

## 생체시료 중 카테콜아민과 폴리아민 프로파일링 분석법

김민지 · 김보경 · 김성민 · 박지숙 · 홍종기\*

경희대학교 약학대학  
(2011. 9. 9. 접수, 2011. 10. 3. 승인)

### Profiling analysis of catecholamines and polyamines in biological samples

Min-Ji Kim, Bo-Kyung Kim, Seong Min Kim, Ji-Suk Park and Jongki Hong\*

College of Pharmacy & Kyunghee East-West Pharmaceutical Research Institute,  
Kyung Hee University, Seoul 136-701, Korea

(Received September 9, 2011; Accepted October 3, 2011)

#### 1. 서 론

생체 아민(biogenic amines)은 생물체의 세포 내 아미노산의 탈탄산 작용(decarboxylation), 아미노기 전이 작용(transamination) 등의 화학적 작용에 의해 생성되는 생리활성을 지닌 저분자량의 유기 질소 화합물을 말한다.<sup>1</sup> 생체 아민은 인체 및 동물체내에서 중추 신경의 신경전달물질로서 직·간접적으로 작용하며 혈압 조절 및 혈류 등의 심혈관계에도 영향을 미치는 필수 성분 중의 하나이다.<sup>2</sup> 또한 생체 아민은 일반적으로 인체 내의 신경 및 혈관계 등을 자극하여 임상병리학적 증상을 유발시킬 수 있으며 체내 대사과정에서 휘발성 *N*-nitrosamine과 같은 강력한 발암 물질을 발생시킬 수 있는 잠재성을 지니고 있다.<sup>3</sup>

생체 아민은 화학적 구조에 따라 3가지로 분류할 수 있다. 방향족 아민류(tyramine, phenylethylamine), 지방족 아민류(putrescine, cadaverine, spermine, spermidine), 헤테로사이클릭 아민류(tryptamine)가 대표적 예이다. 또한 생체 아민은 생합성 과정에 따라 크게 카테콜아민과 폴리아민으로 나눌 수도 있다. 대표적인 생체아민의 구조는 Fig. 1과 같다. 이러한 생체 아민의 대사

이상은 체내에서 신경 및 정신 작용과 관련하여 다양한 질환에 밀접하게 관련되어 있어 생리학적으로 그 중요성이 크다.<sup>4,5</sup>

#### 1.1. 카테콜아민(catecholamines)과 폴리아민(polyamine)의 역할과 중요성

카테콜아민은 벤젠고리에 인접한 히드록시기 두 개가 치환되어 있는 카테콜그룹과 에틸아민그룹이 겹가지로 붙어있는 구조를 가지고 있으며, 체내 주요 카테콜아민으로는 dopamine (DA), epinephrine (E), norepinephrine (NE)이 있다. 카테콜아민은 생체 내에서 생리학적으로 중요한 신경전달물질 또는 호르몬으로 작용한다. 예를 들어 E와 NE가 에피네프린 수용체를 자극하여 피부나 내장혈관의 수축, 동공의 확대, 혈압의 상승 등의 작용이 있다. 이러한 특징을 갖는 카테콜아민은 생체시료의 정량 분석을 통해 신경내분비성 질환을 진단하고 생리·병리학적 상태를 확인하는데 사용된다. 예를 들어 소변 또는 혈장 내 비정상적으로 높은 카테콜아민의 농도는 카테콜아민 생성 종양인 크롬친화성세포종(phaeochromocytoma), 부신경절종(paraganglioma), 신경아세포종(neuroblastoma), 파킨슨

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-961-9255 Fax : +82-(0)2-961-0357

E-mail : jhong@khu.ac.kr

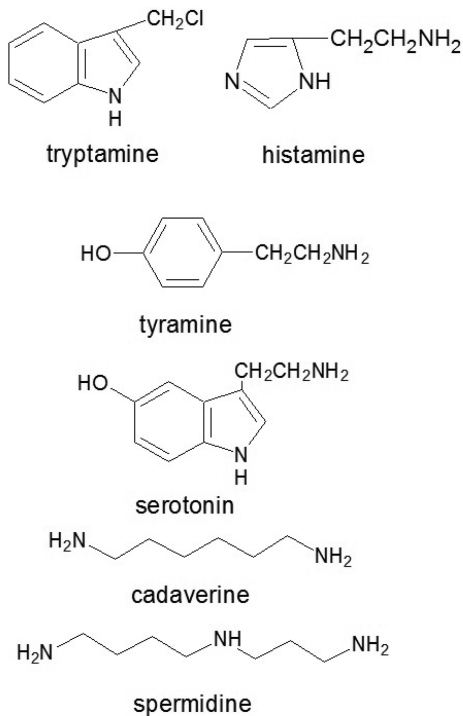


Fig. 1. Chemical structures of typical biogenic amines.

병(Parkinson's disease) 등을 암시한다.<sup>6,8</sup> 따라서 카테콜아민 대사체 중 주요 지표물질을 정량분석 함으로써 질환의 조기 진단에 사용될 수 있다. 또한 카테콜아민의 생산, 대사, 분비 속도와 관련된 정보들은 스트레스의 진단 및 관리에 있어 유용함을 보여준다.<sup>9</sup> 그리고 특정 카테콜아민 농도의 증가는 고혈압, 심부전과 관련이 있어서 특히 주목할 필요가 있다.<sup>10</sup> 결과적으로 카테콜아민과 그 대사체들은 대사 이상으로 발생하는 질환을 진단하고 치료 과정을 면밀히 모니터링 할 수 있는 중요한 생체지표(biomarker)로서 이용할 수 있음을 시사해준다.

폴리아민은 생물체에 널리 존재하는 제1급 아미노기를 두 개 이상 갖는 저분자의 지방족탄화수소를 말한다. 폴리아민은 동물, 식물 및 미생물에 걸쳐 모두 존재하는 필수 구성성분으로, 특히 성장조절물질로 알려져 있다. 그리고 폴리아민은 체내 pH에서 양이온으로 존재하여 전기적으로 DNA, RNA, 산, 인지질, 단백질과 같은 음이온성 화학종과 반응할 수 있다. 따라서 핵산의 안정화 및 조절 작용을 함으로써 세포의 성장과 증식 및 막 안정성에 중요한 역할을 한다.<sup>11</sup> 또한 폴리아민은 활성산소종(reactive oxygen species)을

제거하는 산화방지제 역할을 함으로써 DNA, 단백질, 지질을 보호하기도 한다. 폴리아민의 종류는 1,2-diaminopropane (1,2-DAP), putrescine (PUT), cadaverine (CAD), spermidine (SPD), spermine (SPM), acetylspermine (AcSPM), diacetylspermine (DiAcSPM), diacetylspermidine (DiAcSPD), 1,3-diaminopropane (1,3-DAP), *N*-acetylputrescine (*N*-AcPUT), *N*-acetylcadaverine (*N*-AcCAD) 등이 있다.<sup>12</sup> 이들 중 PUT, SPM, SPD는 세포 분열을 촉진시키는 필수 화합물로 알려져 있다. {이러한 영향으로 인해}폴리아민의 과다축적은 암세포로의 전이를 유발한다고 알려져 있으며, 현재 동물세포를 이용한 폴리아민 연구가 활발히 진행되고 있다.

## 1.2. 대사경로 과정

카테콜아민은 티로신(tyrosine)으로부터 합성되며, 첫 번째 단계에서 티로신은 티로신 히드록실라아제(tyrosine hydroxylase)에 의해 수산화(hydroxylation) 반응으로 *L*-3,4-dihydroxyphenylalanine (*L*-DOPA)이 생성되고, 도파 디카복실라아제(dopa decarboxylase)의 탈탄산 반응을 거쳐 도파민(dopamine, DA)이 생성된다. DA는 다시 dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)에 의해서 수산화 반응으로 NE가 생성된다. 이후 NE는 phenylethanolamine *N*-methyltransferase (PNMT)에 의해서 메틸화 반응(methylation)으로 E가 생성된다. 이러한 카테콜아민들은 catechol-*O*-methyltransferases (COMTs) 또는 monoamine oxidases (MAOs)에 의해 각각 메틸화 및 산화적 탈아민 반응으로 분해되어 homovanillic acid (HVA)와 vanillylmandelic acid (VMA)와 같은 산성형의 구조를 가진 물질이 카테콜아민의 최종 대사체가 된다. 이들 카테콜아민의 체내 대사 경로는 Fig. 2에 실었다.

폴리아민의 합성은 ornithine의 탈탄산 반응에 의해 PUT가 생성되는 것부터 시작해서 SPD, SPM 등의 폴리아민이 생성된다. 폴리아민 대사는 산화(oxidation), 아세틸화(acetylation), 아미노기 전이, 카르바모일화(carbamoylation) 반응에 의해 일어난다. 생체 내에서 PUT는 두 개의 다른 경로를 통해 합성된다. 첫 번째 경로는 arginine이 arginine decarboxylase (ADC) 효소에 의해 촉진되어 agmatine으로 변환된다. 이후 agmatine은 agmatine imino hydroxylase (AIH)에 의해 *N*-carbamoylputrescine으로 변환되어 결과적으로 *N*-carbamoylputrescine은 PUT로 변환된다. 두 번째 다른 경로는 arginine이 ornithine으로 변환되고 ornithine은 ornithine decarboxylase (ODC)에 의해 PUT로 변환된

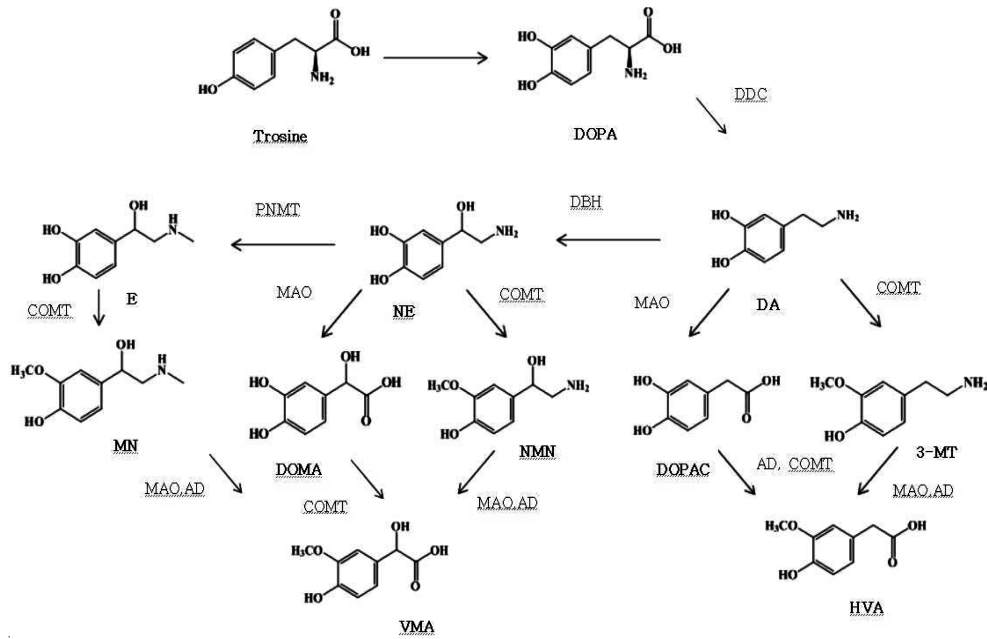


Fig. 2. Metabolic pathways of catecholamines.

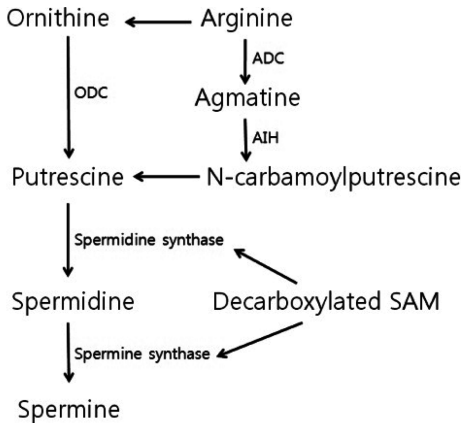


Fig. 3. Metabolic pathways of polyamines.

다. 한편, CAD는 lysine decarboxylase (LDC)에 의해 1단계의 반응으로 lysine으로부터 합성된다. SPD는 decarboxylated S-adenosyl-L-methionine (SAM)으로부터 aminopropyl group을 사용하여 PUT로부터 합성된다. 이 반응은 spermidine synthase에 의해 촉진된다. SPM도 spermine synthase에 의해 decarboxylated SAM의 aminopropyl group을 사용하여 spermine synthase에 의해 촉진되며 SPD로부터 합성된다.<sup>13</sup> 체내에서 폴리아민류의 생성과정은 Fig. 3에 실었다.

### 1.3. 물리적 · 화학적 성질의 특징

카테콜아민은 히드록시기가 결합된 방향족 화합물로 쉽게 산화되는 성질이 있어서 시료 보관이나 전처리 시 분석물질의 변성에 유의해야 한다. 특히 산소나 다른 산화제 존재시 쉽게 산화되어서 O-quinone과 유사한 화합물을 형성하고, 반응이 더 진행되면 착색된 생성물의 혼합물이 생기게 된다. 그러므로 카테콜아민 용액은 아스코르빈산이나 NaHSO<sub>3</sub>와 같은 항산화제를 첨가하여 보존하여야 한다. 한편, 이러한 산화 경향을 이용하여 HPLC의 전기화학 검출기에 적용할 수도 있다.

카테콜아민은 산성기(방향족 히드록시기)와 염기성기(지방족 아미노기)를 모두 가지고 있는 극성물질이다. 그렇기 때문에 pH 7.4에서 NE는 양이온형(cationic forms)이 95% 이상 존재하고 양쪽이온형(zwitter ionic forms)이 약 3% 정도 존재하며 비이온형(nonionized forms)이 2% 이하로 존재하는 것으로 밝혀졌다.<sup>14</sup> 이와 같은 사실 때문에 NE, DA와 같은 카테콜아민은 물에 대한 용해도가 크다. 카테콜아민은 분자 중에 O-dihydroxybenzene 또는 페놀 구조를 가지고 있어서, 중금속이온과 착화합물을 이루고 발색한다.

폴리아민은 분자량이 작은 지방족 아민으로 물에 잘 녹으며 아미노기를 두 개 이상 갖는다. 세포 내 폴리아민은 다가양이온으로서 음전하를 띠는 핵산, 인지질, 다른 단백질과 상호 작용을 한다. 특히 폴리아민

이 핵산에 작용하면 전사나 해독작용에 영향을 준다. 그리고 세포막에 존재하는 인지질에 작용할 경우 막 투과성 등 세포막의 성질을 변화시켜 활성에 변화를 준다.

#### 1.4. 프로파일링 분석(profiling analysis)을 통한 조기진단

생체아민은 체내에 극미량으로 존재하고 있지만 고감도의 분석기법이 개발되면서 대사 이상으로 발생하는 다양한 질환 진단에 활발히 적용되고 있다. 카테콜아민 중 HVA, VMA, 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA), 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMM) 등은 진단의 생체지표로 널리 사용되었다. 폴리아민의 대사 이상에 대한 지표물질로는 PUT, SPD, SPM이 주로 사용되었다. 이들 물질은 크롬친화성세포종, 신경질환, 파킨슨병 등 여러 질환에 대한 생체지표로 주목 받고 있다. 1971년 Russell이 암 환자의 소변 시료에서 폴리아민이 과다 검출되는 것을 발견하고 폴리아민의 과다 분비와 질환과의 상관관계를 연구하였다.<sup>15</sup> 한편, 악성 종양 환자의 소변 시료에서 폴리아민의 농도가 크게 증가했다는 보고가 있었다.<sup>16</sup> 이외에도 몇몇 종류의 악성 종양세포 증식에 세포내 폴리아민의 농도 증가가 있음이 보고되어 폴리아민이 암의 생체지표로서 주목을 받고 있다.<sup>17-20</sup> 그리고 적혈구 내 폴리아민의 농도는 세포 증식의 척도로 사용되고 있는데, 암환자의 적혈구에서 SPM과 SPD가 높은 농도로 측정되었다. 따라서 폴리아민의 생체 농도는 암환자와의 관계에 있어 암 진단 및 치료에 매우 중요한 의미를 가지고 있다.<sup>21</sup>

## 2. 방 법

### 2.1. 생체시료의 채취 및 보관

생체시료 중 극미량의 생체아민류를 정확하게 분석하기 위해서는 각 생체시료의 전반적인 보관 방법과 화학물질의 안정도, 변성에 대하여 매우 유의하여야 한다.

#### 2.1.1. 소변

소변 시료는 혈액시험에 비해 시료 채취가 용이하며, 시료 변성 가능성이 적으며, 분석이 용이하여 경제적인 장점을 가지고 있다. 그러나 시료의 보존 시간이 길어질수록 시료의 안정성이 떨어지는 경우가 있다.<sup>22</sup> 보통 24시간 동안 채취한 소변 시료는 지정된 보존제를 넣은 용기에 받아 분석 전까지 냉장보관 한

다. 소변 시료의 pH 값은 화학구조의 변화를 막기 위해 정확하게 유지되어야 한다.<sup>23</sup> 따라서 보존제 처리와 냉장보관을 하지 않을 경우 측정할 물질이 변성되어 분석 결과에 큰 오차가 생길 수 있음을 유의해야 한다. 카테콜아민은 소변 시료에서 황산염 형태나 글루쿠로닉의 형태로 존재한다. 특히 산화 가수분해는 황산염 형태의 카테콜아민에서 잘 일어나므로 ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 아스코르빈산, 글루타치온을 보존제로 사용하면 카테콜아민의 산화를 막는데 효과적이다. 소변 시료의 카테콜아민 보관시 보존제로 HCl 용액을 사용한 경우도 있으며, 보존제로 처리하고 분석 전까지 -20 °C에서 보관하면 최대 6개월까지 보존 가능하다.<sup>24</sup> 그러나 폴리아민은 일반적으로 암모니아보다 강한 염기성을 띠어 소변 시료에서 화학구조의 변화가 일어나지 않는다. 따라서 소변 시료 중 폴리아민 분석에 있어서 따로 보존제를 사용하지 않고 저온에서 보관할 수 있다.<sup>11,22,25</sup> 온도와 보관 기간을 달리한 실험에서 폴리아민의 농도가 보관시의 온도에 크게 영향을 받지 않는 특징도 보고되었다.<sup>22</sup>

#### 2.1.2. 혈액

혈액 시료를 채취시 적당한 응고방지법이 없다면 응고가 쉽게 일어나기 때문에 혈액 시료의 분석을 위해서는 적절한 보관 방법이 필요하다. 혈액 시료를 분석하기 위해서는 분석 전에 항응고제(주로 EDTA, 리튬 헤파린염)를 넣어 보관한다. 혈액 시료에 항응고제를 적절한 비율로 투여하지 않으면 micro clot이 생겨 분석과정에 엄청난 오차를 유발할 수 있어 주의가 필요하다. 보통 채취된 혈액은 응고 방지과정을 거친 후 -20 °C 이하에서 보관해야 한다.<sup>22,25-27</sup> 또는 채취된 혈액 시료가 항응고 과정을 거친 다음 분석 전까지 4 °C에 보관된 경우도 있었으나 이 조건에서 혈액 시료의 안정성은 1주정도 밖에 되지 않았다.<sup>21</sup> 채취된 혈액 시료를 건조, 살균하여 응고 방지제로 10% EDTA tetrasodium salt를 넣은 다음 원심분리 하여 -20 °C에서 보관하기도 한다.<sup>28</sup>

#### 2.1.3. 생체조직

그 밖에 생체시료로는 뇌 조직, 모발, 손톱, 타액 등이 있으며, 보관할 때 생체 지표의 농도를 유지할 수 있게 하는 것이 중요하다. 이를 위하여 액체 질소를 이용한 급속냉각으로 생체 지표의 농도를 유지하면서 시료의 변성을 막을 수 있는 방법이 이용된다.<sup>29</sup> 특히 뇌 조직은 냉동 및 해동 조건에서 많은 양의 세포 소

실이 일어나기 때문에 적절한 보관 방법을 필요로 한다. 따라서 신속히 분리하여 추출할 때까지  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다.<sup>30,31</sup> 카테콜아민은 뇌척수액에서 비교적 안정적인데, 시료 채취시 혈액에 의해 오염되어 적혈구의 용혈로 카테콜아민류의 산화가 일어날 수 있다. 따라서 혈액에 의해 오염되면 바로 원심 분리하여 혈액을 제거해야 한다. 그리고 뇌척수액 시료를  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 저장했을 때는 24시간까지 안정하였다.<sup>32</sup> 또 시료를 얼리게 되면 몇 시간 동안은 5-HIAA와 HVA의 변성이 일어나지 않으며,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  이하에서 보관하면 항산화제 없이도 5년 이상 보관이 가능하다.<sup>33</sup> 이외에도 마우스 시료의 뇌하수체 전엽을 적출한 후 식염수로 세척하고 생화학적 분석 전까지 인산염 완충용액에 얼리거나,<sup>34</sup> 뇌의 각 부분의 무게를 측정하고  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한 사례가 있었다.<sup>35</sup>

## 2.2. 시료 추출 및 정제 방법

생체시료를 분석하기 전, 목적성분을 제외한 시료 내 방해 물질을 제거함으로써 분석 물질의 감도를 높일 필요가 있다. 따라서 생체시료의 특징에 따라, 분석대상물질에 따라, 분석 장비에 따라, 적절한 추출 방법과 전처리 방법을 선택 하여야 한다.

### 2.2.1. 원심분리법(high-speed centrifugation)

원심분리는 고속회전으로 발생하는 원심력을 이용하여 액체 중의 물질들을 비중에 따라 분리하거나 고체입자 또는 액체미립자를 분리하는 조작이다. 특히 고체와 액체의 혼합물의 경우 고체입자의 크기와 밀도의 차가 적어서 중력의 힘만으로 침강이 잘 되지 않을 때 원심력이 작용하면 입자는 더 많은 힘을 받아 침강속도가 빨라져 단시간 내에 쉽게 침강할 수 있어 효율적이다. 이는 그 자체로도 유용한 방법일 뿐만 아니라 침강분리, 탈수, 여과 등의 기계적 분리 시에도 많이 이용된다. 인체 소변 시료 중 세포와 다른 미립자들을 제거하기 위해서 HCl, NaCl, ether 등을 첨가한 원심분리(10분, 2000 rpm)방법이 소개되었다.<sup>36</sup> 또한, 고체상 추출법에 의한 전 단계로서 혈액과 소변 시료가 각각 1400 g에서 5분간, 1000 g에서 3분간 원심분리를 통한 미립자의 제거에 대한 연구도 소개되었다.<sup>31</sup>

### 2.2.2. 액-액 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)

서로 용해도가 차이가 나는 두 액상 간에 목적성분의 분배를 이용한 분리법이다. 섞이지 않은 2개의 액

체에서 목적성분의 용해도 차이를 이용한 이 방법은 선택성이 우수해서 고순도화가 가능하며 추출능력이 커서 성분의 농축이 가능하다. 액체상으로는 주로 물과 유기용매를 이용한다. 회수율이 높고 2차 오염을 일으키지 않는 장점이 있다. 하지만 추출시간이 길고 과량의 추출용매를 사용해야하며, 화기에 대해 반드시 대책이 필요하다. 소변 시료에서 카테콜그룹을 가진 화합물을 특이적으로 두 단계의 LLE로 시행한 방법이 보고되었다. 첫 번째 단계에서는  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 에 EDTA와 phenylboronic acid를 녹여  $\text{NH}_4\text{OH}$ 로 pH를 조정후 추출하였다. 두 번째 단계는 1-octanol이 정량적으로 녹아있는 heptane에 tetraoctylammonium bromide (TOAB)를 용해시켜 추출하였다.<sup>6</sup>

### 2.2.3. 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)

SPE는 추출용매를 카트리지에 넣어 흡윤 상태로 만들고 액체 형태의 시료를 고체상(solid phase)에 흘러주어 용질을 물리·화학적 특성에 따라 흡착시킨 후 세척과정을 거쳐 적합한 용출용매로 원하는 물질을 선택적으로 용출시키는 전처리 방법이다. 시료를 추출하고 정제시키므로 실험이 용이하고 여러 시료를 신속하게 분석할 수 있다는 장점이 있다. 하지만, 분석 결과가 SPE 카트리지의 정지상 극성에 따라 차이를 보이므로 정지상 흡착제의 선택에 어려움이 있을 수 있다.<sup>37</sup> 유기용매의 사용량은 액상추출법에 비해 적지만 카트리지 제조회사별, 활성화 방법 등에 따라 다른 결과가 나타날 수 있다. 최근에는 친수성-소수성 균형 흡착제를 사용한 HLB-SPE 카트리지를 이용해서 소변 시료 중에 카테콜아민을 분석한 방법,<sup>38,39</sup> molecularly imprinted polymer (MIP)가 흡착제로 사용된 카트리지를 사용한 분석방법도 보고되었다.<sup>40</sup> 후자의 흡착제인 MIP는 수소결합과 정전기적 상호작용에 의해서 목적성분을 흡착시킬 수 있는 특이성을 가지고 있다. 또한 phenylboronic acid (PBA) 카트리지 가 소변 시료 중의 카테콜아민 정량·정성분석에 많이 사용되고 있으며, 특히 자동화된 방법으로 SPE에 이용되고 있다.<sup>24,40,41</sup> 그 외에도 medium cation exchange (MAX)-SPE 카트리지를 이용해서 혈액과 소변 시료에서 카테콜아민을 분석한 방법이 최근에 소개되었다.<sup>26</sup>

## 2.3. 시료별 추출 정제 방법

### 2.3.1. 소변(urine)

소변 시료 중 생체 아민을 분석하기 위해서는 전처리 과정이 선행되어야 한다. 소변 시료를 원심분리와

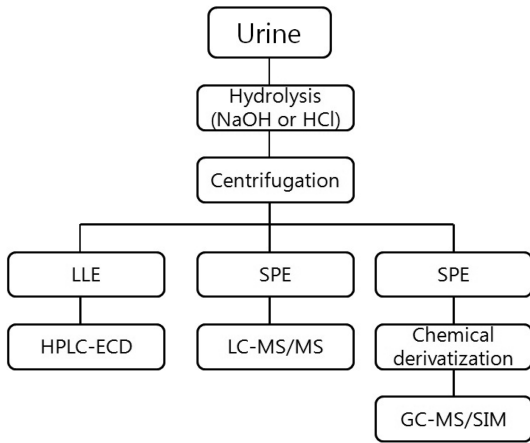


Fig. 4. Analytical procedure of biogenic amines in urine samples.

LLE를 이용하거나,<sup>7</sup> filter paper로 추출하는 방법<sup>42</sup>이 있다. 또는 HPLC-ECD에 분석 전 SPE 추출을 사용하기도 한다.<sup>43</sup> 다른 전처리 방법으로는 이온 교환법을 사용하는 경우가 있는데, 이 경우 10~15분 동안 지속적으로 침전물이 생길 경우 원심분리 하는 것이 좋다.<sup>44</sup> 혹은 소변 시료에 다른 표준용액과 perchloric acid를 더한 다음 완전하게 섞은 후 원심분리 하여 상층액을 추출하거나,<sup>11</sup> 처음부터 소변 시료를 pentane으로 추출 후 원심분리 하고 다시 그 용액에 1,6-diaminohexane을 넣고 탄산염 완충용액을 가해 pH 9.0으로 만들어 정제한다.<sup>25</sup> 또는 소변 시료를 원심분리 후 1:4의 비율로 증류수를 희석한다.<sup>22</sup> 그리고 소변 시료 중 신경전달물질은 생체 내 대사과정에서 글루쿠로닉 혹은 황산염과 결합된 상태로 존재하므로 신경전달물질을 가수분해 한 후에 분석한다. 따라서 소변 시료에서 normetanephrine (NMN)과 metanephrine (MN)을 추출하는데 HCl을 첨가하여 20분간 수욕 상에서 산가수분해로 가열 추출하였다.<sup>38</sup> 소변 시료 중 생체아민류의 전반적인 분석과정은 Fig. 4에 실었다.

### 2.3.2. 혈액(blood, serum, plasma)

혈액 시료가 응고되기 전에 원심분리, LLE 등을 이용하여 혈액에서 필요한 부분(적혈구, 백혈구, 혈소판 및 혈장)을 추출한다. 혈장분석시 적혈구를 분리하기 위해 전체 혈액을 원심분리하며, 혈청을 분석하기 위해서는 분석 전에 응고 방지제를 넣어 분리한다.<sup>23</sup> 적혈구 분석시 혈액 시료를 리튬 헤파린 튜브에 넣어 원심분리한 후, 혈장을 제거해 NaCl 용액을 가하여

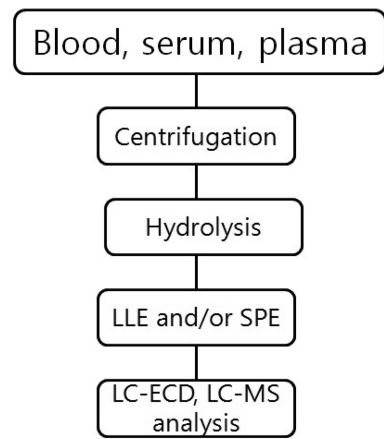


Fig. 5. Overall analytical procedure of biogenic amines in blood, serum and plasma.

적혈구의 활동을 멈추게 한다. 다시 10%의 냉각 perchloric acid를 넣어 시료의 단백질을 제거한 후 얼음 욕조에서 보관했다가 원심분리하여 적혈구를 추출한다.<sup>21</sup> 또는 혈액 시료를 증류수로 희석시킨 후 가열하거나 온도를 높여 단백질을 침전시킨다. 그 후 다시 혈액 시료에 탄산나트륨 완충용액을 가하여 수용액 상태의 시료를 추출한다.<sup>25</sup> 또는 탄산나트륨 완충용액을 넣어 pH를 9.0으로 조절할 수도 있다.<sup>45</sup> 저온에서 보관한 혈액 시료를 해동한 후, 아세트니트릴을 가하여 단백질을 제거한 다음 원심분리 하여 상층액을 추출 후 분석에 사용한다.<sup>28</sup> 혈액 시료 중 생체아민류의 일반적인 분석과정은 Fig. 5에 실었다.

### 2.3.3. 뇌 조직(brain tissue)

뇌 조직은 마우스 시료로부터 적출하여 보통 -80 °C에서 즉시 얼렸다가 사용하기 직전 해동한다. 해동된 뇌 조직은 균질기로 균질화하여 교반한 후 원심분리하여 추출하고 정제한다. 뇌 조직은 실험에 따라 사용되는 부위가 다르므로 필요 부위를 절단하여 사용한다. 마우스의 뇌 조직의 해마, 전전두엽 피질, 선조체를 분석할 때, -80 °C에서 얼린 뇌를 아세트니트릴 혼합물과 함께 4 °C에서 20분 동안 고주파를 거친 후 원심분리 하는 방법이 소개되었다.<sup>46</sup> 또는 뇌 조직의 4개 부분(전두엽, 기저핵, 측중격핵, 편도체)을 절단하여 각 부분을 포름산 용액에서 균질화하고, 4 °C에서 원심분리 후 상층액에 있는 신경전달물질을 분석한다.<sup>29</sup> 뇌 조직 중 생체아민류의 전반적인 분석과정은 Fig. 6에 실었다.

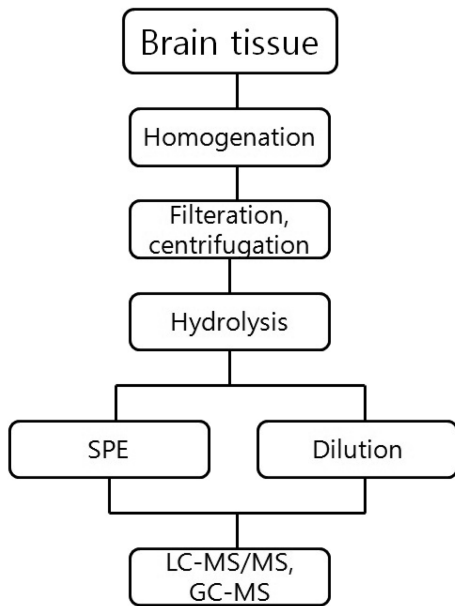


Fig. 6. Analytical procedure of biogenic amines in mouse brain tissue.

#### 2.3.4. 모발(hair)

모발 시료는 시료 채취가 용이하며 채취한 후 가수분해한 다음 구조도 칼럼들을 사용하여 SPE를 이용하여 추출 정제하는 방식이 널리 사용되었다. 모발 시료는 순차적으로 탈이온수 및 아세트산과 함께 3번 세척한 다음, 초음파를 이용해 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)로 세척한다. 그 다음 상온에서 질소 기류 하에 건조시킨 후, 50 mg의 모발 시료 부분 표본들을 원심분리기에 정밀하게 넣는다. 분석하기 전 모발시료는 일반적으로 상온에서 보관한다. 모발 시료는 장기간의 만성 생화학 정보를 가지고 있으며 편리한 시료채취, 안정성, 효과적인 분리, 높은 민감성, 짧은 분석시간 등의 장점이 있다.<sup>47</sup>

#### 2.4. 생체아민의 화학 유도체화 방법

미량의 극성물질을 분석하기 위해서는 화학 유도체화 방법이 널리 사용되며 화합물의 구조에 따라 다양한 유도체화 방법이 있다. 화학 유도체화 방법은 화합물의 열적 안정성을 높이고 크로마토그래피의 기능을 향상시킨다. 그리고 분석 장비 중 가스 크로마토그래피(gas chromatography, GC) 적용 시 분석이 용이하도록 화합물의 극성을 낮추며 휘발성을 증가시킬 수 있도록 화합물의 이화학적 성질을 전환시킨다. 질량분석기에 연계할 경우 유도체화 방법을 사용하여 화합물

의 확인이 용이하도록 특성이온을 생성시켜 정성 및 정량분석에 도움을 준다. 그 외에도 selected ion monitoring (SIM)에 의해서 분석의 감도를 높일 수 있다. HPLC-UV를 사용할 때 화합물의 발색단이 없거나 낮은 흡광도를 갖는 화합물 분석의 경우에 유도체화 방법의 도입으로 분석의 감도를 크게 향상시킬 수 있다. 대표적인 예로, 폴리아민은 적당한 발색단과 형광단을 가지지 않으며 휘발성이 낮고 분자량이 작아 분석 감도가 떨어지기 때문에 유도체화 시약과 반응시켜 분석 감도를 높인다. 유도체화 시약과 반응시킨 후 폴리아민의 감도가 50배나 높아진 경우가 있으며, 짧은 시간 내에 분석이 가능하고, 다양한 온도에서 검출이 가능하다.<sup>11</sup> 또한 화합물이 시료의 방해물질에 영향을 받는 경우, 머무름 시간을 조정하여 매트릭스 효과를 크게 줄일 수 있다.

화학 유도체화 방법의 또 다른 장점은 용매추출 방식에 적용시킬 수 있는 점이다. 수용성 화합물을 유기 용매로 추출하기 위해 수용성 극성물질의 특성 기능기 한 부분을 유도체화 시켜 비수용성 화합물로 전환시키는데 사용될 수 있다. 특히 매트릭스가 매우 복잡한 시료 내의 특정한 화합물을 분석하려면 유도체화 방법이 필요하다. 유도체화 방법을 실시하지 않는다면 불필요한 화합물까지 추출되기 때문에 목적성분을 선택적으로 유도체화 시켜 추출하는 것이 효율적이다.

유도체화 방법은 크게 생체 아민인 카테콜아민과 폴리아민에 따라 나눌 수 있다. 카테콜아민의 유도체화 방법은 매우 다양한 시약이 사용된다. 특히 극미량의 카테콜아민 대사체류를 분석하기 위해서는 극성이 큰 아미노기, 히드록시기, 카르복시기의 활성수소를 가진 화합물을 휘발성이 크고 안정한 비극성의 유도체 화합물로 전환하는 과정이 필수적이다.<sup>48</sup> 일반적으로 아민류에 대하여 alkylation<sup>49-52</sup>과 alkoxy carbonyl esterification<sup>53-55</sup> 유도체화 방법이 주로 사용되고 있다. 소변 시료에서 VMA와 HVA의 정량 분석을 위해 유도체화 작용물질로써 ethyl chloroformate를 사용한 경우도 있었다.<sup>43</sup>

카테콜아민은 발색단을 가지고 있으며 일반적으로 UV를 이용해 검출하기도 한다. 하지만 UV로 검출하는 경우 매우 낮은 농도의 카테콜아민류를 분석하는데 한계가 있다. 따라서 분석 감도를 높이고 시료 매트릭스의 영향을 줄이기 위해서 형광 그룹을 결합시키는 유도체화 방법이 널리 사용된다. 이러한 형광물질은 기존의 카테콜아민 파장을 다른 UV 파장으로 바꾸어 준다. 따라서 시료가 다른 물질들로부터 영향

Table 1. Fluorescence reagents used for catecholamine analysis

Reagent	Target	Instru- ment	Sample	Detection limits	Ref.
<i>O</i> -phthaldehyde	DA	CE	Rat striatum	36 nM (S/N=3)	[56]
Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde	DA	MEKC	Standard	31 nM (S/N=3)	[57]
Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde	DA, NE	CE	Microdialysate from thalamus of rats	1 nM (S/N=3) for NE	[58]
Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde	DA	MEKC	Human urine	4.7 nM (S/N=3)	[69]
5-Furoylquinoline-3-carboxaldehyde	DA, NE	MEKC	Standard	20 nM (S/N=3)for NE	[60]
Fluorescein isothiocyanate	DA, NE, E, DOPA	CE	Standard	1.2 nM (S/N=3) for DA	[61]
Fluorescein isothiocyanate	DA, NE	CE	<i>P. oleracea</i> L. extracts	0.34 nM (S/N=3) for DA	[62]
Fluorescein isothiocyanate	DA, NE, E	CE	PC-12 tumor cell extracts	0.08 nM (S/N=3) for DA	[63]
<i>N</i> -Hydroxysuccinimidyl fluorescein - <i>O</i> -acetate	DA, NE, E	LC	Human urine	3.2 fmol (S/N=3) for NE	[64]
4-Fluoro-7-nitro-2,1,3- benzoxadiazole	DA, NE, E, NMN, MN	LC	Standard	0.5 nM	[65]
Ethylenediamine	NMN	LC	Rat tissues homogenate	10 nM (S/N=3) for NMN [66,68-70]	
Ethylenediamine	DOPAC, HVA	LC	Rat kidney microdialysate	5 nM (S/N=3) for DOPAC	[67]
Ethylenediamine	DA	-	Pharmaceutical products and human urine	120 nM (S/N=3)	[71]
1,2-Diphenylethylenediamine	DA, NE, E	LC	Extract of culture media removed from myeloid cells	3 nM (S/N=3) for E	[72]
1,2-Diphenylethylenediamine	DA, NE, E	LC	Standard	2.5 pM (S/N=3) for E	[73]
1,2-Diphenylethylenediamine	DA, NE	LC	Brain microdialysate	4.2 pM (S/N=3) for DA	[74]
1,2-Diphenylethylenediamine	DA, NE, DOPAC	LC	Brain extracts and microdi- alysate	12 pM (S/N=3) for NE	[75]
Benzylamine	NE	LC	Mouse brain icrodialysate	4.0 pM (S/N=3)	[76]
Benzylamine	NE	LC	Mouse brain icrodialysate	4.5 pM (S/N=3)	[77]
1,2-Phenylenediamine	DA	-	Standard	2.1 μM (S/N=3)	[78]
Terbium (III) ion	DA, NE, E	LC	Urine	10 nM (S/N=3) for NE	[79]

CE, capillary electrophoresis; DA, dopamine; DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; E, epinephrine; HVA, homovanillic acid; LC, liquid chromatography; MEKC, micellar electrokinetic chromatography; MN, metanephrine; NE, norepinephrine; NMN, nometanephrine

을 덜 받게 할 수 있다. 카테콜아민의 유도체화에 사용되는 형광시약들은 Table 1과 같다.<sup>56-79</sup>

덧붙여, 생체시료 중 폴리아민의 다양한 유도체화 방법에 대한 실례를 간단히 소개하면 다음과 같다. 첫 번째 예로 소변 시료 중 폴리아민을 분석하기 위해 염기성 조건에서 benzoyl chloride를 가하여 benzoylation 시킨 후 diethyl ether로 추출한 경우가 있다.<sup>11</sup>

두 번째 예로 dansyl chloride를 사용하여 적혈구 내 폴리아민을 유도체화한 방법이 있다. 적혈구가 있는 perchloric 층에 포화된 탄산나트륨 용액을 넣어 알칼리화 한 다음 dansyl chloride가 있는 아세톤을 넣는다. 하루 정도 보관한 뒤 proline에 의해 과량의 dansyl

chloride를 제거한 후 dansyl 유도체를 시클로헥산으로 추출하여 질소 조건하에서 증발 건조한다. 특히 dansyl 유도체화 된 폴리아민은 조금 더 쉽게 이온화 되는 현상을 보였다.<sup>21</sup>

세 번째 예로 *N*-hydroxy-succinimidyl fluorescein-*O*-acetate (SIFA)로 폴리아민을 유도체화 하는 방법이 있다. 사람 혈장 내 폴리아민에 형광을 띄게 만드는 방법으로 먼저 시료를 테프론이 코팅된 바이알에 넣고 borate 완충용액으로 pH를 고정시킨 후 SIFA 시약을 넣는다. 그 후 45 °C에서 30분간 가온하여 유도체화 시켜 HPLC-FLD (fluorescence detector)로 분석하였다.<sup>28</sup>

마지막 예로 소변과 혈청 시료에 각각 전처리 과정을 실행한 후 isobutyl chloroformate를 넣고 아민 카르바모일화 한다. 35 °C에서 배양하고 식힌 뒤 diethyl ether로 2번 추출한 후 유도체화 된 용액을 농축하고 다시 acetic acid와 acetic acid-acetonitril을 1:1 비율로 하여 첨가한다.<sup>25</sup> 그 외에 모발 시료의 폴리아민을 heptafluorobutyryl chloride (HFB-Cl)로 유도체 합성하고 n-hexane으로 용출한 경우도 있었다.<sup>47</sup>

## 2.5. Biogenic amine류의 검출 방법

### 2.5.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA 방법은 항체(또는 항원)에 효소를 표지하고 효소활성을 지표로 하여 항원항체반응을 이용한다. 이를 통해 항원(또는 항체), 항체량의 강도를 확인하고 정량적으로 측정하는 방법이다. 발색반응산물을 만들기 위해서 무색의 기질과 함께 항체흡착 효소를 반응시킨다. 반응형식을 2가지로 크게 나누어 볼 수 있다. 첫 번째는 효소표지항체(또는 항원)와 비표지항원(또는 항체)을 경쟁시키는 방법이다. 경쟁 반응에서는 항원과 반응하는 항체에 바로 효소를 결합시켜 사용하는 방법이 있다. 두 번째는 이 2가지를 경쟁시키지 않는 방법이다. 비경쟁반응에서는 항원과 결합할 효소가 없는 1차 항체와 그 1차 항체와 연결하는 2차 항체에 효소를 결합시켜 분석하는 방법이 있다. 그리고 항원이 플레이트에 잘 결합하도록 항원에 대한 항체를 먼저 플레이트에 결합시키고 그 항체에 항원을 결합시킨 다음 직·간접적으로 조사하는 샌드위치 방법도 있다. 이 방법은 다른 분석법에 비해 높은 선택성과 감도를 가지고 있으며 분석 방법이 편리하다는 장점이 있다. 또한 세기가 미미한 복사선이라도 정밀한 측정이 가능하며 검사과정이 비교적 간단하고 시약만 준비되면 전처리 없이 바로 시료를 분석할 수 있다. 결합분획과 유리분획을 분리한 후 통상 결합분획의 방사능을 측정한다. 세로측은 표준물질에 반응시켜 얻은 결합분획의 복사선을 기준으로 하고 가로측은 표준물질의 농도를 기준으로 하여 표준곡선을 그리면 복사선 측정치와 농도가 역상관계를 보인다. 결과적으로 미지검체의 농도를 구할 수 있다.

### 2.5.2. High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC는 카테콜아민과 그 대사체를 분석하는데 가장 많이 이용되는 방법이며 자동 주입기를 사용하여 하루에 대량의 시료를 분석할 수 있다.<sup>45</sup> DA, E, NE를 분석하기 위해서 역상 액체 크로마토그래피(reversed

phase liquid chromatography, RPLC) 또는 전기화학검출기가 연결된 친화/이온쌍 HPLC (affinity/ion-pair HPLC, IPLC)를 많이 사용한다. 이 검출 방법들은 감도가 우수하고 선택성이 비교적 높지만,<sup>40</sup> 장비 조작 기술이 복잡하고 LLE<sup>80</sup> 및 SPE<sup>81</sup>와 같은 시료 전처리 과정이 필수적으로 선행되어야 한다. 최근에는 이온 교환 또는 phenylboronic acid 친화성 지지체를 이용한 자동화 온라인 추출법을 사용하기도 한다.<sup>24,82</sup> RPLC에서 더 나아가 친수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophilic interaction chromatography, HILIC), pre-aqueous liquid chromatography (PALC)가 개발되었다.<sup>41</sup> 최근에는 10,000 psi 이상의 고압을 지원하는 ultra performance liquid chromatography (UPLC)도 개발되어 미량의 대사체 분석에 사용되고 있다. 높은 감도를 가지며 아주 미세한 크기의 정지상 입자를 사용하여 분리능이 크게 향상된 장점을 가지고 있다. 하지만 목적성분의 농도가 매우 낮은 생체시료에서는 LLE, SPE, low-performance liquid chromatography와 같은 시료 전처리가 필요하다. 복잡한 전처리 과정에도 불구하고 방해물질이 충분히 제거되지 않기 때문에 선택적 검출이 필수적이다.<sup>40</sup> LC에 연결하여 사용되는 검출기는 주로 electrochemical detector (ECD), mass spectrometer (MS) 및 tandem mass spectrometer (MS/MS)이며 그 외에도 fluorescence, UV/Vis, chemiluminescence 등이 있다. 검출기 개발이외에도 효과적인 분리기술을 위해 다양한 HPLC 칼럼들이 개발 중이며, 이를 이용한 비교실험이 진행 중에 있다. 이처럼 칼럼과 검출기의 종류에 따라 다양한 HPLC 분석 방법이 존재한다.<sup>26</sup>

HPLC는 생체시료의 분석, 대사체 프로파일링 분석에 가장 많이 사용되는 분석기기이다. 그러나 HPLC-UV는 분석물질의 적절한 발색단이 있어야 검출이 가능하다. UV 스펙트럼은 복잡한 시료 내 목적성분들에 대한 유용한 정보를 주기도 하지만 종종 정확한 동정이 불가능하며 성분의 간단한 구분 정도만 보여주는 경우가 있다.<sup>83</sup> 따라서 HPLC-UV/fluorescence는 적혈구 중 폴리아민 검출 시 dansyl chloride로 유도체화시키는 방법이 널리 사용되고 있으나, PUT에 있어서는 매우 낮은 감도를 보이는 단점이 있다.<sup>21</sup> HPLC-ECD는 산화-환원반응을 기초로 한 방법으로 신경과학 분야에서 널리 사용된다. 특히 파킨슨병의 진단에 있어서 카테콜아민류의 분석에 주로 HPLC-ECD가 사용되고 있다.<sup>46</sup> 그러나 평형에 이르는데 긴 시간이 요구되며, 수용성 고분자 물질의 검출에 적합하지 않은

단점을 가지고 있다.

### 2.5.3. 전기화학검출기(Electrochemical detector, ECD)

주요 신경전달물질인 카테콜아민류의 검출에 있어서 다양한 검출기가 사용되고 있으나, 이들 중 가장 널리 사용되는 검출기는 ECD이다. 이 검출기는 산화-환원반응의 특징을 가지고 선택적으로 검출할 수 있는 장점이 있다. 최근 DA의 검출에 있어서 탄소 나노튜브/키토산이 치환된 유리탄소전극(glassy carbon electrode modified with carbon nanotube/chitosan)이 높은 안정성과 우수한 감도를 가지고 있다고 보고되었다.<sup>84</sup> 또한 DA를 검출할 경우에 screen-printed electrodes를 사용하면 농축 전 극미량일 때도 검출이 가능하다. 따라서 소변이나 혈청에서의 일부 특정 카테콜아민 분석에 유용하게 쓰인다.<sup>85</sup> DA, E, NE를 검출할 때 유리탄소전극을 이용한 differential pulse stripping voltammetry를 사용하며 pH 6.4에서 모든 물질이 민감한 반응을 보인다.<sup>86</sup> DA, E, NE 검출 시 monolithic silica disk-packed spin column은 기존의 silica보다 시료 흡수력을 낮추며 미량의 분석 물질에도 반응하기 쉽기 때문에 생체시료 분석에 적합하다. 이는 ECD가 형광검출기보다 좋은 감도와 선택성을 보였다.<sup>87</sup>

### 2.5.4. HPLC-MS/MS (tandem mass spectrometry)

LC-MS는 일반적으로 HPLC에서 좋은 발색단을 가지지 않는 경우 사용하며 구조 확인에 있어서 용이하다. 또한 LC-MS는 빠르고 선택적이며 민감하고 좋은 감도를 가지는 장점이 있다. LC-MS/MS (tandem mass spectrometry)는 잘 알려지지 않은 대사체나 성분 분석이 애매한 경우 사용하며 시료 처리량과 감도 면에서 GC-MS보다 우수하다. 동위원소 희석(isotope dilution)법을 적용한 LC-MS/MS방법은 성분 정성 및 정량분석에 있어서 가장 적절한 방법으로 소개되었다.<sup>82</sup> LC-MS/MS로 적혈구 세포의 폴리아민을 분석하는데 널리 사용된다. 생체시료 중 극미량의 폴리아민을 dansylation시켜서 분석할 때, LC-MS/MS는 HPLC-FLD 또는 flow injection analysis(FIA)-MS 보다 더 좋은 분석결과를 보여 주었다.<sup>21</sup> 또한 LC-MS/MS 방법으로 폴리아민은 1 ng/mL의 정량한계를 보여준다.<sup>25</sup> 기존의 HPLC-ECD는 혈장 내 MN과 NMN을 분석할 때 HPLC-MS/MS보다 감도가 떨어지므로 HPLC-ECD보다는 HPLC-MS/MS를 사용하는 것이 유리하다. 기존의 검출 방법들은 많은 시간이 소요되며 시료를 전처리

하는데 번거롭지만 이 방법은 자동 시료 분석이 되도록 다루기 쉽고 짧은 시간이 소요되며 저렴한 편이다.<sup>88</sup> 이외에도 flow system에서 HPLC를 결합한 LC-NMR은 성분의 구조적 확인에 적용되었으나, 분리능과 감도에 있어서 아직 문제점을 가지고 있다.

UPLC-MS/MS는 2  $\mu\text{m}$  미만의 매우 작은 입자를 사용하여 분석물질을 분리하는데 있어 높은 피크 분리능을 보여주었다. 미세한 충전제를 사용하여 좋은 분리능과 감도를 가지며 고압으로 인해 분리속도가 매우 빠르다. 하지만 신경전달물질의 분석에는 드물게 쓰이고 있다. 현재 사용하는 방법들보다 분석 시간이 짧으며 작은 부피(5  $\mu\text{L}$ )의 시료를 가지고도 분석이 가능하다.<sup>30</sup> 이중 분석관이 연결된 HPLC-Q-TOF-MS (quadrupole-time of flight mass spectrometry)는 대사체 분석에 대한 많은 정보를 얻을 수 있으며 전체 이온 크로마토그램(total ion chromatogram, TIC)으로부터 분석 대상이 되는 이온 추출이 가능하다.<sup>40</sup> 추출이온크로마토그램으로부터 목적성분의 존재와 정량에 대한 정보를 매우 높은 감도로 얻을 수 있는 장점이 있다.

### 2.5.5. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC 분석에 앞서 카테콜아민과 그 대사체류의 아민기의 극성을 낮추고 휘발성을 증가시키기 위해서 유도체화 과정이 반드시 선행되어야 한다. 일반적으로 GC 화학 유도체화 방법은 자동화 immunoassays와 HPLC-ECD의 단점을 보완한 방법이다.<sup>38</sup> GC 분석 시 극성 작용기(-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH)에 있는 활성 수소를 막기 위하여 전처리를 하는데 이 과정은 폴리아민 구조에 있어서 부적합하기 때문에 폴리아민을 대상으로 분석할 때 잘 사용되지 않는다.<sup>25</sup> GC 분석 시 극성 작용기에 대한 감도가 낮고 시료 처리 단계와 분석시간이 길기 때문에 시료 처리량이 제한적이다. 하지만 유도체화가 가능한 물질은 정량·정성 분석을 할 때 높은 감도와 분리능을 나타내기 때문에 매우 널리 사용되고 있다.

과거에는 GC의 검출기로써 flame ionization detector(FID)를 많이 썼으나 최근에는 높은 감도를 가지며 분석 물질 확인에 유용한 질량분석법(MS)로 대체하고 있다. MS는 성분 분리에 용이하며 대부분의 유기 성분을 발견할 수 있고 비교적 높은 감도를 가지고 있다. 실제로 GC-TOF로 결합조직의 폴리아민을 분석하여 암을 진단한 경우도 있다. 분석 감도를 향상시킬 수 있는 선택이온모니터링을 사용한 분석법인 GC-MS-SIM 방법은 재현성과 감도에 있어 이점을 보여주었다.<sup>47</sup>

### 2.5.6. Capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS)

CE-MS는 시료 전처리 과정 거의 없이 1000개에서 2000개의 폴리펩티드를 검출할 수 있으며, 지질, 탄수화물, 염 등과 같은 물질들이 존재하면 분석하는데 문제점을 유발시키므로 주의해야 한다.<sup>89</sup> CE는 UV, MS, ECD와 같은 다양한 검출기에 연결시켜 사용한다. CE는 높은 감도를 얻기 위해 field-amplified sample injection (FASI)에 의한 온라인 시료 전 농축과정이 사용되기도 한다.<sup>90</sup> 그러나 FASI는 이전 농축한 시료를 통해 감도를 향상시켜주지만 기질의 염에 의해 방해받는데, 이를 줄이기 위해 SPE와 molecularly imprinted polymer (MIP)를 이용한다. 따라서 MIP-SPE와 FASI-CE-UV를 함께 사용하면 시료를 직접 사용하면서도 염의 방해 줄일 수 있기 때문에 소변 시료 내의 신경전달물질을 분석하는 좋은 방법이 될 것이다.<sup>91</sup>

### 2.5.7. 동속전기영동(Isotachopheresis, ITP)

ITP에 의한 분석에는 따로 전 처리방법이 필요하지 않다. 이는 ITP에서 동속 전기 영동법의 2차원 설정으로 인해 충전 되지 않은 매트릭스 화합물이 분사 밸브에 남아 있기 때문이다. 하지만 종종 시료의 농축이 필요한 경우도 있다. 이는 동속 전기 영동법과 모세관 구역 전기 영동법을 합친 ITP-CZE가 문제 해결을 위해 현재 시험되고 있다.<sup>43</sup>

## 3. 질병 진단을 위한 임상분석방법의 예

### 3.1. 크롬친화성세포종(pheochromocytoma)

크롬친화성세포종은 부신 수질의 신경내분비성 종양을 말한다. 이 종양은 크롬친화성 세포에서 발생되는 것으로 알려져 있다. 이 질환의 원인으로는 확실하게 알려진 것은 없으며, 전체 크롬친화성세포종의 약 25% 정도가 유전자 변이에서 비롯되었다고 한다. 질환과 직접적인 연관이 있는 유전자 5가지로는 RET, roto-oncogene, von Hippel-Lindau (VHL), neurofibromatosis type 1 (NF1), succinate dehydrogenase subunits D와 B (SDHD, SDHB)가 있다. 동반되는 증후로는 고혈압과 저혈압, 체온상승, 심부전, 심근증 등이 있다.

크롬친화성세포종의 특징은 정상보다 과도한 양의 카테콜아민과 HMMA (4-hydroxy-3-methoxymandelate), HVA와 같은 대사체를 많이 분비하는 것이다. 따라서 혈액이나 소변 등의 생체시료에서 HMMA와 HVA를

지표물질로 선정하여 검출한다.<sup>7,92</sup> 보다 정확한 진단을 위하여 24시간 동안 소변 시료를 채취하여 MN과 NMN, E와 NE, VMA, HVA의 농도를 측정하는 방법이 가장 널리 이용되고 있다. 혈액 중에는 MN과 NMN, E와 NE를 측정하는 방법이 널리 이용되고 있다. 이 방법은 HPLC-ECD, LC-MS/MS 및 GC-MS/SIM으로 시간에 따른 대사체의 변화량을 관측하여 진단한다. 그 외에 혈청 중의 chromogranin A (Cg A)의 농도를 측정하는 방법이 있는데,<sup>93</sup> 이는 Cg A가 종양 세포에 카테콜아민과 함께 저장되고 분비되기 때문이다. 그러나 감도가 낮고 검출 특이성이 떨어지기 때문에 임상에서 진단 방법으로는 사용되지 않는다. 덧붙여서 clonidine suppression test에서 정상인일 경우 clonidine에 의해 카테콜아민 생산이 감소하고 크롬친화성세포종 환자일 경우는 그 반응이 미미하다.

### 3.2. 신경아세포종(neuroblastoma)

신경아세포종은 5살 이하 아동에게서 유병률이 높은 종양 질환 중 하나이다. 이 종양은 인체 내에서 빠르게 퍼지며 다양한 부위에서 발병하는 특징을 가진다. 전체 신경아세포종 환자의 65%는 주로 복부와 부신에서 종양이 발생하며 아동들은 주로 목과 가슴에서 종양이 발생한다. 나이와 성별에 따라 예후를 보며 나이와 질병 단계에 따라 진단한다.<sup>94</sup> 신경아세포종은 카테콜아민 생합성 및 대사 이상과 밀접한 관계를 가지고 있다. 이 종양은 교감신경계에 기원을 두고 이를 반영하며 DA의 주요 대사체인 HVA, 그리고 E와 NE의 주요 대사체인 VMA가 이 질환에 관련된다. 또, 이 질환이 있으면 카테콜아민 물질대사가 활발해지기 때문에 소변에 HVA, VMA와 같은 대사체들이 많아진다.<sup>43</sup> 따라서 환자의 혈청과 소변에서 정상인에 비해 HVA, VMA와 같은 대사체들이 많이 분비되므로 신경아세포종의 진단에 편리한 지표로 쓰인다.<sup>95</sup> 또는 VMA, HVA, 5-HIAA를 신경아세포종의 생체지표로 쓰이기도 한다. 종양이 있는 경우 소변에서 VMA 농도는 정상인에 비해 매우 높았다.<sup>94</sup> 대체적으로 정상인과 환자 모두 HVA보다 VMA 농도가 더 낮았다.<sup>44</sup> 신경아세포종을 진단하는데 필요한 지표물질의 선정과 분석방법은 Table 2에 실었다.<sup>7,42-45,94</sup>

### 3.3. 멘케스병(menkes disease)

멘케스병은 체내 구리 수송 장애로 인해 퇴행성 신경병증이 생기는 X 염색체 연관 유전 질환이다.<sup>96</sup> 구리는 미량 원소로써 cytochrome C oxidase, superoxide

Table 2. Analysis of biogenic amines in urine of patients with neuroblastoma

Target	Instrument	Detection limit	Ref.
HMMA, 5-HIAA, HVA	HPLC-ECD	HMMA: 0.15 mol/L, 5-HIAA: 0.03 mol/L, HVA: 0.08 mol/L	[7]
VMA, HVA, DA	HPLC	-	[42]
VMA, HVA	ITP-ITP,HPLC-ECD	VMA: 3.7 $\mu$ mmol/L, HVA: 2.7 $\mu$ mmol/L	[43]
HVA, VMA	GC-FID	-	[44]
VMA, HVA, 5-HIAA	HPLC-MS	VMA: 0.001 mg/L, 5-HIAA: 0.015 mg/L, HVA: 0.050 mg/L	[45]
VMA	Ion-exchange chromatography	-	[94]

dismutase, lysyl oxidase, tyrosinase, DBH 등의 많은 효소 체계에서 필수적이는데, 구리가 결핍되어 이들 효소 체계에 기능 장애가 생기면 멘케스병에서 볼 수 있는 여러 임상 증상들이 생기게 된다. 그 중 cytochrome C oxidase의 기능 저하가 대부분의 신경학적 증상에 관련되어있다. 비경구 구리 히스티딘 요법으로 초기에 치료할 수 있지만 유아기에는 잘 나타나지 않아 진단이 어렵다. 구리 수송을 주관하는 유전자 P형인 ATP7A가 멘케스병의 원인 유전자로 확인되었는데, 구리 의존 효소의 활동이 저하되면 DA가 NE로 변하는 과정을 저해한다.

HPLC로 환자들의 소변을 분석한 결과, HVA/VMA 비율이 환자들에게는 4.1에서 69.7까지 다양한 범위로 나타났지만, 대체적으로 정상인에 비해 비율이 높은 편이었다.<sup>97</sup> 따라서 HVA와 VMA는 이 병을 진단하는데 중요한 지표 물질로 인식되고 있다.

### 3.4. 신경교종(neuroglioma)

신경교종은 뇌와 척수의 내부에 있는 신경교세포에서 기원하는 종양이다. 신경교종의 대부분은 주위 정상 조직을 침투하여 빠른 성장을 보이며, 수술로 완전히 제거하는 것이 어렵다. 신경교종은 종양을 구성하는 주된 세포에 따라 성상세포종, 핍지교세포종, 상의 세포종 등으로 분류된다. 신경교종을 진단할 때 폴리아민 농도를 측정하는 방법을 이용한다. 신경교종 환자를 진단하는데 있어서 적혈구세포 내 PUT, SPD, SPM을 LC-MS/MS로 분석하여 수행한 예가 있었다. 적혈구세포로부터 폴리아민의 지표물질을 추출한 후 유도체화 하여 GC, LC, HPLC로 확인을 해왔지만 주요 지표물질인 PUT에 대해서 감도와 정확성이 낮은 단점이 나타났다. 하지만 LC-MS/MS를 이용하여 적혈구 세포에 있는 PUT 검출감도를 높일 수 있었다. 진단에 있어서 일반적으로 환자의 폴리아민 중 SPD 농도가 특히 높았다.<sup>21</sup>

### 3.5. 암(cancer)

암이란 정상적이지 않은 세포가 불완전하게 성숙하거나 억제되지 않아 과다하게 증식하여 생기는 체내 혹 또는 덩어리를 말한다.<sup>98</sup> 종양조직은 빠르게 RNA의 증식을 유도하고, 폴리아민은 RNA polymerase의 활동과 RNA 대사과정을 증가시킨다. 이런 영향으로 PUT, CAD, 1,3-DAP, DiAcSPM과 같은 폴리아민이 종양조직에서 빠르게 증가한다.<sup>13</sup>

암을 진단하기 위한 일환으로 다양한 분석법이 적용되었다. 일례로 남성과 여성의 모발에 있는 폴리아민을 분석하였는데, 생체지표로는 PUT, SPD, SPM을 선정하여 GC-MS/SIM으로 분석하였다. 그 결과, 폴리아민 중 SPD가 가장 높은 농도로 검출되었고 다음으로 PUT, SPM 순이었다. 그리고 대체적으로 여성보다 남성에서 폴리아민 농도가 높았다.<sup>47</sup>

암 환자의 소변을 수집해 DAP, PUT, SPD, SPM, CAD, AcSPM을 생체지표로 하여 HPLC-Q-TOF-MS로 분석하였다. 전체적인 폴리아민의 농도는 암 환자에서 더 높게 나타났다. 그리고 환자의 소변 시료에서 PUT의 농도가 SPM의 농도보다 더 높았지만 정상인의 경우 그 반대였다.<sup>11</sup> 이러한 경향은 암환자의 조기 진단을 위한 지표물질의 정량분석에 있어 매우 중요한 의미를 갖는다. 암 환자의 혈장을 HPLC-FLD로 PUT, SPD, SPM, CAD를 분석하였다. 그 결과 암 환자의 SPD, SPM의 농도가 더 높게 나타났다.<sup>45</sup>

특히 유방암 환자를 대상으로 한 검사들이 많이 보고되었다. 유방암 환자와 결장암 환자 및 정상인의 소변과 혈청에 있는 DiAcSPD와 DiAcSPM을 ELISA 방법으로 분석한 결과 DiAcSPM이 DiAcSPD보다 민감하게 나타났다. DiAcSPD와 DiAcSPM은 기존의 지표인 carcinoembryonic antigen (CEA) 또는 carbohydrate antigen (CA) 15-3보다 많은 양이 검출되었다. 그 때문에 DiAcSPD와 DiAcSPM가 종양 지표로 더 유용하게 사용될 수 있을 것이다.<sup>22</sup> 또, 유방암 환자와 정상인의

소변과 혈청에서 폴리아민(1,3-DAP, PUT, CAD, *N*-AcPUT, *N*-AcCAD, SPD, AcSPD, AcSPM, SPM) 농도를 LC-MS/MS로 분석한 결과, 두 그룹 간 소변 내 폴리아민 농도의 차이는 크지 않아서 유방암 진단 시 소변 폴리아민의 중앙 지표로는 적절하지 않았다. 하지만 혈청에서 1,3-DAP, PUT, SPM, AcSPD의 농도는 유방암 환자의 농도가 정상인보다 높은 농도를 가져서 혈청 내 폴리아민 농도가 암 진단의 지표가 될 수 있다.<sup>25</sup> 유방암 환자 중 폐경기 전후와 수술 전후의 환자, 그리고 정상인의 폴리아민(1,3-DAP, PUT, CAD, *N*-AcPUT, *N*-AcCAD, SPD, *N*-AcSPD, SPM, *N*-AcSPM) 농도를 LC-MS/MS로 비교 측정할 경우도 있었다.<sup>27</sup>

### 3.6. 파킨슨병(Parkinson's disease)

파킨슨병은 뇌의 구조적 손상에 기인하여 가장 흔하게 발생하는 신경계 퇴행성 질환으로, 1817년 영국인 의사 James Parkinson이 처음으로 진전, 근경직 및 자세성 반사의 소실의 특징적인 증후군을 '진전마비(shaking palsy)'로 기술하면서 알려지게 되었다.

파킨슨병은 기저핵을 포함하는 신경계의 만성적이고 점진적인 질환으로 근 긴장의 장애, 비정상적 자세, 불수의 운동과 같은 증상을 나타낸다. 파킨슨병의 이러한 증상은 대뇌피질에서의 운동명령을 통합하고 근육의 움직임을 무의식적으로 조절하는 기저핵의 신경 변성으로 미상핵과 파각부위로 DA를 보내는 흑질 치밀부의 손상 및 파괴로 인한 DA의 감소가 주원인이라고 할 수 있다. DA의 감소가 일어나는 원인에는 생성 자체의 감소와 생성된 DA의 산화, 분해 등이 있다.

파킨슨병 환자의 뇌 조직 시료<sup>99</sup>와 소변 시료<sup>100</sup>는 DA가 산화된 강력한 도파민계 신경독인 oxidopamine (6-OHDA)을 포함하고 있다. 그리고 DA의 전구물질인 *L*-DOPA는 도파민의 감소를 치료하기 위해 이용된다. 이러한 치료를 받는 환자의 6-OHDA 농도가 정상인과 비교하여 증가되었다.<sup>101</sup> 6-OHDA 농도의 증가로 인하여 장기적인 *L*-DOPA를 이용한 치료는 심각한 부작용을 갖고 있으나, 현재로서는 다른 대안이 없는 실정이다.

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)으로 파킨슨병을 유발된 마우스의 뇌세포를 이용하여 DA, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), HVA를 분석하였다. 그 결과, 정상에 비해 DA, DOPAC, HVA 농도가 현저히 낮았다.<sup>8</sup> 그리고 또 다른 분석에서는 6-OHDA, DA, DOPAC, HVA를 분석한 결과, DA, DOPAC, HVA 농도는 파킨슨병에서 정상보다 낮은 농

도를 보였다. 그리고 파킨슨병이 유발된 마우스의 뇌세포에 *L*-DOPA를 주입했을 경우, 6-OHDA는 *L*-DOPA를 주입하지 않았을 때보다 높은 농도를 보였다.<sup>102</sup>

### 4.7. 알츠하이머병(Alzheimer's disease)

알츠하이머병은 베타 아밀로이드라는 독성 단백질이 뇌에 축적되면서 뇌신경세포가 점진적으로 소멸되는 병으로 서서히 발병하여 악화되는 특징적인 경과를 보인다. 사망한 알츠하이머병 환자의 뇌를 현미경으로 검경하면 베타 아밀로이드 단백질이 침착된 특징적인 노인반과 신경원섬유 농축이 관찰되는 것을 볼 수 있다. 최근 알츠하이머병은 베타 아밀로이드가 침착하여 생긴 노인성신경반과 타우단백질이 과인산화(hyperphosphorylation) 되면서 서로 결합한 신경섬유다발이 신경세포 손실을 일으키는 것으로 알려져 있다.

알츠하이머병과 카테콜아민의 관계는 1970년대에 알츠하이머병 환자의 뇌에서 카테콜아민의 변화를 연구한 것에서 시작된다. 그 결과 DA와 NE의 농도 평균치가 알츠하이머병 환자의 뇌에서 확연하게 낮았다는 것을 밝혀냈다.<sup>103</sup> 그리고 1983년에 카테콜아민과 콜린성효소를 측정할 결과에서 노르에피네프린 신경과 콜린성신경이 알츠하이머병에서 감소함을 찾았고, 결론적으로 카테콜아민의 농도가 정상인에 비해서 낮다는 것을 밝혔다.<sup>104</sup> 최근에 알츠하이머병 환자들의 혈장에서 카테콜아민의 대사를 측정하였다. 그 결과, 알츠하이머병 환자들의 시상하부에서 콜린성 시냅스 전 뉴런의 결핍을 나타냈다. 시상하부는 말초의 카테콜아민 대사에 중요한 역할을 하는데, 이러한 결핍으로 알츠하이머병 환자들은 카테콜아민 농도가 감소하였다.<sup>105</sup> 그 후 많은 문헌에서 혈장과 세포에서 카테콜아민 농도와 알츠하이머병의 깊은 연관성을 찾아냈다.<sup>105-115</sup>

알츠하이머병 환자들의 소변 시료를 HPLC-FLD로 분석한 사례를 살펴보면, 환자들에게서는 *L*-DOPA, DOPAC, DA, NE가 모두 정상인에 비해 현저히 낮은 농도를 보였다.<sup>116</sup> 또한 뇌척수액을 시료를 HPLC-ECD로 NE, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), DOPAC, HVA, 5-HIAA를 검출한 결과, 정상인에 비해 환자에서 더 낮은 농도로 검출되었다.<sup>117</sup>

## 4. 결 론

생체아민은 중추신경의 신경전달물질로써 심혈관

계에서부터 신경정신작용에 이르기까지 인체 전반에 두루 영향을 미치는 물질이다. 특히 카테콜아민의 대사체인 HVA, VMA는 크롬친화성세포종, 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 질환에서 생체시료 내의 농도가 변하기 때문에 생체지표로 임상에서 사용되고 있다. 또 폴리아민 중에 PUT, SPD, SPM은 각종 종양 질환과 관련이 깊은 생체지표인데, 주로 소변과 혈액 시료에서 매우 극미량으로 존재하고 있다. 따라서 이들 화합물의 정확한 분석을 위해서는 적절한 전처리 방법과 유도체화 방법이 필요하며, 각각의 분석기기가 가지는 특징을 고려하여 ELISA, HPLC, ECD, HPLC-MS/MS, GC-MS, CE-MS, ITP와 같은 적절한 분석 방법을 선택해야 한다.

특히 대사체 프로파일링 분석법은 심혈관계 질환, 당뇨, 치매, 암 등과 같은 질환에서 나타나는 비정상적인 대사 이상을 측정함으로써 병태생리학적 지표를 규명하는 연구에 널리 이용되고 있다. 그러므로 대사체 프로파일링 분석법은 질환의 진단뿐만 아니라 이를 활용하여 신약개발 관련 생체지표 발굴에 이용될 수 있으므로 그 가치가 높다고 할 수 있다.

앞으로는 신속하고 감도가 우수하며 경제적인 분석 기기의 발달과 더불어 질환의 증상이 발현되지 않는 초기상태에서의 조기진단을 가능케 하며, 질병 진단을 위한 생체지표로서 생체 아민의 중요성을 인식할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 고감도의 분석방법을 개발하여, 인체내 극미량의 생체아민 대사체의 프로파일링 분석을 함으로써 질환 진단의 유용성과 범위를 넓힐 수 있을 것이라고 예상된다. 프로파일링 분석법은 생체지표로서 생체아민 뿐만 아니라 스테로이드와 같은 내인성 물질의 대사이상으로 기인되는 쿠싱증후군(Cushing's syndrome), 콘중후군(Conn's syndrome) 등과 같은 다양한 질환의 조기진단에 활용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 한국연구재단(생체시료 중 생체아민 프로파일링기술개발, No. 2011-0012671)에 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. J. Harro and L. Oreland, *Brain Res. Rev.*, **38**, 79-128 (2001).

2. Y. J. Cho, M. J. Son, S. M. Kim, H. K. Park, H. K. Yeo and K. B. Shim, *J. Fish. Mar. Sci. Edu.*, **20**, 135-145 (2008).

3. A. R. Shalaby, *Food Res. Int.*, **29**, 675-690 (1996).

4. T. G. Rosano, T. A. Swift and L. W. Hayes, *Clin. Chem.*, **37**, 1854-1867 (1991).

5. Y. L. Wang, J. W. Wei and A. Y. Sun, *Neurochem. Res.*, **18**, 1293-1297 (1993).

6. M. M. Kushnir, F. M. Urry, E. L. Frank, W. L. Roberts and B. Shushan, *Clin. Chem.*, **48**, 323-331 (2002).

7. T. Manickum, *J. Chromatogr. B*, **877**, 4140-4146 (2009).

8. P. C. Chen, M. R. Vargas, A. K. Pani, R. J. Smeyne, D. A. Johnson, Y. W. Kan and J. A. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2933-2938 (2009).

9. M. M. Walther, H. R. Keiser and W. M. Linehan, *World J. Urol.*, **17**, 35-39 (1999).

10. N. W. Tietz, 'Textbook of Clinical Chemistry' Chap. 9, 997-1171 W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1986.

11. R. Liu, Y. Jia, W. Cheng, J. Ling, L. Liu, K. Bi and Q. Li, *Talanta*, **83**, 751-756 (2011).

12. F. Gaboriau, R. Havouis, J. P. Moulinoux and J. G. Delcros, *Anal. Biochem.*, **318**, 212-220 (2003).

13. U. Bachrach, *Plant Physio. Biochem.*, **48**, 490-495 (2010).

14. G. L. Patrick, 'An Introduction to Medicinal Chemistry' 4th Ed., 599, Oxford University Press, New York, USA, 2005.

15. D. H. Russell, *Nat. New Biol.*, **233**, 144-145 (1971).

16. D. H. Russell, C. C. Levy, S. C. Schimpff and I. A. Hawk, *Cancer Res.*, **31**, 1555-1558 (1971).

17. A. Lipton, L. M. Sheehan and G. F. Kessler Jr., *Cancer*, **35**, 464-468 (1975).

18. D. H. Russell, *Clin. Chem.*, **23**, 22-27 (1977).

19. S. Kubota, M. Okada, K. Imahori and N. Ohsawa, *Cancer Res.*, **43**, 2363-2367 (1983).

20. N. Uehara, S. Shirakawa, H. Uchino and Y. Saeki, *Cancer*, **45**, 108-111 (1980).

21. V. Ducros, D. Ruffieux, H. Belva-Besnet, F. de Fraipont, F. Berger and A. Favier, *Anal. Biochem.*, **390**, 46-51 (2009).

22. Y. Umemori, Y. Ohe, K. Kuribayashi, N. Tsuji, T. Nishidate, H. Kameshima, K. Hirata and N. Watanabe, *Clin. Chim. Acta*, **411**, 1894-1899 (2010).

23. T. N. Kolokolova, O. Y. Savel'ev and N. M. Sergeev, *J. Anal. Chem.*, **63**, 104-120 (2008).
24. W. H. A. de Jong, E. G. E. de Vries, B. H. R. Wolfenbuttel and I. P. Kema, *J. Chromatogr. B*, **878**, 1506-1512 (2010).
25. J. A. Byun, S. H. Lee, B. H. Jung, M. H. Choi, M. H. Moon and B. C. Chung, *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 73-80 (2008).
26. F. D. P. Ferreira, L. I. B. Silva, A. C. Freitas, T. A. P. Rocha-Santos and A. C. Duarte, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7049-7054 (2009).
27. J. A. Byun, M. H. Choi, M. H. Moon, G. Kong and B. C. Chung, *Cancer Lett.*, **273**, 300-304 (2009).
28. Y. H. Deng, H. S. Zhang, X. L. Du and H. Wang, *J. Sep. Sci.*, **31**, 990-998 (2008).
29. C. Zancanaro, A. Bolner and C. Righetti, *Dev. Neurosci.*, **23**, 107-112 (2001).
30. R. R. Gonzalez, R. F. Fernandez, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich and M. L. G. Prez, *J. Neurosci. Meth.*, **198**, 187-194 (2011).
31. M. Moreno, F. Canadas, D. Cardona, C. Sunol, L. Campa, M. C. Sanchez-Amate, P. Flores and F. Sanchez-Santed, *Toxicol. Lett.*, **176**, 162-167 (2008).
32. C. Brautigam, R. A. Wevers, R. J. T. Jansen, J. A. M. Smeitink, J. F. D. R. Andel, F. J. M. Gabreels and G. F. Hoffmann, *Clin. Chem.*, **44**, 1897-1904 (1998).
33. J. R. Strawn, N. N. Ekhatior and T. D. Geraciotti Jr., *J. Chromatogr. B*, **760**, 301-306 (2001).
34. G. Oze, G. Onyeze, S. Abanobi, O. Ojiako and O. Austin, *Eur. J. Med. Plants*, **1**, 98-106 (2011).
35. J. A. Starkey, Y. Mechref, J. Muzikar, W. J. McBride and M. V. Novotny, *Anal. Chem.*, **78**, 3342-3347 (2006).
36. X. Li, W. Jin and Q. Weng, *Anal. Chim. Acta*, **461**, 123-130 (2002).
37. Z. Huang and S. Zhang, *J. Chromatogr. B*, **792**, 241-247 (2003).
38. R. L. Taylor and R. J. Singh, *Clin. Chem.*, **48**, 533-539 (2002).
39. H. Siren, M. Mielonen and M. Herlevi, *J. Chromatogr. A*, **1032**, 289-297 (2004).
40. D. H. Thomas, J. D. Taylor, O. S. Barnaby and D. S. Hage, *Clin. Chim. Acta*, **398**, 63-69 (2008).
41. A. Kumar, J. P. Hart and D. V. McCalley, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 3854-3861 (2011).
42. V. Strenger, R. Kerbl, H. J. Dornbusch, R. Ladenstein, P. F. Ambros, I. M. Ambros and C. Urban, *Pediatr. Blood Cancer*, **48**, 504-509 (2007).
43. D. Flottmann, J. Hins, C. Rettenmaier, N. Schnell, Z. Kuci, G. Merkel, G. Seitz and G. Bruchelt, *Microchim. Acta*, **154**, 49-53 (2006).
44. S. Grkovic, R. Nikolic, M. Ordevic and L. Stojanov, *Indian. J. Clin. Biochem.*, **20**, 178-181 (2005).
45. L. Lionetto, A. M. Lostia, A. Stigliano, P. Cardelli and M. Simmaco, *Clin. Chim. Acta*, **398**, 53-56 (2008).
46. V. Najmanova, L. Rambousek, K. Syslova, V. Bubnikova, R. lamberova, K. Vales and P. Kacer, *Chromatogr.*, **73**, 143-149 (2011).
47. L. Li, K. Hara, J. Liu, Y. Yu, L. Gao, Y. Wang and Y. Wang, *J. Chromatogr. B*, **876**, 257-260 (2008).
48. D. R. Knapp, 'Handbook of Analytical Derivatization Reactions' 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, USA, 1979.
49. J. D. Shoemaker and W. H. Elliott, *J. Chromatogr. B*, **562**, 125-138 (1991).
50. I. Matsumoto and T. Kuhara, *Mass Spectrom. Rev.*, **15**, 43-57 (1996).
51. T. Kuhara, *J. Chromatogr. B*, **758**, 3-25 (2001).
52. T. Shinka, Y. Inoue, M. Ohse, A. Ito, M. Ohfu, S. Hirose, T. Kuhara, *J. Chromatogr. B*, **776**, 57-63 (2002).
53. P. Husek, *J. Chromatogr. B*, **669**, 352-357 (1995).
54. N. Domergue, M. Pugnieri and A. Previero, *Anal. Biochem.*, **214**, 420-425 (1993).
55. P. Husek, *J. Chromatogr. A*, **552**, 289-299 (1991).
56. M. T. Bowser and R. T. Kennedy, *Electrophor.*, **22**, 3668-3676 (2001).
57. C. H. Tsai, H. M. Huang and C. H. Lin, *Electrophor.*, **24**, 3083-3088 (2003).
58. S. Parrot, V. Sauvinet, V. Riban, A. Depaulis, B. Renaud and L. Denoroy, *J. Neurosci. Meth.*, **140**, 29-38 (2004).
59. H. M. Huang and C. H. Lin, *J. Chromatogr. B*, **816**, 113-119 (2005).
60. Z. Chen, J. Wu, G. B. Baker, M. Parent and N. J. Dovichi, *J. Chromatogr. A*, **914**, 293-298 (2001).
61. S. Xiong, H. Han, R. Zhao, Y. Chen and G. Liu, *Biomed. Chromatogr.*, **15**, 83-88 (2001).
62. J. Y. Zhang, X. G. Chen, Z. D. Hu and X. Ma, *Anal. Chim. Acta*, **471**, 203-209 (2002).

63. M. Du, V. Flanigan and Y. Ma, *Electrophor.*, **25**, 1496-1502 (2004).
64. H. Wang, J. Li, X. Liu, T. X. Yang and H. S. Zhang, *Anal. Biochem.*, **281**, 15-20 (2000).
65. X. Zhu, P. N. Shaw and D. A. Barrett, *Anal. Chim. Acta*, **478**, 259-269 (2003).
66. M. Tsunoda, K. Takezawa, M. Masuda and K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **16**, 536-541 (2002).
67. M. Tsunoda, K. Mitsuhashi, M. Masuda and K. Imai, *Anal. Biochem.*, **307**, 153-158 (2002).
68. Y. Hirano, M. Tsunoda, T. Funatsu and K. Imai, *J. Chromatogr. B*, **819**, 41-46 (2005).
69. M. Tsunoda and K. Imai, *Anal. Bioanal. Chem.*, **380**, 887-890 (2004).
70. M. Masuda, M. Tsunoda and K. Imai, *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 1069-1073 (2003).
71. H. Y. Wang, Q. S. Hui, J. G. Xu, L. X. Jiang, J. G. Jiang and Y. Sun, *Anal. Chim. Acta*, **497**, 93-99 (2003).
72. N. Simon, R. Myers, C. Bayle, M. Nertz, J. K. Stewart and F. Couderc, *J. Chromatogr. A*, **913**, 253-259 (2001).
73. K. Fujino, T. Yoshitake, J. Kehr, H. Nohta and M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A*, **1012**, 169-177 (2003).
74. T. Yoshitake, S. Yoshitake, K. Fujino, H. Nohta, M. Yamaguchi and J. Kehr, *J. Neurosci. Meth.*, **140**, 163-168 (2004).
75. T. Yoshitake, J. Kehr, S. Yoshitake, K. Fujino, H. Nohta and M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B*, **807**, 177-183 (2004).
76. J. Kehr, T. Yoshitake, F. H. Wang, D. Wynick, H. K. Holmberg, U. Lendahl, T. Bartfai, M. Yamaguchi, T. Hokfelt and S. O. Gren, *J. Neurosci. Meth.*, **109**, 71-80 (2001).
77. T. Yoshitake, K. Fujino, J. Kehr, J. Ishida, H. Nohta and M. Yamaguchi, *Anal. Biochem.*, **312**, 125-133 (2003).
78. S. Kundu, S. K. Ghosh, M. Mandal, A. Pal and T. Pal, *J. Indian Chem. Soc.*, **81**, 868-873 (2004).
79. M. A. Fotopoulou and P. C. Ioannou, *Anal. Chim. Acta*, **462**, 179-185 (2002).
80. I. A. Macdonald and D. M. Lake, *J. Neurosci. Meth.*, **13**, 239-248 (1985).
81. C. Sabbioni, M. A. Saracino, R. Mandrioli, S. Pinzauti, S. Furlanetto, G. Gerra and M. A. Raggi, *J. Chromatogr. A*, **1032**, 65-71 (2004).
82. R. T. Peaston and C. Weinkove, *Ann. Clin. Biochem.*, **41**, 17-38 (2004).
83. K. B. Kim and B. M. Lee, *Toxicol. Res.*, **25**, 59-69 (2009).
84. A. Babaei, M. Babazadeh and H. R. Momeni, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **6**, 1382-1395 (2011).
85. M. Moreno, A. S. Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, M. C. Rodriguez, Y. Jalit and G. A. Rivas, *Talanta*, **80**, 2149-2156 (2010).
86. Y. Ni, Y. Gui and S. Kokot, *Anal. Meth.*, **3**, 385-392 (2011).
87. M. Tsunoda, C. Aoyama, S. Ota, T. Tamura and T. Funatsua, *Anal. Meth.*, **3**, 582-585 (2011).
88. W. H. A. de Jong, K. S. Graham, J. C. van der Molen, T. P. Links, M. R. Morris, H. A. Ross, E. G. E. de Vries and I. P. Kema, *Clin. Chem.*, **53**, 1565-1567 (2007).
89. W. Kolch, C. Neusüß, M. Pelzing and H. Mischak, *Mass Spectrom. Rev.*, **24**, 959-977 (2005).
90. P. Diao, H. Yuan, F. Huo, L. Chen, D. Xiao, M. C. Paau and M. M. F. Choi, *Talanta*, **85**, 1279-1284 (2011).
91. B. Claude, R. Nehm and P. Morin, *Anal. Chim. Acta*, **699**, 242-248 (2011).
92. S. G. Waguespack, T. Rich, E. Grubbs, A. K. Ying, N. D. Perrier, M. Ayala-Ramirez and C. Jimenez, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**, 2023-2037 (2010).
93. D. Cotesta, C. Caliumi, P. Ai, L. Petramala, M. G. Reale, R. Masciangelo, A. Signore, R. Cianci, E. D'Erasmus and C. Letizia, *Tumori*, **91**, 53-58 (2005).
94. S. T. Bolkar, M. S. Ghadge and A. S. Raste, *Indian J. Clin. Biochem.*, **23**, 293-295 (2008).
95. N. K. V. Cheung, S. L. Cohn, 'Neuroblastoma', 7-20, SpringerVerlag, New York, USA, 2005.
96. D. M. Danks, P. E. Campbell, B. J. Stevens, V. Mayne, E. Cartwright, *Pediatrics.*, **50**, 188-201 (1972).
97. M. Matsuo, R. Tasaki, H. Kodama and Y. Hamasaki, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **28**, 89-93 (2005).
98. <http://www.cancer.go.kr>.
99. H. C. Curtiusa, M. Wolfensbergera, B. Steinmanna, U. Redweika and J. Siegfrieda, *J. Chromatogr.*, **99**, 529-540 (1974).
100. R. Andrew, D. G. Watson, S. A. Best, J. M. Midgley, H. Wenlong and R. K. H. Petty, *Neurochem. Res.*, **18**, 1175-1177 (1993).
101. A. H. V. Schapira, M. Emre, P. Jenner and W. Poewe,

- Eur. J. Neurol.*, **16**, 982-989 (2009).
102. A. Borah and K. P. Mohanakumar, *Neurochem. Int.*, **56**, 357-362 (2010).
103. R. Adolfsson, C. G. Gottfries, B. E. Roos and B. Winblad, *Br. J. Psychi.*, **135**, 216-223 (1979).
104. C. M. Yates, J. Simpson, A. Gordon, A. F. J. Maloney, Y. Allison, I. M. Ritchie and A. Urquhart, *Brain Res.*, **280**, 119-126 (1983).
105. H. Umegakia, N. Tamaya, T. Shinkai and A. Iguchi, *Exp. Gerontol.*, **35**, 1373-1382 (2000).
106. H. Arai, K. Kosaka and R. Iizuka, *J. Neurochem.*, **43**, 388-393 (1984).
107. I. Bergman, G. Brane, C. G. Gottfries, K. G. Jostell, I. Karlsson and L. Svennerholm, *Psychophar.*, **80**, 279-283 (1983).
108. K. J. Reinikainen, H. Soininen and P. J. Riekkinen, *J. Neurosci. Res.*, **27**, 576-586 (1990).
109. D. Storga, K. Vrecko, J. G. D. Birkmayer and G. Reibnegger, *Neurosci. Lett.*, **203**, 29-32 (1996).
110. J. E. Ahlskog, R. J. Uitti, G. M. Tyce, J. F. O'Brien, R. C. Peterson and E. Kokmen, *J. Neurol. Sci.*, **136**, 162-168 (1996).
111. H. Umegaki, H. Ikari, H. Nakahata, J. Yoshimura, H. Endo, T. Yamamoto and A. Iguchi, *Brain Res.*, **858**, 67-70 (2000).
112. E. C. Petrie, E. R. Peskind, D. J. Dobie, R. C. Veith and M. A. Raskind, *Psychoneuro.*, **26**, 147-164 (2001).
113. W. J. Burke, S. W. Li, H. D. Chung, D. A. Ruggiero, B. S. Kristal, E. M. Johnson, P. Lampe, V. B. Kumar, M. Franko, E. A. Williams and D. S. Zahm, *Neurotoxicol.*, **25**, 110-115 (2004).
114. R. P. Elaine, D. Wingerson, M. Pascualy, L. Thal, R. C. Veith, D. M. Dorsa, S. Bodenheimer and M. A. Raskind, *Biol. Psychi.*, **38**, 532-538 (1995).
115. M. C. Craig and D. G. M. Murphy, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, **23**, 53-61 (2009).
116. L. Liu, Q. Li, N. Li, J. Ling, R. Liu, Y. Wang, L. Sun, X. H. Chen and K. Bi, *J. Sep. Sci.*, **34**, 1198-1204 (2011).
117. S. Engelborghs, E. Vloeberghs, N. Le Bastard, M. Van Buggenhout, P. Marie, N. Somers, G. Nagels, B. A. Pickut and P. P. De Deyn, *Neurochem. Int.*, **52**, 1052-1060 (2008).