

모노리틱 칼럼을 이용한 혈장 중 펜시클로버의 HPLC 신속분석법 개발 및 이를 이용한 생물학적동등성시험

김진희 · 박아연 · 정은하 · 이철우 · 이태호 · 염정록*

중앙대학교 약학대학

(2007. 7. 18. 접수, 2007. 7. 26. 승인)

Development of a rapid HPLC method for the determination of penciclovir in human plasma using a monolithic column and its application to a bioequivalence study

Jin Hee Kim, Ah Yeon Park, Eun Ha Jung, Cheol-Woo Lee,
Tae Ho Lee and Jeong-Rok Youm*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Korea

(Received July 18, 2007; Accepted July 26, 2007)

요 약: 본 연구에서는 건강한 성인 혈장 중의 펜시클로버를 모노리틱(monolithic) 칼럼을 이용한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)-형광검출법으로 신속하게 분석하는 방법을 개발하였다. 충전형 ODS 칼럼보다 빠른 유속에서 고분리능을 구현할 수 있는 모노리틱 칼럼을 사용하였고, 이동상에 이온쌍 시약(ion-pairing reagent)인 sodium dodecyl sulfate와 잔존 실라놀기(residual silanol group)를 차폐하는 triethylamine을 첨가하여, 용매 조성과 유량에 대한 기울기 용리(gradient elution)를 실시하였다. 그 결과, 펜시클로버와 내부표준물질로 사용한 간시클로버의 머무름시간을 4분 이내로 단축시킬 수 있었다. 확립된 방법으로 분석법 검증을 실시한 결과, 0.1~5 µg/mL의 농도 범위 내에서 검량선의 상관계수가 0.9994로 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 하루에 5번 반복 실험하여 구한 일내 정밀성과 정확성은 1.36~8.55%, 92.8~100.0%이었고, 5일간 반복 실험하여 구한 일간 정밀성은 0.93~5.62%이었으며, 정량한계는 0.1 µg/mL이었다. 건강한 성인 24명을 대상으로 한 판시클로버 제제의 생물학적동등성시험에 본 분석법을 적용하였으며, 생물학적동등성시험 판단기준에 따라 시험약이 대조약에 대하여 동등한 것으로 판명되었다.

Abstract: A simple and rapid HPLC method with fluorescence detection(FLD) for quantitation of penciclovir in human plasma using a monolithic column was developed and validated. Penciclovir and ganciclovir(internal standard, I.S.) were separated on a Chromolith column RP-18e (4.6×100 mm) with a mobile phase consisting of a mixture of (A) methanol/50 mM sodium phosphate buffer containing 200 mg/L sodium dodecyl sulfate (3/97, pH 2.5) and (B) methanol/50 mM sodium phosphate buffer containing 200 mg/L sodium dodecyl sulfate (50/50, pH 2.5) at a flow gradient of 1.6~4.0 mL/min. The retention times of penciclovir and internal standard were less than 4.0 min. Calibration curve was linear ($R^2=0.9994$) over a concentration range of 0.1~5 µg/mL.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-820-5601, 5674 Fax : +82-(0)2-3280-5596

E-mail: youmjr@cau.ac.kr

Intra-day precision, accuracy and inter-day precision were 1.36~8.55 %, 92.8~100.0 % and 0.93~5.62 %, respectively with a limit of quantitation at 0.1 µg/mL. The present HPLC-FLD method is sensitive, precise and accurate. The method described herein has been successfully used for the bioequivalence study of a famciclovir formulation product after oral administration to healthy Korean volunteers

Key words : Penciclovir, HPLC-Fluorescence Detection, Monolithic column, Bioequivalence study, Plasma

1. 서 론

펜시클로버(penciclovir, 2-amino-9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl]-3H-purin-6-one)는 prodrug인 팜시클로버(famciclovir)의 대사체로 nucleoside 유도체와 같은 화학구조(Fig. 1)를 가진다. 팜시클로버는 위장관 및 간에서 펜시클로버로 빠르게 대사된 후, *herpes simplex virus type I*(HSV-I), *type II*(HSV-II), *varicella-zoster virus*(VZV), *Epstein-Bar virus*(EBV)에 감염된 세포에서 바이러스의 thymidine kinase에 의해 monophosphate 형태로 인산화된다. 그 후 세포내 효소에 의해 펜시클로버 triphosphate로 전환되어 dGTP와 경쟁적으로 DNA에 삽입되어 *herpes virus*의 DNA 복제 및 합성을 선택적으로 억제한다. 따라서 펜시클로버는 단순포진(HSV) I, II형 및 수두(VZV)에 매우 효과적이다.¹⁻³

하지만 펜시클로버 자체로는 경구투여 하였을 경우에 매우 낮은 생체이용률을 보이므로,⁴ 이를 개선하기 위하여 펜시클로버의 6-deoxy 유도체를 diacetyl 에스테르화한 팜시클로버를 경구투여하여 치료제로 사용하고 있다.⁵ 건강한 성인에게 팜시클로버 250 mg을 1회 경구투여 하였을 때, 최고 혈중농도(C_{max})가 약 1.87 µg/mL, 최고 혈중농도 도달시간(T_{max})은 0.76 hr, 최종상 소실반감기는 약 3 hr이며, 펜시클로버의 90% 이상이 미변화체로 신장으로 배설되는 것으로 보고되어 있다.⁶

팜시클로버 제제의 약물동력학 연구⁷⁻¹⁰를 위한 생체 시료 중 펜시클로버의 분석에는 주로 고성능액체크로마토그래피(HPLC)¹¹에 자외선검출기(UVD)¹²⁻¹⁴와 형광검출기(FLD)¹⁵로 분석하는 방법들이 이용되었으며, capillary electrophoresis를 이용한 분석법¹⁶도 보고되었다. 자외선검출기를 이용한 고성능액체크로마토그래피의 경우, 정량한계가 0.2 µg/mL 수준이어서, 약동학적 연구를 수행하는데 그 감도가 충분하지 않은 단점을 가지고 있다. 한편 nucleoside 유사체들과 마찬가지로¹⁷ 펜시클로버도 형광성을 가지므로, Schenkel 등¹⁵은 형광검출기를 사용하여 aqueous humor에서 정량한계 0.05 µg/mL로 분석 감도를 향상시켰다. Capillary electrophoresis에 UVD를 이용한 문헌¹⁶에서는 선택성과 분리능, 분석속도 등이 향상되었으나, 여전히 낮은 감도를 극복하지 못하였다. 최근에는 LC-ESI-MS/MS 분석법을 이용하여 펜시클로버를 분석한 보고¹⁸도 있었다. 이 방법은 대상 성분에 대한 매우 높은 선택성과 고감도 및 빠른 분석시간, 전처리 용이성 등의 장점이 있지만, 분석 장비가 매우 고가이어서 아직까지는 범용으로 사용하기가 어렵다는 단점이 있다.

본 연구에서는 혈장 중 펜시클로버의 분석으로, 고가의 분석 장비를 갖춰야 하는 LC-MS/MS 분석법 대신, 보다 쉽게 적용할 수 있는 HPLC 분석법의 개선을 통하여 신속한 분석법을 확립하고자 하였다. 최근에 그 활용성이 증가하고 있는 모노리틱 칼럼¹⁹⁻²⁰을 사용하면, 보통의 역상 칼럼과 비교하여 매우 짧은 시

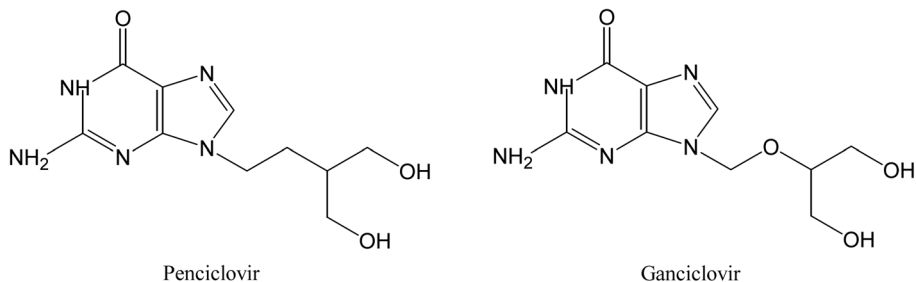


Fig. 1. Chemical structures of penciclovir and ganciclovir (internal standard).

간 안에 분석이 가능하다. 이는 다공성 막대 형태의 흡착제가 충분한 표면적을 가지고 있어 우수한 분리능을 나타내면서, 충전형의 칼럼과 달리 압력이 낮게 걸려 고속의 유량을 적용할 수 있기 때문이다. 따라서 혈장 중 펜시클로버의 신속 분석법에 모노리틱 칼럼을 적용하여 그 분석조건을 확립하였고, 분석법에 대한 검증(validation)도 실시하였다.

또한, 확립된 HPLC-FLD 신속분석법을 이용하여, 24명의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 팜시클로버 제제의 시험약인 “클로비어정 250 mg”이 대조약인 “팜비어정 250 mg”과 생체이용률에 있어서 통계학적으로 동등하다는 것을 입증하기 위한 생물학적동등성 시험을 실시하였다. 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성 시험 기준에 따라 임상시험을 수행하였으며, 대조약과 시험약 간의 생물학적동등성 평가를 위하여 혈장중 약물농도-시간 곡선으로부터 산출한 혈장중 약물농도-시간곡선하면적(AUC)과 최고 혈장중 농도(C_{max})를 로그변환한 후 분산 분석하여 비교하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

펜시클로버 표준품은 Calbiochem사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였으며, 내부표준물질로 사용한 간시클로버와 ion-pairing reagent로 사용한 sodium dodecyl sulfate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 시판품을 사용하였다. 잔존 실라놀기를 차폐하기 위해 이동상에 첨가하는 triethylamine²¹은 Junsei chemical사(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. 이동상 제조에 사용한 아세트니트릴, 메탄올, 제일인산나트륨은 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 HPLC급으로 구입하였고, 물은 Fisher Scientific사(Springfield, NJ, USA)의 HPLC급을 사용하였다. 시료 전처리에 사용한 아세트니트릴 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 사용하였다.

HPLC용 펌프는 Waters 600E pump(Waters, Milford, MA, USA)를, 시료주입을 위한 autosampler는 Hitachi L-2200(Hitachi, Tokyo, Japan) 자동주입기를, 칼럼 으로는 Hitachi L-2300을, 형광검출기로는 Jasco 821-FP(Jasco, Tokyo, Japan) 등을 사용하였다. HPLC 칼럼은 Chromolith column RP-18e(4.6×100 mm, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, 데이터 처리장치는 Autochro-2000(Ver. 1.0, Young Lin, Anyang, Korea)을 사용하였다.

Table 1. Gradient elution profile used for the separation of penciclovir in human plasma using a monolithic column

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A(%)	Mobile phase B(%)
0→4.5	1.6	100	0
4.5→8.5	4.0	30	70
8.5→10.0	4.0	100	0
10.0→10.5	1.6	100	0

2.2. HPLC 조건 최적화

건강한 성인 혈장 중 펜시클로버의 정량은 이미 보고된 HPLC 분석법을 참고¹⁵하여 최적의 조건을 확립한 후 수행하였다. 전처리된 혈장 시료는 다음의 조건에서 분석하였다. 분석 칼럼은 Chromolith column RP-18e(4.6×100 mm)를 사용하였으며, 칼럼 보호를 위해 stainless steel frit 조합형(0.5 μm)도 장착하였다. 이동상으로는 (A) 50 mM sodium phosphate buffer(pH 2.5, triethylamine 2 mL/L, sodium dodecyl sulfate 200 mg/L)/Methanol=98/2 용액과, (B) 50 mM sodium phosphate buffer(pH 2.5, triethylamine 2 mL/L, sodium dodecyl sulfate 200 mg/L)/Methanol=50/50 용액을 0.2 μm membrane filter로 여과하고, 초음파 세척기에서 가스 제거한 것을 사용하였으며, 이동상 조성 뿐만 아니라 유량도 변화시켜가며 기울기 용리하였다(Table 1). 분석 칼럼의 오븐 온도는 20°C로 일정하게 하였으며, 형광검출기에서 여기 파장은 254 nm로, 방출 파장은 380 nm로 설정하여 분석하였다.

2.3. 표준검량선 작성 및 분석법 검증

펜시클로버 표준품을 물에 녹여 1 mg/mL를 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈장으로 희석하여 펜시클로버의 혈장 중 농도가 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 5 μg/mL 농도가 되도록 표준혈장을 만들었다. 각각의 표준혈장 0.5 mL를 시험관에 넣고, 여기에 내부표준물질인 간시클로버 용액(10 μg/mL 농도의 수용액) 50 μL를 가하고 탁상용 혼합기에서 10초간 혼합하였다. 여기에 아세트니트릴 1 mL를 가하여 탁상용 혼합기로 섞어 제단백한 후, 원심분리하여 상정액만 취하였다. 상정액을 취하여 깨끗한 새 시험관에 옮기고 40°C에서 질소기류로 완전히 건조시킨 후, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 2.5, triethylamine 2 mL/L, sodium dodecyl sulfate 200 mg/L)/Methanol = 98/2(이동상 A)의 용액 100 μL로 재분

산하였다. 이 중 10 μ L를 취하여 HPLC-FLD에 주입하여, 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 펜시클로버의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다. 하루에 실험을 5회 반복 시행하여 일내 재현성과 정확성을 구하였고, 5일간 실험을 반복 수행하여 일간 재현성을 구하였다.

2.4. 피험자 선정 및 관리

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성시험 기준에 근거하여 만 19~55세의 건강한 성인 남성으로서, 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액 질환의 병력이 없고, 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 자를 모집 공고하여 지원자 36명을 모집하였다. 지원자를 대상으로 시험의 목적, 시험대상 성분에 대한 약리작용 및 이상 약물반응 가능성, 시험내용, 주의사항 및 보상내용 등을 설명하였고, 이들을 대상으로 하나로 의료재단 하나로의원에서 건강진단을 실시하였다. 36명의 지원자 중 피험자 선정기준 및 제외기준에 따라 선정기준에 모두 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 건강한 사람으로 판정된 24인을 선정하였으며, 자발적인 의사결정에 따라 시험참가동의서를 받은 후 생물학적 동등성시험을 실시하였다.

모든 피험자에게는 정해진 투약일 일주일 전부터 시험기간까지 항생제 및 진통제 등을 포함한 일체의 약물 복용을 금지하였다. 또한 시험기간 중에는 연구자의 지시에 따라 운동, 식사, 흡연, 음주 및 xanthine 계 음료 등을 제한 관리하도록 하였다. 시험 전날 오후 7시경에 피험자 전원을 소집하여 동일한 저녁식사를 제공한 후, 식사종료 시점인 오후 8시부터 시험 당일 투약 후 4시간까지는 금식시켰다. 피험자에게 시험내용과 주의사항을 다시 한 번 주지시키고, 오후 10시경에 취침하도록 하였으며, 시험 당일 오전 7시경에 병원에 도착하여 시험 준비에 착수하였다.

2.5. 약물 투약 및 혈액 채취

약물 투약, 채혈 및 피험자 관리는 하나로의원의 일반인과 격리된 공간에서 시험담당자인 전문의의 감독하에 실시하였다. 약물 투약은 2시기 2제품의 라틴 방격법에 따른 교차시험법을 택하였으므로, 24명의 피험자를 무작위로 군당 12명으로 나누었다. 제 1기 1군에는 대조약인 “팜비어정 250 mg”을, 제 2군에는 시험약으로 “클로비어정 250 mg”을 투약하였으며, 제 2기 때에는 그 반대로 투약하였다. 모든 피험자들의 상완

정맥부위에 heparin-locked I.V. catheter를 설치하고 공혈액 10 mL를 채혈한 다음, 2분 간격으로 대조약 또는 시험약 각각 1정씩을 물 240 mL와 함께 투약하였다. 채혈은 투약직전, 투약 후 15분, 30분, 45분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간의 총 13 시점에서 실시하였다. 채혈 시 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 1 mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 8 mL의 혈액을 heparinized vacutainer에 채취하였다. 채혈 후마다 I.V. catheter안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리 식염수 0.5 mL를 주입하였다. 채혈된 혈액의 응고를 방지하고 혈구의 파괴를 막기 위해, vacutainer를 천천히 흔들어 섞고, 잠시 방치한 다음 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 혈장만을 취하여 polypropylene 시험관에 옮겨 담고 분석시까지 영하 70°C에서 보관하였다.

2.6. 혈장 시료의 처리 및 농도 계산

피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 70°C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 1분간 진탕한 다음, 이 중 0.5 mL를 취하여 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질 용액 50 μ L를 가한 후, 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리하였다. 전처리한 최종 시료를 HPLC에 주입하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 펜시클로버의 피크 면적비를 구하고, 미리 작성한 검량선에 대입하여 혈장 시료 중 펜시클로버의 농도를 구하였다.

2.7. 생체이용률 파라미터

생체이용률 파라미터들로서 AUC_t , C_{max} , T_{max} 는 HPLC 분석방법에 의해서 얻은 혈장중약물농도-시간곡선으로부터 구하였다. 최고 혈장중 농도(C_{max})와 최고 혈장중 농도 도달시간(T_{max})은 실측치로부터 직접 구하였고, 투약 후 마지막 채혈 시간인 10시간까지의 혈장중 약물농도-시간곡선 하면적(AUC_t)은 사다리꼴 공식에 의하여 산출하였다. T_{max} 를 제외한 AUC_t 와 C_{max} 의 로그변환치를 생물학적 동등성시험 통계 프로그램인 K-BE Test로 유의수준 $\alpha=0.05$ 에서 분산 분석을 실시하였고, 90% 신뢰한계를 구하였다. 대조약인 “팜비어정 250 mg”에 대한 시험약 “클로비어정 250 mg”의 생물학적동등성 여부는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성시험 기준에 따랐다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 혈장 중 펜시클로버의 분석법 개발 및 검증

펜시클로버는 아시클로버(acyclovir)나 간시클로버와 같이 nucleoside 유도체로서 매우 극성이 커서 수용액 외에 대부분의 유기용매에 녹지 않는다.²² 따라서 C18 또는 C8과 같은 역상 칼럼을 사용할 경우에 고정상과 매우 약한 친화력을 보이며, 이동상으로 95 % 이상의 수용성 완충용액을 사용하여야 한다. 이를 해결하기 위하여 100 % 수용액에서도 분리능과 재현성이 확보되는 칼럼을 사용하거나, 이온쌍 시약을 이동상에 첨가하여 고정상에 머무름을 증가시키는 방법¹⁵ 등이 연구되어 왔다. 하지만 이러한 경우 펜시클로버의 머무름 시간이 길어져서 약물동력학 연구나 생물학적동등성시험과 같이 시료수가 수백~수천개에 해당하는 연구에는 응용하기가 어려웠다.

모노리틱 칼럼은 일반 충전형 역상 칼럼보다 고가인 단점이 있으나, 고정상 구조의 특성으로 인하여 칼럼 압력이 매우 낮으며, 분리능에 큰 변화 없이 이동상의 유량을 고속으로 흘려주는 것이 가능하여, 분석시간을 획기적으로 단축할 수 있다. 이와 같은 장점을 이용하여 최근에 Tzanavaras 등¹⁹이 모노리틱 칼럼을 사용하여 아시클로버와 그 불순물을 고효율로 분석하는 방법을 보고하였으며, Kazoka²⁰는 purine과 pyrimidine 유도체들을 Si-모노리틱 칼럼으로 분석하여 보고하였다. 본 연구에서는 이온쌍 시약과 triethylamine(잔존 실라놀기를 차폐하기 위함)을 이동상에 첨가하여 펜시클로버와 혈장 중 내인성 물질과의 분리능을 더 향상시켰고, 용매 조성과 유량에 대한 기울기 용리를 실시하여 펜시클로버의 머무름시간을 4분 이내로 단축시켰다.

건강한 피험자의 공혈장과 공혈장에 펜시클로버와 내부표준물질을 함께 가한 것 및 펜시클로버 제제를 투여한 후 4 시간 후에 채취한 혈장 시료를 본 시험법에 따라 전처리한 후, HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 펜시클로버 피크의 머무름 시간은 약 3.8분, 내부표준물질인 간시클로버 피크의 머무름 시간은 2.1분이었으며, 혈장 중의 어떠한 간섭물질들로부터 영향을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

피험자의 공혈장 시료, 공혈장에 내부표준물질만 가한 시료 및 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 5 µg/mL의 검량선용 표준혈장 시료를 각각 전처리한 후 HPLC로 분석하였을 때, 혈장 시료로부터 구한 펜시클로버 검량선의 계

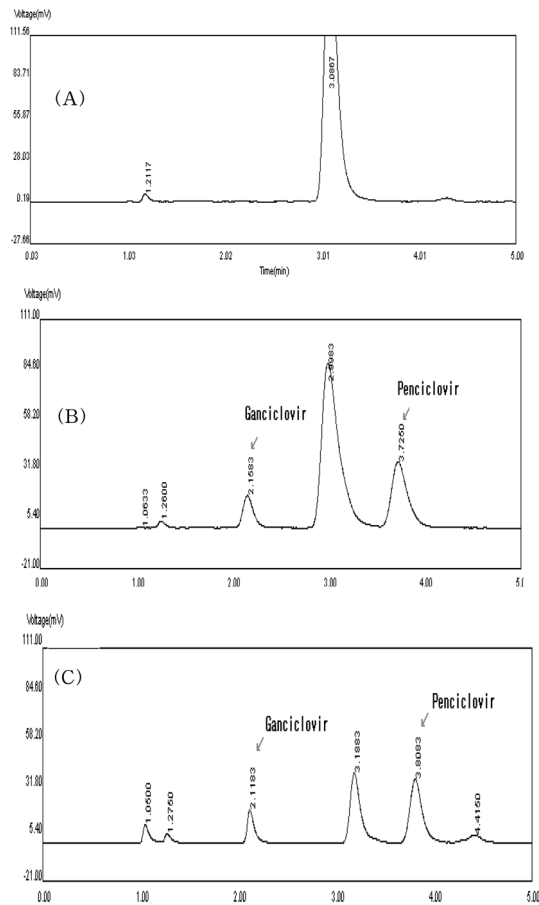


Fig. 2. Chromatograms of (A) blank plasma; (B) blank plasma spiked with penciclovir (1 µg/mL) and internal standard (ganciclovir); (C) plasma sample from a healthy volunteer at 4 hr after oral administration of 250 mg famciclovir tablet.

산식은 $y(\text{펜시클로버/내부표준물질 피크 면적의 비율}) = 3.4633x(\text{펜시클로버 농도, } \mu\text{g/mL}) + 0.0767$ ($R^2 = 0.9994$)로 0.1~5 µg/mL의 범위에서 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 3).

각기 다른 5 가지 농도(0.1, 0.5, 1, 2, 5 µg/mL)의 펜시클로버 표준혈장을 분석하였을 때, 본 분석법의 정밀성(C.V., %)은 일내 정밀성이 1.36~8.55%, 일간 정밀성은 0.93~5.62 % 범위로 나타났고, 정확성은 92.8~100.0 %로 나타났었다(Table 2). 혈장 중 펜시클로버 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하고 정밀성이 20 % 이하이고, 정확성이 80~120 %인 조건을 만족하는 0.1 µg/mL로 정하였다. 이로부터 혈장 중 펜시클로버에 대한 본 연구의 HPLC 분석법은

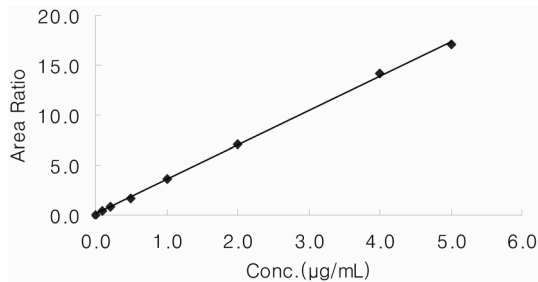


Fig. 3. Calibration curve of penciclovir in human plasma($y = 3.4633x + 0.0767$, $R^2 = 0.9994$).

Table 2. Precision and accuracy for the determination of penciclovir in human plasma by the HPLC-FLD method

Concentration (g/mL)	Precision C.V. ^a (%)		Accuracy (%)
	Intra-Day (n=5)	Inter-Day (n=5)	Intra-Day (n=5)
0.1	8.55	5.62	92.8
0.5	1.50	0.93	99.2
1	3.35	3.08	100.0
2	1.36	1.45	97.7
5	1.60	2.47	99.0

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

생물학적 동등성 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 확인하였다.

3.2. 팜시클로버 제제의 생체이용률 평가

건강한 성인 24명에게 시험약과 대조약으로 “클로비어정 250 mg”과 “팜비어정 250 mg”을 각각 1정씩 교차 경구투여한 후, 일정 시간마다 채혈하고 분석하여 얻은 전체 피험자에 대한 팜시클로버 평균 혈장중 약물농도-시간곡선을 Fig. 4에 나타내었다. 각 피험자의 AUC_t 값은 약물 투여 후 10시간까지의 각 피험자의 혈장중 약물농도-시간곡선들로부터 사다리꼴 공식에 의해 구하였다. C_{max} 는 각 피험자의 혈장중 약물농도-시간곡선으로부터 가장 높은 혈장중 농도를 읽은 값을 사용하였으며, T_{max} 는 각 피험자의 혈장중 약물농도-시간곡선으로부터 최고 혈장중 약물농도에 도달하는 시간을 읽은 값을 사용하였다.

대조약인 “팜비어정 250 mg”의 평균 혈장중 약물농도-시간곡선 하면적 $AUC_t(\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL})$ 는 2.88 ± 0.58 , 최고 혈장중 약물농도 $C_{max}(\mu\text{g}/\text{mL})$ 는 1.50 ± 0.33 , 최고 혈장중 농도 도달시간 $T_{max}(\text{hr})$ 는 0.71 ± 0.26 이었다. 한편 시험약인 “클로비어정 250 mg”의 평균 혈장중 약물농도-시간곡선 하면적 $AUC_t(\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL})$ 는 3.11 ± 0.73 , 최고 혈장중 약물농도 $C_{max}(\mu\text{g}/\text{mL})$ 는 1.60 ± 0.33 , 최고 혈장중 농도 도달시간 $T_{max}(\text{hr})$ 는 0.68 ± 0.33 으로(Table 3), 대조약과 시험약의 생체이용률 파라미터의 평균치 차이가 대조약의 $\pm 20\%$ 이내이어야 한다는 전제 조건을 만족하였다.

본 연구에서는 식품의약품안전청의 규정에 따라 대조약과 시험약 간의 생물학적 동등성 평가를 위한 비

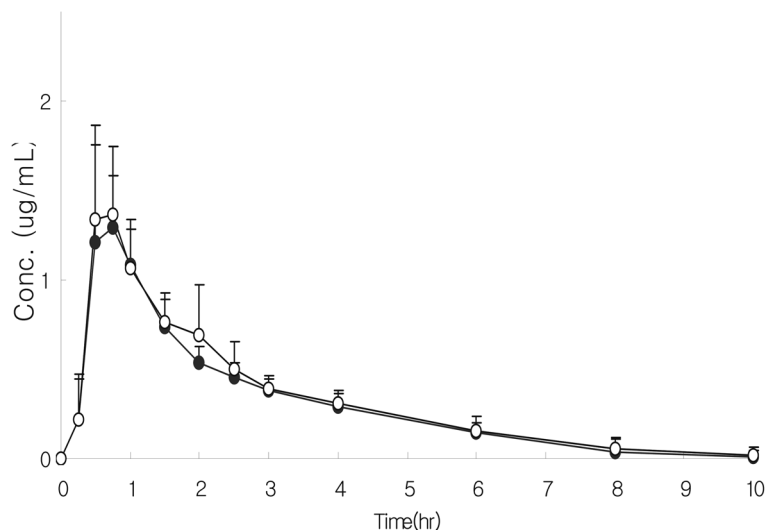


Fig. 4. Mean plasma concentration-time curves of penciclovir in 24 human volunteers following single oral administration of reference preparation(●) and test preparation(○) at the dose of famciclovir 250 mg (mean \pm S.D.).

Table 3. Bioequivalence parameters of penciclovir in 24 human volunteers after oral administration of reference tablet and test tablet at the famciclovir dose of 250 mg

Parameter	Reference (mean±S.D.)	Test (mean±S.D.)	90% confidence interval
AUC _t (µg·hr/mL)	2.88±0.58	3.11±0.73	1.0007~1.1426
C _{max} (µg/mL)	1.50±0.33	1.60±0.33	1.0007~1.1374
T _{max} (hr)	0.71±0.26	0.68±0.33	

교향목으로 혈장중 약물농도-시간곡선으로부터 산출한 혈장중 약물농도-시간곡선 하면적(AUC_t), 최고 혈장중 농도(C_{max})를 확인하였으며, 최고 혈장중 약물농도 도달시간(T_{max})은 단지 참고값으로만 사용하였다. 또한 피험자 총 24명의 약물농도 데이터 처리는 K-BE Test 2002(ver. 1.2.1) 프로그램으로 통계처리 하였으며, T_{max}를 제외한 대조약과 시험약의 비교평가항목의 실측치를 로그변환하여 α(유의수준) = 0.05에서 분산 분석을 실시하였다. 생물학적 동등성 평가 항목인 AUC_t 및 C_{max}에 대한 K-BE Test 프로그램 통계처리 결과, 교차 시험 설계가 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었으며, 로그변환한 AUC_t 평균치 차의 90% 신뢰구간이 log 1.0007~log 1.1426으로서 log 0.8~log 1.25이내에 들어야 한다는 판정기준을 만족하였으며, 로그변환한 C_{max} 평균치 차의 90% 신뢰구간 역시 log 1.0007~log 1.1374로서 동등성 판정기준을 만족시켰다 (Table 3). 따라서 두 제제는 평가항목 AUC_t 및 C_{max}에 있어서 생물학적으로 동등함을 통계적으로 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 최근 그 활용도가 증가하고 있는 모노리틱 칼럼을 이용하여 건강한 성인 혈장 중의 펜시클로버를 신속하게 분석하는 방법을 제시하였다. 매우 극성인 펜시클로버의 화학적 특성으로 인하여, 이온쌍시약을 이동상에 첨가하여 고정상에 대한 머무름 시간을 증가시키고, 분리능을 개선하였으며, 염기성 약물에 대한 잔존 실라놀기의 꼬리끌림 현상을 제거하고자 triethylamine을 이동상에 첨가하여 잔존 실라놀기를 차폐시켰다. 이동상의 유속에 대한 모노리틱 칼럼의 낮은 압력을 이용하여, 용매조성에 대한 기울기 용리 뿐만 아니라, 유량도 변화시켜가며 최적의 분석 방법을 결정하였다.

개발한 펜시클로버의 신속 분석법으로 분석법 검증(validation)을 실시한 결과, 표준혈장 시료로부터 구한

검량선은 0.1~5 µg/mL 범위에서 상관계수 0.9994로 매우 양호한 직선성을 보였다. 일내 정밀성이 1.36~8.55%, 일간 정밀성은 0.93~5.62% 이었으며, 정확성은 92.8~100.0%, 최저정량한계는 0.1 µg/mL로 생체 분석에 이용할 수 있는 충분한 정밀성과 정확성, 감도를 갖고 있음을 확인하였다.

본 분석법을 팜시클로버 제제에 대한 생물학적 동등성 시험에 적용하였으며, 건강한 성인 24명을 대상으로 혈중 약물농도를 분석하여 통계 처리한 결과, 시험약인 “클로비어정 250 mg”이 대조약인 “팜비어정 250 mg”에 대하여 생물학적 동등성 시험 판단기준인 AUC_t 및 C_{max}에 있어서 모두 동등한 것으로 판명되었다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원으로 중앙대학교 약학대학 약품분석화학교실에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. M. R. Boyd, T. H. Bacon, D. Sutton and M. Cole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1238-1242 (1987).
2. M. R. Boyd, T. H. Bacon and D. Sutton, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 358-363 (1988).
3. T. H. Bacon and M. R. Boyd, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1599-1602 (1995).
4. R. A. V. Hodge, D. Sutton, M. R. Boyd and M. Cole, *Antiviral Res.*, **9**, 146 (1988).
5. R. A. V. Hodge, D. Sutton, M. R. Boyd, M. R. Harnden and R. L. Jarvest, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**(10), 1765-1773 (1989).
6. K. S. Gill and M. J. Wood, *Clin. Pharmacokinet.*, **31**(1), 1-8(1996).
7. C. W. Filer, G. D. Allen, T. A. Brown, S. E. Fowles, F.

- J. Hollis, E. E. Mort, W. T. Prince and J. V. Ramji, *Xenobiotica*, **24**(4), 357-368 (1994).
8. C. W. Filer, J. V. Ramji, G. D. Allen, T. A. Brown, S. E. Fowles, F. J. Hollis and E. E. Mort, *Xenobiotica*, **25**(5), 477-490 (1995).
9. M. A. Pue, S. K. Pratt, A. J. Fairless, S. E. Fowles, J. Laroche, P. Georgiou and W. T. Prince, *J. Antimicrob. Chemother.*, **33**(1), 119-127 (1994).
10. S. C. Boike, M. A. Pue, M. I. Freed, P. R. Audet, A. Fairless, B. E. Ilson, N. Zariffa and D. K. Jorkasky, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **55**(4), 418-426 (1994).
11. A. Loregian, R. Gatti, G. Palu and E. F. De Palo, *J. Chromatogr. B*, **764**, 289-311 (2001).
12. J. R. McMeekin, S. E. Fowles, C. F. Winton and D. M. Pierce, *Anal. Proc.*, **29**, 178-180 (1992).
13. S. E. Fowles and D. M. Pierce, *Analyst*, **114**(11), 1373-1375 (1989).
14. H. A. Kang, H. Y. Cho, I. J. Oh, M. H. Lee and Y. B. Lee, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**(4), 295-301 (2005).
15. F. Schenkel, S. Rudaz, Y. Daali, M. K. Oestreich, J. L. Veuthey and P. Dayer, *J. Chromatogr. B*, **826**, 1-7(2005).
16. L. C. Hsu, D. J. C. Constable, D. R. Orvos and R. E. Hannah, *J. Chromatogr. B*, **669**, 85-92 (1995).
17. K. K. Phe and K. H. Yuen, *J. Chromatogr. B*, **693**, 241-244(1997).
18. H. W. Lee, J. H. Seo and K. T. Lee, *J. Chromatogr. B*, **852**, 382-388 (2007).
19. P. D. Tzanavaras and D. G. Themelis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1526-1530 (2007).
20. H. Kazoka, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 15-21 (2007).
21. M. J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch and A. Berthod, *J. Chromatogr. A*, **1119**, 202-208(2006).
22. G. Bahrami, S. Mirzaeei and A. Kiani, *J. Chromatogr. B*, **816**, 327-331 (2005).