

Monodansyl Cadaverine 유도체화된 유리지방산류의 H₂O₂-Bis(2,4,6-trichlorophenyl) Oxalate에 의한 고속액체크로마토그래피

이용문* · 문동철

충북대학교 약학대학

(Received July 6, 1993)

H₂O₂-Bis(2,4,6-trichlorophenyl) Oxalate Chemiluminescence Detection of Monodansyl Cadaverine Derivatives of Free Fatty Acids in High Performance Liquid Chromatography

Yong Moon Lee* and Dong Cheul Moon

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

Abstract—The sensitive detection of free fatty acids was investigated by using H₂O₂-bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate chemiluminescence system after monodansyl cadaverine labeling. Because dansyl moiety is well excited by this chemiluminescence system, monodansyl cadaverine was a prominent reagent to this system for the determination of free fatty acids. The eluent of 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.7)-acetonitrile (1:4, v/v) was run through TSK gel ODS 80 TM column. The reagent solutions were mixed with the eluent containing the monodansyl cadaverine derivative of fatty acids from the column. By this system, linolic acid was detected 50 fmol by injected amount.

Keywords □ Free fatty acids, monodansyl cadaverine, chemiluminescence detection, high-performance liquid chromatography.

최근들어 high-performance liquid chromatography(HPLC)에서 사용되는 검출장치에는 분석대상물의 종류가 다양해짐에 따라 그에 대응하는 새로운 방식의 고감도 검출 방법이 요구되고 있다. 그 중에서 화학발광(chemiluminescence)현상을 이용한 검출방법은 형광분석법에서 볼 수 있었던 형광시약과 반응부산물들에 의한 chromatogram의 back ground 상승 및 소광현상 등과 같은 분석상의 문제점들이 적으며, 목적물만을 선택적으로 검출할 수 있는 방법이다. 또 반응시약의 선택에 따라 감도의 향상을 기대할 수 있는 우수한 방법으로 이용되기 시작하고 있다. 화학발광현상은 여러 반응계에서 보고되어 있으나, HPLC와 연결하여 사용할 수 있는 반응은 Chand-

ross에 의하여 보고된 oxalate와 과산화수소의 반응이며,¹⁾ 측정감도를 향상하기 위한 검토는 Rauhut에 의하여 정리되어 비로소 고감도 분석이 가능하게 되었다.²⁾ 본 연구는 형광성 probe인 monodansyl cadaverine (MDC)을 사용하여 지방산류를 완화된 조건에서 신속하게 유도체화하여 H₂O₂와 bis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO)의 화학반응에서 나오는 에너지에 의하여 MDC를 여기시킨 후, 방출되는 형광량을 검출하여 지방산류를 50 fmol까지 검출할 수 있었다.

실험방법

지방산류의 MDC유도체화—포화 및 불포화 지방

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

산류 10종을 Lee 등의 방법에 의하여 유도체화하였다.³⁾ 12 mM MDC 및 coupling agent로 diethyl phosphorocyanidate (DEPC)를 사용하였다. 반응용매 dimethylformamide (DMF) 50 μl에 500 pmol의 지방산류를 녹인 후, 50 μl MDC용액 및 DEPC 2 μl를 가하였다. 2~3초간 혼화한 후 상온에서 15분간 반응시켜 MDC에 의한 유도체화를 완결하였다.

지방산류의 분리 및 검출—HPLC장치는 880-PU intelligent pump와 825-CL intelligent CL detector 및 RC-250 desktop recorder로 구성된 Jasco사 (Tokyo, Japan)의 기기를 사용하였고, 용매류는 HPLC grade를 사용하였다.

결과 및 고찰

H₂O₂와 oxalic ester와의 용액내 반응에 의하여 발생하는 활성중간체가 형광단과 반응하여 형광단을 여기시킨 후 형광단이 기저상태로 되돌아오면서 발생하는 형광의 광량을 측정하는 방법을 화학발광검출법 (chemiluminescence detection)이라 한다. Oxa-

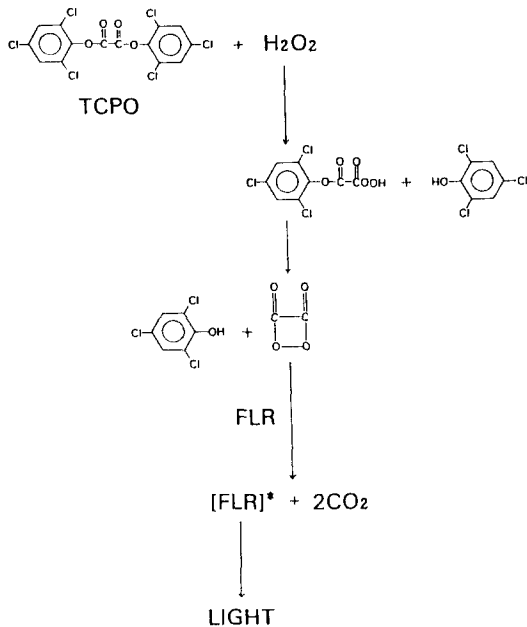


Fig. 1—The chemiluminescent reaction of bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate with hydrogen peroxide. [FLR]*: excited fluorescer

lic ester중 bis-(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate (TCPO)나 수용성인 bis[4-nitro-2-(3,6,9-trioxadecyl-carbonyl)phenyl]oxalate (TDPO)를 사용하여 H₂O₂와 반응시키면, 활성중간체 1,2-dioxetanedione이 생성되며, 이것이 용매내 형광단과 접촉하면 2분자의 CO₂로 분해한다. 이때 생성되는 화학energy (약 71 kcal/mol, 402 nm)로 dansyl fluorophore를 여기시킬 수 있다.⁴⁾

MDC에 의하여 유리 지방산류 11종을 유도체화하였다. 3대의 pump를 사용한 HPLC system에서 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.7) : acetonitrile (1 : 4, v/v)의 용리액을 유속 0.4 ml/min로 하고, 시료를 주입하여 TSK gel ODS 80 TM (4.6 mm i.d.×150 mm)을 통하여 분리되어 나오는 각각의 유리지방산의 MDC 유도체들을 5 mM TCPO의 ethyl acetate용액 및 50 mM H₂O₂의 acetone용액의 유속을 각각 0.25 ml/min 및 0.1 ml/min로 하여 mixer에서 혼화한 후, 용리액의 형광체와 반응하여 나오는 광량을 화학발광 검출기로 측정하였다.

혈액등 체액에 존재하는 포화 및 불포화 유리지방산류 10종은 margaric acid를 내부표준물질로 하여 완전히 baseline 분리가 가능하였다. 이 조건에서 linolic acid의 경우, 형광검출기 (λ_{ex}. 340 nm, λ_{em}. 520 nm)에서의 검출한계는 약 100 fmol이었으나,⁵⁾ 본 방법에 의한 검출한계는 약 50 fmol이었다. 본 방법의 조건이 예비적 조건임을 감안할 때 차후 조건의 상세한 검토에 의하여 더욱 고감도 검출이 가능하리라 생각된다. 앞으로 고감도화를 하기 위하여는 용리액의

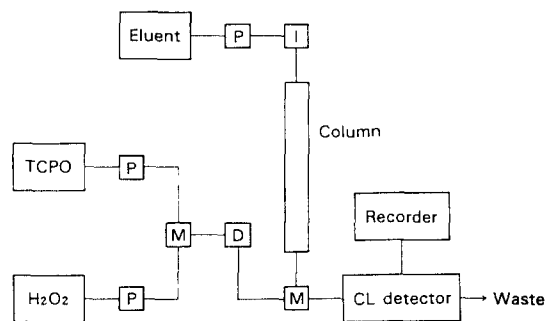


Fig. 2—Flow diagram for chemiluminescence detection system for MDC derivatized free fatty acids: D, damper; I, injector; M, mixer; P, pump.

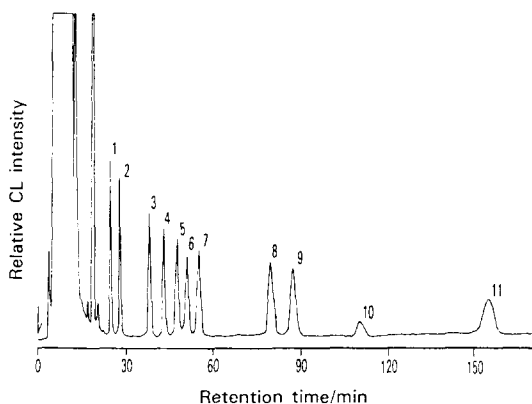


Fig. 3—Chromatogram of a mixture of MDC derivatized free fatty acids. Conditions: injected amount, 5 pmol each (internal standard, 2 pmol); detector atten. \times gain, 16×10 ; HPLC conditions were described in Results and Discussion. Peak identifications: (1) lauric acid ($C_{12:0}$), (2) myristoleic acid ($C_{14:1}$), (3) linoleic acid ($C_{18:2}$), (4) myristic acid ($C_{14:0}$), (5) palmitoleic acid ($C_{16:1}$), (6) arachidonic acid ($C_{20:4}$), (7) linolic acid ($C_{18:2}$), (8) palmitic acid ($C_{16:0}$), (9) oleic acid ($C_{18:1}$), (10) margaric acid ($C_{17:0}$, I.S.), (11) stearic acid ($C_{18:0}$).

유속, 시약농도, 시약용매 등의 조건 설정이 필요하며, 그의 반응용매에서 유래하는 불순물의 제거 및 오염 방지에 세심한 주의가 필요하다. 또 amino acids의 dansyl-유도체가 imidazole buffer에서 고감도 검출된

보고가 있어⁶⁾ 앞으로 본 방법의 개선에 유용하리라 생각된다.

결론적으로 본 방법에 의한 유리지방산류의 고감도 측정법은 생물학적 시료로부터 미량으로 존재하는 지방산류의 선택적인 분석수단으로 유용하리라 생각된다.

참고문헌

- 1) Chandross, E. A.: A new chemiluminescence system. *Tetrahedron Letters*, **12**, 761 (1963).
- 2) Rauhut, M. M., Roberts, B. G. and Semsel, A. M.: A study of chemiluminescence from reactions of oxalyl chloride, hydrogen peroxide and fluorescent compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3604 (1966).
- 3) Lee, Y. M., Nakamura, H. and Nakajima, T.: Rapid determination by high-performance liquid chromatography of free fatty acids released from rat platelets after derivatization with monodansyl cadaverine. *J. Chromatogr.*, **515**, 467 (1990).
- 4) 今井一洋, 沢田 嗣朗, 渡邊 訓行, 渡邊 秀夫: 超高感度 高速液體クロマトグラフィー, 學會出版 센터, 東京 p 73 (1985).
- 5) 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).
- 6) 今井一洋, 生物發光と化學發光, 廣川書店, 東京 p 223 (1989).