

## 인체 혈장 중 칼시트리올의 효소면역 분석법 검증 및 단회투여 후 약물동태 연구

김예태 · 진수언<sup>1</sup> · 김현기 · 신백기 · 정의현 · 김종국<sup>1</sup> · 박정숙<sup>†</sup>

충남대학교 약학대학, <sup>1</sup>서울대학교 약학대학

(2009년 6월 17일 접수 · 2009년 7월 6일 수정 · 2009년 7월 27일 승인)

### Validation of an Enzyme-Immunoassay for Calcitriol in Human Plasma and Evaluation of Its Pharmacokinetics after Single-dose in Korean Volunteers

Ye-Tae Kim, Su-Eon Jin<sup>1</sup>, Hyun-Ki Kim, Baek-Ki Shin, Ui-Hyeon Jeong, Chong-Kook Kim<sup>1</sup> and Jeong-Sook Park<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received June 17, 2009 · Revised July 6, 2009 · Accepted July 27, 2009)

**ABSTRACT** – An enzyme immunoassay (EIA) was validated for quantitation of calcitriol in human plasma. Calcitriol was immunoextracted with immunocapsules, which contain monoclonal antibodies to calcitriol linked to solid phase particles in suspension with a vitamin D binding protein inhibitor. Calcitriol was eluated and the eluates were evaporated under a gentle stream of nitrogen gas. The absorbance of analytes was determined using a microplate reader (reference wavelength 650 nm; measurement wavelength 450 nm). The method was specific and sensitive enough to detect as low as 6.5 pmol/L of calcitriol. Linear calibration range was 6.5-491 pmol/L with correlation coefficient greater than 0.99. The overall accuracy was in the range of 83.8 to 111.2% and precision C.V. (%) 0.99 to 8.47%. The recovery was approximately 100% and stability was confirmed during storage and sample preparation. The pharmacokinetic parameters were calculated by baseline subtraction because calcitriol is an endogenous material. Following oral dose of calcitriol, the mean AUC<sub>24h</sub> was 1038±539 pmol/L·hr and C<sub>max</sub> of 128±63.1 pmol/L was reached at 3.50±1.07 hr. The mean t<sub>1/2</sub> of calcitriol was 5.13±2.10 hr. The present EIA method was successfully applied to study bioavailability after oral administration of 2 µg of calcitriol in healthy Korean subjects.

**Key words** – Calcitriol, Enzyme immunoassay (EIA), Validation, Pharmacokinetics

칼시트리올(calcitriol, 1, 25-dihydroxycholecalciferol [1, 25-(OH)<sub>2</sub>VitD<sub>3</sub>])는 스테로이드 호르몬으로 음식물에 의해 섭취되거나, 체내의 7-dehydrocholesterol이 햇빛에 의해 피부에서 분해되어 제공된다. 또한 칼시트리올은 비타민 D (cholecalciferol)의 활성 대사체로, 혈중 칼슘과 인의 농도를 증가시켜 골 형성과 미네랄화에 중요한 역할을 한다.<sup>1,2)</sup> 칼시트리올 제제는 신부전 환자나 투석환자의 저칼슘혈증, 대사성 골질환 및 부갑상선기능항진증의 치료에 사용되고 있다. 그러나 비타민 D의 과량 복용에 의한 독성으로 고칼슘혈증이 유발되거나, 실내 근무자의 경우 비타민 D의 결핍으로 인한 골연화증이 발생할 수 있다.<sup>2,3)</sup>

칼시트리올의 혈중 최고 농도(C<sub>max</sub>)에 도달하는 시간은 4-8시간이며, 반감기는 약 3.5시간으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 일본의 약품집에 의하면 건강한 성인 남성에게 칼시트리올 4 µg을

경구투여 하였을 때 C<sub>max</sub>는 101 pg/mL, T<sub>max</sub>는 4시간으로 보고되어 있다.<sup>5)</sup> 그러나 칼시트리올은 내인적으로 생성되어 체내 내분비계에 의해 조절될 뿐만 아니라, 골다공증 치료 목적으로는 0.25-0.5 µg와 같은 저용량의 칼시트리올을 투여하기 때문에 약물 투여 후 혈장 중 농도가 매우 낮아<sup>6)</sup> 이를 정량할 수 있는 검증된 분석방법이 필요하다.

국내에서 칼시트리올 제제는 주식회사 한국로슈의 “로칼트롤”을 비롯하여 여러 제약회사의 제제가 시판되고 있는데, 식품의약품안전청에서는 생물학적동등성시험 및 동등성 재평가를 통하여 유사 대체제제의 품질을 평가, 공인함으로써 유효하고 안전한 유사 대체제제를 공급하기 위하여 노력하고 있다. 특히 의약품 동등성 재평가 성분 중 생물학적동등성시험 표준지침이 없고 생동성 입증방법이 미 확립된 성분을 대상성분으로 선정하여 생체이용률시험을 통한 의약품 동등성 재평가 성분의 생동성 입증 방법을 제시하고 의약품 동등성 재평가 정책을 지원함으로써 국내 제네릭 의약품의 품질 확보와 의약품 동등성 관리의 효율화를 도모하고자 한다.

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)821-5932, E-mail : eicosa@cnu.ac.kr

그러나, 칼시트리올 제제와 같은 내인성 약물에 대한 생물학적동등성시험에 있어서 시험의 감도를 확보하기 위해 그 물질의 체내 기저치(baseline)를 보정할 필요가 있으며, 심사자료 제출 시에는 기저치에 대해서 보정된 혈중 농도와 보정되지 않은 혈중농도를 모두 고려한 자료를 제출하는 것이 바람직한 것으로 권장하고 있다. 칼시트리올과 같은 내인성 약물의 경우에는 외부에서 투여하였을 때 많은 경우 체내의 항상성 유지 기전에 의해 혈중 농도가 크게 증가되지 않는 경우가 많으며, 또한 투약 전에 이미 체내에 존재하는 기저치와 투약으로 발생하는 혈중농도의 증가를 구분해 내기 위해서는 고감도 분석이 필수 요건이라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 혈장 중 칼시트리올 농도 분석을 위해 효소면역분석법(EIA)을 검증하였으며, 이를 이용하여 8명의 건강한 성인을 대상으로 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험기준(식품의약품안전청 고시 제 2005-31호, 2005. 6. 7.)<sup>7)</sup>에 따라 한국로슈의 “로칼트롤 연질캡셀”(calcitriol 0.25 µg) 8캡슐을 경구투여한 후 약물속도론적 파라미터를 구하여 향후 의약품 동등성 재평가 성분의 생동성 입증에 위한 지침을 마련하고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

시험에 사용한 시험약은 (주)한국로슈에서 시판 중인 “로칼트롤 연질캡셀”(제조번호: BDG MD102005 사용기한: 2008. 10. 16)로 칼시트리올 0.25 µg을 함유하는 캡셀제였다. 칼시트리올 분석은 OCTEIA 1,25-Dihydroxy Vitamin D kit(Immunodiagnostic Systems Ltd., 영국)을 사용하였으며, 칼시트리올 표준품은 분석 kit에서 제공받은 것을 사용하였다. 증류수는 18 MΩ·cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 그대로 사용하였다.

약물 분석 기기로는 플레이트 리더기(Sunrise, Tecan Trading, 스위스), 회전식교반기(Rotator, Glas-Col Co., 미국), 증발농축기(Dry Thermo Bath MG-2100, EYELA, 일본) 및 탁상용혼합기(MD-M37615, Thermolyne, 미국)를 사용하였다.

### 피험자 선정

피험자는 식품의약품안전청이 고시한 생물학적동등성시험기준<sup>7)</sup> 제 10조(피험자의 선정) 및 제 11조(피험자의 제외기준)에 따라 지원자 모집공고를 통하여 19~55세의 건강한 성인 지원자를 모집하였다. 전문의사의 건강진단을 실시하여 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않은 자료

서 본 기관(충남대 약대)에서 생체이용률시험에 적합한 건강인으로 판정된 자 총 8명을 피험자로 선정하고, 기관 임상시험 심사위원회(Institutional Review Board, IRB)의 승인 후 생체이용률시험을 수행하였다. 본 시험에 참여하는 지원자를 대상으로 생체이용률시험 설명회를 실시하여 이 시험의 목적, 방법, 약물유해반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 이로부터 자유의사에 의한 시험참가동의서를 받은 후 생체이용률시험을 실시하였다. 최종 선정된 피험자들의 체중은 69.50±9.75 kg, 평균 나이는 만 22.50±1.31세였다.

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

칼시트리올은 내인성 물질이므로, 칼시트리올의 혈중 기저치를 측정하기 위하여 건강진단 및 투약전 혈액을 채취하였다. 생체이용률시험을 위하여 8명의 시험자에 대하여 무작위 배열한 다음, “로칼트롤 연질캡셀”(calcitriol 0.25 µg)을 동일 투약일에 투여하고, 투약량은 “로칼트롤 연질캡셀”(calcitriol 0.25 µg) 8캡슐(칼시트리올로서 2 µg)을 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 채혈 시간을 고려하여 약 1분 간격으로 하였다.

칼시트리올은 일본의약품집<sup>5)</sup>에 의하면 투약 24시간 경과 후 칼시트리올의 혈중 농도는 기저치에 도달하였으므로, 이를 토대로 반감기의 3배 이상인 24시간 동안 채혈을 실시하였다. 기저치 산출을 위해 건강검진 당일에 채혈을 실시하였으며, 시험일 채혈시간은 약물 투약 직전과 투약 후 0.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 8, 12, 24시간의 총 12시점에서 실시하였다. 채혈방법은 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 후마다 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 즉시 혈장분리관을 사용하여 혈장을 채취하고 분석 시

까지 영하 70°C에서 보관하였다.

### 검량선 작성 및 혈장 중 칼시트리올의 정량

칼시트리올 표준 용액은 소혈청알부민(BSA) 및 0.09% sodium azide와 함께 동결건조된 분말 상의 칼시트리올을 EIA kit 제조사의 지시사항에 따라 증류수에 녹여 제조하였다. 사람의 혈장을 이용하여 제조한 용액에서도 표준용액과 동일한 농도를 나타내었기 때문에 사람의 혈장 유무에 따른 차이는 나타나지 않았다. 검량선 작성을 위한 표준용액은 6.5, 12.6, 34.8, 93.2, 228.0, 491.0 pmol/L의 농도로 제조하였다. 제조된 표준 용액에 1차 항체 용액 100 µL를 가하여 거품이 생기지 않도록 주의하면서 섞어준 후 2-8°C에서 16-20시간 동안 방치하였다. 이 용액 150 µL를 microplate에 가하고 약 90분간 실온에서 혼합하여 방치 후 제거하였다. 여기에 100 µL의 1,25-Vit D-biotin 액을 가하고 잘 섞어주고 실온에서 1시간 동안 방치 후 제거하였다. Washing 액 250 µL를 가하여 3회 washing한 후 200 µL의 효소 conjugate 액을 가하여 30분간 실온에서 방치 후 제거하였다. 다시 washing 액 250 µL를 가하여 3회 washing한 후 기질로서 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB) 200 µL를 가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 100 µL의 반응 정지 시약을 가하여 450 nm에서 30분 이내에 측정하였다. 혈장 중 칼시트리올의 정량은 상기 기기 조건하 실온에서 플레이트 리더기 (대조파장: 620 nm, 측정파장: 450 nm)를 이용하여 정량하였으며, 외부에서 3초간 교반하고, 10초간 안정화시킨 후 측정하였다.

표준용액 농도의 로그값(log pmol/L)을 x축으로, 다음 식을 이용하여 얻은 결합율(binding percentage, B/Bo(%))을 y축으로 플롯하여 검량선을 작성하였다. 하루에 실험을 5회 시행하여 일내 재현성을 구하고, 연속하여 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

$$B/Bo (\%) = \frac{(\text{mean abs.} - \text{mean abs. substrate blank})}{(\text{mean abs. for '0' cal.} - \text{mean abs. substrate blank})} \times 100$$

### 혈장 시료의 처리

피험자 혈장 시료 또는 대조시료 250 µL에 지질제거용액 25 µL를 가하여 vortexing한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층의 지질이 제거된 혈장시료를 얻었다. Immunocapsule에 지질을 제거한 혈장시료 100 µL를 가하고 실온에서 약 90분간 잘 혼합되도록 교반하였다. 2,500 rpm에서 약 1분간 원심분리하여 immunocapsule로부터의 유출

액을 제거하고, 여기에 다시 탈이온수를 500 µL를 가하여 2회 washing하였다. Elution액을 150 µL 씩 가하여 immunocapsule을 적시고 2,500 rpm에서 약 1분간 원심분리한 다음 반복하여 immunocapsule로부터 2회 더 추출하여 추출액 약 450 µL를 채취하였다. 이 추출액을 40°C에서 약 20-30 분간 질소 기류 하에서 건조시켰다.

건조된 시료에 분석용 완충액 100 µL와 1차 항체 용액 100 µL를 가하여 거품이 생기지 않도록 주의하면서 섞어준 후 2-8°C에서 16-20시간 동안 방치하였다. 이 용액 150 µL를 microplate에 가하고 약 90분간 실온에서 혼합하여 방치 후 제거하였다. 여기에 100 µL의 1,25-Vit D-biotin 액을 가하고 잘 섞어준 후 실온에서 1시간 동안 방치 후 제거하였다. Washing 액 250 µL를 가하여 3회 washing 후 200 µL의 enzyme conjugate 액을 가하여 30분간 실온에서 방치 후 제거하였다. 다시 한 번 washing 액 250 µL를 가하여 3회 washing한 후 기질로서 TMB를 200 µL 가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 100 µL의 반응 정지 시약을 가하여 450 nm에서 30분 이내에 측정하였다.

### 회수율 시험

영하 70°C에서 보관했던 공혈장을 실온에서 완전히 해동한 후 칼시트리올 표준품을 혈장에 가하여 저농도(12.6 pmol/L), 중농도(34.8 pmol/L)와 고농도(93.2 pmol/L)로 조제하여 검체 처리한 분석결과와 100% 회수율을 의미하는 같은 농도의 순수 표준용액의 분석 결과와 비교하였다. 회수율 검증을 위한 농도는 검량선 작성시 사용한 표준용액 농도 중 직선성이 가장 우수한 농도 범위로서 로그값을 취하였을 때 1~2의 x축값을 나타내는 농도를 선정하였으며, 회수율 시험은 3회 반복 시험하였다.

### 안정성 시험

시료의 안정성은 냉해동, 단기, 장기, 표준원액, 그리고 조제 후 안정성으로 평가하였으며, 회수율 시험과 동일하게 세 농도의 표준 용액을 제조하여 시험하였다. 냉해동 안정성은 칼시트리올 표준품에 공혈장을 넣어 저농도(12.6 pmol/L), 중농도(34.8 pmol/L)와 고농도(93.2 pmol/L)로 조제하여 영하 70°C에서 24시간 동안 냉동 보관하였다. 각 시료를 꺼내어 실온에서 보조기구 없이 해동한 다음 완전히 녹으면, 다시 영하 70°C에서 24시간 동안 냉동 보관하였다. 같은 방법으로 다시 녹였다가 얼림으로써 총 3회의 동결과정을 거친 시료를 녹인 후, 상기 혈장 시료 처리 방법에 따라 처리하여 분석하였다. 단기온도 안정성은 칼시트리올 표준품에 공혈장을 넣어 저농도(12.6 pmol/L), 중농도(34.8 pmol/L)와

고농도(93.2 pmol/L)로 조제하고, 영하 70°C에서 24시간 동안 냉동 보관한 다음 동일한 방법으로 검체 처리하여 분석하였다. 장기 안정성은 혈장 표준시료를 2개월 동안 영하 70°C에서 보관하고 실온에서 보조기구 없이 완전히 해동한 후 검체 처리하여 분석하였다. 표준원액 안정성은 칼시트리올 표준원액을 준비하여 검체처리 하지 않고 제조한 다음 24시간 후에 분석하였다. 조제 후 안정성은 칼시트리올 표준품에 공혈장을 넣어 칼시트리올 혈장 표준 시료를 검체 처리하여 분석하고 남은 것을 24시간 동안 냉장 보관하여 반복 분석하였다. 안정성 시험은 각 3회 반복 시험 하였다.

### 약물속도론 및 통계분석

“로칼트를 연질캡셀” (calcitriol 0.25 µg)을 각각 8캡슐씩 8명의 지원자에게 경구투여 하여 얻은 혈장 중 약물농도-시간 곡선으로부터 약물 속도 파라미터를 산출하였다. 칼시트리올은 내인성 약물이므로 건강검진일과 약물투여 직전의 혈중농도로부터 기저치 농도를 미리 산출하고, 약물투여 후 기저치 농도를 보정하였다. 최고 혈장 중 농도( $C_{max}$ )와 최고 혈장 중 농도 도달시간( $T_{max}$ )은 약물농도-시간 곡선으로부터 직접 수치를 읽어 값을 구하였고, 투약 24시간 후와 무한대까지의 혈장 중 약물농도-시간곡선하면적( $AUC_{24h}$  및  $AUC_{\infty}$ ) 및 소실 반감기( $t_{1/2}$ ) 등은 BA Calc 2002를 사용하여 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균±표준편차로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 혈장 중 칼시트리올 정량

표준용액 시료를 분석하여 얻은 칼시트리올의 흡광도로부터 B/Bo(%)값을 구하고, 칼시트리올 농도의 로그값에 대하여 도시하였을 때,  $y=4.0529x+120.42$ ( $r^2=0.9972$ )로 6.5-491.0 pmol/L 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 일내 및 일간 변동계수의 크기가 검량선 최저농도에서 20%이하이고, 그 이외의 농도에서 15%이하일 경우, 최저정량한계농도(lower limit of quantitation)는 6.5 pmol/L였다 (Table I). 또한 Table I에 나타낸 바와 같이 이 농도범위에서 칼시트리올의 정밀성을 C.V.(%)로 나타내었을 때 일내 및 일간 정밀

**Table I—Precision and Accuracy for the Determination of Calcitriol in Human Plasma**

Concentration (pmol/L)	Precision C.V. (%)		Accuracy (%) <sup>b</sup>
	Intra-day <sup>a</sup>	Inter-day <sup>a</sup>	
6.5	1.41	7.33	83.8
12.6	4.10	6.28	98.6
34.8	1.15	2.51	109.8
93.2	2.63	6.82	110.0
228.0	4.09	8.47	111.2
491.0	0.99	3.86	98.9

<sup>a</sup>, n=5; <sup>b</sup>, n=9

성은 모두 15% 이하였고, 정확성은 83.8-111.2%로 최저농도를 제외한 전 농도에서 일간 정밀성은 8.47% 이하였다. 이로부터 혈장 중 칼시트리올은 이 분석법을 통해 인체에 대한 생체이용률시험에 이용될 수 있는 충분한 감도와 정확성 및 정밀성이 있음을 알 수 있었다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 일반적인 칼시트리올 분석법은 방사선동위원소를 이용한 면역분석법(RIA)과 본 실험에서 사용한 EIA법이 있으며, EIA법은 방사선동위원소를 사용하지 않기 때문에 RIA법에 비해 사용이 간단하고 안전할 뿐만 아니라 충분한 안정성이 확보되어 있다.<sup>8)</sup>

### 회수율

Table II에 나타난 바와 같이 본 분석방법의 혈장시료 평균회수율(%)은 저농도(12.6 pmol/L)가 96.0%, 중농도(34.8 pmol/L)가 98.1% 그리고 고농도(93.2 pmol/L)가 101.1%로 추출방법에 의한 소실이 적은 것으로 확인되었다.

### 안정성

냉·해동 안정성은 영하 70°C와 실온에서의 냉해동과정을 반복한 결과 저농도와 고농도 검체에서 13%이내에서 유지되었으나, 중농도에서는 20% 이상의 차이가 나타났다 (Table II). 반복적인 냉해동과정이 칼시트리올의 안정성에 영향을 줄 수 있으므로, EIA kit 프로토콜에 따라 표준용액을 사용직전 조제하여 사용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

**Table II—Recovery and Stability of Calcitriol in Human Plasma (n=3)**

Concentration (pmol/L)	Recovery (%)	Freeze-thaw stability (%)	Short term stability (%)	Long term stability (%)	Standard stability (%)	Processed sample stability (%)
12.6	96.0	87.1	85.1	101.5	101.5	94.7
34.8	98.1	77.7	80.6	95.6	88.0	85.3
93.2	101.1	92.8	99.4	89.5	98.8	95.4

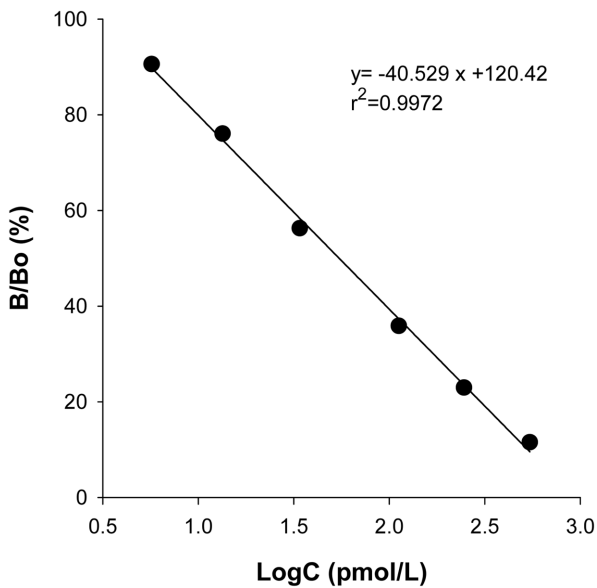


Figure 1—Calibration curve of calcitriol in human plasma.

단기 안정성은 냉동하여 24시간 방치한 후 20% 이내의 변동률을 보였으며, 장기 안정성은 영하 70°C에서 2달간 보관하였을 때 11% 이내의 변동률을 나타내었다. 특히, 34.8 pmol/L 시료의 단기안정성은 20% 이내의 범위였으나 80.6%로 다소 낮은 값을 나타내었으며 이는 단기간에 냉해동을 수행하는 것은 표준용액의 안정성을 감소시킬 수 있음을 의미하므로, 분석을 위하여 혈장 시료를 녹인 후에는 재냉동하여 사용하지 않도록 하였다. 표준용액 안정성은 표준액 제조 후 검체처리하지 않고 24시간동안 냉장 보관했을 때 12% 이내의 차이를 보였으며, 조제 후 안정성은 검체처리 후 24시간동안 냉장 보관했을 때 15% 이내에서 유지되므로, 반복적인 냉해동과정과 일부 단기 안정성을 제외하면 안정성 확인 실험 결과 모든 과정에서 안정한 것으로 확인되었다.

**생체이용률 파라미터의 산출**

건강진단 및 투약 전, 투약 24시간 후에 지원자 8명의 혈액을 채취하여 칼시트리올의 기저치를 측정된 결과, 지원자 8명의 평균 기저치 농도는 96.8±8.1 pmol/L였으며, Figure 2와 같다. 건강한 성인의 칼시트리올 기저치는 39.36~194.64 pmol/L이며, 본 실험에 참여한 지원자의 기저치는 정상 범위에 포함되었다. 각 피험자의 혈장농도는 개인별 기저치를 고려하여 산출하였다. Figure 3은 “로칼트롤 연결캡셀” (calcitriol 0.25 µg) 8캡슐씩을 건강한 지원자 8명에게 경구투여한 후 평균 혈장 중 칼시트리올 농도를 시간에 따라 나타낸 것이다. 또한, 피험자들의 혈장 중 약물 농도 곡선으로

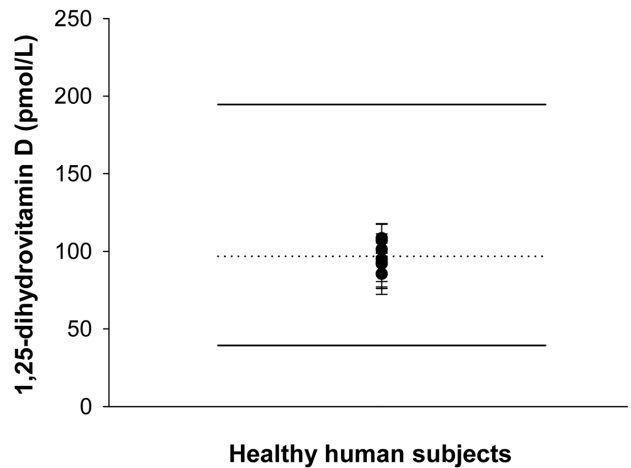


Figure 2—Mean basal concentrations of calcitriol in eight healthy subjects. Sampling was carried out at the pre-study, prior to the drug administration and at 24 hr postdose. Solid lines are expected values for normal adults from manual instruction and dotted line is the mean value from eight subjects in this experiment.

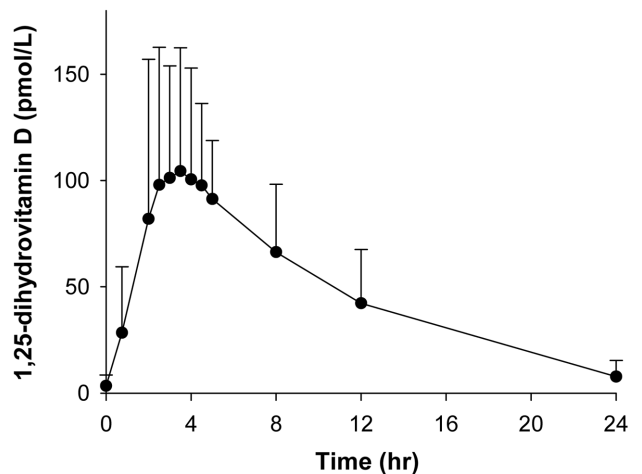


Figure 3—Mean plasma concentration-time profile of calcitriol following oral administration of Rocaltrol® at the calcitriol dose of 2 µg (n=8). The plasma concentrations of calcitriol were obtained with subtracting baseline.

부터 생체이용률 파라미터인 AUC<sub>24h</sub>, AUC<sub>∞</sub>, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> 및 t<sub>1/2</sub>의 값을 Table III에 나타내었다. “로칼트롤 연결캡셀” (calcitriol 0.25 µg) 8캡슐을 경구투여 시 AUC<sub>24h</sub>, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> 및 t<sub>1/2</sub>은 각각 1038±539 pmol/L · hr, 128±63.1 pmol/L, 3.50±1.07 hr, 5.13±2.10 hr이었다. 마지막 채혈시간인 24시간이 반감기 5.13시간의 3배 이상에 만족하였고 AUC<sub>24h</sub>가 AUC<sub>∞</sub> (1113±606 pmol/L · hr)의 93.25%로, 최종 채혈시간까지의 AUC가 AUC<sub>∞</sub>의 80%이상을 만족하였으므로 적절한 채혈시간으로 사료되었다. 또한 본 결과는 Jin 등의 연구

**Table III—Pharmacokinetic Parameters of 8 Volunteers after a Single Dose Oral Administration of Rocatrol® capsules (2 µg Calcitriol)**

Pharmacokinetic parameters	Values for subtracted baseline
AUC <sub>24h</sub> (pmol/L · hr)	1038±539
AUC <sub>∞</sub> (pmol/L · hr)	1113±606
C <sub>max</sub> (pmol/L)	128±63.1
T <sub>max</sub> (hr)	3.50±1.07
t <sub>1/2</sub> (hr)	5.13±2.10

결과와 비교시,<sup>8)</sup> T<sub>max</sub>와 t<sub>1/2</sub>의 편차는 각각 3.4%와 13.6% 이내로 유사한 값을 얻었으나 C<sub>max</sub>와 AUC<sub>24h</sub>의 편차는 각각 47%와 44%로 다소 큰 차이를 나타내었다. 또한 Jin 등의 기저치는 정상 범위보다 다소 낮게 나타났고<sup>8)</sup> 본 연구에서의 기저치는 정상범위의 중간값을 나타내었으므로, 이에 따른 분석 측정차이와 제공되는 식사의 종류 등과 같은 시험조건에 따라 내인성 물질인 칼시트리올의 혈중 농도 차이가 나타난 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 사람의 혈중 칼시트리올 농도를 정확하고 정밀하게 측정할 수 있는 효소면역분석법을 검증하였다. 혈장시료로부터 구한 칼시트리올 검량선은 6.5~491.0 pmol/L 범위에서 양호한 직선성을 나타내었고, 정량한계는 6.5 pmol/L이었다. 분석법을 검증한 결과 일내와 일간의 정확성 및 정밀성이 전농도 15%, 최저정량농도 20% 이내 변동율에 들었으며, 시료처리 회수율 및 안정성 검증 결과 15% 이내의 변동율을 나타내었으므로, 본 분석법의 충분한 감도와 정확한 시험 기준<sup>9)</sup>에 준하여 건강한 성인 8명을 대상으로 시험약 2 µg(주식회사 한국로슈의 “로칼트롤 연결캡슐”(calcitriol 0.25 µg) 8캡슐)을 투여하여 생체이용률시험을 시행하였다. 본 분석방법을 이용하여 약동학적 파라미터를 산

출하였고, AUC<sub>24h</sub>는 1038 pmol/L · hr이었고, C<sub>max</sub>(128 pmol/L)는 3.50 hr에 도달되었으며 t<sub>1/2</sub>는 5.13 hr이었다. 본 연구결과로부터 칼시트리올 제제의 생물학적동등성평가에 활용할 수 있는 의약품 동등성 재평가 표준지침을 작성할 수 있었다. 또한 칼시트리올과 같은 내인성 물질의 경우, 체내 기저농도를 고려하여 생체이용률 파라미터를 산출해야 적절한 생물학적동등성평가를 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구소의 지원(KFDA-06072생동성169)을 받아 수행되었으며, 연구비 지원 기관 및 참여한 모든 연구원들에게 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) J.A. Kanis, Vitamin D metabolism and its clinical application, *J. Bone Joint Surg. Br.*, **64**, 542-560 (1982).
- 2) H.A. Morris, Vitamin D: a hormone for all seasons-how much is enough? *Clin. Biochem. Rev.*, **26**, 21-32 (2005).
- 3) A.M. Wootton, Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D, *Clin. Biochem. Rev.*, **26**, 33-36 (2005).
- 4) B.S. Levine, F.R. Singer, G.F. Bryce, J.P. Mallon, O.N. Miller and J.W. Coburn, Pharmacokinetics and biological effects of calcitriol in normal humans, *J. Lab. Clin. Med.*, **105**, 239-246 (1985).
- 5) Japan Pharmaceutical Information Center (2005) (28<sup>th</sup> ed.) *Drugs in Japan - Ethical Drugs*, Jiho, Inc., Tyokyo, Japan, 604-607.
- 6) H.F. DeLuca, J. Krisinger and H. Darwish, The vitamin D system: 1990, *Kidney Int.*, **38**, S2-S8 (1990).
- 7) 식품의약품안전청 고시 제 2005-31호, 생물학적동등성시험기준 (2005. 6. 7).
- 8) S.E. Jin, J.S. Park and C.K. Kim, Pharmacokinetics of oral calcitriol in healthy human based on the analysis with an enzyme immunoassay, *Pharmacol. Res.*, **60**, 57-60 (2009).