

HPLC를 이용한 뇨 및 혈액중의 Pancuronium Bromide의 미량분석

김박광* · 김양숙* · 박성배* · 이종숙** · 정규혁** · 김경님

서울대학교약학대학

*서울시보건환경연구원

**국립과학수사연구소

(Received January 14, 1993)

Microanalysis of Pancuronium Bromide in Urine and Blood by HPLC

Bak-Kwang Kim*, Yang-Suk Kim*, Sung Bae Park*, Jong-Sook Rhee**
Kyu-Hyuck Jung** and Kyung Nim Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 152-742, Korea

*Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment, Seoul 137-130

**National Institute of Scientific Investigation, Seoul, 158-094, Korea

Abstract—HPLC/fluorescence detection method for the analysis of pancuronium bromide in biological fluids was developed. The method depends on the formation of insoluble red complex between pancuronium bromide and rose bengal in aqueous layer. This complex is quantitatively extracted from aqueous layer into chloroform layer. The complex is stable for 1 day in chloroform layer at room temperature. It was possible to analyze pancuronium bromide in the range of 0.05~0.5 µg/ml without the effect of co-prescribed drugs.

Keywords □ Pancuronium bromide, rose bengal, ion pair extraction, HPLC analysis

Pancuronium bromide (PcBr)는 biquaternary ammonium steroid 구조로서 수술시 근육 이완제로 널리 이용되고 있는 약물이다. 이 약물은 생체내에서 3, 17 위치의 아세틸기가 가수 분해되어 3-하이드록시, 17-하이드록시 그리고 3, 17-hydroxy pancuronium bromide로 대사된다¹⁾(Fig. 1). 이 약물은 간에 고농도로 축적되며²⁾ 치사량³⁾ ($LC_{50}=0.047$ mg/kg in mice) 매우 낮기 때문에 의료사고나 약화사고의 원인규명 및 약물 동력학적 측면에서 응용할 수 있는 시험법이 요구되는 약물이다.

일반적으로 암모늄 화합물의 정량에 있어서 다음의 p-phenylazobenzamide 및 p-phenylazobenzenesulfonamide,⁴⁾ chloroplatinate salt,⁵⁾ thio urea,⁶⁾ chloranil,⁷⁾ chloranilic acid,⁸⁾ nitroso-R salt,⁹⁾ I₂,¹⁰⁻¹¹⁾ 그리고

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

picric acid¹²⁾ 등의 여러가지 이온 회합시약을 이용한 분석법이 보고되어 있다. Cohen은¹³⁾ 이온 회합시약으로 rose bengal(RB)을 이용하여 암모늄 화합물인 (+)-tubocurarine을 정량한 바가 있다.

PcBr은 수용성 약물이기 때문에 생체 시료중 함유되었을 경우 자체로는 유기용매로 추출되지 않으며 UV 흡수단을 가지고 있지 않으므로 검출의 어려움이 있다. 그러나 이 약물은 수용성 형광색소인 RB(rose bengal)와 착체를 형성하여 유기층으로 이행된다(Fig. 2).

PcBr의 대사체들도 RB와 모두 같은 착체를 형성하므로 암모늄 화합물인 PcBr과 그 대사체에 대해서도 선택적인 분석이 가능하다. 이 방법으로 Ursula 등은¹⁾ plasma, liver, kidney, bile 그리고 urine에 함유된 PcBr, 그리고 Lemuel 등은¹⁴⁾ 모체와 태출의

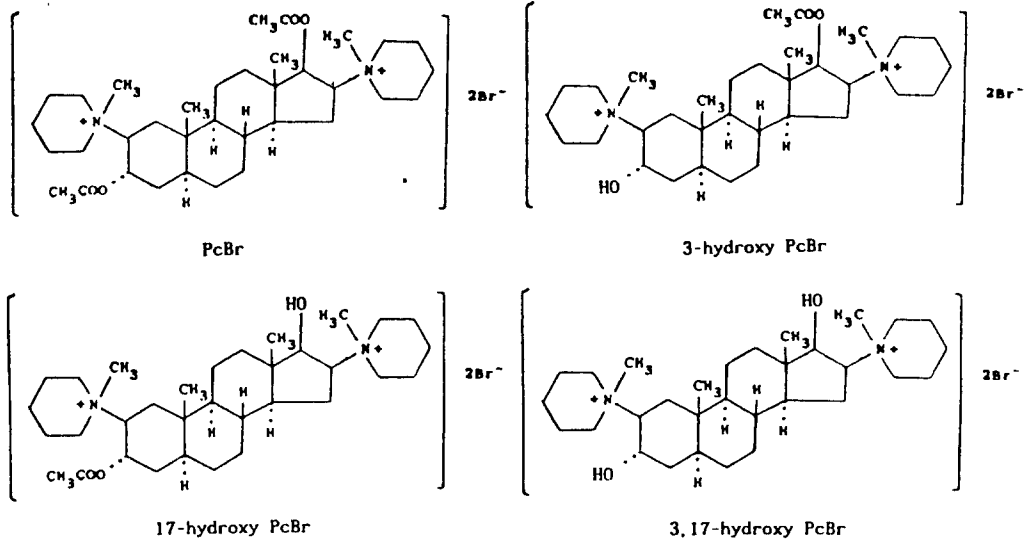


Fig. 1—Structure of PcBr and deacetylated metabolites.

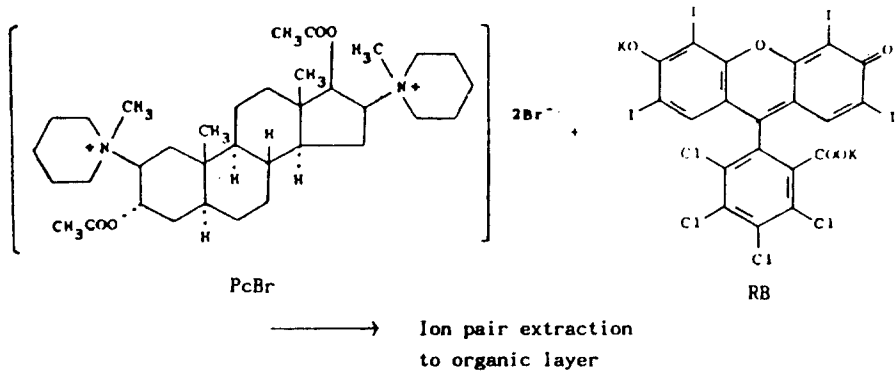


Fig. 2—Ion pair extraction of pancuronium bromide with rose bengal.

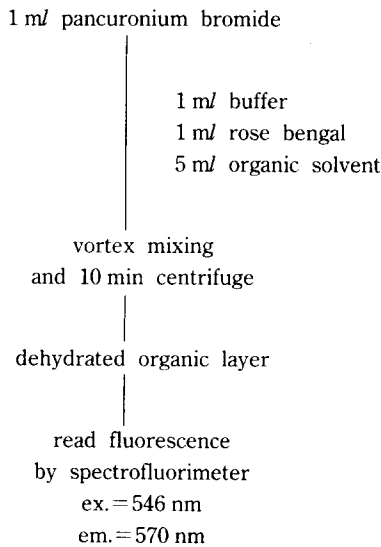
혈청중에 함유된 PcBr을 정량하여 보고한 바 있다.

본 실험에서는 PcBr을 정량하기 위해 RB를 이온 회합시약으로 이용하여 추출시 완충액의 pH, 진탕시간, 추출용매, 착체의 결합비율을 실험하여 추출시 최적조건을 설정하였다. 이 조건하에서 뇨와 혈액중에 함유된 PcBr의 이온쌍 추출조작을 한 후 고속 액체 크로마토그래피를 이용하여 형광검출기로 RB를 분석하므로써 PcBr을 간접정량하는 방법을 확립하였다. 또한 수술시 PcBr과 함께 투여될 수 있는 동시 처방약물의 영향도 검토하여 보았다.

실험방법 및 결과

시료 및 시약—Rose bengal (Sigma R4507: RB)은 시판 특급 시약을 구입하여 0.45 M K₂HPO₄에 녹여 500 µg/ml 용액으로 조제한 후 동량의 클로로포름으로 3회 세척하여 사용하였다. 판큐로니움 브로마이드는 시판표준품을 구입하여 증류수에 녹여 1×10⁻⁴ M 용액을 조제하였다. 위의 용액들은 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

완충액은 Elving의¹⁵⁾ 방법에 따라 구연산 완충액을



Scheme I—Extraction of pancuronium-rose bengal complex

사용하였으며 (이온강도 0.5), 본 실험에 사용한 인산염완충액(pH 10.5)은 K_2HPO_4 35.0g과 10N KOH 2 ml를 가해 증류수를 사용하여 1L로 조제하였다.

본 실험에 사용된 추출용매는 증류한 클로로포름을 사용하여 에탄올이 0.75% 함유되도록 조제하였다. 고속 액체크로마토그래피에 사용된 용매로는 HPLC 용 메탄올과 탈이온 처리된 증류수를 사용하였고 이온안정화제로 테트라부틸암모늄 포스페이트 염이 함유된 IPC A(Alltech 10009) 시약을 사용하였다. 동시 처방약물의 영향을 알아보기 위하여 사용한 약물들은 working standard를 이용하였다. 뇨와 혈액은 건강한 성인으로부터 얻었으며 냉동보관 하였다.

기 기—형광측정에는 spectrofluorometer MK₂ (Ferrand Optical Co. Inc.)를 이용하였으며 표준물질로 퀴닌술페이트를 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 조제하여 ex.=350 nm, em.=450 nm에서 측정하여 매번 보정하여 주었다. 고속액체크로마토그래피는 Waters사의 U6K injector, M-6000A pump, 470 형광검출기를 사용하였다.

추출조건의 검토

1) pH의 영향—Scheme I의 방법에 따라 RB를 이온 회합시약으로 이용한 PcBr의 유기용매로의 추

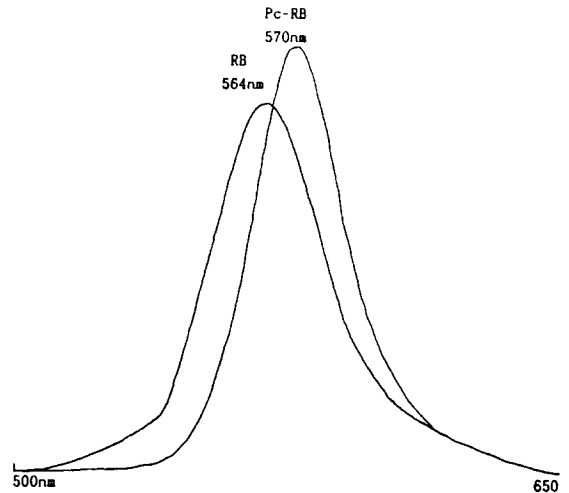


Fig. 3—Emission fluorescence spectra of Pc-RB in chloroform and in D.W. against Exi.=546 nm.

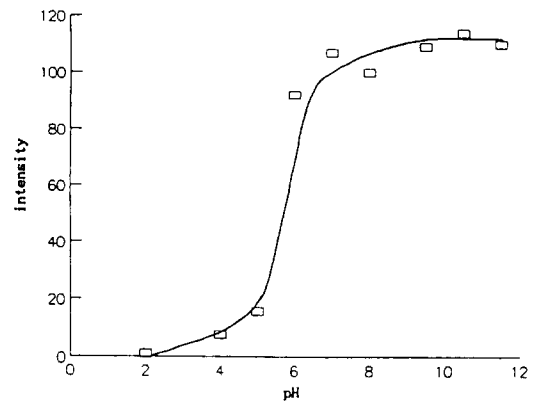


Fig. 4—Effect of pH.

출은 수용액의 액성에 영향을 받는다. pH 2.0~11.5의 여러 완충액에 대한 PcBr의 추출은 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 pH 6~12 사이에서 양호한 추출을 보여 주었다. 본 실험에서는 인산염 완충액(pH 10.5)을 선택하여 사용하였다.

2) 추출용매—PcBr-RB 이온착제는 여러가지 유기용매에 대한 이행정도가 각각 다르다. 디클로로메탄, 클로로포름, 사염화탄소, 사이크로헥산, 헥산, n-헵탄, 에테르에 대하여 실험한 결과 알킬 클로라이드 계통의 디클로로메탄과 클로로포름이 양호한 추출효과를 나타내었다. 본 실험에서는 클로로포름을 추출용매로 선택하여 사용하였다.

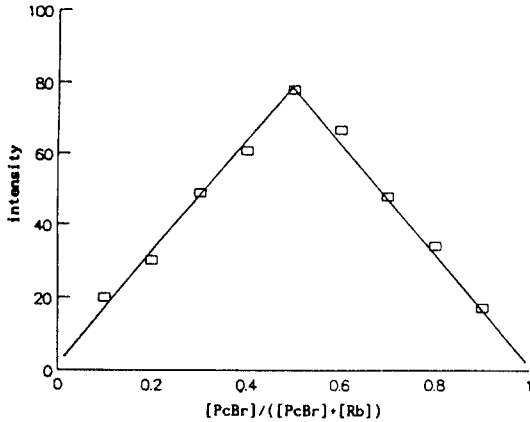


Fig. 5—Continuous variation method.

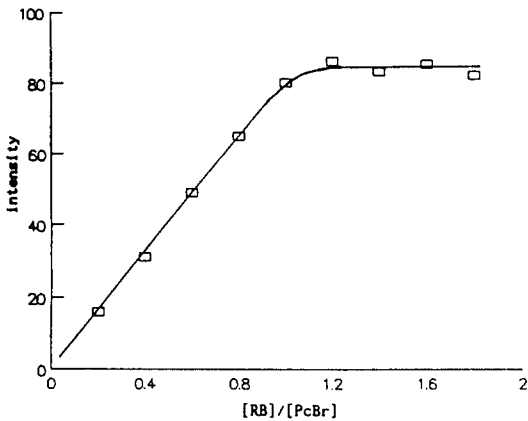
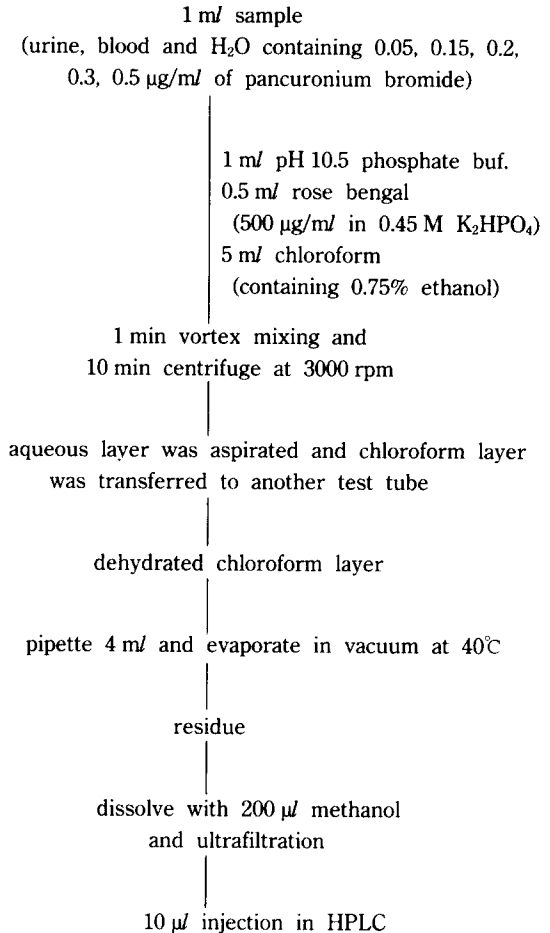


Fig. 6—Mole ratio method.

3) 추출시간—추출조작에 있어서 진탕시간을 30초, 1분, 5분, 30분 및 1시간으로 하여 실험한 결과 모두 일정한 형광값을 보여 PcBr-RB 이온착체의 유기용매로의 추출은 신속하게 이루어짐을 알 수 있었다. 본 실험에서는 진탕시간을 1분으로 고정하여 실험하였다.

4) 착체의 결합비율—PcBr을 추출하기 위하여 필요한 RB의 양은 JOB의 연속 변화법과 몰비법에 의한 착체의 결합비율로서 알 수 있었다.

연속변화법은 PcBr과 RB를 각각 1:9, 2:8, ..., 8:2, 9:1의 몰비로 가하고 추출한 후 유기용매층으로 이행된 이온쌍에 대한 형광값을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 전체 물속에 대한 PcBr의 몰비가 0.5일 때 최대값을 보였다.



Scheme II—Preparation of sample

몰비법은 PcBr을 1.5×10^{-6} M 농도로 일정하게 하고 RB를 각각 0.3×10^{-6} M에서 2.7×10^{-6} M로 점차 증가시키면서 가하여 추출하였다. Fig. 6과 같이 PcBr에 대한 RB의 몰비가 1일 때 최대 형광값을 보였다. 이로부터 PcBr과 RB의 착체 형성을 위한 결합비율은 1:1의 몰비로 결합됨을 알 수 있었다.

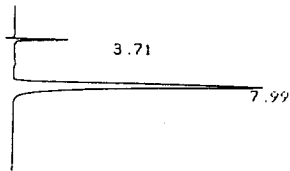
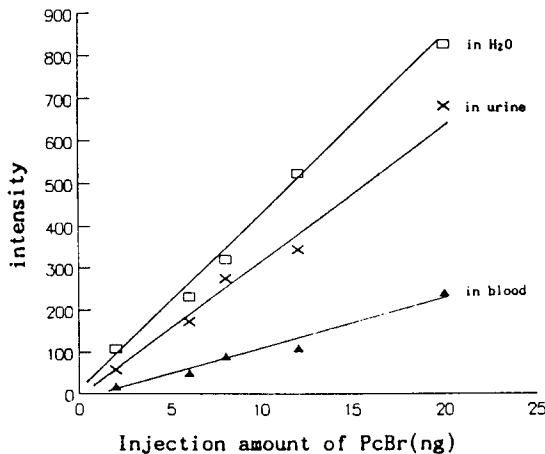
생체 시료중의 pancuronium bromide의 정량

1) 시료의 조제 및 추출—혈액시료는 자체가 가진 단백성분을 제거하기 위해 10% 트리클로로초산 1.5 ml를 가해 침전시키고, 진탕한 후 원심분리하여 얻은 상침액을 6N 수산화나트륨 2방울로 중화하는 전처리 과정이 필요하였다. 뇨와 혈액중에 함유된 PcBr을

Table I—Analytical condition of HPLC

Column	: μ -Bondapak C ₁₈
Mobile phase	: 70% Methanol+Pic A reagent (Tetra butyl ammonium phosphate salt)
Detector	: Fluorescence (Waters 470)
	: Excitation=546 nm, Emission=570 nm
	: Attenuation=128, Gain= \times 1000,
	Filter=1.5 sec
Flow rate	: 0.8 ml/min
Recorder	: Attenuation=64, Chart speed=0.25 cm/min, OF=20, pt=1000

CHANNEL A INJECT 11/05/91 02:29:88 STORED TO BIN # 24

**Fig. 7**—Chromatogram of rose bengal standard.**Fig. 8**—Calibration curve of PcBr in H₂O, urine and blood.

추출하기 위하여 앞에서 조사한 최적 추출조건을 이용하였다. Scheme II와 같이 인산염 완충액(pH 10.5) 1 ml와 착체 형성을 위한 충분량인 RB(500 μ g/ml in 0.45 M K₂HPO₄) 0.5 ml를 가하였고 추출용매로는 시료를 안정화하기 위하여 0.75% 에탄올이 함유된 클로로포름을 이용하였다. 1분간 진탕 추출한 후 원심 분리하고 착체가 이행된 클로로포름층을 일정량 취

Table II—Effect of co-prescribed drugs

drugs	added amount to PcBr	recovery(%) (n=3)
atropine·HCl	0.13 μ g/ml	108 \pm 8 (SD)
droperidol	0.5 μ g/ml	94 \pm 6 (SD)
fentanyl citrate	0.5 μ g/ml	106 \pm 4 (SD)
glycopyrrolate	0.023 μ g/ml	92 \pm 4 (SD)
hydroxyzine·HCl	8.3 μ g/ml	108 \pm 7 (SD)
ketamine	7.5 μ g/ml	106 \pm 6 (SD)
neostigmine bromide	0.13 μ g/ml	108 \pm 2 (SD)
pyridostigmine bromide	1.3 μ g/ml	100 \pm 2 (SD)
succinyl choline	20.0 μ g/ml	100 \pm 4 (SD)
thiopental sodium	17.5 μ g/ml	94 \pm 6 (SD)

하여 감압증류하여 남은 잔사를 200 μ l 메탄올에 녹인 후 여과하여, 이 여액을 시료검액으로 하였다.

2) HPLC에 의한 분석—위의 여액 10 μ l을 Table I의 HPLC 조건에 따라 형광검출기로 PcBr-RB 착체의 RB를 분석함으로써 PcBr을 간접정량할 수 있었다. Chromatogram은 Fig. 7과 같이 나타났다. 이로부터 뇨, 혈액 그리고 증류수중에 함유된 PcBr의 검량선은 Fig. 8과 같이 상관계수가 각각 0.993, 0.986 그리고 0.997로서 양호한 직선을 얻을 수 있었다.

시료의 농도가 0.05~0.5 μ g/ml (2.0~20.0 ng*)에서 정량이 가능하였으며 뇨의 경우 0.03 μ g/ml (1.2 ng*), 혈액의 경우 0.05 μ g/ml (2.0 ng*)까지 검출이 가능하였다. (*HPLC 분석시 시료 주입량)

3) 동시처방 약물의 영향—수술시 PcBr과 함께 처방되어 투여될 수 있는 약물들로¹⁶⁾ 인한 방해 작용을 검색하기 위해 다음의 여러 약물들을 PcBr 0.5 μ g/ml에 해당하는 각각의 투여 비율대로 첨가하여 Scheme I의 방법으로 실험하였다.

PcBr 0.5 μ g/ml에 대한 회수율은 Table II에 표시한 바와 같이 108~92.0%로 양호하였으며 따라서 수술시 투여될 수 있는 공존 약물로 인한 방해작용은 거의 없는 것으로 나타났다.

결 론

1) 생체 시료중에 함유된 pancuronium bromide를 정량하기 위하여 rose bengal과 착체를 형성시켜 유기층으로 이행시키고 HPLC를 이용하여, 형광검출기로 rose bengal을 분석함으로써 pancuronium bro-

mide를 간접 정량할 수 있었다.

2) 착체의 이행은 완충액의 pH가 6~12, 추출용매로는 디클로로메탄, 클로로포름을 사용하였을 때 양호하였으며, 연속변화법과 몰비법으로 실험한 결과 1:1의 몰비로 착체가 형성됨을 알 수 있었다.

3) HPLC에 의한 분석은 μ -Bondapak C₁₈ 칼럼과 IPC A (Alltech 10009) 시약이 함유된 70% 메탄올을 이동상으로하여 형광검출기의 ex.=546 nm, em.=570 nm 파장을 선택하여 분석하였다.

4) 뇨와 혈액중에 함유된 pancuronium bromide를 분석한 결과 검출한계는 뇨의 경우 0.03 μ g/ml(1.2 ng*), 혈액의 경우 0.05 μ g/ml(2.0 ng*)이었으며 pancuronium bromide 0.05~0.5 μ g/ml (2~20 ng*) 농도에서 뇨, 혈액 그리고 증류수는 양호한 직선을 보여주었다>(*HPLC 분석시 시료 주입량)

5) Pancuronium bromide와 동시에 투여되는 약물의 공존시 회수율은 108.0~92.0%로 양호하였고 따라서 동시처방 약물로 인한 방해작용은 거의 없었다.

감사의 말씀

본 연구에 소요된 경비의 일부는 본 대학 교육연구재단 학술조성비 (1992년도) 및 신의약품 개발 센터 지원에 의해서 충당되었으며 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

- 1) Ursula, W. Kersten, Meijer, D. K. F. and Agoston, S.: Fluorimetric and chromatographic determination of pancuronium bromide and it's metabolite in biological materials, *Clinica Acta* **44**, 59-66 (1973).
- 2) F. Ban Der Veen: Meeting of the dutch physiological and phamacological society, *Rotterdam*, The Netherland, April (1971).
- 3) Buckett, W. R. *et al.*: Pharmacology of pancuronium bromide, a new potent steroidal neuromuscular blocking agent, *loc. cit.* (1968).
- 4) Silverstein, R. M.: Spectrophotometric determination of primary, secondary and tertiary fatty amines in aqueous solution, *Anal. Chem.* **35**, 154 (1963).
- 5) Naga, S., Abe, M., Suzuki, Y. and Korke, H.: Ion pair extraction of aliphatic amines with methyl orange, *Bunseki Kagaku* **35**, 87 (1986).
- 6) Schultz, H. W. and Paveenbampheh, C.: Quantitative GLC analysis of theophyllin, ephedrine·HCl and phenobarbital suspension, *J. Pharm. Sci.* **62**, 1995 (1973).
- 7) Saucin, M. and Van De Vorst, A.: Charge-transfer complexes and molecules of pharmacological interest. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 909 (1971).
- 8) Zakhari, N. A., Rizk, M., Ibrahim, F. and Walash, M. I.: Determination of phenothiazines by charge-transfer complex formation with chloranilic acid, *Talanta* **33**, 111 (1986).
- 9) Jayarama, M., D'Souza, V., Yathirajan, H. S. and Rangaswamy: Interaction of phenothiazines with nitroso-R salt and extractive spectrophotometric determination of phenothiazine drugs, *Talanta* **33**, 352 (1986).
- 10) Foster, R. and Hanson, P.: Electron doner-acceptor complex formation by compounds of biological interest(I), *Biochem. Biophys. Acta.* **112**, 482 (1966).
- 11) Foster, R. and Fyfe, C. A.: Electron doner-acceptor complex formation by compounds of biological interest(II), *Biochem. Biophys. Acta.* **112**, 490 (1966).
- 12) Ock, C. W. and Shin, T. Y.: Spectrophotometric determination of phenothiazine derivatives by using picric acid as electron acceptor, *Yakhak Hoeji* **31**, 322 (1987).
- 13) Cohen, E. N.: Fluorescent analysis of d-tubocurarine·HCl, *J. Lab. Clin. Med.* **61**, 338 (1963).
- 14) Lemuel, B. Wingard, Jr., Ezzat Abouleish, Daniel, C. West and Thomas, J. Goehn.: Modified fluorometric quantitation of pancuronium bromide and metabolites in human material and umbilical serums, *J. of pharmaceutical Science* **68**, 914-916 (1979).
- 15) Elving, P. J., Markowitz, J. M. and Rosenthal, I.: Preparation of buffer systems of constant ionic strength, *Anal. Chem.* **28**, 1179 (1956).
- 16) 카톨릭 의대 중앙 의료원, 원내 상용 의약품 편람 (1990).