약제학회지(2004), 제 34 권 제 6 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 34, No. 6, 513-519 (2004)

LC-ESI-MS/MS를 이용한 생체시료 중 브롬화피나베리움의 고감도 분석 및 이를 이용한 생체이용률 평가

박 석 · 이예리* · 김호현* · 이희주* · 김윤균** · 염정록 · 한상범†
*중앙대학교 약학대학, *서울의과학연구소, **단국대학교 의과대학*
(2004년 10월 15일 접수 · 2004년 11월 22일 승인)

Sensitive Determination of Pinaverium Bromide in Human Plasma by LC-ESI-MS/MS : Applicability to Oral Bioavailability Determination

Seok Park, Ye-Rie Lee*, Hohyun Kim*, Hee Joo Lee*, Yoon Gyoon Kim, Jeong-Rok Youm and Sang Beom Han†**
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
**Seoul Medical Science Institute, Seoul Clinical Laboratories, Seoul 140-809, Korea*
***College of Medicine, Dankook University, Chonan 330-714, Korea*
(Received October 15, 2004 · Accepted November 22, 2004)

ABSTRACT–A sensitive method for quantification of pinaverium bromide in human plasma was established using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry(LC-ESI-MS/MS). Glimepiride was used as internal standard. Pinaverium bromide and internal standard in plasma sample were extracted using *tert*-butylmethylether(TBME). A centrifuged upper layer was then evaporated and reconstituted with mobile phase of acetonitrile-5 mM ammonium formate (80/20, pH 3.0). The reconstituted samples were injected into a C_{18} reversed-phase column. Using MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode, pinaverium and glimepirde were detected without severe interference from human plasma matrix. Pinaverium produced a protonated precursor ion ($[M+H]^+$) at m/z 510.3 and a corresponding product ion at m/z 228.9. Internal standard produced a protonated precursor ion ($[M+H]^+$) at m/z 491.5 and a corresponding product ion at m/z 352.0. Detection of pinaverium bromide in human plasma was accurate and precise, with limit of quantitation at 0.5 ng/m*l*. The method has been successfully applied to bioavailability study of pinaverium bromide tablet in Korean healthy male volunteers. Pharmacokinetic parameters such as AUC_t, C_{max}, T_{max}, K_{el} and $t_{1/2}$ were calculated.

Key words–Pinaverium bromide, LC-ESI-MS/MS, Bioavailability, Pharmacokinetic parameters

브롬화피나베리움 (Pinaverium bromide, 4-[(2-Bromo-4,5-dimethoxyphenyl)methyl]-4-[2-[2-(6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-yl)ethoxy]ethyl]morpholinium bromide, $C_{26}H_{41}Br_2NO_4$, MW 591.42)은 강한 파파베린 유사 진경제로서 4급 암모늄 유도체이다.[1] GI(gastrointestinal) tract에 가장 선택적인 약물로서 최초의 Ca^{2+} 차단제이며, 복통, 복부불쾌감과 연관된 IBS(Irritable Bowel Syndrome)에 쓰이고, 통증과 관련된 담도 기능장애 및 바륨 관장을 위한 제제로도 사용된다.[2-5]

브롬화피나베리움과 같은 4급 암모늄 화합물은 경구 투여 후 세포막과 위장벽으로 이동이 쉽지 않은 것으로 알려져 있다.[6] 따라서 브롬화피나베리움은 혈중 흡수되는 양이 10% 이하로 낮은 생체이용률을 보이며,[7] 이러한 이유 때문에 혈중에서 브롬화피나베리움을 정량하기 위해서는 고감도의 분석법이 필요하다. 이미 보고된 생체시료 중의 브롬화피나베리움 분석 방법 중에는 Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)법[1]이 있으나, 유도체화 반응이 필요하여 시료 전처리 과정이 매우 복잡하며, 분석 시간이 긴 단점을 가지고 있다. 또한 정량한계(LOQ)가 2.5 ng/m*l* 정도 이어서, 약물속도론적 파라미터를 구할 수 있는 충분한 혈중농도-시간 곡선을 얻을 수 없었다. 이러한 이유로 아직까지 한국인을 대상으로 한 생체이용률 시험과 약물속도론적 파라미터들에 대한 보고가 없다.

따라서 본 연구에서는 기존 분석법의 단점을 극복하고자 liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry(LC-ESI-MS/MS)를 이용하여 사람 혈장 중의 브롬화피나베리움에 대한 새로운 분석법을 개발하였다. 이 분석법은 기존의 방법에 비해 훨씬 시료 전처리가 간단하며,

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)820-5596, E-mail : hansb@cau.ac.kr

높은 검출 감도와 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 보였다. 이 분석법을 이용하여 8인의 건강한 한국인 남성에게 브롬화피나베리움 제제인 "디세텔정 50 mg" 2정을 투약하고, 혈 중 피나베리움의 농도를 구하였다. 또한 브롬화피나베리움의 생체이용률에 따른 약물속도론적 파라미터 등을 구하였으며, 브롬화피나베리움에 대한 생물학적동등성시험 표준지침을 제시할 수 있었다.

실험 방법

시약 및 기기

실험에 사용된 시험약은 일양약품(주)의 "디세텔정 50 mg"(제조번호 : C011, 사용기한 : 2007년 4월 27일)으로 브롬화피나베리움을 50 mg 함유하는 정제이다. 브롬화피나베리움 표준품과 내부표준물질로 사용한 글리메피리드 표준품은 일양약품(Seoul, Korea)에서 제공받았으며, ammonium formate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, HPLC용 아세토니트릴은 Fisher 사(Fair Lawn, NJ, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 주사용 생리식염수 및 헤파린은 중외제약(Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 증류수는 PURE-UP(Chem-Science, USA)에서 18 MΩ-cm로 여과한 것을 사용하였다. TBME(*tert*-butylmethylether) 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

혈장 시료 분석에 있어서 HPLC용 펌프로 Agilent 1100 Series(Palo Alto, CA, USA)를, HPLC용 칼럼으로는 Capcell Pak C18(2.0×150 mm, 5 μm, Shiseido, Japan)을, 시료자동주입기로 CTC Autosampler(CTC Analytics, Switzerland)를, MS/MS 검출기로는 API 3000 triple-quadrupole mass spectrometry(Applied Biosystems MDS SCIEX, Canada)를, 데이터 처리장치로는 Analyst(Ver. 1.3.2.)를 사용하였다.

피험자 선정 및 관리

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험기준[8]에 근거하여 만 19~55세의 건강한 성인 남성으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액 질환의 병력이 없고, 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은자를 모집공고하여 지원자 11명을 모집하였다. 지원자를 대상으로 시험의 목적, 시험대상 성분에 대한 약리작용 및 이상약물반응 가능성, 시험내용, 주의사항 및 보상내용 등을 설명하였고, 이들을 대상으로 서울시 서초구 양재동 108-1번지에 위치한 비이의원 건강검진센터에서 건강진단을 실시하였다. 11명의 지원자 중 피험자 선정기준 및 제외기준에 따라 선정기준에 모두 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 건강한 사람으로 판정된 8인을 선정하였으며, 자발적인 의사결정에 따라 시험참가동의서를 받은 후 생체이용률시험을 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 xanthine계 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 한번 주지시키고, 오후 10시경에 취침하도록 하였으며, 시험 당일 오전 7시경에 비이의원 건강검진센터에 도착하여 시험 준비에 착수하였다.

약물 투약 및 혈액 채취

약물 투약, 채혈 및 피험자 관리는 비이의원 건강검진센터의 일반인과 격리된 공간에서 시험담당자인 전문의의 감독하에 실시하였다. 모든 피험자들의 상완 정맥부위에 heparin-locked I.V. catheter를 설치하고 공혈액을 채혈한 다음, 2분 간격으로 시험약 2정씩을 240 m*l*의 물과 함께 투약하였다. 채혈은 투약직전, 투약 후10분, 20분, 30분, 45분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 3시간 4시간, 6시간 및 8시간의 총 13시점에서 실시하였다. 채혈 시 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 1 m*l*의 혈액을 빼내어 버리고 약 8 m*l*의 혈액을 heparinized vacutainer에 채취하였다. 채혈 후마다 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리 식염수 0.5 m*l*를 주입하였다. 채혈된 혈액의 응고를 방지하고 혈구의 파괴를 막기 위해, vacutainer를 천천히 흔들어 섞고, 잠시 방치한 다음 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 혈장만을 취하여 polypropylene시험관에 옮겨 담고 분석시까지 영하 70°C에서 보관하였다.

혈장 중 피나베리움의 정량

검량선 작성-브롬화피나베리움 표준품을 이동상에 녹여 농도를 피나베리움으로서 1.0 mg/m*l*로 만들어 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 공혈장으로 희석하여 피나베리움의 혈장 중 농도가 각각 0.5(정량한계 농도), 1, 2, 5, 10, 20, 40, 50 ng/m*l*가 되도록 검량선용 표준혈장을 조제하였다. 각각의 표준혈장 0.5 m*l*를 glass tube에 넣고 여기에 내부표준물질인 글리메피리드 용액50 μ*l*(1 ppm, 이동상에 녹임)를 가하고 3 m*l*의 추출용매 *tert*-butylmethylether를 가하고 30분 동안 왕복진탕기에서 잘 섞어 추출하였다. 3000

rpm에서 10분간 원심분리한 후, 유기층을 취하여 질소기류로 완전히 건조시켰다. 여기에 이동상 200 μl로 reconstitution을 시키고, 이 중 20 μl를 취하여 LC-ESI-MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 피나베리움의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다. 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고, 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

LC-ESI-MS/MS 조건–전처리된 혈장 시료는 다음의 조건에서 정량하였다. 이동상으로는 5 mM ammonium formate 완충액(pH 3.0)과 아세토니트릴의 혼액(20:80, v/v)을 사용하였으며, 칼럼은 Capcell Pak C18(2.0×150 mm, 5 μm, Shiseido, Japan)을 사용하였다. 유속은 0.2 ml/min였으며, 피이크 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MRM(multiple reaction monitoring) 방법으로 검출하였다. 이온화는 electrospray ionization(ESI)을 사용하여 positive ion mode로 분석하였으며, nebulizing gas와 collision gas는 모두 질소가스를 사용하였고, ion spray 온도는 350°C로 설정하였다. MRM 방법을 이용한 피나베리움과 내부표준물질인 글리메피리드의 precursor ion은 각각 m/z 510.3과 491.5의 수소화된 분자이온을 사용하였으며, 생성된 product ion은 m/z 228.9와 352.0 이온을 모니터링 하였다.

혈장 시료의 처리 및 농도 계산–피험자로부터 각 시간별

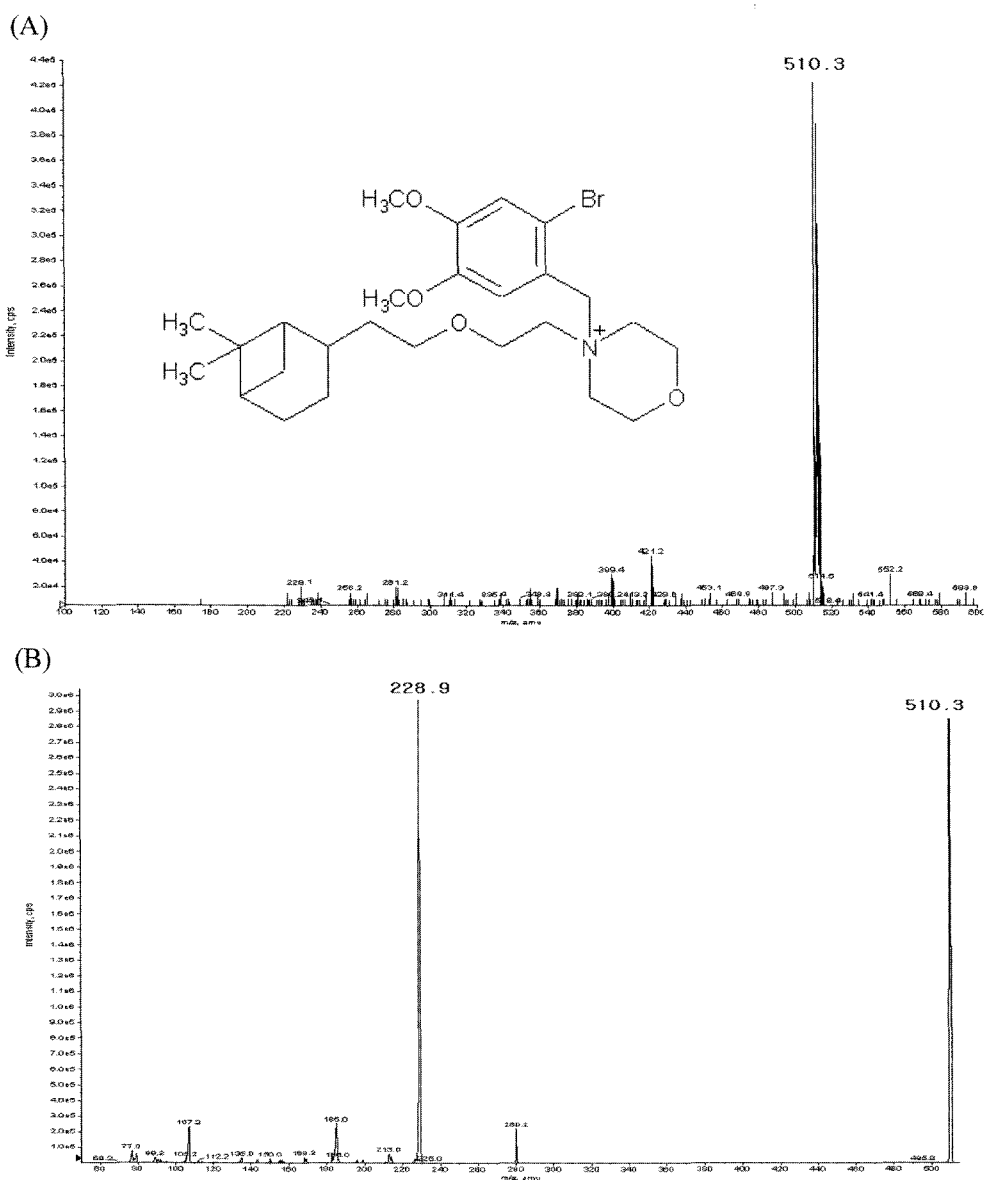

Figure 1–Electrospray Positive ion Q1 mass spectrum (A) and product ion mass spectrum (B) used in MRM for pinaverium determination.

로 채취하여 영하 70°C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후, 3초간 진탕한 다음 이 혈장 0.5 ml을 취하고, 위 검량선 작성과 동일한 방법으로 처리하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피이크 면적에 대한 피나베리움의 피이크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 피나베리움의 농도를 구하였다.

생체이용률 파라미터

생체이용률(BA) 파라미터들로서 AUC_t, C_{max}, T_{max}는 LC-ESI-MS/MS분석방법에 의해서 얻은 혈장 중 약물농도-시간곡선으로부터 구하였다. 최고혈중농도(C_{max})와 최고혈중농도 도달시간(T_{max})은 실측치로부터 직접 구하였고, 투약 후 마지막 채혈 시간인 8시간까지의 혈중농도-시간곡선하면적(AUC_t)은 사다리꼴 공식에 의하여 산출하였다. 혈장 중 피나베리움의 소실속도상수(K_{el}) 및 소실반감기($t_{1/2}$)는 BA Calc 2002를 이용하여 구하였다.

결과 및 고찰

혈장 중 피나베리움의 분석법 검증

피나베리움과 내부표준물질인 글리메피리드의 precursor ion은 positive ion mode에서 $[M+H]^+$으로 검출되어, 피나베

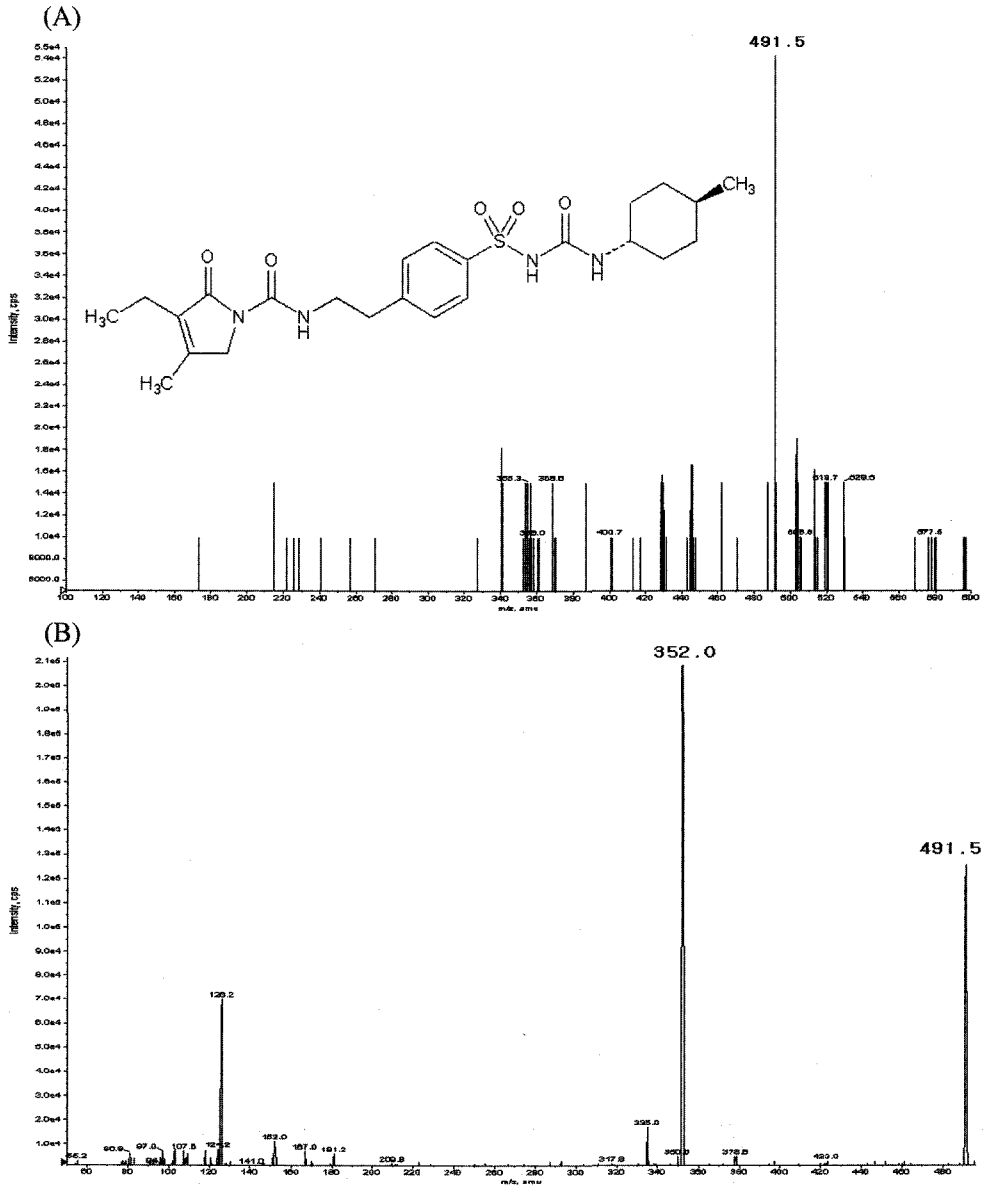

Figure 2–Electrospray Positive ion Q1 mass spectrum (A) and product ion mass spectrum (B) used in MRM for internal standard (glimepiride).

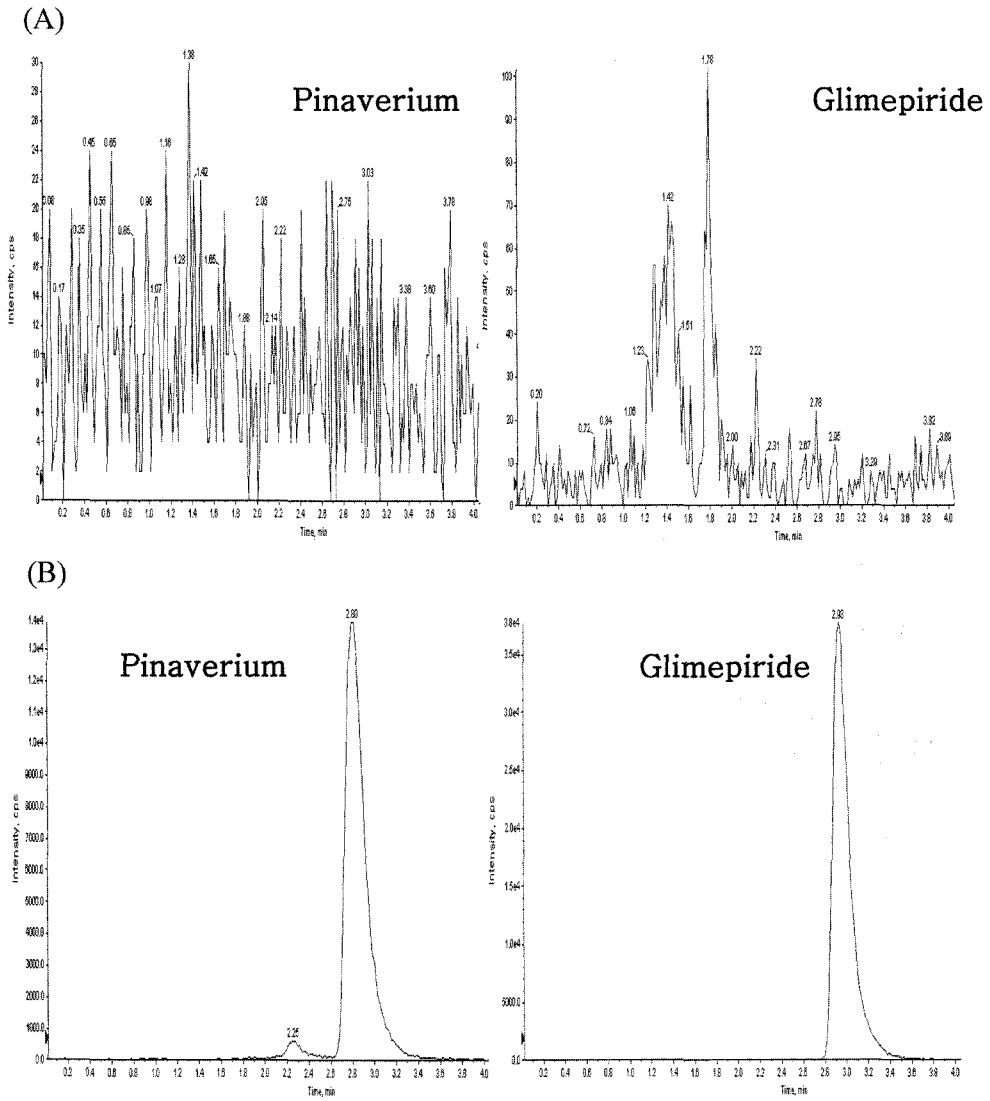

Figure 3–LC-ESI-MS/MS chromatograms of (A) a blank human plasma sample, (B) human plasma spiked with 10 ng/m*l* of pinaverium and 100 ng/m*l* of glimepiride (internal standard).

리움은 m/z 510.3(Figure 1), 글리메피리드는 m/z 491.5 (Figure 2)의 ion을 precursor ion으로 선정하였다. 선정한 precursor ion의 product ion scan을 통하여, 가장 잘 검출되는 피나베리움과 글리메피리드의 product ion은 m/z 228.9와 m/z 352.0의 ion으로 선정하였다.

건강한 성인의 공혈장과 공혈장에 브롬화피나베리움과 내부표준물질을 함께 가한 것 및 브롬화피나베리움 제제 100 mg을 투여한 후 20 분에 채취한 혈장을 본 시험방법에 따라 전처리한 후, LC-ESI-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 3과 Figure 4에 나타내었다. 브롬화피나베리움 피이크의 유지시간은 약 2.80분, 내부표준물질 글리메피리드 피이크의 유지시간은 약 2.93분이었으며, MS/MS의 높은 선택성 때문에 분석물질에 방해되는 물질은 나타나지 않았다.

공혈장 시료, 공혈장에 내부표준물질만 가한 혈장시료 및 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 50 ng/m*l*의 검량선용 표준혈장시료를 각각 전처리한 후 LC-ESI-MS/MS로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 피나베리움 검량선의 계산식은 Y(피나베리움/내부표준물질 피이크 면적의 비율)=0.0798×(피나베리움 농도, ng/m*l*)–0.0185(r=0.9998)으로 0.5~50 ng/m*l*범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

혈장 중 피나베리움 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 9로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 0.5 ng/m*l* 이었다. 최저정량한계를 제외한 검량선 농도 범위에서 피나베리움의 일내 및 일간 변동계수

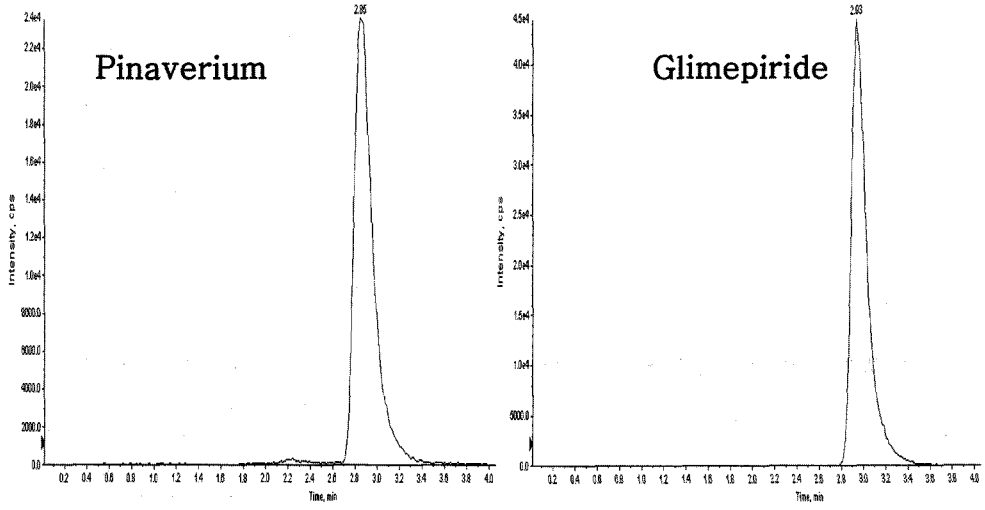

Figure 4–LC-ESI-MS/MS chromatograms of volunteer's plasma sample after the administration of an oral dose of 100 mg of pinaverium bromide. The sample's concentration was 19.5 ng/m*l*.

Table I–*Precision and Accuracy of LC-ESI-MS/MS Analysis for Pinaverium in Human Plasma*

Concentration (ng/mL)	Coefficient of Variation(%)		Accuracy (n=5)
	Intra-Day (n=5)	Inter-Day (n=5)	
0.5	15.07	7.79	103.7
2.0	7.82	7.08	92.1
10.0	7.75	3.67	92.2
20.0	5.52	8.70	100.5
40.0	3.46	4.20	104.6

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

(C.V.)는 모두 8.70% 이하로 나타났고, 정확성은 92.1~104.6% 이었다(Table I). 이로부터 혈장 중 피나베리움에 대한 본 LC-ESI-MS/MS 분석법은 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

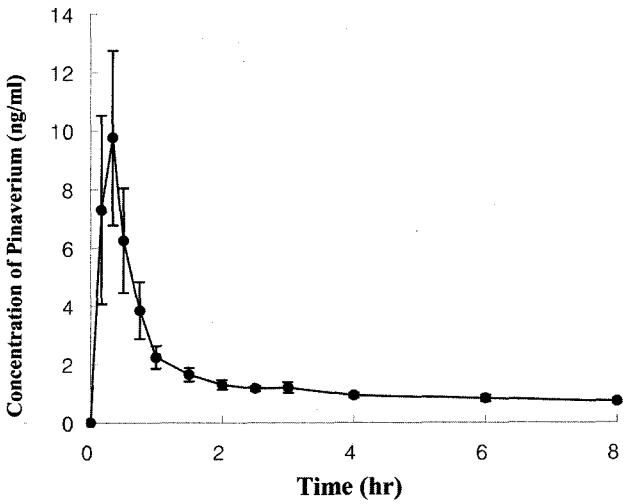

Figure 5–Mean plasma concentration-time curves of pinaverium following oral administration of Dicetel tablets at the dose of 100 mg of pinaverium bromide (Mean ± S.D., n=8).

브롬화피나베리움 제제의 생체이용률

피험자 8인에게 "디세텔정 50 mg" 2 정(브롬화피나베리움으로서 100 mg)을 물 240 m*l*와 함께 경구 투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 혈장 중 피나베리움 평균농도-시간 곡선을 Figure 5에 나타내었다. Table II에 8인의 피나베리움 흡수 파라미터(AUC_t, C_{max} 및 T_{max})와 소실 파라미터(K_{el}, $t_{1/2}$) 등을 나타내었다.

"디세텔정 50 mg"의 평균 혈중농도-시간곡선하면적 AUC_t(ng·hr/m*l*)는 12.5±4.0, 최고혈중농도C_{max}(ng/m*l*)는 13.0±9.4, 최고혈중농도 도달시간 T_{max}(min)는 20.0±7.6, 소실속도상수 K_{el}(hr^{-1})는 0.170±0.089, 소실반감기 $t_{1/2}$(hr)는 4.95±2.09 이었다.

브롬화피나베리움에 대한 약물속도론적 파라미터에 대한 보고는 매우 제한되어 있다. 브롬화피나베리움 약물의 최초 개발사인 Solvay Kingswood사(Ontario, Canada)의 기술자료에 의하면,[7] 건강한 성인에게 브롬화피나베리움 50 mg을 경구 투여하였을 때, C_{max}는 7.2 ng/m*l*, 소실반감기는 1.5 시간으로 보고되어 있어, 서로 다른 투약량을 감안하였을 때, 본 연구결과와 C_{max}값에는 큰 차이가 없으나, 소실 반감기는 다소 큰 차이를 보이고 있다. 참고문헌에서는 혈 중 브롬화피나베리움의 농도를 분석할 때, 정량한계가 2.5 ng/m*l*에 불과하여 채혈시간 2시간까지만 정량할 수 있었다. 따라서, 약

Table II–*Individual Pharmacokinetic Parameters of Dicetel Tablet (100 mg Pinaverium Bromide)*

Subject	Parameters				
	AUC_t (ng·hr/mL)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	K_{el} (hr^{-1})	$t_{1/2}$ (hr)
1	5.1	1.7	20	0.082	8.47
2	13.0	10.3	10	0.278	2.50
3	8.0	2.7	20	0.145	4.79
4	16.8	16.3	30	0.151	4.58
5	15.7	27.8	10	0.102	6.77
6	13.1	23.0	20	0.134	5.16
7	14.4	15.8	20	0.337	2.05
8	13.8	6.5	30	0.131	5.30
Mean	12.5	13.0	20	0.170	4.95
S.D	4.0	9.4	7.6	0.089	2.08

물속도론적 파라미터를 구할 수 있는 충분한 혈중농도-시간 곡선을 얻을 수 없었으며, 이에 따라 문헌에 보고된 반감기 1.5 시간은 다소 짧게 계산된 것이라 생각된다.

또 다른 문헌에서 브롬화피나베리움 100 mg을 경구투여 하였을 때,[1] C_{max}는 26 ng/ml, T_{max}는 30 분으로 보고되어 있는데, 이는 전처리 방법이 유도체화 반응을 통하여 매우 복잡하고 시료를 GC/MS법으로 분석하여, 인종간 차이뿐만 아니라 분석 방법에 따른 혈중 농도 차이도 있을 것으로 사료된다.

결 론

브롬화피나베리움의 매우 낮은 생체이용률로 인하여 생체시료 중의 농도를 분석함에 있어 많은 한계가 있으며, 이러한 이유로 브롬화피나베리움에 대한 약물동력학, 생체이용률, 생물학적동등성시험 등을 수행하는 데에 많은 어려움이 있었다. 따라서, 본 연구에서는 LC-ESI-MS/MS를 이용하여 보다 시료 전처리가 간편하고, 높은 감도와 짧은 분석시간을 갖는 브롬화피나베리움의 생체시료 분석법을 확립하였으며, 이 분석법에 대한 검증(validation)을 실시하였다.

또한, 국내에서는 한국인을 대상으로 한 브롬화피나베리움의 생체이용률시험이 행해진 바가 없으며, 이에 따라 한국인의 브롬화피나베리움에 대한 혈중농도-시간곡선하면적(AUC_t), 최고혈중농도(C_{max}), 최고혈중농도 도달시간(T_{max}), 소실속도상수(K_{el}), 소실반감기($t_{1/2}$) 등이 보고되어 있지 않아, 의료 전문인에게 약물의 정보가 제한된 측면이 있었다.

따라서 본 연구에서는 8명의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 브롬화피나베리움의 기존 시판 제제인 "디세텔정 50 mg"(pinaverium bromide 50 mg)을 경구 투약하여 생체이용률시험을 실시하고, 브롬화피나베리움 제제의 약물속도론적 파라미터를 제시하여, 향후 약물치료에 유용한 자료로 활용될 수 있도록 하였다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 지원을 받아 중앙대학교에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1) G.A. de Weerdt, R.P. Beke, H.G. Verdievel, F. Barbier, J.A. Jonckheere and A.P. de Leenheer, Quantitative gas chromatographic mass spectrometric determination of pinaverium-bromide in human serum, *Biomed. Mass Spectrum.*, **10**, 162-167 (1983).

2) C.L. Lu, C.Y. Chen, F.Y. Chang, S.S. Chang, L.J. Kang, R.H. Lu and SD Lee, Effect of a calcium channel blocker and antispasmodic in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, *J. Gastrsenterol. Hepatol.*, **15**, 925-930 (2000).

3) M. Bouchoucha, A. Faye, G. Devroede and M. Arsac, Effect of oral pinaverium bromide on colonic response to food in irritable bowel syndrome patients, *Biomed. Pharmacother.*, **54**, 381-387 (2000).

4) C. Scarpignato and I. Pelosini, Management of irritable bowel syndrome : novel approaches to the pharmacology of gut motility, Can. *J. Gastroenterol.*, **13**, 50A-65A (1999).

5) Y. Dai, J.X. Liu, J.X. Li and Y.F. Xu, Effect of pinaverium bromide on stress-induced colonic smooth muscle contractility disorder in rats. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 557-561 (2003).

6) L.S. Schanker, P.A. Shore, B.B. Brodie and C.A.M. Hogben, Absorption of drugs from the stomach. I. The rat, *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **120**, 528-539 (1957).

7) Technical information : Dicetel(R), pinaverium bromide, Solvay Kingswood Inc., Scarborough, Ontario, Canada (1993).

8) 식품의약품안전청 고시 제2002-60호., 생물학적동등성시험 기준 (2002. 11. 22).