

컬럼 스위칭 고속액체크로마토그래프법을 이용한 혈장 중 플루코나졸의 분석

지준필 · 진 숙 · 이미경 · 김양배 · 김종국[†]

서울대학교 약학대학
(1999년 12월 17일 접수)

Column-switching High Performance Liquid Chromatographic Determination of Fluconazole in Human Plasma

Jun-Pil Jee, Sook Jin, Mi-Kyung Lee, Yang-Bae Kim and Chong-Kook Kim[†]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 17, 1999)

ABSTRACT—A column-switching high performance liquid chromatographic method has been developed for the determination of a fluconazole in human plasma. Each plasma sample was centrifuged for 10 min at 5000 g. After an aliquot of the supernatant was taken to nylon microcentrifuge filter, these samples were centrifuged for 10 min at 5000 g. An aliquot of the supernatant was injected directly onto the HPLC column. Deionized water was run for 2 min at a flow rate of 1.0 ml/min to retain fluconazole in an extraction column, while proteins and endogenous interferences were eluted to the waste. The analyte was then back-flushed onto an analytical column, C₁₈ reversed-phase column. The mobile phase for analytical column, 0.01 M sodium acetate (pH 5.0)-methanol (65:35, v/v), was run at a flow rate of 1.0 ml/min. The column effluent was monitored by ultraviolet detection at 261 nm. The retention time for fluconazole was 11.76 min in human plasma. The detection limit for fluconazole in human plasma was 0.2 µg/ml. No interference from endogenous substances was observed.

Keywords—Column-switching high-performance liquid chromatography, Fluconazole

플루코나졸은 bis-triazole로서 화학명은 2-(2, 4-Difluorophenyl)-1, 3-bis(1H-1, 2, 4-triazole-1-yl)-2-propanol이며 구조식은 Figure 1과 같다. 플루코나졸은 triazole계 항진균제로서 진균의 sterol 합성을 선택적으로 저해한다.¹⁾

플루코나졸은 다른 azole계 약물처럼 시험관 내에서 보다 생체 내에서 탁월한 감수성을 보인다.¹⁾ 플루코나졸은 조갑진균증, 족부백선, 체부백선, 고부백선, 어루러기 및 칸디다증을 포함한 피부진균감염증, 급성 또는 재발성 질칸디다증,

칸디다혈증, 전염성칸디다증 및 그외의 다른 침투성 칸디다 감염증을 포함한 전신성 칸디다증에 효과가 있다.²⁾ 또한 면역기능이 정상인 환자 및 후천성 면역 결핍증(AIDS), 장기 이식환자 또는 그 밖의 다른 면역 억제요법을 받는 환자의 효모균 수막염 및 기타 부위(폐, 피부 등)의 효모균증, 에이즈 환자의 효모균증의 재발을 방지하기 위한 유지 요법에도 사용된다.^{3,4)} 플루코나졸은 또한 진균의 cytochrome P-450 의존성 효소에 대해 고도의 선택성을 갖고 있다.⁵⁾

플루코나졸의 약동력학적 특성은 경구투여 또는 정맥 투여시 유사점이 있다.³⁾ 경구투여시 플루코나졸의 흡수는 신속하게 이루어지며 흡수율도 매우 높아서 최고 혈중농도 도달 이후의 혈중농도 추이는 정맥 주사후의 혈중농도 추이와 매우 유사하며 생체 이용율은 90%이상이 된다.⁶⁾ 경구투여시 음식물과 함께 복용하여도 흡수율은 영향을 받지 않는다.⁷⁾ 공복시 최고 혈중농도는 투여후 0.5-1.5시간 사이에 도달되며 혈장에서의 배설 반감기는 약 30시간이다.⁷⁾ 약물의 분포 용적은 전체 체액의 분포용적과 거의 같으며 혈장단백 결합율은 11~12%로 비교적 낮다.⁸⁾ 약물의 배설경로는 주로 신장이며 투여량의 약 80%가 대사되지 않은 상태로 요를 통해 배설된다.^{8,9)} 플루코나졸의 클리어런스는 (clearance) 크레

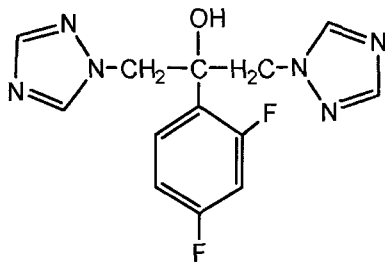


Figure 1—Structural formula of fluconazole.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)880-8142, E-mail : cckim@plaza.snu.ac.kr

아티닌 클리어런스에 비해한다.⁶⁾ 체내에서 순환되는 대사물은 존재하지 않는다.⁶⁾

지금까지 생체시료 중 플루코나졸의 함량 측정은 단백질을 제거한 다음 유기용매를 사용하여 약물을 추출한 후 HPLC로 약물을 분석하는 방법을 사용하였다. 그러나, 이방법은 추출과정에 소요되는 시간이 길고 추출과정 후 하층 부분을 취하여 HPLC 분석을 시행하여야 하므로 분석 샘플이 오염될 가능성이 크다.¹⁰⁾

본 실험에서는 약물의 혈장 샘플 처리가 간편하고, 비교적 분석 비용이 저렴하며, 총 분석시간을 단축시킬 수 있는 컬럼 스위칭 HPLC 분석법을 사용하여 혈장중의 플루코나졸을 정량할 수 있는 조건을 확립하고자 시도 하였으며 이에 지견을 얻었으므로 보고하고자 한다.

실험방법

시료 및 시약

플루코나졸은 한미약품공업주식회사로부터 공급받았다. 내부표준물질로 사용한 펜아세틴 (N-[4-Ethoxyphenyl]acetamide)은 시그마에서 구입하였다. 그외의 시약들은 특급이나 HPLC용 등급을 사용하였다.

기기

HPLC 장치는 Hitachi사(Tokyo, Japan)의 HPLC 시스템을 사용하였고, 이 시스템은 L-7200 auto sampler, L-6000 펌프, L-6200 펌프, L-4200 UV-VIS 검출기 그리고 D-2500 integrator(Hitachi, Tokyo, Japan)로 구성되었다. 분석용 컬럼은 Lichrosorb RP-18(4.6×150 mm, 5 μm, GL science, Japan)을 사용하였으며, 추출 컬럼은 Hichrom RP10 (4.6×10 mm, Hichrom, Reading, Berkshire, England)을 사용하였다. Flow-path switching unit은 신영 과학사(Seoul, Korea)에서 제조한 것을 사용하였다. 원심분리기는 비전(Seoul, Korea)의 VS-15000 CFN 모델을 사용하였다. Nylon micro-centrifuge filter는 Xpertek(0.45 μm, P.J. Cobert Associates, inc.)을 이용하였으며 시료는 이를 이용하여 여과하였다.

분석조건

이동상은 0.01 M 초산나트륨(pH 5.0)과 메탄올을 65:35 (v/v%)의 조성으로 분석할 때마다 제조하였다. 0.45 μm membrane filter를 사용하여 여과하고 초음파기로 공기를 제거한 후 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하였고 샘플은 200 μl씩 주입하였다. 컬럼온도는 실온으로 하였고, 자외선 흡광광도 261 nm에서 검출하였다.

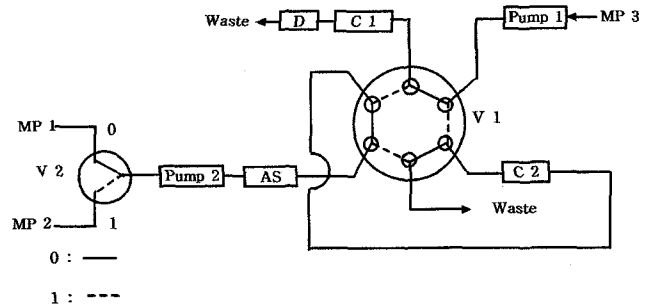


Figure 2—Automated HPLC system with column-switching used for separation and quantification of fluconazole in human plasma.

C 1 : Analytical column

C 2 : Extraction column

AS : Autosampler

D : Detector

V 1 : Six-port two-position valve

V 2 : Solenoid valve

MP : Mobile phase

The solid and dotted lines in V 1 and V 2 indicated the valve position of 0 and 1, respectively.

Step 1 (V 1 = 0, V 2 = 0; 0min) : A plasma sample is injected.
Step 2 (V 1 = 0, V 2 = 0; 0-2min) : The plasma sample is swept with MP 1 using pump 2.

Step 3 (V 1 = 1, V 2 = 0; 2-10min) : MP 3 was run using pump 1 through C 2 in the back-flush mode and elutes the analyte onto C 1, where the analyte is separated.

Step 4 (V 1 = 0, V 2 = 0; 10-15min) : MP 3 was run into C 1 for chromatographic. Concurrently, C 2 is washed with MP 1.

Step 5 (V 1 = 0, V 2 = 1; 15-18min) : C 2 is washed with MP 2 to remove hydrophobic substances retained column.

Step 6 (V 1 = 0, V 2 = 0; 18-25min) : C 2 is reconditioned with MP 1 and prepared for the next injection.

고속액체크로마토그래프

분석하는 과정은 Figure 2에 도식하여 상세히 설명하였다. 이동상 1(MP 1)은 탈이온수로서, 펌프 2로 유속 1.0 ml/min으로 하여 추출컬럼(C 2)에 유입시켰다. 이동상 2(MP 2)는 70% 메탄올로 C 2를 세척하는데 사용하였다. 이동상 3(MP 3)는 0.01 M 초산나트륨:메탄올(65:35, v/v%)로 조성되었으며, 펌프 1을 이용하여 유속 1.0 ml/min 로 컬럼(C 1)에 유입시켰다. 혈장샘플을 주입한 후 C 2에 플루코나졸을 유지시키고 C 2로부터 단백질과 내부 간섭물질을 제거하기 위하여 MP 1을 2분동안 유입시켰다. 그 후 valve 1(V 1)이 스위칭 되어 플루코나졸은 MP 3에 의해 C 2에서 C 1으로 back-flush되어 유입되었다. MP 3는 플루코나졸이 혈장샘플로부터 분리될 때까지 유입되었다. 유출액은 261 nm로 고정시킨 자외선 흡광광도 검출기에 의해 측정되었다(2-15분 사이). 플루코나졸이 C 1에서 분리되는 동안, V 1은 다시 스위칭 되어 MP 1으로 C 2를 세척하였으며(10-15분 사이), 그 후 C 2에 잔류하는 소수성 물질을 제거하기 위하여 valve 2(V 2)를 스위칭하여 재차 세척하였다(15-18분 사이).

표준용액의 조제

플루코나졸의 표준 용액은 메탄올에 녹여서 만들었다. 플루코나졸-메탄올 용액을 증류수로 순차적으로 희석하여 1000, 500, 200, 100, 50, 20 µg/ml의 농도가 되도록 제조하였다. 내부표준물질로 사용한 펜아세틴 표준 용액은 메탄올에 녹여서 만들었다. 펜아세틴-메탄올 용액을 증류수로 희석하여 25 µg/ml의 농도가 되도록 제조하였다.

혈장 중 표준용액 첨가

제조한 플루코나졸 표준 용액을 혈장 1 ml에 10 µl씩 첨가하여 혈장 중 농도가 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 µg/ml가 되도록 하였다. 내부표준물질로 제조한 펜아세틴 표준 용액은 혈장 1 ml에 10 µl를 첨가하였다.

혈장 시료 채취

평균 체중 67.3 kg의 평균 25.2세의 건강한 남성 지원자 3명으로부터 동의서를 받은 후 이들을 대상으로 플루코나졸 캡셀(50 mg)을 3캡셀씩 복용(150 mg)시켜 플루코나졸 투여 전, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 시간까지의 혈장을 채취하였다. 채취한 혈장은 -40°C에서 보관하였다.

혈장 시료의 전처리

분석 직전 혈장 시료를 실온에서 서서히 해동시켰다. 이들 혈장 시료를 원심분리기를 이용 5000 g, 4°C에서 10분동안 원심분리 후 상층액을 취하여 0.45 µm microcentrifuge filter로 여과하여 혈장에 존재하는 입자를 제거한 다음 HPLC에 직접 주입하였다.

결과 및 고찰

컬럼스위칭법의 장점은 1) 생체시료중 약물의 함량을 측정하기 위하여 시료중에 존재하는 단백질을 제거한 다음 유기용매를 사용하여 약물을 추출하는 일련의 과정을 생략할 수 있으며 또한 2) 내부표준물질을 사용하지 않고 분석을 할 수 있다는 점이다. 그러나 컬럼스위칭법을 사용하여 약물을 분석하고자 할 경우에는 반드시 사전에 HPLC 시스템을 전체를 검증할 필요가 있다. 본 연구에서도 분석컬럼, 추출컬럼, 자동검체채취기, 검출기, 밸브시스템으로 구성된 자동화된 HPLC 시스템을 사용하여 시료처리가 간편하고, 분석비용이 저렴하며, 총 분석시간을 단축시킬 수 있는 분석 조건을 확립하고 자동화된 분석시스템이 이상없이 작동되는지 총체적으로 검증하고자 내부표준물질을 사용하여 연구하였다.

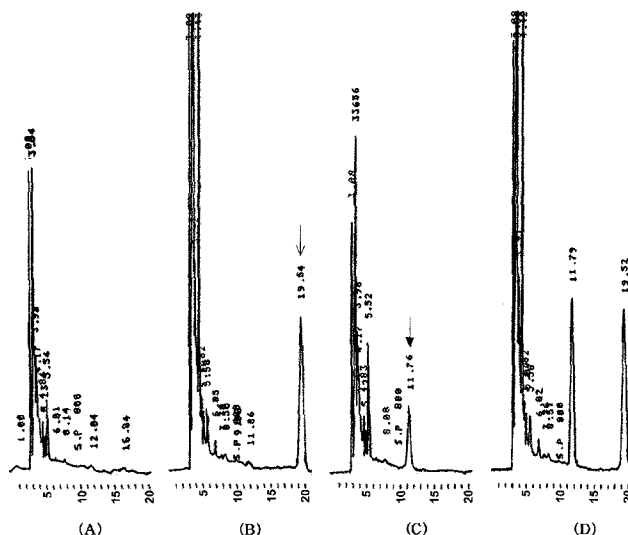
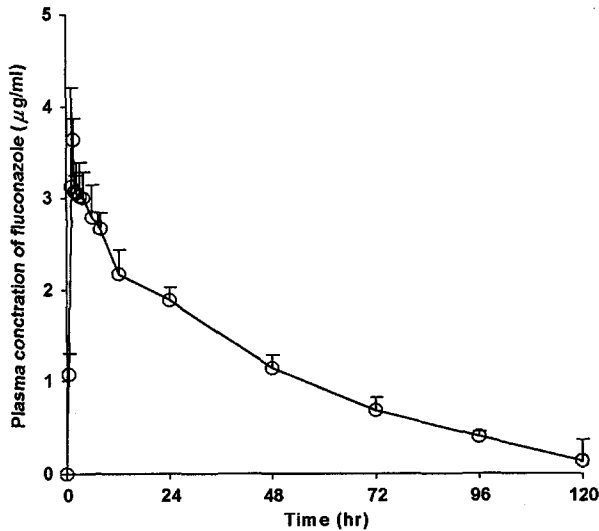


Figure 3—Chromatogram of (A) drug-free human plasma, (B) human plasma spiked with 0.5 µg/ml of phenacetin, (C) human plasma spiked with 3 µg/ml of fluconazole, (D) human plasma spiked with 10 µg/ml of fluconazole and 0.5 µg/ml of phenacetin. Keys: fluconazole = \blacktriangleright , phenacetin = \rightarrow .

Figure 3는 공혈장 (A), 사람 혈장에 펜아세틴을 가한 것 (B), 플루코나졸을 가한 것 (C), 펜아세틴과 플루코나졸을 가한 것 (D)으로부터 얻은 크로마토그램이다. 플루코나졸과 펜아세틴(내부표준물질) 모두 혈장내에 존재하는 물질로부터 간섭을 받지않고 피이크가 명확히 분리되었다. 플루코나졸과 펜아세틴의 유지시간은 각각 약 11.76분, 19.54분 이었다. 본 분석방법에 의한 혈장 중 플루코나졸의 검출한계는 0.2 µg/ml이었으며 검량선은 0.2~10 µg/ml 범위에서 피이크 높이로 작성하였을 때 $(y)=0.909$ 플루코나졸 농도(x)-0.0062 인 매우 양호한 직선성을 나타내었다($r^2=0.9971$). 내부표준물질을 사용하지 않고 검량선을 피이크의 높이로 작성하였을 경우에도 동일한 결과를 얻었다. 이러한 연구결과는 자동화된 HPLC 시스템에서 컬럼 스위칭법으로 분석방법을 만들 때는 내부표준물질이 없이도 가능하다는 것을 사실적으로 입증하는 것이다. Table I에 의하면 일간 변동성(C.V.)은 0.622~8.081%로 나타났으며 일내 변동성(C.V.)은 0.764~5.119%로 나타났다. 이를 통하여 본 분석의 정밀성을 입증 할 수 있었으며, -3.092~3.142%의 상대오차를 나타내어 분석의 정확성을 입증할 수 있었다. 크로마토그래프상의 피이크에 혈장 시료는 단백질의 함량이 많으므로 소수의 시료를 분석할 경우에는 변화가 없으나 다수의 시료(50개 이상)를 자동검체채취기로 주입할 경우 추출컬럼에 많은 부하가 걸리기 때문에 추출컬럼의 압력이 상승하여 크로마토그래프상의 피이크가 변하는 경우가 있다. 따라서 다수의 검체를 자동검체채취기가 부착된 HPLC를 사용하여 컬럼스위칭법으로 분석할

Table I—Precisions, Accuracies of Fluconazole at Various Concentrations in Human Plasma

Conc. (µg/ml)	Precision (%)		Accuracy	
	Interday C.V.	Intraday C.V.	Conc. Measured (µg/ml)	Relative Error (%)
0.2	6.268	4.762	0.206 ± 0.025	2.885
0.5	8.081	5.119	0.516 ± 0.061	3.142
1	3.969	5.063	1.015 ± 0.081	1.455
2	1.448	1.325	1.947 ± 0.071	-2.666
5	1.309	1.176	4.845 ± 0.097	-3.092
10	0.622	0.764	10.152 ± 0.083	1.523

**Figure 4—Mean plasma concentration-time profile of fluconazole after oral administration of fluconazole (150 mg). Bars represent standard deviation of the mean(n=3).**

경우 우발적으로 발생하는 추출컬럼의 기능저하, 자동검체채취기의 정밀도, 시험자의 숙련도 등이 우려될 때는 내부표준 물질을 사용하므로써 보다 신뢰할 수 있는 분석결과를 얻을 수 있다. Figure 4는 3명의 건강한 남성 지원자에게 플루코나졸 150 mg을 경구투여한 후 경시적으로 채혈한 후 본 분석조건에 따라 분석한 혈장 중 평균 플루코나졸의 농도-시간 곡선을 나타낸 것이다. 본 분석조건에 의해서는 플루코나졸 150 mg을 경구투여한 후 120시간까지 플루코나졸의 혈장중 농도를 측정할 수 있었다.

결 론

혈장 중 플루코나졸의 농도를 측정하기 위해 컬럼 스위칭 HPLC 방법을 도입하여 정밀성과 정확성을 갖춘 비교적 간

편한 분석법을 확립하였다. 본 분석법의 검출한계는 0.2 µg/ml이며, 플루코나졸 0.2~10 µg/ml 농도범위에서 혈장 시료를 직접 컬럼에 주입함으로써 시료 전처리과정을 단순화시켜 간편하고 비교적 짧은 시간내에 분석을 마칠 수 있었다. 이와 같은 분석법은 혈장중의 약물 정량 및 약물의 약동력학에 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 말씀

이 논문은 서울대학교 약학대학 종합연구소의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) S.M. Grant and S.P. Clissold, Fluconazole : a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses, *Drugs*, **39**, 877-916 (1990).
- 2) H. Dermoumi, *In vitro* susceptibility of fungal isolates of clinically important specimens to itraconazole, fluconazole and amphotericin B, *Chemotherapy (Basel)*, **40**, 92-98 (1994).
- 3) D.J. Winston, P.H. Chandrasekar, H.M. Lazarus, J.L. Goodman, J.L. Silber, H. Horowitz, R.K. Shadduck, C.S. Rosenfeld, W.G. Ho and M.Z. Islam, Fluconazole prophylaxis of fungal infections in patients with acute leukemia. Results of a randomized placebo-controlled, double blinded, multicenter trial, *Ann. Intern. Med.*, **118**, 495-503 (1993).
- 4) British Society for Antimicrobial chemotherapy working party, Antifungal chemotherapy in patients with acquired immunodeficiency syndrome, *Lancet*, **340**, 648-651 (1992).
- 5) M.P. Gascon, K.M. Oestreicher and P. Dayer, Comparative effects of imidazole antifungals on liver monooxygenases, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **49**, 158 (1991).
- 6) K.L. Goa and L.B. Barradell, An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in major superficial and systemic mycoses in immunocompromised patients, *Drugs*, **50**, 658-690 (1995).
- 7) K.M. Schafer, Pharmacokinetic optimisation of oral antifungal therapy, *Clin. Pharmacokinet.*, **25**, 329-341 (1993).
- 8) K.W. Brammer, P.R. Farrow and J.K. Faulkner, Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans, *Rev. Infect. Dis.*, **12**, 318-326 (1990).
- 9) D. Debruyne and J.P. Ryckelynck, Clinical pharmacokinetics of fluconazole, *Clin. Pharmacokinet.*, **24**, 10-27 (1993).
- 10) C.H. W. Koks, H. Rosing, P.L. Meenhorst, A. Bult and J.H. Beijnen, High-performance liquid chromatographic determination of the antifungal drug fluconazole in plasma and saliva of human immunodeficiency virus-infected patients, *J. Chromatogr. B*, **663**, 345-351 (1995).