

β -Cyclodextrin에 의해 증가된 Neutral Red의 형광을 이용한 Promethazine의 분광형광법 정량

최서연 · 최희선*

수원대학교 자연과학대학 화학과
(접수 2013. 11. 9; 게재확정 2014. 1. 30)

Spectrofluorimetric Determination of Promethazine with Neutral Red Enhanced by β -Cyclodextrin

Seo-Yeon Choi and Hee-Seon Choi*

Department of Chemistry, The University of Suwon, Wau-ri, Bongdam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-743, Korea. *E-mail: choihs@suwon.ac.kr
(Received November 9, 2013; Accepted January 30, 2014)

주제어: Promethazine, β -Cyclodextrin, Neutral red, 내포 착물, 분광형광법

Key words: Promethazine, β -Cyclodextrin, Neutral red, Inclusion complex, Spectrofluorimetry

서 론

Promethazine은 항히스타민, 진정, 항정신, 진토 그리고 항콜린 효과를 가지고 있어 치료제로서 널리 사용되고 있지만, 사람에게 내분비 질환 그리고 심장병과 같은 부작용을 일으키기도 한다.^{1,2} 그러므로 promethazine을 정량하는 것에 대해 많은 관심을 갖게 되고, 이에 따라 promethazine의 함량을 측정하는 다양한 방법이 개발되었다. 이 중에는 전위차법,³ 펄스차이 벋김법,⁴ 흡수 분광광도법,⁵ 화학발광법,⁶ 모세관 띠 전기이동,⁷ HPLC-MS,⁸ 네모파 전압전류법⁹ 등이 있다.

형광시약인 neutral red(NR)는 요즘에는 DNA 구조를 조사하는 데에도 사용하고 있으며, 용액 상태에서 2년 동안이나 보관하여도 매우 안정하다는 특성을 가지고 있다.¹⁰

β -cyclodextrin(β -CD)(Fig. 1(a))의 구멍 내부는 외부에 비해 비극성¹¹이다. 염기성에서 비교적 비극성인 형태를 갖는 형광시약 neutral red(NR)(Fig. 1(b))는 β -CD 구멍 내부에 들어가 내포되어 착물을 만들면서 형광의 세기가 증가한다. 이처럼 형광 세기가 증가하는 것은 NR이 β -CD와 내포 착물을 만들면서 NR 분자내의 회전 및 진동 운동이 자유롭지 못해 내부전환으로 인한 비복사 에너지 손실이 없기 때문인 것으로 보인다. 여기에 분석물인 promethazine(Fig. 1(c))이 첨가되면 β -CD와 센 상호작용을 하여 β -CD에 내포되어 있는 NR을 치환하면서 형광의 세기를 감소시킨다. 즉 promethazine의 농도가 증가함에 따라 NR- β -CD의

형광 세기가 비례적으로 감소하는데 이 현상을 이용하여 promethazine을 정량하는 방법에 대해 연구하였다.

실 험

기기 및 실험조건

일본 Hitachi 모델 F-2000 Fluorescence Spectrophotometer를 사용하였다. 형광 시약인 neutral red의 들뜸 파장과 형광 파장은 각각 285 nm와 581 nm이었으며 스펙트럼 피나비는

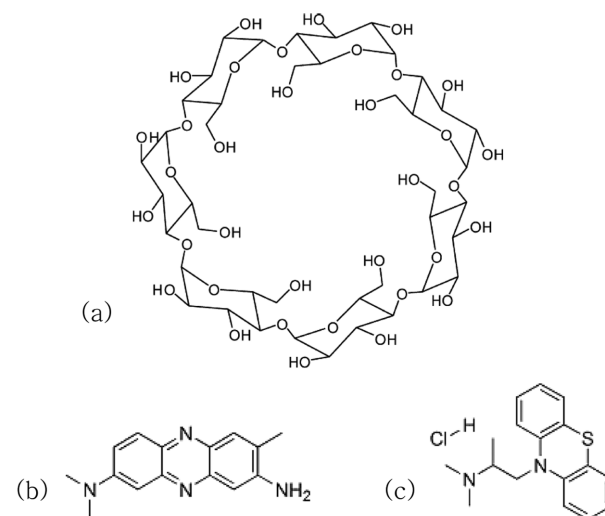


Figure 1. Structures of (a) β -cyclodextrin, (b) neutral red, and (c) promethazine hydrochloride.

둘 모두 10 nm로 하였다. 시료 용기는 사면이 모두 투명한 1 cm 셀을 사용하였다. 시료 용액에 질소 기체를 불어 넣어 산소 기체의 존재 유무에 따른 형광 세기를 관찰하여 보니 차이가 없었으므로 시료용액과 표준용액에 질소 기체를 불어넣지 않고 형광 세기를 직접 측정하였다. 실험 중 pH를 조절하거나 완충용액을 만들 때는 Istak 모델 750P pH미터(Jisico, Korea)를 사용하였다.

시약과 용액

본 실험에서 사용한 모든 시약들은 분석급 시약을 정제하지 않고 사용하였다. β -cyclodextrin(Wako, Japan)는 1.0×10^{-2} M 저장용액, neutral red(Aldrich, U.S.A)는 1.0×10^{-3} M 저장용액, promethazine hydrochloride(Aldrich, U.S.A) 1.0×10^{-2} M 저장용액을 각각 만들어 어두운 장소에 보관하고 사용할 때마다 적절한 농도로 묽혀서 사용하였다. 0.1 M borax 용액과 0.1 M NaOH를 적당량 혼합하여 만든 borax 완충용액(pH = 10.5)을 사용하여 시료 용액과 표준용액의 pH를 조절하였다. 탈이온수는 한국 영린 기기의 Ultra 370 series 초순수 장치를 이용하여 만들어 사용하였다.

Promethazine을 정량하기 위한 검정곡선

20.0 mL 부피 플라스크 7개에 promethazine을 각각 이들의 농도가 3.0×10^{-6} M ~ 9.0×10^{-5} M 되도록 취하였다. 각각에 NR 농도가 2.5×10^{-5} M, β -CD 농도가 1.0×10^{-3} M 되게 하고, borax 완충용액(pH = 10.5)을 2.0 mL 가하고, 증류수로 표선까지 묽힌 후 형광 세기를 측정하였다. 실제 시료 분석에 이용하는 검정곡선은 promethazine을 가하지 않았을 때의 NR- β -CD 내포 착물의 형광 세기(F1)와 promethazine을 첨가한 후의 NR- β -CD 내포 착물의 형광 세기(F2)의 차이($\Delta F = F1 - F2$)를 promethazine의 몰농도(M)에 대해 도시하여 얻었다. 바탕용액은 promethazine과 NR을 제외하고 나머지 시약들은 똑같은 양을 가하여 만들었으며 이의 형광 세기를 측정하여 바탕보정에 사용하였다.

Promethazine 합성시료 및 실험시료 만들기

Promethazine 100 mg, 250 mg 및 500 mg에 각각 부형제인 mannitol 또는 lactose를 4.90 g, 4.75 g 및 4.50 g씩을 혼합하여 promethazine이 포함된 6종류의 5.0 g의 합성시료를 만들었다.

이들 각각을 500 mg씩 취하여 각각의 100 mL 부피 플라스크에 넣고 증류수로 용해시켜 표선까지 묽혔다. 이들 중 promethazine 10 mg이 포함된 용액에서는 20.0 mL 부피 플라스크에 2.0 mL를, 25 mg과 50 mg이 포함된 용액은 1.0 mL를 취하였다. 각각 모두에 NR 농도가 2.5×10^{-5} M, β -CD 농도가 1.0×10^{-3} M 되도록 하고, borax 완충용액

2.0 mL를 가하고 증류수로 표선까지 묽힌 후 형광 세기를 측정하였다.

결과 및 고찰

Neutral red의 형광 스펙트럼

Neutral red(a), neutral red- β -cyclodextrin 내포 착물(b), 그리고 neutral red- β -cyclodextrin 내포 착물에 promethazine을 첨가하였을 때(c)의 형광 스펙트럼을 Fig. 2에서 보여주고 있다. 같은 농도의 NR에 대해서 β -CD 농도가 1.0×10^{-3} M로 들어있을 때 NR과 β -CD간의 내포 착물이 형성되어 형광 세기가 증가한다. 그리고 NR- β -CD 내포 착물에 promethazine이 첨가되면 NR- β -CD 내포 착물에서 NR이 promethazine으로 치환되므로 인해 형광의 세기가 감소되는 것을 볼 수 있다.

최적 실험 조건

β -CD의 내부는 외부보다 비극성이므로 NR이 비교적 비극성에 가까운 구조를 가질수록 β -CD와 더 잘 상호작용을 하여 NR- β -CD 내포 착물을 효율적으로 만들게 되는데 이는 pH에 의해 영향을 받을 수 있다. NR의 구조(Fig. 1(b))를 보면 산성일 때는 두 아민기와 헤테로 고리에 있는 두 개의 질소에 H⁺가 붙어 큰 양전하를 띠 수 있지만, 염기성일 때는 이런 현상이 일어나지 않아 전하를 띠지 않게 되므로 내포 착물을 더 잘 만들 것이다. 따라서 어느 pH에서 NR- β -CD 내포 착물을 잘 형성하여 형광 세기를 크게 증가시키고, promethazine에 의해 β -CD에 내포된 NR이 가장 잘 치환되는지를 조사해 보았다. pH 10.0~11.0에서 가장 큰 형광 세기가 나타남을 알 수 있었다. 따라서 pH는 borax 완충용액을 이용하여 10.5로 조절하였다.

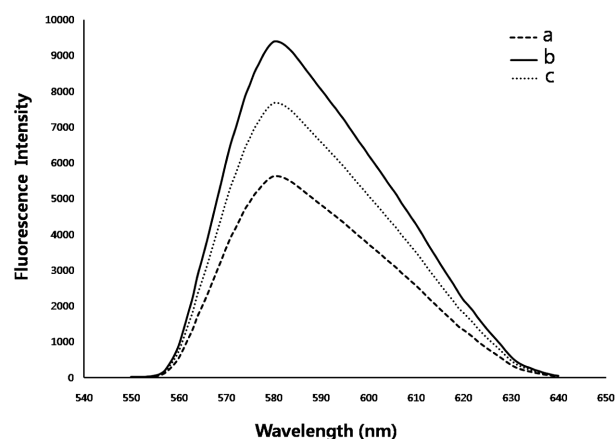


Figure 2. Fluorescence emission spectra of (a) neutral red (2.5×10^{-5} M) (b) neutral red- β -cyclodextrin inclusion complex and (c) neutral red- β -cyclodextrin inclusion complex in promethazine solution.

NR-β-CD 내포 착물을 많이 만들어 형광 세기를 극대화시켜야 다양한 농도의 promethazine을 검출할 수 있으므로 최대의 형광세기를 얻을 수 있는 NR과 β-CD의 농도를 결정해 보았다.

β-CD와 결합하는 NR의 농도가 증가할수록 NR-β-CD 착물을 더 많이 만들어 형광 세기가 증가하므로 일정량의 β-CD에 NR의 농도를 변화시키면서 최대 형광 세기를 나타내는 NR의 농도를 알아보았다. pH 10.5에서 β-CD의 농도가 1.0×10^{-3} M 일 때 형광의 세기가 가장 큰 NR의 농도를 조사해 보니 2.5×10^{-5} M이었다. 그리고 NR의 농도가 이보다 크게 되면 측정 기기의 형광 세기 측정 범위를 넘어섰기 때문에 사용할 수 없었다.

β-CD의 농도가 높을수록 NR과 내포 착물을 많이 만들게 되므로 β-CD를 NR의 양 보다 과량을 넣어주어야 하는데 NR의 농도가 2.5×10^{-5} M 일 때 β-CD의 농도를 1.0×10^{-3} M일 때 가장 형광 세기가 컸었고 그 이상의 β-CD 농도에서는 형광의 세기 변화는 거의 없었다. 그리고 β-CD의 농도가 너무 진하면 산란 현상이 일어남을 알 수 있었다.

NR-β-CD 내포 착물에 있는 NR이 promethazine으로 치환되는 반응이 평형을 이루는 시간이 필요할 것으로 예상되었다. 최적 조건에서 NR-β-CD 내포 착물에 promethazine을 가한 직후인 0분부터 120분까지 반응 시간에 따른 형광 세기를 측정하였다. promethazine을 넣어주자마자 형광의 세기가 감소한 후 그 이후에는 변함없이 거의 일정하였다. 따라서 시료 측정용액을 만든 후 1시간 이내에 측정하였다.

검정곡선과 검출한계

실험 부분에서 설명한 방법으로 promethazine의 검정곡선을 얻었으며 Table 1에 이의 성능계수를 적어 놓았다. 감도가 비교적 좋고, 직선성(R^2)도 매우 좋음을 알 수 있다. 25개 바탕용액의 형광 세기를 측정하여 이 형광 세기들의 표준편차의 3배에 해당하는 값과 검정곡선의 기울기를 이용하여 검출한계를 구하였다.

시료에서의 응용

실제 시료 속에 들어있는 promethazine의 함량을 측정하기 위해 시중에서 promethazine이 함유된 약을 구입하려고 했으나 여러 가지 부작용으로 인해 시판되고 있지

Table 1. Figures of merits for calibration curve of promethazine

Linear dynamic range	3.0×10^{-6} M ~ 9.0×10^{-5} M
Regression equation	$y = 3.42 \times 10^7 x - 32.11$
Correlation coefficient (R^2)	0.9974
Detection limit	9.0×10^{-7} M (0.29 μg/mL)

Table 2. Determination of promethazine in synthetic samples

Samples (500 mg)	Certified value (mg)	Found value (mg) ^a	% relative error
in mannitol	10.0	10.4(±0.5)	+4.0
	25.0	24.4(±0.7)	-2.4
	50.0	51.1(±0.8)	+2.2
in lactose	10.0	9.6(±0.3)	-4.0
	25.0	25.5(±0.8)	+2.0
	50.0	50.8(±1.0)	+1.6

^aThe mean values were obtained from seven replicate samples.

않았다. 따라서 실험실에서 약을 만들 때 사용되는 부형제인 mannitol 또는 lactose에 promethazine hydrochloride를 일정량씩 혼합하여 합성 시료를 만들어 측정하였다. 이에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다. 합성 시료에 들어있는 promethazine은 비교적 적은 상대오차 범위(±5.0% 이내)에서 정량할 수 있음을 알 수 있었다.

결론

Neutral red-β-cyclodextrin 내포 착물을 이용하여 합성 시료 중에 들어있는 promethazine을 분광형광법으로 비교적 간단하게 정량할 수 있었다. 측정 농도 범위는 3.0×10^{-6} ~ 9.0×10^{-5} M이고, 검출한계는 9.0×10^{-7} M (0.29 μg/mL)이고, 측정값의 % 상대오차는 모두 5% 미만이었다.

Acknowledgments. Publication cost of this paper was supported by the Korean Chemical Society.

REFERENCES

- Daniel, D.; Gutz, I. G. R. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *494*, 215.
- Alizadeh, T.; Akhoundian, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 3477.
- Alizadeh, T.; Akhoundian, M. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 3477.
- Ni, Y.; Wang, L.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *439*, 159.
- Saif, M. J.; Anwar, J. *Talanta* **2005**, *67*, 869.
- Sultan, S. M.; Hassen, Y. A. M.; Abulkibash, A. M. *Talanta* **2003**, *59*, 1073.
- Lara, F. J.; Garcia-Campaña, A. M.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra J. M. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *535*, 101.
- Huang, M.; Gao, J.; Zhai, Z.; Liang, Q.; Wang, Y.; Bai, Y.; Luo, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *62*, 119.
- Marco, J. P.; Borges, K. B.; Tarley, C. R. T.; Ribeiro, E. S.; Pereira, A. C. *Sens. Actuators, B* **2013**, *177*, 251.
- Ni, Y.; Du, S.; Kokok, S. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 19.
- Zhu, X.; Sun, J.; Wu, J. *Talanta* **2007**, *72*, 232.