

생체시료 중 미량 아미노산 대사 프로필을 위한 분석법 응용

남형욱^{1,2} · 박송자¹ · 표희수^{1,*} · 팽기정²

¹한국과학기술연구원, 생체대사 연구센터

²연세대학교, 화학과

(2003. 7. 7 접수, 2003. 8. 8 승인)

Applied Analysis for Metabolic Profiling of Trace-level Amino Acid in Biological Fluid

Hyung Wook Nam^{1,2}, Song-Ja Park¹, Hee Soo Pyo^{1,*} and Ki Jung Paeng²

¹Korea Institute of Science and Technology, Bioanalysis and Biotransformation Research Center
P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 136-650, Korea

²Department of Chemistry, Yonsei Univ.

(Received Jul. 7, 2003, Accepted Aug. 8, 2003)

요약 : 유전학적으로 밝혀지지 않은 생물학적 연구에 있어서 작은 분자량의 아미노산 또는 홀몬과 같은 대사체들은 그 변화와 여러 생물학적 데이터와 결합 되어 직접적인 생화학적 의미 해석을 가능하게 한다. 미량의 생체 시료에 존재하는 아미노산을 분석하기 위해서 HPLC/FLD를 사용하였으며, 감도가 우수하고 반응시간이 빠른 유도체화 방법인 OPA/3-MPA로 형광 유도체화 하여 세포 배지를 바탕시료로 하여 아미노산을 분석하였다. 유도체화물의 시간에 대한 불안정성을 개선하기 위하여 다 단계의 injector program을 사용하여 유도체화 반응 후 시료 주입시간을 일정하게 조절하여 유도체화 과정 중 발생할 수 있는 불순물 제거 및 정량성을 개선하였다. 19종 아미노산의 표준 검정 곡선은 0.5 - 100.0 ppb의 범위에서 $r^2=0.99$ 이상의 직선성을 나타냈으며, 검출 한계는 1.70 pmol(GLU) - 23.81 pmol(SER) 범위로 측정되었다. 이를 통해 다량의 세포를 대상으로 하는 대사 프로필을 위해 감도가 우수하고 안정적으로 정량할 수 있는 분석법을 설정하였다.

Abstract : The universality of low molecular weight metabolites (*i.e.* amino acids, steroid hormones) allows rapid and straightforward investigation of biochemistry of genetically un-characterized species. Thus *in vivo* metabolic profiling of amino acid in combination with multivariate data analysis (metabolomics) offers great potential in comparative biology. In this paper, amino acid profiles in biological fluid (media) were studied by using HPLC/FLD. HPLC procedure for amino acids require the formation of derivatives due to the low absorption of the free compounds. *o*-Phthalaldehyde (OPA) used in association with a thiol, such as 3-mercaptpropionic acid (3-MPA), is one of the most popular and sensitive reagents, which yield quickly fluorescent iso-indoles at room temperature. To improve

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-958-5181 Fax : +82+(0)2-958-5059

E-mail : pbs3692@kist.re.kr

unstability of OPA/3-MPA derivatization, we optimized injector programs for fixed injection times. Linear regressions for the standard curves were linear in the range 0.5 - 100.0 ppb, giving correlation coefficients above 0.99. The detection limit were 1.70 pmol(GLU) - 23.81 pmol(SER). It is practically useful when the amount of sample is very low on single cells.

Key words : metabolic profiling, amino acid, HPLC/FLD, injector program

1. 서 론

최근에는 유전공학이 발달함에 따라서 특정 대사에 대하여 유전자 변이를 시켜 일반의 생명현상과 대사 프로필을 비교하여 생체대사 메카니즘을 규명하는 기술 (metabolomics)이 가능하게 되었다. 생체에서 대사체 (metabolite)는 유전형질 (phenotype)을 가장 잘 나타내는 소분자를 의미한다. 또한 그 집단체들을 대사체군 (metabolome)이라 하고, 이는 세포 부유물 (cell suspension) 혹은 모든 생체액 (biological fluid) 안에 존재하는 작은 분자량 (100 - 1000)을 갖는 것들을 의미한다.

이러한 대사체군들의 대사 프로필 (metabolic profile)이란 한번의 전처리 과정 및 기기를 이용한 시험 분석을 통해 얻어지는, 인체 내 특정 대사에 관여하는 대사체군에 대한 일련의 정량적인 데이터를 의미하고,¹ 이는 대사체와 관련된 기술인 metabolomics의 초기 연구 단계라 할 수 있다.

기존의 임상 화학적 시험 (clinical chemical test)들이 이미 알려진 하나 또는 몇 개의 성분만을 검출할 수 있었던 것에 반해, 프로필 분석 (profile analysis)은 대사적으로 혹은 분석적으로 관련이 있는 다수의 물질들을 동시에 검출 및 확인할 수 있다. 이로 인하여 예상치 않았던 새로운 물질을 찾아낼 수 있으며, 여러 성분들간의 상대적 농도 비율의 변화 등을 관찰할 수 있으므로 정상 상태 및 대사 이상에 관련된 대사체들 (예를 들면 아미노산, 스테로이드 호르몬, 유기산 등)의 상대적 변화를 통해 대한 많은 정보들을 얻을 수 있고,² 대사 경로 상에서의 전구물질 (metabolites of precursors)과 생성 물질 (metabolites of products) 간의 불균형으로부터 관련 효소의 비활성도를 예상할 수 있다. 또한 유전공학이 발달함에 따라서 특정 대사에 대하여 유전자 변이를 시켜 일반의 생명현상과 대사 프로필을 비교하여 생체대사 메카니즘을 규명하는 연구도 가능하게 되었다.

여러가지 형태의 대사체 가운데 아미노산은 인체 내

모든 대사 및 체내 단백질 합성에 관련되며, 특히 중추신경계에서 신경전달물질³⁻⁶ 또는 그 전구물질로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, glutamic acid와 aspartic acid는 신경흥분성 물질로, glycine, γ -aminobutyric acid (GABA), taurine 등은 신경억제성물질로, glycine, serine은 메틸전이반응의 변환기 (transducer)로, tyrosine, tryptophan 및 histidine은 신경전달물질의 전구물질로 알려져 있다. 일반적으로 대사, 성장 또는 단백질과 아미노산의 대사에 영향을 미치는 체세포와 조직의 복제 시에 방해 또는 비정상적인 상황으로 인하여 세포 부유물 혹은 모든 생체액 중의 아미노산 농도가 급격히 변화될 수 있다. 따라서 아미노산 대사체의 프로필 변화는 다양한 생리학적 조건과 병리학적 상황에 대한 민감한 표시자가 될 수 있다.⁷⁻¹²

따라서 이와 같은 각종 질환 또는 대사의 과정의 확인을 위한 자료로서 세포 부유물 혹은 생체액과 같은 생체물질에서의 유리 아미노산에 대한 대사 프로필의 확인은 필수적인 사항이다. 이와 같은 대사 프로필을 위한 시료의 특성은 생체 물질이라 외부에 노출 되었을 때 시료 자체의 효소에 의한 변성이 쉽고, 양적으로 소량 존재하며, 목적으로 하는 대사체 이외에 유사한 많은 불순물의 영향으로 고정된 실험 조건 및 환경이 요구된다. 또한 대사의 정상과 비정상 상태의 비교는 개체 간 오차를 감안하기 위해 동일종의 많은 시료 결과가 필요하기 때문에 분석의 신속함과 안정성이 요구된다.

일반적으로 아미노산의 분석에서는 이온교환 크로마토그래피법 (ion-exchange chromatography)으로 분리하고 ninhydrin, fluorescamine, 또는 *o*-phthalaldehyde에 의한 post-column 유도체화방법을 사용해 분석해 왔다. 이러한 방법들은 아미노산의 분리가 잘 되지만 분석시간이 1시간 이상 걸리고 검출한계가 높으며, 불안정한 glutamine과 asparagine은 정량하기 어렵다. 최근에 *o*-phthalaldehyde (OPA), dansyl chloride, 9-fluorenyl methoxy carbonyl chloride (FMOC), phenylisothio cyanate (PITC) 등으로 유

도체화한 후 자외선검출기 또는 형광검출기로 분석하는 방법이 개발되어 검출감도가 향상되었으나, dansyl chloride 방법은 유도체반응시간이 3-4시간이나 걸리고, FMOc 방법은 2차 아미노산만 분석가능하기 때문에, 유도체화 및 검출이 1시간 내에 이루어지며 정확한 정량이 가능한 PITC법이 많이 활용되고 있다. 최근에는 LC/MS나 tandem MS(MS/MS)와 같은 새로운 분석기술의 개발로 복잡한 전처리과정을 거치지 않고도 한번에 여러 종류의 아미노산을 스크리닝 할 수 있는 방법도 있으나 정량성은 아직 부족하다.¹³⁻¹⁴

본 연구에서 생체내 세포 부유물이나 생체액에 존재하는 미량의 19 종의 유리 아미노산 대사체의 검출을 위하여 최소 배지를 바탕 시료로 injector program을 최적화 하여 on-line으로 OPA/3-MPA 유도체화 시킨 후 HPLC/FLD를 사용하였다. 이를 통하여 다량의 시료에서 안정적으로 pmol scale의 정량값을 얻을 수 있는 분석법을 설정하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 표준 시약

본 연구에 사용된 19 종의 아미노산 표준품과, 내부표준물질 (norvaline), *o*-phthalaldehyde (OPA), 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) 등은 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.) 제품이 며, methanol, acetonitrile 등은 HPLC 용을 Whatman (Kent, UK)사의 membrane filter (pore size 0.2 μ m)로 여과하여 사용하였고, 기타 시약들은 1급 또는 특급 시약을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q 및 Milli-RO system을 통과한 3차 증류수를 Whatman사의 membrane filter (pore size 0.2 μ m)로 여과한 것을 사용하였다.

2.1.1. 표준시료 제조

19 종의 아미노산 표준품과 내부표준물질 (norvaline)은 각각 0.1M HCl 용액에 녹여 1000 μ g/ml가 되도록 조제하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하고 필요에 따라 묽혀서 사용하였다. 최소 배지는 NaCl, MgSO₄, NaH₂PO₄, KCl, CaCl₂, D-glucose, HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)의 적정 배합으로 제조하였다.

2.1.2. 이동상의 제조

이동상 A는 potassium dihydrogen phosphate 5.5 g을 취해 증류수 1 l에 녹인 후 1N KOH를 첨가하여 pH

7.8로 맞추었다. 이동상 B는 methanol/acetonitrile/증류수를 45:45:10 (v/v/v)의 비율로 섞어 제조하였다.

2.1.3. OPA/3-MPA 유도체 시약 제조

o-Phthalaldehyde (OPA) 10 mg을 methanol 500 μ l에 녹이고, 0.4 M borate buffer (pH:10) 3 ml와 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) 20 μ l를 혼합하여 차광한 후 4 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관하며, 3일마다 새로 제조하여 사용하였다.

2.2. 유도체화 반응 및 시료 전처리

2.2.1. 유도체화 반응

유도체화 반응은 예상되는 시료의 농도에 적합하도록 *o*-phthalaldehyde (OPA)와 3-mercaptopropionic acid (3-MPA)의 몰농도 비율을 조절하였다. 또한 과량의 반응시약으로 인한 크로마토그램의 오염을 방지하기 위해서 시료와 반응시약간의 부피비를 20:1 (v/v)이 되도록 농도를 조절하여 혼합하였다.

2.2.2. 시료의 전처리 방법

극저온 (-70 $^{\circ}$ C)에 보관되었던 최소 배지 500 μ l를 취한 후 내부표준물질인 norvaline 10 ng/ μ l를 5 μ l 넣었다. 여기에 단백질을 제거하기 위해 acetonitrile 2 ml 첨가하여 원심 분리 (3000 rpm, 10분) 하였다. 단백질이 제거된 상층부만 분취하여 질소 증발기를 사용하여 건조시켰다. 건조된 잔류물질을 200 μ l의 증류수로 녹인 후 syringe filter(0.2 μ m I.D.)를 통과시켜 시료를 분석하였다 (Fig. 1).

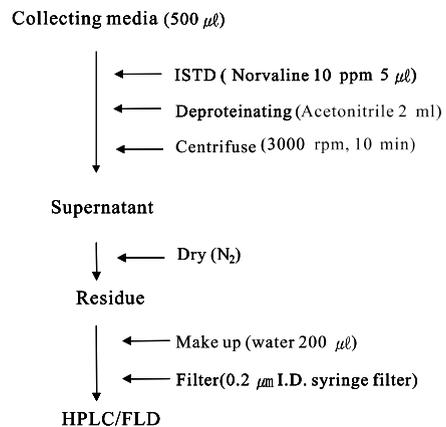


Fig. 1. Sample preparation procedure.

2.3. 분석기기 및 작동 조건

2.3.1. 분석기기

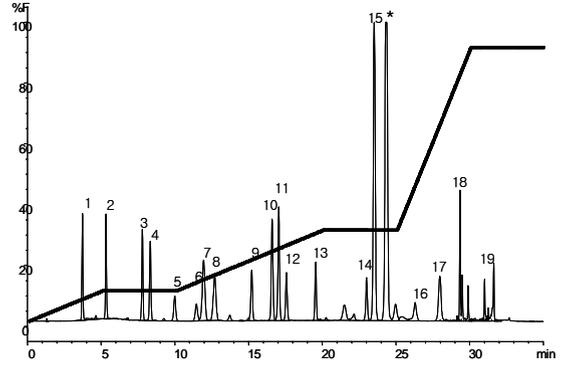
본 연구에서 사용한 기기는 유도체화된 표준물질을 분리시키기 위하여 Agilent Technologies 사(Palo alto, CA, U.S.A)의 HPLC 1100 Series (DR5 solvent delivery system, variable volumn autoinjector, temperature controlled column compartment)를 사용하였다. 검출기로는 Agilent Technologies 1046A fluorescence detector (FLD)를 사용하였고, 자료의 정리에는 HP Vectra 5000 컴퓨터와 HP 870K Deskjet 프린터를 사용하였다. 분리용 컬럼은 Agilent Technologies 사(Palo alto, CA, U.S.A)의 Zorbax Extended-C₁₈ (4.6 mm I.D.×150 mm, 5 μm)을 사용하였고, 시료의 전처리를 위해 Thermolyne 사(Spark, NV, U.S.A)의 16500 Dry bath와 Zymark (Hopkinton, MA, U.S.A) 사의 Turbo Vap LV evaporator 및 Heecacus사의 Varifuge-F 원심분리기를 사용하였다.

2.3.2. HPLC 분석 조건

HPLC 분석 조건은 내경 4.6 mm이고 길이 150 mm의 Zorbax Extended-C₁₈ 컬럼을 사용했으며, 이동상으로는 50 mM phosphate buffer (pH 7.8)와 ACN:MeOH:H₂O (45:45:10, v/v/v)의 혼합 용액을 유속 1.0 ml/min로 기울기 용리 (gradient elution)로 흘려주었다 (Fig. 2). 19 종 아미노산 유도체는 극성의 범위가 넓기 때문에 아미노산 유도체의 분리를 위해 Table 1과 같이 기울기 용리를 최적화 하였다. 형광 검출을 위해서 아미노산 유도체의 특징적인 excitation (340 nm)과 emission (450 nm)에서 검출하였다. 또한 분리 컬럼을 세척하기 위해 10 분간의 post time을 주었으며 시료의 용리액에 대한 용해도를 높이고 용리액의 점도를 감소시켜서 컬럼 내의 압력을 낮추기 위해 column oven 온도를 40 °C로 고정시켜 주었다.

2.3.3. Injector program

시료 주입은 HPLC의 주입기 내에서 OPA/3-MPA 시약 0.2 μl를 취하고 증류수로 needle을 세척한 후 시료 4 μl를 취하는 과정을 5번 반복하여, 총 시료량 20 μl와 OPA/3-MPA 유도체화 시약 1 μl를 injection port 앞 부분에 있는 100 μl loop에서 혼합하여 유도체화 한 후에 주입하였다 (Table 1).



1-19: peak number ; *: Internal Standard (norvaline)

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
5	90	10
10	90	10
20	70	30
25	70	30
30	20	80

Fig. 2. HPLC Chromatogram of mixture of OPA derivatized amino acids by gradient elution.

Table 1. HPLC/FLD operating parameters

Column : Zorbax Extended-C₁₈ (4.6 μm × 150 mm , 5 μm)
 Mobile phase A: Phosphate Buffer (pH 7.8)
 B: ACN: MeOH: water (45:45:10, v/v/v)
 Gradient elution ; (Fig. 6)

Flow : 1 ml/min
 Column oven temperature : 40 °C
 Run time: 35 min; Post time: 10 min
 Detector: (FLD) Ex.: 340 nm Em.: 450 nm

Step	Operation	Details	Substance
1	Draw 0.2 μl	From vial 1	OPA/3-MPA reagents
2	Draw 4 μl	From sample	Amino acid (sample)
3	Draw 0 μl	From vial 2	Water for needle wash
4-15	Repeat 4 times (1-3 step)		
16	Mix	"in Air" 5 times 50 μl	Derivatisation
17	Inject		Derivatives

3. 결과 및 고찰

3.1 유도체화 반응의 최적 조건

본 실험에서는 최소 배지 시료의 아미노산을 OPA/3-MPA로 유도체화하여 형광을 나타내는 isoindole 체 (ex: 340 nm, em: 450 nm)를 형성시켜 분석하였다. OPA 유도체화는 기본적으로 OPA에 alkyl-thiol을 치환시킨 형태로 3-MPA 경우는 카복실기가 OPA를 안정시킴으로써 다른 OPA-thiol 치환체보다 상대적으로 좋은 형광 (10-55%)과 안정성을 가진다.¹⁵⁻¹⁶ OPA/3-MPA 유도체화법은 유도체화 반응 시간이 짧고, 실온에서 일어나며, 하나의 product에 대하여 높은 수율을 보이고, 물과 반응하지 않는 장점이 있다 (Fig. 3). 반면 OPA/3-MPA 유도체화 반응은 생성물의 시간에 따른 안정성이 떨어지며, 유도체화 시간으로 인한 실험적인 손실이 있다는 단점이 있다.

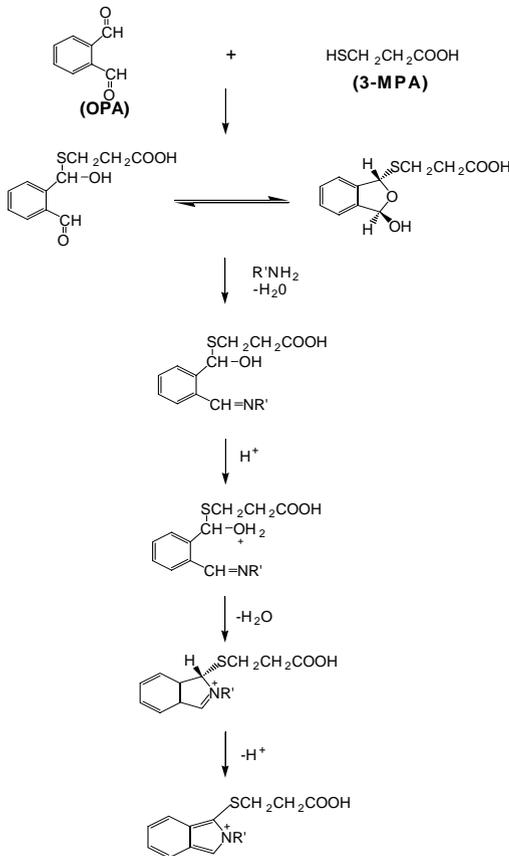


Fig. 3. Formation of isoindole derivative of amino acid.

OPA/3-MPA 유도체화 시약 제조시의 pH 조건은 크로마토그램에서 좋은 감도와 분리도를 갖게 한다. 낮은 pH에서는 isoindole 유도체가 가수분해되어 크로마토그램 상에 impurity가 나타나서¹⁷ pH를 10으로 조정하였다. 아미노산 유도체화 반응에 의한 감도는 유도체화 시약의 농도의 영향을 받는다.¹⁸ 일반적인 유도체화 반응의 경우, 유도체화 시약은 분석물의 농도에 비해 과량을 넣어 유도체화 반응을 시킨다. 그러나 높은 OPA 농도는 isoindole 유도체의 높은 불안정성을 유발시키기 때문에, side product peak의 생성을 최대한 감소시키고 검출 한계를 향상시킬 수 있도록 OPA와 3-MPA 간의 몰농도를 조절하여 유도체화 시약을 제조하였다.

Fig. 4는 OPA/3-MPA 시약에서 3-MPA의 몰농도 비율에 따른 크로마토그램을 비교한 것이다. OPA:3-MPA의 몰농도 비율이 1:30인 경우와 1:3일 경우를 비교한 결과 OPA:3-MPA=1:3인 경우 side product의 생성이 감소하여 LC 크로마토그램상의 base line이 안정화되어 분리도와 감도를 향상시킬 수 있었다. OPA/3-MPA 유도체의 경우 좋은 감도를 나타내는 1-alkylthio-2-alkyl substituted isoindole을 형성하지만, 이와 같은 impurity peak이 나타나는 이유는 과량의 3-MPA 시약이 첨가될 경우 1,3-dithio-substituted-2-alkyl substituted isoindole을 형성하기 때문으로 알려져 있다.¹⁷

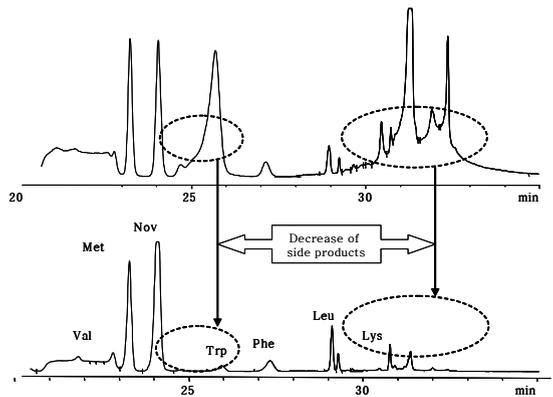


Fig. 4. Effect of OPA vs. 3-MPA concentration ratio on chromatograms. (up; OPA:3-MPA=1:30, down; OPA:3-MPA=1:3)

3.2 유도체화물의 시간에 따른 안정성

OPA/3-MPA 유도체화반응은 OPA와 3-MPA가 혼합되었을 때 가역 반응이 매우 빠르게 일어난다. 이와 같

은 현상은 유도체화 반응의 생성물인 isoindole 유도체의 안정성이 감소되어 크로마토그램 상에서 시간이 지날수록 아미노산 유도체화물의 peak area의 degradation이 일어나기 때문이다.¹⁷ 이는 같은 시료에 대해 크로마토그램의 변형 및 side product peak를 증가시키고, 정량값의 재현성을 감소시킨다.

또한 glycine, GABA, lysine 등의 유도체화물은 multi-derivatisation 되어 여러 개의 peak을 생성시킨다. Multi-derivatisation된 아미노산 경우는 다른 유도체화물에 비해 상대적으로 안정성 및 정량성이 감소되고, fluorescence quenching에 의해서 낮은 농도의 검출이 어렵다. 다음 Fig. 5와 Table 2는 유도체화 된 시료를 총 550분 동안 12번 주입한 경우 peak area 비율의 변화를 나타낸 것이다. 유도체화 반응 후 약 10시간 후에 serine (SER)과 lysine(LYS)의 경우 32.43, 38.81% 까지 감소했으며, 평균적으로 약 11%의 peak area의 변화가 있었다. 따라서 대사 프로필과 같이 다수의 시료가 존재할 경우에 동시에 전처리 한 후 auto-sampler를 이용하여 시료를 분석할 경우에는 일부 아미노산의 경우 정량값의 재현성이 감소하게 된다.

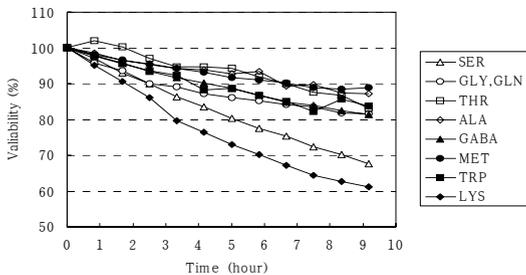


Fig. 5. Decrease tendency in peak area ratio to time.

3.3. Injector program의 최적화

위와 같은 유도체화 물의 불안정성을 개선하기 위하여 적용할 수 있는 방법이 injector program이다. 컬럼 분리전에 시료를 유도체화를 시켜 (pre-column 법) 컬럼에서 분리 분석하는 OPA/3-MPA 법은 유도체화물이 불안정한 단점을 갖는다. 이를 개선하기 위해 injector program으로 전처리한 생체 시료를 AOLS (Automatic on-line system)를 이용하여 HPLC에 주입하기 전에 동일한 유도체화 과정과 환경으로 유도체화 시킨 후, 시료를 분석하여 유도체화물의 정량 재현성을 개선하였다.

Table 2. Variability of peak area for 12 times injection

Peak No.	Amino Acid	Variability of peak area(%)
1	ASP	2.44
2	GLU	0.49
3	ASN	1.88
4	SER	32.43
5	HIS	7.87
6,7	GLY, GLN	18.33
8	THR	16.78
9	ARG	2.69
10	ALA	12.74
11	TAU	4.32
12	GABA	18.69
13	TYR	2.06
14	VAL	5.56
15	MET	11.15
16	TRP	16.30
17	PHE	4.08
18	LEU	2.23
19	LYS	38.81

OPA와 3-MPA 그리고 아미노산의 농도와 시료의 부피의 적정 비를 환산해 총 시료의 부피가 유도체화 반응시약의 부피의 20 배일 때 유도체화가 최적으로 이루어지도록 조절하였다. 이를 injector program에 적용하면 시료 주입량이 20 μl 일 때 유도체화 반응 시약은 1 μl 가 loop에서 혼합되어야 한다. Fig. 6은 시료 20 μl 와 유도체 시약 1 μl 를 단순히 혼합했을 경우 (general)와, 같은 양을 5번 분할 (separate control)하여 혼합했을 때를 비교한 것이다. Injector에서 mixing step은 100 μl 의 loop에서 이루어지는 것으로 반응시약과 시료간의 혼합이 어렵기 때문에, 같은 양을 5번 분할하여 혼합함으로써 크로마토그램에서 mixing의 비효율로 후반 시간대 나타나는 hydrophobic한 side product peak를 감소시키고 바탕선을 안정화시킬 수 있었다.

3.4. 전처리 방법의 회수율 비교

생체 시료의 전처리는 분석대상 물질의 변형을 방지하기 위해서 되도록 빠르고, 간단하게 설정되어야 한다. 시료에 따라 단백질, 지방산, 암모니아 등 불순물 및 방해물질로 작용하는 것들을 제거하는 과정이 이에 포함된다. OPA/3-MPA 유도체화법에 적용되는 시료의 경우 유도체화 시약이 암모니아와 반응하기 때문에 소변과 같은 시료의 경우 암모니아 제거 과정이 필요하고,

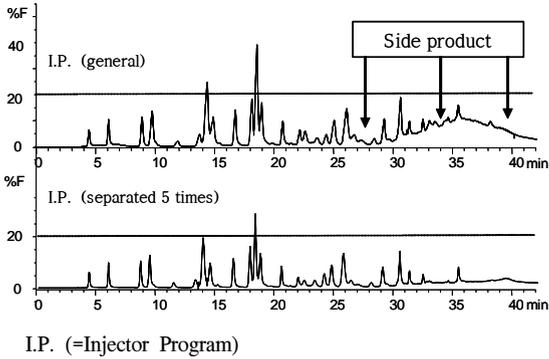


Fig. 6. Comparison of modified injection program in HPLC/FLD chromatograms.

생체시료의 경우 펩타이드와 단백질의 N-terminus와 반응하기 때문에 단백질 제거 과정이 필수적으로 요구된다.¹⁸ 일반적으로 시료에서 단백질을 제거하는 과정은 산을 이용하여 제거시키거나 유기 용매를 사용하여 단백질 분자의 용해도 차이로 제거하는 과정이 많이 사용된다. 일반적으로 산으로 단백질을 제거하는 경우 아미노산이 단백질에 흡착되어 떨어지면서 회수율이 감소하며, tryptophan과 cystine은 cysteic acid로 변형이 되고, 다른 아미노산의 경우도 조금씩 분해된다는 것이 밝혀져 있다.¹⁹

다음 Fig. 7은 대상 매트릭스인 최소 배지에서 acetonitrile 과 과염소산 (2N)으로 단백질을 제거했을 경우의 peak area 값을 비교하였고, acetonitrile의 경우 Table 3에서와 같이 상대적인 회수율이 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

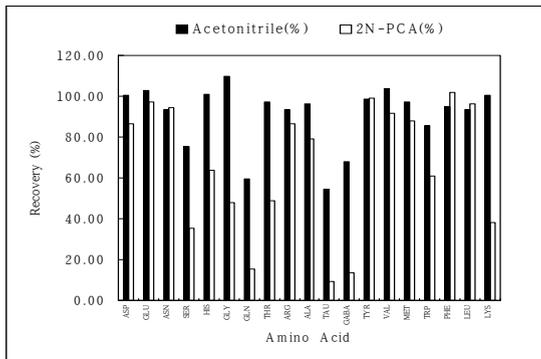


Fig. 7. Difference in HPLC/FLD chromatograms by deproteinating procedures.

Table 3. Recovery of deproteinating procedures (ACN vs. PCA)

Peak No.	Amino Acid	Recovery (%)	
		ACN	2N-Perchloric acid
1	ASP	100.3	86.4
2	GLU	102.6	97.3
3	ASN	93.5	94.4
4	SER	75.4	35.4
5	HIS	100.9	63.6
6	GLY	109.6	47.8
7	GLN	59.6	15.5
8	THR	97.4	48.7
9	ARG	93.3	86.3
10	ALA	96.0	79.0
11	TAU	54.3	9.2
12	GABA	67.7	13.6
13	TYR	98.8	98.9
14	VAL	103.9	91.5
15	MET	97.0	88.1
16	TRP	85.7	61.1
17	PHE	94.8	101.8
18	LEU	93.6	96.0
19	LYS	100.6	38.0

(n=3) concentration: 100 ppb

3.5. 머무름 시간 및 검량선

각 아미노산의 OPA/ 3-MPA 유도체에 대하여 내부표준물질에 대한 상대 머무름 시간과 반복주입시의 재현성은 Table 4에서 보듯이 대부분의 아미노산에서 RSD 4% 이하의 양호한 재현성을 보여 주었다.

아미노산의 정량을 위하여 대상 매트릭스인 media에 각 아미노산 0.5 - 100 ppb 범위의 농도가 되도록 하여, 전처리 과정을 통해 내부표준물질에 대한 면적비로부터 표준 검량선을 구하였다 (Table 5). 모든 아미노산 유도체의 검량선의 직선성은 모두 0.99이상이었으며, 검출한계 (S/N=3)는 1.70 pmol (0.5 ppb; GLU)에서 23.81 pmol (5 ppb; SER) 범위로 측정되었다.

3.6. 생체시료에의 응용결과

생체 시료에의 적용을 위하여, 위의 분석 조건으로 실제 뇌세포를 배양하여 대사 프로필을 확인하였다. 시상하부의 suprachiasmatic nucleus라는 세포를 배양한 후, 5 세트의 세포에서 자발적으로 용출하는 아미노산을 3 시간 간격으로 60 시간 동안 19 종 아미노산의 변화를 확인하였다.

Table 4. Relative retention times of amino acid derivatives

Peak No.	Amino acid	Retention time(min)	R.R.T	
			Mean	R.S.D.(%)
1	ASP	2.98	0.13	2.24
2	GLU	4.46	0.20	3.70
3	ASN	6.53	0.29	0.87
4	SER	6.89	0.31	0.28
5	HIS	7.99	0.36	0.18
6	GLY	8.87	0.40	0.13
7	GLN	9.08	0.41	0.26
8	THR	10.37	0.47	0.27
9	ARG	12.09	0.54	0.27
10	ALA	13.97	0.63	0.20
11	TAU	14.59	0.65	0.17
12	GABA	15.35	0.69	0.04
13	TYR	17.77	0.80	0.61
14	VAL	21.21	0.95	0.08
15	MET	21.69	0.97	0.68
16	TRP	23.81	1.07	0.04
17	PHE	24.81	1.11	1.83
18	LEU	27.78	1.25	0.12
19	LYS	29.51	1.32	0.06

(n=5) *Internal Standard: norvaline (22.305 min)

Table 5. Standard calibration data for amino acid derivatives

Peak No.	Amino Acid	Concentration range (ppb)	y = ax + b			D.L.(S/N=3)	
			a	b	r ²	ppb	pmol
1	ASP	0.5-100	0.401	0.020	0.997	0.5	1.88
2	GLU	0.5-100	0.583	0.017	0.999	0.5	1.70
3	ASN	0.5-100	0.699	0.010	0.999	0.5	1.89
4	SER	5.0-100	1.349	0.123	0.994	5.0	23.81
5	HIS	1.0-100	0.181	0.006	0.999	1.0	3.22
6	GLY	1.0-100	0.651	0.003	0.994	1.0	6.67
7	GLN	1.0-100	2.908	0.184	0.999	1.0	3.42
8	THR	0.5-100	0.899	0.081	0.999	0.5	2.10
9	ARG	1.0-100	0.812	0.012	0.999	1.0	2.87
10	ALA	1.0-100	1.318	0.062	0.998	1.0	5.62
11	TAU	0.5-100	2.336	0.015	0.999	0.5	2.00
12	GABA	2.0-100	0.859	0.002	1.000	2.0	9.71
13	TYR	1.0-100	0.624	0.014	0.999	1.0	2.76
14	VAL	1.0-100	0.448	0.019	0.998	1.0	4.27
15	MET	1.0-100	0.825	0.012	0.999	1.0	3.36
16	TRP	5.0-100	0.567	0.030	1.000	5.0	12.25
17	PHE	5.0-100	0.851	0.012	0.999	5.0	15.15
18	LEU	1.0-100	0.849	0.020	0.999	1.0	3.82
19	LYS	2.0-100	0.218	0.015	1.000	2.0	6.85

(n=5) *Internal Standard: norvaline (100 ppb)

실제 배양한 시료에서 모든 종류의 아미노산이 검출 한계 이상으로 검출 되었고, 시간에 따른 유무 및 증감의 변화가 나타났다. 이러한 증가 감소가 시간에 따른 주기적인 패턴으로 확인 되지는 않았지만, 각 아미노산의 최대 검출량은 5 세트에서 모두 비슷한 경향으로 나타났다 (Table 6).

결과적으로 위와 같은 분석법의 응용을 통하여 suprachiasmatic nucleus의 세포에서 용출하는 pmol 수준의 아미노산량의 프로파일 확인이 가능하였으며, 본 세포의 대조군의 프로파일과 비교가 이루어 진다면, suprachiasmatic nucleus에 있어서 아미노산 대사의 프로파일 변화가 확인되리라 예상된다.

Table 6. Maximum release amounts of 19 amino acid in suprachiasmatic nucleus

Maximum release amounts.	Amino Acid
> 1000 pmol	Ser, His
> 100 pmol	Trp, Lys, Gln, Val
> 20 pmol	Ala, Met, Arg, Tyr, Gly, Leu, Thr, Tau, Asp, Phe
< 20 pmol	Asn, Glu, GABA

(n=5)

4. 결 론

본 연구에서는 아미노산의 대사 프로파일을 하고자 HPLC/FLD를 이용하여 생체액 조건에서 분석 및 실험 조건을 최적화하여 분석하는 방법을 연구하였다. 대상 시료를 최소 배지로 하여 극미량의 19 종 아미노산을 검출하기 위해 OPA/3-MPA 유도체화법을 선택하여 HPLC/FLD 분석조건을 최적화하였다.

예상되는 시료의 농도 (pmol)에 적합하도록 OPA/3-MPA 유도체화 시약을 제조하였고, 유도체화 반응의 안정성을 확인 하였다. OPA/3-MPA 유도체화물의 시간에 대한 안정성을 보완하기 위하여 최적화된 injector program으로 유도체화 반응의 과정을 일률적으로 처리 하여 정량성을 개선하였다. 생체시료의 단백질을 제거를 위해서는 acetonitrile로 전처리하는 것이 효율적이었다.

19 종 아미노산의 표준 검점 곡선은 0.5 - 100.0 ppb의 범위에서 $r^2=0.99$ 이상의 직선성을 나타냈으며, 검출 한계는 1.70 pmol(GLU) - 23.81 pmol(SER) 범위로 측정되었다. 이를 통해 다량의 세포를 대상으로 하는 대

사 프로필을 위해 감도가 우수하고 안정적으로 정량할 수 있는 분석법을 응용한 결과 suprachiasmatic nucleus의 19 종 아미노산의 시간에 따른 정량적인 프로필 변화를 확인할 수 있었다. 이는 대조군 실험의 추가를 통해 본 세포에서의 아미노산 대사체의 구체적 변화형태를 확인할 수 있으리라 예상된다.

감사의 글

본 연구에 사용된 knock-out mice의 suprachiasmatic nucleus 배양시료를 제공해 주신 KIST 학습기억현상연구단의 신희섭 박사님께 감사드립니다.

참고 문헌

1. C. H. L. Shackleton, *J. Chromatogr.*, **91**, 379 (1986).
2. H.N. Liebich, "GC profiling in metabolic disorders", 419, Mercel Dekker Inc., 1985.
3. J. R. Benson and P. E. Hare, *Pro. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 619(1975).
4. B. Erecinska, and M. Nelson, *Brain Research*, **304**, 9(1984).
5. M. W. Haupman, *Brain Research*, **304**, 23(1984).
6. G. A. Qureshi, *J. Chromatogr.*, **400**, 247(1987).
7. P. F. Benson, and A. H. Fensom, "Genetic biochemical disorders", ch 5, pp. 149-308, Oxford: Oxford University Press, 1985.
8. H. J. Bremer, M. Duran, J. P. Kamerling and H. Przyrembel, "Disturbances of amino acid metabolism", Baltimore, Urban and Schwarzenber, 1981.
9. W. L. Nyhan, "Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine", Norwalk, CT. Appleton-Century-Crofts, 1984.
10. W. L. Nyhan and N. A. Sakati, "Diagnostic recognition of genetic disease", Philadelphia: Lea and Febiger, 1987.
11. C. R. Scriver, C. L. Clow and P. Lamm, *Clin. Biochem.*, **6**, 142-188(1973).
12. C. R. Scriver, "The metabolic basis of inherited disease", New York : McGraw-Hill, 1989.
13. T. H. Zytkovicz, E. F. Fitzgerald, D. Marsden, C. A. Larson, V. E. Shih and D. L. Johnson, *Clin. Chem.*, **47**, 1945-1955(2001).
14. M. S. Rashed, *J. Chromatogr. B.*, **758**, 27-48 (2001).
15. F. R. Antonine, C. I. Wei and R. C., Littell, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 100-5107(1997)
16. M. P. Ibolya, and B. Imre, *J. Chromatogr.*, **798**, 37-46(1998).
17. L. R. Helen and F. M. Keith, *J. Neurosci. Methods*, **57**, 93-99(1995).
18. M. P. Iboya, *J. Chromatogr. A*, **913**, 283-302 (2001).
19. C. K. Lim, "Hplc of small molecules", chapter 2, IRL press, 1996.