약학회지 제 54 권 제 4 호 295~299 (2010)
Yakhak Hoeji Vol. 54, No. 4

藥學會誌

고속액체크로마토그라피법을 이용한 사람 혈장 중 알리벤돌(Alibendol)의 정량 및 검증

송현호*,**・유지영*・김보겸*・박현주*・최광식*・권영이*,#
*(사)한국의약품수출입협회 부설 한국의약품시험연구소 생동성연구부,
**고려대학교 생명과학대학원 생명공학과
(Received May 10, 2010; Accepted July 10, 2010)

Determiniation and Validation of Alibendol using High Pressure Liquid Chromatography in Human plasma

Hyun Ho Song*,**, Ji-young Yu*, Bo Gyeom Kim*, Hyeon Ju Park*,
Kwang Sik Choi* and Young Ee Kwon*,#
**Division of Bioequivalence, Korea Drug Test Laboratory, Seoul 130-060, Korea*
***Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea*

Abstract — The aim of this study was to develop and validate for determination of alibendol in human plasma by HPLC method. After precipitation of 500 μl plasma samples by 50% methanol 50 μl and 60% perchloric acid 30 μl and the supernatant 50 μl was injected into HPLC. The assay was performed isocratically using 10 mM potassium phosphate (pH 3.0) and acetonitrile (80 : 20, v/v) as mobile phase. The C_{18} column (particle size 3.5 μm, 4.6×50 mm, Zorbax Eclipse) was used as a solid phase. The mobile phase was delivered at a flow-rate of 1.7 ml/min, detection was by ultraviolet absorption at 232 nm and concentrations were calculated on the basis of peak areas. In these conditions, alibendol can be separated from ethylparaben, the internal standard, and endogenous substances. The retention times of alibendol and ethylparaben were just about 2.6 and 3.5 minutes, respectively. This rapid HPLC method was validated by examining the precision and accuracy for inter- and intra-day analysis. The standard curve was linear (R^2=1.0000) over the concentration range of 0.05~20 μg/ml. The inter-day relative standard deviation (R.S.D.) and accuracy were 0.2~12.2% and 94.4~101.2% (82.7% at the lower limit of quatitation). The intra-day R.S.D. and accuracy were 0.1~11.8% and 98.8~102.5%, respectively. The method was successfully applied to the determination of alibendol in plasma for a pharmacokinetic study.

Keywords □ alibendol, bioavailability, bioequivalence, human plasma, HPLC/UV

알리벤돌(alibendol, $C_{13}H_{17}NO_4$)은 소화불량, 구역, 구토, 변비 등의 소화기계질환을 치료하는 전문의약품으로, IUPAC명은 5-allyl-2-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-3-methoxybenzamide(Fig. 1)이고, CAS No.는 26750-81-2이다.[1] 이 약은 성인의 경우 알리벤돌로서 1일 300~400 mg을 3~4회 분할하여 식전 및 취침 시 경구투여하는 것으로 알려져 있다.[2] 알리벤돌은 식품의약품안전청에서 약사법 제 33조 및 제 42조 제 4항 '의약품 재평가 실시에 관한 규정(식품의약품안전청고시)'[3]에 의하여 2011년 생물학적동등성 재평가 성분으로 발표된 성분들 중의 하나이다. 프랑스 쏘시에제약의 제품이 오리지널이며, 국내 대조약은 진양제약(주)의 '리베라정'이다.[4] 그러나 알리벤돌은 약물동태가 알려져 있지 않고, 대한약전, 미국약전 및 일본약국방 등에도 수록되어있

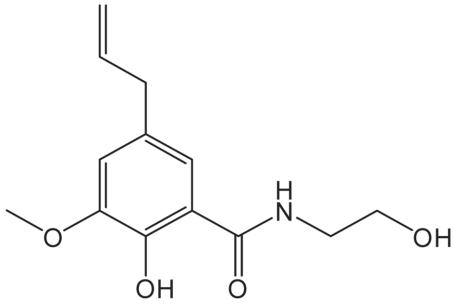

Fig. 1 – Chemical structure of alibendol.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-967-7068 (팩스) 02-6933-7721
(E-mail) yekwon@kdtl.or.kr

지 않으며, 분석법도 국내외적으로 보고된 내용이 없다. 알리벤돌은 구조적으로 벤젠고리와 측쇄에 알케닐기를 가지고 있고 페놀의 히드록시기(OH)와 1차 알콜기를 가지고 있어 적절한 수용성기와 지용성기를 모두 함유하고 있으며, 투여용량도 100 mg이므로 혈액 중 약물의 농도는 비교적 높을 것으로 예상되었다. 따라서 HPLC로 분석, UV로 검출이 가능할 것으로 판단되어 HPLC/UV를 이용하여 분석을 시도하였다. 저자들은 HPLC를 이용한 알리벤돌의 혈장 중 정량분석법을 확립하였고, 미국 FDA의 생체시료분석법 평가지침에 따라[5] 특이성, 직선성, 일간-일내 정밀성과 정확성을 측정하여 검증된 정량분석법을 확립하였고, 혈장 중 단기와 냉 · 해동 시의 안정성 및 혈장시료 조제 후 안정성을 시험하여 안정성이 확보된 실험결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

시약 및 분석기기

알리벤돌 표준품은 영풍제약주식회사에서 제공받았으며, 내부표준물질로 사용한 ethyl paraben은 Simga chemical Co.(St Louis, 미국)의 특급시약을 사용하였다. HPLC용 메탄올 및 아세토니트릴은 Budick & Jackson Co.(Muskegon, MI, 미국) 제품을 사용하였고, 증류수는 Milli Q(Millipore Co., Milford, MA, 미국)에서 18 MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 인산칼륨(potassium phosphate), 인산 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 사용하였다. 분석기기인 HPLC는 Agilent 1100 series (Agilent-technologies, Waldbronn, 독일)의 quaternary pump와 자동주입기를 사용하였고, 검출기는 Agilent 1100 variable wavelength detector를 사용하였다.

특이성, 정밀성, 정확성 및 감도

FDA의 생체시료분석법평가지침에 따라[5] 생체시료내 존재 가능한 간섭물질인 내인성 성분, 대사물질, 분해산물, 공존 약물 등이 약물 분석에 영향을 미치지 않음을 입증하기 위하여 기원이 다른 6개의 독립적인 공혈장을 사용하여 약물 분석과 동일한 방법으로 분석하였다. 알리벤돌과 내부표준물질의 검량선에 의하여 정량한 농도에 대한 정밀성(CV %) 및 정확성(%)을 구하기 위하여 하루에 5번 시행하여 일내재현성을 구하고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다. 최저정량한계는 크로마토그램상에서 신호 대 잡음비 (S/N ratio)를 5 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다.

사람 혈장 중 알리벤돌의 검량선 작성

알리벤돌 표준품을 메탄올에 녹여 알리벤돌로서 1 mg/ml의 농도로 만든 후, 혈장 중 알리벤돌의 최종 농도가 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μg/ml가 되도록 알리벤돌 표준액을 가하여 검량선용 표준혈장을 조제하였다. 각각의 검량선용 표준혈장 500 μl에 내부표준물질(ethyl paraben 200μg/ml)의 50% 메탄올용액 50 μl를 가하고 60% 과염소산을 30 μl 넣은 다음 5분간 교반 후, 이를 14,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 혈장단백질을 제거하였다. 상징액 50 μl를 취하여 HPLC에 주입하였다. 고정상으로 입자크기 3.5 μm, 너비 4.6 mm, 길이 50 mm인 C_{18}컬럼(Zorbax Eclipse)을 사용하였고, 이동상으로는 10 mM potassium phosphate를 함유한 물(pH 3.0) : 아세토니트릴=80 : 20(v/v) 혼합용액을 사용하였다. 유속은 1.7 ml/min, 주입량 50 μl 및 UV 검출기(wavelength: 232 nm)를 이용하여 검출하였고, 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크면적에 대한 알리벤돌의 피크면적비로 검량선을 작성하였다.

안정성

이 시험에 사용된 안정성시료는 낮은 농도인 0.2 μg/ml와 높은 농도인 20 μg/ml로 각각 3개의 시료가 조제되었고, 비교시료는 안정성시료와 동일한 낮은 농도(low)와 높은 농도(high) 각각 3개씩 용시 조제되었으며, 안정성시료(각 조건별 보관 시료)와 함께 분석하여 변동성을 관찰하였다. 단기 실온 안정성은 실온에서 4시간 방치한 안정성시료와 용시 조제한 비교시료를 함께 전처리 후 분석하였다. 조제 후 안정성은 알리벤돌과 내부표준물질인 에틸파라벤의 혈장시료를 전처리 후 4°C에서 24시간 보관된 안정성시료와 비교시료를 함께 분석하였다. 냉 · 해동 안정성은 시료의 냉동과 해동을 반복하는 과정이 약물의 안정성에 영향을 미칠 수 있는 지 확인하기 위하여, 냉 · 해동 안정성 시료로 낮은 농도와 높은 농도 각각 3개씩 조제하여 냉동과 해동의 반복을 3회 실시하여 변동성을 관찰하였다.

결과 및 고찰

특이성(Selectivity)

기원이 다른 6개의 독립적인 공혈장을 사용하여 약물 분석과 동일한 HPLC 방법으로 분석한 결과 분석조건에서 알리벤돌 및 내부표준물질은 기타 혈장 성분들과 간섭현상이 나타나지 않았으며, 잘 분리되었다. 공혈장, 알리벤돌과 내부표준물질의 대표 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다.

정밀성(precision), 정확성(accuracy) 및 검량선(calibration)

0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μg/ml의 표준혈장 500 μl에 내부표준물질(ethyl paraben 200 μg/ml)의 50% 메탄올용액 50 μl 넣은 시료를 전처리하여 HPLC로 분석하였을 때 알리벤돌의 피크 유지시간은 약 2.6분, 내부표준물질(ethyl paraben)은 약 3.5

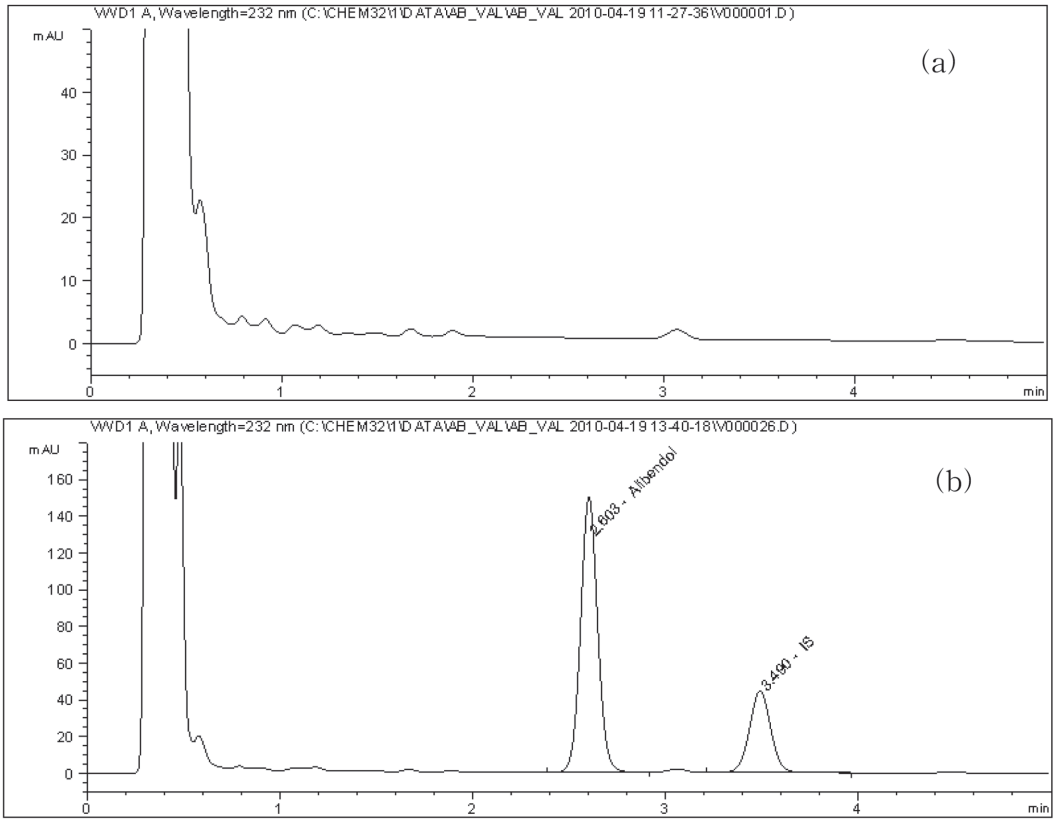

Fig. 2 – Chromatograms of blank plasma (a), and alibendol (20 μg/m*l*) and ethylparaben(I.S.) in human plasma (b).

분이었고, 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5 이상으로 하고 일내 및 일간 정밀성 및 정확성을 20% 미만으로 하였을 때 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quatitation)는 0.05 μg/m*l*이었으며, 혈장시료로부터 구한 알리벤돌 검량선의 계산식은 $y=0.1367x+0.0026$($R^2=1.0000$) [y=알리벤돌/내부표준물질 피이크 면적의 비율, x=알리벤돌의 농도(μg/m*l*)]였고, 0.05~20 μg/m*l*의 범위에서 이상적인 직선성을 나타내었다(Fig. 3) 또한, 이 농도 범위에서 알리벤돌의 각 농도에서 5회 반복 측정하여 얻은 일간 정밀성(R.S.D.)은 0.2~12.2% 범위 내에 나타났고,

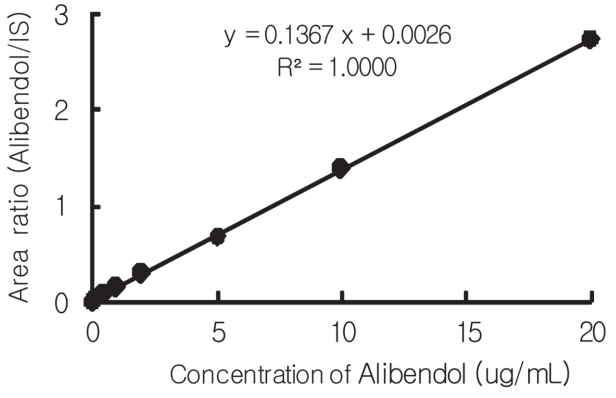

Fig. 3 – Calibration curve of alibendol.

정확성은 LLOQ 농도에서 82.7%, 나머지 농도에서는 94.4~101.2%로 나타났다. 일내 정밀성(R.S.D.)은 0.1~11.8%, 정확성은 98.8~102.5%로 나타났다(Table I). 이로부터 혈장 중 알리벤돌에 대한 HPLC/UV 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 정밀성 및 정확성이 확보되었고, 검량선의 직선성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 알리벤돌 제제 1정(100 mg)을 경구투여 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 혈장 중 알리벤돌의 농도추이(n=1)는 Fig. 4에 나타내었다.

안정성

냉동실에서 꺼내어진 혈장시료가 실험벤치에 올려진 상태에서 전처리할 때까지 혈장 내 약물의 안정성을 유지하는지 확인하기 위하여 실온에서 4시간 동안의 단기 안정성을 확인한 결과 낮은 농도인 0.2 μg/m*l*에서 비교시료와 안정성시료의 평균 실측 농도는 각각 0.2076±0.0031 μg/m*l*와 0.2091±0.0022 μg/m*l*로 변화율은 0.8%로 나타났다. 높은 농도인 20 μg/m*l*에서 비교시료와 안정성시료의 평균 실측 농도는 각각 20.0492±0.1030 μg/m*l*와 19.9326±0.0630 μg/m*l*로 변화율은 -0.6%로 나타나 실온에서 4시간까지 혈장시료내의 약물은 안정함을 알 수 있었다(Table II). 조제 후 안정성은 시료의 전처리 후 자동주입기내에서 약물의 안정성을 확인하기 위하여 4°C에서 24시간 방치 후 분석한 결과,

Table I – The precision and accuracy of alibendol in human plasma

Concentration (μg/ml)		Mean (n=5)	SD	Precision R.S.D.[a] (%) (n=5)	Accuracy[b] (%) (n=5)
Inter-day	0.05 (LLOQ)	0.0413	0.0050	12.0	82.7
	0.1	0.0944	0.0115	12.2	94.4
	0.5	0.4893	0.0103	2.1	97.9
	1	1.0055	0.0188	1.9	100.5
	2	2.0243	0.0414	2.0	101.2
	5	4.9793	0.0840	1.7	99.6
	10	10.0320	0.1059	1.1	100.3
	20	19.9922	0.0466	0.2	100.0
Intra-day	0.05 (LLOQ)	0.0509	0.0060	11.8	101.9
	0.1	0.1025	0.0097	9.4	102.5
	0.5	0.4987	0.0037	0.7	99.7
	1	1.0103	0.0032	0.3	101.0
	2	2.0115	0.0050	0.3	100.6
	5	5.0495	0.0220	0.4	101.0
	10	9.8818	0.0220	0.2	98.8
	20	20.0455	0.0158	0.1	100.2

[a]Relative standard deviation (Coefficient of variations).
[b]Values are reasonable for 15% deviation of the standard from nominal concentration (20% deviation in case of LLOQ).
[c]Lower limit of quantitation.

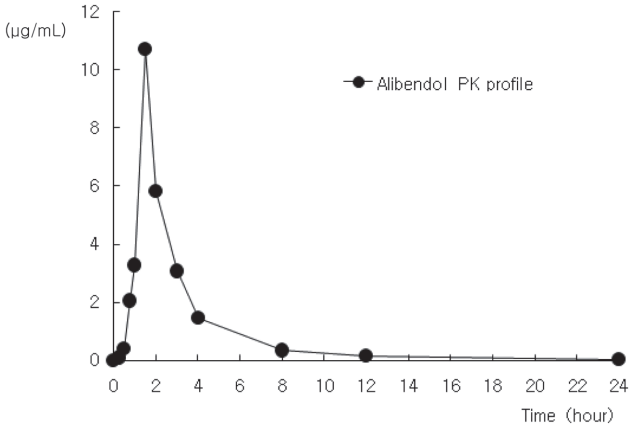

Fig. 4 – Plasma concentration-time curve of alibendol following the oral administration at a dose of alibendol 100 mg (n=1).

낮은 농도인 0.2 μg/ml에서 비교시료와 안정성시료의 평균 실측 농도는 각각 0.2076±0.0031 μg/ml와 0.2094±0.0030 μg/ml로 변화율은 0.9%로 나타났다. 높은 농도인 20 μg/ml에서 비교시료와 안정성시료의 평균 실측 농도는 각각 20.0492±0.1030 μg/ml와 20.0477±0.0914 μg/ml로 변화율은 0.0%로 나타나 시료의 전처리 후 4°C에서 24시간까지 혈장시료내의 약물은 안정함을 알 수 있었다(Table III). 냉 · 해동 안정성은 낮은 농도인 0.2 μg/ml와 높은 농도인 20 μg/ml를 각각 4 ml씩 조제하여 -70°C에 보관 한 후 꺼내어 실온에서 녹이는 과정은 3회 반복하여 관찰하였다. 냉 · 해동을 3회 반복한 후 낮은 농도인 0.2 μg/ml에서 비교시료와 안정성시료의 평균 실측농도는 0.2258±0.0044 μg/ml와 0.2217±0.0015 μg/ml로 변화율은 -2.1%로 각각 나타났으며, 높은 농도인 20 μg/ml에서는 각각 19.8327±0.0787 μg/ml와 19.4599±0.0515 μg/ml로 변화율은 -1.9%로 각각 나타나 3회 냉 · 해동 시 혈장시료 내의 약물은 안정함을 알 수 있었다(Table IV).

결 론

기원이 다른 6개의 독립적인 공혈장을 사용하여 특이성을 시험한 결과 알리벤돌 및 내부표준물질은 기타 혈장 성분들과 간섭현상이 나타나지 않았으며, 잘 분리되었다. 혈장 내 알리벤돌의 검량선 0.05~20 μg/ml의 범위에서 R^2=1.0000의 이상적인 직

Table II – Stability after short term (bench top) storage at room temperature

Concentration (μg/ml)	Mean (n=3)	SD	Precision R.S.D[a] (%) (n=3)	Accuracy[b] (%) (n=3)	Change (%)
0.2	0.2076	0.0031	1.5	103.8	0.8
0.2 (post 4 hr)[c]	0.2091	0.0022	1.0	104.5	0.8
20	20.0492	0.1030	0.5	100.2	-0.6
20 (post 4 hr)[c]	19.9326	0.0630	0.3	99.7	-0.6

[a]Relative standard deviation (Coefficient of variations).
[b]Values are reasonable for 15% deviation of the standard samples from the stability samples.
[c]Three aliquots of each of the low and high concentrations should be thawed at room temperature and kept at this temperature during 4 hours and analyzed.

Table III – Stability of post-preparative samples

Concentration (μg/m*l*)	Mean (n=3)	SD	Precision R.S.D[a] (%) (n=3)	Accuracy[b] (%) (n=3)	Change (%)
0.2	0.2076	0.0031	1.5	103.8	0.9
0.2 (post 24 hr)[c]	0.2094	0.0030	1.4	104.7	
20	20.0492	0.1030	0.5	100.2	0.0
20 (post 24 hr)[c]	20.0477	0.0914	0.5	100.2	

[a]Relative standard deviation (Coefficient of variations).
[b]Values are reasonable for 15% deviation of the standard samples from the stability samples.
[c]Three aliquots of each of the low and high concentrations should be prepared at room temperature and kept at 4°C during 24 hours and analyzed.

Table IV – Stability after three cycles of freezing and thawing samples

Concentration (μg/m*l*)	Mean (n=3)	SD	Precision CV[a] (%) (n=3)	Accuracy[b] (%) (n=3)	Change (%)
0.2	0.2258	0.0044	1.9	112.9	-2.0
0.2 (3 cycles)	0.2217	0.0015	0.7	110.9	
20	19.8327	0.0787	0.4	99.2	-1.9
20 (3 cycles)	19.4599	0.0515	0.3	97.3	

[a]Relative standard deviation (Coefficient of variations).
[b]Values are reasonable for 15% deviation of the standard samples from the stability samples.

선성을 나타내었으며, 일간 일내 정밀성과 정확성 모두 15% 범위 내, 최저정량한계에서는 20% 범위 내로 나타났다. 한명의 피험자에게 알리벤돌을 경구투여하기 직전(0시간)과 투여 직후 0.25, 0.5 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 8.0, 12.0, 24.0시간에 채혈하여 알리벤돌의 혈장 중 농도를 정량하였고, 약물동태 파라메타를 계산한 결과 C_{max}는 10.69 μg/m*l*, T_{max}는 1.5시간, $t_{1/2}$은 3.96시간, AUCt는 19.764 μg · h/m*l*으로 나타났다. 혈장 중 알리벤돌에 대한 HPLC/UV 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 정밀성 및 정확성이 확보되었고, 이상적인 검량선 직선성을 가지고 있었으므로 알리벤돌제제의 생물학적동등성시험에 활용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

1) Online Database of Chemicals from Around the World, chemBlink Inc. P.O. Box 5231 Cary, North Carolina 27512-5231, The United States of America, http://www.chemblink.com/products/26750-81-2.htm.
2) 식품의약품안전청 의약품분야 사이버민원실, KFDA EZ drug, http://ezdrug.kfda.go.kr/.
3) 식품의약품안전청 고시 제2009-212호(2009.12.22, 개정), 의약품 재평가 실시에 관한 규정.
4) 식품의약품안전청 공고 제2009-289호.
5) Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2001), U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).