

# Application News

No. SSI-LCMS-082K

## Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8060

### LC-MS/MS를 이용한 Oxysterol 화합물의 분리와 정량 분석

### Separation and Quantitation of Oxysterol Compounds Using LC-MS/MS



Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8060

#### ◆ 요약

Oxysterol 및 cholesterol 관련 화합물 16종을 Shimadzu Nexera UHPLC 및 Shimadzu LCMS-8060을 이용하여 분석하였다. 검출 및 정량한계는 APCI, ESI 및 Dual Ion (DUIS) 소스를 이용해 얻었다.

#### ◆ 연구배경

Oxysterol은 신경퇴행성질환과의 상관관계 때문에 정량에 대한 많은 요구가 있다. 체액 내 다양한 Oxysterols의 비율은 연구자들이 질병의 상태를 연구하는 데 이용된다. 이에 Shimadzu LCMS-8060을 이용하여 LCMS Oxysterol 정량 분석법을 개발하였다. 검출한계 및 정량한계는 각 성분의 다중 반응 모니터링 (MRM) 모드를 이용해 결정하였다.

#### ◆ 분석방법

Oxysterol 표준용액들은 메탄올로 제조하였고, 10:90 H<sub>2</sub>O:MeOH로 희석하였다. Oxysterol 관련 분석 대상 성분은 표 1에 나타내었다. MRM 조건은 Shimadzu triple quadrupole 질량분석기(LCMS-8060) 및 LabSolution 5.82를 이용하여 최적화하였다. Shim-pack XR-ODS III 컬럼을 이용하여 화합물을 분리하였으며, Autosampler 온도는 10 °C, 주입량은 2 µL로 설정하였다. 분석 초기 유속은 0.4 mL/min 이고, 잔류된 화합물의 용출 속도를 높이기 위해 분석이 끝날 때는 0.7 mL/min에 도달하도록 유속을 조절하였다.

표 1. Oxysterol 관련 분석 대상 성분

Compound name	Abbreviation
24 (S)-hydroxycholesterol	24HC
(D7)22-hydroxycholesterol	22HC(d7)
25-hydroxycholesterol	25HC
27-hydroxycholesterol	27HC
(D7)7α-hydroxycholesterol	7αHC(d7)
7α-hydroxycholesterol	7αHC
7β-hydroxycholesterol	7βHC
7-Ketocholesterol	7KC
(D7) 7-Ketocholesterol	7KC(d7)
7α-hydroxycholestenone	7αHCn
(D3) Vitamin D3	VitD3(d3)
Zyosterol	Zymo
Desmosterol	Desmo
7α,27 dihydroxycholestenone	7α,27diHC,3one
Cholesterol	CH
7dehydrocholesterol	7DHC

MRM 조건은 DUIS, APCI 및 ESI 소스를 이용한 triple quadrupole 질량분석기로 최적화하였다. 두 개의 precursor 이온에서 강한 신호를 나타내는 경우, 두 precursor ion 모두를 이용하여 MRM 조건을 최적화하였다. 이는 향후, 응용분석 시에 다른 매트릭스에서 더 좋은 감도를 제공할 수 있는 옵션이 될 수 있다.

DUIS 소스에서 nebulizing, heating 및 drying gas의 유속은 3, 17 그리고 3 L/min으로 설정하였다. 그리고, Interface, desolvation line 및 heat block의 온도는 각각 300 °C, 250 °C 그리고 400 °C로 설정하였다. APCI 소스에서의 interface, desolvation line 및 heat block 온도는 각각 350 °C, 200 °C

그리고 200 °C로 설정하였으며, drying gas의 유속은 5 L/min으로 하였다. ESI 소스에서는 nebulizing, heating 및 drying gas의 유속을 3, 10 그리고 10 L/min으로 설정하였으며, Interface, desolvation line 및 heat block 온도는 300 °C, 250 °C 그리고 400 °C로 하였다.

표 2. Oxysterol 관련 화합물의 MRM 분석조건

Compound Name	Retention time (min)	DUIS		APCI		ESI	
		Target MRM	Reference MRM	Target MRM	Reference MRM	Target MRM	Reference MRM
24HC	4.0	385.45>367.30	385.45>324.30	367.35>91.05	367.35>104.85	385.10>367.25	385.10>109.00
24HC	4.0	367.30>281.10	367.30>104.90	385.40>367.30	385.40>104.90	367.45>95.15	367.45>105.25
22HC(d7)	4.2	374.40>91.10	374.40>255.25	374.40>104.80	374.40>133.15	374.20>104.90	374.20>132.95
25HC	4.1	385.30>367.40	385.30>324.25	367.35>95.00	367.35>135.10	367.35>105.15	367.35>147.15
25HC	4.1	367.35>81.15	367.35>105.10	385.35>367.30	385.35>133.10	385.20>367.30	385.20>324.45
27HC	4.5	385.05>67.15	385.05>93.10	385.10>135.10	385.10>149.10	385.15>95.05	385.15>324.35
7αHC(d7)	7.6	374.35>159.15	374.35>91.15	374.40>145.30	374.40>159.25	374.20>158.95	374.20>144.80
7αHC	7.7	367.35>117.10	367.35>66.90	367.45>144.95	367.45>95.00	367.15>145.40	367.15>159.35
7αHC	7.7	385.30>367.40	385.30>367.40	385.10>367.25	385.10>159.10	385.45>367.35	385.45>159.05
7βHC	7.9	385.30>367.30	385.30>324.35	367.15>159.10	367.15>145.30	367.10>95.15	367.10>158.95
7βHC	7.9	367.35>81.10	367.35>104.85	385.10>367.30	385.10>159.00	385.10>367.15	385.10>158.95
7KC	8.3	401.15>95.10	401.15>383.30	401.10>80.95	401.10>383.35	401.45>95.30	401.45>383.30
7KC(d7)	8.1	408.30>390.15	408.30>95.15	408.40>81.15	408.40>95.25	408.40>390.25	408.40>95.05
7αHCn	6.5	401.25>383.30	401.25>97.10	401.35>383.45	401.35>97.10	401.10>382.95	401.10>96.90
VitD3(d3)	3.0	386.25>232.20	386.25>368.45	386.40>368.35	386.40>92.90	386.40>368.30	386.40>95.20
Zymo	12.8	367.30>95.00	367.30>80.90	367.15>95.20	367.15>109.20	367.15>95.10	367.15>80.95
Desmo	13.3	367.25>95.05	367.25>95.05	367.35>135.25	367.35>104.90	367.15>95.00	367.15>104.95
7α,27diHC,3one	2.2	417.25>399.10	417.25>381.30	417.30>399.25	417.30>381.45	417.35>399.30	417.35>97.25
CH	17.4	369.30>161.10	369.30>94.90	369.40>95.20	369.40>146.95	369.40>147.25	369.40>135.25
7DHC	14.5	367.25>95.05	367.25>158.90	367.30>145.25	367.30>159.25	367.15>145.10	367.15>159.20

Multiple MRM transition은 각 precursor 이온으로부터 결정되었고, 가장 강한 신호를 보이는 두 가지를 표시함.

각 성분들의 분리는 Shim-pack XR-ODS III 컬럼과 Shimadzu Nexera UHPLC system을 이용하여 진행되었다. 24HC와 25HC 및 7αHC와 7βHC와 같은 분리가 어려운

물질의 경우에도 분리하여 개별 정량이 가능하도록 하였다. UHPLC 시스템의 최대 작동 압력은 약 11,000 psi였다.

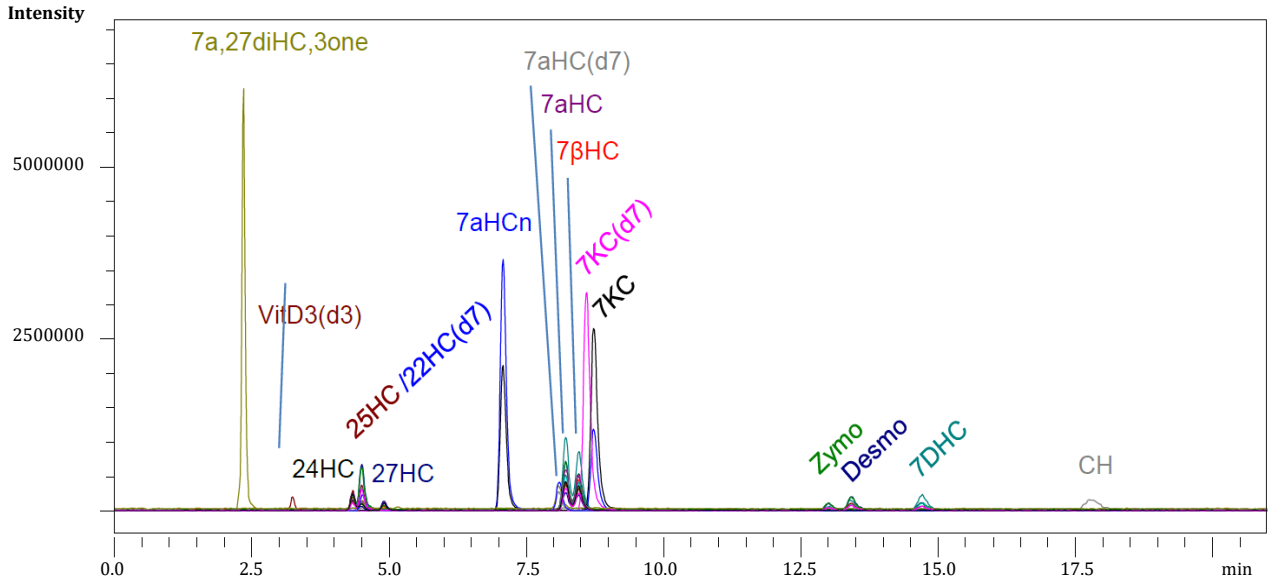


그림 1. 16종의 Oxysterol 관련 화합물의 크로마토그램

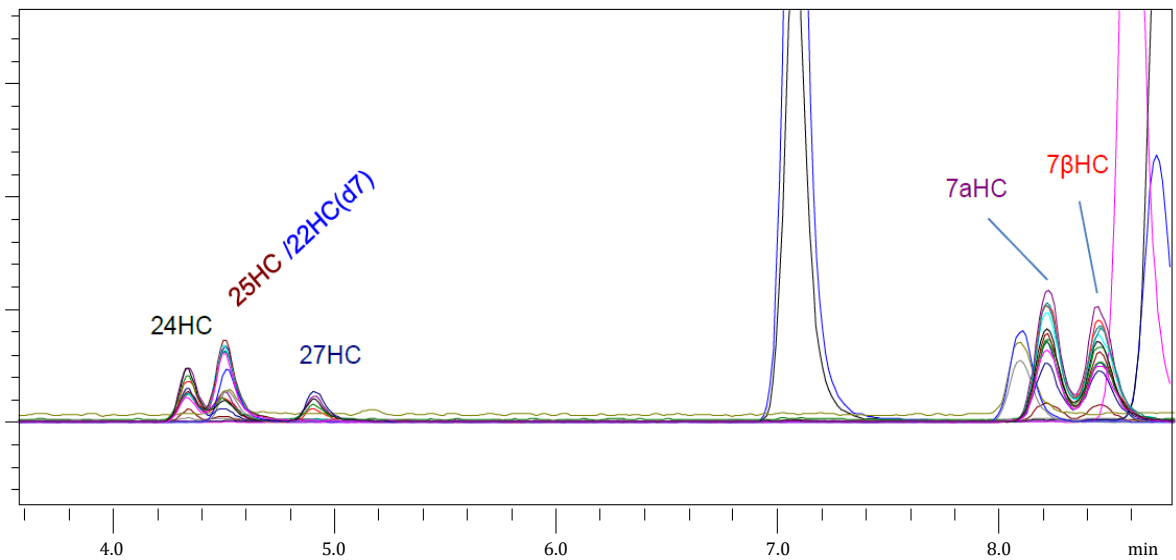


그림 2. 주요 성분의 분리를 보여주는 크로마토그램

ESI, APCI 및 DUIS소스를 이용해 얻은 검출한계를 아래 표에 나타내었다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 3:1과 10:1의 SN비로 결정하였다.

ESI에서 대부분의 oxysterol 관련 화합물이 낮은 검출한계를 얻었지만, zymosterol과 desmosterol의 경우 순수한 표준물질을 이용해도 실질적인 정량한계에 도달하는 데 어려움이 있었다. APCI는 이 두 화합물에서 더 나은 정량성을 보였으나, 그 외 다수의 화합물에서의 LOD 및 LOQ는 좋지않았다. DUIS의 경우, 다른 화합물의 LOD에 크게 영향을 주지 않으면서 zymosterol과 desmosterol의

정량을 가능하게 하여 APCI와 ESI의 이점을 모두 제공한다. 따라서, DUIS는 Oxysterol 관련 혼합물을 분석하기 위한 최적의 소스이다. Dual ion DUIS 소스는 ESI 및 APCI 소스를 각각 사용하여 분석을 두 번 수행하는 대신 한 번의 분석으로 16종의 분석물질을 모두 정량할 수 있다.

비타민 D3 (D3)의 경우, APCI 및 ESI에 비하여 DUIS를 사용했을 때, 검출 및 정량한계가 훨씬 더 낮았다. 이는 DUIS(및 ESI)에서는 가능하지만 APCI에서는 불가능한 probe position 최적화의 결과일 수 있다.

표 3. ESI, APCI 및 DUIS 소스를 이용하여 LCMS-8060으로 결정된 LOD와 LOQ. (Picogram 단위로 나타냄.)  
(초록색은 낮거나 가장 낮은 한계를 나타냄. 노란색은 가장 낮은 한계보다 다소 높은 한계를 나타냄. 빨간색은 가장 높은 한계를 나타냄.)

	ESI		APCI		DUIS	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
24 (S)-hydroxycholesterol	20	30	30	50	20	50
(D7) 22-hydroxycholesterol	10	20	30	50	10	20
25-hydroxycholesterol	20	30	50	100	20	30
27-hydroxycholesterol	20	50	50	50	20	100
(D7) 7a-hydroxycholesterol	20	20	10	10	10	10
7a-hydroxycholesterol	4	10	10	10	10	20
7b-hydroxycholesterol	10	10	10	30	10	20
7-Ketocholesterol	1	4	4	10	1	4
(D7) 7-Ketocholesterol	0.5	2	2	4	0.5	2
7a-hydroxycholestenone	0.5	4	4	4	1	4
(D3) Vitamin D3	30	300	50	50	20	30
Zyosterol	100	>2000	30	300	300	300
Desmosterol	300	>2000	30	50	100	300
7a,27 dihydroxycholestenone	0.25	1	2	4	0.5	2
Cholesterol	100	1000	100	500	100	500
7dehydrocholesterol	100	300	100	300	100	500

◆ 결과 및 토의

16종의 oxysterol 관련 화합물의 MRM 분석조건은 LCMS-8060을 이용하여 최적화하였다. UHPLC 컬럼은 화합물 분리를 위해 사용되었으며, 24HC, 25HC, 7αHC 및 7βHC는 충분히 개별 정량이 될 수 있도록 분리하였다. 이 분석법의 분석시간은 21분이며, oxysterol 관련 성분 에 대한 검출한계와 정량한계는 APCI, ESI 및 DUIS 소스를 이용하여 결정되었다. 비록 LOD와 LOQ가 화합물마다 다양하지만, LCMS-8060은 oxysterol 관련 성분 에 대해 낮은 picogram 범위에서 검출한계에 도달하는 것이 가능했다. DUIS는 oxysterol 관련 성분 분석에 적합한 소스로 보여진다. 이것은 ESI와 APCI 모두의 장점을 보여주고, 한번의 분석으로 16종의 화합물을 분석할 수 있다.

◆ 결론

향후, Oxysterol 관련 화합물의 정량에 대한 분석 지원을 위해 triple quadrupole 질량분석기를 이용한 빠르고 고감도의 분석법을 개발하였다.



SHIMADZU Scientific Korea Corp.  
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China. This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.