

Capillary Column-GC/MSD 를 이용한 Acebutolol 의 분석에 관한 연구

朴鍾世¹·盧東錫·洪宗基

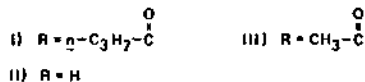
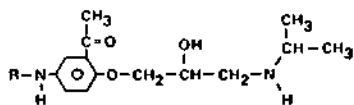
한국과학기술원 도핑컨트롤센터
 (1989. 2. 3 접수)

Capillary Column GC/Mass Spectrometric Assay with Selected Ion Monitoring for Acebutolol in Human Urine

Jong Sei Park¹, Dong Seok Lho, and Jong Ki Hong

Doping Control Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul 136 791, Korea
 (Received February 3, 1989)

Acebutolol은 β -blocker에 속하는 고혈압, 심장병 치료제로서 널리 이용되고^{1,2} 있지만, 양궁이나 사격 등 호흡조절과 관계가 있는 운동선수들이 복용할 경우 경기력을 향상시키기 때문에 국제 올림픽 기구에서는 참가선수들에게 acebutolol을 포함한 β -blocker를 금지약물로 규제하고 있다. 그러므로 acebutolol과 그의 metabolite의 분석은 의학적인 측면에서 뿐만 아니라 스포츠에서도 중요한 의미를 지니고 있다.

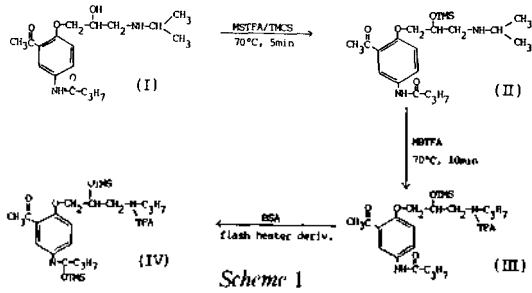


Chemical structures of acebutolol(I), its primary amine hydrolysis product(II), the acetyl-metabolite(III).

Acebutolol은 산 존재하에서 primary-arylamine 형태로 가수분해 될 뿐 아니라 gas chromatography(GC) 분석시 주입부의 높은 열에 의하여 side chain이 떨어져 생성된 phenol 형태와 탈수현상에 의해서 생성된 탄소-탄소간의 이중결합된 형태 등이 검출되는 열적 불안정을 나타내므로 정량, 정성분석이 어렵다. 이러한 열

안정도와 관련된 문제점을 해결하기 위한 분석방법으로 Thin Layer Chromatography³(TLC)와 High Pressure Liquid Chromatograph⁴(HPLC)를 사용한 보고가 있지만 감도가 좋지 못한 단점이 있다.

Meffin⁵은 GC-Mass Spectrometry(MS)로 분석하기 위하여 acebutolol의 극성기인 히드록시기와 아민기를 N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide(MSTFA)와 N-methyl-bis-trifluoroacetamide(MBTFA)를 사용하여 O-trimethylsilylation(OTMS), N-trifluoroacylation(NTFA)시켜 분석한 바 있다. 그러나 다른 극성기인 아마이드는 일반적인 유도체화 반응조건에서는 반응이 일어나지 않기 때문에 GC 분석에 있어서 낮은 감도 및 피이크 꼬리꼬림 현상이 나타나고 있다. 그러므로 본 연구에서는 acebutolol의 히드록시기와 아민기는 물론 아마이드기를 유도체로 만들어 줌으로써 지금까지의 GC 분석에서의 문제점들을 해결하였다. Acebutolol은 먼저 MSTFA/TMCS(Trimethylchlorosilane)(100/2), MBTFA를 사용하여 acebutolol-OTMS-NTFA 유도체로 만든 후, 아마이드기의 enol 형태인 iminol의 히드록시기를 TMS화시키기 위하여 N,O-bis(trimethylsilyl)



acetamide(BSA)를 사용하여 Flash-Heater Derivatization(FHD)⁶⁻⁸ 방법으로 Scheme 1에서 보는 것처럼 acebutolol-(OTMS)₂-NTFA 유도체를 만들어 GC/MSD로 분석하였다.

FHD 방법으로 생성된 유도체(IV)는 유도체(III)보다 GC/MSD 분석에 있어서 상당히 좋은 감도를 나타냈으며, 피이크도 꼬리풀림없이 대칭적으로 잘 나타났고 또한 짧은 머무름 시간을 보였다. 이 FHD 방법은 반응물질들을 GC 주입부의 높은 온도를 이용하여, 기체상태에서 반응시키는 방법이다. 즉 시료와 유도체화 시약을 GC에 함께 주입함으로써 반응성이 낮은 아미이드기는 BSA와 주입부에서 순간적으로 유도체반응을 일으켜 iminol-OTMS-ether 형태의 유도체가 얻어지게 된다. 이러한 유도체화 방법을 aryl-sulfonamide(-Ar-NH-SO₂-R) 또는 aryl-amide(-Ar-CO-NH₂)기를 가진 약물인 sotalol, atenolol 및 labetalol에 적용한 결과 sulfonamide기를 가진 sotalol의 경우 매우 잘 적용되었지만 아미이드기를 가진 atenolol과 labetalol은 반응과정 중 dehydration되어 nitrile기로 변하여 검출되었다.

본 실험에서는 반응과정(III)→(IV)의 FHD 방법에서 반응에 영향을 미치는 2가지 주요 요소를 조사하였다. 첫째는 유도체 시약의 선택이며, 이 실험에서 쓰인 시약으로서 MSTFA, BSA 및 N-trimethylsilylimidazole(TMSI)을 사용하였는데 Table 1에서 보듯이 BSA가 MSTFA보다 4배 정도 좋은 silylation화 반응이 나타났으며, TMSI의 경우 FHD 반응 과정 중 부산물이 생성되므로 이 실험에 적합하지 못했다. 둘째는 주입되는 BSA의 양을 조사하였다. 2, 3, 4 μl로 BSA의 양을 변화시킨 결과 Table 2에서 보듯이

Table 1. Derivatization of acebutolol with various reagents

	Peak area ratio		Peak height ratio	
	x, n = 5	r.s.d(%)	x, n = 5	r.s.d(%)
MSTFA	0.443	13	0.299	6.5
BSA	1.768	3.8	1.266	3.6
TSMI	-	-	-	-

Table 2. Effect of BSA volume injected on derivatization

	Peak area ratio		Peak height ratio	
	x, n = 5	r.s.d(%)	x, n = 5	r.s.d(%)
2 μl	1.611	5.42	1.069	5.90
3 μl	1.877	1.90	1.309	4.11
4 μl	1.905	4.47	1.351	7.24

3 μl와 4 μl일 때는 silylation되는 정도가 거의 차이가 없으나, 3 μl일 때 좋은 재현성을 나타내었다. 따라서 FHD 과정은 유도체 시약으로 BSA를 선택하고 시약 주입량은 3 μl로 정하여 수행되었다.

Acebutolol을 복용한 사람의 뇨에서 추출한 acebutolol과 acetyl-metabolite를 이 유도체화 방법을 적용하여 얻은 ion chromatogram과 mass spectrum을 Fig. 1에 실었다. Fig. 1에서 보듯이 ion chromatogram에 나타난 peak I, II는 acetyl-metabolite-(OTMS)₂-NTFA과

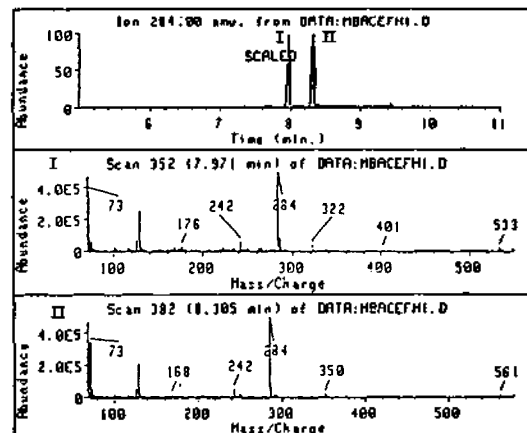


Fig. 1. Ion chromatogram and mass spectra of acebutolol-(OTMS)₂-NTFA(II) and acetyl metabolite-(OTMS)₂-NTFA(I).

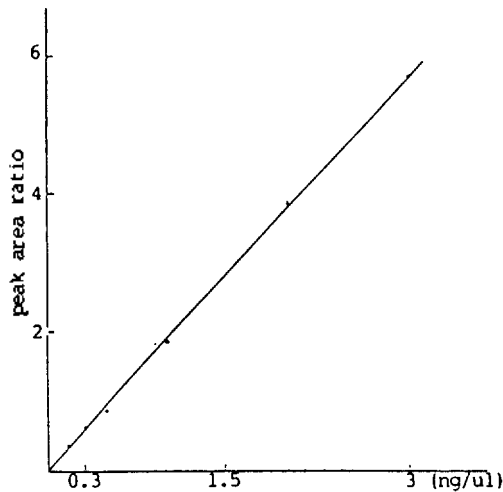


Fig. 2. Calibration graph for acebutolol.

acebutolol-(OTMS)₂-NTFA 유도체이다. 이들의 질량 스펙트럼에서 $m/z=576$ 과 548 은 각 유도체의 분자이온(M^+)으로써 비교적 낮은 존재비로 나타났으며, $m/z=561$ 과 533 은 TMS 유도체의 특성 피이크인 (M^+-15)에 해당하는 토막이온들이다. 그리고 $m/z=73$ 은 TMS기가 떨어져서 생성된 이온이며, 기준 피이크인 $m/z=284$ 는 side chain에서 inductive cleavage에 의해서 생성된 이온이다.

이 유도체화 반응의 직선성을 조사하기 위하여 GC/MSD-Selected Ion Monitoring(SIM) mode를 사용하였다. Acebutolol의 농도범위 $0.15\sim 3\text{ ng}/\mu\text{l}$ 에서 내부 표준물질로 propranolol를 사용하였다. SIM mode에서 사용한 이온 $m/$

$z=284, 561, 412$ 를 선택하여 피이크 면적비의 값을 취하여 calibration graph를 도시하였다 (Fig. 2). 이때 나타난 직선식은 $Y=0.0561X+0.0216$ 으로 나타났으며 직선 상관계수 $r=0.999$ 로 좋은 직선성을 나타내었다.

이 연구는 히드록시, 아민기 및 아마이드기, 또는 sulfonamide기 등 여러가지 기능기를 가진 화합물에 대해 히드록시기와 아민기를 -OTMS, -NTFA 형태로 선택적 유도체를 만든 후 반응성이 낮은 아마이드기나 sulfonamide기를 FHD 방법으로 TMS 유도체를 만들어 GC/MSD-SIM mode를 이용하여 분석함으로써 생체물질 등 존재하는 미량의 약물을 정량 및 정성분석하는데 이용하고자 한다.

인용 문헌

1. R. A. Winkle, P. J. Meffin, W. B. Ricks and D. C. Harrison, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **4**, 519 (1977).
2. C. M. Kaye, C. R. Kumana, M. Leighton and P. Turner, *Clin. Pharmacol. Therapeu.*, **19**, 416 (1976).
3. J. M. Steyn, *J. Chromatogr.*, **120**, 465 (1976).
4. P. J. Meffin, S. R. Harapat, Y. G. Yee and D. C. Harrison, *J. Chromatogr.*, **138**, 183 (1977).
5. P. J. Meffin, S. R. Harapat and D. C. Harrison, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **15**, 31 (1976).
6. A. S. Christophersen, E. Hovland and K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr.*, **234**, 107 (1982).
7. A. S. Christophersen and K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr.*, **174**, 454 (1976).
8. A. S. Christophersen and K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr.*, **192**, 363 (1980).