

# Application News

No. 01-00255-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer  
: LCMS™-8045/LCMS-8050/LCMS-8060NX

## 신속 독성 스크리닝 시스템을 이용한 혈액분석의 활용

Screening and Semi-Quantitation by LC/MS/MS in Whole Blood Using Rapid Tox Screening

Waters B<sup>1</sup>, Arao Y, Imoto E  
1 Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

### ➤ 서론

법의학 독성학은 법의학 및 사망 수사 분야에서 중요한 도구이다. 조사는 시간에 민감하기 때문에, 독물학자들과 검사관들에게 적시에 정보를 제공하는 신속한 분석 시스템이 도움이 될 것이다. 최근 LC/MS/MS 시스템의 견고성, 민감성 및 경제성에 대한 발전으로 이 시스템은 법의학 실험실에서 필수적인 존재가 되었다. 전혈 샘플을 반정량 할 수 있는 빠르고 견고한 스크리닝 시스템인 LC/MS/MS 신속 독성 스크리닝 시스템이 개발되었다. 이 시스템은 231종의 법의학적으로 관련된 화합물을 정성 및 반정량하는 분석법과 파라미터를 포함하고 있다. 이 시스템은 마이크로 용량의 QuEChERS 키트를 사용하여 전혈 샘플 100 µL만으로도 분석할 수 있다. 이 뉴스레터는 LC/MS/MS 신속 독성 스크리닝 시스템 버전 3.01을 사용하여 실제 부검 전혈 샘플의 전처리 방법과 분석 결과에 대해 설명한다.



그림 1. LC/MS/MS 신속 독성 스크리닝 시스템

### ➤ 샘플 전처리 방법

샘플 전처리 과정은 그림 2와 같으며, 세부 사항은 아래에 설명하였다. 추출 염을 포함하고 있는 마이크로 용량의 QuEChERS 키트(Micro Volume QuEChERS kit)에 300 µL의 아세토니트릴, 200 µL의 증류수를 넣고 잘 섞어준다. 4 ng/µL 농도의 Diazepam-d5, 200 ng/µL 농도의 Phenobarbital-d5가 포함된 내부표준물질 5 µL 를 추가한다. 100 µL 의 전혈을 넣고, 즉시 섞어준 뒤, 원심분리(15,000 x g, 10 분, 상온)를 진행한다. 100 µL의 상층액을 새로운 1.5 mL 의 플라스틱 튜브에 옮기고, 0.1% TFA-아세토니트릴 용액 20 µL을 넣고 섞어준다. 이 용액을 질소 가스를 이용하여 증발시킨 다음, 샘플을 메탄올 500 µL로 재용해 한다. 그리고 원심분리(15,000 x g, 10 분, 상온) 후에 샘플을 오토샘플러 바이알에 옮겨서 분석한다.

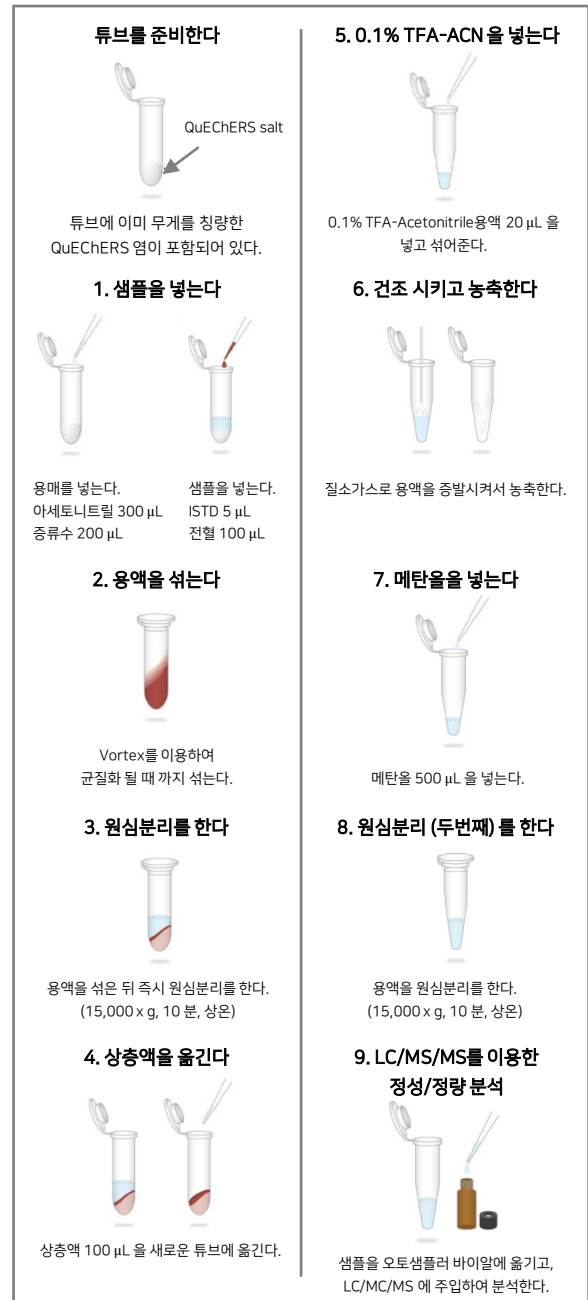


그림 2. 마이크로 용량의 QuEChERS 키트를 이용한 샘플 전처리 과정

➤ 분석 조건

추출한 시료는 Nexera™ X2 시스템과 LCMS-8045를 이용해서 분석하였다. 분석 컬럼은 Shim-pack Velox™ SP-C18 (2.1 mm I.D x 100 mm L., 2.7 μm)을 사용하였다. Synchronized Survey Scan (SSS)은 샘플의 정성분석을 위해 사용하였고, Multiple Reaction Monitoring (MRM)은 샘플의 정량분석을 위해 사용하였다. 표 1은 두 방법에 사용된 공통 UHPLC 조건이며, 표 2는 각 방법에 대한 다른 MS/MS 조건을 보여준다.

표 1. UHPLC 분석 조건

UHPLC (Nexera™ X2 system)	
Column	: Shim-pack Velox™ SP-C18 (2.1 mm I.D x 100 mm L., 2.7 μm, Shimadzu) P/N 227-32003-03
Mobile phase	: A) 10 mM ammonium formate, 0.1 % formic acid in water : B) 10 mM ammonium formate, 0.1 % formic acid in methanol
Flow rate	: 0.3 mL/min
Mode	: Gradient elution (15 min)
Injection vol.	: 5 μL

표 2. MS/MS 분석 조건

SSS method	
Ionization	: ESI (Positive/Negative switching)
Mode	: MRM and Product Ion Scan (231 Compounds)
Nebulizing gas flow	: 3 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C
MRM method	
Ionization	: ESI (Positive/Negative switching)
Mode	: MRM (229 Compounds)
Nebulizing gas flow	: 3 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

➤ 부검 혈액 샘플

후쿠오카 의과대학 법의학부에서 부검한 사건의 전혈 샘플을 테스트 샘플로 사용하였다. 반정량적 방법을 사용하여 분석하기 전에 9개의 농도 수준으로 각 화합물의 표준품을 첨가한 검량선용 용액을 사용하여 검증된 LC/MS/MS 방법으로 정량하였다. 검출된 화합물과 정량 값을 표 3에 나타내었다.

표 3. 부검 혈액 샘플에서 검출된 성분과 이전 연구에 의해 계산된 정량 결과

성분명	정량 결과 (ng/μL)
7-Aminoflunitrazepam	0.0059
Biperiden	0.002
Haloperidol	0.0033

➤ SSS 방법을 이용한 정성결과

LC/MS/MS 신속 독성 스크리닝 시스템은 SSS와 MRM 두 개의 방법 파일을 포함하고 있으며, 두 방법 모두 각 성분에 대한 검정곡선 정보를 포함하고 있기 때문에 표준시료 없이 반정량 결과를 계산할 수 있다. SSS 방법은 각 화합물에 대해 MRM 분석을 수행하고 설정된 임계값을 초과하는 화합물에 대해 product ion scan을 실행한다. 결과는 LabSolutions Insight Library Screening을 통해 쉽게 확인할 수 있다. SSS 방법으로 분석한 부검 혈액 샘플 데이터로부터 세 가지 성분(Biperiden, Haloperidol, 7-Aminoflunitrazepam)이 검출되었다.

각 성분의 라이브러리 검색 결과는 표 4와 같으며, 그림 3은 LabSolutions Insight Library Screening 소프트웨어를 이용하여 라이브러리 검색 결과를 처리하는 예시이다.

표 4. Library screening 결과

성분명	유사성 (Similarity, Maximum 100)
7-Aminoflunitrazepam	61
Biperiden	84
Haloperidol	95

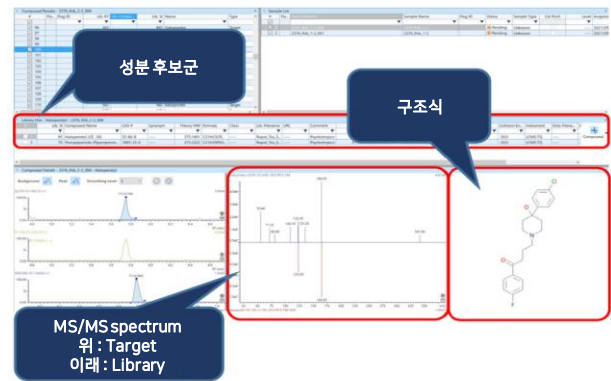


그림 3. LabSolutions Insight Library Screening의 예시

➤ MRM 방법을 이용한 반정량결과

MRM 방법은 SSS 방법에 비해 낮은 농도에서 더 좋은 정량적 정확도를 제공한다. SSS 방법으로 확인된 3 가지 성분을 MRM 방법으로 분석하였으며, 크로마토그램은 그림 4와 같다. 표 3의 정량 결과와 반정량 결과 사이의 오차는 표 5와 같다.

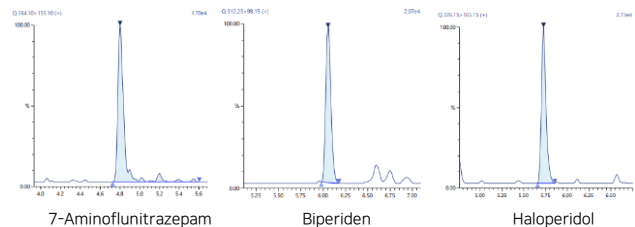


그림 4. 부검 혈액 샘플에서 검출된 성분의 크로마토그램

표 5. MRM 방법에 의한 반정량 결과

성분명	반-정량 결과 (ng/μL)	정량 결과의 오차 (%)
7-Aminoflunitrazepam	0.0051	14
Biperiden	0.0007	65
Haloperidol	0.0034	3

➤ 결과

LC/MS/MS 신속 독성 스크리닝 시스템은 후쿠오카 의과대학 법의학부에서 채취한 실제 부검 혈액 샘플에서 법의학 관련 성분을 검출하는 데 효과적이었다. Method package에 저장된 검량곡선에 의해 반정량된 두 성분(7-Aminoflunitrazepam, Haloperidol)의 결과는 이전 연구<sup>1)</sup>에서 나타난 결과와 매우 유사했다. Biperiden의 결과는 신속 독성 스크리닝 방법의 최저정량한계(LLOQ) 미만으로, 이 성분에 대한 부정확성을 설명할 수 있다. 이러한 결과는 매우 낮은 농도의 화합물의 스크리닝 결과와 등록된 검량곡선을 이용한 반정량 결과의 정확성과 관련하여 실제 부검 혈액 샘플에 적용될 때 신속 독성 스크리닝 시스템의 유용성과 편리성을 입증했다.

➤ 등록된 성분 목록

표 6에 LC/MS/MS 신속 독성 스크리닝 시스템에 등록된 성분들을 정리하였다.

표 6. 신속 독성 스크리닝 시스템에 등록된 성분

7-Aminoclonazepam	7-Aminoflunitrazepam	7-Aminonimetazepam
7-Aminonitrazepam	8-Hydroxyetizolam	Acetaminophen
Aconitine	Alfa-methyltryptamine	Allylisopropylacetylurea
alpha-Hydroxylprazolam	alpha-Hydroxymidazolam	alpha-Hydroxytriazolam
Alprazolam	Amitriptyline	Amlodipine
Amobarbital	Amoxapine	Amphetamine
Ampicillin	Aripiprazole	Atenolol
Atomoxetine	Atorvastatin	Atropine
Azelnidipine	Azilsartan	Barbital
Benzoyl ecgonine	Biperiden	Blonanserin
Brexpiprazole	Bromazepam	Bromocriptine
Bromovalerylurea	Bromperidol	Brotizolam
Bupivacaine	Caffeine	Candesartan
Carbamazepine	Carbazochrome	Carpipramine
Carvedilol	Chlordiazepoxide	Chlorpheniramine
Chlorpromazine	Chlorpromazine-M	Cibenzoline
Clobazam	Clocapramine	Clomipramine
Clonazepam	Clotiazepam	Cloxazolam
Clozapine	Cocaine	Codeine
Colchicine	DDVP	Delorazepam
DEP	Desipramine	Desmethyloclozepam
Desmethyldiazepam	Dextromethorphan	Diazepam
Dibucaine	Diclofenac	Dihydrocodeine
Diltiazem	Diphenhydramine	Diprophyline
Diquat	Domperidone	Donepezil
Dosulepin	Droperidol	Duloxetine
Ecgonine methyl ester	Ephedrine	Escitalopram
Estazolam	Ethenzamide	Ethyl loflazepate
Etizolam	Famotidine	Fludiazepam
Flufenamic acid	Flunitrazepam	Fluphenazine

Flurazepam	Fluvoxamine	Furosemide
Gabapentin	Glibenclamide	Gliclazide
Glimepiride	Haloperidol	Haloxazolam
Hydroxymethylbrotizolam	Hydroxyzine	Ibuprofen
Imidapril	Imipramine	Irbesartan
Isopropylantipyrine	Ketamine	Ketoprofen
Lamotrigine	Levetiracetam	Levomopromazine
Lidocaine	Lorazepam	Lormetazepam
Losartan	Loxoprofen	Malathion
Maprotiline	MDA	MDMA
Medazepam	Mefenamic acid	Memantine
Mepivacaine	Mequitazine	Metformin
Methamphetamine	Methomyl	Methylephedrine
Methylphenidate	Mexazolam	Mexiletine
Mianserin	Midazolam	Milnacipran
Mirtazapine	Morphine	Mosapramine
Naftopidil	N-Desmethyl clobazam	N-Desmethyl zopiclone
N-Desmethyilmirtazapine	Nemonapride	Nicardipine
Nicotine	Nicotine-M	Nifedipine
Nimetazepam	Nitrazepam	Norephedrine
Nortriptyline	Noscapine	Olanzapine
Olmesartan	Oxazepam	Oxypertine
Paliperidone	Papaverine	Paroxetine
Pemoline	Pentazocine	Pentobarbital
Perospirone	Perphenazine	Phenobarbital
Phenytoin	Pimozide	Pioglitazone
Pipamperone	Piroxicam	Pitavastatin
Pranlukast	Primidone	Procaine
Prochlorperazine	Promethazine	Propericiazine
Propofol	Propranolol	Quazepam
Quetiapine	Risperidone	Ropivacaine
Rosuvastatin	Salicylamide	Salicylic acid
Secobarbital	Sertraline	Setipiline
Sildenafil	Sildenafil	Sitagliptin
Solifenacin	Spiroperone	Spiroinolactone
Sulfamethoxazole	Sulpiride	Sultopride
Suvorexant	Tadalafil	Tandospirone
Telmisartan	Temazepam	Tetracaine
THC	THC-COOH	Thiamylal
Timiperone	Tofisopam	Topiramate
Tramadol	Trandolapril	Trazodone
Triazolam	Trihexyphenidyl	Trimethoprim
Trimipramine	Urapidil	Valproic acid
Valsartan	Vardenafil	Venlafaxine
Verapamil	Warfarin	Zaleplon
Zolpidem	Zolpidem_M-1	Zonisamide
Zopiclone	Zopiclone-N-oxide	Zotepine

➤ 참고문헌

- 1) Waters B et.al., "Tissue distribution of suvorexant in three forensic autopsy cases", J. Anal. Toxicol. 42 (2018) 276-283.



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.

Copyright © 2018 SHIMADZU group. All rights reserved.