

ESI-MS/MS를 이용한 소변 중 Globotriaosylceramide(Gb3)의 정량 및 임상 응용; 패브리병(Fabry) 진단

윤혜란[#] · 조경희^{**} · 강승우^{**} · 권영주^{***} · 정준식^{*} · 이용수^{*}

덕성여자대학교 약학대학 생의약분석실, *병태생리 및 약물학실, **바이오코아 분석연구팀,

***고려대학교 의과대학 내과학 교실

(Received February 5, 2007; Revised March 19, 2007)

Method Development for the Profiling Analysis of Urine Globotriaosylceramide (Gb3) for the Screening of Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry

Hye-Ran Yoon[#], Kyunghee Cho^{**}, Seungwoo Kang^{**}, Young Joo Kwon^{***},
Choon Sik Jeong^{*} and Yong Soo Lee^{*}

Dept. of Biomedical & Pharmaceutical Analysis,

*Dept. of Pathophysiology & Pharmacology, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Korea

**Dept. of Analytical Research, BioCore Co., LTD, Korea

***Dept. of Internal Medicine, College of Medicine, Korea University, Korea

Abstract – Measurement of globotriaosylceramide (Gb3, ceramide trihexoside) in urine has clinical importance for monitoring after enzyme replacement therapy in Fabry disease patients. The disease is an X-linked lipid storage disorder that results from a deficiency of the enzyme α -galactosidase A (α -Gal A). The lack of α -Gal A causes an intracellular accumulation of glycosphingolipids, mainly Gb3. A simple, rapid, and highly sensitive analytical method for Gb3 in urine was developed without labor-extensive pre-treatment by electrospray ionization MS/MS (ESI-MS/MS). Only simple 5-fold dilution of urine is necessary for the extraction and isolation of Gb3 in urine. Gb3 in diluted urine was dissolved in dioxane containing C17:0 Gb3 as an internal standard. After centrifugation it was directly injected and analyzed through guard column by in combination with multiple reaction monitoring mode of ESI-MS/MS. Eight isoforms of Gb3 were completely resolved from urine matrix. C24:0 Gb3 occupied 50% of total Gb3 as a major component in urine. Linear relationship for Gb3 isoforms was found in the range of 0.005~5.0 μ g/ml. The limit of detection ($S/N=5$) was 0.005 μ g/ml and limit of quantification was 0.05 μ g/ml for C24:0 Gb3 with acceptable precision and accuracy. Correlation coefficient of calibration curves for 8 Gb3 isoforms ranged from 0.9598 to 0.9975. This method could be useful for rapid and sensitive 1st line Fabry disease screening, monitoring and/or diagnostic tool for Fabry disease.

Keywords □ quantification, globotriaosylceramide (Gb3), MS/MS, fabry disease, screening

패브리병(Anderson-Fabry disease)은 X-염색체 연관 희귀유전 질환으로 리소좀에 있는 효소인 alpha-galactosidase A(EC 3.2.1.22)의 부분 결함 혹은 전체 결함으로 인해 glycosphingolipid인 globotriaosylceramide(Gb3, CTH, ceramide trihexoside)가 세포내 리소좀에 축적되는 지질 축적 질환이다. X-염색체 연관 질환이므로 임상증상이 나타나는 패브리병 환자는 대부분 남자

(hemizygotes)이고 여자는 임상증상을 거의 나타내지 않거나 보인자(heterozygotes)이다.^{1,3)}

최근 패브리병 치료에 있어서의 큰 진전으로 여겨지고 있는 것은 효소치료 후 소변이나 혈 중 Gb3 수치가 극적으로 감소하고 있다는 점이다.⁴⁻⁶⁾ 이러한 사실은 Gb3가 부가적인 biomarker로서의 기능을 할 수 있다는 점을 시사하고 있다. 그러나 생물학적 시료 중의 Gb3양을 정확히 측정하는 것은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 분자구조 자체가 가지고 있는 복잡성과 함께 산성과 염기성의 양쪽성 분자의 성격을 가진 구조로 인해 물리 화학적 성질이 매우 복합적이어서 이의 분석은 매우 까다롭

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8387 (팩스) 02-997-1990
(E-mail) hyeran11@duksung.ac.kr

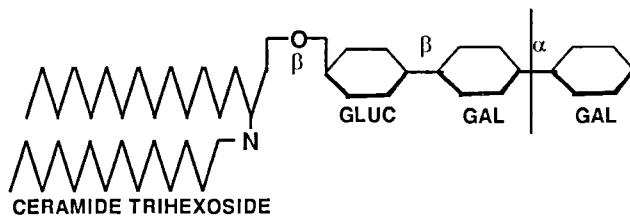


Fig. 1 – Structure of Globotriaosylceramide (Gb3).

다.^{7,8)} 즉 스팽고 염기(긴 사슬 염기)와 지방산 아실 복합체인 구조가 Gb3 전체구조의 복잡성을 더욱 증가시켜 이 물질의 정량의 어려움을 더해 주고 있을 뿐만아니라 이런 복잡한 구조의 Gb3는 8가지 이상의 isoform으로 구성 되어있어 각 isoform 들의 완전한 분리 및 정량을 어렵게 하고 있다.

보고되고 있는 일반적인 분석방법은 이러한 모든 Gb3 isoform 을 한 번에 통합하여 측정하는 "총 Gb3"를 측정하는 방법이 널리 사용되고 있으며, 이렇게 한꺼번에 "총 Gb3"를 측정하는 분석방법을 사용함으로써 분석의 전처리와 분리의 복잡함을 어느 정도 해소 제거하고자 하였다. "총 Gb3"를 측정하는 방법으로는 박층 크로마토그래피,⁹⁾ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)¹⁰⁾가 광범위하게 사용되고 있으며, 그 외에도 "총 Gb3"를 측정하는 방법으로 액체크로마토그래피-차외검출법(LC-UV),¹¹⁻¹⁶⁾ 기체크로마토그래피- 불꽃이온화 검출법(GC-FID)¹⁷⁾이 보고되었다.¹⁶⁾ 그러나 액체크로마토그래피나 기체크로마토그래피를 이용하는 두 방법 모두 Gb3 isoform을 측정할 때 유도체를 조제하여 간접적으로 측정하여야 하므로 기기 분석에 적합한 유도체화를 만들 때 매우 오랜 시간이 걸린다는 단점이 있다.

최근에는 소변 중 "총 Gb3"의 측정을 위해 흐름 주입법과 함께 하는 전자 분무 이온화 이중질량분석법(ESI-MS/MS, electrospray tandem mass spectrometry)을 이용하는 것이 보고되었다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 이 방법은 Gb3를 유도체화 할 필요가 없으므로 비교적 짧은 시간에 분석을 할 수 있는 직접 측정방법으로 분석 감도 또한 우수하며, "총 Gb3"가 아닌 개개의 Gb3 isoform을 각각 따로 정량 할 수 있는 우수한 점이 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 보고되고 있는 기준의 방법은 glycolipid인 Gb3 분석을 위해 총 지질을 클로로포름과 메탄올 혼액 용매상에서 액체-액체 추출법을 이용하여 추출한 후 많은 시간과 노동력과 비용이 수반되는 고체상 추출법을 이용하여 총 지질을 정제하여 디메틸суլ파이드(DMSO)에 녹이는 과정이 보고되고 있다.^{10,16)}

본 연구에서는 Gb3의 추출시 많은 시간과 노동력이 요구되는 ODS를 이용하는 고체상추출법을 사용 하지 않고 직접희석 및 추출을 한 후 ESI-MS/MS을 이용하였다. 이 방법은 국내에서는 처음으로 시도되어 보고되는 분석법으로 소변 시료 중의 Gb3를 직접 추출한 후 분석함으로써 기존의 고체상 추출방법에 비해 빠른 분석시간과 고감도, 그리고 좋은 재현성의 장점이 있으며 이

를 이용하여 국내에 대부분의 의료진이 관심을 갖지 않는 희귀 유전질환인 패브리병 환자의 진단 및 임상추적 검사에 유용하게 이용될 수 있으므로 보고하고자 한다.

본 연구에서는 개발된 분석방법으로 희귀 유전성대사질환 환자인 패브리병 환자의 소변을 분석함으로써 본 방법의 임상이용 가능성을 보여 주었고, 확진 검사 및 환자의 모니터링을 할 수 있음을 시사하는 사례를 보여주었다. 향후 이 방법을 이용하여 외국의 스크리닝 결과와 한국인의 스크리닝 결과 사례를 비교 연구함으로써 질환의 발생빈도를 추측 관찰하여 국내에서 이 병에 대한 적절한 대책 수립의 근거가 될 수 있는 매우 유용한 분석법으로 사료되어 보고하고자한다.

실험 방법

시약 및 기기

Ceramide trihexosides(globotriaosylceramide, Gb3)는 Matreya 사(PA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 내부표준액인 C17:0-Gb3는 Genzyme사(MA, USA)에서 제공한 것을 사용하였다. HPLC급 시약인 용매 및 이동상인 메탄올, 클로로포름, 아세톤, 암모니움아세테이트는 Sigma사(MO, USA) 및 Tedia사 (OH, USA)에서 구입하여 사용하였다. 초순수 증류수는 Millipore MilliQ™ system의 표준 정제수 정제 시스템(MA, USA)을 이용하여 정제된 18 MΩ·cm의 증류수를 사용하였다. 이동상의 용매와 초순수 증류수는 Millipore membrane filter 시스템 통해 Whatman사(Maidstone, U.K.)의 nylon membrane filter(0.2 μm)로 여과한 후 10분간 탈기하여 사용하였다. C8 guard cartridge 칼럼은 Phenomenex사(CA, USA)로부터 구입하였다.

소변 시료 분석에 사용한 ESI-MS/MS로는 Applied Biosystems 사(MA, USA)의 API 4000 triple quadrupole 모델을 사용하였으며, HPLC 및 펌프는 Agilent 1100 시리즈 이중 마이크로 펌프(CA, USA) 모델과 함께 CTC Analytics AG사(Zwingen, Switzerland)의 HTS PAL autosampler를 사용하였다. 데이터는 Analyst(version 1.4.2)를 이용하여 처리하였다.

소변 검체의 채취

효소 검사와 DNA 유전자 분석을 통하여 패브리병 환자로 확진되어 효소치료를 시작하는 환자를 대상으로하여 효소투여 전과 후의 임상 추적관찰을 위해 병원에 내원할 때마다 무작위 소변을 1 mL씩 채취한 후 분석 전까지 -70°C에서 냉동 보관하였다.

소변 중 Gb3 정량

표준용액 조제 - -70°C에서 냉동 보관된 Gb3 표준품을 메탄올/클로로포름(2 : 1, v/v)에 녹여 농도를 Gb3로 1 mg/ml로 조제하여 stock 표준용액을 냉장 보관하였다. Stock 표준용액을 메탄올

로 50배 희석하여 농도를 Gb3로서 20 µg/mL로 조제하여 working 표준용액을 냉장 보관하였다. -70°C에서 냉동 보관된 C17:0-Gb3 내부표준품을 메탄올/클로로포름(2 : 1, v/v)에 녹여 농도를 C17:0-Gb3로서 5 µg/mL로 조제하여 stock 내부표준용액으로 하여 냉장 보관하였다. Stock 내부표준 용액은 메탄올/클로로포름(2 : 1, v/v)에 2배 희석하여 농도를 C17:0-Gb3로서 2.5 µg/mL 조제하여 working 내부 표준용액으로 조제하여 냉장 보관하여 사용하였다. 표준용액과 내부표준용액은 분석 전까지 -20°C 이하로 냉동 보관하였다.

검량선 작성 – 표준액(20 µg/mL)은 공소면 및 디옥산으로 희석하여 최종용액 1 mL 중 Gb3의 농도가 각각 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 및 5.0 µg/mL이 되도록 조제하였고 내부표준액(2.5 µg/mL)을 첨가하여 검량선의 용액을 조제하였다. 서로 다른 6개의 Gb3 농도가 되도록 공소면 200 µL를 각각의 유리튜브에 넣고 여기에 내부표준물질인 C17:0-Gb3 5 µL(2.5 µg/mL)을 가하고 희석용매인 디옥산을 가하여 최종부피를 1 mL로 하였다. 이 액을 vortex mix로 30초 간 잘 섞은 후 30초 간 초음파로 다시 잘 섞고 5분 간 원심분리(10,000 rpm)하여 autosampler용 유리튜브로 옮겼다. 이 중 5 µL를 텐덤매스로 주입하였고 C₈ guard cartridge 칼럼을 통하여 ESI-MS/MS로 분석하였다. 여기서 얻은 내부표준물질의 피크면적에 대한 Gb3의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다.

ESI-MS/MS 조건 – 위와 같이 전처리 된 소변 시료 중 Gb3 분석은 다음 조건에서 분석되었다. 이동상 A는 2 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid를 포함하는 탤이온 중류수를 사용했고, 이동상 B는 2 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid를 포함하는 메탄올을 사용했으며, 이동상 B는 20% 메탄올 농도로부터 80% 메탄올 농도까지의 농도구배조건을 사용하였다. 칼럼은 C₈ guard cartridge 칼럼(4.0 mm × 3.0 mm, 5 µm)을 사용하였으며, 유속은 500 µL/min, 이었고, 10 µL 크기의 시료루프를 사용하였고, 충돌 가스로는 초고순도 질소를 사용하였다. 칼럼 온도는 40°C였고 Gb3 isoform의 프로파일을 얻고 정량을 위해 MRM scan mode로 분석을 하였다. 이를 위한 모이온과 팔이온

Table I – Selected parent and daughter ion masses for the quantification of globotriaosylceramide (Gb3) standard

Gb3 isoform	Parent ion*	Daughter ion*	Formula
C16:0-Gb3	1046.64	884.64	C ₅₂ H ₉₇ NO ₁₈ Na
C18:0-Gb3	1074.65	912.65	C ₅₄ H ₁₀₁ NO ₁₈ Na
C20:0-Gb3	1102.68	940.68	C ₅₆ H ₁₀₅ NO ₁₈ Na
C22:1-Gb3	1128.68	966.68	C ₅₈ H ₁₀₇ NO ₁₈ Na
C22:0-Gb3	1130.68	968.68	C ₅₈ H ₁₀₉ NO ₁₈ Na
C24:1-Gb3	1156.71	994.71	C ₆₀ H ₁₁₁ NO ₁₈ Na
C24:0-Gb3	1158.71	996.71	C ₆₀ H ₁₁₃ NO ₁₈ Na
C24:OH-Gb3	1174.95	1012.95	C ₆₀ H ₁₁₃ NO ₁₉ Na
C17:0-Gb3(I.S.)**	1060.64	898.64	C ₅₃ H ₉₉ NO ₁₈ Na

* Selected ion presented as m/z (mass to charge ratio).

** I.S.; internal standard.

은 Table I과 같으며 이 두 이온을 정량이온으로 선택하여 정량하였다. Gb3 isoform 분석을 위한 최적의 MS/MS 조건은 de-clustering potential(DP)이 80 V, entrance potential(EP)이 10 V, collision energy(CE)가 22 V, collision cell exit potential(CXP)이 12 V, deflector(DF)가 -200 V, channel electron multiplier(CEM)가 2100 V, collision activated dissociation gas(CAD)가 6 psi, curtain gas(CUR)가 12 psi, nebulizer gas(NG)가 50 psi, auxiliary gas(AG)가 40 psi, ionspray voltage (ISV)가 5500 V 그리고 이온원 온도는 400°C였다. 데이터 처리장치로는 Analyst(version 1.4.2)을 사용하였다.

일간 일내 재현성 검토 – 하루에 실험을 7번 수행하여 일내 재현성을 구하였고, 3일 간 실험을 수행하여 일간 재현성을 구하였다. 회수율을 구하기 위하여 0.2 µg/mL 농도의 Gb3를 소변에 가하여 본 실험의 전처리 방법과 동일하게 처리하고, 이에 해당하는 농도의 표준용액과 각각 3회 분석하고 비교하여 각 농도에 해당하는 평균 회수율을 구하였다.

소변검체의 전처리 및 농도계산 – 정상인 및 패브리병 환자로부터 채취한 소변은 -70°C로 보관하였고 분석직전 실온에 방치하여 녹인 후 약 0.5분 동안 탁상용 혼합기에서 잘 섞은 후 200 µL를 유리튜브에 넣고 여기에 내부 표준물질인 C17:0-Gb3 5 µL(2.5 µg/mL)을 가하고 추출용매인 디옥산을 가하여 최종부피를 1 mL로하고 탁상용 혼합기로 30초간 잘 섞은 후 30초간 초음파로 다시 잘 섞고 5분간 원심분리(10,000 rpm)하여 CTC-PAL autosampler용 유리튜브로 옮겼다. 이 액의 5 µL를 텐덤매스의 이온원내로 주입하였다. Multiple reaction monitoring mode에서 얻어진 크로마토그램과 스펙트럼으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 Gb3의 피크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 소변 중 Gb3 농도를 구하였다.

결과 및 고찰

MRM 모드를 위한 이온선택

ESI-MS/MS로 분석시 MRM scan 모드를 사용하였고, Table I과 같이 특징적인 모이온과 팔이온으로 구분할 수 있었으며, 두 이온을 정량이온으로 선택하여 분석을 하였다. ESI-MS/MS로 Gb3 isoform을 분석하여 얻은 Fig. 2A와 같은 스펙트럼의 프로파일을 얻었다. 모든 Gb3 isoform들이 스펙트럼 상에서 모두 양호하게 잘 분리가 되었다(Fig. 2 A). 소변 내에는 8종류의 total Gb3 isoform 중 C24:0 Gb3가 50% 이상을 차지하여 가장 많은 성분비로 존재함을 알 수 있었다.

소변 중 Gb3의 분석법 검증

C16:0 Gb3, C18:0 Gb3, C20:0 Gb3, C22:0 Gb3, C24:1 Gb3, C24:0 Gb3, C24:0 OH Gb3, 및 내부표준액 C17:0 Gb3가

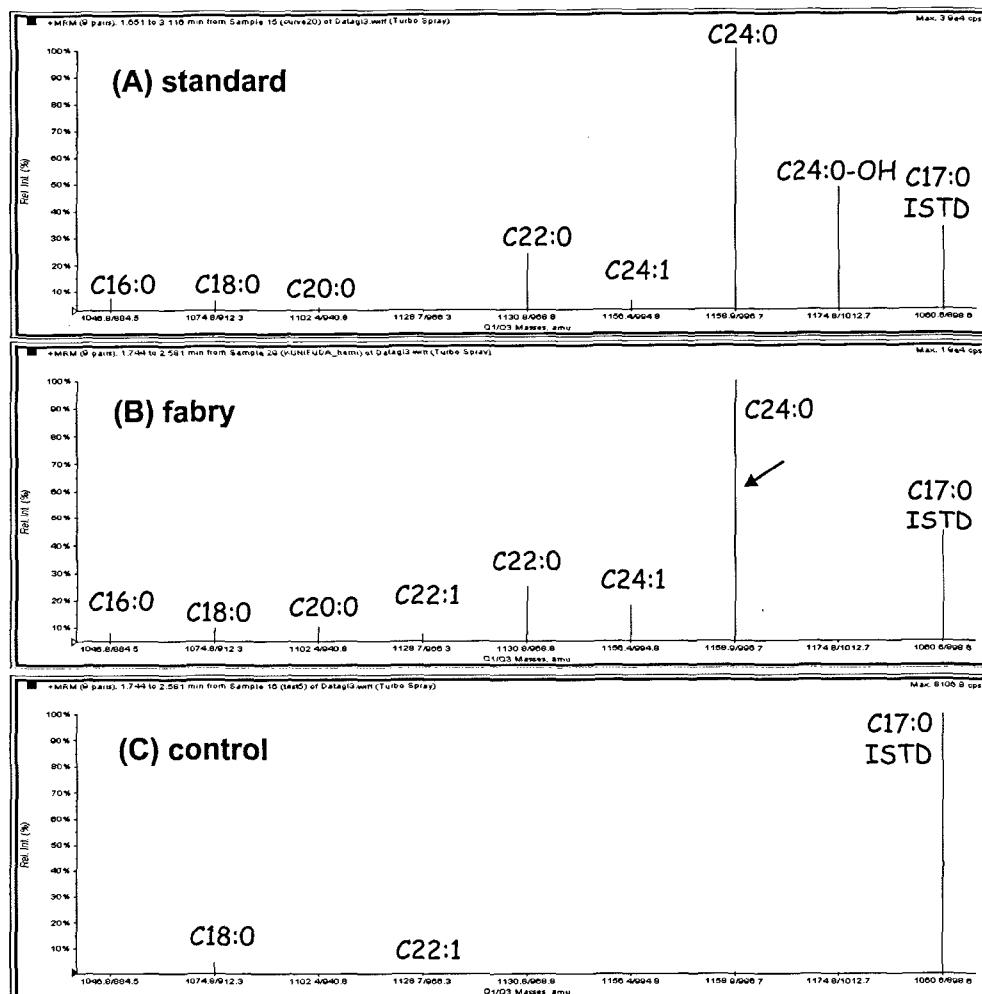


Fig. 2 – ESI-MS/MS multiple reaction monitoring spectra for (A)standard Gb3, (B) Fabry disease affected male urine, and (C) healthy control urine.

분석조건에서 다양한 성분을 가진 소변으로부터 잘 분리되었음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 건강한 소아(신생아~2세) 및 성인(2세 이상)의 소변, Gb3 및 내부표준물질인 C17:0 Gb3를 첨가한 소변을 본 분석법에 따라 ESI-MS/MS로 분석하여 얻은 스펙트럼을 Fig. 2C에서 보여지는 것과 같이 정상 대조 소변들은 Gb3가 거의 나타나지 않는다.

공소변 시료에 내부표준물질만 첨가한 소변시료 및 Gb3의 농도가 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 및 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 되도록 조제한 검량선용 표준소변시료를 각각 전처리한 후 ESI-MS/MS로 분석하였을 때 얻어진 C24:0 Gb3의 검량선의 직선성을 위한 회귀식은 $Y(\text{Gb3}/\text{내부표준물질 피크면적비율}) = 0.5038 X(\text{Gb3 농도, } \mu\text{g}/\text{mL}) + 0.3758$ ($R^2 = 0.9976$)으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 3). 검량선용 표준소변시료의 농도를 회석하여 직선성을 나타내는 범위를 구해 본 결과 0.005~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위 내에 있었으며, Gb3 isoform들의 검량선들은 R^2 은 0.9598~0.9976 범위에 속하였다. 직선성을 나타내는 범위 내에서 신호 대 잡음비(S/N 비)가

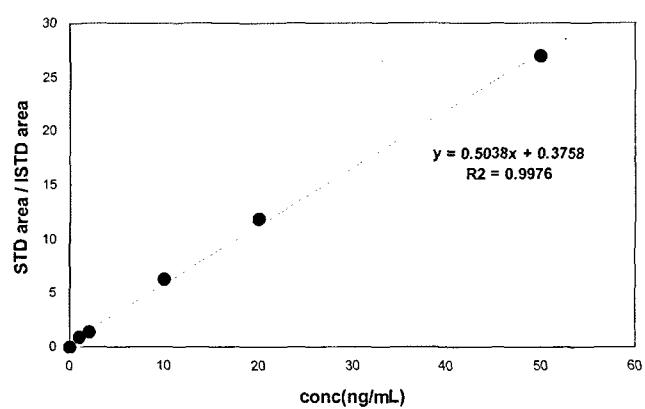


Fig. 3 – Calibration curve for major Gb3 component in urine, C24:0 Gb3.

5가 될 때 얻은 소변 중 Gb3 isoform의 검출한계(LOD, limit of detection)는 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였고, 정밀도 5% 이내에서의 정량한계(LOQ, limit of quantification)는 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 직선성의 범

Table II – Reproducibility for urine Gb3 quantification

	Amount added	SD (%)	Precision C.V. (%)	Accuracy (%)
Intra-day (n=7)	0.2 µg/ml	2.3	3.74	93.51
Inter-day (n=3)	0.2 µg/ml	2.1	3.49	98.23

C.V. (coefficient of variation)=(SD; standard deviation/Mean)×100.

Table III – Urine Gb3 concentration measured in normal controls, carrier females, and fabry disease males (Seoul, Korea)

Classification	Urine (µg/mg creatinine)*
Normal controls (n=57)	0.01~0.90 (0.17±0.20)
Carrier females (n=3)	0.01~0.70 (0.38±0.27)
Fabry disease males (n=8)	2.90~15.10 (7.38±4.15)

* Concentration presented as mean±SD.

위를 나타내는 범위에서 회수율을 구하기 위하여 0.2 µg/ml 농도의 Gb3를 소변에 가하여 본 실험의 전처리 방법과 동일하게 처리하고, 이에 해당하는 농도의 표준용액과 각각 3회 분석하고 비교하여 각 농도에 해당하는 평균 회수율을 구하였다. 이때의 정밀성은 5% 이하, 정확성이 93~98%인 조건을 만족하였다(Table II).

이로부터 소변 중 Gb3의 ESI-MS/MS 분석법은 임상시험에 적용될 수 있는 충분한 감도, 직선성, 재현성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

소변 중 Gb3 분석법의 임상적 응용

본 연구에서 개발된 분석방법을 실제 임상시료에 적용시켜 한국인에게 적용시키기 위한 정상인의 소변 중 참고 범위를 설정하였다. 한국인 소변에서 구한 Gb3의 참고 범위는 정상인(n=57)의 경우 0.01~0.90 µg/mg creatinine, 보인자(heterozygote)인

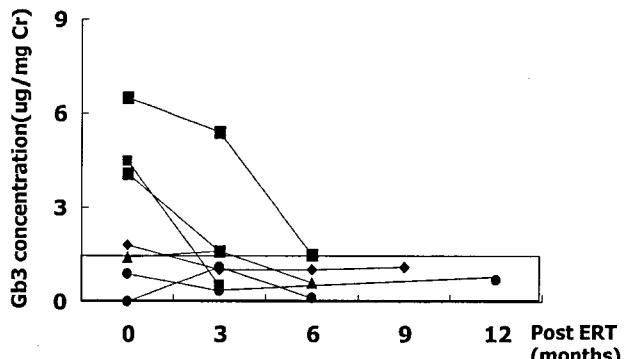
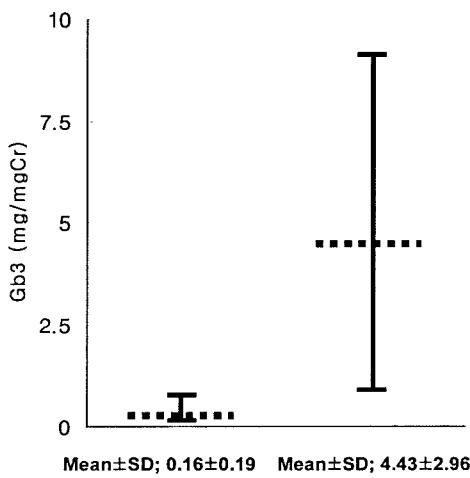


Fig. 5 – Sequential change of urine Gb3 concentration during enzyme replacement therapy.

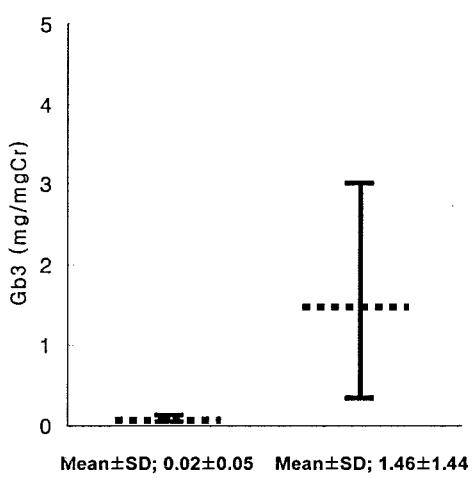
여성(n=3)의 경우 0.01~0.70 µg/mg creatinine, 패브리병 환자인 남성(n=8)의 경우는 2.90~15.10 µg/mg creatinine의 범위에 각각 속하는 것으로 나타났다(Table III, Fig. 4).

패브리병인 남성 환자의 Gb3 농도는 정상인의 소변 중 Gb3 농도보다 월등히 높은 농도범위에 있었고 이러한 사실은 스펙트럼 상에서도 확연하게 구분이 가능하였다(Fig. 2B, Fig. 4). 특히 패브리병 환자의 소변에서는 다양한 Gb3 isoform들 중에서 C24:0 Gb3가 현저하게 정상소변보다 증가되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2B).

7명의 확진된 패브리병 환자 남성의 소변 중 Gb3의 농도를 임상 추적 검사 모니터링하면서 효소치료법(enzyme replacement therapy) 전 후의 Gb3농도의 감소효과를 검토하였다. 효소치료 전과 비교하였을 때, 효소치료 후 3, 6, 9, 12개월 후에 치료효과가 나타나면서 소변 중 Gb3의 농도가 현저히 감소되어 6개월 이후부터는 정상범위에 속하거나 거의 정상범위의 수준에 있게 됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5).



(A) total Gb3



(B) C24:0 Gb3

Fig. 4 – Reference range of urine Gb3 concentration; (A) total Gb3 and (B) C24:0 Gb3 for healthy control (left side of A and B) and Fabry disease affected male (right side of A and B).

따라서, 본 연구에서의 분석방법이 패브리병 환자의 확진검사와 환자의 치료 전 후의 임상 추적 모니터링에 유용하게 응용할 수 있음을 보여주었다.

결 론

Gb3의 분석법이 국내에서는 확립되지 않아 패브리병 환자를 모니터링하거나 진단할 때의 임상적 연구 관찰에 제한점이 된 측면이 있었으며, 전처리시 고체상 추출법을 이용하지 않으면서 Gb3 isoform을 텐덤매스로 분석한 경우는 아직까지 국내에서 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 국내에서는 처음으로 패브리병 환자의 진단, 스크리닝 및 모니터링을 할 목적으로 ESI-MS/MS를 사용하여 기존의 방법보다 신속하면서도 정확하게 Gb3를 정량 분석 할 수 있는 방법을 개발하였을 뿐만아니라 임상응용시의 판단근거로 제시할 수 있도록 정상인과 환자의 범위를 설정하였다. Gb3 전처리과정에서는 기존의 다른 분석방법들보다 시간을 월등히 단축시켰으며, 유도체화 과정도 제거하였고, 시료의 바탕 잡음의 방해를 최소화 하였다.

소변 중 Gb3 분석에서는 MRM scan 모드를 이용하였고, 모든 분석대상의 Gb3 isoform에 대한 일내 분석과 일간 분석에서 양호한 회수율과 직선성, 재현성을 보여 ESI-MS/MS를 이용한 Gb3 분석의 유용함을 보여 주었다. 소변 중 Gb3의 정상 범위와 환자 범위의 임상적 파라미터를 제시하였으며, 본 연구에서 개발된 분석법의 분석법 검증도 실시하였다.

실제 임상검체를 적용하여 유전성대사질환 환자인 패브리병 환자의 소변 내에서의 Gb3를 분석하여 정상인과 환자들의 농도 범위를 설정함으로써 향후 국내의 희귀질환자를 위한 패브리병 환자의 확진검사, 스크리닝 및 임상 추적 검사 모니터링에 유용하게 이용될 수 있음을 제시하였다.

감사의 말씀

본 연구는 2004-2005년 Genzyme Corporation (USA)의 연구비 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 본 연구의 일부는 2005-2007년 정부(교육인적자원부)의 지원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구이고(KRF-2005-005-과제 번호-J13002), 확진된 패브리병 환자의 추적검사용 시료를 지원해 주신 울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아과 유한우 교수님께 감사드립니다.

문 헌

1) Desnick, R. J., Brady, R., Barranger, J., Collins, A. J., Germain,

- D. P., Goldman, M. G., Packman, S., Wilcox, W. R. and Grabowski, J. : Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder : expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann. Intern. Med.* **138**(4), 338 (2003).
- 2) Barbey, E., Hayoz, D., Widmer, U. and Burnier, M. : Efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* **2**(4), 277 (2004).
- 3) Eng, C. M., Guffon, N., Wilcox, W. R., Germain, D. P., Lee, P., Waldek, S., Caplan, L., Linthorst, G. E. and Desnick, R. J. : Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N. Engl. J. Med.* **345**(1), 9 (2001).
- 4) Thurberg, B. L., Rennke, H., Colvin, R. B., Dikman, S., Gordon, R. E., Collins, A. B., Desnick, R. J. and O'Callaghan, M. : Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int.* **62**, 1933 (2002).
- 5) Desnick, R. J., Brady, R., Barranger, J., Collins, A. J., Germain, D. P., Goldman, M., Grabowski, G., Packman, S. and Wilcox, W. R. : Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann. Int. Med.* **138**, 338 (2003).
- 6) Frustaci, A., Chimenti, C., Ricci, R., Natale, L., Russo, M. A., Pieroni, M., Eng, C. M. and Desnick, R. J. : Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy. *N. Engl. J. Med.* **345**(1), 25 (2001).
- 7) Schiffmann, R., Murray, G. J., Trec, D., Daniel, P., Sellos-Moura, M., Myers, M., Quirk, J. M., Zirzow, G. C., Borowski, M., Loveday, K., Anderson, T., Gillespie, F., Oliver, K. L., Jeffries, N. O., Doo, E., Liang, T. J., Kreps, Gunter, C. K., Frei, K., Crutchfield, K., Selden, R. F. and O'Brady, R. O. : Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 365 (2000).
- 8) Nelson, B. C., Roddy, T., Araghi, S., Wilkens, D., Thomas, J. J., Zhang, K., Sung, C. C. and Richards, S. M. : Globotriaosylceramide isoform profiles in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **805**(1), 127 (2004).
- 9) Berna, L., Asfaw, B., Conzelmann, E., Cerny, B. and Ledvinova, J. : Determination of urinary sulfatides and other lipids by combination of reversed-phase and thin-layer chromatographies. *Anal Biochem.* **269**(2), 304 (1999).
- 10) Zeidner, K. M., Desnick, R. J. and Ioannou, Y. A. : Quantitative determination of globotriaosylceramide by immunodetection of glycolipid-bound recombinant verotoxin B subunit. *Anal. Biochem.* **267**, 104 (1999).

- 11) Schiffmann, R., Murray, G. J., Treco, D., Daniel, P., Sellos-Moura, M., Myers, M., Quirk, J. M., Zirzow, G. C., Borowski, M., Loveday, K., Anderson, T., Gillespie, F., Oliver, K. L., Jeffries, N. O., Doo, E., Liang, T. J., Kreps, C., Gunter, K., Frei, K., Crutchfield, K., Selden, R. E. and O'Brady, R. O. : Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 365 (2000).
- 12) Gross, S. K. and McCluer, R. H. : High-performance liquid chromatographic analysis of neutral glycosphingolipids as their per-O-benzoyl derivatives. *Anal. Biochem.* **102**, 429 (1980).
- 13) Ullman, M. D. and McCluer, R. : Quantitative microanalysis of perbenzoylated neutral glycosphingolipids by high-performance liquid chromatography with detection at 230 nm. *J. Lipid Res.* **19**, 910 (1978).
- 14) Lee, W. M. F., Westrick, M. A. and Macher, B. A. : High-performance liquid chromatography of long-chain neutral glycosphingolipids and gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta.* **712**, 498 (1982).
- 15) Strasberg, P. M., Warren, I., Skomorowski, M. A. and Lowden, J. A. : HPLC analysis of neutral glycolipids: an aid in the diagnosis of lysosomal storage disease. *Clin. Chim. Acta.* **132**, 29 (1983).
- 16) Yoo, H. H., Son, J. and Kim, D. H. : Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of ceramides and related lipid species in cellular extracts. *J. Chromatogr. B* **843**(2), 327 (2006).
- 17) Fauler, G., Rechberger, G. N., Devrnja, D., Erwa, W., Plecko, B., Kotanko, P., Breunig, F. and Paschke, E. : Rapid determination of urinary globotriaosylceramide isoform profiles by electrospray ionization mass spectrometry using stearoyl-d35-globotriaosylceramide as internal standard. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **19**(11), 1499 (2005).
- 18) Boscaro, F., Pieraccini, G., la Marca, G., Bartolucci, G., Luceri, C., Luceri, F. and Moneti, G. : Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **16**(16), 1507 (2002).
- 19) Nelson, B. C., Roddy, T., Araghi, S., Wilkens, D., Thomas, J. J., Zhang, K., Sung, C. C. and Richards, S. M. : Globotriaosylceramide isoform profiles in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **805**(1), 127 (2004).