

GC/FPD를 이용한 β -락탐系 抗生物質의 分析(II)

朴萬基 · 曹榮鉉 · 楊貞善 · 朴政一

서울대학교 藥學大學

(Received June 21, 1984)

Determination of β -Lactam Antibiotics by Gas-Chromatography with Flame Photometric Detector (II)

Man Ki Park, Yung Hyun Cho, Jeong Seon Yang and Jeong Hil Park

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

Abstract—For gas chromatographic determination with the sulfur-specific flame photometric detector, nine β -lactam antibiotics without α -amino group were esterified with methyl iodide and eight β -lactam antibiotics with α -amino group were esterified with borontrifluoride-methanol complex and then N-benzoylated with benzoyl chloride. The gas chromatographic separation of these products was successfully carried out on various silicon polymers (OV-1, OV-101, OV-17, OV-225, and QF-1) coated on the acid washed, silanized diatomite. The structure of the esterified and N-benzoylated product was confirmed by mass spectrometer.

저자들은 前報¹⁾를 통하여 페니실린과 세팔로스포린을 알칼리성에서 methyl ester로 만든 후 이들을 含硫黃醫藥品에 대해 高感度 特異性을 지닌 炎光光度檢出器—가스크로마토그래피(GC/FPD)로 분리분석한 예를 보고한 바가 있다. 이들 methyl ester 유도체들을 fluorinated silicon 重合體인 QF-1으로 분석하였을 때 몇가지 유도체들이 잘 분리되지 아니한 점을 보완하기 위해 5가지 고정상에 대해 이 유도체들의 분리특성을 검토하였다. Ampicillin이나 cephadroxil과 같이 α 위치에 아미노基가 있는 β -lactam系 항생물질들은 카르복실基만 보호시켜서는 GC分析이 되지 아니한다. 이것은 보호되지 아니한 아미노基로 인하여 고정상에 吸着 또는 고정상과의 相互作用으로 溶出되지 않기 때문으로 추정된다. Wu등²⁾은 ampicillin을 silyl化하여 분석한 예를 보고한 바가 있다. 그러나 silyl化시킨 유도체는 FPD의 火炎중에서 분해되어 silicon酸化合物이 生成된 후 검출기에 부착된 석영관이나 유리관에 被膜되어 感度を 크게 저하시키므로 FPD로 분석할 수 없게 된다. 따라서 저자들은 β -lactam계 항생물질중 α -아미노基가 있는 것은 benzoyl基를 도입한 후 GC/FPD로 분석하여 양호한 결과를 얻었으며, 그 구조를 質量分析에 의해 확인하였다.

實 驗 方 法

試料—페니실린류와 세팔로스포린류는 모두 市販 단일제제 또는 原料를 사용하였다.

試藥—Borontrifluoride-methanol 복합체(BF₃·MeOH)는 Merck-Schuchardt製(獨逸), benzoyl chloride는 市販 特級을 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 그외에 사용한 시약 및 그 규격은 前報¹⁾의 것과 동일한 것을 사용하였다.

檢液의 調製—분자구조내 α -아미노기가 없는 시료는 前報¹⁾와 같은 方法으로 메틸에스테르화시켰

다. 分子구조내에 α -amino基가 있는 시료는 1mmol을 반응용기에 취하여 $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ 3ml를 넣고 100°C 에서 15分 동안 가온하였다. 반응물을 감압농축시킨 후 pyridine 3~4ml를 가해 殘渣를 녹였다. -5°C 이하에서 교반하면서 benzoyl chloride 1.2mmol을 아주 서서히 적가하고 -5°C 이하에서 30分 더 교반한 후 실온에서 12시간동안 방치하였다. 반응물을 dichloromethane 5ml에 녹이고 水포화 염화나트륨액과 물로 2~3회 세척하였다. dichloromethane 층을 취하여 무수염화칼슘으로 脫水시키고 질소기류를 통하여 유기용제를 완전히 날려 보낸 후 dichloromethane 5ml에 녹여 GC 分析에 이용하였다. Bacampicillin, pivampicillin 및 talampicillin은 pyridine에 녹인 후 바로 benzoyl化시켜 검액으로 하였다.

裝置 및 分析 條件—GC는 394nm interference filter가 있는 炎光光度檢出器가 부착된 Pye-Unicam GCV chromatograph를 이용하였다. 칼람은 물, 에탄올, 아세톤, 5% tetramethylchlorosilane등으로 충분히 세척한 coiled glass column (4mm i.d. \times 1.5m)에 溶媒被膜法으로 담체 (80~100 mesh)에 입힌 고정상을 충전시켜 사용하였다. 칼람온도는 별도로 기록하지 않는 한 220°C , 檢出器 및 시료주입부의 온도는 각각 280°C , 250°C 에서 분석하였으며, 각 기체의 流量은 N_2 25ml/min, H_2 25ml/min, air 27ml/min, purge air 50ml/min으로 하였다.

GC-Mass spectrometer의 조작은 OV-101 fused silica capillary 칼람 (0.2mm i.d. \times 12m)을 장치한 GC (model: Hp 5840A GC, Hewlett-Packard, USA)로 주입부 및 칼람온도는 각각 280°C 와 210°C , carrier gas는 He(流速 20cm/sec)을 사용하였으며, Hewlett-Packard model Hp 5985B GC/MS System에서 Source온도 200°C , EM전압 1.8KV, EI에너지 70ev로 조정하여 質量스펙트럼을 얻었다.

實驗結果 및 考察

Methylester化 및 N-Benzoyl 化—分子構造내에 α -아미노기가 없는 β -락탐계 항생제는 카르복실기만 에스테르화시켜 GC分析이 가능함은 前報¹⁾에서 보고한 바와 같다. α -아미노기가 있는 β -락탐계 항생제의 N-benzoyl化는 -5°C 이하에서 약 30분내에 거의 完結되었으며 이 生成物質은 室

Table I—Recovery test^{a)}.

Antibiotic	% Recovery ^{b)}			
	1st run	2nd run	3rd run	\bar{x}
Bacampicillin·HCl	95.4	97.1	96.4	96.3
Pivampicillin·HCl	90.0	89.6	92.4	90.7
Talampicillin·HCl	94.6	93.7	91.2	93.2
Ampicillin·3H ₂ O	86.4	83.8	82.5	84.2
Amoxicillin·3H ₂ O	84.9	80.2	82.9	82.7
Cyclacillin base	82.7	83.1	79.8	81.9
Cephalexin·H ₂ O	95.8	93.1	95.4	94.8
Cephadroxil·H ₂ O	97.7	96.8	98.5	97.7

a. About 2.0 equivalence of benzoyl chloride was used vs. antibiotic.

b. Values based on the peak area response to the known amount of chlorpromazine (the peak area was calculated upon the previous report¹⁾.)

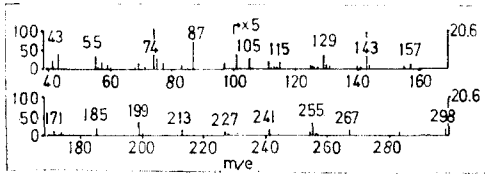


Fig. 1—Mass spectrum of methyl esterified and N-benzoylated cephadroxil.

溫에서 수일간 안정하였다. Table I에서 나타난 바와 같이 α -ester아미노기가 있는 抗生物劑 중 시료자체가 에스테르化合物인 bacampicillin, pivampicillin, talampicillin 등은 거의 定量的으로 N-benzoyl化가 일어났으며, 구조내에 카르복실기 및 α -아미노기가 있는 物質들의 에스테르화 및 N-benzoyl化는 cyclacillin 85.2%~cephadroxil 97.7%로서 높은 收率로 일어났

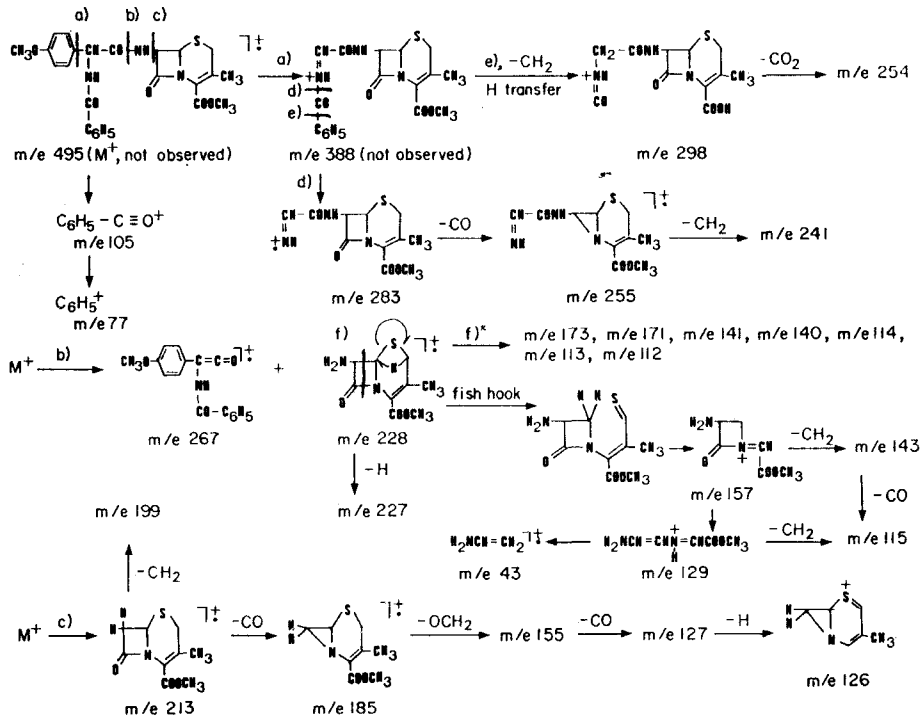


Fig. 2—Possible fragmentation of methyl esterified and N-benzoylated cephalosporin.

* Corresponded with the previous report⁵⁾

다. α -아미노기가 있는 遊離型 β -lactam계 抗生物劑들은 脂溶性 有機溶劑에 잘 溶解되지 아니하므로, 칼륨이나 나트륨염의 형태로 된 抗生物劑들은 脫鹽시킨 후 遊離形을 적당한 有機溶劑로 추출하여 에스테르화 및 N-benzoyl化 시키거나 혹은 알칼리용액중에서 에스테르 유도체를 만든 후 적당한 용매로 추출하여 N-benzoyl化하여야 하므로 그 추출과정에서의 상당한 負誤차가 예상된다. Fig. 1은 $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$ 과 benzoyl chloride로 처리한 cephadroxil의 질량스펙트럼이다. 이 生成物의 질량스펙트럼에서 分子이온 peak는 出現하지 아니하였으나 m/e 298, m/e 267, m/e 255 등은 α -amino基에 benzoyl基가 도입되었음을 보여주고 있다(Fig. 2). m/e 267, m/e 205, m/e 177 등은 페놀성 $-\text{OH}$ 가 methylether 유도체로, m/e 227, m/e 213, m/e 129 외에 다수의 peak들이 carboxyl기가 methyl ester化되었음을 나타내고 있다. 그 외에 m/e 199, m/e 185, m/e 171, m/e

Table II—Relative retention times of methyl ester derivatives of β -lactam antibiotic.

Antibiotic	3% OV-225 on Diatomite CQ	3% QF-1 on Chromosorb WAW-DMCS	2% OV-17 on Gas Chrom Q	3% OV-101 on Chromosorb G-HP	3% OV-1 on Chromosorb W
Phenoxymethyl penicillin	1.00 ^{a)}	1.00 ^{b)}	1.00 ^{c)}	1.00 ^{d)}	N.D. ^{e)}
Benzyl penicillin	1.06	0.84	0.95	0.98	N.D.
Carbenicillin	0.47	0.88	0.78	0.84	N.D.
Hetacillin	0.46	0.49	0.80	0.68	N.D.
Dicloxacillin	0.77	0.33	0.50	0.52	N.D.
Cloxacillin	0.55	0.25	0.47	0.48	N.D.
Floxacillin	0.45	0.20	0.32	0.46	N.D.
Cefazolin	0.43	0.47	0.47	0.55	N.D.
Cephmandole nafate	0.29	0.22	0.20	0.46	N.D.

a) Retention time (t_R , min.)=35.4, b) t_R =16.2, c) t_R =12.0, d) t_R =5.6, e) Non-detected.

143등의 이온 peak들은 cephalosporin核의 토막이온에 의해 出現하는 전형적인 peak이며 이들은 Richter등³⁾과 Porter등⁴⁾의 文獻과 일치한다.

GC에 의한 페니실린 및 세팔로스פור인의 分離 分析— α -아미노기가 없는 여러가지 β -lactam계 항생물질의 methylester 유도체들에 대해서 6가지 충전제에서의 分離特性을 Table II에 기록하였다. 이 표에서 알 수 있는 바와 같이 酸처리한 후에 silyl化시킨 구조토에 silicon계 고정상을 입힌 충전제에서는 이 methyl ester 유도체들이 溶出되었으나 Chromosorb W에 OV-1을 입힌 충전제에서는 전혀 溶出되지 아니하였다. 이는 담체로 쓰인 Chromosorb W에 methyl ester 유도체들이 吸着되거나 觸媒活性으로 인한 表面相互作用이 일어나기 때문으로 생각된다. silyl化한 ampicillin을 溶出시키는데 Chromosorb WAW-DMCS에 OV-17을 입힌 충전제를 이용한 것²⁾도 같은 이유로 생각할 수 있다. 물론 OV-101과 McReynolds常數(Rohrschneider常數)⁵⁾가 거의 유사한 OV-1을 不活性 구조토에 입혀 충전한 칼럼에서는 이 메칠에스텔 유도체가 OV-101에서와 비슷한 分離係數를 나타내면서 溶出될 것이다. 前報¹⁾에서 나타난 바와 같이 0.6% QF-1에서는 phenoxymethylpenicillin의 保持시간에 대해서 benzylpenicillin과 carbenicillin의 相對保持時間이 0.87과 0.84이고, cloxacillin과 floxacillin은 0.24와 0.22로서 잘 분리되지 아니하였으나, benzylpenicillin과 carbenicillin은 OV-101에서, cloxacillin과 floxacillin은 OV-225 또는 OV-17에서 양호하게 분리할 수 있었다(Table II). QF-1에서 잘 분리되는 物質들이 OV-101이나 OV-225에서 거의 겹치는 경우도 있으므로 각 物質에 따라서 충전제를 有效적절하게 선정할 필요가 있음을 나타내고 있다.

α -아미노기가 있는 항생물질은 $BF_3 \cdot MeOH$ 와 benzoyl chloride로 처리한 다음 0.9% QF-1으로 20분내로 분리하였다(Table III). 極성이 비교적 강한 고정상인 OV-225가 3% 함유된 칼럼에서 에스텔유도체들이 쉽게 溶出되지 아니하였으나 中極性~微極性の 固定相에서 쉽게 溶출되었다. Evrard등⁶⁾은 酸處理한 Silanized "Gas Chrom P"에서 高濃度로 被膜시킨 QF-1에서 이들 유도체가 잘 溶出되지 않았음을 보고한 바가 있다. 따라서 極성이 비교적 강한 固定相으로 β -lactam系 항생물질을 分析하려면 담체에 대한 고정상의 함량이 적은 칼럼을 이용하는 것이 바람직하다.

Fig. 3은 어느 製藥會社에서 출고된 benzylpenicillin 주사제를 취하여 바이알내의 질소를 공기

Table III—Relative retention times(t_R) of ester derivatives of N-benzoylated β -lactam antibiotic.

Antibiotic	$t_R^{a)}$
Phenoxyethyl penicillin	1.00 ^{b)}
Pivampicillin	1.84
Talampicillin	1.28
Bacampicillin	0.87
Amoxicillin	0.86
Ampicillin	0.78
Cyclacillin	0.59
Cephadroxil	1.01
Cephalexin	0.96

a) Column: 0.9% QF-1 on Chromosorb WAW-DMCS (80-100 mesh), column temperature: 200°C

b) Retention time=10.6 min.

로 치환시켜 室溫에서 遮光하지 않고 1개월 또는 14개월 보관한 제품의 gas chromatogram 으로서 經時變化를 일으키는 양상을 보여주고 있다. 따라서 본 실험방법에 의해 β -락탐계 항생물질들의 品質管理를 有效적절하게 活用할 수 있을 것이다.

Benzoyl chloride에 의한 α -amino基를 가진 β -락탐계 항생제의 분석은 分析用試藥의 가격은 저렴하나 그 定量操作에 상당한 주의와 시간이 필요하다는 단점이 있다.

結 論

α -amino基가 없는 β -lactam계 항생물질들은 methylester化만으로 GC 분석이 가능하며, α -아미노기를 가진 것은 그 methyl ester 유도체들을 정량적으로 N-benzoyl化 시켜 비로소 GC로 분석할 수 있었다. 이 유도체들은 不活性化시킨 규조토에 여러가지 silicon 重合體를 적당한 농도로 입혀 충전한 칼럼에서 溶出할 수 있었고 이들을 含硫黃化合物에 高感度 特異性을 가진 炎光光度 檢出器로 분석함으로써 製劑들의 品質관리와 임상분석에 유용하게 응용할 수 있을 것이다.

이 논문은 1984년도 재단법인 서울대학교 약학대학 교육연구재단의 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

文 獻

1. 朴萬基, 曹榮鉉, 楊貞善, GC/FPD를 이용한 β -락탐계 항생물질의 분석(I). 藥學會誌 28, 25 (1984).
2. H.L. Wu, M. Masada, and T. Uno, Gas chromatographic and gas chromatographic mass spectrometric analysis of ampicillin. *J. Chromatogr.* 137, 127 (1977).
3. W. Richter and K. Biemann, Application of mass spectroscopy to structural problems. XXIV, High re-

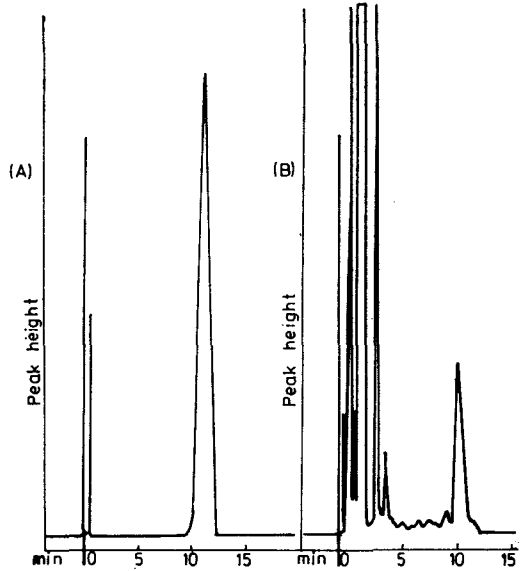


Fig. 3—Gas chromatograms of one-month stored(A) and fourteen-month stored(B) benzylpenicillin preparation stored at room temperature without protecting from light. Column: 0.9% QF-1 on Chromosorb WAW-DMCS (80-100 mesh), oven temperature: 200°C.

- solution mass spectra of cephalosporin C derivatives. *Monatsch. Chem.* 96, 484 (1965).
4. Q.N. Porter and J. Baldas, *Mass spectrometry of heterocyclic compounds*, Wiley-Interscience, New York, 1971, p-542.
 5. W.R. Supina and L.P. Rose, Use of Rohrschneider constants for classification of GLC columns. *J. Chromatogr. Sci.* 8, 214 (1970).
 6. E. Evrard, M. Claesen and H. Vanderhaeghe, Gas chromatography of penicillin and penicillanic acid esters, *Nature* 201, 1124 (1964).
 7. K.H. Kim, Y.H. Cho, M.K. Park and W.K. Lee, Determination of sulfur-containing drugs by gas-chromatography with fine photometric detector. *Arch. Pharm. Res.* 6, 103 (1983).