

Analytical trends in mass spectrometry based metabolomics approaches of neurochemicals for diagnosis of neurodegenerative disorders

Na-Kyeong Lee, Won-Jei Jeon, Seung-Woo Jeong, Jae-Sung Byun, Wonwoong Lee, and Jongki Hong[★]

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

(Received October 14, 2017; Revised December 6, 2017; Accepted December 9, 2017)

퇴행성신경질환의 진단을 위한 신경전달물질 대사체의 질량 분석법 동향

이나경 · 전원제 · 정승우 · 변재성 · 이원웅 · 홍종기[★]

경희대학교 약학대학

(2017. 10. 14. 접수, 2017. 12. 6. 수정, 2017. 12. 9. 승인)

Abstract: Because neurochemicals are related to homeostasis and cognitive and behavioral functions in human body and because they enable the diagnosis of numerous neurodegenerative disorders, there has been increasing interest in the development of analytical platforms for neurochemical profiling in biological samples. In particular, mass spectrometry (MS)-based analytical methods combined with chromatographic separation have been widely used to profile neurochemicals in metabolic pathways. However, development of delicate sample preparation procedures and highly sensitive instrumental detection is necessary considering the trace levels and chemical instabilities of neurochemicals in biological samples. Therefore, in this review, analytical trends in MS-based metabolomics approaches to neurochemicals in multiple biological samples, such as urine, blood, CSF, and biological tissues, are discussed. This paper is expected to contribute to the development of an analytical platform to discover biomarkers that will aid diagnosis, prognosis, and treatment of neurodegenerative disorders.

요 약: 신경전달물질(neurochemicals)은 인체 내의 항상성유지와 인지 및 행동기능에 관여하므로 수많은 퇴행성신경질환 진단에 활용할 수 있어 생물학적 시료 내에서 신경화학물질을 프로파일링할 수 있는 분석플랫폼 개발에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히, 크로마토그래피 분리법과 결합된 질량분석법 기반의 분석법은 대사경로 내의 신경전달물질을 프로파일링하는 데 널리 사용되어 오고 있다. 하지만 생물학적 시료내 신경전달물질은 극미량으로 존재하며 화학적으로 불안정한 특징이 있어 정교한 시료전처리 과정과 고감도의 기기분석법의 개발이 수반되어야 한다. 따라서 본 총설 논문에서는 소변, 혈액, 뇌척수액과 생체조직과 같은 다양한 생물학적 시료에서 신경전달물질에 대한 질량분석법 기반의 대사체학 접근법의 분석 연구 경향에 대해서 논의할 예정이다. 이 논문은 향후 퇴행성신경질환의 진단, 예후예측과 치료를 가능하게 하는 생체지표물질을 발굴을 위한 분석플랫폼 개발에 기여할 것으로 기대된다.

Key words: neurochemicals, profiling analysis, chromatographic separation, mass spectrometry, metabolomics approach

[★] Corresponding author

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

E-mail : jhong@khu.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

신경전달물질 (neurochemicals; neurotransmitters and neuromodulators)은 일반적으로 신경세포 시냅스 (synapse) 간극에서 뉴런 (neuron) 사이의 의사소통을 가능하게 하는 화학메신저그룹을 총칭한다.¹ 이 중 아미노산계인 γ -아미노부티르산 (gamma-amino butyric acid, GABA)²은 중추신경계 (central nervous system, CNS)에서 저해성 신경 전달기능을 갖는 아미노산으로 글루타메이트 (glutamate, Glu) 및 아스파테이트 (aspartate, Asp)와 같이 광범위한 신경 네트워크에 작용하는 흥분성 신경 자극성 화합물³과는 대조적인 역할을 수행한다. 트립토판 (tryptophan, Trp)에서 유래된 모노아민인 세로토닌 (serotonin, 5-HT)은 기억, 학습, 수유, 수면 및 체온 조절과 같은 생리기능에 관여하며 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)과 같은 신경퇴행성 질환에도 관련되어 있다고 알려져 있다.³ 또한 카테콜아민 (catecholamine, CA)과 같은 다른 모노아민들 즉 도파민 (dopamine, DA), 에피네프린 (epinephrine, E), 노르에피네프린 (norepinephrine, NE)은 모두 티로신 (tyrosine, Tyr)과 페닐알라닌 (phenylalanine, Phe)의 대

사과정에서 유래한 것으로 신경전달에서 중요한 역할을 수행하는 화합물이다. 앞서 언급한 모노아민들의 대사경로는 Fig. 1(A)에 도식화하였다. 이 CA은 알츠하이머병 및 파킨슨병 (Parkinson's disease)의 병인기전^{4,5}과 관련되어 있어 진단 및 치료에 중요한 역할을 할 것으로 기대되고 있다. 그밖에 이러한 신경퇴행성질환들은 콜린성 신경계 (cholinergic neuron)의 기능장애와도 연관되어 있어 신경활성 분자로 처음 발견되었으며 Fig. 1(B)에 나타난 콜린성 신경전달물질의 대사경로 내의 주성분인 아세틸콜린 (acetylcholine, ACh)과도 관련이 있을 것으로 예상된다.^{3,6}

1.1. 신경전달물질 대사이상과 신경계 질환

말초 신경계 (peripheral nervous system, PNS)와 CNS의 신경매개의 기본은 신경전달물질의 교환이다. 신경세포로부터의 자극은 신경전달물질, 즉 아미노산, 펩티드 및 모노아민의 분자들을 통해 전달된다.⁷ 현재 100 가지 이상의 신경전달물질이 알려져 있는데⁸ 신경생리학 관점에서 가장 중요하다고 여겨지는 신경전달물질은 ACh (알츠하이머병 및 근무력증), DA (파킨슨병)이며, Fig. 1(C)와 같은 대사경로가 밝혀진 Glu와

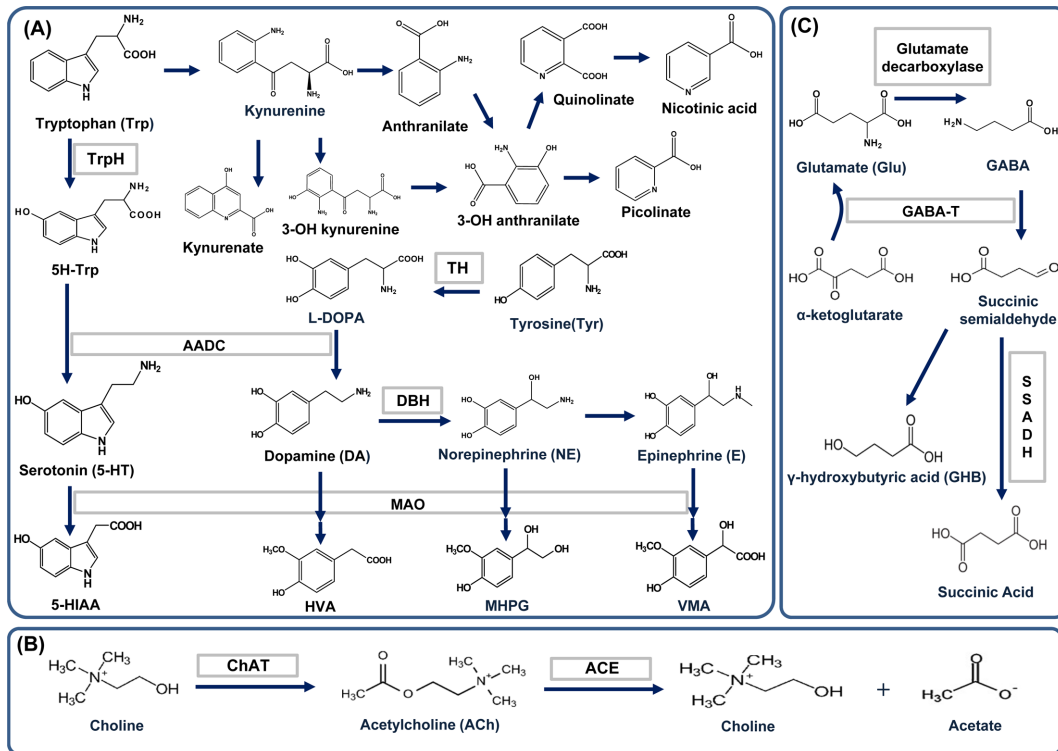


Fig. 1. Metabolic pathways of principal neurochemicals: (A) monoamines, (B) acetylcholine, and (C) glutamate and GABA.

GABA(간질 및 발작) 및 5-HT(우울증)이다.^{9,10} 또한 주요 신경전달매개체 중 하나인 DA를 포함한 CA계열의 신경전달물질은 Phe과 Tyr의 아미노산 전구체로부터 DA, E, NE를 비롯한 각종 대사체로 구성되어 있다.¹¹ 신경전달물질의 대사 장애와 관련된 질병은 (1) 신경세포의 점진적인 소실과 CA 및 대사산물의 신체 내 농도 감소로 인한 신경퇴행성 장애 및 (2) 시상하부의 기질병변 또는 유전적 결함으로 인한 CA의 과도한 합성에 의한 신경내분비 장애의 두 가지 주요 그룹으로 나눌 수 있다.⁹ (1)의 대표적인 예로는 파킨슨병과 알츠하이머병을 들 수 있다. 다이하이드록시페닐알라닌(dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)과 DA 간 그리고 NE과 E간의 비을 감소와 같은 CA류의 대사과정 내에서 전구체로부터의 생합성이 유의한 수준으로 감소되는 현상을 체액 중에서 규명이 가능하도록 돕는 분석법의 개발은 초기 단계에서 파킨슨병의 진단과 우울증을 구분하는 데에 도움을 줄 것으로 보고되었다.¹² 또한 알츠하이머병 환자의 사후 뇌조직 연구를 통해 NE성 및 5-HT성 뉴런이 사멸되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 이유로 다양한 뇌 영역에서 NE, 5-HT 및 이들의 대사산물 농도가 변화하며 이러한 호르몬의 생합성 감소는 소변 및 혈액과 같은 체액의 농도에 영향을 준다고 알려져 있다.¹³ 즉 CA계열인 E, NE과 그 대사산물은 알츠하이머병과 파킨슨병의 진단마커로 작용할 수 있다. 반면 크롬친화세포종(Pheochromocytoma)은 부신에서 크롬친화성 조직으로부터 발생하거나 교감 신경절 또는 부교감 신경절을 따라 여분의 부신 종양(기능성 대장 종양)으로 인해 발생하는 CA생성 종양으로 과도한 CA분비를 유발한다고 알려져 있으며 이로 인하여 고혈압, 두통, 심계항진 등의 내분비 장애가 유발된다.^{12,14,15} 따라서 CA류는 질병진행 과정에서 농도가 변화하기에 퇴행성신경질환의 주요한 바이오마커로 사용할 수 있다.⁹

생체 내 5-HT의 농도가 낮아지면 우울, 편두통, 양극성 장애 및 불안과 같은 여러 질병과 관련되어 있다.^{16,17} 동물실험에서 DA를 주입하면 뇌의 5-HT 농도는 감소하는 것으로 보고되었다.¹⁸ DA 전구체인 L-DOPA는 다른 뉴런의 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)을 증가시키고 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA)을 감소시키는 반면, 반대 효과는 5-HT 전구체인 5-hydroxy-Trp (5-HTP)에 의해 유도된다.¹⁹ 임상 결과에 따르면, 외인성의 L-DOPA로부터 합성된 DA는 5-HT의 합성에 관여하는 효소를 저해하여 5-HT의 분비를 억제한다

고 한다.^{20,21} 따라서 DA와 5-HT를 동시에 측정할 수 있는 분석법 개발은 중요한 의미를 가지고 있다.²²

ACh은 뇌 콜린성 뉴런과 신경절후 부교감신경 및 콜린성교감신경, 말초신경, 그리고 교감절전신경섬유와 부교감절전신경섬유 모두에서 작용하는 주된 신경전달 물질로 알려져 있다.²³ 또한, 췌장 알파세포,²⁴ 내피세포,²⁵ 태반세포와 같은 다양한 말초세포가 비신경성 ACh을 발현하는 것으로 밝혀졌다.²⁶ 다중 수용체, 효소 및 운반체로 인한 콜린성 대사이상의 불균형은 다양한 질병을 유발할 수 있다.²⁷ 예를 들어, 중증 근무력증, 쇼그렌 증후군, 천식 및 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)의 발병 기전에 콜린성 관련이 분명히 나타나며 이들의 가능한 치료 방법은 콜린성 대사과정의 균형을 회복시키는데 목적이 있다.²⁷ 따라서 콜린성 대사과정을 조절하고 그 효과를 측정하는 신뢰할만한 방법, 더 구체적으로 말해서 콜린성 대사과정의 불균형으로 인한 각종 질병을 구별하기 위한 바이오마커 발굴에 많은 노력을 기울이고 있다.²⁸ 신경전달물질은 다수의 조절계와 신진대사 과정에 관여하므로²⁹ 여러 신경내분비 및 심혈관 질환의 진단, 치료 및 예후를 위한 바이오마커로서 중요한 역할을 갖는다.³⁰ 예를 들어 파킨슨병은 불충분한 DA 신경전달과 관련이 있으므로³¹ 체액 및 조직에서 CA 농도를 측정하는 것은 의심의 여지없이 유용하며 이러한 화합물의 추출, 분리 및 정량에 대한 신뢰할 수 있는 생체 분석 방법의 개발이 필요하다.³² 또한, CA 대사산물을 정량화하는 것도 중요한데 신경전달물질의 전구체를 함께 측정했을 때 질병 발달 및 치료 효과에 대한 고유한 정보를 제공할 수 있기 때문이다.³² 예를 들어 뇌척수액(cerebrospinal fluids, CSF)에서 DA의 주요 대사산물인 homovanillic acid (HVA)의 농도는 중추 신경계의 DA성 경로에 간접적인 바이오마커로 작용할 수 있다.³³ 신경전달물질의 생리적 수준은 생합성 및 대사 효소의 활성과 농도에 영향을 받기 때문에 생체아민과 관련 전구체와 대사산물은 동시에 정량분석하는 것이 이상적이다.³⁴ CA은 생물학적 시료에 아주 낮은 농도로 존재하며, 매우 민감하고 특이적인 생물 분석 방법을 요구한다.³⁵ 또한, 화학적으로 불안정하며, 자발적인 산화가 일어나기 쉽고 높은 pH 수준에서 쉽게 분해된다.^{36,37} 그러므로 이러한 신경전달물질 분석법 개발 연구의 필요성과 중요성에 대한 인식은 계속 높아지고 있으며 이미 십 수년 이상 신경전달물질의 분석기법을 지속적으로 개발 중에 있다.

1.2. NMR과 MS의 특성

신경전달물질 분석법의 가장 초기의 기술 중에는 방사선효소분석, 면역학적 분석법이 있었으나 최근에는 고속액체크로마토그래피법(high performance liquid chromatography, HPLC)같은 보다 고감도이며 선택적인 크로마토그래피 방법과 형광,³⁸ 전기화학(electrochemical detection, ECD)검출법,³⁹ 자외선흡광법,⁴⁰ 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis, CE),⁴¹ 질량 분석법(mass spectrometry, MS)⁴²이 이를 대체하게 되었다.

대사체학 연구에서 가장 널리 사용되고 있는 분석법은 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR)분광법과 질량분석법이다.^{43,44} NMR은 복잡한 체액에 존재하는 광범위한 대사체(수소 및 탄소를 함유한 유기 대사산물)를 마이크로 몰 농도수준에서 비교적 정확하게 검출 및 정량을 할 수 있는 분석 장비이다. NMR은 전처리 시간이 짧고 조작과정이 간단하여 시료 “전체”에 대한 분석이 가능하여 샘플을 손상시키지 않고 분석할 수 있는 장점이 있다.

헌팅톤병(Huntington's Disease) 생쥐 모델 연구,⁴⁵ 외상성 뇌 손상의 쥐 모델에서 조직 및 혈장에 대한 연구⁴⁶와 정신 분열증 환자의 연구를 포함한 CNS 장애에서 NMR을 이용한 대사체학 접근법에 대한 연구 결과가 보고된 바 있다.^{47,48}

이에 반해 MS 기반 접근법은 조직 또는 체액에 존재하는 다양한 화합물을 정성 및 정량화가 가능한 고감도의 분석 장비를 이용하여 검출하는 보편적인 분석법이다.⁴⁹ 질량분석법을 활용한 검출에 앞서 일반적으로 복잡한 생체시료에서 기인하는 내인성의 대사체들을 분리하기 위하여 크로마토그래피법을 사용하여 분리한다. 대개의 경우 기체 크로마토그래피법(gas chromatography, GC) 또는 액체 크로마토그래피법(liquid chromatography, LC)과 질량분석기법을 결합하여 대사체를 검출한다. CNS 장애 대사체 연구를 위한 MS의 사용은 아미노산과 유기산, 지방산, 당(sugar), 당-인산염(sugar phosphates), 담즙산(cholic acids), 지질(lipids) 및 뉴클레오티드 염기(nucleotide base)를 포함하는 다양한 대사산물을 생리적 농도 수준에서 검출이 가능한 장점이 있다. MS는 알려진 대사산물뿐만 아니라 새로운 대사산물을 비교적 간단하게 식별할 수 있다. 이것은 주로 분자의 정확한 분자량(exact molar mass)을 측정하거나 탄뎀 질량분석기 등을 이용하여 MS/MS spectra에 나타난 모분자 이온으로부터 쪼개진 조각이온을 조사하여 분자 구조를 추론함

으로써 가능하다.⁴⁸ 지난 10년 동안 대사체 프로파일링을 위한 질량분석법의 사용은 크로마토그래피 분리법의 발전과 검출기 감도의 향상으로 인해 증가되었다. MS 이전에 분리 단계로 사용되는 크로마토그래피는 하위분류 대사산물(극성 대 비극성, 고분자량 또는 저분자량 등)에 따른 다양한 분리기법이 개발되었다.⁵⁰

NMR의 경우는 빠르고, 비파괴적이며 추출물에 있어서는 자동화된 분석을 할 수 있고, 다양한 대사체를 정량적으로 검출이 가능하다. 그러나 NMR은 검출감도의 단점과 정량 농도에 직선성 한계가 있으며,⁵¹ 함량이 적은 시료의 경우는 분석하기 어려운 단점이 있다.⁵² 그에 반해 MS는 미량시료에 대해서 고감도 분석이 가능하고 고분해능의 질량분석기와 탄뎀 질량분석기법을 활용하여 얻어진 분자이온으로부터 구조를 밝히는데 유용하다.⁴⁸ 신경전달물질의 MS 기반 대사체 분석법 중 GC-MS, LC-MS, 및 capillary electrophoresis-MS (CE-MS)와 같은 크로마토그래피법과 연계된 분석법이 가장 많이 활용되고 있다.⁵² 본 논문에서는 생체시료(체액 및 조직)로부터 질량분석기법을 바탕으로 주요 신경전달물질의 대사체학적 접근방법에 대한 연구동향을 소개하고 퇴행성신경질환을 비롯한 신경계 질환의 진단, 치료, 예후 예측을 위한 바이오마커 발굴 현황을 조사하여 이와 관련된 연구 개발을 위한 최신 분석법을 고찰하였다.

2. 시료 전처리 방법

2.1. 생체 체액 시료 (biological fluids)

생체 체액 시료에는 임상분야에서 다양한 의학적 검사를 위해 채취하는 혈액, 소변 등을 비롯하여 뇌척수액 등이 있다. 생체시료에 존재하는 미량의 분석물질 검출을 방해할 수 있는 많은 성분이 함유되어 있으므로 최대한 방해성분을 제거하여야 신뢰성 높은 분석결과를 얻을 수 있다.

일반적으로 혈액 등의 생체액 시료는 다양한 내인성 물질들이 존재하므로 이를 제거할 수 있는 정제 방법과 적절한 시료 전처리가 수행되어야 한다.^{53,54} 주로 사용되는 시료전처리 방법으로는 단백질 침전법(protein precipitation, PP),⁵⁵⁻⁵⁹ 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE),⁶⁰⁻⁶⁶ 고체상추출법(solid phase extraction, SPE)⁶⁷⁻⁷⁰ 등이 있으며 그 외에도 초음파추출기를 이용한 시료 추출법^{65,66,71}과 이동상 용매로 희석하여 분석방해요인의 영향을 감소시키는 방법^{57,72,73}도 보고되었다. 그 중 고체상추출법은 분석대상성분에

대한 흡착력이 뛰어난 흡착제(sorbent)가 충전 되어 있는 카트리지에 시료를 주입한 뒤 적절한 세척용액을 사용하여 내인성의 분석 방해 요인들을 효과적으로 제거하고 특정 분석대상 성분만 선택적으로 용출시켜 검출하는데 사용되고 있다. 이 방법은 분석대상성분의 이화학적 성질이 유사할 경우 높은 정제효율과 회수 효율을 가지며 용출액의 용매를 농축하는 과정이 포함 되면 고감도의 분석이 가능하다는 장점이 있다.^{68-70,74-76} 대표적인 고체상 추출법의 카트리지(cartridge) 충전제로 옥타데실기 결합 실리카겔(octadecylsilane, ODS, C18), 극성폴리머, 활성탄을 사용하며, 막(membrane) 형태, 섬유질(fiber)에 고체상을 피막화한 고체상 마이크로 추출(solid phase microextraction, SPME) 등이 있다.^{54,78}

이외에도 혈액을 비롯한 생체 시료 내에 유리되어 있는 수용성 단백질을 제거하기 위하여 소수성의 유기용제를 첨가하거나 pH를 변화시켜 시료 내 단백질의 용해도를 낮춤으로써 단백질을 침전시켜 제거하는 단백질 침전법은 생체 체액 시료에 포함되어있는 단백질을 간단히 침전시켜 분석대상 성분만을 효과적으로 추출하기 위해 광범위하게 사용하기도 한다.^{55-59,67,79-82}

2.1.1. 혈액 시료 (blood; plasma; serum)

혈액은 인체의 모든 장기 및 조직에 필요한 영양분, 호르몬, 대사체를 운반하므로 체내 조직기능의 항상성이 벗어나거나 대사이상이 발생될 경우 다양한 질환이 발생될 수 있으며 혈액 내에 포함된 다양한 대사체 양의 변화를 야기시킨다.^{1,59} 따라서 현재에도 혈액을 구성하고 있는 화학 성분을 분석함으로써 다양한 질환에 대한 진단이 가능하고, 진단이 어려운 질환에 대하여 적용하여 향후 진단 및 예후에 대한 예측도 가능해질 것으로 보고 있다.^{9,37,53} 혈액은 혈장 혹은 혈청으로 분리되는데 혈장은 혈액에서 적혈구와 백혈구, 혈소판 등 혈구세포를 제외한 액체성분을 말하며 이러한 혈장에서 피브리노겐을 제거하면 혈청이 된다. 혈액은 분석방해요인에 대한 영향을 최소화하기 위하여 일반적으로 원심분리 과정이나 기타 시약의 처리를 통하여 혈장 혹은 혈청 상태에서 분석에 적용한다.^{61,84}

쥐의 혈장 시료에서 간단한 단백질 침전법을 이용하여 Trp, Phe, Tyr, indole-3-acetic acid (IAA), hippuric acid (HA), phenaceturic acid (PA), Glu, succinic acid (SA), GABA와,⁵⁵ DA, NE, 5-HT, 5-HIAA, HVA, GABA, Glu,⁵⁶ 그리고 사람의 혈장 시료에서 valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile), methionine (Met), Trp, 5-HT, 5-HIAA, kynurenine (Kyn), 3OH-Kyn, kynurenic acid (KA),

Phe⁵⁷와 같은 다양한 신경전달물질의 분석을 수행하기도 하였다. 혈청의 특성상 혈액응고인자가 제거되어있어 분석에 방해가 되는 단백질을 제거하고 필요 성분만을 추출하는 기타 시료전처리 방법보다 널리 사용되었다.^{59,85} 최근에는 단백질 침전법을 이용하여 쥐의 혈청시료로부터 5-HT, GABA, DA, NE, E, histamine (Hist)를 비롯하여 아미노산 및 그 대사체 31 종을 분석한 결과가 보고되기도 하였다.⁵⁹

고체상 추출법으로는 쥐와 미니돼지의 혈장 시료와 쥐의 소변 시료 내에서 E, NE, DA 검출을 위해 Oasis WCX SPE 카트리지를 사용이 보고되었다.⁶⁸ 보고된 결과 중에서 시린지를 이용하여 소형화된 고체상 추출법인 microextraction by packed sorbent (MEPS)를 이용하여 사람의 혈장 시료 내에서 5-HIAA, HVA, DOPAC, 3-methoxy tyramine (3-MT), 5-HT, DA, E, Trp, NE, 5-hydroxy tryptophan (5-HTp), Tyr, L-DOPA를 분석한 결과가 보고되었다.⁸⁶ 여기서 사용된 MEPS는 기존의 SPE 컬럼과 동일한 흡착제를 사용하지만 기존 SPE 카트리지와는 달리, 저공극의 MEPS 흡착제 베드를 적은 양의 시료 조작이 가능한 액체 취급 주사기에 통합되어 있다. 이로 인해 시료가 고체 지지체를 통과할 때 분석물은 바늘에 채워진 고체상에 흡착되고 이후 세척 및 용리과정은 일반적인 SPE의 원리를 바탕으로 하고 있어 기존의 SPE에서 MEPS로 전환하여 적용하는 것은 비교적 간단하다. 또한 MEPS는 시약 및 시료 용량을 줄임으로써 대부분의 기존 SPE 방법과 함께 사용하기에 적합하다. SPE와 차이점은 MEPS는 중성자를 포함한 다양한 분석 물질을 동시에 추출 할 수 있는 소형화 SPE로 일반적인 SPE 카트리지의 위에서 아래로 향하는 단방향의 용액 흐름으로 인해 일회성인 데에 비해서, MEPS는 상하에 의한 양방향이므로 여러 번 재사용할 수 있는 장점이 있다. 이러한 이유로 MEPS는 세척 및 용리 단계의 최적화가 중요하다. 일반적인 MEPS의 과정은 Fig. 2(A)에서 보여지듯이 왼쪽 고체 충전용 흡착제 약 2 mg을 마개(100-250 μ L) 또는 마개와 바늘 사이에 카트리지로 포장하고, 시료 채취 및 농축은 포장된 흡착제에서 수행된다. 이 기술은 다음 두 부분으로 구성된 단일 장치에서 시료 추출, 사전 농축 및 세척을 결합한다. MEPS 주사기 및 MEPS 카트리지는 BIN (barrel insert and needle)이라고도 하는데 BIN에는 시료가 통과하여 주사기 바늘에 내장되어있을 때 표적 분석대상성분을 보유하는 견고한 지지대인 포장된 MEPS 베드가 들어 있다. BIN은 100 μ L 또는 250 μ L 기밀 MEPS 주사

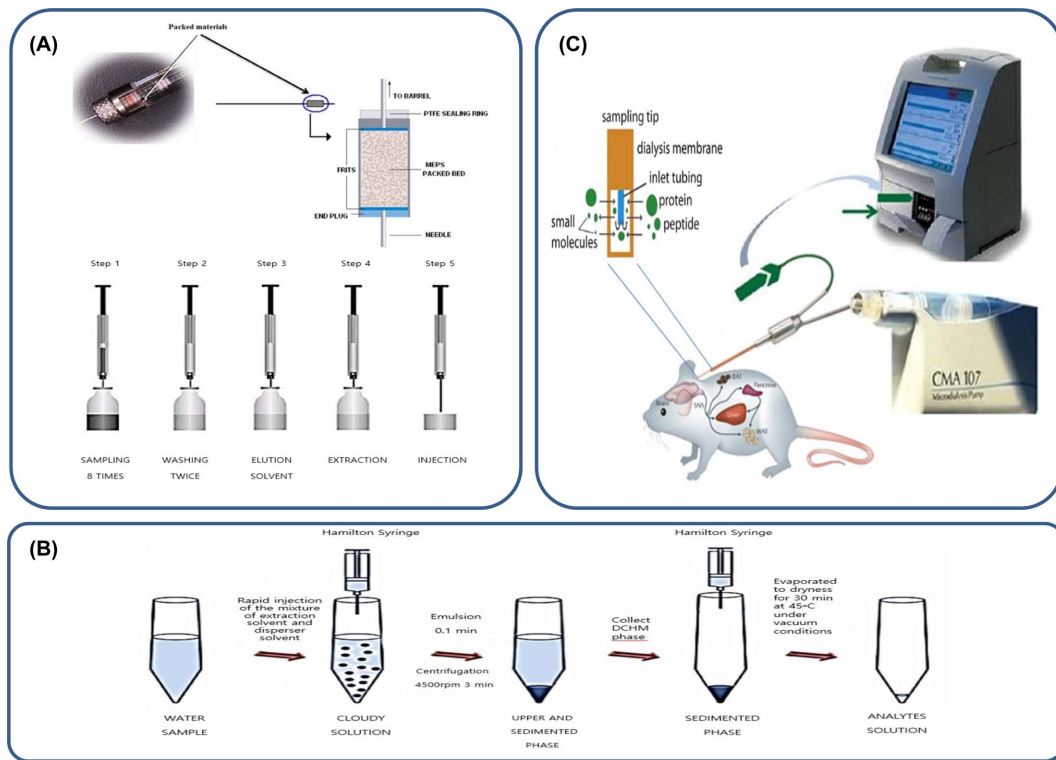


Fig. 2. Different sample preparation techniques: (A) MEPS, (B) DLLME, and (C) microdialysis.

기와 함께 사용되어 일반 SPE 압력에서 유체 취급이 가능하다.⁸⁷ 또한, 사람의 혈청 시료에서 MAX μ Elution plate를 사용하여 신경내분비 종양(neuroendocrine tumor)에서 분리되는 VMA, normetanephrine (NMN), metanephrine (ME), 3-MT의 생리적 농도수준을 분석한 결과가 보고되기도 하였다.⁶⁹

2.1.2. 소변 시료 (urine)

소변은 혈액이나 CSF 또는 생체 조직 시료들보다 시료채취에 있어서 용이성을 가진다. 혈액 속에 있는 대사물은 혈장에서 소변으로 배설될 수 있으므로 소변의 분석을 통하여 진단에 활용할 수 있다.^{53,87} 소변은 채취의 용이성으로 인하여 임상적 환경에서 채취한 사람의 소변^{57,62,67,70,74-76,86,89,90}을 비롯하여 쥐^{66,68,81,82}와 생쥐 소변⁷²등의 시료를 다양한 연구에 활용하고 있다.

소변 시료의 전처리법은 PP,^{57,80,81} SPE,^{68,70,74-77} 회석법,^{57,72} LLE (liquid-liquid extraction) 등의 방법이 보고되었다.^{62,66} PP 전처리법을 활용하여 HVA, 5-HIAA, DOPAC, Glu, glutamine (Gln), proline (Pro), Trp, tyramine (TyrA), Tyr, Val, E, NMN, MN를 분석하였고^{81,82} SPE

전처리법의 경우 카트리지에 따라서 분석대상들이 상이하였는데 각각 Strata-XCW으로 E, NE, DA, f-metanephrine (f-MN), f-normetanephrine(f-NMN)을 추출하였고,⁷⁷ Oasis HLB로 [NE, E, DA],⁷⁰ MCX로 [GABA, Glu],^{74,75} ENVI C18로 [DA, Trp, Kyn, 5-HIAA, HVA, 3-HAA], 3-hydroxykynurenine (3-HK), DOPAC, 5-HT, 3-MT, NE, E]⁷⁶ OasisWCX로 [E, NE, DA]⁶⁸를 고체상 추출법을 수행하였다.

가장 최근에 보고된 시료 전처리방법 중에서는 분산 액체-액체 미세 추출법 (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) 이용한 연구도 있다. DLLME는 시간 소모적이고 많은 양의 시료와 유기 용매가 요구되는 LLE 방법을 개선하고자 개발된 방법 중 하나이다. 일반적으로 친수성의 생체시료와 추출 용액으로 주로 사용되는 유기 용매 양 쪽에 분산 가능한 분산용매를 추가로 사용하여 추출 효율을 높이고 소모되는 시료 및 유기 용매의 양을 크게 감소시킨다.⁹¹ Fig. 2(B)와 같이 친수성 시료에 추출 용매와 분산 용매의 혼합물을 신속하게 주입하여 섞어주면 분산매가 양쪽으로 분산되어 혼탁한 용액 상태가 된다. 이 상태

에서 천천히 흔들거나 정치시켜준 뒤 원심분리하면 dichloromethane과 같은 밀도가 높은 유기용매를 사용한 경우 추출 용매가 하층에 형성된다. 이 후 추출 용매층을 옮겨 건조시킨 뒤 크로마토그래피에 적합한 용매로 변환하여 분석을 수행하게 된다.⁹⁰ 대표적인 예로써 사람의 소변 시료에 분산매로써 ethanol과 추출용매로써 dichloromethane을 적용하여 DA, 5-HT, E를 비롯한 13종의 신경전달물질을 분석한 연구결과⁹⁰가 보고되었으며 마찬가지로 사람의 소변 시료에 DLLME를 적용하면서 heptafluorobutylchloroformate를 이용하여 유도체화를 동시에 수행한 연구결과⁶²도 보고되어 있다. 이에 덧붙여 더욱 최근에는 초음파를 이용한 분산 액체-액체 미세 추출법 UA (ultrasound assisted)-DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction)이 개발되어 보고되었다.⁶⁶ 이 방법은 DLLME의 한 방법으로 초음파 사용으로 분산매를 통한 시료와 추출 용매 사이의 추출 효율을 높일 수 있으며 보고된 결과에 따르면 쥐의 소변 시료에 분산매로써 아세트니트릴 용매를 사용하고 추출 용매로써 4-bromoanisole을 적용하였으며 추출과 동시에 유도체화를 적용하여 DA, NE, GABA를 포함한 총 19종의 신경전달물질의 검출을 수행하였다.

또한 소변 시료 분석에서 정도관리를 위해서 사용한 QC 용액의 농도에 따라 회수율이 향상됨을 보이는 분석결과도 보고되어 있으나^{66,81} QC 용액의 농도와 회수를 수치가 연관성을 나타내지 않는 경우도 보고되었다.^{76,89,92}

2.1.3. CSF (Cerebrospinal fluid)

뇌척수액(Cerebrospinal fluid, CSF)은 뇌와 척추 뼈의 염상체를 채우는 중추신경계의 분비물이다. 뇌척수액(CSF)의 성분 구성은 뇌의 대사율에 직접적으로 연관되어 있다. 따라서 뇌척수액 시료를 이용한 대사체 분석은 뇌 손상, 파킨슨병, 다발성 경화증 등 중추 신경계통의 질환에 대한 진단에 이용할 수 있다.⁵³

CSF 시료는 주로 요추천자과정을 통해 채취하게 되는데 피부에 침투적인 시료 채취 과정에서 혈액에 의해 쉽게 오염될 수 있다. CSF는 혈액에 비해 낮은 단백질 농도를 가지는데⁹³ 혈액 속의 높은 단백질 농도로 인해서 오염된 시료의 경우 대사체 분석에 영향을 끼칠 수 있으므로 혈액 단백질을 제거하기 위해 시료의 동결건조 전에 원심분리를 하거나 PP를 이용하여 불필요한 단백질을 제거한다.^{85,94} 쥐의 CSF 시료를 차가운 아세트니트릴 용매를 이용하여 단백질을 제거한

뒤 분석한 결과 Trp, 3-HK, 3-HAA, quinolinic acid (QA), 5-HT, 5-HIAA에 대해 85~115%의 회수율을 보였으며,⁸⁵ 사람으로부터 채취한 뇌척수액 시료에서는 물로 시료를 100배 희석한 뒤 시료에서 직접 유도체화 반응을 수행하여 ACh, Ch, DOPAC, CA, ethanolamine (ETA), *N*-acetylputrescine (NAP), GABA, 5-HIAA, homocysteic acid (HCA), HVA를 비롯하여 아미노산 및 관련 대사체 70종을 프로파일링하였다.⁹⁴

2.2. 생체 조직 시료(biological tissues)

생체 조직 시료는 신경전달물질이 광범위하게 작용하는 뇌 조직을 주 연구 타겟으로 설정하였는데 주로 사람보다는 실험동물인 쥐나 생쥐의 뇌를 이용하여 연구가 진행되었다. 체액시료(특히, 혈장 및 소변)는 생체 조직시료(주로 뇌 조직)에 비해 쉽게 수집 가능하고 더 실용적이며 임상적으로 매우 적합하다. 반면 생체 조직은 추출과정과 시료 내 분석방해요인이 다량 존재하며 추출 가능한 대사산물의 양이 적어서 액체 시료에 비해 덜 빈번하게 연구되어 왔다. 보고된 연구에 따르면 일반적으로 생체 조직 시료의 전처리 시료 수가 적으며 신경전달물질과 관련된 대사체의 분석 연구의 경우 대부분 신경세포 및 조직이 광범위하게 집약되어있는 뇌 조직 시료를 사용하는데, 복잡하게 구성되어있어 매트릭스 내 분석방해요인을 효과적으로 제거할 수 있는 정제 방법과 더불어 분석 대상에 대한 추출정제법이 필요하다. 시료전처리 과정 및 시료 조작은 조직 시료 내의 효소 등으로 대사체 농도의 변화를 막기 위하여 얼음 등을 사용하여 저온(4 °C)에서 수행되며 일반적으로 시료전처리 과정에서 시료에 대한 균질화 작업을 필요로 한다.^{57,59,85,95-99} 생쥐의 뇌 조직에 저온의 0.5 mM sodium metabisulfate, 0.2 M perchloric acid 와 0.5 mM EDTA 혼합용액 500 µL를 넣고 균질화한 뒤 원심분리한 상층액에서 Val, Leu, Ile, Met, Trp, 5-HT, 5-HIAA, kynurenine (Kyn), 3OH-Kyn, KA, AA, Phe, Tyr, DA, 3-MT를 검출하였는데 특히 Kyn, 3OH-Kyn, AA와 3-MT에 대해서 농축없이 검출한 첫 번째 사례로 보고되었다.⁵⁷

원심분리는 구성성분의 분리, 정제, 농축, 추출을 목적으로 사용한다. 특히, 혈액에서 신경성 물질의 농도 보정을 위하여 western blot을 통한 단백질 정량을 수행하기 위해서 사용되기도 하였으며,⁵⁹ 쥐의 뇌에서 아미노산, 신경 전달 물질, 퓨린 및 피리미딘 경로를 모니터링하기 위한 HILIC-MS/MS 방법 개발을 위해서도 간단한 원심분리법이 적용되기도 하였다.^{59,97} 이

와 같은 원심분리는 조직시료의 전처리 과정에서 시료 내에 다량 포함되어있는 단백질을 제거하기 위한 단백질 침전법과 연계하여 주로 사용된다. 대표적인 방법으로 쥐의 뇌에 0.1%의 formic acid in water-methanol (3:7, v/v) 용액 10 mL를 가하여 균질화한 뒤 원심분리하여 상층액을 0.1% formic acid in water-acetonitrile (50:50)으로 용해하여 여과한 뒤 Glu, Gln, pyroglutamic acid (pGlu), GABA, theanine과 같은 신경성물질의 추출을 수행한 연구결과가 보고되어 있다.⁹⁸ 또한 우울증 유발 쥐의 뇌 시료에 1.89% formic acid가 첨가된 증류수를 첨가하여 균질화한 뒤 원심분리하고 뒤이어 1% formic acid가 첨가된 아세트니트릴을 더하여 단백질을 제거한 뒤 GABA, DA, 5-HT를 비롯한 8종의 신경전달물질을 검출하였다.⁹⁶ 이 외에도 생쥐의 뇌 시료로부터 GABA, DA, 3-MT를 포함한 총 10종의 신경전달물질 검출을 위하여 ACN/MeOH (15/85, v/v) 혼합용액을 사용하여 단백질 침전법을 적용한 연구결과도 보고되었다.⁹⁹

음파처리 (sonication)의 방법으로 전처리를 수행한 연구들도 보고되어있는데 음파처리란 10-20 kHz의 음파를 사용하여 유리기구 등의 세정이나 세포나 세포 내 구조체 등을 파괴하는 방법이다. 특히 진동수가 약 20 kHz 이하의 가청주파영역을 초과하는 음파를 초음파라고 하는 경우가 있으므로 초음파 처리와 같은 의미로 사용하기도 한다. 하지만 세포 파괴에 있어서는 음파와 초음파를 따로 구분하여 고려할 필요는 없으며, 공동현상으로 생성되는 거품진동에 의해 생기는 소용돌이 유동을 세포 파괴의 원인이라고 생각하기도 한다. 음파 처리장치로는 막대모양 진동자를 시료에 담그는 유형과 진동자를 설치한 욕조 같은 용기에 시료를 넣어 처리하는 유형이 있다. 이 음파처리와 균질화 방법에 붕산완충액, benzoyl chloride 시약을 이용하여 쥐의 뇌 조직 연구를 진행하기도 하였다.⁸⁵

2.3. 미세투석법과 기타 동물 시료

생체 내에서 주요 장기의 세포 외액(extra cellular fluid, ECF) 시료를 수집하기 위해 주로 사용되는 미세투석법 (microdialysis)은 뇌 및 심근과 같은 주요 장기에 동물의 외과적 영역으로 이식된 투석막을 통해 링거액과 같은 유사 체액을 관류시켜 체내 대사체 등이 포함된 체액을 추출하는 방법이다.^{95,100} 이 샘플링 기술에서 microdialysis probe는 세포 외 공간에서 연속적인 시료채취가 가능한 대상조직에 이식된다. 이러한 외과적인 이식에도 불구하고 미세투석법은 생리

기능을 방해하지 않고 생동적이며 시간에 따른 분자 변화에 대한 정보를 제공하기 때문에 많이 사용되고 있다.³⁷ 최근 연구에 따르면 Fig. 2(C)처럼 각종 질환이나 환경 변화에 따른 뇌에서 일어나는 신경전달물질 변화를 자동화로 실시간 검출하기 위하여 microdialysis probe를 동물 (주로 rat)의 뇌에 주입한 후 얻어진 체액을 이용하여 연구를 수행하고 있다.^{64,65,94,95,101-103} Microdialysis는 그 자체로도 주요 기능 조직 세포 외액의 대사체를 수집할 수 있는 방법이지만 이후 다른 추가적인 전처리 방법과 연계하기도 한다. 대표적으로 100 mM sodium bicarbonate 완충액과 2% benzoyl chloride 시약을 첨가하여 원심분리를 통한 전처리과정과 benzoylation 유도체화를 동시에 수행하여 UHPLC-MS/MS 시스템에 직접 주입하여 주요 신경전달물질을 포함한 70종의 대사체 동시 분석법 개발 연구가 보고되어있다.⁹⁴ 그밖에도 미세투석액 연구에 주로 사용되는 시료전처리 방법은 희석(dilution)이다. 시료를 희석하는 주된 목적은 분석 전 분석대상 성분의 분해를 막는 것으로써 이는 희석에 사용되는 용액이 산성 완충액 또는 산화 방지제가 포함된 용액이 자주 사용되고 있다. 대표적 예로써 쥐의 미세투석액을 내부표준물질이 첨가된 0.1% formic acid 용액으로 희석하여 진행한 연구와¹⁰⁴ 미세투석액을 완충액과 dansyl 유도체화 시약 첨가에 의한 유도체화와 희석을 통해 LC-MS/MS로 직접 주입하여 분석한 연구도 보고되어 있다.¹⁰⁵

최근 소변시료에 적용한 시료전처리에서 설명한 UADLLME 방법으로 쥐의 미세투석액 시료에 적용한 연구결과를 발표하였고 특히 유도체화를 동시에 수행함과 더불어 분석대상 성분의 증가된 친유성으로 인하여 추출효율을 높일 수 있는 방법으로 보고되었다.^{64,65,103}

이들 시료 외에도 기타 사람의 말초 혈액 단핵구 세포,¹⁰⁶ 초파리,⁹⁴ 달팽이,⁶³ zebrafish¹⁰⁷와 예쁜꼬마선충⁷¹ 등과 같은 다양한 생체시료들이 연구에 사용되었다.

사람의 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 0.25 mL 이용한 연구에서는 Oasis HLB를 사용한 고체상 추출법을 적용하였으며 용리 조건의 최적화를 위하여 분석대상 성분 중 대표적인 뉴로케미컬인 NE, E, DA의 회수율을 조사하였다.¹⁰⁶

초파리의 체액을 이용한 연구에서는 체액을 저온의 아세트니트릴 80 µL로 희석하여 혼합한 뒤 다음 원심분리 하였고, 상층액 20 µL를 유도체화 시켰다. 그 후 유도체화를 위해 50 µL의 물을 첨가하고 뒤이어

100 mM sodium carbonate 완충액, benzoyl chloride (BzCl) 유도체 시약을 넣고 아세트니트릴 용매조건에서 유도체화를 수행하였다.⁹⁴ 동일 연구에서 초파리의 조직시료에 액체 질소에서 동결 시킨 후 머리와 몸통을 분리하여 머리는 4 μ L의 ice-cold acetonitrile, 몸체는 20 μ L의 ice-cold acetonitrile에서 균질화하여 100 mM sodium carbonate 완충액과, BzCl 시약을 사용하여 유도체화한 후 UPLC-MS/MS에 의해 분석하였다.⁹⁴

연못 달팽이를 이용한 연구에서는 쉽게 식별할 수 있고 CNS 연결 노드로 인하여 신경 생물학에서 종종 이용되고 있으며 CNS 신경전달 물질을 정량화하기 위한 분석법이 개발되었다.⁶³ 균질화 과정과 원심분리 과정을 통해 전처리를 하였고 3-MT, 5-HIAA, 5-HT₁, ACh, Choline (Ch), DOPA, DA, E, GABA, Glu, Gln, Hist, L-Trp, L-Tyr, NE, NMN, TyrA, 5-HT, Phe의 대상 성분 분석을 위해서 적용하였을 경우 63-95%의 회수율로 보고되었다.⁶³ Zebrafish를 이용한 연구에서는 척추동물의 발달과 당뇨병, 암 또는 신경 행동 질환과 같은 인간 질병을 연구하기 위한 모델 시스템으로 널리 사용되는 zebrafish는 작은 수생 척추동물인데, 신경 전달 물질과 신경 내분비계가 포유류 시스템과 구조적으로 매우 유사하여 많이 이용된다. 따라서 최근에 zebrafish는 신경과학과 생리학 연구 분야에서 새로운 모델 종으로 떠오르고 있다.¹⁰⁷ 이 연구에서는 20 마리의 zebrafish 치어를 methanol을 사용하여 zebrafish 조직 시료에서 단백질 침전 후 상층액을 유도체화 하여 GC-MS로 NMN을 비롯한 신경

전달물질 6종을 분석하였으며, 그 결과 NMN, E, 3-MT-d₄, DA-d₄, NE-d₆, serotonin-d₄ (5-HT-d₄)의 신경전달물질을 분석하였다.¹⁰⁸ Caenorhabditis elegans는 지구상의 생물 종 중에서 유일하게 전체의 신경망 연결 구조가 온전히 밝혀진 종으로써 신경과학 분야뿐만 아니라 독성학이나 생리학 등 다양한 연구 분야에서 연구대상으로 이용되고 있다. Caenorhabditis elegans을 이용해 연구를 수행한 대표적인 연구결과에서는 C. elegans 배양액에 대표적인 파킨슨병 치료약물인 selegiline 혹은 tolcapone을 농도 별로 주입한 후 각각 3시간과 4시간씩 노출하여 이에 대한 DA와 5-HT의 농도변화를 관찰하여 보고하였다. 이 과정에서 C. elegans는 균질화하고 원심분리하여 추출되고 각 신경 전달물질의 중수소치환 내부표준물질에 의해 비교적 정확하게 정량분석되었다.⁷¹

상기 시료전처리 및 수집법 중 액체-액체 미세추출법과 소형화 고체상 추출법 및 미세투석액에 대한 전처리 조건은 Table 1에 자세하게 나타내었다.

3. 기기적 분석 방법

주요 신경전달물질과 그 대사경로의 프로파일링을 위한 질량분석법(MS) 기반의 분석 플랫폼은 대체적으로 기체 크로마토그래피(GC)와 액체 크로마토그래피(LC)와 같은 크로마토그래피법과 결합하여 개발되어 왔다. 이는 복잡한 생체시료로부터 기인된 동중 화합물(isobaric compounds)을 비롯하여 신호 증가나 감소를 유발하는 매트릭스 효과(matrix effect)를 낮추는 데

Table 1. Sample preparation and recovery of neurochemicals in biological matrices

Matrix	Volume (μ L)		Sample preparation	Recovery (%)	Ref.
Human plasma and urine	plasma: 100 urine: 50	MEPS	(activation) methanol 3 \times 100 μ L, (condition) water 3 \times 100 μ L, (washing) 0.1% formic acid 2 \times 50 μ L, (elution) 0.1% formic acid in methanol 3 \times 50 μ L	87.6–100.3	[86]
Human urine	25	LLME	0.5% tris(3-hydroxypropyl)phosphine in water 25 μ L, organic medium (isooctane:HFBO:HFBCF, 15:1:4) 50 μ L, catalytic medium (4% (v/v) pyridine in 1 M NaOH in water) 25 μ L + 25 μ L, isooctane 50 μ L, 1 M HCl in water 25 μ L	80–121	[62]
Rat urine	20	UA (ultrasound assisted)-DLLME/CCR derivatization/extraction/ultrasonication	NaHCO ₃ -Na ₂ CO ₃ buffer(pH 9.5) 800 μ L/acetonitrile(dispersant) 150 μ L, 4-bromoanisole(extractant) 80 μ L	91.7–105.5	[66]
Mouse urine	60	SCX Ziptip	(washing) 0.1% formic acid in water, (elution) 5% NH ₄ OH in 30% methanol	NR	[72]
Rat	100	protein precipitation	250 mM formic acid 100 μ L	NR	[99]
Microdialysate	10	direct injection into UHPLC-MS/MS	employment of microdialysis as a sample preparation	NR	[104]

에 용이한 방법이기 때문이다.¹⁰⁹ 특히 GC-MS는 높은 휘발성이 전제되어야 하므로 극성이 높은 신경전달물질의 경우에 유도체화를 통해 극성 기능기를 치환해 주어야 한다.¹¹⁰ 또한 LC-MS의 경우에 높은 극성의 신경전달물질을 전통적으로 많이 사용되는 C18과 같은 역상의 컬럼을 사용하여 분석하기 위해서는 이동상에 이온쌍 시약³⁷을 사용하기도 하고 GC와 마찬가지로 유도체화 과정을 통해 극성을 낮춰 역상 컬럼에 대한 머무름을 증가시키기도 한다.⁶³ 하지만 최근에 HILIC과 같은 친수성 극성 분석대상성분을 분리하기 용이한 컬럼을 적용한 방법도 개발되어 유도체화나 이온쌍 시약의 적용없이 신경전달물질의 분석을 수행 가능하다.⁶³ 본 장에서는 대표적인 크로마토그래피 분리기법인 GC와 LC와 연계한 MS 기반의 신경전달물질 분석법에 대해서 살펴보고자 한다.

3.1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS는 높은 분리 효율과 고감도 및 견고성으로 인해 소변 대사체의 통합적 분석을 위한 효율적인 도구이다.^{111,112} 하지만 GC-MS의 적용 범위는 휘발성이면서 열적으로 안정한 분석물에 한정되어 있어, 아미노산과 카르복실산과 같은 소변의 극성 대사체는 GC 분석 전에 유도체화 과정이 필요하다. Alkyl chloroformates (RCFs)를 이용한 유도체화법이 점차 대중적인 접근법이 되고 있는데, 실릴화(silylation)와 달리 RCF는 알코올 및 피리딘 촉매의 존재하에 높은 극성의 작용기를 *N*-carbamate와 (*S*, *O*)-carbonate carboxylic esters로 전환시킨다. Pentafluoropropyl chloroformate (PFPCF) 또는 heptafluorobutyl chloroformate (HFBCF)으로 RCFs에 대한 연구는 광범위하게 이루어졌고, HFBCF 시약은 혈청 내의 아미노산의 비카이랄 및 카이랄 프로파일링에서 매우 효율적인 것으로 확인되었다.^{62,113,114}

사람 소변 시료에서 GC-MS에 의한 CA와 5-HT의 6 가지 산성 대사체의 동시 측정을 위한 새로운 유도체화법을 개발한 연구에서는 HVA, DOPAC, vanillylmandelic acid (VMA), iso-VMA, 5-HIAA, 3,4-dihydroxymandelic acid (DOMA)를 분석하였다.⁸⁹ 이 연구의 주요 이점은 ethoxycarbonyl (EOC) / tert-butylidimethylsilyl (TBDMS) 유도체화로써 CA와 5-HT의 산성 대사산물을 동시에 분석하기 위한 선택적이고 민감한 GC-MS-SIM 방법의 개발이라는 것이다. 이 연구는 불안정한 카테콜기를 포함하는 하이드록실 치환체를 용매 추출이 가능한 *O*-EOC 유도체로 전환

시켜 극성 및 산화 분해의 감소에 의한 추출 효율을 향상시키려고 시도했다. TBDMS 반응은 잔류 카르복실기의 유도체화하고 GC-MS로 분석하였다. 트리메틸실릴(trimethylsilyl, TMS) 유도체와 비교할 때, TBDMS 유도체는 TMS 유도체보다 가수분해조건 하에서 훨씬 더 안정하다. TBDMS과 methoxime (MO) / TBDMS 반응으로 CA들을 프로파일링하기 위한 이전의 방법과¹¹⁵⁻¹¹⁷ GC-MS에 의한 EOC-MO-TBDMS 유도체로써 CA와 아미노산을 동시에 프로파일링한 분석은^{118,119} 생체시료에서 다양한 CA를 측정 할 수 있는 유용함이 입증되었다. CA와 5-HT의 산성 대사체들은 월등한 수용성을 갖는 카테콜기와 여러 하이드록실 치환체들을 가지고 있다. 따라서, 단일 TBDMS 방법은 산성의 수용액상태로부터 추출 단계에서 낮은 회수율을 보였다. 알칼리성 수용액에서의 메톡시메이션 반응(methoximation reaction)은 카보닐기가 없는 대사체들에서는 필요하지 않다. 또한, 강알칼리 수용액에서의 EOC 반응은 DOMA 및 DOPAC의 경우 카테콜기의 산화 분해에 의해 일반적인 반응 효율이 감소된다. 그리고 실제 시료 내에 존재하는 DOMA와 DOPAC의 농도는 미량 수준이다. 따라서 이 연구에서는 이전 방법을 개선하여 임상모니터링을 위한 소변의 산성 대사체들로 iso-VMA를 포함하여 6 개의 CA들에 대한 동시 측정을 하고자 했다.¹¹⁵⁻¹¹⁹ 여기서는 selected ion monitoring (SIM) 모드에서 GC-MS에 의한 직접 분석을 위해 산성 대사체들을 *O*-EOC/TBDMS 유도체로 전환시킴으로써 이러한 문제를 극복하였다. 불안정한 카테콜기는 초기에 EOC 유도체로부터 용매 추출 가능한 형태로 전환하여 보호되었으며, 이는 추출 효율의 향상과 기본 조건 하에서의 산화 분해의 회피 모두를 가능하게 했다. 결과적으로, TBDMS 반응은 카복실기의 남아있는 활성 양성자를 차단하여 극성을 감소시키고 휘발성을 향상시켜 GC-MS 분석을 용이하게 하였다. 개발된 분석법은 인간 소변 샘플의 모든 산성 대사체의 검출에 적용되었다.⁸⁹

사람 소변 시료에서 GC-MS를 이용한 CA와 5-HT 그리고 이들의 산성 대사체들의 분석법 개발 연구에서는 hexamethyldisilazane (HMDS) / methyl-bisheptafluorobutyramide (MBHFBA)를 사용한 선택적인 유도체화방법을 통해 생체아민과 그들의 산성 대사체를 분석하였다.⁷⁴ 연구 결과에 따르면 일반적으로 생체 시료 내의 극미량 대사체를 분석할 경우 미량으로 인하여 검출이 어렵고 상이한 이화학적 특성을 지니기 때문에 유도체화 과정에서 종종 불완전한 반응이 유

도되거나 부산물의 형성이 초래되어 다중 부산물 형성 등으로 인하여 정량이 어려운 점을 극복하였다. HMDS 시약은 하이드록실기 및 카르복실기에 대한 선택적 반응을 위한 효과적인 TMS 시약이며 아민기와 반응하지 않는 점¹²⁰을 활용하여 유도체 과정 중 부산물 생성을 막을 수 있었다. MBHFBA는 아민기의 선택적 유도체화를 위해 사용하였는데 이 시약들로 산성 및 염기성 생체 화합물 모두가 부산물없이 성공적으로 유도체화 되었다. 또한 인간 소변에서 생체아민과 산성 대사체들을 효과적으로 추출하고 선택적으로 매트릭스의 분석방해요인을 제거하기 위해 각각 다른 SPE 용리액들을 사용하는 mixed cation exchange (MCX) SPE 카트리지를 사용한 고체상 추출법을 수행했다. MCX SPE 카트리는 일반적으로 생체 시료에서 염기성 화합물을 추출하는데 사용되었지만, 이 SPE 방법은 생체아민과 산성 대사체를 동시에 추출하는데 적용되었다. 잠재적인 matrix effects를 줄이기 위해 특정 이온을 선택하여 관심있는 대상에 대한 고감도의 선택적인 검출을 위해 GC/MS SIM을 적용해 DA, HVA, L-DOPA, NMN, E, NE, DOPAC, VMA, 5-HT, 5-HIAA를 분석했다. 정리해보면 소변에서 생체아민과 그의 산성 대사체들의 측정을 위한 포괄적인 분석 방법은 MCX SPE를 이용한 정제 및 추출과 선택적 유도체화 이어서 GC/MS SIM 모드를 사용하여 개발되었다. 이 방법을 적용하여 소변에서 생체 아민과 산성 대사 물질을 효과적으로 추출, 정제 및 선택적 유도체화를 할 수 있었다. 적절한 이온의 선택을 통한 SIM 모드의 특이성은 신호 대 잡음비의 증가에 의한 선형성 및 감도 측면에서 분석 성능의 향상을 제공하고 재현성 높은 분석 방법의 개발과 중수소 치환 내부 표준물질의 결합으로 정확도와 정밀도 향상이 나타났다고 보고하였다.⁷⁴

위와 같은 유도체화방법을 이용해 소변에서 Tyr, Trp 및 Glu경로의 대사 프로파일링 분석에 적용한 연구에서는 MCX SPE cleanup 및 GC-MS/MS-multiple ion reaction monitoring (MRM) mode에 의한 민감한 분석 방법을 개발하여 인간의 소변에서 20 개의 광범위한 신경화학물질의 측정을 가능하게 했다.⁷⁵ 이 방법의 주된 장점은 신속한 SPE cleanup 단계, 표적 범위의 확장 및 매우 민감하고 선택적인 MRM 모드를 사용하는 분석 성능의 향상으로 보고되었다. MRM 모드와 동위원소가 표지된 12 개의 내부 표준물질들을 사용하면 매우 신뢰할 수 있는 정량이 가능해져 인간의 소변에서 Tyr, Trp 및 Glu 대사 경로를 정확하

게 특성화할 수 있다. 또한 개별 분석대상 성분에 대한 MRM 전이 이온의 적절한 선택은 소변 샘플에서 신경화학물질의 높은 선택성과 민감성을 제공했다. 연구결과에 따르면 MS/MS fragmentation 조사를 수행하여 분석대상 성분의 정확한 규명이 가능할 뿐 아니라 다른 관련 대사체들의 MRM 전이 이온 선택에 도움을 줄 수 있다고 보고되었다. 또한 동위원소가 표지된 내부 표준물질들 및 matrix interference없이 MRM 크로마토그램의 재구성을 사용하여 표적 분석물질들의 신뢰할 수 있는 정량을 얻을 수 있었다. 개발된 분석법은 사람의 소변 시료에서 GABA, Glu, HVA, DOPAC, MHPG, VMA, 5-HIAA, TyrA, OA, 3-MT, DA, Tyr, NMN, NE, MN, E, L-DOPA, Trp, 5-HT, 5-HTp 총 20 종의 신경전달물질을 분석대상으로 프로파일링이 가능한 것으로 보고되었다.⁷⁵

한편 소변시료에서 신경내분비 중양에 대한 마커로써 적용이 가능한 HVA, VMA, 5-HIAA의 분석법을 개발한 연구에서는⁷⁸ 클로로포름산에틸/에탄올 혼합물을 사용하여 예비 유도체화 과정을 거친 SPME-GC-QqQ-MS/MS 방법을 제시했다. 이 연구에서 개발된 분석법이 갖는 이점으로 3 가지를 제시하였다. 우선 첫째로 신속한 자동화로 대량시료처리가 가능한 분석법의 적용이고, 둘째로 HVA와 VMA에 대해 얻어진 LOD는 문헌에서 보고된 값 중 가장 낮은 값으로써 나타내었으며 (LOD ($\mu\text{g/L}$) : HVA-1.3, VMA-0.046), 마지막으로 적절한 전구체-생성이온 간의 MRM transition 선정으로 획득된 특이성은 분석체 식별 능력을 향상시킨다는 점이었다.⁷⁸

Zebrafish에서 모노아민 신경전달물질 (Monoamine neurotransmitters, MNTs)을 측정하기 위한 고감도의 방법으로 최적화된 유도체화 조건 하에서 GC-MS를 사용하여 개발되었다. Zebrafish 조직에서 DA, E, NE, 노르메타네프린 (Normetanephrine, NMN), 3-메톡시티라민 (3-Methoxy tyramine, 3-MT)과 같은 MNTs와 그 대사체들을 분석하기 위한 O-silylation의 유도체화 과정 수행을 위해 HMDS 시약이 사용되었고, N-perfluoroacylation 과정을 위해서는 MBHFBA 유도체 시약이 사용되었다. 해당 연구에서 수행한 선택적 유도체화 방법은 기존에 보고되었던 방법⁷⁴을 따라 수행되었다. 개발된 분석법으로 zebrafish에서 저농도로 존재하는 MNT의 작은 변화 탐지에 성공적으로 적용되었다.¹⁰⁸

마지막으로 사람과 쥐의 혈장에서 GC-negative ion chemical ionization (NICI)-MS로 안정 동위원소(¹⁵N)가 표지 또는 비표지된 L-트립토판 (L-tryptophan, L-

Table 2. Mass spectrometric detection conditions combined with gas chromatographic separation.

Analytes	Sample	IS	GC Column	Analyzer type	Detection mode	Detection limit (ng/mL)	Ref.
HVA, DOPAC, VMA, iso-VMA, 5-HIAA-1, 5-HIAA-2, DOMA	Human urine	3,4-dimethoxybenzoic acid	Ultra-2 cross-linked capillary column 0.2 mm × 25 m, 0.11 μm	quadrupole	SIM	0.001–4.7	[89]
DA, HVA, L-DOPA, NMN, E, NA, DOPAC, VMA, 5-HT, 5-HIAA	Human urine	HVA-d ₃ , DA-d ₃	DB-5MS column 0.25 mm × 15 m, 0.25 μm	quadrupole	SIM	0.17–17.84	[74]
HVA, VMA, 5-HIAA	Human urine	HVA-d ₃ , VMA-d ₃ , 5-HIAA-d ₅	Thermo TR-5MS column 0.25 mm × 30 m, 0.25 μm	triple quadrupole	MRM	0.063–49.6	[78]
Trp, KYN, 5-HT, QA	Human and rat plasma	¹³ C ₁₁ , ¹⁵ N ₂ -Trp, Methyl-5-HT, 3,5-Pyridinedicarboxylic acid	HP-1MS capillary column 250 μm × 30 m, 0.25 μm	quadrupole	SIM	NR	[121]
153 Endogenous metabolites including 4-Aminobutyrate, Asp, Glu, Phenylalanine, HVA, Gln, VMA, KA, Tyr, 3-Methoxytyramine, DA, L-DOPA, MN, Cys, TrpA, NMN, Trp, KYN, 5-OH-Indoleacetate, 5-OH-TrpA, DOPAC, DOMA	Human urine	4-phenylbutyrate, homophenylalanine	Agilnet VF-5MS column 0.25 mm × 30 m, 0.25 μm	quadrupole	SIM	0.59–447.92	[62]
3-MT, DA, E, NE, NMN, 5-HT	Zebrafish	3-MT-d ₄ , DA-d ₄ , NE-d ₆ , 5-HT-d ₄	J&W DB-5 column 0.25 mm × 30 m, 0.25 μm	quadrupole	SIM	1.2–95	[108]
GABA, Glu, HVA, DOPAC, MHPG, VMA, 5-HIAA, TyrA, OA, 3-MT, DA, Tyr, NMN, NE, MN, E, L-DOPA, Trp, 5-HT, 5-HTp	Human urine	GABA-d ₆ , Glu-d ₅ , HVA-d ₃ , DOPAC-d ₅ , VMA-d ₃ , 5-HIAA-d ₅ , DA-d ₃ , Tyr-d ₄ , NE-d ₆ , L-DOPA-d ₃ , Trp-d ₅	DB-5MS capillary column 0.25 mm × 20 m, 0.25 μm	triple quadrupole	MRM	0.02–11.10	[75]

Trp) 및 이것의 주요 대사체들 즉, L-키누레닌 (L-kynurenine, L-Kyn), 5-HT, 그리고 퀴놀린산 (quinolinic acid, QA)을 동시에 검출하기 위해서 pentafluoropropionic anhydride (PFPA)와 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol (PFPOH)를 2:1 비율로 넣은 시약으로 유도체화하여 분석한 연구결과가 보고되었다. 이 방법은 Trp 대사가 생리적 변화와 질병에 미치는 반응을 탐구하고 L-Trp 대사의 네 가지 경로 (Serotonin pathway, Kynurenine pathway, NAD pathway, and Glutaric Acid pathway) 사이의 균형에 대한 중요성을 제시하였다. 또한 $^{15}\text{N}_2$ -L-Trp 4 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 를 매시간 임신한 쥐의 목정맥에 지속적으로 주입한 추적자 실험을 시행하여 혈장 내 $^{15}\text{N}_2$ 이 표지된 L-Trp 수준을 분석하였다.¹²¹

위의 분석법의 GC separation의 분리 조건과 MS 검출 조건 및 그에 따른 검출한계에 대한 상세한 내용은 Table 2에 요약하여 나타내었다.

3.2. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

LC는 GC와 비교했을 때 분석물질에 대한 적용범위

가 넓으며 시료의 전처리법이 상대적으로 간단하고¹¹⁰ 비휘발성 물질에 적용 가능하므로 검출 가능한 분자량이 상대적으로 크다는 장점이 있어 기존 GC법을 대체해왔다.⁵⁰ Fig. 3(A)에서 볼 수 있듯이 GC 분석 시 높은 피크 분리를 나타내며 각 신경전달물질의 분리도가 향상되는 것을 확인할 수 있다. 반면 Fig. 3(B)에서 나타난 UHPLC에 의한 분석 결과에서는 기술기 용리를 이용하여 단 시간에 검출이 가능하였으며 GC에서 얻어진 peak와 비교하였을 때 크게 뒤처지지 않는 피크 분리를 나타내었다. 이에 따라 최근에는 광범위하게 사용되는 기존 HPLC의 컬럼보다 작은 내경과 2 μm 이하의 충전제 입자를 갖는 컬럼 사용이 가능하며 상대적으로 더 높은 압력을 견딜 수 있도록 제작된⁸³ UHPLC의 사용이 점점 늘고 있다. 같은 조건에서 HPLC와 UHPLC를 비교했을 때, HPLC가 UHPLC보다 15~50 배 더 높은 LOD 값을 보이는데^{65,99,122} 이는 UHPLC 사용에 따른 크로마토그램 상에서 나타나는 피크 분리도의 증가로 기인한 것이다. 이로 UHPLC가 고감도 분석에 보다 용이하고 분석에 소요되는 시간도 대체로 HPLC보다 짧아 대량

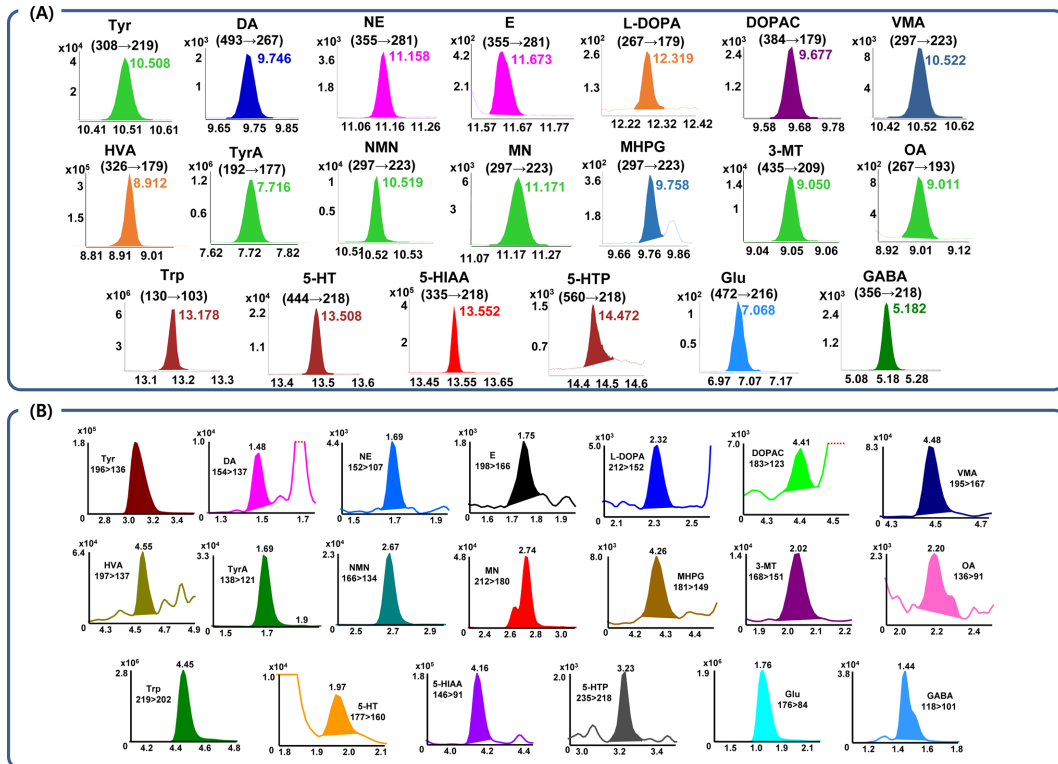


Fig. 3. MRM chromatograms of neurochemicals in human urine by (A) GC-MS/MS and (B) UHPLC-MS/MS.

시료 처리를 통한 임상 적용이 용이하다는 이점이 있다는 것을 알 수 있다.¹¹⁰

LC에 사용되는 컬럼으로는 일반적으로 C18 알킬 체인을 고정상으로 하는 역상컬럼이 광범위하게 사용되며 이를 reversed-phase liquid chromatography (RPLC)라 한다. 역상 컬럼으로 극성 신경전달물질 분석에 적용할 시 고정상이 극성 분석대상 성분과 상호작용이 낮아 컬럼에 대한 머무름이 감소하여 용출이 과도하게 빨라져 분석 시간이 감소하는 한편 분석 대상 성분의 분리도가 낮다는 단점이 있다.³⁷ 이런 역상 컬럼의 단점을 보완하기 위해 최근에 많이 이용되는 방법 중 하나는 HILIC 컬럼을 적용한 경우도 있다. 일반적으로 이들은 실리카 또는 실리카에 amide나 cyano기와 같은 극성 관능기를 유도체화한 친수성의 고정상 컬럼을 이용하여 역상컬럼에서 주로 발생하는 극성물질의 과도한 조기 용출을 방지하고 극성이 높은 이동상 사용으로 높은 극성을 갖는 분석물질의 기존 비극성 이동상에 대한 제한된 용해성을 보완한다. 이를 통해 ion pair reagent나 유도체화 없이 역상 컬럼보다 극성 분석물질에 더 감도 높게 반응하며^{88,97} 또한 무엇보다 MS와 결합될 경우 신경전달물질 분석법 개발 시 가장 적합한 선택성을 보였다.⁶⁵

그러나 HILIC 역시 각 극성물질의 피크 형태나 머무름이 유사하여 역상 컬럼보다 나은 분리도를 보이거나 실제로 명확한 분리도 차이가 나타나지 않기도 한다. 이런 HILIC 컬럼의 단점을 극복하기 위해 역상컬럼과 HILIC 컬럼의 혼합적인 성질을 가진 컬럼을 사용하는 것이 제시되었다. 서로 다른 기전을 갖는 컬럼으로 역상컬럼은 Kinetex C18 컬럼, HILIC 컬럼은 Atlantis HILIC Silica, ZIC-HILIC 컬럼, 이외에 역상과 weak cation exchanger (WCX) 기전이 혼합되어있는 컬럼으로 Acclaim Mixed-Mode WCX 컬럼을 선정하여 비교하였다.⁶⁰ 머무름을 비교하기 위하여 용량인자 k' 값을 구하였는데 이는 머무름 시간에서 컬럼의 불용체적에 대한 용출시간을 뺀 값으로써 나타났다. 역상컬럼의 경우에는 k' 값이 대부분으로 2 미만의 값을 나타냈으며 Trp와 Phe의 경우만 4 이상의 머무름을 나타냈다. 이를 통해 극성이 높을수록 역상컬럼에 대한 머무름이 거의 없었다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 HILIC 컬럼의 경우 Atlantis HILIC과 ZIC-HILIC 컬럼에서 k' 값이 5-6과 8-10 범위로 각각 나타났다. 전체적인 극성의 신경전달물질에 대한 머무름은 HILIC 컬럼에서 우수하게 나타났으나 각 분석대상 성분의 k' 값의 차이가 많이 나지 않아 분리도 면에서

우수하지 않은 것으로 나타났다. 마지막으로 Acclaim Mixed-mode WCX 컬럼을 사용하였을 때 k' 값은 2에서 12 사이로 고르게 분산되어있는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 역상과 이온교환 기전이 혼합되어있는 컬럼을 사용하여 극성의 신경전달물질을 역상이나 HILIC 컬럼보다 더 높은 분리도를 얻을 수 있는 연구결과를 제시하였다.⁶⁰

그 밖에도 HILIC이나 혼합 기전을 활용한 컬럼을 사용하는 방법 대신 기존의 관습적인 역상컬럼을 그대로 사용하면서 이온쌍 시약 (ion pairing reagents)을 이동상에 추가하거나 분석대상물질을 유도체화하여 극성인 신경전달물질의 고정상에 대한 머무름을 증가시키는 방법을 이용할 수 있다. 먼저 이온쌍 시약을 이용하는 경우 monoamine 계열의 물질들은 염기성의 아민기로 인하여 양이온을 형성하기 쉬운 성질이 있는데 이 때 heptafluorobutyric acid (HFBA)와 같은 강한 음이온성 시약을 첨가할 경우 분석물질의 전하를 안정화시켜 비극성의 성질을 높이고 역상 고정상과의 상호작용을 증가시켜 분리능을 높일 수 있는 것으로 나타났다.¹¹⁰ 실제로 이온쌍 시약인 HFBA를 사용하여 분석을 시행하였을 때, HFBA는 머무름의 증가와 피크의 모양을 개선시켰고, 휘발성의 산성물질이라는 점에서 LC-MS에 적합하다는 장점이 보고되었다. 그 밖의 보고된 결과에 따르면 HFBA의 농도가 증가할수록 분석물질의 머무름이 더욱 향상되었으나 NE와 E에는 효과가 적어 분석물질마다 상이한 반응이 나올 수 있다는 것을 알 수 있었다.⁸²

이온쌍 시약을 사용하는 방법 외에도 분석물질 내의 산성과 염기성을 나타내는 극성의 관능기를 유도체화하여 극성을 낮추는 방법을 사용할 수 있다. 유도체화 방법을 사용하면 역상 LC 조건에서 머무름을 증가시켜 분리도를 높여주는 동시에 이온화 과정을 단일화하여 일반적으로 positive ion mode에서 물질의 이온화가 용이해지고 산성과 염기성의 뉴로케미컬이 동시에 분석 가능해진다. 대표적인 유도체화 시약으로는 benzoyl chloride^{85,94,100} 와 dansyl chloride^{56,76,95,105} 등의 시약이 사용되며 주로 극성의 아민기와 페놀기와 같은 관능기를 효과적으로 치환하는데 사용된다.

이외에도 (5-*N*-succinimidoxy-5-oxopentyl)triphenylphosphonium bromide (SPTPP),¹⁰¹ lissamine rhodamine B sulfonylchloride (LRSC),⁶⁴ 4'-carbonyl chloride rosamine (CCR),^{66,103} 10-methyl-acridone-2-sulfonyl chloride (MASC),⁶⁵ 활성화된 *N,N*-dimethyl leucine (DiLeu)⁷²와 같은 유도체화 시약을 적용하여 효과적으로 아민기와

폐놀기를 치환함과 동시에 분석대상 성분의 역상 컬럼에 대한 머무름과 이온화 효율을 크게 증가시킨 결과도 보고되었다. 특히하게도 일반적으로 유도체화가 용이한 아민기와 폐놀기가 아닌 카르복시산과 benzylic position의 알코올만을 선택적으로 치환하여 산성 관능기를 효과적으로 보호하여 역상 컬럼 내 분리도를 높이고 positive ion mode에서 검출감도를 크게 향상시킨 연구결과가 보고되기도 하였다.¹²³

신경전달물질의 효과적인 검출을 위해서는 LC의 최적 컬럼 선정, 유도체화, 이온쌍 크로마토그래피 등의 방법을 통해 분리능을 높일 수 있는 방법과 더불어 MS의 검출 감도를 향상시킬 수 있는 방법도 고려되어야 한다. MS 감도는 이온화 효율과 밀접한 관계가 있는데 분석대상 성분의 이화학적 성질, 크로마토그래피의 특성, matrix interference, 이온화 방식에 따른 감도 등에 따라 결정된다. 또한 신경전달물질처럼 분석물질의 극성이 클수록, 질량이 작을수록 ion suppression에 민감하며 이를 방지하기 위한 시료 전처리과정의 도입이 중요하다.

이온화방식은 대체로 극성을 가진 대상 분석에 사용되는 전자분무이온화법 (electrospray ionization, ESI) 과 상대적으로 비극성인 물질의 분석에 사용되는 대기압 화학 이온화법 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)으로 나누어진다. ESI는 LC-MS 분석 동안 시료 매트릭스나 LC 상에서 공출된 물질에 의한 매트릭스 영향을 비교적 받기 쉽다는 단점이 있는데 이러한 문제점을 해결하기 위해 유도체화 과정을 이용하여 이온화 효율을 높이고 내인성 분석방해물질의 영향을 낮춰 검출 성능을 높일 수 있다.⁶⁴ 그 외 추가적으로 ESI의 fast polarity switching 모드를 사용하면 한 번의 chromatographic run을 수행하는 동안 positive 와 negative ion mode 양쪽에서 동시에 분석하여 이화학적 특성이 다른 분석대상을 동시에 검출 가능하다는 장점이 있다.¹²⁴ 일반적으로 분석대상성분의 화학적 특성과 이온화방식에 따라 positive ion mode에서는 Tyr, Trp과 같은 아미노산과 DA, E 등의 아민기를 포함한 염기성의 물질을 주로 검출하였으며, 반대로 negative ion mode에서는 HVA, VMA, DOPAC와 같은 산성 물질을 검출하였다. Positive ion mode와 negative ion mode에서 동시에 검출이 가능한 물질들도 있는데, 결과적으로 서로 다른 이온화 모드에서 LOD나 LOQ 값을 비교했을 때, 보다 낮은 수준의 검출한계와 정량한계를 얻는다면 분석물질의 더 나은 이온화 방법을 효과적으로 선택했다고 볼 수 있다.⁶⁶

현재까지의 개발된 분석법은 대체적으로 negative ion mode보다 positive ion mode에서 분석을 수행한 방법이 많았으며 이는 주요 신경전달물질이 모노아민을 비롯하여 폴린류와 같은 cation성 물질이 다수를 차지하기 때문이다.

또한 LC를 이용하여 분석대상성분을 분리하는 것과는 별개로 MS에서는 분석관의 종류에 따라 분석물질에 대한 질량 이온 분리도를 크게 높여 미지의 분석대상성분을 규명하거나 선택적으로 분석대상만을 검출하여 정량에 이용하는 것처럼 연구목적에 따라 달리 사용할 수 있다. 먼저 quadrupole-time of flight (QToF), orbitrap 질량분석관과 같이 고분해능 MS (high resolution MS, HRMS)는 동일한 정수단위의 분자량을 갖는 대사체 성분들의 물질 규명을 가능하게 하며 비표적형 대사체 분석을 위한 생체 시료의 정성 분석에 주로 적용한다. 이와 대조적으로 single 또는 triple quadrupole 같은 저분해능 MS (low resolution MS, LRMS)는 표적 대사체에 대한 선택적 검출을 통해 시료의 정량분석에 더 활발하게 사용된다.⁸⁸ 최근에 보고된 대부분의 연구는 LRMS를 이용하여 표적 대사체에 대한 정량적 검출을 수행하였으나 간혹 Q/ToF MS나^{72,80,125} orbitrap MS^{76,84}를 이용하여 비표적형 대사체 분석을 한 연구결과도 다수 보고되어있다. 또한, HRMS를 이용한 물질규명뿐만 아니라 MS/MS의 활용을 통해서도 보다 정확한 구조 규명이 가능하다. 대표적인 예로 단일 질량분석관으로 분석을 시행할 경우 NMN과 E 같이 분자량이 동일한 물질들은 같은 m/z 값으로 검출되어 구분이 어려운 문제점이 발생할 수 있다. 그러나 MS/MS를 사용하여 분석을 수행할 경우 동일 m/z 값을 가지고 있는 물질이더라도 MS/MS spectra에서 나타난 조각이온 (fragment ion)의 패턴 차이를 확인하여 물질을 규명해낼 수 있다. 이러한 장점으로 인해 최근에 수행되는 대부분의 연구들은 단일 MS 보다는 MS/MS를 이용이 활발해지고 있다.

마지막으로 이온화된 분석물질의 검출 시스템에 따라서도 MS의 민감도가 달라질 수 있다. 검출 시스템 중 하나인 MRM으로 검출할 경우 이와 대조적인 full range scan이나 SIM으로 검출하는 것에 비해 공출되는 성분에 의한 노이즈를 낮추면서 분석대상성분에 대한 특이성을 크게 높일 수 있다. 보고된 연구결과의 검출한계를 비교하였을 때 MRM 검출했을 때보다 SIM 검출했을 때보다 DA 검출 시 1.17배에서 최대 5-HT 검출 시 66 배까지 향상되는 것으로 나타났다.^{63,86} 이

Table 3. Mass spectrometric detection conditions combined with liquid chromatographic separation

Chromatography	Analytes	Sample	IS	Column	Mobile phase	Ionization mode	Analyzer type	Detection mode	Detection limits (ng/mL)	Ref.
HPLC	AD, Agm, Cadaverine, DA, Hist, 3-MT, NA, Norephedrine, OA, PhEt, Put, 5-HT, Spd, Spm, TrpA, TyrA	Human urine	1-aminoheptane solution	Acclaim Mixed Mode WCX 2.1 × 150 mm, 3 μm	A : 0.1 % acetic acid in 20 % MeOH B : 2.0 % acetic acid in 20 % MeOH Flow rate (μL/min) : 400	APCI +	hybrid triple quadrupole/linear ion trap	MRM	1.0–21.9	[60]
HPLC	DA, NE, 5-HT	Rat brain microdialysates	NE-d ₆ , 5-HT-d ₄ , DA-d ₄	Phenomenex Kinetex PFP 4.6 × 50 mm, 2.5 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 1,000 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	30 pM	[101]
HPLC	HVA, VMA, Orotic acid, Homogentisic acid	Human urine		Discovery C16 amide 2.1 × 100 mm	A : 0.05 % acetic acid in 40 % ACN B : 0.05 % acetic acid in water Flow rate (μL/min) : 200	ESI -	ion trap	SIM	50–250	[73]
UHPLC	VMA, HVA	Human serum	VMA-d ₃ , ¹² C ₆ , ¹⁸ O-HVA	Waters Acquity UPLC HSS T3 2.1 × 150 mm, 1.8 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 400 column temperature : 45 °C	ESI -	triple quadrupole	MRM	VMA: 0.02; HVA: 0.18	[61]
UHPLC	NE, E, DA	Human urine	NE-d ₆ , E-d ₃ , DA-d ₄	Restek ultra PFP 2.1 × 150 mm, 3 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : methanol Flow rate (μL/min) : 450 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	NE: 2.5; E: 0.25; DA: 2.5	[70]
HPLC	DA, NE, 5-HT, DOPAC, HVA, VMA, MHPG, 5-HIAA, Trp, KYN, KA, Glu, Gln, GABA	Rat brain homogenates, microdialysates	DHBA, 5-HICA	Ultimate XB-C8 2.1 × 50 mm, 3.0 μm	A : 20 nM NH ₄ OAc and 0.1 % formic acid in water B : Acetonitrile Flow rate (μL/min) : 250 column temperature : 40 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	(Homogenates) 0.4–9.7 pM (Microdialysates) 1.2–9.7 pM	[95]
UHPLC	(PI) Tyr, DA, NA, E, 3-MT, NMN, MN (NI) L-DOPA, DOPAC, DOMA, DHPG, HVA, MHPG, VMA	Rat urine	Isoproterenol	Inertsil ODS-EP 4.6 × 150 mm, 5.0 μm	(PI) A : 0.01 % HFBA in water B : 0.01 % HFBA in methanol (NI) A : 0.01 % acetic acid in water B : 0.01 % acetic acid in methanol Flow rate (μL/min) : 1,000 column temperature : 30 °C	ESI + ESI -	hybrid triple quadrupole/linear ion trap	MRM	(+) 1.7–10.6 (-) 1.8–11.5	[82]
HPLC	3-MT, 5-HIAA, 5-HT, Trp, ACh, Ch, L-DOPA, DA, E, GABA, Glu, Gln, Hist, His, Trp, Tyr, NE, NMN, Phe, 5-HT, TyrA	CNS of pond snail (<i>Lymnaea stagnalis</i>)	3-MT-d ₄ , ACh-d ₄ , 5-HT-d ₄ , 5-HIAA-d ₃ , L-Trp-d ₃ , GABA-d ₆ , DOPA-d ₃ , DA-d ₄ , L-Tyr-d ₄ , ¹³ C ₂ ¹⁵ N-E, Ch-d ₁₃ , Glu-d ₃ , ¹³ C ¹⁵ N-Gln, NE-d ₆ , 5-HT-d ₄	ZIC-chILIC 2.1 × 150 mm, 3 μm	10 mM NH ₄ COOH in ACN:water 90:10 v/v at pH 2.8 Flow rate (μL/min) : 200 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	0.1–58	[63]
UHPLC	5-HT, 5-HIAA, DA, NE, HVA, GABA, Glu	Rat plasma	DHBA, NE, 5-HICA	ACQUITY UPLC BEH C18 2.1 × 50 mm, 1.7 μm	A : 0.1 formic acid in water B : Acetonitrile Flow rate (μL/min) : 200 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	0.15–740.06	[56]

Table 3. Continued

Chromatography	Analytes	Sample	IS	Column	Mobile phase	Ionization mode	Analyzer type	Detection mode	Detection limits (ng/mL)	Ref.
HPLC	Trp, Phe, Tyr, IAA, HA, PA, Cr, Glu, SA, GABA	Rat plasma	Phe, Tinidazole	CAPCELL PAK C18 4.6 × 250 mm, 5 μm	A : Methanol B : 0.01 % formic acid in water Flow rate (μL/min) : 800 column temperature : 30 °C	ESI +	quadrupole	SIM	100–2000	[55]
HPLC	E, NE, DA	Rat and mini pig plasma and urine	E-d ₆ , NE-d ₆ , DA-d ₄	Perfluorophenyl Fluophase 2.1 × 100 mm, 5 μm	A : 0.5 % HFBA in water B : 0.5 % HFBA in methanol Flow rate (μL/min) : 600	ESI +	triple quadrupole	MRM	(plasma) 0.02 (urine) 0.25	[68]
HPLC	(PI) Neurotransmitter ACh, Hist, Glu, GABA, 5-HT (NI) Prostanoid TxB ₂ , PGE ₂ , PGD ₂ , 15d-PGJ ₂ , 6-keto-PGF _{1α} , PGF _{2α}	Rat blood	(Neurotransmitter) Glu, Hist, GABA, 5-HT(derivatized with benzoyl chloride-d ₃) (Prostanoid) TxB ₂ -d ₄ , PGE ₂ -d ₄ , PGD ₂ -d ₄ , 15d-PGJ ₂ -d ₄ , 6-keto-PGF _{1α} -d ₄ , PGF _{2α} -d ₄	Synergi Hydro-RP 2.0 × 150 mm, 4.0 μm	(Neurotransmitter analysis) A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 300 (Prostanoid analysis) A : water:ACN 175:100 (v/v) Phase B : methanol Flow rate (μL/min) : 200	ESI + ESI -	linear ion trap	MRM	0.0035–0.56	[100]
UHPLC	Ala, GABA, Val, Leu, Lys, DA, His, Phe, NE, 5-HT, Tyr, Trp	Mouse urine	3-aminoquinoline	Homemade C18 75.1 μm × 150 mm, 1.7 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 0.35	ESI +	Q-TOF	SRM	1.12–31.03	[72]
HPLC	4-Aminohippurate, 5-HIAA, Glu, Gln, Hippurate, Pimelate, Pro, Trp, TyrA, Tyr, Val	Rat urine	Cortisol	XTerra RP ₁₈ 3.91 × 100 mm, 3.5 μm	A : 0.1 % acetic acid in water B : 0.1 % acetic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 450 column temperature : 40 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	25	[81]
HPLC	NMN, MN, 3-MT, VMA	Human serum	NMN-d ₃ , MN-d ₃ , 3-MT-d ₄	Atlantis HILIC 2.1 × 50 mm, 2.6 μm	A : acetonitrile B : 100 mM NH ₄ COOH in water Flow rate (μL/min) : 400	ESI -	hybrid triple quadrupole/ linear ion trap	MRM	0.0042–0.25	[69]
UHPLC	5-HT, DA, E, NE	Rat brain	4-Chlorophenyl-alanine	Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (HILIC) 2.1 × 50 mm, 1.7 μm	A : 0.1 % formic acid in 5 % ACN B : 0.1 % formic acid in 95 % ACN with 1mM NH ₄ OAc Flow rate (μL/min) : 500 column temperature : 0 °C	APCI +	triple quadrupole	SRM	0.05–0.55	[97]
UHPLC	DA	Rat brain ECF	DA-d ₃	Acquity HSS T3 2.1 × 100 mm, 1.7 μm	A : 0.1 % formic acid in MeOH B : 0.1 % formic acid in water Flow rate (μL/min) : 500 column temperature : 65 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	DA: 0.15	[104]
UHPLC	Asp, Ser, Gly, Ala, Met, Leu, Tyr, Trp, Glu, GABA	Human plasma	Met-d ₃ , Glu-d ₃	Ascentis® Express HILIC 4.6 × 100 mm, 2.7 μm	A : 10 mM NH ₄ OAc in water B : 10 mM NH ₄ OAc in 60 % ACN Flow rate (μL/min) : 500	ESI +	triple quadrupole	MRM	9.7–13.3 nM	[79]

Table 3. Continued

Chromatography	Analytes	Sample	IS	Column	Mobile phase	Ionization mode	Analyzer type	Detection mode	Detection limits (ng/mL)	Ref.
HPLC	DA, 5-HT	<i>C. elegans</i>	DA-d ₄ , 5-HT-d ₄	YMC-Triart PFP 3 × 150 mm, 3.0 μm	A : 10 mM formic acid in water B : 10 mM formic acid in methanol Flow rate (μL/min) : 425 column temperature : 25 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	DA: 0.057; 5-HT: 0.025	[71]
HPLC	(PI) Tyr, Trp, 5-HT, DA, E, NE, 3-MT, 5-HIAA, L-DOPA, 5-HT (NI) VMA, HVA, DOPAC	Human urine	PI : Norvaline NI : DHBA	XBridge Amide™ BEH (HILIC) 3.0 × 100 mm, 3.5 μm	A : 10 mM NH ₄ COOH in water B : 10 mM NH ₄ COOH in ACN Flow rate (μL/min) : 1,000 column temperature : 25 °C	ESI +, ESI -	quadrupole	SIM	(+) 10–20 (-) 10–20	[90]
HPLC	DA, Trp, KYN, 5-HIAA, HVA, 3-HAA, 3-HK, DOPAC, 5-HT, 3-MT, NE, E	Youth urine	NE-d ₆ , DA-d ₄ , 5-HT-d ₄	ACQUITY UPLC BEH-C18 2.1 × 100 mm, 1.7 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 250 column temperature : 35 °C	ESI +	orbitrap	targeted MS/MS scan	0.08–1	[76]
UHPLC	L-DOPA, DA, E, NE, DOPAC, HVA	Rat brain microdialysates	Isoprenaline	Agilent SB C18 2.1 × 50 mm, 1.8 μm	A : 0.2 % formic acid in 5 % ACN B : 0.2 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 200 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	0.002– 0.004 nM	[64]
HPLC	(PI) AD, NA, Glu, GABA, DA, 5-HT, 5-HIAA (NI) MHPG	Rat brain	Isoprenaline	ACE C18-PFP 2.4 × 150 mm, 3.0 μm	A : 0.2 % formic acid in water B : 0.2 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 600 column temperature : 25 °C	ESI + ESI -	triple quadrupole	MRM	(+) 0.25– 250 (-) 1	[96]
HPLC	E, NE, DA, MN, NMN	Human urine	E-d ₆ , NE-d ₆ , DA-d ₄ , MN-d ₃ , NMN-d ₃	RPLC 2.0 × 100 mm, 3.0 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 300 column temperature : 40 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	3.5–7.4	[77]
UHPLC	70 Neurochemicals including DOPAC, L-DOPA, MHPG, 3-MT, GABA, 5-HIAA, 5-HT, 5-HT, Trp, Tyr, VMA etc.	Microdialysate from rats, human CSF, human serum, fly tissue homogenate, fly hemolymph	ACh-d ₄	Acquity HSS T3 C18 1 × 100 mm, 1.8 μm	A : 10 mM NH ₄ COOH with 0.15 % formic acid in water B : acetonitrile Flow rate (μL/min) : 100 column temperature : 27 °C	ESI +	triple quadrupole	dMRM	0.0088– 28.83	[58]
UHPLC	DA, HVA, 3-MT, 5-HT, 5-HIAA, NE, ACh, Glu, GABA	Mice and rat brain tissue	DA-d ₃ , ¹² C ₂ , ¹⁵ N-5-HT, GABA-d ₆ , ¹³ C ₆ -DA, 5-HT-d ₄ , NE-d ₆ , ACh-d ₄ , Glu-d ₄ , 5-HIAA-d ₃	Waters Acquity HSS T3 C18 2.1 × 100 mm, 1.8 μm	A : 25 mM formic acid water B : methanol Flow rate (μL/min) : 500 column temperature : 65 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	(ECF) 0.5–80 nM (brain) 0.75–50 nM	[99]
HPLC	5-HIAA, HVA, DOPAC, 3-MT, 5-HT, DA, E, Trp, NE, 5-HT, Trp, L-DOPA	Human urine and plasma	DHBA	XBridge Amide™ BEH (HILIC) 3.0 × 100 mm, 3.5 μm	A : 10 mM NH ₄ COOH in water B : 10 mM NH ₄ COOH in ACN Flow rate (μL/min) : 1,000 column temperature : 25 °C	ESI +	quadrupole	SIM	10.0–20.0	[86]

Table 3. Continued

Chromatography	Analytes	Sample	IS	Column	Mobile phase	Ionization mode	Analyzer type	Detection mode	Detection limits (ng/mL)	Ref.
UHPLC	7 Endogenous metabolites including 5-HT, E, DA, NE	Rat brain and serum	6-TG, DHBA, 5-HICA	ACQUITY UPLC® BEH Amide (HILIC) 2.1 × 50 mm, 1.7 μm	A : 20 mM NH ₄ COOH and 0.25 % formic acid in water B : 20 mM NH ₄ COOH and 0.25 % formic acid in 93 % ACN Flow rate (μL/min) : 500 column temperature : 35 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	1.46–1205.63	[59]
UHPLC	Glu, Gln, pGlu, GABA, Theanine	Mouse brain	Glu-d ₅ , Glun-d ₅ , pGlu-d ₅ , Theanine-d ₅	TSKgel Amide-80 (HILIC) 2.0 × 150 mm, 2.0 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 300 column temperature : 40 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	10.3–17	[98]
UHPLC	Val, Leu, Ile, Met, Trp, 5-HT, 5-HIAA, KYN, 3-OH-KYN, KA, XA, AA, 3-OH-AA, Phe, Tyr, DA, 3-MT, HVA	Human urine and plasma Mice prefrontal cortex (PFC)	5-HIAA-d ₄ , Tyr-d ₄ , ¹³ C ₆ -3OH-KYN, Trp-d ₅ , Phe-d ₅ , 5-HT-d ₅ , ¹³ C ₆ -KYN, DA-d ₄ , 3-MT-d ₄ , KA-d ₅	Acquity BEH C18 2.1 × 100 mm, 1.7 μm	water and methanol both containing 0.01 % formic acid and 1 mM NH ₄ COOH Flow rate (μL/min) : 300 column temperature : 55 °C	ESI +	triple quadrupole	SRM	(urine) 2.5–1000 (plasma) 0.3–100 (PFC) 0.1–5	[57]
UHPLC	E, NE, DA	Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	NE-d ₆ , E-d ₃ , DA-d ₄	Luna PFP 2.1 × 150 mm, 3 μm	A : 0.01 % formic acid in water B : 0.01 % formic acid in MeOH Flow rate (μL/min) : 450 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	E: 0.18; NE: 0.85; DA: 0.77	[106]
UHPLC	L-DOPA, DA, NE, E, 3-MT, NMN, MN, DOPAC, DOMA, DHPG, HVA, VMA, MHPG, 5-HT, 5-HIAA, 2,3-DHBA, 2,5-DHBA, Glu, GABA, Gly, Asp, Baicalein	Rat brain microdialysate	Isoprenaline, 5-HICA, Nle	SB C18 2.1 × 50 mm, 1.8 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : 0.1 % formic acid in ACN Flow rate (μL/min) : 200 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	0.1–3 pM	[103]
HPLC	Trp, 3-HK, 3-HAA, QUIN, 5-HT, 5-HIAA	Rat CSF, serum, brain tissue	Caffeic acid	Agilent SB-C18 2.1 × 100 mm, 3.5 μm	A : acetonitrile B : 0.1 % formic acid and 2 mM NH ₄ OAc in water Flow rate (μL/min) : 300 column temperature : 40 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	(Saline) 0.088–102.11 (CSF) 0.088–102.11 (Plasma) 1.12–102.11	[85]
UHPLC	L-DOPA, DA, NE, E, 3-MT, NMN, MN, DOPAC, DOMA, DHPG, HVA, VMA, MHPG, 5-HT, 5-HIAA, Glu, GABA, Gly, Asp	Rat urine	Isoprenaline 5-HICA, Nle	SB C18 2.1 × 50 mm, 1.8 μm	A : 0.1 % formic acid in water B : acetonitrile Flow rate (μL/min) : 200 column temperature : 30 °C	ESI +	triple quadrupole	MRM	0.077–0.38	[66]

외에도 소변에서 내인성 대사체 분석에 대한 연구결과들로 미루어볼 때 MRM이 일반적으로 더 높은 감도를 가지며 더 넓은 검출 범위를 갖는다고 보고되어 있다.⁸⁸

위에서 언급한 연구방법의 LC 분리 및 MS 검출 조건과 그에 따른 검출한계에 대하여 Table 3에 요약하여 나타내었다.

4. 결론 및 전망

본 논문에서는 최근 개발된 퇴행성신경질환의 생체 지표물질인 신경전달물질 분석을 위하여 단백질 침전법, 액체-액체 추출법과 고체상 추출법 등의 시료전처리 방법과 크로마토그래피와 연계된 MS 기반의 분석법에 대해서 조사하였다. 시료 전처리 방법에 있어서 LLE와 SPE의 단점을 극복하고 효율을 높은 DLLME나 MEPS와 같은 시료 전처리 방법과 실험동물의 주요 장기에 직접 탐침을 주입하여 세포 외액의 주요 대사체를 추출해내는 시료채취 및 전처리 방법이 주요한 연구기법으로 주목받고 있다. 저분자량을 갖는 1차 대사체 검출에 대해 높은 특이성과 감도, 분해능을 제공하는 GC-MS 방법은 지속적으로 활용이 되고 있으며 EI 이온화법을 통해 얻어진 특이성있는 조각이온을 통한 SIM 분석도 여전히 활용도가 높으며 MS/MS를 이용해 선택성을 높이고 분석방해요인의 영향을 크게 낮추는 MRM 검출이 신경전달물질의 대사체 검출에 높은 효율성을 보이고 있다. 전통적으로 널리 사용되고 있는 역상 LC를 이용한 LC-MS 분석 시에는 극성 신경전달물질 및 그 대사체의 분리에서 나타나는 과도하게 빠른 용출 현상을 극복하기 위해서 이동상에 이온쌍 시약 첨가나 분석대상 성분에 대한 유도체화를 적용하였으며 특히 유도체화의 적용은 ESI의 양이온 검출 모드에서 검출감도 향상에 크게 기여하는 것으로 나타났다. 유도체화 적용에 대한 불편함을 낮추고자 극성의 고정상을 사용하는 HILIC 컬럼이나 CE 등에 대한 적용도 시도되고 있었으며 특히 역상과 이온교환의 특성을 모두 갖는 혼합모드의 컬럼 적용으로 머무름의 개선뿐만 아니라 분리도를 높여려는 시도도 수행되고 있었다. 하지만 단일의 분석 플랫폼으로 분석을 수행함에 있어서 신경전달물질의 전체적인 대사경로를 프로파일링하고 규명해내기에는 크로마토그래피에서 이온화와 분석관의 종류에 따른 서로 다른 장단점의 존재로 인하여 제한된다. 현재 이를 극복하기 위해서 하나의 분석법이 아닌 두 개의 다른

복합 분석플랫폼으로 각각의 장점들은 극대화하고 단점들을 상호보완하는 연구도 진행되고 있다. 대표적으로 RP-LC/GC-MS, RP-LC/CE-MS의 사례가 보고되어 있고 최근에는 직접 분석을 수행하는 DIMS (direct infusion mass spectrometry)도 빠르게 성장하고 있어 여기에 크로마토그래피 분리법이 적용된 질량분석법과 연계된 조합도 개발될 것으로 예상된다. 추가로 생체 체액 시료와 생체 조직 시료의 적절한 시료전처리 방법과 연구목적에 적합한 시료 조작법에 대한 연구도 함께 이루어진다면 지금까지 알려진 여러 가지 분석방법의 장점이 복합된 분석플랫폼의 개발에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다. 그리하여 이를 통해 개발된 분석플랫폼은 효과적으로 신경전달물질의 대사경로 프로파일링해낼 것이며 향후 임상적용 시 퇴행성신경질환을 비롯한 다양한 질병 진단 및 치료 방법의 연구와 개발에 기여할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 한국연구재단의 연구개발비 (NRF-2017R1A2B4005616과 2017M3A9F3047858)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. T. Opladen, E. Cortès-Saladelafont, M. Mastrangelo, G. Horvath, R. Pons, E. Lopez-Laso, J. A. Fernández-Ramos, T. Honzik, T. Pearson, J. Friedman, S. Scholl-Bürgi, T. Wassenberg, S. Jung-Klawitter, O. Kuseyri, K. Jeltsch, M. A. Kurian and À. Garcia-Cazorla, *Mol. Genet. Metab. Reports*, **9**, 61-66 (2016).
2. T. Lapainis and J. V. Sweedler, *J. Chromatogr. A*, **1184**, 144-158 (2008).
3. Oliver von Bohle und Halbach and Rolf Dermietzel, Wiley-VCH, Handbook of Receptors and Biological Effects, 2006.
4. R. Adolfsson, C. G. Gottfries, B. E. Roos and B. Winblad, *Br. J. Psychiatry*, **135**, 216-223 (1979).
5. L. F. Nolden, T. Tartavouille and D. J. Porche, *J. Nurse Pract.*, **10**, 500-506 (2014).
6. E. Sánchez-López, C. Montealegre, A. L. Crego and M. L. Marina, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **67**, 82-99 (2015).
7. L. H. Rodan, K. M. Gibson and P. L. Pearl, *Pediatr. Neurol.*, **53**, 277-286 (2015).

8. J. Soleymani, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **72**, 27-44 (2015).
9. I. A. Veselova, E. A. Sergeeva, M. I. Makedonskaya, O. E. Eremina, S. N. Kalmykov and T. N. Shekhovtsova, *J. Anal. Chem.*, **71**, 1155-1168 (2016).
10. D. Kondziella, *Neurochem. Res.*, **42**, 1767-1771 (2017).
11. C. Marecos, J. Ng and M.A. Kurian, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **37**, 619-626 (2014).
12. W. T. Kassahun, *Vascular.*, **23**, 297-304 (2015).
13. Y. Shen, J. Lu, Q. Tang, Q. Guan, Z. Sun, H. Li and L. Cheng, *Rapid, J. Chromatogr. B*, **1002**, 92-97 (2015).
14. R. NAE, R. MG and T. JM, *JCAR.*, **33**, 53-55 (1982).
15. T. E. Dicke, M. L. Henry and J. P. Minton, *J. Surg. Oncol.*, **34**, 160-164 (1987).
16. Z. Wang, Q. Liang, Y. Wang and G. Luo, *J. Electroanal. Chem.*, **540**, 129-134 (2003).
17. J.-M. Zen, I.-L. Chen and Y. Shih, *Anal. Chim. Acta*, **369**, 103-108 (1998).
18. G. Curzon and A.R. Green, *Br. J. Pharmacol.*, **37**, 689-697 (1969).
19. W. Wesemann, C. Grote, H. Clement, F. Block and K. Sontag, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **17**, 487-499 (1993).
20. M. Karobath, J.-L. Díaz and M. O. Huttunen, *Eur. J. Pharmacol.*, **14**, 393-396 (1971).
21. M. Karobath, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1253-1263 (1972).
22. M. Hasanzadeh, N. Shadjou and E. Omidinia, *J. Neurosci. Methods*, **219**, 52-60 (2013).
23. K. ER, S. JH and J. TM, *Principles of Neural Science*, 2000.
24. R. Rodriguez-Diaz, R. Dando, M. C. Jacques-Silva, A. Fachado, J. Molina, M. H. Abdulreda, C. Ricordi, S. D. Roper, P.-O. Berggren and A. Caicedo, *Nat. Med.*, **17**, 888-892 (2011).
25. I. Wessler, C. J. Kirkpatrick and K. Racké, *Pharmacol. Ther.*, **77**, 59-79 (1998).
26. M. B. Bhuiyan, F. Murad and M. E. Fant, *Cell Commun. Signal.*, **4**, 1-7 (2006).
27. K. Ofek and H. Soreq, *Chem. Biol. Interact.*, **203**, 113-119 (2013).
28. S. Shenhar-Tsarfaty, S. Berliner, N. M. Bornstein and H. Soreq, *J. Mol. Neurosci.*, **53**, 298-305 (2014).
29. J. Bergquist, A. Sciubisz, A. Kaczor and J. Silberring, *J. Neurosci. Methods*, **113**, 1-13 (2002).
30. M. A. Raggi, C. Sabbioni, G. Nicoletta, R. Mandrioli and G. Gerra, *J. Sep. Sci.*, **26**, 1141-1146 (2003).
31. M. Tsunoda, C. Aoyama, H. Nomura, T. Toyoda, N. Matsuki and T. Funatsu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 712-715 (2010).
32. M.-J. Kim, B.-K. Kim, S. M. Kim, J.-S. Park and J. Hong, *Anal. Sci. Technol.*, **24**(5), 319-335 (2011).
33. I. Marín-Valencia, M. Serrano, A. Ormazabal, B. Pérez-Dueñas, A. García-Cazorla, J. Campistol and R. Artuch, *Clin. Biochem.*, **41**, 1306-1315 (2008).
34. M. Yoshitake, H. Nohta, H. Yoshida, T. Yoshitake, K. Todoroki and M. Yamaguchi, *Anal. Chem.*, **78**, 920-927 (2006).
35. M. A. Fotopoulou and P. C. Ioannou, *Anal. Chim. Acta*, **462**, 179-185 (2002).
36. T. G. Rosano, T. A. Swift and L. W. Hayes, *Clin. Chem.*, **37**, 1854-1867 (1991).
37. J. Bicker, A. Fortuna, G. Alves and A. Falcão, *Anal. Chim. Acta*, **768**, 12-34 (2013).
38. H. W. Nam, S.-J. Park, H. S. Pyo and K. J. Paeng, *Anal. Sci. Technol.*, **16**(5), 349-357 (2003).
39. P.-T. Linh, S.-C. Lee, Y.-H. Kim, S.-P. Hong, C.-W. Song and J.-S. Kang, *Anal. Sci. Technol.*, **13**(5), 630-635 (2000).
40. K. Vuorensola and H. Sirén, *J. Chromatogr. A*, **895**, 317-327 (2000).
41. R. T. Peaston and C. Weinkove, *Ann. Clin. Biochem.*, **41**, 17-38 (2004).
42. K. Vuorensola, J. Kokkonen, H. Sirén and R. A. Ketola, *Electrophoresis*, **22**, 4347-4354 (2001).
43. M. Coen, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 9-27 (2008).
44. O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon and J. K. Nicholson, *Nat. Protoc.*, **2**, 2692-2703 (2007).
45. T. M. Tsang, B. Woodman, G. A. McLoughlin, J. L. Griffin, S. J. Tabrizi, G. P. Bates and E. Holmes, *J. Proteome Res.*, **5**, 483-492 (2006).
46. M. R. Viant, B. G. Lyeth, M. G. Miller and R. F. Berman, *NMR Biomed.*, **18**, 507-516 (2005).
47. E. Holmes, T. M. Tsang, J. T. J. Huang, F. M. Leweke, D. Koethe, C. W. Gerth, B. M. Nolden, S.

- Gross, D. Schreiber, J. K. Nicholson and S. Bahn, *PLoS Med.*, **3**, 1420-1428 (2006).
48. M. P. Quinones and R. Kaddurah-Daouk, *Neurobiol. Dis.*, **35**, 165-176 (2009).
49. K. Dettmer, P. A. Aronov and B. D. Hammock, *Mass Spectrom. Reviews*, **26**, 51-78 (2007).
50. M. E. Dumas and L. Davidovic, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **10**, 402-424 (2015).
51. J.-L. Wolfender, G. Marti, A. Thomas and S. Bertrand, *J. Chromatogr. A*, **1382**, 136-164 (2015).
52. B. Peng, H. Li and X. X. Peng, *Protein Cell*, **6**, 628-637 (2015).
53. M. J. Nunes de Paiva, H. C. Menezes and Z. de Lourdes Cardeal, *Analyst*, **139**, 3683-3694 (2014).
54. C. Silva, C. Cavaco, R. Perestrelo, J. Pereira and J. S. Câmara, *Metabolites*, **4**, 71-97 (2014).
55. H. Xing, K. Zhang, R. Zhang, Y. Zhang, L. Gu, H. Shi, K. Bi and X. Chen, *J. Chromatogr. B*, **988**, 135-142 (2015).
56. L. Zhao, S. Zheng, G. Su, X. Lu, J. Yang, Z. Xiong and C. Wu, *J. Chromatogr. B*, **988**, 59-65 (2015).
57. J. Marcos, N. Renau, O. Valverde, G. Aznar-Lain, I. Gracia-Rubio, M. Gonzalez-Sepulveda, L. A. Pérez-Jurado, R. Ventura, J. Segura and O. J. Pozo, *J. Chromatogr. A*, **1434**, 91-101 (2016).
58. J.-M. T. Wong, P. A. Malec, O. S. Mabrouk, J. Ro, M. Dus and R. T. Kennedy, *J. Chromatogr. A*, **1446**, 78-90 (2016).
59. J. Chen, W. Hou, B. Han, G. Liu, J. Gong, Y. Li, D. Zhong, Q. Liao and Z. Xie, *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 2527-2542 (2016).
60. F. Gosetti, E. Mazzucco, M. C. Gennaro and E. Marengo, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 907-916 (2013).
61. K. Sadiilkova, K. Dugaw, D. Benjamin and R. M. Jack, *Clin. Chim. Acta*, **424**, 253-257 (2013).
62. P. Hušek, Z. Švagera, D. Hanzlíková, L. Āimneova, H. Zahradniekova, I. Opekarova and P. Šimek, *J. Chromatogr. A*, **1443**, 211-232 (2016).
63. S. Tufi, M. Lamoree, J. de Boer and P. Leonards, *J. Chromatogr. A*, **1395**, 79-87 (2015).
64. Y. He, X.-E. Zhao, S. Zhu, N. Wei, J. Sun, Y. Zhou, S. Liu, Z. Liu, G. Chen, Y. Suo and J. You, *J. Chromatogr. A*, **1458**, 70-81 (2016).
65. L. Zheng, X.-E. Zhao, S. Zhu, Y. Tao, W. Ji, Y. Geng, X. Wang, G. Chen and J. You, *J. Chromatogr. B*, **1054**, 64-72 (2017).
66. X.-E. Zhao, Y. He, M. Li, G. Chen, N. Wei, X. Wang, J. Sun, S. Zhu and J. You, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **135**, 186-198 (2017).
67. X. Yang, Y. Hu, G. Li, and Z. Zhang, *J. Sep. Sci.*, **8**, 1380-1387 (2015).
68. H. He, E. Carballo-Jane, X. Tong and L. H. Cohen, *J. Chromatogr. B*, **997**, 154-161 (2015).
69. N. Tohmola, O. Itkonen, U. Turpeinen, S. Joenvaara, R. Renkonen and E. Hamalainen, *Clin. Chim. Acta*, **446**, 206-212 (2015).
70. X. Li, S. Li, P. Wynveen, K. Mork and G. Kellermann, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 7287-7297 (2014).
71. F. Schumacher, S. Chakraborty, B. Kleuser, E. Gulbins, T. Schwerdtle, M. Aschner and J. Bornhorst, *Talanta*, **144**, 71-79 (2015).
72. L. Hao, X. Zhong, T. Greer, H. Ye and L. Li, *Analyst*, **140**, 467-475 (2015).
73. W. Y. Hsu, C. M. Chen, F. J. Tsai and C. C. Lai, *Clin. Chim. Acta*, **420**, 140-145 (2013).
74. N. H. Park, J. Y. Hong, H. J. Shin and J. Hong, *J. Chromatogr. A*, **1305**, 234-243 (2013).
75. H. J. Shin, N. H. Park, W. Lee, M. H. Choi, B. C. Chung and J. Hong, *J. Chromatogr. B*, **1051**, 97-107 (2017).
76. H. Lu, J. Yu, J. Wang, L. Wu, H. Xiao and R. Gao, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **122**, 42-51 (2016).
77. H. I. Woo, J. S. Yang, H. J. Oh, Y. Y. Cho, J. H. Kim, H.-D. Park and S.-Y. Lee, *Clin. Biochem.*, **49**, 573-579 (2016).
78. M. Monteleone, A. Naccarato, G. Sindona and A. Tagarelli, *Anal. Chim. Acta*, **759**, 66-73 (2013).
79. D. S. Domingues, E. J. Crevelin, L. A. B. De Moraes, J. E. C. Hallak, J. A. De Souza Crippa and M. E. C. Queiroz, *J. Sep. Sci.*, **38**, 780-787 (2015).
80. Q. Liang, H. Liu, T. Zhang, Y. Jiang, H. Xing and A. Zhang, *RSC Adv.*, **6**, 3586-3591 (2016).
81. X.-J. Zhai, F. Chen, C. R. Zhu and Y.-N. Lu, *Biomed. Chromatogr.*, **29**, 1737-1743 (2015).
82. C. Lv, Q. Li, X. Liu, B. He, Z. Sui, H. Xu, Y. Yin, R. Liu and K. Bi, *J. Mass Spectrom.*, **50**, 354-363 (2015).
83. J. Bicker, A. Fortuna, G. Alves and A. Falco, *Anal.*

- Chim. Acta*, **768**, 12-34 (2013).
84. L. Brunelli, G. Ristagno, R. Bagnati, F. Fumagalli, R. Latini, R. Fanelli and R. Pastorelli, *Metabolomics*, **9**, 839-852 (2013).
85. X. Han, M. Min, J. Wang, Z. Bao, H. Fan, X. Li, T.I. Adelusi, X. Zhou and X. Yin, *J. Neurosci. Res.*, (2017), DOI: 10.1002/jnr.24098.
86. L. Konieczna, A. Roszkowska, A. Synakiewicz, T. Stachowicz-Stencel, E. Adamkiewicz-Drożyńska and T. Baczek, *Talanta*, **150**, 331-339 (2016).
87. M. M. Moein, A. Abdel-Rehim and M. Abdel-Rehim, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **67**, 34-44 (2015).
88. M. M. Khamis, D. J. Adamko and A. El-Aneed, *Mass Spectrom. Reviews*, **36**, 115-134 (2017).
89. D. T. Nguyen, I. S. Cho, J. W. Kim, K. R. Kim, G. Lee and M. J. Paik, *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 216-221 (2013).
90. L. Konieczna, A. Roszkowska, M. Niedwiecki and T. Baczek, *J. Chromatogr. A*, **1431**, 111-121 (2016).
91. B. Hashemi, P. Zohrabi, K.-H. Kim, M. Shamsipur, A. Deep and J. Hong, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **97**, 83-95 (2017).
92. I. Moreno, M. Barroso, A. Martinho, A. Cruz and E. Gallardo, *J. Chromatogr. B*, **1004**, 67-78 (2015).
93. T. Rosenling, M. P. Stoop, A. Smolinska, B. Muilwijk, L. Coulier, S. Shi, A. Dane, C. Christin, F. Suits, P.L. Horvatovich, S. S. Wijmenga, L. M. C. Buydens, R. Vreeken, T. Hankemeier, A. J. Van Gool, T. M. Luider and R. Bischoff, *Clin. Chem.*, **57**, 1703-1711 (2011).
94. J. M. T. Wong, P. A. Malec, O. S. Mabrouk, J. Ro, M. Dus and R. T. Kennedy, *J. Chromatogr. A*, **1446**, 78-90 (2016).
95. L.-H. Zhang, H.-L. Cai, P. Jiang, H.-D. Li, L.-J. Cao, R.-L. Dang, W.-Y. Zhu and Y. Deng, *Anal. Methods*, **7**, 3929-3938 (2015).
96. A. Wojnicz, J. Avendaño Ortiz, A. I. Casas, A.E. Freitas, M. G. López and A. Ruiz-Nuño, *Clin. Chim. Acta*, **453**, 174-181 (2016).
97. W. Zhou, B. Zhu, F. Liu, C. Lyu, S. Zhang, C. Yan, Y. Cheng and H. Wei, *J. Chromatogr. B*, **1002**, 379-386 (2015).
98. K. Inoue, Y. Miyazaki, K. Unno, J. Z. Min, K. Todoroki and T. Toyo'oka, *Biomed. Chromatogr.*, **30**, 55-61 (2016).
99. M. S. S. Bergh, I. L. Bogen, E. Lundanes and Å. M. L. Øiestad, *J. Chromatogr. B*, **1028**, 120-129 (2016).
100. F. Kondo, M. Tachi, M. Gosho, M. Fukayama, K. Yoshikawa and S. Okada, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 5261-5272 (2015).
101. S. Greco, W. Danysz, A. Zivkovic, R. Gross and H. Stark, *Anal. Chim. Acta*, **771**, 65-72 (2013).
102. P. Voehringer, R. Fuertig and B. Ferger, *J. Chromatogr. B*, **939**, 92-97 (2013).
103. X.-E. Zhao, Y. He, P. Yan, N. Wei, R. Wang, J. Sun, L. Zheng, S. Zhu and J. You, *RSC Adv.*, **6**, 108635-108644 (2016).
104. A. Gottås, Å. Ripel, F. Boix, V. Vindenes, J. Mørland and E. L. Øiestad, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **74**, 75-79 (2015).
105. R. Nirogi, P. Komarneni, V. Kandikere, R. Boggavarapu, G. Bhyrapuneni, V. Benade and S. Gorentla, *J. Chromatogr. B*, **913-914**, 41-47 (2013).
106. X. S. Li, S. Li and G. Kellermann, *J. Chromatogr. A*, **1449**, 54-61 (2016).
107. T. M. Fonseka, X.-Y. Wen, J. A. Foster and S. H. Kennedy, *J. Neurosci. Res.*, **94**, 3-14 (2016).
108. A. Aragon, J. Legradi, A. Ballesteros-Gómez, J. Legler, M. van Velzen, J. de Boer and P. Leonards, *Anal. Bioanal. Chem.*, **409**, 2931-2939 (2017).
109. S. Lista, H. Zetterberg, B. Dubois, K. Blennow and H. Hampel, *J. Neurol.*, **261**, 1234-1243 (2014).
110. R. González-Domínguez, A. Sayago and Á. Fernández-Recamales, *J. Chromatogr. B*, (2017) DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.02.008.
111. M. M. Koek, R. H. Jellema, van der J. Greef, A.C. Tas and T. Hankemeier, *Metabolomics*, **7**, 307-328 (2011).
112. K. K. Pasikanti, P. C. Ho and E. C. Y. Chan, *J. Chromatogr. B*, **871**, 202-211 (2008).
113. P. Štímek, P. Husěk and H. Zahradníčková, *Anal. Chem.*, **80**, 5776-5782 (2008).
114. N. A. Alterman and P. Hutzinger, In 'Amino acid handbook', Chapter 13, Springer, New York, 2012.
115. M.-J. Paik, D.-T. Nguyen, J. Yoon, H. S. Chae, K.-R. Kim, G. Lee and P. C. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **32**, 2418-2422 (2011).
116. K.-R. Kim, H.-G. Park, M.-J. Paik, H.-S. Ryu, K.S.

- Oh, S.-W. Myung and H. M. Liebich, *J. Chromatogr. B.*, **712**, 11-22 (1998).
117. M.-J. Paik, E.-Y. Cho, H. Kim, K.-R. Kim, S. Choi, Y.-H. Ahn and G. Lee, *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 450-453 (2008).
118. M.-J. Paik, H.-J. Lee and K.-R. Kim, *J. Chromatogr. B.*, **821**, 94-104 (2005).
119. M.-J. Paik and K.-R. Kim, *J. Chromatogr. A*, **1034**, 13-23 (2004).
120. S. T. Kadam and S. S. Kim, *J. Organomet. Chem.*, **694**, 2562-2566 (2009).
121. M. Sano, V. Ferchaud-Roucher, C. Nael, A. Aguesse, G. Poupeau, B. Castellano and D. Darmaun, *J. Mass Spectrom.*, **49**, 128-135 (2014).
122. Ø. Middtun, G. Kvalheim and P. M. Ueland, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 2009-2017 (2013).
123. W. Lee, N. H. Park, T.-B. Ahn, B. C. Chung and J. Hong, *J. Chromatogr. A*, (2017), DOI: 10.1016/j.chroma.2017.10.021.
124. S. Jiang, Z. Liang, L. Hao and L. Li, *Electrophoresis*, **37**, 1031-1038 (2016).
125. H. Chu, A. Zhang, Y. Han, S. Lu, L. Kong, J. Han, Z. Liu, H. Sun and X. Wang, *J. Chromatogr. B*, **1015-1016**, 50061 (2016).