

동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법에 의한 혈청 내 콜레스테롤의 정량

신혜선¹ · 이화심² ★ · 이계호¹

¹충남대학교 화학과, ²한국표준과학연구원 보건측정센터
(2008. 11. 10. 접수, 2008. 12. 12. 승인)

Quantification of cholesterol in human serum by isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry

Hyesun Shin¹, Hwashim Lee^{2,★} and Gaeho Lee¹

¹Department of Chemistry, Chungnam National University, 220, Gung-dong,
Yuseong-Gu, Daejeon 305-764, Korea,

²Health Metrology Center, Division of Quality of Life, Korea Research Institute Standards
and Science, 209 Gajeong-Ro, Yuseong-Gu, Daejeon, 305-600, Korea

(Received November 10, 2008, Accepted December 12, 2008)

요 약: 혈청 내 콜레스테롤을 정량분석하기 위한 일차분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법(isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry)을 사용하였다. 콜레스테롤은 Thermo ODS hypersil C₁₈ 칼럼을 사용하여 분리하였고, 이동상은 100% 메탄올, 유속은 0.3 mL/min으로 하였다. 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4-¹³C₂는 [M-H₂O+H]⁺이온에 해당하는 m/z 369.4와 371.3에서 모니터링하여 정량에 합당한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 방법의 유효성을 증명하기 위해서 NIST SRM 909b를 분석한 결과 인증값과 불확도 범위 내에서 일치하는 것을 확인하였다. 이 방법을 바탕으로 혈청 인증표준 물질 4 종류를 제조하여 인증을 실시하였다. 인증 결과, 반복성의 상대표준오차는 0.1~0.8%, 재현성의 경우 0.24%이하, 확장 불확도는 95% 신뢰도구간에서 약 1.43%로 나타났다.

Abstract: An ID LC/MS (isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry) was used as a primary method for the quantitative analysis of cholesterol in human serum. The separation of cholesterol was carried out by Thermo ODS hypersil C₁₈ column. The mobile phase was 100% methanol, and flow rate was 0.3 mL/min. Cholesterol and cholesterol-3,4-¹³C₂ were monitored at m/z 369.4 and 371.3, which correspond to [M-H₂O+H]⁺ respectively. In order to verify the measurement method, NIST SRM 909b was analyzed. The results agreed well with certified values within uncertainty. The four kinds of serum certified reference material were prepared and certified. The repeatabilities of measurement were ranged from 0.1 to 0.8% (RSD), which were relatively good. The reproducibility between independent measurement run was below 0.24% (RSD). The expanded uncertainty was about 1.43% within the 95% confidence interval.

Key words : cholesterol, ID LC/MS, primary method, traceability

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-5348 Fax : +82-(0)42-868-5800

E-mail : eelhs@kriss.re.kr

1. 서 론

콜레스테롤은 4개의 고리로 된 cyclopentanoperhydrophenanthrene 핵을 가지는 스테로이드의 한 부류로 Fig. 1과 같은 구조를 가진다.¹ 콜레스테롤의 분자량은 386.6이고 분자식은 $C_{27}H_{46}O$ 로 거의 모든 유기용매에는 녹으나 물에는 거의 녹지 않는다. 콜레스테롤은 사람의 몸에 존재하는 동물성 지방으로서 식물성 지방에는 존재하지 않는다. 콜레스테롤은 세포막의 구성요소, 스테로이드 호르몬과 담즙산의 재료로서의 기능을 하고 있으며 사람의 몸에 없어서는 안 되는 중요한 물질이다. 콜레스테롤은 체내에서 유리형과 에스테르형 두 가지 형태로 존재한다. 유리형은 콜레스테롤 그 자체로 주로 몸의 구성요소로서 몸 전체를 돌고 있으며 세포의 표면 특히 신경조직에 많이 존재한다. 에스테르형은 콜레스테롤에 지방산이 결합된 것으로 우리 몸에서 콜레스테롤이 축적되면 에스테르형으로 존재하고 혈액과 간장 등에 많이 존재한다. 혈액 중의 콜레스테롤 정상치는 180~220 mg/dL 범위이고 240 mg/dL가 고농도 경계치이다. 콜레스테롤이 혈액 중에 많이 존재하면 혈액 순환계 질환이 발생하는데 혈액에 50~60%의 지방질이 들어 있으면 동맥경화를 일으키는 원인이 된다. 동맥경화가 일어나는 주요 원인은 콜레스테롤이 에스테르형으로 혈관 벽에 쌓이기 때문이다.²

본 연구에서는 혈청 내 콜레스테롤을 정량하기 위한 일차분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법을 개발하였다. 일차분석법은 측정에 있어서 질적으로 가장 상위인 방법으로 그 조작 방법이 완벽하게 기술되어야 하고, 측정하고자 하는 양(화학측정의 경우, mol)에 대해 어떤 표준을 참고하지 않고도 그 결과가 받아들여질 수 있어야 한다. 일차분석법의 일반적인 정의를 화학측정에 적용하기 위해서는 어떤

지정된 물질에 특정한 방법이 사용되어야 하며 모든 매개 변수의 값과 다른 화학종이나 매질과 관련된 보정인자가 잘 알려져 있거나 적절한 불확도 범위 안에서 계산될 수 있어야 한다.³ 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법은 지금까지의 일차분석법이었던 동위원소희석 기체크로마토그래피/질량분석법에 비하여 유도체화 과정이 필요치 않고, 내부표준물질로 동위원소를 사용함으로써 매질의 방해와 기기의 감도변화에 따른 편차를 해소할 수 있다는 장점을 가지고 있다.⁴⁻¹⁰ 콜레스테롤은 비휘발성으로 기체 크로마토그래피로 분석하면 머무름 시간이 길어 피이크 폭이 넓어지고 꼬리 끌림 현상이 나타난다.¹¹ 이런 이유로 콜레스테롤을 기체크로마토그래피로 분석할 때는 휘발성 물질로 만들어 주기 위한 유도체화 과정이 필요하지만, 액체크로마토그래피는 유도체화 과정이 필요하지 않아 전처리 과정이 간단하다는 장점이 있다. 또한 이 방법은 내부표준물질로 측정 대상물질과 질량만 다르고 물리 화학적 성질이 같은 동위원소를 사용하므로 전처리 시 매질에 의한 영향을 보정할 수 있는 장점이 있다. 그리고 동위원소를 첨가하여 균질하게 한 후 첨가한 동위원소가 매질 속의 측정대상성분과 동일한 형태로 일단 평형에 도달하면, 농도의 계산에서는 대상물질의 피이크 면적비만 고려되고 시료 회수율에는 의존하지 않는 장점도 있어 일차분석법으로 인정되고 있다.

총 콜레스테롤을 측정하기 위해서는 착물 에스테르로 존재하는 콜레스테롤을 유리 콜레스테롤로 바꿔주는 비누화 반응이 필요하다.¹¹⁻¹⁶ 이 과정은 실험부분에서 상세히 소개된다.

혈청 콜레스테롤 측정에 있어 소급성의 확립은 외국의 경우 국가적인 과제 규모로 진행되고 있지만,¹⁷⁻²¹ 우리나라의 경우는 아직 발판이 미비한 상태라 본 연구에서는 소급성을 확립하고 이 소급성을 임상 진단 기관 등에 보급하고자 인증표준물질의 제조 및 인증에 대한 연구를 수행하였다.

이러한 필요에 의하여 혈청 내 콜레스테롤을 분석하는 일차분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법을 확립하였고, 이 방법의 유효성을 확인하기 위하여 NIST (National Institute of Standards and Technology) SRM (Standard Reference Material) 909b를 분석하여 상호 비교하였다. 측정결과 인증값과 불확도 범위 내에서 일치하는 것을 확인하였으며, 이를 토대로 4 종류의 혈청 인증표준물질에 대한 제조와 인증을 실시하였다.

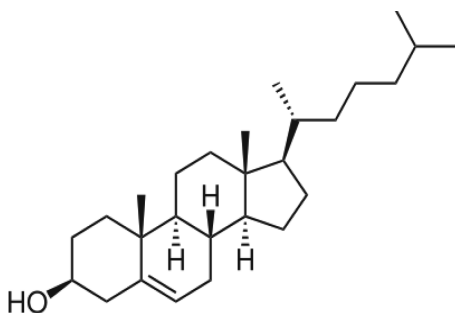


Fig. 1. Structure of free form cholesterol.

2. 실험

2.1. 시약

수산화칼륨(ACS, $\geq 85\%$)과 아세트산(ACS, 99%)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서, 에탄올(ACS, HPLC certified solvent), 헥산(ACS, HPLC certified solvent), 아세토니트릴(ACS, HPLC certified solvent), 2-프로판올(ACS, HPLC certified solvent)은 Burdick&Jackson (Muskegon, MI, USA)사에서, 메탄올(HPLC grade)은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)사에서 구입하였다. 이동상은 사용하기 전에 0.22 μm PVDF membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA)로 filter하여 사용하였다. 증류수는 Millipore Alpha Q purification system과 reverse osmosis system (Sinhan-science tech. Co. Ltd., Korea)을 사용해서 얻었다.

일차표준용액 제조에 쓰인 콜레스테롤 고순도 표준물질(NIST SRM 911b)과 분석방법의 유효성을 확인하기 위해서 사용된 혈청표준물질(NIST SRM 909b)은 NIST(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 동위원소표지 내부표준물질, 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ (99%)는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 표준용액 준비

콜레스테롤 고순도 표준물질 약 8 mg을 에탄올 10 mL에 녹여 약 1000 $\mu\text{g/g}$ 농도가 되도록 3개의 콜레스테롤 일차표준용액을 만들었다. 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 16 mg을 에탄올 20 mL에 녹여 약 1000 $\mu\text{g/g}$ 농도가 되도록 1개의 동위원소표지 콜레스테롤 표준용액을 만들었다.

콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 표준용액과 콜레스테롤 일차표준용액의 농도비가 1:1이 되도록 혼합하여 3개의 혼합표준용액을 제조하였다. 혼합표준용액의 정확한 농도를 계산하여 약 50 $\mu\text{g/g}$ 농도가 되도록 에탄올로 희석한 후 사용하였다.

2.3. 혈청시료의 준비

혈청시료는 본 연구에서 제조한 4 종류의 혈청 인체표준물질로 냉동혈청(Frozen human serum, Level I and II) 두 종류와 냉동건조혈청(Lyophilized human serum, Level I and II) 두 종류를 포함하고 있다. Level I은 정상농도, level II는 고농도를 의미한다. 혈청시료는 -75°C 에서 보관되었다. 먼저 냉동혈청은 상온에서 완전히 해동시키고 저울실에서 약 2 시간 정

도 두어 온도에 의한 무게 변화가 생기지 않도록 하였다. 냉동건조혈청은 다음의 재구성 과정을 거친 후 사용하였다. 혈청시료 병은 가볍게 두드리 모든 혈청 분말이 병 바닥에 모이도록한 후 무게를 측정하여 기록하였다. 시료 병을 열고 10 ± 0.02 mL 고순도 증류수를 교정된 pipette으로 취하여 조심스럽게 첨가한 후 뚜껑을 다시 닫고 병의 무게를 측정하였다. 거품이 생기지 않도록 시료 병을 조심스럽게 흔들어 건조혈청을 녹였다. 혈청시료의 전처리 과정은 다음과 같다.

먼저 갈색 병의 무게를 측정하였다. 다음 혈청 0.3 mL를 취하여 미리 무게를 달아둔 갈색 병에 옮기고 다시 무게를 측정하였다. 채취한 시료의 콜레스테롤과 동위원소비가 1:1(w/w)이 되도록 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 표준용액을 spiking하고 갈색 병의 무게를 측정하였다. 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 표준용액이 첨가된 시료는 잘 흔들어 섞어준 후, 1시간 동안 실온에 보관하였다. 8.6 M 수산화칼륨 수용액 0.36 mL와 무수 에탄올 2.4 mL를 첨가한 후, 잘 섞어주었다. 60°C 오븐에서 2 시간 동안 반응시킨 후 실온에서 충분히 식혔다. 증류수 5 mL와 헥산 10 mL을 넣어 강하게 교반한 후 상이 분리될 때까지 방치하였다. 상이 분리되면 위 층(헥산 층)을 취한 후, 35°C 에서 질소가스를 이용해 헥산을 휘발시켰다. 잔류물에 에탄올 1 mL를 가하여 시료를 완전히 용해시켰다. 필터를 한 후, 50 $\mu\text{g/g}$ 농도가 되도록 에탄올로 희석하고 액체크로마토그래피의 자동시료주입기용 바이알에 옮겨 담았다. 만일 전처리가 완료된 시료를 바로 분석하지 않는 경우, 4°C 냉각고에서 직사광선을 차단한 상태로 보관하도록 한다.

2.4. ID LC/MS 최적화 조건

액체크로마토그래피는 Agilent 1100 series를 사용하였고, 질량분석기는 triple-stage quadrupole mass spectrometer로 ABI회사의 API 2000 모델을 사용하였다. 이온화 장치는 APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) 양이온 모드를 사용하였다. 칼럼은 ODS hypersil C_{18} (Thermo, 100×2.1 mm, 3 μm)을 사용하였고, 보호 칼럼도 ODS hypersil C_{18} (Thermo, 10×3 mm, 5 μm)을 사용하였다. 액체크로마토그래피에서 이동상은 100% 메탄올, 유속은 0.3 mL/min, 시료주입량은 5 μL 를 최적화 조건으로 하였다. 질량분석기에서는 선택이온분석법(Selected Ion Monitoring, SIM)을 통해 콜레스테롤은 m/z 369.4, 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 은 m/z 371.3에서 모니터링하였다. 최적 질량분석기 조건은 양이온 모드에서 curtain gas는 35

psi, nebulizer current는 1.5 μ A, 온도는 450°C, nebulizer gas는 70 psi, heater gas는 25 psi, declustering potential은 20 V, focusing potential은 400 V, entrance potential은 4 V이다.

2.5. 측정절차

KRISS (Korea Research Institute of Standards and Science)에서 제조한 4종류의 혈청 인증표준물질 각각을 무작위로 5 개씩 선택하여 전처리 과정을 수행하였다. 최적화 조건에서 혼합표준용액, 시료의 순서로 4회 이상 반복 측정하여 분석하였다. 분석 결과로 콜레스테롤/콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 면적비를 얻었으며, 콜레스테롤 농도(C)는 아래 식에 각각의 변수를 대입하여 계산하였다.

$$C = \frac{M_{is-cho},spiked \times AR_{sample} \times M_{s-cho},std \times C_{s-cho}}{W_s \times AR_{std} \times M_{is-cho},std}$$

여기에서 $M_{is-cho},spiked$ 은 시료에 spiking된 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 표준용액의 무게, AR_{sample} 은 시료의 액체크로마토그래피/질량분석법 측정으로 얻은 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 특성이온의 면적비, M_{s-cho},std 는 혼합표준용액에 투입한 콜레스테롤 표준용액의 무게, C_{s-cho} 은 콜레스테롤 표준용액의 농도($\mu\text{g/g}$), W_s 는 시료(혈청)의 무게, AR_{std} 는 혼합표준용액의 액체크로마토그래피/질량분석법 측정으로 얻은 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 특성이온의 면적비, M_{is-cho},std 는 혼합표준용액에 투입한 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 표준용액의 무게를 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ID LC/MS 측정의 최적화 조건

APCI 양이온 모드에서 콜레스테롤의 질량 스펙트럼을 확인하였다. 먼저 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 각각의 용액에 대해 질량 스펙트럼을 얻은 후, 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 혼합표준용액의 질량 스펙트럼을 확인하였다. Fig. 2는 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 혼합표준용액의 Q1 질량 스펙트럼으로 콜레스테롤은 m/z 369.4에서, 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 는 m/z 371.3에서 가장 큰 이온세기를 나타내었다. 이는 물 분자가 떨어진 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 이온에 해당하는 것으로 분자이온보다 더 큰 이온세기를 나타내었으며 본 연구에서는 이 두 이온을 모니터링하여 정량하였다.

적합한 이동상을 선택하기 위하여 용매의 조성을 아세트니트릴:2-프로판올(65:35와 70:30, v/v), 메탄올:물(90:10, v/v), 메탄올(0.1% 아세트산 포함) 100%, 순수 메탄올 100%, 메탄올:아세트니트릴(95:5, v/v), 아세트니트릴:물 (95:5, v/v) 등 여러 종류로 실험해 본 결과, 이온세기는 모두 비슷한 값을 가졌다. APCI는 용매의 이온화가 먼저 일어나고 이온화된 용매분자가 측정 대상물질을 이온화시키므로 이온화가 잘되고, 머무름 시간이 가장 빠른 메탄올 100%를 이동상으로 선택하였다. 유속은 피크 모양을 고려하여 0.3 mL/min을 선택하였다. 이러한 최적조건에서 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 를 spiking한 혈청시료를 분석하여 얻은 질량 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 콜레스테롤의

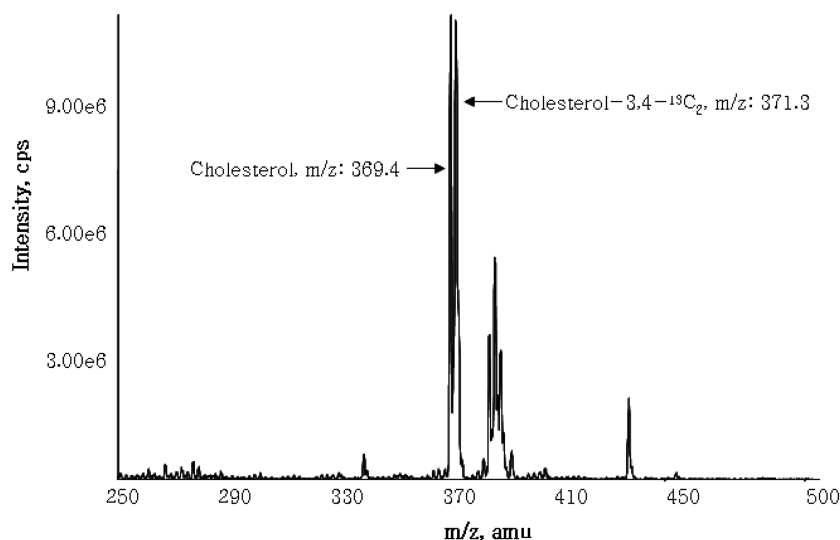


Fig. 2. Mass spectrum of $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ of cholesterol and cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$.

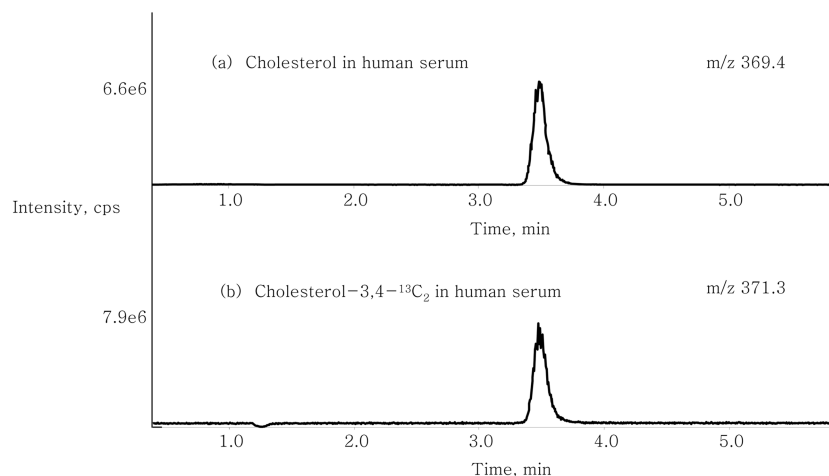


Fig. 3. Mass chromatograms of cholesterol (50 µg/g) (a) and cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$ (50 µg/g) (b) in spiked human serum.

머무름 시간은 3.7분이었고 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 와 동일한 머무름 시간을 나타내었으며, 매질에 의한 간섭 현상 없이 정량하기에 합당한 이온세기와 피크 모양을 얻을 수 있었다. 혈청시료에 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 오염 여부를 알기 위해 순수한 혈청에 대한 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 질량 크로마토그램을 얻었을 때 혈청에 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 는 불순물로 포함되어 있지 않음을 확인하였다.

3.2. 혼합표준용액의 검증

3개의 혼합표준용액에 대한 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법 실험을 4회 반복측정한 후 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 무게비에 대한 피크 면적비에 해당하는 감도계수(response factor, R.F.)를 구하여 상호 비교하였다. 혼합표준용액은 동위원소희석 질량분석법에서 결과산출을 위한 직접적인 표준이 되므로 이에 대한 검증은 반드시 필요하다. Table 1은 감도계수를 나타낸 것으로 이로부터 표준용액 제조의 정확성과 측정 도중 기기의 drift에 의한 영향 여부 등을 알 수 있다. 0.71%의 낮은 상대표준편차를 얻음으로써 혼합표준용액의 제조가 정확하고 측정하는 동안 기기에 대한 drift도 낮았음을 알 수 있었다. 혼합표준용액 중에서 평균값에 근접하고 반복측정의 상대표준편차가 작은 혼합표준용액 1개를 선택하여 콜레스테롤 정량을 위한 표준용액으로 사용하였다.

3.3. 검출한계와 정량한계

혈청시료의 질량 크로마토그램에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)에 기초하여 검출한계와 정량한계를 측정

Table 1. Relative response factors of cholesterol-3,4- $^{13}\text{C}_2$ and cholesterol calibration standard mixture solution

No.	Weight ratio (chol./isotope)	Area ratio (chol./isotope)	Relative response factor ¹⁾
1	0.996	0.974	0.978
2	1.004	0.985	0.981
3	0.974	0.965	0.990
Average			0.983
Standard Deviation			0.007
Relative Standard Deviation (%)			0.71

¹⁾Relative response factor : Area ratio/Weight ratio

하였다. 시료용액을 묻힌 다음 최적조건에서 시료를 5 µL 취하여 반복 측정하였다. 검출한계는 신호 대 잡음비가 3인 피크 세기에서의 농도이며 약 0.05 µg/g임을 확인하였다. 정량한계는 신호 대 잡음비가 최소 10인 피크 세기에서의 농도로 약 0.17 µg/g이나 측정의 재현성을 고려하여 최소 0.5 µg/g 이상의 농도가 적절함을 확인하였다.

3.4. ID LC/MS 방법의 유효성 확인

혈청 내 콜레스테롤을 분석하기 위해 본 연구에서 확립한 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법의 정확성과 유효성을 확인하기 위하여 인증값을 갖고 있는 NIST SRM 909b를 분석하였다. 분석을 위해 1 회 측정 시 SRM 909b로부터 5개의 시료를 취하여 분석하였다. 인증값과 분석값을 서로 비교한 결과 불확도 범위 내에서 일치하는 것을 확인하였으며 이를 Table 2에 나타내었다. NIST SRM 909b는 동위원소희

Table 2. Certified values and measurement results of cholesterol in NIST SRM 909b

	Certified value ($\mu\text{g/g}$)	Measured value ($\mu\text{g/g}$)
Level I	1432.35 $\pm$ 17.61	1432.40 $\pm$ 15.82
Level II	2269.05 $\pm$ 28.93	2264.86 $\pm$ 36.61

석 기체크로마토그래피/질량분석법으로 얻은 인증값으로서 두 방법간의 비교도 가능하게 했다. 이로써 동위원소희석 기체크로마토그래피/질량분석법 대신에 유도체화 과정이 필요 없는 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법으로의 분석법 확립이 가능함을 확인하였다.

3.5. 혈청 인증표준물질의 콜레스테롤 농도

4 종류의 혈청인증표준물질을 제조하여 이에 대한 인증을 실시하였다. 콜레스테롤의 전처리 과정은 앞의 실험부분에서 언급한바와 같으며, 비교적 혈 중 농도가 높고 혈청 내에 존재하는 다른 물질에 비해서 추출이 잘되므로 혼합표준용액 제조과정과 spiking만 유의한다면 좋은 결과를 얻을 수 있다. 혼합표준용액 제조 시에는 에탄올 용매를 사용하므로 휘발로 인한 농도의 변화가 없도록 주의하고, spiking을 할 때는 용매와 혈청의 매질이 다르므로 정확한 농도의 spiking을 위해 부피에 대한 무게의 보정을 실시해 주는 것이 필요하다.

약 2주 간격으로 6회 반복 측정하여 재현성을 살펴 보았다. 매번 측정할 때마다 혈청 인증표준물질 4 종류에 대해 무작위로 5개 시료를 선택하였고, 미리 예비실험을 통해 측정된 혈청 인증표준물질 내 콜레스

테롤의 농도값을 기준으로 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 를 1:1(w/w)이 되도록 첨가하여 전처리를 진행하였다. 동위원소희석 액체크로마토그래피/질량분석법으로 4 번 반복 측정하여 얻은 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4- $^{13}\text{C}_2$ 의 면적비로부터 농도(C) 식에 의해서 계산된 농도값과 표준편차를 Table 3에 나타내었다. 독립적인 각 batch에서 측정의 표준편차는 반복성을 나타내는 것으로 5개의 시료에 대한 무게측정과 spiking한 양의 무게측정, 혼합표준용액과 시료의 ID LC/MS 측정에서 오는 불확도를 포함한다고 볼 수 있다. 본 측정에서는 4 종류 모두에 대해 상대표준편차가 약 0.1~0.8%의 범위에 해당하는 좋은 반복성을 보였으며, 각 시료에 대해 6회 독립적으로 반복 측정된 평균값과 상대표준편차를 Table 3에 나타내었다. 4 종류에 대해 모두 0.24%이하의 상대표준편차를 얻음으로써 좋은 재현성을 보였다. 인증표준물질에 대한 인증값은 냉동혈청(Frozen human serum) Level I은 1259.67 $\pm$ 18.01 $\mu\text{g/g}$, 냉동혈청 Level II는 1554.49 $\pm$ 22.23 $\mu\text{g/g}$, 냉동건조혈청(Lyophilized human serum) Level I은 1373.46 $\pm$ 19.64 $\mu\text{g/g}$, 냉동건조혈청 Level II는 1512.26 $\pm$ 21.63 $\mu\text{g/g}$ 임을 확인하였다.

3.6. 측정불확도 평가 및 요인

측정불확도는 불확도 평가 프로그램인 PUMA (Program for Uncertainty Calculation in Measurement and Analysis)를 이용하여 ISO guide²²에 따라 평가하였으며, 냉동혈청 Level I 시료의 콜레스테롤 측정결과에 대한 불확도 평가 결과를 Table 4에 나타내었다. 여기에서 또 하나 중요한 요점은 불확도에 영향을 미치는 인자와 기여도의 정도이다. 불확도에 영향을 미

Table 3. Measurement results of cholesterol in human serum by ID LC/MS

Period	F* I ($\mu\text{g/g}$)	F II ($\mu\text{g/g}$)	L** I ($\mu\text{g/g}$)	L II ($\mu\text{g/g}$)
1	1260.56 $\pm$ 5.93	1553.71 $\pm$ 9.90	1372.29 $\pm$ 10.81	1511.96 $\pm$ 6.92
2	1254.61 $\pm$ 6.56	1549.97 $\pm$ 10.18	1370.39 $\pm$ 7.42	1513.74 $\pm$ 6.42
3	1259.63 $\pm$ 1.67	1555.36 $\pm$ 1.01	1373.33 $\pm$ 5.86	1507.54 $\pm$ 11.46
4	1258.96 $\pm$ 5.89	1553.98 $\pm$ 5.33	1378.22 $\pm$ 3.54	1513.18 $\pm$ 3.67
5	1264.07 $\pm$ 3.46	1559.73 $\pm$ 1.52	1370.75 $\pm$ 3.97	1512.07 $\pm$ 1.20
6	1260.19 $\pm$ 5.37	1554.21 $\pm$ 2.02	1375.78 $\pm$ 3.28	1515.05 $\pm$ 1.28
Average	1259.67	1554.49	1373.46	1512.26
SD	3.05	3.15	3.04	2.58
RSD (%)	0.24	0.20	0.22	0.17
Exp. unc.	18.01	22.23	19.64	21.63

*F : Frozen human serum

**L : Lyophilized human serum

Table 4. Uncertainty budget for measurement result of cholesterol in frozen human serum according to ISO guide

Parameter	Input	Unit	Standard uncertainty	Degree of freedom	Type of uncertainty	Sensitivity coefficient	Uncertainty contribution (%)
M _{spiked}	0.6060	g	0.0001	200	B	2081.81	0.03
AR _{sample}	1.0209		0.0046	3	A	1235.38	64.97
M _{chol, std}	0.3926	g	0.0001	200	B	3212.11	0.07
W _s	0.5114	g	0.0001	200	B	-2466.20	0.04
AR _{std}	0.9803		0.0029	3	A	-1286.49	28.04
M _{is-cho1, std}	0.3840	g	0.0001	200	B	-3284.39	0.07
M _{chol}	39.7890	ug	0.0577	200	B	31.66	6.78
M _{ethanol}	39.7718	g	0.0001	200	B	-31.68	0.00
Average (ug/g)							1261.14
Combined standard uncertainty							7.02
Effective degree of freedom							5
k (95% level of confidence)							2.57
Expanded uncertainty							18.05

치는 인자의 기여도를 살펴보면 시료의 면적비(콜레스테롤/콜레스테롤-3,4-¹³C₂)가 가장 큰 영향을 미치고 그 다음으로 혼합표준용액의 면적비가 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 질량분석기가 얼마나 안정하게 반복 측정하는지의 여부에 따른 것으로 기기의 안정된 운용이 불확도를 줄이는 주요 관건이 될 수 있음을 알 수 있었다. 확장불확도(Expanded Uncertainty)는 95% 신뢰도 구간에서 약 1.43%였다.

4. 결 론

본 연구에서는 혈청 내 콜레스테롤을 정량분석하기 위한 최상위 측정방법으로 ID LC/MS 방법을 제안하였다. 이 방법은 ID GC/MS에 비해 유도체화 과정이 필요 없고 시료 전처리 과정이 간단하여 시간과 비용을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 콜레스테롤과 콜레스테롤-3,4-¹³C₂는 m/z 369.4와 m/z 371.3에서 방해이온 없이 정량에 합당한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 방법의 유효성을 확인하기 위해 NIST SRM 909b를 분석하여 인증값과 비교한 결과 불확도 범위 내에서 일치함을 보였다. 혈청 인증표준물질 4종류를 분석한 결과, 반복성의 상대표준 편차는 0.1~0.8%, 재현성은 0.24%이하로 좋은 결과를 얻었다. 확장 불확도는 95% 신뢰도에서 약 1.43%로 나타났다. 본 연구를 통하여 혈청 내 콜레스테롤을 절대 정량 분석하는 최상위 비교분석법으로써 ID LC/MS 방법을 확립하였으며, 이 방법은 혈청 인증표준물질을 인증하는 일차기준측정절차로 사용될 수 있다.

참고문헌

1. 菅野道廣, 今泉己, 李相榮, 崔龍淳, '콜레스테롤', 17-50, 新光出版社, 대한민국, 1990.
2. 류병호, '콜레스테롤 · 동맥경화', 9-34, 신지서원, 대한민국, 1998.
3. 소현영 외, '물질량 측정 정확도 향상 연구', KRISS/IR-2000-022, 419-443, 한국표준과학연구원, 대한민국, 1999.
4. P. Ellerbe., S. Meiselman and L. T. Sniegowski, *Anal. Chem.*, **61**, 1718-1723(1989).
5. R. Kock, B. Delvoux and H. Greiling, *Clin. Chem.*, **43**(10), 1896-1903(1997).
6. O. Pelletier, L. A. Wright and W. C. Breckenridge, *Clin. Chem.*, **33**(8), 1403-1411(1987).
7. P. Ellerbe, G. L. Myers, G. R. Cooper, H. S. Hertz, L. T. Sniegowski, M. J. Welch, E. White and V., *Clin. Chem.*, **36**(2), 370-375(1990).
8. P. Gambert, C. Lallemant and A. Archambault, *J. chromatogr.*, **162**, 1-6(1979).
9. H.S. Lee and S.R. park, *Anal. sci. & tech.*, **18**(7), 271-277(2005).
10. G. R. Cooper, S. J. Smith, I. W. Duncan, A. Mather, W. D. Fellows, T. Foley, I. D. Frantz, J. B. Gill, T. A. Grooms, I. Hynie, R. Laessig, F. A. LoBasso, J. Martin, H. Naito, H. A. Newman, L. Sideman, J. H. Turner and D. Williams, *Clin. Chem.*, **32**(6), 921-929(1986).
11. C. S. J. Wolff Briche, D. Carter and K. S. Webb, *Rapid*

- Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 848-853(2002).
12. A. Takatsu and S. Nishi, *Anal. Chem.*, **60**, 2237-2239 (1988).
13. A. Takatsu and S. Niah, *Clin. Chem.*, **33**(7) 1113-1117 (1987).
14. I. W. Duncan and P. H. Culbreth and C. A. Burtis, *J. Chromatogr.*, **162**, 281-292(1979).
15. J. T. Bernert, Jr., J. R. Akins, G. R. Cooper, A. K. Poulos, G. L. Myers and E. J. Sampson, *Clin. Chem.*, **37**(12), 2053-2061(1991).
16. I. Björkhem, R. Blomstrand and L. Svensson, *Clin. Chim. Acta*, **54**, 185-193(1974).
17. M. Nakamura, S. Sato and T. Shimamoto, *J. Ather. and Throm.*, **10**(3), 145-153(2003).
18. P. S. Bachorik, J. W. Ross, *Clin. Chem.*, **41**(10), 1414-1420(1995).
19. S. Usui, M. Nakamura, K. Jitsukata, M. Nara, S. Hosaki and M. Okazaki, *Clin. Chem.*, **46**(1), 63-72(2000).
20. G. L. Myers, M. M. Kimberly, P. P. Waymack, S. J. Smith, G. R. Cooper and E. J. Sampson, *Clin. Chem.*, **46**(11), 762-772(2000).
21. L. M. Thienpont, A. P. De Leenheer, D. Stckl and H. Reinauer, *Clin. Chem.*, **39**(6), 1001-1006(1993).
22. ISO guide ISBN 92-67-10188-9; Guide to the expression of uncertainty in measurement.