

흡착벗김 전압-전류법을 이용한 부신피질 호르몬의 분석

김일광[†] · 천현자 · 정승일 · 박정환*

원광대학교 자연대학 화학과

*조선대학교 자연대학 화학과

(1994. 2. 7. 접수)

Adsorption Stripping Voltammetric Analysis of Corticosteroid Hormones

Il Kwang Kim[†], Hyun Ja Chun, Seung Il Jeong and Jung Hwan Park*

Dept. of Chemistry, Coll. of Natural Science, Wonkwang University, I-ri, 570-749, Republic of Korea

*Dept. of Chemistry, Coll. of Natural Science, Chosun University, Kwangju, 062, Republic of Korea

(Received Feb. 7, 1994)

요약: 1.0×10^{-2} M 수산화나트륨을 지지전해질로 하여 흡착벗김 전압-전류법으로 부신피질 호르몬을 분석하였다. 분석 최적 조건은 흡착시간 360초, 흡착전위 -0.80 volts, 수은방울 크기 medium, 주사속도 $20\text{mV}/\text{sec}$ 였으며 검량선은 5.0×10^{-9} M에서 8.0×10^{-7} M 범위까지 좋은 직선성을 보여 주었다. 검출한계는 9.5×10^{-10} M이었다. 또한 이 방법을 의약품의 부신피질 호르몬 분석에 응용한 결과, 다른 첨가제의 방해 없이 분리분석이 가능하였다.

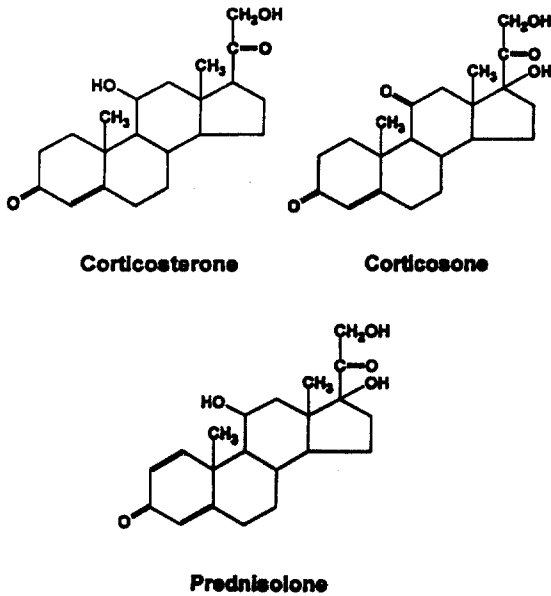
Abstract: The adsorptive stripping voltammetry of corticosterone was studied in 1.0×10^{-2} M sodium hydroxide as supporting electrolyte. The analytical conditions were as follows: 360 sec. for deposition time, -8.0 volts deposition potential, medium size mercury drop, and $20\text{mV}/\text{sec}$ scan rate. Calibration curve has shown a linearity in the range of 5.0×10^{-9} M to 8.0×10^{-7} M and the detection limits have been 9.5×10^{-10} M for corticosterones. This method has shown such a high sensitivity even in dilute solution that has been useful for analyzing sex hormones in medical supplies without interference of additives.

Key words: adsorptive stripping voltammetry, corticosteroid hormones, voltammetric analysis.

I. 서론

Corticosteroid는 인체내의 부신피질에서 분비되는 keto-steroid 호르몬의 일종으로 3-keto, 20-keto 및 21-hydroxy group을 가지고 있으며, 그들의 구조를 Scheme 1에 보였다. 이들은 경구투여 1~2시간 후에 최

고 혈중농도치에 이르며, 주요 대사산물은 glucuronide conjugate가 대부분이다.¹ 또한 corticosteroid계 호르몬은 항염 및 면역억제의 약물로 개발되어 장기 이식수술과 그밖의 질환에 널리 사용되고 있으나, 대식세포로부터 분비되는 인터루킨 I의 생성을 방해하고, T 임파구에서 생성되는 인터루킨 II의 분비장애



Scheme 1. The molecular structures of the corticosteroids

일켜 면역반응이 억제되는 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.^{2, 3}

이들 약물의 저농도에서는 항체형성과 홍선세포의 분화가 강화되지만, 고농도에서는 홍선의 위축, T 세포의 분열 및 백혈구의 식작용 저하가 일어난다고 보고된 바 있다.⁴ 이들 steroid의 분석을 위하여 radioimmunoassay⁵, competitive proteinbinding⁶ 및 GC-mass⁷ 등의 방법이 있으나 취급 간편성과 열적 안정성 등에 어려움이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 HPLC^{8, 9}가 많이 사용된다.

전기화학적 방법으로는 Kabasakalian¹⁰ 등이 여러 가지 keto-steroid의 폴라로그래피적 특성을 보고한 바 있으며, Opheim⁷ 등은 펄스차이 폴라로그래피를 이용하여 알약제에 존재하는 norentisterone을 정량하였다. Wang¹² 등은 흡착벚짐 전압-전류법으로 riboflavin을 분석하여 2.5×10^{-11} M의 검출한계를 보고하였다. 일반적으로 흡착벚짐 전압-전류법은 펄스 전압-전류법보다 $10^3 \sim 10^4$ 배 정도 감도가 좋아 화학물질의 극미량 분석에 매우 유용한 방법으로 보고되어 있다.¹³

본 연구에서는 극성기능기를 가진 steroids가 수은전극 표면에 특히 잘 흡착되는 성질을 이용하여 흡착벚짐 전압-전류법으로 미량의 corticosteroid를 정량하

였다. 이를 위하여 먼저 흡착시간, 흡착전위, 수은방울 크기, 주사속도 등의 분석조건 변화에 따라 봉우리 전류값을 조사하여 분석최적조건을 구하였다. 또한 얻어진 분석조건을 이용하여 시판되는 의약품 중의 corticosteroids 호르몬에 대한 분석을 시도하였다.

II. 실험

1. 시약

지지전해질인 수산화나트륨은 Aldrich제를 사용하였다. Corticosterone은 구입한 시약(Sigma제)을 ethanol에 녹인 후 1차 증류수를 Milli-Q에 통과시킨 탈이온수로 희석하여 1.0×10^{-3} M의 stock solution으로 만들어 사용하였다. 실험용액 안의 용존산소를 제거하기 위한 질소는 시판용을 구입하여 vanadous chloride 용액과 염기성 pyrogallol 용액, 그리고 증류수에 통과시킨 후 사용하였다. 미지 시료들은 주사액으로 시중에서 판매되는 것을 구입하여 농도비에 따라 적절히 희석하여 사용하였다.

2. 실험기기

EG & G PARC model 174A polarographic Analyzer에 PARC model 303A static mercury drop electrode system(ohmic drop 보상을 위한 3전극형)과 PARC model RE0074 X-Y recoder를 연결하여 전압-전류그림을 얻었다.

작업전극으로는 static mercury drop을, 기준전극으로는 Ag-AgCl 전극(PARC model G0159)을, 대조전극으로는 백금선을 사용하였다.

3. 실험방법

1.0×10^{-2} M 수산화나트륨으로 만든 지지전해질 10.0 ml를 취하여 용기에 넣고 질소 분위기하에서 적절한 흡착환원 전위를 선택하고 일정한 시간만큼 흡착을 실시한 다음 음전위쪽(환원)으로 주사하면서 흡착벚짐 전압-전류그림을 얻었다. 흡착시간, 흡착전위, 수은방울 크기, 주사속도 등의 변화에 따른 전류값을 조사하고, 얻어진 최적 조건하에서 표준검량선을 작성하였다. 시료의약품로는 corticosteroid 호르몬이 함유된 주사액을 시중에서 구입하여 농도비로 희석한 후 실험최적 조건에 맞추어 흡착벚짐 봉우리 전류를 측정하였으며 표준검량선과 비교하여 농도를 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수산화나트륨 전해질에서 corticosterone의 봉우리 전류

1.0×10^{-2} M NaOH 지지전해질만 있을 때와 2.0×10^{-7} M corticosterone을 가했을 때의 전형적인 흡착 벗김 전압-전류곡선을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1의 a에서는 지지전해질만 있을 때의 전압-전류곡선으로 -1.60 volts 근방까지 안정한 잔류전류만이 보였으며, b에서는 -1.45 volts 근방에서 corticosterone의 흡착 벗김 봉우리가 나타났다. 이것은 아래의 반응식과 같이 -0.8 volts 근방에서 corticosterone이 수은전극 표면에 흡착 축적되었다가 음전위쪽으로 주사할 때 -1.45 volts 정도에서 전자를 받아 탈착되면서 벗김봉우리를 보여 주는 것이다.

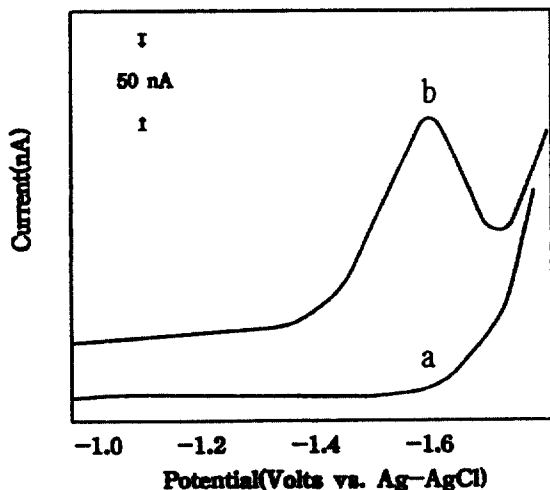
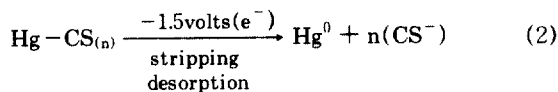
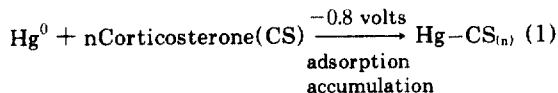


Fig 1. A typical stripping differential pulse voltammogram of adsorption stripping current for 5.0×10^{-7} M corticosterone in 1.0×10^{-2} M NaOH; -0.8 volts deposition potential, 20mV/sec scan rate, 360sec. deposition time, medium size mercury drop.

- a: only 1.0×10^{-2} M NaOH(supporting electrolyte).
- b: added 5.0×10^{-7} M corticosterone.

2. 흡착전위의 영향

2.0×10^{-7} M corticosterone 표준용액에 대하여 흡착시간을 360초로 하고 흡착전위를 -0.2 volts에서 -1.0 volts로 변화시키면서 얻은 봉우리 전류값을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2를 보면 흡착전위가 -0.2 volts에서 -1.0 volts로 변함에 따라 봉우리 전류값이 약간씩 감소함을 알 수 있다. 이것은 -1.5 volts의 벗김단계로 주사되는 동안에도 계속하여 전극표면에 호르몬성분이 추가로 흡착되기 때문으로 설명된다. 본 실험에서는 비교적 높은 전류값을 유지하면서 벗김주사에 걸리는 시간을 단축하기 위하여 -0.8 volts를 흡착전위로 선택하였다.

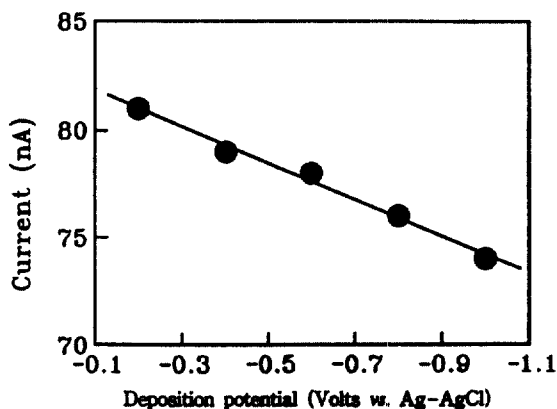


Fig 2. Effect of deposition potential on the differential pulse ASV peak current for 5.0×10^{-7} M corticosterone in 1.0×10^{-2} M NaOH; 20mV/sec scan rate, 360sec. deposition time, medium size mercury drop.

3. 흡착시간의 영향

Fig. 3은 2.0×10^{-7} M corticosterone 표준용액에 대하여 흡착전위 -0.8 volts의 조건에서 흡착시간을 30초에서 12분까지 변화시키면서 봉우리 전류값을 비교한 것이다. Fig. 3에서 흡착시간이 길어짐에 따라 전류값이 흡착등온선으로 증가하였으며 6분 이후에는 거의 일정하게 되는 것을 알 수 있다.

이것은 일정한 표면적의 매달린 수은 방울에 흡착되는 양이 최대로 될 때까지만 봉우리 전류값이 흡착시간에 비례하여 커지기 때문이다. 본 실험에서는 실험하는 농도가 미량이 아닐 경우 흡착시간이 짧아도 검출이 가능하므로 봉우리 전류값을 크게 유지하면서도 흡착시간을 단축하기 위해 360초를 적절한 조건으

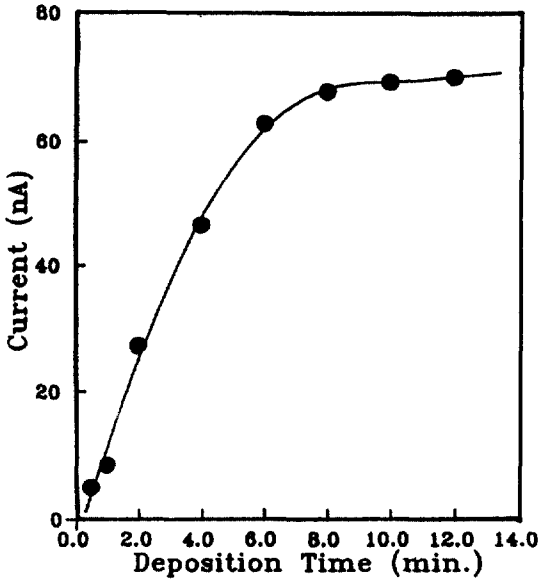


Fig 3. Effect of deposition time on the differential pulse ASV peak current for 5.0×10^{-7} M corticosterone in 1.0×10^{-2} M NaOH; -0.8 volts deposition potential; 20mV/sec scan rate.

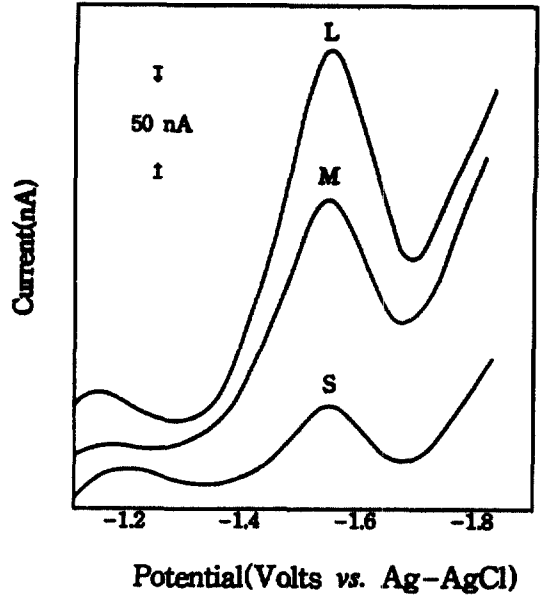


Fig 4. Effect of mercury drop size on the differential pulse ASV peak current for 5.0×10^{-7} M corticosterone in 1.0×10^{-2} M NaOH; -0.8 volts deposition potential, 20mV/sec scan rate, 360sec . deposition time.

S : small size M : medium size L : large size

로 선택하였다.

4. 수은방울크기와 주사속도의 영향

Fig. 4는 2.0×10^{-7} M corticosterone 표준용액에 대하여 흡착전위 -0.8 volts, 흡착시간 360초의 조건에서 수은방울의 크기를 변화시키면서 봉우리 전류값을 비교한 것이다. 수은방울의 크기가 small에서 medium, large로 됨에 따라 봉우리의 높이 전류값은 1:1.9:4.2로 증가되었다.

이것은 작은 전극부피에서 높은 감도가 얻어지는 산화법 측정법과는 달리 흡착법 측정법에서는 반응물이 전극 표면에 비례하여 흡착되며 흡착된 양에 따라 법봉우리의 전류값이 증가하기 때문이다.¹² 수은방울의 크기가 large인 경우에 봉우리 전류값이 가장 좋았으나 봉우리 모양이 불안정하여 보였으므로 본 실험에서는 medium 크기의 수은방울을 선택하여 사용하였다.

Fig. 5는 2.0×10^{-7} M corticosterone 표준용액에 대하여 흡착전위 -0.8 volts, 흡착시간 360초, 수은방울 크기 medium의 조건에서 주사속도를 변화시키면서 봉우리 전류값을 비교한 것이다. 선형주사법 전압-

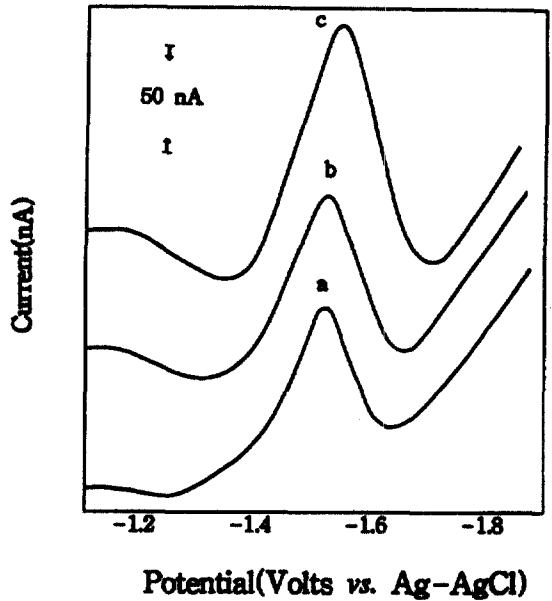


Fig 5. Effect of scan rate on the differential pulse ASV peak current for 5.0×10^{-7} M corticosterone in 1.0×10^{-2} M NaOH; -0.8 volts deposition potential, 360sec . deposition time, medium size mercury drop.

a : 5mV/sec b : 10mV/sec c : 20mV/sec

전류법에서의 벚짐 봉우리 전류(i^p)는 주사속도의 제곱근($v^{1/2}$)과 반응에 포함되는 전자수에 따라($n^{3/2}$) 증가된다.¹⁴ Fig. 5에서 주사속도의 제곱근에 따라 봉우리 전류값이 증가됨을 알 수 있었으나, 본 실험에서는 감도와 분해능력이 좋은 상태를 유지하면서 분석시간을 짧게 하기 위하여 20mV/sec의 주사속도를 선택하였다.

5. Corticosteroid 농도에 대한 표준검량곡선

흡착전위 -0.8 volts, 흡착시간 360초, 수은방울크기 medium, 주사속도 20mV/sec, 1.0×10^{-2} M 수산화나트륨 지지전해질의 조건에서 corticosterone 표준용액의 농도변화에 대한 봉우리 전류값을 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6의 검량선은 5.0×10^{-9} M와 8.0×10^{-7} M의 범위에서 좋은 농도비례를 보여 주었다. 이 조건에서 검량감도는 15.8이었고, 검출한계는 9.5×10^{-10} M이었다.

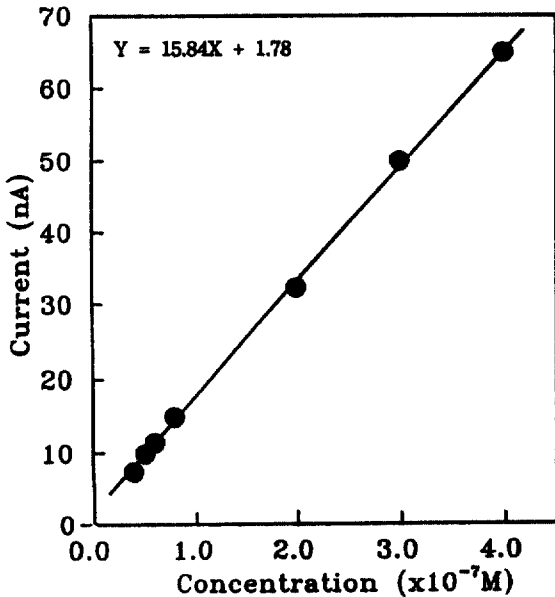


Fig 6. Calibration curve for the differential pulse ASV determination of corticosterone in 1.0×10^{-2} M NaOH : -0.8 volts deposition potential, 20mV/sec scan rate, 360sec. deposition time, medium size mercury drop, 9.5×10^{-10} M detection limit.

6. 의약품 중의 corticosteroid 함유량

의약품 중의 corticosteroid 함유량을 조사하기 위하여 시중에서 구입한 의약품을 ethanol에 녹인 후 회석하여 시료용액을 만들고 20.0~100.0 μ l씩을 취하여 전해질로 10.0ml가 되도록 한 다음 표준용액으로 구한 최적 조건에서 흡착벚짐 전압-전류곡선을 얻었다.

1) Prednisolone acetate 주사액 중의 corticosteroid 함유량

Prednisolone acetate 주사액 중 corticosteroid 정량을 위하여 표준용액과 비교하면서 얻은 흡착벚짐 전압-전류곡선을 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서 a는 4×10^{-7} M의 corticosterone 표준용액이다. 이 표준용액 a에 회석된 prednisolone acetate 주사액을 표지의 표기상으로 회석하여 3.2×10^{-7} M 되도록 가한 것이 b이고, c는 여기에 다시 2.0×10^{-7} M의 표준용액을 가하여 얻은 ASV이다.

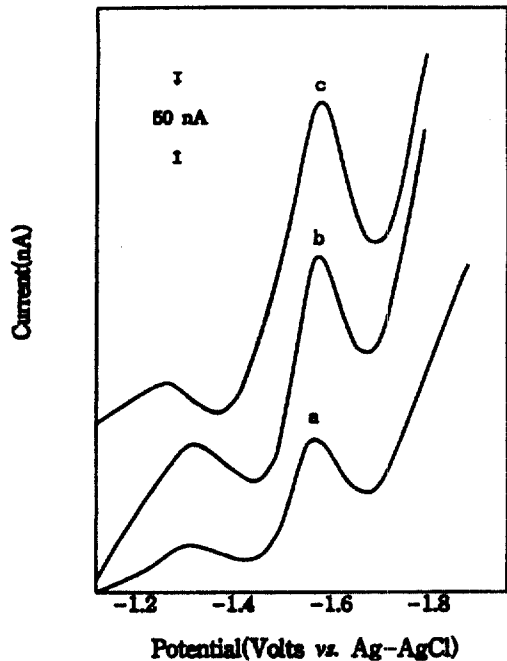


Fig 7. Determination of corticosterone in prednisolone acetate injection.

- a ; corticosterone standard 4.0×10^{-7} M
- b ; added corticosteron medical samples 3.2×10^{-7} M in a
- c ; added corticosteron standard 2.0×10^{-7} M in b

2) Sodium hydroxy cortison 주사액 중의 corticosteroid 함유량

Sodium hydroxy cortison 주사액 중의 corticosteroid 정량을 위하여 표준용액과 비교하면서 얻은 흡착 벗김 전압-전류곡선을 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에서 a는 2.9×10^{-7} M의 sodium hydroxy cortison 주사액만을 그린 것이다. 계속하여 같은 농도만큼의 회석된 주사액시료를 가하여 b를 얻었으며, c와 d는 corticosterone 표준용액을 3.0×10^{-7} M과 8.0×10^{-7} M씩 가하여 얻은 흡착벗김 전압-전류곡선이다. Fig. 7과 8의 결과를 보면 -1.68 volts 근방의 흡착벗김 봉우리 전위가 변함 없이 거의 일정하면서 전류값은 농도에 따라 잘 비례하였다. 이것은 흡착벗김 전압-전류방법을 시료용액의 corticosteroid 분석에 쉽게 이용할 수 있음을 보여 준다. 이와 같이 의료용 시료용액에서 얻어진 전류값을 미리 준비된 표준점량곡선과 비교하고 회석률을 보상하여 corticosteroid 함유량으로 환산하

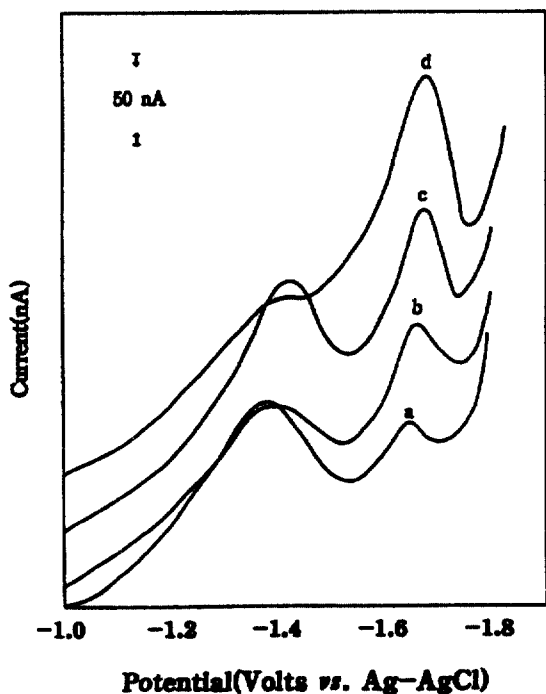


Fig 8. Determination of corticosterone in a sodium hydroxy cortison injection.

- a : only an injection 2.9×10^{-7} M
- b : added an injection 2.9×10^{-7} M in a
- c : added corticosteron standard 3.0×10^{-7} M in b
- d : added corticosteron standard 6.0×10^{-7} M in c

였다.

7. Corticosterone과 의약품의 봉우리 전위의 변화

Table 1은 corticosterone 표준용액과 의약품의 봉우리 전위의 변화를 조사한 것이다. Corticosterone 표준용액과 의약품의 봉우리 전위값을 비교 조사해 본 결과, 표준용액에 비하여 의약품의 경우에 대략 0.1~0.2 volts 정도로 음전위 이동되었다. 이것은 의약품 중에 함유되어 있는 전해질이나 벤질알코올 혹은 유도체화되어 있는 호르몬 성분 자체의 구조효과에 기인된 것으로 사료되나 분석결과에는 거의 영향을 미치지 않았다.

Table 1. Characteristic of the DPS peak potential for corticosterone and medical supplies

Compounds	Peak potential (Volts)
Standard corticosterone	-1.48
Prednisolone acetate injection	-1.56
Sodium hydroxy cortison injection	-1.68

8. 의약품의 corticosteroid 호르몬의 순도 측정

Table 2는 표지의 표기상으로 나타난 의약품 중 corticosteroid 호르몬의 순도를 확인하기 위하여 표기된 의약품을 일정 비율로 회석하여 봉우리 전류값을 측정 한 후, 표준용액의 검량선에 맞추어 실제 corticosteroid 농도로 계산한 것이다.

Table 2를 보면 표기상을 기준으로 하여 일정 비율로 회석된 농도와 ASV로 실제 얻어진 농도 사이에는 10^{-7} M 범위내에서 어느 정도 일치되고 있으나, 실제 농도가 2~3배 높게 나타난 것으로 보아 이러한 종류

Table 2. Measurement of purity of corticosteroid in medical products

Compound	Product's labelled purity (mol/L)	Experimental purity (mol/L)
Prednisolone acetate injection	6.32×10^{-7}	2.32×10^{-7}
Sodium hydroxy cortison injection	5.76×10^{-7}	2.32×10^{-7}

의 의약품이 일반적으로 함량이 미달되고 있음을 의미하며, 이 결과는 차후 정밀한 검증실험을 통하여 확인할 필요가 있을 것이다.

IV. 결론

1.0×10^{-2} M 수산화나트륨을 지지전해질로 하여 흡착벚김 전압-전류법으로 corticosterone의 분석을 시도하였다. 분석조건은 흡착시간 6분, 흡착전위 -0.8 volts, 수은방울 크기 medium, 주사속도 20mV/sec 의 조건에서 실시하였으며 검량선은 5.0×10^{-9} M에서 8.0×10^{-7} M 범위까지 직선성을 보여 주었다.

또한 이 방법을 의약품 중에 응용한 결과 감도가 높아 물게 회석한 의약품 중에 포함되어 있는 전해질이 나 고형제 혹은 benzyl alcohol과 같은 성분의 방해 없이 corticosteroid 호르몬의 분리 분석이 가능하였으며 제약의 품질분석에 충분히 이용할 만하였다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특정기초 연구과제(91-03-00-08) 일부와 일반기초 연구과제(911-0340-042-2)에 의해 이루어진 것으로 저자들은 이에 깊은 감사를 드립니다.

Reference

1. A. C. Guyton, "Medical Physiology" 6th W. B. Saunders Co., Philadelphia London Toronto, pp 992-1021(1981).
2. Dale, M. N. and Foreman, J. C., "Textbook of immunopharmacology", 283(1984).
3. Beck, J. S. and Brawning, M. C. K., *J. Royal Soc. Med.*, **76**, 473(1983).
4. Goldstein, A. L., *Science*, **222**, 1353(1983).
5. Apter, D., Jame, O. and Vihko, R., *Clin. Chim. Acta*, **63**, 139(1975).
6. Murphy, R. E. P., *J. Clin. Endocrinol Metab., Clin. Chim.*, **19**, 821(1973).
7. Schneider, R. S., Lindquist, P, and Wang, E. T., *Clin. Chem.*, **19**, 821(1982).
8. Roger D, T et al., *J. Pharm. Sci.*, **71**(5), 573(1982).
9. Milda, J. W. and Walter E. D., *J. Pharm. Sci.*, **71**(4), 446(1982).
10. P. Kabasakalian and J. McGlotten, *JACS*, **78**, 5032(1956).
11. L. N. Opheim, *Anal. Chim. Acta*, **89**, 225(1977).
12. J Wang D. B. Luo, P. A. M. Farias and J. S. Mahmoud, *Anal. Chem.*, **57**, 158(1985).
13. EG & G, "Model 303A SMDE Instruction Manual" III-2, (1984).
14. J. M. Park, I. K. Kim, "Adsorption Stripping Analysis" *Chemworld*, **29**, 746(1993)