JOURNAL OF RADIATION INDUSTRY

Original article

17(2) : 127-134 (2023)
https://doi.org/10.23042/radin.2023.17.2.127

^{14}C-아세트아미노펜 비임상시험을 통한 생체시료 분석용 가속질량분석기의 검증

송진호[1,*], 심재훈[1], 박정배[1], 여창수[1], 배수현[1], 최민선[1], 권미혜[1], 김경민[1]

[1]한국원자력의학원 국가RI신약센터

Non-clinical Trials using ^{14}C-Acetaminophen to Validate Biomedical Accelerator Mass Spectrometry System

Jinho Song[1,*], Jae Hoon Shim[1], Jung Bae Park[1], Chang Su Yeo[1], Soo Hyeon Bae[1], Min Sun Choi[1], Mi Hye Kwon[1] and Kyeong Min Kim[1]

[1]Korea Radio-Isotope Center for Pharmaceuticals, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, 75 Nowon-ro, Nowon-gu, Seoul 01812, Republic of Korea

Abstract Pharmacokinetic (PK) data provide pivotal information in drug development, and they are usually first studied in the preclinical stage using various animals. However, quite often, animal PK data may not match with human PK, especially in metabolites. Thus, most regulatory agencies in the world make it mandatory to obtain metabolite information using ^{14}C radiolabeled drug in human for small molecule drug candidates. However, such studies are expensive and time consuming and they are usually done at the end of Phase II trials using ~3.7 MBq of ^{14}C labeled drug in a limited number of human subjects. Introduction of accelerator mass spectrometry (AMS) in this kind of study has revolutionized it. Since AMS can measure ^{14}C level as close as natural abundance, it can quantify the amounts of ^{14}C labeled drugs and their metabolites produced in human body that consumes less than the amount of 0.0037 MBq of ^{14}C labeled drug, a very safe level of radioactive dose in human. Therefore, it is now possible to conduct human ^{14}C studies safely in early clinical trials without spending hefty amount of money and time. Korea Radioisotope Center for Pharmaceuticals (KRICP) at Korea Institute of Biological and Medical Sciences (KIRAMS) has established an AMS facility in 2018, housing a 0.5 MV AMS manufactured at the US National Electrostatics Corps (NEC). The AMS instrument has been validated using various standard samples that have been prepared at Lawrence Livermore National Laboratory in the US, a worldly reputable provider of AMS standards. In this paper, we present a mass balance study for acetaminophen in rats using AMS and prove that the study results are equivalent with those of literature, which shows the AMS facilities at KRICP has successfully installed and be ready to be used in the various PK studies using ^{14}C labelled compounds for new drug development.

Key words: ^{14}C-Acetaminophon, Accelerator mass spectrometry, Mass balance

1. 서 론

신약개발에서 약동학적 정보를 얻는 것은 매우 중요하다. 특정약물을 섭취했을 때, 약물이 체내에 흡수되는 정도와 배출되는 정도, 그리고 체내에 머무는 시간 등을 정확하게 예측하지 못한다면 해당 약물에 대한 적절한 용량

http://www.ksri.kr/

Copyright © 2023 by
Korean Society of Radiation Industry

***Corresponding author.** Jinho Song
Tel. +82-2-970-8918 Fax. +82-2-970-1989 E-mail. jinho1120@kirams.re.kr

Received 7 July 2022 **Revised** 17 March 2023 **Accepted** 12 June 2023

과 복용간격을 제시할 수 없다. 또한, 약물이 체내에서 약물을 분해하여 생성하는 대사물질들이 어떤 것이 있는지 정확히 규명하고 그 대사물질의 독성을 확인하지 않는다면, 약물은 치료제가 아닌 독약이 될 수도 있다[1]. 인체 내에서 채취한 검체 내에서 약물과 그의 대사물질들을 추적하여 약동학적 결과를 얻기 위해서는 많은 노력이 필요하다.

방사성동위원소는 이런 약동학적 정보를 좀더 쉽게 얻는 데에 도움을 준다. 방사성동위원소 표지 약물은 분해가 되어 대사물질로 변환되어도 방사성동위원소를 보유하고 있기 때문에, 방사성동위원소의 유무를 확인하는 것만으로 해당 물질이 약물에서 유래한 대사물질이라는 사실을 쉽게 파악할 수 있으며 그 양을 쉽게 정량할 수 있다. 특히 ^{14}C를 표지한 약물의 경우 약물의 구조를 변화시키지 않으면서 안전하게 약물에 표지가 가능하고, 긴 반감기의 약물도 추적이 가능하기 때문에 약동학 연구에 유용하게 쓰인다.

생체시료에 들어있는 ^{14}C의 양을 계측하기 위해서는 일반적으로 액체섬광계수기를 이용해 왔다. 액체섬광계수기는 ^{14}C가 ^{14}N으로 변환될 때 발생하는 β-ray를 통하여 시간에 따른 변환 이벤트를 계수하고 이를 통해 ^{14}C의 양을 정량하는데, ^{14}C의 양이 적어지면 ^{14}N의 변환 빈도도 역시 적어져 유의미한 통계치를 지닌 계측을 하는 데까지 오랜 시간이 걸린다. 또한 기기 자체의 노이즈에 따라 0.8 Bq 이하의 방사능은 정량이 불가능 하기도 하다. 따라서 액체섬광계수기에서 분석할 수 있는 양의 생체시료를 얻기 위해서는 대용량의 ^{14}C 표지 약물을 섭취해야 했다. 이에 따라 임상시험자는 방사능 피폭의 위험을 감수해야 했고, 시험 후에 발생하는 방사성폐기물의 양이 적지 않았다.

이를 보완하기 위해 초극미량의 ^{14}C를 계측할 수 있는 가속질량분석기(Accelerator Mass Spectrometry) 시스템이 1990년대부터 약동학 평가에 도입되게 되었다[2]. 가속질량분석기는 기존 방식과 달리 ^{14}C, ^{13}C, ^{12}C 원자의 개수를 각각 계수하여 그 비율을 확인하는 방법을 사용하므로 기존 방사선 측정기보다 1,000,000배 이상의 감도로 ^{14}C의 계측이 가능하다[1]. 따라서 사람이 비행기 여행을 할 때 받는 피폭량 정도에 준하는 ^{14}C 양으로 약동학 시험을 할 수 있게 해준다[3].

한국원자력의학원(Korea Institute of Biological and Medical Sciences, KIRAMS) 국가RI신약센터(Korea Radioisotope Center for Pharmaceuticals, KRICP)에서는 2018년에 미국 National Electrostatics Corps (NEC)로부터 0.5 MV 가속질량분석기 도입하여 설치하고, 이를 이용하기 위한 시료 전처리 시스템을 갖춰 가속질량분석기를 이용한 약동학 시험법을 구축하고 있다[4]. 이 논문에서는 국가RI신약센터에 설치된 가속질량분석기의 성능 검증 방법을 소개하고 이 가속질량분석기를 이용하여 약동학 시험의 하나인 매스밸런스(Mass balance) 시험을 수행한 연구결과를 소개하고자 한다.

매스밸런스 평가는 복용한 약물의 양과 배출된 약물의 양을 비교하여 복용한 약물이 신체에 축적되지 않고 완전하게 배출하게 되는지 그리고 약물의 주된 배설 경로는 어디인지를 확인하는 약동학적 평가이다. 이때 방사성동위원소를 표지하지 않고 약물의 배출량을 확인하려면 약물이 체내에서 어떤 물질로 대사되는지 일일이 확인해야 하고, 그 대사물질의 양을 모두 질량분석기로 정량해야 하는데, 이것은 현실상 쉽지 않은 일이다. 이때 방사성동위원소를 표지한 약물을 통해 매스밸런스를 실시하면, 약물이 어떤 물질로 대사되든지 방사성동위원소를 포함하기 때문에 방사성동위원소의 양만 계측하게 되면 실체 배출하는 모약물과 대사물질 전체의 양을 쉽게 계측할 수 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 장비 및 시약

가속질량분석기로 시료를 분석하기 위해서는 시료를 산화하여 이산화탄소를 만든 후 이를 환원시켜 흑연을 생성하는 흑연화 과정을 거쳐야 한다. 이때 사용된 산화제로 막대형 산화구리(Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 사용하였고, 환원제로 아연가루(Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 사용하였다. 환원시 촉매제로는 평균 직경 5 μm 이하의 비정형 철가루(Materion, Milwaukee, WI, USA)를 사용하였다.

가속질량분석기의 성능검증을 위하여 Table 1에 정리한 5가지 표준시료를 사용하였다. 흑연화 전처리 과정에서 유입되는 ^{14}C의 노이즈 확인을 위한 흑연가루(Graphite powder, natural, briquetting grade, -100 mesh, Lot number Q21A015)는 Alfa Aesar (Ward Hill, MA.USA)에서 구매하

였다.

약동학 평가에서는 ^{14}C-아세트아미노펜(Moravek, Brea, CA, USA)을 이용하여 소동물 랫드(Rat)에서의 매스밸런스를 확인하였다. 이때 수집된 소변(Urine)와 대변(Feces)을 흑연화 하기 위한 탄소 소스로 Tributyrin (MP Biomedicals, Solon, OH, USA)를 사용하였다.

2.2. 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley 9~10주령 수컷 쥐(Rat, 309±5.5 g)를 사용하였으며, 영바이오(Seongnam, Korea)에서 공급받아 동물 실험을 실시하였다. 실험동물은 온도 25±2°C, 습도 50±10% 및 명암 주기 12시간을 유지하며 사육하였고 투여 12시간 전 절식시켰다. 한국원자력의학원 동물실험윤리위원회의 승인(KIRAMS-2018-0038)을 받아 수행하였다.

Table 1. Standards for validation of accelerator mass spectrometry

Standard name	Material	Manufacture
SRM 4990C	Oxalic acid	NIST[a)]
C3	Cellulose	IAEA[b)]
C8	Oxalic acid	IAEA
OX12	Oxalic acid	LLNL[c)]
OX102	Oxalic acid	LLNL

[a)]National Institute of Standards and Technology
[b)]International Atomic Energy Agency
[c)]Lawrence Livermore National Laboratory

2.3. 시료의 흑연화 전처리

가속질량분석을 위한 시료의 전처리과정은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 시료의 건조, 밀봉, 산화, 이송, 환원의 과정을 통해 이루어지는 흑연화 과정과 이 흑연을 가속질량분석기에 장착하기 위하여 알루미늄 음극에 압착하는 과정[5]으로 수행하였다. 시험에 사용하는 모든 시험관은 전기로를 이용하여 500°C에서 2.5시간 동안 열처리를 수행하여 유기물을 제거한 후에 사용하였다.

2.3.1. 건조

가속질량분석을 위한 흑연의 양은 약 0.25~10 mg이 적절하기 때문에[6] 시료를 준비할 때 시료의 탄소 함량을 고려하여 시료의 양을 채취하여 석영 시험관(외경 6 mm, 내경 4 mm, 길이 38 mm)에 담았다. 생체시료의 경우 시료를 시험관에 넣고 진공원심농축기를 이용한 건조 과정(25°C, 3시간, 2000 rpm)을 수행하였지만 표준시료의 경우 이미 건조가 되어 있는 상태이기 때문에 따로 건조의 과정을 거치지 않았다.

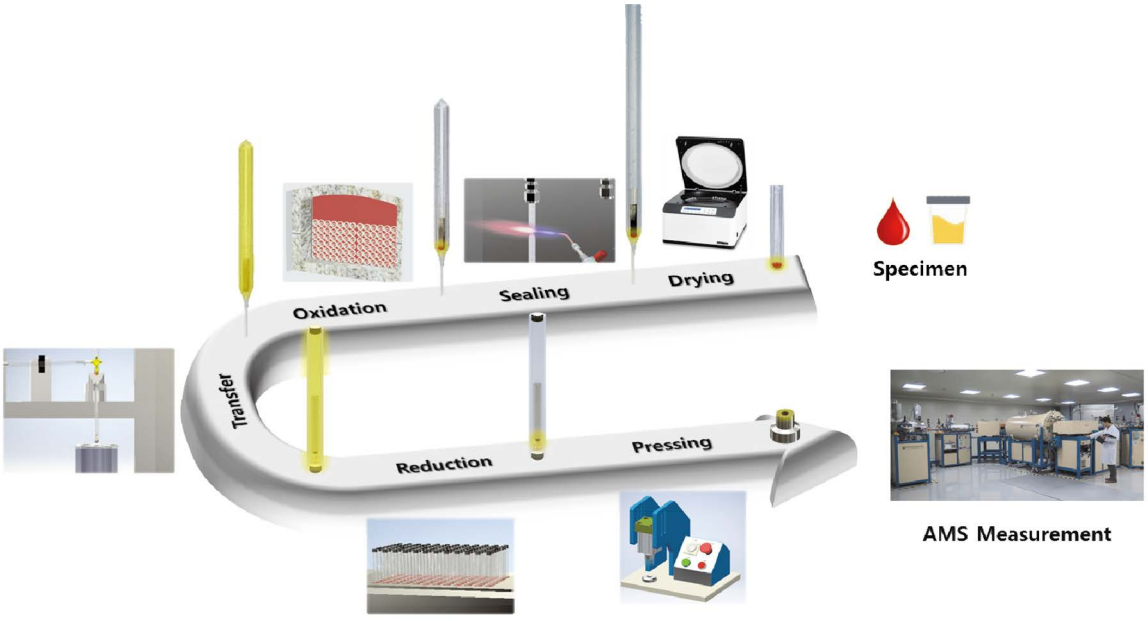

Fig. 1. Graphitization process of biological samples for AMS analysis. It consists of drying, sealing, oxidation, transport, reduction, and pressing in the order.

2.3.2. 밀봉

석영 시험관에 산화 구리를 추가한 후 끝을 쉽게 절단할 수 있는 산화용 석영 시험관(외경 9 mm, 내경 7 mm, 길이 210 mm)에 넣었다. 산화용 석영 시험관을 진공 펌프가 연결되어 있는 매니폴트에 연결하여 내부의 공기 압력을 1×10^{-3} torr 이하로 낮춘 후 용접용 불꽃을 이용하여 시험관을 밀봉하였다.

2.3.3. 산화

시료를 산화시켜 이산화탄소와 수증기로 변환하기 위해 시료가 들어있는 산화용 석영 시험관을 산화용 전기로에 넣고 900°C에서 3시간 동안 가열하였다.

2.3.4. 이송

붕규산 유리 시험관(외경 8 mm, 내경 6 mm, 길이 100 mm)에 환원제 아연을 넣고 촉매제 철가루가 들어 있는 붕규산 유리 시험관(외경 4 mm, 내경 2 mm, 길이 40 m)을 넣은 후 실리콘 마개로 밀봉하여 환원용 시험관을 만들었다. 이후 산화용 시험관에 들어 있는 이산화탄소와 수증기를 액체질소를 이용하여 매니폴트에 의해 진공 처리된 환원용 시험관으로 이송하였다.

2.3.5. 환원

환원용 시험관을 환원용 전기로에 넣고 525°C에서 3시간 동안 가열하였다. 이때 시험관에서 다음과 같은 반응[5]이 일어나며 촉매제 철가루가 들어있는 시험관에서 흑연이 생성된다.

$$Zn + H_2O \rightarrow ZnO + H_2$$
$$CO_2 + H_2 \rightarrow CO + H_2O$$
$$CO + H_2 \rightarrow C\,(graphite) + H_2O$$

Fig. 2는 흑연이 생성된 환원용 시험관의 사진이다. 철가루와 흑연이 뭉쳐 검은색의 덩이를 보이고 있다. 환원과정에서 흑연이 아닌 회색 탄화철(Fe_3C)이 형성되면 가속질량분석기의 이온빔 전류양을 낮춰 측정에 악영향을 줄 수 있으나[7], 모든 환원된 시료에서 회색 덩이는 관측되지 않았다.

2.3.6. 압착

클린벤치 내에서 환원된 흑연이 부착된 철가루를 가속질량분석용 알루미늄 음극의 1 mm 구멍에 주입한 후 1 mm 핀을 이용하여 압착하였다. 이때 공압 압착기를 이용하여 3 bar의 압력으로 5초간 압착하였다.

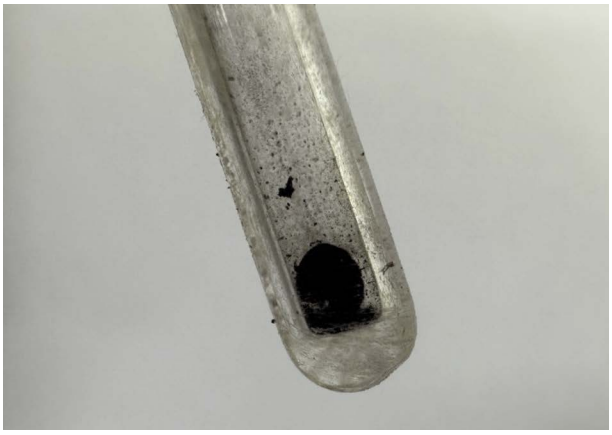

Fig. 2. Reduced graphite formed on the Fe catalyst. All black and no gray iron carbide is visible.

2.4. 가속질량분석기의 구성 및 성능

흑연화된 시료들을 국가RI신약센터에 설치된 0.5 MV 탄뎀형 가속질량분석기(National Electrostatics Corps., Middleton, WI, USA)를 이용하여 분석하였다. 본 장비는 시료를 이온화시키는 이온소스, 이온을 고전압을 이용해 가속시키는 가속탱크, 가속되는 이온에 자기장을 가해 원하는 질량의 이온을 분리하는 전자석, 그리고 이온을 검출하는 검출기로 구성되어 있다. 이온소스는 134개의 고체 시료를 장착할 수 있는 고체 전용 이온 소스와, 40개의 고체 및 기체시료를 분석할 수 있는 혼합형 이온소스를 장착하고 있는데, 해당 실험에서는 134개의 고체 시료용 이온소스를 사용하였다. 이온 소스에서는 Cs 기체를 시료에 스퍼터링하여 약 20~40 μA의 음이온은 발생시켰고, 이 음이온을 +460 kV전압으로 설정한 가속탱크를 이용하여 가속시켜 이온빔을 생성하였다. 이때 두개의 전자석에 의해 이온빔은 ^{12}C, ^{13}C, ^{14}C의 이온빔으로 나뉘어 가속되게 되는데, 각각의 이온빔 끝단에서 검출기를 사용하여 이온의 양을 측정하였다. ^{12}C, ^{13}C의 검출에는 많은 양의 이온을 전류로 측정할 수 있는 패러데이컵을 사용하였고, ^{14}C 검출에는 적은 양의 이온의 개수를 하나씩 측정할 수 있는 실리콘 입자 검출기를 사용하였다.

2.5. 가속질량분석기 성능 검증

가속질량분석에서는 ^{12}C, ^{13}C, ^{14}C의 상대적 양을 원시

데이터로 얻고, 이 데이터를 NIST에서 판매하는 옥살산 표준물질(SRM 4990C)의 측정값을 기준으로 정규화하여 Faction Modern Carbon (fMC) 라는 값으로 환산한다[8]. 이때 측정이 올바른 지 확인하기 위해서는 표준시료를 분석하여 가속질량분석의 정확도를 검증하는 작업이 필요하다.

IAEA에서 보증하는 표준시료 C3, C8과 LLNL에서 생산한 표준시료 OX12, OX102를 이용해 가속질량분석기를 이용한 측정의 정확도, 변동계수, 반복계수 및 측정에 대한 신뢰구간을 확인하였다. 이를 위하여 각각의 표준시료를 6개씩 흑연화 전처리를 하여 사용하였다.

각 지표에 대한 계산방법은 다음과 같다.

$$\text{정확도}(\%) = \left(1 - \frac{|\text{측정값} - \text{표준값}|}{\text{표준값}}\right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{변동계수}(\%) = \frac{\text{표준편차}}{\text{평균}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{반복계수}(\%) = \sqrt{\frac{1}{2}[(\text{변동계수1})^2 + (\text{변동계수2})^2]} \quad (3)$$

2.6. 소동물 매스밸런스 평가

실험동물(n = 3)에 아세트아미노펜 50 mg kg^{-1}와 ^{14}C-아세트아미노펜 185 Bq kg^{-1}을 혼합하여 경구투여한 후(총 투여량 15.5 ± 0.3 mg, 이중 ^{14}C 표지 성분 0.000118%), 24시간 동안 소변과 대변을 0~2 h, 2~4 h, 4~6 h, 6~12 h, 12~24 h의 구간으로 채집하였다. 채집한 소변과 대변에서 아세트아미노펜과 대사산물의 양을 확인하기 위해 흑연화 과정을 거쳐 가속질량분석을 실시하였다. 일반적으로 소변과 대변의 경우 각각 시료 중 탄소 함량이 0.3~1.5 (소변), 10% (대변)으로 보고 되어 있어 200 μL의 소변 혹은 10 mg의 대변을 사용하여 흑연화를 실시한다[3]. 하지만 소변은 나트륨의 함량이 많아 흑연화 과정에서 석영시험관에 손상을 줄 위험이 있어[5] 메탄올로 100배 희석하였고, 대변은 균질화가 필요하기 때문에 물과 메탄올 1 : 1 혼합 용액을 넣어(대변 질량의 5배) 균질화(약 10분, 3000 rpm)를 진행 후 메탄올로 추가적으로 10배 희석하였다. 이후 희석된 시료 10 μL에 탄소 소스인 Tributyrin 2 μL (탄소량 1.23 mg) 추가하여 흑연화를 실시하였다. 이때 소변 및 대변의 최종 탄소 함량은 0.004 mg 이하가 되기 때문에 실제 계산에서는 측정 시료의 탄소 함량을 Tributyrin 2 μL의 탄소 함량 1.23 mg으로 사용하였다.

매스밸런스평가에서는 투여한 약물 대비 배설한 약물의 비율을 %로 환산하여 회수율을 표현한다. 이때, 투여한 ^{14}C 약물의 양이 Bq 단위로 표현되었기 때문에 배설한 약물의 단위도 Bq 단위로 환산되어야 한다. 1 fMC는 0.0002260 Bq mgC^{-1} (6.108 fCi mgC^{-1}) 즉 1 mg의 탄소당 0.0002260 Bq의 ^{14}C이 있는 양이다. 따라서 가속질량분석기에서 측정한 fMC 값을 0.0002260으로 나누고, 시료의 탄소 함량 1.23 mg을 곱하면 흑연화 전처리한 시료 안의 총 ^{14}C 양이 Bq 단위로 환산된다. 여기에 시료 분취량과 희석배수 등의 정보를 통해 시간별 수집한 검체에서의 ^{14}C 총량을 계산하고 시간에 따라 배설한 ^{14}C 양을 누적하여 시간에 따른 회수율을 계산하였다.

3. 결 과

3.1. 가속질량분석기 성능 검증

Table 2에서 가속질량분석기의 성능검증 결과를 확인할 수 있다. 정확도에 대한 결과를 보면 LLNL에서 제공하는 OX12시료 한 샘플을 제외하고 모두 95% 이상의 정확도를 보여주고 있으며 OX12의 나머지 한 시료도 94.6%로 95%에 근접한 정확도를 보여주고 있다. 각 표준시료에 대한 변동계수는 0.5~3.6%인 것을 확인할 수 있으며 반복계수는 0.5~2.9%로 모두 3% 이내의 값을 보여준다. 해당 표준시료를 이용한 가속질량분석기의 신뢰구간에 대한 그래프가 Fig. 3에 도식되어 있다.

3.2. 소동물 매스밸런스 평가

Table 3에서 시간별 각 쥐의 배설량을 보여준다. 소변은 각 2시간마다 배설이 이루어 졌지만 대변은 6시간 이후에 배설이 이루어진 것을 확인할 수 있다. 가속질량분석기에서 측정한 각 시료의 fMC 값을 이용하여 흑연화 한 시료의 ^{14}C 농도를 구한 뒤 희석 배수와 배설량을 역산하면 시간당 배설한 ^{14}C 약물의 총 양을 환산할 수 있다.

Fig. 4에서는 랫드에 아세트아미노펜의 투여 후 24시간 동안 회수율을 보여준다. 랫드에서 아세트아미노펜의 회수율은 88.5~94.9%로 평균 92.6%의 회수율을 보여주고 있다. 이 중 소변으로 배설된 아세트아미노펜과 그 대사산

Table 2. Accuracy, repeatability, reproducibility of AMS measurement using standard samples

Standard name	Reference (fMC)	1st day			2nd day			Reproducibility (%)
		fMC	Accuracy (%)	Repeatability (%)	fMC	Accuracy (%)	Repeatability (%)	
C3	1.2941	1.2977	99.7	0.5	1.2915	99.8	0.6	0.5
		1.2976	99.7		1.2970	99.8		
		1.3039	99.2		1.3097	98.8		
		1.3127	98.6		1.3086	98.9		
		1.2942	100.0		1.3063	99.1		
		1.2967	99.8		1.3049	99.2		
C8	0.1503	0.1460	97.2	3.6	0.1483	98.7	2.0	2.9
		0.1478	98.3		0.1533	98.0		
		0.1505	99.9		0.1506	99.8		
		0.1594	93.9		0.1494	99.4		
		0.1502	99.9		0.1475	98.1		
		0.1438	95.7		0.1445	96.1		
OX12	12.3839	12.0075	97.0	1.0	12.0646	97.4	1.2	1.1
		11.9179	96.2		11.8680	95.8		
		11.9650	96.6		11.9523	96.5		
		11.9014	96.1		12.0259	97.1		
		12.0842	97.6		12.0142	97.0		
		11.7197	94.6		11.6814	94.3		
OX102	102.0357	101.7746	99.7	1.2	105.0405	97.1	0.8	1.0
		101.4205	99.4		105.4453	96.7		
		98.2666	96.3		105.1100	97.0		
		99.8463	97.9		103.9891	98.1		
		100.4783	98.5		105.8399	96.3		
		100.1659	98.2		103.7608	98.3		

물들은 87.0% (82.2~89.4%)를 차지하였고 대변으로 배설된 아세트아미노펜과 그 대사산물들은 5.6% (4.9~6.3%)를 차지했다(Table 4).

4. 고 찰

가속질량분석을 위해서는 흑연화 전처리 과정이 선행되기 때문에 가속질량분석기의 성능에 문제가 없다 하더라도, 흑연화 전처리의 과정에서 문제가 발생한다면 정상적인 결과값을 얻을 수 없다. 따라서 가속질량분석기의 성능 검증 결과는 가속질량분석기의 성능뿐만 아니라 측정 데이터를 fMC값으로 환산하는 변환 소프트웨어의 적합성 그리고 흑연화 전처리 진행자의 숙련도 및 흑연화 전처리 도구들의 적합성을 대변한다. NEC에서 제작한 0.5 MV 가속질량분석기의 경우 ^{14}C의 검출을 위하여 실리콘 입자 검출기를 사용하는데, 많은 양의 ^{14}C를 측정할 경우, 입자 두 개 이상이 입자 검출기에 동시에 도달하여 하나의 입자로 계측되는 파일업(Pile-up) 현상과 검출기의 신호처리 동안 다른 입자 신호는 처리하지 못하는 데드 타임(Dead time) 현상이 발생하기 때문에 ^{14}C의 양이 많은 시료일수록 ^{14}C의 검출 효율이 떨어진다[9]. 이러한 이유로 발생하는 고농도 ^{14}C의 시료 측정시의 부정확도는 데이터의 환산 시 입자 검출기의 검출 빈도에 따른 환산 값 보정을 통해 보완 가능하다.

성능 검증 결과 모든 시료에 대한 측정의 정확도가

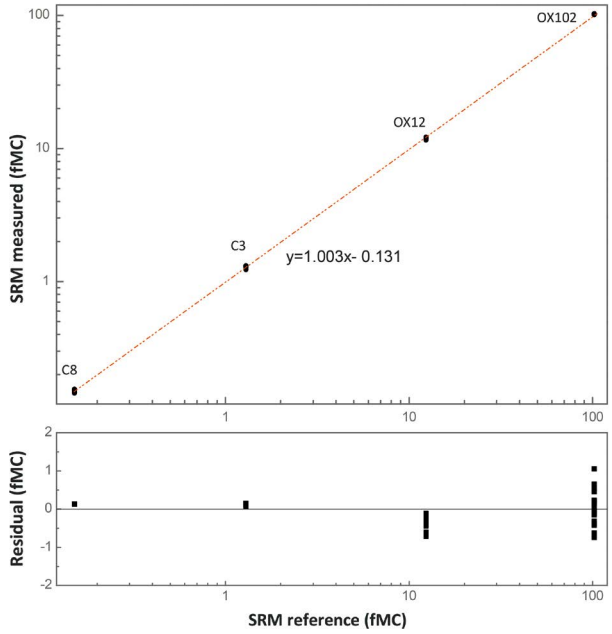

Fig. 3. Four standard samples C8 (0.1503 fMC), C3 (1.2941 fMC), OX12 (12.3839) and OX102 (102.0357) were measured to qualify AMS machine. It shows linear range from 0.15 to 102 fMC.

Table 3. Excretion of urine and feces of each rat per time interval.

Time (h)	Urine volume (mL)			Feces weight (g)		
	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 1	Rat 2	Rat 3
0~2	3.67	0.5	1.85	0	0	0
2~4	0.8	0.6	0.85	0	0	0
4~6	0.82	0.7	1.04	0	0	0
6~12	2.4	4.1	4.7	3.702	4.608	2.746
12~24	5.6	9.7	8.2	4.507	7.672	7.448

94.6% 이상인 것을 보여주는데 이는 시료의 전처리, 측정 및 데이터 환산 방법이 바르게 수행되고 있고, 고농도 ^{14}C 측정에 대한 보정 값이 잘 적용되어 있는 것을 의미한다. 변동계수에서 전처리 담당자가 같은 시료를 6개 반복하여 흑연화 전처리한 시료들이 3.6% 이내의 차이를 보이는 것을 확인할 수 있는데 이는 흑연화 전처리 담당자의 숙련도가 높음을 증명하고 있다. 반복계수는 가속질량분석기를 사용하여 동일한 시료를 반복하여 측정하였을 때 동일한 값을 보여주는지를 보여주는 수치인데, 이 또한 3% 이하의 변동성을 보여주어 가속질량분석기가

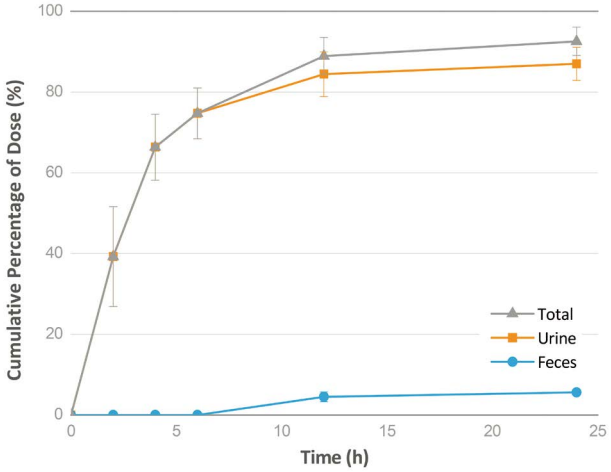

Fig. 4. Recovery of collected urine and feces after oral administration of ^{14}C-Acetaminophen to rats. Total average recovery of 92.6% was obtained over 24 hours.

Table 4. Recovery of ^{14}C-Acetaminophen and its metabolites in urine and feces over time

Time (h)	Recovery from Urine (%)	Recovery from Feces (%)	Total recovery (%)
0~2	39.3	0	39.3
2~4	66.3	0	66.3
4~6	74.7	0	74.7
6~12	84.4	4.5	88.9
12~24	87.0	5.6	92.6

매우 안정적으로 작동하고 있다는 것을 확인할 수 있다. 2018년 FDA에서 발행한 'Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry'에서는 크로마토그래피 시험에 대한 정확도와 변동계수에 대한 요구사항을 일반 상용양에 대해 ±15% 최저 정량한계에서 ±20%로 규정하고 있다[10]. 가속질량분석기의 성능 평가 결과 최저 정확도 94.6%를 FDA에서 계산하는 방식의 정확도로 환산하면 ±5.4%가 되고, 변동계수도 ±3.6%를 보여주고 있으므로 가속질량분석기의 성능은 FDA에서 규정하는 바이오 시료 분석을 위한 조건을 충족하고 있음을 확인할 수 있다.

Fig. 3에 도식한 그래프에 의하면 가속질량분석기는 0.1503~102.0357 fMC구간까지 선형 신뢰구간을 보유하고 있기 때문에 이 구간에 해당하는 시료를 측정하는 데에 문제가 없다. 그리고 102.0357 fMC 이상의 시료를 분석하기 위해서는 해당 시료를 희석하여 보정하거나 더 높

은 방사선량을 측정할 수 있는 액체섬광계수기를 사용하는 것이 합당하다. 하지만 최대 fMC 값이 102.037인 이유가 현재 시중에서 구할 수 있는 표준시료의 최대 fMC 값이기 때문이지 해당 가속질량분석기의 실제 성능 한계를 대변하지는 않기 때문에 더 높은 농도의 시료를 이용하여 장비를 검증한다면 가속질량분석기의 신뢰 구간을 확장할 수 있다.

아세트아미노펜은 이미 임상시험으로도 매스밸런스에 관한 연구가 많이 진행된 약물로 24시간 동안 소변과 대변으로 85~96% [11,12] 정도의 회수율을 보고하고 있고, 대부분의 회수가 소변을 통해 이루어진다고 발표되어 있다. 본 시험에서 도출된 92.6%의 회수율은 해당 결과들과 유의한 결과를 보여주고 있으며 전체 배설량의 94.0%는 소변으로 배설되는 것으로 보아 아세트아미노펜의 주된 배설 경로는 소변임을 다시 확인해 준다. 해당 매스밸런스 평가를 위해 사용한 ^{14}C표지약물은 약 1 kBq로 가속질량분석기를 사용시 매우 적은 양의 방사성동위원소를 이용하여 약동 평가를 수행하지만 신뢰성 있는 결과를 보여준다는 결론을 뒷받침한다.

5. 결 론

본 논문에서는 표준시료를 이용하여 가속질량분석기가 FDA에서 제시하는 생물학적 분석을 위한 장비성능에 만족하는 것을 확인하였고, 소동물을 이용한 매스밸런스 약동학 평가를 통해 기존에 보고된 결과에 부합하는 결과값을 도출하였다. 가속질량분석기를 이용한 매스밸런스는 극미량의 ^{14}C를 이용해서 약동학 평가가 가능하기 때문에 비임상시험 뿐 아니라 임상시험에서 사용하여도 안전하다. 그리고 대사체에 대한 식별을 용이하게 해주기 때문에 혈장, 소변, 등의 검체에서 대사체 분석부분에 뛰어난 역할을 보여줄 수 있다. 앞으로 해당 장비를 통하여 국내 신약개발에 필요한 약동학 평가기술이 활발하게 구축되어 약동학 평가에 유용하게 활용될 것을 기대해 본다.

사 사

본 논문은 2020년도 한국원자력의학원에서 발행한 방사성동위원소이용 신개념치료기술개발 플랫폼구축사업 최종보고서 데이터를 활용하여 재구성하였으며 과학기술정보통신부 한국원자력의학원 연구운영비지원사업(No.50539-2022)의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

1. Cho KH, Lee HJ, Choie HS, Lee KR, Dueker SR and Shin YG. 2013. Trends of innovative clinical drug development using AMS (Accelerator mass spectrometry) and ^{14}C-tracer. *Yakhak hoeji*. **57**(6):412-419.
2. Vogel JS, Turteltaub KW, Felton JS, Gledhill BL, Nelson DE, Southon JR, Proctor ID and Davis JC. 1990. Application of AMS to the biomedical sciences. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* **52**(3-4):524-530.
3. Voge, JS and Love AH. 2005. Quantitating isotopic molecular labels with accelerator mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **402**: 402-422.
4. Korea Institute of Radiological and Medical Sciences. 2020. Final Report on the Construction of a Platform for the Development of New Concept Therapeutic Technologies Using Radioisotopes.
5. Getachew G, Kim SH, Burri BJ, Kelly PB, Haack KW, Ognibene TJ, Buchholz BA, Vogel JS, Modrow J and Clifford AJ. 2006. How to convert biological carbon into graphite for AMS. *Radiocarbon*. **48**(3):325-336.
6. Ognibene TJ, Bench G, Vogel JS, Peaslee GF and Murov S. 2003. A high-throughput method for the conversion of CO_2 obtained from biochemical samples to graphite in septa-sealed vials for quantification of ^{14}C via accelerator mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**(9):2192-2196.
7. Kim S-H, Kelly PB, Ortalan V, Browning ND and Clifford AJ. 2010. Quality of graphite target for biological/biomedical/environmental applications of ^{14}C-accelerator mass spectrometry. *Anal. Chem.* **82**(6):2243-2252.
8. Stenström K, Skog G, Georgiadou E, Genberg J and Mellström A. 2011. A guide to radiocarbon units and calculations.
9. Müller JW. 1973. Dead-time problems. *Nucl. Instrum. Methods*. **112**(1-2):47-57.
10. FDA. 2018. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.
11. Browne TR, Szabo GK, Ajami A and Browne DG. 1998. Performance of human mass balance studies with stable isotope-labeled drug and continuous flow-isotope ratio mass spectrometry: A progress report. *J. Clin. Pharmacol.* **38**(4):309-314.
12. Tozuka Z, H Kusuhara, K Nozawa, Y Hamabe, I Ikushima, T Ikeda and Y Sugiyama. 2010. Microdose study of ^{14}C-acetaminophen with accelerator mass spectrometry to examine pharmacokinetics of parent drug and metabolites in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **88**(6):824-830.