

GC/MS를 이용한 소변중의 Cyclofenil 및 그 대사체의 분석

명승운* · 민혜기 · 조현우* · 김동현 · 김명수

한국과학기술연구원 도핑컨트롤센터

*경기대학교 이과대학 화학과

(2002. 1. 9 접수)

Analysis of Cyclofenil and its Metabolites in Human Urine using GC/MS

Seung-Woon Myung* · Hye-Ki Min · Hyun-Woo Cho* · Dong-Hyun Kim, Myungsoo Kim

Donping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 136-791, Korea

*Department of Chemistry, KyongGi University, Suwon, Kyonggi-do 442-760, Korea

(Received Jan. 1, 2002)

요 약 : Cyclofenil은 국제올림픽위원회(IOC)에서 금지약물로 규정하고 있다. 이에 따라 본 실험에서는 GC/MS를 사용하여 소변으로부터 cyclofenil의 복용여부를 검사할 수 있는 방법을 만들었다. 이를 위하여 cyclofenil 및 그 대사체들의 추출 회수율을 측정하였는데 pH 5-9 사이가 최적의 추출 조건이었으며, 소변으로는 모 약물인 cyclofenil은 배설되지 않아서 검출하지 못하였고 대신에 그 대사체들을 검출함으로써 cyclofenil의 복용여부를 검출할 수 있었다. 따라서 대사체들은 가수분해 후 pH 9.6에서 에테르로 추출하여 MSTFA로 유도체화시켜서 GC/MS로 분석하였다.

Abstract : International Olympic Committee (IOC) prohibits the use of cyclofenil for male. To prove whether cyclofenil product was taken or not, the analytical method in urine using GC/MS was established. The extraction recoveries of cyclofenil and its metabolites were higher in the range of pH 5-9. Because the parent drug (cyclofenil) was not excreted in urine, metabolites were detected and these were used as a criteria of cyclofenil dose. Therefore the metabolites were hydrolyzed, extracted at pH 9.6, derivatized with MSTFA and analyzed by GC/MS.

Key words : cyclofenil, metabolite, doping, GC/MS

1. 서 론

Cyclofenil [4,4'-(cyclohexylidene)methylene]bis(phenyl acetate), CFN]은 에스트로겐 성질과 항 에스트로겐 성질을 동시에 가지고 있는 diphenylethylene계 유도체로써 그 구조는 Fig. 1과 같다. 분자량은 364이며, 물에 대한 용해도는 매우 작고 알코올에는 매우 잘 녹는

백색의 분말형태이다. CFN은 1963년 스웨덴의 Uppsala 대학의 Miquel에 의해 최초로 합성되었는데, 우수한 배란유발 효과로 인해 무배란성 불임 환자에게 불임치료제로서 세계 각국에서 널리 이용되어 오던 중, 1968년 Netter에 의해 CFN이 노중 FSH(Follicle stimulating hormone, 난포자극호르몬) 배설을 감소시킨다는 사실이 밝혀짐으로써 이 약물이 폐경기 장애에 사용될 수 있음이 제안되었다.¹ 또한, CFN의 장기투여로 폐경기의 자율신경계 이상증상을 경감시킬 수 있다²는 사실이 밝혀진 이후, 이탈리아의 Poli사에서 폐경기 장애

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-958-5104, Fax : +82+(0)2-958-5059

E-mail : swmyung@kist.re.kr

치료제로써 Neocylm이라는 상품명으로 1982년 발매되어 지금까지 사용되어 오고 있다.

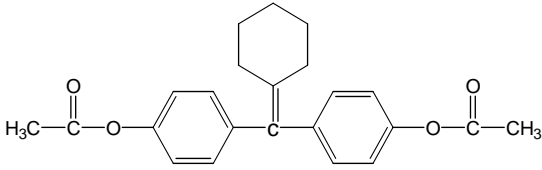


Fig. 1. Chemical structure of cyclofenil

CFN은 시상하부에서 난소 호르몬 수용체와 결합하여 시상하부-뇌하수체 기능상태에 따라 폐경기 여성에게 약한 에스트로겐 효과를 나타냄으로써 에스트로겐 감소로 인한 각종 폐경기 증후군 (안면홍조, 감각이상증, 심계항진, 두통, 불안, 초조, 우울증, 발한, 골조송증 등)을 개선시킨다. 또한 가임기의 무배란 여성에게는 항 에스트로겐 효과를 나타냄으로써 성선 자극 호르몬의 분비를 증가시켜 배란을 유발시키는 작용을 한다. CFN과 비슷한 효과를 지니고 있는 estradiol valerate, placebo 등은 환자에게 투여시 동등한 임상적 결과를 얻었지만 치료말기에 경도의 체중증가와 유방통 등의 부작용을 수반하는 경우가 있고, 특히 유방암을 일으킬 수 있는 prolactin 농도의 현격한 증가가 발견된 바 있으나, CFN 투여시에는 이러한 부작용이 나타나지 않은 것으로 보고되어 있다.³ 그러나 CFN이 생체내에서 내인성 스테로이드의 생성을 증가시킨다는 성질이 오용되어 일부 운동선수들이 이러한 약물을 임상적 치료 목적 이외에 근육강화와 지구력 향상, 체력 증진 등의 경기력 향상을 목적으로 스포츠에 오·남용하고 있는 경우가 있으므로, 국제 올림픽 위원회 (IOC)에서 남성에 대해서는 이를 금지약물로 규정하여 규제하기 시작하였다.⁴

Cyclofenil에 대한 소변에서의 분석 연구는 거의 되어 있지 않고 혈액에 대한 분석연구는 발표된 논문들이 있다.^{5,6} 이와 같은 맥락에서 본 연구에서는 금지약물로 새롭게 추가된 CFN과 그의 대사체에 대한, 분석 방법을 연구하게 되었다.

2. 실험

2.1. 분석기기 및 시약

본 실험에 사용한 기기는 시료의 분석을 위해

Hewlett-Packard사의 HP 5890 GC에 direct interface로 연결된 5970 Mass Selective Detector (MSD)를 사용하였다. 컬럼은 Ultra-2 (Hewlett-Packard, 길이 17 m, 직경 0.20 mm, 필름두께 0.33 μ m)를 사용하였다.

경구투여용 cyclofenil은 (주)대원제약의 제품을 사용하였고, 표준품도 (주)대원제약으로부터 공급받아 메탄올에 녹여 1000 μ g/ml 표준용액을 만들어 사용하였다.

시료 전처리 과정에 있어서 산화방지를 위해 사용한 L-cysteine은 Sigma사 (미국)로부터 구입하였고 pH 조절을 위해 사용한 5 N potassium hydroxide 용액은 KOH (Junsei사, 일본)를 증류수에 용해시켜 사용하였다. Sodium sulfate는 Aldrich사 (미국)로부터 구입하여 사용하였으며 유도체화 시약인 MSTFA는 Sigma사(미국)로부터 구입하였다.

2.2. 실험과정

2.2.1 뇨 시료의 채취와 표준용액의 제조

실험에 사용한 뇨 시료는 건강한 성인남자 (나이 : 42세, 체중 : 65kg)에게 cyclofenil 200 mg (200 mg/1 Tab)을 일회 복용시킨 뒤 0~48 시간 사이 동안에 채취하였으며 분석 전까지 2~3 $^{\circ}$ C의 냉장상태에서 보관하여 사용하였다. Cyclofenil의 표준용액은 표준품을 메탄올에 용해시켜 1000 μ g/ml가 되도록 제조한 후 희석하여 사용하였다. 이들 표준용액도 모두 암소에서 냉장 보관하여 사용하였다.

2.2.2 pH에 따른 cyclofenil 표준물질의 절대 회수율 및 대사체의 상대 회수율 시험

용액의 pH 변화에 따른 cyclofenil의 절대 회수율 조사를 통해 최적의 추출조건을 알아내고자 10 μ g/ml 농도에서 회수율 시험을 3회씩 실시하였다. Cyclofenil을 복용하지 않고 채취한 소변 5 ml에 cyclofenil 표준용액 (1000 μ g/ml)을 각각 25 μ l와 50 μ l씩 가한 후, 추출용매인 에테르를 2 ml씩 넣어준 뒤 3 N HCl과 5 N KOH를 사용하여 pH를 1, 3, 5, 7, 9, 11로 조절하였다. 염석효과를 위해 sodium sulfate를 약간 넣어준 뒤 진탕기를 사용하여 20분간 진탕시켜 추출하였다. 이 용액을 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 -30 $^{\circ}$ C의 냉동기를 사용하여 유기층과 수층을 분리하였다. 유기층을 다른 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질 (toliprolol)을 가하여 GC/MSD에 2 μ l를 주입하였다.

대사체들에 대한 상대 회수율 실험은 표준품이 없기 때문에 약물 복용 후 채취된 소변을 통해서 회수율 실험을 하였다. Cyclofenil과 마찬가지로 pH를 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13으로 소변의 pH를 조절한 후 에테르로 추출한 후 MSTFA로 유도체화를 시킨 후 GC/MSD로 분석하였으며 자세한 실험절차는 아래 기술된 바와 같다.

2.2.3 유도체화 과정 및 GC/MSD 분석

5ml 뇨 시료를 원심분리 시험관에 취하고 6 N 염산 용액과 L-cysteine 100 mg을 가한 후 105°C에서 30분 동안 가수분해시킨다. 시험관이 냉각된 후 에테르 5 ml를 가하고 10분 동안 진탕기에서 진탕시킨 후 2500 rpm에서 5분 동안 원심분리 시킨다. 유기층을 취하여 다른 시험관에 옮기고 5 N KOH를 사용하여 pH를 조절하고, t-butanol 0.5 ml와 에테르 5 ml를 넣은 후 sodium sulfate 3 g을 넣어서 20분 동안 진탕시키고 5분 동안 원심분리시켜서 에테르층을 반응용 시험관으로 옮겼다. 질소기체를 사용하여 에테르를 완전히 말린 후 methyl orange가 200 µg/ml이 포함된 acetonitrile-trifluoroacetic acid (60:40, v/v) 혼합용액 50 µl로 추출물을 용해 시킨다. 유도체화 시약인 MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)를 90 µl를 가하여 80°C에서 10분간 반응시켜 유도체 반응을 완결하였다. 시료를 실온에서 냉각시킨 뒤 GC/MSD에 2 µl를 주입하였다.

바탕실험(blank urine)을 위해 cyclofenil을 복용하기 전의 뇨 시료를 같은 과정을 거쳐 처리한 뒤, 같은 조건에서 GC/MSD에 2 µl 주입하여, 복용하기 전과 후를 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. GC/EI-MS에 의한 cyclofenil 및 그 대사체 확인

기체 크로마토그래프에 분석하기에 적합한 성질로 만들기 위하여 cyclofenil 및 대사체는 TMS 유도체를 시켜서 극성을 감소시키고 휘발성이 큰 형태로 만든 후 GC/EI-MS에 주입하여 각각의 이온화 방식에서 크로마토그램과 질량 스펙트럼을 얻었다. 대사체의 확인을 위해서는 cyclofenil을 복용하기 전의 뇨 시료(blank sample)와 복용 후의 뇨 시료에 대한 크로마토그램을 비교함으로써 대사체를 확인 할 수 있었는데 이를 Fig. 2에 나타내었다. 이와 같은 비교 분석에 의하면

모 약물인 cyclofenil 자체는 소변시료에서는 검출되지 않았다. 따라서 대사체로 추정되는 물질을 9.53분과 10.52분에서 검출하였다.

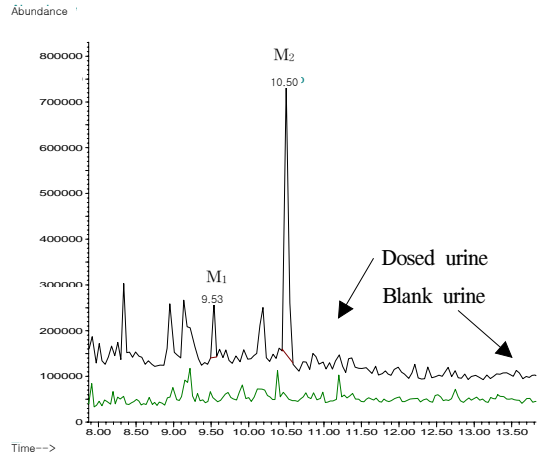


Fig. 2. The compared GC/EI-MS chromatograms obtained a dosed urine (upper layer) and a blank urine sample (lower layer).

대사체들에 대한 질량스펙트럼은 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 9.53분에서 검출된 대사체는 분자량이 424 (Fig. 3)로 측정되었는데 나타내었는데, 이는 CFN의 구조에서 아세틸기가 두 개가 떨어진 히드록실기 형태로 변한 대사체에 TMS가 두 곳에 결합된 형태이며, m/z 409는 분자이온에서 메틸기가 하나 떨어진 이온이다. 분자량 424의 이 물질을 M_1 이라고 표시하였다.

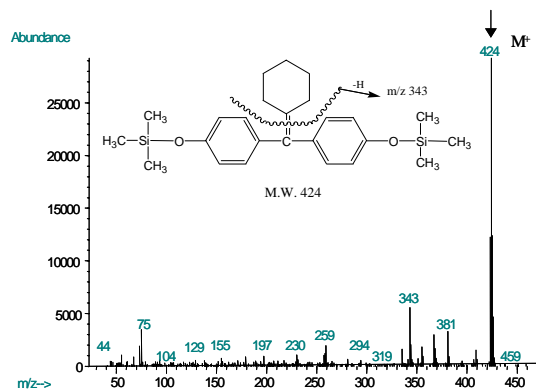


Fig. 3. GC/EI-MS spectrum of the derivatized (bis-O-TMS) metabolite M_1

10.52분에서 보여진 스펙트럼 (Fig. 4)에서 대사체 (M_2)는 분자이온이 m/z 512에서 측정되었는데, 분자량 512는 대사체 M_1 의 cyclohexyl기에 hydroxylation된 형태가 TMS 작용기와 유도체화 반응에 의해 결합된 형태이다. M/z 497은 여기에서 메틸기가 하나 떨어져 나간 이온이다.

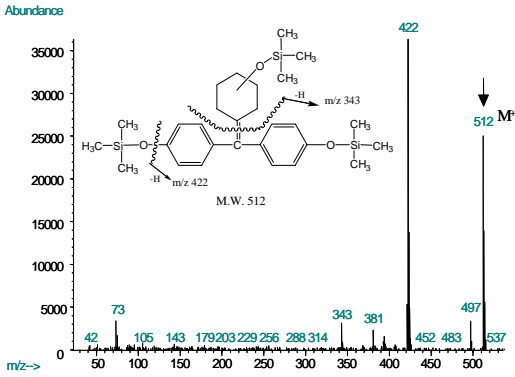


Fig. 4. GC/EI-MS mass spectrum of the derivatized (tris-O-TMS) metabolite M_2 .

3.2 추출 회수율

여러 pH (1, 3, 5, 7, 9, 11)에서 cyclofenil 표준물질에 대해서는 절대 회수율을 조사하였으며, 그 대사체들에 대해서는 pH에 따른 상대적인 추출 회수율 시험을 실시하였다. 그 결과 모 약물인 cyclofenil은 산성조건에서 높은 회수율 및 좋은 반복성을 나타내는 가운데 pH 5에서 가장 높은 절대 회수율(93.7%)을 나타내었으며 염기성에서는 추출 회수율이 낮고 반복성도 좋지 않았다(Table 1). 하지만 모 약물은 소변에서는 검출되지 않으므로 실제 약물검사시에는 대사체의 추출 pH가 중요할 것이다.

Table 1. Extraction recoveries of cyclofenil

| pH | 10 μ g/ml | | | | | |
|--------------|---------------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 |
| Recovery (%) | 77.5 | 89.1 | 95.7 | 46.5 | 29.2 | 35.6 |
| | 85.3 | 77.9 | 86.3 | 37.5 | 37.1 | 29.4 |
| | 79.9 | 83.7 | 99.2 | 43.2 | 31.3 | 38.9 |
| Average (%) | 80.9 | 83.6 | 93.7 | 42.4 | 32.5 | 34.6 |
| RSD (%) | 5.0 | 6.7 | 6.7 | 10.5 | 13.1 | 12.4 |

따라서 cyclofenil의 복용여부를 판단하는 대사체에 대한 회수율이 pH에 따른 상대적인 추출 회수율(가장 높은 피크 적분값(pH 7)에 대한 상대적인 적분값)을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다. 대사체 M_1 은 pH 7이상에서 거의 일정한 회수율을 나타내었으며, M_2 의 경우는 pH 5-9사이에 높은 회수율을 나타내었고 pH 9이상의 염기성 조건에서는 회수율이 서서히 감소하다가 pH 11이상에서는 급격하게 감소하였다.

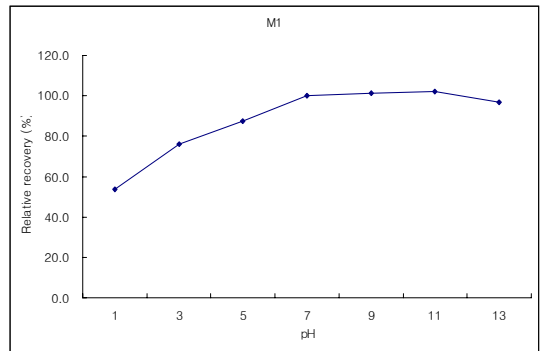


Fig. 5. Relative extraction recovery of the metabolite M_1 .

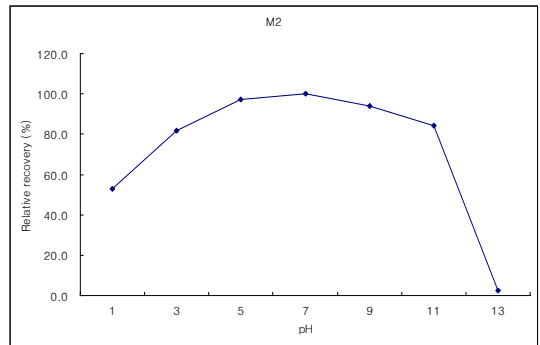


Fig. 6. Relative extraction recovery of the metabolite M_2 .

이와 같은 결과로부터 cyclofenil의 대사체 분석에서는 추출시 pH는 7-9사이가 적절함을 알 수 있었다. 따라서 회수율에서 큰 손실없이 기존의 약물검사 방법에서 동시에 분석하고 있는 베타-차단제, 마약류와 동시에 분석 (pH는 9.6에서 추출)이 가능하였다.

4. 결론

본 연구에서 나온 결과들로부터 cyclofenil의 복용

여부를 소변으로 검사하기 위해서는 그 대사체인 M_1 과 M_2 를 GC/MS로 검출함이 타당하며, 이들 화합물의 추출율은 pH 7-9 정도가 적절하며 GC/MS 분석을 위한 유도체화 방법도 적절함을 알 수 있었다. 이와 같이 확립된 GC/MS에 의한 소변 시료중의 cyclofenil 대사체 분석법은 cyclofenil의 복용여부를 판단할 수 있는 방법이 되므로 국제올림픽위원회 (IOC) 및 각 경기단체에서 금지하고 있는 cyclofenil의 복용여부를 검사하는데 적용할 수 있으며, 법의학, 임상의학 측면에서도 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 국가지정실(NRL) 사업 (N23020)의 연구비 지원을 받아 수행된 과제이며 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. L. Schubert, *Acta Europeae Fertilitatis.*, **8**, 83(1973).
2. R. A. Roeder, M. J. Garber and G. T. Schelling, *J. Anim. Sci.*, **76**, 142-151(1978)
3. P. H. Slee and D. H. Stevenson, *Cancer and Chemotherapy.*, **42(6)**, 512-514(1988)
4. International Olympic Committee, "Olympic Movement Anti-Doping Code, Appendix A.", Lausanne, Switzerland, 2001
5. L. Borgstroem, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **19(3)**, 213-16(1981)
6. E. M. Hassan, M. A. El Sayed and E. F. Khamis, *Pharma Sci.*, **4**, 305-308(1994).
7. Doping Control Center, "Reaccreditation for Antidoping Analysis: Test Report", KIST, Seoul, Korea, Nov. 2001.