

혈장중 Ofloxacin의 HPLC분석

백채선 · 김영수
조선대학교 약학대학

High Performance Liquid Chromatographic Assay of Ofloxacin in Plasma

Chae Sun Baek and Young Su Kim
College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

A high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection was evaluated for analysis of ofloxacin in plasma. Biological fluids (plasma, 200 μ L) were prepared for assay by protein precipitation with chloroform. The detection of ofloxacin and triamterene as an internal standard were performed at 358 nm for excitation and 495 nm for emission. The HPLC separation was carried out on Ultrasphere ODS column (4.6 mm \times 25 cm, 5 μ m) with acetonitrile (45%)-phosphoric acid (1.5%) containing 0.3% sodium laurylsulfate as the mobile phase. The flow-rate was 1.0 mL/min. The calibration graphs were linear from 3.0 to 80 ng/mL with $r=0.998$. The minimal detectable concentration in plasma was 1.5 ng/mL. The proposed technique is reproducible, selective, reliable and sensitive.

□ Keywords—Ofloxacin, HPLC analysis

Ofloxacin(\pm)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid)은 fluoroquinolone 계열의 항생제로서 Gram(+), (-)의 박테리아 균에 대해 광범위한 항균범위와 강한 항균력을 나타내며, 다른 quinolone 항생제보다 약동력학적인 독성이 적기 때문에 여러 난치성 감염증을 포함한 매우 다양한 영역의 감염증 치료에 효과적으로 사용되고 있다.¹⁾

최근 생체액중 ofloxacin의 분석은 주로 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)법에 의해서 이루어지고 있으며 분석대상 생체시료로서 머리카락,^{2,3)} 누액,⁴⁾ saliva,⁵⁾ serum,⁶⁻⁸⁾ 혈장, 뇨⁹⁻¹⁴⁾ 및 체 조직^{15,16)} 등에서 광범위하게 연구되고 있다. 이 중 Chan CY 등¹⁷⁾은 환자의 뇨 시료로부터 fluoroquinolones 검출을 위해 metal ion에 의한 키레이트 화합물을 만들어 HPLC로 정량 하였고, Lehr KH 등¹⁸⁾은 생체액중 ofloxacin의 광학 이성체 성분을 분석하기 위하여 chiral 칼럼을 이용

한 HPLC법을 제시하는 등 새로운 분석법 개발에 관한 연구들이 보고되고 있다. 이와 같은 HPLC분석법의 일반적인 시료제조과정은 유도체를 만들어야하고 산 처리 후 유기용매 추출 및 증발 건조 등의 몇 단계의 과정을 거쳐야 하는 번잡성과 ion pairing 시약 (sodium dodecyl sulfate 등)의 강한 계면활성 때문에 칼럼의 수명단축과 머무름 시간의 주기적 변화를 가져오는 등의 문제점으로 미량분석에 어려운 점이 많아서 본 연구에서는 감도, 재현성 및 간편성을 고려하여 시료의 전처리 조작, 이동상 용매, 이온쌍 시약과 내부표준물질등을 개선하고 ofloxacin의 형광성을 이용함으로써 혈장중에서 ofloxacin의 분석법의 표준화를 위한 보다 안정된 HPLC분석법을 확립하게 되었다.

실험방법

시약 및 기기

Ofloxacin과 트리암테렌(내부표준물질)은 Sigma사 제품을, 아세토니트릴(HPLC용)은 Merck사 제품을, 클로로포름, 1%인산 및 0.1M-인산염(KH_2PO_4)원충용액은 Junsei사 제품의 분석용 특급시약을 조제하여 사용하였다. 혈장은 혈액은행으로부터 구입하여 냉동보관(-21°C)

교신저자: 백채선
조선대학교 약학대학
광주 광역시 동구 서석동 375
TEL. 062-232-9214, FAX. 062-222-5414

하여 사용하였다. HPLC에는 Waters 520 펌프와 Waters 717 pus 시료자동주입기와 Jasco FP-920 형광검출기와 Hewlett Packard integrator를 장착하여 사용하였다. 그 외에 pH메타(Beckman 110), 시험관 혼합기(Thermolyne), 원심분리기(Beckman GS-15), 미량분석용저울(SatoriusS⁴)등을 사용하였다.

표준액의 조제

표준원액

Ofloxacin 원액 (50 µg/mL)은 ofloxacin 5.00 mg을, 트리암테렌 원액(50 µg/mL)은 트리암테렌 5.00 mg을 각각 취하여 50% 메타놀을 넣어 100 mL되게 조제하였다.

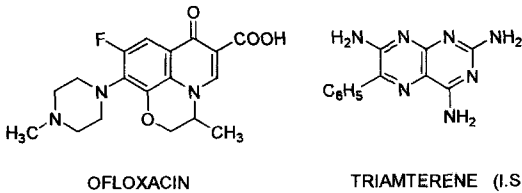
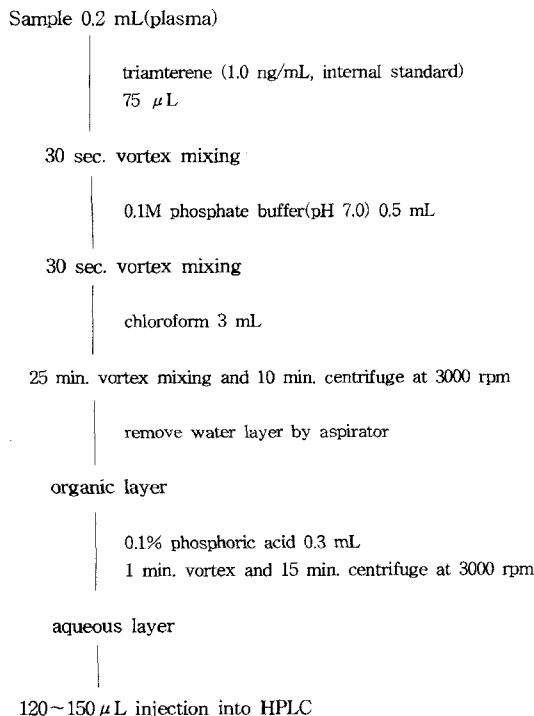


Fig. 1. Chemical structures of ofloxacin and triamterene (internal standard)



Scheme 1. Schematic outline of the HPLC analysis of ofloxacin in plasma

표준액

Ofloxacin 표준액 (1000 ng/mL)은 ofloxacin 원액 2.0 mL를 취하여 1% 인산용액으로 100 mL되게 조제하고, Ofloxacin 표준액 (20.0 ng/mL)은 ofloxacin 표준액 (1000 ng/mL) 1.0 mL를 취하여 1% 인산용액으로 50 mL 되게 조제하였으며, 트리암테렌 표준액 (100 ng/mL)은 트리암테렌 원액 0.2 mL를 취하여 50% 아세토니트릴용액으로 100 mL 되게 조제하고, 트리암테렌 표준액 (1.00 ng/mL)은 트리암테렌 표준액 (100 ng/mL) 1.0 mL를 취하여 50% 아세토니트릴용액으로 100 mL 되게 조제하였다.

시료용액의 분석

혈장 0.2 mL를 내부표준물질 (1.0 ng/mL) 75 µL가 함유된 시험관에 취하여 30초간 진탕 혼합시킨 후 0.1 M 인산염 완충용액(pH=7.0) 0.5 mL를 가하고 30초간 진탕한 다음 클로로포름 3 mL를 가하여 25분간 흔들어서 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리시킨 후 유기 용매층을 새로운 시험관에 옮긴 후 0.1% 인산 0.3 mL를 넣고 1분간 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 수층을 HPLC의 자동 시료주입기에 120~150 µL씩 주입하여 분석하였다 (Scheme 1).

정량법

Ofloxacin의 정량은 blank 혈장 (0.2 mL)에 ofloxacin의 최종농도가 0, 1.5, 3.0, 6.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 ng/mL 함유되도록 ofloxacin 표준액을 각각 첨가하여 Scheme 1의 분석법에 의해 내부표준물질에 대한 각 농도의 피크 높이비 (PHR)의 최소제곱법의 관계로부터 표준검량선을 작성하여 실시하였다.

HPLC측정조건

검출은 여기파장 358 nm, 형광파장 495 nm에서 실시하였으며 칼럼은 Ultrasphere ODS (Beckman, 4.6 mm×25 cm, 5µm particle size)를, 이동상으로는 45% 아세토니트릴+1.5% 인산+0.3% 소듐염라우릴설페이트를 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min.로, 주입량은 120~150 µL로 하였다.

결과 및 고찰

생체액중 약물분석에 대한 HPLC 방법은 약물의 물리화학적 특성을 고려한 여러 가지의 HPLC 조건들 중 칼럼 및 이동상의 조합과 추출과정의 개선으로부터 이루어지고 있다.

본 HPLC 방법은 생체액중 약물분석에 광범위하게 이용되고 있는 ion-par reverse-phase HPLC 장치에서

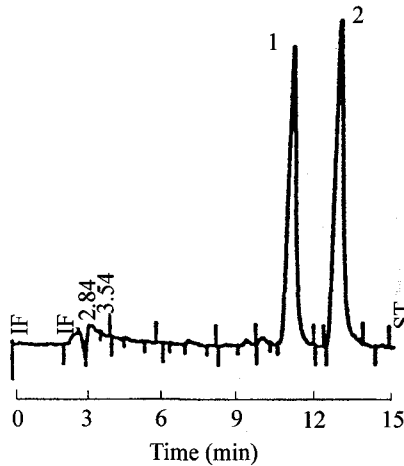


Fig. 2. Typical chromatogram of ofloxacin (60 ng/mL) in plasma. Peaks: 1. ofloxacin (11.5 min), 2. triamterene (internal standard, 13.5 min)

ofloxacin과 트리암테렌에 대한 상호분리를 검토한 결과, ODS 칼럼과 시료이온에 대해 비교적 큰 대립이온을 갖는 소듐라우릴설페이트 (0.3%)와 인산 (1.5%)이 함유된 45% 아세트니트릴을 이동상으로 사용하였을 때 머무름 시간이 빠르고 분리도가 양호한 결과를 얻을 수 있었다. Ofloxacin과 내부표준물질의 머무름 시간은 각각 11.5분 및 13.5분이었으며 (Fig. 2), 정량한계 범위는 내부표준물질의 피크높이에 대한 약물의 피크높이비 (PHR)와 최소 제곱법에 의해 검토한 결과 3.0~80 ng/mL 농도범위에서 상관계수가 0.998인 양호한 직선 ($y=0.0202x+0.0130$)을 얻을 수 있었다. 이것은 종전의 분석법들의 검출한계 (20 ng/mL)보다 안정적으로 형광검출기(여기파장 358 nm, 형광파장 495 nm)에서 미량측정이 가능하였다. 본 분석법에서 intraday와 interday 분석방법으로 4개의 시료농도에 대해 각기 5회씩 측정된 결과 coefficients of variation (C.V.) 값은 각각 1.5~4.4%와 2.7~6.5% 이었으며, 평균회수율은 97.9%이었다 (Table 1).

Table 1. Recovery and reproducibility of ofloxacin analysis

Concentration (ng/mL)	Recovery (%; mean±S.D.)	Coefficient of variation (%)	
		Inter-day	Intra-day
10	96.7±2.9	4.4	6.5
20	98.6±3.4	3.1	4.8
40	97.9±3.0	2.9	3.4
80	98.4±2.1	1.5	2.7

n=5 at each concentration

결 론

혈장중에서 Ofloxacin성분은 ODS 칼럼과 형광검출기 (여기파장 358 nm, 형광파장 495 nm)를 장착한 ion-pair reverse phase HPLC를 사용하여 45% 아세트니트릴+1.5% 인산+0.3% 소듐라우릴설페이트의 이동상에서 분석한 결과 15분 이내의 머무름시간 (ofloxacin 11.5분, 내부표준물질 13.5분)에서 정량할 수 있었으며, 표준검량선은 3.0~80 ng/mL 농도범위에서 상관계수가 0.998인 양호한 직선성 ($y=0.0202x+0.0130$)을 나타내었고 검출한계는 약 1.5 ng/mL이었다.

감 사

본 연구는 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Antibiotics in Laboratory Medicine 4th, 1996
2. 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. Biomed. Appl.* 1994; 653(2): 187-193
3. Miyazawa N, Uematsu T, Mizuno A, et al. Ofloxacin in human hair determined by high performance liquid chromatography. *Forensic Sci. Int.* 1991; 51(1): 65-77
4. Kraemer HJ, Gehrke R, Breithaupt A, et al. Simultaneous quantification of cefotaxime, desacetylcefotaxime, ofloxacin and ciprofloxacin in ocular aqueous humor and in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997; 700(1-2): 147-153
5. Ohkubo T, Suno M, Kudo M, Uno T, et al. Column-switching high-performance liquid chromatography of ofloxacin in human saliva and correlation of ofloxacin level in saliva and serum. *Ther Drug Monit.* 1996; 18(5): 598-603
6. Auten GM, Preheim LC, Sookpranee M, et al. High-pressure liquid chromatography and microbiological assay of serum ofloxacin levels in adults receiving intravenous and oral therapy for skin infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(12): 2558-2561
7. Griggs DJ, Wise R. A simple isocratic high-pressure liquid chromatographic assay of quinolones in serum. *J. Antimicrob Chemother.* 1989; 24(3): 437-445
8. Groeneveld AJ, Brouwers JR. Quantitative determination of ofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin in serum by high pressure liquid chromatography. *Pharm Weekbl Sci.* 1986; 6(1): 79-84
9. Mignot A, Lefebvre MA, Fourtillan JB. High-performance liquid chromatographic determination of ofloxacin

- cin in plasma and urine. *J. Chromatogr.* 1988; 430(1): 192-197
10. Le Coguic A, Bidault R, Farinotti R, et al. Determination of ofloxacin in plasma and urine by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1988; 434(1): 320-323
 11. Xu DK, Ding AZ, Yuan YS, et al. Determination of ofloxacin in human plasma and studies of its pharmacokinetics using HPLC method. *Yao Hsuoh Pao.* 1992; 27(6): 461-466
 12. Mack J, Ptacek P. Determination of ofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 1995; 673(2): 316-319
 13. Wong FA, Juzwin SJ, Flor SC. Rapid stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of levofloxacin in human plasma and urine. *J. Pharm Biomed. Anal.* 1997; 15(6): 765-771
 14. Ozyazgan S, Senses V, Ozuner Z, et al. Quantification of ofloxacin in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Basic Clin. Physiol Pharmacol.* 1997; 8(1-2): 73-79
 15. Ohkubo T, Kudo M, Sugawara K, et al. The determination of ofloxacin in human skin tissue by high-performance liquid chromatography and correlation between skin tissue concentration and serum level of ofloxacin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994; 46(6): 522-524
 16. Fabre D, Bressolle F, Kinowski JM, et al. A reproducible simple and sensitive HPLC assay for determination of ofloxacin in plasma and lung tissue. Application in pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1994; 12(11): 1463-1469
 17. Chan CY, Tsang DS, Chan TL, et al. Detection of fluoroquinolones in urinary specimens from patients undergoing anti-tuberculous therapy. *Chemotherapy* 1988; 44(1): 7-11
 18. Lehr KH, Damm P. Quantification of the enantiomers of ofloxacin in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1988; 425(1): 153-161