

초고성능액체크로마토그래프-질량분석법(UPLC-MS)에 의한 오줌에서 푸로세미드의 정량

윤정호, 리현희

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《보건사업은 사람의 생명과 건강을 다루는 중요한 과학기술사업입니다. 의학과과학기술을 발전시켜야 치료예방사업에서 나서는 모든 문제를 원만히 풀어나갈수 있으며 보건사업을 높은 과학기술적도대우에 올려세울수 있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 81페이지)

푸로세미드는 인체에 비교적 빨리 흡수되고 쉽게 제거되는 리노약이다. 지금 많은 리노약들이 리용되고있지만 푸로세미드는 고혈압병과 심장성부종, 콩팥성부종, 간성부종, 임신중독증, 말초혈관장애로 인한 부종 및 뇨로결석증때 배설촉진제로 널리 리용되고있다. 이 리노약에 의한 부작용증상으로는 메스꺼움, 게우기, 설사, 두드러기, 가려움 등이 있을 수 있다. 그러므로 체액에서 푸로세미드에 대한 분석은 약리작용연구에서 중요한 의의를 가진다.

체액에서 푸로세미드의 분석에는 주로 GC-MS법[1, 2], HPLC-MS법[3, 4], 분광광도법[5] 등이 리용되고있다.

우리는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법(UPLC-MS)[6, 7]을 리용하여 사람의 오줌에서 푸로세미드를 정량하기 위한 연구를 하였다.

실험 방법

기구로는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석계(《ACQUITY™ UPLC-SQD2》), 분리탑(《ACQUITY UPLC® BEH C18》, 1.7 μ m, 2.1mm \times 100mm), 125mL 분액팔때기, pH미터(《PHS-3C》)를, 시약으로는 초순수, 아세토니트릴(HPLC급), 개미산(HPLC급), 푸로세미드 표준용액, 초산에틸(분석순), 수소탄산나트륨(분석순), 탄산칼리움(분석순), 이수소린산칼리움(분석순)을 리용하였다. 시료전처리용시약으로 리용되는 알카리성고체완충제는 수소탄산나트륨 15g과 탄산칼리움 10g을 정확히 저울질하여 마노절구에 넣고 잘 혼합한 것을, 산성고체완충제는 이수소린산칼리움을 그대로 리용하였다.

오줌에서 리노약을 분석하기 위한 시료전처리방법에는 산성추출과 알카리성추출방법이 있다.

산성추출방법 모든 추출조작에서는 시약공백, 오줌공백, 표준첨가한 시료, 대상물시료를 10mL 시험관에 각각 2mL씩 넣고 여기에 산성고체완충제(이수소린산칼리움) 0.5g을 넣은 다음 초산에틸 4mL를 넣고 15min동안 진탕시킨 후 2 500r/min에서 5min동안 원심분리한다. 팽동기(-20℃)에서 팽동시킨 다음 얼음상태의 물상은 버리고 옷층의 유기상을 초산연용액이 들어있는 시험관에 옮긴다. 5s동안 혼합하고 5min동안 방치하거나 1min동안 원심분리한다.

다시 펌프에서 펌프시킨 다음 얼음상태의 물상은 버리고 옷층의 유기상을 분리하여 질소로 날려보내고 잔사를 이동상에 풀어 UPLC-MS체계에 주입한다.

알카리성추출방법 시약공백, 오줌공백, 오줌시료 2mL에 각각 알카리성고체완충제 0.5g을 넣은 다음 초산에틸 4mL를 넣는다. 15min동안 진탕한 다음 2 500r/min에서 5min동안 원심분리한다. 펌프기(-20℃)에서 펌프시킨 다음 얼음상태의 물상은 버리고 옷층의 유기상을 분리하여 질소로 날려보낸 다음 잔사를 이동상에 풀어 UPLC-MS체계에 주입한다.

이때 초고성능액체크로마토그래프측정조건은 다음과 같다. 이동상으로는 0.1% 개미산수용액 : 아세토니트릴=50 : 50(체적비), 이동상흐름속도는 0.2mL/min, 탑온도는 30℃, 시료주입량은 10μL이며 측정시간은 5min이다.

실험결과 및 해석

푸로세미드의 전기분무이온화질량스펙트럼 푸로세미드를 전기분무이온화시키고 형성된 음이온을 측정하면 m/z 328, 284, 204의 이온이 관찰되는데 이 이온들중에서 m/z 328과 284의 이온붕우리는 비교적 크지만 m/z 204의 이온붕우리는 매우 작다.(그림 1)

푸로세미드의 정량분석에는 주로 m/z 328이온이 리용되며 동정에는 m/z 328, 284와 204이온이 리용된다.

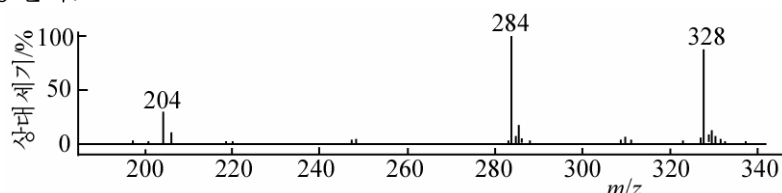


그림 1. 푸로세미드의 전기분무이온화질량스펙트럼

특성이온검출조건 액체크로마토그래프-질량분석법에 의한 특성이온검출은 측정조건에 영향을 심하게 받으므로 최적측정조건을 설정하여야 한다.

액체크로마토그래프측정조건은 우와 함께 하고 질량분석계에서 m/z 328, 284, 204이온들의 크로마토그램붕우리세기에 미치는 탈용매기체흐름속도(v), 원추전압($U_{원}$), 모세관전압($U_{모}$), 탈용매화온도(T)의 영향을 고찰하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 m/z 328이온의 붕우리세기는 원추전압이 증가함에 따라 작아지는데 이것은 원추전압이 증가함에 따라 m/z 328이온이 분열되기때문이다. 따라서 이 특성이온을 정량분석에 리용하는 경우 원추전압을 최대

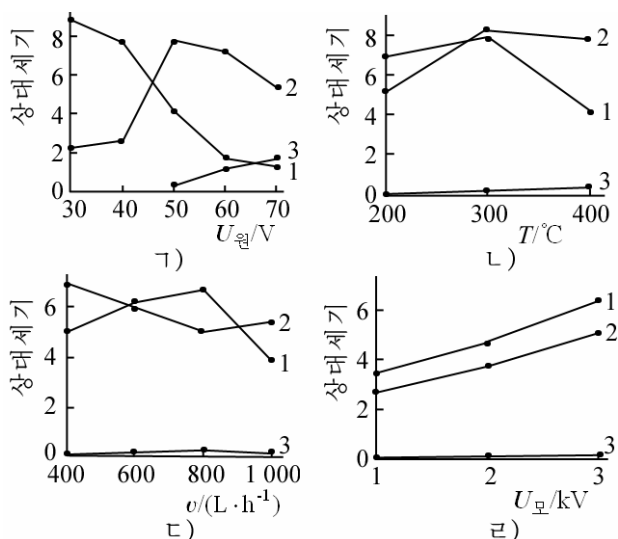


그림 2. 푸로세미드의 특성이온들의 질량크로마토그램 붕우리세기에 미치는 원추전압(가), 탈용매화온도(나), 탈용매기체흐름속도(다), 모세관전압(라)의 영향
1-3은 m/z 가 각각 328, 284, 204이온인 경우

작게 하는것이 유리하다는것을 알수 있다. 그리고 파편이온인 m/z 284, 204이온의 세기는 증가하다가 m/z 284이온의 세기는 50V에서 다시 작아진다. 이로부터 동정을 위한 원추전압은 m/z 328과 284이온을 리용할 때는 45V가 가장 좋으며 m/z 204이온까지 리용할 때에는 60~70V를 리용할수 있으나 감도가 떨어진다. 탈용매화온도가 300℃일 때 m/z 328과 284이온들의 봉우리세기가 최대로 되며 탈용매기체흐름속도가 600~800L/h일 때 m/z 328과 204이온들의 세기가 제일 크다. 또한 모든 이온들의 세기는 모세관전압이 증가함에 따라 커진다.

이로부터 원추전압 45V, 탈용매화온도 300℃, 탈용매기체흐름속도 650L/h, 모세관전압 3kV를 특성이온검출조건으로 설정하였다.

검량선의 선형범위와 검출한계 표준용액으로 푸로세미드의 검량선을 작성하였을 때 검량선의 선형범위는 0.01~5 $\mu\text{g/mL}$, 상관결수는 $R^2=0.998$, 검출한계($S/N=3$)는 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 이다.

대상물분석 푸로세미드의 특성이온들의 질량크로마토그램은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 m/z 328, 284, 204이온봉우리와 함께 그것들의 유지시간이 일치되어야 푸로세미드가 존재한다는것을 확인할수 있다.

푸로세미드를 동정한 다음 원추전압 10V에서 m/z 328이온을 선택하여 정량(선택이온기록법 : SIR)하였다. 정량은 표준첨가법으로 하였다. UPLC-MS로 푸로세미드를 사용한 사람의 오줌속에서 푸로세미드를 분석한 결과를 UPLC와

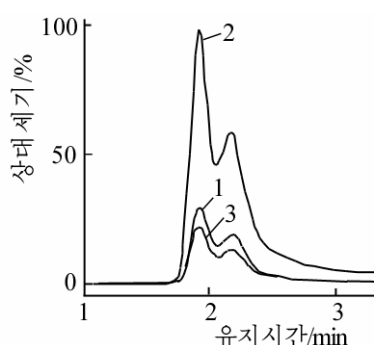


그림 3. 푸로세미드의 특성이온들의 질량크로마토그램
1-3은 그림 2에서와 같음
비교하여 표에 보여주었다.

표. 푸로세미드를 사용한 사람의 오줌속에서 푸로세미드의 분석결과

No.	UPLC-MS			UPLC		
	함량/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	변동결수/%	회수률/%	함량/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	변동결수/%	회수률/%
1	3.65	0.35	97.8	3.86	0.72	96.8
2	1.23	1.89	97.1	1.73	2.3	96.5
3	0.75	2.31	96.2	—	—	95.2

표에서 보는바와 같이 실시 시료에 첨가한 푸로세미드의 회수률은 96.2%이상이다.

맺 는 말

푸로세미드를 정량하기 위한 UPLC-MS측정조건을 설정하였으며 표준첨가법으로 푸로세미드를 사용한 사람의 오줌에서 푸로세미드를 정량하였다.

푸로세미드의 동정은 특성이온들의 질량크로마토그램의 유지시간을 리용하여 진행하였으며 정량은 m/z 328이온을 선택하여 표준첨가법으로 진행하였다.

푸로세미드를 정량하기 위한 검량선의 선형범위는 0.01~5 $\mu\text{g/mL}$, 검출한계($S/N=3$)는 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 이며 오줌에서 푸로세미드를 변동결수 2.31%이하, 회수률 96.2%이상으로 정량할수 있다.

참 고 문 헌

- [1] Claudia Margalho et al.; Journal of Analytical Toxicology, **29**, 309, 2005.
- [2] A. Alejandro et al.; Journal of Chromatography, **B 730**, 49, 1999.
- [3] S. Carda Broch et al.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **23**, 803, 2000.
- [4] Shankar Ganesh Gadepalli et al.; Journal of Pharmaceutical Analysis, **4**, 400, 2014.
- [5] C. F. Monica et al.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **26**, 443, 2001.
- [6] Mei Liu et al.; Journal of Chromatography, **B 1006**, 8, 2015.
- [7] Xiangjun Qiu et al.; Journal of Chromatography, **B 992**, 91, 2015.

주제 107(2018)년 7월 5일 원고접수

Determination of Furosemide in Urine by Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry(UPLC–MS)

Yun Jong Ho, Ri Hyon Hui

We established the analytical method for determination of furosemide in urine by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry(UPLC–MS).

Identification and determination of furosemide were performed by selecting m/z 328 ion and retention time of mass chromatogram of specific ions and by using the standard addition method.

The linear range of calibration curve for determination of furosemide is $0.01 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ and the detection limit($S/N=3$) is $0.01 \mu\text{g/mL}$. Furosemide can be determined with the variation coefficient below 2.31% and the recovery percent of 96.2% in urine.

Key words: UPLC–MS, furosemide