

액체크로마토그래피-텐덤질량분석법을 위한 경주마 소변 중 염기성 약물의 고체상 추출법 최적화

신현두^{1, 2} · 양지숙¹ · 정미혜² · 김형승^{2, 3} · 염정록² · 허만배¹ · 김상진^{1, *} · 한상범^{2, *}

¹한국마사회 도핑검사소, ²중앙대학교 약학대학, ³국방부조사본부 과학수사연구소
(2008. 7. 9. 접수, 2008. 9. 9. 승인)

Optimization of solid-phase extraction for the liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of basic drugs in equine urine

Hyun Du Shin^{1, 2}, Ji Suk Yang¹, Mihye Jung², Hyung-seung Kim^{2, 3}, Jeong-Rok Youm²,
Man Bae Hu¹, Sung Jean Kim^{1, *} and Sang Beom Han^{2, *}

¹Racing Laboratory, Korea Racing Authority, 685, Juam-dong, Gwacheon, Gyeonggi-do, 427-711, Korea

²College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221, Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul, 156-756, Korea

³Scientific Investigation Lab of Criminal Investigation Command, Ministry of National Defense,
Yongsan-gu, Seoul, 140-701, Korea

(Received July 9, 2008, Accepted September 9, 2008)

요 약: 액체크로마토그래피/텐덤질량분석법을 이용하여 말 소변에서 55 가지 염기성 약물을 동시 분석하는 고체상 추출법을 개발하였다. 본 연구에서는 다양한 종류의 약물인 베타-차단제, 베타-길항제, 항저혈압제, 중추신경흥분제, 진정제, 정신 안정제, 항우울제, 항고혈압제 등을 분석하였다. 각 성분의 분리와 정량은 LC-MS/MS의 positive ion electrospray ionization (+ESI)과 multiple reaction monitoring (MRM)으로 수행하였다. 시판되고 있는 4 가지 SPE 상품(UCT XTRACT[®] XRDAH, Supelco DSC-MCAX[®], Varian Bond Elut Certify[®], Waters Oasis[®] MCX)의 혼합형 양이온 교환 흡착제를 비교하였고 최적의 추출 조건을 확립하였다. 그 결과, UCT XTRACT[®] XRDAH의 흡착제에서 분석 대상약물의 상대 회수율이 terbutaline (41.3%), salbutamol (71.5%), heptaminol (70.7%), phenylpropranolamine (66.3%)을 제외하고 80% 이상의 좋은 결과를 나타내었고, 직선성은 0.9804~0.9999를 갖는 55 개의 검정곡선을 얻을 수 있었으며, 검출한계는 0.2~8.3 ng/mL임을 확인하였다.

Abstract: A procedure based on solid-phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry has been developed for the simultaneous analysis of 55 basic drugs in equine urine. The test scope covers diversified classes of drugs including some β -blockers, β -agonists, antihypertensives, CNS stimulants, sedatives, tranquilizers, antidepressants, antihypertensives and so on. LC-MS/MS separation and quantification was carried out in positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode. Four different brands of mixed mode cation exchange SPE sorbents; UCT XTRACT[®] XRDAH, Supelco DSC-MCAX[®], Varian Bond Elut Certify[®] and Waters Oasis[®] MCX were compared. The UCT XTRACT[®] XRDAH sorbent provided

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-820-5596, 2-509-1930 Fax : +82-(0)2-3280-5596, 2-509-1907

E-mail : hansb@cau.ac.kr, sjkim@kra.co.kr

the best results in the preconcentration of samples, yielding relative recoveries higher than 80% except for terbutaline (41.3%), salbutamol (71.5%), heptaminol (70.7%), phenylpropanolamine (66.3%). Detection limits of the target drugs provided by the proposed analytical procedure were between 0.2~8.3 ng/mL.

Key words : Basic drugs, Equine urine, SPE, LC-MS/MS

1. 서 론

경주마 도핑검사에서는 광범위하게 분류되어 있는 다양한 약물들을 금지약물로 규정하고 있다. 이는 말의 경주에 대한 인식에 기초한 것으로, 즉 경주 능력을 증가시키거나 감소시킬 수 있는 어떠한 물질의 사용도 법으로 금지하고 있기 때문이다. 금지약물들은 그들의 약리학적 작용에 의해 산성약물, 염기성약물, 비스테로이드계 진통소염제, 아나볼릭 스테로이드 등으로 구분되어진다.

한국마사회(Korea Racing Authority, KRA)에서는 경주마에 대하여 경주 전·후에 도핑검사를 실시하고 있는데, 경주 전에는 출주하는 모든 경주마의 혈액을 채취하여 도핑검사를 실시하며, 경주 후에는 일반적으로 경주마의 소변을 이용하여 도핑검사를 실시하나, 주어진 시간(3시간) 내에 소변시료 채취가 불가능할 경우는 혈액으로 대신한다. 시료 채취가 완료되면 수의사들은 시료를 A, B로 나누어 봉인한다. 일상적인 도핑검사는 시료 A를 사용하고, 여기서 금지약물에 대한 양성반응이 나타날 경우, 보안요원의 철저한 감독 하에 관리되는 시료 B를 이용하여 재검사를 실시한다. 이렇게 하여 한국마사회 도핑검사소에서 수행하는 경주마 도핑검사건수는 연간 약 35,000건에 이른다.

도핑검사는 다양한 범위의 약물 및 대사체들을 포함하고 있는 소변, 혈액, 타액, 땀 등을 채취하여 검사를 수행되고 있다.^{1,4} 특히, 경주마 도핑검사에서는 오랫동안 혈액보다 소변시료를 더 선호해 왔는데, 그 이유는 소변시료는 부피가 크며, 대상약물 또는 그 대사체 농도가 혈액보다 높고, 일반적으로 여타의 배설보다 소변으로 약물 및 그 대사체가 배설되는 시간이 길며, 말에 스트레스를 적게 주는 비침습적 방법(noninvasive method)이기 때문이다. 따라서 대부분의 도핑검사에서는 경주마의 소변시료를 이용하여 검사를 실시하는 것이 바람직하며, 이를 이용한 연구는 다양하게 이루어지고 있다.^{2,4,6} 한편 혈액을 이용한 도핑검사의 장점은 분석이 요구되는 시점에서 즉시로 sampling이 가능하며, 가끔 실패할 가능성이 있는 소변시료 채취와 달리 혈액

채취는 항상 가능하며, 대사가 잘 일어나는 약물의 경우 모약물의 검출이 더 용이하다는 것이다.

시료 전처리 방법 중 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE)은 폭넓은 범위의 시료 적용과 다양한 물질 분석에 이용되고 있다. 특히, 혼합형 이온교환수지는 분석 대상 물질과 소수성 및 이온교환 작용을 하여 다양한 약물의 동시 분석을 수행할 수 있어 경주마 도핑검사에 널리 적용되고 있다.^{3,4,6-9} 시료 전처리의 목적으로 고체상 추출법 적용 시, 생체 시료에 존재하는 불순물을 효과적으로 제거시키는 것은 분석의 감도를 증가시키고, 분석 장비의 효율성을 증가시킨다는 면에서 매우 중요하다. 경주마의 소변은 다른 동물에 비해 상대적으로 점도가 크고, 불순물을 많이 내포하고 있다.⁴ 이런 점을 고려할 때, 경주마 소변의 SPE 적용에서는 불순물을 효과적으로 제거하는 세척 단계(washing step) 최적화에 많은 노력이 필요하다.

도핑검사 분야에서는 오래전부터 얇은 판 크로마토그래피(TLC), 기체 크로마토그래피(GC), 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 모세관 전기영동(CE), 기체 크로마토그래피-질량분석법(GC-MS) 등의 분석법이 사용되어 왔다. 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC-MS)은 최근에 여러 분야에서 각광을 받고 있으며, 특히 액체 크로마토그래피-텐덤질량분석법(LC-MS/MS)은 screening 검사에 폭넓게 적용을 할 수 있는¹⁰⁻¹³ 분석법이라 할 수 있다.

본 연구에서는 경주마 소변으로부터 55종 염기성 약물을 검출하는 혼합형 이온교환수지의 고체상 추출법-액체 크로마토그래피-텐덤질량분석법을 개발하였다. 55종 염기성 약물에는 중추신경흥분제, 베타 차단제, 베타 길항제, 국소마취제, 진정제, 항우울제, 근육이완제, 항고혈압제, 항저혈압제 등 넓은 범위의 약물들이 포함된다. 현재 한국마사회 도핑검사소에서는 여러 가지 액체-액체 추출법(LLE)을 이용한 추출과 유도체화 과정¹⁴⁻¹⁶을 거친 후 GC-MS를 이용하여 이들 약물들을 분석하고 있다. LLE는 SPE에 비해 비용, 소요 시간, 소모되는 용액의 양이 많고, 자동화에 적합하지 않은 단점이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 기존에

수행되고 있는 LLE 전처리법을 보완하여 혼합형 이온교환수지를 이용하고, 자동화 전처리 방법의 최적화와 LC-MS/MS 분석법을 개발하는 것이다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

표준물질 acepromazine, aminopyrine, amitriptylline, antipyrine, atenolol, atropine, azaperone, benzocaine, bupivacaine, caffeine, carbamazepine, chlorpheniramine, chlorpromazine, clenbuterol, diphenhydramine, dipyrone, doxapram, guaifenesine, heptaminol, imipramine, lidocaine, mephentermine, mepivacaine, methocarbamol, methoxyphenamine, nikethamide, oxprenolol, papaverine, phenylpropanolamine, procaine, promazine, propionylpromazine, propranolol, pyrilamine, salbutamol, scopolamine, pentazocine, terbutaline, tetracaine, timolol, trimethoprim, tripelenamine, xylazine은 USP사(Rockville, MD, USA)에서, 마약류 표준물질 amphetamine, benzoylecgonine, butorphanol, cocaine, codeine, diazepam, ephedrine, ketamine, meperidine, methamphetamine, methylphenidate, nordiazepam은 Cerillant사(Round Rock, TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. 내부표준물질로 사용한 cotinine, dibucaine은 USP사(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 소변 시료의 가수분해를 위해 사용한 ammonium acetate는 시약급(Junsei, Kyoto, Japan)의 제품을 사용하였고, β -glucuronidase/arylsulfatase는 Roche Diagnostics사(Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 가수분해 된 시료의 pH 조절을 위해 사용한 인산(phosphoric acid)은 시약급(Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA)을 사용하였고, 고체상 추출법의 최적화 실험을 위해 카트리지형태의 혼합형 양이온교환 수지 4 가지 제품; XTRACT[®] XRDAH, 3 mL, 200 mg (UCT, Bristol, PA, USA), Bond Elut Certify[®], 3 mL, 130 mg (Varian, Palo Alto, CA, USA), Discovery DSC-MCAX[®], 3 mL, 100 mg (Supelco, Bellefonte, PA, USA), Oasis[®] MCX, 3 cc, 60 mg (Waters, Milford, MA, USA)을 구입하여 사용하였다. 고체상 추출 실험 시 세척 단계에 사용한 개미산(formic acid)과 암모니아(ammonia solution)는 시약급(Junsei, Kyoto, Japan)의 제품을 사용하였고, 메탄올(methanol)은 HPLC급(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)을 사용하였다. 액체크로마토그래프의 이동상 제조에 사용한 ammonium formate는 특급(Kato, Tokyo, Japan)을 사

용하였다. 본 실험에서 사용한 모든 수용액은 3차 증류수를 이용하여 제조하였다. 3차 증류수는 1차 증류수 제조기 PRIMA (USF Elga, High Wycombe, UK)로 정제된 증류수를 MAXIMA (USF Elga, High Wycombe, UK)를 사용하여 제조하였다.

2.2. 분석기기 및 장비

본 연구에 사용한 SPE 장비는 Gilson사(Madison, WI, USA)의 자동 ASPEC XL을 사용하였으며, pH meter는 Mettler-Toledo사 (Schwerzenbach, Switzerland)의 SevenEasy S20 모델을 사용하였다. HPLC 시스템으로는 degasser, binary pump, auto-injector, column oven을 갖춘 Hewlett-Packard사의 HP 1100 series (Waldbronn, Germany)를, 텐덤 질량분석기 (MS/MS)는 PE SCIEX사의 API 2000 (Toronto, MO, Canada)을 사용하였다. 데이터 처리장치로는 Analyst (Ver. 1.4.2)를, 기타 장비로는 질소발생기(Model 78-72, Whatman, Florham Park, MA, USA)와 질소 증발기(MG-2200, Eyla, Tokyo, Japan) 등을 사용하였다.

2.3. LC-MS/MS 조건

칼럼은 Zorbax Eclipse-C8 (2.1 mm×100 mm, 3.5 μ m; Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 이동상은 5 mM ammonium formate (pH=3.5)를 용매 A로, methanol을 용매 B로 하여 선형 기울기법으로 분석하였다. 선형 기울기법은 최초 용매 A를 70%, 용매 B를 30%로 하여 5분간 용매 A를 20%로 감소시키고, 용매 B를 80%로 증가시킨 후 3분간 유지시킨다. 그리고, 다시 1분에 걸쳐 용매 A를 70%로 증가시키고, 용매 B를 30%로 감소시킨 후 7분간 유지시킨다. 이때 유속은 200 μ L/min이고, 총 분석시간은 16분이다. 시료 전처리 후 농축된 시료의 주입량은 5 μ L로 하였다.

LC에서 분리되어 나오는 55종의 염기성 약물들의 검출은 triple-quadrupole mass spectrometer를 이용하여 MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 수행하였다. 각 약물의 MRM transition은 해당 표준물질을 syringe pump를 이용하여, 분당 10 μ L로 API 2000에 주입하면서 collision energy와 parameter (Table 1)를 최적화하였다. 각 약물의 transition 시 머무름 시간 (dwell time)은 25 ms로, 쉬는 시간(pause time)은 5 ms로 하였다. 55종 염기성 약물들과 2종 내부표준물질의 MRM transition에 소요되는 총 시간은 1.71 초였다. 이온화 방법은 양이온 분무 방식(+electrospray ionization, +ESI)을 사용하여 nebulizer gas를 45 psi,

Table 1. MS spectrometer parameters for detecting 55 basic drugs

Basic drugs	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP(V) ^a	EP(V) ^b	CE(eV) ^c	CXP(V) ^d
Atenolol	267.2	190.1	24	10	26	32
Terbutaline	226.2	152.1	23	11	22	23
Salbutamol	240.2	148.0	16	8	25	25
Procaine	237.2	100.1	14	9	22	15
Codeine	300.3	215.2	26	12	34	37
Heptaminol	146.2	128.2	15	8	13	19
Trimethoprim	291.2	230.2	30	10	35	37
Scopolamine	304.2	138.1	24	11	28	22
Phenylpropanolamine	152.1	134.1	11	9	14	23
Ephedrine	166.1	148.2	14	10	17	24
Caffeine	195.0	138.0	22	12	28	21
Dipyron	218.2	97.0	19	9	18	15
Methamphetamine	150.2	91.1	17	9	24	13
Atropine	290.2	124.0	30	12	34	19
Amphetamine	136.2	119.1	12	9	13	18
Ketamine	238.2	207.1	15	10	20	9
Lidocaine	235.2	86.0	17	10	27	11
Aminopyrine	232.2	113.1	15	12	19	17
Mephentermine	164.2	91.1	15	9	31	13
Benzoylcegonine	290.2	168.3	24	10	27	27
Mepivacaine	247.2	98.1	15	10	27	14
Clenbuterol	277.2	203.1	12	9	22	33
Guaifenesine	221.1	221.1	23	11	11	17
Xylazine	221.2	90.0	22	10	33	11
Antipyrine	189.1	104.0	22	11	32	13
Methoxyphenamine	180.1	121.0	15	10	26	19
Nikethamide	179.1	108.0	25	10	26	16
Timolol	317.3	261.2	20	10	24	43
Cocaine	304.2	182.1	24	9	29	29
Methylphenidate	234.2	84.1	18	11	35	11
Methocabamol	242.1	118.1	16	10	14	18
Meperidine	248.3	220.2	21	10	30	37
Papaverine	340.3	324.3	31	11	41	45
Butorphanol	328.3	310.3	21	11	33	52
Azaperone	328.2	165.1	20	9	30	27
Pentazocine	286.2	218.2	30	10	28	9
Oxprenolol	266.2	72.3	22	8	35	10
Doxapram	379.5	292.2	22	12	29	45
Tripelenamine	256.2	211.2	10	7	20	30
Pyrilamine	286.3	121.1	5	6	33	18
Bupivacaine	289.3	140.1	20	9	30	20
Benzocaine	166.1	138.0	20	8	15	20
Chlorpheniramine	275.3	230.2	14	6	22	34
Tetracaine	265.3	176.1	20	5	22	27
Propranolol	260.2	116.2	24	10	25	17
Diphenhydramine	256.2	167.1	10	5	18	7
Acepromazine	327.2	86.1	18	9	32	11
Carbamazepine	237.2	194.1	21	11	26	31
Promazine	285.1	86.1	18	8	27	12
Imipramine	281.3	86.1	15	9	25	11
Propionylpromazine	341.3	86.1	20	10	33	11
Amitriptyline	278.2	233.1	24	10	24	36
Chlorpromazine	319.2	86.1	19	10	30	12
Nordiazepam	271.1	140.0	30	10	38	21
Diazepam	285.1	154.1	32	10	39	22

^adeclustering potential, ^bentrance potential, ^ccollision energy, ^dcollision cell exit potential

400°C의 heater gas를 90 psi로 하여 작동하였다. 이때 ionspray voltage는 5400 V, curtain gas는 40 psi, collision gas는 3 psi로 정하였다. Q1에서 precursor ion과 Q3에서 product ion의 선택 시 분해능은 unit mass로 정하여 수행하였다.

2.4. 실험방법

2.4.1. SPE 종류에 따른 55종 염기성 약물의 상대 회수율 비교

고체상 추출법을 이용한 시료 전처리 시 분석 대상 물질과 수지의 물리화학적인 특성을 고려해야 한다. 본 연구에서는 혼합형 양이온 교환 수지가 충전된 4가지 상업용 SPE 카트리지를 구매하여 각 카트리지를별로 55종 염기성 대상약물의 상대 회수율을 비교하였다. 또한 말의 소변은 다른 생체 시료에 비해 점도가 높으므로 막힘 현상이 적은 카트리지를 선택하고자 하였다. 실험에 사용된 경주마의 소변은 약물투여 사실이 없는 것을 채취하여 공 시료(blank urine)로 하였다. 상대 회수율 비교를 위하여 공 시료에 55종 염기성 약물 표준 용액을 이용하여 농도가 100 ng/mL가 되도록 첨가한 후, 시료 처리 방법과 동일한 방법으로 분석하였다. 상대 회수율은 공 시료에 표준용액을 첨가하여 추출한 후 분석한 결과와 공 시료를 추출한 후 표준용액을 첨가하여 분석한 결과의 면적을 상호 비교하여 구하였다.

준비된 소변시료 2 mL에 1 M ammonium acetate buffer (pH=5.0) 1 mL와 β -glucuronidase/arylsulfatase 10 μ L를 첨가하고 vortex mixer를 이용하여 혼합시킨 후, 37°C에서 12시간 동안 효소 가수분해 하였다. 가수분해된 소변시료는 인산(85 weight % solution) 약 200 μ L를 첨가하여 pH를 3으로 조정하였다. SPE 카트리는 시료 적용 전 2 mL 메탄올과 2 mL 증류수로 활성화시켰다. 활성화된 카트리지에 시료를 유속 1 mL/min로 하여 통과시키고, 2% 개미산 수용액 2 mL, 증류수 2 mL, 2% 암모니아 수용액 2 mL, 10% 메탄올 수용액 2 mL를 유속 2 mL/min으로 세척한 후, 질소를 이용하여 3분간 건조시켰다. 용출 용매로 2% 암모니아수 메탄올 용액 2 mL를 사용하여 분석대상 약물을 용출시켰다. 모든 고체상 추출 과정은 자동화 장비(ASPEC XL)를 사용하였다. 용출된 용액은 60°C 질소 관류기를 이용하여 증발·건조시켰다. 건조된 잔사를 5 mM ammonium formate : methanol 혼합용매(7/3, v/v) 50 μ L로 녹인 후, LC-MS/MS에 5 μ L를 주입하여 분석하였다.

2.4.2. 고체상 추출법 최적화

2.4.1 항의 실험결과를 비교하여 최적의 SPE 카트리지를 선정 후, 세척 용액으로 사용한 2% 암모니아 수용액과 10% 메탄올 수용액의 부피를 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL로 각각 변경하면서 상대 회수율의 변화를 확인하였다.

최적의 세척 용액 부피를 선정 후, 세척 용액의 유속을 분당 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL로 변경하면서 유속의 변화에 따른 추출효율을 확인하였다.

2.4.3. 검증 실험

염기성 약물 55종의 screen 검사의 유효성 확인을 위하여 “EURACHEM”에서 제시한 방법으로 검출한계(limit of detection, LOD)와 선택성(selectivity)을 검증하였다.¹⁷

검정곡선 작성에 사용된 시료는 55종의 염기성 약물의 농도가 0.05, 0.5, 2.5, 5, 50 ng/mL가 되도록 표준약물을 공 시료에 첨가하여 제조하였다. 각 농도별 3개씩 준비된 시료는 내부표준물질을 첨가하고, 최적화된 고체상 추출법을 이용하여 실험하였다.

검출한계는 공 시료를 10회 분석한 결과와 서로 비교하여 신호대 잡음비(signal/noise, S/N)가 3 이상인 농도를 검출한계 값으로 정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. SPE 종류에 따른 55종 염기성 약물의 상대 회수율 비교

경주마 소변시료를 대상으로 도핑검사를 할 때, 전처리 방법으로 SPE를 자주 사용하는데, 이 경우 가장 큰 장애는 SPE 카트리지의 막힘 현상(blockage)이다. 특히 많은 시료를 빠른 시간에 분석하기 위하여 자동화된 SPE 처리 장치를 사용할 경우, 막힘 현상은 치명적으로 분석의 효율성을 방해한다. 소변시료의 겔보기 특성으로 소변시료의 유동성과 막힘 현상에 영향을 줄 수 있는 정보를 예측하기는 매우 힘들지만, 일반적으로 소변의 점도, 색깔, 냄새 등이 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

SPE 카트리지의 막힘 현상은 현탁된 고체성분이나 점성인 성분에 의한 것으로 알려져 있으나, 이 보다는 SPE sorbent와 소변시료 여러 성분과의 반응에 의한 일종의 “clotting” 현상이 발생하여 막힘 현상이 진행되고, 따라서 시료 적용시 SPE 카트리지에 대상약물 흡착과 통과가 방해받는다라는 보고가 있었다.⁴ 이에 대

Table 2. Comparison of relative recoveries of the four selected sorbents (n=3)

Basic Drugs	Sorbents			
	XRDAH	MCX	DSC-MCAX	Certify
Atenolol	103.6 ± 10.2	100.0 ± 4.5	74.6 ± 5.9	70.9 ± 4.2
Terbutaline	41.3 ± 1.4	86.2 ± 6.5	1.7 ± 13.1	3.3 ± 6.0
Salbutamol	71.5 ± 6.9	108.6 ± 9.2	11.4 ± 12.3	18.8 ± 8.0
Procaine	104.3 ± 3.6	102.7 ± 4.6	101.3 ± 7.2	93.3 ± 2.4
Codeine	112.5 ± 5.1	98.4 ± 9.7	104.5 ± 5.4	101.2 ± 4.8
Heptaminol	70.7 ± 1.1	88.0 ± 4.9	21.8 ± 6.3	19.6 ± 2.4
Trimethoprim	111.6 ± 2.5	105.1 ± 6.6	96.3 ± 5.5	105.9 ± 1.7
Scopolamine	108.5 ± 3.8	103.4 ± 4.8	109.6 ± 4.6	103.8 ± 3.6
Phenylpropanolamine	66.3 ± 3.1	84.7 ± 8.7	22.5 ± 0.4	19.9 ± 4.1
Ephedrine	100.6 ± 4.9	98.5 ± 7.8	58.2 ± 1.3	55.1 ± 4.6
Caffeine	94.8 ± 9.5	20.5 ± 15.0	45.4 ± 13.0	78.8 ± 8.8
Dipyron	106.7 ± 6.7	117.7 ± 8.1	81.1 ± 4.6	78.4 ± 5.1
Methamphetamine	109.8 ± 7.4	96.7 ± 7.1	112.8 ± 4.0	93.4 ± 11.4
Atropine	98.3 ± 10.9	102.7 ± 9.1	111.7 ± 5.2	98.2 ± 0.6
Amphetamine	110.2 ± 7.2	96.5 ± 4.7	78.6 ± 3.5	67.2 ± 10.9
Ketamine	114.8 ± 3.6	99.9 ± 11.4	101.5 ± 7.1	101.9 ± 5.6
Lidocaine	113.2 ± 5.0	100.9 ± 8.0	98.0 ± 7.2	101.3 ± 3.4
Aminopyrine	111.9 ± 6.6	110.5 ± 9.4	102.9 ± 2.1	92.2 ± 2.3
Mephentermine	105.3 ± 7.3	85.7 ± 5.2	93.1 ± 10.5	97.1 ± 14.3
Benzoylcegonine	102.0 ± 6.9	99.8 ± 9.0	110.7 ± 1.3	96.2 ± 2.0
Mepivacaine	111.7 ± 4.2	96.2 ± 8.3	99.6 ± 5.6	102.7 ± 5.3
Clenbuterol	106.7 ± 3.9	97.5 ± 8.2	94.6 ± 6.4	99.8 ± 6.1
Guaifenesine	106.8 ± 6.5	90.7 ± 9.7	90.3 ± 10.0	100.1 ± 14.6
Xylazine	107.2 ± 6.2	92.2 ± 10.0	94.4 ± 8.0	101.8 ± 13.2
Antipyrine	109.2 ± 3.0	100.7 ± 7.4	105.4 ± 3.4	99.5 ± 5.5
Methoxyphenamine	108.5 ± 8.5	84.8 ± 8.4	91.1 ± 10.8	101.5 ± 10.2
Nikethamide	104.5 ± 2.3	98.2 ± 6.7	74.5 ± 5.1	82.8 ± 1.8
Timolol	111.7 ± 2.6	94.4 ± 8.6	86.3 ± 8.8	96.4 ± 5.1
Cocaine	103.9 ± 5.4	93.3 ± 11.6	99.4 ± 8.3	99.1 ± 13.0
Methylphenidate	108.0 ± 6.3	92.9 ± 10.5	93.8 ± 9.8	97.5 ± 13.5
Methocabamol	92.1 ± 3.6	96.9 ± 10.4	68.5 ± 6.0	84.1 ± 4.9
Meperidine	105.9 ± 5.9	94.5 ± 10.5	91.5 ± 10.8	96.9 ± 19.3
Papaverine	99.0 ± 9.4	83.3 ± 19.5	107.7 ± 10.5	102.3 ± 11.8
Butorphanol	103.0 ± 5.6	94.6 ± 10.3	91.5 ± 6.1	100.6 ± 12.0
Azaperone	103.1 ± 25.7	90.5 ± 27.3	106.3 ± 1.1	101.0 ± 45.4
Pentazocine	101.0 ± 6.5	95.5 ± 10.1	93.8 ± 10.5	104.1 ± 9.6
Oxprenolol	105.0 ± 5.0	92.9 ± 9.6	82.6 ± 14.0	103.5 ± 9.7
Doxapram	100.8 ± 2.5	94.5 ± 13.8	96.5 ± 12.0	102.6 ± 13.1
Tripelenamine	100.1 ± 10.8	87.5 ± 16.3	94.2 ± 15.3	106.2 ± 27.0
Pyrilamine	96.0 ± 13.5	84.8 ± 17.2	98.0 ± 18.5	101.6 ± 23.5
Bupivacaine	109.9 ± 6.4	93.1 ± 10.8	85.8 ± 15.7	101.2 ± 13.2
Benzocaine	109.8 ± 5.6	92.2 ± 7.6	84.5 ± 6.5	92.4 ± 5.9
Chlorpheniramine	100.4 ± 14.9	91.0 ± 12.2	101.1 ± 12.9	105.9 ± 30.6
Tetracaine	101.4 ± 8.6	90.9 ± 15.0	97.4 ± 12.5	104.9 ± 17.1
Propranolol	105.3 ± 11.3	91.6 ± 14.3	98.2 ± 16.9	105.3 ± 13.6
Diphenhydramine	103.0 ± 10.3	84.3 ± 16.0	98.3 ± 7.0	96.5 ± 25.5
Acepromazine	98.7 ± 7.3	94.5 ± 20.8	110.5 ± 7.1	106.9 ± 14.8
Carbamazepine	115.5 ± 3.6	98.9 ± 5.8	119.4 ± 3.2	106.5 ± 1.1
Promazine	97.0 ± 16.6	103.6 ± 18.7	101.5 ± 8.5	101.6 ± 28.0
Imipramine	103.5 ± 11.0	93.4 ± 17.9	102.1 ± 14.8	112.5 ± 30.8
Propionylpromazine	95.3 ± 14.7	92.0 ± 16.7	100.1 ± 10.1	102.5 ± 25.0
Amitriptyline	102.9 ± 19.4	89.6 ± 18.1	119.9 ± 2.1	111.2 ± 36.6
Chlorpromazine	109.2 ± 23.5	102.2 ± 21.6	89.4 ± 15.0	99.1 ± 34.1
Nordiazepam	112.6 ± 3.7	90.5 ± 9.0	100.1 ± 6.9	82.5 ± 13.8
Diazepam	109.5 ± 3.7	93.6 ± 9.0	110.8 ± 8.7	108.4 ± 0.7

Average relative recovery values and relative standard deviations (n=3) obtained from 55 basic drugs spiked urine samples applied the same SPE washing procedures.

한 증거로 단순히 시료를 희석만 하더라도 막힘 현상이 많이 개선되었다.

SPE 카트리지의 막힘 현상을 극복하기 위하여 소변 시료를 희석하는 방법 외에 많은 전처리 과정의 변경 방법이 있는데, 원심분리의 강화, 시료여과, 효소 가수분해, 산·염기 가수분해, pH 조정, 이온 강도 변화 등이다.⁴ 또한 막힘 현상이 적은 적절한 SPE sorbent를 선택하는 방법도 있다.

본 연구에서는 경주마 소변시료의 SPE 전처리 방법에서 막힘 현상을 적게하고 회수율을 높이는 최적의 조건을 검토하기 위하여, 소변시료를 효소 가수분해한 후 상염화되어 시중에서 유통되는 4종의 혼합형 양이온교환 수지 SPE 카트리지를 대상으로 전처리 조건을 비교 검토하였다.

XTRACT® XRDAH는 매우 점성인 생체시료에도 적용할 수 있도록 흡착제의 입자크기가 125-210 µm이며, 고정상이 C8과 benzenesulfonic acid (strong cation exchange, SCX)의 혼합형태로 되어 있으며, Bond Elut Certify®와 Discovery DSC-MCAX®는 흡착제의 입자크기가 각각 40-120 µm, 50 µm이며, 고정상은 역시 C8과 benzenesulfonic acid로 구성되어 있다. Oasis® MCX는 polymer base로 silanol interaction이 없다는 장점을 가지고 있으며, 고정상이 N-vinylpyrrolidone의 친수성 작용기와 divinylbenzene의 소수성 작용기로 구성되어 있고 여기에 추가로 benzenesulfonic acid 작용기가 결합되어 있다.

최적의 추출 결과를 얻기 위해 4가지 SPE 카트리지에 따른 각 성분별 상대 회수율 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. Oasis® MCX에 의한 상대 회수율 결과는 caffeine (20.5%)를 제외하고 모두 80% 이상 좋은 결과를 나타내었고, XTRACT® XRDAH에 의한 결과는 terbutaline (41.3%), salbutamol (71.5%) heptaminol (70.7%), phenylpropanolamine (66.3%)을 제외하고 모두 80% 이상 좋은 결과를 나타내었다.

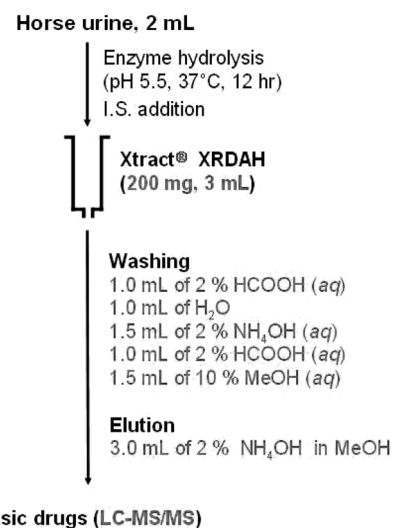
본 연구에서는 검사 대상 약물로 International Federation of Horseracing Authorities (IFHA)의 협약¹⁸에 의해 반드시 검출해야 되는 약물과 경주마에 오남용 가능성이 높은 약물을 선택하였다. 하지만, 선정된 대상 약물들은 물리화학적인 성질이 다양하여 동시 분석을 수행하기 위한 최적 추출조건을 찾기에 어려움이 있었다. 특히 heptaminol, phenylpropanolamine, salbutamol, terbutaline 등은 혼합형 양이온 교환 수지로 분석하기에 적합하지 않음을 알 수 있었다.^{4,7} 이에 호주 경마실험실에서는 위의 4 가지 대상약물의 추출

효율을 높이기 위하여 특수한 sorbent (Bond Elute PBA; phenylboronic acid covalently linked to a silica gel surface)를 사용할 것을 제안하고 있었다.⁴ 따라서, 본 연구에서는 위 4 가지 대상약물을 포함하여 총 55종 염기성 약물에 대한 추출 효율이 좋은 혼합형 양이온 수지의 SPE 카트리지를 선택하고자 하였고, 분석 결과 Oasis MCX와 XTRACT XRDAH를 이용할 경우 추출 효율이 상대적으로 우수함을 확인할 수 있었다.

앞에서도 언급했듯이 경주마의 소변시료는 점도가 커서, 자동화 SPE 장치를 적용할 경우 막힘 현상이 발생하여, 분석 효율을 감소시키는 경우가 자주 있었다. 본 연구에서는 막힘 현상을 방지하기 위하여 카트리지별로 중력 상태에서 유속을 비교하여 유속이 큰 카트리지를 사용하고자 하였다. 카트리지별 상대적인 유속은 XTRACT® XRDAH > Discovery® DSC-MCAX > Oasis® MCX > Certify® 순이었다. 이는 XTRACT® XRDAH의 sorbent 입자 크기가 여타 SPE 카트리지 sorbent의 입자보다 상대적으로 크기 때문일 것이다.

각 카트리지별 상대 회수율과 유속을 비교한 결과 XTRACT® XRDAH SPE 카트리지에 경주마 도핑검사 적용에 적합함을 알 수 있었다. 다만 동일한 SPE 카트리지 부피(3 mL)에서 sorbent mass와 카트리지 입자크기(particle size), pore size가 일정하지 않아, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

3.2. XTRACT® XRDAH를 이용한 추출법 최적화 고체상 추출법의 최적화를 위하여 세척단계에 사용



Scheme 1. Optimized sample preparation.

Table 3. Relative recoveries from the various washing solvent volumes using XRADH cartridge

Basic Drugs	1.0 mL ^a			1.5 mL ^a			2.0 mL ^a		
	1.0 mL ^b	1.5 mL ^b	2.0 mL ^b	1.0 mL ^b	1.5 mL ^b	2.0 mL ^b	1.0 mL ^b	1.5 mL ^b	2.0 mL ^b
Atenolol	84.7	75.4	89.1	97.3	90.7	95.1	110.4	110.9	111.5
Terbutaline	48.2	41.3	44.3	41.1	42.5	41.4	33.2	32.1	29.3
Salbutamol	62.2	49.7	59.7	57.7	59.0	59.7	71.5	67.2	66.3
Procaine	84.3	78.2	82.9	97.7	94.9	89.8	100.9	111.1	108.3
Codeine	87.7	88.4	99.1	97.0	102.8	98.6	109.9	122.5	122.5
Heptaminol	73.3	58.7	66.4	70.0	66.4	66.0	74.1	72.1	70.4
Trimethoprim	103.0	100.0	99.8	112.1	116.2	104.9	111.1	120.9	123.0
Scopolamine	108.7	100.9	109.0	113.3	112.2	104.6	112.2	115.5	123.2
Phenylpropanolamine	72.9	63.3	71.7	68.7	65.7	60.8	70.5	67.5	68.1
Ephedrine	97.1	87.0	99.3	97.1	91.6	89.7	101.0	102.6	104.4
Caffeine	91.0	76.4	92.7	83.3	78.1	73.8	98.1	92.9	90.8
Dipyron	91.5	88.0	97.9	99.1	89.9	101.2	94.1	109.2	104.2
Methamphetamine	96.9	89.6	106.9	112.1	108.3	102.3	101.6	114.6	115.0
Atropine	95.2	90.9	96.6	101.6	103.9	97.5	102.5	105.7	108.4
Amphetamine	99.4	91.2	105.4	104.1	95.0	91.8	100.6	102.8	104.4
Ketamine	98.1	98.1	101.9	110.7	110.7	105.8	102.9	113.6	112.6
Lidocaine	103.5	100.4	106.4	111.4	108.7	105.6	108.2	114.2	115.4
Aminopyrine	98.2	93.8	102.6	107.9	101.8	105.6	107.9	110.3	111.2
Mephentermine	104.7	102.5	108.5	112.6	106.6	99.7	100.6	111.0	112.9
Benzoyllecgonine	94.2	89.5	96.8	98.4	96.8	94.7	100.0	99.5	103.2
Mepivacaine	110.8	107.7	108.8	110.1	113.4	102.3	106.3	112.4	113.4
Clenbuterol	112.5	109.6	110.4	115.7	120.7	103.2	116.4	117.9	120.0
Guaifenesine	110.9	108.9	108.9	115.8	111.9	101.0	104.0	118.8	120.8
Xylazine	110.8	108.2	111.3	117.5	117.0	107.2	108.2	124.2	122.7
Antipyrine	102.8	100.0	108.1	108.5	98.7	102.4	104.5	104.2	111.1
Methoxyphenamine	106.6	101.6	109.9	110.7	106.5	101.8	102.1	110.9	113.0
Nikethamide	100.9	91.6	99.8	97.5	89.1	92.7	103.6	98.9	103.6
Timolol	103.5	103.5	104.7	109.4	112.9	102.9	108.8	113.5	115.2
Cocaine	103.1	101.8	99.2	105.5	105.8	98.2	100.5	114.4	116.2
Methylphenidate	105.1	104.0	114.6	117.2	113.0	108.1	107.1	124.3	122.8
Methocbamol	94.2	75.5	90.8	80.4	72.3	70.8	94.2	90.8	81.1
Meperidine	102.8	108.5	112.1	118.4	112.8	105.0	105.7	121.3	119.9
Papaverine	79.2	101.4	97.4	98.4	108.4	96.3	104.0	124.4	128.1
Butorphanol	95.5	105.0	103.6	110.0	116.4	103.6	108.2	126.4	121.4
Azaperone	83.5	104.2	127.4	125.3	115.8	85.6	101.4	135.8	131.2
Pentazocine	101.9	101.9	106.2	114.9	114.9	104.3	111.8	126.7	128.0
Oxprenolol	105.3	110.1	107.4	112.2	113.8	101.6	110.1	118.6	117.6
Doxapram	104.9	108.1	106.9	115.0	108.5	104.0	111.3	135.2	123.1
Tripelenamine	101.9	112.5	118.7	123.7	117.9	96.9	104.7	130.0	128.0
Pyrilamine	91.4	106.8	109.7	119.4	119.0	95.0	105.4	134.1	132.3
Bupivacaine	107.8	119.0	112.5	115.6	111.8	98.8	105.0	121.5	119.0
Benzocaine	94.1	88.2	100.5	95.7	89.4	99.8	98.0	100.2	101.8
Chlorpheniramine	103.9	115.2	127.5	136.5	118.5	97.8	108.4	137.6	132.0
Tetracaine	94.1	106.9	105.4	113.7	105.4	97.5	102.5	131.9	120.6
Propranolol	95.7	112.3	124.9	124.9	118.2	99.1	115.1	138.5	134.5
Diphenhydramine	101.5	122.4	117.9	120.5	114.2	100.7	103.4	129.9	126.9
Acepromazine	91.0	106.2	111.8	117.1	91.5	95.3	101.9	135.5	116.6
Carbamazepine	97.8	97.8	101.6	109.2	109.8	108.2	108.2	115.2	112.5
Promazine	91.6	122.5	133.2	128.0	99.8	87.4	98.5	133.4	117.1
Imipramine	92.4	113.0	129.6	135.3	105.5	100.9	108.1	155.5	136.3
Propionylpromazine	104.1	119.6	128.4	125.7	98.6	89.9	105.4	150.7	120.3
Amitriptyline	107.8	114.7	148.1	135.7	105.4	97.7	113.2	149.6	133.3
Chlorpromazine	102.9	114.7	141.2	140.2	92.5	87.0	118.6	142.2	111.8
Nordiazepam	120.7	119.2	106.7	117.1	115.9	108.2	107.9	116.5	114.6
Diazepam	108.9	116.4	103.7	105.4	109.1	108.4	105.2	115.7	111.3

^aVolume of 2% NH₄OH (aq), ^bVolume of 10% MeOH (aq)

Table 4. Relative recoveries from the various flow rates using XRADH cartridge

Basic Drugs	Flow rate				
	1 mL/min	2 mL/min	3 mL/min	4 mL/min	5 mL/min
Atenolol	116.7 ± 5.2	105.1 ± 14.8	95.4 ± 1.1	92.8 ± 3.3	99.3 ± 23.5
Terbutaline	43.4 ± 4.4	45.7 ± 3.9	44.7 ± 5.3	47.9 ± 2.2	46.4 ± 5.8
Salbutamol	75.4 ± 12.3	71.1 ± 9.6	63.9 ± 2.6	66.6 ± 2.7	68.7 ± 9.6
Procaine	99.3 ± 6.3	91.8 ± 11.4	86.7 ± 7.9	87.8 ± 1.5	84.5 ± 14.1
Codeine	97.0 ± 7.5	97.2 ± 10.6	98.2 ± 4.2	94.8 ± 1.1	94.0 ± 7.3
Heptaminol	79.3 ± 11.0	74.5 ± 8.9	69.5 ± 3.6	68.8 ± 3.2	67.3 ± 6.7
Trimethoprim	111.5 ± 3.4	102.7 ± 9.4	101.2 ± 3.6	98.7 ± 0.5	96.5 ± 8.9
Scopolamine	111.6 ± 4.3	109.3 ± 7.2	102.2 ± 3.9	100.2 ± 1.8	101.1 ± 7.9
Phenylpropanolamine	62.8 ± 12.1	63.6 ± 7.1	63.5 ± 4.4	65.2 ± 2.8	66.0 ± 9.7
Ephedrine	93.8 ± 9.9	98.4 ± 5.4	94.4 ± 2.6	92.9 ± 6.6	96.8 ± 10.0
Caffeine	91.7 ± 18.7	97.0 ± 8.5	91.3 ± 6.8	86.3 ± 8.4	80.1 ± 10.6
Dipyron	103.5 ± 7.3	95.3 ± 15.2	93.7 ± 3.1	94.0 ± 6.0	93.7 ± 12.5
Methamphetamine	107.1 ± 4.8	108.9 ± 5.3	106.1 ± 3.8	99.5 ± 5.7	100.7 ± 11.0
Atropine	107.7 ± 2.9	99.6 ± 6.9	93.5 ± 3.7	88.7 ± 2.8	88.3 ± 9.3
Amphetamine	101.1 ± 9.2	106.4 ± 6.1	100.2 ± 3.9	99.7 ± 7.9	97.5 ± 10.8
Ketamine	114.3 ± 5.7	110.1 ± 8.6	105.8 ± 3.6	98.8 ± 4.6	99.6 ± 14.1
Lidocaine	112.5 ± 3.0	107.4 ± 7.5	104.8 ± 2.3	100.0 ± 5.3	100.6 ± 11.0
Aminopyrine	116.3 ± 4.9	107.5 ± 7.6	103.2 ± 2.8	97.6 ± 6.3	102.8 ± 9.9
Mephentermine	97.1 ± 3.9	99.9 ± 0.7	100.8 ± 5.6	96.5 ± 6.0	95.1 ± 7.5
Benzoyllecgonine	108.5 ± 3.7	104.2 ± 4.2	99.2 ± 2.4	96.4 ± 4.2	100.4 ± 9.1
Mepivacaine	107.2 ± 2.7	103.6 ± 5.1	103.2 ± 4.2	100.5 ± 2.3	98.2 ± 6.6
Clenbuterol	99.0 ± 4.8	102.4 ± 3.0	101.4 ± 4.1	99.6 ± 1.6	94.3 ± 5.9
Guaifenesine	100.9 ± 3.9	102.2 ± 6.6	102.2 ± 6.4	98.5 ± 2.1	95.2 ± 8.4
Xylazine	98.1 ± 3.8	97.4 ± 8.8	99.5 ± 8.0	95.9 ± 2.6	92.5 ± 9.2
Antipyrine	113.9 ± 4.6	107.2 ± 4.5	104.6 ± 2.1	98.8 ± 3.4	104.3 ± 5.8
Methoxyphenamine	99.3 ± 2.0	103.0 ± 4.0	99.8 ± 5.8	97.8 ± 5.4	94.3 ± 7.9
Nikethamide	100.0 ± 10.5	102.0 ± 7.0	96.2 ± 3.9	95.9 ± 6.5	103.4 ± 3.7
Timolol	102.4 ± 5.2	103.0 ± 7.0	100.8 ± 4.2	98.8 ± 2.4	93.9 ± 9.5
Cocaine	100.1 ± 4.1	98.4 ± 8.9	99.0 ± 8.2	97.0 ± 2.4	93.5 ± 11.7
Methylphenidate	101.1 ± 6.0	107.0 ± 6.3	111.0 ± 7.9	110.0 ± 4.0	100.9 ± 7.3
Methocarbamol	89.4 ± 19.7	95.4 ± 9.3	86.5 ± 5.2	86.3 ± 8.2	77.9 ± 16.7
Meperidine	96.0 ± 4.1	104.3 ± 6.1	103.3 ± 9.3	99.5 ± 3.4	95.7 ± 8.1
Papaverine	89.0 ± 6.7	93.3 ± 13.0	98.0 ± 12.9	99.8 ± 1.4	95.6 ± 5.3
Butorphanol	99.4 ± 3.4	95.0 ± 11.7	99.8 ± 5.8	95.2 ± 1.9	90.7 ± 6.0
Azaperone	52.1 ± 6.1	93.2 ± 23.1	99.1 ± 25.3	99.6 ± 11.8	98.0 ± 16.0
Pentazocine	96.0 ± 1.0	95.4 ± 6.6	97.6 ± 9.5	94.9 ± 0.3	89.3 ± 7.2
Oxprenolol	103.0 ± 3.9	101.9 ± 3.8	102.8 ± 8.7	100.9 ± 3.8	95.7 ± 7.4
Doxapram	100.3 ± 3.0	97.2 ± 11.0	100.0 ± 11.4	98.8 ± 5.4	92.4 ± 7.2
Tripelenamine	70.5 ± 3.4	90.5 ± 8.2	93.9 ± 16.8	94.4 ± 1.1	95.1 ± 10.8
Pyrilamine	68.6 ± 5.7	83.3 ± 6.4	87.4 ± 15.9	87.5 ± 3.7	88.6 ± 8.1
Bupivacaine	90.2 ± 3.6	100.2 ± 4.0	106.4 ± 10.6	104.2 ± 0.4	97.5 ± 8.7
Benzocaine	110.5 ± 6.8	102.5 ± 3.7	94.3 ± 14.2	93.1 ± 3.7	100.1 ± 1.6
Chlorpheniramine	65.8 ± 2.5	96.8 ± 9.6	101.9 ± 18.8	100.9 ± 8.6	93.3 ± 8.5
Tetracaine	87.0 ± 3.7	94.7 ± 8.4	100.2 ± 14.6	100.5 ± 1.8	95.5 ± 6.5
Propranolol	79.7 ± 3.4	93.3 ± 5.3	95.0 ± 15.3	96.8 ± 2.2	91.3 ± 7.4
Diphenhydramine	81.8 ± 5.2	97.3 ± 4.7	103.2 ± 16.1	102.1 ± 2.5	94.9 ± 6.6
Acepromazine	83.8 ± 1.4	97.4 ± 12.0	102.1 ± 19.8	105.1 ± 6.1	104.9 ± 12.5
Carbamazepine	125.3 ± 1.2	109.3 ± 6.7	107.3 ± 3.2	100.4 ± 4.9	95.8 ± 4.2
Promazine	63.7 ± 2.6	93.6 ± 16.3	103.3 ± 20.8	102.7 ± 4.0	102.6 ± 17.9
Imipramine	86.0 ± 3.6	108.9 ± 12.9	114.1 ± 19.5	115.4 ± 8.9	115.7 ± 20.4
Propionylpromazine	71.2 ± 2.0	94.3 ± 14.7	99.1 ± 16.2	99.8 ± 1.9	102.0 ± 15.1
Amitriptyline	68.2 ± 7.9	103.8 ± 21.5	112.7 ± 21.2	103.8 ± 4.0	106.8 ± 16.8
Chlorpromazine	67.9 ± 2.8	100.8 ± 22.8	108.4 ± 20.7	108.0 ± 9.5	110.1 ± 20.8
Nordiazepam	121.3 ± 1.7	108.7 ± 6.9	102.9 ± 3.2	92.1 ± 7.1	76.0 ± 2.7
Diazepam	122.5 ± 2.8	111.6 ± 10.7	113.2 ± 3.6	110.5 ± 5.4	104.2 ± 3.5

Average relative recovery values and relative standard deviations (n=3) obtained from 55 basic drugs spiked (100 ng/mL) urine samples applied the same SPE washing procedures.

Table 5. Analytical data for the LC-MS/MS method

Basic drugs	t_R (min)	r^2	LOD (ng/mL)
Atenolol	1.41	0.9984	2.0
Terbutaline	1.44	0.9992	3.7
Salbutamol	1.45	0.9996	2.0
Procaine	1.49	0.9995	0.2
Codeine	1.55	0.9804	1.6
Heptaminol	1.66	0.9992	2.4
Trimethoprim	1.94	0.9924	0.7
Scopolamine	2.02	0.9996	3.2
Phenylpropanolamine	2.07	0.9951	8.3
Ephedrine	2.2	0.9994	0.5
Caffeine	2.51	0.9999	1.5
Dipyron	2.81	0.9996	1.2
Methamphetamine	2.82	0.9993	0.3
Atropine	2.84	0.9992	0.2
Amphetamine	2.85	0.9988	1.1
Ketamine	3.5	0.9993	0.6
Lidocaine	3.55	0.9998	0.4
Aminopyrine	3.89	0.9998	0.1
Mephentermine	3.9	0.9986	2.4
Benzoylcegonine	3.92	0.9993	0.1
Mepivacaine	4.01	0.9996	0.2
Clenbuterol	4.04	0.9991	0.7
Guaifenesine	4.08	0.9988	3.8
Xylazine	4.08	0.9995	0.3
Antipyrine	4.14	0.9995	0.6
Methoxyphenamine	4.31	0.9980	0.7
Nikethamide	4.35	0.9996	0.9
Timolol	4.96	0.9994	0.2
Cocaine	5.53	0.9988	0.3
Methylphenidate	6.2	0.9994	0.4
Methocabamol	7.51	0.9984	0.6
Meperidine	7.84	0.9990	0.5
Papaverine	7.89	0.9959	0.2
Butorphanol	8.31	0.9924	0.3
Azaperone	8.48	0.9919	3.2
Pentazocine	8.59	0.9996	0.2
Oxprenolol	8.75	0.9995	0.3
Doxapram	8.82	0.9852	0.7
Tripelenamine	9.16	0.9994	0.5
Pyrilamine	9.21	0.9991	1.4
Bupivacaine	9.45	0.9992	0.2
Benzocaine	9.48	0.9932	4.3
Chlorpheniramine	9.54	0.9996	0.5
Tetracaine	9.59	0.9976	2.4
Propranolol	9.79	0.9963	0.9
Diphenhydramine	9.88	0.9993	0.5
Acepromazine	10.3	0.9932	1.7
Carbamazepine	10.42	0.9986	0.6
Promazine	10.5	0.9986	0.8
Imipramine	10.59	0.9959	2.3
Propionylpromazine	10.74	0.9957	7.8
Amitriptyline	10.74	0.9905	6.4
Chlorpromazine	11.03	0.9965	2.8
Nordiazepam	11.42	0.9984	3.8
Diazepam	11.55	0.9969	1.3

Approximate retention time (t_R), correlation coefficient (r^2) of calibration curve (range; 0.05-50 ng/mL), limit of detection (LOD) of the target drugs.

되는 용액의 부피와 유속을 변화시키면서 상대 회수율을 확인하였다. 이 때 경주마의 소변시료 적용과 용출단계에서는 유속을 분당 1 mL로 하였다. 최적화된 고체상 추출법 모식도를 Scheme 1에 나타내었다. 2% 암모니아 수용액, 10% 메탄올 수용액이 세척 단계에서 중요한 역할을 하는데, 2% 암모니아 수용액으로 물질과 혼합형 이온교환수지 간, 양이온 교환 상호 작용을 하는 이온성 불순물들을 효과적으로 제거할 수 있었고, 10% 메탄올 수용액으로는 물질과 혼합형 이온교환수지 간, 소수성 상호 작용을 하는 불순물들을 효과적으로 제거할 수 있었다.

따라서 이 두 가지 수용액의 부피를 각각 1.0 mL, 1.5 mL, 2.0 mL로 각각 변화 시키면서 상대 회수율을 비교하였다(Table 3). 비교 결과, 부피 변화에 따른 회수율의 차이는 크지 않았으며, 분석 소요시간과 용액의 사용량 등을 고려하여 두 가지 모두 1.5 mL를 사용하기로 결정하였다. 또한 세척 과정에서 적용되는 용액의 유속 변화(분당 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL)에 따른 상대 회수율 추이를 분석한 결과, 유속이 분당 2 mL일 때 가장 좋은 분석 결과를 나타내었다(Table 4).

3.3. 최적화된 분석법의 검증

55종 염기성 약물에 대한 검정 곡선은 0.05 ng/mL ~50 ng/mL 범위 내에서 codeine (0.9804)과 doxapram (0.9852)을 제외하고, 상관계수(r^2)가 0.99 이상의 직선성을 나타내었다. 검출한계는 0.2 ng/mL~8.3 ng/mL로 측정되었다(Table 5). 또한 55종 염기성 약물을 LC-MS/MS의 MRM 방식으로 검출한 결과, 각 성분별 머무름 시간대에서 분석에 방해되는 어떠한 피이크도 검출되지 않았다(Fig. 1).

4. 결 론

경주마의 소변 중 염기성 약물 55종을 대상으로, 기존의 LLE 전처리 방법 대신 자동화된 SPE 방법을 도입하여 추출하고, LC-MS/MS로 동시 분석하는 방법을 제시하였다. SPE를 이용한 전처리 단계에서는 2% 암모니아 수용액과 10% 메탄올 수용액의 최적 부피와 최적 유속을 결정하여, 시료 내에 포함되어 있는 많은 불순물들을 효과적으로 제거하면서 또한 양호한 회수율을 유지할 수 있었다.

확립된 실험방법에 대한 분석법 검증을 수행한 결과, 55종 약물에 대한 검량곡선의 직선성 상관계수(r^2)



Fig. 1. Typical selected product-ion chromatograms of the 55 targeted basic drugs obtained from the analysis of spiked urine samples.

는 0.99 이상이었으며(codeine, doxapram은 예외), 검출한계(LOD)는 55종 대상 약물별로 0.2~8.3 ng/mL의 농도범위에 있는 것으로 확인하였다. 또한 LC-MS/MS의 MRM 방법으로 55종을 분석한 결과, 각 대상 약물별 머무름 시간대에 방해되는 피크가 검출되지 않음을 확인하였다.

참고문헌

1. D. Thieme, P. Anielski, J. Grosse, H. Sachs and R. K. Muller, *Anal. Chim. Acta*, **483**, 299-306(2003).
2. S. Starano-Rossi, C. Colamonici and F. Botr, *Anal. Chim., Acta*, **606**, 217-222(2008).
3. A. Takeda, H. Tanaka, T. Shinohara and I. Ohtake, *J. Chromatogr. B*, **758**, 235-248(2001).
4. P. M. Wynne, D. C. Batty, J. H. Vine and N. J. K. Simpson, *Chromatographia*, **59**, S51-S60(2004).
5. M. Thevis, G. Opfermann and W. Schanzer, *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 393-402(2001).
6. E. N. M. Ho, D. K. K. Leung, T. S. M. Wan and N. H. Yu, *J. Chromatogr. A*, **1120**, 38-53(2006).
7. G. N. W. Leung, E. W. Chung, E. N. M. Ho, W. H. Kwok, D. K. K. Leung, F. P. W. Tang, T. S. M. Wan and N. H. Yu, *J. Chromatogr. B*, **825**, 47-56(2005).
8. N. H. Yu, E. N. M. Ho, D. K. K. Leung and T. S. M. Wan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **37**, 1031-1038(2005).
9. G. N. W. Leung, D. K. K. Leung, T. S. M. Wan and C. H. F. Wong, *J. Chromatogr. A*, **1156**, 271-279(2007).
10. S. M. R. Stanely, W. K. Wee, B. H. Lim and H. S. Foo, *J. Chromatogr. B*, **848**, 292-302(2007).
11. S. M. R. Stanely and S. C. Foo, *J. Chromatogr. B*, **836**, 1-14(2006).
12. M. Gergov, J. N. Robson, I. Ojanpera, O. P. Heinonen and E. Vuori, *Forensic Sci. Inter.*, **121**, 108-115(2001).
13. A. Koehler, R. Oertel and W. Kirch, *J. Chromatogr. A*, **1088**, 126-130(2005).
14. R. Cordero and S. Paterson, *J. Chromatogr. B*, **850**, 423-431(2007).

15. P. J. Rudzki, K. Bu, H. Ksyciska and K. Kobyliska, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**, 356-367(2007).
16. C. Hao, X. Zhao and P. Yang, *Trends in Anal. Chem.*, **26**, 569-580(2007).
17. The Fitness for Purpose of Analytical Methods; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1998 ed., EURACHEM.
18. International Agreement on Breeding, Racing and Wagering, 2008 ed., International Federation of Horseracing Authorities.