

HPLC에 의한 製劑中の 염산 암브록솔과 염산 클렌부테롤의 分離定量

毒性藥品科

金 裕 卿 · 金 明 姬

Simultaneous Determination of Clenbuterol HCl and Ambroxol HCl in Drugs by HPLC

Division of Toxicopharmaceutics

Yoo Kyung Kim and Myung Hee Kim

= Abstract =

The simultaneous determination of Clenbuterol HCl and Ambroxol HCl was carried out by HPLC.

The obtained results were as follows;

1. Clenbuterol HCl and Ambroxol HCl were separated by μ -Bondapak C₁₈ column with methanol: isopropanol: 0.15% sod. heptanesulfonate (58:2:40) (A), 55% methanol added 0.005M KH₂PO₄ (B) and 50% methanol added 0.005M phosphate buffer (C) as mobile phase at UV 240 nm.
2. It is good to extract sample using methanol instead of N-HCl solution.
3. Total analytical time was within 16 minute.

서 론

Ambroxol HCl은 bromhexine의 代謝物質로서 慢性 氣管支炎의 治療에 대한 效果가 bromhexine 보다 優秀하다고 報告된 바 있으며¹⁾, 氣管支分泌促進作用과 肺表面活性作用에 있어 silicosis group에 비해 2배 정도 治療效果가 優秀하다고 한다²⁾.

Clenbuterol HCl은 β -adrenoreceptor stimulating drug로서 細氣管支 및 氣管支 擴張作用이 있어 客談排出이 容易하며, LD₅₀은 經口投與시 mouse에서 176 mg/kg, rat에서 315 mg/kg으로 報告되어 있다³⁾.

Ambroxol HCl은 methanol에 녹고 acetone, chloroform 등에 거의 녹지 않으며, Clenbuterol HCl은 H₂O, methanol, ethanol에 매우 잘 녹고 ether, benzene 등에는 거의 녹지 않으며 UV 240, 294 nm에서 吸收極大를 나타낸다.

이 두 成分에 대한 分析方法으로는 GC/MS를 이용하여 血漿中の 濃度를 測定한 경우가 報告되어 있으며⁴⁾, HPLC를 이용하여 定量하는 方法이 公正書⁵⁾에 收載되어 있다. 本 實驗에서는 公定書에 있는 實驗方法을 檢討하고 보다 迅速하고 簡便한 分析法을 開發하여 分析業務에 效率을 높이고자 하였다.

材料 및 方法

1. 器機

Waters社의 HPLC 510과 745 data model, detector는 model 481 사용.

2. 材料

1991년 市中流通되는 錠劑 3종(錠當 염산 암브록솔 30 mg, 염산 클렌부테롤 0.02 mg)

3. 試藥

Ambroxol HCl, Clenbuterol HCl : NIH working standard

Metanol, Acetic acid glacial : Merck 製品 (HPLC 용)

Sodium heptanesulfonate : Sigma 製品

Hydrochloric acid : Avondale laboratory 製品

Potassium phosphate monobasic, Phosphoric acid : Junsei Chemical Co. 製品

3. 實驗方法

1) 標準液 調製

Ambroxol HCl 30 mg을 精密히 달아 10 ml 메스플라스크에 넣고 Clenbuterol HCl은 20 mg을 精密히 달아 methanol로 稀釋하여 最終濃도를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 하여 메스플라스크에 넣고 methanol을 소량 가해 30분간 超音波한 후 다시 methanol을 標線까지 채워 標準液 1로 한다. 稀釋溶媒를 methanol 대신 N-HCl을 사용하여 같은 方法으로 調製하여 標準液 2로 한다.

2) 檢液 調製

檢體 20정을 취하여 가루로 한 후 1정 해당량을 精密히 달아 10 ml 메스플라스크에 넣고 methanol을 소량 가해 30분간 超音波한 후 다시 methanol로 標線까지 채워 檢液 1로 한다. 稀釋溶媒를 methanol 대신 N-HCl을 사용하여 같은 方法으로 調製하여 檢液 2로 한다.

3) 實驗條件

Table 1과 같은 條件으로 實驗하였다.

4) 檢量線 作成과 回收率

표준액 1을 原液, 2배 稀釋液, 4배 稀釋液으로 하여 각각의 액을 10 μl 씩 HPLC injection port에 注入하여 얻은 peak area로 檢量線을 作成하고, 檢液 1에 一定量

Table 1. Analytical Condition of Ambroxol HCl and Clenbuterol HCl by HPLC.

Column	μ -Bondapak C ₁₈
Mobile phase	(A) Methanol : Isopropanol : 0.15% Sod. heptanesulfonate (58 : 2 : 40) (B) Methanol : 0.005M Potassium phosphate monobasic (55 : 45) (C) Methanol : 0.005M Phosphate Buffer (pH 2.8) (50 : 50)
Detector	240 nm
Flow Rate	0.6 ml/min.
Injection vol.	7.5 μl

의 標準品(Ambroxol HCl 30 mg, Clenbuterol HCl 0.02 mg)을 가하여 함께 methanol에 녹여 全량을 20 ml로 한 후 理論値와 實驗値를 比較하여 回收率을 구하였다.

結果 및 考察

Ambroxol HCl의 경우에는 3 mg/ml 濃度, Clenbuterol HCl은 0.002 mg/ml 濃度로 두 成分의 濃도가 1500배의 차를 보이므로 낮은 濃度の 成分은 attenuation 8로, 높은 濃度の 成分은 attenuation 1024로 變換하면서 두 成分을 分離하였다. 標準液과 檢液을

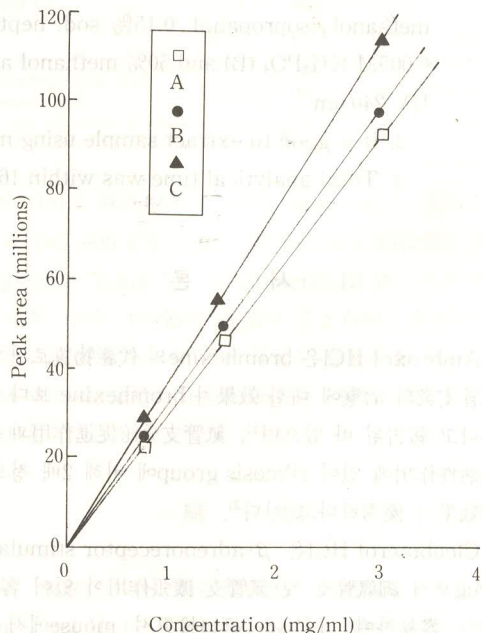


Fig. 1. Standard calibration curve of ambroxol HCl in mobile phase A, B, C.

Table 2. Correlation Coefficient (R) and Linear Regression of Ambroxol HCl (AH) and Clenbuterol HCl (CH) in Standard.

Mobile phase		A	B	C
Correlation	AH	0.9999	0.9989	0.9999
Coefficient	CH	0.9997	0.9977	0.9896
Linear	AH	$y = 31301069x - 769813$	$y = 37864154x - 401191$	$y = 32645530x + 509685$
Regression	CH	$y = 45822x$	$y = 51423x + 514$	$y = 47840x + 1603$

methanol과 N-HCl로 추출하여 HPLC injection port 에 주입하여 얻은 chromatogram 結果 標準液의 경우에는 두 抽出溶液에서 모두 分離가 잘되나 檢液의 경우에는 N-HCl로 抽出한 경우에는 Clenbuterol HCl의 peak가 완전히 分離되지 않는다. 또 公定書⁵⁾에서와 같이 鹽基性에서 ether로 抽出하여 다시 鹽산산성(N-HCl)로 再抽出한 경우의 chromatogram과 檢體에 직접 N-HCl을 가하여 抽出한 경우의 chromatogram간 에 差異가 거의 없었다. 이상의 結果로서 實驗은 methanol로 抽出한 標準液과 檢液을 가지고 실시하였다. 標準液과 檢液의 HPLC chromatogram이 Fig. 1 에 圖示되어 있다.

移動相 (A), (B), (C)에서의 檢量線이 Fig. 2와 Fig. 3에 圖示되어 있고 檢量線의 相關係數, 直線式이 Table 2에 나타나 있다.

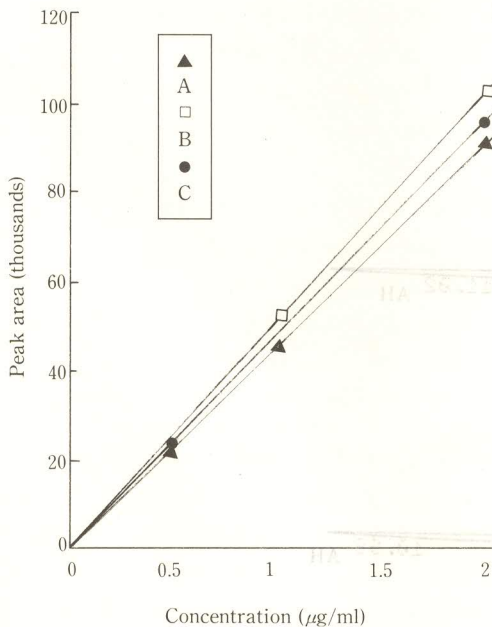


Fig. 2. Standard calibration curve of clenbuterol HCl in mobile phase A, B, C.

Table 3. Recovery Rates of Ambroxol HCl (AH) and Clenbuterol HCl (CH).

	AH		CH	
	Add (mg)	Found (mg)	Add (µg)	Found (µg)
Mobile Phase A	31.3	31.3	2.02	2.01
	31.3	31.2	2.02	1.98
	31.3	31.2	2.02	2.03
Recovery rate (%) (Mean±SD)	99.8±0.15		99.3±1.02	
Mobile Phase B	31.3	31.4	2.02	2.04
	31.3	31.1	2.02	2.00
	31.3	31.3	2.02	2.01
Recovery rate (%) (Mean±SD)	99.9±0.40		99.8±0.34	
Mobile Phase C	31.3	31.2	2.02	2.01
	31.3	30.9	2.02	1.96
	31.3	31.4	2.02	2.04
Recovery rate (%) (Mean±SD)	99.6±0.66		99.2±1.63	

이 세가지 移動相에서 비슷한 樣相으로 두 成分이 16 분 이내에 分析可能하였다. 각각에 대한 回收率은 99% 이상이었고 (Table 3), Clenbuterol HCl의 경우 濃度가 매우 낮아 注射器의 洗滌이 중요하며, Ambroxol HCl의 peak가 완전히 나온 후에도 移動相을 좀더 흘려 준 후에 다음 檢體를 injection하는 것이 必要하다고 생각된다.

結 論

本 實驗에서는 呼吸器疾患 治療劑로 사용되는 Ambroxol HCl과 Clenbuterol HCl 複合製劑의 보다 簡便한 分析方法 開發의 一環으로 HPLC를 이용하여 두 成分을 同時分析하였다. Clenbuterol HCl과 Ambrox-

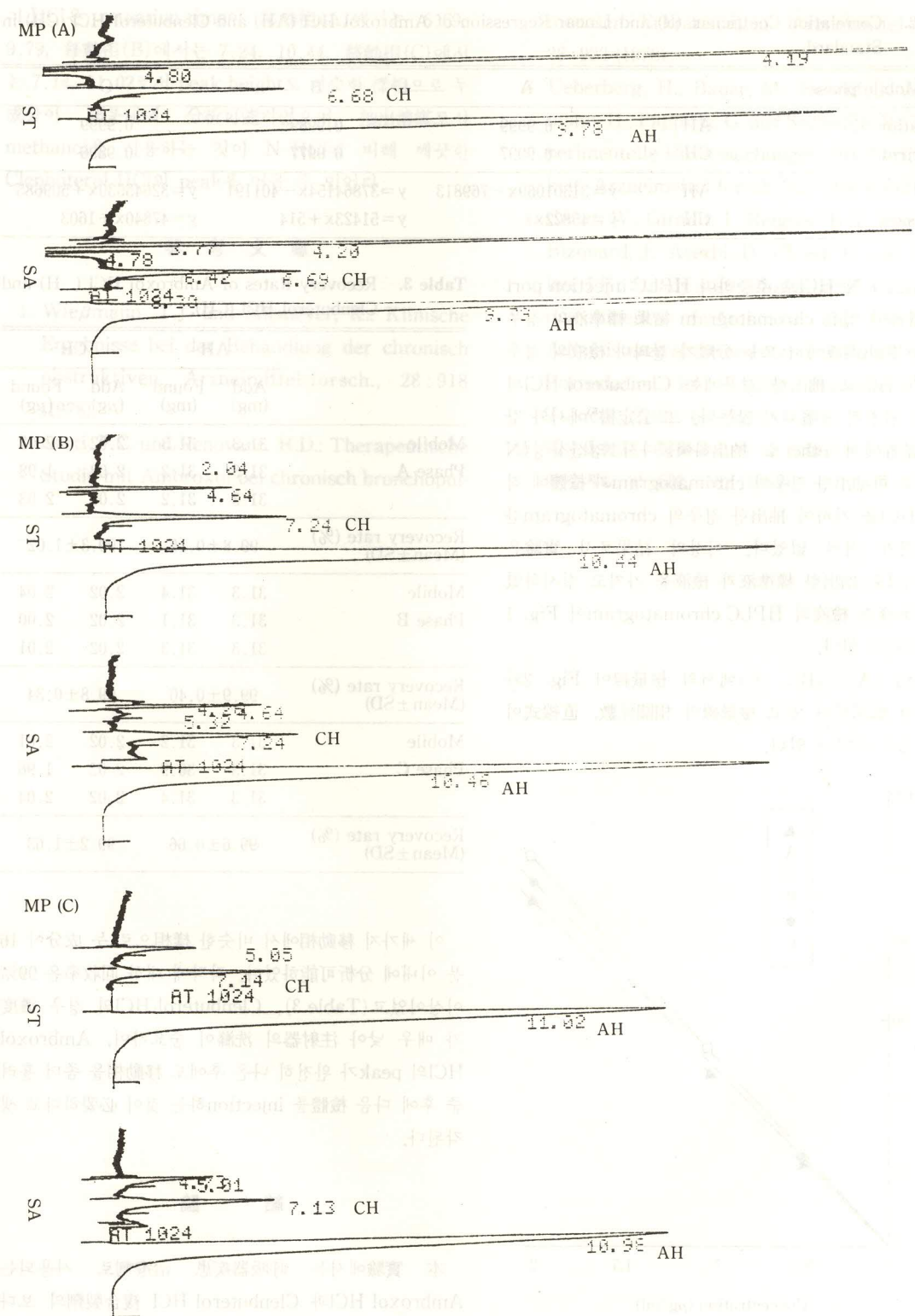


Fig. 3. HPLC chromatogram of ambroxol HCl (AH) and clenbuterol HCl (CH) in mobile phase A, B, C.

이 HCl은 retention time이 移動相(A)에서는 6.69, 9.79, 移動相(B)에서는 7.24, 10.44, 移動相(C)에서는 7.14, 11.02로서 peak height도 비슷한 樣相으로 두成分이 16분내에 分析可能하였으며 抽出溶媒로서 methanol을 사용하는 것이 N-HCl에 비해 깨끗한 Clenbuterol HCl의 peak를 얻을 수 있었다.

參 考 文 獻

1. Wießmann, T.J. und Niemeyer, K.: Klinische Ergebnisse bei der Behandlung der chronisch obstruktiven. *Arzneimittel-forsch.*, 28: 918 (1978).
 2. Curti, P.C. und Renovanz, H.D.: Therapeutische Studie mit Ambroxol bei chronisch bronchopul-

monalen Erkrankungen. *Arzneimittel-forsch.*, 28: 922 (1978).
 3. Ueberberg, H., Bauer, M., Eckenfels, A., Lehmann, H., Pappritz, G. und Serbedija, R.: Tierexperimentelle Untersuchungen zurs Vertraglichkeit. *Arzneimittel-forsch.*, 22: 1420 (1972).
 4. Couet, W., Girault, J., Reigner, B.G., Ingrand, I., Bizouard, J., Acerbi, D., Chiesi, P. and Feurtilan, J.B.: Steady-state Bioavailability and Pharmacokinetics of Ambroxol and Clenbuterol Administered alone and combined in a New Oral Formulation. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 27(9): 467 (1989).
 5. 國立保健院: 醫藥品基準 및 試驗方法(I). 國立保健院考試 89-6號. 102 (1989).