

HPLC를 이용한 수종 Corticosteroids의 동시 분석에 관한 연구

毒性藥品科

宋永美·崔善姬·吳世宗

Studies on the Simultaneous Determination of Corticosteroids by High Performance Liquid Chromatography

Division of Toxicopharmaceutics

Young-Me Song, Seon-Hee Choi and Sea-Jong Oh

= Abstract =

This study was carried out to develop the high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of corticosteroids.

The results were as follows.

1. 10 corticosteroids—betamethasone, dexamethasone, cortisone acetate, hydrocortisone, prednisone, prednisolone, prednisolone acetate, triamcinolone, triamcinolone acetonide and fluocinonide—were analyzed by condition 1 and 2 with good linearity ($r > 0.993$).
2. The recovery of dexamethasone, prednisolone and triamcinolone acetonide from cold and cough preparation was higher than 98.5%.

緒 論

스테로이드란 4개의 ring으로 구성된 cyclopentano-perhydrophenanthrene 핵을 기본구조로 하는 물질을 총칭한다 (Fig. 1). 체내에는 cholesterol, ergosterol 등의 sterol로 부르는 알콜과 estrogen, progesterone 등의 OH기가 없는 물질을 포함하여 수많은 스테로이드 물질이 존재한다. 그러나 일반적으로 스테로이드 호르몬이라 하면 부신피질스테로이드 호르몬을 말하며 임상적으로는 특히 당질코르티코이드 (glucocorticosteroids)를 지칭한다.¹⁾

1940년대 말과 1950년초에 steroid제제는 류마치스성 관절염에 처음 사용된 이후 강력한 항염증작용과 면역억제작용으로 현재 외인성 및 내인성 염증성 질환, 천식 및

알레르기성 질환 등에 국소적 또는 전신적 치료목적으로 널리 이용되고 있다. steroid제제는 그 효과가 매우 극적인 반면, 그에 동반된 부작용 - 소화성 궤양, 감염증의 치유곤란, 골조송증, 당뇨병, 부신의 위축, 피부의 위축, 부종, 백혈구의 증가 등- 이 크므로, 장기간 사용이나 오남용에 세심한 주의가 필요하다.^{1,2,3)}

현재 다양한 시료로부터 스테로이드를 분리, 분석하기 위해 Gas chromatography (GC), Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS), Radioimmunoassay (RIA), Enzyme immunoassay (EIA), High performance liquid chromatography (HPLC) 등이 이용되고 있다.^{4,5,6,7,8)}

본 실험에서는 시중에서 유통되고 있는 각종 의약품 제제중에서 이들 steroid성분의 오남용 실태를 조사하기 위하여, 이들 성분에 대한 신속한 분석방법으로서 우선

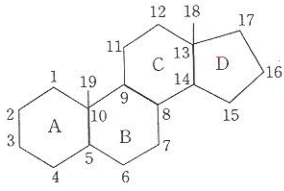
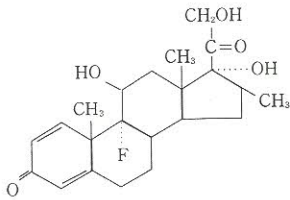
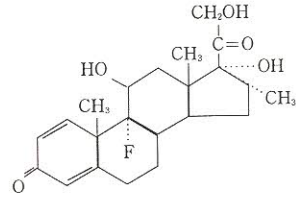


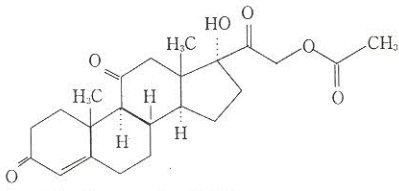
Fig. 1. Cyclopentanoperhydrophenanthrene skeleton.



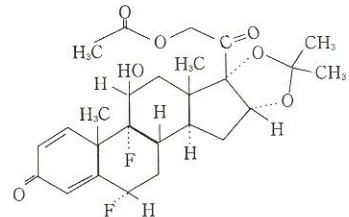
Betamethasone



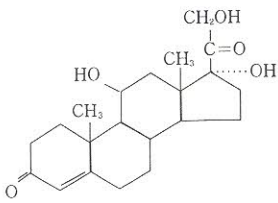
Dexamethasone



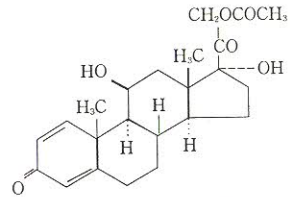
Cortisone Acetate



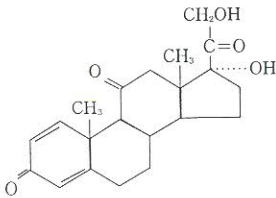
Flucicnonide



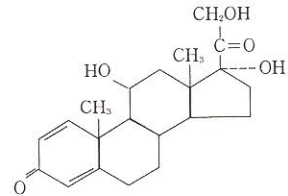
Hydrocortisone



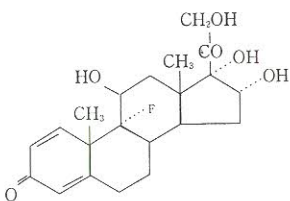
Prednisolone acetate



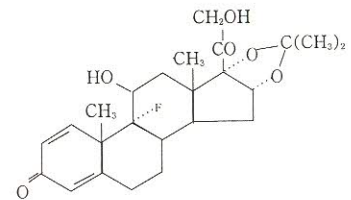
Prednisone



Prednisolone



Triamcinolone



Triamcinolone Acetonide

Fig. 2. Structures of corticosteroids.

고속액체크로마토그래프의 분배원리를 이용하여 고정상 (silica, silica-C₁₈)에 대한 다양한 액상 이동상에서, 스테로이드 호르몬의 동시 분리 조건을 알아보려고 하였다.

材料 및 方法

1. 機 器

본 연구에서 사용한 기기는 Waters Association사의

High Performance Liquid Chromatograph로서 시료 주입기는 U6K Universal Injector, 펌프는 510 Solvent Delivery System, 검출기는 486 Tunable Absorbance Detector, 기록계는 745 Data module과 Waters Millennium Data Processing System을 사용하였다.

2. 試 藥

표준품으로 betamethasone, dexamethasone, cortisone acetate, hydrocortisone, fluocinonide, prednisone, prednisolone, prednisolone acetate, triamcinolone, triamcinolone acetonide의 정량용 원료를 사용하였고 (Fig. 2), acetonitrile (Mallinckrodt specialty chemicals Co., HPLC grade), methylene chloride (J.T. Baker Inc., HPLC grade), methanol (Fisher scientific, HPLC grade)을 사용하였다.

3. 材 料

시판 종합감기약에 위의 각종 corticosteroids를 첨가하여 시료로 사용하였다.

4. 實驗方法

1) 標準液 調製

betamethasone, dexamethasone, cortisone acetate, fluocinonide, hydrocortisone, prednisone, prednisolone, prednisolone acetate, triamcinolone, triamcinolone acetonide을 각각 15 mg을 취하여 각각의 이동상에 녹여 100 ml로 하여 stock solution (0.15 mg/ml)으로 사용하였다.

2) 檢量線 作成

Table 1의 HPLC조건에 따라 표준액을 주입하여 얻은 peak area로부터 0.6~3.5 ng 범위에서 검량선을 작

성하였다.

3) 試料의 調製

시판되고 있는 종합감기약 1종을 선택하여 1캡셀을 25 ml의 용량 플라스크에 넣고 텍사메타손 (0.87 mg/ml), 프레드니솔론 (0.74 mg/ml), 트리암시놀론 아세토니드 (0.8 mg/ml)를 각각 1 ml, 5 ml, 5 ml 취하여 넣은 후 이동상으로 25 ml로 하였다. 시료를 3번 만든 후 실험조건에 따라 회수율을 측정하였다.

結果 및 考察

1. 이동상의 결정

Reverse phase에서 10종의 스테로이드를 분리해내기 위한 최적의 조건으로 40% acetonitrile이 선택되었다. 40% acetonitrile (flow: 0.7 ml/min)에서 이성질체인 betamethasone과 dexamethasone은 하나의 peak로 나타났으며, prednisolone, hydrocortisone, pred-

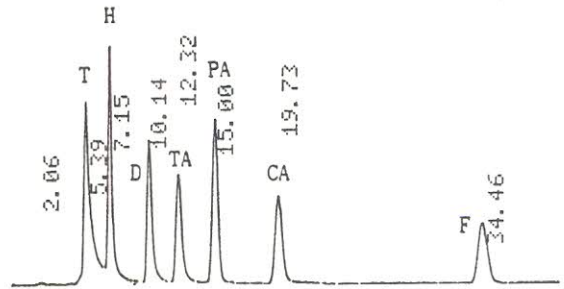


Fig. 3. HPLC chromatogram of mixed standard corticosteroids (condition 1).

CA : Cortisone acetate D : Dexamethasone
F : Fluocinonide H : Hydrocortisone
PA : Prednisolone acetate
T : Triamcinolone
TA : Triamcinolone acetonide

Table 1. Analytical Conditions of HPLC.

	Condition 1	Condition 2
Column	μ -Bondapak C ₁₈	μ -Porasil
Detector	Waters 486 (254 nm)	Waters 486 (240 nm)
Injector	U6K Injector	U6K Injector
Pump	Waters 510	Waters 510
Flow rate	A : 0.7 ml/min B : 1.5 ml/min (after 20 min from the start)	0.8 ml/min
Injection volume	10 μ l	10 μ l
Mobile phase	Acetonitrile/Water (60:40)	Methylene chloride/Methanol (97:3)

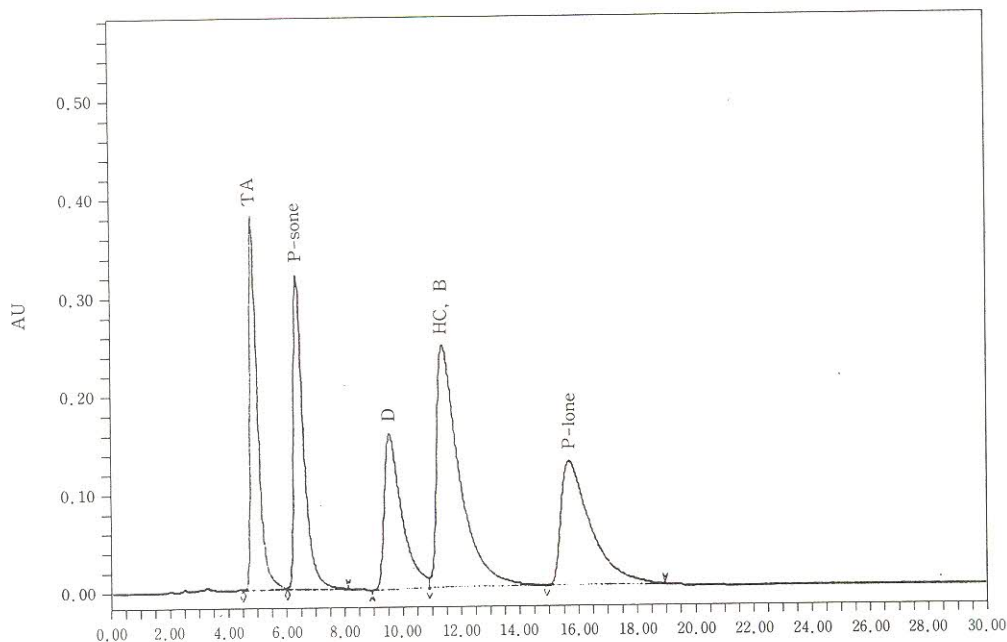


Fig. 4. HPLC chromatogram of mixed standard corticosteroids (condition 2).
 B: Betamethasone D: Dexamethasone HC: Hydrocortisone TA: Triamcinolone acetonide
 P-sone : Prednisone P-lone : Prednisolone

nisone이 하나의 peak로 나타났다 (Fig. 3).

이동상의 유속은 0.7 ml/min이 알맞은 것으로 사료되었으나 fluocinonide의 peak가 1시간 이후에 나타나므로 분석시간을 줄이기 위하여 시료주입후 20분후에 유속을 1.5 ml/min으로 조정하였다. 하나의 peak로 나타난 두 group군을 분리하기 위해 normal phase에서 Methylene chloride:MeOH (97:3)의 이동상을 선택하였다.

위의 조건에서 bethamethasone과 dexamethasone이 분리되었고 prednisolone, hydrocortisone, prednisone이 분리되었으나 hydrocortisone과 betamethasone이 하나의 peak로 나타났다 (Fig. 4). 그러나 hydrocortisone과 dexamethasone은 reverse phase에서 분리확인이 가능하므로 스테로이드 분석에서 reverse phase와 normal phase 모두를 사용하는 것이 적절하다고 사료된다.

2. 검량선 작성

Reverse phase, normal phase에서 각각의 표준액은 양호한 직선성을 나타냈으며 (Fig. 5, Fig. 6) 각각의 회귀방정식과 상관계수는 Table 2, Table 3와 같다.

Table 2. Equation and correlation coefficient in calibration curves of corticosteroids (condition 1).

Corticosteroids	Equation	R
Cortisone acetate	$Y=738017X-20842$	0.9999
Dexamethasone	$Y=558597X-68408$	0.9999
Fluocinonide	$Y=516552X-33232$	0.9999
Hydrocortisone	$Y=598803X-427687$	0.9999
Prednisolone	$Y=785799X-19092$	0.9999
Prednisone acetate	$Y=609822X-41782$	0.9999
Triamcinolone acetonide	$Y=741685X-135867$	0.9999

Table 3. Equation and correlation coefficient in calibration curves of corticosteroids (condition 2).

Corticosteroids	Equation	R
Betamethasone	$Y=111614X-46758$	0.9998
Dexamethasone	$Y=10540X+174386$	0.9965
Hydrocortisone	$Y=86238X-58540$	0.9998
Prednisolone	$Y=178187X-309513$	0.9950
Prednisone	$Y=119074X+84704$	0.9999
Triamcinolone acetonide	$Y=103311X+136030$	0.9934

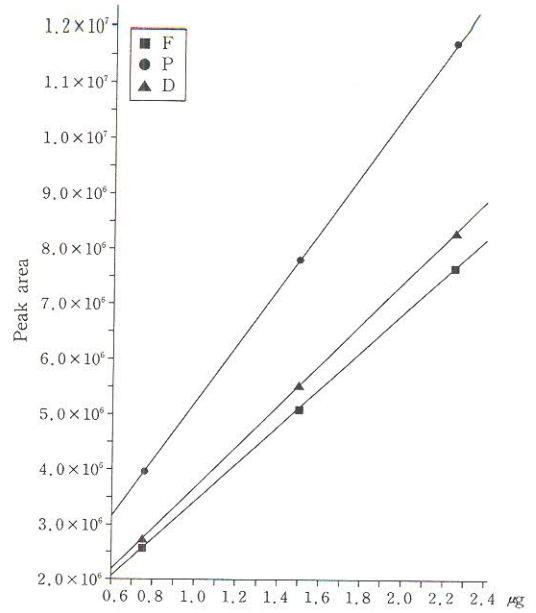
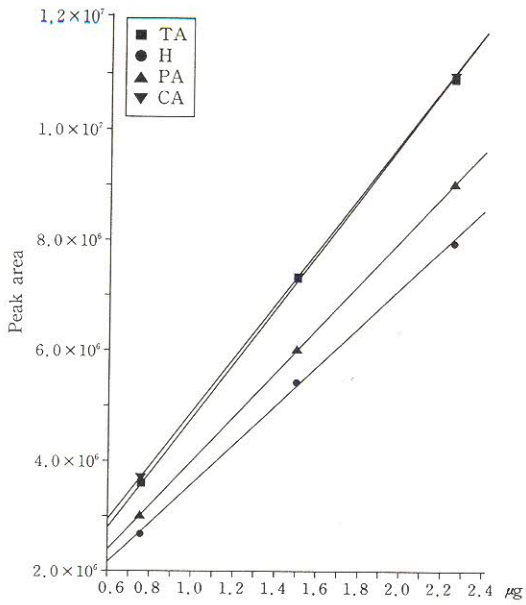


Fig. 5. Calibration curve of standards (condition 1).
 CA : cortisone acetate D : dexamethasone
 P : prednisolone PA : prednisolone acetate

F : fluocinonide H : hydrocortisone
 TA : triamcinolone acetonide

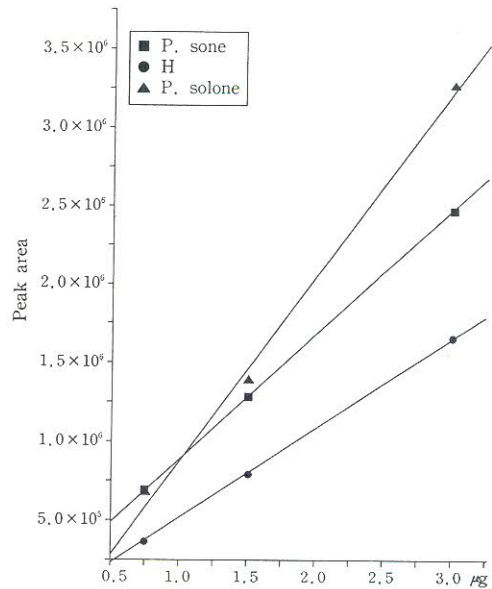
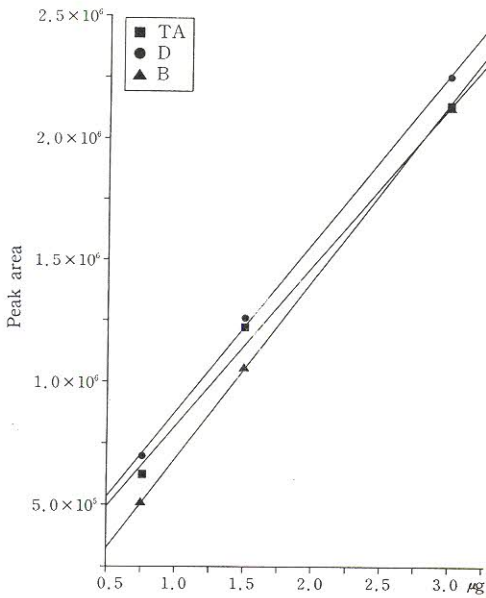


Fig. 6. Calibration curve of standards (condition 2).

B : betamethasone D : dexamethasone H : hydrocortisone TA : triamcinolone acetonide
 P-sone : prednisone P-lone : prednisolone

3. 시료분석

시중에 유통되고 있는 신경통이나 관절염의 치료약 중

처방가능성이 높으며 정제의 형태로 시판되고 있는 스테로이드 3종 (prednisolone, dexamethasone, triamci-

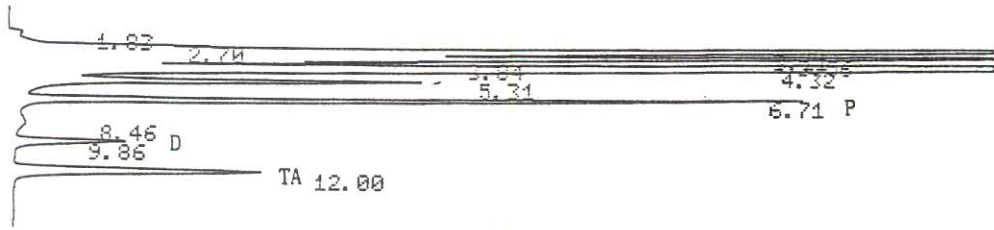


Fig. 7. Chromatogram of sample.

D : Dexamethasone P : Prednisolone acetate TA : Triamcinolone acetonide

Table 4. Recovery of Dexamethasone, Prednisolone, Triamcinolone acetonide.

	1	2	3	mean(%)	RSD(%)
Dexamethasone	101.7	100.1	99.9	100.6	0.9866
Prednisolone	100.4	100.5	98.9	99.9	0.8963
Triamcinolone acetonide	100.1	99.0	98.5	99.2	0.8185

nonone acetonide)을 선택하였고 이를 종합감기약과 혼합하여 시료를 만들고 이를 이미 확립된 Table 1의 조건에서 분리 정량하였다. 실험에 사용된 종합감기약은 acetaminophen, caffeine, dl-chlorpheniramine maleate, cloperastine hydrochloride, serratiopeptide, thiamine nitrate, 갈근말 엑스의 조성이며, 감기약 성분들은 40% acetonitrile의 이동상에서 5분이전에 스테로이드와 모두 분리되어 이에 영향을 받지 않고 스테로이드를 분리 확인할 수 있었다. Fig. 7은 시료를 분석한 chromatogram이며, 이의 회수율은 Table 4와 같다.

위의 실험결과를 의약품 오남용실태조사에 응용하기 위해서는 종합감기약외에 관절염치료제, 한약제제 등에서의 스테로이드 분리, 확인에 관한 유의성을 검토하여야 할 필요가 있으며 HPLC방법외에도 GC-MS, NMR 등을 이용한 구조 확인이 되어야 할 것으로 사료된다.

結 論

1. 스테로이드 호르몬 cortisone acetate, fluocinonide, hydrocortisone, prednisolone acetate, triamcinolone, triamcinolone acetonide는 μ -Bondapak C₁₈의 컬럼을 적용한 이동상 40% acetonitrile 및 흡광파장 UV 254 nm의 분석조건에서 분리정량이 가능하였다. 위의 조건에서 분리가 미약했던 Betamethasone과 dexamethasone,

Prednisone과 Prednisolone은 순상컬럼 μ -porasil, 이동상 Methylene chloride/Methanol (97:3) 및 흡광파장 UV 240 nm로 분석조건을 변화시킴으로써 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

2. acetaminophen, caffeine, dl-chlorpheniramine maleate, cloperastine hydrochloride, serratiopeptide, thiamine nitrate, 갈근말 엑스의 조성을 갖는 종합감기약 중에서는 prednisolone, triamcinolone acetonide, dexamethasone의 98.5% 이상의 회수율을 얻었다.

參 考 文 獻

1. 월간약국 4:84(1994)
2. Martindale the Extra Pharmacopoeia, the Pharmaceutical Press, 872(1989).
3. 약물학, 한국약학대학협의회, 문성사, 674(1987).
4. Chiong, D.M., Consuegra-Rodriguez, E. and Almirall, J.R. : The Analysis and Identification of Steroids, Journal of Forensic Sciences 37(2):488 (1992).
5. Masatoki Katayama, Yuichi Masuda and Hirokazu Taniguchi : Determination of Corticosteroids in Plasma by HPLC after Pre-column Derivatization with 2-(4-carboxylphenyl)-5,6-dimethylbenzimidazole, Journal of Chromatography Biomedical Applications 612:33(1993).
6. R. Hartley and J.T. Brocklebank : Determination of Prednisolone in Plasma by HPLC, Journal of Chromatography 232:406(1982).
7. James Q. Rose and William J. Jusko : Corticosteroid Analysis in Biological Fluids by HPLC, Journal of Chromatography 162:273(1979).
8. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, the Pharmaceutical Press 219(1986).