

파라퀴논 유도체와의 전하이동착물 형성을 이용한 에녹사신 정량

이지연* · 김동오 · 남수자 · 정문모 · 허문회# · 안문규

*경성대학교 약학대학 약학과, #부산지방식품의약품안전청

(Received April 21, 1999)

The Determination of Enoxacin with *p*-Quinone Derivatives

J. Y. Lee*, D. O. Kim, S. J. Nam, M. M. Jung, M. H. Hur#, M. K. Ahn

*Department of Pharmacy, Kyungseong University, #110-1, Daeyundong,
Namgu, Pusan, 608-736, Korea

#Pusan Regional Food & Drug Administration, #123-7, Yongdangdong,
Namgu, Pusan 608-080, Korea

Abstract — Enoxacin[1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-1,8-naphthyridine -3-carboxylic acid, ENX] is a new quinolone antibacterial agent. The method is based on the highly colored charge-transfer complex formation of this drug as a π -electron donor with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane(TCNQ) or chloranil(CL) as π -acceptors. The colored products were measured spectrophotometrically at 842 nm and 552 nm for TCNQ and CL, respectively. The different experimental conditions are optimized. The linearities for TCNQ and CL were 1.6 $\mu\text{g/mL}$ ~32 $\mu\text{g/mL}$ and 6.4 $\mu\text{g/mL}$ ~160 $\mu\text{g/mL}$, respectively and colors were produced in non-aqueous media. This report describes a simple and rapid method for the analysis of enoxacin.

Keywords □ Enoxacin, quinolone, 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane, chloranil, charge-transfer complex.

4-Quinolone계 항생제는 박테리아의 DNA-gyrase에 작용하여 박테리아의 분열기 뿐 아니라 휴지기에도 그람 음성균과 그람 양성균 모두에 작용, 대사작용을 저해하여 살균작용을 나타내며, 이 약물은 신속하게 흡수되어 작용 발현이 빠르고, 조직이나 체액에 고농도로 분포하는 등 생체이용률도 높다. 또한 합성이 비교적 용이하고 저렴하며 경구투여로 뛰어난 항균력을 가져 그 사용이 크게 증가하고 있으며, 주로 호흡기 감염과 비뇨기계 감염에 적용한다. 이미 norfloxacin (NRF), ENX, ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, cinoxacin, enrofloxacin, tosulfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin 등 여러 약물이 제제화되어

있고, 그 외에도 새로운 4-quinolone계 항생제가 계속 개발되고 있어 제제 분석에의 신속, 간편한 방법이 점점 더 요구되어지고 있다.

지금까지 이들 약물은 흡광도법,¹⁻⁵⁾ 형광도법,^{6,7)} 전압전류법,⁸⁻¹⁰⁾ HPLC,¹¹⁻¹³⁾ Ion-Selective Electrode¹⁴⁾ 등 여러 가지 방법으로 정량된 바 있다. 그리고 supracene violet 3B, tropaeolin 000, bromcresol purple, bromphenol blue 등과의 이온쌍착물 형성을 이용한 용매추출분광광도법^{15,16)}과 *p*-quinone 유도체와의 전하이동착물 형성을 이용한 흡광도법^{3,5)} 등이 보고된 바 있다.

p-Quinone 유도체와의 전하이동착물 형성을 이용한 흡광도법은 다른 분석법보다 신속, 간편한 장점을 가지고 있으나, ENX의 경우 alcohol이나 acetonitrile에 녹지 않아 검액을 조제할 수 없는 문제점이 있다. 이에 분석과정에서 사용되는 용매에 대한 조건을 설정

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 051-620-4882 (팩스) 051-628-6540

하여 NFX 및 ENX에 적합한 정량법과 제제 분석에의 적용 가능성을 검토하여 보고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기 - Chloranilic acid(CLA), ENX, TCNQ, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone(DDQ) 등은 Sigma 사, trichloroisocyanuric acid, duroquinone은 Aldrich 사, β -naphthol은 Fluka 사 제품을 사용하였으며, 용매로서 사용한 acetonitrile은 Fisher 사, 1,4-dioxane, dimethyl sulfoxide(DMSO), *N,N*-dimethylformamide(DMF), chloroform 등은 Junsei 사, CL은 Wako 사 제품을 사용하였다.

Spectrophotometer는 Hitach사의 U-3000 모델과 Spectronic사의 spectronic 20D⁺와 Chandos silica cell을 사용하였으며, mixer는 Thermolyne 사, water bath는 동양과학 사의 제품을 사용하였다.

1×10^{-2} M ENX 용액은 DMSO에 녹여 1주일 간격으로 조제하고 사용할 때 희석하여 사용하였고, 5×10^{-3} M TCNQ 용액은 acetonitrile에 녹여 일주일마다 조제하여 냉장보관하였으며, 5×10^{-3} M CL 용액은 acetonitrile에 녹여 상온에 방치 사용하였다.

정량법 - TCNQ 법; $1.6 \sim 32 \mu\text{g/mL}$ ENX용액 150 μL 를 취하여 5×10^{-3} M TCNQ 용액 2 mL를 넣은 후 acetonitrile로 채워 전량 10 mL로 하였다. 잘 혼합하여 상온에서 40분간 방치 후 극대흡수 파장인 842 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

CL 법; $6.4 \sim 160 \mu\text{g/mL}$ ENX용액 300 μL 를 취하여 5×10^{-3} M CL 용액 2 mL를 넣은 후 acetonitrile로 채워 전량 10 mL로 하였다. 잘 혼합하여 60°C에서 10분간 방치 후 극대흡수 파장인 552 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

착물형성 시약의 선택 - β -Naphthol, duroquinone, symclosene 및 DDQ 등은 ENX에 의한 흡광도 변화를 보이지 않았고, CLA의 경우 자체의 흡수파장(452 nm, $A=0.5414$)이 전하이동 착물의 흡수파장(480 nm, $A=0.6839$)과 근접하고 흡광도 차도 크지 않아 부적합하였다. CL은 ENX의 높은 농도에서 흡수 피크를 보였으나 TCNQ에 비해 감도가 낮았다. 이와

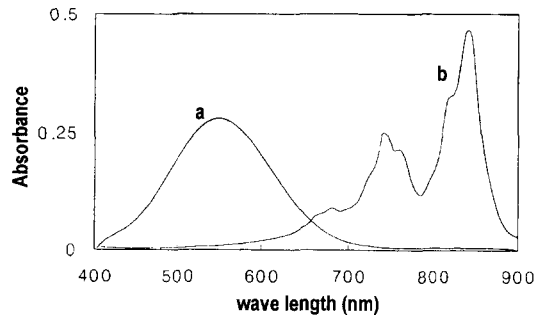
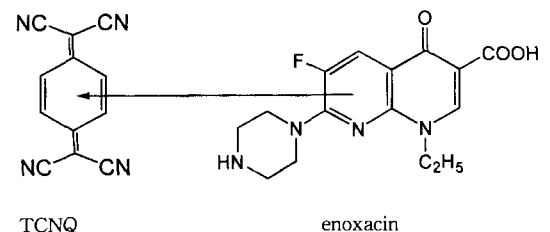


Fig. 1 - Absorption spectra of charge-transfer complexes of ENX-CL (a) and ENX-TCNQ. (b) CL, TCNQ: 1×10^{-3} M, ENX: 3×10^{-5} M(a), 1.5×10^{-5} M(b)

같이 *p*-quinone계 시약들 중 TCNQ가 반응성 및 감도 면에서 가장 적합하였다. CL과 CLA는 60°C에서 10분간 방치하고, DDQ를 사용한 경우는 상온에서 10분간 방치하였으며 TCNQ는 상온에서 40분 방치 후 그 흡광도를 측정하였다.

용매의 선택 - ENX의 CL또는 TCNQ와의 전하이동 착물의 DMSO-acetonitrile 용액 중에서의 흡수곡선은 Fig. 1과 같으며, ENX과 CL의 전하이동 착물은 552 nm에서, ENX과 TCNQ의 전하이동 착물은 842 nm에서 각각 최대 흡수를 나타내었다. Amin 등^{5b}이 발표한 보고를 근거로 한 ENX과 TCNQ의 전하이동 착물의 구조는 Scheme 1과 같으며, π -electron donor로서의 ENX과 π -electron acceptor로서의 *p*-quinone 유도체를 사용하여 전하이동 착물을 형성시켜 흡광도법으로 정량할 경우, ENX이 alcohol이나 acetonitrile에 잘 녹지 않아 이들보다 극성이 큰 DMSO에 녹였다. 이때 희석용매 혹은 TCNQ의 용매로서 DMSO를 사용하는 경우와 acetonitrile을 사용하는 경우를 비교 실험한 결과는 Table I과 같았다. 일정농도의 ENX 150 μL 를 취하여 5×10^{-3} M TCNQ 용액 2 mL를 넣은 후 각기 희석용매로 채워 전량 10 mL로 하였다. DMSO를 희



Scheme 1 - The structure of TCNQ-ENX.

Table I—Effects of solvent on the absorbance of ENX-TCNQ complex

Solvent for TCNQ	Dilution solvent	Absorbance (blank)
DMSO	DMSO	0.6608 (0.2752)
DMSO	acetonitrile	0.2280 (0.1181)
acetonitrile	DMSO	0.6151 (0.1553)
acetonitrile	acetonitrile	0.2822 (-0.0002)

석용매로 사용한 경우 흡광도와 공시험치가 높았으며, acetonitrile의 경우에는 DMSO보다 흡광도와 공시험치도 낮았다. TCNQ를 DMSO에 녹인 경우보다 acetonitrile에 녹인 경우에 더 큰 흡광도를 얻을 수 있었다. 이에 TCNQ의 용매 및 희석용매로서 acetonitrile을 사용하는 것이 더 양호한 결과를 보였다. Amin 등⁵⁾이 보고한 바에 의하면 CL과 TCNQ들은 용매로서 염소계 유기용매를 사용할 수 있으나 chloroform이나 benzene의 경우 용해도가 낮아서 부적합하다고 보고하였다. 그리하여 본 실험에 적합한 유기용매를 선택하기 위하여 염소계 유기 용매 및 다른 유기용매를 사용하여 서로 비교해 본 결과 CL의 경우 acetonitrile, dichloromethane, dichloroethane이 양호하였고 TCNQ의 경우 acetonitrile, DMSO가 양호하였으며 DMF는 TCNQ의 radical anion 생성으로 부적절하였으며, 그외 chloroform과 1,4-Dioxane의 경우 모두 다 낮은 흡광도를 보였다(data not shown). 앞에서 언급한 바와 같이 TCNQ의 경우 DMSO를 사용하면 높은 공시험치가 문제되며, CL의 경우 염소계 유기용매에서도 좋은 흡광도를 보이지만 휘발성에 따른 재현성의 문제와 간독성의 문제가 있어 전체적으로 acetonitrile을 사용하는 것이 가장 적합하였다. 이때 DMSO는 공시험치를 높이므로, DMSO 양의 변화에 따른 공시험치의 변화를 살펴보았다. 전체 10 mL중 DMSO의 양을 1 mL에서 5 mL로 점차적으로 증가시켰을 때 공시험치는 증가하는 추세였으나, CL의 경우 공시험치가 크지 않아 분석에 지장을 주지 않았고(data not shown), TCNQ의 경우 약 150 μ L까지는 공시험치와 거의 같았으므로(Fig. 2) ENX를 용해 시킬 때 150 μ L를 넘지 않도록 하였다.

반응 온도 및 시간 - CL의 경우 60 °C에서 10분간 반응하여 최적의 조건을 얻을 수 있었으며(data not

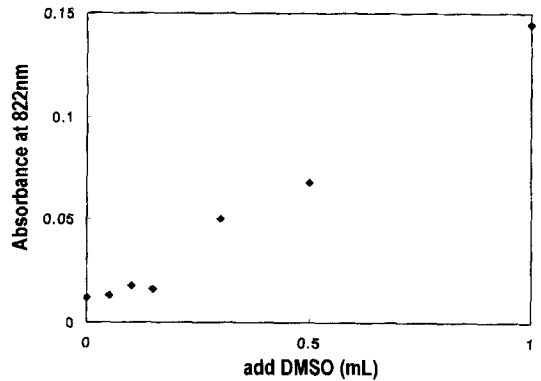


Fig. 2 – Effect of dimethylsulfoxide volume in solvent on the absorbance of TCNQ. TCNQ: 1.0×10^{-3} M

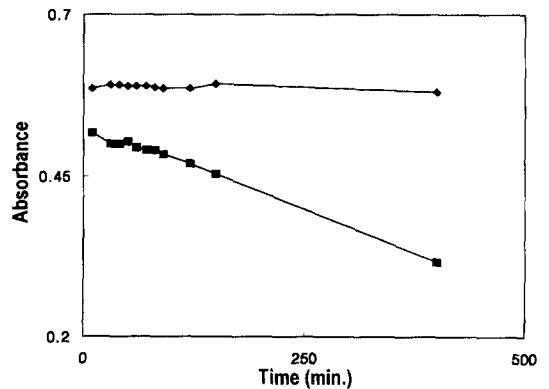


Fig. 3 – Effects of reaction time and temperature on the absorbance of ENX-TCNQ complex. (◆: room temperature, ■: 60 °C) ENX: 3.0×10^{-5} M

shown), TCNQ는 60 °C로 가온시 그 흡광도가 지속적으로 하락하는 등 불안정하였으나 상온에서 40분간 방치시 장시간동안 일정한 흡광도를 유지하였다(Fig. 3).

결합비 - Fig. 4는 CL 및 ENX과의 결합비를 살펴본 것으로 그 결합비가 거의 1:1임을 알 수 있었다. Fig. 5는 TCNQ 및 ENX간의 결합비를 나타낸 것으로서, Amin 등⁵⁾은 NFX과 TCNQ간의 결합비가 1:1이라고 보고하였으나 본 실험에서 몰비법으로 살펴본 결과 ENX에 대하여 1:1결합이 아닌 다른 결합이 일어나고 있는 것으로 나타나 이에 대한 검토가 더 필요할 것으로 생각된다. 그러나 TCNQ의 농도가 ENX에 비해 15배 이상부터 흡광도의 변화가 적었으므로 TCNQ의 양을 1×10^{-3} M로 하였다.

검량선 - 정량법에 따라 CL 혹은 TCNQ와 ENX를 반응시켜 ENX에 대한 검량선을 구한 결과 TCNQ의 경우 1.6~32 μ g/mL, CL은 64~160 μ g/mL에서 직선

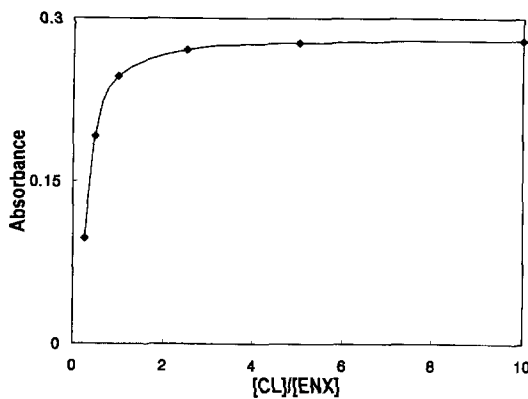


Fig. 4 - Mole ratio plot for CL-ENX complex. ENX: 2.0×10^{-4} M.

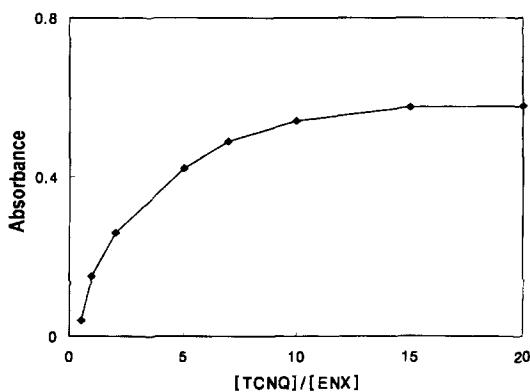


Fig. 5 - Mole ratio plot for TCNQ-ENX complex. ENX: 4.0×10^{-5} M

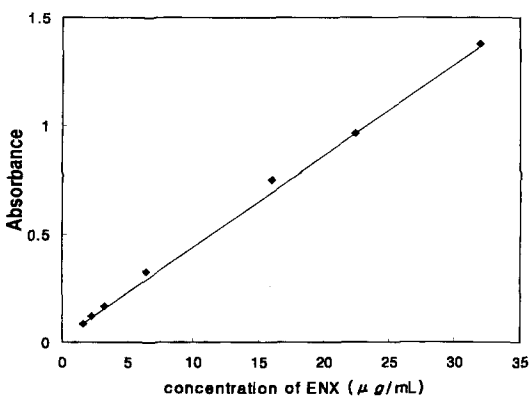


Fig. 6 - Calibration curve for TCNQ-ENX. λ_{\max} for TCNQ-ENX complex: 842 nm

성을 나타내었다(Fig. 6). 회수율은 TCNQ의 경우 98.8%, CL의 경우 101.0%이었으며, 상대표준편차는 각각 1.82%, 2.42%였다. 시판 제제 20개를 혼합하여 ENX 100 mg에 해당하는 양을 정밀히 취한 후 최종

Table II - Analysis of ENX in pharmaceutical formulations
TCNQ method, n=6, (mean \pm S.D)

Samples	Labeled amount of ENX (mg)	Found amount of ENX (mg)
A	100	97.2 \pm 2.43
B	100	102.7 \pm 1.52

Table III - Comparison between the proposed method and Amin's method for TCNQ-NFX complex (n=6)

	Proposed method	Amin's method
Molar absorptivity	1.238×10^4	1.414×10^3
Found (%)	101.4	102.2
RSD(%)	1.19	3.36

농도가 약 $12 \mu\text{g/mL}$ 이 되게 희석하였다. 이를 TCNQ를 이용한 정량법에 따라 정량한 결과는 Table II와 같았다.

비교 - NFX $16 \mu\text{g/mL}$ 에 대하여 본 실험 방법으로 6회 반복실험하여 흡광도를 측정된 결과는 Table III과 같았다. 기존방법⁵⁾과 같이 norfloxacin을 acetonitrile만 사용한 경우 예민도가 낮고 상대표준편차는 크게 나타났으나 DMSO를 사용한 경우, 보다 예민하고 정밀도도 좋았다. 본 방법은 ENX와 NFX 이외에 acetonitrile에 용해도가 낮은 다른 4-quinolone계 항생제에도 적용이 가능할 것으로 생각된다.

결 론

1. ENX는 alcohol 및 acetonitrile등에 용해되지 않아 DMSO에 녹여 검액을 조제하였다.
2. DDQ, CLA의 경우 공시험치가 높을 뿐 아니라 예민성이 낮아 적절치 못하였고, TCNQ나 CL의 경우 공시험치가 낮고 고유의 흡수 스펙트럼을 보였다.
3. 희석용매로서 DMSO와 DMF를 사용한 경우 공시험치가 높아 부적절 하였고 acetonitrile을 사용한 경우 공시험치가 낮고 경시변화에서 안정성을 보였다.
4. 검량선은 TCNQ의 경우 $1.6 \mu\text{g/mL} \sim 32 \mu\text{g/mL}$, CL의 경우 $6.4 \mu\text{g/mL} \sim 160 \mu\text{g/mL}$ 였으며, 상관계수는 모두 0.999였다. TCNQ의 경우 ENX $16 \mu\text{g/mL}$ 에 대하여 6회 반복 실험시 RSD가 1.82 %, CL의 경우 ENX $48 \mu\text{g/mL}$ 에 대하여 2.42 %로 나타나 재현성이 양호하였다.
5. 제제분석에서 A사 및 B사의 함량이 각각 97.2

%, 102.7%로 나타났고 RSD는 각각 2.5%, 1.48%로 나타나 제제분석에의 적용이 가능하였다.

6. NFX을 acetonitrile에 녹이는 기존의 방법과 DMSO에 녹이는 본방법을 비교하여 본 결과 본방법이 예민도와 정밀도 모두 양호 하였으며, acetonitrile에 녹지 않는 4-quinolone계 항생제의 분석에도 적용이 가능할 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Rao, G. R., Avadhanulu, A. B., Giridhar, R. and Kokate, C. K. : Spectrophotometric estimation of norfloxacin in its dosage forms using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride. *Indian Drugs*, **26**(10), 580 (1988).
- 2) Rathore, Y. K. S., Chatterjee, P. K., Mathur, S. C., Lal, S. and Sethi, P. D. : Colorimetric determination of norfloxacin in pharmaceutical formulations. *Indian drugs*, **27**(5), 326 (1989).
- 3) Mishra, P. and Jain, S. : A new colorimetric method for the estimation of norfloxacin in formulations. *Ind. J. Pharm. Sci.*, **54**, 114 (1992).
- 4) Ahmad, A. K. S., Kawy, M. A. and Nebsen, M. : Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of pefloxacin. *Anal. Lett.*, **30**(4), 809 (1997).
- 5) Amin, A. S., Sayed, G. O. E. and Issa, Y. M. : Utility of certain π -acceptors for the spectrophotometric determination of norfloxacin. *Analyst*, **120**, 1189 (1995).
- 6) Ruiz, T. P., lozano, C. M., Tomas, V. and Carpena, J. : Determination of norfloxacin in real samples by different spectrofluorimetric techniques. *Analyst*, **122**, 705 (1997).
- 7) Cabarga, M. M., Navapro, A. S., Gandarillas, C. I. C. and Dominguez-gil, A. : Effects of two cations on gastrointestinal absorption of ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**(10), 2102 (1991).
- 8) Squella, J. A., Lueje, A. A., Sturm, J. C. and Vergara, L. J. N. : Enoxacin: polarographic behaviour and its determination in pharmaceutical forms. *Anal. Lett.*, **26**(9), 1943 (1993).
- 9) Veber, A., Veber, M., Kozjek, F. and Gomissek, S. : Determination of norfloxacin by differential pulse polarography. *Acta Pharm. Jugosl.*, **39**, 321 (1989).
- 10) Zhou, G. and Pan, J. : Polarographic and voltammetric behaviour of ofloxacin and its analytical application. *Anal. Chim. Acta*, **307**, 49 (1995).
- 11) Davis, J. D., Aarons, L. and Houston, J. B. : Simultaneous assay of fluoroquinolones and theophylline in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **621**, 105 (1993).
- 12) Ohkubo, T., Kudo, M. and Sugawara, K. : High-performance liquid chromatographic determination of ofloxacin in serum. *Anal. Sci.*, **7**, 741 (1991).
- 13) Mizuno, A., Uematsu, T., Nakashima, M. : Simultaneous determination of ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin in human hair by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.*, **653**, 187 (1994).
- 14) Avsec, H. and Gomiscek, S. : A study of the prospects for a ciprofloxacin PVC coated wire ion-selective electrode based on 4-quinolones. *Anal. Chim. Acta*, **268**, 307 (1992).
- 15) Tosunoglu, S. and Savci, N. : Two spectrophotometric determination methods of ciprofloxacin with brom-cresol purple and bromphenol blue. *Acta Pharm. Tur.*, **35**, 1 (1993).