

Application News

No. SSK-LC-2401

액체크로마토그래피-전기화학검출기를 이용한 겐타마이신 황산염 중 겐타마이신 및 불순물의 분석

Analysis of gentamicin and impurities in gentamicin sulfate using Liquid chromatography-Electrochemical detector

사용자 활용 포인트

- ◆ Shimadzu Nexera XR system과 GL Science ED743을 이용하여 겐타마이신 황산염 중 겐타마이신과 불순물을 분석하였다.
- ◆ 유럽약전(European Pharmacopoeia) 11.0에 기재된 겐타마이신 황산염 분석의 시스템적합성 허용기준을 모두 충족하였다.
- ◆ 확립된 분석조건으로 사용자가 편리하게 겐타마이신 황산염 분석을 진행할 수 있다.

■ 서론

겐타마이신 황산염은 다양한 병원균 감염을 치료하기 위해 사용되는 항생제 중 하나이며, 각 겐타마이신들의 서로 유사한 화학 및 물리적인 특성으로 인해 겐타마이신 혼합물로 존재한다. 따라서 상용화된 겐타마이신 황산염의 주요 성분은 겐타마이신 C1, C1a, C2, C2a, C2b로 구성되어 있으며, 일부 불순물도 소량 함유하고 있다.

이에 유럽약전 11.0 중 겐타마이신 황산염 항목에서는 액체크로마토그래피-전기화학검출기를 이용한 겐타마이신 황산염 분석 시스템적합성 허용기준과 성분 함량시험법을 소개하고 있다.

이 뉴스레터에서는 유럽약전 11.0에 기재된 겐타마이신 황산염 분석법에 따라 Shimadzu Nexera XR system과 GL Science ED743을 이용하여 시스템적합성 평가를 진행하였으며, 시료 중 겐타마이신 및 불순물의 함량을 확인하였다. 또한, 겐타마이신 황산염 표준용액을 이용하여 반복성 및 직선성을 확인하였다.

■ 용액의 조제 및 시료 전처리

이동상 용매

이동상 용매로 증류수 900 mL 에 Trifluoroacetic acid 7 mL와 Pentafluoropropionic acid 250 µL를 첨가한 후, NaOH 수용액을 이용하여 용액의 pH를 2.6으로 조정하였다. 이후 Acetonitrile 30 mL를 첨가하고 전체 용액의 부피가 1 L가 되도록 증류수로 채운다.

포스트컬럼 용액

50 % NaOH 수용액을 증류수로 희석하여 0.5 M NaOH 수용액을 조제한다.

시험시료 전처리

시험용액 (a)

겐타마이신 황산염 시료 농도가 1,000 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

시험용액 (b)

겐타마이신 황산염 시료 농도가 200 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

시스템적합성시료 전처리

참조 용액 (a)

겐타마이신 표준물질의 농도가 200 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석하여 조제한다.

참조 용액 (b)

시소마이신 표준물질의 농도가 1,000 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석하여 조제한다.

참조 용액 (c)

참조용액 (b)를 이용하여 시소마이신 표준물질의 농도가 10 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

참조 용액 (d)

시소마이신 표준물질의 농도가 20 µg/mL, 겐타마이신 황산염 시료 농도가 100 µg/mL의 혼합용액이 되도록 이동상 용매로 희석하여 조제한다.

■ 분석조건

유럽약전 11.0에 기재된 겐타마이신 황산염 분석법을 참고하여 설정한 기기 분석조건을 표1과 표2에 나타내었다.

표 1. 기기 분석조건

Column	: GL Science InertSustain C18 (4.6 mm x 250 mm I.D., 5 µm)
Mobile phase	: 7 mL/L Trifluoroacetic acid, 250 µL/L Pentafluoropropionic acid buffered pH 2.6 with NaOH, 30 mL/L Acetonitrile
Flow rate	: 1.0 mL/min
Post-column solution	: 0.5 M NaOH in H ₂ O
Flow rate of post-column solution	: 0.3 mL/min
Column temp.	: 35 °C
Injection volume	: 20 µL
Sample cooler	: 15 °C
Detector	: Electrochemical Detector (ED743, Gold)
✓ Using 375 µL (PTFE, 0.25 mm x 7.65 m) Polymeric mixing coil	

표 2. ECD의 PAD* 조건

Detection	ECD Pulse Mode
E1: 50 mV	T1: 50 ms
E2: 750 mV	T2: 300 ms
E3: -150 mV	T3: 300 ms
E4: 0 mV	T4: 0 ms
	Ts: 50 ms

*: Pulsed Amperometric Detection

■ 겐타마이신의 확인

참조용액 (a)를 분석하여 그림 1과 같이 겐타마이신 5종의 피크가 모두 분리되는 것을 확인하였다.

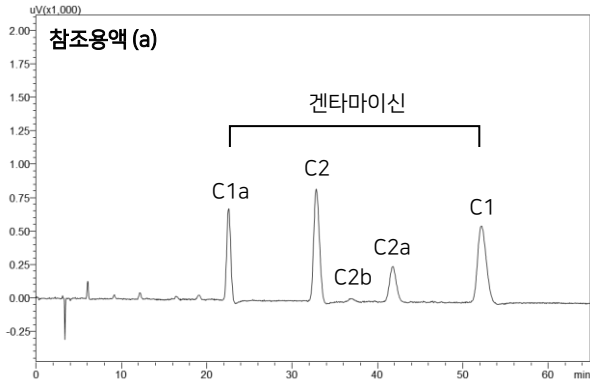


그림 1. 참조용액 (a)의 크로마토그램

■ 시스템적합성 평가

유럽약전 11.0에 기재된 겐타마이신 황산염 분석의 시스템적합성 항목과 그 허용기준은 표 3과 같다.

표 3. 겐타마이신 황산염 분석의 시스템적합성 항목

시스템적합성 항목		허용기준
S/N 비	시소마이신	≥ 20
분리도	시소마이신 - 겐타마이신 C1a	≥ 1.2
	겐타마이신 C2 - 겐타마이신 C2b	≥ 1.5

S/N 비 확인

참조용액 (c)를 분석하였을 때 표 4와 같이 S/N 비 허용기준을 충족하였으며 크로마토그램은 그림 2에 나타내었다.

표 4. 시스템적합성 평가 결과(S/N 비)

분석물질	S/N 비 (허용기준)
시소마이신	117 (≥ 20)

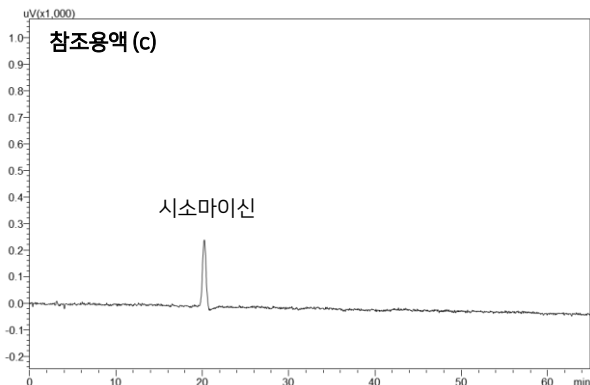


그림 2. 참조용액 (c)의 크로마토그램

분리도 확인

참조용액 (d)를 분석하였을 때 표 5와 같이 분리도 허용기준을 충족하였으며 크로마토그램은 그림 3에 나타내었다.

표 5. 시스템적합성 평가결과(분리도)

분석물질 짝	분리도 (허용기준)
시소마이신 - 겐타마이신 C1a	3.0 (≥ 1.2)
겐타마이신 C2 - 겐타마이신 C2b	3.5 (≥ 1.5)

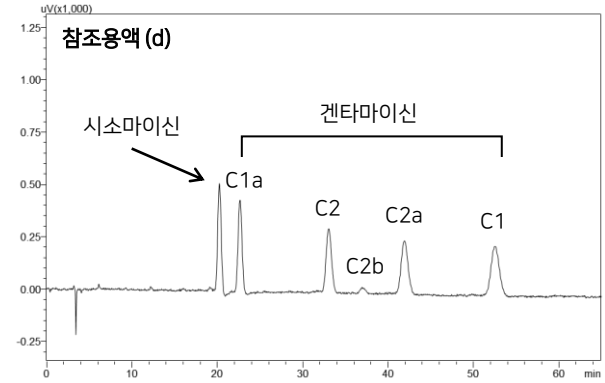


그림 3. 참조용액 (d)의 크로마토그램

■ 시료 분석

겐타마이신 함량

겐타마이신 황산염 시료 중 겐타마이신 함량을 확인하기 위해 시험용액 (b)를 분석하였다. 유럽약전 11.0에 기재된 겐타마이신의 함량기준과 실제 함량결과를 표 6에 나타내었으며 실제 함량결과는 함량기준을 충족하였다. 시험용액 (b)의 크로마토그램은 그림 4에 나타내었다.

표 6. 시료 중 겐타마이신 함량기준과 실제 함량결과

겐타마이신	함량기준	실제 함량결과
C1	25.0 - 45.0 %	26.2%
C1a	10.0 - 30.0%	22.8%
C2 + C2a + C2b	35.0 - 55.0%	47.6%

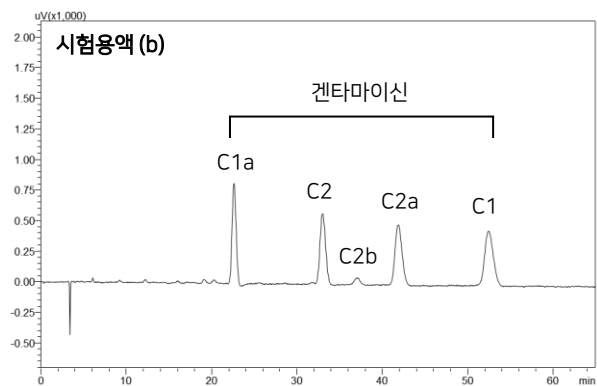


그림 4. 시험용액 (b)의 크로마토그램

불순물 함량

겐타마이신 황산염 시료 중 불순물 함량을 확인하기 위해 시험용액 (a)를 분석하였고 함량 계산에 참조용액 (c)의 시소마이신 피크면적을 이용하였다.

유럽약전 11.0에 기재된 불순물의 함량기준과 실제 함량결과는 표 7에 나타내었으며 실제 함량결과는 함량기준을 충족하였다. 시험용액 (a)의 크로마토그램은 그림 5에 나타내었다.

표 7. 시료 중 불순물 함량기준과 실제 함량결과

시험용액 (a) 중 불순물	함량기준	실제 함량결과
	참조용액 (c) 시소마이신 면적의	참조용액 (c) 시소마이신 면적의
불순물 A	3배 이하	0.15배 이하
불순물 B	3배 이하	0.07배 이하
그 외 불순물	3배 이하	0.14배 이하
전체 불순물	10배 이하	0.28배 이하

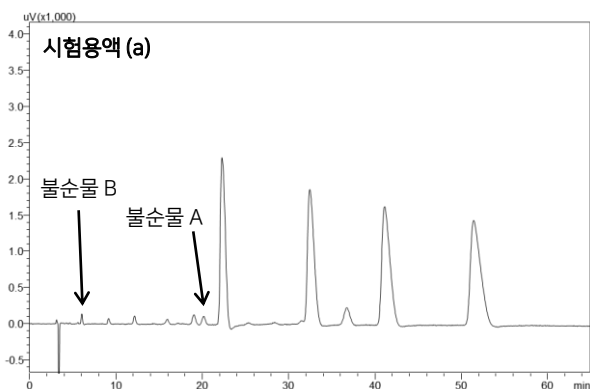


그림 5. 시험용액 (a)의 크로마토그램

■ 반복성

겐타마이신 황산염 표준물질을 200 µg/mL 농도로 조제하여 반복성을 평가하였다. 5회 반복 분석 시 겐타마이신 C1a, C2, C2b, C2a 와 C1의 크로마토그램은 그림 6에 나와있고 상대표준편차는 모두 2.5% 이하로 확인되었으며 각각의 결과는 표 8에 나타내었다.

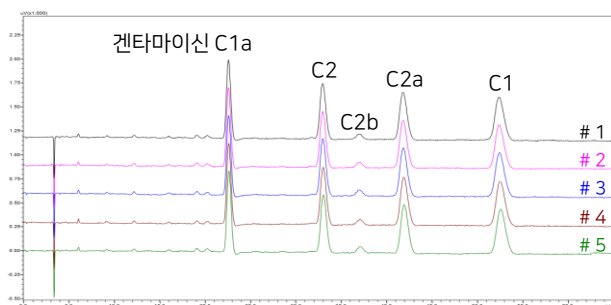


그림 6. 겐타마이신 황산염(200 µg/mL)의 반복 분석 크로마토그램

표 8. 반복성 결과 (n=5)

반복성 (n=5)	겐타마이신				
	C1a	C2	C2b	C2a	C1
상대표준편차(%)	2.5	1.2	2.3	1.6	1.9

■ 직선성

각 겐타마이신의 검량선을 10 - 200 µg/mL 범위 내에서 작성하여 직선성을 확인하였다. 모든 겐타마이신의 검량선은 0.997 이상의 우수한 R²값을 나타내었다 (그림 7).

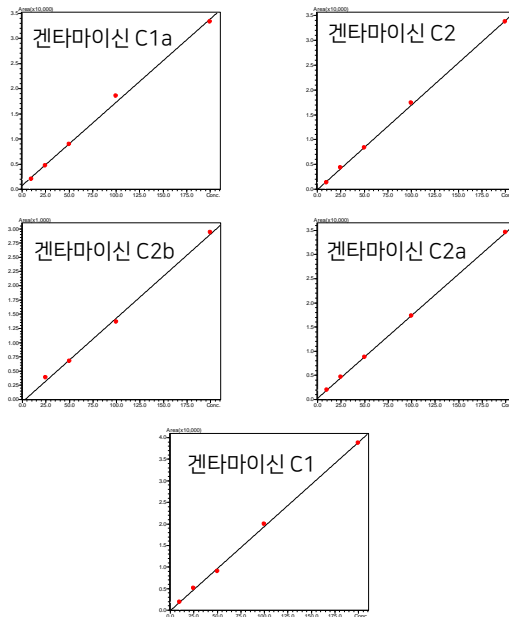


그림 7. 겐타마이신 5종의 검량선

■ 결론

이 뉴스레터에서는 Shimadzu Nexera XR system과 GL Science ED743을 이용하여 유럽약전 11.0에 기재된 겐타마이신 황산염 분석법에 따라 겐타마이신 황산염 분석을 진행하였다. 분석 결과, 시스템적합성 허용기준을 충족하였으며 겐타마이신 황산염 시료의 겐타마이신 및 불순물 함량 분석이 가능하였다. 시료의 반복성과 직선성 평가 결과 또한 우수하게 나타났다.

■ 참고문헌

- 1) Gentamicin Sulfate, European Pharmacopoeia (EP) 11.0