

RP-HPLC를 이용한 혈액에 포함된 펩타이드의 분리

이 승 기 · Yulia Polyakova · †노 경 호
초정밀생물분리기술센터, 인하대학교, 화학공학과
(접수 : 2002. 4. 26., 게재승인 : 2002. 6. 24.)

Isolation of Peptides from Human Blood by RP-HPLC

Sueng Ki Lee, Yulia Polyakova, and Kyung Ho Row†
Center for Advanced Bioseparation Technology and Dept. of Chem. Eng.,
Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2002. 4. 26., Accepted : 2002. 6. 24.)

The biologically active peptides in human blood can adjust the functions of many physiological systems. The peptides in human blood were separated on the five steps of linear gradient-elution mode by RP-HPLC with UV detection. The size of commercially available C₁₈ chromatographic column was 4.60×150 mm with particle size of 5 μm and pore size of 100 Å. The mobile phases used were water in 0.75% trifluoroacetic acids (TFA) and organic modifier of acetonitrile. The isolation methods suggested in this work for peptides from the blood were composed of the formation of immiscible liquid layers and precipitation by centrifuge and chemicals of sodium citrate and trichloroacetic acid (TCA). The some peptides were identified based on the retention times previously constructed database.

Key Words : peptides, Isolation, degradation, RP-HPLC, human blood

서 론

생리활성(biological-active) 물질의 분석 및 분리는 화학, 생물학, 생화학 그리고 의학분야에서 매우 중요하다. 광범위한 생리활성 물질 중에서 본 연구에서는 적혈구 내의 생리활성 펩타이드를 선정하였다(1). 생체의 기능조절에 관여하는 펩타이드로서 혈액 내에서 분비되는 양이 극히 적기 때문에 다양한 생리 기능을 밝히는데 어려운 점이 많았다. 그러나 생리활성 펩타이드에 관한 연구는 각종 질환의 진단, 예방 및 치료약으로서의 응용 가능성이 매우 높아서 지속적으로 이루어지고 있다. 또한 간염, AIDS를 비롯한 각종 바이러스에 의한 질환에 대하여 펩타이드를 이용하는 진단법, 예방 및 치료약의 개발은 종래의 고가의 단백질을 이용한 것보다 비용을 절감할 수가 있으며, 단백질보다 높은 감도, 선택적 특이성 및 효율성을 제공할 수 있다는 측면에서 여러 분야의 연구가 수행되어지고 있다(2,3). 이와 같은 펩타이드를 분리하는 방법에는 역상 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)와 UV 검출기가 가장 많이 사용된다(4,5). 모세관 전기영동(capillary electrophoresis)을 적용하여 펩타이드를 분리하는 경우도 있지만 RP-HPLC를 더 선호한다. 그 이유는 펩타이드가 극성인 용매

의 이동으로부터 정지상으로의 흡착이 용이하게 이루어지기 때문이다. 지난 수년간, RP-HPLC를 이용한 분석기술은 혼합되어 있는 펩타이드의 용리위치를 예측하는데 매우 유용한 정보를 제공해 주고 있으며, 특정 펩타이드나 혼합된 작은 펩타이드를 분리하는데 탁월한 성능을 보이고 있다(6).

RP-HPLC의 컬럼 내에서 펩타이드 분리에 영향을 미치는 요소에는 아미노산의 조성, 펩타이드의 사슬길이 그리고 아미노산의 결합 순서에 따른 구조적 차이 등이 있고, 정지상과의 흡착성 그리고 용리(elution)를 위한 크로마토그래피의 조건 또한 펩타이드 분리에 큰 영향을 미친다. 따라서 펩타이드와 펩타이드가 분리되는 정지상 사이에서는 소수성 상호작용이 일어남으로 이동상은 물과 유기용매의 혼합물을 사용한다. 그리고 컬럼으로부터의 펩타이드의 용리는 유기 첨가제(organic modifier) 함량의 증가에 따라 나타난다(7-9). 이동상은 대부분의 역상 분리에서 필수적으로 물과 유기 용매인 메탄올 등의 알코올, 아세트나이트릴이 사용된다(10-12). 이 중에서 아세트나이트릴은 UV 투과도(transparency), 낮은 점도(viscosity), 휘발도가 좋기 때문에 일반적으로 많이 사용된다. 또한 예전부터 많은 실제적 목적의 최적 용매조건 하에서 만족할만한 분리도와 선택도를 제공해 준다. 펩타이드 분리를 위한 이동상에는 이온 첨가제가 포함되는데 그것은 아미노산 전하의 counter-ion에 작용한다. 이 이온 첨가제는 이온쌍(ion-pair) 복합 형태를 형성 펩타이드의 소수성을 증가시켜 분리를 용이하게 해준다. 가장 많이 사용되는 이온 첨가제로는 trifluoroacetic acid(TFA)가 있는데 이것은 강한 이

† Corresponding Author : Department of Chem. Eng., Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

온쌍 시약이고 UV를 투과하며 동결 건조에 의해 쉽게 제거가 되는 장점이 있다. 일반적으로 실험에 사용되는 컬럼의 실리카 공극 크기(pore-size)는 펩타이드의 크기에 의존하는데, 매우 큰 펩타이드나 단백질은 300 Å, 반면에 작은 펩타이드들은 (<125 Å)가 적합하다. 본 실험에서는 적혈구 내의 작은 펩타이드들을 분리하는 것이므로 5 μm의 C₁₈으로 충전된, 공극의 크기가 100 Å를 사용하였다. 본 실험에서는 혈액을 채취한 날로부터 3일, 5일, 7일째 되는 날에 샘플시료를 만들었고, 0.75% TFA가 함유된 물과 아세트나이트릴을 사용하여 분리, 분석하였다. 혈액 속에 있는 적혈구 내의 생리활성 펩타이드를 RP-HPLC와 UV 검출기를 이용하여 분리하기 위한 실험조건을 정립하고, 펩타이드의 일부를 정성적으로 규명하는 것이 이 연구의 목적이다.

실 험

시 약

본 실험에 사용된 표준시료 펩타이드와 이온 첨가제인 trifluoroacetic acid (TFA)는 Sigma에서 구입하였다. trichloroacetic acid (TCA)는 Acros Organics에서, sodium citrate는 Shinyo pure chemical에서 구입하였다. HPLC-grade의 아세트나이트릴은 J. T. Baker에서 구입하였고 물은 2차 증류한 증류수를 사용하였다.

기 기

채취한 혈액을 분리하기 위해 고속원심분리기(Micro 17R plus, Hanil Science Industrial Co., Ltd.)를 사용하였다. HPLC는 Waters사의 600S(solvent delivery system), UV 검출기는 2487 UV dual channel detector(Waters, Milford, MA, U.S.A.)를 사용하였다. 데이터 저장 시스템은 HP Vectra 500 PC에 설치된 Millennium 3.2를 사용하였다. 분석용 컬럼(4.60×150 mm)은 Alltech 회사에서 구입한 것으로 C₁₈ 입자크기가 5 μm이고 공극의 크기가 100 Å를 사용하였다.

방 법

본 실험에 사용된 샘플시료는 인하대학교 고순도분리연구실에서 다음 단계를 거쳐서 직접 준비하였다(13,14).

1. 건강한 사람의 혈액 9 mL를 채취, 3.8%의 sodium citrate 용액 1 mL에 용해시킨다. (Figure 1-(A) 참조)
2. 1 mL의 혈액을 centrifuge tube에 넣고 원심분리기로 밀도차이에 의하여 분리한다. (원심 분리기 조건: 10분, 2280 rpm=602 g)
3. 위 아래의 층으로 구분된 성분 중 위쪽의 혈장(plasma) 부분을 제거한다. (Figure 1-(B) 참조)
4. 냉동 보관된 0.154M NaCl 용액을 남은 아래 부분에 첨가한다. 이때 pH는 7.4로 유지한다.
5. 원심분리기로 다시 분리한다. (원심분리기 조건: 10분, 2280 rpm=602 g)
6. 양쪽으로 분리된 성분 중 위쪽 부분을 제거하고 0.154 M NaCl을 첨가한다.
7. (5)-(6)의 과정을 2번 더 반복한다. (Figure 1-(C) 참조)

8. 위의 단계 이후로 구분된 성분 중 위쪽 부분을 제거하

고 적혈구가 포함된 혈액 성분에 TCA 0.15%을 첨가한다.

9. TCA가 첨가된 시료를 원심분리기로 분리한다. (원심분리기 조건: 10분, 3120 rpm=1000 g)

10. TCA에 의해 혈액 속의 적혈구 및 단백질 성분들은 바닥에 침전되고 위쪽 부분에는 순수한 펩타이드 성분만이 남게 되고 이를 시료로 사용하였다. (Figure 1-(D) 참조)

혈액을 채취한 날짜로부터 각각 3일째, 5일째, 7일째되는 날에 위와 같은 방법으로 시료를 만들었다. 위에서 얻은 4개 샘플 시료의 용매, 용리 시간에 따른 변화를 비교하기 위하여 분석용 HPLC를 사용하였다. 이동상은 0.75% TFA가 포함된 물, 아세트나이트릴로 구성하였다. 펌프를 사용하여 이동상의 기체성분을 제거하였고 시료의 주입량은 10 μL, 이동상의 유속은 1.0 mL/min로 고정하였다. UV 검출기는 254 nm를 사용하였고 모든 실험은 상온에서 수행하였다.

결과 및 고찰

혈액으로부터 생리활성 펩타이드를 얻어내기 위해 건강한 사람의 혈액을 채취하였다. 응고를 막기 위해 3.8%의 sodium citrate 용액 1 mL를 첨가하였고 적혈구, 백혈구, 혈소판이 포함되어 있는 혈구부분에 0.154M NaCl 용액을 첨가하여 원심분리기로 분리하였다. 이 작업을 2-3번 정도 반복하면 적혈구의 성분만이 하층부에 남게 되고 백혈구와 혈소판 등은 NaCl 용액에 의해 씻겨져 상층부로 분리되어 나와 제거된다. 이제 하층부에 0.15% TCA를 첨가하면 하층부에는 적혈구가 침전되고 상층부에는 적혈구에 있는 순수한 펩타이드만이 분리되어 나온다.

RP-HPLC는 펩타이드가 극성인 용매에서 비극성 충전제로 흡착이 용이하게 이루어지기 때문에 널리 사용된다. 아미노산의 내부 분자의 일부는 전기적인 전하를 띠는데, 극성인 이동상과 비극성인 정지상 사이에서 분리에 중요한 역할을 하게 된다(15,16). 따라서 이동상은 극성인 물과 아세트나이트릴을 사용하였고 이온 첨가제로는 0.75% TFA를 사용하였다. 이러한 물질들의 특징을 이용하기 위해서는 일정용매 조성으로 분리하기는 거의 불가능하기 때문에(17), 선형적 구배용매 조성을 이용하여 펩타이드를 분리하였고, 구배시간과 단계를 변화시키면서 얻은 조건 중에서 가장 좋은 분리도를 보인 실험 결과가 Table 1에 나타나 있다.

혈액 속의 생리활성을 가지는 펩타이드들의 정량 변화를 측정하기 위해서 날짜별로 만들어진 4개의 샘플시료를 Table 1의 조성으로 분석한 결과가 Figure 2-4에 나타나 있다. Figure 2는 당일 준비된 시료의 크로마토그램이고, Figure 3의 (a)는 3일, (b)는 5일째, Figure 4에서는 7일째 만들어진 시료의 크로마토그램을 보여주고 있다. 각 peak를 정성적으로 분석하기 위해 표준시료가 사용되었고 크로마토그램에 표시하였다. 표준시료는 아미노산의 결합순서에 따른 코드명으로 나타내었다. Figure 3에서는 7일째의 Figure 4와 유사하여 물질명을 표기하지 않았다. 각각의 크로마토그램을 분석한 결과 3일, 5일, 7일째 만들어진 샘플시료의 peak 형태는 거의 비슷했다. 단지 첫날 시료와 비교해서 4 분대에 peak #2가 추가되었다. Table 2에 날짜와 peak에 따른 면적의 변화에 관한 표를 작성했다. 표에서 확인할 수 있도록 peak #1(V-H-I-T-R-F-F-

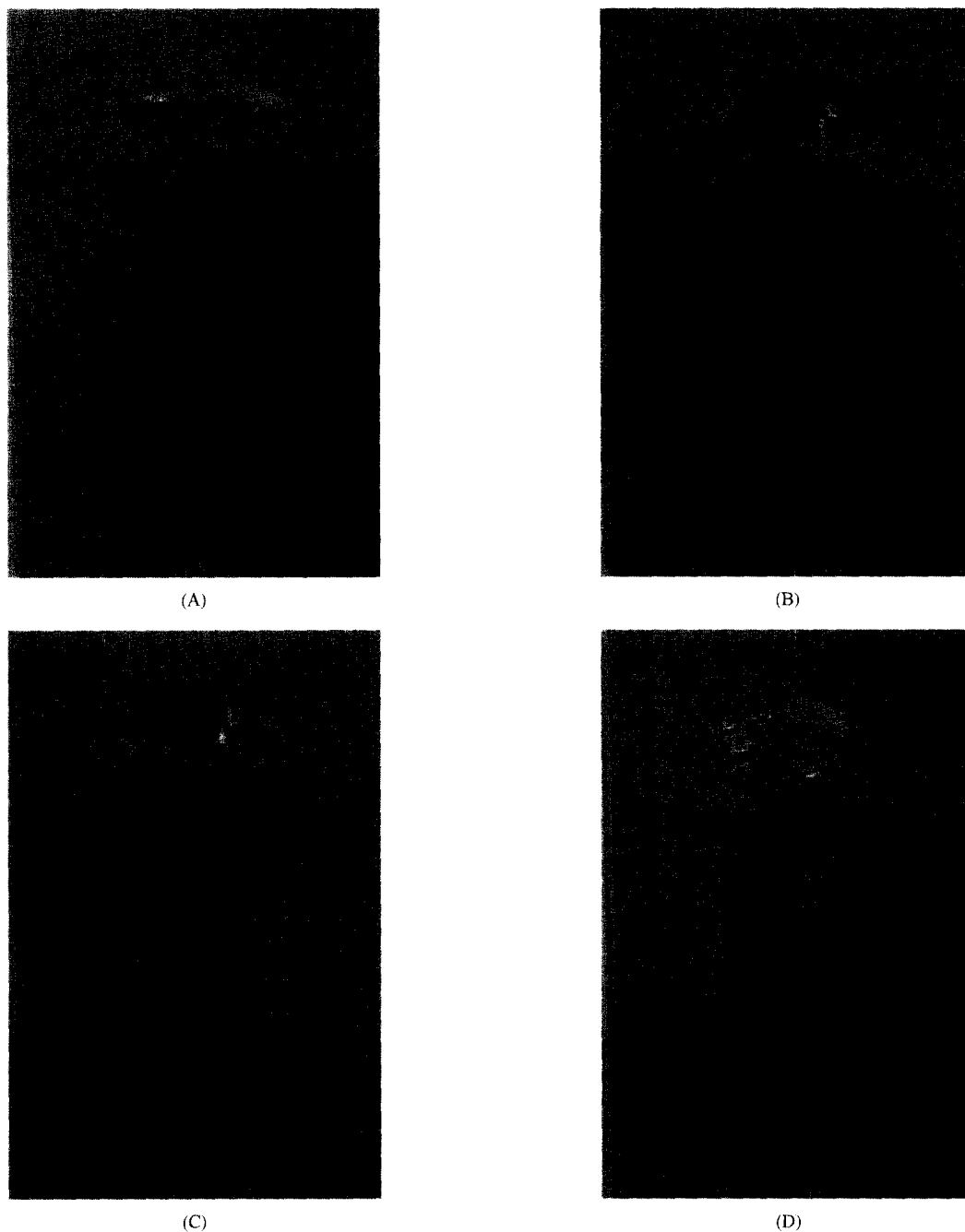


Figure 1. Photograph showing the sample preparation process. (A) fresh sample of blood (B) plasma in the upper side and erythrocytes in the lower side. (C) leukocytes in the upper side and erythrocytes in the lower side. (D) peptides in the upper side and erythrocytes and proteins in the lower side.

Table 1. Mobile phase composition and gradient conditions

	Gradient time (min)	0.75% TFA in water, vol. %	Acetonitrile, vol. %
	Initial	100	0
	4	90	10
Figures	7	80	20
2,3,4	10	65	35
	20	50	50
	30	0	100

Table 2. Shift in peak areas with days

Peak area	Sample			
	1 day	3 days	5 days	7 days
Peak #1	1,876,546	1,927,687	2,063,253	2,206,054
Peak #2	.	177,164	220,297	204,573
Peak #3	2,392,804	953,340	858,778	676,798
Peak #4	536,568	348,798	382,263	287,139
Peak #5	232,524	222,016	253,964	252,088

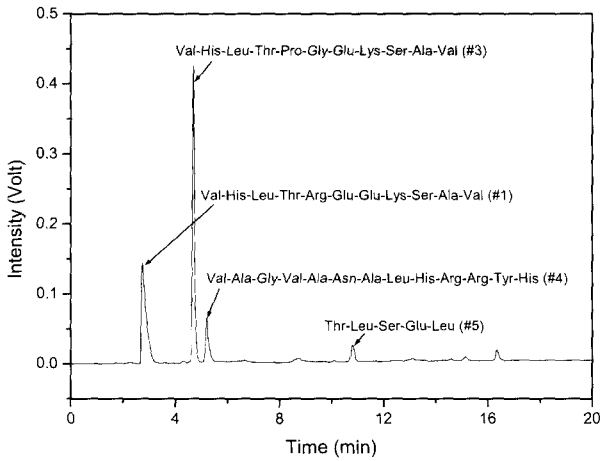


Figure 2. Separation of peptides from human blood by RP-HPLC. (fresh sample, injection volume 10 μ L)

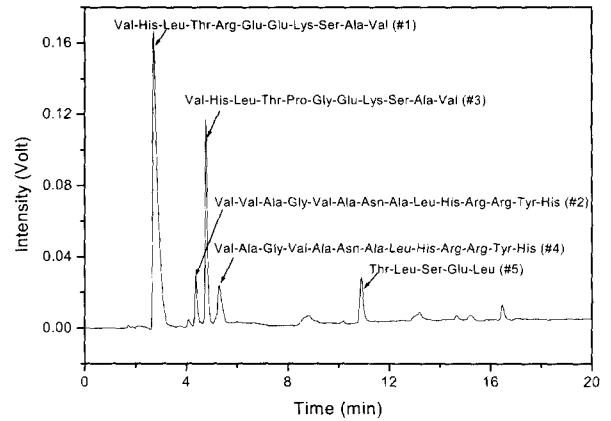


Figure 4. Separation of peptides from human blood by RP-HPLC. (7 days, injection volume 10 μ L)

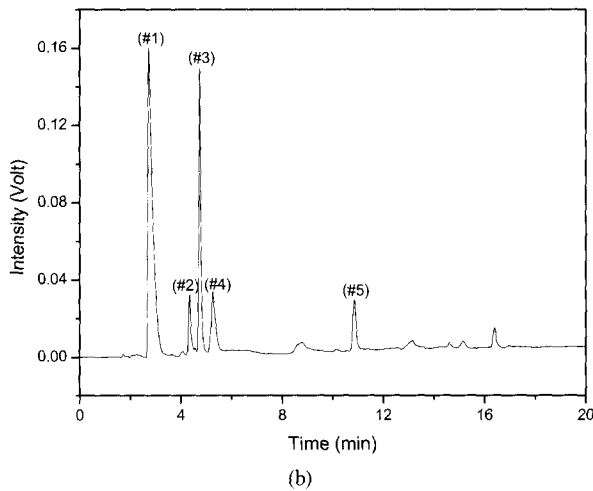
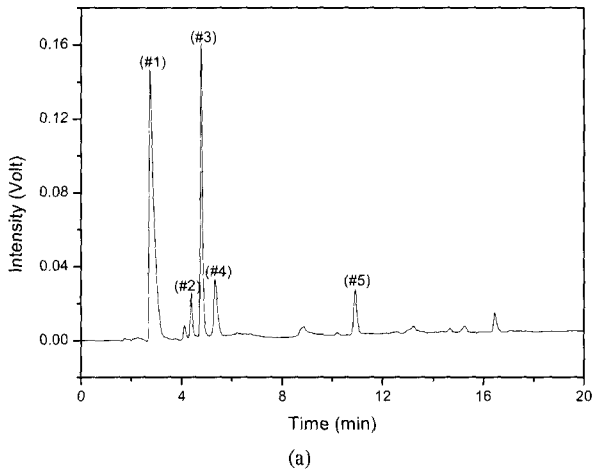


Figure 3. Separation of peptides from human blood by RP-HPLC. ((a) 3days, (b) 5days, injection volume 10 μ L)

K-S-A-V)의 면적은 날짜가 지남에 따라 계속 증가하였다. Peak #2(V-V-A-G-V-A-N-A-L-H-R-R-Y-H)는 첫날 시료에는 없고 이후 3일, 5일, 7일째 시료에만 나타났다. Peak #3(V-HIS-LEU-THR-ARG-GLU-GLU-LYS-SER-ALA-VAL)와 #4(V-ALA-GLY-VAL-ALA-ASN-ALA-LEU-HIS-ARG-ARG-TYR-HIS)는

날짜가 지남에 따라 면적이 감소하였는데, 그 중 peak #3은 가장 크게 감소하였다. 반면에 Peak #5(T-L-S-E-L)는 거의 일정한 면적분포를 나타냈다. 이와 같은 peak 면적의 변화는 시간이 경과함에 따라 채취한 혈액 속에 산소 부족 현상으로 발생한다.(1,13) 적혈구 내의 세포들이 산소를 소비함으로써 적혈구 내에 있던 펩타이드는 분해되어 새로운 아미노산 구조를 생성한다. 즉 새로운 생리활성을 가지는 펩타이드가 만들어지는 것이다.

적혈구내에서 왜 이와 같은 작용이 일어나는지에 대한 정확한 이론은 아직 없다. 다만 본 연구에서는 이와 같이 구조적 변화를 나타내는 펩타이드들을 RP-HPLC에 의하여 정량 및 정성적으로 확인하였다. 적혈구내에 있는 생리활성 펩타이드는 시간이 지남에 따라 스스로 분해하여 새로운 형태의 물질을 만들어낸다. 본 연구실에서는 이와 같은 분해 과정에 관한 연구를 계속 진행 중에 있으며 곧 좋은 결과를 발표할 예정이다.

요 약

생리활성을 가지는 펩타이드에 관한 연구는 각종 질환의 진단, 예방 및 치료약으로서의 응용 가능성이 매우 높아서 현재 많은 연구가 진행 중이다. 펩타이드를 RP-HPLC에 의해 정량, 정성분석 함으로 다양한 연구 분야로의 확대를 모색해 볼 수 있다. 혈액 속에 있는 적혈구내의 펩타이드를 분리하기 위해 0.75% TFA가 포함된 물과 아세트나이트릴을 이동상과 선형적 구배용매 조성을 이용한 실험결과, 펩타이드의 peak 분리도는 상당히 우수하였다. 혈액을 채취한 날짜의 경과에 따라서 새로운 생리활성 물질이 만들어짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 현상은 적혈구내의 세포들이 산소를 계속적으로 소비함으로써 산소 부족현상 때문에 발생하는 것으로 알려져 있고 구조적 변화를 나타내는 생리활성 펩타이드를 정성적으로 확인함으로써 좀더 의학적인 분야로의 연구를 수행할 수 있게 될 것이다.

감 사

본 연구는 인하대학교 교수도부리연구실에서 수행하였으며

인하대학교와 초정밀분리기술센터의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. A. A. Karelin, M. M. Filippova, O. N. Yatskin, E. Yu. Blishchenko, I. V. Nazimov, and V. T. Ivanov (1998), Proteolytic Degradation of Hemoglobin in Erythrocytes Yields Biologically Active Peptides, *Peptide Science*, **4**, 271-281.
2. Zhuo, X. Wu, H. Liu, W. Huang, Z (1997), Determination of basic drugs in blood by RP-HPLC, *Fa Yi Xue Za Zhi*, **13**, 203-204, 253-254.
3. Pagel, P. Blome, J. Wolf, H U (2000), High-performance liquid chromatographic separation and measurement of various biogenic compounds possibly involved in the pathomechanism of Parkinson's disease, *J. Chrom. B*, **746**, 297-304.
4. V. Casal, P. J. Martin-Alvarez, T. Harraiz (1996), Comparative prediction of the retention behaviour of small peptides in several Reversed-phase high-performance liquid chromatography columns by using partial least squares and multiple linear regression, *Anal. Chimica Acta*, **326**, 77-84.
5. Zukowski J., Pawlowska M., Nagatkina M. Armstrong D. W. (1993), High- performance Liquid Chromatographic Enantioseparation of Glycyl dipeptides and tripeptides on Native Cyclodextrin Phases, Mechanistic Considerations, *J. Chrom.* **629**, 169-179.
6. T. Harraiz (1997), Sample preparation and Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of food-derived peptides, *Anal. Chimica Acta*, **352**, 119-139.
7. Florance J., Galdes A., Konteatis Z., Kosarych Z., Langer K., Martucci C. (1987), High Performance Liquid Chromatographic Separation of Peptide and Amino Acid Stereoisomers, *J. Chrom.* **414**, 313-323.
8. Snider L. R., Kirkland J. J. (1979), Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed., Wiley Interscience. N. Y.
9. Issaq H. J., (1986), Separation of Selected Dipeptides by High Performance Liquid Chromatography, *J. Liq. Chrom.* **9**(1), 229-237.
10. Apffel A. (1995), Peptide mapping, *J. Chrom.* **712**, 177-190.
11. Ebert R. F. (1998), Peptidemapping of fibrogen subunits, *J. Chrom.* **443**, 309-316.
12. Seiler P. (1999), Peptide bank regulatory peptides, *J. Chrom. A*. **852**, 273-283.
13. Ivanov V. T., Karelin A. A., Philippova M. M., Nazimov I. V., Pletnev V. Z. (1997), Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of a tissue-specific peptide pool, *Peptide Sci.* **43**. 171-188.
14. Blishchenko E. Yu., Mermenko O. A., Yatskin O. N., Ziganshin R. H., Philippova M. M., Ivanov V. T., Karelin A. A. (1997), Neokytorphin and neokytorphin (1-4): secretion by erythrocytes and regulation of tumor cell growth, *FEBS Lett.* **414**, P.125-128.
15. Mant C. T. and R. S. Hodges. (1991), High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation, *CRC*, **938**.
16. Cantor C. R., Schimmel P. R. (1980), Biophysical chemistry, part 1, ch. 2, 5, part 3, ch. 17, 20, 21. W. H. Freeman & Co. San Francisco.
17. Chang C. A., Ji H., Lin G. (1990), Effects of Mobile Phase Composition on the Reversed-Phase Separation of Dipeptides and Tripeptides with Cyclodextrin Bonded-Phase Columns, *J. Chrom.* **522**, 143-152.