

## HPLC/DAD/ESI-MS 및 고체상 추출법을 이용한 뇨시료중 갑상선 호르몬 분석

곽선영<sup>1</sup> · 문명희<sup>2</sup> · 표희수<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>중외제약 중앙연구소 합성연구실, <sup>2</sup>연세대학교 화학과,

<sup>3</sup>한국과학기술연구원, 생체대사연구센터

(2006. 8. 24. 접수. 2006. 10. 25. 승인)

## Determination of thyroid hormones by solid-phase extraction using high performance liquid chromatograph/diode array detector/electro-spray ionization mass spectrometry in urine samples

Sun Young Kwak<sup>1</sup>, Myeong Hee Moon<sup>2</sup> and Heesoo Pyo<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Process Development Lab., Choongwae Pharma Corp., 146-141 Annyong-Dong, Hwasung, Kyunggi-Do 445-976, Korea

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Yonsei University, 134 Shinchon-Dong, Seoul 120-749, Korea

<sup>3</sup>Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute Science & Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

(Received August 24, 2006; Accepted October 25, 2006)

**요 약:** 본 연구에서는 뇨시료를 고체상 추출법으로 추출한 후 HPLC/DAD/ESI-MS(high-performance liquid chromatograph/diode array detector/electro-spray ionization mass spectrometry)를 사용하여 분석하였다. 7종의 thyroid hormones의 HPLC 분리조건은 Hypersil ODS(octadecylsilica) 컬럼(4.6 mm I.D., 100 mm length, particle size 5  $\mu$ m)을 사용하고 ammonium formate buffer와 acetonitrile을 이동상으로 하여 기울기 용리한 결과 완전 분리가 가능하였으며, UV spectra 및 질량스펙트럼을 확인할 수 있었다. 고체상 추출법에 의한 전처리 최적 조건을 조사한 결과 시료를 pH 3으로 한 후 C18 고체상을 사용하여 4 mL의 methanol/ammonium hydroxide(9:1) 혼합용액으로 용리할 경우 회수율이 89.0-113.1%로 나타났다. HPLC/DAD를 이용하여 10-1000 ng/mL범위에서 검량선을 작성한 결과  $r^2$ 값은 0.992-0.998 으로 나타났으며 검출한계는 2-4 ng/mL(3.8-13.0 pmol/mL)로 계산되었다.

**Abstract:** An analytical method for the determination of thyroid hormones in urine samples has been studied by using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/diode array detector/electro-spray mass spectrometry. Seven thyroid hormones were successfully separated by gradient elution on the reverse phase Hypersil ODS column (4.6 mm I.D., 100 mm length, particle size 5  $\mu$ m) with ammonium formate buffer and acetonitrile, and UV spectra and mass fragment could be confirmed. The extraction recoveries of thyroid hormones in the urine samples (pH 3) were in the range of 89.0-113.1% with solid-phase extraction by C18,

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-958-5181 Fax : +82-(0)2-958-5059

E-mail: pbs3692@kist.re.kr

followed by elution with 4 ml of methanol/ammonium hydroxide (9 : 1). The calibration curves showed good linearity with the correlation coefficients ( $r^2$ ) varying from 0.992 to 0.998 and the detection limits of all analytes were obtained in the range of 2-4 ng/ml (3.8-13.0 pmol/ml).

**Key words:** thyroid hormones, HPLC/DAD/ESI-MS, urine

## 1. 서 론

인체 내의 중요한 내분비기관 중 하나인 갑상선은 후두의 물렁뼈 아래에 위치하며, 목소리를 관장하고 혈중 칼슘치를 적절한 수준으로 유지하는 역할을 한다. 요오드를 원료로 하여 갑상선에서 생성되는 갑상선호르몬(thyroid hormones)은 체내의 특정부위에서만 작용이 일어나는 다른 호르몬들과는 달리, 신체내의 거의 모든 조직에서 작용하여 세포 내의 이화작용을 촉진하고 총 대사량을 증가시켜 체온을 높이며 뇌의 흥분성을 강화한다. 또한, 단백질 동화를 돕고 간에 있는 글리코겐의 분해를 촉진시키며 지방질대사에도 관여하는 등 다양한 작용을 수행한다.<sup>2</sup>

Thyroid hormones은 혈액 내에서 그 대부분이 결합 글로블린(TBG : thyroid hormone binding globulin), 타이록신 결합 프레알부민(TBPA : thyroxine binding prealbumin)과 알부민(albumin)등의 단백질과 결합하여 존재하며 극히 일부분 즉, 3,3',5-triiodothyronine (T3)의 약 0.3%와 thyroxine(T4)의 약 0.03%만이 단백질과 결합하지 않은 유리형(free form)의 형태로 전신을 순환하고 있다. 혈중 T3와 T4의 정상 범위는 각각 0.8-2  $\mu\text{g/L}$ 와 50-120  $\mu\text{g/L}$  범위로 알려져 있으며, 3,3',5'-triiodothyronine(r-T3)의 농도는 0.25-0.75  $\mu\text{g/L}$ 로 T3의 약 1/3 정도로 존재한다.<sup>3</sup> T3와 T4의 양은 갑상선자극호르몬(TSH:thyroid stimulating hormone)에 의해 조절되며 그 양이 과도하게 많거나 부족할 경우 갑상선 기능 항진증 또는 저하증이 발생한다.

이와 같이 체내에서 중요한 역할을 하는 thyroid hormones에 의한 각종 질병 또는 대사 이상을 판단하기 위한 자료로서 혈액이나 뇨 등의 생체 물질에서의 thyroid hormones에 대한 정확한 정성 및 정량분석은 매우 중요하며 특히 생체 내에 포함되어 있는 thyroid hormones의 분리 및 확인을 위한 분석법 개발이 필수적이다. Thyroid hormones을 분석하기 위한 연구는 주로 혈중농도 조사에 치중되어 왔으나<sup>4,5</sup> 최근들어 이 외에도 뇨,<sup>6,7</sup> 머리카락<sup>8</sup> 등에서 thyroid hormones을 분석한 사례들이 보고되고 있다. Thyroid hormones을

분석하기 위한 고전적인 방법으로는 ion-exchange,<sup>9</sup> gel chromatography,<sup>10</sup> liquid partition,<sup>11</sup> paper chromatography(PC), Thin layer chromatography(TLC),<sup>12</sup> Colorimetry<sup>13</sup> 등이 있으며, 최근에는 gas chromatography(GC),<sup>14-15</sup> high performance liquid chromatography(HPLC)<sup>16-17</sup> capillary electrophoresis(CE)<sup>18</sup> 및 immunoassay 등을 이용한 방법들이 연구되고 있다. GC에 의한 분석방법은 감도, 특이성, 신속성의 관점에서 관심을 끌만한 방법이나 이 화합물들의 증기압이 매우 낮기 때문에 GC에 의한 분석에는 제한을 받는다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 Richard 등이 보고한 바와 같이<sup>19</sup> 유도체화 과정을 거쳐야하는 단점이 있다. 반면, HPLC를 사용할 경우 GC와 달리 유도체 화없이 thyroid hormones을 직접 분석할 수 있으나 지금까지의 연구는 대부분 T3와 T4의 분석에 국한되어 있다.

HPLC의 경우, diode array detector나 fluorescence detector 등의 검출기를 사용할 수 있으나 이 경우 선택과정에 의한 peak의 머무른 시간 및 그 넓이에 의해서만 정성 및 정량이 가능하므로 정확한 분자구조 및 분자량의 확인이 불가능한 단점이 있다. 이에 비해 LC/MS를 사용할 경우 HPLC/DAD에 의한 분석만으로는 확인하기 어려운 각 물질의 분자량 및 분자구조에 대한 정보를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 여러 가지 방해물질에 의한 크로마토그램의 바탕선 상승 등의 문제점을 해결할 수 있는 장점이 있다. 그 밖에 immunoassay에 의한 방법<sup>20</sup>이 사용될 수 있는데 이 방법은 특이성과 감도가 좋은 장점이 있으나 여러 종류의 thyroid hormones을 동시에 분리하기 어려운 단점이 있다.

또한 복잡한 생체시료로부터 thyroid hormones만을 효과적으로 추출, 정제하는 시료전처리 과정이 필요하다. 뇨 및 혈액과 같은 생체시료의 전처리에는 liquid-liquid extraction이 널리 사용되고 있으나, 이 방법은 시료 내의 불순물 제거가 어려워 검출한계가 높아지는 단점이 있다. 반면, solid-phase extraction을 사용할 경우 적절한 고체상 및 용리액을 사용할 경우 효과적

인 추출과 정제가 가능하며 동시에 여러 개의 시료를 처리할 수 있는 장점이 있다.

이에 본 연구에서는 갑상선 호르몬을 대상으로 HPLC/DAD/ESI-MS를 이용하여 확인, 정량하는 방법을 연구하였으며, 뇨시료에서의 시료 전처리를 위한 고체상 추출법의 최적 조건을 조사하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

본 연구에 사용된 7종의 대상물질은 모두 Sigma-Aldrich사(Steinheim, Germany)의 제품을 사용하였고, ethyl acetate, acetone, methanol, ethanol 및 acetonitrile은 Burdick & Jackson사(Muskegon, MI, USA)의 HPLC grade급을 사용하였다. Ammonium formate는 Aldrich사(Steinheim, Germany)의 제품을 구입하여 사용하였고, 증류수는 Milli-Q 및 Milli-RO system을 통과한 3차 증류수를 Whatman사의 membrane filter (pore size 0.2  $\mu\text{m}$ )로 여과한 것을 사용하였다. 고체상 추출에 사용한 카트리지는 Waters사에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 기기 및 장치

본 연구에서 사용된 HPLC/DAD/ESI-MS는 Agilent사의 제품으로 HP 1100 Series LC(DR5 solvent delivery system, variable volume autoinjector, temperature controlled column compartment 및 diode array detector)와 1100 series LC/MS Trap을 연결하여 사용하였다. 분리관은 Hewlett Packard사의 Hypersil ODS Column(5  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  4.6 mm)을 사용하였다. 고체상 추출은 Waters사의 vacuum folder를 이용하였으며, 시료 농축을 위해 Büchi사의 RE111 진공회전증발기와 Zymark사의 Turbo Vap LV 질소증발기를 사용하였다.

### 2.3. 실험방법

#### 2.3.1. 표준시료 제조

7종의 표준물질을 각각 0.1N NaOH용액에 녹여 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 저장용액을 만든 후, 이들을 혼합하여 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 혼합표준용액을 만들어 사용하였다. 내부표준물질인 ethyltheophylline은 1000 mg/mL methanol 용액으로 제조해 희석하여 사용하였다.

#### 2.3.2. 용리액의 제조

이동상은 ammonium formate(FW=63.06, 97%) 1.3

g을 1L에 녹여 20 mM(pH 4)이 되도록 제조한 용액과 acetonitrile을 사용하였다.

#### 2.3.3. 시료 전처리법

뇨 시료 10 mL를 pH 3으로 조절한 후, sodium chloride 2 g을 첨가하여 용해시켰다. 고체상 카트리지를 vacuum folder에 장착하고 methanol과 증류수(pH 3)를 차례로 10 mL씩 흘려준 다음 준비된 10 mL를 고체상에 loading하였다. 세척액으로 ethyl acetate 10 mL를 사용하여 불순물을 씻어낸 후 20분간 진공펌프로 고체상의 수분을 제거하였다. Methanol/ammonium hydroxide(9:1) 용액 4 mL을 통과시키면서 용리한 다음 내부표준물질(ethyltheophylline 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 100 mL를 첨가하여 질소농축기로 200  $\mu\text{L}$ 까지 농축하여 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter로 걸러 vial에 담았다.

#### 2.3.4. HPLC 분석방법

전처리에서 얻은 용액 10  $\mu\text{L}$ 를 HPLC에 주입하고 Table 1에 나타난 기기조건에 따라 기울기 용리하여 분리한 후 각 성분의 UV 스펙트럼 및 질량스펙트럼을 얻었다.

#### 2.3.5. 검량선 작성

뇨시료 10 mL에 thyroid hormones 표준용액의 농도를 단계적으로 각각 10-1000 ng/mL의 범위로 첨가하고 전처리 한 후 HPLC에 의해 분석하여 각 성분의 농도와 피크 넓이와의 관계식을 구하여 검량선을 작성하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 HPLC/DAD에 의한 thyroid hormones의 분리 및 스펙트럼

본 연구에서는 조사대상물질인 7종의 thyroid hormones을 효과적으로 동시분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. Table 1의 방법에 따라 기울기 용리하여 분리한 결과 Fig. 1과 같이 15분 이내에 7종 대상물질의 완전분리가 가능하였다. 또한 각 물질의 UV 스펙트럼을 확인한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 대부분의 물질이 230 nm의 파장에서 최대흡광도를 나타내어 이 파장을 선택하여 분석하였다.

7종의 thyroid hormones에 대한 머무른 시간의 안정성을 조사하기 위하여 표준물질 혼합용액을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 제조한 후 7번 연속으로 HPLC

Table 1. HPLC operating conditions for analysis of thyroid hormones

· Instrument : Hewlett Packard HPLC 1100/DAD/MS Trap
· Column : ODS Hypersil (100×4.6 mm I.D., 5 μm)
· Mobile phase :
Ammonium formate, 20 mM (pH 4.0) / ACN =
100/0%(v/v) (5 min hold) → 60/40 %(v/v)(1.33 mL/min)
· Flow rate : 1 mL/min
· Injection volume : 10 μL
· Ion source type : ESI (positive and negative)
· Scan range : 40-800 m/z
· Drying gas(N <sub>2</sub> ) : 4 L/min
· Nebulizer gas pressure : 10 psi
· Source voltage : 3.5 kV
· Vaporization temp. : 325°C
· Relative collision energy : 25%
· Column oven temperature : 40°C
· Run time : 16 min
· Post time : 3 min
· DAD Wavelength : 230 nm

에 주입한 후 머무른 시간을 측정하여 평균과 RSD (%) 값을 구하였다. 그 결과 Table 2에 나타낸 바와 같이 0.43-0.79%의 RSD(%) 값을 나타내어 반복성이 우수한 것으로 확인하였다.

### 3.2. LC/MS에 의한 thyroid hormones의 확인

LC/MS를 사용하여 thyroid hormones을 분석할 경우 HPLC/DAD에 의한 분석만으로는 확인하기 어려운 각 물질의 분자량 및 분자구조에 대한 정보를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 여러 가지 방해물질에 의한

크로마토그램의 바탕선 상승 등의 문제점을 해결할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 thyroid hormones이 검출되었을 경우 이를 확인하는 방법으로 LC/ESI-MS에 의한 질량스펙트럼을 조사하여 분석의 선택성과 정밀성을 개선하고자 하였다.

대상물질인 thyroid hormones의 ion trap MS에 의한 질량 스펙트럼을 Fig. 4에 나타내었다. 먼저, 양이온 스펙트럼을 살펴보면 모든 thyroid hormones에서  $[MH^+]$ 와  $[MH^+-46]$  토막이온이 나타났다. Monoiodothyronine(MIT)의 경우  $[MH^+-46]$ 이 base peak으로 나타났으며 이는  $[MH^+]$ 에서 HCOOH가 떨어져 나간 토막이온으로 추정된다(Fig. 3).

DIT, T2, T3, r-T3 및 T4는  $[MH^+]$ 가 base peak으로 나타난 반면, thyronine(T0)은 아미노산의 일반적인 토막나기(fragmentation)의 특징인  $[MH^+]$ 에서 NH<sub>3</sub>가 떨어져 나가 생성된 이온으로 추정되는  $[MH^+-17]$ 이온이 base peak으로 나타났다.

음이온 스펙트럼은 모든 thyroid hormones에서  $[M-H]$ 가 나타난 반면 분자량이 비교적 작은 물질인 MIT와 T0에서  $[2(M-H)^-Na]^+$  형태는 dimer가 나타난 것을 제외하면 다른 특성 peak이 나타나지 않았다.

### 3.3. 추출회수율 조사

생체시료의 전처리에는 분석대상물질의 손실을 방지하면서 matrix로부터 대사물질을 분리하고 농축, 정제하는 과정 등이 포함된다. 본 연구에서는 고체상 추출법을 사용하여 대상 matrix인 뇨시료에서 thyroid

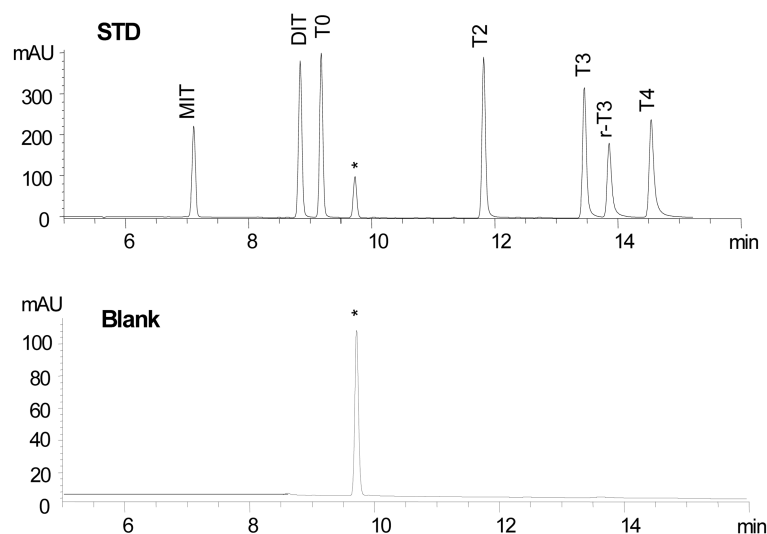


Fig. 1. Chromatograms of thyroid hormones by HPLC/DAD.

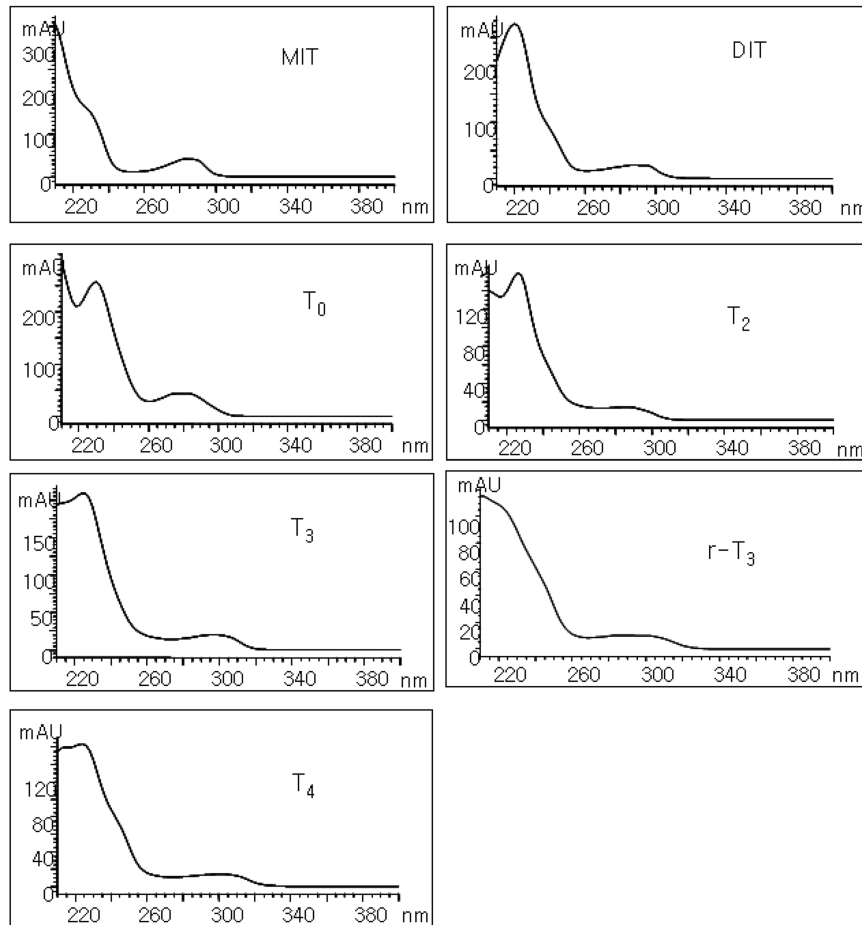


Fig. 2. UV Spectra of thyroid hormones by HPLC/DAD.

Table 2. Retention time stability of thyroid hormones by HPLC/DAD

Compounds	Relative retention time (min)		RSD (%)
	mean	SD	
MIT	0.738	0.006	0.79
DIT	0.912	0.007	0.71
T0	0.946	0.006	0.59
T2	1.215	0.007	0.59
T3	1.384	0.006	0.43
r-T3	1.427	0.007	0.51
T4	1.498	0.009	0.62

MIT : Monoiodotyrosine  
 DIT : Diiodotyrosine  
 T0 : Thyronine  
 T2 : 3,5-Diiodothyronine  
 T3 : 3,5,3'-Triiodothyronine  
 r-T3 : 3,5',3'-Triiodothyronine  
 T4 : Thyroxine

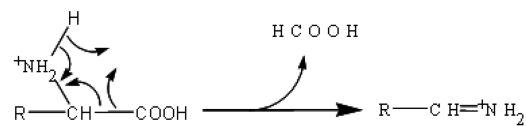


Fig. 3. [MH<sup>+</sup>46] fragment by rearrangement in thyroid hormones.

hormones을 추출하기 위한 최적조건을 조사하였다.

### 3.3.1. 고체상에 의한 회수율 비교

C18, C8, C2, cyanomethyl 및 silica 등 여러 가지 고체상을 사용하여 회수율을 비교한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 C18 고체상을 사용할 경우 7종의 대상물질에 대한 추출율이 89.0-113.1% 범위로 나타나 가장 적합한 고체상인 것으로 나타났다. 또한 추출의 재현성도 RSD가 6.2-8.9% 범위로 나타났다(Table 3).

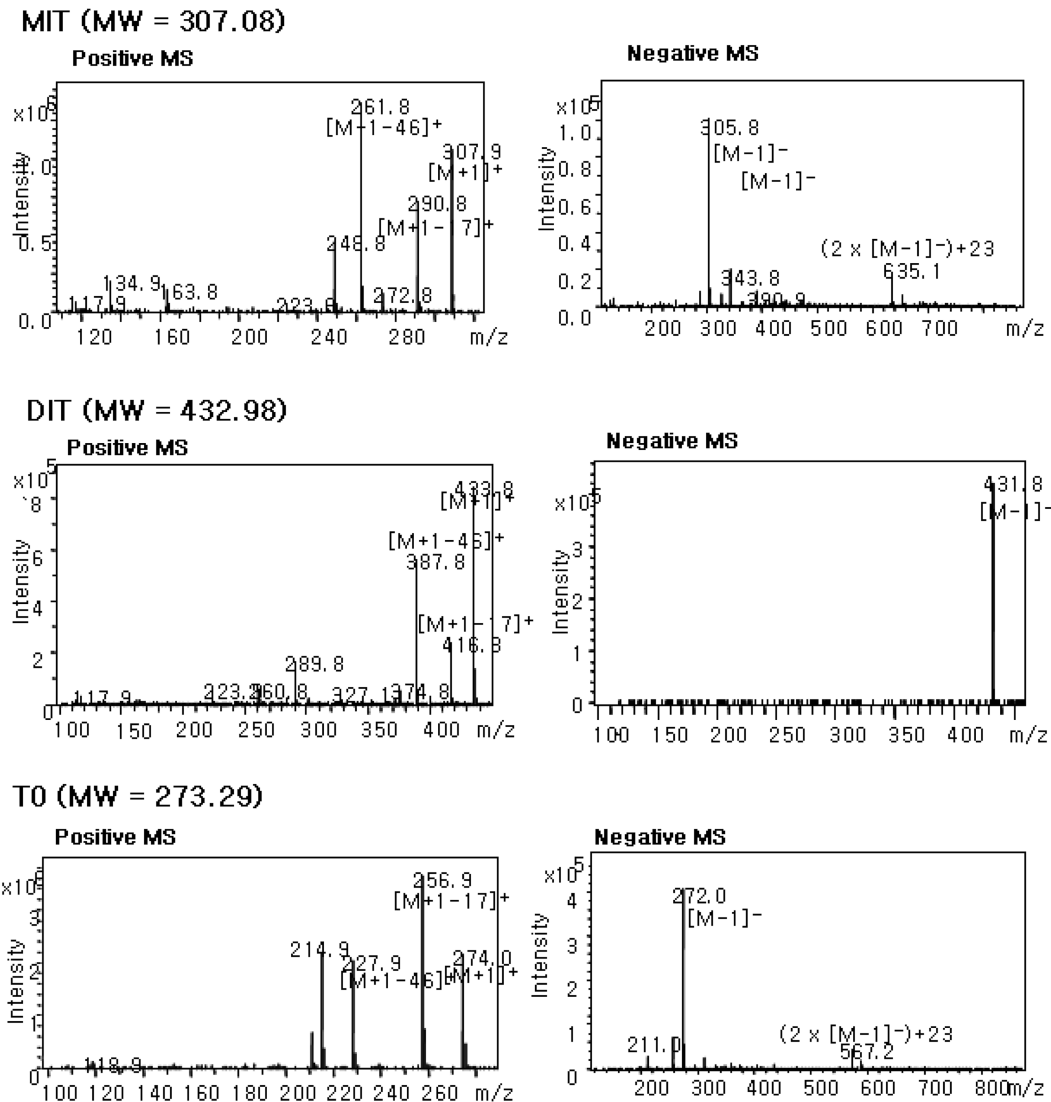


Fig. 4. Mass spectra of thyroid hormones by LC/ESI-MS.

### 3.3.2. 용리액에 따른 회수율 비교

위의 실험 결과에 따라 회수율이 가장 높았던 C18 고체상을 사용할 경우 용리액에 따른 회수율을 비교한 결과 methanol/ammonium hydroxide의 비율이 9:1인 경우가 가장 높은 회수율을 보였다(Table 4).

### 3.3.3. 시료의 pH에 따른 회수율 비교

C18 고체상과 용리액으로 methanol/ammonium hydroxide(9:1) 4 mL를 사용하고 시료의 pH를 1, 3, 5, 7, 9 등으로 변화시키면서 추출한 결과, Table 5에

나타낸 바와 같이 pH3에서의 추출율이 가장 높게 나타났다.

### 3.3.4. Washing 용매액에 따른 회수율 비교

C18 고체상에 thyroid hormones를 흡착시킨 후 용리에 앞서 불순물을 제거하기 위한 washing 과정으로 ethyl acetate, acetone 및 acetonitrile 등의 용매를 흘려준 후 손실율을 조사하였다. 일반적으로 용매의 극성도를 나타내는 척도인 solvent polarity parameter(p) 값이 acetonitrile(5.8) > acetone(5.1) > ethyl acetate(4.4)

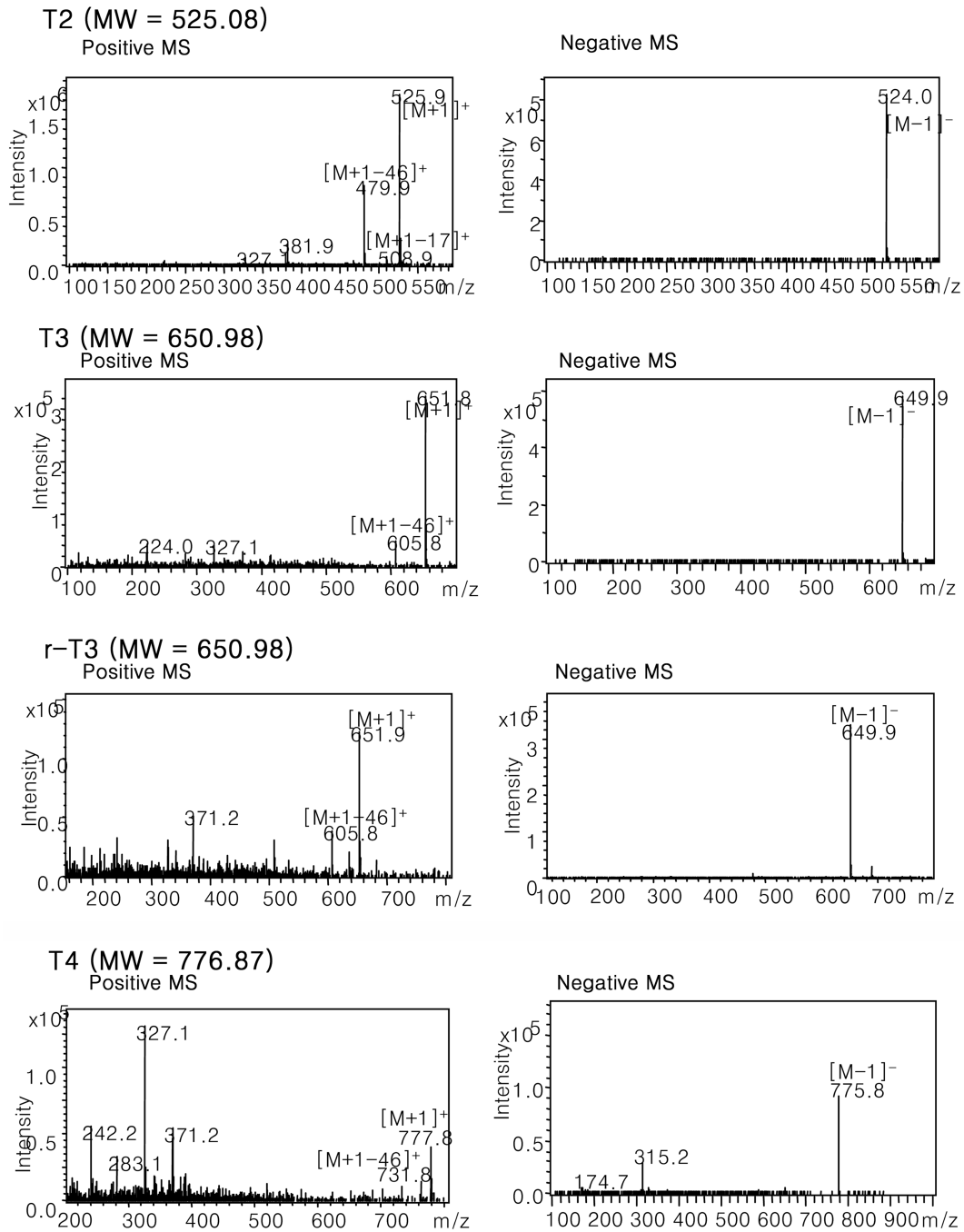


Fig. 4. Continued.

의 순으로 나타나 있다<sup>21</sup>. 연구 결과 극성도가 큰 acetone과 acetonitrile 등을 사용할 경우 회수율이 50%

미만으로 현저히 저하되는 것으로 나타나 극성용매에 의하여 thyroid hormones이 빠져나가는 것으로 나타났

Table 3. Effects of solid phase on the extraction recoveries of thyroid hormones from urine with SPE

Compounds	Extraction recoveries(%)									
	C18		C8		C2		cyanomethyl		Silica	
	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD
MIT	112.8	8.9	56.5	3.7	29.0	4.6	18.6	2.0	12.2	1.0
DIT	99.2	6.3	47.2	2.4	47.3	5.4	39.5	6.1	13.4	2.3
T0	113.1	8.1	83.1	1.8	82.2	3.3	60.9	10.7	8.9	1.2
T2	103.5	6.3	64.0	1.8	68.0	2.9	99.3	4.8	0.3	0.6
T3	107.5	7.2	43.1	5.6	47.8	2.6	76.3	1.3	2.9	1.7
r-T3	98.6	6.2	43.3	1.0	45.5	4.4	79.6	8.6	3.5	0.6
T4	89.0	8.3	37.8	1.3	51.8	10.6	67.3	0.8	4.1	1.8

conc. = 1 µg/mL (n=3)

Table 4. Effects of eluent on the extraction recoveries of thyroid hormones from urine with SPE

Compounds	Extraction recoveries(%)							
	Methanol		Methanol/Ammonium hydroxide				Ethanol/Ammonium hydroxide	
			90:10		70:30		90:10	
	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD
MIT	50.5	1.3	112.8	8.9	62.3	1.3	62.5	3.4
DIT	50.7	9.1	99.2	6.3	43.9	4.0	81.1	4.9
T0	52.6	1.7	113.1	8.1	64.7	5.9	85.9	2.1
T2	47.6	1.8	103.5	6.3	42.4	1.4	75.2	6.6
T3	48.9	1.6	107.5	7.2	28.8	6.2	78.3	6.2
r-T3	45.3	0.3	98.6	6.2	40.6	3.7	88.0	6.1
T4	39.5	1.6	89.0	8.3	24.4	3.2	80.7	3.7

conc. = 1 µg/mL (n=3)

Table 5. Effects of pH on the extraction recoveries of thyroid hormones from urine with SPE

Compounds	Extraction recoveries(%)									
	pH 1		pH 3		pH 5		pH 7		pH 9	
	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD
MIT	82.8	5.4	112.8	8.9	69.7	7.0	71.8	7.3	57.0	5.1
DIT	10.9	2.6	99.2	6.3	74.4	9.1	56.4	8.8	49.1	7.3
T0	41.2	2.9	113.1	8.1	87.1	10.3	85.9	7.4	93.0	1.3
T2	18.9	4.2	103.5	6.3	79.4	5.7	82.0	5.0	88.1	4.8
T3	11.5	8.5	107.5	7.2	71.0	5.0	96.8	5.9	104.6	0.3
r-T3	12.6	3.5	98.6	6.2	96.9	2.8	98.1	1.8	93.0	5.6
T4	16.9	10.6	89.0	8.3	74.0	2.7	78.2	3.5	73.3	1.6

conc. = 1 µg/mL (n=3)

다. 반면 ethyl acetate를 사용하여 washing할 경우에는 thyroid hormones이 손실되지 않는 것을 확인하였다(Table 6).

### 3.3.5. 용리액의 양에 따른 회수율의 변화

Thyroid hormones을 C18 고체상에 흡착한 후 용리액으로 methanol/ammonium hydroxide(9:1) 용액을 2 mL씩 흘려 용리시키면서 분취하여 각 분액내의 추출율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 모든 물질이 2 mL정도에서 98%이상 용리된 것으로

Table 6. Effects of washing solvent on the extraction recoveries of thyroid hormones from urine with SPE

Compounds	Extraction recoveries(%)					
	Ethyl acetate		Acetone		Acetonitrile	
	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD
MIT	112.8	8.9	17.9	9.4	15.7	7.3
DIT	99.2	6.3	31.2	10.5	21.5	7.8
T0	113.1	8.1	24.4	7.1	23.1	4.0
T2	103.5	6.3	29.4	1.5	35.4	10.6
T3	107.5	7.2	31.2	8.9	42.6	4.8
r-T3	98.6	6.2	31.5	7.8	45.6	2.7
T4	89.0	8.3	23.7	8.5	53.8	3.1

conc. = 1 µg/mL (n=3)

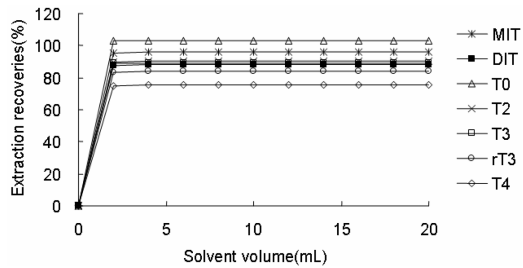


Fig. 5. Effects of solvent volume on the extraction recoveries of thyroid hormones from urine with SPE.

나타났으며 4 mL 이후에는 회수율이 증가하지 않아 용리액은 4 mL로 정하였다.

### 3.4. 검량선 작성 및 검출한계 조사

Thyroid hormones 표준용액이 10-1000 µg/mL 범위

로 포함된 뇨시료 10 mL을 2.3.3에서 설명된 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후 HPLC/DAD로 분석하고, 내부 표준물질에 대한 각 성분의 농도와 피크 넓이와의 관계식을 구하여 검량선을 작성하여 Table 7에 나타내었다. 7종의 대상물질의 검량선은 상관계수가  $r^2=0.99$  이상으로 직선성이 양호하였으며 검출한계는 10-40 ng/mL(15.4-61.4 pmol/mL) 범위로 나타났다.

## 4. 결론

뇨시료로부터 HPLC/DAD/ESI-MS를 이용한 thyroid hormones의 분석 및 추출에 대한 최적조건을 연구하였다. 7종의 thyroid hormones를 검출하기 위해 HPLC/DAD/ESI-MS를 사용하여 기울기용리한 결과 완전분리가 가능하였으며 머무른 시간의 반복성 또한 RSD가 0.43-0.79%로 우수하였다.

Thyroid hormones의 확인을 위해 LC/MS를 사용한 결과, 모든 thyroid hormones에서  $[MH^+]$ 가 검출되었으며  $[MH^+]$ 에서 HCOOH가 떨어져 나간 토막이온인  $[MH^+-46]$ 과  $NH_3$ 가 떨어진  $[MH^+-17]$  이온 등이 주로 나타났다. 또한 음이온스펙트럼의 경우는  $[M-H]$ 가 모두 검출되었다.

고체상 추출법에 의한 thyroid hormones의 전처리의 최적조건을 조사한 결과 pH 3에서 C18 고체상을 사용하고 methanol/ammonium hydroxide(9:1)의 혼합용액 4 mL로 용리할 경우 회수율이 89.0-113.1% 범위로 가장 높게 나타났다. 7종 thyroid hormones의 검량선은 10-1000 ng/mL 범위에서  $r^2=0.99$  이상의 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 10-40 ng/mL(15.4-61.4 pmol/mL) 범위로 측정되었다.

Table 7. Calibration data and detection limits of thyroid hormones

Compounds	RRT	Concentration Range (ng/mL)	Y=aX+b			MDL	
			a	b	$r^2$	(ng/mL)	(pmol/mL)
MIT	0.738	10 - 1000	0.985	0.0150	0.998	10	32.6
DIT	0.912	10 - 1000	0.568	0.0298	0.992	10	23.1
T0	0.946	10 - 1000	1.545	0.0345	0.996	10	36.6
T2	1.215	10 - 1000	1.174	0.0467	0.994	10	19.0
T3	1.384	10 - 1000	1.007	0.0109	0.998	10	15.4
r-T3	1.427	40 - 1000	0.543	0.0165	0.995	40	61.4
T4	1.498	40 - 1000	0.488	0.0162	0.997	40	51.5

\*ISTD : Ethyltheophylline ( $t_R = 9.723$ )

MDL : method detection limits

## 참고문헌

1. H. Gika, M. Lümmerhofer, I. Papadoyannis, W. Lindner, *J. Chromatogr.*, **800**, 193-201 (2004).
2. R.O. Greep and E.B. Astwood, "Handbook of physiology, Section 7: Endocrinology", **Vol III**, American Physiology Soc., New Work, U.S.A., 1974.
3. 안세영, "갑상선 클리닉", pp. 53-55, 정보사, 대한민국, 2004.
4. H. Volkoff, J.P. Wourms, E. Amesburg and F.F. Snellson, *J. Experimental zoology*, **284**, 501 (1999).
5. L. Kovacikova, P. Kunovsky, P. Skrak, V. Hraska, L. Kostalova and E. Tomeckova, *European J. of Cardio-Thoracic Surgery*, **21**, 1037-1041 (2002).
6. J-E. Parry, C. Zhang and J.G. Eales, *General and Comparative Endocrinology*, **95**(2), 310-319 (1994).
7. C.D. Thomson, S. Woodruffe, A.J. Colls, J. Joseph and T.C. Doyle, *European J. of Clinical Nutrition*, **55**, 387 (2001).
8. F. Tagliaroa, M. Camilotb, R. Valentinib, F. Mengardab, F. Antoniazib and L. Tatob, *J. Chromatogr. B*, **716**(1-2), 77 (1998).
9. G. Knapp, H. Spitzky and H. Leopold, *Anal. Chem.*, **46**(6), 724-726 (1974).
10. E.H. Mougey and J.W. Mason, *Anal. Biochem.*, **6**, 223-233 (1963).
11. J.H. Graham, D. Banes, M.E. Beisemeyer and A. Nadkarmi, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 763 (1974).
12. J.E. Moody Jr., J.R. Hohmann and G.B. Kaplan, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 634 (1968).
13. K. Kasuya, S. Kanda and T. Misaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1747 (1982).
14. A.H. Richards and W.B. Mason, *Anal. Chem.*, **38**(12), 1751-1752 (1966).
15. C. Zomzely, G. Marco and E. Emery, *Anal. Chem.*, **34**, 1414-1417 (1962).
16. A.J. Falk, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 274 (1974).
17. G. Lovell and P.H. Corran, *J. Chromatogr.*, **525**, 287 (1990).
18. P.S. Dalal, P. Albuquerque and H.R. Bhafat, *Anal. Biochem.*, **211**, 34-36 (1993).
19. A.H. Richards and W.B. Mason, *Anal. Chem.*, **38**, 1751-1752 (1966).
20. O.P. Soldin, L. Hilakivi-Clarke, E. Weiderpass and S.J. Soldin, *Clinica Chimica Acta*, **34**, 181-189 (2004).
21. L.R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 223 (1978).