Implementation and Validation of a Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Pristanic Acid and Phytanic Acid Quantification in Plasma Specimens

Ahram Yi^{*}, Jun Hyung Lee^{*}, Gahyun Yoo^{ID}, Hye Jin Lim^{ID}, Euna Park^{ID}, Jungsun Han^{ID},
Geun Young Kim^{ID}, Sung-Eun Cho^{ID}, Sang Gon Lee^{ID}, and Eun Hee Lee^{ID}

Department of Laboratory Medicine, Green Cross Laboratories (GC Labs), Yongin, Korea

Corresponding author:

Sung-Eun Cho
Department of Laboratory Medicine,
Green Cross Laboratories (GC Labs),
107, Ihyeon-ro 30beon-gil, Giheung-gu,
Yongin 16924, Korea
Tel +82-31-260-0947
E-mail secho1206!!@gclabs.co.kr
*These two authors contributed equally
to this manuscript.

Received: July 21, 2021

Revised: August 3, 2021

Accepted: August 9, 2021

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We validated a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for quantifying pristanic acid (PrA) and phytanic acid (PhA) in plasma specimens. We developed a GC-MS method based on the analysis of 20 μM $^2\text{H}_3$ -pristanic acid (PrA-IS) and 80 μM $^2\text{H}_3$ -phytanic acid (PhA-IS) as internal standards. The GC-MS was fitted with a 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm HP-5MS (Agilent, USA) column. The mass spectrometer was operated through the transitions from the precursor to the product ions (m/z [mass-to-charge ratio] 355, 369, 358, and 372 for PrA, PhA, PrA-IS, and PhA-IS, respectively). The retention times of PrA, PhA, PrA-IS, and PhA-IS were 19.33, 20.39, 19.31, and 20.38 minutes in a 26.83-minute analysis, respectively. Linearity, recovery, precision, and carry-over were evaluated to validate the method. The GC-MS method yielded a linear response from 0.032 to 9.951 $\mu\text{mol/L}$ for PrA ($R^2=0.9999$) and from 0.127 to 39.432 $\mu\text{mol/L}$ for PhA ($R^2=0.9998$). The limits of quantification by the methods were 0.032 $\mu\text{mol/L}$ for PrA and 0.127 $\mu\text{mol/L}$ for PhA. The recovery of PrA and PhA GC-MS method measurements were within $\pm 10\%$ when evaluated with external quality assessment materials. The within-batch and total coefficients of variation were all below 6% for both PrA and PhA test results. Twenty-interday imprecision (%) were all below 5% for both PrA and PhA test results. Carry-over was found to be 0.001% for PrA and -0.008% for PhA. The GC-MS PrA and PhA assay showed adequate recovery, precision, sensitivity, and linearity. Hence, it is suitable for routine clinical work.

(Lab Med Qual Assur 2021;43:162-165)

Key Words Pristanic acid, Phytanic acid, Gas chromatography-mass spectrometry, Method validation

페록시솜 질환(peroxisomal disorders) 환자들은 프리스탄산(pristanic acid) 및 피탄산(phytanic acid) 등과 같은 분지 사슬 지방산(branched-chain fatty acids)의 충분한 섭취가 이루어지면 혈장 프리스탄산 및 피탄산 농도가 증가한다[1]. 혈장 프리스탄산 및 피탄산의 신뢰할 수 있는 정량화는 페록시솜 질환 환자를 평가하는 데 필수적이다. 이에 저자들은 혈장 검체에서 프리스탄

산 및 피탄산을 정량화하기 위한 기체 크로마토그래피 질량분석법(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 검사법을 구현하고 검증했다[1].

20 μM $^2\text{H}_3$ -프리스탄산 및 80 μM $^2\text{H}_3$ -피탄산(Cambridge Isotope Laboratories Inc., Andover, MA, USA)을 내부표준 물질로 분석하여 GC-MS 검사법을 개발했다. 검체 전처리에는

아세토니트릴(acetonitrile)을 혼합한 HCl을 이용한 산 가수분해 및 메탄올(methanol)을 혼합한 NaOH를 이용한 알칼리 가수분해, 헥산(hexane)을 이용한 액체-액체 추출(liquid-liquid extraction), 유기 용매의 증발, *N*-Methyl-*N*-tert-butyl dimethylsilyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) 및 피리딘(pyridine)에 의한 유도체화가 포함되었다. 길이 30 m, 내경(inner diameter) 0.25 mm, 필름 두께 0.25 μ m인 HP-5MS (Agilent, Folsom, CA, USA) 컬럼이 장착된 7890B-5977B GC-MS (Agilent, Waldbronn, Germany) 장비를 사용하였고, 헬륨은 운반가스로 사용되었다. 질량분석기는 전구체(precursor)에서 생성물 이온(product ions)으로의 전이(transition)를 통해 구동되었다. 프리스탄산, 피탄산, 프리스탄산-내부표준물질 및 피탄산-내부표준물질 각각의 mass-to-charge ratio (m/z)은 다음과 같다(m/z : 355, 369, 358, 372). 프리스탄산, 피탄산, 프리스탄산-내부표준

Table 1. Analytical instrument conditions for gas chromatography

Variable	Values/features
Columns	
Run time (min)	26.83
Flow (mL/min)	1
Pressure (psi)	8.20
Average velocity (cm/sec)	36.62
Holdup time (min)	1.37
Post run (mL/min)	1.30
Front injector	
Syringe size (μ L)	10.00
Injection volume (μ L)	1.50
Plunger speed	Fast
Wash vial solvent	Hexane
Inlets	
Carrier gas control	Constant flow-helium
Mode	Split
Split ratio	10:1
Split flow (mL/min)	10
Oven program	
Initial temperature	60°C for 1.00 min
Ramp 1	30°C/min to 160°C, hold for 0.00 min
Ramp 2	5°C/min to 230°C, hold for 0.00 min
Ramp 3	20°C/min to 230°C, hold for 5.00 min
Post run	300°C

물질 및 피탄산-내부표준물질의 각각의 머무름 시간(retention times)은 다음과 같다(전체 26.83분 분석에서 각각 19.33, 20.39, 19.31, 20.38분).

분석장비 조건은 Table 1 (GC 조건), Table 2 (MS 조건)에 제시한 바와 같다. 본 연구에서는 검사법을 평가하기 위해 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)에 제시된 평가 지침 및 문헌에 따라 GC-MS법을 이용하여 측정된 혈장 프리스탄산 및 피탄산 농도에 대하여 정밀도, 직선성, 회수율 및 잔효를 평가하였다[2-9]. 각각의 평가에 대한 통계는 Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

정밀도는 ERNDIM Control Special Assays in Serum(물질번호 SAS2019.01, SAS2019.04, SAS2019.05, SAS-02.1 [lot. no. 2018.2161], SAS-02.2 [lot. no. 2018.2162]; MCA Laboratory, Winterswijk, Netherlands) 세 가지 각각 다른 농도의 외부정도 관리물질을 이용하여 1일 1시행(run)씩, 시행당 3회, 3일 동안, 그리고 추가적으로 1일 3시행씩, 시행당 1회, 20일 동안 반복 측정하여 두 번에 걸쳐 평가하였다. 20일 추가정밀도 평가의 경우, 각

Table 2. Analytical instrument conditions for mass spectrometry

Variable	Values/features
Ion mode	Electron ionization
Source temperature (°C)	250
Quadrupole temperature (°C)	150
Electron energy (eV)	70
Emission (μ A)	34.60
Repeller (V)	31.11
Entrance lens (V)	17.60
Extractor lens (V)	0.00

Table 3. Precision of pristanic acid and phytanic acid measurements by gas chromatography-mass spectrometry with high-, medium-, and low-level quality control materials

Items	Level (μ mol/L)	Mean $\pm$ standard deviation (μ mol/L)	Coefficient of variation (%)
Pristanic acid	Low	0.63 $\pm$ 0.02	2.60
	Medium	1.27 $\pm$ 0.05	4.24
	High	3.70 $\pm$ 0.15	3.97
Phytanic acid	Low	2.58 $\pm$ 0.07	2.87
	Medium	5.33 $\pm$ 0.24	4.58
	High	13.76 $\pm$ 0.44	3.20

Fig. 1. Linearity analyses by gas chromatography-mass spectrometry method measurements. (A) Pristanic acid. (B) Phytanic acid.

각의 정도관리물질을 20일 동안 매일 3시행씩, 시행당 1회씩 반복 측정하여 평가하였다[2,3]. 정밀도의 허용기준은 $<\pm 15\%$ 로 설정하였다[4].

직선성은 CLSI EP06-A에 따라 평가하였다[5]. 프리스탄산 및 피탄산 표준품(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 톨루엔(toluene)으로 희석하여 검량선(calibration curve) 시료를 제조하는 방법과 동일한 방법으로 직선성을 확인할 수 있는 농도의 물질을 조제하였다. 이들을 각각 3회씩 반복 측정하여 그 결과를 이용하여 직선성을 평가하였다.

회수율은 ERNDIM Control Special Assays in Serum(물질번호 SAS2019.01, SAS2019.04, SAS2019.05; MCA Laboratory, Winterswijk, Netherlands) 세 가지의 각각 다른 농도의 외부정도관리물질을 이용하여 1일 3회, 3일간 분석하여 평가하였다[6].

잔효는 $[(L1-L3)/(H2-L3)] \times 100$ 계산식으로 구하여 평가하였고, 허용기준은 $<\pm 1.0\%$ 로 설정하였다[7-9]. 프리스탄산 및 피탄산의 잔효는 각각 0.001%, -0.008%로 허용기준을 만족하였다.

각 종목별 정밀도 평가결과를 Table 3에 제시하였다. 각 종목별 정밀도 평가결과 총 변이계수는 2.60%에서 4.58% 수준의 값을 보였다[4]. Fig. 1은 프리스탄산 및 피탄산 검사항목의 직선성 평가결과를 보여주는 그래프이다. 직선성 평가에서 두 종목 모두 결정계수가 0.99 이상이었다. 각 종목별 회수율 평가결과를 Table 4에 제시하였다. 각 종목별 회수율 평가결과 회수율은 92.30%에서 109.09% 수준의 값을 보였다[4].

GC-MS법을 이용한 혈장 프리스탄산 및 피탄산의 농도 측정 정밀도, 직선성, 회수율, 잔효에 있어서 매우 만족할 만한 결과를 보였다. 따라서 혈장 프리스탄산 및 피탄산 GC-MS 검사법은 연구 목적뿐 아니라 임상검사 목적으로도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Recovery of pristanic acid and phytanic acid measurements by gas chromatography-mass spectrometry with high-, medium-, and low-level quality control materials

Items	Assigned (μmol/L)	Mean ± standard deviation (μmol/L)	Coefficient of variation (%)	Recovery (%)
Pristanic acid	0.44	0.48 ± 0.02	3.29	109.09
	2.15	2.23 ± 0.06	2.63	103.91
	6.20	6.38 ± 0.23	3.73	102.90
Phytanic acid	3.48	3.43 ± 0.12	3.43	98.51
	9.50	9.39 ± 0.11	1.12	98.85
	15.70	14.49 ± 0.28	1.90	92.30

ORCID

Ahram Yi	https://orcid.org/0000-0002-3107-936X
Jun Hyung Lee	https://orcid.org/0000-0002-8682-3694
Gahyun Yoo	https://orcid.org/0000-0002-4417-8172
Hye Jin Lim	https://orcid.org/0000-0002-2339-3877
Euna Park	https://orcid.org/0000-0002-3230-1364
Jungsun Han	https://orcid.org/0000-0003-1160-0776
Geun Young Kim	https://orcid.org/0000-0002-5867-5655
Sung-Eun Cho	https://orcid.org/0000-0001-8082-3100
Sang Gon Lee	https://orcid.org/0000-0002-4672-5811
Eun Hee Lee	https://orcid.org/0000-0002-2517-175X

REFERENCES

1. Vreken P, van Lint AE, Bootsma AH, Overmars H, Wanders RJ, van Gennip AH. Rapid stable isotope dilution analysis of very-long-chain fatty acids, pristanic acid and phytanic acid using gas chromatography-electron impact mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;713:281-7.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures: EP05-A3. 3rd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
3. Whang DH. Method validation: precision. In: Korean Society for Laboratory Medicine, editor. *Laboratory medicine*. 6th ed. Seoul: PanMun Education, 2021:73-6.
4. U.S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administrations; Center for Drug Evaluation and Research; Center for Veterinary Medicine. Bioanalytical method validation: guidance for industry. Silver Spring (MD): Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administrations, 2018.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach: EP06-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias; approved guideline: EP15-A3. 3rd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement procedures; approved guideline: EP10-A3-AMD. 3rd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
8. Haeckel R. Recommendations for definition and determination of carry-over effects. *J Automat Chem* 1988;10:181-3.
9. Broughton PM. Carry-over in automatic analysers. *J Automat Chem* 1984;6:94-5.