

SPME/GC-MS를 이용한 혈액중의 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인의 분석

유은아* · 김정수 · 명승운*

성신여자대학교 화학과, *한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터
(2000. 9. 30 접수)

Determination of Homocysteine, Methionine, Cysteine in Human Plasma with SPME/GC-MS

Eun-Ah Yoo*, Jung-Soo Kim and Seung-Woon Myung*

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

*Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea

(Received September 30, 2000)

요 약: SPME/GC-MS방법을 이용하여 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인의 혈액중의 함량을 측정하고 관상동맥질환과 호모시스테인의 함량과의 관계를 조사하였다. 혈액중의 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인은 관상동맥질환의 위해성에 대한 생체표식인자로 알려지고 있다. 관상동맥질환자들에 대한 이들의 함량분포는 호모시스테인의 경우 18.47-33.38 $\mu\text{mol/L}$, 메치오닌의 경우는 30.16-56.72 $\mu\text{mol/L}$ 그리고 시스테인의 경우는 183.16-387.32 $\mu\text{mol/L}$ 범위의 함량을 보였다. 이 방법은 시간과 노력이 절약되고 또한 용매의 제한 사용으로 훨씬 환경 친화적인 방법임을 시사하였다.

Abstract: The purpose of this study was to determine the homocysteine (Hcy), methionine (Met) and cysteine (Cys) using solid phase micro-extraction (SPME)/gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS) in human plasma and to correlate between the plasma concentration of homocysteine with coronary artery disease. The homocysteine, methionine and cysteine in blood can be used as biomarkers for the risk assessment of vascular disease. The plasma homocysteine level for the coronary artery disease patients was higher than general patients. The concentration ranges of the Hcy, Met and Cys for coronary artery disease patients were 18.47-33.38 $\mu\text{mol/L}$, 30.16-56.72 $\mu\text{mol/L}$ and 183.16-387.32 $\mu\text{mol/L}$, respectively. This method showed good sensitivity and convenience.

Key words: homocysteine, methionine, cysteine, SPME, GC-MS

1. 서 론

현대인의 성인병중에 가장 높은 비율을 차지하는

질병중의 하나인 관상동맥질환(coronary disease)은 황을 포함하는 필수아미노산 가운데 하나인 호모시스테인(homocysteine, Hcy)의 함량과 밀접한 관계가 있다는 보고가 최근에 급증하고 있다. 일반적으로 관상동맥 질환에 대한 기존의 위험인자로는 흡연, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 유전 등을 꼽는다. 이외에 관상동맥질환의 발병원인으로는 몇 가지 대사산물 요인들이

* Corresponding author
Phone & Fax: +82-(0)2-920-7168
E-mail: eayoo@sungshin.ac.kr

있는데 지방단백질류, 지혈제인자 그리고 호모시스테인 등과 같은 대사체들이 있다. 그 중에서 호모시스테인은 심장혈관질환(cardiovascular disease)을 진단하는데 있어서 선택적으로 선호되는 질병요인으로 보고²되어지고 있다. Hcy은 대사과정중 메치오닌(methionine, Met)의 demethylation에 의해 형성되며 또한 대사과정중에 시스테인(cystein, Cys)으로 바뀌거나 remethylation이 일어나 다시 메치오닌으로 바뀌게 된다.³ 한편, cobalamin (vitamin B₁₂)과 엽산(folate)은 호모시스테인을 메치오닌으로 methylation시킬 때의 효소로 작용하므로 이들이 부족한 환자들은 혈액중의 호모시스테인 농도가 급격하게 증가하게 된다. 이 호모시스테인의 혈액중의 농도가 극도로 증가되는 선천적인 대사질환인 homocystinuria는 조산아 혈관질환(premature vascular disease)과 정맥과 동맥의 혈전색전증(thrombotic phenomena)과 밀접한 관계⁴가 있다. 그러므로 혈액 중에 존재하는 호모시스테인의 농도를 정확하게 측정하여 이러한 병을 진단하거나 예방하는데 기초자료로 사용할 수 있으며 또한 약의 효율을 모니터 할 수 있다. 아직까지 한국인에 대한 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인의 성별, 연령 등에 따른 기준치가 발표되지 않았으므로 이에 대한 조사가 필요하다.

한편, 현재까지 발표된 혈액중의 호모시스테인 분석 방법은 여러 가지가 있다. 혈액중의 총 호모시스테인의 양을 정량적으로 시도한 방법은 radioenzymatic assay방법⁵이었고, 대부분은 아미노산 분석기⁶(amino acid analyzer), 고성능 액체크로마토그래피⁷(HPLC) 및 기체크로마토그래피(GC)⁸ 등을 이용한 방법으로 분석되고 있다. 호모시스테인의 HPLC 분석의 경우 검출기로는 대부분 형광검출기를 사용하므로 황에 특성적으로 반응하여 형광을 나타내는 유도체화 시약인 mBrB (monobromobiamine),⁹ SBD-F (ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulphonate),¹⁰ ABD-F (4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxaldazol)¹¹ 및 o-phthalaldehyde¹² 등으로 반응시킨 후 HPLC를 통해 형광 검출기로 분석하는 방법이며 각 유도체화 시약은 장·단점을 각각 지니고 있다. 형광검출기의 경우 감도가 매우 높지만 대부분 용매 및 이동상으로 완충용액을 사용하므로 컬럼의 수명을 단축시키며 또한 대부분의 유도체화 시약은 가격이 비싸고, 상온에서 불안정한 단점을 지니고 있다. 전기 화학적 검출기

를 사용한 방법은 유도체화 과정은 필요치 않고 티올을 선택적으로 분석하기 위해 단일 금수는 전극을 사용하며 sulfhydryl 화합물에 대해 특성적으로 작용하므로 정량에 큰 장점을 가지나 flow cell의 오염과 금수는 전극이 손상되었을 때의 영향 때문에 많은 주의를 요하는 방법이다. 실험실에서는 주로 HPLC/형광검출기를 사용하는 방법이 아주 보편화되어 있다. 기체 크로마토그래피를 사용하는 경우는 아미노산의 극성기인 -NH₂, -COOH 및 -SH 작용기를 유도체화 반응을 통해 비극성기로 바꾸어 준 후 GC에 주입하여 질량분석기를 이용하여 검출하는 방법을 사용하는 것이 기존의 방법⁶들이다. 특히 유도체화 반응은 초창기에는 아미노산 분석에 사용한 유도체화 방법을 그대로 사용하다가 1987년 Stabler에 의해 처음으로 tert-butyl dimethylsilyl 유도체를 만들어 분석¹³하였다. 최근에는 Husek^{14,15}이 알킬 클로로포메이트(alkyl chloroformate)로 N(O,S)-alkoxy carbonyl 유도체를 만들어 아미노산을 분석하는 방법을 보고하였는데 이 방법은 상온에서 특별한 조작없이 몇 분내로 끝나는 간편한 유도체화 방법이다. 특히 수용액중에서 바로 유도체화 반응이 진행되어 생체내 물질을 분석하는데 좋은 방법으로 Jorn 등¹⁶은 호모시스테인에 이 방법을 적용시켰다.

본 연구에서는 이미 본 연구진에 의해서 개발된 방법^{18,20} SPME/GC-MS 방법을 이용하여 혈장 중에 존재하는 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인을 혈장 내에서 알킬 클로로포메이트를 사용하여 N(O,S)-alkoxycarbonyl alkyl ester를 만들어 비극성이며 휘발성이 있는 유도체로 만든 후 간단하고 감도가 좋은 solid phase micro-extraction (SPME) 방법으로 추출하여 GC/MS로 측정하는 응용시험을 실시하였다.

2. 실험

2.1. 분석기기 및 장치

본 실험에서 사용한 기기는 Hewlett-Packard사의 HP 6890 gas chromatograph/HP 5973 mass selective detector이었다. 단백질을 제거하기 위하여 사용한 원심분리기는 Eppendorf사의 centrifuge 5417 R이었으며, Thermolyne사의 type 37600 mixer와 Corning사의 stirrer/hot plate가 사용되었다. SPME fiber는 Supelco 사 제품의 85 μm polyacrylate (PA)를 사용하였다.

2.2. 시 약

DL-homocysteine과 L-cystein은 Sigma사, L-methionine은 Fluka사 제품이였으며 내부 표준 물질로 사용한 S-2-amino ethyl-L-cystein hydrochloride는 Sigma사로부터 구입하였다. 유도체화 시약인 ethyl chloroformate는 Aldrich사 제품이고 물은 Milli-Q를 통과한 3차 증류수를 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 표준용액의 조제

Homocystein, 메치오닌 및 cystein 표준물질을 증류수에 녹여 1000 µl/ml로 만든 후 묽혀서 사용하였다. 내부표준물질인 S-2-amino ethyl-L-cysteine hydrochloride도 또한 증류수에 녹여 10 mmole/L로 조제하였으며 이들 표준물질들은 모두 냉장 보관하여 사용하였다.

2.3.2. 시료의 전처리

혈장 중에 포함되어 있는 단백질을 제거하기 위하여 500 µl의 혈장과 500 µl의 증류수를 섞은 후 이 혼합용액에 100 µl의 10 mM 내부표준물질을 첨가하였다. 환원제인 dithiothreitol 25 µl를 가한 후 vortex

mixer로 30초간 흔들어 준 후 40°C에서 30분간 항온 처리시켰다. 이 용액에 100 µl trichloroacetic acid를 가한 후 30초간 흔들어 주고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 이 때 온도는 실온으로 유지한다.

2.3.3. 시료의 유도체화 및 분석

단백질이 제거된 상등액 600 µl를 취한 후 n-프로필 알콜/피리딘 (4 : 1, v/v%) 혼합물 400 µl 가하고 유도체화 시약인 에틸 클로로포메이트 50 µl를 가하여 vortex mixer로 3분간 실온에서 혼합한다. 이 용액에 증류수 2 ml를 가하여 30초간 vortex mixer로 충분히 혼합한 후에 30분간 85 µm polyacrylate SPME fiber에 흡착시킨다. 이때 용액은 자기젓개로 교반시키고 온도는 실온으로 유지시킨다. 흡착이 끝난 후 SPME fiber를 직접 기체 크로마토그래프의 주입구에 주입한 후 1분간 탈착시켜 시료를 분석하였다. 시료의 전처리과정과 유도체화 과정을 도표로 나타내면 Fig. 1과 같다.

2.3.4. 기체 크로마토그래프 및 질량 분석기

기체 크로마토그래프에 사용된 컬럼은 모세관 컬럼으로써 Hewlett-Packard사의 HP-5를 사용하였으며 컬럼의 길이는 30 m, 내경은 0.25 mm, 정지상의 두께는 0.25 µm이었다. 이동상 기체는 헬륨기체로써 0.8 ml/min 이었고 주입방법은 분할주입(1 : 10)법을 사용하였다. 주입구와 인터페이스의 온도는 280°C와 300°C이었으

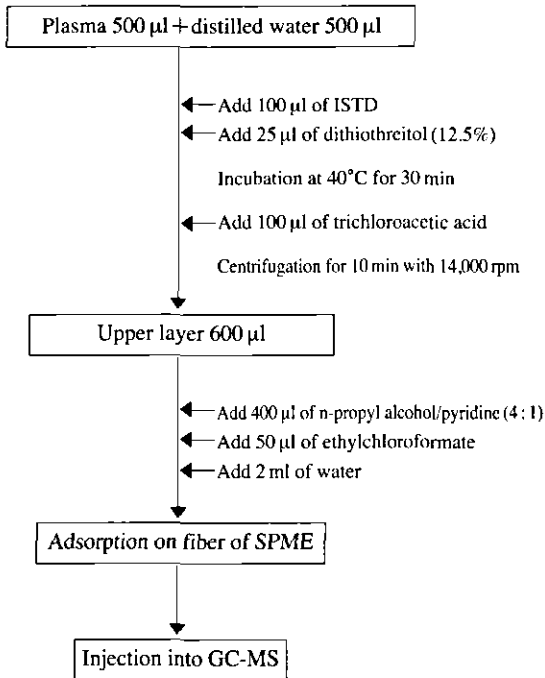


Fig. 1. Schematic diagram for the sample preparation.

Table 1. Operation conditions for GC and MS

* Column : HP-5 column (30 m length × 0.25 mm I.D × 0.25 µm film thickness)				
* Carrier gas : He (0.8 ml/min)				
* Split mode : split ratio 1/10				
* Ionization mode : electron impact (70 eV)				
* Injection port temp. : 250°C				
* Oven temperature				
Initial Temp. (°C)	Initial time (min)	Rate (°C/min)	Final Temp. (°C)	Final Time (min)
100	0.5	10	200	0
		20	300	3
* SIM Mode :				
Group	Start time	Selected Ions, m/z		
1	6	(61, 129, 189)		
2	11	(74, 146, 220)		
3	12	(56, 128, 189)		
4	14	(56, 102, 172)		

며 컬럼의 초기온도는 100°C이었으며 이 온도에서 0.5분간 유지한 후 10°C/min 속도로 200°C까지 승온시키고 다시 20°C/min 속도로 300°C까지 승온시켜서 3분 동안 머물게 하였다. 한편, 질량분석기에서 검출 방법으로는 SIM (selected ion monitoring) 방법을 사용하였으며 조건은 Table 1에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

혈액 중에 존재하는 총 호모시스테인의 양은 심장 혈관 질환을 진단하는데 선택적으로 선호되는 인자이며 현재 우리 나라의 종합병원에서는 일차적으로 환원제를 사용하여 단백질에 결합된 황을 포함하는 아미노산의 결합을 끊어서 환원형의 형태로 만든 후에 단백질 침전제를 사용하여 단백질을 침전시킨 후 상등액을 취해 형광검출기로 검출하기 위해 유도체화를 시킨 후 HPLC를 사용하여 함량을 결정하는 방법을 사용하고 있다. 혈액중에 존재하는 호모시스테인은 일반적으로 저장조건에 따라 안정도가 달라지므로¹⁷ 본 실험에서는 혈액중의 혈장과 혈청을 혈액의 나머지 부분으로부터 분리하여 -20°C의 온도에서 보관하면서 실험을 하였다.

Fig. 2에 호모시스테인의 유도체화 과정을 간단히 도표화하여 나타내었다. 앞서의 논문에서 보고¹⁸한 바와 같이 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인의 아민 및 티올에 대한 여러 유도체화 시약들 즉 에틸프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸 및 알릴 클로로포메이트의 반응성을 액체-액추출하여 비교한 결과 각 호모

시스테인류의 아민 및 티올은 alkoxy carbonyl 기능기로, 카르복시 산은 각각의 에스테르형태로 전환되었으며, 호모시스테인과 메치오닌의 경우 부틸과 이소부틸 유도체화가 에틸이나 이소프로필 클로로포메이트보다 반응성이 좋았으며 호모시스테인과 메치오닌의 경우 이소프로필과는 반응성이 좋지 않았다. SPME 방법을 이용한 유도체화 반응의 경우 그 반응성을 비교하여 본 결과 호모시스테인, 메치오닌과 시스테인의 경우 모두에게 좋은 효율성을 나타낸 것은 에틸 크로로포메이트 유도체화 시약이었으며 특히 SPME fiber의

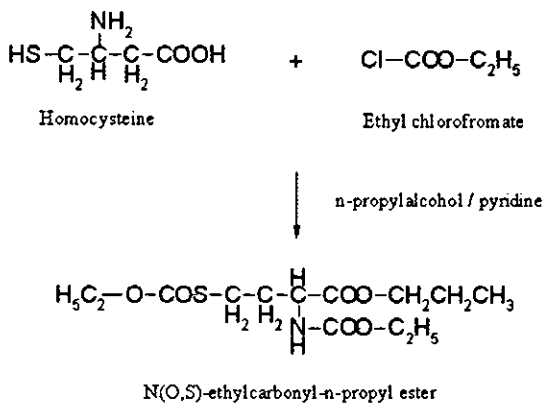


Fig. 2. The derivatization scheme of the homocysteine.

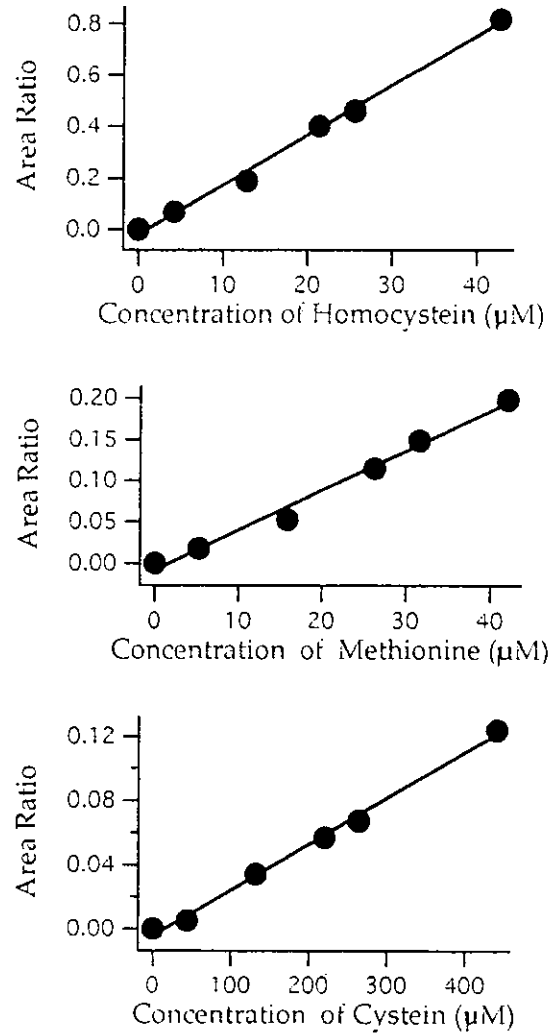


Fig. 3. Calibration curves for the determination of homocysteine, methionine and cysteine.

경우 polyacrylate (PA)를 사용한 경우가 유도체화의 효율성이 가장 컸음을 보고하였다.¹⁸⁻²⁰ 그리하여 본 실험에서는 유도체화 시약으로 에틸 크로로포메이트를 사용하였으며 SPME의 최적조건은 85 μm의 PA fiber로 또 추출시간은 30분을 사용하였으며 추출 후 바로 GC에 직접 주입하여 탈착시킨 후 질량 분석기에서 정량하였다.

정량을 위한 검량곡선의 농도 범위는 호모시스테인의 경우 5-50 μmol/L ($y = 0.019314x - 0.020516, r^2 = 0.9976$), 메치오닌의 경우 5-50 μmol/L ($y = 0.004816x - 0.008093, r^2 = 0.9941$), cystein의 경우는 40-400 μmol/L ($y = 0.0002856x - 0.004417, r^2 = 0.9975$)이었으며 정량 범위 내에서 좋은 직선성을 보였다(Fig. 3). 사용된 내부표준물질은 S-(2-aminoethyl)-L-cysteine이었다.

심장질환자 및 일반질환자의 혈액은 서울 삼성병원으로부터 제공받아 언급된 전처리 실험방법에 따라서 처리하여 정량하였으며 SPME/GC-MS에 의해서 얻어진 크로마토그램은 Fig. 4와 같다. 호모시스테인은 9.32분에서 검출되었으며 메치오닌은 6.82분, 시스테

인은 8.23분 그리고 내부표준물질은 12.01분에서 검침이 없고 균형이 있는 피크로써 검출되었다. SIM에서 설정한 특성 이온은 호모시스테인의 경우 m/z 56, 128, 189, 메치오닌의 경우 m/z 61, 129, 189, 시스테인의 경우 74, 146, 220이었으며 내부표준물질의 경우는 m/z 56, 102, 172를 사용하였다.

심장질환자 9명과 일반질환자 9명 등 전체 환자 18명에 대한 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인의 함량을 측정할 결과는 각각 Table 2에 보인 바와 같다.

일반환자의 경우, 호모시스테인의 경우 함량범위가 14.88-29.18 μmol/L의 범위를 보였고 평균 호모시스테인의 농도는 21.68 μmol/L이었으며 심장질환자의 경우는 18.47-33.38 μmol/L의 범위를 나타냈으며 평균 26 μmol/L로써 심장질환자의 경우 대체적으로 높게 나타났다. 메치오닌 및 시스테인에 대한 결과도 Table 2에 나타내었다. 이들의 농도는 차후에 호모시스테인 농도와의 상관관계를 조사하는 파라미터가 될 수 있을 것으로 사료된다.

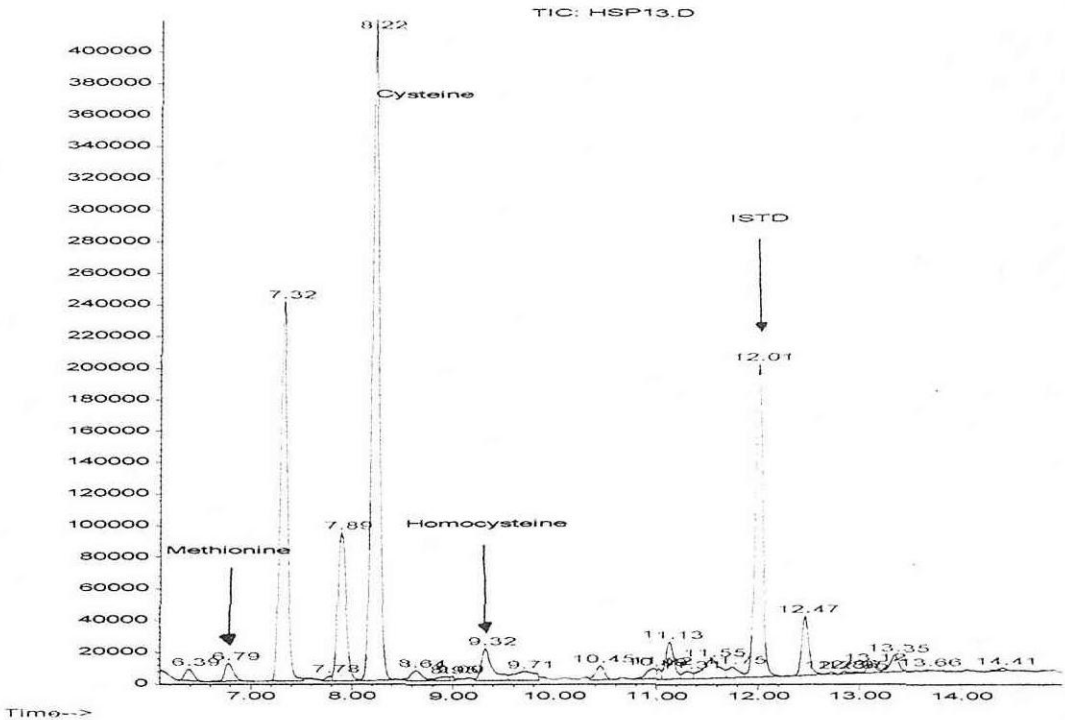


Fig. 4. GC-MS chromatogram obtained from the spiked plasma: homocysteine 9.3 min; methionine 6.7 min; cysteine 8.2 min; ISTD 12.0 min.

Table 2. The determined amounts of total homocystein, methionine and cysteine of patients

Classification (Year/Sex)	Homocystein ($\mu\text{mol/L}$)	Methionine ($\mu\text{mol/L}$)	Cysteine ($\mu\text{mol/L}$)
(General patients, n = 9)			
58M Normal	29.18	51.90	226.72
44M Normal	14.88	23.19	123.64
79M Hyperglycemia	22.48	47.50	248.52
44M Normal	22.11	54.29	331.78
65M Toxic liver disease	27.15	35.12	246.64
60M Normal	18.78	34.62	223.51
57M Cerebral infarction	19.99	26.59	201.45
48M Chest pain	18.11	32.84	239.33
44M Auricular fibrillation and flutter	22.45	42.37	177.76
ERange	14.88-29.18	23.19-54.29	123.64-331.78
Average	21.68	38.71	224.37
(Cardiac group, n = 9)			
52M Unknown angina	27.15	43.60	183.16
63M Angina	33.38	33.78	387.32
77M Myocardial infarction	30.34	31.06	312.75
83M Unstable angina	24.46	35.47	248.76
66M Unknown angina	18.47	30.16	186.43
59M Unstable angina	24.10	56.72	265.92
35M Dilated cardio myopathy	24.68	43.73	222.44
68M Unknown angina	25.23	41.21	234.02
67M Variant angina	30.94	47.82	313.09
Range	18.47-33.38	30.16-56.72	183.16-387.32
Average	26.52	40.39	261.54

4. 결 론

심장질환의 생체표식인자로 고려되고 있는 호모시스테인 및 관련 대사체인 메치오닌과 시스테인의 혈중 농도를 SPME/GC-MS방법을 사용하여 측정하였다. 이 방법은 극성이 매우 큰 황이 포함된 아미노산들을 극성이 작고 휘발성이 큰 물질로 혈장 시료내에서 직접 유도체화 시킨 후 추출과 농축과정이 통합된 SPME방법을 채택하고 이를 직접 기체크로마토그래프-질량 분석기에 주입하여 분석하는 방법으로써, 지금까지 사용되고 있는 방법과 비교하여 간편하고 빠르고 환경친화성이며 감도가 좋은 분석방법임이 입증되었고 실제 시료의 응용에서도 좋은 결과를 나타내었다. 본 연구에서 나타난 심장질환자 및 일반 질환자들의 호모시스테인, 메치오닌 및 시스테인의 혈중 농

도는 비록 적은 숫자이지만 한국인의 심장질환 질병 진단 및 치료에 응용될 수 있는 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 성신여자대학교의 1998년도 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. J. C. Chambers, O. A. Obeid, H. Refsum, P. Ueland, D. Hackett, J. Hooper, R. M. Turner, S. G. Thompson and J. S. Kooner, *Lancet*, **355**, 523-527 (2000).
2. M. N. Reddy and C. Behnke, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **20**, 1391-1408 (1997).

3. L. H. Chen, M. L. Liu, H. Y. Hwang, L. S. Chen, J. Korenberg and B. Shane, *J. Biol. Chem.*, **272**, 3628-3634 (1997).
4. E. L. Mayer, D. W. Jacobsen and K. Robinson, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **27**, 517-527 (1996).
5. H. Refsum, S. Helland and P. M. Heland, *Clin. Chem.*, **31**, 624-628 (1985).
6. H. Kataoka, K. Takagi and M. Martin, *J. Chromatogr. B*, **664**, 421-425 (1995).
7. I. Fermo, C. Arcelloni, E. De Vecchi, S. Vigano and R. Paroni, *J. Chromatogr.*, **593**, 171-176 (1992).
8. 명승운, 장윤정, 유은아, 박준호, 민혜기, 김명수, *분석과학*, **12**, 408-414 (1999).
9. D. W. Jacobsen, V. J. Gatautis and R. Green, *Anal. Biochem.*, **178**, 208-214 (1989).
10. A. Araki and Y. Sako, *J. Chromatogr.*, **422**, 43-52 (1987).
11. P. E. Cornwell, S. L. Morgan and W. H. Vaughn, *J. Chromatogr.*, **617**, 136-139 (1993).
12. C. Carducci, M. Birarelli, V. Leuzzi, G. Sautagataa, P. Serafini and I. Antonozzi, *J. Chromatogr. A*, **729**, 173-180 (1996).
13. S. P. Stabler, P. K. Marcell, E. R. Podell and R. H. Allen, *Anal. Biochem.*, **162**, 185-196 (1987).
14. P. Husek, *J. Chromatogr.*, **552**, 289-299 (1991).
15. P. Husek, *FEBS*, **280**, 354-356 (1991).
16. J. O. Sass and W. Endress, *J. Chromatogr. A*, **776**, 342-347 (1997).
17. P. M. Ueland, H. Refsum, S. P. Stabler, M. R. Malinow, A. Andersson and R. H. Allen *Clin. Chem.*, **39**, 1764-1779 (1993).
18. S.-W. Myung, M. Kim, H.-K. Min, E.-A. Yoo and K.-R. Kim, *J. Chromatogr. B*, **727**, 1-8 (1999).
19. 민혜기, 성신여자대학교 석사논문, (1998).
20. 장윤정, 성신여자대학교 석사논문, (1999).