

## 형광광도법 및 HPLC-형광검출법에 의한 생체시료 중의 Vecuronium bromide의 미량분석

고용석<sup>†</sup> · 한상수 · 신태용\* · 안년형 · 옥치완

원광대학교 약학대학

\*전주우석대학교 약학대학

(1994. 7. 18. 접수)

### Microanalysis of Vecuronium Bromide in Biological Fluids by Spectrofluorimetry and HPLC-Fluorescence Detection

Yong-Seok Ko<sup>†</sup>, Sang-Soo Han, Tae-Yong Shin\*, Nyeon-Hyoung An and Chi-Wan Ock

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iri 570-749, Korea

\*Dept. of Pharmacy, Chonju Woosuk University, Chonju 565-800, Korea

(Received Jul. 18, 1994)

**요약** : 생체시료 중에 함유된 베크로늄브로마이드(VeBr)를 정량하기 위해 로즈벵갈(RB)과 이온쌍착물(ion-pair complex)을 형성시켜 유기용매층으로 이행시킨 다음 형광광도법 및 형광검출기를 이용한 고속액체크로마토그래프(HPLC)법으로 정량하였다. 이 때 이온쌍착물의 최적 추출조건을 검토하기 위하여 완충액의 pH, 추출용매, 진탕시간의 영향을 실험하였다. 한편, 이온착물의 형성 및 조성은 연속변화법, 몰비법, IR, <sup>1</sup>H-NMR로 확인하였으며, 또한 베크로늄브로마이드와 동시 부여될 수 있는 약물의 영향도 검토하였다.

**Abstract** : The determination of the neuromuscular blocking agents vecuronium bromide (VeBr) in biological fluids has been investigated. The method depends on the formation of insoluble red complex between vecuronium bromide and rose bengal in aqueous layer. The amount of vecuronium bromide was calculated from that of extracted rose bengal which was determined by spectrofluorimetry or HPLC/fluorescence detection method. It was possible to analyze VeBr in the range of 2~32 $\mu$ g/ml ( $r=0.998$  for water soln., 0.999 for urine, 0.996 for plasma). This method was applied to the analysis of VeBr in biological fluids, urine and plasma.

**Key words** : Vecuronium bromide, Rose bengal, Spectrofluorimetry, HPLC analysis.

#### 서 론

Vecuronium bromide(VeBr)는 4급 암모늄 화합물로서, 수술시 근육이완제로 사용되는 비탈분극성 신경

근차단제이다.<sup>1</sup> 이 약물은 치사량<sup>2</sup>(LD<sub>50</sub>=0.061mg/kg, i. v., in mice) 매우 낮으므로 약화사고의 원인규명 및 pharmacokinetic 측면에서의 분석 방법이 요구되는 약물이다. 이 약물은 생체내에서 acetyl기가 가수분

해되어 3-hydroxy VeBr, 17-hydroxy VeBr, 그리고 3, 17-dihydroxy VeBr로 대사된다.<sup>3</sup>

VeBr의 정량법으로는 post-column ion-pair extraction을 이용한 HPLC<sup>4-6</sup>, iodide ion-pair extraction 후 nitrogen sensitive detector를 이용한 GC법<sup>7</sup>, electron ionization를 이용한 GC/MS법<sup>7</sup>, iodide ion-pair extraction 후 moving belt-LC/MS법<sup>8</sup> 등이 보고되어 있다.

한편, alkaloid, amine 및 4급 암모늄염의 정량에 이염기성 산성색소인 bromthymol blue<sup>9, 10</sup>, bromphenol blue<sup>11-15</sup>, bromcresol green<sup>16-18</sup> 등이 응용되었으나 이들 색소에 의한 흡광광도법은 pH 의존성이 큰 결점이 있다. 이런 점을 개선코자 일염기성 산성색소인 tetrabromophenolphthalein ethyl ether<sup>19-22</sup>, dichlorophenol indophenol<sup>23</sup>이 사용되고 있으며 이들 색소가 이염기성 산성색소에 비해 정색이 예민하여 pH 의존성에서 우수하다고 보고되어 있다. Cohen<sup>24</sup> 등은 ion-pair reagent로 rose bengal(RB)을 이용하여 d-tubocurarine를 정량하였으며 Kim<sup>25</sup> 등은 HPLC/fluorimetric detector를 이용하여 pancuronium bromide를 0.05~0.5 $\mu$ g/ml 농도까지 정량한 바가 있다.

VeBr는 수용성 약물이기 때문에 생체시료 중에 함유되어 있을 때는 자체로는 유기용매에 추출되지 않으므로 검출에 어려움이 있으나 수용성 형광색소인 RB와 ion-pair를 형성하여 유기용매층으로 이행된다.

본 실험에서는 VeBr를 정량하기 위해 RB를 ion-pair reagent로 하여 추출시 최적 조건을 결정하고 이 조건을 이용하여 요와 혈액 중의 VeBr를 형광광도법으로 정량하였으며, HPLC를 이용하여 RB를 분석함으로써 VeBr를 간접정량하는 방법을 확립하였다. 또한 VeBr와 함께 투여될 수 있는 다른 약물의 영향도 검토하였다.

## 실험방법

### 시료 및 시약

Rose bengal(disodium salt, Aldrich<sup>®</sup> 33,000-0; RB)은 0.45M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에 용해시켜 500 $\mu$ g/ml 용액으로 조제한 후 동량의 디클로로메탄으로 3회 세척한 후 16시간 이내에 사용하였다. VeBr는 시판 표준품을 증류수에 녹여 1 $\times$ 10<sup>-3</sup>M 용액으로 조제한 후 24시간 이내에 사용하였다. 완충액은 Elving의 방법<sup>26</sup>에 따라

구연산완충액을 이용하여 pH 2.2~8.0까지의 범위에서 조제하였으며, pH 9.0~12.0까지는 인산염완충액으로 조제하였다. 본 실험에서 추출용매로는 디클로로메탄(Junsei, 특급)을 사용하였고 HPLC에 사용된 용매는 HPLC용 메탄올과 탈이온수를 사용하였으며 counter-ion reagent로는 테트라부틸암모늄포스페이트염이 함유된 PIC A(Waters 85101) 시약을 사용하였다. 동시처방약물의 영향을 검토하기 위한 약물은 시판되고 있는 주사제를 사용하였다. 요 및 혈장은 건강한 성인으로부터 얻었으며 냉동보관하였다.

## 기기

형광측정에는 SFM 25 spectrofluorimeter (Kontron Instrument)을 사용하였으며 HPLC에는 M-45 Pump(Waters Assoc.), 검출기로는 SFM 25 spectrofluorimeter(with flow cell)(Kontron Instrument) 및 Rheodyne injector(model 7125 Rheodyne Inc.), IR spectrum 측정에는 FT-IR(Perkin Elmer 1710)을, <sup>1</sup>H-NMR spectrum 측정에는 JEOL FT-NMR spectrometer(400MHz)를 사용하였다.

## 정량조작

Scheme II에 의해 조제된 시료에 대하여 형광광도측정법 및 HPLC에 의하여 정량하였다. 형광측정에는 표준물질로 황산퀴닌을 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 $\mu$ g/ml의 농도로 조제하여 ex. $\lambda$ =350nm, em. $\lambda$ =450nm에서 측정하여 매번 보정하여 주었다.

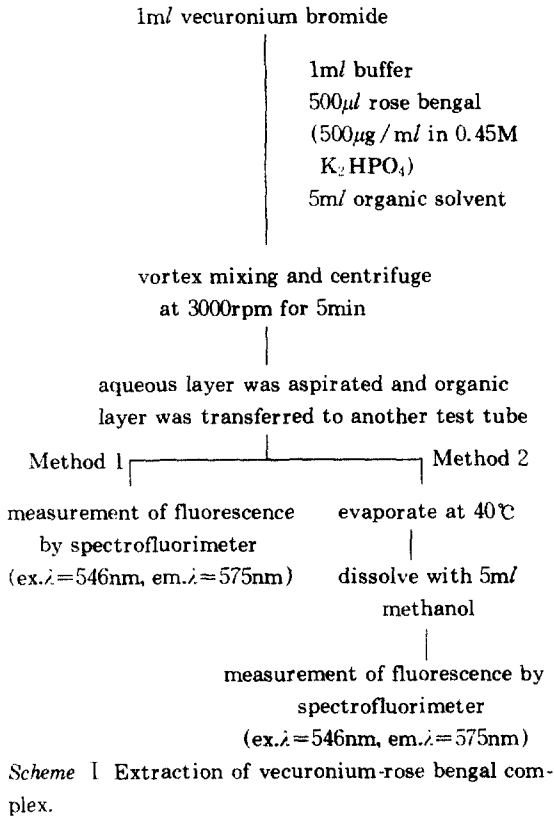
## 실험결과 및 고찰

### pH의 영향

Scheme I의 Method 1에 따라 RB를 ion-pair reagent로 이용한 VeBr의 추출은 수용액의 pH의 영향을 받는다. pH 2.2~12.0까지의 여러 완충액에 대하여 실험한 결과 pH 2.2~6.0 사이에서 높은 형광강도를 일정하게 유지하였다. 본 실험에서는 pH 5.0 buffer를 사용하였다. 그리고 Scheme I의 Method 2에 의하면 pH 2.2~7.0 사이에서는 blank값이 높으므로 pH 9.0 완충액을 사용하였다.

### 추출용매의 영향

차물의 추출용매로서 클로로포름, 에테르, 디클로로



메탄, 사이클로헥산, 헥산, 사염화탄소, 디클로로에탄에 대하여 실험한 결과 Fig. 1에서와 같이 디클로로메탄이 상대형광강도가 제일 높으므로 본 실험에서는 디클로로메탄을 추출용매로 사용하였다.

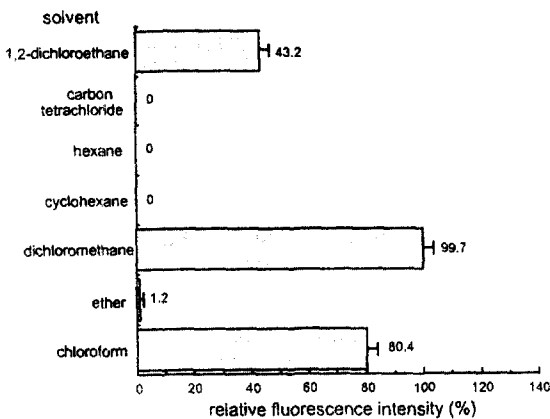


Fig. 1. Effect of solvents for the extraction of Vecuronium bromide-Rose bengal complex

**추출시간의 영향**

추출시간을 10, 20, 40sec, 1, 3, 5, 10, 20, 30min으로 하여 실험한 결과 40초 이후에는 일정한 상대형광강도를 보여 VeBr-RB ion-pair complex 형성 및 유기용매로의 추출은 신속하게 이루어짐을 알 수 있었다. 본 실험에서는 추출시간을 3분으로 하여 실험하였다.

**착물에 대한 검토**

착물의 조성을 연속변화법과 몰비법으로 검토한 결과 Fig. 2의 (a), (b)에서와 같이 VeBr와 RB의 몰비는 전부 1:1이었다.  $10^{-3}$ M VeBr의 용액과  $10^{-3}$ M RB 용액의 1:1비에 의하여 생성된 착물을 디클로로메탄으로

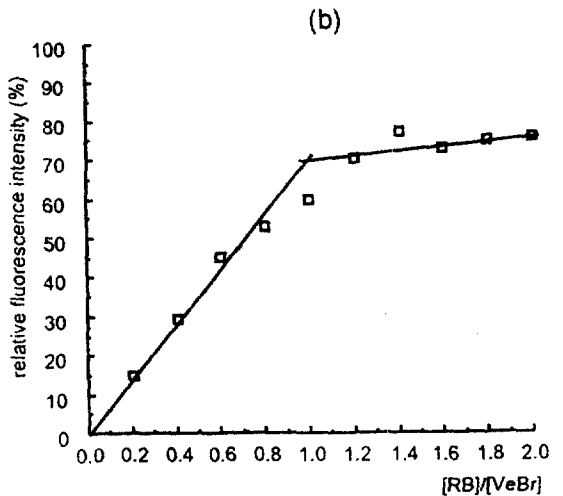
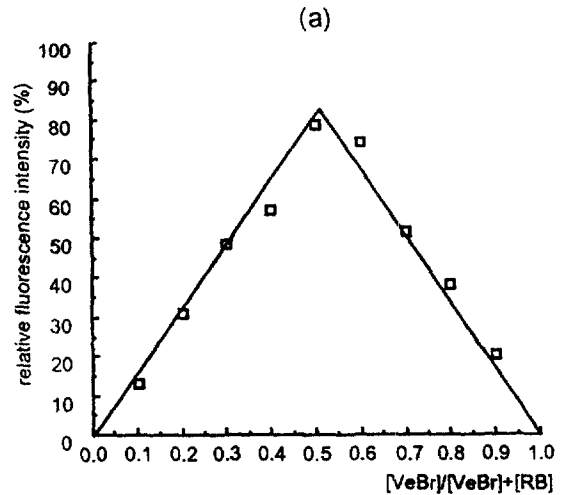


Fig. 2. Continuous variation method(a) and Mol-ratio method(b)

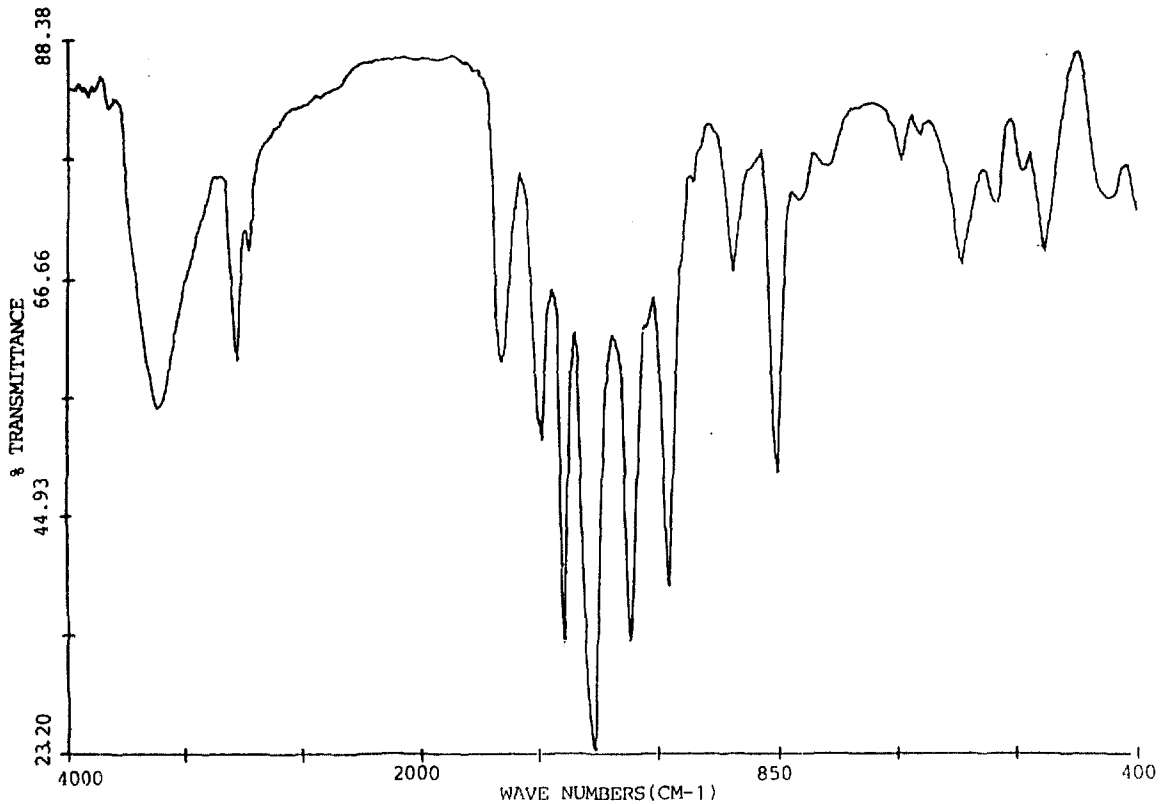


Fig. 3. IR spectrum of Vecuronium bromide-Rose bengal complex

반복 추출한 후 40℃에서 증발건조한 후 잔사를 건조하여 얻은 결정으로 IR 스펙트럼은 KBr disc법으로,  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼은  $\text{CDCl}_3$ 와  $\text{CD}_3\text{OD}$ 를 혼합용매로 하고 TMS를 내부 표준물질로 사용하여 측정하였으며 그 결과는 Fig. 3과 4에 나타내었다. VeBr-RB간에 형성된 착물의 spectrum에서는 VeBr의 amine site에 인접된  $-\text{CH}_3$  spectrum이  $1360\text{cm}^{-1}$ 에서  $1430\text{cm}^{-1}$ 로 전이가 일어났으며  $2800\sim 3000\text{cm}^{-1}$ 의  $\text{V}_{\text{C-H}}$  및  $1750\text{cm}^{-1}$  부근의  $\text{V}_{\text{C=O}}$ 에 의한 peak의 intensity가 현저히 감소되었으며  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼을 보면 VeBr-RB간에 착물의 형성으로 VeBr의 piperidine에 결합된 methyl기의 proton이 3.25에서 3.61ppm으로 현저한 저자장 shift를 나타내었다. 따라서 VeBr과 RB간에 ion-pair complex의 형성이 예상된다.

#### 생체시료 중의 VeBr의 정량

Scheme II의 방법에 따라서 증류수, 요 및 혈장 중의

VeBr를 정량하였다. 혈장 시료는 10% 트리클로로초산 1.5ml를 가해 단백성분을 침전시키고 진탕 후 원심 분리하여 얻은 상정액을 5M NaOH로 중화시키는 전처리과정이 필요하였다. Spectrofluorimeter(1cm × 1cm, quartz cell)로  $\text{ex.}\lambda=546\text{nm}$ ,  $\text{em.}\lambda=575\text{nm}$ 에서 상대형광강도를 측정한 결과 증류수, 요 및 혈장 중에 함유된 VeBr의 검량선은 Fig. 5와 같이 시료의 농도가  $1\sim 16\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 정량이 가능하였으며 상관계수가 각각 0.996, 0.989, 0.998로 양호한 직선을 얻을 수 있었다.

#### HPLC에 의한 생체시료 중의 VeBr의 정량

Scheme II의 방법 2에 따라서 증류수, 요 및 혈장 중의 VeBr를 정량하였다. HPLC에 의한 분석은 Table 1에 표시한 것과 같이  $\mu\text{-Bondapak C}_{18}$  column과 테트라부틸암모늄포스페이트염을 함유한 PIC A(Waters 85101) 시약이 함유된 70% 메탄올을 이동상으로 하여

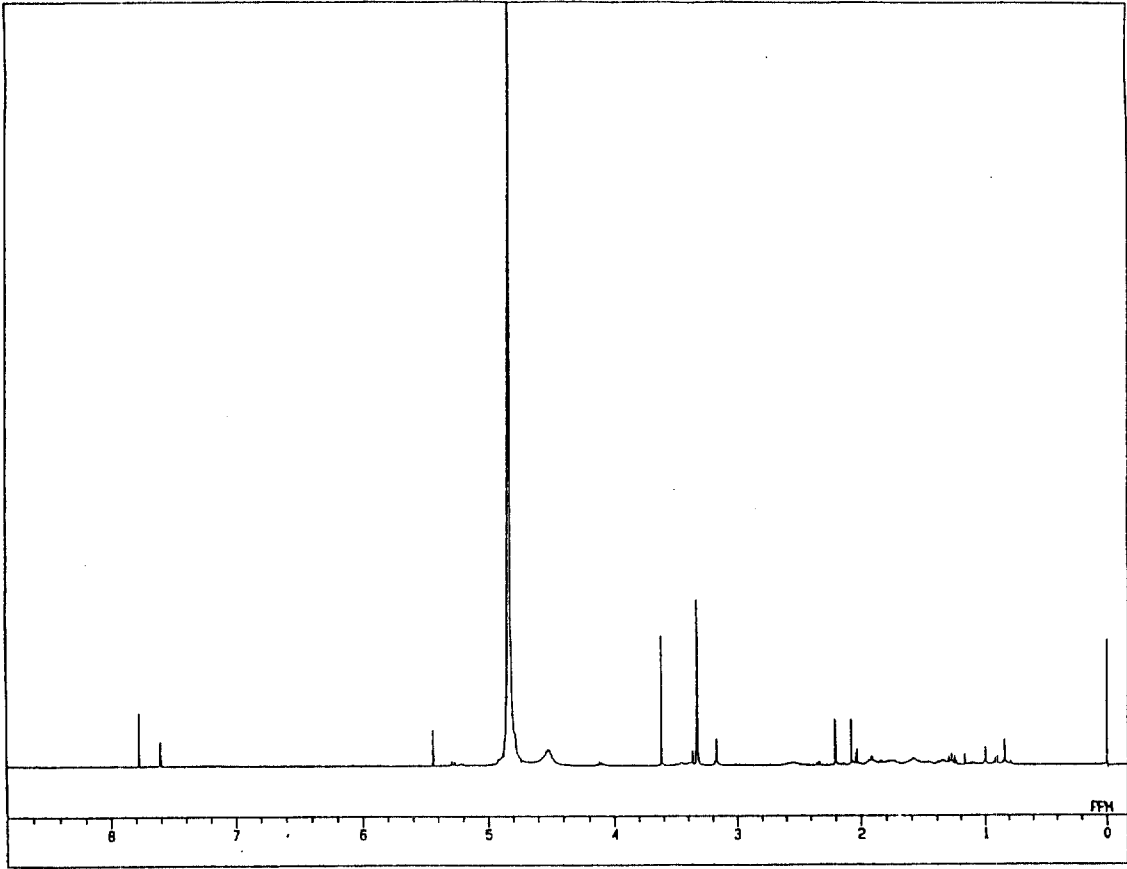


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Vecuronium bromide-Rose bengal complex

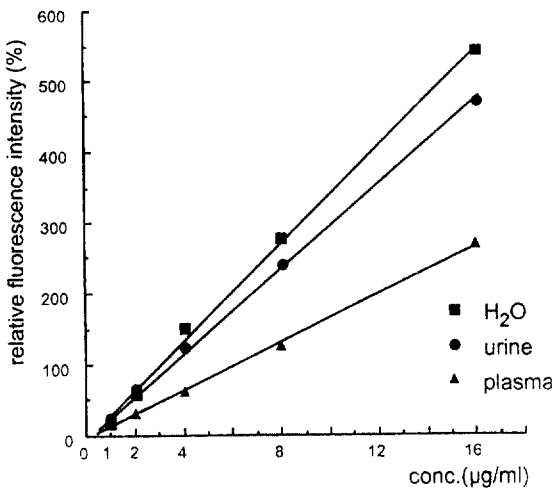


Fig. 5. Calibration curves of Vecuronium bromide-Rose bengal complex extracted from H<sub>2</sub>O, urine and plasma by spectrofluorimeter (ex.λ=546nm, em.λ=575nm)

ex.λ=546nm, em.λ=575nm에서 형광검출기로 RB를 분석함으로써 VeBr을 간접정량할 수 있었다. 이로부터 증류수, 요 및 혈장에 함유된 VeBr의 검량선은 Fig. 6과 같이 2~32µg/ml(0.08~1.28µg\*)에서 직선성을 보였으며 요의 경우 0.8µg/ml(32ng\*), 혈장의 경우 2µg/ml(80ng\*)까지 검출이 가능하였다. (\*HPLC 분석 시 시료 주입량)

Table 1. Analytical condition of HPLC

Mobile phase	: 70% Methanol+PIC A reagent
Column	: µ-Bondapak C <sub>18</sub> (Waters Assoc.) 5µm, 3.9mm i. d.×300mm
Detector	:SFM 25 spectrofluorimeter(with flow cell) ex.λ=546nm, em.λ=575nm
Flow rate	: 1.5ml/min

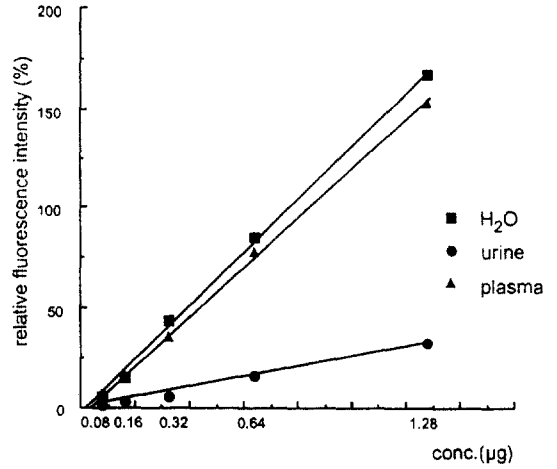
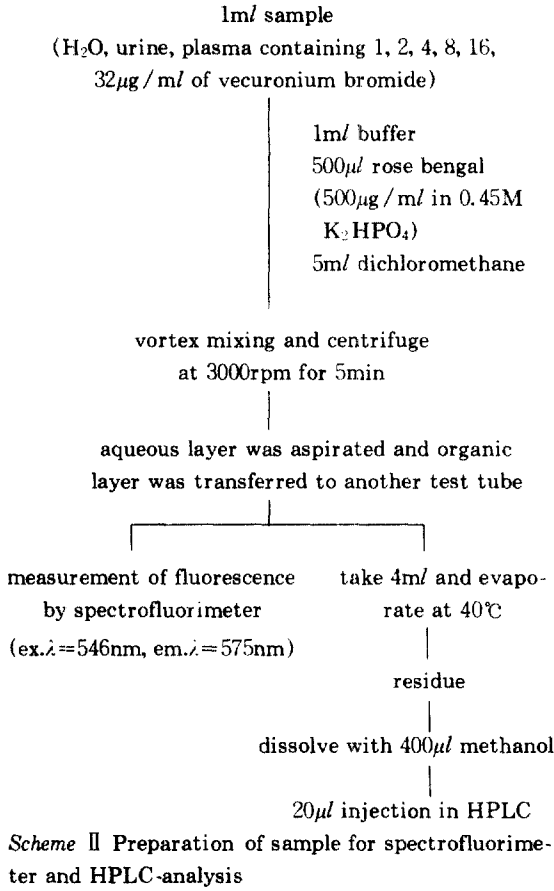


Fig. 6. Calibration curves of Vecuronium bromide extracted from H<sub>2</sub>O, urine and plasma by HPLC

을 검토하기 위하여 Table II의 여러 약물을 VeBr 10 μg/ml에 해당하는 각각의 투여비율대로 가하여 Scheme II의 방법으로 실험하였다. VeBr 10 μg/ml에 대한 회수율은 Table II에서 보는 바와 같이 대부분의 약물에서 103~108%로 방해작용이 없었으나 ketamine과 pancuronium은 방해작용이 있는 것으로 나타났다. 여기에서 ketamine의 경우 주사제에 함유되어 있는 benzethonium chloride가 간섭하는 것으로 사료된다.

**동시처방 약물의 영향**

VeBr과 동시에 투여될 수 있는 약물로 인한 방해작용

**결론**

Table 2. Effect of co-prescribed drugs on the determination of VeBr by HPLC

Drugs	added amount(μg/ml) to VeBr 10μg/ml	recovery(%) (n=5)
Atropine · H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.6	105 ± 5 <sup>a)</sup>
Glycopyrrolate	0.46	104 ± 6
Hydroxyzine · HCl	166	103 ± 9
Neostigmine · Br	2.6	108 ± 7
Pyridostigmine · Br	26	105 ± 10
Thiopental · Na	35	106 ± 6
Droperidol	10	103 ± 7
Ketamine · HCl	100	190 ± 32
Pancuronium · Br	10	220 ± 9

<sup>a)</sup> Each value represents the mean ± S. D

생체시료 중에 함유된 VeBr를 정량하기 위하여 RB와 ion-pair complex를 형성시켜 유기용매층으로 이행시키고 spectrofluorimeter를 이용하여 VeBr를 정량할 수 있었다. 또한 HPLC를 이용하여 형광검출기로 RB를 분석함으로써 VeBr를 간접정량할 수 있었으며 VeBr-RB 착물의 최적 추출조건은 완충액의 pH가 5.0, 9.0, 추출용매는 디클로로메탄이었다. 또한 IR 및  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에 의해 VeBr와 RB 사이의 ion-pair complex 형성이 예상되며 그 조성비는 1:1이었다. 한편, VeBr과 동시에 투여되는 약물의 공존시 회수율은 103~108%로 양호하였다. 단, ketamine과 pancuronium bromide는 방해작용을 하였으며 ketamine의 경우 주사제에 함유되어 있는 benzethonium chloride의 간섭으로 사료된다.

#### 참고문헌

1. American Society of Hospital Pharmacists, *Drug information*, 683(1990).
2. J. Elks, *Dictionary of drugs*, 1273(1990).
3. Kersten, U. W., Meijer, D. K. F. and Agoston, S., *Clinica Chimica Acta.*, **44**, 59(1973).
4. Paanakker, J. E. and Van De Larr, G. L. M., *J. Chromatogr.*, **183**, 459(1980).
5. Paanakker, J. E., Thio, J. M. S. L., Van Den Wildenberg, H. M. and Kasperson, F. M., *J. Chromatogr.*, **421**, 327(1987).
6. Weindlmayer-Goettel, M., Lankmayr, E. P., Köberl, G. and Gilly, H., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343**, 85(1992).
7. Furuta, T., Canfell, P. C., Castagnoli, K. P., Sharma, M. L. and Miller, R. D., *J. Chromatogr.*, **427**, 41(1988).
8. Baker, J. R., Vouros, P., Rinden, D. and Martyn, J. A. J., *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.*, **19**, 69(1990).
9. Chatten, L. G. and Okamura, K. O., *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1328(1973).
10. 堀岡正義, 石岡ひろみ, *藥誌*, **81**, 76(1961).
11. Sakai, T. and Ohio, N., *Chem. Letter*, **19**, 107(1982).
12. 酒井忠雄, 大野典子, *分化*, **32**, 302(1983).
13. Kigasawa, K., Shimizu, H. and Ibuki, M., *Yakugaku Zasshi*, **92**, 1009(1992).
14. 官路敏彦, 日比清勝, 酒井忠雄, *分化*, **39**, 73(1990).
15. 立況正義, 中山修二, 大河原晃, *分化*, **19**, 761(1970).
16. Sakai, T., *Analytica Chimica Acta.*, **147**, 33(1983).
17. Aoki, M., Iwayama, Y. and Yata, N., *Yakugaku Zasshi*, **82**, 918(1962).
18. 酒井忠雄, 大杉善隆, 嘉本武史, 大野典子, 佐佐木英人, *分化*, **37**, 174(1987).
19. 緒方惟治, 坂口武一, 市川芳子, 出口富美子, 船岡紀子, 清田千生美, *分化*, **24**, 279(1975).
20. 坪内正弘, *分化*, **20**, 83(1971).
21. Tsubouchi, M., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 3164(1970).
22. Tsubouchi, M., Sakai, t., Watake, T., Kanazawa, K. and Tanaka, M., *Talanta*, **20**, 222(1973).
23. 酒井忠雄, 坪内正弘, 畦地義義, *分化*, **25**, 675(1976).
24. Cohen, E. N., *J. Lab & Clin. Med.*, **61**(2), 338(1963).
25. Kim, B. W., Kim, Y. S., Park, S. B., Rhee, J. S., Jung, K. H. and Kim, K. N., *Yakhak Hoeji*, **37**(1), 30(1993).
26. Eliving, P. J., Markowitz, I. M. and Rosenthal, I., *Anal. Chem.*, **28**(7), 1179(1956).