

LC/MS/MS를 이용한 원숭이 및 비글견의 간 및 장관 조직에서의 Doxifluridine과 대사체 5-FU 동시분석법 개발

우영아 · 김기환 · 정은주 · 김충용[#]

안전성평가연구소

(Received October 24, 2007; Revised January 11, 2008)

Simultaneous Determination of Doxifluridine and 5-FU in Liver and Intestine Tissue Using LC/MS/MS

Young-Ah Woo, Ghee Hwan Kim, Eun Ju Jeong and Choong-Yong Kim[#]

Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-343, Korea

Abstract — A liquid chromatographic method with tandem spectrometric detection (LC/MS/MS) for the simultaneous determination of doxifluridine and its active metabolite, 5-fluorouracil (5-FU) was developed over the concentration range of 5~2000 ng/ml, respectively. Doxifluridine, 5-FU and internal standard, 5-chlorouracil (5-CU), were extracted from liver and intestine tissue via protein precipitation. Acetonitrile was used as the extraction solvent and the supernatant was evaporated and reconstructed in mobile phase. Optimum chromatographic separation was achieved on a Agilent Zorbax C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm) column with mobile phase run in isocratic with methanol : water (20 : 80, v/v). The flow rate was 0.2 ml/min with total cycle time of 5 min. The lower limit of quantification was validated at 5.0 ng/ml of liver and intestine tissue, for both doxifluridine and 5-FU, respectively. The intra-day and inter-day precision and accuracy of quality control (QC) samples were <11% coefficient of variation and <7% relative error from theoretical concentration for both analytes. In addition, the special designed stability study was performed, because the metabolism of doxifluridine occurs spontaneously even in ice bath for monkey liver. The stability of doxifluridine in liver and intestine of monkey and beagle dog was compared. It was found that bioanalytical validation could not be performed for the monkey liver; however, beagle dog's liver has relatively low speed of metabolism compared to monkey liver and instead of monkey liver, beagle dog's liver could be used for the validation. Bioanalytical validation could be performed in monkey intestine. Eventually, this developed method for liver and intestine will be useful in support of the toxicokinetic and pharmacokinetic studies of doxifluridine and 5-FU.

Keywords □ doxifluridine, 5-FU, LC/MS/MS, monkey, beagle dog, liver, intestine, simultaneous determination, stability

약물의 독성학적 연구나 약리학적 연구를 위해서는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 대한 포괄적인 이해가 필요하고, 이에 대상 조직에서의 약물과 대사체의 분포나 축적을 확인할 수 있는 분석법이 필수적이다. 특히, 반복투여의 경우에는, 조직 축적 가능성이 있어 혈중농도와는 별도의 확인이 필요하지만, 인체를 대상으로 실험하는 것은 불가능하므로, 같은 영양류인 원숭이를 이용한 연구가 실제 ADME 예측을 함에 유용하게 사용될 수 있다. 이러한 목적으로 본 연구에서는 항암제 독시플루리딘 및 5-

FU의 조직 축적 확인을 위한 분석법을 개발하였다. 독시플루리딘은 주로 대장암에 약효를 나타내는 약물로서, 그 대상 조직이 장관 조직으로, 본 연구에서는 간 조직과 장관 조직 중의 독시플루리딘과 5-FU를 LC/MS/MS를 이용하여 신속하게 선택적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하였다.

독시플루리딘(doxifluridine)은 플루오로피리미딘(fluoropyrimidie) 유도체로서 항암효과를 가진 5-FU(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 중양조직에서 선택

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

적으로 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 전환이 되며, 설사, 소화기 출혈, 백혈구 감소 등 항암제의 독성이 여전히 나타나는 문제점이 있다.

이러한 항암제의 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, 이전 연구에서 LC/MS/MS를 이용한 원숭이 혈액 중에 존재하는 독시플루리딘과 5-FU 동시 분석법을 보고한 바 있다.³⁾

지금까지 독시플루리딘과 5-FU에 대한 분석은 주로 HPLC-UV법이나 LC/MS/MS를 이용한 방법이 보고되었다. 보고된 분석법은 주로 5-FU를 분석하는 방법으로써,⁴⁻⁶⁾ 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 분석하는 방법으로 보고된 HPLC-UV법은 한 시료를 분석시 독시플루리딘과 5-FU의 극성 차이로 인하여 복잡한 고상추출 과정을 거치고, 한 시료당 20분이 소요되는 긴 LC 분석시간의 단점이 있다.^{7,8)} LC/MS/MS를 이용하여 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 분석한 방법 또한 LC분석시간이 12분이고 5-FU에 대한 최저 정량한계치(lower limit of quantification, LLOQ)가 50 ng/ml로 상대적으로 높은 값을 나타내고 있다.⁹⁾

주로 분석법은 혈중 독시플루리딘이나 5-FU를 분석하는 방법으로서 간 조직이나 장관 조직 중에 분포되어 있는 약물을 간단하고 신속하게 분석하는 방법은 거의 보고되어 있지 않다. 그러므로, 본 연구에서는 원숭이 간 조직이나 장관 조직에 존재하는 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 분석할 수 있도록 선택적으로 감도가 높은 LC/MS/MS 방법을 이용하고, 효과적인 크로마토그래피법을 이용하여 한 시료당 분석시간을 5분 이내로 분석할 수 있도록 개선하였다.

이전에 본 연구팀에 의해 발표한 원숭이 혈액 중 독시플루리딘 및 대사체 5-FU의 분석에서는 액상추출법을 사용하였지만, 조직 시료에 적용시 효율적인 추출 효율을 유도할 수 없었고, LLOQ 또한 조직에서의 존재량이 혈중보다 매우 낮을 것으로 예상되므로, 보다 낮은 농도로 분석하기 위해 유기 용매에 의한 단백질 침전법을 이용한 새로운 시료 전처리 조건을 확립하였다.

조직 중의 구조상 극성 차이가 많이 나는 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 시료 전처리 할 수 있도록 적절한 추출 용매를 사용하였고, 동시에 간편하게 많은 시료 수를 분석할 수 있도록 96-well filtering plate를 이용하여 전처리에 소요되는 시간을 단축시켰다. 또한, LC 분석시간을 5분 이내로 단축하여 신속하고 정확하게 두 가지 물질을 동시에 정량 할 수 있는 분석법을 개발하였다.

또한 원숭이 간 조직의 경우, 공시료에 독시플루리딘을 첨가하자마자 5-FU 등으로 대사되는 현상이 발견되어, 간 조직 분석을 위해서 비글견의 간조직을 사용하였다. 독시플루리딘과 5-FU의 간 및 장관 조직 안정성을 시간과 온도를 달리 하여 원숭이 및 비글견에서 비교하였다.

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 Q™(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, 이동상으로는 메탄올/물을 20 : 80(v/v)의 비율로 등용매분리 조건으로 5분 동안 분리하였고, 유속은 0.2 ml/min로 하였다. MS조건에서는 multiple reaction monitoring(MRM) 모드에서 독시플루리딘은 245→108, 5-FU는 129→42, 5-CU는 145→42의 조건에서 검출하였고, 음(negative) 이온화 모드에서 각각의 collision energy는 -28, -30 및 -28 V를 사용하였다. Source 온도는 500°C로 하였고, declustering potential은 세 이온 모두 -30 V로 하였고, entrance potential은 -10 V로 하여 분석하였다.

시료 전처리

본 실험에서는 원숭이(*Macaca fascicularis*) 간 및 장관 조직과 비글견(*Canis familiaris*)의 장관 조직을 사용하였다. 간 조직의

경우, 원숭이 간조직 공시료에 독시플루리딘 첨가하자마자 대사가 일어나 독시플루리딘이 손실되기 때문에 비글견의 간 조직으로 대체하여 실험을 진행하였고, 장관 조직은 원숭이의 것을 사용하였다. 분석법 개발을 위해 간 조직을 두 배(중량/용량)의 인산 완충액(pH 6.8)을 넣고, 장관 조직은 네 배(중량/용량)의 인산 완충액(pH 6.8)을 넣어 homogenizer(Powergen 700, Fisher)로 분쇄하여 준비하였다. 여기서 조직 시료 50 μ l를 취하여 단백질을 제거하기 위해 acetonitrile 150 μ l와 내부 표준품(5-CU, 40 ng/ml) 50 μ l를 넣어 96-well membrane filter plate(Protein precipitation FF, Fisher Scientific)에 넣어 혼합기(CM 1000, EYELA)로 2분간 섞어 주었다. 이것을 감압 여과하여 감압농축기(SPD 1010, Thermo)를 이용하여 용매를 제거하였다. 잔사에 이동상 100 μ l로 넣어 용해시킨 다음, 여기서 10 μ l를 취해 HPLC에 주입하였다.

검량선 작성

독시플루리딘과 5-FU 표준품을 이동상과 메탄올에 녹여 100 μ g/ml로 한 다음, 이 표준액을 적당한 범위로 희석한 다음, 공조직에 1/9비율로 첨가하여 독시플루리딘과 5-FU의 농도가 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ng/ml가 되도록 표준조직시료를 만들었다. 개발한 분석법의 정확성, 정밀성, 안정성을 확인하기 위하여, 세 가지 종류의 QC 시료를 같은 방법으로 15, 400, 1600 ng/ml가 되도록 조제하였다.

분석법 검증(Bioanalytical method validation)

개발된 분석법은 검량선 작성용 표준시료 이외에 별도로 조제한 QC 시료를 저농도(15 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, 본 방법의 간 조직 및 장관 조직 시료에서의 회수율을 평가하였다. 시료전처리 후 안정성 평가를 위해, 시료전처리 후 자동시료주입기, 4°C에서 24시간 보관 후 변화를 평가하였다.

조직 안정성 평가

간 조직과 장관 조직에서의 분석 물질, 독시플루리딘과 5-FU의 안정성을 평가하기 위하여, 원숭이 및 비글견의 간 조직, 원숭이 장관 조직에 독시플루리딘과 5-FU를 각각 첨가하여 온도(ice bath, 실온, 37°C) 및 시간(0, 1, 2, 3, 4 hr)에 따른 변화를 확인하였다.

결과 및 고찰

혈청 중 독시플루리딘과 대사체인 5-FU의 분석법 검증

선택성 - 본 연구에서 개발한 분석 조건에서 독시플루리딘과 5-FU의 분석을 방해할 수 있는 간 조직과 장관 조직 중에 존재

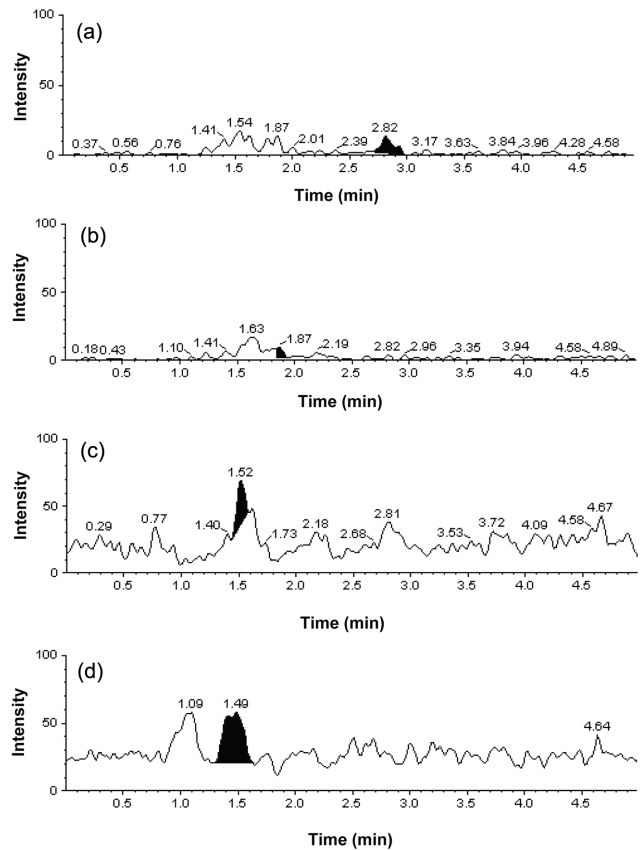


Fig. 1 - Chromatogram of (a) blank liver sample in doxifluridine analysis mode (b) blank intestine sample in doxifluridine analysis mode (c) blank liver sample in 5-FU analysis mode (d) blank intestine sample in 5-FU analysis mode.

하는 내인성 물질이나 간섭물질에 의한 영향을 조사하기 위하여 LLOQ에 해당하는 시료의 크로마토그램을 확인하였다. Fig. 1(a) 및 (b)에서 확인할 수 있듯이 독시플루리딘의 경우, 간 조직 및 장관 조직의 공시료에서는 분석물질의 피크를 없음을 확인하였다. 5-FU의 경우, Fig. 1(c) 및 (d) 분자량이 작기 때문에 혈액 중의 아미노산 등의 내인성 물질에 의한 간섭영향 피크가 보이는 하지만, 분석물질에 비해 상대적으로 매우 적고, 실제 분석 결과에서도 영향이 없음을 확인하였다. 이런 결과를 통하여 본 연구에서 개발한 분석 방법이 독시플루리딘 및 5-FU를 생체시료 내에서 선택적으로 분석할 수 있음을 확인할 수 있었다. 독시플루리딘과 5-FU의 머무름 시간은 각각 2.8분, 1.6분이었으며, 내부 물질로 사용한 5-CU는 1.9분이었다(Fig. 2). 세 분석 물질 모두 3분 이내에 피이크를 확인할 수 있었고, 한 시료당 분석 시간을 5분 내에 분석법 검증을 수행하였다.

직선성, 정확성, 정밀성 - 독시플루리딘과 5-FU 분석시, 1/x에 대한 가중치로 단순회귀분석 하였을 때 각각 5 ng/ml~2000 ng/ml에서 직선성을 나타내었고 회귀계수는 모두 0.999 이상이었다. 5회 분석한 검량선용 표준생체시료에 대한 정확성과 정밀성을

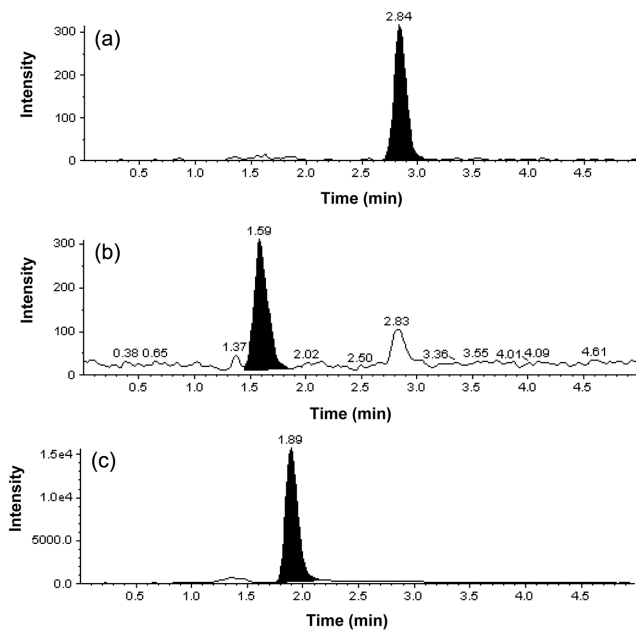


Fig. 2 – LC/MS/MS chromatogram of (a) doxifluridine (b) 5-FU (c) 5-CU at standard liver tissue sample of 10 ng/ml.

Table I – Linearity and accuracy of doxifluridine and 5-FU for calibration curve samples in liver (a) and intestine tissue (b)

(a) Liver tissue				
Concentration (ng/ml)	Doxifluridine		5-FU	
	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
5	92.4	11.2	96.4	6.7
10	98.3	10.5	104.1	6.8
20	96.6	11.3	110.7	10.6
50	101.8	7.8	96.1	5.4
100	105.9	5.3	99.0	11.4
200	102.5	3.3	97.4	3.5
500	101.2	7.5	97.1	6.3
1000	106.2	1.8	101.9	4.0
2000	97.9	1.4	100.4	1.4

(b) Intestine tissue				
Concentration (ng/ml)	Doxifluridine		5-FU	
	Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
5	93.5	9.6	102.1	8.6
10	103.3	8.5	96.4	8.9
20	98.9	6.1	100.8	5.0
50	99.9	9.6	97.9	1.9
100	103.9	9.1	99.9	7.5
200	99.0	7.7	99.1	6.0
500	106.9	6.0	103.6	2.7
1000	102.0	8.0	98.1	4.9
2000	98.0	4.4	99.8	2.2

Table I에 나타내었다. 또한 각각의 분석 물질에 대한 정확성과 정밀성은 별도의 저농도(15 ng/ml), 중농도(400 ng/ml), 고농도

Table II – Intra- and inter-accuracy and precision for doxifluridine and 5-FU in liver and intestine tissue

Tissue	Analytes	Conc. (ng/ml)	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=6)	
			Accuracy (%)	CV (%)	Accuracy (%)	CV (%)
Liver	Doxifluridine	15	97.6	5.2	97.0	7.8
		400	99.2	8.9	101.2	8.0
		1600	103.4	6.3	103.2	7.1
	5-FU	15	104.6	8.2	103.2	10.3
		400	94.3	3.3	98.2	4.2
		1600	94.3	4.6	96.0	4.4
Intestine	Doxifluridine	15	102.1	4.9	101.6	9.0
		400	99.3	8.0	97.9	9.8
		1600	93.7	9.4	93.8	9.5
	5-FU	15	100.7	6.5	106.5	7.0
		400	97.9	2.6	98.8	7.2
		1600	100.3	7.7	95.7	9.3

Table III – Accuracy and precision for LLOQ (5 ng/ml) samples (n=5)

	Liver tissue		Intestine tissue	
	Doxifluridine	5-FU	Doxifluridine	5-FU
Accuracy (%)	92.4	96.4	93.5	102.1
SD	0.5	0.3	0.4	0.4
CV (%)	11.2	6.7	9.6	8.6

(1600 ng/ml)에 해당하는 각각 6개의 QC(quality control) 시료로 평가하였으며, 일간 정밀성은 3일 동안 측정하였다. 측정결과는 Table II에서 볼 수 있듯이, 간 조직에서 일간 정확성 및 정밀성은, 독시플루리딘은 97.6~103.4%의 정확성과, 5.2~8.9%의 CV 값을 나타내었고, 5-FU는 94.3~104.6%의 정확성과 3.3~8.2%의 CV값을 나타내었고, 장관 조직에서는 독시플루리딘은 93.7~102.1%의 정확성과, 4.9~9.4%의 CV값을 나타내었고, 5-FU는 97.9~100.7%의 정확성과 2.6~7.7%의 CV값을 나타내었다.

일간 정확성 및 정밀성의 경우, 간 조직에서는 독시플루리딘은 97.0~103.2%의 정확성과, 7.1~8.0%의 CV값을 나타내었고, 5-FU는 96.0~103.2%의 정확성과 4.2~10.3%의 CV값을 나타내었고, 장관 조직에서는 독시플루리딘은 93.8~101.6%의 정확성과 9.5~9.8%의 CV값을 나타내었고, 5-FU는 95.7~106.5%의 정확성과 7.0~9.3%의 CV값을 나타내었다.

최저정량한계 – 최저정량한계는 검량선의 직선성을 유지하면서 공조직 시료에서 나타날 수 있는 피크의 강도의 5배 이상이 되는 농도로 결정하였다. 검량선용 농도에서 가장 낮은 농도에 해당하는 최저정량한계에 해당하는 5 ng/ml에서의 5회 분석 결과는 Table III에 나타난 것처럼 간 조직에서 독시플루리딘의 경우, 정확성은 92.4%, CV값은 11.2%이었고, 5-FU의 경우는, 정확성은 96.4%, CV값은 6.7%이었고, 장관 조직에서 독시플루리딘의 경우, 정확성은 93.5%, CV값은 9.6%이었고, 5-FU의 경우는, 정확성은 102.1%, CV값은 8.6%이었다.

Table IV – Postpreparative stability of doxifluridine and 5-FU for 24 hr at 4°C (n=3)

	Relative concentration (%)					
	Doxifluridine (ng/ml)			5-FU (ng/ml)		
	15	400	1600	15	400	1600
Liver	95.1	103.6	100.9	111.3	100.4	96.4
Intestine	95.9	111.5	93.0	103.4	106.4	97.8

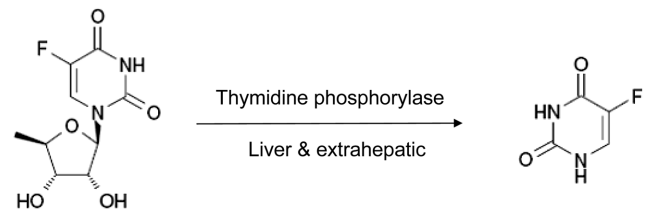
회수율 – 저농도(15 ng/ml), 중농도(400 ng/ml), 고농도(1600 ng/ml)에 해당하는 시료(n=6)를 준비하여 회수율을 검토하였다. 회수율을 구하는 방법은 확립된 분석방법으로 준비한 시료의 피크 면적(A)과 공혈청에 분석물질을 첨가하지 않고 시료 전처리를 마친 후의 분석물을 첨가한 후 측정된 피크 면적(B)의 상대적 비율로 측정하였다.¹⁰⁾ 간 조직에서 독시플루리딘의 회수율은 95.8%이고, 5-FU의 회수율은 97.3%이었으며, 장관 조직에서 독시플루리딘의 회수율은 76.8%이고, 5-FU의 회수율은 93.7%이었다. 이러한 결과로부터 본 실험에서 개발한 분석법이 양호한 회수율을 나타냄을 알 수 있었고, 실제 생체시료 분석시 높은 회수율로 보다 정확한 결과를 도출할 수 있는 가능성을 시사하였다.

시료전처리 후 안정성 – 저농도(15 ng/ml), 중농도(400 ng/ml), 고농도(1600 ng/ml)에 해당하는 각각 3개의 시료를 모든 전처리 과정을 거친 다음, 자동시료주입기 안에서, 4°C, 24시간 보관 후 독시플루리딘과 5-FU의 안정성을 확인하였다. 그 결과, Table IV에서 알 수 있듯이, 간 조직 및 장관 조직 모두, 시료전처리 후 정해진 조건에서 독시플루리딘과 5-FU 모두 안정함을 알 수 있었다.

이전 연구로 혈액 중 독시플루리딘과 5-FU의 분석에서 본 저자 등은 커다란 극성 차이를 가진 독시플루리딘과 5-FU를 동시에 혈액으로부터 추출할 수 있도록 에틸아세테이트와 이소프로필알콜의 조합에 의한 액상-액상 추출법을 개발하였다. 하지만, 본 방법을 간 조직과 장관 조직 시료 전처리에 적용하였을 경우, 효과적인 추출 효율을 얻기 어려웠고, 조직의 경우, 혈중 농도보다 미량의 매우 낮은 농도가 예상되므로, 이전에 개발했던 액상-액상 추출법을 적용하기 어려웠다. 그러므로, 보다 효율이 좋은 방법을 개발하고자, 유기용매에 의한 단백질침전법을 사용하였다. 사용한 용매는 메탄올, 아세트니트릴을 비교한 결과, 메탄올 보다는 조직의 경우, 아세트니트릴을 사용했을 때 좋은 분석결과를 얻을 수 있었다. 또한, 96-well filter plate를 사용함으로써 신속하고 효과적으로 여러 개의 시료를 분석할 수 있는 방법을 개발하였다.

조직 안정성평가(stability test)

간 조직 – 독시플루리딘은 세포에서 Fig. 3과 같이 5-FU로 대사되어 약효 활성을 나타낸다. 그러므로, 간 조직 세포에서도 생체 내에서의 대사의 진행을 예상할 수 있다. 본 연구에서는 간

**Fig. 3** – Metabolism of doxifluridine into 5-FU.

조직 생체 시료 중 독시플루리딘과 5-FU 두 가지 분석물질의 농도 분석법을 확립하는 과정에서 매우 흥미로운 사실을 발견하였다. 공시료로 확보한 간 조직 시료에 독시플루리딘을 첨가하여 표준시료를 제조하는 과정에서 첨가한 독시플루리딘이 급격히 손실되어 사라지는 현상을 확인할 수 있었다. 이것은 thymidine phosphorylase에 의해 원숭이의 간 조직 공시료에 독시플루리딘을 첨가하는 경우, 에너지의 공급 없이 자발적으로 5-FU로의 대사가 진행됨을 예상할 수 있었고, 이러한 사실은 본 연구에서 입증되어 되었다.

본 연구에서는 간 조직 및 장관 조직의 공시료에 독시플루리딘과 5-FU를 단독으로 추가하여 독시플루리딘의 손실양과 대사에 의해 생성되는 5-FU의 양을 측정하였으며, 또한 5-FU의 변화의 유무도 측정하였다. 대사의 온도에 따른 영향을 측정하기 위해서, ice-bath, 실온, 37°C의 세 가지 온도 조건에서, 0에서 4시간 동안 1시간 간격으로 시간에 따른 농도 변화를 분석하였다.

또한 원숭이 간 조직 시료를 이용하여 표준시료를 제조하기 어렵기 때문에 대체할 수 있는 비글견 간 조직 시료를 확보하였고, 원숭이 간 조직에서의 안정성 평가와 동일한 평가를 거쳐 validation용 간 조직 시료로 사용할 수 있는지 확인하였다. 실험 결과로는 ice bath상에서도 독시플루리딘이 대사되어 5-FU로 대사됨을 알 수 있었고, 대사는 원숭이 간 조직과 비글견 간 조직에 따라 그 속도가 현저히 다름을 알 수 있었다.

원숭이와 비글견을 비교한 결과, 원숭이의 경우에는 Fig. 4(a) 및 (b)에서 볼 수 있듯이, ice bath상에서 1시간 후에 절반가량이 5-FU로 변환되어 소실되는 것을 알 수 있었다. 실온과 37°C에서는 1시간 안에 모든 양이 소실되었다. 대부분이 5-fluorouracil로 변화되는 것을 확인할 수 있었고, 약 10% 정도는 다른 대사체로 손실되었다. 종(species)이 다른 비글견에서의 독시플루리딘의 대사는 Fig. 4(c) 및 (d)에서 알 수 있듯이, 독시플루리딘을 간 조직 공시료에 첨가하였을 때, 원숭이와는 달리, ice bath 위에서는 대사가 진행되지 않음을 확인할 수 있었고, 실온이나 37°C에서는 마찬가지로 급격하게 독시플루리딘이 소실되는 것을 확인하였고, 그 속도는 원숭이에 비해서 현저히 느리다는 것을 알 수 있었다. 또한 원숭이 간 조직에서는 소실되는 대부분의 독시플루리딘이 5-FU로 대사되는 반면, 비글견 간 조직에서는 손실되는 양의 일부분만이 5-FU로 대사된다는 차이를 발견할 수 있었다.

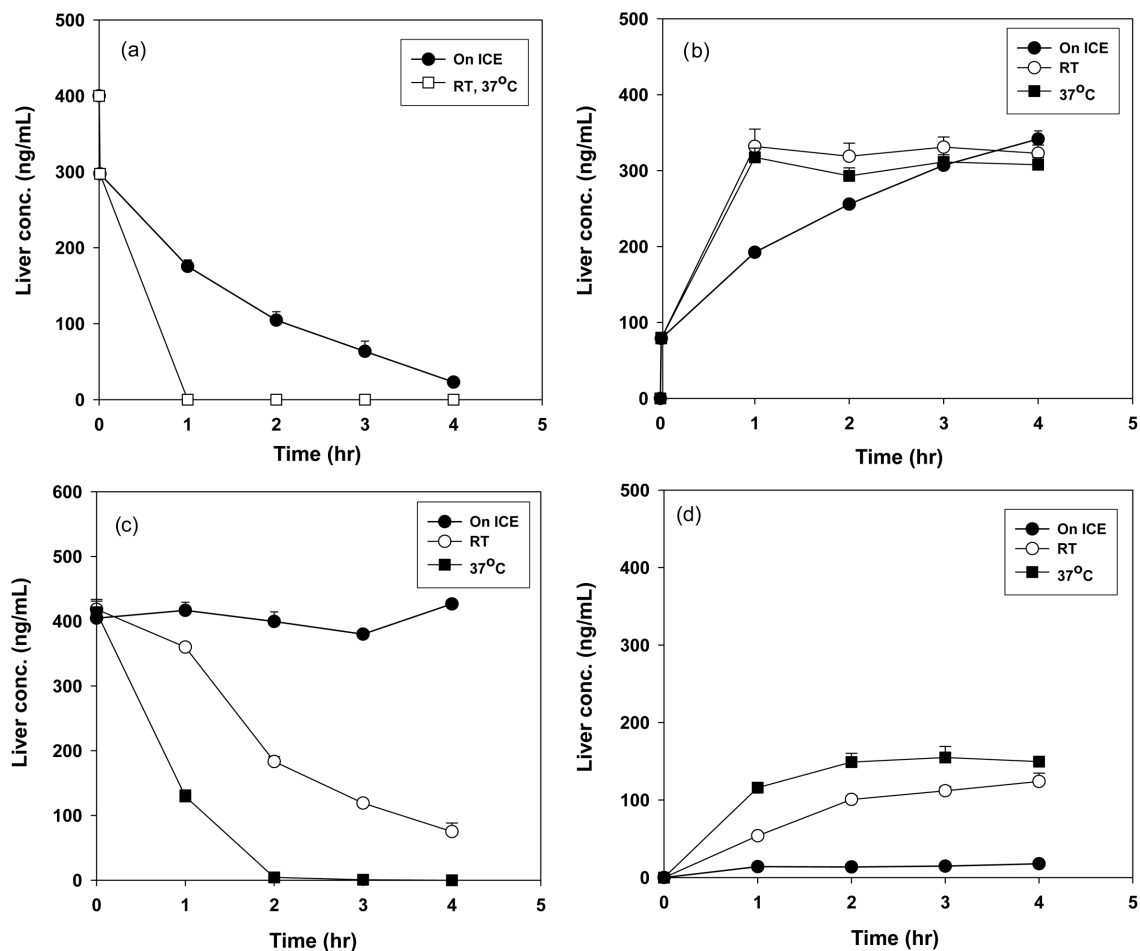


Fig. 4 – (a) Time profiling of doxifluridine on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in monkey liver tissue (b) Doxifluridine loss into 5-FU on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in monkey liver tissue (c) Time profiling of doxifluridine on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in beagle dog liver tissue (d) Doxifluridine loss into 5-FU on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in beagle dog liver tissue.

원숭이 간 조직에 첨가한 5-FU는 Fig. 5에서 볼 수 있듯이, 1 시간 동안은 온도나 시간에 관계없이 다른 형태로 소실되거나 대사되지 않는다는 것도 확인하였고, 2시간 이후로는 점점 그 농도가 낮아짐을 알 수 있었다. 그 속도는 온도가 높은 조건일수록 빨리 소실됨을 확인할 수 있었다. 또한 소실되는 5-FU가 prodrug의 형태인 독시플루리딘으로는 변환하지 않는 것도 확인하였다.

또한, 5-FU는 비글견 간 조직에서, 위와 실험과 동일하게 세 가지 온도, ice, RT, 37°C에서, 0~4시간 동안 확인하였을 때, Fig. 5(b)에서 알 수 있듯이, 비글견의 경우는, 5-FU의 소실이 나타나지 않았다.

이러한 이유로 본 실험에서는, 분석법 확립과 validation을 위하여 독시플루리딘과 5-FU 두 가지 경우 모두 비글견 간 조직을 이용하여 공시료로 이용하고, 온도 조건은 ice bath상에서 분석을 진행하기로 결정하였다.

장관 조직 – 장관 조직에서도 간 조직에서의 독시플루리딘 및 5-FU 안정성 연구를 수행하였다. 간 조직에서와 마찬가지로 장

관 조직 생체 시료 내에서 독시플루리딘과 5-FU 단독으로 넣었을 때, 소실되는 독시플루리딘과 생겨나는 5-FU를 0~4시간 동안, 1시간 간격으로, ice, RT, 37°C에서 각각 분석하였다. 장관 조직에서도, 원숭이의 경우, ice bath상에서 독시플루리딘이 대사되어 다음과 같이 5-FU로 변환된다는 사실을 발견하였다.

이러한 대사의 진행은 간에서와 같이 급격히 진행하지는 않았다. Fig. 6(a)에서 원숭이 장관 조직 공시료는 독시플루리딘을 첨가하는 경우, 간과 양상은 비슷하지만, 간에서처럼, 분석물질을 첨가하자마자 대사가 급속히 진행되지는 않는다는 사실을 알 수 있었다. Ice bath 상에서는 약 3시간 후 절반으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 간에서는 약 1시간 만에 절반의 농도로 손실되는 것과 비교하였을 때, 장관에서의 대사 속도가 약 3배 정도 느리다는 것을 알 수 있었다. 또한 실온이나, 37°C에서는 첨가한 독시플루리딘이 급격히 소실되었고, 일부는 5-fluorouracil로 대사됨을 Fig. 6(b)에서 알 수 있었다. 간 조직과 장관 조직과의 다른 양상은, 간에서는 소실된 독시플루리딘의 대부분이 5-FU로 대사

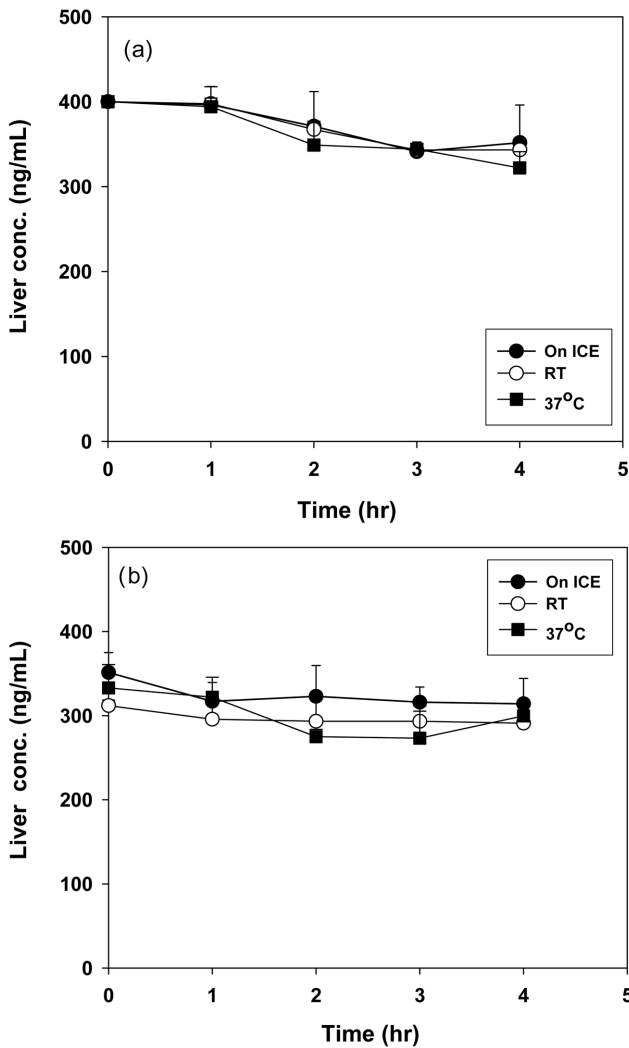


Fig. 5 – (a) Time profiling of 5-FU on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in monkey liver tissue, (b) Time profiling of 5-FU on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in beagle dog liver tissue.

되는 반면, 장관에서는 단지 20~30%만이 5-FU로 전환됨을 알 수 있었다.

또한, 5-FU는 위의 실험과 동일하게 실험을 수행하였다. 세가지 온도, ice, RT, 37°C의 경우, 0~4시간 동안 장관 조직 공시료에서 단독으로 5-FU를 첨가하여 농도 변화를 관찰하였다. 그 결과, 원숭이 장관 조직에서, ice, RT, 37°C의 조건에 있는 시료, 시간이 지나도 모두 안정한 것을 Fig. 7처럼 확인할 수 있었다.

본 실험 결과를 바탕으로, 장관 조직에서 독시플루리딘 및 5-FU 분석법 개발은 원숭이 장관 조직 공시료를 그대로 이용하였고, 가능한 한 모든 시료의 전처리는 ice bath상에서 수행하였고, 최대한 시료 전처리시간을 단축하면서, 독시플루리딘을 시료에 첨가하자마자 곧바로 전처리 과정이 수행될 수 있도록 하였다. 그 결과, 원숭이 조직을 그대로 사용하여도 양호한 validation 결과를 얻을 수 있었다.

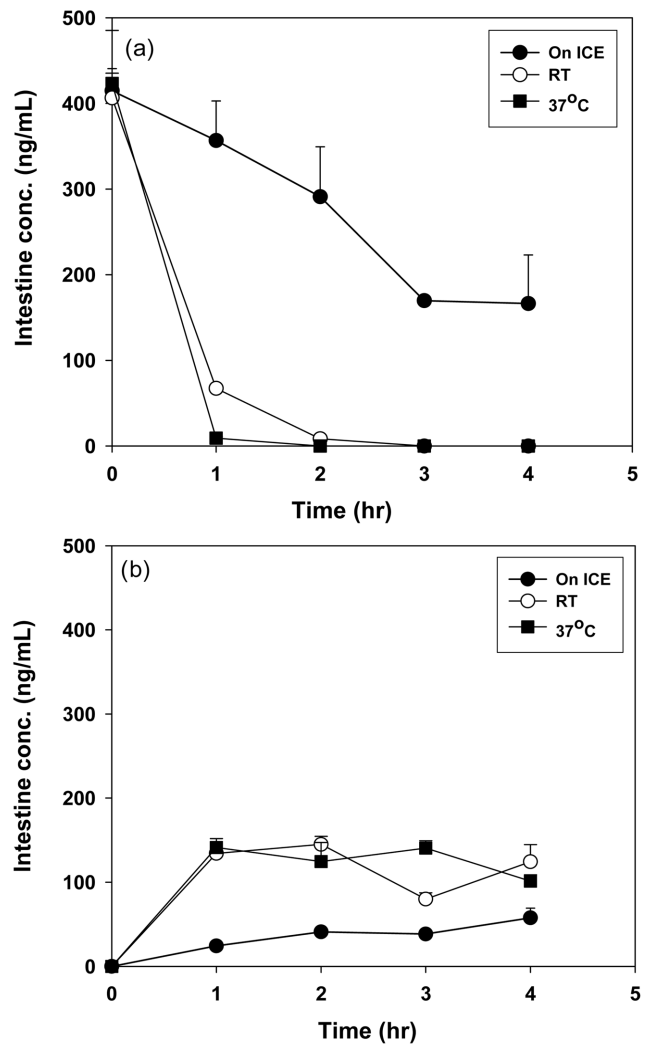


Fig. 6 – (a) Time profiling of doxifluridine on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in monkey intestine tissue (b) Doxifluridine loss into 5-FU on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in monkey intestine tissue.

실제 본 분석법을 바탕으로 약물동태 및 독성동태 연구를 위한 실제 생체 시료 분석 시에는 해동 과정에서 독시플루리딘의 대사가 진행될 수 있으므로, 대사의 진행을 차단할 수 있는 전처리법 또는 생체시료 수집 후 즉각적인 분석 실험 진행이 요구된다.

결론

본 연구에서는 LC/MS/MS를 이용하여, 간 조직 및 장관 조직 중의 독시플루리딘과 대사체인 5-FU의 분석법을 확립하였으며, 분석의 검증을 위하여 선택성, 직선성, 정확성, 및 정밀성, 시료 전처리후 안정성을 검토한 결과, 모두 양호한 결과를 나타내었다. 이 분석법은 기존의 분석법에 비해 간단한 전처리 과정을 통해 극성의 차이가 나타나는 독시플루리딘과 대사체인 5-FU를 동

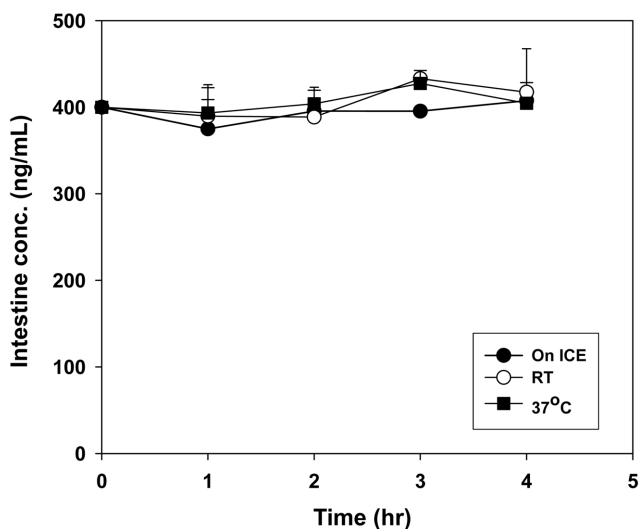


Fig. 7 – Time profiling of 5-FU on ice, at 20°C, and at 37°C for 4 hr in monkey intestine tissue.

시에 분석할 수 있도록 하였고, 적절한 시료를 분석하는 LC/MS/MS 분석 소요시간도 5분 이내로 단축시켰다. 또한 확립한 분석법의 검증을 통해 분석의 강건성을 시사하였다. 본 연구에서 확립된 방법은 간 조직 및 장관 조직 중의 독시플루리딘 및 대사체인 5-FU를 간단하고 신속하게 선택적으로 확인하는데 유용하게 사용될 수 있어, 원숭이를 이용한 독시플루리딘 독성동태연구 및 약물의 조직 분포 연구 등에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

또한 본 연구에서는 일반적인 대사와는 특이하게, 간 조직 및 장관 조직에서 ice bath상에서도 자발적으로 대사되는 독시플루리딘과 5-FU의 특성을 발견하였으며, 이러한 연구 결과는 실제 생체시료 분석시 주의해야 할 점과 한계를 분명히 제시하였고, 추가적인 실험을 통해 대사를 저해할 수 있는 전처리 개발법 등을 통해 실온에서도 분석할 수 있는 방법 연구의 동기를 부여하였다. 또한, 본 독시플루리딘의 대사 결과는 지금까지 발표된 적이 없는 연구 결과로서 추가적인 대사 연구를 통해 좀 더 구체적인 대사체 및 대사 양상에 대한 연구의 도출이 기대된다.

감사의 말

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 2006년 용역과제(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) Woo, Y. A., Kim, G. H., Kim, W., Lee, J. H., Jeong, E. J., Kim, J. H. and Kim, C. Y. : Quantitative determination of doxifluridine and 5-FU in monkey serum using LC/MS/MS. *Yakhak Hoeji* **51**, 174 (2007).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).