

LC/MS/MS를 이용한 산화성 스트레스 지표로써 소변 중 8-iso-PGF_{2α} 분석

고영림 · 이은희* · 채홍재** · 최경호*** · 백도명***[†]
을지대학교 보건환경과학부, *극동대학교 보건과학대학원,
전남대학병원 산업의학과, *서울대학교 보건대학원
(2009. 11. 4. 접수/2009. 12. 28. 수정/2010. 1. 5. 채택)

Determination of 8-iso-PGF_{2α} as Oxidative Stress Marker in Human Urine by High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

Young Lim Kho · Eun Hee Lee* · Hong Jae Chae** · Kyungho Choi*** · Domyung Paik***[†]

School of Human & Environmental Sciences, Eulji University, Sungnam City, Kyeonggi, Korea

**Graduate School of Health Science, Far East University, Eumsung, Chungcheongbuk, Korea*

***Chonnam National University Hospital, Cheolanam, Korea*

****School of Public Health, Seoul National University, Seoul, Korea*

(Received November 4, 2009/Revised December 28, 2009/Accepted January 5, 2010)

ABSTRACT

This study aimed to develop analytical method for 8-isoprostanes as biomarkers for oxidative stress with LC/MS/MS technique and to apply the method for human urine samples. Analyzed compounds for urinary oxidative stress markers were 7 stereo-isomers of prostaglandins and the internal standard (iso-PGF_{2α}-d₄) was used to adjust the recovery rate. The method for determining urinary iso-PGF_{2α} consisted of solid phase extraction and LC/MS/MS detection. Separation of isomers of prostaglandins completed by porous graphitic carbon column and buffer solution. Detection limits for urinary markers of oxidative stress, iso-PGF_{2α} with LC/MS/MS were 0.01 ng/ml by S/N ratio 3 and 0.028 ng/ml by calculated as to FDA method. The recovery (92.8~101.9%) and precision (8.8~20.7%) of analysis were feasible for detecting iso-PGF_{2α} in real human urine samples. We detected 4 isomers of prostaglandins in human urine samples. Mean (standard deviation) of urinary iso-PGF_{2α} concentration were 0.231 (0.117) ng/mg creatinine for smoking group and 0.154 (0.082) ng/mg creatinine for non-smoking group.

Keywords: oxidative stress, 8-iso-PGF_{2α}, prostaglandin, LC/MS/MS

I. 서 론

생체 분자의 산화는 여러 가지 질병의 민감도에 중요한 역할을 한다. 산화성 스트레스는 자유라디칼이나 라디칼을 생성하는 물질의 농도가 제거하는 물질의 농도보다 높을 때 일어난다. 산화성 스트레스의 원인은 흡연 등의 외적 요인과 대식세포(macrophages)의 산화성 폭발(oxidative burst) 등의 내적 요인으로 구분할 수

있으며, DNA, 단백질, 지질 등에 산화성 손상을 야기하여 많은 임상 증상들이 산화 스트레스 지표와 관련되어 있다.¹⁾

산화성 스트레스의 지표로 널리 이용되고 있는 것은 MDA(malondialdehyde)와 iso-PGF_{2α}(8-iso-prostaglandin F_{2α})이다. MDA는 다중불포화지방산의 과산화 생성물이 분해된 것²⁾이며, iso-PGF_{2α}는 아라키돈 산(arachidonic acid, AA)을 포함하는 지질이 산소 라디칼에 의해 산화되어 생성된 에이코사노이드(eicosanoid) 류이다. 전통적으로는 산화성 스트레스에 비특이적이거나 중간생성물 지표인 MDA나 과산화지질(conjugated dienes) 등을 분석하였으나, 최근에는 아라키돈 산의 자

[†]Corresponding author : School of Public Health, Seoul National University
Tel: 82-2-740-8886, Fax: 82-2-745-9104
E-mail : paekdm@snu.ac.kr

유라디칼 반응 생성물인 iso-PGF_{2α}에 관심이 모아지고 있다.^{3,5)}

AA는 생체내에서 대부분 인지질(phospholipids)과 에스테르화되어 존재하며, 이 에스테르화가 깨지면서 효소에 의한 산화과정을 거치게 된다. 산화효소(Cyclooxygenase)에 의해 과산화물이 생성되고 이들의 작용으로 프로스타글란딘 류(prostaglandins, PGs)가 생성되게 되는 것이다.⁶⁾ 자유라디칼에 의한 PGs 연구의 가장 흥미 있는 점은 소변이나 혈중에 존재하는 PGs의 양은 인간의 몸속에서 일어나는 지질과산화물 정량적으로 측정할 수 있는 지표가 되는 것이다.⁷⁾ 자유라디칼이 과다하게 생성되는 것과 관련된 허혈성 심장질환,⁸⁾ 고혈압,⁹⁾ 파라퀘트(paraquat) 등에 의한 중독,¹⁰⁾ 흡연,^{11,12)} 알콜에 의한 간 질환,¹³⁾ 알쯔하이머와 같은 염증성 질환,^{14,15)} 만성폐쇄성폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)와 같은 폐질환¹⁶⁾ 등이 혈중이나 요중의 iso-PGF_{2α} 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 한편, 국내에서도 비특이적 산화성 손상 지표인 MDA 및 8-OHdG를 이용한 연구^{17,18)}는 활발하게 진행되고 있으나 iso-PGF_{2α}를 이용한 연구는 LC/MS/MS의 이용이 일반화되지 못하여 EIA를 이용¹⁹⁾하거나 GC/MS를 이용한 연구^{20,21)}가 몇몇 연구자들에 의해 진행되었다.

아라키돈 산의 산화에서 생성되어 소변으로 배출되는 4가지 종류의 PGs 이성질체를 분석하는 방법은 GC/MS/NICI를 이용하는 방법과 Murphy 등에 의해 개발된 LC/MS/MS를 이용하는 방법, GC/MS/MS를 이용하는 방법, Immuno/GC/MS를 이용하는 방법과 효소면역법을 이용하는 방법 등이 있다.²²⁾ 초기에는 ELISA (enzyme-linked immunoassay)에 의한 분석이 주로 이용되었으나 효소면역법과 이후 정립된 GC/MS/NICI 분석법 간의 상관성에 대한 논란이 제기된²³⁻²⁵⁾ 후 GC/MS/NICI를 이용한 분석법이 널리 이용되게 되었다. 하지만, GC/MS/NICI 방법을 이용하여 생체시료 중의 iso-PGF_{2α}를 분석하기 위해서는 상당히 복잡한 전처리 과정이 요구된다. Davies 등²⁶⁾은 iso-PGF_{2α}의 대사체를 LC/MS/MS를 이용하여 분석하여 기존의 GC/MS를 이용한 분석법과 비교한 결과 우수한 상관성(R=0.77)을 발견하였으며, LC/MS/MS를 이용한 분석이 간편하며 빠르게 진행할 수 있음을 강조하였다. Ohashi 등²⁷⁾도 LC/MS/MS 법을 이용하여 iso-PGF_{2α}를 빠르게 분석할 수 있는 방법을 개발하였다. Liang 등²⁸⁾은 GC/MS 방법과 LC/MS/MS 분석법을 비교한 결과 상관성이 뛰어났지만(R=0.97), 소변 중 iso-PGF_{2α}의 농도에 대한 LC/MS/MS 분석결과가 GC/MS 분석결과보다 50% 정도 낮게 나온다는 것을 발견하였다. GC/MS 분석법의

경우 유도체화 과정에서 세 종류의 PGs 이성질체들이 하나의 피크로 나타나게 된 것을 이유로 들었다.

Bohnstedt 등²⁹⁾도 LC/MS/MS를 이용하여 5종의 PGs 이성질체를 정량분석하였으며, 최근 들어 iso-PGF_{2α}의 분석을 위하여 과거의 GC/MS 방법 보다는 LC/MS/MS 방법을 더 많이 이용하고 있다. 하지만, 두 가지 이상의 서로 다른 특성의 고체상추출과 정제 과정을 거치는 까다로운 전처리 방법을 적용한다거나,^{26,28)} 정량이 가능한 정도로 이성질체의 분리를 이루어내지 못하고 있다. iso-PGF_{2α}의 경우 다양한 질량과의 연관성이 밝혀졌으며, 생체 내에서 효소에 의한 생성이 이루어질 수 없고 유해물질의 작용에 의한 지질의 과산화에 의해 생성되므로⁶⁾ 앞으로 많은 역학적 연구가 진행될 것으로 보인다. 대규모의 역학연구를 진행하기 위해서는 비침습적인 방법에 의한 소량의 생체시료를 이용하여 신속하고 정확한 분석방법 개발이 선행되어야 한다. 따라서 본 연구는 LC/MS/MS를 활용하여 산화성 손상에 대한 생체지표인 8-isoprostanes의 분석법을 확립하여 실제 소변시료에 적용시키기 위하여 진행되었다.

II. 연구방법

1. 물질 및 재료

소변 중에 존재하는 PGs 이성질체를 분리, 검출하기 위하여 이용된 표준물질은 산화성 스트레스 지표로 주로 이용되는 iso-PGF_{2α}와 분자량이 같고 동일한 질량분석기 반응을 보이는 7종(PGF_{2α}, iso-PGF_{2α}, PGF_{2β}, iso-PGF_{2β}, 15(R)-PGF_{2α}, iso15(R)-PGF_{2α}, 11β-PGF_{2α})와 내부표준물질(iso-PGF_{2α}-d4)이 포함되었다. 이들 7종의 표준물질들은 분자량이 모두 같고 작용기의 위치까지 같은 입체 이성질체이기 때문에 HPLC를 이용한 분리가 매우 까다로운 물질들이다(Fig. 1).

분석에 이용된 표준물질들과 내부표준물질은 Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)에서 구입하였으며, 고체상추출법(SPE) 및 HPLC 분석에 이용된 용매는 Burdick & Jackson(Morristown, NJ, USA)에서 구입하였다. 완충용액 제조를 위한 암모늄아세테이트(NH₄CH₃COO)와 암모니아 수용액을 Aldrich 사(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다.

2. 소변시료의 전처리

소변시료에서 분석대상 물질을 추출하기 위한 전처리 과정은 Liang 등²⁸⁾이 제시한 방법을 수정한 것이며 요약하면 다음과 같다. 소변에 포함된 iso-PGF_{2α}를 분석

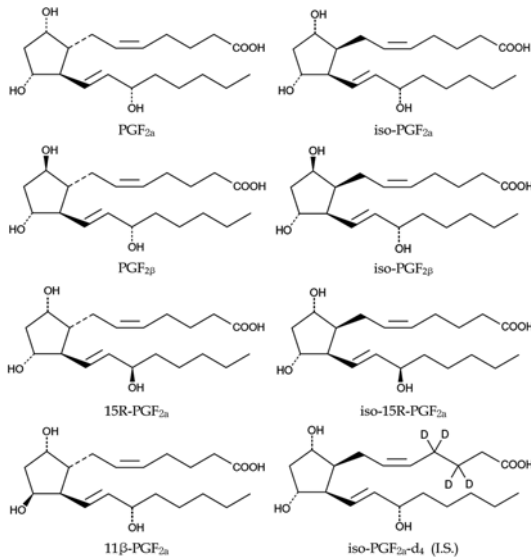


Fig. 1. Stereospecific molecular structure of standard material of prostaglandin F_{2α}.

하기 위하여 냉동보관 중인 소변 시료를 해동하여 잘 섞은 후 원심분리(5000 rpm, 10 min)하고, 0.5 ml를 1.5 ml 원심관에 넣고 0.5 N HCl 80 μ l를 이용하여 pH를 3으로 조정하고 증류수 0.5 ml, 내부표준물질(iso-PGF_{2α}-d₄) 1 μ g/ml 10 μ l를 넣고 잘 혼합하였다.

소변에서 분석대상물질을 추출하기 위하여 C₁₈ 카트리지(Sep-pak, 1 cc/100 mg, Waters)를 이용한 고체상추출(SPE)을 실시하였다. 우선, 에틸아세테이트, 메탄올, 0.5 N HCl 및 초순수 각각 2 ml로 조정(preconditioning)한 후, 전처리한 소변 시료를 통과시켰다. 물, 40% 메탄올 및 노말헥산 각각 2 ml로 세척한 후 에틸아세테이트 2 ml로 분석대상물질을 용출하였다. 용액 속에 남아있는 수분을 제거하기 위하여 황산나트륨(Na₂SO₄) 일정량을 넣어 잘 섞은 후, 나일론 실린지필터(Whatman, 0.2 μ m, Kent, UK)를 이용하여 고형물을 제거하고 진공농축기(Speed-Vac, CVE-3100, Eyr, Japan)를 이용하여 40°C로 가열하며 건조시켰다. 거의 완전히 건조된 시료를 재조정 용매(water : methanol = 1 : 1) 100 μ l를 이용하여 다시 녹인 후 HPLC 용기에 넣고 LC/MS/MS 시스템에서 정량분석하였다.

분석대상 물질이 전혀 포함되지 않은 소변을 구할 수 없었기 때문에, 검량선 작성을 위하여 10, 50, 100, 200, 600, 1,200, 2,400, 4,800 pg/ml 농도의 표준용액을 증류수에 희석하여 제조하고 시료를 처리하는 방법과 같이 고체상추출을 거친 후 LC/MS/MS 시스템에서 분석하였다.

3. LC/MS/MS를 이용한 분석

분석대상 물질인 7종의 광학이성질체는 분자량이나 구조가 같기 때문에 질량 스펙트럼도 동일하게 나타난다. 따라서 이들 물질의 분리는 순전히 HPLC 컬럼에서 진행되어야 한다. PGs 류 중에서 PGF_{2α} 이성질체의 분리에 가장 결정적인 역할을 하는 것은 컬럼과 용매의 선정이다.²⁹⁾ 액체크로마토그래피 시스템(Nanospace SI-2, shiseido, Japan)에서 PGC 컬럼(Hypercarb, 5 μ m, 1.0×150 mm, Thermo, USA)을 이용하여 경사용매 조성법으로 7종을 입체이성질체를 분리하였다. 분리를 위한 이동상은 물 : 아세토니트릴 : 메탄올 = 5 : 3 : 2 비율로 유지하며 암모니아 수용액(NH₄OH)으로 pH를 9.5로 조정하였다. 유량은 60 μ l/min이었으며, 용매는 초기 조건 0% B에서 1분간 유지하다가 5분 만에 30%, 다시 6분 만에 100% B로 증가시켰으며 5분 동안 100% B 상태를 유지하다가 초기 조건으로 되돌아오도록 하였다. 분석대상물질이 모두 빠져나오는 데에는 21분 정도가 소요되었으며, 총 분석시간은 38분이었다.

MS/MS(triple quadrupole mass spectrometer) 질량 분석기는 API 4000(Appliedbiosystems, USA) 모델이 이용되었다. Iso-PGF_{2α} 분석은 ESI(electron spray ionization) 음이온 모드에서 이루어졌으며 인퓨전(Infusion)법에 의한 최적화를 통해 정량분석을 위한 질량분석기 조건을 정하였다. 분석은 MRM(multiple reaction mode)으로 진행되었으며, iso-PGF_{2α}의 경우 m/z 353 → 193을 이용하고, iso-PGF_{2α}-d₄의 경우 m/z 357 → 197을 이용하여 검출하였다.

4. 분석방법의 정확도 검증

소변시료의 전처리 과정 및 고체상추출 과정을 진행하여 LC/MS/MS를 이용하여 iso-PGF_{2α}와 그 이성질체들을 분리 정량하는 분석법에 대한 평가는 검출한계, 정확도, 정밀도 등에 대하여 수행하였다. 검출한계는 S/N 비(signal to noise ratio) 및 검량선의 회귀직선식을 이용하는 미국 FDA에서 추천하고 있는 계산방법³⁰⁾으로 검증하였다.

정확도(accuracy)와 정밀도(precision)를 검증하기 위하여 분석대상 소변시료에서 일정량씩 모아 통합 소변시료(pooled urine sample)을 제조하였다. 정확도는 회수율(recovery) 평가를 통하여 이루어졌으며, 통합 소변시료에 0.6, 1.2, 2.4 ng/ml 농도가 되도록 7종의 표준물질 혼합액을 첨가하여 전처리하여 분석한 결과를 검량선을 이용하여 농도를 결정하고 통합 소변시료 공시료(blank) 농도를 빼준 후 첨가한 양에 대한 회수율을

Table 1. Optimized LC/MS/MS conditions for analyzing isomers of 8-isoprostanes

Parameters	Conditions
Column	Hypercarb, 5 μm, 1.0× 150 mm
Mobile phase	(A) Water : acetonitrile : methanol = 5 : 3 : 2 (pH = 9.5) (B) acetonitrile : methanol = 3 : 2
Gradient1 (60 μl/min)	Time(min) 0 1 6 12 17 18 38 B(%) 0 0 30 100 100 0 0
Injection volume	10 μl
Column temperature	40°C
Ionization mode	ESI negative
Curtain Gas	15 psi
Temperature	450 °C
Ion Spray Voltage	-4500 V
Ion Source Gas 1	40 psi
Ion Source Gas 2	60 psi
Collision Gas (CAD)	6

계산하였다. 각 농도별로 5회 반복하여 분석하여 농도별 평균 회수율을 이용하여 정확도를 검증하였다.

반복실험에 대한 일정성을 표현하는 정밀도는 정확도 검증에 이용된 3가지 농도 수준에서 5회 반복 실험했을 때의 변이계수(Coefficient of variable, CV)를 이용하여 검증하였다. 검량선 작성을 위해 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 ng/ml (n=8) 범위의 표준물질을 증류수에 희석하여 제조한 후, 시료와 같은 방법으로 전처리하여 LC/MS/MS로 분석하였다.

5. 소변시료의 분석

위에서 확립된 분석방법에 의해 실제 소변시료 중에

서 iso-PGF_{2α}를 분석하기 위하여 사무직 근로자인 20대 남성 자원자를 대상으로 흡연자 10명과 비흡연자 10명의 소변시료를 채취하여 분석하였다.

소변 중 크레아티닌 보정을 위해 파장 505 nm에서 측정하는 비색법(Jaffe, Kinetic method)을 이용하여 분석하였다. 크레아티닌 측정을 위한 장비는 ADVIA 1650(Bayer, USA)이었다.

III. 결과 및 고찰

1. Iso-PGF_{2α}의 분리 및 LC/MS/MS

Iso-PGF_{2α}의 경우 분자량(molecular weight)이 354.5로 음이온 모드에서 이온화하면 [M-H]=353인 물질로 되며, 이 모분자(parent molecule)에서 깨어진 다양한 파편(daughter ion)들 중에서 분석에 이용한 것은 193이었다. 실제로 피크의 높이는 309가 더 높았으나, 바탕선의 차이로 인하여 193이 더 뛰어난 감도를 나타내었다(Fig. 2).

PGs 류 중에서 PGF_{2α} 이성질체의 분리에 가장 결정적인 역할을 하는 것은 컬럼과 용매의 선정이다.²³⁾ 분리에 적합한 컬럼으로 선정된 PGC 컬럼은 용매의 성분에 따라 상당한 분해도의 차이를 보였다. 암모니아와 메탄올이 PGs 이성질체의 분리에 많은 역할을 담당하는 것을 알 수 있었다. 유기용매의 조성에서 메탄올의 비율이 높아질수록 분리가 더 많이 일어난다는 장점은 있었지만 분석시간이 상당히 길어지기 때문에 적절한 유기용매의 비율을 아세토니트릴 : 메탄올 = 60 : 40으로 결정하게 되었다. 암모니아의 역할도 중요한 변수였기 때문에 상당량의 암모니아를 이동상 용매에 첨가하여

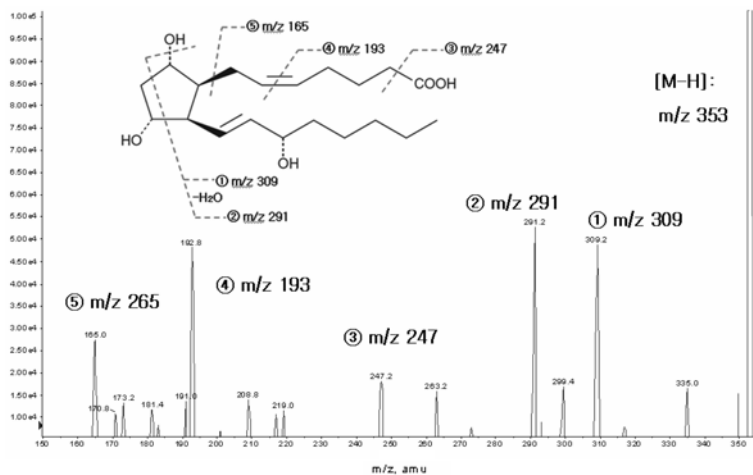


Fig. 2. MS/MS fragmentation spectra of 8-isoprostane.

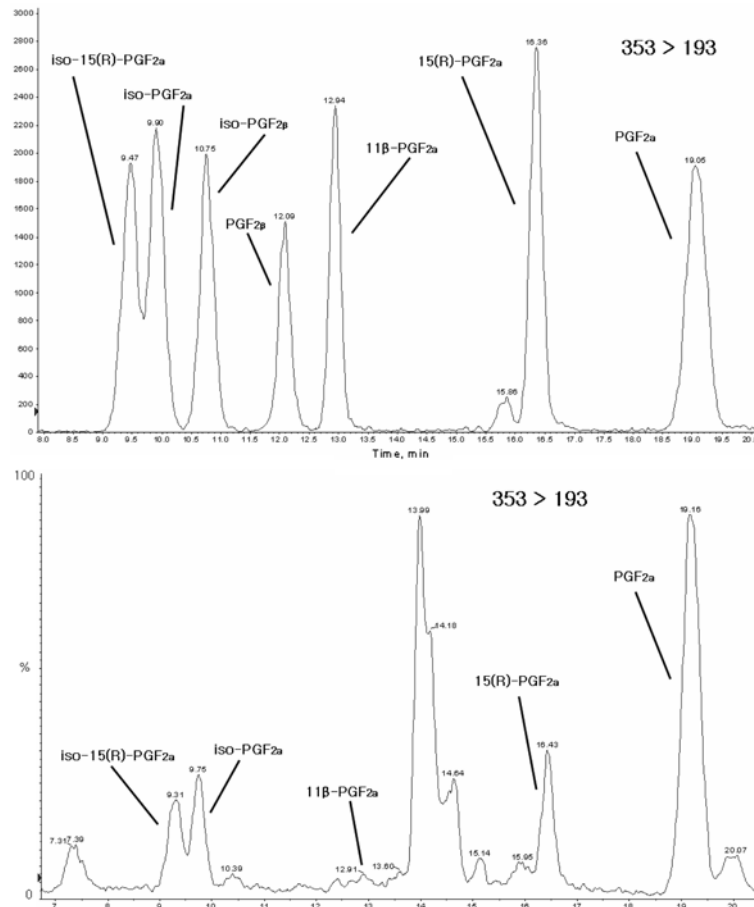


Fig. 3. LC/MS/MS spectra of 7 standard prostaglandins diluted in mobile phase (0.1 ng/ml) (top) and human urine sample (bottom).

pH가 9.5가 되도록 조절하여 이용하였다. 이와 같이 질량분석기의 조건을 최적화하고 용매의 선택과 컬럼의 선정을 마친 후에 LC/MS/MS 시스템에서 7종의 표준 물질을 분리할 수 있었다. 표준물질 혼합 용액을 이용하여 분리를 확인하고, 실제 소변시료를 전처리하여 분석하였다(Fig. 3).

PGs의 다양한 이성질체에는 물질별로 각각의 특징들이 있을 수 있다. 예를 들면, 11β -PGF_{2α}의 경우 비만세포에서 생성되는 prostaglandin D₂의 생체지표로 이용되어지는 물질³¹⁾이다. 본 연구에서도 11β -PGF_{2α}를 표준물질로 이용하여 분리를 확인하였다. 하지만, 실제 소변시료에서는 상당히 낮은 농도를 보여 일부의 근로자 소변에서만 정량가능한 11β -PGF_{2α}를 발견할 수 있었다.

표준물질과 동일한 분석 조건에서 소변시료를 전처리하여 분석한 결과 Fig. 3에서와 같이 나타났다. 7종의

이성질체 중에서 4종(iso-15(R)-PGF_{2α}, iso-PGF_{2α}, 15(R)-PGF_{2α}, PGF_{2α})의 분석대상 물질이 정량 가능한 농도로 소변 중에서 검출되었으며 실제 소변시료에 존재하는 PGs 이성질체의 분리가 가능함을 보일 수 있었다. 11β -PGF_{2α}의 경우 검출한계치에 가까운 낮은 농도로 검출되는 시료와 검출되지 않는 시료로 구분되었는데, 시료의 전처리 및 농축 방법을 개선한다면 11β -PGF_{2α}도 검출할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 내경이 1 mm인 PGC 컬럼을 이용하였는데, 적정 유량이 50 μl/min 내외이기 때문에 피크가 넓게 퍼지는 경향을 막을 수는 없었다. 향후 연구되어야 할 과제는 내경이 좀 더 큰 PGC 컬럼을 이용하여 피크의 넓이를 좁히는 것이다. 현재의 분리도를 유지하면서 피크의 넓이가 줄어들 수 있다면 상당한 민감도의 향상을 가져올 것이다.

Table 2. The results of method validation for 8-isoprostanes in human urine

Compound	Limit of detection* (ng/ml)	Accuracy(n=5), %			Precision(n=5), %		
		0.6 ng/ml	1.2 ng/ml	2.4 ng/ml	0.6 ng/ml	1.2 ng/ml	2.4 ng/ml
iso-PGF _{2α}	0.029	92.8	101.9	93.1	20.7	8.8	9.5
iso-15(R)-PGF _{2α}	0.035	120.8	99.4	98.5	9.3	15.3	13.7
iso-PGF _{2β}	0.064	123.0	105.7	102.2	16.0	18.9	18.5
PGF _{2β}	0.103	101.6	96.1	97.7	10.6	19.2	15.3
11β-PGF _{2α}	0.079	114.7	102.1	96.7	16.8	14.5	10.5
15(R)-PGF _{2α}	0.076	113.7	100.2	98.3	17.2	14.6	13.9
PGF _{2α}	0.055	92.3	81.3	100.1	25.7	21.2	9.3

*LOD=3.3×(standard error of y intercept)/(estimate of slope for linear regression)

2. 분석법에 대한 평가

Iso-PGF_{2α}의 경우 표준물질을 전처리과정 없이 MS/MS 시스템에 주입하여 계산한 IDL(instrumental detection limit) 값은 0.5 pg이었다. 검출한계 결정을 위해 표준용액을 희석하는 방식으로 S/N 비(signal to noise ratio)가 3이 되는 지점의 값을 측정하여 검출한계는 10 pg/ml로 계산되어졌다. 표준물질로 이용한 7가지 물질에 대하여 통합 소변시료에 첨가하여 분석한 결과를 미국 FDA의 검출한계 계산법³⁰⁾으로 계산한 결과 Table 2와 같이 0.029~0.103 ng/ml로 나타났으며, 이 결과는 디에틸에테르로 추출하여 분석한 Bohnstedt 등²⁹⁾(0.035 ng/ml)이나 고체상추출 후 분석한 Cavalca 등⁵⁾(0.097 ng/ml)의 결과와 비교해서도 뒤지지 않았다.

통합 소변시료에 세가지 농도(0.6, 1.2 2.4 ng/ml)가 되도록 7가지 표준물질 혼합액을 첨가하여 분석한 정확도 검증 결과 iso-PGF_{2α}의 경우 92.8, 101.9, 93.1%의 안정적인 값을 보였다. 그리고 iso-PGF_{2α}에 대한 반복실험에 대한 일정성을 표현하는 정밀도의 경우 변이계수(CV) 값이 20.7, 8.8, 9.5%로 나타났다(Table 2).

검량선 작성을 위해 10 pg/ml~4.8 ng/ml (n=8) 범위의 표준물질을 제조하여 분석한 결과 시료분석에 적합한 직선성(r² > 0.99)을 나타내었으며, 분석대상 시료의

농도가 이 범위에 들어오는 것을 확인하였다. 100 ng/ml 농도의 표준용액을 주입하고 난 후 곧바로 공시료를 분석하여 캐리오버(carry over)를 분석한 결과 0.01% 이하였다.

3. 소변시료 분석

본 연구에서 적용한 분석방법을 활용하여 건강한 20대 남성, 사무직 근로자 20명(흡연자 10명, 비흡연자 10명)을 대상으로 소변 중 PGs 이성질체를 분석하였다. 흡연자의 연령(28.0±0.82)과 비흡연자의 연령(28.6±0.70)은 통계적인 차이가 없었으며 분석결과를 Table 3에 나타내었다. 4종의 PGs 이성질체의 농도가 비흡연자보다 흡연자 소변에서 높은 농도를 나타내었다. 산화성손상의 생체지표로 주로 이용되는 iso-PGF_{2α}의 산술 평균 농도가 흡연자에게서 더 높게 나타남으로써 비흡연자에 비해 산화성 스트레스가 더 많다는 것을 볼 수 있었다(Table 3). 하지만, 흡연자와 비흡연자의 소변 중 산화성손상 지표의 농도는 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. Helmersson 등¹³⁾의 연구와 같은 대규모(n > 600) 연구에서는 물론, Ahmadzadehfar 등¹¹⁾의 연구에서와 같은 소규모 집단(n < 50)에서도 흡연 유무에 따른 통계적 차이를 나타낼 수 있기 때문에 대상자

Table 3. Levels of 4 identified PGs in smokers and non-smokers urine

Smoking group	Creatinine adjusted	iso-PGF _{2α}	PGF _{2α}	iso-15(R)-PGF _{2α}	15(R)-PGF _{2α}
Non-Smoker (n=10)	Adjusted	0.154±0.082* (0.064~0.289)	0.843±0.473 (0.392~0.190)	0.213±0.100 (0.119~0.398)	0.196±0.131 (0.098~0.528)
	None	0.267±0.170 (0.049~0.560)	1.462±0.888 (0.298~2.850)	0.352±0.169 (0.100~0.597)	0.334±0.222 (0.075~0.792)
Smoker (n=10)	Adjusted	0.231±0.117 (0.095~0.486)	0.957±0.375 (0.451~1.477)	0.294±0.117 (0.124~0.542)	0.242±0.159 (0.100~0.646)
	None	0.457±0.252 (0.084~0.743)	2.053±1.218 (0.261~4.240)	0.554±0.273 (0.162~0.847)	0.478±0.305 (0.071~1.130)

*mean concentration ±standard deviation (range)

concentration unit : creatinine adjusted - ng/mg creatinine, creatinine none adjusted - ng/ml

수를 적절하게 설정한다면 유의한 결과를 보일 수 있을 것이다.

Iso-PGF_{2α} 농도의 경우 Dillon 등³²⁾이 EIA 방법으로 분석한 결과와 비교할 때(비흡연자 0.852, 흡연자 1.579 ng/mg creatinine) 본 연구에서의 결과값이 상당히 낮은 것으로 나타났으며, Lee 등³³⁾이 GC-NCI/MS 방법으로 분석한 결과(0.502 ng/mg creatinine) 보다도 낮았다. 이것은 20대의 젊고 건강한 남성만을 대상으로 하였기 때문에 상대적으로 iso-PGF_{2α} 농도가 낮게 검출된 것으로 볼 수도 있으나, EIA 방법과 GC-NCI/MS 방법은 앞에서 설명한 바와 같이 다양한 방해요인이 존재하므로 실제 농도보다 높게 나왔을 가능성도 배제할 수 없다.

IV. 결 론

산화성 스트레스의 지표물질로 최근에 관심이 모아지는 소변 중 iso-PGF_{2α}의 분석은 LC/MS/MS 시스템을 이용하는 것이 정확도를 높일 수 있음이 제기되고 있다. 본 연구는 소변시료 중에 존재하는 산화성 스트레스 지표물질인 iso-PGF_{2α}를 간략한 전처리 방법을 이용하여 역학연구에 이용할 수 있을 정도의 검출한계를 나타낼 수 있는 분석방법을 정립하고 평가하기 위하여 진행하였다. 7종의 PGs 이성질체를 분석 대상 물질로 하여 소변 시료를 고체상추출과 진공 농축 과정을 진행하여 LC/MS/MS로 분석하였다. 분석 결과, 7종의 PGs 이성질체 표준물질을 분리 검출할 수 있었으며, 실제 소변시료 중에서 4종의 이성질체가 검출한계 이상으로 발견되었다. Iso-PGF_{2α} 분석을 위한 검출한계는 0.028 ng/ml로 대상자의 모든 소변에서 검출할 수 있는 수준이었으며, 3개 농도 수준에서 실시한 정확도 검증 결과 92.8~101.9%로 나타났고, 정밀도는 8.8~20.7%로 안정된 값으로 나타났다. 본 연구에서 진행한 LC/MS/MS 기법을 응용한 iso-PGF_{2α} 분석방법은 향후 산화성 스트레스와 관련된 역학적 연구의 방법론적 측면에서 중요한 역할을 담당할 것이다.

참고문헌

- Block, G., Dietrich, M., Norkus, E. P., Morrow, J. D., Hudes, M., Caan, B., Packer, L. : Factors associated with oxidative stress in human populations. *American Journal of Epidemiology*, **156**(3), 274-285, 2002.
- Mukai, F. F., Goldstein, B. D. : Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science*, **191**, 868-869, 1976.
- Reilly, M., Delanty, N., Lawson, J. A., FitzGerald, G. A. : Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, **94**(1), 19-25, 1996.
- Dimopoulos, N., Piperi, C., Psarra, V., Lea, R. W., Kalofoutis, A. : Increased plasma levels of 8-iso-PGF_{2α} and IL-6 in an elderly population with depression. *Psychiatry Research*, **161**, 59-66, 2008.
- Cavalca, V., Minardi, F., Scurati, S., Guidugli, F., Squellerio, I., Veglia, F., Dainese, L., Guarino, A., Tremoli, E., Caruso, D. : Simultaneous quantification of 8-iso-prostaglandin-F2α and 11-dehydro thromboxane B2 in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **397**, 168-174, 2010.
- Roxach, J., Khanapure, S. P., Hwang, S.-W., Adiyaman, M., Lawson, J. A., FitzGerald, G. A. : The isoprostanes: A perspective. *Prostaglandins*, **54**, 823-851, 1997.
- Morrow, J. D., Harris, T. M., Roberts, L. J. : Non-cyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: Analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Analytical Biochemistry*, **184**(1), 1-10, 1990.
- Favreau, F., Petit-Paris, I., Hauet, T., Duthel, D., Papet, Y., Mauco, G., Tallineau, C. : Cyclooxygenase 1-dependent production of F2-isoprostane and changes in redox status during warm renal ischemia-reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**(8), 1034-1042, 2004.
- Hozawa, A., Ebihara, S., Ohmori, K., Kuriyama, S., Ugajin, T., Koizumi, Y., Suzuki, Y., Matsui, T., Arai, H., Tsubono, Y., Sasaki, H., Tsuji, I. : Increased plasma 8-isoprostane levels in hypertensive subjects: the tsurugaya project. *Hypertension Research*, **27**(8), 557-561, 2004.
- Reilly, M. P., Barry, P., Lawson, J. A., FitzGerald, G. : Urinary 8-EPI PGF_{2α}: an index of oxidant stress in vivo. *Fibrinolysis and Proteolysis*, **11**, 81-84, 1997.
- Ahmadzadehfar, H., Oguogho, A., Efthimiou, Y., Kritz, H., Sinzinger, H. : Passive cigarette smoking increases isoprostane formation. *Life Sciences*, **78**(8), 894-897, 2006.
- Helmersson, J., Larsson, A., Vessby, B., Basu, S. : Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F2α, interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis*, **181**(1), 201-207, 2005.
- Hill, D. B., Awad, J. A. : Increased urinary F2-isoprostane excretion in alcoholic liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**(5-6), 656-660, 1999.
- Irizarry, M. C. : Biomarkers of alzheimer disease in plasma. *NeuroRX*, **1**(2), 226-234, 2004.
- Praticò, D., Rokach, J., Lawson, J., FitzGerald, G. A. : F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. *Chemistry and Phys-*

- ics of Lipids*, **128**(1-2), 165-171, 2004.
16. Montuschi, P., Collins, J. V., Ciabattini, G., Lazzari, N., Corradi, M., Kharitonov, S. A., Barnes, P. J. : Exhaled 8-Isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **162**, 1175-1177, 2000.
 17. Hong, Y., Park, E., Park, M., Ko, J.A., Oh, S., Kim, H., Lee, K., Leem, J., Ha, E. : Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population. *Toxicology Letters*, **184**, 139-144, 2009.
 18. Park, E., Hong, Y., Lee, K., Im, M., Ha, E., Kim, Y., Ha, M. : Maternal exposure to environmental tobacco smoke, GSTM1/T1 polymorphisms and oxidative stress. *Reproductive Toxicology*, **26**, 197-202, 2008.
 19. Shin, M., Lee, J., Jang, Y., Park, E., Oh, J., Chung, J., Chung, N. : Insulin resistance, adipokines, and oxidative stress in nondiabetic, hypercholesterolemic patients: leptin as an 8-epi-prostaglandin F_{2α} determinant. *Metabolism*, **55**, 918-922, 2006.
 20. Kim, K., Jung, B., Paeng, K., Kim, I., Chung, B. : Increased urinary F₂-isoprostanes levels in the patients with Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, **64**, 47-51, 2004.
 21. Kim, K., Paeng, K., Hahm, J., Kim, D., Chung, B. : Elevated urinary 8-isoprostaglandin F_{2α} in females with Graves' hyperthyroidism, Prostaglandins. *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **71**, 143-147, 2004.
 22. Lawson, J. A., Rokach, J., FitzGerald, G. A. : Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(35), 24441-24444, 1999.
 23. Devaraj, S., Hirany, S. V., Burk, R. F., Jialal, I. : Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F₂-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clinical Chemistry*, **47**(11), 1974-1979, 2001.
 24. Il'yasova, D., Morrow, J. D., Ivanova, A., Wagenknecht, L. E. : Epidemiological marker for oxidant status: comparison of the ELISA and the gas chromatography/mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F_{2t}-isoprostane. *Annals of Epidemiology*, **14**(10), 793-797, 2004.
 25. Proudfoot, J., Barden, A., Mori, T. A., Burke, V., Croft, K. D., Beilin, L. J., Puddey, I. B. : Measurement of urinary F₂-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation-A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **272**(2), 209-215, 1999.
 26. Davies, S. S., Zackert, W., Luo, Y., Cunningham, C. C., Frisard, M., Roberts, L. J. : Quantification of dinor,dihydro metabolites of F₂-isoprostanes in urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **348**(2), 185-191, 2006.
 27. Ohashi, N., Yoshikawa, M. : Rapid and sensitive quantification of 8-isoprostaglandin F_{2α} in human plasma and urine by liquid chromatography?electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **746**(1), 17-24, 2000.
 28. Liang, Y., Wei, P., Duke, R. W., Reaven, P. D., Harman, S. M., Cutler, R. G., Heward, C. B. : Quantification of 8-iso-prostaglandin-F_{2α} and 2,3-dinor-8-iso-prostaglandin-F_{2α} in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine*, **34**(4), 409-418, 2003.
 29. Bohnstedt, K. C., Karlberg, B., Wahlund, L.-O., Jonhagen, M. E., Basun, H., Schmidt, S. : Determination of isoprostanes in urine samples from Alzheimer patients using porous graphitic carbon liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **796**, 11-19, 2003.
 30. FDA, 1998, Validation of analytical procedures: Methodology, recommended for implementation at step 7 of the VICH process on 22 October 1998 by the VICH steering committee, FDA, DHHS.
 31. Mucha, I., Riutta, A. : Determination of 9α,11β-prostaglandin F₂ in human urine. Combination of solid-phase extraction and radioimmunoassay, Prostaglandins. *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **65**(5-6), 271-280, 2001.
 32. Dillon, S. A., Billington, D., Rahman, K. : Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F₂ in smoking and nonsmoking men and women. *Human Nutrition and Metabolism Research Communication*, **132**, 168-171, 2002.
 33. Lee, C. J., Jenner, A. M., Halliwell, B. : Rapid preparation of human urine and plasma samples for analysis of F₂-isoprostanes by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **320**, 696-670, 2004.