

생체시료로부터 미량 β -Blockers의 동시고상추출에 사용될 흡착제들의 특성

김경래[†] · 김도정
성균관대학교 약학대학 제약학과
(1993. 12. 2. 접수)

Characterization of Adsorbents for the Simultaneous Solid-Phase Extraction of Trace β -Blockers from Biological Samples

Kyoung Rae Kim[†] and Do Jeong Kim

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received Dec. 2, 1993)

요약 : 생체시료 중 β -blockers의 동시분석을 위한 시료 전처리 과정으로서 고상추출법을 사용 하기 위해 4가지 흡착제의 흡착 및 탈착 효율을 조사하였다. 용출 용매로서 methanol을 사용하였을 때 Chromosorb 107이 가장 높은 회수율을 보였다. β -Blockers의 breakthrough 조사를 하여 Chromosorb 107 컬럼의 우수한 흡착 및 탈착 성질을 혈청 중 2~8 ppm 농도 범위의 β -blockers를 동시에 고상추출하는 데 Chromosorb 107/methanol의 유용성을 조사하였다.

Abstract : The efficiencies of four different solid adsorbents were evaluated for the simultaneous solid-phase extraction of six β -blockers from biological sample. Chromosorb 107 using methanol as the eluting solvent gave the highest solid-phase extraction yield. From the breakthrough studies of β -blockers, the excellent sorption and desorption properties of the Chromosorb 107 column were verified. The usefulness of Chromosorb 107/methanol was examined for the simultaneous solid-phase extraction of the β -blockers from serum in the concentration range of 2~8ppm.

Key word : solid-phase extraction, β -blockers, Chromosorb 107/methanol, breakthrough curve, serum.

1. 서론

장기의 β -adrenoreceptor에서 catecholamine의 작용을 상경적으로 차단하는 β -blockers는 주로 고혈압, 심부정맥, 심근경색증 등의 심혈관계 치료에 쓰이는 약물로서 혈중 유효 치료농도는 약 50~400 ng/ml이고 치사 혈중농도는 10~20 μ g/ml이다.¹⁻³

치료과정 중에 서맥, 저혈압, 전도장애, 울혈성 심장 마비, 기관지경련, 불면증, 우울증 및 말초순환 악화 등이 발현되기도 한다. 비교적 낮은 경구 복용량(5~100mg)에서 나타나는 심박동률 및 근육경련이 감소되는 부작용 효과를 운동선수들이 악용하기 시작하자 현재 doping 규제 약물로 선정되어 있다. 장기간에 걸친 효과적인 치료를 위한 약물 동력학적, 임상치료학적 연

구, 또한 doping 스크리닝 등을 성공적으로 수행하기 위해서는 다양한 구조를 가진 β -blockers와 그 대사물들을 동시에 신속하고 정확하게 분석할 수 있어야 한다.

분리능, 감도, 재현성, 분석시간 등에 우수성을 갖는 gas chromatography(GC)법을 적용하여 다양한 β -blockers를 정확하게 분석하기 위해서는 β -blockers의 hydroxyl, amino 혹은 amide기의 활성 수소를 극성이 적은 기능기로 치환하여⁴⁻⁶ 열에 안정하고 휘발성이 큰 유도체로 전환시킨다. 본 실험실에서는 GC 및 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) 분석 성질이 우수한 *tert*-.butyldimethylsilyl(TBDMS) 유도체화 반응을 β -blockers에 적용하여 보고한 바 있다.⁷

생체시료 중 미량의 β -blockers를 분석하기에 앞서 수행되는 시료 처리과정으로서 유기용매 추출법이 주로 이용되고 있으며, Bond-elut C₂, C₁₈, CN 등의 유기 흡착제를 이용한 고상추출법(solid-phase extraction)도 적용되고 있다.^{5, 8, 9} 그러나 유기용매추출법보다 조작이 간단하여 자동화가 가능한 고상추출법을 적용할 때에는 최적의 흡착제와 용출 유기용매를 결정하기 위하여 사용 가능한 흡착제들의 흡착 및 탈착 등의 물리적 성질 조사가 선행되어야 한다. 본 연구실에서는 pH의 영향을 받지 않는 흡착제들인 Chromosorb 102, Chromosorb 107, Thermosorb, Caropak B의 다양한 약물들에 대한 흡착제수 및 탈착제수를 조사하여 보고한 바 있다.¹⁰⁻¹³

본 연구에서는 β -blockers 중에서 가장 널리 쓰이는 atenolol, betaxolol, metoprolol, oxprenolol, penbutolol, propranolol에 대한 이들 흡착제들의 고상추출성질을 조사하고 최적 흡착제를 선정한 후 혈청시료에 적용하여 matrix 영향과 검출 정량성을 검토하였다.

2. 실험

재료 및 시약: Atenolol, betaxolol · HCl, metoprolol · 1/2 tartrate, oxprenolol · HCl, penbutolol · 1/2 H₂SO₄, propranolol · HCl의 6종류 β -blockers는 Sigma (St. Louis, U.S.A.)로부터 구입했고 madazepam (MZ)은 종근당으로부터 제공되었다. Acetone, methanol, methylene chloride(James Burrough, UK)는 HPLC급 시약이고 toluene, diethyl ether(Junsei, Japan), petroleum ether(Tedia, U.S.A.), ethyl acetate

(American Burdick & Jackson, U.S.A.)는 특급시약이었다. Tetrahydrofuran(THF)과 유도체화 시약인 N-methyl-N-(*tert*-.butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide (MTBSTFA)는 Pierce(Rockford, IL, U.S.A.) 것을 사용하였다. 사용된 물은 2차 정제한 (Milli Q water system, U.S.A.) 탈이온수였다. 60~80mesh의 Chromosorb 102, Chromosorb 107, Caropak B (Supelco Inc., U.S.A.)와 40~60mesh의 Thermosorb(Union Carbide, U.S.A.) 4종류의 고흡착제를 본 실험에서 조사하였다.

약물용액과 혈청시료: β -Blockers를 유리아민 형태로서 methanol에 10mg/ml의 농도가 되도록 혼합 표준원액을 조제하였다. MZ을 10mg/ml의 농도가 되도록 methanol에 용해하여 내부 표준원액으로 사용하였다. 탈이온수를 pH 12.0으로 조정한 후 0.2, 0.4, 20ppm 농도가 되도록 표준원액을 첨가하여 β -blockers 혼합 표준수용액을 조제하였다. 100 μ l 혈청에 2, 4, 8ppm 농도가 되도록 β -blockers 혼합 표준수용액을 첨가한 후, pH 12.0의 물을 가하여 10배 희석된 β -blockers 혈청시료를 조제하였다.

GC 분석조건: GC 분석을 위해 flame ionization detector(FID)와 split injector가 장착된 Pye Unicam GCV gas chromatograph에 J & W사의 DB-1 fused silica capillary column(13m \times 0.25mm i.d., 0.2 μ m d_r)을 연결하여 사용하였다. 0.5~0.8 μ l 시료를 split mode(30:1)로 주입하였으며 column 온도는 210 $^{\circ}$ C(2min)에서 280 $^{\circ}$ C까지 7 $^{\circ}$ C/min 상승시켰다. FID와 injector는 각각 300 $^{\circ}$ C, 280 $^{\circ}$ C로 유지시켰다. 혈청시료 분석시에는 on-column injector와 FID가 장착된 HP 3394A integrator가 연결된 Shimadzu GC 9A Gas chromatograph를 사용하였다. Deactivated fused silica tubing(1m \times 0.25mm i. d.)이 연결된 DB-1 fused silica capillary column(15m \times 0.25mm i. d., 0.2 μ m d_r)에 0.4 μ l 시료를 on-column 주입한 후 100 $^{\circ}$ C(0.5 min)에서 40 $^{\circ}$ C/min로 220 $^{\circ}$ C까지 상승시킨 후 7 $^{\circ}$ C/min로 280 $^{\circ}$ C까지 상승시키고 7분간 유지하였다. 검출기와 주입구의 온도는 각각 300 $^{\circ}$ C와 상온으로 유지시켰다. MZ에 대한 β -blockers의 피크 면적비를 검량선의 값과 비교하여 모든 정량계산을 하였다.

고상추출 실험: 각 흡착제(200mg)가 기밀하게 충전되어 있는 polypropylene 흡착컬럼(4mm i. d.)을 순환용 Eyela A-3S aspirator(Japan)에 연결된 12개의 시

료를 동시에 처리할 수 있는 고상추출장치(Supelco, Inc., U.S.A.)에 장착하였다. 감압하에서 각 흡착 컬럼들을 methanol, pH 12.0, methanol, acetone, methylene chloride, methanol 순서로 세척하고 pH 12.0의 물로 평형시켰다. 여기에 20ppm 혼합 표준수용액(1ml)를 서서히 통과시켜 β -blockers를 동시 흡착시킨 후 증류수(3ml)와 petroleum ether(1ml) 순서로 통과시켜 세정하였다. 탈수한 후 흡착된 β -blockers를 methanol(3ml)로 용출시키고 이 용출액에 내부표준물질 MZ의 양이 20ppm이 되도록 가하고 무수 Na_2SO_4 로 건조시켰다. 1ml를 취하여 휘발 건조(N_2 , 60°C)시키고 THF(10 μ l)와 MTBSTFA(20 μ l)를 첨가한 후 가온하여(60°C, 1시간) TBDMS 유도체화한 후 GC 분석하였다. β -Blockers의 정량 목적으로 혼합표준용액을 1에서 10 μ g 되게 취하고 MZ를 5 μ g씩 첨가한 후 건조시키고 같은 방법으로 TBDMS 유도체화시킨 뒤 GC 분석하여 검량선을 작성하였다.

Breakthrough Curve 및 Elution Curve 측정: 사용한 high performance liquid chromatography(HPLC) 기기는 U6K injector 6000A solvent delivery system 과 440 adsorbance detector가 부착된 Waters Assoc. Model ALC 200이었다. HPLC용 stainless steel column(5cm \times 2mm i. d.)에 70mg의 Chromosorb 107를 기밀하게 충전한 후 injector와 UV detector 사이에 직접 연결하고, HPLC용 물 혹은 methanol을 이동상으로 사용하여 275nm에서 β -blockers의 UV response를 on-line monitoring하였다. Methanol을 Chromosorb 107 column 내로 낮은 유속(0.4ml/min)으로 통과시키면서 20ppm β -blockers 혼합 표준수용액을 50, 100, 150 μ l씩 주입하고 함께 용출되는 β -blockers의 UV response(1.0 AUFS)를 측정하여 검량선을 작성하였다. 동일한 Chromosorb 107 column을 물로 평형시킨 후 동일한 20 ppm β -blockers 혼합 표준수용액(100 μ l)를 주입하고 물을 20분간 통과시키면서(3.0ml/min), breakthrough curve(0.01 AUFS)를 얻었다. 이동상을 methanol로 전환하여(0.4ml/min) Chromosorb 107 column으로부터 흡착된 β -blockers가 동시에 용출되는 elution curve(1.0 AUFS)를 얻었다.

혈청 중의 β -blockers 정량: 유리 컬럼(3mm i. d.)에 Chromosorb 107(50mg)을 기밀하게 충전한 후 고상추출장치를 사용해서 HPLC용 물, methanol, acetone,

methylene chloride, methanol 순으로 세정하고 pH 12.0의 물로 평형시켰다. 여기에 희석된 혈청시료(2~8ppm) 1ml를 서서히 loading시킨 후 HPLC용 물(6ml)로 세정하고 탈수시키고 다시 petroleum ether(3ml)로 세정한 후 건조시켰다. Methanol(2ml)로 흡착된 β -blockers를 용출하여 얻은 용출액을 MZ의 최종 농도가 0.5ppm이 되도록 가한 후 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 휘발건조시킨 후 THF(5 μ l)와 MTBSTFA(5 μ l)를 첨가한 뒤 반응시키고(60°C, 1시간) GC로 분석하였다. 동일한 방법으로 0.2, 0.4ppm의 혼합표준수용액을 전처리하고 GC 분석하였다. 정량 목적으로 혼합표준용액을 0.1에서 1.0 μ g 되게 취하고 MZ를 0.5 μ g씩 첨가한 후 TBDMS 유도체화시키고 GC 분석하여 검량선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

본 실험에서 조사한 6종류 β -blockers의 2급 hydroxyl기와 amide기를 이미 보고한 TBDMS 유도체화 최적반응조건에서⁷ 동시에 안정한 휘발성 유도체로 전환시킨 후 GC 분석하였을 때 0.1에서 1.0 μ g 범위와 1에서 10 μ g 범위에서 각각 0.999 이상의 상관계수를 갖는 일직선의 검량선을 얻을 수 있었다.

흡착제들의 고상추출효율: 조사한 β -blockers는 aryloxypropanol의 공통 구조를 갖고 있는 약염기성 2급 아민 유도체($\text{pK}_a=9.4\sim 9.6$)이므로 유리아민물분율을 높이기 위해서 20ppm 혼합표준수용액의 pH를 12.0으로 조정하고 후 각 흡착제에 동시 흡착시켰다. 예비실험에서 Caropak B 통과여액에서는 거의 검출되지 않았으나 Chromosorb 107, Chromosorb 102, Thermosorb 순서로 통과 여액에서 검출되는 양이 증가되는 것을 확인하였다. 흡착되어 있는 약물들을 methanol로 용출시킨 뒤 회수율을 계산하여 각 흡착제들의 고상추출효율을 서로 비교하였다(Table 1).

일반적으로 편극성이 큰 약물들에 대해 높은 흡착계수를 가진 흑연유사구조의 비극성 Caropak B¹⁰⁻¹²가 β -blockers에 대해서도 가장 높은 흡착력을 보였다. 그러나 methanol 용출시 6.6~56.7%의 가장 낮은 회수율을 낸 것은 비가역적 흡착으로 인해 탈착평형에 신속히 도달하지 못한 것으로 사료된다.

극성이 큰 성분들에 대해 흡착탈착평형에 신속히 도

Table 1. Simultaneous solid-phase extraction of β -blockers

β -blockers	Mean recovery \pm SD of β -blockers(%) ^a			
	Chromosorb 107	Chromosorb 102	Thermosorb	Carbopak B
Oxprenolol	91.0 \pm 1.1	77.6 \pm 1.7	75.2 \pm 0.8	23.6 \pm 0.6
Metoprolol	94.1 \pm 0.3	83.1 \pm 1.5	78.3 \pm 0.5	45.0 \pm 0.2
Penbutolol	90.4 \pm 1.4	75.0 \pm 1.8	58.0 \pm 1.0	56.7 \pm 0.9
Propranolol	92.8 \pm 2.7	76.3 \pm 1.0	73.3 \pm 2.8	6.6 \pm 0.5
Betaxolol	90.4 \pm 1.2	85.6 \pm 1.8	77.3 \pm 2.3	10.5 \pm 0.2
Atenolol	91.4 \pm 2.0	86.9 \pm 0.6	59.7 \pm 2.0	50.8 \pm 1.4

^aSolid adsorbent (200mg) packed into column (4mm i. d.) : 20ppm β -blockers (1ml) : gravity flow : methanol elution (4ml) : n=3.

달하는 특성을 가진 acrylic ester 중합체인^{13,14} Chromosorb 107은 β -blockers에 대해서도 높은 흡착력과 또한 methanol 용출시 90% 이상의 가장 높은 회수율을 내었다. β -blockers 혼합물의 동시 고상추출흡착제로서 Chromosorb 107을 선정하였다.

Chromosorb 107에 대한 breakthrough 조사: 선정된

Chromosorb 107 고상추출 흡착제를 혈액과 같은 복합 생체시료에 적용할 때에는 β -blockers를 용출하기 전에 Chromosorb 107 표면으로부터 시료의 대부분을 차지하는 수용성, 그리고 지용성 방해물질을 제거해야 한다. 흡착된 β -blockers가 Chromosorb 107 column에서 breakthrough되기 전까지 수용성 방해물질을 제거시

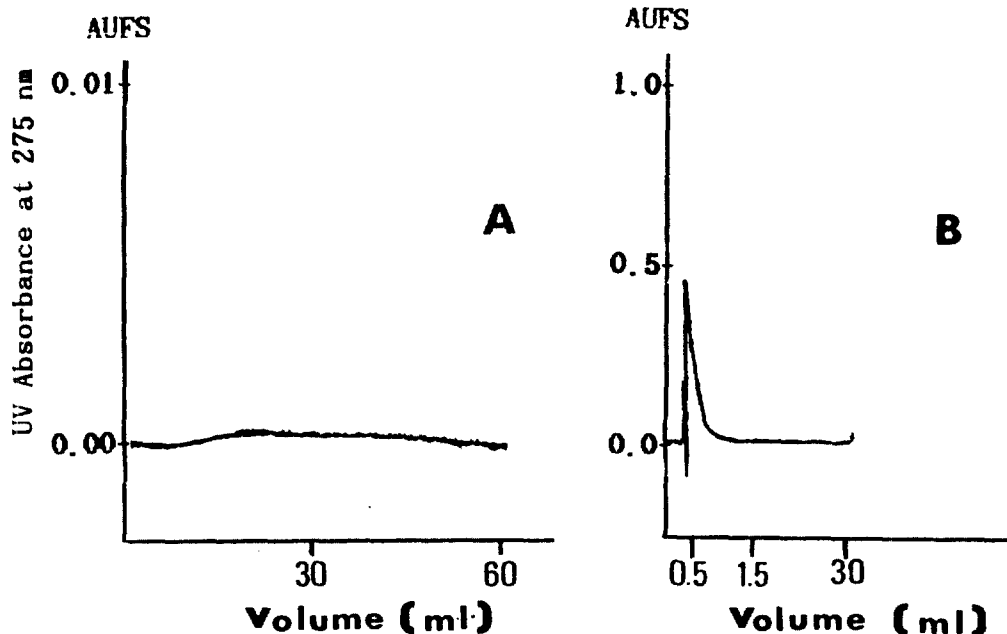


Fig. 1. Breakthrough curve (A) and methanol elution curve (B) for the β -blocker mixture.

키는 목적으로 통과 가능한 물의 최대 용량을 측정하기 위하여 20ppm β -blockers 혼합표준수용액(100 μ l)을 주입한 후 통과되는 물을 20분간 on-line monitoring하여 breakthrough curve(Fig. 1-A)을 구하였다. 60ml의 물이 통과해도 β -blockers가 70mg의 Chromosorb 107 표면에 강하게 흡착되어 있기 때문에 breakthrough되지 않고 있음을 보여 주고 있다.

0.4ml/min의 낮은 유속으로 methanol을 통과시키면서 측정한 elution curve(Fig. 1-B)에서 Chromosorb 107에 흡착된 β -blockers가 거의 tailing 없이 1.5ml 이내에 용출되었음을 알 수 있다.

Chromosorb 107 컬럼에 흡착된 β -blockers를 직접 용매로 용출시킨 경우와 물을 통과시킨 후 용출시켰을 경우를 정량적으로 비교하였다(Table 2). 물을 통과시킨 경우에 오히려 Chromosorb 107 컬럼의 효율이 168에서 221로 증가하고 broadening factor는 3.6에서 2.4로 감소한 것은 β -blockers가 Chromosorb 107 컬럼에 좁은 band로 강하게 흡착된 후 물이 통과하는 동안 거의 band broadening이 일어나지 않았음을 증명해 준다. 또한 0.7ml의 적은 methanol 용량으로 β -blockers가 94% 이상 회수되었음을 보여 주고 있다.

Table 2. Results of the simultaneous breakthrough studies of β -blockers on Chromosorb 107 column

	Passage of water ^a	
	Without	After
Column efficiency(n)	168	221
Broadening factor	3.6	2.4
Recovery(%)	NA	94.4
Elution volume(ml)	0.8	0.7

^aChromosorb 107(70mg) packed into column (5cm \times 2mm i.d.) : 20ppm β -blockers(100 μ l) : methanol elution (0.4ml/min) : distilled water passage (3ml/min) : n=2

NA=not applicable.

혈청 중 β -blockers의 고상추출: Chromosorb 107 흡착컬럼에 β -blockers 혈청시료를 loading하고 물과 petroleum ether 순서로 세정하여 수용성, 지용성 방

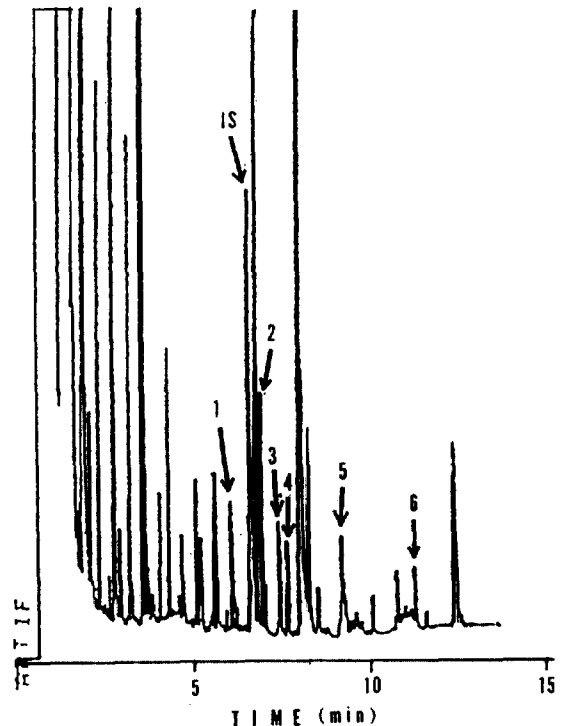


Fig. 2. Typical chromatogram of serum spiked with β -blockers.

1=oxprenolol. 2=metoprolol. 3=penbutolol.
4=propranolol. 5=betaxolol. 6=atenolol.
IS=medazepam as internal standard

Cross-linked methylsilicone DB-1 fused silica capillary column(15m \times 0.25mm i. d.) connected to a deactivated fused silica tubing(1m \times 0.25mm i. d.) as the guard column, temperature programmed from 100 $^{\circ}$ C(0.5min) to 220 $^{\circ}$ C at 40 $^{\circ}$ C/min and 280 $^{\circ}$ C at 7 $^{\circ}$ C/min, 0.4 μ l injected in on-column mode.

해성분을 제거한 후 methanol로 용출하였다. 용출액을 분석하여 얻은 전형적인 GC 프로파일(Fig. 2)은 혈청 내의 다른 성분들도 함께 고상추출되었으나 첨가된 β -blockers의 검출정량에는 방해하지 않음을 보여 주고 있다.

β -Blockers는 체내 단백질합물이 약물에 따라 90%까지 달라므로 고상추출에 대한 혈청 matrix 영향을 조사하기 위해서 pH 12.0 물시료를 동일한 방법으로 분석하였다(Table 3). 83.2~99.5%의 높은 회수율을 보인 물시료에 비해 혈청시료인 경우에는 낮은 회수율을

Table 3. Effects of serum matrix on the solid-phase extraction of β -blockers

β -blockers	Mean recovery \pm SD of β -blockers(%) ^a			
	Amount added to water ^b		Amount added to serum ^c	
	0.2 μ g	0.4 μ g	0.2 μ g	0.4 μ g
Oxprenolol	99.3 \pm 3.2	99.5 \pm 3.2	75.7 \pm 3.1	62.2 \pm 3.0
Metoprolol	94.6 \pm 3.0	95.6 \pm 1.6	40.0 \pm 2.5	59.2 \pm 1.2
Penbutolol	91.3 \pm 4.8	83.2 \pm 4.3	34.0 \pm 2.6	55.9 \pm 2.3
Propranolol	86.1 \pm 2.3	84.2 \pm 3.2	62.8 \pm 2.7	69.6 \pm 2.1
Betaxolol	89.4 \pm 4.3	88.8 \pm 2.4	59.9 \pm 2.1	78.1 \pm 5.0
Atenolol	97.6 \pm 5.0	98.9 \pm 1.1	55.2 \pm 1.8	66.3 \pm 2.4

^aChromosorb 107(50mg) packed into glass column (3mm i. d.) : methanol elute(2ml) : n=3.

^bpH 12.0 water(1ml) :

^cserum(100 μ l) diluted with pH 12.0 water(900 μ l).

Table 4. Linear regression analysis for the calibration graph of the solid-phase extracted β -blockers from serum

β -blockers	Regression line		Correlation coefficient r
	m ^b	b ^c	
Oxprenolol	0.0371	0.0386	0.9996
Metoprolol	0.0365	0.0362	0.9975
Penbutolol	0.0575	0.0375	0.9961
Propranolol	0.0389	0.0163	0.9980
Betaxolol	0.0458	0.0208	0.9995
Atenolol	0.0316	0.0314	0.9999

^aSerum(100 μ l) diluted with pH 12.0 water(0.9ml) :

Chromosorb 107(50mg) packed into glass column (3mm i. d.) :
methanol elute(2ml) : n=3

^bm = slope = relative weight response = mean peak area ratio
of β -blocker \times weight of I. S. / weight of β -blocker

^cb = y -intercept

내었다. 그러나 혈청에 첨가된 β -blockers 농도와 피크 면적비 사이의 직선성과 재현성을 조사하였을 때 2~8ppm 농도 범위에서 0.9961에서 0.9999의 상관계수 (Table 4)를 갖는 일직선의 검량선들을 얻었다(Fig. 3).

재현성이 2.0에서 7.6% 범위이지만 대부분의 경우 5.0% 이하였으므로 혈청내 미량의 β -blockers를 정밀하게 정량할 수 있었다.

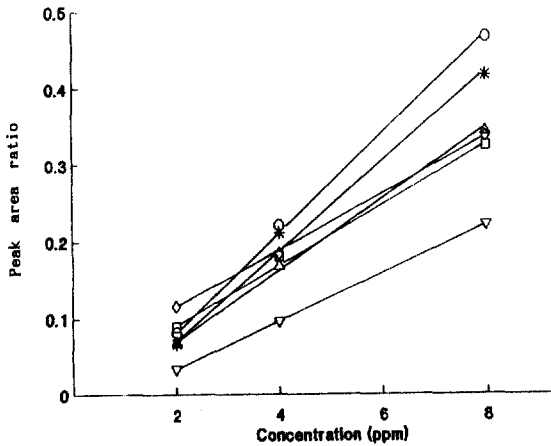


Fig. 3. Calibration curve for the solid-phase extracted (◇) oxprenolol, (○) metoprolol, (*) penbutolol, (□) propranolol, (△) betaxolol, and (▽) atenolol from serum.

4. 결론

Chromosorb 107/methanol을 사용한 본 고상추출 방법은 신속하게 적은 양의 혈청시료를 전처리하여 β -blockers의 분리능측을 가능케 하므로 HPLC의 on-column 시료전처리 precolumn으로서 확장되어 이용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 고상추출 후 TBDMS 유도체로서 GC 분석하는 본 방법은 생체시료 중 미지의 β -blockers를 신속히 스크리닝하는 데 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

감사의 말

한국과학재단의 지원(과제번호 881-0304-005-2)에 의해서 본 연구가 이루어졌으므로 감사드립니다.

인용문헌

1. K. Florey, "Analytical Profiles of Drug Substances", Academic, Press, Vol. 13, pl-26, 1984.
2. A. Schneeweiss, and G. Schettler, "Cardiovascular drug therapy in the elderly", Martinus Nijhoff Publishing, p.289-374, 1987.
3. W. G. Clark, D. C. Brater, and A. R. Johnson, "Goth's Medical Pharmacology", 12th Ed., p.181-185, The C. V. Mosby Company, 1988.
4. K. D. Ballard, D. R. Knapp, J. E. Oatis, Jr., and T. Walle, *J. Chromatogr.*, **277**, 333-339(1983).
5. F. T. Delbeke, M. Debackere, N. Desmet, and F. Maertens, *J. Chromatogr.*, **426**, 194-201(1988).
6. D. S. Lho, J. K. Hong, H. K. Park, J. A. Lee, and J. Park, *J. Anal. Toxicol.*, **14**, 77-83(1990).
7. K. R. Kim, S. Y. Myung, and D. J. Kim, Manuscript in preparation to be submitted to *Bulletin* (1993).
8. P. M. Harrison, A. M. Tonkin, and A. J. McLean, *J. Chromatogr.*, **339**, 429-433(1985).
9. M. S. Leloux, E. G. Dejong, and R. A. A. Maes, *J. Chromatogr.*, **488**, 357-367(1989).
10. K. R. Kim, Y. J. Lee, H. S. Lee, and A. Zlatkis, *J. Chromatogr.*, **400**, 285(1987).
11. 김경례, 명노홍, *성균약학논문집*, **1**, 68-73(1989).
12. 김경례, 이경원, 심원희, *약학회지*, **36**, 120-125(1992).
13. 김경례, 심원희, *약학회지*, **36**, 563-569(1992).
14. G. R. Aiken, E. M. Thurman, and R. L. Malcolm, *Anal. Chem.*, **51**, 1799-1803(1979).