

## LC/ESI/MS와 GC/TOF-MS를 이용한 인체노시료에서의 Prostanozol 대사체 검출

염태우<sup>1,2</sup> · 팽기정<sup>2</sup> · 김연제<sup>1,★</sup>

<sup>1</sup>한국과학기술연구원 청정에너지센터, <sup>2</sup>연세대학교 화학과  
(2011. 3. 28. 접수, 2011. 4. 13. 승인)

### Determination of metabolites of prostanozol in human urine by LC/ESI/MS and GC/TOF-MS

Taewoo Yum<sup>1,2</sup>, Ki-Jung Paeng<sup>2</sup> and Yunje Kim<sup>1,★</sup>

<sup>1</sup>Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

(Received March 28, 2011; Accepted April 13, 2011)

**요 약:** 약물(Prostanozol)을 복용한 여성을 대상으로 한 노시료 중에 함유된 Prostanozol 및 그 대사체들을 검출하기 위해 LC/ESI/MS와 GC/TOF-MS를 이용하여 효과적으로 분리 및 검출하였고, LC/ESI/MS의 질량스펙트럼으로부터는 각각의 분자량을 추정하였으며 GC/TOF-MS로는 이들을 확인하였다. M1은 Prostanozol의 17번 탄소가 케톤기로 치환된 17-keto-Prostanozol, M2는 M1에서 pyrazole nucleus 와 A-ring에 한 개의 히드록시기가 치환된 hydroxy-17-keto-Prostanozol, M3는 B-ring 또는 C-ring에 한 개의 히드록시기가 치환된 hydroxy-17-keto-Prostanozol, M4는 한 개의 히드록시기가 D-ring에 치환된 hydroxy-17-keto-Prostanozol로 확인되었으며 M5는 17번 탄소 위치에 히드록시기를 갖고 B-ring 또는 C-ring에서 하나의 히드록시기가 치환된 hydroxy-17-hydroxy-Prostanozol로 추정되며 M6은 17번 탄소 위치에 케톤기를 갖고 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 하나의 히드록시기를 또한 B-ring 또는 C-ring에 또 하나의 히드록시기가 치환된 dihydroxy-17-keto-Prostanozol, M7은 M6와 같이 17번 탄소에 케톤기를 갖고 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 하나의 히드록시기를, 또한 D-ring에 또 하나의 히드록시기를 가진 dihydroxy-17-keto-Prostanozol로 확인되었다. 마지막으로 M8은 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 하나의 히드록시기를 갖고 그 외의 ring에 또 다른 히드록시기가 치환된 dihydroxy-17-hydroxy-Prostanozol임을 확인할 수 있었다. 이중 M5, M7, 그리고 M8은 지금까지 밝혀지지 않았던 새로운 대사체였다. 체내에서의 포합반응 여부를 확인한 결과 Prostanozol과 8종의 모든 대사체가 글루쿠론산 포합체를 형성하였고, 8종의 대사체 중 일부는 포합체를 형성하지 않고도 배출되며 특히 M6과 M7은 황산 포합체로도 배출되는 것을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** This research examined prostanozol and its metabolites in urine of women who took the medicine (prostanozol). Prostanozol and its metabolites were successfully separated and detected by using LC/ESI/MS and GC/TOF-MS. Mass spectrum of LC/ESI/MS estimated molecular weight of Prostanozol and its metabolites

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-958-5060 Fax : +82-(0)2-958-5209

E-mail : yjkim@kist.re.kr

www.kci.go.kr

and that of GC/TOF-MS verified them. For M1, carbon number 17 of Prostanazol substituted to a keto group and it is called 17-keto-Prostanazol. M2 turned out to be hydroxy-17-keto-Prostanazol. It came from substitution of one hydroxyl group of pyrazole nucleus and A-ring of M1. Substitution of one hydroxyl group of B-ring or C-ring became M3, hydroxy-17-keto-Prostanazol. M4 was found to be a hydroxy-17-keto-Prostanazol transposed from one hydroxyl group to a D-ring. M5 has a hydroxyl group of carbon number 17. One hydroxyl group is substituted from B-ring or C-ring and it is assumed to be hydroxy-17-hydroxy-Prostanazol. M6 was turned out to be dihydroxy-17-keto-Prostanazol transposed from one hydroxyl group to pyrazole nucleus or A-ring and to B-ring or C-ring. Like M6, M7 has a keto group at carbon number 17 and was identified as dihydroxy-17-keto-Prostanazol. M7 has one hydroxyl group at pyrazole nucleus or A-ring and also at D-ring. At last M8 was found to be dihydroxy-17-hydroxy-Prostanazol. Pyrazole nucleus or A-ring has got one hydroxyl group and other rings were substituted to another hydroxyl group. From above, M5, M7 and M8 were verified as new metabolites that were not discovered yet. Prostanazol and all of the 8 metabolites formed glucuronic conjugates as a result of conjugation reaction test in human body. Some of 8 metabolites were excreted without forming conjugates. Particularly M6 and M7 were excreted as sulfate conjugates.

**Key words:** Prostanazol, metabolites, liquid chromatography, gas chromatography, time-of-flight (TOF)

## 1. 서 론

Prostanazol ([3,2-c]pyrazole-5 $\alpha$ -etioallocholane-17 $\beta$ -tetrahydrophranol)은 근육 강화제로서 간독성의 위험이 적으며 tetrahydropyranol ether에 의해 림프 시스템으로 흡수되는 속도가 빠르고 흡수되는 양도 많다. 또한 아로마타제 억제제(aromatase inhibitors)로 작용해 에스트로겐으로의 생화학적인 변환이 억제되어 약물 복용에 의한 부작용이 적기 때문에 남용이 우려되는 약물이다. 이 약물은 미국 내에서 구매가 쉽고 처방전 없이도 팔리는 건강보조식품(dietary supplements)으로 2004년 처음 유통되었으며 체내에 흡수되면 합성 동화성 근육강화 효과를 나타낼 가능성이 있어 2005년 세계 반 도핑 기구(world anti-doping agency, WADA)에 의해 금지 약물로 지정되었다.<sup>1,2</sup>

Prostanazol의 경우는 인체 뇨 중에서 5개의 대사체 3'-hydroxy-17-keto-Prostanazol, 4z-hydroxy-17-keto-Prostanazol, 3',6-dihydroxy-17-keto-Prostanazol, 16-hydroxy-17-keto-Prostanazol 및 17-keto-Prostanazol을 검출한 결과만이 보고되고 있으며 그 밖의 연구는 아직 활발하게 진행되지 않고 있다.<sup>2-5</sup> 또한 pyrazole nucleus를 포함하는 물질의 경우 추출과 방해물질로부터의 분리에 매우 어려움이 있으며 기체 크로마토그래피에서 peak 끌림으로 효과적인 분석에 어려움이 있다고 보고되고 있다.<sup>6,7</sup> Costas G. Georgakopoulos 등이 positive mode로 electrospray ionization (ESI)을 이용한 LC/

TOF-MS와 실릴(silyl) 유도체화 후 GC/TOF-MS를 이용하여 Prostanazol을 복용 후 수집한 뇨시료에 함유된 Prostanazol 및 그 대사체 분석에 관한 연구를 비롯하여, Moscow Anti-Doping Centre (Russia)에서 실릴(silyl) 유도체화 후 GC-MS를 이용하여 뇨시료에서 Prostanazol의 대사체에 관한 연구 등이 보고되어왔다.<sup>4,5</sup> 기존의 연구에서 가수분해 후 pH 9로 조절하여 추출하고 단일 유도체화 시약으로 GC를 이용하여 대사체들의 구조를 제시한 것에 비해<sup>2,4</sup> 본 연구에서는 pH 6 및 8로 복수 추출한 후 soft ionization으로 유용한 LC/ESI/MS로 분자량을 추정하고 보다 구체적인 구조 분석을 위해 두 가지 유도체화 시약을 사용하여 mass fragmentation으로 특정 화합물의 확인에 유용한 GC/TOF-MS의 결과를 비교함으로써 기존보다 다양하고 구체적으로 대사체를 검출하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약

Prostanazol tablet은 ALR Industries사 (Las Vegas, NV, USA)제이고, 내부표준물질로 Sigma-aldrich사 (Saint Louis, MO, USA)의 methyltestosterone을 사용하였다. 시료 전처리에 사용한 Serdolite PAD-I resin (particle size 100~200  $\mu$ m)은 Serva사 (Heidelberg, Germany)제품을 사용하였다. 효소가수분해에 사용된

$\beta$ -glucuronidase (*E. coli*)와  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase (*Helix pomatia*)는 Roche Diagnostics사 (Mannheim, Germany)제품이며, ethylacetate, methyl t-butyl ether (MTBE), diethyl ether, n-hexane, acetonitrile, methanol 과 acetone은 모두 HPLC grade로 J. T. Baker 사 (Phillipsburg, NJ, USA)제품을 사용하였다.

Liquid Chromatography/Mass Spectrometer (LC/MS)에 용리액으로 사용된 ammonium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )는 Merck 사 (Mannheim, Germany)제품을 사용하였다. Acetonitrile과 distilled water는 Millipore filter (0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과하고 Branson사 (Danbury, CT, USA)의 3510 ultrasonic cleaner로 20 분간 sonication하여 공기를 제거한 후 사용되었다.

GC/MS 분석 시 유도체화 시약으로 쓰인 N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA), ammoniumiodide ( $\text{NH}_4\text{I}$ ) 그리고 dithioerythriol (DTE)은 모두 Sigma-Aldrich사 제품을 사용하였다.

## 2.2. 기기 및 장치

대사체를 분리하고 분자량을 추정하기 위해 LECO 사 (St. Joseph, MI, USA)의 TOF-MS에 Agilent Technologies사 (Palo Alto, CA, USA)의 HP 1100 series LC

Table 1. LC/ESI/MS operating condition

| <b>LC conditions</b>  |    |    |                |              |               |
|---|----|----|----------------|--------------|---------------|
| Column : Gemini 3u C18<br>(50 mm length $\times$ 2 mm I.D., particle size 3 $\mu\text{m}$ ) |    |    |                |              |               |
| Flow rate : 0.3 mL/min  |    |    |                |              |               |
| Mobile phase solvent A : 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$<br>solvent B : acetonitrile      |    |    |                |              |               |
| Gradient time table :   |    |    |                |              |               |
| Time (min)  | 0  | 3  | 5<br>(1.5 min) | 8<br>(1 min) | 10<br>(5 min) |
| A solvent (%)   | 85 | 75 | 55             | 20           | 85            |
| B solvent (%)   | 15 | 25 | 45             | 80           | 15            |
| Run time : 10 min   |    |    |                |              |               |
| Injection volume : 10 $\mu\text{L}$   |    |    |                |              |               |
| Column temperature : 40 $^\circ\text{C}$  |    |    |                |              |               |
| <b>ESI-MS conditions</b>  |    |    |                |              |               |
| Ion source type : ESI (electrospray ionization)   |    |    |                |              |               |
| Ionization mode : positive ion mode   |    |    |                |              |               |
| Desolvation gas flow : 7000 cc/min ( $\text{N}_2$ )   |    |    |                |              |               |
| Nebulizer pressure : 300 kPa  |    |    |                |              |               |
| Desolvation gas temperature : 350 $^\circ\text{C}$  |    |    |                |              |               |
| Scan range : $m/z$ 100~500  |    |    |                |              |               |
| Scan rate : 3.13 spectra/sec  |    |    |                |              |               |

Table 2. GC/TOF-MS operating condition

| <b>GC conditions</b>   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
|--|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Column : Ultra-2 (cross-linked 5% phenylmethylsiloxane,<br>25 mm length $\times$ 0.2 mm I.D., 0.33 $\mu\text{m}$ film thickness) |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Carrier gas : He at 1.0 mL/min   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Oven temperature program :   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Temp. ( $^\circ\text{C}$ )   | Rate ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) | Temp. ( $^\circ\text{C}$ ) | Rate ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) | Temp. ( $^\circ\text{C}$ ) | Rate ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) | Temp. ( $^\circ\text{C}$ ) | Rate ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) |
| 180  | 10                                   | 220                        | 6                                    | 260                        | 15                                   | 300                        |                                      |
| Run time : 22 min  |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Injection volume : 2 $\mu\text{L}$   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Injection port temperature : 280 $^\circ\text{C}$  |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Transfer line temperature : 280 $^\circ\text{C}$   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| <b>TOF/MS conditions</b>   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Ionization mode : EI (electron impact ionization)  |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Scan rate : 10 spectra/sec   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Mass range : $m/z$ 100~700   |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |
| Ion source temperature : 230 $^\circ\text{C}$  |                                      |                            |                                      |                            |                                      |                            |                                      |

가 장착된 LC/TOF-MS를 사용하였다. 이때 컬럼은 Phenomenex사 (Torrance, CA, USA)의 Gemini 3u C18 (50 mm length  $\times$  2.0 mm I.D., particlesize 3  $\mu\text{m}$ )을 사용하였다.

대사체를 확인하기 위하여 Agilent사의 6890N GC에 LECO사의 TOF-MS가 장착된 GC/TOF-MS를 사용하였고, 시료의 분리를 위하여 사용한 컬럼은 Ultra-2 capillary column (cross-linked 5% phenylmethylsiloxane, 25 m  $\times$  0.2 mm i.d., 0.33  $\mu\text{m}$  film thickness)이었다. LC/ESI/MS와 GC/TOF-MS의 분석 조건은 각각 Table 1과 2에 나타내었다.

진탕 추출을 위해서는 IKA사 (Staufen, Germany)의 HS501D shaker를, 원심분리기는 Heraeus사 (Hanau, Germany)의 Varifuge-F를 각각 사용하였고, Vortex mix는 Scientific industry사 (Bohemia, USA)의 제품을, 시료 농축을 위해서는 Zymark사 (Hopkinton, MA, USA)의 Turbovap LV evaporator 및 Heidolph사 (Schwabach, Germany)의 WB 2000 진공 증발기를 사용하였다. 유기층 수거를 위해 사용한 Refrigerated Bath Circulator는 Daecil Biotech사 (Gyeonggi, Korea)의 DTC-311이었다.

## 2.3. 시료채취

근력을 필요로 하는 여성운동선수의 경우 남성보다 남용의 우려가 크기 때문에 건강한 여성 지원자(age 26, weight 55 kg)에게 Prostanazol (25 mg/tablet) 1정

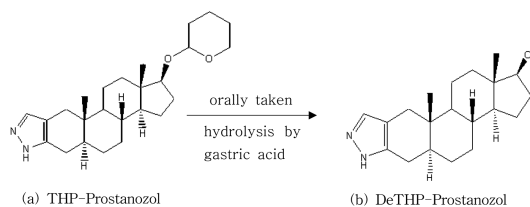
을 경구 투여하여 1시간부터 56시간까지 뇨시료를 채취하였으며 3~5 °C로 보관하였다.

#### 2.4. 시료 전처리

Pasteur pipet에 채운 PAD-I Resin을 3 mL의 증류수로 세척하여 활성화 시킨 후, 내부표준물질로 methyltestosterone (20 µL, 10 µg/mL)이 첨가된 뇨시료 3 mL을 loading하고 증류수(3 mL)로 세척한 후 메탄올 3 mL로 추출하였다. 추출된 메탄올을 진공 증발기로 증발시킨 후 그 잔류물에 0.2 M acetate buffer 1 mL (pH 5.2)와 β-glucuronidase/arylsulfatase 50 µL를 넣고 55 °C에서 3시간 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 후 각 pH 6.0 및 8.0로 복수 추출하고 5 mL의 ether를 가한 다음, 혼합물은 shaker를 사용하여 10분간 진탕시켜 추출한 후 450 g에서 5분간 원심분리하였다. -20 °C의 냉각기를 이용하여 유기층을 수거한 뒤 질소가스로 완전히 증발시킨 후 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, silicagel 및 KOH가 들어 있는 데시케이터에서 30분 동안 방치하여 수분을 완전히 제거해 건조한 추출물을 얻었다. 추출물에 acetonitrile 50 µL를 가한 후 LC/ESI/MS에 10 µL를 주입하였다.<sup>8</sup>

#### 2.5. GC/TOF-MS를 위한 Trimethylsilylation

데시케이터에서 30분 동안 방치하여 수분을 완전히 제거해 건조한 추출물을 실릴(silyl) 유도체화시키기 위해 MSTFA 50 µL를 가하고 70 °C에서 30분 동안 유도체화 시킨 후 GC/TOF-MS에 2 µL를 주입하였다.<sup>9</sup>



Scheme 1. Prostanazol.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. LC/ESI/MS를 이용한 Prostanazol 및 대사체들의 검출

Fig. 1은 LC/ESI/MS에 의해 검출된 blank urine과 dosed urine (Prostanazol 복용 5시간 후에 채취)의 total ion chromatogram (TIC)이다. THP (tetrahydrophranol)기를 포함하는 Prostanazol은 경구 투약 시 위의 gastric acid에 의해 빠르게 가수분해되어 THP기가 이탈되므로 히드록시기로 치환된 DeTHP-Prostanazol의 형태로 대사되고, THP-Prostanazol과 DeTHP-Prostanazol 두 물질은 동일한 대사체를 생성한다.<sup>10</sup> 따라서 DeTHP-Prostanazol을 Prostanazol로 명명하며 특별히 구분해야 할 경우에는 THP-와 DeTHP-로 구별하여 명명하였다(Scheme 1).

Dosed urine에서 blank urine과 비교하여 Prostanazol 뿐만 아니라 새로운 8개의 peak가 검출되었다. 이들을 각각 M1~8로 구별 하였으며 이 peak들이 Prostanazol의 대사체들 일 것으로 예상하였다(Fig. 1(b)).

Fig. 2~6은 각각 dosed urine으로부터 검출된 Prostanazol-M1~8의 extracted ion chromatogram과 mass

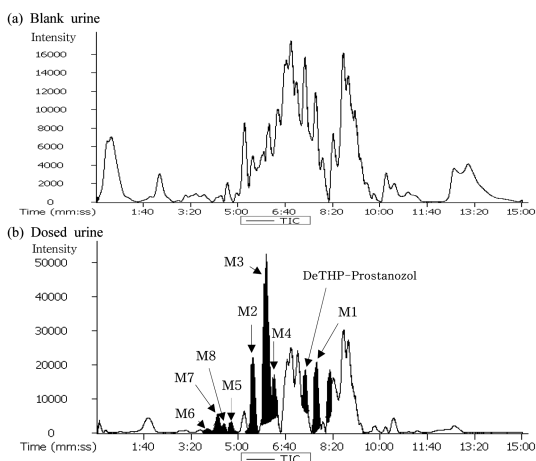


Fig. 1. Total ion chromatograms of blank urine (a), dosed urine (b) by LC/ESI/MS.

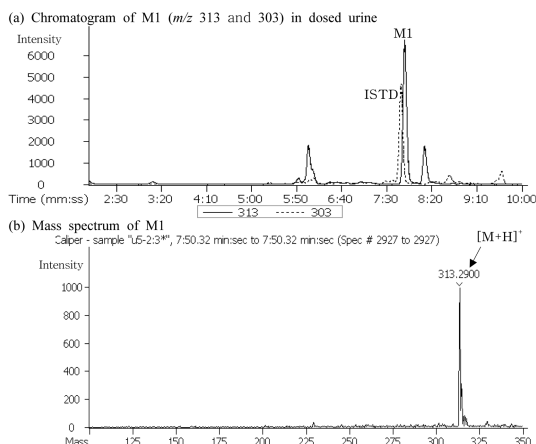


Fig. 2. Extracted ion chromatogram of M1 in dosed urine (a) and mass spectrum (b) by LC/ESI/MS.

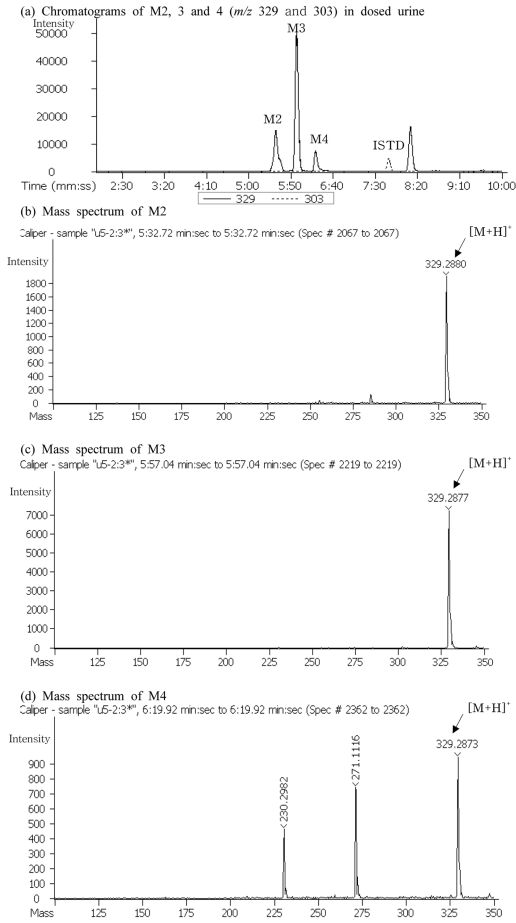


Fig. 3. Extracted ion chromatograms of M2, M3, and M4 in a urine sample (a) and mass spectra (b, c, d) by LC/ESI/MS.

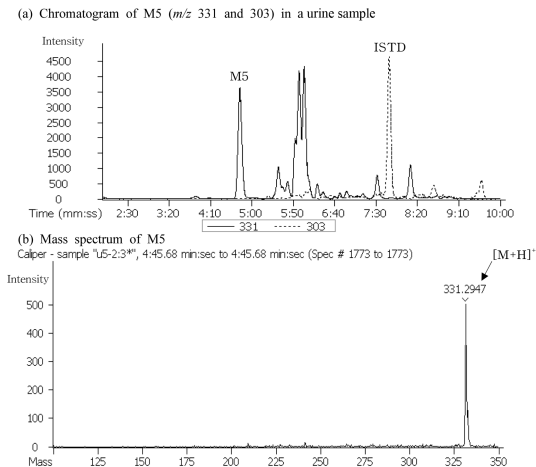


Fig. 4. Extracted ion chromatogram of M5 in a urine sample (a) and mass spectrum (b) by LC/ESI/MS.

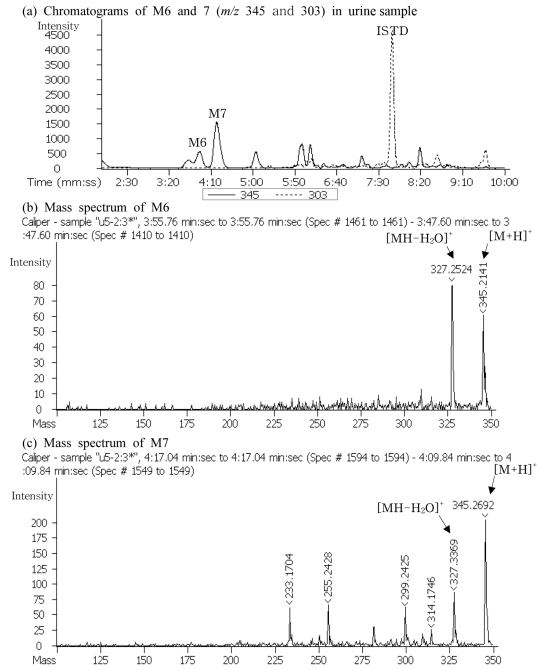


Fig. 5. Extracted ion chromatograms of M6 and 7 in a urine sample (a) and mass spectra (b, c) by LC/ESI/MS.

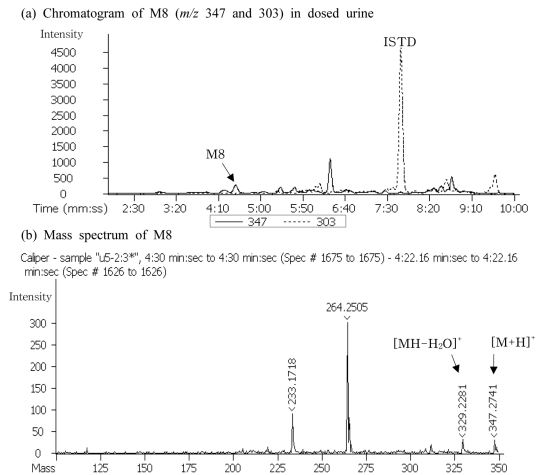


Fig. 6. Extracted ion chromatogram of M8 in a urine sample (a) and mass spectrum (b) by LC/ESI/MS.

spectra를 나타내었다. LC/ESI/MS의 이온발생은 soft ionization이기 때문에  $H^+$ 이 첨가된  $[M+H]^+$ 이온을 생성한다. 따라서 이 결과들로부터 Prostanazol의 대사체로 추정되는 M1은  $m/z$  312, M2~M4는 328, M5는 330, M6와 M7은 344과 M8은 346의 분자량을 가지는 것으로 예측되었다.

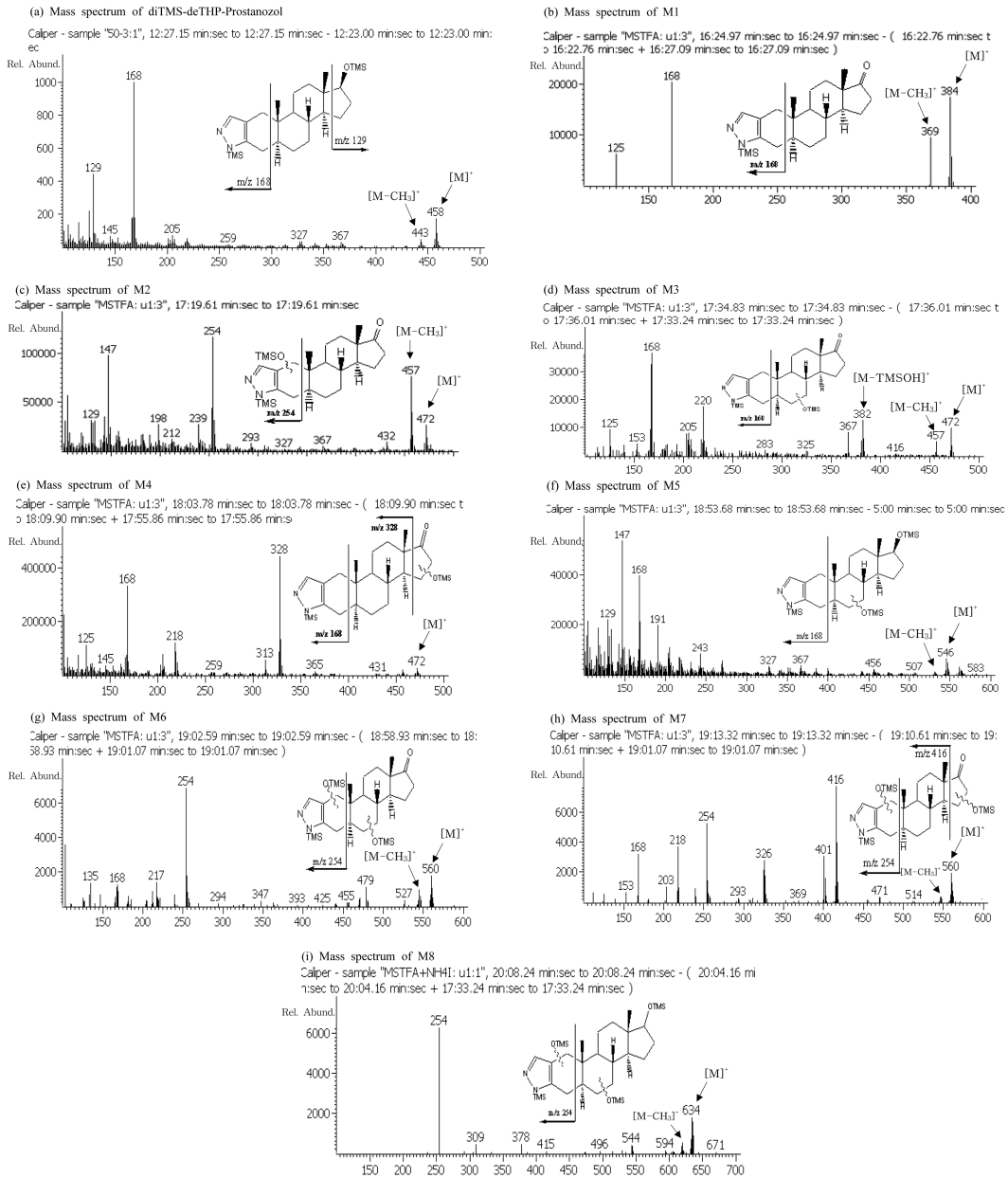


Fig. 7. Mass spectra and main fragmentations of diTMS-deTHP-Prostanazol (a), M1 (b), M2 (c), M3 (d), M4 (e), M5 (f), M6 (g), M7 (h) and M8 (i) by GC/TOF-MS.

### 3.2. GC/TOF-MS를 이용한 Prostanazol 및 대사체들의 검출

Prostanazol과 그 대사체들을 확인하기 위해 LC/ESI/MS와 같이 노시료로부터 추출된 시료를 trimethylsilylation 후에 GC/TOF-MS로 분석하였다. Fig. 7(a)는 di-TMS-deTHP-Prostanazol의 질량스펙트럼이

며 분자이온인  $m/z$  458 ( $[M]^+$ ) 및 443 ( $[M-CH_3]^+$ ), 129 (C14-15와 C17-18의 분할), 그리고 168 (C1-10와 4-5의 분할)의 토막이온들이 검출되었다.  $m/z$  129 이온은 17번 탄소위치에 히드록시기를 갖는 물질의 TMS 유도체 화합물이 D-ring의 절단으로 생성되는 특성 이온으로 알려져 있다.<sup>3,11</sup> 또한  $m/z$  168이온은

pyrazole nucleus를 갖는 stanozolol 및 그 대사체의 토막이온 생성연구에서와 같이 A-ring에 치환기가 없는 경우 retro Diels-Alder fragmentation으로 A-ring절단시 생성되는 특성이온이다.<sup>12,13</sup>

Prostanazol-M1의 mass spectrum인 Fig. 7(b)는 분자이온인  $m/z$  384와 대사체 M1의 주요 토막이온인 369 ( $[M-CH_3]^+$ )와  $m/z$  168을 포함하고 있다. 그리고 구조 예측에 관한 더 많은 정보를 얻기 위해 케톤기의 엔올화 유도체 반응이 일어나 카보닐기의 치환이 가능한 MSTFA/NH4I/DTE (500:4:2, w:w:w) 혼합시약을 사용하여 케톤기의 존재여부를 확인하였다. M1이 17번 탄소에 케톤기를 가지고 있을 경우, MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약으로 유도체화를 한다면 히드록시기만을 Trimethylsilyl (TMS)기로 전환시키는 약한 반응력을 가진 MSTFA로 유도체화를 한 chromatogram에서와 동일한 머무름 시간에 peak가 생성되지 않을 것이다. MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약을 사용한 경우, MSTFA만을 사용한 chromatogram에서와 동일한 머무름 시간에서 peak가 생성되지 않아 17번 탄소위치에 케톤기가 존재함을 확인할 수 있었다. 따라서 LC/MS의 결과를 참조하면 M1은 분자량 312 그리고 17번 탄소 위치에 케톤기를 가지는 구조인 17-keto-Prostanazol임을 추정할 수 있었다.<sup>2-5</sup>

M2, M3와 M4는 LC/MS 결과에 따르면 같은 분자량을 갖는 물질들인 것으로 예상되었다. M2의 mass spectrum인 Fig. 7(c)에서 분자이온인  $m/z$  472 ( $[M]^+$ )와 주요 토막 이온으로 457 ( $[M-CH_3]^+$ )과 254가 검출되었다.  $m/z$  254는 아민기와 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 위치하는 하나의 히드록시기가 TMS로 치환되어 생성되는 특성이온이다.<sup>14</sup> 또한 케톤기의 존재여부를 알아보기 위해 M1과 같은 목적으로 MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약을 사용한 결과 MSTFA로 유도체화를 한 chromatogram과 같은 머무름 시간에서 peak가 생성되지 않았다. 즉 M2는 LC/MS의 결과로부터 분자량이 328이며, 17번 탄소 위치에 케톤기를 가지고 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 히드록시기가 한 개 치환된 구조인 hydroxy-17-keto-Prostanazol로 추정할 수 있었다.<sup>2-5</sup> M3 (Fig. 7(d))는 457 ( $[M-CH_3]^+$ )과 168의 특성 토막 이온이 나타났다.  $m/z$ 168 토막이온으로부터 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 히드록시기가 치환되어 있지 않은 구조임을 예상할 수 있고, MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약을 사용한 결과 M2와 마찬가지로 동일한 시간에 peak가 생성되지 않았다. 따라서 M3는 분자량 328에 17번 탄소 위치에 케톤기와

B-ring 또는 C-ring에 한 개의 히드록시기가 치환된 hydroxy-17-keto-Prostanazol임을 추정할 수 있었다.<sup>2-5</sup> M4 (Fig. 7(e))는 특성 토막 이온으로  $m/z$  328 (C14-15와 17-18의 분할)과 168이 검출되었다. MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약을 사용한 결과 M2와 마찬가지로 동일한 시간에 peak가 생성되지 않았다. 따라서 M4는 분자량 328, 17번 탄소 위치의 케톤기 그리고 D-ring에 한 개의 히드록시기를 갖는 구조인 hydroxy-17-keto-Prostanazol임을 추정할 수 있었다.<sup>2-5</sup>

분자이온  $m/z$  546 ( $[M]^+$ ) 및 특성 토막 이온  $m/z$  531 ( $[M-CH_3]^+$ )과 168을 보이는 M5의 mass spectrum을 Fig. 7(f)에 나타내었다. LC/MS 결과로부터 분자량 330으로 추정된 M5는 DeTHP-Prostanazol보다 질량수 16이 많으므로 하나의 히드록시기가 치환된 구조일 것이라 예측되었고 Fig. 7(f)로부터  $m/z$  546의 분자이온과 531, 456 ( $[M-CH_3-OTMS]^+$ ) 그리고  $m/z$  168이 검출되었다. MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약을 사용한 결과 MSTFA로 유도체화를 한 chromatogram과 동일한 머무름 시간에서 peak가 생성되어 17번 위치에 히드록시기가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 M5는 분자량이 330인 물질로 17번 탄소 위치에 히드록시기가 치환되고, B-ring 또는 C-ring에 또 하나의 히드록시기가 치환된 dihydroxy-17-keto-Prostanazol임을 추정할 수 있었으며 이 대사체는 아직까지 보고되지 않은 새로운 대사체이다.

M6와 M7은 LC/MS 결과를 참조하면 동일한 분자량  $m/z$  344를 갖는 물질이다. M6는 분자이온인  $m/z$  560 ( $[M]^+$ ) 및 545 ( $[M-CH_3]^+$ )와 254의 특성 토막 이온을 생성하였다(Fig. 7(g)). M6의  $m/z$  254 이온은 M2와 마찬가지로 pyrazole nucleus 혹은 A-ring 위치에 하나의 히드록시기가 위치함을 알 수 있다. MSTFA/NH4I/DTE 혼합시약을 사용한 결과 M1과 마찬가지로 동일한 머무름 시간에 peak가 생성되지 않으므로 M6는 17번 탄소 위치에 케톤기를 가짐을 알 수 있다. 또한 DeTHP-Prostanazol보다 질량수가 30이 증가한 것은 17번 탄소 위치가 히드록시기인 DeTHP-Prostanazol과 비교해 M6는 17번 탄소에 케톤기를 가지므로 질량수가 2만큼 차이 나는 것을 고려하면 두 개의 히드록시기가 치환되어 있는 형태임을 유추할 수 있으며 254이온으로 인해 그 중 한 개는 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 위치한 dihydroxy-17-keto-Prostanazol임을 추정할 수 있었다.<sup>2-5</sup> M7 (Fig. 7(h))은  $m/z$  254이온으로부터 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 한 개의 히드록시기가 치환된 구조로 예측되었으며,

$m/z$  416은 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 한 개의 히드록시기가 치환된 구조에서 D-ring의 토막화가 일어날 경우 생성될 수 있는 이온으로 예상되었다.  $m/z$  416 토막이온에서 하나의 TMSOH가 제거되어 생성되는  $m/z$  326이 검출되므로 한 개의 히드록시기는 D-ring에 치환되었음을 예측할 수 있었다. 또한 M1과 같은 목적으로 MSTFA/NH<sub>4</sub>/DTE 혼합시약을 사용한 결과 동일한 시간에 peak가 생성되지 않았다. 따라서 M7은 분자량  $m/z$  344 그리고 17번 탄소 위치의 케톤기, pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 한 개의 히드록시기, D-ring에 한 개의 히드록시기가 치환된 dihydroxy-17-keto-Prostanazol이라고 예상할 수 있었으며 이 화합물도 M5와 마찬가지로 아직 알려지지 않은 새로운 대사체이다.

M8은  $m/z$  634 ( $[M]^+$ ), 619 ( $[M-CH_3]^+$ )와 254의 특성 토막 이온을 생성하였다(Fig. 7(i)).  $m/z$  254특성이온으로부터 pyrazole nucleus 혹은 A-ring에 한 개의 히드

록시기가 치환된 구조임을 예측할 수 있었다.  $m/z$  634의 경우 LC/MS 결과를 참조하면 M8의 분자량 346에 Prostanazol보다 질량수가 32 더 많은 물질로 히드록시기가 두 개 치환된 구조일 것이라고 추정하였다. 이를 바탕으로 아민기와 두 개의 히드록시기가 TMS로 치환되어 질량수 288이 증가한  $m/z$  634을 분자 이온으로 하는 tetraTMS-17-hydroxy-Prostanazol 유도체의 생성을 예상하였다. M5와 마찬가지로 MSTFA/NH<sub>4</sub>/DTE 혼합시약을 사용한 결과 동일한 머무름 시간에 peak가 생성되었기 때문에 17번 탄소가 히드록시기로 치환되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 대사체 M8은 분자량 346 그리고 pyrazole nucleus와 A-ring에 하나의 히드록시기가 치환된 dihydroxy-17-hydroxy-Prostanazol 일 것으로 예측되는 새로운 대사체이다.

Table 3은 LC/ESI/MS와 GC/TOF-MS를 이용한 Prostanazol과 대사체들에 대한 머무름 시간과 토막이온들을 정리한 것이다.

Table 3. Characterization ions of LC/ESI-MS data and GC/TOF-MS data of Prostanazol and its metabolites by LC/ESI/MS and GC/TOF-MS

|                | LC/ESI-MS |           | GC/TOF-MS |         |              |                              | OTMS and NTMS-derivative       |
|----------------|-----------|-----------|-----------|---------|--------------|------------------------------|--------------------------------|
|                | RT (min)  | $[M+H]^+$ | RT (min)  | $[M]^+$ | $[M-CH_3]^+$ | Characteristic ion ( $m/z$ ) |                                |
| Prostanazol    | 7.08      | 315       | 16.32     | 458     | 443          | 129, 168                     | 17-hydroxy-diTMS metabolite    |
| Prostanazol-M1 | 7.50      | 313       | 16.25     | 384     | 369          | 168                          | 17-keto-TMS metabolite         |
| Prostanazol-M2 | 5.32      | 329       | 17.19     | 472     | 457          | 239, 254, 367                | 17-keto-diTMS metabolite       |
| Prostanazol-M3 | 5.57      | 329       | 17.35     | 472     | 457          | 168, 367, 382                | 17-keto-diTMS metabolite       |
| Prostanazol-M4 | 6.19      | 329       | 18.04     | 472     | 457          | 168, 313, 328                | 17-keto-diTMS metabolite       |
| Prostanazol-M5 | 4.45      | 331       | 18.53     | 546     | 531          | 168, 456                     | 17-hydroxy-triTMS metabolite   |
| Prostanazol-M6 | 3.55      | 345       | 19.02     | 560     | 545          | 254                          | 17-keto-triTMS metabolite      |
| Prostanazol-M7 | 4.17      | 345       | 19.13     | 560     | 545          | 254, 326, 401, 416           | 17-keto-triTMS metabolite      |
| Prostanazol-M8 | 4.30      | 347       | 20.08     | 6       | 619          | 254, 544                     | 17-hydroxy-trtraTMS metabolite |

Table 4. Comparison to Prostanazol/Internal Standard (ISTD) and metabolites/ISTD ratios without enzyme hydrolysis and with enzyme hydrolysis of  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase

|        | Without hydrolysis |           | With hydrolysis of $\beta$ -glucuronidase |         | With hydrolysis of $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase |         |
|--------|--------------------|-----------|---|---------|---|---------|
|        | Ratio*             | RSD** (%) | Ratio                                     | RSD (%) | Ratio   | RSD (%) |
| M1     | 0.03±0.00          | 3.58      | 0.14±0.01                                 | 2.20    | 0.12±0.01   | 3.98    |
| Parent | 0.14±0.01          | 0.98      | 0.23±0.01                                 | 2.75    | 0.18±0.01   | 5.68    |
| M2     | 0.25±0.01          | 0.89      | 0.41±0.02                                 | 0.99    | 0.44±0.03   | 4.00    |
| M3     | N.D.               | N.D.      | 0.05±0.00                                 | 5.77    | 0.06±0.01   | 5.59    |
| M4     | 0.21±0.03          | N.D.      | 1.54±0.12                                 | 0.92    | 1.80±0.14   | 2.38    |
| M5     | N.D.               | N.D.      | 0.01±0.00                                 | 9.01    | 0.02±0.00   | 7.30    |
| M6     | 0.03±0.00          | 4.68      | 0.22±0.02                                 | 2.21    | 0.49±0.06   | 5.95    |
| M7     | 0.002±0.00         | 13.87     | 0.05±0.00                                 | 8.81    | 0.08±0.01   | 6.59    |
| M8     | N.D.               | N.D.      | 0.04±0.00                                 | 6.02    | 0.04±0.00   | 6.54    |

### 3.3. Prostanazol 과 대사체의 체외 배출시 포함체 생성

본 연구에서는 GC/TOF-MS를 이용하여 Prostanazol 과 8종의 대사체가 체내에서 글루쿠론산 포함체 (glucronic acid conjugate) 그리고 황산 포함체 (sulfate conjugate)의 형성 유무를 알아보기 위해  $\beta$ -glucuronidase (*E. Coli*)와  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase (*Helix-pomatia*)를 사용한 결과를 비교 검토해 보았다. 이 결과는 가수분해 후 Prostanazol과 그 대사체 peak들과 내부표준물질 peak의 면적비로부터 조사되었으며, 각각의 재현성도 함께 조사되었다(Table 4).

Table 4에서 보는 바와 같이 가수분해과정을 거치지 않은 경우에도 Prostanazol과 대사체 M1, M2, M4, M6 및 M7이 검출되는 것으로 보아 이들의 일부는 포함체를 형성하지 않고 배설되었으며,  $\beta$ -glucuronidase를 이용한 경우에는 Prostanazol과 함께 모든 대사체가 검출되기 때문에 Prostanazol과 8개의 대사체는 글루쿠론산 포함체를 형성하여 배설되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Prostanazol, 대사체 M1, M2, M4, M6 및 M7의 가수분해 결과를 보면  $\beta$ -glucuronidase 가수분해의 경우가 약 두 배 이상 높게 나오기 때문에 이들은 포함체도 함께 생성되는 것을 알 수 있었다. 한편  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase를 사용한 경우, 두 개의 히드록시기가 치환된 M6과 M7은 각각 0.49와 0.08로써  $\beta$ -glucuronidase로 가수분해시킨 결과인 0.22와 0.05에 비해 비교적 높게 나타나기 때문에 일부는 황산 포함체로도 배설되는 것을 확인할 수 있었다.

## 4. 결 론

Prostanazol을 복용한 노시료로부터 대사체의 배설 화학종 및 배설 양상을 LC/ESI/MS를 이용하여 조사한 결과 8종의 대사체를 검출하였다.  $[M+H]^+$  이온을 측정 한 질량스펙트럼의 정보로부터 대사체 M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 및 M8로 구별 하였고 분자량이 각각 312, 328, 328, 328, 330, 344, 344, 및 346임을 확인하였다. TMS유도체화 후 GC/TOF-MS로 분석한 결과 M1은 Prostanazol의 17번 탄소 위치가 케톤기로 산화된 구조임을 확인하였고 M2, M3, M4는 17번 탄소 위치의 케톤기와 한 개의 히드록시기를 가진 구조임을 확인하였다. M5는 17번 탄소에 히드록시기를 가진 구조에 한 개의 또 다른 히드록시기가 치환되었음을 확인할 수 있었으며 M6과 M7는 17번 탄소 위치에 케톤기를 가지고 두 개의 히드록시기가 치환

된 구조임을 확인할 수 있었다. M8은 17번 탄소 위치에 히드록시기를 가진 구조에서 두 개의 히드록시기가 더 치환되었음을 확인하였다. 이중 M5, M7 그리고 M8은 아직까지 밝혀지지 않은 새로운 대사체이었다. 모든 대사체는 글루쿠론산 포함체를 형성하며 일부는 황산 포함체로도 형성함을 확인하였으며 Prostanazol과 대사체 M1, M2, M4, M6 그리고 M7은 포함체를 형성하지 않고도 배설되었음을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 KIST 기관고유사업으로부터 지원받았습니다.

## 참고문헌

1. World Anti-Doping Agency (WADA), "The 2005 Prohibited List International Standard", 2005.
2. G. Rodchenkov, T. Sobolevsky and V. Sizoi, *24th Cologne Workshop on Dope Analysis, Proceedings of the Manfred Donike Workshop, Recent Advances in Doping Analysis*, **14**, 141-150 (2006).
3. A. G. Frakaki, Y. S. Angelis, A. Tsantili-Kakoulidou, M. Koupparis and C. Georgakopoulos, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **115**, 44-61 (2009).
4. C. G. Georgakopoulos, A. Vonaparti, M. Stamou, P. Kioussi, E. Y. S. Angelis, G. Tsoupras, B. Wuest, M. W. F. Nielsen, I. Panderi and M. Koupparis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2439-2446 (2007).
5. K. Maria, Parr, M. Gütschow, J. Daniels, G. Opfermann, M. Thevis, W. Schänzer, *Steroids*, **74**, 322-328 (2009).
6. V. Ferchud, B. L. Bizet, M. P. Montrade, D. Maumeand F. Monteau, *J. Chromatogr. B.*, **695**, 269-277 (1997).
7. S. Poelmanas, K. De Wasch, H. F. De Brabander, M. Van De Wiele, D. Courtheyn, L. A. Van Ginkel, S. S. Sterk, P. H. Delahaut, M. Dubois, R. Schilt, M. Nielsen, J. Vercammen, S. Impens, R. Stephany, T. Hamoir, G. Pottie, C. Van Poucke and C. Van Peteghem, *Anal. Chim. Acta*, **473**, 39-47 (2002).
8. S. J. Gaskell, *J. Mass. Spectrom.*, **32**, 677-688 (1997).
9. D. Carreras, C. Imaz, R. Navajas, M. A. Garcia, C. Rodriguez, A. F. Rodriguez and R. Cortes, *J. Chromatogr. A*, **683**, 195-202 (1994).

10. A. De Groot and W. Koert, 'Ether and Nitrogen Derivatives', *Het Anabolenboek*, 2007.
11. B. L. Bizet, F. Courant, I. Gaudin, E. Bichon, B. Destres, R. Schilt, R. Draisci, Monteau and F. Andre, *Steroid*, **71**, 1078-1087 (2006).
12. W. Schänzer and M. Donike, *Anal. Chim. Acta*, **275**, 23-48 (1993).
13. R. Masse, C. Ayotte and R. Dugal, *J. Chromatogr.*, **489**, 23-50 (1989).
14. R. Kazlauskas, *24th Cologne Workshop on Dope Analysis*, Proceedings of the Manfred Donike Workshop, Recent Advances in Doping Analysis, **14**, 129-140 (2006).