ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol.17, No.4, 322-336, 2004
Printed in the Republic of Korea

기체크로마토그래피/ 질량분석기를 이용한 인체 내 뇨시료에서의 Tamoxifen 대사체 검출을 위한 유도체화 연구

김연제★ · 이윤정
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터
(2004. 6. 16 접수, 2004. 7. 6 승인)

A study on the derivatization technique for tamoxifen metabolites in human urine by gas chromatography/mass spectrometry

Yunje Kim★ and Yoonjung Lee
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. box 131, Cheongryang, Seoul, Korea
(Received Jun. 16, 2004, Accepted Jul. 6, 2004)

요 약 : 항암치료제인 tamoxifen을 복용한 후 체내에서 분비되는 tamoxifen과 그 대사체를 trifluoroacetic anhydride (TFAA), pentafluoropropionic anhydride (PFPA), 및 heptafluorobutyric anhydride (HFBA) 유도체화 시약으로 이들이 함유하고 있는 히드록시기를 아실화반응시킴으로써 기체크로마토그래피와 질량분석기로 분석 가능하게 하고, 검출한계 등을 개선한 새로운 방법에 대해 연구하였다. 한편 질량 분석기로 검출하기 위한 이온화 방법의 하나인 전자 충격 이온화법과 화학 이온화법을 비교하여 보다 개선된 분석법을 연구하고, 이 방법을 실제 인체 뇨시료에 적용한 tamoxifen 대사체 검출을 위한 최적 조건을 연구하였다. Acylation 방법에 있어서의 최적 반응조건은 반응 온도 50 ℃와 반응 시간 30 min 이었으며, 뇨시료에 있어서 tamoxifen 대사체 추출에 대한 최적 pH는 7.0, 추출 용매는 디에틸에테르가 적절함을 알 수 있었다. TFAA, PFPA, HFBA로 유도체 시킨 후 CI법과 EI법을 비교 분석한 결과, NCI법에서는 주로 $[M-HF]^-$ 또는 $[M-2HF]^-$이온이 주요 이온으로 나타났으며 NCI에서 감도가 뛰어난 할로겐원소가 함유된 유도체 시약을 사용하였기 때문에 생체시료 내에 미량 존재하는 약물을 보다 용이하게 검출 및 확인 할 수 있었다. 한편 GC/MS로 tamoxifen대사체를 분석한 결과 tamoxifen이 간에서 대사 될 때 주 대사체로 알려져 있는 4-hydroxytamoxifen은 검출 되지 않았고 hydroxymethoxytamoxifen이 주 대사체로 검출되었다. Acylation 유도체화 과정을 거친 hydroxymethoxytamoxifen은 NCI에서의 토막 이온을 조사한 결과 아미노 그룹의 β-cleavage가 일어난 m/z 491이온, acylation 유도체 한 분자가 쪼개진 m/z 344이온이 비교적 높게 검출되었다.

Abstract : The improved derivatization technique of tamoxifen metabolite in human urine is described for the acylation method that they are substituted by derivatization reagent like acyl anhydride for use

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-958-5060 Fax : +82+(0)2-958-5059
E-mail : yjkim@kist.re.kr

of gas chromatography/mass spectrometry. The hydroxyl group of tamoxifen metabolite was derivatized by trifluoroacetic anhydride (TFAA), pentafluoroacetic anhydride (PFPA) and heptaflorobutylic anhydride (HFBA). It was investigated to the gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) technique use negative ion chemical ionization (NCI), positive ion chemical ionization (PCI) and electron impact (EI). In acylation of the metabolites of tamoxifen, the effective reaction temperature and time were shown to be at 50 ℃ for 30 min. The 4-hydroxytamoxifen, which is known to major metabolite of tamoxifen, was not detected in human urine, whileas the hydroxymethoxytamoxifen was detected. We thought that this result was from the single dose of tamoxifen.

Key words : Tamoxifen, metabolite, gas chromatography/mass spectrometry, acylation, derivatization, electron impact, and chemical ionization

1. 서 론

본 연구의 대상물질인 tamoxifen은 에스트로겐과 경쟁반응 되먹임 작용을 하여 에스트로겐으로 인한 암 세포의 성장을 막는 약효를 나타낸다. 또한 사람을 대상으로 한 대사체 연구는 주로 장기간 tamoxifen을 투여한 여성 암환자를 대상으로 진행되어왔다. Tamoxifen의 약리 작용은 호르몬에 작용하여 에스트로겐과 길항작용을 보이거나 혹은 선택적 호르몬 수용체 작용제 (selective estrogen receptor modulator)로 잘 알려져 있기 때문에 유방이나 자궁에서의 에스트로겐으로 인한 암세포의 성장을 억제할 수 있다.[1] 동화작용을 나타내는 내인성 스테로이드 중 androstendione과 testosterone은 대사되어 estrone과 estradiol로 전환된다. 이때 aromatase효소에 의하여 aromatization 과정을 거치며, 이러한 과정에 의해 에스트로겐이 형성된다. Tamoxifen은 이 반응을 방해하는 것이 아니라 에스트로겐 길항제 (antagonist)로서 호르몬 수용체에 작용하여 경쟁반응을 일으켜 에스트로겐과 수용체 결합을 방해한다.[2-8] 또한 혈액내의 낮은 에스트로겐 수준에서도 가슴근육을 발달시킬 수 있기 때문에 근육 강화와 체력증진을 목적으로 하는 스포츠 종목에서 스테로이드를 남용하는 남성의 경우 부작용에 의한 여성화가 문제가 되기도 한다. 이를 막기 위해 합성 동화성 스테로이드와 tamoxifen을 동시에 섭취함으로서 남성의 여성화를 막고 또한 스테로이드 섭취로 인해 체내 에스트로겐의 농도가 증가하면 효소 방해 작용으로 더 이상 aromatization과정이 일어나지 않아 동화작용을 나타내는 스테로이드들이 체내에 잔류하는 기간이 길어져 최대 동화작용 효과를 보이므로 주로 보디빌더들에서 사용되어 왔으며 현재 tamoxifen은 국제올림픽조직위원회 (IOC)에서 금지약물로 규정하고 있다.[9,10]

액체크로마토그래피를 이용한 tamoxifen의 연구는 쥐나 사람의 간 또는 혈장을 이용하여 C.K. Lim[11,12], R,S, Plumb[13]등에 의해 이루어졌고, Dick de Vos와 peter H. T. J. Slee등은 tamoxifen을 장기 투여한 유방 암 환자들의 뇨 시료나 혈청을 이용한 연구가 알려져 있다.[14] Tamoxifen은 대부분 간에서 대사되고 뇨에서 대사되는 양은 전체 20%에 지나지 않아 체외로 배설되는 양이 적기 때문에 뇨 시료에 대해서는 이들의 극미량 분석이 요구되고 있다.[14-16] 현재까지 액체크로마토그래피와 질량 분석계를 사용한 tamoxifen의 분석은 활발히 진행되어왔으나 기체크로마토그래피와 질량 분석계를 이용할 경우 tamoxifen의 히드록시기에 의한 높은 극성으로 인하여 비극성 컬럼을 사용하는 기체크로마토그래피로는 분리 분석이 어려워 이를 이용한 연구는 거의 진행되지 않고 있다.

본 연구에서는 기체크로마토그래피와 질량분석기 (Gas Chromatography/Mass Spectrometry: GC/MS)를 이용하여 인체에서 분비되는 tamoxifen 대사체와 내인성 스테로이드를 분석하는데 있어서 이들의 히드록시기를 할로겐 원소가 있는 아실 무수물이나 아실 할로겐화물 같은 유도체화 시약 (trifluoroacetic anhydride, pentafluoropropionic anhydride, heptafluorobutyric anhydride)으로 치환하는 아실화 반응을 이용하여 검출한계 등을 개선하는 새로운 방법에 대해 연구하였다.

2. 실 험

2.1. 측정기기 및 장비

유도체한 모든 시료는 Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA) Trace GC-Polaris Q에 주입하였고, 이때 사용한 이온화 방법은 Electron Impact (EI), Positive Chemical Ionization (PCI)와 Negative Chemical Ionization (NCI) 모드였다.

진탕 추출을 위해서 Edmund Buchler사 (Germany)의 7400 Rubigen shaker, 원심분리기는 Varifuge-F Haeraus (Germany)를 사용하였고, 시료혼합을 위해서는 Thermolyne사 (USA)의 voltex mixer를, 시료농축을 위해서는 Thermolyne사의 16500 dry bath와 Zymark사 (Hopkinton, MA, USA)의 Turbovape LV evaporator와 Buchi Rotavapor R-200 진공증발기를 사용하였다. 유도체화반응의 온도조절을 위해 Liebisch Labortechnik사 (Germany)의 Heating block을 사용하였고, 유기층 수거를 위해 LAUDA 사 (Germany) ecoline RE 112 Freezer를 사용하였다.

2.2. 시약

본 연구에 사용된 각종 표준물질들 (4-hydroxytamoxifen, methyltestosterone, tamoxifen)은 실험 목적에 따라 임의로 선택하여 Sigma사 (Saint Louise, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 표준물질별로 100 g/mL가 되도록 하였으며 메탄올로 저장용액을 만들어 4 ℃ 냉장고에 보관하고 필요할 때마다 적당한 농도로 묽혀 사용하였다.

시료 전처리에 사용한 Serdolite AD-I resin (100 ~ 200 ㎛)은 독일 Serva사제로서, 아세톤 및 메탄올로 씻은 후 증류수로 침강 시키는 방법으로 활성화시켜 사용하였다. 그리고 enzyme hydrolysis에 사용된 β-glucronidase는 E. coli에서 추출한 것으로 독일 Boehringer Mannheim 사제이다. 완충용액 제조에 사용된 KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 는 Aldrich사 (Milwaukee, WI, USA)의 특급시약으로, 이들 용액을 pH 7.2의 완충용액으로 만들어 사용하였다. 시료 전처리 과정에서 추출을 위해 쓰인 용매는 디에틸에테르, n-pentane 이고 그밖에 메탄올, 아세톤 및 HPLC에서 이동상으로 사용된 아세토니트릴 등은 모두 HPLC 등급으로 J.T Baker사 (Phillisberg, NT, USA) 제를 사용하였다. 또한 HPLC 이동상인 유기용매 및 3차 증류수는 각각 pore size 0.5 ㎛ 와 0.45 ㎛의 Millipore사 (USA)제 membrane filter로 여과한 후 20분 간 공기를 제거한 후 사용하였다. HPLC 이동상인 ammonium acetate buffer는 ammonium acetate 1.54 g 을 물 1 l에 용해 시켜 만들었다. 이때 사용한 물은 3차 증류수였다.

유도체 시약으로는 trifluoroacetic anhydride (TFAA), pentafluoropropionic anhydride (PFPA), heptafluorobutyric anhydride (HFBA)는 Sigma사제를 그대로 냉장 보관하여 사용하였다.

2.3. 뇨시료의 채취

실험에 사용한 뇨 시료는 건강한 성인 남자 (나이 : 28 세, 체중 : 70 ㎏)에게 AstraZeneca (USA)에서 판매한 Nolvadex 1정 (10 mg/tablet)을 경구투여로 일회 복용시킨 후부터 220시간까지 일정 간격으로 채취하였다. 채취된 뇨시료는 실험에 사용되기 전까지 2-3 ℃의 냉장 보관하면서 필요에 따라 일정량을 취해 사용하였다.

2.4. 유도체 과정

Tamoxifen (100 ㎍/mL), 4-hydroxytamoxifen (100 ㎍/mL)의 표준용액을 각각 20 µL씩 실린지로 취하여 시험관에 옮긴 후에 질소 가스로 완전히 건조시키고, 수분 제거를 위해 KOH와 Silica gel이 들어있는 데시케이터에서 30분간 고진공상태로 방치하였다. 건고된 시험관에 아세톤 100 µL을 넣고 Vortex-mixer로 잠시 혼합한 후 aceticanhydride 용액인 TFAA, PFPA와 HFBA를 각각의 건조된 분석대상 물질이 함유된 시험관에 20 µL 씩 넣은 후, 50 ℃ heating block에서 30분간 반응시켰다. 반응용액을 상온으로 식힌 후 질소 가스로 완전히 건조시켜 아세토니트릴 40 µL로 묽히고, 2 µL를 취하여 GC/MS에 주입하였다. 이때 사용한 GC/MS 조건은 *Table* 1에 나타내었다.

2.5. 뇨시료 중 tamoxifen의 추출

뇨에서 tamoxifen을 효과적으로 분리하는 방법으로 액체-액체 추출법을 사용하여 비교 실험 하였다. Serdolite PAD-I Resin을 지름 0.5 cm 의 일회용 pasteur pipet에 약 2 cm 정도 채운 후 2 mL의 증류수로 충분히 세척하여 활성화 시켰다. Tamoxifen 복용 후 채취한 뇨시료를 2500 rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후, Serdolite PAD-I Resin이 충전된 컬럼에 흘려주고 내부표준물질인 methyltestosterone 10 ug/mL 용액 20 µL를 넣었다. 흡착된 뇨 시료를 같은 량의 증류수로 씻어준 후, 메탄올 3 mL로 추출하였다. 추출된 메탄올을 회전 진공 증발기

Table 1. GC/MS operating conditions

1) GC parameter

Brand : HP ultra-1, length 17 m, inner diameter 0.20 mm, film thickness 0.33 ㎛.
(Agilent, Palo alto, CA, USA)

Type : 100% methylsiloxane

Flow rate : 1.0 mL/min (carrier gas, reagent gas)

Split ratio : 10 : 1

Injection volume : 2 µL

Injector temperature : 280 ℃

Carrier gas : He

Oven temperature :

Temp.[time] ℃[min]	rate ℃/min	temp.[time] ℃[min]	rate ℃/min	temp.[time] ℃[min]	rate ℃/min	temp.[time] ℃[min]
150 [2]	15	260 [0]	20	300 [1]	20	300 [2]

2) MS parameter

Ionization mode : Electron ionization, Chemical ionization (Positive, Negative) mode

Acqusition mode : Scan mode

Interface temperature : 280 ℃

Source temperature : 180 ℃

Reagent gas : Methane (99.9999%)

로 증발시킨 후, 그 잔류물에 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 1 mL과 β-glucuronidase 25 µL를 넣고 55 ℃에서 1 시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 후 잔류물이 함유된 시험관을 실온으로 냉각시키고 potassium carbonate 약 100 ㎎을 가하여 pH를 9로 조절한 다음, 추출용매인 수분이 제거된 distilled diethyl ether 5 mL 을 가하였다. Shaker를 사용하여 10분간 진탕시켜 추출하였고 이 혼합용액을 2500 rpm에서 5분간 원심분리한 후 -30 ℃의 냉동기에서 buffer층만 얼게 하였다. 얼지 않은 ether층을 다른 시험관으로 옮기고 질소 가스로 완전히 증발, 건조시킨 후 추출 회수율 시험을 위해서는 HPLC/DAD에 시료 주입하였으며 이때의 조건은 *Table* 2에 수록하였으며 GC/MS를 사용하는 경우 2.4 항의 유도체화 과정을 거친 후 GC/MS에 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

Tamoxifen [Z-(1-4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl/-1,2-

Table 2. HPLC/DAD operating conditions

Instrument : Agilent 1100 series LC G1315A diode array detector system

Column : Hypersil-OSD C_{18} column (4.6 mm i.d. X 75 mm length, particle size 5 ㎛)

Flow rate : 1.0 mL/min

Mobile phase :

Time	Acetonitrile	Ammouium acetate buffer
Initial	30%	70%
15 min	80%	20%

Injection volume : 10 µL

Run time : 20 min

Oven Temperature : 40 ℃

Detection wave length : 240 nm

diphenyl-1-butene)]은 성 호르몬(sex hormones) 중에 항난포호르몬(antiestrogen)으로 인체 내에서 *Fig.* 1과 같은 대사체를 생성시킨다. 그림에서 보는 바와 같이 Tamoxifen의 대사체는 hydroxyl 기나 amine 기를 포함하고 있기 때문에 이들의 극성을 감소시키기 위한 적절한 유도체를 형성시키지 않으면 GC에 효과적으로 응용할 수 없다. 즉 유도체화 없이 GC/MS에 사용하는 경우, 모세컬럼에서의 효율이 떨어지거나 검출한계가 높아지는 등의 문제가 있게 된다. 따라서 본 연구에서는 향후의 tamoxifen 복용과 내인성 스테로이드의 분비 형태에 대한 연구를 진행하기위한 사전연구로 이들의 극성기를 아실화 반응을 이용하여 극성을 감소시켜 GC/MS 사용을 용이하게 하고 실제 인체 뇨시료에 적용하는 연구를 진행하였다.

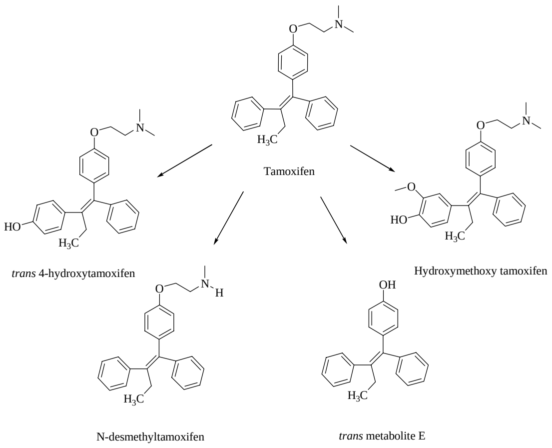


Fig. 1. The metabolites of tamoxifen in human urine.

3.1. 반응 조건

4-hyroxytamoxifen의 TFAA, PFPA, HFBA 유도체화 과정에 있어서 최적 반응 온도를 알아보고자 40 ℃, 50 ℃, 60 ℃, 70 ℃, 80 ℃ 및 90 ℃의 온도조건을 설정하여 시험하였으며 그 결과는 *Fig.* 2에 나타내었다. 또한 위의 실험으로 얻은 최적화된 온도에서 반응시간에 따른 적정 생성율을 알아보고자 10 min, 20 min, 30 min 및 60 min씩 반응시간을 달리하여 실험하였으며 그 결과는 *Fig.* 3에 나타내었다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이, 유도체화 된 4-hyroxytamoxifen과 내부표준물질의 비로 상대적 반응감도를 나타내었으며 그 결과 일정온도 (50 ℃)까지 반응성이 증가하였다가 다시 감소하는 것을 볼 수 있다. 이때의 상대적 감응 비율은 TFAA는 0.4-0.7, PFPA는 0.08-0.12, HFBA는 0.1-0.14의 범위를 가졌다. 따라서 50 ℃가 본 유도체화에서 가장 적절한 반응 온도임을 알 수 있었다.

이를 바탕으로 하여 최적 온도인 50 ℃에서 반응이 완료되어 더 이상 진행되지 않는 시간을 측정하여 실험의 효율을 높이기 위한 반응 시간에 따른 영향을 알아보았으며 *Fig.* 3에서 보는 바와 같이 TFAA, PFPA, HFBA로 유도체화 된 4-hyroxytamoxifen의 상대 비율은 0.11에서 0.67의 범위로 나타났고 반응 시간이 60 min인 경우에도 이 범위를 넘어서지 않은 것으로 보아 30 min의 조건에서 반응이 완결되었다 판단 할 수 있었다. 따라서 본 연구를 위한 유도체화 반응은 반응온도 50 ℃ 및 반응 시간 30 min이 최적 조건임을 알 수 있었다.

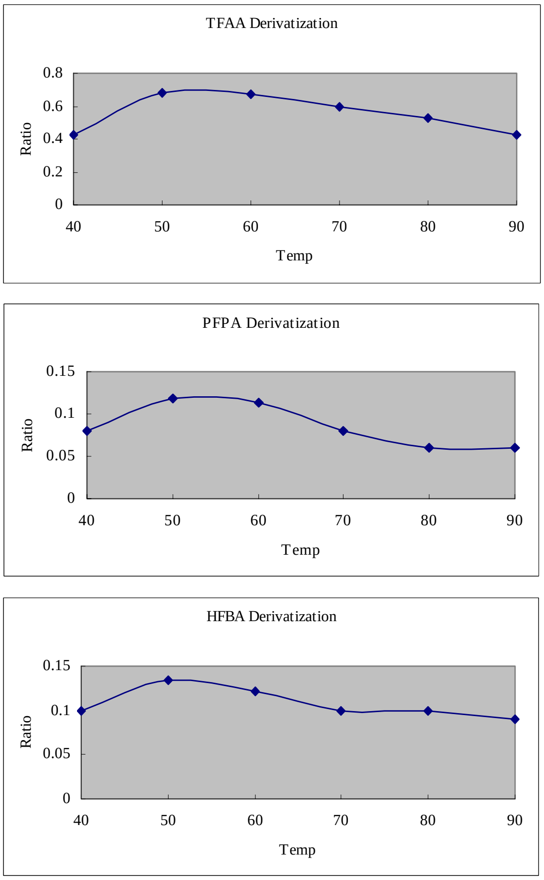
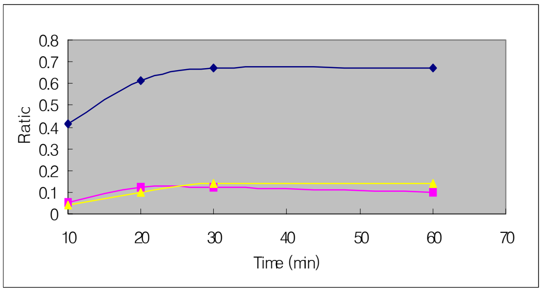


Fig. 2. Effect of reaction temperature in fluoroactylation procedure of the 4-hydroxytamoxifen.

(n=5)



◆ 4-hydroxytamoxifen-TFAA ■ 4-hydroxytamoxifen-PFPA, △ 4-hydroxytamoxifen-HFBA

Fig. 3. Effect of reaction time in derivatization procedure of the 4-hydroxytamoxifen.

3.2. 아실화 반응

앞서 확립된 반응 조건 하에서 TFAA, PFPA, HFBA로 유도체화된 4-hydroxytamoxifen을 GC/MS로 검출하였으며 그 결과는 *Fig.* 4에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 electron impact (EI)법과 negative ion chemical ionization (NCI)법으로 검출한 결과를 나타내었으며 positive ion chemical ionization (PCI)법에서는 검출되지 않았다. *Fig.* 4의 EI법에는 10.52분에서 tamxifen과 TFAA, PFPA, HFBA로 유도체화된 4-hydroxytamoxifen를 각각 10.88 분, 10.87 분, 11.02분에서 검출 할 수 있었다. 반응이 진행되지 않는 tamoxifen의 경우 일정한 감도로 검출되어 내부 표준물질로의 유효성을 확인 할 수 있었다. NCI법으로 비교한 4-hydroxytamoxifen을 보면 TFAA의 경우 PFPA와 HFBA에 비해 상대적으로 방해물질들이 많이 검출되었고, TFAA의 경우 1.1 x 10^2, PFPA와 HFBA는 각각 8.2 x 10^5, 1.6 x 10^3의 감도를 나타냄으로써 유도체화 과정에 있어서의 여러 아실화 반응 중 PFPA가 가장 양호한 결과를 보였다.

또한 *Fig.* 5에는 4-hydroxytamoxifen을 TFAA, PFPA, HFBA로 유도체화 반응 시킨 후 EI법으로 검출한 이들의 질량스펙트럼을 나타내었다. Tamoxifen의 질량 토막내기에서 나타나는 아미노기의 α위치와 β위치에서의 토막내기로부터 형성된 m/z 72이온과 m/z 58이온이 검출되고 각 유도체화 된 분자량인 m/z 483, m/z 533, m/z 583이온이 검출됨으로써 아실화 반응이 진행되었음을 확인할 수 있었다.

Fig. 6에는 TFAA, PFPA, HFBA로 유도체화된 4-hydroxytamoxifen의 NCI 질량 스펙트럼을 나타내었다. 각 스펙트럼에는 토막이온 m/z 411, 461, 511이 검출되었으며 EI 질량 스펙트럼의 결과와 함께 검토해볼 때 4-hydroxytamoxifen의 히드록시기에 TFAA, PFPA, HFBA가 유도체화 됨을 확인 할 수 있었다.

3.3. Tamoxifen의 회수율 시험

3.3.1. 추출 회수율 시험을 위한 LC 분석 조건

LC는 유도체 과정을 거치지 않아도 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있기 때문에 유도체 과정의 전 단계에서의 tamoxifen의 추출 회수율 시험은 LC법이 GC/MS 분석법보다 효과적이라 판단되었다. 따라서 일반적으로 사용되고 있는 역상(reverse phase) LC법을 사용하여 분리추출 회수율 시험을 하였다. 용리 조건은 암모늄 아세테이트 완충용액과 아세토니트릴을 이동상으로 이용하여 아세토니트릴의 조성을 30%에서 80%까지 1분당 3.3%로 증가시키면서 기울기 용리 시켰다. 표준물질들을 LC에 직접 시료 주입하여 얻은 결과인 *Fig.* 6에서 보는 바와 같이 LC 크로마토그램과 UV 스펙트럼으로 대상 물질의 확인이 가능하였다. 4-Hydroxytamoxifen은 9.619 min에서, 내부 표준물질(mathyltestosterone)과 tamoxifen은 각각 10.155 min과 11.493 min에서 검출하였다.

한편 뇨시료부터의 방해물질 영향을 알아보기 위하여 바탕 뇨시료에 tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen 그리고 내부 표준 물질의 표준 용액을 뇨 중 농도가 10 μg/mL가 되도록 첨가하여 시료 전처리를 거친 후 동일한 조건으로 시료 주입하였으며 이에 대한 결과는 *Fig.* 7에 나타내었다. 그림에서 표준 용액, 바탕 뇨시료(negative control urine) 그리고 표준 용액을 첨가시킨 뇨시료(positive control urine)의 순으로 크로마토그램을 비교하였다. Tamoxifen 표준용액과 4-hydroxytamoxifen 표준 용액의 크로마토그램에서 보면, 각각 9.61 min과 11.49 min에서 검출 되었으며, 뇨에 tamoxifen과 4-hydroxytamoxifen을 첨가한 경우 각각 9.64 min과 11.53 min에서 검출 되었고 첨가시키지 않은 뇨 시료에서는 내부표준물질만 나타났다. 이와 같은 결과를 근거로 추출 회수율 시험을 진행하였다.

3.3.2. pH의 영향

뇨시료로부터 tamoxifen을 효과적으로 추출하기위한 pH의 영향을 조사하기 위해 바탕 뇨시료에 내부표준물질이 첨가된 tamoxifen과 4-hydroxytamoxifen을 각각 1 μg/mL

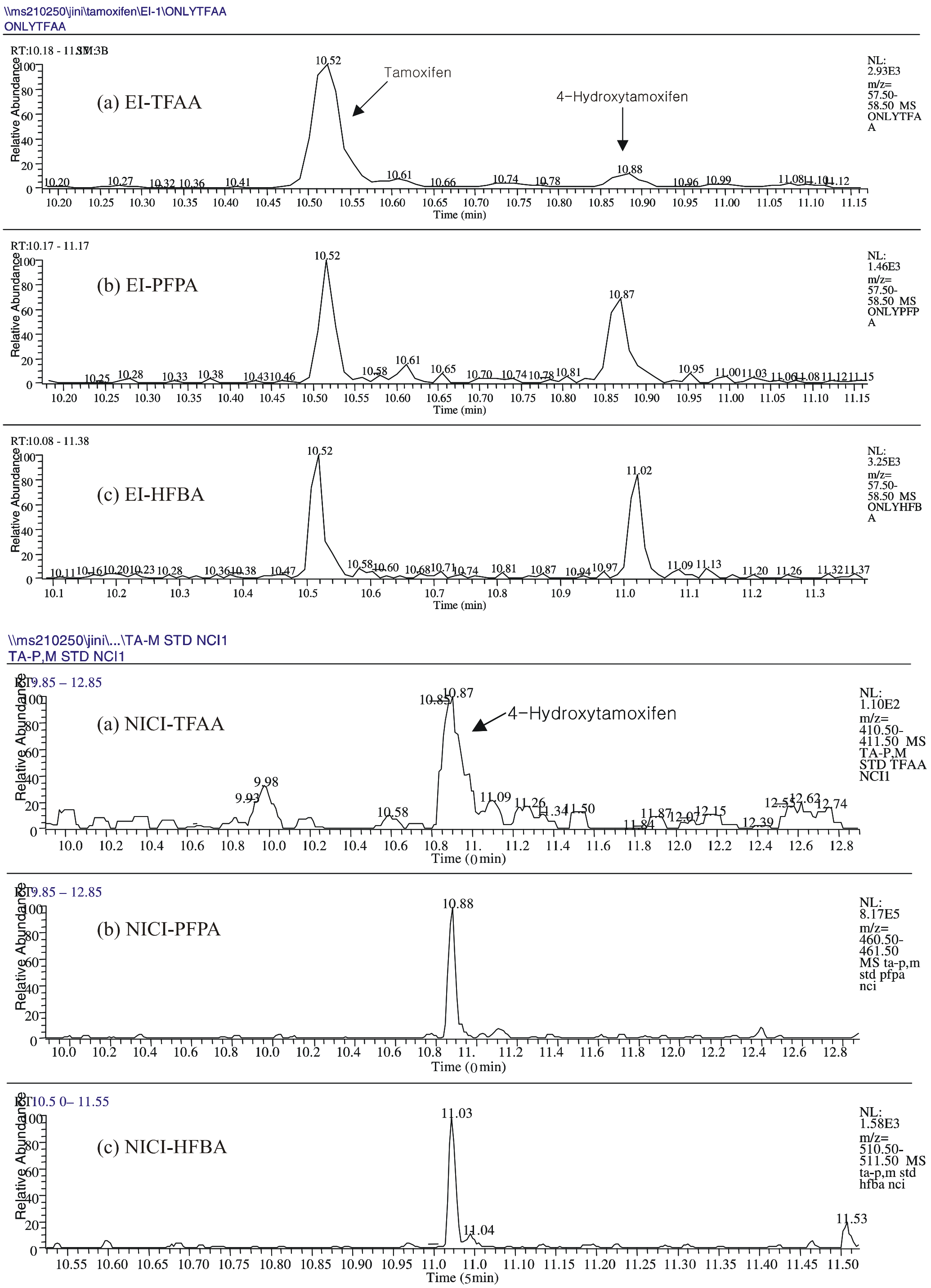


Fig. 4. Extracted ion chromatograms of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with TFAA (a), PFPA (b), HFBA (c) in EI and NICI modes by GC/MS.

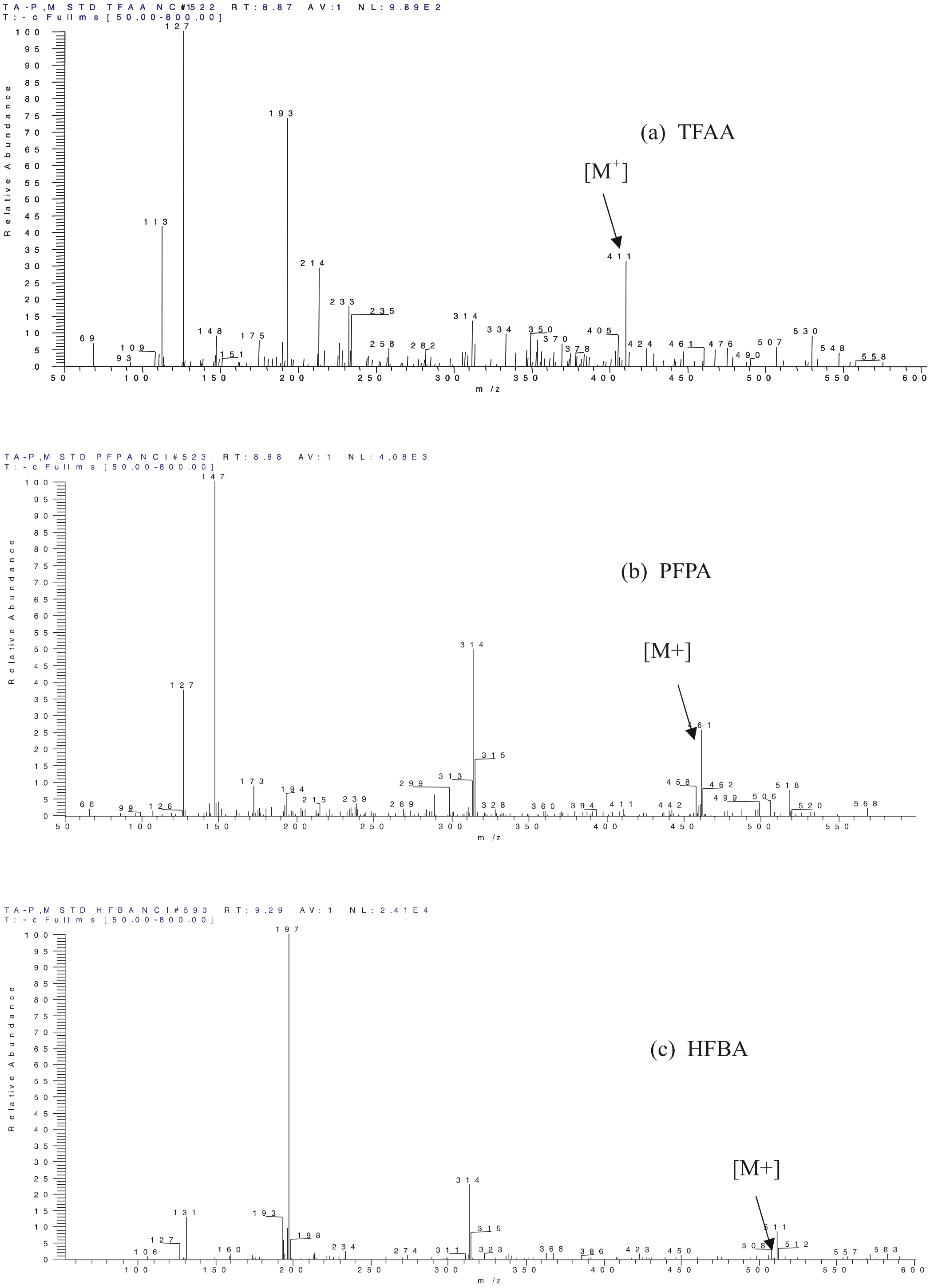


Fig. 5. EI mass spectra for derivatized 4-hydroxytamoxifen with TFAA (a), PFPA (b), HFBA (c), by GC/MS.

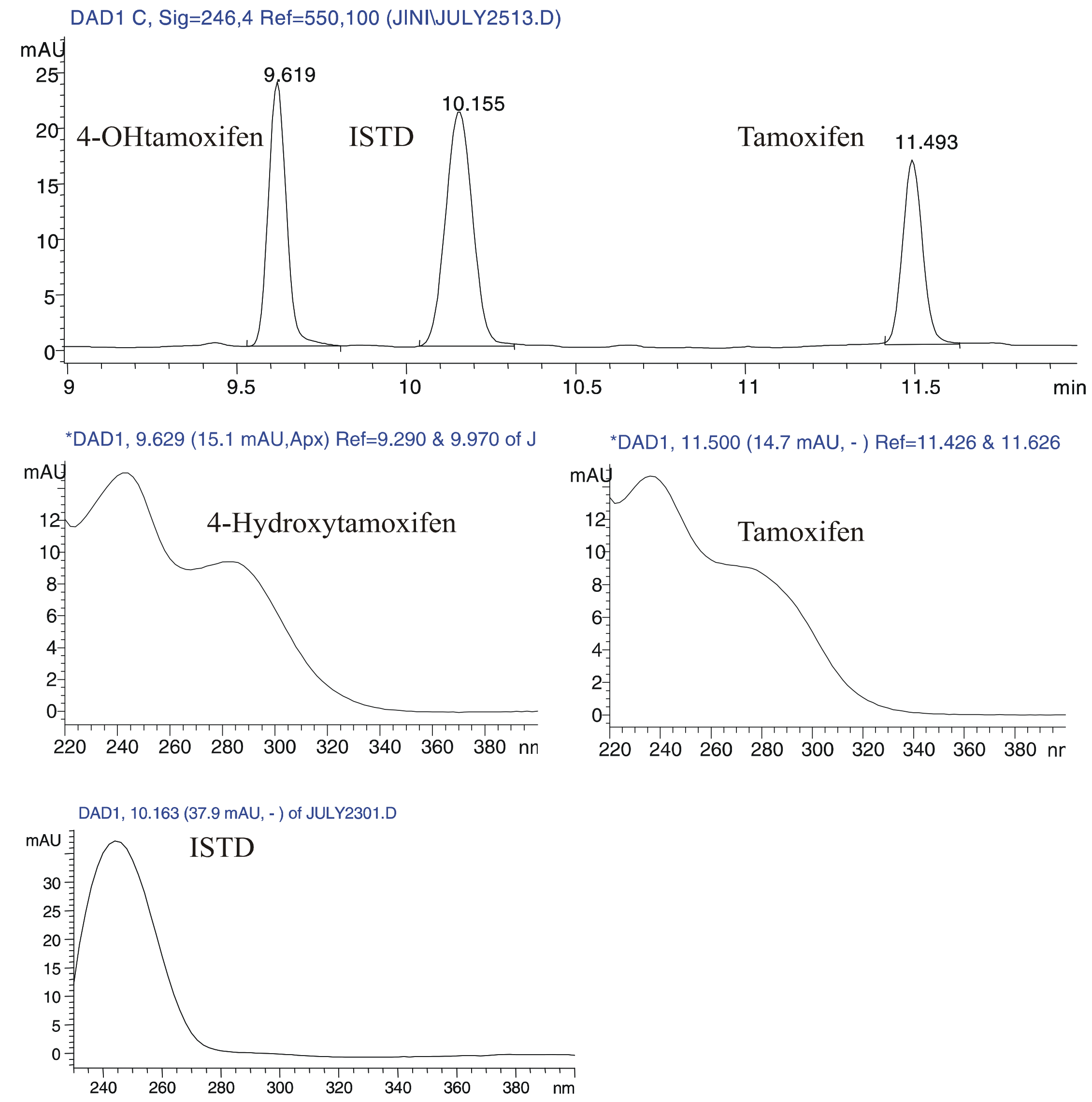


Fig. 6. HPLC chromatogram (upper) and UV spectra (bottomm) of standard tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and ISTD (methyltestosterone).
Concentration of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and ISTD : Each 10 ㎍/mL in methanol.

의 농도가 되도록 첨가시킨 후 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조절한 다음 각각 5회의 실험으로 회수율을 측정하였다. 이 결과를 나타낸 *Table* 3에서 보는 바와 같이 tamoxifen은 pH 6.0에서 76.20%, 4-hydroxytamoxifen은 pH 7.0에서 92.91%로 가장 좋은 결과를 얻었고, 이때의 표준편차와 상대표준편차는 tamoxifen의 경우 1.22와 1.59%, 4-hydroxytamoxifen의 경우에는 3.28 와 3.52%의 결과를 보였다. 따라서 적정 pH를 6.5로 하여 추출 하는 경우 비교적 양호한 회수율을 보일 것으로 판단되었으며, 이때 시용한 추출 용매는 디에틸에테르이었다.

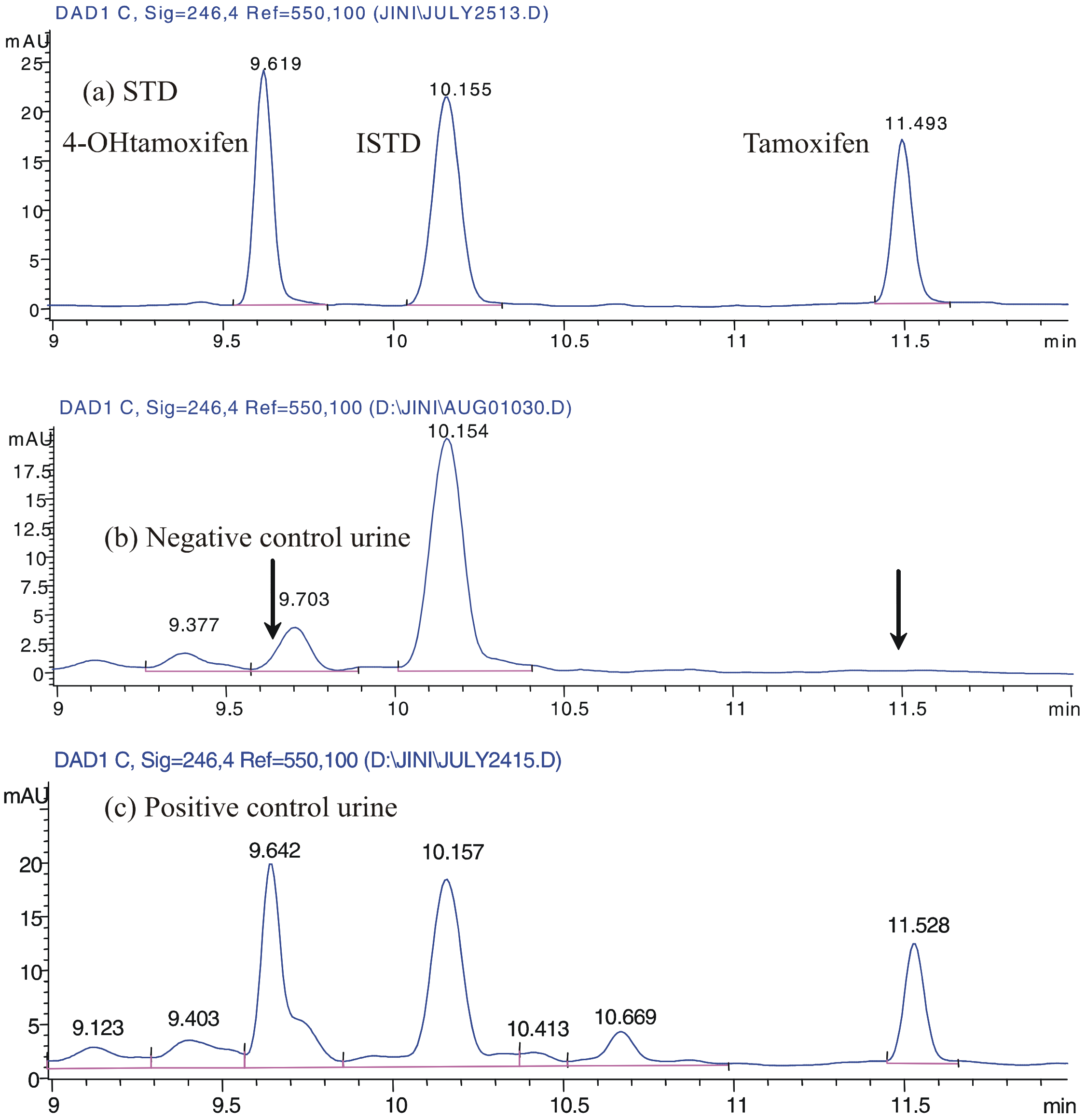


Fig. 7. HPLC chromatograms of standard tamoxifen (a), negative control urine (b), positive control urine (c). Concentration of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen : 10 μg/mL in urine. Concentration of ISTD : 10 μg/mL in urine.

3.3.3. 추출율에 대한 용매의 영향

시료 전처리 과정에서의 효과적인 추출을 위한 추출 용매를 조사하기 위해 디에틸에테르와 펜탄을 각각의 용매에 대해 5 회씩 실험을 수행하여 조사하였다. 또한 뇨에 함유된 방해 물질의 경우, 대부분 체내에서 배설이 되기 쉽게 수용성을 띄는 물질로 전환된 형태를 가지기 때문에 정제를 위하여 비교적 비극성인 용매를 선택하였다. 각 표준 용액을 뇨 중 농도 500 ng/mL이 되도록 첨가시킨 후 회수율을 비교하였고, 농도에 따른 재현성을

Table 3. The effect of pH on the extraction recovery of spiked tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen in human urine by HPLC/DAD

Tamoxifen			n=5
pH	Recovery (%)	SD*	RSD (%)**
5.0	72.96	6.67	9.15
6.0	76.20	0.13	0.18
7.0	73.97	1.22	1.59
8.0	73.26	1.66	2.26
9.0	73.22	3.93	5.36
4-Hydroxytamoxifen			**n=5**
pH	Recovery (%)	SD*	RSD (%)**
5.0	89.46	7.70	8.61
6.0	89.33	3.28	3.52
7.0	92.91	3.10	3.48
8.0	84.11	2.32	2.76
9.0	84.60	2.18	2.58

* SD : Standard deviation
**RSD : Relative Standard deviation

조사하기 위해 디에틸에테르를 용매로 하여 tamoxifen과 4-hydroxytamoxifen을 뇨 중 농도 1 μg/mL이 되도록 하여 회수율을 알아보았다. 이에 대한 결과를 나타낸 *Table* 4에서 보는 바와 같이 500 ng/mL을 첨가하여 디에틸에테르로 추출하였을 때의 회수율은 tamoxifen의 경우 86.52 %, 4-hydroxytamoxifen 은 95.61%로 펜탄 보다 높았으며 상대표준편차 (RSD)는 각각 3.65% 와 1.49%로 비교적 양호한 결과를 얻었다. 농도 1 μg/mL을 첨가한 경우, tamoxifen은 71.05%, 4-hydroxytamoxifen은 98.06%의 높은 회수율을 얻을 수 있었으며 상대표준편차는 각각 4.30%와 2.82%이었다.

3.4. 실제 시료 분석

앞서의 결과를 바탕으로 GC/MS를 이용하여 NICI법으로 tamoxifen의 대사체 분석을 시도하였다. 본 연구를 위한 기초 시험으로부터 주 대사체로 알려져 있는 4-hydroxytamoxifen은 검출되지 않았다. 이는 섭취한 tamoxifen의 양이 tamoxifen의 산화과정이 일어나기 위한 체내 조건이 적절하지 않았거나, 장기복용을 하는 경우의 주 대사체이기 때문에 1회의 일시적인 투여에 기인한 것으로 판단된다. 본 연구에서 검출한 대사체는 hydroxymethoxytamoxifen이었으며 silylation 유도체화 방법을 이용해 질량 스펙트럼을 확인하였다.[4] Tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen 그리고 hydroxymethoxytamoxifen TMS

Table 4. The effect of extracting solvent on the extraction recovery of spiked tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen in human urine by HPLC/DAD.

Tamoxifen			n=5
Solvent	Recovery (%)	SD	RSD (%)
Diethyl ether (500 ng/mL)	86.52	3.16	3.65
Diethyl ether (1 μg/mL)	71.05	3.05	4.30
n-pentane (500 ng/mL)	49.63	2.81	5.60
4-Hydroxytamoxifen			**n=5**
Solvent	Recovery (%)	SD	RSD (%)
Diethyl ether (500 ng/mL)	95.61	1.42	1.49
Diethyl ether (1 μg/mL)	98.06	2.77	2.82
n-pentane (500 ng/mL)	34.36	2.91	8.46

유도체를 GC/MS 로 분석한 total ion chromatogram (TIC)와 extracted ion chromatogram (EIC) 그리고 질량스펙트럼을 *Fig.* 8에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 trimethylsilylated tamoxifen은 9.79분에 나타났고, trimethylsilylated 4-hydroxytamoxifen은 11.65분에서 검출되었다. *Fig.* 8의 (b)는 tamoxifen 바탕시료를 trimethylsilylation하여 검출한 TIC로 tamoxifen과 4-hydroxytamoxifen이 검출되지 않음을 확인하였다. *Fig.* 8의 (c)는 실제 뇨 시료의 TIC로 tamoxifen과 4-hydroxytamoxifen은 검출되지 않았고 11.82 min에서는 바탕 뇨시료에서 검출되지 않았던 봉우리가 검출되었다. 이는 trimethylsilylated hydroxymethoxytamoxifen으로 참고 문헌으로부터 확인되었으며 (d)에 그 질량 스펙트럼을 나타내었다. m/z 489이온은 hydroxymethoxytamoxifen 히드록시기에 trimethylsilylation된 것이고 m/z 58이온과 m/z 72은 tamoxifen과 4-hydrotamoxifen의 EI법에서 공통적으로 검출된 아미노 그룹의 α와 β위치에서 쪼개짐이 일어난 이온이다.

한편 앞서 연구한 유도체화 방법 중 가장 효율이 높고 안정적인 PFPA 유도체화 방법을 뇨에 적용하여, hydroxymethoxytamoxifen이 함유된 뇨시료를 PFPA 유도체화 시켜 EI, NCI 그리고 PCI로 검출한 결과를 *Fig.* 9에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 EI에서는 1.4 X 10^2의 감도를 그리고 PCI법에서는 1.8 X 10^3의 감도를 보였다. 한편 NCI에서는 3.9 X 10^5으로 가장 높은 감도를 보였을 뿐 만 아니라 안정된 바탕선으로 가장 효과적인 방법임을 확인 할 수 있었다.

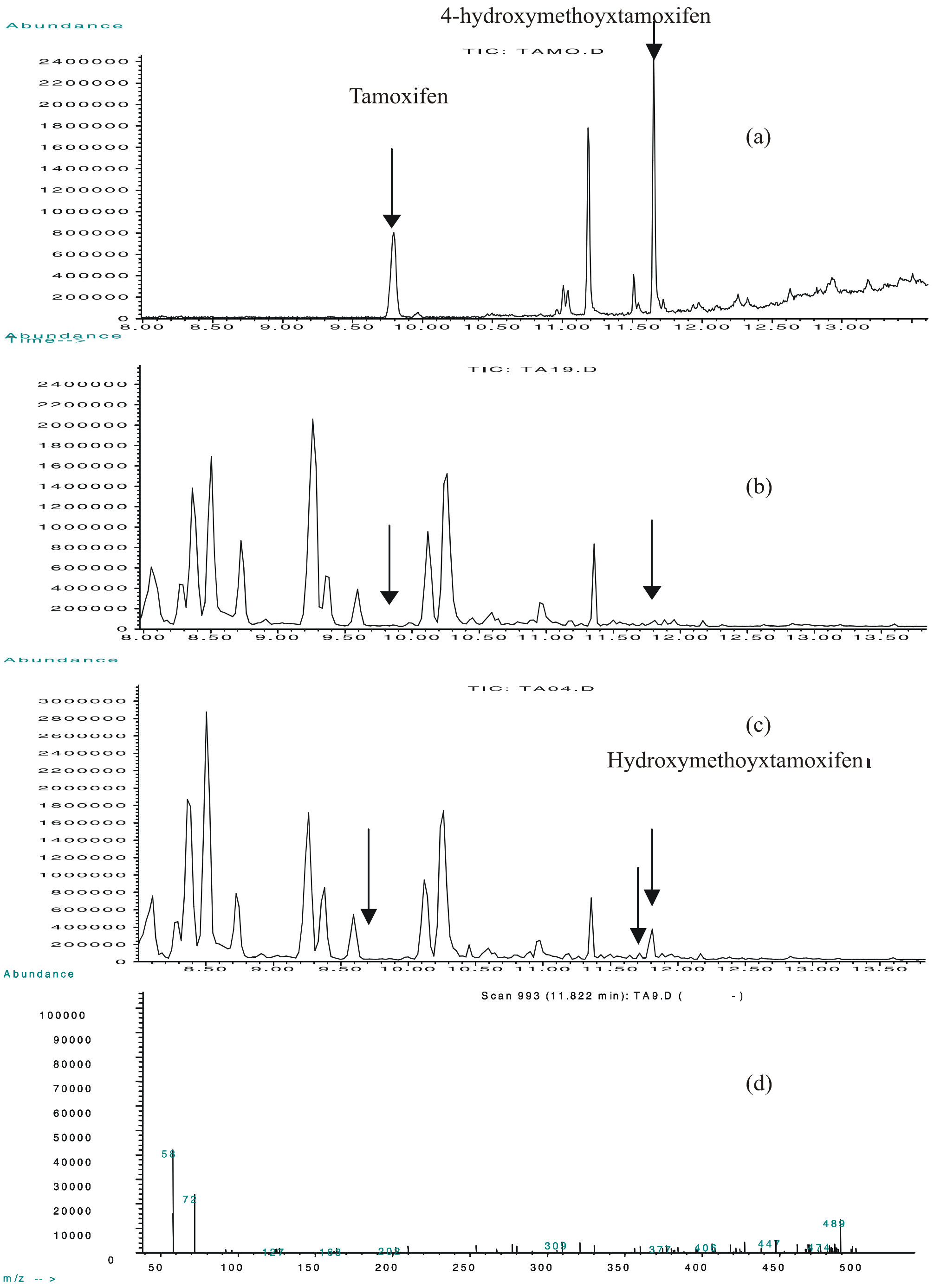


Fig. 8. Total ion chromatograms of standard tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen (a), negative control urine (b), tamoxifen metabolite excreted urine (c), and mass spectrum (d) hydroxymethoxy tamoxifen TMS derivative of tamoxifen metabolite in urine.

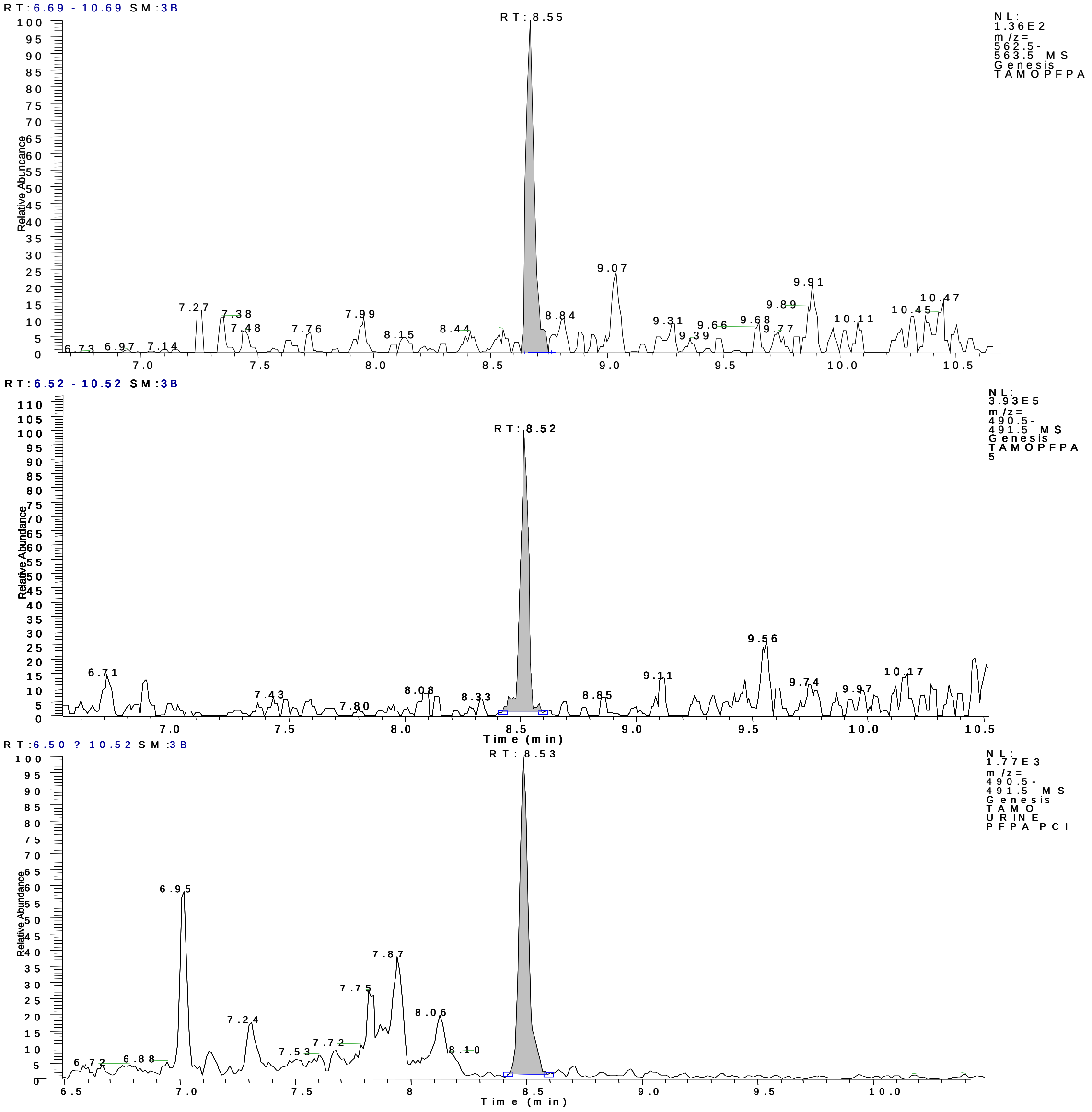


Fig. 9. Extracted ion chromatograms of EI mode (a), NICI mode (b) and PICI mode (c) of PFPA derivative of tamoxifen metabolite in human urine by GC/MS.

Fig. 10은 hydroxymethoxytamoxifen-PFPA의 NCI 질량 스펙트럼으로 $[M-PFP]^-$ 이온 (m/z 344)이 39%로 그리고 분자 내 아미노기의 β위치의 탄소 사슬이 끊어진 m/z 491이 14%의 봉우리비로 나타났다.

4. 결 론

tamoxifen 대사체의 GC/MS 이용을 위한 acylation 방법에 있어서의 최적 반응조건은 반응 온도 50 ℃와 반응 시간 30 min 이었다. 뇨시료에 있어서 tamoxifen 대사체 추출에 대한 최적 pH는 7.0 이었르며, 추출 용매는

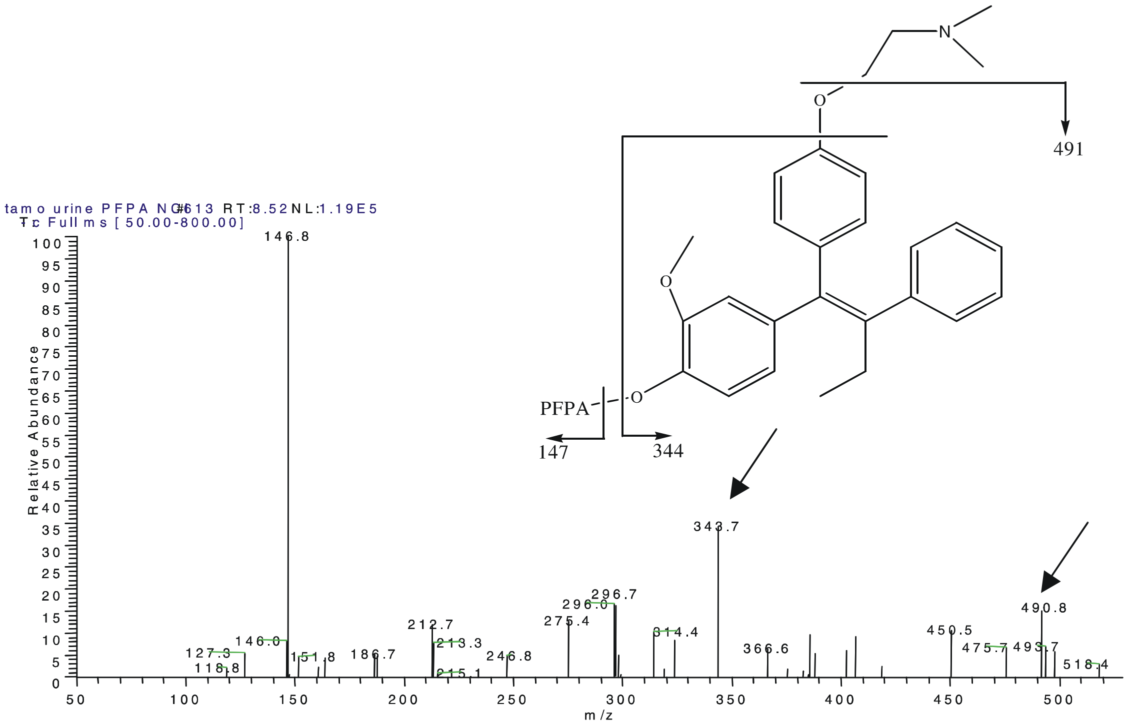


Fig. 10. Chemical structure and mass spectrum of PFPA derivative of tamoxifenmetabolite (hydroxymethoxytamoxifen) by GC/MS.

디에틸에테르가 적절함을 알 수 있었다. Tamoxifen 대사체의 작용기에 TFAA, PFPA, HFBA로 유도체 시킨 후 CI법과 EI법을 비교 분석한 결과, NCI법에서는 주로 [M-HF]$^-$ 또는 [M-2HF]$^-$이온이 주 봉우리로 나타났다. NCI법에서 감도가 뛰어난 할로겐원소가 함유된 유도체 시약을 사용하였기 때문에 EI법에 비하여 감도가 좋고, 한번 주입으로 생체시료 내에 미량 존재하는 약물을 검출 및 확인 할 수 있었다. 한편 GC/MS로 tamoxifen대사체를 분석한 결과 tamoxifen이 간에서 대사 될 때 주 대사체로 알려져 있는 4-hydroxytamoxifen은 검출 되지 않았고 hydroxymethoxytamoxifen이 주 대사체로 검출되었다. Acylation 유도체 과정을 거친 hydroxymethoxytamoxifen은 NCI에서의 토막 이온을 조사한 결과 아미노 그룹의 β-cleavage가 일어난 m/z 491 이온, acylation 유도체 한 분자가 쪼개진 m/z 344이온이 비교적 높게 검출되었다.

참고 문헌

1. Mihailescu Ruxandra, Y. Hassan, *Biomed. Chromatogr,* **14,** 180, 2000.
2. K. B. Horwitz. *Ann. NY Acad. Sci,* **684**, 63. 1993.
3. M. L. Graham, N. L. Krett, L. A. Miller, K. K. Leslie, D. F. Gordon, W. M. Wood, L. L. Wei. *Cancer Res,* **50**, 6208, 1990.
4. S. Raam, N. Robert, C. A. Pappas, H. Tamura. *J. Natl. Cancer Inst,* **80**, 756. 1998.
5. G. K. Scott, P. Kushner, P. Vigne, C. C. Benz. *J. Clin. Invest,* **88**, 700, 1991.
6. B. D. Foster, D. R. Cavener, F. F. Parl. *Cancer Res*, **51**, 3405, 1991.
7. L. C. Murphy, H. Dozlaw. *Mol. Endocrinol.,* **3**, 611, 1989.
8. Lu Wenzhe, K. Poon Grace, Paul L.

Carmichael, R. B. Cole, *Anal. Chem.*, **68**, 668, 1996.
9. E. Robinson, G. G. Kimmick , H. B. Muss, *Drugs & Aging*, **8,** 329, 1996.
10. M. H. Gail, J. P. Costantino, J. Bryant, *J. Natl. Cancer Inst*, **91**, 1829, 1999.
11. C. K. Lim, R.M. Jones, *J. Chromatogr. A*, **722**, 249, 1996.
12. C. K. Lim, Russell M. Jones, *Rapid Communication*, **16**, 361, 2002.
13. R. S. Plumb, H. Warwick, D. Higton, Rapid Commun. Mass Spectrom, **15**, 297, 2001.
14. D. De Vos, P. H Slee, R. J Briggs, D. Stevenson, *Cancer Chemother. Pharmacol*, **42**, 512, 1998.
15. R. J. Santen, A. Manni, H. Harvey, et al., *Endocr. Rev,* **11**, 1, 1990.
16. Li Xing-Fang, Spencer Carter, *J. Chromatogr. A*, **914**, 5, 2001.