

GC/MS를 이용한 carteolol의 대사 및 배설연구

민혜기 · 김명수 · 조현우* · 김택제* · 김동현 · 명승운*

한국과학기술연구원 도핑컨트롤센터

*경기대학교 이과대학 화학과

(2002. 8. 22 접수)

Study on Metabolism and Excretion of Carteolol in Human Urine using GC/MS

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

Doping 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 Aug. 22, 2002)

요 약 : Carteolol은 국제올림픽위원회 (IOC)에서 금지약물로 규정하고 있는 β -차단제 중의 하나이다. 본 실험에서는 GC/MS를 사용하여 사람의 소변으로부터 carteolol의 복용 여부를 확인하기 위한 검출방법 및 대사와 배설에 대해서 고찰하였다. 이를 위하여 효소 가수분해방법과 산 가수분해방법을 비교하여 보았는데 효소가수분해방법이 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 효소 가수분해방법을 이용하여 실험한 결과 RSD 10%내외의 정밀도와 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 제외하고는 오차 5% 이내의 좋은 정확도를 보여주었으며 회수율은 78.5%로 나타났다. Carteolol은 소변에서 대부분이 free carteolol과 conjugated carteolol로 존재하며 소량의 p-OH-carteolol로 대사됨을 알 수 있었으며 모 약물로 배출되는 양 중 conjugated form이 59.4%로 나타났다. 소변으로 배출된 carteolol의 양을 측정된 결과 복용량의 49%가 복용 후 72시간까지 모 약물로 배출됨을 알 수 있었다.

Abstract : International Olympic Committee (IOC) prohibits the use of carteolol which is one of β -blockers. To prove whether carteolol product was taken or not, the analytical method in urine using GC/MS was established, and metabolism and excretion study were evaluated. As compared with acid hydrolysis, enzyme hydrolysis method was more efficiency. Coefficients of variation for intra-assay precision was around 10%. Error was less than 5% except the concentration of 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Recovery was 78.5% at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Free carteolol, conjugated carteolol, and small amount of p-OH carteolol were found in dosed human urine samples. The conjugated form was being 59.4% of the total carteolol in human urine. The amount of carteolol renal excreted for 72 h after oral dose of 10 mg of carteolol was 49% of the administered dose.

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

1. 서 론

Carteolol hydrochloride (5-(3-tert-butylamino-2-hydroxy)propoxy-3,4-dihydrocarbostyryl · HCl)는 고혈압, 심장신경증, 부정맥, 협심증 등의 치료제로 널리 사용되는 β -차단 효과를 가진 β -아드레너지 수용체 (β -adrenoceptor) 길항약

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-958-5104 Fax : +82+(0)2-958-5059
E-mail : swmyung@kist.re.kr

이다.¹² 하지만 국제올림픽위원회-의무분과 (IOC-MC)에서는 carteolol을 금지약물로 규정함으로써 carteolol의 근본목적인 치료제로 사용하지 않고 경기력 향상을 위해 복용하는 것을 감시하고 있다.³

소변 또는 혈액으로부터 carteolol의 분석을 위하여 HPLC^{4,6}를 사용하였는데 UV/Vis 검출기나 ECD를 사용하여 in vitro 대사시험 또는 약동력학 시험을 수행하였고, GC/MS^{7,8}를 이용한 경우는 PFB유도체화 반응을 시킨 후 화학음이온화 (NCI)방법을 사용하였으며, GC-NPD^{9,10}를 사용하기 위해서 cyclic boronate 유도체를 만들어 분석한 결과들이다. 하지만 이들 논문 가운데서도 carteolol의 phase I과 phase II에 관한 연구는 되어 있지 않다.

약물은 복용후 체내에서 독성을 감소시키고 배설되기 쉽도록 친수성 물질로 대사되는데 phase I과 phase II 과정이 있다. Phase I 과정에 의해서는 화합물의 기능기가 극성 기능기로 전환되는데 배설될 때는 phase I 대사물질로 체외로 배설되거나 더 친수성 물질인 glucuronide가 붙은 conjugation 형태의 phase II 대사물질로 배설되기도 한다. 하지만 경우에 따라서는 모약물이 phase II 대사를 이루어 배설되는 경우도 있다. 따라서 배설물인 소변에는 모약물, phase I 대사체, phase II 대사체가 혼재되어 있는 상태이므로 carteolol이나 그 대사체를 검출하기 위해서는 모 약물이나 phase I 대사체만을 측정하는 것이 일반적인 방법이다. 이는 phase II 대사체가 너무 극성이 크기 때문에 기체크로마토그래프나 액체크로마토그래프로 검출하기 어려운 점도 있기 때문이다. 따라서 가수분해 과정을 통해서 glucuronide가 떨어진 phase II 상태의 대사체

(conjugated 형태)를 모약물이나 phase I 상태의 대사체 (free 형태)로 변환시킨다. Carteolol의 경우 모약물과 phase I 대사체인 *p*-OH-carteolol, 그리고 이들에 대한 phase II 대사체로 배설되는 것으로 알려져있다.⁹ (Fig. 1)

본 연구에서는 아직까지 사람의 뇨를 통한 배설 형태나 양상이 알려지지 않은 carteolol을 복용 후 소변시료에서 carteolol 모 약물의 free와 conjugation 형태의 양을 측정함으로써 약물의 배설 형태를 알아보았으며, 또한 산 가수분해와 효소에 의한 가수분해의 효율성도 아울러 측정하였다. 이 실험결과는 운동선수들의 약물복용검사를 비롯하여 약물치료에 응용될 수 있을 것이다.

2. 실험

2.1. 분석기 및 시약

본 실험에 사용한 기기는 Agilent 6890N gas chromatograph/ 5973N Mass Selective Detector (GC/MSD) (Agilent, Palo Alto, USA)를 사용하였다. 시료 농축을 위하여 사용한 질소 농축기는 Zymark사의 TurboVap LV evaporator (Zymark, Hopkinton, USA)를 사용하였다.

경구투여용 carteolol은 한국오츠카제약의 미케란정을 사용하였으며, 표준물질은 물에 녹여 1000 µg/ml 농도로 만들어 분석시 희석하여 사용하였다. 시료 전처리 과정에 사용한 모든 유기용매는 HPLC용 (J. T. Baker, NJ, USA)을 사용하였으며, 가수분해를 위해 사용된 효소인 β-glucuronidase/Arylsulfatase (from *Helix pomatia*)는 Roche Diagnostics사 (독일)로부터 구입하였다. 유도체화 시약인 MSTFA와 MBTFA는 Pierce사 (미국)로부터 구입하였다.

2.2. 실험과정

2.2.1. 뇨 시료의 채취

실험에 사용한 뇨 시료는 건강한 성인남자 (나이 : 42세, 체중 : 65 kg)에게 carteolol 10 mg (5 mg/1 Tab)을 일회 복용시킨 후 0~72 시간 사이 동안에 채취하였으며 분석 전까지 2~3 °C의 냉장상태에서 보관하여 사용하였다. 바탕실험을 위한 바탕시료를 위해 carteolol 복용 전에 뇨 시료를 채취하여 사용하였다.

2.2.2. 시료 전처리

(1) 효소가수분해 (enzyme hydrolysis) 방법

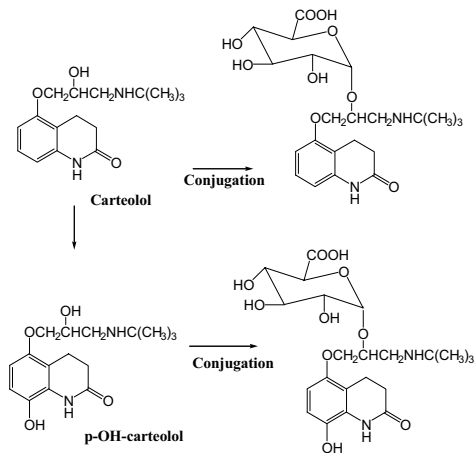


Fig. 1. Metabolism of the carteolol.

노 시료 5 mL를 시험관에 취한 후 1 N acetate buffer (pH 5.2) 1 mL와 β -glucuronidase/arylsulfatase 50 μ L를 넣은 후 55 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 가수분해 시킨 후 내부표준물질인 toliprolol 20 μ L (200 μ g/mL)를 넣고, Na_2CO_3 : NaHCO_3 (1:2)를 사용해 pH를 9.6으로 맞추는 후 diethylether 5 mL로 추출하였다. 이때 염색효과를 위해서 t-butanol 0.5 mL와 sodium sulfate 3 g을 첨가한 다음 진탕기에서 20분간 흔들어 준 뒤 2500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이 용액 중 유기층만 취하여 다른 시험관에 옮기고 질소기체를 사용해 완전히 건조시켰다.

(2) 산가수분해 (acid hydrolysis) 방법

효소가수분해 방법과 비교하기 위해 산가수분해 방법을 실시하였다. 노 시료 5 mL를 시험관에 취한 후 100 mg의 L-cysteine과 6N HCl 1 mL를 넣고 105 $^{\circ}$ C에서 30분간 가수분해시켰다. 시험관을 실온까지 냉각시킨 후에 5 mL의 diethylether를 넣고 10분간 진탕기에서 흔들어 준 후 원심분리하여 유기층은 버렸다. 남은 수층에 내부표준물질인 toliprolol 20 μ L (200 μ g/mL)를 넣고 위의 효소가수분해 전처리 방법과 같은 방법으로 pH를 9.6으로 맞추고 5 mL diethylether로 추출하여 유기층을 취한 뒤 질소기체로 완전히 건조시켰다.

2.2.3. 유도체화 과정

질소기체를 사용하여 유기층을 모두 건조시킨 잔사에 methyl orange가 200 μ g/mL이 포함된 acetonitrile-trifluoroacetic acid (60:40, v/v) 혼합용액 50 μ L를 넣어 추출물을 용해 시켰다. 유도체화 시약인 MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) 90 μ L를 가하여 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 다시 MBTFA (N-methyl-bis-(Trifluoroacetamide))를 10 μ L 가하여 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 유도체 반응을 완결하였다. 시료를 실온에서 냉각시킨 뒤 GC/MS에 2 μ L를 주입하였다.

2.2.4. 분석기기의 조건

기체 크로마토그래프-질량분석검출기 (GC/MS)에 사용된 모세관 컬럼은 길이가 17 m, 내경이 0.2 mm, 필름두께가 0.33 μ m인 Ultra-1 (Agilent, U.S.A.)을 사용하였고 이동상으로 사용된 헬륨기체의 흐름속도는 0.8 mL/min이었으며, 주입방식은 분할방식 (10:1)을 사용하였다. 주입구의 온도는 280 $^{\circ}$ C, 연결장치의 온도는 300 $^{\circ}$ C이었으며, 오븐 온도는 초기 140 $^{\circ}$ C에서 분당

20 $^{\circ}$ C/min의 승온 속도로 300 $^{\circ}$ C까지 올린 후 6분간 머물게 하였다.

질량분석기에 사용된 이온화 방법은 전자충격이온화법 (EI)으로 이온화 에너지는 70 eV로 사용하였으며 이온원의 온도는 230 $^{\circ}$ C이었고 정량을 위한 검출방식은 선택이온검색법 (SIM)을 사용하였다.

3. 결 과

3.1. GC/MS에 의한 분석

2.2절에서 명시한 방법대로 소변을 가수분해시킨 후 추출과정에 따라 염기성 조건 (pH 9.6)에서 diethylether로 추출한 후 기체크로마토그래프 성질을 개선하기 위해 TMS 유도체화반응 후 GC/MS로 분석한 결과는 다음과 같다.

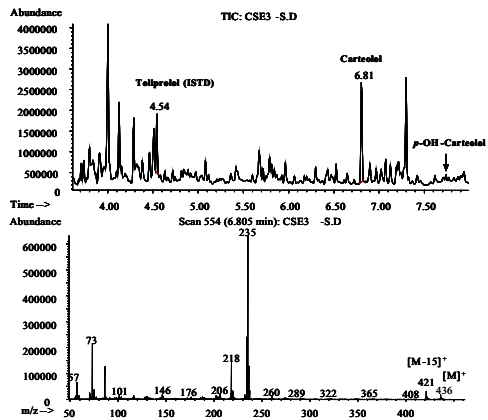


Fig. 2. Total ion chromatogram (upper) and mass spectrum of carteolol (lower) obtained from human urine sample.

Fig. 2는 carteolol 복용 후 11시간 경과 후 소변에서 검출한 결과로서, 내부표준물질인 toliprolol은 4.54분에서 검출되었고 carteolol 유도체인 carteolol-2TMS는 6.81분에서 검출되었다. Carteolol-2TMS의 분자량을 나타내는 분자이온[M]⁺이 m/z 436에서 측정되었고 [M-CH₃]⁺가 m/z 421에서 나타났다.

기준봉우리인 m/z 235는 [M - CH₂-CH (O-TMS) CH₂NHC (CH₃)₃+H]⁺이며 m/z 218은 [M - O-CH₂-CH (O-TMS) CH₂NHC (CH₃)₃]⁺를 나타낸다. Carteolol 표준물질

질을 같은 방법으로 유도체화시켜서 GC/MS로 분석하였는데 머무름 시간과 질량스펙트럼이 정확하게 일치하였다.

실제 시료분석에서는 감도를 높이기 위해서 선택이온검색법(SIM)을 사용하였으며, 사용된 이온으로는 내부표준물질로 사용한 toliprolol의 경우 m/z 129, 133, 284 이며 carteolol의 경우 m/z 218, 235, 421 이온을 선택하여 측정하였다.

3.2. 유효성 시험

Carteolol의 소변중 농도를 측정하기 위하여 선행된 검정곡선이 Fig. 3에 나타났는데 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 작업구간에서 $r^2=0.9996$ 의 좋은 직선성을 나타내었다. 정밀도와 정확도는 Table 1에 나타내었는데 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 제외하고는 좋은 정밀도와 정확도를 보여주었다. 아울러 실제시료인 복용 후 7, 40, 72시간 후의 소변에 대한 정량결과에서도 볼 수 있듯이 RSD 10% 내외의 좋은 정밀도를 나타내었다.(Table 2) 소변에서의 정량한계(LOQ)는 S/N=7에서 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며 회수율은 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 78.5%를 나타내었다.

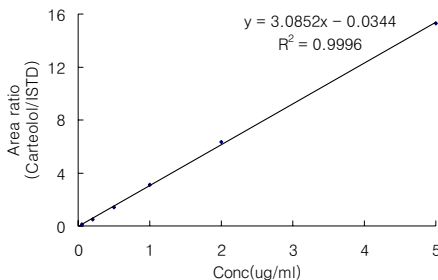


Fig. 3. Calibration curve of carteolol (0.05 - 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Table 1. Precision and accuracy for the assay of carteolol at various concentrations (n=3)

Spiked amount	0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Observed amount	1 0.068	0.20	0.48	0.93	2.05
	2 0.073	0.20	0.47	1.12	1.95
	3 0.072	0.19	0.48	0.94	2.01
Average ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.071 \pm 0.0027	0.20 \pm 0.0035	0.48 \pm 0.0061	1.00 \pm 0.106	2.01 \pm 0.50
RSD (%)	3.8	1.7	1.2	10.6	2.4
Accuracy (%)	42.6	1.4	4.4	0.3	0.3

Vol.15, No.5, 2002

Table 2. Precision of carteolol in dosed human urine samples

	7 hour	40 hour	72 hour
1	2.58	0.56	0.065
2	2.45	0.62	0.056
3	2.25	0.61	0.070
Average ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.43 \pm 0.17	0.60 \pm 0.03	0.064 \pm 0.007
RSD(%)	6.8	5.3	11.1

3.3. 효소가수분해방법과 산가수분해방법의 비교

Carteolol 모 약물의 conjugation된 형태인 phase II 대사체를 free form으로 바꾸기 위해서는 시료 전처리시 가수분해를 시켜야한다. 이를 위하여 효소를 사용하여 가수분해시키는 방법과 강산(pH 1 이하) 조건하에서 가수분해시키는 방법의 효율성을 비교하기 위하여 복용 후 3시간 후의 소변을 사용하여 두 가지 방법으로 가수분해시켜서 측정하였다. 그 결과 산 가수분해방법으로 실험하여 얻은 피크 크기의 5.5%에 지나지 않았다.(Fig. 4)

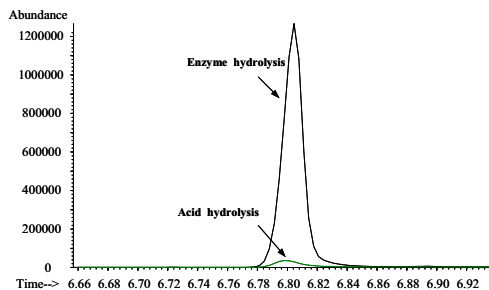


Fig. 4. Overlaid ion chromatogram of carteolol extracted from enzyme and acid hydrolysed human urine samples.

산 가수분해방법이 적절하지 않음을 알 수 있었으며, 이 방법을 사용했을 때의 검출되는 양은 다음에 언급되는 free 형태의 carteolol 양보다도 더 적게 검출되는 것으로 미루어 이 방법이 glucuronide 결합을 잘 끊어주지 못하는 것이 아니라 강산에 의해 carteolol 자체가 분해되는 것으로 사료된다. 따라서 현재 비휘발성 마약류와 베타차단제를 소변으로부터 동시에 분석하기 위해서 약물검사기관에서 일반적인 방법으로 채택하고 있는 산 가수분해방법은 개선의 여지가 있기 때문에

carteolol을 비롯한 몇종의 베타차단제의 정밀한 검출을 위해서는 효소 가수분해 방법이 병행되어야 할 것이다.

3.4. Carteolol의 대사 및 배설

소변으로 배설되는 free carteolol의 양과 conjugated carteolol의 양을 비교하기 위해 효소가수분해과정을 거친 후 추출하여 정량한 값과 가수분해과정 없이 추출하여 정량한 값을 각 시료에 대해서 실시하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 모 약물인 carteolol은 free form과 conjugation form의 두 가지 형태로 모두 배설됨을 알 수 있으며 conjugation 된 형태로 배설되는 양이 전체 양의 59.4%를 차지하는 것으로 나타났다. 따라서 소변 중의 carteolol을 검출하기 위해서는 가수분해과정이 필수적임을 알 수 있었다. 또한 이미 알려진 주대사체인 *p*-OH-carteolol로도 머무름 시간 7.7분에서 소량 검출되었는데 이는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 극성이 증가하였기 때문에 모 약물보다 늦게 용출되었으며 Fig. 6에 나타난 질량스펙트럼에서는 두 개의 -OH기에 TMS 유도체반응이 일어난 결과 분자이온이 *m/z* 524에서 검출되었고 *m/z* 323과 308은 모약물과 동일한 위치에서 토막이온이 생성되었음을 알 수 있다. 이 대사체에 대한 확

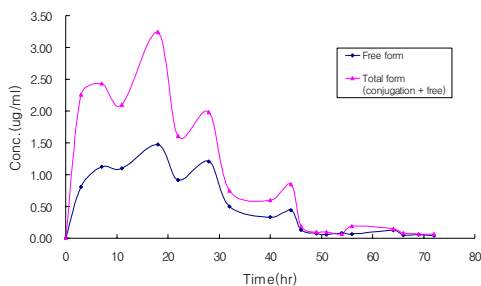


Fig. 5. The comparison of the concentration of the free carteolol with the conjugated carteolol.

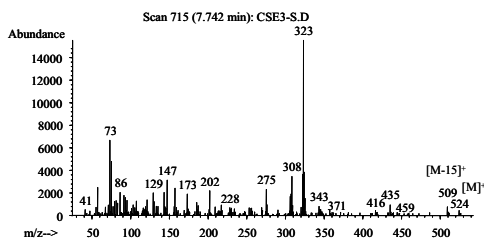


Fig. 6. Mass spectrum of *p*-OH-carteolol (2TMS) obtained the human urine sample.

인은 authentic standard가 없으므로 문헌상에 나타난 자료를 근거로 확인하였다.⁹ 이 주대사체는 carteolol의 복용을 확인하기 위한 화합물이 될 것이다.

한편, carteolol 10 mg을 복용한 뒤 72시간까지 배설된 소변을 받아 carteolol의 양을 측정하는 결과를 Table 3에 나타내었다. 복용 후 18시간 후의 소변에서 가장 높은 농도인 3.24 µg/ml를 나타내었으며 72시간까지 배설된 모약물의 양을 모두 합하면 4.9 mg으로서 복용량의 49%가 모 약물 또는 그의 phase II 대사체로 뇨를 통해서 배설되었다. (Fig. 7)

Table 3. Excretion in the human urine after a single oral dose of carteolol at 10 mg

No.	Time (hour)	Volume of urine (ml)	pH	Density	Conc. (µg/ml)	Amount (µg)
blank	0	220	6.0	1.015	0	0
1	3	480	6.0	1.010	2.26	1084
2	7	370	6.0	1.015	2.43	911
3	11	310	6.5	1.015	2.10	651
4	18	230	6.0	1.030	3.24	745
5	22	200	6.0	1.020	1.61	322
6	28	220	6.0	1.025	1.98	435
7	32	180	6.0	1.020	0.75	135
8	40	420	6.0	1.020	0.60	235
9	44	115	5.0	1.030	0.85	97
10	46	200	6.0	1.015	0.19	38
11	49	345	6.0	1.015	0.10	34
12	51	230	7.0	1.010	0.10	22
13	54	220	6.0	1.015	0.07	15
14	56	210	6.5	1.010	0.19	40
15	64	420	6.0	1.015	0.15	63
16	66	190	5.0	1.020	0.08	15
17	69	260	7.0	1.010	0.07	17
18	72	290	6.5	1.015	0.06	18

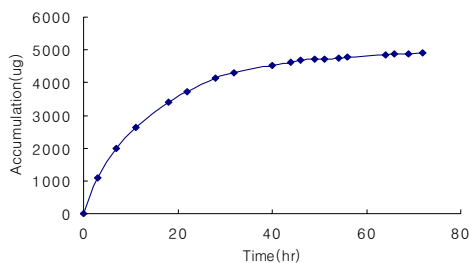


Fig. 7. Accumulated excretion amount in the human urine after a single oral dose of carteolol at 10 mg

4. 결 론

본 연구에서는 carteolol 10 mg 복용 후 72시간까지 받은 소변을 분석함으로써 carteolol의 대사형태와 배설 속도를 고찰하였다. Carteolol은 대부분이 모 약물의 phase II 대사가 이루어져 59.4%가 conjugated carteolol로 배설되며 나머지가 free carteolol로 배설됨을 확인할 수 있었으며, 매우 소량이 주 대사체인 *p*-OH-carteolol로 대사되었다.

산 가수분해 방법을 사용하여 효소 가수분해방법과 비교하였는데 산 가수분해 방법을 사용해 분석하는 경우 carteolol 자체의 화학적 분해가 일어나서 이 약물을 분석하기에는 적절하지 못한 방법이므로 효소 가수분해를 실시하여야할 것이다.

본 실험을 통해서 소변중의 carteolol의 적절한 분석 방법을 찾아내었으며 carteolol은 복용후 18시간 시점에서 최고 농도를 나타내었으며 72시간까지도 배설됨을 확인할 수 있었고 복용량의 49%가 모 약물인 carteolol 또는 그의 conjugate 형태로 배설됨이 확인되었다. 이상의 결과로부터 운동선수들의 carteolol 복용여부의 정확한 확인은 물론이며 복용시점까지도 추적이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고 문헌

1. K. Nakagowa, N. Murakami, S. Yoshizaki, M. Towinaga, H. Mori, Y. Yabuuchi, S. Shintani, *J. Med. Chem.*, **17**, 529-533(1974).
2. Y. Yabuuchi, D. Kinoshita, *Jpn. J. Pharmacol.*, **24**, 853-861(1974).
3. International Olympic Committee, "Olympic Movement Anti-Doping Code, Appendix A.", Lausanne, Switzerland, 2002
4. I. Rapado-Martinez, M. C. Garcia-Alvarez-Cogue, R. M. Villanueva-Camanas, *J. Chromatogr. A*, **765**, 221-223(1997).
5. S. Kudo, M. Uchida, M. Odomi, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **52**, 479-485(1997).
6. O. Reiko, S. Hiroshi, F. Shohei, U. Toshihiko, K. Ryohei, K. Yuko, K. Yuji, O. Katsuji, *Exp. Eye Res.*, **66**, 487-494(1998).
7. M. Nagasawa, M. Kashimoto, M. Sugawara, Y. Kimura, *J. Chromatogr. B*, **673**, 294-298(1995).
8. L. Jeong Ae, L. Dong-Seok, K. Myung Soo, K. Keon, K. Yunje, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1150-1160(1998).
9. Y. Xu, L. Shen, Y. Wu, S. Wang, C Zhang, *Fenxi Ceshi Xuebao*, **13**, 85-87(1994).
10. Y. Toshikazu, M. Yoko, S. Yutaka, H. Masahisa, *J. Chromatogr.*, **239**, 609-615(1982).