

## LC/TOF-MS와 GC/TOF-MS를 이용한 인체 내 요시료 중 Superdrol과 그 대사체의 분석

최해민 · 염태우 · 팽기정<sup>1</sup> · 김연제\*

한국과학기술연구원, 청정에너지센터, <sup>1</sup>연세대학교, 화학과  
(2011. 4. 28. 접수, 2011. 5. 31. 승인)

### Determination of superdrol and its metabolites in human urine by LC/TOF-MS and GC/TOF-MS

Haemin Choi, Taewoo Yum, Gijeong Paeng<sup>1</sup> and Yunje Kim\*

Clean Energy Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box 131, Cheonryang, Seoul, Korea

<sup>1</sup>Department of chemistry, Yonsei University, Wonju, 221-710, Korea

(Received April 28, 2011; Accepted May 31, 2011)

**요 약:** 본 연구에서는 LC/ESI/MS 및 GC/MS로 superdrol을 인체에 경구투여 한 후 채취한 요시료 중에 함유된 superdrol 및 그 대사체의 분석법을 확립하고 이들의 체내 배설형태를 조사하였다. 액체-액체 추출에서 최적 추출 pH는 6.5 이고 최적 추출 용매는 diethyl ether이었다. GC/MSD를 이용하여 superdrol 과 그 대사체의 분석법에 대한 유효성을 점검한 결과, intra-day의 회수율은 89.7-113.2%, 정확도 91.8-113.8%, 재현성은 0.2-6.8%로 나타났고 inter-day의 회수율은 89.3-104.1%, 정확도는 95.2-103.0%, 재현성은 0.7-7.8%로 나타났다. LC/ESI/MS를 통해 얻은 blank urine과 dosed urine의 크로마토그램을 비교하여 superdrol의 대사체를 검출하였으며 Superdrol과 그 대사체를 유도체화 시켜 GC/TOF-MS로 확인하였다. 확보된 질량스펙트럼으로부터 superdrol M1의 경우 superdrol의 3-C 위치의 케톤기가 하이드록시기로 환원된 것으로 추정할 수 있었고 M2의 경우 superdrol의 D-ring에 하이드록시기가 첨가된 것으로 추정할 수 있었다. 또한, 효소가수분해과정을 비교해 본 결과 superdrol과 그 대사체들은 대부분 글루쿠론산 포합체를 형성하여 체외로 배설되는 것을 확인하였다. Superdrol 경구투여 후 채취한 요시료로부터 superdrol 과 그 대사체의 배설양상을 조사한 결과, 모두 4.3 시간에서 최대배설량을 보였고 superdrol과 superdrol M1은 48시간까지도 미량검출 되어 체내 잔류성이 높은 물질임을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** This study was done for the determination and excretion profile of superdrol and its metabolites in human urine using both liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry after trimethylsilylation. Superdrol and its two metabolites were detected in human urine after administration of superdrol to healthy volunteers. The intra-day recovery ranged 89.7-113.2%, accuracy ranged 91.8-113.8% and reproducibility ranged 0.2-6.8% and inter-day recovery ranged 89.3-104.1%, accuracy ranged 95.2-103.0%, reproducibility ranged 0.7-7.8%. We found that superdrol M1 was a

★ Corresponding author

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

E-mail : yjkim@kist.re.kr

www.kci.go.kr

hydration at C-3 and superdrol M2 was a hydroxylation at D-ring. Superdrol and two metabolites were excreted as their glucuronidated fractions. The glucuro-/sulfa-conjugated ratio of superdrol, superdrol M1 and superdrol M2 were 0.02, 0.02, 0.01, respectively. The excretion studies showed that superdrol and two metabolites were reached 4.3 h after oral administration and superdrol and superdrol M1 were detected until 48 h in human urine.

**Key words:** superdrol, metabolite, LC/MS, GC/MS

## 1. 서 론

Anabolic androgenic steroids (AAS)는 testosterone의 구조를 기반으로 하는 합성스테로이드의 일종이다.<sup>1</sup> 이는 남성과 여성의 특징적인 성질을 나타내는 일반적인 내인성 스테로이드 호르몬의 작용과는 다르게 주로 근육의 양을 늘리는데 도움을 주며 근력을 강화시켜 주기 때문에<sup>2,4</sup> 1950년부터 운동선수들에 의하여 일시적인 경기 능력 향상과 체력강화를 목적으로 남용되었으며 1976년에 금지 약물로 지정되었다.<sup>5</sup> 시장에서는 “pro-hormone” 또는 “designer supplement”, “designer steroids”와 같은 이름으로 제품이 판매되고 있다. 이것의 화학적 구조는 시장에 판매되고 있는 이전의 steroid와 유사하지만 현재 금지된 steroid의 질량 분석법에는 검출되지 않게 최소한의 개선만 해놓은 물질이다.<sup>6</sup>

본 연구의 대상물질인 superdrol (methasteron, methyl-drostanolone)은 “designer steroids”의 일종으로 17번 위치가 알킬화 된 Anabolic androgenic steroids와 유사하며 methyltestosterone과 구조가 비슷하다.<sup>7</sup> 이 약물은 장기간 과량 복용할 경우 간에서의 독성 효과와 신장 기능 저하 등의 부작용이 나타나며<sup>8,9</sup> 인터넷 등에서 쉽게 구입 가능하기 때문에 운동선수들이 근육 강화나 지구력 등을 키우기 위한 목적으로 오용될 소지가 많다. 그러나 인체 요시료 내에서 superdrol과 superdrol의 대사체에 대한 연구가 아직까지 많이 진행되지 않았기 때문에<sup>10</sup> 이에 대한 연구가 필요하다.

그동안 AAS와 그 대사체를 검출할 때는 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)를 많이 사용해 왔으며 도핑 검사에서는 가수분해, liquid-liquid extraction과 silylation 유도체화 과정 순으로 전처리과정과 함께 진행했다. 대부분 좋은 결과를 얻었지만 유도체화 과정에서 keto기와 hydroxyl기의 반응에서 많은 부산물을 만들고 아직 연구되지 않은 반응이 일어나는 제한사항이 있어<sup>11</sup> Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)를 이용해 GC/MS에서는 확인할

수 없었던 피크에 대해서 확인하고 있다. 그러나 GC/MS보다 감도가 많이 떨어지기 때문에 상황에 맞춰 두 장비를 고루 사용하고 있다.<sup>12</sup>

본 연구에서는 그 동안 진행되어온 동물의 요시료, 인체 내 간세포에서의 superdrol을 분석하고 그 대사체에 대해 규명했던 것<sup>13,14</sup>과는 달리 인체 요시료로부터 GC/MS, LC/MS를 이용해 superdrol의 분석법을 확립하고, 그 대사체의 연구와 함께 배설형태를 살펴보았다.

## 2. 실험

### 2.1. 측정기기 및 실험기구

시료 내에 함유된 각 물질들을 검출하고 그 분자량을 예측하기 위해 Agilent사 (Palo Alto, CA, USA)의 HP 1100series LC에 LECO사 (St. Joseph, MI, USA)의 Time-Of-Flight (TOF) mass spectrometer가 장착된 LC/TOF-MS를 사용하였다. Positive mode에서 이온화법은 Electro-spray Ionization (ESI)를 사용하였고 컬럼은 Shiseido사 (Chuo ku, Japan)의 Capcell Pak C<sub>18</sub> column (25 mm I.d. × 150 mm length, particle size 5 μm)을 사용하였다. 예측한 화합물을 확인하기 위하여 Agilent사 (Palo Alto, CA, USA)의 6890N GC에 LECO사의 TOF mass spectrometer가 장착된 GC/TOF-MS를 사용하였고, 사용된 컬럼은 Ultra-2 (25 m × 0.20 mm, 0.11 μm)이었다. 또한, Superdrol과 그 대사체의 최적 추출조건, 유도체화조건 및 배설양상을 조사하기 위해서 Agilent사 (Palo Alto, CA, USA)의 6890N GC, 5975 Mass selective detector (MSD)를 사용하였고 컬럼은 위와 동일하다. 진탕 추출을 위해서는 IKA사 (Staufen, Germany)의 HS501D shaker, 원심분리기는 Heraeus 사 (Hanau, Germany)의 Varifuge-F를 각각 사용하였고, Vortex mixer는 Scientific industry사 (Bohemia, USA)의 제품을, 시료 농축을 위해서는 Zymark사 (Hopkinton, MA, USA)의 Turbovap LV evaporator 및 Heidolph 사 (Schwabach, Germany)의 WB 2000 진공증발기를

사용하였다. 유기용매층 수거를 위해 사용한 Refrigerated Bath Circulator는 Daeil Biotech사 (Gyeonggi, Korea)의 DTC-311였다.

## 2.2. 시약 및 시료

본 연구에 사용된 Superdrol 약물은 Bodybuilding warehouse사 (Manchester, UK)에서 판매하는 M-DROL (2a, 17a-dimethyl-etiocolan-3-one-17-ol 10 mg/tablet) 이었으며, Superdrol 표준물질은 1 tablet (10 mg)을 메탄올 10 mL에 녹인 후 filter하여 stock solution으로 제조하였고 필요에 따라 희석하여 working solution으로 사용하였다. 내부표준물질로 사용한 methyltestosterone은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, Mo, USA)제를 사용하였다. 시료 전처리에 사용한 Serdolite PAD-I resin (100~200  $\mu\text{m}$ )은 Serva사 (Heidelberg, Germany) 제로서, 아세톤 및 메탄올로 씻은 후 증류수로 침강시키는 방법으로 활성화시켜 사용하였다. 완충용액으로 사용한 Phosphate buffer는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{K}_3\text{PO}_4$ 이며, 이는 Merk사 (Darmstadt, F.R, Germany)제로 이들 용액을 pH 6.8이 되도록 사전에 조제하여 사용하였고, Acetate buffer는 Merk사제의 Sodium Acetate와 J.T. Baker사 (Phillisburg, MT, USA)제의 Acetic Acid로 pH 5.2가 되도록 조제하여 사용하였다. 효소가수분해에 사용된  $\beta$ -glucuronidase는 Roche Diagnostics사 (Mannheim, Germany)제이며 추출에 사용된 diethyl ether는 HPLC 등급으로 J.T. Baker사제를 증류하여 사용하였다. LC의 이동상으로 HPLC등급으로 J. T. Baker사제의 Acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고 각각 pore size 0.45  $\mu\text{m}$ 의 Millipore사 (Billerica, MA, USA)제 membrane filter로 여과한 후 Branson사 (Danbury, CT, USA)의 3510 ultrasonic cleaner로 20분간 공기를 제거시켰다. 그리고 이온화 효율을 향상시키기 위해 J. T. Baker 사제의 Acetic acid를 1% 되게 첨가한 후 사용하였다. GC/MS 분석 시 사용한 유도체 시약으로 *N*-methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA), Ammonium iodide ( $\text{NH}_4\text{I}$ ) 및 Dithioerythriol (DTE)은 Sigma사제로 500:4:2 (w/w/w)의 비율로 혼합하여 냉장 보관하여 사용하였다.

## 2.3. 실험방법

### 2.3.1. 요시료의 채취

본 연구에서 사용한 요시료는 남성보다는 근육강화제의 부작용 우려가 큰 성인 여성(나이 : 26세)에게 Superdrol을 함유한 M-DROL 1정(superdrol 10 mg/

tablet)을 경구 투여시킨 후 0~48시간까지 80~410 mL의 소변을 채취하였다. 채취된 요시료는 분석 전까지 2~3 °C의 냉장 상태로 보관하고, 필요에 따라 일정량을 취하여 사용하였다.

### 2.3.2. 시료 전처리

Disposable pasteur pipet에 채운 3 mL의 PAD-I Resin을 2 mL의 증류수로 충분히 세척하여 활성화시켰다. 내부표준물질인 methyltestosterone 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  용액을 요시료에 50  $\mu\text{L}$  첨가하였고, 이 요시료를 활성화된 PAD-I로 충전된 컬럼에 5 mL을 용리시킨 다음 메탄올 4 mL로 추출하였다. 추출된 메탄올을 진공 증발기로 증발시킨 후 그 잔류물에 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8) 1 mL과 *E. coli*에서 추출한  $\beta$ -glucuronidase 50  $\mu\text{L}$ 을 넣고 55 °C에서 1시간 동안 가수분해시켰다. 가수분해 후 diethyl ether을 가한 다음 shaker를 사용하여 10분간 진탕 시켜 추출하였다. 이 혼합용액을 450 G에서 5분간 원심분리하고 -20 °C의 냉각기를 이용하여 유기용매층을 수거한 뒤 질소가스로 완전히 증발시킨 후  $\text{P}_2\text{O}_5$ , silica gel 및 KOH가 들어 있는 데시케이터에서 30분 동안 방치하여 수분을 완전히 제거해 건조한 추출물을 얻었다.

### 2.3.3. LC/ESI/MS를 이용한 대사체 분석

각 요시료로부터 추출한 잔류물에 Acetonitrile (ACN) :  $\text{H}_2\text{O}$  (1 : 1)(w : w)을 50  $\mu\text{L}$ 을 가한 후 자동 시료 주입기로 LC/ESI/MS에 10  $\mu\text{L}$ 씩 주입시켰다. 기울기 용리법으로 LC/ESI/MS 크로마토그램과 질량스펙트럼을 얻었으며 이때 사용된 LC/ESI/MS의 가동조건은 다음과 같다. 이동상 용매로 A용매는 0.1% acetic acid가 포함된 증류수를 사용했고 B용매는 0.1% acetic acid가 포함된 acetonitrile을 사용했다. 유속은 0.2 mL/min이고 컬럼온도는 40 °C로 유지시켰다. 기울기 조건으로 A용매의 양을 10분 전까지 80%로 유지하고 10분부터 15분 전까지 10%, 16분부터 20분까지 80%로 흘러주었다.

### 2.3.4. GC/TOF-MS를 이용한 대사체 분석

각 요시료로부터 추출한 성분들을 실릴(silyl) 유도체화시키기 위해 MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}$ /DTE (500:4:2)(w:w:w) 혼합용액 50  $\mu\text{L}$ 을 가하여 60 °C에서 15분 동안 유도체화시켜 GC/TOF-MS에 2  $\mu\text{L}$ 을 주입하였다. 이때 사용된 GC/TOF-MS의 측정조건은 다음과 같다. 운반 기체는 헬륨가스(99.9999%)를 사용하였으며 유속은

1.0 mL/min으로 하였다. 컬럼 온도는 초기온도 180 °C에서 2분간 유지시킨 후 220 °C까지는 20 °C/min 속도로, 그 후 260 °C까지는 3 °C/min 속도로 온도를 올리고 1분 동안 유지시켰다. 마지막으로 컬럼 내의 고휘발성 잔류물을 제거하기 위해 325 °C까지 10 °C/min 속도로 온도를 올리고 2분 동안 유지시켰다. 주입구와 검출기의 온도는 280 °C이었으며 시료 주입은 split mode (10:1) 사용하였다.

### 2.3.5. 요시료에 함유된 superdrol 및 그 대사체의 가수분해

바탕 요시료 5 mL을 취하고 내부표준물질(10 µg/mL, methyltestosterone) 50 µL를 첨가한 후 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 사용하여 pH 6.8로 조절하였다. 다음 β-glucuronidase 50 µL를 첨가하여 55 °C에서 1시간 동안 효소 반응을 시켰다. 한편 β-glucuronidase/arylsulfatase (from *Helix pomatia*)를 이용한 요시료의 가수분해는 0.1 M acetate buffer 1 mL을 첨가해 pH 5.2로 조절한 후 β-glucuronidase/arylsulfatase 50 µL를 첨가하여 55 °C에서 3시간 동안 효소 반응을 시켰다. 이와 같이 가수분해 반응을 거친 다음 추출과정 및 유도체화 과정을 거친 후 2 µL의 시료를 GC/MSD에 주입하였으며 각 5회씩 실험하였다. 이때, 이온 검출 방법은 selected ion monitoring (SIM) 모드를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 요시료에서의 Superdrol 검출법 및 유효성 검증

본 연구에서는 액체-액체 추출법을 사용하여 pH와 추출 용매의 변화에 따른 추출 회수율과 재현성을 조사함으로써 최적 추출 조건을 확립하였고 유도체화 과정에서 온도와 시간에 따른 반응조건을 살펴봄으로써 최적조건을 확립하였다. 용매에 따른 추출 효율을 비교해보기 위해 n-Hexane, ethyl acetate, diethyl ether, methylene chloride를 선택해 각각의 추출 용매에 대해

Table 1. Effect of extracting solvent on the extraction recovery and reproducibility of superdrol from human urine

	Recovery (%)	Reproducibility (%)
n-Hexane	87.08	3.00
Ethyl acetate	90.11	2.62
Diethyl ether	92.38	1.08
Methyl chloride	88.57	1.65

Table 2. Effect of pH on the extraction recovery and reproducibility of superdrol from human urine

	Recovery (%)	Reproducibility (%)
pH 4.0	94.93	9.24
pH 5.0	98.60	3.84
pH 6.0	98.27	2.18
pH 6.5	102.25	1.53
pH 7.0	102.25	7.37
pH 7.5	101.64	3.98
pH 8.0	101.43	3.68
pH 9.0	101.72	5.48

5회씩 실험하였다. <Table 1>에 나타난 결과에 따라 가장 높은 회수율과 양호한 재현성을 보이는 diethyl ether를 추출용매로 선택하였다. 다음으로 추출 효율에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 바탕 요시료 5 mL에 superdrol 표준용액(10 µg/mL) 50 µL를 첨가한 후 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0으로 조절 한 다음 diethyl ether로 추출하여 추출회수율과 재현성을 구하였다. <Table 2>에 나타난 결과를 살펴보면 pH의 차이에 따른 회수율과 재현성은 눈에 띄는 차이를 보이지 않았기에 회수율과 재현성이 상대적으로 양호한 pH 6.5를 최적조건으로 선택하였다.

실험 방법의 유효성을 점검하기 위하여 동일한 날 (intra-day)과 일간(inter-day) 변화량의 정확성, 재현성 및 시료 전처리 시의 회수율을 확인하였으며, 그 결과를 <Table 3>에 나타내었고 재현성은 Relative standard deviation (RSD)로 나타내었다. 동일한 날의 변화량 분석 경우 하루에 세 번 실험하였으며, 일간 변화량 분

Table 3. Results of Intra-day and Inter-day test to superdrol in human urine

	Intra-day			Inter-day			
	Con (ng/mL)	Accuracy (%)	Recovery (%)	Reproducibility (%)	Accuracy (%)	Recovery (%)	Reproducibility (%)
Super-drol	1	113.8	113.2	3.8	107.1	91.5	7.0
	20	103.2	103.4	0.2	104.0	103.1	0.6
	50	91.8	89.7	6.8	87.6	94.6	6.5

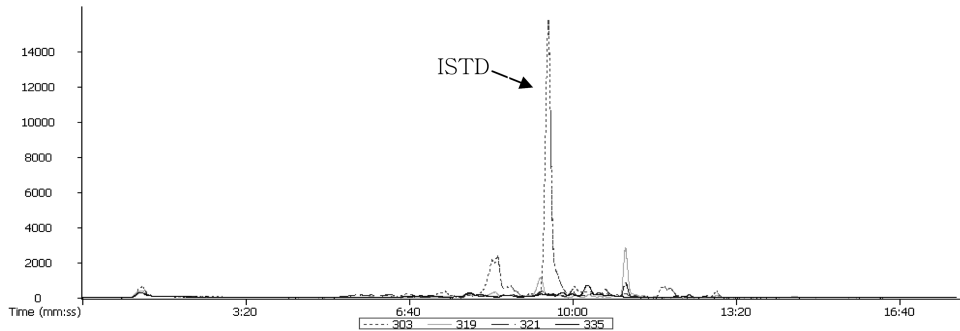
석은 하루에 한 번씩 연속하여 3일간 수행하여 그 결과를 비교하였다. 이때 1회당 시료수는 5개이었다. 동일한 날과 일간 변화량의 정확도, 회수율과 재현성 모두 양호한 결과를 보여 주기 때문에 분석방법의 전처리 절차는 본 연구에 적합함을 알 수 있었다.

**3.2. LC/ESI/MS와 GC/MS를 이용한 Superdrol 대사체들의 검출**

LC/ESI/MS를 이용하여 superdrol 및 그 대사체들을 검출하였다. Blank urine과 dosed urine의 크로마토그램을 비교함으로써 superdrol과 그 대사체로 추정되는 미지의 물질들을 조사하였으며, 이를 M1과 M2로 구분하고 선택이온 크로마토그램과 질량스펙트럼을 Fig. 1과 2에 나타내었다. <Fig. 1>에서 보는 바와 같이, superdrol, superdrol M1과 superdrol M2의 머무름 시간은 각각 11.40 min, 6.28 min과 9.58 min이었다. <Fig. 2>의 m/z 319는 superdrol (m/z 318)의 어미분자에 H<sup>+</sup>가 첨가되어 생성된 [M+H]<sup>+</sup>에 의한 것이며, m/z 321은 대사체 M1의 분자량이 320

임을, 그리고 m/z 335는 대사체 M2의 분자량이 334임을 추정할 수 있다. 우선 LC/ESI/MS의 결과로부터 superdrol M1은 hydration (m/z 318 → m/z 320)의 첨가반응, 그리고 M2는 hydroxylation (m/z 318 → m/z 334)의 치환반응을 예상하였다. 대사체 M1과 M2를 확인하기 위하여 GC/TOF-MS를 이용하였으며, Superdrol M1과 M2의 경우, LC/ESI/MS의 결과로부터 추론된 분자량 m/z 318, m/z 334에서 2개의 TMS기가 치환되었을 것으로 예상되는 [M]<sup>+</sup>의 분자량 m/z 464와 m/z 550이온을 선택이온으로 한 이온 크로마토그램과 질량 스펙트럼을, 그리고 silylation 화 된 superdrol을 <Fig. 3>과 <4>에 나타내었다. Dosed urine에서 superdrol은 8.35 min, superdrol M1은 7.32 min, superdrol M2는 10.00 min에서 검출되었다. Superdrol은 원래 구조로부터 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (m/z 447) 이온과 D-ring이 깨지면서 나타나는 m/z 143 이온, A-ring이 깨져 나타나는 m/z 156 이온이 검출되었으며 따라서 Fig. 4(a)의 질량스펙트럼은 dosed urine에서의 superdrol 임을 확인할 수 있었다. M1의

(a) Blank urine (m/z 303, 319, 321, 335)



(b) Dosed urine (m/z 303, 319, 321, 335)

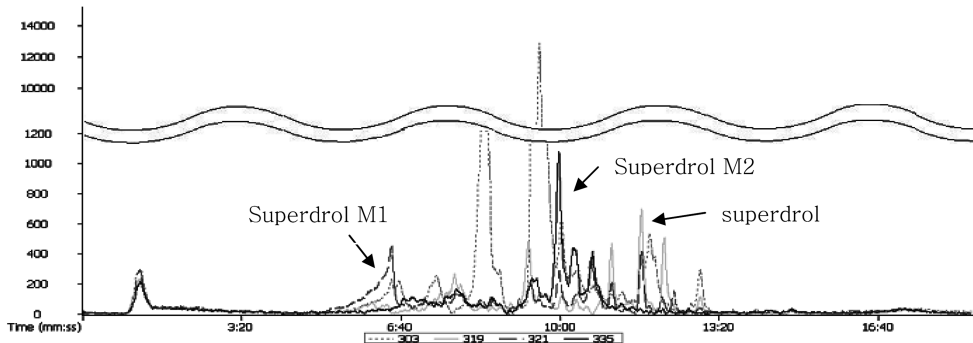
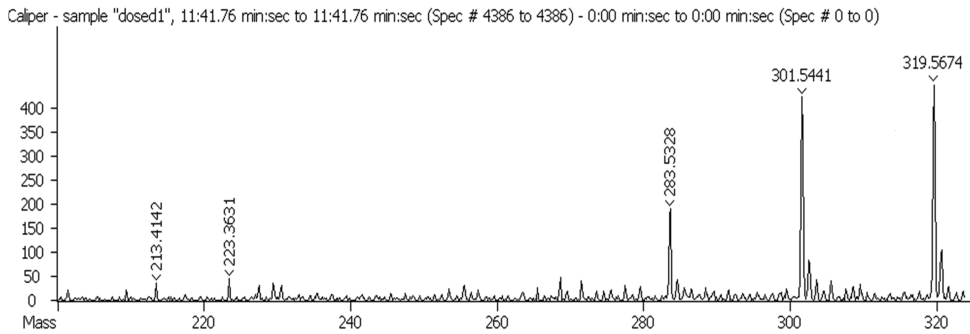
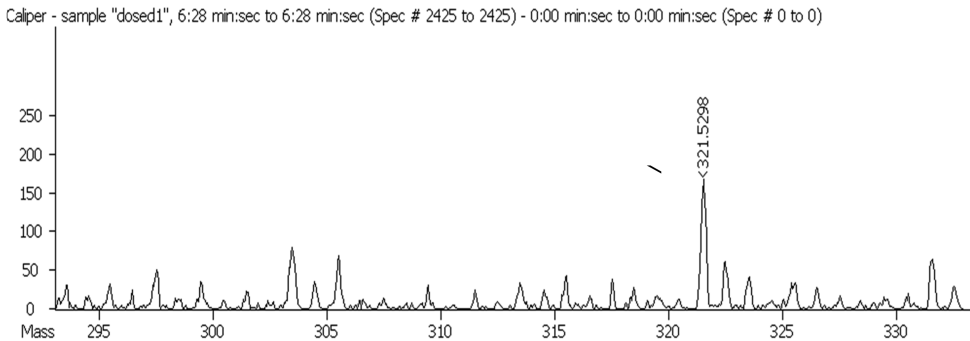


Fig. 1. Extracted ion chromatograms of superdrol, superdrol M1 and superdrol M2 in blank urine (a) and dosed urine (b) by LC/ESI/MS.

(a) Mass spectrum of Superdrol (m/z 319)



(b) mass spectrum of Superdrol M1 (m/z 321)



(c) Mass spectrum of Superdrol M2 (m/z 335)

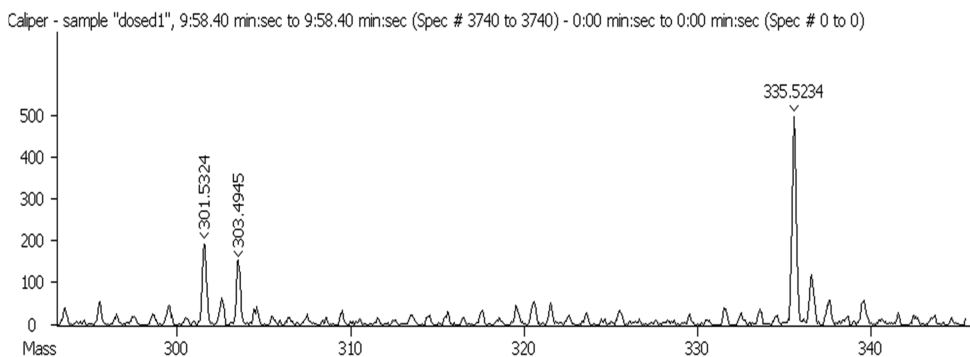


Fig. 2. Mass spectra of superdrol (a), superdrol M1 (b) and superdrol M2 (c) by LC/ESI/MS.

경우  $[M-CH_3]^+$  (m/z 449)와 D-ring이 깨져 나간 m/z 143이온과 m/z 130이온이<sup>15</sup>, M2의 경우는  $[M]^+$ 이온인 m/z 550과  $[M-CH_3]^+$  (m/z 535) 이온, D-ring이 깨진 m/z 232이온<sup>16</sup>이 각각 검출될 것으로 예상하였는데 이는 Fig. 4(b)와 (c)로부터 확인하였다. 이 결과들로부터 M1은 C-3번 위치의 케톤기가 하이드록시기로 환원된 것으로, 그리고 M2는 D-ring 위치

의 하이드록시기가 TMS로 치환된 것으로 추정할 수 있었다. 간세포에서의 대사체에 관한 연구를 진행한 Christiane Ayotte 등의 결과에 따르면, Superdrol M2 외에도 8가지의 대사체가 검출되었으나,<sup>17</sup> 요시료에서는 superdrol M1과 간세포에서는 검출되지 않았던 superdrol M2가 검출되는 다른 결과를 나타내었다.

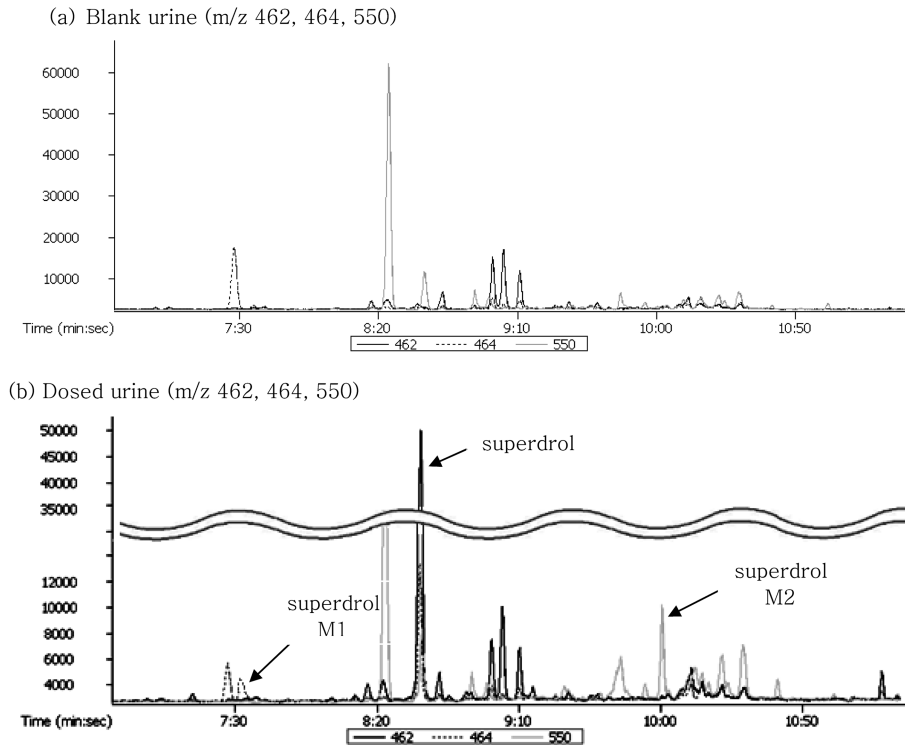


Fig. 3. Extracted ion chromatograms (m/z 462, 464, 550) of 2-trimethyl-silylated-superdrol solution, 2-trimethyl-silylated-M1 and 2-trimethyl-silylated-M2 in blank urine (a) and dosed urine (b) by GC/TOF-MS.

### 3.3. Superdrol과 그 대사체들의 가수분해

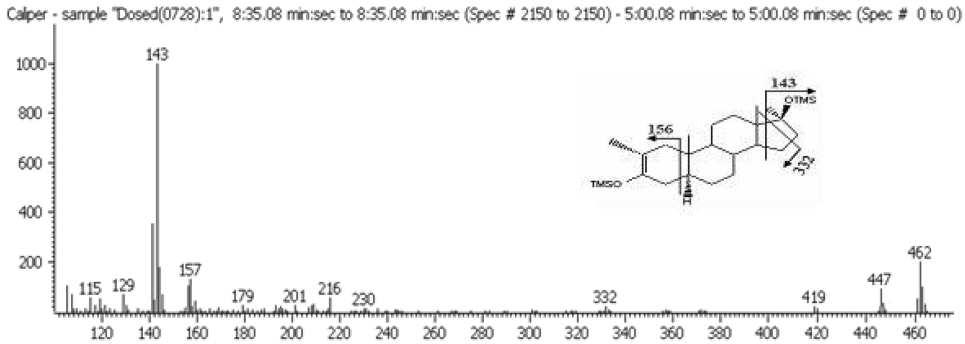
현재까지의 연구 결과에 따르면, Anabolic steroids는 인체에서 대부분 글루쿠론산 또는 황산 포함체를 형성하여 배출되는 것으로 알려져 있다<sup>18,19</sup>. 본 연구에서는 superdrol과 그 대사체들 (M1과 M2)이 체내에서 어떤 포함체 형태로 배설되는지 확인하기 위해, 가수분해 과정을  $\beta$ -glucuronidase (from *E. coli*)와  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase (from *Helix pomatia*)를 사용하여 효소가수분해를 시킨 뒤 GC/MSD로 확인하여 글루쿠론산 포함반응과 황산포함반응을 확인해보았다. Superdrol과 그 대사체 (M1, M2)의 경우 가수분해를 하지 않았을 경우에는 검출되지 않았지만,  $\beta$ -glucuronidase (from *E. coli*)와  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase (from *Helix pomatia*)를 가수분해시켰을 경우에는 검출되었으며 두 효소로 가수분해했을 경우 검출정도가 비슷하고 황산 포함체/글루쿠론산 비율이 101~102%로 나타났다. 이를 통해 superdrol과 그 대사체는 주로 글루쿠론산 포함반응이 일어남을 확인하였다.

### 3.4. Superdrol과 그 대사체의 배설양상

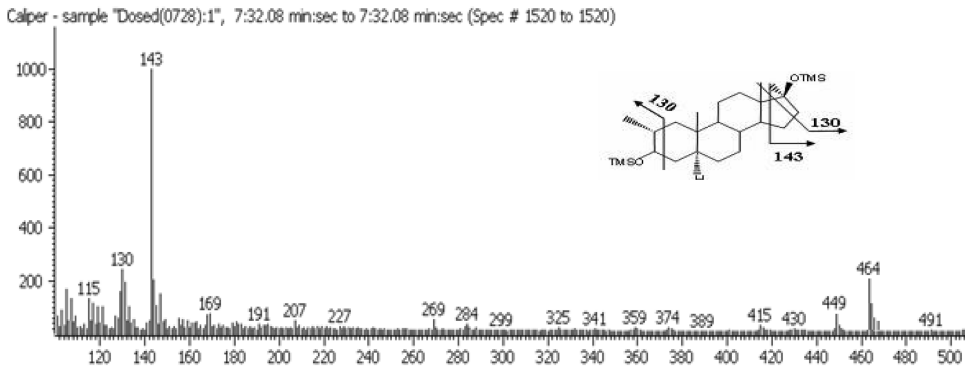
약물의 대사속도와 체내 잔류성에 대한 정보를 얻고 아울러 약물이 체내에서 대사 과정을 거쳐 대사체로 변환되는 정도와 변환되지 않고 모 화합물로 배설되는 정도를 알아보기 위해 약물을 복용한 후 대사체의 배설양상을 조사하였다. Superdrol을 10 mg 복용하고 채취된 요시료를 전처리 과정을 거쳐 superdrol과 대사체(M1과 M2)를 대상으로 GC/MSD SIM mode를 이용하여 조사하였다. 이 때 채취한 요시료는 약물 복용 후 48시간까지였고, superdrol과 대사체의 표준물질의 확보가 어려워 peak 넓이를 내부표준물질의 peak 넓이로 나눈 값을 경과 시간에 대해 도시하여 배설양상을 간접적으로 파악하였다 (Fig. 5).

요 내의 superdrol은 복용 후 4.3 시간 후에 얻은 요시료에서 최대 배설량을 보였고, 20 시간 이후부터는 미량 검출되었다. Superdrol M1도 같은 경향을 보이나 20 시간 이후에도 계속해서 미량 검출되었고 48 시간이 지난 후 얻은 요시료에서도 매우 적은 양

(a) Mass spectrum of superdrol (m/z 462)



(b) Mass spectrum of superdrol M1 (m/z 464)



(c) Mass spectrum of superdrol M2 (m/z 550)

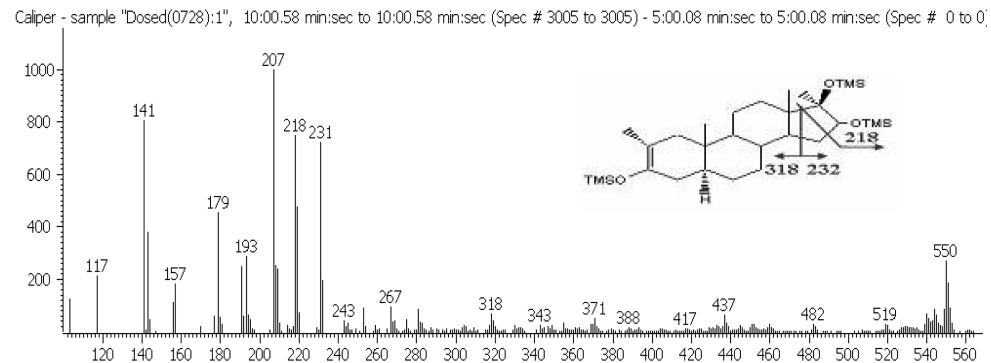


Fig. 4. Mass spectra of 2-trimethyl-silylated-superdrol solution (a) 2-trimethyl-silylated-M1 (b) and 2-trimethyl-silylated-M2 (c) in Mass spectrum by GC/TOF-MS.

이 검출되었으며 superdrol M2는 비슷한 경향을 보이나 30시간 이후에는 검출되지 않았다. 따라서, superdrol과 그 대사체는 약 0~2 시간 후부터 체외로 배설 되다가 4.3 시간 후 최대 배설량을 나타내었으며, superdrol과 대사체 M1은 48시간까지도 검출되는 것을 보아 체내 잔류성이 높은 약물임을 알 수 있었다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 LC/ESI/MS 및 GC/MS로 superdrol을 인체에 경구투여 한 후 채취한 요시료 중에 함유된 superdrol 및 그 대사체의 분석법을 확립하고 이들의 체내 배설형태를 조사하였다. 이를 위하여 요시료의 전처리 과정을 통해 시료 내의 대사체들을 액체-액

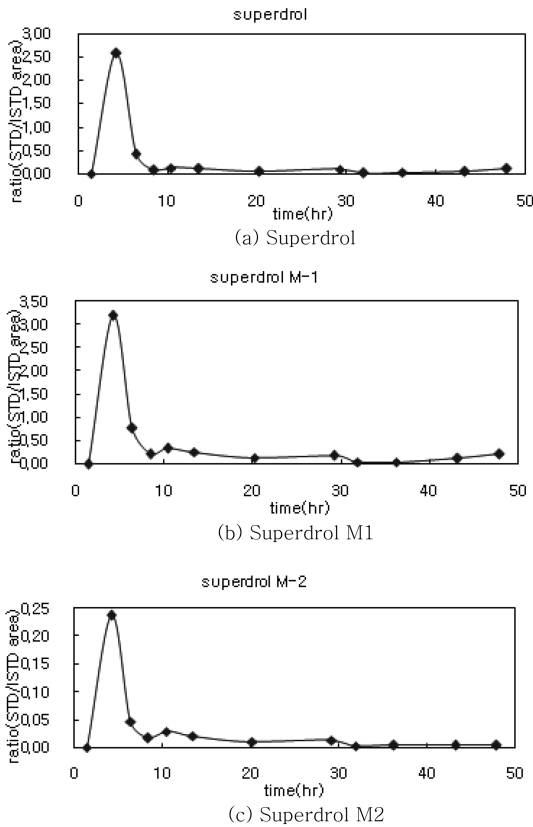


Fig. 5. Excretion profiles of superdrol (a), superdrol M1 (b) and superdrol M2 (c).

체 추출법으로 추출하였고 GC/MS를 이용하여 대사체들을 확인하기 위하여 TMS-유도체화 반응을 이용하였다.

GC/MSD를 이용하여 superdrol과 그 대사체의 분석법에 대한 유효성을 점검한 결과, intra-day의 회수율은 89.7-113.2%, 정확도 91.8-113.8%, 재현성은 0.2-6.8%로 나타났고 inter-day의 회수율은 89.3-104.1%, 정확도는 95.2-103.0%, 재현성은 0.7-7.8%로 나타났다. LC/ESI/MS를 통해 얻은 blank urine과 dosed urine의 크로마토그램을 비교하여 superdrol과 두 가지의 대사체를 검출하였으며 Superdrol과 그 대사체를 유도체화시켜 GC/TOF-MS로 확인하였다. 확보된 질량스펙트럼으로부터 superdrol M1의 경우 superdrol의 C-3 위치의 케톤기가 하이드록시기로 환원된 것으로 추정할 수 있었고 M2의 경우 superdrol의 D-링에 하이드록시기가 첨가된 것으로 추정할 수 있었다. 또한, 효소가수분해과정을 비교해 본 결과 superdrol과 그 대사체들은 대부분 글루쿠론산 포함체를 형성하여 체외로

배설되는 것을 확인하였다. Superdrol 경구투여 후 채취한 요시료로부터 superdrol과 그 대사체의 배설양상을 조사한 결과, 모두 4.3 시간에서 최대배설량을 보였고 superdrol과 superdrol M1은 48시간까지도 미량 검출 되어 체내 잔류성이 높은 물질임을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 KIST 기관고유사업으로부터 지원받았습니다.

## 참고문헌

1. A. G. Fragkaki, Y. S. Angelis, A. Tsantili-Kakoulidou, M. Koupparis and C. Georgakopoulos, *J. Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **115**, 44-61 (2009).
2. N. T. Sakhidi, *Clinical Therapeutics*, **23**(9), 1355-1390 (2001).
3. K. Pascal, *Legal Medicine*, **5**, 29-33 (2003).
4. C. Manho, C. Bongchul, K. Myungsoo, C. Jeongeun and K. yunje, *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, **12**, 1749-1755 (1998).
5. N. A. Wade, *Science*, **176**, 1399-1401 (1972).
6. G. Julie, G. Danielle, P. Donald and A. Christiane, *Steroids*, **74**, 306-314 (2009).
7. B. R. Jaya, W. David, C. Richard, Z. Lixian and N. Abdul, *American J. Gastroenterology*, **101**, 1-4 (2006).
8. N. John, A. Jawad, *Dig. Dis. Sci.*, **54**, 1144-1146 (2009).
9. B. R. Jaya, W. David, C. Richard, Z. Lixian and N. Abdul, *American J. Gastroenterology*, **101**, 1-4 (2006).
10. E. V. Peter and D. T. Frans, *J. Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **101**, 161-178 (2006).
11. Kai Fang, Xuejun Pan, Bin Huang, Jingliang Liu, Yu Wang and Jianpei Gao, *Chromatographia*, **72**, November (No. 9/10) 949-956 (2010).
12. O. J. Pozo, P. Van Eenoo, K. Deventer and F. T. Delbeke, *TrAC Trend Analytical Chemistry*, **27**(8), 657-671 (2008).
13. G. Julie, G. Danielle, P. Donald and A. Christiane, *Steroids*, **74**, 306-314 (2009).
14. S. P. James, C. D. Adam, T. Philip and P. M. Clive, *Steroids*, **75**, 643-652 (2010).
15. S. Willi and D. Manfred, *Anal. Chim. Acta*, **275**, 23-48

- (1993).
16. P. K. Maria, Z. Josef, B. Michael, O. Georg, B. Ulrike and S. Wilhelm, *Steroids*, **72**, 545-551 (2007).
17. G. Julie, G. Danielle, P. Donald and A. Christiane, *Steroids*, **74**, 306-314 (2009).
18. S. Willi and D. Manfred, *Anal. Chim. Acta*, **275**, 23-48 (1993).
19. B. L. Bruno, C. Frederique, G. Isabelle, B. Emanuelle, D. Blandine, S. Robert, D. Rosa, M. Fabrice and A. Francois, *Steroids*, **71**, 1078-1087 (2006).