

혈장중 비스테로이드성 소염진통제의 HPLC분석

백채선

조선대학교 약학대학

High Performance Liquid Chromatographic Assay of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Plasma

Chai-Sun Baek

College of Pharmacy, Chosun University

A high performance liquid chromatographic method has been developed for the simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma. The simultaneous determination of ibuprofen, fenoprofen and ketoprofen is performed by RP-HPLC with UV detection. The chromatographic system consisted of Spherisorb octyl column(5 μ m); the mobile phase was acetonitrile - 0.5% phosphoric acid(55 : 45, v/v) and the detection wavelength was 230nm. Tolmetin was employed as an internal standard. The method described is rapid and simple with sensitivity limits of 2.0 μ g/ml ibuprofen, 0.5 μ g/ml fenoprofen and 0.3 μ g/ml ketoprofen and is suitable for routine clinical and pharmacokinetic studies.

서 론

비스테로이드계 소염진통제는 관절염 치료등 여러 형태의 염증과 통증치료에 광범위하게 이용되고 있는 약물이며 생체액중 분석법은 주로 HPLC방법으로 이루어져 있다.¹⁻⁷⁾ 생체액중 HPLC분석법의 일반적인 시료제조과정은 산 전처리후 유기용매 추출 및 증발 건조등의 몇 단계의 과정을 거쳐야 하는 번잡성과 감도의 불안전성 등의 문제점이 있으며 더욱이 이러한 시료제조과정들은 혼합약물의 동시분석에 일률적으로 적용할 수 없는 한계점이 있으므로 이를 개선하기 위한 연구가 진행되어왔다.⁸⁻¹⁵⁾

본 연구에서는 생체액중 혼합약물의 동시분석에 적합한 시료제조 과정과 HPLC조건들의 개선

을 통해 비스테로이드성 소염진통제로 널리 이용되고 있는 ibuprofen, fenoprofen과 ketoprofen의 혼합약물에 대한 혈장중의 동시분석법을 확립할 수 있었다.

실험 방법

실험재료 및 기기

본 실험에 사용한 시료로는 ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, tometin(Sigma Chem. Co.)을, 용매로는 acetonitrile, methanol, ethanol(E. Merck의 HPLC용)을 사용하였으며, 기타 다른 시약들은 특급시약(Junsei chemical co.)을 사용하였다. 실험 기기로는 HPLC set에 UV detector(Waters 484)

와 autosampler(Waters 717 plus)를 부착하여 사용하였고, 그 외에 centrifuge(VS-4000, Vision), mixer(Thermolyne), micro balance(Satorius S4)등을 사용하였다.

표준액

Ibuprofen표준액(0.1mg/ml), fenoprofen표준액(0.1mg/ml), ketoprofen표준액(0.1mg/ml), tolmetin표준액(1.00mg/ml) 각각을 50%CH₃CN로 조제하였다.

시료용액

혈장 200 μ l를 시험관에 취하여 각 약물의 표준액을 일정 농도별로 spike하고 내부표준물질 500 μ l를 가하여 1분간 vortex로 혼합한 다음 3000rpm에서 10분간 원심 분리시킨 후 상등액을 autosampler vial에 옮기고 column에 10 μ l씩 주입하였다.

HPLC 측정조건

230nm에서 검출하였으며 column은 Sperisorb octyl(Sigma, 4.6 \times 250mm, 5 μ m)를, 이동상으로는 acetonitrile + 0.5% phosphoric acid(55 : 45,v/v)를 사용하였고, 유속은 1.0ml/min로 주입량은 10 μ l로 하였다.

정량법

내부표준물질에 대한 각 농도의 피크높이비(PHR)의 linear regression 관계로부터 표준검량선을 작성하여 정량하였다.

결과 및 고찰

산성약물에 대한 HPLC분석법들은 그 약물의 물리화학적 특성을 고려한 여러가지의 HPLC조건들중 이동상 및 column의 조합과 추출과정의 개선으로부터 이루어지고 있다. 생체액중 약물분석에

광범위하게 이용되고 있는 HPLC분석법의 일반적인 시료제조과정들은 시료에 대한 산처리 후 유기용매 추출과 질소기류에서 증발 건조 및 이동상용매 등에 의한 reconstitution의 과정등으로 이루어져 있는데, 이처럼 몇 단계의 시료제조과정을 거쳐야 하는 번잡성과 유기용매 추출과정에서 단백질의 불완전한 침전등으로 감도에 영향을 주는 문제점이 있으며 더욱이 혼합약물의 동시분석에 일률적으로 적용할 수 없는 한계점도 가지고 있다. 본 HPLC 방법에서는 시료제조과정을 개선하기 위해 시료에 내부 표준물질을 가하고 진탕과 원심분리 후 그 상등액을 취하여 column에 주입하는 방법으로 시료제조과정을 간소화시킴으로서 혼합약물의 동시분석법 개발에 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 본 HPLC 실험방법으로 230nm의 흡수파장과 acetonitrile-0.5% phosphoric acid (55 : 45, v/v) 이동상과 Sperisorb octyl column의 실험조건에서 얻어진 혈장중 비스테로이드계 소염진통제 혼합약물의 대표적인 chromatograms로부터 각 약물의 유지시간은 tolmetin(내부표준물질) 6.44, ketoprofen 7.36, fenoprofen 10.10, ibuprofen 12.55분이었으며 (Fig. 1), 정량 한계범위는 내부표준물질의 피크높이에 대한 각 약물의 피크높이비(PHR)와 linear regression에 의해서 검토한 결과 $r^2 > 0.997$ 로서 양호한 직선을 얻을 수 있었고(Table I), 혈장에서 검출한계는 ibuprofen 2.0 μ g/ml, fenoprofen 0.5 μ g/ml, ketoprofen 0.3 μ g/ml이었다.

Fig. 1. Typical chromatograms of non-steroidal anti-inflamm-atory drugs in plasma.

A) chromatogram of internal standard ; B) drug mixture Peaks : 1. tolmetin(internal standard, 6.44 min.), 2. ketoprofen(7.36 min.), 3. fenoprofen(10.10 min.), 4. ibuprofen(12.55 min.)

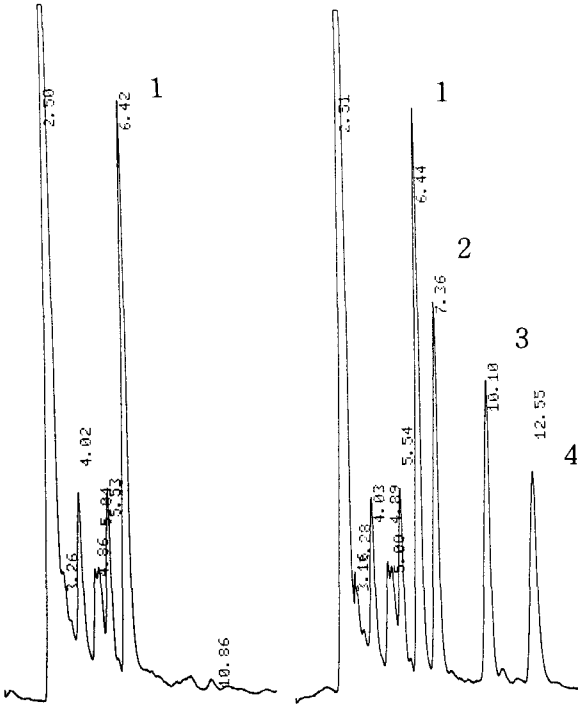


Table I. Linear regression parameters for the standard curves for each drug in plasma

Drug	Slope	r ²
Ibuprofen	0.0088x + 0.0287	0.998
Fenoprofen	0.0406x + 0.0197	0.995
Ketoprofen	0.0449x + 0.0130	0.997

이것은 종전의 분석법들의 검출한계(0.1~10.0µg/ml)와 유사한 범위에서 안정적으로 측정이 가능하였다. 본 HPLC방법에서 interday와 intraday precision은 Table II와 같았다.

Table II. Inter-day and Intra-day precision of non-steroidal anti-inflammatory drugs assay in plasma

Concentration (kg/ml)	coefficient of variation(%), n = 6					
	Inter-day precision			Intra-day precision		
	Ibu	Feno	Keto	Ibu	Feno	Keto
25	8.3	5.4	6.2	6.2	4.3	4.5
50	4.8	4.3	5.4	4.4	4.1	3.9
100	3.2	3.6	4.0	2.7	3.6	2.9
250	5.4	3.0	4.2	3.0	2.4	3.2
500	3.8	2.1	3.5	2.9	3.4	2.1

Ibu : inuprofen, Feno : fenoprofen, Keto : Ketoprofen

즉 5개의 시료에 대해 각기 6회 측정된 결과 interday precision에서 ibuprofen의 coefficient of variation(C.V.)값은 3.2 ~ 8.3%, fenoprofen은 2.1 ~ 5.4 %이고, ketoprofen은 3.5 ~ 6.2%이었으며, intraday precision에서는 ibuprofen은 2.9 ~ 6.3%, fenoprofen은 2.4 ~ 4.3%이고 ketoprofen은 2.1 ~

4.5%이었다. 회수율 측정은 물과 혈장에 각각 첨가하여 4가지의 다른 농도에서 얻어진 PHR 값을 비교 분석하였을 때, ibuprofen의 평균회수율은 95.7%, fenoprofen은 94.0%, ketoprofen은 96.7%이었다(Table III).

Table III. Recovery of analytes from plasma

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery(%), n = 3		
	Ibuprofen	Fenoprofen	Ketoprofen
10.25	95.4	90.9	94.5
20.00	96.5	92.4	96.5
50.50	96.0	95.6	98.4
100.00	94.7	97.0	97.3

결 론

혈장에서 ibuprofen, fenoprofen과 ketoprofen의 비스테로이드성 소염진통제 혼합약물에 대해 octyl column과 UV 검출기(230nm)를 장착한 reverse phase HPLC를 사용하여 acetonitrile - 0.5% phosphoric acid(55 : 45, v/v)의 이동상에서 동시분석한 결과 15분 이내의 유지시간(ibuprofen 7.25, fenoprofen 10.08, ketoprofen 12.72분)에서 분리정량할 수 있었으며, 표준점량선은 ibuprofen 2.0~50 $\mu\text{g/ml}$, fenoprofen 0.5~15 $\mu\text{g/ml}$ 와 ketoprofen 0.3~25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 양호한 직선($r^2 > 0.997$)을 나타내었고, 검출한계로는 ibuprofen 2.0 $\mu\text{g/ml}$, fenoprofen 0.5 $\mu\text{g/ml}$, ketoprofen 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

감사의 말씀

본 연구는 1994년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행된 연구의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) R. A. Upton, J. N. Bunskin, T. W. Guentert, R. L. Williams and S. Riegelman, *J. Chromatogr.*, 190, 119(1980)
- 2) J. L. Shimek, N. G. S. Rao and S. K. Wahba Khalil, *J. Pharm. Sci.*, 70, 514(1981)
- 3) L. J. Dusci and L. P. Hackett, *J. Chromatogr.*,

172, 516(1979)

- 4) K. Oka, S. Aoshima and M. Noguchi, *J. Chromatogr.*, 345, 419(1985)
- 5) B. Levine and Y.H. Caplan, *Clin. Chem.*, 31, 346(1985)
- 6) S. G. Owen, M. S. Roberts and W. T. Friesen, *J. Chromatogr.*, 416, 293(1987)
- 7) P. E. Minkler and C. L. Hoppel, *J. Chromatogr.*, 428, 388(1988)
- 8) A. K. Singh, Y. Jang, U. Mishra and K. Granley, *J. Chromatogr.*, 568, 351(1991)
- 9) D. C. Titus, T. F. August and D. G. Musson, *J. Chromatogr.*, 534, 87(1990)
- 10) S. M. Soglowek, G. Geissinger and K. Brune, *J. Chromatogr.*, 532, 295(1990)
- 11) C. Volland, H. Sun and L. Z. Benet, *J. Chromatogr.*, 534, 127(1990)
- 12) B. M. Lampert and J. T. Stewart, *J. Chromatogr.*, 504, 381(1990)
- 13) P.J. Hayball, R. L. Nation, F. Bochner and R. K. Le Leu, *J. Chromatogr.*, 7, 446(1991)
- 14) R. Mehvar and F. Jamali, *J. Chromatogr.*, 5, 53 (1988)
- 15) A. Mancinelli, G. Bruno, G. Cardace, E. Morabito, A. Marzo and E. A. Martelli, *J. Chromatogr.*, 553, 81(1991)