

Gentamicin Sulfate의 螢光分析法에 관한 研究

白于玟 · 金正優 · 許明權 · 朴根昌

중근당 中央研究所

(Received November 11, 1977)

Woo Hyun Paik, Jung Woo Kim, Myung Kwon Hou and Kun Chang Park

Research Center, Chong Kun Dang Corporation, Seoul 150

Studies on the Fluorophotometric Determination of Gentamicin Sulfate
and its Preparations

Abstract—Gentamicin sulfate reacted with pyridoxal and zinc (II) ion in pyridine-methanol solution to yield highly fluorescent zinc(II) chelates of N-pyridoxylidene derivatives. This fluorescence reaction was sensitive and showed excitation maximum at 398 nm, and emission maximum at 482 nm. The effects of reagent concentration, reaction time and temperature, standing time and temperature were studied. And a new fluorophotometric method for the determination of gentamicin sulfate was developed. A good result was obtained and this method was applied to various preparations.

gentamicin sulfate의 分析法으로는 生物學的 定量法¹⁾ 以外에는 아직 뚜렷한 理化學的 分析方法이 確立되어 發表된 바 없다.

그러나 Maeda²⁾ 등은 hexosamine 이 pyridine methanol 溶液中에서 pyridoxal 및 Zn (II) ion 과 反應하여 N-pyridoxylidene derivatives 의 Zn chelate 化合物이 나타내는 강한 螢光을 利用한 螢光分析法³⁾을 提示하였고 이 方法을 利用하여 amino acid⁴⁾ 및 kanamycin, polyoxin, kasugamycin 과 같은 aminosugar 系 抗生物質의 分析法⁵⁾을 發表한 바가 있다. 著者들은 同一系인 gentamicin sulfate 의 分析에 適用시켰으나 그 條件에서는 螢光이 不安定하고 再現성이 나빠, 보다 正確하고 安定하며 再現성이 좋은 條件을 檢討한 結果 다음과 같은 螢光分析法을 確立하였기에 이를 報告한다.

實 驗

試料, 試藥 및 裝置—gentamicin sulfate 는 crude gentamicin sulfate 의 精製한 것을 使用하였으며 實驗에 使用한 모든 試藥은 特級試藥을 使用하였다. 그리고 螢光은 spectrophotofluo-

rometer(Aminco Bowman)를 사용하여測定하였다.

方 法—Pyridoxal hydrochloride 0.002 w/v%, zinc acetate 0.2 w/v% 및 pyridine 2.0 v/v%를 함유하는 methanol 용액을 pyridoxal zinc 試液으로 사용하였고, 標準液은 gentamicin sulfate 標準品(U.S.P. XIX 規格品) 50~100 mg(力價로서)을 正確히 取하여 蒸溜水에 溶解시킨 後 50 ml로 하고 다시 이 液 1 ml를 取하여 50 ml로 만든 液을 使用하였다(最終濃度: 20~40 $\mu\text{g/ml}$).

檢液은 gentamicin sulfate 製劑인 檢體 一定量을 正確히 取하여 蒸溜水에 溶解시켜 檢液中 gentamicin sulfate의 最終濃도가 標準液과 비슷하도록 調劑한 液을 使用하였다. 操作은 標準液, 檢液 및 對照液(증류수)을 各各 1 ml씩 正確히 取하여 公寸시험판에 넣고 pyridoxal zinc 試液 10 ml씩 加하고 잘 振盪한 後 40°에서 90分間 反應시킨 다음 이를 꺼내어 10~15°의 水浴 上에서 30分간 放置한 後 excitation λ_{max} 398 nm, emission λ_{max} 482 nm에서 標準液의 比較螢 光強度(RFI: relative fluorescence intensity)를 100으로 하여 그때의 檢液 및 對照液의 RFI를 測定한다.

檢液中 gentamicin sulfate의 最終濃度($\mu\text{g/ml}$)

$$= \frac{\text{檢液의 RFI} - \text{對照液의 RFI}}{\text{標準液의 RFI} - \text{對照液의 RFI}} \times \text{標準液의 最終濃度} (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{含量}(\%) = \frac{\text{檢體中 gentamicin sulfate의 量}(\text{mg})}{\text{檢體의 量}(\text{mg})} \times 100$$

結果 및 考察

波長의 선택—一般的으로 kanamycin, polyoxin, kasugamycin 등과 같은 amino sugar系 抗 生物質의 excitation λ_{max} 은 380 ± 10 nm, emission λ_{max} 은 475 ± 10 nm로 報告된 바⁵⁾ 있으나 gentamicin sulfate의 excitation λ_{max} 은 398 nm, emission λ_{max} 은 482 nm로 나타났다(Fig. 1).

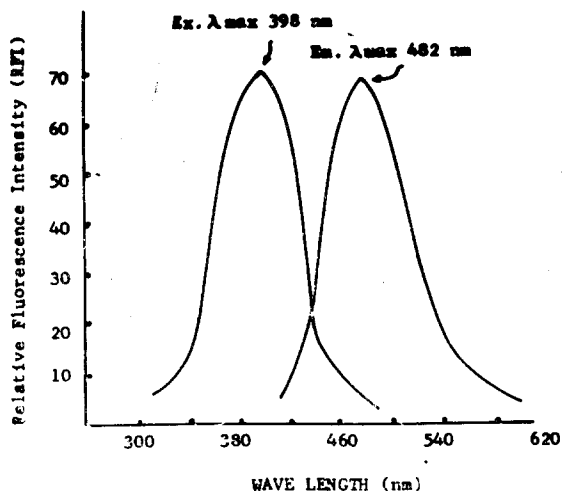


Fig. 1—Fluorescence excitation and emission spectra of gentamicin sulfate reacted with reagents.

試液 濃度의 決定—pyridoxal hydrochloride의 濃度는 zinc acetate 및 pyridine의 濃度를 一定하게 維持시키고 pyridoxal hydrochloride의 濃度를 變化시킬 때 Fig. 2에 表示된 바와 같이 pyridoxal hydrochloride의 濃度가 0.002 w/v%에서 最大螢光을 나타내며 그 以下 또는 以上의 濃度에서는 螢光強度가 현저히 減少하였다. 따라서 pyridoxal hydrochloride의 濃度를 最大螢光을 發하는 0.002 w/v%로 定하였다.

zinc acetate의 濃度는 위와 마찬가지로 方法으로 zinc acetate의 濃度를 變化시킬 때 0.2 w/v%에서 最大螢光을 發하였으며 그 以上의 濃度에서도 螢光은 더 以上 增加하지 않았으므로 zinc acetate의 濃度를 0.2 w/v%로 定하였으며 이를 Fig. 3에 나타

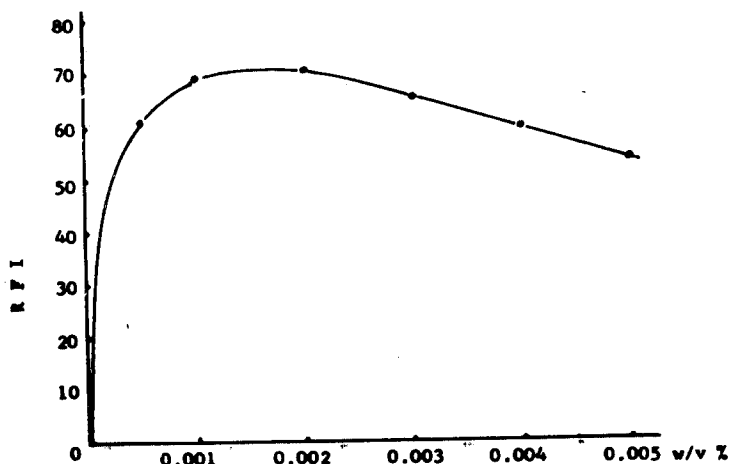


Fig. 2—Effect of concentration of pyridoxal hydrochloride in gentamicin sulfate solution (40 $\mu\text{g/ml}$).

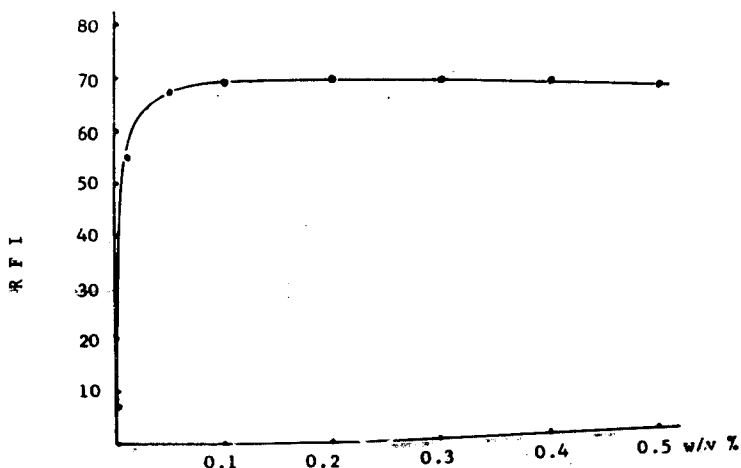


Fig. 3—Effect of concentration of zinc acetate in gentamicin sulfate solution (40 $\mu\text{g/ml}$).

내었다.

pyridine의 농도변화에 따른 螢光強度의 변화는 Fig. 4와 같이 pyridine의 농도가 2.0 w/v% 이상에서 一定한 最大螢光을 發하므로 2.0 w/v%로 決定하였다.

反應條件—反應時間 및 溫度는 이 反應에 있어서 나타난 螢光이 不安定하므로 螢光을 安定化시켜 이에 따른 誤差를 最少化하기 위하여 다음과 같은 實驗을 하였다. 反應時間 및 溫度에 따른 螢光의 變化를 보면 Fig. 5와 같이 室溫에서 反應시킨 경우 계속적인 螢光強度의 上昇을 나타냈으며, 40°로 加溫 反應시키면 1~2時間 사이에서 거의 一定한 螢光을 나타냈다.

放置時間 및 溫度는 40°에서 90分間 反應시킨 後 測定時의 溫度를 5~10°, 10~15°, 15~20°로 一定時間 維持시키고 이에 따른 螢光強度의 安定性을 본 結果 5~15°에서 安定하게 나타났

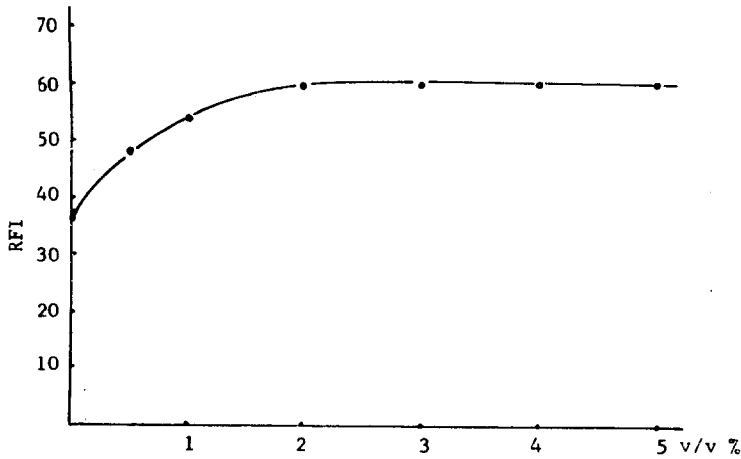


Fig. 4.—Effect of concentration of pyridine in gentamicin sulfate solution (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

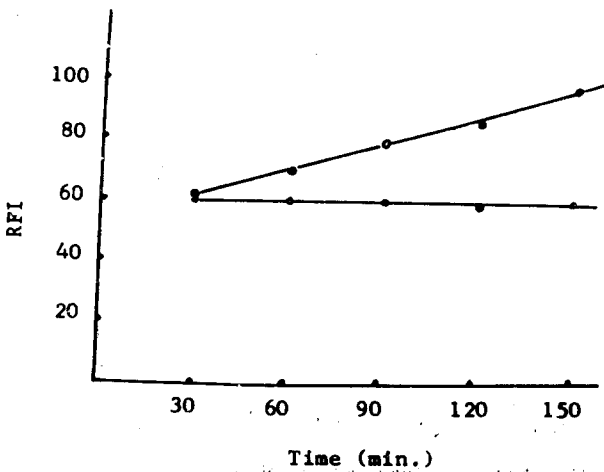


Fig. 5—Effect of reaction time at room temperature(—○—) and 40°(—●—).

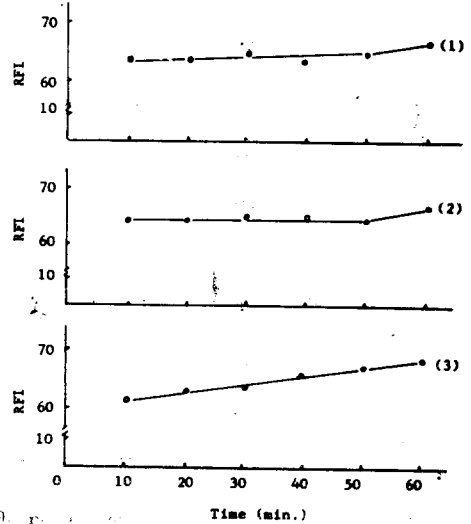


Fig. 6—Relationship between standing time and relative fluorescence intensity at various temperatures: (1) 5~10° (2) 10~15° (3) 15~20°

으나 操作의 便宜上 10~15°로 택하였다(Fig. 6).

螢光의 安定性은 Fig. 5(—●—)와 Fig. 6의 (2)로부터 40°에서 90分間 反應시키고 10~15°로 放置시켜 螢光을 測定할 때 放置時間에 따른 螢光의 安定性을 본 結果 Fig. 7과 같이 20~80分 사이에서 매우 安定한 螢光을 나타냈다.

檢量線—以上的 結果로부터 反應條件을 40°, 90分間 加溫하여 反應시키고, 10~15°로 30分間 冷却시킨 後 螢光을 測定하는 것으로 定하였다.

위의 條件으로 gentamicin sulfate의 濃度에 따른 螢光強度의 變化에 대한 檢量線을 그린 結果 Fig. 8과 같이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 사이의 濃度에서 直線關係가 成立되었다.

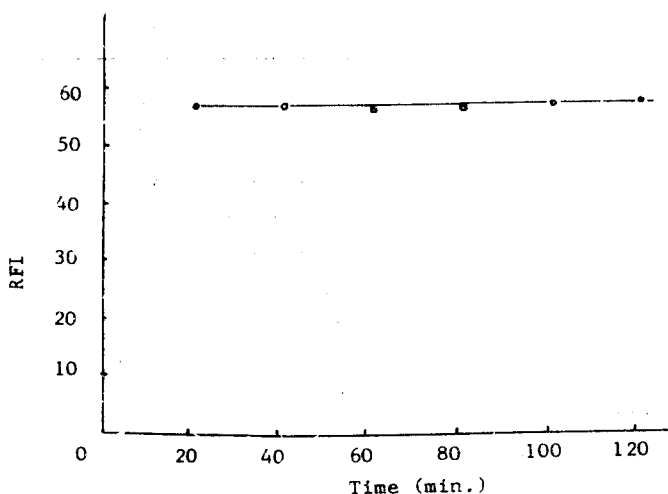


Fig. 7—Effect of standing time, reaction condition: 40° for 90 min., standing temperature: 13°

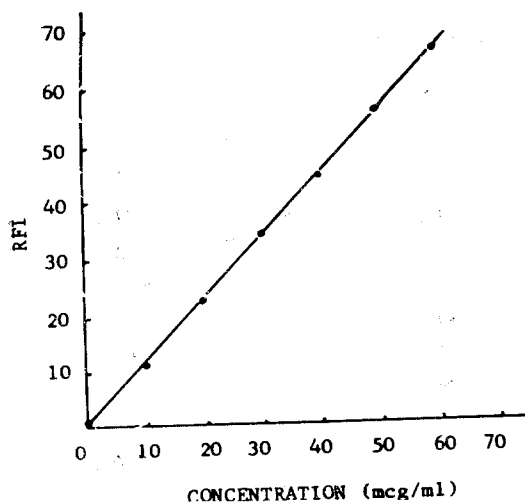


Fig. 8—Calibration curve of gentamicin sulfate.

Table 1—Microbiological and proposed methods comparison for the pure gentamicin sulfate

Sample	Percent by weight of components			Microbiological method	Proposed method
	C ₁	C ₂	C _{1a}	Potency*	Potency*
Bulk A	—	—	—	594	591
Bulk B	—	—	—	582	603
Bulk C	—	—	—	600	607
Bulk D	—	—	—	600	601
Bulk E	36.2	41.8	22.0	582	582
Bulk F	34.8	43.8	21.4	600	624
Bulk G	35.5	42.8	21.7	582	592
Bulk H	35.7	42.5	21.8	573	609

* In micrograms of base per milligram of gentamicin sulfate

製劑에의 應用——精製된 pure gentamicin sulfate 에 대하여 生物學의 方法과 化學의 方法(提示된 方法)에 의해 分析한 結果를 Table 1에 表示했다. Table 1에서 보는 바와 같이 生物學의 方法이 化學의 方法과 거의 비슷하거나 대체로 약간 낮은 力價를 나타냈으며 gentamicin sulfate C₁, C₂, C_{1a}의 組成에 따른 影響을 檢討하였으나 위와 마찬가지로의 結果를 얻었다.

粗 gentamicin 을 精製時 使用되는 active carbon 의 螢光強度에 對한 방해여부를 檢討하기 위하여 任意의 檢體를 調劑하여 以上에서 檢討한 proposed assay method 와 따로 microbiological assay¹⁾를 하여 比較한 것을 Table II에 表示했으며, carbon 이 混在되어도 螢光에 거의 影響이 미치지 않음을 알 수 있다. 반면, bioassay에 의한 方法은 plus 방해를 받으며 그 정도는 약 5%

Table II—Recovery of gentamicin sulfate from sample containing carbon

Sample	Recovery(%)	
	(A)	(B)
Gentamicin sulfate(50 mg*)	99.7	105.8
Carbon(50 mg)	98.2	107.6

* as activity

(A) Proposed method

(B) Microbiological method

以上임을 알 수 있다.

gentamicin sulfate를 製劑化시킬때 軟膏劑 및 注射劑에 使用될 수 있는 添加劑들 各各에 대하여 이의 混在時 螢光強度에 미치는 影響을 Table III에 表示하였다. 添加劑가 水溶性物質인 경우에는 이의 混在時에도 전혀 螢光強度에 影響을 주지 않았으며 親油性인 添加劑도

Table III—Effect of other materials in determination of gentamicin sulfate

Other Materials	mg/1.0 mg of Gentamicin Sulfate	Average Recovery*
EDTA	10.0	100.4
Malic acid	1.0	100.0
Tartaric acid	1.0	99.6
Citric acid	1.0	100.2
Sod. bisulfite	1.0	100.6
Cetyl alcohol	40.0	100.0
Stearyl alcohol	40.0	99.4
Methyl paraben	2.0	97.7
Propyl paraben	5.0	97.4
Tween 60	20.0	97.4
Propylene glycol	150.0	99.2
Glycerine	100.0	101.6

* Each result is the average of 4 experiments.

Table IV—Determination of gentamicin sulfate in artificial preparations

Component	Declared mg/unit				
	Ointment		Injection		
	A	B	C	D	
Gentamicin sulfate(activity)	10.0	10.0	200.0	500.0	
EDTA	1.0	1.0	50.0	20.0	
Cetyl alcohol	40.0	—	—	—	
Stearyl alcohol	—	40.0	—	—	
Citric acid	0.1	0.1	0.1	—	
Span 60	—	20.0	—	—	
Tween 60	20.0	—	—	—	
Sodium bisulfite	—	—	320.0	200.0	
Mineral oil	60.0	—	—	—	
Propylene glycol	—	15.0	—	—	
Methyl paraben	2.0	—	180.0	—	
Propyl paraben	—	0.5	—	50.0	
Purified water	sufficient to make 1.0g	1.0g	100.0 ml	100.0 ml	
Found mg/unit	Proposed method	9.9	10.1	197.2	502.0
	microbiological Method	10.2	10.3	202.0	515.0
Recovery (%)	Proposed method	99.0	101.0	98.6	100.4
	microbiological Method	102.0	103.0	101.0	103.0

Table V—Representative commercial pharmaceutical products assayed for gentamicin sulfate by proposed and microbiological methods

Sample	Declared* mg/unit	Found(mg)		Recovery(%)	
		Proposed	Microbiological	Proposed	Microbiological
Ointment A	1.0/1 g	1.03	0.97	103.0	97.0
B	1.2/1 g	1.18	1.17	98.3	97.5
Injection C	80/2 ml	79.28	81.20	99.1	101.5
D	80/2 ml	80.00	82.40	100.0	103.0

* as activity

대체로 影響을 미치지 않았으나 일부는 過量을 添加할 경우 약간의 방해를 하므로 이를 分離除去하면 定量이 可能하다.

gentamicin sulfate 製劑中 軟膏劑와 注射劑에 대하여 Table III을 基礎로 하여 製造한 製劑 및 市販되고 있는 製劑에 대해 microbiological assay 와 比較 檢討한 바를 Table IV와 Table V에 表示하였으며 여기에 提示한 方法과 microbiological assay에 있어 거의 같은 結果를 얻었다.

結 論

gentamicin sulfate 의 定量法으로는 앞에서 提示한 螢光分析法으로 分析이 可能하며 gentamicin sulfate 製劑인 注射劑, 軟膏劑등의 應用에도 간단히 使用될 수 있다고 思料된다.

文 獻

1. 大韓民國 保健社會部, 大韓 抗生物質 醫藥品 基準, 1976.
2. M. Maeda, M. Ikeda and A. Tsuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1094 (1976).
3. M. Maeda, T. Kinoshita and A. Tsuji, *Anal. Biochem.*, **38**, 121 (1970).
4. M. Maeda and A. Tsuji, *Anal. Biochem.*, **52**, 555 (1973).
5. M. Maeda and A. Tsuji, *Yakuzai-gaku*, **32**, 138 (1972).