		888,754		0.05002	99.99
		237.3715		0.000015	0.036864
		0.03		0.03	0.04

그 결과, 알약(Tablet)의 hydroxychloroquine sulfate 함량은 제품에 표시된 함량 대비 99.99 % 인 것으로 나타났으며, USP 기준인 93 % 이상 107 % 이하의 범위에도 만족하는 것으로 나타났다.

■ 결론

유럽약전(EP 10.0)에 따라 hydroxychloroquine sulfate와 유연물질을 시마즈 UHPLC 시스템으로 분석하였다. 그 결과 hydroxychloroquine sulfate와 유연물질 C, 유연물질 B와 유연물질 C가 잘 분리됨을 확인하였으며, 분리도도 유럽약전(EP) 기준을 만족하는 것으로 나타났다. 또, 시마즈 HPLC 시스템을 이용하여 미국약전(USP 43)에 따라 알약(Tablet)에서의 hydroxychloroquine sulfate 함량을 측정하였다.

그 결과, Hydroxychloroquine sulfate와 chloroquine phosphate의 분리도는 3.728, 피크 면적에 대한 재현성 RSD%는 0.03 % (n=5)로 미국 약전(USP) 기준을 만족하는 것으로 나타났다.