

碩士學位論文

GC/MS에 의한 이노제 약물의 검출과
경주마 혈액에의 응용 연구



化學科

許 萬 培

2002年 06月

GC/MS에 의한 이노제 약물의 검출과 경주마 혈액에의 응용 연구

指導校授 姜 昌 禧

許萬培

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



許萬培의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 鄭 憲 商 印

委 員 李 南 昊 印

委 員 姜 昌 禧 印

濟州大學校 大學院

2002年 06月

Detection of Diuretics by GC/MS and Its Application to Horse Plasma Samples

Man-Bae Hu

(Supervised by professor Chang-Hee Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF NATURAL SCIENCE

2002. 06.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	i
List of Tables	ii
list of Figures	iii
I. 서 론	1
II. 실험	4
1. 시약및 기기	4
1.1. 시약	4
1.2. 기기	4
2. 표준용액의 조제	4
3. 이노제의 분석	5
4. 경주마 혈액 응용 실험	5
5. 이노제 약물의 유도체화	5
5.1. Methylation 유도체화	6
5.2. Silylation 유도체화	6
6. 혈장에서 이노제의 추출	6
6.1. 액상 추출법	6
6.2. 고체상 추출법	6
7. 회수율 실험	7
III. 결과 및 고찰	10
1. 이노제의 유도체화 및 GC/MS 분석	10
2. 이노제 유도체 화합물의 질량 스펙트럼	14
3. 추출방법에 따른 회수율 비교	26
4. 경주마 혈액에의 응용 실험	27
4.1. 표준검정곡선 작성	28

4.2. 경주마 혈액중의 furosemide 검출	29
4.3. 경주마 혈액중의 hydrochlorothiazide 검출	31
4.4. 경주마 혈액중의 acetazolamide 검출	31
5. 이뇨제에 의한 카페인의 이뇨 효과	32
5.1. 표준검정곡선 작성	32
5.2. 경주마 혈액중의 caffeine 검출	33
IV. 결 론	35
참고문헌	37
감사의 글	42

ABSTRACT

By means of the extraction of 12 diuretics from the horse plasma, liquid-liquid extraction and solid-phase extraction methods were compared each other. Also, the best conditions to separate and detect those diuretics were variously studied for GC/MS analysis. The derivatization reactions were performed so that the all diuretics was converted into methyl and silyl derivatives by methylation and silylation. Based on the methylation, the 9 diuretics such as acetazolamide, ethacrynic acid, dichlorophenamide, furosemide, chlorthalidone, bumetanide, hydrochlorothiazide, triamterene and bendroflumethiazide, showed good results to be separated and detected by GC/MS analysis. However, the silylation was founded to be better results for 3 diuretics such as bumetanide, ethacrynic acid and furosemide. For the identification of all methylated diuretics, the fragmentation pattern was investigated by means of mass spectra of deuterated methyl (methyl-D₃) isotopes, and it was very helpful to interpret the mass spectra. The extraction recoveries were in the range of 28.6 ~ 89.4% for the liquid-liquid extraction method with tert-butyl methyl ether at pH 5, and 45.0 ~ 89.7% for the solid phase extraction method using Sep-Pak C₁₈ cartridge.

The application of those analytical methods to horse plasma sample was tested to check whether they could be applicable for doping test of race horses. From the study on the application test, the furosemide was detected until 10 hours after administration of diuretic by oral dosing, and 3 hours after administration of diuretic by intra venous. While the hydrochlorothiazide and acetazolamide were detected until 24 hours after administration of diuretic by oral dosing. So, the analytical methods selected in this study looks to be applied in the doping test for diuretics in horse plasma.

List of Scheme & Table

Scheme 1. The extraction procedure of diuretics from horse plasma by liquid-liquid extraction method	8
Scheme 2. The extraction procedure of diuretics from horse plasma by solid-phase extraction method	9
Table 1. Characterization of mass ions for methyl and methyl-D ₃ derivatives of diuretics	13
Table 2. Characterization of mass ions for silyl derivatives of diuretics	13
Table 3. The results of recovery test for 9 diuretics	27
Table 4. GC/MS conditions and regression results of standard calibration curve for quantitative analysis of	28
Table 5. GC/MS conditions and regression results of standard calibration curve for quantitative analysis of	33

List of Figures

Figure 1. Chemical structures of 12 diuretics selected in this study	3
Figure 2. Total ion chromatogram of methylated diuretics derivatives	11
Figure 3. Total ion chromatogram of trimethylsilylated diuretics derivatives	12
Figure 4. Mass spectra of acetazolamide derivative	17
Figure 5. Mass spectra of ethacrynic acid derivative	18
Figure 6. Mass spectra of dichlorphenamide derivative	19
Figure 7. Mass spectra of furosemide derivative	20
Figure 8. Mass spectra of chlorthalidone derivative	21
Figure 9. Mass spectra of bumetanide derivative	22
Figure10. Mass spectra of hydrochlorothiazide derivative	23
Figure11. Mass spectra of triamterene derivative	23
Figure12. Mass spectra of bendroflumethiazide derivative	24
Figure13. Mass spectra of trimethylsilylated diuretics	25
Figure14. Excretion profile of furosemide(oral dosing) in horse plasma	30
Figure15. Excretion profile of furosemide(intra venous) in horse plasma	30
Figure16. Excretion profile of hydrochlorothiazide(oral dosing) in horse plasma	31
Figure17. Excretion profile of acetazolamide(oral dosing) in horse plasma	32
Figure18. Excretion profile of caffeine(intra venous) in horse(A) plasma	34
Figure19. Excretion profile of caffeine(intra venous) in horse(B) plasma	34

I. 서 론

이뇨제(diuretics)는 뇨의 생성속도를 촉진시키는 약물이며 일반적으로 이뇨 작용에는 두 가지가 있다. 즉, 하나는 뇨의 양 자체를 증가시키는 작용이고, 다른 하나는 뇨 중의 용질과 수분을 배출, 제거하는 작용이다.¹⁾ 이뇨제는 약리학적 특성에 따라 근위세뇨관에 작용하는 carbonic anhydrase 억제 약물, henle 고리의 상행각에 작용하는 이뇨제, 원위세뇨관에 작용하는 thiazides, 집합관에 작용하는 K^+ 보존 이뇨제, 그리고 기타 물질로 구분되며, 이 약물들은 일반적으로 배설되는 뇨 중에 대사되지 않은 상태의 높은 농도로 배출된다.²⁾

임상에서 이뇨제는 체액의 용적 및 성분을 조절해야 하는 고혈압, 급만성 신부전증, 신증 등의 치료에 필요한 약물로서 그 사용 빈도가 높다.¹⁾ 이러한 이뇨제는 스포츠에서 두 가지 이유 때문에 오용될 수 있다. 즉, 운동선수가 좀더 낮은 등급에서 경쟁할 수 있도록 체중을 감소하기 위하여 이뇨제를 복용하는 경우와 뇨의 배출속도를 촉진시켜 다른 금지 약물의 검출을 방해하기 위한 목적으로 사용되고 있다.^{3,4)}

말(horse)의 경우 비스테로이드성 진통소염제로 많이 사용되는 phenylbutazone의 뇨 중 농도는 이뇨제인 furosemide를 사용할 경우 40배까지 감소시키는 것으로 알려져 있다. 이런 이유 때문에 "masking agent"로 사용되는 이뇨제는 여러 경마시행국에서 사용을 금지하고 있는 대표적인 약물이다.^{5,6)} 경주마의 경우 격렬한 운동을 벌이는 도중에 약 75% 정도가 폐에 출혈이 나타나는 운동유발성 폐출혈(EIPH)이 발생하는 것으로 알려져 있고, 미국에서는 이의 치료를 위해 이뇨제인 furosemide를 경마에서 허용하고 있다.⁷⁾ 매년 여러 나라에서 경주마에 대한 도핑검사 결과 이러한 이뇨제가 검출되는 것으로 조사되고 있으며, 2001년의 경우 모두 16건이 보고되었다.⁸⁾

이뇨제의 경우 다른 여러 작용기(carboxyl, amino, aminosulfonyl 등)를 갖고 있고 폭넓은 pKa값을 나타내기 때문에 혈액이나 뇨에서 추출하는데 어려움이 따르고, 주로 산성과 염기성 조건에서 뇨 중의 이뇨제를 추출하는 방법을 채택하고 있다.^{9,10)} 생체 내에서 이러한 이뇨제를 분리, 검출하고 정량하기 위한 방법들로는 thin-layer chromatography^{11,12)}, gas-liquid chromatography,^{13,14)} gas chromatography/mass spectrometry,^{3,6,15-20)} gas chromatography,²¹⁻²²⁾ high performance liquid chromatography,^{2,3,4,9,10,23-29)} 그리고 Immunoassay^{30,31)} 방법들이 보고되고 있다. 이러한 방법들 중에

서도 GC 분석의 경우 높은 감도를 얻기 위해 이노제의 sulfonamide 그룹과 O- 또는 N-와 결합된 수소 원자를 포함하는 다른 그룹에 대해 alkylation 또는 silylation 방법으로 유도체화시킨 후 각 성분들을 분리하는 방법을 이용하고 있다. 그리고 LC 분석의 경우 고정상으로 C₁₈ 역상 칼럼을 사용하고, 이동상으로 acetate, phosphate buffer, acetonitrile, methanol 등을 사용하여 분리시키는 방법이 많이 이용되고 있다. 또한 시료의 전처리 방법으로는 유기용매를 이용한 액상추출법과 C₁₈ 칼럼을 이용한 고체상추출법이 주로 이용되고 있다.

본 연구는 GC/MS를 이용하여 말의 혈액에서 이노제 12종을 검출하기 위한 목적으로 수행되었다. 이를 위해 이노제의 추출 방법, GC/MS 검출 감도를 증가시키기 위한 유도체화 방법을 다각도로 비교하였고, deuterated methyl iodide(CD₃I)를 이용하여 이노제의 mass spectrum을 조사하였다. 또한 제주마에 3종의 이노제와 카페인을 직접 투여하여 동일한 방법으로 추출과정을 거친 후 검출 정도를 비교함으로써 이러한 분리 및 검출의 실제 응용 가능성에 대해 다양한 방법으로 연구하였다.



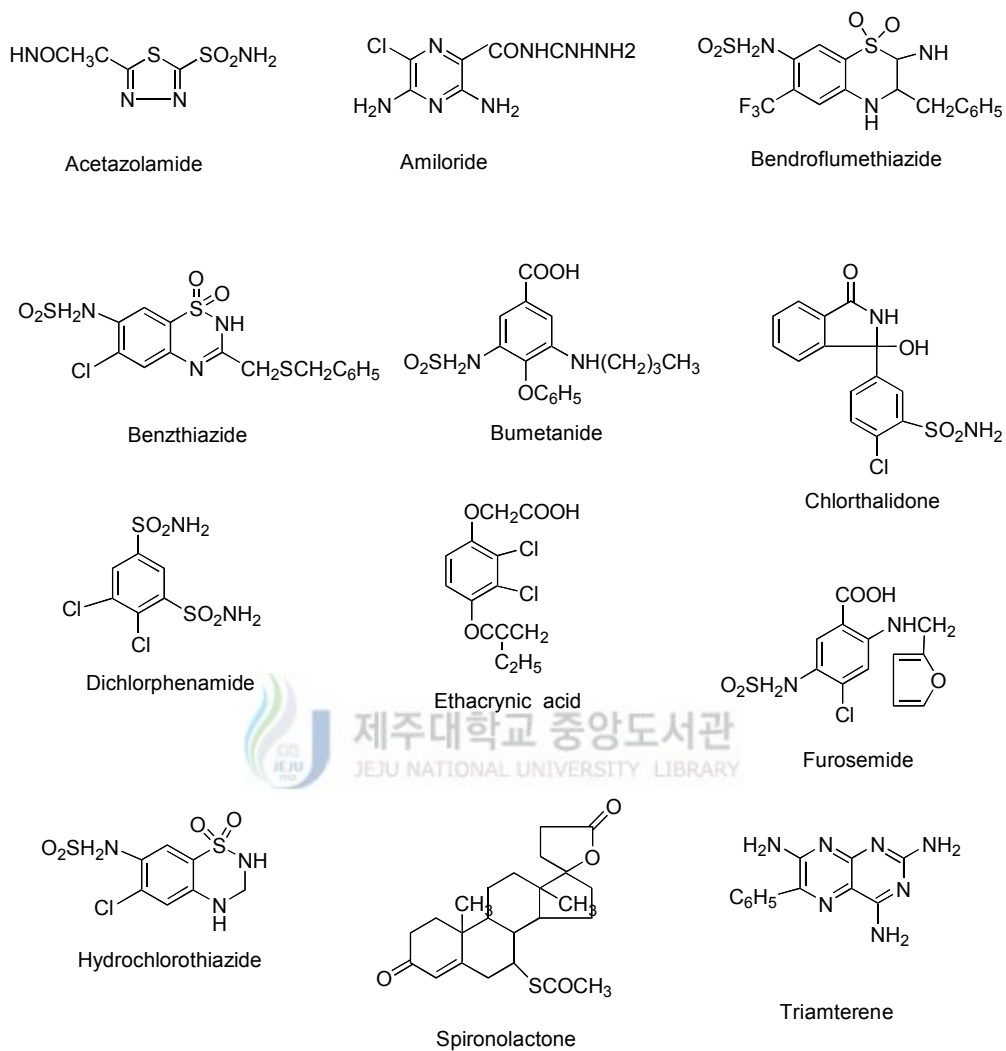


Figure 1. Chemical structures of 12 diuretics selected in this study.

II. 실험

1. 시약 및 기기

1.1 시약

이뇨제 표준물질인 acetazolamide, amiloride, bendroflumethiazide, benzthiazide, bumetanide, chlorthalidone, dichlorphenamide, ethacrynic acid, furosemide, hydrochlorothiazide, spironolactone, triamterene과 GC/MS 분석 시 내부표준물질로 사용한 ketoptofen은 Sigma사의 특급시약(EP grade)을 사용하였다. 또 추출과정에 사용한 시약들은 모두 Merck사의 HPLC 등급 시약을 사용하였고, 유도체화 반응에 사용한 N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA), methyl iodide, methyl iodide-D₃ 시약은 Sigma사의 특급시약을 이용하였다. 또한 고체상 추출에 이용된 Sep-Pak Cartridge는 Waters사 제품을 사용하였다.

1.2 기기

12종의 이뇨제 성분들은 모두 Gas Chromatograph (Hewlett-Packard, Model 6890) / Mass Selective Detector (Hewlett-Packard, Model 5792)와 autosampler (HP 6890 series)를 사용하여 분석하였고, data system은 HP Vectra pentium PC 및 HP G1701 BA MS chemstation 프로그램을 이용하였다.

혈액중의 이뇨제를 분리하기 위하여 채택한 액체상추출 방법에서 혈액의 분리는 원심분리기(Vision, Model 6000CFN)와 shaker를 이용하였고, 고체상추출 방법에서 진공은 vacuum manifold (Milipore, Model DOP104-AA)를 이용하여 걸어 주었으며, 추출 후 유기물 층은 heating block (Pierce, Model Reacti-Vap)을 사용하여 증발, 농축시켰다.

2. 표준용액의 조제

이뇨제 표준용액은 모두 1000 µg/mL 농도의 저장용액(stock solution)을 조제하여 4 °C에서 냉장 보관하였고, 필요시 적당한 농도로 희석하여 사용하였다. 이 때 이뇨제

표준물질의 회석 용매는 acetazolamide, benzthiazide의 경우 acetone을 사용하였고, amiloride, bendroflumethiazide, bumetanide, chlorthalidone, dichlorophenamide, ethacrynic acid, furosemide, hydrochlorothiazide의 경우에는 methanol을, spironolactone은 chlorform을, 그리고 triamtene에는 formic acid를 사용하였다. 또 내부표준물질인 ketoprofen은 500 µg/mL 농도로 methanol 용매에 녹여 사용하였다.

3. 이뇨제의 분석

모든 이뇨제 성분들은 GC/MS를 사용하여 분석하였으며, 분리관은 DB-1 (25 m × 180 µm × 0.11 µm), 운반기체는 He을 사용하였다. GC 분리는 기울기 용리법을 채택하였고, 분리관의 온도를 80 °C에서 300 °C까지 10 °C/min의 속도로 상승시킨 후 300 °C에서 10분간 유지하였다. 이 때 시료 주입구의 온도는 280 °C, 검출기의 온도는 300 °C를 유지하였고, 운반기체의 유속은 0.9 mL/min, 시료는 splitless mode 조건에서 주입하였다. 또 각 성분들의 정량분석 데이터는 HP G1701BA MS chemstation 프로그램 및 개인용 컴퓨터를 사용하여 수행하였다.

4. 경주마 혈액 응용 실험



몸무게 280 kg과 320 kg의 거세마 2두(제주 조랑말 12세 및 5세)를 선정하여 1차로 한독약품의 라식스정 10정(400 mg, furosemide)을 경구 투여하고, 유한양행의 빼콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)를 정맥주사로 투여하였다. 2차로 10일 경과 후에 한독약품의 라식스주사 40 mL(400 mg, furosemide)와 빼콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)를 정맥주사로 투여하였다. 또 3차로 10일 경과 후에 유한양행의 다이크로질정 10정 (250 mg, hydrochlorothiazide)을 경구 투여하고, 빼콤 C 50mL(400 mg, caffeine)를 정맥주사로 투여하였다. 다시 4차로 10일경과 후 유한사이나미드의 다이아막스정 10정 (2500 mg, acetazolamide, 경구투여)과 빼콤 C 50 mL (400 mg, caffeine, 정맥주사)을 투여하였으며, 마지막으로 10일 경과 후 실험마 2두에 빼콤 C 50 mL(400 mg, caffeine)를 정맥주사로 투여하였다. 이러한 경주마로부터 혈액 시료는 약물 투여 전, 10, 20, 30, 40분, 그리고 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24, 48, 72, 96, 120 시간의 간격으로 채취하고, 채취된 혈액 시료는 lithium heparin으로 처리하여 원심 분리한 후 혈장만을 분리하여 분석 전까지 -20 °C에서 냉동 보관하였다.

5. 이노제 약물의 유도체화

5.1 Methylation 유도체화

10 ppm 농도의 표준용액을 조제하여 15 mL test tube에 30 μ L 첨가한 후 60 $^{\circ}$ C 의 heating block에서 질소를 불어 넣어 용매를 증발시킨 다음 유도체화 반응 시약인 methyl iodide 30 μ L와 acetone 200 μ L, 그리고 potassium carbonate 100 mg을 첨가하여 60 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시켰다. methyl-D₃ 유도체화 역시 trideuterated methyl iodide를 사용하여 동일한 방법으로 반응시켰다.

5.2 Silylation 유도체화

10 ppm 농도의 표준용액을 조제하여 15 mL test tube에 30 μ L 첨가한 후 60 $^{\circ}$ C 의 heating block에서 질소를 불어 넣어 용매를 증발시킨 다음 유도체화 반응 시약인 MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) 50 μ L를 첨가하여 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다.

6. 혈장에서 이노제의 추출



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

6.1 액상 추출법

말의 혈액에서 이노제는 액상 추출법(liquid-liquid extraction)과 고체상 추출법으로 추출하여 상호 비교하였고, 액상 추출 과정은 다음과 같다. 먼저 혈액을 원심분리한 후 상층액인 혈장 3 mL를 15 mL test tube에 가하고, 내부표준물질인 ketoprofen을 15 μ L 첨가하였다. 여기에 pH를 조절하기 위하여 0.1 g의 phosphate buffer (pH 5 ; KH₂PO₄, pH 7 ; 1:1 KH₂PO₄/K₃PO₄, pH 9 ; K₂HPO₄, pH 11 ; 3:1 K₂HPO₄/K₃PO₄)를 넣고 anhydrous sodium sulfate 50 mg을 첨가하였다. 다시 tert-butyl methyl(TBM) ether 5 mL를 가하여 10분 동안 추출하고, 2500 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상층액(TBM ether층)을 60 $^{\circ}$ C heating block에서 질소를 불어넣어 증발시켰다.

6.2 고체상 추출법

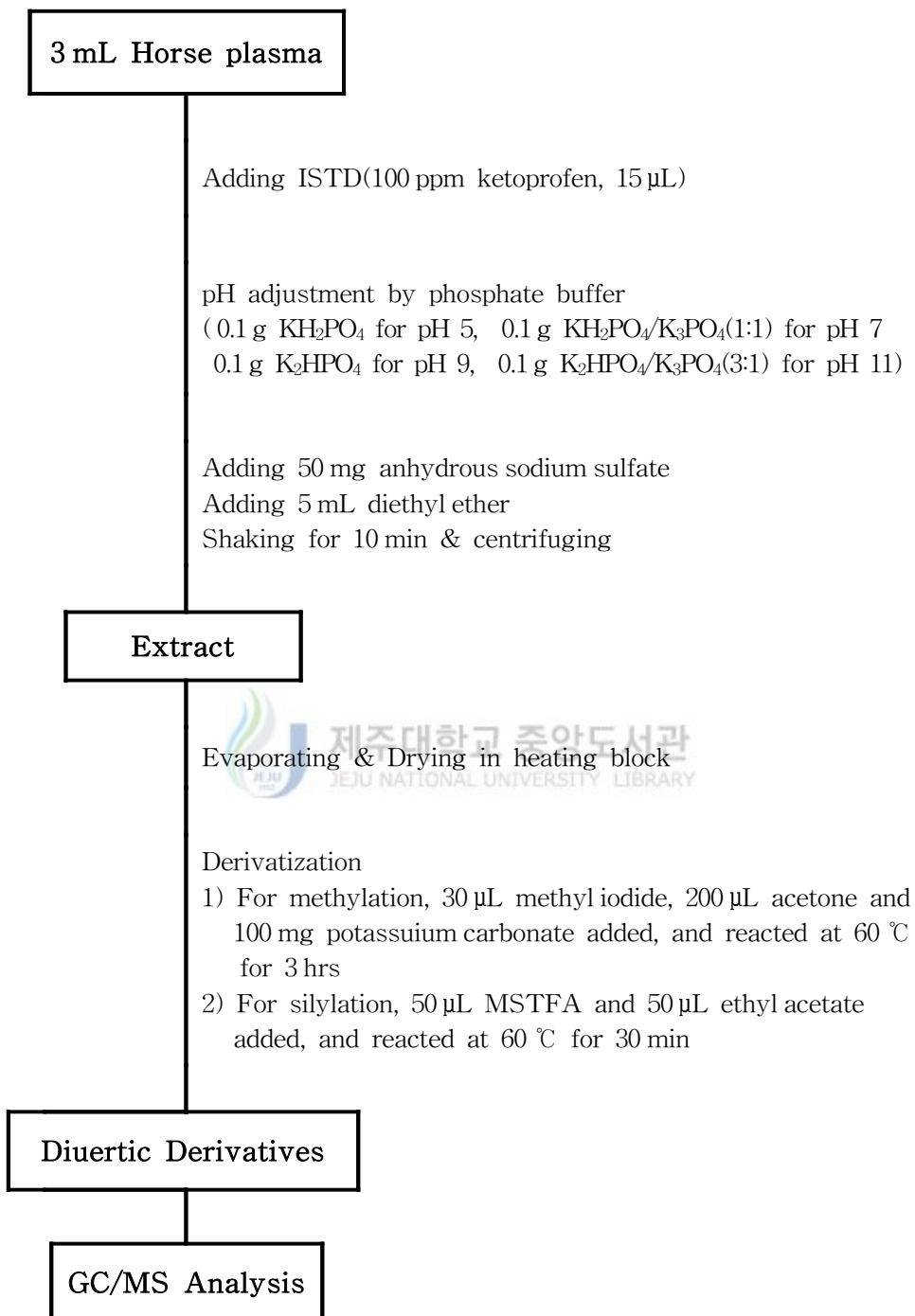
말의 혈액에서 고체상 추출법(solid-phase extraction)에 의한 이노제의 추출과정은 다음과 같다. 먼저 Sep-pak C₁₈ cartridge 컬럼을 vacuum manifold에 연결하여 methanol 5 mL(2회), 증류수 5 mL(2회)로 컬럼을 conditioning한 다음, 3 mL의 혈장 시료와 내부

표준물질 ketoprofen 15 μL 를 컬럼에 가하고 진공을 걸어준 상태에서 용리시켰다. 다시 증류수 5 mL와 n-hexane 1 mL로 컬럼을 세척하고, 추출용매인 diethyl ether 2 mL(3회)와 methanol 2 mL를 사용하여 이노제 성분들을 용출시켰다. 용출된 용액은 60 $^{\circ}\text{C}$ heating block에서 앞에서와 동일한 방법으로 용매를 증발시켰다.

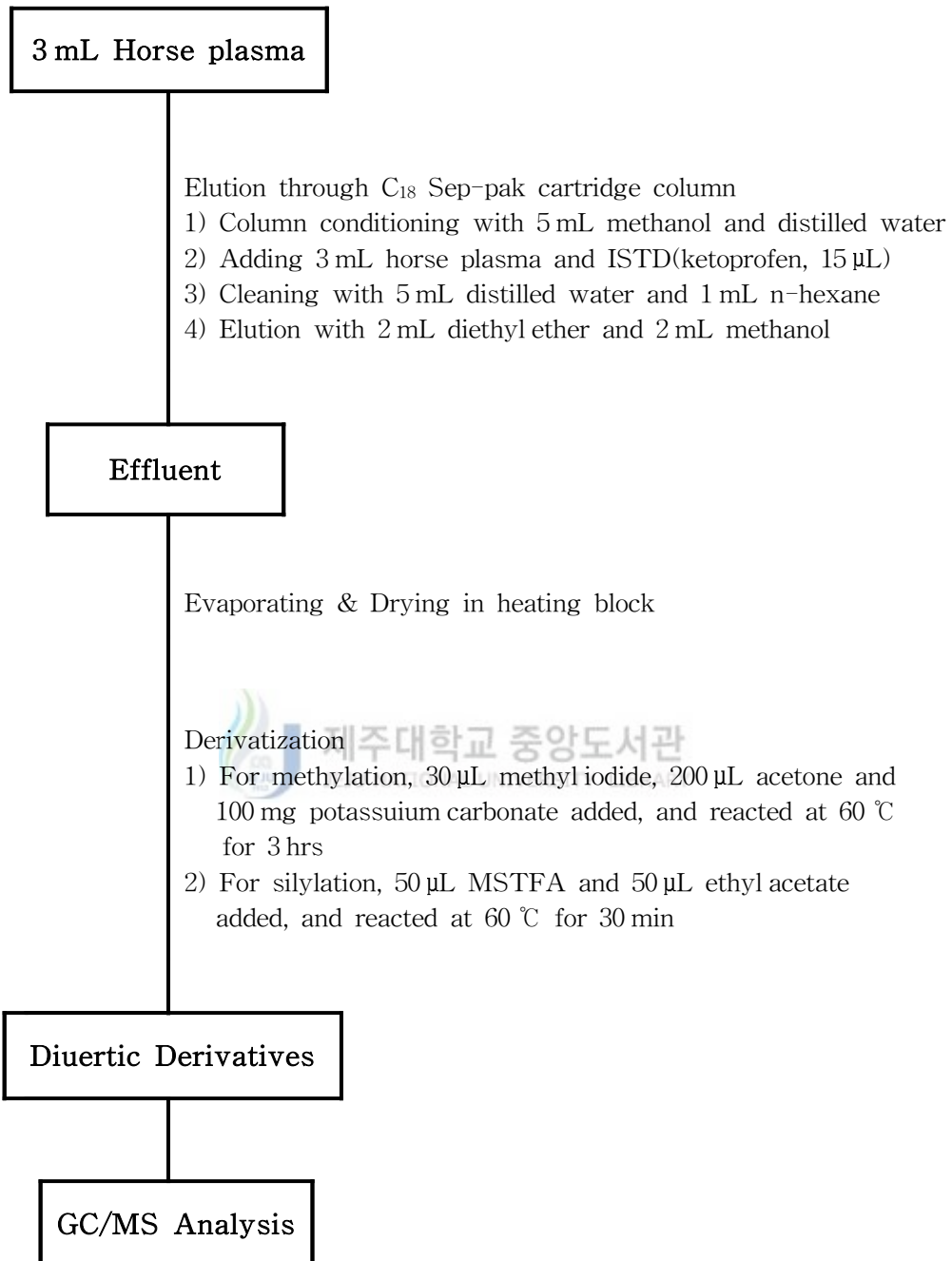
7. 회수율 측정

추출방법에 따른 이노제 약물의 회수율 측정은 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 이노제 표준물질의 농도가 각각 1, 2, 5, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 조제하여 50 μL 를 test tube에 취하고 유도체화 반응을 시킨 다음 앞에서와 동일한 방법으로 액상 및 고체상 추출과정을 거쳐 분석한 후 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선은 각 농도별로 3회 반복하여 실험한 결과를 이용하여 작성하였다. 이렇게 작성한 검정곡선을 이용하여 blank 혈장 3 mL에 이노제 표준물질을 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 spike한 시료를 이용하여 3회 반복실험 후 회수율을 측정하였다.





Scheme 1. The extraction procedure of diuretics from horse plasma by liquid-liquid extraction method.



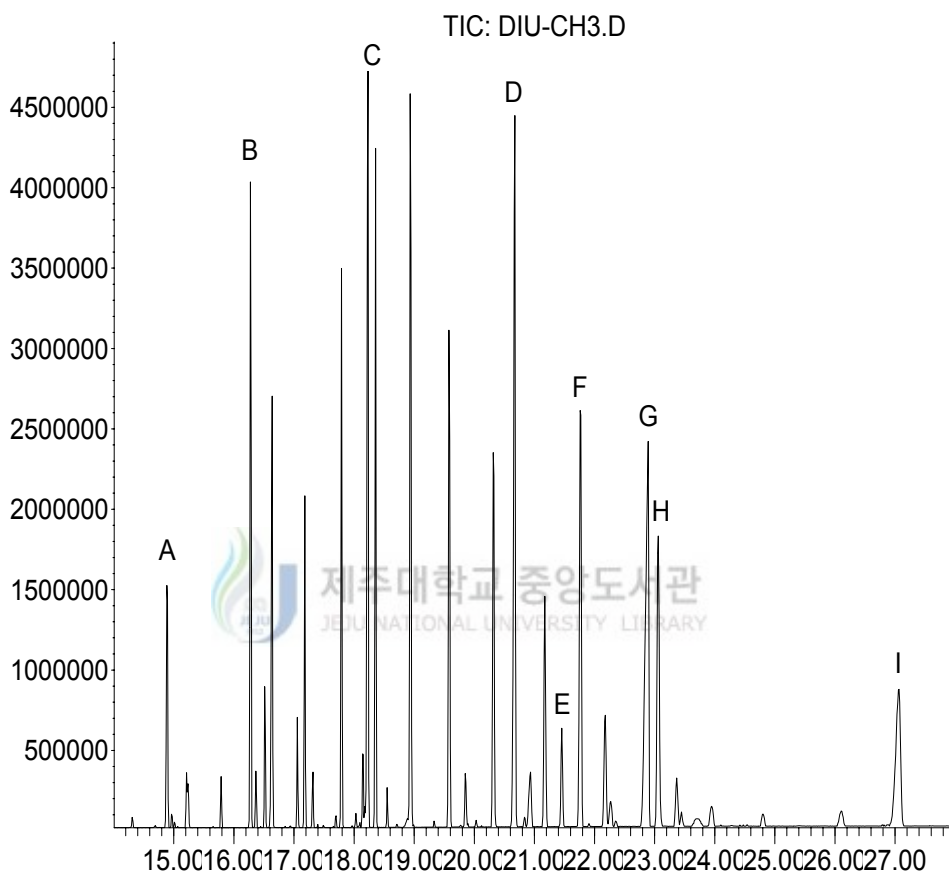
Scheme 2. The extraction procedure of diuretics from horse plasma by solid-phase extraction method.

III. 결과 및 고찰

1. 이뇨제의 유도체화 및 GC/MS 분석

이뇨제 약물의 경우 대부분 끓는점이 높고, carboxyl, amide, aminosulfonyl 등의 여러 극성기가 결합된 화합물들이기 때문에 GC에서 직접적인 분석이 어렵다. 이를 해결하기 위한 방법으로 유도체화 방법이 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 methyl 유도체화 및 silyl 유도체화 방법으로 각 이뇨제 성분들을 분석하였다. 유도체화 시약으로는 methyl iodide, trideuterated methyl iodide, N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)를 사용하였고, 대상 이뇨제 성분들을 methyl 유도체 및 silyl 유도체로 전환시킨 후 GC/MS를 이용하여 분석하였다. 이 때 trideuterated methyl iodide는 mass 이온 생성 여부를 추적하기 위한 목적으로 methyl-D₃ 유도체 반응에 이용하였다. 이러한 유도체화 반응을 거쳐 GC/MS 분석을 수행한 결과 acetazolamide, ethacrynic acid, dichlorophenamide, furosemide, chlorthalidone, bumetanide, hydrochlorothiazide, triamterene, bendroflumethiazide는 methyl 유도체 상태로 양호하게 분리, 검출이 가능하였으나 amiloride, benzthiazide, spironolactone는 분리에 어려움이 있었다. 또 이러한 화합물들의 methylation 상태를 질량스펙트럼으로 확인해 본 결과 triamterene의 경우는 6개의 methyl기가 결합되었고, dichlorophenamide, chlorthalidone, hydrochlorothiazide, bendroflumethiazide는 4개, bumetanide, furosemide, acetazolamide는 3개, 그리고 ethacrynic acid는 1개의 methyl기가 결합되었음을 알 수 있었다. 반면에 bumetanide, ethacrynic acid, furosemide 3 성분은 methyl 유도체화 방법에 비해 silyl 유도체화 방법으로 훨씬 양호한 분리, 검출이 가능하였고, 이 중 bumetanide, furosemide는 2개의 trimethylsilyl (TMS)가 결합했고, ethacrynic acid의 경우는 1개의 TMS기가 결합했음을 확인할 수 있었다. 이러한 방법으로 9종의 이뇨제에 대해 유도체화 과정을 거치고, GC/MS로 분석한 total ion chromatogram을 Figure 2와 Figure 3에 나타내었다. 또 이들 9종의 이뇨제에 대해 질량 스펙트럼을 얻어내고, methyl 및 methyl-D₃ 유도체 화합물들의 특성 질량이온 스펙트럼을 Table 1에, 그리고 silyl 유도체 화합물들의 특성 질량이온 스펙트럼을 Table 2에 수록하였다.

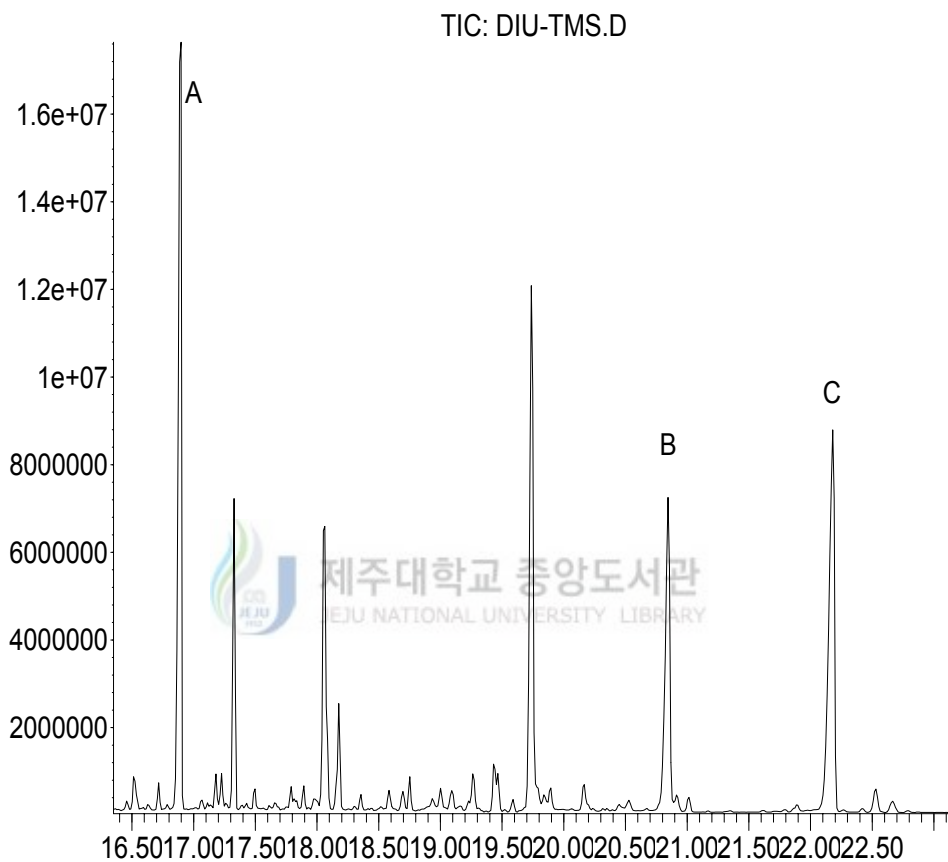
Abundance



Time-->

Figure 2. Total ion chromatogram of methylated diuretics derivatives (with each 100 ng injection volume). (A) Acetazolamide, (B) Ethacrynic acid, (C) Dichlorphenamide, (D) Furosemide, (E) Chlorthalidone, (F) Bumetanide, (G) Hydrochlorothiazide, (H) Triamterene, (I) Bendroflumethiazide.

Abundance



Time-->

Figure 3. Total ion chromatogram of trimethylsilylated diuretics derivatives (with each 100 ng injection volume). (A) Ethacrynic acid, (B) Furosemide, (C) Bumetanide.

Table 1. Characterization of mass ions for methyl and methyl-D₃ derivatives of diuretics.

Methylated Compound	RT	Characterisitic Ions (m/z)	Molecular Weight
Acetazolamide	CH ₃		
	CD ₃	14.89	249, 43, 83, 108, 264
Ethacrynic acid	CH ₃		264
	CD ₃	16.28	258, 43, 86, 114, 273
Dichlorphenamide	CH ₃		316
	CD ₃	18.23	261, 263, 243, 245, 316, 318
Furosemide	CH ₃		319
	CD ₃	20.68	264, 266, 243, 245, 319, 321
Chlorthalidone	CH ₃		360
	CD ₃	21.46	44, 108, 144, 253, 255, 360, 362
Bumetanide	CH ₃		372
	CD ₃	21.77	50, 114, 144, 260, 262, 372, 374
Hydrochlorthiazide	CH ₃		372
	CD ₃	22.89	81, 53, 96, 381, 383
Triamterene	CH ₃		381
	CD ₃	23.06	81, 53, 96, 381, 383
Bendroflumethiazide	CH ₃		394
	CD ₃	27.07	176, 255, 257, 287, 289, 363, 365
	CH ₃		406
	CD ₃	21.77	182, 258, 260, 294, 296, 372, 374
	CH ₃		406
	CD ₃	21.77	254, 318, 363, 406
	CH ₃		415
	CD ₃	22.89	257, 321, 372, 415
	CH ₃		353
	CD ₃	22.89	310, 218, 220, 288, 290, 312, 353, 357
	CH ₃		365
	CD ₃	23.06	319, 221, 223, 300, 302, 321, 365, 367
	CH ₃		337
	CD ₃	23.06	336, 279, 294, 307, 322, 337
	CH ₃		355
	CD ₃	27.07	355, 289, 307, 323, 337, 354
	CH ₃		477
	CD ₃	27.07	386, 42, 91, 278
	CH ₃		489
	CD ₃	27.07	398, 45, 91, 284

Table 2. Characterization of mass ions for silyl derivatives of diuretics.

Trimethylsilylated Compound	RT	Characteristic Ions (m/z)	Molecular Weight
Ethacrynic acid	16.89	375, 339, 319, 243, 73	375
Furosemide	20.85	493, 465, 303, 73	474
Bumetanide	22.19	508, 493, 465, 303, 73	508

2. 이노제 유도체화합물의 질량스펙트럼

총 12개의 이노제 중 methylation 유도체화 반응을 거친 acetazolamide, ethacrynic acid, dichlorophenamide, furosemide, chlorthalidone, bumetanide, hydrochlorothiazide, bendroflumethiazide, triamterene의 9종에 대해 GC/MS 분석을 수행하였다. 그리고 이들 각각의 질량 스펙트럼을 Figure 4 ~ Figure 12에 나타내었으며, 각 질량 스펙트럼의 판독 결과를 다음과 같이 요약하였다. 또한 methyl 유도체화 방법에 비해 silyl 유도체화 방법으로 훨씬 양호한 분리, 검출이 가능했던 bumetanide, ethacrynic acid, furosemide 세 성분의 질량 스펙트럼을 Figure 13에 나타내었다.

1) Acetazolamide

Acetazolamide methylation 유도체의 질량스펙트럼을 보면 3개의 methyl기와 결합한 acetazolamide의 m/z 249 이온은 분자이온 m/z 264에서 methyl 라디칼이 떨어져서 생성되었기 때문에 methyl-D₃(CD₃)와 결합한 경우는 m/z 258(+9)이 나타나고, m/z 108 이온은 분자이온에서 sulfonamide 양이온이 떨어져서 생성되어, CD₃와 결합한 경우는 m/z 114(+6) 이온 피크가 나타난다. m/z 43은 CH₃CO⁺ 이온이기 때문에 CD₃와 결합한 스펙트럼에서도 m/z 43이 나타난다.

2) Ethacrynic acid

Ethacrynic acid methylation 유도체의 분자이온은 m/z 316에서 나타나고 있고, ³⁷Cl 에 기인한 동위원소 피크(m/z 318)가 비교적 크게 나타나고 있다. 또 다른 특성 이온들에서도 이러한 동위원소에 기인한 +2 이온이 일정 비율로 나타나고 있다. 또한 m/z 261 이온은 분자이온에서 butenyl 라디칼(-57)이 떨어져나가 생성된 이온이고, m/z 261, 263 이온이 나타나는 것으로 보아 Cl 원자가 결합되어 있음을 알 수 있다. 또한 trideuterated methyl iodide를 사용하여 methylation시킨 유도체화합물의 질량 스펙트럼을 보면 CD₃와 결합한 경우는 m/z 264, 266 이온이 나타난다. m/z 243은 라디칼 CH₃CO₂CH₃가 떨어져 생성된 것을 알 수 있고, CD₃와 결합한 경우도 CD₃가 떨어져 나가기 때문에 동일한 m/z 243 이온이 나타나고, ³⁷Cl 동위원소 때문에 245 이온이 나타난다.

3) Dichlorphenamide

4개의 methyl, methyl-D₃기가 결합된 dichlorphenamide는 m/z 360과 m/z 362 분자 이온을 갖는다. CH₃NCH₂(-CH₃-N=CH₂)기가 떨어지고, sulfonyl(-SO₂)가 떨어져 m/z 253이온을 형성하고 동위원소 ³⁷Cl 때문에 255 이온을 형성한다. CD₃와 결합한 경우는 CD₃NCD₂기가 떨어지고, sulfonyl기가 떨어져 m/z 260, 262 이온을 형성한다. Base 이온인 m/z 44는 dimethylamine 양이온((CH₃)₂N⁺)이고, CD₃와 결합한 경우는 m/z 50 이온을 형성한다. 분자이온에서 sulfonamide(O₂S=N(CH₃)₂) 양이온이 떨어져 m/z 108 이온을 형성하고 CD₃와 결합한 경우는 m/z 114 이온을 형성한다.

4) Furosemide

3개의 methyl, methyl-D₃와 유도체화된 furosemide는 분자이온 m/z 372, 381의 약한 피크를 나타낸다. 동위원소 ³⁷Cl 때문에 m/z 374, 383 이온이 스펙트럼에서 관찰되며, 주요 이온인 m/z 81은 C₅H₅O⁺ 이온에 의해 생성된다. m/z 53 이온은 carbonyl CO가 떨어져서 C₄H₅⁺이온에 의해 생성되고, m/z 96은 benzene 링의 쪼개짐에 의해 생성된다.⁷⁾



5) Chlorthalidone

Chlorthalidone의 경우 분자이온인 m/z 393, 406 이온은 발견되지 않았다. methoxy 라디칼인 CH₃O·가 떨어져서 m/z 363 이온을 형성하고, 동위원소인 CD₃와 결합한 경우는 m/z 372 이온을 형성한다. sulfonamide 라디칼(SO₂N(CH₃)₂·)이 떨어져서 m/z 255 (CD₃와 결합한 경우는 m/z 258 생성) 이온이 생성되고, CH₃NCH₂이 떨어지고 Hydrogen rearrangement에 의해 m/z 351이 생성되고, 이 이온에서 SO₂가 떨어져 m/z 287을 형성한다. m/z 176은 벤젠 링 5번 위치에서 떨어져 생성되고, CD₃와 결합한 경우는 m/z 182를 형성한다.

6) Bumetanide

3개의 methyl기와 결합한 bumetanide는 분자이온(M⁺) m/z 406이 스펙트럼에서 주요 피크를 형성한다. 분자이온에서 propyl 라디칼이 방출되어 m/z 363(CD₃와 결합한 경우는 m/z 372)이온이 생성되고, (CH₃)₂NH가 떨어져 m/z 318이온을 형성한다. 이

이온에서 SO_2 를 잃어서 m/z 254이온이 형성된다. 분자이온에서 $\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 이 떨어져서 m/z 298이 생성되고, CD_3 와 결합한 경우는 m/z 301 이온을 형성한다.

7) Hydrochlorothiazide

Hydrochlorothiazide는 분자이온 m/z 353(CD_3 와 결합한 경우는 m/z 367)이 스펙트럼에서 주요 피크를 구성한다. CH_3NCH_2 를 잃어서 m/z 310 이온을 형성하고, 동위원소 ^{37}Cl 때문에 m/z 312 이온을 포함한다. CD_3 와 결합한 경우 CD_3NCH_2 를 잃어서 m/z 319 이온을 형성한다. m/z 288은 $[\text{M}-1]^+$ 이온에서 SO_2 를 잃어 형성되었다. 또한 CD_3 와 결합한 형태에서는 m/z 300과 동위원소 ^{37}Cl 때문에 m/z 302 이온을 형성한다.

8) Bendroflumethiazide

Bendorflumethiazide는 mass 스펙트럼에서 분자이온이 주요 피크를 구성하는 hydrochlorothiazide와 유사한 구조를 갖고 있지만, 분자이온인 m/z 477(동위원소 CD_3 와 결합한 경우 m/z 489)은 구할수 없었다. benzyl 라디칼이 떨어져 m/z 386 이온을 형성하고, 동위원소인 CD_3 와 결합한 경우 m/z 는 398이온을 형성한다. benzyl 양이온은 m/z 91을 형성하고, m/z 278 이온은 m/z 386이온에서 $(\text{CH}_3)_2\text{NSO}_2$ 라디칼이 떨어져서 생성된 이온이다. CD_3 와 결합한 형태에서는 m/z 284이온을 구성한다.

9) Triamterene

6개의 methyl기가 결합한 triamterene은 m/z 337 이온과 $[\text{M}-1]^+$ 이온 m/z 336 이온을 형성하고, CD_3 와 결합한 경우 m/z 는 355이온을 형성한다. 분자이온에서 methyl 라디칼이 떨어져 m/z 322, m/z 307, 그리고 m/z 292 이온을 형성하고, CD_3 와 결합한 경우도 같은 이온 피크를 형성한다.

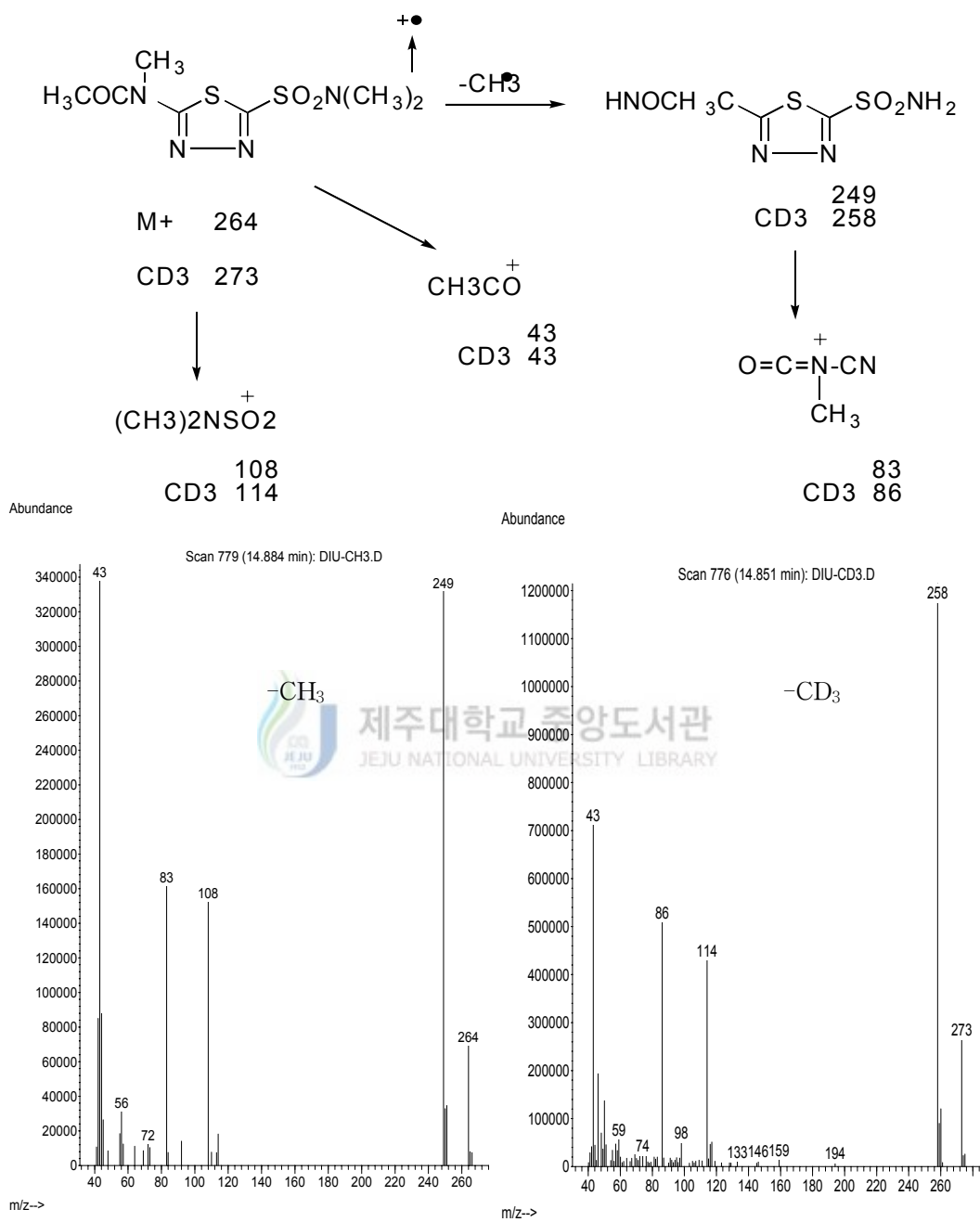


Figure 4. Mass spectra of acetazolamide derivative.

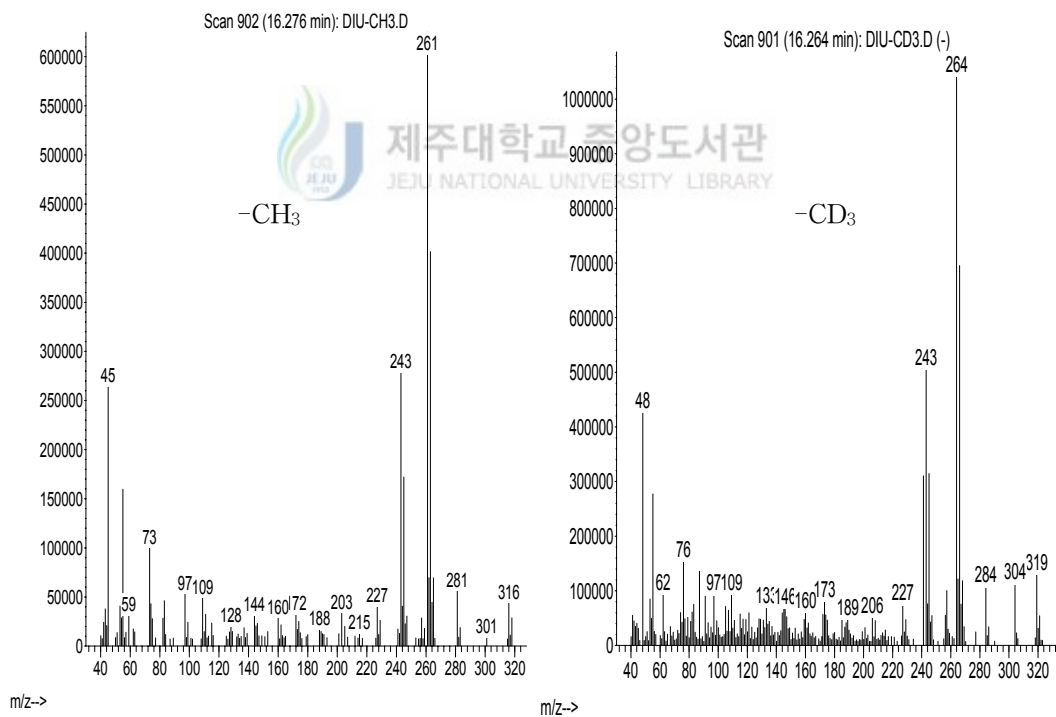
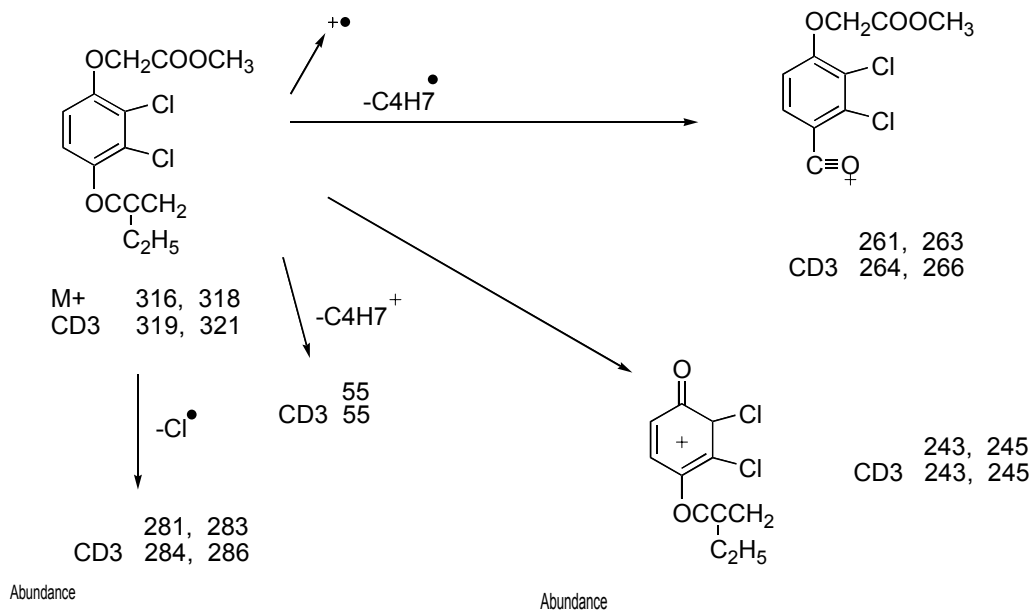


Figure 5. Mass spectra of ethacrynic acid derivative.

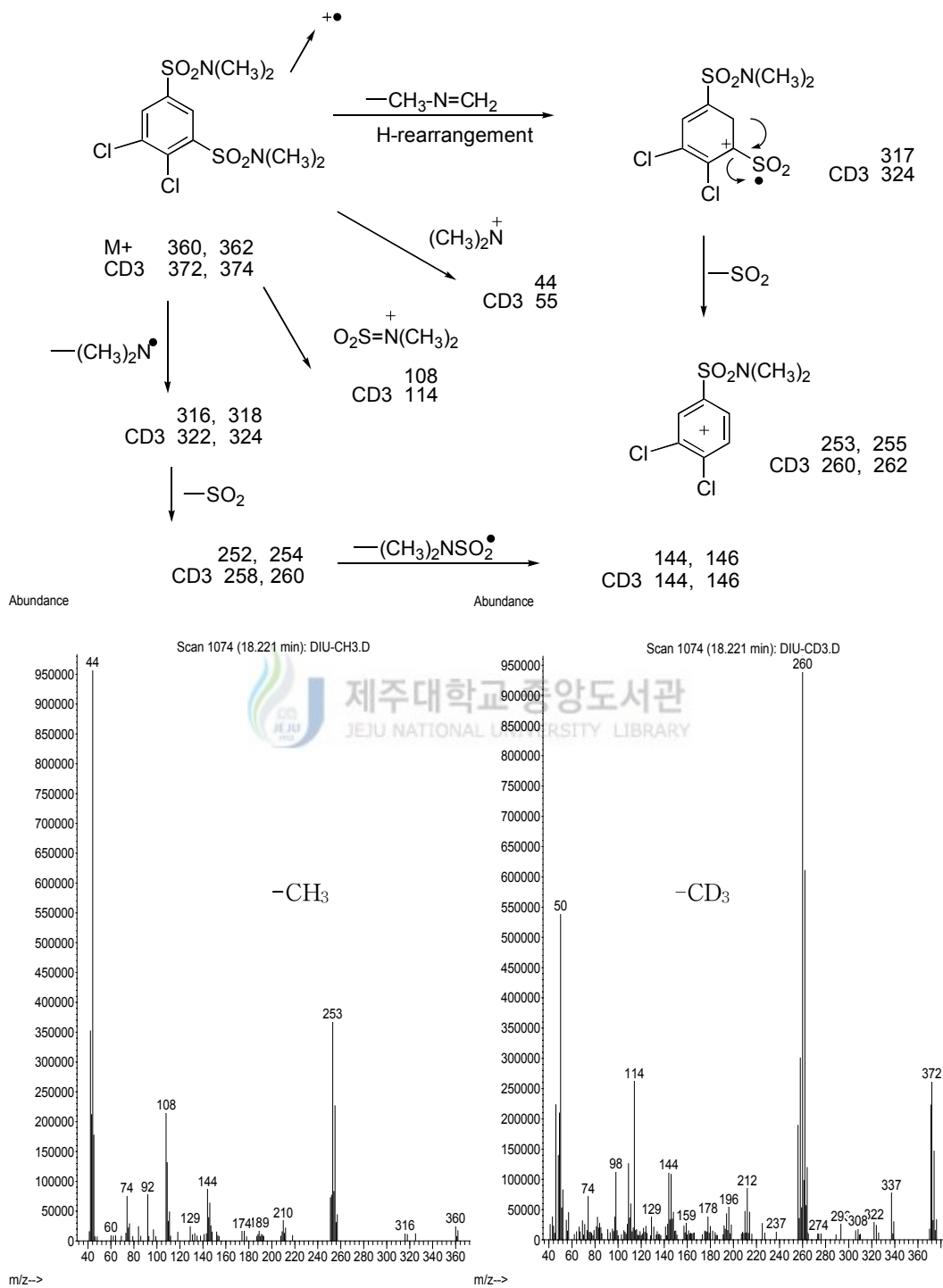


Figure 6. Mass spectra of dichlorophenamide derivative.

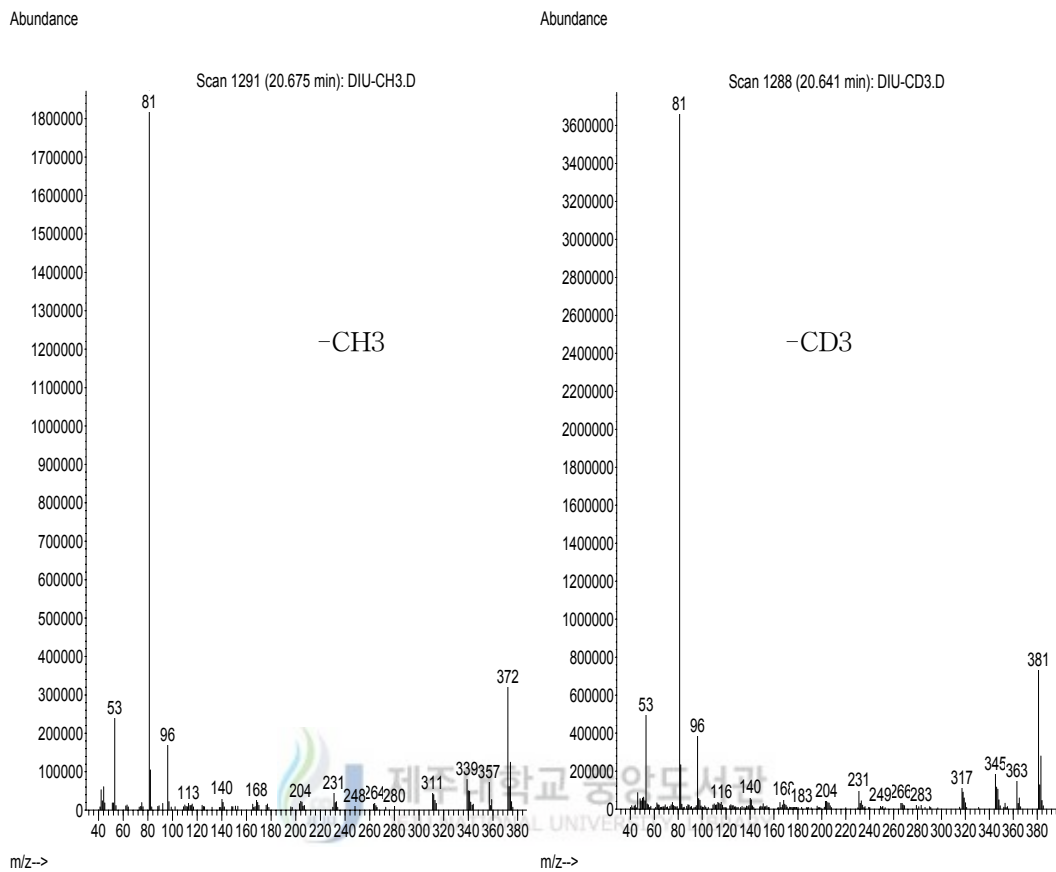


Figure 7. Mass spectra of furosemide derivative.

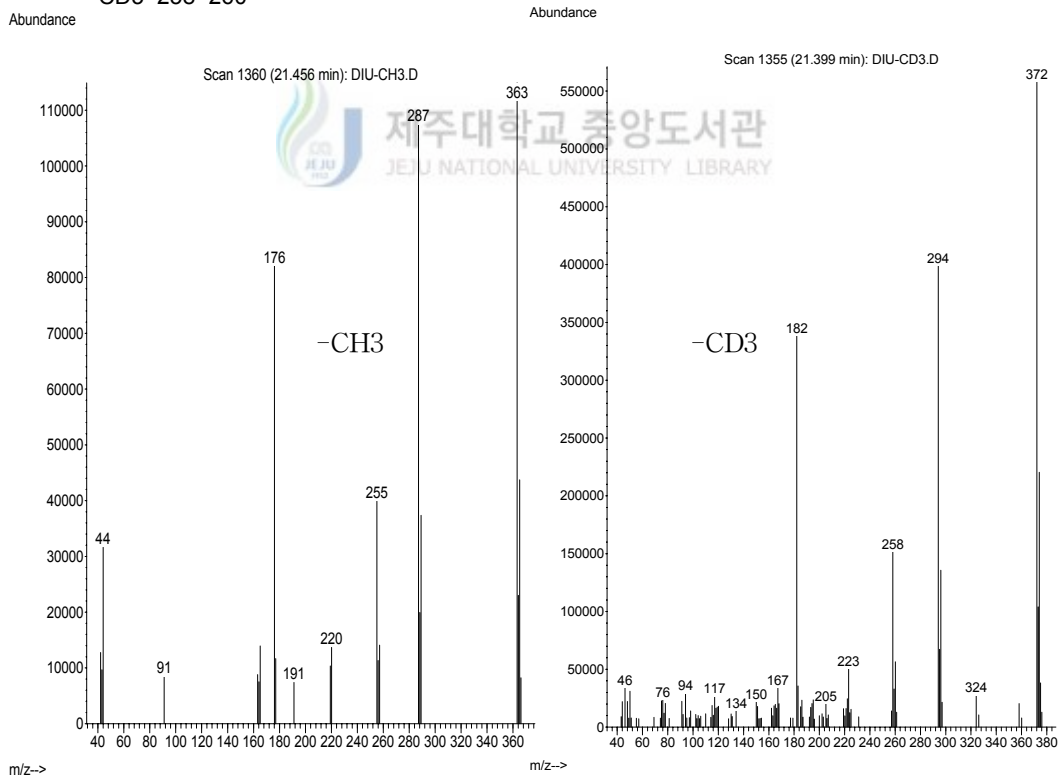
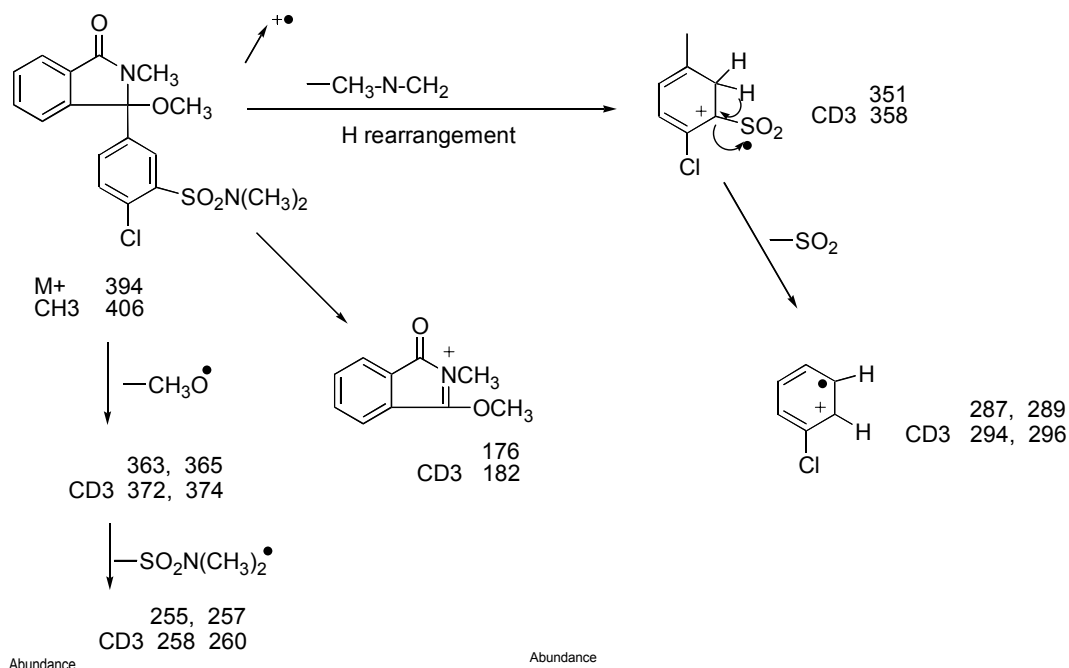


Figure 8. Mass spectra of chlorthalidone derivative.

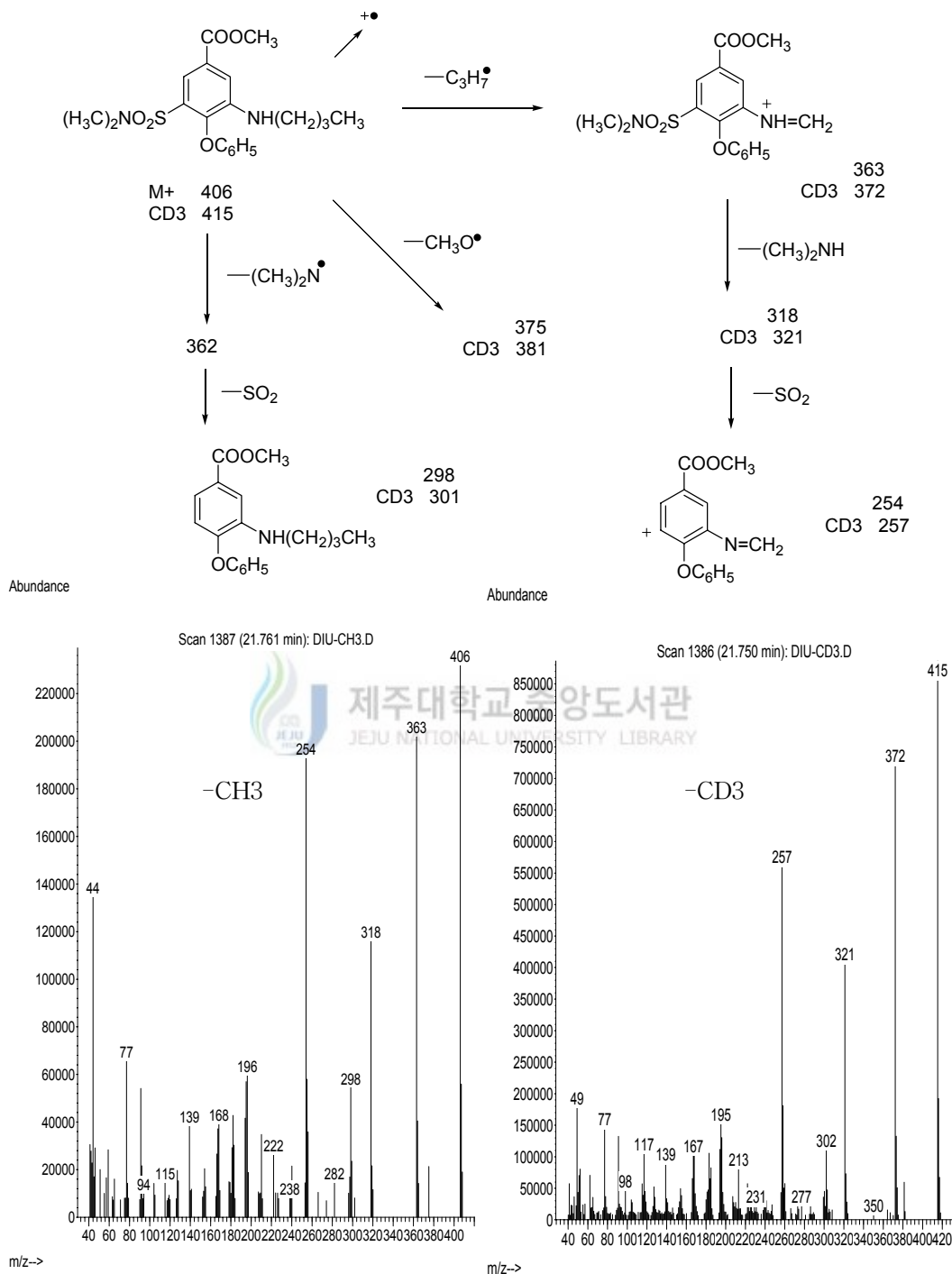


Figure 9. Mass spectra of bumetanide derivative.

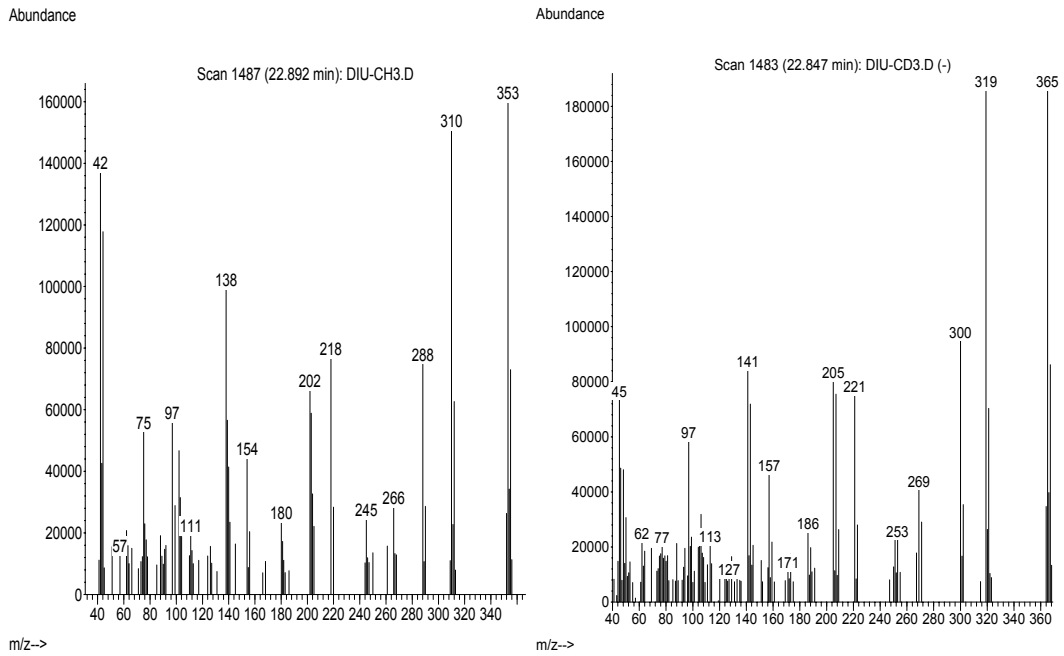


Figure 10. Mass spectra of hydrochlorothiazide derivative.

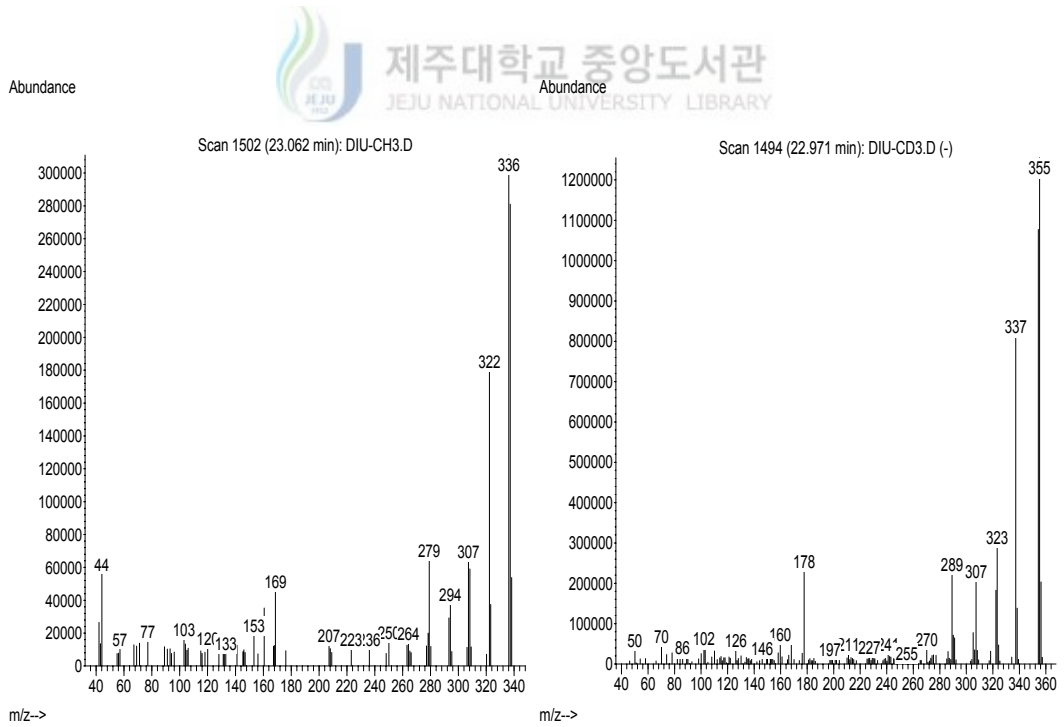


Figure 11. Mass spectra of triamterene derivative.

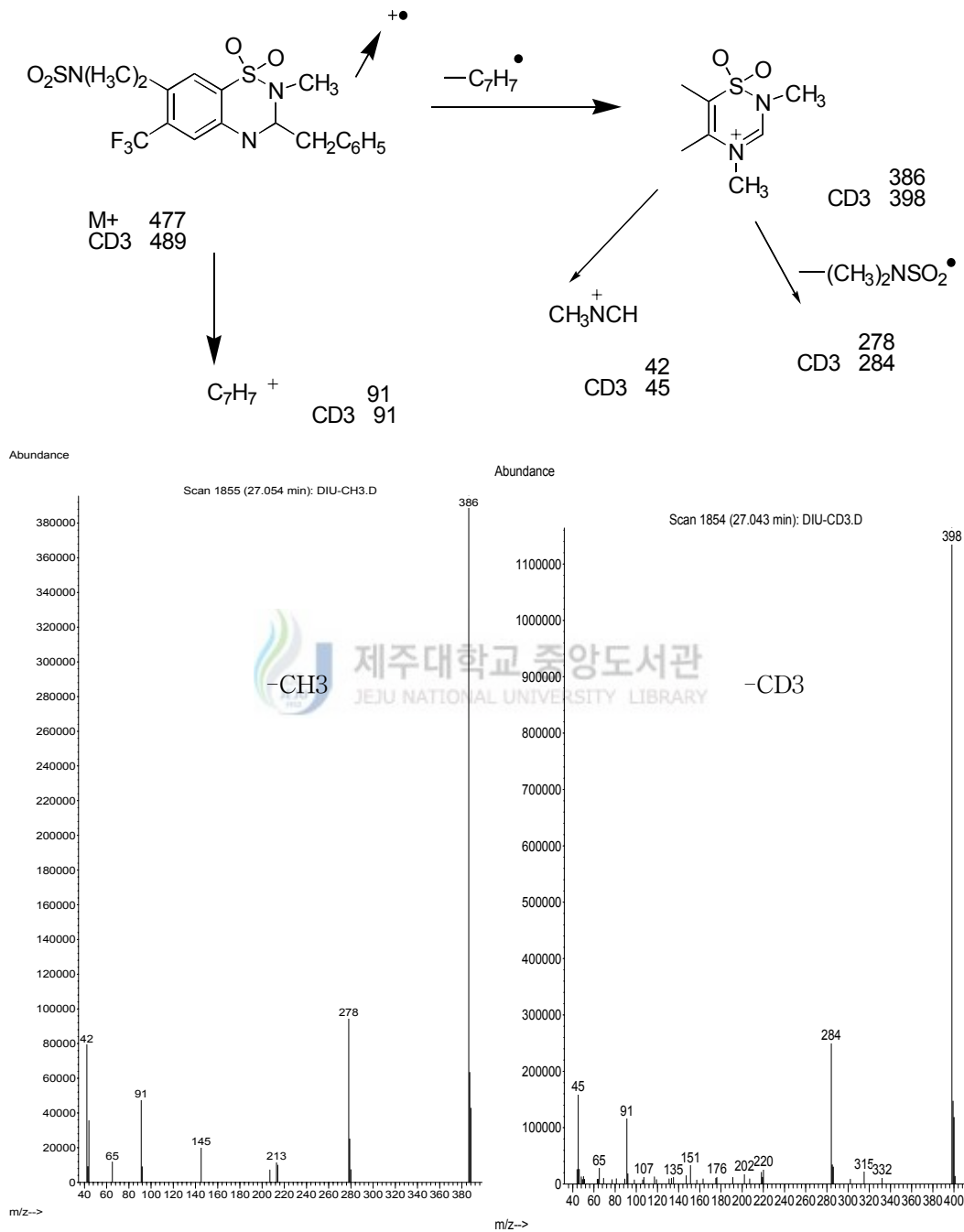
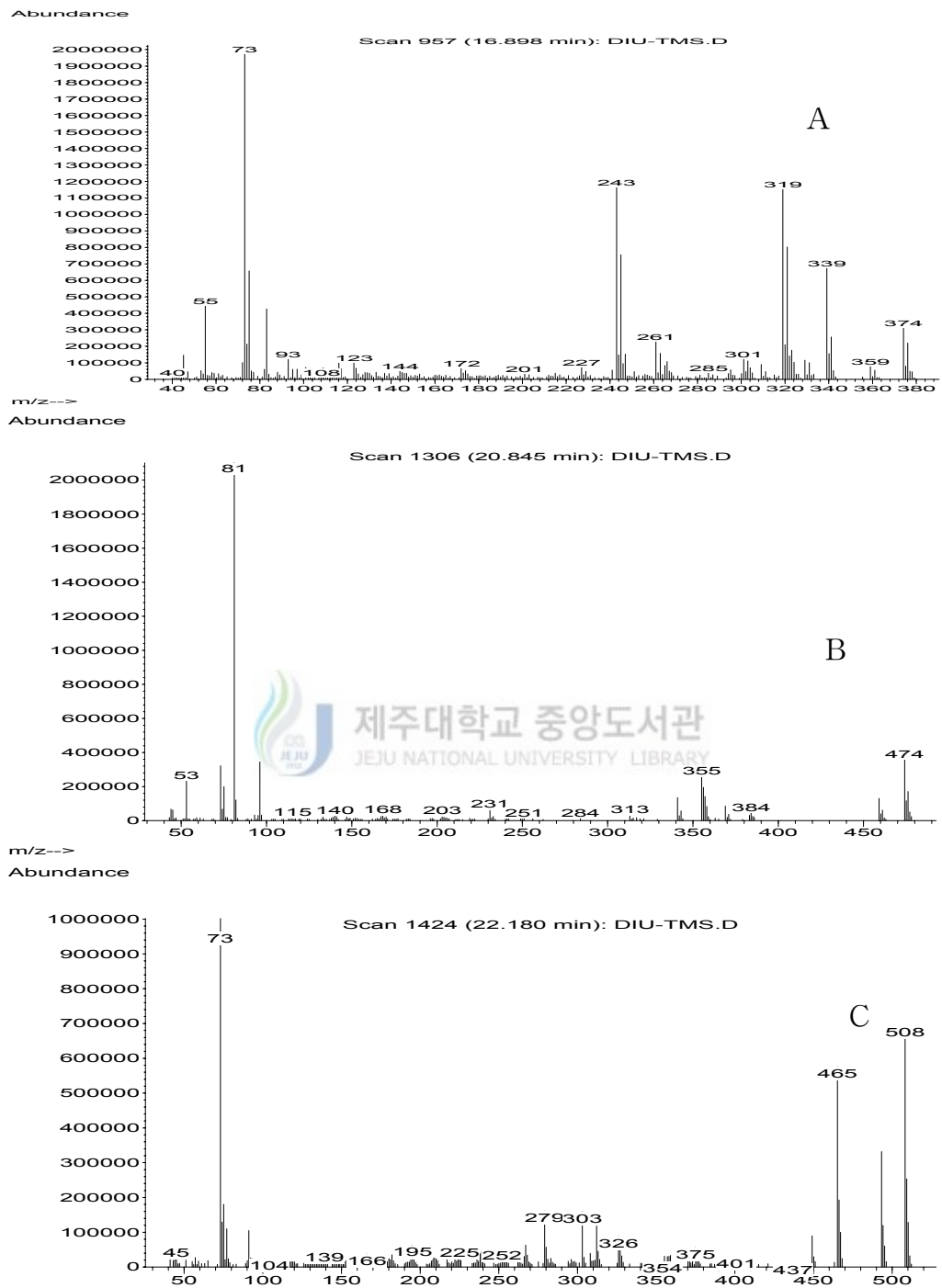


Figure 12. Mass spectra of bendroflumethiazide derivative.



3. 추출방법에 따른 회수율 비교

일반적으로 이뇨제 유도체의 추출 방법에는 액상 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)과 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE)이 주로 이용되고 있다. 본 연구에서도 이러한 두 가지 추출법을 동시에 적용하여 추출법에 따른 회수율을 비교하였다. 액상 추출을 위한 추출 용매로는 끓는점이 낮고 추출했을 때 방해 피크가 적게 나타나는 tert-butylmethyl ether를 사용하였다. 또 고체상 추출에서는 Sep-pak C₁₈ 카트리지와 diethyl ether 및 methanol 용매를 사용하여 추출하였다. 회수율 측정은 혈장 3 mL에 각 이뇨제 약물 0.5 µg/mL를 spike하고, 이를 상기의 방법으로 추출하였으며, 모두 3회 반복(n=3)하여 실험한 결과이다. 이들 두 가지 방법을 적용한 회수율 측정 결과를 Table 4에 비교하였다. 결과에서 보는 바와 같이 추출방법에 따른 회수율은 액상 추출법이 28.6 ~ 89.4%의 범위를 나타내었고, 고체상 추출법에서는 45.0 ~ 89.7%의 범위로 비교적 높은 회수율을 나타내었다. 대체적으로 액상 추출법보다는 고체상 추출법이 높은 회수율을 나타내었고, 액상 추출법에서는 pH에 따라 다소의 차이를 보였다. 즉, bumetanide, bendroflumethiazide, furosemide, hydrochlorothiazide, dichlorphenamide, ethacrynic acid 등은 pH 5의 산성 조건에서 높은 회수율을 보인 반면 나머지 chlorthalidone, acetazolamide, triamterene의 이뇨제는 오히려 pH 7의 조건에서 더 높은 회수율을 나타내었고, pH 7인 상태에서 추출하는 것이 바람직한 것으로 조사되었다. 하지만 triamterene은 두 방법 모두에서 비교적 낮은 회수율을 보이고 있는데, 이러한 원인은 이 성분이 물에 높은 용해도를 나타내기 때문인 것으로 추정된다

Table 3. The results of recovery test for 9 diuretics. (The diuretics were extracted from 3 mL plasma spiked with each 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by liquid-liquid extraction and solid-phase extraction methods)

Drug	SPE (%)		LLE (%)							
			pH 5		pH 7		pH 9		pH 11	
	Ave	RSD	Ave	RSD	Ave	RSD	Ave	RSD	Ave	RSD
Acetazolamide	66.1	2.7	59.2	13.4	64.4	8.2	47.5	7.4	17.5	6.7
Ethacrynic acid	65.6	6.3	62.2	8.5	53.1	11.1	42.5	11.1	-	-
Dichlorphenamide	85.3	9.7	72.8	7.3	70.6	10.9	73.3	5.6	44.4	9.3
Furosemide	68.6	8.6	84.4	11.2	70.3	3.4	18.1	6.5	-	-
Chlorthalidone	78.3	9.8	61.9	10.5	63.9	10.1	61.1	2.9	32.2	7.3
Bumetanide	71.4	5.8	87.8	6.7	86.9	8.1	41.7	9.9	-	-
Hydrochlorothiazide	64.2	9.2	81.5	9.4	72.5	11.4	64.2	9.2	-	-
Triamterene	45.0	11.8	28.6	8.2	40.3	8.8	43.1	4.1	43.9	8.1
Bendroflumethiazide	89.7	6.6	85.6	3.4	89.2	5.3	89.4	4.0	68.3	12.0

4. 경주마 혈액에의 응용 실험

본 연구에서 수행한 이뇨제 성분들의 분리, 검출 방법을 실제 경주마에 적용하는 것이 가능한지 여부를 확인하기 위하여 응용 실험을 실시하였다. 이를 위해 2 두의 제주마에 3종의 이뇨제와 카페인을 직접 투여하여 앞에서와 동일한 방법으로 추출과정을 거친 후 검출 정도를 비교하였다. 제주마(제주 조랑말 12세 및 5세)는 몸무게 280 kg과 320 kg의 거세마이며, 적용 실험은 앞에서 기술한 실험 방법에서와 같이 1차로 한독약품의 라식스정 10정을 경구 투여하고, 유한양행의 빼콤 C를 정맥주사로 투여하였다. 2차로 10일 경과 후에 한독약품의 라식스주사와 빼콤 C를 정맥주사로 투여하였다. 또 3차로 10일 경과 후에 유한양행의 다이크로질정을 경구 투여하고, 빼콤 C를 정맥주사로 투여하였다. 다시 4차로 10일 경과 후 유한사이나미드의 다이아막스정과 빼콤 C를 투여하였으며, 마지막으로 10일 경과 후 실험마 2 두에 빼콤 C를 정맥주사로

투여하였다. 이러한 경주마로부터 혈액 시료는 약물 투여 전, 10, 20, 30, 40 분, 그리고 1, 2, 3, 4, 6, 10, 24, 48, 72, 96, 120 시간의 간격으로 채취하였다. 채취된 혈액시료는 lithium heparin으로 처리하여 원심 분리한 후 혈장만을 분리하여 GC/MS로 분석하고, 그 결과로부터 응용 가능성을 확인하였다.

4.1 표준검정곡선 작성

응용 실험에서 사용한 대상 약물은 furosemide, hydrochlorothiazide, acetazolamide 3 종이며, 검정범위는 약물 투여 후 제주마의 혈장에서 검출되는 농도에 따라 결정하였다. 따라서 본 실험은 마필에 약물 투여 후 최고의 농도로 판단되는 1일째 시료까지를 미리 예비 실험한 후 농도 범위를 0 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 결정하였고, 대상 표준약물로 검정용 표준시약을 제조하였다. 추출방법은 비교적 높은 회수율을 나타내었던 pH 5의 조건에서 액상 추출법을 채택하였다. 이 때 내부표준물질은 bendroflumethiazide를 사용하였고, 혈장에서의 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 조절하여 표준검정곡선(standard calibration curve)을 작성하였다. 이러한 방법으로 furosemide, hydrochlorothiazide, acetazolamide의 세 가지 성분에 대해 분석하고, GC/MS의 분석 조건과 표준검정 결과를 요약하여 Table 4에 수록하였다.

Table 4. GC/MS conditions and regression results of standard calibration curve for quantitative analysis of diuretics.

Diuretics	Retention Time	Ion Mass	Y(10 ⁴)=mX		Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
			m	r ²	
Furosemide	20.68	372	0.583	0.992	0.1, 0.5, 1, 5, 10
Hydrochlorothiazide	22.89	353	0.259	0.981	0.1, 0.5, 1, 5, 10
Acetazolamide	14.89	249	1.089	0.987	0.1, 0.5, 1, 5, 10

4.2 경주마 혈액 중의 furosemide 검출

Figure 14와 Figure 15에서 보는 바와 같이 furosemide 성분이 함유된 한독약품의 라식스정 10정(400 mg)을 경구투여하고, 또 caffeine 성분이 함유된 유한양행의 빼콤 C 50 mL(400 mg)을 정맥 주사한 제주마의 혈액에서 furosemide는 개체에 따라 투여 후 10분과 30분에 채혈한 시료에서 최초 검출되어 30 ~ 50분에 채혈한 시료에서 최고 농도 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 나타내었고, 최고 10시간까지 검출되었다.

또한 한독약품의 라식스주사 40 mL(400 mg)를 정맥주사하고, 빼콤 C 50 mL(400 mg)를 정맥주사로 투여한 경우 제주마 혈액에서 furosemide는 투여 후 10분에서 채혈한 시료에서 최고 농도인 7.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 나타내었고, 3시간까지 검출되었다.

정맥주사한 경우 경구투여보다 혈장에서 높은 농도를 보여주지만 혈장 중에서 상대적으로 급격한 기울기를 갖기 때문에 투여 후 3시간이 경과하면 혈액에서 furosemide를 검출하는데는 어려움이 있었다.



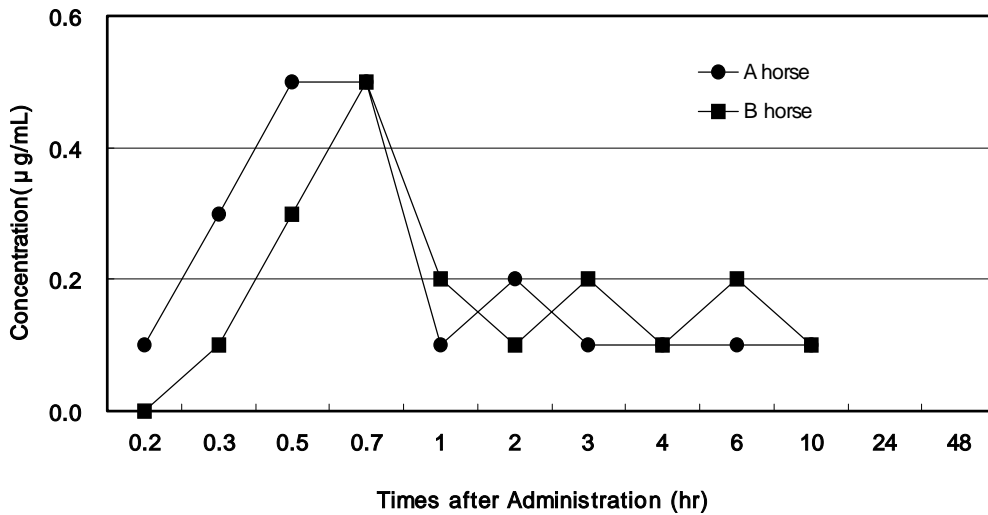


Figure 14. Excretion profile of furosemide(oral dosing) in horse plasma.

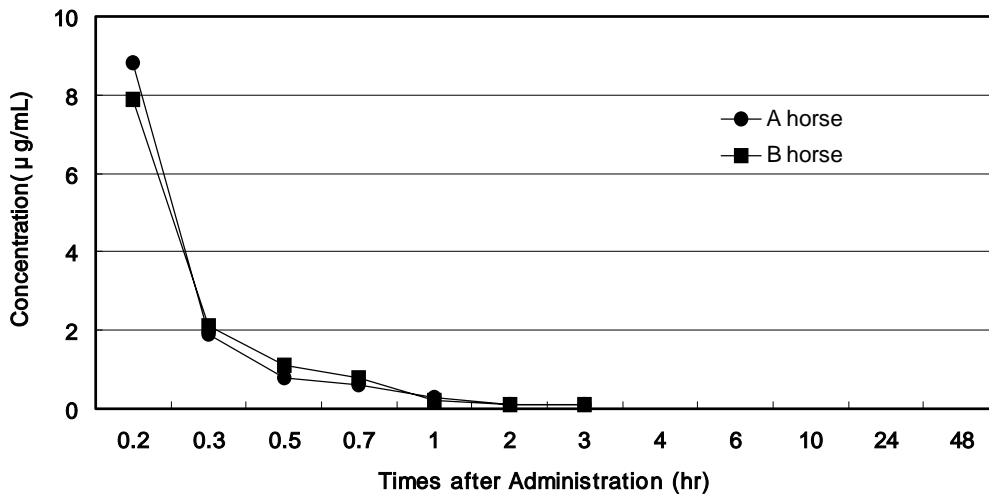


Figure 15. Excretion profile of furosemide(intra venous) in horse plasma.

4.3 경주마 혈액 중의 hydrochlorothiazide 검출

Hydrochlorothiazide를 함유한 유한양행의 다이크로질정 10정(250 mg)을 경구투여 하고, caffeine을 함유한 뼈곰 C 50 mL(400 mg)를 정맥주사하여 투여한 경우 제주마의 혈액에서는 투여 후 10분에서 채혈한 혈액에서 최초 각각 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타냈고, 투여 후 30분에 채혈한 시료에서 최고 농도 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 와 0.9 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타내었으며, 최고 24시간까지 검출되었다. Figure 16의 결과에서처럼 hydrochlorothiazide는 경구투여 후 빠른 시간에 혈액으로 흡수되어 시간경과에 따라 큰 농도 변화 없이 서서히 감소함을 알 수 있다. 참고로 Stevenson 등이 연구한 결과를 보면 125 mg의 hydrochlorothiazide를 정맥투여 했을 때 혈액 중에서는 최대 3시간까지 검출이 되는 것으로 조사되고 있다.³²⁾

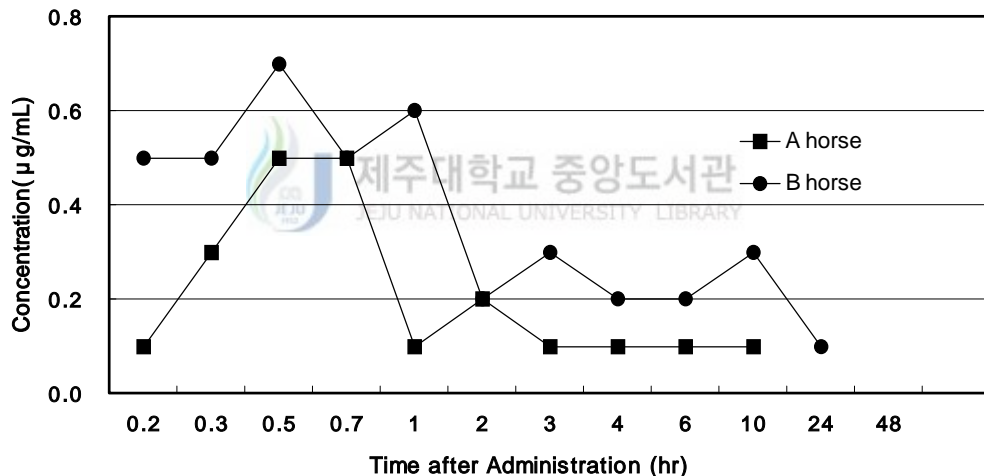


Figure 16. Excretion profile of hydrochlorothiazide(oral dosing) in horse plasma.

4.4 경주마 혈액 중의 acetazolamide 검출

Acetazolamide를 함유한 유한사이나미드 다이아막스정 10정(2500 mg)을 경구투여 하고, 뼈곰C 50 mL (400mg, caffeine)를 정맥투여한 경우 제주마의 혈액에서는 투여 후 30분에 채취한 시료에서 최초에 각각 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 검출되었으며, 2시간 후에 채혈한 시료에서 최고 농도 4.9 $\mu\text{g/mL}$ 와 5.8 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타내었고, 24

시간까지 검출되었다(Figure 17). 이처럼 acetazolamide는 hydrochlorthiazide에 비해 천천히 혈액으로 흡수되는 결과를 나타내었고, 상대적으로 많은 양을 경구투여 했기 때문에 높은 최고 농도를 나타내는 것으로 조사되었다.

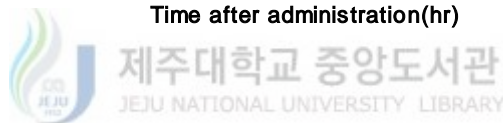
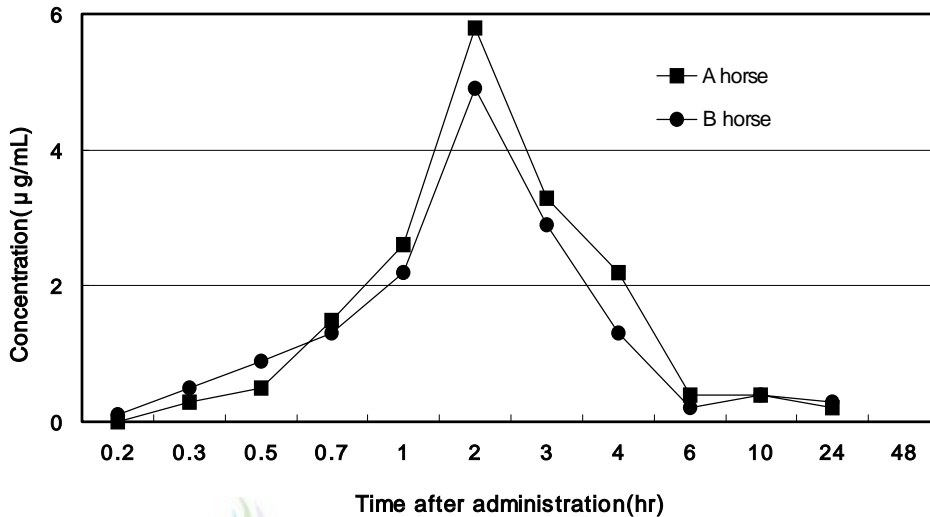


Figure 17. Excretion profile of acetazolamide(oral dosing) in horse plasma.

5. 이노제에 의한 카페인의 이노 효과

5.1 표준검정곡선 작성

Caffeine의 검정범위는 마필에 약물 투여 후 최고의 농도로 판단되는 1일째 시료까지를 미리 예비 실험한 후 농도 범위를 0 ~ 10 µg/mL로 결정하였고, 대상 표준약물로 검정용 표준시약을 제조하였다. 추출방법은 혈장 3 mL를 pH 9로 조절한 후 9 : 1 chlorform : methanol의 추출용매 6 mL를 이용하여 추출하였다. 추출 용액은 다시 원심분리 및 증발 과정을 거친 후 methanaol 100 µL에 희석하여 2 µL를 GC/MS에 주입하여 분석하였다. 이 때 내부 표준물질은 diphenylamine이 1 µg/mL가 되도록 조절하여 검정곡선을 작성하였다.

Table 5. GC/MS conditions and regression results of standard calibration curve for quantitative analysis of caffeine.

Diuretics	Retention Time	Ion Mass	Y(10 ⁴)=mX		Concentration (μg/mL)
			m	r ²	
Caffeine	12.4	194	0.583	0.992	0.1, 0.5, 1, 5, 10

5.2 경주마 혈액중의 caffeine 검출

제주마 2두에 빠콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)을 정맥주사한 경우 채취된 시료에서 10분 후에 caffeine은 최고농도 4.6 μg/mL와 3.7 μg/mL를 나타내었으며 72시간까지 검출되었다. 또 이뇨제에 의한 이뇨 효과를 조사하기 위해 빠콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)를 정맥주사하고 라식스정 10정(400 mg, furosemide)을 경구투여한 경우 카페인 채취된 시료 10분에서 최고농도 4.6 μg/mL와 3.9 μg/mL를 나타내었고, 72시간까지 검출되었으며, caffeine을 단독 투여한 경우와 큰 차이를 보이지 않았다.

또한 빠콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)을 정맥주사하고 라식스 주사 40 mL (400 mg, furosemide)을 정맥주사한 경우 카페인 채취된 시료 10분에서 최고농도 2.5 μg/mL를 나타내었고, 3시간까지 검출되었다. 이러한 결과는 caffeine을 단독 투여한 경우에 비해 최고농도는 약 1/2 감소하였고, 검출시간은 1/24 정도 감소한 것으로 furosemide를 정맥주사한 경우는 이뇨효과가 크게 나타남을 알 수 있다.

한편 빠콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)을 정맥주사하고, 다이크로질정 10정 (250 mg, hydrochlorothiazide)을 경구투여한 경우 카페인 농도는 10분 후에 채취된 시료에서 최고농도 4.7 μg/mL와 3.9 μg/mL를 나타내었고, 72시간까지 검출되어, caffeine을 단독 투여한 경우와 큰 차이를 보이지 않았다.

또 빠콤 C 50 mL (400 mg, caffeine)을 정맥주사하고, 다이아막스정 10정 (2500 mg, acetazolamide)을 경구투여한 경우 카페인 농도는 10분 후에 채취된 시료에서 최고농도 3.5 μg/mL와 3.7 μg/mL를 나타내었고, 72시간까지 검출되어, 마찬가지로 caffeine을 단독 투여한 경우와 차이가 없는 것으로 확인되었다.

이러한 과정의 실험을 거친 결과 furosemide를 정맥주사한 경우에는 caffeine을 검출하는데 영향을 미치며, 검출시간을 1/24까지 감소시켰고, furosemide를 경구투여한 경우에는 큰 농도 차이가 없음을 알 수 있었다.

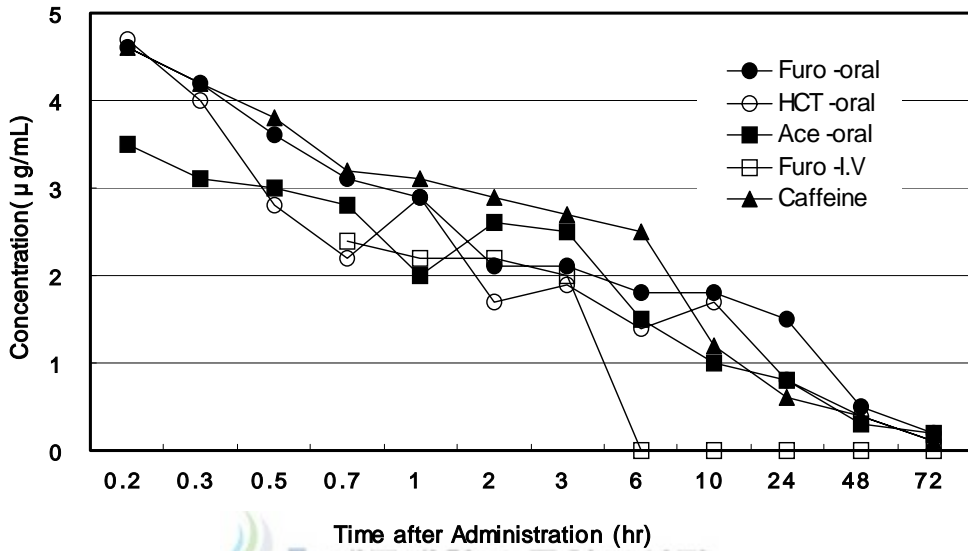


Figure 18. Excretion profile of caffeine(intra venous) in horse(A) plasma.

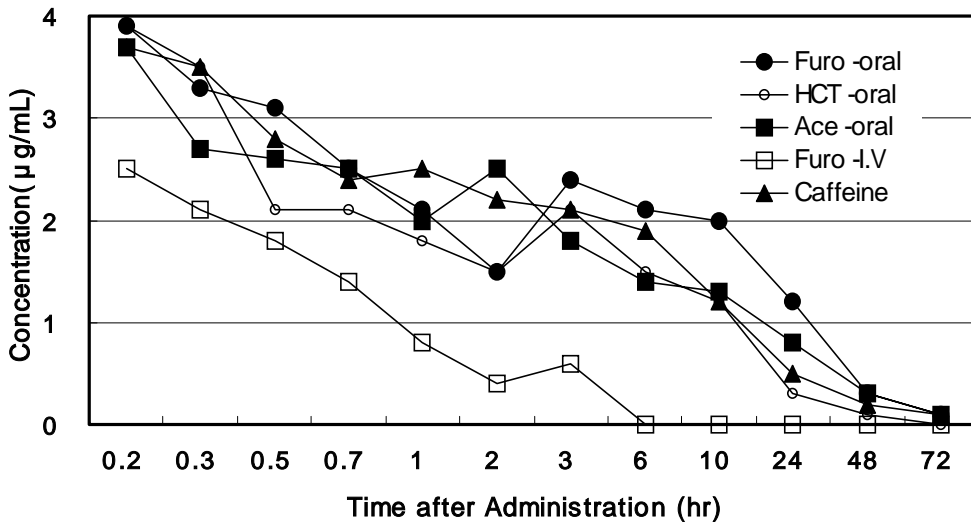


Figure 19. Excretion profile of caffeine(intra venous) in horse(B) plasma.

IV. 결 론

말의 혈액에서 이뇨제 12종을 분리, 검출하기 위한 추출 방법과 GC/MS 검출감도를 증가시키기 위한 분석조건을 다각도로 조사하고, 또 제주마에 3종의 이뇨제와 카페인을 직접 투여하여 분리 및 검출의 실제 응용 가능성에 대해 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 12종의 이뇨제를 선정하여 유도체화 방법으로 GC/MS에 의한 분리, 검출을 시도한 결과, methylation 방법의 경우 acetazolamide, ethacrynic acid, dichlorophenamide, furosemide, chlorthalidone, bumetanide, hydrochlorothiazide, triamterene, bendroflumethiazide 성분은 양호하게 검출되었으나, amiloride, benzthiazide, spironolactone은 검출에 어려움이 있었다. 반면에 silylation 방법을 적용한 결과 bumetanide, ethacrynic acid, furosemide 성분이 양호하게 검출되었다. 또한 methylation 유도체의 특성 질량스펙트럼들은 methyl iodide와 methyl iodide-D₃ 동위원소 화합물을 동시에 사용하여 methylation시키고, 질량스펙트럼을 비교하는 방법으로 효과적인 판독이 가능하였다.
2. 추출방법에 따른 회수율을 비교한 결과 액상 추출법은 28.6 ~ 89.4%의 회수율을 나타내었고, 고체상 추출법은 45.0 ~ 89.7%의 비교적 높은 회수율을 나타내었다. 또 액상 추출법에서는 bumetanide, bendroflumethiazide, furosemide, hydrochlorothiazide, dichlorophenamide, ethacrynic acid 등이 pH 5의 산성 조건에서 높은 회수율을 보인 반면 나머지 chlorthalidone, acetazolamide, triamterene은 pH 7의 조건에서 더 높은 회수율을 나타내었다.
3. Furosemide, hydrochlorothiazide, acetazolamide의 이뇨제 3종과 caffeine을 제주마에 투여한 결과, 경구투여한 furosemide는 투여 후 30 ~ 50분에 채혈한 시료에서 최고농도 0.5 µg/mL를 나타내었고 10시간까지 검출되었다. 반면에 정맥주사한 furosemide는 투여 후 10분에 채혈한 시료에서 최고농도 7.9 µg/mL, 8.8 µg/mL를

나타내었고 3시간까지 검출되었다. 또한 경구투여한 hydrochlorothiazide는 투여 후 30분에 채혈한 시료에서 최고농도 $0.7 \mu\text{g/mL}$, $0.9 \mu\text{g/mL}$ 를 나타내었고, 24시간까지 검출되었다. 그리고 acetazolamide의 경우 투여 후 2시간에 채혈한 시료에서 최고농도 $4.9 \mu\text{g/mL}$, $5.8 \mu\text{g/mL}$ 를 보였고 24시간까지 검출되었다.

4. 이뇨제에 의한 카페인의 이뇨 효과를 확인한 결과, furosemide, hydrochlorothiazide, acetazolamide 이뇨제를 경구투여한 경우는 이뇨 효과를 검증하기 어려웠다. 그러나 furosemide를 정맥주사한 경우는 경주마에서 주기적인 뇨 배설이 목격되었고, 혈장 중 카페인 최고농도가 약 1/2 감소하였으며, caffeine의 검출은 단독 투여에 비해 1/24인 3시간까지만 검출되었다.
5. 한국 경마의 경우 혈액 시료가 뇨 시료보다 3:2의 비율로 많은 비중을 차지하고 있기 때문에 본 실험 결과는 혈액에서 이뇨제 투여 여부를 검사하기 위한 목적으로 응용이 가능할 것으로 기대된다.



참 고 문 헌

1. 김경환 (1997) 이우주의 약리학강의(제4판), 의학문화사, 365-390
2. R. O. Fullinaw, R. W. Bury, and R. F. W. Mouds (1987) Liquid chromatographic screening of diuretics in urine, J. Chromatogr., 415, 347-56.
3. Claire Y. Gradeen, Debbie M. Billay, and Siu C. Chan (1990) Analysis of bumetande in human urine by high performance liquid chromatography with flulrescence detection and gas chromatography/mass spectrometry, J. Anal. Toxicol., 14, 123-126.
4. P.A. Tisdall, T.P. Moyer, and J.P. Anhalt (1980) Liquid chromatographic detection of thiazide diuretics in urine, J. Chromatogr., 415, 702-706.
5. B.L. Roberts, J. W. Blake, and T. Tobin (1978) The pharmacology of furosemide in the horse. II. Its detection, pharmacokinetics, and clearance from urine, J. Equine Med. Surg., 2, 185-194.
6. Heinz-Werner Hagedorn and Rudiger schulz (1992) Detection of Diuretics in Horse by GC/MS, J. Anal. Toxicol., 16, 194-198.
7. T. Tobin. DRUGS AND THE PERFORMANCE HORSE. 111- 131.
8. Richard A. Sams (2002) 2001 Medication Case Reports First Quarter, AORC Bulletin No. 533.
9. S.F. Cooper, R. Masse, and R. Dugal (1989) comprehensive screening procedure

for diuretics in urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 489, 65-88.

10. R. O Fullinaw, R. W. Bury, and R. F. W. Moulds (1982) Liquid chromatographic screening of diuretics in urine. *J. Chromatogr.*, 101, 219-221.

11. B. W. Hadzija and A. M. Mattocks (1982) Thin-layer chromatographic determination of furosemide and 4-chloro-5-phenyl anthranilic acid in plasma and urine, *J. Chromatogr.*, 229, 425-432.

12. M. Schafer, H. E. Geissler, and E. Mutscher (1977) fluorometric determination of hydrochlorothiazide in body fluids by direct measurement of thin-layer chromatographic plates, *J. Chromatogr.*, 143, 615-623.

13. P. H. degen and A. Schweizer (1977) Quantitative determination of drugs in biological materials by means of extractive alkylation and gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 142, 549-557.

14. A. Frigerio and C. Pantarotto (1977) Quantitative determination of sulpyrid in biological samples from rats by gas-liquid chromatography and chemical ionization-mass fragmentography, *J. Chromatogr.*, 130, 361-367.

15. Song-Ja Park, Hee-Soo Pyo, Yun-je Kim, Mi-Sook Kim, and Jongsei Park (1990) Systematic Analysis of Diuretic Doping Agents by HPLC Screening and GC/MS Confirmation, *J. Anal. Toxicol.*, 14, 84-90.

16. Heinz-Werner Hagedorn and Rudiger Schulz (1992) Detection of Diuretics in Horse Urine by GC/MS, *J. Anal. Toxicol.*, 16, 194-198.

17. Chang No Yoon, Tae Hyun Lee, and Jongsei Park (1990) Mass Spectrometry of Methyl and Methyl-D3 Derivatives of Diuretic Agents, *J. Anal. Toxicol.*, 14, 196-101.
18. Claire Y. Gradeen, Debbie M. Billay, and Siu C. Chan (1990) Analysis of Bumetanide in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, 14, 123-126.
19. Singh, A. K. Jang, Y. Mishra, and Granley. K (1991) Simultaneous analysis of flumixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urine by high performance liquid chromatography and gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 568, 351-361.
20. Singh, A. K (1989) Analysis of furosemide. *Proc Assoc Official Racing Chem.* 41&42, 315-341.
21. H. L. J. M. Fieuren and J. M. Van Rossum (1978) Determination of chlorthalidone in plasma, urine, and red blood cells by gas chromatography with nitrogen detection. *J. Chromatogr.*, 152, 41-54.
22. Lindstrom, M. Molander, and M. Groschinsky (1975) Gas chromatographic determination of hydrochlorthiazide in plasma, blood corpuscles and urine using an extractive alkylation technique, *J. Chromatogr.*, 114, 459-462.
23. Shults, T. Roberts, B. L. Blake, J. W. and Tobin. T (1978) The detection, identification and basic pharmacology of furosemide in the horse, *Equine Pharmacol.*, 2, 43-57.

24. Shngh, A.K. Mcardle, C. Gordons, B. Ashraf, and Granley. K (1989) Simultaneous analysis of furosemide and bumetanide in horse plasma using high performance liquid chromatography, *Biomed Chromatogr.*, 3, 262-265.
25. Uchino K, Isozaki. S, Saitoh. Y, Nakagawa. F, Tamura. Z and Tanaka. N (1984) Quantitative determination of furosemide in plasma, water, urine and ascites fluid by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 308, 301-302.
26. M.J. Van Der Meer and L.W. Brown (1987) Simultaneous determination of aniloride and hydorchlortothiazide in plasma by reverse-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 423, 351-357.
27. K. J. Swart and H. Botha (1987) Rapid method for the determination of diuretic triamterene and its metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 413, 315-319.
28. L. J. Lovett, G. Nygard, P. Dura, and S. K. W. Khalil (1985) An improved HPLC method for the determination of furosemide in plasma and urine, *J. Liq. Chromatogr.*, 8, 1611-1628.
29. W. Snedden, J. N. Sharma, P. G. Fernandez (1982) A sensitive assay method for furosemide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *Ther. Drug Monit.*, 4, 381-383.
30. T. Wood, C. L. Tai, P. Henry, W. E. Woods and T. Tobin (1988) The Detection of Furosemide in Equine Blood by Fluorescence and Enzyme-Linked Immunoassays, *Proceedings of the 7th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Kentucky*, 113-117.
31. S. Stanley, T. Wood, J. P. Goodman, P. A. Henry, W. E. Woods, S. L. Chang, H.

H. Tai, D. Watt, S. Kwiatkowski, J. W. Blake, T. Tobin, D. Gerken, and R. Sams (1994) Immunoassay detection of drugs in racing horses—detection of ethacrynic acid and bumetanide in equine urine by ELISA, J. Anal. Toxicol. 18, 95–100.

32. A. J. Stevenson, M. P. Weber, D. Hopkins, L. Brooks, S. Kacew (1998) Volume X: Pharmacokinetics, Analytical methodology for detection and confirmation of drugs in equine body fluids 95–114.



감사의 글

이 논문이 완성되기까지 따뜻한 관심과 세심한 지도로 격려를 해주시고 학문적 가르침으로 저를 이끌어주신 강창희 교수님께 깊은 감사를 드리며, 늦게 시작한 학문의 길에 이론적 지식과 다양한 배움의 기회를 주신 화학과 교수님들께 무한한 감사를 드립니다. 분석화학 실험실의 모든 분들을 알게된 것 또한 즐거움이었으며 좋은 추억이었습니다.

학문을 할 수 있도록 도와주신 한국마사회 박창정부회장님, 나상기이사님, 임영재소장님, 김상진부장님, 한관석과장님 그리고 남다른 정성으로 줄곧 협조해준 정동일대리, 유준동대리, 한지숙씨와 도핑검사소 직원 여러분들께 고마움을 표합니다.

특히 본 연구에는 눈초롱과 피노키오의 도움이 절대적이었습니다. 경주마로 뛰어난 성적에도 불구하고, 은퇴 후 실험마의 역할을 묵묵히 수행한 2두의 말에게 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 여기 일일이 밝히지는 못하지만 저를 아껴주신 여러분들에게 감사드리며, 존경하는 부모님, 사랑하는 아내 그리고 준혁, 나윤이와 이 작은 결실의 기쁨을 나누고자 합니다.