

고속액체크로마토그래피에 의한 벤조일 클로라이드를 유도체화제로 한 혈청 중의 폴리아민의 분리 정량

이석봉 · 고용석 · 김형민* · 문영희** · 진원태*** · 신태용#

우석대학교 약학대학, *원광대학교 약학대학, **원광대학교 의과대학, ***국립과학수사연구소

(Received June 7, 1997)

Determination of Polyamines in Serum Using Benzoyl Chloride as Derivatization Agent by HPLC

Seok-Bong Lee, Yong-Seok Ko, Hyung-Min Kim*, Young-Hoe Moon**,
Weon-Taek Jin*** and Tae-Yong Shin#

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

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

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

***National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-097, Korea

Abstract—A rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method with UV detection for the analysis of polyamines(putrescine, spermidine, spermine) has been developed. The benzoyl chloride derivatives of putrescine, spermidine and spermine are separated on a μ -Bondapak C₁₈ reverse-phase column with 50% methanol as the mobile phase. This method was applied to the analysis of polyamines in the serum of normal human and uterine cancer patients. The results show that the mean level of polyamines in cancer patients serum is much higher than that in normal human serum.

Keywords □ Putrescine, spermidine, spermine, benzoyl chloride, HPLC analysis.

Polyamine 중 대표적인 것은 putrescine(PU), spermidine(SD) 및 spermine(SP)이며, PU는 L-ornithine으로부터 유래되어 SD의 전구체가 되며 SP는 SD에서 합성된다. 이러한 polyamine은 세포의 성장과정에 관여한다는 것이 밝혀졌고 DNA, RNA 및 단백질의 합성과정에도 관여하는 것으로 보고되어 있다.¹⁾ 이들 polyamine은 동물 뿐만 아니라 식물, 미생물에서도 광범위하게 분포되어 있으며 고등동물에서는 일반적으로 단백질의 합성이 왕성한 조직에서 농도가 높다.

Russel, D. H. 등이 대부분의 암환자의 경우 뇨와 혈청에서 PU, SD 및 SP의 양이 증가되어 있으며²⁻⁴⁾, 체액에서 이들의 정량은 암환자의 조기진단과 치료에

유용함을 제공할 수 있다고 보고한 이래 체액에서 이들을 분석하기 위해 다수의 연구가 진행되었지만⁵⁻⁹⁾ 아직 충분히 예민한 분석법을 제공하지 못하고 있다.

여러 종류의 암환자에게서 증가된 PU, SD 및 SP가 암치료 후에는 현저히 감소된다는 Fair, W. R. 등¹⁰⁻¹³⁾의 보고는 PU, SD 및 SP의 분석이 암의 조기진단에 이용될 수 있음을 시사하고 있으나 현재까지의 연구의 대부분은 polyamine을 정상인의 각 조직에서 분리하여 정량하거나¹⁴⁻¹⁹⁾ 동물의 각 조직에서 분리하여 정량하는 것이었으며²⁰⁻²⁵⁾ 정상인과 암환자의 체액 중에서 polyamine을 비교 분석한 예는 많지 않다. 본 연구에서는 Redmond, J. H.²⁶⁾ 등의 방법을 응용하여 benzoyl chloride(BC)를 유도체화제로 하여 HPLC법으로 정상인과 암환자의 혈청에서 PU, SD 및 SP를 비교 분석하였으며 또 유도체의 생성유무를 LC/MS법에 의

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0652-290-1405 (팩스) 0652-290-1400

Table I— Conditions of HPLC

Column	μ -Bondapak C ₁₈ (3.9 x 300 mm, Waters co.)
Detector	UV detector 245 nm
Mobile Phase	50% methanol
Flow rate	1 ml/min
Chart speed	0.25 cm/min
Injection volumn	10 μ l
Column temperature	ambient
Sensitivity	0.01 AUFS

한 질량스펙트럼으로 확인하였다.

실험방법

시약 및 시료 - Putrescine dihydrochloride, spermidine trihydrochloride 및 spermine tetrahydrochloride는 Sigma사에서 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였고, benzoyl chloride는 Kanto Chemical사의 특급시약을 사용하였으며 기타 시약은 시판시약 특급을 사용하였다. 정상인의 혈청은 건강한 성인으로부터 얻었으며 자궁암 환자의 혈청은 병원에 입원중인 환자로부터 채취하였다. PU, SD 및 SP의 표준용액은 3차 증류수에 녹여 10 μ g/ml용액으로 조제 한후 사용할 때 희석하였다.

기기 - 본 실험에서 사용한 HPLC는 Waters사의 제품으로 600 HPLC pump, 717 Plus autosampler, 486 Tunable absorbance detector, 746 Datamodular가 부착된 것을 사용하였다. 질량 스펙트럼을 얻기 위한 LC/MS는 Hewlett Packard사의 HPLC(HP 1050 series), Finigan MAT사의 MS (TSQ 7000), Shimadzu사의 spectrophotometer (UV-2102PC)를 사용하였다.

혈청시료 - 정상인 및 자궁암 환자의 혈청 2ml를 screw-capped tube에 취하여 진한 염산 2ml를 정확하게 가해 100°C에서 14시간 동안 가수분해시키고 glass filter로 여과한 다음 혈청시료용액으로 사용하였다.

표준용액의 유도체화 - PU, SD 및 SP 표준용액 (0.1 μ g/ml~2.0 μ g/ml) 2ml를 취한 후 6M-NaOH 6ml를 가하여 알칼리성으로 한 후 BC 5 μ l를 가하고 진탕한 후 20분동안 방치하였다. 여기에 NaCl 포화용액 2ml 및 chloroform 2ml를 가하여 3000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 유기용매층을 취해 질소기류 하에서 용매를 증발 건조시킨 다음 증발 잔사를 methanol 1ml에 용해하여 Table I의 HPLC 분석조

Table II— Conditions of LC/MS

Column	μ -Bondapak C ₁₈ (3.9x300 mm, Waters co.)
Mobile phase	65% methanol
Flow rate	0.5 ml/min
Injection volumn	5 μ l
Ion Source	ESI
EN Voltage	1220V
MS range	200~800 m/z
Capillary celsius	250°C

건에 따라 실험하였다.

혈청시료의 유도체화 - 혈청 시료 2ml를 취한 후 6M-NaOH 6ml를 가하여 알칼리성으로 한 후 BC 5 μ l를 가하고 진탕 후 20분 동안 방치 하였다. 이 혼합물에 NaCl포화용액 2ml 및 chloroform 2ml를 가하여 진탕한 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 유기용매층을 취해 질소기류 하에서 용매를 증발 건조시킨 다음 methanol 1ml에 용해하여 Table I의 HPLC 분석조건에 따라 실험하였다.

LC/MS 측정 - HPLC유도체화 조작에 따라 PU, SD 및 SP 표준품을 유도체화 하여 얻어진 반응 생성물을 methanol에 용해하여 Table II의 LC/MS 분석조건에 따라 실험하였다.

검량선의 작성 및 재현성의 검토 - PU, SD 및 SP의 표준용액을 증류수로 희석하여 각각의 농도를 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 1.5 μ g/ml 및 2.0 μ g/ml로 조제하여 표준용액의 유도체화 조작에 따라 실험하여 검량선을 작성하였으며 각각의 표준용액을 5회 반복 실험하여 재현성을 검토 하였다.

실험 결과 및 고찰

BC유도체의 추출용매 결정 - PU, SD 및 SP와 BC가 반응하여 생성된 유도체들의 흡수 스펙트럼으로 추출 용매를 검토한 결과 Table III에서와 같이 chloroform, dichloromethane의 추출률은 차이가 없었으며 dichloroethane의 추출률은 낮았다. 본 실험에

Table III— Extraction effect of organic solvents

	PU		SD		SP	
	λ_{max}	A	λ_{max}	A	λ_{max}	A
Chloroform	245	0.896	246	0.929	245	0.915
Dichloroethane	225	0.605	226	0.621	242	0.909
Dichloromethane	247	0.809	242	0.907	246	0.909

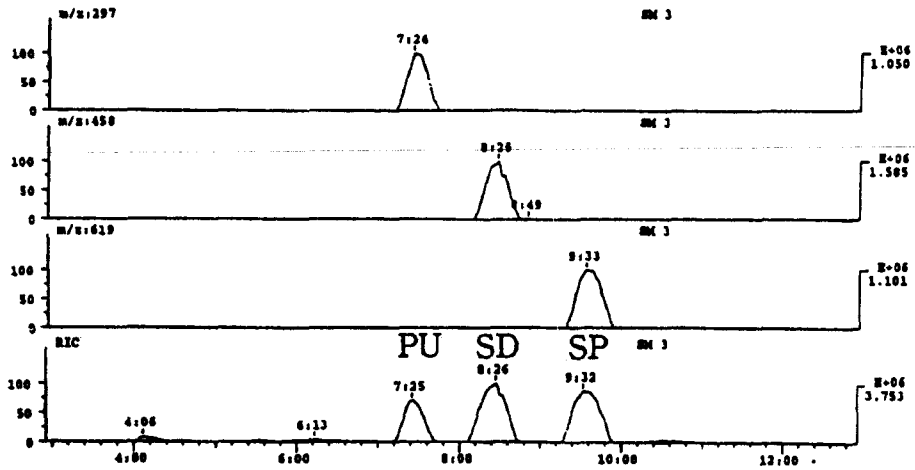


Fig. 1 — Total ion chromatogram of the BC derivatives by LC/MS.

서는 용매로 chloroform을 사용했을 때 추출이 양호하고 경시변화가 적었으므로 추출용매로 chloroform을 사용하여 245 nm에서 실험하였다.

LC/MS를 이용한 BC유도체의 검토 - PU, SD 및 SP와 BC 사이의 유도체화 반응은 Schotten Baumann의 benzylation반응²⁷⁾에 의하여 쉽게 이루어진다. 과잉의 BC는 알칼리성에서 포화NaCl에 의해 쉽게 분해되어 benzoic acid를 생성하며 이 benzoic acid는 chloroform으

로 추출할 때 수용액층에 잔존하므로 조작에 영향을 주지 않는다. 각 표준용액의 BC유도체를 LC/MS조건에 따라 실험하여 얻은 total ion chromatogram은 Fig. 1과 같으며 PU, SD 및 SP의 peak 유지시간은 각각 7.25분, 8.26분, 9.32분이었다. 또 각 polyamine의 질량스펙트럼은 Fig. 2에서와 같이 PU와 BC가 반응한 반응물의 base peak는 m/z 297에서 나타났으며 이것은 PU와 BC가 HCl을 생성하며 1:2로 반응한 질량 296보다 1이 많은 것

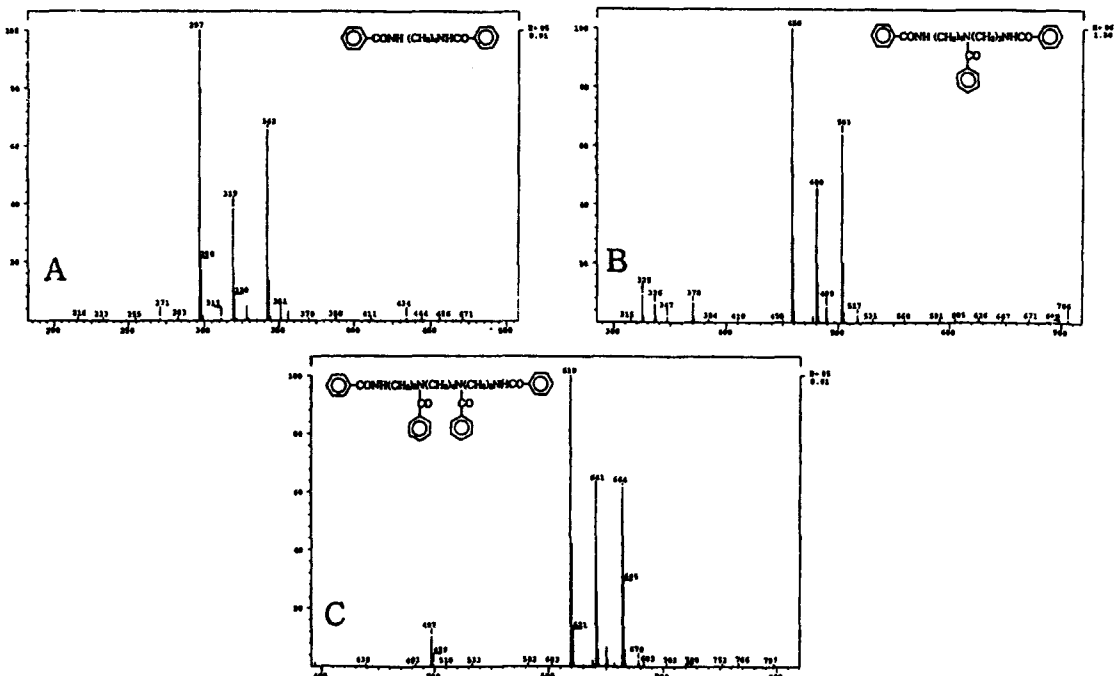


Fig. 2 - Mass spectra of the BC derivatives of polyamines. A : PU, B : SD, C : SP.

으로 보아 1개의 proton과 반응물이 결합하여 MH^+ 를 생성한 것으로 추정된다. SD와 BC의 반응물 및 SP와 BC의 반응물의 base peak는 각각 m/z 485, m/z 619에서 나타났으며 SD와 BC는 1:3 으로 SP와 BC는 1:4로 반응한 반응물의 질량보다 1이 많은 것으로 이 물질들도 MH^+ 를 생성하는 것으로 추정된다.

Polyamine의 분석 - PU, SD 및 SP의 유도체를 분리 정량하기 위하여 Table I의 HPLC분석조건에 따라 실험한 결과 Fig. 3, Fig. 4 및 Fig. 5에서와 같이 표준품에서는 3가지의 polyamine의 peak 가 30분 이내에 완전히 분리되었고 혈청시료의 경우도 PU, SD 및 SP를 분리 정량할 수 있었다. 정상인의 혈청에서는 PU 및 SD를 정량할 수 있었지만 SP는 검출되지 않았다. 그러나 자궁암 환자의 경우 혈청 중에서 PU, SD 및 SP를 모두 분리 정량할 수 있었다.

검량선 및 재현성 - 각 polyamine의 표준용액을 희석하여 표준용액의 유도체화 조작에 따라 실험하여 피크 면적으로부터 검량선을 작성한 결과 Fig. 6에서와 같이 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 2.0 \mu\text{g/ml}$ ($1.0 \sim 20 \text{ ng}^*$)의 농도범위에서 상관계수가 모두 0.998이상의 양호한 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 PU, SD는 $0.01 \mu\text{g/ml}$ (0.1 ng^*), SP는 $0.1 \mu\text{g/ml}$ (1 ng^*) ($S/N=5$)이었다(* HPLC분석 시 시료주입량). 각각의 표준액($2 \mu\text{g/ml}$)을 HPLC 분석조건에 따라 5회 반복 실험한 결과 PU, SD 및 SP의

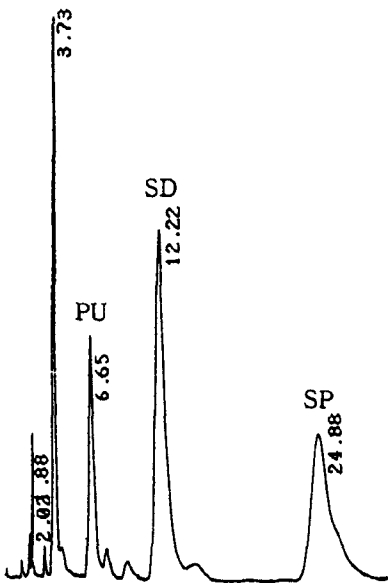


Fig. 3—HPLC chromatogram of the standard mixture derivatives of polyamines.

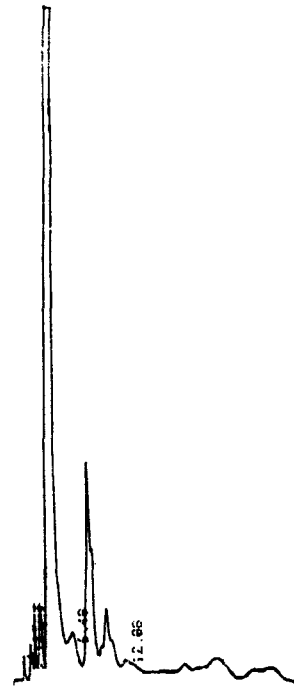


Fig. 4—Typical HPLC chromatogram of the BC derivatives of polyamines obtained from normal serum sample.

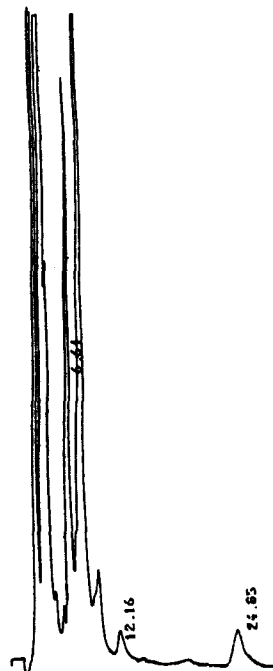


Fig. 5—Typical HPLC chromatogram of the BC derivatives of polyamines obtained from uterine cancer serum sample.

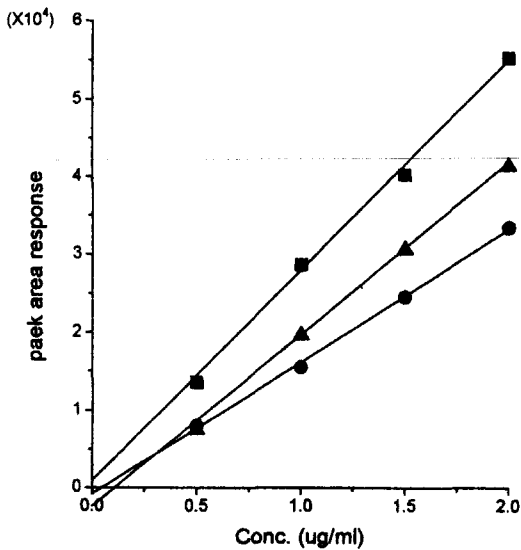


Fig. 6 — Calibration curves of the polyamine standards.

- : PU($r=0.99968$)
- : SD($r=0.99898$)
- ▲ : SP($r=0.99864$)

Table IV — Amounts of PU, SD and SP in sera of normal individuals(ng/ml)

No.	PU	SD	SP
1	91±0.9	82±0.5	N.D.
2	67±0.7	71±0.9	N.D.
3	66±0.6	60±0.6	N.D.
4	63±0.8	59±0.6	N.D.
5	74±0.8	55±0.8	N.D.
6	44±0.5	43±0.6	N.D.

N.D. : nondetectable

Mean value of three determinations

Table V — Amounts of PU, SD and SP in sera of uterine cancer patients(ng/ml)

No.	PU	SD	SP
1	223±2.2	1034±8.9	285±2.5
2	280±2.8	956±9.7	384±3.4
3	622±5.1	937±8.3	N.D.
4	342±2.1	724±6.4	N.D.
5	230±1.9	896±7.0	379±11.7
6	730±6.1	801±6.8	564±4.5

N.D. : nondetectable

Mean value of three determinations

표준편차가 각각 0.3262%, 0.5873% 및 0.3039%로 재현성이 양호한 결과를 얻었다.

정상인과 자궁암 환자의 혈청 중 Polyamine의 정량

본 방법에 따라 정상인 여자 6명(32~60 age)의 혈청과 자궁암환자 6명(35~65 age)의 혈청중의 polyamine을 분석한 결과는 Table IV 및 Table V와 같다.

정상인의 경우 PU 및 SD는 검출이 가능했으나 SP는 검출되지 않았다. 그러나 자궁암 환자의 경우 PU, SD는 6명 모두에서, SP는 6명중 4명의 혈청으로부터 검출할 수 있었으며 PU, SD 및 SP는 모두 정상인의 경우에 비해 현저한 증가를 보였다(S/N=3).

결 론

혈청 중의 polyamine을 분리 정량하기 위하여 BC를 유도체화제로 하고 HPLC를 이용하여 UV detector로 polyamine을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. HPLC에 의해 μ -Bondapak C₁₈ column과 50% methanol을 이동상으로 하여 245 nm에서 polyamine을 분석한 결과, PU, SD 및 SP는 0.1 μ g/ml~2.0 μ g/ml(1.0~20 ng*)의 농도범위에서 상관계수가 모두 0.998이상의 양호한 직선성을 나타내었다. 검출한계는 PU, SD는 0.01 μ g/ml(0.1 ng*), SP는 0.1 μ g/ml(1 ng*)이었다(* HPLC분석시 시료주입량).

2. μ -Bondapak C₁₈ column과 65% methanol을 이동상으로 하여 LC/MS로 PU, SD 및 SP와 BC의 유도체의 생성 유무를 검토한 결과, PU와 BC는 1:2로, SD와 BC는 1:3으로, SP와 BC는 1:4로 반응하는 것을 LC/MS의 결과로 추정할 수 있었다.

3. 본 실험법에 의하여 표준품 및 혈청 중에서 PU, SD 및 SP를 분리 정량할 수 있었다.

4. 정상인과 자궁암 환자의 혈청 중의 PU, SD 및 SP를 정량한 결과 암환자의 경우 정상인에 비해 혈청 중의 농도가 PU의 경우는 2.5배이상, SD는 9배이상으로 증가하였으며 SP는 정상인에서 검출되지 않았으나 6명의 암환자 중 4명에서 검출되었다.

이상의 결과로 BC를 유도체화제로 하여 polyamine을 HPLC법으로 정량할 수 있었으며, 본 실험법은 암을 진단하기 위한 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

문 헌

- 1) Cochen, S. S. : The functions of the polyamines. *Advances in Polyamines Research* 1, 1 (1978).
- 2) Russell, D. H. : Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. *Nature* 233, 144 (1971).
- 3) Russell, D. H., Levy, C. C., Schimpff, S. C. and

- Hawk, I. A. : Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res.* **31**, 1555 (1971).
- 4) Marton, L. J., Russell, D. H. and Levy, C. C. : Measurement of spermidine and spermine in physiological fluids by use of amino acid analyzer. *Clin. Chem.* **19**, 923 (1973).
 - 5) Gehrke, C. W., Kuo, K. C. and Ellis, R. L. : Polyamines an improved automated ion-exchange method. *J. Chromatogr.* **143**, 345 (1977).
 - 6) Jiang, X. C. : Determination of polyamines in urine of normal human and cancer patients by capillary gas chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **4(2)**, 73 (1990).
 - 7) Laser, C., Folsch, U. R., Paprotny, C. and Creutzfeldt, W. : Polyamines in colorectal cancer. Evaluation of polyamine concentrations in the colon tissue, serum and urine of 50 patients with colorectal cancer. *Cancer* **65(4)**, 958 (1990).
 - 8) Marton, L. J., Heby, O., Wilson, C. B. and Lee, P. L. Y. : A method for the determination of polyamines in cerebrospinal fluid. *FEBS Lett.* **46**, 305 (1974).
 - 9) Brown, N. D., Sweet, R. B., Kintzios, J. A., Cox, H. D. and Doctor, B. P. : Determination of 5-dimethylamino naphthalene-1-sulfonyl of urinary polyamines by ion pair high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **164**, 35 (1979).
 - 10) Fair, W. R., Wehner, N. and Brorsson, U. : Urinary polyamine levels in the diagnosis of carcinoma of the prostate. *J. Urol.* **144**, 88 (1975).
 - 11) Marton, L. J., Heby, O., Levin, V. A., Lubich, W. P., Crafts, D. C. and Wilson, C. L. B. : The relationship of polyamines in cerebrospinal fluid to the presence of central nervous system tumors. *Cancer Res.* **36**, 973 (1976).
 - 12) Sanford, E. J., Drago, J. R., Rohner, T. J., Kessler, G. F., Sheehan, L. and Lipton, A. : Preliminary evaluation of urinary polyamines in the diagnosis of genitourinary tract malignancy. *J. Urol.* **113**, 218 (1975).
 - 13) Waalkes, T. P., Gehrke, C. W., Bleyer, W. A., Zumwalt, R. W., Olweny, C. L. M., Kuo, K. C., Lakings, D. B. and Jacobs, S. A. : Potential biologic markers in burkitt's lymphoma. *Cancer Chemotherapy Rept.* **59**, 721 (1975)
 - 14) Marton, L. J. and Lee, P. L. Y. : More sensitive automated detection of polyamines in physiological fluids and tissue extracts with o-phthalaldehyde. *Clin. Chem.* **21**, 1721 (1975).
 - 15) Villanueva, V. R. and Adlakha, R. C. : Automated analysis of common basic amino acids, mono-, di-, and polyamines, phenolicamines and indoleamines in crude biological samples. *Anal. Biochem.* **91(1)**, 264 (1978).
 - 16) Culebras Poza, J. M., Depierre, D. and Roth, M. : Automated determination of urinary polyamines. *Anal. Lett.* **12**, 37 (1979).
 - 17) Chou, T. Y., Gao, C. X., Colgan, S. T., Krull, I. S., Dorschel, C. and Bidlingmeyer, B. : Polymeric benzotriazol reagent for the off-line liquid chromatographic derivatization of polyamines and related nucleophiles in biological fluids. *J. Chromatogr.* **454**, 169 (1988).
 - 18) Hallak, A., Rosenberg, R., Gilat, T. and Somjen, G. J. : Determination of free polyamines in human bile by high-performance liquid chromatography. *Clin. Sci.* **85(4)**, 451 (1993).
 - 19) Wall, R. A. : Accelerated ion-exchange chromatography of some biogenic amines. *J. Chromatogr.* **60**, 195 (1971).
 - 20) Noto, T., Hasegawa, T., Hasimoto, H. and Nakajima, T. : Distribution of putrescine in rat brain measured by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Neurochem.* **48(3)**, 684 (1987).
 - 21) Noto, T., Hasegawa, T., Kamimura, H., Nakao, J., Hashimoto, H. and Nakajima, T. : Determination of putrescine in brain tissue using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **160(2)**, 371 (1987).
 - 22) Slemr, J. and Beyermann, K. : Determination of biogenic amines in meat by combined ion exchange and capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **283**, 241 (1984).
 - 23) Marton, L. J., Heby, O., Wilson, C. B. and Lee, P. L. Y. : An automated micromethod for the quantitative analysis of di- and polyamines utilizing a sensitive high pressure liquid chromatographic procedure. *FEBS Lett.* **41(1)**, 99 (1974).

- 24) Heby, O., Marton, L. J., Wilson, C. B. and Martinez, H. M. : Polyamines: A high correlation with cell replication. *FEBS Lett.* **50(1)**, 1 (1975).
- 25) Wirtz, H. P. : Bioamines and proteins in the saliva and salivary of palaeartic blackflies. *Trop. Med. Parasitol.* **41**, 59 (1990).
- 26) Redmond, J. W. and Tseng, A. : High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.* **170**, 479 (1979).
- 27) Furniss, B. S., Hannaford, A. J., Smith, P. W. G. and Tatchell, A. R. : *Vogel's textbook of practical organic chemistry*(15th), Longman Scientific and Technical, 916 (1989).