

## 인체 혈장 중 니카르디핀의 정량을 위한 HPLC 분석법 검증 및 단일 용량 투여에 의한 약물동태 연구

임호택 · 조성희 · 이현우 · 박완수 · 류재환\* · 최영욱\*\* · 용철순\*\*\* · 이경태†

경희대학교 약학대학, \*경희의료원,  
\*\*중앙대학교 약학대학, \*\*\*영남대학교 약학대학  
(2005년 8월 8일 접수 · 2005년 9월 20일 승인)

### Validation of a Simple HPLC Method for Determination of Nicardipine in Human Plasma and Its Application to Single-dose Pharmacokinetics

Ho-Taek Im, Sung-Hee Cho, Heon-Woo Lee, Wan-Su Park, Jae-Hwan Rew\*,  
Young-Wook Choi\*\*, Chul-Soon Yong\*\*\* and Kyung-Tae Lee†

College of Pharmacy and \*Medical Center, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

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

\*\*\*College of Pharmacy and Institute for Drug Research, Yeung Nam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received August 8, 2005 · Accepted September 20, 2005)

**ABSTRACT**—A simple HPLC method with ultraviolet detection of nicardipine in human plasma was developed and validated. After drug extraction with solid phase extraction (SPE) method, chromatographic separation of nicardipine in plasma was achieved at 30°C with a C<sub>18</sub> column and acetonitrile-0.02% phosphate buffer mixture (with 0.02% triethylamine, final pH 7.0), as mobile phase. Quantitative determination was performed by ultraviolet detection at 254 nm. The method was specific and validated with a limit of quantification of 5 ng/mL. The intra- and inter-day precision and accuracy were acceptable for all quality control samples including the lower limit of quantification. The applicability of the method was demonstrated by analysis of plasma after oral administration of a single 40 mg dose to 8 healthy subjects. From the plasma nicardipine concentration versus time curves, the mean AUC<sub>t</sub> was 134.04±59.72 ng·hr/mL and C<sub>max</sub> of 108.65±69.17 ng/mL reached 1.5 hr after administration. The mean biological half-life of nicardipine was 3.93±0.82 hr. Based on the results, this simple and validated assay method could readily be used in any pharmacokinetic or bioequivalence studies using human.

**Key words**—Nicardipine hydrochloride, Validation, Bioavailability, HPLC

염산 니카르디핀(2-(N-benzyl-N-methylamino)-ethyl methyl 2,6-dimethyl-4-(m-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate hydrochloride)은 디하이드로피리딘계 칼슘 채널 길항제로서 외부로부터 세포막을 통한 칼슘의 유입을 막음으로서 관상동맥이나 말초의 혈관 확장을 일으킨다. 니카르디핀의 작용이 동맥혈관에 선택적이며 고혈압, 심근 허혈성 질환의 치료나 수술 환자의 혈관 확장에 매우 효과적임이 알려져 있다.<sup>1,2)</sup>

인체 및 동물 실험에서 염산 니카르디핀은 경구 투여 시 위장관에서 빠르고 완전하게 흡수 되나 비교적 낮은 혈중 농도를 나타내는데 이는 염산 니카르디핀이 간에서 일차 대사 과정을 거쳐 빠르게 대사되기 때문이다.<sup>3)</sup>

지난 수년간 생체 시료 중에서 니카르디핀 정량을 위한 HPLC 논문이 많이 발표 되었다.<sup>4,5)</sup> 보고된 인체 혈장에서의 니카르디핀의 정량으로 전기화학검출기(electrochemical detection)를 이용한 방법,<sup>4)</sup> 박막 가스 크로마토그래프 질량 분석 방법(thin layer-gas chromatography-mass spectroscopy)<sup>5)</sup> 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 방법들은 복잡하거나 번거로운 과정을 거쳐 경비 및 시간이 많이 들어 혈액 시료 분석에 적합하지 않다는 문제점을 가지고 있다.

국내에서는 니카르디핀의 인체 혈장 시료를 사용한 분석법 및 한국인을 대상으로 한 생체이용률 및 약물속도론적 파라미터들에 대한 보고가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 Sep-Pak C<sub>18</sub> 카트리지를 이용한 SPE 방법을 이용하여 간단하면서도 빠른 니카르디핀의 HPLC 분석법을 개발하고, 이 방법을 사용하여 8인의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 염산 니카르디핀의 기존 시판 제제인 페르디핀(염산 니

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)961-0860, E-mail : ktlee@khu.ac.kr

카르디핀 20 mg) 2정을 경구 투여하여 생체이용률에 따른 약물속도론 파라미터 등을 구하여, 이미 발표된 외국의 자료와 비교하여 표준 생체이용률 측정을 위한 지침을 마련하고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

실험에 사용된 시험약은 페르디핀® (제조번호: 3608, 유효기한: 2008. 07. 27) 정으로 염산 니카르디핀 20 mg을 함유하는 정제이었다. 염산 니카르디핀 표준품과 내부표준물질로 사용한 니모디핀 표준품은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, 미국)로부터 구입하였다. HPLC용 아세토니트릴, 메탄올(이상 Fisher Scientific Co.), 생리식염수 및 헤파린(이상 중외제약)은 시판품을, SPE 카트리지는 Sep-Pak® Vac 3 cc (500 mg) C<sub>18</sub> 카트리지(Waters, 미국)를, 증류수는 Milli Q (Millipore Co., Milford, MA, 미국)에서 18 MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 약물분석 기기로는 Millipore Waters HPLC system(Waters, 미국)을 검출기로는 Waters 486 UV detector를, 컬럼은 CAPCELL PAK C<sub>18</sub>(250×4.6 mm I.D., s-5 μm, Shiseido Co. Ltd, Tokyo, 일본)를, 데이터 처리장치로는 Millenium Ver 3.0(Waters, 미국)를 사용하였다.

### 피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 제 2002-60호(2002. 11. 22) 생물학적동등성시험기준<sup>6)</sup>에 근거하여 지원자 모집공고를 통하여 만 19-55세의 건강한 성인으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액질환의 병력이 없고 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 모집 공고하고 지원신청서를 받아 지원자 8명을 모집하였다. 지원자 8명에 대한 건강진단은 경희의료원에서 실시하여 생물학적동등성시험기준의 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 자로서 생물학적동등성시험에 적합한 건강한 사람으로 판정된 8명을 피험자로 선정하였다. 피험자로 선정된 사람들의 평균체중은 64.9 kg, 평균나이는 만 22.9세 이었다. 이들로부터 참여 동의를 받은 후 생체이용률 시험을 실시하였다. 모든 지원자는 정해진 투약일 10일 전부터 항생제 및 진통제등을 포함한 일체의 약물 복용을 금지시켰고, 흡연 및 xanthine계 음료 등을 제한 관리 하였다. 시험 전날 오후 8시부터 시험 당일 투약 후 4시간까지는 금식시켰다. 또한 시험 기간 중에는 연구자의 지시에 따라 모두 같은 식단의 식사 및 경미한 활동을 하게 하였다.

### 약물 투약 및 혈액 채취

생체이용률 측정을 위하여 8명의 지원자에 대하여 각각 동일 투약 일에 투여하고, 투약량은 페르디핀® (염산 니카르디핀 20 mg) 2정을 경구투약하였다. 피험자들 모두에게 heparin-locked catheter를 팔 정맥부위에 설치하고 240 mL의 물과 함께 복용시켰다. 피험자 간 복약 시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 약 1분 간격으로 실시하였고, 염산 니카르디핀 40 mg 투약 시 반감기가 5.35시간으로 보고<sup>7)</sup> 되어있어, 채혈은 약물의 혈중 소실 반감기를 토대로 반감기의 3 배 이상인 24시간동안 실시하였다. 채혈 횟수는 약물 투약 직전과 투약 후 0.5, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 3, 4, 6, 9, 12 및 24시간의 총 13시점에서 실시하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter에 남아있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 0.5 mL의 혈액을 빼내어 버리고 헤파린으로 처리된 주사기로 약 5 mL의 혈액을 헤파린(30 IU/mL)으로 처리된 튜브에 채취하였다. 채혈 후마다 I.V. catheter안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 헤파린을 주입하였다. 채혈된 혈액은 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장만을 플라스틱 튜브에 옮기고 이 튜브를 영하 70의 초저온 냉동기에 넣어 분석 시까지 보관하였다. 피험자들의 혈액채취는 일반인들의 출입이 통제된 격리된 방에서 실시하며, 사용하는 기구는 완전 멸균된 1회용으로 하였다. 피험자의 입원, 채혈 및 휴식 등의 모든 일은 경희의료원에서 타인과 격리된 상태에서 이루어졌다.

### 혈장 중 니카르디핀의 정량

혈장 중 니카르디핀 정량은 이미 보고된 니카르디핀 분석법<sup>7)</sup>을 참조하여 상기 기기조건하 실온에서 이동상으로는 아세토니트릴과 0.02% 인산 완충액을 63:37의 비율로 섞여 여기에 트리에틸아민을 0.02% 첨가하여 인산으로 최종 pH를 7.0으로 맞춘 용액을 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min, 컬럼 오븐 내 온도는 30°C, 주입량은 100 μL로 하여 UV검출기(파장 254 nm)로 니카르디핀을 정량하고 다음과 같이 검량선을 작성 하였다.

염산 니카르디핀 표준품을 10% 메탄올에 녹여 니카르디핀으로서의 농도를 1000 μg/mL로 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 공혈장에 가하여 니카르디핀의 혈장 중 농도가 각각 5(정량한계 농도), 10, 20, 50, 100, 200 및 500 ng/mL 농도가 되도록 검량선용 표준 혈장액을 조제하였다. 각각의 검량선용 표준 혈장액 1 mL에 내부표준물질로 니모디핀(10 μg/mL) 10 μL를 첨가한 후 30초 동안 진탕하였다. 이어서 미리 메탄올과 물로 활성화시켜 놓은 Sep-Pak C<sub>18</sub> 카트리지에 준비된 혈장 시료를 가한 후

물과 30% 메탄올을 이용하여 세척 한 후 니카르디핀과 내부표준물질을 100% 메탄올(1% 트리에칠아민 함유)로 유출시켰다. 이 시료를 Speed-Vac evaporator를 이용하여 유기용매 층을 날린 후 200  $\mu$ L의 이동상으로 재구축하였다. 이를 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상등액 100  $\mu$ L를 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질 니모디핀의 피이크 높이에 대한 니카르디핀의 피이크 높이 비를 구하여 검량선을 작성하였으며 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 70°C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음 이 혈장 1 mL를 취하고 여기에 내부표준물질로 니모디핀(10  $\mu$ g/mL) 10  $\mu$ L를 가한 후 흔들어 섞었다. 상기 검량선 작성을 위한 추출법에 따라 추출하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질 니모디핀의 피이크 높이에 대한 니카르디핀의 피이크 높이 비를 구하여 미리 작성한 검량선에 의해 혈장 시료 중 니카르디핀의 농도를 산출하였다.

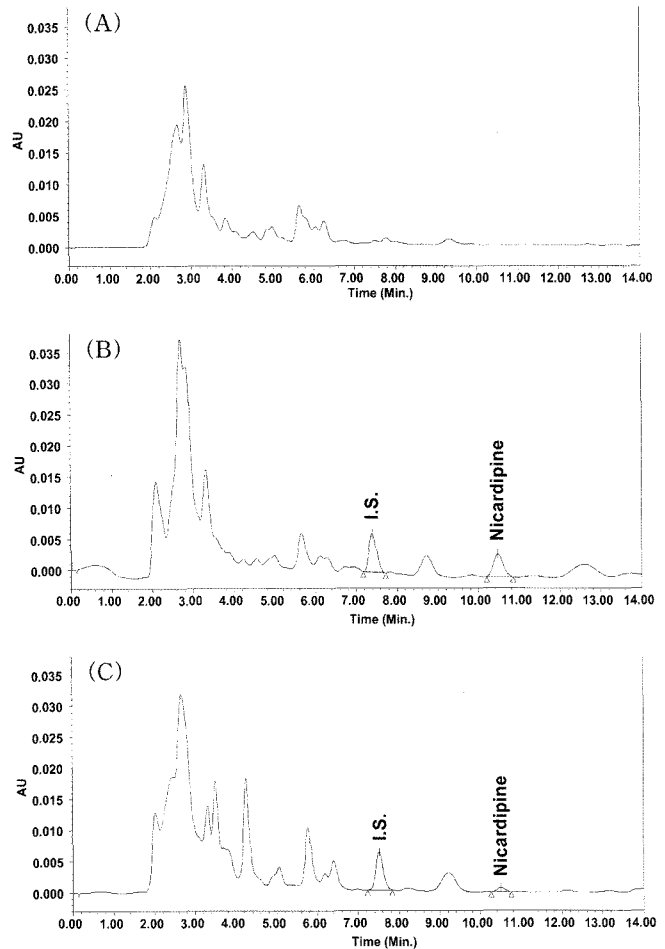
**약물속도론적 파라미터의 분석 및 생체이용률 평가**

페르디핀 정을 각각 2정씩 8명의 지원자에게 따라 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적 파라미터인 AUC, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, k<sub>e</sub> 및 t<sub>1/2</sub>은 WinNonlin(version 1.1)을 이용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**혈장 중 니카르디핀의 정량**

건강한 성인의 대조혈장과 대조혈장에 내부표준물질인 니모디핀과 니카르디핀을 함께 가한 것 및 니카르디핀 정제 투여 후 1시간째의 혈장을 본 시험방법에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 1에 나타내었다. 니카르디핀 피이크의 출현 시간은 약 10.5분, 내부표준물질 니모디핀 피이크의 출현 시간은 약 7.5분이었으며 각 물질의 분리 상태는 양호 하였다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5로 하고 일내 및 일간 변동계수의 크기를 20% 미만으로 하였을 때의 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 5 ng/mL이었다. 혈장시료로부터 구한 니카르디핀의 검량선의 계산식은 y(니카르디핀/내부표준물질 니모디핀 피이크 높이의 비율)=0.6×10<sup>-2</sup>×니카르디핀 농도(ng/mL, x)-1.1×10<sup>-2</sup>(r<sup>2</sup>=0.9999)로 5-500 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 이 농도 범위에서 있어서 니카르디핀의 일내 정밀



**Figure 1**—Chromatograms of (A) blank human plasma, (B) plasma spiked with nicardipine (100 ng/mL) and internal standard (nimodipine 10  $\mu$ g/mL), and (C) plasma (48.31 ng/mL) obtained from a volunteer at 1.0 hr after an oral administration of 40 mg nicardipine hydrochloride tablet.

성(C.V., %) 및 정확성은 검량선의 최저농도(5 ng/mL)에서 C.V.는 12.43% 및 정확도에서 117.9%를 보였으며 기타 농도에서는 15% 이내로 확인되었다. 일간 정밀성 및 정확도에서 최저 농도인 5 ng/mL에서 C.V.는 0.64%를, 정확도에서 117.4%를 보였으며 기타 농도에서는 전부 15% 이하의 결과를 나타내었다(Table I). 이로부터 혈장 중 니카르디핀에 대한 상기 HPLC 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

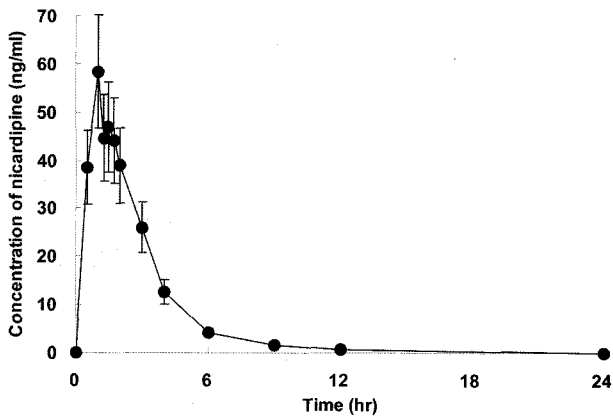
**혈장 중 니카르디핀 농도 추이**

페르디핀® (니카르디핀 20 mg) 2정씩을 지원자 8명에게 경구 투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 각 제제의 전체 피험자에 대한 혈장 중 니카르디핀의 평균농도를 Figure 2에

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

Concentration (ng/mL)	Precision C.V.(%)		Accuracy(%)	
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)
5	12.43	0.64	117.9	117.4
10	11.13	0.18	99.9	99.7
20	12.41	2.17	92.1	91.5
50	3.62	0.27	96.4	96.5
100	5.27	1.88	98.7	98.9
200	1.77	2.03	102.7	101.7
500	2.77	0.82	99.7	99.3

C.V.(%)=S.D./mean×100



**Figure 2—Mean (±S.D., n=8) plasma concentration-time curves of nicardipine following oral administration of Perdipine tablet at the dose of 40 mg of nicardipine hydrochloride.**

나타내었다. 또한, 피험자에 대해 약물을 투여하여 얻은 혈장 중 약물 농도-시간 곡선으로부터 산출한 약물속도론적 파라미터(AUC, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, k<sub>e</sub> 및 t<sub>1/2</sub>)를 Table II에 나타내었다. 페르디핀® (니카르디핀 20 mg) 2정을 경구투여 하였을

때의 AUC<sub>t</sub>(ng · hr/mL)는 134.04±59.72, C<sub>max</sub>(ng/mL)는 108.65±69.17, T<sub>max</sub>(hr)는 1.5±1.0, k<sub>e</sub>(hr<sup>-1</sup>)는 1.04±0.59 및 t<sub>1/2</sub>(hr)는 3.93±0.82이었다. 이는 외국 문헌<sup>7)</sup>에 보고된 40 mg 경구 투여의 경우(AUC<sub>∞</sub>: 322.1±69.6 ng · hr/mL, C<sub>max</sub>: 109.8±38.7 ng/mL, T<sub>max</sub>: 1.6±0.3 hr, t<sub>1/2</sub>: 5.35±2.28 hr)와 비교할 때 C<sub>max</sub>와 T<sub>max</sub>는 유사한 결과를 보였으나 문헌에서와 같이 채혈 시간을 9시간까지로 하였을 경우의 AUC<sub>∞</sub>와 본 실험에서 24시간까지 채혈한 AUC와의 비교에서는 다소 차이가 있었음을 보여주고 있다.

**결 론**

니카르디핀의 간편한 HPLC 분석법의 유효성을 검토하여 생체이용률 측정을 위한 표준 지침을 마련하고자 식품의약품안정청이 고시한 제 2002-60호(2002. 11. 22) 생물학적동등성시험기준<sup>6)</sup>에 근거하여 8인의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 페르디핀® (니카르디핀 20 mg) 2정씩을 8명의 지원자에게 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적

**Table II—Bioavailability Parameters for Each Volunteer Obtained after Oral Administration of Perdipine Tablet at the Nicardipine HCl Dose of 40 mg**

Volunteer	Perdipine Tablet				
	AUC <sub>t</sub> (ng · hr/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (hr)	k <sub>e</sub> (hr <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (hr)
1	87.06	137.67	0.5	0.50	5.25
2	259.88	242.49	1.0	1.00	2.84
3	135.76	48.31	1.0	1.00	3.51
4	79.29	74.26	0.5	0.50	4.02
5	149.43	117.64	1.5	1.50	3.50
6	141.86	87.80	3.0	3.00	3.98
7	144.34	143.00	1.8	1.75	3.36
8	74.70	18.00	3.0	3.00	4.98
Mean	134.04	108.65	1.5	1.04	3.93
(S.D.)	59.72	69.17	1.0	0.59	0.82

파라미터인  $AUC_t$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $k_e$  및  $t_{1/2}$ 을 WinNonlin (version 1.1)을 이용하여 구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장을 Sep-Pak  $C_{18}$  카트리지로 전처리하여 HPLC 크로마토그램으로 분석한 결과 혈장성분 등 내부 간섭물질의 방해 없이 니카르디핀 및 내부 표준물질인 니모디핀을 분리하였다.

2. 혈장시료로부터 구한 니카르디핀의 검량선의  $r^2=0.9999$ 로 5~500 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고 정량 한계는 5 ng/mL이었다. 분석법을 검증한 결과 intra-day와 inter-day의 평균 정밀성과 정확성이 모두 기준값 이내에 들어 이 분석법은 충분한 감도와 정확성 및 정밀성이 있었다.

3. 8명의 건강한 한국인 지원자를 대상으로 페르디핀® (염산 니카르디핀 20 mg) 2정을 경구투여 한 결과  $AUC_t$ 는  $134.04 \pm 59.72$  ng · hr/mL,  $C_{max}$ 는  $108.65 \pm 69.17$  ng/mL,  $T_{max}$ 는  $1.5 \pm 1.0$  hr,  $k_e$ 는  $1.04 \pm 0.59$  hr<sup>-1</sup> 및  $t_{1/2}$ 는  $3.93 \pm 0.82$  hr이었다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면 니카르디핀의 간편한 HPLC 분석법 및 생체이용률 시험을 수행하여 얻은 실험결과를 향후 생물학적동등성시험 수행지침으로 활용할 수 있다고 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 국립독성연구원의 지원(KFDA-04142-약동성-423)을 받아 경희대학교에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) Y. Kishi, F. Okumura and H. Furuya, Haemodynamic effects of nicardipine hydrochloride. Studies during its use to control acute hypertension in anaesthetized patients, *Br. J. Anaesth.*, **56**, 1003-1007 (1984).
- 2) E.S. Hysing, J.E. Chelly, M.F. Doursout, C. Hartley and R.G. Merin, Cardiovascular effects of and interaction between calcium blocking drugs and anesthetics in chronically instrumented dogs. III. Nicardipine and isoflurane, *Anesthesiology*, **65**, 385-391 (1986).
- 3) E.M. Sorkin and S.P. Clissold, Nicardipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy, in the treatment of angina pectoris, hypertension and related cardiovascular disorders, *Drugs*, **33**, 296-345 (1987).
- 4) R.J. Eastwood, C. Galustian, R.K. Bhamra and D.W. Holt, High-performance liquid chromatographic method for the measurement of nicardipine in plasma or serum, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **530**, 463-468 (1990).
- 5) S. Higuchi and S. Kawamura, Specific determination of plasma nicardipine hydrochloride levels by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **223**, 341-349 (1981).
- 6) 식품의약품안전청 고시 제 2002-60호, 생물학적동등성 시험 기준 (2002. 11. 22).
- 7) K. Li, X. Zhang, Y.S. Yuan and F.L. Zhao, A high-performance liquid chromatographic method for the determination of nicardipine in plasma and its application to pharmacokinetics in humans, *Biomed. Chromatogr.*, **12**, 326-329 (1998).