

## 고속원자충격질량분석법을 이용한 Thromboxane B<sub>2</sub> 분석

장석윤 · 김정훈 · 이용문 · 장성기 · 문동철<sup>†</sup>

충북대학교 약학대학

(1993. 7. 20. 접수)

## An Analytical Method of Thromboxane B<sub>2</sub> by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

Suk-Yoon Jang, Jung-Hoon Kim, Yong-Moon Lee, Seung-Ki Jang and Dong-Cheul Moon<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chungbuk National University Cheongju 360-763, Korea

(Received Jul. 20, 1993)

**요약** : 고속원자충격질량분석법을 이용하여 thromboxane B<sub>2</sub>의 극미량분석법을 개발하였다. static FAB mode에서 docosanoic acid를 내부표준물로 이용하여 검출한계 5ng의 분석법을 확립하였고, CF-FAB mode에서 고안한 시료도입장치를 사용하여 thromboxane B<sub>2</sub>의 측정감도, 재현성 등 정량분석에 미치는 용매조성, 용매의 유속 등 분석파라미터들을 조사하였다. CF-FAB mode에서 0.75% glycerol(in EtOH, v/v)을 eluent 용매로, 유속을 3.7 $\mu$ l/min.로 하여 분석조건을 최적화하고 TIC법과 SIM 검출법을 이용하여 정량한계 각각 500pg 및 10pg인 극미량분석법을 확립하였다.

**Abstract** : Analytical methods of thromboxane B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>) using various techniques of Fast Atom Bombardment mass spectrometry (FAB MS) were studied, static FAB condition was investigated to obtain linear response curve using docosanoic acid as a internal standard. For maximum sensitivity, a continuous-flow(CF-) FAB MS by selected-ion monitoring(SIM) with devised sample introduction system, has been developed to quantiate thromboxane B<sub>2</sub> in biological sample. Instrumental parameters affecting sensitivity, reproducibility have been studied. The method has been optimized with respect to the eluent, 0.75% glycerol(in EtOH v/v) and flow rate of 3.7 $\mu$ l/min. Under the condition, detection limits were below 10pg in SIM mode and a good linear relationship between dose and response was achieved.

**Key words** : Thromboxane B<sub>2</sub>, static FAB MS, Continuous Flow FAB MS, TIC, SIM.

### 1. 서론

인체 중에는 비타민, 호르몬 등을 위시하여 신경전달 물질, 효소, 세포내 정보전달물질(cAMP, cGMP 등), autacoid 등 여러 가지 물질이 존재하고 이들이 상호

간 영향을 주면서 생체의 발육, 성장, 항상성(homeostasis) 유지를 위한 방향으로 움직이고 있다. prostaglandins(PGs)도 이와 같은 생체조절물질의 일종으로 이들의 다양한 생리활성 때문에 생리, 약리, 생화학 등의 각 분야에서 흥미의 대상이 되어 왔다. PGs들 중 혈

소판에서 발견된 thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)는 강력한 혈소판응집작용과 혈관평활근수축작용을 가지고 있으나 혈관벽에서 유리되는 prostacycline(PGI<sub>2</sub>)는 TXA<sub>2</sub>와 상반되는 작용, 즉 강력한 혈소판 응집저지작용 및 혈관평활근 이완작용을 나타내고 있다. 따라서 이 두 물질의 balance는 심혈관계의 항상성유지에 매우 중요한 factor가 되고 있다.<sup>12</sup> TXA<sub>2</sub>는 특히 혈압 조절, 혈소판응집에 관여함으로써 심근경색(myocardial infarction), 관상동맥질환(coronary disease), 고혈압, 관상동맥혈전질환 등에 관여하고<sup>34</sup>, 그외에도 PGs와 함께 정상 및 병적 상태에서 여러 가지 신장기능, 소화관장애, 염증, 과민성(anaphylaxis), 생식생리, 노화 등에도 깊은 관련이 있음이 알려지고 있다.<sup>58</sup> 그러나 TXA<sub>2</sub>는 생체내에서 곧 안정한 thromboxane B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)로 분해되므로 TXB<sub>2</sub> 함량을 측정함으로써 병변부위조직과 혈액, 요 등 생체액에서 TXA<sub>2</sub>의 동적변화를 추적할 수 있다.

TXB<sub>2</sub> 등 PGs의 극미량분석이 매우 어려운 이유는 검출능, 측정감도, 검출을 위한 유도체화 조작 등이 매우 복잡하다는 점 외에도 생체시료의 전처리 조작이 복잡하고 표준품 및 isotope 입수와 작업환경이 까다롭다는 점을 들 수 있다. TXB<sub>2</sub> 등 PGs의 임상분석에 이용되는 radioimmunoassay(RI)법은 조작이 비교적 간편하고 감도가 우수한 편이지만 항체특이성, 즉 선택성(selectivity) 및 측정재현성(reproducibility)이라는 分析精度面에 있어서 아직도 개선할 점이 많았다.<sup>7</sup> HPLC법에서는 UV 흡수가 없고 따라서 방사능검출을 위한 isotope labeling 조작이 필요하다. GC법에서 FID 검출은 pg 정도로는 검출이 불가능하며 유도체화하여 ECD 검출이 필요하고 NPD 검출용 적당한 유도체화 시약이 마땅치 않다.

수십 ng 정도의 시료량으로도 분석이 가능한 질량분석법은 가장 실용적인 방법의 하나이지만, 전자충격이온화(EI)법은 고질량 영역에 있어서 분자이온 또는 특징적 조각이온 등이 검출되지 않거나 감도가 낮은 문제점이 있다. 최근 음이온화화이온화(Negative Ion Chemical Ionization: NICI)법도 극미량분석이 가능하지만 유도체화조작과 고가의 증수소표지체 내부표준물질(IS)이 필요하다.<sup>8</sup>

M. Barber 등에 의해 개발된 고속원자충격질량분석(Fast atom bombardment mass spectrometry : FAB

MS)<sup>9</sup>은 극성이 크고 열에 불안정한 여러 종류의 생리활성 물질들에 대한 분자량 확인 및 그 구조에 대한 정보를 효과적으로 제공하여 왔다. FAB 이온화법은 극성분자 이온들의 질량분리와 검출이 가능하며 최근에는 Flow Injection Analysis(FIA)에 의해 바탕값 보정이 가능한 Continuous Flow(CF-) FAB MS법<sup>10</sup>이 개발되었다. 따라서 저자들은 항혈전성물질 assay계를 확립할 목적으로 새로운 질량분석기술인 FAB MS를 이용하여 TXB<sub>2</sub>의 극미량분석법을 검토하였다. static mode에서 matrix 효과, 알칼리 첨가효과 및 감도 등을 비교검토하고 IS를 검토하여 분석최적화를 시도하였다. CF-FAB MS에서 용매도입부를 고안하고 TXB<sub>2</sub>의 TIC-mass chromatography와 selected ion monitoring(SIM)법을 검토, 각 분석조건을 확립하였다. 본 분석법은 혈소판응집시 유리되는 수십 pg 정도의 TXB<sub>2</sub> 정량에 가장 확실한 분석방법으로 그 활용이 기대된다.

## 2. 실험

### 2. 1. 기기 및 장치

본 연구에서 TXB<sub>2</sub>의 static FAB MS 분석조건 검토에 주로 사용한 질량분석기는 VG사의 TRIO-2A형 사중극형 질량분석기로서 lab-bass™ data system을 이용하였다. FAB gun은 Ion-Tech사의 saddle-field gun(Ion Tech, Teddington, U. K.)으로, Ion tech(Teddington, England)사의 전원공급장치를 통해 FAB source 전압 8~9KeV, 전류 1mA에서 생성되는 xenon의 고속중성원자빔을 이용하였다. 측정은 TXB<sub>2</sub> 표준품 및 glycerol을 비롯한 matrix 각 1μg을 스테인레스 재질의 target 표면에 loading, 충격이온화한 다음 질량주사속도는 100~1700amu/3sec로 하였다. mass calibration은 CsI(in glycerol)를 사용하였다.

CF-FAB MS 실험에 이용한 질량분석기는 2중 收束型(B-E)의 JMS-AX505H(Jeol Ltd, Japan)로써 data system은 Complment(version 1.53, Jeol Ltd., Japan)이고 음이온 검출방식을 채택하였다. 측정은 300~400amu 영역을 cyclic time 1초로 하고 resolution 1500(10% valley 정의)에서 가속전압은 3kV에 고정하였다. CsI와 RbI를 glycerol에 섞어서 mass calibration하였다. SIM 측정조건은 절대검량선법을 이

용하여 자장조절 mode에서 sweep width 1000ppm, lock mass 367. 1816 (glycerol tetramer)로 설정하였다.

CF-FAB 인터페이스로는 fused silica capillary (60 $\mu$ m i. d.×1m)로 연결시킨 Frit-Fab LC-MS interface (Jeol Ltd.)를 사용하였고, 용매 delivery system으로는 pressure bottle을 이용, 질소압으로 이동상의 유속을 약 4 $\mu$ l/min 전후로 조정하여 사용하였다. Injector는 loop volume 0.5 $\mu$ l의 Rheodyne 7520 (Rheodyne, Cotati, CA, USA)을 사용하였다. capillary는 vessel ferrule로써 injector에 연결하였다.

2. 2. 시약 및 재료

TXB<sub>2</sub>는 Sigma Chemicals로부터 공급받았다. CF-FAB mode에서 eluent로 사용한 용매는 미리 membrane 여과 후 사용하였다. glycerol은 Aldrich 특급시약(99.9%), Xe은 research급(99.95%; East Rutherford, New Jersey, USA)을 사용하였고 그의 모든 시약은 분석급 및 HPLC용급 시약을 사용하였다. CF-FAB MS에서 biological sample에서의 TXB<sub>2</sub>의 response 여부 및 회수율을 검토하여 위하여 적십자혈액원에서 혈액을 구입하여 B. J. R. Whittle의 방법<sup>7</sup>대로 하여 혈장(혈소판 포함)을 분리하고 TXB<sub>2</sub>를 spike한 plasma를 준비하였다. 혈장시료로부터 TXB<sub>2</sub>의 추출에는 powell의 방법<sup>11</sup>을 적용하였다.

2. 3. 실험방법

static FBA mode에서는 glycerol, 0.1% NH<sub>4</sub>OH(in glycerol), 0.1% NaOH(in glycerol) 용액을 matrix로 사용하여 target에 1 $\mu$ g loading한 다음 TXB<sub>2</sub> 표준품 1 $\mu$ g를 섞어서 FAB ( $\pm$ ) mode에서 각각 측정, 검토하였다. static FAB MS에서 내부 표준물질로 docosanoic acid를 선택하고 analyte 및 IS 상호간의 용해도 및 이온화 감도를 고려하여 3-nirto-benzyl alcohol(NBA), triethanol amine(TEA), glycerol 등 몇 가지 matrix를 비교하였다. 검량성은 TXB<sub>2</sub> 1ppm, 5ppm, 25ppm의 methanol 용액 1 $\mu$ l와 IS 용액(250ppm) 1 $\mu$ l를 NBA 1 $\mu$ l에 섞어 충격이온화하고 각각 5분간 측정하여 그 평균값을 취하였다.

CF-FAB mode에서 용액도입장치는 Fig. 1에서와 같이 고안하였다. 용액이 target 표면에서 안정한 film

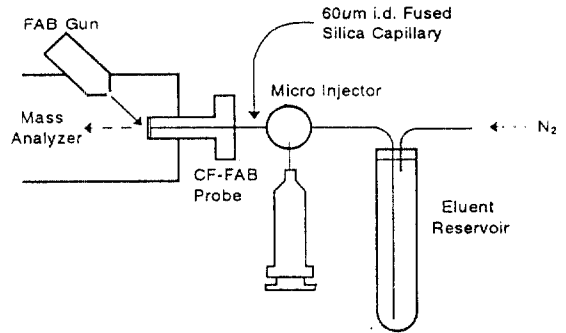


Fig. 1. Schematic Diagram of Sample Introduction System in CF-FAB Mode.

상을 유지하면서도 지속적으로 새로와지는 표면 최적화 조건을 찾기 위하여 eluent 중 glycerol 농도변화에 따른 signal trace의 stability를 검토하였다. 검량선은 음이온검출법에서 eluent로 0.75% glycerol(in ethanol) 용액을 3.7 $\mu$ l/min의 유속으로 흘리면서, 각 TXB<sub>2</sub> 표준액, 0.925-, 2.78-, 8.33-, 및 25.0ppm(in EtOH)을 0.5 $\mu$ l loading하여 3회씩 측정하고 total ion chromatogram(TIC)에서 m/z 369의 peak height값으로부터 구하였다.

Selected ion monitoring(SIM)에 의한 검출은 m/z 369.2500([M-H]<sup>-</sup>)에 대하여 sweep width 1000ppm으로 하여 측정하였다. 검량선은 TXB<sub>2</sub> 표준액 50-, 100-, 500-, 5000ppb(in EtOH)를 각 0.5 $\mu$ l씩 loading하여 측정하고 chromatogram에서 peak area값으로부터 구하였다. SIM mode에서 검출기는 conversion dynode에 +10kV의 전압으로 증폭하여 검출하였다.

검량선을 구한 회기선식에서 정량한계의 결정에는 J. C. Miller의 방법<sup>17</sup>에 따르고 data 처리는 AK. Ebel의 Program<sup>18</sup>을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. Static FAB MS Spectrometry를 이용한 TXB<sub>2</sub>의 분석 검토

Positive Ion FAB MS Spectrum: 양이온검출법에서 m/z 371(TXB<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>) 이온은 검출되지 않았다. oxalic acid, HCl 등을 0.1% 되게 matrix에 첨가하여

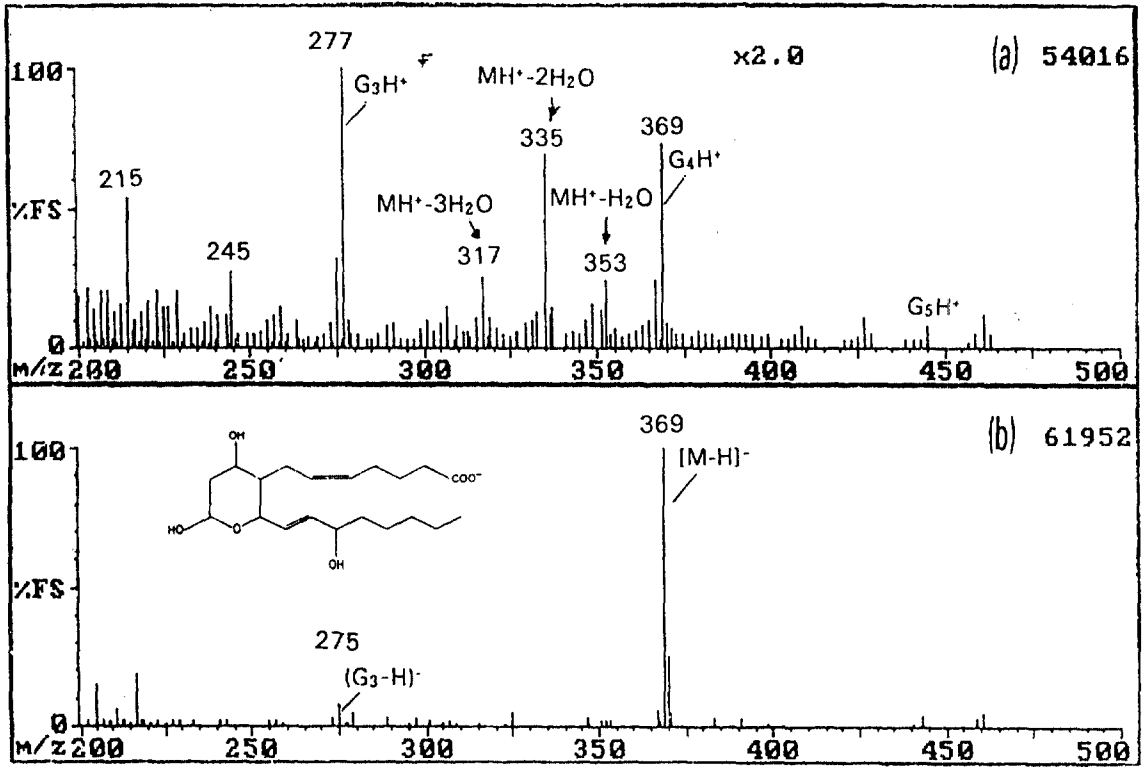


Fig. 2. FAB spectra of Thromboxane B<sub>2</sub> in Positive- and Negative ion Mode.

측정한 경우도 동일한 결과를 보였다. 그러나 dehydration에 기인한 3개의 특징적 이온들(m/z 353: [MH<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O]; m/z 335: [MH<sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O]; m/z 317: [MH<sup>+</sup>-3H<sub>2</sub>O])이 Fig 2-a에서와 같이 뚜렷하게 검출되고 TXB<sub>2</sub>량에 따라 이온강도가 비례적으로 증가하였다. 그러나 이들 생성이온들에 대한 MS/MS fragments들의 해석으로부터 수용액 중 TXB<sub>2</sub>의 안정성에 대하여 유용한 지견이 얻어질 수 있으리라고 사료된다.

**Negative ion FAB MS spectrometry:** 음이온 mode에서 m/z 369를 linked scan 방식에 의한 collision activated dissociation(CAD) 실험에서 daughter ion들은 TXB<sub>2</sub> 분자에서 -COO<sup>-</sup>, -OH<sup>-</sup>, 측쇄 alkyl group 등이 해리되어 생성된 조각이온들(m/z 325, 275, 195)임을 확인하였다.<sup>12</sup> 한편, 음이온 검출 spectrum은 Fig. 2-b에서처럼 TXB<sub>2</sub>의 [M-H]<sup>-</sup>이온이 높은 감도로 검출되며 특히 0.1% NaOH를 matrix에 첨가시 감도가 약 20배 정도 증가하였다. 오실로스코프를 이용하

여 TXB<sub>2</sub> 1ng에 대한 m/z 369의 real time signal을 측정한 결과 2.5×10<sup>-14</sup>A/ng의 검출감도를 보였다 (단, detector gain : 10<sup>5</sup>; display AMP gain : 10<sup>3</sup>). 그러나 probe 삽입 후 최대감도를 보인 [M-H]<sup>-</sup>이온이 시간에 따라 급격히 감소하여 mass 주사속도를 증가시켜도 spectrum상에서 signal을 뚜렷하게 검출할 수 없었다. TXB<sub>2</sub> 1ng, 5ng, 10ng에 대한 [M-H]<sup>-</sup> ion의 절대이온강도는 농도에 따라 증가하지만 1ng 정도의 TXB<sub>2</sub>로는 glycerol에서의 life time이 적어서 spectral analysis 방법을 적용하기 곤란하다고 보여진다. 5ng에서는 바탕이온들 및 cluster ion들에 의해 analyte 구별이 힘들고 10ng에서는 [M-H]<sup>-</sup> 이온의 구별이 가능하였다. 따라서 static FAB mode에서 TXB<sub>2</sub>의 검출한계는 10ng(27 pmol)이라고 결론내릴 수 있다.

**FAB MS 음이온검출에 미치는 Alkali의 영향:** FAB 음이온 검출감도에 영향을 주는 첨가 alkali 농도 및 종류에 따른 [M-H]<sup>-</sup> 이온의 검출감도를 검토하고 LC-

FAB MS 분석시 eluent 성분에 휘발성인 NH<sub>4</sub>OH의 사용 가능성을 검토할 목적으로 glycerol 1μg에 NaOH 및 NH<sub>4</sub>OH를 각각 0.01% 및 0.1% 되게 조제한 4종의 matrix에 대하여 TXB<sub>2</sub> 15ng의 FAB MS 결과 0.1% NaOH의 경우에만 [M-H]<sup>-</sup> peak가 뚜렷하게 검출되

었다. clusters 이온들도 다수 검출되지만 [M-H]<sup>-</sup> ion 강도도 크게 증가하였다. FAB MS에서 이온의 검출도는 matrix에서 TXB<sub>2</sub>의 해리 정도에 좌우되며, 따라서 life time, 이온화율, 해당 질량영역에서의 background에 의한 interference가 없고, 용해성 등 제조건을 최대

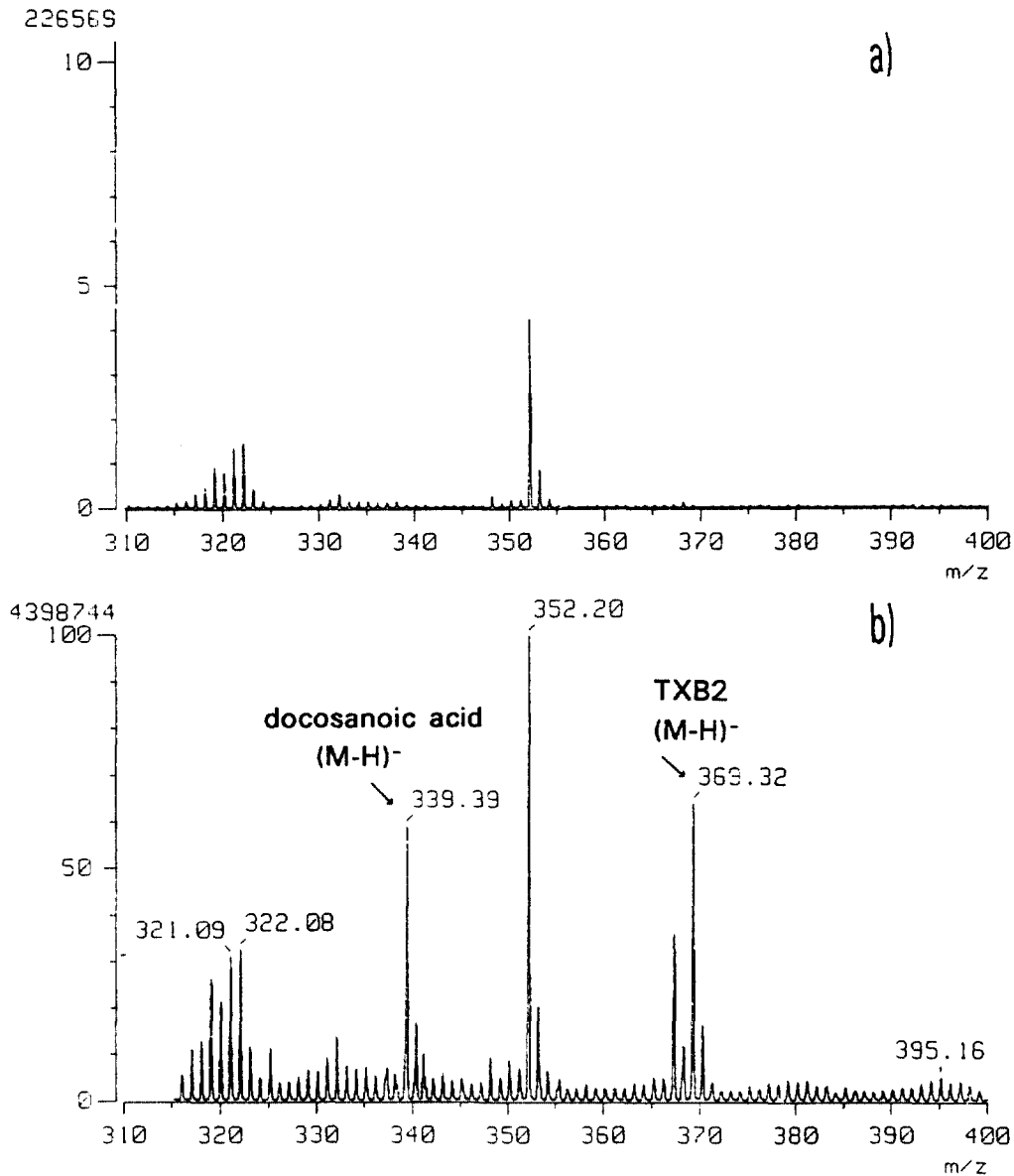


Fig. 3. Negative Ion FAB MS spectra of TXB<sub>2</sub> in NBA matrix.

NBA:3-nitro benzylalcohol

(a) Negative Ion Spectrum of NBA

(c) Negative Ion Spectrum of TXB<sub>2</sub> in NBA matrix as docosanoic acid as IS.

로 만족할 수 있는 matrix의 검색이 요구된다.

**내부표준물 및 정량성 검토:** 생체내에 존재하지 않고 분자량이 비슷한 지방산, docosanoic acid(MW : 340)를 IS로 선택하였다. IS가 공존시 해당 성분들의 검출감도, 용해성면에서 3-nitro-benzylalcohol(NBA)은 glycerol보다 나으며, TXB<sub>2</sub>의 질량영역에서 interference를 보이지 않는 장점을 가지고 있다. FAB MS spectrum은 Fig. 3에서 보인다. IS에 대한 analyte의 상대적 이온강도비를 plot한 결과 양호한 직선성( $r=0.9972$ )을 보였으며 검량선으로부터 구한 정량한계는 10ng으로 나타났다.

### 3. 2. CF-FAB MS Spectrometry를 이용한 TXB<sub>2</sub>의 분석

CF-FAB MS는 양이온 분석을 주로 그 대상으로 하였으나<sup>15</sup> 최근에는 음이온을 분석한 예도 보이고 있다.

<sup>14</sup> CF-FAB mode는 matrix를 포함한 eluent가 미세한 구멍을 통해 source에 연속적으로 공급되므로 target에서 균질하게 표면을 덮을 수 있는 용액의 흐름속도, 진공하에서 항상 새롭게 analyte 용액을 공급할 수 있는 확실 정도에 좌우된다. solvent flow에 따른 source에서의 높은 압력으로 방전이 일어날 수도 있다.<sup>15-18</sup> 따라서 signal fluctuation현상이 일어나지 않는 유속의 미세한 조절이 주요인이라 할 수 있다. 이 외에도 solvent delivery system의 효율성, dead volume과 용매의 휘발성도 고려해야 하지만 FAB matrix로서의 일반적인 요건도 충족되어야 한다.<sup>18</sup>

본 연구에서  $[M-H]^-$  이온의 검출에 TIC법 외에 SIM 검출법을 채택하고 용매조성, 유속 등 분석최적화 조건 등을 검토하고 검량선의 linearity와 정량한계를 비교 검토하였다. 한편, 혈장검체를 사용하여 TXB<sub>2</sub>의 response 및 회수율을 검토하여 생체시료 분석에의

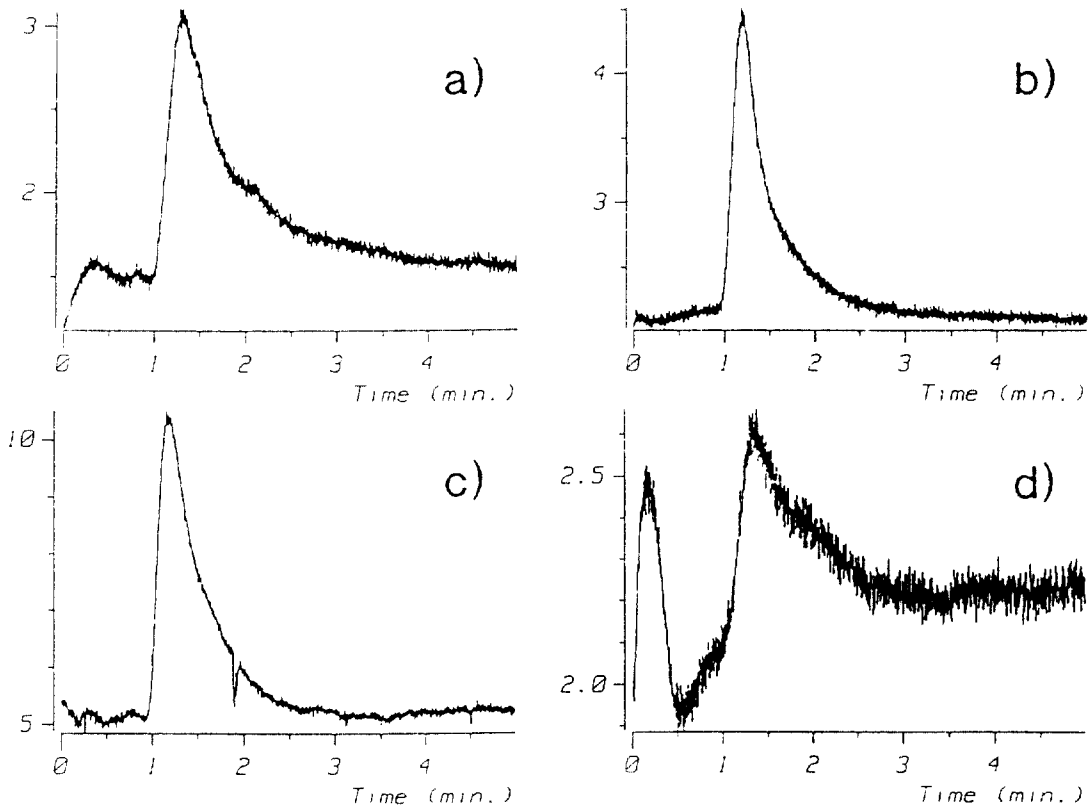


Fig. 4. Effects of Eluent Composition on the Signal Stability.

- a) Glycerol:EtOH=0.5:99.5(v/v)    b) Glycerol:EtOH=0.75:99.25(v/v)  
c) Glycerol:EtOH=1:99(v/v)        d) Glycerol:EtOH=2:98(v/v)

응용 가능성을 예비적으로 검토하였다.

**용매조성의 검토:** 시그널 안정화에 미치는 eluent 조성을 검토하기 위하여 fluctuation 현상이 일어나지 않고 tailing 현상이 적으며 감도가 높은 크로마토그램을 얻기 위하여 몇 가지 eluent 용매조성을 검토한 결과 glycerol-ethanol 조성이 가장 양호하였다. 용매의 각 조성에 따른 결과는 chromatogram 결과는 Fig. 4에서 보인다. 따라서 glycerol-ethanol(0.75:99.25)를 eluent의 최적 조건으로 선택하였다.

**재현성 검토:** 시료용액의 주입에 따른 재현성을 검토하기 위하여 TXB<sub>2</sub> 각각 0.925-, 2.78-, 8.33-, 25ppm

(in EtOH)을 0.5 $\mu$ l씩 반복하여 주입시 그 response는 Fig. 5에서 보이고 있다. peak height 및 area의 재현성이 양호하고 농도에 따른 response가 양호하게 직선적으로 비례함을 보이고 있다. 25ppm의 경우는 반복 주입에 따른 재현성이 약간 떨어지는 결과로 나타났다.

**검출한계:** SIM mode에서 TXB<sub>2</sub> 25pg(67.6 fmol)에 대한 selected ion trace는 Fig. 5에 보인다. 따라서 검출한계는 S/N 비로 볼 때 10pg(27 fmol) 정도로 static mode에 비해 1000배의 감도증가를 보이고 있다.

**검량선:** 표준액으로부터 TXB<sub>2</sub> 각 0.463-, 1.390-, 4.165-, 및 12.500ng에 대한 TIC mass chromatogram에

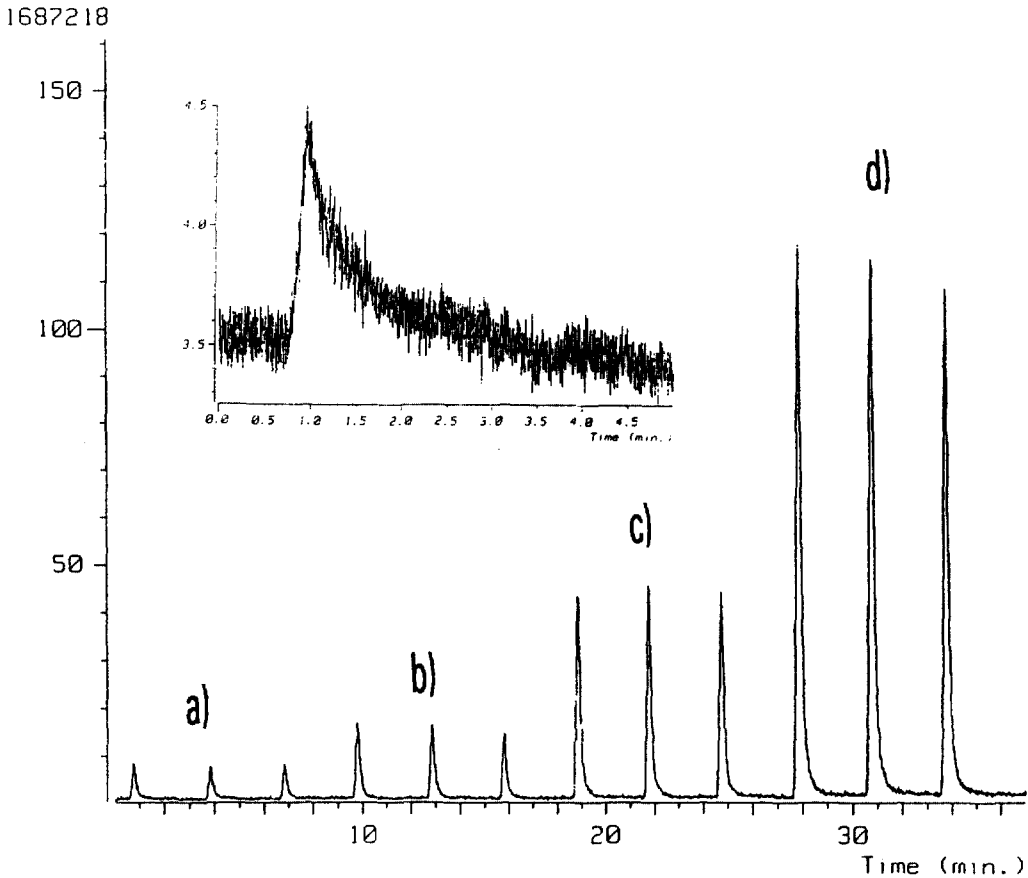


Fig. 5. Selected-ion Traces of  $m/z$  369 in Reconstructed Ion Chromatogram (RIC) for Various Amounts of TXB<sub>2</sub> in CF-Negative Ion FAB MS Spectrometry. Upper Drawing : Selected-ion Trace of  $m/z$  369 in SIM mode for 25pg of TXB<sub>2</sub>

TXB<sub>2</sub> amt. : a) 0.925ppm; b) 2.78ppm; c) 8.33ppm; d) 25ppm

Capillary, 60 $\mu$ m : eluent : glycerol-methanol(0.75:99.25, v/v) : flow-rate, 3.7 $\mu$ l/min; injection volume, 0.5 $\mu$ l

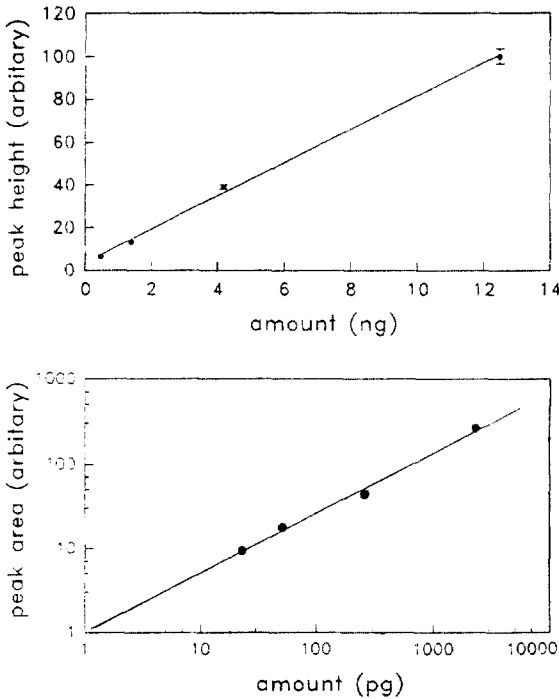


Fig. 6. Standard Curves for TXB<sub>2</sub>(m/z 369).

- (a) The peak heights in TIC-MS chromatogram(selected-ion traces) were used. the error bars show standard deviation and the line is based on a linear regression ( $r=0.9985$ ).
- (b) The peak area in SIM method were used. the line is based on a linear regression ( $r=0.9999$ )

capillary, 60 $\mu$ m ; eluent :glycerol-methanol (0.75:99.25, v/v); flow-rate, 3.7 $\mu$ l/min; injection volume, 0.5 $\mu$ l

서 selected ion(m/z 369) 강도(피크높이)를 plot한 결과로부터 구한 검량선은 Fig. 6-a에 보인다. 양호한 직선성( $r=0.9985$ )을 보이며 검량선으로부터 정의되는 정량한계는 0.5ng이다.(유의수준 10%). 한편, SIM법에서 TXB<sub>2</sub> 각 25-, 50-, 250- 및 2500pg에 대한 selected ion(m/z 389.2500) trace의 response(피크면적)를 log-log plot한 결과는 Fig. 6-b에서 보인다. TXB<sub>2</sub>의 넓은 농도범위(wide dynamic range)에서 양호한 직선성( $r=0.9999$ )을 나타내었다.

**생체시료분석에의 적용 검토**: 생체시료분석에 적용 가능성 여부를 예비적으로 검토하기 위하여 혈액으로부터 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma:PRP)를 분리한 다음 그 중 일정량을 취하여 Powell의 방법대로 전처리하여 TXB<sub>2</sub> 등 icosanoids를 분리하고 분리액을 동일하게 나누어 각각 eluent 용액에 다시 녹여 SIM법에 의한 CF-FAB MS에서 selected ion(m/z 369.2500) trace의 peak area를 측정, 검량선으로부터 plasma 중 TXB<sub>2</sub> 농도를 측정하고할 수 있었다. 한편, TXB<sub>2</sub> 표준품 10pg을 spike한 분리액을 측정한 결과 TXB<sub>2</sub>의 회수율은 100%에 가까웠다. 따라서 생체시료 중 TXB<sub>2</sub>를 표준물첨가법에 의해서 분석이 가능하다고 사료되었다.

#### 4. 결론

본 연구결과 TXB<sub>2</sub>는 유도체화 조작이 필요 없는 FAB MS 분석법을 적용하여 m/z 369의 [M-H]<sup>-</sup> 이온을 검출 분석할 수 있었다. static FAB mode에서 docosanoic acid를 IS로 하고 NBA를 matrix로 이용한 분석법에서 TXB<sub>2</sub>의 검출한계는 10ng으로 나타났고, CF-FBA MS에서는 eluent로 0.75% glycerol(in ethanol, v/v)액을 사용, 3.7 $\mu$ l/min의 유속으로 source target에 도입 분석하였다. 검출한계는 TIC법에서 0.5ng 이하로 SIM법을 적용할 경우 10pg(TXB<sub>2</sub>, 27 femto-mol) 이하로 나타났다. 따라서 본 연구는 혈소판응집시 유리되는 TXB<sub>2</sub>의 정확한 assay계로써 항혈전작용물질의 탐색연구에 유효하게 이용되리라 사료된다. 한편, micro-column에서 TXB<sub>2</sub>와 6-keto PGF<sub>1</sub>  $\alpha$ 의 상호분리조건이 밝혀지면 LC에 직접 on-line화가 가능하며 혈장, 조직, 요 등 다양한 생체시료 중 TXB<sub>2</sub> 및 6-keto PGF<sub>1</sub>  $\alpha$ 의 동적생성변화 추적이 동시에 가능해지며 혈행관계 병태질환의 원인 규명에 가장 확실한 분석법으로 이용되리라 본다.

#### 감사의 글

본 연구는 1992년도 충북대학교학술연구재단 연구비와 91년도 한국과학재단 기초연구비지원(KOSE-F911-0304-043-1)의 일부로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.



## 참고문헌

1. S. Bunting, S. Moncada and J. R. Vane, *Br. Med. Bull.*, **39**, 271(1983).
2. B. J. R. Whittle and S. Moncada, *Br. Med. Bull.*, **39**, 232(1983).
3. D. J. Fitzgerald, L. Roy, F. Catella and G. A. FitzGerald, *N. Engl. J. Med.*, **315**, 983(1986).
4. D. J. Fitzgerald, L. Roy, F. Wright and G. A. FitzGerald, *Circle. Res.*, **65**, 83(1989).
5. C. J. Lote and J. Haylor, *Prostaglandins Leukotriens Essent. Fatty Acids*, **36**, 203(1989).
6. Michihiko Tada, *Prostaglandin*, Bioscience series, 化學同人, Tokyo, 1988.
7. C. Benedetto, R. G. McDonald-Gibson, S. Nigam and T. F. Slater, *Prostaglandins and related substances*, p. 151-158, IRL Press, Ltd, England, 1987.
8. C. Weber, M. Holler, J. Beeten, D. D. Clerck and F. Tegemeier, *J. Chromatogr.*, **562**, 599(1991).
9. M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *Nature*, **293**, 270(1980).
10. R. M. Caprioli, *Anal. Chem.*, 62(1990).
11. Powell, W. S. *Prostaglandins*, **20**, 947(1980).
12. D. C. Moon and S. Y. Chang, *unpublished results* (1992).
13. T. C. Wang, M. Shih, S. Markey and M. Duncan, *Anal. Chem.*, **62**, 1013(1989).
14. P. Kokkonen, J. van der Greef, W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, G. J. Hove and G. Werken, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **3**, 102(1989).
15. U. Justesen and G. Bojesen, *J. Chromatogr.*, **562**, 59(1991).
16. G. Bojesen and J. Moller, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **68**, 239(1986).
17. J. C. Miller and J. N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed. Ellis Horwood. LTD, England (1990).
18. JS Kang and AK Ebel, *Statistics for anal. Chem. (ver 1.0)*, Inst. f. Pharmazie und LMC 8700, Wurzburg, Germany(1990).
19. R. M. Caprioli, *Continuous-Flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, New York(1990).