

기체 크로마토그래피/질량분석법을 이용한 요 중에서의 유기산 분석

劉銀娥 · 高善暎 · 金種源 · 金廷昱 · 明承云¹

성신여자대학교 화학과¹ 삼성의료원

²한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

(1997. 7. 24 접수)

Analysis of Organic Acids in Urine by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Eun-Ah Yoo, Sun-Young Ko, Jong-Won Kim¹, Jeong-Uk Kim¹, and Seung-Woon Myung^{1*}

Department of Chemistry, Sungshin Women's University, Seoul 136-742, Korea

²Samsung Medical Center, Seoul 135-230, Korea

¹Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Cheongryang, Seoul 136-791, Korea

(Received July 24, 1997)

요 약. 기체크로마토그래피/질량분석법(GC/MS)을 이용하여 소변 내에 존재하는 유기산들을 동시에 분리 정량분석할 수 있는 최적의 분석조건을 확립하기 위해 액체-액체추출법을 이용하여 분리하였고 이때 pH의 영향 및 역추출방법과 그리고 옥심화 과정 첨가의 효과를 알아보았다. 그 결과 옥심화 과정 없이 pH가 0.5일 때 회수율이 좋았고 RSD값은 0.3-12.4%로 가장 적었다. 역추출과정을 통하여 방해물질이 제거되어 15-16분대의 머무름 값을 갖는 몇가지 유기산 검출이 확실시 되었다. 이를 토대로 51종의 유기산들에 대한 검량곡선을 작성하여 한국 정상어린이(n=16) 요시료 중의 유기산 함량분포를 얻었다.

ABSTRACT. GC/MS was used to find an optimum experimental condition for the screening of organic acids in urine. Urinary organic acids were isolated through the liquid-liquid extraction method (LLE) to examine the influence of pH and the effect of including the back extraction and oximation processes respectively on the extraction. When pH was adjusted to 0.5 during the extraction without oximation process, relatively higher recovery rate and the smallest relative standard deviations (0.3-12.4%) were obtained. By removing the interference, the addition of back extraction made possible surer identification of organic acids with retention time of 15-16 minutes. Under this condition, we obtained the content distribution of urinary organic acids in healthy Korean children (n=16) by establishing the calibration curves for 51 standard organic acids.

서 론

생리액 중에 있는 유기산의 분석은 유기산 대사과정에서 일어날 수 있는 수많은 선천적 질환을 진단하는데 중요한 도구로 이용되고 있다.¹⁻³

이러한 유기산을 분석하는 방법은 매우 다양하나 최근에는 기체크로마토그래피/질량분석법(GC/MS)이나 고성능 액체크로마토그래피/질량분석법(HPLC/MS)을 사용하여 각 머무름 시간의 봉우리 면적에 의한 정량분석뿐 아니라 질량스펙트럼으로 각 물질들을 확인함으로써 보다 정확한 분석을 수행할 수 있게 되

었다.⁴

각 대사장에 질환에 기여하는 특성 화학종에 관한 분리 및 정량분석방법에 대한 연구는 많이 이루어져 있으나 이러한 질환을 진단하려면 관련되는 수 많은 유기산들을 동시에 분석하는 방법이 확립되어야 하고 정상인 기준농도 참고치⁵⁻⁷가 있어야 하는데 현재 까지 한국인에 대한 참고치가 보고된바 없다.

기체 크로마토그래피에 의한 분석과정은 시료로부터 유기산들을 분리하고 이 유기산들을 유도체화한 후 검출기를 이용하여 분석하는, 세 단계로 이루어

어진다.

Mardens 등⁸은 액체-액체 추출법(LLE)⁹⁻¹¹과 액체-고체 추출법(LSE)¹²⁻¹⁴의 장단점을 비교 실험한 결과, LLE방법에서는 폴리히드록시 화합물들과 글리신 유도체들의 회수율이 낮지만 이 화합물들은 글리세린산만 제외하고는 임상적으로 별로 중요하지 않으며 옥살산, 피루브산, 글리옥살산, 2-케토글루타르산 등과 같은 임상적으로 중요한 더 많은 화합물들의 회수율이 LSE방법에서 보다 높고 더 신속하고 간단한 방법임을 보고하였다. 따라서 극성인 물질들의 회수율 증가와 방해물질의 제거에 대한 문제를 해결하면 반복적인 유기산 분석에 있어서는 용매추출법이 훨씬 유리한 방법이다.

유도체화 과정에서는 실랄화하기 전에 불안정한 케토산들을 옥심화(oximation) 시킴으로써 감도를 크게 할 수 있어 이들 유기산을 정량하는데 많이 이용되고 있다.¹⁵⁻¹⁸ 그러나 이 옥심 반응을 첨가할 때 들 어올 수 있는 방해요인에 의한 분석결과에 미치는 영향을 고려해야 하며 전처리 과정에서 한단계의 생략 및 추가는 중요한 의미가 있으므로 옥심화반응의 필요성을 확실히 해야한다.

본 연구에서는 추출효율이 비교적 높은 액체-액체 추출법으로 에틸아세테이트용매를 이용하되 추출시 최적 pH를 알아내고, 용매추출법의 가장 큰 단점인 산성 조건하에서 중성물질의 동시추출^{19,20}을 방지하기 위해 역추출과정을, 불안정한 유기산들에 대해 옥심화과정을 첨가했을 때 이들 효과에 대해 알아보았다.

이러한 연구를 통해 얻은 신속하고 정확, 정밀한 유기산 분석방법을 실제 요에 함유되어 있는 유기산들의 분석에 적용하여 한국 정상 어린이의 요중에 함유된 유기산 함량분포를 얻어 정상군 값으로 사용할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다.

실 험

분석기기 및 장치

본 실험에서 분석 장치로서 사용한 GC/MS는 FISONS사의 GC 8000 series Gas Chromatograph에 direct interface로 연결된 MD 800 Mass Selective Detector이며 시료의 주입은 AS 800 Autosampler를 이용하였다.

여러가지 시약 및 용매를 혼합시킬때는 Vison사의

VORTEX Mixer를 사용하였고 용매추출할 때 두층으로의 분리를 완전하게 하기위해 Sorvall RT 6000D 원심분리기를 이용하였다. 증발-건조를 위해서 Pierce사의 Reacti-Therm Heating/Stirring Module 을 사용하였다.

시 약

각종 유기산의 표준물질들은 Sigma사, Fluka사, Merck사로부터 구입한 특급시약을 사용하였으며 정량분석에 필요한 내부표준물질은 tropic acid(Aldrich사)와 2-oxocaproic acid(Aldrich사)를 이용하였다.

유도체화시약인 N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide:trimethylchlorosilane (BSTFA:TMCS, 99:1 v/v)와 O-2,3,4,5,6-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride는 Pierce사에서 구입하였다.

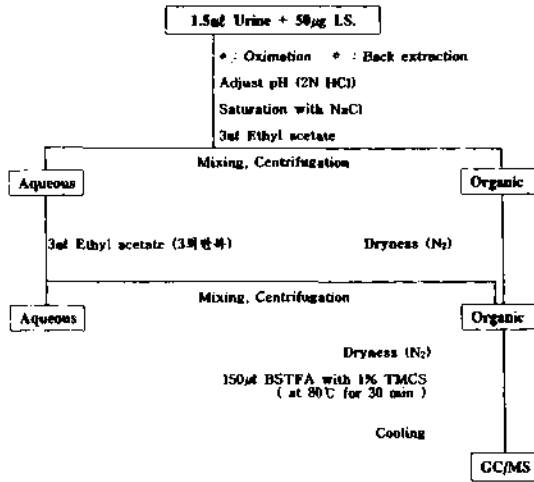
물은 Millipore사의 Milli-Q System을 통과한 3차 증류수를 이용하였으며 유기용매로는 Mallinckrodt사와 삼전시약주식회사의 HPLC용 에틸아세테이트와 헥산을 사용하였다.

실험방법

표준혼합용액 제조. 각각의 표준물질들은 장기간 보관할 때 좀더 안정하도록 20 mmol/L의 중탄산나트륨 수용액을 용매로 사용하고, 이 용매에 잘 녹지 않는 물질들은 에탄올을 사용하였으며, 또한 케토산들은 20 mmol/L HCl 수용액에 녹여, 각각 50 mmol/L의 저장 표준용액을 만들었다. 각 표준용액 1 ml씩을 취해 0.5 mmol/L의 표준물 혼합용액 100 ml가 되도록, 그러나 citric acid와 hippuric acid는 각각 100 mmol/L, 10 mmol/L의 농도가 되도록 하였다.

정량분석시 필요한 내부표준물질인 tropic acid와 2-oxocaproic acid는 각각 20 mmol/L의 중탄산나트륨 수용액에 녹여 10 mmol/L로 제조하고 각각 50 µg에 해당하는 33.2 µl와 30.4 µl를 첨가하여 사용하였다.

추출 조건 및 유도체 생성. 1.5 ml의 각 분석 시료용액에 내부표준물질로 tropic acid를 33.2 µl 그리고 옥심화과정을 추가하는 경우에는 2-oxocaproic acid도 30.4 µl 첨가한 뒤 2N-HCl를 사용하여 액성을 조절하고 NaCl 약 1 g으로 포화시켰다. 그리고 추출용매인 ethyl acetate 3 ml를 첨가하여 Vortex Mixer로 2분간 혼합시키고 3100 rpm으로 5분간 원심분리한 후 유기층을 5 ml Vial에 옮겨 30°C에서 질소기체를 사용하여 유기용매를 증발시켰다. 이 추출과정



* : Oximation * : Back extraction
 O : PFBOxime
 (at 60°C for 30min)

* : Adjust pH=12 (1N NaOH)
 3µl Hexane

Scheme 1. Procedure of extraction.

을 3번 반복하여 얻어진 시료에 유도체화 시약인 BSTFA-1% TMCS, 150 µl를 가하고 80 °C에서 30분간 가열하여 유도체화 반응을 완결하였다. 시료를 실온에서 냉각시킨 뒤 GC/MS에 autosampler를 이용해 1 µl를 주입하였다(Scheme 1).

위 과정 중 pH를 0.1, 0.5, 1로 각각 조절하여 회수율을 알아보고 산성으로 액성조절 전에 1N-NaOH 용액으로 pH를 12로 조절하여 옥시화(oxidation)과정 그리고 역추출과정(back extraction process)을 첨가한 후 추출하여 그 효과를 각각 검토하였다.

GC/MS법을 이용한 정성 및 정량분석. 유도체화된 시료 1 µl를 주입하여 얻어진 질량토막이온으로부터 선택이온 검출법(SIM, selective ion monitoring method)을 이용하여 이온세기가 큰 특성이온이나 분자이온에 대한 머무름시간대별로 Find Target Method Program을 작성하였다. 이 프로그램을 이용하여 요시료 중 유기산들의 존재여부를 검색하고 각 물질별로 검량곡선을 작성하여 정량분석하였다.

기체크로마토그래피/질량분석기의 작동조건은 Table 1에 수록하였다.

표준검량곡선의 작성. 정량 분석이 가능한 51종의 유기산 표준물질들에 대해 농도범위를 15에서 240 nmol로 정하여 대상 유기산들을 모두 혼합하고

Table 1. GC/MS operating parameters

Column: SPB-1 (Fused Silica Capillary Column)
 30 m Length, 0.32 mm I.D., 0.25 µm
 Film thickness

Carrier Gas: He (1 ml/min)

Split Ratio: 1/10

Injection Port Temperature: 210 °C

Interface Temperature: 260 °C

Oven Temperature Program: Initial Temp. → 70 °C

Initial Time → 8 min

Rate → 4 °C/min

Final Temp. → 260 °C

Final Time → 8 min

Solvent Delay Time: 4 min

Mass range: m/z 40-550

Ionization mode: Electron-Impact (EI) (70 eV)

3차증류수를 이용하여 농도별로 5개의 검량용 표준 혼합물을 만들었다.

요 속에 많이 존재하는 유기산들에 해당하는 물질들은 아래와 같은 농도범위 즉 citric acid와 hippuric acid는 150에서 2250 nmol로, 그리고 lactic acid, 3-hydroxybutyric acid, 2-oxoglutaric acid, acetoacetic acid는 60에서 960 nmol, glycolic acid는 45에서 720 nmol, 4-hydroxyphenylacetic acid는 30에서 480 nmol로 조제하여 분석하였다. 이때 내부표준물질인 tropic acid와 2-oxocaproic acid (10 mmol/L)도 해당량 첨가하였다.

이 검량용 표준혼합물을 본 실험방법(Scheme 1, pH, 0.5)에 따라 추출한 후 유도체화시켜 GC/MS로 내부표준물질법을 이용하여 각각의 검량곡선을 만들었다.

실제 시료의 분석. 생체시료의 수집: 6세 미만의 어린이 16명에게서 24시간동안 배설된 요를 수집하여 실험하기 전까지 20 °C에서 보관하였다.

정량분석: 위의 시료를 25 °C의 평형온도에서 1.5 ml 취해 pH를 0.5로 맞추고 Scheme 1에 따라 전처리해서 GC/MS에 주입한 후 Find Target Method Program을 이용하여 요 중에 포함된 유기산들의 질량스펙트럼을 얻어 150여가지의 유기산들을 검색하였다. 위에서 작성한 51종의 표준물질들의 검량곡선을 이용하여 정상인들의 유기산 함량을 구하였다.

Creatinine의 측정: 신장 기능의 유력한 지표가 되는 creatinine값으로 유기산들의 농도를 보정해 주기 위하여 Jaffe방법²⁾으로 요 시료 내의 creatinine양을 측정하였다.

결과 및 고찰

TMS 유도체화에 의한 유기산들의 질량 스펙트럼

유기산을 GC/MS를 이용하여 정량분석할 때 여러 가지 유도체화 방법이 개발되어왔다.²²⁻²⁶ 그중에서 BSTFA/TMCS(99:1) 시약을 이용한 trimethylsilylation (TMS)이 가장 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는

51종의 표준물질들의 TMS유도체들의 질량스펙트럼을 얻었고 이로부터 특성이온들을 선택하여 정량분석에 이용하였다.

추출조건

추출 효율에 미치는 pH의 영향. 지금까지 보고된 분석방법들을 살펴보면 대략 pH가 1보다 적게라고만 되어있다. 본 연구에서는 추출과정 중 pH변화에 따른

Table 2. Recovery of standard substances as a function of pH (n=6, 240 nmol)

No*	Acids	t _R	RRT	Recovery (%)		
				pH 0.1	pH 0.5	pH 1
1	LT	6.91	0.253	56.9± 4.3	72.6± 2.5	77.0± 3.2
2	2HIB	7.18	0.262	60.1± 5.9	78.3± 5.9	82.1± 4.5
3	GLCO	7.38	0.270	10.8± 0.5	16.8± 0.7	18.7± 1.2
4	PY	7.99	0.292	16.7± 2.2	23.4± 4.1	26.5± 3.9
5	OX	9.96	0.364	14.7± 2.9	17.1± 1.4	16.1± 0.8
6	2HB	10.42	0.381	57.1± 6.1	74.1± 4.0	76.9± 4.6
7	3HB	11.89	0.434	32.0± 3.8	62.4± 2.2	68.7± 3.9
8	2HIV	12.24	0.447	73.5± 8.5	82.1± 4.6	84.1± 6.4
9	2OB	12.46	0.455	108.8± 3.1	182.7± 4.8	209.7± 5.2
10	MALO	13.50	0.493	47.3± 6.6	76.3± 6.7	71.0± 8.4
11	MM	14.14	0.517	114.6± 9.2	142.5± 5.4	143.9± 3.6
12	4HB	15.23	0.556	9.2± 0.7	14.8± 3.6	23.2± 6.6
13	AA	15.50	0.567	105.4± 29.4	162.4± 10.8	163.5± 24.1
14	CAP	15.99	0.584	61.2± 13.2	67.2± 10.4	70.7± 12.5
15	EM	16.89	0.618	91.6± 7.3	100.7± 2.0	100.5± 2.1
16	4HIV	18.01	0.658	43.6± 4.5	69.0± 5.8	72.8± 5.5
17	ML	18.40	0.673	11.5± 4.9	25.8± 4.2	31.9± 6.2
18	MS	18.62	0.680	84.0± 5.8	100.3± 2.0	101.2± 2.7
19	UC	18.74	0.685	7.6± 0.3	12.1± 0.3	13.5± 0.6
20	FU	19.55	0.714	139.9± 10.6	157.4± 3.0	157.8± 3.0
21	AG	19.92	0.728	7.6± 1.4	18.6± 0.3	23.2± 1.4
22	TM	21.11	0.772	10.7± 0.9	23.8± 0.8	28.3± 1.3
23	GT	21.40	0.782	68.7± 3.8	91.8± 0.9	93.1± 2.3
24	2MGT	21.83	0.798	89.9± 5.9	99.5± 1.3	99.0± 1.8
25	3MGT	22.12	0.808	90.6± 6.3	100.0± 1.1	99.5± 1.8
26	PG	24.63	0.900	7.1± 0.4	14.5± 0.5	17.0± 1.2
27	AD	24.75	0.904	95.0± 3.4	105.7± 1.5	104.9± 2.8
28	MLI	24.86	0.908	9.8± 0.5	16.7± 0.5	17.8± 1.1
29	PL	27.11	0.963	98.3± 4.4	101.1± 1.7	99.1± 3.2
30	I.S.1	27.36	1.000	76.0± 22.7	86.8± 19.3	87.4± 27.9
31	PIM	27.80	1.016	100.2± 4.3	104.5± 1.3	103.1± 3.0
32	3H3MGT	28.24	1.032	70.1± 2.3	134.6± 2.9	144.4± 5.2
33	2OGT	28.39	1.037	34.3± 3.8	56.6± 2.2	57.4± 4.3
34	4HPA	28.60	1.045	100.7± 4.0	104.2± 1.3	103.0± 3.5
35	NAA	29.07	1.062	9.0± 3.0	21.5± 12.4	34.5± 19.0
36	SA	29.33	1.072	72.3± 7.0	79.6± 1.7	81.9± 7.4
37	TT	29.77	1.088	6.8± 0.1	7.9± 0.2	7.9± 0.3
38	SUB	30.53	1.116	102.4± 4.5	105.6± 1.8	104.1± 4.2
39	TCB	31.88	1.165	41.3± 3.2	67.2± 1.6	70.3± 3.9

Table 2. Continued

No*	Acids	t_R	RRT	Recovery (%)		
				pH 0.1	pH 0.5	pH 1
40	OT	32.16	1.175	18.8± 2.2	28.8± 3.2	26.8± 3.6
41	GLTC	32.21	1.177	91.4± 22.4	115.6± 4.8	119.4± 10.1
42	HIP	33.29	1.217	102.4± 6.0	109.4± 0.7	105.7± 5.2
43	HG	34.50	1.261	93.8± 5.5	97.3± 1.3	94.8± 6.2
44	CIT	34.78	1.271	14.9± 0.5	19.4± 0.4	20.1± 1.0
45	SEB	35.82	1.309	95.8± 7.5	98.8± 1.0	96.9± 7.2
46	4HPL	36.32	1.327	93.9± 5.3	96.9± 2.1	94.2± 7.6
47	PAL	39.63	1.448	101.4± 7.0	104.8± 5.5	103.0± 11.1
48	4HPP	39.93	1.459	82.6± 18.2	80.6± 5.1	67.7± 19.8
49	AT	41.03	1.499	85.3± 7.2	96.0± 4.4	92.1± 7.9
50	5HIAA	43.21	1.579	72.5± 4.8	79.6± 4.0	78.2± 9.2
51	ST	44.20	1.615	86.8± 41.8	106.3± 10.2	104.2± 14.6

No*: number of elution order, t_R : retention time RRT: Retention time relative to TMS derivative of tropic acid Recovery (%): mean±standard deviation

표준물질들의 추출 회수율을 비교·분석하여 Table 2에 나타내었다. pH에 따른 회수율의 변화가 일률적으로 크거나 적게 나타나지는 않았으나 pH 0.1 일때는 회수율이 모두 감소했고 pH가 1일 때 20여가지의 유기산들에서 가장 큰 회수율을 보였으나 pH가 0.5일 때의 값과 차이가 별로 크지 않았으며 상대표준편차 (RSD)는 0.3에서 12.4%의 범위로 pH가 0.5일 때 2가

지 유기산만 제외하고 모든 유기산의 경우 작게 나타났으며 pH 1일때의 값보다 훨씬 적어 정밀도가 좋을 것을 보여주었다.

옥심화(oximation)의 영향. GC/MS로 유기산을 분석할 때 케토산들은 불안정하기 때문에 시료 전처리 과정에 옥심화반응을 첨가하여 케토산을 안정화시켜 분석이 잘 이루어지도록 한다. 그러나 생체시

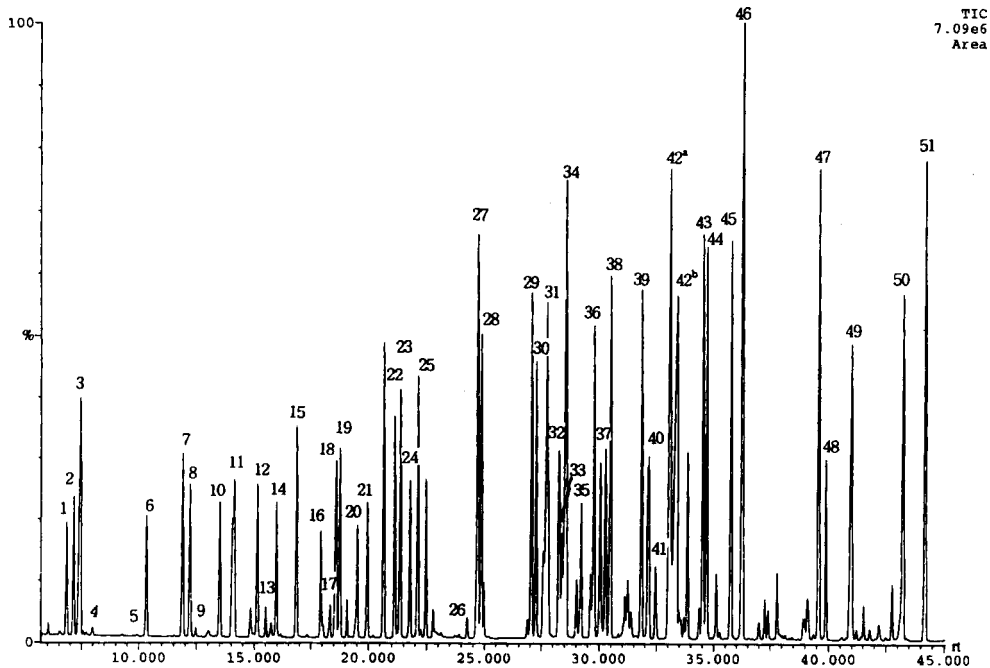


Fig. 1. GC/MS total ion chromatogram of TMS derivatives of organic acids.

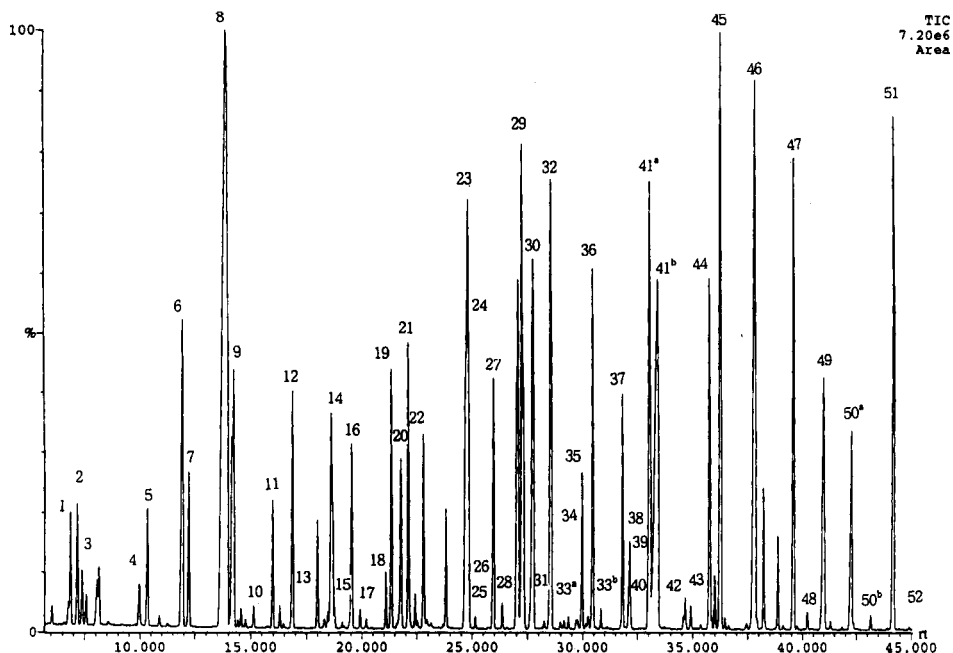


Fig. 2. GC/MS total ion chromatogram of TMS derivatives of organic acids with oximation.

료의 경우 시료 조제 단계가 간단하고 신속해야만 하기 때문에 한 단계를 생략한다는 것은 큰 의미가 있다. 생체 시료중의 유기산 정량분석에 대한 연구들을 조사해보면 특별한 언급없이 옥심화 과정을 첨가

한 경우와 생략한 경우 그 수의 비율이 비슷하였다.

본 연구에서는 옥심화과정을 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때의 TIC(total ion chromatogram)를 얻고 (Fig. 1과 2) 또한 각 유기산들의 추출효율을 비교(Table

Table 3. Recovery of standard substances according to oximation process (n=6, 240 nmol)

No*	Acids	With oximation		
		t_r	RRT	Recovery (%)
1	LT	7.12	0.221	43.5+8.9
2	2HIB	7.17	0.223	51.2+13.9
3	GLCO	7.39	0.230	13.4±1.5
4	OX	9.97	0.310	28.2±3.3
5	2HB	10.35	0.322	65.2±12.0
6	3HIB	11.94	0.371	150.2±18.7
7	2HIV	12.22	0.380	68.5±12.4
8	MALO	13.93	0.433	17.6±1.8
9	MM	14.57	0.453	62.0±7.9
10	4HB	15.14	0.470	17.0±4.2
11	CAP	15.98	0.496	50.9±17.7
12	EM	16.98	0.528	95.3±11.4
13	4HIV	17.96	0.656	35.0±1.5
14	ML	18.32	0.670	7.2±5.5
15	UC	18.76	0.686	8.2±0.2
16	FU	19.53	0.714	152.5±10.5
17	AG	19.91	0.728	13.9± 1.3

Table 3. Continued

No*	Acids	With oximation		
		t _R	RRT	Recovery (%)
18	TM	21.20	0.775	25.0± 1.5
19	GT	21.45	0.784	83.5± 4.4
20	2MGT	21.79	0.797	87.9± 8.7
21	3MGT	22.14	0.809	89.7± 6.6
22	GLO ^a	23.67	0.790*	67.2± 5.6
23	PG	24.64	0.901	13.3± 1.3
24	AD	24.71	0.903	100.5± 4.2
25	MLI	25.44	0.909	11.6± 3.6
26	PY	25.12	0.838*	54.0± 3.2
27	2OB	26.02	0.868*	96.1± 12.3
28	PL	27.10	0.991	94.8± 3.4
29	I.S.1	27.35	1.000	89.9± 15.5
30	PIM	27.79	1.016	91.7± 2.8
31	3H3MGT	28.00	1.024	1.8± 1.2
32	4HPA	28.59	1.045	93.4± 3.5
33 ^a	NAA diTMS	28.97	1.059	35.6± 8.2
33 ^b	triTMS	30.24	1.106	
34	TT	29.76	1.088	8.1± 1.0
35	I.S.2	29.97	1.000	146.6± 4.8
36	SUB	30.49	1.115	94.2± 3.2
37	TCB	31.84	1.164	56.8± 4.4
38	OT	32.09	1.173	39.5± 21.0
39	GLTC	32.16	1.176	33.3± 22.5
40	MS	32.19	1.177	5.8± 0.1
41 ^a	HIP diTMS	33.06	1.209	93.2± 2.3
41 ^b	triTMS	33.41	1.222	
42	HG	34.45	1.260	2.2± 0.02
43	CIT	34.64	1.266	17.6± 1.1
44	SEB	35.77	1.308	80.2± 1.5
45	4HPL	36.28	1.326	1546.5± 64.8
46	2OGT	37.84	1.262*	781.0± 151.4
47	PAL	39.61	1.448	85.6± 6.1
48	4HPP	39.90	1.459	23.5± 5.3
49	AT	40.99	1.499	71.3± 3.7
50 ^a	5HIAA diTMS	42.29	1.546	60.9± 26.0
50 ^b	triTMS	43.16	1.578	
51	ST	44.20	1.616	87.6± 9.7
52	SA	49.51	1.652*	77.5± 6.9

No*: number of elution order with oximation, t_R: retention time RRT: retention time relative to tropic acid RRT*: retention time relative to 2-oxocaproic acid for keto acids Recovery (%): mean±standard deviation GLO^a: glyoxylic acid

3)하였다.

그 결과 케토기를 가진 유기산들(pyruvic, glyoxylic, 2-ketoglutaric, acetoacetic acids)의 회수율이 크게 증가하였고 더 낮은 농도범위에서도 정확한 검량곡선을 얻을 수 있었다.

그러나 Fig. 1과 2에서 보는바와 같이 이 반응으로

인한 부산물들의 생성으로 케토산 이외의 봉우리들의 감도가 아주 적어지며 전체 질량스펙트럼을 분석할 때 방해가 되고 시료 전처리과정이 복잡해져 소비되는 시간이 증가하는 단점들 때문에 실제 정상인의 요 시료내의 유기산들을 분석할 때 특히 반복적인 유기산 분석을 필요로 할 때 이 반응과정은 생략

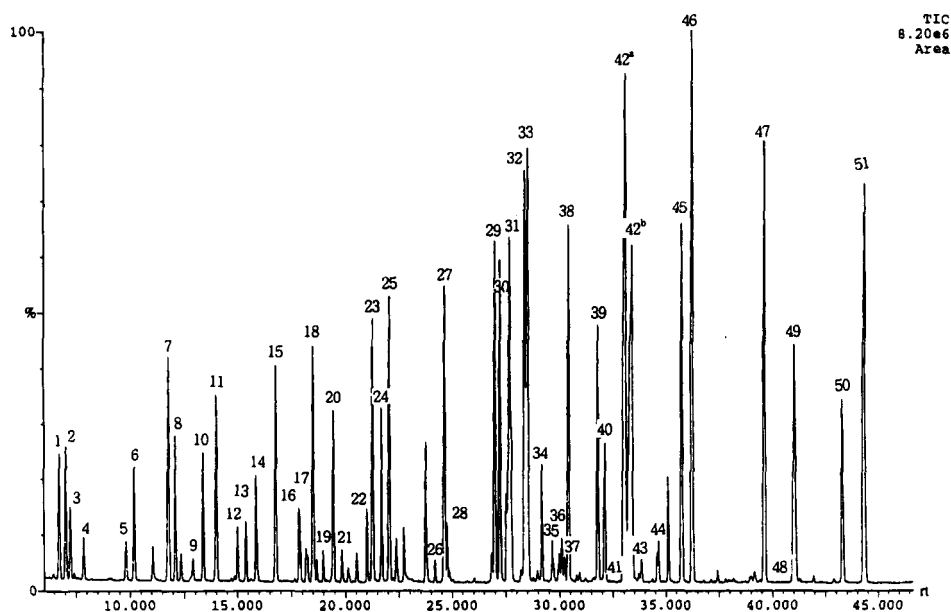


Fig. 3. GC/MS total ion chromatogram of TMS derivatives of organic acids with back extraction.

하는 것이 유리함을 확인하였다.

그럼에도 불구하고 유기산 대사질환 중에 ketosis 나 ketoacidosis 같은 질환의 경우⁵ 이 과정은 반드시 필요하다. 즉 임상적으로 케토기를 가진 유기산의 정확한 분석을 위한 옥심화과정의 첨가 유무를 판단할 수 있는 지표를 결정해야 한다.

따라서 정상인들의 요 시료내에 존재하는 유기산들 특히 케토기를 가진 물질들의 정량값들을 구해 정상참고치를 결정하는 연구들이 실행되어야 하며 그 값들 이상의 결과가 얻어진 경우에만 옥심화과정을 첨가하여 유기산을 분석함이 바람직하다.

역추출의 영향. 유기산에 대한 액체-액체 추출법의 단점 중 하나인 중성물질의 동시추출을 방지하기 위해 역추출방법을 시도하였다. 즉 유기산 추출 전에 1N NaOH 용액을 사용하여 염기성 조건을 맞추고 핵산으로 추출하여 중성 및 염기성 물질을 제거하는 과정을 첨가하여 그 효과를 확인하였다.

역추출과정을 첨가하지 않은 경우(Fig. 1)와 첨가한 경우의 표준용액의 크로마토그램(Fig. 3)과 추출율(Table 4)을 비교해보면 2가지 유기산만을 제외하고 회수율에 있어 큰 변화를 보이지 않았으며 전체적으로 조금씩 증가하였다. 또한 요시료의 크로마토그램(Fig. 4)에서 보는 바와 같이 GC/MS를 이용해 유기산을 분석할 때 역추출과정을 첨가한 경우에는

Table 4. Comparison of recovery of organic acids with and without back extraction process (n=6, 240 nmol)

No*	Acids	with back extraction (%)	without back extraction (%)
1	LT	77.5 ± 4.4	72.6 ± 2.5
2	2HIB	75.6 ± 5.2	78.3 ± 5.9
3	GLCO	17.3 ± 1.4	16.8 ± 0.7
4	PY	33.2 ± 5.0	23.4 ± 4.1
5	OX	21.3 ± 1.9	17.1 ± 1.4
6	2HB	78.4 ± 3.7	74.1 ± 4.0
7	3HB	101.2 ± 8.1	62.4 ± 2.2
8	2HIV	79.9 ± 3.2	82.1 ± 4.6
9	2OB	247.7 ± 28.3	182.7 ± 4.8
10	MALO	78.4 ± 3.2	76.3 ± 6.7
11	MM	115.4 ± 8.1	142.5 ± 5.4
12	4HB	23.6 ± 6.6	14.8 ± 3.6
13	AA	139.3 ± 14.7	162.4 ± 10.8
14	CAP	65.0 ± 12.3	67.2 ± 10.4
15	EM	89.0 ± 2.3	100.7 ± 2.0
16	4HIV	159.1 ± 2.9	69.0 ± 5.8
17	ML	46.3 ± 6.3	25.8 ± 4.2
18	MS	91.8 ± 1.8	100.3 ± 2.0
19	UC	11.2 ± 0.6	12.1 ± 0.3
20	FU	135.9 ± 3.0	157.4 ± 3.0
21	AG	18.4 ± 0.7	18.6 ± 0.3
22	TM	27.7 ± 2.0	23.8 ± 0.8
23	GT	81.1 ± 1.5	91.8 ± 0.9
24	2MGT	85.8 ± 0.8	99.5 ± 1.3
25	3MGT	86.5 ± 2.1	100.0 ± 1.1

Table 4. Continued

No*	Acids	with back extraction (%)	without back extraction (%)
26	PG	13.7± 0.6	14.5± 0.5
27	AD	90.7± 2.4	105.7± 1.5
28	MLI	15.2± 5.0	16.7± 0.5
29	PL	94.3± 1.0	101.1± 1.7
30	I.S.1	89.2± 1.2	86.8± 19.3
31	PIM	84.5± 2.6	104.5± 1.3
32	3HEMGT	70.8± 5.4	134.6± 2.9
33	2OGT	61.1± 3.8	56.6± 2.2
34	4HPA	90.2± 2.1	104.2± 1.3
35	NAA	26.9± 1.6	21.5± 12.4
36	SA	73.6± 1.9	79.6± 1.7
37	TT	8.5± 0.1	7.9± 0.2
38	SUB	91.7± 1.3	105.6± 1.8
39	TCB	68.5± 2.8	67.2± 1.6
40	OT	23.3± 1.2	28.8± 3.2
41	GLTC	87.9± 2.8	115.6± 4.8
42	HIP	94.3± 1.8	109.4± 0.7
43	HG	67.3± 9.4	97.3± 1.3
44	CIT	18.2± 0.5	19.4± 0.4
45	SEB	89.5± 4.3	98.8± 1.0
46	4HPL	90.5± 3.6	96.9± 2.1
47	PAL	91.3± 10.8	104.8± 5.5
48	4HPP	2.5± 0.1	80.6± 5.1
49	AT	82.2± 6.1	96.0± 4.4
50	SHIAA	44.3± 3.0	79.6± 4.0
51	ST	100.5± 14.2	106.3± 10.2

Recovery (%): mean ± standard deviation

15에서 16분 사이에 나타난 요소 등의 방해물질들이 제거됨으로 그 시간대에 머무름 값을 갖는 유기산들의 봉우리가 더 정확하게 검색 및 검량될 수 있음을 알 수 있었다. 이를 확인하기 위해 요소용액에 대한 역추출과정 첨가의 효과를 알아본 결과 Fig. 5(a)에 나타난 바와 같이 요소의 양이 현저히 감소하였음을 확인하였다. 특히 크로마토그램상에서 머무름 시간이 늦은 35분대에 나타나는 방해물질 봉우리가 없어졌으며, 40분이상에서 나타나는 물질들도 역추출법을 첨가해서 실험하였을 때 좋은 추출율을 보여주었다. 그리고 극성이 큰 유기산들, 3-hydroxy-propionic acid, 3-hydroxy-isobutyric acid, 2-hydroxy-isovaleric acid, 2,3-dihydroxy-butyric acid, citric acid 등의 추출율이 현저히 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5(b))

Table 5에 실제 요시료에 대한 역추출과정의 첨가의 효과를 tropic acid와의 면적비를 이용해 정량적으로 나타내었다.

따라서 이 과정에서 용매 선택이나 pH조절 등의 방법을 보완한다면 중성물질의 완전한 제거와 동시에 유기산들의 추출율을 더욱 증가시킬 수 있을 것이다.

실제 시료의 분석

정량분석시 내부표준물질의 선택은 분석결과의

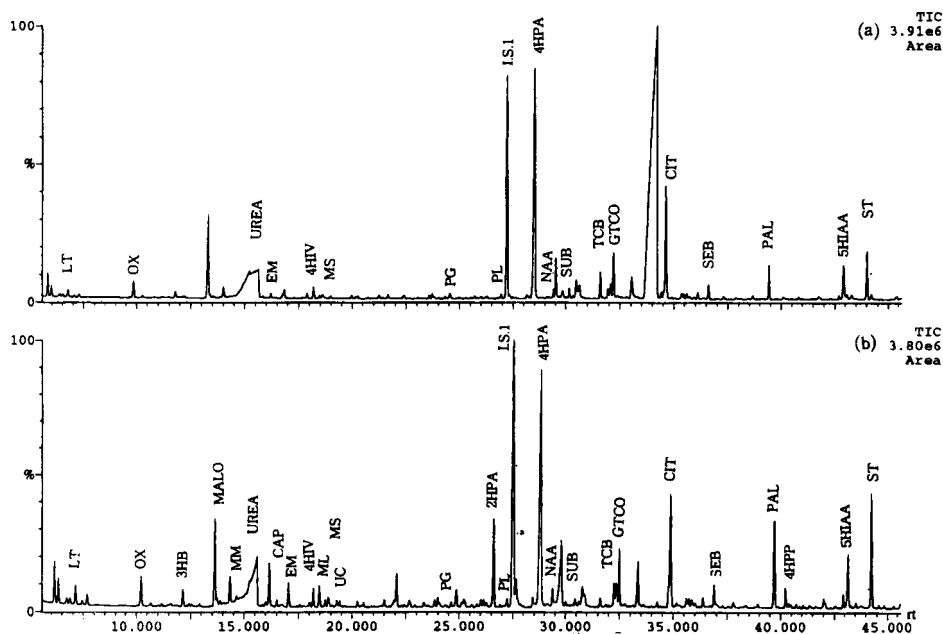


Fig. 4. GC/MS total ion chromatogram of TMS derivatives of urinary organic acids (a) Without back extraction (b) With back extraction.

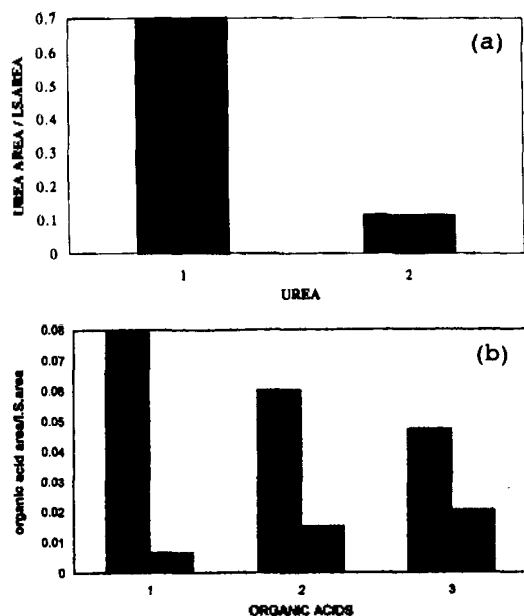


Fig. 5. Comparison of area ratio according to addition of back extraction (a) 1: without back extraction, 2: with back extraction (b) 1: 2,3-dihydroxybutyric acid, 2: 3-hydroxyisobutyric acid, 3: 2-hydroxyisovaleric acid (■: with back extraction, □: without back extraction)

Table 5. Comparison of area ratio of organic acids found in the analysed urines with and without back extraction process

Acids	with back extraction	without back extraction
	O.A. area/I.S. area (n=3)	O.A. area/I.S. area (n=5)
LT	0.115±0.068	0.102±0.030
2HIB	0.130±0.074	0.172±0.062
GLCO	0.030±0.001	0.025±0.012
PY	0.051±0.013	0.042±0.011
OX	0.043±0.024	0.036±0.003
2HB	0.154±0.008	0.138±0.019
3HB	0.038±0.019	0.016±0.007
2HIV	0.019±0.001	0.010±0.001
2OB	0.054±0.025	0.020±0.011
MALO	0.024±0.004	0.020±0.003
MM	0.010±0.004	0.018±0.002
4HB	0.065±0.005	0.043±0.007
AA	0.083±0.003	0.094±0.005
CAP	0.049±0.004	0.051±0.003
EM	0.009±0.001	0.010±0.005
4HIV	0.105±0.012	0.016±0.002
ML	0.035±0.002	0.017±0.003
MS	0.030±0.009	0.035±0.005
UC	0.024±0.001	0.023±0.001
FU	0.107±0.006	0.113±0.011

Table 5. Continued

Acids	with back extraction	without back extraction
	O.A. area/I.S. area (n=3)	O.A. area/I.S. area (n=5)
AG	0.083±0.006	0.084±0.007
TM	0.079±0.009	0.068±0.004
GT	0.578±0.012	0.602±0.019
2MGT	0.343±0.026	0.396±0.040
3MGT	0.192±0.028	0.238±0.054
PG	0.093±0.023	0.107±0.040
AD	0.485±0.018	0.493±0.038
MLI	0.017±0.041	0.044±0.013
PL	0.216±0.021	0.268±0.014
I.S.1	1.000	1.000
PIM	0.411±0.026	0.516±0.012
3H3MGT	0.018±0.003	0.028±0.004
2OGT	0.101±0.018	0.084±0.023
4HPA	0.105±0.010	0.151±0.034
NAA	0.034±0.006	0.025±0.004
SA	0.027±0.005	0.032±0.008
TT	0.018±0.001	0.015±0.001
SUB	0.168±0.015	0.181±0.018
TCB	0.067±0.016	0.061±0.028
OT	0.379±0.039	0.393±0.049
GLTC	0.087±0.016	0.105±0.048
HIP	1.025±0.095	1.057±0.102
HG	0.157±0.078	0.219±0.093
CIT	0.697±0.083	0.717±0.057
SEB	0.121±0.069	0.137±0.085
4HPL	0.494±0.036	0.587±0.045
PAL	0.887±0.039	0.976±0.087
4HPP	0.022±0.002	0.289±0.090
AT	0.139±0.021	0.192±0.032
5HIAA	0.995±0.086	0.136±0.069
ST	0.109±0.036	0.117±0.098

O.A. area/I.S. area: mean ± standard deviation
(O.A.: Organic Acid, I.S.: Internal Standard)

신뢰도에 많은 영향을 줌으로 지금까지 내부표준물질로 사용된 화학종들이 매우 다양하다. 최근 Duez 등²⁶은 tropic acid와 2-oxocaproic acid를 함께 사용하는 것이 가장 좋은 결과를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구에서 실험결과 옥심화과정을 첨가하지 않은 경우에는 2-oxocaproic acid의 구조변화로 인해 내부표준물질로서의 역할을 수행하지 못한다는 것을 알게 되었다.

따라서 본 연구에서는 앞에서 설정한 전처리과정을 거쳐 tropic acid를 내부표준물질로 사용하여 GC/MS scan방법을 이용해 건강한 6세 미만의 어린이

Table 6. Concentration of urinary organic acids in healthy children

Acids	r	mmol/mol Creatinine		
		Median	From	To
LT	0.999	25.1	3.2	183.3
2HIB	0.999	23.6	2.3	94.4
GLCO	0.989	32.0	4.1	69.5
PY	0.890	5.5	1.5	28.0
OX	0.987	48.8	1.7	144.3
2HB	0.994	7.8	2.3	16.0
3HB	0.994	14.6	1.9	27.6
2HIV	0.996	8.2	1.9	15.7
2OB	0.977	14.1	3.3	24.9
MALO	0.982	16.2	0.2	17.4
MM	0.993	12.5	1.8	25.1
4HB	0.974	18.9	3.6	32.4
AA	0.948	13.4	1.1	16.5
CAP	0.994	12.5	2.3	18.4
EM	0.991	15.1	2.3	25.9
4HIV	0.988	17.7	5.0	61.8
ML	0.948	18.8	3.0	40.2
MS	0.992	7.3	2.5	13.0
UC	0.976	3.5	1.6	5.1
FU	0.995	9.9	1.8	20.2
AG	0.982	10.6	2.6	19.2
TM	0.975	1.3	0.1	2.5
GT	0.997	9.0	2.2	22.0
2MGT	0.999	6.3	1.2	17.7
3MGT	0.998	5.7	0.1	10.3
PG	0.995	20.3	4.2	40.2
AD	0.996	10.7	0.1	19.7
MLI	0.992	12.8	1.2	26.2
PL	0.999	2.4	0.1	8.6
PIM	0.994	10.8	0.8	20.0
3H3MGT	0.994	21.8	4.2	31.3
2OGT	0.991	60.4	1.0	100.1
4HPA	0.998	19.4	0.1	57.9
NAA	0.989	21.3	2.3	62.9
SA	0.994	21.7	1.6	24.8
TT	0.990	11.8	2.9	103.4
SUB	0.996	8.4	1.6	25.0
TCB	0.995	6.7	2.0	13.9
OT	0.991	6.5	0.1	16.2
GLTC	0.996	7.1	2.8	18.9
HIP	0.985	19.6	1.1	48.0
HG	0.991	6.9	0.1	15.2
CIT	0.994	35.4	8.9	148.7
SEB	0.998	8.9	0.3	15.9
4HPL	0.997	6.8	0.1	20.3
PAL	0.992	14.2	0.7	26.4
4HPP	0.977	12.3	0.1	21.3
AT	0.992	15.7	0.3	31.3
5HIAA	0.994	19.7	0.1	101.5
ST	0.997	25.6	0.1	87.6

r: correlation coefficient of calibration curve
 mmol/mol creatinine: the amount of the organic acid per
 mol of creatinine in the urine

소변 내에 존재하는 유기산들을 동시 분리 정량분석하였다.

앞에서 언급한 51종 유기산들의 검량곡선의 상관 계수값과 정상어린이들의 요로 배설되는 유기산들의 정량 분석 결과를 Table 6에 수록하였다.

결 론

본 연구에서는 요 중에 함유된 유기산들의 screening 방법 확립을 위한 다양한 분석조건을 통하여 다 음의 결과를 얻었고 이를 이용하여 정상 한국 어린이들의 유기산 함량분포를 얻었다.

1. 에틸아세테이트용매를 사용하여 LLE법으로 추출할 때 산성 조건의 pH를 0.1, 0.5, 1로 조절하여 실험한 결과 pH가 0.5일 때 회수율도 좋고 특히 정밀도가 가장 크게 나타났다.

2. 분석과정 중 케토산들을 안정화시키기 위한 옥심화과정을 첨가하여 비교실험하였다. 피루브산, 글리옥살산, 2-케토글루타르산 등의 케토산들에 대한 감도가 확실히 증가하였으나 screening할 때에는 오히려 다른 유기산들의 감도를 많이 감소시켜 이 과정을 첨가하지 않는 것이 좋은 결과를 보였다.

3. 분리과정 중 역추출과정을 첨가하여 유기산들을 분석한 결과 방해물질들이 많이 감소하였고 전체적으로 회수율이 증가하였으며 시료성분들의 크로마토그래피 성질이 좋아짐을 볼 수 있었다.

4. 51종의 유기산들에 대해 pH를 0.5로 조절하여 LLE법으로 추출해서 BSTFA 1% TMCS시약으로 TMS 유도체로 만들고 tropic acid를 내부표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하였을 때 상관계수 값이 0.970이상의 좋은 직선성을 보였으며 이를 토대로 6세 미만의 건강한 한국 어린이(16명) 요 내에 존재하는 유기산들을 동시에 분리, 정량분석하여 함량분포를 얻었다.

인 용 문 헌

1. Goodman, S. I.; Markey, S. P. *Diagnosis of Organic Acidemias by Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis*; Alan, R. Liss: New York, U. S. A., 1981.
2. Verhoeven, N. M.; Kulik, W.; Van de Heuvel, C. M. M.; Jakobs, C. J. *Inher. Metab. Dis.* 1995, 18(1), 45.

3. Niwa, T. *Special Issue, Clinical Mass Spectrometry*, *Clin. Chem. Acta.* **1995**, 241-242, Chap. 8.
4. *ibid*, Chap. 2, 3.
5. Liebich, H. M. *J. Chromatogr.* **1986**, 379, 347.
6. Bonham, J. R.; Downing, M.; Pollitt, R. J.; Manning, N. J.; Carpenter, K. H.; Olpin, S. E.; Allen, J. C.; Worthy, E. *Ann. Clin. Biochem.* **1994**, 31, 129.
7. General, F.; Buchman, C. *Clin. Chem.* **1994**, 40, 862.
8. Mardens, Y.; Kumps, A.; Planchon, C.; Wurth, C. *J. Chromatogr.* **1992**, 577, 341.
9. Wurth, C.; Kumps, A.; Mardens, Y. *J. Chromatogr.* **1989**, 491, 186.
10. Hoffmann, G.; Aramaki, S.; Hoffmann, E. B.; Nyhan, W. L.; Sweetman, L. *Clin. Chem.* **1989**, 35(4), 587.
11. Nakanishi, T.; Shimizu, A. *Rinsho Byori.* **1992**, 40(11), 1161.
12. Verhaeghe, B. T.; Lefevre, M. F.; De Leenheer, A. P. *Clin. Chem.* **1988**, 34, 1077.
13. Niwa, T.; Yoshizumi, H.; Emoto, Y.; Miyazaki, T.; Hashimoto, N.; Takeda, N.; Tatematsu, A.; Maeda, K. *Clin. Chem.* **1991**, 37, 159.
14. Tuchman, M.; McCann, M. T.; Johnson, P. E.; Lemieux, B. *Pediatr. Res.* **1991**, 30, 315.
15. Williams, V. P.; Ching, D. K.; Cederbaum, S. D. *Clin. Chem.* **1979**, 25, 1814.
16. Jakobs, C.; Bojasch, M.; Monch, E.; Rating, D.; Siemes, H.; Hanefeld, F. *Clin. Chim. Acta.* **1981**, 111, 169.
17. Liebich, H. M. P.; Pickert, A.; Tetschner, B. *J. Chromatogr.* **1984**, 289, 259.
18. Hoffmann, G.; Sweetman, L. *J. Chromatogr.* **1987**, 421, 336.
19. Thompson, J. A.; Markey, S. P. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1313.
20. Fitch, W. L.; Anderson, P. J.; Smith, D. H. *J. Chromatogr.* **1979**, 162, 249.
21. Jaffe, M. Z. *Physiol. Chem.* **1886**, 10, 391.
22. De Jong, A. P. J. M.; Elema, J.; van de Berg, B. J. T. *Biomed. Mass Spectrom.* **1980**, 7, 359.
23. Liebich, H. M.; Pickert, A.; Stierle, U.; Woll, J. *J. Chromatogr.* **1980**, 199, 181.
24. Greter, J.; Lindstedt, S.; Seeman, H.; Steen, G. *Clin. Chem.* **1980**, 26, 261.
25. Sweetman, L. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics; A Laboratory Manual.* 1991; p 143.
26. Deuz, P.; Kumps, A.; Mardens, Y. *Clin. Chem.* **1996**, 42, 1609.