SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

LC-MS/MS
Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

No.SSK-LCMS-2004

LC-MS/MS를 이용한 혈액 중 신경전달물질의 자동유도체화 분석법
(Automated derivatization of neurotransmitters in plasma extracts for liquid chromatograph tandem mass spectrometry)

신경전달물질(Neurotransmitters)은 내인성 화학물질로써 뇌에서 행동, 질병 상태 및 약물 농도에 따라 신경 전달에 영향을 주기 때문에 신경과학 분야에서의 생체 내 신경화학적 모니터링은 매우 중요하다. 혈액, 소변 및 뇌척수액(CSF) 등에서의 신경전달물질(Neurotransmitters)과 그 대사물질은 기기 분석을 통해 질병과 관련된 지표 성분이나 진단을 위한 표적 생화학 검사에 대한 정보를 제공할 수 있다[1]. 그러나 신경전달물질(Neurotransmitters)은 극성이 매우 커서 크로마토그래피 조건에서 분리하는데 어려움이 있다.

이에 이 연구에서는 염화벤조일 (Benzoyl chloride)을 사용하여 컬럼전 자동 유도체화 방법 (Auto-precolumn derivatization)을 통해 신경전달물질 (Neurotransmitters)을 소수성을 띄게 만든 후, 역상 크로마토그래피로 분리할 수 있는 LC-MS/MS 분석법을 소개하고자 한다.

그림 1. LCMS-8050 system

■전처리 방법

알칼리 조건에서 염화벤조일(Benzoyl chloride)을 이용한 1차, 2차 아민 또는 페놀의 벤조일화(Benzoylation)는 쇼텐-바우만 반응(Schotten-Baumann reaction)으로 알려진 매우 편리한 방법으로 이 반응의 모식도는 〈그림 2〉와 같다[2].

전처리 방법은 단백질 제거를 위해 쥐 혈액 샘플에 차가운 아세토니트릴을 넣은 후 12,000 *g* 로 10 분간 원심분리를 진행하여, 상층액을 오토샘플러 바이알에 옮겨 담은 후 염기 상태에서 염화벤조일(Benzoyl chloride)과 반응시켰다. 반응 과정은 오토샘플러를 이용하여 자동으로 진행하였으며, 시료의 전처리 과정은 〈그림 3〉과 같다. 또한, 오토샘플러의 세부적인 과정을 〈그림 4〉에 나타내었다.

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.

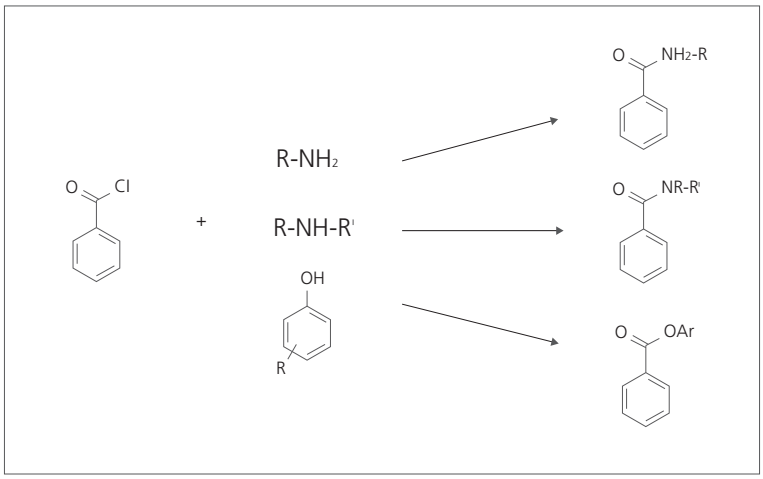

그림 2. 벤조일화(Benzoylation) 반응의 모식도

단백질 침전법

- 쥐 혈액 20 µL 에 차가운 아세토니트릴 80 µL 을 넣는다.
- Vortex 한다.
- 12,000 *g* 로 10 분간 원심분리하여 상층액을 사용한다.

↓

[SIL-30AC autosamler를 이용한 자동화 방법]
유도체화

- 샘플 15 µL 를 바이알에 넣는다.
- 100 mM 탄산나트륨 (sodium carbonate) 10 µL 를 샘플 바이알에 넣는다.
- 2 % 염화벤조일 (benzoyl chloride) 10 µL 를 샘플 바이알에 넣은 후 혼합한다.

↓

내부 표준품

- 1% 개미산 용액에 용해시킨 내부표준품 5 µL 를 샘플 바이알에 넣은 후 혼합한다.

↓

LC-MS/MS 에 주입 및 분석

그림 3. 시료 전처리 방법

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.

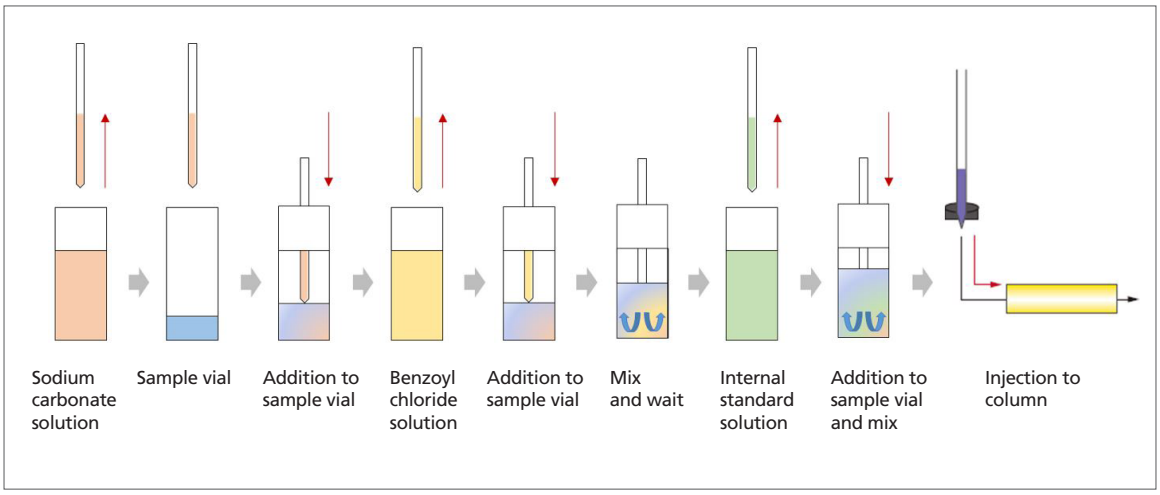

그림 4. 시료 전처리를 위한 오토샘플러의 세부과정

■시스템 구성 및 분석조건

신경전달물질(Neurotransmitters) 분석을 위한 액체크로마토그래프-텐덤질량분석기의 세부 분석 조건은 아래 〈표 1〉, 〈표 2〉와 같다.

표 1. UHPLC-MS/MS 조건

LC system	Nexera X2 UHPLC
Flow	0.3 mL/min
Mobile phase A	5 mM Ammonium formate and 0.1 % formic acid in water
Mobile phase B	Acetonitrile
Gradient	20 %B (0.5 min) – 70 %B (6.5 – 7.5 min) - 20 % B (7.6 – 10.0 min)
Column	Shim-pack GIST C18 (50 x 2.1 mm.i.d., 2 μm)
Column oven	30 ℃
Injection volume	5 μL
MS system	**LCMS-8050**
Ionization method	ESI, positive
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	10 L/min
DL temp.	250 ℃
Interface temp.	300 ℃
Heat block temp.	400 ℃
Drying gas flow	10 L/min

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.

표 2. MRM조건

Compound	Class	Target ion, *m/z*	Reference ion, *m/z*
3-HK	Target	433.1>105.2	433.1>162.2
3-MT	Target	376.1>105.2	376.1>77.1
5-HIAA	Target	313.1>105.2	313.1>77.2
5-HT	Target	385.0>105.2	385.0>264.2
DA	Target	466.1>105.1	466.1>77.2
DOPAC	Target	394.1>105.1	394.1>77.2
DOPAL	Target	378.1>105.2	378.1>77.2
E	Target	496.1>105.2	496.1>478.2
HVA	Target	304.1>105.2	304.1>137.2
KYN	Target	417.1>146.2	417.1>122.2
KYNA	Target	294.1>105.2	-
L-DOPA	Target	510.1>105.1	510.1>360.3
NE	Target	482.1>105.1	482.1>77.2
Salsolinol	Target	388.1>105.2	388.1>77.2
Trp	Target	309.1>105.2	309.1>263.2
Tyr	Target	390.1>105.1	390.1>77.2
GABA	Target	208.0>105.0	208.0>77.0
Glutamate	Target	252.2>105.1	252.2>76.9
Glycine	Target	180.2>105.0	180.2>76.9
3-MT-d4	IS	380.0>105.2	380.0>77.2
5-HIAA-d5	IS	318.0>105.2	318.0>77.2
5-HT-d4	IS	389.1>105.2	389.1>268.3
DA-d4	IS	469.9>105.1	-
DOPAC-d5	IS	399.1>105.2	399.1>77.2
E-d6	IS	502.0>105.2	502.0>484.2
HVA-d5	IS	309.0>105.2	309.0>292.3
L-DOPA-d3	IS	513.1>105.2	513.1>363.2
NE-d6	IS	488.2>105.2	488.2>470.2
Trp-d8	IS	317.0>105.2	317.0>269.2
Tyr-d7	IS	397.0>105.1	397.0>247.2

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.

■분석 결과

1. 크로마토그램

표준물질 및 쥐 혈액 시료의 MRM 크로마토그램을 〈그림 5〉와 같이 비교하여 나타내었다.

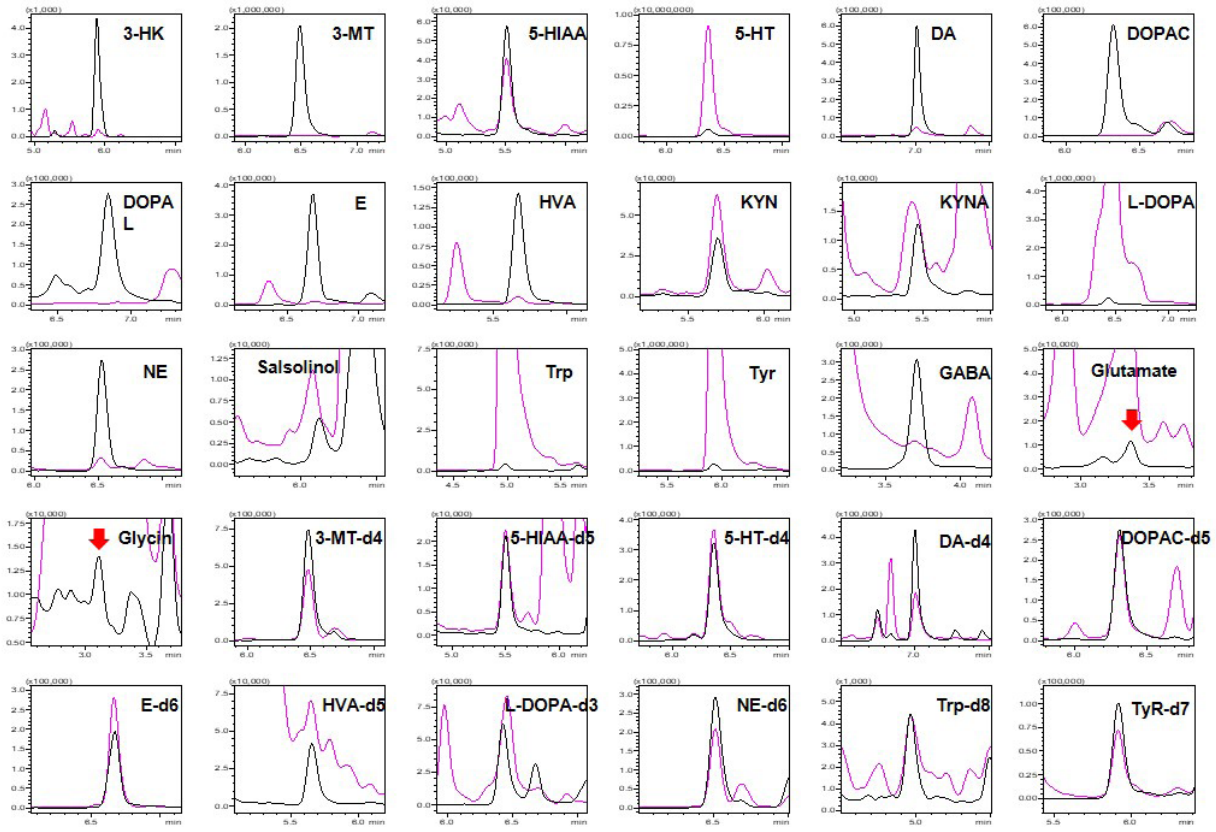

그림 5. MRM 크로마토그램 (검정색: 표준물질 10 ng/mL, 분홍색: 쥐 혈액 시료)

2. 밸리데이션

밸리데이션을 위해 검정곡선은 내부표준법으로 (1 ~ 100) ng/mL 범위에서 작성하였으며, 결정계수(R^2)는 전 성분에서 0.99 이상으로 나타났다. 정확도와 정밀도는 농도 10 ng/mL 표준물질을 8회 반복 분석하여 산출한 것으로 정확도는 (95 ~ 138) %, 정밀도는 (2 ~ 14) % 수준으로 나타났으며, 정량한계(LOQ)는 (0.03 ~ 5) ng/mL수준으로 확인되었다. 그 결과는 아래 〈표 3〉과 같다.

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.

표 3. 신경전달물질(Neurotransmitters)에 대한 밸리데이션 결과

Compound	R^2	Accuracy (%) (n = 8)	% RSD (n = 8)	LOQ (ng/mL)
3-HK	1.000	104	3.7	0.30
3-MT	0.996	106	2.1	0.03
5-HIAA	0.999	118	2.8	1.48
5-HT	0.996	108	3.7	0.08
DA	0.991	115	2.5	0.07
DOPAC	0.998	117	2.4	0.07
DOPAL	0.997	138	4.6	0.22
E	0.992	121	3.5	0.08
HVA	0.993	106	2.8	0.18
KYN	0.999	96	5.6	0.33
KYNA	1.000	102	5.8	5.16
L-DOPA	0.996	129	5.2	0.06
NE	0.991	116	1.7	3.16
Salsolinol	0.992	126	3.5	5.33
Trp	0.995	95	8.0	1.15
Tyr	0.998	95	3.2	0.14
GABA	1.000	110	1.9	0.25
Glutamate	0.994	137	13.7	4.90
Glycine	0.993	138	14.3	5.18

내부표준법 적용 검토를 위해 쥐 혈액 시료에 내부표준물질을 10 ng/mL 농도로 첨가하여 4회 반복 분석한 결과, 각 성분 별 반복성은 〈표 4〉에서와 같이 % RSD가 20 % 이내인 것으로 나타났다.

표 4. 내부표준물질의 반복성 평가 (농도 10 ng/mL)

Compound	% RSD (n = 4)
3MT-d4	5.3
5-HIAA-d5	10.4
5-HT-d4	12.7
DA-d4	14.1
DOPAC-d5	6.0
E-d6	12.9
HVA-d5	19.2
L-DOPA-d3	8.5
NE-d6	11.4
Trp-d8	3.8
Tyr-d7	4.7

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.

■결론

이 뉴스레터는 극성이 큰 신경전달물질(Neurotransmitters)을 벤조일화(Benzoylation) 반응을 이용하여 유도체화 함으로써 C18 컬럼으로 분리 및 분석이 가능하도록 하였다. 시마즈 오토샘플러 SIL-30AC에서 유도체화를 자동으로 하여 쥐 혈액 중 19개의 신경전달물질(Neurotransmitters)에 대한 빠르고 간편한 분석법을 확립하였다. 이를 시마즈 LCMS-8050을 이용하여 밸리데이션 시험을 수행하여 안정적인 결과를 확인할 수 있었다.

■참고 문헌

1. *Lance H. Rodan, K. Michael Gibson, Phillip L. Pearl. Clinical Use of CSF Neurotransmitters. Pediatric Neurology, 53, 2015, 277-286.*
2. Somnath Ghosh, Jhantu Das. Benzoylation of Amines sans Alkali: A Green Protocol in Neat Phase. Organic Chemistry International, volume 2010, Article ID 743186.

※본 자료는 발행시의 정보를 기반으로 작성되어 있으며, 예고없이 개정 될 수 있습니다.