

## Capillary Electrophoresis에 의한 carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체 분리

조천호 · 구소현 · 명승운\*

경기대학교 이과대학 화학과

(2006. 6. 23. 접수; 2006. 8. 4. 승인)

## Separation of racemic enantiomer carvedilol and its metabolites using capillary electrophoresis

Cheon-Ho Jo, So-Hyun Koo, and Seung-Woon Myung\*

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon, Kyeonggi-do, 443-760, Korea

(Received June 23, 2006; Accepted August 4, 2006)

**Abstract :** A capillary electrophoresis method for the separation of carvedilol and its metabolites enantiomers using cyclodextrins as the chiral selectors was developed. The effect of several types of cyclodextrins, concentration and capillary temperature for enantiomer resolution were investigated. Best results were obtained by 15 mM carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin in the run buffer. Also the effect of capillary temperature on efficiency was assessed. The optimized method was applied for separation of chiral carvedilol and its three metabolites.

**Key words :** carvedilol, metabolite, enantiomer, capillary electrophoresis, separation

### 1. 서 론

Carvedilol은 고혈압 치료제로서 비선택적인  $\beta$ -차단제이며,<sup>1,2</sup>  $\alpha_1$ -adrenergic blocking 작용까지 지니며 내인성 교감신경흥분작용 (ISA)이 없어서 기립성저혈압의 부작용빈도가 낮은 약물이다.<sup>3,4</sup> 또한 carvedilol 분자 내 독특한 carbazol기의 매개에 의한 강력한 항산화작용과 혈관평활근 증식억제작용으로 심혈관계를 보호하여 준다.

Carvedilol (( $\pm$ )-1-(carbazol-4-yloxy)-3-((2-(o-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-2-propanol)은 구강복용 후 간에서

대사되며<sup>5</sup> 주요 대사체는 *O*-demethylated carvedilol(*O*-DMC)와 ring 구조의 4번과 5번 위치에 hydroxyl group이 도입이 된 4- 그리고 5-hydroxyphenyl carvedilol(4-HPC, 5-HPC)이다(Fig. 1).

Carvedilol 및 그 대사체는 1개의 키랄 중심을 가진 두 개의 광학이성질체 (enantiomer)로 이루어져 있으며, 일반적으로 복용하는 약에는 S(-) 와 R(+)-형태가 동시에 존재하는데 carvedilol의 경우 S(-)-형태는  $\alpha_1$ -차단효과와  $\beta$ -차단효과를 동시에 나타내는 반면에, R(+)-형태는  $\alpha_1$ -차단효과만을 나타낸다.

한편, 현재까지 보고된 문헌들 가운데 carvedilol은

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-249-9647 Fax : +82-(0)31-249-9647

E-mail: swmyung@kyonggi.ac.kr

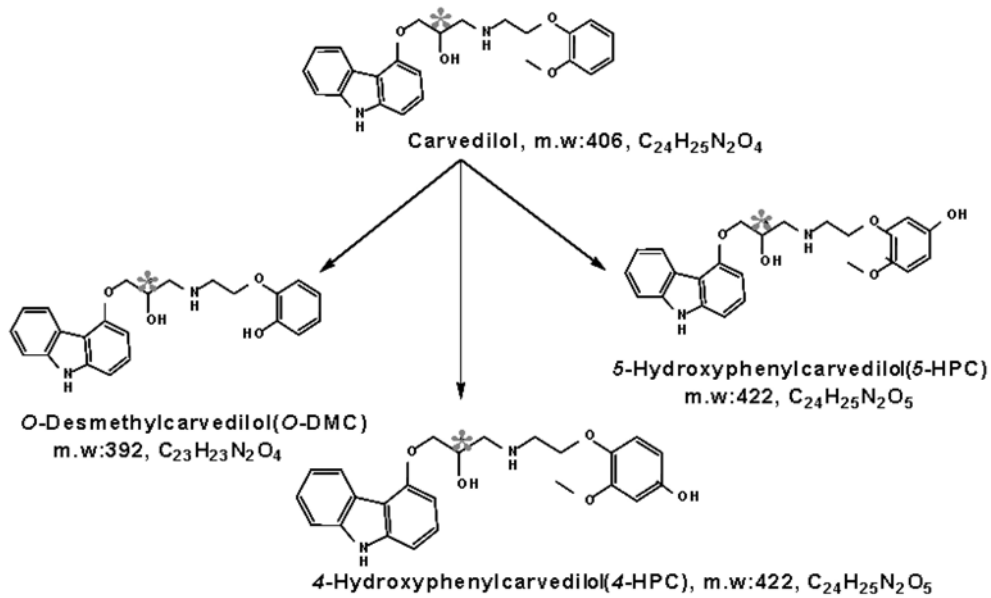


Fig. 1. Chemical structures of carvedilol and its metabolites.

HPLC-fluorescence나 CE-UV를 사용하여 인체시료인 혈청이나 혈장,<sup>6,8</sup> 소변 및 다른 생체시료에서<sup>7,9,10</sup> 분석되었고, GC-MS를 사용하여 인체 소변에서 carvedilol 및 그의 대사체가 분리 분석되었다.<sup>11</sup> 그리고 carvedilol의 거울상 이성질체의 분리를 위해 CE를 사용한 방법<sup>8,12-16</sup> 등이 다수 보고되었다. 하지만 carvedilol과 그 대사체의 거울상이성질체 모두를 동시에 분리 분석한 연구 결과가 없어서 본 연구에서는 chiral selector를 첨가한 CE-UV를 사용하여 carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체를 모두 분리 분석하고자 한다. 본 연구를 통해 carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체를 분리 분석하기에 적합한 조건들이 제시됨으로써 carvedilol 뿐만 아니라 비슷한 구조의 약물에 대한 임상학적, 약동력학적 과정을 규명하는 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. 실험

### 2.1. 기기 및 시약

본 실험에 사용된 capillary electrophoresis 분석기는 Beckman Instruments(Fullerton, CA)사의 P/ACE 5500 모델이었으며, 데이터는 System Gold Chromatography Software, version 8.10(Beckman Instruments, Fullerton, CA)을 갖춘 Pentium II/400 MHz 컴퓨터

(SAMSUNG Corporation, Seoul, Korea)를 사용하여 수집 및 분석하였다.

표준물질인 R-(+)-Carvedilol, S-(-)-Carvedilol, R-(+)-O-DMC, S-(-)-O-DMC, R-(+)-4-HPC, S-(-)-4-HPC, R-(+)-5-HPC, S-(-)-5-HPC은 Toronto Research Chemicals Inc.(Toronto, Canada)사에서 구입하였으며, chiral selector로 사용된 carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin은 Fluka Chemie GmbH(Mannheim, Germany)에서 구입하였고, HCl, NaOH, ammonium acetate, MeOH 등은 분석급을 사용하였다. 실험에 사용된 물은 Millipore Milli-Q를 2차 통과한 탈 이온수로서 비저항이 18.2 M $\Omega$ /cm 이상인 것을 사용하였다.

### 2.2. 전기영동 조건

전기영동은 용융 실리카 모세관으로써, 내경이 50  $\mu$ m, 길이는 57 cm(검출기까지 길이 : 50 cm)을 사용하였고, 바탕 전해질은 50 mM ammonium acetate buffer, pH 5.0와 15 mM carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin (CM- $\beta$ -CD)로 구성하였다. 주입은 0.5 psi의 압력으로 4초동안(약 18 nL)주입하였고 separation voltage는 20 kV이었다. 모세관은 증류수 (2.0분)와 0.1 M NaOH (2.0분)를 순서대로 세척하였으며 주입하기 전에 모세관은 run buffer로 3분 동안 씻어 주었다. 검출기는 UV를 사용하였으며 243 nm에서 작동시켰다 (Table 1).

Table 1. Optimum electrophoretic conditions

| Parameters             | Conditions   |
|------------------------|--|
| Column                 | Fused silica uncoated Capillary, 50 $\mu$ m ID, 57 cm(50 cm to the detector)       |
| Background electrolyte | 50 mM ammonium acetate buffer (pH 5.0), 15 mM Carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin |
| Injection              | Pressure at 0.5 psi for 4s (approximately 18 nL)                                   |
| Separation Temperature | 10°C   |
| Separation Voltage     | 20 kV (with the cathode being at the detector end)                                 |
| Capillary rinse        | Water (2.0 min), 0.1 M sodium hydroxide (2.0 min), run buffer (3.0 min)            |
| Detection              | UV at 243 nm   |

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Chiral selector의 농도 효과

키랄분리에 일반적으로 사용되는 방법인 완충용액에 chiral selector를 첨가하는 방법이 사용되었으며, 여러 가지 수용성  $\beta$ -cyclodextrin 유도체를 chiral selector로 선택하여 run buffer에 묶혀 낮은 농도에서 높은 농도로 조건을 변화시켜 실험하였다. 사용한  $\beta$ -cyclodextrin 유도체는 heptakis(2,3,6-tri-o-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin(TM- $\beta$ -CD), heptakis(2,6-di-o-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin(DM- $\beta$ -CD), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin(HP- $\beta$ -CD) 이었는데 이들은 완전한 분리를 이루는 데는 한계가 있었다. 그러나 음전하를 띠고 있는 carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin (CM- $\beta$ -CD)는 capillary 내에서 적당한 머무름을 갖게 하여 carvedilol 및 그 대사체들의 거울상이성질체를 분리함에 있어서 가장 효과적인 chiral selector임을 확인할 수 있었다. CM- $\beta$ -CD의 농도를 7.5 mM에서 15 mM로 변화시켰을 때

낮은 농도에서는 이성질체가 분리가 이뤄지지 않았지만 고농도로 갈수록 이성질체의 피이크가 잘 분리됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 하지만 20 mM 이상의 농도에서는 점성도가 증가하고, 전기삼투적 흐름(Electro-Osmotic Flow, EOF)가 감소하므로 migration time이 길어질 뿐만 아니라 피이크의 떠나비가 증가하였고 이성질체의 분리가 전혀 이루어지지 않았다.

#### 3.2. Voltage 효과

모세관 전기영동에서 voltage는 분석 시간을 결정하는 주요 요인이다. 또한 실험의 효율이 voltage 크기에 직접적으로 비례한다.<sup>18</sup> 모세관 전기영동을 가지고 carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체 분석을 위해 최적의 분리 voltage를 결정하기 위해 주어진 voltage(15 kV)에서 단계적으로 증가시켰다. 20 kV에서 가장 좋은 효율을 보였으며 20 kV 이하에서는 분석시간이 길어져 이성질체의 분리가 잘 이루어지지 않았으며 20 kV 이상의 voltage에서는 모세관 내부에 많

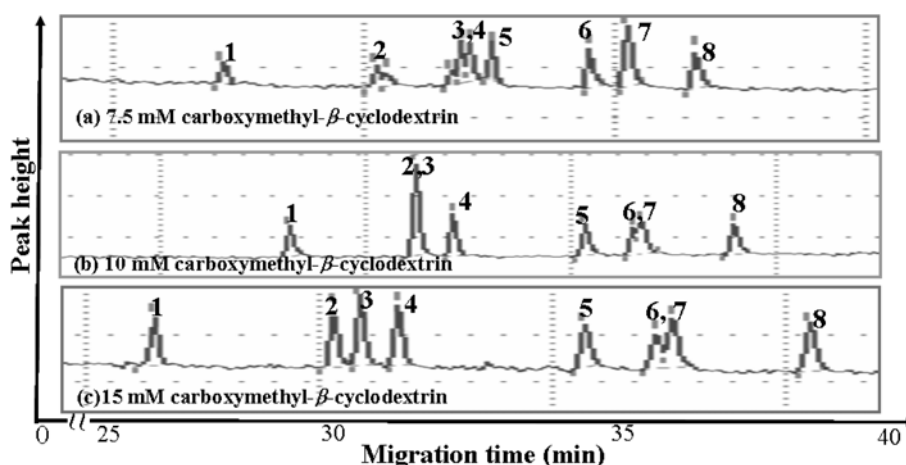


Fig. 2. Effect of cyclodextrin concentration in resolution ; peak identification : 1. (S)-(-)-5-HPC, 2. (R)-(+)-5-HPC, 3. (S)-(-)-4-HPC, 4. (R)-(+)-4-HPC, 5. (S)-(-) O-DMC, 6. (R)-(+)-O-DMC, 7. (R)-(+)-carvedilol, 8. (S)-(-)-carvedilol.

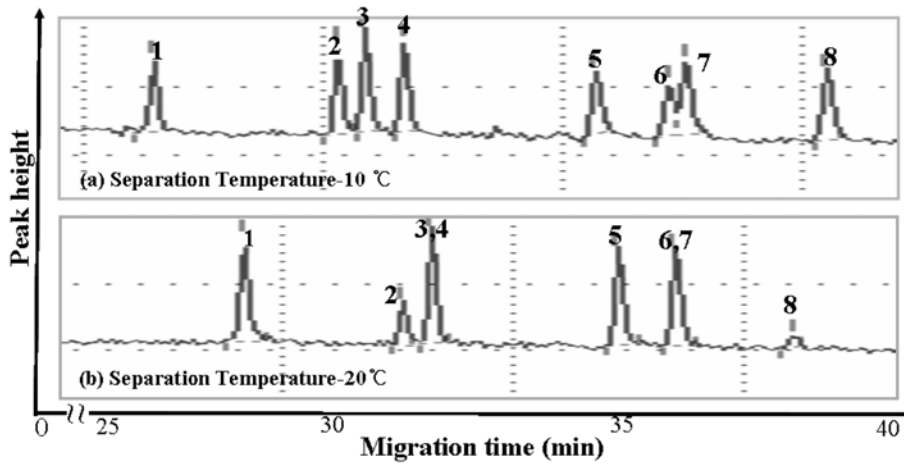


Fig. 3. Effect of cartridge temperature on resolution ; peak indentification : 1. (S)-(-)-5-HPC, 2. (R)-(+)-5-HPC, 3. (S)-(-)-4-HPC, 4. (R)-(+)-4-HPC, 5. (S)-(-)-O-DMC, 6. (R)-(+)-O-DMC, 7. (R)-(+)-carvedilol, 8. (S)-(-)-carvedilol.

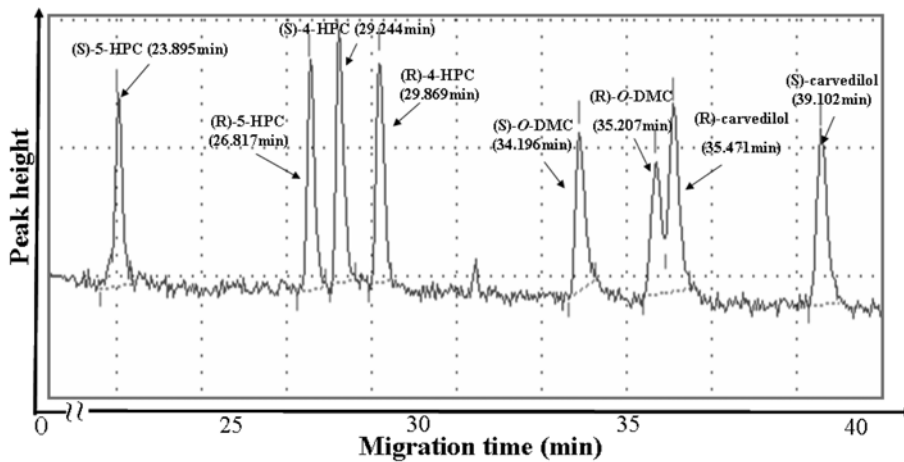


Fig. 4. Electropherogram of the separation of racemic enantiomer carvedilol and its metabolites at 25 µg/mL in run buffer by CE using CM-β-CD in the run buffer.

은 열이 발생(buffer의 점도를 감소시켜 분석물의 확산이 일어나 피이크의 띠나비가 증가)하여 이성질체의 분리가 이루어지지 않았다.

### 3.3. Buffer pH의 효과

Buffer의 종류와 농도, 그리고 pH는 이성질체의 분리와 migration time에 영향을 주는 요소들이다. 본 연구에서는 50 mM sodium phosphate buffer, pH 2.5와 50 mM ammonium acetate buffer, pH 5.0, 50 mM sodium phosphate, pH 5.0, 그리고 50 mM sodium borate buffer, pH 8.5에서 실험하였다. 염기성 조건에서는 EOF가 커서 분석물질이 빠르게 용출되어 분리가 이루어 지지 않았고, 강한 산성 조건에서는 EOF는

작아 완충용액의 흐름은 작지만 분석물이 양전하를 띠게 되어 빠르게 용출되므로 분리가 이루어지지 않았다. 결론적으로 본 연구에서는 50 mM ammonium acetate buffer, pH 5.0에서 가장 좋은 이성질체 분리와 적당한 migration time을 가지게 되었다.

### 3.4. 모세관의 온도 효과

모세관의 온도를 조절하는 것은 분석의 재현성을 위해 매우 중요한 요소이다. 전류가 모세관을 지날 때 전기 에너지는 Joule heating으로 바뀐다. 온도는 buffer의 점도를 변화시키기 때문에 분석물질의 migration time을 변화시키고 결국 분석물질의 분리능에 영향을 준다.<sup>17</sup> Carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체는 상온

(20°C)에서 온도를 낮추면서(10°C)부터 분리능이 좋아짐을 발견하였다(Fig. 3).

### 3.5. Carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체를 분리하기 위한 최적 조건 확립

위와 같은 chiral selector의 농도변화, 모세관의 온도변화 및 전해질 농도 변화에 따른 최적화된 전기영동 조건은 다음과 같다 ; background electrolyte는 50 mM ammonium acetate buffer, pH 5.0였고, chiral selector로는 15 mM carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin(CM- $\beta$ -CD)를 사용하였으며, 모세관은 용융 실리카, 50  $\mu$ m ID, 57(50) cm을 사용하였다. Capillary voltage는 20 kV였고, 모세관의 온도는 10°C, 시료의 주입은 초고순도(99.9995%) N<sub>2</sub>를 사용하여 0.5 psi의 압력으로 4 초간(약 18 nL) 주입하였고, 검출기는 UV 검출기로 243 nm에서 측정하였다. Fig. 4는 최적화된 조건에서의 electropherogram을 나타낸 것이다.

## 4. 결 론

Carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체를 분리 분석하기 위해 효율적인 stereoselective CE법이 개발되었다. 이 방법은 과거 carvedilol의 거울상이성질체만을 분리한 CE법에서 더 발전된 형태로 비교적 짧은 시간 안에 carvedilol 및 그 대사체의 거울상이성질체 8종 모두를 효과적으로 분리해낼 수 있었다. 확립된 분석 방법은 carvedilol 뿐만아니라 이와 비슷한 약물의 임상약학적 측정 및 연구에 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. T. Morgen, *Clin. Pharmacokinet.*, **26**, 335(1994).
2. R. Ruffolo, M. Gellai, J.P. Heible, R.M. Willette, A. J. Niichoas, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **38**, 82(1990).
3. M. R. Bristow, *Am. J. Cardiol.*, **71**, 12C(1993).
4. W. H. Frishman. *N. Engl. J. Med.*, **339**(24), 1759(1998).
5. H. -H. Zhou, A. J. J. Wood, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **57**, 1995(1995).
6. J. Macek, P. Ptacek, *J. Chromatogr. B*, **789**, 405(2003).
7. K. Reiff, *J. Chromatogr. B*, **413**, 355(1987).
8. L. Clohs, K. M. McFrlane, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 407(2003).
9. G. Sponer, W. Bartsch, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **38**, S104(1990).
10. J. N. Robson, M. Gergov, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 912(2000).
11. S.-W. Myung, C.-H. Jo, *J. Chromatogr. B*, **822**, 70(2005).
12. A. M. Patterson, E. J. Eisenberg, *J. Chromatogr.*, **493**, 105(1989).
13. F. Behn, S. Michels, *J. Chromatogr. B*, **755**, 111(2001).
14. G. Neugebauer, W. Akpan, *J. Clin. Pharmacol.* **38**(Suppl. 2), S108(1990).
15. H. Spahn, W. Henke, *Arch. Pharm.* **323**, 465(1990).
16. K. M. McFrlane, L. Clohs, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 545(2001).
17. A. Guttman, *Electrophoresis*, **16**, 1900(1995).
18. G. M. McLaughlin, J. A. Nolan, J. L. Lindahl, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 961(1992).