

# LC/MS/MS를 이용한 인간 혈청 내의 Endogenous Steroid 패널의 정량 측정

## Agilent Supported Liquid Extraction(SLE) Chem Elut S 플레이트 사용

### 저자

Limian Zhao  
Agilent Technologies, Inc.

### 개요

Agilent Chem Elut S Supported Liquid Extraction(Chem Elut S)은 전통적인 규모보다 우수한 일관성과 더 높은 수분 유지 능력을 갖춘 합성 충전제를 이용합니다. 본 연구에서는 Chem Elut S 2mL 96-well plate를 사용하여 인간 혈청 내 15종 Endogenous Steroid 패널의 LC/MS/MS 정량 측정에 대해 다룹니다. 표적 분석물질을 추출하고 염, 단백질 및 부분 인지질과 같은 매트릭스 간섭을 제거하기 위해 Supported Liquid Extraction(SLE)을 이용하여 혈청 시료를 전처리하였습니다. 전체 시료 처리는 배치 절차로서 96-well plate 내 수행되었으며, 먼저 수용성 시료를 SLE 흡착제에 로드한 후 물과 혼합될 수 없는 용매를 이용해 중력에 의해 용리하였습니다. Chem Elut S in-plate 워크플로는 전통적인 액체-액체 추출(LLE)에 비해 시간과 노동력을 크게 절약할 수 있습니다. 기존 SLE 분석법으로 혈청 내 5 ~ 10,000pf/mL의 넓은 검량 범위에 걸쳐(estradiol 및 testosterone의 검량 범위는 10 ~ 10,000pg/mL, hydrocortisone, 17-hydroxypregnenolone 및 progesterone의 검량 범위는 20 ~ 10,000pg/mL) 표적 스테로이드에 대해 검증한 결과, 뛰어난 분석법 분석물질 정확도(80 ~ 120%)와 재현성(RSD<15%)을 보였습니다. 이 분석법의 선택성과 캐리오버에 대해서도 평가하였으며, 5종 분석물질 정량 한계(LOQ)의 상승은 혈청 매트릭스의 선택성으로 인한 것이었습니다. 또한 합성 SLE 흡착제는 규모 기반의 SLE 및 기존 LLE에 비해, 주어진 추출용 시료 용매에서 더 효과적으로 생체액 매질 중의 인지질을 제거할 수 있습니다.

## 서론

기존 LLE는 유도체화 과정이 있거나 없는 조건에서 스테로이드 분석을 수행하기 위해, 혈청이나 혈장과 같은 생물학적 시료 매질 내의 내인성 스테로이드 추출에 널리 사용되었습니다<sup>1-3</sup>. 이들 프로토콜에서 혈청 또는 혈장과 같은 생물학적 시료는 보통 개별 마이크로원심분리 튜브에 분주한 후 추출 용매를 첨가합니다. 시료를 혼합하고 원심분리한 뒤, 상층의 유기물을 다른 튜브 또는 96-well plate로 옮겨 후속의 시료 처리를 수행하였습니다. 이 과정의 실천에는 노동 집약적이고 시간 소모적인 튜브 라벨링, 시료 혼합, 상(phase) 분리, 유기물층 이전 등 고처리량 시료 전처리의 속도를 제한하는 단계를 포함하고 있습니다.

LLE의 이상 단점들을 극복할 수 있는 대안은 SLE입니다. SLE 카트리지의 흡착제는 코팅된 수용성 시료를 위해 화학적 비활성 표면을 제공합니다. 평형화 과정 후, 중력, 약간의 진공 또는 압력을 사용해 물과 혼합될 수 없는 용매로 표적 분석물질을 용리하고, 수용성 상(phase)을 카트리지에 남깁니다. SLE 흡착제는 넓은 수용성 표면 면적을 제공하기에, 표적 분석물질은 충전제를 통과할 때 유기 용매에 효율적으로 추출될 수 있습니다. 그림 1은 추출 과정을

보여줍니다. SLE는 혼합 단계가 필요하지 않으며, 에멀전 현상을 효율적으로 방지할 수 있습니다. 또한 수용성 상과 유기상 사이의 긴밀한 접촉을 통해 효율적인 분할과 높은 분석물질 회수율을 성취할 수 있습니다. 로드와 용리 워크플로만 필요하기 때문에 SLE 워크플로는 매우 간단하며, 인건비와 시간을 크게 절약할 수 있습니다. 마지막으로 96-well plate SLE 포맷은 특히 자동화에 적합하기 때문에, 시료 전처리의 처리량을 향상시킬 수 있습니다.

전통적으로 SLE에 사용되는 흡착제는 고도로 정제된 구조도입니다. 그러나 구조도는 불규칙하게 화석화된 미생물로

구성된 천연 재료로서, 흡착제 배치 간 입자 일관성을 제어하기가 어렵습니다. 흡착제의 다양성은 제품 제조와 품질 관리 과정을 복잡하게 만들어 제품 성능의 비일관성을 초래합니다. 또한 구조도는 합성 충전제에 비해 더 낮은 일관성과 수분 유지 능력을 가집니다.

Chem Elut S 합성 흡착제는 수분 유지 능력, 배치 간 일관성 및 성능 일관성을 크게 개선하였습니다. 본 응용 자료에서는 Chem Elut S 96-well plate를 이용하여 인간 혈청 내 15종 내생성 스테로이드 패널(표 1)의 정량 측정에 대해 다룹니다.

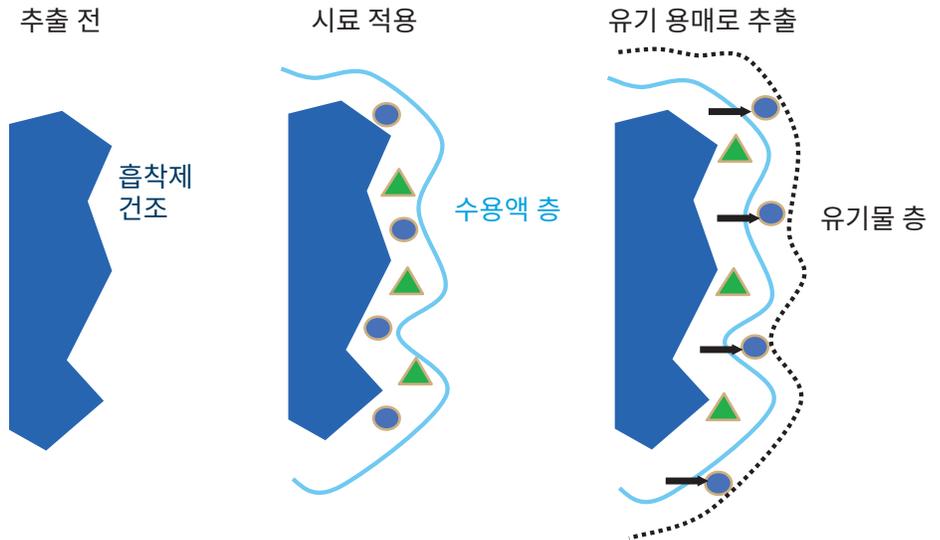


그림 1. SLE의 과정 및 분석물질 추출 메커니즘

표 1. 15종 표적 스테로이드의 분자식과 구조.

화합물 명	Log P	분자식	구조
2-Methoxyestradiol (2-MeE1)	4	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	
Estriol(E2)	2.5	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	
2-Methoxyestrone (2-MeE1)	3.1	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	
Progesterone(PGT)	3.9	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	
17-Hydroxyprogesterone (17-OH PGT)	3.2	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	
11-Deoxycortisol (11-DCTS)	2.5	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	
Estradiol(E2)	4	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	
Testosterone(TTS)	3.4	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	

화합물 명	Log P	분자식	구조
Hydrocortisone(HCTS)	1.6	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	
Androstenedione(ASD)	2.7	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	
17-α-Hydroxypregnenolone (17-OH PGN)	3.1	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	
11-Deoxycorticosterone (11-DCCS)	2.9	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	
Aldosterone	1.1	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	
Estrone(E1)	3.1	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	
Cortisone(CTS)	1.5	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	

## 실험

### 시약 및 화학물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 분석 등급이었습니다. 메탄올(MeOH)은 Honeywell(Muskegon, MI, USA)에서 구입하였고, methyl *t*-butyl ether(MTBE)는 VWR-BDH Chemicals(Radnor, PA, USA)에서 구입하였으며, ethyl acetate(EtOAc)은 J.T. Baker(Center Valley, PA, USA)에서

구입하였습니다. Ammonium fluoride, 모든 스테로이드 표준물질 및 내부 표준물질 원액 (1mg/mL in MeOH 또는 100µg/mL in MeOH)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였습니다. 인간 혈청(DC Mass Spect Gold, MSG4000)은 Golden West Biologicals, Inc.(Temecula, CA, USA)에서 구입하였습니다. 혈청은 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였습니다.

### 표준물질 및 용액

500ng/mL인 표준 스파이킹 용액은 1:1 MeOH/water에서 제조되었으며, 50ng/mL인 IS 스파이킹 용액은 1:1 MeOH/water에서 제조되었습니다. 스테로이드 화합물은 특히 저농도일 때 유리 표면에 대해 민감합니다. 때문에 모든 스파이킹 용액 보관 및 전처리 시, 플라스틱 바이알을 사용하는 것이 매우 중요합니다. 모든 스파이킹 용액은 사용 할 때까지 -20°C에서 보관하였습니다.

37.04mg의 ammonium fluoride(NH<sub>4</sub>F)를 1L Milli-Q 물과 MeOH에 용해시켜, 1mM NH<sub>4</sub>F 수용액과 MeOH를 만들었습니다. Milli-Q 물과 MeOH로 1mM의 용액을 희석하여, 0.2mM NH<sub>4</sub>F 수용액(이동상 A)과 0.2mM NH<sub>4</sub>F MeOH 용액(이동상 B)을 전처리하였습니다.

100mL의 MTBE와 EtOAc를 혼합하여 1:1 MTBE/EtOAc 추출 용액을 새로 전처리하였으며, 분석 당일에 사용하였습니다. SLE 후, 건조 시료를 재용해하기 위해 1:1 MeOH/water 용액을 사용하였습니다.

### 장비 및 재료

시료 전처리에 사용된 장비는 다음과 같습니다.

- Centra CL3R 원심분리기 (Thermo IEC, MA, USA)
- Multitube Vortexer(VWR, PA, USA)
- Eppendorf 피펫 및 repeater
- SPE Dry 96 증발기
- Agilent positive pressure manifold 96 processor(PPM-96, p/n 5191-4116)
- ViaFlo 96 Liquid Handler(Integra, Hudson, NH, USA)
- Agilent Chem Elut S 2mL 96 well plate, 200µL(p/n 5610-2003)
- Agilent square 96-well 2mL collection plate(p/n 5133009)
- Agilent square 96-well sealing caps(p/n 5133005)

### 기기 조건

시료는 Agilent 1290 Infinity binary 펌프 (G4220A), Agilent 1290 Infinity 고효율 자동 시료 주입기(G4226A), Agilent 1290 Infinity 향온 컬럼 장치(G131C)로 구성된 Agilent 1290 Infinity LC에서 분석되었습니다. UHPLC 시스템은 Agilent Jet Stream iFunnel 전기분무 이온화원이 장착된 Agilent G6490 QQQ LC/MS

시스템과 결합하여 사용하였습니다. 데이터 수집 및 처리에는 Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어를 사용하였습니다.

표 2는 분석물질 파라미터를 보여주고, 혈청 내 1ng/mL의 스테로이드 LC/MS/MS 크로마토그램은 그림 2에 나와 있습니다.

HPLC 조건			
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 100 × 2.1mm, 1.8µm(p/n 959758-902) Agilent ZORBAX RRHD C18 가드 컬럼, 5 × 2.1mm, 1.8µm(p/n 821725-901)		
유속	0.4mL/분		
컬럼 온도	40°C		
주입 부피	20µL		
이동상	A) 0.2 mM ammonium fluoride in water B) 0.2 mM ammonium fluoride in MeOH		
니들 세척	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H <sub>2</sub> O w/ 0.2% FA		
그라디언트	시간(분)	%B	유속(mL/분)
	0	50	0.4
	3.0	60	0.4
	8.0	90	0.4
8.5	100	0.4	
중지 시간	8.5분		
사후 시간	2.5분		
MS 조건			
가스 온도	180°C		
가스 유속	11L/분		
Nebulizer	20psi		
Sheath 가스 가열 장치	400°C		
Sheath 가스 유속	10L/분		
캐필러리	3,500V(양이온) 3,000V(음이온)		
iFunnel 파라미터	고압 RF: 150V(양이온 및 음이온) 저압 RF: 100V(양이온 및 음이온)		
데이터 수집	dMRM		

표 2. 스테로이드 분석물질, 사용된 IS, 머무름 시간, MRM 조건

분석물질	내부 표준물질 사용	머무름 시간(분)	극성	전구 이온(m/z)	생성 이온(m/z)			
					정량 이온	CE(V)	정성 이온	CE(V)
Estriol	IS 1	2.04	NEG	287.2	171.0	45	143.1	73
Aldosterone-D <sub>4</sub> (IS1)		2.31	POS	365.2	347.1	17	319.2	21
Aldosterone	IS 1	2.32	POS	361.2	343.2	17	91.1	80
Cortisone-D <sub>8</sub> (IS2)		2.71	POS	369.2	169.2	21	125.1	49
Cortisone	IS 2	2.75	POS	361.2	163.2	25	91.0	73
Hydrocortisone	IS 2	3.24	POS	363.2	121.1	25	91.1	73
17-Hydroxypregnenolone	IS 2	3.24	NEG	331.2	313.2	21	--	
11-Deoxycortisol-D <sub>5</sub> (IS3)		4.53	POS	352.3	100.0	37	113.0	45
11-Deoxycortisol	IS 3	4.58	POS	347.2	109.0	41	97.0	41
Androstenedione	IS 3	5.31	POS	287.2	97.0	25	109.0	29
Estradiol-D <sub>5</sub> (IS4)		5.39	NEG	276.2	147.0	45	187.0	49
Estrone- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (IS5)		5.43	NEG	272.3	148.0	41	146.0	61
Estrone	IS 5	5.42	NEG	269.1	145.0	49	143.1	73
Estradiol	IS 4	5.45	NEG	271.2	145.1	49	183.0	49
11-Deoxycorticosterone	IS 3	5.72	POS	331.0	97.1	25	109.1	33
2-Methoxyestrone	IS 5	5.85	NEG	299.2	284.1	25	--	--
Testosterone	IS 6	5.86	POS	289.3	97.1	23	109.1	25
2-Methoxyestradiol	IS 4	6.01	NEG	301.2	286.2	25	--	--
17-Hydroxyprogesterone-D <sub>8</sub> (IS6)		6.21	POS	339.3	100.1	45	113.2	37
17-Hydroxyprogesterone	IS 6	6.26	POS	331.2	109.1	33	97.1	29
Progesterone-D <sub>9</sub> (IS7)		7.39	POS	324.3	100.1	29	113.0	25
Progesterone	IS 7	7.44	POS	315.2	97.1	25	108.9	37

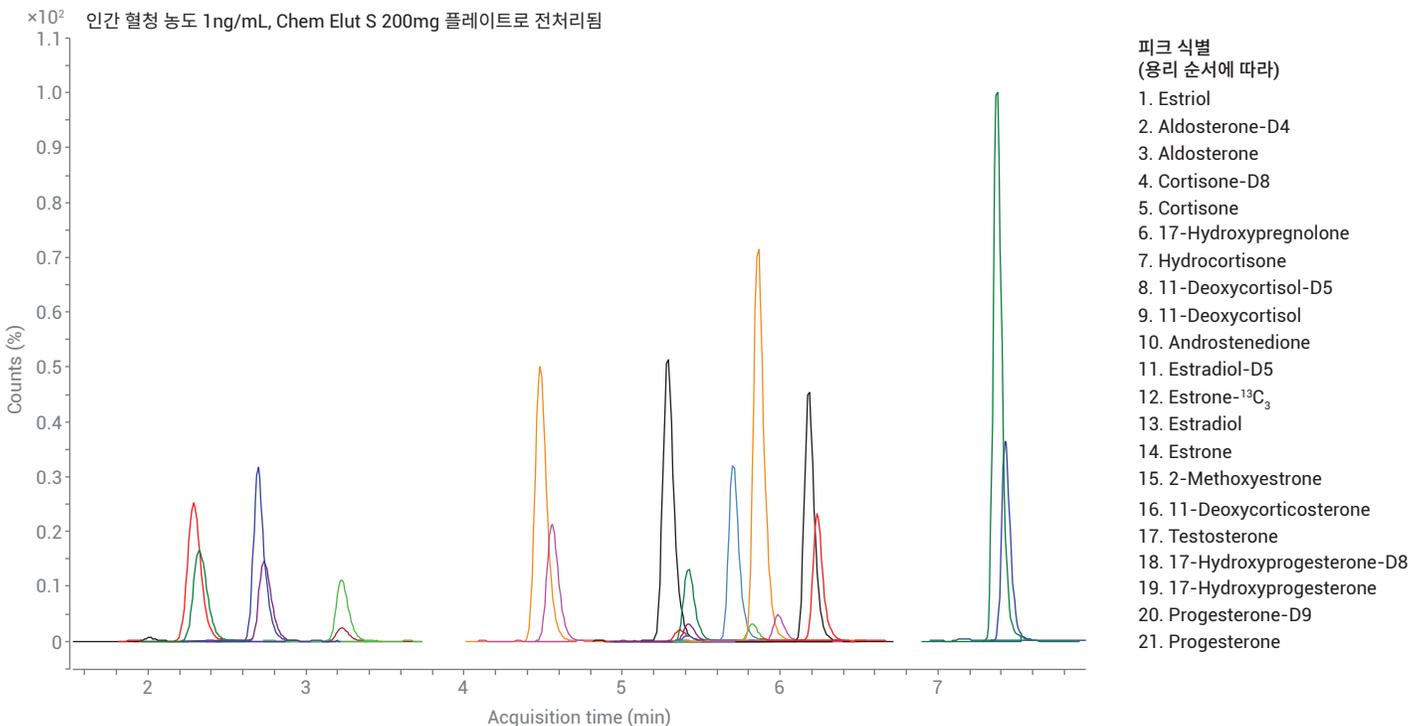


그림 2. Agilent Chem Elut S Supported Liquid Extraction 분석법을 사용해 전처리된 혈청 내 1ng/mL 스테로이드의 LC/MS/MS 크로마토그램

### 검량 표준물질 및 QC 시료 전처리

표준 스파이킹 용액(1:1 MeOH/water에서 용해됨) 500ng/mL를 이용하여 50ng/mL인 혈청 내 중간 표준 스파이킹 용액을 전처리하였습니다. 그리고 이 중간 표준 스파이킹 용액을 인간 혈청 내의 검량선 표준물질 제조에 사용하였습니다. 적절한 양의 중간 표준 스파이킹 용액을 혈청 바탕에 스파이킹하여 혈청 내 농도가 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 및 10,000pg/mL를 포함한 검량 표준물질을 제조하였습니다. 정확도 및 정밀도 분석법 검증 테스트를 위해, 가장 낮은 정량 한계(LLOQ)인 5(10/20) pg/mL, 중간 QC인 100pg/mL, 높은 QC인 1,000pg/mL 및 가장 높은 정량 한계(HLOQ)인 10,000pg/mL를 포함한 4개 레벨의 품질 관리(QC) 시료를 분석하였습니다. 이들 QC 시료도 적절한 양의 중간 혈청 시료를 스파이킹하여 전처리하였습니다. 모든 검량 표준물질과 QC는 2mL 의 스냅 캡 튜브 또는 5mL 플라스틱 튜브 내에서 전처리되었습니다. 그리고 추출을 위해 96-well plate에 분주하였습니다.

### 시료 추출

SLE 추출 최적화는 분석물질 회수율과 매트릭스 청결도, 용매 선택, 용리 부피 및 시간에 대한 고려에 기반합니다. 그림 3은 최적의 시료 전처리 절차를 자세히 보여줍니다. 전체 프로토콜은 시료를 플레이트에 분주, IS와 혼합 및 SLE 플레이트로 이전, SLE 플레이트에 시료 추출 수행 및 collection plate에서 시료 후처리 수행 등 4개 주요 섹션으로 구성됩니다. 혈청 시료를 1mL의 collection plate에 분주하였으며, 그 후 IS 스파이킹 용액을 첨가하였습니다. 시료를 vortex 처리한 후, 전체 시료 혼합물을 하단에 2mL의

사각형 collection plate를 갖춘 Chem Elut S 2mL 플레이트에 옮겼습니다. 추출 용매를 SLE 플레이트에 첨가할 때에는 용매가 튀어서 캐리오버 현상을 야기하지 않도록 주의하십시오. 중력에 의해 용리하고

마지막으로 압력 또는 진공을 천천히 가하여 흡착제 건조 단계를 수행하였습니다. 추출에 휘발성 용매 MTBE 및 EtOAc를 사용하기 때문에, 배출 후드(fume hood) 안에 추출 과정을 수행하는 것이 매우 중요합니다.

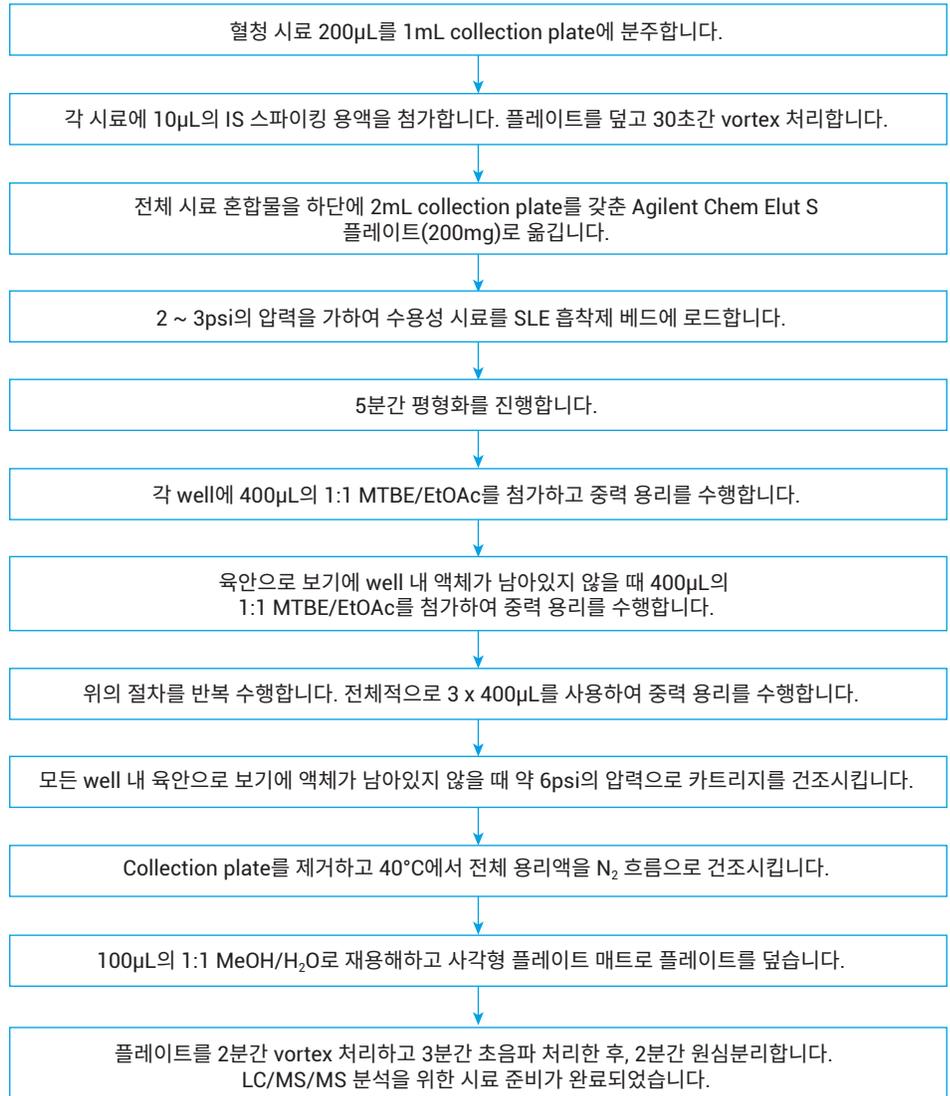


그림 3. Agilent Chem Elut S 2mL 플레이트(200µL)를 사용한 혈청 내 스테로이드 분석의 시료 전처리 워크플로 흐름도

## 분석법 검증

3일간의 정확도 및 정밀도(A & P) 분석을 수행하여 분석법을 검증하였습니다. 매일의 A & P 분석에는 3개의 서로 다른 SLE 플레이트 배치를 사용하였기 때문에, 3일간의 A & P 분석법 검증은 또한 SLE 플레이트 배치 간 재현성 테스트에 사용되었습니다. 검량 표준물질과 QC는 모두 적절하게 사전 스파이킹되었습니다. 시료는 다음과 같은 순서에 따라 collection plate에 분주하였습니다. 더블 매트릭스 바탕, 매트릭스 바탕(IS 스파이킹), 첫 번째 검량 표준물질 세트, 2 ~ 3개 매트릭스 바탕, LLOQ(n=6), 중간 QC(n=6), 높은 QC(n=6), HLOQ(n=6), 2 ~ 3개 캐리오버 매트릭스 바탕, 더블 매트릭스 바탕, 매트릭스 바탕, 두 번째 검량 표준물질 세트, 2 ~ 3개 매트릭스 바탕.

## 분석법 및 제품 비교

검증된 SLE 분석법을 LLE 및 구조토 기반 SLE와 비교하여 분석물질 회수율, 재현성 (RSD), 매트릭스 효과, 검량선 직선성 등을 비교하였습니다.

혈청 내에 1ng/mL인 사전 스파이킹 및 사후 스파이킹된 QC 시료 간 분석물질 기기 반응(피크 면적)을 비교하여 분석물질 절대 회수율을 연구하였습니다. 사전 스파이킹된 QC는 혈청 내에 직접 적절하게 스파이킹되었으며, 개발된 분석법으로 시료를 전처리하였습니다. 사후 스파이킹된 QC는 추출 후 매트릭스 바탕에 스파이킹되었습니다. 보다 상세하게 말하자면, 사후 스파이킹은 적절한 순수 표준용액을 사용해 건조 매트릭스 바탕 시료를 재용해하는 시료 재용해 단계에 발생하였습니다. 사후 스파이킹된 QC 시료 및 시약 바탕 용액 내에서 만들어진 해당 순수한 표준물질 간의 분석물질 기기 반응(피크면적) 비교하여 매트릭스 효과를 분석하였습니다.

## 매트릭스 인지질 제거

인지질 프로파일을 모니터링함으로써 매트릭스 청결도를 조사하였습니다. Chem Elut S 플레이트를 사용한 혈청 시료 추출은 부분 인지질 제거를 보여주었습니다. 처리된 혈청 및 다른 종류 혈장의 매트릭스 바탕의 인지질 프로파일을 비교하였습니다. Chem Elut S 플레이트와 경쟁사의 해당 구조토 기반 SLE 플레이트를 사용하여 진일보로 서로 다른 추출 용매가 인지질 제거에 끼치는 영향을 분석하였습니다.

## 결과 및 토의

이 연구는 임상 연구 응용을 위해 Chem Elut S 플레이트를 사용하여 혈청 내의 스테로이드 정량 측정에 초점을 둡니다.

## 분석법 개발 및 최적화

**기기 분석법 및 특별 주의 사항:** ESI 또는 APCI 이온화원을 사용할 때 5종 스테로이드 분석물질(estriol, estrogen, estradiol, 2-methoxyestrogen 및 2-methoxyestradiol)의 이온화는 매우 어렵습니다. 일반 조건에서, 이들 물질이 고농도로 존재하더라도 화합물 신호를 관찰하기 어렵습니다. 이들 화합물을 유도체화할 수 있지만, 시료 전처리 과정 중 추가 단계가 필요합니다. 또한 유도체화 과정이 있거나 없는 스테로이드에 대해 통합 시료 전처리를 수행하는 것도 매우 어렵습니다. Ammonium fluoride 완충액의 사용은 음이온 모드의 이온화를 도와주고<sup>4</sup>, 스테로이드 분석 감도를 크게 향상시키는 것으로 보고되었습니다<sup>5</sup>. 이와 같은 정보에 기반하여, 까다로운 스테로이드 화합물에 대해 1mM의 ammonium fluoride 완충액을 이동상으로 사용하였으며, 이는 기기 분석 감도를 크게 향상시켰습니다. 완충액 농도에 대한 자세한 조사는 보다 낮은 ammonium fluoride 농도(0.2mM)가 더 우수한 분석 감도를 가져온다는 것을 밝혀냈습니다. 또한 이동상 A와 B의 동일한 염 농도는 보다 일관된 결과를 제공하였습니다. 그리고 0.2mM ammonium fluoride의 수용액과 MeOH 용액을 각각 이동상 A와 B의 최적화된 조건으로 확정되었습니다.

앞서 언급된 바와 같이<sup>5</sup>, ammonium fluoride 완충액의 사용은 음이온 모드에서 이들 스테로이드 화합물의 어려운 이온화 효율을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 기타 화합물이 양이온 모드에서의 이온화 효율도 향상시켰습니다. 15종 스테로이드 분석물질의 전체 패널에 대해 이 조건에 기반하여 기기 조건을 구축하였습니다.

그림 4는 향상된 분석법 분석 감도를 보여주는 혈청 내 정량 한계(LOQ) 5pg/mL 농도에서의 E1 및 E2 크로마토그램을 나타냅니다.

스테로이드 화합물이 특히 저농도일 때 유리 표면에 매우 민감하다는 점을 주의해야 합니다. 유리 바이알을 사용하면 스테로이드

화합물의 현저한 변화 및 손실을 야기할 수 있으며, 특히 시료 매체가 높은 물함량을 가질 때에 더욱 그렇습니다. 때문에 표준물질과 시료 전처리 및 다룰 때 유리 바이알과 튜브를 사용하지 말아야 합니다.

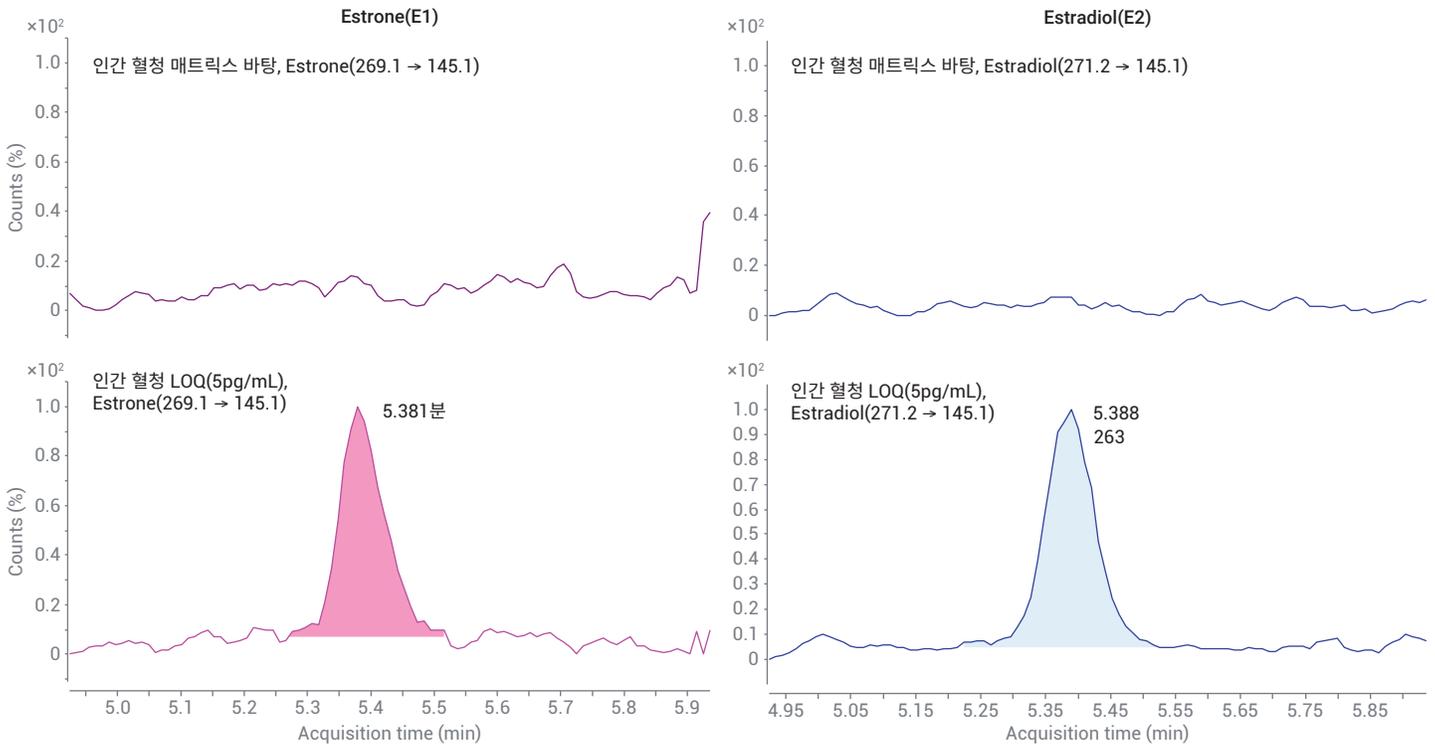


그림 4. 혈청 바탕 및 혈청 내 5pg/mL의 LOQ에 대한 estrogen(E1)과 estradiol(E2)의 크로마토그램

**SLE 분석법 최적화:** SLE 분석법은 기존의 LLE 분석법에 기반하여 개발하거나, SLE 카트리지가 또는 플레이트에서 직접 개발할 수도 있습니다. 본 연구는 기존에 출판된 LLE 분석법을 참고하여 SLE 플레이트에서 SLE 분석법을 직접 최적화하였습니다. SLE 분석법 최적화에는 용매, 용매 혼합물 및 시료 용리 최적화 등이 포함되어 있습니다. 그림 5에 확인할 수 있는 것처럼, 최적화는 평균 분석물질 회수율, RSD 및 매트릭스 효과의 조합 평가를 바탕으로 이루어졌습니다.

MTBE, diethyl ether(DEE), EtOAc 및 DCM/MTBE(1:4) 등 흔히 사용되는 4종 LLE 용매/용매 혼합물에 대해 평가함으로써 우선적으로 추출 용매에 대해 조사하였습니다. 그림 5의 첫 번째

그룹 비교(왼쪽)에서 볼 수 있듯이, MTBE 추출은 최적의 평균 매트릭스 효과를 제공하였으며, 이는 매트릭스가 가장 깨끗하다는 것을 의미하지만 이 때의 평균 회수율은 상대적으로 낮았습니다. EtOAc 추출은 최적의 추출 효율을 보였으나, 보다 높은 매트릭스 이온 억제를 초래하였습니다. DEE와 DCM/MTBE 혼합물 추출은 모두 보다 낮은 분석물질 회수율을 보였으며, DCM/MTBE 추출은 또한 낮은 재현성도 나타났습니다. 결과적으로 분석물질 회수율과 매트릭스 효과 간의 가장 우수한 균형을 찾기 위해 MTBE/EtOAc 혼합물을 심층적으로 연구하였습니다.

그림 5에 나타난 용매 혼합물 최적화에 사용된 두 번째 그룹 비교(중간)에서, MTBE와 EtOAc를 1:1, 2:1, 1:2의 비율로 혼합하여

시료 추출에 사용하였습니다. 그림 5는 1:1 MTBE/EtOAc 추출 혼합물이 분석물질 회수율과 매트릭스 효과 간 최적의 균형을 제공하였음을 보여주며, 따라서 이를 최적의 추출용 용매로 선택하였습니다. 이들 연구는 500 $\mu$ L 용매를 이용한 이중 추출에 기반하였습니다. 400 $\mu$ L의 최적 용매를 사용한 삼중 추출을 통해 시료 추출에 대해 심층적으로 조사하였습니다. 비교 결과는 그림 5의 세 번째 그룹 비교(오른쪽)에 나타나 있습니다. 400 $\mu$ L 용리액으로 삼중 추출을 수행한 후, 매트릭스 효과 저하 없이 분석물질의 평균 회수율은 더욱 향상되었습니다. 결과적으로 SLE 분석법은 400 $\mu$ L의 1:1 MTBE/EtOAc를 이용한 삼중 추출을 통해 최적화되었습니다.

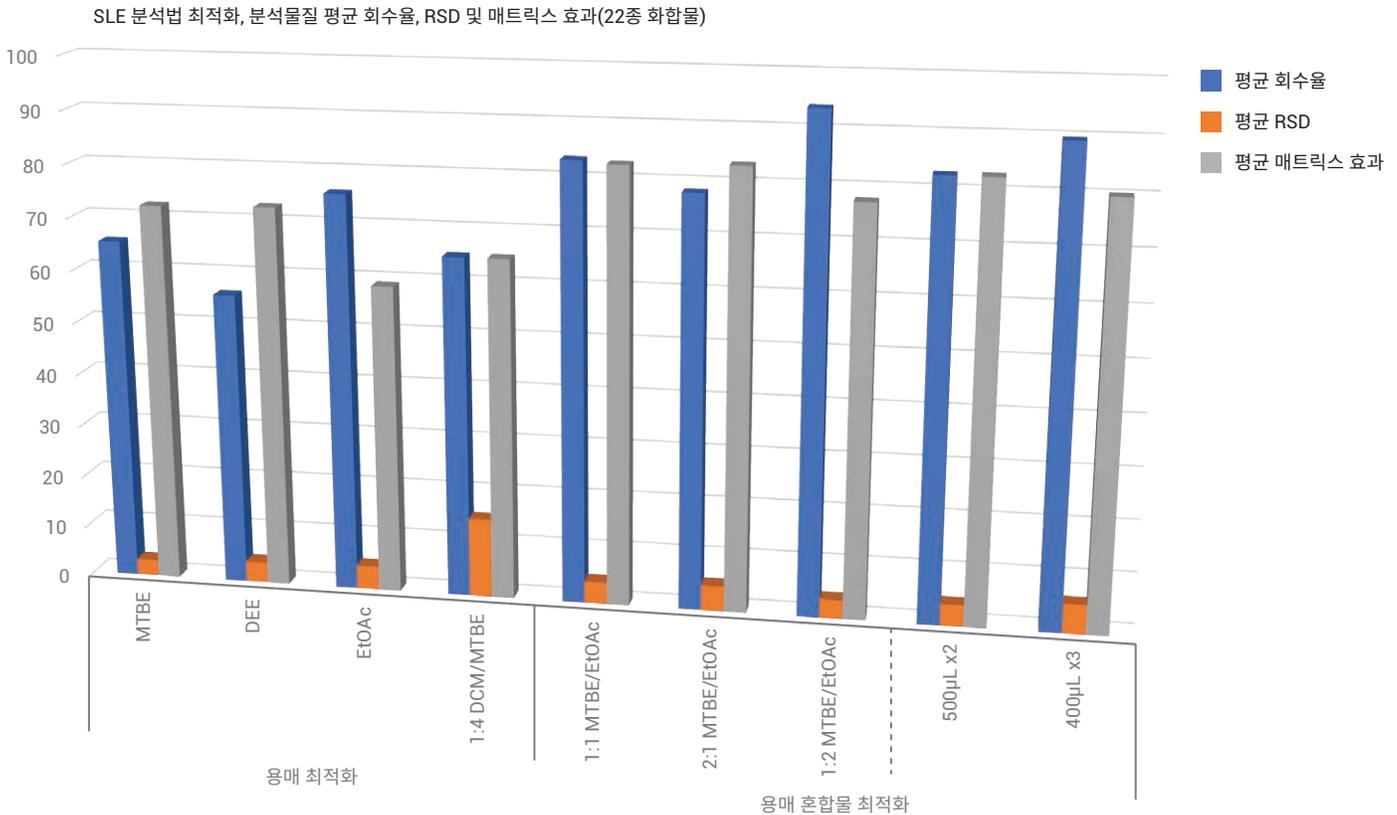


그림 5. 용매 선택 및 시료 용리를 위한 SLE 분석법 최적화. 최적화는 평균 분석물질 회수율, RSD 및 매트릭스 효과의 조합 평가를 바탕으로 이루어졌습니다.

**분석법 검증**

3일간의 정확도와 정밀도 분석으로 전체 정량 결과를 수집하여 최적화된 분석법을 검증하였습니다. 표 3에서 볼 수 있는 결과에는 검량선 데이터와 3일간/배치 정확도 및 정밀도 데이터가 포함되어 있습니다. 선형 회귀 및  $1/x^2$ 의 가중을 사용하여 모든 분석물질의 검량선을

생성하였으며,  $R^2 > 0.99$ 이었습니다. 혈청 내 대부분 분석물질의 LOQ는 5pg/mL이었으며, 매트릭스 간섭 또는 매트릭스 바탕에 나타난 분석물질 등으로 인해 예외적으로 estradiol 및 testosterone의 LOQ는 10pg/mL이고, progesterone, 17-hydroxypregnenolone 및 hydrocortisone의 LOQ는 20pg/mL로 나타났습니다.

3일간의 정확도와 정밀도 분석은 이 분석법 검증이 신뢰성 있는 정량을 실현할 수 있다는 것을 입증하였을 뿐만 아니라, 3개 제조 로트의 SLE 플레이트를 사용하였기 때문에 Chem Elut S 플레이트 배치 간 재현성도 보여주었습니다. 그림 6은 분석물질 정확도와 정밀도에 기반한 SLE 플레이트 배치 간 재현성을 요약하여 보여줍니다.

**표 3.** 인간 혈청 내 15종 스테로이드 화합물의 정량 측정을 위한 분석법 검증 결과.

분석물질	LOQ (pg/mL)	검량 범위 (pg/mL)	QC 스파이킹 농도(pg/mL)	정확도 및 정밀도						
				1일차(SLE 배치 1)		2일차(SLE 배치 2)		3일차(SLE 배치 3)		일간/배치 RSD% (n=18)
				정확도% (n=6)	RSD% (n = 6)	정확도% (n=6)	RSD% (n = 6)	정확도% (n=6)	RSD% (n = 6)	
Estradiol	5	5-10,000	5	95	18.0	97	6.9	103	11.6	12.8
			100	102	6.5	97	8.3	107	5.2	6.4
			1,000	98	2.8	92	1.2	92	4.6	3.1
			10,000	107	5.9	92	5.6	101	4.2	5.0
Aldosterone	5	5-10,000	5	106	4.7	103	12.4	100	9.4	9.2
			100	96	9.3	101	12.8	97	3.0	8.1
			1,000	111	2.5	103	4.2	98	1.9	3.3
			10,000	113	2.4	95	7.5	107	4.2	4.2
Cortisone	5	5-10,000	5	104	9.8	92	10.1	99	7.6	9.5
			100	93	7.0	93	9.2	97	7.6	7.6
			1,000	104	3.5	94	3.7	100	2.4	3.3
			10,000	106	5.6	95	7.8	106	5.5	6.2
Hydrocortisone	20	20-10,000	20	89	6.5	97	13.6	86	12.6	11.1
			100	96	18.2	90	6.7	96	9.5	11.3
			1,000	96	4.4	93	2.4	93	4.1	3.8
			10,000	95	6.3	92	4.1	97	6.8	5.6
17-Hydroxypregnenolone	20	20-10,000	20	109	1.8	99	18.9	91	8.1	9.8
			100	94	19.2	91	8.2	103	15.4	14.0
			1,000	94	6.0	91	2.1	100	5.2	4.6
			10,000	93	3.6	97	3.8	106	9.3	5.3
11-Deoxycortisol	5	5-10,000	5	99	8.3	95	10.7	95	16.2	11.9
			100	94	6.5	89	10.4	97	9.1	8.5
			1,000	105	1.5	87	3.8	99	1.7	2.5
			10,000	110	2.7	92	7.2	104	4.5	4.6
Androstenedione	5	5-10,000	5	99	11.4	102	9.5	110	11.2	10.9
			100	88	8.2	89	8.8	106	10.7	9.0
			1,000	104	2.1	90	3.7	91	1.6	2.7
			10,000	109	5.5	101	5.7	108	7.6	6.0
Estrone	5	5-10,000	5	95	8.7	92	11.3	102	8.9	9.8
			100	98	10.1	95	7.5	99	4.3	7.1
			1,000	104	2.8	95	2.8	96	3.0	3.1
			10,000	105	6.2	94	3.3	98	4.3	4.4

분석물질	LOQ (pg/mL)	검량 범위 (pg/mL)	QC 스파이킹 농도 (pg/mL)	정확도 및 정밀도						
				1일차(SLE 배치 1)		2일차(SLE 배치 2)		3일차(SLE 배치 3)		일간/배치 RSD% (n=18)
				정확도% (n=6)	RSD% (n = 6)	정확도% (n=6)	RSD% (n = 6)	정확도% (n=6)	RSD% (n = 6)	
Estradiol	10	10-10,000	10	105	10.2	101	19.3	100	9.7	13.2
			100	97	11.4	96	10.2	102	10.2	10.4
			1,000	99	3.0	102	5.1	95	2.4	3.7
			10,000	101	2.9	102	2.1	100	4.3	2.9
11-Deoxycorticosterone	5	5-10,000	5	108	12.3	101	13.5	113	6.5	11.0
			100	94	7.6	94	9.8	104	13.3	10.4
			1,000	108	4.8	105	5.2	103	4.7	4.7
			10,000	109	5.8	108	5.7	115	5.3	5.4
2-Methoxyestrone	5	5-10,000	5	109	9.0	111	4.8	100	7.8	7.4
			100	93	3.7	94	7.7	95	7.2	6.0
			1,000	106	2.9	93	4.1	91	4.7	4.1
			10,000	111	3.2	101	7.2	104	2.6	4.3
Testosterone	10	10-10,000	10	100	9.0	95	8.9	94	10.9	8.2
			100	94	3.7	91	6.6	100	8.5	8.2
			1,000	102	2.9	89	4.7	97	6.2	5.6
			10,000	104	3.2	106	6.3	102	5.0	5.7
2-Methoxyestradiol	5	5-10,000	5	92	9.1	109	7.4	94	10.1	9.1
			100	96	6.2	103	7.9	98	7.2	6.9
			1,000	99	1.9	94	1.9	93	4.5	2.9
			10,000	106	3.1	99	2.5	105	2.9	2.6
17-Hydroxyprogesterone	5	5-10,000	5	98	14.9	103	9.1	95	10.8	11.8
			100	89	5.2	93	9.2	98	7.2	7.0
			1,000	105	4.8	89	4.2	100	3.3	4.3
			10,000	106	4.5	103	4.9	100	2.2	3.7
Progesterone	20	20-10,000	20	108	4.8	97	11.0	89	4.0	6.8
			100	97	6.7	91	12.1	101	5.2	7.8
			1,000	119	6.7	91	3.3	95	2.5	4.3
			10,000	112	6.8	99	7.3	104	4.2	5.9

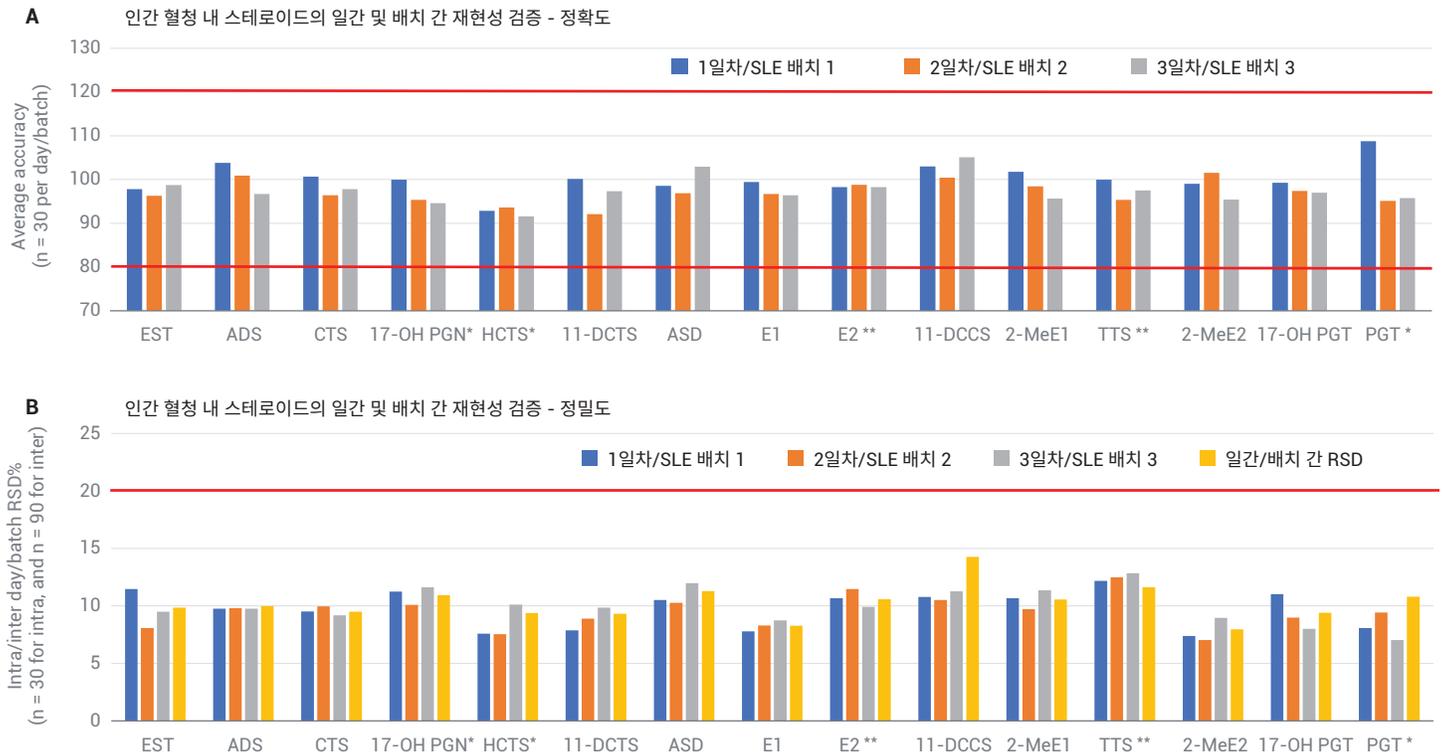


그림 6. 정확도 및 정밀도에 기반한 Agilent Chem Elut S 분석법의 일간 검증 및 플레이트 배치 간 성능 재현성 요약

## 분석법 및 제품 비교

분석물질 회수율, 재현성, 매트릭스 효과 및 검량선 직선성에 기반하여, 분석법 성능 방면에 개발된 Chem Elut S 분석법과 기존 LLE 및 경쟁사의 규조토 기반 SLE를 비교하였습니다.

LLE 대비, SLE는 인건비와 시간을 크게 절약할 수 있습니다. SLE 워크플로는 시료 혼합, 상(phase) 분리, 유기 상등액 이전 등과 같은 중요 단계의 인건비와 시간을 절약하고 시료 전처리 효율을 크게 향상시켰습니다. 이와 같은 단계를 제거함으로써, SLE 프로토콜은 시료 수에 따라 50% 이상의 시간을 절약할 수 있습니다. SLE 절차는

시간과 인건비 절감 뿐만 아니라 에멀전 현상을 방지하고 분석법 신뢰성도 향상시켰습니다.

그림 7은 분석물질 회수율(7A) 및 재현성(7B)에 기반한 분석법 성능 비교를 보여줍니다. SLE 프로토콜은 수용성 상과 유기상 사이의 긴밀한 접촉을 제공하여 효율적인 분할과 높은 분석물질 회수율을 성취할 수 있습니다. SLE 분석법 사용 시, 분석물질 회수율은 LLE 분석법에 비해 전체적으로 10 ~ 20% 향상되었습니다. 보다 높은 분석물질 회수율은 분석물질 반응을 개선하여, 더 우수한 분석법 분석 감도를 제공할 수 있습니다.

규조토 기반의 SLE는 동급의 또는 약간 더 높은 회수율을 나타냈으나, 특히 극성이 보다 강한 분석물질에 대해 뚜렷한 well 간 변화가 관찰되었습니다. 이는 규조토 흡착제와 수분 유지 능력의 비일관성 때문일 수 있습니다. Chem Elut S 플레이트가 제공하는 향상된 well 간 재현성과 분석법 분석 감도 덕분에, 검량선 직선성도 개선되었습니다. 이 모든 개선 사항은 정량 분석법의 신뢰성과 일관성을 높였습니다.

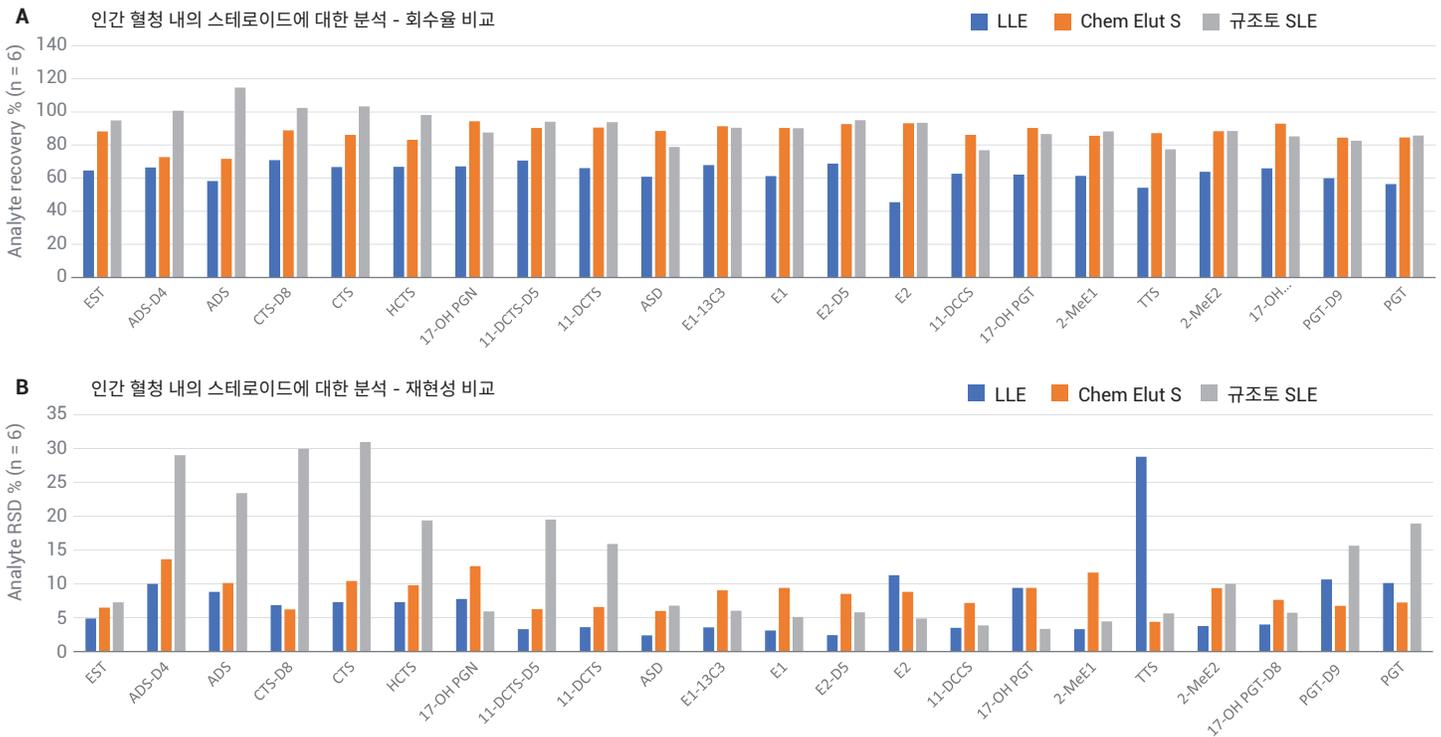


그림 7. 분석법 및 제품 성능 비교, LLE vs Agilent Chem Elut S vs 규조토 SLE

## 매트릭스 인지질 제거

Chem Elut S 플레이트를 사용하여 생체액을 전처리하는 것은 일부 인지질을 제거할 수 있습니다.

이 연구에서는 극도로 낮은 표적 스테로이드 정량 한계에 대해 우수한 매트릭스 선택성을 성취하기 위해 호르몬이 제거된 혈청을 사용하였습니다. 그러나 호르몬이 제거된 혈청은 인지질도 제거되었으며, 이는 다른 응용 테스트에서 불필요할 수 있습니다. 인지질 제거를 조사하기 위해, 표준 LLE, Chem Elut S 및 경쟁사 규조토 SLE 분석법을 이용하여 미처리된 혈장으로 매트릭스 내 인지질 프로파일링을 분석하였습니다. 그림 8A의 프로파일 비교는 MTBE 용매를 사용하는 Chem Elut S 분석법을 이용한 인지질 제거율은 경쟁사의 규조토 SLE 방법에 비해 99% 더 높고, MTBE 기반의 LLE에 비해 30%가 더 높다는 것을 보여줍니다.

Chem Elut S와 규조토 SLE에 대한 심층적인 비교 연구를 위해 서로 다른 종류의 혈장에 대해 다양한 추출 용매를 사용하였으며, 그 결과는 그림 8B에 나타나 있습니다. 인지질 총 반응은 존재비를 바탕으로 정규화되었습니다. 발견한 결과는 다음과 같습니다.

- 서로 다른 종류 혈장의 인지질 존재비는 차이가 있을 수 있으며, 그 중 지방혈성 혈장에 가장 많은 인지질이 포함되어 있었습니다.
- 다양한 용매는 서로 다른 레벨의 인지질 추출을 설치할 수 있으며, 그 중 EtOAc와 DCM이 MTBE 및 DEE에 비해 더 많은 인지질을 추출하였습니다.
- Chem Elut S는 경쟁사의 규조토 SLE에 비해 더 효율적인 인지질 제거 능력을 제공할 수 있습니다.

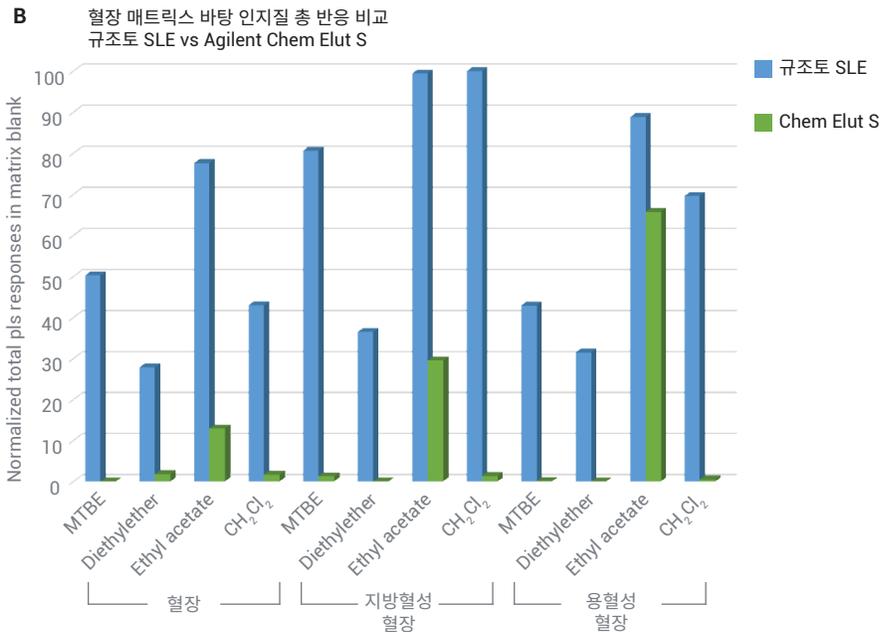
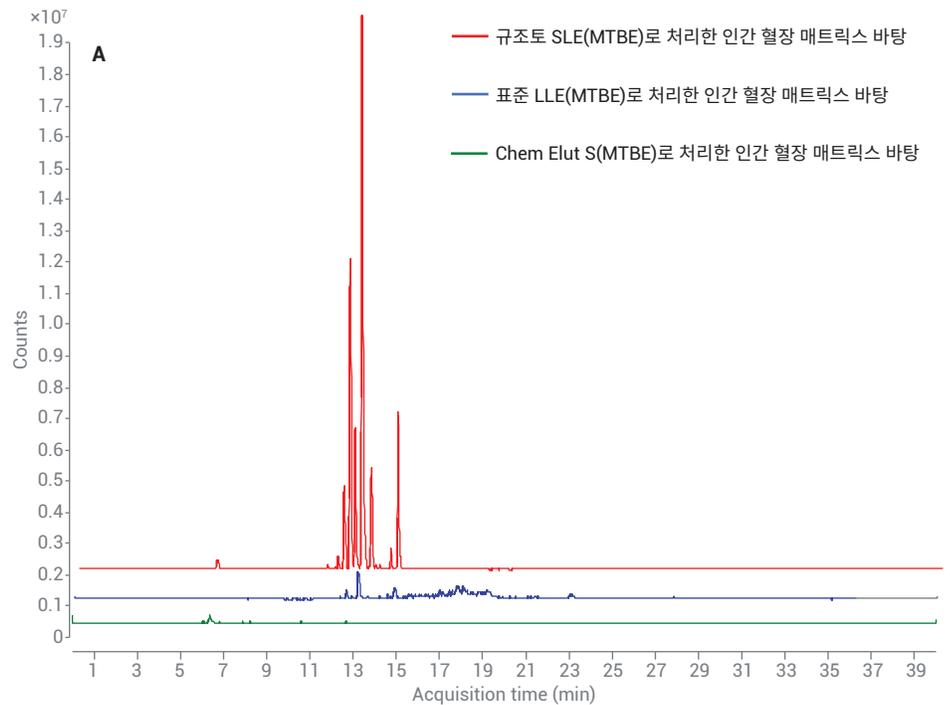


그림 8. 서로 다른 용매를 사용한 혈장 내 인지질 제거 비교, Agilent Chem Elut S vs 규조토 SLE vs LLE

## 결론

인간 혈청 내 15종 스테로이드 화합물 패널을 정량 측정하기 위해 Agilent Chem Elut S 2mL 플레이트를 사용한 시료 분리법을 개발 및 검증하였습니다. SLE 분석법은 분석물질 회수율, 분석법 재현성 및 매트릭스 효과를 바탕으로 용매 사용 및 시료 용리를 위해 최적화되었습니다. 3일간의 정확도 및 정밀도 측정을 통해 이 분석법은 수용 가능한 검량선 직선성, 뛰어난 일간 및 일중 정확도 및 정밀도, 탁월한 분석물질 회수율 및 분석법 생산성 등을 가지고 있음을 검증하였습니다. Chem Elut S 분석법은 표준 LLE와 규조토 SLE 대비, 표준 LLE 보다 전체적으로 더 높은 분석물질 회수율을 제공하였고 규조토 SLE보다 우수한 흡착제 일관성 및 well 간 카트리지 재현성을 제공하였습니다. 이는 또한 혈장이나 혈청과 같은 생체액 매질에서 효율적인 인지질 제거 효과를 성취하였습니다. 96-well plate 포맷에서 개발된 이 프로토콜은 고처리량 실험실의 자동화 가능한 빠른 시료 전처리에 매우 적합합니다. 또한 편리한 로드와 용리 절차는 액체 추출 워크플로를 간소화하고 시간과 인건비를 절약해줍니다. Chem Elut S는 규조토 흡착제보다 높은 시료 유지 능력을 갖추고 있어, 효율적으로 시료를 흡착하고 시료 투과 가능성을 낮출 수 있습니다. 새로운 플레이트 설계는 다음과 같은 특징을 가지고 있습니다.

- 시료 및 용리액을 위한 넓은 헤드스페이스
- 압력 또는 진공이 가할 때까지 시료를 유지할 수 있는 상단 사각형 프리트
- 완벽한 하드웨어 호환성을 위한 full skirt
- 빠르고 일관된 용리

## 참고문헌

1. Anari, M. R.; *et al.* Derivatization of Ethinylestradiol with Dansyl Chloride to Enhance Electrospray Ionization: Application in Trace Analysis of Ethinylestradiol in Rhesus Monkey Plasma. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4136–4144.
2. Lee, J. S.; *et al.* Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2006**, *91*, 3791–3797.
3. Kushnir, M. M.; *et al.* High-Sensitivity Tandem Mass Spectrometry Assay for Serum Estrone and Estradiol. *Clinical Chemistry* **2008**, *129*, 530–539.
4. Wang, W.; Cole, R. B.; Enhanced Collision-Induced Decomposition Efficiency and Unraveling of Fragmentation Pathways for Anionic Adducts of Brevetoxins in Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8826–8838.
5. Hindle, R. Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-2473EN, **2013**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
2019년 5월 15일, 한국에서 인쇄  
5991-0949KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)

