

## Tandem Mass를 이용한 혈중 니코란딜의 정량법 개발 및 생체이용률시험

문철진<sup>#</sup> · 이은희 · 양송현 · 문해란

대사질환연구소, 의료법인 녹십자의료재단

(Received February 24, 2005; Revised April 20, 2005)

### Tandem Mass Spectrometry for the Quantification and Bioavailability Test of Nicorandil in Human Plasma

Chul-Jin Moon<sup>#</sup>, Eun-Hee Lee, Song-Hyun Yang and Hae-Ran Moon

Institute of Metabolism, Green Cross Reference Laboratory, #314, Bojung-ri, Gusung-myun, Yongin-si, Kyoungki-do 449-913, Korea

**Abstract** — A rapid, sensitive and selective tandem mass spectrometric method (LC-MS/MS) for the quantitation of nicorandil in human plasma was developed. A bioavailability study of Sigmat tablet (5 mg nicorandil, Choongwae Co.) was performed using the validated LC-MS/MS method. The dose of 5 mg of nicorandil (1 tablet) was orally administered to 9 healthy Korean subjects. After administration, blood was taken at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, and 24 hour. The validation data were as follows; the standard curve was linear ( $r^2=0.999$ ) over the concentration range of 0.5~200.0 ng/ml. The coefficient of variation for intra- and inter-day assay were 3.55~7.44, and 2.17~9.10%, respectively. The lower limit of quantification for nicorandil was 0.5 ng/ml. The pharmacokinetic parameters obtained were as follows;  $AUC_t$  was  $145.9 \pm 83.0$  ng·hr/ml,  $C_{max}$  was  $83.8 \pm 32.2$  ng/ml,  $t_{max}$  was  $0.42 \pm 0.13$  hr,  $K_e$  was  $0.56 \pm 0.23$  1/hr, and  $t_{1/2}$  was  $1.42 \pm 0.52$  hr. Based on the validated analytical method and pharmacokinetic parameters, a standard guideline of the bioavailability test of nicorandil dosage forms was prepared successfully and could be used for the bioequivalence test of nicorandil preparation.

**Keywords** □ tandem mass spectrometry, nicorandil, bioavailability

니코란딜(nicorandil; N-[2-(nitroso)ethyl]-3-pyridine-carboxamide)은 칼륨통로를 개방하는 작용과 혈관평활근의 세포내 cyclic guanosine monophosphate의 증가가 복합적으로 나타나 혈관이완작용을 나타내는 협심증치료제이다.<sup>1)</sup> 니코란딜은 위장관을 통하여 신속하게 흡수된다. 간에서 대사되지 않기 때문에 75% 이상의 생체이용률을 보인다. 니코란딜의 98%가 신장을 통해 소실되고 2%만 담즙을 통해 소실된다. 니코란딜의 약물속도론적 파라미터는 5~40 mg의 용량에서 용량의존적 비례관계가 있다. 투약 후 30분~1시간에 최대효과를 발현하며, 반감기가 짧다.<sup>2)</sup>

니코란딜은 일반적으로 고체상추출<sup>3-5)</sup>이나 유기용매 추출<sup>6)</sup> 후 역상크로마토그래피로 분석해왔다. 이들 방법은 검출한계가 7~10 ng/ml로 임상연구를 위해서는 보다 감도가 높은 방법이 요구되어 광전도검출기(photoconductivity detector)<sup>3)</sup>나 가스크로마토그래프-질량분석기<sup>4)</sup>가 사용되었으나 긴 전처리시간과 비용이 문

제였다. 이외에 APCI(Atmospheric pressure chemical ionization) 방식의 HPLC-MS를 이용하여 HPLC-UV보다 감도의 향상과 전처리시간을 단축한 보고가 있었으나 니코란딜로서 20 mg을 경구투여하여 일일 최대 상용량인 15 mg을 초과하였다.<sup>7)</sup> 국내외에서 LC-MS/MS를 이용한 니코란딜의 약물동력학적 연구나 한국인을 대상으로 한 생체이용률 자료도 보고된 바 없었다.

본 연구는 5 mg의 니코란딜을 경구투여함으로써 피험자의 안전을 최대한 보장하는 동시에 충분한 정밀성과 정확성을 확보할 수 있도록 ESI(Electrospray ionization)방식의 LC-MS/MS를 이용한 분석방법을 개발하고, 이 방법을 이용하여 한국인을 대상으로 한 니코란딜의 약물동력학적 파라미터인  $AUC$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$ 를 구하여 약물동력학적 특성을 파악하고자 하였다.

#### 실험 방법

##### 시약 및 기기

시험에 사용된 시험약은 (주)중외제약에서 시판하고 있는 "시그마트"정으로 니코란딜을 5 mg 함유하는 정제였다. 니코란딜 표

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 031-260-9627 (팩스) 031-260-9262  
(E-mail) biolab@mail.gcrl.co.kr

준품은 Wako Co.(오사카, 일본)로부터 공급받았으며 ethyl acetate, diethyl ether, ammonium acetate, formic acid 및 내부 표준물질로 사용한 diphenhydramine은 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. HPLC용 이동상에 사용된 아세토니트릴은 TEDIA Co.(Fairfield, OH, 미국)로부터 구입하였다. 약물분석용 기기로는 Agilent 1100 Series HPLC(Agilent, 미국)와 API 3000(Applied biosystem, 미국) 질량분석기를 사용하였다. 컬럼은 Xterra MS C<sub>18</sub> column(3.5  $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm, Waters, 미국)을, 데이터 처리장치로는 Analyst 1.4(Applied biosystem, 미국)를 사용하였다.

### 피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적 동등성 시험기준<sup>8)</sup>에 근거하여 만 19~55세의 건강한 성인 남성 지원자를 공고를 통하여 모집하였다. 건강검진은 대한임상검사정도관리협회에 등록되어 정기적인 정도관리를 받고 있는 녹십자의료재단에서 실시하였다. 전문의의 건강진단 결과 시험에 적합하다고 판정된 9명을 선정하여 서면동의서를 받았다. 피험자로 선정된 사람들은 평균체중 67.1 kg(55~75 kg), 평균연령 만 24.4세(23~25세)의 건강한 남성이었다.

### 피험자 관리

모든 피험자는 시험 전 10일 이내 및 시험기간 중에는 음주나 다른 일체의 약물 복용을 금하였다. 시험 전날 오후 6시경에 피험자 전원에게 동일한 저녁식사를 제공한 후 식사종료 후부터 익일 정오까지 공복상태를 유지하였다. 저녁식사 후 지정된 속도로 이동하여 운동, 식사, 흡연, xanthine계 음료 및 음주 등을 제한 관리하였다. 오후 10시에 모두 취침시키고 시험 당일 채혈장소인 녹십자의원에 오전 8시경에 도착하여 시험 준비에 착수하였다. 약물투약 후 정해진 시간에 따라 채혈하였으며 4시간 및 9시간째 채혈이 끝난 직후 모든 피험자에게 점심식사 및 저녁식사를 제공하였다. 12시간째 채혈이 끝난 후 다시 속도로 돌아와 전날과 동일한 방식으로 피험자를 관리하였다. 시험 제 2일차에 오전 8시까지 채혈장소에 도착하여 24시간째 채혈을 하였다. 채혈이 종료된 후 담당의사에 의해 혈압, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하고 귀가시켰다. 시험 전 과정을 통하여 피험자 개인의 상태를 관찰하여 증례기록서에 기록하였다.

### 약물투약 및 혈액 채취

혈액채취를 위하여 피험자들의 팔 정맥부위에 카테타를 설치하고 공혈액을 채취한 후 피험자에게 "시그마트"1정(니코란딜로서 5 mg)을 물 240 ml와 함께 복용시켰다. 각 피험자로부터 15분, 30분, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12시간 및 24시간째에 5 ml의 혈액을 채취한 다음 헤파린 처리를 한 채혈용기에 넣고 천천히 섞

어준 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장은 혈장분리관에 옮겨 분석시까지 -70°C에서 보관하였다.

### 혈장중 니코란딜의 정량

**검량선 작성** - 니코란딜 표준품을 아세토니트릴에 녹여 농도를 1 mg/ml로 만들어 냉동 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈장으로 희석하여 니코란딜의 혈장 중 농도가 각각 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0 ng/ml 농도가 되도록 검량선용 표준혈장을 만들었다. 각각의 표준혈장 0.3 ml에 내부표준용액으로 diphenhydramine의 표준액(50 ng/ml) 30  $\mu$ l와 ethyl acetate 300  $\mu$ l, diethyl ether 600  $\mu$ l를 섞은 다음 1분간 진탕하였다. 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음 상등액을 새로운 시험관으로 옮긴 다음 질소기류 하에서 건조시켰다. 얻어진 잔사를 이동상 100  $\mu$ l로 녹이고 1분 동안 진탕한 후 0.22  $\mu$ m syringe filter로 거른 다음 10  $\mu$ l를 주입하였다. 표준혈장시료의 피크 면적(니코란딜 피크면적/내부표준물질 피크면적)를 구하여 니코란딜 농도에 대한 검량선을 작성하고, 이 검량선의 직선식에 피험자 혈장의 피크면적비(니코란딜 피크면적/내부표준물질 피크면적)를 대입하여 농도를 산출하였다.

### 분석조건

분석에 사용한 LC-MS/MS의 조건으로 이동상은 1% formic acid를 아세토니트릴에 녹인 2 mM ammonium acetate 용액을 사용하였고, 유속은 0.2 ml/min이었다. 검출은 positive ion mode, MRM mode에서 수행하였으며 니코란딜은 Q1 m/z 211→Q3 m/z 136, 내부표준물질인 diphenhydramine은 Q1 m/z 255→Q3 m/z 168로 정량하였다. 이온화방법으로는 electrospray를 채택하였으며 nebulizing gas는 질소를 사용하였다. Ion spray 온도는 180°C, ion spray voltage는 6.0 kV, collision energy는 -9.5 V로 설정하였다.

**분석법의 검증** - 피험자 혈장시료 중 니코란딜의 농도를 측정하기 전에 상기의 분석방법에 대하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 감도 등의 유효성 평가를 하였다. 정밀성은 니코란딜과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 니코란딜과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 검량선 작성 실험을 5번 시행하여 일내 정밀성을 구하였고 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간정밀성을 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 감도(정량한계)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)가 5 이상이고 정밀성이 20% 이하, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다.

**약물속도론적 파라미터의 분석** - "시그마트정"을 1정(니코란딜 5 mg)씩 9명의 피험자에게 경구투여하여 얻은 각각의 혈중 약물

농도-시간곡선으로부터 약물속도론적 파라미터인  $AUC_t$ 와  $C_{max}$ , 소실속도상수( $K_e$ ), 반감기( $t_{1/2}$ ) 및  $t_{max}$ 를 구하였다. 파라미터의 계산은 BA Calc 2002 ver 1.1.1을 이용하였다.

**결과 및 고찰**

**분석법의 검증**

건강한 성인의 공혈장과 투약 후 30분 후 혈장을 본 분석시험

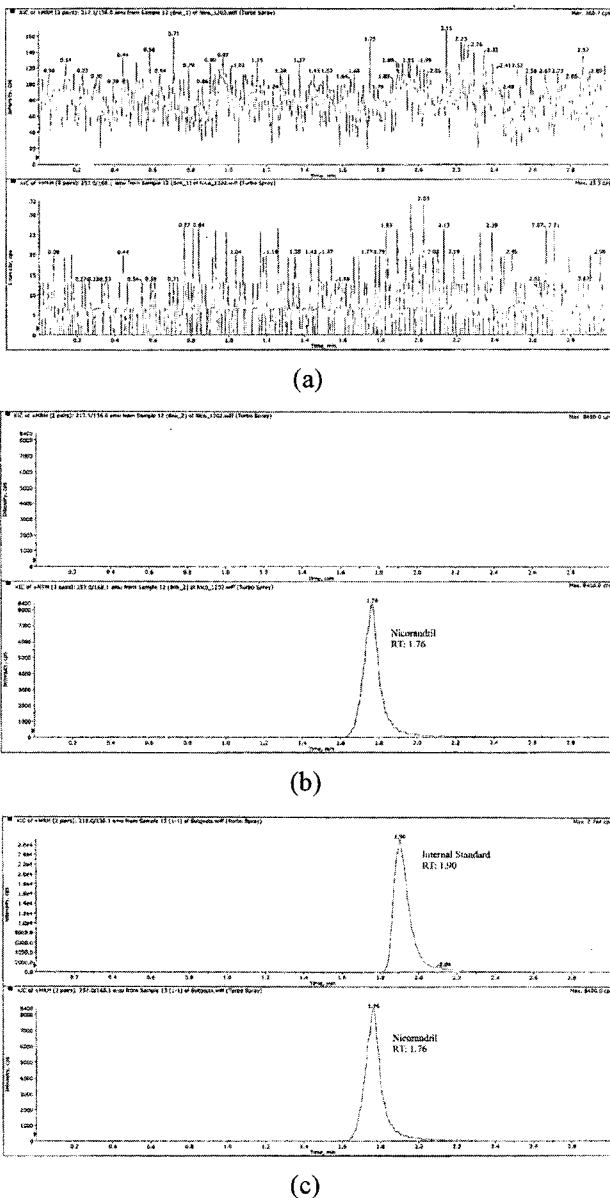


Fig. 1 – Mass ion chromatogram of nicorandil and diphenhydramine (internal standard). (a): Blank human plasma, (b): Human plasma spiked with nicorandil, (c): Human plasma at 0.5 hour after oral administration of nicorandil tablet to a subject.

방법에 따라 분석하여 얻은 이온크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 니코란딜 피크의 유지시간은 약 1.9분, 내부표준물질 피크의 유지시간은 약 1.7분이었고, 분석조건에서 니코란딜 및 내부표준물질은 기타 혈장 성분들과 잘 분리되었다. 이온크로마토그램상에서 신호대 잡음비가 5 이상이고, 정밀성이 20% 이하, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 최저정량한계농도는 0.5 ng/ml이었다. 최저정량한계농도를 제외한 기타 농도에서도 정밀성 15% 이하, 정확성 85~115% 이내의 조건을 모두 충족시켰다 (Table I). 니코란딜의 농도가 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0 ng/ml가 되도록 제조한 표준 시료를 분석하여 얻은 검량선의 계산식은  $Y=0.02227X+0.00389$  ( $r^2=0.99976$ )로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 2). 이로부터 혈장 중 니코란딜에 대한 상기 LC-MS/MS 분석법은 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정확성 및 정밀성, 직선성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

**혈장중 니코란딜 농도 추이**

각 피험자에게 "시그마트정"을 경구투여한 후 구한 시간별 혈장 중 약물 농도는 Table II에 나타내었으며, 전체 피험자의 혈장 중 약물농도-시간 곡선은 Fig. 3과 같다. 본 투약용량에서 이상 반응을 보인 예는 없었으므로 적절한 투여량으로 생각된다. 모든 피험자에서 투약 후 9시간 내에 AUC의 80% 이상 도달하

Table I – Accuracy and precision data for nicorandil in spiked human plasma samples

Concentration (ng/ml)	Precision (%)		Accuracy (%)
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	
0.5	7.44	6.27	83.7
1.0	5.56	2.17	90.0
5.0	5.12	9.10	99.6
10.0	6.22	6.02	102.5
50.0	4.69	5.39	97.1
100.0	4.58	3.18	102.4
200.0	3.55	3.59	99.6

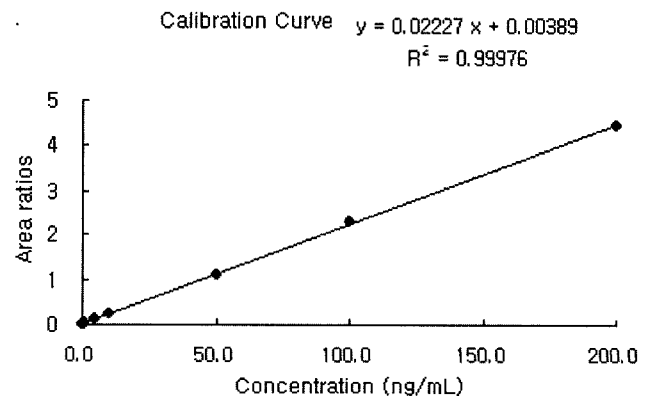
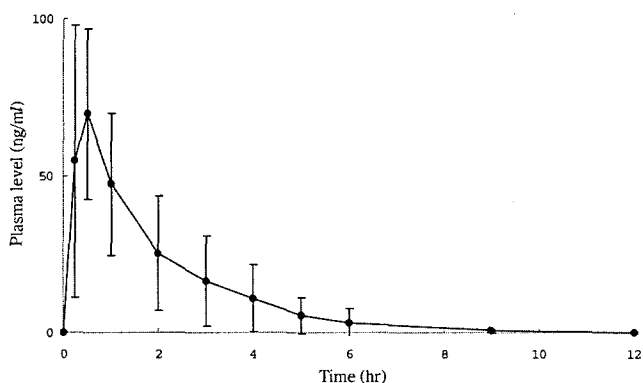


Fig. 2 – Calibration curve of nicorandil in human plasma.

**Table II** – Plasma concentration-time relation of nicorandil after a single oral administration of 5 mg nicorandil to korean healthy volunteers (ng/ml)

Subject	Time after administration (hr)											
	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	6	9	12	24
A1	0.0	9.6	43.0	28.5	9.2	4.8	2.9	1.4	0.8	B.Q.L	B.Q.L	B.Q.L
A2	0.0	30.2	46.5	24.5	3.8	2.0	0.9	0.7	B.Q.L	B.Q.L	B.Q.L	B.Q.L
A3	0.0	65.4	51.4	27.3	12.6	3.3	1.7	1.1	0.9	B.Q.L	B.Q.L	B.Q.L
A4	0.0	69.0	95.0	87.2	55.3	39.5	25.3	8.4	1.9	0.7	B.Q.L	B.Q.L
A5	0.0	19.7	119.6	58.0	24.6	13.1	6.1	2.6	1.6	0.7	B.Q.L	B.Q.L
A6	0.0	14.9	52.4	40.7	24.0	19.5	14.3	8.2	3.1	1.3	B.Q.L	B.Q.L
A7	0.0	125.3	66.5	41.8	22.9	13.8	8.1	3.7	1.0	B.Q.L	B.Q.L	B.Q.L
A8	0.0	103.0	83.0	70.4	48.6	35.7	28.4	17.7	14.1	1.4	0.8	B.Q.L
A9	0.0	38.9	104.3	63.2	48.0	36.3	27.7	14.6	4.7	0.8	B.Q.L	B.Q.L
Mean	0	54.6	69.7	47.3	25.1	16.5	11.0	5.5	2.9	0.5	-	-
SD	0	43.2	27.3	22.6	18.3	14.4	10.7	5.8	4.6	0.6	-	-

B.Q.L : Below quantitative limit.

**Fig. 3** – Mean plasma concentration-time curve of nicorandil after a single oral administration of 5 mg nicorandil to korean healthy volunteers (n=9).

였으므로 적절한 채혈시간은 9시간으로 판단된다.

#### 생체이용률 파라미터의 산출

각 피험자의 생체이용률 파라미터는 Table III과 같고 평균  $AUC_t$ 는  $145.9 \pm 83.0$  ng·hr/ml,  $C_{max}$ 는  $83.8 \pm 32.2$  ng/ml,  $t_{max}$ 는  $0.42 \pm 0.13$  hr,  $K_e$ 는  $0.56 \pm 0.23$  hr<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$ 는  $1.42 \pm 0.52$  hr이었다. 서양인을 대상으로 한 니코란딜의 생체이용률 결과에 따르면, 음식을 제공한 상태에서 니코란딜을 5 mg을 경구투여한 결과  $C_{max}$ 가  $58 \pm 25$  ng/ml,  $t_{max}$ 는 0.5 hr였고,<sup>1)</sup> 아침을 금식한 상태에서 10 mg의 니코란딜을 투여한 경우는  $C_{max}$ 가  $163 \pm 15$  ng/ml,  $AUC_t$ 가  $265 \pm 53$  ng·hr/ml이었다.<sup>2)</sup> 니코란딜 20 mg을 경구투여했을 때  $C_{max}$ 가  $275.7 \pm 105.6$  ng/ml,  $AUC_t$ 가  $452.1 \pm 142.1$  ng·hr/ml, 반감기가  $0.52 \pm 0.13$  hr,  $t_{max}$ 가 0.5 hr이었다.<sup>1)</sup> 니코란딜의 약력학적 데이터는 제품에 따라 혈중농도의 편차가 큰 것으로 보고 되어 있으나,<sup>2)</sup> 니코란딜이 빠른 시간에 높은 흡수율을 보이고 5~40 mg의 범위에서 약물속도론적 자료가 용량과 비례관계에

**Table III** – Pharmacokinetic parameters of each subject

	$AUC_t$ (ng·hr/ml)	$C_{max}$ (ng/ml)	$t_{max}$ (hr)	$K_e$ (1/hr)	$t_{1/2}$ (hr)
A1	56.1	43.0	0.5	0.64	1.08
A2	46.6	46.5	0.5	0.53	1.32
A3	72.5	65.4	0.25	0.32	2.18
A4	246.8	95.0	0.5	0.55	1.25
A5	138.2	119.6	0.5	0.32	2.19
A6	125.9	52.4	0.5	0.42	1.65
A7	133.2	125.3	0.25	1.05	0.66
A8	265.0	103.0	0.25	0.48	1.45
A9	228.5	104.3	0.5	0.69	1.00
Mean	145.9	83.8	0.42	0.56	1.42
SD	83.0	32.2	0.13	0.23	0.52

있으며,<sup>2)</sup> 공복상태에서 경구투여한 피험자 상태를 고려할 때 본 연구의 결과는 선행 연구결과와 일치한다는 결론을 얻었다. 또한 반감기를 고려하여 채혈시간은 6시간이 적당한 것으로 보이나 질량분석검출기를 사용할 때는 검출한계가 0.5~1.0 ng/ml까지 낮아지므로 최소 9시간의 채혈시간이 필요한 것으로 사료된다.

본 연구의 결과는 국내에서 니코란딜을 함유하는 의약품의 시험자료를 평가할 때 객관성을 높이는 등 보다 효율적인 의약품 개발과 임상적 지원에 도움이 될 것으로 기대된다.

#### 감사의 말씀

본 연구는 2004년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업에 의한 것입니다

#### 참고문헌

- 1) Frydman, A., Chappelle, P., Diekmann, H., Bruno, R., Thebault, J. J., Bouthier, J., Caplain, H., Ungethuen, W., Gaillard, C. and

- Le Liboux, A. : Pharmacokinetics of nicorandil. *Am. J. Cardiol.* **20**(21), 25 (1989).
- 2) Frydman, A. : Pharmacokinetic profile of nicorandil in humans: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**(Supple 3), S34 (1992).
- 3) Schwende, F. J. and Lewis, R. C. : Determination of nicorandil in plasma using high performance liquid chromatography with photoconductivity and ultraviolet detection. Application to pre-clinical pharmacokinetics in beagle dogs. *J. Chromatogr.* **525**(1), 151 (1990).
- 4) Gomita, Y., Furuno, K., Eto, T., Fukuda, Y., Araki, M., Yamori, R. and Oishi, R. : Rapid and simple determination of nicorandil in rat plasma using a solid-phase extraction column. *J. Chromatogr.* **528**(2), 509 (1990).
- 5) Mawatari, K., Nakamura, Y., Shimizu, R., Sate, S., Iinuma, F. and Watanabe, M. : Fluorimetric determination of nicorandil in human plasma by a high-performance liquid chromatographic-postcolumn ultraviolet irradiation [corrected] system equipped with on-line back-pressure tubing. *J. Chromatogr. B* **679**(1-2), 155 (1996).
- 6) Ishizaki, T., Chiba, K., Suganuma, T., Sasaki, T., Kamiyama, H. and Nakano, H. : Pharmacokinetics of nicorandil, a new coronary vasodilator, in dogs. *J. Pharm. Sci.* **73**(4), 494 (1984).
- 7) Andresek, S., Smidovnik, A., Pecavar, A. and Prosek, M. : Routine and sensitive method for determination of nicorandil in human plasma developed for liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B* **735**(1), 103 (1999).
- 8) 식품의약품안전청 고시 제2002-60호, 생물학적동등성시험기준, 식품의약품안전청(2002. 11. 22.).