

미분 펄스 폴라로그래피에 의한 Chloramphenicol의 정량분석

韓英熙* · 全正仙

상명여자대학교 자연과학대학 화학과

(1992. 1. 3 접수)

Determination of Chloramphenicol by Differential Pulse Polarography

Younghée Hahn* and Jung-Sun Jeon

Department of Chemistry, Sang Myung Women's University 7 Hongji-dong,
Chongro-Ku, Seoul 110-743, Korea

(Received January 3, 1992)

요약. Chloramphenicol에 대한 미분 펄스 폴라로그래피 분석법을 연구하였다. Chloramphenicol은 Ag/AgCl(포화 KCl) 기준전극에 대하여 0.00~ -1.50 Volt 영역에서 pH 의존성을 갖는 하나의 환원 피이크를 나타내었다. 실온(20°C)에서 측정한 피이크 전위(E_p)를 chloramphenicol 용액의 pH에 대하여 도시하였을 때 직선적인 관계를 보여주었으며 pH 8.9에서 기울기(E_p/pH) 변화를 나타내었다. 기울기는 pH 2.7~8.9 사이에서 -59.7 mV/pH 이었고 pH 8.9~11.2 사이에서는 -24.3 mV/pH 이었다. pH 8.0 암모늄완충용액을 지지전해질로 사용하여 $4.8 \times 10^{-7} \text{ } \sim 6.2 \times 10^{-5} M$ ($0.16 \text{ ppm} \sim 20 \text{ ppm}$), chloramphenicol 용액의 피이크 전류(i_p)를 농도에 대하여 도시하였을 때 직선성을 나타내었다. Chloramphenicol에 대한 미분 펄스 폴라로그래피법과 공정서 방법인 278 nm에서의 자외선 흡수분광분석법 사이에 상관계수는 0.996으로서 우수한 상관관계를 나타내었다. Chloramphenicol을 약알칼리성(pH 8.0) 용액에서 장기간 보관시 분해 생성물의 검출은 미분 펄스 폴라로그래피법이 분광분석법보다 용이하였다.

ABSTRACT. Chloramphenicol was studied by differential pulse polarography (DDP). A reduction peak which is dependent on pH of the solution appeared in the voltage range between zero and -1.50 volt vs. Ag/AgCl (sat. KCl) reference electrode. A plot of peak potentials (E_p) measured at room temperature (20°C) vs pH of the chloramphenicol solutions showed linear relationship changing slope (E_p/pH) at pH 8.9. The slope was -59.7 mV/pH in pH 2.7~8.9 and -24.3 mV/pH in pH 8.9~11.2, respectively. A log plot of peak currents (i_p) vs. concentrations showed a linearity at the concentrations between $4.8 \times 10^{-7} M$ and $6.2 \times 10^{-5} M$ ($0.16 \text{ ppm} \sim 20 \text{ ppm}$) chloramphenicol in pH 8.0 ammonium buffer. Between the DPP method and the refence method measuring absorbance at 278 nm, the correlation coefficient was 0.996, which means an excellent linearity. The DPP method was able to detect degradation products of chloramphenicol in mild alkaline solution (pH=8.0) more distinctly than the spectrophotometric method.

서 론

항생물질의약품기준¹의 역가시험은 주로 미생물을 사용한 원통평판법이 이용되고 있다. 이 방법은 특정한 미생물을 사용하여 항생제의 역가를 판정하는 방법으로서 흔히 유사한 화학구조를 가진 항생물질

들이 동일한 효과를 나타낼 수 있으므로 유통과정 중의 분해산물 또는 합성한 항생제의 경우 출발원료 항생물질의 존재를 확인하기 어렵다. 이 공정서에는 미생물학적 분석방법 이외에 자외선 및 가시광선 영역의 파장을 이용한 흡수분광분석법, 자외선 분

광광도계를 검출기로 사용하는 액체크로마토그래피법과 불꽃이온화 검출기를 사용한 기체크로마토그래피법이 소수 이용되고 있다.

전기적으로 산화-환원될 수 있는 작용기를 가진 항생물질의 경우 폴라로그래피법(polarography)이 이용될 수 있으나 우리나라 공정서에는 아직 채택되고 있지 않다.

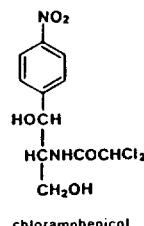
Chloramphenicol의 경우 전기적으로 환원될 수 있는 nitro기를 갖고 있으므로 폴라로그래피법 또는 미량분석에 적합한 미분 펄스 폴라로그래피(differential pulse polarography : DDP)를 사용하여 정량분석할 수 있다. Chloramphenicol은 광범위 항생제로서 항생물질의약품기준¹에서는 미생물학적 방법의 역가시험 이외에 278 nm에서 흡광도 측정으로 정량분석하는 광학적 방법이 채택되고 있다.

기타 문헌에 보고된 chloramphenicol에 대한 분석연구로는 크로마토그래피법^{2~4}과 폴라로그래피법⁵이 있다.

Fosdal과 Jacobsen은 chloramphenicol에 대한 전기화원연구⁵에서 nitro group(R-NO₂)은 2개의 전자와 2개의 H⁺가 관여하는 느린 반응에 의해 nitroso group(R-NO)으로 환원되고 곧이어 2개의 전자와 2개의 H⁺가 관여하는 빠른 반응에 의해 hydroxylamine(R-NHOH)으로 환원되어 DC 폴라로그래피의 첫번째 확산전류는 4개의 전자와 4개의 H⁺가 관여하는 환원전류라고 결론지었다.

또한 미분 펄스 폴라로그래피에 의한 Tetracycline계 항생물질⁶ 연구에서 이 물질들은 수소 이온이 환원반응에 관여하는 세 개의 피이크를 나타내었으며, 알카리성 용액 중의 항생물질 분해산물도 DPP 법에 의하여 용이하게 확인될 수 있었다.

이 논문에서는 미분 펄스 폴라로그래피를 이용하여 chloramphenicol에 대한 분석방법을 연구하고 공정서방법인 자외선 분광분석법¹과 비교하고자 한다.



실 험

실험기기. 모든 전기화학 측정은 EG & G Princeton Applied Research model 174A Polarographic Analyzer와 이에 부착된 model 303 static mercury drop electrode(SMDE)를 사용하여 수행하였다. 기준전극(reference electrode)으로서 Ag/AgCl 전극(포화 KCl 용액), 보조 전극(counter electrode)으로서는 백금선을 사용하였고, Houston Instrument 사의 model RE0074 Omnidigraphic X-Y recorder를 이용하여 differential pulse polarogram을 기록하였다. 완충용액 등 모든 수용액의 pH 측정은 Dong-Woo medical system model DP-215 DMS digital pH/ION meter를 사용하였다. 자외선 흡수 분광분석법은 Milton Roy company의 Spectronic 1201 UV/VIS spectrophotometer를 사용하였다.

시약 및 용액. 모든 화학약품은 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 즉 Potassium chloride(Junsei chem. co.) ; Potassium phosphate monobasic(Shimakus pure chem) ; Sodium phosphate dibasic·12H₂O(Yakuri pure chem.) ; Sodium acetate(Shinano pure chem.) ; Acetic acid(Yakuri pure chem.) ; Ammonium chloride(Oriental chem) ; Ammonia water(Oriental chem.)가 사용되었다. 아세트산염 완충용액은 0.1F CH₃COOH 용액과 0.1F CH₃COONa 용액을 일정비율로 혼합하여 pH 범위 2.7~5.2로 조절하였다. 인산염 완충용액은 0.1F Na₂HPO₄ 용액과 0.1F KH₂PO₄ 용액을 일정비율로 혼합하여 pH 범위 6.7~7.7로 조절하였고, 암모늄완충용액은 0.1F NH₄Cl 용액과 0.1F NH₃ 용액을 일정비율로 혼합하여 pH 범위 8.0~11.2로 조절하였다. Chloramphenicol은 약전규격 이상의 순도로서 종근당 제약회사 제품을 정제하지 않고 사용하였다. pH 변화에 따른 chloramphenicol 용액의 전기화학적 성질에 관한 연구 목적으로 1 mg의 chloramphenicol을 분석 저울로 정확히 평량한 후 10 ml의 눈금 flask에 옮기고 완충용액을 가하여 용해시키면서 부피가 10 ml가 되도록 하였으며, 실험이 진행되는 동안 계속 정제된 질소가스를 용액속에 분산시키면서 보관하였다. 시중에서 구입한 질소 가스(유진가스회사, 서울)속에 녹아있는 미량의 산소를 제거시키기 위하여 먼저 산성 vanadous chloride 용액이

담긴 가스 세정관을 통과시켜 준 다음 산을 제거시키기 위하여 종류수가 들어 있는 가스 세정관을 통과시켜서 질소를 정제시켜 사용하였다.

미분 펄스 폴라로그래피 분석법. 모든 미분 펄스 폴라로그래피(DPP) data는 실온에서 얻었다. pH 2.7~5.2의 아세트산염 완충용액과 pH 6.7~7.7의 인산염 완충용액 및 pH 8.0~11.2의 암모늄 완충용액을 사용하여 제조된 각각의 100 ppm chloramphenicol 용액을 pipet으로 7 ml/씩 취하여 cell에 옮긴 후 12분간 질소가스를 통하여 탈 산소화하였다.

또한 Ag/AgCl(포화 KCl) 기준전극에 대하여 적 하수은 전극에 0.00 volt에서 -1.50 volt까지 potential을 주사하여 pH 변화에 따른 피크 전위 및 피크 전류를 측정하였다. 이 때 다른 조건은 drop time : 1.0 sec, scan rate : -2 mV/sec modulation amplitude : 25 mV이었다.

피크 전류가 직선성을 갖는 농도범위를 고찰하기 위하여 0.16, 0.32, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ppm (4.8×10^{-7} ~ $6.2 \times 10^{-5} M$)의 chloramphenicol 용액을 각각 DDP mode로 피크 전류를 측정하였다. 이 때 완충용액은 앞의 실험에 의하여 가장 감도가 좋은 pH 8.0 암모늄 완충용액을 사용하였다.

정밀도 검사를 하기 위하여 0.2, 2, 20, 100 ppm (6.2×10^{-7} ~ $3.1 \times 10^{-4} M$)으로 chloramphenicol의 농도를 변화시키면서 제조한 각각의 용액을 제조한 당일 5회 반복하여 피크 전류를 측정하였고(within-day precision), 한편 용액 제조 후 1, 2, 6, 8, 14일 경과 후의 피크 전류를 측정하여(inter-day precision) 상대표준편차(relative standard deviation, R.S.D.)를 계산하였다.

자외선 흡수 분광분석법. 0.16~20 ppm 사이의 chloramphenicol의 pH 8.0 암모늄 완충용액에 대한 흡광도(absorbance)를 측정하여 직선성을 갖는 농도 범위를 조사하였다.

일일간 정밀도 검사(within-day precision)는 0.2, 2, 20, 100 ppm chloramphenicol 용액에 대하여 각각 5번씩 278 nm에서 흡광도를 측정하여 상대표준편차를 계산하였다. 장기간 정밀도 검사(inter-day precision)는 20 ppm chloramphenicol의 pH 8.0 암모늄 완충용액에 대하여 용액제조 후 1, 2, 6, 8, 14 일에서 200~800 nm 사이에 파장을 주사하였고 그

중 흡광도를 나타내는 파장영역 12곳에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

pH 변화에 따른 피크 전위(peak potential) 및 피크 전류(peak current)의 측정. Fig. 1은 0.10 M KCl 용액을 지지전해질로 사용한 $3.1 \times 10^{-4} M$ (100 ppm) chloramphenicol 용액의 미분 펄스 폴라로그램이며 0.00~-1.50 volt 사이에서 하나의 환원 피크를 보여주고 있다.

Chloramphenicol의 환원 피크에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 범위 2.7~5.2 사이의 아세트산염 완충용액과 pH 범위 6.7~7.7 사이의 인산염 완충용액, pH 범위 8.0~11.2 사이의 암모늄 완충용액을 지지전해질로 하여 100 ppm chloramphenicol의 미분 펄스 폴라로그램을 측정하였다. 여러 가지 pH 용액 중의 chloramphenicol은 모두 다 0.00~-1.50 volt 사이에서 하나의 환원 피크를 나타내었으며 각 pH 매체에서의 피크 전위와 피크 전류를 Table 1에 나타내었다. Table 1의 결과를 보면 피크 전위(E_p)는 pH가 증가됨에 따라 점차적으로 음의 방향으로 증가하였으며 E_p 를 pH에 대하여 도시하였을 때 직선적인 관계를 나타내었다.

실온에서 측정하였을 때(20°C) 직선의 기울기는, 즉 pH당 피크 전위 변화는 pH 2.7~8.9에서 -59.7 mV/pH와 pH 8.9~11.2에서 -24.3 mV/pH이었

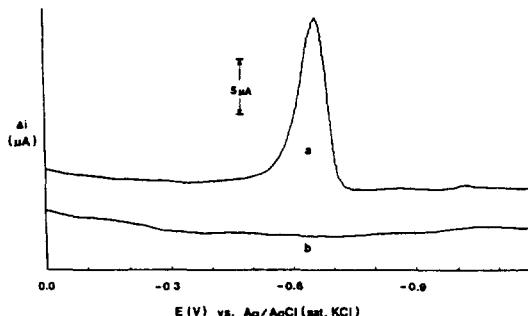


Fig. 1. Differential pulse polarogram of chloramphenicol. a: $3.1 \times 10^{-4} M$ (100 ppm) chloramphenicol in 0.10 M KCl; b: 0.10 M KCl; Drop size: Middle; Modulation Amplitude: 25 mV; Drop Time: 1 sec; Scan Rate: -2 mV/sec.

다. 또한 pH 8.0일 때 큰 피아크 전류를 나타내었다. 그러므로 본 실험에서는 pH 8.0인 암모늄 원충용액을 chloramphenicol의 지지전해질로 사용하였다.

농도 변화에 따른 피아크 전류측정. pH 8.0 암모늄 원충용액을 지지전해질로 사용한 4.8×10^{-7} ~ $6.2 \times 10^{-5} M$ (0.16~20 ppm) chloramphenicol 용액의 미분 펄스 폴라로그램으로부터 피아크 전류(i_p)를 측정하고 $\log C$ 에 대한 $\log i_p$ 의 관계를 도시하여

Table 1. Differential pulse polarographic data of 100 ppm chloramphenicol solutions in various pH buffer media

pH	Peak potential E_p (V)	E_p/pH $\langle\gamma\rangle$	Peak current i_p (μA)
2.7	-0.270		11.9
3.9	-0.320		15.4
5.2	-0.395		17.9
6.7	-0.500	-0.0597 V/pH $\langle 0.996 \rangle$	22.3
7.7	-0.565		22.5
8.0	-0.590		23.3
8.9	-0.615	-0.0243 V/pH $\langle 0.991 \rangle$	22.9
9.8	-0.630		22.3
11.2	-0.670		12.3

Various pH solutions are acetate (pH 2.7~5.2), phosphate (pH 6.7~7.7), and ammonium (pH 8.0~11.2) buffers. These data were obtained at room temperature (20°C) vs. Ag/AgCl (sat. KCl sol'n) reference electrode. γ : correlation coefficient.

Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 실험 측정범위에서 직선성을 나타내었다.

정밀도 검사

1일간 정밀도 검사(Within-Day Precision Study).

6.2×10^{-7} ~ $3.1 \times 10^{-4} M$ (0.5~100 ppm) 농도 범위의 4가지 용액의 peak current를 5회 반복 측정하여 얻은 결과를 Table 2에 기록하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 3가지 용액의 경우 분광광도법의 정밀도가 높았으나 이는 미분 펄스 폴라로그래피법에서는 X-Y 기록계에 그려진 폴라로그램으로부터 피아크 전류를 수동작으로 측정하였고 분광광도법에서는 Spectronic® 1201에 내장된 마이크로프로세서에 의해 흡광도가 자동측정된 차이로 사려된다. 농도가 낮은 $6.2 \times 10^{-7} M$ chloramphenicol 용액의 경우, 5회 반복 측정한 피아크 전류의 평균값은

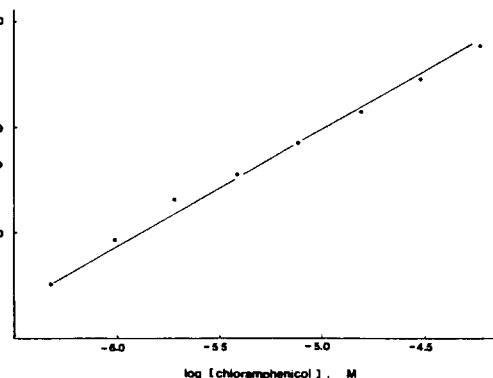


Fig. 2. The relationship between peak currents (i_p) and concentrations (M) of chloramphenicol.

Table 2. Within-day precision studies of chloramphenicol solutions by DPP and UV-spectrophotometry

	Peak current(μA)				Absorbance(A) at 278 nm			
	a	b	c	d	a	b	c	d
X_i	34.50	6.60	0.66	0.062	2.898	0.615	0.064	0.002
	34.30	7.10	0.66	0.062	2.903	0.614	0.065	0.002
	34.75	7.20	0.66	0.065	2.905	0.613	0.065	0.003
	35.60	7.14	0.68	0.062	2.885	0.613	0.065	0.002
	34.00	7.20	0.64	0.065	2.897	0.613	0.065	0.002
\bar{X}	34.63	7.05	0.66	0.063	2.898	0.613	0.065	0.002
S	0.608	0.254	0.014	0.002	0.008	0.001	0.0004	0.0004
R.S.D.(%)	1.76	3.60	2.12	3.17	0.28	0.16	0.62	20

a: $3.1 \times 10^{-4} M$; b: $6.2 \times 10^{-5} M$; c: $6.2 \times 10^{-6} M$; d: $6.2 \times 10^{-7} M$. Chloramphenicol in pH 8.0 ammonium buffer solution. X_i : individual measurement; \bar{X} : mean; S: standard deviation; R.S.D(%): % Relative standard deviation.

$0.063 \mu\text{A}$ 이고 상대표준편차는 3.2%로서 합리적인 데이터로 간주될 수 있으나 흡광도의 평균값은 0.002에 상대표준편차 20%로서 측정의 어려움을 나타내었다.

장기간 정밀도 검사(Inter-Day Precision Study). $6.2 \times 10^{-5} M$ (20 ppm) chloramphenicol의 pH 8.0 완충용액을 제조한 후 2주일간 보관하면서 미분펄스 플라스로그램을 측정하였더니 Fig. 3과 같았으며 변화되는 피크 전류는 Table 3에 나타내었다. 용액 제조 후 2일까지는 -0.40 V 에서의 피크는 현저하지 않았으며 -0.58 V 에서의 피크 전류의 상대 표준편차는 1.4%로서 정밀도가 높았다. 용액 제조 후 6일부터 14일 사이에 -0.40 V 의 피크 전류는 점차로 증가되고 -0.58 V 의 피크 전류는 점차로 감소되었다. 이는 chloramphenicol의 분해

과정으로 예측된다.

자외선 흡수 분광분석법과의 비교. “항생물질의 약품기준법”에서 chloramphenicol의 역가 분석으로 제시된 파장 278 nm 를 이용하여 $4.8 \times 10^{-7} \sim 6.2 \times 10^{-5} M$ chloramphenicol의 pH 8.0 완충용액들에 대관계를 도시하여 Fig. 4에 나타내었다. 또한 미분펄스 플라스로그램과 기준 방법인 278 nm 에서의 자외선 흡수분광 분석법¹ 사이의 상관관계를 보기 위하여 흡광도 측정이 어려운 $4.8 \times 10^{-7} M$ 을 제외한 $9.7 \times 10^{-7} \sim 6.2 \times 10^{-5} M$ 농도범위에서 같은 농도의 chloramphenicol 용액으로부터 측정한 흡광도와 피크 전류로부터 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 $\log A$ 에 대한 $\log i_p$ 의 관계를 도시하였다.

최소자승법(Linear least square method)으로 계산한 기울기는 1.11이었고, 상관계수(correlation coefficient : γ)은 0.996으로서 두 방법 사이에는 상관관계가 높았다.

$6.2 \times 10^{-7} \sim 3.1 \times 10^{-4} M$ chloramphenicol의 pH

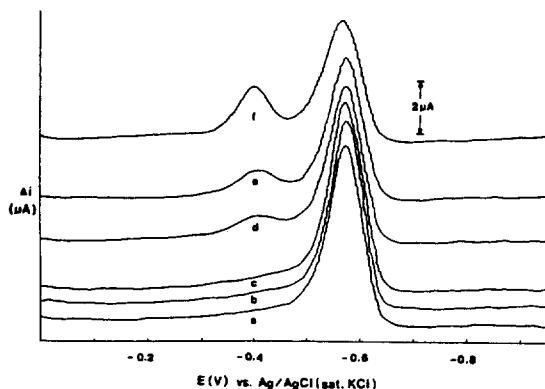


Fig. 3. Differential pulse polarograms of $6.2 \times 10^{-5} M$ chloramphenicol and its degradation product in pH 8.0 ammonium buffer solution. a: fresh preparation; b: 1 day after preparation; c: 2 days after preparation; d: 6 days after preparation; e: 8 days after preparation; f: 14 days after preparation.

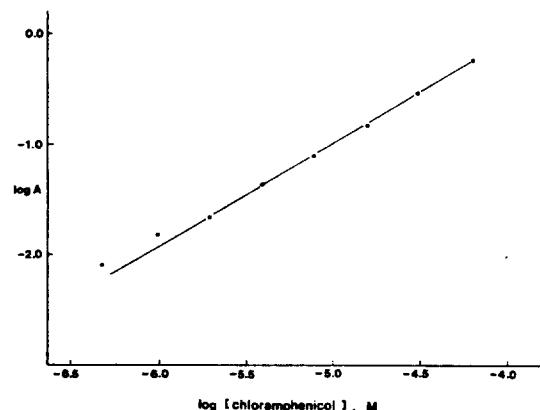


Fig. 4. The relationship between absorbances and concentrations of chloramphenicol.

Table 3. DPP and spectral changes of 20 ppm chloramphenicol in pH 8.0 ammonium buffer

	Peak current (μA)		Wave length maximum (nm)	Absorbance
	at -0.40 V	at -0.58 V		
fresh		6.68	276.9	0.605
1 day after preparation		6.80	276.9	0.601
2 days after preparation		6.90	277.2	0.611
6 days after preparation	0.40	5.50	275.2	0.610
8 days after preparation	0.60	5.00	275.2	0.616
14 days after preparation	1.44	4.16	273.2	0.630

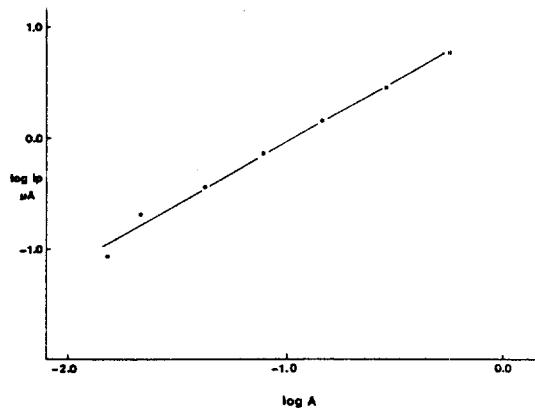


Fig. 5. The relationship between peak currents and absorbances of chloramphenicol.

8.0 암모늄 원총용액에 대하여 1일 이내의 흡광도를 278 nm에서 5회 반복 측정한 결과 Table 2에 DDP 법의 피이크 전류와 함께 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 $6.2 \times 10^{-6} M$ 보다 진한 용액에서는 상대 표준편차가 1% 이내로 좋은 정밀도를 보였다. 또한 20 ppm($6.2 \times 10^{-5} M$) chloramphenicol의 pH 8.0 암모늄 원총용액을 제조 후 2주일간 보관하면서 파장변화에 따른 흡광도를 측정하여 최대흡광도를 주는 파장(λ_{max})과 흡광도를 Table 3에 나타내었다. 흡광도를 나타내는 영역의 12개의 파장에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 Fig. 6에 나타내었는데 그림에서 보는 바와 같이 스펙트럼이 약간씩 변화하면서 시일이 경과함에 따라 λ_{max} 가 단파장쪽으로 약간 이동하였다. 이러한 결과는 미분 펄스 폴라로그래피법에서 관찰한 바와 같이 분해 생성물의 존재를 나타내는데 미분 펄스 폴라로그래피법이 자외선 분광광도법 보다 좀 더 명확하게 분해 생성물의 존재를 나타내고 있다.

Fossdal과 Jacobsen⁵⁾이 발표한 폴라로그래피에 의한 chloramphenicol의 정량분석에서는 0.003% decylamine⁶⁾이 함유된 pH 4.7 아세트산염 원총용액을 지지전해질로 사용하여 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.7 \times 10^{-3} M$ 에서 확산 전류가 농도에 비례함을 나타내었다. 본 연구에서는 polarographic maximum의 억제제로 사용되는 decylamine의 첨가가 필요없고 pH 2.7~11.2 영역에서 같은 농도의 chloramphenicol에 대하여 피이크 전류가 제일 큰 pH 8.0 암모늄 원총용

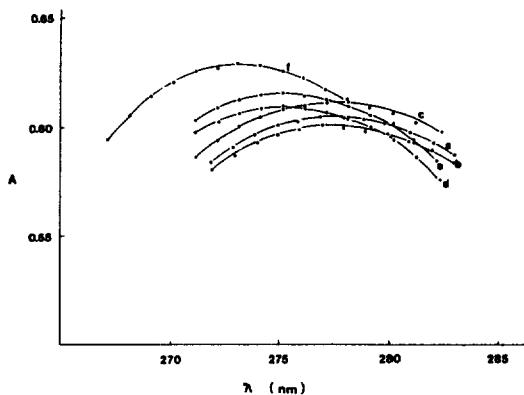


Fig. 6. Ultraviolet spectrums $6.2 \times 10^{-5} M$ chloramphenicol in pH 8.0 ammonium buffer solution. a: fresh preparation; b: 1 day after preparation; c: 2 days after preparation; d: 6 days after preparation; e: 8 days after preparation; f: 14 days after preparation.

액을 지지전해질로 사용하였다. 그리고 $4.8 \times 10^{-7} \sim 6.2 \times 10^{-5} M$ chloramphenicol 용액에 있어서 피이크 전류가 농도에 비례함을 실험적으로 나타내어 직류 폴라로그래피법⁵보다 미분 펄스 폴라로그래피법이 더 낮은 농도의 chloramphenicol을 정량분석 할 수 있음을 보여주었다. 본 실험에서 지지전해질의 pH가 증가됨에 따라 피이크 전위(E_p)가 음의 방향으로 커지는 것은 H^+ 가 환원반응에 사용되는 것을 의미 하며 pH 2.7~8.9 사이에서 실온에서 측정한 pH 당 피이크 전위의 변화(E_p/pH)가 $-59.7 \text{ mV}/\text{pH}$ 이었는데 이는 같은 수의 H^+ 와 전자가 환원반응에 관여함을 나타내어 Fossdal과 Jacobsen⁶⁾이 제시한 환원반응 과정을 입증해 준다.

인 용 문 헌

- 보건사회부 “항생물질의약품기준”, 대한민국, 1986.
- P. D. Shaw, *Anal. Chem.*, **35**, 1580 (1963).
- Y. T. Lin, K. T. Wan, and T. I. Wang, *J. Chromatogr.*, **21**, 158 (1966).
- K. R. Kim, J. H. Kim, and K. S. Choi, *Yakhak Hoeji*, **29**, 50 (1985).
- K. Fossdal and E. Jacobsen, *Anal. Chim. Acta*, **56**, 105 (1971).
- Y. Hahn, *J. of SangMyung Women's Univ.*, **10**, 489 (1982).