

GC-MS 크로마토그램의 컴퓨터 자동해석을 이용한 유전성 대사질환의 진단법 개발

윤 레 란*

덕성여자대학교 약학대학, 생·의약분석실, 유전성대사질환연구실

≡ Abstract ≡

Development of a GC-MS Diagnostic Method with Computer-aided Automatic Interpretation for Metabolic Disorders

Hye-Ran Yoon*

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

Purpose: A personal computer-based system was developed for automated metabolic profiling of organic aciduria and aminoacidopathy by gas chromatography-mass spectrometry and data interpretation for the diagnosis of metabolic disorders

Methods: For automatic data profiling and interpretation, we compiled retention time, two target ions and their intensity ratio for 77 organic acids and 13 amino acids metabolites. Metabolites above the cut-off values were flagged as abnormal compounds. The data interpretation was a based on combination of flagged metabolites. Diagnostic or index metabolites were categorized into three groups, "and" , "or" and "NO" compiled for each disorder to improve the specificity of the diagnosis. Groups "and" and "or" comprised essential and optional compounds, respectively, to reach a specific diagnosis. Group "NO" comprised metabolites that must be absent to make a definite diagnosis. We tested this system by analyzing patients with confirmed Propionic aciduria and others.

Results: In all cases, the diagnostic metabolites were identified and correct diagnosis was

founded to be made among the possible disease suggested by the system.

Conclusion: The study showed that the developed method could be the method of choices in rapid, sensitive and simultaneous screening for organic aciduria and amino acidopathy with this simplified automated system.

Key words: simultaneous analysis, organic acids and amino acids, trimethylsilyl - trifluoroacetyl derivative, GC-MS, diagnostic algorithm, mass screening

서 론

가스크로마토그래피-질량분석기(GC-MS)는 특히 유기산혈증을 포함한 유전성 대사이상질환 분야에서의 진단 도구로 유용하게 사용되고 있다¹⁻⁵⁾. 특히 1966년 Tanaka⁶⁾ 등에 의해 이소발레실산노증을 가진 두 형제가 처음으로 GC-MS에 의해 진단되면서 이 기술은 복잡한 생물학적 검체시료 기질 중에서 유기산을 분리하고 확인하는데 사용되어왔으며 급속히 증가하는 수많은 유기산노증을 진단하고 그 대사물을 확인하는데 매우 큰 공헌을 하였다.

특히 질량분석기는 최근 신생아 스크리닝 프로그램에 매우 심도있게 검토되고 이를 차세대 신생아 스크리닝 기술로 여겨 도입되고 있는 실정이다⁷⁻⁹⁾. 기기와 기술의 눈부신 발전에 비해 결과의 해석과 자동화 시스템은 아직 덜 개발되어 더욱 개발 보완되어야 하는 시점에 있다.

현재 대부분의 경우 GC-MS의 크로마토그램을

적합하게 해석하여 최적의 진단을 내리는 과정은 매우 복잡하다. 소변 중 배출되는 기지의 혹은 미지의 수백 여 종의 다양한 유기산 및 다른 대사물 때문이다¹⁰⁻¹³⁾. GC-MS 크로마토그램 데이터를 자동으로 분류하여 해석하는 소프트웨어 프로그램이 몇몇 논문으로 보고되었지만 이 경우도 유기산노증을 진단하는 경우만 보고되었으며¹⁴⁾, 이는 여전히 시간과 노동력이 많이 걸리는 작업일 뿐아니라¹⁵⁻¹⁷⁾ 이에 관한 보고가 별로 없는 실정이다.

본 연구에서는 저자의 연구실에서 이전 연구로부터 개발된 GC-MS를 이용한 유기산과 아미노산의 동시개발법에 기초한 자료를 근간으로 하여¹⁸⁾ 개인용 컴퓨터를 기반으로 GC-MS 크로마토그램 데이터를 자동으로 해석함으로써 한번의 GC-MS 분석으로 유전성 대사이상질환인 유기산노증이나 아미노산혈증모두를 진단할 수 있는 방법을 개발하였다. 이를 위해 각 대사질환진단의 유용한 대사물들에 대한 정상인과 환자를 구

분하는 cut-off 치가 자동으로 체크되는 시스템을 구축하였다.

방 법

1) 시약 및 기구

내부표준물질인 tropic acid는 Sigma-Aldrich 사(MA, USA)에서 구입하였고, 표준물질인 아미노산 표준품(glycine 및 propionylglycine, isobutyrylglycine, isovalerylglycine, tiglylglycine), 유기산 표준품 (3-hydroxy propionic acid, Methylmalonic 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 Sigma사(MA, USA)로부터 구입하였다. HPLC grade인 아세토니트릴, trifluoroacetic acid, sulfosalicylic acid (SSA)를 Merck(Germany)사에서 구입하였다. 직경이 6mm인 혈액여지는 Schleicher and Schunel사(S&S #900; Dassel, Germany)로부터 공급받았다.

2차 증류수는 Millipore-Milli Q™(Tokyo, JAPAN)를 통해 제조하여 사용하였다. 기기는 HP 6890 Gas chromatography와 HP 5973 Mass selective detector를 이용하였다. 컬럼으로는 HP의 Ultra 2 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane, 50m×0.2mm×0.33μ m)를 사용하였고, 농축을 위해 Thermo vap (PIERCE Model 18780)을 사용하였다. 시료 전처리 과정을 위해 TAITEC (Tokyo, JAPAN)사의 incubator/shaker를 사용하였다.

2) Gas chromatography-mass spectrometry

GC-MS 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, 25m×0.2mm, film thickness 0.33μ m)를 사용하였다. 오븐온도는 80℃에서 2분간 유지하고 80℃에서 290℃ 까지 분당 5℃씩 증가시켰으며, 290℃에서 5분간 유지 시켰다. 주입구 온도는 300℃였고, 검출기 280℃온도였다. MSD는 전자 에너지 70 eV에서 electron impact mode로 작동되었다. 운반기체인 헬륨기체의 유속은 0.8 mL/min였고 시료 주입량은 10μl였다. 시료주입 시의 split 비율은 1:10으로 하였다. m/z 50-550까지 full scan mode로 스캔하여 유도체화한 분열양상을 확인하였다.

3) 실험부

윤에 의해 보고된 방법으로 대사물질들은 trimethylsilylation(TMS) 과 trifluoroacetylation(TFA)하여 전처리 한 후 GC-MS 분석하였다¹⁸⁾.

4) Target 유기산과 아미노산 정량을 위한 주요 파라미터 선정

아미노산과 유기산의 표준품을 TMS와 TFA유도체화한 후 이로부터 얻어진 GC-MS 크로마토그램에서 각각의 아미노산과 유기산의 스펙트럼을 얻고 확인 동정하였다. TMS-TFA 유도체화 반응 후 아미노산과 유기산의 분자량 (fomular weight, FW), 유도체화한 분자량 (M+), 머무름 시간(retention time, RT), 상대머무름 시간(relative retention time, RRT), 상대 반응요소

(relative response factor, RRF), selected ion monitoring(SIM)을 위한 정량이온(quantitation ion, QI) 확인이온(confirmation ion, CI)에 대한 주요 정보를 구하였다. 각 아미노산과 유기산의 머무름 시간 등에 대한 정보를 가지고 SIM 프로그램을 완성시키고 각 화합물의 RT, 이온강도 등을 근거로 SIM 이온을 선택하였다. SIM 모드의 정량을 위해 사용된 선택 이온들의 대부분은 TMS 유도체화된 분자이온(molecular ion, M^+)이거나 분자이온에서 CH_3 기가 떨어진 $M-15$ 이온이었다.

5) 혈장 및 소변으로 정도관리 물질의 제작 및 농도범위 설정

정상적으로 판명된 혈장 및 소변 검체를 분류하여 모두 모아 합친 후 pooled plasma와 pooled urine을 만들어서 정도관리 물질로 사용하였다. 이검체로부터 정도관리를 위한 아미노산과 유기산의 농도범위를 설정하여 이 범위내에서 10회 씩 실험하여 평균, 표준편차, 농도범위를 구하였다.

6) 연령별 참고치 (reference range) 결정

정상인의 혈장 및 소변을 연령별(생후 0 - 1개월, 1개월 - 2세, 2 - 18세)로 분류하여 참고치를 구하였다.

7) TMS-TFA를 이용한 GC/MS library 제작

GC/MS의 scanning mode에서의 크로마토그램으로부터 각 아미노산과 유기산의 TMS-TFA 스펙트럼을 얻었고, 이를 확인 동정하여 library로 제작하였다 (가칭 HMP0033.lib). 이 library는 미지의 피크가 발견될 때 피크 동정용으로 사용되었다.

8) 크로마토그램 해석의 자동화 시스템 개발

개인용 컴퓨터의 Excel Macro 프로그램은 "Laboratory Report" 라는 최종 결과지가 프린트되도록 구성하였다. 혈장이나 소변으로부터 유기산과 아미노산의 동시분석을 위하여 GC-MS에서 나온 정량수치에 관련하여 생성된 Text 파일을 Excel VBA를 사용한다. 이렇게 분석되어진 90 여종 성분별 수치를 추출하여 혈장과 소변의 연령별 참고치에 대한 계산을 수행하여 "Laboratory Report" 라는 결과 보고서를 자동으로 생성하는 Excel Macro 프로그램이다.

Scheme 1에서는 GC-MS에서 나온 정량결과를 근거로 연령별 참고치로부터 진단을 위한 해석이 나오기까지의 프로그램이 수행되는 과정을 flow chart로 나타내었다.

9) 대조군과 환자군에 대한 실제 검체의 적용

GC-MS 크로마토그램에서는 77종의 유기산과 13종의 아미노산(6종의 글라이신류 포함)의 피크들이 모두 다른 피크와 구별될수 있도록 양호하게 분리가 되었다.

개발한 방법이 실제 진단에 유용하게 진단에 응용될 수 있는지 유기산 대사이상질환인 Propionic aciduria, Methylmalonic aciduria 환자과 아미노산 대사이상질환인 Maple syrup urine disease, phenylketoneuria, hyperphenylalaniemia (PKU), homocystinuria, cystinuria, lysinuria, nonketotic-hyperglycinemia의 혈장여지 및 소변여지로 올바른 자동해석의 결과지가 생성되는지 검토하였다.

결과 및 고찰

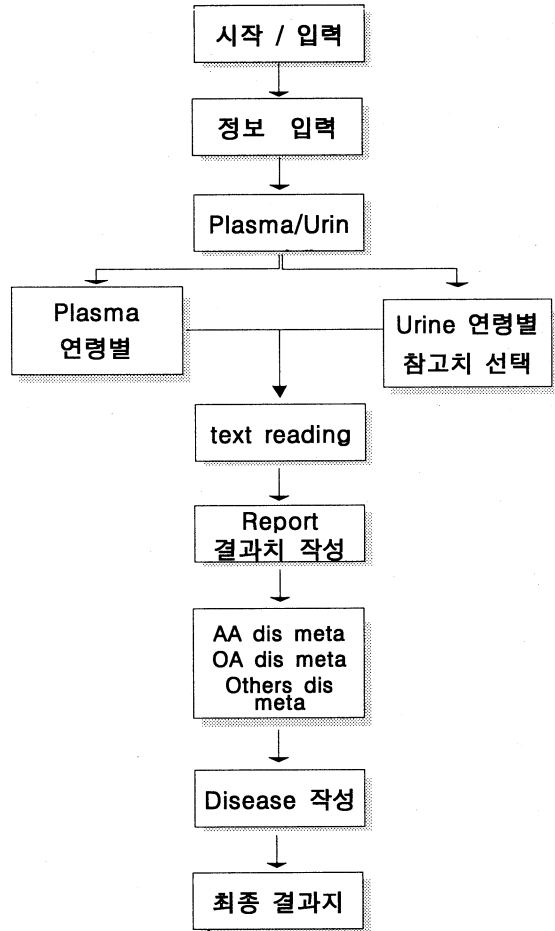
분석대상이 되는 유기산 및 아미노산의 종류를 선정하기 위해 유전성 대사이상 질환을 진단할 수 있는 파라미터나 진단 marker가 될 수 있는 103종의 주요 아미노산 및 유기산을 대상으로 확립되어진 TMS-TFA 유도체화 반응을 하였다. 이 중 아미노산 1 종 (citrulline)과 유기산 12 종은 이 유도체를 적용하기에 적합하지 않아 최종적으로는 90 종이 분석대상이 되었다.

본 유도체화 반응이 효과적이지 못했던 12 종의 유기산은 glyoxylate, pyruvate, 3-hydroxy-isobutyrate, 2-keto-isovalerate, ethylhydracrylate, urea, acetoacetate, 2-keto-3-methylvalerate, 2-keto-isocaproate, succinylacetone, 2-ketoglutarate 와 suberylglycine 이었다.

확정된 분석대상 화합물로 TMS-TFA 유도체화한 90개의 유기산과 아미노산 화합물들의 질량스펙트럼을 얻은 후 이를 HP Chem Station 내에서 library로 만들었다 (HMP0033.1). 크로마토그램으로부터 library matching의 quality를 확인한 결과 90% 이상의 양호한 matching quality rate를 얻을 수 있었다. 유기산인 mevalonolactone (Fig. 1) 과 아미노산인 valine (Fig. 2) propionylglycine, library의 matching quality는 각각 93%, 92%, 94%로 매우 양호함이 확인되었다.

혈장 및 소변 검체는 연령별 (생후 0 - 1개월, 1개월 - 2세, 2 - 18세)로 분류하여 유기산 (Table 1)과 아미노산 (Table 2)의 연령별 참고치를 구하였고 이 결과를 이미 보고된 문헌과 비교하였다 (본 논문에서는 생후 0 - 1개월의

Scheme 1. Flow chart of diagnostic process from quantification result the interpretive diagnosis results.



참고치만 보고함). phosphate와 같이 진단에 크게 관련이 없는 대사물 및 그 밖의 아미노산 (arginine, branched chain amino acid)을 제외하고는 이미 보고된 문헌과 유사한 참고수치를 보였으며, 대부분의 경우 본 연구의 참고수치는 보고된 문헌에 비해 약간 높은 수치를 보였다. 이것은 검체수집 즉시 fresh specimen을 검사하는 것이 아니고 검체가 검사일로 도착하는

데 1일이 소요되므로 그 사이에 검체의 변화로 보이거나, 이러한 근소한 변화가 본 소프트웨어 프로그램을 이용하여 유전성 대사이상질환을 정확히 진단하는데 영향을 주지는 않았다.

Fig. 1. TMS-TFA mass spectrum library (HMP0033.L) matching of organic acid, mevalonolactone.

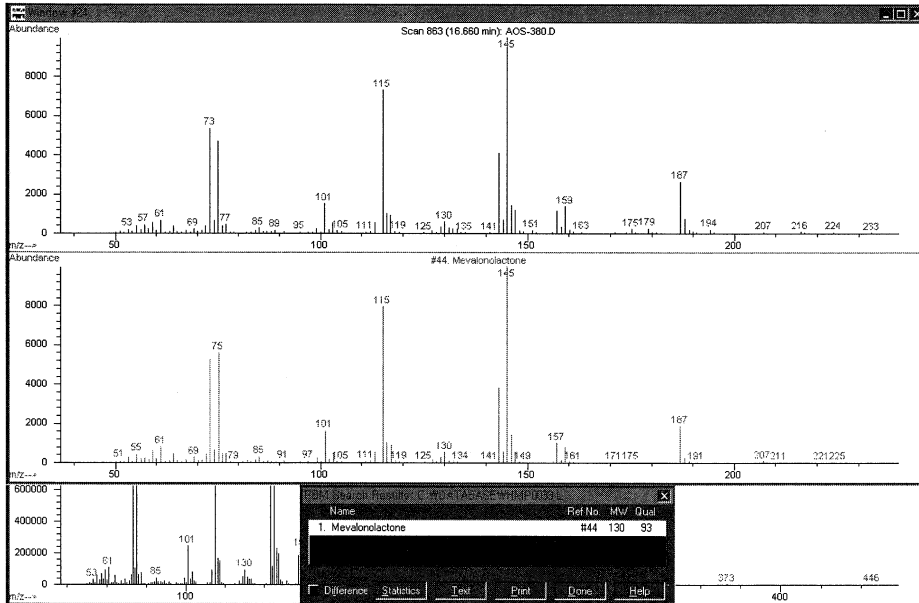


Fig. 2. TMS-TFA mass spectrum library (HMP0033.L) matching of amino acid, valine.

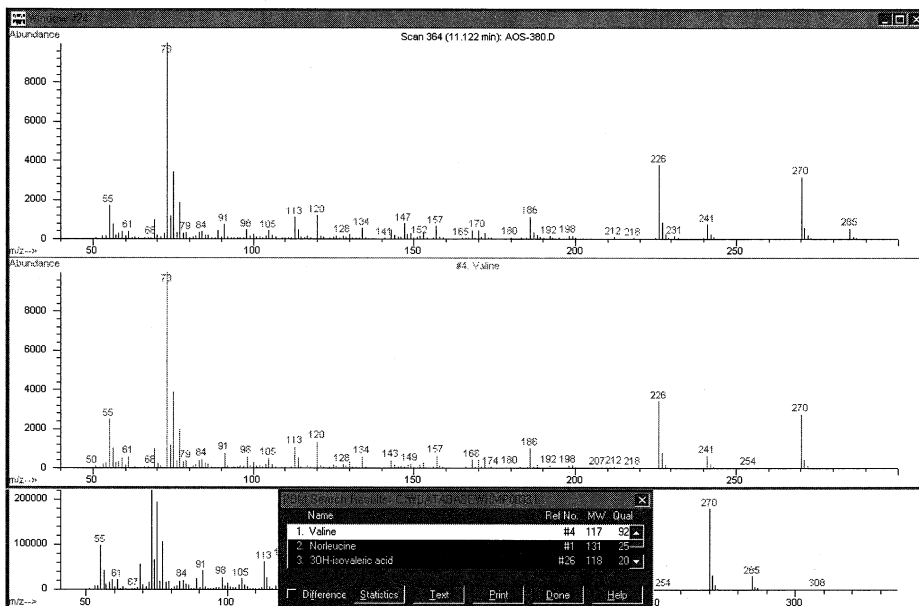
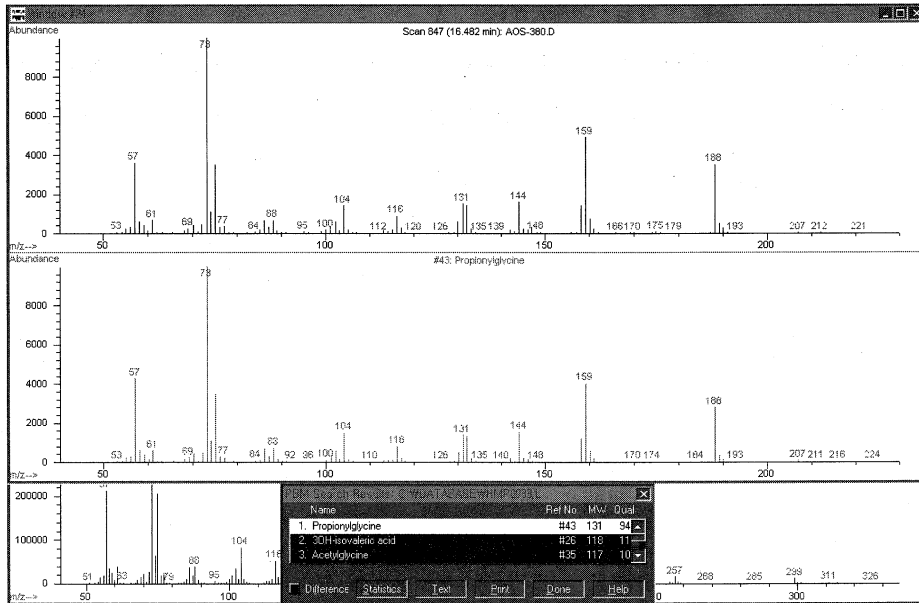


Fig. 3. TMS-TFA mass spectrum library (HMP0033.L) matching of propionylglycine.



개인용 PC를 이용한 결과 자동화 시스템 개발을 위하여 Excel macro를 이용한 결과 자동해석 시스템을 위한 조건문을 만들기 위해 주요 대사물들을 And, Or 혹은 No로 그룹을 나누어 분류하였다. 각 유기산 및 아미노산을 대사이상질환의 진단과 관련된 조건문을 만들기 위한 소스를 만들었다. 이 자료를 토대로 프로그램 소스 (Scheme 1)를 구성한 뒤 최종적인 결과 자동해석 시스템 프로그램을 제작하였다 (Table 3).

확진된 유전성 대사이상질환 검체로의 적용하기 위해 개발된 GC-MS 크로마토그램의 quality의 점검, 유기산 프로파일, 아미노산 프로파일, 정상인의 연령별 정량 수치에 대해 재점검하기 위해 실제 대사이상질환 환자를 진단하여 보았다.

Table 3은 새로 제작한 Excel macro 프로그램을 통하여 대사이상질환자 검체로부터 GC-MS

를 통해 얻은 연령별 정량 수치를 적용시킨 결과 프로피온산노증 환자를 진단하기 위해 생성된 최종 결과 보고서이다. 가장 가능성이 높은 진단명부터 목록에 1, 2, 3 과같이 번호순으로 나오도록 프로그램을 만들었다. 적용한 환자의 여지에서는 이미 확진된 프로피온산노증이 1번 목록으로 뜨므로 이 환자를 정확히 진단할 수 있음을 확인하였다.

Table 1. Reference value for urine organic acids in infants within 1 month of age (N=10)

Organic acid	Our Lab	Hoffmann, G.(1993) ^c
	Mean ^a ± SD ^a	Normal range ^{a,b}
1-Lactic acid	9565.5 ± 3706	700 - 3300
2-2OH isobutyric acid	3.7 ± 10	6 - 9
3-4-Oxobutyric acid	1.0 ± 3	0 - 105
4-Glycolic acid	50.1 ± 14	0 - 42
5-2OH butyric acid	109.5 ± 43	8 - 80
6-Oxalic acid	1083.3 ± 467	N.D. ^d
7-3OH propionic acid	39.1 ± 8	0 - 4
8-Valproic acid	10.9 ± 13	N.D. ^d
9-3OH butyric acid	188.6 ± 216	22 - 700
10-3OH isovaleric acid	33.1 ± 19	0 - 19
11-Malonic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
12-3OH isovaleric acid	14.3 ± 4	N.D. ^d
13-Methylmalonic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
14-4OH butyric acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
15-2OH isocaproic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
16-Benzoic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
17-Oxomalic acid	48.2 ± 54	5 - 19
18-Glycerol	195.1 ± 100	N.D. ^d
19-Ethylmalonic acid	23.3 ± 18	N.D. ^d
20-Phosphoric acid	9153.9 ± 3886	N.D. ^d
21-Acetylglucine	0.0 ± 0	N.D. ^d
22-Phenylacetic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
23-Maleic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
24-Succinic acid	23.6 ± 8	0 - 32
25-Methylsuccinic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
26-Glyceric acid	49.7 ± 14	0 - 25
27-Uracil	0.6 ± 1	N.D. ^d
28-Fumaric acid	12.1 ± 5	0 - 4
29-Propionylglycine	0.0 ± 0	N.D. ^d
30-Mevalonolactone	0.0 ± 0	N.D. ^d
31-Isobutyrylglycine	0.0 ± 0	N.D. ^d
32-Mesoaconitic(Methylfumaric) acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
33-Glutaric acid	1.1 ± 0	0 - 1.8
34-3Methylglutaric acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
35-Glutacetic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
36-Decanoic acid	5.3 ± 4	5 - 17
37-Isovalerylglucine	0.0 ± 0	N.D. ^d
38-Malic acid	45.6 ± 16	0 - 21
39-Adipic acid	2.1 ± 1	N.D. ^d
40-5-Oxopropylmethylpyroglutamic acid	149.4 ± 96	13 - 161

^aUnit : μmol/L. ^bChildren aged 0.2-16 years. ^cHoffmann, G. et al.(1993) physiology and pathophysiology of organ acids in cerebrospinal fluid. ^dN.D.; not determined.

Table 1. Continued.

Organic acid	Our Lab	Hoffmann, G.(1993) ^c
	Mean ^a ± SD ^a	Normal range ^{a,b}
41-Thiodiglycolic acid	3.3 ± 7	N.D. ^d
42-3Methyladipic acid	2.5 ± 2	N.D. ^d
43-Tiglylglycine	0.0 ± 0	N.D. ^d
44-2OH glutaric acid	51.0 ± 48	0 - 1.5
45-3OH glutaric acid	18.1 ± 17	N.D. ^d
46-Phenylacetic acid	0.2 ± 0	N.D. ^d
47-Pimelic acid	2.9 ± 4	N.D. ^d
48-3OH 3methylglutaric acid	56.4 ± 42	N.D. ^d
49-3OH phenylacetic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
50-4OH benzoic acid	12.2 ± 12	N.D. ^d
51-Hexanoylglycine	0.0 ± 0	N.D. ^d
52-4OH phenylacetatoic acid	57.3 ± 49	N.D. ^d
53-N-Acetylaspargic acid	29.4 ± 17	N.D. ^d
54-Suberic acid	4.8 ± 5	0 - 10
55-2Keto adipic acid	10.2 ± 9	N.D. ^d
56-Crotic acid	3.7 ± 6	N.D. ^d
57-Aconitic acid	33.5 ± 14	0 - 0
58-Vanillic acid	2.2 ± 2	N.D. ^d
59-Homovanillic acid	14.8 ± 10	N.D. ^d
60-Azeleic acid	5.7 ± 8	0 - 58
61-Citric acid	196.0 ± 222	30 - 406
62-Isocitric acid	107.6 ± 62	0 - 10
63-Homogentisic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
64-Hippuric acid	342.6 ± 366	0 - 5
65-Methylcitric acid1	52.8 ± 39	N.D. ^d
65-Methylcitric acid2	8.6 ± 5	N.D. ^d
66-3OH suberic acid	230.0 ± 394	N.D. ^d
67-Sebacic acid	6.8 ± 16	N.D. ^d
68-Vanilmandelic acid	7.3 ± 6	N.D. ^d
69-4OH phenylacetic acid	12.7 ± 16	N.D. ^d
70-Indole 3 acetic acid	10.4 ± 16	N.D. ^d
71-3Phenylpropionylglycine	0.0 ± 0	N.D. ^d
72-Palmitic acid	9.1 ± 5	75 - 780
73-4OH phenylpyruvic acid	62.7 ± 117	N.D. ^d
74-2OH hippuric acid	0.3 ± 0	N.D. ^d
75-Dodecanedioic acid	0.0 ± 0	N.D. ^d
76-Uric acid	5.9 ± 4	N.D. ^d
77-N-Acetyltyrosine	0.0 ± 0	N.D. ^d

^aUnit : μmol/L. ^bChildren aged 0.2-16 years. ^cHoffmann, G. et al.(1993) physiology and pathophysiology of organ acids in cerebrospinal fluid. ^dN.D.; not determined.

Table 2. Reference value for plasma amino acids in infants within 1 month of age (N=10).

Amino acid	Our Lab	Dickinson et al. (1965) ^b
	Mean ^a ± SD ^a	Mean ^a ± SD ^a
A1-Glycine	393.8 ± 213	343 ± 69
A2-Valine	273.5 ± 95	136 ± 39
A3-Leucine	262.7 ± 85	72 ± 17
A4-Isoleucine	144.8 ± 59	39 ± 8
A5-Homocysteine	0.0 ± 0	N.D. ^c
A6-Methionine	78.2 ± 35	29 ± 8
A7-Phenylalanine	179.5 ± 41	78 ± 14
A8-Ornithine	188.0 ± 82	91 ± 25
A9-Lysine	188.7 ± 83	200 ± 46
A10-Arginine	1256.1 ± 669	54 ± 17
A11-Tyrosine	177.1 ± 53	69 ± 16
A12-Cystine	97.5 ± 157	N.D. ^c
A13-Homocystine	0.0 ± 0	N.D. ^c

^aUnit : nmol/L. ^bRecalculated from Dickinson et al., 1965:25 infants (more than 2500grams) studied before feeding. ^cN.D.; not determined.

Table 3. Result report of the patient with Propionic aciduria

Simultaneous Analysis of Organic and Amino acids (Urine)								
환자명				생년월일				병원명
접수일자				보고일자				I.D.
종 목	결과	L/H	참고치	종 목	결과	L/H	참고치	
A1-Glycine	4434.00	↑	21.44 - 2634.23	38-Malic acid	436.90	H	0.80 - 45.12	
A2-Valine	8.70		0.85 - 17.49	39-Adipic acid	29.30	H	0.83 - 4.95	
A3-Leucine	N.D.		0.00 - 9.87	40-Pyroglutamic acid	40.30		0.00 - 112.33	
A4-Isoleucine	5.00	↑	0.51 - 4.89	41-Thiodiglycolic acid	N.D.		0.00 - 187.06	
A5-Homocysteine	N.D.		0.00 - 133.48	42-3 Methyladipic acid	5.70	↑	0.53 - 3.69	
A6-Methionine	0.80		0.00 - 9.33	43-Tiglylglycine	16.00	H	0.00 - 0.00	
A7-Phenylalanine	90.40		19.54 - 110.32	44-2OH glutaric acid	134.70	H	3.65 - 35.34	
A8-Ornithine	3.00		0.00 - 9.81	45-3OH glutaric acid	39.30	H	2.80 - 14.84	
A9-Lysine	27.10		0.00 - 87.64	46-3 Phenyllactic acid	N.D.		0.00 - 0.71	
A10-Arginine	N.D.		0.00 - 3194.54	47-Pimelic acid	4.90	↑	0.00 - 4.53	
A11-tyrosine	42.00		34.13 - 96.71	48-3OH 3methylglutaric aci	37.30	H	3.98 - 15.24	
A12-Cystine	71.30	H	0.00 - 0.00	49-3OH phenylacetic acid	N.D.		0.00 - 6.74	
A13-Homocystine	N.D.		0.00 - 0.00	50-4OH benzoic acid	N.D.		0.00 - 11.27	
1-Lactic acid	215.80		12.09 - 1268.14	51-Hexanoylglycine	N.D.		0.00 - 0.00	
2-2OH-isobutyric acid	8.60		4.01 - 48.24	52-4OH phenylacetic acid	63.40		13.12 - 127.20	
3-Caproic acid	N.D.		0.00 - 32.64	53-N-Acetylaspartic acid	41.00	↑	4.33 - 21.34	
4-Glycolic acid	168.40		43.69 - 353.64	54-Suberic acid	3.40		0.52 - 33.88	
5-2OH butyric acid	8.90	H	0.00 - 4.09	55-2Ketoadipic acid	10.40	H	0.00 - 4.61	
6-Oxalic acid	1467.5		269.17 - 1760.67	56-Orotic acid	N.D.		0.00 - 0.00	
7-3OH propionic acid	2313.3	H	10.27 - 120.04	57-Aconitic acid	42.10		23.49 - 98.20	
8-Valproic acid	1.20		0.00 - 1.74	58-Vanillic acid	13.00	↑	1.43 - 8.05	
9-3OH butyric acid	15.70		1.99 - 60.42	59-Homovanillic acid	10.70		2.06 - 11.83	
10-2OH isovaleric acid	0.80		0.00 - 5.87	60-Azelic acid	4.20		0.70 - 8.87	
11-Malonic acid	342.00	H	0.00 - 0.00	61-Citric acid	821.00		15.92 - 949.00	
12-3OH isovaleric acid	54.20	↑	7.55 - 40.56	62-Isocitric acid	129.90		5.91 - 292.01	
13-Methylmalonic acid	N.D.		0.00 - 0.00	63-Homogentisic acid	N.D.		0.00 - 3.41	
14-4OH butyric acid	N.D.		0.00 - 1141.89	64-Hippuric acid	259.20		0.00 - 325.54	
15-2OH isocaproic acid	N.D.		0.00 - 1.36	65-Methylcitric acid	1722.3	H	1.51 - 125.56	
16-Benzoic acid	6.80		0.00 - 70.19	66-3OH suberic acid	112.20	↑	0.00 - 71.03	
17-Octanoic acid	N.D.		0.00 - 7.73	67-Sebacic acid	N.D.		0.00 - 0.34	
18-Glycerol	45.70		11.63 - 83.75	68-Vanilmandelic acid	9.10		1.95 - 9.29	
19-Ethylmalonic acid	68.50		0.00 - 287.18	69-4OH phenyllactic acid	3.30		0.91 - 11.84	
20-Phosphoric acid	17228	↑	0.00 - 10187.2	70-Indole 3 acetic acid	28.00		0.00 - 248.69	
21-Acetylglucine	N.D.		0.00 - 0.00	71-3 Phenylpropionylglycin	3.90	H	0.00 - 0.00	
22-Phenylacetic acid	N.D.		0.00 - 33.48	72-Palmitic acid	3.90		1.23 - 11.85	
23-Maleic acid	N.D.		0.00 - 9.19	73-4OH phenylpyruvic acid	12.30		0.00 - 128.29	
24-Succinic acid	153.80		4.92 - 193.81	74-2OH hippuric acid	0.20		0.00 - 0.97	
25-Methylsuccinic acid	6.20	↑	1.20 - 3.66	75-Dodecanedioic acid	N.D.		0.00 - 0.00	
26-Glyceric acid	20.80		2.92 - 21.28	76-Uric acid	N.D.		0.00 - 9.37	
27-Uracil	18.40		2.84 - 26.58	77-N-Acetyltyrosine	N.D.		0.00 - 5.22	
28-Fumaric acid	199.40	H	1.18 - 23.89	*unit : mmol/mol Cr	Creatinine(mg/dl)		20.0	
29-Propionylglycine	836.60	H	0.00 - 0.00	Disease				
30-Mevalonolactone	N.D.		0.00 - 0.00	1. Propionic aciduria				
31-Isobutyrylglycine	9.70	H	0.00 - 0.00	2. Cystinuria				
32-Mesaconic acid	N.D.	L	0.31 - 4.46	3. 3-OH-3-methylglutaric				
33-Glutaric acid	106.50	H	0.88 - 3.75	4. Glutaric aciduria type 1				
34-3 Methylglutaric acid	1.80	↑	0.54 - 1.67	5. Glutaric aciduria type 2				
35-Glutaconic acid	N.D.		0.00 - 130.28					
36-Decanoic acid	0.80	↑	0.00 - 0.54					
37-Isovalerylglucine	17.50	H	0.00 - 0.00					

결 론

운반이나 보관이 용이한 소변이나 혈장 여지로 부터 유기산과 아미노산을 동시에 추출하여 TMS-TFA유도체화한 후 GC-MS로 분석하였다. 여기서 나온 크로마토그램의 대사물의 유무 및 과소량에 관한 정보를 유전성대사이상 질환과 짝지어 데이터 베이스를 만들어 개인용 컴퓨터를 이용하여 Excel macro 프로그램을 만들어 자동해석하는 시스템을 개발하였다. 이를 이용하여 프로피온산노증 환자의 검체에 적용해본 결과 정확한 진단이 가능하였으므로 앞으로 이 진단법은 편리하고 유용하게 사용될 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서는 임상적 스크리닝 및 진단을 목적으로 GC-MS를 사용하여 기존의 방법보다 신속, 간편하게 유기산과 아미노산을 정량분석하는 방법을 개발하였다. 이 시스템을 실제 유전성대사질환 환자 (프로피온산노증, 메틸말론산노증, PKU 등 다수 질환)의 검체를 적용해 봄으로써 이 방법의 유용함을 제시하였다. 이 방법은 유전성대사질환인 mass screening, 유기산과 아미노산 대사이상질환 환자의 진단, 그리고 환자의 follow-up 모니터링에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 일부 보건복지부의 재원인 보건 의료 기술 연구개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (과제번호 HMP-00-B-21000-0033). 또한 일부 서울 의과학연구소의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- 1) Antoshechkin AG, Seriogina IA, Maximova LA, Tatur VYu. Identification of 4-methoxybenzoyl-N-glycine in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1991 ;20(9):575-6.
- 2) Bonham JR, Downing M, Pollitt RJ, Manning NJ, Carpenter KH, Olpin SE, Allen JC, Worthy E. Quality assessment of urinary organic acid analysis. *Ann Clin Biochem*. 1994 ; 31:129-33.
- 3) Brown GK, Stokke O, Jellum E. Chromatographic profile of high boiling point organic acids in human urine. *J Chromatogr*. 1978 ;145(2): 177-84.
- 4) Chalmers RA, Bickle S, Watts RW. A method for the determination of volatile organic acids in aqueous solutions and urine, and the results obtained in propionic acidaemia, beta-methylcrotonylglycinuria and methylmalonic aciduria. *Clin Chim Acta*. 1974 ;52(1):31-41.
- 5) Chalmers RA, Lawson AM, Watts RW, Tavill AS, Kamerling JP, Hey E, Ogilvie D. D-2-hydroxyglutaric aciduria: case report and biochemical studies. *J Inherit Metab Dis*. 1980;3(1):11-5.

- 6) Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. Proc Natl Acad Sci USA. 1966; 56(1):236-42.
- 7) Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. J Inherit Metab Dis. 1990;13(3):321-4.
- 8) Tuchman M, McCann MT, Johnson PE, Lemieux B. Screening newborns for multiple organic acidurias in dried filter paper urine samples: method development. Pediatr Res. 1991 Oct;30(4):315-21.
- 9) Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. Pediatr Res. 1995 Sep;38(3):324-31.
- 10) Clayton PT. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. J Inherit Metab Dis. 2001 ;24(2):139-50. Review.
- 11) Iles RA, Chalmers RA, Hind AJ. Methylmalonic aciduria and propionic acidemia studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Clin Chim Acta. 1986 ;161(2):173-89.
- 12) Ishiguro Y, Kajita M, Aoshima T, Watanabe K, Kimura M, Yamaguchi S. The first case of 4-hydroxybutyric aciduria in Japan. Brain Dev. 2001 ;23(2):128-30.
- 13) Lehnert W, Niederhoff H. Seven years of experience with selective screening for organic acidurias. Eur J Pediatr. 1984 ;142(3):208-10.
- 14) Yamaguchi S, Kimura M, Iga M, Fu XW, Ohie T, Yamamoto T. Automated, simplified GC/MS data processing system for organic acidemia screening and its application. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999;30 Suppl 2:174-80.
- 15) Yamaguchi S, Orii T, Yasuda K, Kohno Y. A case of glutaric aciduria type I with unique abnormalities in the cerebral CT findings. Tohoku J Exp Med. 1987 ;151(3):293-9.
- 16) Yamaguchi S. [Organic acidemia: outline] Ryoikibetsu Shokogun Shirizu. 1998;(18 Pt 1):261-6. Review. Japanese.
- 17) Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Ohse M, Zhen-wei X, Yoshida I, Inokuchi T, Yamaguchi S, Takayanagi M, Matsumoto I. Pilot study of gas chromatographic-mass spectrometric screening of newborn urine for inborn errors of metabolism after

- treatment with urease, J Chromatogr
B Biomed Sci Appl,
1999;731(1):141-7.
- 18) Yoon HR, Simultaneous GC-MS
analyses of organic acids and amino
acids in urine using TMS-TFA
derivative, Anal Sci Tech,
2006;19(1):107-14.