

GC-MS에 의한 소변 중 Ibuprofen의 대사체 규명 및 대사 연구

유대형 · 조정흠 · 홍종기★

경희대학교 약학대학 약학과

(2010. 3. 10. 접수, 2010. 4. 1. 승인)

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

Daehyung Yu, Junghum Cho and Jongki Hong★

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Korea

(Received March 10, 2010; Accepted April 1, 2010)

요 약: 본 연구는 건강한 성인남자로부터 ibuprofen의 인체 내 대사물질의 규명 및 배설에 대한 연구를 gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) 법으로 수행하였다. Ibuprofen 복용 후 3시간 단위로 15 시간까지 소변을 채취하여 실험하였다. 이 중 glucuronide가 포함된 대사체로부터 포함체를 떼어내기 위해 6 M HCl을 통해 100 °C에서 30분 동안 가열하여 산 가수분해 시켰다. 가수분해 된 뇨 중 ibuprofen 과 그 대사체를 추출하기 위하여 액체-액체 추출법을 적용하였다. 모약물과 대사체의 추출 최적조건을 찾기 위하여 pH 3, 5 및 8에서 수행하였으며 그 중 pH 3에서 가장 좋은 회수율을 보여 주었다. 또한 미량의 대사체 검출을 위하여 trimethylsilylation (TMS) 유도체 반응을 적용시킨 후 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 본 연구에서는 모약물을 포함한 총 5개의 대사체를 검출하였으며, 이들 대사물질들은 주로 산화과정에 의해 약물 모핵에 hydroxylation 또는 carboxylation된 화합물이었다. 또한 시간대별로 채취한 시료에서 각각의 대사체의 배설율의 변화를 관찰함으로써 시간대별 배설율 및 축적률을 구할 수 있었다.

Abstract: The oxidative metabolism of ibuprofen in healthy male urine collected at 3, 6, 9, 12 and 15 h after oral administration of ibuprofen was studied by GC/MS assay. To detect conjugated metabolites of ibuprofen, urine sample was acid-hydrolyzed with 6 M HCl at 100 °C for 30 min. To effectively extract ibuprofen and its metabolites, liquid-liquid extraction (LLE) was conducted at pH 3, 5, and 7, respectively. As a result, LLE at pH 3 was shown to be the best extraction condition. For the determination of trace amounts of ibuprofen and its metabolites in extract, trimethylsilylation (TMS) with BSTFA was applied and followed by GC/MS analysis. In this study, main 5 metabolites including parent drug were detected and these metabolites were assigned as three hydroxylated forms and one carboxylated form. Each metabolite was tentatively identified by both interpretation of mass spectrum and comparison with previously reported results. In addition, time profile of urinary excretion rate for parent drugs and metabolites was studied. Finally, the metabolic pathways of ibuprofen were suggested on the basis of the structural elucidation of its metabolites and excretion profiles.

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

★ Corresponding author

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

E-mail : jhong@khu.ac.kr

1. 서 론

Ibuprofen은 비스테로이드성 항염진통제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)로 체내의 arachidonic acid가 cyclooxygenase (COX) 효소에 의해 염증과 통증을 유발하는 호르몬인 프로스타글란딘으로 전환되는 합성과정을 억제하여 류마티스 관절염을 포함한 다양한 염증 치료에 널리 쓰이는 약물이다.^{1,2} 최근에는 NSAIDs 약물이 Alzheimer's disease (AD)의 위험에 방어적인 역할을 한다는 것을 기반으로 장기적인 ibuprofen의 투여가 AD환자에게 뇌전파(resting electroencephalographic rhythms)에 치료효과를 나타낸다는 흥미로운 연구결과가 보고되었다.³

이 약물의 복용 시 체내에서는 다양한 대사 경로를 통해 여러 대사체로 변형이 일어난다. 약물 대사는 체내의 효소에 의해 일어나는 생체변환 작용으로 산화, 환원 및 가수분해 반응을 통해 분자구조에 극성 관능기를 도입하는 대사성반응(제 1상반응)과 glucuronidation, sulfatation 및 아미노산(glycine, glutamine 등) 포함 반응을 통해 모분자 구조 내의 관능기에 체내 내인성 구성물질을 결합시켜 수용성을 증가시키는 포합반응(제 2상반응)으로 대별된다.⁴ 이와 같은 일련의 대사 과정을 거쳐 수용성이 증가된 약물은 대부분 신장을 통해 소변으로 배설되는데 이와 같은 점은 치료 채취의 어려움을 갖는 혈장 내의 대사체 분석보다 좀 더 유리한 이점을 갖는다.

인체 및 동물의 약물 동태를 알아보고 약리 활성, 부작용을 나타내는 NSAIDs의 대사체를 규명하는 연구가 수행되어 왔다. 특히 ibuprofen의 경우 대사체는 산화과정에 의해서 생성된 hydroxyibuprofen과 carboxyibuprofen으로 보고되었다.⁵ 인체나 동물에서 산성 ibuprofen과 대사체의 분석은 주로 고성능액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatograph, HPLC)에 UV 검출기를 이용한 연구와⁶ 기체크로마토그래피법(gas chromatography, GC)⁷에 의한 연구가 수행되었다. 최근에는 소변시료에서 ibuprofen의 광학 선택성을 가진 주 대사체를 solid-phase microextraction (SPME) 방법으로 추출하고 키랄컬럼이 장착된 HPLC로 분석하는 연구가 수행되었다.^{7,8} 또한 쥐와 닭 혈청에서 ibuprofen 광학 특이성에 대한 연구를 HPLC로 수행하여, ibuprofen과 hydroxylated 대사체의 광학이성질체의 분리를 수행되었다.^{9,10} 이들 광학이성질체의 분리연구를 통하여 생체내의 대사효소와의 반응성을 규명하는데 활용되었다.

그러나, 인체 및 동물에서 ibuprofen의 대사화 연구는 특이적인 부분에 대하여 제한적으로 진행되었으며, 또한 극미량의 다양한 대사체의 검출에 있어서 한계를 가지고 있었기에 본 연구에서 이들 모핵약물과 대사체를 동시분석할 수 있는 분석법에 대하여 연구하였다. 특히 산성약물과 그의 대사체의 추출에 있어서 효율적인 역추출방법을 도입하였으며, 극미량의 대사체를 검출하기 위하여 화학유도체화 방법을 도입하였다. 화학유도체방법¹¹은 GC 크로마토그래피 분석에 있어서 비휘발성 물질에 대한 휘발성과 열적안정성을 높일 수 있으며, 피이크 분리능에서도 탁월성을 보여준다. 또한 전자이온화 질량분석법에 있어서 특성이온을 생성시켜 구조규명에 효율적으로 활용될 수 있다.

본 연구에서는 GC-MS를 이용하여 소염 진통제인 ibuprofen의 소변 중 ibuprofen과 그 대사체의 추출 조건을 조사하였으며, GC-MS에 의해 검출된 대사체의 질량분석스펙트럼을 해석하여 각 대사체의 구조를 규명하였다. 또한, 분석 결과를 통해 시간대별로 소변 중 ibuprofen과 대사체들의 배설 양상을 확인하고 시간에 따른 약물의 동태를 알아보았다.

2. 실험

2.1. 시약

시험자가 복용한 ibuprofen 표준품은 99.7% 이상의 순도를 지닌 백색 가루형태이며, 국내 제약회사로부터 공급받았다. 시료의 전처리 과정 중 포합 대사체를 가수분해하기 위해 사용한 염산 용액은 Merck사(Darmstadt, Germany)의 제품이었다. 액체-액체추출법(liquid-liquid extraction) 및 유도체 반응에서 사용한 에틸 아세테이트 용매는 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였고 pH의 조절을 위해 sodium phosphate monobasic monohydrate와 sodium phosphate dibasic heptahydrate는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을, NaOH와 초산은 Ducksan Chemical (Gyeonggi, Korea)의 제품을 사용하였다. 추출액의 수분 제거를 위해 사용한 무수 Na₂SO₄는 Junsei사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 유도체 반응을 위한 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)는 SUPELCO사(Bellefonte, PA, USA)의 제품을 사용하였다. 내부표준물질인 phenanthrene-d₁₀은 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA)로부터 구입하였다. Ibuprofen과 내부표준물질은 메탄올과 *n*-octane에 각각 녹여 100 ppm으로 만든 후 냉장 보관

하여 필요시 사용하였다.

2.2. 분석기기 및 조건

시료의 분석을 위하여 사용한 GC-MS는 6890N gas chromatograph/5973 mass selective detector로 Agilent Technologies사(Palo Alto, CA, USA) 제품이었으며, 컬럼은 J&W Scientific사(Folsom, CA, USA)의 DB-5MS (cross-linked 5% phenylmethylsilicon, 30 m length × 0.32 mm I.D., 0.25 µm film thickness)를 사용하였다. 운반기체로 순도 99.999%의 헬륨가스를 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 조절하였다. 시료 주입은 직접 주입하였으며 GC 주입구 온도는 270 °C로 정하였고, 분할(10:1) 주입방법을 사용하였다. 컬럼 온도는 100 °C에서 3분간 유지시킨 후 15 °C/min 으로 205 °C 까지 올리고 5 °C/min으로 235 °C까지 올린 후 280 °C 까지 다시 15 °C/min으로 올리고 5분간 유지하였다.

GC와 MS의 연결 인터페이스 온도는 270 °C로 정하였으며, 이온원의 온도는 200 °C로 설정하였다. 시료 이온화는 전자충돌(electron impact)법으로 사용한 에너지는 70 eV으로 정하였고, 질량분석관으로는 사중극자로 구성되었으며 질량분석은 50-550 amu의 범위를 스캔모드로 조사하였다.

2.3. 실험 과정

2.3.1. 약물 복용 및 소변 채집 방법

약물을 복용한 피험자는 건강한 성인 남성(25세, 75

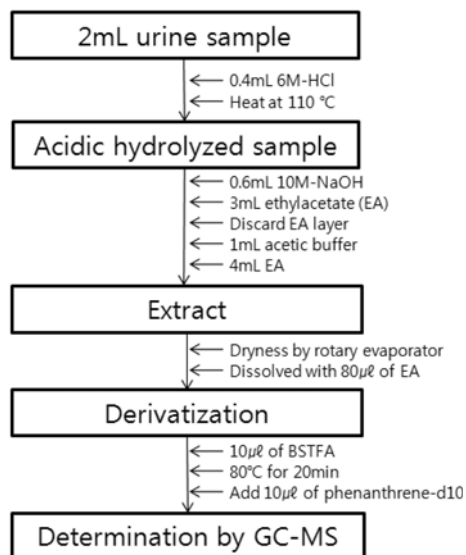


Fig. 1. Sample preparation for analysis of ibuprofen and its metabolites in human urine by GC-MS.

kg)으로 ibuprofen 200 mg을 1회 복용한 후 15시간 동안 총 6회에 걸쳐 소변을 채취하였다. 소변의 채집은 약 복용부터 약 0시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간, 15시간 후에 각각 실시하였고 채집한 소변시료는 4 °C로 냉장 보관하였다. 분석을 위한 시료 전 처리 방법은 Fig. 1에 나타내었다.

2.3.2. 산 가수분해 및 추출

제 2상 대사체의 포함체를 분리하기 위하여, 2 mL 소변 시료에 0.4 mL 6 M의 HCl를 가하여 110 °C에서 30분간 가열하였다. 산 가수분해 후 용액시료는 실온에 방치한 뒤 10 M의 NaOH로 강염기로 만들었다. 에틸아세테이트 4 mL를 넣고 15분 동안 흔들어 준 뒤 원심분리하여 층을 분리하고 에틸아세테이트층을 제거하는 과정을 두 번 반복하였다. 대사체와 모핵약물을 추출하기 위하여 acetate buffer로 pH 3으로 맞추 후 에틸아세테이트 5 mL를 넣고 15분 흔들어 주었다. 원심분리과정을 통하여 층분리하고 유기층을 취하는 과정을 2회 반복하였다. 추출된 유기층은 Na₂SO₄를 이용하여 수분을 제거하고 회전식감압건조기를 사용해 감압농축 하였다. 농축된 추출액은 유도체화 반응 바이알로 취하여 질소농축 하였다.

2.3.3. Trimethylsilylation (TMS) 유도체화 반응

극 미량의 대사체의 검출을 위하여 TMS 유도체화 방법을 적용하였다. 유도체화반응은 건조된 추출물에 무수 에틸아세테이트 80 µL을 넣은 후 TMS 유도체 시약인 BSTFA 10 µL을 넣고 80 °C에서 20분간 가열 하였다. 방냉 후 내부표준물질로 phenanthrene-d₁₀ 10 µL을 가하고 흔들어 준 후 용액 중 1 µL를 GC/MS에 주입하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 소변 중 ibuprofen의 추출

일반적으로 소변에서 약물과 대사체의 분석을 위해서는 요소(urea)와 같은 불순물들을 제거하는 과정과 제 2상 대사 과정에서 생성되는 포함체를 떼어내는 가수분해 과정이 필요하다. 일반적으로 포함대사체를 검출하기 위해서는 효소 가수분해법(enzymatic hydrolysis)이나 산가수분해법(acid hydrolysis)이 널리 사용되고 있으나, 본 연구에서는 극산성 조건에서도 모핵 및 대사체의 분해가 일어나지 않는 산 가수분해방법을 적용하였다. 산 가수분해과정을 거치지 않았을 경우, 모

핵약물과 산화된 대사체의 양은 전체적으로 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 ibuprofen 모핵약물과 대사체는 제 2상 대사과정이 상당히 일어나는 것으로 보이며, 기존에 발표된 연구에서는 모핵 약물의 58%가 포합대사체로 보고되었다.⁷

본 연구에서는 뇨시료의 산 가수분해 후 10M-NaOH를 첨가하여 pH 12이상으로 조절한 후 에틸아세테이트로 추출 후 폐기하였다. 이 과정을 통하여 소변 내 염기성을 가진 방해물질들은 대부분 제거되었다. 그러나 산성구조를 가진 ibuprofen과 대사체들은 이 과정에서 손실되지 않았다. 실제 이러한 역추출(back extraction)과정을 수행하지 않을 경우 많은 방해물질의 존재로 인하여 미량의 대사체 분석에 있어서 어려움이 발생된다.

수용액 중 ibuprofen의 추출 최적 조건을 찾기 위하여 시료 3 mL에 pH 3, 5, 8으로 각각 조절한 후 추출률을 비교하였다(Fig. 2). Ibuprofen의 화학적 구조를 살펴보면 1개의 카르복실기를 가지고 있으며 이의 pK_a 는 대략 4.4로 알려져 있으며, 이의 대사체들의 pK_a 는 대

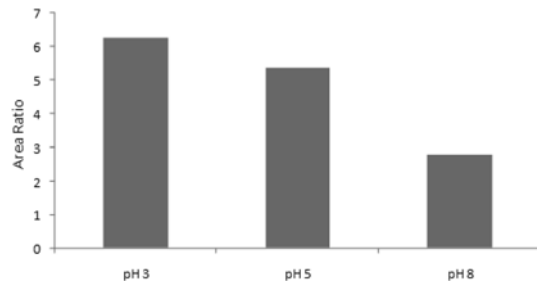


Fig. 2. Extraction ratio from a urine sample collected after 3hr of oral administration at pH 3, 5, and 8, respectively.

략 3~4 정도이다. 따라서 수용액의 pH가 ibuprofen의 pK_a 보다 높아질수록 ibuprofen의 추출률이 낮아짐을 예상할 수 있다. 이는 pH가 높아질수록 수용액 내에서 모핵 약물과 대사체의 해리현상이 증가되기에 추출률이 감소될 것으로 판단된다. 또한 ibuprofen의 대사체의 경우, 대부분이 hydroxylated 형태와 carboxylated 형태로 배설되기에 비교적 pH 3에서 만족할 만한 추출결과를 얻었다. 그러나 극단적인 액성 영역인 pH 2이하에

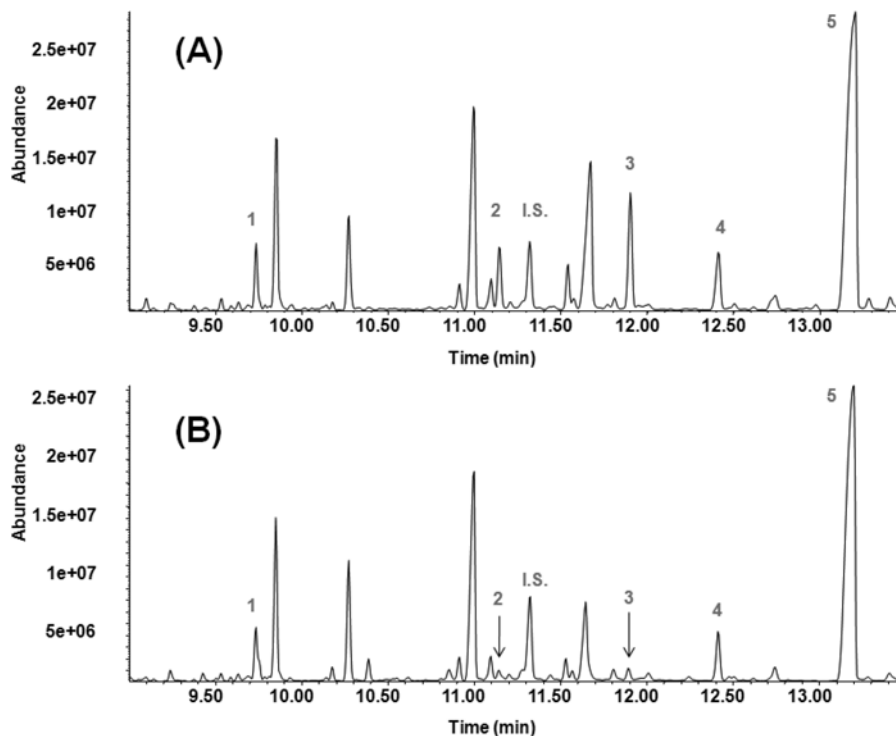


Fig. 3. Total ion chromatograms of ibuprofen and its metabolites extracted from a urine sample collected after oral administration 3hr, (A) acid hydrolyzed urine sample (B) without acid hydrolyzed urine sample. Peaks' identity are as follows; 1. ibuprofen-OTMS, 2. 1-hydroxyibuprofen-(OTMS)₂, 3. 2-hydroxyibuprofen-(OTMS)₂, 4. 3-hydroxyibuprofen-(OTMS)₂, 5. carboxyibuprofen-(OTMS)₂.

서는 오히려 ibuprofen과 대사체의 추출률이 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 모약물과 대사체의 추출조건을 pH 3으로 설정하였다.

3.2. Ibuprofen 및 대사체의 분석

0시간에서 15시간의 시료를 각각 산 가수분해한 후 액체-액체 추출법을 통하여 추출한 후 농축하였다. 추출된 ibuprofen과 그 대사체들은 TMS 유도체화 반응을 거친 후, GC-MS 스캔모드로 분석한 total ion chromatogram (TIC)은 Fig. 3에 실었다. 본 연구에서 소변 중 모약물과 대사체들의 포함체와 비포함체(유리형)의 함량을 비교하기 위하여, 산 가수분해과정을 거친 시료(Fig. 3-A)와 산 가수분해 과정을 통하지 않은 시료(Fig. 3-B)의 분석결과를 비교 검토하였다. 대표적으로 복용 3시간 후의 소변시료에서, 이들 모두에서 유도체화된 ibuprofen과 주요 대사체 4종류가 검출되었다. 그러나, 두 경우의 TIC에서 나타난 모약물과 대사체의 함량에 있어서 상당한 차이가 관측되었다. 이들 유도체화된 모약물과 대사체의 머무름 시간과 특성이온을 Table 1에 요약하였다.

기존의 연구에 의하면 ibuprofen의 주대사체는 hydroxyibuprofen과 carboxyibuprofen으로 보고되었다.^{7,12} Fig. 3에서 보듯이 TIC상에 ibuprofen을 1번 피이크에서 확인할 수 있고 hydroxyibuprofen 이성질체 3종류를 피이크 2, 3, 4번에서 carboxyibuprofen을 피이크 5번에서 관찰 할 수 있다. Fig. 4는 ibuprofen과 그 대사체들에 대한 TMS 유도체들의 질량스펙트럼이다. 이들은 Fig. 4의 각각의 스펙트럼에서 볼 수 있는 특성 조각이온들을 통해서 알 수 있다.

Fig. 4의 (A)는 다른 형태의 구조로 대사화되지 않고 배설된 ibuprofen-OTMS의 질량 스펙트럼이다. 이 화합물의 분자이온은 m/z 278에서 나타났으며 TMS 유도체의 특성 피이크인(M-15)⁺ 이온이 m/z 263에서 관찰되었다. 이 이온은 TMS기로부터 methyl기가 떨어진 것으로 기인된다. 또한 Si(CH₃)₃⁺이온이 m/z 73에서

특성적으로 관찰되었다. 또한 ibuprofen에서 TMS와 유도체화된 carboxyl기가 떨어진 [M-COOTMS]⁺ 이온과, COOTMS⁺ 이온이 각각 m/z 160과 117에서 나타났다. Ibuprofen에서 분자이온으로부터 CO₂가 탈락되어 6환 고리를 형성하는 것으로 기인된 [M-CO₂]⁺ 이온이 m/z 234에서 나타났다.

Fig. 4의 (B), (C) 및 (D)는 hydroxyibuprofen의 구조 이성질체 대사물질 3종이 검출된 것이다. 이들 hydroxyibuprofen 이성질체의 TMS 유도체들의 분자이온은 매우 약하게 나타나거나 관측되지 않았으나 [M-15]⁺ 이온인 m/z 351이 특성적으로 나타났다. 이들은 구조이성질체로 존재하지만 OH기의 위치에 따라 매우 상이한 질량 분석스펙트럼이 나타났다. 즉, ibuprofen의 1'-위치(benzylic position)가 산화되어 생성되는 1-hydroxyibuprofen은 Fig. 4의 (B) 스펙트럼에서 나타나는 특성이온인 m/z 323을 통해 확인 할 수 있다. 이는 1-hydroxyibuprofen의 benzylic 위치에 붙어있던 C₃H₇이 떨어져 생성된 이온이다.

Ibuprofen의 2'-위치가 산화되어 생성되는 2-hydroxyibuprofen은 Fig. 4의 (C) 스펙트럼에서 나타나는 특성이온인 m/z 131의 존재를 통해 확인 할 수 있다. 이는 benzyl 위치에 붙어있던 C₃H₆OTMS가 쉽게 떨어져 생성된 이온으로 이는 2번 위치에 hydroxy기가 치환되어 있는 것을 유추할 수 있다.

Ibuprofen의 3'-위치가 산화되어 생성되는 3-hydroxyibuprofen은 Fig. 4의 (D) 스펙트럼에서 나타나는 특성이온인 m/z 276을 통해 확인 할 수 있다. 이는 3-hydroxyibuprofen의 benzyl 위치에 붙어있는 CH₂OTMS가 떨어진 것으로 이는 3번 위치에 hydroxylation이 일어난 것을 나타낸다.

기존의 연구결과에 의하면 carboxylation은 3'-위치에 일어난다고 보고되었다.⁷ 이것은 3'-위치에 hydroxylation이 일어난 후 산화과정이 더 진행되어 carboxyl기가 된 것으로 예상된다. 이 carboxyibuprofen은 Fig. 4의 (E) 스펙트럼에서 분자이온인 m/z 380에서 잘 나

Table 1. GC-MS data of trimethylsilylated ibuprofen and its metabolites extracted from urine sample

OTMS-Derivative	M.W	Retention Time(min)	[M-15] ⁺	Characteristic ions (m/z)
Ibuprofen-OTMS	278	9.918	263	263 160 117 234 73
1-hydroxyibuprofen-(OTMS) ₂	366	11.384	351	351 323 159 133 73
2-hydroxyibuprofen-(OTMS) ₂	366	12.175	351	351 308 159 133 73
3-hydroxyibuprofen-(OTMS) ₂	366	12.720	351	351 276 232 158 145 118
Carboxyibuprofen-(OTMS) ₂	380	13.518	365	365 336 145 118 117 91

*MW: molecular weight

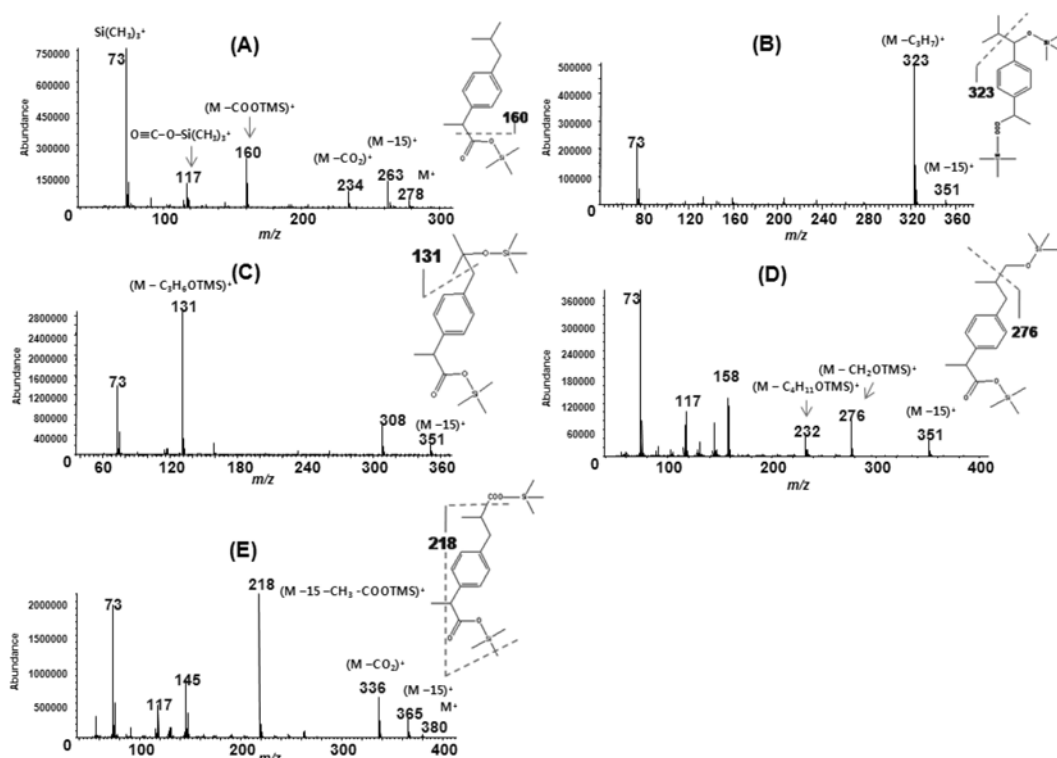


Fig. 4. Mass spectra of ibuprofen and its metabolites; (A) ibuprofen-OTMS, (B) 1-hydroxyibuprofen-(OTMS)₂, (C) 2-hydroxyibuprofen-(OTMS)₂, (D) 3-hydroxyibuprofen-(OTMS)₂, and (E) carboxyibuprofen-(OTMS)₂.

타났으며 이외에 특성이온인 m/z 336과 218의 존재와 해석을 통하여 3'-위치에 산화가 일어난 것을 알 수 있다. 특성이온인 m/z 336은 분자이온으로부터 COOTMS기가 벤젠링과 6환링을 형성하는 과정에 분자이온으로부터 CO₂가 떨어져 생성된 것으로 예상된다. 또한 m/z 218은 분자이온으로부터 연속적으로 COOTMS와 methyl기가 떨어져 나가 생성된 이온으로 예상된다.

3.3. Ibuprofen 대사과정의 규명

앞서 GC/MS 분석을 통하여 소변으로 배설되는 ibuprofen의 대사체들의 구조를 규명하였으며, 이를 기반으로 시간에 따라 배설되는 대사체의 양을 조사하여 대사과정을 조사하였다. Ibuprofen의 배설양과 대사체의 함량을 조사하여 체내에서 대사과정을 유추할 수 있다. 이들 약물의 대사체 표준품의 확보가 어려워 대사약물의 정확한 양을 측정할 수 없어 시간에 따른 각 대사체의 상대적 양을 측정하여 누적배설 양상에 대하여 조사하였다. 또한 대사체 표준품의 미확보에 따른 또 다른 문제점은 GC/MS 분석에서 각 화합

물의 절대 감응도 (response factor)를 조사할 수 없는 점이 있다. 따라서 ibuprofen 및 그 대사체들의 시간에 따른 누적배설 양상 그래프를 Fig. 5에 실었다. Ibuprofen의 경우 반감기가 1.8~2시간이어서 복용 후 체내에서 매우 빠르게 대사와 배설이 되기 때문에 주 대사체인 carboxyibuprofen과 2-hydroxyibuprofen은 3시간까지 많은 양이 배설되었고 점진적으로 감소하였다. 이 외에도 미량 대사체인 1-hydroxyibuprofen과 3-hydroxyibuprofen 역시 주 대사체들과 비슷한 배설양상을 나타내었지만 양이 매우 적어 3시간 이후에는 거의 나타나지 않았다.

대사체들의 시간에 따른 배설 양상과 양을 비교하여 대사과정을 예측해본 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Ibuprofen의 대사경로는 효소에 의한 산화반응이다. Ibuprofen은 phase 1의 산화 반응을 거쳐서 ibuprofen의 1, 2, 3번 위치에 hydroxylation이 일어난다. 이러한 산화 반응은 cytochrome P450의 isoenzyme인 CYP2C8과 CYP2C9에 의한 일어난 것으로 알려져 있다.^{13,14} 또한 3-hydroxyibuprofen으로부터 산화과정이 더 진행되어 carboxyibuprofen으로 대사되는 것으로 예측된다.

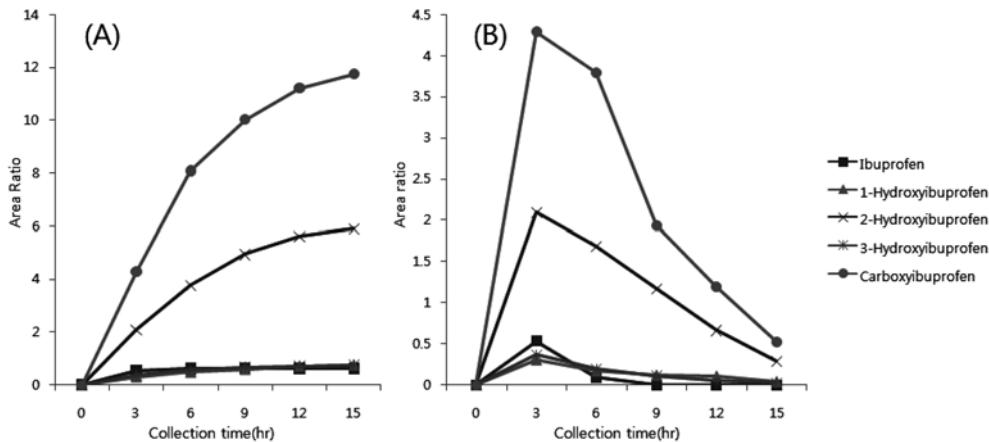


Fig. 5. (A) Accumulation curves of ibuprofen and its metabolites in urines and (B) Excretion curves of ibuprofen and its metabolites in urines.

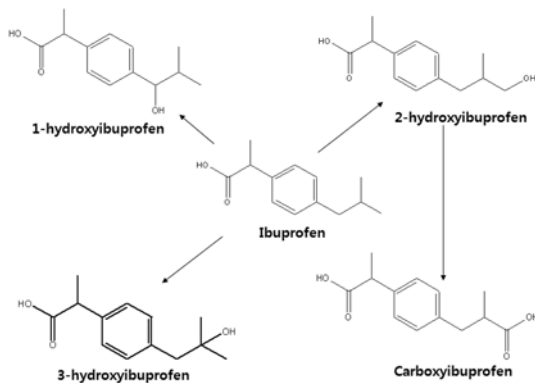


Fig. 6. Proposed metabolic pathways of ibuprofen in human.

Ibuprofen과 그 대사체들은 제 2상 반응인 glucuronide 및 sulfate 포함반응체로 배설되며 주 대사체인 2-hydroxyibuprofen과 carboxyibuprofen의 경우 약 58%가 제 2상 대사과정을 통해 배설된다고 알려졌다.⁷ 또한 미량대사체인 1-hydroxyibuprofen과 3-hydroxyibuprofen은 이 과정을 거의 거치지 않는다고 보고하였다. 이에 대한 연구를 검토하기 위하여 약물복용 후 포함대사체와 비포함대사체의 양을 조사하였으며[Fig. 3-A and B 참조] 이들의 결과는 3회 반복측정하여 Table 2에 정리하였다. 그러나 Table 2에서 보듯이, 모약물의 경우 포함대사체의 양은 약 27% 정도로 나타났으며, hydroxylation 대사체인 1-, 2-, 및 3-hydroxyibuprofen의 포함체의 양은 각각 84, 91 및 46%로 나타났다. 주요 대사체인 carboxyibuprofen의 경우 약 33% 정도가 포함체로 나타났다. 이 결과는 기존의 연구⁷에서 발표된 양과는 상이한 차이를 나타

Table 2. Area ratios and percentages of conjugated form of ibuprofen and its metabolites in urine

compound	Area ratio for acid hydrolysis	Area ratio without acid hydrolysis	*Percent (%) of conjugated form
ibuprofen	0.660	0.478	27.6
1-hydroxyibuprofen	0.723	0.113	84.4
2-hydroxyibuprofen	1.293	0.110	91.5
3-hydroxyibuprofen	0.830	0.442	46.8
carboxyibuprofen	8.638	5.791	33.0

*percent (%) of conjugated form : area ratio of [conjugated form / (free + conjugated form)] × 100

났다. 이러한 차이는 기존 연구에서 가수분해 조건이 4M-NaOH로 2시간 동안 수행하였으므로 완전한 가수분해가 되지 않아 발생한 결과로 사료된다. 또 다른 원인은 HPLC-UV법에 의한 검출로 구조이성질체들을 성공적으로 분리되지 않아 발생된 것으로 유추된다.

4. 결론

본 연구에서는 ibuprofen을 복용 후 소변 중 약물의 대사체를 GC-MS로 분석하였다. 약물 복용 후 0시간부터 15시간까지 받은 소변으로 모약물의 대사양상을 유추하였다. 소변 중 산성인 약물과 대사체를 역추출 방법을 사용하여 효과적으로 방해물질의 제거와 대상 약물 및 대사체를 성공적으로 추출할 수 있었다. 또한 TMS 유도체화 반응을 통하여 GC-MS로 극미량의 대사 물질을 분석해 낼 수 있었으며, 일부 조각이온들은 대사체 확인에 매우 유용한 진단이온으로 사용될 수

있었다. 본 연구에서 사용되었던 산-가수분해 과정은 기존 연구에서 보고되었던 염기-가수분해 결과보다 더 많은 포함대사체의 함량을 얻을 수 있었다. 그러나 본 연구에서 대사체들의 표준품의 확보가 어려워 정확한 정량분석이 어려운 점이 있으나, 대사체 배설 경향성을 보다 정확하게 예상할 수 있었다.

본 실험을 통하여 GC-MS를 이용한 체내 약물 대사체의 분석은 각 대사체의 약효를 탐색하거나 안전성을 증명하는데 이용될 수 있으며, 약물의 체내 동태를 밝힘으로써 복용 약물을 확인하고 복용시간과 용량을 결정하여 약물동력학의 활용에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다. 특히 본 논문에서 제시한 pH 3에서 약물과 대사체의 추출율을 높일 수 있을 것이며 시간대별 추출율과 누적율을 임상에 적용함으로써 환자의 체내의 농도 변화, 분포, 배설 등을 예측하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청(유해물질 인체 모니터링) 연구비에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. L. L. Brunton, J. S. Lazo, K. L. Parker, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, 2006.
2. S. Bancos, M. P. Bernard, D. J. Topham and R. P. Phipps, *Cell Immun.*, **258**, 18-28(2009).
3. B. Babiloni, G. B. Frisoni, C. D. Percio, O. Zanetti, C. Bonomini, E. Cassetta, P. Pasqualetti, C. Miniussi, M. De Rosas, A. Valenzano, G. Cibelli, F. Eusebi and P. M. Rossini, *Clin. Neurophys.*, **120**, 709-718(2009).
4. 의약화학 편집위원회, “의약화학”, 2th Ed., p. 85-106, 신일상사, 서울, 2004.
5. R. F. N. Mills, S. S. Adams, E. E. Cliff, W. Dickson and J. S. Nicholson, *Xenobiotica*, **3**, 589-598(1973).
6. B. Chai, P. E. Minkler and C. L. Hoppel, *J. Chromatogr. A*, **430**, 93-101(1988).
7. A. R. M. de Oliveira, F. J. M. de Santana and P. S. Bonato, *Anal. Chim. Acta*, **538**, 25-34(2005).
8. A. R. M. de Oliveira, E. J. Cesarino and P. S. Bonato, *J. Chromatogr. B*, **818**, 285-291(2005).
9. X. W. Teng, S. W. J. Wang and N. M. Davies, *J. Chromatogr. B*, **796**, 225-231(2003).
10. B. Vermeulen and J. P. Remon, *J. Vet. Pharm. Therap.*, **24**, 105-109(2001).
11. J. Jung, H. Hur, W. W. Lee and J. Hong, *Anal. Sci. Tech.*, **21**(6), 510-517(2008).
12. S. C. Tan, S. H. D. Jackson, C. G. Swift and A. J. Hutt, *J. Chromatogr. B*, **701**, 53-63(1997).
13. R. Lopez-Rodriguez, J. Novalbos, S. Gallego-Sandin, M. Roman-Martinez, J. Torrado, J. P. Gisbert and F. Abad-Santos, *Pharm. Res.*, **58**, 77-84(2008).
14. M. A. Hamman and G. A. Thompson, and S. D. Hall, *Biochem. Pharm.*, **54**, 33-41(1997).