

액체크로마토그래프-탠덤질량분석기(LC-MS/MS)를 이용한 소변 내 D-, L- Lactate 분리 및 정량

의료법인 녹십자의료재단

문 철 진 · 양 송 현

Simultaneous Quantification of Urinary L-, and D-Lactate by Reversed-Phase Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Chul Jin Moon, Song Hyun Yang

Institutional affiliation: Green Cross Laboratories

Purpose: Lactate has two optical isomers, L-lactate and D-lactate. In human L-lactate is the most abundant enantiomer of lactate. As plasma and urinary levels of L-lactate is associated with inherited metabolic disorders in general, D-lactate have been linked to the presence of diabetes and inflammatory bowel disease. Previously developed techniques have shown several limitations to further evaluate D-lactate as a biomarker for this condition. In this paper, we describe a highly sensitive, specific and fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of D-, L-lactate in urine.

Methods: D- and L-lactate were quantified using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with labelled internal standard. Samples were derivatized with (+)-O,O'-diacetyl-L-tartaric anhydride (DATAN) and separated on a Poroshell 120 EC-C18 column.

Results: Quantitative analysis of D-, and L-lactate was achieved successfully. Calibration curves were linear ($r > 0.999$) over 0.5-100 $\mu\text{g/mL}$. Stabilities for samples were within the 10% variation. Inter- and Intra-day assay variations were below 10%.

Conclusion: The presented method proved to be suitable for the quantitation of D- and L-lactate and opens the possibility to explore the use of D-lactate as a biomarker.

Key words: D-lactate, L-Lacate, LC-MS/MS

서 론

L-lactate와 D-lactate는 α -hydroxy group의 방향이 서로 다른 입체 이성질체이다¹⁾. L-lactate는 골격근에서 포도당이 산화되는 대사과정의 주요 산물로써 사람의 대사산물은 항상 L-lactate이며, 혐기성 해

당과정 중에 pyruvate가 lactate dehydrogenase에 의하여 변환되어 생성된다. 이에 반해 D-lactate는 신체 내에서 두가지 주요 경로로 생성되는 바 그 중 하나는 해당과정과 지질산화반응(lipid oxidation)의 과정에서 만들어진 methylglyoxal이 glyoxalase II (EC 3.1.2.6)에 의하여 대사되어 생성되는 것과 위장관의 박테리아에 의해 생성되는 경우이다²⁾. L-lactate는 혈당량이 떨어지는 것을 막기 위한 포도당신생합성(gluconeogenesis)의 기질로도 사용된다. 일반적인 생리조건 하에서 L-lactate의 농도는 D-lactate에 비하여

책임저자: 양송현, 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107
의료법인 녹십자의료재단
Tel: 031)260-9210, Fax: 031)260-9049
E-mail: eicheyang@gclabs.co.kr

100배 가량 높다³⁾. 선천성대사이상과 관련하여 L-lactate가 높게 측정되는 경우는 glucose-6-phosphatase deficiency, fructose-1, 6-diphosphatase deficiency, pyruvate carboxylase deficiency, pyruvate dehydrogenase deficiency, oxidative phosphorylation deficiency, methylmalonic aciduria 등이 있다.

D-lactate는 주로 위장관에서 공생하는 박테리아가 혐기성 해당과정을 하면서 만들어진 산물로서 정상적인 생리조건 하에서는 박테리아에 의해 acetate로 대사된다. 장투과성 손상, 위장관내 박테리아의 과량증식, 당뇨로 인하여 methylglyoxal이 증가된 경우에 혈장과 소변에서 D-lactate가 고농도로 측정된다^{4, 5)}. 췌양성 대장염, 장허혈, 충수염 등에서도 D-lactate의 증가가 관찰된다⁶⁾. Necrotizing enterocolitis가 있는 유아, 짧은 창자 증후군(short bowel syndrome) 또는 공회장 수술(jejunoileal surgery)을 받은 환자의 소변 등에서 D-lactate/creatinine의 비율이 증가되는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

인체 내의 D-lactate는 대사가 잘 일어나지 않기 때문에 주로 소변으로 배설된다. 소변에서 L-lactate는 거의 없는데 비하여 D-lactate는 섭취된 양의 40% 이상이 소변으로 배설된다⁸⁾. D-lactate의 농도가 높게 되면 대사산증을 유발하게 되며, 이를 치료하지 않게 되면 심각한 신경학적 증상의 발현을 초래하게 된다⁹⁾.

생체 내에서 주로 존재하는 lactate가 L-lactate임에도 불구하고 D-lactate를 생체표지자로서 측정해야 하는 요구가 증가함에 따라 L-lactate와 D-lactate를 구별하여 분석하기 위한 다양한 방법이 시도되어 왔다. 키랄고정상을 기반으로 한 액체크로마토그래프²⁾, 기체크로마토그래프-질량분석법(GC-MS)¹⁰⁾, 액체크로마토그래프-질량분석법(LC-MS)¹¹⁾ 등이 있었으나, 낮은 감도, 다량의 검체량 필요, 복잡한 크로마토그래프 시스템, 긴 분석시간 등 단점이 있었다.

본 논문에서는 고가의 키랄고정상을 사용하지 않고도 액체크로마토그래프-탠덤질량분석기(LC-MS/MS)를 이용하여 빠른 시간 내에 높은 감도와 선택성으로 D-, L-lactate를 분석하는 방법을 보고하고자 하였으

며, 소변 내 D-, L-lactate를 정량하기 위하여 분석방법의 신뢰성을 확보하였다.

대상 및 방법

1. 시약

Sodium D-lactate (≥99%)와 sodium L-lactate (-98%)는 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland)로부터, 내부표준물질로 사용한 sodium L-lactate-3, 3,3-d3 (-98%)는 CDN isotopes (Quebec, Canada)로부터 구입하였다. 인공소변을 제조하기 위한 urea, sodium chloride, potassium chloride, potassium dihydrogen phosphate, bovine serum albumin도 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland)로부터 구매하였다. 유도체화 시약인 (+)-O,O'-diacety-L-tartaric anhydride (DATAN)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, U.S.A)로부터 구입하였다. 전처리에 사용된 methanol과 dichloromethane은 TEDIA (Fairfield, U.S.A), acetonitrile과 물은 Fisher Scientific (Fairlawn, U.S.A), acetic acid (≥99.7%)는 Junsei (Tokyo, Japan)로부터 각각 구매하였다.

2. 크로마토그래피 조건

액체크로마토그래프는 1290 Infinity Solvent Delivery system (Agilent, U.S.A.)을, 텐덤질량분석기는 Agilent 6460A (Agilent, U.S.A.)를, 컬럼은 Poroshell 120 EC-C18 (2.7 μm, 3×50 mm, Agilent, USA)을, 데이터 처리장치는 MassHunter workstation software 6.0 (Agilent, USA)을 사용하였다. 컬럼의 온도 45°C와 자동시료주입기 온도 10°C를 유지하도록 하였다. 이동상은 용매 A는 1.5 mM ammonium formate (0.01% formic acid), 용매 B는 acetonitrile을 사용하였으며, 용매의 구배조건은 다음과 같았다. 0-0.6분간 용매 A를 99%, 0.6-3분 이내에 용매 A를 42%로 바꾸고, 3-3.2분간 조건을 유지한 뒤, 3.2-5분 이내에 용매 A를 99%로 바꾼 다음, 5-7분간 초기 조

건을 유지시키면서 컬럼을 안정화 시켰다. 시료주입량은 5 μL 유속은 0.5 mL/min로 하였다.

3. 탠덤질량분석기 조건

MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode로서 음이온 측정모드로 분석하였다. L-, D-lactate 모두 Q1 m/z 값은 305.1, Q3 m/z 값은 89.1 이었고, 내부 표준물질인 L-lactate-3,3,3-d3의 Q1 m/z 값은 308.1, Q3 m/z 값은 92.1이었다. 탠덤질량분석기의 내부기기 조건은 시료도입부의 탈용매기체의 온도가 330°C로서 기체의 유속은 11 L/min.이었고, capillary voltage는 4000 V였다.

4. 검량선용 시료와 정도관리시료의 제조

검량선용 시료와 정도관리시료를 제조하기 위하여 인공소변을 다음과 같이 제조하였다. 증류수 100 mL 에 최종농도가 각각 30 mM urea, 11.4 mM sodium chloride, 7.8 mM potassium chloride, 1.5 mM potassium dihydrogen phosphate, 7.6 mg/L bovine serum albumin이 되도록 제조하였다. 제조된 인공소변은 -20°C 이하에서 냉동보관 하였다.

L-Lactate, D-Lactate 표준품을 각각 최종농도가 1 mg/mL과 500 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 증류수에 녹여 표준원액을 만든 다음 4°C에서 냉장 보관하였다. 시료 중 Lactate의 농도가 각각 0.5-100 $\mu\text{g/mL}$ 씩 되도록 인공소변을 이용하여 검량선용 표준시료를 조제하였다.

5. 소변시료의 처리

-70°C 이하에서 냉동 보관된 소변시료를 상온에서 해동한 뒤 4°C, 13,200 rpm의 조건으로 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 실험에 사용하였다. 검량선시료 및 소변시료 20 μL 에 내부표준물질(L-Lactate-3,3,3-d3, 10 $\mu\text{g/mL}$) 20 μL 와 methanol 300 μL 를 첨가한 후 50°C 질소기류 하에서 증발건고 하였다. Dichloromethane: Acetic acid=4:1 (v/v)에 녹인 유도체시

약 50 μL 첨가한 후 30초간 짧게 교반한 다음 50°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 실온에서 10분간 방치시킨 다음 50°C 질소기류 하에서 증발건고 하였다. 잔사를 25% acetonitrile 200 μL 를 첨가하고 3분간 교반하여 재용해 시켰다. 재용해된 용액 중 5 μL 를 액체크로마토그래프-탠덤질량분석기에 주입하여 측정하였다.

6. 분석방법 검증(Method validation)

L-, D-lactate 표준원액을 증류수로 희석하여 저농도(20 $\mu\text{g/mL}$)와 고농도(90 $\mu\text{g/mL}$) 각 농도별 최소 3개의 등분체를 준비한 뒤 표준원액에 대한 실온안정성(상온에서 3시간 방치)과 4°C에서의 냉장안정성(냉장조건에서 7일간 보관)을 평가하였다.

검량선 0.5-100 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 시그널을 분석대상물질의 농도에 대한 함수로 작성한 다음 상관계수(correlation coefficient)를 구하여 직선성을 평가하였으며, 가중치는 적용하지 않았다. L-, D-lactate의 농도가 각각 20, 40, 60, 90 $\mu\text{g/mL}$ 인 분석법 검증시료에 대하여 일내일간 각각 5번의 시험을 수행하여 정밀성, 정확성 등을 평가하였다.

L-, D-lactate 표준시료 저농도(20 $\mu\text{g/mL}$), 고농도(90 $\mu\text{g/mL}$) 각 농도별 3개의 등분체를 전처리하여 측정된 뒤 10°C 조건의 자동시료주입기에서 24시간 방치 한 다음 재주입하여 전처리 후 안정성을 측정하였고, 동일한 농도의 표준시료를 상온에서 3시간 방치하여 단기온도안정성을 평가하였다. 표준시료 저농도(20 $\mu\text{g/mL}$), 고농도(90 $\mu\text{g/mL}$) 각 농도별 3개의 등분체를 24시간 이상 -70°C에서 보관한 뒤 상온에서 해동한 뒤 다시 얼리는 과정을 3회 반복한 다음 분석하여 소변시료의 냉해동 안정성을 평가하였다.

결 과

Lactate의 직선성은 L-lactate의 검량선의 회귀방정식이 $y=0.259x-0.000789$ ($r=0.9999$), D-lactate가 $y=0.283x+0.000601$ ($r=0.9991$)로서 0.5-100

µg/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. L-, D-lactate와 내부표준물질의 피크분리는 Fig. 1과 같이 상호간 간섭이 보이지 않았다. 표준원액의 냉장안정성 및 실온안정성의 결과는 Table 1, 2와 같이 10% 내의 변동량을 보였다. 일내 5회, 일간 5회 실시한 L-, D-

lactate의 정밀성, 정확성 시험은 Table 3, 4에서와 같이 이론값과의 차이가 10% 이내였다. 소변시료를 상온에서 3시간 방치한 뒤 분석하여 검체의 단기온도안정성을 평가한 결과 10% 이내의 변동량을 보였다. 전처리가 끝난 시료를 자동시료주입기로 주입하여 분석한

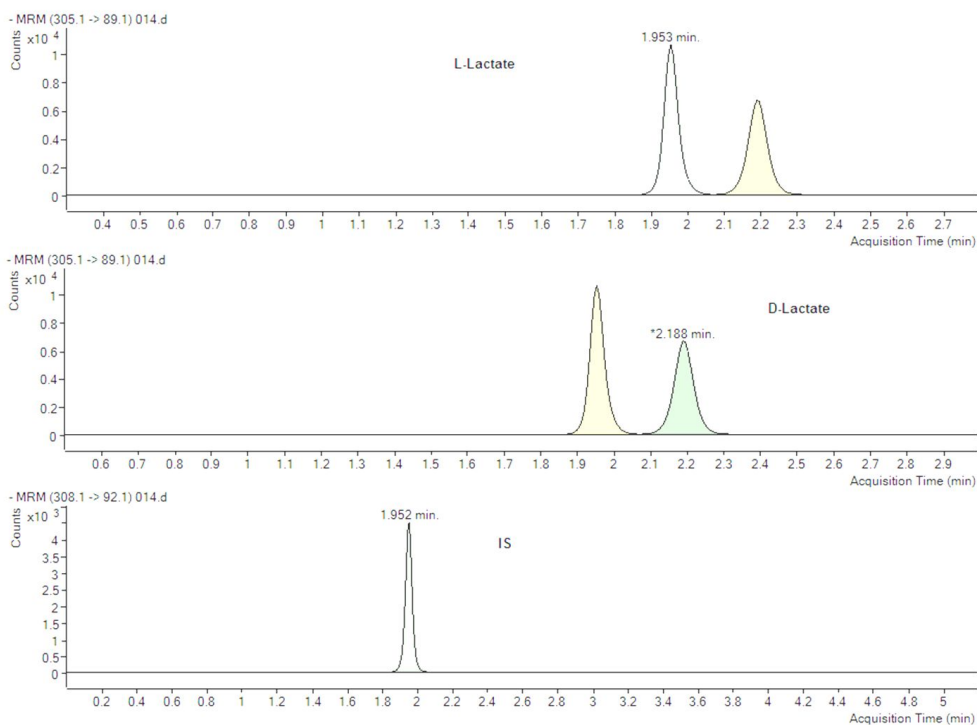


Fig. 1. The isolated peak chromatogram of between L-, D-lactate and internal standard. The retention time of L-, D-lactate and internal standard were 1.953, 2.188, and 1.952 min., respectively.

Table 1. Refrigerated Stability of Standard Solution

		Initial area	Area of 7 days later	Difference (%)
20 µg/mL	L-lactate	2598.963	2694.409	3.67
	D-lactate	1966.038	2035.766	3.55
90 µg/mL	L-lactate	135541.516	143016.525	5.51
	D-lactate	100079.188	103676.845	3.59

Table 2. Room Temperature Stability of Standard Solution

		Initial area	Area of 3 hours later	Difference (%)
20 µg/mL	L-lactate	2518.603	2498.169	-0.81
	D-lactate	1960.146	1773.003	-9.55
90 µg/mL	L-lactate	141027.071	129913.608	-7.88
	D-lactate	102980.244	97459.503	-5.36

Table 3. Accuracy and Precision of L-lactate

Concentration (µg/mL)	Precision (CV, %)		Accuracy (%)	
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)
20	2.92	3.80	104.80	104.80
40	2.66	2.24	98.80	98.40
60	1.14	1.67	102.70	101.10
90	0.59	0.66	102.10	101.25

Table 4. Accuracy and Precision of D-lactate

Concentration (µg/mL)	Precision (CV, %)		Accuracy (%)	
	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)
20	1.25	92.67	7.22	96.00
40	1.35	98.67	1.55	99.11
60	0.80	94.93	3.71	98.03
90	2.51	104.10	3.48	102.21

Table 5. Differences (%) Result between Initial and after Each Stability Test Conditions

		Short term stability	After preparation	Freeze-thaw
		20 µg/mL	L-lactate	3.60
	D-lactate	4.11	9.26	8.78
90 µg/mL	L-lactate	1.46	1.03	7.97
	D-lactate	6.37	8.64	5.63

다음 10°C의 온도가 유지되는 상태에서 24시간 동안 시료주입기 내부에 방치한 뒤에 다시 재주입하여 분석한 결과 그 변동량은 10% 이내였다. 냉해동 절차를 3회 반복하여 실시한 냉해동안정성시험의 결과 역시 L-, D-lactate 모두 10% 이내의 변동량을 보였다 (Table 5).

고 찰

키랄고정상을 기반으로 한 액체크로마토그래프⁹⁾은 이성질체를 분리하기 위해 최적의 키랄컬럼을 찾기 위하여 많은 노력이 필요하고, 이성질체의 완벽한 분리를 위해 SPE를 사용해야 하므로 상대적으로 분석비용이 높아진다. 키랄컬럼이 갖는 낮은 컬럼수명 또한 대량의 시료를 분석하기에 단점이었다. 기체크로마토그래프-질량분석법(GC-MS)¹⁰⁾과 액체크로마토그래프-질량분석법(LC-MS)¹¹⁾ 등은 낮은 감도, 다량의 검체량 필

요, 복잡한 크로마토그래프 시스템, 35분 이상의 긴 분석시간 등의 단점을 갖고 있었다. 본고에서 밝힌 분석방법의 장점은 L-, D-lactate를 DATAN으로 유도체화 할 경우 고가의 키랄컬럼을 사용하지 않고도 역상컬럼을 사용하여 lactate 이성질체의 분리분석이 가능한 점이다. 이 분석법은 복잡한 컬럼스위칭 기법이나 상대적으로 소모품가격이 고가인 고체상추출법(solid phase extraction)을 사용하여 전처리 할 필요가 없으며, 시료의 크로마토그래프상 running time은 5분 내외로 서 같은 시간 내에 많은 양의 시료를 분석하는 것이 가능하다. 또한 분석을 위해 사용되어지는 시료의 양도 20 µL에 불과하고, 한 번의 전처리로 D-, L-lactate를 동시 정량할 수 있으므로 효율적으로 분석자원을 활용할 수 있다.

주로 신체에서 존재하는 lactate가 L-lactate임에도 불구하고 최근 당뇨와 관련하여 혈장 및 소변에서 D-lactate가 증가한다는 보고와 더불어^{5, 6)} 케양성대장염,

장허혈, 충수염 등에서도 D-lactate의 증가가 관찰되고 있다^{5, 8)}. 이와 관련하여 일반인의 건강검진 차원에서 D-lactate의 측정을 요구하는 수요가 늘고 있으므로 기존의 가스크로마토그래프-질량분석기를 사용하거나 total lactate를 분석하는 방법은 한계가 있다.

본고에서 사용한 DATAN 유도체화를 거친 lactate 이성질체의 액체크로마토그래프-탠덤질량분석 방법은 glucose-6-phosphatase deficiency, fructose-1, 6-diphosphatase deficiency, pyruvate caboxylase deficiency, pyruvate dehydrogenase deficiency, oxidative phosphorylation deficiency, methylmalonic aciduria 등의 대사이상검사 외에도 최근 증가하는 염증성 장질환과 과민성 장증후군 환자를 진단하는데 유용할 것으로 사료된다.

요 약

사람의 신체내에서 주로 존재하는 lactate는 L-lactate로서 몇몇 선천성대사이상과 관련하여 증가된다. 최근 2형 당뇨병(type 2 diabetes)과 만성적인 염증성 위장질환(inflammatory bowel disease)과 관련하여 증가되는 D-lactate를 L-lactate와 분리해야 하는 요구도가 높아졌다. 이에 액체크로마토그래프-탠덤질량분석기를 사용하여 소변 내 D-, L-lactate를 분리하는 방법을 확립하였으며, 분석시간과 정밀성, 정확성, 특이성 등에서 신뢰성 있는 방법임을 확인하였다.

참 고 문 헌

- 1) Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 1990;269:1-11.
- 2) Stallknecht B, Vissing J, Galbo H. Lactate production and clearance in exercise. Effects of training. A mini-review, *Scand J Med Sci Sports* 1998;8: 127-31.
- 3) Hasegawa H, Fukushima T, Lee JA, Tsukamoto K, Moriya K, Ono Y, et al. Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-column fluorescence derivatization, *Anal Bioanal Chem* 2003;377:886-91.
- 4) Kondoh Y, Kawase M, Kawakami Y, Ohmori S. Concentrations of D-lactate and its related metabolic intermediates in liver, blood, and muscle of diabetic and starved rats. *Res Exp Med (Berl)* 1992;192:407-14.
- 5) Murray MJ, Gonze MD, Nowak LR, Cobb CF. Serum D(l)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *Am J Surg* 1994;167:575-8.
- 6) Duzgun AP, Bugdayci G, Sayin B, Ozmen MM, Ozer MV, Coskun F. Serum D-lactate: a useful diagnostic marker for acute appendicitis, *Hepato-Gastroenterology* 2007;54:1483-6.
- 7) Traube M, Bock JL, Boyer JL. D-Lactic acidosis after jejunoileal bypass: identification of organic anions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Ann Intern Med* 1983;98:171-3.
- 8) Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-Lactate in human and ruminant metabolism. *J Nutr* 2005; 135:1619-25.
- 9) Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:73-82.
- 10) Inoue Y, Shinka T, Ohse M, Kohno M, Konuma K, Ikawa H, et al. Changes in urinary level and configuration ratio of d-lactic acid in patients with short bowel syndrome, *J Chromatogr B* 2007;855: 109-14.
- 11) Franco EJ, Hofstetter H, Hofstetter O. Determination of lactic acid enantiomers in human urine by high-performance immunoaffinity LC-MS, *J Pharm Biomed Anal* 2009;49:1088-91.