

## GC/MS에 의한 담석과 담즙내의 Cholesterol, Bile Acids 및 Sterols의 동시 Profiling

梁允禎 · 李宜和 · 金賢珠<sup>1</sup> · 鄭鳳哲\*

한국과학기술연구원 생체대사연구센터

<sup>1</sup>국립충주산업대학교 교양학부

(1998. 1. 8 접수)

## Simultaneous Determination of Cholesterol, Bile Acids and Sterols in Human Bile Juices and Gallstones Using GC/MS

Yoon Jung Yang, Seon Hwa Lee, Hyunjoo Kim<sup>1</sup>, and Bong Chul Chung\*

Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and  
Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea

<sup>1</sup>Chungju National University, Division of General Education, Chungju 380-702, Korea

(Received January 8, 1998)

**요 약.** 담즙산 분비 저하 및 콜레스테롤의 과도한 분비는 담석 형성의 주된 원인으로 담즙내의 담즙산과 콜레스테롤 및 그 전구 물질인 스테롤의 상대적인 농도는 담즙 성분의 이상을 알아보기 위한 중요한 지표로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 염기를 이용한 가수 분해와 pH 14와 1에서 두 번의 액체-액체 추출을 거친 후, MSTFA/NH<sub>4</sub>I 혼합액으로 유도체화 시키는 전처리 방법과 GC/MS를 이용한 새로운 분석 방법을 설정, 담즙산과 스테롤 그리고 콜레스테롤의 동시 분석을 시도하였다. 그 결과 회수율은 73.56-96.95% 이었고 within-a-day 및 day-to-day 분석의 RSD 값은 각각 1.72-13.79%, 0.68-14.10% 이었으며, 이 방법을 간내 담석증 환자에 적용하여 담즙과 담석내에 존재하는 7종의 스테롤과 5종의 담즙산, 그리고 콜레스테롤의 농도 및 그들간의 상대적인 농도 분포를 측정한 결과 담즙과 담석에서 현저히 다른 차이를 보였다.

**ABSTRACT.** Cholesterol supersaturation in bile, which causes gallstone formation, is the result of low bile acid secretion or high cholesterol secretion. The quantitative analysis of cholesterol, bile acids and sterols which are precursors of cholesterol have been used to examine the changes in bile component. We described a simple, sensitive and reproducible method for simultaneous determination of cholesterol, five bile acids and seven sterols in human bile juices and gallstones by capillary column gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Clinical samples were hydrolyzed by alcoholic KOH, extracted twice (pH 14 and 1) and derivatized to trimethylsilyl (TMS) ether with MSTFA/NH<sub>4</sub>I (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide/ammonium iodide) mixture in order to be detected on the GC/MS. The good quality control data were obtained through within-a-day and day-to-day test (RSD values were 1.72-13.79%, 0.68-14.10%, respectively) and the recovery range of them was 73.56-96.95%. Using this method, biliary and gallstone compositions in the patients with intrahepatic stones were analyzed. The amounts and its relative distribution of cholesterol, bile acids and sterols showed different pattern in bile juices and gallstones.

### 서 론

담즙산은 카르복시기와 히드록시기가 포함된 스테로이드 골격구조를 가지며 그 중, cholic acid와

chenodeoxycholic acid는 1차 담즙산으로써 간에서 콜레스테롤로부터 합성되어 주로 glycine과 taurine 이 결합된 형태로 존재한다. 십이지장으로 분비된

1차 담즙산의 탈수화로 2차 담즙산인 deoxycholic acid와 lithocholic acid가 생성되는데, 이들은 주로 회장(ileum) 말단부에서 1차 담즙산들과 함께 간으로 운반되는 장관 순환(enterohepatic cycle)을 통해 재흡수된다. 이렇게 생성된 담즙산은 담낭에서 농축, 저장되어 지방의 소화와 흡수를 도우며 간에서 지질의 분비에도 관여하는 등 신체 기능과 건강 유지에 있어서 필수적이다.<sup>1</sup> 그러므로 장관 순환계의 이상은 2차적으로 간의 담즙 지질 합성과 분비에 영향을 미치게 되며, 담즙내 지질 조성 변화로 인한 콜레스테롤의 과포화와 침전으로 이어져 담석형성을 초래한다.

담즙내에 존재하는 대부분의 콜레스테롤은 간에서 생성된 것으로 비수용성이며 담즙내에서 담즙산염과 인지질 등이 혼합된 micelle 형태로 용해되어 있는데 이들 구성 물질간의 상호 조성에 따라 그 용해정도가 달라지므로 담즙내에서 콜레스테롤의 급격한 증가나 담즙산과 인지질 농도의 감소가 불용성 콜레스테롤을 형성하게 된다.<sup>2</sup> 비록 간에서 콜레스테롤이 포화된 담즙생성이 담석형성의 선행조건이나 그 절대량보다는 구성 물질간의 상대적인 농도의 변화가 중요하므로 담즙내 콜레스테롤의 용해를 좌우하는 성분을 분석하는 것이 담석형성원인을 규명하는데 도움이 되리라 여겨진다.<sup>3</sup> 또한 콜레스테롤의 체내 대사작용을 알아보기 위해서는 콜레스테롤 합성의 indicator인 cholesterol precursor sterol (lanosterol, lathosterol, desmosterol)과 흡수의 indicator인 plant sterol(campesterol, sitosterol) 등의 noncholesterol sterol들을 분석할 필요가 있다.<sup>4-7</sup> Noncholesterol sterol들의 경우, 농도가 매우 낮아서 이들이 담석형성에 결정적인 역할을 한다고 보기는 어렵지만 콜레스테롤 대사과정에 관련된 식이습관이나 유전적 인자들의 영향을 받아 콜레스테롤 합성의 급성, 만성적인 변화를 반영, 체내 콜레스테롤 농도의 변화를 나타낸다.<sup>8-9</sup>

이와같이 담즙의 결석형성경향을 알아보기 위해서는 다양한 담즙 구성 물질간의 상대적인 조성과 콜레스테롤 농도를 확인할 필요가 있으나 현재까지는 콜레스테롤과 담즙산, 그리고 스테롤에 대해 각각 다른 전처리와 검출과정을 실시하여 왔다.<sup>15,16</sup> 이처럼 성분들의 농도가 여러 과정에서 측정될 경우 각 단계별로 오차가 개입될 여지가 있어 측정값의 신뢰성이 떨어질 수 있다. 그러므로 동일한 처리방

법과 검출조건에서의 동시 측정이 이들 물질들의 정확한 농도 측정과 나아가 담석형성의 원인과 메커니즘을 밝히는데 필요하다고 여겨진다.

그러나 생체물질내의 담즙산과 스테롤 분석은 낮은 농도로 인해 측정에 어려움이 있다. 분광학, radioimmunoassay, thin-layer chromatography(TLC), gas chromatography(GC), high performance liquid chromatography(HPLC) 그리고 gas chromatograph/mass spectrometry(GC/MS) 등이 생체물질분석에 이용되어 왔으며, 특히 SIM(selected ion monitoring)방법을 사용한 GC/MS<sup>10-13</sup>가 극미량으로 존재하는 내인성 물질들의 확인과 정량에 좋은 감도를 나타내 신뢰성이 높은 분석방법으로 활용되고 있다.<sup>14</sup> 따라서 본 연구에서는 담석 및 담즙에 적용이 가능하며 한번의 시료 전처리로 콜레스테롤을 비롯하여 담즙산과 스테롤들을 동시에 검출할 수 있는 방법으로서, 염기를 이용한 가수 분해와 pH 14와 1에서 두 번의 액체-액체 추출을 거친 후 이를 MSTFA/NH<sub>4</sub>I 500:1(v:w) 혼합용액으로 유도체화 하는 전처리 방법과 GC/MS에서의 분석조건을 확립, 한번의 시료처리로 대상물질인 콜레스테롤과 5종의 담즙산(cholic acid, chenodeoxycholic acid, lithocholic acid, deoxycholic acid, ursodeoxycholic acid), 7종의 스테롤(cholestanol, coprosterol, desmosterol, campesterol, sitosterol, lathosterol, lanosterol)의 동시분석을 시도하여 이를 기존의 담즙산과 스테롤 각각의 분석법 결과와 비교하여 보았으며, 간내 담석증 환자의 담즙과 담석에서 대상물질들의 분포경향을 알아보았다.

## 실 험

### 생체 시료의 수집

실험에 사용한 간내 담석증 환자 33인의 담석 및 담즙 시료는 중앙병원(서울 송파구 풍납동 소재)으로부터 수집하여 실험하기 전까지 담즙은 -20°C에서, 담석은 밀봉한 상태로 4°C에서 냉장, 보관하였다.

### 기기 및 시약

**측정 기기 및 작동 조건.** Hewlett-Packard(HP) 5890A gas chromatograph(GC)에 5970B Series mass selective detector(MSD)를 연결하여 사용하였고, 모든 시료는 HP 7673A autosampler를 이용하여 GC에 주입하였다. Data system으로는 HP G1701AA MSD

ChemStation을 이용하였고 chromatogram과 mass spectrum은 HP LaserJet 5p Printer로 부터 얻었다. 시료주입장치는 300 °C로 고정시켰으며 주입 방법은 split mode로써 ratio는 1:8로 조절하였고 이동상 기체는 헬륨으로써 column head pressure를 82.8 kPa (12 psi)로 하였다. 분리관은 Ultra-1(길이 33 m, 내경 0.20 mm, film thickness 0.11 μm)을 사용하였으며, 분리관의 온도는 180 °C에서 270 °C까지 5 °C/min으로 올리고, 3분간 머무른 후 다시 1 °C/min으로 290 °C까지 올린 다음 10 °C/min으로 300 °C까지 상승시켜 2분간 유지 시켰다. 이온화에 사용한 전자 에너지는 70 eV 이었고 전처리된 시료들을 분석하기 위해 질량 스펙트럼상의 특성 이온(characteristic ion)만을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring(SIM)방법을 이용하였으며 MSD의 electron multiplier는 autotune값보다 400 V 더 증가시켜 가동하였다. 또한 이 때 선택된 이온들을 Table 1에 나타내었고 dwell time은 50 m sec로 조절하였다.

시 약. 본 실험과정에서 사용한 스테롤은 coprosterol, cholesterol, cholestanol, desmosterol, lathosterol, campesterol, lanosterol, sitosterol이고 담즙산은 lithocholic acid(LCA), deoxycholic acid(DCA), chenodeoxycholic acid(CDCA), cholic acid(CA), ursodeoxycholic acid(UDCA)이며 내부 표준 물질(ISTD)은 5α-cholestane으로써 모두 Sigma사(미국) 특급 시약을 사용하였다. 표준 용액은 0.01 g을 정확히 칭량한 다음 메탄올로 1,000 ppm이 되게 만든 후, 10배 희석한 것을 냉장 보관하면서 사용하였다.

2 M KOH 용액은 90% 에탄올에 용해시켜 제조하였고, 유도체화 시약은 MSTFA(*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide)와 ammonium iodide를 Sigma사(미국)로 부터 구입하여, MSTFA와 NH<sub>4</sub>I를 500:1(v:w)의 비율로 섞은 용액을 사용하였다.

### 실험 방법

**콜레스테롤, 담즙산 및 스테롤 profiling을 위한 시료 전처리 과정.** 100 μL의 담즙 또는 10 mg의 담석을 취하여 0.1% butylated hydroxytoluene 100 μL와 내부 표준 물질인 5α-cholestane(5 μg)를 넣어주었다. 2 M KOH 용액을 1 mL 가해 80 °C에서 30분간 유지시킨후 실온으로 식히고 2,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 용액을 또다른 시험관에 옮긴뒤 증류수 1 mL를 넣었다. 이를 헥산 5 mL로 추출하여 헥산층은 증발시키고, 수층은 염산을 이용하여 pH를 1로 맞춘 뒤 에틸아세테이트 5 mL로 추출하였다. 앞의 헥산층을 증발시킨 시험관에 다시 에틸아세테이트 추출액을 넣어 증발시켰다. 추출된 스테롤과 담즙산들을 GC/MS로 검출하기 위하여 MSTFA/NH<sub>4</sub>I의 500:1(v:w) 혼합물 50 μL를 가하고 60 °C에서 30분간 반응시켜 TMS ether 유도체를 만든 후 GC/MS에 1 μL를 주입하였다.

**표준 검정 곡선의 작성.** 콜레스테롤의 담즙 및 담석내 농도는 그 차이가 매우 크므로 각각의 검정 농도범위를 담즙에서는 100-2,000 μg/mL, 담석에서는 1,000-20,000 μg/100 mg로 달리하였고, 담즙산은 담즙과 담석에서 각각 10-1,000 μg/mL, 10-1,000 μg/100 mg, 그리고 스테롤은 0.1-100 μg/mL, 0.1-100 μg/100 mg으로 정한 뒤 대상 물질들을 혼합한 6개의 검정용 표준 혼합물을 만들었다. 이 검정용 표준 혼합물들을 위의 실험 방법에 따라 추출한 후 MSTFA/NH<sub>4</sub>I 500:1(v:w) 혼합용액으로 유도체화시켜 GC/MS로 분석하여 각각의 검정곡선을 얻었다. 그 결과 모든 표준 검정곡선은 정량범위내에서 직선성( $r > 0.978$ )을 나타내었다.

**회수율 및 정확도, 정밀도 시험.** 임의의 담석 시료에 콜레스테롤은 10.00, 50.00, 100.00 μg/mg, 담즙

Table 1. Characteristic ions and relative retention times of TMS-derivatized cholesterol, bile acids and non-cholesterol sterols for detection by GC/MS

Compounds	Characteristic ion (m/z)	Relative Retention time*
Coprosterol	445, <u>370</u> , 355	1.310
Cholesterol	<u>458</u> , 368, 329	1.222
Cholestanol	460, <u>445</u> , 215	1.322
Desmosterol	456, 441, <u>343</u>	1.349
Lathosterol	458, <u>443</u> , 255	1.375
Campesterol	472, <u>382</u> , 343	1.441
Lanosterol	498, 483, <u>393</u>	1.544
Sitosterol	486, <u>396</u> , 357	1.563
Lithocholic acid	520, 505, <u>430</u>	1.445
Deoxycholic acid	593, 428, <u>255</u>	1.521
Chenodeoxycholic acid	<u>428</u> , 413, 255	1.556
Cholic acid	682, 517, <u>253</u>	1.562
Ursodeoxycholic acid	593, <u>518</u> , 428	1.604

\*5α-Cholestane was used as internal standard (retention time: 19.461). Quantitative ions are underlined.

산은 1.00, 5.00, 10.00 µg/mg, 그리고 비교적 농도가 낮은 스테롤은 0.10, 0.50, 1.00 µg/mg씩을 가한 후의 총 스테롤과 담즙산의 농도를 정량하여, 그 값들을 비교해 봄으로써 본 분석 방법의 정확도 및 정밀도를 시험하였다. Day-to-day 분석의 경우 하루에 한번씩 3일간 시험하였으며, within-a-day 분석은 하루에 세번 실험하여 그 결과를 비교하였다. 또한 위와 같은 양을 혼합한 표준혼합물을 전처리과정을 거치지 않고 바로 유도체화 후 GC/MS로 분석한 결과를 위의 실험방법을 거친 뒤의 각 대상 물질들의 농도와 비교하여 각각의 평균값으로써 본 실험 방법의 회수율을 알아 보았다.

### 결과 및 고찰

**콜레스테롤, 담즙산 및 스테롤 동시 검출 방법의 확립.** 담석 및 담즙내에 존재하는 콜레스테롤과 담즙산, 그리고 스테롤의 동시 분석을 위한 전처리 과정에서는 먼저 포합형태의 담즙산과 스테롤을 비포합된 상태로 만들어 주는 단계가 필요하다. 본 실험에서는 첫 단계로 강염기를 이용한 가수분해를 실시하여 담즙산의 주된 포합물질인 taurine과 glycine을 분해하고, ester 형태로 존재하는 스테롤들을 비누화 시킴으로써 free 상태의 스테롤로 전환시켰다. 그 다음으로 액체-액체 추출(liquid-liquid extraction) 과정에서는 대상 물질들의 pK<sub>a</sub> 값을 고려하여 스테롤은 pH 14에서, 그리고 담즙산을 pH 1에서 두단계로 추출하였다. 가수분해 후 용액의 액성이 강염기성인 상태에서 바로 추출 시 스테롤은 대부분 추출 되나 담즙산의 경우는 회수율이 떨어지므로 산성에서의 추출과정이 추가로 필요하였고 기존 방법<sup>15,16</sup>에서도 스테롤은 염기성에서, 담즙산은 산성에서 추출하고 있다.

그 구조상에서 극성이 큰 히드록시기와 카르복시기를 포함하는 담즙산과 역시 히드록시기를 갖고 있는 스테롤 분자는 GC상에서 분리관 내벽에 흡착이 일어나 분리가 어려우므로 시료의 좋은 분리와 감도 있는 결과를 위해 작용기들을 비극성 작용기로 치환해주는 유도체화 반응이 필수적이다. 이에 위의 두 극성기들을 acetate, trifluoroacetate, trimethylsilyl (TMS) ether 등의 형태로 안정화시키는 몇몇 유도체화 방법이 제시되어 왔으며,<sup>14</sup> 일반적으로 담즙산의

경우에는 ethanolic HCl 등을 이용한 카르복시기의 알킬에스터화 반응이 히드록시기의 유도체화에 선행되었다. 그러나 스테롤과의 동시 분석에서는 desmosterol과 lanosterol 등이 단일 생성물을 형성하지 못하므로 이 방법이 정량분석에 적당치 않음을 확인하였다. 이에 본 연구에서는 TMS기 치환 시약을 이용한 두 작용기의 동시 치환을 시도하였다. MSTFA/TMS-Cl(100:1) 혼합용액과 MSTFA/NH<sub>4</sub>I(500:1) 혼합용액을 사용해본 결과, TMS-Cl을 사용한 혼합용액의 경우 대상 물질들의 전체적인 abundance가 NH<sub>4</sub>I를 사용한 결과 보다 낮았고, 무엇보다도 담즙산 중에서 유도체화 후의 cholic acid의 재현성에 문제점을 나타내었으므로 본 연구에서는 MSTFA/NH<sub>4</sub>I, 500:1(v:w) 혼합용액을 사용하여 담즙과 담석시료내 담즙산과 스테롤류의 GC/MS에서의 동시분석방법을 확립하였다.

**TMS 유도체화에 의한 콜레스테롤, 담즙산 및 스테롤의 질량 스펙트럼.** 대상이 되는 5가지 담즙산과 7종의 스테롤 및 콜레스테롤 표준물질들을 MSTFA/NH<sub>4</sub>I, 500:1(v:w) 혼합용액으로 유도체화한 각각의 질량 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었고 이때의 머무름시간과 특성이온을 정리하여 Table 1에 보였다.

담즙산과 스테롤은 모두 cyclopentanohydrophenanthrene ring의 구조를 가지고 있으며, 대상 스테롤 중 cholestanol과 coprosterol을 제외한 lanosterol, desmosterol, lathosterol 등의 콜레스테롤 전구물질과 plant 스테롤인 campesterol, β-sitosterol은 콜레스테롤과 같이 B 고리에 이중결합을 하나씩 포함하고 있다.

담즙산의 경우 히드록시기와 카르복시기가 하나씩 있는 분자량 376의 LCA에서만 TMS-ether화된 분자이온인 m/z 520이 나타나고 그외에 CA, DCA, CDCA, UDCA는 [M]<sup>+</sup>가 나타내지 않는 반면 [M-15]<sup>+</sup>인 m/z 682, 593 등이 특징적으로 나타난다. DCA, CDCA, UDCA의 분자량은 모두 392로써 각각 두 개의 히드록시기와 한 개의 카르복시기를 가지므로 같은 형태의 토막내기과정(fragmentation)을 거치며 특성이온 역시 m/z 593, 428, 255로 동일하게 나타나지만, 머무름 시간에 차이가 있고 주 봉우리(base peak)가 각각 m/z 255, 428, 518로 다르기 때문에 GC 상에서 분리가 가능하다.

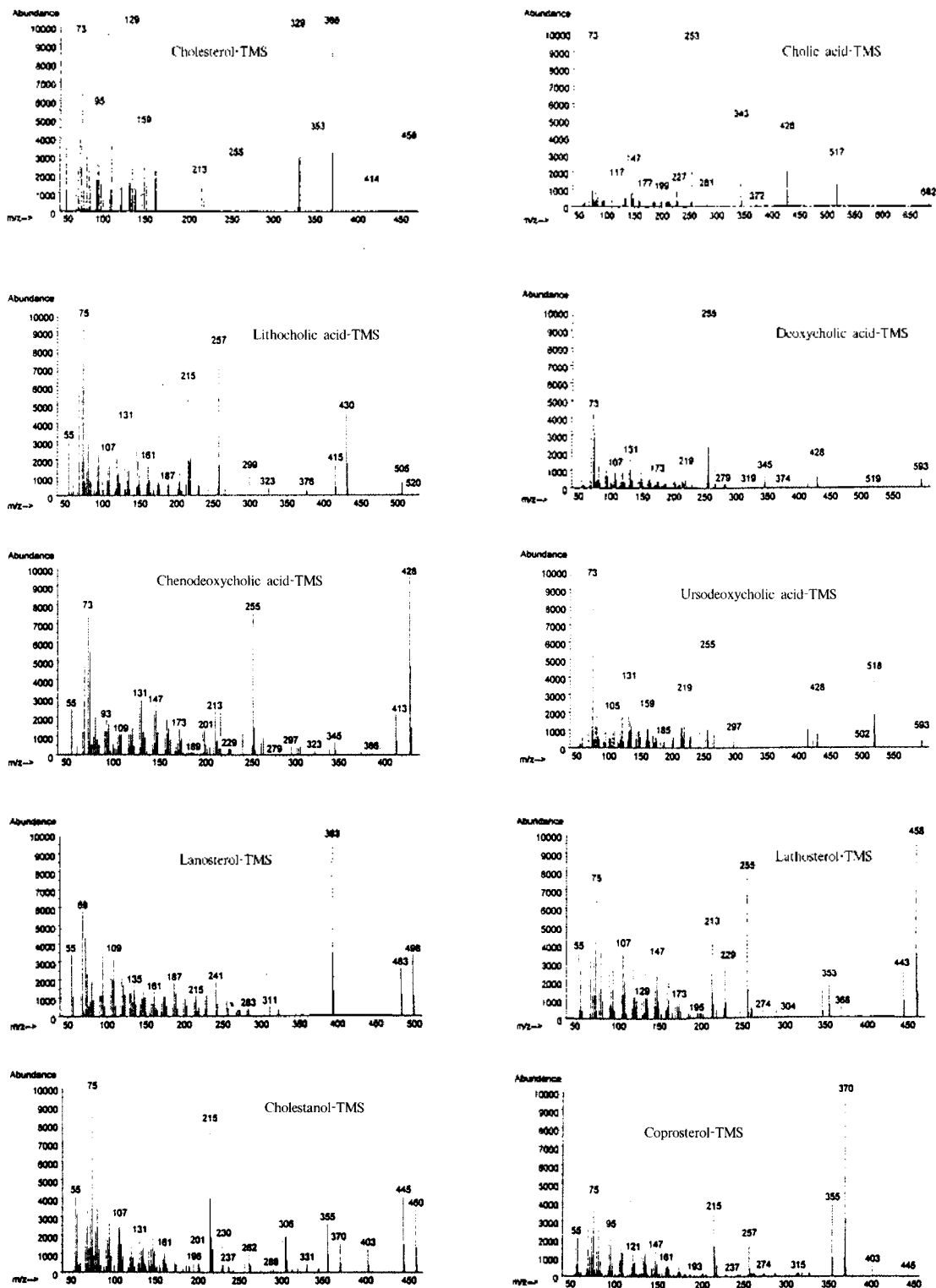


Fig. 1. Mass spectra of TMS-derivatized cholesterol, bile acids and sterols.

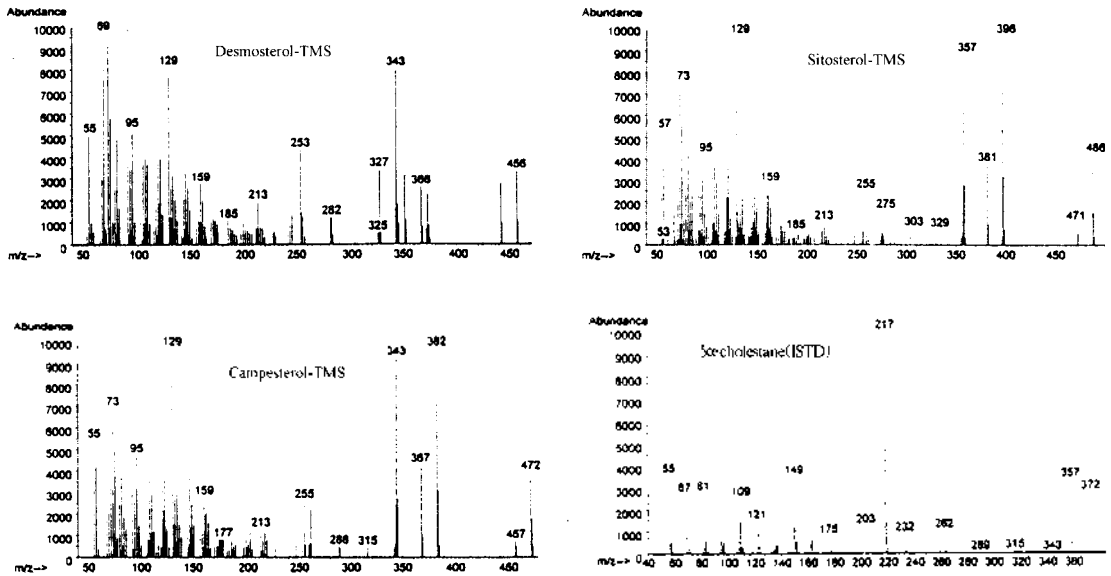


Fig. 1. Continued.

Table 2. Precision, accuracy and recovery data for determination of cholesterol and noncholesterol sterols in human gallstones

Compounds Added Amount ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Recovery* (%)	Within-a-day (n=3)		Day-to-day (n=3)	
		Mean $\pm$ SD	RSD (%)	Mean $\pm$ SD	RSD (%)
Cholesterol	96.95				
0.00		144.70 $\pm$ 15.57	10.76	136.87 $\pm$ 10.64	7.77
10.00		153.27 $\pm$ 19.66	12.82	145.70 $\pm$ 16.24	11.14
50.00		212.97 $\pm$ 26.79	12.58	218.78 $\pm$ 21.78	9.96
100.00		235.03 $\pm$ 28.57	12.15	250.93 $\pm$ 14.75	5.88
Coprosterol	87.21				
0.00		0.71 $\pm$ 0.01	2.11	0.70 $\pm$ 0.03	3.61
0.10		0.85 $\pm$ 0.02	2.28	0.78 $\pm$ 0.05	6.82
0.50		1.13 $\pm$ 0.10	8.92	1.28 $\pm$ 0.06	4.91
1.00		1.80 $\pm$ 0.03	1.72	1.77 $\pm$ 0.02	1.09
Cholestanol	84.35				
0.00		1.92 $\pm$ 0.21	10.94	1.89 $\pm$ 0.18	9.52
0.10		2.03 $\pm$ 0.18	8.90	1.98 $\pm$ 0.11	5.56
0.50		2.51 $\pm$ 0.35	13.79	2.54 $\pm$ 0.36	14.10
1.00		3.23 $\pm$ 0.34	10.53	3.18 $\pm$ 0.23	7.23
Desmosterol	79.31				
0.00		0.54 $\pm$ 0.02	4.15	0.54 $\pm$ 0.05	9.79
0.10		0.70 $\pm$ 0.04	5.19	0.68 $\pm$ 0.05	8.53
0.50		1.24 $\pm$ 0.15	12.49	1.30 $\pm$ 0.14	10.65
1.00		1.75 $\pm$ 0.10	5.44	1.76 $\pm$ 0.11	6.27
Lathosterol	87.27				
0.00		2.76 $\pm$ 0.19	6.88	2.51 $\pm$ 0.17	6.77
0.10		2.91 $\pm$ 0.19	6.69	2.98 $\pm$ 0.26	8.91
0.50		3.32 $\pm$ 0.17	5.04	3.38 $\pm$ 0.28	8.26
1.00		4.28 $\pm$ 0.31	7.25	4.03 $\pm$ 0.46	11.41

Table 2. Continued

Compounds Added Amount ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Recovery* (%)	Within-a-day (n=3)		Day-to-day (n=3)	
		Mean $\pm$ SD	RSD (%)	Mean $\pm$ SD	RSD (%)
Campesterol	88.37				
0.00		1.99 $\pm$ 0.10	5.02	2.21 $\pm$ 0.09	4.07
0.10		2.14 $\pm$ 0.11	5.26	2.41 $\pm$ 0.20	8.11
0.50		2.62 $\pm$ 0.27	10.31	2.70 $\pm$ 0.22	8.15
1.00		3.42 $\pm$ 0.24	7.14	3.64 $\pm$ 0.15	4.01
Lanosterol	73.67				
0.00		0.91 $\pm$ 0.04	4.40	0.87 $\pm$ 0.01	1.42
0.10		1.07 $\pm$ 0.08	7.48	0.96 $\pm$ 0.08	8.01
0.50		1.52 $\pm$ 0.09	6.16	1.48 $\pm$ 0.10	6.60
1.00		2.11 $\pm$ 0.16	7.75	2.15 $\pm$ 0.02	1.02
Sitosterol	87.07				
0.00		1.01 $\pm$ 0.07	6.49	0.93 $\pm$ 0.01	0.68
0.10		1.23 $\pm$ 0.11	9.35	1.11 $\pm$ 0.03	3.12
0.50		1.76 $\pm$ 0.11	5.99	1.75 $\pm$ 0.09	5.02
1.00		2.31 $\pm$ 0.23	9.00	2.40 $\pm$ 0.02	0.75

\*Recovery is average value for the three different amounts added.

Table 3. Precision, accuracy and recovery data for determination of bile acids in human gallstones

Compounds Added Amount ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Recovery* (%)	Within-a-day (n=3)		Day-to-day (n=3)	
		Mean $\pm$ SD	RSD (%)	Mean $\pm$ SD	RSD (%)
Lithocholic acid	81.84				
0.00		0.70 $\pm$ 0.07	10.01	0.58 $\pm$ 0.03	5.21
1.00		1.78 $\pm$ 0.15	8.66	1.88 $\pm$ 0.10	5.36
5.00		7.07 $\pm$ 0.82	11.60	7.30 $\pm$ 0.58	7.94
10.00		11.51 $\pm$ 0.69	5.98	12.02 $\pm$ 0.20	1.69
Deoxycholic acid	73.56				
0.00		1.53 $\pm$ 0.11	7.50	1.60 $\pm$ 0.05	3.09
1.00		3.00 $\pm$ 0.14	4.56	3.14 $\pm$ 0.08	2.46
5.00		7.93 $\pm$ 0.46	5.18	7.73 $\pm$ 0.64	8.28
10.00		12.30 $\pm$ 0.51	4.16	12.72 $\pm$ 0.32	2.53
Chenodeoxycholic acid	76.80				
0.00		12.01 $\pm$ 0.57	4.76	12.17 $\pm$ 0.16	1.32
1.00		13.23 $\pm$ 1.30	9.85	13.07 $\pm$ 0.31	2.37
5.00		17.41 $\pm$ 1.40	8.07	18.27 $\pm$ 1.04	5.71
10.00		25.47 $\pm$ 0.76	2.97	25.10 $\pm$ 1.68	6.69
Cholic acid	76.89				
0.00		5.51 $\pm$ 0.27	4.93	5.42 $\pm$ 0.14	2.56
1.00		6.95 $\pm$ 0.50	7.18	7.04 $\pm$ 0.48	6.81
5.00		10.86 $\pm$ 0.68	6.28	10.83 $\pm$ 1.02	9.40
10.00		16.69 $\pm$ 1.36	8.12	16.30 $\pm$ 1.52	9.34
Ursodeoxycholic acid	75.27				
0.00		0.99 $\pm$ 0.04	4.51	0.86 $\pm$ 0.07	8.07
1.00		1.97 $\pm$ 0.09	4.60	2.08 $\pm$ 0.15	7.37
5.00		6.94 $\pm$ 0.51	7.32	7.14 $\pm$ 0.17	2.39
10.00		12.23 $\pm$ 1.12	9.12	12.41 $\pm$ 0.46	3.71

\*Recovery is average value for the three different amounts added.

콜레스테롤을 비롯한 스테롤들은 담즙산과 달리 coprosterol을 제외하곤 모두 유도체화된 분자이온 peak를 보였고, 모든 스테롤에서 [M-15]<sup>+</sup>, [M-90]<sup>+</sup>, [M-105]<sup>+</sup>에 해당하는 이온이 특징적으로 나타났으나 cholesterol과 lanosterol에서는 각각 [M-15]<sup>+</sup>와 [M-90]<sup>+</sup>가 보이지 않았다. 에피머(epimer)인 coprosterol과 cholestanol은 토막내기과정이 같은 형태로 이루어지나 주 봉우리(base peak)가 m/z 370, 215로 서로 다르고 [M]<sup>+</sup> 인 m/z 460이 cholestanol에서만 나타나며 머무름 시간도 달라서 확인을 할 수 있었다.

내부표준물질로 사용한 5 $\alpha$ -cholestane은 cholestanol의 히드록시기가 수소로 치환된 것으로서 [M]<sup>+</sup> 인 m/z 372와 그 밖의 특성이온으로 [M-15]<sup>+</sup>인 m/z 357을 비롯하여 m/z 262, 217 등이 존재하였다.

**콜레스테롤, 담즙산 및 스테롤분석의 회수율 및 정확도, 정밀도.** 본 연구에서 설정한 담즙산과 스테롤의 동시검출을 위한 전처리 과정의 회수율을 시험해본 결과 73.56-96.95%로서 스테롤은 기존의 스테롤 분석법의 결과와 거의 비슷했고 담즙산의 경우는 기존 담즙산 분석법으로 정량한 농도의 73.14-92.27%의 값을 보였다.

그리고 이 방법의 within-a-day 분석과 day-to-day 분석 결과 각각의 RSD 값이 0.68-13.79%, 1.72-14.22%로써 대부분 10% 이하의 결과를 보였으며, 스테롤과 담즙산에 대한 회수율 및 정확도와 정밀도 실험의 결과를 Table 2와 3에 각각 나타내었다.

**담석 및 담즙 시료내의 콜레스테롤, 담즙산 및 스테롤 농도 결정.** 앞에서 제시한 전처리 과정과 GC/MS의 SIM 방법(Fig. 2)을 이용하여 간내 담석증 환자(n=33)의 담석과 담즙시료내에 존재하는 콜레스테롤과 담즙산 및 스테롤의 농도를 결정하였다. 또한 기존의 방법<sup>15,16</sup>으로도 정량 분석을 시도하여 그 결과를 Table 4와 5에 비교하여 나타내었다. 먼저 스테롤 농도를 살펴보면, 본 방법에서 얻은 농도와 기존의 스테롤 분석법의 결과를 비교해 볼 때 담즙에서는 기존 방법에 의해 결정된 농도가 약간 높았으나 담석에서는 거의 비슷하였고, 담즙의 desmosterol은 다소 편차를 보였는데 이는 그 절대량이 적은 때문이라 여겨진다. 담즙산의 경우도 두 방법으로 정량한 스테롤 농도간의 높은 일치성에 비해서는 약간 낮지만 기존의 담즙산 분석법에 의한 정량농도의 73.14-92.27%의 값을 보였고 UDCA의 경우는 양쪽

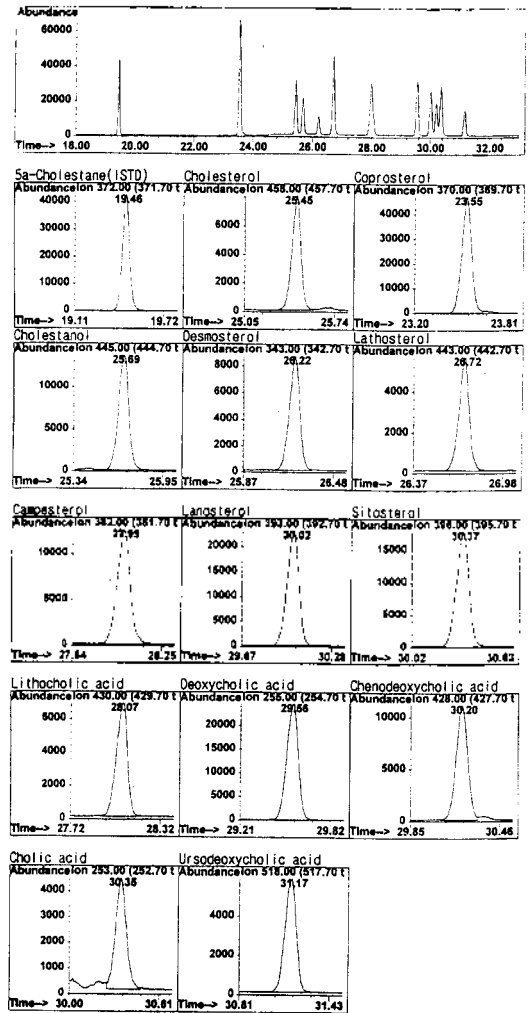


Fig. 2. SIM chromatogram of TMS-derivatized cholesterol, bile acids and sterols.

모두에서 본 방법으로 정량한 농도가 더 높았다 (145.79%). 이러한 결과로 볼 때 앞으로 담즙산과 스테롤의 분석시 각각 다른 과정을 거쳐야 하는 기존의 방법을 대신하여 본 방법으로써 한번의 시료전처리로 콜레스테롤을 비롯한 담즙산과 스테롤들의 동시 검출이 가능하리라 생각된다.

본 실험 방법에 의해 결정된 농도를 바탕으로, 간내 담석증 환자(n=33)의 담석과 담즙시료내에 존재하는 콜레스테롤과 담즙산 그리고 스테롤의 상대적인 농도 분포를 살펴보면, 담석과 담즙 모두에서 콜레스테롤이 가장 큰 농도를 나타냈으며 다음으로 1차 담즙산들인 CDCA와 CA가 차례로 높게 나타났



Table 4. Concentration of cholesterol, noncholesterol sterols and bile acids in bile juices from 33 patients

Compounds	Current Method <sup>15,16</sup>		New Method	
	Range	Mean	Range	Mean
Cholesterol	33.10-323.24	136.30	44.14-235.64	125.38
Coprosterol	0.00-0.01	0.01	0.00-0.01	0.01
Cholestanol	0.06-1.45	0.58	0.11-1.63	0.51
Desmosterol	0.01-0.02	0.01	0.01-0.05	0.02
Lathosterol	0.01-1.43	1.09	0.04-3.34	0.95
Campesterol	0.03-1.61	0.79	0.05-1.87	0.59
Lanosterol	0.01-1.83	0.89	0.02-2.12	0.82
Sitosterol	0.05-2.35	1.16	0.05-4.05	0.93
Lithocholic acid	0.00-16.01	10.03	0.00-25.32	7.38
Deoxycholic acid	0.00-42.36	21.37	0.00-47.01	15.63
Chenodeoxycholic acid	33.45-99.59	57.32	16.36-71.45	52.89
Cholic acid	4.06-545.16	48.95	17.01-69.99	36.28
Ursodeoxycholic acid	0.00-57.18	14.77	3.11-49.70	19.56

unit: 100× μg/μL.

Table 5. Concentration of cholesterol, noncholesterol sterols and bile acids in gallstones from 33 patients

Compounds	Current Method <sup>15,16</sup>		New Method	
	Range	Mean	Range	Mean
Cholesterol	241.04-2922.10	1496.77	342.23-2217.01	1479.30
Coprosterol	0.02-0.08	0.04	0.02-0.07	0.04
Cholestanol	1.78-15.44	9.89	1.53-29.03	7.98
Desmosterol	0.16-0.33	0.22	0.15-0.33	0.23
Lathosterol	0.25-489.4	13.27	1.24-78.66	13.94
Campesterol	1.67-11.42	3.76	0.94-8.91	4.21
Lanosterol	0.29-5.67	1.85	0.43-4.59	1.83
Sitosterol	0.85-7.59	2.97	0.49-6.47	3.01
Lithocholic acid	0.00-123.41	25.11	15.83-68.32	19.09
Deoxycholic acid	1.01-56.22	40.89	10.48-64.77	31.56
Chenodeoxycholic acid	7.34-400.15	83.07	36.64-156.30	70.09
Cholic acid	1.34-350.66	60.42	26.47-108.12	44.67
Ursodeoxycholic acid	0.21-20.02	10.09	0.78-23.33	14.71

unit: 100× mg/100 mg of stone.

다. 대상 담즙산 농도를 모두 합산한 총담즙산 농도를 콜레스테롤과 비교시 총담즙산 농도가 담석에서 1.80 mg/100 mg of stone, 그리고 담즙에서 1.32 μg/μL인 반면 콜레스테롤은 각각 14.79 mg/100 mg of stone, 1.25 μg/μL로 두 시료간에 현저한 차이를 나타냈다(Fig. 3). 따라서 조성면에서 담즙의 경우 콜레스테롤 48.05%, 총담즙산 50.48%, 총스테롤이 1.47%로써 총담즙산 농도가 콜레스테롤 농도보다 약간 높게 나타난 반면, 담석에서는 콜레스테롤이 총담즙산 농도에 비해 월등히 높은 경향(콜레스테롤, 총담즙산, 총스테롤이 각각 87.50%, 10.65%, 1.85%)을 나

타내어 담즙과 차이를 보였으며 콜레스테롤을 포함한 총스테롤중의 콜레스테롤의 비율은 담즙과 담석에서 각각 97.04, 97.93%로 비슷하였다.

스테롤 중에서는 콜레스테롤 전구물질인 lathosterol이 양쪽 모두에서 큰 값을 보였으며 그 다음으로 담즙에서는 plant sterol들인 campesterol과 sitosterol이 높게 나타난 반면, 담석에서는 cholestanol이 더 높게 나타나 차이를 보였다. 또한 스테롤들의 절대 농도는 담즙보다 담석에서 모두 높았다. 그러나 모든 대상시료들에서 콜레스테롤 몰 농도당 스테롤의 몰 농도로 나타낸 상대 농도의 평균값을 담석

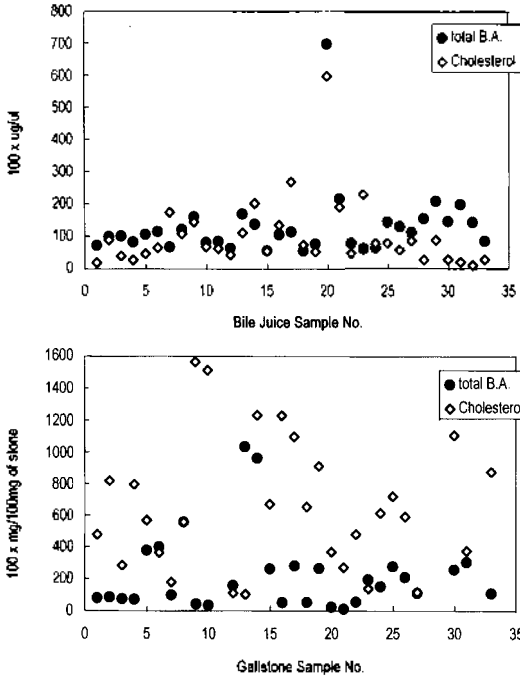


Fig. 3. Concentration range of cholesterol and total bile acids (33 patients).

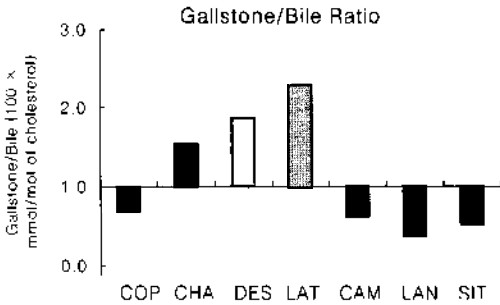


Fig. 4. Gallstone/bile juice concentration ratio of sterols (33 patients). COP: Coprosterol, CHA: Cholestanol, DES: Desmosterol, LAT: Lathosterol, CAM: Campesterol, LAN: Lanosterol, SIT: Sitosterol.

과 담즙에서 비교해 보면(Fig. 4), coprosterol과 campesterol, sitosterol 등의 plant sterol 그리고 methylated cholesterol precursor sterol인 lanosterol이 담즙에서 높게 나타나며 담석에서는 cholestanol과 demethylated cholesterol precursor sterol인 lathosterol, desmosterol만이 높게 나타남을 볼 수 있었다. 이처럼 담즙에 비해 담석의 nonpolar sterol(lanosterol)의 결여는 nonpolar sterol이 antinucleating 인자를 가지거나 또는 담석 표면이나 담즙내에 polar sterol

(lathosterol)만을 주로 침전시키는 nucleating 인자의 존재를 고려할 수 있으며, 따라서 polarity가 담석성장과정과 관계가 있다고 여겨지는데 이러한 분포 경향은 기존의 스테롤 분석 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.<sup>5</sup>

## 결론

본 연구에서는 담석과 담즙시료내에 존재하는 콜레스테롤, 담즙산 및 스테롤들의 동시분석을 위한 조건을 설정하였다. 포함형태로 존재하는 이들 대상 물질들을 비포함된 형태로 만들어 주기 위해 염가를 이용한 가수분해를 실시하였고 스테롤과 담즙산에 대해 각각 pH 14와 1에서 두 단계의 액체-액체 추출 과정을 거쳐 MSTFA/NH<sub>3</sub>I 혼합용액으로 유도체화하는 전처리 방법과 이를 GC/MS에서 검출하기 위한 분석 조건을 확립하였다. 이 방법으로 간내 담석증 환자의 담석과 담즙에 존재하는 콜레스테롤, 담즙산 그리고 스테롤들을 정량하였으며 기존의 분석법과 비교할 때 비슷한 값을 얻었다. 콜레스테롤과 총담즙산 농도 분포가 담즙과 담석 시료에서 다르게 나타났고 스테롤의 절대농도와 상대농도 역시 차이를 보인 한편 콜레스테롤이 총 스테롤 농도의 97.04%와 97.93%로 높았는데, 이는 문헌에 보고된 결과와도 일치했다. 그러므로 각각 다른 과정을 거쳐야 하는 기존의 담즙산과 스테롤 분석방법을 대신하여 본 방법으로써 한번의 시료전처리로 콜레스테롤을 비롯한 담즙산과 스테롤들을 동시 검출할 수 있으리라 생각된다.

## 인용문헌

- Hofman, A. F.; Small, D. M. *Amer. Rev. Med.* **1967**, *18*, 433.
- Ito, T.; Kawata, S.; Imai, Y.; Kakimoto, H.; Trzaskos, J. M.; Matsuzawa, Y. *Gastroenterology* **1996**, *110*, 1619.
- Tazuma, S.; Hatsushika, S.; Yamashita, G.; Aihara, N.; Sasaki, M.; Horikawa, K.; Yamashida, Y.; Teramen, K.; Hino, H.; Kajiyama, G. *J. Chromatogr.* **1994**, *653*, 1.
- Miettinen, T. E.; Tarpila, S.; Gylling, H. *Hepatology* **1997**, *25*, 514.
- Miettinen, T. E.; Kesaniemi, Y. A.; Gylling, H.; Silvennoinen, E.; Miettinen, T. A. *Hepatology* **1996**,

- 23, 275.
6. Tasaki, T.; Miki, M.; Tanaka, M. *J. Gastroenterol.* **1994**, *29*, 332.
  7. Hakala, K.; Vuoristo, M.; Miettinen, T. A. *Digestion* **1996**, *57*, 83.
  8. Miettinen, T. A.; Kesaniemi, Y. A.; Jarvinen, H.; Hastbacka, J. *Gastroenterology* **1986**, *90*, 858.
  9. Kesaniemi, Y. A.; Koskenvuo, M.; Vuoristo, M.; Miettinen, T. A. *Gastroenterology* **1983**, *84*, 1207.
  10. Axelson, M.; Moerk, B.; Sjoval, J. *J. lipid Res.* **1988**, *29*, 629.
  11. Behar, J.; Lee, K. Y.; Tompson, W. R.; Brancani, P. *Gastroenterology* **1989**, *97*, 1479.
  12. Shoda, J.; Tanaka, N.; Bing-fang, H. E.; Matsuzaki, Y.; Osuga, T.; Miyazaki, H. *Dig. Dis. Sci.*, **1993**, *38*, 2130.
  13. Nakayama, F. *J. Chromatogr.* **1988**, *452*, 399.
  14. Scalia, S. *J. Chromatogr.* **1995**, *671*, 299.
  15. McEwen C. N.; Larsen B. N. *Mass Spectrometry of Biological Materials*; Marcel Dekker Inc: New York, U.S.A., 1990; p 287.
  16. Kim, M. H.; Han, D. S.; Lee, S. K.; Min, Y. I.; Lee, S. G.; Chung, B. C. *Korean J. Medicine* **1994**, *47*, 1.