

Methyl Orange에 의한 4급 Amine類의 Ion Pair 抽出 吸光度 定量(I)

Cetyltrimethylammonium bromide, Betylium tosylate, Gallamine
triethiodide 및 Thiamine의 定量

崔 宗 煥 · 金 永 洙

朝鮮大學校 藥學大學

(Received January 26, 1987)

Spectrophotometric Determination of Ion Pair Extraction of Quaternary Amines with Methyl Orange

Jong Hwan Choi and Young Soo Kim

College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 500, Korea

Abstract—Methyl orange(MO) and cetyltrimethylammonium bromide(CTA) were mixed and added to 10ml of the buffer solution and then the solution was shaken for 5 minutes.

The maximum absorption wavelength of the reaction product was 419nm. Dichloromethane was the best extracting solvent among the several organic solvents and the most suitable pH range was 2~8. When the CTA-MO calibration curve was made in the best experimental condition, the Lambert-Beer's law was obeyed in the range of CTA concentration of $1.5 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} M$ by UV spectrophotometer. This method was possible to determine quaternary ammonium salts in the pharmaceutical preparations.

염기성 유기화합물의 ion pair 추출에 의한 phthalein계 색소 또는 azo계 색소를 이용한 NMR-rate measurement¹⁾, fluorescence techniques^{2,3)}, UV spectra techniques^{4~7)}의 다양한 방법은 이미 알려져 있으며 이들 amine류중 3급 amine^{8~10)}에 대한 연구도 검토되었다.

그러나 의약품으로 널리 쓰여지고 있는 4급 Ammonium salts에 대해서는 별로 언급된 바 없이 미량 합질소화합물의 ion pair 有機溶媒抽出에 관한 정량법의 일환으로 저자 등은 4급 ammonium salts중 공해물질중 양 ion 청정제, 방부제로 이용되는 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTA)^{11~14)}를 비롯하여 항고혈압제 및 고감진경 차단제로 사용되고 있는 berylium tosylate(BRT)^{15~19)}, 또한 꿀근육 이완제로 이용되고 있는 gallamine triethiodide(GMT)^{20~24)}, thiamine^{25~29)}, 과 같은 4급 amine류를 methyl orange(MO)로

ion pair를 형성시켜 유기용매인 dichloromethane (DCM)으로 抽出하여 이중 4급 amine류를 선택적으로 정량 확일성 있는 동일 분석 조작법을 고안하였을 뿐만 아니라 부형제 및 pH 변화에 크게 영향을 받지않는 매우 안정된 착체를 형성케 하는 신속 간편한 재현성이 높은 정량법을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

實驗方法

試藥—CTA, BRT, GMT, TAM 표준용액은 Aldrich chem. Co. 제품인 特級試藥을 각각 탈 ion수에 녹여 $1 \times 10^{-3} M$ 용액을 조제한 후 필요에 따라 이를 희석하여 사용하였고 MO는 Hayashi pure chem. 特級試藥을 0.3273g을 탈 ion수에 녹여 1,000ml로 만들었다. dichloromethane은 kokusen chemical製 特級試藥을 사용하였다.

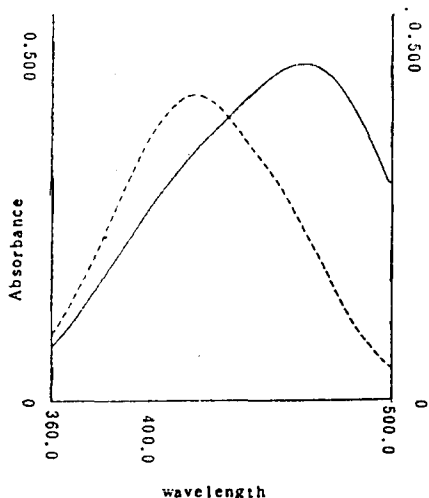


Fig. 1—Absorption spectra of CTA-MO complex extracted with 20ml of DCM and MO-aqueous solution

CTA : $2.7 \times 10^{-5}M$

pH : 7.0

MO : $1.0 \times 10^{-4}M$

Reference : Reagent blank

Broken line : CTA-MO curve

Solid line : MO-curve

裝置—Spectrophotometer는 shimadzu 240 UV spectrometer(1.0cm 석영흡수 llce)를, NMR-spectrometer는 FT-NMR 80 SY, Bruker Co.를, IR-spectrometer는 shimadzu IR-440 with data processor를, Thermo-mixer(model TM-100 single unit, Tokyo Thermonics Co., LTD)를 사용하였다.

實驗操作法—pH 7.0인 phosphate buffer solution 및 MO 용액 및 CTA 용액을 차례로 내용 50ml의 separatory funnel에 직접 취하고 여기에 DCM을 가해서 5분간 thermo-mixer로 진탕 혼합 방치한 후 有機層을 분리 분리하고 水層에 새로운 DCM을 가해서 또 다시 진탕 혼합한다. 이 조작은 4회 반복한다. 분리된 有機層을 모두 합하여 측정된 결과 최대흡광파장은 Fig. 1과 같이 419nm에서 나타났다. 대조액으로서는 CTA가 들어 있지 않는 동일조작을 한 용액을 사용하였다.

實驗結果 및 考察

pH의 影響—Fig. 2와 같이 MO와 CTA 간에 생성된 ion pair 생성의 최적 pH는 2~8 범위였다. blank는 DCM을 탈 ion수로 포화시켜 동일 처리한 것을 사용하였으며 강산성측의 액성 조절은 염산을 가하였다.

色素量の 影響—pH 7.0인 phosphate buffer solution 8ml와 $5.4 \times 10^{-4}M$ -CTA 1ml를 50ml separatory funnel에 각각 취하고 여기에 MO 농도를 $6 \times 10^{-5} \sim 10^{-2}M$ 까지 변화시켜 수증량이 10ml가 되게끔 하였다. 여기에 각각 20ml의 DCM을 4회로 나누어 5분간씩 진탕 혼합 추출시켰다. 감시 방치한 후 有機層을 분리하여 흡광도를 측정 한 결과는 Table. 1에 表示하였다. 따라서 본 실험에서는 $1.0 \times 10^{-4}M$ -MO를 사용하였다.

抽出溶媒의 選擇— $2.7 \times 10^{-4}M$ -CTA와 MO간 ion pair 생성에 대하여 몇가지 유기용매에 의한 추출효과를 비교한 결과는 Table II에 기록하였다. Benzene, CCl_4 와 같은 무극성용매는 거의 추

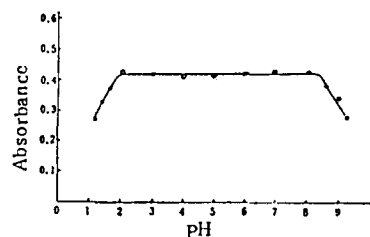


Fig. 2—Effect of pH on absorbance of CTA-MO complex extracted with DCM

CTA : $2.7 \times 10^{-5}M$

MO : $1.0 \times 10^{-4}M$

pH : 1.0~9.0

Table I—Variation of MO concentration

CTA : 2.7×10^{-5} (fixed)

MO(molarity)	Absorbance
3.0×10^{-6}	0.044
1.0×10^{-5}	0.142
2.5×10^{-5}	0.395
2.7×10^{-5}	0.419
4.0×10^{-5}	0.422
5.0×10^{-4}	0.419

Table II—Extracting effect of organic solvents.

solvent	Absorbance
dichloromethane	0.41
dichloroethane	0.410
chlorobenzene	0.391
benzene	0.013
carbontetrachloride	0.004

출되지 아니하였으며 chloroform, chlorobenzene, dichloroethane, dichloromethane의 순으로 추출 효과가 증대되었으므로 본 실험에서는 dichloromethane을 추출용매로 선택하였다.

抽出時間과 放置時間의 影響—CTA-MO간에 생성된 ion pair 抽出時間은 3분이면 충분하였으며 경시변화는 48時間후에도 흡광도에 영향이 없었으므로 매우 안정된 ion pair 착화합물이 생성되었다고 생각된다.

反應生成物의 組成—MO와 STA간의 ion pair 생성물의 조성비를 連續變化法으로 검토한 결과는 Fig. 3와 같이 MO와 CTA는 1:1의 mole비로 결합함을 알 수 있다.

共存 ion의 影響—CTA정량시 다른 공존금속 ion의 영향을 검토한 결과는 Table III에 표시되어 있다. CTA 10 μ g이 함유된 1ml의 液에 Cd(II), Sr(II)를 각각 10배量 첨가시 약간 negative diversion이 일어나고 있으며 Co(III), Mg(II)를 각각 10배量을 첨가시는 약간 positive diversion이 생김을 알 수 있으나 Fe(II), Cu(II), Bi

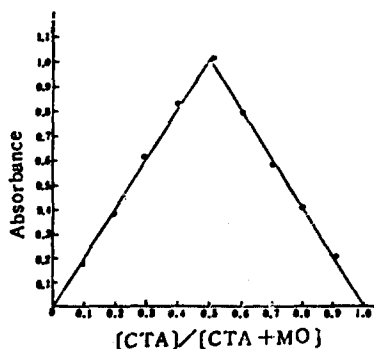


Fig. 3—Determination of the composition of the reaction product by continuous variation method

CTA : 6 $\times 10^{-4}$ M MO : 6 $\times 10^{-4}$ M

Table III—Absorbance of CTA-MO complex in the presence of diverse metal ions

(CTA: 10 μ g/ml)			
Form of added metal ion	Added amount (μ g)	Absorbance	Deviation from blank
—	—	0.441	—
Cu(CH ₃ COO) ₂	100	0.461	0.020
Bi(NO ₃) ₃	100	0.457	0.016
Zn(NO ₃) ₂	100	0.406	-0.035
Co(NO ₃) ₃	100	0.510	0.069
Sr(NO ₃) ₂	100	0.376	-0.065
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100	0.481	0.040
Ni(CH ₃ COO) ₂	100	0.422	-0.019
FeSO ₄ ·7H ₂ O	100	0.401	-0.040
Cd(NO ₃) ₂	100	0.411	-0.030

(III), Ni(II), Na(I) 등의 첨가시는 별로 방해 받지 않음을 알 수 있다.

檢量線 作成—실험조작법에 따라 조제한 DCM 층에 포함된 여러가지 농도의 CTA는 Fig. 4와 같이 1.5 $\times 10^{-5}$ ~1.0 $\times 10^{-4}$ M 범위에서 Lambert Beer's law가 잘 성립함을 알 수 있다.

그리고 이 정량법을 다른 4급 Ammonium 염류 實驗의 劃一性있는 응용가능성의 일환으로 시판되고 있는 의약품중 BRT.GMT.TAM을 CTA 때와 동일 실험 조작법으로 처리된 검량선을 검토한 결과는 Fig. 5~Fig. 7과 같다.

反應生成物의 IR spectrum—Fig. 8와 Fig. 9에 MO와 CTA IR spectrum을 나타내었고, Fig. 10

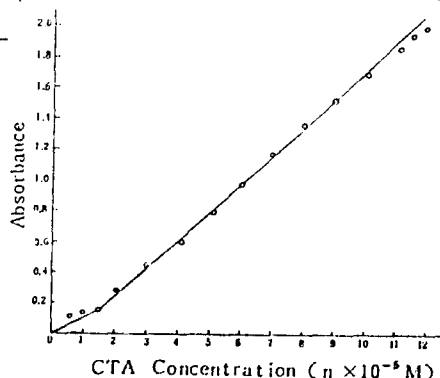


Fig. 4—Calibration curve of CTA by spectrophotometry
MO : 2.0 $\times 10^{-3}$ M
Wavelength : 419nm
pH : 7.0

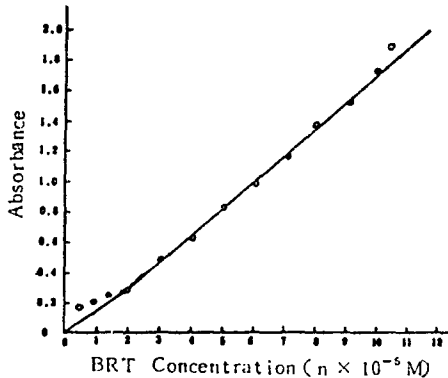


Fig. 5-Calibration curve of BRT by spectrophotometry

MO : $1.0 \times 10^{-4} M$ pH : 7.0
Wavelength : 419nm
Reference : Reagent blank(DCM)

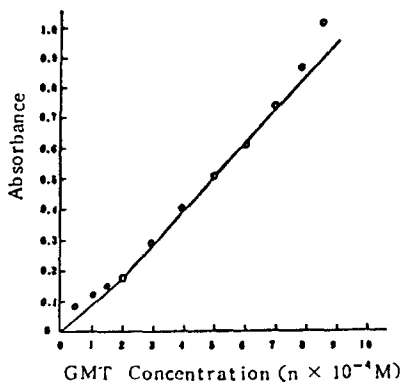


Fig. 6-Calibration curve of GMT by spectrophotometry

MO : $1.0 \times 10^{-3} M$ pH : 7.0
Wavelength : 425nm
Reference : Reagent blank(DCM)

에 이들의 착화합물에 대한 spectrum을 표시하였다.

CTA-MO간에 형성된 착화합물의 spectrum (Fig. 10)에서는 MO에 있는 $-S=O$ 의 vibration이 $1,363cm^{-1}$ 에서 $1,350cm^{-1}$ 로 장파장쪽 진이가

어났으며 CTA에 있는 $-N^{+}$ 의 spectrum도 $2,820cm^{-1} \sim 2,880cm^{-1}$ 에서 $2,840cm^{-1} \sim 2,900cm^{-1}$ 로 단파장쪽 진이가 확실히 관찰된다.

또 착화물 형성에서의 새로운 vibration으로 생각되는 $1,565cm^{-1}$ 에서 spectrum이 생겨났는데 이는 $-SO_3^-$ 에 형성되는 CTA의 착화물 형성을 예상할 수 있다.

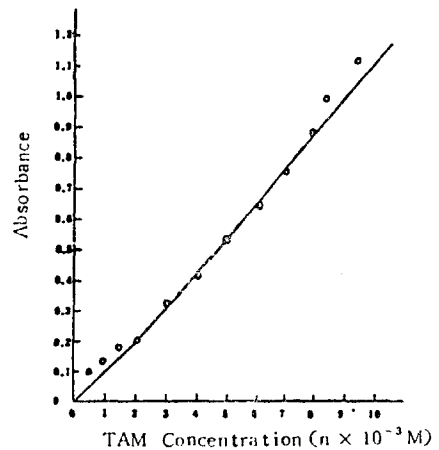


Fig. 7-Calibration curve of TAM by spectrophotometry

MO : $1.0 \times 10^{-2} M$ pH : 7.0
Wavelength : 425nm
Reference : Reagent blank(DCM)

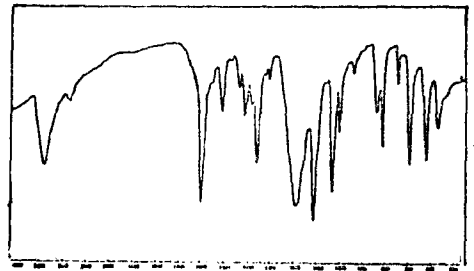


Fig. 8-IR spectrum of MO

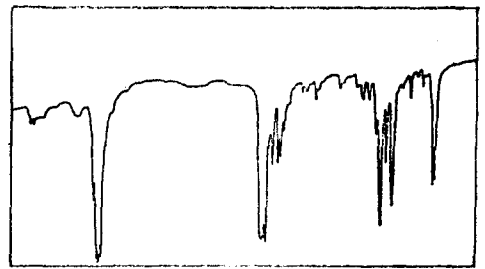


Fig. 9-IR Spectrum of CTA

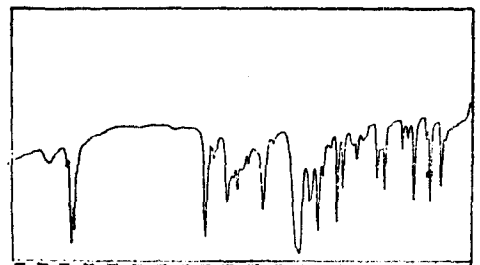
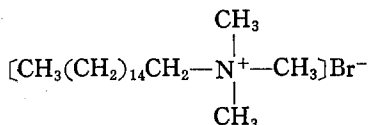


Fig. 10-IR spectrum of CTA-MO complex

反應生成物의 NMR spectrum- 착화합물이 형성되는 mechanism을 추정해 보기 위해 陽性子共鳴 周波數 80MHz에서 internal locking 물질 및 용매로서 chloroform-D를 넣고 基準物價로 TMS(tetramethyl silane)를 넣어 얻어 ¹H-NMR spectrum을 얻었다. 착화합물 형성시 counter compound로 使用한 MO와 CTA 그리고 MO-CTA의 ¹H-NMR spectrum의 assignment들을 표시하였다.

CTA



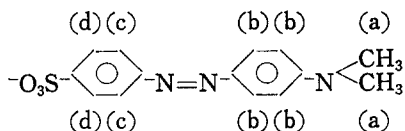
original complex

—(CH₃)₃ : 9H 3.48ppm→3.34

—N⁺—CH₂ : 2H 3.68ppm→3.70

(CH₂)₁₄ : 28H 1.26ppm→1.20

MO



original complex

a) 3.07 → 3.09ppm

b) 6.85 → 6.83ppm

c) 7.75 → 7.88ppm

d) 7.82 → 7.92ppm

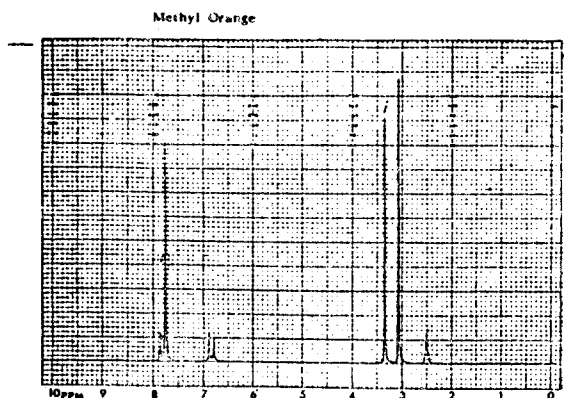


Fig. 11-NMR spectrum of MO

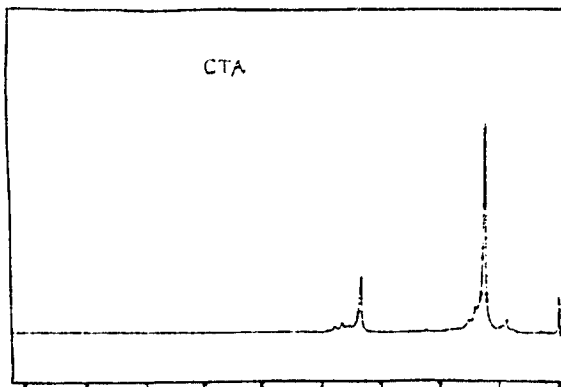


Fig. 12-NMR spectrum of CTA

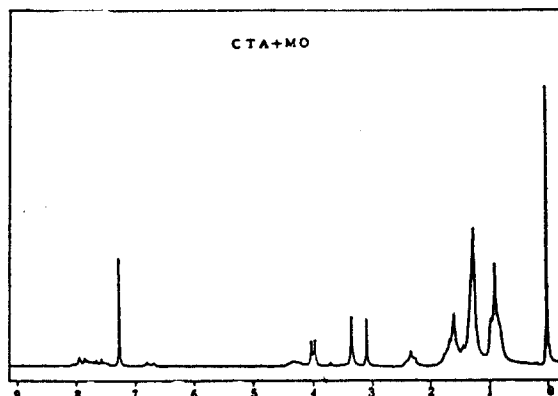


Fig. 13-NMR spectrum of CTA-MO complex

위의 결과에서 볼 수 있듯이 quaternary ammonium의 site에 있는 proton의 경우 대부분 chemical shift가 upper field쪽으로 옮겨짐을 알 수 있고 MO의 SO₃⁻에 의한 착화합물 형성시 전자밀도가 증가하고 특히 MO의 —SO₃⁻ 가까이에 있는 (d) 수소의 chemical shift가 0.1ppm만큼 변화된 것으로서도 착화합물 형성이 증명되며 이에 대한 결과는 Fig. 11~Fig. 13에 표시하였다.

結 論

1) 4급 ammonium類와 MO간에 매우 안전성이 높은 inpair 착물이 형성되어 극성이 큰 DCM으로 抽出 定量되었으며 CTA 이외의 4급 ammonium類인 BRT, GMT, TAM도 동일 기본조작법에 의한 UV spectrum법으로 정량된 종합된 결과는 Table N에 표시하였다.

Table IV-Experimental results of assay by UV spectrometry

Drugs	λ max	Determination range	Shift interval	pH	mole ratio (Drugs-MO)	Extraction solvent
CTA	419nm	$1.5 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} M$	45nm	7.0	1 : 1	DCM
BRT	419nm	$2.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-4} M$	45nm	7.0	1 : 1	DCM
GMT	425nm	$2.0 \times 10^{-4} \sim 7.0 \times 10^{-4} M$	39nm	7.0	1 : 1	DCM
TAM	425nm	$2.0 \times 10^{-3} \sim 8.0 \times 10^{-3} M$	39nm	7.0	1 : 1	DCM

2) IR spectrum법에 의한 구조적 고찰의 측면에서 볼 때 MO에 있는 $-SO_3^-$ 의 vibration이 장파장 쪽으로 shift 되었으며 CTA의 quaternary ammonium site는 단파장 쪽으로 shift된 것과 new peak가 생긴 것으로 ion pair 착체 형성이 입증된다.

3) NMR spectrum의 구조적 고찰에서도 MO의 (d) 수소의 chemical shift가 0.1ppm만큼 변화되었으며 4급 ammonium 중 $-\overset{|}{N}^+-$ 위치에 있는 1H 의 chemical shift가 upper field쪽으로 shift 됨으로 보아 ion pair 착체 형성을 예상할 수 있다.

문 헌

- Zia, H.R.H. and Luzzi, L.A.; *J. Pharm. Sci.*, **60**, 45 (1971).
- Jun, H.W. and Luzzi, L.A.; *ibid.*, **60**, 1430 (1971).
- Ibid.*, 1981.
- Aizawa, H.; *Eiyo To shokuryo*, **23**, 320-324 (1973).
- Ibid.*, **22**(4), 235 (1969).
- Aizawa, H.; *Sokuhin Eiseigaku Zasshi*, **8**, 40 (1967).
- 小池久 · 大稿芳; *分化*, **17**, 17, 603, (1968).
- Clarke, E.G.C.: *Isolation and Identification of Drugs*. The Pharmaceutical Press(London) p. 428 (1971).
- Park, M.K., Lim, B.R., Yu, K.S., and Yong, K.H.; *Yakhak Hoeji*, **22**, 27(1978).
- Pitel, G., and Luee, T., *Ann. Pharm. France*, **23**, 673 (1975).
- Cid, E., Dresse, A. and Jaminet, Fr.; *Pharm. Acta Helv., Belg.*, **46**, (377), (1971).
- Linari, G.; *Pharm. Acta Helv., Italy*, **47**, 26 (1972).
- Schott, Hans and Young, C.Y.; *J. Pharm. Sci.*, **61**, 762 (1972).
- Mirzabekov, A.D., Rhodes, Daniela, Finch, J.T., Klug, A. and Clark, B.F.C.; *Nature New Biol.*, (1972).
- Toda, Noboru; *J. Pharmacol. Exp. Ther., Japan*, **181**, 318 (1972).
- Markis, John. E. and Kock-weser, Jan; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **178**, 94 (1971).
- Clarke, D.E. and Capps, P.A.G.; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., Eng.*, **199**, 282 (1972).
- Wellens, D. and Wauters, E.; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., Belg.*, **198**, 355 (1972).
- Weiner, N., Cloutier, G., Bjur, R. and Pfeffer, R.I.; *Pharmacol. Rev.*, **24**, 203 (1972).
- Bouyard, Pierre, Balansard, Pierre and Jadot, guy; *C.R. Soc. Biol., Fr.*, **165**, 136 (1971).
- Kammerer, E. and Krug, M.; *Acta Biol. Med., Ger.*, **28**, 361 (1972).
- Freeman, Shirley, E. and Turner, R.J.; *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., Aust.*, **50**, 21 (1972).
- Goat, Valerie A.; *Proc. Roy. Soc. Med., Eng.*, **65**, 149 (1972).
- Mercier, Jacques and Dessaigne, Suzanne; *C.R. Soc. Biol., Fr.*, **165**, 1368 (1971).
- Schertel, M. and Sheppard, A.J.; *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1070 (1971).
- Yamamoto, Ryuichi and Shima, Kazuhiro; *Shionogi, Japan*, **29**, 89, (1971).
- Naupari, Villanueva Hector L.; *An. Programa. Acad. Med., Peru*, **52**, 157 (1969).

- 28) Popescu, Felicia and Gorcea, Viorica: *Stud. Cercet. Biochim., Rom.*, 15, 73 (1972).
- 29) Nishimune, Takahiro, Abe, Mitsuko and Hayashi, Ryoji; *Biochim. Biophys. Japan*, 279, 527 (1972).