

테르페나딘 체내동태 연구를 위한 혈청 중 펙소페나딘의 HPLC 정량법 개발 및 검증

조혜영 · 강현아 · 김윤균* · 최후균** · 이용복†

전남대학교 약학대학 부속 생물학적동등성 및 가교시험연구소, 전남대학교 병원 임상시험센터,

*단국대학교 의과대학, **조선대학교 약학대학

(2005년 9월 23일 접수 · 2005년 11월 17일 승인)

Development and Validation of an HPLC Method for the Pharmacokinetic Study of Fexofenadine in Human

Hea-Young Cho, Hyun-Ah Kang, Yoon-Gyoon Kim*, Hoo-Kyun Choi** and Yong-Bok Lee†

Institute of Bioequivalence and Bridging Study, College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Clinical Trial Center, Chonnam National University Hospital, Gwangju 501-757, Korea

*Medical School, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea

**College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received September 23, 2005 · Accepted November 17, 2005)

ABSTRACT—A rapid, selective and sensitive reversed-phase HPLC method for the determination of a major metabolite of terfenadine, fexofenadine, in human serum was developed, validated, and applied to the pharmacokinetic study of terfenadine. Fexofenadine and internal standard, haloperidol were extracted from human serum by liquid-liquid extraction with acetonitrile and analyzed on a Symmetry™ C8 column with the mobile phase of 1% triethylamine phosphate (pH 3.7)-acetonitrile (67:33, v/v, adjusted to pH 5.6 with triethylamine). Detection wavelength of 230 nm for excitation, 280 nm for emission and flow rate of 1.0 mL/min were fixed for the study. The assay robustness for the changes of mobile phase pH, organic solvent content, and flow rate was confirmed by 3³ factorial design using a fixed fexofenadine concentration (50 ng/mL) with respect to its peak area and retention time. In addition, the ruggedness of this method was investigated at three different laboratories using same quality control (QC) samples. This method showed linear response over the concentration range of 10-500 ng/mL with correlation coefficients greater than 0.999. The lower limit of quantification using 0.5 mL of serum was 10 ng/mL, which was sensitive enough for the pharmacokinetic studies of terfenadine. The overall accuracy of the quality control samples ranged from 95.70 to 114.58% for fexofenadine with overall precision (% C.V.) being 3.53-14.39%. The relative mean recovery of fexofenadine for human serum was 90.17%. Stability studies (freeze-thaw, short-term, extracted serum sample and stock solution) showed that fexofenadine was stable during storage, or during the assay procedure in human serum. However, the storage at -70°C for 4 weeks showed that fexofenadine was not stable. The peak area and retention time of fexofenadine were not significantly affected by the changes of mobile phase pH, organic solvent content, and flow rate under the conditions studied. This method showed good ruggedness (within 15% C.V.) and was successfully used for the analysis of fexofenadine in human serum samples for the pharmacokinetic studies of orally administered Terfenadine tablet (60 mg as terfenadine) at three different laboratories, demonstrating the suitability of the method.

Key words—Terfenadine, Fexofenadine, Human serum, Validation, Pharmacokinetics, HPLC

테르페나딘(terfenadine, α -[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-4-(hydroxydiphenyl methyl)-1-piperidinebutanol)은 선택적인 히스타민 H₁ 수용체 차단제로 중추신경계에는 영향을 주지 않고 말초에만 작용하여 알러지성 질환을 치료하므로, 중추성 이상반응 및 항콜린성 이상반응을 일으키지 않는 제제이다.¹⁻⁷⁾

테르페나딘은 약 97%가 혈장 단백질과 결합하고, 흡수 후

초회통과효과를 받아 99% 이상이 대사되어 대부분이 테르페나딘의 tert-butyl group이 카르복실레이션된 펙소페나딘으로 변화할 뿐만 아니라 테르페나딘은 최고 혈중 농도가 10 ng/mL 미만으로 나타나지만 펙소페나딘은 약 200 ng/mL로 혈중에 테르페나딘보다도 20배 이상 고농도로 존재한다.¹⁾ 테르페나딘의 주대사체인 펙소페나딘의 혈중 최고 농도에 도달하는 시간은 1.42~3시간이며, 반감기는 약 13-14시간으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 테르페나딘의 상용량은 60 mg으로 1일 1회 또는 1일 2회로 나누어 복용하며 신기능이 저하된 사람에게 는 상용량의 1/2을 투여한다.¹⁾

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 062)530-2931, E-mail : leeyb@chonnam.chonnam.ac.kr

국내에서 테르페나딘 제제는 동광제약(주)의 “타페딘 정”을 비롯하여 다수 회사의 제제가 사용되고 있는데 대한민국 식품의약품안전청에서는 생물학적동등성시험을 통하여 유사 대체제제의 품질을 평가, 공인함으로써 유효하고 안전한 유사 대체제제를 공급하기 위하여 노력하고 있다. 이러한 유사 대체제제의 공급은 의료비 절감과 독과점 체계의 폐해를 방지한다는 점에서도 권장되어야 할 사항이다. 이를 위하여 식품의약품안전청에서는 수차례에 걸친 생물학적동등성시험 시행 고시의 개정 및 품목별 생물학적동등성시험 표준지침서 작성 등을 통하여 생물학적동등성시험의 선진화를 도모하고 약효동등성시험 관리의 효율성을 제고하고자 노력하고 있다. 그런데, 테르페나딘 제제의 생물학적동등성시험을 시행하기 위해 필요한 한국인을 대상으로 한 테르페나딘 제제 투여 후 그 주대사체인 펙소페나딘의 약물동태학적 특성치들에 대한 보고가 아직까지 없을 뿐만 아니라, 생체시료를 이용한 펙소페나딘 분석법의 견고성(robustness)이나 확신성(ruggedness)에 대한 검증 실례가 보고된 바가 없는 실정이다.

본 연구에서는 혈청 중 펙소페나딘의 분석법을 개발하여 그 견고성을 검증하고, 개발한 분석법의 확신성 확보를 위하여 별도의 다른 두 기관에서 이를 순차적으로 확인·검증하여 분석의 견고성과 확신성이 확립된 혈청 중 펙소페나딘의 최종 분석법을 확립하고자 하였다. 아울러 이렇게 검증된 분석법을 이용하여 서로 다른 세 기관에서 각각 8명씩 총 24명의 건강한 성인을 대상으로 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준⁸⁾(식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 2002. 11. 22.)에 따라 테르페나딘 기준 시판 대조제제인 타페딘 정(테르페나딘 60 mg) 1정을 1회 경구 투여한 생체이용률시험을 순차적으로 수행하여 한국인에서의 테르페나딘 주대사체인 펙소페나딘의 약물동태학적 특성을 파악하고자 하였다. 본 시험은 각 시험기관 별로 별도의 기관별 임상시험 심사위원회(institutional review board, IRB)를 거쳐 시험계획서의 승인을 받은 후 시험계획서에 따라 수행되었으며 모든 피험자의 동의를 받아서 이루어졌다.

실험 방법

시약 및 기기

생체이용률시험에 사용된 대조제제는 식품의약품안전청으로부터 허가를 받아 동광제약 주식회사(서울)에서 시판하고 있는 “타페딘 정”(제조번호: ZF 02, 사용기한: 2007. 1. 13)으로 테르페나딘을 60 mg 함유하는 정제이었다.

펙소페나딘 표준품 및 내부표준물질로 사용한 할로페리돌

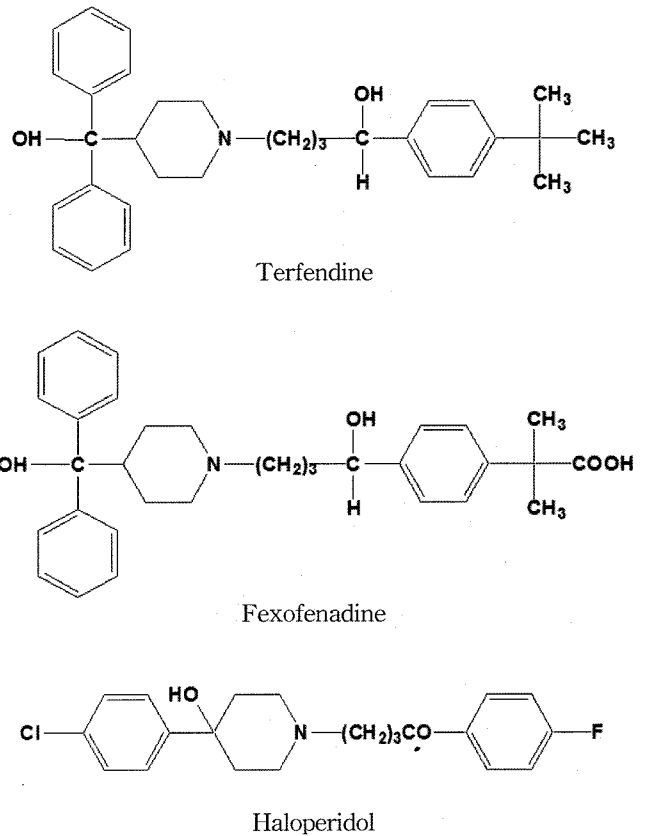


Figure 1—Chemical structures of terfenadine, fexofenadine (its major metabolite and haloperidol (internal standard).

(이상 Sigma Chemical Co., St Louis, MO, 미국, Figure 1), HPLC용 메탄올 및 아세트니트릴(이상 Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, 미국), triethylamine phosphate (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, 미국), 생리식염수 및 헤파린 (이상 중외제약, 서울, 한국)은 시판품을, 증류수는 Milli Q(Millipore Co., Milford, MA, 미국)에서 18 MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 그대로 사용하였다.

약물분석 기기로는 HPLC용 펌프(LC 10AD, Shimadzu, Kyoto, 일본), Symmetry™ C8 컬럼(입자경 5 μm, 4.6 mm × 150 mm, Waters Co., MA, 미국), 형광 검출기(RF10A_{XL}, Shimadzu, Kyoto, 일본), 주입기(Model 7725i, Rheodyne, Cotati, CA, 미국), 적분계(Model Class LC-10, Shimadzu, Kyoto, 일본), 원심분리기(UNION 55R, Hanil Science Industrial Co., 인천, 한국), 증발농축기(CVE200D, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, 일본), 냉각회수기(UT-80, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, 일본), pH 측정기(Model 7, Corning Ltd., Halstead Essex England, 영국) 및 탁상용 혼합기(G560, Scientific Co., Bohemia, NY, 미국)를 사용하였다.

피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준⁸⁾ 제 10조(피험자의 선정) 및 제 11조(피험자의 제외기준)에 따라 서로 다른 세 기관에서 지원자 모집공고를 통하여 19~55세의 건강한 성인 지원자를 각각 모집하였다. 각 기관별로 전문의사의 건강진단을 실시하여 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 자로서 생체이용률시험에 적합한 건강인으로 판정된 자 각 8명씩 총 24명을 피험자로 선정하였다. 이 시험의 피험자로 선정된 사람들의 평균 체중은 67.64 ± 8.30 kg, 평균 나이는 25.67 ± 7.42 세 이었다. 본 시험에 참여하는 지원자를 대상으로 각 시험기관에서는 생체이용률시험 설명회를 실시하여 이 시험의 목적, 방법, 약물유해반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 이들로부터 자유의사에 의한 시험참가동의서를 받은 후 생체이용률시험을 실시하였다.

모든 피험자는 정해진 투약일 일주일 전부터 항생제 및 진통제 등을 포함한 일체의 약물 복용을 금지하였을 뿐 아니라 흡연, 크산틴계 음료 및 음주 등을 제한 관리하였고, 시험 전날 오후 8시부터 시험 당일 투약 후 4시간까지는 금식시켰다. 또한 시험 기간 중에는 각 기관 연구자의 지시에 따라 모두 같은 식단의 식사 및 경미한 활동을 하게 하였다.

약물 투약 및 혈액 채취

생체이용률시험을 위하여 각 기관에서는 8명의 피험자에 대하여 난수발생법에 따라 무작위 배열한 다음, “타페딘 정(테르페나딘 60 mg)”을 동일 투약일에 투여하고, 투약량은 “타페딘 정(테르페나딘 60 mg)” 1정을 1회 경구 투여하였다. 피험자들 모두에게 heparin-locked(150 unit/mL) Angiocatheter(JELCO™, 22G, Johnson & Johnson Medical, Pomezia, 이탈리아)를 팔 또는 손등 정맥부위에 설치하고 240 mL의 물과 함께 복용시켰다. 피험자 간 복용 시간의 차이는 채혈 시간을 고려하여 약 2분 간격으로 하였다.

채혈은 펙소페나딘 투약 시 최종상 반감기가 약 13-14시간임^{2,4)} 토대로 먼저 제 1기관에서는 반감기의 3배 이상인 72시간까지, 제 2 및 3기관에서는 제 1시험기관의 결과를 토대로 $AUC_0-\infty$ 가 AUC_{0-72} 의 80%가 넘는 24시간 동안 실시하였고, 채혈 시간은 약물 투약 직전과 투약 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7(2, 3기관), 8, 10(2, 3기관), 12, 24, 48, 72시간(제 1기관)에 총 12회 채혈하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 5 mL의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재되어 있는 vacutainer에 넣었다. 채혈 후마다 I.V. catheter 안에 잔류하

는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 즉시 혈청분리관을 사용하여 혈청을 채취하고 분석 시까지 영하 80°C에서 보관하였다.

혈청 중 펙소페나딘의 정량

혈청 중 테르페나딘의 주대사체인 펙소페나딘 정량은 이미 보고된 펙소페나딘 HPLC 분석법을 참고하고,⁵⁻⁷⁾ 일부 수정하여 상기 기기 조건하 실온에서 이동상으로는 1% triethylamine phosphate(pH 3.7):아세토니트릴=67:33(v/v, triethylamine으로 pH를 5.6으로 조정)의 혼합용액을 사용하였으며 유속 1.0 mL/min, 주입량 50 μ L 및 형광 검출기(excitation : 230 nm, emission : 280 nm)를 이용하여 정량하였다. 분석법의 확신성 확보를 위하여 제 1기관에서 분석법을 확립한 후 동일 검량선용 표준혈청과 QC 시료를 이용하여 순차적으로 제 2 및 3기관에서 이를 확인하였으며 다음과 같이 최종 분석법을 확립하고 각각의 검량선을 작성하였다.

펙소페나딘 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 1000 μ g/mL로 만든 후 4°C에서 냉장 보관시키고, 이 용액을 검량선용 표준혈청으로 희석하여 혈청 중 약물농도가 각각 10, 20, 50, 100, 200 및 500 ng/mL씩 되도록 검량선용 표준혈청액을 조제하였다. 각각의 검량선용 표준혈청 500 μ L에 내부표준물질로 할로페리돌 메탄올 용액(100 μ g/mL) 50 μ L를 가한 후 흔들어 섞었다. 여기에 0.5 mL의 아세토니트릴을 가하여 1분 30초 동안 진탕하여 추출한 다음 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 여기에서 상층을 취하여 깨끗한 시험관에 옮긴 다음 55°C에서 증발·건조시킨 후 잔사에 이동상 150 μ L를 넣어 30초간 진탕하였다. 이 용액을 Eppendorf tube에 옮겨 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층에서 50 μ L를 취해 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 펙소페나딘의 피크 면적비를 구하여 검량선을 작성하였으며 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였을 뿐만 아니라 10, 20, 50 및 200 ng/mL 농도에서 각각 5회 측정하여 정확성을 평가하였고 상기 농도에서 물에 대한 평균 상대추출률을 구하였다. 또한, 동결해동 안정성(-70°C 24시간 동결/상온 해동), 단기실온 안정성(24시간 상온 보관) 및 장기 안정성(-70°C 4주 보관) 시험은 QL(20 ng/mL) 및 QH(200 ng/mL) 농도 각 3개씩 이용하여 각각 3회 반복 측정하여 펙소페나딘의 면적으로부터 안정성을 평가하였고 조제후 안정성(시료 추출 후 6 및 12 시간 보관) 및 표준원액 안정성(상온 6시간 보관) 시험은 펙소페나딘(200 ng/mL) 및 내부표준물질(100 ng/mL) 각 3개씩

Table I—Factorial Design for 3-level-3-factor Investigated in the Robustness Test

Factors	Units	Levels		
		Low(-1)	Medium(0)	High(1)
A. Flow rate of the mobile phase	mL/min	0.9	1.0	1.1
B. pH of the mobile phase	-	5.4	5.6	5.8
C. Organic solvent content (%) in the mobile phase	%	30	33	35

이용하여 각각 3회 반복 측정하여 안정성을 평가하였다.

아울러, 분석법의 견고성을 확보하기 위해 혈청 중 페소페나딘 농도분석 시 가장 영향을 크게 미칠 가능성이 있는 이동상의 pH, 유기용매의 함량 및 유속의 변동에 의한 영향을 일정농도의 페소페나딘 혈청 시료(50 ng/mL)를 이용하여 나타난 피크 면적과 출현시간을 기준값으로 하여 그 변동 영향을 평가하였다(Table I). 이때, 각 변동요인이 결합되어 나타나는 효과를 분석하기 위하여 상호작용효과를 고려한 아래와 같은 모형을 가정하여 얻은 상기 기준값에 대하여 SPSS 프로그램을 이용하여 일반선형모형에 의한 ANOVA 분석을 실시하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

한편, 혈청 시료의 분석은 먼저 피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 70°C에 보관했던 혈청 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음 이 혈청 500 µL를 취하여 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질로 할로페리돌(100 µg/mL) 메탄올용액 50 µL를 가한 후 상기 검량선 작성을 위한 추출법에 따라 추출하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 페소페나딘의 피크 면적비를 구하여 미리 작성된 검량선에 의해 혈청 시료 중 페소

페나딘의 농도를 산출하였다.

약물속도론적 파라미터의 산출 및 생체이용률 평가

“타페딘 정(테르페나딘 60 mg)” 1정을 각 기관별로 8명의 피험자에게 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적 파라미터인 최고혈청중농도(C_{max}), 최고혈청중농도 도달시간(T_{max}), 체혈시간 t와 무한대까지의 혈청 중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t 및 AUC_∞) 및 소실반감기(t_{1/2}) 등은 WinNonlin 프로그램⁹⁾을 이용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

혈청 중 페소페나딘 정량 및 검증

건강 성인의 대조혈청과 대조혈청에 내부표준물질인 할로페리돌과 페소페나딘을 함께 가한 것 및 테르페나딘 정제 투여 후 1시간째의 혈청을 본 시험방법에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다. 페소페나딘 및 내부표준물질 피크의 출현시간은 세 기관 모두 약 5.2~6.4분 및 7.3~8.5분이었으며 각 물질의 분리상태는 양호하였다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5 이상으로 하고 일내

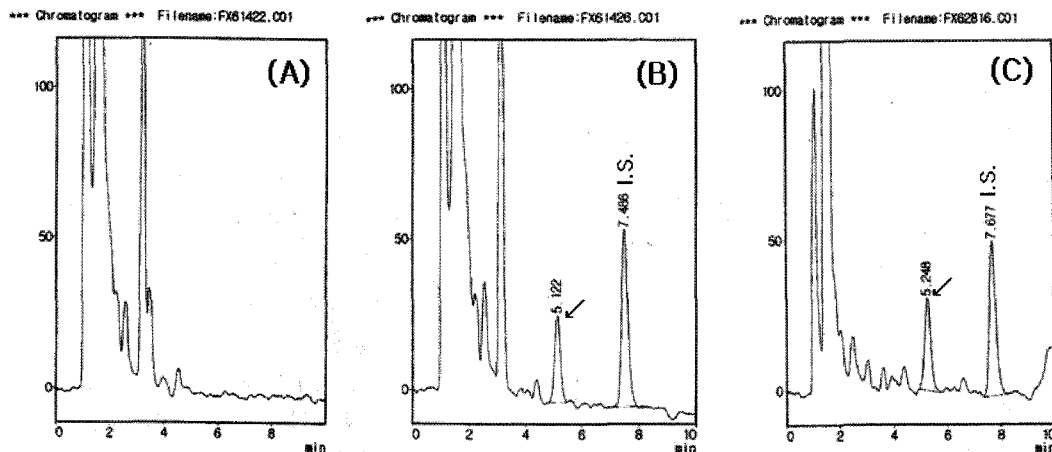


Figure 2—Chromatograms of (A) blank human serum, (B) blank human serum spiked with fexofenadine (100 ng/mL) and internal standard (IS, haloperidol 10 µg/mL) and (C) serum sample at 1 hr after oral administration of 60 mg terfenadine tablet (The serum concentration of fexofenadine corresponds to 116.93 ng/mL). ✓ = fexofenadine peak.

및 일간 변동계수의 크기를 20% 미만으로 하였을 때의 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 10 ng/mL이었으며, 수용액 중 약물을 추출한 것의 평균 피크 면적에 대한 추출 시료 중 약물의 피크 면적비로부터 구한 평균 추출회수율은 90.17%이었다. 혈청 시료로부터 구한 페소페나딘의 검량선은 피크 면적비(y)=0.00485×페소페나딘 농도 (ng/mL, x)-0.00241(r=0.9999, p<0.01; 제 1기관), y=0.00460x+0.00162(r=0.9999, p<0.01; 제 2기관) 및 y=0.00539x-0.00563(r=0.9999, p<0.01; 제 3기관)으로 10~500 ng/mL 범위에서 모두 양호한 직선성을 나타내었다. 또한, 이 농도범위에 있어서 페소페나딘의 일내 및 일간 변동계수(C.V.)는 세 기관 모두 15% 이하로 나타났고, 10, 20, 50 및 200 ng/mL의 농도에서 5회 반복 측정하여 얻은 표준편차(% deviation)도 세 기관 모두 ±15%(최저정량한계 농도에서는 ±20%) 이내로 나타나 확실성을 확보할 수 있었다 (Table II). 또한, Table III에는 피크 면적을 기준으로 분산 분석한 결과를 나타내었으며 이동상의 pH, 유기용매의 함량 및 유속의 변화에 따른 약물 피크 면적이나 출현시간에 미치는 영향을 측정하여 요인분석을 실시한 결과 각 변동요인에 대한 각 수준에서는 유의한 차이(p<0.05)가 나타나지 않아 이 분석법에 대한 견고성을 확보할 수 있었다. 피크 출현시간을 기준으로 하였을 때에도 마찬가지로 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 아울러 동결해동, 단기실온, 조제

후 및 표준원의 안정성 시험 결과, 각 QC 시료에 대해 각각 3회 반복 측정하여 얻은 측정 초기치에 대한 변동계수가 모두 10% 이내로 안정함을 나타내었으나 장기 안정성이 확보되지 않은 결과를 나타내어 모든 시료의 분석은 4주안에 마치는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

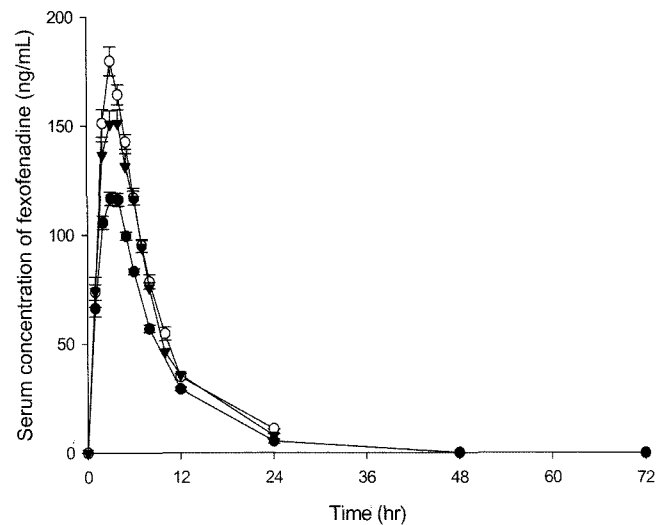


Figure 3—Mean (±S.E.) serum concentration-time curves of fexofenadine for each institute following oral administration of Tafenadine tablet 60 mg (terfenadine). Key: ●; 1st institute (n=8), ○; 2nd institute (n=8), ▼; 3rd institute (n=8).

Table II—Precision and Accuracy for the Determination of Fexofenadine in Human Serum at Each Institute

Concentration (ng/mL)	Precision C.V. (%)						Accuracy (%)		
	Intra-day (n=5)			Inter-day (n=5)			1st	2nd	3rd
	Institutes								
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd			
10 (LLOQ)	14.39	3.87	4.11	12.52	11.77	10.09	95.70	95.70	105.40
20 (low)	10.04	5.53	8.14	10.79	3.69	8.69	111.75	90.87	109.40
50 (medium)	3.53	4.36	9.28	10.88	0.96	4.32	111.10	96.64	109.20
200 (high)	5.75	3.08	5.49	9.78	1.55	6.67	114.58	99.72	108.61

C.V.(Coefficient of Variation)=100×S.D./mean.

Table III—Analysis of Variance for the Factorial Design of Robustness Test on the Basis of Its Peak Area

Factors	Mean square(×10 ⁷)	F*	P
Flow rate	48.1	1.250	0.337
pH	3.20	0.083	0.921
Content of organic solvent	24.6	0.641	0.552
Flow rate × pH	3.23	0.084	0.985
Flow rate × content of organic solvent	15.9	0.413	0.795
Content of organic solvent × pH	24.7	0.643	0.647
Flow rate × pH × content of organic solvent	38.4		

*Error mean square based on flow rate, pH and content of organic solvent interactions, 8 d.f.

Table IV—Pharmacokinetic Parameter Values for Each Institute Obtained after Oral Administration of Tafenine Tablet at the Terfenadine Dose of 60 mg[#]

Parameters	1st Institute (n=8, t=72 hr)	2nd Institute (n=8, t=24 hr)	3rd Institute (n=8, t=24 hr)	Total (n=24)
AUC _t (ng · hr/mL)	1128.37±274.62	1289.85±455.51	1358.13±325.09	1258.78±357.70
AUC _∞ (ng · hr/mL)	1105.89±259.97	1408.03±431.07	1399.74±325.35	1339.61±376.17
C _{max} (ng/mL)	125.99±22.75	186.66±47.81	162.30±46.67	158.32±46.52
T _{max} (hr)	3.63±1.06	3.00±0.76	3.25±0.89	3.29±0.91
t _{1/2} (hr)	4.84±1.27	4.06±1.13	4.87±1.09	4.59±1.18

[#]Mean±S.D..

이로부터 혈청 중 페소페나딘에 대한 상기 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정밀성, 정확성, 안정성, 견고성 및 확실성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈청 중 페소페나딘 농도 추이

“타페딘 정(테르페나딘 60 mg)” 1정씩 세 기관에서 피험자 8명에게 각각 경구 투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 각 기관 별 피험자에 대한 혈청 중 페소페나딘 평균 농도를 Figure 3에 나타내었다. 또한, 각 피험자의 혈청 중 약물농도-시간 곡선으로부터 구한 약물속도론적 파라미터를 Table IV에 나타내었다. “타페딘 정(테르페나딘 60 mg)” 1정을 경구 투여하여 얻은 주대사체인 페소페나딘의 평균 AUC_∞(ng · hr/mL)는 1339.61±376.17, C_{max}(ng/mL)는 158.32±46.52, T_{max}(hr)는 3.29±0.91, t_{1/2}(hr)은 4.59±1.18이었다. 이는 문헌^{2,4)}에 보고된 테르페나딘의 주대사체인 페소페나딘의 파라미터(C_{max}: 200 ng/mL, T_{max}: 1.42-3시간)와 비슷한 값을 나타내고 있었으나, 최종상 반감기는 보고된 값(13-14 시간)과 크게 다르게 나타남을 알 수 있었다. 이는 인종간의 차이로 인한 테르페나딘의 대사율이 크게 달랐기 때문으로 사료되었다.

결 론

테르페나딘 투여 후 나타난 사람 혈청 중 테르페나딘 주대사체인 페소페나딘의 HPLC 분석법을 확립·검증하여 테르페나딘 제제의 생물학적동등성시험을 위한 표준지침을 마련하고자 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준⁸⁾에 따라 서로 다른 세 기관에서 각 8명의 건강한 한국인 성인 남성 총 24명을 대상으로 “타페딘 정(테르페나딘 60 mg)” 1정씩을 경구 투여하여 생체이용률 시험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 내부표준물질을 할로페리돌로 하여 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과 혈청 성분 등 내인성 물질의 간섭 없이 페소페나딘 및 내부표준물질이 양호하게 분리되었다.

2. 혈청시료로부터 구한 페소페나딘 검량선은 10~500 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고 최저 정량한계는 10 ng/mL이었다. 확립한 분석법을 검증한 결과 intra- 및 inter-day의 정확성 및 정밀성이 모두 15% 이내로 나타나 이 분석법은 충분한 감도, 정확성 및 정밀성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 동결해동, 단기실온, 조제 후 및 표준원액 안정시험 결과 초기 측정치에 대한 변동성이 모두 10% 이내로 나타나 안정하였으나 장기안정성이 확보되지 않은 결과를 나타내어 가능한 한 시료의 분석은 4주안에 마치는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

3. 페소페나딘에 대해 확립한 HPLC 분석조건에서의 이동상의 pH, 유기용매의 함량 및 유속의 변화에 따른 약물 피크 면적이나 출현시간에 미치는 영향을 측정하여 요인분석을 실시한 결과 각 변동요인에 대한 수준에서는 유의한 차이가 나타나지 않아 이 분석법에 대한 견고성을 확보할 수 있었을 뿐 아니라 서로 다른 세 기관에서 QC 시료를 사용하여 각각 검증한 결과 정확성과 정밀성의 상대표준편차가 모두 15% 이내로 나타나 이 분석법은 확실성이 있음을 알 수 있었다.

4. 총 24명의 건강한 성인 지원자를 대상으로 “타페딘 정(테르페나딘 60 mg)” 1정을 경구 투여하여 얻은 주대사체인 페소페나딘의 평균 AUC_∞(ng · hr/mL)는 1339.61±376.17, C_{max}(ng/mL)는 158.32±46.52, T_{max}(hr)는 3.29±0.91, t_{1/2}(hr)은 4.59±1.18이었다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 지원(04142-약동성-431)을 받아 전남대학교 약학대학에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Martindale, The complete drug reference, 32 editions 1999, p. 418 (1999).
- 2) J.E. Countant, P.A. Westmark, P.A. Nardella, S.M. Walter and R.A. Okerholm, Determination of terfenadine and terfenadine acid metabolite in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr.*, **570**, 139-148 (1991).
- 3) Martindale, The complete drug reference, 32 editions 1999, p. 410 (1999).
- 4) D.K. Robbins, M.A. Castles, D.J. Pack, V.O. Bhargava and S.J. Weir, Dose proportionality and comparison of single and multiple dose pharmacokinetics of fexofenadine (MDL 16455) and its enantiomers in healthy male volunteers, *Biopharm. Drug Dispos.*, **19**, 455-463 (1998).
- 5) K.Y. Chan, R.C. George, T.M. Chen and R.A. Okerholm, Direct enantiomeric separation of terfenadine and its major acid metabolite by high-performance liquid chromatography, and the lack of stereoselective terfenadine enantiomer biotransformation in man, *J. Chromatogr.*, **571**, 291-297 (1991).
- 6) U. Hofmann, M. Seiler, S. Drescher and M.F. Fromm, Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **776**, 227-233 (2002).
- 7) T. Uno, N. Yasui-Furukori, T. Takahata, K. Sugawara and T. Tateishi, Liquid chromatographic determination of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**(4), 937-942 (2004).
- 8) 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적동등성시험 기준 (2002. 11. 22).
- 9) WinNonlinTM Users Guide Ver. 3.0, Pharsight Corp. Mountain View, CA, USA (1998-1999).