

인체혈청 중 펜톡시필린의 정량을 위한 HPLC 분석법의 검증 및 단일용량 투여에 의한 약물동태

성민경 · 박효민 · 김나형 · 정수연 · 고은정 · 이화정
이화여자대학교 약학대학

Validation of a HPLC Method for Determination of Pentoxifylline in Human Serum and Its Application to Single-dose Pharmacokinetics

Min Kyung Sung, Hyo Min Park, Na Hyung Kim, Soo Yeon Chung,
Eun Jung Go and Hwa Jeong Lee

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

A simple HPLC method was employed for the determination of pentoxifylline in human serum. After addition of internal standard (IS, 50 μ L of 3 μ g/mL chloramphenicol methanol solution) into the serum sample, the drug and IS were extracted by dichloromethane. Following a 1-min vortex-mixing and a 15-min centrifugation at 3500 rpm, the organic phase was transferred and evaporated to dryness under a vacuum. The residue was reconstituted with 120 μ L of mobile phase and 50 μ L was injected into C18 column with a mobile phase composed of 0.034 M phosphoric acid adjusted to pH 4 with 10 M NaOH and acetonitrile (75:25, v/v). The samples were detected using an ultraviolet detector at 273 nm. The method was simple, specific and validated with a limit of 10 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 this method was evaluated by analysis of human serum after oral administration of a single 400 mg dose to 8 healthy subjects. The pharmacokinetic parameters for pentoxifylline in human subjects were calculated using WinNonlin program. As a result, $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} and $t_{1/2}$ were 962.28 ± 645.69 ng·hr/mL, 132.82 ± 42.05 ng/mL, 2.06 ± 2.68 hr and 8.74 ± 4.38 hr, respectively. Based on the results, this validated method appears to be useful for the pharmacokinetic study of pentoxifylline in humans.

□ **Key words** – pentoxifylline, HPLC, validation, pharmacokinetics

펜톡시필린 [1-(5-owohexyl)-3,7-dimethylxanthine]은 손상된 적혈구의 변형능을 개선시키고, 혈소판의 응집을 억제하며, 상승된 혈액의 점도를 저하시켜 변성된 혈액의 유동성을 개선시킴으로써 혈류가 손상된 부위에 미소순환을 증가시켜 뇌 순환 장애, 눈의 혈류순환 장애 및 말초동맥순환 장애에 효과를 나타내는 제제이다¹⁻³). 용량 및 용법으로는 성인에게 펜톡시필린으로서 상용량이 1회 400 mg, 1일 2~3회 이다⁴).

경구투여 시 펜톡시필린은 위장관에서 흡수가 잘 되는 것으로 알려져 있고 펜톡시필린 400mg을 건강한 남성지원자 8인에게 경구투여 하였을 때 최고혈중농도는 123~164 ng/mL이고 최고혈중농도에 도달하는 시간은 2.2~2.4 시간으로 보고되었으며⁵) 배설반감기(최종상 반감기)는 약 0.4~0.8 시간으로 보고되어 있다⁶).

펜톡시필린의 분석에 관해서는 gas chromatography(GC)^{7,8}) 나 자외부를 사용한 high-performance liquid chromatography (HPLC)^{5,9-12})등을 이용한 여러 연구논문이 발표된 바 있다. 그러나 이러한 방법들은 추출과정이 복잡하거나 시간이 많이 소요되거나 감도가 낮은 문제점을 갖고 있다.

현재 국내에서는 펜톡시필린의 인체 혈청시료를 사용한 분석법 및 한국인을 대상으로 한 생체이용률 시험 등에 관한 보고가 없는 실정이다. 본 연구에서는 디클로로메탄의 추출법을 이용하여 분석한 Raz⁵)의 HPLC 방법을 검증, 보완하여 감도를 향상시킨 Jia Woei Wong¹²)의 방법을 일부 수정하여 분석법을 개발하였다. 또한 8인의 건강한 한국인을 대상으로 펜톡시필린 시판제제인 (주)한독약품의 트랜탈[®] 정 (펜톡시필린 400 mg) 1정을 경구투여하여 개발된 본 분석법의 생체 시료 분석에서의 유용성을 입증하고 생체이용률에 따른 약물동태학적 파라미터 등을 구하여 펜톡시필린 제제의 생체이용률 및 생물학적 동등성 시험을 위한 지침을 마련하고자 하였다.

Correspondence to : 이화정
이화여자대학교 약학대학
서울시 서대문구 대현동 11-1
Tel: +02-3277-3409, Fax: +02-3277-2851
E-mail: hwalee@ewha.ac.kr

실험재료 및 방법

시약 및 기기

본 연구에 사용된 펜톡시필린 표준품과 내부표준물질인 클로람페니콜은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 메탄올 및 아세트니트릴(Fisher Scientific Ltd, Milwaukee, WI, USA)은 HPLC 등급을 이용하였으며, 수산화나트륨, 디클로로메탄, 85% 인산 등은 1등급이 사용되었다. 생체이용률 시험에 사용된 시험약은 (주)한독약품의 트렌탈® 정(펜톡시필린 400 mg)이 사용되었다. HPLC 시스템으로는 Shimadzu LC 10AD system(Shimadzu, Tokyo, Japan)을, 검출기로는 자외선 검출기(273nm)를, 컬럼은 Luna C18 컬럼(5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을, 데이터 처리장치로는 Shimadzu C-R6A Chromatopac (data processor)을 사용하였다.

분석조건

전처리된 혈청시료는 HPLC를 이용하여 정량하였다. 이동상으로는 0.034 M 인산(10 M 수산화나트륨을 사용하여 pH 4로 조정) : 아세트니트릴 혼합용액(75:25, v/v)을 사용하여 유출속도 0.8 mL/min로 파장 273 nm에서 검출하였다.

피험자 선정 및 약물투여

생물학적동등성시험기준¹³⁾ 제10조(피험자의 선정)에 의하여 지원자 모집공고를 통하여 모집된 만 19~55세의 건강한 성인 지원자 중에서 전문의사의 건강진단을 실시하여 피험자 선정기준에 부합하고 제11조(피험자의 제외기준)에 해당되지 않는 자로서 생체이용률시험에 적합하다고 판정된 8명을 피험자로 선정하였다. 본 시험에 최종 선정된 피험자들은 평균체중 68.50 kg, 평균연령 24.63세의 남성이었다. 생체이용률시험에 관한 설명회를 통하여 참여 지원자에게 본 시험의 목적 및 방법, 이상약물반응 발생가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 충분히 설명한 후 자유의사에 의한 피험자 시험참가 동의를 문서로 받았다.

시험 전날에 모인 모든 피험자에게 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 익일 오후 12시까지 금식시켰다. 본 실험에 있어 약물투여는 8명의 피험자에 대하여 난수발생법에 따라 무작위 배열한 다음, 시험당일 오전 7시30분부터 채혈시간을 고려하여 피험자간 복약시간 간격을 2분으로 하여 트렌탈® 정 1정(펜톡시필린 400 mg)을 물 240 mL와 함께 1회 경구 투약하였다.

투약 전 피험자들의 상완 정맥 부위에 heparin-locked(50 unit/mL) catheter를 설치하고 공혈액으로 각각 5 mL씩을 채혈하였다. 채혈자 및 피험자들에게 미리 채혈시간표를 나누어 주어 각자의 채혈시간표를 확인하도록 하여 실수로 인한

채혈시간의 변동을 사전에 방지하였다. 채혈 및 관리인원으로는 시험담당자인 전문의 1인, 채혈관리 2인, 채혈보조인원 3인 및 시험책임자 1인으로 총 7인을 참가시켰다.

식사에 의한 영향을 배제하기 위하여 투약 전 12시간 이상 절식한 상태에서 투약 후 4시간까지는 금식상태를 유지시켰다. 투약 후 4시간 쯤과 8시간 쯤 채혈을 마친 후 각각 동일한 점심 및 저녁식사를 제공하였고 투약 후 12시간 쯤 채혈이 끝난 후에는 상박 주전부에 거취된 catheter를 제거하고 속소로 이동하여 휴식을 취하게 하고 밤 11시 이전에 시험담당자 등과 함께 취침을 하였다. 다음날 동일 장소에서 24시간 쯤 마지막 채혈을 한 후 담당의사에 의해 혈압, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하였다. 피험자 개개인의 상태를 시험 전 과정을 통하여 관찰하여 증례기록서에 기록하였다.

채혈

채혈시간은 생물학적동등성시험기준¹³⁾ 제18조에 따라 약물의 혈중소실 반감기(0.4~0.8 시간)⁶⁾를 토대로 반감기의 3배 이상인 24 시간 동안 실시하였고, 채혈은 격리된 방에서 투약 직전과 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 12 및 24 시간의 총 13 시점에서 실시하였다. 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. catheter에 남아있는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 혈청분리관에 옮겨 담고 분석 시까지 -70°C에서 보관하였다.

검량선 작성 및 혈청 중 약물농도 측정

펜톡시필린 표준품을 물에 녹여 1000 μ g/mL의 표준액으로 하여 냉장 보관하였다. 이 표준액을 검량선용 표준혈청으로 희석하여 혈청 중 약물 농도가 펜톡시필린으로서 10, 20, 50, 100, 200 및 500 ng/mL씩 되도록 표준혈청시료를 조제하였다. 각각의 표준혈청액 0.5 mL를 취하여 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질로 클로람페니콜 메탄올 용액(3 μ g/mL) 50 μ L와 디클로로메탄 4 mL를 가하여 1분간 섞고 3500 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 유기층을 시험관에 옮겨 진공 하에서 증발·건조시킨 후 잔사에 이동상 120 μ L를 가하여 녹이고 이 용액 50 μ L를 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피이크 면적에 대한 펜톡시필린의 피이크 면적의 비를 이용하여 검량선을 작성하였으며 실험을 하루에 5회 시행하여 일내 재현성을 구하였고 5일간 연속하여 시행하여 일간 재현성을 구하였다.

혈청시료의 분석은 전처리하여 냉동보관했던 각 혈청시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음, 혈청시료 0.5 mL를 취하여 위와 같이 전처리한 후 HPLC에 주입하여

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 펜톡시필린의 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈청 중 펜톡시필린의 농도를 구하였다.

약물동태학적 파라미터 분석

지원자 8인에게 트렌탈®정 (펜톡시필린 400 mg) 1정씩 경구 투여하여 얻은 혈청 중 약물농도-시간 곡선으로부터 최고 혈청 중 농도(C_{max})와 최고혈청 중 농도 도달시간(T_{max}), 혈청 중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t), 소실속도 정수(k_e) 및 소실반감기(t_{1/2}) 등을 WinNonlin 프로그램을 이용하여 구하였고 모든 수치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

실험결과 및 고찰

분석조건의 검증

혈청 중 펜톡시필린 분석 크로마토그램으로 건강 성인의 공혈청(1)과 공혈청 0.5 mL에 내부표준액 및 펜톡시필린을 spike한 혈청(2) 및 피험자에 트렌탈®정 (펜톡시필린 400 mg) 1정을 투여한 후 3시간대에 얻은 혈청(3)을 Fig. 1에 나타내었다. 펜톡시필린 피크의 유지시간은 약 7.0분, 내부표준물질 피크의 유지시간은 약 16.0분이었으며, 이 분석조건에서 펜톡시필린 및 내부표준 물질은 기타 혈청 성분들과 잘 분리되었다.

혈청시료로부터 구한 내부표준물질의 피크면적에 대한 펜톡시필린의 면적비를 구하여 작성한 검량선의 계산식은 피이크 면적비(y) = 0.00581 × 펜톡시필린 농도(ng/mL, x) - 0.00869 (r²=0.9999)으로 10~500 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 크로마토그램 상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5로 하고 일내 및 일간 변동계수의 크기를 20% 미만으로 하였을 때의 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 10 ng/mL이었다. Table 1에 나타낸 것과

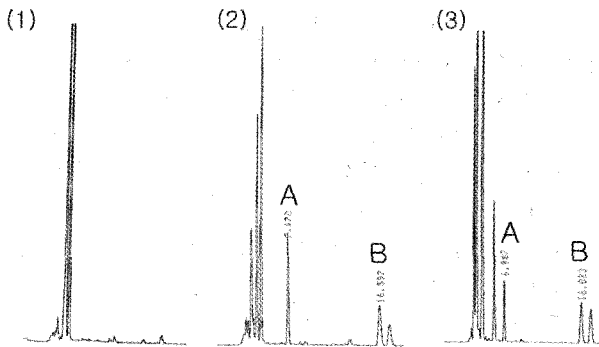


Fig. 1. Chromatograms of (1) blank human serum, (2) human serum spiked with pentoxifylline (0.5 µg/mL) and internal standard (IS, 3 µg/mL chloramphenicol), (3) human serum obtained from a volunteer at 3 hr after an oral administration of 400 mg pentoxifylline tablet. (A: Pentoxifylline, B: IS)

같이 펜톡시필린의 정밀성(C.V.%)은 최저정량한계를 포함한 농도에서 일내 정밀성이 14.78% 이하, 일간 정밀성은 13.48% 이하를 나타내었다. 또한 정확성은 101.00~108.80%를 나타내어 이로부터 혈청 중 펜톡시필린에 대한 본 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성 및 감도를 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈청 중 펜톡시필린의 농도추이 및 약물동태학적 파라미터의 산출

Fig. 2는 트렌탈®정(펜톡시필린 400 mg) 1정을 건강안 지원자 8명에게 각각 경구투여한 후 시간에 따른 평균 혈청 중 펜톡시필린의 농도를 나타낸 것이다. 또한, Table 2에는 피험자들의 혈청 중 약물농도 곡선으로부터 구한 약물동태학적 파라미터인 AUC_t, C_{max}, T_{max}, k_e 및 t_{1/2}의 평균값을 나타내었다. 본 연구를 통하여 한국인 건강 성인 남성에게 있어서 트렌탈®정(펜톡시필린 400 mg) 1정을 경구투여하였을 때 약물동태학적 파라미터 AUC_t, C_{max}, T_{max}, k_e 및 t_{1/2}은 각각 962.28 ± 645.69 ng · hr/mL, 132.82 ± 42.05 ng/mL, 2.06 ± 2.68 hr, 0.098 ± 0.048 hr⁻¹ 및 8.74 ± 4.38 hr이었다. 본 연구

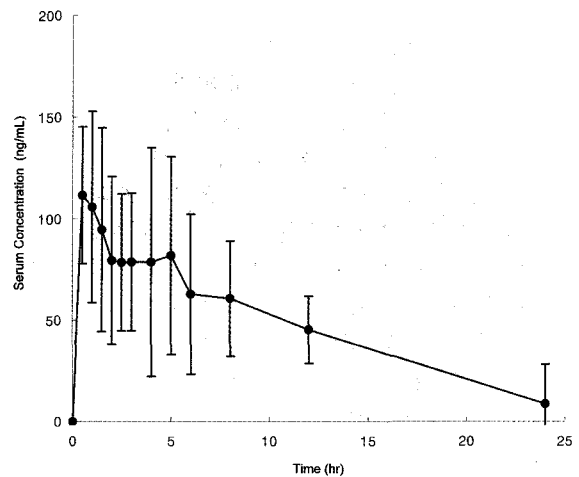


Fig. 2. Mean serum concentration-time curve of pentoxifylline after an oral administration of Trental® tablet at the dose of 400 mg of pentoxifylline.

Table 1. Precision and accuracy for the determination of pentoxifylline in human serum

Concentration (ng/mL)	Precision (C.V.%)		Accuracy (%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
10	14.78	13.48	101.00
20	12.55	10.64	104.70
100	7.02	8.71	102.90
200	7.39	7.09	108.80

C.V.% = (S.D. / Mean) × 100

Table 2. Mean pharmacokinetic parameters of 8 healthy volunteers after a single dose administration of trental® tablet (pentoxifylline 400mg) orally

	Trental® Tablet				
	AUC _t (ng·hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	K _e (hr ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
Mean	962.28	132.82	2.06	0.098	8.74
S.D.	645.69	42.05	2.68	0.048	4.38

에서 나타난 펜톡시필린의 최종상 반감기가 문헌⁶⁾에 보고된 0.4~0.8 시간과 달리 나타나는 것은 본 제제가 서방정 제제이기 때문인 것으로 사료되며, C_{max} 및 T_{max}는 문헌치⁵⁾와 거의 일치하였다. 또한 24시간동안의 체혈시간은 AUC_t가 AUC_∞(1251.74 ± 954.08 ng · hr/mL)의 약 80%를 차지함으로써 생물학적 동등성 시험기준에 적합하였다.

결론

인체혈청 중 펜톡시필린의 정량을 위한 HPLC 분석법을 확립 및 검증하고 (주)한독약품의 트렌탈® 정(펜톡시필린 400 mg)을 시험약으로 하여 8명의 지원자에게 경구투여한 후 얻은 약물동태학적 파라미터들을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 분석조건에서 펜톡시필린 및 내부표준물질은 기타 혈청 성분들과 잘 분리됨을 확인할 수 있었고, 혈청시료로부터 구한 펜톡시필린 검량선의 r²=0.9999, p<0.01으로 10~500 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

2. 최저정량한계 농도인 10 ng/mL를 포함한 농도에서의 일내, 일간 평균 C.V.와 accuracy가 각각 15%이내에 들어가 본 분석법은 충분한 감도와 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 검증하였다.

3. 건강한 8명의 한국인 남성지원자를 대상으로 한 연구결과 트렌탈®정 (펜톡시필린 400 mg) 1정의 AUC_t는 962.28 ± 645.69 ng · hr/mL, C_{max}는 132.82 ± 42.05 ng/mL, T_{max}는 2.06 ± 2.68 hr, k_e는 0.098 ± 0.048 hr⁻¹ 및 t_{1/2}는 8.74 ± 4.38 hr이었다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 지원(KFDA-03142-약동성-535)을 받아 이화여자대학교에서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Accetto B, Beneficial hemorrheologic therapy of chronic peripheral arterial disorders with pentoxifylline: results of

double-blind study versus vasodilator-nylidrin. *Am Heart J* 1982; **103**: 864-9.

2. Porter JM, Cutler BS, Lee BY, et al, Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: Multi-center controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J* 1982; **104**: 65-72.

3. Nishio T, Toshima Y, Matsuno Y. Effects of pentoxifylline on cell shape, ATP content and deformability in rabbit erythrocytes under hyperosmolar conditions. *Int J Biochem* 1982; **14**: 915-20.

4. Dettelbach HR, Aviado DM. Clinical pharmacology of pentoxifylline with special reference to its hemorrheologic effect for the treatment of intermittent claudication. *J Clin Pharmacol* 1985; **25**: 8-16.

5. Raz I, Ben-David J, Hussein Z, et al. Comparative pharmacokinetic analysis of novel sustained-release dosage forms of pentoxifylline in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1988; **26**: 206-8

6. Martindale. 32th edition. 1999. pp 925-6

7. Burrows JL. Determination of oxpentifylline and three metabolites in plasma by automated capillary gas chromatography using nitrogen-sensitive detection. *J Chromatogr* 1987; **423**: 139-46.

8. Smith RV, Waller ES, Doluisio JT, et al. Pharmacokinetics of Orally Administered Pentoxifylline in Humans. *J Pharm Sci* 1986; **75**: 47-52.

9. Dennis M, Grasela DM, Rocci ML Jr. High-performance liquid chromatographic analysis of pentoxifylline and 1-(5'-hydroxyhexyl)-3,7-dimethylxanthine in whole blood. *J Chromatogr* 1987; **419**: 368-74.

10. Lambert WE, Yousouf MA, Van Liedekerke BM, et al. Simultaneous determination of pentoxifylline and three metabolites in biological fluids by liquid chromatography. *Clin Chem* 1989; **35**: 298-301.

11. Rieck W, Platt D. Determination of 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthine(pentoxifylline) and its 3,7-dimethyl-1-(5-hydroxyhexyl)-xanthine metabolite in the plasma of patients with multiple disease using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984; **305**: 419-27.

12. Jia Woei Wong, Kah Hay Yuen, Kok Khiang Peh. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of pentoxifylline in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; **716**: 387-91.

13. 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적 동등성 시험기준 (2002. 11. 22).