

Application News

No. 06-SAIP-GC-034-ENK

Gas Chromatograph Mass Spectrometer GCMS-QP 2020 NX

GC-MS를 이용한 마른 소변의 영양 및 대사 프로파일링을 위한 유기산 스크리닝

Screening of organic acids for nutritional and metabolic profiling from dried urine spots using Gas Chromatograph Mass Spectrometer

사용자 활용 포인트

- ◆ 영양 및 대사 프로파일링을 위한 유기산의 신속한 스크리닝 분석
- ◆ 소변 매트릭스로부터 쉽고 빠르고 신뢰할 수 있는 시료 전처리
- ◆ 빠른 유기산 식별을 위한 Smart Metabolites Database™ Ver.2 와 Automatic Adjustment of Retention Time (AART)기능 사용

■ 서론

인간은 다양한 박테리아와 공생하며 산다. 일부 박테리아는 병원균의 콜로니화로부터 숙주를 보호하고, 장의 발달을 조절하거나 숙주를 위한 비타민과 호르몬을 생산하는 것과 같은 건강상의 이점에 기여할 수 있는 반면, 일부 박테리아는 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 미생물의 대사 과정에서 생산될 수 있는 중요한 대사산물 중 하나는 유기산이다. 유기산은 약산성을 특징으로 하는 화합물로 대부분의 유기체가 저분자량의 유기산을 생산한다는 것은 잘 알려져 있다. 여러 유기산은 식이성 폴리페놀, 흡수되지 않은 아미노산 또는 탄수화물에 대한 박테리아 대사 작용의 특정 산물인 것으로 알려져 있다. 또한 유기산은 주요 미생물 대사 경로의 중간체로 필요하다^[1].

인체 건강에서 유기산의 역할

유기산은 크렙스 회로(Kreb`s cycle, TCA cycle)의 중간 생성물이며 조직 파괴를 방지하는 에너지원 역할을 한다. 유기산의 주요 활동은 비활성 펩티노겐을 활성 펩신으로 전환시키는 위 pH의 저하와 관련이 있다. 유기산이 미네랄과 복합체를 형성하고 생체 이용률을 돕기 때문에 보충 미네랄과 질소의 배출은 최소화 된다. 또한 유기산은 항미생물 활성을 가지며 살균 및 정균성을 가지고 있다^[2]. 이로 인해 병원성 박테리아 증식을 억제하고 장내 미생물 균형을 개선하여 전체 위장 소화율을 향상시킬 수 있다.

영양 지표로서 소변 중 유기산의 임상적 관련성

유기산 분석을 통해 우리의 전반적인 건강을 이해하는데 매우 중요한 영양 수준, 호르몬 기능, 심지어 미생물의 상태까지 신체가 어떻게 기능하고 있는지에 대한 지표를 얻을 수 있다. 비정상적으로 높은 수준의 유기산을 선별하는 것은 영양소 흡수를 저해하는 장질환과 같은 영양소 결핍을 유발하는 것으로 알려진 특정 의학적 문제를 가진 사람에게 유용하다. 유기산 분석은 기존 의학이 종종 간과하는 기회감염균 유기체의 인간 생화학 및 소화 시스템 불균형에 대해 더 깊이 이해하는 중요한 수단이다.

본 뉴스레터에서는 Shimadzu 가스 크로마토그래프 질량 분석기를 사용하여 영양 및 대사 프로파일링을 위한 잠재적 마커로서 마른 소변에서 유기산을 신속하게 스크리닝하기 위한 POC(Proof of Concept)를 제공한다(그림 1).



그림 1. Shimadzu GCMS-QP2020 NX

■ 실험 샘플 준비

소변 샘플 또는 소변 여과지 샘플은 Creatinine 측정에 기초하여 전처리에 필요한 시료량을 결정한 후 내부 표준물질, 전처리 시약 그리고 Trimethylsilyl 유도체화를 추가하여 준비하였다. 기기 분석 조건과 샘플 전처리 순서는 표 1과 그림 2에 나타났다.

표 1. GC-MS 분석 조건

System configuration	
Instrument	Shimadzu GCMS-QP2020 NX
Auto injector	AOC™-20i+s
Column	SH-I-5 Sil MS (30 m,0.25 mm,0.25 um)
Liner	Restek Topaz™ Liner (With wool)
GC	
Injector Temp.	250 °C
Column Oven Temp	60 °C (2 min), 15 °C/min to 310 °C (5 min)
Run Time	23.67 min
Injection mode	Split
Injection Volume	1.0 µL
Linear velocity	38.9 cm/sec (Constant mode)
MS	
Interface Temp.	280 °C
Ion source Temp.	200 °C
Ionization mode	EI
Loop Time	0.3 sec

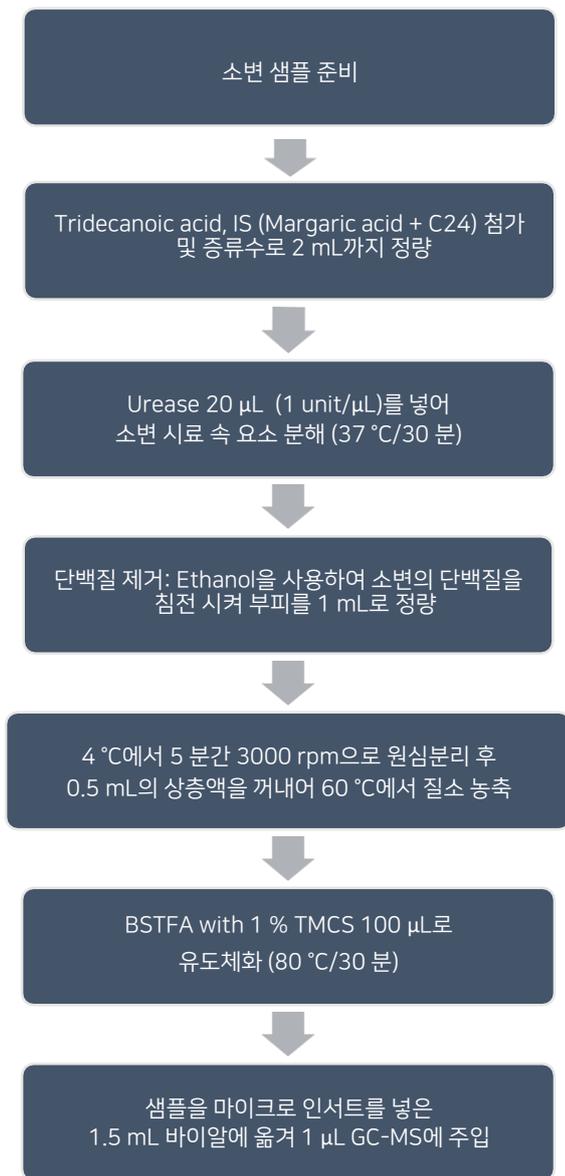


그림 2. 샘플 전처리 순서

■ 결과

정성분석:

소변 또는 생물학적 매트릭스에서 비정상적으로 높거나 낮은 수준의 유기산을 확인하기 위한 기본 단계는 물질을 식별하고 피크 감도를 내부 표준 물질 피크 감도와 비교하는 것이다. 위의 목적을 위해 두가지 방법을 사용할 수 있다.

1. 첫번째 방법은 Library를 통한 최대 10개의 유기산 스크리닝 분석이다. 가장 간단한 분석 방법이지만, 샘플 매트릭스 반응성이 낮기 때문에 스캔 분석 방법 중 유기산을 정확하게 식별하는 가장 신뢰 할 수 있는 방법은 아니다.
2. 두번째 방법은 약 700개의 대사체가 포함된 스마트 대사체 데이터베이스를 활용하는 것이다. GCMS 솔루션의 AART 기능을 사용하면 분석 조건에 관계 없이 유기산을 식별할 수 있다. AART 기능은 관심 분석 물질의 머무름 시간을 예측하기 위해 Custom retention index standard(n-Alkane)를 사용한다.

AART는 유기산의 정성적 스크리닝 시간을 상당히 줄이는데 도움이 되었다. 질량 스펙트럼을 Library에 있는 것과 일치시키면 정확한 식별 가능성이 높아진다.

소변 샘플 내 65개 유기산의 총 크로마토그램과 유기산 중 하나의 대표적인 Library 검색 결과를 각각 그림 3과 그림 4에 나타냈다.

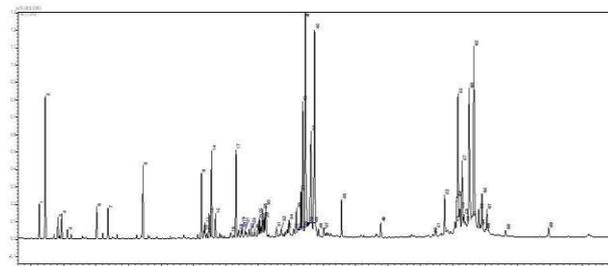


그림 3. 소변 시료 내 유기산 크로마토그램

Similarity Search Results

Report View Compound Info Process Help

#	Similarity	Register	Ret. Index	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library Name
1	92	<input checked="" type="checkbox"/>	1260	Phosphoric acid-TMS ; phosphoric acid	314	C9H27O4P3	OA_TMS_BPX5_23min_V3.lib
2	45	<input type="checkbox"/>	1256	Glycerol-3TMS ; propane-1,2,3-triol	308	C12H32O3S3	OA_TMS_BPX5_23min_V3.lib
3	40	<input type="checkbox"/>	1269	Ethylmalonic acid-2TMS ; 2-ethylpropanedioic acid	276	C11H24O4S2	OA_TMS_BPX5_23min_V3.lib
4	34	<input type="checkbox"/>	1260	Octanoic acid-TMS ; octanoic acid	216	C11H24O2S	OA_TMS_BPX5_23min_V3.lib
5	32	<input type="checkbox"/>	1271	2-Ketooisocaproic acid-oxime-2TMS ; 4-methyl-2	289	C12H27NO3S2	OA_TMS_BPX5_23min_V3.lib
6	26	<input type="checkbox"/>	1255	Benzoic acid-TMS ; benzoic acid	194	C10H14O2S	OA_TMS_BPX5_23min_V3.lib

그림 4. Phosphoric acid-TMS 유도체의 Library 검색 결과 (그림 3의 피크 8번)

Library 검색 결과와 스펙트럼 일치도를 통해 분석 물질의 Reference ion 감도 비 또한 정해진 기준으로 평가할 수 있었다. 이러한 결과는 Linear Retention Index(LRI)와 AART 기능을 사용한 후 분석물질 식별에 더욱 도움이 되었다. 그림 5(a), 5(b), 5(c), 5(d)는 소변 샘플 매트릭스에서 분석된 여러 유기산의 대표적인 Target, Reference 크로마토그램이다. 분석된 총 65 개의 유기산(표 2)은 복잡하고 만성적인 건강 문제에서 파생된 장과 관련된 추가 정보를 찾는 동시에 신진대사의 정보를 제공한다.

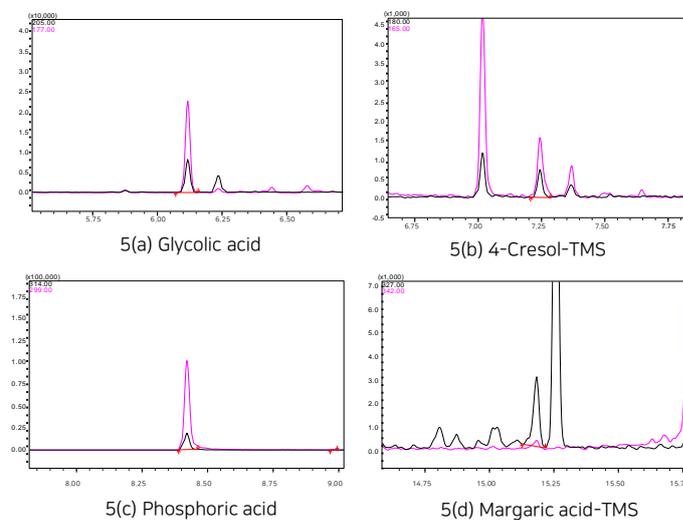


그림 5. 소변 속 유기산 크로마토그램

표 2. 해당 방법으로 분석한 유기산 목록

ID #	Compound Name	ID #	Compound Name	ID #	Compound Name	ID #	Compound Name
1	Lactic acid	17	Phosphoric acid	33	Creatinine	49	Homovanillic acid
2	Glycolic acid	18	Ethylmalonic acid	34	2-Hydroxyphenylacetic acid	50	Citric acid
3	Pyruvic acid	19	Succinic acid	35	3-Hydroxyglutaric acid	51	Hippuric acid
4	2-Keto-isovaleric acid	20	Methylsuccinic acid	36	3-Phenyllactic acid	52	Dopamine
5	2-Hydroxybutyric acid	21	Uracil	37	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid	53	Homogentisic acid
6	Oxalic acid	22	Fumaric acid	38	Phenylpyruvic acid	54	Methylcitric acid
7	4-Cresol	23	Thymine	39	2-Ketoglutaric acid	55	3-(3-Hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid
8	2-Hydroxyisovaleric acid	24	Glutaric acid	40	Tartaric acid	56	Vanilmandelic acid
9	3-Hydroxybutyric acid	25	3-Methylglutaconic acid	41	4-Hydroxybenzoic acid	57	4-Hydroxyphenyllactic acid
10	3-Methyl-2-oxovaleric acid	26	3-Methylglutaric acid	42	N-Acetylaspartic acid	58	Pyridoxine
11	Malonic acid	27	Mandelic acid	43	Arabinose	59	Sebacic acid
12	Acetoacetic acid	28	Citramalic acid	44	Suberic acid	60	Ascorbic acid
13	Methylmalonic acid	29	Malic acid	45	Quinolinic acid	61	2-Hydroxyhippuric acid
14	2-Ketoisocaproic acid	30	Adipic acid	46	Aconitic acid	62	Pantothenic acid
15	2-Hydroxyisocaproic acid	31	2-Phenyllactic acid	47	Orotic acid	63	Kynurenic acid
16	4-Hydroxybutyric acid	32	5-Hydroxymethyl-2-furoic acid	48	Tricarballic acid	64	Margaric acid
						65	3-Indoleacetic acid

특정 유기산의 높은 수치는 전신홍반루프스(Systemic Lupus Erythematosus (SLE))와 같은 자가면역 질환과 강한 상관관계가 있음을 발견했으며, 인산 수치를 통해 SLE 환자와 대조군 샘플을 구별하는 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다^[3]. 이러한 연구는 다양한 만성 질환을 유발할 수 있는 중요한 바이오 마커로서 소변 또는 배설물에서 상승된 유기산 수치의 중요성을 보여준다. 본 뉴스레터와 같은 특정 관심 마커의 신속하고 정확한 스크리닝은 우울증, 불안, 심혈관 질환, 당뇨병, 암, 식욕 부진 등과 같은 유기산 수치와 관련된 여러 장애를 조기에 발견하는데 도움이 될 수 있다.

정량분석:

스크리닝된 수백 가지의 유기산 중에서 시료에 존재할 수 있는 각각의 유기산 표준물질 혹은 상업적으로 이용가능한 유기산들은 시장에서 구입할 수 있다. Tridecanoic acid trimethylester와 Margaric acid를 내부 표준물질로 사용하여 장애에 대해 보다 정확한 진단 결과를 얻을 수 있다. 검정곡선의 범위는 분석하고자 하는 물질에 따라 범위를 정할 수 있으며, 아래 그림 6은 세균 불균형 마커로서 임상적 관련성이 있는 Glutaric acid에 대한 검정곡선이다.

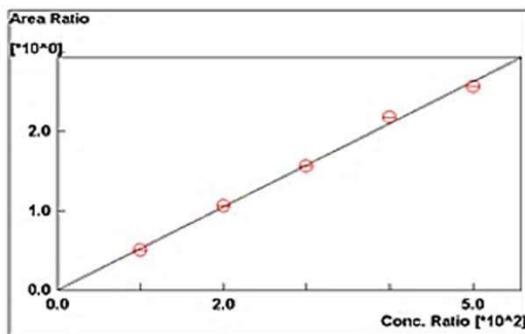


그림 6. Glutaric acid 검정곡선

■ 결론

20000 u/sec 초고속 스캔 속도를 갖고 있는 QP2020 NX system과 AART 및 Linear Retention Indices 기능을 결합하여 마른 소변과 같이 어려운 매트릭스에서 유기산을 빠르고 효율적으로 스크리닝 할 수 있었다. 본 뉴스레터를 통해 영양 및 대사 프로파일링을 위한 잠재적 마커로서 소변 속 유기산 분석의 중요성을 알 수 있다.

■ References

1. Naraian, R., & Kumari, S. (2017). Microbial production of organic acids. *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*, 93.
2. Suiryanrayna, M. V., & Ramana, J. V. (2015). A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 1-11.
3. Yan, R., Jiang, H., Gu, S., Feng, N., Zhang, N., Lv, L., & Liu, F. (2020). Fecal metabolites were altered, identified as biomarkers and correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus in a GC-MS-based metabolomics study. *Frontiers in immunology*, 2138.

*Smart Metabolites Database and AOC 는 Shimadzu Corporation 또는 계열사의 상표입니다. Topaz는 Restek Corporation 의 상표입니다.



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
 Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only, Not for use in diagnostic procedures, Not available in the USA, Canada, and China. This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

Copyright © 2022 SHIMADZU group. All rights reserved.