

High Performance Liquid Chromatography 를 이용한 Cefatrizine · Propylene Glycol 의 분리 및 정량

권순자 · 이기창* · 최광훈**

경희대 학교 화학과 *명지대학교 화공과
**영진약품(주) 중앙연구소

Separation and Determination of Cefatrizine · Propylene Glycol by High-performance Liquid Chromatography

Kwon, Shoon-Ja · Lee, Ki-Chang* · Choe, Koang-Hoon**

Dept. of Chemistry, Kyung Hee University
**Dept. of Chemical Engineering, Myong Ji University*
***Central Research Institute, Yung Jin Pharm. Ind. Co., Ltd.*

(Received May 20, 1989)

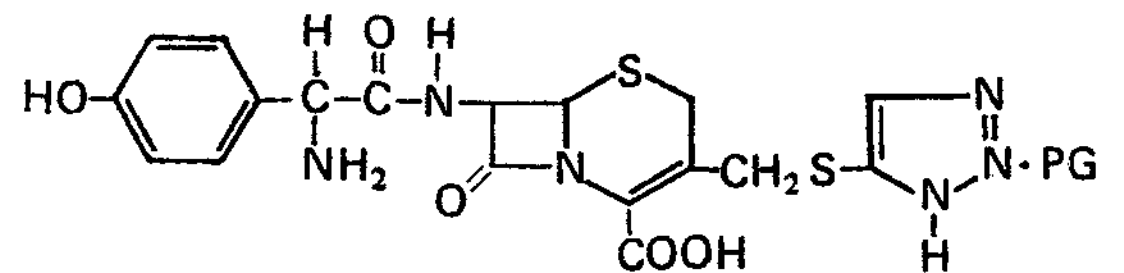
ABSTRACT

The fast separation and determination of cefatrizine-propylene glycol and impurities - TACA: 7-amino-3-(1,2,3-triazol-4-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid and 7-ACA; 7-amino cephalosporanic acid - was performed by the high performance liquid chromatography using octadecyl silane (ODS) column. Methanol and ammonium phosphate buffer [0.03M(NH₄)₂HPO₄, (pH 7.5)] was used to analyze, as eluent. The experimental value of the contents of cefatrizine-propylene glycol and impurities agree with the theoretical value of those.

I. 서 론

Cefatrizine · propylene glycol [7-(D-α-amino-α-(4-hydroxyphenyl)acetamido)-3-(1,2,3-triazol-4(5)-ylthiomethyl)-3-cephem-4-carboxylic acid·propylene glycol] 은 1970년대 미국의 Bristol Myers 연구소에서 개발한 Cephalosporin계통의 경구용 항생제로서 그람 양성균 및 그람음성균에 사용된다.^{1~3)} 특히 그람음성

균에 대하여는 대부분의 Cephalosporin 계통의 항생제보다 우수한 효과를 갖는 것으로 알려져 있다.^{4,5)}



Cefatrizine · Propylene Glycol

Cefatrizine · propylene glycol의 정량방법으로는 전위차를 이용한 산적정법 및 미생물을 이용한 역가측정법^{6,7)}이 사용되고 있으나 이들 방법은 Cefat

rizine · propylene glycol 합성시 원료 및 중간체로 사용되는 7-ACA 및 TACA의 분리와 확인이 곤란하며 복잡한 조작방법과 많은 시간이 소요되는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 신속하고 빠르게 Cefatrizine · propylene glycol 과 미반응물인 7-ACA와 TACA 및 부생성물들을 성분별로 분리한 후 확인할 수 있었다.

II. 재료 및 방법

1. 시 약

Cefatrizine · propylene glycol은 일본후생성의 표준품을, 7-ACA 및 TACA는 Lark사(이태리)의 표준품을, Cephalexin [7-(D- α -aminophenylacetamido) desacetoxycephalosporanic acid; 7-(D-2-amino-2-phenylacetamido)-3-methyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylic acid]은 USP급을 사용하였다. 용리액 및 용매로 사용한 CH₃OH 및 H₂O는 Merck사의 HPLC용 시약을 사용하였으며 기타의 시약들은 Wako사의 1급 시약을 사용하였다.

2. 기기 및 분리조건

HPLC는 Waters 484 Tunable Absorbance Detector, U6K Universal Injector 및 Waters 745 data module이 부착된 Waters Model 600E를 사용하였다. column은 ODS (octadecyl silane)계통의 Lichrosorb RP-18(4.0 mm×25 cm, 10 μ m, Merck)을 syringe는 Hamilton glass syringe (10 μ l)를 사용하였으며 시료의 분리는, 이동상은 0.03 M (NH₄)₂ HPO₄와 CH₃OH의 비율을 750:250으로 한 후 아세트산으로 pH를 7.5로 조절하였으며, 분리관의 온도는 상온, 검출기는 UV 254 nm, 유속은 1 ml/min에서 시행하였다.

3. 검량선 작성

Cefatrizine · propylene glycol, 7-ACA 및 TACA를 각각 20 mg, 40mg, 60 mg 및 100 mg씩을 소량의 이동상이 들어 있는 서로 다른 10 ml 용량플

라스크에 정밀하게 취한 후, 각 용량플라스크에 내부표준물로 Cephalexin 40mg씩을 가한 다음 이동상으로 녹여 10 ml로 하고, 이중 10 μ l씩을 주입하여 얻어진 Chromatogram으로부터 각 농도에 대하여 시료와 내부표준물의 peak 면적비에 의해서 검량선을 작성하였다.

4. 정밀성 측정

Cefatrizine, propylene glycol, TACA 및 7-ACA를 각각 취하여 1) 30 + 40 + 35(mg), 2) 40 + 50 + 45 (mg), 3) 50 + 60 + 55 (mg), 4) 60 + 70 + 65 (mg) 및 5) 70 + 80 + 75 (mg)의 5개 시료를 만든 후 각 시료에 내부표준물로 Cephalexin 40 mg씩을 가하고 이동상으로 녹여 10 ml로 하였다. 이 용액들을 각각에 대하여 10 μ l씩 6회 반복 측정하여 얻어진 Chromatogram의 peak 면적으로부터 회수율을 구하였다.

III. 결과 및 고찰

역상분리관인 Lichrosorb RP-18에 의한 혼합물의 분리를 위하여 1) 완충액의 농도 변화 [Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, KH₂PO₄ 및 (NH₄)₂HPO₄ 등], 2) 이동상의 변화(약산-약알칼리)에 따라 연구하였다. 분리도는 0.03 M (NH₄)₂ HPO₄와 CH₃OH의 비율을 75:25로 혼합한 후 아세트산을 사용하여 pH를 7.5로 조절하였을 때, 가장 양호하였으며, 완충액의 농도 변화(0.01 - 0.05 M)에 큰 영향을 받지 않는다.

Fig. 1은 이동상의 pH가 5, 6.5 및 7.5에서의 Cefatrizine, propylene glycol 및 미반응물인 7-ACA 및 TACA의 Chromatogram이며 7-ACA, TACA, Cefatrizine, propylene glycol 및 Cephalexin의 순서로 검출됨을 알 수 있었다.

Fig. 1에서 보면 이동상의 pH가 산성일수록 각 성분들이 빠르게 검출됨을 알 수 있었다. pH 5인 이동상에서는 내부표준물로 사용된 Cephalexin과 Cefatrizine · propylene glycol이 중첩되며, pH 6.5에서는 불순물과 미반응물인 7-ACA의 분리가 완전치 못하였다. 약 알칼리인 pH 7.5에서는 내부표준물의 검출이 늦게 검출되는 단점은 가지고 있으나 약 산성쪽 보다는 좋은 분리도를 보여주었다.

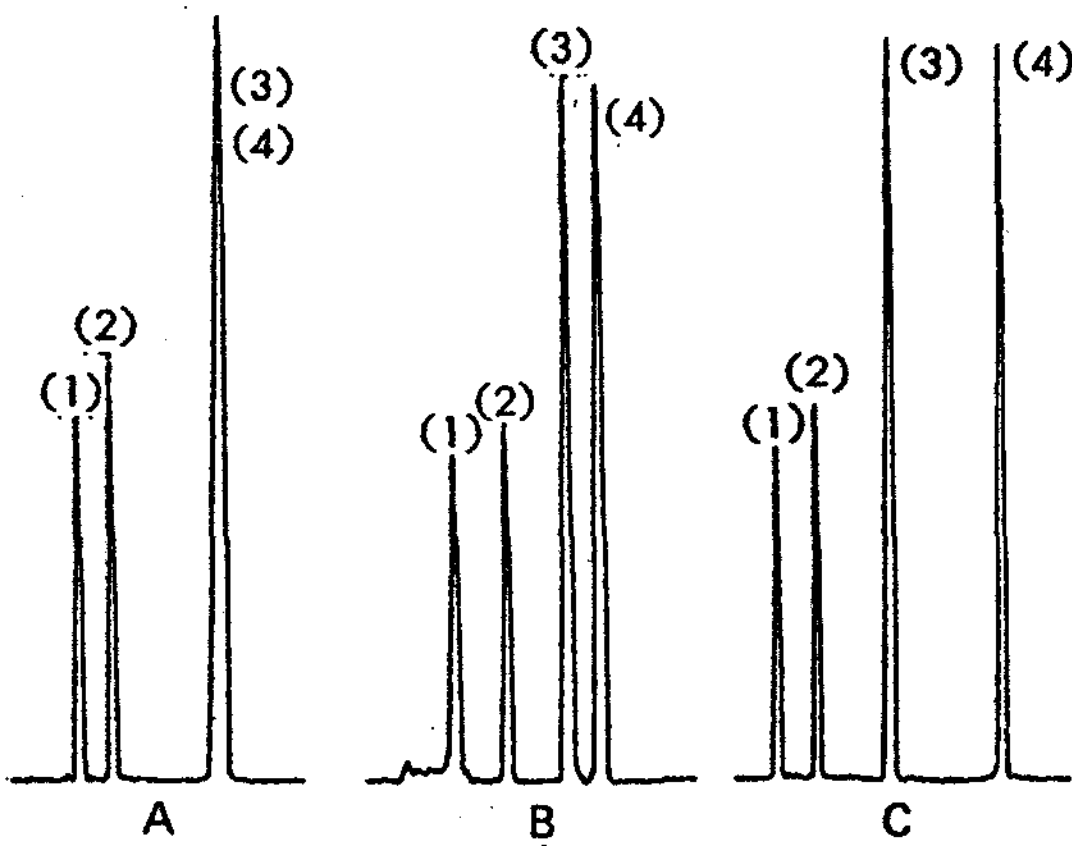


Fig. 1. Chromatogram of 7-ACA(1), TACA(2), Cefatrizine·propylene glycol(3) and Cephalixin(4), Column: Lichrosorb RP-18(4mm x 25cm), Mobile phase: 0.03M(NH₄)₂HPO₄/CH₃OH(750/250; A:pH5, B:pH6.5, C:pH7.5), Detector: UV254nm.

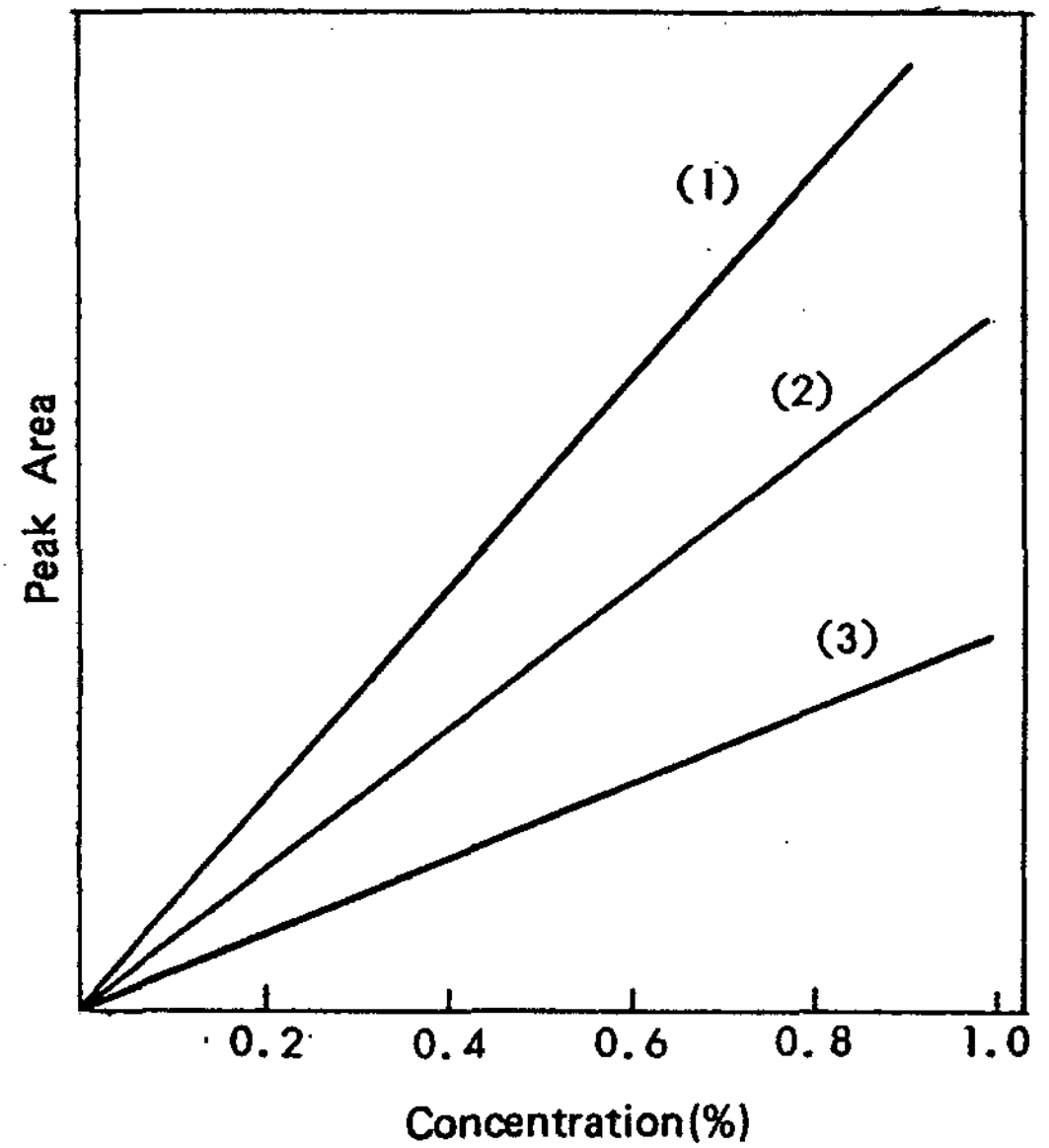


Fig. 2. Calibration curve [Cefatrizine·propylene glyco (1), TACA (2), 7-ACA (3)]

Table 1. Comparison of theoretical and experimental value measured from HPLC

C		TACA		7-ACA		Recovery(%) (T/E)		
T	E	T	E	T	E	C	TACA	7-ACA
0.300	0.297	0.400	0.398	0.350	0.355	101.0	100.5	98.6
0.400	0.401	0.500	0.495	0.450	0.454	99.7	101.0	99.1
0.500	0.506	0.600	0.604	0.550	0.543	98.8	99.3	101.3
0.600	0.594	0.700	0.702	0.650	0.660	101.0	99.7	98.5
0.700	0.695	0.800	0.791	0.750	0.740	100.7	101.7	101.4

*C: Cefatrizine·propylene glycol
 **T: Theoretical value
 ***E: Experimental value

Fig. 2는 pH 7.5인 이동상을 사용해 얻은 Chromatogram으로부터 작성한 각 성분들의 검량곡선이다.

임의비로 혼합하여 만든 5종의 시료에 대한 실험치와 이론치의 비교를 Table 1에 나타내었으며, 혼합비에 의한 이론치와 검량선으로부터 얻은 실험치가 잘 일치함을 알 수 있었다.

와 역상분리관을 이용하여 Cefatrizine·propylene glycol과 7-ACA(7-amino cephalosporanic acid) 및 TACA[7-amino-3-(1,2,3-triazol-4-yl)thiomethyl-3-cephem-4-carboxylic acid]의 혼합물에 대한 분리 및 확인을 쉽게 할 수 있었으며, 기존방법인 전위차 적정법이나 미생물에 의한 역가측정법보다 더 효율적으로 함량을 측정할 수 있었다.

IV. 결 론

문 헌

1. J. Wilkins, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 8 (1975)
2. J.P. Patent, 50 - 105813
3. J.P. Patent, 60 - 20394
4. A. Vuye, H. Socp and J. Pyck. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 9, 569 (1973)

5. C.C. Blackwell, E.H., Frimer and G.C. Tuke, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10, 288 (1976)
6. “한국 항생물질 의약품 기준” 보사부, 230, 1986
7. “일본 항생물질 의약품 기준해설” 약업지보사, 238, 1986