

## TMS-TFA 유도체화를 이용한 소변여지 중 유기산과 아미노산의 GC/MS 동시분석

윤혜란\*

덕성여자대학교 약학대학 생체대사물 및 의약분석연구실  
(2006. 1. 11. 접수, 2006. 2. 7. 승인)

### Simultaneous GC/MS Analyses of Organic acids and Amino acids in Urine using TMS-TFA derivative

Hye-Ran Yoon\*

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

(Received January 11, 2006, Accepted February 7, 2006)

**요약** : 본 연구에서는 trimethylsilyl (TMS) 및 trifluoroacetyl (TFA)유도체화를 이용하여 소변여지에서 대사이상 질환을 신속하게 스크리닝하는 GC/MS 분석법을 개발하였다. 유기산과 아미노산을 동시에 유도체화하기 위해 메틸오렌지를 지시약으로 하여 60-70°C에서 15-20 분간 카르복실기는 TMS로 아미노기는 TFA로 유도체화 후 GC/MS-SIM으로 분석하였다. 유기산과 아미노산의 직선성의 범위는 0.001-50 mg 이었고, 소변에서의 검출한계는 10-200 ng, 정량한계는 80-900 ng 이었다. 직선성을 보이는 범위에서의 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.994-0.998이었고, 회수율은 methylcitric acid와 glycine을 제외하고 80-100%를 보였다. 이 방법은 기존의 유기산분석에는 GC/MS를 아미노산 분석에는 아미노산분석기를 사용하는 것과 비교할 때 GC/MS만 사용하여 동시에 유기산과 아미노산을 분석함으로써 전처리가 간단하고 짧은 분석시간과 우수한 감도, 정확도, 정밀도를 보여 주었다. 정상인과 대사이상질환 환자의 검체에 적용해 보았을 때, 본 분석방법은 유기산과 아미노산대사이상의 유전성대사질환 환자의 스크리닝, 진단 및 모니터링에 임상적으로 유용함을 보여주었다.

**Abstract** : Early diagnosis and medical intervention are critical for the treatment of patients with metabolic disorders. A rapid analytical method was developed for simultaneous quantification of organic acids and amino acids in urine without labor-intensive pre-extraction procedure showing high sensitivity and specificity. A new method consisted of simple two-step trimethylsilyl (TMS)-trifluoroacetyl (TFA) derivatization using GC/MS-selective ion monitoring (SIM). Filter paper urine specimens were dried under nitrogen after being fortified with internal standard (tropate) in a mixture of distilled water and methanol. Methyl orange was added to the residue as indicator reagent. Silyl derivative of carboxylic functional group was followed by trifluoroacetyl derivative

★ Corresponding author

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

E-mail: hyeran11@duksung.ac.kr

for amino functional group. N-methyl-N-(trimethylsilyl-trifluoroacetamide) and N-methyl-bis-trifluoroacetamide were consecutively added and heated for 15-20 min at 65°C-70°C, for TMS-TFA derivative, respectively. This reactant was analyzed by GC/MS-SIM. Linear dynamic range showed 0.001-50 mg with the detection limit of (S/N=3) 10-200 ng, and the quantification limit of 80-900 ng in urine. Correlation coefficient of regression line was 0.994-0.998. When the method was applied to the patients' urine, it clearly differentiated the normal from the patient with metabolic disorder. The study showed that the developed method could be the method of choices in rapid and sensitive screening for organic aciduria and amino acidopathy.

**Key words :** simultaneous analysis, organic acids and amino acids, trimethylsilyl-trifluoroacetyl derivative, GC-MS

## 1. 서 론

유기산과 아미노산은 지방이나 단백질의 정상적인 최종산물이거나 대사 중간체로 정상인은 이 물질들을 효소에 의해 완전히 분해하여 대사시킨다. 한편 선천적으로 유기산과 아미노산을 분해하는 효소의 결손이 있는 중증의 대사이상질환 환자의 경우 유기산, 아미노산이 생체 내에서 정상적으로 대사되지 못하고 체내에 축적되어 노나 혈액으로 정상인보다 과다 배출된다.<sup>1</sup> 유전성대사이상 질환(Inborn errors of metabolism, IEM)의 빠르고 정확한 진단은 이들 환자의 삶의 질을 향상시키기 위한 필수적인 요소이다.<sup>2</sup> 1967년 가스 크로마토그래피-질량분석기(GC/MS)가 처음으로 예일 대학의 Tanaka 등에 의해 Isovaleric acidemia의 진단에 응용되어진 이후<sup>3</sup>, 현재까지 40 여종 이상의 유기산 및 아미노산 대사이상 질환들이 진단 및 치료에 이용되고 있다.<sup>4</sup> 이후 GC/MS를 이용한 진단은 Jellum<sup>5</sup> 및 Charmers<sup>6</sup>, Sweetman<sup>7</sup> 등에 의해 정확한 정성과 정량이 가능하면서도 실용 및 임상응용에 널리 사용되었다.

일반적인 분석방법은 아미노산과 유기산을 각기 다른 기기인 GC 나 아미노산 분석기를 이용하여 정성 및 정량적 측정을 한다. 이렇게 유기산과 아미노산을 각각 분석을 할 경우 시료처리 및 분석 시간이 12시간 정도로 길다는 단점이 있다. 생체 시료 중 유기산과 아미노산이나 이들의 대사물을 따로따로 분석하는 크로마토그래피법으로는 LC, GC, GC-MS, LC-MS 등이 자연과학, 농학, 환경화학, 의약학 분야에서 많이 보고되었다.<sup>8-10</sup> 아미노산의 GC 분석방법은 alkyl chloroformate<sup>11-14</sup>, ethylchloroformate<sup>15-16</sup> 등으로 유도체화하는 것이 보고되었고, 유기산의 GC 분석은

methylation<sup>17</sup>, silylation<sup>8,18-21</sup> 등으로 유도체화하는 방법이 보고되어 있다. 이 중 methylation을 이용한 유도체화는 생체내의 자연적인 methylation과 구별될 수 없고, silylation을 이용한 유도체화는 수분이 매우 약하다는 단점이 있다. 한편 아미노산과 비아미노기성 유기산을 동시에 분석하는 방법은, silylation 유도체를 이용한 식물체 중 동시 분석<sup>18,22</sup>, ethylchloroformate 유도체를 이용한 혈장 중 동시 분석<sup>23</sup> 및 tertbutyldimethylsilyl 유도체를 이용한 식물체 중 동시 분석<sup>18</sup> 등 몇 개만 보고되어 있는 실정이다.

GC/MS는 여러 생체대사물의 다른 화합물을 동시에 검출할 수 있는 기능을 가지고 있다.<sup>24</sup> 현재 미량의 생체 대사물을 GC로 분석하기 위해 널리 사용하고 있는 유도체화 방법인 trimethylsilylation (TMS) 유도체화는 수분에 불안정하다는 단점이 있다.

본 연구에서는 첫째, 소변여지를 사용하여 임상검체의 이동과 분석이 용이하도록 하였으며, 소변여지를 이용한 유기산과 아미노산 분석법을 통하여 시료 중의 matrix effect를 최소화 하였다. 둘째, 앞에서 언급한 TMS 유도체법의 단점을 개선하면서 유기산과 아미노산이 동시에 유도체화시킬 수 있는 two-step TMS (trimethylsilylation)와 TFA(trifluoroacetylation) 동시 유도체화법을 개발하였다(Fig. 1). 셋째, 개발된 방법을 실제 대사이상질환 환자시료에 적용하여 정확한 진단이 가능한지 실용성의 유무를 검증하였다. 개발된 방법은 기존의 방법에 비해 충분히 비교할 만큼 빠른 분석시간과 고감도, 우수한 재현성을 보여주었다. 따라서 본 연구의 결과는 유전성대사이상 질환을 신속하게 스크리닝하거나 환자를 진단하고 모니터링 하는데 매우 유용함을 보여주었기에 이를 보고하고자 한다.

Table 1. Major parameters of organic acids, amino acids and glycines for GC/MS-SIM performance

Compounds	F.W.	M+	RT <sup>a)</sup>	RRT <sup>b)</sup>	RF <sup>c)</sup>	QI <sup>d)</sup>	CI <sup>e)</sup>
3 - hydroxy propionic acid	90.1	234	10.26	0.464	0.2322	177.1	219.1
methylnmalonic acid	118.1	262	12.36	0.559	0.3242	147.1	218.1
propionylglycine	131.0	203	16.44	0.744	0.1145	159.1	188.1
isobutyrylglycine	145.0	217	17.15	0.776	0.7512	158.1	202.1
glutaric acid	132.1	276	17.43	0.789	0.7412	261.1	158.1
isovalerylglycine	159.0	231	19.56	0.885	0.3863	172.1	216.1
tiglylglycine	157.0	229	21.64	0.979	0.0660	83.1	170.1
methylcitric acid1	206.0	494	27.76	1.256	0.2904	287.2	361.2
methylcitric acid2	206.0	494	27.90	1.262	1.0340	287.2	361.2
glycine	75.0	243	9.27	0.649	0.6497	228.0	107.0

<sup>a)</sup>retention time <sup>b)</sup>relative retention time <sup>c)</sup>relative retention factor <sup>d)</sup>quantification ion <sup>e)</sup>confirmation ion

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기구

내부표준물질인 tropic acid는 Sigma-Aldrich사(MA, USA)에서 구입하였고, 표준물질인 아미노산 표준품(glycine 및 propionylglycine, isobutyrylglycine, isovalerylglycine, tiglylglycine), 유기산 표준품(3-hydroxy propionic acid, Methylnmalonic acid, Glutaric acid, Methylcitric acid)도 Sigma-Aldrich사(MA, USA)에서 구입하였다. 지시약인 methyl orange와 유도체화 시약인 N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide(MSTFA) 및 N-Methyl-bis(trifluoro acetamide)(MBTFA)를 Sigma 사(MA, USA)로부터 구입하였다. HPLC grade인 아세트니트릴, trifluoroacetic acid, sulfosalicylic acid (SSA)를 Merck(Germany)사에서 구입하였다. 직경이 6 mm인 소변여지는 Schleicher and Schunel사(S&S #900; Dassel, Germany)로부터 공급받았다.

2차 증류수는 Millipore-Milli Q<sup>TM</sup>(Tokyo, JAPAN)를 통해 제조하여 사용하였다. 농축을 위해 Thermo vap (PIERCE Model 18780)을 사용하였다. 시료 전처리 과정을 위해 TAITEC(Tokyo, JAPAN)사의 incubator/shaker를 이용하여 증발 농축 및 유도체화 반응을하였다.

### 2.2. Gas chromatography-mass spectrometry

GC-MSD 시스템은 Hewlett-Packard 6890 Gas chromatography와 HP 5973 Mass selective detector를 이용하였다. 컬럼으로는 Hewlett-Packard의 fused silica capillary column Ultra 2(5% Phenyl methyl siloxane, 25 m×0.2 mm, film thickness 0.33 μm)를 사용하였다. 오븐 온도는 80°C에서 2분간 유지하고 80°C에서 290°C

까지 분당 5°C씩 증가시켰으며, 290°C에서 5분간 유지시켰다. 주입구 온도는 300°C였고, 검출기 280°C온도였다. MSD는 전자에너지 70 eV에서 electron impact mode로 작동되었다. 운반기체인 헬륨기체의 유속은 0.8 mL/min였고 시료 주입량은 10 μl였다. 시료주입시의 split 비율은 1:10으로 하였다. m/z 50-550까지 full scan mode로 스캔하여 유도체화한 분열양상을 확인하였다. 정량에 이용된 이온은 Table 1에 나타나었다.

### 2.3. 실험부

#### 2.3.1. 표준액 내부표준액 및 지시약의 조제

아미노산과 유기산 각각의 표준원액과 내부표준액의 원액 제조시, 아미노산은 2차 증류수에 녹였고, 유기산은 메탄올에 녹여서 stock solution의 농도를 10 mmol/L로 제조하였다. 실험용 표준용액과 내부표준용액은 40배 희석한 250 μmol/L의 농도로 제조하여 사용하였다. 지시약인 methyl orange는 아세트니트릴과 trifluoroacetic acid의 혼합용액(CH<sub>3</sub>CN : TFA = 6:4)에 녹여 200 ppm이 되도록 조제하였다.

#### 2.3.2. 추출 및 유도체과정

5 cm×2.5 cm의 여지에 소변 0.6 mL를 묻힌 후 여지를 충분히 말렸다. 이 여지를 3 mL 주사기 안에 말아 넣고, 주사기 아래 10 mL 시험관을 놓아 추출액을 받았다. 여지를 0.6 mL의 10% 메탄올로 충분히 적셔 입구를 parafilm으로 잘 막았다. 시험관을 원심분리기 에 넣고 3,000 rpm에서 10분간 돌려 여지에 묻어있는 소변과 혈장안의 유기산과 아미노산을 0.6 mL의 10% 메탄올로 추출한 다음 15% sulfosalicylic acid로 제단

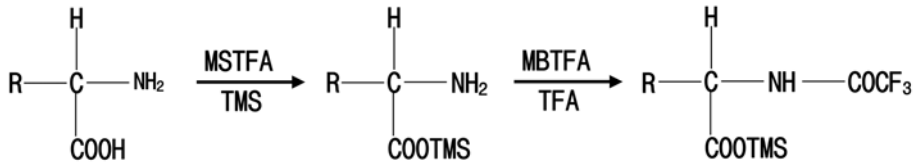


Fig. 1. Reaction scheme of the derivatizing reagents for amino acids and organic acids.

백 하였다. 소변여지의 추출액 중 100  $\mu\text{L}$ 씩을 반응 용기에 취하여 질소로 증발 건조 하였다. 증발건조한 액에 지시약으로 메틸오렌지를 넣고 마개를 닫은 다음, 메틸오렌지가 적색이 될 때까지 MSTFA를 넣고 60°C에서 10분 간 반응시켜 카르복시기에만 trimethylsilylation(TMS)하였다. 계속하여 60°C에서 15분 간 MBTFA를 넣고 반응시킴으로서 아미노기에 trifluoroacetylation 하였다. 이렇게 trimethyl-silylation (TMS)과 trifluoroacetylation(TFA) 유도체를 만든 후(Fig. 1) 5분간 식혀 GC의 autosampler vial에 옮겼다.

### 3. 결과 및 고찰

GC/MS의 scanning mode에서 얻어진 크로마토그램으로부터 각 아미노산과 유기산 표준품의 머무름 시간과 일치하는 피크를 확인 동정하여 질량스펙트럼을 얻었다. 선택이온 모드(selective ion mode, SIM)를 수행하기 위한 최적 이온 선택을 위해 유도체화 한 아미노산과 유기산의 분자량(Formula weight, FW), 분자피크( $M^+$ ), 머무름 시간(retention time, RT), 상대 머무름 시간(relative retention time, RRT), 상대감응인자(relative response factor, RRF)를 조사하였다. 앞의 조사를 근거로 분자량 100 이상으로 다른 성분 피크의 영향을 받지 않는 이온을 정량이온(quantification ion, QI)으로 정하였고, 유도체화한 분자피크로서 피크 이온의 상대 강도가 20% 이상인 피크를 검토했던 결과, TMS 유도체화된 분자이온( $M^+$ ), 혹은 분자이온에서  $\text{CH}_3$ 기가 떨어진 M-15 이온이 확인 이온으로 적합하였다(Table 1). 선정된 선택이온과 확인이온, 각각의 이온이 나타나는 아미노산과 유기산 피크의 머무름 시간을 근거로 하여 SIM 모드의 한 구간 당 2-3개의 화합물을 설정하여 SIM 프로그램을 완성시켰다. 국내에서 발생하는 메틸말론산노증, 프로피온산노증, 이소발레릴산노증의 3가지 대사이상질환 진단을 본 방법으로 임상적용하기 위해 각 질환의 마커에 해당하는 유기산과 아미노산의 동시분석을 위한 target compound를 선정하였다(Table 2) target compound의 직선성을 보

Table 2. Lists of target organic acids, amino acids and glycines for simultaneous analyses

Metabolic diseases	Target compounds
1 Methylmalonic aciduria	methylmalonic acid
	methylcitric acid
2 Propionic acidemia	methylcitric acid
	propionylglycine
	tiglylglycine
	3-hydroxy-n-valeric acid
	3-hydroxypropionic acid
3 Isovaleric acidemia	2-methyl-3-hydroxyvaleric acid
	glycine
	isovalerylglycine
	3-hydroxyisovaleric acid

Table 3. Linear dynamic range, LOD and LOQ for target organic acids, amino acids and glycines in urine

Compounds	Linear range	LOD(ng)	LOQ(ng)
3-OH propionic acid	1 ng - 50 mg	10	170
methylmalonic acid	1 ng - 50 mg	10	80
propionylglycine	1 ng - 50 mg	420	420
isobutyrylglycine	1 ng - 50 mg	650	650
glutaric acid	1 ng - 50 mg	10	150
isovalerylglycine	1 ng - 40 mg	20	200
tiglylglycine	5 ng - 50 mg	220	220
methylcitric acid 1 <sup>a</sup>	1 ng - 50 mg	10	130
methylcitric acid 2 <sup>a</sup>	1 ng - 50 mg	90	900
glycine	1 ng - 40 mg	10	80

<sup>a</sup>isomers

이는 범위는 0.0001-50 mg으로 매우 넓었으며 검출한계(S/N=5)(limit of detection)는 8-200 ng의 범위에 있었고, 정량한계(limit of quantitation)는 80-900 ng의 범위에 있었다. 모든 대사이상 환자는 소변으로 비정상적인 대사물을 정상인에 비해 다량 배출하므로 본 연구에서 확인된 검출한계 및 정량한계가 유용하게 진단에 응용될 수 있다(Table 3). 유기산과 아미노산의 직선성은 Table 4에서 보는 바와 같이 tiglylglycine만 제외하고 직선성을 나타내는 농도범위에서의 화합물

Table 4. Regression line and correlation coefficient( $r^2$ ) for organic acids, amino acids and glycines.

Compounds	Regression line <sup>a</sup>		$(r^2)$
	m	b	
3-hydroxy propionic acid	0.0438	0.0132	0.9977
methylmalonic acid	0.0655	-0.0033	0.9971
propionylglycine	0.0316	-0.0435	0.9936
isobutyrylglycine	0.1780	-0.1388	0.9977
glutaric acid	0.1516	-0.0168	0.9960
isovalerylglycine	0.0905	-0.0066	0.9966
tiglylglycine	0.2076	-0.9720	0.9866
methylcitric acid 1	0.0611	-0.0151	0.9949
methylcitric acid 2	0.2064	0.0020	0.9985
glycine	0.1192	0.0537	0.9972

<sup>a</sup>y=mx+b

의 상관계수( $r^2$ )는 0.994이상을 보였고, glycine의 경우 회귀식은  $Y=0.1192X + 0.037$  이고, glycine의 상관계수( $r^2$ )는 0.9972로 매우 양호한 상관관계를 보였다. Fig. 2는 SIM mode에서의 GC/MS크로마토그램으로

다양한 유기산, 아미노산, 글라이신류 등이 비교적 방해물질 없이 잘 분리되어 있으므로 TMS-TFA 유도체화 방법의 유용함을 보여주고 있다.

회수율 및 정밀도 실험결과는 Table 5와 같다. 정량 가능한 농도 중 낮은 농도(정량한계(LOQ)를 포함하는 농도), 중간농도, 높은 농도를 포함하는 0.5, 5, 50 ng/mL을 노시료에 첨가한 뒤 회수율을 구하였다. 0.5 ng/mL의 회수율의 평균은 0.43 ng/mL이 회수되어 84.9%, 5 ng/mL의 회수율은 4.42 ng/mL로 회수되어 88.3%, 50 ng/mL의 회수율은 46.9 ng/mL 회수되어 93.8%의 회수율을 보여, 전체 농도범위에서 회수율 실험결과가 매우 양호함을 보여주었다. 소변여지의 회수율을 살펴보면 아미노산인 글리신류는 여지에서 유기산보다는 시간이 갈수록 회수율이 낮아짐을 볼 수 있었다. 메틸말론산농도와 프로피온산농도에서 현저히 증가하는 유기산인 methylcitric acid는 유기산들 중 가장 회수율이 낮았다(Table 5).

정밀도 측정은 낮은 농도, 중간농도, 높은 농도인 0.5, 5, 50 ng/mL 첨가하여 between-day assay로 5일

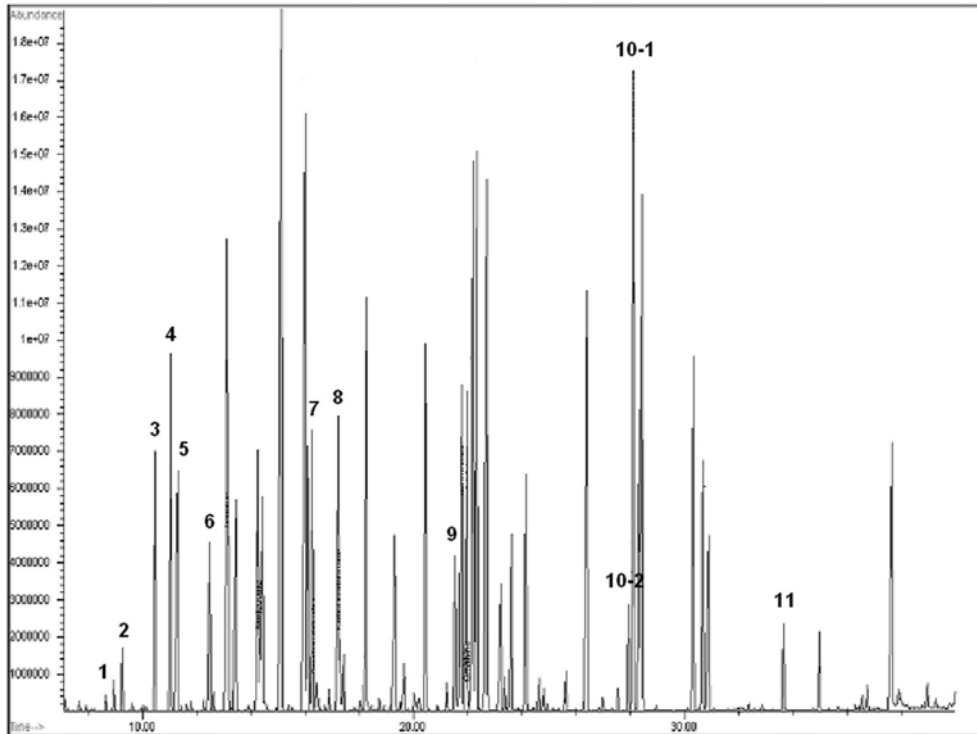


Fig. 2. Organic acid, amino acid, and glycine standards mixture on GCMS chromatogram. Peak number: 1=glycine; 2=3-hydroxypropionic acid; 3=3-hydroxy- isovaleric acid; 4=3-hydroxy-n-valeric acid; 5=2-methyl-3-hydroxyvaleric acid; 6=methylmalonic acid; 7=propionylglycine; 8=isovalerylglycine; 9=tiglylglycine; 10 =methylcitric acid; 11=tropic acid(internal standard)

Table 5. Recovery of organic acids and amino acids fortified to filter paper urine for between-day assay (n=5). Performance statistics of GC/MS-SIM analyses.

Compounds	value found [mean recovery (%)±SD]		
	0.5 ng/mL	5 ng/mL	50 ng/mL
3-hydroxy propionic acid	0.489 (97.8 ± 10.2)	4.88 (97.6 ± 9.6)	49.8 (99.6 ± 3.9)
methylmalonic acid	0.478 (95.6 ± 11.7)	4.73 (94.6 ± 10.2)	48.2 (96.4 ± 4.3)
propionylglycine	0.448 (91.6 ± 18.7)	4.67 (93.4 ± 11.5)	47.5 (95.0 ± 8.8)
isobutyrylglycine	0.452 (94.4 ± 17.5)	4.71 (94.2 ± 13.8)	48.7 (97.4 ± 7.6)
glutaric acid	0.468 (91.6 ± 11.2)	4.97 (97.2 ± 13.9)	48.4 (96.8 ± 3.5)
isovaleryl-glycine	0.437 (85.4 ± 16.4)	4.84 (96.8 ± 14.6)	47.2 (98.4 ± 7.9)
tiglylglycine	0.412 (82.4 ± 19.7)	3.93 (78.6 ± 18.2)	47.6 (94.4 ± 8.9)
methylcitric acid 1	0.382 (76.4 ± 29.7)	3.86 (77.2 ± 25.4)	44.1 (88.2 ± 9.7)
methylcitric acid 2	0.335 (67.6 ± 31.5)	3.82 (76.4 ± 29.1)	47.2 (88.4 ± 9.8)
glycine	0.354 (66.8 ± 26.1)	3.75 (75.0 ± 28.4)	43.4 (86.8 ± 9.9)

The data were obtained by 5 determinations for between-day assay.

동안 매일 3회씩 측정하였다. 낮은 농도인 0.5 ng/mL에서는 between-day assay의 회수율의 표준편차는 10.4%을 보였다. 중간 농도인 5 ng/mL에서는 between-day assay의 표준편차는 9.6%, 높은 농도인 50 ng/mL에서는 between-day assay의 표준편차는 4.2%로 낮은 농도에서 between-day assay의 표준편차가 다소 높았다. 각기 다른 농도에서의 재현성을 고찰하기 위해 첨가한 전체 농도범위에서 정밀도는 20% 내외로 안정적이었으므로, 본 실험결과와 재현성이 양호함을 보여주었다(Table 5).

최근 여지를 이용한 유기산 대사이상질환의 스크리닝에는 두가지 접근 방식이 이용되고 있다. 하나는 이중질량분석기를 이용한 아실카르니틴 분석이고,<sup>25,26</sup> 하나는 GC-MS를 이용한 소변 중 유기산 분석이다.<sup>27</sup> 두 방법 모두 한번의 분석으로 동시에 여러 종류의 질환을 진단할 수 있다는 장점이 있다. 이중질량분석기를 이용하는 경우는 한 분석기기로 일일 다룰 수 있는 검체량이 대량이므로 분석비용은 매우 경제적이지만 장비가 매우 고가이다. 한편 GC-MS는 광범위하고도 자세한 정량적 데이터를 얻을 수 있지만 검체 전처리 및 분석시간이 길고, 기기 운용비용이 고가라는 어려운 점이 있다. GC-MS를 이용한 유기산 분석이 광범위한 유전질환 스크리닝을 위한 목적에 실제 적합하다고는 말할 수 없으나 고위험군 환자의 경우 진단이나 환자의 상태를 평가하는 기준으로 삼기에 매우 직접적이고 중요한 역할을 함에는 틀림이 없다.

이 연구는 임상적으로 유기산과 아미노산 대사이상 질환을 진단하기 위한 간단하고 편리한 스크리닝 방법

을 개발하는데 주안점을 두었다. 또한 소변여지로부터 유기산과 아미노산을 추출한 후 TMS-TFA유도체화를 만든후 분석함으로써 실제적으로 본 방법의 효율성을 다음과 같이 보여주었다.

프로피온산노증 환자는 propionyl-Co A carboxylase 효소 결핍으로 propionyl-Co A에서 D-methylmalonyl-Co A로 대사되지 못하여, 비정상적인 대사물인 3-hydroxy propionic acid가 만들어지며 그 외에도 현저히 증가된 propionic acid 나 tiglic acid와 같은 비정상적인 대사물이 glycine과 결합하여 정상인에게서는 전혀 존재하지 않는 tiglylglycine, propionylglycine의 대사물들의 소변 중으로의 배설이 증가하였다. 특히 프로피온산노증은 biomarker인 methylcitric acid(두 개의 isomer)(Fig. 3, peak 10-1, 10-2)가 3-hydroxy propionic acid(Fig. 3, peak 2), propionylglycine(Fig. 3, peak 7), tiglylglycine(Fig. 3, peak 9)과 함께 비정상적으로 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 3).

대개의 유전성대사이상질환은 상염색체열성 유전하며, 프로피온산노증은 leucine, isoleucine, methionine 같은 아미노산 대사에 관여하는 propionyl-Co A carboxylase 효소 결핍으로 propionic acid, methylcitric acid, tiglylglycine이 증가하는 대표적인 ketotic hyperglycinemia질환의 하나이다. 메틸말론산노증은 methylmalonyl-Co A로부터 만들어진 methylmalonic acid와 propionyl-Co A로부터 만들어지는 3-hydroxypropionic acid와 methylcitric acid가 현저하게 증가하는 질환이다. Isovaleric acidemia는 leucine metabolism의 중간대사체인 isovaleric acid가 isovaleryl-Co A dehydrogenase의 결핍으로 축적되어 나타난다. 프로피온산노

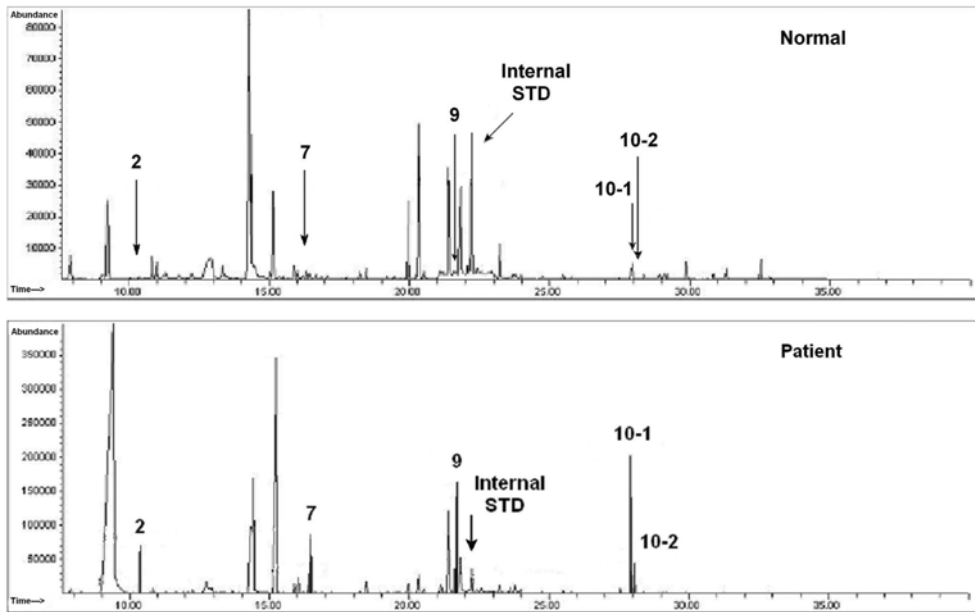


Fig. 3. Urine metabolic profile with normal and Propionic aciduria patient in GC-MS SIM mode.

증, 메틸말론산노증 Isovaleric aciduria의 유기산 대사 이상질환에서는 글리신과 결합된 화합물이 현저히 증가하여 식욕저하, 구토, 기면, 저체온, 경련, 지능저하 등을 일으킨다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 임상적 스크리닝 및 진단을 목적으로 GC-MS를 사용하여 기존의 방법보다 신속, 간편하게 유기산과 아미노산을 정량분석하는 방법을 개발하였다. 분석의 전처리 시간면을 살펴보면 two-step 유도체화를 함으로서 기존의 유도체화 방법보다 시간을 대폭 단축하였으며, 소변여지의 사용을 통해 이동의 편의성을 도모하였고, 시료의 matrix interference를 최소화 하였다. 유기산과 아미노산의 동시분석은 GC-MS selective ion monitoring mode에서 수행하였으며, 양호한 회수율과 직선성, 재현성을 보였다.

따라서, 이 연구에서 개발한 방법은 유전성대사질환인 유기산과 아미노산 대사이상질환 환자의 진단과 환자의 follow-up 모니터링에 이용할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 실제 유전성대사질환 환자(프로피온산노증, 메틸말론산노증)의 검체를 적용해 봄으로써 이 방법의 유용함을 제시하였다.

#### 감사의 글

이 연구는 2005학년도 덕성여자대학교 교내연구비 지원으로 수행되었으며, 보건복지부의 보건의료기술 연구개발사업 (HMP-00-B-21000-0033), 서울의과학연구소 연구비(SMSI-01-RG-BG01-0007)에 의해 일부 지원되었음.

#### 참고문헌

1. G. K. Brown, O. Stokke and E. Jellum, *J. Chromatogr.*, **145**(2), 177-184 (1978).
2. W. Lehnert and H. Niederhoff, *Eur. J. Pediatr.*, **142**(3), 208-10 (1984).
3. K. Tanaka and K. J. Isselbacher., *J. Biol. Chem.*, **242**(12), 2966-72 (1967).
4. P. T. Clayton, *J Inherit Metab Dis.*, **24**(2), 139-50 Review (2001).
5. E. Jellum, E. A. Kvittingen and O. Stokke, *Biomed Environ Mass Spectrom.*, **16**(1-12), 57-62 (1988).
6. R. A. Chalmers, S. Bickle and R. W. Watts, *Clin. Chim Acta.*, **52**(1), 31-41 (1974).
7. G. Hoffmann, S. Aramaki, E. Blum-Hoffmann, W.L. Nyhan and L. Sweetman., *Clin. Chem.*, **35**(4), 587-95

- (1989).
8. M. A. Adams, Z. Chen, P. Landman and T. D. Colmer, *Anal Biochem.*, **266**(1), 77-84 (1999).
  9. M. A. Hans, E. Heinzle and C. Wittmann, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **56**(5-6), 776-9 (2001).
  10. C. Wittmann, M. Hans and E. Heinzle, *Anal Biochem.*, **307**(2), 379-82(2002).
  11. J. Lee and J. M. Harnly, *J. Agric Food Chem.*, **53**(23), 9100-4 (2005).
  12. F. C. de Toledo, M. Yonamine, R. L. de Moraes Moreau and O. A. Silva, *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **798**(2), 361-5 (2003)
  13. Henriksen T, Svensmark B, Lindhardt B, Juhler RK, *Chemosphere.*, **44**(7), 1531-9. (2001). Erratum in: *Chemosphere.*, **57**(8), 1037 (2004).
  14. H. G. Ugland, M. Krogh and K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, **701**(1), 29-38 (1997).
  15. S. Yamamoto, S. Kiyama, Y. Watanabe and M. Makita, *J Chromatogr.*, **233**, 39-50 (1982).
  16. J. O. Sass and W. Endres, *J Chromatogr A.*, **776**(2), 342-7 (1997).
  17. K. B. Hammond and S. I. Goodman, *Clin Chem.*, **16**(3), 212-4 (1970).
  18. Z. Chen, P. Landman, T. D. Colmer, M.A. and Adams., *Anal. Biochem.*, **259**(2), 203-11(1998).
  19. C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. Wells. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497-507(1963).
  20. U. Roessner, C. Wagner, J. Kopka, R. N. Trethewey and L. Willmitzer., *Plant J.*, **23**(1), 131-42 (2000).
  21. P. Husek, *LC-GC Intl.*, **5**, 43-9 (1992).
  22. P. Husek, *J. Chromatogr. B.* **669**, 352-7(1995).
  23. Y. Shinohara, H. Hasegawa, K. Tagoku and T. Hashimoto., *J. Chromatogr. B.*, **758**, 283-7 (2001).
  24. S. G. Villas-Bas, G. D. Daniel, M. kesson and J. Nielsen, *Anal. Biochem.* **322**, 134-138 (2003).
  25. C. R. Roe, D. S. Millington, D. A. Maltby, T. P. Bohan and C. L. Hoppel. *J. Clin. Invest.*, **73**(6), 1785-8 (1984).
  26. D. S. Millington, N, Kodo, D. L. Norwood and C. R. Roe. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **13**(3), 321-4 (1990).
  27. G. Hoffmann, S. Aramaki, E. Blum-Hoffmann, W. L. Nyhan and L. Sweetman. *Clin. Chem.*, **35**(4), 587-95 (1989).