

형광검출 역상 액체크로마토그래피에 의한 Histamine의 정량

유희춘[†] · 김형룡* · 김상현 · 김대기** · 이영미** · 김형민** · 안년형*** · 신태용

우석대학교 약학대학

*원광대학교 치과대학

**원광대학교 의과대학

***원광대학교 약학대학

(1996. 2. 13. 접수)

Determination of Histamine by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

Hee-Chun Ryu[†], Hyung-Ryong Kim*, Sang-Hyun Kim, Dae-Ki Kim**, Young-Mi Lee**,

Hyung-Min Kim**, Nyeon-Hyoung An***, Tae-Yong Shin

College of Pharmacy, Woosuk University, Chonju 656-701, Korea

**Wonkwang University School of Dentistry, Iksan 570-749, Korea*

***Wonkwang University School of Medicine, Iksan 570-749, Korea*

****College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea*

(Received Feb. 13, 1996)

요약 : Histamine을 정확하고 신속하게 정량하기 위해 9-Fluorenylmethyl chloroformate를 형광유도체화제로 하여 역상 HPLC법으로 정량하였다. 히스타민을 형광유도체화할 때 반응액의 pH, 반응시간, 형광유도체화제의 농도 등 최적 반응 조건을 검토하였다. 이 방법으로 히스타민을 분석한 결과 0.1~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도범위에서 상관계수가 0.992인 양호한 직선성을 나타내었으며 검출한계는 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다.

Abstract : A rapid and simple method for the determination of histamine by reverse-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection was established. 9-Fluorenylmethyl chloroformate(FMOC) was used as fluorescent derivative reagent. The optimum conditions for the derivatization such as pH, reaction time and the concentration of FMOC were investigated. Linearity of calibration curve was obtained between 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.992$) and the limit of detection was 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Key words : HPLC analysis, Histamine, 9-Fluorenylmethyl chloroformate

1. 서론

히스타민은 즉시형 알레르기 반응의 유발하는 매

개물질이며^{1,2}, indolamine(serotonine 등), catecholamine(dopamine, epinephrine 등) 및 polyamine(spermine 등)과 더불어 생체내에 존재하는 생리활성

아민으로 알려져 있다.

히스타민은 포유동물의 경우 경조직을 제외한 대부분의 조직과 림프액, 혈액, 위액 및 타액 등의 분비액 중에 존재하고 체내에서 histidine decarboxylase의 작용에 의해 histidine으로부터 생합성되어 조직의 비만세포, 혈액 호중구의 과립 중³에 저장된다. 히스타민은 생리작용이 다양하며 최근에는 면역체계에서의 역할이 주목되고 있다. 체내에 들어오는 항원은 major histocompatibility complex(주요 조직적합성 유전자 복합체) 분자에 의하여 T세포를 자극함으로써 T세포에서 방출하는 IL-4 등의 세포활성물질에 의해 B세포에서 IgE를 합성시킨다. 생성된 IgE는 비만세포와 호염기구 표면에 있는 IgE 수용체(Fcε RI)와 결합하고 재차 동일한 알레르겐으로 자극되면 각종 화학적 매개물질(histamine, serotonin, prostaglandin 등)이 탈과립되어 즉시형 알레르기질환 및 평활근의 수축이나 혈관의 확장 등을 일으키고 이들 물질에 의해 말초혈액 중의 호염기구나 호산구가 조직내에 침윤하여 조직을 손상시키는 물질의 분비가 계속적으로 일어나 결국 만성 질환으로 이행된다. 따라서 염증반응과 알레르기 반응에 관여하는 매개물질이며 항알레르기 약물 개발의 지표물질인 히스타민의 정확한 분석은 매우 중요하다. 생체시료 중의 히스타민은 Shore⁴ 등이 1959년 o-phthalaldehyde(OPA)를 형광시약으로 하여 형광광도법으로 분석한 이래 OPA⁵⁻¹¹, Fluorescamine¹² 등을 형광유도체화제로 한 HPLC법, 효소동위원소법^{13,14}, GC-MS법¹⁵⁻¹⁷ 등을 이용한 연구가 보고되어 있다. 그러나 형광광도법 및 OPA를 형광유도체화제로 한 HPLC법은 전처리 조작이 복잡하며, 효소동위원소법은 감도는 좋으나 재현성이 떨어지고, 방사능과 그 폐기물에 의한 위험이 따르고 있다. 또 GC-MS법은 히스타민 및 히스타민 대사체를 동시에 정량할 수 있으나 시료를 전처리해야 하는 번거로움이 있다. 이에 저자들은 아미노산 정량의 라벨화제로 이용되고 있는 9-Fluorenylmethyl chloroformate(9-Fluorenyl ethoxycarbonyl chloride, FMOC)¹⁸⁻²¹를 형광유도체화제로 사용하여 전처리 조작이 간단하고 재현성 있는 히스타민의 정량법을 확립하였으며 이 방법을 이용하여 혈청 중의 히스타민도 정량할 수 있는 지점을 얻었으므로 보고하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 기기

Histamine dihydrochloride(Sigma Co.)는 0.1 N-HCl에 용해시켜 10 μ g/ml의 농도로 stock solution을 조제하여 냉동보관하였다. Working solution은 stock solution을 0.1N-HCl로 희석하여 4 $^{\circ}$ C 이하에서 보관하였다.

FMOC(Aldrich Co.)는 acetonitrile과 acetone의 1:1 혼합액에 녹여 4 $^{\circ}$ C 이하에서 보관하였다. Compound 48/80은 Sigma사 제품을, acetonitrile과 methanol을 비롯한 유기용매들은 E. Merck사의 HPLC용을, 기타 시약은 시판 시약 특급을 사용하였다. 본 실험에 사용한 HPLC는 Waters(Model 6000A)사의 제품을, 검출기는 SFM 25 spectrofluorometer(Kontron Instrument)를 사용하였다.

2.2. 정량조작법

1.5ml Eppendorf tube(E.P tube)에 히스타민 표준액(0.1 μ g/ml) 400 μ l와 pH 8.0의 붕산완충액 100 μ l를 가해 진탕한 후 3mM로 조제한 FMOC 용액 500 μ l를 가해 1분간 진탕반응시켜 형광유도체화시켰다. 유도체화된 반응액 20 μ l를 취해 역상 column에 주입하여 HPLC의 분석조건에 따라 실험하였다.

2.3. HPLC의 분석 조건

Column : μ -Bondapak C₁₈, mobile phase : 65% acetonitrile, flow rate : 1.5ml/min, temperature : ambient, injection volume : 20 μ l, detector : fluorescence detector λ_{ex} =260nm, λ_{em} =316nm.

3. 결과 및 고찰

3.1. 형광유도체의 형광 특성

히스타민과 FMOC가 반응하여 생성된 형광유도체의 여기 극대파장(λ_{ex})과 형광 극대파장(λ_{em})을 측정 한 결과 각각 260nm, 316nm였으므로 본 실험에서는 λ_{ex} =260nm, λ_{em} =316nm에서 실험하였다.

3.2. 반응조건의 검토

3.2.1. pH의 영향

E. P tube에 히스타민 표준액(0.1 μ g/ml) 400 μ l 및 pH 3.0~12.0의 완충액 100 μ l를 각각 가해 진탕한 후 3mM로 조제한 FMOC 용액 500 μ l를 가해 1분간 진탕 반응시켜 정량 조작법에 따라 실험한 결과 Fig. 1에서와 같이 pH 7.0~9.0 사이에서 상대 형광강도가 일정 하였으므로 본 실험에서는 pH 8.0의 붕산완충액을 사용하였다.

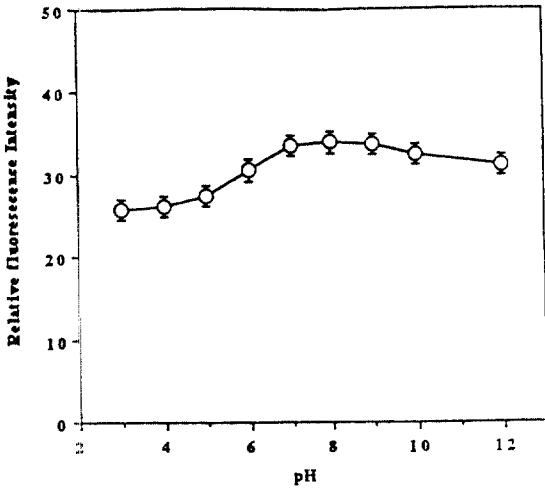


Fig. 1. Effect of pH on the derivatization of histamine with FMOC

3.2.2. 반응시간과 안정성의 검토

히스타민과 FMOC의 형광유도체화 반응시간과 안

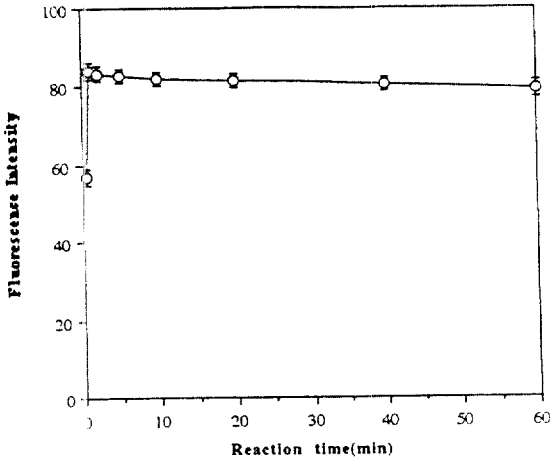


Fig. 2. Effect of reaction time on the derivatization of histamine with FMOC

정성을 검토하기 위하여 E. P tube에 히스타민 표준액 (0.1 μ g/ml) 400 μ l와 pH 8.0의 붕산완충액 100 μ l를 가해 진탕한 후 3mM로 조제한 FMOC 용액 500 μ l를 가해 반응시간을 0.5분, 1분, 2분, 5분, 10분, 20분, 40분, 60분으로 하여 정량 조작법에 따라 실험한 결과 Fig. 2에서와 같이 1분 이상에서 거의 일정한 상대 형광강도를 나타내었으므로 본 실험에서는 반응시간을 1분으로 하였으며, 또한 60분까지 안정하였다.

3.2.3. FMOC의 농도 영향

형광유도체화제의 최적 농도를 결정하기 위하여 E. P. tube에 히스타민 표준액(0.1 μ g/ml) 400 μ l와 pH 8.0의 붕산완충액 100 μ l를 가해 진탕한 후 FMOC의 농도를 0.3mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 5mM, 7.5mM 및 15mM로 하여 1분간 진탕반응시켜 정량 조작법에 따라 실험한 결과 Fig. 3에서와 같이 2mM 이상에서 일정한 상대형광강도를 나타내었다. 본 실험에서는 FMOC의 농도를 3mM로 하였다.

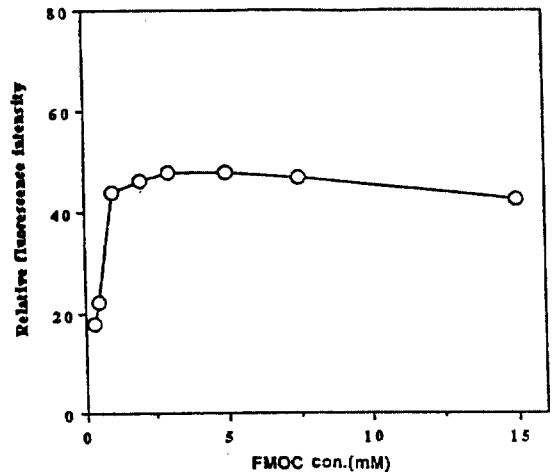


Fig. 3. Effect of concentration of FMOC on the derivatization of histamine with FMOC

3.3. 검량선 작성

히스타민 표준액을 희석하여 정량 조작법에 따라 형광유도체화시킨 후 chromatogram의 상대 형광강도로부터 검량선을 작성한 결과 Fig. 4에서와 같이 0.1~0.5 μ g/ml의 농도 범위에서 상관계수가 0.992인 양호한 직선성을 나타내었으며 검출한계는 0.01 μ g/ml (S/N > 4)으로 비교적 낮았다.

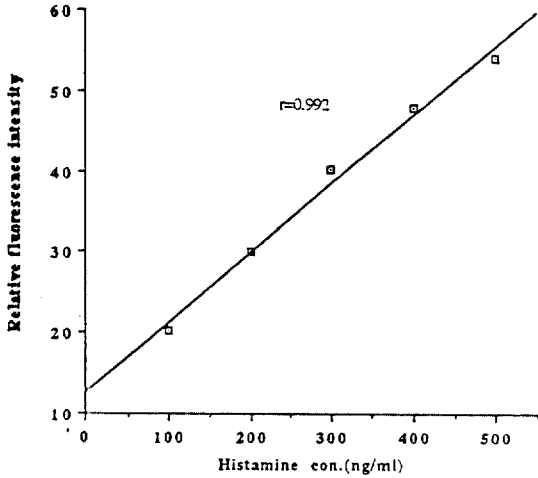


Fig. 4. Calibration curve for the histamine standard

3.4. 혈청 중 히스타민의 확인 및 분석

ICR계 mouse의 복강내에 compound 48/80을 주사하여 비만세포의 히스타민을 탈과립시킨 후 채혈하여 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 혈청에 methanol을 가해 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질을 침전 제거하고 methanol층을 취해 증발 건조하였다. 그 잔사를 히스타민 표준액의 정량조작법에 따라 유도체화시킨 후 20 μ l를 취해 HPLC의 분석 조건에 따라 실험한 결과 표준품의 retention time으로부터 히스타민을 확인하였으며, 혈청 중에서 방해

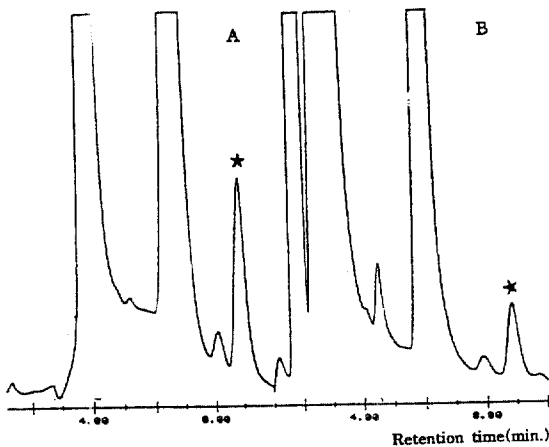


Fig. 5. Chromatograms of histamine derivative from standard solution (A) and mouse serum after compound 48/80 injection (B)

peak 없이 히스타민을 정량할 수 있었다(Fig. 5).

4. 결론

생체 시료 중의 히스타민을 정량하기 위해 FMOC를 형광유도체화제로하고 HPLC를 이용하여 형광검출기로 히스타민을 분석한 결과 형광유도체화할 때 최적 반응 조건은 pH가 7.0~9.0, FMOC의 농도가 3mM, 반응시간은 1분으로 충분하였으며 60분까지 반응액은 안정하였다.

HPLC에 의한 분석은 μ -Bondapak C₁₈ Column과 65% Acetonitrile을 이동상으로 하여 형광검출기의 $\lambda_{ex}=260nm$, $\lambda_{em}=316nm$ 의 파장에서 히스타민을 분석한 결과 0.1~0.5 μ g/ml의 농도범위에서 상관계수가 0.992인 양호한 직선성을 나타내었으며 검출한계는 0.01 μ g/ml였다.

이상의 결과 FMOC를 형광유도체화제로 하여 생체 성분 중 히스타민만을 선택적으로 간편하게 정량할 수 있었으며, 아울러 이 방법이 알레르기 질환을 연구하고 그 치료제를 개발하는 데 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. T. B. Casale, D. Wood, H. B. Richerson, S. Trapp, W. J. Metzger, D. Zavala and G. W. Hunninghake, *J. Clin. Invest.*, **79**, 1197-1203(1987).
2. S. R. Durham, T. H. Lee, O. Cromwell, R. J. Shaw, T. G. Merrett, P. Cooper and A. B. Kay, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **74**, 49-60(1984).
3. R. W. Schayer, *Am. J. Physiol.*, **186**, 199-202(1956).
4. P. A. Shore, A. Burkhalter and V. H. Cohn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182-186(1959).
5. R. E. Subden, R. G. Brown and A. C. Noble, *J. Chromatogr.*, **166**, 310-312(1978).
6. Y. Tsuruta, K. Kohashi and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **146**, 490-493(1978).
7. T. P. Davis, C. W. Gehrke, C. W. Gehrke, Jr., T. D. Cunningham, K. C. Kuo, K. O. Gerhardt, H. D. Johnson and C. Williams, *J. Chromatogr.*, **162**, 293-310(1979).
8. L. D. Mell Jr., R. N. Hawkins and R. S. Thompson, *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 1393-1406(1979).

9. A. Yamatodani, K. Maeyama, T. Wadanabe, H. Wada and Y. Kitamura, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 305-309(1982).
10. A. Yamatodani, H. Fukuda, H. Wada, T. Iwaeda and T. Watanabe, *J. Chromatogr.*, **344**, 115-123 (1985).
11. R. Czerwonka, D. Tsikas and G. Brunner, *Chromatogr.*, **25**, 219-222(1988).
12. A. Bettero, M. R. Angi, F. Moro and C. A. Benassi, *J. Chromatogr.*, **310**, 390-395(1984).
13. G. J. Gleich and W. M. Hull, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **66**, 295-298(1980).
14. K. M. Verburg, R. R. Bowsher and D. P. Henry, *Life Sci.*, **35**, 241-251(1984).
15. A. Yamatodani, T. Seki, M. Taneda and H. Wada, *J. Chromatogr.*, **144**, 141-145(1977).
16. H. Mita, H. Yasueda and T. Shida, *J. Chromatogr.*, **221**, 1-7(1980).
17. H. Mita, H. Yasueda and T. Shida, *J. Chromatogr.*, **181**, 153-159(1980).
18. S. Einarsson, B. Josefsson and S. Lagerkvist, *J. Chromatogr.*, **282**, 609-618(1983).
19. S. Einarsson, *J. Chromatogr.*, **348**, 213-220(1985).
20. T. Teerlink and E. D. Boer, *J. Chromatogr.*, **491**, 418-423(1989).
21. B. Gustavsson and I. Betner, *J. Chromatogr.*, **507**, 67-77(1990).