

고속액체크로마토그래피를 이용한 사람 혈장중 메비놀린 산의 정량

오한석 · 박동영 · 서성훈 · 김영관 · 홍선표 · 최영욱* · 이경태†

경희대학교 약학대학 *중앙대학교 약학대학

(2000년 9월 26일 접수)

Quantitation of Mevinolinic Acid in Human Plasma by HPLC

Han-Suk Oh, Dong-Young Park, Sung-Hoon Seo, Young-Gwan Kim,
Seon-Pyo Hong, Young Wook Choi* and Kyung-Tae Lee†

College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

*College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received September 26, 2000)

ABSTRACT—Simple and precise high-performance liquid chromatographic (HPLC) assay was developed and validated for the determination of a HMG-CoA reductase inhibitor, lovastatinTM and its active metabolite (mevinolinic acid) in human plasma. The method involved solid phase extraction of mevinolinic acid and internal standard using Sep-Pak Cartridge. Samples were analyzed by reversed-phase HPLC using Capcell-Pak C₁₈ column with ultraviolet detection at 238 nm. The quantitation limit of mevinolinic acid was 2 ng/ml and the calibration curve was linear over the range of 2-50 ng/ml ($r^2 > 0.999$) with human plasma. The analyses of quality control samples indicated that the normal values could be predicted with an accuracy >97%. The intra- and inter-day coefficients of variation for the analyses were <10%. The average recoveries were similar (79%) for mevinolinic acid and methylmevinolinic acid. The method described has been successfully applied to the quantification of mevinolinic acid in about 1,000 human plasma samples over six-month period.

Keywords—Validation, Mevinolinic acid, HPLC, Bioavailability

로바스타틴은 HMG-CoA reductase 저해제로서 10-80 mg/day 투여시 혈장 중의 low density lipoprotein(LDL)을 20-40% 떨어뜨림과 동시에 high density lipoprotein(HDL), 콜레스테롤을 8-10% 증가시키며 관상동맥 질환과 사망률을 감소시킨다.¹⁾

경구투여시 30%가 흡수되며 간에서 mevinolinic acid로 대사되어 활성형이 된다. 활성형의 약물은 간에서 콜레스테롤의 합성을 경쟁적으로 저해함으로써 2차적으로 LDL 수용체의 발현을 증가시켜 혈장 LDL 수준을 낮추는 것으로 보고되어 있다.²⁻³⁾

로바스타틴 40 mg을 성인에게 경구 투여했을 때 활성형인 mevinolinic acid의 최고 혈중농도(C_{max})는 17.9 ng/ml, 최고 혈중농도에 도달하는 시간(T_{max})은 3.5시간, 반감기는 1-2시간 그리고 AUC(0-24 hr)는 54.8 ng · hr/ml이다 라고 보고되어 있다.³⁾

Stubbs 등⁴⁾은 HPLC 자외선검출기로 정량하였을 경우 정량한계는 25 ng/ml으로 크로마토그램에서 내부 간섭이 있음

을 보고하였으며, 로바스타틴과 유사한 구조 화합물인 심바스타틴의 HPLC 자외선검출기에 의한 분리 및 정량법 등은 보고되어 있다.⁵⁻⁶⁾ Ochihei 등⁷⁾이 형광 검출기를 사용하여 column-switching HPLC 방법으로 시험했을 경우 정량한계는 0.1 ng/ml이었다.

본 연구에서는 사람 혈장 중 로바스타틴의 대사활성체인 mevinolinic acid의 분리와 감도를 HPLC의 자외선 검출기를 사용하여 증가시키고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

Mevinolinic acid와 methyl mevinolinic acid는 Biogal Pharmaceutical Works(Pallagistreet, Debrecen, Hungary)에서 구입하였다. 다른 모든 시약들은 특급을 사용하였고 solid-phase extraction column은 Sep-Pak Cartridge(Waters, MA, USA)를 사용하였다. HPLC system은 501 pump (Waters, MA, USA), 717 plus autosampler(Waters, MA, USA), reversed-phase column(Capcell Pak C₁₈, UG-120 5 μ m, 4.6 mm×250 mm, Shiscido, Tokyo, Japan), 그리고

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)961-0860, E-mail : klee@khu.ac.kr

486 UV detector(Waters, MA, USA)를 사용하였다.

표준 용액의 제조

Mevinolinic acid를 메탄올 : 물 = 80 : 20(v/v)로 녹여 10 mg/ml가 되게 조제하고 이 용액 1 ml를 80% 메탄올로 희석하여 100 µg/ml가 되게 하였다. 이를 저장용 표준 용액으로 하여 -70°C에 저장하였다. Mevinolinic acid의 혈장 표준 농도는 2에서 50 ng/ml이다. 내부표준물질로는 methylmevinolinic acid를 80% 메탄올에 녹여 100 µg/ml가 되게 만들고 이를 -70°C에 저장하였다.

시료의 전처리

메탄올 5 ml과 물 5 ml을 가하여 활성이 된 Sep-Pak Cartridge에 100 µl 인산완충액(pH 3.5)로 산성화시킨 1 ml 혈장시료를 통과시켰다. pH 7.2 인산완충액 5 ml과 아세트 니트릴 : pH 7.2 인산완충액(2:8) 4 ml을 연속하여 통과시킨 후, 메탄올 : 아세트니트릴 = (25:75) 1 ml로 elution하였다. 이것을 Speed Vac(Savant, NY, USA)으로 건조한 다음 이동 상 용매 200 µl를 가하고 10,000 rpm에서 원심 분리하였다. 상등액 192 µl를 취한 다음 180 µl를 HPLC에 주입하였다.

HPLC 분석 조건

이동상 용매의 조성은 20 mM 인산완충액(pH 2.6)과 아세트 니트릴을 53 : 47(v/v)의 비율로 섞은 후 0.45 µm 필터로 여과한 후에 사용하였다. 칼럼온도는 35°C, 파장은 238 nm이며 유속은 1.5 ml/min이었다. 얻어진 크로마토그램은 Millennium³²(Waters, MA, USA)로 적분하여 내부표준물질에 대한 mevinolinic acid 피크의 면적비율을 계산하여 정량하였다.

검량선 작성 및 validation 분석

사람 혈장중 검량선 표준물질인 mevinolinic acid 100 µl와 methylmevinolinic acid 50 µl(100 ng/ml)을 공혈장 900 µl에 첨가하여 최종 mevinolinic acid 농도가 2, 3, 5, 10, 25 및 50 ng/ml가 되도록 준비하였다. 시료전처리와 HPLC 분석은 위에서 기술한 대로 수행하였으며 검량선은 표준농도에 대한 mevinolinic acid와 methylmevinolinic acid의 피크면적의 비율에서 얻어진 직선을 사용하였다.

Intraday의 C.V와 정밀도는 mevinolinic acid와 methylmevinolinic acid의 혈장 시료 (n=5)를 5개의 mevinolinic acid 농도(2, 3, 5, 10, 25, 50 ng/ml)를 가하여 분석하였다. Interday에서의 C.V와 정밀도는 같은 농도에서 시료(n=5)를 5일에 걸쳐 분석하였다.

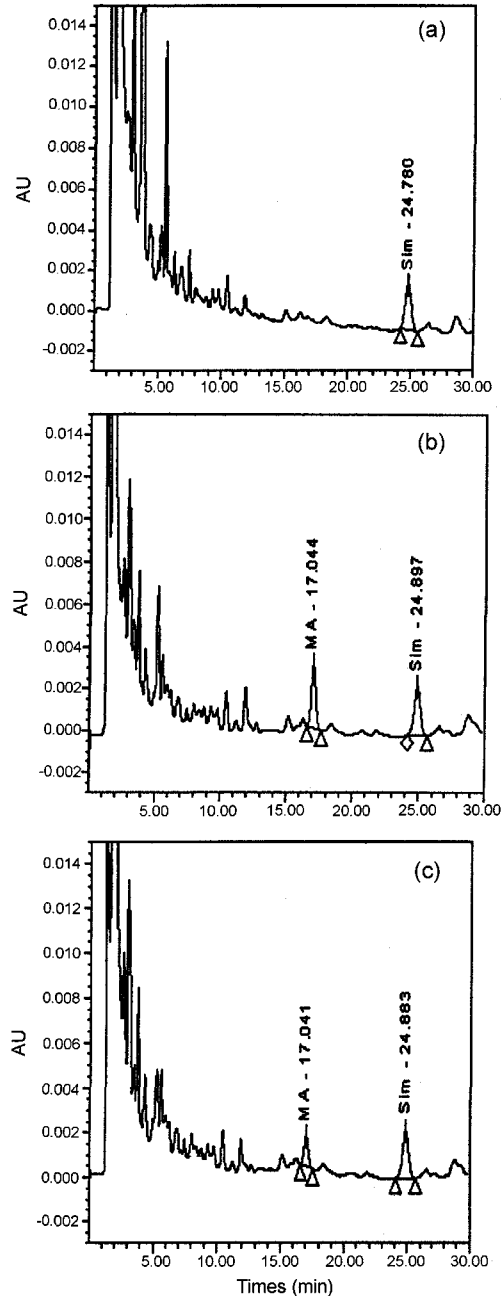


Figure 1—Representative chromatogram of mevinolinic acid and internal standard (methylmevinolinic acid, Sim) in human plasma. (A) Drug-free control human plasma. (B) Human plasma spiked with 50 ng/ml mevinolinic acid (MA) and internal standard (Sim, 50 ng/ml) and (C) 3 hr plasma sample after oral administration of single 80 mg lovastatin tablets.

생체이용률 측정

피험자는 식품의약품 안전청이 고시한 생물학적 동등성시험 기준에 근거하여 경희대학교에 재학중인 20-40세의 건강한 성인 남성 지원자를 공고를 통하여 모집하였다. 지원자에 대하여 경희의료원에서 건강진단을 받아 정상으로 판명된 지

원자를 선정하였다. 피험자로 선정된 사람은 평균체중 67.7 kg의 21-26세(평균 23.1세)의 건강한 남성 16명이었으며 모두 참여 동의서를 받은 후 임상시험을 하였다.

16명의 피험자에게 메바코정 80 mg(20 mg 4정)을 경구 투여하였다. 피험자들 모두에게 heparin-locked(30 units/ml) Angiocatheter(Jelco™, 20G, CRMKON, Pomezia, Italia)를 팔목의 정맥에 설치하고 200 ml의 물과 함께 복용시켰다. 혈액은 catheter를 통해서 투약직전, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10 및 12시간 때에 약 10 ml의 혈액을 채취하여 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 채취하여 분석 시까지 -70°C에 보관하였다.

결과 및 고찰

혈장중 Mevinolonic acid의 분리

건강한 성인 혈장 중 분리된 mevinolonic acid와 내부표준 물질인 methylmevinolonic acid를 함께 가한 것 및 로바스타틴 정제 투여후 3시간째의 혈장을 본 시험 방법에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 1에 나타내었다. Mevinolonic acid와 methylmevinolonic acid의 출현 시간은 각각 16분과 23분이었으며 각 물질의 분리 상태는 양호하였다.

검량선, 정확성 및 정밀성 측정

사람 혈장 중에 mevinolonic acid를 정량하기 위해 2-50 ng/ml(n = 5)의 범위에서 6개의 농도로 구성된 검량선은 상관계수는 0.999 이상인 일직선을 보였다. Intra-day 및 inter-day의 표준편차를 포함하는 평균 검량선은 $y = 0.0182 \times (\pm 0.0005) - 0.0062(\pm 0.0049)$ 를 나타내었으며, y는 피크면적의 비(mevinolonic acid/methylmevinolonic acid)를 \times 는 mevinolonic acid의 농도(ng/ml)를 표시하고있다.

Intra-day의 검량선 범위내의 mevinolonic acid 농도에서 이론적 농도와 실험결과의 평균 농도 및 표준 편차에서

C.V. 값은 9.27%를 초과하지 않았으며 intra-day의 accuracy 는 97%와 103% 사이에 있음을 보였다(Table I).

Inter-day 이론적 농도와 실험결과 얻어진 농도결과는 Table I에 나타내었다. C.V. 값은 5.13%와 accuracy는 98.72%와 104.53% 사이에 있음을 보였다. Intra-day 및 inter-day 모두 C.V. 및 accuracy 값이 이론농도와의 차이가 10% 이내에 들어감을 확인하여 정확도와 정밀도의 기준에 적합함을 확인하였다.

정량한계

C.V 값이 10% 이내를 만족하는 lower limit of quantification(LLOQ)는 signal에 대한 noise의 비를 3:1로 하였을 때 2 ng/ml (n = 5)이었다. 이 농도에서의 평균과 표준 편차의 값은 각각 1.94와 0.18이며 C.V.와 accuracy 값은 각각 9.27과 97.07을 나타내었다(Table I).

회수율

Mevinolonic acid의 회수율 측정을 2, 3, 5, 10, 25 및 50 ng/ml(n = 5)의 농도에서 시행하였다. 회수율은 6개의 미추출 표준 mevinolonic acid를 같은 농도에서 추출한 시료와 피크의 면적을 비교하여 정량하였다. 각각의 농도에 대해서 회수율은 평균 79±5.3%를 보였다.

생체이용률 측정

위에서 사용한 분석방법으로 중외제약의 Mevacor® 정을 총 16명의 피험자에 일회 80 mg을 경구 투여한 후 생체이용률을 측정한 결과 중외제약의 Mevacor® 정의 AUCt, C_{max} 및 T_{max} 값은 각각 91.97±19.91 ng · hr/ml, 23.32±3.42 ng/ml 및 3.28±0.52 hr이었다(Figure 2).

결 론

기존의 UV detector를 이용한 mevinolonic acid의 분리는

Table I—Intra- and Inter-day Validity

Theoretical concentration (ng/ml)	Intra-day			Inter-day		
	Concentration found (mean ± S.D.)(ng/ml)	C.V. (%)	Accuracy(%)	Concentration found (mean ± S.D.)(ng/ml)	C.V. (%)	Accuracy (%)
2	1.94 ± 0.18	9.27	97.07	2.09 ± 0.09	4.51	104.53
3	3.03 ± 0.27	8.93	101.02	3.11 ± 0.10	3.08	103.73
5	5.17 ± 0.47	9.07	103.33	4.98 ± 0.20	4.05	99.68
10	10.03 ± 0.33	3.31	100.26	9.98 ± 0.29	2.88	99.82
25	24.57 ± 0.49	1.99	98.28	24.68 ± 0.56	2.28	98.72
50	50.03 ± 1.78	3.56	100.07	50.16 ± 2.57	5.13	100.31

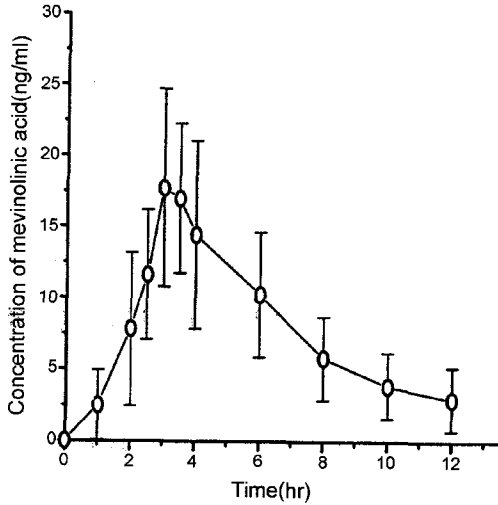


Figure 2—Plasma concentration-time curve of mevinolinic acid following oral administration of Mevacor(O) tablets at the lovastatin dose of 80 mg. Data are expressed as mean ± S.D. (n = 16).

크로마토그램에서 내부 간섭물질의 방해, 추출과정의 문제점과 감도 등으로 혈중 분석을 하는데 있어 많은 어려움이 있다. 본 연구에서 재현성이 높으며 감도가 좋은 분석법으로 로바스타틴의 활성형 대사체인 mevinolinic acid를 methyl-mevinolinic acid를 내부 표준물질로 하여 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장을 인산완충액(pH 3.0)으로 전처리 하여 HPLC 크로마토그램으로 분석한 결과 내부 간섭물질의 방해 없이 mevinolinic acid를 분리하였으며, 정량한계는 2 ng/ml이었고 회수율은 평균 79±5.3%를 얻었다.

2. 사람혈장에서 intra-day와 inter-day의 평균 C.V와 accuracy 모두 이론수치와의 차가 10%내에 들어감으로서 분석법의 정확성과 정밀성을 확인하였다.

3. 중의제약의 Mevacor® 정을 본 시험법에 따라 분석한 결과 AUC, C_{max} 및 T_{max} 값은 각각 91.97±19.91 ng·hr/ml, 23.32±3.42 ng/ml 및 3.28±0.52 hr를 나타내었다.

문 헌

- 1) K.P. Vyas, P.H. Kari, S.M. Pitzemberger, R.A. Halpin, H.G. Rmjit, B. Arison, J.S. Murphy, W.F. Hoffman, M.S. Schwartz and E.H. Ulm, Biotransformation of lovastatin. I. Structure elucidation of *in vitro* and *in vivo* metabolites in the rat and mouse, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 203-211 (1990).
- 2) P.J. Neuvonen and K.M. Jalava, Itraconazole drastically increase plasma concentration of lovastatin and lovastatin acid, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **60**, 54-61 (1996).
- 3) J.M. Henwood and R.C. Heel, A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidemi, *Drugs*, **36**, 429-454 (1988).
- 4) R.J. Stubbs, M. Schwartz and W.F. Bayne, Determination of mevinolin and mevinolinic acid in plasma and bile by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.*, **19**, 438-443 (1986).
- 5) G. Carlucci, P. Mazzeo, L. Biordi and M. Bologna, Simultaneous determination of simvastatin and its hydroxy acid form in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **10**, 693-697 (1992).
- 6) L. Wang and M. Asgharnejad, Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **6**, 1243-1248 (2000).
- 7) H. Ochiai, N. Uchiyama, K. Imagaki, S. Hata and T. Kamei, Determination of simvastatin and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with 1-bromoacetylpyrene, *J. Chromatogr. B.*, **694**, 211-217 (1997).