

박충크로마토그래피 및 농도측정법에 의한 Ampicillin Trihydrate 中の N, N-Dimethylaniline 의 檢索

李 王 圭 · 金 博 光 · 沈 昌 求

서울대학교 藥學大學

Detection of N, N-Dimethylaniline in Ampicillin Trihydrate
by Thin Layer Chromatography and Densitometry

Wang Kyu Lee, Bak-Kwang Kim and Chang Koo Shim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151

Abstract-A simple and convenient method of detecting N, N-dimethylaniline (D. M. A.) residues in ampicillin trihydrate (A. T.) was established. D. M. A. was extracted by chloroform from the chloroform pre-saturated N/10-ammonia water solution of A. T. and chromatographed on silica gel G thin layer. Blue spot appeared in 15minutes after spray of 2, 6-dichloroquinonechlorimide solution was compared with the blue spot of reference concomitantly processed. The developing solvent was prepared by mixing equal volume of cyclohexane and chloroform.

To quantitate the amount of D. M. A. in A. T., T. L. C. was performed with the Eastmann Chromatogram sheet, then color density was measured by Cosmo Superclick densitometer. The developing solvent at this time was cyclohexane-chloroform (3+7) mixture. The peak areas obtained with the amount of D. M. A. ranging from 0.05 to 2.0 μg were linear to color density. Better sensitive results would be available with the densitometer equipped with monochromator.

ampicillin trihydrate(A. T.)의 合成時에 晶出溶媒로 쓰이는 N, N-dimethylaniline(D. M. A.)은 沸點(192~194°C)이 높아 乾燥에 의해 完全히 揮散되지 못하고 最終製品에 殘留하는 일이 있다.

그런데 D. M. A.는 有毒한 物質로써 最近 몇몇 外國에서는 A. T. 中の 殘留 D. M. A.의 量이 一定量 以下일 것을 要求하고 있는 실정이다.

D. M. A.의 定性法으로는 paper chromatography^{1,2)}, thin layer chromatography³⁾, gas chromatography⁴⁾에 의한 方法과 nitro 化法⁵⁾, formylation 法⁶⁾ 등의 spot test 法 等도 報告되어 있으나 A. T. 中の 殘留 D. M. A.를 檢索, 定量하는 法에 對해서는 아직 報告가 없다.

著者等은 A. T. 中の 殘留 D. M. A.의 量을 簡便히 알아낼 수 있는 純度試驗法을 確立하여 A. T.의 品質管理에 應用될 수 있도록 하였다.

그 方法으로는 우선 thin layer chromatography(T. L. C.)에 의해 A. T. 中の D. M. A. 量이 一定量(여기서는 例로 10ppm을 들었음) 以下인가 與否를 判定한 다음 近來에 아미노산⁷⁾, ephedrine⁸⁾, erythromycin⁹⁾의 定量等に 널리 應用되고 있는 densitometry에 의해 그 量을 定量코자

시도하였던 바 매우 간편하고 良好한 結果를 얻었다.

實驗方法

試藥 및 試料—silica gel G(E. Merck 7731), chloroform(和光一級), N,N-dimethylaniline (Hayashi 一級), cyclohexane(和光一級), 2,6-dichloroquinonechlorimide(E. Merck 分析用), decalin(和光一級), ampicillin trihydrate(市販品).

機器 및 器具—densitometer(Cosmo Super Click D-101-B), Eastmann Chromatogram Sheet(20 × 20cm²),

D. M. A. 의 抽出(檢液의 調製)—A. T. 10g 을 精稱하여 分액여두에 넣고 chloroform 이 飽和된 0.1N-NH₄OH 約 20ml 로 完全히 溶解시킨 다음 chloroform 10, 5, 4ml 로 3 회 抽出하여 全 chloroform 층을 합친 후 chloroform 을 加하여 精確히 20ml 가 되게 하여 T. L. C. 用 檢液으로 하였다.

標準液의 調製—D. M. A. 標準品 一定量을 取해 5ug/ml 가 되도록 chloroform 으로 稀釋한 液을 T. L. C. 用 標準液으로 하였다.

Thin Layer Chromatography—micropipet 을 써서 T. L. C. 用 標準液 및 檢液 各 100μl 적을 T. L. C. plate(silica gel G 0.25cm) 上에 spotting 하고 cyclohexane + chloroform 混液(5+5)으로 展開시킨 다음 2,6-dichloroquinonechlorimide 의 cyclohexane 용액(0.5%)을 分무하여 發色시켰다. 約 15分 後 檢液에 의한 靑色班點의 深度가 標準品の 그것보다 크던 A. T. 中의 殘留 D. M. A. 의 量은 10 ppm 을 超過한 것이다.

Densitometry—上記 T. L. C. 用 표준액 및 검액 일정량을 취해 70°C 의 항온조에서 chloroform 을 휘산시킴으로서 精確히 10 배 농후하게 만든 液을 各各 10μl 적 Eastmann sheet 에 約 5cm 간격으로 spotting 한 후 cyclohexane + chloroform 混液(3+7)으로 展開하고 上記 T. L. C. 와 同一하게 發色시켰다. 約 15分 후 표준액 및 검액에 의한 班點이 한꺼번에 포함되도록 sheet 를 切斷하여 densitometer 에 걸고 color density 를 recording 하였다. 계산은 recording 된 chart 의 peak area 比로부터 다음과 같이 시행하였다. peak area 는 peak 에 의해 占有된 chart 上의 칸수로 부터 구하였다.

$$X = \frac{A_T}{A_S} \times 5(\mu\text{g/ml}) \times \frac{V(\text{ml})}{W(\text{g})}$$

X: D. M. A. 의 상대量(ppm)

A_S: 표준액에 의한 Chart 面積

A_T: 검액에 의한 Chart 面積

V: 검액의 부피(ml)

W: 검액 Vml 조제시 사용된 A. T. 의 量(g)

結果 및 考察

D. M. A. 의 抽出—A. T. 는 물 또는 酸, 有機溶媒에 難溶 또는 不溶이며 alkali 中에서도 ammonia 水에만 가장 잘 溶解되었으며 그 농도는 0.1N 로서 충분하였다. 그러나 미리 chloroform 을 포화시켜놓지 않은 ammonia 水를 사용했을 경우에는 densitometry 에서 그 color density 가 一定하지 않았기 때문에 chloroform 을 포화시켜 사용하였다. 이는 chloroform 을 포화시키지 않

은 ammonia 水에 A. T. 를 녹이고 chloroform 으로 抽出하면 일단 chloroform 에 녹은 D. M. A. 가 미량이나마 암모니아水층에 混入되어 chloroform 에 의한 抽出이 不完全해진다 고 사료되었기 때문이다. 또 이 條件에서 10, 5, 4ml 로 3회 抽出한 것과 다시 10ml 씩으로 2회 더 抽出한 것의 color density 의 차가 없음을 볼 때 上記와 같이 3회 抽出로 충분하다고 사료된다.

展開溶媒의 영향—cyclohexane 만을 使用하면 $R_f \approx 0$ 이고 chloroform 만을 使用하면 $R_f \approx 1$ 이므로 두 溶液을 混合하여 使用하였다. 手製한 T. L. C. plate 의 경우에는 cyclohexane + chloroform = 5+5 가 적합하였고 Eastmann plate 에서는 3+7 이 良好하였다. 이 때 D. M. A. 以外에는 斑點을 漏하는 物質이 없었다.

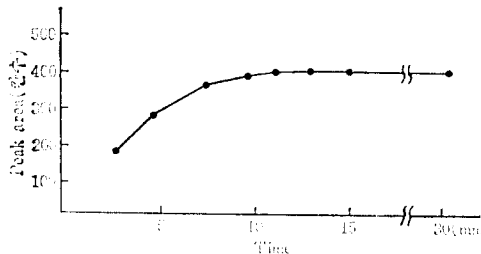


Fig. 1—Effect of time on color intensity.

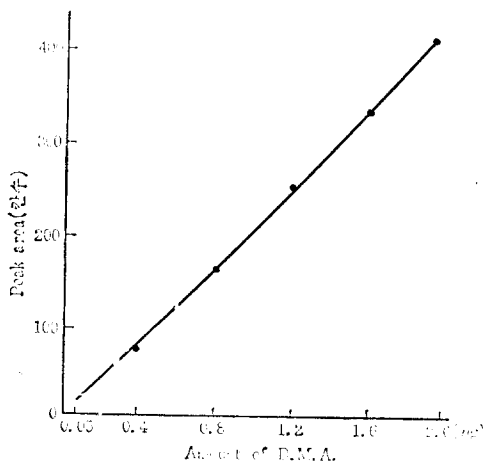


Fig. 2—Calibration curve for D. M. A.

發色時間의 영향—展開 後 發色劑를 분무한 뒤 densitometer 를 使用하여 發色時間의 影響을 調査한 바는 Fig. 1 과 같았다. 따라서 發色劑 분무 후 約 15分 後에 육안으로 또는 densitometer 로 color density 를 측정함이 적당하리라 사료된다.

定量 範圍—농도가 각기 다르게 調製한 標準 D. M. A. 의 chloroform 溶液 10μl 씩을 Eastmann sheet 에 點滴하고 上記 densitometry 에 준하여 color density 를 測定한 結果 Fig. 2 와 같이 0.05~2.0μg 사이의 D. M. A. 의 量에 대해서는 良好한 直線을 나타내었다. 實際적으로 조사필요성이 없는 2.0μg 以上에 對해서는 檢討해보지 않았다. 따라서 本法에서 처럼 約 0.5μg 의 D. M. A. 는 良好한 直線性 範圍안에 들어 定量 可能함을 알았다. 同一 檢液에 對해 同一한 方法으로 5회 定量한 結果는 Table I 과 같다.

結 論

A. T. 中の D. M. A. 量이 10ppm 以下인 가 여부를 T. L. C. 로 간단히 判定할 수 있었으며 densitometry 에 의해 그의 定量도 可能하였다.

本法中 T. L. C. 法은 A. T. 의 純度試驗法으로서 實務에 그대로 應用 가능하리라 사료되며 densitometry 는 gas chromatography 에 비하여 精度가 다소 뒤떨어질 것이 豫想되나 純度試驗의 目的으로는 충분히 實用 價値가 있음은 물론 monochromator 가 장치된 densitometer 를 使用하면 매우 良好한 精度의 定量도 가능하리라 생각된다.

Table I—Analytical results

Sample	Data (ppm) obtained						S*
	1st	2nd	3rd	4th	5th	Mean	
A. T.	4.92	5.05	5.01	4.90	4.88	4.95	0.0074

*S: standard deviation.

아울러 國內에서도 A. T. 中の D. M. A. 양을 규제함이 바람직하다고 사료된다.

文 獻

1. J. Neseck, and Gasparic, *J. Chromatogr.*, **32**, D 11(1968).
2. L., Reio, *J. Chromatogr.*, **47**, 60(1970).
3. J. H., Ross, *Anal. Chem.*, **60**, 2140(1968).
4. A. T., James, *Anal. Chem.*, **28**, 1564(1956).
5. F. Feigl, *Spot test in Organic Analysis*, 6th Eng. Edition, **1960** p-483.
6. F. Feigl and E. Jungreis, *Analyst*, **83**, 669(1958).
7. 山本裕志外, *分化*, **23**, 1016 (1974).
8. 布浦由樹, 岩上正藏, *厚生科學研究報告*(1974).
9. C. Radecka *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 430(1972).