

LC/MS/MS를 이용한 원숭이 혈액에서의 Doxifluridine과 대사체 5-FU 동시분석법 개발 및 Validation

우영아 · 김기환 · 김원 · 이종화 · 정은주 · 김진호* · 박귀례* · 김충용#

안전성평가연구소, *식품의약품안전청

(Received March 15, 2007; Revised April 16, 2007)

Quantitative Determination of Doxifluridine and 5-FU in Monkey Serum Using LC/MS/MS

Young-Ah Woo, Ghee-Hwan Kim, Won Kim, Jong-Hwa Lee, Eun Ju Jeong, Jinho Kim*,
Kui Lea Park* and Choong-Yong Kim#

Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-343, Korea

*Korea Food & Drug Administration, Seoul 121-704, Korea

Abstract — A reverse-phase high performance liquid chromatography method with electrospray ionization and detection by mass spectrometry is described for the simultaneous determination of doxifluridine and its active metabolite 5-fluorouracil (5-FU) in monkey serum. The method has greater sensitivity and simpler process than previous published methods with good accuracy and precision. A proper liquid/liquid extraction was used to extract simultaneously doxifluridine and 5-FU which has considerable difference in the polarity. Extracts were analyzed using LC/MS/MS providing a short analysis time within 5 min. The lower limit of quantification was validated at 10.0 ng/ml of serum for both doxifluridine and 5-FU. Accuracy and precision of quality control (QC) samples for both analytes met FDA Guidance criteria of $\pm 15\%$ for average QC accuracy with coefficients of variation less than 15%. The method will be applicable for preclinical studies and bioequivalence studies.

Keywords □ doxifluridine, 5-FU, LC/MS/MS, monkey, serum, simultaneous determination, validation

독시플루리딘(doxifluridine)은 플루오로피리미딘(fluoropyrimidie) 유도체로서 항암효과를 가진 5-FU(5-fluorouracil)의 독성을 감소시키고 치료효과를 증대시킬 목적으로 합성되었으며, 결장암, 직장암, 유방암 등의 치료에 많이 쓰이고 있는 항암제 중의 하나이다. 독시플루리딘 자체로는 항암효과를 가지고 있지 않고, 디옥시리보푸라노실(deoxyribofuranosyl)기가 티미딘포스포릴라아제(thymidine phosphorylase, TP)에 의해 중앙조직에서 선택적으로 떨어져 나감으로서, 5-FU 형태인 활성화된 대사형태로서 항암 효과를 나타내는 5-FU의 전구체이다. 5-FU는 TS(thymidylate synthase)를 저해시키고 세포내 뉴클레오타이드 생합성을 방해하여 항암효과를 나타낸다.¹⁾ 5-FU는 20년 이상 항암제로서 널리 사용이 되었고, 독성을 줄이고 치료효과를 높이기 위한 여러

가지 형태의 전구 약물이 개발되어 왔다. 독시플루리딘은 5-FU의 전구약물로서, 주로 경구로 투여되며 정상적인 조직에 비교하여 다양한 형태의 중앙조직에서 높은 농도로 발견되는 TP에 의해 5-FU로 전환된다.²⁾ 하지만, 독시플루리딘도 정상적인 세포에도 존재하는 TP에 의해 5-FU로 대사되며, 설사, 소화기계 출혈, 백혈구 감소 등 항암제의 독성이 여전히 나타나는 문제점이 있다.

이러한 항암제 같은 독성 물질의 경우, 현실적으로 정상적인 사람의 체내 동태를 파악하기 어려운 점이 있기 때문에 사람과 유사한 실험 동물로서 원숭이 같은 영장류를 이용하여 약물동태/독성동태(pharmacokinetics/toxicokinetics)를 평가하는 기술이 필수 불가결한 요소이다. 이러한 약물동태/독성동태를 파악하기 위해서는 약물을 분석할 수 있는 분석법이 필요함에 따라, 본 연구에서는 원숭이 혈액 중에 존재하는 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 측정할 수 있는 분석법을 LC/MS/MS를 이용하여 개발하였다. 또한, 실제 본 분석법을 전임상연구, 임상연구, 생물학적동등

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-610-8051 (팩스) 042-610-8172
(E-mail) kimcy@kitox.re.kr

성 연구에 적용할 수 있도록 생체시료분석법 validation을 실시하여 개발한 방법의 강건성을 시사하였다.

지금까지 독시플루리딘과 5-FU에 대한 분석은 주로 HPLC-UV법이나 LC/MS/MS를 이용한 방법이 보고되었다. 이는 주로 5-FU를 분석하는 방법이고,^{3,5)} 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 분석하는 방법으로 보고된 HPLC-UV법은 한 시료를 분석시 독시플루리딘과 5-FU의 극성 차이로 인하여 복잡한 고상추출 과정을 거치고, LC분석 시간으로 한 시료당 20분을 필요로 하였다.^{6,7)} LC/MS/MS를 이용하여 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 분석한 방법 또한 LC분석시간이 12분이고 5-FU에 대한 LLOQ(lower limit of quantification)가 50 ng/ml로 상대적으로 높은 값을 나타내고 있다.⁸⁾

그러므로, 본 연구에서는 원숭이 혈액에 존재하는 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 분석할 수 있도록 선택적으로 감도가 높은 LC/MS/MS 방법을 이용하였고, 물질구조상 극성 차이가 많이 나는 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 시료 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 독시플루리딘(99.3%)은 신평 제약에서 공급받았으며, 대사체인 5-FU는 Sigma-Aldrich사(MA, USA)에서 구입하였다. 내부표준물질로 사용한 5-CU(chlorouracil)도 Sigma-Aldrich사(MA, USA)에서 구입하였고, 이동상 용매로 사용된 메탄올은 J. T. Baker(HPLC grade, USA)에서 구입하였다. 2차 증류수는 Milipore-Milli QTM(Tokyo, JAPAN)를 이용하여 제조하였다. Speedvac(Thermo, USA)을 사용하여, 시료전처리 중 유기용매를 제거하였다.

LC tandem mass spectrometry

시료의 분석에는 Agilent HP 1100 series liquid chromatograph/API 3200 Qtrap mass spectrometer(Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 질량분석기의 이온화 방식에는 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI)법을 사용하였다. HPLC 분석에서 컬럼은 C₁₈(Zorbax XDB, Agilent)으로 10 mm(length)×2.1 mm(i.d.)×3.5 μm(particle size)를 사용하였으며, 이동상으로 메탄올/물 20:80의 비율로 등용매분리 조건으로 5분 동안 분리하였고, 유속은 0.2 ml/min로 하였다. MS조건에서는 MRM(multiple reaction monitoring) mode에서 독시플루리딘은 245→108, 5-FU는 129→42, 5-CU는 145→42의 조건에서 검출하였고, 네가티브(negative) 이온화 모드에서 각각의 collision energy는

-28 V, -30 V, -28 V를 사용하였다. Source 온도는 500°C로 하였고, declustering potential은 세 이온 모두 -30 V로 하였고, entrance potential은 -10 V로 하여 분석하였다.

검량선 작성 및 시료 전처리

독시플루리딘과 5-FU 표준품을 이동상과 메탄올에 녹여 100 μg/ml로 한 다음, 이 표준액을 적당한 범위로 희석한 다음, 공혈청에 1/9비율로 첨가하여 독시플루리딘과 5-FU의 농도가 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/ml가 되도록 표준혈청을 만들었다. 개발한 분석법의 정확성, 정밀성 및 안정성을 확인하기 위하여, 세 가지 종류의 QC시료를 같은 방법으로 30, 400, 1600 ng/ml가 되도록 조제하였다.

위에서 만든 표준 혈청시료 50 μl을 취하고, 0.05 M HCl 1 ml과 내부표준물질(5-CU, 1000 ng/ml) 50 μl을 넣고 추출용매(에틸 아세테이트 : 이소프로필알코올=9:1) 5 ml로 10분 동안 진탕하여 추출하였다. 3000 rpm으로 5분 동안 원심 분리한 다음 상층에서 4 ml를 취하여 Speedvac(Thermo, USA)을 이용하여 60°C에서 1시간 30분 동안 유기용매를 제거하였다. 잔사를 이동상 250 μl로 용해한 다음, 여기서 10 μl를 LC/MS/MS에 주입하였다.

분석법 검증(Bioanalytical method validation)

개발된 분석법은 검량선 작성용 표준시료 이외에 별도로 조제한 QC시료를 저농도(30 ng/ml), 중농도(400 ng/ml), 고농도(1600 ng/ml)를 이용하여 정확성(accuracy %)과 정밀성(coefficient of variance %)을 확인하였다. 일간 정밀성을 확인하기 위하여, 3일 동안 같은 방법으로 분석한 결과를 평가하였으며, 분석이 수행되는 동안에 필요한 안정성 평가로서, 표준 용액 안정성, 냉·해동 안정성, 시료전처리 후 안정성을 수행하였고, 실제 생체시료 분석 시 참고가 될 수 있도록 본 방법의 회수율을 평가하였다.

결과 및 고찰

혈청 중 독시플루리딘과 대사체인 5-FU의 분석법 검증

선택성 - 본 연구에서 개발한 분석 조건에서 독시플루리딘과 5-FU의 분석을 방해할 수 있는 혈청 중에 존재하는 내인성 물질이나 간섭물질에 의한 영향에 대한 확인을 위하여 최저정량한계(LLOQ)에 해당하는 시료의 크로마토그램을 확인하였다. Fig. 1a)에서 확인할 수 있듯이 각기 다른 6개체에서 얻은 공혈청 시료에서는 독시플루리딘이나 5-FU의 분석에 영향을 미치는 요소가 없음을 확인하였다. 독시플루리딘과 5-FU의 머무름 시간은 각각 2.9분, 1.6분이었으며, 내부 물질로 사용한 5-CU는 1.9분이었다(Fig. 1). 세 분석 물질 모두 3분 이내에 피크를 확인할 수 있었고, 한 시료당 분석 시간을 5분으로 하여 분석법 검증을 수행

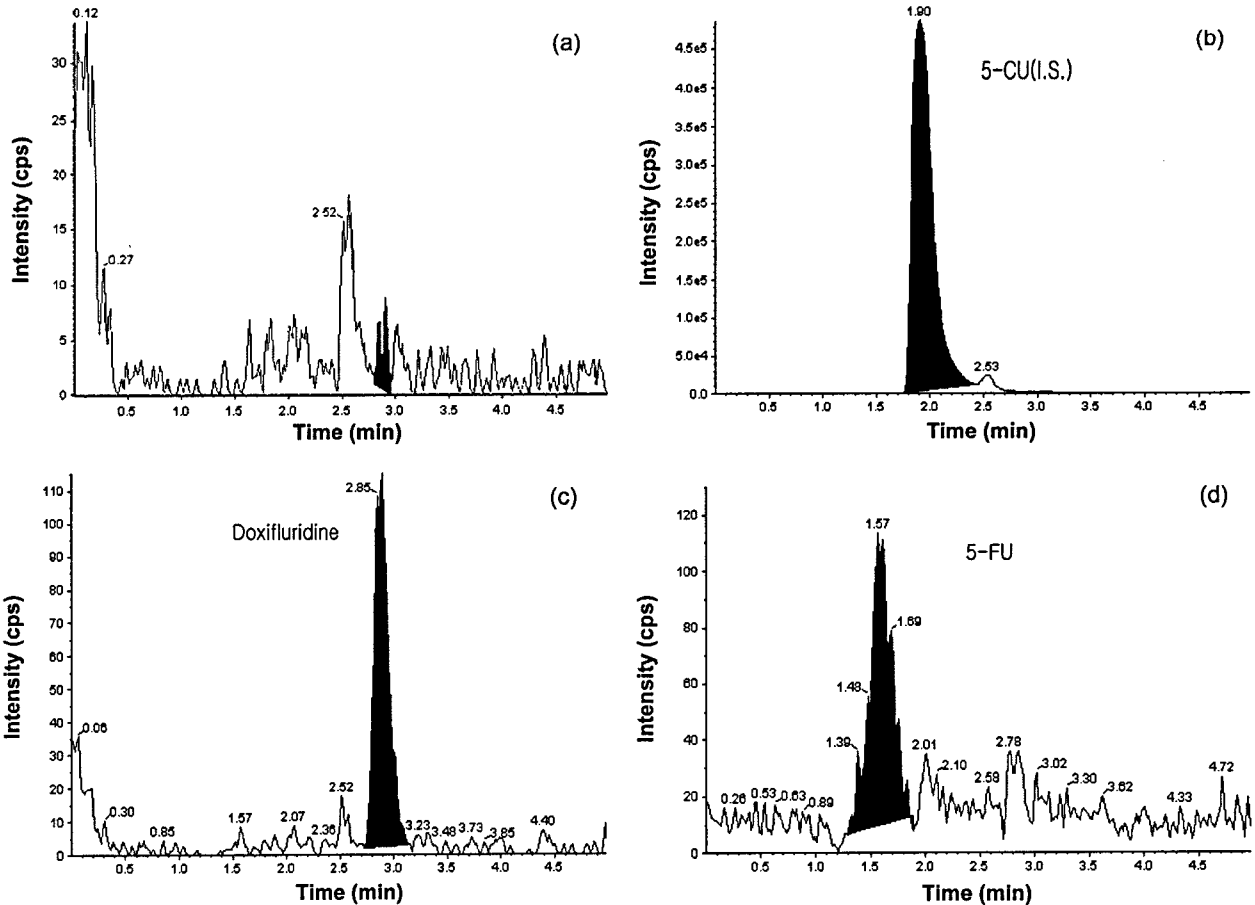


Fig. 1 – Chromatogram obtained from LC/MS/MS at LLOQ. a) blank, b) 5-CU, c) doxifluridine, d) 5-FU.

Table I – Linearity of calibration curve samples of a) doxifluridine, b) 5-FU

a) doxifluridine				
Concentration (ng/ml)	Measured (n=5)	SD	CV (%)	Accuracy (%)
10	9.8	0.6	6.2	97.6
20	19.1	1.1	5.6	95.6
50	50.3	3.5	7.0	100.7
100	104.6	8.0	8.0	104.6
200	204.0	7.2	3.6	102.0
500	515.8	8.5	1.7	103.2
1000	1014.0	11.4	1.1	101.4
2000	1912.0	53.1	2.7	95.6

b) 5-FU				
Concentration (ng/ml)	Measured (n=5)	SD	CV (%)	Accuracy (%)
10	10.5	1.0	9.9	104.8
20	20.4	0.9	4.5	101.8
50	49.7	4.4	8.8	99.4
100	100.6	3.2	3.2	100.6
200	192.4	2.7	1.4	96.2
500	508.2	17.9	3.6	101.6
1000	1009.4	20.0	2.0	100.9
2000	1994.0	33.6	1.7	99.7

하였다.

직선성, 정확성, 정밀성 – 독시플루리딘과 5-FU 분석시, 1/x에 대한 가중치로 단순회귀분석 하였을 때 각각 10 ng/ml~2000 ng/ml에서 직선성을 나타내었고 회귀계수는 모두 0.999 이상이였다. 5회 분석한 검량선용 표준생체시료에 대한 정확성과 정밀성을 Table I에 나타내었다. 또한 각각의 분석 물질에 대한 정확성과 정밀성은 별도의 저농도(30 ng/ml), 중농도(400 ng/ml), 고농도(1600 ng/ml)에 해당하는 각각 6개의 QC(quality control)시료로 평가하였으며, 일간 정밀성은 3일 동안 측정하였다. 측정결과는 Table II에서 볼 수 있듯이, 일간 정확성 및 정밀성의 경우, 독시플루리딘은 99.6~102.6%의 정확성과, 2.6~3.8%의 CV값을 나타내었고, 5-FU는 100.3~102.0%의 정확성과 0.9~4.2%의 정밀성을 나타내었다. 일간 정확성 및 정밀성의 경우, 독시플루리딘은 99.7~101.0%의 정확성과, 4.0~7.4%의 CV값을 나타내었고, 5-FU는 99.3~101.1%의 정확성과 1.7~5.1%의 정밀성을 나타내었다.

최저정량한계 – 최저정량한계는 검량선의 직선성을 유지하면서 공혈청 시료에서 나타날 수 있는 피크의 강도의 5배 이상이

Table II – Intra- and inter-accuracy and precision for doxifluridine and 5-FU in serum

Analytes	Concentration (ng/ml)	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=6)	
		Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
doxifluridine	30	99.6	2.6	100.6	7.4
	400	102.2	3.0	99.7	4.0
	1600	102.6	3.8	101.0	4.4
5-FU	30	100.3	4.2	99.3	5.1
	400	100.8	0.9	101.1	1.7
	1600	102.0	1.9	100.9	2.6

Table III – Accuracy and precision for LLOQ samples

Run No.	Doxifluridine (10 ng/ml)	5-FU (10 ng/ml)
1	9.8	9.8
2	10.1	11.5
3	9.1	9.3
4	10.6	11.4
5	9.2	10.5
SD	0.6	1.0
CV (%)	6.2	9.9
Accuracy (%)	97.6	104.8

되는 농도로 결정하였다. 검량선용 농도에서 가장 낮은 농도에 해당하는 최저정량한계에 해당하는 10 ng/ml에서의 5회 분석 결과는 Table III에 나타난 것처럼 독시플루리딘의 경우, 정확성은 97.6%, CV값은 6.2%이었고, 5-FU의 경우는, 각각 정확성은 104.8%, CV값은 9.9%이었다.

안정성 – 분석 물질의 화학적 특성에 따라서 또는 혈청이나 용기 등에 의한 안정성을 분석 시 발생할 수 있는 보관 조건에 따라서 안정성을 평가하였다. 농도가 1000 ng/ml인 표준 용액을 24시간 실온 방치하였을 때, 독시플루리딘은 95.5%, 5-FU는 106.0%, 5-CU는 100.0%로 안정함을 알 수 있었다. 생체시료 분석시 예상되는 냉·해동에 따른 안정성을 평가하기 위하여, 공혈청에 저농도 및 고농도의 QC시료를 준비하여 -80°C에서 냉동한 후, 약 24시간이 지난 후 해동하고, 같은 조작은 2회 반복하여, 총 3회 냉·해동 후 안정성을 평가하였을 때, 독시플루리딘은 97.7~101.3%이고, 5-FU는 95.5~100.4%으로 안정함을 확인하였다. 또한 시료전처리 후 4°C, 자동주입기에서 24시간 방치시 안정성을 평가하였을 때, 독시플루리딘은 93.8~101.6%이고, 5-FU는 96.5~101.0%로 안정함을 확인하였다(Table IV).

회수율 – 저농도(30 ng/ml), 중농도(400 ng/ml), 고농도(1600 ng/ml)에 해당하는 시료를 각각 6개로 준비하여 회수율을 검토하였다. 회수율을 구하는 방법은 확립된 분석방법으로 준비한 시료의 피크 면적(A)과 공혈청에 분석물질을 첨가하지 않고 시료 전처리를 마친 후의 분석물을 첨가한 후 측정된 피크 면적(B)의 상대적 비율로 측정하였다.⁹⁾ 독시플루리딘의 회수율은 87.1%이고, 5-FU의 회수율은 77.7%이었으며, 각각의 CV값은 12.4%, 11.4%이었다. 독시플루리딘과 5-FU 간의 커다란 극성 차이에도

Table IV – Stability of doxifluridine and 5-FU in serum

Storage condition	Relative concentration (%)					
	Doxifluridine (ng/ml)			5-FU (ng/ml)		
	30	400	1600	30	400	1600
Freeze-Thaw, 3 cycles (n=3)	101.0	97.7	101.3	95.5	100.4	100.3
Post-preparative, 24 hr at 4°C (n=3)	93.8	101.6	98.0	96.5	101.0	99.7

불구하고, 두 가지 약물 모두 비슷한 회수율을 얻으므로써 동시 추출법으로서 비교적 좋은 결과를 구하였다. 회수율이 그리 높지 않은 이유로는 독시플루리딘이 물에 잘 녹고, 5-FU의 경우도 독시플루리딘과 극성 차이가 크긴 하지만, 두 가지 물질 모두 일반적인 약물보다는 극성이 크기 때문에 혈청에서 유기용매로 추출하는 과정에서 손실이 예상된다. 이러한 손실을 최소화하고 추출 효율을 극대화하며 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 추출할 수 있는 방법으로, 본 연구에서는 유기용매로 에틸아세테이트와 이소프로필알콜의 조합에 의한 효과적인 추출법을 개발하였다. 여기서 개발한 추출법은 회수율이 매우 높지는 않지만 상당히 안정적이고 재현성있는 추출 효율을 나타냄을 정확성 및 정밀성 validation 결과를 통해 확인하였다.

결론

본 연구에서는 LC/MS/MS를 이용하여, 원숭이 혈청 중의 독시플루리딘과 대사체인 5-FU를 분석법을 확립하였으며, 분석의 검증을 위하여 선택성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 안정성을 검토한 결과, 모두 양호한 결과를 나타내었다. 이 분석법은 기존의 분석법에 비해 간단한 전처리 과정을 통해 극성의 차이가 나타나는 독시플루리딘과 대사체인 5-FU를 동시에 분석할 수 있도록 하였고, 한 시료를 분석하는 LC/MS/MS 분석 소요시간도 5분 이내로 단축시켰다. 또한 확립된 분석법의 검증을 통해 분석의 강건성을 시사하였다. 본 연구에서 확립된 방법은 혈액 중의 독시플루리딘 및 대사체인 5-FU를 간단하고 신속하게 선택적으로 확인하는데 유용하게 사용될 수 있어, 원숭이를 이용한 독시플루리딘 독성동태연구 및 생물학적동등성연구에도 기여를 할

수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 2006년 용역 과제(06132독성평423)에 의해 지원되었습니다.

참고문헌

- 1) Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. : 5-fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nature* **3**, 330 (2003).
- 2) Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I. and Ishitsuka, H. : Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumors by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur. J. Cancer* **34**, 1274 (1998).
- 3) Pisano, R., Breda, M., Grassi, S. and James, C. A. : Hydrophilic interaction liquid chromatography-APCI-mass spectrometry determination of 5-fluorouracil in plasma and tissues. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 738 (2005)
- 4) Remaud, G., Boisdron-Celle, M., Morel, A. and Gamelin, A. : Sensitive MS/MS-liquid chromatography assay for simultaneous determination of tegar, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil in plasma. *J. Chromatogr. B* **824**, 153 (2005)
- 5) Wang, K., Mulligan, T., Bush, E. D. and Edom, R. W. : Derivatization of 5-fluorouracil with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for determination by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **9**, 970 (1998).
- 6) Reigner, B., Verweij, J., Dirix, L., Cassidy, J., Twelves, C., Allman, D., Weidekamm, E., Roos, B., Banken, L., Utoh, M. and Osterwalder, B. : Effect of food on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites oral administration in cancer patients. *Clin. Cancer Research* **4**, 941 (1998).
- 7) Guerrieri, A., Palmisano, F. and Zamboni, P. G. : 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).
- 8) Guichard, S. M., Mayer, I. and Jodrell, D. I. : Simultaneous determination of capecitabine and its metabolites by HPLC and mass spectrometry for preclinical and clinical studies. *J. Chromatogr. B* **826**, 232 (2005).
- 9) Matuszewsk, B. K., Constanzer, M. L. and Chavez-Eng, C. M. : Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019 (2003).