

Application News

No. SSK-LC-2402

액체크로마토그래피-전기화학검출기를 이용한 네오마이신 황산염 중 네오마이신 및 불순물의 분석

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

사용자 활용 포인트

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

■ 서론

아미노글리코사이드 계열 항생물질에 속하는 네오마이신 황산염은 세균의 단백질 합성을 저해하여 살균 작용을 하며 녹농균, 대장균과 같은 그람 음성균으로 인해 발생한 감염 치료에 효과적이다. 네오마이신 황산염의 구성은 일반적으로 네오마이신 A(neamine), 네오마이신 B(framycetin), 네오마이신 C와 몇가지 불순물들로 이루어져 있다.

유럽약전 11.0의 네오마이신 황산염 항목 중 액체 크로마토그래피-전기화학검출기를 이용한 분석법이 기재되어 있다. 이 뉴스레터에서는 유럽약전 11.0의 네오마이신 황산염 분석법에 따라 Shimadzu Nexera XR system과 GL Science ED743을 이용하여 시스템적합성 평가를 수행하고, 네오마이신 시료를 분석하여 불순물 및 함량 분석에 대한 결과를 소개한다.

■ 용액의 조제 및 시료 전처리 방법

이동상 용매

이동상 용매로 증류수 900 mL 에 Trifluoroacetic acid 20.0 mL와 50% Sodium hydroxide solution 6.0 mL를 첨가한다. 이후 전체 용액의 부피가 1 L가 되도록 증류수로 채운다.

포스트컬럼 용액

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

시스템적합성 시료 전처리 방법

참조용액 (a)

네오마이신 B (framycetin) 표준물질이 500 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

참조용액 (b)

참조용액 (a)를 이용하여 네오마이신 B 표준물질의 농도가 25 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

참조용액 (c)

참조용액 (a)를 이용하여 네오마이신 B 표준물질의 농도가 5 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

참조용액 (d)

네오마이신 A (nemine) 표준물질이 10 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

참조용액 (e)

네오마이신 황산염 표준물질이 100 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

시험시료 전처리 방법

시험용액

시료 농도가 500 µg/mL이 되도록 이동상 용매로 희석한다.

■ 분석조건

유럽약전 11.0에 기재된 네오마이신 황산염 분석법을 참고하여 설정한 기기 분석조건을 표 1과 표 2에 나타내었다.

표 1. 기기 분석조건

Column	: GL Science InertSustain C18 (4.6 mm x 250 mm I.D., 5 µm)
Mobile phase	: 2% Trifluoroacetic acid, 0.3% NaOH in water
Flow rate	: 0.7 mL/min
Post-column solution	: 20 g/L NaOH in H ₂ O
Flow rate of post-column solution	: 0.5 mL/min
Column temp.	: 25 °C
Injection volume	: 10 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: 0 mV	T1: 50 ms
E2: 800 mV	T2: 300 ms
E3: -600 mV	T3: 300 ms
E4: 0 mV	T4: 0 ms
	Ts: 50 ms

*: Pulsed Amperometric Detection

■ 시스템적합성 평가

유럽약전 11.0에 기재된 네오마이신 황산염 분석의 시스템적합성 항목 허용기준과 분석 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3. 네오마이신 황산염 분석의 시스템적합성 항목

시스템적합성 항목			허용기준	분석결과
S/N 비	참조용액 (c)	네오마이신 B	≥ 10	46
분리도	참조용액 (e)	네오마이신 C - B	≥ 2.0	2.6

S/N 비 확인

참조용액 (c)를 분석하였을 때 네오마이신 B의 S/N 비는 46으로 S/N비 허용기준을 충족하였으며, 그림 1에 크로마토그램을 나타내었다.

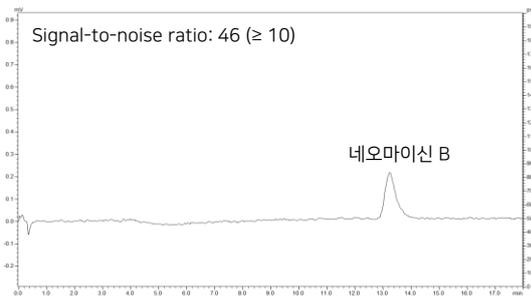


그림 1. 참조용액 (c)의 크로마토그램

분리도

참조용액 (e)를 분석하였을 때 네오마이신 C와 네오마이신 B의 분리도는 2.6으로 분리도 허용기준을 충족하였으며, 그림 2에 크로마토그램을 나타내었다.

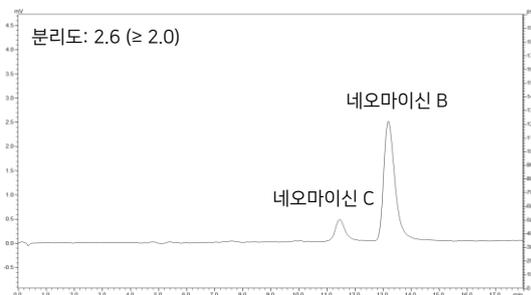


그림 2. 참조용액 (e)의 크로마토그램

■ 반복성

네오마이신 황산염 분석의 시스템적합성 평가 외에 임의의 농도로 네오마이신 혼합용액을 조제하여 반복성 평가를 추가적으로 진행하였다. 네오마이신 A와 B 표준물질의 농도가 각각 25 µg/mL가 되도록 혼합용액을 조제하여 6회 반복 분석하였다. 머무름 시간 및 피크면적에 대한 네오마이신 A의 %RSD는 각각 0.1%, 1.2%, 네오마이신 B의 %RSD는 각각 0.1%, 1.6%로 확인되었다 (표 4).

표 4. 25 µg/mL의 네오마이신 A, B 반복성 결과 (n=6)

네오마이신	Retention time (min)		Peak Area	
	A	B	A	B
RSD(%)	0.1	0.1	1.2	1.6

■ 시료 분석

네오마이신 함량

네오마이신 황산염 시료의 성분 함량을 확인하기 위해 시험용액을 분석하였고 그림 3에 크로마토그램을 나타내었다. 각 성분의 함량 계산은 참조용액(b) 및 참조용액(d)의 네오마이신 피크면적을 이용한다. 유럽약전 11.0에 기재된 각 성분의 함량 기준은 표 5에 정리하였으며, 시험용액 분석 결과, 모든 성분이 함량 기준을 충족하였다.

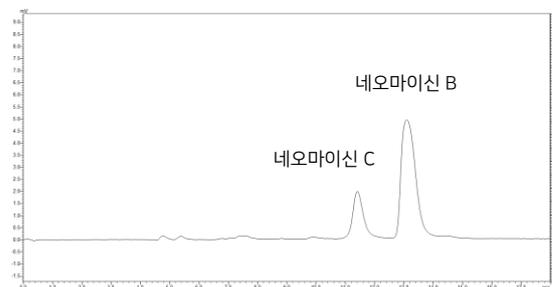


그림 3. 시험용액의 크로마토그램

표 5. 시험용액 중 성분 함량기준

성분	허용기준
네오마이신 A	참조용액 (d) 네오마이신 A 면적의 1배 이하
네오마이신 C	참조용액 (b) 네오마이신 B 면적의 0.6배 이상 - 3배 이하
그 외 불순물	참조용액 (b) 네오마이신 B 면적의 1배 이하
전체 불순물	참조용액 (b) 네오마이신 B 면적의 3배 이하

■ 결론

이 뉴스레터에서는 Shimadzu Nexera XR system과 GL Science ED743을 이용하여 유럽약전 11.0에 기재된 네오마이신 황산염 분석을 진행하였다. 시스템적합성 허용 기준을 충족하여 네오마이신 황산염 시료 분석이 가능하였고, 시료의 반복성 평가 결과 또한 우수하게 나타났다.

■ 참고문헌

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