

Gas-liquid Chromatography에 의한 Ethambutol의定量

李王圭·姜吉鍾·朴萬基

서울大學校 藥學大學

(Received August 27, 1975)

Wang Kyu Lee, Gil Jong Kang and Man Ki Park (*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151*): Determination of Ethambutol by Gas-liquid Chromatography

Abstract—The quantitative analysis of ethambutol·2 HCl as well as commercial ethambutol preparations was undertaken by gas-liquid chromatography by finding optimum conditions, such as the use of internal standard, stability of an ethambutol·2HCl-caffeine standard solution, and the effect of column temperature, *N,N*-bis(trimethylsilyl) acetamide [B.S.A.] concentrations and other substances present in the preparations. Under the chromatographic conditions, an ethambutol·2HCl-caffeine standard solution was injected and immediately followed a B.S.A. injection for silylation. The retention time of ethambutol·2HCl was 3 min. 30 sec. and that of caffeine as an internal standard, 9 min. 30 sec. The relative molar response of ethambutol·2HCl and caffeine studied was 2.08. Ethambutol·2HCl could be quantitated up to 1×10^{-8} moles. The possible decomposition of B.S.A. due to the moisture when tested and the incomplete reaction for silylation could be minimized.

Ethambutol dihydrochloride [*d-N, N'*-di(1-hydroxymethylpropyl) ethylenediamine·2 HCl]는 1961年 Lederle 研究所에서 合成 開發된 이래 *Mycobacterium tuberculosis*에 有効한 經口投與用 醫藥品으로 使用되어 왔다.

이에 對한 定量法으로는 Reinecke salt¹⁾를 利用하거나, Cu⁺⁺와의 complex 形成을 利用한 colorimetric method^{2~5)}, mercuric acetate를 使用하여 ethambutol·2 HCl의 2 HCl을 除去後 非水溶媒 滴定⁶⁾을 하는 法, microbial assay⁷⁾, differential thermal analysis⁸⁾等이 發表되었다. 또한 gas chromatography에 依해서는 1968年 Calo等⁹⁾이 ethambutol을 trimethylsilylating agent (T.M.S. 化劑)를 使用, 2% SE-30 column으로써 實驗한 것이 報告되었으며 同 研究者¹⁰⁾等은 6% QF 1 column을 使用하여 ethambutol을 包含한 抗結核剤들의 分離를 T.M.S.化剤를 使用하여 實驗하였다. Richard等¹¹⁾은 3% OV-17 column을 使用하여 ethambutol을, T.M.S.化剤

로 N-trimethylsilylimidazole (T.S.I.M.)을 使用하여 定量하였으며 여러가지 T.M.S.化劑에 대 한 應用性을 檢討하였다.

그러나 이러한 gas chromatography에 依한 方法들은 ethambutol과 T.M.S.化劑와의 反應時 溶媒의 選擇等 反應條件이 까다로울 뿐 아니라 反應時의 誤差問題, 濕氣에 依한 T.S.M.化劑의 分解問題等이 생기며 또 高價의 試藥인 T.S.M.化劑의 使用量도 커지게 된다.

이러한 點을 改善하기 위하여 著者等은 OV-17 boron-silicate glass column을 使用, T.M.S.化劑로는 N,O-bis-(trimethylsilyl) acetamide [B.S.A.]를 使用하여 ethambutol을 MeOH에 溶한 溶液을 注入한 後 一定過量의 B.S.A. 原液을 注入하는 booster method를 采用, column 內에서의 ethambutol의 silanization을 試圖하였으며 한편 機械上의 誤差를 減少시키기 위하여 内部標準物質로서 caffeine을 使用하였다. 이에 對하여 gas chromatography의 條件, 内部標準物質의 選擇, B.S.A.濃度의 影響, 相對量感度比 (R.M.R.; relative molar response)等을 實驗하여 ethambutol을 定量하였고, 製劑藥品分析에 應用하여 他 共存物質의 影響없이 比較的 簡單한 操作으로 ethambutol의 定量이 可能하였다.

實驗方法

試液—Ethambutol 標準液은 ethambutol·2HCl (Lederle Lab.) 100 mg 을 精秤하여 MeOH에 溶解시켜 10 ml로 하였다.

Ethambutol·2 HCl—caffeine 標準液은 ethambutol·2 HCl (L.L.) 100 mg 과 内部標準物質인 caffeine (元素分析用 標準試料) 50 mg 을 精秤하여 MeOH에 溶解시켜 10 ml로 하였다.

B.S.A. (Sigma Chem. Co. grade 1)는 原液을 使用하였으며 冷藏庫에서 0°~5°로 保存하였다¹²⁾.

裝置—本 實驗에 使用한 gas chromatography는 Shimadzu G.C.-4 BM을 使用하였으며, detector는 flame ionization detector (F.I.D.)를, recorder는 bench type self-balancing recorder (Shimadzu R-101)를 使用하였다.

豫備操作—本 實驗에서 column의 前處理는 特別히 하지는 않았으나 使用前 1日間 250°, N₂ 30 ml/min 으로 aging 시킨 後 B.S.A.를 注入시켜 column의 極性物質을 除去後 使用하였다.

T.M.S.化劑는 보통 試料의 —OH, —NH₂, —NH, —SH 基들에 作用하여^{13~19)} 試料를 —O—TMS, —NH—TMS, —N—TMS, —S—TMS 等으로 ether 化 또는 ester 化시켜 熱에 安定한 挥發性 誘導體를 生成시킨다. Ethambutol의 構造上 —NH, —OH 基가 存在하여 또한 B.S.A.의 反應性이 높으므로²⁰⁾ column 內에서의 T.M.S.化가 쉽게 일어난 수 있다고 思料된다. 이 때 使用되는 B.S.A.의 濃度가 一定過量이므로 流出을 充分히 시켰다.

Gas chromatography의 一定한 條件을 維持하거나 同一量의 試料注入이 거의 不可能하므로 内部標準物質 caffeine을 使用하여 이에 對한 ethambutol·2 HCl의 相對量感度比를 計算하여 誤差를 最大한으로 減少시킬 수 있었다.

Detector의 感度는 2.56×10^{-8} a.f.s.보다 增加시키면 더 적은 濃度까지 確認이 可能하였으나 感度가 클수록 再現性이 減少되었다. 定量計算時 面積強度法이 重量法에 비하여 더 正確하나 正確한 面積을 求하기가 困難하였으므로 peak를 重量으로 秤量하여 計算하였다. 이처럼 結果及 標準操作과 같은 GLC 條件을 求하였다.

標準操作—Ethambutol·2 HCl-caffeine 標準液을 micro syringe로써 正確히 2 μ l를 取하여 注入한 後 즉시 B.S.A. 2 μ l를 注入하였으며, 이 때의 GLC 條件은 column은 3 mmφ×1 m

boron silicate glass column, 充填劑는 3% OV-17, 填體 80~100 mesh shimalite 를 使用하였으며 GLC 溫度條件은 injection port 210°, detector 210°, 그리고 column oven 은 처음에는 140°로 恒溫, 4分 後 1分에 10°로 210°까지 昇溫시켰다. Gas 流速은 窒素 60 ml/min, 水素 60 ml/min, 그리고 空氣 880 ml/min 이었으며 感度는 2.56×10^{-8} a.f.s. 이었다. 위의 條件下에서 retention time 3分 30秒에, ethambutol·2 HCl 을 9分 30秒에 內部標準物質 caffeine 的 peak 를 얻었다. 이 peak 들의 面積을 오려내어 微量天秤으로 무게를 秤量하여 相對물感度比 (2.08, 標準偏差 2.74%) 를 얻었으며, 이에 依據하여 定量하였다.

結果 및 考察

內部標準物質의 選擇—Ethambutol·2 HCl 標準液에 對하여 gas chromatography 의 溫度條件만을 140° 恒溫으로 變化시키고 標準操作에 따라 實驗한 結果 barbital 的 경우 peak 가 ethambutol·2 HCl 的 peak 와 겹쳐져 나오므로 使用할 수 없었으며 caffeine 的 경우 ethambutol·2 HCl 과 완전히 分離되었으므로 內部標準物質로서는 caffeine 을 使用하였다. 또 caffeine 的 量은 MeOH 에 對한 溶解度를 考慮하여 5mg/ml 이 되게 使用하였다. 本 操作에서 B.S.A. 는 caffeine 에 아무런 影響을 주지 않음을 確認하였다.

Column 溫度의 影響—Ethambutol·2 HCl-caffeine 標準液에 對하여 溫度條件만을 變化시키고 標準操作에 따라 實驗한 結果, 140°恒溫으로 할 境遇 caffeine 的 retention time 이 19分이나 되었으며 peak 가 둔하였다. 또 140°에서 처음부터 10°/min 으로 昇溫한 境遇에는 peak 的 形態들은 鋭敏하였으나 ethambutol·2 HCl 的 peak 가 MeOH, B.S.A.의 peak 와 완전히 分離되지 않았다. 따라서 溫度條件은 140°恒溫에서 ethambutol·2 HCl 을 確認後 4分 後 10°/min 으로 昇溫시켜 caffeine 的 peak 를 얻은 境遇가 가장 最適條件이었다.

B.S.A. 濃度에 依한 影響—B.S.A.의 濃度條件만을 1, 2, 4, 6, 8 μl 로 變化시키고 標準操作에 따라서 實驗하여 相對물感度比를 求한 結果 Fig. 1에서 보는 바와 같이 B.S.A.의 濃度가 1 μl 以上에서는 相對물感度比가 一定하였다. 따라서 B.S.A.의 充分量을 考慮하여 2 μl 를 使用하였으며 이 量은 ethambutol·2 HCl 標準液 2 μl 에 對하여 約 100 moles 倍에 該當된다.

Ethambutol·2 HCl-caffeine 標準液의 經時變化—Ethambutol·2 HCl 標準液의 安定性에 對하

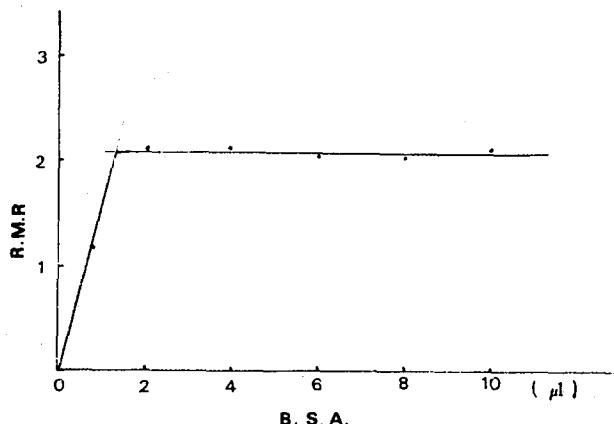


Fig. 1—Effect of B.S.A. concentration on silylation.

여는 放冷하여 두면 수 주일간 安定하다고 報告¹¹⁾되어 있다. 本 實驗에서는 ethambutol·2 HCl-caffeine 標準液의 經時變化를 標準操作에 따라 實驗한 結果 Fig. 2에서 보는 바와 같이 쳇어도 7日까지는 아무 變化가 없었다.

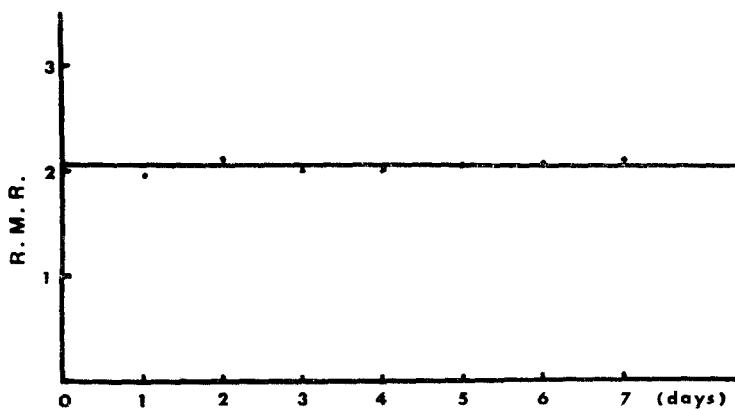


Fig. 2—Stability of ethambutol·2 HCl-caffeine standard solution stored at 10°~15°.

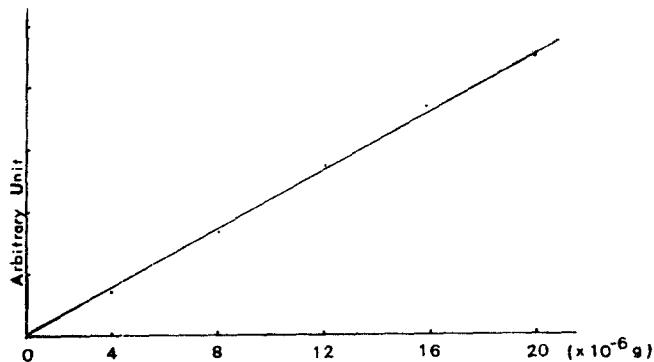


Fig. 3—Calibration curve of ethambutol·2 HCl.

Calibration curve—以上의 實驗結果로부터 標準操作과 gas chromatography 的 條件을 確立하고 同一操作에 따라서 ethambutol·2 HCl의 量을 $0.4\sim2.0\times10^{-5}\text{g}/2\mu\text{l}$ 로 變化시키고 內部 標準物質을 使用치 아니하고 實驗한 結果, Fig. 3에서 보는 바와 같이 直線을 나타내었다. 그러나 定量結果 檢量線에 依한 定量法이 相對量感度比에 依한 方法에 比하여 誤差가 크므로 本 實驗에서는 相對量感度比에 依하여 定量하였다. 또한 이 結果 本 實驗에서의 試料注入量은 $0.4\sim2.0\times10^{-5}\text{g}/2\mu\text{l}$ 로 하는 것이 가장 適切하였다.

Ethambutol·2 HCl 과 Ethambutol Base 와의 比較檢討—Ethambutol·2 HCl 標準液을 MeOH에 溶解시켜 5mg/ml의 溶液을 調製하여 그 中 1ml를 取하여 NaOH의 0.2% MeOH 溶液 1ml를 加하여 ethambutol·2 HCl을 base 化하였다. 이 溶液을 水浴上에서 MeOH를 날려 버린 後 B.S.A. 0.5 ml를 加하여 調製된 試料를 溫度만을 恒溫으로 固定시키고 標準操作과 同一

한 gas chromatography 條件下에서 $2\mu\text{l}$ 를 注入한 結果, ethambutol·2 HCl 을 사용한 標準操作時의 結果와 同一한 結果를 나타내었다.

위의 方法에 따라 ethambutol·2 HCl $0.2 \sim 1.0 \times 10^{-5}\text{g}/2\mu\text{l}$ 에 對하여 peak 的 무게比로 檢量

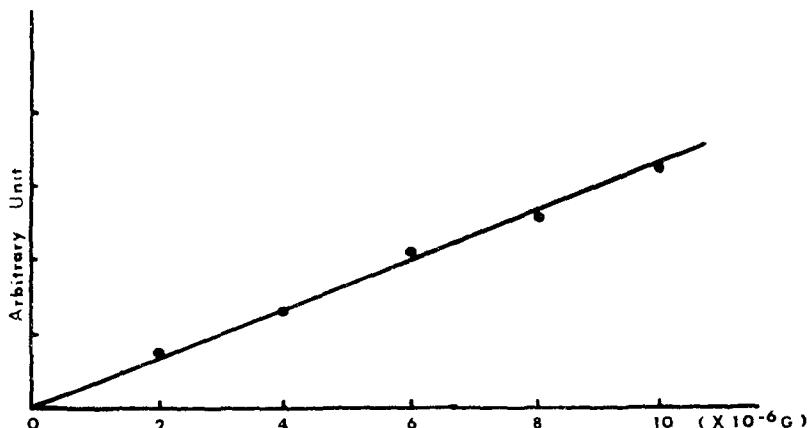


Fig. 4—Calibration curve of ethambutol base.

線을 求한 結果 Fig. 3의 結果와 同一 하였다(Fig. 4). 이러한 結果로 볼 때 ethambutol·2 HCl 的 base 化는 操作의 복雜성이 따르므로 구태여 할 必要가 없다고 料된다.

Recovery Test 下記處方, 即 ethambutol·2 HCl (100 mg), lactose (150 mg), starch (250 mg), 黃色 4 號(q.s.), stearic acid (q.s.)와 Mg-stearate (q.s.)를 調製하여 標準으로 하였다. 이 處方을 caffeine 50 mg 과 함께 10 ml volumetric flask에 넣은 後 適當量의 MeOH を 넣고, 充分히 溶解시킨 後 MeOH로 正確히 標線까지 채운다. 이 液을 檢液으로 標準操作에 따라 實驗한 結果 上記의 處方에서 本 定量法에 따른 recovery test의 結果는 6回 平均 98.7%를 나타내었다(Table I).

Table I—Recovery data of ethambutol·2 HCl

No. of tests	Found (%)
1	97.2
2	96.5
3	100.8
4	97.1
5	98.2
6	103.5

Standard deviation; 2.76%

Table II—Determination of ethambutol·2 HCl in preparations

Sample	Contents of ethambutol·2 HCl (%)
Maker A	104
Maker B	96
Maker C	98

製剤中 ethambutol 的 定量—市販되는 三種의 ethambutol 錠劑 20錠씩을 取하여 ethambutol 이 100 mg 정도 정확히 含有토록 하고 標準操作에 따라 實驗한 結果는 ethambutol·2 HCl 과 caffeine 的 peak area에는 아무런 影響을 주지 않게 分離되었다. 이 結果로써 ethambutol·2 HCl 的 含量을 計算한 結果는 Table II와 같다. 上記製品이 GMP에 依據管理된 製品으로 볼

때 上記 結果를 얻은 것은 製品과 本 實驗結果와 잘一致되는 것으로 思料된다. 또한 製劑中에 包含된 添加劑는 標準處方과는 다소 差異가 있고 皮膜剤 等이 混入되어 있으나 本 實驗結果에는 아무런 影響을 주지 않았다.

結論

GLC에 依하여 試料注入 後 T.M.S.化剤인 B.S.A.를 즉시 注入하는 booster method에 依한 ethambutol의 定量法을 確立하여 GLC 感度 2.56×10^{-8} a.f.s. 下에서 ethambutol·2 HCl 1×10^{-8} moles 까지 定量 可能하였으며, 一定하게 調劑한 處方에 대하여 recovery test를 한 結果 滿足하게 定量할 수 있었다. 또한 製剤에 應用時 共存物質의 影響 없이 간단하게 定量할 수 있었다.

Booster method를 使用한 結果 T.M.S.化時의 誤差問題, 濕氣에 의한 T.M.S.化剤의 分解可能性 等을 最大限 減少시킬 수 있었으며 高價의 T.M.S.化剤의 使用量이 미리 反應시켜 使用하는 것보다 比較 안될 程度로 少量 使用하여 定量하였다.

文獻

1. P. Tarli, F. Lattanzi and S. Benocci, *Farmaco, Ed. Prat.*, **24**, 707 (1969).
2. J.M. Burger, F.D. Pisano and R.A. Nash, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 110 (1969).
3. H. Reutgen and M. Grunert, *Pharmazie*, **24**, 148 (1969).
4. A. Doadrio and A. Garcia Carro, *An Real Acad. Farm.*, **34**, 291 (1968).
5. G. Olivari and G. Pattinar, *Boll. Chim. Farm.*, **109**, 21 (1970).
6. British Pharmacopeia, 1973, p-191.
7. Z.K. Zofia, *Gruzelica*, **37**, 615 (1969).
8. H. Ferrari and D.G. Grabar, *Microchem. J.*, **16**, 5 (1971).
9. A. Calo, C. Cardini and V. Quercia, *Boll. Chim. Farm.*, **107**, 296 (1968).
10. A. Calo, C. Cardini and V. Quercia, *J. Chromatogr.*, **37**, 194 (1968).
11. B.M. Richard, J.E. Manno and B.R. Manno, *J. Chromatogr.*, **89**, 80 (1974).
12. E.D. Smith, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 34 (1972).
13. C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W.W. Welles, *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
14. T. Hashizume and Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, **15**, 199 (1966); *ibid.*, **16**, 1 (1966); *ibid.*, **15**, 346 (1966); *ibid.*, **21**, 316 (1967); *ibid.*, **24**, 232 (1968).
15. T. Hashizume and Y. Sasaki, The 7 th International Congress of Biochemistry (Abstract), Tokyo, p-969, (1967).
16. D.F. Zinkel, M.B. Lathrp and L.C. Zank, *J. Gas Chromatogr.*, **6**, 158 (1968).
17. S. Friedmann and M.L. Kaufman, *Anal. Chem.*, **38**, 144 (1966).
18. R.J. Ferrier and M.F. Singleton, *Tetrahedron*, **18**, 1143 (1962).
19. R.J. Ferrier, *Tetrahedron*, **18**, 1149 (1962).
20. J.F. Klebe, H. Finkbeiner and D.M. White, *J. Amer. Soc.*, **88**, 3390 (1966).