

인체 혈장에서 염산시프로플록사신(시프로플록사신으로서 250 mg) 정량을 위한 HPLC 분석법의 유효성검토

하용화 · 조성희 · 천성국 · 서성훈 · 류재환* · 최영욱** · 이경태†

경희대학교 약학대학, *경희의료원, **중앙대학교 약학대학

(2004년 5월 13일 접수 · 2004년 6월 12일 승인)

Validation of a Simple HPLC Method for Determination of Ciprofloxacin Hydrochloride in Human Plasma

Yong-Hwa Ha, Sung-Hee Cho, Sung-Kuk Chun, Seong-Hoon Seo, Jae-Hwan Rew*,
Young-Wook Choi** and Kyung-Tae Lee†

College of Pharmacy and *Medical Center, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**College of Pharmacy, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received May 13, 2004 · Accepted June 12, 2004)

ABSTRACT—A simple HPLC method with ultraviolet detection of ciprofloxacin in human plasma was developed and validated. After protein precipitation with trichloroacetic acid, chromatographic separation of ciprofloxacin in plasma was achieved at 50°C with a C₁₈ column and methanol-phosphate mixture (pH 2.5), as mobile phase. Quantitative determination was performed by ultraviolet detection at 278 nm. The method was specific and validated with a limit of quantification of 100 ng/ml. The intra- and inter-day coefficients of variation were between 1.67% and 10.55% and accuracy between 92.01% and 106.09%. The method has been successfully applied in a bioavailability study of 250 mg ciprofloxacin hydrochloride tablet.

Key words—Ciprofloxacin hydrochloride, Validation, Bioavailability, HPLC

시프로플록사신(Ciprofloxacin;1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid)은 항균제로서 항균 범위가 넓고 강력하여, 신체 각 부위의 감염에 광범위하게 처방할 수 있으며 중증의 복합 감염증에도 좋은 효과를 나타내는 약물로 알려져 있다. 염산시프로플록사신은 경구투여시 비교적 높은 혈중 농도를 나타내며 반감기가 3-5시간으로 보통 1일 2회 투여하는 약물이다. 약물동력학적으로 염산시프로플록사신은 위장관흡수가 용이하고 약물의 배설은 대부분 신장을 통한다.¹⁾

지난 수년간 생체 시료중에서 시프로플록사신 정량을 위한 HPLC 논문이 많이 발표되었다.²⁻⁵⁾ 보고된 인체 혈장에서 시프로플록사신의 정량으로 컬럼 스위칭(switching)방법,⁶⁾ liquid-liquid 추출법⁷⁻¹⁰⁾ 또는 유도체(derivatization) 전환법¹¹⁾ 등의 다양한 시료 추출법 등이 사용되었다. 그러나 이러한 방법들은 경비 및 시간이 많이 든다는 문제점을 가지고 있다.

국내에서는 인체 혈장 시료를 사용한 분석법 및 한국인을 대상으로 한 생체이용률 및 약물속도론적 파라미터들에 대

한 보고가 없는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 시프로플록사신의 단백질 침전에 따른 HPLC 분석법을 개발하고, 이 방법을 사용하여 8인의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 염산시프로플록사신의 기존 시판 제제인 씨프로바이®(시프로플록사신 250 mg) 1정을 경구 투여하여 생체이용률에 따른 약물속도론적 파라미터들을 구하여, 이미 발표된 외국의 자료와 비교하여 표준 생체이용률 측정을 위한 지침을 마련하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

실험에 사용된 시험약은 씨프로바이®(제조번호: 30413, 유효기한: 2003.3.2.) 정으로 시프로플록사신 250 mg을 함유하는 정제이었다. 시프로플록사신 표준품과 내부표준물질로 사용한 로메플록사신 표준품은 Sigma Chemical Co.(St.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, HPLC용 메탄올(Fisher Scientific Co., Milwaukee, WI, USA), trichloroacetic acid(Lancaster, United Kingdom), 인산(Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA), 인산수소나트륨(Yakuri pure chemical, Osaka, Japan),

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Tel : 02)961-0860, E-mail : ktlee@khu.ac.kr

생리식염수 및 헤파린(이상 중외제약, 서울, 한국)은 시판품을, 증류수는 Milli Q(Millipore Co., Milford, MA, USA)에서 18 MΩ·cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 약물분석 기기로는 Millipore Waters HPLC system(Milfors, MA, USA)을, 검출기로는 Waters 486 UV detector를, 컬럼은 C₁₈ Capcell-pak ACR (s-5 μm, 250 mm×4.6 mm, Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Japan)를, 데이터 처리장치로는 Millenium Ver 3.0 (Waters)를 사용하였다.

피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 제 2001-57호(2001. 9. 5) 생물학적동등성시험기준¹²⁾에 근거하여 지원자 모집공고를 통하여 만 19-55세의 건강한 성인으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액질환의 병력이 없고 현재 타약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 모집 공고하고 지원신청서를 받아 지원자 8명을 모집하였다. 지원자 8명에 대한 건강진단은 경희의료원에서 실시하여 생물학적동등성시험기준의 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 자로서 생물학적동등성시험에 적합한 건강한 사람으로 판정된 8명을 피험자로 선정하였다. 피험자로 선정된 사람들의 평균체중은 67.13±8.07 kg, 평균 나이는 만 21.38±2.07세이었다. 이들로부터 참여 동의를 받은 후 생체이용률 시험을 실시하였다. 모든 지원자는 정해진 투약일 10일 전부터 항생제 및 진통제등을 포함한 일체의 약물 복용을 금지시켰고, 흡연 및 xanthine계 음료 등을 제한 관리하였다. 시험 전날 오후 8시부터 시험 당일 투약 후 4시간까지는 금식시켰다. 또한 시험 기간 중에는 연구자의 지시에 따라 모두 같은 식단의 식사 및 경미한 활동을 하게 하였다.

약물 투약 및 혈액 채취

생체이용률 측정을 위하여 8명의 지원자에 대하여 각각 동일 투약일에 투여하고, 투약량은 씨프로바이®(시프로플록사신으로서 250 mg) 1정을 경구투약하였다. 피험자들 모두에게 heparin-locked catheter를 팔 정맥부위에 설치하고 240 ml의 물과 함께 복용시켰다. 피험자 간 복약 시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 약 2분 간격으로 실시하였고, 염산시프로플록사신 500 mg 투약 시 반감기가 3.8시간으로 보고¹³⁾되어 있어, 채혈은 약물의 혈중 소실 반감기를 토대로 반감기의 3배 이상인 12시간동안 실시하였다. 채혈 횟수는 약물 투약 직전과 투약 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 및 12시간의 총13시점에서 실시하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 에 남아있는 헤파린 처리 생리식염수를

완전히 제거하기 위해 매번 약 0.5 ml의 혈액을 빼내어 버리고 헤파린으로 처리된 주사기로 약 5 ml의 혈액을 heparin (30 I.U/ml)으로 처리된 튜브에 채취하였다. 채혈 후마다 I.V. catheter안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장만을 플라스틱 튜브에 옮기고 이 튜브를 영하 70°C의 초저온 냉동기에 넣어 분석시까지 보관하였다. 피험자들의 혈액채취는 일반인들의 출입이 통제된 격리된 방에서 실시하며, 사용하는 기구는 완전 멸균된 1회용으로 하였다. 피험자의 입원, 채혈 및 휴식등의 모든 일은 경희의료원에서 타인과 격리된 상태에서 이루어졌다.

혈장 중 시프로플록사신의 정량

혈장 중 시프로플록사신 정량은 이미 보고된 시프로플록사신 분석법¹⁴⁾을 참조하여 상기기 조건하 실온에서 이동상으로는 메탄올과 0.02 M 인산 완충액(pH 2.5)를 22:78(v/v)로 혼합한 용액을 사용하였고, 유속은 1.8 ml/min, 컬럼 온도는 50°C, 주입량은 10 μl로 하여 UV검출기(파장 278 nm)에서 시프로플록사신을 정량하고 다음과 같이 검량선을 작성 하였다.

시프로플록사신 표준품을 10% 메탄올에 녹여 농도를 1000 μg/ml로 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 공혈장에 가하여 시프로플록사신의 혈장 중 농도가 각각 0.1(정량한계 농도), 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 μg/ml 농도가 되도록 검량선용 표준 혈장액을 조제하였다. 각각의 검량선용 표준 혈장액 0.2 ml에 내부표준물질로 로메플록사신(5 μg/ml) 40 μl를 첨가한 후 6% trichloroacetic acid 100 μl를 가하고 30초동안 진탕한 후 10,000 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 여기에서 상등액 100 μl를 취하여 그 중 10 μl를 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질 로메플록사신의 피크 면적에 대한 시프로플록사신의 피크 면적비를 구하여 검량선을 작성하였으며 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 70°C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음 이 혈장 0.2 ml를 취하고 여기에 내부표준물질로 로메플록사신(5 μg/ml) 40 μl를 가한후 흔들어 섞었다. 상기 검량선 작성을 위한 추출법에 따라 추출하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질 로메플록사신의 피크 면적에 대한 시프로플록사신의 피크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선에 의해 혈장 시료 중 시프로플록사신의 농도를 산출하였다.

약물속도론적 파라미터의 분석 및 생체이용률 평가

씨프로바이정을 각각 1정씩 8명의 지원자에게 따라 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적 파라미터인 AUC_{0-∞}, C_{max}, T_{max}, k_e 및 t_{1/2}은 WinNonlin(version 1.1)을 이용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

혈장 중 시프로플록사신의 정량

건강 성인의 대조혈장과 대조혈장에 내부표준물질인 로메플록사신과 시프로플록사신을 함께 가한 것 및 시프로플록

사신 정제 투여후 2시간째의 혈장을 본 시험방법에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 1에 나타내었다. 시프로플록사신 피이크의 출현 시간은 약 4.88분, 내부표준물질 로메플록사신 피이크의 출현 시간은 약 5.78분이었으며 각 물질의 분리 상태는 양호하였다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5로하고 일내 및 일간 변동계수의 크기를 20% 미만으로 하였을때의 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 0.1 µg/ml이었다. 혈장시료로부터 구한 시프로플록사신의 검량선의 계산식은 y(시프로플록사신내부표준물질 로메플록사신 피이크 면적의 비율) = 1.2608 × 시프로플록사신 농도(µg/ml, x) - 0.0218(r² = 1)로 0.1~10 µg/ml 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 이 농도 범위에서 있어서 시프로플록사신의 정밀성(C.V.%)은 일간 정밀성이 9.28% 이하, 일내 정밀성은 10.55% 이하였으며, 정확성은 92.01 - 106.09%로 나타났다(Table I). 이로부터 혈중 시프로플록사신에 대한 상기 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

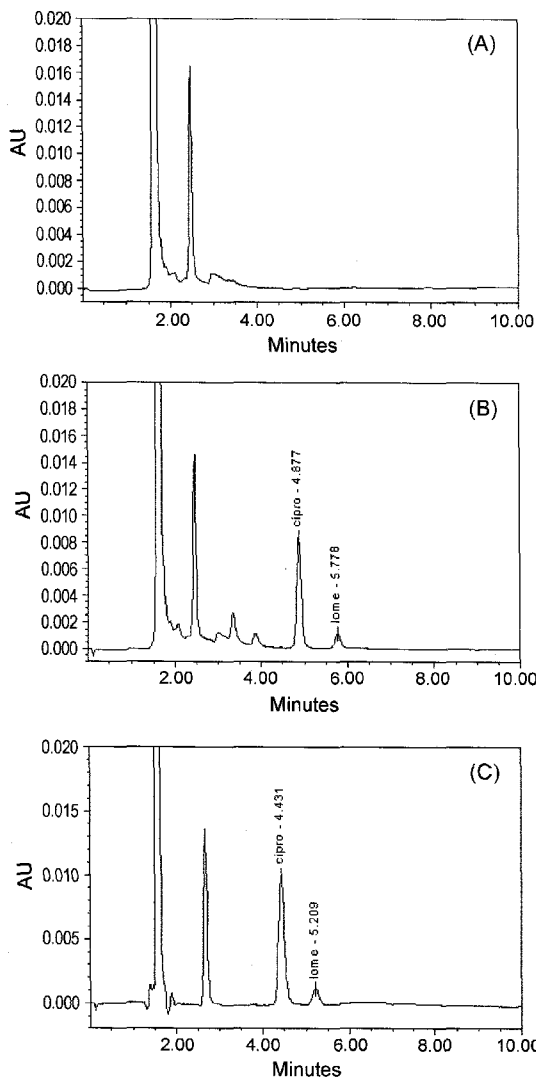


Figure 1—Chromatograms of (A) blank human plasma, (B) plasma spiked with ciprofloxacin and internal standard (lomefloxacin 5 µg/ml) and (C) plasma obtained from a volunteer at 2.0 hr after an oral administration of 250 mg ciprofloxacin.

Table I—Precision and Accuracy for the Determination of Ciprofloxacin in Human Plasma

Concentration (µg/ml)	Precision C.V. (%)		Accuracy (%)
	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	
0.1	9.27	10.55	106.09
0.2	2.13	8.96	92.01
0.5	6.98	6.59	99.09
1	5.53	7.18	100.25
2	5.92	4.39	98.48
5	9.28	4.86	100.75
10	8.07	1.67	99.87

C.V. = 100 × S.D./mean.

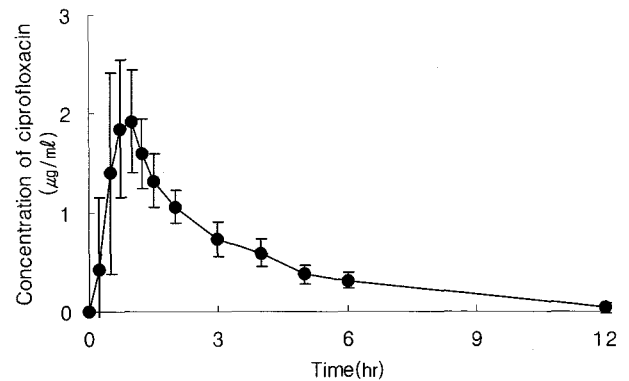


Figure 2—Mean(±S.D., n=8) plasma concentration-time curves of ciprofloxacin following oral administration of Ciprobay® tablet at the dose of 250 mg of ciprofloxacin.

Table II—Bioavailability Parameters for Each Volunteer Obtained after Oral Administration of Ciprobay[®] Tablet at the Cirprofloxacin Dose of 250 mg

Volunteer	Ciprobay [®] Tablet				
	AUC _t (μg · hr/ml)	C _{max} (μg/ml)	T _{max} (hr)	k _e (hr ⁻¹)	t _{1/2} (hr)
A-1	6.51	2.37	1.00	0.39	1.76
A-2	6.13	1.62	1.25	0.26	2.68
A-3	6.38	3.37	0.50	0.45	1.54
A-4	5.82	1.46	0.75	0.21	3.32
A-5	7.03	3.04	0.75	0.37	1.89
A-6	6.60	2.25	1.00	0.33	2.10
A-7	4.66	1.14	1.00	0.30	2.24
A-8	4.50	2.44	1.00	0.52	1.33
Mean	5.95	2.21	0.91	0.35	2.11
(S.D.)	(0.92)	(0.77)	(0.23)	(0.10)	(0.64)

혈장 중 시프로플록사신 농도 추이

씨프로바이[®](시프로플록사신으로서 250 mg) 1정씩을 지원자 8명에게 경구 투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 각 제제의 전체 피험자에 대한 혈장 중 시프로플록사신 평균농도를 Figure 2에 나타내었다. 또한, 피험자에 대해 시험약을 투여하여 얻은 혈장 중 산출한 약물속도론적 파라미터 (AUC_t, C_{max}, T_{max}, k_e 및 t_{1/2})를 Table II에 나타내었다. 씨프로바이[®]정(시프로플록사신으로서 250 mg)의 AUC_t(μg · hr/ml)는 5.95 ± 0.92, C_{max}(μg/ml)는 2.21 ± 0.77, T_{max}(hr)는 0.91 ± 0.23, k_e(hr⁻¹)는 0.35 ± 0.10 및 t_{1/2}(hr)는 2.11 ± 0.64 이었다. 보고된 외국 문헌의 경우 200 mg 경구 투약시¹⁵⁾ AUC_t(μg · hr/ml)는 3.6, C_{max}(μg/ml)는 1.1 및 T_{max}(hr)는 0.9이었고, 500 mg 경구 투약시¹³⁾ AUC_t(μg · hr/ml)는 12.11, C_{max}(μg/ml)는 2.44, T_{max}(hr)는 0.79 및 t_{1/2}(hr)는 3.8이었다. 서로 다른 투약량을 감안하여 보았을 때, 500 mg의 C_{max}를 제외하고는 동량 투약시 유사한 수치를 나타낼 것으로 추정되었다. 동일한 분석조건으로 타 기관에서 분석을 시행한 경우 AUC_t(μg · hr/ml), C_{max}(μg/ml), T_{max}(hr), k_e(hr⁻¹), t_{1/2}(hr)는 각각 7.03 ± 1.23, 1.84 ± 0.26, 1.22 ± 0.57, 1.22 ± 0.53를 보임으로서 이러한 파라미터들에서 보이는 차이는 한국인 피험자들에서 나타나는 정도의 차이로 사료된다.

결 론

시프로플록사신의 간편한 HPLC 분석법의 유효성을 검토하여 생체이용률 측정을 위한 표준 지침을 마련하고자 식품의약품안전청이 고시한 제 2001-57호(2001. 9. 5) 생물학적동등성시험기준¹²⁾에 근거하여 8인의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 씨프로바이[®](시프로플록사신 250 mg) 1정씩을

8명의 지원자에게 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적 파라미터인 AUC_t, C_{max}, T_{max}, k_e 및 t_{1/2}을 WinNonlin (version 1.1)을 이용하여 구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장을 6% trichloroacetic acid로 전처리 하여 HPLC 크로마토그램으로 분석 한 결과 내부 간섭물질의 방해 없이 시프로플록사신 및 내부 표준물질인 로메플록사신을 분리하였으며, 정량한계는 0.1 μg/ml이었다.

2. 사람혈장에서 intra-day와 inter-day의 평균 C.V.와 accuracy 모두 이론수치와의 차가 15%내에 들어감으로서 분석법의 정밀성과 정확성을 확인하였다.

3. 씨프로바이[®](시프로플록사신 250 mg) 1정의 AUC_t(μg · hr/ml)는 5.95 ± 0.92, C_{max}(μg/ml)는 2.21 ± 0.77, T_{max}(hr)는 0.91 ± 0.23, k_e(hr⁻¹)는 0.35 ± 0.10 및 t_{1/2}(hr)는 2.11 ± 0.64 였다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면 시프로플록사신의 간편한 HPLC 분석법 및 생체이용률 시험을 수행하여 얻은 실험결과를 향후 생물학적동등성시험 수행지침으로 활용할 수 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 지원을 받아 경희대학교에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) T.L. Ke, G. Cagle, B. Schleich, O.J. Lorenzetti, and J. Mattern, Ocular bioavailability of ciprofloxacin in sustained release formulations, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **17**, 555-563 (2001).
- 2) A. El-Yazigi and S. Al-Rawithy, A direct liquid chromatography method for the determination of ciprofloxacin in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 105-112 (2000).

- graphic quantitation of ciprofloxacin in microsamples of plasma with fluorometric detection, *Ther. Drug Monit.*, **12**, 378-381 (1990).
- 3) A. Weber, D. Chaffin, A. Smith, and K.E. Opheim, Quantitation of ciprofloxacin in body fluids by high-pressure liquid chromatography, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**, 531-534 (1985).
 - 4) S.J. Morton, V.H. Shull, and J.D. Dick, Determination of norfloxacin and ciprofloxacin concentrations in serum and urine by high-performance liquid chromatography, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 325-327 (1986).
 - 5) G. Mack, Improved high-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin and its metabolites in human specimens, *J. Chromatogr.*, **582**, 263-267 (1992).
 - 6) B.B. Ba, D. Ducint, M. Fourthillan, and M.C. Saux, Fully automated high-performance liquid chromatography of ciprofloxacin with direct injection of plasma and Mueller-Hinton broth for pharmacokinetic/pharmacodynamic studies, *J. Chromatogr. B*, **714**, 317-324 (1998).
 - 7) F. Jehl, C. Gallon, J. Debs, J.M. Brogard, H. Monteil, and R. Minck, High-performance liquid chromatographic method for determination of ciprofloxacin in biological fluids, *J. Chromatogr.*, **339**, 347-357 (1985).
 - 8) W.M. Awni, J. Clarkson, and D.R.P. Guay, Determination of ciprofloxacin and its 7-ethylenediamine metabolite in human serum and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **419**, 414-420 (1987).
 - 9) Y.Y. Pei, X. Meng, and C.H. Nightingale, An improved HPLC assay for ciprofloxacin in biological samples, *Acta Pharmacol. Sinica*, **15**, 197-201 (1994).
 - 10) M. Kamberi, N. Hajime, P. Kamberi, N. Uemura, K. Nakamura, and S. Nakano, Simultaneous determination of grepafloxacin, ciprofloxacin, and theophylline in human plasma and urine by HPLC, *Ther. Drug Monit.*, **21**, 335-340 (1999).
 - 11) J.A. Morley and L. Elrod, Determination of fluoroquinolone antibacterials as N-acyl derivatives, *Chromatographia*, **37**, 295-299 (1993).
 - 12) 식품의약품안전청 고시 제 2001-57호(2001. 9. 5). 생물학적동등성시험기준.
 - 13) Y. Escobar and C. Hoyo-Vadillo, Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy Mexican volunteers, *Arzneimittelforschung*, **53**, 664-667 (2003).
 - 14) R. Bellmann, P. Egger, W. Gritsch, R. Bellmann-Weiler, M. Joannidis, S. Dunzendorfer, and ChJ. Wiedermann, Pharmacokinetics of ciprofloxacin in patients with acute renal failure undergoing continuous venovenous haemofiltration: influence of concomitant liver cirrhosis. *Acta. Med. Austriaca*, **29**, 112-116 (2002).
 - 15) T. Bergan, A. Dalhoff, and R. Rohwedder, Pharmacokinetics of Ciprofloxacin, *Infection*, **16**, 3-13 (1988).