

노시료에 함유된 7-keto-DHEA-acetate의 대사체에 관한 연구 (I)

김연제* · 이진희

한국과학기술연구원 도핑컨트롤센터
(2004. 6. 30 접수, 2004. 7. 16 승인)

A study of the metabolites for 7-keto-DHEA-acetate in human urine

Yunje Kim* and Jinhee Lee

Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. box 131,
Cheongryang, Seoul, Korea

(Received Jun. 30, 2004, Accepted Jul. 16, 2004)

요 약 : 근육강화제의 일종인 7-keto-dehydroepiandrosterone-acetate (7-keto-DHEA-acetate)를 투여시킨 후 사람의 뇨를 통해서 배설되는 대사체들을 확인하고 그 결과를 향후 도핑 검사에 있어서 금지 약물로 선정될 경우를 대비한 기초 연구를 진행하고자 하였다. 먼저 뇨 시료의 매트릭스로부터 7-keto-DHEA-acetate가 방해 없이 효과적으로 검출되는 것을 알아보았으며, 약물을 복용한 dosed urine에 배설되는 대사체를 검출하기 위하여 LC/ESI/MS와 GC/MSD를 사용하였다. 그 결과 바탕 뇨 시료에서 나타나지 않은 여러 개의 새로운 화합물들이 복용 뇨 시료에서 검출되었으며 이들을 M1, M2, M3, M4 및 M5로 구별 하였으며 이 결과들로부터 대사체 M1과 M2는 물분자가 제거될 수 있는 히드록시기나 케톤기를 세 개 이상 가진 구조일 것으로 예상되었다. M1의 경우, m/z 518 이 분자이온이라면 분자량이 302인 이 대사체는 3번과 17번 탄소 위치에 케톤기, 7번 탄소위치에서 히드록시기를 가지는 구조인 7-OH-androstendione이라고 예상 할 수 있었으며, M2의 경우에는 M1 대사체와 마찬가지로 m/z 518이 분자이온이라면 분자량이 302인 이 대사체는 3번 탄소 위치에 히드록시기가 있고 17번 탄소 위치에 케톤기를 가지며 7번 탄소위치에 케톤기가 있는 구조인 7-keto-DHEA로 판단되었다.

Abstract : 7-keto-dehydroepiandrosterone-acetate (7-keto-DHEA-acetate) is an anabolic steroids, and we studied basically to the metabolites of it after human dosing. We tested the matrix effect from human urine to detect the 7-keto-DHEA-acetate. And LC/ESI/MS and GC/MSD was used to detect the metabolites in dosed urine. We found the some unknown compound from dosed urine (M1, M2, M3, M4 and M5), and from these results, we supposed that these compounds have the more than 3 hydroxyl and/or ketone group. Metabolite M1 was supposed that molecular weight is 302 and 3-,17- diketone and

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-958-5060 Fax : +82+(0)2-958-5059

E-mail : yjkim@kist.re.kr

7-hydroxyl compound (7-OH-androstendione). Metabolite M2 was supposed that the molecular weight was same to M1 and 7-,17- diketone and 3-hydroxyl compound (7-keto-DHEA).

Key words : 7-keto-dehydroepiandrosterone-acetate, metabolites, human dosed urine, metabolite M1, metabolite M2, LC/ESI/MS, GC/MS

1. 서 론

근육강화제의 일종인 7-keto-dehydroepiandrosterone-acetate (7-keto-DHEA-acetate)는 인터넷에서 쉽게 구매가 가능하고, 미국 내에서는 처방전 없이도 팔리는 건강보조식품으로 알려져 있다. 또한 이 약물이 체내에 흡수되면 합성 동화성 근육강화 효과를 나타내기 때문에 운동선수들에게 오용될 소지가 많다. 또한 이 약물은 체내에 흡수되고 난 후 아세트산기가 빠르게 가수 분해되어, dehydroepiandrosterone (DHEA)의 대사체인 7-keto-DHEA로 전환되는 물질이다.¹ 7-keto-DHEA-acetate의 알려진 효능으로는, 항산화 효과, 노화 방지 효과가 있으며, 동물실험의 경우, 체중이 감소되고 기억력이 증가되는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 아울러 이 약물은 체내에 흡수되어 testosterone이나 DHEA 같은 성호르몬으로 대사되지 않는 특징이 있다.¹⁻³

현재까지 7-keto-DHEA-acetate의 인체 내 뇨 시료에 있어서의 대사과정에 관한 연구는 활발히 진행되고 있지 않은 편이다.¹⁻³ 그러나 7-keto-DHEA-acetate는 DHEA의 대사체인 7-keto-DHEA로 쉽게 전환되기 때문에 체내에서 대사되는 과정과 화학적 및 약리학적 거동이 7-keto-DHEA와 유사할 것으로 예상된다. 최근까지 알려진 7-keto-DHEA의 대사체는 testosterone, epitestosterone, androsterone, etiocholanolonolone과 같은 내인성 스테로이드들이다.⁴⁻⁶ 7-keto-DHEA를 쥐의 간으로부터 in vitro 실험을 수행하여 대사체를 확인한 결과 7-keto-DHEA, 7 α -OH-DHEA, 7 β -OH-DHEA, 7 α -triol, 7 β -triol 등이 주 대사체로 발견되었다.²

현재 7-keto-DHEA-acetate의 모화합물인 DHEA는 복용 시 근육동화작용을 일으키므로 금지약물중의 하나로 지정되어 있으며, 이에 대한 대사과정 연구도 활발히 진행되고 있다.⁷⁻¹⁰ 그러나 7-keto-DHEA-

acetate는 건강보조 식품의 용도 외에도 근육강화제의 목적으로 오용될 소지가 많은 약물로서 IOC 등으로부터 복용 금지약물로 지정될 가능성이 높지만, 지금까지 사람의 체내에서 일어나는 대사과정과 이 때 생성된 대사체들에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.^{3,11-13}

본 연구에서는 7-keto-DHEA-acetate를 투여시킨 후 사람의 뇨를 통해서 배설되는 대사체들을 확인하고 그 결과를 향후 도핑 검사에 있어서 금지약물로 선정될 경우를 대비한 기초 연구를 진행하고자 하였다.

2. 실 험

2.1. 측정기기 및 실험기구

본 연구에서는 시료분석을 위해 시료 자동주입기 (HP 1100 Series G1313A Autosampler)가 장착된 Hewlett Packard사의 HP 1100 Series HPLC를 사용했으며 HPLC에서 분리된 각 물질들의 분자량 확인과 구조 예측을 위해 Agilent (Palo Alto, CA, USA)사의 Mass Spectrometer가 장착된 LC/MSD Trap을 사용하였다. 이 때 사용된 이온화 법은 ESI/Positive mode이었다. Column은 Agilent사 Hypersyl-ODS C₁₈ column (4.6 mm I.D × 100 mm Length, particle size 5 μ m)을 사용하였다.

예측한 대사체들을 재확인하기 위해 Hewlett Packard사의 6890 기체 크로마토그래프에 5973 질량선택성검출기를 직접 연결한 GC/MSD를 사용하였다. 시료는 HP 7683 자동시료주입기 및 운반가스 자동 제어기를 사용하여 주입하였다.

진탕 추출을 위해서 Edmund Buchler사의 7400 Rubigen shaker, 원심분리기는 Varifuge-F Haeraus를 사용하였고 시료 혼합을 위해서는 Thermolyne사의 vortex mixer를, 시료농축을 위해서는 Thermolyne사의 16500 dry bath와 Zymark (Hopkinton, MA, USA)

사의 Turbovap® LV evaporator, Büchi Rotavapor R-200 진공증발기를 사용하였다. 유도체화 반응의 온도조절을 위해서 Liebig Labortechnik의 Heating block을 사용하였고, 유기층 수거를 위해 사용한 Freezer는 LAUDA사 ecoline RE 112였다.

2.2. 시약 및 시료

1) 시약

본 연구에 사용된 합성 동화성 스테로이드인 7-keto-DHEA-acetate는 경구투여용으로 Vitamin World, Inc. (Ronkonkoma, NY 11779, U. S. A)사제이며 내부 표준물질인 methyltestosterone은 Sigma 사제로서 내부표준물질 10 mg을 메탄올에 녹여 20 µg/mL 표준용액으로 만들어 사용하였다. 시료 전처리에 사용한 Serdolite® PAD-I resin (100~200 µm)은 독일 Serva사제로서, 아세톤 및 메탄올로 씻은 후 증류수로 침강시키는 방법으로 활성화시켜 사용하였다. 그리고 β-glucuronidase/arylsulphatase는 *Helix Pomatia*에서 추출한 것으로 독일 Boehringer Mannheim 사제이다. 완충용액 제조에 사용된 KH₂PO₄와 K₂HPO₄는 Aldrich사제 특급시약으로, 이들 용액을 pH 7.0이 되도록 만들고 완충용액으로 사용하였다.

한편 HPLC에서 이동상으로 사용된 Acetonitrile은 HPLC등급으로 Baker 사제를 사용하였다. 또한 HPLC 이동상인 아세토니트릴과 3차 증류수는 각각 pore size 0.5 µm와 0.45 µm의 Millipore사제 membrane filter로 여과한 후 20분간 탈기시켜 사용하였다.

N-methyl-N-(trimethyl-N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoro-acetamide (MSTFA)와 Ammonium iodide 및 Dithioerythriol (DTE)은 Sigma 사제로서 500:4:2 (w/w/w)의 비율로 혼합하여 유도체화 시약으로 사용하였다.

2) 노시료의 채취

실험에 사용한 노 시료는 건강한 성인여자(나이: 23 세, 체중: 45 kg)에게 Vitamin World에서 판매하는 7-keto-DHEA-acetate 2 정 (25 mg/tablet)을 일 회 복용시킨 후 5시간부터 58 시간까지의 소변을 채취하였다. 채취된 노 시료는 실험에 사용되기 전까지 2-3 °C의 냉장상태로 보관하였다.

2.3. 실험 방법

1) 노 시료 전처리

PAD-I Resin을 지름 0.5 cm 의 disposable pasteur pipet에 약 3 cm 정도 채운 후 3 mL의 증류수로 충분히 세척하여 활성화 시켰다. 노 시료를 2500 rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후, 활성화된 PAD-I 이 충전된 컬럼에 1 mL 씩 5회에 걸쳐 용리시킨 다음 내부 표준물질인 methyltestosterone 10 µg/mL 용액을 20 µL 첨가하였다. 흡착된 컬럼에 같은 량의 증류수로 용리시킨 후, 메탄올 1 mL로 5회에 걸쳐 추출하였다. 추출된 메탄올을 회전 진공 증발기로 증발시킨 후, 그 잔류물에 0.2 M acetate buffer (pH 4.2) 2 mL와 *Helix Pomatia*에서 추출한 β-glucuronidase/arylsulphatase 50 µL을 넣고 55 °C에서 3시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 후 잔류물을 함유한 시험관을 실온에서 냉각시키고 potassium carbonate 약 200 mg을 가하여 pH를 8-9로 조절한 뒤, 수분이 제거된 distilled diethyl ether 5 mL을 가한 다음 shaker를 사용하여 10분간 진탕시켜 추출하였다. 이 혼합용액을 2500 rpm에서 5분간 원심분리하고 -30°C의 냉동기에서 buffer층만 열게 하였다. 얼지 않은 ether층을 다른 시험관으로 옮기고 질소 가스로 완전히 증발시켜 건조한 추출물을 얻었다.

2) LC/ESI/MS를 이용한 대사체 분석

7-keto-DHEA-acetate를 복용하기 전에 채취한 노 시료와 약을 복용하고 5시간 후에 채취한 노 시료로부터 추출한 잔류물에 각각 200 µL의 메탄올을 가한 다음 자동 시료 주입기로 LC/ESI/MS에 10 µL씩 주입시켰다. 기울기 용리법으로 LC/ESI/MS 크로마토그램과 질량스펙트럼을 작성하였으며 이때 사용된 LC/ESI/MS와 LC/ESI/MS/MS의 측정 조건은 Table 1에 수록하였다.

3) GC/MSD를 이용한 대사체 분석

GC/MSD 분석을 위하여 7-keto-DHEA-acetate를 복용하기 전에 채취한 노 시료와 복용 후 0-5시간 동안 채취한 노 시료로부터 추출한 성분들을 실릴 (silyl) 유도체화 시키기 위해 MSTFA/NH₄I/DTE (500:4:2, w/w/w) 혼합물질 50 µL을 가하여 60 °C에서 15분 동안 유도체화 시켜 GC/MSD에 2 µL을 주입하였다. 이 때 사용된 GC/MSD의 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 1. LC/ESI/MS operating conditions for 7-keto-HEA -acetate and metabolites

Instrument: Agilent 1100 series LC/ESI/MS system		
Column: Hypersil ODS 4.6 mm I.D x 100 mm length, particle size 5 μ m		
Flow rate: 0.6 ml/min		
Mobile phase:		
time	acetonitrile	water
initial	20%	80%
25min	45%	55%
Injection volume: 10 μ L		
Ionization mode : ESI (electrospray ionization)		
Ion mode: positive mode		
Drying gas: N ₂		
Drying gas temp. : 350 $^{\circ}$ C		
Drying gas flow: 10 L/min		
Nebulizer pressure : 40 psi		
Capillary exit voltage: 80 eV		

Table 2. GC/MSD operating conditions for the derivatives of 7-keto-DHEA-acetate and metabolites

Instrument: Agilent 1100 series LC/ESI/MS system				
GC/MS: Agilent 6890 GC / 5973 MSD				
Column: Ultra-1 (cross-linked methylsilicon 17 m X 0.2 mm I.D X 0.33 μ m film thickness)				
Carrier gas : He at 0.6 mL/min				
Inlet pressure : 16.10 psi				
Split ratio : 5:1				
Injection port temp. : 280 $^{\circ}$ C				
Transfer line temp. : 300 $^{\circ}$ C				
Oven temp. program :				
initial temp. ($^{\circ}$ C)	initial time (min)	rate ($^{\circ}$ C/min)	final temp. ($^{\circ}$ C)	final time (min)
120	0	70.0	180	0.86
		4	235	13.75
		30	300	2.17

3. 결과 및 고찰

3.1. 뇨 시료 중 7-keto-DHEA-acetate 및 그 대사체들의 분리 및 검출

1) 뇨 시료 중 7-keto-DHEA-acetate의 분리

뇨 시료의 매트릭스로부터 7-keto-DHEA-acetate가 방해 없이 효과적으로 검출되는 것을 알아보기 위해

7-keto-DHEA-acetate 표준용액, 바탕 뇨 시료, 표준용액 (100 μ g/mL, 200 μ L)을 첨가시킨 뇨 시료 (spiked urine) 및 약물을 복용한 후 5시간 후에 채취한 뇨 시료 (dosed urine)를 전처리 방법에 따라 처리한 다음 LC/ESI/MS에 주입한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1 (a)은 7-keto-DHEA-acetate 표준물질의 extracted ion chromatogram (EIC)이며, 7-keto-DHEA-acetate가 머무름 시간 19.5 min에서 검출되었다. 이때의 m/z 285이온은 7-keto-DHEA-acetate에서 아세트산기가 가수분해 된 이온이다. 한편 spiked urine에서는 Fig.1 (b)와 같이 표준물질과 동일한 머무름 시간에서 검출되었으며 바탕 뇨 시료의 결과와 함께 검토해 볼 때 방해물질의 영향이 없기 때문에 7-keto-DHEA-acetate의 효과적인 검출이 가능한 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1 (d)에 나타난 dosed urine의 크로마토그램을 보면 7-keto-DHEA-acetate는 검출되지 않는 반면 17.5min에서 바탕 뇨 시료에서는 검출 되지 않는 새로운 봉우리가 검출되었다. 이 봉우리는 7-keto-DHEA-acetate의 대사체로 추정되며, Marwa 등의 연구에 의하면 7-keto-DHEA-acetate를 쥐에게 복용시킨 후 배설되는 뇨로부터 모 화합물이 전혀 검출되지 않으며 이것은 약물이 체내에 흡수되면서 초산기가 빠르게 가수분해 되어 7-keto-DHEA로 변화하기 때문이라고 했다.² 따라서 사람의 경우에도 모 화합물이 검출되지 않은 것은 체내에 흡수된 7-keto-DHEA-acetate가 7-keto-DHEA로 변화된 후 다른 대사체로 변화하였거나 혹은 본 연구에 사용한 뇨 시료는 인체 시료이기 때문에 Marwa 등의 연구와는 다른 대사과정이 진행되었을 수도 있다.

2) 뇨 시료 중 7-keto-DHEA-acetate의 대사체 검출

약물을 복용한 dosed urine에 배설되는 대사체를 검출하기 위하여 바탕 뇨 시료와 복용 뇨 시료를 전처리 과정을 거쳐 LC/ESI/MS와 GC/MSD로 검출하였다. Fig. 2는 LC/ESI/MS에서 얻은 바탕 뇨 시료와 복용 뇨 시료의 Total Ion Chromatogram (TIC)을 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 바탕 뇨 시료에서 나타나지 않은 여러 개의 새로운 봉우리가 복용 뇨 시료에서 검출되었는데, 이 봉우리들이 7-keto-DHEA-acetate의 대사체일 것으로 추정하였다. Fig. 3은 LC/ESI/MS로 검출한 모 화합물과 각 대사체들로 추정되는 봉우리들에 대한 EIC이다. 그림의 EIC에서 보는 바와 같이 복용 뇨 시료에서 대사체로

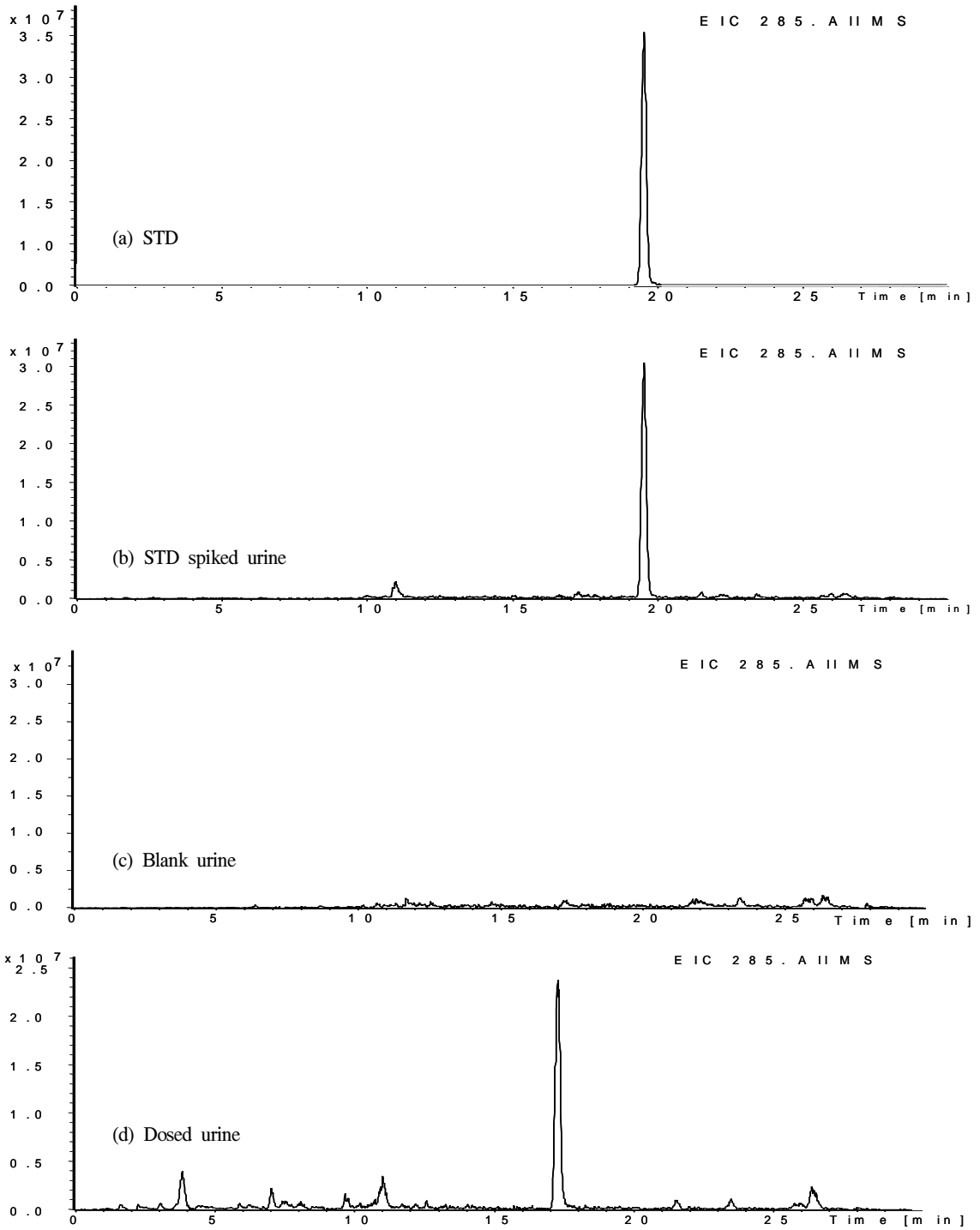


Fig. 1. LC/ESI/MS chromatograms of standard (a), STD spiked urine (b), blank urine (c) and dosed urine (d).

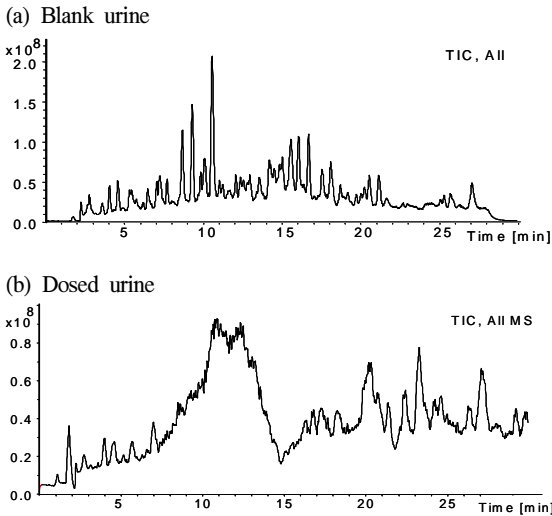


Fig. 2. Total ion chromatograms of blank urine (a) and dosed urine (b) by LC/ESI/MS.

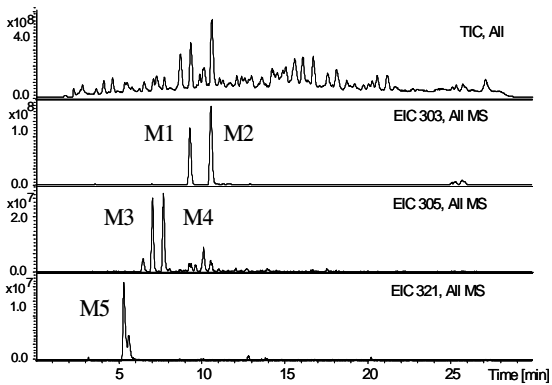


Fig. 3. Total ion chromatogram and extracted ion chromatograms of m/z 303, m/z 305 and m/z 321 by LC/ESI/MS.

추정되는 5개의 봉우리를 검출 하였으며 이들을 M1, M2, M3, M4 및 M5로 구별 하였다. 한편, 7-keto-DHEA-acetate와 대사체들을 GC/MSD로 검출하기 위해서는 먼저 시료를 극성 감소를 위한 유도체화를 진행시켜야 하며, 본 연구에서는 MSTFA, NH₄I와 DTE가 500 : 4 : 2 (w/w/w) 로 혼합된 시약을 사용하여 60 °C에서 15분간 반응시켰다. 이러한 유도체화 과정을 거친 후 GC/MSD에 시료 주입한 결과는 Fig. 4에 나타내었으며 이는 GC/MSD로 측정한 바탕뇨 시료와 복용 뇨 시료의 TIC 이다. LC/ESI/MS의 크로

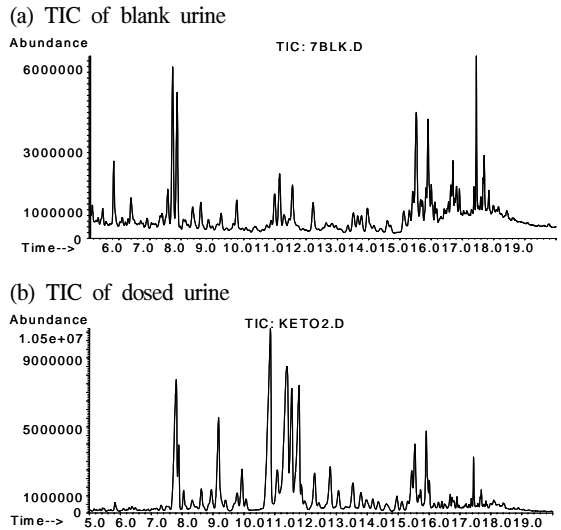


Fig. 4. Total ion chromatograms of blank urine (a) and dosed urine (b) by GC/MS.

마토그램과 마찬가지로 바탕 뇨 시료에서 나타나지 않은 여러 개의 봉우리가 복용 뇨 시료에서 검출되었다.

3.2. LC/ESI/MS에 의한 대사체 검출

1) 표준 7-keto-DHEA-acetate

일반적으로 대사체들은 모화합물에 비해 비교적 간단한 작용기의 변화만 있기 때문에 모 화합물의 토막이온 양상은 대사체의 검출에 있어 유용한 정보가 될 수 있다. 따라서 LC/ESI/MS/MS를 이용하여 먼저 모 화합물인 7-keto-DHEA-acetate의 토막이온 생성을 살펴보았다. 본 연구에 사용된 LC/ESI/MS/MS의 이온화 방법은 양이온 모드이었으며 이 경우 H⁺를 비롯하여 Na⁺ 또는 K⁺ 등과 같은 양이온들이 첨가된 첨가 이온 (adduct ion)을 생성한다. 따라서 ESI/MS 질량 스펙트럼에서는 분자이온의 질량으로부터 m/z 이 1, 23, 39 만큼 증가된 양이온들이 검출되며 이들 결과는 분자량 확인에 유용한 정보가 된다.

LC/ESI/MS로부터 검출된 7-keto-DHEA-acetate의 TIC, MS 및 MS/MS 스펙트럼을 Fig. 5에 나타내었다. 먼저 Fig. 5 (a)의 TIC를 보면 표준 7-keto-DHEA-acetate가 머무름 시간 19.5min에서 나타났으며 이것의 질량 스펙트럼 Fig. 5 (b)를 보면 m/z 285가 검출되었다. 이것은 7-keto-DHEA-acetate에서 아세트산기가 해리된 후 H⁺가 첨가되어 생성된 것으로 추정된다. Fig. 5 (C)는 MS 스펙

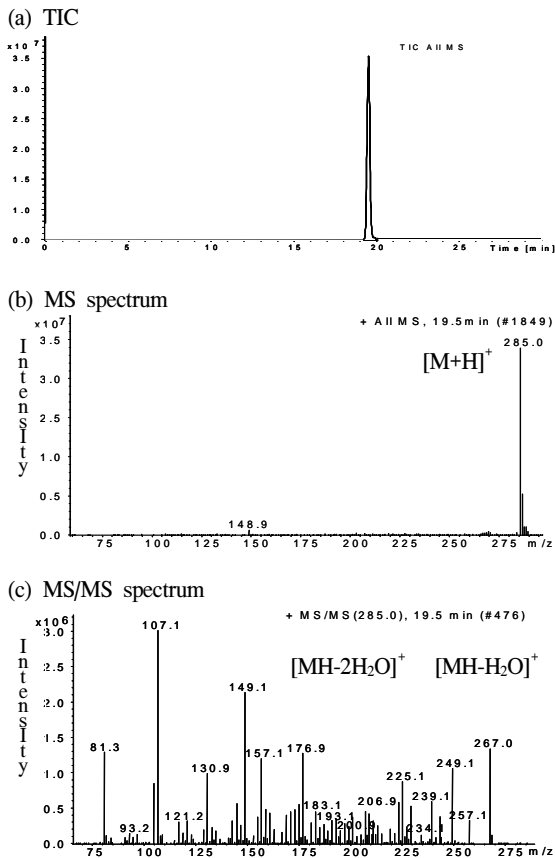


Fig. 5. LC/ESI/MS chromatogram of 7-keto-DHEA-acetate standard: EIC (a), MS spectrum (b) and MS/MS spectrum (c) of m/z 285.

트럼에서 가장 큰 봉우리의 m/z 285를 어미이온으로 하여 다시 토막이온화 시킨 MS/MS 질량스펙트럼이다. 그림에서 보는 바와 같이 m/z 267 및 249 등의 새로운 이온들이 생성되었다. m/z 267에서 나타난 봉우리는 m/z 285로부터 한 개의 H₂O가 제거된 [285-H₂O]⁺에 의한 것이며, m/z 249는 두개의 H₂O가 떨어져 나간 토막이온으로 추정하였다. Fig. 6은 GC/MSD를 이용하여 얻은 표준 7-keto-DHEA-acetate의 TIC와 EIC 그리고 질량스펙트럼을 나타내었다. Fig. 6(a)의 TIC에서는 7-keto-DHEA-acetate가 8.315 min에서 검출되었으며 Fig. 6(b)의 질량스펙트럼을 보면 m/z 428은 7-keto-DHEA-acetate 유도체의 분자이온에서 아세트산기가 떨어진 후 실릴화가 진행된 화합물의 토막이온으로 추정된다. 그리고 m/z 413은 TMS 유도체에서 나타나는 가장 일반적인 토막반응인 TMS 유도체로부터 메틸기가 떨어져 나가

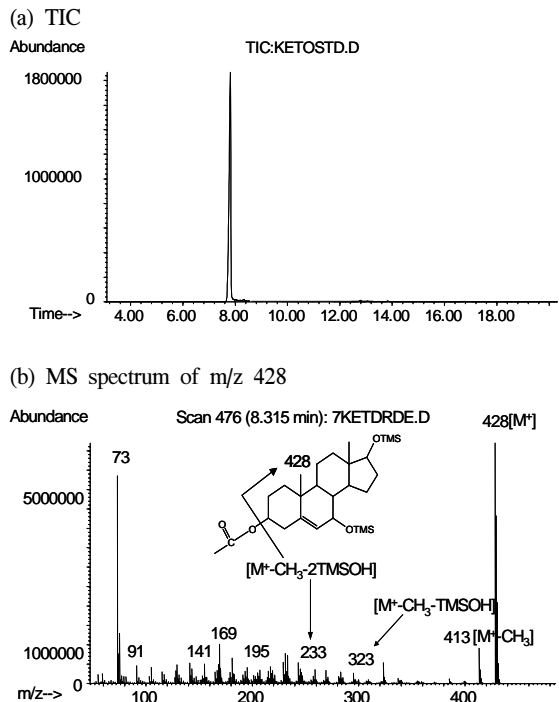


Fig. 6. TIC (a) and MS spectrum (b) of 7-keto-DHEA-acetate.

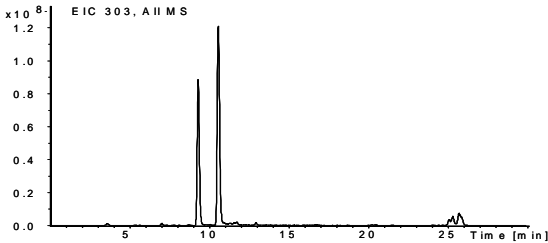
면서 생성된 [M-CH₃]⁺ 이온으로 보인다. m/z 323 이온은 [M-CH₃-TMSOH]⁺, m/z 233은 [M-CH₃-2TMSOH]⁺의 토막이온으로 예상된다.

2) 대사체 M1

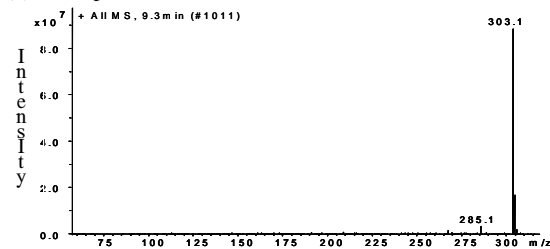
복용 뇨 시료 중의 대사체를 확인하기 위하여 LC/ESI/MS를 이용하여 얻은 질량스펙트럼으로부터 대사체들의 분자량을, 그리고 LC/ESI/MS/MS를 이용하여 얻은 질량스펙트럼에서 대사체들의 구조에 관한 정보를 얻고자 하였다. 먼저 Fig. 7(a)의 EIC에서 대사체 M1의 머무름 시간은 9.3 min이며 질량스펙트럼 Fig. 7(b)에서는 m/z 303이 검출되었다. 이것은 대사체 M1의 어미분자에 H⁺가 첨가되어 생성된 [M+H]⁺에 의한 것이 라면 대사체 M1의 분자량은 302라고 추정할 수 있다. Fig. 7(c)는 MS 스펙트럼에서의 m/z 303을 어미이온으로 하여 다시 한번 토막이온화 시킨 MS/MS 질량스펙트럼이며 m/z 285, 267, 249 이온이 검출되었다. m/z 285 이온은 [M+H]⁺로부터 한 개의 H₂O가 제거된 [MH-H₂O]⁺에 의한 것이며, m/z 267은 [M+H]⁺로부터 두 개의 H₂O가 떨어져 나간 토막이온으로 그리고 m/z

249는 $[M+H]^+$ 로부터 세 개의 H_2O 가 떨어져 나간 토막 이온으로서 대사체 M1은 물분자가 제거될 수 있는 히드록시기나 케톤기를 세 개 이상 가진 구조일 것으로 예상된다.

(a) EIC of Metabolite M1



(b) MS spectrum



(c) MS/MS spectrum of m/z 303

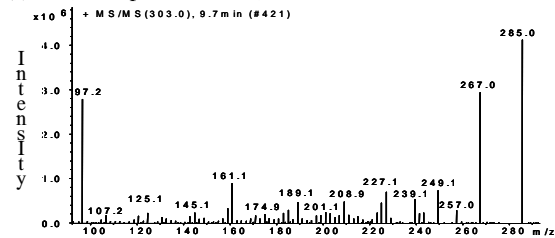


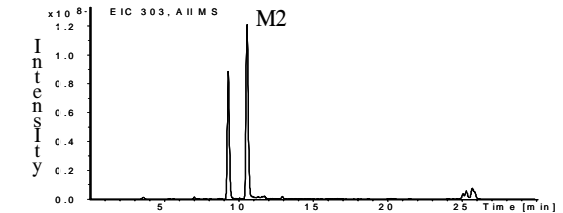
Fig. 7. Extracted ion chromatogram of metabolite M1 (a), MS spectrum of metabolite M1 (b), MS/MS spectrum (c) of m/z 303.

2) 대사체 M2

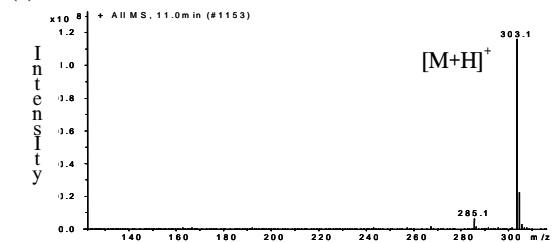
Fig. 8(a)의 대사체 M2에 대한 EIC를 보면 대사체 M2는 머무름 시간 10.5min에서 나타났으며, 질량 스펙트럼은 Fig. 8(b)이다. Fig. 8(c)는 MS 스펙트럼에서의 m/z 303을 어미이온으로 하여 다시 한번 토막이온화한 MS/MS 질량스펙트럼이다. 그림에서 보는 바와 같이 m/z 285, 267, 249 이온이 생성되었으며, m/z 285 이온은 $[M+H]^+$ 이온으로부터 한 개의 H_2O 가 떨어져 나간 $[MH-H_2O]^+$ 이온, m/z 267은 $[M+H]^+$ 이온으로부터 두 개의 H_2O 가 떨어져 나간 토막이온, 그리고 m/z 249는

$[M+H]^+$ 이온으로부터 세 개의 H_2O 가 떨어져 나간 토막이온이라고 판단된다. 따라서 대사체 M2는 대사체 M1의 경우와 마찬가지로 물분자가 제거될 수 있는 히드록시기나 케톤기를 세 개 이상 가진 구조일 것이라고 예상되었다.

(a) EIC of Metabolite M2



(b) EIC of M1 and M2



(c) MS/MS spectrum

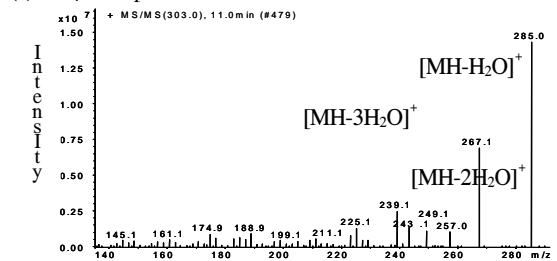


Fig. 8 Extracted ion chromatogram of metabolite M2 (a), MS spectrum of metabolite M2 (b), MS/MS spectrum (c) of m/z 303.

3.3. GC/MSD를 이용한 뇨 시료 중 7-keto-DHEA-acetate 대사체들의 검출

복용 뇨 시료내의 7-keto-DHEA-acetate 대사체들에 대해 LC/ESI/MS와 LC/ESI/MS/MS에서 얻은 결과들부터 각 대사체들의 구조에 모두 세 개 이상의 히드록시기와 케톤기가 있다면 이 들 히드록시기 혹은 케톤기를 유도체화 시키는 경우 TMS에 의해 분자량보다 216이 늘어난 TMS-enol-ether 유도체를 생성할 것으로 예상된다. 따라서 각 대사체의 분자량에 216을 더한 m/z값을

가지는 분자이온으로 대사체들의 검출을 시도하였다. 먼저 Fig. 9는 GC/MSD를 이용하여 얻은 TIC 와 EIC 이다. Fig. 9 (b)에서 보는 바와 같이 LC/ESI/MS로부터 얻은 결과인 대사체 M1과 M2의 분자량 302에 216을 더한 값인 m/z 518의 이온 크로마토그램에서 머무름 시간 11.358 min과 11.534 min에서 각각 나타났다. 머무름 시간 11.358 min의 질량 스펙트럼을 Fig. 10 (a)에 나타내었으며 아울러 Fig. 10 (b)에서는 11.534 min의 질량스펙트럼을 나타내었다.

먼저 Fig. 10 (a)의 질량스펙트럼을 보면 m/z 518 이온이 분자이온, m/z 503은 분자이온으로부터 메틸기가 떨어져 나가면서 생성된 $[M-CH_3]^+$ 토막이온, m/z 429은 분자이온으로부터 -TMSOH가 떨어져 나간 토막이온 그리고 m/z 323 은 분자이온으로부터 메틸기와 두 개의 -TMSOH가 떨어져 나간 토막이온으로서 이것은 TMS 유도체에서 일반적으로 나타나는 토막반응이다. m/z 180은 B-ring이 깨지면서 나타나는 이온으로 3번 탄소위치에 케톤기 또는 히드록시기가 있는 것으로 예상 할 수 있으며, 또한 m/z 169는 C-ring이 깨지면서 나타나는 이온으로 17 번 탄소 위치에도 케톤기 또는 히드록시기가 있는 구조임을 예상 할 수 있다. 따라서 m/z 518이 분자 이온이라면 분자량이 302인 이 대사체는 3번과 17 번 탄소 위치에 케톤기, 7번 탄소위치에서 히드록시기를 가지는 구조인 7-OH-androstendione이라고 예상 할 수 있다.² 한편 머무름 시간 11.534 min의 크로마토그램에서 얻은 질량스펙트럼인 Fig. 10 (b)에서도 Fig. 10 (a)에서와 마찬가지로 m/z 518을 분자 이온으로, m/z 503은 분자이온으로부터 메틸기가 떨어진 $[M-CH_3]^+$ 토막이온, m/z 429는 분자이온으로부터 -TMSOH가 그리고 m/z 323은 분자이온으로부터 메틸기와 두 개의 -TMSOH가 떨어진 $[M-CH_3, -2TMSOH]^+$ 토막이온이다. m/z 129는 A-ring이 깨지면서 나타나는 토막이온으로 3번 탄소위치에 히드록시기가 있으며, m/z 169는 C-ring이 깨어진 토막 이온으로 17번 탄소 위치에 케톤기가 있는 구조인 것으로 판단된다. 따라서 이들 결과들로부터 M1 대사체와 거의 유사하게 m/z 518이 분자이온이라면 분자량이 302인 이 대사체는 3번 탄소 위치에 히드록시기가 있고 17번 탄소 위치에 케톤기를 가지며 7번 탄소위치에 케톤기가 있는 구조인 7-keto-DHEA 로 판단된다.²

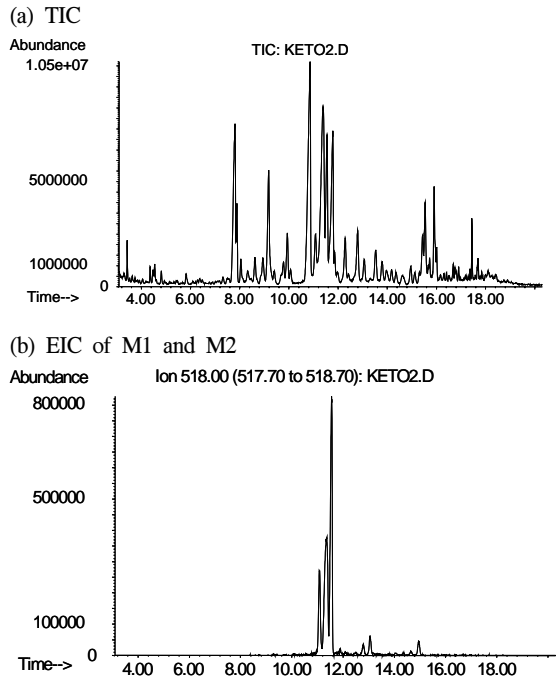


Fig. 9 Total ion chromatogram (a), and extracted ion chromatogram (b) of M1 and M2.

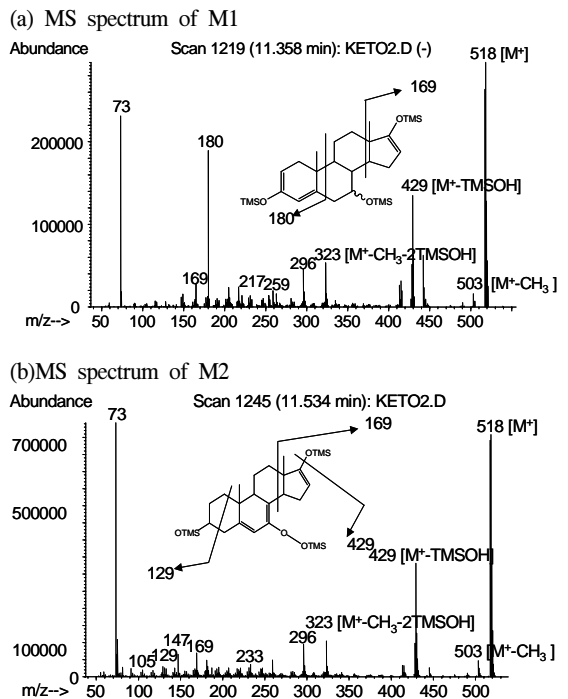


Fig. 10. MS spectra of M1 (a) and M2 (b).

4. 결 론

뇨 시료의 매트릭스로부터 7-keto-DHEA-acetate가 방해 없이 효과적으로 검출되는 것을 알아보기 위해 7-keto-DHEA-acetate 표준용액, 바탕 뇨 시료, 표준용액을 첨가시킨 뇨 시료 (spiked urine) 및 약물을 복용한 후 5시간 후에 채취한 시료 (dosed urine)를 LC/ESI/MS에 주입한 결과에서 보면, spiked urine에서는 표준물질과 동일한 머무름 시간에서 검출되었으며 바탕 뇨 시료의 결과와 함께 검토해 볼 때 방해물질의 영향이 없기 때문에 7-keto-DHEA-acetate의 효과적인 검출이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

또한, 약물을 복용한 dosed urine에 배설되는 대사체를 검출하기 위하여 바탕 뇨 시료와 복용 뇨 시료를 전처리 과정을 거쳐 LC/ESI/MS와 GC/MSD로 검출한 결과를 보면 바탕 뇨 시료에서 나타나지 않은 여러 개의 새로운 봉우리가 복용 뇨 시료에서 검출되었으며 이들을 M1, M2, M3, M4 및 M5로 구별 하였다. 뿐 만 아니라 이 결과들로부터 대사체 M1과 M2는 물분자가 제거될 수 있는 히드록시기나 케톤기를 세 개 이상 가진 구조일 것으로 예상되었다. M1의 경우, m/z 518이 분자이온이라면 분자량이 302인 이 대사체는 3번과 17번 탄소 위치에 케톤기, 7번 탄소위치에서 히드록시기를 가지는 구조인 7-OH-androstendione이라고 예상 할 수 있었으며, M2의 경우에는 M1 대사체와 마찬가지로 m/z 518이 분자이온이라면 분자량이 302인 이 대사체는 3번 탄소 위치에 히드록시기가 있고 17번 탄소 위치에 케톤기를 가지며 7번 탄소위치에 케톤기가 있는 구조인 7-keto-DHEA로 판단되었다.

참고 문헌

1. A. Marwa, P. Marwa, H. Lardy, *J. Chromatogr., B*, **767**, 285, 2002.
2. A. Marwa, P. Marwa, H. Lardy, *J. Chromatogr., A*, **935**, 279, 2001.
3. W. Schanher, M Donike, *Anal. Chim. Acta.*, **23**, 275, 1993.
4. Simon J. Gaskell *J. Mass Spec.*, **32**, 677, 1997.
5. H. Lardy, N. Kneer, B. Partridge, Y. Wei, P. Marwa, *Steroids*, **63**, 158, 1998.
6. D. Goudreault, P. Bherer, J. Levesque, D.

Poirier, C. Ayotte *Cologne workshop on dope analysis*, **9**, 73, 2001.

7. R. Hample, L. Starka, *Endocrinologia experimentalis*, **1**, 5,1 976.
8. V. P. Uralets, P. A. Gilette. *Cologne workshop on dope ananysis*, **8**, 119, 2000.
9. P. Van Eenoo. F. T. Delbeke, N. Desmet, P. De Backer. *Cologne workshop on dope ananysis*, **9**, 91, 2001.
10. V. P. Uralets, P. A. Gilette. *Cologne workshop on dope Ananysis*, **9**, 85, 2001.
11. J. F. Levesque, C. Ayotte. *Cologne Work shop on dope ananysis*, **7**, 213, 1999.
12. R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos. *J. Chromatogr. B*, **742**, 1, 2000.
13. M. Ueki, M. Okano. *J. Toxicol. Toxin. Review*, **18**(2), 177, 1999.