

ESI/MS/MS를 이용한 혈장 중 카르니틴 정량분석

강승우 · 김호현 · 이경률 · 윤혜란*

141-809 서울시 용산구 동빙고동 7-14 서울의과학연구소 유전성대사질환팀

*132-714 서울시 도봉구 쌍문동 419 덕성여자대학교 약학대학 생체대사물 및 의약분석연구실
(2005. 1. 12. 접수, 2005. 3. 8 승인)

Quantitation of L-carnitine in plasma by electrospray ionization tandem mass spectrometry

Seung woo Kang, Hoh yun Kim, Kyung ryul Lee and Hye-Ran Yoon*

Department of Biochemical Genetics, Seoul Medical Science Institute (SMSI), Seoul Clinical Laboratory (SCL)

*Biomedical & Pharmaceutical Analysis Lab, College of Pharmacy, Duksung Women's University

(Received Jan. 12, 2004, Accepted Mar. 8, 2005)

요 약 : 본 연구에서는 ESI/MS/MS를 이용하여 혈장에서 카르니틴을 신속하게 정량하는 분석방법을 개발하였다. 분석방법은 free carnitine (FC)는 유도체화 없이 혈액여지를 80% 메탄올로 추출하여 분석하였고, Total carnitine (TC)은 가수분해 한 후 추출하여 multiple reaction monitoring (MRM) scan mode로 분석하였다. Acyl carnitine (AC)는 TC에서 FC를 뺀 값을 사용하였다. 카르니틴의 분석에서 상관계수 (r^2)는 0.9995, 회수율은 97%, 재현성은 변동계수가 10% 이하, 검출한계는 0.0016 $\mu\text{mol/L}$ 였다. 이 방법은 기존의 액체 크로마토그래피 보다 전처리가 간단하고 짧은 분석시간과 좋은 감도와 재현성을 보여 주었다. 정상인은 AC가 낮고 FC는 높은 패턴을 보였고, 유전성대사질환 환자는 FC는 낮고 AC가 높은 패턴으로 나타나 카르니틴의 3분획 분석은 유전성대사질환 환자의 확진 및 모니터링에 유용함을 보여주었다.

Abstract : In this study, a novel analytical method has been developed for the rapid determination of L-carnitine in human plasma using electrospray ionization tandem mass spectrometry. Free carnitine (FC) was analyzed after extraction with 80% methanol and total carnitine (TC) was analyzed after hydrolysis and extraction. Acyl carnitine (AC) was subtracted FC from TC. Analytical methods used multiple reaction monitoring (MRM) scan modes. A correlation coefficient of linear regression (r^2) was 0.9995, recovery was 97%, reproducibility was less than 10%, and limit of detection (LOD) was 0.0016 $\mu\text{mol/L}$. This method reduced sample preparation time and showed high resolution and good reproducibility compared to that with liquid chromatographic methods. Normal control showed AC

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-901-8387 Fax : +82+(0)2-997-1990

E-mail : hyeran11@ducksung.ac.kr

was lower than FC. Clinical management of patients with inborn error of metabolism showed FC was lower than AC. Thus, carnitine fraction level was very important to monitoring patients with metabolic disorder.

Key words : IR, NMR, MMPs, Zymography, SK-Hept-1, MTT

1. 서 론

카르니틴 (L-carnitine)은 지방산을 운반하는 정상적인 대사중간체로 지방산이 미토콘드리아의 세포막을 용이하게 통과할 수 있도록 하는 역할을 한다.¹ 카르니틴은 세포에 주요 에너지를 공급하는 역할을 하므로 혈장에서 카르니틴의 정량은 유전성의 만성적 카르니틴 결핍증²과 유전적인 유기산질환 (프로피온산혈증, 메틸말론산혈증), 레신드름과 같이 유기산과 기타대사물들이 2차 카르니틴유도체로 배설되는 질환³과 혈액투석으로 카르니틴 치료받는 만성신부전환자에게는 아주 중요하다. 카르니틴은 양쪽성이온으로 극성이면서, 발색단이 없는 비휘발성 화합물로 고성능 액체크로마토그래피 (HPLC)나 기체 크로마토그래피 (GC)로 분석이 가능하다. 카르니틴을 브로모펜아실 에스테르로 유도체화하여 HPLC/UV로 검출한 경우, 유기산이 방해물질로 작용하고 정량한계 (LOQ)가 높아진다.⁴ 그리고, GC/MS로 분석시⁵, 알칼리 가수분해한 후 유리된 산을 메틸에스테르로 만들거나, 염기를 촉매로하여 고리화를 한 후 demethylation된 유도체화를 검출하는데 복잡한 전처리 과정이 필요하며 분석시간이 길다는 점과 휘발성이 없는 많은 생체 대사물질들의 확인이 어렵다는 단점이 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 도입된 것이 FAB-MS를 이용한 분석이다.⁶⁻⁸ FAB-MS에 의한 혈장 중 카르니틴 분석법은 정량한계가 상당히 높게 나타났다. 이후 FAB-MS/MS⁹, continuous flow FAB-MS¹⁰, secondary ion MS¹¹ 등 카르니틴 분석을 위해 다양한 기법이 보고되고 있다. 본 연구에서 카르니틴은 혈액여지를 사용하여 컬럼을 사용하지 않고 유도체화 없이 ESI/MS/MS를 이용하여 분석을 하였다. 혈액여지를 이용한 카르니틴 분석법은 샘플의 matrix interference를 줄여준다.¹² 이 방법은 기존의 방법에 비해 빠른 분석시간과 고감도, 그리고 좋은 재현성을 보여주었다. 또, 유전성대사질환 환자의 TC, FC, AC 3분획을 분석함으로써 확진 검사 및 환자의 모니터링을 하는데 필요함을

보여주었기에 이를 보고하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

본 연구에 사용한 L-carnitine은 Sigma-Aldrich (MA, USA)에서 구입하였고, 내부표준물질인 L-carnitine-d3는 Cambridge Isotope Laboratories Ins. (MA, USA)에서 구입하였다. HPLC grade인 메탄올, potassium hydroxide는 Merck (Germany)에서 구입하였다. 그리고, hydrochloric acid는 Tedia (OH, USA)에서 구입을 하였다. 이 실험에서 사용된 초순수는 Millipore-Milli QTM (Tokyo, Japan)에서 구입을 하여 사용하였으며, 이동상인 메탄올과 초순수는 0.2 μm 의 Whatman (Maidstone, U.K.)사의 nylon membrane filter로 여과한 후 10분간 탈기 하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 electrospray ionization tandem mass spectrometer로는 Applied Biosystems (MA, USA)사의 API4000모델을 사용하였으며, 이동상을 흘려주기 위해 사용한 펌프로는 Agilent 1100 series binary 마이크로 펌프를 사용하였고, CTC analytics systems (Switzerland)사에서 나온 HTS PAL auto-sampler를 사용하였다. 시료 전처리 과정을 위해 TAITEC (Tokyo, Japan)사의 incubator/shaker를 사용하였다.

2.2. 실험방법

표준물질과 내부표준물질의 표준원액의 농도는 10 mmol/L로 초순수를 이용하여 제조하였다. 표준용액의 농도는 40배 희석한 250 $\mu\text{mol/L}$ 로 제조하여 사용하였다. 혈장 150 μL 에 내부표준물질 30 μL 를 첨가하고 혼합을 한 후, FC 분석은 30 μL 를 직경이 6 mm인 혈액여지 (Schleicher and Schunel, S&S #900; Dassel, Germany)에 분주한다. TC 분석은 남아 있는 150 μL 에 potassium hydroxide 1 mol/L 농도를 10 μL 가한 후 혼합하고 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 반응한다. 반응이 끝난 후 실

온에서 냉각을 시키고 hydrochloric acid 1 mol/L 농도를 10 μ L를 가해 중화시킨 후 원심 분리기로 13,000 rpm의 가속도로 원심분리한다. 원심분리된 상층액 30 μ L를 다른 혈액여지에 분주한다. 처음의 FC 샘플과 TC 샘플을 같이 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응을 하고 실온에서 10분간 냉각을 시킨다. 80% 메탄올 200 μ L로 추출을 한 다음 30분간 흔들어 주고 새로운 96well plate 옮겨 auto-sampler를 이용하여 탠덤질량분석기에 시료를 주입하였다. 분석할 때 autosampler에서 샘플은 2 $^{\circ}$ C로 일정하게 보관하면서 분석을 하였다. AC는 TC에서 FC를 뺀 값을 사용하였다. 카르니틴 분석조건은 이동상으로 80% 메탄올을 사용하였고, 시료의 주입량은 5 μ L, 이동상의 유속은 200 μ L/min, 샘플 loop는 10 μ L를 사용하였고, 충돌가스로는 초고순도질소를 사용하였다. 카르니틴 프로파일을 얻기 위해 MRM scan mode로 분석을 하였으며, 표준물질은 162.1/85.1 m/z, 내부표준물질은 165.1/ 85.1 m/z범위로 정량을 하였다.

카르니틴 분석의 최적의 MS/MS 조건은 declustering potential (DP)이 80 V, entrance potential (EP)이 10 V, collision energy (CE)가 22 V, collision cell exit potential (CXP)이 12 V, deflector (DF)가 -200 V, channel electron multiplier (CEM)가 2100 V, collision activated dissociation gas (CAD)가 6 psi, curtain gas (CUR)가 12 psi, nebulizer gas (NG)가 50 psi, auxiliary gas (AG)가 40 psi, ionspray voltage (ISV)가 5500 V 그리고 ion source 온도는 0 $^{\circ}$ C이다.

3. 결과 및 고찰

ESI/MS/MS로 카르니틴을 first quadrupole scan한 그래프는 Fig. 1와 같다. 카르니틴의 모이온 (mother ion) m/z 162와 딸이온 (daughter ion)인 m/z 103 과 m/z 85 이온들이 같이 나타났다. 딸이온 m/z 103은 모이온에서 trimethylamino기가 떨어진 것으로 사료되며, 딸이온 m/z 85는 추가적으로 hydroxy기가 떨어진 것으로 사료된다. 최적의 딸이온은 third quadrupole production ion scan (Fig. 2)을 해 본 결과 m/z 85를 major production ion 으로 선정하였다. ESI/MS/M는 MRM scan mode를 이용할 경우 특징적인 production ion으로 분류할 수 있으며, 카르니틴의 경우 m/z 85를 갖는 precursor ion m/z 162를 사용하여 정량분석을 하였다. FC와 TC의 직선성은 Fig. 2와 같다. 5개 point의 농도의 직선성은 FC

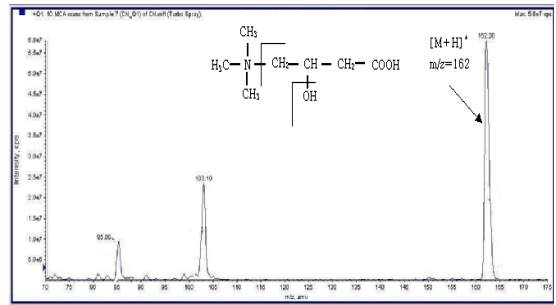


Fig. 1. First quadrupole scan spectrum of L-carnitine on tandem mass spectrometry.

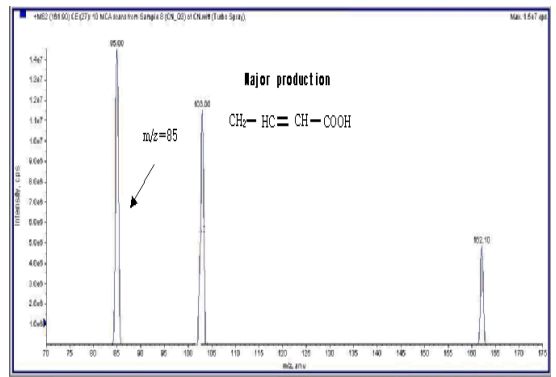


Fig. 2. Third quadrupole production ion scan spectrum of L-carnitine on tandem mass spectrometry.

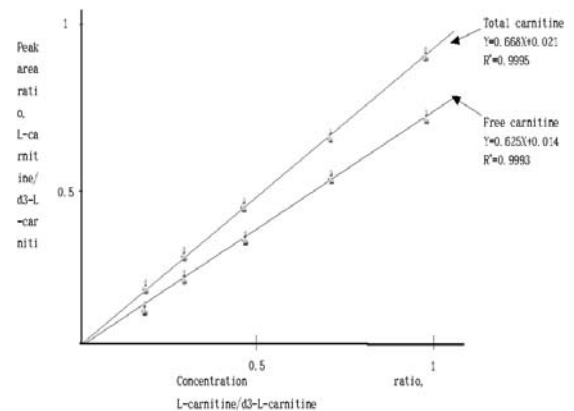


Fig. 3. Calibration curves of peak area ratio vs L-carnitine/d3-L-carnitine concentration ratio (n=5)

의 상관계수 (r^2)는 0.9993, 회귀식은 $Y = 0.668X + 0.021$ 이고, TC의 상관계수 (r^2)는 0.9995, 회귀식은 $Y = 0.625X + 0.014$ 로 아주 좋은 상관관계를 보였다. 회수율 및 정밀도 실험결과는 Table 1 과 같다. 회수율

농도는 정량농도의 낮은 농도, 중간농도, 높은 농도인 3, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$ 을 첨가한 뒤 회수율을 구하였다. 3 $\mu\text{mol/L}$ 의 회수율은 2.93 $\mu\text{mol/L}$ 로 회수되어 97.7%, 30 $\mu\text{mol/L}$ 의 회수율은 27.6 $\mu\text{mol/L}$ 로 회수되어 92.0%, 50 $\mu\text{mol/L}$ 의 회수율은 48.5 $\mu\text{mol/L}$ 회수되어 97%의 회수율을 보였다. 따라서, 전체 농도범위에서 회수율이 안정되었음을 보여주었다. 카르니틴의 limit of detection (LOD)는 0.0016 $\mu\text{mol/L}$ 이고, limit of quantitation (LOQ)는 0.016 $\mu\text{mol/L}$ 로 아주 극미량의 농도까지 측정이 가능하였다. 정밀도 실험결과도 낮은 농도, 중간농도, 높은 농도인 3, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$ 을 withinday-assay는 5회 측정하였고, between-day-assay는 5일 동안 측정하였다. 낮은 농도인 3 $\mu\text{mol/L}$ 는 withinday-assay의 변동계수가 1.8%, between-day-assay의 변동계수는 3.1%로 보였다. 중간 농도인 30 $\mu\text{mol/L}$ 는 withinday-assay의 변동계수가 2.2%, between-day-assay의 변동계수는 7.8%로 낮은 농도 보다 between-day-assay값이 다소 높았다. 높은 농도인 50 $\mu\text{mol/L}$ 는 withinday-assay의 변동계수는 2.8%, between-day-assay의 변동계수 값은 7.8%로 낮은 농도 보다 between-day-assay값이 다소 높았다. 그렇지만, 전체 농

도에서 10%미만으로 안정적이고 재현성이 좋음을 보여주었다. 성인 20세 이상 정상인의 카르니틴의 참고범위는 Table 2와 같다. TC는 59.6 $\mu\text{mol/L}$ 로 E. schmidt-sommerfeld 가 측정했던 참고범위² 보다 조금 높았으며, FC는 48.4 $\mu\text{mol/L}$ 로 조금 높았으나 AC는 11.2 $\mu\text{mol/L}$ 로 조금 낮았다. AC/FC도 0.24로 조금 낮았으며, 전반적으로 E. schmidt-sommerfeld가 측정했던 참고범위²와 큰 차이가 없음을 보여주었다. 정상인, 유전성대사질환 환자, follow up 유전성대사질환환자의 혈장에서 TC, FC, AC는 Fig. 4 에 비교하여 표현하였다. 정상인의 카르니틴 수치는 1세 이상일때 E. schmidtsommerfeld 의 참고범위²로 TC는 28~84 $\mu\text{mol/L}$, FC는 24~66 $\mu\text{mol/L}$, AC는 4~32 $\mu\text{mol/L}$ 인데 실제 SCL에서 측정한 정상인의 수치는 TC는 54.3 $\mu\text{mol/L}$, FC는 39.9 $\mu\text{mol/L}$, AC는 14.4 $\mu\text{mol/L}$ 로 모두 정상범위안에 들어왔다. 그리고, 각각의 패턴을 비교해 보면 TC, FC, AC의 순으로 값이 높았다. 유전성대사질환 중 3-methylcrotonic aciduria, propionic aciduria, methylmalonic aciduria, isovaleric acidemia의 질환의 양성환자검체를 분석하였다. 3-methylcrotonic aciduria는 leucine metabolism의 중간대사체인 3-methylcrotonic acid가 3-methylcrotonyl-Co A carboxylase의 결핍으로 축적되어 나타난다.¹³

Table 1. Performance statics of ESI/MS/MS assay

No of aliquots	Recovery			Reproducibility (C.V.,%)	
	L-carnitine added, $\mu\text{mol/L}$	L-carnitine detected, (mean \pm S.D.) $\mu\text{mol/L}$	Mean %	Withinday-assay (n=5)	Between-day-assay (n=5)
3	3.0	2.93 \pm 0.05	97.7	1.8	3.1
3	30.0	27.60 \pm 0.61	92.0	2.2	7.8
3	50.0	48.5 \pm 0.42	97.0	2.8	7.5

Table 2. Reference value for TC, FC and AC ($\mu\text{mol/L}$) and AC/FC in plasma

	Total carnitine	Free carnitine	Acyl carnitine	AC/FC
22~60 years	54.0 \pm 12.62	39.1 \pm 8.62	14.9 \pm 7.02	0.39 \pm 0.172
(Adults)	59.6 \pm 9.8a	48.4 \pm 9.3a	11.2 \pm 4.7a	0.24 \pm 0.13a

a: present study in SMSI by ESI/MS/MS

2: Total carnitine and free carnitine were measured by a radiochemical method

3-methylcrotonic aciduria환자는 FC가 11.9 $\mu\text{mol/L}$ 로 정상범위보다 낮았으며, 각각의 패턴을 비교해 보면 TC, AC, FC순으로 값이 높았다. Propionic aciduria는 valine, isoleucine, methionine 같은 아미노산 대사에 관여하는 propionyl-Co A carboxylase 효소 결핍으로 propionic acid, methylcitric acid, tiglyglycine이 증가하는 대표적인 ketotic hyperglycinemia질환의 하나이다.¹³ Propionic aciduria환자 1은 FC가 10.7 $\mu\text{mol/L}$ 로 정상범위보다 낮았으며, AC는 43.1 $\mu\text{mol/L}$ 로 정상범위보다 높았다. 각각의 패턴을 비교해 보면 FC가 AC보다 낮은 패턴을 보였다. Propionic aciduria환자 2는 TC가 104 $\mu\text{mol/L}$, AC가 78.8 $\mu\text{mol/L}$ 정상범위보다 아주 높았으며, FC는 25.2 $\mu\text{mol/L}$ 로 최저값에 가까웠다. 각각의 패턴을 비교해보면 1번환자와 같이 TC, AC, FC 순으로 값이 높았다. Methylmalonic aciduria는 methylmalonyl-Co A로부터 만들어진 methylmalonic acid와 propionyl-Co A로부터 만들어지는 3-hydroxypropionic acid와 methylcitric acid가 현저하게 증가하는 질환이다.¹³ Methylmalonic aciduria환자는 이미 확진이 되어 follow up 되는 환자로서 유전성대사질환 치료로 카르니틴을 투여하고 있었

다. 이 환자는 TC가 181 $\mu\text{mol/L}$, FC는 101 $\mu\text{mol/L}$, AC는 80 $\mu\text{mol/L}$ 로 모두 정상범위보다 2~3배 높았다. 각각의 패턴을 비교해 보면 TC, FC, AC 순으로 값이 높았다. Isovaleric acidemia는 leucine metabolism의 중간대사체인 isovaleric acid가 isovaleryl-Co A dehydrogenase의 결핍으로 축적되어 나타난다. 또, isovalerylglycine이 현저히 증가하여 식욕저하, 구토, 기면, 저체온, 경련, 지능저하 등을 일으키는 질환이다.¹³ 이 환자도 이미 확인이 되어 follow up되는 환자로서 카르니틴을 투여 하고 있었다. 이 환자 2명은 모든 값이 정상범위에 들었고, 패턴도 정상인과 똑같은 TC, FC, AC 순으로 높았다. 따라서, follow up환자들은 카르니틴 치료로 인해 정상인과 같은 패턴을 보였으며, 유전성대사질환 환자들은 AC가 FC보다 높은 비정상적인 패턴임을 알 수 있었다. 따라서, 카르니틴 3분획검사는 만성 카르니틴 결핍증 외에 유전성대사질환 환자의 확진검사와 follow up환자의 모니터링에 유용함을 보여주었다.

4. 결 론

본 연구는 임상학적 진단을 목적으로 electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI/MS/MS)를 사용하여 기존의 방법보다 신속, 정확하게 카르니틴을 정량분석 하였다. ESI/MS/MS를 사용하기위해 필요한 전처리 시간은 기존의 다른 분석방법들 보다 많은 시간을 단축시켰으며, 유도체화과정을 필요하지 않고, 샘플 matrix interference를 줄였다. 카르니틴은 MRM scan mode에서 분석했으며, 좋은 회수율과 직선성, 재현성을 보여 ESI/MS/MS를 사용하여 카르니틴 분석에 유용함을 보여 주었다. 또, 유전성대사질환 환자의 FC, TC, AC의 3분획 검사는 확진 검사 및 follow up 모니터링에 유용함을 보여 주었다.

참고 문헌

1. R. D. Stevens, S. L. Hillman, S. Worthy, D. Sanders, D. S. Millington. *Clin. Chem.*, **46**, 727-729 (2000).
2. E. Schimidt-Sommerfeld, D. Werner, D. Penn, *Eur. J. Pediatr.*, **147**, 356-360 (1988).
3. M. S. Rashed, P. T. Ozand, M. J. Bennett, J. J. Barnard, D. R. Govindaraju, P. Rinaldo. *Clin. Chem.* **41**, 1109-1114 (1995).
4. M. S. Rashed, M. P. Bucknall, D. Little, A. Awad, M. Jacob, M. Alamou, M. Alwattar and P. T Ozand, *Clin. Chem.*, **43**, 1129-1141 (1997).
5. R. A Chalmers and A. M. Lawson, "rganic acid in man", Chapman and Hall, 27-55, London, 1982.
6. M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliot, D. R. Sedgwick and A. N. Tyler, *Anal. Chem.*, **54**, 465A-657A (1982).
7. D.S. Millington, D. L. Norwood, N. Kodo, C. R. Roe and F. Inoue, *Anal. Biochem.*, **180**, 331-339 (1989).
8. A. Moon and W. J. Rhead, *J. Clin. Invest.*, **79**, 59-64 (1987).
9. D. S. Millington, N. Kodo, D. L. Norwood and C. R. Roe, *J. Inher. Metab. Dis.*, **13**, 321-324 (1990).
10. D. H. Chace, S. L. Hillman, D. S. Millington, S. G. Kahler, B. W. Adam and H. L. Levy, *Clin. Chem.*, **42**, 349-355 (1996).
11. D. S. Millington, N. Kodo, N. Terada, D. Roe and C. H. Chace, *Int. J. Mass Spectrom Ion Processes*, **111**, 211-228 (1991).
12. S. Chung, S.S. Cheng, and S.K. Lam *Clinical Chemistry*, **49**, 1189 (2003).
13. D.C. Lehotay, T.R.Clarke. *Critical reviews in clinical laboratory science*, **32**, 377-429 (1995).