

## Gas Liquid Chromatography에 의한 Dienestrol Cream中的 Dienestrol 定量

白南豪 · 朴萬基 · 柳京秀 · 廉貞祿

서울대학교 약학대학

(Received January 10, 1979)

Nam Ho Paik, Man Ki Park, Kyung Soo Yu and Jeong Rok Youm

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151*

Determination of Dienestrol in Dienestrol Cream by Gas Liquid Chromatography

**Abstract**—A gas chromatographic determination of dienestrol in dienestrol cream has been studied. Dienestrol cream was dissolved in pyridine and silylation was done by using N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide. The derivative was injected into 3% silicone OV-17 column for chromatographic estimation. The dienestrol peak was found to be well separated from the other components of the cream. The detection limit was obtained to be  $5.6 \times 10^{-11}$  mol of dienestrol for this method. As there is no need for prior separation procedure, this experiment is extremely simple and less time consuming as compared to the conventional methods for estimation of dienestrol in cream.

合成 estrogen인 dienestrol의 定量法으로 NF XIV는 dienestrol을 pyridine中에서 아세틸화하여 그 무게를 달아 定量하는 重量法을, British Pharmacopeia 1973은 아세틸화한 것을 0.5N NaOH 용액으로 滴定하는 방법을 채택하고 있다. 製劑中の dienestrol을 定量하는 방법으로는 NF XIV는 polarography를, British pharmacopeia 1973은 sodium molybdotungstophosphate로 發色하여 750nm에서 吸光度를 측정하는 比色法을 쓰고 있다. 이외에도 dienestrol 및 製劑中에서의 dienestrol 定量法에는 比色法 및 吸光度法에 의한 것으로 Cocking<sup>1)</sup>, Malpress<sup>2)</sup>, Gottlieb<sup>3)</sup>, Banes<sup>4)</sup>, Nedergaard<sup>5)</sup>, Graham<sup>6)7)</sup>, 등이 발표한 바가 있으며 Gry<sup>8)</sup>, Summa<sup>9)</sup>, Forman<sup>10)</sup> 등은 Polarography를 이용한 定量法을, Jarc<sup>11)</sup>, Nenninger<sup>12)</sup>, Van Waes<sup>13)</sup> 등은 TLC에 의한 定量法을 보고하였고 Smith<sup>14)</sup>는 malic acid를 사용한 置換滴定法을 소개한 바 있다. Roose<sup>15)</sup>, Hesse<sup>16)</sup> 등은 HPLC를 사용한 방법을 발표하였고 gas chromatography에 의한 방법으로는 McGregor<sup>17)</sup>, Luukarich<sup>18)</sup>, Fricke<sup>19)</sup>, Moretti<sup>20)</sup>에 의한 것들이 있다.

市販 dienestrol cream 중의 dienestrol 含量은 極少量이다. 위의 방법들 중 dienestrol cream

중에서의 dienestrol 定量에 적용 가능한 것을 검토한 바 모두 dienestrol 을 分離하여 定量하는 방법으로서 前處理 조작에 손이 많이 가야하고 또 적지 않은 시간을 필요로 한다. 이에 著者 등은 간편하고 신속한 방법으로 dienestrol cream 을 직접 TMS 化劑에 녹이는 동시에 silylation 하여 바로 gas chromatograph 에 적용하는 방법을 검토하였던 바 좋은 결과를 얻었다.

### 實驗方法

**試藥 및 試料**—N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) 는 Applied Science Laboratory Inc. 製를 pyridine 은 Pierce 社製의 silylation grade 를 사용하였으며 dienestrol cream 은 市販品을 그대로 사용하였다.

**機器**—gas chromatograph 와 recorder 는 각각 Shimadzu GC-4BM 과 Shimadzu R-101 을 사용하였다.

**標準 操作**—dienestrol (標準品) 일정량을 正確히 취해 pyridine 에 녹여 20, 40, 60, 80, 100 $\mu$ g/ml 용액을 만들어 標準溶液으로 하고 dienestrol cream 約 4g (dienestrol 로 4mg 해당량)을 正確히 취해 10ml vol. flask 에 넣고 pyridine 을 넣어 녹이고 pyridine 으로 標線까지 채워 이것을 試料溶液으로 한다(약 40 $\mu$ g/ml). 標準溶液 및 試料溶液을 1.0ml 씩을 취하여 teflon 으로 lining 한 cap tube 에 각각 넣고 BSTFA 1ml 씩을 가하여 80°C에서 20분간 가온한 다음 Tab. I 과 같은 조건에서 gas chromatography 를 행한다. 각 표준용액의 chromatogram 으로부터 얻은 dienestrol-TMS 의 peak 의 면적으로부터 검량선을 작성하여 시료용액의 chromatogram 의 dienestrol-TMS 의 면적을 검량선에 대입하여 dienestrol 의 量을 읽는다(W  $\mu$ g).

dienestrol cream 1g 중 dienestrol 의 量(mg)

$$= \frac{W \times 10}{\text{dienestrol cream 取한 量} \times 1000}$$

### 實驗 및 考察

**測定 條件의 檢討**—silylating agent 로써 BSA 와 BSTFA 를 비교한 결과 특기할 만한 차이가 없었으므로 detector 의 오염을 덜 수 있는 BSTFA 를 택하였다. BSTFA 의 濃度는 dienestrol 1 mol 에 대해서 60mol 이상을 가하면 dienestrol-TMS 의 濃度가 일정하였다. silylation 에 미치는 溫度 및 時間의 영향은 Fig. 1과 같았다. 50°C에서는 30분 이상 되어야 일정치를 나타냈으나 80°C 및 100°C의 경우에는 10분이면 反應이 충분히 종결된 것을 나타내고 있다. Fig. 2는 實驗方法에

Tab. I Chromatographic Condition

Gas chromatograph	SHIMADZU GC-4BM	
Detector	FID	
Column	u Type Glass 2m	
Stationary phase	3% OV-17	
Support material	Shmalite W 80/100	
Flow rate	N <sub>2</sub>	32 ml/min
	H <sub>2</sub>	35 ml/min
	Air	800 ml/min
Temperature	Injector	250°C
	Colum	190°C
	Detector	250°C
Sensitivity	8 × 10 <sup>3</sup>	

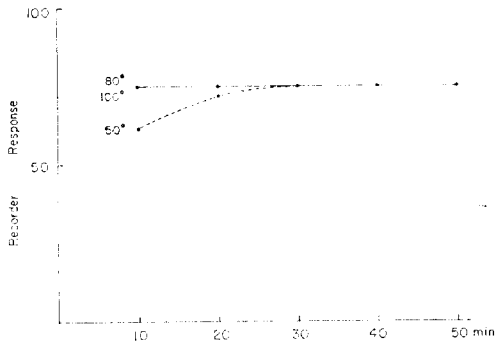


FIG. 1 Effect of Silylation Time & Temperature

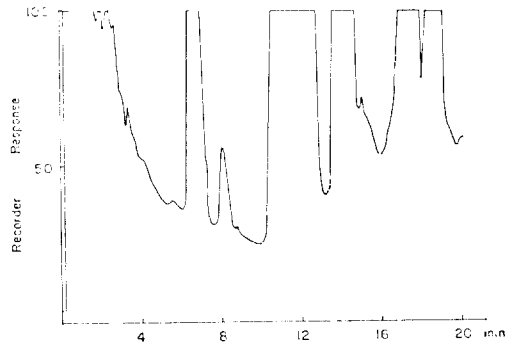


FIG. 2 Typical Chromatogram of Silylated Dienestrol Preparation

따라 dienestrol cream 을 처리하여 얻어진 chromatogram 이다. dienestrol-TMS 의 Rt 은 Tab. 1 의 조건에서 約 8 분이였다.

**Dienestrol-TMS 의 安定性**—silylation 된 dienestrol 을 室溫에서 48時間 방치하며 그 安定性을 檢討한 結果는 Fig. 3과 같다. 일단 silylation 된 dienestrol 은 매우 安定한 것을 알 수 있다.

**檢量線**—Fig. 4는 앞의 實驗方法에 따라 실험하여 얻은 檢量線을 보인 것이다. 10ng~50ng 사이에서 양호한 直線性을 보이고 있다.

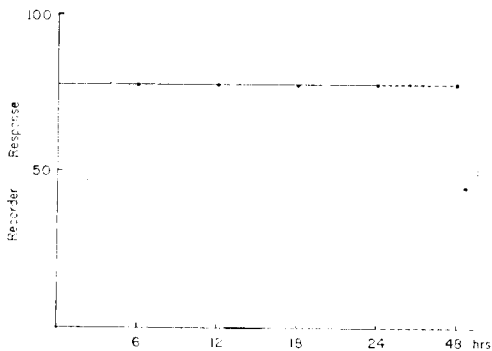


FIG. 3 Stability of Silylated Dienestrol

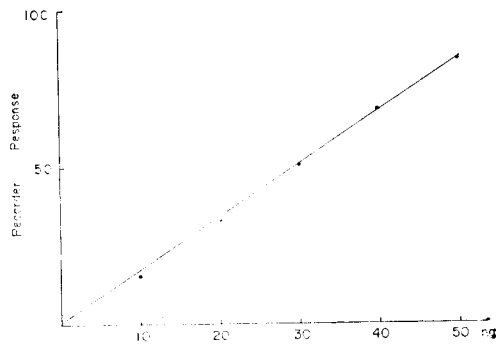


FIG. 4 Calibration Curve

**共存物質의 影響**—市販 dienestrol cream 의 各成分(Tab. II)을 따로 따로 實驗方法에 準해 實驗한 結果 dienestrol-TMS 와 중복되는 成分은 없었다.

**回收試驗**—Tab. III은 既知量의 dienestrol 을 市販 dienestrol cream 에 添加하여 얻은 回收試驗 結果이다.

### 結 論

本 定量法은 市販 dienestrol cream 中の dienestrol 을 다른 수단으로 분리하지 않고 바로 silylating agent 로 silylation 한 후 gas chromatography 로 분리 정량하는 방법으로서 前處理 과 정을 생략하므로써 매우 신속하고 간편화한 정량법이며 감도는  $8 \times 10^{-12}$  a. f. s 일 때 dienestrol  $5.6 \times 10^{-11}$  mol 까지 정량 가능하였다. 再現性이 비교적 양호하여 dienestrol cream 의 品質管理 目的에 적합한 방법이라고 思料된다.

Tab. II Comp. of the Dienestrol Cream

Dienestrol	1 g
Tween 60	q. s
Span 60	q. s
Stearic acid	q. s
Mineral oil	q. s
Methyl paraben	q. s
Propyl paraben	q. s
Propylene glycol	q. s
Sorbitol 70 %	q. s
Cetyl alcohol	q. s

Tab. III Recovery Test

Added, mg	Found, mg	Found %
0.188	0.185	98.4
0.192	0.190	99.0
0.195	0.197	101.0
0.206	0.204	99.0
0.207	0.206	99.5

## 文 獻

1. T. T. Cocking, *Analyst.*, **68**, 144 (1943).
2. F. H. Malpress, *Biochem. J.*, **30**, 95 (1945).
3. S. Gottlieb, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **36**, 379 (1947).
4. D. Banes, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **44**, 323 (1961).
5. M. Nedergaard, *Boll. Chim. Farm.*, **107**, 507 (1968) [C.A. **70** 22944h (1969)].
6. J. H. Graham, D. Banes, J. B. Proctor, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **55**, 190 (1972).
7. J. H. Graham, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **56**, 674 (1973).
8. O. Gry, *Dansk Tidsskr. Farm.*, **23**, 139 (1949).
9. A. F. Summa, J. H. Graham, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 612 (1965).
10. B. J. Forman, L. T. Grady, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 1262 (1969).
11. H. Jarc, O. Ruttner, W. Krocza, *Fleischwirtschaft*, **56**, 1326 (1976) [C.A. **86**, 3631t(1977)].
12. H. Neuninger, *Sci. Pharm.*, **40**, 13 (1972) [C.A. **76** 158420r (1972)].
13. H. Van Waes, *Rev. Agr.*, **23**, 1135 (1970) [C.A. **74** 63231z (1971)].
14. A. E. Wilder Smith, *Nature*, **157**, 697 (1946).
15. R. W. Roos, *J. Pharm. Sic.*, **63**, 594 (1974).
16. C. Hesse, K. Pietrzik, D. Hoetzel, *Chromatographia*, **10**, 256 (1977).
17. R. F. McGregor, D. N. Ward, J. A. Cooper, B. G. Creech, *Anal. Biochem.*, **2**, 141 (1961).
18. T. Luukainch, N. J. A. Vanden Henvel, E. C. Horning, *Biochim. Biophys. Acta*, **62**, 153 (1962).
19. F. L. Fricke, S. M. Walters, W. T. Lampkin, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 868 (1968).
20. G. Morretti, G. Cavina, P. Siniscalchi, *Ann. Ist. Super. Sanita*, **5**, 586 (1969) [C.A. **73** 113007h (1970)].