

LC/MS/MS를 이용한 비글견의 혈장 중 Doxifluridine 및 5-Fluorouracil의 동시 분석법 Validation

김기환 · 김원 · 김진성 · 김경일 · 강원구* · 이종화 · 하정현 · 정은주[†]

화학연구원 부설 안전성평가연구소, 대전, 305-343, 대한민국, * 대구 가톨릭대학교, 대구, 712-702, 대한민국
(2007년 6월 1일 접수 · 2007년 6월 18일 승인)

Validation of a Selective Method for Simultaneous Determination of Doxifluridine and 5-Fluorouracil in Dog Plasma by LC-MS/MS

Ghee Hwan Kim, Won Kim, Jin Sung Kim, Qingri Jin, Wonku Kang*, Jong-Hwa Lee, Jung-Heun Ha and Eun Ju Jeong[†]

Korea Institute of Toxicology, Daejeon, 305-343, S. Korea

*College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Daegu, 712-702, S. Korea

(Received June 1, 2007 · Accepted June 18, 2007)

ABSTRACT – A simple, sensitive and selective liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method (LC-MS/MS) was developed and validated for doxifluridine and 5-fluorouracil (5-FU) quantification in dog heparinized plasma. Sample preparation was based on liquid-liquid extraction using a mixture of isopropanol/ethyl acetate (1/9 v/v) to extract doxifluridine, 5-FU and 5-chlorouracil (5-CU, an internal standard) from plasma. Chromatography was performed on a C-18 analytical column and the retention times were 2.7, 1.5 and 1.7 min for doxifluridine, 5-FU and 5-CU, respectively with shorter analysis time within 5 min than previously reported methods. The ionization was optimized using ESI negative mode and selectivity was achieved by tandem mass spectrometric analysis by multiple reaction monitoring (MRM) using the transformations of m/z 244.8 > 107.6, 129.0 > 42.0 and 144.9 > 42.1 for doxifluridine, 5-FU and 5-CU, respectively. The achieved low limit of quantification was 20.0 ng/mL and the assay exhibited linear range of 20-2000 ng/mL ($R^2 > 0.99957$ for doxifluridine and $R^2 > 0.99857$ for 5-FU), using 100 μ L of plasma. Accuracy and precision of quality control samples for both doxifluridine and 5-FU met KFDA and FDA Guidance criteria of 15% for accuracy with coefficients of variation less than 15%. This method demonstrated adequate sensitivity, specificity, accuracy, precision and stability to support the simultaneous analysis of doxifluridine and 5-FU in dog plasma samples in pharmacokinetic and bioequivalence studies.

Key words - Doxifluridine, 5-Fluorouracil, LC/MS/MS, Validation, Dog Plasma

독시플루리딘(doxifluridine, 5'-deoxy-5-fluorouridine)은 경구 플루오로피리미딘 유도체로서 일반조직 보다 암조직에 많이 분포되어 있는 피리미딘 뉴클레오사이드 포스포릴라아제 (pyrimidine nucleoside phosphorylase:PyNPase)에 의해 5-플루오로우라실(5-fluorouracil:5-FU)로 체내에서 대사되어 약효를 발현하는 것으로 보고되어 있다.¹⁾ 5-FU는 티미딘, 피리미딘 등의 염기 합성 저해, RNA 합성 방해, DNA 손상 등의 3가지 작용으로 활성을 나타낸다.²⁾ 그러나, 5-FU는 세포독성의 성질을 지니고 있어 임상적으로 사용하기에 제한 또는 문제점을 발생시키기 때문에 5-FU의 유도체들이 개발되어 대장암, 위암, 방광암 그리고 유방암 등에 항암제로 많이 사용되고 있다.³⁾ 5-FU 유도체의 하나인 doxifluridine의 치료지수

(therapeutic index)는 5-FU에 비해 1/10이다.⁴⁾

이러한 항암제 같은 독성 물질의 경우, 현실적으로 정상적인 사람의 체내 동태를 파악하기 어려운 점이 있기 때문에 사람과 유사한 실험동물로써 비글견(beagle dog)을 이용한 약물동태(pharmacokinetics) 평가가 요구되고 있다. 특히 항암제의 생물학적 동등성시험은 부작용 및 윤리적인 문제로 인해 건강한 성인을 대상으로 한 시험이 불가능하다. 따라서 환자들을 대상으로 직접시험을 하고 있으나 환자들의 투병상태에 따른 변이, 병용투여 약물, 건강상태 등이 시험에 영향을 줄 수 있으며, 시험도중 피험자가 사망하여 시험을 종결할 수 없는 경우 등이 발생 할 수 있다. 따라서 대체조제를 위한 항암제의 생물학적 동등성시험의 경우 제한적으로 동물을 사용하여 생물학적 동등성시험을 하는 것이 허용되고 있다. 이러한 약물동태/생물학적 동등성 연구를 위해서는 약물을 분석 할 수 있는 분석법이 필요함에 따라, 본 연구에서는 비글견의 혈액 중 존재하는 doxifluridine과 5-

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)610-8227, E-mail : kimgh@kitox.re.kr

FU를 동시에 측정할 수 있는 분석법을 LC/MS/MS를 이용하여 개발하였고 실제 전임상연구, 생물학적동등성 연구에 적용할 수 있도록 생체시료분석법 validation을 실시하여 개발한 방법의 적합성을 나타내었다.

지금까지 doxifluridine과 5-FU에 대한 분석은 주로 HPLC-UV법이나 LC/MS/MS를 이용한 방법이 보고되었다. 보고된 분석법은 5-FU를 분석하는 방법들이 주로 보고되었고^{1,5)} doxifluridine과 5-FU를 동시에 LC/MS/MS로 분석한 방법이 소개되었으나, 시료전처리 방법이 Doxifluridine과 5-Fluorouracil의 극성차이로 인하여 많은 종류의 유기용매를 사용하여 여러과정을 거치는 고상추출법을 사용하며 한 시료 당 LC/MS/MS 분석 시간이 약 20분정도 길게 소요되었다.^{6,7)} 그러므로 본 연구에서는 비글견 혈액에 존재하는 doxifluridine과 5-FU를 동시에 분석할 수 있는 선택적이고 감도가 높은 LC/MS/MS방법을 이용하였고, 물질구조상 극성 차이가 많이 나는 doxifluridine과 5-FU를 동시에 전처리하여 분석 효율을 높이기 위해 액상추출법을 개발하였다. 또한, LC 분석시간을 5분 이내로 단축하여 신속하고 정확하게 두 가지 물질을 동시에 정량할 수 있는 분석법을 개발하였다.

실험 방법

시약 및 기구

본 연구에서 사용한 표준물질인 doxifluridine은 신평제약(주)에서 공급받았다. 내부표준물질로 사용한 5-CU (chlorouracil)는 Sigma-Aldrich(MA, USA)에서 구입하였고, 이동상 용매로 사용된 메탄올은 J. T. Baker(HPLC grade, USA)에서 구입하였다. 3차 증류수는 Milipore-Milli QTM(Tokyo, JAPAN)를 이용하여 제조하였다. Speedvac(Thermo, USA)을 사용하여, 시료전처리 중 유기용매를 제거하였다.

기기 조건

Agilent HPLC system, Centrifuge(GS-6R, Beckman, USA), Evaporator(SPD2010-220, Thermo Electron corporation, USA) 과 API 4000 MS/MS(Applied Biosystems, USA) 를 이용하여 분석하였고, 세부조건은 ESI negative mode, curtain gas 16, nebulizing gas 60, turbo gas 50, source temperature 500°C, gas of CAD 5, entrance potential -10 V, MRM ion transfer(m/z) 및 collisional energy(CE)는 각각 doxifluridine :244.8→107.6(CE:-30 V), 5-FU:129.0→42.0(CE:-20 V), 5-CU(internal standard):144.9→42.1(CE:-20 V)으로 분석 하였다. 또한, 이동상은 Methanol/H₂O=20/80 (v/v), 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C18(2.1×100 mm, 3.5 μm), 유속은 0.2 mL/min,

주입량은 10 mL으로 하여 분석하였다.

검량선 작성

Doxifluridine 및 5-FU 표준품을 물에 녹여 농도를 100 μg/mL로 만든 후 순차적으로 희석하여 0.2~40 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈장으로 희석하여 doxifluridine 및 5-FU의 혈장 중 농도가 각각 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/mL가 되도록 표준혈장시료를 만들었다. 각각의 표준혈장 100 μL에 내부표준액(5-CU, 4 μg/mL, 물) 25 μL와 0.05 M 염산용액 1 mL를 가하여 섞어준 후, 추출용매(ethylacetate/isopropyl alcohol=9/1, v/v) 5 mL로 5분 동안 추출한 다음 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액 4 mL를 취하여 깨끗한 test tube에 옮겨 vacuum evaporator(60°C, 1 hr)에서 증발 건조시킨 다음, 잔사를 이동상 500 μL에 녹여 이 중 10 μL를 LC/MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 doxifluridine 및 5-FU의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였으며, 40, 400, 1600 ng/mL 농도의 혈장 표준시료를 이용하여 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험하여 일간 재현성을 구하였다.

혈장 시료의 처리

피험동물로부터 각 시간별로 채취하여 -80°C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 혈장 100 μL를 취하여 시험관에 옮겼다. 여기에 내부표준액 25 μL와 0.05 M 염산용액 1 mL를 가하여 섞어준 후, 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리하여 LC/MS/MS에 주입하였다.

혈중농도 계산

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 doxifluridine 및 5-FU의 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 doxifluridine 및 5-FU의 농도를 구하였다. 검량선은 선형회귀 방법으로 구하였으며 가중치는 1/x 을 이용하였다.

정확성 및 정밀성

40, 400, 1600 ng/mL 농도의 doxifluridine 및 5-FU 혈장 표준액을 상기의 검체 처리방법으로 처리하여 분석하였다(n=5). 각 성분과 내부표준물질의 측정치의 표준편차를 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(% CV로 표시)을 구하였고 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(% CV로 표시)을 구하였다.

검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

회수율

시험방법의 회수율을 조사하기 위하여 doxifluridine 및 5-FU이 포함된 혈장시료를 우선 전처리 후, 내부표준물질을 가하여 각 성분의 회수율을 구하였고, 내부표준물질도 동일한 방법으로 혈장에 첨가하여 우선 전처리를 한 다음 농도를 알고 있는 표준물질용액을 가하여 분석하고 얻어진 크로마토그램의 피이크 면적비를 이용하여 회수율을 구하였다.

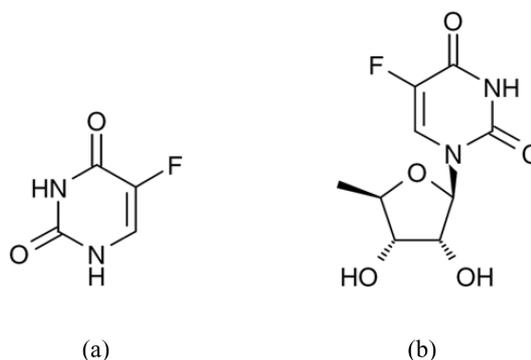


Figure 1-Structures of (a) doxifluridine and (b) 5-fluorouracil.

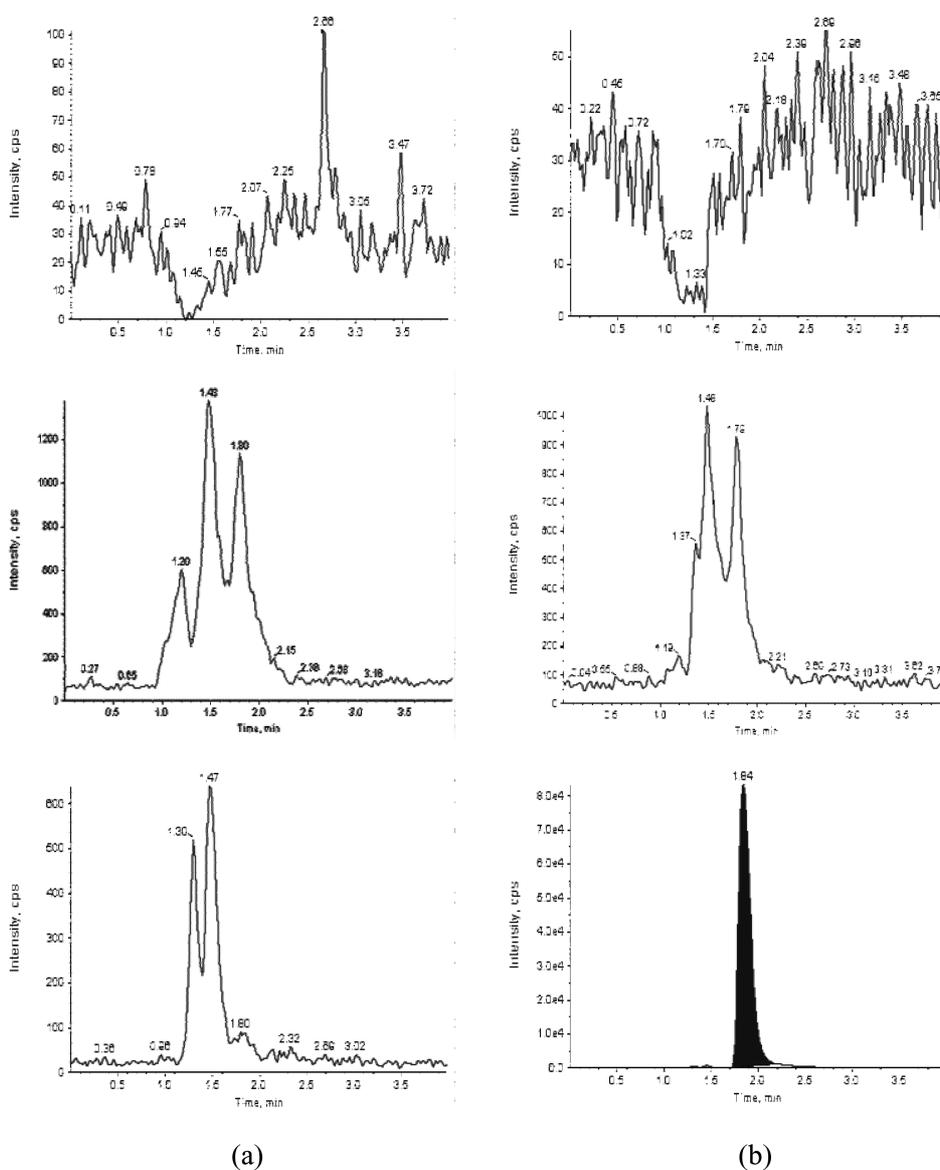


Figure 2-Representative chromatograms of doxifluridine and 5-fluorouracil (a) blank plasma, (b) zero blank plasma spiked with 1 mg/mL internal standard (top; doxifluridine, middle; 5-fluorouracil, bottom; 5-chlorouracil, IS).

표준원액 안정성

Doxifluridine, 5-FU 및 내부표준물질의 농도가 각각 1.0 및 4.0 µg/mL의 표준원액을 준비하여 실온에서 24 시간 방치 후, 분석하여 얻은 피크의 면적비를 이용하여 안정성을 평가하였다(n=3).

혈장시료의 안정성

Doxifluridine과 5-FU의 농도 40, 400, 1600 ng/mL의 QC시료를 전처리가 끝난 후, 냉각기(4°C)가 장착된 자동시료주입장치에서 24 시간 보관 한 후에 분석하였다. 별도로

위와 같은 세농도의 QC시료를 조제하여 실온 및 -80°C에서 보관하며 예정한 기간 후 2 set 씩을 분석하여 안정성을 평가하였다. 안정성의 평가는 각 혈장시료의 초기 농도값을 100%로 하고 이에 대한 상대 농도값으로 나타내었으며 ±20% 미만의 상대농도값을 나타내는 것을 기준으로 평가하였다.

희석에 의한 영향

이 실험은 시료의 분석에 앞서 정량범위를 초과하는 시료에 대한 정확성을 평가하기 위한 것으로 표준혈장시료를 공

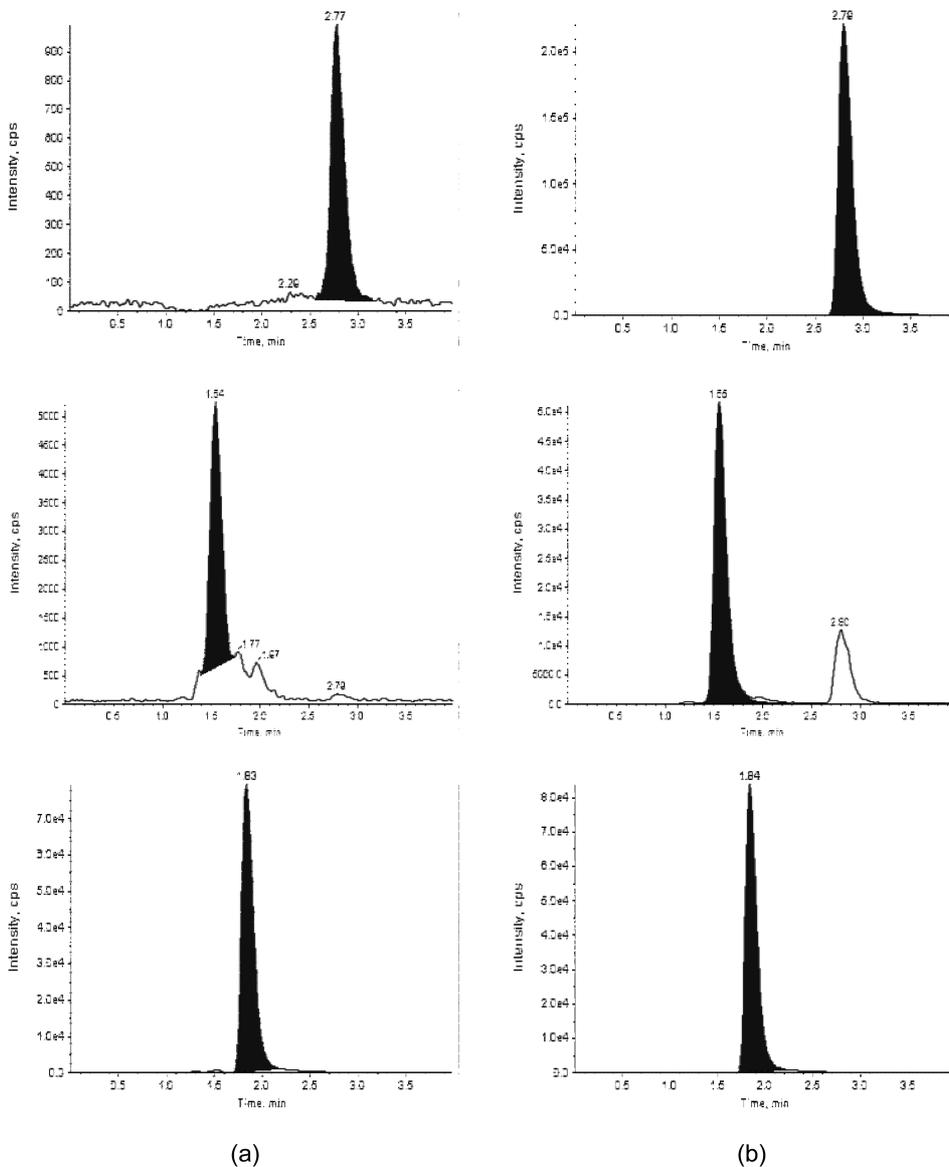


Figure 3—Representative chromatograms of doxifluridine and 5-fluorouracil (a) plasma spiked with standard 20 ng/mL(LLOQ) and 1 mg/mL internal standard, (b) plasma sample from a beagle dog at concentration peak time (top; doxifluridine, middle; 5-fluorouracil, bottom; 5-chlorouracil, IS).

Table I—Concentration of Doxifluridine in Dog Plasma (n = 6)

Concentration (ng/mL)	Weighted (1/x)				Unweighted			
	Mean	SD	CV (%)	RE (%)	Mean	SD	CV (%)	RE (%)
20	22.5	1.4	6.2	12.6	27.5	5.8	21.2	37.7
50	48.2	1.0	2.0	-3.6	52.9	5.1	9.7	5.9
100	92.8	2.6	2.8	-7.2	97.1	4.7	4.9	-2.9
200	181.9	5.1	2.8	-9.0	186.1	6.4	3.4	-7.0
500	488.6	20.8	4.2	-2.3	489.2	20.6	4.2	-2.2
1000	1023	13	1.3	2.3	1018	15	1.4	1.8
2000	2009	23	1.2	0.5	1995	9	0.5	-0.3

Table II—Concentration of 5-Fluorouracil in Dog Plasma (n = 6)

Concentration (ng/mL)	Weighted (1/x)				Unweighted			
	Mean	SD	CV (%)	RE (%)	Mean	SD	CV (%)	RE (%)
20	18.2	1.4	7.7	-9.1	14.0	10.5	75.3	-30.2
50	50.5	2.3	4.6	0.9	46.5	8.4	18.0	-6.9
100	102.7	2.6	2.6	2.7	99.2	9.0	9.1	-0.8
200	210.1	7.6	3.6	5.0	207.4	5.0	2.4	3.7
500	511.1	12.1	2.4	2.2	510.8	12.3	2.4	2.2
1000	986.6	55.8	5.7	-1.3	990.7	62.0	6.3	-0.9
2000	1991	53	2.7	-0.5	2001	29	1.4	0.1

혈장을 이용하여 희석하고 분석하여 영향을 평가하였다.

결과 및 고찰

특이성

상기의 시험방법과 같이 검체를 처리하여 LC/MS/MS로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Figure 2와 Figure 3 같았으며, doxifluridine의 피이크 유지시간은 약 2.7분, 5-FU 피이크의 유지시간은 약 1.5분 및 내부표준물질(5-CU) 피이크의 유지시간은 약 1.8분이었고, 분석조건에서 각 성분의 피이크는 기타 혈장 성분들과 잘 분리되는 것을 확인하였다.

직선성

표준물질 농도 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/mL의 혈장시료에 내부표준물질을 spike한 혈장시료를 전 처리하여 LC/MS/MS로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 doxifluridine과 5-FU의 검량선은 각각 $y=0.000214x-0.002120$ ($R^2=0.99957$) 및 $y=0.000713x-0.017434$ ($R^2=0.99857$)과 로 20~2000 ng/mL 범위에서 우수한 직선성을 나타내었다(Figure 4). 10 ng/mL의 농도에서는 정확성과 정밀성 값이 기준에서

벗어나 정량범위에서 제외하였다.

선형회귀분석에 있어 가중치로 1/x를 사용하였는데, 가중치를 사용하지 않은 회귀식에 비하여 낮은 농도범위까지 정확한 추세를 나타내는 것으로 확인되었다. 두 경우의 실험적으로 구해진 검량선의 데이터를 Table I, II에 비교하여 나타내었다.

정확성 및 정밀성

Doxifluridine에 대한 정밀성 CV%는 일내 정밀성이 3.4%

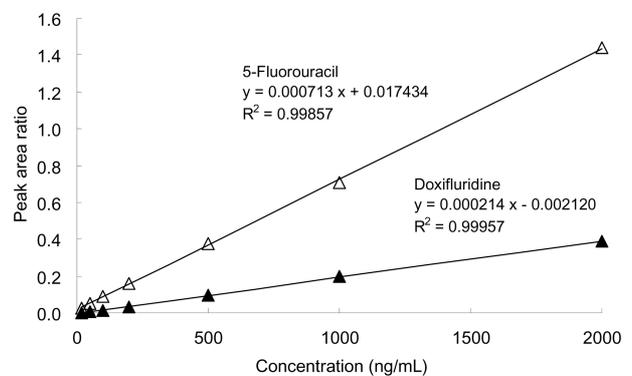


Figure 4—Calibration curves of doxifluridine and 5-fluorouracil in dog plasma (Δ : 5-Fluorouracil, \blacktriangle : Doxifluridine).

Table III–Accuracy and Precision of Doxifluridine and 5-Fluorouracil in Dog Plasma

Material	Concentration (ng/mL)	Intra day (n=5)		Inter day (5 days)	
		Precision (CV,%)	Accuracy (%)	Precision (CV,%)	Accuracy (%)
Doxifluridine	40	1.5	87.2	10.3	97.4
	400	2.5	91.3	1.8	108.5
	1600	3.4	97.8	5.6	101.5
5-Fluorouracil	40	9.3	95.8	14.4	105.1
	400	9.5	95.8	4.4	107.5
	1600	2.2	102.0	1.1	101.2

이하, 일간 정밀성은 10.3% 이하로 나타났다. 또한 일내 정확성은 87.2~97.8%, 일간 정확성은 97.4~108.5%였다. 5-FU에 대한 정밀성 CV%는 일내 정밀성이 9.5% 이하, 일간 정밀성은 14.4% 이하로 나타났다. 또한 일내 정확성은 95.8~102.0%, 일간정확성은 101.2~107.5%로 나타났다.

이로부터 혈장 중 doxifluridine 및 5-FU에 대한 본 LC/MS/MS 분석법은 생체시료의 분석에 이용될 수 있는 충분한 정확성 및 정밀성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

감도(정량한계)

직선성 및 정확성, 정밀성의 실험을 통하여 전체 농도범

Table IV–Accuracy and Precision of Doxifluridine and 5-Fluorouracil at LLOQ (Lower Limit of Quantification)

Run no.	Doxifluridine (20 ng/mL)	5-Fluorouracil (20 ng/mL)
1	20.2	19.7
2	21.6	16.2
3	23.0	16.9
4	22.7	18.4
5	23.7	18.3
6	23.9	19.5
Mean	22.5	18.2
SD	1.4	1.4
CV (%)	6.2	7.7
RE (%)	12.6	-9.1

Table V–Stability of Standard Solution at Room Temperature for 24 hr

	Doxifluridine	5-Fluorouracil	5-Chlorouracil
Concentration of Standard Solution (µg/mL)	1.0	1.0	4.0
Relative Concentration (%)	92.8	97.4	103.3

위에서의 정확성과 정밀성이 모두 $\pm 15\%$ 이내로 들어오며, 최저한계농도에서도 $\pm 20\%$ 이내의 값을 나타내는 농도를 정량한계로 하였다. 타당성 검증 결과, 초기에 설정한 10 ng/mL의 농도에서는 위의 기준을 벗어나는 것으로 나타나 본 분석법의 정량한계는 20 ng/mL로 결정하였다. 각 검량선으로부터 계산된 정량한계 농도에서의 정확성과 정밀성의 결과를 Table IV에 나타내었다.

회수율

Doxifluridine의 평균 회수율은 75.3%, 5-FU의 평균회수율은 57.2% 및 내부표준물질인 5-CU의 평균 회수율은 74.4%로 나타났다. 5-FU의 경우 다소 낮은 회수율을 나타내었다.

안정성

표준원액의 안정성 – Doxifluridine, 5-FU 및 내부표준물질의 농도 모두가 방치 전시료들과 비교해서 15% 이내 이므로 실온에서 24 시간 동안 안정한 것으로 나타났다.

전처리시료 및 혈장시료의 안정성 – 전처리시료는 자동시료주입기(4°C)에서 24 시간 동안 안정하였으며 혈장시료는 실온 24 시간, 냉동(-80°C)조건에서 30일간 안정성을 나타내었다. 또한 반복된 3회의 냉/해동 시험에서 안정한 것으로 나타났다.

희석에 의한 영향

이 실험은 시료의 분석에 앞서 정량범위를 초과하는 시료에 대한 정확성을 평가하기 위한 것으로, 각 혈장시료의 이론적인 농도값에 대하여 실험적으로 구한 농도값이 $\pm 15\%$ 이내의 변동계수(CV%)와 상대오차(RE%)를 나타내었다. 따라서 시험결과, doxifluridine과 5-FU 모두 희석($\times 10$)에 의하여 정량성이 유지됨을 알 수 있었다.

비글견 혈장 중 Doxifluridine과 5-FU의 정량

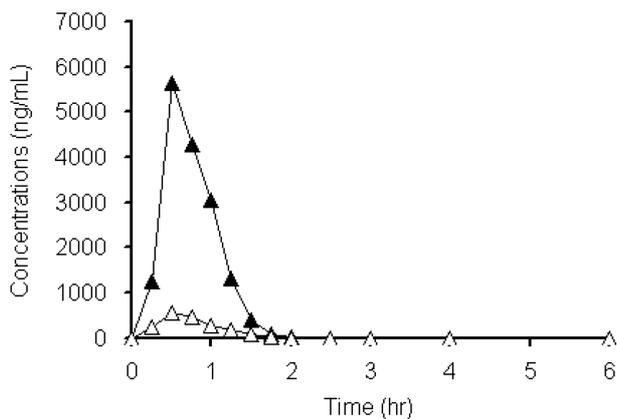
본연구에서 확립한 분석법의 약물동태연구에 적용 가능성

Table VI–Stability of Dog Plasma Samples

Storage Condition	Relative Concentration (%)					
	Doxifluridine (µg/mL)			5-Fluorouracil (µg/mL)		
	40	400	1600	40	400	1600
Initial Sample	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Processed Sample (4°C, 24 hr)	105.2	110.0	113.8	96.3	98.7	104.5
Plasma (Room Temperature, 24 hr)	98.0	99.2	104.4	102.2	93.6	98.1
Plasma (Freeze/thaw 3 times)	111.5	101.0	108.8	99.6	97.8	102.4
Plasma (–80°C, 10 day)	109.7	100.6	105.6	98.4	96.2	101.7
Plasma (–80°C, 20 day)	100.0	100.8	107.6	93.5	106.9	103.3
Plasma (–80°C, 30 day)	87.6	85.7	104.9	98.9	96.1	93.4

Table VII–Dilution Effect by Blank Dog Plasma (n = 6)

Sample	Conc. (ng/mL)	Dilution	Target conc. (ng/mL)	Found (ng/mL)	CV (%)	RE (%)
Doxifluridine	2000	×10	200	222.6	1.3	11.3
	10000		1000	1068.8	0.8	6.9
5-Fluorouracil	2000	×10	200	195.3	1.7	–2.4
	10000		1000	882.2	0.4	–11.8

**Figure 5**–The dog plasma concentration-time curve in a typical subject following the administration of a single oral dose of 200 mg/head of doxifluridine (△: 5-Fluorouracil, ▲: Doxifluridine).

을 평가하기 위하여 비글견에 doxifluridine 200 mg/head를 경구투여하고 투여 후 6 시간까지 일정 시간에 채혈하여 얻은 doxifluridine 및 5-FU의 혈장 중 약물 농도-시간 곡선을 Figure 5에 나타내었다. 투여 후 약 2.5 시간까지 혈장 중에서 doxifluridine과 5-FU가 검출되었으며, 5-FU의 혈중농도는 doxifluridine의 혈중농도의 약 1/10 수준이었다.

결 론

혈장 중 doxifluridine과 5-FU에 대한 본 LC/MS/MS 분

석법은 비글견에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

1. 내부표준물질을 5-CU로 하여 LC/MS/MS 분석한 결과 혈장 성분 등 내인성 물질의 간섭 없이 doxifluridine, 5-FU 및 5-CU가 각각 약 2.7분, 약 1.5분 및 약 1.8분에 양호하게 분리 되었다.

2. 혈장 시료로부터 구한 doxifluridine과 5-FU의 검량선은 각각 $R^2=0.99957$ 와 $R^2=0.99857$ 로 20~2000 ng/mL에서 양호한 직선성을 나타내었고 최저 정량한계는 20 ng/mL이었다. 확립된 분석법을 검증한 결과 일내 및 일간 정확성 및 정밀성이 모두 15% 이내로 나타나 이 분석법은 충분한 감도, 정확성, 정밀성 및 안전성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 혈장시료의 단기 실온(24 시간) 안정성과 장기 냉동(–80°C, 30일) 안정성 및 표준원액의 실온 (24 시간) 안정성이 확보되었다. 아울러 동결해동 및 전처리 후(4°C, 24 시간) 안정성 시험결과, 각 QC 시료에 대해 각각 3회 반복 측정하여 얻은 측정 초기치에 대한 변동 계수가 15% 이내로 안정함을 나타내었다.

본 연구에서 확립된 방법은 비글견 혈액 시료에서 doxifluridine과 5-fluorouracil을 동시에 액상추출법을 사용하여 분석함으로써 이전의 고상추출법에 비하여 전처리 과정을 간단하게 하였고, 또한 LC/MS/MS를 이용하여 분석 소요시간을 이전의 20여분에서 5분 이내로 단축시켜 혈액 중의 do-

xifluridine 및 대사체인 5-fluorouracil을 간단하고 신속하게 선택적으로 확인하는데 유용하게 사용될 수 있으므로, 비글견을 이용한 doxifluridine의 독성동태연구 및 생물학적동태연구에도 적용 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 용역연구개발사업(KFDA-0672생동성174)에 의해 지원받아 안전성평가연구소에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) J.F. Zheng and H.D. Wang, 5-Fluorouracil concentration in blood, liver and tumor tissues and apoptosis of tumor cells after preoperative oral 5'-deoxy-5-fluorouridine in patients with hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, **11**(25), 3944-3947 (2005).
- 2) M. Molina-Arcas, G. Moreno-Bueno, P. Cano-Soldado, H. Herná' ndez-Vargas, F. Javier Casado, J. Palacios and M. Pastor-Anglada., Human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) is required for the transcriptomic response of the nucleoside-derived drug 50-DFUR in breast cancer MCF7 cells. *Biochem. pharmacol.*, **72**, 1646-1656 (2006).
- 3) H. Phuoc Le and C.E. Mu" ller., Rapid microwave-assisted fluorination yielding novel 50-deoxy-50-fluorouridine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6139-6142 (2006).
- 4) W.H. Zhao, SF. Wang, W. Ding, J.M. Sheng, Z.M. Ma, L.S. Teng, M. Wang, F.S. Wu and B. Luo, Apoptosis induced by preoperative oral doxifluridine administration in gastric adenocarcinoma and its mechanism of action. *World J. Gastroenterol.*, **12**(9), 1356-1361 (2006).
- 5) M.R. Dhananjeyan, J. Liu, C. Bykowski, J.A. Trendel, J.G. Sarver, H. Ando and P.W. Erhardt, Rapid and simultaneous determination of capecitabine and its metabolites in mouse plasma, mouse serum, and in rabbit bile by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1138**, 101-108 (2007).
- 6) B. Reigner, J. Verweij, L. Dirix, J. Cassidy, C. Twelves, D. Aliman, E. Weidekamm, B. Roos, L. Banken, M. Utoh and B. Osterwalder, Effect of Food on the Pharmacokinetics of Capecitabine and Its Metabolites following Oral Administration in Cancer Patients. *Clin. Cancer Research*, **4**, 941 (1998).
- 7) A. Guerrieri, F. Palmisano, P.G. Zambonin, M. De Lena and V. Lorusso, Solid-phase extraction of fluoropyrimidine derivatives on a copper-modified strong cation exchanger: determination of doxifluridine, 5-fluorouracil and its main metabolites in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. chromatogr.*, **617**, 71 (1993).