

혈장중 Acebutolol 및 그 Acetyl 대사체의 HPLC 분석

백채선[†] · Emil T. Lin*

조선대학교 약학대학

*School of Pharmacy, University of California, San Francisco (U.S.A.)

(1993년 7월 4일 접수)

High Performance Liquid Chromatographic Assay of Acebutolol and its Acetyl Metabolite in Plasma

Chai-Sun Baek[†] and Emil T. Lin*

College of Pharmacy, Chosun University, Kwangju 505, Korea

*School of Pharmacy, University of California, San Francisco, CA 94143 (U.S.A.)

(Received July 4, 1993)

A high-performance liquid chromatographic assay using ion-pair reverse-phase system was developed for the separation of acebutolol and acebutolol acetyl metabolite in plasma. A ion-pair reverse-phase system consisting of an ODS-bonded silica column and a mixture of 20% CH₃CN, 0.1% H₃PO₄, 0.035 M heptanesulfonic acid and 0.005 M tetrabutylammonium hydrogen sulfate as the mobile phase were used. Triamterene was employed as an internal standard. Based on 0.2 ml of plasma, the detection limits were 10.4 ng/ml for acebutolol and 10.3 ng/ml of acebutolol acetyl metabolite at the signal-to-noise ratio of 3:1.

Keywords—Acebutolol, Acebutolol acetyl metabolite, HPLC assay

Acebutolol은 임상적으로 고혈압과 심실부정맥의 치료에 효과가 있는 beta-adrenergic antagonist이며¹⁻³⁾ 이의 주요 대사물질로서 acetyl metabolite가 알려져 있다.^{4,5)} 생체액 중에서 다른 beta-blocker 약물들과의 약리활성 및 약동력학적인 문제들을 비교 연구하기 위해 acebutolol과 이의 acetyl metabolite에 대한 많은 연구⁶⁻¹²⁾들이 진행되어 왔다.

Acebutolol의 분석법으로는 병용투여되는 약물의 영향을 크게 받는 TLC법¹¹⁾과 유도체를 만들어야 하고 전처리 조작의 번잡성과 안정성에 문제점이 있는 GC법⁴⁾이 있으나 최근에는 주로 액체크로마토그래프법(HPLC)에 의한 연구가 계속되고 있다. Meffin 등에 의한 HPLC법⁶⁾은 ion-pair와 칼럼의 온도변화를 고려한 gradient reverse phase system 분석법으로 메탄올 생체액에서 염기성 약물에 대한

ion-pair reverse-phase chromatography의 장점을 제시하였으나 column 온도의 점진적 상승(30°C)과 ion pairing reagent(sodium dodecyl sulfate)의 강한 계면활성 때문에 column의 수명단축과 유지시간의 주기적 변화를 가져오는 등의 문제점이 있었으며 Upton 등^{7,8)}은 Spherisorb ODS 칼럼과 아세트니트릴-인산염완충액의 이동상을 이용한 개선된 ion-pair reverse-phase chromatography법을 제시하였으나 이와 같은 HPLC 분석법들은 동시분리분석과 미량 분석에 어려운 점이 많아서 저자 등은 감도, 재현성 및 간편성을 고려하여 시료의 전처리 조작, 이동상 용매, ion-pair 시약과 내부표준물질 등을 개선하고 acebutolol의 형광성을 이용함으로써 혈장 중에서 acebutolol과 그의 대표적인 대사물질인 acetyl metabolite의 분리 정량법의 표준화를 위해 새로운

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

HPLC 분석법을 확립하였다.

실험 방법

시료 및 시약

모든 용매는 HPLC grade, 모든 시약은 시약급을 사용하였다. Acebutolol hydrochloride(Watson), acebutolol acetyl metabolite(May & Baker), triamterene(USPC reference, Rockvillie), 메탄올, 아세트니트릴, 수산화나트륨, 인산(이상 Fisher), tetrabutylammonium hydrogen sulfate, 1-헵탄설폰산(이상 Sigma), Nanopure water(Synbron Barnstead), 혈장(Irwin Memorial Blood Bank) 등을 썼다.

기기

HPLC 장치로는 Shimadzu auto injector model SIL-6A, Shimadzu pump model LC-6A, Shimadzu RF-535 fluorescence detector, Hewlett-Packard 3392A integrator 등으로 구성하여 사용하였다.

표준액의 조제

표준원액—Acebutolol HCl 원액(59.3 µg/ml)은 acebutolol HCl 1.643 mg을, acebutolol control stock solution(69.3 µg/ml)은 acebutolol HCl 1.921 mg을 각각 취하고, acebutolol acetyl metabolite 원액(92.3 µg/ml)은 acebutolol acetyl metabolite 2.308 mg을, acebutolol acetyl metabolite control 원액(77.9 µg/ml)은 acebutolol metabolite 1.947 mg을 각각 취하여 50% 메탄올을 넣어 25 ml로 조제하고, triamterene 원액(internal standard, 1.008 µg/ml)은 triamterene 5.6 mg을 메탄올 10 ml에 녹이고 이 중 0.18 ml를 취하여 50% 메탄올을 넣어 100 ml로 조제하였다.

표준액—Acebutolol과 acebutolol acetyl metabolite 표준액(각 20.8 µg/ml)은 acebutolol 원액 7.0 ml와 acebutolol acetyl metabolite 원액 4.5 ml를 각각 취하고, acebutolol control 표준액(20.8 µg/ml)과 acebutolol acetyl metabolite control 표준액(19.5 µg/ml)은 acebutolol 원액 6 ml와 acebutolol acetyl metabolite 원액 5.0 ml를 각각 취하고, triamterene 표준액(50.4 ng/ml)은 triamterene 원액 1.0 ml를 취하여 각각 50% 메탄올로 20.0 ml가 되게 조제하였다.

시료용액

혈장 0.2 ml를 내부표준물질(50.4 ng/ml)이 함유된

시험관에 취하여 30초간 vortex시킨 후 0.5 M 수산화나트륨액 10 ml를 가하고 30초간 vortex한 다음 클로로포름 2 ml를 가하여 10분간 흔들어 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 aspirator로 수층을 제거하고 유기용매층을 새로운 시험관에 옮긴 후 여기에 0.01% HCl 25 ml를 넣고 30초간 vortex한 후 질소 기류하에서 건조시키고 이동상 200 µl로 reconstitution하여 칼럼에 auto sampler로 60-120 µl씩 주입하였다.

정량법

Acebutolol과 acetyl metabolite 정량은 blank 혈장에 acebutolol과 acetyl metabolite의 표준액을 각각 spike하여 내부표준물질에 대한 각 농도의 피크 높이비(PHR)의 least-squares regression 관계로부터 좁은 범위(0-125 ng/ml)와 넓은 범위(0-2080 ng/ml)에서 표준검량선을 작성하여 실시하였다.

HPLC 측정조건

검출은 여기파장 335 nm, 형광파장 475 nm에서 실시하였으며 칼럼은 Ultrasphere ODS(Beckman, 4.6 mm×25 cm, 5 µm particle size)를, 이동상으로는 20% 아세트니트릴+0.1% 인산+0.035 M 헵탄설폰산+0.005 M tetrabutylammonium hydrogen sulfate를 썼고, 유속은 1.0 ml/min로, 주입량은 60-120 µl로 하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 방법은 acebutolol이 형광성이고 열에 불안정하기 때문에 최적이라고 할 수 있다. 생체액중 약물분석에 대한 HPLC 방법은 reverse-phase system이 광범위하게 이용되고 있는데 이것은 retention mechanism이 주로 생체액중 약물의 lipophilic property에 기인되기 때문이다.¹³⁾ Ion-pair reverse-phase HPLC 장치에서 acebutolol과 acebutolol acetyl metabolite의 상호분리를 검토한 결과, C₈ 칼럼에서 보다 C₁₈ 칼럼에서 유지시간이 빠르고 분리도가 양호하였으며, 시료에 대하여 counter ion으로 작용하는 ion-pair reagent로는 시료이온에 대해 비교적 큰 대립이온을 갖는 헵탄설폰산(0.035 M)과 tetrabutyl ammonium(0.005 M)을 병용했을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

본 HPLC 실험조건에서 얻어진 acebutolol과 ace-

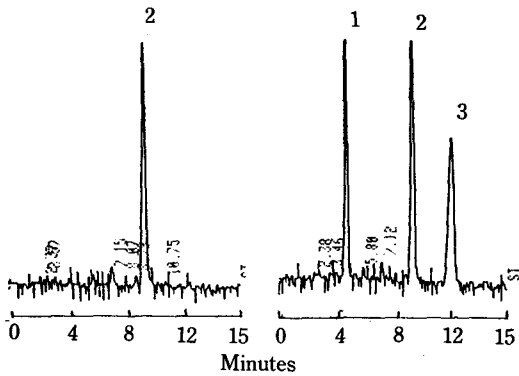


Figure 1—Chromatograms of acebutolol and acebutolol acetyl metabolite in plasma.

Peaks: 1, acebutolol acetyl metabolite (4.70 min.); 2, internal standard (9.34 min.); 3, acebutolol (12.49 min.)

butolol acetyl metabolite 및 내부표준물질의 유지 시간은 12.49, 4.70 및 9.34분이었으며(Fig. 1), 정량 한계 범위는 내부표준물질의 피크높이에 대한 약물의 피크높이비(PHR)와 linear regression에 의해 검토한 결과 0-2080 ng/ml 농도범위에서 양호한 직선($r^2 > 0.9992$)을 얻을 수 있었고(Fig. 2), 혈장에서 acebutolol과 acebutolol acetyl metabolite의 검출한계는 각각 10.4 ng/ml이었다. 이것은 acebutolol을 자외부에서 측정하던 종전의 분석법들의 검출한계 (20-50 ng/ml)보다 안정적으로 형광검출기(여기과장 335 nm, 형광파장 475 nm)에서 미량측정이 가능하였다. 본 HPLC 방법에서 intraday와 interday pre-

Table II—Recovery of Acebutolol from Plasma

Spiked concentration (ng/ml)	Peak height ratio (mean±S.D., n=3)	
	Solvent	Plasma
1040	2.792±0.051	2.835±0.108
312	0.761±0.010	0.815±0.017
62.4	0.148±0.004	0.153±0.006
20.8	0.047±0.005	0.054±0.005

Overall average recovery=106.2%

cision은 Table I, II와 같았다. 즉 4개의 시료농도에 대해 각기 6회 측정된 결과 interday precision에서 acebutolol의 coefficients of variation(C.V.)값은 2.74-4.90%이고 acebutolol acetyl metabolite는 2.08-4.36%이었으며, intraday precision에서는 acebutolol이 2.68-4.54%이고 acebutolol acetyl metabolite는 1.98-5.03%이었다. 회수율을 측정된 결과 acebutolol과 acebutolol acetyl metabolite의 대응량을 물과 혈장에 각각 첨가하여 4가지의 다른 농도에서(19.5-975 ng/ml) 얻어진 PHR값을 비교 분석하였을 때 acebutolol과 acebutolol acetyl metabolite의 평균회수율은 각각 106.2 및 107.8%이었다(Table III).

결론

혈장에서 acebutolol과 acebutolol acetyl metabolite 성분에 대해 ODS column과 형광검출기(여기

Table I—Precision of Acebutolol and its Acetyl Metabolite Assay in Plasma

Spiked concentration (ng/ml)	Inter-day precision		Intra-day precision	
	Calculated concentration (mean, S.D., n=6) (ng/ml)	Coefficient of variation (%)	Calculated concentration (mean, S.D., n=6) (ng/ml)	Coefficient of variation (%)
Acebutolol				
1040	1043.04 (39.64)	3.80	1035.24 (32.61)	3.15
312	320.30 (8.77)	2.74	314.30 (8.42)	2.68
104	106.05 (4.45)	4.20	103.20 (3.51)	3.34
20.8	20.29 (0.95)	4.54	19.80 (0.97)	4.90
Acebutolol acetyl metabolite				
975	973.52 (31.15)	3.20	970.85 (34.95)	3.60
293	294.36 (6.12)	2.20	296.08 (5.86)	1.98
97.5	98.02 (3.90)	3.98	99.60 (4.42)	4.44
19.5	19.76 (8.62)	4.36	19.88 (0.99)	5.03

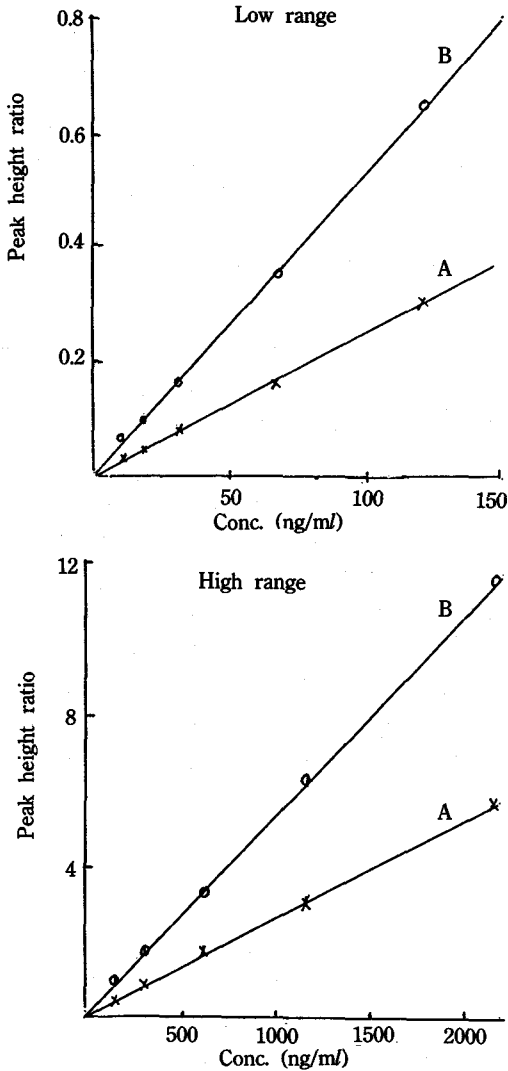


Figure 2—A representative standard calibration curve in plasma assay for acebutolol and its acetyl metabolite. A: acebutolol, B: acebutolol acetyl metabolite.

Table III—Recovery of Acebutolol Acetyl Metabolite from Plasma

Spiked concentration (ng/ml)	Peak height ratio (mean ± S.D., n=3)	
	Solvent	Plasma
975	5.606 ± 0.163	5.689 ± 0.217
58.5	0.282 ± 0.018	0.309 ± 0.014
29.3	1.551 ± 0.030	1.675 ± 0.038
19.5	0.077 ± 0.008	0.087 ± 0.007

Overall average recovery = 107.8%

파장 335 nm, 형광파장 475 nm)를 장착한 ion-pair reverse-phase HPLC를 사용하여 20% 아세트니트릴 + 0.1% 인산 + 0.035 M 헵탄설폰산 + 0.005 M tetrabutylammonium hydrogen sulfate의 이동상에서 분석한 결과 15분 이내의 유지시간(acebutolol 12.49분, acebutolol acetyl metabolite 4.70분)에서 분리 정량할 수 있었으며, 표준검량선은 0-2080 ng/ml 농도 범위에서 양호한 직선($r^2 > 0.9992$)을 나타내었고 검출한계는 약 10 ng/ml이었다.

문헌

- 1) B.S. Lewis, A.S. Mitka and M.S. Gotsman, *S. Afr. Med. J.*, **488**, 21 (1974).
- 2) A.H. Gradman, R.A. Winkle, J.W. Fitzgerald, P.J. Meffin, J. Stoner, P.A. Bell and D.C. Harrison, *Circulation*, **55**, 785 (1977).
- 3) F. Biron, A. Proulx, L. Lapointe, R. Nadeau and S. Tremblay, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **8**, 11 (1975).
- 4) P.J. Meffin, S.R. Harapat and D.C. Harrison, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **15**, 31 (1976).
- 5) R.F. Collins, *Nouv. Press Med.*, **4**, 3223 (1975).
- 6) P.J. Meffin, S.R. Harapat, Y.G. Yee and D.C. Harrison, High-pressure liquid chromatographic analysis of drugs in biological fluids, *J. Chromatogr.*, **138**, 183 (1977).
- 7) T.W. Guentert, G.M. Wientjes, R.A. Upton, D. L. Combs and S. Riegelman, Evaluation of a modified high-performance liquid chromatography assay for acebutolol and its major metabolite, *J. Chromatogr.*, **163**, 373 (1979).
- 8) J.N. Buskin, R.A. Upton, R.M. Jones and R.L. Williams, High-performance liquid chromatography assay of acebutol and two of its metabolites in plasma and urine, *J. Chromatogr.*, **230**, 438 (1982).
- 9) M.P. Miller, R.T. Foster, F.M. Pasutoo and F. Jamali, Stereospecific high performance liquid chromatographic assay of acebutolol in human plasma and urine, *J. Chromatogr.*, **526**, 129 (1990).
- 10) M.P. Miller, R.T. Foster, C.T. Kappagoda and

- F. Jamali, Pharmacokinetics of acebutolol enantiomers in humans, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 313 (1991).
- 11) J.M. Steyn, *J. Chromatogr.*, **120**, 465 (1976).
- 12) A. Roux, A.L. Liboux, B. Delhotal, J. Gaillot, and Flouvat, Pharmacokinetics in man of acebutolol and hydrochlorothiazide as single agents and in combination, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24**, 801 (1983).
- 13) R.J.Y. Shi, L.Z. Benet and E.T. Lin, High-performance liquid chromatographic assay of basic amine drugs in plasma and urine using a silica gel column and an aqueous mobile phase, *J. Chromatogr.*, **377**, 399 (1986).