

## 미분 분광 광도법에 의한 정량분석법(제 1 보)

—염산 피리독신과 니코틴아미이드 혼합물의 자외부에서의 분리정량—

박 만 기 · 조 영 현 · 조 정 환

서울대학교 약학대학

(Received June 20, 1986)

### Quantitative Analysis by Derivative Spectrophotometry ( I )

—Simultaneous quantitation of pyridoxine·HCl and nicotinamide in mixture  
by ultraviolet derivative spectrophotometry—

Man Ki Park, Yung Hyun Cho, Jung Hwan Cho

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

**Abstract**—Authors developed the computer application program (language: APPLE SOFT BASIC) for derivative spectrophotometry. By means of this program, derivative of spectral absorbance with respect to wavelength is recorded versus wavelength. To try this program in connection with spectrophotometer system, the authors have done the simultaneous quantitation of pyridoxine · HCl and nicotinamide in the mixture, and the result was compared with that of absorbance method.

자외부 및 가시부 흡광 스펙트럼 등에서는 물질에 따라서 혼합물에서 흡수대가 중첩되거나 간섭현상이 있어서 이 경우 동시 정량이 어려운 경우가 많다. 이러한 경우에 목적 성분만을 분리 정제하여 정량해야 되는데, 이 과정에서 오차를 유발하기 쉽다.<sup>(6,10)</sup> 이러한 문제점을 해결하는 방법 중의 하나로서, 혼합물에서 흡수대가 중첩되어도, 파장에 따른 흡수대의 강도 및 흡광도의 파장에 대한 순간 변화율, 또는 평균 변화율이 물질마다 다르므로, 목적 성분이 다른 혼재물의 영향을 거의 받지 않는 변화율을 나타내는 과정을 찾아내어 이 과정에서의 흡광도의 변화율을 이용하여 정량을 실시하는 미분 분광 광도법이 개발되어 왔다<sup>(2,4,6,8,9,10)</sup> 저자 등은 혼합물에서 목적 성분만을 간단히 정량할 수 있고, 그 선택성이 높은 미분 분광 광도법을 일단 자외부 분석에 이용하여 보고자, 자외 흡광 광도계의 데이터 시스템으로 장치된 컴퓨터에 대해 BASIC언어로 된 프로그램을 개발하였다. 이 프로그램을 이용해서 염산 피리독신과 니코틴아미

이드의 혼합물 중에서 각 물질을 양호하게 분석할 수 있었다.

### 실 험 방 법

**시약**—염산 피리독신 및 니코틴아미이드는 미국 Sigma제 시약용을 표준품으로 사용했다. UV scan시 사용한 용매는 pH 2.1 염산 완충액을 USP XX의 방법에 따라 조제하여 사용하였다.

**표준액 및 검액의 조제**—염산 피리독신 및 니코틴아미이드 표준품을 각각 pH 2.1 염산완충액에 1,000 $\mu$ g/ml 용액으로 만들고, 이로부터 각각 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 표준액으로 하였다. 검액은 Table II, III에 표시한 바와 같은 농도를 가지도록 각각 적당량을 섞어 최종 부피를 10ml로 맞추어 UV scan을 실시했다. 검액 중 각각의 농도는 여러 시판 제제 중에서의 함유 비율을 기준으로 설정한 것이다.

**기기**—자외 흡광 광도계는 영국 LKB Bioch-

rome사의 UV-4050을 사용하였으며, 컴퓨터는 미국 APPLE사의 APPLE ][ plus personal computer를 사용하였다. 이들 사이의 데이터 전달은 RS-232C interface card를 이용하였다.

### 컴퓨터 프로그램의 작성

미분 스펙트럼을 얻는 루틴—미분 스펙트럼을 얻는 방법에는 파장 변조법(wavelength modulation), 미분 회로법(electronic differentiation), 수치 미분법(digital, numerical differentiation) 등이 있는데<sup>(2,4,10)</sup>, 전자 들은 흡광 광도계의 기계적 구조 또는 검출기와 기록계 사이의 전자 회로의 수정을 필요로 하며, 이에 따르는 기술적인 제반 문제, 설치 비용, 얻어지는 데이터의 유용성, 예를 들어 noise의 처리문제 등의 측면

LIST 7500,7800

```
7500 REM DERIVATIVE SPECTRA
7510 IF PEEK (777) = L + L3 * 10 THEN 7700
7520 IF L3 = 6 THEN 7540
7530 DE = N(L) / (L2(L) - L1(L)) * 10: A = -.5: B = 0
: C = .5: GOTO 7550
7540 DE = N(L) * N(L) / ((L2(L) - L1(L)) * (L2(L) - L
1(L))) * 10: A = 1: B = -2: C = 1
7550 VTAB 22: PRINT SPC(40): VTAB 22: HTAB 13: FLASH
: PRINT " DERIVATIZING ": NORMAL
7560 FOR I = 2 TO N(L) - 1: VZ(I,0) = INT ((A * VZ(I
-1,L) + B * VZ(I,L) + C * VZ(I+1,L)) * DE + .
5): NEXT I: VZ(1,0) = VZ(2,0): VZ(N(L),0) = VZ(N(L)
-1,0)
7570 IF L3 < > 5 AND L3 < > 6 THEN RETURN
7580 POKE 777,L + L3 * 10
7700 IF PEEK (771) = L + L3 * 10 THEN GOSUB 3500: CALL
-676: RETURN
7710 IF L3 = 5 THEN MN$ = "FIRST DERIVATIVE VALUE"
7720 IF L3 = 6 THEN MN$ = "SECOND DERIVATIVE VALUE"
7730 GOSUB 7000
7740 ST = INT ((L1 - L1(L)) / SR(L) * 3 + 1): EN = N(
L) - INT ((L2(L) - L2) / SR(L) * 3): XT = 260 / (
EN - ST)
7750 FOR I = ST TO EN: X1 = 19 + XT * (I - ST): Y1 = B
7 - VZ(I,0) * .08 / DX
7760 IF Y1 < 0 THEN Y1 = 0
7770 IF Y1 > 174 THEN Y1 = 174
7780 IF X1 = 19 THEN H$ = "X1,Y1"
7790 H$ = H$ + "X1,Y1: NEXT : POKE 771,L + L3 * 10: IF
L3 = 2 OR L3 = 8 THEN RETURN
7800 POKE 770,0: CALL -676: RETURN
```

**Scheme I**—The derivative spectrum calculation and plotting routine.

을 고려할 때, 실용도가 수치 미분법에 비해 떨어진다고 볼 수 있다. 수치 미분법을 사용하고 자 할 때는 별다른 부가적 회로나 기계적 수정 없이도, 기존 컴퓨터의 데이터 구조에 따라 적절한 형태의 프로그램을 개발하면 된다는 점과 일단 수치화한 데이터에 대해서는 추가적인 연산을 쉽게 할 수 있어서 이 방법을 채택하였다.

실제로 다음과 같은 1차 및 2차 미분에 해당하는 평균 변화율의 공식을 이용하여 수치 미분을 실시하고, 미분 스펙트럼을 얻는 프로그램을 Scheme I과 같이 작성하였다.

1차 미분

$$\frac{\Delta A}{\Delta \lambda} = \frac{A_{\lambda+\Delta \lambda} - A_{\lambda-\Delta \lambda}}{2 \cdot \Delta \lambda}$$

$\frac{\Delta A}{\Delta \lambda}$ : 파장  $\lambda$ 에서의 1차 미분에 해당되는 평균 변화율

$\Delta \lambda$ : 파장의 변화치

$A_{\lambda+\Delta \lambda}$ : 파장  $\lambda + \Delta \lambda$ 에서의 흡광도

2차 미분

LIST 8000,8530

```
8000 REM SMOOTHING
8010 VTAB 22: PRINT "SMOOTHING: (5), (7), (9) POINTS
: "; GET A$: PRINT A$: L4 = (ASC (A$) - 51) / 2:
IF L4 < 1 OR L4 > 3 OR L4 < > INT (L4) THEN PRINT
BL$: GOTO 8010
8020 VTAB 22: PRINT SPC(40): FLASH: VTAB 22: HTAB
12: PRINT " DATA SMOOTHING ": NORMAL
8030 ON L4 GOTO 8100,8200,8300
8100 N = N(L) - 2: FOR I = 3 TO N: S = 17 * VZ(I,L) +
12 * (VZ(I-1,L) + VZ(I+1,L)) - 3 * (VZ(I-2,
L) + VZ(I+2,L)): VZ(I,0) = S / 35: NEXT I: GOTO
8500
8200 : N = N(L) - 3: FOR I = 4 TO N: S = 7 * VZ(I,L) +
6 * (VZ(I-1,L) + VZ(I+1,L)) + 3 * (VZ(I-2,L)
+ VZ(I+2,L)) - 2 * (VZ(I-3,L) + VZ(I+3,L)
): VZ(I,0) = S / 21: NEXT I: GOTO 8500
8300 N = N(L) - 4: FOR I = 5 TO N: S = 59 * VZ(I,L) +
54 * (VZ(I-1,L) + VZ(I+1,L)) + 39 * (VZ(I-2,
L) + VZ(I+2,L)) + 14 * (VZ(I-3,L) + VZ(I+3,
L)) - 21 * (VZ(I-4,L) + VZ(I+4,L)): VZ(I,0) =
S / 231: NEXT I
8500 FOR I = L4 + 2 TO N: VZ(I,L) = VZ(I,0): NEXT
8510 POKE 770,0: POKE 771,0: POKE 777,0: VTAB 22: PRINT
" PLOT SMOOTHED SPECTRUM (Y/N)? ": GET A$: PRINT
A$: IF A$ = "Y" THEN GOTO 6500
8520 IF A$ < > "N" THEN PRINT BL$: GOTO 8510
8530 RETURN
```

**Scheme II**—The data smoothing routine.

$$\frac{\Delta^2 A}{\Delta \lambda^2} = \frac{A_{\lambda+\Delta\lambda} - 2 \cdot A_{\lambda} + A_{\lambda-\Delta\lambda}}{(\Delta\lambda)^2}$$

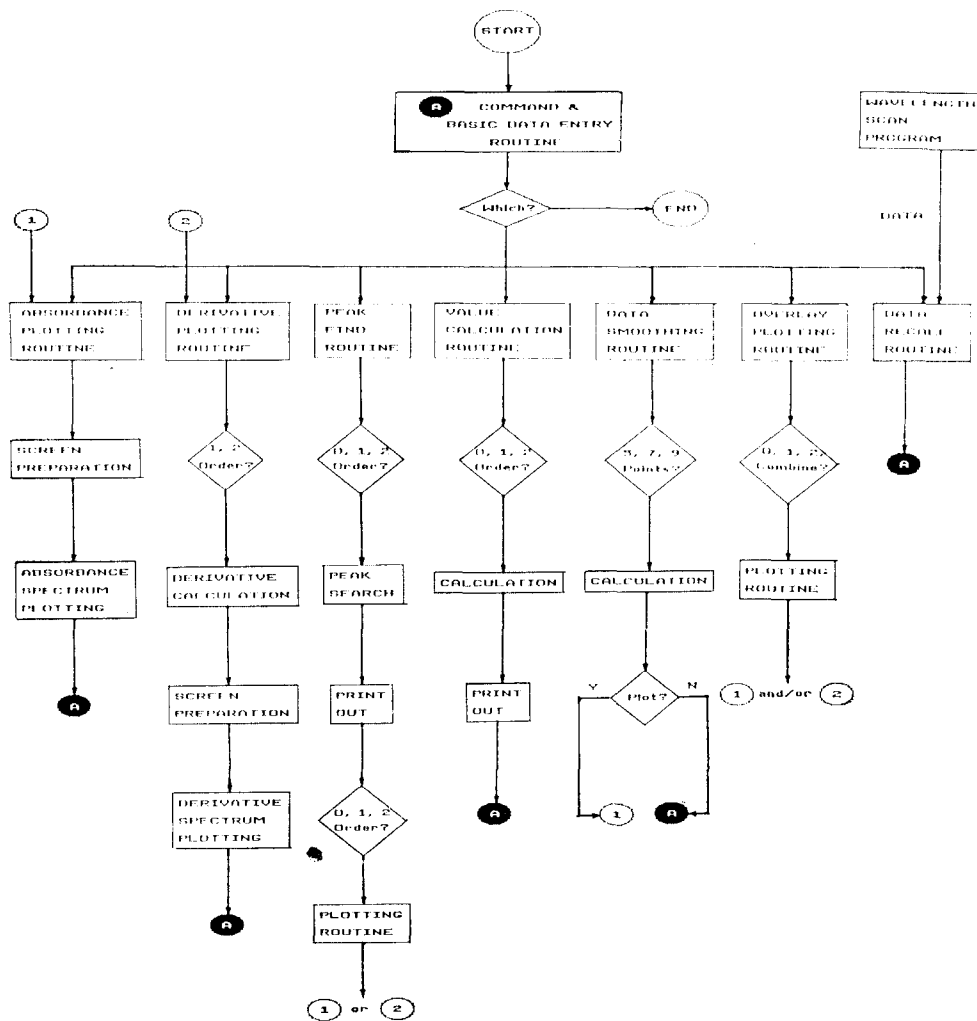
$\frac{\Delta^2 A}{\Delta \lambda^2}$  : 파장  $\lambda$ 에서의 2차 미분에 해당되는 평균 변화율

문장 번호 7520에서는 1차 및 2차 미분의 구분이 이루어지며, 7530에서는 1차 미분, 7540에서는 2차 미분에 해당되는 parameter를 결정하고, 실제 미분값의 계산은 7560에서 이루어지며, 7730에서 7800 사이에서 계산되어진 미분값을 그래픽화하는 루틴이 되도록 프로그램하였다.

**Noise** 제거 루틴—미분 스펙트럼을 얻는 데 있어서, 가장 심각한 문제점은 미분 조작에 의

해서 S/N비가 작아진다는 점이다. 따라서 noise를 될 수 있는 한 제거해 줄 필요가 있게 된다. 이는 통계적으로 처리가 가능한 데 이번 실험에 사용한 방법은 convolution이다. (1,3,5,7,11) convolution 조작을 실시하는 데 있어서 사용될 수 있는 함수는 여러가지가 알려져 있는데 (1,3), 본 실험에서 작성한 프로그램에서는 최소 자승법에 의해서 결정되는 convoluting integer를 사용하였다. convolution을 수식으로 표시하면 다음과 같다.

$$Y_j^* = \frac{\sum_{i=-m}^{i=m} C_i \cdot Y_{j+i}}{N}$$



Scheme III-The architecture of the derivative spectrophotometry computer program.

$Y_{j+i}$ : 원 데이터

$Y_j^*$ : convolution에 의해 얻어지는 noise가 제거된 데이터

$C_i$ : convoluting integer

$N$ : normalizing factor

convoluting integer 및 normalizing factor는 문헌 1에서 인용하였으며, convolution시, 한 block내의 데이터의 수는 5, 7, 9개 중에서 선택할 수 있도록 프로그램을 Scheme II와 같이 작성했다. 즉, 문장 번호 8100에서는 5, 8200에서는 7, 8300에서는 9개 점으로 convolution하도록 프로그램화 하였다.

기타 프로그램 루틴—본 실험을 위해 저자 등이 작성한 프로그램 중에는 그래픽을 위한 루틴, 원 스펙트럼에서의 극대점 및 극소점의 위치 및 그 높이를 구하는 루틴, 스펙트럼을 프린터로 hard copy하기 위한 루틴, 특정 파장에서의 흡광도, 1차, 2차 미분값을 구하는 루틴, 여러 스펙트럼을 동시에 중첩해서 그래픽하는 루틴, 데이터를 보조 기억 장치인 자기 디스크로부터 컴퓨터 주 기억 장치 내로 읽어 들이기 위한 루틴 등을 갖추었는데 Scheme III에서 이 루틴들 사이의 연결 관계 및 데이터의 흐름을 도시했다.

연립방정식에 의한 흡광도법과의 비교—본 실험에서 사용하기 위해서 작성한 컴퓨터 프로그램의 실용성을 가늠하고자, 여러 특정 파장에서 흡광도를 측정하여 그로부터 연립 방정식을 세워 목적 물질들의 농도를 계산해 내는 연립 방정식법을 비교 대상으로 설정하였다. 즉, 같은 회색도의 조제 표준액 및 검액에 대해 두 방법으로 각기 정량하여 그 회색도의 평균치 및 편차를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

Scan 간격에 따른 미분 스펙트럼의 차이—Fig. 1의 A, B, C는 각각 scan 간격을 0.3nm, 1nm, 2nm로 하였을 때의 1차 미분 스펙트럼이다. scan 간격이 커질수록 스펙트럼의 많은 부분이 생략되어 지는 경향을 보였다. 따라서 본 실험에서는 통일적으로 scan 간격을 모두 1nm

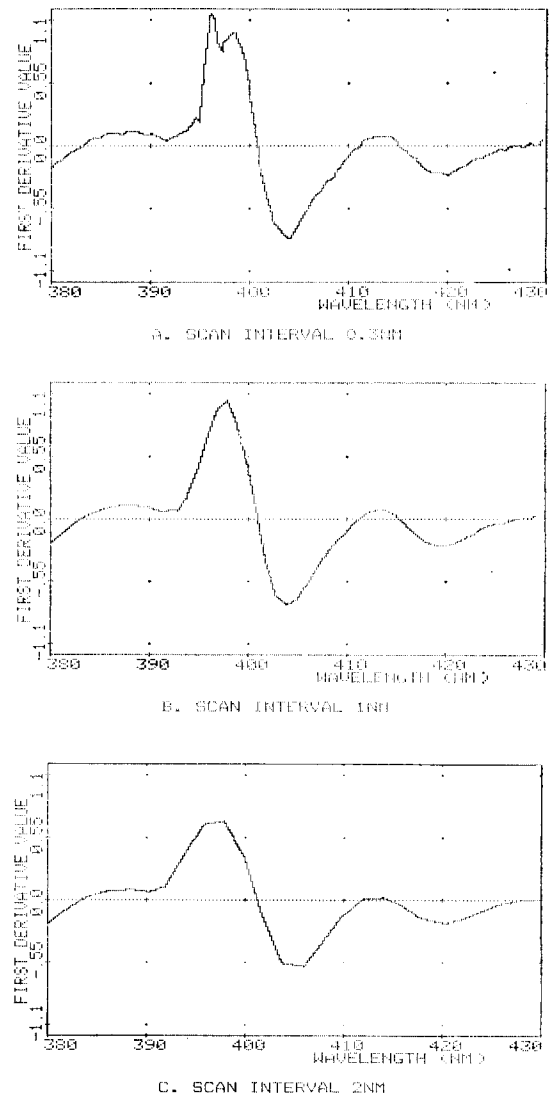


Fig. 1—The comparison of first derivative spectra obtained by 0.3, 1, 2-nm scan interval

로 하여 이후 실험 데이터를 얻었다. 1nm를 scan 간격으로 했을 때 scan 소요 시간, 미분 스펙트럼 계산 시간 및 S/N비 등에 있어서 가장 양호한 조건이었다.

Noise제거 루틴의 적용 결과—Fig. 2의 A, B, C, D는 각각 1차 미분 스펙트럼의 원 스펙트럼 및 5, 7, 9개 점을 block으로 한 convolution에 의한 noise제거 결과 얻어진 스펙트럼 등이다. 원 스펙트럼에 비교할 때, 여러 점을 채택한 con-

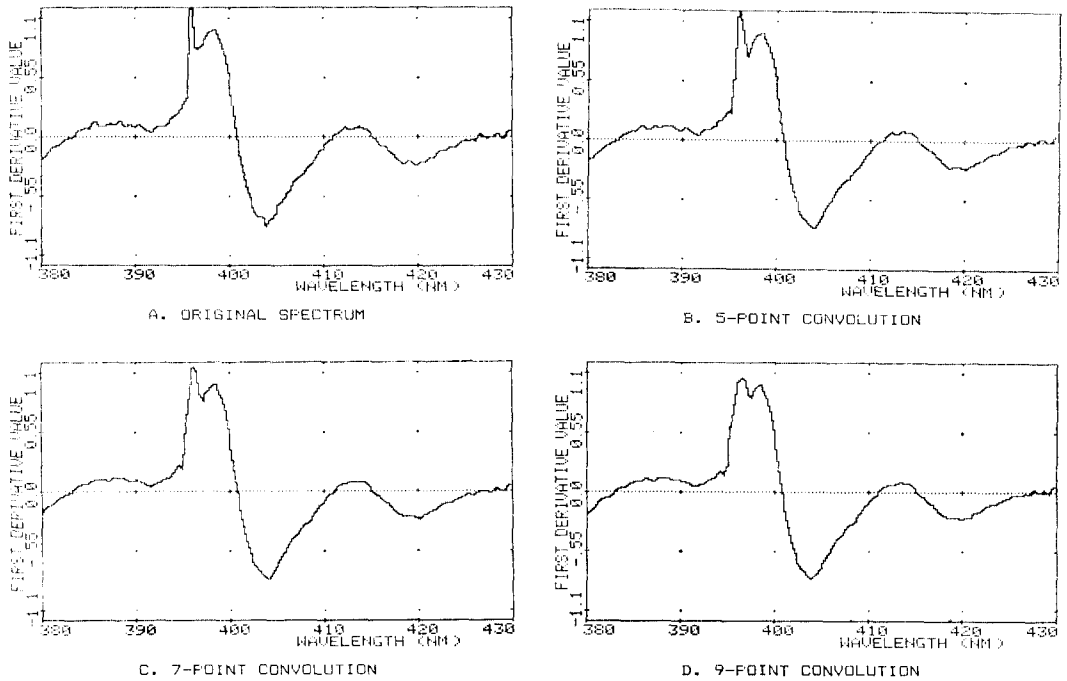


Fig. 2-The relationship between the number of points in convolution block and the degree of data smoothing.

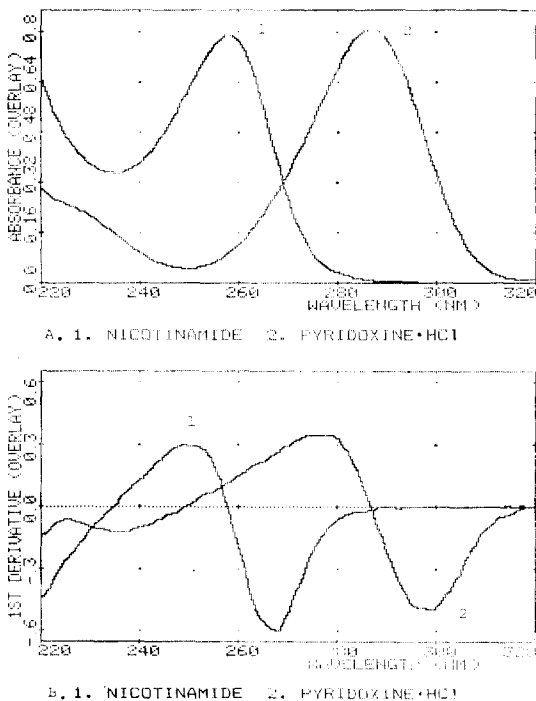
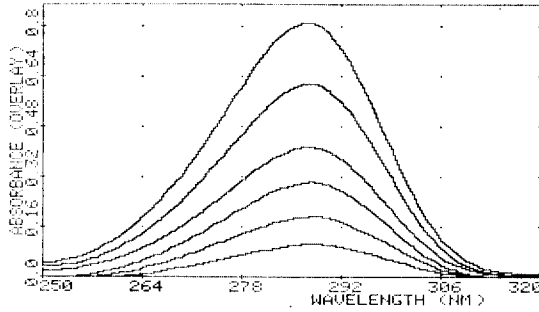


Fig. 3-The comparison of the spectra of pyridoxine-HCl and nicotinamide

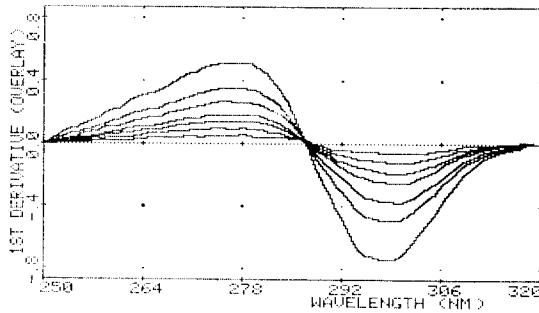
convolution에서 noise가 확실히 제거되어 짐을 알 수 있다. 본 실험에서는 동일적으로 모두 7개 점을 block으로 하는 convolution으로 noise를 제거했다.

염산 피리독신과 니코틴아마이드의 스펙트럼 비교—Fig. 3의 A는 염산 피리독신 20 $\mu$ g/ml 용액의 흡광도 스펙트럼 및 니코틴아마이드 20 $\mu$ g/ml 용액의 흡광도 스펙트럼을 중첩해서 그래픽한 것이다. 그림에서 알 수 있듯이 염산 피리독신의 흡수 극대인 288nm 부근에서 니코틴아마이드도 흡광치가 있으며, 니코틴아이드의 흡수 극대인 259nm 부근에서도 피리독신도 흡광치를 가지고 있어서 혼합물에서는 각각의 흡수 극대 파장에서의 흡광도는 그 시료 내의 각각의 양을 대변할 수 없다. 따라서 각각의 이 두 파장에서의 흡광 계수 및 흡광도를 구해, 이로부터 연립방정식을 세웠다.

Fig. 3의 B는 같은 시료들의 1차 미분 스펙트럼을 중첩해서 그래픽한 것인데 300nm 부근에서 염산 피리독신은 평균 변화율이 음(-)의 방향으로 극대를 이루는 데 반해, 니코틴아마이드



A. Overlay plotting of absorbance spectra.



B. Overlay plotting of derivative spectra.

**Fig. 4**-The overlay plotting spectra of pyridoxine-HCl.

는 0인 것으로 나타나고, 250nm 부근에서 니코틴아마이드는 평균 변화율이 양(+)의 방향으로 극대를 이루나, 염산 피리독신은 0인 것으로 나타난다. 따라서 염산 피리독신은 300nm, 니코틴아마이드는 250nm에서의 평균 변화율을 이용하여 혼합물 중에서도 분리 정량이 가능하였다.

**Table I**-Calibration curve equation parameters

		a	b	r
pyridoxin HCl	A <sub>250</sub>	0.0054	-0.0156	0.99611
	A <sub>288</sub>	0.0409	-0.0044	0.99976
	ΔA/Δλ <sub>300</sub>	0.0246	0.0093	0.99965
nicotinamide	A <sub>250</sub>	0.0390	0.0107	0.99961
	A <sub>288</sub>	0.0012	0.0063	0.99721
	ΔA/Δλ <sub>250</sub>	0.0142	0.0057	0.99885

\* a : slope    b : intercept  
 r : correlation coefficient  
 A<sub>250</sub> : absorbance at 259nm  
 A<sub>288</sub> : absorbance at 288nm  
 ΔA/Δλ<sub>300</sub> : derivative value at 300nm  
 ΔA/Δλ<sub>250</sub> : derivative value at 250nm

검량선의 작성—염산 피리독신 및 니코틴아마이드의 용액을 각각 2.5μg/ml에서 40μg/ml까지의 농도로 조제하여 259nm, 288nm에서의 흡광도 및 염산 피리독신의 경우 300nm에서의 평균 변화율, 니코틴아마이드의 경우 250nm에서의 평균 변화율을 구하여 검량선을 작성하여 본 결과, 양호한 직선성을 나타내는 구간은 두 물질 공히 흡광도의 경우 20μg/ml까지, 평균 변화율의 경우 30μg/ml까지 이었다. Fig. 4는 염산 피리독신 표준 용액들의 흡광도 스펙트럼(A) 및 미분 스펙트럼(B)을 중첩해서 그래프한 것이다. Table I에 각 검량선의 기울기(a), 절편(b), 상관 계수(r)를 기록했다.

혼합물 중에서의 염산 피리독신 및 니코틴아마이드의 정량—Table II, III에서와 같이 조제된

**Table II**-Determination of pyridoxine·HCl in the mixture.

Added amount(μg/ml)		Found amount(μg/ml)			
nicotinamide	pyridoxine	by absorbance		by 1st derivative	
			recovery(%)		recovery(%)
	30	10	10.21	102.1	102.8
	50	10	10.43	104.3	102.3
	100	10	11.18	111.8	103.4
	200	10	11.67	116.7	104.8
	250	10	12.26	122.6	106.9

(p<0.05)

111.5±11.8

104.0±2.5

**Table III**-Determination of nicotinamide in the mixture.

Added amount( $\mu\text{g/ml}$ )		Found amount( $\mu\text{g/ml}$ )			
pyridoxine	nicotinamide	by absorbance		by 1st derivative	
		recovery(%)	recovery(%)	recovery(%)	recovery(%)
20	30	29.40	98.0	30.09	100.3
10	30	29.35	97.8	29.74	99.1
5	30	29.90	99.7	30.09	100.3
5	20	20.63	103.2	20.16	100.8
3.33	10	10.40	104.0	10.23	102.3
2	10	10.38	103.8	10.23	102.3
1	10	10.17	101.7	9.80	98.0
0.5	10	10.51	105.1	10.23	102.3
(p<0.05)		101.7 $\pm$ 2.5		100.7 $\pm$ 1.4	

혼합 검액 중에서 각 물질의 정량을 미분 분광 광도법 및 흡광도의 연립방정식법으로 각각 실시 하였을 때, 염산 피리독신의 경우는 회수율에 있어서 흡광도에 따른 경우 111.5 $\pm$ 11.8%, 1차 미분에 의한 경우 104.0 $\pm$ 2.5%로 나타나고, 니코틴아마이드의 경우에는 각각 101.7 $\pm$ 2.5%, 100.7 $\pm$ 1.4%로 나타나서 1차 미분에 의한 경우가 양호한 결과를 보임을 알 수 있다. 동시에 저자 등이 개발한 컴퓨터 프로그램도 그 실용성이 인정된다고 판단된다.

**결 론**

흡광도를 파장에 따라 미분하여 얻어지는 미분 스펙트럼을 이용한 정량법의 실용화를 피하고자 자의 흡광 광도계의 데이터 시스템으로 이용되는 컴퓨터에 대해 별도의 기계적인 수정은 없이 단지 적절한 프로그램을 개발하게 되었다. 이에 저자 등은 이 프로그램의 실용성을 가늠해 보고자 염산 피리독신과 니코틴아마이드의 여러 비율의 혼합물을 조제하여 염산 완충액(pH 2.1) 중에서 정량하고, 비교 대상으로 흡광도의 연립 방정식법을 설정했다. 결과적으로 미분 분광 광도법으로 더욱 유의성 있는 데이터를 얻을 수 있음을 알 수 있었으며, 동시에 저자 등이 개발한 컴퓨터 프로그램이 실용성이 있음을 알 수 있었다.

이 후 저자 등은 복잡한 혼합물 또는 미지의 분해 산물을 함유하는 시료, 혈액 중의 약물 등의 정량적 분석 및 유사 구조의 화합물의 미분 스펙트럼에 의한 동정 등에 미분 분광 광도법의 실용화를 모색하고 이미 작성한 컴퓨터 프로그램 또한 효율성 및 실용성을 향상시키는 작업을 계속하고자 한다.

**문 헌**

- 1) Savitzky, A., and Golay, M.J.E.: *Anal. Chem.* **36**, 1627 (1964).
- 2) Grum, F., Paine, D., and Zoeller, L.: *Applied Optics* **11**, 93 (1972).
- 3) Steiner, J., Termonia, Y., and Deltour, J.: *Anal. Chem.* **44**, 1906 (1972).
- 4) Green, G.L., and O'Haver, T.C.: *Anal. Chem.* **46**, 2191 (1974).
- 5) Madden, H.M.: *Anal. Chem.* **50**, 1383 (1978).
- 6) O'Haver, T.C.: *Anal. Chem.* **51**, 91A (1979).
- 7) Bromba, M.V.A., and Zirgler, H.: *Anal. Chem.* **51**, 1760 (1979).
- 8) Such, V., Traveset, J., Gonzalo, R., and Gelpi, E.: *Anal. Chem.* **52**, 412 (1980).
- 9) Fix, G.L., and Pollack, J.D.: *Anal. Chem.* **52**, 1589 (1980).
- 10) Kitamura, K., and Majima, R.: *Anal. Chem.* **55**, 54 (1983).

- 
- 11) Bromba, M.V.A., and Ziegler, H.: *Anal. Chem.* 57, 1101 (1985).  
55, 1299 (1983).
- 12) Meal, L.: *Anal. Chem.* 55, 2448 (1983).
- 13) Rubio, S., Gomez-Hens, A., and Valcarcel, M.:  
14) Verdine, G.L., and Nakanishi, K.: *J. Am. Chem. Soc.* 107, 6118 (1985).