



## Determination of Levofloxacin in Human Plasma by HPLC: Method Development, Validation, Stability Evaluation and Application to Pharmacokinetics

Mohammad J. ANSARI<sup>1,2\*</sup>, Mohammed F. ALDAWSARI<sup>1</sup>, Zeenat IQBAL<sup>2</sup> & Arshad KHUROO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy,  
Prince Sattam Bin Abdulaziz University, Al-kharj, Saudi Arabia

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Education and Research,  
Jamia Hamdard New Delhi, India

<sup>3</sup> Associate Vice president, Clinical Pharmacology & Pharmacokinetics,  
Sun Pharma, Gurugram, Haryana, India

**SUMMARY.** This paper reported development, validation and stability evaluations of a simple, selective, sensitive, precise, accurate, and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of levofloxacin in human plasma. The method was validated according to US FDA norms. Extraction procedure employed a simple and rapid single-step protein precipitation to isolate levofloxacin from the plasma. Mobile phase consisted of 4 volumes of acetonitrile and 96 volumes of aqueous phase containing 1.5% v/v tetrabutylammonium hydroxide, 0.3% v/v of triethylamine as ion-pairing agents, adjusted at 0.8 mL/min for isocratic separation. Levofloxacin and norfloxacin (internal standard) were separated on Zorbax SB-CN, a reversed-phase C18 HPLC column kept at 40 °C. The quantification was done by fluorescence detector set at an excitation and emission wavelengths of 290 and 456 nm, respectively. The method was found linear within 0.3-20.39 µg/mL of levofloxacin in plasma with a coefficient of correlation over 0.998. The overall precision and accuracy ranged between 1-7%. The stability of levofloxacin in plasma at different working conditions and long term storage condition were found ~ 98-103% and 93-95%, respectively. The utility of the method is reflected in its simplicity, rapidity, cost-effectiveness such as a high-throughput sample processing and analysis (a batch of 18 samples for a particular time period was processed within 20 min followed by a short run time of 12 min). The mean pharmacokinetic parameters of 18 subjects such as C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> & AUC were 5.50 ± 1.36 µg/mL, 1.306 ± 0.6836 h, and 40.38 ± 8.1751 µg-h/mL, respectively.

**RESUMEN.** Este artículo informa evaluaciones de desarrollo, validación y estabilidad de un método de cromatografía líquida de alto rendimiento simple, selectivo, sensible, seguro, preciso y rápido para la determinación de levofloxacina en plasma humano. El método fue validado de acuerdo con las normas de la FDA de EE. UU. El procedimiento de extracción empleó una precipitación de proteínas simple y rápida en un solo paso para aislar la levofloxacina del plasma. La fase móvil consistió en 4 volúmenes de acetonitrilo y 96 volúmenes de fase acuosa que contenía hidróxido de tetrabutilamonio al 1,5% v/v y 0,3% v/v de trietilamina como agentes de apareamiento iónico, ajustados a 0,8 mL/min para la separación isocrática. La levofloxacina y la norfloxacina (patrón interno) se separaron en Zorbax SB-CN, una columna de HPLC C18 de fase inversa mantenida a 40 °C. La cuantificación se realizó mediante un detector de fluorescencia ajustado a una longitud de onda de excitación y emisión de 290 y 456 nm, respectivamente. El método se encontró lineal dentro de 0.3-20.39 µg/mL de levofloxacina en plasma con un coeficiente de correlación superior a 0.998. La precisión general y la precisión oscilaron entre 1-7%. La estabilidad de levofloxacina en plasma en diferentes condiciones de trabajo y condiciones de almacenamiento a largo plazo se encontraron ~ 98-103 y 93-95% respectivamente. La utilidad del método se refleja en su simplicidad, rapidez y rentabilidad, como el procesamiento y análisis de muestras de alto rendimiento (un lote de 18 muestras para un período de tiempo particular se procesó en 20 min seguido de un tiempo de ejecución corto de 12 min). Los parámetros farmacocinéticos medios de 18 sujetos como C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> y AUC fueron 5.50 ± 1.36 µg/mL, 1.306 ± 0.6836 h y 40.38 ± 8.1751 µg-h/mL, respectivamente.

**KEY WORDS:** chromatography, fluorescence, human, levofloxacin, pharmacokinetics, plasma.

\* Author to whom correspondence should be addressed. E-mails: mj.ansari@psau.edu.sa, javedpharma@gmail.com