

## 레니프릴정(에날라프릴 10 mg)에 대한 에날라프릴정의 생물학적 동등성 평가

노금한 · 배경진 · 강원구

대구가톨릭대학교 약학대학 임상약학 연구실

(2009년 4월 6일 접수 · 2009년 5월 20일 수정 · 2009년 5월 23일 승인)

### Bioequivalence Study of Enalapril Tablet to Lenipril<sup>®</sup> Tablet

Keumhan Noh, Kyoungjin Bae, and Wonku Kang

College of pharmacy, Catholic University of Daegu, Kyongsan, Kyoungbuk 712-702, Korea

(Received April 6, 2009 · Revised May 20, 2009 · Accepted May 23, 2009)

The study was designed to compare the rate and extent of absorption of two enalapril tablets (10 mg), which has been widely used for the treatment of hypertension. This bioequivalence study was conducted using a standard preparation as reference and a generic as test in 24 male healthy volunteers. After an overnight fast, a single dose of the test or reference drugs were given with a washout period of 7 days. Heparinized blood samples were serially collected up to 10 hr. Plasma enalapril concentrations were quantified using a validated LC-MS/MS method. The data obtained for each subject was evaluated for  $C_{max}$  and  $AUC_{10hr}$  with respect to 90% confidence interval for log-transformed data. The 90% confidence intervals were  $\log(0.9384)\sim\log(1.1160)$  for  $AUC_{10hr}$  and  $\log(0.9482)\sim\log(1.1474)$  for  $C_{max}$ . Thus, we concluded that the test and reference formulation are bioequivalent in terms of rate and extent of absorption.

□ Key words - Enalapril, Bioequivalence, LC/MS/MS

에날라프릴((S)-1-{N-[1-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl}-L-proline)은 안지오텐신 전환효소(Angiotensin converting enzyme, ACE) 억제제의 하나로 고혈압치료에 사용되고 있다. 체내에서는 주로 활성대사체인 에날라프릴라트(enalaprilat)로 전환된 형태로 존재하며 모화합물과 함께 Renin-angiotensin-aldosterone mechanism에 작용하여 말초혈관을 이완하여 혈압을 낮추는 작용을 하게 된다.<sup>1,2)</sup> 에날라프릴 10 mg을 경구투여했을 때 투여 후 약 1시간에 최고 혈중농도 40~50  $\mu\text{g/ml}$ 에 이르게 되며, 에날라프릴은 일차소실 속도(반감기는 약 2시간)를 나타내는 반면 에날라프릴라트는 bi-exponential decay를 보여 분포기의 반감기는 약 2~6시간, 소실기 반감기는 약 36시간으로 알려져 있다.<sup>3)</sup>

혈장 중 에날라프릴의 약물농도 분석을 위한 방법으로는 경쟁성결합분석법(Competitive inhibitor binding assay, IBA)<sup>5)</sup>, 효소면역검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>6)</sup>, 고속액체크로마토그래피법(High-performance liquid

chromatography, HPLC)<sup>7)</sup>이 사용되어 왔으며, 최근에는 액체 크로마토그래피와 연계된 질량분석기(tandem mass spectrometer)를 사용한 분석법이 민감도와 정확성 등의 장점으로 인하여 널리 사용되고 있다.<sup>8,9)</sup>

본 연구에서는 에날라프릴의 대조제인 중외제약 ‘레니프릴정 10 mg (enalapril 10 mg)’과 성분과 함량이 동일한 제제인 삼남제약의 ‘에날라프릴정 10 mg (enalapril 10 mg)’을 건강한 한국인 성인 지원자에게 2정씩 경구 투여하였다. 에날라프릴의 혈중농도는 LC/MS/MS를 이용하여 분석하였고, 각 시간별로 얻어진 피험자들의 혈중약물농도 데이터로부터 산출된 혈중농도시간곡선하면적( $AUC_t$ )과 최고혈중농도( $C_{max}$ ) 등의 생체이용률 파라미터를 통계학적으로 검정하여 두 제제의 생물학적 동등성 여부를 판정하였다.

### 실험 방법

#### 시약 및 기기

시험에 사용된 시험약은 의약품임상시험관리기준 제 36조 및 37조의 규정에 따라 제조한 삼남제약의 ‘에날라프릴정 10 mg’ (제조번호 : 16265, 사용기간 : 2009.07.23)이고 대조약은 식품의약품안전청으로부터 허가를 받아 중외제약에서

Correspondence to : 강원구  
대구가톨릭대학교 약학대학 임상약학연구실  
경북 경산시 대구가톨릭대학교 약학대학 213호  
Tel: +82-53-850-3619, Fax: +82-53-850-3602  
E-mail: wonkuk@cu.ac.kr

시판하고 있는 ‘레니프릴정 10 mg’ (제조번호 : RDJ6AC, 사용기한 : 2008.09.08)이었다. 에날라프릴 표준품은 삼남제약으로부터 제공받았으며, 전처리에 필요한 메탄올 및 아세트니트릴 등은 HPLC등급이었으며, 그 외 분석에 사용된 시약들은 모두 특급시약을 사용하였다. 분석기기로는 HPLC(Agilent 1100 series HPLC system, Agilent, USA), XTerra RP<sub>18</sub> 컬럼(3.5  $\mu$ m, 2.1×50 mm, Waters), mass spectrometer (API 4000 LC/MS/MS system, Applied Biosystems, USA), integrator (Analyst<sup>®</sup> 1.4.1), 원심분리기 (Eppendorf centrifuge 5415D, eppendorf, USA) 및 Vortex Mixer (Vortex-2 Genie, Scientific Industries)를 사용하였다.

### 피험자 선정

본 연구에서 피험자는 경북대학교 의과대학 부속병원에서 실시한 건강진단 결과 정상인 경우에 한하여 선발하였다. 건강진단 내용은 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성 시험기준<sup>4)</sup>에 근거하여 만 19~55세의 건강한 지원자를 공고를 통하여 모집하였다. 피험자로 선정된 지원자들은 남자 24명으로 평균체중은 69.1±7.6 kg, 키 175.0±5.2 cm 및 평균연령 23.8±2.8세였다. 이들로부터 본 시험에 대한 동의서를 받은 후 생물학적 동등성 시험을 실시하였다. 모든 지원자는 투약일 전 10일간 및 시험 기간에는 음주를 삼가고 타 약물의 복용을 금하도록 하였으며 시험 전 3일부터는 커피 및 콜라 등 카페인을 함유하고 있는 음식의 섭취를 금하도록 하였다.

시험 전일 오후 8시부터 시험 당일 투약 후 4시간까지는 금식하였고 시험 기간 중에는 책임자의 감독하에 같은 식단의 식사와 적당한 활동을 하게 하였다.

### 약물 투여 및 채혈

총 24명의 지원자를 군당 12인씩 임의로 A, B군으로 나누고 제 I기 A군에는 대조약인 “레니프릴정 10 mg(에날라프릴 10mg)”, B군에는 시험약인 “에날라프릴정 10 mg(에날라프릴 10mg)”을 각각 2정씩을 투여하였고, 제 II기에는 I기와 반대로 투약하였다. 생물학적동등성시험 기준 제 18조 제 4항 휴약기간의 산정기준에 따라 7일의 휴약 기간을 두었다. 채혈은 경북대학교 지역심상시험센터에서 투약 직전과 투약 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 시간의 총 12시점에서 실시하였다. 약 5 ml의 혈액을 취한 후 헤파린이 처리된 튜브에 담아 3000rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈장을 분리하였고 분석시까지 -80°C에서 보관하였다.

### 검량선 작성 및 혈장시료의 처리

에날라프릴 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 1 mg/ml로 만든 후 이 용액을 아세트니트릴로 계열 희석하여 검량선 농도의 10배인 50, 200, 500, 1000, 2000, 500 (ng/ml)로 만들었다. 이 용액을 공혈장 90  $\mu$ l에 각각 10  $\mu$ l씩 정확히 가하

여 에날라프릴의 혈장 중 농도가 각각 5, 20, 50, 100, 200, 500 (ng/ml) 농도가 되도록 혈장시료를 만들었다. 각각의 표준혈장시료 100  $\mu$ l에 라미프릴 (2 ng/ml, internal standard) 아세트니트릴 용액 300  $\mu$ l을 가하여 체단백하고 30초간 교반한 후 13,200 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액 100  $\mu$ l 취하여 자동주입기용 바이알에 옮긴 후 3  $\mu$ l를 주입하였다. 여기에서 얻은 내부 표준물질의 피이크 면적에 대한 에날라프릴의 피이크 면적비로 검량선을 작성하였다. 분석법 검증 을 위해 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다. 냉동 보관했던 혈장시료는 실온에 방치하여 녹인 후 30초간 진탕한 다음 100  $\mu$ l를 취하여 튜브에 옮기고 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리한 후 LC/MS/MS에 주입하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부 표준물질의 피이크 면적에 대한 에날라프릴의 피이크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 에날라프릴의 농도를 구하였다.

### 분석조건

전처리된 혈장 시료는 다음의 LC/MS/MS 조건에서 정량하였다. 내부표준물질과 enalapril은 모두 electrospray ionization positive mode (ESI +)에서 검출하였으며 각각의 mass transition은 enalapril (m/z) [M+H]<sup>+</sup> : 377.2→234.1 및 ramipril (m/z) [M+H]<sup>+</sup> : 417.2→234.1였다. 에날라프릴과 라미프릴의 검출 및 daughter ion 생성을 위한 조건은 각각 DP: 51 eV, EP: 10 eV, CE: 27 eV, CXP: 16 eV 및 DP: 71 eV, EP: 10 eV, CE: 31 eV, CXP: 16 eV였다. 분석용컬럼으로는 XTerra RP<sub>18</sub> column (3.5  $\mu$ m, 2.1×50 mm, Waters)을 사용하였고, 컬럼 오븐의 온도는 20°C였다. 이동상으로는 아세트니트릴: H<sub>2</sub>O (0.1 % formic acid) = 75:25 v/v 혼합용액을 사용하였고 유속 0.3 ml/min였다. 데이터 처리는 Applied Biosystems사의 Analyst<sup>®</sup> 1.4.1을 사용하였다.

### 생물학적 동등성의 평가

생물학적 동등성 여부를 판정하기 위한 통계처리는 생물학적 동등성시험 기준에 따라 혈장 중 약물농도-시간곡선으로부터 산출한 AUC<sub>t</sub> 및 C<sub>max</sub>로 하였다. 각 피험자로부터 얻어진 대조약과 시험약의 두 비교평가항목을 로그변환한 후 생물학적동등성시험 통계처리용 프로그램 (K-BE test)을 이용하여 분산분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 분석법 검증

에날라프릴과 내부표준물질인 라미프릴의 피이크 유지시간은 모두 0.5분이었고, 내인성물질 및 분석 과정 중에 가해진 시약에 의한 간섭은 없었다. 표준혈장시료로부터 구한 에날라프릴의 검량선은 5~500 ng/ml 범위에서 양호한 직선성( $r^2$

**Table 1. Precision and accuracy of the method for the determination of enalapril in human plasma (n=5)**

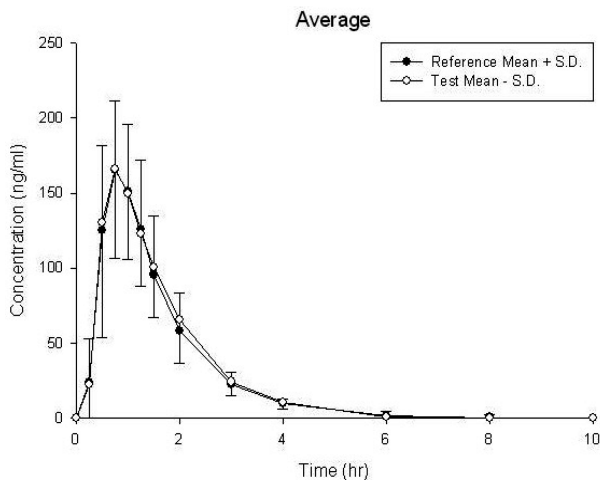
Concentration (ng/ml)	Intra-day	Inter-day
5	101.3±6.2 <sup>1</sup> (6.1) <sup>2</sup>	97.6±5.0 (5.1)
50	100.0±2.0 (2.1)	99.7±5.0 (5.0)
100	97.8±4.4 (4.5)	97.0±1.8 (1.9)
500	98.0±4.3 (4.4)	97.8±1.7 (1.7)

<sup>1</sup> Accuracy (mean %±S.D.)<sup>2</sup> CV, coefficient of variance (%)

= 0.9991±0.0010)을 나타내었으며, 분석법 검증을 위한 5, 50, 100 및 500 ng/ml의 농도에서 에날라프릴의 일내 및 일간 정밀도(CV%)는 모두 6.1% 이내였고, 일내 및 일간 정확도(%)는 97.0~101.3% 범위에 있었다 (Table 1). 이로부터 사람 혈장 중 에날라프릴에 대한 LC/MS/MS분석법은 본 시험에 이용될 수 있는 충분한 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 알 수 있다.

#### 혈장 중 enalapril의 농도 추이 및 생물학적 동등성의 평가

각 피험자의 AUC 값은 약물 투여 후 10시간까지의 각 피험자의 혈장 중 약물농도-시간 곡선들로부터 사다리꼴 공식에 의해 구하였고, C<sub>max</sub> 는 각 피험자의 시간별 혈중약물 농도곡선으로부터 가장 높은 혈장농도를 사용하였다. 에날라



**Fig. 1. Mean Plasma concentration-time profiles of Lenipril™ (reference drug: ●) and Enalapril™ (test drug: ○) administration to 24 volunteers. The Vertical bars represent the standard deviation.**

**Table 2. Statistics of bioequivalence analysis for log-transformed AUC<sub>t</sub> and log-transformed C<sub>max</sub> between test and reference drug of enalapril**

90% Confidence interval	Lower limit	Upper limit
AUC <sub>t</sub>	0.9384	1.1160
C <sub>max</sub>	0.9482	1.1474

프릴의 대조약과 시험약 각 2 정을 피험자 24명에게 경구 투여한 후 일정시간마다 채혈하여 얻은 각 제제의 전체 피험자에 대한 혈장 중 에날라프릴의 평균농도를 Fig. 1에 나타내었다. 대조약 투여 후 약 0.8 시간에 C<sub>max</sub> 179.6±49.8 ng/ml에 도달하였으며 0.7시간의 반감기를 나타내며 혈중에서 소실되었다. 그림 1에 나타난 바와 같이 두 제제의 시간별 혈중 농도 곡선은 겹쳤으며, 생물학적동등성 평가 기준인 AUC와 C<sub>max</sub>를 통계 처리한 결과 대조약에 대한 시험약의 평균치차의 90% 신뢰구간이 각각 log(0.9384)-log(1.1160) 및 log(0.9482)-log(1.1474)로서 log(0.8)에서 log(1.25)이내에 들었다 (Table 2).

## 결론

시험약인 ‘에날라프릴 10 mg’은 대조약인 ‘레니프릴정 10 mg’대하여 생물학적 동등성시험의 판단기준인 AUC<sub>t</sub> 및 C<sub>max</sub> 항목에서 모두 규정 범위에 들어있으므로 두 제제는 생물학적으로 동등하다고 판단하였다.

## 참고문헌

- Pang KS, Cherry WF, Terrell JA *et al.* Disposition of enalapril and its diacid metabolite, enalaprilat, in a perfused rat liver preparation. Presence of a diffusional barrier for enalaprilat into hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 1984; 12(3): 309-313.
- Peter AT, Rennie CH. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs.* 1986; 31: 198-248
- Rorbert JM, Peter AM, Henry LE. Enalapril clinical pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships. *Clin. Pharmacokinet.* 1993; 25: 274-282
- 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적동등성시험 기준 (2002. 11. 22)
- Tikkanen FF, Grönhagen-Riska C. Competitive inhibitor binding assay (IBA) of captopril and their inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Scand. J. Urol Nephrol Suppl.* 1984; 79: 13-16.
- Matalka K, Arafat T, Hamad M *et al.* Determination of enalapril and enalaprilat by enzyme linked immunosorbent assays: application to pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2002; 16(3): 237-244.
- Shepley K, Rocci ML Jr, Patrick H *et al.* An optimized fluoroenzymatic assay for the determination of angiotensin converting enzyme inhibitors in biological fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1988; 6(3): 241-251.

8. Lee J, Son J, Lee M *et al.* Simultaneous quantitation of enalapril and enalaprilat in human plasma by 96-well solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17(11): 1157-1162.
9. Lu S, Jiang K, Qin F *et al.* Simultaneous quantification of enalapril and enalaprilat in human lasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 49(1): 163-167.