

생체 시료 중 카테콜 아민류, 세로토닌 및 대사물질들의 HPLC/ECD 동시 정량분석

민지현 · 한영희[#]

상명대학교 화학과

(Received May 20, 2011; Accepted June 20, 2011)

Simultaneous Determination of Catecholamines, Serotonin and Their Metabolites in the Biological Sample Using HPLC/ECD

Jihyun Min and Younghee Hahn[#]

Department of Chemistry, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Abstract — Simultaneous monitoring of catecholamines and serotonin with their appropriate extraction from the biological samples is required in order to understand thoroughly the regulation of the central and peripheral nervous system. In the present research the segmented gradient elution with the solid phase extraction using a C18 cartridge rather than the previous isocratic elution with alumina extraction is successfully employed to determine norepinephrine (NE), epinephrine (E), dopamine (DA), serotonin (5HT), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) simultaneously within 20 minutes using 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid as the internal standard (IS). Linearities were obtained in the concentration range between 5×10^{-6} M and 1×10^{-4} M for all 7 compounds with detection limits of 0.6–1.9 μ M. The present HPLC/ECD method yielded reasonable accuracy (relative error; -1.4–1.1%) and precision (relative standard deviation; 0.4–1.9%) for 9 measurements of the standard solution consisting of NE, E, DA, 5HT, DOPAC and 5HIAA compounds. Recoveries of catecholamines, serotonin and their metabolites from human serum were in the range of 57%–86%. While the concentrations of NE and 5HT in the serum of normal Sprague-Dawley rat were found as 1.4×10^{-6} M and 2.6×10^{-6} M, respectively, the contents of NE and 5HT in the serum of the stressed rat were increased 5.6 times and 1.4 times more, respectively.

Keywords □ catecholamines, serotonin, HPLC-ECD, segmented gradient elution, solid phase extraction

Epinephrine(E), norepinephrine(NE), dopamine(DA)과 serotonin(5-hydroxytryptamine, 5HT)은 중추 및 말초 신경계의 신경전달물질로서 중요한 역할을 한다. 신경내분비 장애를 평가하기 위해서는 혈장 중의 E, NE, DA와 같은 카테콜 아민류와 DA의 대사물질인 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)의 정량이 요구되며¹⁾ 뇌 안의 NE, DA와 5HT는 스트레스의 신경 병리학과의 연관 되었다²⁾는 보고가 있다. 생체 기질에 함유된 이러한 신경전달물질들은 주로 전기화학검출기(ECD)를 장착한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC),³⁻⁶⁾ 또는 형광검출기를 장착한 HPLC⁷⁾로 분석되고 있으며 모두 등용매 극성 이동상을 사용한

역상 크로마토그래피를 활용하고 있다. 국내외에서 널리 사용되고 있는 교과서에서도 HPLC/ECD를 사용할 때에는 기울기 용리가 유용하지 않은 것으로 기술하고 있다.⁸⁾ Serotonin(5HT)과 그 대사물질인 5-hydroxyindoleacetic acid(5HIAA)의 화학구조는 카테콜 고리(3,4-dihydroxyphenyl moiety)를 포함하고 있는 카테콜 아민류의 구조와 다르기(Fig. 1) 때문에 등용매 용리를 사용하여 이러한 신경전달물질들을 동시에 분석하려면 30분정도의 긴 분석시간⁷⁾ 또는 분리가 잘 안 되는 결과⁵⁾를 초래하였다. 구조적으로 유사한 카테콜 아민류와 그 대사물질 만이 합리적인 분석시간 내에 등용매 용리로 분리 될 수 있었으며^{3,4,6)} 문헌상 기울기 용리를 채택한 HPLC/ECD법은 보고된 바 없다. 혈장 카테콜 아민류는 알루미늄으로 추출 시 60~70% 추출되나⁹⁾ 5HIAA와 5HT의 인돌화합물은 전혀 추출되지 않는다. 이와 같이 예전의 연구에서는 시료의 전처리나 용리방법의 문제로 인하여 생체 시

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5144 (팩스) 02-2287-0070
(E-mail) yhahn@smu.ac.kr

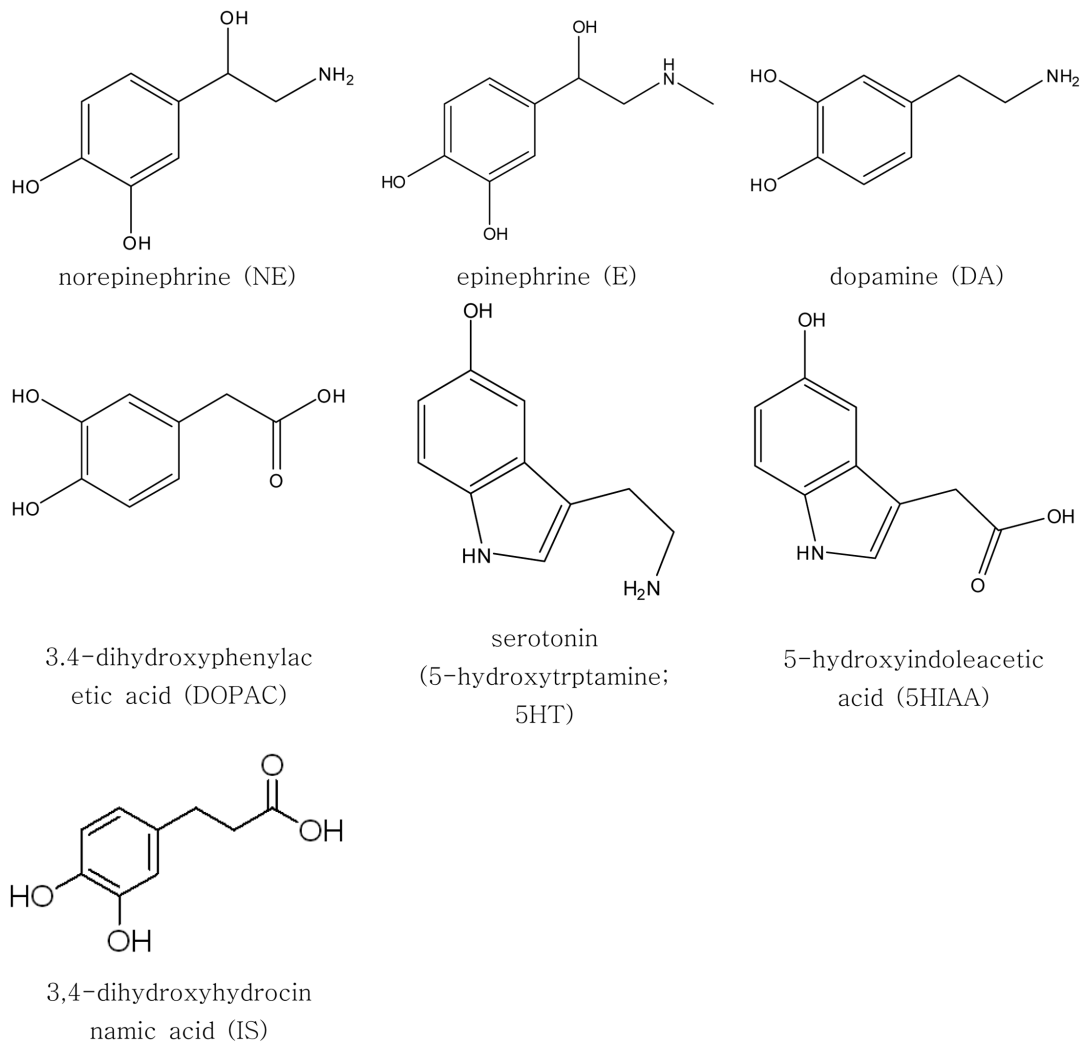


Fig. 1 – Chemical structures of neurotransmitters, metabolites and an internal standard.

료 중 카테콜 아민류와 대사물질 또는 세로토닌과 대사물질을 구분하여 연구가 진행되었다고 사료된다. 화학 구조적으로 서로 다른 카테콜 아민류와 세로토닌 신경전달물질들을 생체 시료에서 동시에 추출하고 분석할 수 있는 방법의 개발은 중추신경계 또는 말초신경계 신경전달물질들의 통합적인 연구를 가능케 한다. 본 연구에서는 혈청 시료에서 카테콜류와 인돌유도체를 모두 추출할 수 있는 추출방법을 연구하고 내부 표준물(IS)로 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid를 사용하여 분절 기술기 용리를 활용한 HPLC/ECD법으로 카테콜류(NE, E, DA, DOPAC)와 인돌유도체(5HT, 5HIAA)를 합리적인 분석시간에 동시에 정량하는 분석방법을 개발하고 이 분석방법의 정확도, 정밀도, 직선 농도 범위, 검출한계 및 혈청에서의 회수율을 조사하며 스트레스를 준 Sprague-Dawley 흰쥐의 혈청 시료 중 NE와 5HT의 농도 변화를 대조군과 비교 연구 하여서 생체 시료 중 카테콜 아민류와 세로토닌 및 대사물질들을 동시에 분석하는 방법을 제시하고자 한다.

실험방법

시약 및 용액

시약은 모두 1급 이상 분석용 시약을 사용하였으며 용액은 초순수 제조장치(ELGA Purelab Classic, UK)를 통과시켜 물의 전기저항이 18.0 MΩ 이상인 순수를 사용하여 제조하였다. Citrate 완충용액(pH 4.0, 0.0500 M)은 Sigma-Aldrich(U.S.A.)에서 구입한 citric acid(FM 192.12) 9.606 g, NaCl(FM 58.44) 5.844 g, 1-octanesulfonic acid sodium salt 20.0 mg, Na₂EDTA · 2H₂O 20.0 mg, sodium metabisulfite 20.0 mg 및 0.014 ml의 triethylamine(Junsei, Japan)을 800 ml의 초순수에 녹이고 1.0 M NaOH(Sigma-Aldrich)용액을 사용하여 pH를 4.0으로 조절한 뒤 초순수로 1000 ml까지 희석하였다. 멤브레인 필터(Millipore; 0.45 μm HA)를 통하여 citrate 완충용액을 여과한 후 20분간 음과파쇄를 하였다. HPLC 등급(100%) methanol은 J. T. Baker에

서 구입 하였고 norepinephrine L-bitartrate hydrate(C₁₂H₁₇NO₉ · xH₂O, FM 319.27, 99%; NE), (-)-epinephrine (+)-bitartrate salt(C₉H₁₃NO₃ · C₄H₆O₆, FM 333.30, 98%; E), 3-hydroxytyramine hydrochloride(C₈H₁₁NO₂ · HCl, FM 189.64, ≥98%, dopamine hydrochloride; DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(C₈H₈O₄, FM 168.15, 98%; DOPAC), 5-hydroxyindole-3-acetic acid(C₁₀H₉NO₃, FM 191.18, ≥98%; 5HIAA), serotonin hydrochloride(C₁₀H₁₂N₂O · HCl, FM 212.68, ≥98%, 5-hydroxytryptamine hydrochloride; 5HT)와 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid(C₉H₁₀O₄, FM 182.17, 98%; IS)는 모두 Sigma-Aldrich (U.S.A.)의 제품이었다. 이들 7가지 화합물의 모액은 citrate 완충 용액을 사용하여 5×10⁻³M로 제조하여 냉동실에 보관하였다. 정확한 농도는 다음과 같았다; 4.95×10⁻³M의 NE, 4.90×10⁻³M의 E, 4.89×10⁻³M의 DA, 4.91×10⁻³M의 DOPAC, 4.90×10⁻³M의 5HIAA, 4.90×10⁻³M의 5HT 및 4.91×10⁻³M의 IS. 사람의 혈청 (from human male AB plasma)은 Sigma-Aldrich에서, 회수율 검사에 사용한 카트리지는 Sep-Pak[®] Plus C18으로서 Waters (U.S.A.)에서 구입하였다.

기기 및 분석조건

HPLC 장치(Waters Corporation, Milford, MA, USA)의 구성은 다음과 같았다: 1525 Binary HPLC Pump, 2707 Autosampler, 2465 전기화학 검출기(유리질 탄소 작업 전극, in situ Ag/AgCl (ISAAC; [Cl⁻]=0.100 M) 기준 전극, stainless steel 보조 전극), Temperature Control Module II 및 Empower2 software. 칼럼은 30°C로 항온 유지된 Waters Xbridge[™] C₁₈(5 μm 4.6×150 mm), 보호 칼럼은 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(5 μm 4.6×12.6 mm)이며 이동상은 methanol과 pH 4.0 citrate 완충용액의 혼합액으로서 Table I에 나타낸 바와 같이 4.0~4.5분 및 10.0~10.5분 사이에 이동상의 조성 변화를 갖는 분절 기술기 용리를 실행하였다. 흐름 속도(V_f)와 주입 부피는 각각 1.0 ml/min와 20 μl이었다. ISSC 기준 전극에 대하여 유리질 탄소 작업 전극에 0.75 V를 가하였다. 분석저울은 Mettler Toledo의 XS 105를 사용하였다.

실험과정

크로마토그램을 실행하기 전에 HPLC 시스템은 100%

Table I – The segmented gradient elution profile

Time (min)	Citrate buffer (%)	MeOH (%)	Elution
0.00~4.00	100.0	0.0	Isocratic
4.00~4.50	100.0→90.0	0.0→10.0	Gradient
4.50~10.00	90.0	10.0	Isocratic
10.00~10.50	90.0→93.0	10.0→7.0	Gradient
10.50~20.00	93.0	7.0	Isocratic

V_f; 1.00 ml/min.

methanol로 2분, 10% methanol로 25분 그리고 초 순수로 30분 간 세척하였고 실험이 끝난 후에도 초 순수로 30분, 20% methanol로 95분, 100% methanol로 10분 연속적으로 세척하였다. NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT와 IS로 구성된 5×10⁻³ M 모액을 citrate 완충용액으로 희석하여 5×10⁻⁶M~1×10⁻⁴M 농도 범위의 표준용액을 제조하였다. 위에 기술한 HPLC조건으로 각각의 표준용액을 5회(5×10⁻⁶M는 10회) 반복 실험하였다. 본 연구에서 제시한 HPLC/ECD 방법의 정확도를 조사하기 위해 5.96×10⁻⁵M의 NE, 8.82×10⁻⁵M의 E, 4.42×10⁻⁵M의 DA, 7.35×10⁻⁵M의 DOPAC, 2.94×10⁻⁵M의 5HIAA와 1.48×10⁻⁵M의 5HT로 구성된 표준용액을 pH 4.0, 0.0500 M citrate 완충용액으로 제조하고 7.35×10⁻⁵M의 IS를 사용하여 9회 반복 분석하였다.

혈청 중 NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 및 5HT의 회수율 검사

사람의 혈청으로부터 카테콜 아민류, 세로토닌 및 대사물질들을 추출하기 위하여 처음에는 문헌에 제시되었던 alumina 추출법을 시도하였으나⁹⁾ 5HIAA와 5HT의 인돌화합물은 전혀 회수되지 않아서 C18 고상추출법¹⁰⁾을 사용하였다. C18 cartridge는 3 ml의 methanol과 6 ml의 초 순수로 세척한 후에 NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 및 5HT 각각의 화합물을 50 nmoles 첨가 한 혈청 1.00 ml를 주입하고 methanol : citrate 완충용액의 비율이 9 : 1인 추출용매로 1.00 ml씩 2회 연속 추출하고 0.45 μm 멤브레인으로 걸러내어 분석시료를 준비하였다. 사람의 혈청시료 자체에 포함된 신경전달물질들을 분석하기위해 혈청 1.00 ml를 세척한 C18 cartridge에 주입한 후 동일한 방법으로 추출하였다. 또한 citrate 완충용액을 사용하여 NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 및 5HT 각각의 농도가 2.50×10⁻⁵M인 표준용액을 제조하였으며 혈청 시료에서 고상 추출한 분석시료 용액과 표준용액에 IS를 각각 2.50×10⁻⁵M로 첨가하고 그 중 20 μl를 HPLC/ECD로 분석하였다.

생체시료 분석

Sprague-Dawley(SD) strain의 성숙한 암컷 흰쥐(250~300 g; 생후 11개월)를 상명대학교 실험동물 사육장에서 18~22°C로 일정하게 유지되는 온도와 일정한 광주기(12시간 조명, 12시간 소등), 그리고 먹이와 물의 접근을 자유롭게(*ad libitum*) 사육하고 실험에 사용하였다. 스트레스를 주기위한 실험 모델은 흰쥐를 30분 간 움직이지 못하게 몸통을 플라스틱 원통에 넣어 속박시키고, 대조군은 자유롭게 사육된 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐를 참수시켜 채취한 혈액은 14,000 rpm에서 30분 간 원심 분리하고 상층 액인 혈청시료를 사용하였다. 혈청시료 5.00 ml를 세척한 C18 cartridge에 주입한 후 methanol : buffer의 비율이 9 : 1인 추출용

매로 1.00 mL씩 2회 연속 추출하고 0.45 μm 멤브레인으로 걸러 내었으며 여과 액 500 μl 에 9.804×10^{-5} M IS를 25 μl 주입하여 IS의 농도가 4.67×10^{-6} M로 첨가된 혈청 추출용액 20 μl 를 HPLC 분석시료로 사용하였다. 혈청 추출용액 중 신경전달물질의 정량 분석은 4.67×10^{-6} M IS의 피크 면적에 대한 신경전달물질들의 피크 면적의 비와 검출기의 감응인자로부터 계산하였다.

실험결과 및 고찰

NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT 및 IS의 분리 분석

카테콜 아민류, 세로토닌과 대사물질들을 분리 분석하기 위하여 처음에는 benzyl amine(BA)을 내부 표준품으로 사용하고 분절 기울기 용리(pH 4.0 citrate 완충용액을 실험 시작 후 7분간 칼럼을 통하여 흐르게 하고 그 후 8분 까지 methanol을 10%로 증가하여 완충용액 : methanol의 부피 비를 9 : 1한 이동상을 분석 종료 시점까지 유지)를 시도하였다. 칼럼의 온도와 흐름 속도 (V_f)는 각각 20°C와 1.0 mL/min이었으며 NE, E, BA, DA, DOPAC, 5HT와 5HIAA의 피크는 각각 2.7분, 4.5분, 5.3분, 9.9분, 12.8분, 14.0분과 17.5분에 나타났다. E와 BA는 잘 분리되지 않았고 DA피크는 methanol피크와 겹쳐 DA양과 관련하여 양(+)의 오차를 초래하였기 때문에 새로운 내부 표준품으로 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid(IS)를 선택하였고 Table I에 기술된 바와 같이 두 분절에서 이동상 조성 변화를 갖는 기울기 용리로 새로운 IS를 포함하여 7가지 화합물이 잘 분리되었다. 칼럼의 온도는 30°C이었고 V_f 는 1.0 mL/min이었다. Fig. 2에 보여진 바와 같이 1×10^{-4} M의 카테콜 아민류, 세로토닌과 대사물질들은 C_{18} (5 μm 4.6 \times 150 mm) 칼럼 상에서 Table I에 제시된 분절 기울기 용리로 합리적인 분석시간 내에 잘 분리되었다. 머무름 시간(retention time)은 다음과 같았다; 3.7분에 NE, 6.8분에 E, 9.4분에 DA, 10.2분에 DOPAC, 14.0분에 5HIAA, 16.3분에 5HT 그리고 17.8분에 IS가 각각 나타났다. 7.4분에 나타난 작은 피크는 용매인 methanol이었으며 E와 DA와도 잘 분

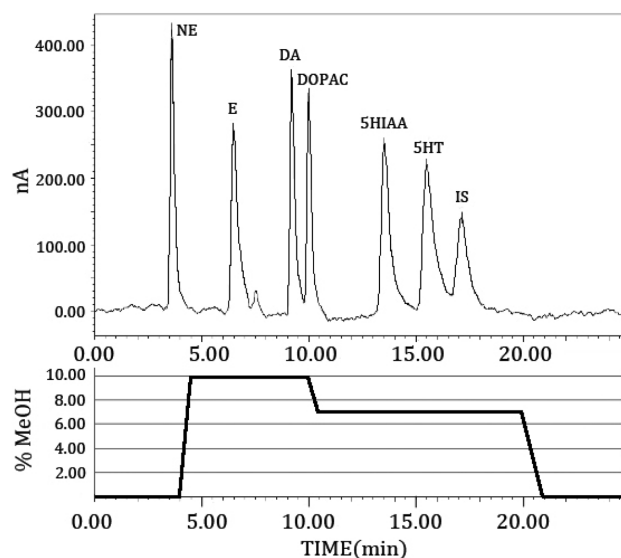


Fig. 2 – Chromatogram of NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT and IS.

리되었다.

직선 범위, 정밀도와 검출한계

5×10^{-6} M와 1×10^{-4} M 농도 범위의 NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT와 IS로 구성된 표준용액을 분절 기울기 용리를 사용한 본 연구의 분석조건 하에서 정량 분석한 결과가 Table II에 수록되어 있으며 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M와 1×10^{-4} M 농도에서는 5회 반복 실험한 피크 면적의 평균값 \pm 표준편차 (mean \pm SD)와 상대 표준편차(RSD%)이며, 5×10^{-6} M 농도에서는 10회 반복 실험한 피크 면적의 mean \pm SD와 RSD%이다. NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT 그리고 IS 각 화합물에 대한 검량곡선은 Fig. 3과 같다. 농도에 대하여 평균 피크 면적을 도시하였을 때 5×10^{-6} M와 1×10^{-4} M 농도 범위에서 7가지 화합물 모두 0.998 이상의 상관계수를 갖는 직선 성을 나타내었다. 7가지 화합물에 대한 하루 중 정밀도(intra-day precision)는 5×10^{-6} M(4.2~13.3%)를 제

Table II – Peak area of NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT and IS at different concentrations

Peak area	5×10^{-6} M*		1×10^{-5} M		5×10^{-5} M		1×10^{-4} M	
	mean \pm SD	RSD%	mean \pm SD	RSD%	mean \pm SD	RSD%	mean \pm SD	RSD%
NE	28451 \pm 3778	13.28	57123 \pm 1385	2.424	292383 \pm 1508	0.516	579546 \pm 17017	2.936
E	26634 \pm 1802	6.767	52623 \pm 206	0.392	270805 \pm 6521	2.408	524255 \pm 24328	4.640
DA	26190 \pm 2209	8.436	51940 \pm 780	1.501	362738 \pm 15351	5.843	522678 \pm 19404	3.712
DOPAC	21947 \pm 1473	6.710	41066 \pm 1337	3.255	213819 \pm 6675	3.122	427453 \pm 18479	4.323
5HIAA	31728 \pm 1343	4.232	64022 \pm 856	1.337	313925 \pm 12642	4.027	684801 \pm 21518	3.142
5HT	32622 \pm 3840	11.77	71547 \pm 4122	5.761	382650 \pm 22777	5.952	722270 \pm 27888	3.861
IS	17126 \pm 1105	6.450	32595 \pm 315	0.967	163311 \pm 7152	4.380	343910 \pm 8580	2.495

*n=10 for 5×10^{-6} M, n=5 for other concentrations.

Unit of peak area; $\mu\text{V} \cdot \text{s}$, (1 V=0.01 nA).

The exact conc. of 1×10^{-4} M: 9.90×10^{-5} M for NE; 9.82×10^{-5} M for DOPAC and IS; 9.80×10^{-5} M for E, 5HIAA and 5HT; 9.78×10^{-5} M for DA.

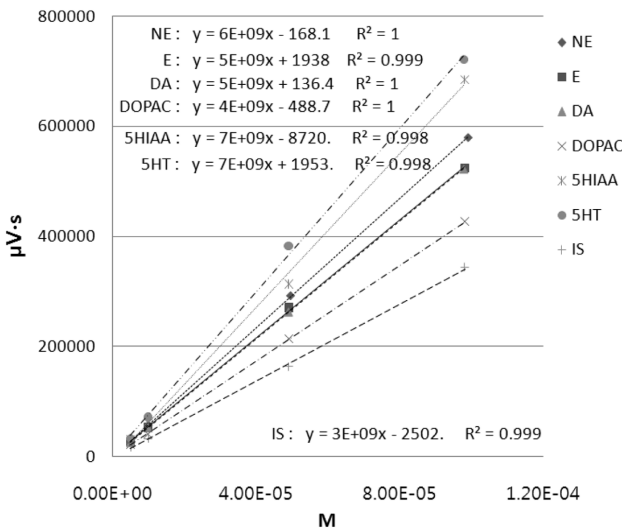


Fig. 3 – Calibration curves of NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT and IS.

Table III – Inter-day precision of NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA, 5HT and IS at different concentrations

Comp.	% RSD			
	5×10 ⁻⁶ M	1×10 ⁻⁵ M	5×10 ⁻⁵ M	1×10 ⁻⁴ M
NE	7.48	2.38	1.62	5.92
E	7.10	0.40	1.45	7.16
DA	7.95	1.92	1.70	4.48
DOPAC	9.95	0.89	2.15	6.11
5HIAA	7.70	2.24	1.33	5.62
5HT	5.34	2.59	5.43	2.82
IS	8.88	0.79	1.23	5.55

위하고는 모두 0.4%와 6.0% 범위 내에 있었다(Table II). 7가지 화합물에 대한 날간 정밀도(inter-day precision)는 표준용액을 제조한 당일, 둘째 날, 다섯째 날에 실험한 각 화합물의 평균 피크 면적으로부터 계산하였으며, 5×10⁻⁶M(5.3~10.0%)를 제외하고는 모두 0.4%와 7.2% 사이의 RSD(%)를 나타내었다(Table III). 열 번 반복 실험한 5×10⁻⁶M 각 화합물의 표준편차의 3배를 각 화합물의 검량곡선 기울기로 나눈 값(3 s/m)을 검출한계로 계산하였더니¹¹⁾ NE는 1.9×10⁻⁶M, E는 1.1×10⁻⁶M, DA는 1.3×10⁻⁶M, DOPAC은 1.1×10⁻⁶M, 5HIAA는 0.6×10⁻⁶M, 5HT는 1.6×10⁻⁶M 그리고 IS는 1.1×10⁻⁶M이었다.

감응인자(response factor) 및 정확도

NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 또는 5HT에 대한 전기화학 검출기(ECD)의 감응 인자(F)는 같은 농도의 내부 표준품인 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid(IS)의 피크 면적에 대한 각 화합물의 피크 면적의 비이다. 본 연구에서는 각 화합물의 F는 IS의 피크 면적에 대한 각 화합물(X)의 피크 면적의 비를 각각의 농도에서 5회(또는 10회) 측정하여 평균하고 이 값에 농도 인자([IS]/

Table IV – Response factors of the electrochemical detector for NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA and 5HT over IS

Compound	F, mean±SD	RSD(%)
NE	1.731±0.026	1.5
E	1.613±0.013	0.8
DA	1.560±0.002	0.1
DOPAC	1.257±0.009	0.7
5HIAA	1.925±0.014	0.7
5HT	2.147±0.047	2.2

F; response factor.

Table V – Accuracy of the present HPLC-ECD method

Comp.	True conc. (M)	Experimental conc. (M)		Er (%)
		mean±SD (n=9)	RSD (%)	
NE	5.96×10 ⁻⁵	6.00×10 ⁻⁵ ±0.11×10 ⁻⁵	1.9	0.7
E	8.82×10 ⁻⁵	8.86×10 ⁻⁵ ±0.04×10 ⁻⁵	0.4	0.5
DA	4.42×10 ⁻⁵	4.46×10 ⁻⁵ ±0.08×10 ⁻⁵	1.8	0.9
DOPAC	7.35×10 ⁻⁵	7.43×10 ⁻⁵ ±0.12×10 ⁻⁵	1.6	1.1
5HIAA	2.94×10 ⁻⁵	2.94×10 ⁻⁵ ±0.04×10 ⁻⁵	1.2	0.0
5HT	1.48×10 ⁻⁵	1.46×10 ⁻⁵ ±0.01×10 ⁻⁵	0.6	-1.4

RSD; relative standard deviation, Er; relative error.

[X])를 곱하여 계산한 후 서로 다른 농도에서의 각 X의 F값을 평균하여 계산하였다(Table IV). 각 화합물의 F값은 다음과 같았다. NE는 1.731, E는 1.613, DA는 1.560, DOPAC은 1.257, 5HIAA는 1.925 그리고 5HT는 2.147로 계산되었다. 본 HPLC/ECD 방법의 정확도를 조사하기 위해 5.96×10⁻⁵M NE, 8.82×10⁻⁵M E, 4.42×10⁻⁵M DA, 7.35×10⁻⁵M DOPAC, 2.94×10⁻⁵M 5HIAA 및 1.48×10⁻⁵M 5HT로 구성된 표준용액을 pH 4.0, 0.0500 M citrate 완충용액으로 제조하고 7.35×10⁻⁵M IS를 사용한 분절 기울기 용리법으로 9회 반복 분석하였다. IS에 대한 각 X의 피크 면적 비(A_X/A_{IS}) 값에 IS의 농도, 7.35×10⁻⁵M를 곱하고 각 X의 F값으로 나누어 실험적으로 각 X의 농도를 계산하였다. 각 화합물에 대하여 9회 계산한 실험적으로 구한 농도를 평균하여 참 농도(제조한 농도)와 비교하여 Table V에 실였으며 각 화합물에 대한 상대 오차(Er)는 다음과 같았다; NE는 0.7%, E는 0.5%, DA는 0.9%, DOPAC은 1.1%, 5HIAA는 0.0% 그리고 5HT는 -1.4%로서 ±1% 내외의 좋은 정확도를 나타내었다. NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 및 5HT에 대하여 9회 측정된 실험적인 농도 값에 대한 상대 표준편차(RSD)는 0.4~1.9%이었다. 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid를 내부 표준품으로 사용하여 분절 기울기 용리법을 적용한 본 HPLC/ECD 방법의 정확도와 정밀도는 합리적이었다.

회수율 검사

NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 및 5HT 각각의 화합물을 50 nmoles 첨가 한 혈청 1.00 ml를 C18 cartridge로 고상 추출한 분석시료 용액은 2회 이상 HPLC/ECD로 분석한 후 각 화합물의

Table VI – Solid phase extraction of NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA and 5HT from human serum

Compound	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)						
	NE	E	DA	DOPAC	5HIAA	5HT	IS
std. added	167024	91748	125195	112588	153458	217534	121342
blank	82282	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Rxi	0.698	0.756	1.032	0.928	1.265	1.793	
Rsi	1.217	1.258	1.298	1.099	1.575	2.081	
%recovery	57.4	60.1	79.5	84.4	80.3	86.2	

nd; not detectable.

평균 피크 면적을 blank(혈청시료 자체)에 대하여 보정하고 IS의 피크 면적에 대한 각 화합물의 알짜 피크 면적의 비(Rxi)를 계산하였다. 표준용액에 대해서도 IS의 피크 면적에 대한 각 화합물의 피크 면적의 비(Rsi)를 계산한 다음 $(Rxi/Rsi) \times 100$ 으로 회수율을 계산하였다. Methanol의 농도가 낮은 추출용매인 MeOH : citrate 완충용액(1.0 : 9.0) 1 ml의 경우 5HIAA 및 5HT는 전혀 혈청에서 회수되지 않았으며 methanol의 농도가 커질수록 인돌류 화합물인 5HIAA 및 5HT의 회수율이 증가하는 경향을 보였다. C18 cartridge를 3 ml의 methanol과 6 ml의 초 순수로 세척한 후에 NE, E, DA, DOPAC, 5HIAA 및 5HT 각각의 화합물을 50 nmoles 첨가 한 혈청 1.00 ml를 주입하고 MeOH : citrate 완충용액(9.0 : 1.0)인 추출용매로 1.00 ml씩 2회 연속 추출하고 0.45 μm 멤브레인으로 걸러낸 분석시료에 대한 회수율을 Table VI에 수록하였다. 사람의 혈청 시료 자체에서는 NE만 검출되었고 다른 신경전달물질들은 검출되지 않았다. 혈청 시료 중 각 화합물의 회수율(%)은 NE; 57%, E; 60%, DA; 80%, DOPAC; 84%, 5HIAA; 80% 그리고 5HT; 86%이었다.

생체시료 중 NE와 5HT의 정량분석

스트레스를 준 SD흰쥐와 대조군 SD흰쥐의 혈청시료에서 C18

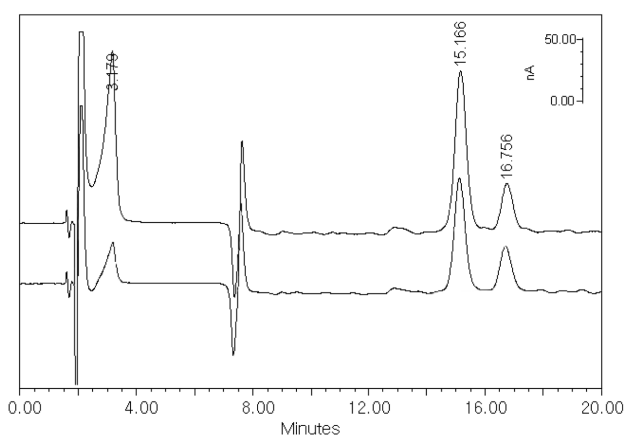


Fig. 4 – Chromatograms of IS added analytical samples obtained from control and stressed rats.
Upper: stressed lower: control.

cartridge로 고상추출 한 분석시료에 4.67×10^{-6} M 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid를 IS로 첨가한 용액 20 μl 를 본 연구의 HPLC/ECD법으로 분석하였을 때 Fig. 4와 같은 크로마토그램을 얻었으며 머무름 시간 3.2분, 15.2분과 16.8분에 피크가 나타났다. 분석시료에 NE 표준용액을 첨가 하였을 때 머무름 시간 3.2분의 피크면적이 증가하였고 분석시료에 5HT의 표준용액을 첨가하였을 때 15.2분의 피크면적이 증가함으로써 3.2분과 15.2분의 피크는 각각 NE와 5HT로 확인되었다. 머무름 시간 16.8분에 나타난 피크는 4.67×10^{-6} M IS 피크이다. 대조군과 스트레스를 준 흰쥐의 분석시료를 각각 3회 반복하여 크로마토그램을 그렸을 때 측정된 각 화합물의 피크면적에 대한 정밀도는 1.0~3.2%로 합리적 이었다. 참수한 흰쥐의 혈청시료를 C18 cartridge로 고상 추출한 HPLC 분석시료 중 각각의 화합물(X), 즉 NE와 5HT의 농도는 IS에 대한 각 X의 피크 면적 비(A_X/A_{IS}) 값에 IS의 농도, 4.67×10^{-6} M를 곱하고 각 X의 F값(NE; 1.217, 5HT; 2.081)으로 나누어 실험적으로 각 X의 농도를 계산하였다. 그 결과 Table VII에 나타난 바와 같이 HPLC 분석시료 중 대조군에서 NE와 5HT의 농도는 각각 1.99×10^{-6} M와 5.61×10^{-6} M이었으며 스트레스를 받은 흰쥐에서의 NE와 5HT의 농도는 각각 1.11×10^{-5} M와 7.92×10^{-6} M이었다. 고상 추출에 의한 혈청 중 NE와 5HT의 회수율이 각각 57%와 86% 이었고 흰쥐의 혈청시료는 5.00 ml, 총 추출용매의 부피는 2 ml이었으므로 대조군의 혈청 시료 중 NE와 5HT의 농도는 각각 1.4×10^{-6} M와 2.6×10^{-6} M로 추정된다. 스트레스를 받은 쥐는 안 받은 쥐에 비하여 혈청 중 NE와 5HT의 농도가 각각 5.6배와 1.4배로 더 높게 나타났다.

Table VII – Concentrations of NE and 5HT in the analytical samples for HPLC and serum obtained from control and stressed rats

		Conc. of neurotransmitters (M)	
		NE	5HT
HPLC anal. sample	Control	1.99×10^{-6}	5.61×10^{-6}
	Stressed	1.11×10^{-5}	7.92×10^{-6}
Serum	Control	1.4×10^{-6}	2.6×10^{-6}
	Stressed	7.8×10^{-6}	3.7×10^{-6}

결 론

중추와 말초 신경계의 조절을 통합적으로 이해하기 위하여 생체 시료에서 카테콜 아민류와 세로토닌을 동시에 적절한 방법으로 추출하여 측정하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 예전에 사용되었던 알루미나 추출법으로 생체시료를 추출하고 등용매 용리로 분석하는 대신 C18 cartridge를 사용하여 생체 시료를 전처리하고 30°C에서 C₁₈(5 µm 4.6×150 mm)칼럼을 통하여 분절 기술기 용리방법으로 norepinephrine(NE), epinephrine(E), dopamine(DA), serotonin(5HT), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)와 5-hydroxyindoleacetic acid(5HIAA)를 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid를 내부 표준품(IS)으로 사용하여 20분 이내에 동시 정량분석 하였다. 일곱 가지 화합물 모두 5×10⁻⁶M과 1×10⁻⁴M 농도범위에서 직선 성을 나타내었고 검출한계는 0.6~1.9 µM 이었다. 본 연구의 HPLC/ECD방법으로 1.48×10⁻⁵M ~8.82×10⁻⁵M 범위의 NE, E, DA, 5HT, DOPAC과 5HIAA로 구성된 표준 용액에 대하여 9회 반복 정량하였을 때 각 화합물에 대한 정밀도(상대 표준편차)는 0.4% 내지 1.9% 범위 이었고 정확도(상대 오차)는 -1.4% 내지 1.1%로 합리적 이었다. 혈청 1 ml에 각각 50 nmoles로 첨가한 카테콜 아민류, 세로토닌 및 대사물질들을 C18 cartridge를 사용하여 methanol과 citrate 완충 용액의 부피 비가 9:1인 추출용매를 1 ml씩 2회 반복 추출하여 0.45 µm 멤브레인 필터로 걸렀을 때 각 화합물의 회수율은 57~86%이었다. 참수한 Sprague-Dawley 흰쥐의 혈청 중 NE와 5HT의 농도는 각각 1.4×10⁻⁶M와 2.6×10⁻⁶M로 분석되었으며 30분간 몸통을 플라스틱 원통에 넣어 스트레스를 준 흰쥐에서 NE와 5HT의 농도는 각각 5.6배와 1.4배로 더 높게 나타났다. 혈청 시료를 C18 cartridge를 사용하여 고상 추출하고 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid를 내부 표준품으로 분절 기술기 용리법을 시도한 본 연구의 HPLC/ECD법은 생체 시료 중 카테콜 아민류와 세로토닌 및 대사물질들을 20분 이내에 동시에 정량할 수 있음을 입증하였다.

감사의 말씀

본 연구는 2010년도 상명대학교 교내 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 생체시료 분석을 할 수 있도록 흰쥐의 혈청 시료를 만들어주시는 상명대학교 그린생명과학과 발생·생리학 실험실의 이 성호교수님께 감사드립니다.

참고문헌

1) Kopin, I. J. : Catecholamine metabolism: basic aspects and

- clinical significance. *Pharmacol. Rev.* **37**, 333 (1985).
- 2) Thierry, A.-M., Javoy, F., Glowinski, J. and Kety, S. S. : Effects of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the central nervous system of the rat. I. modifications of norepinephrine turnover. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **163**, 163 (1968).
- 3) Raggi, M. A., Sabbioni, C., Casamenti, G., Gerra, G., Calonghi, N. and Masotti, L. : Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **730**, 201 (1999).
- 4) Sastre, E., Nicolay, A., Bruguerolle, B. and Portugal, H. : Method for simultaneous measurement of norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and 3,4-dihydroxyphenylglycol by liquid chromatography with electrochemical detection: application in rat cerebral cortex and plasma after lithium chloride treatment. *J. Chromatogr. B* **801**, 205 (2004).
- 5) Patel, B. A., Arundell, M., Parker, K. H., Yeoman, M. S. and O'Hare, D. : Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **818**, 269 (2005).
- 6) Machida, M., Sakaguchi, A., Kamada, S., Fujimoto, T., Takechi, S., Kakinoki, S. and Nomura, A. : Simultaneous analysis of human plasma catecholamines by high-performance liquid chromatography with a reversed-phase triacontylsilyl silica column. *J. Chromatogr. B* **830**, 249 (2006).
- 7) Yoshitake, T., Fujino, K., Kehr, J., Ishida, J., Nohta, H. and Yamaguchi, M. : Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. *Anal. Biochem.* **312**, 125 (2003).
- 8) Harris, D. C. : Quantitative Chemical Analysis, 7th Ed., Freeman and Company, New York, U.S.A. p. 571 (2007).
- 9) Dirks, B., Vorwalter, C., Grünert, A. and Ahnefeld, F. W. : Basal plasma-catecholamine-level determination using HPLC-ED and different sample cleanup techniques. *Chromatographia* **25**, 223 (1988).
- 10) Cho, Y. H. and Hahn, Y. : Simultaneous determinations of anthracycline antibiotics by high performance liquid chromatography coupled with radial-flow electrochemical cell. *Analytical Science & Technology* **20**, 308 (2007).
- 11) Harris, D. C. : Quantitative Chemical Analysis, 7th Ed., Freeman and Company, New York, U.S.A. p. 86 (2007).