

초고성능액체크로마토그래프법에 의한 오줌에서 프레드니졸론의 분석

리현희, 한찬현

프레드니졸론은 합성신상선피질호르몬으로서 뇌하수체전엽기능부전, 신상선피질기능부전, 류마치스, 신경성피부염, 기관지천식 등 여러가지 질병치료에 리용된다. 그러나 이 약을 오래 쓰면 피부알레르기, 뼈성감증 등의 부작용이 있게 된다. 이로부터 사람이나 여러 동물의 오줌, 혈장 등에서 졸론류의 화합물을 분석하기 위한 연구사업이 많이 진행되었다.

프레드니졸론의 분석에는 대체로 액체크로마토그래프분석법[1, 2], 기체크로마토그래프-질량분석법[3], 액체크로마토그래프-질량분석법[4, 5] 등이 리용되었다.

우리는 초고성능액체크로마토그래프법(UPLC)으로 오줌에서 프레드니졸론을 분석하기 위한 시료전처리 및 UPLC측정조건을 최적화하고 대상물분석에 적용하였다.

실 험 방 법

장치 및 기구로는 초고성능액체크로마토그래프(《ACQUITY™ UPLC》), 빛2극소자배렬 검출기(《ACQUITY™ UPLC PDA》), 원심분리기(《Allegra X-12》), 항온수욕조, 펌프기, 마이크로피펫, 시약으로는 프레드니졸론알약(5mg/알), 아세토니트릴(HPLC급), 개미산(HPLC급), 메틸알콜(HPLC급), 수소탄산나트륨(분석순), 탄산칼리움(분석순), 이수소린산나트륨(분석순), 수소린산나트륨(분석순), β -글루쿠로니다제(β -GLU, 125 000U/mL), 초순수를 리용하였다.

표준용액과 이동상, 완충용액, 효소용액의 준비 프레드니졸론표준용액(100 μ g/mL)은 프레드니졸론 0.005g을 메틸알콜 50mL에 용해시켜 제조하였다. 수소탄산나트륨 100g과 탄산칼리움 100g을 저울질하여 초순수로 풀고 1L까지 희석하여 수소탄산나트륨완충용액(pH 10.0)을 조제하였다. 수소린산나트륨 35.80g과 이수소린산나트륨 15.60g을 초순수로 풀고 1L까지 희석하여 린산완충용액(pH 6.9)을 준비하였다.

β -글루쿠로니다제용액(25 000U/mL)은 125 000U의 효소를 초순수 5mL에 풀어 준비하였다. 초순수 500mL에 개미산 0.5mL를 첨가한 0.1% 개미산수용액을 준비하여 이동상 A로 하고 아세토니트릴을 이동상 B로 하였다.

초고성능액체크로마토그래프분리조건의 최적화 ACQUITY UPLC HSS 및 BEH계열의 5가지 탭들을 선택하여 프레드니졸론표준용액의 크로마토그램을 측정하고 프레드니졸론의 유지인자와 봉우리면적을 비교하였다.

봉우리면적과 유지인자가 큰 탭을 선택한 다음 실지 오줌시료에서 프레드니졸론의 분리조건을 검토하기 위하여 이동상조성(아세토니트릴함량)을 변화시키면서 프레드니졸론봉우리와 오줌기질에 의한 배경봉우리와의 분리정도를 평가하였다.

다음 오줌기질에 의한 배경을 얻기 위하여 프레드니솔론을 사용하지 않은 사람의 오줌(음성오줌)을 아래에 서술한 액-액추출절차에 따라 시료전처리를 진행하였다. 음성오줌 시료용액에 프레드니솔론을 $10\mu\text{g/mL}$ 되게 첨가한 다음 배경봉우리와 프레드니솔론봉우리의 분리도를 구하였다.

오줌에서 프레드니솔론을 분리농축하기 위한 액-액추출방법 오줌시료의 전처리단계는 β -글루쿠로니다제에 의한 효소분해(55°C 에서 2h), 유기용매추출, 증발농축, 재용해단계로 진행된다. 먼저 10mL 시험관에 오줌시료 2.0mL를 넣고 린산완충용액 1mL와 β -글루쿠로니다제를 넣고 55°C 에서 2h동안 효소분해를 진행한 다음 여기에 알카리성완충용액과 초산에틸을 넣고 5min간 진탕한다. 5 000r/min에서 10min간 원심분리를 진행하고 -20°C 에서 랭동한 다음 랭동된 시험관을 조심히 꺼내어 옷층의 맑은 초산에틸층을 다른 시험관에 옮기고 질소기체를 불어주면서 $70\sim 80^\circ\text{C}$ 에서 초산에틸을 증발시킨다. 시험관의 잔사를 이동상용매($A:B=50:50$ (체적비))로 풀어 액체크로마토그래프에 주입한다. 실험에서는 오줌시료 2mL에 대하여 알카리성완충용액의 량을 0.2~0.6mL, 추출용매인 초산에틸의 량을 2.0~6.0mL, 효소의 량을 1 000~3 000U로 변화시키면서 프레드니솔론의 추출률을 봉우리면적으로 비교하고 최적조건을 결정하였다.

실험결과 및 해석

오줌에서 프레드니솔론의 최고성능액체크로마토그래프측정조건 실험에서는 탭 HSS T3($2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$), BEH HILIC($2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$), BEH Shield RP18($2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$), HSS SB($2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$), HSS C18($2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$)을 리용하여 프레드니솔론의 유지특성을 측정하였다.(표 1) 이때 이동상조성은 $A:B=50:50$ (체적비)이다.

표 1. 탭종류에 따르는 프레드니솔론의 유지인자(k')와 봉우리면적

탭	k'	봉우리면적
HSS T3	1.31	154 595
BEH HILIC	0.49	154 768
BEH Shield RP18	0.80	157 919
HSS SB	1.04	150 676
HSS C18	1.09	153 721

표 1에서 보는바와 같이 HSS T3탭의 유지인자가 제일 크며 봉우리면적은 BEH Shield RP18탭에서 제일 크다.

다음 이 두 탭을 선택하여 아세토니트릴함량을 30, 50, 70%로 변화시키면서 실지 오줌시료에서 프레드니솔론봉우리의 분리정도를 비교하였다. 이때 시료는 음성오줌시료에 프레드니솔론을 $10\mu\text{g/mL}$ 되게 첨가한것을 리용하였다. 린산완충용액 1mL, β -글루쿠로니다제 2 500U를 넣고 효소분해한 다음 알카리성완충용액 0.3mL, 초산에틸 4mL를 넣고 위의 실험방법에서 서술한대로 액-액추출을 진행하고 얻어진 잔사를 이동상용매로 풀어 최고성능액체크로마토그래프에 주입하였다.

음성오줌시료에 프레드니솔론을 첨가하고 크로마토그램을 측정하고 오줌시료에서 탭

의 종류와 이동상조성에 따르는 프레드니솔론과 린접붕우리사이의 분리도를 비교한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 오줌에서 탑의 종류와 이동상조성에 따르는 프레드니솔론과 린접붕우리사이의 분리도비교

탑	이동상에서 아세토니트릴의 함량/%	프레드니솔론의 유지시간/min	린접붕우리의 유지시간/min	분리도
HSS T3	30	6.40	6.35	0.03
	50	4.58	4.87	0.13
	70	13.06	12.90	0.15
BEH Shield RP18	30	8.86	10.00	0.58
	50	5.03	5.86	0.24

표 2에서 보는바와 같이 HSS T3탑에서는 아세토니트릴함량이 70%일 때 분리도가 크며 BEH Shield RP18탑에서는 반대로 아세토니트릴함량이 30%일 때 분리도가 0.58로서 제일 컸다. 이것은 오줌에서 프레드니솔론의 분리에는 극성용매에 의한 극성물질의 분리에 적합하게 설계된 탑인 HSS T3탑에 비해 폐놀류분석물질의 분리를 위해 설계된 BEH Shield RP18탑이 더 적합하다는것을 보여준다.

따라서 실험에서는 BEH Shield RP18탑을 프레드니솔론의 분석에 리용하였다.

우의 측정결과로부터 오줌에서 프레드니솔론을 분석하기 위한 초고성능액체크로마토그래프분리조건은 다음과 같다.

분리탑 BEH Shield RP18(2.1mm×150mm, 1.7 μ m), 이동상조성 0.1% 개미산수용액 : 아세토니트릴=70 : 30(체적비), 이동상흐름속도 0.1mL/min, 검출파장 244nm, 탑온도 25 $^{\circ}$ C, 시료주입량 10 μ L.

오줌에서 프레드니솔론의 액-액추출조건 5개의 10mL 시험관에 음성오줌 2.00mL를 넣고 프레드니솔론을 10.0 μ g/mL 되게 첨가한 다음 알칼리성완충용액을 각각 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6mL 넣었다. 초산에틸을 4.0mL씩 첨가하고 우의 방법대로 시료전처리를 진행한 다음 시료용액의 크로마토그램을 측정하여 프레드니솔론의 봉우리면적을 비교하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 완충용액의 량을 0.3mL로 하였을 때 프레드니솔론의 봉우리면적이 제일 컸다. 이것은 완충용액의 량을 늘이면 물상에 비한 유기상의 비가 작아지면서 추출률이 떨어진다는것을 보여준다. 따라서 알칼리성완충용액의 량을 0.3mL로 하였다.

4개의 10mL시험관에 음성오줌 2.0mL를 넣고 프레드니솔론을 10.0 μ g/mL 되게 첨가한 다음 알칼리성완충용액 0.3mL를 넣고 초산에틸을 각각 2.0, 3.0, 4.0, 6.0mL 첨가하고 우의 방법대로 시료전처리를 진행하고 프레드니솔론의 봉우리면적을 측정한 결과는 그림 2와 같다.

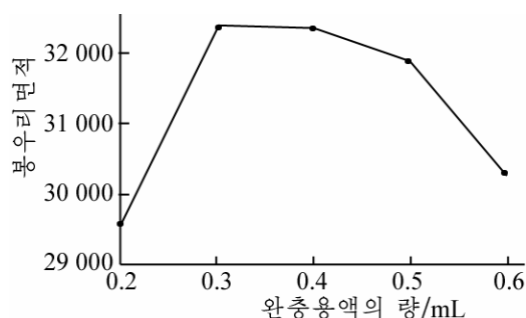


그림 1. 완충용액의 량에 따르는 프레드니솔론의 봉우리면적변화

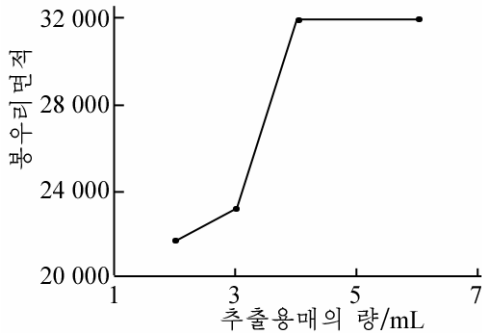


그림 2. 추출용매의 량에 따르는 프레드니졸론의 봉우리면적변화

파는 그림 3과 같다.

그림 3의 결과로부터 효소분해에서 취하는 효소량을 오줌 2.0mL당 2 500U로 정하였다.

우의 결과로부터 오줌에서 프레드니졸론을 추출하기 위한 최적조건은 다음과 같다. 오줌 2.0mL에 대하여 린산완충용액 1.0mL, 효소의 량은 2 500U, 효소분해시간은 55℃에서 2h, 알칼리성완충용액의 량은 0.3mL, 초산에틸의 량은 4mL이다.

우에서 최적화한 시료전처리 및 액체크로마토그래프분리조건에서 측정 한 오줌시료의 액체크로마토그램은 그림 4와 같다.

그림 2의 결과로부터 추출용매의 량은 오줌시료 2.0mL에 대해 4.0mL로 정하였다.

오줌시료의 효소분해에서 효소의 량을 결정하기 위해 5개의 10mL 시험관에 양성오줌시료(프레드니졸론 5mg을 사용한 다음 6h후에 취한 시료) 2.0mL를 넣고 각각 린산완충용액 1.0mL, β -글루쿠로니다제 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000U를 넣은 다음 우에서와 같이 효소분해를 진행하고 알칼리성완충용액 0.3mL, 초산에틸 4.0mL로 추출을 진행한 다음 프레드니졸론의 봉우리면적을 결정한 결

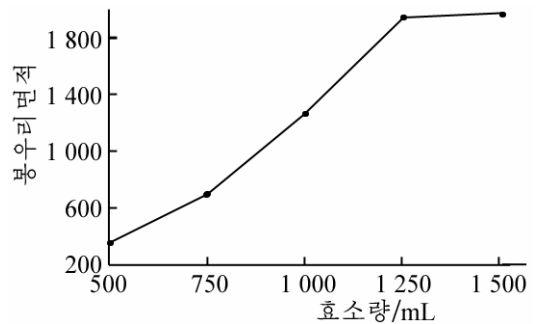


그림 3. 효소량에 따르는 오줌에서 프레드니졸론의 봉우리면적변화

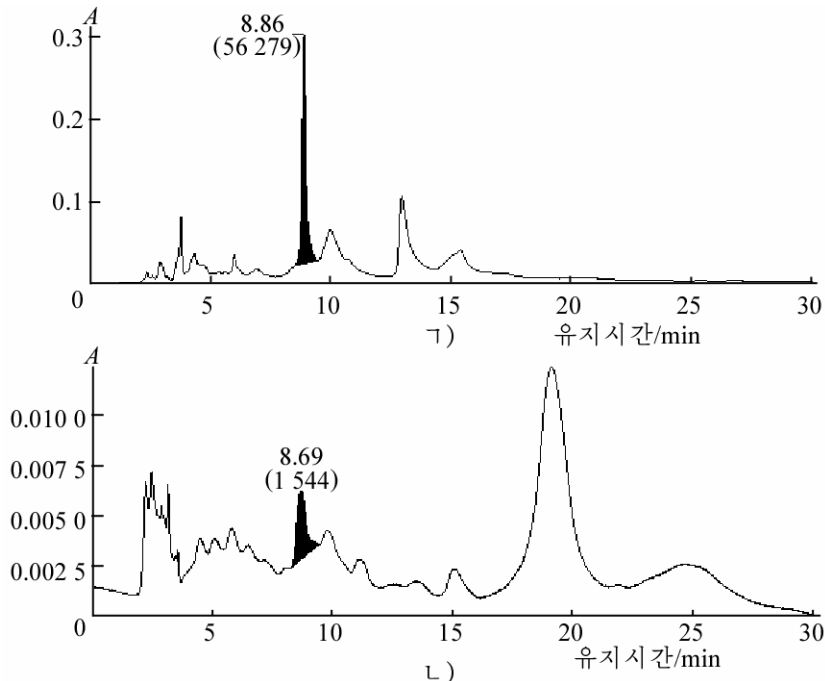


그림 4. 오줌시료의 액체크로마토그램

ㄱ) 음성오줌에 프레드니졸론을 첨가한것(10.0 μ g/mL), ㄴ) 약사용후 8h만에 취한 양성오줌시료

그림 4에서 보는바와 같이 양성오줌시료에서 프레드니솔론의 봉우리가 분리되었다.

검량선작성 및 대상물분석 우에서 서술한 효소분해와 용매추출로 이루어진 시료전처리 과정에서 음성오줌시료를 처리하고 재용해하기 전에 프레드니솔론의 농도가 각각 0.50, 2.00, 10.00, 25.00 $\mu\text{g/mL}$ 되게 표준용액계렬을 조제하고 측정하였다. 결과 검량선의 선형범위는 0.50 \sim 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 이고 회귀방정식은 $y=1\ 926.4x+141.5$, $R^2=0.997\ 8$ 로서 좋은 선형성을 보여주었다. 프레드니솔론의 검출한계는 0.075 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 0.11 $\mu\text{g/mL}$ 였다.

프레드니솔론을 사용한 사람의 오줌시료에 대하여 우에서 확립한 시료전처리방법과 크로마토그래프분리조건에서 프레드니솔론의 함량분석결과는 표 3과 같다.

표 3. 오줌시료에서 프레드니솔론의 함량분석결과(반복측정회수 3)

시료번호	사용량/mg	약사용후 시료채 취시간/h	함량/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	변동결수/%
1	5	6	0.84	2.88
		4	0.18	2.40
2	5	8	0.36	1.06
		12	0.52	1.21

표 3에서 알수 있는바와 같이 확립된 초고성능액체크로마토그래프분석법으로 오줌에서 프레드니솔론을 변동결수 1.21 \sim 2.88%로 분석할수 있다. 확립된 분석방법에서 프레드니솔론의 회수율은 93.0 \sim 95.2%이다.

맺 는 말

초고성능액체크로마토그래프법으로 오줌에서 프레드니솔론을 분석하기 위한 방법을 확립하였다. 효소분해와 초산에틸을 추출용매로 하는 액-액추출에 의한 시료전처리방법과 크로마토그래프분리조건을 확정하였다. 오줌에서 프레드니솔론은 0.50 \sim 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 선형구간에서 변동결수 1.21 \sim 2.88%, 회수율 93.0 \sim 95.2%로 정량할수 있으며 정량한계는 0.11 $\mu\text{g/mL}$ 이다.

참 고 문 헌

- [1] Yan Zhang et al.; Journal of Chromatography, B 840, 116, 2006.
- [2] S. AbuRaz et al.; Journal of Chromatography, B 798, 193, 2003.
- [3] A. A. Inamdar et al.; Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 119, 189, 2016.
- [4] Adam Tolgyesi et al.; Journal of Chromatography, B 878, 1471, 2010.
- [5] Caifen Wang et al.; Analytica Chimica Acta, 909, 75, 2016.

Analysis of Prednisolone in Urine by Ultra-Performance Liquid Chromatography

Ri Hyon Hui, Han Chan Hyon

We established the method to determine the content of prednisolone in urine by ultra-performance liquid chromatography. Prednisolone in urine can be determined with the coefficient of variation of 1.21~2.88% and the recovery of 93.0~95.2% in the liner range of 0.50~25.0 μ g/mL. The quantitative limit is 0.11 μ g/mL.

Key words: ultra-performance liquid chromatography, prednisolone, urine