약학회지 제 49 권 제 3 호 212~216 (2005)
Yakhak Hoeji Vol. 49, No. 3

藥學會誌

Electrospary Tandem Mass를 이용한 혈중 글리퀴돈의 정량법 개발 및 생체이용률시험

문철진# · 이은희 · 양송현 · 문해란
대사질환연구소, 의료법인 녹십자의료재단
(Received January 18, 2005; Revised May 16, 2005)

Electrospray Tandem Mass Spectrometry for the Quantification and Bioavailability Test of Gliquidone in Human Plasma

Chul-Jin Moon#, Eun-Hee Lee, Song-Hyun Yang and Hae-Ran Moon
Institute of Metabolism, Green Cross Reference Laboratory, #314, Bojung-ri, Gusung-myun, Yongin-si, Kyoungki-do 449-913, Korea

Abstract — A rapid, sensitive and selective electrospray tandem mass spectrometric (ESI-LC/MS/MS) method for the quantitation of gliquidone in human plasma was developed. A bioavailability study of gliquidone tablet (30 mg gliquidone, Boehringer Ingelheim Korea Co.) was performed using the validated ESI-LC/MS/MS method. The dose of 30 mg of gliquidone (1 tablet) was orally administered to 9 healthy Korean subjects. After administration, blood was taken at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 7, 9, 12, 24, and 33 hour. The validation data were as follows; the standard curve was linear (r^2=0.999) over the concentration range of 10~1000 ng/ml. The coefficient of variation for intra- and inter-day assay were 8.30~18.86, and 2.19~12.92%, respectively. The lower limit of quantification for gliquidone was 10 ng/ml. The pharmacokinetic parameters obtained were as follows; AUC_t was 3861.17±1328.61 ng·hr/ml, C_{max} was 831.02±227.99 ng/ml, t_{max} was 2.94±0.77 hr, K_e was 0.19±0.06 1/hr, and $t_{1/2}$ was 4.47±3.52 hr. Based on the validated analytical method and pharmacokinetic parameters, a standard guideline of the bioavailability test of gliquidone dosage forms was prepared successfully and could be used for the bioequivalence test of gliquidone preparation.

Keywords □ electrospray tandem mass, gliquidone, bioavailability

글리퀴돈(gliquidone)은 설포닐우레아(sulfonylurea)계통의 약물로서, 췌장 랑겔한스섬의 β-세포를 자극하여 당대사호르몬인 인슐린의 분비를 정상화시켜 혈당강하작용을 나타낸다. 투약 후 2~3시간에 최대효과를 발현하여 5~7시간 동안 지속하며, 반감기가 짧고 체내축적이 없어 저혈당을 초래하지 않는다. 경구투여된 글리퀴돈의 95%는 분변으로 소실되고 5%는 신장으로 소실된다.[1] 글리퀴돈의 대사는 신장보다 간에서 주로 이루어지기 때문에 연령증가로 신장기능이 감소함에 따라 약물이 체내에 고농도로 축적되어 일어날 수 있는 위험이 상대적으로 적다고 알려져 있다. 글리퀴돈에 대한 분석법으로 HPLC/UV 검출기를 이용한 분석법,[2] LC/MS(atmospheric pressure chemical ionization method; 이하 APCI)를 이용한 분석법[3] 등이 보고되었다. 글리퀴돈 30 mg을 투여한 약동학적 연구보고는 HPLC/UV 검출기를 이용한 von Nicolai의 보고[4]와 Courtois의 보고[5] 등이 있었다. 그러나 국내외에서 APCI 방식보다 이온화방법으로서 사용빈도가 잦은 electro spray(이하 ESI) 방식을 채택한 분석법이나, HPLC/UV 분석법에 비교하여 전체 분석시간을 크게 단축할 수 있는 tandem mass로 분석한 보고는 없었다. 또한 약물동력학적 실험결과도 한국인을 대상으로 한 결과는 없었다.

본 연구는 ESI-tandem mass를 이용하여 정밀성과 정확성이 확보된 분석방법을 개발하고, 이 방법을 이용하여 한국인을 대상으로 한 글리퀴돈의 약물동력학적 파라미터인 AUC, C_{max}, t_{max}, $t_{1/2}$ 구하여 약물동력학적 특성을 파악하고자 하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-260-9627 (팩스) 031-260-9262
(E-mail) biolab@mail.gcrl.co.kr

실험 방법

시약 및 기기

시험에 사용된 시험약은 한국베링거인겔하임에서 시판하고 있는 "글루레노름정"으로 글리퀴돈을 30 mg 함유하는 정제였다. 글리퀴돈 표준품은 한국베링거인겔하임으로부터 공급 받았으며 초산, 염산, 톨루엔 및 내부표준물질로 사용한 글리피짓(glipizide)은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. HPLC용 이동상에 사용된 물과 메탄올은 TEDIA Co.(Fairfield, OH, 미국)로부터 구입하였다. 약물분석용 기기로 Agilent 1100 Series HPLC(Agilent, 미국)와 API 3000(Applied biosystem, 미국) 질량분석기를 사용하였다. 컬럼은 Eclipse XDB-C18 column(3.5 μm, 3.0×150 mm, Agilent, 미국)을, 데이터 처리장치로는 Analyst 1.4(Applied biosystem, 미국)를 사용하였다.

피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성 시험기준[6]에 근거하여 만 19~55세의 건강한 성인 남성 지원자를 공고를 통하여 모집하였다. 건강검진은 대한임상검사정도관리협회에 등록되어 정기적인 정도관리를 받고 있는 녹십자의료재단에서 실시하였다. 전문의의 건강진단 결과 시험에 적합하다고 판정된 9명을 선정하여 서면동의를 받았다. 피험자로 선정된 사람들은 평균체중 67.2 kg(60~85 kg), 평균연령 만 22.6세(19~26세)의 건강한 남성이었다.

피험자 관리

모든 피험자는 시험 전 10일 이내 및 시험기간 중에는 음주나 다른 일체의 약물 복용을 금하였다. 시험 전날 오후 6시경에 피험자 전원에게 동일한 저녁식사를 제공한 후 식사종료 후부터 익일 정오까지 공복상태를 유지하였다. 저녁식사 후 지정된 숙소로 이동하여 운동, 식사, 흡연, xanthine계 음료 및 음주 등을 제한 관리하였다. 오후 10시에 모두 취침시키고 시험 당일 채혈장소인 녹십자의원에 오전 8시경에 도착하여 시험 준비에 착수하였다. 약물투약 후 정해진 시간에 따라 채혈하였으며 4시간 및 9시간째 채혈이 끝난 직후 모든 피험자에게 점심식사 및 저녁식사를 제공하였다. 12시간째 채혈이 끝난 후 다시 숙소로 돌아와 전날과 동일한 방식으로 피험자를 관리하였다. 시험 제 2일차에 오전 8시까지 채혈장소에 도착하여 24시간, 33시간째 채혈을 하였다. 채혈이 종료된 후 담당의사에 의해 혈압, 맥박, 기타 이상유무를 확인하고 귀가시켰다. 시험 전 과정을 통하여 피험자 개개인의 상태를 관찰하여 증례기록서에 기록하였다.

약물투약 및 혈액 채취

혈액채취를 위하여 피험자들의 팔 정맥부위에 카테타를 설치하고 공혈액을 채취한 후 피험자에게 "글루레노름" 1정(글리퀴돈으로서 30 mg)을 물 240 ml와 함께 복용시켰다. 각 피험자로부터 0.5시간, 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 3시간, 3.5시간, 4시간, 5시간, 7시간, 9시간, 12시간, 24시간, 33시간째에 5 ml의 혈액을 채취한 다음 헤파린 처리를 한 채혈용기에 넣고 천천히 섞어준 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장은 혈장분리관에 옮겨져 -70°C에서 분석시까지 보관하였다.

혈장중 글리퀴돈의 정량

글리퀴돈 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 1 mg/ml로 만들어 냉동 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈장으로 희석하여 글리퀴돈의 혈장 중 농도가 각각 10, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/ml 농도가 되도록 검량선용 표준혈장을 만들었다. 표준혈장과 혈장시료 0.2 ml에 내부표준용액으로 글리피짓의 메탄올액(5 μg/ml) 10 μl와 1 M HCl 40 μl를 넣어 1분간 진탕하였다. 톨루엔 1.2 ml을 첨가하여 1분간 진탕한 다음 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 유기용매층을 새로운 시험관으로 옮긴 다음 질소기류 하에서 건조시켜 얻어진 잔사를 이동상 200 μl로 녹이고 1분 동안 진탕한 후 10 μl를 컬럼에 주입하였다. 표준혈장시료의 피크 면적비(글리퀴돈 피크면적/내부표준물질 피크면적)를 구하여 글리퀴돈 농도에 대한 검량선을 작성하고, 이 검량선의 직선식에 피험자 혈장의 피크면적비(글리퀴돈 피크면적/내부표준물질 피크면적)를 대입하여 농도를 산출하였다.

분석에 사용한 ESI-tandem mass의 조건으로 이동상은 메탄올(0.08% 초산)/물의 혼합액(90/10, v/v)을 사용하여 유속 0.2 ml/min로 흘려주었다. 검출은 positive ion mode, MRM mode에서 수행하였으며 gliquidone은 Q1 m/z 528→Q3 m/z 403, 내부표준물질(glipizide)은 Q1 m/z 446→Q3 m/z 321로 정량하였다. Nebulizing gas로 질소를 사용하였고, Ion spray 온도는 180°C, ion spray voltage는 6.0 kV, collision energy는 -9.5 V로 설정하였다.

피험자 혈장시료 중 글리퀴돈의 농도를 측정하기 전에 상기의 분석방법에 대하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 감도 등을 평가를 하였다. 정밀성은 글리퀴돈과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 글리퀴돈과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 검량선 작성 실험을 5번 시행하여 일내 정밀성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간정밀성을 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 감도(정량한계)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)가 5 이상이고 정밀성이 20% 이하, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도

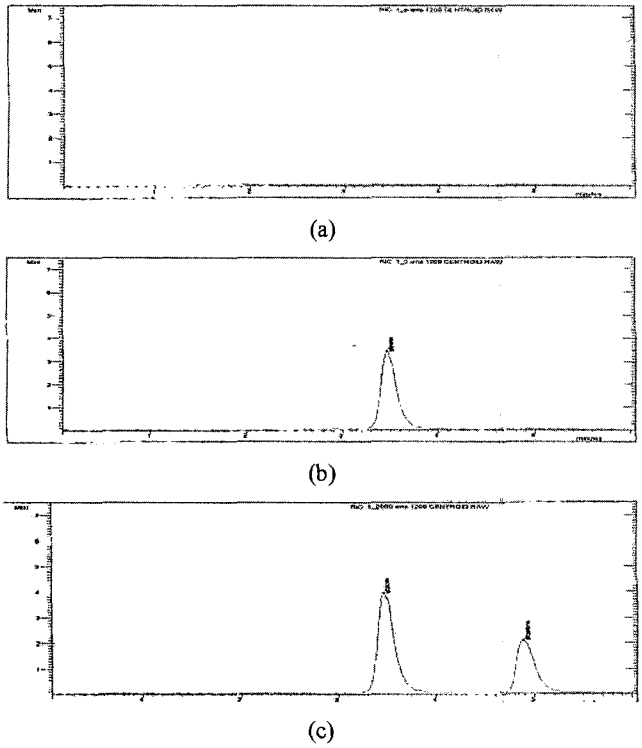

Fig. 1 – Mass ion chromatogram of gliquidone and glipizide (internal standard). (a) Blank human plasma, (b) Human plasma spiked with gliquidone, (c) Human plasma at 1.5 hour after oral administration of gliquidone tablet to a subject.

로 구하였다.

약물속도론적 파라미터의 분석

"글루레노름정"을 1정(글리퀴돈 30 mg)씩 9명의 피험자에게 경구투여하여 얻은 각각의 혈중 약물 농도-시간곡선으로부터 약물속도론적 파라미터인 AUC_t와 C_{max}, 소실속도상수(K_e), 반감기($t_{1/2}$) 및 t_{max}를 구하였다. C_{max}와 t_{max}는 실측치이고 이외의 파라미터

Table I – Accuracy and precision data for gliquidone in spiked human plasma samples

Concentration (ng/ml)	Precision (%)		Accuracy (%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
10	18.86	12.92	96.3
100	9.92	6.12	105.8
200	11.51	3.09	100.7
400	8.30	4.25	101.2
600	10.03	6.24	97.1
800	10.07	3.01	100.0
1000	9.02	2.19	100.8

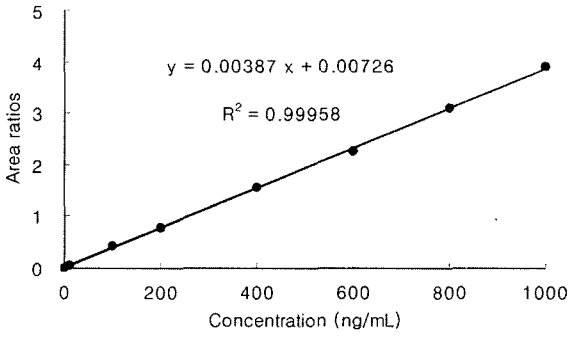

Fig. 2 – Calibration curve of gliquidone in human plasma.

는 linear one compartment model을 근거로 하여 BA Calc 2002 program(version 1.1.1)을 통해 계산하였다.

결 과

분석법의 검증

건강한 성인의 공혈장과 투약 후 1.5시간 후 혈장을 본 분석 시험방법에 따라 분석하여 얻은 이온크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 글리퀴돈 피크의 유지시간은 약 4.9분, 내부표준물

Table II – Plasma concentration-time relation of gliquidone after a single oral administration of 30 mg gliquidone to korean healthy volunteers (ng/ml)

Subject	Time after administration (hr)														
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	5	7	9	12	24	33
A1	0.0	47.6	340.1	615.9	1111.7	1156.5	1007.8	1226.3	899.3	574.4	346.3	191.5	153.6	20.3	B.Q.L
A2	0.0	102.4	236.0	481.7	916.9	917.7	685.5	643.4	398.1	277.0	156.6	61.3	54.7	22.5	20.4
A3	0.0	4.6	23.2	65.8	91.5	302.3	401.9	964.9	796.9	829.4	216.2	78.0	33.4	B.Q.L	B.Q.L
A4	0.0	67.0	159.6	215.7	449.4	396.4	398.2	450.4	428.3	364.1	109.0	92.6	81.8	15.5	B.Q.L
A5	0.0	67.8	86.7	110.8	144.1	239.4	541.0	738.9	697.8	433.7	186.7	103.0	69.8	14.3	B.Q.L
A6	0.0	185.0	646.7	625.1	830.9	853.9	862.1	732.7	536.2	463.4	242.8	189.5	128.9	26.5	B.Q.L
A7	0.0	73.6	191.2	517.6	949.0	943.2	857.8	768.7	747.8	498.7	181.6	105.3	60.8	19.9	B.Q.L
A8	0.0	0.0	16.3	52.2	162.8	306.9	477.7	577.2	479.7	311.1	150.7	82.8	73.7	25.1	B.Q.L
A9	0.0	32.3	293.1	792.7	618.3	522.3	482.0	400.4	355.8	188.1	78.3	44.1	36.3	B.Q.L	B.Q.L
Mean	0	64.5	221.4	386.4	586.1	626.5	634.9	722.5	592.7	437.8	185.4	105.4	76.4	16.9	6.8
SD	0	56.1	195.1	278.5	389.9	342.5	226.4	255.0	195.0	189.1	78.7	52.0	39.5	8.3	5.8

B.Q.L : Below quantitative limit.

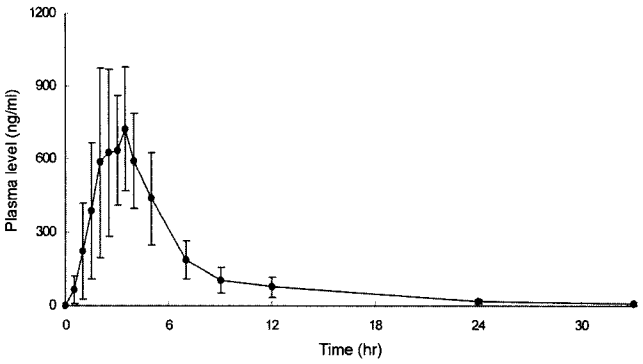

Fig. 3 – Mean plasma concentration-time curve of gliquidone after a single oral administration of 30 mg gliquidone to healthy Korean volunteers.

Table III – Pharmakokinetics parameters of each subject

	AUC_t (ng · hr/ml)	C_{max} (ng/ml)	t_{tmax} (hr)	K_e (1/hr)	$t_{1/2}$ (hr)
A-1	6423.8	1226.3	3.5	0.22	3.18
A-2	3844.4	917.7	2.5	0.05	13.82
A-3	3279.3	964.9	3.5	0.26	2.72
A-4	2933.5	450.4	3.5	0.19	3.66
A-5	3237.1	738.9	3.5	0.21	3.36
A-6	5330.8	862.1	3.0	0.20	3.45
A-7	4542.1	949.0	2.0	0.21	3.30
A-8	2750.4	577.2	3.5	0.19	3.72
A-9	2409.1	792.7	1.5	0.23	3.00
Mean	3861.2	831.0	2.9	0.19	4.47
SD	1328.6	227.9	0.8	0.06	3.52

질 피크의 유지시간은 약 3.5분이었고, 분석조건에서 글리퀴돈 및 내부표준물질은 기타 혈장 성분들과 잘 분리되었다. 이온크로마토그램상에서 신호대 잡음비가 5 이상이고, 정밀성이 20% 이하, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 최저정량한계농도는 10 ng/ml이었다. 최저정량한계농도를 제외한 기타 농도에서도 정밀성 15% 이하, 정확성 85~115% 이내의 조건을 모두 충족시켰다(Table I). 글리퀴돈의 농도가 10, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/ml 되도록 제조한 표준 시료를 분석하여 얻은 검량선의 계산식은 $Y=0.00387X+0.00726$($r^2=0.9996$)로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 2). 이로부터 혈장 중 글리퀴돈에 대한 상기 ESI-tandem mass 분석법은 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정확성 및 정밀성, 직선성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈장중 글리퀴돈 농도 추이

각 피험자에게 글루레노름 정을 경구투여한 후 구한 시간별 혈장 중 약물 농도는 Table II에 나타내었으며, 전체 피험자의 혈장 중 약물농도-시간 곡선은 Fig. 3과 같다. 본 투약용량에서 이상 반응을 보인 예는 없었으며 모든 피험자에서 마지막 채혈 시간 33시간까지 AUC의 80% 이상에 도달하였으므로 투여량과 채혈시간이 적절하였다고 생각된다.

생체이용률 파라미터의 산출

피험자들의 평균 생체이용률 파라미터는 평균±표준편차로 표현하였으며, 각각의 자료는 Table III과 같다. 평균 AUC_t는 3861.17±1328.61 ng · hr/ml, C_{max}는 831.02±227.99 ng/ml, t_{max}는 2.94±0.77 hr, K_e는 0.19±0.06, $t_{1/2}$는 4.47±3.52 hr 이었다.

Courtois는 42~59세의 중년지원자와 71~75세의 고령지원자에게 글리퀴돈 30 mg을 경구투여한 결과 C_{max}가 각각 810±70, 460±80 ng/ml, t_{max}가 1.58±0.08, 2.92±0.33 hr, $t_{1/2}$가 1.61±0.10, 4.93±1.90 hr로 연령의 차이에 따라 약물속도론적 파라미터가 차이가 있음을 보고하였다.[5] 중년을 대상으로 30 mg의 글리퀴돈을 경구투여한 Kopitar의 생체이용률 결과도 Courtois의 중년층 대상결과와 유사하였다.[7] 본 연구의 생체이용률 결과는 Kopitar나 Courtois의 연구결과와 차이가 있었다. 이는 인종간의 차이 이외에도 서양의 생체이용률시험이 경구용 당뇨병치료제의 주된 사용자가 중년이상임을 고려하여 40대 이상의 지원자를 대상으로 선발했기 때문에 본 연구의 피험자 연령층과 차이가 있었던 점이 원인으로 생각된다.

본 연구의 결과는 국내에서 글리퀴돈을 함유하는 의약품의 시험자료를 평가할 때 객관성을 높이는 등 보다 효율적인 의약품 개발과 임상적 지원에 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업에 의한 것입니다.

참고문헌

1) Ferner, R. E. and Chaplin, S. : The relationship between the pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of oral hypoglycaemic drugs. *Clin. Pharmacokinetics*. **12**, 379 (1987).
2) Sener, A., Akkan, A. G. and Malaisse, W. J. : Standardized procedure for the assay and identification of hypoglycemic sulfonylureas in human plasma. *Acta Diabetologica*. **32**(1), 64 (1995).
3) Maurer, H. H., Kratzsch, C., Kraemer, T., Peters, F. T. and Weber, A. A. : Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **773**(1), 63 (2002).
4) von Nicolai, H., Brickl, R., Eschey, H., Greischel, A., Heinzel,

G., Konig, E., Limmer, J. and Rupprecht, E. : Duration of action and pharmaco-kinetics of the oral antidiabetic drug gliquidone in patients with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Arzneimittelforschung.* **47**(3), 247 (1997).

5) Courtois, P., Sener, A., Herbaut, C., Turc, A. and Malaisse, W. J. : Pharmacokinetics of gliquidone, glibenclamide, gliclazide and glipizide in middle-aged subjects. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **103**(2), 211 (1999).

6) 식품의약품안전청 고시 제2002-60호, 생물학적동등성시험기준, 식품의약품안전청(2002. 11. 22.).

7) Kopitar, Z. and Koss, F. W. : Pharmacokinetic behavior of gliquidone (AR-DF 26), a new sulfonyl urea. Summary of the studies so far (author's transl). *Arzneimittelforschung.* **25**(12), 1933 (1975).