

LC-MS/MS를 이용한 혈청 중 finasteride 분석

남혜선 · 남경희 · 정수희 · 이장우 · 강진영 · 홍순근 · 김태성 ·
강태석¹ · 윤혜정 · 이광호 · 이규식[★]

식약청, 식품의약품안전평가원 식품위해평가부, ¹독성평가연구부
(2011. 8. 3. 접수, 2011. 9. 1. 승인)

Determination of finasteride 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, 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 Osongsaengmyeong2(i)-ro,
Gangseo-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do, 363-951, Korea*

(Received August 3, 2011; Accepted September 1, 2011)

요 약: 본 연구는 LC-ESI-MS/MS를 이용하여 혈청 중의 피나스테라이드의 분석법을 확립하고, 밸리데이션을 통하여 분석방법의 타당도를 검증하였다. 혈청에 내부표준물질로 베클로메타손을 첨가한 후 methyl *tert*-butyl ether (MTBE)을 사용하여 액체상추출법(liquid-liquid extraction, LLE)으로 전처리하였다. LC-MS/MS의 양이온 모드에서 피나스테라이드와 베클로메타손의 MRM (multiple reaction monitoring) mass transition은 각각 m/z 373.2→305.2, m/z 409.3→391.2 이었으며, 머무름 시간은 각각 5.81분, 5.46분이었다. 피나스테라이드의 정량한계는 0.1 ng/mL로 나타났으며, 0.1~20.0 ng/mL의 농도 범위에서 검량선은 우수한 직선성($R^2=0.9997$)을 확인할 수 있었으며, 회수율은 80~83% 범위이었다. 피나스테라이드의 일내에 대한 정밀도는 6.3~10.6%, 정확도는 97.3~103.6% 범위이었으며, 연속 3일간 수행한 일간 정밀도는 0.8~5.2%, 정확도는 99.8~102.5%로 나타났다.

Abstract: A liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) method was developed and validated for the determination of finasteride in human serum. Beclomethasone was used as internal standard (IS) and liquid-liquid extraction (LLE) using methyl *tert*-butyl ether (MTBE) was carried out to isolate analyte. The mass transitions monitored in multiple reaction monitoring (MRM) in positive ion mode were m/z 373.2→305.2 for finasteride and m/z 409.3→391.2 for IS. Retention times of finasteride and IS were 5.81 and 5.46 min, respectively. The limit of quantitation (LOQ) was 0.1 ng/mL and the calibration curve showed good linearity in the range of 0.1~20.0 ng/mL ($R^2=0.9997$). The intra-day assay precision and accuracy were in the range 6.3~10.6% and 97.3~103.6%, respectively, and the inter-day assay precision and accuracy were in the range 0.8~5.2% and 99.8~102.5%, respectively. The sample extract recovery of the method was 80~83%.

Key words: Finasteride, 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

www.kci.go.kr

1. 서 론

전립선비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)은 여러 가지 원인에 의해 전립선이 비정상적으로 커져 배뇨장애 및 성기능 장애를 일으키게 되는 현상으로 50대 이상의 남성들에게서 흔히 발생하는 증상이다.¹ 최근 우리나라도 서구식 생활화 및 고령화로 인해 전립선 비대증 및 전립선암 환자가 증가하고 있는 추세이다. 전립선비대증의 원인은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone) 등의 내분비 호르몬과 관계가 있는 것으로 추측되고 있다.

피나스테라이드(finasteride, Fig. 1a)는 테스토스테론에서 강력한 남성 호르몬인 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)으로의 전환을 촉진시키는 5- α -reductase 효소의 활성을 억제하는 4-아자스테로이드(azasteroid)계 합성화합물이다.^{2,4} 피나스테라이드는 프로스카(Proscar)라는 이름으로 1992년에 미국 식품의약국(FDA)에서 전립선 비대증 치료제로 승인되었으며, 피나스테라이드의 처리는 전립선과 DHT 수치의 뚜렷한 감소로 결과되었다.⁵

한편, 피나스테라이드의 치료 중 부작용으로 머리털이 새로 나는 것을 보고 경구용 피나스테라이드가 남성형 탈모증(androgenetic alopecia)을 치료하는데 효과가 있다는 연구결과가 발표되었다.^{6,7} 그 후 1997년에 피나스테라이드는 프로페시아(Propecia)라는 이름으로 FDA에서 남성형 탈모증 치료제로 승인되었고, 현재까지 전립선 비대증과 남성형 탈모증의 경구 치료제로 널리 사용되고 있다.

그러나 강력한 남성호르몬인 DHT로의 전환을 저해하기 때문에 피나스테라이드에 노출된 산모의 남자태아는 외부 생식기 이상의 선천적 장애가 발생할 수 있으며, 현재까지 소아와 여성들에 있어서 안전성이 확립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 임신 중이거나 임신 가능성이 있는 여성에게 피나스테라이드의 사용은 금하고 있으며, 피나스테라이드 성분의 약물을 투여 받고 1개월이 경과하지 아니한 사람은 체혈 금지대상자로 선정되어 있다.^{8,9} 또한 약제가 피부를 통해 흡수될 수 있기 때문에 임신 중이거나 임신 가능성이 있는 여성은 부서지거나 가루로 분쇄된 피나스테라이드정의 노출을 피해야 한다.

인체 시료에서 피나스테라이드를 정량하는 분석법은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)¹⁰⁻¹³, 액체 크로마토그래피-질량분석법(LC-MS)¹⁴⁻¹⁶, 액체 크로마토그래피-탠덤 질량분석법(LC-MS/MS)¹⁷⁻¹⁸, 그리고 동위원

소 희석 질량분석법¹⁹ 등의 방법이 사용되고 있다. 그 중 HPLC법은 분석비용이 적고 검출반응이 안정적인지만 시료에서 아자스테로이드를 추출하고 간섭물질들을 분리하는데 많은 시간이 소요되며, 검출한계가 높고 다량의 시료를 필요로 하는 단점이 있고, LC-MS법은 HPLC법에 비해 분석비용은 높으나, 높은 선택성과 감도, 신속함으로 인해 생물학적 시료를 이용한 약물동력학 연구에 적합하며, 특히 LC-MS/MS법은 가장 높은 감도와 분리능을 보이며 극미량까지도 정량이 가능하다. 혈청 중의 피나스테라이드의 정량한계(limit of quantitation)는 HPLC 분석법의 경우 1에서 10 ng/mL까지 다양한 수준으로 보고되고 있다.¹⁰⁻¹³

따라서 본 연구에서는 가임기 여성에게 수혈될 경우 태아기형 유발의 가능성으로 인해 헌혈 금지 약물로 선정되어 관리되고 있는 피나스테라이드의 보다 효과적이고 정밀한 분석을 위하여 LC-ESI/MS/MS를 이용한 혈청 내 분석법을 확립하고자 수행하였다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 표준물질로 사용된 피나스테라이드(98%)와 내부표준물질로 사용된 베클로메타손(99%, Fig. 1b)은 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 표준혈청(human serum)은 PAA Laboratories사(Cölbe, Germany)로부터 구입하였다. LC-MS/MS 분석을 위해 필요한 모든 용매는 HPLC급 고순도 용매를 사용하였고, 아세트니트릴은 Merck사(Darmstadt, Germany), 메탄올 및 증류수와 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.

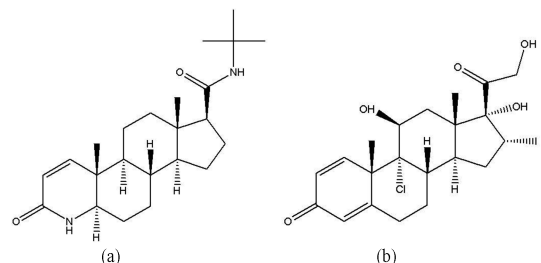


Fig. 1. Chemical structures of (a) finasteride and (b) beclomethasone (Internal standard).

2.2. 기기 및 장치

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

시료의 전처리는 액체상 추출법을 이용하였으며, 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

피나스테라이드 표준품과 내부표준물질인 베클로메타손은 메탄올에 녹여 1000 μg/mL의 농도가 되도록 표준원액(stock solution)을 만들어 냉장 보관하였으며, 표준원액을 200, 100, 50, 20, 10, 2, 1 ng/mL의 농도가 되도록 메탄올로 단계별로 희석하여 표준용액(stock solution)을 제조하였다.

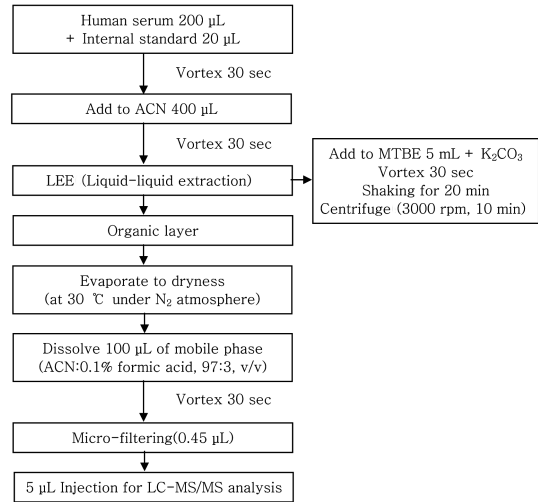


Fig. 2. Schematic diagram of the sample preparation.

2.3.2. 시료보관 및 전처리

-70 °C로 냉동 보관하였던 시료는 실온에서 해동한 후 혈청 200 μL을 취하고 내부표준 물질(베클로메타손) 20 μL를 첨가하여(10 ng/mL) 잘 섞은 후(vortexing, 30 sec), 아세토니트릴 400 μL를 넣어 단백질을 침강시켰다. 여기에 탄산칼륨을 가한 후 MTBE 5 mL를 넣고 20분간 shaking 하고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 취한 상등액은 N₂ evaporator (30 °C)를 이용하여 건조하였다. 건조물은 LC-MS/MS

Table 1. Analytical conditions of LC-MS/MS

LC condition	
HPLC	Agilent 1200 series
Column	Unison UK-C18 (2 mm i.d. × 75 mm length, 3 μm particle size)
Column oven	35 °C
Flow Rate	250 μL/min
Injection	10 μL
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water, B: acetonitrile 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 condition			
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)	48
Dwell time (ms)	150	Entrance potential (EP) (V)	10
Ion source gas (gas1) (psi)	25	Collision energy (CE) (V)	38
Ion source gas (gas2) (psi)	50	Collision cell exit potential (CXP) (V)	12

분석용 이동상 100 μL 로 녹여 잘 섞은 후(vortexing, 30 sec), micro-filtering (0.45 μL , PTEE)하여 LC-MS/MS에 10 μL 씩 주입하여 분석하였다(Fig. 2).

2.3.3. 기기분석 조건

시료 전처리 과정을 통해 추출, 농축, 정제를 마친 시료는 Table 1에서와 같은 기기분석 조건에서 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 시료 분리를 위한 HPLC의 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)으로 분석하였다. 이동상의 유속은 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이었으며 시료 주입량은 10 μL 이었다. 분석칼럼의 오븐 온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 일정하게 유지시켰다.

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 48 V, entrance potential 10 V, collision energy 38 V, collision cell exit potential 12 V로 설정하여 분석하였다.

2.4. 분석방법의 신뢰성 검증

분석방법의 신뢰성 확보를 위하여 생체시료분석법 밸리데이션²⁰ 및 Bioanalytical Method Validation²¹에 따라 밸리데이션을 수행하였다. 피나스테라이드 분석법의 신뢰성 검증을 위하여 검량선 작성용 표준시료액(0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 ng/mL)을 시료전

처리 방법과 동일하게 하여 하루에 5회 밸리데이션을 시행하였다. 피나스테라이드의 QC 시료는 검량선 작성 농도 범위를 기준으로 저농도(0.3 ng/mL), 중농도(8.0 ng/mL), 고농도(16.0 ng/mL)로 시료의 전처리 방법과 동일하게 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 정밀도(precision), 정확도(accuracy)를 구하고, 연속하여 3일간 실험을 행하여 일간 정밀도, 정확도를 구하여 타당도를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LC-MS/MS 스펙트럼

인체시료인 혈청 중의 피나스테라이드를 분석하기 위하여 LC-MS/MS를 사용하였고, 분석조건은 Table 1에 나타내었다. 피나스테라이드와 내부표준물질인 베클로메타손의 분자이온의 확인을 위하여 텐텀 질량분석기에서 실린지 펌프를 이용하여 표준물질을 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 주입(Infusion)하는 방법을 이용하였고 manual tuning mode에서 분석대상물질의 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 해당하는 피크를 확인한 후, 최적화(quantitative optimization) 과정을 수행하여 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)을 확인하였다. ESI 양이온(+) 모드에서 피나스테라이드와 내부표준물질인 베클로메타손의 선구이온은 각각 m/z 373.2, m/z 409.3 이었으며 생성이온은 각각 m/z 305.2, m/z 391.2이었다(Fig. 3).

3.2. 선택성

선택성은 시료에서 다른 조성을 가진 물질과 분석하고자 하는 물질을 분리하고 정량하는 분석 능력을

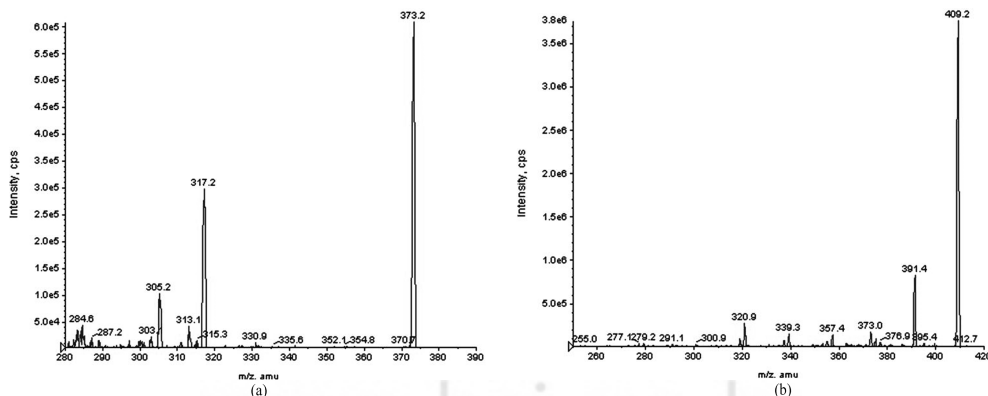


Fig. 3. Electrospray product ion mass spectra of (a) finasteride and (b) beclomethasone.

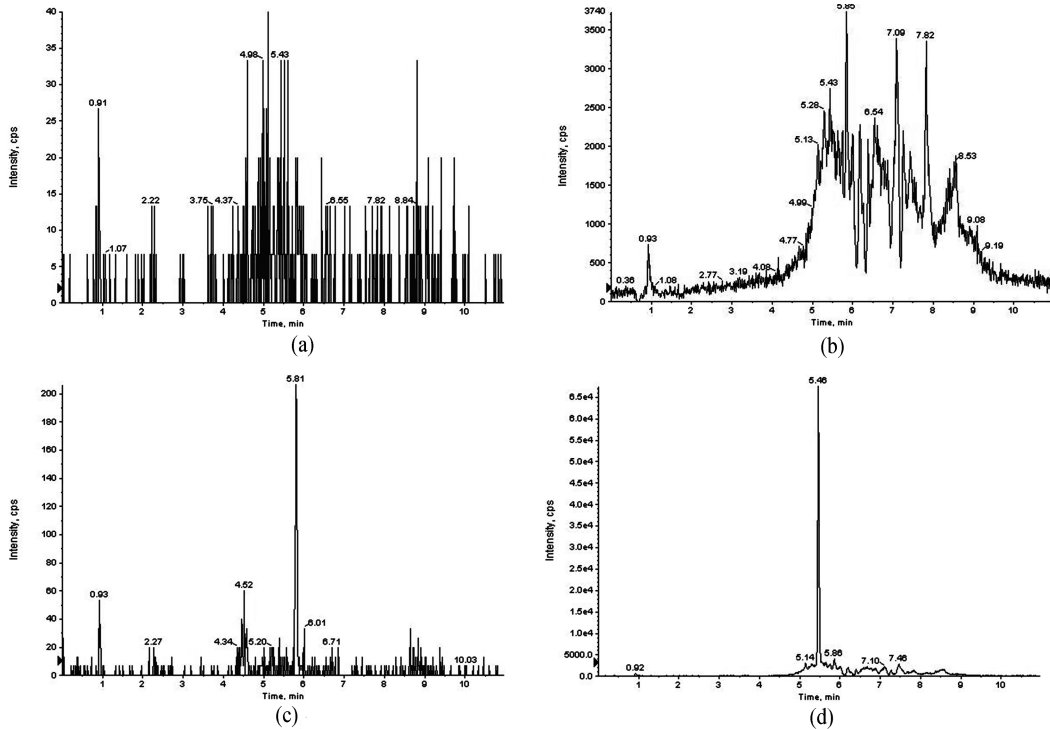


Fig. 4. Chromatogram of (a, b) blank human serum and spiked (c) finasteride and (d) internal standard at 0.1 ng/mL.

나타낸다. Blank 시료와 최저 정량한계 수준의 농도를 첨가하여 본 시험방법에 따라 전처리 한 후 MRM (multiple reaction monitoring) 모드로 분석한 시료의 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a, b)의 blank 시료에서는 피나스테라이드와 베클로메타손이 검출되지 않은 반면, Fig. 4(c, d)에서는 피나스테라이드와 내부표준물질인 베클로메타손이 깨끗한 피크의 모양을 나타내며 머무름 시간은 각각 5.81분, 5.46분으로 다른 물질과의 간섭이 없이 명확하게 완전히 분리됨을 확인할 수 있었다.

3.3. 직선성

혈청 중에서 농도가 0.1~20.0 ng/mL의 범위가 되도록 표준물질을 첨가하여 전처리 과정을 거친 후 검량선을 작성하였으며, $y=0.0323x + 0.0002$, 상관계수(R^2)가 0.9997로 우수한 직선성을 확인하였다(Fig. 5).

3.4. 정밀도, 정확도

피나스테라이드 0.1~20 ng/mL 농도범위에서 일내 정밀도는 변동계수(coefficient of variation, C.V.)가 1.7~9.5%로 나타나 생체시료분석법 밸리데이션 가이드

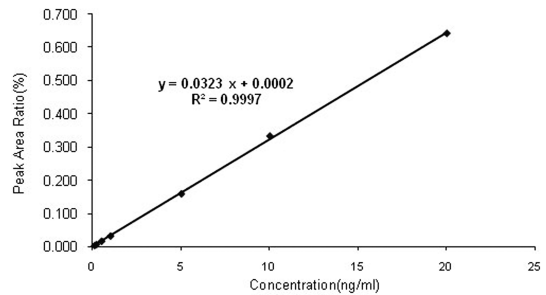


Fig. 5. Linearity of the standard calibration curve of finasteride.

던스인 15%이내였으며, 정확도는 88.4~102.7%로 생체시료분석법 밸리데이션 가이드스인 80~120%에 만족하였다(Table 2). 또한 피나스테라이드 분석 시 실시한 정밀도는 3가지 농도 수준(저농도 0.3 ng/mL, 중농도 8.0 ng/mL, 고농도 16.0 ng/mL)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 CV는 6.3~10.6%로 나타났으며, 정확도는 97.3~103.6%범위이었다(Table 3). 연속 3일간의 수행한 일간에서도 3가지 농도 수준(저농도 0.3 ng/mL, 중농도 8.0 ng/mL, 고농도 16.0 ng/mL)에서 CV는 0.8~5.2%으로 나타났으며, 정확도는 99.8~102.5%이

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

Spiked Conc. (ng/mL)	Mean \pm SD, N=5	*Precision (%)	**Accuracy (%)
0.1	0.09 \pm 0.00	1.7	88.4
0.2	0.18 \pm 0.02	9.5	91.6
0.5	0.49 \pm 0.03	6.5	97.7
1.0	0.99 \pm 0.06	5.6	98.7
5.0	4.92 \pm 0.19	3.8	98.5
10.0	10.27 \pm 0.60	5.9	102.7
20.0	19.93 \pm 0.66	3.3	99.6

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

**Accuracy=Measured concentration/Spiked concentration

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

Spiked Conc. (ng/mL)	Intra-day (n=5)		Intra-day (n=3)	
	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)
0.3	10.6	97.3	5.2	99.8
8.0	6.3	98.4	2.1	100.2
16.0	8.2	103.6	0.8	102.5

Table 4. Recovery for determination of finasteride in human serum

Spiked Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
0.3	82.6
16.0	80.2

었다(Table 3). 이상의 결과로 본 연구의 피나스테라이드에 대한 LC-MS/MS 분석법은 사람의 혈청을 이용한 시험에 이용될 수 있는 적합한 정밀도와 정확도를 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

3.5. 회수율

액체상 추출법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 회수율을 확인하고자 하였다. 회수율은 전처리를 거치기 전과 후의 피나스테라이드와 내부표준물질의 피크 면적비를 비교하여 백분율(%)로서 구하였으며 0.3과 16.0 ng/mL의 농도에서 측정된 회수율은 82.6과 80.2%의 값을 각각 나타내었다(Table 4).

4. 결 론

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 피나스테라이

이드의 분석법을 확립하였으며, 이 분석법에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 그 결과, 정량한계는 0.1 ng/mL이고, 0.1~20.0 ng/mL의 농도범위에서 검량선은 우수한 직선성($R^2=0.9997$)을 나타내었고 회수율은 80~83% 이었다. 이러한 결과는 기존의 LC-MS 혹은 LC-MS/MS 분석법들과 비교하여 정량한계는 2배에서 10배까지 낮은 수준이었다.

따라서 본 연구에서 확립된 LC-MS/MS 분석법은 혈청 내의 피나스테라이드의 정량과 확인에 이용할 수 있는 높은 감도와 선택성, 직선성, 정밀도와 정확도를 가지고 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

- H. A. Guess, H. M. Arrighi, E. J. Metter and J. L. Fozard, *Prostate*, **17**, 241-246 (1990).
- T. Liang, M. A. Cascieri, A. H. Cheung, G. F. Reynolds and G. H. Rasmusson, *Endocrinology*, **177**, 571-579 (1985).
- J. R. Brooks, C. Berman, R. L. Primka, G. F. Reynolds and G. H. Rasmusson, *Steroids*, **47**, 1-19 (1986).
- D. H. Peters and E. M. Sorkin, *Drugs*, **46**, 177-208 (1993).
- M. I. Wilde and K. L. Goa, *Drugs*, **57**, 557-581 (1999).
- K. J. McClellan and A. Markham, *Drugs*, **57**, 111-126 (1999).
- S. Rossi, *Australian Medicines Handbook*, 2004.
- Blood Guidances, Food and Drug Administration, USA, 2011.
- Blood Regulation Law, Ministry of Health and Welfare, Korea, 2011.
- T. Takano and S. Hata, *J. Chromatogr., B*, **676**, 141-146 (1996).
- P. Ptáček, J. Macek and J. Klíma, *J. Chromatogr., B*, **738**, 305-310 (2000).
- A. I. Segall, M. R. Vitale, V. L. Perez, M. L. Palacios and M. T. Pizzorno, *J. Liquid Chromatogr. Related Technol*, **25**, 3167-3176 (2002).
- G. Carlucci and P. Mazzeo, *J. Chromatogr., B*, **693**, 245-248 (1997).
- X. Li, L. Ding, L. Li, X. Hao and Z. Zhang, *Acta Pharmaceutica Sinica*, **38**(6), 455-457 (2003).
- F. Q. Guo, L. F. Huang, K. P. Wong, Y. H. Dai, Y. W. Li, Y. Z. Liang, K. L. Huang, K. J. Zhong and M. J.

- Wu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1507-1513 (2007).
16. X. Chen, E. R. Gardner, D. K. Price and W. D. Figg, *J Chromatogr Sci.* **46**(4), 356-361 (2008).
 17. M. L. Constanzer, C. M. Chavez and B. K. Matuszewski, *J. Chromatogr. B*, **658**, 281-287 (1994).
 18. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **70**, 882-889 (1998).
 19. A. Guarna, G. Danza, G. Marrucci, A. Dini and S. M. Serio, *J. Chromatogr. B*, **674**, 197-204 (1995).
 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.