

## 고속액체크로마토그래피에 의한 프로스타글란딘류의 고감도 형광 분석법

이용문\* · 문동철

충북대학교 약학대학

(Received September 18, 1992)

### A Sensitive Fluorescent Detection Method for Prostaglandins by High Performance Liquid Chromatography

Yong Moon Lee\* and Dong Cheul Moon

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chongju 360-763, Korea

**Abstract**—The Prostaglandins were derivatized rapidly with monodansyl cadaverine as a fluorophore in mild conditions. The carboxylic moiety of prostaglandins was activated with diethyl phosphorocyanidate and successively coupled with fluorophore in dimethylformamide at room temperature. The labeling yield was reached about 95% at 15 min using arachidic acid (C<sub>20:0</sub>) as a test sample. This derivative showed constant fluorescent intensity at 4°C for 180 days. The derivatives of prostaglandins were shown high solvent selectivity with tetrahydrofuran in reversed-phase column. therefore, these derivatives could be successfully separated on YMC pack A-212(S-5 120A C8) column in tetrahydrofuran-based eluents. The detection limits of these derivatives was ca. 500 fmol and determination limits was ca. 5 pmol as injected amount in fluorescent detection ( $\lambda_{ex}$ . 340 nm,  $\lambda_{em}$ . 520 nm). In this method, the ranges of recovery and coefficient of variation were 93.6~102.7% and 4.3~5.8%, respectively.

**Keywords** □ Prostaglandins, monodansyl cadaverine, carboxylic moiety, fluorescent detection, high performance liquid chromatography.

생체내에는 고도 불포화 지방산류에 속하는 여러 종류의 생리활성 eicosanoid류가 존재하며, 그 존재 부위에 따라 다양한 생리활성을 나타낸다. 그 중에서도 특히 prostaglandin류(PGs), leucotriene류(LTs), hydroxytetraenoic acid류(HETEs)는 생체내에서 그 존재량의 미세한 변화가 질병의 원인 또는 결과로 나타나는 경우가 많다. 따라서, 이들 생체내 미량존재 물질들에 대한 정확한 분석은 병태의 해석과 원인 규명에 중요한 의미를 갖는다고 말할 수 있다.<sup>1,2)</sup>

HPLC에 의한 방법은 eicosanoid류가 수용성이고, 열에 불안정하며, 다수의 구조유사화합물이 존재하는

특성 때문에 최적이라고 할 수 있다. HPLC에 의한 prostaglandin류의 분석방법은 prostaglandin류가 자외부에서의 흡광계수가 매우 낮아 실용성 있는 분석을 하기가 매우 어렵다. 따라서 대부분의 분석은 카르복실기 부분에 발색단이나 적당한 형광단을 도입하여 검출가능하게 하고 있다.

이중에서도 형광검출법은 선택성 및 감도에서 월등한 분석법으로 많은 보고가 있다. 그러나 이들 방법도 시약의 종류에 따른 장단점이 있어, 현재까지 가장 많이 사용된 9-anthryldiazomethane<sup>3-5)</sup>은 시약 자체의 순도가 떨어지며, 불안정하여 쉽게 파괴되며, 반응생성물 또한 상온에서 분해되기 쉬운 점등 개선점이 남아있다. 또 7-[(bromocarbonyl)methoxy]-4-

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

methylcoumarin,<sup>6)</sup> p-(9-anthroyloxy)phenacyl bromide<sup>7,8)</sup>는 고감도 분석이 가능하고, 반응생성물은 안정하다. 그러나 용매조성의 변화에 따른 형광의 변화가 심하여 isocratic elution밖에 사용할 수 없고, 재현성 및 분석시간에 개선하여야 할 점이 많다. 한편 최근에 발표된 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methylquinoxalin-2(1H)-one (Br-DMEQ)은  $\text{KHCO}_3$ 와 18-crown-6 존재하에  $50^\circ\text{C}$ , 15분간 반응시킨 후, HPLC 분리후 455 nm 형광 측정시 fmol level의 고감도를 얻을 수 있다.<sup>9,10)</sup> Br-DMEQ는 감도면에서는 가장 탁월하나, 반응조건 설정 및 부반응물의 크로마토그램상 처리가 미해결 과제이다.

Monodansyl cadaverine(MDC)<sup>11)</sup>은 N,N-dimethylaminonaphthalene sulfonyl(DANSYL)환의 강한 형광을 갖으며, 술폰아미드류의 경우, 80% acetonitrile에서 0.33정도의 높은 형광 양자수율을 갖고 있다. 또한 기존 카르복실산 유도체화 형광시약보다 분자 크기가 작아 역상 HPLC에서 분리시 유리하고, 상온에서도 비교적 안정하며, 고순도품을 얻을 수 있다. 따라서 MDC를 고감도 검출시약으로서의 평가 및 이 방법의 HPLC에의 적용을 검토하여, prostaglandin류의 새로운 분석방법을 개발하였다.

### 실험방법

시약 및 기기—MDC는 Sigma사 제품을 ethanol로 3회 세척하여 사용하고, 축합제 diethylphosphorocyanidate(DEPC)는 Wako사의 제품을 감압증류하여  $88^\circ\text{C} \sim 89^\circ\text{C}$  사이의 분획을 사용하였다. 시료로 사용한  $\text{PGA}_1$ ,  $\text{PGA}_2$ ,  $\text{PGB}_1$ ,  $\text{PGB}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_1$ ,  $\text{PGE}_2$ , 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$ 는 Sigma에서 구입하였다. 이 외에 포화 지방산 arachidic acid은 동경화성에서 구입하였다. HPLC용 유기용매인 methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran, acetone은 E. Merck사의 HPLC grade 시약으로 사용하였다.

HPLC장치는 Jasco사의 TRIROTAR-VI Model(Tokyo, Japan)에 역상컬럼 TSK gel 80<sub>TM</sub>(4.6 mm i.d.×250 mm, Tosoh, Japan)을 장치하여 사용하였다. 형광검출기는 micro-flow cell의 용적이  $15 \mu\text{l}$ 인 FP-210 Model(Jasco, Japan)을 사용하였다.

형광생성물의 특성 및 안정성 검토—MDC와 arachidic acid를 Lee등의 방법<sup>11)</sup>으로 축합반응하였다.

즉 arachidic acid 500 pmol의 dimethylformamide(DMF)용액  $50 \mu\text{l}$ 에 86 mM DEPC, 12 mM MDC의 DMF용액  $50 \mu\text{l}$ 를 순서대로 가하고 상온에서 15분간 방치하여 축합반응을 완결하였다.

MDC에 의한 유도체화 반응 수율을 구하기 위하여 MDC 3.294 mg(9.8  $\mu\text{mol}$ ) 및 arachidic acid 4.167 mg(13.3  $\mu\text{mol}$ )을  $200 \mu\text{l}$  DMF에 용해한 후,  $10 \mu\text{l}$  DEPC(43  $\mu\text{mol}$ )을 가하여 흔들어 혼합하여 실온에서 30분 반응시켰다. 반응생성물은 95% acetonitrile을 사용한 역상 HPLC용 컬럼에서 15.4분에 용출하는 분획을 정제하여 2.245 mg의 정제된 순품을 얻었다. 반응수율의 계산은 정제된 순품과 반응생성물의 형광 피이크 높이를 비교하여 계산하였다. 극대형광파장을 알기 위하여 정제된 순품을 0.2 M NaOAc buffer(pH 6.5)–DMF(10 : 90, v/v)의 용액 ( $3 \times 10^{-6}\text{M}$ )에 녹여, 동일 농도의 dansyl alanine을 기준물질로하여 형광특성을 관찰하였다.

정제한 반응물은  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관하면서 6개월 걸쳐 형광강도의 감소추이를 상기의 HPLC조건으로 확인하여 안정성을 평가하였다.

MDC-PGs의 용출 선택성—PGs에 대한 MDC 유도체화는 PGs 표준품 500 pmol을 사용하여 상기의 반응조건에서 유도체화 하였다.

HPLC의 용매조건은 20% acetonitrile(A액), acetonitrile(B액) 및 유기용매(C액)를 처음 10분간 A : B : C = 80 : 0 : 20의 isocratic elution한 후, 90분에 A : B : C = 40 : 40 : 20의 비가 되도록 linear gradient elution으로 용리하였다. 유도체화물의 분리는 YMC pack A-212(S-5 120A C8) 컬럼을  $40^\circ\text{C}$ 로 고정하여 사용하였고, 사용 유기용매는 tetrahydrofuran(THF), isopropyl alcohol, acetone, methanol 및 DMF로 용출 선택성을 검토하였다.

재현성 및 회수율—Human seminal fluid시료 5  $\mu\text{l}$ 를 채취하여 여기에 PGs시료를 각각 100 pmol을 스파이크하고 내부표준물질  $\text{PGD}_2$ 의 MeOH용액 40  $\mu\text{l}$ 를 가하고 약 2분간 상온에서 방치하여 침전된 단백질을 원심분리하여 제거하였다. 단백질을 제거액에 묶은 염산(pH 3.1) 1 ml를 가하여 액성을 산성으로 한 후, ethyl acetate 1 ml를 넣고  $1000 \times G$ 에서 5분간 원심분리하여 나온 ethyl acetate액을 합하여 질소기류 하에서 건조시켰다. 이 건조물을 MDC로 유도체화하여, HPLC로 분리후 용리되어 나오는 피이크 높

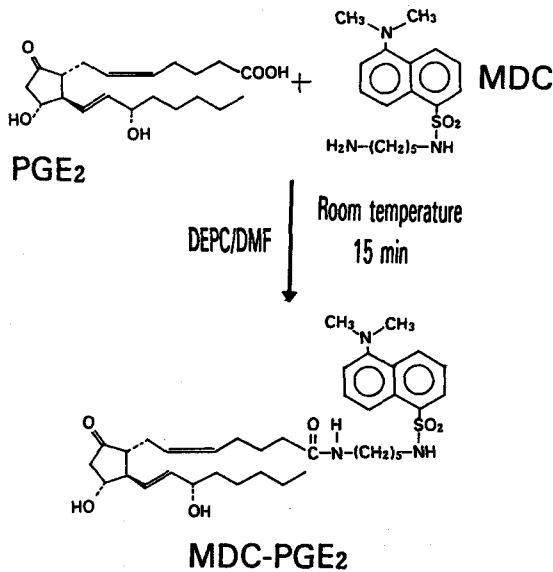


Fig. 1—Fluorescent derivatization of PGE<sub>2</sub>.

이를 측정하였다. 상기 조작을 6회 반복 시행하였다.

### 결과 및 고찰

**형광유도체화 반응**—MDC는 cadaverine의 말단 아미노기가 강한 염기성을 나타내므로, MDC의 DMF용액은 강한 염기성 조건이 된다. 이때, PGs의 카르복실기의 양성자는 해리되고, 이 부분이 DEPC에 의하여 활성화되어 전자부족상태로된 상태에서, cadaverine의 아미노기의 친핵성 첨가반응에 의하여 축합 반응이 이루어진다(Fig. 1). 실제 반응용매 DMF 및 축합제 DEPC를 사용하여 표준시료 arachidic acid에 대한 최적반응 조건을 검토한 결과, 상온에서 15분 반응후의 반응수율이 95% 이상이었다. 반응생성물 MDC-arachidic acid의 형광특성은 기준물질로 사용한 dansyl alanine과 형광 극대파장( $\lambda_{ex}$ . 320 nm,  $\lambda_{em}$ . 518 nm) 및 그 형광강도가 대등하였다. 이는 본 방법으로 dansyl chloride를 사용한 형광분석법과 동일한 고감도 분석이 가능함을 시사하고 있다.

PGs에 대한 유도체화는 PGE<sub>2</sub>에 대하여 상기 반응조건에서 행한 결과, 정량적으로 생성되었고 이외의 여러종류의 PG에 대한 MDC유도체(MDC-PGs)를 얻을 수 있었다. 반응생성물은 4°C에서 보관하면서 형광강도의 변화를 HPLC로 검토한 결과 6개월 이상

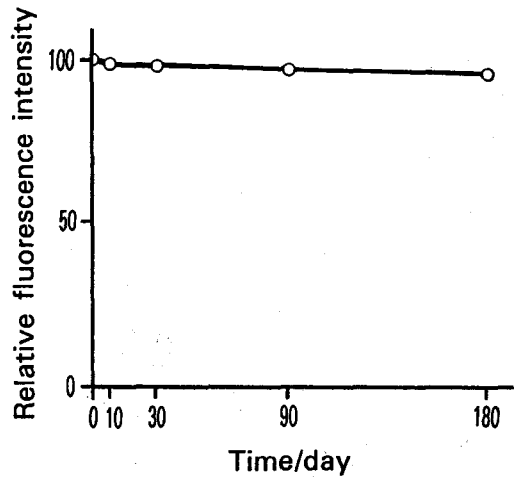


Fig. 2—The stability of MDC-arachidic acid at 4°C.

경과한 후에도 형광강도의 저하가 나타나지 않는 매우 안정한 형광 유도체임을 알았다(Fig. 2).

**용매선택성**—MDC-PGs의 상호 분리를 역상 HPLC장치에서 검토한 결과, 통상의 octadecylsilyl (ODS, C<sub>18</sub>) 컬럼에서의 용출보다 octyl(C<sub>8</sub>) 컬럼에서 용출시간이 빠르고, 분리도 양호하였다. 사용한 용매 중 용출력의 세기가 가장 큰 THF에서 가장 좋은 분리조건을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 일반적으로 PGs는 OH기에 의한 극성효과가 용출 특성을 좌우한다고 알려져 있어 용리액으로 MeOH, EtOH, iso-PrOH 등의 알코올성 용매를 사용한 보고가 대부분이나,<sup>12-14)</sup> MDC유도체화된 MDC-PGs의 경우는 오히려 알코올성 용매에서는 분리효율이 나빠지고, 고리형 에테르인 THF에서의 분리가 가장 양호하였다. 이 현상은 MDC-PGs에서만 보고된 흥미있는 현상으로, 유도체화로 인한 분자량증가가 HPLC의 고정상 또는 이동상간의 인식부위의 변화, 즉 THF의 5원자고리와 PGs의 5원자고리의 상호인식에 기인한 것이 아닌가 추측되며, 앞으로 이 부분을 좀더 연구 할 계획이다.

**최적분리조건 설정**—PGs의 표품에 대하여 MDC 유도체화한 후, THF를 사용하여 분리 조건을 검토한 결과, arachidonic acid의 대사산물인 6-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGF<sub>2 $\beta$</sub> , PGD<sub>2</sub> 및 그외에 PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGE<sub>1</sub>을 분리할 수 있었다. Fig. 4는 20 pmol을 주입하였을 때의 크로마토그램을 나타낸다. 약 23분 및 37분 부근에서 용출하는 피이크는 MDC로부터 유래하는 반응 부산물들

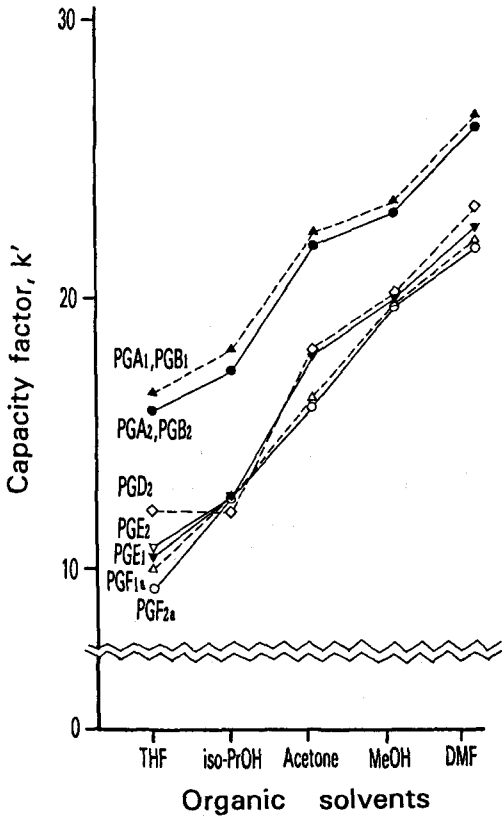


Fig. 3—Chromatographic profiles of MDC-PGs in YMC Pack A-212 column.

이다. 통상의 유기용매는 불포화화합물에 대한 붙잡는효과를 나타내어 포화화합물보다 빨리 용출시키는 경향이 있으나, THF는 PGE<sub>1</sub>과 PGE<sub>2</sub>에 대하여 붙잡는 효과를 보이지 않아 PGE<sub>1</sub>과 PGE<sub>2</sub>의 용출순서가 반전되어 나오는 현상을 관찰할 수 있다. 따라서 크로마토그램상 PGE<sub>1</sub>과 PGE<sub>2</sub>의 피이크가 약간 겹쳐 나오고 있으나, 실제 분석은 가능하다고 판단된다. 한편 TXB<sub>2</sub>의 용출거동을 검토한 결과, PGF<sub>2a</sub>와 PGF<sub>1a</sub>의 용출위치에 넓은 피이크로 용출하였다. 이러한 현상은 용리액의 pH를 산성으로 함에따라 예리한 피이크가 되어 PGF<sub>2a</sub>와 PGF<sub>1a</sub>와의 분리가 개선되나, 그 대신에 6-keto PGF<sub>1a</sub>의 피이크가 넓어지는 경향을 보였다. TXB<sub>2</sub>의 피이크가 폭 넓은 이유는 PGs가 cyclopentane ring인 골격을 갖는 반면, TXB<sub>2</sub>는 hemiacetal ring의 골격이므로, 이 고리가 열린 형태와 닫힌 형태 사이에 평형상태로 존재하기 때문으로 여겨진다. 이 현상을 개선하기 위하여는 용리액의 pH를 올려,

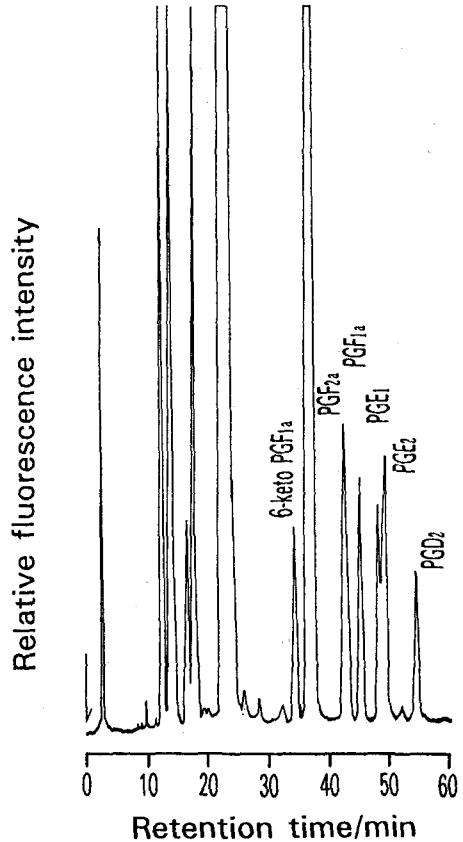


Fig. 4—Chromatographic elution of MDC-PGs.

Eluent A: 20% THF, B: acetonitrile, C: THF  
 Linear gradient profile: eluent A : B : C (80 : 0 : 20) 0 min—(80 : 0 : 20) 10 min—(60 : 40 : 0) 60 min, Column: YMC Pack A-212 (S-5 120A C8) (5.0 mm *i.d.* × 150 mm), Flow rate: 1 ml/min, Column temperature: 40°C, Injected amount: 20 pmol each.

고리를 열린형태의 상태로 편재시켜, hemiacetal ring을 CH<sub>3</sub>ONH<sub>2</sub>·HCl을 사용하여 methoximation하여 고리를 고정하는 방법이 유용하리라 생각된다. PGA<sub>1</sub>과 PGB<sub>1</sub> 그리고 PGA<sub>2</sub>와 PGB<sub>2</sub>는 이 조건에서 약 80분 이후에 용출되나, PGA<sub>1</sub>과 PGB<sub>1</sub>이 1개의 피이크로 PGA<sub>2</sub>와 PGB<sub>2</sub>가 1개의 피이크로 용출되었다. 그 이유는 PGA group과 PGB group는 구조상으로 5원자고리의 2중결합위치 만이 서로 달라 역상 컬럼에서 서로 다르게 인식되지 않기 때문으로 추정된다.

MDC는 시약자체의 안정성이 높아 반응부산물이 적으므로, 9-anthryldiazomethane시약을 사용한 경우

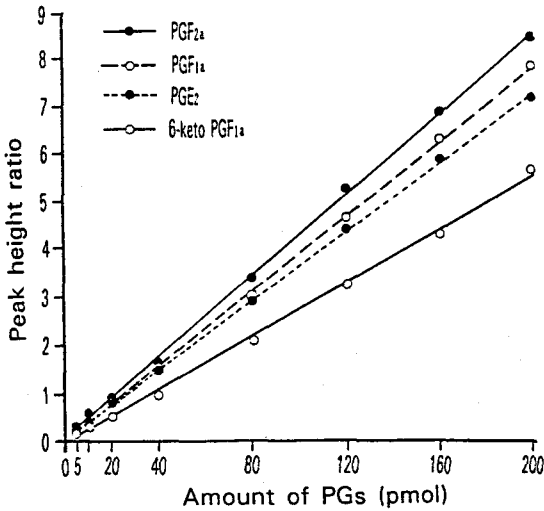


Fig. 5—Calibration curves of MDC-PGs. PGD<sub>2</sub> (40 pmol) is used as a reference.

Table I—Analytical recovery of PGs added to human seminal fluid

PGs added(pmole)	found(pmole)	recovery(%± S.D.)
PGF <sub>2a</sub> 100.0	102.7± 5.8	102.7± 5.8
PGF <sub>1a</sub> 100.0	97.4± 4.4	97.4± 4.4
PGE <sub>1</sub> 100.0	93.6± 4.3	93.6± 4.3
PGE <sub>2</sub> 100.0	97.2± 5.1	97.2± 5.1

The mixture of PGs was added to 5 μl of human seminal fluid (N=6)

보다 크로마토그램의 바탕선이 안정되어 있어 9-anthryldiazomethane시약을 사용할 경우 필수적인 Sep-pak cartridge 등에 의한 반응액 전처리 조작이 불필요하였다.

**검출한계 및 재현성**—이 HPLC조건에서의 PGs의 검출한계는 signal to noise ratio(S/N비)를 3으로 할 경우, 500 fmol이었다. 정량한계범위를 검토한 결과 측정된 5 pmol에서 200 pmol까지의 양호한 직선을 얻을 수 있었다.(Fig. 5) 본 방법의 재현성 및 회수율은 human seminal fluid시료 5 μl에 대하여 각각 100 pmol의 PGs를 첨가한 결과 재현성은 93.6%~102.7% 사이, 상대표준편차는 4.3%에서 5.8% 사이 이었다. 그 결과를 Table I에 정리하였다.

**감사의 말씀**

이 논문은 1990년도 문교부지원 한국학술진흥재단

의 지방대육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

**문헌**

- 1) Lands, W. E. M. and Smith, W. L.: In *Methods in Enzymology* Vol. 86, *Prostaglandins and Arachidonate Metabolites*, Academic Press, N.Y., p. 357 (1982).
- 2) Benedetto, C., McDonald-Gibson, R. G., Nigam, S. and Slater, T. F.: *Prostaglandins and Related Substances*, IRL Press, Oxford, p. 209(1987).
- 3) Yamagi, K. and Oh-ishi, S.: 9-Anthryldiazomethane-HPLC method for detection of prostaglandins and thromboxane: an application to the measurement of the products of stimulated rabbit platelets. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 3526(1986).
- 4) Hatsumi, M., Kimata, S and Hirokawa, K.: 9-Anthryldiazomethane derivatives of prostaglandins for high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr.*, **253**, 271(1982).
- 5) Kiyomiya, K., Yamagi, K., Nimura, N., Kinoshita, T. and Oh-ishi, S.: Phobol myristate acetate-stimulated release of cyclooxygenase products in rat pleural cells: Derivatization of prostaglandins with 9-anthryldiazomethane for fluorometric determination by high performance liquid chromatography. *Prostaglandins* **31**(1), 71(1986).
- 6) Tsuchiya, H., Hayashi, T., Naruse, H and Takagi, N.: Sensitive high performance liquid chromatographic method for prostaglandins using a fluorescence reagent, 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin. *J. Chromatogr.*, **231**, 247(1982).
- 7) Watkins, W. D. and Peterson, M. B.: Fluorescent/ultraviolet absorbing ester derivative formation and analysis of eicosanoids by high pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **125**, 30(1982).
- 8) Morreal C. E., Sinha, D. K., White, C. J. and Nemoto, D. T.: Assay of prstaglandins in the epithelial cells and fibroblasts of the rat mammary gland. *J. Chromatogr.*, **345**, 380(1985).
- 9) Yamaguchi, M., Fukuda, K., Hara, S. and Nakamura, M.: Fluorometric high performance liquid chromatography of prostaglandins and its applica-

- tion to their determination in human seminal fluid. *J. Chromatogr.*, **380**, 257(1986).
- 10) Yamaguchi, M., Takehiro, O., Hara, S., Nakamura, M. and Ohkura, Y.: 3-Bromomethyl-6,7-methylene-dioxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone as a highly sensitive fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids in high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**(6), 2263(1988).
- 11) Lee, Y. M., Nakamura, H. and Nakajima, T.: Monodansyl cadaverine as a versatile reagent for fluorogenic precolumn derivatization of carboxylic acids. *Anal. Sci.*, **5**, 209(1989).
- 12) Clark, C. P., Snider, B. G. and Bowman, P. B.: High performance liquid chromatographic method for determining the enantiomeric purity of a benzindene prostaglandin by a diastereomeric separation. *J. Chromatogr.*, **408**, 275(1987).
- 13) Oliw, E. H., Benthin, G. and Hamberg, M.: Isolation of 19,20-dehydroprostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> in humal seminal fluid and further studies on 18,19-dehydroprostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**(1), 272(1987).
- 14) Veenstra, J., Van Der Pol, H., Van Der Torre H., Schaafsma, G. and Ockhuizen, T.: Rapid and simple methods for the investigation of lipoxigenase pathyays in human granulocytes. *J. Chromatogr.*, **431**, 413(1988).