

사람 혈장 중 부메타니드의 HPLC 분석법 검증 및 단일 용량 투여에 의한 약물동태 연구

박혜영* · 곽혜선* · 전인구†

동덕여자대학교 약학대학, *이화여자대학교 약학대학
(2004년 12월 18일 접수 · 2005년 1월 18일 승인)

Determination of Bumetanide in Human Plasma by a Validated HPLC Method and Its Application to Single-dose Pharmacokinetics

Hae-Young Park*, Hye-Sun Gwak* and In Koo Chun†

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

*College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received December 18, 2004 · Accepted January 18, 2005)

ABSTRACT—A high-performance liquid chromatographic method was employed for the determination of bumetanide in human plasma. After addition of internal standard (IS, naproxen) and acidification of the plasma with 1 M hydrochloric acid, the drug and IS were extracted into dichloromethane. The organic phase was back-extracted into 1 M sodium bicarbonate solution and 50 μ l of the aqueous phase was injected onto a reversed-phase C18 column with a mobile phase consisting of methanol : water : glacial acetic acid = 65 : 35 : 1. The samples were detected utilizing a fluorescence detector (excitation wavelength 235 nm, emission wavelength 405 nm). The method was specific and validated with a lower limit of 5 ng/mL. Intra- and inter-day precision and accuracy were acceptable for all quality control samples including the lower limit of quantification. The applicability of the method was demonstrated by analysis of plasma after oral administration of a single 2 mg dose to 24 healthy subjects. From the plasma bumetanide concentration vs. time curves, the mean AUC was 246.5 ± 73.8 ng·hr/mL and C_{max} of 132.1 ± 40.9 ng/mL reached 1.2 hr after administration. The mean biological half-life of bumetanide was 1.1 ± 0.2 hr. Based on the results, this simple and validated assay method could readily be used in any pharmacokinetic or bioequivalence studies using humans.

Key words—Bumetanide, HPLC, Fluorescence, Validation, Pharmacokinetics

부메타니드 (3-butylamino-4-phenoxy-5-sulfamoylbenzoic acid)는 설폰아미드계의 루프 이뇨제로서 메타닐아미드 유도 체라는 점에서는 구조적으로 푸로세미드와 유사하나 4-phenoxy와 5-butylamino기를 갖는 점에서는 다른 구조를 나타내며 40-60배 더 강력한 작용을 나타낸다.¹⁻⁴⁾ 주요 작용부위는 Henle 고리의 상행부위이고 기타 근위세뇨관에서 일부 작용하는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾

부메타니드는 투여 후 빠르고 거의 완전한 흡수를 나타낸다. 건강한 성인에 있어 단일 용량 투여 시 약 85-95%가 흡수되는 것으로 보고되었다.⁸⁾ 경구투여 후 최고혈중농도는 0.5-2시간에 나타나고 1 mg 용량으로 약 31-48 ng/mL, 2 mg 용량으로 73 ng/mL의 최고혈중농도에 도달하는 것으로 보고되었다. 경구투여 후 소실반감기는 1-1.5시간이고 클리어런스는 건강한 성인에 있어 120-250 mL/min이며 약

50-65%는 신장으로 소실된다. 경구투여시 초회 용량은 0.5-2 mg으로 1일 1-2회 투여하며 최대용량은 1일 10 mg이다.⁸⁾

생체시료 중 부메타니드의 분석법으로 Smith⁹⁾는 아세토페논을 내부표준물질로 하여 부메타니드는 형광검출을, 내부표준물질은 254 nm의 자외부에서 검출하는 이원적인 검출법을 보고하였고, Bokens 등¹⁰⁾은 내부표준물질로 3-n-butylamino-4-phenoxy-5-methylsulphamoyl benzoic acid를 합성하여 사용하였고, Wells 등¹¹⁾은 피레타니드를 내부표준물질로 하고 혈장 검체를 제단백한 후 고상추출하여 유출액을 주입하고 형광검출하여 정량하였으며, Holazo 등¹²⁾은 radioimmunoassay 법¹³⁾을 이용하여 약물동태 연구를 하였다. 위의 방법들은 내부표준물질의 입수가 어렵거나 조작이 번잡하고 정량감도가 낮은 단점이 있다.

이 연구에서는 부메타니드의 간편하고 신속한 분석법을 확립하고자 Singh 등¹⁴⁾이 보고한 HPLC 법을 변형하여 내부표준물질로 나프록센을 사용하여 형광검출에 의한 부메타

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)940-4523, E-mail : ikchun@dongduk.ac.kr

니드의 분석법을 검토하여 검증하였다. 또 이 방법을 이용하여 최초로 한국인을 대상으로 미국 Roche사의 Bumex® 정(부메타니드 2 mg) 1 정을 경구투여 한 후 약물속도론적 파라메타를 구하였다.

실험 방법

시약 및 기기

이 연구에 사용된 부메타니드 표준품과 내부표준물질인 나프록센은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고 HPLC 메탄올 (J.T. Baker, Philipsburg, NJ, 미국), 디클로로메탄과 염산(Junsei, Tokyo, 일본), 빙초산 및 탄산수소나트륨(Yakuri, Kyoto, 일본) 등을 사용하였다. 생체이용률 시험에 사용된 대조약은 미국 Roche사의 Bumex® 정(부메타니드 2 mg)을 구하여 사용하였다. HPLC용 장치로는 펌프 (Jasco PU-1580 Intelligent HPLC pump, 일본), 형광검출기 (Jasco FP-2020 Plus, 일본) 및 integrator (Varian Model-4290, Varian Corp., Palo Alto, CA, 미국) 등으로 구성된 것을 사용하였다. 칼럼으로는 Radial Pak insert (C18, Waters, Milford, MA, 미국)가 장착된 Luna C18 칼럼(5 µm, 4.6×150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, 미국)을 사용하였다.

분석조건

전처리된 혈장시료를 HPLC에 주입하여 정량하였다. 이동상으로는 메탄올·물·빙초산 혼합액 (65:35:1, v/v)을 사용하여 1.5 mL/min의 속도로 유출하고 여기파장 235 nm, 형광파장 405 nm에서 검출하였다.

피험자 선정 및 약물투약

생물학적동등성시험기준¹⁵⁾ 제 10조(피험자의 선정) 및 제 11조(피험자의 제외기준)에 따라 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자로서 전문의사의 건강진단을 실시하여 건강한 사람으로 판정된 24명을 피험자로 선정하였다. 이 시험의 피험자로 최종 선정된 사람은 평균체중 63.7 kg, 평균연령 24.7세의 건강한 지원자 24명이었고 그 중 남성이 15명, 여성 지원자가 9명이었다. 여성 지원자의 경우에는 건강진단 시 비임신 사실이 확인된 자들이었다. 본 시험에 참여하는 지원자에게 생체이용률시험 설명회를 실시하여 이 시험의 목적, 방법, 이상약물반응 발생가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 피험자의 자유의사에 의한 시험 참가 동의를 문서로 받았다.

본 실험에 있어 약물투약은 시험 전날에 모인 모든 피험

자에게 본 시험의 목적, 방법, 이상약물반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 다시 한번 주지시킨 후 저녁식사를 제공하고 식사 종료 시점인 저녁 7시 30분부터 다음 날 오후 1시 20분까지 금식시켰다. 피험자에 대한 투약은 오전 9시부터 대조약 1정을 물 240 mL와 함께 투약하였다. 피험자간 복약시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 2분 간격으로 하였다.

투여 시 피험자들의 상완 정맥 부위에 heparin-locked(50 unit/mL) catheter를 설치하고 blank 혈액으로 각각 6 mL씩을 채혈하였다. 실수로 인한 채혈시간의 변동을 사전에 방지하기 위하여 채혈자에게 채혈시간표를 나누어 주고, 피험자들에게는 각자의 채혈시간표를 확인하도록 하였다. 채혈 및 관리인원으로는 시험담당자인 전문의 1인, 채혈관리 2인, 채혈보조인원 3인 및 시험책임자로 총 7인을 참가시켰다.

식사에 의한 영향을 배제하기 위하여 투약 전 12시간 이상 절식한 상태에서 투약 후 4시간까지는 금식상태를 유지시켰다. 투약 후 4시간 쯤 채혈을 마친 후 점심식사를 제공하였고 오후 5시에 마지막 채혈을 하였다. 시험 전 과정을 통하여 피험자 개인의 상태를 관찰하여 증례기록서에 기록하였으며, 채혈이 끝난 후에는 담당의사에 의해 혈압, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하였다.

채혈

채혈은 약물의 혈중소실 반감기를 토대로 반감기^{2,12)}의 3배 이상인 8시간 동안 실시하였고, 채혈 회수는 약물 투여 직전과 투약 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 및 8 시간의 총 15 시점에서 실시하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 6 mL의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재되어 있는 vacutainer에 넣었다. 채혈 후 I.V. catheter에 남아있는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린 (25 IU/mL)을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 혈장을 취하여 혈장분리관에 옮겨 담고 분석 시까지 -70°C에서 보존하였다.

검량선 작성 및 혈장 중 농도 측정

부메타니드 표준품을 50% 메탄올에 녹여 100 µg/mL로 하여 이 액을 표준액으로 하여 냉장 보관하였다. 이 표준액을 50% 메탄올로 적절히 희석하고 냉동 보관하였던 공혈장에 넣어 부메타니드의 혈장 중 농도가 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150 및 250 ng/mL 농도가 되도록 표준혈장시료를

만들었다. 각각의 표준혈장 0.5 mL에 내부표준용액(나프록센 수용액 1500 ng/mL) 100 µl 및 1 M 염산 100 µl를 넣어 섞고 디클로로메탄 4 mL를 넣어 7분간 추출한 다음 3000 rpm으로 10분간 원심분리시켰다. 유층 3 mL을 취하여 원심관에 옮기고 1 M 탄산수소나트륨용액 400 µl 넣어 5분간 볼텍싱하여 역추출한 후 10분간 원심분리하여 수층 50 µl를 취하여 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크면적에 대한 부메타니드의 피크면적비를 가지고 검량선을 작성하였으며 하루에 시험을 5회 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

혈장시료의 분석은 먼저 피험자로부터 각 시간 별로 채취하여 냉동보관 했던 각 시료혈장 0.5 mL를 위와 같이 전처리하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 부메타니드의 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 부메타니드의 농도를 구하였다.

약물속도론 및 통계분석

Bumex® 정을 각각 1정씩 24명의 지원자에게 경구투여하여 얻은 혈장 중 약물농도-시간 곡선으로부터 최고 혈장 중 농도(C_{max})와 최고 혈장 중 농도 도달시간(T_{max}), 혈장 중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC) 및 소실속도 정수(k_e)는 BA Calc 2002를 사용하여 구하였고 소실반감기는 t_{1/2}를 사용하여 $t_{1/2} = \ln(2)/k_e$ 로 계산하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

혈장 중 부메타니드 정량

Figure 1은 혈장 중 부메타니드 분석 크로마토그램으로 건강 성인의 대조혈장(A)과 대조혈장 0.5 mL에 내부표준물질 150 ng 및 부메타니드 10 ng을 spike한 혈장(B) 및 피험자에 대조약 1정을 경구투여한 후 1.25시간대에 얻은 혈장(C)을 나타낸 것이다. 부메타니드의 피크의 유지시간은 약 5.7분이었고 내부표준물질 피크의 유지시간은 약 6.7분이었으며, 이 분석조건에서 부메타니드 및 내부표준물질은 기타 혈장의 내인성 성분들과 잘 분리되었다.

크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비를 5로 하고 정밀성이 20% 이하이고 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도에서 정량한계를 구하였을 때 그 값은 5 ng/mL이었다. 혈장시료로부터 구한 부메타니드의 혈장 중 농도에 대해 내부표준물질의 피크면적에 대한 부메타니드의 피크 면적비를 나타내는 검량선의 계산식은 $y = 0.0057x + 0.0194$ ($r^2 = 0.9996$)로 5~250 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 Table I에 나타난 바와 같이 이 농도범위에서 부메타니드의 정밀성을 C.V.(%)로 나타내었을 때 일내 정밀성이 9% 이하, 정량한계 농도에서의 일내 정밀성은 17% 이하이었고, 일간 정밀성은 정량한계를 포함하여 12% 이하를 나타내었다. 또한 정확성은 87.3 - 104.7%를 나타내었고 정량한계에서는 82.6%이었다. 이로부터 혈장 중 부메타니드에 대한 이 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충

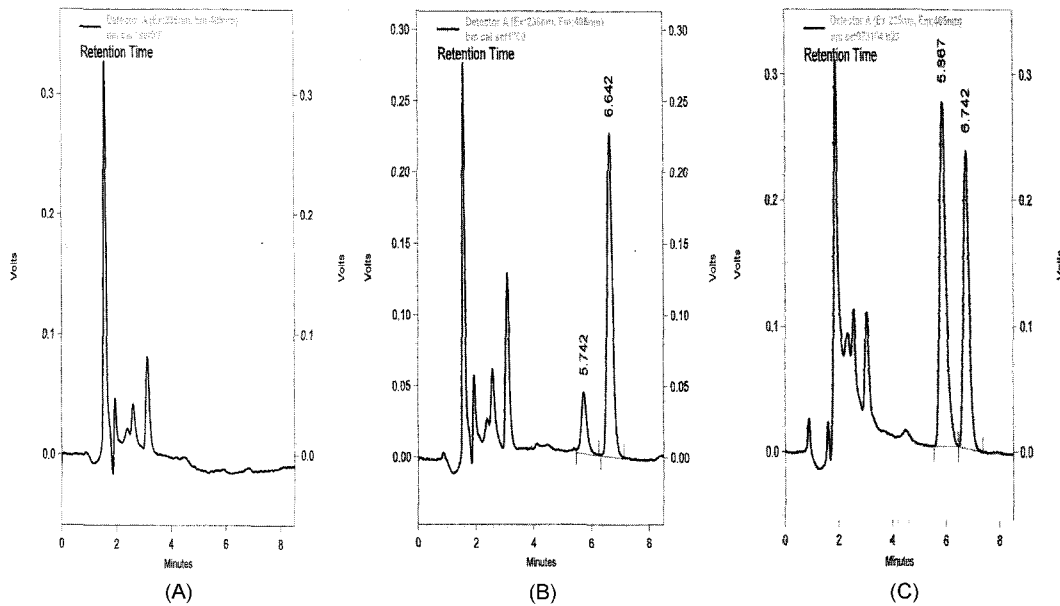
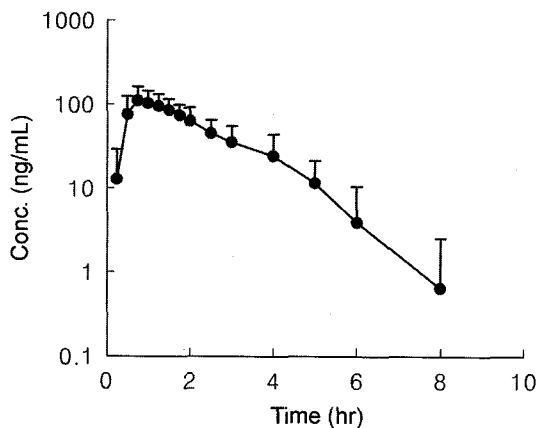


Figure 1—Chromatograms of (A) blank human plasma, (B) human plasma spiked with bumetanide (20 ng/mL) and internal standard (IS, naproxen 300 ng/ mL), (C) human plasma obtained from a volunteer at 1.25 hr after oral administration of 2 mg bumetanide tablet.

Table I—Precision and Accuracy for the Determination of Bumetanide in Human Plasma

Concentration (ng/mL)	Precision C.V. (%)		Accuracy (%)
	Intraday (n=5)	Interday (n=5)	
5	16.1	7.4	82.6
10	8.2	7.0	87.3
20	7.6	11.7	104.1
30	7.5	8.5	104.7
50	3.6	2.5	103.2
100	7.4	2.8	100.0
150	1.5	5.8	103.0
250	4.4	4.0	99.5

C.V. (%) = S.D./mean × 100

**Figure 2—Mean plasma concentration-time curve of bumetanide following oral administration of Bumex® tablet at the dose of 2 mg of bumetanide.**

분한 감도와 정확성 및 정밀성이 있음을 알 수 있었다.

생체이용률 파라미터의 산출

Figure 2는 Bumex® 정(부메타니드 2 mg) 1 정씩을 건강한 지원자 24명에게 경구 투여한 후 평균 혈장 중 부메타니드 농도를 시간에 따라 나타낸 것이다. 8시간대의 혈장 중 농도는 1명을 제외하고 모두 정량한계인 5 ng/mL 이하이거나 검출이 되지 않았다. 따라서 AUC는 무한대까지의 값으로 산출하여 나타내었다. 또한, 피험자 각각의 혈장 중 약물 농도-시간 곡선으로부터 생체이용률 파라미터인 C_{max} , T_{max} , k_e 및 $t_{1/2}$ 를 구하여 그 평균값 및 표준편차를 Table II에 나타내었다. Bumex® 정(부메타니드 2 mg) 1 정을 경구투여하였을 때 얻은 AUC, C_{max} , T_{max} , k_e 및 $t_{1/2}$ 은 각각 246.5 ± 73.8 (ng · hr/mL), 132.1 ± 40.9 (ng/mL), 1.2 ± 0.8 (hr), 0.64 ± 0.14 (hr⁻¹) 및 1.1 ± 0.2 (hr)이었다. 이는 문헌²⁾에 보고된 3 mg 경구투여의 경우 (C_{max} : 106 ± 22 ng/mL, T_{max} :

Table II—Pharmacokinetic Parameters of Each Volunteer after a Single Dose Administration of Bumex® Tablet (Bumetanide 2 mg) Orally

AUC (ng · hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	k_e (hr ⁻¹)	$t_{1/2}$ (hr)
246.5 ± 73.8	132.1 ± 40.9	1.2 ± 0.8	0.64 ± 0.14	1.1 ± 0.2

Data were expressed as the mean ± S.D. (n = 24).

1.2 ± 0.8 hr, $t_{1/2}$: 0.8 ± 0.2 hr)와 비교할 때 C_{max} 는 문헌값보다 다소 높게 산출되었으나 T_{max} 와 $t_{1/2}$ 는 대체적으로 유사하였다.

결 론

사람 혈장 중 부메타니드의 HPLC 분석법을 확립하여 Roche사의 Bumex® 정을 대조약으로 하여 생체이용률시험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 내부표준물질을 나프록센으로 하여 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과 혈장성분 등 내인성 물질의 방해 없이 부메타니드 및 내부표준물질이 양호하게 분리되었다.
2. 혈장시료로부터 구한 부메타니드 검량선의 $r^2 = 0.9996$ 으로 5~250 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고 정량한계는 5 ng/mL이었다. 분석법을 검증한 결과 intra-day와 inter-day의 정확성 및 정밀성이 기준값 이내에 들어 이 분석법은 충분한 감도와 정확성 및 정밀성이 있었다.
3. 24명의 건강한 한국인 지원자를 대상으로 Bumex® 정(부메타니드 2 mg) 1 정을 경구투여 한 결과 AUC는 246.5 ± 73.8 ng · hr/mL, C_{max} 는 132.1 ± 40.9 ng/mL, T_{max} 는 1.2 ± 0.8 hr, k_e 는 0.64 ± 0.14 hr⁻¹ 및 $t_{1/2}$ 는 1.1 ± 0.2 hr이었다.

감사의 말씀

이 연구는 국립독성연구원의 지원(KFDA-04142-약동성-414)을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) E.H. Ostergaard, M.P. Magnussen, C.K. Nielsen, E. Eilertsen and H.H. Frey, Pharmacological properties of 3-n-butylamino-4-phenoxy-5-sulfamylbenzoic acid (Bumetanide), a new potent diuretic, *Arzneimittelforschung*, **22**, 66-72 (1972).
- 2) M.J. Asbury, P.B. Gatenby, S. OSullivan and E. Bourke, Bumetanide: potent new "loop" diuretic, *Br. Med. J.*, **1**, 211-213 (1972).
- 3) K.H. Olesen, B. Sigurd, E. Steiness and A. Leth,

- Bumetanide, a new potent diuretic. A clinical evaluation in congestive heart failure, *Acta. Med. Scand.*, **193**, 119-131 (1973).
- 4) D.L. Davies, A.F. Lant, N.R. Millard, A.J. Smith, J.W. Ward and G.M. Wilson, Renal action, therapeutic use, and pharmacokinetics of the diuretic bumetanide, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **15**, 141-155 (1974).
 - 5) E. Bourke, M.J.A. Asbury, S. O'Sullivan and P.B.B. Gatenby, The sites of action of bumetanide in man, *Eur. J. Pharmacol.*, **23**, 283-289 (1973).
 - 6) S.G. Kariander, R. Henning and O. Lundvall, Renal effects of bumetanide, a new saluretic agent, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **6**, 220-223 (1973).
 - 7) J.B. Puschett, Renal effects of bumetanide, *J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 575-580 (1981).
 - 8) G.K. McEvoy, O.H. Welsh Jr. and E.K. Snow, American Hospital Formulary Service, 41th eds., ASHP, Bethesda, U.S.A., pp. 2314-2319 (1999).
 - 9) D.E. Smith, High-performance liquid chromatographic assay for bumetanide in plasma and urine, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 520-523 (1982).
 - 10) H. Bökens, C. Bouscheidt and R.F. Müller, Determination of bumetanide in plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, **434**, 327-329 (1988).
 - 11) T.G. Wells, I.R. Hendry and G.L. Kearns, Measurement of bumetanide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and application to bumetanide disposition, *ibid*, **570**, 235-242 (1991).
 - 12) A.A. Halazo, W.A. Colburn, J.H. Gustafson, R.L. Young, and M. Parsonnet, Pharmacokinetics of bumetanide following intravenous, intramuscular, and oral administrations to normal subjects, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1108-1113 (1984).
 - 13) W.R. Dixon, R.L. Young, A. Halazo, M.L. Jack, R.E. Weinfeld, K. Alexander, A. Liebman and S.A. Kaplan, Bumetanide: radioimmunoassay and pharmacokinetic profile in humans, *ibid*, **65**, 701-704 (1976).
 - 14) A.S. Singh, C. McArdle, B. Gordon, M. Ashraf and K. Granley, Simultaneous analysis of furosemide and bumetanide in horse plasma using high performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.*, **3**, 262-265 (1989).
 - 15) 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적동등성 시험 기준 (2002. 11. 22).