

NMR Spectroscopy에 의한 Sulfonamide의 定量

朴萬基·金成璟·李淑淵*

서울대학교 藥學大學·淑明女子대학교 藥學大學*

(Received August 21, 1984)

Determination of Sulfonamides by NMR Spectroscopy

Man Ki Park, Sung Kyeong Kim and Sook Yeon Lee*

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

*College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul 140, Korea

Abstract—A rapid and accurate NMR procedure for the analysis of a mixture of sulfametrol, sulfalene and sulfameter in $CDCl_3$ and dimethylsulfoxide- d_6 was developed. Thioacetamide was used as an internal standard. The signals chosen for the analysis were a singlet of 4.03ppm due to the methoxyl group of sulfametrol, a singlet of 3.98ppm due to the methoxyl group of sulfalene and a singlet of 3.83ppm due to the methoxyl group of sulfameter. The quantification of the characteristic peak was done by the integration method and the peak height method. The variation coefficient of sulfametrol, sulfalene and sulfameter were 1.7($n=6$), 1.7($n=6$) and 1.4%($n=6$), respectively in the peak height method and 8.9($n=6$), 9.4($n=6$) and 7.0($n=6$), respectively in the integration method.

Sulfonamide는 *p*-aminobenzenesulfonic acid의 amide이며 중요한 抗菌劑이다. 지금까지 sulfonamide의 定量법으로 GC¹⁾, HPLC²⁻⁴⁾, UV⁵⁾, GC-MS⁶⁾, colorimetry^{7,8)}, luminescence,⁹⁾ fluorescence,¹⁰⁾ titration¹¹⁾을 이용한 定量법이 보고되었다.

최근 약물이 복잡해지고 複合劑가 점점 발달함에 따라 藥物의 신속하고 간편한 分析法이 절실히 요구되어지고 있다. 이에 따라 NMR spectroscopy에 의한 藥物의 定量分析이 시도되어 왔다.

鎮痛劑 및 鎮痙劑¹²⁾, meprobamate¹³⁾, chloralhydrate¹⁴⁾, acetazolamide¹⁵⁾, pentylene tetrazol¹⁶⁾, aspirin·phenacetin·caffeine복합제¹⁷⁾, aminophyllin·cloxacillin복합제¹⁸⁾ 등의 NMR spectroscopy를 이용한 定量법이 보고되었다. 1972년에 Turczan¹⁹⁾ 등이 NMR spectroscopy를 이용한 sulfonamide의 分析을 시도하여 21개 sulfonamide의 NMR spectra가 발표되었고 NMR spectroscopy를 이용한 sulfonamide의 정성 定量분석이 보고²⁰⁻²²⁾된 바 있다. 그중, Rodriguez²⁰⁾는 錠劑 및 散劑 중의 trimethoprim과 sulfamethoxazole을 定量하였고 NMR을 이용한 分析에서는 混合物중의 각 分析 peak가 각각 0.3ppm이상 분리되어야 한다고 보고하였다.

본실험에서는 구조에 methoxyl기를 지닌 sulfametrol, sulfalene과 sulfameter를 實驗物質로 선택하였다. sulfametrol, sulfalene과 sulfameter의 分析 peak로는 3물질의 methoxyl기에 기인한 4.08ppm, 3.93ppm과 3.83ppm의 singlet을 이용하여 적분법과 peak 높이법으로 定量하여 우수한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

實驗方法

試料 및 試藥—Sulfametrol, sulfalene, sulfameter는 의약품 원료를 사용하였다. Maleic acid,

malonic acid 및 thioacetamide(Wako Pure Chem Co.)는 市販 특급시약을 사용하였으며 dimethyl sulfoxide-d₆와 CDCl₃(E.Merck)는 NMR spectroscopy용을 사용하였다.

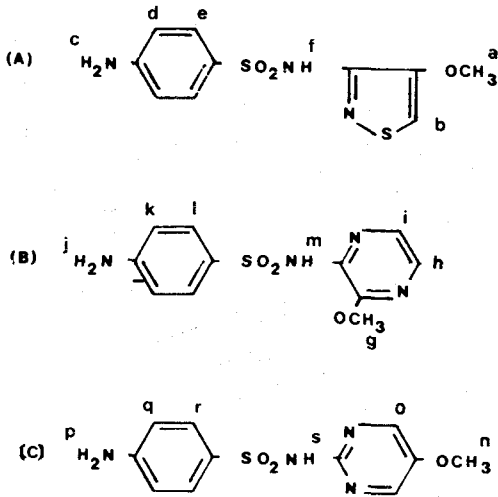
裝置—NMR spectroscopy는 Perkin Elmer R32 Spectromer(90MHz)를 사용하였다.

實驗方法—Sulfametrol, sulfalene과 sulfameter 각각을 3, 5, 10, 15mg씩 정확히 취한 시료 및 3物質을 4~10mg 범위로 同量씩 정확히 혼합한 시료를 NMR cell에 옮긴 후, 내부표준물질인 thioacetamide 동일당량을 加하여 2~3滴의 DMSO-d₆를 加해 완전히 녹이고 TMS를 含有한 CDCl₃를 加하여 0.4ml로 한 뒤 NMR로 측정하였다. 모든 peak의 field 위치는 TMS를 0ppm으로 한 deltascale에 준하였다. 分析에 이용한 각 peak는 적분강도와 peak 높이를 測定하였고 적분강도는 5회 이상 測定하여 平均值를 이용하였다. Sulfametrol, sulfameter와 sulfalene의 定量적 계산은 Shin¹⁸⁾등의 方法을 사용하였다.

內部標準物質의 選定—Maleic acid, malonic acid 및 thioacetamide를 약 5mg씩 취하여 2~3滴의 DMSO-d₆를 가하고 TMS를 함유한 CDCl₃ 용액을 넣어 0.4ml로 한뒤 NMR로 측정하였다.

實驗結果 및 考察

NMR 스펙트럼—實驗物質을 3mg씩 정확히 취하여 얻은 NMR spectrum의 signal과 noise 比率이 分析에 이용할 만큼 충분히 커서 3mg 이상의 實驗物質을 취하였다. Scheme I에 표시된 바와 같은 구조를 지닌 sulfametrol, sulfalene, sulfameter의 각 proton의 chemical shift를 Table I에 나타내었다. Fig. 1은 위의 3物質의 混合液의 NMR spectrum이며 sulfametrol, sulfalene,



Scheme I- Structure of sulfametrol (A), sulfalene (B) and sulfameter (C).

Table I—Chemical shifts of sulfametrol, sulfalene and sulfameter

Sulfametrol	Sulfalene	Sulfameter
a 4.08	g 3.98	n 3.83
b 7.75	h 7.60	o 8.22
c 3.72	i 7.69	p 2.90
d 6.88	j 3.15	q 6.67
e 7.80	k 6.68	r 7.78
f broad	l 7.80	s 5.06
	m 5.40	

sulfameter의 methoxyl기에 기인한 peak가 각각 4.08, 3.98, 3.83ppm에서 나타났다. 위의 3peak를 2.36ppm에 나타난 thioacetamide의 methyl기 peak와 비교하여 定量하였다.

內部標準物質 및 溶媒의 選定—內部標準物質로서 檢討한 maleic acid는 6.31, 12.40ppm, malonic acid는 3.21, 2.01ppm, thioacetamide는 2.36, 9.13ppm에서 peak가 나타났다. 이 peak들중에서 sulfa劑 分析에 이용할 수 있는 singlet peak로서 maleic acid는 6.31ppm, malonic acid는 3.21ppm, thioacetamide는 2.36ppm으로서, 이중 6.31ppm은 Scheme I에 표시된 d, k, q의 proton에

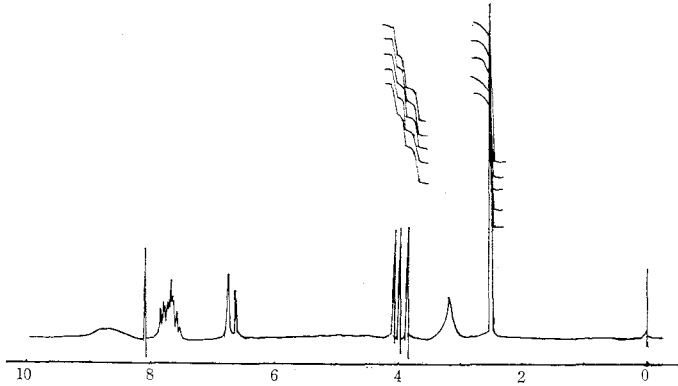


Fig. 1—The NMR spectrum of a mixture of sulfamer, sulfalene and sulfametrol with thioacetamide (internal standard).

기인하는 peak와 매우 근접되어 있고, 3.21ppm은 j의 proton에 기인하는 peak와 거의 겹치므로 内部標準物質로 사용하기 곤란하였다(Table I). 그러나 thioacetamide에서 나타나는 peak 2.36 ppm은 이와 가장 근접된 peak인 p의 proton에 기인하는 2.90ppm과 0.54ppm의 차이가 나므로 thioacetamide를 内部標準物質로 선정하였다.

溶媒는 $CDCl_3$ - $DMSO-d_6$ (40 : 1)의 混合液이 試料 및 内部標準物質을 잘 용해시키며 試料의 methoxyl proton에 기인하는 peak와 内部標準物質의 methyl proton에 기인하는 peak를 적절한 간격으로 분리시키므로 溶媒로 선정하였다.

檢量線—NMR spectrometer를 이용하여 sulfametrol, sulfalene과 sulfameter가 溶媒 0.4ml중에 3~15mg 함유된 범위에서 作成하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이 각 檢量線은 이 범위에서 좋은

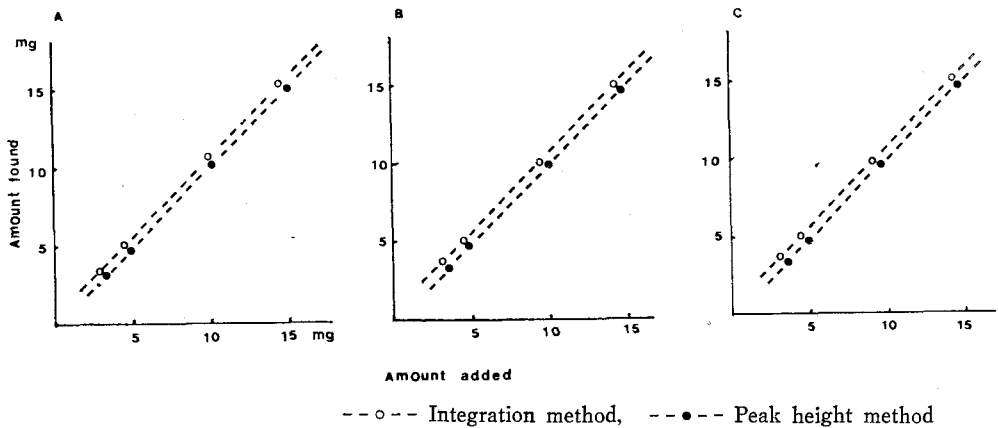


Fig. 2—Calibration curves of sulfametrol(A), sulfalene(B) and sulfameter(C).

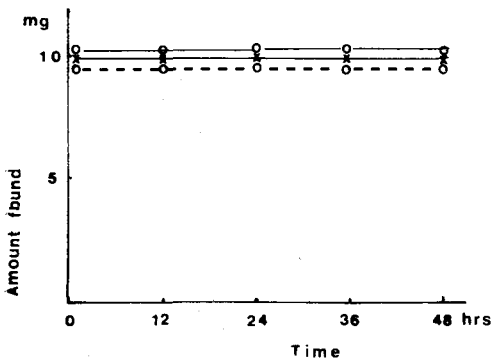


Fig. 3—Stability of NMR peak height. sulfametrol (x—x), sulfalene (o—o), sulfameter (O—O).

Table II—Recovery(%) of sulfametrol, sulfalene and sulfameter from individual samples.^{a)}

Drugs	Integral method	Peak height method
Sulfametrol	99.3(2.5) ^{b)}	101.0(1.2) ^{b)}
Sulfalene	100.7(1.5)	100.5(2.0)
Sulfameter	99.8(1.9)	100.2(1.6)

a) n=6, b) variation coefficient (%).

같이 peak 높이법과 적분법의 정확도는 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 혼합액 중의 인접한 peak를 分析 peak로 이용할 경우 recovery 평균치와 표준편차로부터 생각해 볼 때 peak 높이법이 좀 더 정확하였다.

Table III—Recovery(%) of sulfametrol, sulfalene, sulfalene and sulfameter from the mixture of them.

Run	Sulfametrol		Sulfalene		Sulfameter	
	Integral	Peak height	Integral	Peak height	Integral	Peak height
1	110.0	98.3	110.1	99.7	113.0	102.1
2	106.0	97.8	108.3	98.2	109.9	100.9
3	97.7	100.0	102.4	100.2	105.6	101.6
4	96.4	99.4	91.8	98.0	94.6	100.3
5	120.4	102.3	120.0	102.5	116.7	102.2
6	115.7	97.9	116.7	98.0	109.3	103.5
\bar{x}	107.9	99.3	108.2	99.4	108.2	101.7
SD	8.9	1.7	9.4	1.7	7.0	1.4

直線性を 나타내었다. 각 proton의 相對強度는 sulfametrol을 기준으로 하였을 때 integral法에 의해서는 sulfalene이 0.95, sulfameter가 0.98이었으며, peak 높이法에 의해서는 sulfalene이 0.99, sulfameter가 0.96으로 나타나 NMR에 의한 定量分析이 가능함을 나타내고 있다.

經時變化 安定性—混合溶液을 12시간마다 48시간까지 peak height를 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 48hr까지 관찰한 결과 경시변화 없이 안정하였다.

定量結果—Sulfametrol, sulfalene과 sulfameter 各溶液과 混合液을 NMR spectrometer로 정량한 결과를 Table II와 Table III에 나타내었다. Peak 높이법과 적분법을 이용하여 그 결과를 비교하였다. 混合液의 NMR spectrum에서 적분치는 두 peak 사이의 중앙에서 수직으로 선을 그어 적분선과 만나는 점까지의 값을 읽었다. 각각의 표준액의 경우 Table II에 나타난 recovery 평균치와 표준편차의 결과와

結 論

NMR을 이용한 sulfonamide의 분석에서 적분법과 peak 높이법을 사용하여 양호한 정량 결과를 얻었으며 앞으로 본방법을 sulfonamide의 신속 간편한 정량법으로 널리 적용할 수 있으리라 사료된다.

文 獻

1. M. Arthur and S. William, GLC determination of sulfamethazine in swine and cattle tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 794 (1981).
2. R. Robert, HPLC determination of sulfisoxazole in pharmaceuticals and separation patterns of other sulfonamides. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 851 (1981).
3. P.H. Cobb and G.T. Hill, HPLC of some sulfonamides. *J. Chromatogr.* **123**, 444 (1976).
4. R.C. Doerr, N. Parris and O.W. Park, Determination of sulfanilic acid in the presence of sulfanilamide and some sulfa drugs by reversed-phase ion-pair HPLC. *J. Chromatogr.* **196**, 498 (1980).
5. K.S. Kim, A study on the direct spectrophotometric determination of sulfa drugs. *Report of KIH, Korea* **17**, 435 (1980).
6. W.J. Irwin and J.A. Slack, Pyrolysis GC-Mass spectrometric study of medicinal sulfonamides. *J. Chromato.* **139**, 364 (1977).
7. H.A. Elobeid and A.I. Jado, A new colorimetric assay of sulfonamides in pharmaceutical formulation. *Anal. Lett.* **14**(B2), 129 (1981).
8. R.G. Shepherd, A specific analytical method for certain pyrimidines. *Anal. Chem.* **20**, 1150 (1948).
9. J.W. Bridges, L.A. Gifford, W.P. Hayes and J.N. Miller, Luminescence properties of sulfonamides drugs. *Anal. Chem.* **46**, 1010 (1974).
10. R.J. Sturgeon and S.G. Schulman, Fluorimetric determination of arylamides by coupling with N-(1-naphthyl) ethylenediamine. *Anal. Chim. Acta.* **75**, 225 (1975).
11. J.E. Fritz, A specific analytical method for certain pyrimidines. *Anal. Chim. Acta.* **10**, 413 (1954).
12. G.A. Neville, Application of proton magnetic resonance spectroscopy to pharmaceuticals. I. Analgesics. *Can. Spectr.* **14**, 44 (1969).
13. J.W. Turczan and T.C. Kram, Determination of meprobamate in tablets by NMR. *J. Pharm. Sci.* **56**, 1643 (1967).
14. J.W. Turczan and B.A. Goldwitz, Determination of chloral hydrate in soft gelatin capsules by NMR. *J. Pharm. Sci.* **61**, 613 (1972).
15. J.W. Turczan, Determination of acetazolamide and its sodium salt in various dosage forms. *Anal. Chim. Acta* **68**, 395 (1974).
16. J.W. Turczan and B.A. Goldwitz, Determination of pentylenetetrazol in tablets and injectables by NMR. *J. Pharm. Sci.* **61**, 1309 (1972).
17. D.P. Hollis, Quantitative analysis of aspirin, phenacetin and caffeine mixture by NMR. *Anal. Chem.* **35**, 1682 (1963).
18. M.H. Shin, M.K. Park, Determination of ampicillin and cloxacillin mixture by NMR. *Arch. Pharm. Res.* **4**, 9 (1981).
19. J.W. Turczan, T. Medwick, Identification of sulfonamides by NMR spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* **61**, 434 (1972).
20. M.R. Rodriguez, M.T. Pizzorno and S.M. Albonico, NMR determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in tablets and powders. *J. Pharm. Sci.* **66**, 121 (1977).
21. H. Lackner, G. Doering and K. Garre, NMR spectrometric identification of sulfonamides from urine. *Forensic Sci.* **4**, 291 (1974).
22. C.J. Chang, H.G. Floss and G.E. Peck, Carbon-13 magnetic resonance spectroscopy of drugs. *J. Med. Chem.* **18**, 505(1975).