

分光光度法에 의한 製劑中 Gentamicin Sulfate의 定量에 관한 研究

李 珍 浩 · 梁 鎬 錫 · 李 允 中*

株式會社 종근당 · *成均館大學校 藥學大學

(Received January 14, 1983)

Chin-ho Lee, Ho-suk Yang and Yoon-jung Lee

Chong Kun Dang Corp., Seoul 150 and

*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suweon 170, Korea

Studies on the Spectrophotometric Determination of Gentamicin Sulfate and its Preparations

Abstract—The ability of gentamicin to form a stable coloured complex with copper (II) in a sodium carbonate buffer solution, which had a maximum absorption at 694nm, was used for the spectrophotometric quantitative determination of gentamicin sulfate. The calibration curve obtained was linear over the range of 200~2,000mcg per ml of the sample and the analysis was very well agreed with the microbiological method.

각종 炎症 특히 Gram陰性菌의 *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 몇가지 *Proteus* species뿐 아니라 *Staphylococcus aureus* 등의 Gram陽性菌(enterococci제외)에 感受性이 있는 aminoglycoside계의 廣範圍抗生劑인 gentamicin^{1~3)} (이하 GM이라 略함)은 Craig distribution⁴⁾, paper chromatography^{4~5)}, ion-exchange column chromatography^{6~7)}, TLC^{7~8)} 및 NMR⁹⁾ 등으로 분리하여 보면 여러 성분중 GMC₁, GMC₂, 그리고 GMC_{1a}의 3가지 主成分으로 構成되어 있는 複合物質이며 그 構造는 모두 2-deoxystreptamine을 비롯하여 garosamine 및 purpurosamine으로 이루어지고 6'-C 위치의 methylation정도에 따라 나누어 진다.

GM의 總定量法으로는 生物學的方法^{10~11)} 이외에 아직 뚜렷한 理化學的方法이 確立되어 있지 않다¹²⁾고 하나 ninhydrin법^{13~14)}, polarimetric법¹⁵⁾, potentiometric titration법¹⁶⁾, fluorometric법¹⁷⁾, enzyme법^{18~20)} 및 HPLC법^{21~22)} 등이 보고되어 있는 외에 Borowiecka 등²³⁾은 GM을 α -naphthol과 결합시켜 比色定量할 수 있다고 보고한 바 있으며, Copper 등²⁴⁾은 GM과 Cu(II)가 complex를 형성한다고 보고하였고 이를 이용하여 Kartseva 등²⁵⁾이 定量을 시도한 바 있다. 著者は GM이 alkali性에서 Cu(II)와 有色的 complex를 形成하는 原理를 利用하여 그 조건들을 검토한 결과 더욱 感도가 좋고 再現性이 良好하여 迅速·正確·簡便하고 GM 單一物質 이외에 他物質이 共存하는 製劑의 分析에도 응용이 가능하며 生物學的 分析方法에 의한 결과와도 일치하는 GM 總定量法을 確立하였다.

實驗方法

機器, 試料 및 試藥—Spectrophotometer는 Hitachi사의 200-20型을, pH meter는 Metrohm Herisau사의 E512型을, laminar flow bench는 Gelman Clemco사의 CF43S型을 使用했다. Gentamicin의 reference standard는 U.S.P.C.社. (U.S.A.)製를 使用하였고 분석한 시료는 DOTT. Bonapace & C.사 (Italy)의 제품을 使用하였다. 1% CuSO_4 液은 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.564g을 0.02N H_2SO_4 에 용해시켜 100ml로 만들어 준비하였다. pH 9.7의 sodium carbonate buffer용액(이하 SCB라 略)은 Na_2CO_3 21.2g을 증류수에 용해시켜 1,000ml로 만든 것 390ml와 NaHCO_3 16.8g을 증류수에 용해시켜 1,000ml로 한 것 610ml를 합하여 만들었다. GM의 표준액은 표준품을 5mmHg에서 3시간 건조한후 증류수에 용해시켜 1,000mcg/ml로 하여 만들었다.

實驗方法—역가로 약 1,000mcg/ml 농도의 GM용액을 20ml mess flask에 취하고 1% CuSO_4 용액 2ml를 가한후 SCB로 표선을 맞추고 여과하여 694nm에서 吸光度를 測定하였다. (blank : 증류수)

實驗結果 및 考察

Complex의 吸光曲線—波長에 따른 吸光度의 變化를 검토한 결과 Fig. 1와 같이 694nm에서 吸光極大를 나타냈다.

pH의 影響—波長 694nm에서 SCB의 pH에 따른 吸光度의 變化를 검토한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 pH 9.7 부근에서 가장 높았다.

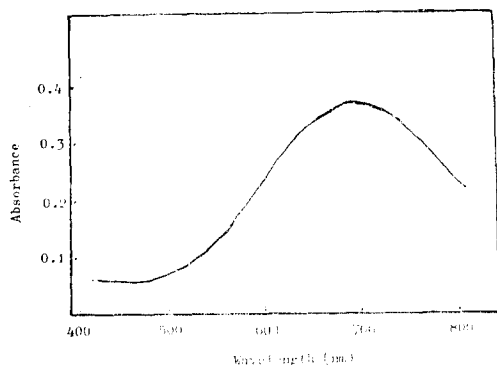


Fig. 1—Absorption curve of GM-Cu (II).
GM: 20mg Cu: $1.25 \times 10^{-2}\text{M}$

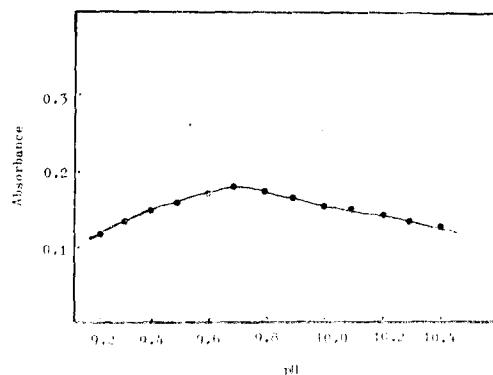


Fig. 2—Effect of pH on absorption of GM-Cu (II) at 694nm.

緩衝液 添加量의 影響—SCB의 添加量이 complex에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 3와 같이 약 8ml를 가했을 때 吸光度가 가장 높았다.

緩衝液의 影響—완충액의 종류에 따른 吸光度의 영향을 검토하기 위하여 pot. carbonate buffer, boric acid buffer 및 N-NaOH용액을 SCB와 비교사용하여 scanning한 결과 Fig. 4와 같이 SCB를 사용했을 때 모든 波長에 걸쳐 높은 吸光度를 나타냈다.

黃酸銅 溶液의 影響 : CuSO_4 용액의 添加量을 변화시키며 吸光度를 측정한 결과 Fig. 5에서 알 수 있듯이 2ml 부근에서 가장 높았다. 또한 Fig. 6은 CuSO_4 용액의 過量에 의하여 吸光度가 낮

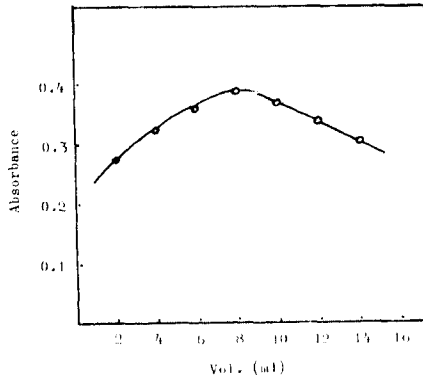


Fig. 3—Effect of the amount of sod. carbonate buffer sol'n on absorption of GM-Cu (II), pH 9.7, at 694nm.

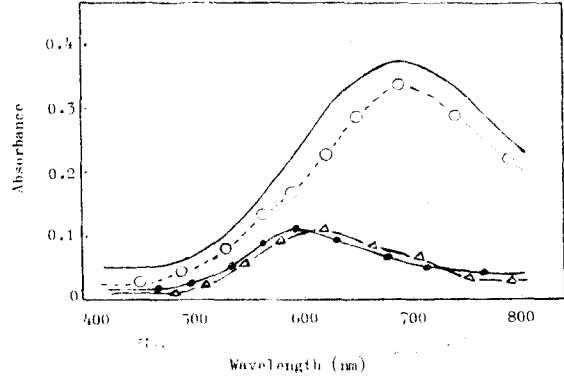


Fig. 4—Effect of variety of buffer sol'n on absorption of GM-Cu (II).

- : pH 9.7 sod. carbonate buffer
- : pH 9.7 pot. carbonate buffer
- △—△ : pH 9.7 boric buffer
- : Adjust pH to 9.7 with 1N-NaOH

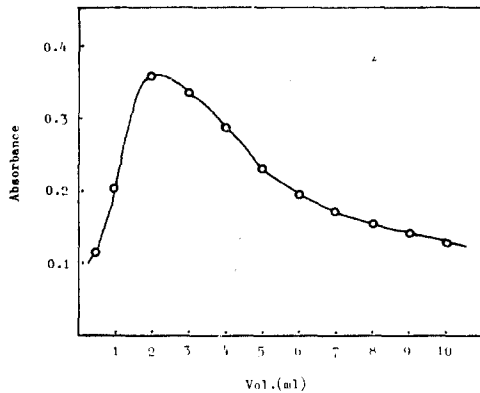


Fig. 5—Effect of the amount of 1% sol'n of CuSO_4 on absorption of GM-Cu (II) at 694nm.
GM: 20mg

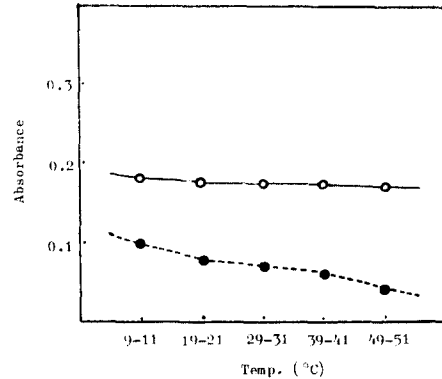


Fig. 6—Relationship between reaction temp. and absorption of GM-Cu (II) at 694nm.

- : pH 9.7 sod. carbonate buffer
- : 1N sod. hydroxide sol'n

아지는 것을 보여 주므로 GM量에 따라 CuSO_4 量의 조절이 必要하여, 實驗한 결과 SCB를 가하여 沈澱이 形成되는 量만큼의 CuSO_4 를 가하는 것이 最適이었고 本法에선 GM 20mg 사용시 適量인 2ml를 사용하였다.

反應溫度의 影響—SCB 및 N-NaOH를 사용하여 반응온도가 吸光度에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 6과 같이 SCB를 사용했을 때는 큰 차가 없었고 N-NaOH를 사용했을 때는 온도가 상승함에 따라 吸光度가 크게 떨어졌다. 本法은 室溫에서 행하였다.

試液 添加 順序의 影響—황산동용액과 SCB의 添加順序를 바꾸면 Table I과 같이 SCB를 먼저 가했을 때 吸光度가 떨어지는 경향을 보였다.

色의 安定性—Complex의 安定性を 검토하기 위하여 吸光度의 經時變化를 조사한 결과 Fig. 7

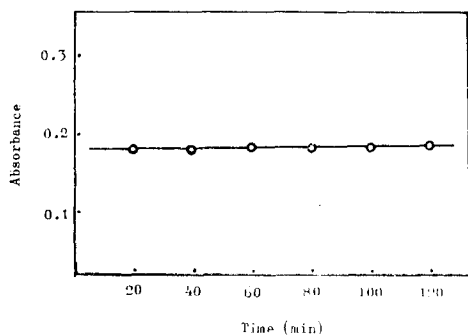
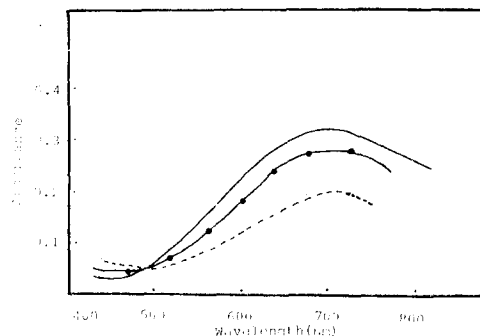
Table I—Effect of the adding order of reagent.

No.	Absorbance	
	Method 1*	Method 2**
1	0.182	0.170
2	0.183	0.179
3	0.182	0.181
4	0.182	0.181
5	0.183	0.180

* Proposed method

** Add buffer sol'n and then CuSO₄ sol'n.**Table II**—The influence of NH₄OH on absorbance.

Concentration of the GM ($\mu\text{g/ml}$)	Solutions without NH ₄ OH	Concentration of NH ₄ OH in the solutions (V/V %)				
		0.005%	0.01%	0.03%	0.05%	0.1%
500	0.092	0.092	0.099	0.126	0.154	0.207
1000	0.185	0.186	0.193	0.213	0.235	0.278
2000	0.367	0.369	0.379	0.403	0.427	0.432

**Fig. 7**—Stability the absorbance of GM-Cu (II).**Fig. 8**—Identification of GM-Cu (II) complex with isobestic point.

Cu: $3 \times 10^{-2} \text{M}$ Cu: GM 75mg
 Cu: GM 50mg Cu: GM 25mg

에서 보는 바와 같이 2시간 이상 安定하였다.

Ammonia의 影響—銅이온은 암모니아分子와 有色的 錯鹽을 形成하고 암모니아는 물에 稀히 溶存되어 있으므로 이의 影響을 검토한 결과 Table II에서 보는 바와 같이 농도가 높아질수록 吸光度가 크게 증가하므로 암모니아 농도를 0.005% 以下로 하여야 한다.

GM-Cu(II) Complex의 確認—농도가 다른 3종류 GM용액과 같은 농도의 CuSO₄용액을 가지고 本法대로 행하여 scanning을 한 결과 Fig. 8와 같이 500nm 부근에서 isobestic point를 나타내므로 GM과 Cu(II)는 complex를 형성한다.

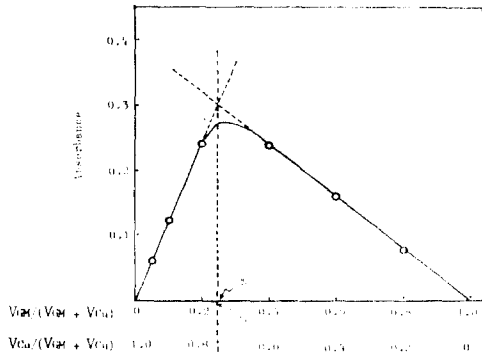


Fig. 9—Continuous variations method applied to the GM-Cu(II).
 $[GM] = [Cu(II)] = 1 \times 10^{-2} M$, pH 9.7, 694 nm

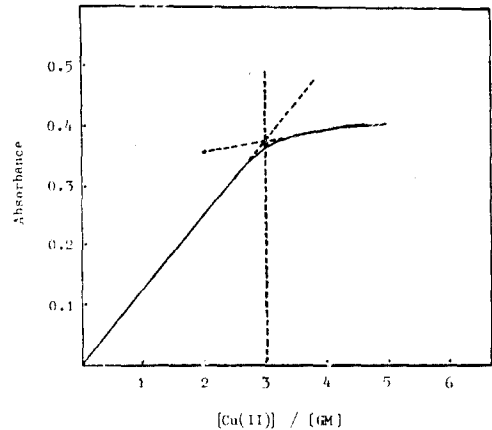


Fig. 10—Mole-ratio method applied to the GM-Cu(II).
 $[Cu(II)] : 1.25 \times 10^{-2} M$, pH 9.7 sod. carbonate buffer, 694nm

GM-Cu(II) Complex의 組成—GM과 Cu(II)와의 결합비율을 알기 위하여 연속변화법과 mole-ratio법²⁶⁻²⁸⁾으로 검토한 결과 Fig. 9 및 Fig. 10에서 보는 바와 같이 GM과 Cu(II)는 1:3의 비율로 결합하였다.

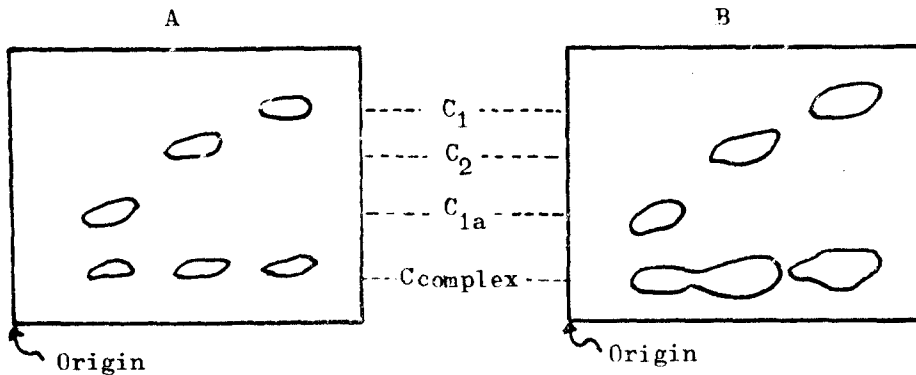


Fig. 11—A: Ninhydrin-treated chromatogram illustrating separation of GM compounds run on Whatman No. 1 paper using chloroform-methanol-17% ammonia(2:1:1 V/V) solvent system.

B: Bioautograph of gentamicins. Chromatogram run on Whatman No. 1 paper using lower phase of chloroform-methanol-17% ammonia (2:1:1 V/V) and plated against *S. aureus* ATCC 6538 P.

GM成分의 分離 및 Bioautography—GM-Cu(II) complex의 組成을 검토할 때 GM은 GM C₁·C₂·C_{1a}의 복합물질이므로 GM을 paper chromatography로 分離한 후 bioautography^{5,11,29)}를 행하여 본 결과 Fig. 11와 같이 비슷한 비율로 組成되어 있으므로 GM의 分子量을 세 성분 平均分子量인 463으로 하여 계산했다. NMR³⁰⁾ 및 densitometry³¹⁾ 등에 의한 결과도 이와 유사하게 보

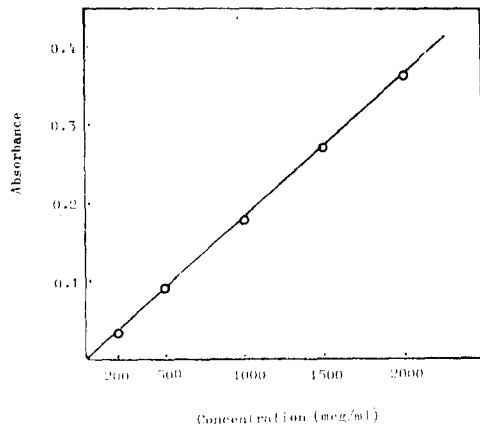


Fig. 12—Relationship between absorbance and concentration of GM

劑中の GM分析에 應用하기 위하여 흔히 添加되는 共存物質³²⁾ 混在時의 影響을 Recovery test를 하여 검토한 결과 Table V와 같이 平均回收率이 거의 100%로 표시된 量에서는 影響을 미치지 않았다.

2) 실험실적 調製品 分析: Table V를 기초로 실험실적으로 GM製劑를 調製하여 分析한 결과 Table VI과 같이 처방 1과 같은 연고제 및 처방 2와 같은 주사제에서 平均回收率 약 101%, 標準偏差 1.3인 良好한 結果를 얻었다.

Table III—Reproducibility of absorption development.

Average absorbance	Standard deviation	Coefficient of variation
0.183	0.001	0.005

* Replicate same GM sol'n (1000r/ml)

Table IV—Results of the determination of gentamicin by proposed and microbiological method.

Sample	Concentration of gentamicin ($\mu\text{g/ml}$)	
	Proposed method	Microbiological method*
A	5100	5200
B	7300	7400
C	15500	152000
D	37000	392000
E	54600	537000

* Mean results of 5-7 parallel tests given.

Table V—Effect of other materials in the determination of gentamicin.

Other materials	mg/100mg of GM sulfate	Average recovery* (%)
Methyl paraben	45.0	99.2

고되어 있다.

檢量線—本法에 따라 分析한후 calibration curve를 作成한 결과 Fig. 12과 같이 GM 200 mcg/ml에서 2,000mcg/ml까지의 농도 범위에서 吸光度와 농도 사이에 직선 관계가 성립하였다.

再現性—5회 反復實驗하여 再現性을 검토한 결과 Table III과 같이 標準偏差가 0.001, 變動係數가 0.005로 良好하였다.

生物學的 分析方法과 比較—本法과 生物學的 分析方法과의 關係를 농도가 다른 5종류 GM용액을 두 방법으로 比較分析하여 검토한 결과 Table IV에서와 같이 일치하였다.

製劑中 GM分析—1) 共存 醫藥品의 影響—製劑中의 共存物質³²⁾ 混在時의 影響을 Recovery test를 하여 검토한 결과 Table V와 같이 平均回收率이 거의 100%로 표시된 量에서는 影響을 미치지 않았다.

2) 실험실적 調製品 分析: Table V를 기초로 실험실적으로 GM製劑를 調製하여 分析한 결과 Table VI과 같이 처방 1과 같은 연고제 및 처방 2와 같은 주사제에서 平均回收率 약 101%, 標準偏差 1.3인 良好한 結果를 얻었다.

Propyl paraben	10.0	99.4
EDTA	3.0	100.4
Sod. bisulfite	20.0	98.6
Propylene glycol	200.0	99.4
Glycerine	200.0	100.3
Span 60	250.0	100.5

* Each value is the mean of 3 experiments.

Table VI—Results of analysis of GM from artificial preparations (Recovery %).

Rx 1	101.1	±	1.378*
Rx 2	100.7	±	1.303

* Standard deviation

Table VII—Results of the determination of gentamicin in commercial pharmaceutical products by proposed and microbiological method.

Sample	Declared* mg/unit	Found(mg)		Found(%)	
		Proposed	Microbiological	Proposed	Microbiological
Inj. A		83.4	81.8	104.3	102.2
Inj. B	80/2ml	79.6	78.2	99.5	97.8
Inj. C		84.6	83.6	105.7	104.5
Inj. D		82.6	80.5	103.3	100.6
Inj. E		81.0	78.6	101.2	98.3

* As activity.

3) 市中製品の 生物學的 分析方法과 比較分析: 현재 商業的으로 販賣되고 있는 주사제 5종을 취하여 生物學的 方法으로 比較分析한 결과 Table VII에서 보는 바와 같이 本法에 의한 data가 1~3% 이내의 높은 경향을 보이는 良好한 결과를 얻었다.

結 論

GM이 alkali性에서 Cu(II)와 有色的 安定한 complex를 形成하는 原理를 利用하여 그 自體 및 製劑中에 包含되어 있는 狀態에서 分光光度法을 適用하여 定量分析한 결과, 1. GM과 Cu(II)는 1:3의 비율로 결합하며, pH 9.7의 sod. carbonate 완충액을 使用時 安定하고 發色이 잘되며, 694nm에서 最大吸光度를 나타내고, GM농도 200mcg/ml에서 2,000mcg/ml 사이에서 定量的으로 分析이 可能하다. 2. 암모니아가 0.005% 이상 共存時 “+”方向의 妨害를 받으며, 흔히 製劑에 添加되는 다른 物質에는 影響을 받지않고, 生物學的 方法과 分析結果가 一致한다. 3. 本法을 適用하여 分析時間 30分 以內的 迅速·正確·簡便하고 再現性 좋게 GM을 定量分析할 수 있다.

文 獻

1. Remington's Pharmaceutical Science, 16th, 1125 (1980).

2. *The United States Dispensatory*, 27th, 545-556 (1973).
3. *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, 27th, 1136-1142 (1977).
4. K.M. Byrne, A.S. Kershner, H. Maehr, J.A. Marquez and C.P. Schaffner, *J. Chromatogra.*, **131**, 191 (1977).
5. G.H. Wagman, J.V. Bailey, and M.M. Miller, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1319 (1968).
6. A.H. Thomas and S.D. Tappin, *J. Chromatogra.*, **97**, 280 (1974).
7. H. Maehr and C.P. Schaffner, *J. Chromatogra.*, **30**, 572 (1967).
8. W.L. Wilson, G. Richard and D.W. Hughes, *J. Chromatogra.*, **78**, 442 (1973).
9. D.J. Cooper, M.D. Yudis, R.D. Guthrie and A.M. Prior, *J. Chem. Soc.*, **C**, 960 (1971).
10. *CFR*, 21, Parts 300 to 499, pp.248-254 (1980).
11. 보사부, 향생물질의 약품기준 119-128 (1978).
12. Snell-Ettre, *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, 5, 614 (1979).
13. K.L. Ganchev, *Farmatsiya* (Sofia) **4**, 13 (1972).
14. K.L. Ganchev, *Farmatsiya* (Sofia) **2**, 8 (1973).
15. V.D. Kartseva, Yu.A. Portnoi, N.A. Vakulenko, N.G. Kruzhkova and E.M. Savitskaya, *Antibiotiki*, **20**, 514 (1975).
16. K. Ganchev, V.M. Fishman and G.S. Libinson, *Khim.-Farm. Zh.*, **8**, 50 (1974).
17. P. Kabasakalian, S. Kalliney and A.W. Magatti, *Anal. Chem.*, **49**, 953 (1977).
18. J.W. Williams, J.S. Langer, and D.B. Northrop, *J. Antibiot.* **28**, 982 (1975).
19. R. Daigneault, A. Larouche, and G. Thibault, *Clin.*, **25**, 1639 (1979).
20. R.K. Holmes and J.P. Sanford, *J. Infect. Dis.*, **129**, 519 (1974).
21. G.W. Peng, M.A.F. Gadalla, A. Peng, V. Smith, and W.L. Chiou, *Clin. Chem.*, **23**, 1838 (1977).
22. M. Freeman, P.A. Hawkins, J.S. Loran, and J.A. Stead, *J. Liquid Chromat.*, **2**, 1305 (1979).
23. B. Borowiecka and W. Chjnowski, *Acta Polon. Pharm.*, **36**, 343 (1979).
24. D.J. Copper, P.J.L. Daniels, M.D. Yudis, H.M. Marigliano, R.D. Guthrie and S.T.K. Bukhari, *J. Chem. Soc.*, **C**, 3126 (1971).
25. V.D. Kartseva, N.G. Kruzhovka and Y.A. Portnoi, *Antibiotiki*, **22**, 974 (1977).
26. 與田玲子, 秋山和也, 山本有一, 村上悠紀雄, *分析化學*, **30**, 160 (1981).
27. A. Osman and R. Abu-Eittah, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1164 (1980).
28. 朴基采, *機器分析의 原理*, 84-86 探求堂, (1977).
29. G.H. Wagman, J.A. Marquez and M.J. Weinstein, *J. Chromatogra.*, **34**, 210 (1968).
30. A.I. Chermyshev, V.D. Kartseva, S.E. Esipov, A.P. Arzamastsev, *Khim.-Farm. Zh.*, **13**, 111 (1979).
31. W.L. Wilson, G. Richard and D.W. Hughes, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 282 (1973).
32. 大韓藥品工業協會, *醫藥品便覽*, 5th, 732-735 (1979).