

인체혈장 중 에탐부톨의 HPLC 분석법의 검증 및 단일용량 투여에 의한 약물동태 연구

곽혜선 · 박경호* · 최준식** · 송진아 · 성민경 · 장정옥 · 이화정[†]

이화여자대학교 약학대학, *서울대학병원 약제부, **조선대학교 약학대학
(2005년 2월 21일 접수 · 2005년 3월 18일 승인)

Determination of Ethambutol in Human Plasma by a Validated HPLC Method and Its Application to Single-dose Pharmacokinetics

Hye-Sun Gwak, Kyung-Ho Park*, Jun-Shik Choi**, Gin-A Song,
Min-Kyung Sung, Jung-Ok Jang and Hwa-Jeong Lee[†]

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

*Department of Pharmacy Administration, Seoul National University Hospital, Seoul 100-744, Korea

**College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-750, Korea

(Received February 21, 2005 · Accepted March 18, 2005)

ABSTRACT – An HPLC method was employed for the determination of ethambutol in human plasma. After addition of internal standard (IS, octylamine, 2 µg/mL) and alkalization of the plasma with 5 M sodium hydroxide, the drug and IS were extracted into the mixture of chloroform and diethyl ether (40:60, v/v). Following a 15-min vortex-mixing and a 10-min centrifugation, the organic phase was spiked with 100 µL of phenylethylisocyanate (2000 µg/mL) for chemical derivatization, mixed for 5 min and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was reconstituted with 100 µL of mobile phase and 20 µL was injected into C18 column with a mobile phase consisting of methanol:water (70:30, v/v). The samples were detected utilizing an ultraviolet detector at 200 nm. The method was specific and validated with a limit of 0.15 µg/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 demonstrated by analysis of human plasma after oral administration of a single 1200-mg dose to 20 healthy subjects. From the plasma ethambutol concentration vs. time curves, the mean AUC was 9.61 ± 1.64 µg · hr/mL and C_{max} of 2.68 µg/mL reached 2.73 hr after administration. The mean biological half-life of ethambutol was 3.46 ± 1.21 hr. Based on the results, this simple and validated assay could readily be used in any pharmacokinetic studies using humans.

Key words – Ethambutol, HPLC, Validation, Pharmacokinetics

염산에탐부톨[D-(R,R)-N,N'-ethylenebis(2-aminobutan-1-ol) dihydrochloride]은 결핵균을 포함한 모든 항산성 Mycobacterium속에 속하는 균들에 유효한 경구 항생제이다.^{1,2)} 염산에탐부톨은 투여 후 분열하는 결핵균 세포 내로 신속히 투과하여 세균의 세포벽 생성에 관여하는 arabinosyl transferase를 억제함으로써 살균작용을 나타낸다.¹⁾ 용법, 용량으로는 보통 성인에게 염산에탐부톨 제제로서 상용량이 1일 15 mg/kg이며 경우에 따라서는 처음 60일 동안에는 25 mg/kg를 사용하고 그 후부터는 15 mg/kg로 조절할 수도 있다.³⁾

경구투여 시 염산에탐부톨은 위장관에서 매우 잘 흡수되어 그 생체이용률이 약 80%를 나타내고 최고혈중농도는 경구투여 후 2-4시간 내에 나타나며 배설반감기는 약 3-4

시간으로 간에서 주로 약 15%정도 대사되고 약 10-40%가 혈장단백과 결합한다.¹⁾

에탐부톨의 분석에 관해서는 gas chromatography(GC),^{4,7)} GC-mass spectrometry,⁸⁾ 자외부^{9,10)}나 형광¹¹⁾을 사용한 HPLC 법, LC-tandem¹²⁾ 등을 이용한 여러 연구논문이 발표된 바 있다. 그러나 이러한 방법들은 간단치 않거나 감도가 떨어지는 문제, 경비 및 시간이 많이 소요되는 각각의 문제점들을 지니고 있다.

국내에서는 인체 혈장 시료를 사용한 분석법 및 한국인을 대상으로 한 에탐부톨의 생체이용률 시험 등에 관한 보고가 없는 실정이다. 본 연구에서는 phenylethylisocyanate (PEIC)를 사용하여 에탐부톨의 유도체를 만든 후 254 nm에서 분석한 Gamberini and Ferioli¹³⁾의 방법과 이 방법을 보완하여 감도를 향상시킨 Chenevier 등¹⁰⁾의 방법을 일부 수정하여 분석법을 개발하였다. 또한 이 방법을 사용하여 20인의

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3277-3409, E-mail : hwalee@ewha.ac.kr

건강한 한국인을 대상으로 에탐부톨 시판제제인 유한양행의 마이암부톨® 정(염산에탐부톨 400 mg) 3정을 경구 투여하여 생체이용률에 따른 약물동태학적 파라미터 등을 구하여 생체이용률 및 생물학적 동등성 시험을 위한 지침을 마련하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

본 연구에 사용된 염산에탐부톨 표준품과 내부표준물질인 옥틸아민은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고 유도체 시약인 PEIC와 HPLC용 메탄올(Merk, Darmstadt, 독일), 수산화나트륨, 클로로포름, 디에칠에텔(Junsei, Tokyo, 일본) 등이 사용되었다. 생체이용률 시험에 사용된 시험약은 유한양행의 마이암부톨® 정(염산에탐부톨 400 mg)이 사용되었다. HPLC용 기기로서 펌프(SLC-100 Intelligent Pump, Samsung, 한국), 자외선 검출기(LC-90, Perkin-Elmer, 미국) 및 Integrator(Varian Model-4290, Varian Incorp., 미국) 등이 사용되었다. 칼럼으로는 Radial Pak insert (C18, Waters, 미국)가 장착된 Hypersil C18 칼럼(3 µm, 4.6 × 150 mm, Thermo, 미국)을 사용하였다.

분석조건

전처리된 혈장시료는 HPLC를 이용하여 정량하였다. 이동상으로는 메탄올:물 혼합액(70:30, v/v)을 사용하여 1.0 mL/min의 속도로 유출하고 파장 200 nm에서 검출하였다.

피험자 선정 및 약물투약

생물학적동등성시험기준¹⁴⁾ 제10조(피험자의 선정) 및 제11조(피험자의 제외기준)에 따라 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 자로서 전문의사의 건강진단을 실시하여 건강한 사람으로 판정된 20명을 피험자로 선정하였다. 본 시험의 피험자로 최종 선정된 사람은 평균체중 70.2 kg, 평균연령 26.6세의 건강한 남성 지원자 20명이었다. 본 시험에 참여하는 지원자에게 생체이용률시험 설명회를 실시하여 본 시험의 목적, 방법, 이상약물반응 발생가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 피험자의 자의의사에 의한 시험참가 동의를 문서로 받았다.

본 실험에 앞서 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 다음 날 오후 1시 20분까지 금식시켰다. 피험자에 대한 투약은 오전

9시부터 대조약 3정을 물 240 mL와 함께 투약하였다. 피험자간 복약시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 2분 간격으로 하였다.

투여 시 피험자들의 상완 정맥 부위에 heparin-locked(50 unit/mL) catheter를 설치하고 blank 혈액으로 각각 7 mL씩을 채혈하였다. 실수로 인한 채혈시간의 변동을 사전에 방지하기 위하여 채혈자에게 채혈시간표를 나누어 주고, 피험자들에게는 각자의 채혈시간표를 확인하도록 하였다. 채혈 및 관리인원으로는 시험담당자인 전문의 1인, 채혈관리 2인, 채혈보조인원 3인 및 시험책임자로 총 7인을 참가시켰다.

식사에 의한 영향을 배제하기 위하여 투약 전 12시간 이상 절식한 상태에서 투약 후 4시간까지는 금식상태를 유지시켰다. 투약 후 4시간 째와 8시간 째 채혈을 마친 후 각각 점심 및 저녁식사를 제공하였고 저녁 9시부터 마지막 채혈을 하였다. 시험 전 과정을 통하여 피험자 개개인의 상태를 관찰하여 증례기록서에 기록하였으며, 채혈이 끝난 후에는 담당의사에 의해 혈압, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하였다.

채혈

채혈은 약물의 혈중소실 반감기^{15,16)}를 토대로 반감기의 3배 이상인 12시간 동안 실시하였고, 채혈 회수는 약물 투여 직전과 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8 및 12시간의 총 12시점에서 실시하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 7 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 15분간 원심분리한 후 혈장을 취하여 혈장분리관에 옮겨 담고 분석 시까지 -70°C에서 보존하였다.

검량선 작성 및 혈장 중 농도 측정

염산에탐부톨 표준품을 2% 트리에칠아민을 함유하는 아세토니트릴에 녹여 1000 µg/mL로 하여 이 액을 표준액으로 하여 냉장 보관하였다. 이 표준액을 아세토니트릴로 적절히 희석하고 냉동 보관하였던 공혈장에 넣어 에탐부톨의 혈장 중 농도가 0.15, 0.37, 0.74, 2.21, 3.68 및 7.37 µg/mL 농도가 되도록 표준혈장시료를 만들었다. 각각의 표준혈장 0.5 mL에 내부표준용액(옥틸아민 아세토니트릴용액 20 µg/mL) 50 µL 및 5 M 수산화나트륨 100 µL를 넣어 섞고 클로로포름:디에칠에텔(40:60, v/v) 7 mL를 넣어 15분간 추출한 다음 3000 rpm으로 10분간 원심분리시켰다. 유층 5 mL

을 취하여 원심관에 옮기고 PEIC(아세트니트릴 용액, 2000 µg/mL) 100 µL를 넣어 5분간 볼텍스 한 후 혼합액을 질소 기류 하에 45°C에서 증발건고하였다. 증발 후 잔류물에 이동상 100 µL를 넣어 5분간 혼합하여 녹인 후 그 용액 20 µL를 취하여 HPLC에 주입하여 얻은 내부표준물질의 피크면적에 대한 에탐부톨의 피크면적비를 가지고 검량선을 작성하였다. 또한 하루에 시험을 5회 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

혈장시료의 분석은 먼저 피험자로부터 각 시간 별로 채취하여 냉동보관했던 각 시료혈장 0.5 mL를 위와 같이 전처리하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 에탐부톨의 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 에탐부톨의 농도를 구하였다.

약물동태학 및 통계분석

마이암부톨® 정(염산에탐부톨 400 mg)을 각각 3정씩 20명의 지원자에게 경구 투여하여 얻은 혈장 중 약물농도-시간 곡선으로부터 최고 혈장 중 농도(C_{max})와 최고 혈장 중 농도 도달시간(T_{max}), 혈장 중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC), 소실속도 정수(k_e) 및 소실반감기(t_{1/2})는 K-BE test를 사용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

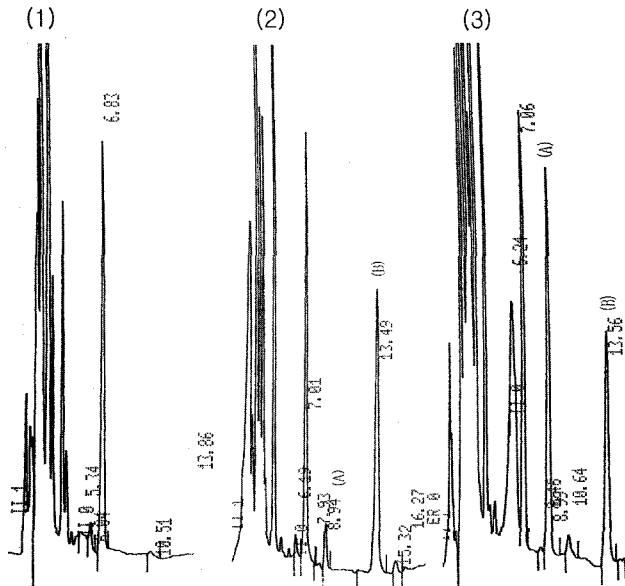


Figure 1—Chromatograms of (1) blank human plasma, (2) human plasma spiked with ethambutol dihydrochloride (0.5 µg/mL) and internal standard (IS, octylamine 2 µg/mL), (3) human plasma obtained from a volunteer at 1.5 hr after oral administration of 1200 mg ethambutol dihydrochloride tablet (A: ethambutol, B: IS).

결과 및 고찰

혈장 중 에탐부톨 정량

Figure 1은 혈장 중 에탐부톨 분석 크로마토그램으로 건강한 성인의 대조혈장(1)과 대조혈장 0.5 mL에 내부표준액 1 µg 및 염산에탐부톨 0.25 µg을 spike한 혈장(2) 및 피험자에 시험약 3정을 투여한 후 1.5시간대에 얻은 혈장(3)을 나타낸 것이다. 에탐부톨 피크의 유지시간은 약 8.9분이었고 내부표준물질 피크의 유지시간은 13.5분이었으며, 이 분석조건에서 에탐부톨 및 내부표준 물질은 기타 혈장 성분들과 잘 분리되었다.

혈장시료로부터 구한 에탐부톨의 혈장 중 농도에 대해 내부표준액의 피크면적에 대한 에탐부톨의 피크 면적 비를 나타내는 검량선의 계산식은 $y=0.4221x-0.0678$ ($r^2=0.9993$)으로 0.15~7.37 µg/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비를 5로 하고 정밀성이 20% 이하이고 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도에서 정량한계를 구하였을 때 그 값은 0.15 µg/mL이었다. 클로로포름 단독을 추출액으로 사용한 경우¹⁰⁾와 비교하였을 때 클로로포름-에틸 혼합액에 의한 추출효율이 약 2.5배 개선되어 Table I에 나타난 바와 같이 에탐부톨 정밀성을 C.V.(%)로 나타내었을 때 정량한계를 포함한 농도에서 일내 정밀성이 10% 이하이었고, 일간 정밀성은 8% 이하를 나타내었다. 또한 정확성은 95.8 - 107.0%를 나타내어 이로부터 혈장 중 에탐부톨에 대한 본 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

생체이용률 파라미터의 산출

Figure 2는 마이암부톨® 정(염산에탐부톨 400 mg) 3정씩을 건강한 지원자 20명에게 경구 투여한 후 평균 혈장 중 에탐부톨 농도를 시간에 따라 나타낸 것이다. 또한, 피험자들의 혈장 중 약물농도 곡선으로부터 생체이용률 파라미터인 AUC, C_{max}, T_{max}, k_e 및 t_{1/2}의 평균값을 Table II에 나

Table I—Precision and Accuracy for the Determination of Ethambutol in Human Plasma

Concentration (µg/mL)	Precision C.V. (%)		Accuracy (%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
0.15	7.8	7.2	100.5
0.74	9.8	5.2	107.0
3.68	5.0	4.0	98.8
7.37	5.4	4.8	95.8

C.V.(%) = S.D./mean × 100

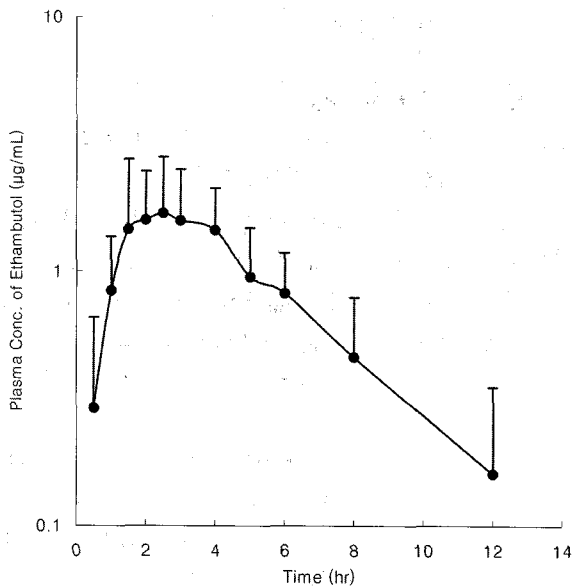


Figure 2—Mean plasma concentration-time curve of ethambutol following oral administration of Myambutol® three tablets at the dose of 1200 mg of ethambutol dihydrochloride.

Table II—Mean Pharmacokinetic Parameters of 20 Volunteers after a Single Dose Administration of Myambutol® Three Tablets (Ethambutol Dihydrochloride 1200 mg) Orally

Volunteer	Myambutol® Tablet				
	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{max} (hr)	K_e (hr^{-1})	$t_{1/2}$ (hr)
Mean	9.61	2.68	2.73	0.22	3.46
S.D.	1.64	1.06	1.21	0.08	1.21

타내었다. 마이암부톨® 정(염산에탐부톨 400 mg) 3정을 경구 투여시 AUC, C_{max} , T_{max} , k_e 및 $t_{1/2}$ 은 각각 9.61 ± 1.64 ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$), 2.68 ± 1.06 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), 2.73 ± 1.21 (hr), 0.22 ± 0.08 (hr^{-1}) 및 3.46 ± 1.20 (hr)이었다. 이는 문헌^{15,16)}에 보고된 $t_{1/2}$ 은 3-4시간, C_{max} 는 2.1-6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 T_{max} 는 2-4시간과 거의 일치하였다.

결 론

인체혈장 중 에탐부톨의 HPLC 분석법을 확립하여 생체이용률 시험을 위한 자칫 마련을 위해 유한양행의 마이암부톨® 정을 대조약으로 하여 시험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장시료로부터 구한 에탐부톨 검량선의 $r^2=0.9993$ 으로 0.15~7.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.
2. 분석법을 검증한 결과 클로로포름·디에칠에테르 혼합액을 추출액으로 하여 분석하였을 때 정량한계 농도인 0.15 $\mu\text{g}/$

mL를 포함한 농도에서의 intra-day와 inter-day의 C.V.와 accuracy가 15%이내에 들어가 본 분석법은 충분한 감도와 정확성 및 정밀성을 갖고 있음이 확인되었다.

3. 20명의 한국인 정상지원자를 대상으로 한 연구결과 마이암부톨® 정(염산에탐부톨 400 mg) 3정의 AUC는 9.61 ± 1.64 $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$, C_{max} 는 2.68 ± 1.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, T_{max} 는 2.73 ± 1.21 hr, k_e 는 0.22 ± 0.08 hr^{-1} 및 $t_{1/2}$ 는 3.46 ± 1.20 hr이었다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품 안전청의 지원(KFDA-04142-약동성-425)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) W.A. Petri, Jr, Antimicrobial agents: In The pharmacological basis of therapeutics, 10th eds., McGraw-Hill, New York, U.S.A., pp 1279-1280.
- 2) American Thoracic Society, Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculosis mycobacteria, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, S1-S25 (1997).
- 3) M. Breda, P. Marrari, E. Pianezzola, and M.S. Benedetti, Determination of ethambutol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.*, **729**, 301-307 (1996).
- 4) A. Calo, C. Cardini, V. Quercia, Gas chromatographic separation of some antitubercular drugs, *Ibid*, **37**, 194-196 (1968).
- 5) B.M. Richard, J.E. Manno, B.R. Manno, Gas chromatographic determination of ethambutol, *Ibid*, **89**, 80-83 (1974).
- 6) C.S. Lee and L.Z. Benet, Gas-liquid chromatographic determination of ethambutol in plasma and urine of man and monkey, *Ibid*, **17**, 188-192 (1976).
- 7) C.S. Lee, D.C. Brater, J.G. Gambertoglio, and L.Z. Benet LZ, Disposition kinetics of ethambutol in man, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **8**, 335-346 (1980).
- 8) M.R. Holdiness, Z.M. Israili and J.B. Justice, Gas chromatographic-mass spectrometric determination of ethambutol in human plasma, *J. Chromatogr. B.*, **224**, 415-422 (1981).
- 9) C. Lacroix C, F. Cerutti, J. Nouveau, S. Menager and O. Lafont, Determination of plasma ethambutol with liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry, *Ibid*, **415**, 85-94 (1987).
- 10) P. Chenevier, L. Massias, D. Gueylard, R. Farinotti, Determination of ethambutol in plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization, *Ibid*, **708**, 310-315 (1998).
- 11) M. Breda, P. Marrari, E. Pianezzola and B.M. Strolin, Determination of ethambutol in human plasma and urine by

- high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.*, **729**, 301-317 (1996).
- 12) J.E. Conte Jr., E. Lin, Y. Zhao and E. Zurlinden, A high-pressure liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of ethambutol in human plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and alveolar cells, *J. Chromatogr. Sci.*, **40**, 113-118 (2002).
- 13) G. Gamberini and V. Ferioli, Determination of optical purity by high-performance liquid chromatography of compounds of pharmaceutical interest, *Farmaco.*, **43**, 357-363 (1988).
- 14) 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적 동등성 시험 기준 (2002. 11. 22).
- 15) C.S. Lee, D.C. Brater, J.G. Gambertoglio and L.Z. Benet, Kinetics of oral ethambutol in the normal subjects, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **22**, 615-621 (1977).
- 16) C.A. Peloquin, A.E. Bulpitt and G.S. Jaresko, Pharmacokinetics of ethambutol under fasting conditions, with food and with antacids, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 568-572 (1999).