

LC-MS/MS를 이용한 혈청 중 dutasteride 분석

남혜선 · 남경희 · 정수희 · 이장우 · 강진영 · 홍순근 · 김태성 ·
정기경 · 강태석¹ · 윤혜정 · 이광호 · 이규식^{*}

식약청, 식품의약품안전평가원 식품위해평가부, ¹독성평가연구부
(2011. 10. 14. 접수, 2011. 11. 15. 수정, 2011. 12. 16. 승인)

Analysis of dutasteride in human serum by LC-MS/MS

Hye-Seon Nam, Kyong-Hee Nam, Su Hee Jung, Jang Woo Lee, Jin Yeong Kang,
Soon Keun Hong, Tae Sung Kim, Ki Kyung Jung, Tae Seok Kang¹,
Hae-Jung Yoon, Kwang Ho Lee and Gyu-Seek Rhee^{*}

Food Safety Evaluation Department, ¹Toxicology Evaluation and Research Department,
National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration
Osong Health Technology Administration Complex, 187 Osongsaengmyeong 2(i)-ro,
Gangseo-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-951, Korea

(Received October 14, 2011; Revised November 15, 2011; Accepted December 16, 2011)

요 약: 본 연구는 혈청 중 두타스테라이드의 확인과 정량을 위하여 LC-ESI-MS/MS를 이용한 신뢰성 있는 분석법을 개발하고, 분석방법의 타당도를 검증하고자 수행하였다. 내부표준물질인 베클로메타손을 첨가한 혈청을 methyl *tert*-butyl ether (MTBE)를 사용하여 액체상추출법(liquid-liquid extraction, LLE)으로 추출하였다. LC-MS/MS의 양이온 모드에서 MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 확인한 두타스테라이드와 베클로메타손의 mass transition은 각각 m/z 529.6→461.5, m/z 409.3→391.2 이었으며, 머무름 시간은 각각 6.45분, 5.46분이었다. 검량선은 0.5~30.0 ng/mL의 농도 범위에서 $R^2=0.9999$ 의 높은 직선성을 나타내었으며, 정량한계와 회수율은 각각 0.5 ng/mL와 66~72% 이었다. 일내에 대한 정밀도는 3.5~5.5%, 정확도는 85.7~89.9% 범위이었으며, 연속 3일간 수행한 일간 정밀도는 4.2~5.8%, 정확도는 90.8~95.8% 이었다.

Abstract: The determination and confirmation of dutasteride in human serum was performed by a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS). Beclomethasone as an internal standard (I.S.) was added to the serum and the mixed sample was pretreated by liquid-liquid extraction (LLE) with methyl *tert*-butyl ether (MTBE). The mass transitions of dutasteride and I.S. monitored in multiple reaction monitoring (MRM) were m/z 529.6→461.5 and m/z 409.3→391.2, respectively, and the retention times were 6.45 and 5.46 min, respectively. The calibration curve was linear in the concentration range of 0.5~30.0 ng/mL ($R^2=0.9999$) and the limit of quantitation (LOQ) was found to be 0.5 ng/mL. The recovery of dutasteride was shown to be 66~72%. The intra-day assay precision and accuracy were in the range 3.5~5.5% and 85.7~89.9%, respectively, and the inter-day assay precision and accuracy were in the range 4.2~5.8% and 90.8~95.8%, respectively.

Key words: Dutasteride, LC-MS/MS, human serum

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-4551 Fax : +82-(0)43-719-4550

E-mail : gsrhee@kfda.go.kr

1. 서 론

두타스테라이드(dutasteride, Fig. 1a)는 4-아자스테로이드(azasteroid)계 합성화합물로 5- α -reductase 효소의 활성을 차단시켜 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone)에서 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)으로의 대사를 억제한다. 두타스테라이드는 아보다트(Avodart)라는 이름으로 2001년에 미국 식품의약국(FDA)에서 전립선 비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH) 치료제로 승인되었으며, 그 후 전립선 비대증을 비롯하여 성인 남성들에게서 흔히 발생하는 질환인 하부요로증상(lower urinary tract symptom, LUTS) 및 남성형 탈모증(male pattern baldness, MPB)을 치료하는 데에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁻⁹

유사한 약리기전을 나타내 미국 FDA에서 전립선 비대증 치료제(Proscar, 1992년)와 남성형 탈모증 치료제(Propecia, 1997년)로 모두 승인 받은 피나스테라이드(finasteride)가 5- α -reductase 효소의 Type 2 isoenzyme만을 선택적으로 억제시키는데 비해, 두타스테라이드는 Type 1과 Type 2 isoenzyme을 동시에 억제시키는 것으로 알려져 있다. 또한 피나스테라이드와 두타스테라이드의 효과를 비교하는 몇몇 연구들에서도 피나스테라이드보다 두타스테라이드가 5- α -reductase 효소를 더 효과적으로 억제하는 것으로 보고하고 있으며, 특히 두타스테라이드가 피나스테라이드보다 Type 2 isoenzyme의 활성을 3배 더 감소시키고 Type 1 isoenzyme은 100배 더 차단시킨다고 보고하고 있다.^{6-7, 10-12}

그러나 두타스테라이드는 현재까지 여성들과 어린이들에 있어서 안전성이 확립되어 있지 않다. 뿐만 아니라 강력한 남성호르몬인 DHT로의 전환을 저해하기 때문에 두타스테라이드에 노출된 산모의 남자 태아는 생식기 기형의 선천적 장애가 발생할 수 있으며, 따라서 임신 중이거나 임신 가능성이 있는 여성은 두타스테라이드의 복용 및 두타스테라이드 연질 캡슐의 노출을 삼가야 한다. 또한 남자어린이의 경우 자연적인 5- α -reductase Type 2 결함의 부작용이 나타날 수 있으며, 성인 남성의 경우 장기간 노출 시 발기불능, 성욕감소, 사정장애 및 여성형 유방증 유발의 부작용이 나타날 수 있다.¹³⁻¹⁴ 더욱이, 두타스테라이드 성분이 혈액을 통해 임신 중이거나 임신 가능성이 있는 여성에게 영향을 줄 수 있기 때문에 두타스테라이드 성분의 약물을 투여 받고 6개월이 경과하지 않은 남성은 헌혈을 금하는 체혈금지대상자로 선정하고 있다.¹⁵⁻¹⁶

이와 같이 두타스테라이드는 여러 목적의 약제로 사용되고 있지만 태아기형 유발 가능성 등의 심각한 부작용을 초래할 수 있어 혈액관리에 의해 헌혈 금지 약물로 선정되어 관리되고 있으며, 따라서 혈액에서 잔류되어 있는 두타스테라이드 성분의 분석은 매우 중요한 사안이다. 그러나 두타스테라이드 분석은 Ramakrishna *et al.* (2004)¹⁷에 의해 혈장(Plasma)에서 LC-MS/MS를 이용한 분석법이 처음 소개된 후 탐스로신(Tamsulosin) 혹은 알푸조신(Alfuzosin)과의 동시 분석법이 시도되었을 뿐 혈청에서의 두타스테라이드의 정량분석은 미비한 수준이며, 국내의 경우 분석법이 거의 확립되어 있지 않은 실정이다.¹⁸⁻¹⁹

따라서 본 연구는 LC-ESI/MS/MS를 이용하여 혈청 중에서 두타스테라이드를 측정할 수 있는 신뢰성 있는 분석방법을 개발하고, 분석방법의 타당도를 검증하고자 수행하였다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 사용된 두타스테라이드(99%, Fig. 1a) 표준물질과 베클로메타손(99%, Fig. 1b) 내부표준물질은 각각 AKSci사(CA, USA)와 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였고, 표준혈청(human serum)은 PAA Laboratories사(Cölbe, Germany)제품을 사용하였다. LC-MS/MS 분석에 사용한 모든 용매는 HPLC급 고순도 용매를 사용하였고, 아세트니트릴은 Merck사(Darmstadt, Germany), 메탄올 및 물과 개미산(formic acid)은 각각 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA)제품을 사용하였다. 액체상 추출법에서 사용된 methyl *tert*-butyl ether (MTBE) 및 탄산칼륨(K₂CO₃)는 각각 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA), Wako사(Junyaku, Japan)제품을 사용하였다.

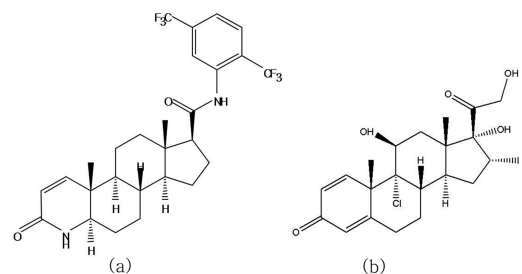


Fig. 1. Chemical structures of (a) dutasteride and (b) beclomethasone (I.S.).

2.2. 기기 및 장치

시료분석을 위해서 사용된 LC-MS/MS는 Agilent 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)와 triple quadruple 텐텀질량분석기(API 4000, Applied Biosystems, USA)로 구성된 것을 사용하였다. HPLC 칼럼은 Imtakt Corporation사(Kyoto, Japan)의 Unison UK-C18 column (2 mm i.d × 75 mm length, 3 μm particle size)을 사용하였다.

시료의 전처리에 사용된 원심분리기는 Beckman Coulter사(Fullerton, CA, USA)의 Allegra 6R을 사용하였고, vortex-mixer는 Scientific Industries사(Bohemia, NY, USA)의 Vortex-Genie 2를 사용하였다. Shaker는 IKA Labortechnik사(Staufen, Germany)의 HS 250 basic을 사용하였고, 질소농축기는 Zymark사(CA, USA)의 Turbovap® LV evaporator를 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 표준용액의 제조

두타스테라이드 표준품은 메탄올에 녹여 1000 μg/mL가 되도록 표준원액(stock solution)을 제조하였고 표준원액을 200, 100, 50, 20, 10, 2, 1 ng/mL의 농도가 되도록 메탄올로 단계별로 희석하여 표준용액을 제조하였다. 내부표준품인 베클로메타손은 메탄올에 녹여 1000 μg/mL가 되도록 표준원액을 조제한 후 메탄올로 희석하여 100, 50 ng/mL의 표준용액을 제조하였다.

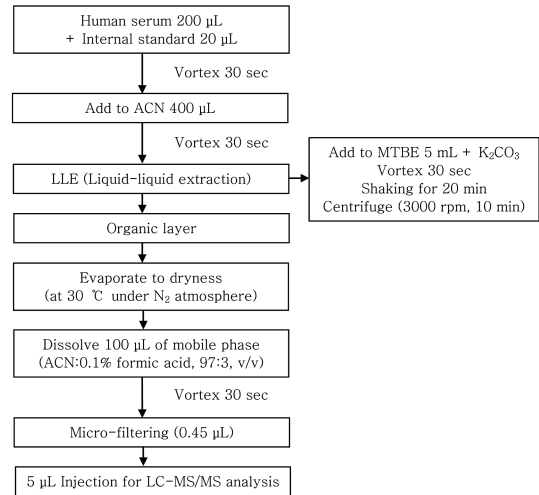


Fig. 2. Schematic diagram of the sample preparation.

2.3.2. 시료보관 및 전처리

시료는 -70 °C에서 냉동 보관하였으며 실온에서 해동한 후 사용하였다. 혈청 200 μL에 내부표준 물질(베클로메타손) 20 μL를 가하여 잘 섞은 후(vortexing, 30 sec), 아세토니트릴 400 μL를 넣어 단백질을 침강시켰다. 여기에 탄산칼륨을 가한 후 MTBE 5 mL를 넣고 20분간 교반하고, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취한 후 N₂ evaporator (30 °C)를 이용하여 건조하였다. 건조물은 LC-MS/MS 분석용 이

Table 1. Experimented conditions of LC-MS/MS

LC conditions			
HPLC	Agilent 1200 series		
Column	Unison UK-C18 (2 × 75 mm, 3 μm)		
Column oven	35 °C		
Flow Rate	250 μL/min		
Injection	5 μL		
	A: 0.1% formic acid in water, B: acetonitrile		
Mobile phase	Gradient: B 10% (0 min) → B 10% (1 min) → B 97% (4 min) → B 97% (6 min) → B 10% (6.1 min) → B 10% (11 min)		
MS/MS conditions			
MS/MS	API 4000	Curtain gas (psi)	10
Ion source	ESI	Collision gas (psi)	5
Detection mode	Positive	Ion spray voltage (V)	4500
Source temperature (°C)	300	Declustering potential (DP) (V)	90
Dwell time (ms)	150	Entrance potential (EP) (V)	10
Ion source gas(gas1) (psi)	25	Collision energy (CE) (V)	46
Ion source gas(gas2) (psi)	50	Collision cell exit potential (CXP) (V)	13

동상 100 μL 로 녹여 잘 섞은 후(vortexing, 30 sec), micro-filtering (0.45 μL , PTEE)하여 LC-MS/MS에 5 μL 씩 주입하여 분석하였다(Fig. 2).

2.3.3. 기기분석 조건

전처리 과정을 마친 시료는 Table 1에서와 같은 기기분석 조건에서 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 분석칼럼은 Unison UK-C18 column (2 mm i.d \times 75 mm length, 3 μm particle size)을 사용하였고, 이동상은 0.1% 개미산이 포함된 수용액과 아세트니트릴이었으며 기울기 용리법(gradient elution)을 사용하여 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 분석하였다. 분석칼럼의 오븐 온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 하였다.

검출을 위한 MS/MS 분석조건은 전기분무이온화(electrospray ionization, ESI) 방식을 선택하였고 양이온(+) 모드에서 MRM (multiple reaction monitoring) 방법을 사용하였다. 분무기체로 질소가스를 사용하였으며 온도는 300 $^{\circ}\text{C}$, ion spray voltage는 4500 V이었다. 기타 MS/MS 분석 파라미터는 declustering potential 90 V, entrance potential 10 V, collision energy 46 V, collision cell exit potential 13 V로 설정하여 분석하였다.

2.4. 분석방법의 신뢰성 검증

생체시료분석법 밸리데이션 및 Bioanalytical Method Validation 에 따라 밸리데이션을 수행하여 분석방법의 신뢰성을 확보하였다.^{20,21} 정량한계(LOQ)는 신호(signal)대 잡음(noise)비율이 10이상을 기준으로 설정하였다. 두타스테라이드의 검량선 작성용 표준시료액 (0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 ng/mL)을 시료전처리 방법과 동일하게 처리하여 하루에 5회 수행한 후 검량선을 작성하였다. 두타스테라이드의 QC 시료는 검량선 작성 농도 범위를 기준으로 저농도, 중농도, 고농도 각각 1.5, 12.0, 24.0 ng/mL의 농도로 하여 시료의 전처리 방법과 동일하게 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 정밀도(precision), 정확도(accuracy)를 구하고, 연속하여 3일간 실험을 수행하여 일간 정밀도, 정확도를 구하여 타당도를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LC-MS/MS 스펙트럼

혈청 중 두타스테라이드의 분석을 위하여 LC-MS/MS를 사용하였고, 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 두타스테라이드와 내부표준물질인 베클로메타손의

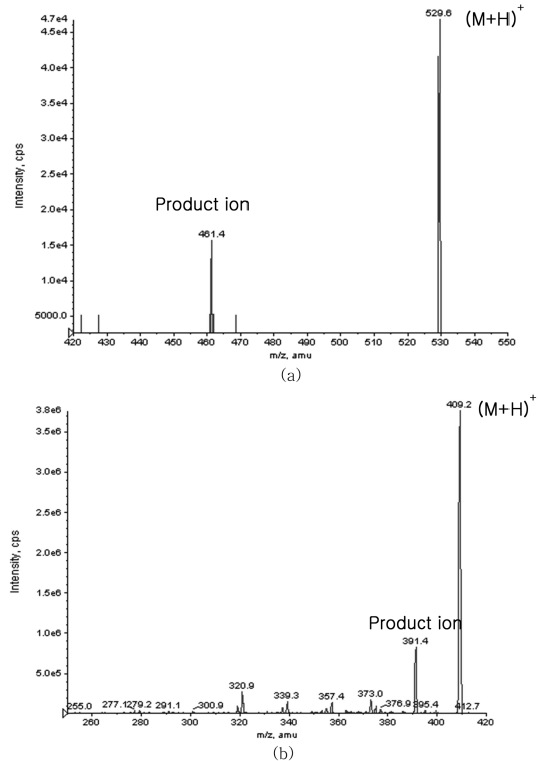


Fig. 3. Electrospray product ion mass spectra of (a) dutasteride and (b) beclomethasone (I.S.).

분자이온의 확인을 위하여 양이온(+) 모드에서 Q1 scan을 실시하였고, 분석대상물질의 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 해당하는 피크를 확인한 후, 최적화(quantitative optimization) 과정을 수행하여 전구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 확인하였다. 그 결과, 두타스테라이드는 m/z 529.6 \rightarrow m/z 461.5, 내부표준물질인 베클로메타손은 m/z 409.3 \rightarrow m/z 391.2로 측정되었다(Fig. 3).

3.2. 선택성

Blank 시료와 최저 정량한계의 농도를 첨가하여 분석방법에 따라 전처리한 후 LC-ESI/MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a)의 내부표준물질만 있는 blank 시료에서는 내부표준물질인 베클로메타손은 5.46분대에서 검출되었으며 두타스테라이드가 검출되지 않았고, 반면 0.5 ng/mL 농도의 dutasteride 시료에서는 두타스테라이드가 6.45 분대에 다른 물질과의 간섭 없이 명확하게 분리된 피크를 나타내었다(Fig. 4(b)).

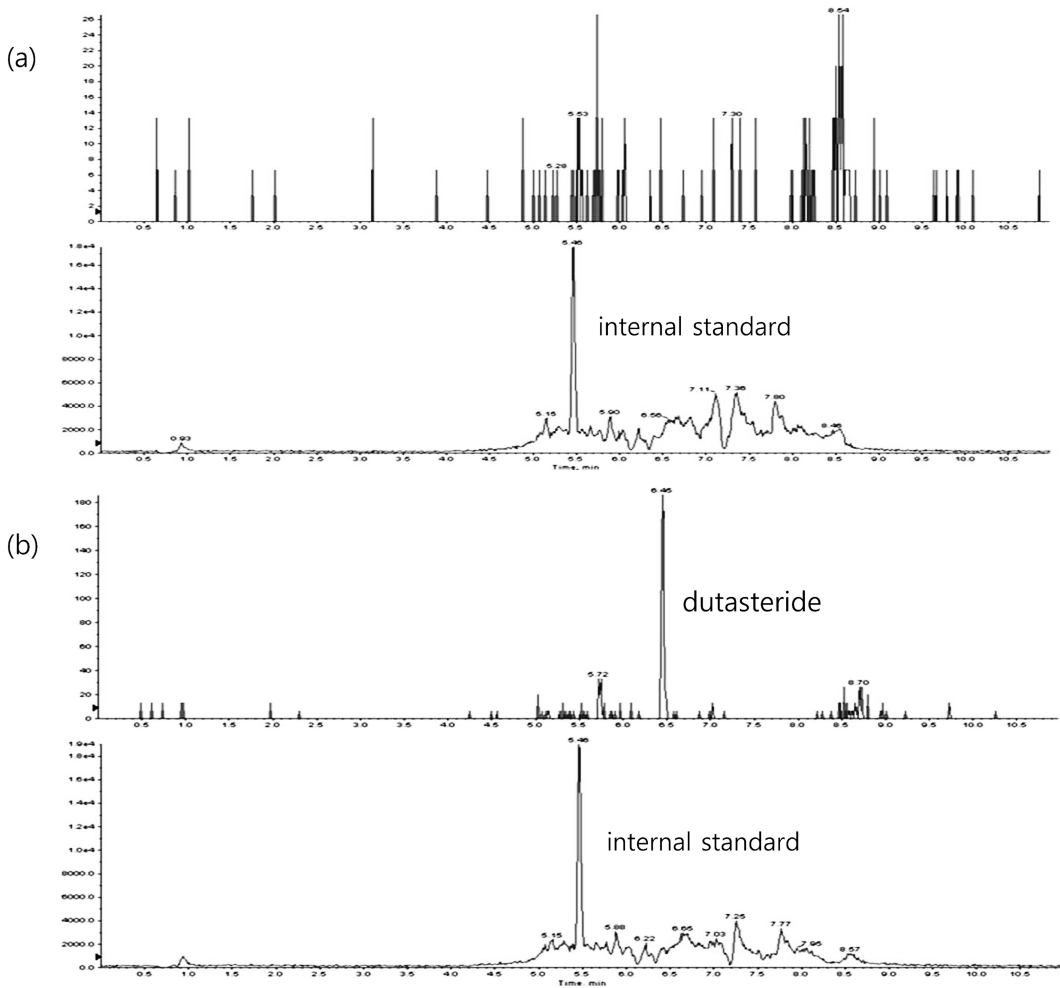


Fig. 4. Chromatogram of (a) blank (drug free spiked with internal standard) human serum and (b) 0.5 ng/mL spiked dutasteride with the internal standard.

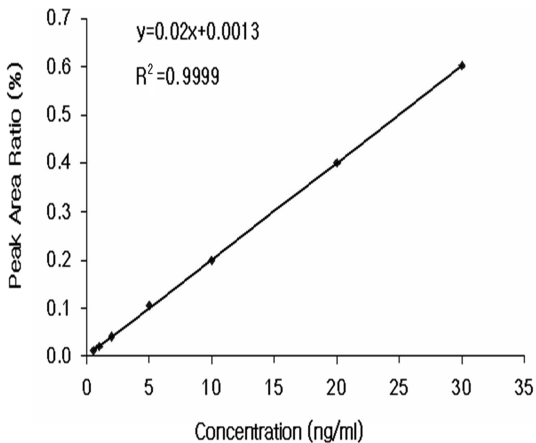


Fig. 5. Linearity of the standard calibration curve of dutasteride.

3.3. 직선성

검량선 작성을 위해 혈청 중 농도가 0.5~30.0 ng/mL의 범위가 되도록 표준물질을 가한 후 전처리 과정을 거쳐 검량선을 작성하였으며, 표준용액의 농도범위에서 상관계수 (R^2) 0.9999의 우수한 직선성을 확인하였다(Fig. 5).

3.4. 정확도, 정밀도

0.5~30.0 ng/mL의 농도범위에서 실시한 검량선 시료의 일내 정밀도는 변동계수(coefficient of variation, CV)가 2.4~8.4%로 생체시료분석법 밸리데이션 가이드라인인 15%를 만족하였으며, 정확도는 92.5~103.8%로 생체시료분석법 가이드라인인 80~120%를 만족하였

Table 2. Precision and accuracy data of backed-calculated concentration of calibration samples for dutasteride in human serum

Spiked Conc. (ng/mL)	Mean ± SD n=5	*Precision (%)	**Accuracy (%)
0.5	0.48 ± 0.04	8.4	92.9
1.0	0.92 ± 0.07	8.0	92.5
2.0	2.01 ± 0.07	3.6	100.6
5.0	5.19 ± 0.18	3.5	103.8
10.0	9.95 ± 0.24	2.4	99.5
20.0	20.01 ± 0.59	3.0	100.1
30.0	30.04 ± 1.04	3.5	100.1

* C.V.=STDEV of measured concentration/Means of measured concentration

** Accuracy = Measured concentration/Spiked concentration

Table 3. Precision and accuracy for the determination of dutasteride in human serum

Spiked Conc. (ng/mL)	Inter-day (n=5)		Intra-day (n=3)	
	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)
1.5	5.2	85.7	5.8	90.8
12.0	5.5	89.1	4.2	92.2
24.0	3.5	89.9	5.8	95.8

다(Table 2). 검량선 작성 농도 범위를 기준으로 세 가지 농도(저농도 1.5 ng/mL, 중농도 12.0 ng/mL, 고농도 24.0 ng/mL)에서 시료 전처리 방법과 동일하게 하루에 실험을 5번 반복 시행하여 구한 일내 정확도는 85.7~89.9%였으며, 연속하여 3일간 수행한 일간 정확도 역시 90.8~95.8%로 생체시료분석법 밸리데이션 가이드를 만족하였다(Table 3). 또한 세 가지 농도(저농도 1.5 ng/mL, 중농도 12.0 ng/mL, 고농도 24.0 ng/mL)에서 실시한 일내, 일간 정밀도는 변동계수가 각각 3.5~5.5%, 4.2~5.8%로 생체시료분석법 밸리데이션 가이드스인 15%를 만족하였다(Table 3). 이상의 결과로 두타스테라이드에 대한 본 분석법은 혈청을 이용한 연구에 적용되기에 충분한 정밀도와 정확도를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

3.5. 회수율

추출법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 실시한 회수율은 전처리를 거치기 전과 후의 두타스테라이드와 내부표준물질의 피크 면적비를 비교하여 백분율(%)로서 구하였으며 1.0과 20.0 ng/mL의 농도에서 측정된 회수율은 65.6%와 72.4%의 값을 각각 나타내었

Table 4. Recovery of dutasteride from human serum

Spiked Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1.0	65.6
20.0	72.4

다(Table 4). Ramakrishna *et al.*(2004)¹⁷의 연구결과(40.7%)와 비교하여 높은 회수율을 나타내었다.

4. 결 론

본 연구에서는 혈청 중 두타스테라이드의 정량을 위하여 LC-MS/MS를 이용한 분석법을 확립하였으며, 이 분석법에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 두타스테라이드의 정량한계와 회수율은 각각 0.5 ng/mL, 66~72%이었고, 0.5~30.0 ng/mL의 농도범위에서 검량선은 우수한 직선성($R^2 = 0.9999$)을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발된 LC-MS/MS 분석법은 혈청 내 두타스테라이드의 정량과 확인에 적용될 수 있는 충분한 감도와 선택성, 직선성 및 정확도와 정밀도를 가지고 있는 것으로 사료되며, 혈액관리법에 의해 현혈 금지 약물로 분류되어 있는 약물인 두타스테라이드의 분석에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. C. G. Roehrborn, P. Boyle, J. C. Nickel, K. Hoefner and G. Andriole, *Urol.*, **60**, 434-441 (2002).
2. H. C. Evans and K. L. Goa, *Drugs Aging*, **20**(12), 905-916 (2003).
3. K. K. Gaines, *Urol. Nurs.*, **23**(3), 218-220 (2003).
4. G. L. Andriole and R. Kirby, *Eur. Urol.*, **44**, 82-88 (2003).
5. F. Debruyne, J. Barkin, P. van Erps, M. Reis, T. L. J. Tammela and C. Roehrborn, *Eur. Urol.*, **46**(4), 488-495 (2004).
6. R. V. Clark, D. J. Hermann, G. R. Cunningham, T. H. Wilson, B. B. Morrill and S. Hobbs, *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **89**(5), 2179-1284 (2004).
7. E. A. Olsen, M. Hordinskym, D. Whiting, D. Stough, S. Hobbs, M. L. Ellis, T. Wilson and R. S. Rittmaster, *J. AM ACAD DERMATOL.*, **55**(6), 1014-1026 (2006).
8. M. Marberger, C. G. Roehrborn, L. S. Marks, T. Wilson and R. S. Rittmaster, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*,

- 91(4), 1323-1328 (2006).
9. C. G. Roehrborn, P. Siami, J. Barkin, R. Damião, K. Major-Walker, B. Morrill and F. Montorsi, CombAT Study Group, *J. Urol.*, **179**(2), 616-621 (2008).
 10. J. C. Nickel, *Urol.*, **6**(9), S31-39 (2004).
 11. N. Makridakis and J. K. V. Reichardt, *J. Mol. Endocrinol.*, **34**, 617-623 (2005).
 12. J. K. Amory, C. Wang, R. S. Swerdloff, B. D. Anawalt, A. M. Matsumoto, W. J. Bremner, S. E. Walker, L. J. Haberer and R. V. Clark, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**(5), 1659-1665 (2007).
 13. C. L. Foley, S. R. Bott, I. S. Shergill and R. S. Kirby, *Drugs. Today.*, **40**(3), 213 (2004).
 14. A. M. Traish, J. Hassani, A. T. Guay, M. Zitzmann and M. L. Hansen, *J. Sexual. Medicine.*, **8**(3), 872-884 (2011).
 15. Blood Guidances, Food and Drug Administration, USA, 2011.
 16. Blood Regulation Law, Ministry of Health and Welfare, Korea, 2011.
 17. N. V. S. Ramakrishna, K. N. Vishwottam, S. Puran, M. Koteswara, S. Manoj and M. Santosh, *J. Chromatogr. B.*, **809**(1), 117-124 (2004).
 18. S. Agarwal, K. V. Gowda, A. K. Sarkar, D. Ghosh, U. Bhaumik, T. K. Chattarai and T. K. Pal, *Chromatographia.*, **67**, 893-903 (2008).
 19. N. A. Gomes, A. Pudage, S. S. Joshi, V. V. Vaidya, S. A. Parekh and A. V. Tamhankar, *Chromatographia.*, **69**, 9-18 (2009).
 20. Bioanalytical Method Validation, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea, 2009.
 21. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration, USA, 2001.