

HPLC-UV를 이용한 혈청 이세파마이신 정량: 약물동태학적 연구

황은경 · 전성실* · 신영희#

경성대학교 약학대학, *왈레스기념 침례병원

(Received January 12, 2015; Revised February 4, 2015; Accepted February 4, 2015)

A Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Isepamicin in Human Serum: Pharmacokinetic Applications

Eun-Kyung Hwang, Seong-Sill Jeon* and Young-Hee Shin#

College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

*Wallece Memorial Baptist Hospital, Busan 609-728, Korea

Abstract — A simple HPLC-UV method was developed and validated for the quantification of human serum isepamicin using phenylisocyanate as a derivatization agent. The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 1~100 $\mu\text{g/ml}$ and LLOQ of 1 $\mu\text{g/ml}$. This method was validated with selectivity, linearity, precision and accuracy, leading to successful application for estimating the pharmacokinetic parameters of isepamicin in Korean healthy subjects following IV infusion of 800 mg isepamicin. The mean $t_{1/2}$ of isepamicin was 1.55 ± 0.08 hr.

Keywords □ isepamicin, phenylisocyanate, derivatization, HPLC-UV, human serum, pharmacokinetics

이세파마이신(1-N-(S-3-Amino-2-hydroxypropionyl) gentamicin B; M.W: 569.6, $\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_{12}$)은 방선균의 일종인 *Micromonospora purpurea*의 배양에 의해 얻어지는 gentamicin B의 1위의 아미노기에 hydroxyaminopropionyl group을 첨가시킨 반합성 유도체로 gentamicin이 갖는 항균스펙트럼, 강력한 살균작용, 강한 항균력을 갖는 동시에 내성균에 대해서도 강한 살균력을 보이며 부작용 발현도 훨씬 낮은 발현률을 보인다.¹⁾ 아미카신과 아주 유사한 활성, 독성 및 PK/PD(약물동태학/약물동력학적) 특징을 가지고 있지만, 아미노글라이코사이드 항생제의 내성에 관여하는 acetyltransferase(AAC(6)-I)를 생성하는 균주에 대해서 resistance하여 여러 가지 아미노글라이코사이드 불활성화효소에 특히 안전환 특징을 지니고 있다.^{2,3)} 이세파마이신은 호흡기나 기관지등에 80~90% 정도로 분포하며 폐 조직에 고농도로 존재하는 특징이 있어 패혈증, 만성 호흡기 병변의 2차 감염, 폐렴, 신우신

염 및 외상 이후 2차 감염 등에 사용되고 있다.^{4,5)}

혈중 이세파마이신을 분석하기 위해 많은 방법이 보고되어 있다. 이세파마이신 자체에 chromophore가 없으므로 적당한 probe를 결합시켜 유도체를 만든 후 high performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하는 방법이 많이 보고되었다. 형광의 immunopolarization을 이용하여 측정하는 방법,^{6,7)} radio-immunoassay(RIA)를 이용하는 방법,⁸⁻¹⁰⁾ column-switching을 이용하는 방법,¹¹⁾ post-column을 이용한 형광탐침 이용하는 방법¹²⁾ 및 light-scattering을 이용하는 방법¹³⁾ 등이 보고되었다. 이러한 방법들은 시간이 많이 소요되거나 비용이 많이 들어 생체 시료중의 이세파마이신의 농도를 분석하는데 어려운 문제점을 가지고 있다. 특히 형광탐침을 이용한 방법은 안정성이 작고 과량의 시약을 사용하는 문제점을 가지고 있으며,¹⁴⁾ 이를 개선할 목적으로 최근에는 형광탐침으로 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate를 이용한 유도체를 만들어 형광 광도계를 이용하는 측정하는 방법이 보고되었다.¹⁵⁾

본 연구에서는 chromophore가 없어 흡광광도계로 측정하기 어려운 이세파마이신의 정량분석을 위해 phenylisocyanate(PIC)를 탐침으로 사용하여^{16,17)} 이세파마이신-PIC 유도체를 합성한 후 HPLC-UV를 이용하여 분석할 수 있는 방법으로 혈중 이세

#Corresponding Author

Young-Hee Shin

College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Tel.: 051-663-4886 Fax.: 051-663-4809

E-mail: yhshin@ks.ac.kr

파마이신의 낮은 농도까지 분석하여 체내 약물동태를 측정할 수 있는 방법을 검토하고자 하였다. 이 방법은 비용 면에서 LC/MS/MS(tandem mass spectroscopy)나 형광 검출기 혹은 RIA 등에 비해 저렴하게 이용 할 수 있고 조작성이 간편하다.

또한, 국내에서는 인체 혈청시료에서의 분석법 및 한국인을 대상으로 한 혈중 이세파마이신의 pharmacokinetic parameter에 대한 보고가 없다. 따라서, 본 연구에서는 본 연구에서 확립한 분석조건을 검증하여 건강한 한국인 지원자 8인의 혈중 이세파마이신의 혈중 농도변화를 측정하여 약물동태학적 파라메타를 구하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

이세파마이신 주사제로는 이세파신 주[®](황산 이세파마이신 200 mg(역가)/2 ml)와 표준품으로 사용한 황산 이세파마이신 표준품은 유탄양행(Seoul, South Korea)에서 제공받아 사용하였다. 내부표준물질로 사용한 kanamicin sulfate, hexanesulfonic acid, triethylamine(TEA), 및 phenylisocyanate(PIC)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, Mo, U.S.A.)에서, 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)은 HPLC grade(Merck, Germany)를, solid phase extraction 용 카트리지는 SPE Strata-X(Phenomenex, U.S.A.)을 구입하여 사용하였다. Autosampler vial, autosampler vial cap, line filter는 Shiseido 사(Tokyo, Japan)에서 각각 구입하여 사용하였다. 컬럼은 Synergi 4 μ Fusion-RP 80A(Phenomenex U.S.A., 4.6 \times 250 mm)를 사용하였으며, 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다. 또한, 이세파마이신의 PIC 유도체 분자량 확인에는 Waters Alliance 2690 LC/MS/MS System을 사용하였다. 혈중농도분석에는 Shiseido nanospace SI-1 HPLC System[2 pumps (Shiseido 3001), UV-VIS detector(Shiseido 3002), degassing unit, autosampler(Shiseido 3023), column oven]을 사용하였으며, refrigerated centrifuge(Mega 17R, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)을 사용하였다.

HPLC 및 Mass 분석조건

HPLC 분석조건 - 컬럼은 Synergi 4 μ Fusion-RP 80A(Phenomenex U.S.A., 4.6 \times 250 mm)를 사용하였으며, 이동상은 아세토니트릴 : 증류수=35 : 65(0.02 M hexanesulfonic acid 함유)(A 용액)와 아세토니트릴 : 증류수=70 : 30(0.02 M hexanesulfonic acid 함유)(B 용액) 두 용액을 gradient method로 사용하였다. 10분까지 A 용액 100%를, 10분부터 30분까지는 A 용액 100%에서 B용액 100%로 직선적으로 변화시켜 분석에 이용하였다. 유속은 1.3 ml/min, 주입량은 25 μ l, UV 검출 파장은 240 nm, 컬럼 온도는 40°C으로 하였다.

Mass 분석조건 - 이세파마이신-PIC 유도체^{16,17)}의 분자량을 확인하기 위하여 질량분석을 행하였으며, 본 분석에 사용한 mass 범위는 m/z 400~2,000이었다.

표준액조제 및 검량선 작성

황산 이세파마이신 표준품의 최종농도가 1 mg/ml가 되도록 정제수에 녹여 조제하여 표준액으로 하고 냉장고에 보관하였다. 이를 공 혈청으로 희석하여 최종 약물농도가 1, 2, 5, 10, 50 및 100 μ g/ml가 되도록 하여 검량선 작성 시료로 하였다. 검량선 작성용 혈청 시료 0.5 ml에 내부표준물질인 카나마이신(100 μ g/ml) 용액 100 μ l를 첨가하여 시료로 사용하였다. 위의 HPLC 분석조건에 따라 얻어진 크로마토그램으로부터 이세파마이신 피크면적과 내부표준물질 피크면적의 비를 구하여 검량선을 작성하였다.

시료조제

분석용 시료는 solid phase extraction 방법에 의하여 처리한 후 PIC 유도체^{16,17)}를 만들어 HPLC로 분석하였다. 즉, solid phase extraction 추출은 우선 Strata-X cartridge(Phenomenex strata-X 3 ml, 60 mg packing)를 메탄올 2 ml로 세척한 후 차례로 0.02 M hexanesulfonic acid 6 ml로 ion-pairing하여 사용하였다. 피험자로부터 각 시간별로 채취하여 -70°C에 보관했던 혈청 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 1분간 진탕한 다음 이 혈청 0.5 ml를 취하여 시험관에 옮기고 내부표준물질로 카나마이신(100 μ g/ml)를 100 μ l 첨가한 후 혼합한 용액을 분석용 시료로 하였다. 분석용 시료를 미리 전처리한 Strata-X cartridge에 가한 다음 0.02 M hexanesulfonic acid 2 ml로 세척한 후 0.2 M hexanesulfonic acid : 아세토니트릴=1 : 1 용액 1 ml로 추출하였다. 추출액을 speed vac을 사용하여 완전히 농축시킨 후 물 200 μ l로 재용해 하였다. 이액에 김 등^{16,17)}의 방법에 따라 TEA (5 mg/ml in acetonitrile)와 PIC(5 mg/ml in acetonitrile)를 각각 100 μ l를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 10분간 방치하여 유도체를 만들었다. 이를 원심분리 한 후 상등액을 취하여 위의 HPLC 분석조건에 따라 분석하였다.

분석법 검증

분석조건에서 설정된 분석방법에 대한 검증을 국립독성 연구원 생체시료분석법 validation에 의하여 아래와 같이 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 평가하였다.

특이성 - 혈청 중 이세파마이신 및 내부표준물질인 카나마이신의 분석방법을 검토할 때 생체 시료내 다른 물질의 공존 시 이세파마이신과 내부표준물질의 분리 및 정량 분석 능력을 검토하였다.

직선성 - 검량선 작성 시와 동일한 농도로 작성하여 얻어진 크로마토그램으로부터 이세파마이신과 내부표준물질의 피크면적

비를 구하여 검량선을 작성하고 직선성을 검증하였다.

정밀성 및 정확성 - 검량선 작성 시와 동일한 농도를 작성하여 5일간 연속 실험하였으며, 일내 5회 연속 실험하여 얻어진 크로마토그램으로부터 이세파마이신과 내부표준물질의 피크면적 비를 구하였다.

이로부터 일간 및 일내 정밀성 및 정확성을 각각 평가하였으며, 변동계수는 최저정량한계농도(LLOQ)에서는 20% 이내, 나머지 농도에서는 15% 이내의 값을 나타내어야 한다.

약물동태학실험

본 실험은 왈레스기념 침례병원(Busan, South Korea)의 임상시험심사위원회(IRB-제42호)에 의해 승인받아 수행하였다.

약물투여 및 혈액시료 채취 - 피험자는 식품의약품 안전청이 고시한 생물학적동등성시험기준에 따라 지원자 모집공고를 통하여 19~55세의 건강한 성인으로 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 공고하여 모집하였다. 본 시험에 최종 선정된 지원자는 모두 남성으로 평균체중은 63.78 ± 5.73 kg, 평균나이는 29.0 ± 2.5 세, 및 평균 신장은 172.7 ± 4.2 cm이었다. 본 시험에 참여하는 지원자는 피험자에 대한 설명회를 통하여 이 시험의 목적, 시험약의 특성, 시험내용, 주의사항 및 보상내용에 대한 설명과 질의응답을 거쳐 시험에 대해 충분히 숙지한 후 자발적인 의사에 따라 서면동의절차를 거쳐 본 실험에 참가하였다. 모든 지원자는 시험 10일 전부터 항생제 및 진통제를 포함한 일체의 약물 복용을 금지하였을 뿐만 아니라 흡연 및 xanthine계 음료 등을 제한 관리하였다. 피험자에 대한 투약은 이세파마이신

800 mg(8 ml, 이세파신 주[®])을 정맥으로 15분간 점적주사 하였다. 채혈 시간은 약물의 혈중소실반감기(2~3시간)을 토대로 반감기의 3배 이상, 또는 AUCt가 AUC_∞의 80%에 해당되는 시점인 12시간 동안으로 하였으며, 채혈 횟수는 투여직전, infusion 시작 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 4, 6, 8 및 12시간으로 하여 총 12회에 걸쳐 각각 5 ml씩 채혈하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 혈청 분리관에 옮겨 담아 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

약물동태학적 파라메타 산출 - 이세파마이신 800 mg을 건강한 한국인 지원자 8명에게 15분간 정맥으로 점적투여 하여 얻은 혈청 중 약물농도-시간 곡선으로부터 최고혈청농도(C_{max})와 최고혈청농도 도달시간(T_{max}), 혈청중약물농도-시간곡선하 면적(AUC), 소실속도정수(Ke), 및 소실반감기(t_{1/2})는 식품의약품안전청이 제공한 K-BE test를 이용하여 산출하였다.¹⁸⁾ 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

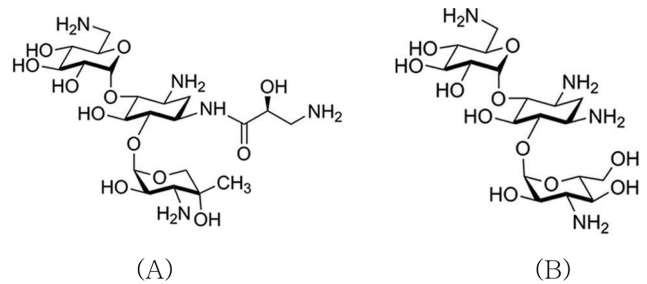


Fig. 1 - Chemical structures of isepamicin (A) and kanamicin (B, Internal standard).

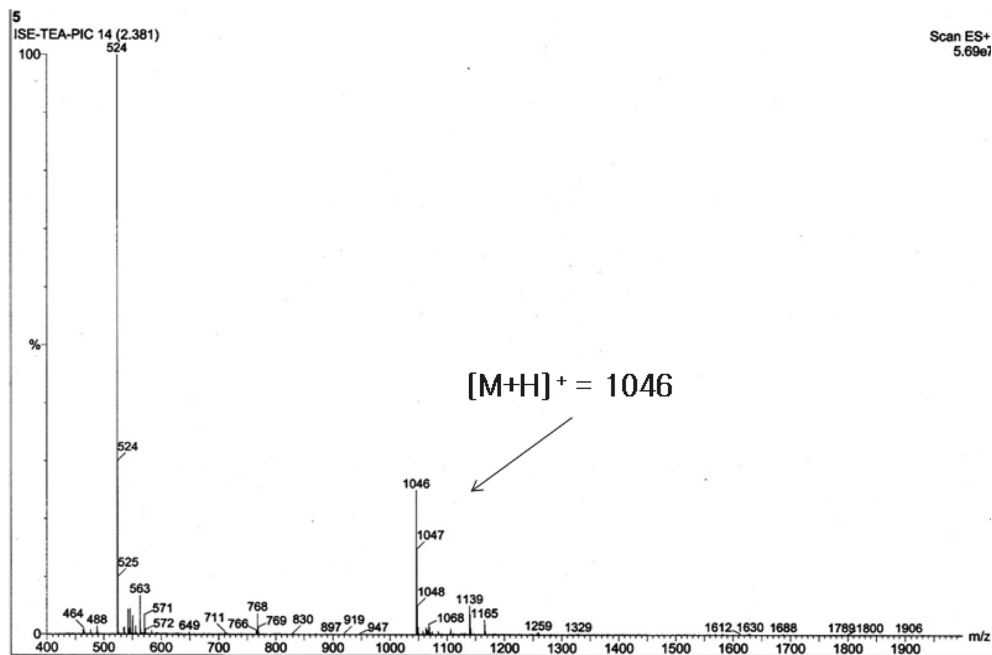


Fig. 2 - LC/MS/MS spectrum of phenylisocyanate derivative of isepamicin.

결과 및 고찰

이세파마이신의 분석 조건 확립 및 Validation

이세파마이신-PIC 유도체의 질량분석 및 HPLC 분석

이세파마이신(Fig. 1)은 chromophore를 가지고 있지 않으므로 UV 흡광분석법을 이용하기 어려워 본 연구에서는 PIC를 이용한 유도체를 만들고 이세파마이신-PIC 유도체의 형성 및 그 분자량을 확인할 목적으로 유도체의 질량분석을 행한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 김 등^{16,17)}은 아미노글라이코사이드인 겐타마이신, 카나마이신, 네오마이신 등과 PIC와 결합하여 얻어진 유도체의

특성을 보고하였다. 이와 유사하게 이세파마이신의 분자구조에서 볼 수 있듯이 PIC와 결합 할 수 있는 4개의 amino group과 PIC와 결합하여 얻어진 유도체의 분자량[M+H⁺]이 1,046을 나타내어 이세파마이신-PIC 유도체를 확인하였다.

Fig. 3(A)은 공 혈청의 크로마토그램이며 Fig. 3(B)과 (C)는 공 혈청에 이세파마이신 및 내부표준물질을 spike한 시료의 크로마토그램이다. Fig. 3에서 보는 것과 같이 HPLC 분석 조건에서 이세파마이신(유지시간 약 9.7분), 내부표준물질(유지시간 약 18.7 분)은 기타 혈청 성분들의 피크와 잘 분리되었다.

분석법 Validation

특이성의 검증 - 시험방법과 같이 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Fig. 3과 같았으며, 이세파마이신의 피크의 유지시간은 약 9.7분, 내부표준물질 피크의 유지시간은 약 18.7분으로 크로마토그램 상에서 나타난 바와 같이 신호 대 잡음 비(S/N ratio)를 10 이상으로 한 분석조건에서 이세파마이신과 내부표준물질은 기타 혈청 성분들과 잘 분리되었다.

검량선 작성 - 검량선은 전 피험자의 혈청 중 이세파마이신 농도범위를 포함하는 1~100 µg/ml에서 양호한 직선성을 나타내었다. 이로부터 검량선 최소 농도인 1 µg/ml를 최소정량한계농도(lower limit of quantification, LLOQ)로 설정하여 이세파마이신 농도를 정량하였다. 본 실험에 사용한 검량선은 $y=3.2804x+0.897(r^2=0.9998)(n=9)$ 이었으며, 이 식에서 y 및 x는 각각 이세파마이신의 피크면적 비 및 이세파마이신의 농도를 나타낸다.

직선성 - 공 혈청시료, 1(정량한계 농도), 2, 5, 10, 50 및 100 µg/ml의 표준 혈청시료를 상기의 분석방법과 같이 전처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈청시료로부터 구한 이세파마이신의 농도는 1~100 µg/ml 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

정밀성 및 정확성 - 1(정량한계 농도), 2, 5, 10, 50 및 100 µg/ml 등 6단계 농도의 이세파마이신 혈청 표준액을 상기의 검체 처리 방법으로 처리하여 분석한 결과는 Table I과 같았다. 정밀성은 이세파마이신의 피크면적 비의 표준편차를 피크면적 비의 평균값의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(CV, %)을 구하였고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(CV, %)을 구하였다. 본 분석방법의 정밀성 CV%는 일내 정

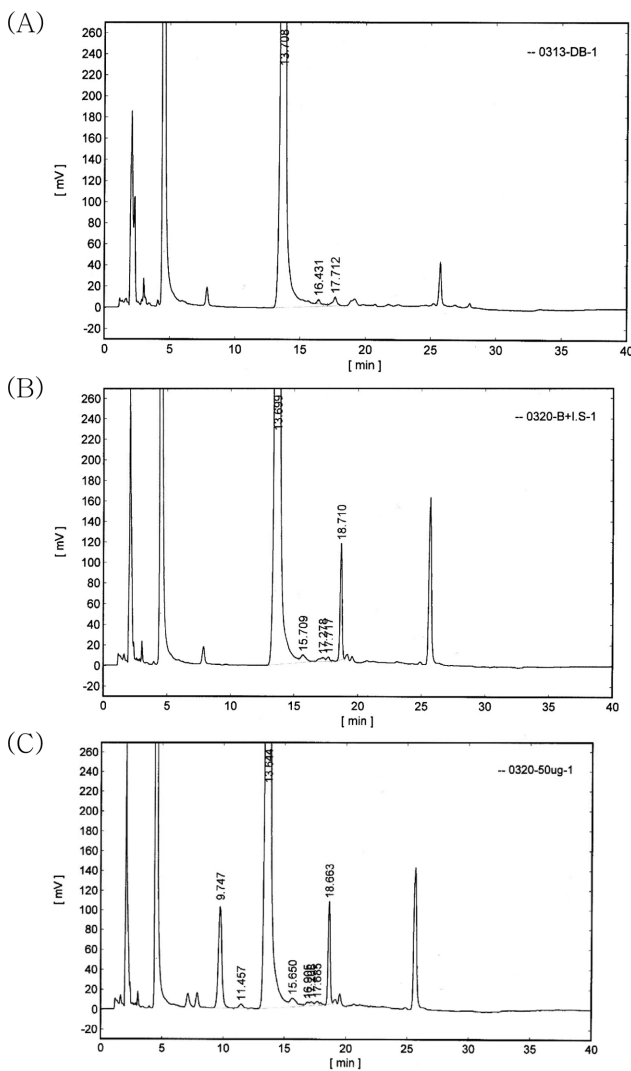


Fig. 3 - Typical chromatogram of human serum isepamicin. (A), Typical chromatogram of drug-free human serum; (B), Chromatogram of blank serum spiked with kanamicin (internal standard); (C), Chromatogram of blank serum spiked with isepamicin and kanamicin. The retention times of isepamicin and internal standard are 9.7 and 18.7 min, respectively.

Table I - Intra-day and inter-day precision and accuracy for the quantification of isepamicin in human serum

Conc. (µg/ml)	Precision (CV %)		Accuracy (% , mean±SD)	
	Intra-Day	Inter-Day	Intra-Day	Inter-Day
1	4.39	4.93	104.48±5.79	95.89±6.08
2	6.04	1.01	111.38±7.56	109.92±1.24
5	0.87	0.49	109.47±1.00	108.91±0.56
10	1.51	0.61	97.79±1.52	97.03±0.61
50	0.61	0.60	98.38±0.60	98.40±0.59
100	0.51	0.49	100.06±0.51	100.67±0.50

밀성, 일간 정밀성 모두 15% 이내였다. 따라서, 이 결과로부터 혈청 중 이세파마이신에 대한 본 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

혈청 중 이세파마이신의 시간별 농도변화 및 약물동태 파라메타 산출

상기에서 확립된 HPLC 분석 조건으로 각 피험자들의 혈청을 분석하여 얻어진 피크 면적 비를 검량선에 대입하여 계산함으로써, 각 피험자들의 혈청 중 이세파마이신의 농도 추이를 알 수 있었다. Fig. 4는 이세파마이신 800 mg을 건강한 지원자 8명에게 정맥 내 점적투여 후 평균 혈청중 이세파마이신의 농도를 시간에 따라 나타낸 것이다. 또한, 피험자들의 혈청 이세파마이신을 분석한 농도를 식약청에서 제공한 K-BE test로 분석해 본 결과 즉, 피험자 각각의 데이터 AUC, C_{max} , T_{max} , Ke 및 $t_{1/2}$ 를 Table II에 나타내었다. 상기의 분석 방법으로 건강한 한국인 지원자 8명에게 이세파마이신을 정맥 내 점적투여 한 후 계산한 약물동태학적 파라메타 AUC는 $193.95 \pm 37.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}/\text{hr}$ 로 나타났으며, C_{max} 는 $145.53 \pm 28.91 \mu\text{g}/\text{mL}$, T_{max} 는 $0.31 \pm 0.12 \text{ hr}$, $t_{1/2}$ 는 $1.55 \pm 0.08 \text{ hr}$, Ke $0.45 \pm 0.02 \text{ hr}^{-1}$ 였다. Tod 등¹⁹⁾과 Radwanski⁸⁾ 등에 의하면 건강한 지원자에게 일회 정맥 내 점적 주사하였을 경우 $t_{1/2(\beta)}$ 는 각각 2.23 hr 또는 3.6 hr로 보고되었다. 본 연구에서는 non-compartment model을 이용하여 $t_{1/2}$ 값 1.55 hr를 산

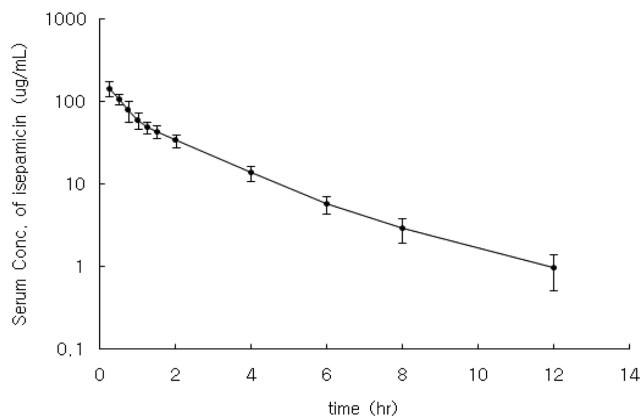


Fig. 4 – Mean serum concentration-time curve following IV infusion of 800 mg isepamicin (8 ml, Isepacin® inj. 200 mg/2 ml) in eight Korean healthy volunteers.

Table II – Pharmacokinetic parameters of isepamicin following a single-dose IV infusion of 800 mg isepamicin (8 ml, Isepacin® inj. 200 mg/2 ml) to eight Korean healthy volunteers

AUC _{0-6hr} ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	T_{max} (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	Ke (hr^{-1})
193.95 ± 37.06	145.53 ± 28.91	0.31 ± 0.12	1.55 ± 0.08	0.45 ± 0.02

출하였다. 이상의 결과로 혈청 이세파마이신의 분석조건이 확립 되었으며, 또한 건강한 한국인에서의 이세파마이신 약물동태에 관한 연구는 아직까지 보고된 바 없으므로 이 보고가 처음인 것으로 사료된다.

결 론

혈청 이세파마이신 농도를 측정하기 위하여 UV 검출기를 이용한 HPLC의 이세파마이신 분석 조건을 확립하였다. 이세파마이신은 chromophore를 가지고 있지 않으므로 UV 흡광분석법을 이용하기 어려워 본 연구에서는 phenylisocyanate(PIC)를 이용한 유도체 즉, 이세파마이신-PIC 유도체를 만들어 HPLC-UV를 이용하여 측정하였다. 이 분석 조건은 직선성, 정확성 및 정밀성 등의 validation 조건을 만족하였다. 또한, 확립한 분석 방법으로 이세파마이신 800 mg을 건강한 한국인 지원자 8명에게 정맥 내 점적투여한 후 약물동태학적 파라메타를 구하였다. 따라서, 본 HPLC-UV 분석방법은 혈청 이세파마이신 분석에 간단하고 편리하여 이세파마이신의 생체이용률 연구에 효율적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

References

- 1) Nagabhushan, T. L., Cooper, A. B., Tsai, H., Daniels, P. J. and Miller, G. H. : The syntheses biological properties of 1-N-(S-4-amino-2-hydroxybutyryl)-gentamicin B and 1-N-(S-3-amino-2-hydroxypropionyl)-gentamicin B. *J. Antibiot (Tokyo)* **31**, 681 (1978).
- 2) Tod, M., Padoin, C. and Petitjean, O. : Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of isepamicin. *Clin. Pharmacokin.* **38**, 205 (2000).
- 3) Barr, W. H., Colucci, R., Radwanski, E., Zampalione, N., Cutler, D., Lin, C. C., Elliott, M. and Afrime, M. B. : Pharmacokinetics of isepamicin. *J. Chemother.* **7**, 53 (1995).
- 4) Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Naples, L., Hare, R. S. and Shaw, K. J. : The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin-a new broad-spectrum aminoglycoside. *J. Chemother.* **7**, 31 (1995).
- 5) Jones, R. N. : Isepamicin (SCH 21420, 1-N-HAPA Gentamicin B): microbiological characteristics including antimicrobial potency and spectrum of activity. *J. Chemother.* **7**, 7 (1995).
- 6) Uematsu, T., Mizuno, A., Suzuki, Y., Sato, R., Yamazaki, T. and Nakashima, M. : Evaluation of fluorescence polarization immunoassay procedure for quantitation of isepamicin, a new aminoglycoside antibiotic. *Ther. Drug. Monit.* **10**, 459 (1988).
- 7) Tod, M., Minozzi, C., Beaucaire, G., Ponsonnet, D., Cougnard, T. and Petitjean, O. : Isepamicin in intensive care unit patients with nosocomial pneumonia: population pharmacokinetic-

- pharmacodynamic study. *J. Chemother.* **44**, 99 (1999).
- 8) Radwanski, E., Batra, V., Korduba, C., Cayen, M., Cutler, D., Affrime, M., Nomeir, A. and Lin, C. C. : Pharmacokinetics of isepamicin following a single administration by intravenous infusion or intramuscular injections. *Antimicrob. Agent Chemother.* **41**, 1794 (1997).
 - 9) Nomeir, A. A., Radwanski, E., Cutler, D., Lin, C. C., Elliott, M., Affrime, M. B., Christopher, D., Korduba, C., Batra, V. and Cayen, M. N. : Single-dose pharmacokinetics of isepamicin in young and geriatric volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **37**, 1021 (1997).
 - 10) Lin, C. C., Veals, J., Hilbert, M. J., Korduba, C. and Nomeir, A. A. : Analysis of isepamicin in human plasma by radioimmunoassay, microbiologic assay, and high-performance liquid chromatography. *Ther. Drug. Monit.* **19**, 675 (1997).
 - 11) Lin, C. C., Radwanski, E., Korduba, C., Affrime, M. and Cayen, M. : Pharmacokinetics of intramuscularly administered isepamicin in men. *Antimicrob. Agent Chemother.* **43**, 86 (1997).
 - 12) Maloney, J. A. and Awni, W. M. L High-performance liquid chromatographic determination of isepamicin in plasma, urine and dialysate. *J. Chemother.* **526**, 487 (1990).
 - 13) Vogel, R., DeFillipo, K. and Rief, V. : Determination of isepamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 405 (2001).
 - 14) Soltes, L. and Sebille, B. : A simple chiral high performance liquid chromatographic method to study the enantiomer differentiating action of microorganism. An assay with DL-tryptophan. *Biomed. Chromatogr.* **13**, 249 (1990).
 - 15) Hosokawa, S., Nakamura, K., Fujita, Y., Horiuchi, R. and Yamamoto, K. : Determination of isepamicin in human plasma by HPLC with fluorescence detection after derivatization using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1866 (2008).
 - 16) Kim, B. H., Kim, Y. K. and Ok, J. H. : Development of liquid chromatographic method for the analysis of kanamycin residues in varicella vaccine using phenylisocyanate as a derivatization reagent. *J. Chromatogr. B.* **752**, 173 (2001).
 - 17) Kim, B. H., Lee, S. C., Lee, H. J. and Ok, J. H. : Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomed. Chromatogr.* **17**, 396 (2003).
 - 18) Lee, Y. J., Kim, Y. G., Lee, M. G., Chung, S. J., Lee, M. H. and Shim, C. K. : Analysis of bioequivalence study using log-transformed model, *Yakhak Hoeji* **44**, 308 (2000).
 - 19) Tod, M., Padoin, C., Minozzi, C., Cougnard, J. and Petitjean, O. : Population pharmacokinetic study of isepamicin with intensive care unit patients, *Antimicrob. Agent Chemother.* **40**, 983 (1996).