

생체 유기대사물 프로파일링 분석의 진단 응용

성균관대학교 약학부

김 경 례

서 론

생체 시료에는 생물체 내의 다양한 대사과정에서 생성된 수많은 유기성 대사물이 존재한다. 화학 구조적으로 다양한 대사물 중에서 최종 혹은 중간 유기대사물에 속하는 저분자량의 산성 유기산류, 양쪽성 아미노산류, 염기성 아민류, 약산성 페놀류의 조성 변화는 유전성 대사질환을 포함한 신체 대사이상의 발현에 중요한 정보를 제공하고 있다¹⁻¹¹⁾. 또한 생체시료 중 키랄성 유기산 및 아미노산의 D- 혹은 L-입체구조는 특정 효소반응의 입체 선택적인 대사과정에 대한 정보와 특정 효소 부족으로 인한 대사질환 등에 대한 임상학적 정보를 제공한다¹²⁻¹⁵⁾. 그러므로 정확한 진단 및 치료과정을 모니터링하기 위해서는 이들 대사물에 대한 체계적인 분석법이 확립되어야 한다.

대부분의 임상분석은 소수의 특정 대사물을 분석하는 표적 화합물 분석법(target compound analysis)에 의해서 이루어지고 있다. 그러나 효과적으로 유기대사물에 대한 체계적인 조사를 수행하기 위해서는 많은 성분들을 동시에 분석하여 예상하지 못했던 새로운 물질도 찾아낼 수 있는, 또한 성분 사이의 농도 비율의 변화를 검출 할 수 있으므로 미지성분을 체계적으로 탐색하는데 특히 유용한 프로파일링 분석법(profiling analysis)을 적용하여야 한다²⁰⁻²²⁾. 프로파일링 분석은 고분리능의 high resolution capillary gas chromatography(GC) 및 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS), high performance liquid chromatography, high performance liquid chromatography-mass spectrometry 및 capillary electrophoresis 법을 이용하여 주로 이루어지고 있다.

프로파일링 분석에 앞서 복합 생체시료 내에 존재하는 미량의 유기산류, 아미노산류, 아민류, 페놀류를

각각 선택적으로 분리농축하여야 한다. 이 목적으로 널리 사용되어온 용매 추출법은 소량의 용매로 짧은 시간에 분석 대상 화합물을 선택적으로 추출할 수 있는 고체상 추출법으로^{16, 17)} 점차 대체 되고 있다. 고체상 추출법에 의해서 유기산, 아민류, 페놀류는 신속히 전처리될 수 있으나¹⁸⁻²³⁾, 양쪽성 아미노산인 경우에는 많은 시간을 요하는 동결건조법에 의존해 왔다. 그러나 최근 수용액 내에서 직접 아미노기를 alkyl chloroformate와 반응시켜서 유기용매로 추출될 수 있는 alkoxy carbonyl 유도체로 전환시켜서 아미노산을 회수하는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{19, 24)}. 분리농축된 각 그룹을 고성능 GC 및 GC-MS에 의해 분석하기 위해서는 -COOH, -NH₂, -NH, SH, phenolic -OH, alcoholic -OH 극성 기능기를 열안정성 및 휘발성이 큰 기능기로 먼저 전환해야 한다. 이 목적으로 기능기에 따라 alkylation, esterification, alkylsilylation, alkoxylation, acylation, benzylation, benzoylsilylation 반응²⁵⁾ 중에서 *tert*-butyldimethylsilyl(TBDMS) 유도체가 trimethylsilyl 유도체 보다 수분에 강하며 GC 및 MS 분석성질이 우수하므로 최근에 널리 이용되고 있다^{18-20, 22, 23)}. 그러나 수분이 제거된 매우 건조한 조건을 요구하는 alkylsilylation 반응을 양쪽성인 아미노산에 적용할 경우에 동결건조가 선행되어야 하는 문제점을 가지고 있다. 최근 수용액 내에서 직접 유도체화 반응과 동시에 용매추출이 가능한 추출성 유도체화 반응으로서 alkoxy carbonylation에 대한 연구가 상당히 진행되어 아미노산, 아민류 및 페놀류에 활용되고 있다^{19-21, 24, 26-28)}. 케토산인 경우에는 케토기를 강염기성 수용액에서 먼저 alkoxylation 한 후에 alkylsilylation 한다.

임상분석의 최종목표는 얻어진 분석자료에 최적의 패턴인식법을 적용하여 질병 진단의 지표가 되는 성분을 정확하게 탐색하고 또한 정상과 병증 상태의 패턴

에 대한 DB를 구축하여 진단을 좀더 통계적으로 객관화하는데 있다. 그러므로 최근에는 높은 신뢰도로 다양한 대사과정의 차이 혹은 시료의 특성을 뚜렷하게 제시할 수 있는 패턴인식법 개발에 대해서 활발히 연구되고 있다^{11, 22, 23, 29-33}. 국내 임상화학 분야에서도 신속하고 정확하게 질병을 조기 진단하고 치료과정을 모니터링하기 위해서는 체계적인 유기대사 성분 분석법 및 패턴인식법의 활용이 요구되고 있다.

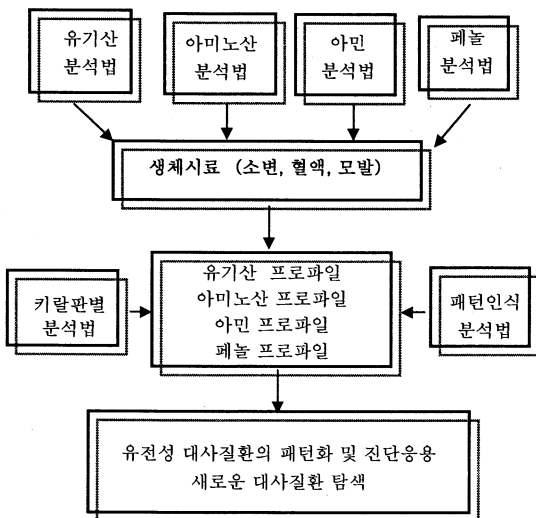
국내외의 임상화학 분야에서는 한가지 특정 그룹에 대한 프로파일링 분석조사를 주로 수행하고 있다. 그러나 다음 그림과 같이 동일한 생체시료(소변, 혈액 및 모발)에 대해서 유기산류, 아미노산류, 아민류, 페놀류 그룹에 대한 프로파일링 분석법 및 키랄판별 분석법 그리고 각 분석자료로부터 종합적이며 상호연관성에 대한 정보를 제공하는 패턴인식 분석법을 적용한다면 유전성 대사질환을 좀더 정확하게 진단할 수 있도록 패턴화가 가능할 것이다. 또한 새로운 유전성 대사질환의 비정상 상태를 지시하는 진단 후보물질을 신속하고 정확하게 탐색할 수 있을 것이다. 한 걸음 더 나가서 각 그룹을 동시에 분석할 수 있는 분석시스템이 개발된다면 분석시간을 네 배 이상 단축하여 소위 high throughput profiling 분석이 가능 할 것으로 본다.

200종 이상의 유기산을 TBDMS유도체로서^{18, 22, 23}, 60종 이상의 비단백질성, 단백질성 아미노산을 *N(O,S)*-isobutoxycarbonyl(isoBOC) TBDMS 유도체로서¹⁹, 60종 이상의 아민을 *N(O)*-isoBOC TBDMS 유도체로서²⁰, 50종 이상의 페놀류를 *O*-isoBOC 유도체로서²¹ 각각 신속히 동정할 수 있는 GC 및 GC-MS 프로파일링 및 스크리닝분석 시스템을 개발하였다. 최근에는 31종의 키랄성 유기산과^{14, 15} 30종의 키랄성 아미노산³⁴ 각각 부분 입체 이성질체로 전환한 후 키랄 분리하고 D- 혹은 L-절대구조를 정확히 판별할 수 있는 키랄 판별 분석시스템을 개발하였다. 그리고 SAS 및 MATLAB과 같은 통계프로그램을 활용하여 프로파일링 분석하여 얻은 프로파일에 대한 계량분석학적인 처리를 통해서 시료 자체의 특성 사이에 패턴인식 연구를 수행하고 있다^{11, 22, 23, 33}. 다양한 화학분석 분야에서 유용하게 응용될 수 있는 체계적인 분석시스템이 되도록 계속해서 최적화 및 확장하고 있는 본 연구실의 유기산, 아미노산, 아민, 페놀 프로파일링 분석시스템, 키랄성 유기산 및 아미노산의 키랄 판별 분석시스템 그리고 패턴인식법을 국내의 유전성 대사질환 연구 분야에 활용될 수 있기를 기대하면서 이곳에 간단히 소개하고자 한다.

실험 방법

1. DB-5 및 DB-17 이중-캐필러리 컬럼 GC 분석시스템

하나의 splitless 주입구와 두 개의 flame ionization detector (FID)가 장착된 Agilent 6890 GC를 본 실험에 사용하였다. 비극성의 DB-5(30 m×0.25 mm I.D., 0.25 μm)와 중간 극성의 DB-17(30 m×0.25 mm I.D., 0.25 μm) 캐필러리 컬럼을 Y-tee로 연결한 후 주입구에 연결하고 각 컬럼 끝은 FID에 각각 연결하였다. 1 μl의 시료를 splitless 주입구에 주입하면 Y-tee에서 두 컬럼으로 분할되어 각 컬럼에서 동시에 분리되고 FID에 의해 동시에 검출된다. 각 컬럼에서 분리된 표준품의 머무름 지수 (I) 를 구하고 DB화하여 시료분석 시에 성분동정에 이용하였다. 비극성 DB-5와 중간 극성 DB-17 대신 동일한 종류인 HP-5 컬럼과 HP-50+ 컬럼을 유기산 분석에 사용하였다.



본 연구실에서는 지난 20년간 복합시료로부터 유기산, 아미노산, 아민 및 페놀류를 각 그룹별로 분리, 농축할 수 있는 고체상 추출법을 개발하였다²⁰⁻²⁶. 또한

2. 유기산의 TBDMS 유도체화 반응 및 GC 프로파일링 분석^{18,22,23)}

산성 수용액에서 Chromosorb P 흡착제/diethyl ether를 이용하여 고체상 추출 후 건조시킨 유기산을 toluene(20 μ l)에 용해시키고 triethylamine(10 μ l)와 *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide(MTBSTFA) 30 μ l를 첨가하고 가온하여(60 $^{\circ}$ C, 1 h), 모든 -COOH, phenolic -OH, alcoholic -OH 극성 기능기를 TBDMS 유도체로 전환하였다. 이어서 이중-캐필러리 컬럼 GC시스템에 의해서 분석하였다.

3. 아미노산의 *N*(*O,S*)-isoBOC, TBDMS 유도체화 반응 및 GC 프로파일링 분석¹⁹⁾

염기성 수용액(pH 11)에서 아미노산을 isobutyl chloroformate(isoBCF, 500 μ l)와 반응시켜(vortex mixing, 5 min) 모든 -NH₂, -NH, SH, phenolic -OH 기능기를 isobutoxycarbonyl(isoBOC)로 전환하고 diethyl ether로 과량의 반응 시약 등을 제거하였다. 수용액 층을 황산을 가해서 산성화 시키고(pH 1-2) 반응된 *N*(*O,S*)-isoBOC 아미노산을 Chromosorb P 흡착제/diethyl ether를 이용하여 고체상 추출 후 건조시켰다. THF(20 μ l)에 용해시키고 MTBSTFA(20 μ l)를 첨가한 후 가온하여(60 $^{\circ}$ C, 20 min), -COOH, alcoholic -OH 극성 기능기를 TBDMS 유도체로 전환한 후에 이중-캐필러리 컬럼 GC시스템에 의해서 분석하였다.

4. 아민의 *N*(*O*)-isoBOC, *O*-TBDMS 유도체화 반응 및 GC 프로파일링 분석²⁰⁾

중성 수용액(pH 7.5)에서 아민류의 phenolic -OH 기능기를 methylene chloride층에 있는 isoBCF(5 μ l)와 반응시켜(vortex mixing, 10 min), 먼저 isoBOC 유도체로 전환하였다. 이어서 수용액 층의 pH를 12로 조절한 후 아민류의 -NH₂ 기능기를 methylene chloride층에 있는 isoBCF(5 μ l)와 반응시켜(vortex mixing, 10 min) isoBOC 유도체로 전환한다. Chromosorb P 흡착제/diethyl ether를 이용하여 고체상 추출 후 건조시키고 toluene(30 μ l)에 용해시키고 MTBSTFA(20 μ l)를 첨가한 후 가온하여(60 $^{\circ}$ C, 2 h), alcoholic -OH 극성 기능기를 TBDMS 유도체로 전환한 후에 이중-캐필러리 컬럼 GC시스템에 의해서 분석하였다.

5. 페놀류의 *O*-isoBOC 유도체화 반응 및 GC 프로파일링 분석²¹⁾

산성 수용액(pH 2)에 있는 페놀류를 methylene chloride층에 있는 isoBCF(5 μ l) 및 TEA(20 μ l)와 반응시켜(vortex mixing, 10 min), phenolic -OH 기능기를 isoBOC 유도체로 전환하였다. 이어서 수용액 층의 pH를 8로 조절한 후 Chromosorb P 흡착제/methylene chloride를 이용하여 고체상 추출 후 건조시키고 toluene(30 μ l)에 용해시키고 이중-캐필러리 컬럼 GC시스템에 의해서 분석하였다.

6. 키랄성 유기산의 *O*-TFA(-)-menthyl ester 유도체화 반응 및 GC 프로파일링 분석¹⁵⁾

산성 수용액에서 Chromosorb P 흡착제/diethyl ether를 이용하여 고체상 추출 후 건조시킨 키랄 유기산을(-)-menthol(100 μ l)에 용해시키고 농축시켰다. Toluene(20 μ l)와 acetyl chloride(1 μ l)를 가하고 반응시켜서(100 $^{\circ}$ C, 1 h), -COOH 기능기를(-)-menthyl ester 부분입체 이성질체로 전환한 후 농축시켰다. 이어서 trifluoroacetic anhydride(TFAA) 20 μ l와 acetonitrile(10 μ l)를 가하고 반응시켜서(60 $^{\circ}$ C, 20 min), -OH 기능기를 trifluoroacetyl(TFA) 유도체로 전환하고 농축시킨 후 toluene(30 μ l)에 녹이고 이중-캐필러리 컬럼 GC시스템에 의해서 분석하였다.

7. 키랄성 아미노산의 *N*(*O,S*)-EOC, *O*-(*S*)-(+)-3-methyl-2-butyl esters 유도체화 반응 및 GC 프로파일링 분석³⁴⁾

약염기성 수용액(pH 8)에서 아미노산의 phenolic -OH 기능기를 methylene chloride층에 있는 ethyl chloroformate(20 μ l)와 반응시켜(vortex mixing, 10 min), 먼저 ethoxycarbonyl(EOC) 유도체로 전환한다. 이어서 수용액 층의 pH를 11-12로 조절한 후 -NH₂ 기능기를 methylene chloride층에 있는 ethyl chloroformate와 반응시켜(vortex mixing, 10 min), EOC 유도체로 전환하였다. 수용액 층을 황산을 가해서 산성화 시키고(pH 1-2) 반응된 *N*(*O,S*)-EOC 아미노산을 diethyl ether를 이용하여 추출 후 건조시켰다. Toluene(20 μ l)에 용해시키고(*S*)-(+)-3-methylbutan-2-ol(30 μ l)와 acetyl chloride(1 μ l)를 가하고 반응시켜서(100 $^{\circ}$ C, 1.5 h), -COOH 기능기를(*S*)-(+)-

3-methyl-2-butyl ester 부분입체 이성질체로 전환한 후 농축시켰다. Toluene(30 μ l)에 녹이고 이중-캐필러리 컬럼 GC시스템에 의해서 분석하였다.

8. 그래픽 패턴인식법

GC프로파일을 선 그래프형의 간단한 I 스펙트럼으로 전환하였다. SAS 통계프로그램을 이용한 단계별 판별 분석법을 통해서 판별 변수가 선정되면 변수를 가지고 radar 형태의 스타 그래프를 작성, 시료의 독특한 패턴을 얻었다. 또한 정준판별 분석을 적용하여 각 시료를 군집 패턴화 하였다.

결과 및 고찰

1. 유기산 프로파일링 분석

본 분석법으로 200종 이상의 다양한 구조의 유기산 TBDMS 유도체로서 동시에 극성이 서로 다른 HP-5 (DB-5와 같음)와 HP-50(DB-17와 같음) 컬럼에 의해서 상보적으로 높은 분리도로 분리할 수 있었다. Fig. 1은 임상 소변시료(자궁근종 환자)에 적용해서 얻어진 유기산 프로파일을 보여주고 있다²³⁾. 유기산의 I 값 비교에 의해서 총 50종의 유기산이 동정되었다.

본 유기산 분석법을 유전성 대사질환과 관계한 임

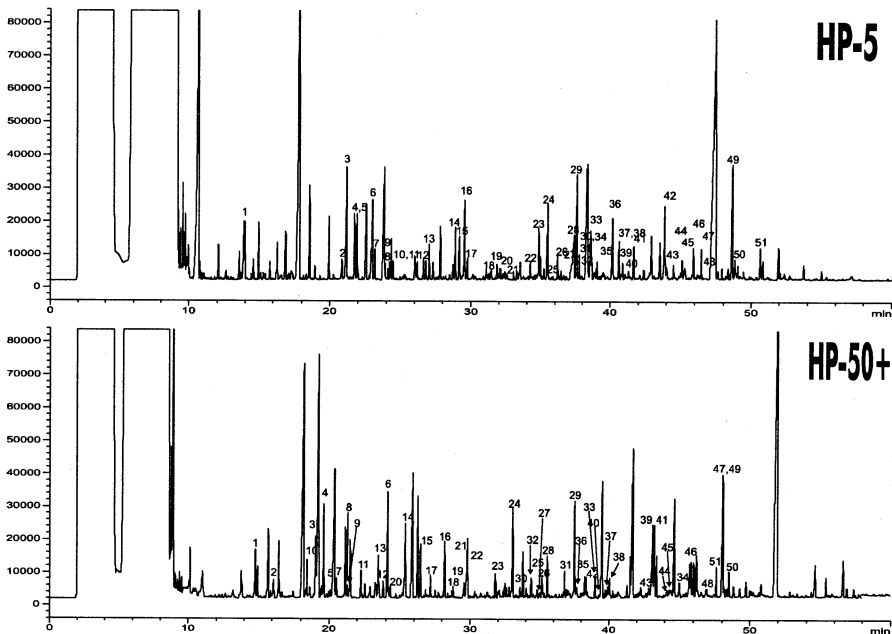


Fig. 1. Dual chromatograms of urinary organic acids from a uterine myoma patient of benign tumor group separated on HP-5 and HP-50+(both 30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μ m film thickness) dual-capillary column system. GC conditions: 60 $^{\circ}$ C(2 min) \rightarrow 280 $^{\circ}$ C(4 $^{\circ}$ C/min). Peaks: 1=pyruvic acid; 2=benzoic acid; 3=lactic acid; 4=glycolic; 5=2-hydroxyisobutyric acid; 6=oxalic acid; 7=2-hydroxybutyric acid; 8=2-hydroxy-2-methylbutyric acid; 9=3-hydroxybutyric acid; 10= α -ketocaproic acid; 11= α -hydroxyisovaleric acid; 12=malonic acid; 13=methylmalonic acid; 14=ethylmalonic acid; 15=maleic acid; 16=succinic acid; 17=methylsuccinic acid; 18=glutaric acid; 19=3-methylglutaric acid; 20=*trans*-3-hexenedioic acid; 21= α -hydroxyphenylacetic acid; 22=adipic acid; 23=3-methyladipic acid; 24= α -ketoglutaric acid; 25=3-phenyllactic acid; 26=*m*-hydroxyphenylacetic acid; 27=pimelic acid; 28=hippuric acid; 29=*p*-hydroxyphenylacetic acid; 30=*p*-hydroxybenzoic acid; 31=malic acid; 32=citramalic acid; 33=phthalic acid; 34=3-indoleacetic acid; 35=suberic acid; 36=2-hydroxyglutaric acid; 37=4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid; 38=4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid; 39=azelaic acid; 40=palmitic acid; 41=*trans*-aconitic acid; 42=*cis*-aconitic acid; 43=*p*-hydroxymandelic acid; 44=stearic acid; 45=4-hydroxy-3-methoxymandelic acid; 46=*p*-hydroxyphenyllactic acid; 47=ferulic acid; 48=citric acid; 49=isocitric acid; 50=hydroxyhippuric acid(J. Chromatogr. B, 1998;712:11-22).

상시료에는 아직까지 적용하지 못하였다.

2. 아미노산 프로파일링 분석

Fig. 2는 51종의 아미노산(단백질성 아미노산 및 비 단백질성 아미노산)이 N(O,S)-isobutyloxycarbonylated TBDMS 유도체로서 동시에 극성이 서로 다른 DB-5 및 DB-17 컬럼에 의해서 높은 분리도로 분리되었음을 보여주고 있다¹⁹⁾. 본 분석법은 아미노산의 아민기를 수용액에서 직접 유도체화 반응시킨 후 고체상 추출함으로 기존에 보고된 분석법 보다 시료 전처리가 매우 용이한 장점을 갖고 있다.

본 아미노산 분석법을 질환과 관계한 임상시료에는 아직까지 적용하지 못 하였다.

3. 아민 프로파일링 분석

Fig. 3은 생리활성이 큰 58종의 다양한 구조의 아민류가 N(O)-isoBOC, O-TBDMS유도체로서 동시에 극성이 서로 다른 DB-5 및 DB-17 컬럼에 의해서 높은 분리도로 분리되었음을 보여주고 있다²⁰⁾. 두 컬럼은 상보적으로 분리된 정보를 제공하고 있다.

본 아민 분석법을 질환과 관계한 임상시료에는 아직까지 적용하지 못 하였다.

4. 페놀류 프로파일링 분석

Fig. 4는 생리활성이 큰 50종의 다양한 구조의 페놀류가 O-isoBOC유도체로서 동시에 극성이 서로 다른 DB-5 및 DB-17 컬럼에 의해서 높은 분리도로 분리

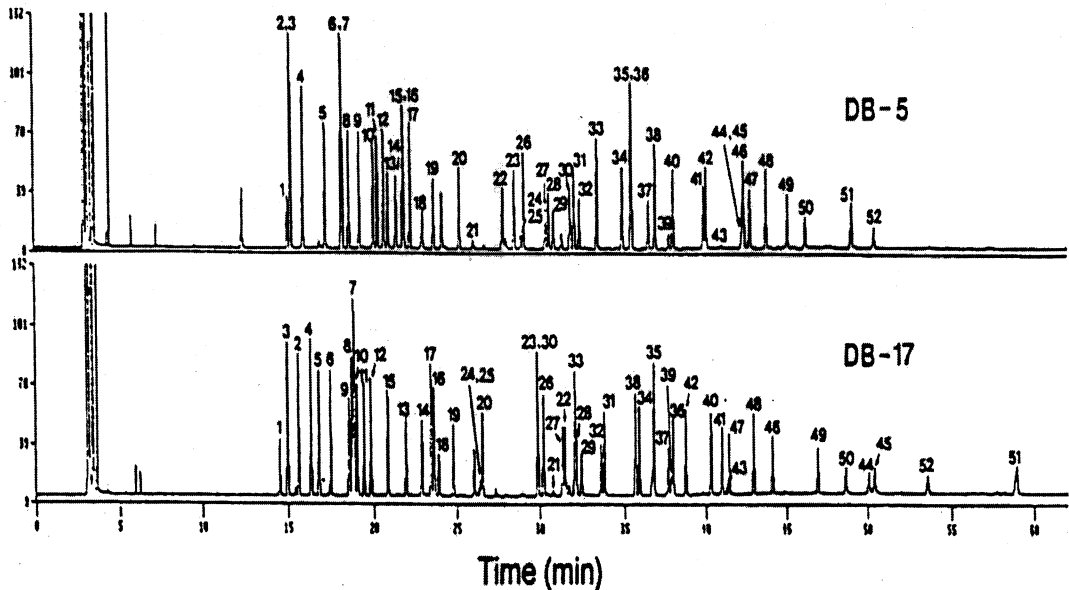


Fig. 2. Chromatograms of the 51 non-protein and protein amino acid mixture as their N(O,S)-isobutyloxycarbonylated TBDMS derivatives separated on DB-5(30 m×0.25 mm I.D., 0.24 μm) and DB-17 (30 m×0.25 mm I.D., 0.24 μm) dual-capillary columns. GC conditions: 150°C(2 min)→280°C(3°C/min). Peaks: 1=α-aminoisobutyric acid; 2=sarcosine; 3=alanine; 4=glycine; 5=α-aminobutyric acid; 6=valine; 7=β-alanine; 8=β-aminobutyric acids; 9=norvaline; 10=leucine; 11=allo-isoleucine; 12=isoleucine; 13=threonine-1; 14=serine-1; 15=D-norleucine; 16=proline; 17=γ-aminobutyric acid; 18=cycloleucine; 19=pipecolic acid; 20=S-methylcysteine; 21=pyroglutamic acid; 22=4-hydroxyproline; 23=methionine; 24=serine-2; 25=threonine-2; 26=ε-aminocaproic acid; 27=ethionine; 28=selenomethionine; 29=o-aminobenzoic acid; 30=DL-homoserine; 31=phenylalanine; 32=selenoethionine; 33=aspartic acid; 34=β-N-methylamino-L-alanine; 35=2,3-diaminopropionic acid; 36=m-aminobenzoic acid; 37=cysteine; 38=glutamic acid; 39= asparagine; 40=p-aminobenzoic acid; 41=homocysteine; 42=α-aminoadipic acid; 43=glutamine; 44=δ-hydroxylysine-1; 45=δ-hydroxylysine-2; 46=ornithine; 47=α-aminopimelic acid; 48=kainic acid; 49=lysine; 50=histidine; 51=tryptphan; 52=tyrosine; 53=5-hydroxy-DL-tryptophan; (J. Chromatogr. A, 669(1994) 125-137).

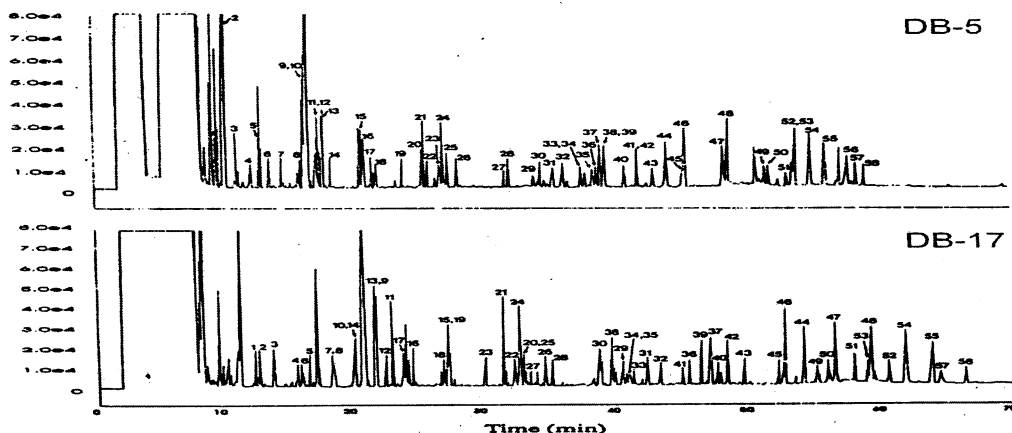


Fig. 3. Dual chromatograms of amines as *N(O)*-isobOC, *O*-TBDMS derivatives separated on DB-5 and DB-17(30 m×0.25 mm I.D., 0.11 μm) dual-capillary column system. GC condition: 60°C→280°C(4°C/min). Peaks: 1=ethylmethylaniline; 2=tert.-butylaniline; 3=diethylaniline; 4=sec.-butylaniline; 5=isobutylaniline; 6=diisopropylaniline; 7=*n*-butylaniline; 8=dipropylaniline; 9=pyrrolidine; 10=isoamylaniline; 11=morpholine; 12=piperidine; 13=*n*-amylaniline; 14=diisobutylaniline; 15=thiazolidine; 16=*n*-hexylaniline; 17=dibutylaniline; 18=cyclohexylaniline; 19=*n*-heptylaniline; 20=diphenylaniline; 21=*o*-toluidine; 22=benzylaniline; 23=*n*-octylaniline; 24=*m*-toluidine; 25=*p*-toluidine; 26=*b*-phenethylaniline; 27=dihexylaniline; 28=*n*-decylaniline; 29=2,4-dichlorobenzylaniline; 30=dicyclohexylaniline; 31=1,3-diaminopropane; 32=3,4-dichlorobenzylaniline; 33=*b*-hydroxyphenethylaniline; 34=norephedrine; 35=ephedrine; 36=putrescine; 37=3,4-dimethoxyphenethylaniline; 38=diethanolamine-1; 39=dibenzylaniline; 40=cadaverine; 41=diethanolamine-2; 42=histamine; 43=1,6-diaminohexane; 44=tryptamine; 45=1,7-diaminoheptane; 46=tyramine; 47=3-methoxytyramine; 48=5-methoxytryptamine; 49=synephrine; 50=octopamine; 51=metanephrine; 52=3,4-dihydroxybenzylaniline; 53=normetanephrine; 54=dopamine; 55=spermidine; 56=serotonin; 57=epinephrine; 58=norepinephrine(J Pharm Biomed Anal 1997;15:1309-18).

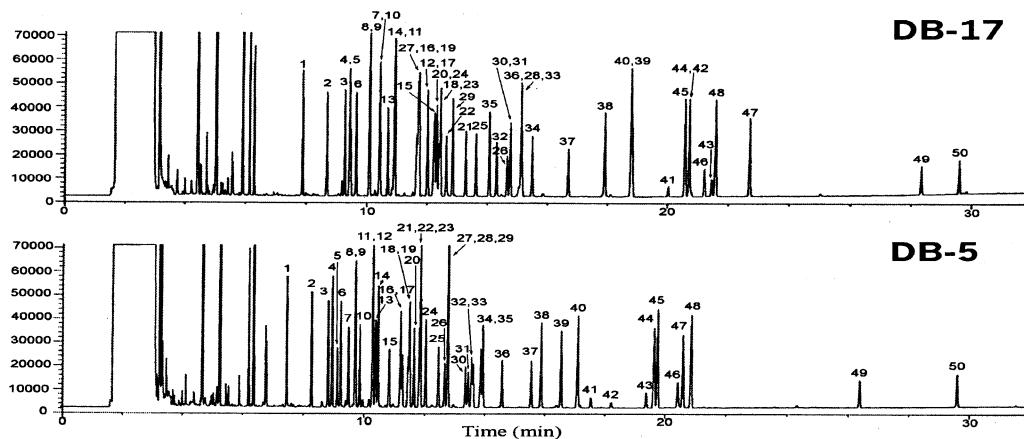


Fig. 4. Dual chromatograms of phenols as their isoBOC derivatives separated on DB-5 and DB-17(both 30 m ×0.25 mm I.D., 0.11 μm film thickness) dual-capillary column system. The inlet pressure of helium was set to 137.9 kPa. Samples(ca. 1.0 l) injected in splitless mode. The oven temperature was held at 80°C for 0.7 min, then programmed to 150°C at a rate of 30°C min⁻¹, and then to 280°C at a rate of 5°C min⁻¹. The inlet pressure of helium was set to 137.9 kPa. Peaks: 1=phenol; 2=*o*-cresol; 3=*m*-cresol; 4=*p*-cresol; 5=2,6-dimethylphenol; 6=2-ethylphenol; 7=2-chlorophenol; 8=3-chlorophenol; 9=2,5-dimethylphenol; 10=4-chlorophenol; 11=2,3-dimethylphenol; 12=2-methoxyphenol; 13=2-*n*-propylphenol; 14=4-ethylphenol; 15=2-bromophenol; 16=2,3,6-trimethylphenol; 17=3-bromophenol; 18=4-bromophenol; 19=4-isopropylphenol; 20=4-chloro-*m*-cresol; 21=3,5-dichlorophenol; 22=2,4-dichlorophenol; 23=2,3,5-trimethylphenol; 24=4-*n*-propylphenol; 25=2,3-dichlorophenol; 26=2-iodophenol; 27=3,4-dichlorophenol; 28=4-tert.-butylphenol; 29=2-nitrophenol; 30=3-iodophenol; 31=3-nitrophenol; 32=2,4,6-trichlorophenol; 33=4-iodophenol; 34=4-nitrophenol; 35=4-*n*-butylphenol; 36=2,4,5-trichlorophenol; 37=2,3,4-trichlorophenol; 38=1-naphthol; 39=2-phenylphenol; 40=catechol; 41=2,5-dinitrophenol; 42=2,4-dinitrophenol; 43=4,6-dinitro-*o*-cresol; 44=hydroquinone; 45=2-methylresorcinol; 46=pentachlorophenol; 47=4-phenylphenol; 48= orcinol; 49=pyrogallol; 50=phloroglucinol(J. Chromatogr. A, 200;866:87-96).

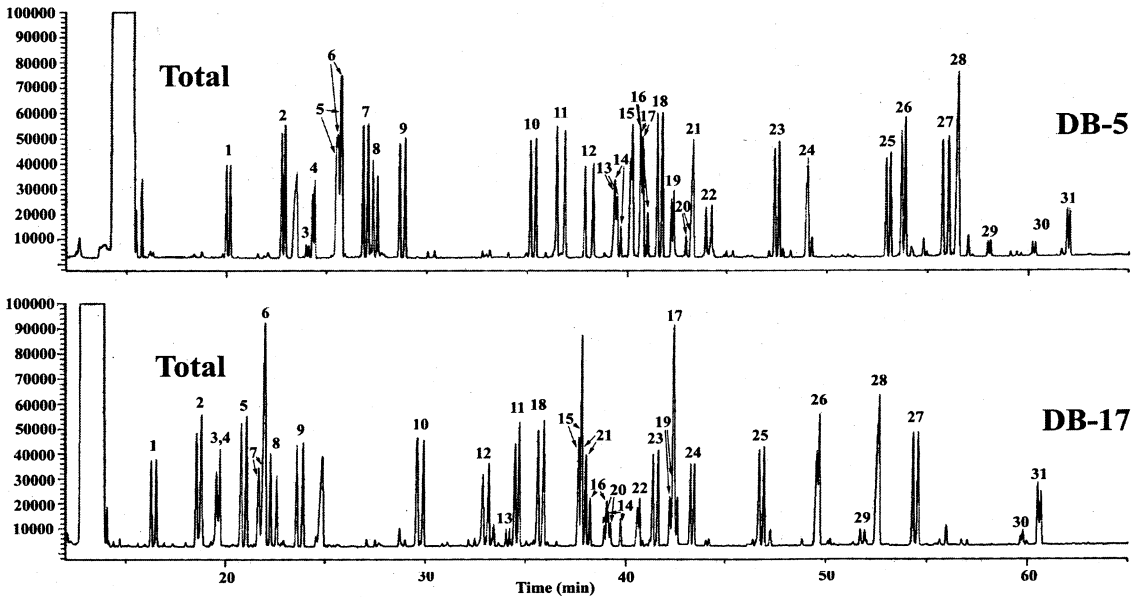


Fig. 5. Dual chromatograms of enantiomers of 30 organic acids as their diastereomeric O-trifluoroacetylated(-)-menthyl esters derivatives. Peaks: 1=lactic acid; 2=2-hydroxybutyric acid; 3=2-hydroxy-2-methylbutyric acid; 4=2-hydroxyisovaleric acid; 5=2-hydroxyvaleric acid; 6=3-hydroxybutyric acid; 7=2-hydroxyisocaproic acid; 8=2-hydroxy-3-methylvaleric acid; 9=2-hydroxycaproic acid; 10=2-hydroxyoctanoic acid; 11=mandelic acid; 12=m-hydroxymandelic acid; 13=p-hydroxymandelic acid; 14=2-phenylbutyric acid; 15=3-phenyllactic acid; 16=3-hydroxy-2-phenylpropionic acid; 17=-methoxyphenylacetic acid; 18=2-hydroxydecanoic acid; 19=3-phenylbutyric acid; 20=4-hydroxy-3-methoxymandelic acid; 21=3-hydroxydecanoic acid; 22=3-hydroxy-4-methoxymandelic acid; 23=2-hydroxydodecanoic acid; 24=3-hydroxydodecanoic acid; 25=2-hydroxytetradecanoic acid; 26=malic acid; 27=2-methylsuccinic acid; 28=2-hydroxyglutaric acid; 29=3,4-dihydroxymandelic acid; 30=citramalic acid; 31=3-methyladipic acid(J Chromatogr. A, 2000;891:257-66).

되었음을 보여주고 있다²¹⁾.

본 페놀류 분석법을 질환과 관계한 임상시료에는 아직까지 적용하지 못 하였다.

5. 키랄성 유기산 프로파일링 분석

Fig. 5는 31종의 키랄성 유기산 라세미체가 O-trifluoroacetylated(-)-menthyl ester 부분입체 이성질체로서 극성이 서로 다른 DB-5 및 DB-17 비키랄성 컬럼에 의해서 높은 분리도로 광학분리 되었음을 보여주고 있다¹⁵⁾. 절대구조를 판별할 수 있도록 각 이성질체의 I값을 구하였다. 측정된 I는 각 유기산 거울상 이성질체에 대하여 매우 특징적이어서 시료 중의 키랄성 유기산의 입체구조를 신속하고 정확하게 판별할 수 있었다.

선천성 대사질환으로 진단된 환자의 소변시료에 적용하여 스크리닝 된 키랄 유기산의 절대구조를 판별 분석한 결과 독특하게 (S)-lactic, (R)-lactic, (S)-2-

hydroxybutyric 그리고(R)-3-hydroxybutyric acid를 검출할 수 있었으며 I값을 이용하여 매우 신속하고 정확하게 각 유기산들의 절대구조를 확인할 수 있었다.

6. 키랄성 아미노산 프로파일링 분석

Fig. 6은 30종의 키랄성 아미노산 라세미체가 N(O,S)-EOC(S)-(+)-3-methyl-2-butyl ester 부분입체 이성질체로서 극성이 서로 다른 DB-5 및 DB-17 컬럼에 의해서 높은 분리도로 광학 분리 되었음을 보여주고 있다³⁴⁾. 절대구조를 판별할 수 있도록 각 이성질체의 I값을 구하였다. 측정된 I는 각 아미노산 거울상 이성질체에 대하여 매우 특징적이어서 시료 중의 아미노산의 입체구조를 신속하고 정확하게 판별할 수 있었다.

본 분석법은 아미노산을 수용액에서 직접 유도체화 반응시킨 후 추출함으로 기존에 보고된 분석법 보다 추출이 매우 용이하고 부분입체 이성질체로 전환 후

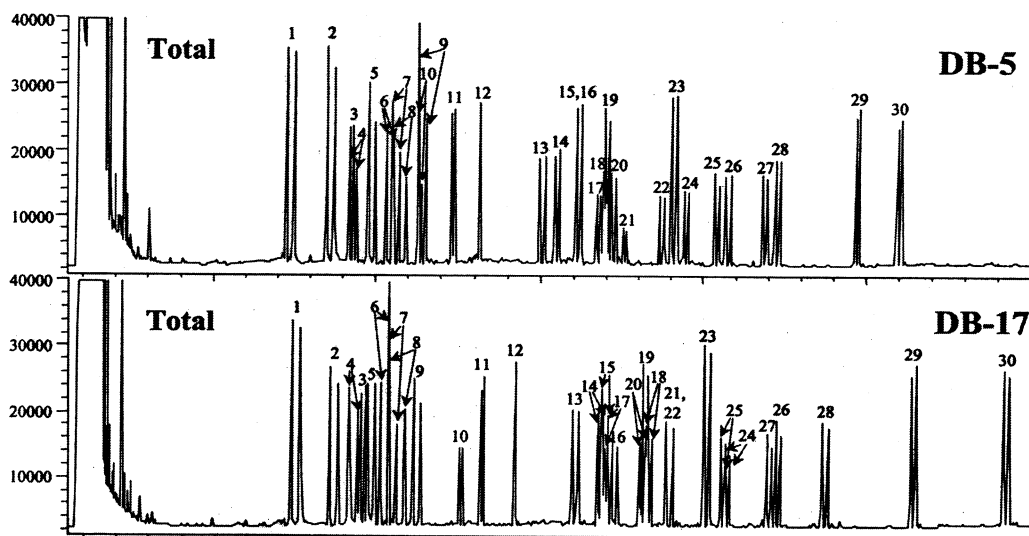


Fig. 6. Dual chromatograms of enantiomeric pairs of 30 amino acids as their diastereomeric *N*(*O,S*)-*E**O*C (*S*)-(+)-3-methyl-2-butyl esters derivatives. Peaks: 1=alanine; 2= α -aminobutyric acid; 3= β -aminoisobutyric acid; 4=valine; 5=norvaline; 6=leucine; 7=allo-isoleucine; 8=isoleucine; 9=norleucine; 10=proline; 11=pipecolic acid; 12=S-methyl-cysteine; 13=methionine; 14=2-phenylglycine; 15=ethionine; 16=selenomethionine; 17=aspartic acid; 18=2,3-diaminopropionic acid; 19=phenylalanine; 20=selenoethionine; 21=cysteine; 22=glutamic acid; 23=homophenylalanine; 24=homocysteine; 25=aminoadipic acid; 26=ornithine; 27= α -aminopimelic acid; 28=lysine; 29=tyrosine; 30=tryptophan. (Analyst, 2001;262:128-2133)

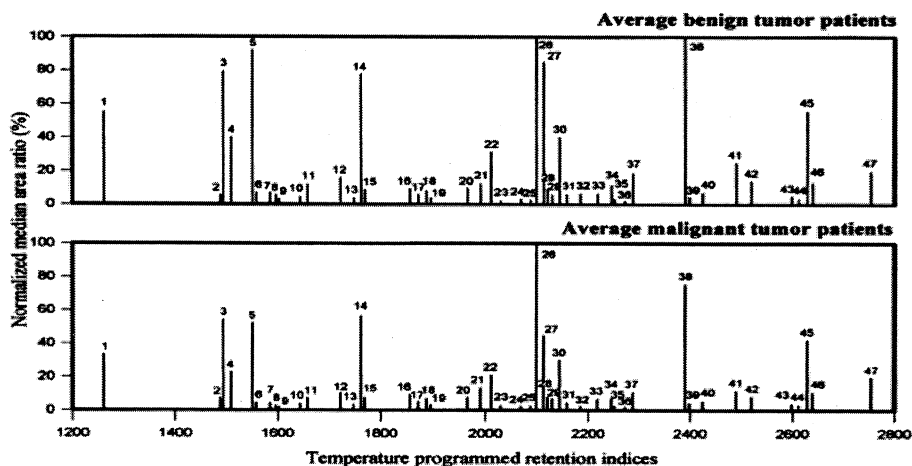


Fig. 7. Average retention index spectra of urinary organic acids from benign tumor group (uterine myoma patients) and malignant tumor group (uterine cervical cancer patients) separated on Ultra-2 (25 m \times 0.20 mm I.D., 0.33 μ m film thickness) capillary column. GC conditions are described in the text. Peaks: 1=pyruvic acid; 2=benzoic acid; 3=lactic acid; 4=glycolic+2-hydroxyisobutyric acid; 5=oxalic acid; 6=2-hydroxybutyric acid; 7=2-hydroxy-2-methylbutyric acid; 8=3-hydroxybutyric acid; 9= γ -ketocaproic acid + γ -hydroxyisovaleric acid; 10=malonic acid; 11=methylmalonic acid; 12=ethylmalonic acid; 13=maleic acid; 14=succinic acid; 15=methylsuccinic acid; 16=glutaric acid; 17=3-methylglutaric acid; 18=*trans*-3-hexenedioic acid; 19= γ -hydroxyphenylacetic acid; 20=adipic acid; 21=3-methyladipic acid; 22= γ -ketoglutaric acid; 23=3-phenyllactic acid; 24=m-hydroxyphenylacetic acid; 25=pimelic acid; 26=hippuric acid; 27=p-hydroxyphenylacetic acid; 28=p-hydroxybenzoic acid + malic acid; 29=citramalic acid; 30=phthalic acid; 31=3-indoleacetic acid; 32=suberic acid; 33=2-hydroxyglutaric acid; 34=4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid; 35=4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid; 36=azelaic acid; 37=palmitic acid; 38=*trans*-aconitic acid; 39=*cis*-aconitic acid; 40=p-hydroxymandelic acid; 41=stearic acid; 42=4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid; 43=p-hydroxyphenyllactic acid; 44=ferulic acid; 45=citric acid; 46=isocitric acid; 47=hydroxyhippuric acid(J. Chromatogr. B, 1998;712:11-22).

비키탈 컬럼에서 분석함으로써 신속하고 정확하게 광학 분리를 할 수 있는 장점을 갖고 있다. 본 키랄 분석법을 질환과 관계한 임상시료에는 아직까지 적용하지 못하였다.

7. 패턴인식 분석

Fig. 7은 임상환자(자궁근종과 자궁암) 소변시료의 유기산 GC 프로파일을 간단한 I 스펙트라 패턴으로 전환하여 비교하고 있다²³⁾. 동정된 유기산의 I 값에 대한 정량 자료를 선 그래프로 표현함으로써 복잡한 GC 크로마토그램을 간단한 패턴으로서 두 시료간의 차이

를 간단히 식별할 수 있도록 해준다. 본 패턴 인식법을 유전성 대사질환과 관계한 임상시료에는 아직까지 적용하지 못하였다.

Fig. 8은 9명의 X-ALD 선천성 신경질환 환자의 혈액 지방산 파라미터인 C22:0(%), C24:0(%), C26:0(%), C24:0/C22:0, C26:0/C22:0 및 C26:0(g/ml) 값을 정상그룹 값에 대한 비율을 가지고 환자 시료의 특성을 스타 그래프로 표현하였다¹¹⁾. 각 환자의 도형적 패턴내부에 존재하는 정상 그룹의 조그만 정육각형 스타 패턴은 각 환자인 경우 6종의 파라미터가 정상수치에 비해서 얼마나 증가되었는지를 신속히 비교할 수 있도록

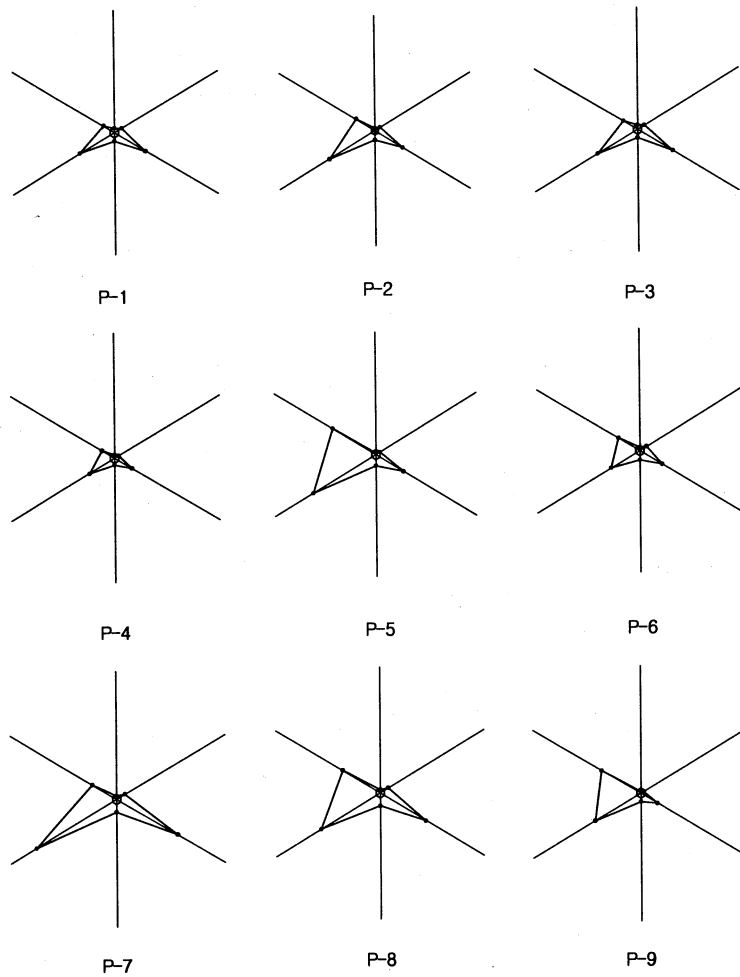


Fig. 8. Star symbol plots of individual X-ALD patients(P-1 though P-16), and patient and normal group averages drawn based on the levels of the very long chain fatty acid variables after normalization to the corresponding median values of the normal group. Rays: 1=C22:0(%); 2=C24:0 (%); 3=C26:0(%); 4=C24:0/C22:0; 5=C26:0/C22:0; 6=C26:0 (g/ml). (J. Chromatogr. B, 2001;760: 149-57).

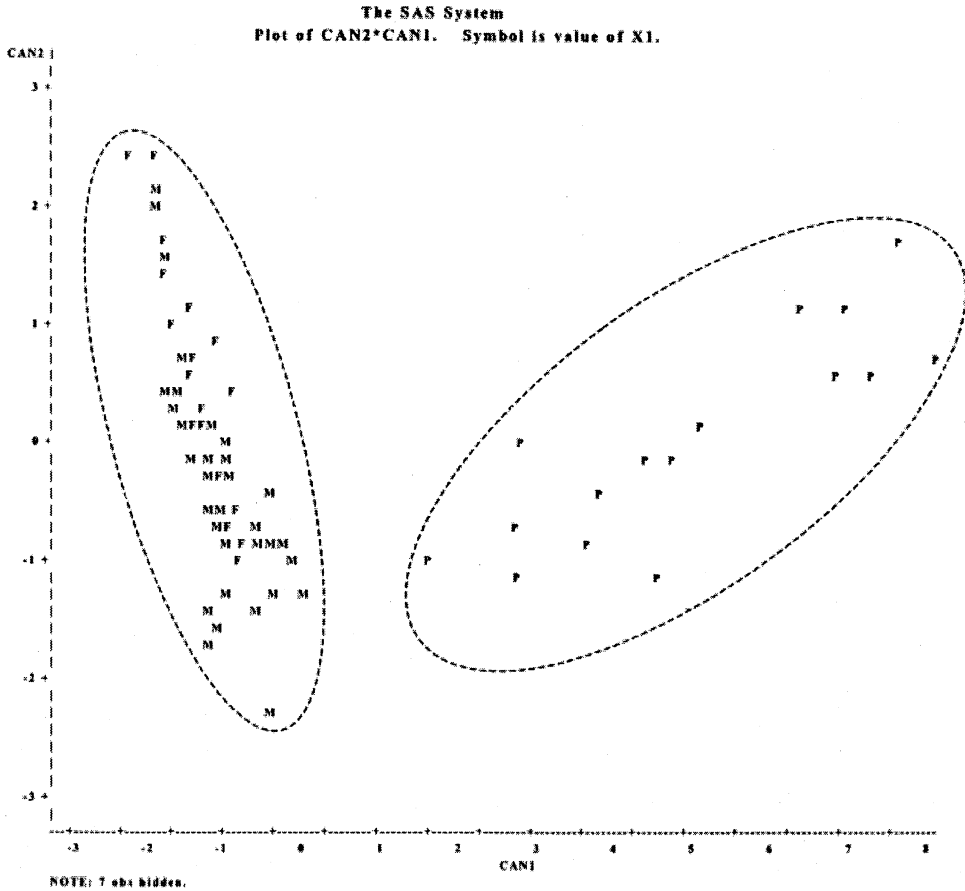


Fig. 9. Plot of the first canonical discriminant function(CAN1) against the second canonical discriminant function(CAN2) of the very long chain fatty acid variables for the 58 normal subjects(each represented by M for male and F for female) and 16 X-ALD patients(each represented by P). Variables: C22:0(%), C24:0(%), C26:0(%), C24:0/C22:0, C26:0/C22:0 and C26:0(g/ml).(J. Chromatogr. B, 760(2001) 149-157)

록 하는 장점을 가지고 있다.

Fig. 9는 16명의 X-ALD 환자와 58명의 정상인의 X-ALD 선천성 신경질환의 파라미터인 C22:0(%), C24:0(%), C26:0(%), C24:0/C22:0, C26:0/C22:0 및 C26:0(g/ml) 값에 대한 정준판별 분석 후 얻어진 정준도면으로서 두 그룹의 뚜렷한 군집 패턴을 보여주고 있다¹¹⁾.

결 론

여기에 소개한 본 연구실의 체계적인 유기 성분분석법이 생체액의 정기적인 모니터링을 통한 예방의학

적 연구, 병증을 판별해 주는 효율적인 패턴인식법 개발, 특정 효소의 대사과정에 대한 생화학적 연구 및 유전성 대사질환의 조기 진단 및 치료 과정 모니터링에 기반 임상분석법으로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- 1) Liebich HM, Foerst C. Basic profiles of organic acids in urine. J. Chromatogr 1990;525:1-14.
- 2) Niwa T. Phenol and p-cresol accumulated in uremic serum measured by HPLC with fluorescence detection Clin. Chem 1993;39:108-111.

- 3) Lee SH, Suh JW, Chung BC, Kim SO. Polyamine profiles in the urine of patients with leukemia. *Cancer Lett* 1998;122:1-8.
- 4) Rinaldo P, Yoon HR, Yu C, Raymond K, Tiozzo C, Giordano. Sudden and unexpected neonatal death: a protocol for the postmortem diagnosis of fatty acid oxidation disorders. *Semin Perinatol* 1999;23:204-10.
- 5) Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Ohse M, Zhenwei, X, Yoshida I, Inokuchi T, Yamaguchi S, Takayanagi M, Matsumoto I. Pilot study of gas chromatographic-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after treatment with urease. *J Chromatogr. B* 1999;731:141-7.
- 6) Korman SH, Mandel H, Gutman A. Characteristic urine organic acid profile in peroxisomal biogenesis disorders. *J Inherit Metab Dis* 2000;23:425-8.
- 7) Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. Dignosis of inborn errors od metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res* 1995;38:324.
- 8) Shigmatsu Y, hata I, Nakai A, Kikawa Y, Sudo M, Tanaka Y, Yamaguchi S, Jakobs C, Prenatal Dignosis of organic Acidimias based on amniotoc fluid levles of acylcarnitines *Ped res* 1996;39:680.
- 9) Suh JW, Lee SH, Chung BC, Park J. Urinary polyamine evaluation for effective diagnosis of various cancers. *J Chromatogr B* 1997;688:179-86.
- 10) Choi MH, Kim KR, Kim YT, Chung BC. Increased polyamine concentration in the hair of cancer patients. *Clin Chem* 2001;47:143-144.
- 11) Paik MJ, Kim KR, Yoon HR, Kim HJ, Diagnostic patterns of very long chain fatty acids in plasma of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Chromatogr B* 2001;760:149-157.
- 12) Kamerling JP, Vliegenthart JFG. Glass Capillary Chromatography in Clinical Medicine and Pharmacology: Determination of the absolute configuration of chiral hydroxy acids by GLC NewYork 1985;371-91.
- 13) Geerts Y, Renier WO, Bakkeren J, Dejong J. 2-hydroxyglutaric aciduria: a case report on an infant with the d-isomeric form with review of the literature *J. Neurol. Sci* 1996;143(issue 1-2): 166-9.
- 14) Kim KR, Lee J, Ha D, Jeon J, Park HG, Kim JH, Enantiomeric separation and discrimination for 2-hydroxy acids as O-trifluoroacetylated(S)-(+)-3-methyl-2-butyl esters by achiral dual-capillary column gas chromatography. *J Chromatogr A* 2000;874:91-100.
- 15) Kim KR, Lee J, Ha D, Kim JH. Configurational analysis of chiral acids as O-trifluoroacetylated(-)-menthyl esters by achiral dual-capillary column gas chromatography, *J Chromatogr A* 2000;891: 257-66.
- 16) Teresa Galceran M. Jauregui Olga. Determination of phenols in sea water by liquid chromatography with electrochemical detection after enrichment by using solid-phase extraction cartridges and disks *Analytica Chimica Acta* 1995;304:75-84.
- 17) Masque N, Pocurull E, Marce RM, Borrull F. Determination of eleven priority 醃 phenolics at ng L-1 levels by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with UV and electrochemical detection *Chromatographia* 1998;47:176-82.
- 18) Kim KR, Hahn MK, Zlatkis A, Horning EC, Middleditch BS. Simultaneous gas chromatography of volatile and nonvolatile carboxylic acids as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr* 1989;468:289-301.
- 19) Oh CH, Kim JH, Kim KR, Mabry TJ, Brownson DM. Simultaneous gas chromatographic analysis of non-protein and protein amino acids as N(O, S)-isobutyloxycarbonyl tert.-butyldimethylsilyl derivatives, *J Chromatogr A* 1994;669:125-37.
- 20) Kim KR, Paik MJ, Kim JH, Dong SW, Jeong DH. Rapid gas chromatographic profiling and screening of biologically active amines. *J Pharm Biomed Anal* 1997;15:1309-19.
- 21) Kim KR, Kim H. Gas chromatographic profiling and screening for phenols as isobutoxycarbonyl derivatives in aqueous samples. *J Chromatogr A* 2000;866:87-96.
- 22) Kim KR, Kim JH, Jeong DH, Paik DJ, Liebich HM. Gas chromatographic profiling analysis of urinary organic acids from smokers and smokers. *J Chromatogr B* 1997;701:1-8.
- 23) Kim KR, Park HG, Paik MJ, Ryu HS, Oh KS, Myung SW, Liebich HM. Gas chromatographic profiling and pattern recognition analysis of urinary organic acids from uterine myoma patient and cervical cancer patients. *J Chromatogr B* 1998;712:11-22..
- 24) Yamamoto S, Iwado A, Hashimoto Y, Aoyama Y, Makita M. Gas chromatography mass spectrometry of polyamines as their N-ethyloxycarbonyl derivatives and identification of sym-homo-spermidine and sym-norspermine in mosses and ferns *J Chromatogr* 1984;303:99-108.

- 25) Blau KB, Halket JM. Handbook of derivatives for chromatography, John Wiley & Sons New York 1993.
- 26) Yamamoto S, Iwado A, Hashimoto Y, Aoyama Y, Makita M. J Chromatogr 1984;303:99.
- 27) Skarping G, Dalene M, Brorson T, Sandstroem JF, Sangoe C, Tiljander A. Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines; I. Determination of 1,6-hexamethylenediamine using glass capillary gas chromatography and thermionic specific detection J Chromatogr 1989;479:125-133.
- 28) Choi MH, Kim KR, Chun BC. Determination of hair polyamines as N-ethoxycarbonyl-N-pentafluoro-propionyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 2000; 897:295-305.
- 29) Rhodes G, Miller M, McConnell ML, Novotny M. Metabolic abnormalities associated with diabetes mellitus, as investigated by gas chromatography and pattern-recognition analysis of profiles of volatile metabolites Clin Chem 1981;27:580-585.
- 30) Jellum E, Bjornson I, Nesbakken R, Johansson E, Wold S. Classification of human cancer cells by means of capillary gas chromatography and pattern recognition analysis J Chromatogr 1981; 217:231-237.
- 31) Jellum E, Harboe M, Bjune G, Wold S. Interpreting complicated chromatographic patterns J. Pharmaceut. Biomed Analysis 1991;9:663-669.
- 32) Halket JM, Przyborowska A, Stein SE, Mallard WG, Dow S, Chalmers RA. Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids-potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders Rapid Commun Mass Spectrom 1999;13:279-284.
- 33) Kim KR, La S, Kim A, Kim JH, Liebich HM. Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from uterine myoma and cervical cancer patients. J Chromatogr B 2001;754:97-106.