

LC-MS/MS를 이용한 Homocysteine 측정과 그 유용성 평가

분당서울대병원 진단검사의학과

전선희 · 임미숙 · 정영순 · 송정한

Evaluation of the Method for Total Homocysteine in Plasma Using LC-MS/MS

Sun-Hee Jun, Mi-Suk Lim, Yong-Sun Jung, and Jung-Han Song

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University, Bundang Hospital, Bundang 463-707, Korea

Total homocysteine is now considered a risk factor for cardiovascular diseases. I increased interest has led to a multitude of studies requiring the determination of total homocysteine in conjunction with other factor. There are various methods for measuring total homocysteine, including HPLC, FPIA, GC-MS and LC-MS/MS. The most recent method for measuring total homocysteine uses a deuterium-labelled internal standard and tandem mass spectrometry. This development requires no derivatization and therefore leads to an increase in sample throughput compared to other techniques. We have evaluated the method for homocysteine by the LC-MS/MS method, and the correlation between the FPIA method and the LC-MS/MS method. The standard curve (0, 5, 10, 20, 50, 100 uM) was linear over the range examined (up to 100 uM). The lower limit of quantification (CV < 10 %) was 0.5 uM/L and the lower limit of detection (S/N > 3) was 0.1 uM/L. Intra-assay variation and inter-assay variation were both < 6 %. The comparison study for homocysteine concentration showed good correlation ($r=0.9684$) between the FPIA method and LC-MS/MS methods. Our conclusion is that the method showed relatively good precision, and was rapid and accurate.

Key Words : Homocysteine, LC-MS/MS, FPIA, Precision, Rapidity, Accuracy

I. 서 론

호모시스테인(homocysteine)은 설파기를 포함한 아미노산으로 필수아미노산인 메티오닌(methionine)의 대사 과정에서 생성된다. 호모시스테인은 remethylation이나 transsulfuration의 두 가지 경로 중 하나를 통해 대사된다. 호모시스테인은 혈장이나 혈청 속에서 자가 산화(auto-oxidation)을 통해 대부분 단백질과 결합한 mixed

disulfide 형태로 존재하고 일부는 homocystine, homocysteine thiolacton 등을 생성한다.

1964년 Carson과 Neil에 의하여 호모시스테인 농도가 질병과 관련되어 있음이 밝혀진 이후(Carson과 Neil, 1964), 1969년 McCully가 혈중 호모시스테인이 증가된 호모시스테인뇨증(homocystinuria) 소아 환자에게서 광범위한 동맥 혈전증을 보고하면서 혈중 호모시스테인의 증가가 심장 혈관 질환을 초래할 수 있다고 제시하였다(McCully, 1969).

이후 많은 연구를 통하여 최근에는 고호모시스테인혈증(hyperhomocysteinemia)이 동맥관질환이나 혈전증의 독립적인 위험인자로 알려져 왔다. 가장 최근에는 혈중

교신저자 : 전선희, (우)463-707 경기도 성남시 분당구 구미동 300번지, 분당서울대학교병원 진단검사의학과
Tel : 031-787-3181
E-mail : sunnyeyo@yahoo.co.kr

호모시스테인의 농도가 증가할 경우 알츠하이머의 발병 위험이 거의 두배까지 높아진다는 새로운 연구 결과도 발표되었다 (Sudha와 Alexa, 2002).

호모시스테인의 농도가 높아지는 것은 유전과 식이적 요인 모두가 관련되어 있다. 호모시스틴뇨증 (homocystinuria)은 열성유전자에 의해 전달되는데 부모 양쪽에게서 열성유전자를 전달받아 태어난 아이는 혈액내의 호모시스테인 농도가 높게 나타난다. 부모의 한편에게서만 열성유전자를 전달받은 사람은 병으로 진전되지는 않지만 종종 약하게나마 혈중의 호모시스테인 수준이 높아진다. 그의 비정상적으로 호모시스테인 혈중 농도가 높은 것은 엽산 (folate), 비타민 B6, 혹은 비타민 B12가 부족한 사람에게서 일어날 수 있다 (Joosten, 1993).

혈중의 높은 호모시스테인은 콜레스테롤을 산화된 저밀도 지단백 (LDL)으로 변환시키는데 이는 동맥에 손상을 일으킬 수 있는 여러 가지 작용을 한다. 또, 정맥내의 혈액응고 (blood clot)를 촉진시켜서 혈관을 막아버려 혈액의 흐름을 방해하는 요인이 된다. 심장 질환 환자의 20% 이상이 높은 호모시스테인 농도를 가지고 있다고 알려져 있다. 따라서 최근에는 관상동맥질환의 예후인자로서 그 중요성이 더욱 부각되고 있다.

호모시스테인을 측정하는 방법으로는 HPLC법, FPIA (fluorescence polarization immunoassay)법, 면역학적 방법, Tandem mass spectrometry 등 여러 가지가 알려져 있다. 이에 저자들은 가장 최근에 알려진 LC-MS/MS (Waters, Micromass, USA)로 호모시스테인을 측정하여 그 유용성을 평가하였고, FPIA법을 사용하는 AxSYM (ABBOTT, USA) 장비와 그 검사결과를 비교 분석을 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

서울대학교병원 진단검사의학과에 검사가 의뢰된 검체

82개를 분석에 이용하였고 호모시스테인 농도 분석은 혈청을 분리하여 먼저 FPIA법으로 검사한 후 약 10일간 냉동 보관 (-20 °C) 후 다시 녹여서 LC-MS/MS법으로 분석하였다.

2. 방법

1) 검사방법

검체는 혈청을 사용하였고 표준물질로는 DL-homocysteine (Sigma, H-4628)을 0, 5, 10, 20, 50, 100 µM 농도로 만들어서 사용하였다. 내부표준물질로는 동위원소가 표지된 d₈-homocystine (Cambridge Isotope lab.)을 0.1 N HCl로 녹여서 10 µM 농도로 사용하였다.

검체와 각 표준물질 20 µL에 내부표준물질 20 µL를 넣고 1분간 섞어준 후 500 mM DTT (dithiothreitol)/0.075 M NaOH 20 µL를 위 혼합물에 넣어 섞어준 후 실온에 15분간 방치한다. 이때 DTT가 검체 내에 있는 homocystine, mixed disulfide homocysteine, protein bound form homocysteine을 free homocysteine으로 변환시켜 주었다.

위의 혼합물에 100 µL의 formic acid: trifluoroacetic acid: MeOH (0.1:0.05:100)를 넣어 1분간 반응시킨 후 원침하여 상층을 microplate well에 옮겨서 그 중 10 µL를 분석에 사용하였다.

호모시스테인 분리에 사용된 column은 Waters Symmetry C8 column (2.1×100 mm, 3.5 µm)이고, 이동상은 30% MeOH/0.1% formic acid를 사용하였으며, 유속 (flow rate)은 0.25 ml/min, cycle time (injection-to-injection)은 2분으로 하였다. LC에서 호모시스테인을 분리한 후 MS/MS로 분석하였는데 이때 호모시스테인과 내부표준물질 (d₈-homocysteine)의 tune parameter는 Table 1과 같고, MRM chromatogram은 Fig. 1에 나타내었다.

2) 직선성

직선성 검사는 NCCLS guideline EP6-P에 따라 저농도의 검체와 고농도의 검체를 희석하여 5개의 농도로 만든 다음, 4번씩 반복 검사하여 측정하였다.

Table 1. Tune parameter for both homocysteine and d₈-homocysteine

| 분석물질 | Cone voltage (v) | Collision energy (eV) | MRM transition (m/z) |
|------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| Homocysteine | 15 | 10 | 135.8>89.6 |
| d ₈ -homocysteine | 15 | 10 | 139.8>93.6 |

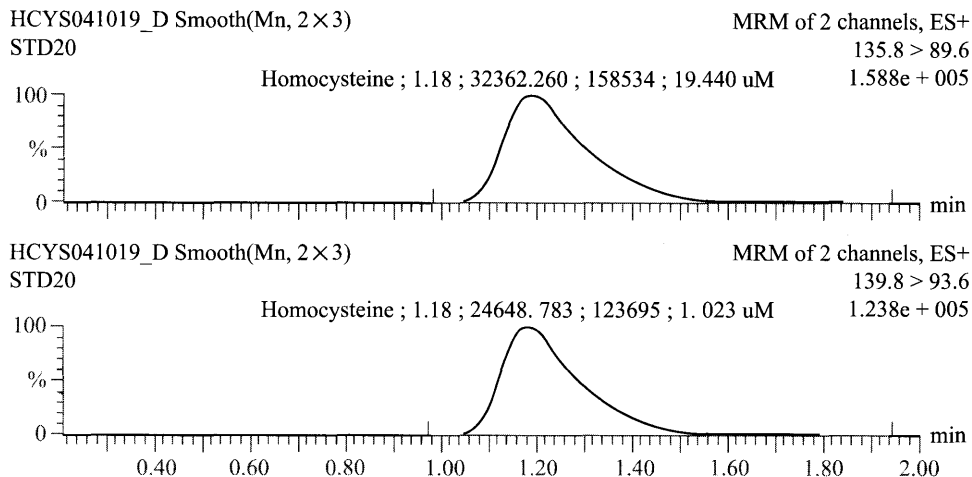


Fig. 1. MRM chromatograms of D₈-homocysteine and homocysteine at concentration of (20 μM) using the appropriate transitions.

3) Ion suppression test

검체에 표준물질을 첨가하여 검사하고, 검체에 증류수를 첨가하여 검사하고, 또 증류수에 표준물질을 넣어 검사하여 세 방법의 area를 비교하여 ion화에 영향을 받는지를 검사하였다.

4) 정밀도

고농도 (32 μM)와 저농도 (8.0 μM)의 control을 가지고 동시에 각각 10번씩 검사를 실시하여 평균값, 변이계수를 산정하여 검사간 정밀도 (inter assay variation)를 평가하였고, 고농도와 저농도의 control를 5일 동안 중복검사하여 역시 평균값, 변이계수를 산정하여 검사일간 정밀도 (intra assay variation))를 평가하였다.

3) 상관관계

환자 검체 82개를 사용하여 FPIA법과 LC-MS/MS로 중복 검사하여 두 검사법의 상관관계를 비교해 보았다.

III. 결 과

각 검체와 표준용액을 전처리하여 LC-MS/MS로 분석한 후, QuanLynx 4.0 소프트웨어를 사용하여 농도를 구하였다. 6개 농도의 표준용액을 이용하여 얻은 검량선의 correlation coefficient는 r 값이 0.99229로 아주 좋은 직선성을 보였다. 또 표준용액을 100 μM 농도까지 사용하였을 경우 Fig. 2와 같이 r=0.9982로 호모시스테인 농도

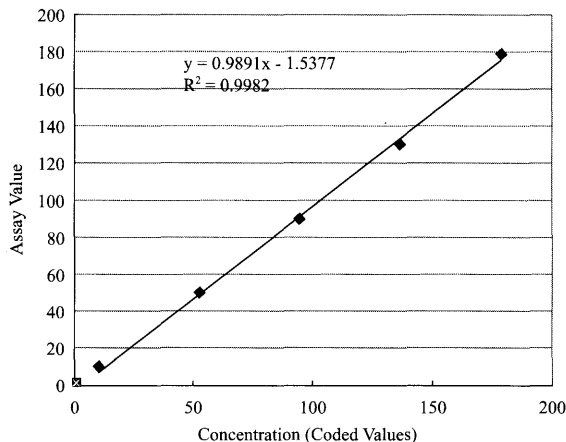


Fig. 2. Linearity test in different concentrations (10, 50, 100, 150, 180 μM).

180 μM까지 직선성을 보여 주었다.

검출 한계 (limit of detection)는 chromatogram에서 slope와 noise의 ratio가 3 이상이면 가능한데 0.05 μM에서는 S/N가 1.67이고 0.1 μM에서는 S/N가 6.84로 나타나 검출한계를 0.1 μM로 잡았다. 또 최저농도측정 (limit of quantification)은 CV가 10% 이하로 나타나면 되는데 0.5 μM에서 CV가 9.3%를 보였다 (Table 2).

Ion suppression test에서는 ion화의 영향을 받는 것으로 나타났으나 (Table 4) 이것은 분석시간을 길게 하거나 내부표준물질을 분석물질과 같은 것을 사용함으로써 줄일 수 있으므로 본 연구에서는 내부표준물질을 d₈-homocysteine을 사용하였다.

Table 2. LOQ (limit of quantification) : CV <10 %

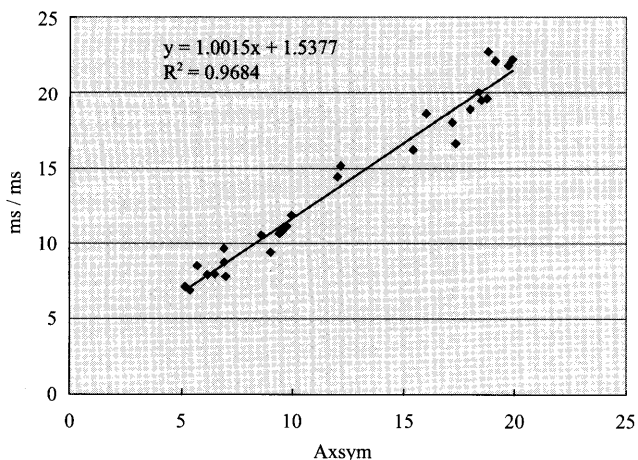
| No | Concentration (μM) | | |
|-------|--------------------|------|------|
| | 0.3 | 0.5 | 1.0 |
| 1 | 0.3 | 0.5 | 1.0 |
| 2 | 0.2 | 0.5 | 0.9 |
| 3 | 0.1 | 0.5 | 0.9 |
| 4 | 0.2 | 0.5 | 1.0 |
| 5 | 0.2 | 0.4 | 1.0 |
| Mean | 0.2 | 0.48 | 0.96 |
| SD | 0.07 | 0.04 | 0.05 |
| CV(%) | 35.4 | 9.3 | 5.7 |

Table 3. Precision for homocysteine using LC-MS/MS

| | Iner-assay variation | | Intra-assay variation | |
|------|----------------------|--------|-----------------------|--------|
| | Mean (μM) | CV (%) | Mean (μM) | CV (%) |
| Low | 7.9 | 3.73 | 7.9 | 4.03 |
| High | 31.9 | 5.37 | 32.4 | 4.99 |

검사간의 정밀도는 변이계수가 각각 3.73 %, 5.37 %로 나타났고 검사일간 정밀도는 각각 4.03 %, 4.99 %로 좋은 정밀도를 유지하고 있음을 보여 주었다 (Table 3).

환자 검체 82개로 FPIA법과 LC-MS/MS로 중복 검사하였을 때 두 검사법의 상관관계는 $Y=1.0015x+1.6907$ 이고, r값은 0.968으로 양호한 상관관계를 나타내었다 (Fig. 3).

**Fig. 3.** Homocysteine correlation between AxSYM & LC-MS/MS (N=82).**Table 4.** Ion suppression test

| | Methods | Area |
|---|---------------------------|------|
| A | Sample + STD (20 μM) +DTT | 5119 |
| B | Sample + DW + DTT | 1476 |
| C | DW + STD (20 μM) +DTT | 7193 |

$$(A-B) / C \times 100 = 50.6 \%$$

IV. 고 찰

호모시스테인의 증가는 그 원인에 관계없이 혈관벽의 콜라겐 침착을 증진시켜 탄력을 감소시키고, 과산화지질을 증가시켜 혈관을 산화적으로 파괴시키는 등의 다양한 기전에 의하여 혈관조직의 이상을 초래하여 조기 관상동맥 질환, 뇌혈관 발작, 혈전색전증과 같은 병의 위험이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Clarke, 1991). 공복시 호모시스테인 5 μM의 증가는 관상동맥질환을 1.8배, 뇌혈관질환을 2.3배, 말초혈관 질환을 6.8배 증가시켜 심혈관 질환의 위험율을 증가시킨다고 한다. 또한 cobalamin이나 엽산 (folate) 투여로 호모시스테인 수치가 감소되면 관상동맥질환으로 인한 위험도를 감소시킬 수 있다고 알려져 있다 (Joosten, 1993). 혈청 호모시스테인의 농도는 나이, 성별, 유전적 요인에 따라 차이가 있으며, 그 외에 흡연이나 많은 알코올섭취, 영양상태 등도 관련이 있다고 한다. 따라서 혈청이나 혈장에서의 호모시스테인 농도를 정확하게 측정하는 것이 심혈관 질환을 예방하는 데 중요하다 하겠다.

호모시스테인 농도를 측정하는 여러 가지 방법들이 있지만 저자들이 소개한 LC-MS/MS법은 검체를 아주 적은 양 (20 μL)을 사용하며, LC (Waters 2795 Alliance HT HPLC)에서 isocratic elution으로 호모스테인을 추출한 후 이를 MS/MS에서 electrospray positive ionisation mode로 분석하는 방법이다. 보다 정확한 결과를 위하여 동위원소가 표지된 내부표준물질을 사용하여 전처리 과정 중에 생길 수 있는 오차를 보정해준다. 직선성은 180 μM농도까지 r값이 0.9982로 매우 우수한 성적을 보였다. AxSYM의 FPIA법과의 상관관계는 $Y=1.0015x+1.6907$ 이고 r값은 0.968로 양호한 상관관계를 나타내었으며, 전처리 시간을 제외한 반응시간도 2분으로 검체를 한꺼번에 전처리를 하여 검사할 경우는 자동화 검사법만큼의 고속처리가 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

LC-MS/MS를 이용한 호모시스테인 측정이 자동화장비보다 편리성이 떨어지는 것이 단점이지만 높은 농도의 호모시스테인 측정이 가능하고, 측정에 방해되는 간섭물질이 없어 정확한 결과 보고가 가능하고, 기존 방법보다 경제적이고, 전처리가 끝난 검체는 1검체당 분석시간이 2분이므로 다량의 검체를 처리할 때에는 유용한 검사로 평가되었다. FPIA법과의 상관성도 우수하여 검사실에 LC-MS/MS가 구비되어 있다면 기존 방법을 대체하여 호모시스테인 측정에 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 274:1049-1057, 1995
2. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324:1149-1155, 1991
3. Gibson JB, Carson N, Neil DW. Pathological findings in homocystinuria. *J Clin Pathol* 17:427-437, 1964
4. Joosten E, van den Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 58:468-476, 1993
5. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56:111-28, 1969
6. The analysis of total homocysteine in plasma using a Quattro micro tandem mass spectrometer. AB34 version 1 July, 2001
7. Sudha S, Alexa B. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and alzheimer's disease. *The New England J of Medicine* 346:476-483, 2002