

HPLC/UV를 이용한 혈장 중 이트라코나졸의 분석

장해종¹ · 이예리^{1,2} · 이경률^{1,2} · 한상범³ · 강승우^{1,3} · 이희주^{1,2}

¹바이오코아(주) 신약개발지원사업부, ²서울의과학연구소, ³중앙대학교 약학대학 약학과
(2006. 1. 16. 접수, 2006. 5. 2. 승인)

Determination of itraconazole in human plasma by high performance liquid chromatography

Hae Jong Jang¹, Ye-Rie Lee^{1,2}, Kyung Ryul Lee^{1,2}, Seung Woo Kang¹, Hee Joo Lee^{1,2}

¹Dept. of Drug Development Supporting Service, BioCore Co., Ltd.

²Dept. of Pharmacokinetics, Seoul Medical Science Institute, Seoul Clinical Laboratory

³College of Pharmacy, ChungAng University

(Received January 16, 2006; Accepted May 2, 2006)

요 약 : 본 연구는 LLE(liquid-liquid extraction) 전처리 방법과 HPLC/UV를 이용하여 혈장에서 이트라코나졸을 정량 분석하는 방법을 연구하였다. 이트라코나졸과 내부표준물질(펠로디핀)을 디에틸에테르로 추출하고 C18 컬럼을 이용하여 분리한 후 UV 검출기를 통하여 254 nm에서 검출하였다. 이동상은 10 mM 아세트산 암모늄 완충액(pH 7) : 아세트나이트릴(35:65, v/v) 혼합용액을 사용하였으며, 유속은 0.2 mL/min. 으로 하였다. 정량범위는 2~1,000 ng/mL 이며, 상관관계(R^2)는 0.9991로 좋은 직선성을 보였다. 정량한계는 2 ng/mL, 재현성은 변동계수가 10.8 이하, 정확도는 97.2~108.2% 였다. 이 분석방법은 혈장 중의 약물 정량 및 약물의 약동력학에 유용함을 보여주었다.

Abstract : This method is used for the determination of itraconazole in human plasma by liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography. Felodipine was used as an internal standard. After extraction of the plasma with diethyl ether, the centrifuged upper layer was then transferred. The supernatant was evaporated and then reconstituted with mobile phase. The mobile phase was composed of 10 mM ammonium acetate adjusted to pH 7 by phosphoric acid with a flow rate of 0.2 mL/min. A C18 reversed-phase column with a pre-column was used as the analytical column. Linear detection responses were obtained for itraconazole concentration range for 2~1,000 ng/mL. The correlation coefficient of linear regression(R^2) was 0.9991, limit of quantification (LOQ) was 2 ng/mL, reproducibility was less than 10.8 %, and accuracy was 97.2~108.2%. This method has been successfully applied to the pharmacokinetic study of itraconazole in human plasma.

Key words : Itraconazole, Felodipine, High performance liquid chromatography

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-571-4431 Fax : +82-(0)2-3461-0590

E-mail: heejoolee0@yahoo.co.kr

1. 서 론

이트라코나졸(itraconazole)은 (±)-cis-4-[4-[4-[4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-5-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]-1-piperziny]-phenyl]-2,4-dihydro-2-(1-methylpropyl)-3H-1,2,4-triazole-3-one (Fig. 1) 화학구조를 가지며,^{1,2} 백선균속, 소아포균속, 표피사상균속 등의 피부사상균, 칸디다균속, 피티로스포류속 등의 효모균과 이스퍼질루스균속 및 여러 병원성 진균의 감염에 효과적인 치료효과를 보이는 트리azole계의 광범위 항진균제이다.^{3,4} 이트라코나졸은 진균 세포막의 필수 구성요소인 에르고스테롤(ergosterol)의 합성을 저해함으로써 항진균 작용을 발현하며,⁵ 높은 지질친화력을 지니고 있어 혈중으로부터 생체조직 깊숙이 축적되며, 진균이 침입한 조직 중 특히 피부에서 혈중에서보다 4배 높은 농도를 유지함으로써 표재성 및 심재성 사상균증에 탁월한 약효를 보이는 약물이다. 그러나 높은 지방 친화력과 약한 염기성의 특징으로 인하여 산성 조건의 수용액에서만 미량으로 용해되며, 약물을 그 자체로 경구 투여하는 경우 위장관에서의 느린 약물용출 속도로 인해 약물의 생체 내 흡수가 잘 이루어지지 않아 약효의 발현 및 생체이용률이 매우 낮으며 환자의 상태에 따라 약물의 흡수 차이에 따른 약효의 편차도 심한 것으로 알려져 있다.^{6,7}

이트라코나졸의 물리적 특성 중 하나는 수용액상에서의 낮은 용해성이다. 수용성 용해도는 중성 pH일 때 용해도는 1 ng/mL, pH 1 일 때 4 µg/mL로 측정된

다. pK_{a4} 는 4로 결정되고, pK_{a3} 는 다른 산화질소가 pH 2와 10사이에서 양성자화 되지 않는 동안 1.5-2로 계산된다. 계산된 $\log P$ 의 값은 6.2이다.⁸

이트라코나졸을 측정할 수 있는 몇 가지 방법들을 보면 SPE(solid-phase extraction)를 이용하여 측정할 경우 정량한계가 10 ng/mL,⁹ LLE(liquid-liquid extraction)를 이용하여 측정할 경우 정량한계가 20 ng/mL¹⁰이고 제단백을 이용한 경우 정량한계가 25 ng/mL¹¹이다. HPLC를 이용한 정량한계는 5 ng/mL이고 LC-MS-MS를 이용한 경우 5 ng/mL 이하의 정량한계를 얻을 수 있음이 보고된 바 있다.^{12,13}

현재까지 보고 되어진 HPLC를 이용한 분석법으로 혈장 중 이트라코나졸의 농도를 분석할 경우 반감기 22시간 이상에서는 정량이 되지 않아 약물역학적 특성, 즉 생체이용률(흡수 속도와 흡수 정도)을 구할 수가 없었다. 본 연구에서는 정량한계를 2 ng/mL까지 낮출 수 있는 HPLC/UV 분석법을 개발하여 혈장 중 이트라코나졸의 농도를 최대 72시간까지 정량할 수 있게 하여 약물정량 및 약물의 약동력학에 활용할 수 있게 하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 분석조건

HPLC 장치는 waters사의 HPLC 시스템을 사용하였고, 각각의 구성원은 in-line degasser AF, waters 717plus auto sampler, HPLC용 waters 1525u 펌프, waters 5CH 컬럼 오븐 그리고 waters 2487 UV-VIS 검출기로 이루어졌다. 데이터 처리장치로는 waters사의 Breeze를 사용하였다. 기타 장비로는 원심분리기(MF 300, 한일과학, 한국), 탁상용 혼합기(Maxi Mix II, Thermolyne, Iowa, 미국), 왕복진탕기(J-SGM, 제일과학, 한국) 및 질소증발기(N-EVAPIII, Organomation inc., Belin, MA, 미국)를 사용하였다.

본 실험에서는 시료 70 µL를 자동주입기로 주입한 후, Grace vydac guard cartridge(10×2.1 mm, 5 µm)와 Capcell pak UG C18(150×2.0 mm, 5 µm)을 이용하여 10 mM 아세트산 암모늄 완충액: 아세트나이트릴 (35:65, v/v) 혼합용매를 유속 0.2 mL/min으로 통과시키면서 이트라코나졸을 분리하고, 유출액은 UV-VIS 검출기를 이용하여 254 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈장 중 이트라코나졸의 농도는 내부표준물질인 펠로디핀(felodipine)의 peak 면적에 대한 이트라코나졸의 peak 면적의 비로부터 구한 검량선을 바탕으로

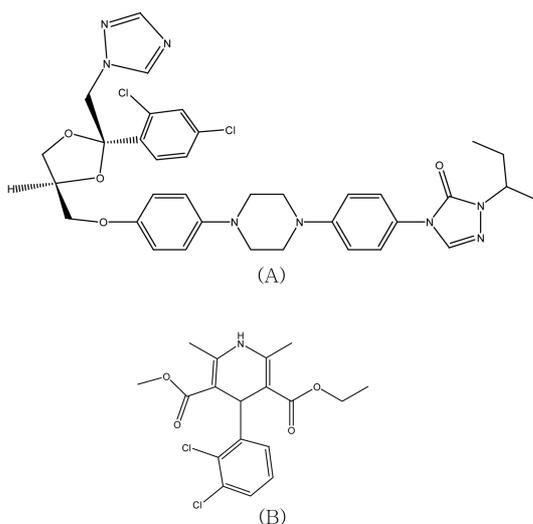


Fig. 1. Chemical structures of (A) itraconazole, (B) felodipine.

하여 분리된 펠로디핀과 이트라코나졸의 면적비를 구하여 정량하였다. 상기에서 얻어진 모든 데이터는 Breeze 3.0 software program을 이용하여 처리하였다.

2.2. 시약

이트라코나졸은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 표준품을 구입하였고, 내부표준물질로 사용한 펠로디핀은 한미약품공업주식회사로부터 공급받았다. 그 외의 시약들은 특급이나 HPLC용 등급을 사용하였다.

2.3. 이동상 및 추출 용매

이동상은 10 mM 아세트산 암모늄 완충액 : 아세트나이트릴 (35:65, v/v) 혼합용액을 사용하였으며, 디에틸아민을 전체 용액에 0.05% 첨가하였고 인산을 이용하여 pH를 7로 맞추었다. 추출 용매는 디에틸에테르를 사용하였다.

2.4. 표준액

이트라코나졸 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 1,000 µg/mL가 되도록 제조한 후 차광하여 4°C에서 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 공혈장으로 희석하여 혈장 중 이트라코나졸 농도가 각각 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 ng/mL가 되도록 표준혈장을 만들었다. 또한 내부 표준물질인 펠로디핀은 메탄올에 녹여 1,000 µg/mL가 되도록 한 후 탈이온수로 희석하여 50 µg/mL가 되도록 제조하여 4°C에서 보관시켰다.

2.5. 시료 전처리

30세 미만의 건강한 남자 12명에게 200 mg의 이트라코나졸을 240 mL 물과 함께 경구투약 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 36, 48 및 72 hr에서 채혈한 혈장시료 1 mL를 15 mL 시험관에 넣고 여기에 내부표준물질 20 µL와 1 M 수산화나트륨 100 µL를 가한 다음 탁상용 혼합기에서 1분간 혼합하였다. 이 용액에 디에틸에테르 6 mL를 넣어 왕복진탕기에서 30분 동안 진탕혼합하여 이트라코나졸과 내부표준물질인 펠로디핀을 추출하였다. 2000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 유기층을 취하여 깨끗한 시험관에 옮기고 40°C 질소 기류 하에 증발 건조시켰다. 여기에 증류수 : 아세트나이트릴(80:20, v/v) 용액 100 µL를 가하여 재용해한 뒤 13000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 위 용액을 70 µL를 취하여 HPLC에 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 2는 HPLC를 이용하여 혈장시료를 분석하였을 때 얻은 크로마토그램으로서 Fig. 2(A)는 blank 혈장시료, Fig. 2(B)는 같은 혈액에 내부표준물질과 이트라코나졸을 각각 50 µg/mL, 200 ng/mL로 spike 한 혈장시료, Fig. 2(C)는 이트라코나졸 200 mg을 경구투여한 뒤 2 시간 뒤에 채취한 혈장시료등을 각각 상기한 검체전처리 및 추출법을 이용하여 정제한 뒤 HPLC를 이용하여 얻은 크로마토그램이다. Fig. 2(B)의 내부표준물질인 펠로디핀 피크의 머무름 시간은 10.8분, 이트라코나졸 피크의 머무름 시간은 18.2분이었고, 각각의 표준편차는 6.1%, 3.4%로 나타났다(Fig. 2).

각기 다른 4가지 농도 (2, 20, 200 및 1,000 ng/mL)의 이트라코나졸의 표준혈장을 분석하였을 때 본 분석방법의 정밀성 C.V.%는 일내 정밀성이 2.03~9.67%, 일간 정밀성은 5.52~10.86%로 나타났고 정확성은 97.2~108.2%로 나타났으며(Table 1), 전처리를 통한 이트라코나졸과 펠로디핀의 회수율은 각각 77±5%, 83±3%로 나타났다.

표준혈장 시료로부터 구한 이트라코나졸의 검량선의 회귀식은 농도비(y)=0.00931×피크면적비(x)-0.00566 이고, 상관계수(R²)은 0.9991로, 2~1,000 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 3).

정량한계는 ICH guideline에 준하여 신호 대 잡음비(S/N 비)를 10으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 하여 2 ng/mL로 계산되었다.

이트라코나졸이 포함되어 있는 혈장 시료는 -20°C에서 4개월 동안 안정하였으며,¹⁴ 공혈장을 이용하여 제조한 표준용액의 경우 4°C 냉장상태에서 2달 동안은 안정하였다.

따라서 상기의 분석방법에 의한 이트라코나졸의 분석은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

12명의 건강한 남성 지원자에게 이트라코나졸 200 mg을 경구투여한 후 경시적으로 채혈하여 본 분석조건에 따라 분석한 혈장 중 평균 이트라코나졸의 농도-시간 곡선을 나타내었다. 본 분석조건에 의해서는 이트라코나졸 200 mg을 경구투여한 후 72시간까지 이트라코나졸의 혈장 중 농도를 측정할 수 있었다(Fig. 4).

혈장 중 이트라코나졸의 농도를 2 ng/mL까지 측정할 수 있는 정밀성과 정확성을 갖춘 비교적 간단한

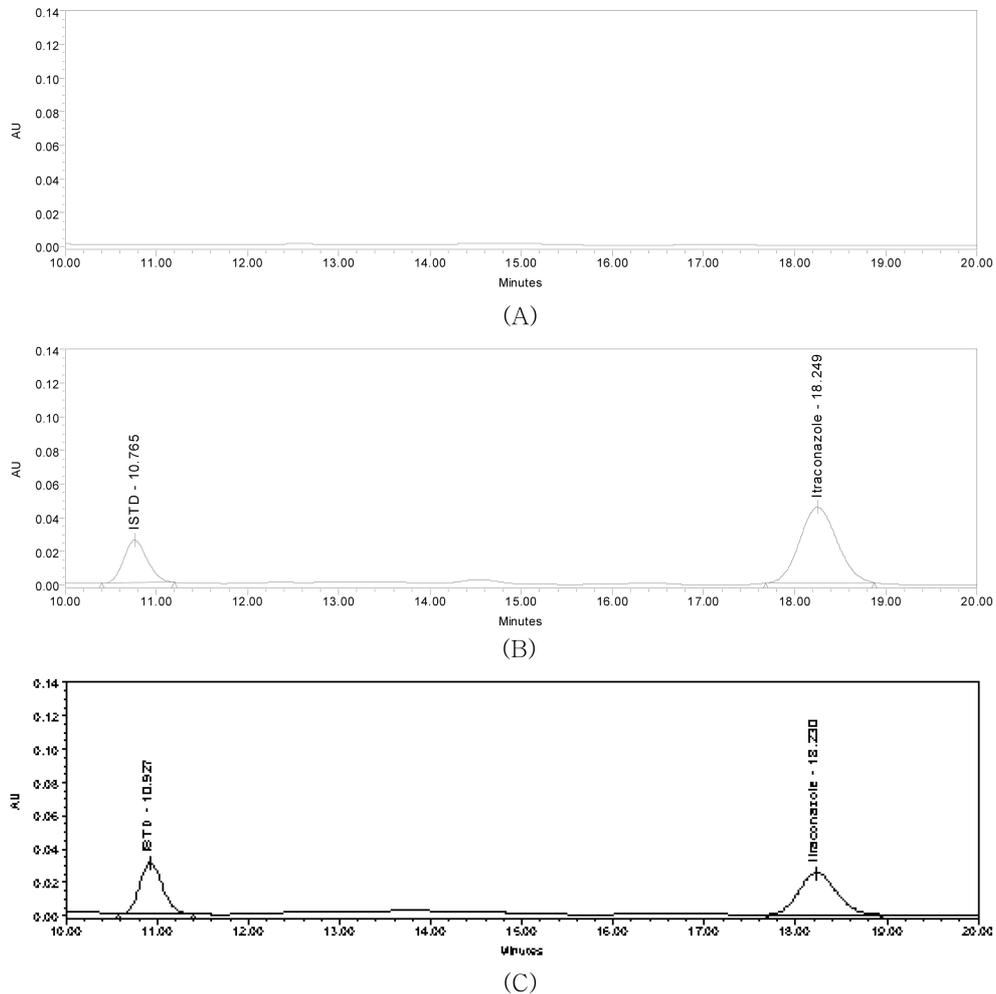


Fig. 2. Chromatograms of (A) blank human plasma, (B) blank human plasma spiked with itraconazole (200 ng/mL) and internal standard (IS, felodipine 50 µg/mL) and (C) plasma sample at 2 hr after oral administration of 200 mg itraconazole tablets.

Table 1. Precisions, accuracies of itraconazole of various concentrations in human plasma

Conc. (ng/mL)	Precision (%)		Accuracy	
	Interday C.V.	Intraday C.V.	Conc. Measured (mean ± S.D.) ng/mL	Relative Error (%)
2	10.86	9.67	1.95 ± 0.23	-2.8
20	7.11	2.39	20.38 ± 0.47	1.9
200	6.30	2.17	216.41 ± 4.69	8.2
1,000	5.52	2.03	999.27 ± 20.30	-0.1

분석법을 확립하였다. 정량한계를 낮춤으로써 이트라코나졸의 반감기인 22시간이상 최대 72시간까지 혈장 중 이트라코나졸의 농도를 측정할 수 있게 되어 생체

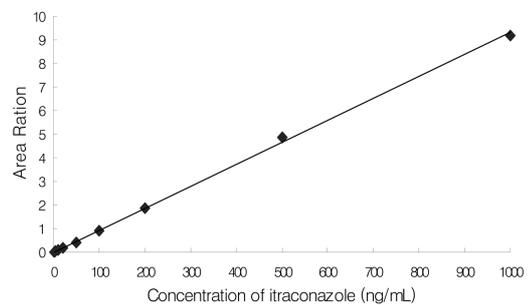


Fig. 3. Calibration curve of itraconazole peak ration.

내의 약물의 흡수율과 생체 이용률을 알 수 있게 되었다. 이와 같은 분석법은 혈장 중의 약물 정량 및 약

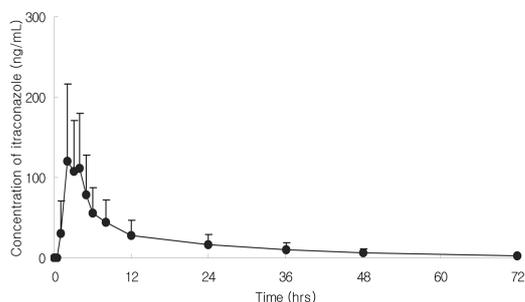


Fig. 4. Mean plasma concentration-time profile of itraconazole after oral administration of itraconazole (200 mg). Bars represent standard deviation of the mean (n=12).

물의 약동력학에 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. J. Heeres, L. J. J. Backx, and J. Van Cutsem, *J. Med. Chem.*, **27**, 894-900 (1984).
2. J. Van Cutsem, F. Van Gerven, M. A. Van de Ven, M. Boregers, and P. A. J. Janssen, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 527 (1984).
3. D. J. Sheehan, C. A. Hitchcock, and C. M. Sibley, Current and Emerging Azole Antifungal Agents, *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 40-79 (1999).
4. D. W. Warnock, Itraconazole and Fluconazole : New Drugs for Deep Fungal Infection, *J. Antimicrob. Chemother.* **24**, 275-277 (1989).
5. De Beule, Pharmacology, Clinical Experience and Future Development, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **6**, 175-181 (1996).
6. Van Peer, R. Woestenborghs, J. Heykants, R. Gasparini, and G. Gauwenbergh, The Effects of Food and Dose in the Oral Systemic Availability of Itraconazole in Healthy Subject, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **36**, 423-426 (1989).
7. B. M. Frey., and F. J. Frey, Clinical Pharmacokinetics of Prednisone and Prednisolone, *Clin. Pharmacokinet.*, **19**, 124-146 (1990).
8. G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, and J. R. Crison, Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.*, **12**, 413-420 (1995).
9. C. H. W. Koks, R. W. Sparidans, G. Lucassen, and K. M. L. Crommentuyn and J. H. Beijnen, *J. Chromatogr. B*, **767**, 103 (2002).
10. J. M. Poirier, M. Lebot, P. Descamps, M. Levy, and G. Cheymol, *Ther. Drug Monit.*, **16**, 596 (1994).
11. P. O. Gubbins, B. J. Gurley, and J. Bowman, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16**, 1005 (1998).
12. A. Carrier, J. Parent, *J. Chromatogr. B*, **745**, 413 (2000)
13. M. Yao, L. Chen, N. R. Srinivas, *J. Chromatogr. B*, **752**, 9 (2001)
14. V. Srivatsan, A. K. Dasgupta, Prashant Kale, Rama Raju Datla, Devangi Soni, Mahendra Patel, Rakesh Patel, and Chandrakant Mavadiya, *J. Chromatogr. A*, **1031**, 307 (2004).