

## 건강한 한국인 자원자에서 메트포민의 Targeted Metabolite Profiling

<sup>1</sup>고신대학교 의과대학 가정의학과교실, <sup>2</sup>경북대학교 대학원 의과학과,  
<sup>3</sup>경북대학교병원 임상시험센터, <sup>4</sup>서울아산병원 임상약리학과, <sup>5</sup>고신대학교 의과대학 약리학교실

임호섭<sup>1\*</sup>, 차재민<sup>2,3\*</sup>, 서정주<sup>2,3</sup>, 박정현<sup>2,3</sup>, 이주미<sup>2,3</sup>, 이혜원<sup>3</sup>, 배균섭<sup>4</sup>, 김우미<sup>5</sup>, 윤영린<sup>2,3</sup>

=Abstract=

### Targeted Plasma Metabolite Profiling of Metformin in Healthy Korean Volunteers

Ho-Seob Lihm<sup>1\*</sup>, Jaemin Cha<sup>2,3\*</sup>, Jeong Ju Seo<sup>2,3</sup>, Jeonghyeon Park<sup>2,3</sup>, Joomi Lee<sup>2,3</sup>,  
Hae Won Lee<sup>3</sup>, Kyun Seop Bae<sup>4</sup>, Woomi Kim<sup>5</sup>, Young-Ran Yoon<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Family Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, <sup>2</sup>Department of Biomedical Science, Kyungpook National University Graduate School, Daegu, <sup>3</sup>Clinical Trial Center, Kyungpook National University Hospital, Daegu, <sup>4</sup>Department of Clinical Pharmacology & Therapeutics, Asan Medical Center, Seoul, <sup>5</sup>Department of Pharmacology, Kosin University College of Medicine, Busan

**Background:** Metformin is an effective oral antihyperglycaemic agent for type 2 diabetes mellitus, with a variety of metabolic effects. In addition to controlling blood glucose level, it has been appeared to decrease the long-period complications of diabetes, including macrovascular disease. Few reports have addressed the metabolite profiling of metformin. The study was to evaluate if targeted metabolic profiling approach is sensitive enough to predict the therapeutic effects of metformin after a single oral dose.

**Methods:** A randomized, open-label, single-dose study was conducted in twenty eight healthy Korean male volunteers. To determine the concentrations of endogenous metabolites in their pre-dose and post-dose plasma samples, blood samples were collected before and at 2 and 6 h after a single oral dose of 500 mg metformin. Both Modular P/Modular D analyzer and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)-based metabolic profiling was performed.

**Results:** We quantified pre-dose and post-dose creatinine, blood urea nitrogen (BUN), lactic acid, 7 amino acids (lysine, glutamic acid, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophan), and 5 lysophosphatidylcholines (14:0, 16:0, 17:0, 18:0, and 18:1) using autoanalyser and UPLC-MS/MS. The postdose levels of alanine, lactic acid, glutamic acid, lysine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophan, and lysoPC (18:1) were slightly decreased with statistical significance, but there is no clinical significance.

**Conclusion:** In order to explore the potential endogenous metabolites associated with the therapeutic effects of metformin, further study including non-targeted (global) metabolite profiling is needed.

**Key words:** Metformin, Targeted metabolite profiling, UPLC-MS/MS

† 이들 저자는 본 연구에 대등하게 기여하였음.

본 연구는 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행하였으며(2011-0026030), 또한 보건복지부 보건의료연구개발사업(A070001) 및 차세대 맞춤형료 유전체사업(A111218-PG02) 지원에 의하여 이루어진 것임. 저자들은 이해상충과 관련하여 밝힐 것이 없음.

교신저자: 윤영린

소 속: 경북대학교 대학원 의과학과 및 경북대학교병원 임상시험센터

주 소: 대구광역시 중구 동인 2가 101번지 (우 700-422)

전화번호: 053-420-4950, 팩스: 053-420-5218, E-mail: yry@knu.ac.kr

접수일자: 2012. 11. 20. 수정일: 2012. 12. 11. 게재확정일: 2012. 12. 15.

## 서 론

메트포민(metformin)은 임상적으로 당뇨병 치료에 많이 사용되는 대표적인 약물 중 하나로, 특히 정상적인 신장 기능을 가지는 과체중, 비만환자에서 제2형 당뇨 치료의 일차 약물이며, biguanide 계열에 속한다(Figure 1). Metformin의 작용기전은 정확히 규명되지 않았으나, 혈당을 강하시키는 기전은 간에서 당 생성을 억제하고, 말초 조직에서 인슐린 저항성을 감소시키며, 소장에서 포도당의 흡수를 감소시키는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 또한 비만이 있는 제2형 당뇨병환자에서 sulfonylurea 계열의 약물보다 insulin이 효율적으로 작용하며, 체중 감소에도 효과가 있는 약물이다.<sup>3)</sup> Metformin의 체중효과에 대한 명확한 기전은 밝혀져 있지 않으나, 식욕 억제와 관련된다고 보고된다.<sup>1,3,4)</sup> Metformin의 생체이용률은 40-60 % 이고, 혈장 단백질과 결합하지 않으며 약물 섭취 후 6시간 이내에는 위장의 흡수가 거의 끝나는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 알려진 부작용으로는 신장기능의 장애, 드물게 lactic acidosis, 탈수 및 쇼크 등이 보고 되었다.<sup>5,6)</sup>

Metformin의 효능과 기전에 대해서 활발하게 연구 되어왔으나, 지금까지도 내인성 대사체를 이용한 연구는 많이 부족한 실정이다. 대사체학은 유전자나 단백질의 변화 유무를 연구하는 유전체학이나 단백질체학과 더불어 중요한 연구의 한 분야이다. 대사체는 세포내 과정의 마지막 산물로서, 유전적

요인뿐만 아니라 생리(병리)적 또는 환경적인 요인까지 잘 반영된 생명체의 표현형을 가장 잘 나타내는 저분자량의 생화학적 성분이므로, 이를 이용한 대사체 profiling 연구는 생체 내의 다양한 현상을 총체적으로 이해하는 데 도움을 줄 수있는 새로운 연구 분야이다.<sup>7)</sup> 본 연구에서는 특정 대사체를 분석하는 targeted metabolite profiling 기법으로 항당뇨병제제인 metformin 투여에 의한 혈중 내인성 대사체 농도 변화량을 분석하였으며, 대상 내인성 대사체로는 metformin의 부작용 중 신장기능의 장애를 예측할 수 있는 중요한 진단 지표인 creatinine과 blood urea nitrogen (BUN), lactic acidosis 유발과 관련된 lactic acid, gluconeogenesis에 관여되는 amino acid, metformin의 대표적인 약리작용 지표인 lysophosphatidylcholine (lysoPC) 등을 측정하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구는 문진, 신체검진 및 활력징후평가, 심전도 검사, 임상실험실검사를 시행하여 적합하다고 판단된 만 20세 이상 50세 이하의 건강한 한국인 남성 자원자를 대상으로 하였다.

본 연구는 서울아산병원 임상시험심사위원회(institutional review board, IRB)의 승인을 얻은 후 헬싱키 선언(Helsinki declaration) 및 의약품임상시험 관리기준(Korean Good Clinical Practice, KGCP) 규정을 준수하여 수행하였다. 모든 자원자들은 모두 사전에 연구의 목적, 내용 등에 대하여 충분한 설명을 듣고 자의에 의해 참여를 결정한 후 동의서에 서명하였다.

본 연구를 위하여 서울아산병원에서 임상시험을 진행한 후에 서울아산병원으로부터 연구에 사

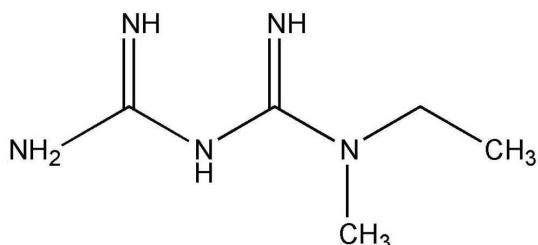


Figure 1. Chemical structure of metformin.

용되는 모든 혈장 샘플을 수령하여 경북대학교병원 임상시험센터에서 혈중 내인성 대사체를 측정하였다.

## 2. 연구방법

### 1) 연구설계

본 연구에서 내인성 대사체 측정을 위해 사용한 혈장 샘플은 서울아산병원에서 수행한 공개, 단회투여, 교차설계로 진행한 임상시험에서 대조약인 metformin hydrochloride(글루코파지<sup>®</sup>, 유유 제약) 500 mg을 240 mL의 물과 함께 단회 경구 투여한 이후에 채취하였다. 모든 피험자는 투약 이후 4시간 동안 금식하였으며, 입원기간 중에는 metformin의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 영향을 줄 수 있는 카페인 함유 음료나 자몽주스, 음주, 흡연 및 심한 운동을 일체 금하였다.

Metformin의 내인성 대사체를 측정하기 위하여 0(투약 직전), 투약 후 2, 6시간까지 총 3회로 채혈시간을 설정하여 각각 약 5 mL의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 즉시 heparinized tube에 담은 후 30분 이내에 4 °C에서 3000 rpm으로 10 분간 원심분리하여, 혈장시료를 취하여 보관용 eppendorf tube에 담아 농도 분석 시까지 -70 °C에 냉동 보관하였다.

임상 연구 기간동안 문진, 신체검진, 활력징후 평가, 임상실험실검사, 심전도검사 및 피험자의 자발적인 이상반응 보고를 통하여 안전성 평가가

이루어졌다.

### 2) 내인성 대사체 측정 및 통계분석

#### (1) 시약 및 기구

본 연구에서 creatinine과 blood urea nitrogen (BUN)의 혈장내 농도 측정은 Modular P/Modular D analyzer (Roche, USA)를 사용하여 Roche/Hitach사의 Creatinine kit와 BUN kit로 측정하였다. 다른 내인성 대사체인 lactic acid, 7 amino acids (lysine, glutamic acid, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophan), 및 5 lysophosphatidylcholines (14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 18:1)의 농도 측정을 위해서는 ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) 방법으로 ACQUITY<sup>™</sup> UPLC system (Waters, USA) 및 Quattro Premier XE<sup>™</sup> Micromass<sup>®</sup> triple quadrupole mass spectrometer (Waters, USA)를 이용하였다.

시약으로는 lactic acid, amityptiline, formic acid, lysine, glutamic acid, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophan 등은 Sigma-Aldrich사(USA)에서 구입하였고, lysoPC14:0, lysoPC16:0, lysoPC17:0, lysoPC18:0, lysoPC18:1은 Avanti lipids 사(USA)에서 구입하였다. 또한 내부 표준물질로 사용된 lactic acid-3,3,3-d<sub>3</sub>와 phenyl-d<sub>5</sub>-alanine은 CDNisotopes사(Canada)에서 구입하였다. 이동상 용매로 사용된 acetonitrile은 Merck사(HPLC grade, Germany)에서 구입하였으며, 2차 증류수는

**Table 1.** Analytical method for UPLC-MS/MS

Analytes	Linearity range of calibration curve (µg/mL)	Mobile phase buffer ratio (A:B, %)*	Flow rate (mL/min)	Run time (min)
Lactic acid	0.35 -150	40:60	0.17	2.5
Amino acid	1.5 -100	85:15	0.20	2.5
LysoPC	0.6 -100	20:80	0.20	4

\* A buffer: 0.1 % formic acid in DW; B buffer: 0.1 % formic acid in acetonitrile.

Millipore-milli Q™ (Tokyo, Japan)를 이용하여 제조하였다.

## (2) UPLC-MS/MS를 이용한 내인성 대사체 측정

UPLC 조건은 피크의 분리를 위한 분석컬럼은 AQUILITY™ UPLC BEH C<sub>18</sub> 컬럼(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm, Waters, USA)을 이용하였으며, 분석물질에 따라 검량선 농도, 이동상 비율, 유속, 분석시간을 설정하였고(Table 1), 각 분석물질의 모 이온(precursor ion)과 조개짐 이온(product ion)의 특성을 이용하여 multiple reaction monitoring (MRM) mode로 분석하였다(Table 2).

채취된 혈장 시료는 전 처리할 때까지 냉동보관(-70 °C) 하였으며, 검량선의 작성을 위한 표준품은 1 mg/mL로 만들어 냉장보관(4 °C) 하였으며, 분석시 증류수로 농도별 희석하였다. 각 분석물질에 따라 Table 1의 검량선 농도와 같이 되도록 공혈장(blank plasma) 90 μL에 표준시료 10 μL을 취하여 2000 rpm에서 10분간 vortex하였으며,

단백질 분리를 위하여 내부표준물질 10 μL와 acetonitrile 480 μL를 첨가하였다. 5분 동안 vortex 후 4 °C에서 30분간 방치한 후에, 4 °C에서 13200 rpm으로 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 물로 1:250배 희석하여 nylon filter (0.22 μm)로 여과시켜 분석 vial에 담아 5 μL를 주입하여 분석하였다.

## (3) 통계분석

Metformin 복용 이후에 각 내인성 대사체의 유의한 농도 변화가 있는지를 평가하기 위하여 반복 측정 분산분석(repeated measures ANOVA test)을 시행하고, P-value < 0.05인 경우에 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 이상의 통계분석은 SPSS® 18.0 (SPSS Korea Inc., Seoul, Republic of Korea) 프로그램을 이용하였다.

## 결 과

28명의 건강한 남성 피험자를 대상으로 하여

**Table 2.** Analytical condition of the MRM transition of UPLC-MS/MS

Standard compound	Precursor ion > product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision Voltage (V)	Mode	RT (min)
Lactic acid	88 > 43	25	9	negative	1.06
Lactic acid-3,3,3-d <sub>3</sub> (IS)	91 > 45	25	9	negative	1.35
Lysine	146 > 83	10	16	positive	0.83
Glutamic acid	147 > 84	15	16	positive	0.92
Alanine	89 > 44	13	10	positive	0.81
Valine	117 > 72	10	20	positive	0.90
Leucine	131 > 86	15	18	positive	0.99
Phenylalanine	165 > 120	15	10	positive	1.04
Tryptophan	205 > 146	15	18	positive	1.21
Phenyl-d <sub>5</sub> -alanine (IS)	170 > 124	17	24	positive	1.04
LysoPC (14:0)	468 > 183	30	25	positive	1.19
LysoPC (16:0)	496 > 183	25	20	positive	1.53
LysoPC (17:0)	510 > 183	40	30	positive	1.79
LysoPC (18:0)	524 > 183	40	30	positive	2.24
LysoPC (18:1)	522 > 183	20	30	positive	1.61
Amitryptiline (IS)	278 > 90	27	22	positive	0.78

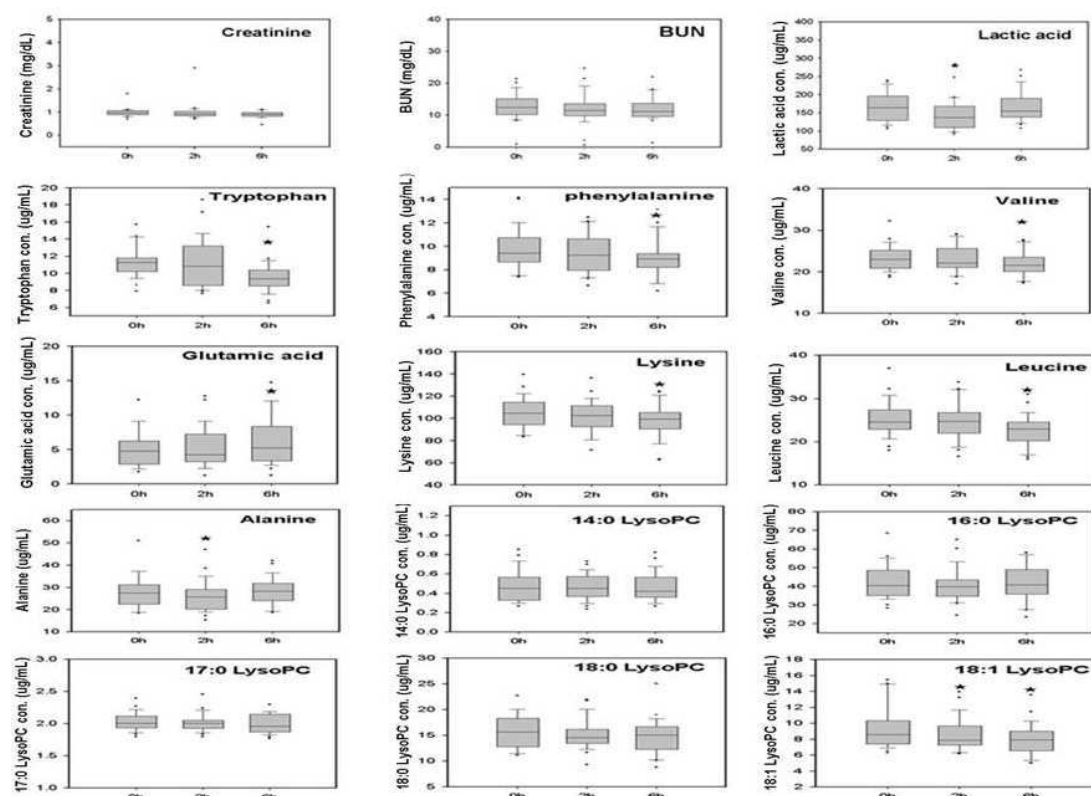
metformin hydrochloride 500 mg을 경구 투여하였으며, 약물 투여 전(0시간), 투여 후 2, 6시간에 채취한 혈장 내에서 측정된 targeted metabolite 농도의 시간에 따른 연속적인 변화를 비교하기 위하여 반복 측정 분산분석(repeated measures ANOVA test)를 시행함으로써 metformin 복용에 따른 내인성 대사체 농도 변화의 유의성 여부를 판단하였다.

Metformin 투약 이전의 각 내인성 대사체 농도를 기저치로 하여 연속적인 변화량을 repeated measures ANOVA test로 분석한 결과, 투약후 2 시간에는 alanine, lactic acid, lysoPC (18:1), 투약

후 6시간에는 glutamic acid, phenylalanine, lysine, valine, leucine, tryptophan, lysoPC (18:1) 농도가 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 BUN, creatinine, lysoPC (14:0), lysoPC (16:0), lysoPC (17:0), lysoPC (18:0) 등은 투약 전 후의 유의성 있는 변화가 없었다(Figure 2).

## 고 찰

본 연구에서는 특정 내인성 대사체를 분석하는 targeted metabolic profiling 방법으로 항 당뇨병제



**Figure 2.** Comparison of targeted metabolite concentrations at 0 (predose), 2h and 6h after a single 500-mg oral dose of metformin. Boxes indicate interquartile range and whisker bars indicate 10th and 90th percentiles. Horizontal bars located in the middle of the boxes represent the median values. \* P-value < 0.05, compared between baseline (predose) and 2h or 6h values by repeated measures ANOVA test.

제인 metformin의 경구투여 전과 투여 후 혈장에서 내인성 대사체의 농도 변화를 UPLC-MS/MS 시스템 등으로 측정하고 그 결과를 분석하였다.

Metformin의 경구 투약 후 최고 혈중 농도(maximum plasma concentration,  $C_{max}$ )가 약 2시간, 반감기는 5 - 6.2시간으로 보고되고 있으며, 투여 후 6 - 10 시간 이내에 약물 흡수가 거의 끝나는 것으로 알려져 있다.<sup>8,9)</sup> 따라서 본 연구에서는 metformin의 단회 투여 후 최고 혈중 농도 시간 및 그 직후의 초기 내인성 대사체 변화를 우선적으로 확인하기 위하여 투약 이전의 기저치와 비교하기 위한 혈장 채취 시간으로 투약 후 2시간 및 6시간을 설정하여 측정하였다.

Creatinine과 BUN은 단백질 대사과정 중에 생성되는 대사체로서, 신장기능의 대표적인 지표들이다. 본 연구에서 creatinine과 BUN의 농도가 유의하게 변화되지 않은 결과는 정상 신장기능을 가진 2형 당뇨병환자에게 metformin을 경구 투여하여 creatinine과 BUN의 농도가 미세하게 감소하는 다른 연구결과와 일치함으로써,<sup>5)</sup> metformin이 신장기능에 임상적으로 유의한 영향이 없음을 확인하였다.

Lactic acidosis의 중요한 지표인 lactic acid는 metformin 투약 전과 비교하여 투약 후 2시간에 유의성 있게 감소하였다. 따라서 lactic acidosis를 유발하지 않음을 확인하였다. 유럽과 캐나다에서 제2형 당뇨병환자에게 metformin을 투여하였을 때 lactic acidosis 발병률과 metformin을 투여하지 않은 환자의 lactic acidosis 발병률이 큰 차이가 없는 결과를 통해 metformin은 lactic acidosis를 유발하지 않는 안전한 약물로 확인되었다.<sup>10,11,12)</sup>

Metformin은 당 신생과정을 억제하여 혈액 내 혈당을 조절하게 되는데,<sup>13,14)</sup> 당 신생과정에 중요한 역할을 하는 amino acid의 농도가 감소하는 결과를 확인하였다. 본 연구에서는 metformin 투

약 후 2시간에는 alanine, 6시간에는 glutamic acid, lysine, valine, leucine, tryptophan의 혈중 농도는 유의성 있게 감소하였음을 확인하였으며, metformin으로 치료 중인 당뇨 환자의 연구 결과에서 이와 비슷한 결과를 확인하였다.<sup>13)</sup>

Lysophosphatidylcholine (lysoPC)의 농도는 metformin 투약 후 6시간의 lysoPC (18:1) 만이 유의성 있게 감소하였으며 나머지 lysoPC (14:0), lysoPC (16:0), lysoPC (17:0), lysoPC (18:0)의 혈중 농도는 약물 투약 전, 후 유의성 있는 차이가 없었다. 이는 metformin을 정상인에게 경구 투약하였을 경우 lysoPC (16:0), lysoPC (18:0), lysoPC (18:1)에서 유의성 있게 감소가 일어나는 연구와 상반된 결과로서, 기존의 연구에 있어서는 500 mg의 metformin을 하루에 두 번씩, 7일간 투약하였지만<sup>15)</sup> 본 연구에서는 500 mg을 단회투여한 이후 얻은 결과로서, 시험 디자인(약물투여 기간과 1일 투여량)의 차이로 인한 결과로 판단된다. 하지만 lysoPC (18:1)은 1일 단회의 투약만으로도 유의성 있게 감소하는 것을 보였으므로 metformin의 작용에 있어서 민감하게 반응을 하는 물질로 metformin의 작용을 판단하는 biomarker로 사용이 가능할 것으로 판단된다.

본 연구에서 이용된 targeted metabolite profiling 기법은 정확하고 빠른 농도 측정과 연관성 파악이 쉽고 명확하게 영향력을 파악할 수 있는 장점을 가지는 반면, 기존의 해당 약물에 대한 영향을 바탕으로 인체 내 수많은 대사체 중에서 예상되는 대사체를 한정적으로 측정하기 어려운 단점이 있다. 이와 비교하여 global metabolic profiling 기법<sup>7)</sup> 사용할 경우에는 수 많은 미지의 체내 약물반응 marker들에 대해서 세포 또는 조직내의 대사체의 거동, 분비 변화 등을 포괄적이고도 체계적으로 확인하고 정량함으로써 대사

체군을 생리, 병리적 상태와 연관짓고 약물 대사체 네트워크를 이해할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서 이용한 targeted metabolic profiling 방법의 한계성을 보완하기 위해서 향후 global metabolic profiling (non-targeted profiling) 기법으로 연구함으로써 본 연구를 보완해야 할 것으로 사료되는 바이다.

### 참고문헌

1. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. *BMJ*, 1995;310(6972):83-88.
2. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). A randomized trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1998; 21(1):87-92.
3. Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, Subbiah MT, Weber K, Illig E, Streicher P, Sieve-Smith L, Tracy TM, Lang JE, McCullough P. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metabolism*, 2001; 50(7):856-861.
4. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 1998;352(9131):854-865.
5. Liu F, Lu JX, Tang JL, Li L, Lu HJ, Hou XH, Jia WP, Xiang KS. Relationship of plasma creatinine and lactic acid in type 2 diabetic patients without renal dysfunction. *Chin Med J (Engl)*, 2009;122(21):2547-2553.
6. Tahrani AA, Varughese GI, Scarpello JH, Hanna FW. Metformin, heart failure, and lactic acidosis: is metformin absolutely contraindicated? *BMJ*, 2007;335(7618):508-512.
7. Jeong BC. Metabolomics in disease researches. *Molecular and Cellular Biology News*. 2006;3: 17-27. (Korean)
8. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*, 2011;50(2):81-98.
9. Lipska KJ, Bailey CJ, Inzucchi SE. Use of metformin in the setting of mild-to-moderate renal insufficiency. *Diabetes Care*, 2011;34(6): 1431-1437.
10. Kruse JA. Metformin-associated lactic acidosis. *J Emerg Med*. 2001;20(3):267-272.
11. Stades AM, Heikens JT, Erkelens DW, Holleman F, Hoekstra JB. Metformin and lactic acidosis: cause or coincidence? A review of case reports. *J Intern Med*, 2004;255(2): 179-187.
12. Chui W. Metformin and contrast media. *The Hongkong Medical Diary*, 2006;11(6):19-20.
13. Marchetti P, Masiello P, Benzi L, Cecchetti P, Fierabracci V, Giannarelli R, Gregorio F, Brunetti P, Navalesi R. Effects of metformin therapy on plasma amino acid pattern in patients with maturity-onset diabetes. *Drugs Exp Clin Res*, 1989;15(11-12):565-570.
14. Johnson AB, Webster JM, Sum CF, Heseltine L, Argyraki M, Cooper BG, Taylor R. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type II diabetes patients. *Metabolism*, 1993;42(9): 1217-1222.
15. Cai S, Huo T, Li N, Xiong Z, Li F. Lysophosphatidylcholine-biomarker of metformin action: studied using UPLC/MS/MS. *Biomed Chromatogr*, 2009;23(7):782-786.