

Quantification of seleno proteins in Korean blood serum using solid phase extraction and affinity chromatography-inductively coupled plasma/mass spectrometry

Ji-Yun Ahn, Hyo-Sik Kwon¹ and Yong-Nam Pak[★]

*Department of Chemistry Education, Korea National University of Education Cheng-Won,
Chung Buk 363-791, Korea*

*¹Department of Chemistry Education, Chung-Buk National University,
Cheng-Ju, Chung Buk 361-763, Korea*

(Received January 15, 2014; Revised March 7, 2014; Accepted March 7, 2014)

고체상 추출과 친화 크로마토 그래피-유도결합 플라즈마 질량분석법을 이용한 한국인 혈청에서의 셀레노 단백질 정량

안지윤 · 권효식¹ · 박용남[★]

한국교원대학교 화학교육학과, ¹충북대학교 화학교육학과
(2014. 1. 15. 접수, 2014. 3. 7. 수정, 2014. 3. 7. 승인)

Abstract: Interferences were removed using anion exchange solid phase extraction (AE SPE) in quantification of selenoproteins in Korean human blood serum with affinity high performance liquid chromatography (AF HPLC)-inductively coupled plasma/mass spectrometry (ICP/MS). The average selenium level obtained for healthy Koreans was $94.3 \pm 2.3 \text{ ng g}^{-1}$ using isotope dilution method. AE SPE was coupled to AF column to separate 3 selenoproteins, glutathione peroxidase GPx, selenoprotein SeLP, and selenoalbumin SeAlb. Post column isotope dilution was employed to quantify the proteins. The certified reference material of human blood serum BCR-637 was analyzed to give total selenoprotein concentration of $85.4 \pm 3.4 \text{ ng g}^{-1}$, which agreed well with the reference value of $81 \pm 7 \text{ ng g}^{-1}$. The pooled concentration of GPx, SeLP, and SeAlb from healthy Koreans ($n=20$) was $12.1 \pm 1.4 \text{ ng g}^{-1}$, $57.2 \pm 2.0 \text{ ng g}^{-1}$, and $20.0 \pm 1.9 \text{ ng g}^{-1}$, respectively. The sum of selenoproteins is 89.3 ng g^{-1} , which is about the same as the total selenium concentration of 94.3 ng g^{-1} . The fact suggests that selenium in blood serum is mostly consisted of selenoproteins. After the removal of interference, GPx showed a significant decrease (more than 50%) from 25.0 ng g^{-1} to 12.1 ng g^{-1} . It was identified that the interference in blood serum was mostly from GPx and the use of AE SPE was proven to be efficient in eliminating Cl and Br that cause interference to GPx.

요약: 본 연구에서는 음이온 고체상 추출법 (AE SPE; anion exchange solid phase extraction)을 사용하여 간섭요인을 제거한 후, 친화 크로마토그래피 (AF HPLC; affinity high performance liquid chromatography)와 유도결합 플라즈마 질량분석법 (ICP/MS; inductively coupled plasma/mass spectrometry)을 사용하여 한

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-230-3732 Fax : +82-(0)43-232-7176

E-mail : pakyn@knue.ac.kr

국인의 혈청에서의 셀레노 단백질들을 분리하고 정량하였다. 먼저 동위원소 희석법으로 셀레늄 총량을 분석한 결과, 건강한 한국 사람의 혈청내 평균농도는 $94.3 \pm 2.3 \text{ ng g}^{-1}$ 이었다. AE SPE와 AF 컬럼을 on-line으로 연결하여 셀레노단백질인 glutathione peroxidase (GPx), selenoprotein P (SeLP), selenoalbumin (SeAlb)을 분리하고, 후 컬럼 동위원소 희석법 (PC ID; post column isotope dilution)으로 정량하였다. 혈청 인증표준물질인 BCR-637을 분석한 결과 전체 셀레노 단백질의 합은 $85.4 \pm 3.4 \text{ ng g}^{-1}$ 으로 문헌값인 $81 \pm 7 \text{ ng g}^{-1}$ 과 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 20 명의 건강한 한국인의 혈청에서 얻은 셀레노 단백질 GPx, SeLP 및 SeAlb 의 농도는 각각 $12.1 \pm 1.4 \text{ ng g}^{-1}$, $57.2 \pm 2.0 \text{ ng g}^{-1}$, 그리고 $20.0 \pm 1.9 \text{ ng g}^{-1}$ 이었으며 이들의 합인 89.3 ng g^{-1} 은 셀레늄의 총량값인 94.3 ng g^{-1} 과 거의 같은 값으로 혈청에서의 셀레늄은 주로 셀레노 단백질로 구성되어 있음을 알았다. 이 중 GPx의 농도는 간섭을 제거하기 전인 25.0 ng g^{-1} 에 비해 50% 이상 크게 감소하였는데 이로서 간섭은 주로 GPx에 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. AE SPE는 간섭요인인 Cl과 Br을 제거 하는데 매우 효과적임을 보여주었다.

Key words: Korean blood serum, AF HPLC-ICP/MS, selenoproteins, GPx, SeLP, SeAlb, solid phase extraction

1. 서 론

셀레늄은 우리가 흔히 접하는 환경이나 식품에 널리 퍼져 있어 우리의 건강과 밀접하게 관련을 가지고 있다. 또한 셀레늄은 인체에서 유익성과 유해성의 농도 범위가 매우 좁은 필수 영양소¹로 적절한 셀레늄은 노화방지, 생식능력, 세균감염 등에 작용하는 구성요소이다. 20세기 중반까지만 해도 셀레늄은 주로 과일 섭취로 인한 독성과 발암성에 대한 기록만 있었지만 셀레늄이 쥐의 간경화를 예방한다는 보고² 이후 셀레늄에 관한 연구는 빠르게 발전해왔다. 셀레늄의 항암성질, 심장 질병의 예방 효과가 보고되었^{3,4} 이후 면역기능에서의 역할,⁵ 바이러스⁶와 HIV 바이러스의 억제,⁷ 노화 방지 작용⁸과 그 후에는 암에 대한 화학적 예방 효과⁹가 확인되었다.

이에 따라 미국 국립 암연구원은 셀레늄과 비타민 E를 함께 투여했을 때에 특정 암에 대하여 효과가 있는지를 검증하기 위한 대규모 연구 프로젝트 (SELECT; Selenium and Vit E cancer prevention trial)를 진행하였지만 2008년과 2011년 중간 결과 보고서를 통해 잠정적으로 암 예방에 큰 효과를 주지 못한다고 결론을 내렸다.¹⁰ 하지만 이것은 미국에 사는 연구대상그룹이 이미 셀레늄섭취가 충분히 이루어져있기 때문에 역지로 셀레늄의 섭취를 늘려도 인체에서의 셀레노 단백질이 추가로 합성되거나 농도가 증가하지 않아 그 효과가 미미하다고 보인다. 하지만 셀레늄의 섭취가 부족한 대사군에서는 분명히 셀레늄과 전립선 또는 유방암은 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으며⁹ 인체 내의 셀레늄량은 혈액에서의 셀레노 단백질과는 직

접적으로 연관이 있다.

그리고 인체에서의 총 셀레늄 양을 아는 것도 중요하지만 여러 셀레늄 화합물들 특히 우리 몸의 건강과 직접 연관된 셀레노 단백질들을 찾아내고 정량하는 것이 더욱 중요하다. 따라서 우리 한국인의 몸에 있는 셀레노 단백질의 양을 모니터링 할 뿐 아니라 어떤 종류의 셀레노 단백질이 어느 정도인지를 정확히 알아야 우리 한국인에 대한 셀레늄 결핍 또는 과잉에 따른 의미 있는 진단과 처방을 내릴 수 있게 될 것이다.

셀레노단백질 (selenoprotein)은 셀레늄을 포함한 단백질로서 유전자적 명령에 의한 셀레노시스테인 (SeCys; selenocysteine)이 단백질내에 참여한 경우와 셀레늄이 아미노산의 황의 위치 (예; SeMet)에 무작위로 치환되어 포함되는 셀렌 포함 단백질 (selenium containing protein)이 있다. 본 논문에서는 두 가지 경우 다 셀레노 단백질이라고 부르코자 한다. 셀레늄에 기인한 대부분의 생물학적 기능은 셀레노단백질에 의한 기인 된 것이라고 증명되었으며¹¹⁻¹²인체에는 최소한 35 개의 셀렌단백질과 셀렌 포함 단백질들이 확인되었지만 아직 많은 셀레노단백질의 기능과 조직분포는 여전히 밝혀지지 않았다. 대표적인 셀레노단백질에는 항산화제인 glutathione peroxidase (GPx)와 selenoprotein P (SeLP) 및 selenoalbumin (SeAlb) 가 있는데 GPx는 인체내에서 중요한 항산화 작용을 하며 간, 폐, 심장에서 주로 생성된다. SeLP의 과잉은 selenosis를 유발하며 알츠하이머병에 관련이 있다고 보고된 바 있다.¹³ 사람의 혈청에서 셀레늄은 SeCys의 형태로 GPx와 SeLP에 합성된다. 이와 달리 SeAlb은 methionine에서 황의 자리에 Se이 무작위로 대체된다. SeAlb은 인체내에서

셀레늄 영양 상태에 대한 bio-indicator 역할을 하는 좋은 지표가 되며 셀레늄이 부족한 경우 SeAlb이 가장 먼저 고갈되는 셀레노단백질이다.

이 셀레노 단백질들을 정확히 정량분석 하는데에는 몇 가지 어려운 점이 있는데 첫째는 그 농도가 매우 낮아서 분석에 어려운 점이 있다는 것이며 또한, 혈청에는 많은 다른 이온들이 공존하고 있기 때문에 심한 기질효과를 받는다는 것이다. 따라서 셀레노 단백질을 분리하고 높은 감도로 분석하기에는 HPLC-ICP/MS 방법이 매우 효과적이다. 초기에는 크기배제 크로마토 그래피 (SEC; size exclusion chromatography)를 사용하여 분리하는 방법이 있으나 시간이 많이 걸리고 분해능이 높지 않은 단점이 있었다.¹⁴ 본 연구에서도 기존의 방법을 개선하여 SEC-IPC/MS를 이용한 셀레노 단백질의 분리 및 검출이 가능하였지만 여전히 분리능이 그렇게 높지 않았다. 따라서 셀레노 단백질을 분리하기에 더 적합한 AF HPLC-ICP/MS를 이용한 연구들이 일부 진행되어 왔으나 주로 국외의 Jitaru와 Sanz-Medel 등의 소수의 연구자들¹⁵⁻²¹에 의해서만 진행되어 왔으나 아직 국내에서는 연구가 시행된 바 없다.

셀레노 단백질들의 정량 특히 GPx에서 Br과 Cl에 의한 간섭이 심하므로 간섭이온들을 제거할 필요가 대두되었으며 Jitaru¹⁷는 SPE를 사용하여 간섭이온을 제거한 뒤에 혈청에서의 셀레노 단백질들을 정량한 바 있다. 최근에 개발된 충돌/반응셀 ICP/MS는 비록 스펙트럼 방해 이온들을 제거할 수 있지만 반응기체로 수소를 사용할 때 또 다른 간섭이 발생하게 된다. 즉, 매트릭스에 과량 존재하는 Cl (⁴⁰Ar³⁷Cl on ⁷⁷Se) 또는 Br (⁸¹Br¹H on ⁸²Se)과 반응하여 동중분자들을 만들어 셀레늄의 측정에 간섭하게 된다. 본 연구에서는 on-line 및 off-line SPE로 매트릭스를 제거하고 AF HPLC-ICP/MS를 이용하여 한국인의 혈청에서의 셀레노 단백질들을 분리하여 검출하였고 정확한 정량분석을 위하여서는 후 컬럼 동위원소 희석법을 사용하였다.

현재까지 한국인의 혈청에서의 셀레노 단백질에 대한 연구가 매우 부족한 상태이며 혈청에서의 3 개의 단백질들을 동시에 정량하는 연구는 아직 국내에서 시도된 바 없다. 혈청에서의 셀레노 단백질의 상태를 파악하는 것은 인체 특히 우리 한국인의 셀레늄의 영양상태를 진단하는 중요한 방법이 될 수 있다. 뿐 아니라, 셀레노 단백질을 biomarker로 이용한 암 진단에도 응용 가능성이 있으므로 한국인의 혈청에서의 셀레노 단백질의 분리 및 정확한 정량분석 기법을 개발하는 것은 우리 한국인의 건강과 보건의에 매우 중요하다고 생각된다.

2. 실험

2.1. 기기

셀레노단백질 분석을 위해 사용한 ICP/MS는 팔중극자 반응셀이 장착된 7500 ce Model (Agilent, Japan)이었다. HPLC pump는 Alltech의 Model 626 dual pump (Alltech, USA)을 사용하였으며, 시료 주입 밸브는 Rheodyne Model 7125 (Cotati, CA, USA)가 사용되었다. 시료주입량은 AE SPE-affinity 컬럼과 SEC 컬럼 모두 100 µL로 일정하게 유지하였다.

AE SPE는 SAX Maxi-CleanTM cartridges (particles size 45-150 µm, Alltech Italia, Milano, Italy)를 사용하였다. 이것은 styrene divinylbenzene에 quaternary ammonium groups가 부착되어 있는 형태이다. 셀레노단백질을 분리하기 위해 Heparin Sepharose (HEP)와 Blue Sepharose (50 mm × 4.6 mm, CE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)를 사용하였고, 두 개의 컬럼을 연결하기 위해 six-way 밸브(Rheodyne, Model 9725i)를 사용하였다. 또한 셀레노단백질을 크기로서 분리하기 위해 SuperdexTM 75 PC 3.2/30 컬럼 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 사용하였다.

2.2. 시약 및 시료

오염을 최소화하기 위하여 clean booth내에서 실험을 진행하였으며 실험에 사용한 모든 용기와 기구는 산세척 후 탈 이온수로 세척, 건조하여 사용하였다. 별도로 기술되지 않은 시약들은 가능한 최고 순도의 분석급 또는 이와 동일한 순도의 제품을 사용하였다.

시약제조 및 용기세척에는 비저항이 18.2 MO cm⁻¹이 상인 Milli-Q System (Millipore Co., USA) 탈 이온수를 사용하였다. 용기의 세척과 시료에 사용한 질산(HNO₃)은 동우화인켐사에서 구입한 만도체급 시약을 사용하였다. Methanol은 99.8%의 HPLC급 시약 (JT Baker, NJ, USA)으로 사용하였고 셀레늄 표준 용액은 NIST SRM 3179(10.11 ± 0.02 mg g⁻¹)를 2% HNO₃에 묽혀 사용하였다. 단백질 표준 용액 (GPx from bovine erythrocytes, Albumin from human serum, Sigma-Aldrich)을 탈 이온수에 묽혀 사용하였다. Human serum CRM은 BCR-637 serum (IRMM, Geel, Belgium)을 사용하였다.

SPE와 AFC의 이동상은 다음과 같이 제조하였다. Binding buffer는 0.05 M의 ammonium acetate을 제조한 후 pH 7.0으로 맞추어 사용하였고, 용리 완충용액 으로서는 0.15 M의 ammonium acetate를 제조하고 pH 7.0으로 맞추어 사용하였다. SEC의 이동상은 5%

methanol에 ammonium acetate를 넣어 50 mM (pH 7.0)으로 제조하였다.

혈청 시료는 한국교원대학교 보건소로부터 충북 청주 지역에 거주하는 20-30 대의 건강한 성인의 혈청을 제공받았다. 채혈된 시료는 항응고제인 헤파린이 포함된 tube에 보관 하였으며 1789 xg으로 10 분간 원심 분리하여 상등액을 취한 후 별도의 전처리 과정 없이 0.45 μm 필터로 걸러서 분석하였다. 시료는 분석 전까지 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 냉동 보관하였다.

2.3. 기기의 최적 조건

ICP/MS의 최적 조건 (Table 1)은 선행연구²²에 따라 사용하였고 SPE와 HPLC의 조건은 다음의 Table 2에 나타내었다.

2.4. 실험 과정

2.4.1. AE SPE를 사용한 매트릭스 제거

본 연구에서는 음이온 교환수지가 채워져 있는 SPE를 컬럼에 on-line으로 연결하거나 또는 off-line으로

로 간섭이온을 제거하였다. 두 방법 모두 가능하며 본 연구에 사용해 보았으나 결과의 차이는 없었다. 다만 전자는 초기의 실험에 사용하기 편리하며 후자는 자동화가 가능하다.

실험방법은 먼저 카트리지에 1.5 mL min^{-1} 의 흐름 속도로 0.05 mol L^{-1} ammonium acetate를 10 mL를 흘려 활성화 시킨 후, 혈청시료를 주입한다. 음이온들은 선택적으로 컬럼에 붙잡히지만 셀레노 단백질들은 SPE 카트리지를 통과한 후에 분석컬럼으로 들어가게 된다. Off-line으로 분석할 경우는 SPE 카트리지를 통과시킨 용출액을 모아 희석 하지 않은 채로 분석 하였다.

2.4.2. 셀레노 단백질의 분리

1) SEC를 사용한 셀레노 단백질의 분리

혈청 시료 속의 셀레노단백질을 분리 및 정량하기 위하여 먼저 SEC를 사용하였고 그 다음에 AFC를 이용하였다. 먼저 SEC에 대한 최적의 조건들을 찾아 이 동상은 5% MeOH와 ammonium acetate 50 mM을 pH 7.0으로 맞추어 사용하였다. 흐름속도는 0.1 mL min^{-1} 로 주입하여 혈청 시료 속의 셀레노 단백질을 크기로 분리할 수 있었다.

2) AF HPLC를 사용한 셀레노 단백질의 분리

AF HPLC에서는 HEP와 BLUE 컬럼을 사용하였다. 먼저 GPx와 albumin의 표준 시료를 이용하여 흐름속도와 주입시료의 부피등, 분리를 위한 최적 조건을 설정하고 혈청 시료 속의 셀레노단백질을 분리하였다.

Six-way 밸브에 연결한 HEP과 BLUE 컬럼을 이용하여 셀레노단백질을 분리하기 위한 방법은 기존연구²³에 따른 것으로 다음과 같이 Fig. 1에 나타내었다.

Table 1. Optimum ICP/MS operation conditions used in the experiment

Plasma conditions	
RF power, W	1450
Carrier gas, Lmin ⁻¹	0.9
Ar/O ₂ auxiliary gas, Lmin ⁻¹	0.18
Sampler and skimer	Pt, 1.0 and 0.4 mm id
Nebulizer	Concentric nebulizer
Collision/reaction cell parameters	
H ₂ flow rate, mL min ⁻¹	4.0

Table 2. SPE-HPLC separation and running conditions for AF and SEC

Affinity chromatography	
SPE	AE SPE : SAX Maxi-Clean™ cartridges
AF column	(5 cm × 4.6 mm id × 45-150 μm)
	AF HPLC: Heparin Sepharose and Blue Sepharose
Mobile phase A (equilibration buffer)	0.05 M Ammonium acetate, pH 7.0
Mobile phase B (elution buffer)	0.15 M Ammonium acetate, pH 7.0
Injection volume, μL	100
Flow rate, mLmin ⁻¹	1.0
Size-exclusion chromatography	
Column	Superdex™ 75 PC 10/30
Mobile phase	5% MeOH, 50 mM Ammonium acetate, pH 7.0
Injection volume, μL	100
Flow rate, mL min ⁻¹	0.1

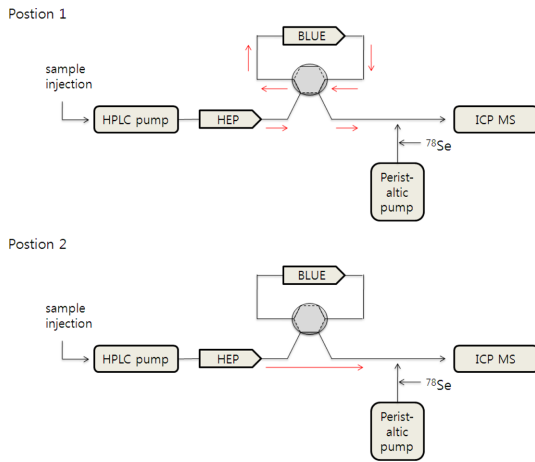


Fig. 1. Schematic diagram for the separation of selenoproteins with HEP and BLUE columns.¹⁸

밸브가 LOAD일 때 (position 1) 시료는 HEP과 BLUE를 모두 통과하므로 SeIP와 SeAlb 모두 컬럼에 붙잡힌다. 셀레노 단백질용 용리할 때에는 밸브를 INJECT (position 2)로 하면 용리액이 HEP만 지나가므로 SeIP가 용리된다. 밸브를 다시 position 1으로 돌리면 용리액은 BLUE까지 거치므로 SeAlb이 용리된다. GPx는 이 두 컬럼에 붙잡히지 않으므로 초기에 용리되어 분리된다. 본 연구에서는 AE SPE를 앞부분에 장착하여 사용하였다.

3. 결과 및 논의

3.1. 혈청 시료 속의 셀레늄 총량 정량

혈청 시료 속의 셀레늄을 분석할 때에 혈청속에 존재하는 다양한 이온들에 의하여 동중간섭이 발생한다. 혈청에는 아연, 철과 같은 양이온과 Br, Cl, SO₄²⁻, 및 PO₄³⁻ 등의 음이온 많이 존재하며 이 들은 셀레늄의 측정에 동중간섭을 일으키게 된다. 따라서 정확한 셀레노단백질 정량을 위해서는 동중간섭을 제거하거나 시료준비과정에서 간섭이온들을 제거할 필요성이 있으므로 본 연구에서는 AE SPE를 컬럼을 사용하여 간섭이온을 제거하였다. 양이온에 의한 간섭은 크지 않거나 m/z를 잘 선택하면 배제할 수 있으므로 본 연구에서는 음이온에 대한 간섭을 집중적으로 연구하였다. AE SPE는 Cl과 Br을 선택적으로 제거하며 셀레노단백질이 머무르지 않기 때문에 따로 용리과정이 필요 없으며 시료가 희석되지 않는 장점이 있다.

먼저 혈청에서 AE SPE를 이용한 음이온의 제거 후

와 제거 전에 측정된 셀레늄 총량을 비교하였다. 검정곡선법 (EC; external calibration curve)과 동위원소 희석법 (ID; isotope dilution method)을 모두 사용하여 비교하였다. ID로 정량 시에는 ⁷⁸Se spike를 사용하여 ⁷⁸Se/⁸⁰Se 비율을 측정하고 그 결과를 다음의 Table 3에 나타내었다. 간섭이온을 제거하기 전의 혈청에서의 셀레늄의 총량은 113.0 ± 3.0 ng g⁻¹이었으나 간섭이온을 제거한 뒤에는 94.3 ± 2.3 ng g⁻¹으로 많은 차이를 보여주고 있다. 따라서 정확한 셀레늄량을 측정하려면 동위원소 희석법을 사용한다 할지라도 반드시 간섭이온들을 제거해야 할 것으로 보인다.

EC와 ID의 두 방법을 비교하여 볼 때에 두 방법의 결과가 서로 다르다는 것을 보여주는데 특히 매트릭스를 제거하기 전에 나타난 차이는 16.6 ng g⁻¹으로서 매트릭스를 제거한 뒤인 7.4 ng g⁻¹보다 훨씬 더 심하였다. 매트릭스이온들을 제거한 후에는 EC법과 ID법은 95%신뢰수준에서 일치하는 결과를 보여준다. 결국 간섭이온들이 시료에 존재할 때에 검정곡선법은 큰 오차를 가져오게 된다는 것을 잘 보여주고 있다.

한편, 이렇게 결정된 총 셀레늄량 중에는 셀레노 단백질과 무기 셀레늄 및 셀레노 아미노산들이 혼합되어 있으며 그 중 얼마가 셀레노 단백질인지 알 수 없다. 따라서 셀레노 단백질만의 정확한 정량을 위하여서는 반드시 이 들 단백질들만 따로 분리한 뒤 각각을 정량해야 한다.

본 연구에서 결정된 건강한 성인 한국인의 혈청에서의 셀레늄 농도를 다른 나라와 비교할 때에 농도가 낮은 지역²⁴ (마세도니아지역 45 ng g⁻¹)보다는 높으며 미국²⁵의 125.6 ng g⁻¹ 보다는 조금 낮지만 대개의 다른 나라²⁶ (예; 이란의 100.4 ng g⁻¹)와 비슷한 정도이다.

3.2. 혈청 시료 속의 셀레노 단백질의 분리 및 정량

3.2.1. SEC를 사용한 셀레노 단백질분리

먼저 SEC 컬럼을 이용하여 혈청 시료 속의 셀레노

Table 3. Accurate determination of total selenium concentrations in human serum when matrix was eliminated with SPE

	AE SPE		NO AE SPE ^a	
	EC	ID	EC	ID
Human serum ^b	101.7 ± 3.0	94.3 ± 2.3	129.6 ± 1.9	113.0 ± 3.0

Mean ± SD (n=3), unit: ng g⁻¹

^aSPE is not used

^bAverage of 20 serum samples.

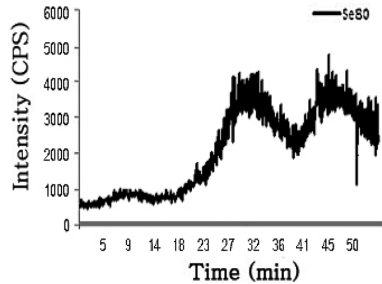


Fig. 2. Moderate separation of 3 selenoproteins with SEC. GPx (9 min.), SelP (30 min.) and SeAlb (46 min.) are separated with each other within an hour.

단백질을 분리하여 보았다. SEC 컬럼에서 용질의 크기가 크면 클수록 더 빨리 통과되므로 크기가 가장 큰 GPx (~90 kDa)가 제일 먼저 나타나고 그 뒤에 SeAlb (~66 kDa)과 SelP (~57 kDa)의 순서로 나타난다. 기존의 실험조건¹⁶을 개선하여 (ammonium acetate 50 mM, pH 7.0) 30분 이내로 셀레노 단백질의 분리가 가능하였지만 분리능은 충분하지 못하였고 다시 좀 더 약한 조건을 사용하여 0.05 M Tris-HNO₃를 pH 7.40에 맞추고 0.1 mL min⁻¹에서 3 개의 셀레노 단백질을 분리할 수 있었다. 하지만, 시간이 약 한 시간 정도 걸리며 SeAlb과 SelP는 아직 피크가 일부 겹친 것으로 나타난다(Fig. 2). 따라서 본격적인 분리 및 정량에는 다음의 AF HPLC를 사용하였다.

3.2.2. AF HPLC 를 사용한 셀레노 단백질의 분리 및 정량

기존 연구²²에서 셀레노 단백질 중 분리를 위해 사용된 binding/elution 완충용액은 0.2 M Tris-HCl (pH 7.0)과 1.4 M ammonium acetate (pH 7.4)이다. 본 연구에서는 보다 더 효율적인 binding/elution 과정을 적용하여 기존의 결과보다 크로마토그래피의 시간을 10분 가량 줄일 수 있었다. 즉, binding buffer 로서 0.05 M CH₃COONH₄ (pH 7.0)를 사용하였고 elution buffer 로서 0.15 M CH₃COONH₄ (pH 7.0)를 사용하여 25 min 내에 셀레노 단백질을 효과적으로 분리해 낼 수 있었다. AFC를 사용하여 분리한 결과를 그림 Fig. 3(a)에 나타내었다. 혈청 시료 속의 셀레노 단백질을 분리한 결과 3 개의 peak가 검출되었는데 첫 번째 peak는 HEP과 BLUE에 머무르지 않는 GPx 및 그 외의 다른 무기셀레늄과 자유 셀레노 아미노산 및 간섭이온들이며, 두 번째 peak는 HEP에 붙잡히는 SelP, 세 번째 peak는 BLUE에 붙잡히는 SeAlb이다. Fig. 3(b)

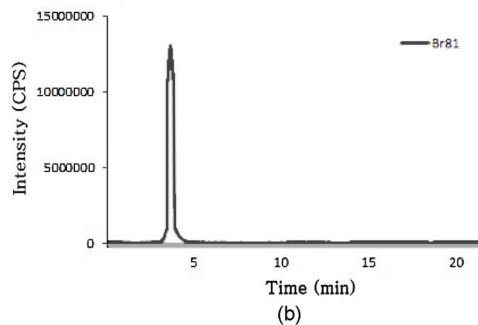
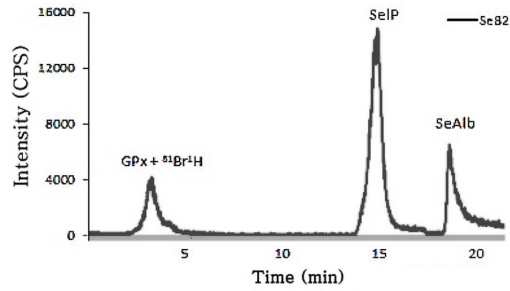


Fig. 3. (a) Separation of selenoproteins in human serum with AE SPE-AF HPLC-ICP/MS monitored at *m/z* 77, (b) Cl appears on GPx position and interferes as ⁷⁷[ArCl].

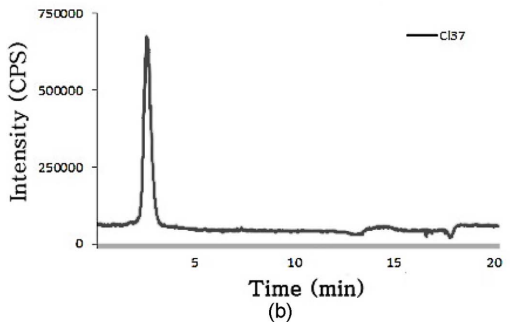
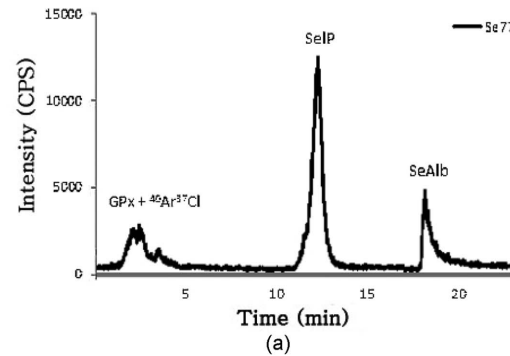


Fig. 4. (a) Separation of selenoproteins in human serum by AE SPE-AF HPLC/ICP/MS monitored at *m/z* 82, (b) Br appears on GPx position and interferes as ⁸²[BrH].

에서 나타난 것처럼 CI는 AFC에 의해 붙잡히지 않기 때문에 GPx의 위치에 나타나며 ArCI로서 GPx의 위치에 함께 co-elute되어 있는 것을 알 수 있다. Fig. 4(a)는 Se⁸²를 모니터링하여 3개의 단백질을 분리한 그림이다. Br은 BrH로서 GPx에 간섭하여 GPx의 위치에 나타난다(Fig. 4(b)). SPE에 의하여 제거되지 않은 경우에 혈청내에 존재하는 CI와 Br는 그림에서 나타난 것처럼 매우 큰 신호값을 보인다.

3.3.3. 한국인의 혈청에서의 셀레노 단백질들의 정량

먼저 표준물질인 CRM을 이용하여 혈청 시료 속의 간섭 매트릭스의 제거한 후에 셀레노 단백질의 중별 정량법의 정확성을 확인하였다. 사용된 CRM은 BCR-637(Se certified $81 \pm 7 \text{ ng mL}^{-1}$, IRMM, Geel, Belgium)로서 그 결과는 다음의 Table 4에 나타내었다. 하지만 CRM에서는 각 셀레노 단백질에 대한 값을 나타내고 있지 않으므로 여기에서는 총량만 비교할 수 밖에 없다. 실험 결과는 $85.4 \pm 3.4 \text{ ng g}^{-1}$ 로서 문헌치인 $81 \pm 7 \text{ ng g}^{-1}$ 과 일치하며 본 연구의 AF HPLC-ICP/MS 분석법이 혈청의 정량분석에 잘 이용될 수 있음을 보여주고 있다.

이 분석법을 건강한 한국인의 혈청시료에 대하여 적용하였고 그 결과를 다음의 Table 5에 나타내었다. AE SPE를 사용하여 혈청 시료 속의 간섭요인을 제거하였을 때와 제거하지 않았을 때를 비교 하였다. 간섭요인을 제거하기 전 (NO SPE)의 GPx의 양은 $25.0 \pm$

1.0 ng g^{-1} 이었으나 간섭을 제거한 후에 GPx의 양은 $12.1 \pm 1.4 \text{ ng g}^{-1}$ 으로 큰 변화를 나타내었다. 다른 셀레노 단백질인 SelP와 SeAlb은 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 SelP와 SeAlb은 AF 컬럼에 의하여 붙잡힌 다음 용리되므로 다른 간섭이온들이 배제되는 한 편, GPx는 컬럼을 그냥 통과하여 다른 간섭이온들 및 자유 아미노산과 함께 용리되기 때문이다. 결과적으로 GPx에 대부분의 간섭요인이 존재함을 알 수 있었으며 또한 AE SPE가 효과적으로 혈청 시료 속의 간섭요인을 제거하는 것을 보여준다.

물론 GPx와 함께 용리되는 양이온과 음이온-특히 CI와 Br 음이온들은 동중간섭을 일으키며 동시에 혈청에서는 셀레노 단백질 외에 SeMet같은 셀레노 아미노산 그리고 무기 셀레늄이 존재할 수 있기 때문이다. 따라서 좀 더 엄밀한 의미에서의 순수 GPx를 정량하려면 간섭하는 양이온 및 음이온, 그리고 자유 셀레늄 아미노산을 모두 제거한 뒤에 하여야 할 것이다.

SPE를 이용하여 간섭이온들(또는 일부 무기셀레늄 이온)을 제거하여 분석한 경우에도 셀레노 단백질의 합한 량(89.4 ng g^{-1})은 Table 3에서의 셀레늄 총량(94.3 ng g^{-1})보다 조금 적다. 즉, 혈청에서의 셀레노 단백질의 합은 셀레늄의 총량보다 작는데 그 이유는 위에서 언급하였듯이 셀레늄 총량에는 셀레노 단백질 뿐 아니라, 다른 형태의 셀레늄 화합종들-자유 셀레노 아미노산 및 무기 셀레늄 이온들이 작은 양이지만 일부 혈청내에 존재하기 때문으로 생각된다.

Table 4. Selenoprotein concentrations of CRM (BCR-637) determined by AE SPE-AF HPLC-ICP/MS

BCR-637	Exp.	Ref.
GPx	11.3 ± 1.0	N.A.
SelP	54.2 ± 1.2	N.A.
SeAlb	19.9 ± 3.0	N.A.
Sum of proteins	85.4 ± 3.4	81 ± 7

Mean \pm SD (n=3), unit: ng g^{-1}

N.A.: not available

Table 5. Selenoprotein concentrations in Korean human serum determined by AE SPE-AF HPLC-ICP/MS

Korean human serum ^a	SPE	NO SPE
GPx	12.1 ± 1.4	25.0 ± 1.3
SelP	57.2 ± 2.0	60.9 ± 1.7
SeAlb	20.0 ± 1.9	23.5 ± 1.3
Sum of species	89.4 ± 2.8	109.3 ± 2.5

mean \pm SD (n=3), unit: ng g^{-1}

aaverage of 20 serum samples.

4. 결 론

본 연구에서는 AE SPE를 사용하여 음이온 매트릭스를 제거한 뒤에 AF HPLC와 ICP/MS를 결합하여 대표적인 생체 시료인 혈청 시료에서 셀레노단백질을 분리하고 정량하였다. AE SPE는 혈청 속 간섭요인 특히 GPx에서의 CI와 Br를 제거 하는데 효과적이었다.

본 연구를 통해 얻은 결과는 앞으로 건강한 한국인에 대하여 혈청에서의 셀레노 단백질의 기초값으로 사용될 수 있으며 한국인의 셀레늄의 영양상태를 모니터링하는데 사용될 수 있을 것이다. 또는 이를 이용하여 셀레노 단백질을 biomarker로 이용한 암의 진단 등 질병의 기초 진단에도 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 일반연구(2010-0010880)

의 도움으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. H. Reyes, L. J. M. Marchante, J. I. Alonso and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, **18**, 11-16 (2003).
2. K. Schwarz and C. M. Foltz, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3292-3293 (1957).
3. FAO/IAEA/WHO, *Trace Elements in Human Nutrition and Health*, World Health Organization, Geneva, 1996.
4. Research Group of Environment and Endemic Diseases, Institute of Geography, *J. Chin. Geog.*, **1**, 71-83 (1990).
5. G. Ravn-Haren, S. Bugel, and B. Krath, *Br. J. Nutr.*, **99**, 883-892 (2008).
6. B. Hurwitz, J. Klaus, and M. Llabre, *Arch. Intern. Med.*, **167**, 146-154 (2007).
7. M. Baum, G. Shor-Posner, and S. Lai, *JAIDS*, **15**, 370-374 (1997).
8. U. Peters, C. B. Foster, N. Chatterjee, A. Schatzkin, D. Reding, G. L. Andriole, E. D. Crawford, S. Sturup, S. J. Chanock and R. B. Hayes, *Am. J. Clin. Nutr.*, **85**, 209-217 (2007).
9. M. P. Rayman, *Proceed. of the Nutrition Society*, **64**, 527-542 (2005).
10. E. A. Klein, I. M. Thompson Jr. and C. M. Tangen, *JAMA*, **306**(14), 1549-1556 (2011).
11. R. Abdulah, K. Mizuzaki, M. Nakazawa and H. Koyama, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **19**, 141-150 (2005).
12. C. Y. Kuo and S. J. Jiang, *Journal of Chromatography A*, **1181**, 60-66 (2008).
13. A. S. Takemoto, M. J. Berry and F. P. Bellinger, *Ethn Dis.*, **20**(1), 92-95 (2010).
14. S. McSheehy, W. Yang, F. Pannier, J. Szpunar, R. Lobinski, J. Auger and M. Potin-Gautier, *Anal. Chim. Acta*, **421**, 147-153 (2000).
15. P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, S. Vaslin-Reimann and P. Fiscaro, *Anal. Chim. Acta*, **657**, 100-107 (2010).
16. Y. Suzuki, T. Sakai and N. Furuta, *Anal. Sci.*, **28**, 1-5 (2012).
17. P. Jitaru, G. Cozzi, A. Gambaro, P. Cescon and C. Barbante, *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 661-668 (2008).
18. P. Jitaru, G. Cozzi, R. Seraglia, P. Traldi, P. Cescon, and C. Barbante, *Anal. Methods*, **2**, 1382-1387 (2010).
19. P. Jitaru, M. Prete, G. Cozzi, C. Turetta, W. Cairns, R. Seraglia, P. Traldi, P. Cescon and C. Barbante, *J. Anal. At. Spectrom.*, **23**, 402-406 (2008).
20. M. Roman, P. Jitaru, M. Agostini, G. Cozzi, S. Pucciarelli, D. Nitti, C. Bedin and C. Barbante, *Microchem. Journal*, **105**, 124-132 (2012).
21. P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. G. Alonso and A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta B*, **60**, 151-207 (2005).
22. H. Y. Jang, H. Min, J. Lee and Y. N. Pak, *Anal. Science & Tech.*, **26**(3), 182-189 (2013).
23. J. Jeong, J. Lee and Y. N. Pak, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **34**(12), 3817-3824 (2013).
24. F. Cuparigova and T. Stafilov, *Chemical Sciences Journal*, **46**, 1-8 (2011).
25. J. Bleys, A. Navas-Acien and E. Guallar, *Arch Intern Med.*, **168**(4), 404-410 (2008).
26. R. Safaralizadeh, G. A. Kardar, Z. Pourpak, M. Moin, A. Zare and S. Teimourian, *Nutrition Journal*, **4**(32), 1-4 (2005).