

GC/NPD를 이용한 정신분열증 환자의 혈중 Haloperidol 정량분석

백만정 · 강보경 · 이경옥 · 신호상*

서울임상병리검사센터(SCL) · 서울의과학연구소

*공주대학교 환경교육학과

(1997. 10. 24 접수)

Determination of Haloperidol Serum Levels in Psychiatric Patients with Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detection

Man-Jeong Paik, Bo-Kyoung Kang, Kyo-Young Lee and Ho-Sang Shin*

Seoul Clinical Laboratories(SCL), Seoul Medical Science Institute, Seoul 140-230, Korea

*Department of Environmental Education, Kongju University, Kongju 314-701, Korea

(Received October 24, 1997)

요약: 정신질환 치료에 가장 흔하게 사용되는 haloperidol(HAL)의 혈중농도 분석법이 개발되었다. 이 연구를 위하여 gas chromatography/nitrogen-phosphorus detection(GC/NPD)을 이용하였으며, bromoperidol을 내부표준물질로 사용하였고, 시료전처리 방법으로써 diethylether를 추출용매로 사용하는 3단계 추출법을 사용하였다. 이 과정에 있어서 추출효율은 15 ng/mL에서 $67.5 \pm 1.9\%$ 이었고, 1~40 ng/mL 범위에서 상관계수 $r^2=0.999$ 인 좋은 직선성을 얻었으며, 혈청을 2 mL 사용했을 때 검출한계는 0.5 ng/mL이었다. 정신분열증 환자의 혈청내 HAL을 분석하기 위하여 이 방법을 적용하였다. Haloperidol decanoate(HD)를 정신분열증 환자에 근육주사한 후, 2주와 4주째의 HAL level을 조사한 결과 4주째에 HAL의 농도가 2주째보다 29.6% 낮게 나타났다. 제시된 방법은 낮은 검출한계와 높은 선택성을 나타냈다. 그러므로 본 연구 방법은 혈청내 HAL의 미량분석과 모니터링에 이용될 수 있을 것이다.

Abstract: Analytical method of haloperidol (HAL) in serum which has been widely used in therapy of schizophrenic disorders is developed. Gas chromatography/nitrogen-phosphorus detection (GC/NPD) was used for this study. Bromoperidol was used as an internal standard and diethylether as a solvent of three-step extraction. The extraction yield in this procedure was $67.5 \pm 1.9\%$ at 15 ng/mL. A good linear response in the range of 1~40 ng/mL was obtained with correlation coefficient of $r^2=0.999$. Detection limit was 0.5 ng/mL when 2 mL of serum was used. This method was applied for the analysis of HAL in serum of schizophrenic patients. After HAL decanoate (HD) was intaken as intramuscular route, HAL levels were determined at second week and forth week. From the result, the concentration of HAL at forth week appeared to 29.6% lower than those at second week. The present method showed low detection limit and high selectivity. Therefore it can be applied for the trace analysis of HAL in serum and the monitoring.

Key words: Haloperidol, Serum, GC-NPD, Trace analysis

1. 서 론

Haloperidol {1-[3-(4-fluorobenzoyl) propyl]-4-hydroxy-4-(4-chlorophenyl) piperidine}(HAL)은 항정신성 약물중 흔히 사용되는 약물로 그 대사 과정

이 단순하여 임상적인 적용과 약리학적 연구에 가장 적절한 것으로 평가되고 있다.^{1,2} 최근에는 장기 지속성 주사제로 HAL decanoate(HD)가 개발되어 많이 사용되고 있다.^{3,4} 특히 HD는 축적질(depot) 형태로 지속적으로 방출되어 환자의 약물 순응도를 높일 수

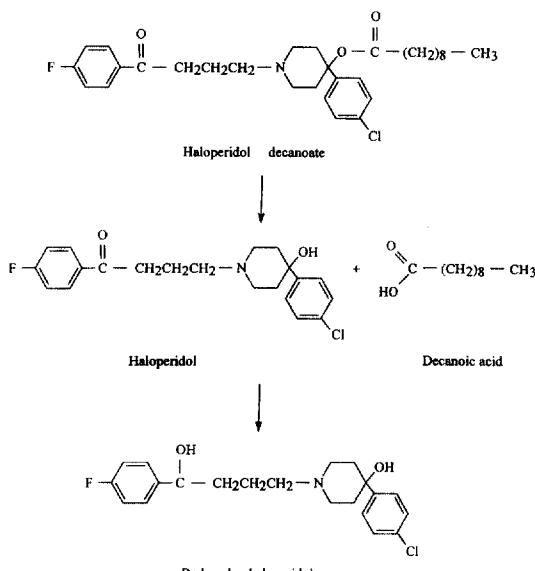


Fig. 1. Chemical structure of haloperidol decanoate, haloperidol and reduced haloperidol.

있는 장점이 있다. HD는 주사된 후 가수분해에 의해서 활성화된 HAL과 decanoic acid로 분해되고, HAL reductase(HALR)에 의해서 HAL은 좀 더 친수성이 있는 알콜 대사물인 환원형의 HAL(RHAL)로 전환된다(Fig. 1). HAL의 혈중 농도와 약물 효과와의 관계는 그리 명확히 알려져 있지 않은 상태이며, HAL의 유효 약물 치료 농도 또한 별로 밝혀져 있지 않다.⁵ HAL을 과량으로 주사 혹은 경구투여시에는 불면, 근육수축작용의 불안정, 초조, 졸음과 현기증, 발한, 피로감, 갈증, 간기능의 이상, 혈압저하, 식욕부진, 변비, 복통, 두통, 빈혈 등의 증상을 일으킬 수 있고, 태아에게는 기형작용을 일으킬 수 있다.^{6,7} 그러므로 미량으로 존재하는 HAL의 혈중 농도에 대한 정확한 분석은 초기 부작용 발생을 피하고, 최적의 치료효과를 얻을 수 있으므로 그 중요성이 날로 증대되고 있다. 현재까지 보고된 분석방법으로는 high performance liquid chromatography/electron chemical detection(HPLC/ECD),^{8,9} HPLC/ultraviolet detection(UV),^{10~13} glass packed와 capillary column을 이용한 GC/NPD,^{5,14~16} 그리고 GC/electron-capture detection(ECD)^{17,18} gas chromatography mass spectrometry(GC/MS),^{19,20} radioimmuno assay(RIA), radioreceptor assay(RRA) 등이 있다.^{3,21} 이 중에서 주로 사용되고 있는 HPLC/

ECD 방법은 검출한계는 낮지만, 검출기의 지속적인 안정성을 유지하기 어렵고, HPLC/UV 법의 경우는 간편하기는 하지만, 검출한계가 높기 때문에 미량 분석에 적합하지 않다. 그리고 RRA와 RIA는 cross reactivity가 문제가 되며, 특히 RIA는 사용 후 방사선 폐기물 처리에 대한 안전처리 문제가 발생할 수 있다.²² 그리고 GC/MS selected ion 모니터링법의 경우 GC/NPD법과 유사한 검출한계를 갖고 있지만, 고가의 장비이므로 비용이 많이드는 단점이 있다.

본 연구에서는 저가의 장비로서 specific detector를 이용하는 capillary column gas chromatograph/nitrogen-phosphorous detector를 이용하였다. 이 방법은 질소와 인을 포함하지 않은 다른 내인성 유기물에는 낮은 감도를 나타내고 상대적으로 HAL에는 높은 감도를 나타내기 때문에 미량분석에 적합하다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

사용한 기기로는 flame ionization detector(FID)와 nitrogen phosphorous detector 그리고 split/splitless injection port가 장착된 HP 6890 series II gas chromatograph(Hewlett-Packard, Avondale, U.S.A.)에 HP 3365 chemstation을 연결하여 사용하였다. 사용된 column은 HP-5(30 m × 0.32 mm I.D., 0.25 μm df, Hewlett-Packard, Avondale, U.S.A.)이었고, 증발 전조하기 위하여 vacuum evaporator(Buchi, Flawil, Switzerland)와 일반 질소가스(한국 산업가스, 시흥, 경기)를 사용하였다. 추출용매로는 HPLC급의 diethylether(Fisher, New Jersey, U.S.A.)를 사용하였고, pH 조절 목적으로 시약급 2 M NaOH(Tedia, Ohio, U.S.A.)와 0.2 M HCl(임순약공업주식회사, Osaka, Japan) 용액을 각각 사용하였으며, 표준용액 조제 및 추출액을 농축하기 위해서 methanol(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 본 연구에서 사용된 HAL과 내부표준물질로 사용한 bromoperidol은 한양대학교 의과대학 신경정신과학교실로부터 공급 받아 사용하였다.

2.2. 표준용액 조제

HAL과 내부표준물질로 사용하는 bromoperidol의 표준 용액은 methanol 10 mL에 10 mg의 무게를

정확히 쟤어 1000 ppm으로 조제한 후, HAL은 각각 1 ppm, 0.1 ppm 그리고 bromoperidol은 1 ppm으로 회석한 후 4°C에 냉장 보관하여 사용하였다.

2.3. 시료의 채취

공시료, 검량선작성, 직선성 및 회수율과 재현성 실험에 사용한 혈청은 본 연구소의 생화학 검사실에서 실시한 생화학적 검사결과 정상으로 판정된 사람의 혈청을 모아서 균일하게 섞은 후 사용하였다. H병원 신경 정신과에 내원한 환자 중 주치의가 정신분열 장애가 있다고 진단한 17명(남자 6명, 여자 11명)을 대상으로 HD 투여 후 2주와 4주째의 혈액을 채혈한 다음 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 혈청을 -70°C deep freezer에 보관하여 사용하였다. 이들 환자들의 평균 체중은 66.5 kg(47~94 kg), 평균 주사용량은 1.51 ± 1.45 mg/kg(0.35~6.45 mg/kg)이었다.

2.4. 시료 전처리법

Glass vial에 bromoperidol 50 ng과 HAL 표준용액 2, 5, 10, 20, 40, 그리고 80 ng을 각각 넣은 후, 질소 가스를 사용하여 완전 진조시켰다. 이어서 혈청 2 mL를 위의 표준 HAL이 첨가된 것과 공시료에 각각 첨가하여 시료 전처리를 수행하였다. 시료 전처리 방법으로는 bromoperidol을 내부표준물질로 diethylether를 추출용매로 사용하여 3단계 추출법을 이용하였다. 3단계 추출법은 먼저 시료에 중류수 2 mL을 첨가하여 시료를 회석하고, 진탕시키는 동안 emulsion과 점성도를 줄인 후,¹⁶ 2 M NaOH 용액 200 μL를 사용하여 알칼리화(pH>10)하였다. 이어서 diethylether 6 mL을 첨가한 다음 10초 동안 격렬하게 진탕시킨 후, 5분 동안 원심분리하여 1차 추출하였다. 추출액에 0.2 M HCl 용액 2.5 mL를 첨가하여 각각 5분 동안 진탕시키고 원심분리한 후 diethylether 층을 버림으로써 불순물을 세정하여 역추출하였다. 수용액층에 다시 2 M NaOH 용액 300 μL와 diethylether 6 mL을 첨가하여 10분 동안 진탕시킨 후, 5분 동안 원심분리하여 3차 추출하였다. 최종 추출액을 vacuum evaporator와 질소를 사용하여 완전히 증발 진조시킨 다음, methanol 200 μL를 첨가하여 용리시킨 후, 다시 질소를 사용하여 40~50 μL로 농축하고, 이어서 유도체화 과정없이 직접 gas chromatograph/

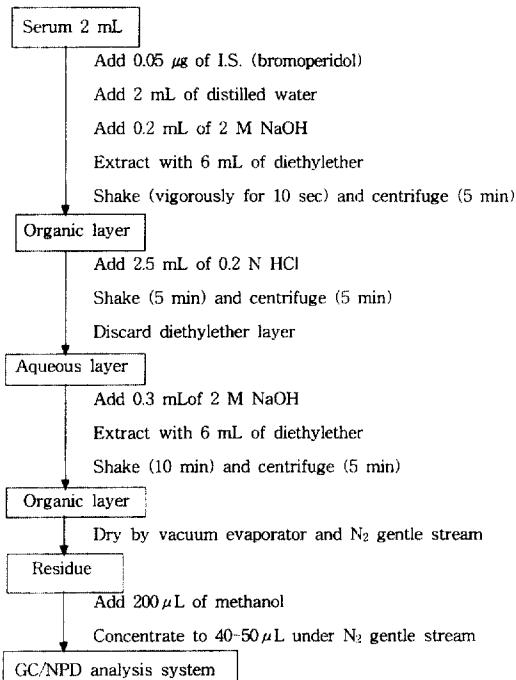


Fig. 2. Schematic flow diagram of haloperidol analysis.

nitrogen-phosphorous detector에 split mode로 주입하였다. 위의 전처리법을 Fig. 2에 요약하였다.

2.5. 검량선 작성, 회수율 및 정확도

혈청 2 mL에 I.S. 50 ng과 HAL 2, 5, 10, 20, 40 그리고 80 ng을 첨가하여 위의 시료전처리법에 의해 추출후 직선성을 조사하였다. 이때 정량은 I.S.에 대한 상대적인 면적비를 이용하였으며, 회수율 실험을 위해 혈청중에 HAL이 5, 15 ng/mL이 되도록 첨가한 후 HAL이 시료전처리에 의해 회수되는 비를 조사하였다. 정확도 실험을 위해서는 혈청에 HAL이 2.5, 5, 15 ng/mL이 되도록 첨가한 후 이들 시료들에 대한 재현성을 조사하였다. 그런 다음 혈청을 2 mL를 사용하여 검출한계를 조사하였다.

2.6. GC 분석 조건

Capillary column gas chromatograph/nitrogen-phosphorous detector의 분석 조건에서 column 온도는 100°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 20°C로 300°C까지 상승시켜 10분간 유지시켰다. Split injector의 온도는 300°C, NPD detector의 온도는

310°C이었으며, carrier gas인 He의 flow rate는 1.5 mL/min이었고, split ratio는 5:1이었다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 capillary column gas chromatograph/nitrogen-phosphorous detector를 이용하여 혈중의 HAL을 유도체화 과정없이 추출 후 직접 분석하였다. 일반적으로 GC 분석을 하기 위해서는 유도체화 시키는 방법이 많이 사용되어 왔으나, HAL은 N을 함유하고 있는 화합물이므로, N과 P를 함유한 화합물에 선택적으로 감도가 높은 NPD를 사용함으로써 시료 전처리 후 유도체화 과정없이 직접 분석이 가능하였다. 유도체화하여 capillary column GC/ECD로 분석 할 경우 불완전한 유도체가 깨지면서 여러개의 피이

크가 동시에 나타나며, ng level에서 직선성에 문제가 있어서 정확도가 떨어지는 문제점이 보고되었고,^{17,18} capillary GC/NPD법이나 GC/MS법의 경우도 ng level에서 시료주입부에서의 직선성이 없는 흡착과 column내에서의 분해로 인하여 정확도가 떨어지는 문제점이 지적되었다.^{5,14,19,20} 하지만, 본 연구에서는 이러한 문제점 없이 분석을 수행하였다. 그리고, 시료 전처리가 간단하며, capillary column GC/ECD^{17,18}법 보다 감도는 낮지만 조건 설정이 쉽고, 유도체화과정이 필요없기 때문에 임상시료에 적용이 용이한 장점을 갖고 있다. 시료 전처리 방법으로는 혈청 2mL을 사용하였고, 이를 알칼리 조건에서 diethylether로 추출한 후 산성화시켜 역추출하였으며, 세 번째 단계에서 이를 알칼리 조건에서 재추출함으로써 혈중에 있는 방해물질을 최저화시켰다. 위의 전처리에 의한 추

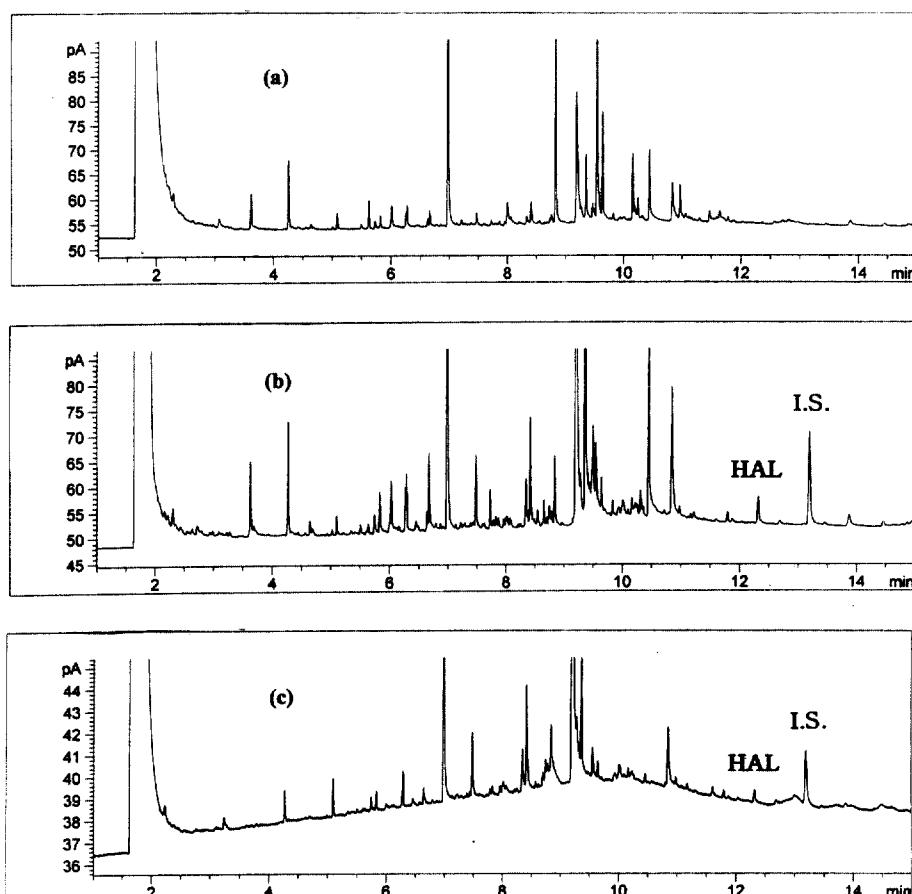


Fig. 3. Typical chromatograms obtained from (a) blank serum, (b) blank serum spiked with 5.0 ng/mL haloperidol and 25.0 ng/mL I.S. (c) a patient serum with 3.1 ng/mL haloperidol.

출물을 gas chromatograph/nitrogen-phosphorous detector로서 검출하였다. 분석결과 HAL과 I.S. 위치에 어떠한 방해 물질도 존재하지 않음을 확인하였으며, HAL 표준용액을 첨가한 혈청과 실제 정신분열증 환자로부터 얻은 혈청을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

3.1. HAL 표준용액의 직선성, 회수율, 재현성 및 검출한계

1~40 ng/mL 범위의 표준 HAL에 대한 직선성 조사 결과 상관계수 $r^2=0.999$ 로 높은 직선성을 나타내었다. 주로 HAL의 혈중농도가 4~20 ng/mL의 분포를 보일 때 임상적으로 치료효과가 있다고 보고되고 있다.¹⁴ 이 결과로 볼 때 본 실험의 분석범위는 실제 시료에서 혈중 유효농도 분석에 충분하다. 본 연구의 직선성 조사 결과는 20 ng/mL보다 낮은 level에서 직선성의 문제로 인해 정확도가 떨어지는 단점을 갖고 있는 glass packed column GC/NPD법¹⁵과 $r^2=0.997$ 의 상관계수를 나타낸 capillary column GC/NPD법¹⁴에 비하여 좋은 직선성을 나타냈다.

5, 15 ng/mL에 대한 회수율은 각각 69.7 ± 3.8 , $67.5 \pm 1.9\%$ 로 나타났는데 이것은 세 번의 추출단계를 고려해 볼 때 비교적 높은 회수율로 간주된다. 이 결과는 S. Ulrich¹⁴ 등이 보고한 63%의 회수율을 나타낸 방법보다 다소 좋은 회수율을 보였다.

2.5, 5, 15 ng/mL에 대한 재현성 조사결과는 8.22, 5.16, 그리고 6.24%로서(Table 1) 기존에 보고된 HPLC나 GC법과 유사하였다.

그리고, 혈청 2 mL을 사용하여 분석한 결과 검출한 계는 0.5 ng/mL(S/N=2 or 3)로 나타났는데, 이것은 HPLC/UV법^{12,13}의 2.0 ng/mL과 glass packed column GC/NPD법^{15,16}의 1.0 ng/mL보다 낮게 나타났으며, 기존의 capillary column GC/NPD법¹⁴의 0.4 ng/mL보다는 다소 높게 분석되었다.

Table 1. Precision and accuracy of determination of haloperidol in human serum (n=5)

Added concentration (ng/mL)	Found concentration (mean \pm sd) (ng/mL)	RSD (%)
2.5	2.56 ± 0.21	8.22
5.0	4.72 ± 0.24	5.06
15.0	14.58 ± 0.91	6.24

Table 2. Serum level of haloperidol in schizophrenic patients

No.	HD ^a dosage (mg)	Body weight (kg)	Dosage/ body (mg/kg)	Serum level of haloperidol (ng/mL)	
				Second week	Forth week
1	60	92	0.65	- ^b	0.94
2	32	53	0.60	1.21	0.84
3	50	80	0.63	1.27	0.89
4	20	58	0.35	0.53	0.38
5	50	47	1.06	-	1.10
6	150	94	1.60	3.47	2.48
7	200	74	2.70	-	5.13
8	100	65	1.54	2.80	2.13
9	120	70	1.71	-	2.51
10	400	62	6.45	14.14	10.76
11	150	51	2.94	4.12	1.78
12	25	63	0.40	0.61	0.57
13	50	67	0.75	1.55	1.09
14	35	60	0.58	-	0.39
15	100	55	1.82	4.21	-
16	75	75	1.00	-	1.25
17	40	77	0.52	1.02	0.74

^aHD: Haloperidol decanoate, ^b-: Serum sample was not collected.

3.2. 정신분열증 환자의 혈중 HAL 분석

위의 확립된 분석 조건을 최적 조건으로 하여 H 병원 신경 정신과에 내원한 환자에게 1회 근육주사 후 혈중 HAL 분석을 시도하였다. 정신분열증 환자에 있어서 혈중의 HAL level은 투여량에 비례하여 증가하는 양상을 나타냈지만, 개인에 따라 변화가 있었다. 이것은 대사에 영향을 미치는 연령, 성별, 흡연, 약물 복용 여부, 체중증감과 일반적인 건강상태 및 약의 흡수 대사능력 등에 의한 것으로 보고되고 있다.⁷ HD 투여 후 2주와 4주째의 혈중 HAL level을 비교해 본 결과 4주째는 2주째의 농도에 비하여 평균 29.6% 감소하는 경향을 나타했는데, 이 결과는 Eyles² 와 Lee⁴ 등이 연구하여 보고한 결과와 부합되게 나타났다 (Table 2).

4. 결 론

본 연구에서 GC/NPD 조건으로 실험한 결과 HAL과 I.S.가 서로 잘 분리된 GC chromatogram을 얻을 수 있었으며, 공시료에서는 HAL과 I.S. 위치에

어떠한 방해물질도 존재하지 않았다. GC 방법의 경우 glass ware에 흡착되거나 capillary column내에서 분해되는 문제로 인하여 분석의 어려움이 보고되었는데,¹⁴ 본 연구에서는 흡착이나 분해에 의한 시료 손실의 문제없이 분석을 수행하였다. 그리고 기존에 연구되어 보고된 GC/NPD 분석법^{14~16}의 경우 직선성이 좋지 않았는데, 본 연구에서는 0.999의 높은 직선성을 나타내었다. 또한 분리능이 뛰어나므로 기존의 glass packed column을 이용한 GC/NPD법이나, HPLC법보다 대청적인 피이크를 나타낸 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 그러므로, 저가의 장비인 gas chromatograph/nitrogen-phosphorous detector를 이용한 HAL 분석은 낮은 검출한계와 높은 선택성을 가지며, 유도체화 과정이 필요없으므로 HAL 경구 투여나 정맥 투여를 받은 환자의 치료적 차원에서 미량의 유효 약물 농도를 모니터링하는데 활용이 클 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- W. H. Chang, S. K. Lin, M. W. Jann, Y. W. Francis Lam, T. Y. Chen, C. T. Chen, W. H. Hu and E. K. Yeh, *Biol. Psychiatr.*, **26**, 239-249 (1989).
- D. W. Eyles, H. A. Whiteford, T. J. Stedman and S. M. Pond, *Psychopharmacol.*, **106**, 268-274 (1992).
- J. S. Froemming, Y. W. Francis Lam, M. W. Jam and C. M. Davis, *Clin. Pharmacokinet.*, **17**(6), 396-423 (1989).
- Y. W. Lee, B. H. Yang and E. K. Chung, *J. Korean Neuropsychiatr. Assoc.*, **29**(1), 79-87 (1990).
- K. Yokogawa, E. Nakashima, F. Ichimura and T. Yamana, *Chem. Pharm. Bull.*, **33** (10), 4581-4586 (1985).
- R. H. Lenox, P. A. Newhouse, W. L. Creelman and T. M. Whitaker, *J. Clin. Psychiatr.*, **53**(2), 47-51 (1992).
- Y. S. Kim, H. S. Jung and B. H. Yang, *Mental Health Res.*, **7**, 1-7 (1988).
- E. R. Korpi, B. H. Phelps, H. Granger, W. H. Chang, M. Linnoila, J. L. Meek, and R. J. Wyatt, *Clin. Chem.*, **29**(4), 624-628 (1983).
- N. D. Eddington and D. Young, *J. Pharm. Sci.*, **77**(6), 541-543 (1988).
- D. Parkinson, *J. Chromatogr.*, **341**, 465-472 (1985).
- K. Miyazaki, T. Arita, I. Oka, T. Koyama and I. Yamashita, *J. Chromatogr.*, **233**, 449-453 (1981).
- P. I. Jatlow, R. Miller and M. Swigar, *J. Chromatogr.*, **227**, 233-238 (1982).
- 이은경, 대한임상화학검사학회지, **6**(1), 39-43 (1995).
- S. Ulrich, F. P. Meyer, S. Neuhof, and W. Knorr, *J. Chromatogr. B*, **665**, 289-296 (1995).
- D. R. Abernethy, D. J. Greenblatt, H. R. Ochs, C. R. Willis, O. D. Miller, and R. I. Shader, *J. Chromatogr.*, **423**, 380-382 (1987).
- G. Bianchetti, and P. L. Morselli, *J. Chromatogr.*, **153**, 203-209 (1978).
- R. F. Tyndale and T. Inaba, *J. Chromatogr.*, **529**, 182-188 (1990).
- J. Fang, G. B. Baker and R. T. Counts, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **12**, 283-288 (1996).
- M. A. Moulin, R. Camsonne, J. P. Davy, E. Poilpre, P. Morel, D. Debruyne, and M. C. Bigot, *J. Chromatogr.*, **178**, 324-329 (1979).
- P. A. Szczepanik, *J. Chromatogr.*, **339**, 321-330 (1985).
- S. G. Dahl, *Clin. Pharmacokinet.*, **11**, 36-61 (1986).
- S. Guthrie, E. A. Lane and M. Linnoila, "Psychopharmacology", 3rd Ed., p. 1323-1335, H. Y. Meltzer, Ed., Raven Press, New York, U. S. A., 1987.