

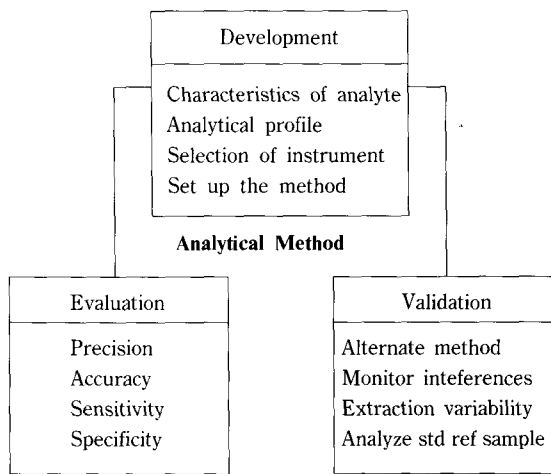
## 생체시료의 약물 분석\*

김 명 수

한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

생체시료에서의 약물이나 그의 대사체를 분석한다는 것은 신약개발, 약물의 오용, 법의학 및 약물연구에 있어서 중요하다. 특히 약물 연구에 있어서 생체이용율(bioavailability)나 생물학적동등성(bioequivalence) 및 약물동력학적 데이터(pharmacokinetic data)를 해석하고 평가하는데 생체시료 즉, 혈액, 뇨, 담즙 등에서의 약물 농도를 정확히 측정하는 것이 필수적이며 이를 위하여 잘 확립되고 재현성이 좋은 분석법을 사용하여 분석하는 것이 중요하다.

약물들은 순수한 약물자체로만 투여되지 않고 효과적이고 안정하고 손쉬운 투여 형태로 만들기 위하여 혼합물로 만들어져 어떠한 제제형태로 투여되며, 제제의 질(the quality of a drug product)은 전달된 약물의 유효성과 직접적으로 관련이 있고 다시 말하면 약물 이용율과 관련된다. 약물이용율(drug availability)은 성질에 따라 biological availability, physiological availability, therapeutic equivalence 및 generic equivalence 등 여러가지 용어로 쓰이고 있으며, 그중 생체이용율이 많이 사용되고 있는데, 이는 투여된 약물이 일반적인 순환계에 도달하는 속도와 양을 의미하며 약효가 흡수된 약물의 농도와 밀접한 관계가 있기 때문이다.<sup>1)</sup> 생물학적동등성이란 비교 생체이용율(comparative bioavailability)를 말하며 여러가지 형태의 비교가 있다. 즉, 투여 경로에 따른 비교, 나이 차이에 따른 비교, 제조방법에 따른 비교, 산제와 과립제 형태의 비교, 현탁제와 캡슐제와의 비교, 다른 제조회사 제품의 비교등 여러가지 생물학적동등성이 있다.<sup>2)</sup> 이러한 생체이



Scheme 1 - Flow chart of analytical method development.

용율이나 생물학적동등성 자료가 정확히 해석되고 평가되기 위하여 약물의 농도를 정확히 측정할 수 있는 생체에서의 분석법 개발과 개발된 방법의 유효성 검토가 중요하다.

분석방법이나 분석기기는 계속 개선되고 있으며 약물의 성격에 따라 적절한 분석방법과 기기를 선택하여야 하기 때문에 개개 약물의 분석 목적에 맞는 특별한 유효성 검토 기준이 필요하다. 그러나 여기서는 생체시료에서의 약물분석 특히 생물학적동등성과 관계되는 부분을 주로 다루고자 한다. 그래서 분석방법의 개발, 평가, 유효성 검토에 대하여 간단히 설명하고 생체시료의 문제점에 대하여 기술하고자 한다. 이들은 scheme 1에서 보여준 바와 같이 서로 연관되어 있으므로 분석방법을 개발할 때 평가와 유효성을 고려하면서 standard operating procedure를 sep up 하여야 한다.

### 분석방법의 개발

\*본 논문은 제 24회 한국약제학회 총회 및 학술대회의 심포지움 “생물학적 동등성시험의 실제와 문제”에서 발표된 것임.

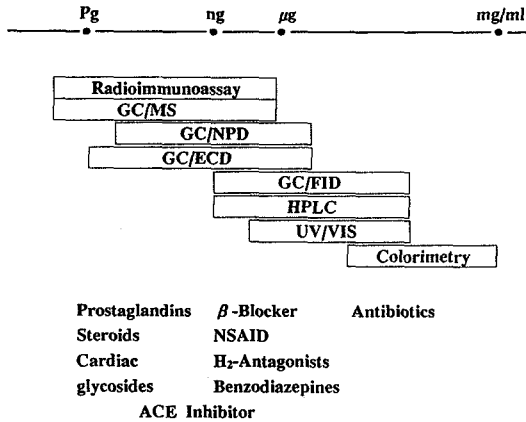


Figure 1—Applicability of various analytical instrument used for the analysis of drugs in biological fluids.

생체시료에서의 약물분석 방법에는 화학적 방법과 면역학적 또는 미생물학적 방법이 있는데, 생물학적 동등성시험에는 주로 화학적 분석법을 이용하기 때문에 여기서는 화학적 분석법에 국한하였다.

첫번째 생각할 것은 개발된 분석법의 사용 목적을 고려하여야 하고, 두번째로는 생체시료에서 요구되는 약물의 농도 즉, 감도가 중요하다. 이를 위하여 사용 할 분석방법(기기)의 감도와 생체에서 약물의 농도를 비교할 수 있는 도표를 Fig. 1에 나타내었다.<sup>3)</sup> Fig. 1에서의 약물농도는 혈중의 유효약물농도를 의미하고 있다.

세번째로는 분석하고자 하는 약물의 물리적, 화학적 특성 및 분광학적 특성을 정리하여야 한다. 기존의 약물인 경우 발표된 논문이나 관련 문헌에서 얻을 수 있으며 신약의 경우 합성논문에서 신약의 특성을 얻을 수 있는데 이를 analytical profile 이라고 한다. Analytical profile에는 분자량, 구조, 용점, 비점 등의 물리화학적 성질과 물이나 유기용매에의 용해도, 물질의 UV/VIS 스펙트럼, IR 스펙트럼, NMR 그리고 Mass spectrum 등이 필요하다. Analytical profile로부터 분리방법 즉, HPLC 또는 GC의 선택을 화학적 물리적 성질로부터 선택하고 검출기의 선택은 spectral properties에 의하여 약물의 생체에서의 농도와 감도등을 고려하여 선택하여야 한다. 형광이 있는 약물의 경우는 감도가 좋고 selectivity가 좋아서 생체시료의 분석에서 여러가지 장점이 있다.

분석기기가 결정된 후에는 생체시료(혈액 또는 뇨)에서 약물만을 추출하는 추출법을 결정하는 것이다. 크로마토그램에서 약물의 피크 부근에서 방해 물질이 같이 추출되지 않도록 생체시료의 pH를 변화시키거나 유기용매를 선택하여 추출하는 것이 중요하고 또한 생체시료에서의 약물 회수율(recovery)을 높일 수 있는 방법을 생각하여야 한다. 지용성이 강한 약물은 Liquid-Liquid extraction으로도 높은 회수율을 얻을 수 있으며 functional group이 많은 약물은 solid-phase extraction을, 그리고 염기성 약물은 XAD-2 resins를 많이 이용하고 있다.<sup>4)</sup> XAD-2 resin 외에 상품화된 C18 또는 C8 bonded cartridge가 주로 사용되고 있다.

생체이용율과 생물학적동등성 실험에서의 생체시료는 주로 혈액이고 가끔 뇨를 시료로 사용하기도 한다. 뇨의 경우 혈액과 달리 구성성분이 일반적으로 단백질이나 지방이 없기 때문에 바로 유기용제로 추출이 가능하다. 이는 일반적으로 뇨에 존재하는 물질들은 물에 잘 녹는 반면 약물들은 지용성이기 때문에 적절한 유기용매로 추출하기가 용이하다.

혈액인 경우 혈청이나 혈장이 주로 이용되는데 혈청은 피를 응고시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 말하며 30~50% 정도의 양이 되며, 혈장은 항응고제를 넣어 원심분리후 얻은 상등액으로써 약 50% 정도의 양이 얻어지기 때문에 혈장을 선호하는 경향이 있다. 혈청나 혈장에는 용성 단백질이 존재하기 때문에 이들 단백질을 제거하여야 한다. 단백질을 제거하는 방법은 90°C에서 5분 - 15분간 가열하거나 얼렸다 녹였다하는 방법이 있으나 시간이 많이 걸리고 효과적이지 못하고 주로 사용되는 방법은 황산아연/수산화나트륨 용액이나, 과염소산, 트리클로로초산 등을 가하여 단백질을 침전시켜 제거한다.<sup>5)</sup> 이외에도 용도에 따라 염기성 약물인 경우 염화알루미늄을 사용하고 특히 HPLC를 이용할때 함께 침전되는 약물의 손실을 막기 위해 1.5배 정도의 아세트오니트릴로 변성시키기도 한다.

추출한 후 선택된 분석기기에 주입할 수 있도록 시료를 처리하고 적절한 컬럼과 검출기등에 의하여 자료를 얻는다.

생체시료 분석에서 내부 표준물질(internal standard)의 사용은 분석하고자 하는 물질의 추출, 희석, 유도체화 과정에서의 오차를 보상할 수 있기 때문에 많이 사용되고 있다. 내부 표준물질은 분석하고자 하는 물질과 화학적 구조, 물성등이 비슷하여야 하며 즉, 대상물질과 functional analogue이거나 isotopic analogue인 물질이며 시료 전처리전에 standards와 시료에 첨가하여야 한다. Mass spectrometry의 경우 stable isotope로 치환된 것이 이상적인 내부 표준물질로써 사용되고 있다. 내부 표준물질을 선택할 때 예상되는 약물의 대사체는 피하여야 하고 내부표준물질 자체의 순도 또한 중요하다.

검량선은 예상되는 생체시료 농도가 검량선의 범위내에 들수 있도록 5개에서 8개 정도의 포인트를 사용하여 작성되며, 비선형 모델이 요구될 때도 있으나 대부분 선형 모델이 주로 사용된다. 약물동력학이나 생물학적동등성에서는 넓은 범위의 dynamic range를 요구하기 때문에 낮은 농도에서의 오차를 줄이기 위하여  $1/\chi$  나  $1/y$  같은 weighing factor를 사용하기도 한다.<sup>6)</sup> 검량선에 대한 이론적인 설명은 Bonate의 regression에 대한 설명에 잘 나타나 있다.<sup>7-9)</sup>

**분석방법의 평가**

개발된 분석법을 이용하여 생체시료에서의 약물을 분석 할 때 항상 똑같은 결과를 얻기가 힘들다. 이는 분석 측정시 오차가 있기 때문인데, 오차(Error)에는 systematic errors와 random errors가 있다. Systematic 오차는 실험자가 주의하면 줄일수 있는 오차로써 예를들면 시험기구를 잘 세척하거나 시약을 정제하여 사용함으로써 artifacts에 의해 발생되는 오차를 줄일 수 있는 오차로서, 실험자가 만족할 만한 결과를 얻지 못하면 이 분석법은 좋지 못한 방법이다. Random 오차는 제거하기 힘들기 때문에 최소화시키도록 노력하여야 한다. 생체시료를 분석 할 때에 약물의 실제 농도에 가까운 값을 얻을 수 있는 분석법에 대한 평가는 accuracy, precision, sensitivity와 specificity에 의하여 확립된다.

Accuracy는 실제 시료에 존재하는 농도와 측정된 농도가 어느정도 일치하는가, 즉 얼마나 오차가 적게 측정되었나 하는 것으로 일반적으로

실험을 20번 내지 30번 하여 얻은 값을 진값(true value)라고 가정 할 수 있다. 통계적으로 보았을때 % accuracy는 다음과 같다.

$$\frac{m_t - m_m}{m} \times 100 = \% \text{ accuracy}$$

단,  $m_m$ 은 measured value이고  $m_t$ 은 true value 이다.

Precision은 실제 농도에 가까운 것 보다는 반복하여 측정하였을때 측정치들 사이의 오차가 어느정도인가를 알아 보는 것이다. 여기에는 standard deviation (SD)이나 coefficient of variation (CV)등의 통계 처리가 필요하다. Coefficient of variation은 반복 측정하였을때 표준편차를 평균으로 나눈 값을 의미하기 때문에 relative standard deviation (RSD) 라고도 한다. 또한 분석법의 precision 이나 linearity를 나타낼때 relative weight response (RWR) 또는 response factor (RF)를 쓰기도 한다. RWR이나 RF는 약물의 단위무게당 (예로써 mg당) 측정된 response로서, 분석기기의 상태나 precision을 확인할 수 있는 방법중의 하나이다. Precision에는 batch 개념이 도입되어 있는데 이는 batch내에서의 precision과 batch 사이에서의 precision으로 나눌수 있고 다시 바꾸어 말하면 within day 개념과 between day 개념으로 나타낼 수 있다.

Sensitivity는 일반적으로 검량선의 slope를 이야기 하나 생체시료에서는 limit of detection (LOD)이 사용되기도 한다. Limit of detection이란 허용 가능한 precision을 갖고 있으면서 측정가능한 가장 낮은 농도를 말하는 것으로써, 그 이하의 농도는 측정되지 않음으로 간주 할 수 있다. 그래서 limit of detection을 limit of quantitation (LOQ)라고도 한다.<sup>10)</sup> Limit of detection은 수식화하면 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$LOD = 3 \text{ SD/S}$$

단, SD은 standard deviation이고 S은 sensitivity이다.

여기서 숫자 3은 99.9%의 신뢰구간에 대한 factor이다. 그러나 실제적으로 구하기 힘들기 때

문에 signal-to-noise의 비율이 3인 경우를 LOD라고 하고 signal-to-noise 비율이 6으로 하였을때를 LOQ 라고 하기도 한다.

Specificity 또는 selectivity는 accuracy에 영향을 주는 것으로서 생체시료를 분석할 때 생체 내부 물질이나 약물의 대사체로부터 방해받지 않고 개발된 분석법에서 측정하고자 하는 약물만 선택적으로 분석되는 것을 말한다. 어떤 면에서는 생체시료 분석시 가장 염두에 두고 주의하여야 할 문제이다.

1990년 12월 Washington, D.C. 에서 열린 Analytical Methods Validation Conference에서 합의 본 바에 의하면 '분석방법에서 accuracy와 precision의 허용기준은 precision은 15% 이하의 CV 이고 accuracy는 nominal 값에서 15% 이하의 편차를 허용하나, limit of quantitation의 농도에서는 accuracy와 precision 모두 20% 까지 허용한다'고 하였다.<sup>10)</sup>

#### 분석법의 유효성

개발된 분석법의 유효성 시험(validation test)은 시료의 채취부터 시작하여 마지막 결과를 얻을 때까지 전과정에 있어서 세심한 주의를 요구하며 순수한 표준품(pure standrad)을 사용하여야 한다. Validation은 앞의 accuracy, precision, sensitivity와 관련하여 분석방법의 재현성과 생체시료의 matrix에 의한 오차를 방지하기 위한 것으로 이를 cross validation 이라고 한다.

첫째로 개발된 분석법과 다른 분석법을 사용하여 시료를 분석할 때 동일한 결과를 얻어야 한다. 예로써 가능하다면 면역학적 분석법과 크로마토그래피 분석법을 비교하거나, HPLC와 GC 분석법의 비교, 또는 HPLC에서 reversed-phase 컬럼을 사용한 분석법과 normal-phase 컬럼을 사용하여 분석한 결과가 동일하여야 한다.

둘째로 오염이나 생체 물질에 의한 방해 피크를 확인하여야 한다. 이런 경우 약물을 투여하지 않은 생체 blank 시료를 분석하여 예상되는 부근에서 방해 피크가 없어야 한다. 이런 경우 HPLC의 경우 다른 종류의 detector system을 사용하거나 다른 두 파장의 검출 파장을 사용하기도 하고 가장 좋은 방법은 mass spectrometry를 사용하거나 photodiode-array detector등을 사용하는 것

이다.

셋째로 생체시료로부터 약물을 추출할때 회수율의 문제이다. 추출과정에서 약물이 protein과 결합하거나 시험관 흡착등에 의한 영향을 배제하여야 한다. 이런 경우는 약물을 추출과정 없이 적당한 용액에 회석시켜 얻은 검량선과 생체시료에 동일한 농도의 약물을 spike시켜 추출한 후 분석한 검량선을 비교하는 방법도 있다. 다른 방법은 실지 생체시료에 기지 농도의 표준 약물을 spike하여 분석하는 것도 추출과정에서의 오차를 줄일 수 있는 방법이며, 내부 표준물질을 사용하여 추출과정에서의 오차를 보정할 수 있다. 약물의 회수율은 농도에 따라 다르기 때문에 3개의 농도 즉 낮은농도, 중간농도, 높은농도에 대한 회수율을 일반적으로 추천하나 낮은농도와 중간농도에 대한 회수율만 하는 경우도 있다.

이렇게 하여 verify된 분석방법은 standard operating procedures에 따라 시료 채취부터 데이터가 얻어질때까지 GLP(Good Laboratory Practices)에 따라서 행하고 모든 과정에서 samples과 standards를 동일하게 실험하여야 한다. 동시에 quality control(QC) 시료를 이용하여 분석시 정확성 및 재현성을 확인하여야 한다.<sup>12)</sup> QC 시료는 생체시료에 표준약물을 spike하여 분석을 한다. 이때에는 검량선 범위내에서 3개의 농도(LOQ 부근의 농도, 중간농도, 높은농도)를 선택하여 두 번씩 실험하여 허용기준에 준하여 결정한다.<sup>11)</sup>

#### 전처리시 주의점

일반분석에서도 마찬가지로지만 생체 분석에서 특히 주의하여야 할 사항은 샘플 채취한 후 바로 분석할 수 없을 경우 채취 즉시 냉동 보관하여야 한다. 생물학적 동등성 시험의 경우 대부분 혈장이나 혈청을 사용하는데, 일부 ester group이 있는 약물들은 plasma esterases에 의해 분해되기 때문에 이를 방지하기 위하여 불화나트륨 같은 esterase inhibitor를 첨가한 후 냉동 보관하였다가 실험전에 녹여서 분석한다. 한달 이상 장기간 보관시는  $-60^{\circ}\text{C}$ 의 deep-freezer에 보관하는 것이 좋으며 짧은 기간이면  $-20^{\circ}\text{C}$  정도의 냉동보관도 좋다. 냉동시료를 녹일때는 상온에서 전 시료를 완전히 녹인 후 흔들어 약물이 균일하게 분포 되도록 한 후 적당량을 취하여 분석한다. 그리고

heparin, citrate, EDTA 등 여러가지 항응고제가 있는데 분석상에 방해할 하지 않는 항응고제를 선택하는 것이 좋다. 생체시료를 저장할 용기로는 플라스틱 보다는 유리제품이 좋으며 이는 nitro-glycerin 같은 일부 약물이 플라스틱에 잘 흡수되기 때문이며, glass에도 흡착되는 약물(amino 그룹 또는 phenol 그룹이 있는 약물)이 있는데 이럴 경우 silylation을 시킨 유리 제품을 사용하여 약물의 손실을 방지 할 수 있다.

그리고 자주 접하는 오염물(contaminants)로서 plasticizer를 들 수 있는데, 플라스틱 용기에서 나오는 phthalic acid derivatives와 뚜껑에서 나오는 tri-butoxyethyl phosphate 등이 있다. 이러한 오염물은 크로마토그램에서 방해 피크로서 작용하기도 하고 대상 약물이 amine 그룹이 있을 경우 ion-pair를 형성하여 추출율을 증가시키는 경우가 종종 보고되고 있다.<sup>13)</sup> 그외 hydrocarbons이 추출과정에서 사용된 adsorbents의 오염물로서 자주 나타나는 경우가 있다.

추출시 사용하는 유기용제들은 안정화제(stabilizer)나 항산화제(antioxidant)등이 첨가되어 있으므로 이들에 대한 방해를 제거하려면 증류하여 사용하여야 한다. 일부 유기용제들은 조건에 따라 분해되기 때문에 주의하여 사용하여야 한다. 예로써 초산에칠은 값도 싸고, 휘발성도 있고 극성이 있어 좋은 추출용매이나 pH가 9이상이면 상온에서도 가수분해되어 초산과 에탄올로 변하기 때문에 주의하여야 하고,<sup>14)</sup> 클로로포름이나 디클로로메탄도 추출력이 높은 용매이나 공기중에 노출되면 반응성이 높고 독한 phosgene으로 변하여 문제를 야기 시킨다. Methylbutyl ketone 같은 ketone 그룹이 있는 용매들은 primary amine 그룹을 갖고 있는 약물과 반응하여 Schiff's base를 형성하여 오차를 유발한다. 그리고 추출시 너무 hash한 조건 즉, 강산이나 알카리성에서 추출하면 약물과 conjugate된 대사체가 가수분해되어 방해 요인이 되기도 하기 때문에 주의하여야 한다.

생체시료에서 약물을 분석할때 이외에도 여러가지 주의 사항이 있으나 이는 각 약물의 성질에 따라 다르기 때문에 이미 설명한 일반적인 사항을 고려하여 분석하는 것이 중요하다.

## 결 론

일반적으로 생체시료에서의 약물분석은 투여한 약물의 성질은 잘 알고 있지만 생체에서의 약물이나 그 대사체의 농도를 모르기 때문에 어떠한 생체시료(body fluids)에서 약물을 분석하느냐에 따라서 분석법을 개발하여야 한다. 더불어 개발된 분석법이 생체시료에서 분석하고자 하는 약물만 선택적으로 분석되어야 하고 동시에 생체시료에서의 약물을 감지 할 수 있는 sensitivity를 갖추어야 하고 통계학적 test에 해당하여야 한다. 또한 분석 소요시간과 분석단가를 고려하여 목적에 적합한 분석방법을 확립시켜 실지 시료에 적용하는 것이 중요하다.

## 문 헌

- 1) A. Rescigno, A.K. Thakur and A. Marzo, On definition and use of the term bioavailability, *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, **44**(II), 1167-1169 (1994).
- 2) D.E. Cadwallader, *Biopharmaceutics and Drug Interactions*, Raven Press, New York, U.S.A.. 21-33 (1983).
- 3) J.A.F. De Silva, The compromise between sensitivity and specificity in analysing biological fluids for drugs, in *Blood Drugs and Analytical Challenges*, E. Reid, (Ed)., Ellis Horwood, Chichester, England, 7-28 (1978).
- 4) J. Scheurer and C.M. Moore, Solid-phase extraction of drugs from biological tissues-A review, *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 264-269 (1992).
- 5) R.P. Maickel, Separation science applied to analyses on biological samples, in *Drug Determination for Therapeutic and Forensic Contents*, E. Reid and I.D. Wilson, (Eds)., Plenum Press, New York, 3-10 (1984).
- 6) E.L. Johnson, D.L. Reynolds, D.S. Wright and L.A. Pachla, Biological sample preparation and data reduction concepts in pharmaceutical analysis, *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 372-379 (1988).
- 7) P.L. Bonate, Concepts in calibration theory, Part I: Regression, *LC · GC*, **10**, 310-314 (1992).

- 8) P.L. Bonate, Concepts in calibration theory, Part II : Regression through the origin-When should it be used?, *LC · GC*, **10**, 378-379 (1992).
- 9) P.L. Bonate, Concepts in calibration theory, Part III : Weighted least-square regression, *LC · GC*, **10**, 448-450 (1992).
- 10) G.L. Long and J.D. Winefordner, Limit of detection-A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.*, **55**, 712A-722A (1983).
- 11) V.P. Shah, K.K. Midha, S. Dighe, I.J. McGilvery, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. McDowall, K.A. Pittman and S. Spector, Analytical method validation : Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies, *J. Pharms. Sci.*, **81**, 309-312 (1992).
- 12) C.L. Grant, I.E. McGee, T.F. Jenkins and M.H. Stutz, Specification-based modified control limits in quality control of trace chemical analyses, *AOAC*, **75**, 39-45 (1992).
- 13) D. Westerlund, L.B. Nilsson and Y. Jaksh, Straight-phase ion-pair chromatography of zimelidine and similar divalent ions, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 373-381 (1979).
- 14) B. Scales, Problems in getting valid results : an overview in *Trace-Organic Sample Handling*, E.Reid, (Ed.), Ellis Horwood, Chichester, England, 353-358 (1981).