

염산레르카니디핀 체내동태 연구를 위한 혈청 중 레르카니디핀의 LC/MS/MS 정량법 검증

김세미 · 김환호 · 신새벽 · 강현아 · 윤화 · 조혜영* · 김윤균** · 양찬우*** · 용철순*** · 이용복†

전남대학교 약학대학 부속 생물학적동등성 및 가교시험연구소,
* 국립독성연구원, ** 단국대학교 의과대학, *** 영남대학교 약학대학
(2007년 7월 26일 접수 · 2007년 8월 13일 승인)

Validation of an LC/MS/MS Method for the Pharmacokinetic Study of Lercanidipine

Se-Mi Kim, Hwan-Ho Kim, Sae-Byeok Shin, Hyun-Ah Kang, Hwa Yoon, Hea-Young Cho*,
Yoon-Gyoon Kim**, Chan Woo Yang***, Chul Soon Yong*** and Yong-Bok Lee†

College of Pharmacy and Institute of Bioequivalence and Bridging Study, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

*General Pharmacology Team, Pharmacological Research Department, NITR, KFDA, Seoul 122-704, Korea

**College of Medicine, Dankook University, Chonan 330-714, Korea

***College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received July 26, 2007 · Accepted August 13, 2007)

ABSTRACT – A rapid, simple and sensitive LC/MS/MS method for the determination of lercanidipine in human serum was validated and applied to the pharmacokinetic study of lercanidipine. Lercanidipine and internal standard, amlodipine, were extracted from human serum by liquid-liquid extraction with hexan-isoamyl alcohol (100:1, v/v) and analyzed on a Symmetry[®] MS C₁₈ column with the mobile phase of acetonitrile-0.2% aqueous formic acid (70:30, v/v). Using MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode, lercanidipine and amlodipine were detected without severe interferences from human serum matrix. Lercanidipine produced a protonated precursor ion ([M+H]⁺) at m/z 612.3 and a corresponding product ion at m/z 280.0. Internal standard produced a protonated precursor ion ([M+H]⁺) at m/z 409.0 and a corresponding product ion at m/z 238.0. The ruggedness of this method was investigated using quality control (QC) samples. This method showed linear response over the concentration range of 0.05-20 ng/mL with correlation coefficient greater than 0.999. The lower limit of quantitation using 0.5 mL of serum was 0.05 ng/mL, which was sensitive enough for pharmacokinetic studies. The overall accuracy of the developed method ranged from 85.51 to 112.2% for lercanidipine with overall precision (% C.V.) being 3.56-13.1%. This method showed good ruggedness (within 15% C.V.) and was successfully applied for the analysis of lercanidipine in human serum samples for the pharmacokinetic studies, demonstrating the suitability of the method.

Key words – Lercanidipine, Human serum, Validation, Pharmacokinetics, LC/MS/MS

염산레르카니디핀(lercanidipine hydrochloride, (±)2-(3,3-diphenylpropyl)methyl-amino-1,1-dimethylethyl methyl (4RS)-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate monohydrochloride)은 제 3세대 dihydropyridine계열 칼슘채널차단제로 높은 지질친화성과 혈관선택성으로 24시간 이상 안정적인 혈압강하를 나타내는 제제이다.¹⁻⁸⁾ 염산레르카니디핀은 경구 투여 후 위장관으로부터 완벽하게 흡수되고 최고혈중농도에 도달하는 시간은 1~3시간이며, 실질 반감기는 약 2~5시간으로 알려져 있다.^{7,8)} 경구 투여시 초회 용량은 10 mg이고 1일 20 mg까지 증량할 수 있으며, 대부분 비활성 대사체로 대사되고, 50%만이 노 중으로 배설된다고 보고되어 있다.⁸⁾

이미 보고된 생체시료 중의 레르카니디핀 분석 방법 중에는 high performance liquid chromatography/UV(HPLC/UV) 및 liquid chromatography/mass/mass spectrometry (LC/MS/MS)로 분석한 방법이 있으나,⁵⁻⁷⁾ 정량한계가 0.5 ng/mL로 약물속도론적 파라미터를 구할 수 있는 충분한 혈중농도-시간 곡선을 얻을 수 없고,⁷⁾ 시료 전처리 과정이 매우 복잡하며, 분석시간이 긴 단점을 가지고 있다.^{5,6)} 또한 아직까지 한국인을 대상으로 한 생체이용률 시험과 약물속도론적 파라미터들에 대한 보고가 없다.

따라서 본 연구에서는 기존 분석법의 단점을 극복하고자 LC/MS/MS를 이용하여 사람 혈청 중의 레르카니디핀에 대한 새로운 분석법을 개발·검증하였다. 이 분석법은 기존의 방법에 비해 시료 전처리가 간단하고, 분석시간도 짧으며 높은 검출감도와 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 보였다. 이렇게 검증된 분석법을 이용하여 30명의 건강한 성인을 대

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 062)530-2931, E-mail : leeyb@chonnam.ac.kr

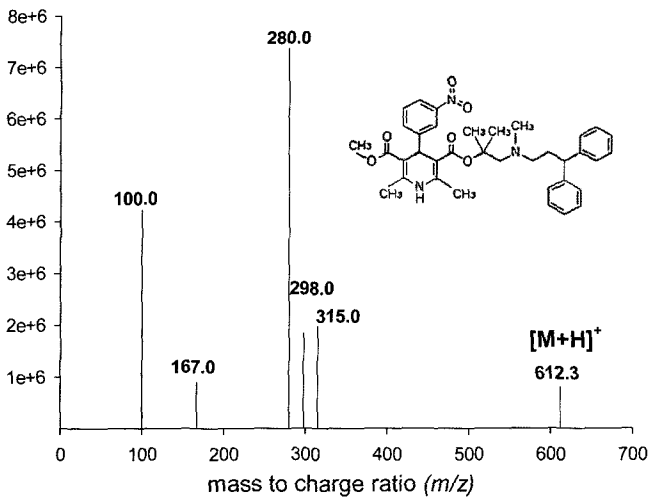


Figure 1—Product ion mass spectrum used in MRM for lercanidipine determination.

상으로 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준⁹⁾(식품의약품안전청 고시 제 2005-31호, 2005. 6. 7.)에 따라 염산레르카니디핀의 기준 시판 대조제제인 자니딤 정(염산레르카니디핀 10 mg) 2정을 1회 경구 투여한 생체이용률시험을 수행하여 한국인에서의 약물동태학적 특성을 파악하고자 하였다. 본 시험은 임상시험 심사위원회(institutional review board, IRB)를 거쳐 시험계획서의 승인을 받은 후 시험계획서에 따라 수행되었으며 모든 피험자의 동의를 받아서 이루어졌다.

실험 방법

시약 및 기기

생체이용률시험에 사용된 대조제제는 식품의약품안전청으로부터 허가를 받아 LG생명과학(서울)에서 시판하고 있는 “자니딤 정”(제조번호: ZAN05072, 사용기한: 2008. 10. 30)으로 염산레르카니디핀을 10 mg 함유하는 정제이었다.

염산레르카니디핀 표준품(삼천당제약 주식회사, 화성, 한국, 염기의 구조; Figure 1) 및 내부표준물질로 사용한 말레인산 암로디핀(하나제약 주식회사, 화성, 한국, 염기의 구조; Figure 2), HPLC용 아세토니트릴 및 메탄올(이상 Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, 미국), 생리식염수 및 헤파린(이상 Chungwae Pharma. Corp., 서울, 한국)은 시판품을, 증류수는 Milli Q(Millipore Co., Milford, MA, 미국)에서 18 MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 핵산, 수산화나트륨 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 그대로 사용하였다.

혈청 시료 분석에 있어서 HPLC용 펌프로 Varian Prostar-410(Varian, Inc., Palo Alto, CA, 미국)을, HPLC용 칼럼

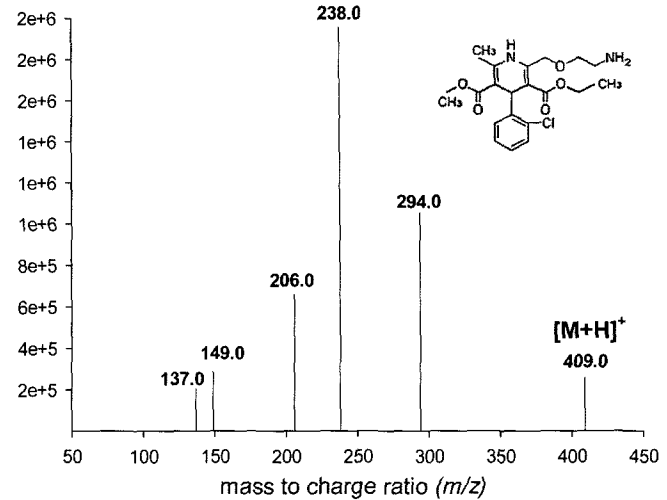


Figure 2—Product ion mass spectrum used in MRM for internal standard (IS, amlodipine) determination.

으로는 Symmetry[®] MS C₁₈(입자경 3.5 μm, 2.1 mm×50 mm, Waters Co., Milford, MA, 미국)을, 시료자동주입기로 Varian Prostar Dynamix(Varian, Inc., Palo Alto, CA, 미국)를, MS/MS 검출기로는 Varian 1200L triple-quadrupole mass spectrometry(Varian, Inc., Palo Alto, CA, 미국)를, 데이터 처리장치로는 Analyst(Ver. 1.4)를 사용하였다.

피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준⁹⁾ 제 10조(피험자의 선정) 및 제 11조(피험자의 제외기준)에 따라 지원자 모집공고를 통하여 19~55세의 건강한 성인 지원자를 각각 모집하였다. 전문의사의 건강진단을 실시하여 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 자로서 생체이용률시험에 적합한 건강인으로 판정된 자 30명을 피험자로 선정하였다. 이 시험의 피험자로 선정된 사람들의 평균 체중은 68.27±6.66 kg, 평균 나이는 만 22.93±1.86세 이었다. 본 시험에 참여하는 지원자를 대상으로 생체이용률시험 설명회를 실시하여 이 시험의 목적, 방법, 이상 약물반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 이로부터 자유의사에 의한 시험참가동의서를 받은 후 생체이용률시험을 실시하였다.

모든 피험자는 정해진 투약일 일주일 전부터 항생제 및 진통제 등을 포함한 일체의 약물 복용을 금지하였을 뿐 아니라 흡연, 크산틴계 음료 및 음주 등을 제한 관리하였고, 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

생체이용률시험을 위하여 30명의 피험자에 대하여 난수발생법에 따라 무작위 배열한 다음, “자니딕 정(염산레르카니디핀)”을 동일 투약일에 투여하고, 투약량은 “자니딕 정(염산레르카니디핀 10 mg) 2정을 1회 경구 투여하였다. 피험자들 모두에게 heparin-locked(150 unit/ml) Angiocatheter (JELCO™, 22G, Johnson&Johnson Medical, Pomezia, 이탈리아)를 팔 또는 손등 정맥부위에 설치하고 240 mL의 물과 함께 복용시켰다. 피험자 간 복약 시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 약 1분 20초 간격으로 하였다.

채혈은 염산레르카니디핀 20 mg 투약 시 반감기가 2-5시간임을^{7,8)} 토대로 반감기의 3배 이상인 24시간동안 실시하였고, 채혈 시간은 약물 투약 직전과 투약 후 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 및 24시간에 총 12회 채혈하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 8 mL의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재되어 있는 vacutainer에 넣었다. 채혈 후 마다 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 즉시 혈청분리관을 사용하여 혈청을 채취하고 분석시까지 영하 80°C에서 보관하였다.

혈청 중 레르카니디핀의 정량

염산레르카니디핀 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 1 mg/mL로 만든 후 4°C에서 냉장 보관시키고, 이 용액을 공혈청으로 희석하여 혈청 중 레르카니디핀 농도가 각각 0.05, 0.2, 0.5, 1, 5, 10 및 20 ng/mL가 되도록 검량선용 표준혈청액을 조제하였다. 각각의 검량선용 표준혈청 500 µL에 내부표준물질로 말레인산 암로디핀(1 µg/mL) 메탄올 용액 45 µL 및 0.1 M NaOH 200 µL를 가하였다. 여기에 hexan-isoamyl alcohol (100:1, v/v) 용액을 넣어 20초 동안 진탕한 다음 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 이 용액을 영하 70°C에서 20분간 방치한 후 유기층을 취하여 깨끗한 시험관에 옮기고, 이를 질소가스 감압 하에서 증발건조시켰다. 그 잔사에 이동상 200 µL를 가하여 녹인 다음 이 용액 15 µL 취하여 LC/MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 레르카니디핀의 피크 면적비를 구하여 검량선을 작성하였으며 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였을 뿐만 아니라 0.05, 0.2, 0.5, 1, 5, 10 및 20 ng/mL 농도에서 각각 5회 측정하여 정확성

을 평가하였다.

이 때의 LC/MS/MS의 조건은 이미 보고된 레르카니디핀 LC/MS/MS 분석법을 참고하고,^{5,6)} 일부 수정하여 상기 기기 조건하에서 이동상으로 아세트니트릴-0.2% aqueous formic acid(70:30, v/v)의 혼합용액을 사용하였으며 칼럼은 Symmetry® MS C₁₈(2.1×50 mm, 3.5 µm, Waters, USA)을 사용하였다. 유속은 0.32 mL/min였으며, 피이크 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 검출하였다. 이온화는 electrospray ionization(ESI)을 사용하여 positive mode로 분석하였으며, ion spray 온도는 320°C로 설정하였다. MRM 방법을 이용한 레르카니디핀과 내부표준물질인 암로디핀의 precursor ion은 각각 m/z 612.3과 409.0의 수소화된 분자이온을 사용하였으며, 생성된 product ion은 m/z 280.0과 238.0 이온을 모니터링 하였다.

한편, 혈청 시료의 분석은 먼저 피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 80°C에 보관했던 혈청 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음 이 혈청 500 µL를 취하여 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질로 말레인산 암로디핀(1 µg/mL) 메탄올 용액 45 µL를 가한 후 상기 검량선 작성을 위한 추출법에 따라 추출하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 레르카니디핀의 피크 면적비를 구하여 미리 작성된 검량선에 의해 혈청 시료 중 레르카니디핀의 농도를 산출하였다.

약물속도론적 파라미터의 산출 및 생체이용률 평가

“자니딕 정(염산레르카니디핀 10 mg)” 2정을 30명의 피험자에게 경구 투여하여 얻은 각 피험자의 약물속도론적 파라미터인 최고혈청농도(C_{max}), 최고혈청농도 도달시간(T_{max}), 채혈시간 t와 무한대까지의 혈청 중 약물농도-시간곡선하 면적(AUC_t 및 AUC) 및 소실반감기(t_{1/2}) 등은 WinNonlin 프로그램¹⁰⁾을 이용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

혈청 중 레르카니디핀 정량 및 검증

레르카니디핀과 내부표준물질인 암로디핀의 precursor ion은 positive ion mode에서 [M+H]⁺으로 검출되어, 레르카니디핀은 m/z 612.3 및 암로디핀은 m/z 409.0의 ion을 precursor ion으로 선정하였다. 선정된 precursor ion의 product ion scan을 통하여, 가장 잘 검출되는 레르카니디핀과 암로디핀의 product ion은 m/z 280.0(Figure 1)과 238.0(Figure 2)

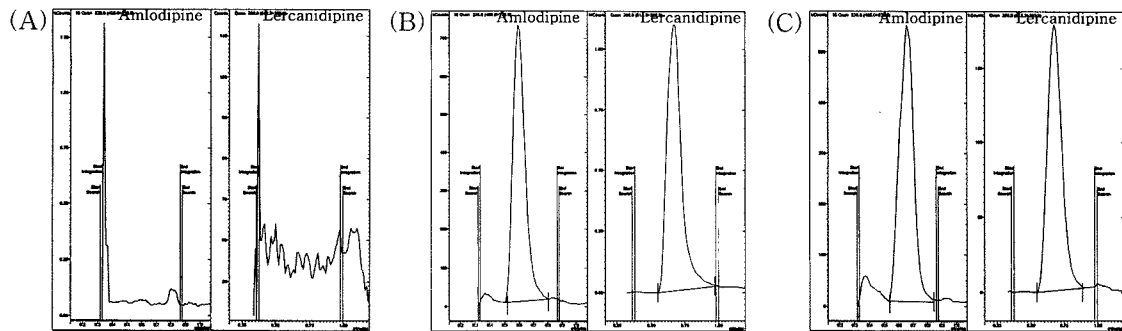


Figure 3—Chromatograms of (A) blank human serum, (B) blank human serum spiked with lercanidipine (10 ng/ml) and internal standard (IS, amlodipine 1 µg/ml) and (C) serum sample at 1 hr after oral administration of two 10 mg lercanidipine tablets (The serum concentration of lercanidipine corresponds to 1.90 ng/mL.).

의 ion으로 선정하였다.

건강 성인의 대조혈청과 대조혈청에 내부표준물질인 말레인산 암로디핀과 염산레르카니디핀을 함께 가한 것 및 염산레르카니디핀 정제 투여 후 1시간째의 혈청을 본 시험방법에 따라 LC/MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Figure 3에 나타내었다. 레르카니디핀 및 내부표준물질 피크의 출현시간은 약 0.5~0.7분이었으며 각 물질의 분리상태는 양호하였다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 5 이상으로 하고 일내 및 일간 변동계수의 크기를 20% 미만으로 하였을 때의 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 0.05 ng/mL이었다. 혈청 시료로부터 구한 레르카니디핀의 검량선

은 피크 면적비(y)= $0.1819173 \times$ 레르카니디핀 농도(x) + 0.0104596 ($r=0.9999$, $p<0.01$)으로 0.05~20 ng/mL 범위에서 모두 양호한 직선성을 나타내었다. 또한, 최저정량한계를 제외한 검량선 농도 범위에서 레르카니디핀의 일내 및 일간 변동계수(C.V.)는 모두 15% 이하로 나타났고, 정확성은 85.51~112.2%이었다(Table 1).

이로부터 혈청 중 레르카니디핀에 대한 상기 LC/MS/MS 분석법은 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

혈청 중 레르카니디핀 농도 추이

“자니딕 정(염산레르카니디핀 10 mg)” 2정씩 30명에게 각각 경구 투여한 후 일정 시간마다 채혈하여 얻은 피험자에 대한 혈청 중 레르카니디핀 평균 농도를 Figure 4에 나타내

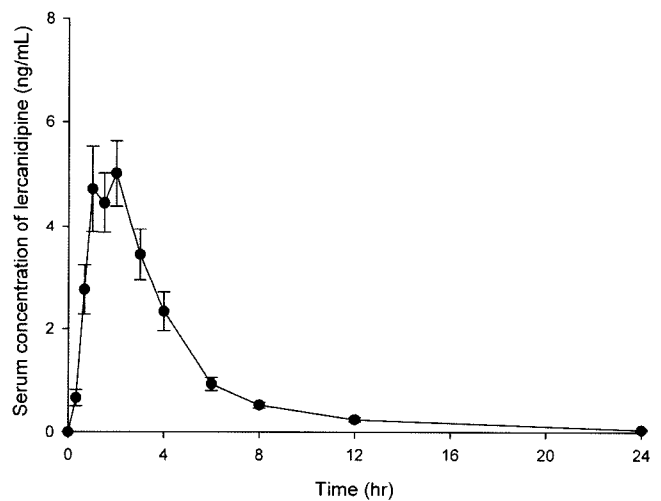


Figure 4—Mean (\pm S.E.) serum concentration-time curves of lercanidipine following oral administration of two Zanidip tablets (as lercanidipine hydrochloride of 20 mg) from human volunteers ($n=30$).

Table 1—Precision and Accuracy for the Determination of Lercanidipine in Human Serum

Concentration (ng/mL)	Precision C.V. (%)		Accuracy (%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
0.05 (LLOQ)	15.4	7.20	82.53
0.2	11.4	4.89	85.51
0.5	12.9	13.1	91.75
1	6.45	3.56	93.69
5	12.3	3.76	112.2
10	7.13	8.76	103.6
20	11.1	8.32	104.9

C.V. (Coefficient of Variation)= $100 \times$ S.D./mean.

Table 2—Pharmacokinetic Parameter Values Obtained after Oral Administration of Two Zanidip Tablets (10 mg) at the Lercanidipine Hydrochloride Dose of 20 mg ($n=30$)[#]

Parameters				
AUC _t (ng·hr/mL)	AUC _∞ (ng·hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	t _{1/2} (hr)
21.13	21.86	7.30	1.78	3.84
± 11.44	± 11.39	± 4.22	± 0.97	± 2.19

[#]Mean \pm S.D.

었다. 또한, 각 피험자의 혈청 중 약물농도-시간 곡선으로부터 구한 약물속도론적 파라미터를 Table 2에 나타내었다. “자니딤 정(염산레르카니디핀 10 mg)” 2정을 경구 투여하였을 때 얻은 평균 AUCt(ng·hr/mL)는 21.13 ± 11.44 , C_{max} (ng/mL)는 7.30 ± 4.22 , T_{max} (hr)는 1.78 ± 0.97 , $t_{1/2}$ (hr)은 3.84 ± 2.19 이었다. 이는 문헌에 보고된 염산레르카니디핀 20 mg을 건강한 성인에게 경구 투여하였을 때의 파라미터(AUC: 11.82~28.57 ng·hr/mL, C_{max} : 2.44~14.93 ng/ml, T_{max} : 1~3 hr 및 $t_{1/2}$: 2~5 hr)와 거의 일치함을 알 수 있었다.^{6,8)}

결 론

사람 혈청 중 레르카니디핀의 LC/MS/MS 분석법을 확립·검증하고자 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험 기준⁹⁾에 따라 30명의 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 “자니딤 정(염산레르카니디핀 10 mg)” 2정씩을 경구 투여하여 생체이용률시험을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 내부표준물질을 암로디핀으로 하여 LC/MS/MS 크로마토그램을 분석한 결과 혈청 성분 등 내인성 물질의 간섭 없이 레르카니디핀 및 내부표준물질이 양호하게 분리되었다.

2. 혈청시료로부터 구한 레르카니디핀 검량선의 $r=0.9999$ 로 0.05~20 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고 최저 정량한계는 0.05 ng/mL이었다. 확립한 분석법을 검증한 결과 최저정량한계를 제외한 검량선 농도 범위에서 intra- 및 inter-day의 정확성 및 정밀성이 모두 15% 이내로 나타났고, 충분한 감도, 특이성, 정밀성 및 정확성이 있음을 확인할 수 있었다.

3. 30명의 건강한 성인 지원자를 대상으로 “자니딤 정(염산레르카니디핀 10 mg)” 2정을 경구 투여한 결과 AUCt(ng·hr/mL)는 21.13 ± 11.44 , C_{max} (ng/mL)는 7.30 ± 4.22 , T_{max} (hr)는 1.78 ± 0.97 , $t_{1/2}$ (hr)은 3.84 ± 2.19 이었다.

4. 국내에서 한국인을 대상으로 한 염산레르카니디핀의 생체이용률시험이 행해진 바가 없으므로, 본 연구에서 얻어진

약물속도론적 파라미터는 향후 약물치료에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구는 삼천당제약 주식회사의 지원을 받아 전남대학교 약학대학에서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) L. M. Bang, T. M. Chapman and K. L. Goa, Lercanidipine: a review of its efficacy in the management of hypertension, *Drugs*, **63**(22), 2449-2472 (2003).
- 2) M. Epstein, Lercanidipine: a novel dihydropyridine calcium-channel blocker, *Heart Dis.*, **3**(6), 398-407 (2001).
- 3) K. J. McClellan and B. Jarvis, Lercanidipine: a review of its use in hypertension, *Drugs*, **60**(5), 1123-1140 (2000).
- 4) V. A. P. Jabor, E. B. Coelho and V. L. Lanchote, Enantioselective pharmacokinetics of lercanidipine in healthy volunteers, *J. Chromatogr. B*, **813**, 343-346 (2004).
- 5) I. I. Salem, J. Idrees, J. I. Al Tamimi and P. Farina, Selective and rapid liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of lercanidipine in human plasma, *J. Chromatogr. B*, **803**, 201-207 (2004).
- 6) V. A. P. Jabor, E. B. Coelho, D. R. Ifa, P. S. Bonato, N. A. dos Santos and V. L. Lanchote, Enantioselective determination of lercanidipine in human plasma for pharmacokinetic studies by normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **796**, 429-437 (2003).
- 7) M. Barchielli, E. Dolfini, P. Farina, B. Leoni, G. Targa, V. Vinaccia and A. Tajana, Clinical pharmacokinetics of lercanidipine, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **29**(Suppl. 2), S1-S15 (1997).
- 8) Martindale, The complete drug reference, 32nd Eds., p. 897 (1999).
- 9) 식품의약품안전청 고시 제 2005-31호, 생물학적동등성시험 기준 (2005. 6. 7).
- 10) WinNonlin™ Users Guide Ver. 3.0, Pharsight Corp. Mountain View, CA, USA (1998-1999).