

HPLC법에 의한 종합감기약중 구성성분의 동시 정량

이 창 현 · 이 계 주

충남대학교 약학대학

(Received June 16, 1988)

HPLC Study on the Determination of Active Ingredients in Cough-Cold Preparations.

Chang-Hyun Lee and Gye-Ju Rhee

College of Pharmacy, Chung-nam National University, Taejon 302-764, Korea

Abstract—A simple and sensitive HPLC method was developed for the simultaneous determination of ten kinds of active ingredients formulated in commercial cough-cold mixtures. A group of Pseudoephedrine·HCl, dl-Methylephedrine·HCl, Noscapine, Chlorophenylamine maleate, Dextromethorphan·HBr and Phenylpropanolamine·HCl were determined at 254nm using a Novapak C₁₈ column with mobile phase consisting of a mixture of methanol-acetonitrile-1,4 dioxane-tetrahydrofuran-water(12:20:20:5:43, pH4.7) containing 0.013M-dioctyl sodium sulfosuccinate. The another group of Acetoaminophen, Caffeine, Guaifenesin and Ethenzamide were also determined at 254nm using a Novapak C₁₈ column as the stationary phase, and a mixture of methanol-1% aqueous acetic acid (3:7). The results indicate that these methods are accurate and precise with relative standard deviation of not more than 1% (n=5) for the above active ingredients.

시판 종합 감기약의 처방은 해열진통성분으로 acetaminophen, ethenzamide, caffeine과, 항히스타민 propanolamine, chlorophenylamine maleate와, 진해거담성분으로 guaifenesin, noscapine, pseudoephedrine, dl-methylephedrine 및 dextromethorphan의 복합처방이 주종을 이루고 있다. 이와 같은 복합제제중 함유성분의 분석법으로는 현재 복잡한 추출과정과 전처리 과정을 거쳐야만 하는 흡광도 측정법과 비색법¹⁻⁴⁾을 사용하거나 전처리 조작을 거쳐야하고 또는 유도체를 만들어야하는 GC법⁵⁾이 이용되어 왔으나 최근에는 주로 HPLC에 의한 방법의 연구⁶⁻¹⁷⁾가 계속되고 있다.

즉 Mcsharry 등¹¹⁾은 acetaminophen, guaifenesin, dextromethorphan을 C₁₈칼럼과 45% 메탄올 수용액(pH4.2)을 이동상으로하여 분석하였고, Hoble등⁸⁾은 μ -Bondapak phenyl 칼럼을 써서 acetaminophen, chlorophenylamine maleate, dextromethorphan, propanolamin을 서로 다른

4가지 이동상에서 분리하였다. Gupta 등¹²⁾은 C₁₈ 칼럼을 사용하여 이동상에 ion suppression이나 ion paring을 시키지 않고 순수역상분배크로마토그래피로 acetaminophen, chlorophenylamine maleate, phenyltoloxamine citrate, ephedrine을 분석하였고, Greco 등¹⁷⁾은 μ -Bondapak phenyl 칼럼과 acetonitrile·glacial acetic acid·H₂O(26.5:1.0:72.5 pH2.4) 0.005M-pentan sulfonic acid를 이용하여 isopropamide, phenyllophrine·HCl, phenacetin, guaifenesin, chlorophenylamine maleate, aspirin, caffeine, dextromethorphan 등을 분석하였다.

이상의 보고된 분석방법은 공존 물질의 영향이나 처방구성비의 차이등으로 인하여 종합감기약중의 동시 성분분리가 어려운 점이 많아서 효과적인 방법이 되지 못하기 때문에 이동상의 용매, pH, ion paring 시약 등을 검토 개선되어야 한다고 생각된다.

이에 저자들은 처방구성의 빈도가 가장 높은

acetaminophen, ephedrine, dl-methylephedrine, noscapin, chlorphenylamine maleate, dextromethorphan, propanolamine, caffeine, guaifenesin, ethenzamide 등 10가지 성분을 대상으로 하여 HPLC 분석법의 조건을 모색하여 새로운 분리정량법을 확립하였다.

실 험 방 법

시약—Pseudoephedrine·HCl(EP), phenylpropanolamine·HCl(PP), chlorphenylamine maleate(CP), dextromethorphan·HBr(DM), acetaminophen(AC), caffeine(CF) 및 guaifenesin(GF)은 USP reference standard를 사용하였고, dl-methylephedrine·HCl(ME), noscapine(NC) 및 ethenzamide(EZ)는 한미약품 제공 working standard를 사용하였다.

기타 methanol, acetonitrile, 1,4-dioxane, tetrahydrofuran은 HPLC용 시약을 사용하였으며 dioctyl sodium sulfosuccinate, glacial acetic acid는 특급시약을 사용하였다.

기기 및 장치—HPLC는 Waters사 Model 204에 UV 검출기를 연결하였고, 칼럼은 Novapak C₁₈(3.9mm×15cm, SS column 4μm, chemically bonded octadecylsilane, Waters), pH meter는 Research Model 611를 사용하였다.

실험 조건—10종의 성분중 pKa 9이상의 강염기성 물질 EP ME PP NS CP 및 DM을 A군으로 분류하고, 기타 AC CF GF 및 EZ을 B군으로 분류하여 다음의 실험조건으로 측정하였다.

Mobile phase; MeOH-acetonitrile-1,4-dioxane-tetrahydrofuran-water(12:20:20:5:43, pH 4.7), 0.013M-dioctyl sodium sulfosuccinate(A군). MeOH-1%-HAC(3:7)(B군), chart speed; 0.5cm/min, sensitivity 0.1 AUs(A군), 2.0 및 0.5 AUs(B군), column temp.; ambient, injection volume; 10μl, wave length 254nm.

정량법—표준액 조제는 EP 100gm, NE 100gm, PP 50mg, CP 20mg, DM 100mg을 100ml용량 플라스크에 같이 넣고 물로 용해하여 100ml로 하였고, NC 20mg, AC 50mg, CF 30mg, GF

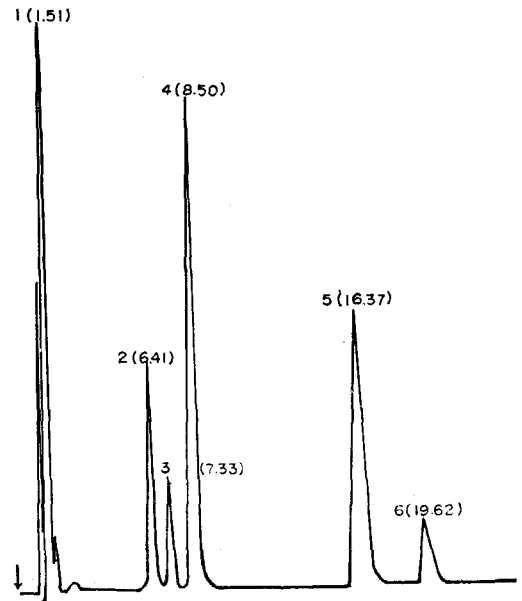


Fig. 1—Chromatogram of Standard Solution of Guaifenesin(1), Pseudoephedrine·HCl(2), Phenylpropanolamine·HCl(3) Noscapine(4) Chlorpheniramine maleate(5) and Dextromethorphan·HBr(6)

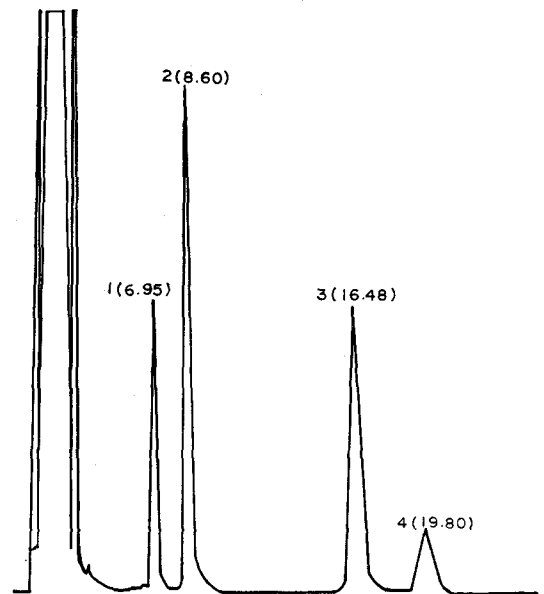


Fig. 2—Chromatogram of Test Solution of Syrup Preparation Comprising dl-Methylephedrine·HCl(1) Noscapine(2) Chlorpheniramine maleate(3) and Dextromethorphan HBr(4)

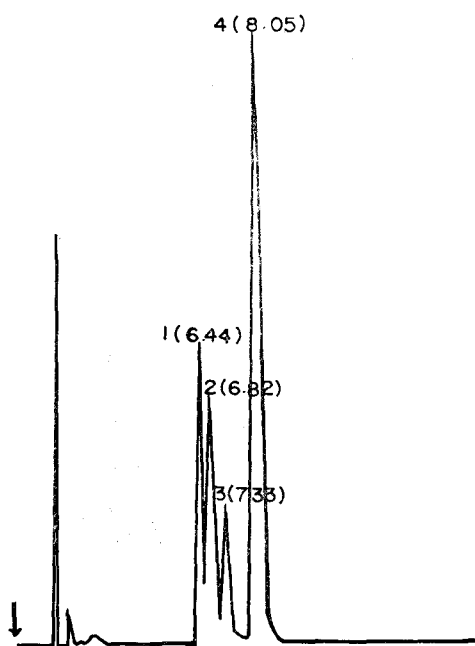


Fig. 3—Chromatogram of Pseudoephedrine·HCl(1) dl-Methylephedrine·HCl(2) Phenylpropanolamine·HCl(3) and Noscapine Mixture(4)

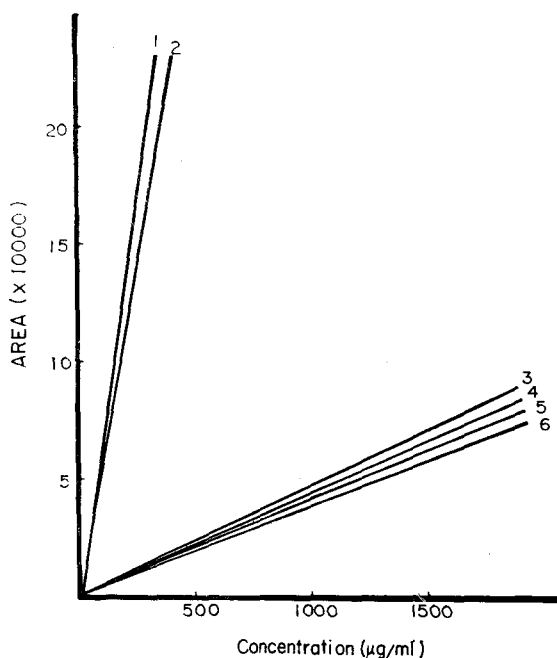


Fig. 4—Calibration Curves of Chlorpheniramine maleate(1) Noscapine(2) Phenylpropanolamine(3) Pseudoephedrine·HCl(4) dl-Methylephedrine·HCl(5) and Dextromethorphan·HBr(6)

100mg 및 EZ 120mg을 함께 50% 메탄올에 녹인 후 물을 가하여 100ml로 하였다.

시료 용액의 조제는 액제와 시럽제는 희석하지 않고 원액을 그대로 사용하였으며 정제와 캡슐제는 1~5정이나 캡슐에 해당하는 양을 취하여 50% 메탄올로 추출하여 여과하고, 여액을 표준

액의 농도와 유사하도록 50% 메탄올로 희석하여 사용하였다.

표준액 및 검액을 0.5µm 필터로 여과하여 A군 및 B군의 실험조건에 따라 각각 10µl씩을 투입한 결과 각 크로마토그램은 Fig. 1~3 및 5, 6과 같고, 검량곡선은 Fig. 4 및 7과 같다.

Table I—Reproducibility & Precision of the component analyzed by HPLC method A and B (unit: peak area)

Com- ponents	Method A						Method B			
	Pseudo-e- phedrin- HCl	Phenylp- ropano- lamine HCl	Noscap- ine	Chlorp- henira- mine· maleate	Dextro- methor- phan· HBr	dl-meth- ylephed- rine· HCl	Acetam- inophen	Caffeine Anhy- droas	Guaifen- esin	Ethenza- mide
Exp. No.										
1	44,622	23,788	122,043	143,529	39,984	42,589	101,044	22,867	34,881	113,642
2	44,033	23,797	121,997	143,359	39,722	42,619	100,004	22,698	34,647	112,386
3	44,604	23,779	123,025	143,252	40,138	42,567	99,857	22,894	34,935	113,640
4	44,624	23,817	123,423	143,515	40,197	42,544	101,140	22,861	34,970	113,565
5	44,786	23,896	122,061	143,564	40,530	42,815	100,867	22,843	34,900	113,425
Average	44,534	23,815	122,510	143,484	40,114	42,627	100,582	22,833	33,867	113,332
Rel. Std. De. (%)	0.65	0.20	0.54	0.06	0.74	0.26	0.60	0.34	0.37	0.47

시판 종합감기약의 분석에—시료 성분을 A군 및 B군으로 구분하여 위의 방법에 따라 시판 상품 고형제 3종과 액제 3종을 대상으로 각 대상성분을 분석하고 결과를 비교하였다. (Table II).

결과 및 고찰

Ion pair reagents—A군의 분리물질은 주로 pKa 값이 9 이상인 강염기성 물질로서 순수 역상 분배 크로마토그래피나 이동상의 pH조건 또는, 염을 첨가하는 이온 억제 크로마토그래피 등으로서는 완전히 분리되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 ion pair reagents를 사용한 결과 분리가 가능하였다.

시료에 대하여 counter ion으로 작용하는 ion pair reagent를 선정함에 있어서 시료이온에 대하여 유기성이 비교적 작은 pentane sulfonic acid나 hexane sulfonic acid를 사용할 때에는 거의

칼럼에 머물지 않고 용출됨을 볼 수 있었다. 또한 pentane sulfonic acid와 hexane sulfonic acid보다 유기성이 큰 대립이온을 갖고 있는 heptane sulfonic acid나 octane sulfonic acid를 사용할 때는 일부 물질만이 분리되거나 변형피크로 용출되었다. 따라서 A군 시료의 시험조건에서는 분리물질 6가지에 대하여 유기성 대립이온을 갖고 있는 dioctyl sodium sulfosuccinate를 선정하였을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

이동상의 구성—A군의 실험 조건에서 최적 분리조건을 찾기 위해서는 먼저 물, 메탄올, 테트라하이드로푸란을 조합하여 일정한 용매 강도를 유지시키고 분리도를 높이기 위하여 아세트니트릴을 첨가하였고, ME와 PP의 분리도를 높이기 위하여서는 1,4-dioxane을 첨가하였다. 용매강도를 변화시키지 않는 범위 안에서 메탄올, 아세트니트릴, 1,4-디옥산, 테트라하이드로푸란의 양을 변화시킬 때, 메탄올보다 아세트니트릴의

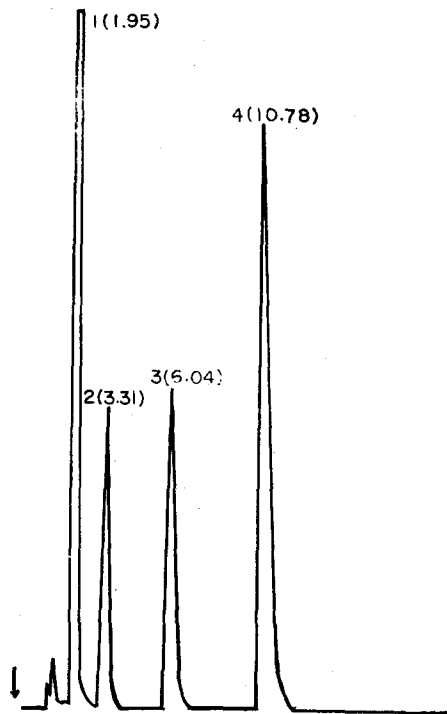


Fig. 5—Chromatogram of Standard Solution of Acetaminophen(1) Caffeine anhydrous(2) Guai-fenesin(3) and Ethenzamide(4)

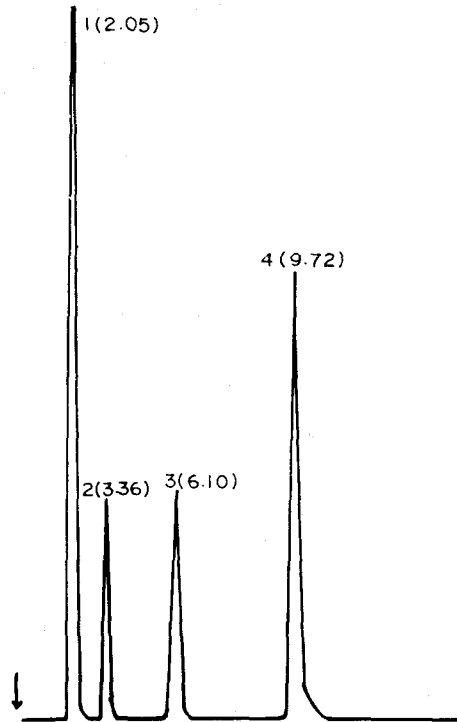


Fig. 6—Chromatogram of Test Solution of Syrup Preparation Comprising Acetaminophen(1) Caffeine anhydrous(2) Guai-fenesin(3) and Methyl-p-hydroxybenzoate(4)

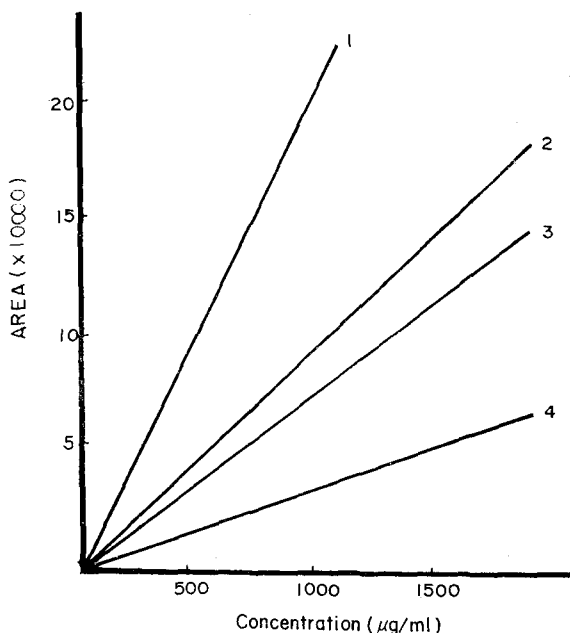


Fig. 7-Calibration Curves of Acetaminophen(1) Ethenzamide(2) Caffeine anhydrous(3) and Guaifenesin(4)

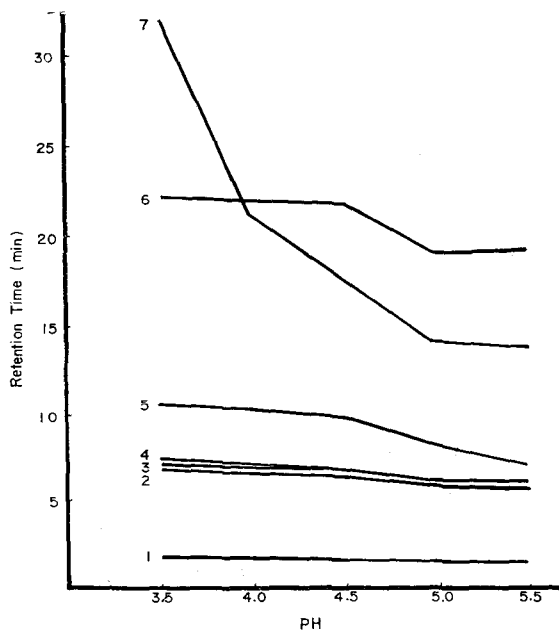


Fig. 8-Effect of the mobile Phase PH on Retention Time of Guaifenesin(1) Pseudoephedrine HCl(2) Phenylpropanolamine·HCl(3) dl-Methylephedrin·HCl(4) Noscapine(5) Chlorpheniramine maleate(6) and Dextromethorphan·HBr(7)

양이 많은 경우에는 ME와 NC의 분리는 좋아지나 ME와 EP의 겹침이 일어나고, 아세트니트릴보다 1,4-디옥산의 양이 많은 경우에는 EP와 PP의 분리는 좋아지나 NC의 retention time이 빨라지고 CP와 DM은 비대칭성 peak를 나타내며, 테트라 하이드로푸란의 양을 증가시킬 경우에는 ME EP PP의 겹침이 일어난다.

이동상의 pH영향—A군의 시험조건에서 이동상의 pH를 변화시킬때 나타나는 각 성분의 retention time의 변화는 Fig. 8과 같이 pH 3.5 이하에서는 DM이 CP보다 훨씬 늦게 비대칭성의 변형 피크로 되어 용출되었고 pH 4.0 부근을 지나서는 DM이 CP보다 retention time이 빨라지면서 대칭성의 피크를 보이고 있다. 따라서 pH 4.5~5.0 부근에서 분리하고자 하는 6가지 성분이 20분 이내에 모두 분석되는 결과를 얻을 수 있었다.

이동상의 Ion pair reagent 농도—A군의 시험조건에서 ion pair reagent 농도에 따른 retention time의 변화는 Fig. 9와 같이 dioctyl sodium

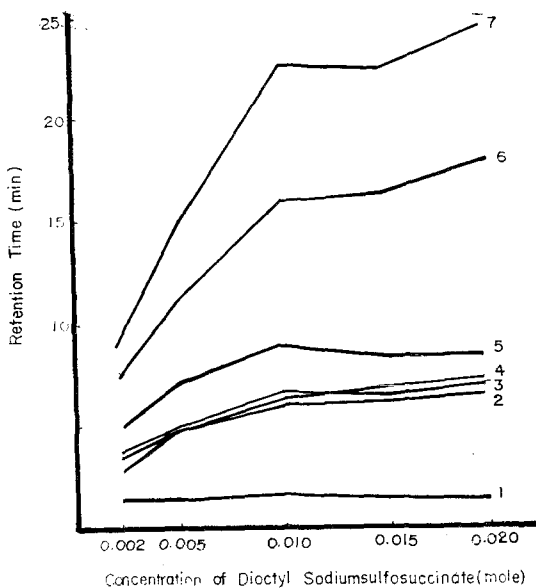


Fig. 9-Effect of the Ion Pair reagent on Retention time of Guaifenesin(1) Pseudoephedrine·HCl(2) Phenylpropanolamine·HCl(3) dl-Methylephedrine·HCl(4) Noscapine(5) Chlorpheniramine maleate(6) and Dextromethorphan·HBr(7)

Table II—Analyzed Data of Commercial Products of Cold-Cough Preparations by HPLC

compomant	Dosage form		Solid dosage form					
	sample	results	Sample A		Sample B		Sample C	
			Labeled (mg/cap)	Result(%)	Labeled (mg/Tab)	Result(%)	Labeled (mg/Cap)	Result(%)
Acetaminophen			150	99.8	200	100.5	100	101.2
Caffeine-anhydrous			15	100.5	30	99.6	25	98.5
Guaifenesin			—	—	—	—	75	99.7
Ethenzamide			—	—	100	101.8	—	—
dl-Methylephedrine·HCl			10	100.0	—	—	5	100.8
Phenylpropanol-amine·HCl			—	—	—	—	—	—
Noscapine			—	—	—	—	10.5	101.7
Chlorpheniramine Maleate			1.5	99.5	2.0	101.5	1.25	98.5
Dextromethorphan·HBr			7.5	98.7	—	—	—	—

compomant	Dosage form		Liquid preparations					
	sample	results	Sample D		Sample E		Sample F	
			Labeled (mg/100ml)	Result(%)	Labeled (mg/100ml)	Result(%)	Labeled (mg/100ml)	Result(%)
Acetaminophen			1,000	97.9	—	—	1,000	97.8
Caffeine-anhydrous			133.4	98.5	—	—	133.9	98.3
Guaifenesin			166.7	100.3	150	98.2	233.3	101.4
Ethenzamide			—	—	—	—	—	—
dl-Methylephedrine·HCl			33.4	100.2	—	—	33.3	98.0
Phenylpropanol-amine·HCl			—	—	650	97.4	—	—
Noscapine			33.4	97.8	—	—	—	—
Chlorpheniramine Maleate			4	99.5	15	99.5	8.3	100.6
Dextromethorphan·HBr			—	—	100	101.2	50	96.9

sulfosuccinate의 농도가 0.01M 이하에서는 대립이온으로 충분히 작용하지 못하여, 대상물질이 빨리 용출되며 비대칭성의 변형피크로 나타났고, 0.015M에서는 대칭성의 피크와 일정한 retention time을 얻을 수 있었다.

B군의 분석조건—B군의 물질은 산성물질과 중성물질의 혼합물이므로 산성물질은 HAc로 이동상 pH를 조정하여 이온 억제 효과에 의해 중성 상태로 고정상에 머물게 하였고, 중성물질은 MeOH/H₂O의 용매 강도를 조정하여 역상 분배 크로마토그래피 효과에 의한 분리를 시도하였다. 시판제제의 처방 구성은 AC와 CF가 GF와 EZ에 비하여 다량 함유되어 있기 때문에, 단 한번의 검액 조작으로 분리하고자 sensitivity를 2.0

및 0.5 Aufs로 조정한 결과 동시 분석이 가능하였다.

재현성 및 정확도—동일 시료에 대하여 A군 및 B군의 분석법으로 5회 반복 시험한 결과를 검토한 각 성분의 재현성 및 정확도는 Table I과 같다. 즉 모든 측정값이 비교 표준편차 0.06~0.7% 범위내로서 양호한 재현성을 나타내었고, 특히 CP에 있어서는 편차가 0.06%로서 가장 양호하였으며, 다만 DM EP 및 AC에 있어서는 0.60~0.74%로서 다른 성분에 비하여 비교적 컸다.

시판의약품 분석 예—시판 의약품 6종에 대하여 위의 조건으로 분석한 결과는 Table II와 같다. 즉 각 성분 분석치는 96.9~101.8%의 범위

로 나타났으며 이는 각 상품의 성분 함량이 균일하였음을 알 수 있었고, 특히 고형제에 있어서는 함량 편차가 1.3~1.8%로서 아주 우수하였다. 반면에 액제의 균일성은 함량편차가 1.8~3.1%로서 고형제에 비하여 약간 컸다.

결 론

이상의 실험 결과 시판 종합감기약을 구성하는 활성성분중 가장 사용빈도가 높은 10가지 성분에 대하여 Novapak C₁₈ 칼럼을 장착한 HPLC (254nm)를 사용하여 메탄올—아세트니트릴—1,4-디옥산—테트라하이드푸란—물(12:20:20:5:43)에 0.013M-dioctyl sodium sulfosuccinate를 함유시키고 pH를 4.7로 조정한 이동상에서 pseudoephedrine·HCl, dl-methylephedrine·HCl, noscipine, chlorpheniramine maleate 및 dextromethorphan·HBr 혼합액을 비교 분석하여 표준편차 1% 이내의 재현성과 retention time 20분 이내에서 간단하게 동시 분리 정량할 수 있었다.

또한 동일한 칼럼하에서 메탄올—1% 아세트산(30:70)의 이동상으로 acetaminophen, caffeine anhydrous, guaifensin 및 ethenzamide를 10분 이내에 쉽게 분리 정량할 수 있었다.

따라서 본 결과는 종합감기약 제제중의 구성성분을 쉽게 동시 분리 정량하는 방법으로 활용이 가능하다고 생각된다.

문 헌

- 1) Auerbach, M.E.: *J. Am. Pharm. Assoc.* **39**, 50 (1950).
- 2) Auerbach, M.E., and Angell, E.: *Sci.* **109**, 537 (1949).
- 3) Cronheim, G., and Were, P.A.: *J. Pharmacol. Exptl. therap.* **92**, 98 (1948).
- 4) Jones, H.M. and Brody, E.S.: *J. Am. Pharm. Assoc.* **38**, 579 (1949).
- 5) 국립보건원, 복합 브롬화수소산 데스트로메토르판, 염산페닐프로판올아민, 구아이페니신, 탈레인산 클로르페니라민 시럽, 의약품 기준 및 시험방법집, 752 (1983).
- 6) 立澤政義: 第36回 液體フロマトグラフィ—研究懇談會, 東大生研(1977).
- 7) 立澤政義: 山官卓二, 江島昭, 高井信治: 第21回液體フロマトグラフ 研究會, 京都 (1978).
- 8) Gupta, V.D. and Heble, A.R.: Quantitation of Acetaminophen, Chlorpheniramine maleate, Dextromethorphan Hydrobromide and Phenylpropanolamine Hydrochloride in Combination Using High-Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.* **73**, 1553 (1984).
- 9) 南原利夫, 池川信夫, 最新高速液體フロマトグラフィ—, 廣川書店, 301 (1983).
- 10) Carnevale, L.: Simultaneous Determination of Acetaminophen Guaifenesin, Pseudoephedrine, Pholcodine and Paraben preservatives in Cough Mixture by High Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Sci.* **72**, 196 (1983).
- 11) Mc aharry, W.O. and Savage, I.V.E.: Simultaneous High pressure Liquid Chromatographic Determination of Acetaminophen, Guaifenesin and Dextromethorphan Hydrobromide in Cough syrup. *J. Pharm. Sci.* **69**, 212 (1980).
- 12) Gupta, V. Das and Tacob, J.T.: quantitation of Acetaminophen Chlorpheniramine maleate, Phenyltoloxamine Citrate and Pseudoephedrine hydrochloride in combinations in capsules and tablets using High Performance Liquid Chromatography. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **13**, 113 (1987).
- 13) Massart, D.L. and Hoogewijs, H.: *Anal. Sett.* **13**, 389 (1980).
- 14) Carroll, M.A. White, E.R. and Zarembo, J.E.: *Anal. Chem.* **53**, 111A (1981).
- 15) Heidemann, D.R.: *J. Pharm. Sci.* **70**, 81 (1981).
- 16) Koziol, T.R. Jacob, J.T. and Achari, R.G.: *J. Pharm. Sci.* **68**, 1135 (1979).
- 17) Greco, G.T.: Ion Pair high performance liquid chromatographic determination of Chlorpheniramine maleate in cough cold mixtures. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **10**, 19 (1984).