

미지시료에서 부신피질호르몬제의 확인을 위한 라이브러리 구축

박미정# · 홍효정* · 이상기*

국립과학수사연구원 동부분원 이화학과, *국립과학수사연구원 약독물과
(Received July 5, 2011; Revised July 29, 2011; Accepted August 9, 2011)

Establishment of Library for the Identification of Corticosteroids in Various Known Sample Types

Meejung Park#, Hyojeong Hong* and Sangki Lee*

Eastern District office, National Forensic Service, Wonju 220-805, Korea

*Division of Drug and Toxicology Section, National Forensic Service, Seoul 158-097, Korea

Abstract — Illegal addition of steroids into cosmetics, ointments or drugs have been increased and their careless usage induced detrimental effect on health. We developed simultaneous analytical method using TLC, HPLC and LC/MS for the identification of 40 corticosteroids. 34 corticosteroids were well separated in HPLC with isocratic mode and remaining 6 drugs were also separated with gradient mode. All of the 40 corticosteroids were detected in negative mode in LC/MS. Halcinonide, prednisolone, triamcinolone acetonide and methylprednisolone hemisuccinate were detected in real samples.

Keywords □ corticosteroids, TLC, HPLC, LC/MS

법과학적인 면에서 약물의 분석은 스크리닝법과 확인시험법이 있으며, 이에에는 정색반응, 면역분석법, 박층크로마토그래피(TLC), 가스크로마토그래피(GC), 가스크로마토그래피/질량분석법(GC/MS), 액체크로마토그래피(HPLC), 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS) 등이 있다.¹⁻⁵⁾ 약물의 종류에 따라 특징기기에 우수한 감도를 나타내는 약물이 있으며 이에 따라 분석기구나 방법이 달라지고 있다. 일반적인 약물 분석시 GC/MS에 의한 확인시험법이 보편적인 데, 이는 사용방법이 간단하고 결과의 재현성이 높으며, library가 유용하게 구축되어 있기 때문이다.⁶⁾ 그러나, 분자량이 크거나 극성이 큰 물질 또는 극미량을 분석하여야 할 경우 GC/MS법으로는 검출하기 힘든 경우가 많이 있다. 이러한 약물의 예로는 부신피질호르몬제를 포함한 스테로이드류, 향생물질류, 발기부전치료제류, 단백질류 등이 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 실제로 최근에 보고되는 외국의 감정사례를 보면, 분석약물의 제한이 거의 없고 감도가 높은 LC/MS법 및 LC/MS/MS법이 각광을 받고 있으며, 이에 관한 연구발표나 문헌보고도 늘고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 따라서 본 실험에서는 GC/MS로는 분석되지 않는 약물 중 일차적으로 부신피

질호르몬제를 포함한 스테로이드류에 대한 HPLC 및 LC/MS법을 확립하고자 하였다.

부신피질호르몬제는 내분비장애, 류마티스성장애, 교원성질환, 피부질환, 알레르기성질환, 안과질환 및 신경계질환 등 그 사용범위가 광범위하나 장기간 복용할 경우 심각한 부작용을 유발하므로 신중히 투여되어야 하는 전문의약품이다. 그러나 최근에는 삼푸, 기능성 화장품, 성형시술제, 한약재, 피부질환 연고제 등 다양한 제품에서 불법적으로 부신피질호르몬제가 검출되고 있다. 또한 이들 부신피질호르몬제의 관능기에 다양한 염을 치환한 유도체들은 대조 표준품이 없어 성분확인시 많은 어려움이 있다. 문헌에 의하면, 몇몇 부신피질호르몬제의 분석에 TLC, HPLC 및 LC/MS가 이용되었다.¹¹⁻¹⁵⁾ 현재 당 연구원에서는 부신피질호르몬제의 분석을 위해 TLC법 및 HPLC/PDA법을 사용하고 있으나, 대부분의 성분들이 유사한 UV 스펙트럼을 가지고 있고 검출시간도 동일한 것이 많아 분석에 어려움이 있다. 이를 극복하기 위하여 기존의 이러한 분석방법 외에도 LC/MS에 의한 확인법이 필수적인 상황이다. 그러나, LC/MS법은 GC/MS법과는 달리 library가 존재하지 않아 약물에 대한 library를 구축하는 것이 선행되어야 한다. 이를 위하여 본 연구에서는 우리나라에서 유통되고 있는 부신피질호르몬제를 포함한 스테로이드류에 대한 일체분석법을 확립하고 LC/MS에 의한 library를 구축하고자 하

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-740-8750 (팩스) 033-731-7636
(E-mail) meejung@korea.kr

였다. 즉, 우리나라에서 다양한 형태의 제품으로 유통되고 있는 스테로이드류 40종을 선택하여 약물 표준품에 대한 표준물질을 조제한 후, 이를 다시 적당한 농도로 희석하여 TLC, HPLC 및 LC/MS에 의한 일제분석법을 확립하였으며, LC/MS에 의한 질량분석 스펙트럼으로 library를 구축하였다. 또한 실제 압수품으로 들어왔던 증거물들에 대하여도 분석을 실시하여 성분을 확인하였다.

실험방법

시약 및 재료

실험에 사용된 스테로이드 의약품 40종의 표준품은 Sigma사에서 구입하거나, 의약품을 제조 생산하는 제약회사에서 순도 98% 이상의 표준물질을 제공받아 사용하였다. HPLC용 메탄올은 J. T. Baker사 제품을 사용하였고 증류수는 Millipore Milli-Q 증류수 제조장치를 사용하여 증류된 물을 사용하였으며, 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다.

표준용액의 제조

본 실험에서 선택된 스테로이드의 종류는 Table I과 같다. 각 성분의 표준용액은 1 mg/ml 농도의 메탄올 용액으로 조제하여 냉장 보관하였으며, 분석시 표준용액을 희석하여 10 µg/ml를 HPLC 및 LC/MS 분석에 사용하였다.

시료처리

캡슐 및 분말은 약 100 mg을 취하여 메탄올 1 ml를 가한 후 30분 동안 초음파 처리한 후 원심분리하여 상등액을 TLC용 시료로 사용하였다. 이를 메탄올로 1000배 희석하여 HPLC 및 LC/MS용 시료로 사용하였다. 정제는 유발과 유봉을 이용하여 분쇄한 다음 상기 방법으로 추출하였다. 시료자체가 혼합물이거나 정제가 필요할 경우에는 분쇄한 후 100 mg을 증류수 2 ml에 현탁시킨 후, 약 20분 동안 초음파 처리한 후 원심분리하여 상등액을 취한 뒤 10% 염산을 가하여 산성상태에서 에틸아세테이트 5 ml로 각각 3회 액상추출하였다. 이를 원심분리하여 그 상등액을 질소농축한 후 남은 잔사를 메탄올로 재현탁한 후 0.2 µm 실린지 필터로 여과하여 분석용 시료로 사용하였다.

TLC

TLC plate는 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였으며, 길이는 가로 20 cm, 세로 10 cm이었다. 전개용매는 클로로포름 : 메탄올(9 : 1)을 사용하였으며 254 nm에서 반점을 확인하여 각각의 R_f를 측정하고 하였고, BTZ시약(0.5% blue tetrazolium 메탄올용액 : 12% 수산화나트륨/메탄올용액=1 : 3, 용시조제)을 발색 시약으로 사용하였다.

HPLC

Agilent사의 1200 series HPLC system을 사용하였으며, 시스템은 Quaternary pump(G1311A), ALS G1329B autosampler, DAD G1315B photodiode array detector로 구성되었고, 240 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 데이터 분석에는 Chemstation™ software를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6×150 mm, 5 µm) 역상컬럼을 사용하였고, 오븐 온도는 30°C, 이동상인 메탄올 : 증류수(60 : 40)를 1.0 ml/min의 유속으로 용출시켰고, 시료는 autosampler를 이용하여 20 µl씩 주입하였다. Isocratic mode로 분리되지 않는 스테로이드의 확인을 위하여 gradient mode를 사용하였으며, 조건은 5분까지 메탄올 : 증류수(60 : 40)로 용출시키다가 5분에서 30분까지 메탄올 : 증류수(90 : 10)으로 이동상의 조성을 변화시켰다.

LC/MS

Varian사의 LC/MS System(Varian ProStar, 1200L series)을 사용하였으며, autosampler는 model 410, 분석용 컬럼은 Varian Polaris C₁₈(4.6×150 mm, 5 µm) 역상 컬럼을 사용하였으며, LC/MS-ESI방법을 사용하여 positive와 negative mode에서 mass spectrum을 확인하였다. 이동상으로는 메탄올 : 증류수(60 : 40)를 사용하였으며, 유속은 0.8 ml/min, mass range는 200~800이였으며, dwell time은 0.6초, scan time은 0.5초, drying gas는 350°C에서 24 psi로 분석을 실시하였다. Isocratic mode로 분리되지 않는 스테로이드의 확인을 위하여 gradient mode를 사용하였으며, 그 조건은 HPLC와 동일하였다. 데이터 분석에는 Star Workstation™ software를 사용하였다.

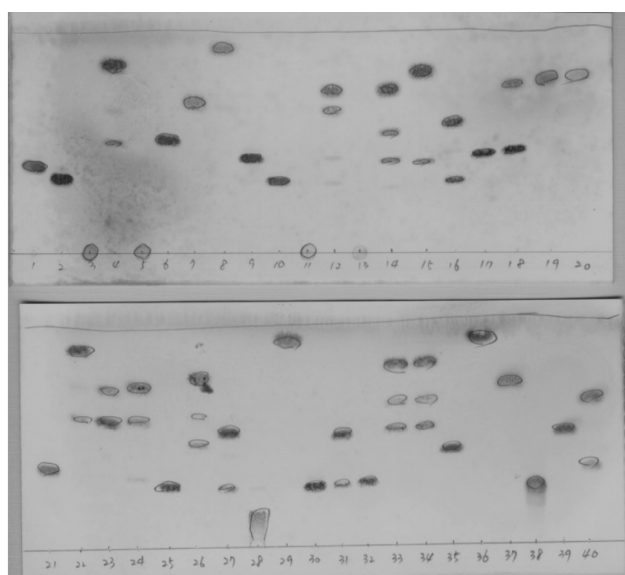


Fig. 1 - TLC pattern of 40 steroids (the number is presented in Table II).

결과 및 고찰

TLC

40종의 약물은 TLC 결과 양호하게 분리되었다(Fig. 1). 이 중 betamethasone-21-phosphate, betamethasone sodium phosphate, dexamethasone disodium phosphate 및 dexamethasone sodium phosphate를 제외한 36개 약물은 TLC 조건에서 모두 양호하게 분리되어 확인이 가능하였으며, 물질에 따라 반점이 2개 또는 3개로 나타났다. 각각의 약물에 대한 Rf 치는 Table I에 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때, 미지시료 중 스테로이드류를 스크리닝하는 방법으로 TLC가 적합하며, 특히 254 nm에서의

UV 반점확인과 BTZ시약에 의한 정색반응으로 스테로이드류의 존재여부를 확인할 수 있음을 알 수 있었다.

HPLC

HPLC에 의한 약물의 분리는 Table I과 같다. 즉, isocratic mode에서는 budenocide, dexamethasone propionate, fluocinolone 및 methylprednisolone hemisuccinate 등 4개의 약물은 두 개의 피크를 나타내었으며, 그 외 30종의 약물은 양호하게 분리되었음을 알 수 있었다. 그러나, betamethasone 21-phosphate, betamethasone sod. phosphate, dexamethasone disod. phosphate, dexamethasone sod. phosphate 및 methylprednisolone

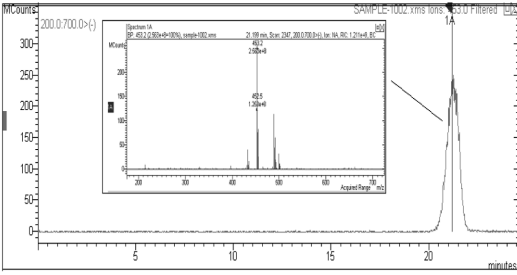
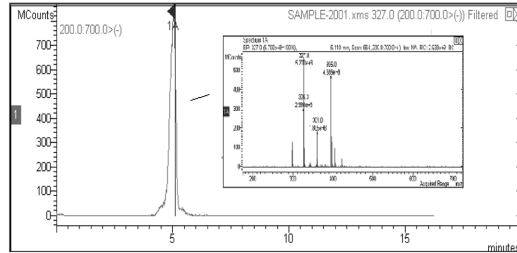
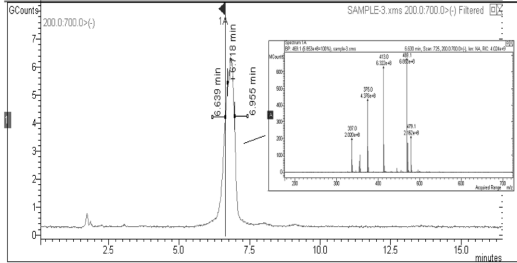
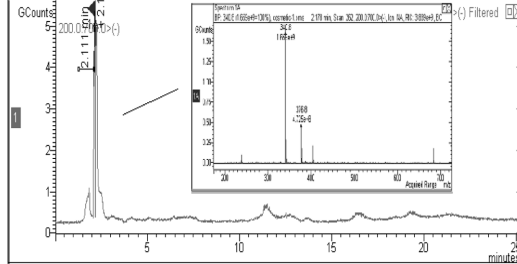
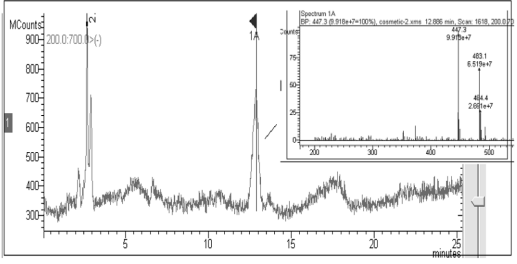
Table I – Retention time and spectrum of steroids in HPLC/DAD and LC/MS (Italic letters mean retention time at gradient mode. The first ions in mass spectrum are most abundant ions and underlined ions are [M-H])

No.	Name	TLC (Rf, %)	HPLC		LC/MS
			RT (min)	RT (min)	Fragmented ion (negative mode)
1	beclomethasone	0.50	6.39	6.65	<u>407</u> , 341, 443, 444
2	betamethasone	0.36	5.76	6.23	427, 361, 339
3	betamethasone 21-phosphate	0	1.35	1.90	<u>471</u> , 472, 493
4	betamethasone dipropionate	0.52	<i>18.07</i>	12.83	447, 483, 413, 493
5	betamethasone sod. phosphate	0	1.31	6.77	503, 527, 539, 549
6	budesonide	0.50	15.66, 16.64	15.56	357, 475, 465, <u>429</u>
7	clobetasol 17-propionate	0.50	21.47	21.40	<u>465</u> , 501, 429
8	clobetasone 17-butyrate	0.89	<i>17.33</i>	<i>18.02</i>	421, 501, <u>477</u>
9	desoxymethasone	0.46	7.86	8.54	355, 399, 421, <u>375</u>
10	dexamethasone	0.34	5.68	6.45	361, 415, 393, 339
11	dexamethasone disod. phosphate	0	1.28	2.17	471, 493, 472, <u>515</u>
12	dexamethasone propionate	0.67	25.64/15.96	14.31/21.04	<u>447</u> , 483/503, 539
13	dexamethasone sod. phosphate	0	1.30	2.17	471, 472, 495, <u>493</u>
14	diflorasone diacetate	0.56/0.77	11.61	8.46/13.43	451, 487/ <u>493</u> , 529
15	diflucortolone valerate	0.45	<i>20.45</i>	8.47	373, 429, 439
16	fludrocortisone acetate	0.34	5.87	6.31	<u>421</u> , 457, 445, 513
17	fluocinolone acetonide	0.46	6.11	7.22	393, 431, 497, <u>451</u>
18	fluocinolone	0.47	6.09/14.58	7.23/14.29	393, 431/355, <u>493</u>
19	fluticasone propionate	0.83	24.77	24.07	413, 535, 545, <u>499</u>
20	halcinonide	0.83	22.21	21.17	<u>453</u> , 455, 433, 489
21	hydrocortisone	0.33	4.13	5.00	329, 385, 363, <u>361</u>
22	hydrocortisone butyrate propionate	0.62	<i>18.07</i>	8.78	511, <u>487</u> , 399
23	hydrocortisone 17-butyrate	0.66/0.74	11.60	12.21	<u>431</u> , 455, 481, 329
24	hydrocortisone valerate	0.60/0.74	22.18	24.86	469, <u>445</u> , 481, 329
25	methylprednisolone	0.30	6.05	6.71	341, 313, <u>374</u> , 409
26	methylprednisolone aceponate	0.50	18.60	18.16	<u>471</u> , 397, 507
27	methylprednisolone acetate	0.28	9.18	6.71/10.12	341, 313, 374/ <u>415</u> , 451
28	methylprednisolone hemisuccinate	0.21	1.34, 1.57	2.18	341, 375
29	norethisterone acetate	0.97	22.27	21.25	329, 421, <u>339</u>
30	prednisolone	0.29	4.21	4.89	326, 361, 395, 405
31	prednisolone acetate	0.30	5.96	4.89/6.98	326, 395/ <u>437</u> , 402
32	prednisolone stearoglycorate	0.30	4.03	4.22	326, 383, 395, 361
33	prednisolone valerate	0.56, 0.66, 0.84	<i>16.30, 17.11, 13.08</i>	16.57	<u>443</u> , 467, 489
34	prednisolone valerate acetate	0.56, 0.66, 0.84	<i>7.12, 13.09, 16.28</i>	2.90/16.95	<u>485</u> , 509/443, 467, 489
35	prednisone	0.46	3.28	4.10	327, 324, 381
36	progesterone	0.97	24.24	23.70	337, 413
37	testosterone	0.77	10.23	11.91	311, <u>287</u> , 413
38	triamcinolone	0.30	2.41	3.32	345, 325, 417, <u>393</u>
39	triamcinolone acetonide	0.54	6.03	6.82	375, 413, 469
40	hydrocortisone acetate	0.36	6.00	5.00/7.15	329, 385/ <u>403</u> , 427, 439

hemisuccinate는 검출시간이 1분대로, 다른 물질과 혼합되었거나 용매의 영향을 받을 경우 분리 및 확인이 어려울 것으로 사료되었다. 특히, 생체시료에서의 이들 성분의 확인을 위해서는 HPLC만으로는 분석에 한계가 있음을 알 수 있었다. 또한, 이러한 isocratic mode로는 서로 겹치는 약물이 존재하였고, 이들을

분리하기 위하여 gradient mode로 분리를 시도하였으며, 그 결과 betamethasone dipropionate, clobetasone 17-butyrate, diflucortolone valerate, hydrocortisone butyrate propionate, prednisolone valerate 및 prednisolone valerate acetate 등 6종의 약물 또한 양호하게 분리됨을 알 수 있었다. 이 중

Table II – Identification of steroids in illegally manufactured samples by LC/MS

Sample type	Result (steroids)	LC/MS		
		TIC and mass spectrum	RT (min)	Fagmented ion
Ointment	Halcinonide		21.20	453, 455, 433, 489
Mixed powder	Prednisolone		5.11	326, 361, 395
Liquid suspension for injection	Triamcinolone acetonide		6.79	375, 413, 469
Cosmetics (Cream)	Methylprednisolone hemisuccinate		2.18	341, 375
Cosmetics (Spray)	Betamethasone dipropionate		12.89	447, 483

prednisolone valerate 및 prednisolone valerate acetate는 각각 HPLC에서 서로 분리되지 않고 UV 스펙트럼도 동일하여 HPLC 만으로는 그 확인이 어려움을 알 수 있었으며, 이는 두 물질의 구조가 유사하기 때문인 것으로 사료된다. 이 둘 40종의 스테로이드류는 유사한 UV 스펙트럼을 가지고 있었으며, 주로 240~245 nm에서 최대흡광도를 나타내고 있었다. HPLC에 의한 분석 결과, TLC에서 전혀 분리되지 않았던 4종의 약물은 HPLC 조건에서도 검출시간이 약 1분 정도이었고, 이들 약물들은 유사한 검출시간과 UV 스펙트럼을 가지고 있으므로 분리에 어려움이 있었다. 따라서, 순수한 약물이 아닌 시료 예를 들면, 생체시료, 화장품, 연고제 등에서 스테로이드류의 분리 및 확인을 위해서는 약물 특성에 맞는 조건의 확립이 요구됨을 알 수 있었다.

LC/MS

본 약물들을 LC/MS로 분석한 결과는 Table I에 나타내었다. 메스스펙트럼에서 가장 먼저 나타난 이온들은 major abundance를 나타낸 이온들이며, [M-H]⁻ 이온은 밀줄로 나타내었다. Beclomethasone 등 40종의 약물들이 모두 negative ion mode에서 검출되었고, 대부분의 약물들은 [M-H]⁻ 이온이 검출되었으며, 이 중 beclomethasone, betamethasone 21-phosphate 등 12종의 약물은 [M-H]⁻이 주된 이온으로 검출되어 특이성을 나타내었다. 그러나 betamethasone 등 11종의 약물들은 [M-H]⁻이 검출되지 않았고, 각각 고유의 스펙트럼을 나타내었다. LC/MS에서 사용한 컬럼의 특성과 길이가 HPLC와 유사하였으므로 검출시간이 HPLC 결과와 매우 유사함을 알 수 있었다. LC/MS에서 isocratic mode로 분리되지 않는 약물은 clobetasone 17-butyrate 및 hydrocortisone butyrate propionate 등 2종이었으며, 이들은 gradient mode를 사용하여 분리할 수 있었다. 40종의 약물이 모두 25분 내에 검출되어 분리조건이 우수함을 알 수 있었다. TLC에서 두 개 또는 세 개로 반점으로 분리되어 검출된 약물들은 HPLC나 LC/MS에서도 피크가 분리되는 양상을 보였으며 이는 염이 붙은 약물에서 뚜렷한 경향을 보였으며 그 이유로는 염의 분리 때문인 것으로 사료되었다.

스테로이드류는 대부분의 경우 연고제, 화장품, 불법조제약 등에 섞여 있으므로, 이의 확인을 위하여는 우선적으로 TLC에 의한 스크리닝이 필요하며, 그 결과 양성을 나타낸 시료에 대해서는 액상추출법을 거쳐 HPLC 및 LC/MS에서의 확인이 필요하다. 실제로 당 연구원에 의뢰되었던 시료 중 연고제, 혼합조제약분말, 주사제, 화장품, 스프레이 등의 시료에서 스테로이드의 확인 시험을 실시하였고, TLC에서 예비시험결과 양성을 나타낸 시료에 대한 LC/MS 분석결과를 Table II에 나타내었다. 즉, 연고제에서는 halcinonide가 검출되었고, 혼합조제약분말에서는 prednisolone, 주사제에서는 triamcinolone acetonide가 검출되었고, 외국산 화장품 및 스프레이에서는 methylprednisolone

hemisuccinate 및 betamethasone dipropionate가 각각 검출되었다.

본 연구결과로 부신피질호르몬제를 포함한 스테로이드류의 스크리닝 및 확인시험시 TLC, HPLC/PDA 및 LC/MS가 매우 유용할 것으로 사료된다. 또한, LC/MS에 의한 스테로이드류의 분석조건을 확립하고 질량 스펙트럼으로 library를 구축하였으므로 미지시료에 대한 분석시 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

참고문헌

- 1) Freimuth, H. C. : Isolation and separation of poisons from biological materials, in Mechanism and analytical methods, C.P. Stolman., A. Eds., Academic Press, New York, 385 (1960)
- 2) Maurer, H. H. : Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. *J. Chromatogr. B.* **733**, 3 (1999).
- 3) Bogusz, M., Aderjian, R., Schmitt, G., Nadler, E. and Neureither, V. : The determination of drugs of abuse in whole blood by means of FPIA and EMIT- dau immunoassays - a comparative study. *Forens. Sci. Int.* **48**, 27 (1990).
- 4) Warfield, R. W. and Maickel, R. P. : A generalized extraction-TLC procedure for identification of drugs. *J. Appl. Toxicol.* **3**, 51 (1983).
- 5) Chen, X. H., Wijsbeek, J., Van Veen, V., Franke, J. P. and de Zeeuw, R. A. : Solid-phase extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single-column procedure on Bond Elut Certify. *J. Chromatogr.* **529**, 161 (1990).
- 6) Foerter, E. H., Hatchett, C. and Garriott, J. C. : A rapid, comprehensive screening procedure for basic drugs in blood or tissues by gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* **2**, 50 (1978).
- 7) Chan, E. M. and Chan, S. C. : Screening for acidic and neutral drugs by high-performance liquid chromatography in postmortem blood. *J. Anal. Toxicol.* **8**, 173 (1984).
- 8) Drummer, O. H., Kotsos, A. and McLntyre, I. M. : A class-independent drug screen in forensic toxicology using a photodiode array detector. *J. Anal. Toxicol.* **17**, 225 (1993).
- 9) Hill, D. W. and Langner, K. J. : HPLC photodiode array UV detection for toxicological drug analysis. *J. Liq. Chromatogr.* **10**, 377 (1987).
- 10) Koves, E. M. : Use of high-performance liquid chromatography-photodiode array detection in forensic toxicology. *J. Chromatogr. A.* **692**, 103 (1995).
- 11) Mazzarino, F. and Botre A. : Fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-estrogen drugs and synthetic anabolic steroids. *Rapid Commun. Mass*

- Spectrom.* **20**, 3465 (2006).
- 12) Arthur, K. E., Wolff, J. C. and Carrier, D. J. : Analysis of betamethasone, dexamethasone and related compounds by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 678 (2004).
- 13) Guan, F, Uboh, C., Soma, L., Hess, A., Luo, Y., Tsang, D. S. : Sensitive liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of beclomethasone dipropionate and its metabolites in equine plasma and urine. *J. Mass Spectrom.* **38**, 823 (2003).
- 14) Park, S. J., Kim, Y. J., Pyo, H. S. and Park, J. J. : Analysis of corticosteroids in urine by HPLC and thermospray LC/MS. *J. Anal. Toxicol.* **14**, 102 (1990).
- 15) Cimpoiou, C., Hosu, A. and Hodisan, S. : Analysis of some steroids by thin-layer chromatography using optimum mobile phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **3**, 633 (2006).