

혈장내 Pentoxifylline과 Metabolite(I)의 HPLC에 의한 분석

민병선 · 정세영 · 노영수 · 윤병호* · 임수한*

경희대학교 약학대학, * 한독약품

(Received 1988)

Determination of Pentoxifylline and Metabolite(I) by HPLC

Byeong Sun Min, Se Young Choung, Young Soo Rho

Byoung Ho Youn* and Soo Han Lim*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, 131-701, Korea and

*Han Dok Remedia, Seoul, 131-220, Korea

Abstract—A rapid and simple method for the determination of pentoxifylline and its major metabolite, metabolite(I) in plasma was examined by HPLC. For the purification and enrichment of drug from plasma, solid-phase extraction was examined using Sep-pak C18 cartridge.

The effectiveness of test method was proved by monitoring of the rat after oral administration of pentoxifylline in a dose of 40mg/kg.

Pentoxifylline, 1-(5-oxohexyl)-3,7-dimethylxanthine은 적혈구의 변형능을 개선시키고^{1,2)} 혈액의 점도를 낮추어³⁾ 뇌혈관장애, 말초혈관장애⁴⁾, 간혈성파행증을 치료하는 약물로 theobromine과 1-bromhexanon-(5)에 의해 합성되었다.⁵⁾

Pentoxifylline의 생체내 대사는 주로 5-oxohexyl기에서 일어나고⁶⁾ 사람을 포함한 포유동물에서 metabolite(I)에서 metabolite(Ⅶ)까지 7개의⁷⁾ 대사물질이 확인되었는데 그중 주요한 대사물질은 metabolite(I), 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthine이고 혈장내에 존재한다.⁷⁾

Pentoxifylline의 생체내 투여후 분석법으로는 Spectrophotometry,⁸⁾ GLC,⁹⁾ HPLC法^{10,11,12)} 등이 보고 되었다. 이들은 모두 생체시료 전처리로 유기용매추출법이 이용되고 있는데 이 방법은 오랜 분석시간을 요구하며 추출시 emulsion이 형성되어¹³⁾ 조작을 더 어렵게하는 경우가 있다.

최근에는 octadecyl화한 silica를 충전한 소형 cartridge, Sep-pak C₁₈ cartridge (Waters Co.)가 시판되고 있으며 이것을 이용해 미량성

분의 농축, 추출을 시도하고 있다.¹⁴⁾

Sep-pak C₁₈ cartridge는 혈장내의 미량성분 농축시 사용이 간편하고 혈장내의 단백질과 지질 성분 등의 제거가 가능하여 사용하는 column의 수명도 연장시킬수 있다.¹⁵⁾

저자는 HPLC와 Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 혈장중의 pentoxifylline과 metabolite(I)을 정량하고자 하였고 내부표준물질은 HPLC조건에서 pentoxifylline과 유사한 retention time을 갖는 antipyrine을 선정하여 실험하였다.

실험 방법

시약—표준품 pentoxifylline metabolite(I)(서독의 Hoechst사), 내부표준품 antipyrine(Sigma사)을 사용하였으며 methanol, acetonitrile(Merck제 HPLC용) 증류수(Milli-Q, HPLC용)을 사용하였다.

시료—Sprague Dawley계 음성 rat에 pentoxifylline 정을 가루로하여 물에 녹여 kg당 40mg을 경구투여후 0.5, 1, 2, 3, 5시간후에 ether

로 마취시킨 다음 복강 대동맥에서 채혈한다. 채혈후 바로 원심분리하여 혈장을 얻어 분석전까지 냉동 보관하였다.

기기—High performance liquid chromatography는 Waters사의 M₄₄₀ Detector, U₆K injector, Data module 730, 6000A solvent delivery system을 사용하였고 column은 Lichrosorb RP C₁₈ (10 μ m, 3.9mm \times 30cm)을 사용하였다.

실험조작—표준액은 pentoxifylline, metabolite (I), 내부표준품 antipyrine 각각 50mg을 정밀히 달아 물에 녹여 정확히 100ml로 한다. 각각 1ml씩 취해 100ml되게 물로 희석한다. 검액은 먼저 Sep-pak C₁₈ cartridge를 methanol 5ml와 물 10ml로 washing하고 혈장 0.5~1ml에 antipyrine 500 μ l (=2.5 μ g), 물 5ml에 섞어 washing한 Sep-pak C₁₈에 2ml/min 속도로 통과시킨 후 물 10ml

Table I—Condition of HPLC

Column	Lichrosorb RPC18 (10 μ m, 3.9mm \times 30cm)
Mobile phase	20mM(NH ₄) ₂ HPO ₄ : Methanol (55 : 45v/v, pH6.0)
Detector	UV 280nm
Injection volume	20 μ l
A.U.F.S.	0.01
Flow rate	1ml/min.

로 세척한다. 이 cartridge를 methanol 2ml로 용출시킨 후 35°C waterbath에서 질소 gas로 증발시켜 물 또는 이동상 500 μ l에 용해시켜 검액으로 한다.

HPLC 조건은 Table I에 나타내었으며 전형적인 chromatogram은 Fig. 1과 같다.

실험 및 고찰

Sep-pak C₁₈ cartridge의 capacity—혈장검체 전처리에 사용되는 시판 Sep-pak C₁₈ cartridge에 pentoxifylline, metabolite(I)이 retain되는지의 여부와 retain되는 양을 검토하였다. 일정량의 시료를 취해 전술한 실험방법에 의해 실험했으며 결과는 Fig. 2와 같이 1개의 Sep-pak C₁₈ cartridge에 retain되는 pentoxifylline, metabolite(I)은 각각 19.32mg, 22.51mg이었다.

H₂O washing시의 회수율—혈장을 Sep-pak C₁₈에 통과 시킨후 단백질 등을 제거하기 위해

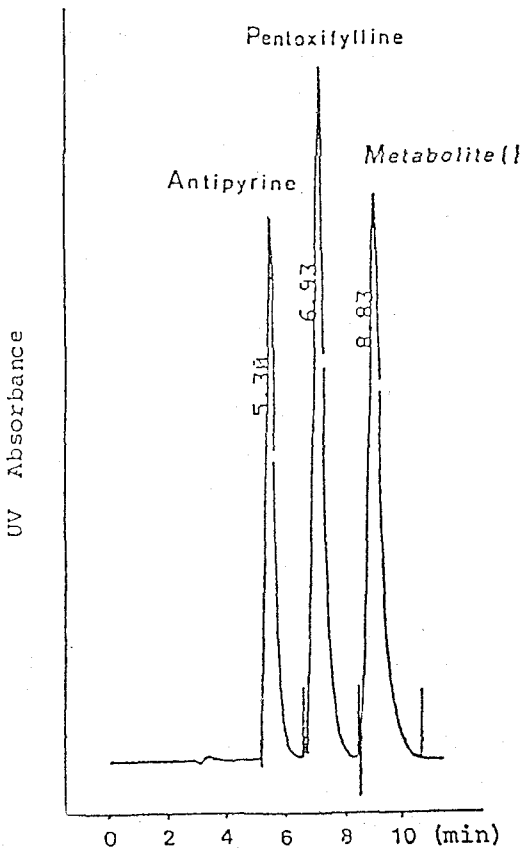


Fig. 1—Chromatogram of pentoxifylline, metabolite (I) and antipyrine.

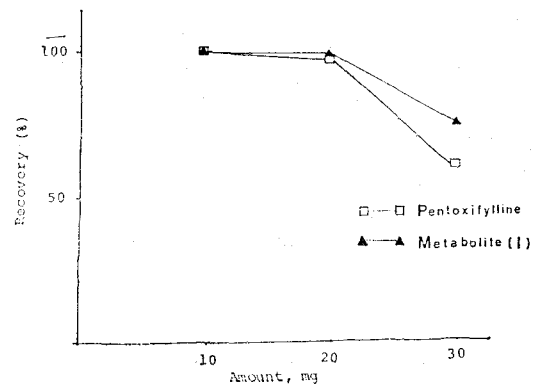


Fig. 2—Capacity of Sep-pak C-18 cartridge to pentoxifylline and metabolite(I).

Table II—Recovery of pentoxifylline and metabolite (I) after H₂O washing

H ₂ O volume (ml)	%, Recovery±SD(n*=3)	
	Pentoxifylline	Metabolite (I)
10	101.82±0.3	102.92±3.1
20	101.59±0.1	100.77±1.8
50	100.12±0.1	99.84±2.0
100	100.01±0.5	99.56±1.6
200	101.55±1.3	100.00±1.6

* n : Number of sample

물로 washing하며 washing시 pentoxifylline과 metabolite(I)의 용출을 알기위해 washing하는 물의 양을 검토하였다. Sep-pak C₁₈에 흡착된 pentoxifylline과 metabolite(I)은 물 200ml까지는 washing량에 관계없이 거의 100%의 회수율을 얻었으며 결과는 Table II에 나타내었다.

용출시 용출용매와 용출량의 선정—Sep-pak C₁₈에 retain된 pentoxifylline, metabolite(I)을 용출시키는 용매로 methanol, acetonitrile을 선정하여 검토하였다. (Table III)

용출 용매로서는 methanol이 acetonitrile보다 좋았고 2ml의 용매로 100% 회수율을 얻었다.

검량선—내부표준물질 antipyrine의 농도를 5µg/ml로 하고 pentoxifylline, metabolite(I)의 농도를 ml당 0.5~10µg으로 Table I의 HPLC 조건으로 검량선을 작성한 결과 Fig. 3과 같이 좋은 직선성을 나타냈다.

회수율—Drug-free plasma에 pentoxifylline과 metabolite(I)를 일정량 가하고 상기 실험방법으로 회수율을 검토하여 Table IV에 나타내었다.

Table III—Recovery of pentoxifylline, metabolite(I) after solvent elution

Volume (ml)	Methanol(%, Recovery n=3)		Acetonitrile(%, Recovery n=3)	
	Pentoxifylline	Metabolite (I)	Pentoxifylline	Metabolite (I)
1	94.89±2.9	82.68±9.0	88.53±13.0	82.59±10.7
2	101.02±1.3	100.68±0.5	96.80± 4.6	90.45± 5.3
3	100.28±0.8	100.74±2.1	98.99± 0.1	95.86± 1.2
5	101.25±3.7	100.20±6.2	99.26± 1.5	95.22± 2.6
10	102.46±2.0	102.98±4.2	100.39± 1.5	92.98± 1.7

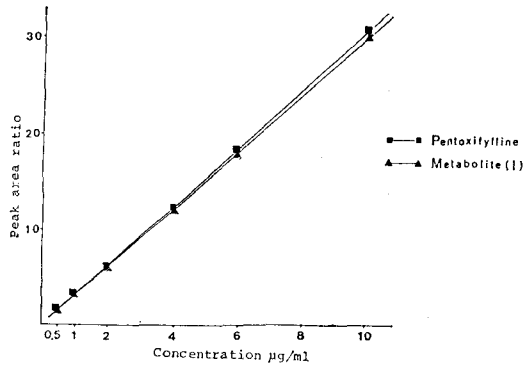


Fig. 3—Calibration curve for pentoxifylline and metabolite (I).

pentoxifylline: $y=0.308x-0.039$ $r=0.998$
 metabolite (I): $y=0.301x-0.048$ $r=0.999$

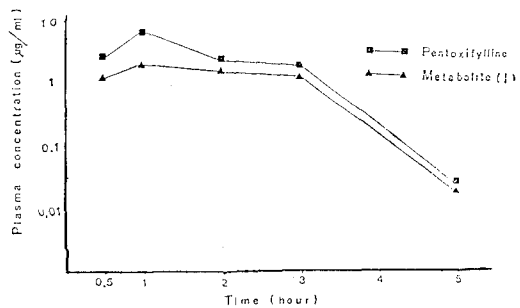


Fig. 4—The plasma level of pentoxifylline and metabolite(I) after oral administration of pentoxifylline tablet in a dose of 40mg/kg (n=3)

Rat blood concentration 검토—Rat에 pentoxifylline을 경구투여하고 일정 시간 경과후 채혈하여 Sep-pak C₁₈에 의한 전처리 방법으로 추출하여 실험하였다. (Fig. 4)

혈장을 Sep-pak C₁₈에 의해 전처리한 후 상기

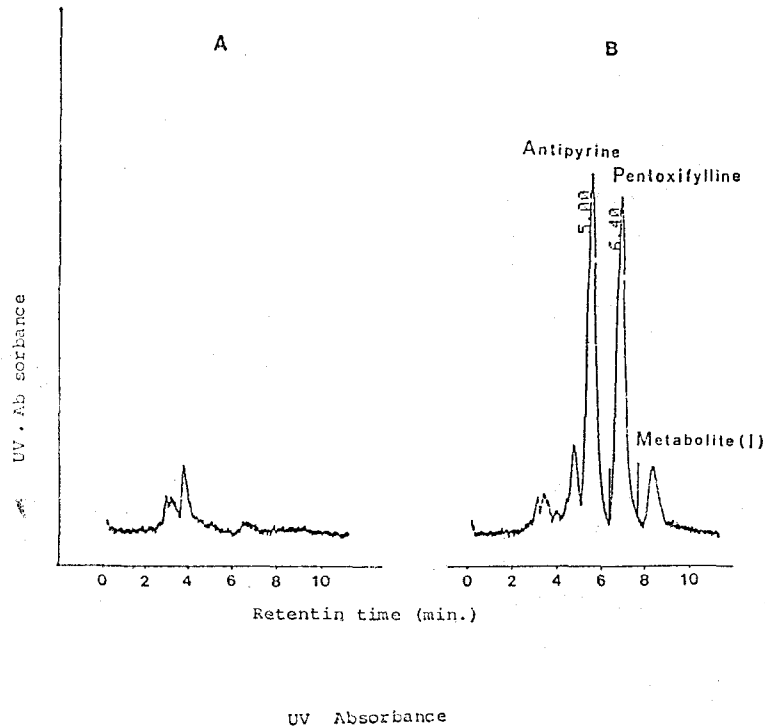


Fig. 5—Chromatogram of extracts with Sep-pak C-18 cartridge from plasma on Lichrosorb RPC-18, Mobile phase : 20mM(NH₄)₂HPO₄ : Methanol(55 : 45v/v, pH6.0) A.U.F.S. 0.01
A : Blank plasma. B : Sample plasma.

Table IV—Recovery of pentoxifylline and metabolite (I) from drug-free plasma

Concentration (μg)	% Recovery (n=3)	
	Pentoxifylline	Metabolite(I)
5	100.43±5.0	99.58±0.7
1	105.07±3.9	100.07±1.2
0.75	105.03±8.1	97.37±11.6
0.50	101.44±6.5	95.73±12.1
0.25	106.90±2.5	96.48±8.6
Mean	103.71	97.85
R.S.D.(%)*	2.69	1.95

*% Relative standard deviation

실험방법으로 분석한 결과 생체성분이 chromatogram에 영향을 주지 않아 좋은 chromatogram을 얻을수 있었다. (Fig. 5)

결론

실험에 사용한 Sep-pak C₁₈ cartridge에 retain 될수 있는 pentoxifylline과 metabolite(I)은 각각 19.32mg, 22.51mg이었고 용출은 methanol 2ml로 가능하였다. 혈장분석시의 회수율은 pentoxifylline과 metabolite(I) 각각 103.71%, 97.85%이고 상대표준편차는 2.69%, 1.95%이었다.

생체분석시 혈장의 전처리에서 Sep-pak C₁₈ cartridge 사용으로 좋은 chromatogram을 얻었고, 1회 추출로 실험이 가능하여 빠르고 간편하였다.

문헌

- 1) R. Müller, F. Lehrach and H.G. Grigoleit: On the mode of action of pentoxifyllin, *Medizinisch*

- Monatsschrift*, 29, 3 (1975).
- 2) G.A. Marcel.: Red cell deformability Physiological clinical and pharmacological aspects, *J. of Medicine*, 10, 409 (1979).
 - 3) Björn B., Robert I., Joseph C., and Angel McDonald: Kinetics of intravenous and oral pentoxifylline in healthy subjects, *Clin. Pharmacol Ther.*, 37, 25 (1985).
 - 4) L.A. Kaznelson, E.E. Gurtovaja., N.A. Michailova, A.A., Jakovlev, V.F. Kaliberdina and L.M. Alexandrova: Experience with pentoxifylline in various vascluar disorders of the fundus ocut, *Pharmatherapeutica*, 2, 146 (1978).
 - 5) Werner M., and Alfons S.: Zur Chemi und synthese von pentoxifyllin, *Arzneim-Forsch.*, 21, 1159 (1971).
 - 6) Christ, O., Gleixner, K., Kellner, H.M., Müller R. and Rupp, W.: Pharmakokinetische Uuter-sungen nach oraler Verabreichung von pentoxi-fyllin on Ratten, Hunde and Menschen, *Arzneim-Forsch*, 22, 1977 (1972).
 - 7) H.J. Hinze, G. Bedeßem and A. Soder, Strukture der Ausscheidungsprodukte des pentoxifyllin beim Menschen, *Arzneium-Forsch*, 22, 1144 (1972).
 - 8) Kazumi, F., Shunichi, Y., Yumiko: M. and Takashi, S.: Absorption, Distribution, Excretion and Metabolism of pentoxifyllime in Rats, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 1137 (1976).
 - 9) Bryce, T.A. and Burrows, J.L.: Determination of oxpentifylline and a metabolite 1-15'-Hydroxyhexyll-3, 7-dimethylxanthine, by Gashiquid chromatography using a nitrogen-selective detector *J. Chromatogr*, 181, 355 (1980).
 - 10) Chivers, D.A., Birkett, D.J. and Miners, J.O.: Simultaneous determination of pentoxifylline and its hydroxy metabdite in plasma by HPLC, *J. Chromatogr*, 225, 261 (1981).
 - 11) Robert, V.S., Shun, K.Y., Patrick, J.O. and Michael, T.B.: Determination of pentoxifylline and its major metabolites in microbial extract by TLC and HPLC, *J. Chromatogr*, 281, 281 (1983).
 - 12) Rieck, W. and Platt, D.: Determination of pentoxifylline and its metabolite(I) in the plasma of patients with multiple disease using HPLC, *J. Chromatogr*, 305, 419 (1981).
 - 13) 中厚雄ニ, 私山稔, 失野耕也: 簡単な液體クロマトグラフィーを用いた水溶液から微量疎水性化合物の抽出, *分析化学* 30, 428 (1981).
 - 15) Riggin, R.M., Howard, C.C.: Determination of benzidine, dichlorobenzidine, and diphenylhydrazine in aqueous media by HPLC, *Anal. Chem.*, 51, 210 (1979).
 - 15) Michael J.F., Mark, J.C., and Laurence, S.K.: A novel method for the quantitation of warfarin and its metaboites in plasma, *J. Liq. Chromatogr.*, 2, 565 (1979).