

아토피피부염 환자에서 국소 스테로이드 사용에 따른 혈청 스테로이드 농도 측정

강현구¹, 이선아², 김현정³, 염혜영¹

서울의료원 ¹소아청소년과, ²의학연구소, ³피부과

The measurement of serum corticosteroid level in atopic dermatitis patients associated with application of topical corticosteroids

Hyun Goo Kang¹, Sun Ah Lee², Hyun Jung Kim³, Hye Yung Yum¹

¹Department of Pediatrics, ²Research Institute, ³Department of Dermatology, Seoul Medical Center, Seoul, Korea

Purpose: Most of the atopic dermatitis (AD) patients and their parents refuse topical treatment because of concern about generalized side effect due to systemic absorption of topical corticosteroids. Therefore, a large number of studies reported difficulty in properly controlling in AD. However, investigations of the percutaneous absorption of topical corticosteroids are still insufficient.

Methods: One hundred nine patients who visited our atopy clinic and diagnosed as AD by a physician from January 2005 to January 2012 were enrolled. We examined serum corticosteroid (clobetasol propionate, hydrocortisone) level by liquid chromatography (LC) coupled with a tandem mass spectrometric (MS/MS) method.

Results: We developed the LC-MS/MS method to determine corticosteroids (clobetasol propionate, hydrocortisone) in sera of AD patients. Also, we confirmed precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, absolute recovery, and relative recovery of the experimental methods. We could not detect clobetasol propionate or hydrocortisone in sera of 109 AD patients using the newly developed LC-MS/MS method.

Conclusion: Regardless of age, the severity and illness duration of AD, clobetasol and hydrocortisone were not detected in sera. Although there are many other factors of determining systemic absorption of topical medications, our results showed that topical corticosteroids applied for several years in AD patients may be under the limit of detection in their sera by the LC-MS/MS method.

(*Allergy Asthma Respir Dis* 2017;5:79-82)

Keywords: Atopic dermatitis, Steroids; Skin absorption

서 론

아토피피부염은 만성 염증성 피부 질환으로 주로 소아기에 발병하며 호전과 악화를 반복하는 질병 경과를 보여 증상의 호전과 유지에 환자 및 보호자의 치료 순응도가 절대적으로 요구된다. 따라서 전문가들을 아토피피부염 환자와 보호자를 위한 치료적 환자교육의 권고안을 통해 자기관리 능력을 습득하여 적극적으로 치료 과정에 참여하도록 하고 있다.¹ 그러나 다수의 환자들은 아토피피부염의 일차 치료제인 국소 스테로이드의 사용을 거부하며 특히 중등증 이상의 환자들의 경우 증상 악화가 시작된 후 6-7일 후에

국소 스테로이드 도포를 시작하는 것으로 알려져 있다.² 또한 스테로이드 사용을 거부하는 보호자들을 대상으로 한 연구에서 환자가 여아인 경우, 환자의 아버지가 과거 국소 스테로이드를 사용한 경험이 있는 경우에 의미 있게 국소 스테로이드 사용에 대한 저항이 높은 것으로 나타났다.³ 국내 소아 아토피피부염 환자들을 대상으로 한 연구에서도 67.5%의 부모가 스테로이드 거부증을 보이고 있었으며 국소 스테로이드 사용 경험과 유의한 상관관계를 보였다.⁴ 이러한 국소 스테로이드에 대한 부적절한 거부증은 과거 국소 스테로이드 처방이 시작된 초기에 표준화된 처방 방침이 부재하여 이로 인한 국소 스테로이드의 남용과 부작용에 대한 보고들이 증

Correspondence to: Hye Yung Yum <http://orcid.org/0000-0002-3997-4094>

Department of Pediatrics, Seoul Medical Center, 156 Sinnae-ro, Jungnang-gu, Seoul 02053, Korea
Tel: +82-2-2276-7361, Fax: +82-2-2276-7377, E-mail: hyyum@hanmail.net

• This study was supported by research fund of Research Institute of Seoul Medical Center.

Received: May 31, 2016 Revised: January 13, 2017 Accepted: January 13, 2017

© 2017 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

폭되어 나타난 결과로 생각할 수 있다. 연고나 크림의 형태로 피부에 바르는 국소 스테로이드는 염증성 질환인 아토피피부염과 여드름 질환, 건선, 습진과 같이 피부 질환을 치료하기 위한 목적으로 50여 년간 처방되고 있다. 그러나 국소 스테로이드의 사용과 관련된 부작용의 보고와 연구는 미흡한 상태이며 특히 체중에 비해 체표면적이 넓은 소아는 전신적 부작용에 취약한 대상에서의 연구도 제한적이다. 이에 국소 스테로이드를 장기간 사용하는 아토피피부염 환자에서 고강도의 clobetasol propionate와 가장 약한 강도의 hydrocortisone의 혈중 농도를 측정하여 전신 흡수 여부와 중증도, 국소 스테로이드 사용과의 연관성을 분석하고자 두 가지 물질의 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 분석법을 개발하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2005년 1월부터 2012년 1월까지 서울의료원에 내원하여 전문의에 의해 아토피피부염으로 진단받은 환자를 대상으로 하였다. 아토피피부염 중증도는 SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) index를 기준으로 하였으며 15점 이하를 mild, 16-40점을 moderate, 41점 이상을 severe로 분류하였다. 이번 연구는 서울의료원 임상시험심사위원회의 승인 후 진행하였다(승인번호: 13-A01).

2. 방법

1) 시료의 전처리 방법

Serum 내의 corticosteroid (clobetasol propionate, hydrocortisone)의 농도를 분석하기 위해 액체상 추출법을 사용하여 실험을 진행하였다. 200 μ L의 serum에 50 μ g/mL 농도의 내부표준물질 (clobetasone butyrate) 10 μ L를 첨가한 후 추출용매인 n-Hexane: Diethyl ether (1:1)을 500 μ L 넣고 10분간 상온에서 방치 후, 다시 10분 동안 12,000 g에서 원심분리를 하여 상층액만을 480 μ L씩 분리하여 N₂ 가스로 용매를 증발시킨 후 Methanol 200 μ L을 넣어 추출물질을 다시 녹인다. 불순물을 제거하기 위해 hydrophilic polyvinylidenefluoride 실린지 필터로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석하였다.

2) 개발된 분석법의 유효성 검증 방법

검정곡선(calibration curve)을 작성하기 위하여 바탕시료에 표준물질을 첨가한 뒤 LC-MS/MS로 분석하였다. Clobetasol propionate, hydrocortisone 모두 바탕 시료와 내부표준물질을 첨가하여 분석물의 신호와 내부표준물질의 신호의 비를 응답신호로 이용하여 내부 표준법으로 분석하였다.

각 분석물의 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of

Table 1. Baseline characteristics of the study population (n = 109)

Characteristic	No. (%)
Age (yr)	
0-1	12 (11.0)
2-5	18 (16.5)
6-10	19 (17.4)
11-21	24 (22.0)
≥ 22	36 (33.0)
SCORAD index	
Mild (≤ 15)	15 (13.8)
Moderate (16-40)	59 (54.1)
Severe (≥ 41)	35 (32.1)

SCORAD, SCORing Atopic Dermatitis.

quantification)는 동일 농도의 시료 6개를 분석한 결과 값을 이용하여 신호 대 잡음비가 3이 되는 농도를 검출한계로 10이 되는 농도를 정량한계로 정의하였다. 정밀도, 정확도, 절대회수율, 상대회수율을 각각 측정하였다.

결과

1. 대상 환자

전체 환자는 109명으로 이중 남자 52명(47.7%), 여자 57명(52.3%)이었다. 평균 연령은 14.7세(4개월-56세)였으며 국소 스테로이드 사용 기간은 1개월에서 34년까지 분포하였으며 평균 5.9 ± 6.4 년이었다. 전체 환자 중 경증 15명(13.8%), 중등증 59명(54.1%), 중증 35명(32.1%)으로 분포하였다(Table 1). 109명의 대상 환자 중 99명이 hydrocortisone 사용하였으며 35명이 clobetasol propionate를 사용하였다. 35명의 clobetasol propionate 사용군은 모두 hydrocortisone 사용력이 있었다. 10명의 환자는 hydrocortisone, clobetasol propionate 이외의 스테로이드를 병용하여 사용하였다. Hydrocortisone 사용군은 평균 3.6 ± 3.1 년을 clobetasol propionate 사용군은 평균 2.7 ± 1.4 년을 각각 사용하였다.

2. 개발된 분석법의 유효성 검증

Clobetasol propionate, hydrocortisone 모두 시료 내 농도를 0.01, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 μ g/mL의 범위가 되도록 내부표준물질을 첨가하여 직선성을 알아보기 위한 검정곡선을 그렸다. Clobetasol propionate의 검정곡선은 $y = 1.864x + 0.199$ ($R^2 = 0.996$)을 나타내었고, Hydrocortisone의 검정곡선은 $y = 0.127x - 0.006$ ($R^2 = 0.983$)를 나타내었다. 모든 분석물질에 대하여 검정곡선의 변동계수 R^2 의 값이 0.97 이상을 나타냄으로써 양호한 직선성(linearity)을 나타내었다(Fig. 1).

실험 방법의 정밀도와 정확도를 평가하기 위하여, 바탕시료 중의 clobetasol propionate나 hydrocortisone의 농도가 0.125, 0.8, 8 μ g/

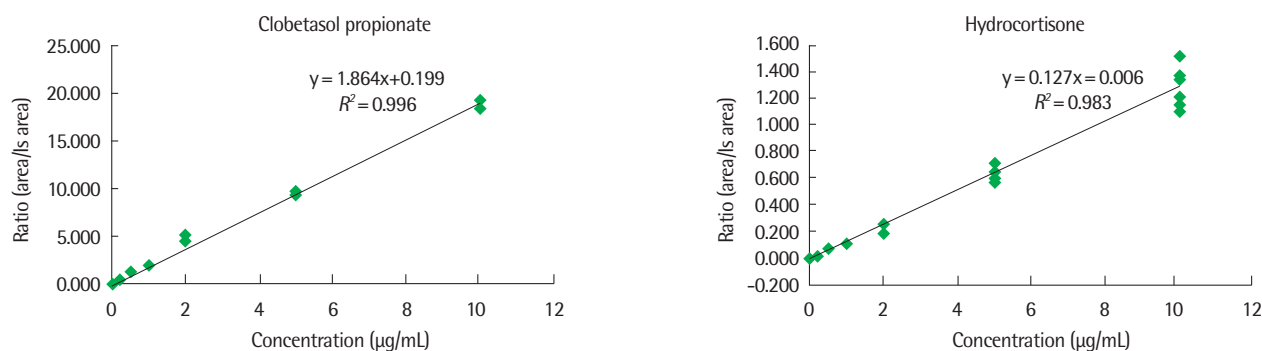


Fig. 1. Calibration of analytical clobetasol propionate (A), hydrocortisone (B).

Table 2. Inter-, Intraday precision, accuracy of analytical method

Method	Concentration (µg/mL)	Precision (CV, %)				Accuracy (bias%)
		Intraday	Interday			
			Day 1	Day 2	Day 3	
Clobetasol propionate	0.125	7.282	4.334	9.918	9.239	-0.312
	0.8	6.823	7.281	6.253	5.737	0.136
	8	11.472	7.295	8.189	7.180	0.014
Hydrocortisone	0.125	13.735	10.102	26.342	31.642	0.241
	0.8	6.985	7.583	12.336	24.587	-0.062
	8	16.679	10.862	13.345	29.663	-0.033

CV, coefficient of variation.

mL가 되도록 각 농도당 6개의 바탕시료에 표준물질을 첨가하여 분석하였다. 정밀도는 3회 반복의 intraday와 3일간의 interday로 나누어 실시하였다. 정확도는 bias(%)로 나타내주었다(Table 2). 정밀도는 변동계수가 4.334%–31.642% 범위로 재현성 있는 실험값을 나타내었으며, 정확도도 모든 농도에서 $\pm 1\%$ 전·후의 양호한 값을 얻었다. 두 농도(0.125, 8 µg/mL)에서 측정된 절대회수율은 6.097%–67.714% 범위였으며, 상대회수율은 14.099%–101.480%였다. 분석물질인 clobetasol propionate와 hydrocortisone 각각에 대하여 검출한계는 0.003, 0.022 µg/mL를 나타내었고, 정량한계는 0.009, 0.073 µg/mL로 혈청 내에 포함되어있는 미량의 clobetasol propionate와 hydrocortisone을 분석할 수 있음을 확인하였다.

고 찰

국소 스테로이드의 사용에 의한 전신적 부작용은 흔하지 않으나 위중하며 hypothalamic-pituitary-adrenal axis의 억제, 고혈당, 당뇨, 전해질 불균형 등이 보고되었다.⁵ 특히 국소 스테로이드 사용에 의한 소아의 Cushing's syndrome 43명의 증례를 분석한 연구에 따르면 86%는 거저귀발진을 가진 영유아들이었고 전체 대상의 82%는 clobetasol을 평균 2.75개월 동안 도포한 것으로 나타났다.⁶ 영유아에서 밀폐된 부위에 장기간 고강도의 국소 스테로이드를 도

포하는 것은 외인성 Cushing's syndrome의 위험을 증가시킬 수 있다. 따라서 국소 스테로이드의 전신적 부작용을 방지하기 위해 고강도의 국소제제의 경우 치료 기간 중 도포 중지 기간을 정하거나, 최소 강도와 용량을 준수하고 국소 스테로이드의 사용을 줄일 수 있는 제제를 함께 사용하는 등의 권고사항을 준수해야 한다.⁷

국소제제의 도포에 따른 경피적 흡수는 전신적 부작용의 가능성을 설명할 수 있으나 이에 대한 연구는 희박하다. 따라서 국소제제의 경피흡수를 정량하는 방법에 대한 시도 또한 제한적이다. 연구자들은 이전 연구에서 시중 판매되는 다양한 보습제 내에 포함될 수 있는 의도적 스테로이드의 검출 방법을 정립한 바 있다.⁸ 광범위한 아토피피부염 소아에서 하루 4회 6주간 tricamcinolone을 도포한 후 혈중 cortisol과 24시간 소변 내 cortisol 농도를 측정한 초기 연구에서는 혈중 cortisol 농도가 정상범위에서 측정되었다.⁹ 이와 달리 Turpeinen 등^{10–12}은 hydrocortisone의 도포와 관련된 경피적 흡수를 정량하였으며 혈중 cortisol의 변화를 측정하여 회복기 보다는 급성기, 중증의 피부 질환을 가진 영아에서 국소 스테로이드의 경피적 흡수를 증명하였다. 국소제제의 경피적 흡수를 정량하는 방법은 이와 같이 혈중, 소변 내의 농도 측정과 같은 간접적 방법이 사용되고 있으나 피부 구획에서의 약물 유흥성을 측정하는 방법들도 제안되고 있다.¹³ 임상적으로 피부에 도포되어 흡수되는 과정에는 밀폐 여부, 도포 기간이나 횟수, 약물의 농도, 인체 부위,

약물 전달체, 피부 손상 여부 등이 영향을 미칠 수 있어 이에 대한 고려도 필요하다.

아토피피부염에 사용하는 일차 국소제제인 국소 스테로이드 외에도 국소 칼시뉴린 억제제인 tacrolimus, pimecrolimus를 사용할 수 있으며 이 국소제제들의 경피적 흡수 정도를 인체 피부 조직을 이용한 분석 연구에 따르면 pimecrolimus가 국소 스테로이드, tacrolimus에 비해 약물농도가 낮게 측정되었다. 이는 친유성과 분자량이 높기 때문으로 판단한다.¹⁴ 일반적으로 pimecrolimus는 국소 스테로이드나 tacrolimus보다 상대적으로 경피 흡수의 위험이 낮을 것으로 예측한다.^{14,15}

이번 연구는 LC-MS/MS를 이용하여 비교적 흔히 사용되는 국소 스테로이드 두 제품(clobetasol propionate, hydrocortisone)의 혈청 내에서 검출 여부를 확인하고자 하였다. 혈청 내에 포함되어 있는 clobetasol propionate와 hydrocortisone을 추출하기 위하여 액체상 추출법을 이용하였으며, 최적화된 추출법으로 분석물에 대하여 약 10%~67% 정도의 절대 회수율을 얻었다. 이번 연구를 통하여 개발한 분석법은 우수한 직선성($R^2 \geq 0.98$) 및 정밀도와 정확도를 나타내었다. 분석물질 clobetasol propionate의 검출 한계는 3 ng/mL 이하, 정량 한계는 9 ng/mL 이하를 나타내고, hydrocortisone의 검출 한계는 0.022 µg/mL 이하, 정량 한계는 0.073 µg/mL 이하를 보여 혈청 내의 미량의 corticosteroid (clobetasol propionate, hydrocortisone)를 분석하기에 적절한 분석법임을 확인하였다.

이번 연구의 대상은 생후 4개월부터 56세에 이르는 다양한 연령의 환자들을 포함하고 있으며 전체 환자의 86.2%가 중등증 이상의 중증도를 보이고 있다. 또한 발병 기간도 평균 5.86년 (9개월~34년)으로 만성 질환의 경과를 반영하고 있다. 저자들은 개발된 LC-MS/MS를 이용한 분석한 결과 109명 대상 환자의 중증도와 사용 기간에 무관하게 clobetasol과 hydrocortisone 자체를 혈청에서 측정할 수 없었다. 이번 연구는 중등증 이상의 중증도와 장기간 경과에도 대상군에서 혈청에서 환자들이 사용한 국소스테로이드를 검출할 수 없었다는 의의를 가진다. 그러나 환자 병변의 피부 조직을 이용한 분석이 향후 이루어진다면 국소 도포 후 경피 흡수의 경로를 추정하고 이에 따른 전신 부작용에 대한 예측이 가능할 것으로 생각한다. 이번 연구의 제한점은 후향적 연구로 연령의 분포가 고르지 않았으며 환자의 국소제제 사용과 연관된 밀폐 여부, 횟수, 부위 및 손상 여부 등에 대한 정보가 명확하지 않아 사용한 국소제제의 강도와 자세한 사용 기간에 대한 분석이 모든 환자에서 이루어지지 않은 점이다. 또한 피부 조직 생검을 확보하지 못하여 혈중 분석과의 비교분석이 이루어지지 않았다.

국소 스테로이드는 현재까지 아토피피부염을 비롯한 다양한 피부 질환의 주치료제로 사용되고 있으나 스테로이드 거부증으로 효율적인 치료가 어려워 국소 스테로이드의 안전성에 대한 다양한 연구가 필요하다. 특히 국소 스테로이드의 주요 부작용인 전신 흡수,

소아와 같이 취약한 연령에서 고강도의 국소 스테로이드의 장기간 도포에 대한 우려를 고려할 때 안전성을 확보하기 위한 인체 내 흡수에 대한 안전성 자료가 요구되고 있다. 연구자들은 혈청 내 국소 스테로이드 검출을 위한 LC/MS-MS를 개발하였다. 이를 적용하여 경피적 흡수의 가능성이 높은 임상군에서의 피부 생검, 혈청 등을 이용한 검출 분석이 이루어진다면 국소 스테로이드의 경피적 흡수의 경로에 대한 추적과 모니터링에 관한 추가 연구가 가능할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Barbarot S, Bernier C, Deleuran M, De Raeye L, Eichenfield L, El Hachem M, et al. Therapeutic patient education in children with atopic dermatitis: position paper on objectives and recommendations. *Pediatr Dermatol* 2013;30:199-206.
2. Zuberbier T, Orlow SJ, Paller AS, Taïeb A, Allen R, Hernanz-Hermosa JM, et al. Patient perspectives on the management of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:226-32.
3. Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, et al. Factors associated with steroid phobia in caregivers of children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol* 2013;30:29-35.
4. Lee JY, Her Y, Kim CW, Kim SS. Topical corticosteroid phobia among parents of children with atopic eczema in Korea. *Ann Dermatol* 2015;27:499-506.
5. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol* 2006;54:1-15.
6. Tempark T, Phatarakijirund V, Chatproedprai S, Watcharasindhu S, Supornsilchai V, Wananukul S. Exogenous Cushing's syndrome due to topical corticosteroid application: case report and review literature. *Endocrine* 2010;38:328-34.
7. Nieman LK. Consequences of systemic absorption of topical glucocorticoids. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:250-2.
8. Park S, Cho GY, Lee SA, Kim HJ, Yum HY, Paeng KJ. Determination of corticosteroids in moisturizers by LC-MS/MS. *Mass Spectrom Lett* 2016;7:26-9.
9. Rasmussen JE. Percutaneous absorption of topically applied triamcinolone in children. *Arch Dermatol* 1978;114:1165-7.
10. Turpeinen M, Salo OP, Leisti S. Effect of percutaneous absorption of hydrocortisone on adrenocortical responsiveness in infants with severe skin disease. *Br J Dermatol* 1986;115:475-84.
11. Turpeinen M, Mashkileyson N, Björkstén F, Salo OP. Percutaneous absorption of hydrocortisone during exacerbation and remission of atopic dermatitis in adults. *Acta Derm Venereol* 1988;68:331-5.
12. Turpeinen M. Influence of age and severity of dermatitis on the percutaneous absorption of hydrocortisone in children. *Br J Dermatol* 1988;118:517-22.
13. Maibach HI, Wester RC. Issues in measuring percutaneous absorption of topical corticosteroids. *Int J Dermatol* 1992;31 Suppl 1:21-5.
14. Billich A, Aschauer H, Aszódi A, Stuetz A. Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus. *Int J Pharm* 2004;269:29-35.
15. Pariser D. Topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors in the treatment of atopic dermatitis: focus on percutaneous absorption. *Am J Ther* 2009;16:264-73.