

Shikonin의 指示藥的 性質에 관한 研究

李王圭 · 柳京秀

서울大學校 藥學大學

(Received July 3, 1980)

Wang Kyu Lee and Gyong Soo Yoo

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Studies on Color Transition Mechanism of Shikonin

Abstract—Color transition mechanism of shikonin as an acid-alkali indicator was studied. It was confirmed that the presence of phenolic hydroxy radical was essential for the color change of shikonin. But in accordance with shikonin sodium salt (blue color), which was presumed to make chelation as six membered rings.

Shikonin in alkaline solution, by dissociated phenolic protons of naphthoquinone nucleus, converted to the corresponding anion and instead of disappearance tautomerization, electron delocalization occurred and an additional pair of nonbonding electrons in the anion was available for interaction with π electron system of the ring with further extension of the conjugation. It was responsible for its blue color (corresponding color: orange) with needs less energy difference ($\pi \rightarrow \pi^*$) because of conjugation extension. Shikonin sodium salt seems to have similar nuclear structure as shikonin anion.

shikonin (5,8-dihydroxy-2-(1-hydroxy-4-methyl-3-pentenyl)-1,4-naphthoquinone)은 紫根 (*Lithospermi Radix*¹⁾에 含有된 主 色素成分이다. 著者는 shikonin을 中和滴定時의 指示藥으로 使用할수 있음을 既報^{2,3)}한바 있으며 따라서 shikonin이 alkali性에서 靑色을 나타내고, 酸性에서 赤色을 나타내는 이러한 可逆的인 色調 變化가 어떤 mechanism에 의하여 일어나는가를 밝히 보코자 試圖 하였다.

Kolthoff에 의하면⁴⁾ 指示藥의 變色 理論으로는 크게 Wilhelm Ostwald의 ionic theory와 Hantzsch의 chromophore theory (혹은 chemical theory) 및 Wolfgang Ostwald의 dispersion theory가 있다. 一般의으로는, ion說과 chromophore說로 說明되어지고 있으나 個個의 指示藥에 대해서는 phenolphthalein, methyl orange, *p*-nitrophenol 등⁴⁾ 몇가지에 대한 變色 mechanism만 밝혀지고 있을 뿐이며 中和滴定 指示藥으로 開發코자하는 naphthoquinone系 指示藥 즉 shikonin의 變色 mechanism에 관한 研究는 報告된 바 없다.

shikonin은 化學構造上 phenol性 hydroxy group과 quinone form을 가지고 있으므로 著者

는 赤色(酸性)에서 青色(alkali 性)으로 變化하는 原因이 benzenoid ring 에 있는 phenol 性 hydroxy radical 의 proton 이 水溶液中에서 解離되어야만 變色되는지 또는 quinoid ring 의 chromophore 의 變色만 있으면 hydroxy group 의 proton 이 解離되지 않아도 變色되는지 알기 위해 shikonin 의 sodium salt 를 合成하여 이 sodium salt 및 shikonin alkali 水溶液에 대한 UV, IR, NMR, DTA 등의 方法으로 色과 分子構造와의 相關關係를 考察하였던 바 그 變色 mechanism 에 관한 有意의인 所見을 얻을 수 있었으므로 이에 報告하고자 한다.

實 驗

試料 및 試藥—Shikonin : 乾燥한 市販紫根(*Lithospermi Radix*)을 Kuroda,⁵⁾ Brockman⁶⁾의 方法에 準하여 粗 shikonin 의 沈澱을 얻은 후, Toribara,⁷⁾ Underwood⁸⁾ 등의 方法에 準하여 精製하였다.

Naphthazarin : Friedel-Craft 反應을 利用한 Zahn 및 Ochwat 法⁹⁾으로 合成. NaOD : Thompson Packard Co. 製品 40% in D₂O (99.0%D). CDCl₃ : NMR Limited Co. 製品으로 99.5%D. D₂O : NMR Limited Co. 製品으로 99.8%D.

Shikonin 溶液의 NMR Spectrum—shikonin 30 mg 및 naphthazarin 20 mg 을 各各 CDCl₃ 에 溶解시킨 후 濾過한 赤色縮液을 試料로 使用하였고, Perkin Elmer R 32 NMR spectrometer 를 使用하여 temperature 35°C, sweeping range 15 ppm, sweeping time 450 s, filter 2, offset O, H₁, level 9, sensitivity 4, 90 MHz, lock signal 을 TMS 로 함. 한편, shikonin 檢液(赤色)에 D₂O 5 방울을 加하여 흔들어 섞은 후 同一條件下에서 deuterized shikonin 의 NMR 을 測定. 또한 alkali 性 shikonin 溶液은 檢體 同量을 NaOD D₂O 20% 2 ml 에 溶液시킨 後 濾過한 青色溶液을 試料로 使用.

Alkali 性 Shikonin 의 UV Spectrum—shikonin 및 naphthazarin 의 ethanol 溶液 (10⁻³M) 5 ml 를 넣은 50 ml volumetric flask 에 Bates¹⁰⁾, Diehl¹¹⁾ 方法으로 調製한 buffer 溶液 (pH 8.55, pH 10.72, pH 11.57)으로 標線을 채웠다. 또 맨끝의 強 alkali 領域은 5N-NaOH 溶液을 使用하였고 Hitachi ESP-3 T UV spectrophotometer 를 使用하여 200~360nm 사이에서 測定.

Shikonin Sodium 鹽에 대한 IR Spectrum—shikonin 및 shikonin sodium 鹽을 KBr disk 로 method Perkin Elmer 735 B IR spectrophotometer 를 使用하여 全領域을 測定하였다. naphthazarin 및 naphthazarin sodium 鹽의 경우도 同一함.

Shikonin Sodium 鹽의 DTA—標準物質은 α-Al₂O₃, Stanton Redcroft DTA 를 使用하여 昇溫條件 10°C/min. chart speed 300mm/hr.

結果 및 考察

shikonin 의 NMR (Fig. 1 및 2)에서 D₂O 를 加하였을 때는 ArO-H peak 가 없어지는 것을 볼때 構造의인 變化가 없이 다만 hydroxy proton 만 deuterium 으로 置換되었기 때문에 化學構造의 變化가 없었으므로 變色이 없이 赤色을 그대로 나타낸다.

그러나 shikonin 의 NaOD D₂O 溶液(青色)의 NMR (Fig. 3)에서 hydroxyl proton 의 signal 이 없어질 뿐만 아니라 shikonin 의 경우 (赤色) benzenoid quinone 核의 ring proton (C₂, C₆, C₇) peak 가 하나이던 것이 分離되어 benzenoid ring (C₆, C₇)은 6.86 ppm 에서, quinoid ring proton (C₂)은 6.78 ppm 에서 두개로 分離되어 나타났다. 이것은 隣接된 위치의 hydroxy proton 이

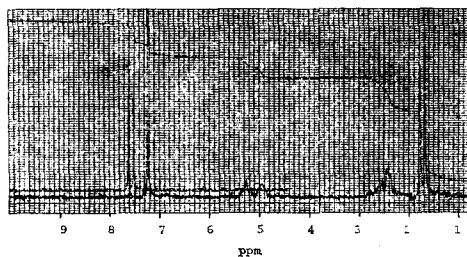


Fig. 1—NMR spectrum of shikonin

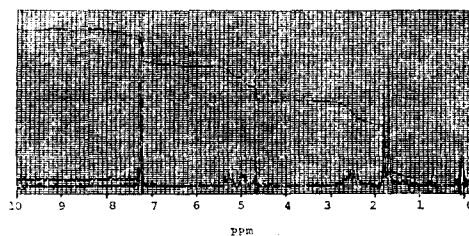


Fig. 2—NMR spectrum of deuterized shikonin

alkali 水溶液에서 解離되어 phenoxy anion으로 變하여 큰 影響을 미쳤던 proton이 없었으므로 해서 C₃위치에 있는 alkyl group의 影響이 相對的으로 크게 나타나게 되어 naphthoquinone 核兩쪽의 electron density가 달라졌기 때문인 것으로 推定되었다. 즉 ring proton(C₆, C₇)은 0.34 ppm, ring proton(C₂)는 0.42 ppm 만큼 high field로 shift되었음은 alkali 性에서 hydroxy group이 phenoxy anion 狀態로 되므로 해서 兩쪽 ring의 electron density가 增加되어 naphthoquinone ring이 兩쪽 核 모두 quinoid form에 더욱 近似하게 變化되었음을 意味하였는데,

특히, C₂ 위치의 ring proton이 0.08 ppm 만큼 더 많이 shift 되는 것은 C₃ 위치의 置換基가

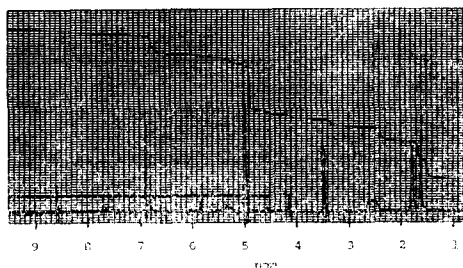


Fig. 3—NMR spectrum of alkaline shikonin solution

Table I—Analysis of NMR spectra (ppm)

		Ar-OH	Ar-H	Color
Shikonin (acid)	position	12.35, 12.46	7.20	red
	multiplicity	singlets	singlet	
	proton	1 : 1	3	
Naphthazarin (acid)	position	12.47	7.14	red
	multiplicity	singlet	singlet	
	proton	2	4	
Shikonin (deuterized)	position		7.19	red
	multiplicity	(-)	singlet	
	proton		3	
Shikonin (alkali)	position		6.86, 6.78	blue
	multiplicity	(-)	singlets	
	proton		2 : 1	
Naphthazarin (alkali)	position		6.83	blue
	multiplicity	(-)	singlet	
	proton		4	

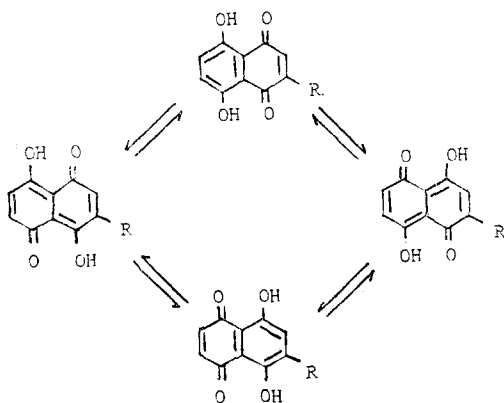
electron releasing alkyl group 임을 알 수 있었다.

naphthazarin의 NMR spectrum (Table I)에서 naphthazarin核의 proton chemical shift는 7.14 ppm 이었는데, 1,4-naphthoquinone의 quinone ring의 chemical shift(6.97 ppm), 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone의 benzenoid ring의 proton chemical shift (7.31ppm, C₆, C₇)와의 중간값 즉 aromatic ring과 quinone ring의 平均值에 대략 해당되었고, *P*-benzoquinone의 proton peak 6.72 ppm^{12,13)} 보다는 훨씬 low field에서 나타났다. 또한 hydroxyl기의 proton chemical shift는 12.47 ppm으로 single peak로 나타나는 점을 고려할 때 naphthazarin은 ring이 모두 quinoid form과 benzenoid form이 각각 同量씩 存在하는 Scheme I에서 表示한 바와 같이 tautomer^{12,14)}가 centrosymmetric한 狀態로 溶液中에 存在함을 豫測할 수 있다.

Dumas¹⁵⁾은 dielectric polarization study로 naphthazarin이 아주 稀薄한 溶液에서는 true quinone 構造를 가지고 있다고 하였으나 naphthazarin 및 shikonin을 10⁻⁷M까지 여러 濃度로 稀釋하여 色調를 觀察한 結果 tautomerization을 하든 true quinone form을 가지고 있던 赤色이 稀釋으로 인하여 褪어지는 外의 變色은 觀察할 수가 없었다. 이 점은 shikonin이 benzenoid quinone核의 tautomerization은 變色에 影響을 주지 않음을 알 수 있었다.

다음 naphthazarin의 alkali 溶液에서의 NMR spectrum (Table I)은 hydroxyl radical의 proton peak가 水溶液中에서 ionization으로 인해 나타나지 않게 되었고 단지 naphthazarin核의 proton peak만 0.31 ppm만큼 high field shift되어 6.83 ppm에서 나타났는데 이 점은 naphthazarin anion의 分子構造가 이미 言及한 바와 같이 quinone form에 類似하게 되었음을 示唆하였다.

shikonin의 UV (Fig. 4)에서 naphthoquinone核의 $\pi \rightarrow \pi^*$ transition으로 인한 alkali 水溶液의 UV absorption spectra가 强 alkali 溶液에서 λ_{max} 310nm ($\epsilon=6700$)까지 34 nm만큼 bathochromic shift 하였다.



Scheme I

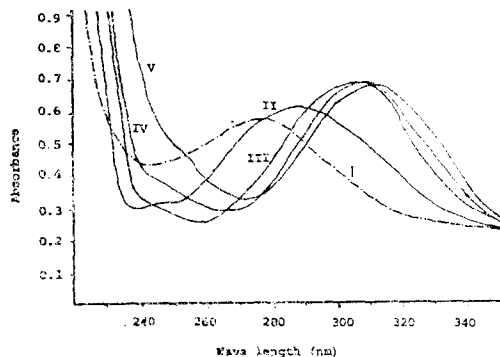


Fig. 4—UV absorption spectra of alkaline shikonin solution in several pH conditions.

Key(pH) : I (blank), II (8.55), III (10.72), IV (11.57), V (5N-NaOH)

마찬가지로 naphthazarin의 경우도 λ_{max} 269 nm($\epsilon=4300$)에서 最大 310 nm($\epsilon=6000$)까지 强 alkali에서 41 nm만큼 크게 bathochromic shift되었는데 이것은 分子內 $\text{>C}-\ddot{\text{O}}-\text{H}$ 의 lone pair electron을 가진 non bonding orbital이 alkali 水溶液中에서 hydroxy proton이 解離되어

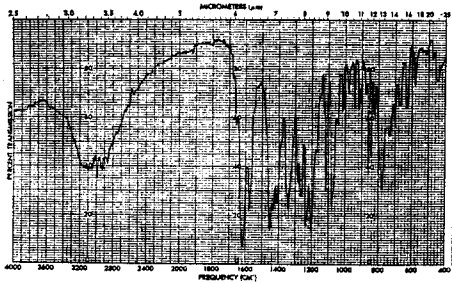


Fig. 5—IR spectrum of shikonin

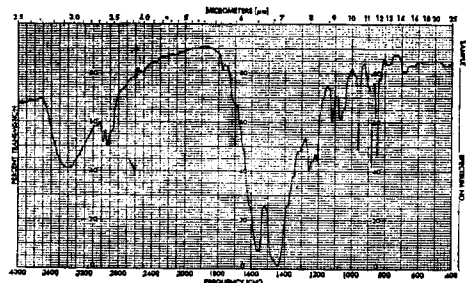


Fig. 6—IR spectrum of shikonin sodium salt

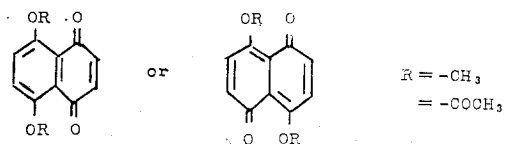
$\text{>C}=\ddot{\text{O}}:$ 상태의 anion이 되므로써 이 lone pair electron, naphthoquinone核이 orbital에 關與하여 conjugation의 extension이 일어난 때문에 思料되었다. 따라서 $\pi \rightarrow \pi^*$ transition에 必 要한 ΔE 가 減小하게 되며 變色이 赤色(吸收色: 靑綠色)에서 이보다 energy level이 낮은 狀 態의 色인 靑色(吸收色: 赤黃色) 쪽으로 absorption band가 red shift 되었음을 알 수 있었다.

Fig. 5 및 Fig. 6의 IR spectrum에서 shikonin 및 naphthazarin에서 모두 同 一한 band로 나 타난 1607cm^{-1} 는 chelated intramolecular hydrogen bond를 하고 있는 $\text{C}=\text{O}$ stretching^{16,17}으로 1,4-naphthoquinone 등 quinone의 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, $\sim 1680\text{cm}^{-1}$ 에서 shift된 것이나 sodium salt인 경우 各 谷을 1550cm^{-1} , 1560cm^{-1} 로 shift되는 것은 hydrogen이 sodium으로 置換되므로써 그 分子內 的 tautomerization이 完 全히 不 可能해지며 따라서 carbonyl character가 弱해지고 shikonin 및 naphthazarin에서 보다 安 定化되어 energy level이 낮은 分子構造狀態로 된다고 볼 수 있다. 또 naphthazarin의 hydroxyl proton이 methoxide나 acetate(黃色)등¹⁸ 鹽으로 된 경우와는 달 리 sodium으로 鹽을 形 成할 경우는 IR에서 固 有한 $\text{C}=\text{O}$ 의 absorption band (1650cm^{-1})가 消 滅하여 나타나지 않는 점으로 察 하여 이 sodium salt는 단순히 Scheme II와 같은 構 造는 아닌 것으 로 推 定되었다.

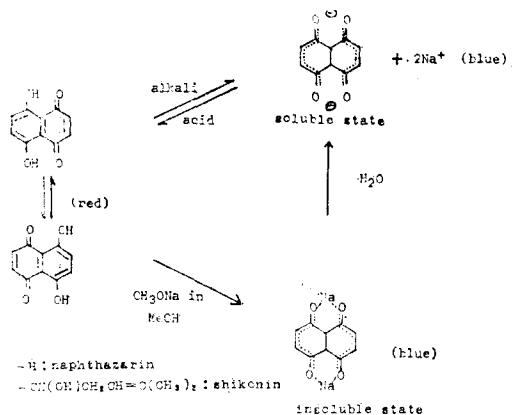
shikonin의 金屬 chelate에 대한 檢 討時 nickel, copper, magnesium 등 metal shikonin chelate의 IR spectrum에서 모두 carbonyl absorption이 shikonin sodium salt의 absorption band (1550cm^{-1}) 부근에서 同 一한 모양을 나타내는 것으로 볼때 sodium salt의 結 合은 이와 同 样的 金屬 chelate의 構 造를 가질 것으로 推 定된다.

즉, 이 때의 分子構造는 Scheme II와 같은 naphthoquinone type이 아니고 Scheme III과 같이 intramolecular hydrogen bond와 類 似하나 tautomerization을 할 수 없으므로 sodium과 6-memberd ring을 形 成하여 chelation^{19,20}을 이루게 되 는 것이라고 思 料된다.

이 때의 shikonin sodium salt가 靑 色을 나타내 는 理 由는 Scheme III에서 보는 바와 같이 shiko nin anion이 alkali水溶液에서 갖고 있는 quinone type, 分子構造와 類 似하게 되므로써 同 一色을 示 한다는 생각되었다.



Scheme II



Scheme III

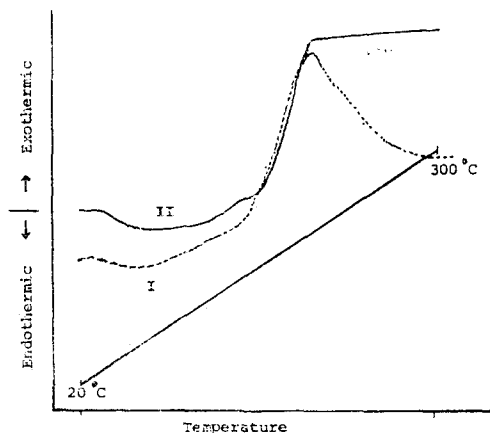


Fig. 7—DTA graph of shikonin sodium salt.

key: I air, II He

shikonin sodium 鹽의 靑色은 無機物에서 흔히 接하는 含水物에 따른 變色與否를 檢討하였다. 즉 Fig. 7에서 보는 바와 같이 150°C까지 吸熱 또는 發熱反應이 없으며, oven에서 250°C까지 昇溫操作을 하면서 色調를 觀察하였으나 變化가 없었으며, 또한 100°C 恒溫에서 3시간 減壓 乾燥시킨 後에도 變色이 되지 않고 靑色을 나타내는 것으로 봐서 結晶水 또는 固定水의 影響에 의한 變色이 아님을 確證하였다.

250°C 以上 加熱한 後에 다시 水溶液에 넣으니 加熱前과 마찬가지로 水溶液에 靑色으로 溶解되었고, 여기에 有機溶媒를 加하면 일부분의 shikonin이 解離되어 赤色으로 有機溶媒層으로 移行하였다.

따라서 shikonin은 水溶液에서 解離되어야만 靑色으로 變하는 것은 아니며, hydroxy proton이 sodium으로 置換된 경우에도 靑色으로 變色됨을 알았다.

結 論

shikonin의 變色은 tautomerization에 의해서는 일어나지 않으며, shikonin의 phenolic hydroxy group proton의 解離에 의한 shikonin anion 狀態가 되면서 이 部位의 electron delocalization이 일어나고 分子內 conjugation extension이 隨伴되므로서 energy level이 더 낮은 安定한 상태로 되기 때문에 赤色에서 靑色(吸收色 赤黃)으로 變色됨을 알았다.

shikonin sodium 鹽도 chelation을 형성하므로서 conjugation extension이 일어나 解離時와 유사하게 核의 構造가 變化되어 靑色을 나타내는 것으로 思料되었다.

參 考 文 獻

1. 대한약전, 제 3개정판, 제 2부, p. 814, 1976.
2. W. K. Lee, B. K. Kim and K. S. Yu, *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 2, 37(1977).
3. W. K. Lee, K. S. Yu and C. K. Sim, *ibid.*, 3, 93(1978).
4. I. M. Kolthoff, *Acid-Base Indicators*, p. 111, 216. Macmillan Co. 1937.
5. T. Magima and C. Kuroda, *Acta Phytochem.*, 1, 43(1922).
6. H. Brockman, *Ann.* 521, 1(1935).

7. T. Y. Toribara and A. L. Underwood, *Anal. Chem.* **21**, 1352(1949).
8. A. L. Underwood and W. F. Neuman, Univ. of Rochester Atomic Energy Project Report. UR-19 1947.
9. K. Zahn and P. Ochwat, *Ann.* **462**, 72(1928).
10. Bates R. G., *Electrometric pH Determination*, p.117, Wiley, New York, 1954.
11. D. Harvey and R. R. Sealock, *Record Chem. Progr.* **13**, 10(1952).
12. S. Patai, *The Chemistry of the Quinonoid Compounds*, Part I, p.165, 174 John Wiley & Sons, 1974.
13. R. K. Norris and S. Sternhell, *Australian J. Chem.*, **19**, 617(1966).
14. L. H. Piette, M. Okamura and G. P. Rabold, *J. Phy. Chem.* **71**, 29(1967).
15. J. M. Dumas, A. Cohen, M. Gomel, *G. R. Acad. Sci. Ser. C.* **269**, 69(1969).
16. L. J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Vol. 2, Chapman and Hall Co., 107-120 1975.
17. L. J. Bellamy, *ibid.*, 160-162 1975.
18. L. A. Cort, and P. A. B. Rodriguez, *J. Chem. Soc. (c)*, 949(1967).
19. 李吉相, 有機 킬레이트試藥論, p.135. 東明社, 서울, 1973.
20. 上野景平, Chelate 滴定法, p. 285, 南江堂, 東京, 1960.