

GC-MS를 이용한 소변 중 Diclofenac 및 대사체 분석

정지혜 · 허 훈 · 이원웅 · 홍종기*

경희대학교 약학대학 약학과
(2008. 10. 31. 접수, 2008. 12. 4. 승인)

Determination of diclofenac and its metabolites in human urine by GC-MS

Jee-Hye Jeong, Hun Huh, Won Woong Lee and Jongki Hong*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Korea
(Received October 31, 2008, Accepted December 4, 2008)

요 약: 본 연구는 건강한 성인남자로부터 비스테로이드성 항염증제인 diclofenac 약물을 복용 후 26시간 동안 배설된 소변을 채취하여 이 약물의 대사과정과 배설에 대하여 연구를 수행하였다. 소변 중에 diclofenac의 포함대사체를 검출하기 위하여 산 가수분해 과정을 수행하였고 이 과정에서 diclofenac과 대사체들은 탈수반응에 의해 락탐환이 형성되어 이들의 극성은 산성에서 염기성으로 전환된다. 그러나 변환된 락탐 환은 염기조건에서 수산화이온에 의해 쉽게 분해가 일어나므로 오히려 염기성 조건에서의 추출율이 낮아지는 경향이 있어 적정 추출 조건에 대하여 연구하였다. 미량의 대사체 검출을 위하여 trimethylsilylation (TMS) 유도체 반응을 시킨 후 gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS)를 이용하여 분석하였다. 본 연구를 통해 4개의 대사체를 검출할 수 있었으며, 이들은 모두 산화과정에 의해 약물모핵에 hydroxylation 된 화합물이었다. 각 대사체는 질량스펙트럼의 해석과 이전 연구결과의 비교를 통하여 구조가 규명되었으며, 이를 바탕으로 시간에 따른 모 약물과 대사체의 배설율을 조사하였다. 본 실험 결과로부터 diclofenac의 체내 대사 경로를 제안하였다.

Abstract: This study has been described the metabolism and excretion in a healthy male urine collected for 26hrs after oral administration of diclofenac. To detect conjugated metabolites of diclofenac, urine sample was acid-hydrolyzed under the conditions of 6M-HCl at over 110°C for 1hr. During the acidic hydrolysis process, diclofenac and its metabolites were converted into their corresponding lactam-ring through dehydration reaction. As results of chemical conversion by means of hydrolysis, the structures of diclofenac and its metabolites were also changed acidic to basic forms. However, lactam-ring was degraded by hydroxyl ion at basic condition. Thus, the extraction rate of dehydrated diclofenac and its metabolites was not favored at basic condition. For the determination of trace amounts of diclofenac and its metabolites in urine, trimethylsilylation (TMS) with MSTFA was applied and followed by analysis with gas chromatograph-mass spectrometer. In this study, four metabolites that are formed by the hydroxylation of parent drug were mainly detected. Each metabolite was

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-961-9255 Fax : +82-(0)2-961-0357

E-mail : jhong@khu.ac.kr

tentatively identified by both interpretation of mass spectra and comparison with previously reported results. In addition, time profile of urinary excretion rate for parent drugs and metabolites was studied. Finally, the metabolic pathway of diclofenac was suggested on the basis of the elucidation of its metabolites and excretion profiles.

Key words : diclofenac, urine, metabolites, TMS, GC/MS, mass spectrum

1. 서 론

Diclofenac은 비스테로이드성 항염증 약물(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)로 체내의 arachidonic acid가 cyclooxygenase (COX) 효소에 의해 염증과 통증을 유발하는 호르몬인 프로스타글란딘으로 전환되는 합성과정을 억제한다.¹

이 약물의 복용 시 체내에서 다양한 대사 경로를 통해 여러 대사체로 변형이 된다. 약물 대사는 체내의 효소에 의해 일어나는 생체변환 작용으로 산화, 수산화, 환원 및 가수분해 반응을 통해 분자구조에 극성 관능기를 도입하는 대사성반응(제 1상반응)과 glucuronidation, sulfatation 및 아미노산(glycine, glutamine 등) 포함 반응을 통해 모분자 구조 내의 관능기에 체내 내인성 구성물질을 결합시켜 수용성을 증가시키는 포합반응(제 2상반응)으로 대별된다.² 이와 같은 일련의 대사 과정을 거쳐 수용성이 증가된 약물은 대부분 신장을 통해 소변으로 배설되는데 이와 같은 점은 치료 체취의 어려움을 갖는 혈장 내의 대사체 분석법보다 좀 더 유리한 이점을 갖는다.

체내의 약물 동태를 알아보고 약리 활성, 부작용을 나타내는 약물의 대사체를 규명하려는 연구는 오랫동안 수행되어 왔다. 기존에 수행되었던 diclofenac에 관한 연구는 high-performance liquid chromatograph (HPLC)를 이용하여 소변 내 diclofenac의 검출³ 및 효소 발현 양상에 따른 소변 내 diclofenac의 대사 양상의 비교,⁴ 유도체화 반응을 통한 gas chromatography (GC) 및 GC-mass spectrometry (MS) 분석법⁵이 소개되었으며, 소변과 혈장에서 NSAID 약물을 검출한 연구가 소개되었다.^{6,8} 이외에도 극미량의 대사체를 검출하기 위하여 pentafluoroacylation 유도체를 적용한 negative chemical ionization GC/MS (GC-NICI-MS)에 의한 연구도 수행되었다.⁹ LC에 nuclear magnetic resonance (NMR)과 MS를 동시에 연결한 LC-NMR-MS 장비를 이용하여 소변 내 diclofenac과 그 대사체들의 구조 분석을 수행한 연구¹⁰도 발표되고 있다. 최

근에는 환경 분야에 대한 연구 관심의 증가와 더불어 LC-electrospray ionization tandem MS (LC-ESI-MS-MS) 기법을 이용하여 하천수에서 다양한 약물 및 그 대사체들을 검출하려는 연구도 보고되고 있다.¹¹ 또한, 단일 약물의 대사체 분석에 관한 연구는 물론 최근에는 복합 제제 등 다양한 약물 간의 상호 작용 등을 알아보고 동시적인 약물 동력학적인 연구를 위한 복합 약물의 대사체 동시 분석법 등도 개발되고 있다.¹²

일반적으로 NSAIDs 약물들의 검출을 위하여 시료 전처리 과정에서 열 유도 반응(thermally-induced reactions)에 의해 (i) 메탄올에 용해 시 카르복실기에 메틸 에스터가 형성되거나, (ii) 탈탄산화 반응이 일어나거나, (iii) 탈수 반응이 일어나거나, (iv) 탄소-질소 다원자 이중원소환의 결합(carbon-heterocyclic nitrogen bond)이 깨지는 등의 현상이 나타난다.⁶ 이 중에서 탈수반응은 diclofenac과 같은 화학구조에서만 가능한 반응으로, 산 조건에서 가열한 경우나 높은 열을 사용하는 GC-MS 조건에서 diclofenac은 탈수되면서 오프링인 락탐환으로 전환된다.⁶ 따라서 대사체의 구조 규명, 대사 동력학을 규명하기 위해서 이들 과정을 명확히 규명할 필요가 있다.

본 연구에서는 GC-MS를 이용하여 소염 진통제인 diclofenac의 화학적 구조 전환을 통한 소변 중 diclofenac과 대사체의 추출 방법 및 조건을 찾아 대사체의 구조를 규명하였고 또한, 분석 결과를 통해 시간 대별로 소변 중 diclofenac과 대사체들의 배설 양상을 확인하고 시간에 따른 약물의 동태를 살펴보았다.

2. 실험

2.1. 시약

시험자가 복용한 diclofenac 표준품은 국제약품공업 주식회사로부터 제공되었다. 시료의 전처리 과정 중 포합 대사체를 가수분해하기 위해 사용한 염산 용액은 Merck사(Darmstadt, Germany)의 제품이었다. 액체-액체 추출과정 및 유도체 반응에서 사용한 에틸 아세

테이트 용매는 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였고, pH의 조절을 위해 phosphoric acid (pH 6, 12)는 Wako사(Osaka, Japan)로부터, boric acid (pH 9)는 Junsei사(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 완충 용액제조에 사용하였다. 추출액의 수분 제거를 위해 사용한 무수 Na_2SO_4 는 Junsei사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 유도체 반응을 위한 *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 내부 표준물질인 phenanthrene- d_{10} 은 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA)로부터 구입하였다.

2.2. 분석기기 및 조건

시료의 분석을 위하여 사용한 GC-MS는 6890N gas chromatograph/5973 mass selective detector로 Agilent Technologies사(Palo Alto, CA, USA) 제품이었으며, 컬럼은 J&W Scientific사(Folsom, CA, USA)의 DB5-MS (cross-linked 5% phenylmethylsilicon, 30 m length \times 0.2 mm I.D., 0.25 μm film thickness)를 사용하였다. 운반기체로 순도 99.999%의 헬륨가스를 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 시료 주입은 직접 주입하였으며 GC 주입구 온도는 270°C로 정하였고, 분할(10:1) 주입방법을 사용하였으며, 이온 검출 방법은 스캔모드를 사용하여 m/z 값 50~550 범위를 조사하였다. 컬럼 온도는 100°C에서 3분간 유지시킨 후 15°C/min 으로 280°C까지 올리고 5분간 유지하였다.

2.3. 실험 과정

2.3.1. 약물 복용 및 소변 채집 방법

약물을 복용한 피험자는 건강한 성인 남성(나이: 23세, 체중: 65 kg)으로 diclofenac을 1회 복용시킨 후 26시간 동안 총 7회에 걸쳐 소변을 채취하였다. 소변의 채집은 약 복용부터 약 3시간, 5시간 30분, 7시간, 10시간, 14시간, 21시간, 26시간 후에 각각 실시하였다. 채집한 소변시료는 4°C로 냉장 보관하였다. 시료 전 처리 방법은 Fig. 1에 나타내었다.

2.3.2. 액체-액체 추출법 (Liquid-Liquid Extraction)

소변 시료의 산 가수분해 및 diclofenac의 락탐환으로의 전환 반응 이후 실온에서 방치한 뒤 분별 깔때기에 옮겨 담고 에틸 아세테이트(EA) 10 mL를 가한 후 5분 동안 흔들여 주었다. 층이 나뉘지면 EA층을 추출하여 둥근 플라스크에 옮겨 담고 다시 분별 깔때

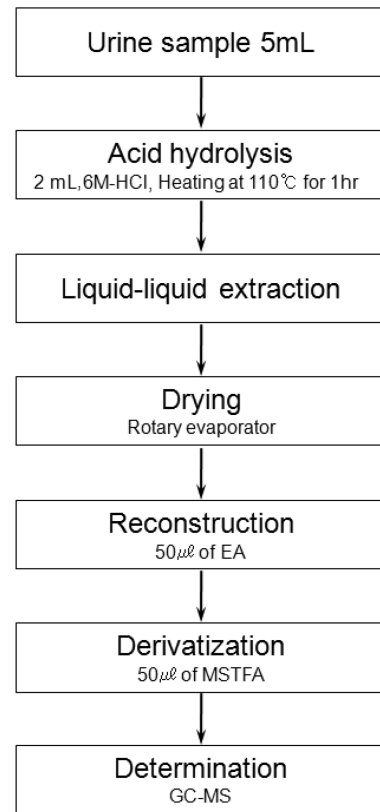


Fig. 1. Sample preparation for analysis of diclofenac and its metabolites by GC-MS.

기에 에틸 아세테이트 10 mL를 가하여 이와 같은 과정을 두 번 반복하였다. 추출한 용액을 회전식 감압 건조기를 이용하여 감압건조 시킨 후에 phosphate buffer 5 mL를 가해 pH 3으로 맞췄다. 여기에 무수 Na_2SO_4 0.5 g을 넣고 잘 흔들여 주었다. 가루가 다 녹은 후에 분별 깔때기에 담고 EA 7 mL를 가하고 5분 동안 흔들여 주었다. 층이 나뉘지면 EA층을 추출하여 둥근 플라스크에 옮겨 담고 다시 분별 깔때기에 에틸 아세테이트 7 mL를 가하여 이와 같은 과정을 두 번 반복하였다. 추출된 EA층의 잔류물을 분석하였다.

2.3.3. Trimethylsilylation (TMS) 유도체화 반응

추출물은 질소 분위기에서 감압건조기를 사용하여 건조한 후, 무수 EA 50 μL 을 넣은 후 TMS 유도체 시약인 MSTFA 50 μL 을 넣고 80°C에서 20분간 가열하였다. 방냉 후 1 μL 를 GC/MS에 주입하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. diclofenac의 화학적 구조변환

γ -, δ -아미노산 기능을 가진 화합물은 일반적으로 산성 조건에서 열을 가하면 탈수 반응이 일어나 안정한 5환 또는 6환링의 화합물을 형성한다고 알려져 있다.¹³ γ -아미노산의 구조를 가지고 있는 diclofenac도 산과 열을 가하면 탈수 반응이 일어나 Fig. 2와 같이 5환링의 락탐형으로 전환된다. 이외에도 acid anhydride 나 높은 온도에 의해서도 탈수반응이 일어나 oxindole

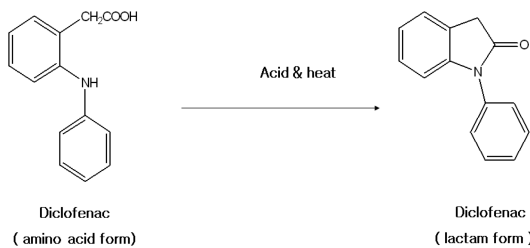


Fig. 2. Dehydration of diclofenac resulting from 110°C heat conditions and in the presence of 6M-HCl.

구조를 갖는 락탐형으로 전환 된다.⁹

본 연구에서도 소변 중 diclofenac의 동태를 분석할 때 glucuronide 포함대사체를 떼어내기 위해 가수분해할 때, 열과 산을 가해야 하므로 락탐형으로 전환시켜서 분석하는 방법을 택하였다. 그러나 최적화된 온도와 pH조건에서 수행되지 않는다면 diclofenac이 락탐형으로 100% 전환되지 않으므로 diclofenac의 정확한 정량 분석하는데 어려움이 있다. 따라서 diclofenac을 락탐형으로 100% 전환시킬 수 있는 온도, pH 조건을 조사하였다.

Fig. 3은 표준시료 diclofenac을 사용하여 전환율을 조사하기 위해 GC-MS로 분석한 결과이다. Fig. 3(A)는 일반적인 산 가수분해 시의 조건인 100~110°C 정도의 열을 가했을 때 total ion chromatogram (TIC)로 락탐형과 아미노산형이 같이 나온 반면에 Fig. 3(B)는 락탐형만이 분석됨을 볼 수 있다. 본 실험을 통하여 6 M-HCl을 2 mL 가한 후 1시간 동안의 110°C 이상의 열로 처리하는 것이 아미노산형의 diclofenac을 락탐형으로 전환하는데 일반적인 포함대사체를 떼어내기 위한 산 가수분해 반응조건보다 더 효과적인 것을 확

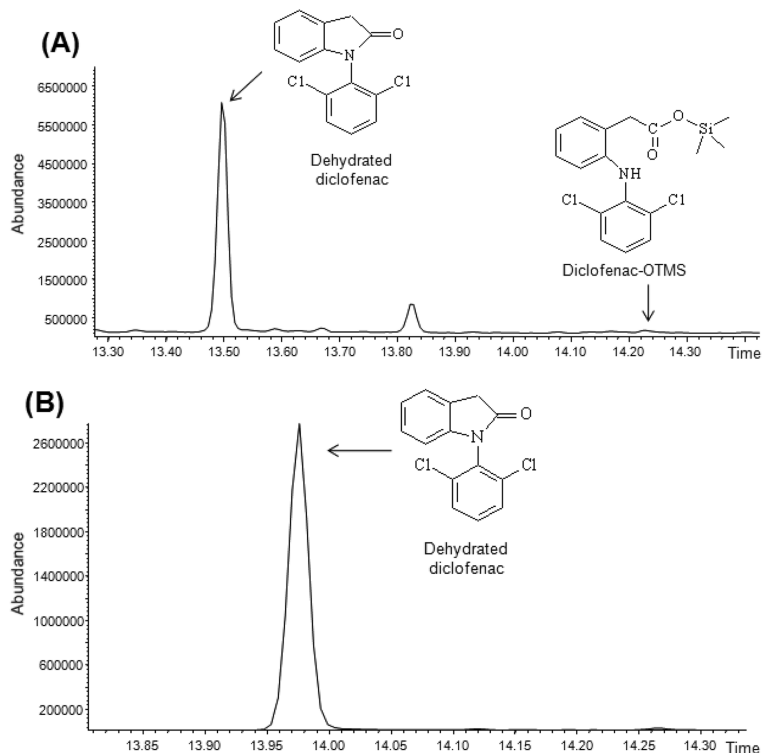


Fig. 3. Total ion chromatograms of 1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone and diclofenac-OTMS (A), and 1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone (B).

인하였다. 이와 동시에 락탐형의 diclofenac 질량 분석 스펙트럼과 머무름 시간(RT)을 조사하였다.

3.2. 소변 중 diclofenac의 추출

일반적으로 소변에서 약물과 대사체의 분석을 위해서는 요소와 같은 불순물들을 제거하는 과정이 필요하며 제 2상 대사 과정에서 생성되는 포함체를 떼어내는 가수분해 과정이 필요하다. Diclofenac의 경우 모핵은 카르복실기를 가지고 있는 산성형 구조를 띠고 있으나 산 가수분해 후에는 이들의 형태는 락탐환 형태로 전환된다. 하지만 변환된 락탐형의 diclofenac은 염기성조건에서는 OH⁻ 이온에 의해 락탐환이 깨어져 원래의 아미노산 형태로 되는 경향이 있다.¹⁴ 따라서 oxindole 구조로 인하여 높은 pK_a값을 갖는 락탐형의 diclofenac의 추출율은 오히려 pH 10이상에서는 급격히 감소하였으며, pH 3, 6 및 9 조건에서는 pH가 증가할수록 서서히 추출율이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 추출율을 조사한 결과 소변 시료에 있어서 pH 3 조건에서 추출율이 가장 높은 것으로 나타났으나, 실제 GC/MS 분석 시 방해물질의 영향이 매우 크기 때문에 추출조건을 pH 6으로 맞추었다.

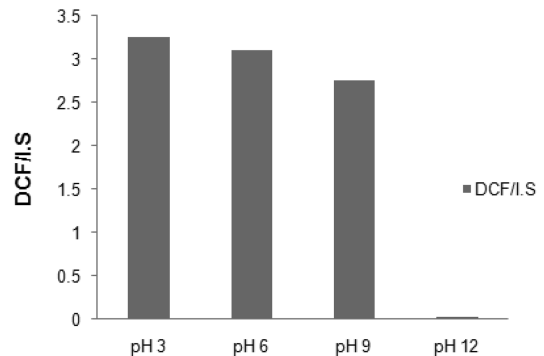


Fig. 4. Diagram of 1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone extracted with EA at pH 3, 6, 9, and 12 after acid-hydrolysis.

3.3. 구조 전환된 Diclofenac 및 대사체의 분석

복용 후 3시간이 지난 다음 채취한 소변 시료를 산 가수분해 수행한 후, 락탐형의 diclofenac과 그 대사체는 액체-액체 추출법을 통하여 추출한 후 농축하였다. 추출된 diclofenac과 그 대사체들은 TMS 유도체화 반응을 거친 후, GC-MS 스캔모드에서 분석한 TIC는 Fig. 5에 실었다. Fig. 5에서 보듯이, 락탐형으로 전환된 diclofenac 및 4개의 대사체가 검출되었다. 이들 유

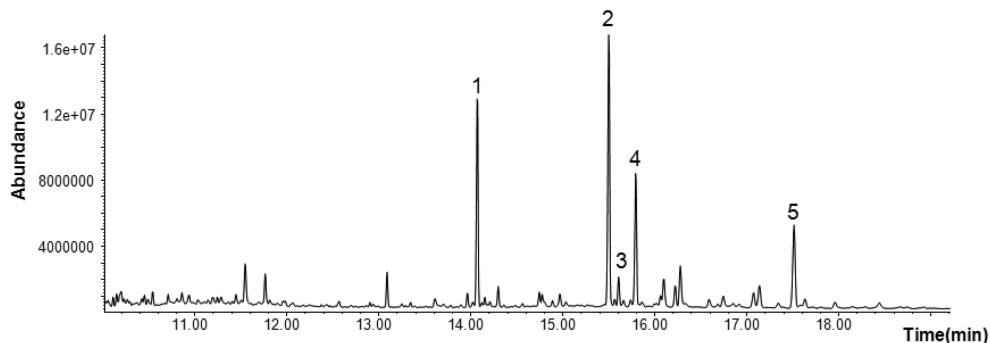


Fig. 5. Total ion chromatogram obtained from a urine sample collected after 3 hr of oral administration. Peaks identified are as follows; 1. 1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone-(OTMS), 2. 1-(2,6-dichlorophenyl)-4'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂, 3. 1-(2,6-dichlorophenyl)-3'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂, 4. 1-(2,6-dichlorophenyl)-5-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂, 5. 1-(2,6-dichlorophenyl)-4',5-dihydroxy-2-indolinone-(OTMS)₃.

Table 1. GC-MS data of derivatized 1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone and its metabolites converted by acidic hydrolysis

	OTMS-Derivative	MW	RT (min)	(M-15) ⁺	Characteristic ion (m/z)
1	1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone-(OTMS)	349	14.07	334	190, 314
2	1-(2,6-dichlorophenyl)-4'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS) ₂	437	15.50	422	190, 402, 437
3	1-(2,6-dichlorophenyl)-3'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS) ₂	437	15.61	422	190, 402, 437
4	1-(2,6-dichlorophenyl)-5-hydroxy-2-indolinone-(OTMS) ₂	437	15.79	422	278, 402, 422, 437
5	1-(2,6-dichlorophenyl)-4',5-dihydroxy-2-indolinone-(OTMS) ₃	525	17.51	510	278, 452, 490, 525

*MW: molecular weight

*RT: retention time

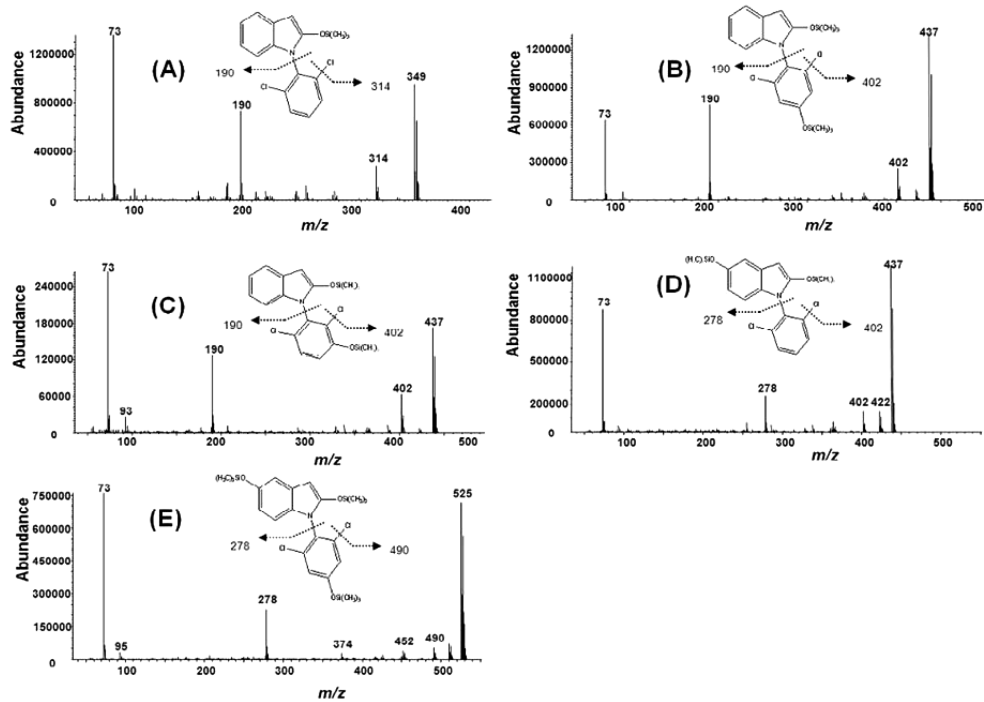


Fig. 6. EI-mass spectra of dehydrated diclofenac and its metabolites formed by heat and acid conditions (A) 1-(2,6-dichlorophenyl)-2-indolinone-(OTMS), (B) 1-(2,6-dichlorophenyl)-4'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂, (C) 1-(2,6-dichlorophenyl)-3'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂, (D) 1-(2,6-dichlorophenyl)-5-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂, (E) 1-(2,6-dichlorophenyl)-4',5'-dihydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂.

도체화된 diclofenac과 그 대사체들의 머무름 시간과 특성이온을 Table 1에 요약하였다.

Fig. 6은 락탐형의 diclofenac과 대사체에 대한 TMS 유도체들의 질량스펙트럼이다. Fig. 6(A)는 대사되지 않고 배설된 락탐형 diclofenac의 질량 스펙트럼이다. 락탐형-diclofenac의 경우 5환링에 산소원자는 케톤그룹의 이중결합으로 붙어있지만 MSTFA로 유도체화하는 과정에 에놀화 반응이 일어나 OTMS 반응이 진행되었다. 이 화합물의 분자이온은 m/z 349에서 관측되었으며, ³⁵Cl/³⁷Cl의 동위원소 비율로 인하여 m/z 351과 353의 이온 클러스터도 함께 나타났으며, 이들 비로 Cl 원자가 2개 있는 것을 알 수 있다. 이외에도 TMS유도체의 특성 피이크인 [M-15]⁺ 이온 및 탈염소화가 일어난 [M-Cl]⁺ 이온이 각각 m/z 334 및 314에서 나타났다. 또한, heterocyclic의 질소원자와 α-위치의 탄소 원자 사이의 결합은 aromatic ring의 공명 효과로 인하여 양이온이 안정화된 조각 이온은 m/z 190에서 비교적 강한 세기로 나타났다. Fig. 6의 (B)와 (C)에서 보듯이 이들 두 화합물은 구조이성질체로 질량분석스펙트럼이 유사한 패턴을 보여주었다. 일반적

으로 diclofenac의 주대사체는 벤젠환의 4'-위치에 수산화기로 치환된 형태이며, 3'-위치에 수산화기로 대사되는 대사체의 양은 매우 낮은 것으로 보고되고 있다.⁵ 본 연구에서도 Fig. 5의 TIC에서 보듯이, 피이크 2와 3의 크기로 보아 이들은 효소 대사 반응을 통해 각각 벤젠환의 4'-위치와 3'-위치가 산화되어 형성된 대사체로 유추할 수 있다. 즉 벤젠환의 hydroxylation은 주로 *para*-위치에서 일어나므로 2번 피이크는 1-(2,6-dichlorophenyl)-4'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂로, 아울러서 *meta*-위치에 hydroxylation이 일어나는 화합물은 3번 피이크로 1-(2,6-dichlorophenyl)-3'-hydroxy-2-indolinone-(OTMS)₂ 추정되어진다. 각 스펙트럼에 나타난 특성 조각이온들은 Fig. 6(A)의 락탐형-diclofenac-TMS 질량분석스펙트럼과 매우 유사한 패턴을 보이고 있다. 분자이온 클러스터인 m/z 437, 439, 441 이온들과 [M-Cl]⁺ 이온이 m/z 402와 404에서 나타났으며, N 원자와 C 원자 사이의 결합이 끊어진 곳에서 m/z 190 이온이 나타났다. Fig. 6(D)에 나타난 스펙트럼 역시 락탐형-diclofenac에 hydroxylation 반응을 거친 대사체라는 것은 분자이온인 m/z 437 이온 클러스터의 관측

을 통해 확인할 수 있었다. 그러나 Fig. 6의 (B)와 (C)에 나타난 스펙트럼과는 조각이온의 양상이 상이하게 나타난 것으로 보아, indolinone 환에 hydroxylation 반응이 일어난 것으로 유추할 수 있다. 이에 대한 증거로서 N-C 결합이 끊어진 곳에서 m/z 278 이온이 나타났는데 이는 m/z 190 이온에 OTMS기가 추가된 질량값으로 유추할 수 있다. Fig. 6-(E)는 분자이온 클러스터인 m/z 525, 527, 529에서 나타난 것으로 보아 1-(2,6-dichlorophenyl)-5hydroxy-2-indolinone 의 dichlorobenzene환의 para위치에 산화가 일어나서 생성된 물질로 확인할 수 있었다. 이에 대한 추가적인 증거는 m/z 278 이온의 관측이다. 따라서 이 화합물은 1-(2,6-dichlorophenyl)-4',5-dihydroxy-2-indolinone-(OTMS)₃ 로 추정된다.

3.4. Diclofenac 대사과정의 규명

앞서 GC/MS 분석을 통하여 소변으로 배설되는 diclofenac의 대사체들의 구조를 규명하였으며, 이를 기반으로 시간에 따라 배설되는 대사체의 양을 조사하여 대사과정을 조사하였다. Dichlorofenac의 배설량과 대사체의 함량을 조사하여 체내에서 대사과정을 유추할 수 있다. 이들 약물의 대사체 표준품의 확보가 어려워 대사약물의 정확한 양을 측정할 수 없어 시간에 따른 각 대사체의 상대적인 양을 측정하여 누적배설 양상에 대하여 조사하였다. Dichlorfenac 및 그 대사체들의 시간에 따른 누적배설 양상 그래프를 Fig. 7에 실었다. Diclofenac의 경우 반감기가 1.2~2시간이어서 복용 후 체내에서 매우 빠르게 대사와 배설되기에 5시간 이후부터는 검출되지 않는 특성을 나타냈다.

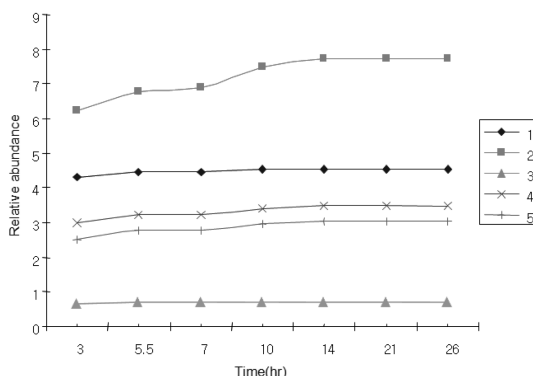


Fig. 7. Time profiling of urinary excretion for the accumulated each metabolites; 1. Diclofenac, 2. 4'-hydroxy-diclofenac, 3. 3'-hydroxy-diclofenac, 4. 5-hydroxy-diclofenac, and 5. 4',5-dihydroxy-diclofenac.

주 대사체인 4'-hydroxydiclofenac은 10시간까지 많은 양이 배설되었고 점진적으로 14시간까지 증가하다가 이후로는 거의 배설되지 않았다. 4'-hydroxydiclofenac의 산화반응에 의해 생성되었을 것으로 예상되는 4',5-dihydroxydiclofenac도 비슷한 배설양상을 나타냈다. 5-hydroxydiclofenac의 경우도 3시간 이내에 대부분 대사과정을 통해 형성되었다가, 그 이후부터는 검출되지 않았다. 미량으로 대사화되는 3'-hydroxydiclofenac의 경우 3시간 이후부터 거의 검출되지 않는 현상을 보여 주었다. 그러나 선행된 연구¹⁶⁻¹⁸에서 발견되었던 메톡실화 대사체인 4'-hydroxy-3'-methoxydiclofenac과 3'-hydroxy-4'-methoxydiclofenac는 본 연구에서는 확인할 수 없었다. 이는 이들 화합물이 산 가수분해 과정에서 탈메틸화되어 분해되었을 가능성이 있는 것으로 예상되었다.

대사체들의 시간에 따른 배설 양상과 양을 비교하여 대사과정을 예측해본 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Dichlorofenac의 대사경로는 크게 두 가지 경로로 예측해 볼 수 있다. 첫 번째로 diclofenac은 phase 1의 산화 반응을 거쳐서 dichlorobenzene의 3번과 4번 위치에 산소원자를 포함하는 3환링의 transition state를 형성할 것으로 생각된다. 이러한 산화 반응은 cytochrome P450의 isoenzyme인 CYP2C에 의한 것으로 알려져 있다.¹⁵ 그 이후에 3번 또는 4번 위치에 hydroxyl기가 형성되어 안정한 형태로 대사체가 형성된다. 또는 3번과 4번에 두 개의 hydroxyl기가 붙은 중간체가 형성되기도 한다. 이는 3, 4번 위치에 동시에 hydroxyl기 두 개가 붙게 되면서 형성되거나 3번 또는 4번 위치의 hydroxyl기가 하나 있는 대사체가 산화되면서 형성될 것으로 유추할 수 있다.

두 번째 경로로 diclofenac은 우선 dichlorobenzene이 아닌 acetic acid의 benzene의 4번과 5번 위치에 산소원자를 포함하는 3환링의 transition state를 거쳐서 5번 위치에 hydroxyl기가 생성되는 과정을 생각해 볼 수 있다. 여기에 다시 dichlorobenzene의 3번과 4번 위치에 산소원자를 포함하는 3환링을 만들었다가 4번 위치에 hydroxyl기가 붙는 대사과정을 예측해 볼 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 Diclofenac을 복용 후 GC-MS를 이용하여 소변 중 약물의 대사체를 분석하였다. 약물 복용 후 26시간까지 받은 소변을 전처리하여 분석하기

용이한 형태로 화학적 구조를 전환시키고 이를 분석하여 약물의 대사 양상을 고찰하였다. 또한 TMS 유도체화 반응을 통하여 GC-MS로 극미량의 대사 물질을 분석해 낼 수 있었으며, 일부 조각이온들은 대사체 확인에 매우 유용한 진단이온으로 사용될 수 있었다.

GC-MS를 통한 Diclofenac의 분석 과정 중 거치는 산 가수분해로 인하여 생기는 락탐형의 diclofenac은 실제 실험 시 본 조건에서 제시한 것뿐만 아니라 생체 염기 혹은 산 처리 과정 중에서도 일부 발생한다. 따라서 락탐형의 diclofenac의 형성은 diclofenac에 대한 정량분석에 어려움을 주었지만 diclofenac의 분석 시 전환되는 구조적인 문제로 인한 정량적인 문제점은 본 실험에서 제시한 전환 조건 및 pH 조건 등을 통하여 해결하는 데에 도움을 줄 것으로 기대된다.

본 실험을 통하여 GC-MS를 이용한 체내 약물 대사체의 분석은 각 대사체의 약효를 탐색하거나 안전성을 증명하는데 이용될 수 있으며, 약물의 체내 동태를 밝힘으로써 복용 약물을 확인하고 복용시간과 용량을 결정하여 약물동력학의 활용에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. L. L. Brunton, J. S. Lazo and K. L. Parker, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, 2006.
2. 의약화학, 의약화학 편집위원회, p. 85-106, 신일상사, 2004.
3. T. Hirai, S. Matsumoto and I. Kishi, *J. Chromatogr. B*, **692**, 375(1997).
4. P. Dorado, R. Berez, M. C. Caceres and A. L. Lerena, *J. Chromatogr. B*, **789**, 437(2003).
5. A. Shafiee, M. Amini and M. Hajmahmodi, *J. Sci. I. R. Iran*, **14**, 21(2003).
6. B. M. El Haj, A. M. Al Ainri, M. H. Hassan, R. K. Bin Khadem and M. S. Marzouq, *Foren. Sci. Inter.*, **105**, 141(1999).
7. G. Gonzalez, R. Ventura, A. K. Smith, R. Torre and J. Segura, *J. Chromatogr. A*, **719**, 251(1996).
8. A. Sioufi, F. Pommier and J. Godbillon, *J. Chromatogr.*, **571**, 87(1991).
9. W. Blum, J. W. Faigle, U. Pfaar and A. Sallmann, *J. Chromatogr. B*, **685**, 251(1996).
10. D. Stulten, M. Lamshoft, S. Zuhke and M. Spiteller, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 371(2008).
11. X. S. Miao, B. G. Koenig and C. D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A*, **952**, 139(2002).
12. W. W. Lee, S. H. Ahn, S. W. Lee and J. Hong, *Anal. Sci. Technol.*, **20**, 315(2007).
13. R. T. Morrison and R. N. Boyd, Organic Chemistry, Allyn and Bacon Inc, London, 1987.
14. J. Frau, M. Coll, J. Donoso, F. Munoz, B. Vilanova and F. Garcia-Blanco, *Electron. J. Theor. Chem.*, **2**, 5665(1997).
15. R. E. Billings, *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 287(1985).
16. C. R. Creveling, N. Dalgard, H. Shimizu and J. W. Daly, *Mol. Pharmacol.*, **6**, 691(1970).
17. T. Leemann, C. Transon and P. Dayer, *Life Sci.*, **52**, 29(1993).
18. B. Boudikova, C. Szumlanski, B. Maidak and R. Weinsilboum, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **48**, 381(1990).