

# HPLC 에 의한 제제중에 첨가된 Corticosteroids의 분석

毒性藥品科

宋 永 美 · 崔 善 姬 · 白 受 鉉  
申 守 容 · 姜 恩 美 · 吳 世 宗

## Analysis of Corticosteroids in pharmaceutical preparations by High Performance Liquid Chromatography

*Division of Toxicopharmaceutics*

Young-Me Song, Seon-Hee Choi, Soo-Hyun Baek,  
Su-Young Shin, Eun-Mee Kang and Sea-Jong Oh

### = Abstract =

The determination of 3 corticosteroids - dexamethasone, prednisolone and triamcinolone acetate - added in pharmaceutical preparations was performed by HPLC using  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> with UV detection at 254nm and 40% acetonitrile as mobile phase.

The results were as follows.

1. In a capsule and a solution form of cold and cough preparations and a granular form of chinese medicine, 3 corticosteroids were extracted with chloroform. The extraction recoveries were higher than 97.0%. The recovery from solution form of cold and cough preparation was about 90.0%.
2. In a solution form of chinese medicine, 3 corticosteroids were extracted with chloroform-hexane(1:1). The recoveries of prednisolone, dexamethasone and triamcinolone acetate were 67.1-86.8%, 73.0-88.1% and 84.1-94.8%. The extraction recoveries and reproducibilities of solution form were lower than solid form preparations.
3. The detection limit for 3 corticosteroids was 250ng. This method was used successfully to identify 3 corticosteroids added in pharmaceutical preparations.

### 緒 論

부신피질스테로이드는 그 작용이 광범위하여 탄수화물,

단백질 및 지방대사, 수분 및 전해질 평형, 순환계, 신장, 골격근, 신경기능 등에 영향을 줄 뿐만아니라 외부로부터의 자극, 환경변화 등에 대처할 수 있게 하는 등의 항상성 (Homeostasis) 유지에 중요한 역할을 한다.<sup>1)</sup>

부신피질호르몬제제는 1940년대 아디손병, 류마티스성 관절염 치료 등에 극적인 효과를 나타낸 이후 현대 의학에서 하나의 경이적인 치료약물로 등장하여 현재 각종 난치성 질환에 응용되어 광범위하게 사용되고 있다.<sup>2,3)</sup>

그러나 이 약물들은 장기간 복용시 심각한 부작용을 나타내어 사용에 주의를 요하는 약물이기도 하다.

특히 이 약물들은 소염진통작용이 우수하여 시중에서 관절염 또는 신경통약, 감기약 등에 남용 또는 오용되고 있으며 종종 이들 약물들의 혼입이 의심되는 조제약, 한방제제, 건강식품 등이 약사법 위반 사건과 관련하여 증거물로 제시되기도 한다.<sup>4)</sup>

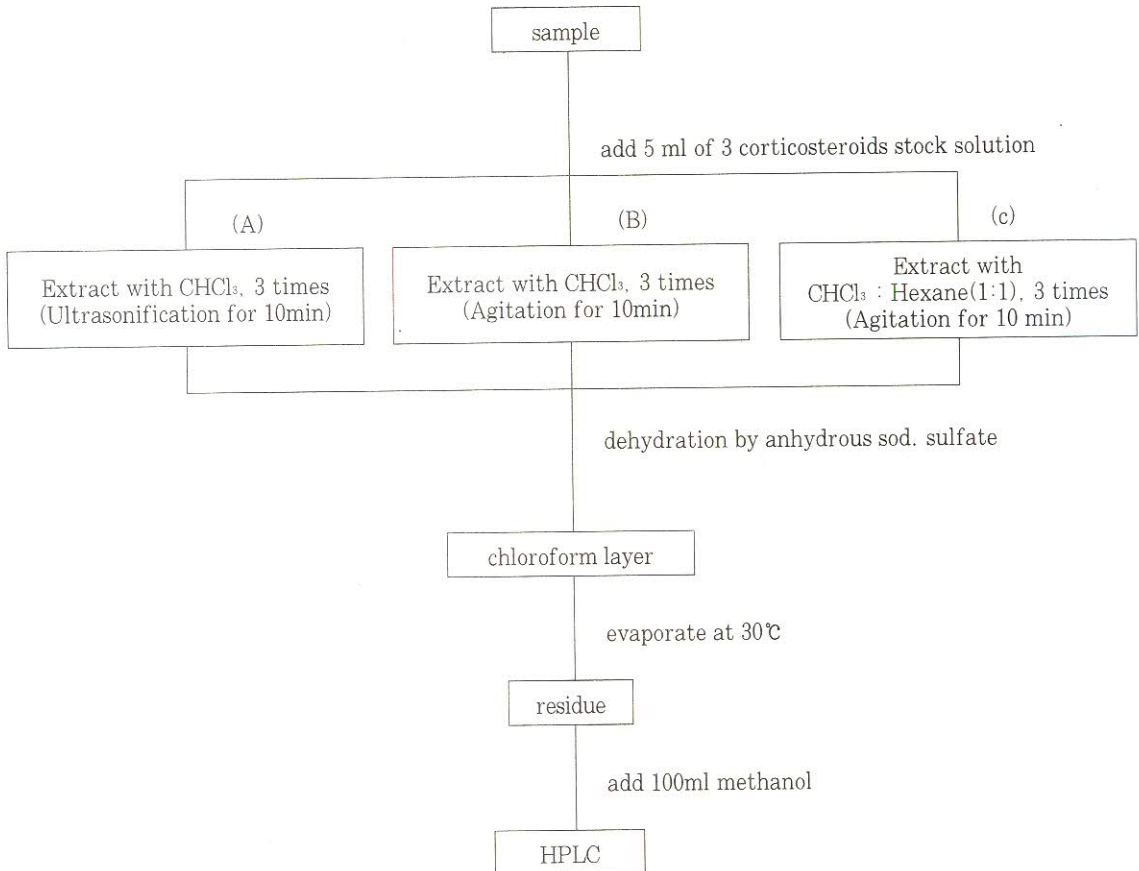
따라서 조제약, 한방제제중에서 이들 스테로이드계 약물의 검출 및 분석방법의 확립이 요구되고 있어 저자들은 전보<sup>5)</sup>에서 HPLC를 이용하여 시중에서 주로 유통되고 있는

10종의 스테로이드 약물의 동시분석조건을 보고하였으며, 본 실험에서는 전보의 분석조건을 이용하여 각종 제제-종합감기약 캡셀제, 종합감기약 액제, 한방액제, 한방과립액스제-에 첨가된 이들 스테로이드성분들의 검출정도 및 분석법을 검토하였기에 보고하는 바이다.

## 材 料 및 方 法

### 1. 機 器

본 연구에서 사용한 기기는 Waters사의 High Performance Liquid Chromatograph로서 시료주입기는 U6K Universal Injector, 펌프는 510 Solvent Delivery System, 검출기는 486 Tunable Absorbance Detector, 기록계는 745 Data module을 사용하였다.



**Fig. 1.** Procedure of sample extraction method  
 (A) capsule form of cold & cough preparation, granular form of chinese medicine  
 (B) solution form of cold & cough preparation  
 (C) solution form of chinese medicine

**Table 1.** Analytical Condition of HPLC,

Column	$\mu$ -Bondapak C18
Detector	Waters 486 (254nm)
Injector	U6K Injector
Pump	Waters 510
Flow rate	0.8ml/min
Injecton volume	5 $\mu$ l
Mobile phase	Acetonitrile/Water (40:60 v/v %)

**2. 試藥**

표준품으로 dexamethasone, prednisolone, triamcinolone acetonide의 정량용 원료를 사용하였고, acetonitrile(Mallinckrodt specialty chemicals Co., HPLC grade), methanol(Fisher scientific, HPLC grade)을 사용하였다.

**3. 材料**

시판 종합감기약 캡셀제 1건, 종합감기약 액제 1건, 한방과립엑스제 1건 및 한방액제 1건에 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드 표준품을 첨가하여 시료로 사용하였다.

**4. 實驗方法**

**1) 標準液 調製**

dexamethasone, prednisolone, triamcinolone acetonide을 각각 1mg/ml의 농도로 chloroform에 용해시켜 stock solution으로 사용하였다.

**2) 試料의 調製**

종합감기약캡셀제, 한방과립엑스제 : 각 제제 1회 복용분량을 미세분말로 한후 물 50ml 에 녹이고, 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드의 stock solution 을 각각 5ml씩 취하여 넣은후 클로르포름 50ml으로 추출하여 탈수하고 클로르포름층을 취하였다. 이를 3회 반복한 후 클로르포름층을 합하여 감압농축한 후 잔사를 methanol에 다시 용해시켜 100ml로 하였다. (Figure 1(A))

종합감기약액제 : 액제 1회 복용분량 20ml에 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드의 stock solution을 각각 5ml 씩 취하여 넣은후, 클로르포름 20ml 씩으로 3회 추출한 후 탈수, 여과한후 이를 감압농축한 후 종합감기약 캡셀제의 방법에 따라 실험하였다. (Figure 1(B))

**Table 2.** The composition of 4 preparations

(A) capsule form of cold & cough preparation	Acetaminophen Chlorpheniramine CloperastineHCl dl-Methylephedrine Caffeine anhydrous Serratiopeptidase Thiamine nitrate Riboflavin
(B) granular form of chinese medicine	Ginseng Radix Alba Atractylodis Rhizoma Alba Glycyrrhizae Radix Zingiberis Rhizoma
(C) solution form of cold & cough preparation	Acetaminophen Chlorpheniramine dl-Methylephedrine Guaiphenesin Caffeine anhydrous Sod. benzoate
(D) solution form of chinese medicine	Ginseng Radix Alba Paeoniae Radix Rehmaniae Radix Preparata Cnidii Rhizoma Angelicae gigantis Radix

**Table 3.** The recoveries of 3 corticosteroids in 4 preparations

(n=3)			
	Prednisolone	Dexamethasone	Triamcinolone acetonide
(A)	97.3	99.0	97.2
	97.2	99.2	100.0
	97.8	98.9	99.7
mean	97.4	99.0	99.0
RSD	0.32	0.15	1.55
(B)	97.5	97.6	97.5
	97.1	97.1	98.2
	96.7	96.7	97.7
mean	97.1	97.1	97.8
RSD	0.41	0.46	0.36
(C)	98.8	89.6	89.9
	90.1	91.2	91.5
	94.5	89.0	96.1
mean	94.5	89.9	92.5
RSD	4.60	1.26	3.47
(D)	76.3	83.2	91.8
	86.8	88.1	84.6
	67.1	73.0	91.4
mean	76.7	81.4	89.3
RSD	12.84	9.45	4.53

- (A) capsule form of cold & cough preparation
- (B) granular form of chinese medicine
- (C) solution form of cold & cough preparation
- (D) solution form of chinese medicine

**한방액제 :** 이 약 100ml에 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세토니드의 stock solution을 각 5ml를 취하여 넣은후 클로르포름-헥산(1:1)의 용매로 추출한 후 원심분리한 후 클로르포름-헥산층을 취하고 이를 감압농축하여 상기의 종합감기약캡슐제의 방법에 따라 실험하였다. (Figure 1(C))

### 3) 회수율 측정

시료를 3회 조제한후 Table 1의 실험조건에서 표준액을 주입하여 얻은 검광선을 작성하여 회수율을 측정하였다.

## 結果 및 考察

스테로이드류성분들의 분석은 TLC법, GC법, HPLC법, UV법 및 RIA(Radioimmunoassay), EIA(Enzyme immunoassay)등 여러 가지가 있다.<sup>6,7,8,9,10,11,12,13)</sup> 단일제제에서의 확인 및 정량은 비교적 간단하나 복합제제 및 한방

제제 등에 첨가된 이들 스테로이드 성분들의 검출 및 정량은 여러 성분들의 방해작용으로 비교적 까다로우며 특히 여러 방해 성분들로부터 이들 성분만을 추출, 정제, 분리하는 방법의 개발이 요구되고 있다. 본 실험에서는 스테로이드 성분들이 주로 오남용되고 있는 감기약류와 한방제제에서 이들 스테로이드 성분들의 검출정도를 검토하였다.

### 1) 종합감기약캡슐제 및 한방과립제

종합감기약 1 캡슐 (400mg)은 아세트아미노펜, 말레인 산클로르페니라민, 염산클로페라스틴, dl-염산메칠에페드린, 무수카페인, 세라티오펜티다제, 질산치아민, 리보플라민의 8가지 성분으로 되어있다. 여기에 스테로이드 중 조제시 처방빈도가 많은 dexamethasone, prednisolone, triamcinolone acetonide의 표준품 stock solution을 첨가하고 클로르포름 추출후 분석하였을 때 감기약 성분의 일부가 클로르포름에 용해되어 추출되지만 스테로이드 성분들의 분석에 영향을 주지않음을 확인할 수 있었다(Figure 2(A)). 이때의 회수율은 97% 이상으로 좋은 재현성을 나타내었다. (Table 3).

인삼, 백출, 감초, 건강으로 구성된 한방과립엑스제에 첨가된 dexamethasone, prednisolone, triamcinolone acetonide의 회수율은 종합감기약캡슐제와 같이 97% 이상으로 좋은 재현성을 나타내었다. (Figure 2(B), Table 3)

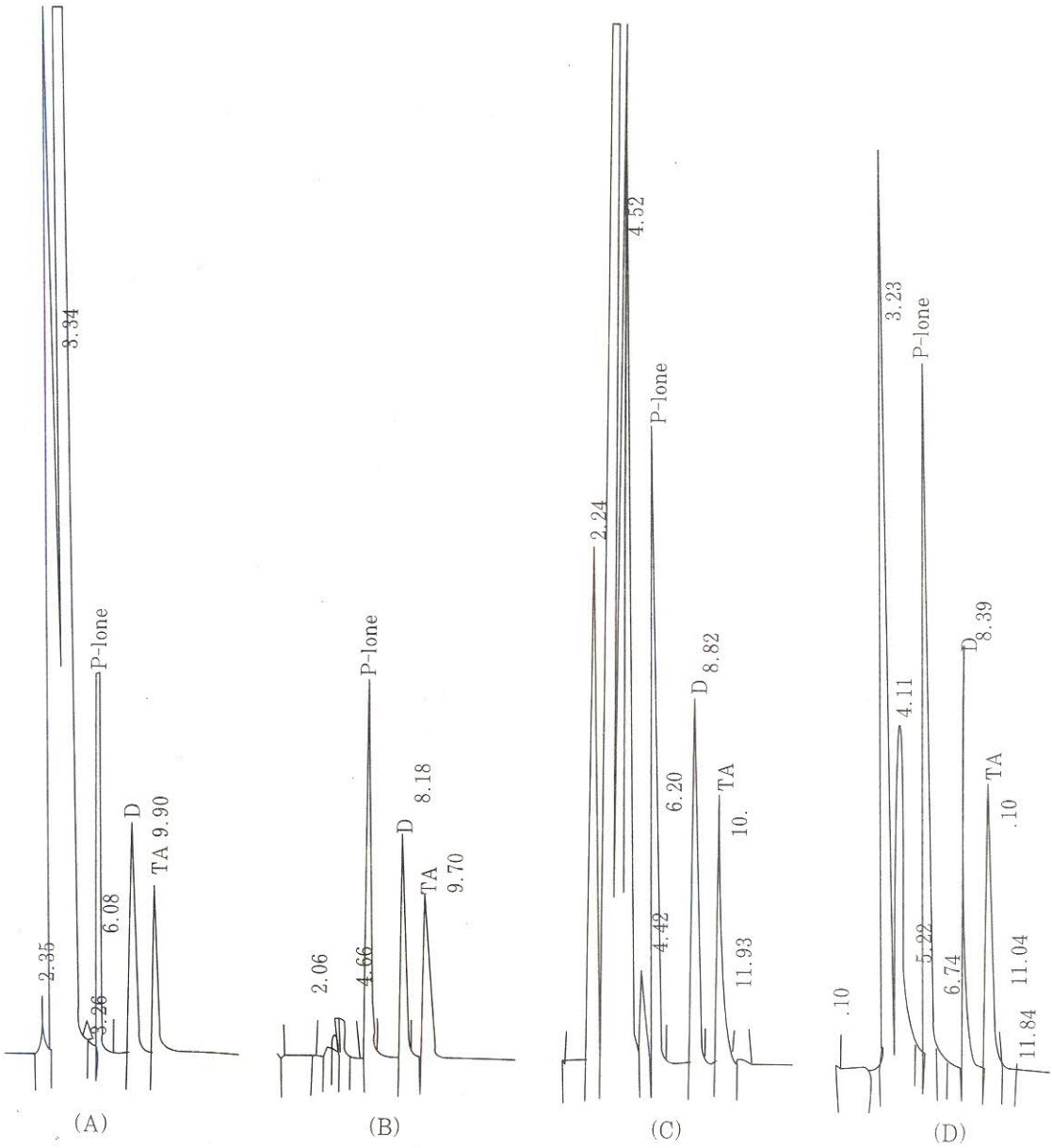
### 2) 종합감기약액제 및 한방액제

종합감기약 액제(성분: 아세트아미노펜, 말레인산클로르페니라민, dl-염산메칠에페드린, 구아이페네신, 무수카페인, 안식향산나트륨)중에 첨가된 스테로이드를 클로르포름으로 추출하여 얻은 회수율은 프레드니솔론 91.3%, 덱사메타손 89.9%, 트리암시놀론 아세토니드 92.5% 이었다 (Figure 2(C), Table 3). 종합감기약캡슐제에 비해서 액제의 회수율이 낮은 이유로는 클로르포름 추출시 물과 클로르포름의 섞임현상이 나타나 클로르포름층의 완전한 분리가 어려웠으며, 스테로이드가 물에 거의 녹지않는다고 되어 있으나<sup>14)</sup> 첨가된 스테로이드의 함량이 미량-5mg-이어서 물에 용해되는 비율이 높고, 액제중에 함유된 용해보조제등의 영향으로 물층으로 이행되었을 것으로 사료된다. 클로르포름층에는 스테로이드 3종뿐만 아니라 감기약성분이 함께 추출되지만 retention time이 5분 이내로 첨가된 스테로이드 성분들의 분석에는 영향을 주지않았다.

한방액제는 제약회사에서 제조된 것으로 백삼, 작약, 숙지황, 천궁, 당귀를 주성분으로 하고 있으며 클로르포름만을 사용하여 추출했을 때 물층과 클로르포름층이 서로 혼합

되어 분리되지 않아 추출할 수 없었다. 클로르포름:헥산 (1:1)의 용매를 사용하고 원심분리함으로써 스테로이드성

분들을 추출할 수 있었으나 평균회수율과 상대표준편차가 좋지않았다. (Figure 2(D), Table 3)



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of corticosteroids in preparations  
 P-lone:Prednisolone D:Dexamethasone TA: Triamcinolone acetonide  
 (A) capsule form of cold & cough preparation  
 (B) granular form of Chinese medicine  
 (C) solution form of cold & cough preparation  
 (D) solution form of Chinese medicine

## 結 論

종합감기약캡셀제, 종합감기약액제, 한방과립엑스제, 한방액제에 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세트나이드 3종의 스테로이드를 일정량씩 첨가하고 회수율을 측정 한 결과,

1. 종합감기약캡셀제와 한방과립엑스제에서는 회수용매로 클로르포름이 가장 양호하였으며 덱사메타손, 프레드니솔론, 트리암시놀론 아세트나이드 모두 97% 이상의 높은 회수율을 나타내었고 종합감기약액제는 클로르포름으로 추출할 때 상기 3종류의 스테로이드 성분에 대해 약 90.0% 정도의 회수율을 얻을 수 있었고

2. 한방액제의 회수용매는 클로르포름보다 클로르포름-헥산(1:1)을 사용하였을 때 스테로이드의 회수율이 가장 양호하였으며, 프레드니솔론 회수율은 67.1 - 86.8 %, 덱사메타손의 회수율은 73.0 - 88.1%, 트리암시놀론 아세트나이드의 회수율은 84.1- 91.8% 로 회수율과 재현성이 고품제제인 종합감기약캡셀제와 한방과립엑스제에 비해 현저히 낮았다.

3. 상기제제들중에 첨가된 3종의 스테로이드 검출농도가 250ng 로 이계통의 약물이 오남용된 경우 상기 분석방법을 통해 비교적 용이하게 검출해 낼 수 있을 것으로 사료된다.

## 參 考 文 獻

1. 월간약국 4:84(1994)
2. Martindale the Extra Pharmacopoeia, the Pharmaceutical Press, 872-881(1989)
3. 약물학, 한국약학대학협회, 문성사, 674-681(1987)

4. Kim, E.M., Kim, M.D., Chung, K.H. and Yoo, Y.C.: Contents of Dexamethasone Illegally Enriched to chinese medicine, Annual Report of N.I.S.I., 23:194(1991)
5. Song, Y.M., Choi, S.H. and Oh, S.J.: Studies on the simultaneous Determination of Corticosteroids by HPLC, Report of S.I.H.E., 31:54(1995)
6. Chiong, D.M., Consuegra-Rodriguez, E. and Almirall, J.R.: The Analysis and Identification of Steroids, Journal of Forensic Sciences 37(2):488(1992)
7. Masatoki Katayama, Yuichi Masuda and Hirokazu Taniguchi : Determination of Corticosteroids in Plasma by HPLC after Pre-column Derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole, Journal of Chromatography Biomedical Applications 612:33-39(1993)
8. R.Hartley and J.T. Brocklebank: Determination of Prednisolone in Plasma by HPLC, Journal of Chromatography 232:406-412(1982)
9. James Q. Rose and William J. Jusko: Corticosteroid Analysis in Biological Fluids by HPLC, Journal of Chromatography 162:273-280(1979)
10. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, the Pharmaceutical Press 219-220(1986)
11. Justus G. Kirchner, John Wiley and Sons : Thin Layer Chromatography (1978)
12. E. Stahl : A Laboratory Handbook, 2nd ed., Springer International
13. Klaus Florey : Analytical Profiles of Drug Substances vol. 12, Academic Press (1973)
14. 대한약전 제 6개정 (1992)