

## HPLC/DAD/ESI-MS를 이용한 혈장시료 중 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

(2007. 6. 20. 접수; 2007. 9. 30. 승인)

### Determination of thyroid hormones in plasma samples by high performance liquid chromatograph/diode array detector/electrospray ionization mass spectrometer

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-City, 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 June 20, 2007; Accepted September 30, 2007)

**요 약:** 혈장시료 중의 갑상선 호르몬을 고체상 추출법을 이용하여 추출한 후 HPLC/DAD/ESI-MS (high-performance liquid chromatograph/diode array detector/electrospray ionization-mass spectrometer)를 사용하여 분석하였다. 7종의 thyroid hormones의 HPLC 분리조건은 Hypersil ODS 컬럼(4.6 mm I.D., 250 mm length, particle size 5  $\mu$ m)을 사용하고 ammonium formate buffer와 아세트나이트릴을 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 메탄올로 용리할 경우 회수율이 74.5-115.7%로 나타났다. HPLC/ESI-MS를 이용하여 20-500 ng/mL 범위에서 검량선을 작성한 결과  $r^2$ 값은 0.9939-0.9978으로 나타났으며 검출한계는 20-50 ng/mL (38.1-162.8 pmol/mL)로 계산되었다. 정상인의 혈장에서 thyroxine의 정량이 가능하였으며 그 결과 50.98-112.97 ng/mL로 검출되었다.

**Abstract:** An analytical method for the determination of thyroid hormones in plasma samples has been studied by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/diode array detector (DAD)/electrospray ionization (ESI)-mass spectrometer. Seven thyroid hormones were successfully separated by gradient elution on the reverse phase Hypersil ODS column (4.6 mm I.D., 250 mm length, particle size 5  $\mu$ m) with ammonium formate buffer and acetonitrile. In addition, these compounds were confirmed by UV spectra and ESI-mass Spectra. The extraction recoveries of thyroid hormones in the plasma sample (at pH 3) were in the range of 74.5-115.7 % with solid-phase extraction by C18, followed by elution with 4 mL of methanol. The calibration

★ Corresponding author

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

E-mail : phs3692@kist.re.kr

curves showed good linearity with the correlation coefficients ( $r^2$ ) varying from 0.9939 to 0.9978 and the detection limits of all analytes were obtained in the range of 20-50 ng/mL (38.1-162.8 pmol/mL). As a result, thyroxine was found in the range of 50.98-112.97 ng/mL in normal plasma samples.

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

## 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.<sup>1</sup> 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 갑상선기능항진증 또는 저하증이 발생한다.

이와 같이 체내에서 중요한 역할을 하는 thyroid hormones에 의한 각종 질병 또는 대사이상을 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> 최근에 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 유도체화없이 thyroid hormones을 직접 분석할 수 있으나 지금까지의 연구는 대부분 T3와 T4의 분석에 국한되어 있다.

HPLC의 경우, 다이오드 배열 검출기나 형광검출기 등의 검출기를 사용할 수 있으나 이 경우 선택과정에 의한 peak의 머무름 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, 정제하기 위해 시료전처리 과정이 필요하다. 뇨 및 혈액과 같은 생체시료의 전처리에는 액체-액체 추출법이 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 효과적인 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, 혈장시료에서의 전처리를 위한 고체상 추출법의 최적 조건을 조사하고 정상인의 혈장시료에 대해 정량분석을 시행하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

본 연구에 사용된 7종의 대상물질은 모두 Sigma-Aldrich사(Steinheim, Germany)의 제품을 사용하였고, 에틸아세테이트, 아세톤, 메탄올, 에탄올 및 아세토나이트릴은 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 Agilent 1100 Series LC (DR5 solvent delivery system, variable volume autoinjector, temperature controlled column compartment 및 다이오드 배열 검출기)와 1100 series LC/MS Trap을 연결하여 사용하였다. 분리관은 Agilent사의 Hypersil ODS Column (5  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  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  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 저장용액을 만든 후, 이들을 혼합하여 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 혼합표준용액을 만들어 사용하였다. 내부표준물질인 ethyltheophylline은 1000  $\mu\text{g/mL}$  메탄올로 제조해 희석하여 사용하였다.

#### 2.3.2. 용리액의 제조

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

Table 1. HPLC operating conditions for analysis of thyroid hormones

• Instrument : Hewlett Packard HPLC 1100/DAD/MS Trap
• Column : Gold Hypersil (250 $\times$ 4.6 mm I.D., 5 $\mu\text{m}$ )
• Mobile phase : Ammonium formate, 20 mM (pH 4.0)/ACN = 100/0 % (v/v) (5 min hold) $\rightarrow$ 60/40 % (v/v) (1.33 mL/min)
• Flow rate : 0.8 mL/min
• Injection volume : 20 $\mu\text{L}$
• Ion source type : ESI (positive and negative)
• Scan range : 40-800 m/z
• Drying gas ( $\text{N}_2$ ) : 4 L/min
• Nebulizer gas pressure : 10 psi
• Source voltage : 3.5 kV
• Vaporization temp. : 325 $^\circ\text{C}$
• Relative collision energy : 25%
• Column oven temperature : 40 $^\circ\text{C}$
• Run time : 25 min
• Post time : 5 min
• DAD Wavelength : 230 nm

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

#### 2.3.3. 시료 전처리법

혈장 시료 1 mL를 pH 3으로 조절한 후, 고체상 카트리지를 vacuum folder에 장착하고 메탄올과 증류수 (pH 3)를 차례로 10 mL씩 흘려준 다음 시료를 고체상에 loading하였다. 세척액으로 에틸아세테이트 5 mL를 사용하여 불순물을 씻어낸 후 20분간 진공펌프로 고체상을 완전 건조하였다. 메탄올 4 mL를 통과시키면서 용리한 다음 내부표준물질(ethyltheophylline 100 mg/mL) 40  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 질소농축기로 100  $\mu\text{L}$ 까지 농축하여 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과하여 vial에 담았다.

#### 2.3.4. HPLC 분석방법

전처리에서 얻은 용액 20  $\mu\text{L}$ 를 HPLC에 주입하고 Table 1에 나타난 기기조건에 따라 기울기 용리하여 분리한 후 각 성분의 UV 스펙트럼 및 질량스펙트럼을 얻었다.

#### 2.3.5. 검량선 작성

혈장시료 1 mL에 thyroid hormones 표준용액의 농도를 단계적으로 각각 20-500 ng/mL의 범위로 첨가하고 전처리 한 후 HPLC에 의해 분석하여 각 성분의 농도와 피크 넓이와의 관계식을 구하여 검량선을 작성하였다.

## 2.4. 실제시료 분석

성인 정상인 15명을 대상으로 혈액을 채취하여 HPLC로 분석하고자 하였다. 혈장 시료는 전처리 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다.

## 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 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 HPLC에 주입한 후 머무른 시간을 측정하여 평균과 C.V.(%) 값을 구하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 0.43-0.79%의 C.V.(%) 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 조사, 분석의 선택성과 정밀성을 개선하여 정량분석하고자 하였다.

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

DIT, T2, T3, r-T3 및 T4는  $[\text{MH}^+]$ 가 base peak로 나타난 반면, thyronine(T0)은 아미노산의 일반적인 토막나기(fragmentation)의 특징인  $[\text{MH}^+]$ 에서  $\text{NH}_3$ 가 떨어져 나가 생성된 이온으로 추정되는  $[\text{MH}^+ - 17]$ 이온이 base peak로 나타났다.

음이온 스펙트럼에서는 모든 thyroid hormones에서  $[\text{M-H}]^-$ 가 나타난 반면 분자량이 비교적 작은 물질인

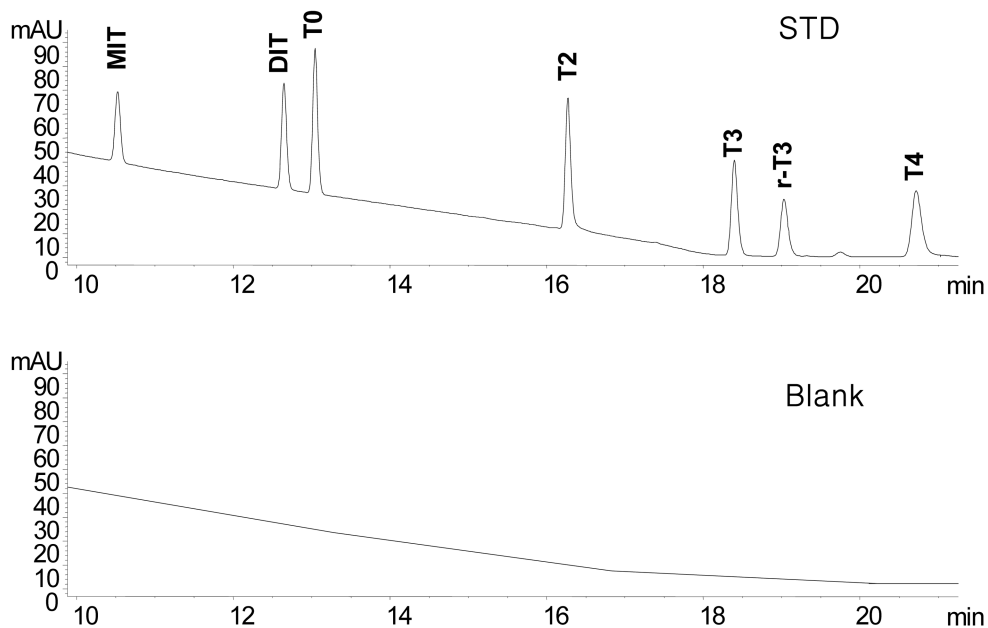


Fig. 1. Chromatograms of thyroid hormones by HPLC/DAD.

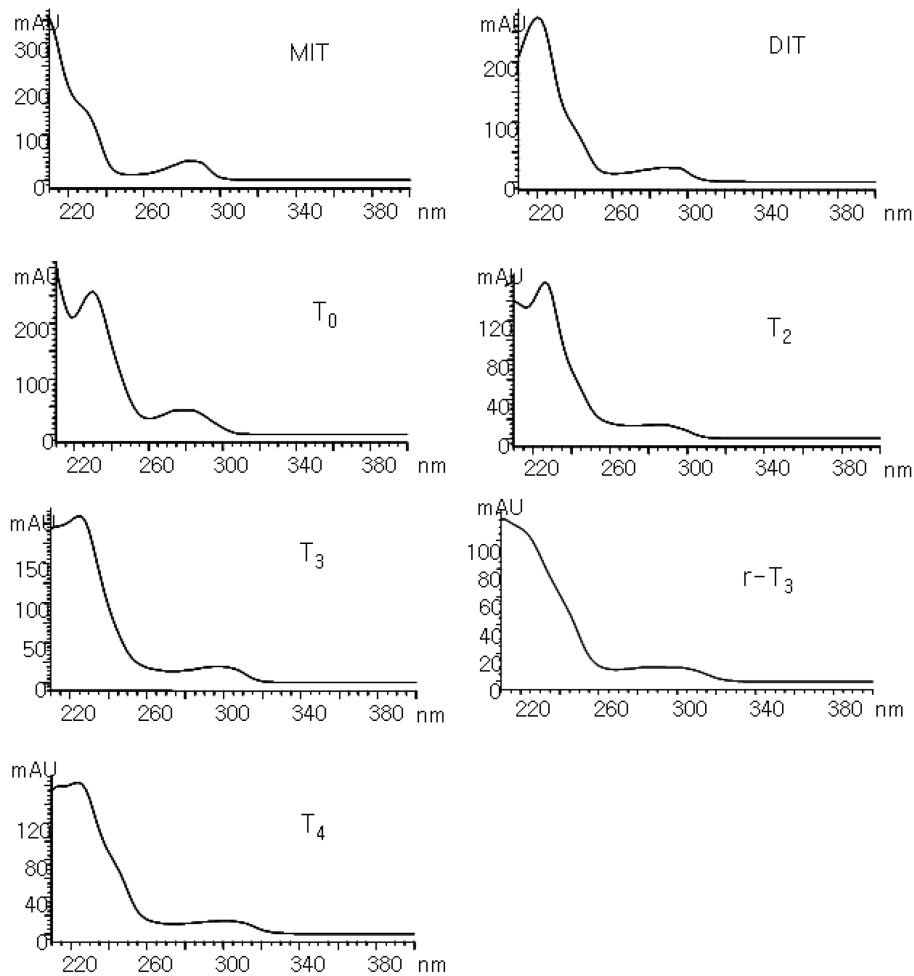


Fig. 2. UV Spectra of thyroid hormones by HPLC/DAD.

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

Compounds	Relative retention time (min)		C.V.(%)
	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

ISTD : ethyltheophylline ( $t_R = 9.723$ ) (n=7)

C.V. : coefficient of variation

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 혈장시료에서 thyroid 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 74.5-115.7% 범위로 나타나 가장 적합한 고체상인 것으로 나타났다. 또한 추출의 재현성도 RSD가 7.1-10.6% 범위로 나타나 매우 우수하였다(Table 3).

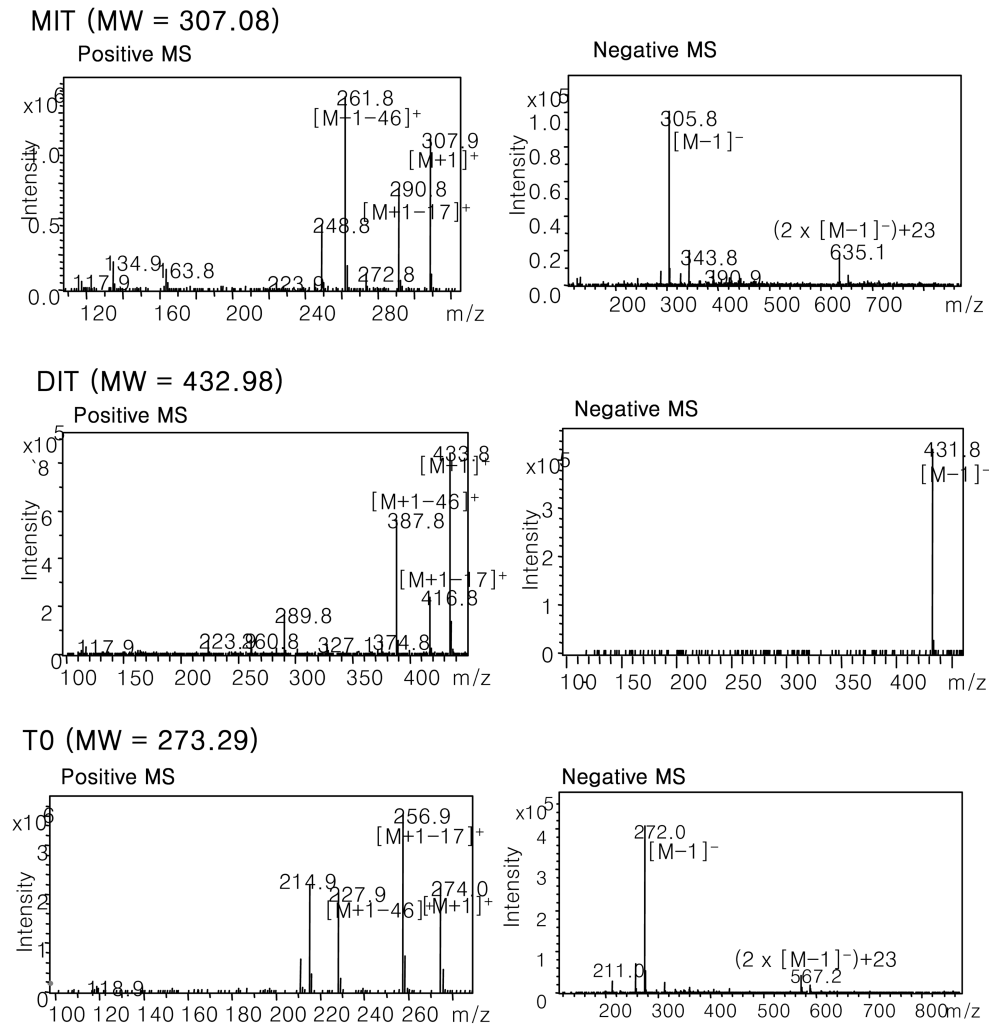


Fig. 3. Mass spectra of thyroids by LC/ESI-MS.

### 3.3.2. 용리액에 따른 회수율 비교

위의 실험 결과에 따라 회수율이 가장 높았던 C18 고체상을 사용할 경우 용리액에 따른 회수율을 비교한 결과 메탄올을 사용할 경우 가장 높은 회수율을 보였다(Table 4). 에탄올의 경우 메탄올과 비교해 보면 회수율에는 큰 차이가 없으나 RSD가 10.4-21.9%로 상대 표준 편차가 커 재현성이 떨어지고, 크로마토그램 상의 방해물질로 인해 120%가 넘는 회수율을 보인 물질이 있어 용리액으로 사용할 수 없었다.

### 3.3.3. 시료의 pH에 따른 회수율 비교

C18 고체상과 용리액으로 메탄올 4 mL를 사용하고

시료의 pH를 1, 3, 5, 7, 9 등으로 변화시키면서 추출한 결과, Table 5에 나타낸 바와 같이 pH 3에서의 추출율이 가장 높게 나타났다. 이는 -COOH기의 pKa 값이 약 2.12이고, -NH<sub>2</sub>기의 pKa 값은 약 6.48로서 thyroid hormone이 pKa 값이 평형화 되면서 약 3~4로 유지되어 pH 3일때 이온화되어 이 상태에서 추출이 가장 우수했던 것으로 판단된다.

### 3.4. 검량선 작성 및 검출한계 조사

Thyroid hormones 표준용액이 20-500 µg/mL 범위 포함된 혈장시료 1 mL을 2.3.3에서 설명된 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후 LC/MS로 정량하기 위해 크로마토그램의 각 성분의 농도와 피크

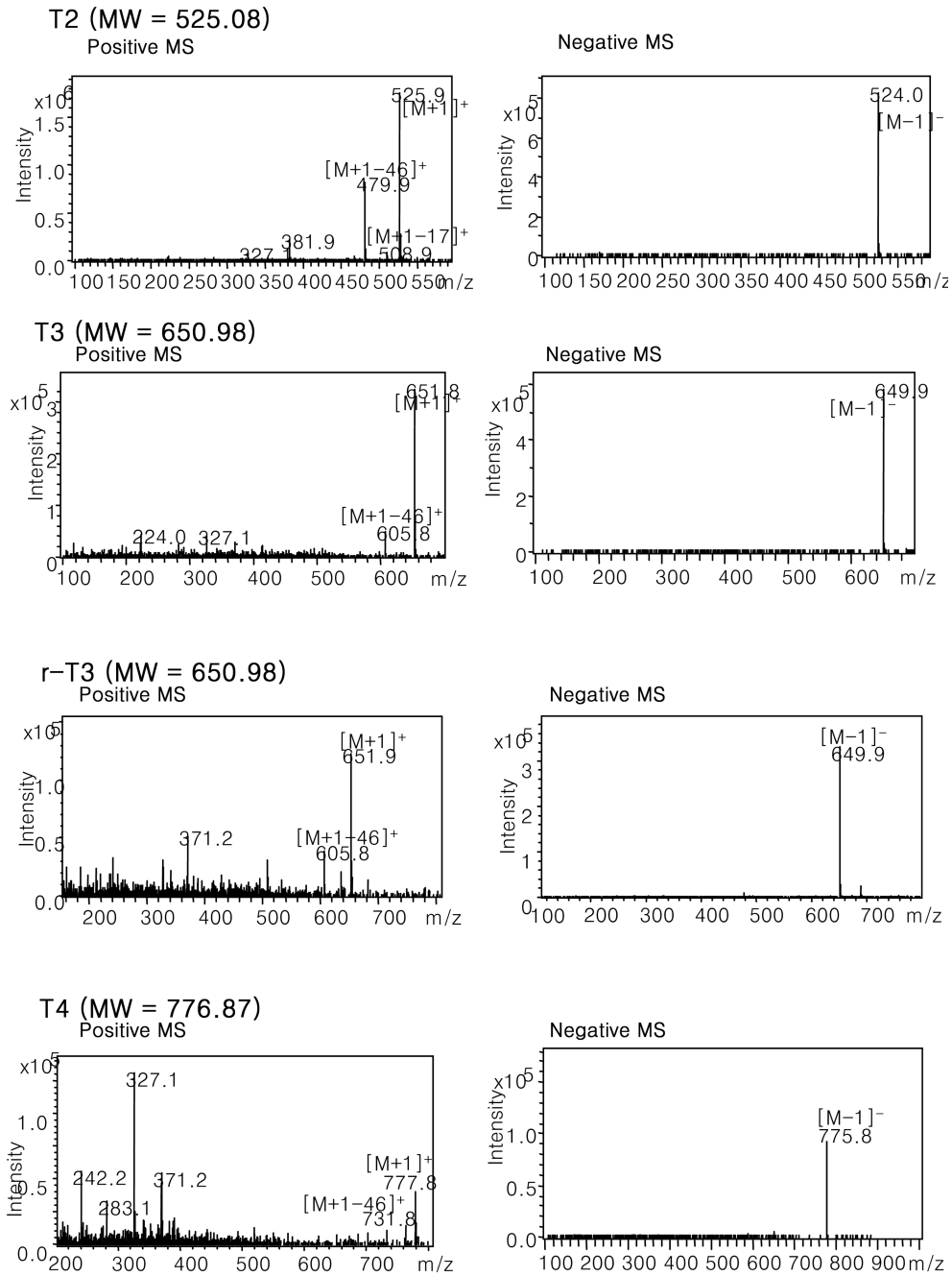


Fig. 3. Continued.

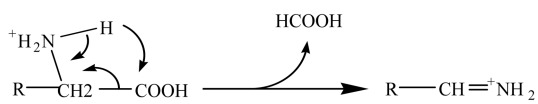


Fig. 4. Formation of  $[\text{MH}^+ - 46]$  ion in the ESI-mass spectra of thyroid hormones.

넓이와의 관계식을 구하여 검량선을 작성하여 Table 6에 나타내었다. 7종의 대상물질의 검량선은 상관계수가  $r^2 = 0.99$  이상으로 직선성이 양호하였으며 검출한계는 20-50 ng/mL (38.1-162.8 pmol/mL) 범위로 나타났다.

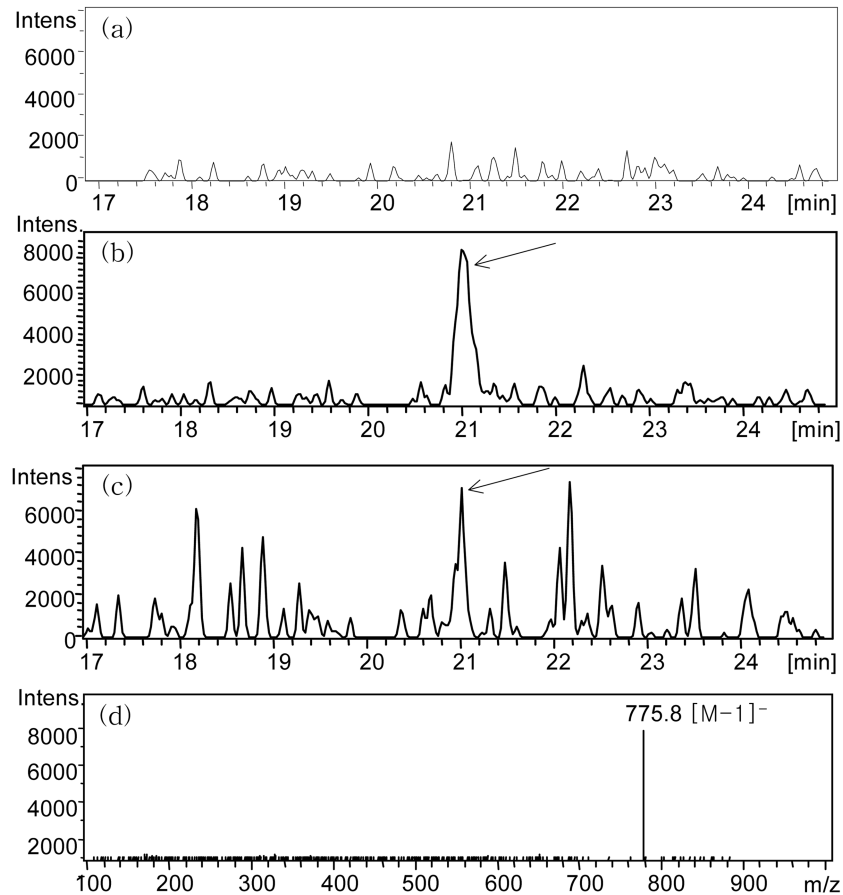


Fig. 5. HPLC chromatograms of thyroxine ( $t_R=21.0$  min). (a) blank, (b) spiked standard, (c) extracted sample, (d) mass spectrum

Table 3. Extraction recoveries of thyroid hormones in plasma with SPE

Compounds	Extraction recoveries(%)									
	C18		C8		C2		cyanomethyl		Silica	
	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD
MIT	79.3	7.1	61.2	5.6	74.8	6.6	53.8	6.2	64.8	17.9
DIT	81.3	7.3	59.8	7.6	62.8	9.5	69.7	6.7	73.1	14.6
T0	101.2	8.9	58.9	5.9	62.6	10.6	71.9	6.8	60.9	14.1
T2	101.1	10.2	59.0	5.9	58.7	9.3	72.7	8.1	34.2	63.3
T3	100.5	10.6	55.9	6.0	50.3	7.4	71.7	10.0	3.6	17.5
r-T3	115.7	10.4	54.0	8.2	49.0	9.6	68.4	10.3	0.0	-
T4	74.5	9.2	50.4	13.4	37.4	9.4	62.3	14.0	0.0	-

conc. = 2  $\mu\text{g/mL}$  (n=5)

### 3.5. 실제시료

위와 같은 방법으로 전처리하고 HPLC로 정량 분석하였다. 각 분석 물질의 머무름 시간과 ESI-MS를 실행하였으며, thyroxine의 경우 MS의 조개짐이  $[M-H]^-$

만이 생성된 negative mode에서 interference가 없어 positive mode에 비해 쉽게 정량이 가능하였다. negative scan mode로 얻은 정량 이온을 통하여 정량한 결과, 채취한 혈장에서 thyroxine에 대한 정량 분석이 가능

Table 4. Effects of eluents on the extraction recoveries of thyroid hormones from plasma with SPE

Compounds	Extraction recoveries(%)					
	Methanol		Methanol/Ammonium hydroxide (90:10)		Ethanol	
	mean	RSD	mean	RSD	mean	RSD
MIT	79.3	7.1	82.7	2.1	123.5	10.4
DIT	81.3	7.3	50.0	0.6	101.5	21.9
T0	101.2	8.9	68.0	0.8	88.0	13.3
T2	101.1	10.2	69.6	2.6	86.4	14.2
T3	100.5	10.6	62.1	1.7	84.4	13.5
r-T3	115.7	10.4	59.6	2.9	82.8	17.1
T4	74.5	9.2	49.5	0.8	79.3	16.2

conc. = 2 µg/mL (n=5)

Table 5. Effects of pH on the extraction recoveries of thyroid hormones from plasma 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	69.8	1.2	79.3	7.1	77.0	3.4	67.5	8.8	62.6	12.8
DIT	66.0	1.3	81.3	7.3	76.2	3.3	52.8	14.4	50.0	15.1
T0	64.8	1.4	101.2	8.9	74.0	3.8	70.1	4.2	70.3	2.1
T2	35.1	2.8	101.1	10.2	72.5	4.8	69.7	5.9	71.6	2.8
T3	31.7	8.9	100.5	10.6	68.9	7.9	67.0	7.6	70.4	3.5
r-T3	31.3	10.5	115.7	10.4	65.4	3.9	64.0	6.8	64.8	3.8
T4	27.8	7.7	74.5	9.2	59.7	7.6	57.0	7.1	57.8	4.0

conc. = 2 µg/mL (n=5)

Table 6. Calibration data and detection limits of thyroid hormones by LC/MS

Compounds	Ion (m/z)	Conc. range ng/mL	Calibration data (Y = aX + b)			MDL	
			a	b	r <sup>2</sup>	ng/mL	pmol/mL
MIT	306	50 - 500	638.4	2784.4	0.9939	50	162.8
DIT	432	20 - 500	1137.4	3196.9	0.9978	20	46.2
T0	272	20 - 500	2649.9	4275.7	0.9970	20	73.2
T2	524	20 - 500	1622.8	13282.0	0.9957	20	38.1
T3	650	50 - 500	857.7	1724.0	0.9959	50	76.8
r-T3	650	50 - 500	841.0	15915.0	0.9946	50	76.8
T4	776	50 - 500	355.2	1902.6	0.9960	50	64.4

MDL : method detection limits

하였으며, 50.98-112.97 ng/mL로 검출되었다.

#### 4. 결 론

혈장 시료로부터 HPLC/DAD/ESI-MS를 이용한 thyroid hormones의 분석 및 추출에 대한 최적조건을

연구하였다. 7종의 thyroid hormones을 검출하기 위해 HPLC/DAD/ESI-MS를 사용하여 기울기 용리한 결과 완전분리가 가능하였으며 머무른 시간의 반복성 또한 C.V.가 0.43-0.79%로 우수하였다.

Thyroid hormones의 확인을 위해 LC/MS를 사용한 결과, 모든 thyroid hormones에서 [MH<sup>+</sup>]가 검출되었

으며  $[MH^+]$ 에서  $HCOOH$ 가 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 메탄올 4 mL로 용리할 경우 회수율이 74.5-115.7% 범위로 가장 높게 나타났다. 7종 thyroid hormones의 ESI-MS(negative scan)에 의한 검량선은 20-500 ng/mL 범위에서  $r^2 = 0.99$  이상의 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 20-50 ng/mL (38.1-162.8 pmol/mL) 범위로 측정되었다.

정상인 15명을 대상으로 혈장을 정량분석한 결과 thyroxine이 50.98-112.97 ng/mL로 검출되었다.

### 참고문헌

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