약제학회지(2005), 제 35 권 제 3 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 35, No. 3, 137-142 (2005)

글리피짓 체내동태 연구를 위한 혈청 중 글리피짓의 HPLC 정량법 검증

조혜영 · 이화정* · 최후균** · 이용복†
*전남대학교 약학대학, *이화여자대학교 약학대학, **조선대학교 약학대학*
(2005년 1월 14일 접수 · 2005년 6월 4일 승인)

Validation of an HPLC Method for the Pharmacokinetic Study of Glipizide in Human

Hea-Young Cho, Hwa Jeong Lee*, Hoo-Kyun Choi and Yong-Bok Lee†**
College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
**College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea*
***College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea*
(Received January 14, 2005 · Accepted June 4, 2005)

ABSTRACT – A rapid, selective and sensitive reversed-phase HPLC method for the determination of glipizide in human serum was validated and applied to the pharmacokinetic study of glipizide. Glipizide and internal standard, tolbutamide, were extracted from human serum by liquid-liquid extraction with benzene and analyzed on a Nova Pak C_{18} 60Å column with the mobile phase of acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate (10 mM, pH 3.5) (4:6, v/v). Detection wavelength of 275 nm and flow rate of 0.7 ml/min were fixed for the study. The assay robustness for the changes of mobile phase pH, organic solvent content, and flow rate was confirmed by 3^3 factorial design using a fixed glipizide concentration (500 ng/ml) with respect to its peak area and retention time. And also, the ruggedness of this method was investigated at three different laboratories using same quality control (QC) samples. This method showed linear response over the concentration range of 10-1000 ng/ml with correlation coefficient greater than 0.999. The lower limit of quantitation using 0.5 ml of serum was 10.0 ng/ml, which was sensitive enough for pharmacokinetic studies. The overall accuracy of the quality control samples ranged from 82.6 to 105.0% for glipizide with overall precision (% C.V.) being 1.13-13.20%. The percent recovery for human serum was in the range of 85.2~93.5%. Stability studies showed that glipizide was stable during storage, or during the assay procedure in human serum. The peak area and retention time of glipizide were not significantly affected by the changes of mobile phase pH, organic solvent content, and flow rate under the conditions studied. This method showed good ruggedness (within 15% C.V.) and was successfully used for the analysis of glipizide in human serum samples for the pharmacokinetic studies at three different laboratories, demonstrating the suitability of the method.

Key words – Glipizide, Human serum, Validation, Pharmacokinetics, HPLC

글리피짓(glipizide, 1-cyclohexyl-3-{4-2-(5-methylpyrazine-2-carboxamido)-ethyl-benzenesulphonyl}urea)은 췌장의 β세포를 자극함으로써 당대사 호르몬인 인슐린 분비를 촉진시켜 인슐린의 혈장 내 농도를 높여 혈당강하효과를 나타내는 제 2세대 설폰요소계 경구용 제제이다.[1,2] 글리피짓은 경구투여 후 위장관으로부터 빠르게 흡수되고 최고혈중농도에 도달하는 시간은 1~3시간이며, 소실 반감기는 약 2~4시간으로 알려져 있다.[2] 또한, 경구 투여시 주로 간에서 싸이토크롬(CYP) 2C9에 의해 대사되어 적어도 5개의 대사체가 생성되는데, 주 대사체는 4-*trans*-와 3-*cis*-히드록시글리피짓으로 이들은 신장을 통해 빠르게 배설된다고 보고되어 있을 뿐만 아니라 CYP2C9의 유전적 다형성으로 말미암아 약물체내동태가 민족간 차이를 나타내는 약물로 알려져 있다.[3-5] 경구 투여시 초회 용량은 2.5~5 mg으로 아침 식사 또는 점심 식사 전에 투여하며, 최대용량은 1일 40 mg이다.[2] 한편, 글리피짓은 투여 후 24시간 이내에 3~10%만이 미변화체로서 뇨 중으로 배설된다고 보고되어 있다.[1]

국내에서 글리피짓은 (주)유한양행의 "다이그린 정"을 비롯하여 다수 회사의 제제가 사용되고 있는데 대한민국 식품의약품안전청에서는 생물학적동등성시험을 통하여 유사 대체제제의 품질을 평가, 공인함으로써 유효하고 안전한 유사 대체제제를 공급하기 위하여 노력하고 있다. 이러한 유사 대체제제의 공급은 의료비 절감과 독과점 체계의 폐해를 방지

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 062)530-2931, E-mail : leeyb@chonnam.chonnam.ac.kr

한다는 점에서도 권장되어야 할 사항이다. 이를 위하여 식품의약품안전청에서는 수차례에 걸친 생물학적동등성시험 시행 고시의 개정 및 품목별 생물학적동등성시험 표준지침서 작성 등을 통하여 생물학적동등성시험의 선진화를 도모하고 약효동등성시험 관리의 효율성을 제고하고자 노력하고 있다. 그런데, 민족간 차이를 나타내는 글리피짓의 생물학적동등성시험을 시행하기 위해 필요한 한국인을 대상으로 한 글리피짓의 약물동태학적 특성치들에 대한 보고가 아직까지 없을 뿐만 아니라, 생체시료를 이용한 글리피짓 분석법의 견고성(robustness)이나 확신성(ruggedness)에 대한 검증 실례가 보고된 바가 없는 실정이다.

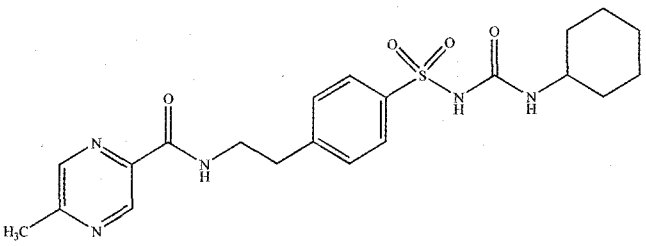
본 연구에서는 혈청 중 글리피짓의 분석법을 개발하여 그 견고성을 검증하고, 개발한 분석법의 확신성 확보를 위하여 별도의 다른 두 기관에서 이를 순차적으로 확인 · 검증하여 분석의 견고성과 확신성이 확립된 혈청 중 글리피짓의 최종 분석법을 확립하고자 하였다. 아울러 이렇게 검증된 분석법을 이용하여 서로 다른 세 기관에서 각각 8-9명씩 총 25명의 건강한 성인을 대상으로 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준[6](식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 2002. 11. 22.)에 따라 글리피짓의 기존 시판 대조제제인 다이그린(글리피짓 5 mg) 1정을 1회 경구 투여한 생체이용률시험을 순차적으로 수행하여 한국인에서의 약물동태학적 특성을 파악하고자 하였다. 본 시험은 각 시험기관 별로 별도의 기관별 임상시험 심사위원회(institutional review board, IRB)를 거쳐 시험계획서의 승인을 받은 후 시험계획서에 따라 수행되었으며 모든 피험자의 동의를 받아서 이루어졌다.

실험 방법

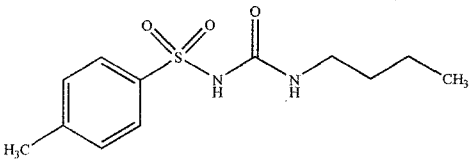
시약 및 기기

생체이용률시험에 사용된 대조제제는 식품의약품안전청으로부터 허가를 받아 주식회사 유한양행(서울)에서 시판하고 있는 "다이그린 정"(제조번호: 4001, 사용기한: 2007. 2. 12)으로 글리피짓을 5 mg 함유하는 정제이었다.

글리피짓 표준품 및 내부표준물질로 사용한 톨부타미드(이상 Sigma Chemical Co., St Louis, MO, 미국, Figure 1), HPLC용 아세토니트릴(Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, 미국), 인산이수소칼륨(Yakuri pure chemicals Co., Osaka, 일본), 생리식염수 및 헤파린(이상 Chungwae Pharma Corp., 서울, 한국)은 시판품을, 증류수는 Milli Q(Millipore Co., Milford, MA, 미국)에서 18 MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 벤젠, 염산 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 그대로 사용하였다.



Glipizide



Tolbutamide

Figure 1–Chemical structures of glipizide and internal standard (IS, tolbutamide).

분석기기로는 세 기관 모두 동일한 HPLC용 펌프(LC 10AD*vp*, Shimadzu, Kyoto, 일본), Nova Pak C_{18} 60Å(입자경 4 μm, 3.9 mm×300 mm, Waters Co., Milford, MA, 미국), UV 검출기(SPD 10A*vp*, Shimadzu, Kyoto, 일본), 주입기(Model 9725i, Rheodyne, Cotati, CA, 미국) 및 적분계(SCL-10A*vp*, Shimadzu, Kyoto, 일본)를 사용하였으며 기타 원심분리기(UNION 55R, Hanil Science Industrial Co., 인천, 한국), 원심분리형 농축기(CVE200D, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, 일본), 냉각회수기(UT-80, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, 일본), pH 측정기(Model 7, Corning Ltd., Halstead Essex England, 영국) 및 탁상용 혼합기(G560, Scientific Co., Bohemia, NY, 미국) 등을 사용하였다.

피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준[6] 제 10조(피험자의 선정) 및 제 11조(피험자의 제외기준)에 따라 서로 다른 세 기관에서 지원자 모집공고를 통하여 19~55세의 건강한 성인 지원자를 각각 모집하였다. 각 기관별로 전문의사의 건강진단을 실시하여 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 자로서 생체이용률시험에 적합한 건강인으로 판정된 자 각 8-9명씩 총 25명을 피험자로 선정하였다. 이 시험의 피험자로 선정된 사람들의 평균 체중은 70.70±10.28 kg, 평균 나이는 만 24.52±4.83세

이었다. 본 시험에 참여하는 지원자를 대상으로 각 시험기관에서는 생체이용률시험 설명회를 실시하여 이 시험의 목적, 방법, 이상약물반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 이들로부터 자유의사에 의한 시험참가동의서를 받은 후 생체이용률시험을 실시하였다.

모든 피험자는 정해진 투약일 일주일 전부터 항생제 및 진통제 등을 포함한 일체의 약물 복용을 금지하였을 뿐 아니라 흡연, 크산틴계 음료 및 음주 등을 제한 관리하였고, 시험 전날 오후 8시부터 시험 당일 투약 후 4시간까지는 금식시켰다. 또한 시험 기간 중에는 각 기관 연구자의 지시에 따라 모두 같은 식단의 식사 및 경미한 활동을 하게 하였다.

약물 투약 및 혈액 채취

생체이용률시험을 위하여 각 기관에서는 8-9명의 피험자에 대하여 난수발생법에 따라 무작위 배열한 다음, "다이그린 정(글리피짓)"을 동일 투약일에 투여하고, 투약량은 "다이그린 정(글리피짓 5 mg)" 1정을 1회 경구 투여하였다. 피험자들 모두에게 heparin-locked(150 unit/ml) Angiocatheter (JELCO™, 22G, Johnson&Johnson Medical, Pomezia, 이탈리아)를 팔 또는 손등 정맥부위에 설치하고 240 ml의 물과 함께 복용시켰다. 피험자 간 복약 시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 약 2분 간격으로 하였다.

채혈은 글리피짓 5 mg 투약 시 반감기가 3.1시간임을[7] 토대로 먼저 제 1기관에서는 반감기의 3배 이상인 24시간까지, 제 2 및 3기관에서는 제 1시험기관의 결과를 토대로 12시간 동안 실시하였고, 채혈 시간은 약물 투약 직전과 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10(제 2 및 3기관), 12 및 24시간(제 1기관)에 총 12회 채혈하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 ml의 혈액을 빼내어 버리고 약 8 ml의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재되어 있는 vacutainer에 넣었다. 채혈 후마다 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 즉시 혈청분리관을 사용하여 혈청을 채취하고 분석시까지 영하 80°C에서 보관하였다.

혈청 중 글리피짓의 정량

혈청 중 글리피짓 정량은 이미 보고된 글리피짓 HPLC 분석법을 참고하고,[7,8] 일부 수정하여 상기 기기 조건하 실온에서 이동상으로 0.01 M 인산이수소칼륨액(pH 3.5):아세토니트릴=60:40(v/v)의 혼합용액을 사용하였으며 유속 0.7 ml/min, 주입량 50 μl 및 UV 검출기(275 nm)를 이용하여 정량하였다. 분석법의 확신성 확보를 위하여 제 1기관에서 분석법을 확립한 후 동일 검량선용 표준혈청과 QC 시료를 이용하여 순차적으로 제 2 및 3기관에서 이를 확인하였으며 다음과 같이 최종 분석법을 확립하고 각각의 검량선을 작성하였다.

글리피짓 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 50 μg/ml로 만든 후 4°C에서 냉장 보관시키고, 이 용액을 검량선용 표준혈청으로 희석하여 혈청 중 약물농도가 각각 10, 20, 50, 100, 500 및 1000 ng/ml씩 되도록 검량선용 표준혈청액을 조제하였다. 각각의 검량선용 표준혈청 500 μl에 내부표준물질로 톨부타미드(20 μg/ml) 메탄올 용액 100 μl 및 0.05 M 염산 1.0 ml를 가한 후 흔들어 섞었다. 여기에 벤젠 3 ml를 가하고 2분 동안 진탕하여 추출한 다음 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층 2.5 ml를 취하여 깨끗한 시험관에 옮긴 다음 증발·건조시킨 후 잔사에 이동상 200 μl을 넣어 30초간 진탕 혼합하였다. 이 용액 중 50 μl를 취해 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 글리피짓의 피크 면적비를 구하여 검량선을 작성하였으며 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였을 뿐만 아니라 10, 20, 100 및 500 ng/ml 농도에서 각각 5회 측정하여 정확성을 평가하였고 상기 농도에서 물에 대한 평균 상대추출율을 구하였다. 또한, 동결해동 안정성, 단기실온 안정성 및 장기 안정성 시험은 QL(20 ng/ml) 및 QH(500 ng/ml) 농도 각 3개씩 이용하여 각각 3회 반복 측정하여 글리피짓의 면적으로부터 안정성을 평가하였고 조제후 안정성 및 표준원액 안정성 시험은 글리피짓(100 ng/ml) 및 내부표준물질(20 μg/ml) 각 3개씩 이용하여 각각 3회 반복 측정하여 안정성을 평가하였다.

아울러, 분석법의 견고성을 확보하기 위해 혈청 중 글리피짓 농도분석 시 가장 영향을 크게 미칠 가능성이 있는 이동상의 pH, 유기용매의 함량 및 유속의 변동에 의한 영향을 일정농도의 글리피짓 혈청 시료(500 ng/ml)를 이용하여 나타난 피크 면적과 출현시간을 기준값으로 하여 그 변동 영향을 평가하였다. 이때, 각 변동요인이 결합되어 나타나는 효과를 분석하기 위하여 상호작용효과를 고려한 아래와 같은 모형을 가정하고 Table I에 나타낸 3요인 3수준 실험계획법, 즉 3^3 요인실험법(3^3 factorial design)에 따라 총 27회 실험을 실시하여 얻은 상기 기준값에 대하여 SPSS 프로그램을 이용하여 일반선형모형에 의한 ANOVA 분석을 실시하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + c_{ijk}$$

Table I–*Factorial Design for 3-level-3-factor Investigated in the Robustness Test*

Factors	Units	Levels		
		Low (-1)	Medium (0)	High (1)
A. Flow rate of the mobile phase	ml/min	0.6	0.7	0.8
B. pH of the mobile phase	-	3.0	3.5	4.0
C. Organic solvent content (%) in the mobile phase	%	35	40	45

한편, 혈청 시료의 분석은 먼저 피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 80°C에 보관했던 혈청 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음 이 혈청 500 μl를 취하여 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질로 톨부타미드(20 μg/ml) 메탄올 용액 100 μl 및 0.05 M 염산 1.0 ml를 가한 후 상기 검량선 작성을 위한 추출법에 따라 추출하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 글리피짓의 피크 면적비를 구하여 미리 작성된 검량선에 의해 혈청 시료 중 글리피짓의 농도를 산출하였다.

약물속도론적 파라미터의 산출 및 생체이용률 평가

"다이그린 정(글리피짓 5 mg)" 1정을 각 기관별로 8-9명의 피험자에게 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적 파라미터인 최고혈청중농도(C_{max}), 최고혈청중농도 도달시간(T_{max}), 채혈시간 t와 무한대까지의 혈청중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t 및 AUC_∞) 및 소실반감기($t_{1/2}$) 등은 BA-Calc 2002[9] 및 WinNonlin 프로그램[10]을 이용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

혈청 중 글리피짓 정량 및 검증

건강 성인의 대조혈청과 대조혈청에 내부표준물질인 톨부타미드와 글리피짓을 함께 가한 것 및 글리피짓 정제 투여 후 2시간째의 혈청을 본 시험방법에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다. 글리피짓 및 내부표준물질 피크의 출현시간은 세 기관 모두 약 9.7~10.8분 및 11.7~13.1분이었으며 각 물질의 분리상태는 양호하였다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5 이상으로 하고 일내 및 일간 변동계수의 크기를 20% 미만으로 하였을 때의 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 10 ng/ml 이었으며, 수용액 중 약물을 추출한 것의 평균 피크 면적에 대한 추출 시료 중 약물의 피크 면적비로부터 구한 추출회수율(%)은 85.17~93.51이었다. 혈청 시료로부터 구한 글리피짓의 검량선은 피크 면적비(y)=0.0033x글리피짓 농도(ng/ml, x)+0.0003(r=0.9997, $p<0.01$; 제 1기관), y=0.0040x–0.0012 (r=0.9999, $p<0.01$; 제 2기관) 및 y=0.0034x+0.0026(r=0.9999, $p<0.01$; 제 3기관)으로 10~1000 ng/ml 범위에서 모두 양호한 직선성을 나타내었다. 또한, 이 농도범위에 있어서 글리

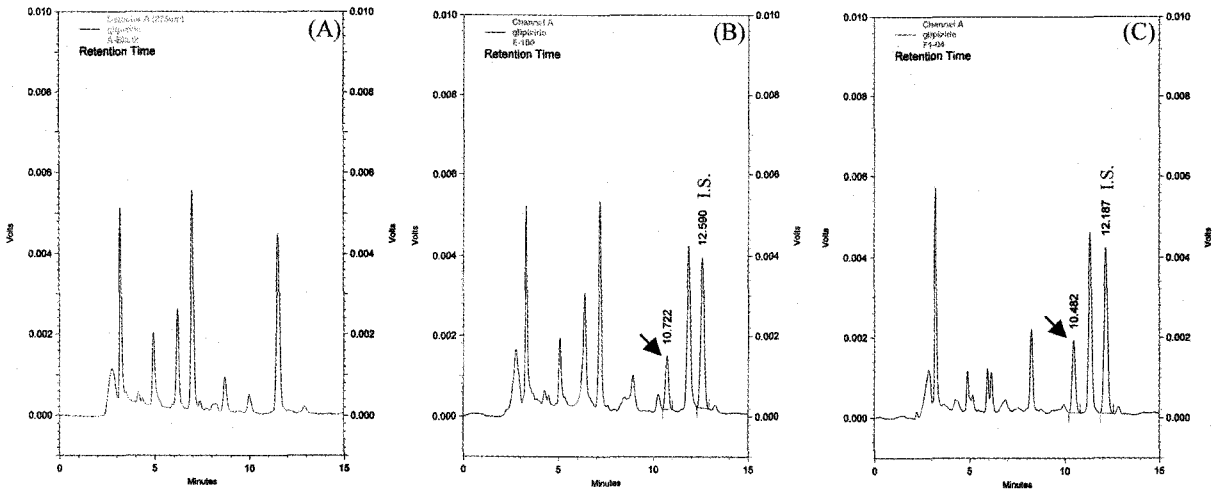


Figure 2–Chromatograms of (A) blank human serum, (B) blank human serum spiked with glipizide (100 ng/ml) and internal standard (IS, tolbutamide 4 μg/ml) and (C) serum sample at 2 hr after oral administration of 5 mg glipizide tablet (The serum concentration of glipizide correspond to 124.00 ng/ml). ↙=glipizide peak.

Table II–*Precision and Accuracy for the Determination of Glipizide in Human Serum at Each Institute*

Concentration (ng/ml)	Precision C.V.(%)						Accuracy (%)		
	Intra-day (n=5)			Inter-day (n=5)					
	Institutes								
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
10 (LLOQ)	8.82	13.20	9.86	8.43	11.03	8.59	82.60	112.43	97.80
20 (low)	5.79	10.16	3.11	12.97	11.81	8.03	92.65	104.72	99.40
100 (medium)	1.49	3.69	5.31	11.90	9.14	5.87	104.03	102.29	104.92
500 (high)	1.13	9.35	3.09	3.03	6.54	4.54	105.03	108.72	101.31

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

Table III–*Analysis of Variance for the Factorial Design of Robustness Test on the Basis of Its Peak Area*

Factors	Mean square ($\times 10^7$)	F	P
Flow rate	5.5	1.419	0.720
pH	42.3	1.677	0.314
Content of organic solvent	4.2	0.282	0.789
Flow rate × pH	12.6	1.156*	0.398
Flow rate × content of organic solvent	2.2	0.199*	0.932
Content of organic solvent × pH	23.5	2.166*	0.164
Flow rate × pH × content of organic solvent	10.9		

*Error mean square based on flow rate, pH and content of organic solvent interactions, 8 d.f..

피짓의 일내 및 일간 변동계수(C.V.)는 세 기관 모두 15% 이하로 나타났고, 10, 20, 100 및 500 ng/ml의 농도에서 5회 반복 측정하여 얻은 표준편차(% deviation)도 세 기관 모두 ±15% 이내로 나타나 확신성을 확보할 수 있었을 뿐 아니라(Table II) 이동상의 pH, 유기용매의 함량 및 유속의 변화에 따른 약물 피크 면적이나 출현시간에 미치는 영향을 측정하여 요인분석을 실시한 결과 각 변동요인에 대한 각 수준에서는 유의한 차이($p<0.05$)가 나타나지 않아 이 분석법에 대한 견고성을 확보할 수 있었다(Table III에는 피크 면적을 기준으로 분산분석한 결과를 나타내었으며 피크 출현시간을 기준으로 하였을 때에도 마찬가지로 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.). 아울러 동결해동, 단기실온, 장기, 조제 후 및 표준원액 안정성 시험 결과, 각 QC 시료에 대해 각각 3회 반복 측정하여 얻은 측정 초기치에 대한 변동계수가 모두 10% 이내로 나타났다.

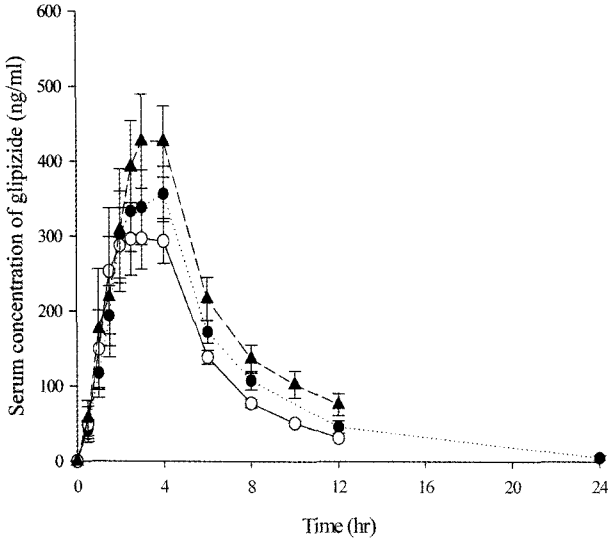


Figure 3–Mean (±S.E.) serum concentration-time curves of glipizide for each institute following oral administration of Digrin tablet (glipizide 5 mg). Key: ●; 1st institute (n=8), ○; 2nd institute (n=9), ▲; 3rd institute (n=8).

이로부터 혈청 중 글리피짓에 대한 상기 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정밀성, 정확성, 안정성, 견고성 및 확신성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈청 중 글리피짓 농도 추이

"다이그린 정(글리피짓 5 mg)" 1정씩 세 기관에서 피험자 8-9명에게 각각 경구 투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 각 기관 별 피험자에 대한 혈청 중 글리피짓 평균 농도를 Figure 3에 나타내었다. 또한, 각 피험자의 혈청 중 약물농도-시간 곡선으로부터 구한 약물속도론적 파라미터를 Table IV에 나타내었다. "다이그린 정(글리피짓 5 mg)" 1정을 경구 투여하였을 때 얻은 평균 AUC_∞(μg·hr/ml)는 2.33±0.74,

Table IV–*Pharmacokinetic Parameter Values for Each Institute Obtained after Oral Administration of Digrin Tablet at the Glipizide Dose of 5 mg#*

Parameters	1st Institute (n=8)	2nd Institute (n=9)	3rd Institute (n=8)	Total (n=25)
AUC_t (μg · hr/ml)	2.35 ± 0.74	1.75 ± 0.26	2.52 ± 0.55	2.19 ± 0.62
AUC_∞ (μg · hr/ml)	2.33 ± 0.80	1.86 ± 0.27	2.86 ± 0.73	2.33 ± 0.74
C_{max} (μg/ml)	0.41 ± 0.14	0.42 ± 0.04	0.58 ± 0.08	0.47 ± 0.12
T_{max} (hr)	3.44 ± 0.82	2.67 ± 1.12	2.44 ± 0.94	2.84 ± 1.03
$t_{1/2}$ (hr)	3.13 ± 0.97	2.50 ± 0.28	3.10 ± 0.73	2.90 ± 0.74

#Mean ± S.D..

C_{max}(μg/ml)는 0.47±0.12, T_{max}(hr)는 2.84±1.03, $t_{1/2}$(hr)은 2.90±0.74이었다. 이는 문헌[7]에 보고된 글리피짓 5 mg을 당뇨환자에게 경구 투여하였을 때의 파라미터(AUC_t: 2.66μg·hr/ml, C_{max}: 0.46μg/ml, T_{max}: 2 hr 및 $t_{1/2}$: 3.1 hr)와 거의 일치함을 알 수 있었다.

결 론

사람 혈청 중 글리피짓의 HPLC 분석법을 확립 · 검증하여 생물학적동등성시험을 위한 표준지침을 마련하고자 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준[6]에 따라 서로 다른 세 기관에서 각 8-9명의 건강한 한국인 성인 남성 총 25명을 대상으로 "다이그린 정(글리피짓 5 mg)" 1정씩을 경구 투여하여 생체이용률시험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 내부표준물질을 톨부타미드로 하여 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과 혈청 성분 등 내인성 물질의 간섭 없이 글리피짓 및 내부표준물질이 양호하게 분리되었다.

2. 혈청시료로부터 구한 글리피짓 검량선의 r=0.9999로 10~1000 ng/ml 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고 최저 정량한계는 10 ng/ml이었다. 확립한 분석법을 검증한 결과 intra- 및 inter-day의 정확성 및 정밀성이 모두 15% 이내로 나타났고, 동결해동, 단기실온, 조제 후, 장기 및 표준원액 안정시험 결과 초기 측정치에 대한 변동성이 모두 10% 이내로 나타나 이 분석법은 충분한 감도, 정확성, 정밀성 및 안정성이 있음을 확인할 수 있었다.

3. 글리피짓에 대해 확립한 HPLC 분석조건에서의 이동상의 pH, 유기용매의 함량, 및 유속의 변화에 따른 약물 피크 면적이나 출현시간에 미치는 영향을 측정하여 요인분석을 실시한 결과 각 변동요인에 대한 수준에서는 유의한 차이가 나타나지 않아 이 분석법에 대한 견고성을 확보할 수 있었을 뿐 아니라 서로 다른 세 기관에서 QC 시료를 사용하여 각각 검증한 결과 정확성과 정밀성의 상대표준편차가 모두 15% 이내로 나타나 이 분석법은 확신성이 있음을 알 수 있었다.

4. 총 25명의 건강한 성인 지원자를 대상으로 "다이그린 정(글리피짓 5 mg)" 1정을 경구 투여한 결과 AUC_∞(μg·hr/ml)는 2.33±0.74, C_{max}(μg/ml)는 0.47±0.12, T_{max}(hr)는 2.84±1.03, $t_{1/2}$(hr)은 2.90±0.74이었다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 지원(KFDA-04142-약동성-407)을 받아 전남대학교 약학대학에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1) L. Balant, Clinical pharmacokinetics of sulphonylurea hypoglycemic drugs, *Clin. Pharmacokinet.*, **6**, 215-241 (1981).
2) Martindale, The complete drug reference, 32nd Eds., p. 320 (1999).
3) J. Kirchheiner and J. Brockmoller, Clinical consequences of cytochrome P4502C9 polymorphisms, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **77**, 1-16 (2005).
4) R.S. Kidd, A.B. Straughn, M.C. Meyer, J.A. Goldstein and J.T. Dalton, Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide, and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9*3 allele, *Pharmacogenetics*, **9**, 71-80 (1999).
5) J.O. Miner and D.J. Birkett, Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism, *Br. J. Pharmacol.*, **45**, 525-538 (1998).
6) 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적동등성시험 기준 (2002. 11. 22).
7) H. Emilsson, High-performance liquid chromatographic determination of glipizide in human plasma and urine, *J. Chromatogr.*, **421**, 319-326 (1987).
8) S. Dhawan and A.K. Singla, Performance liquid chromatographic analysis of glipizide: application to *in vitro* and *in vivo* studies, *J. Chromatogr. Sci.*, **41**(6), 295-300 (2003).
9) Y.J. Lee, S.J. Chung and C.K. Shim, Bioavailability Analysis Program BA Calc. 2002 for Windows, Ver. 1.1.1, Seoul National University, Seoul, Korea (2002).
10) WinNonlin™ Users Guide Ver. 3.0, Pharsight Corp. Mountain View, CA, USA (1998-1999).