

HPLC에 의한 Gypsogenin-2, 4-DNPH의 정량

이 왕 규 · 유 병 기 · 김 박 광

서울대학교 약학대학

(Received March 8, 1987)

—Determination of Gypsogenin by HPLC Using 2, 4-Dinitrophenylhydrazine as a Pre-labeling Reagent—

Wang Kyu Lee, Byung Gi Ryu and Bak-Kwang Kim

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

Abstract—Gypsogenin was derivatized with 2, 4-dinitrophenylhydrazine prior to analysis with HPLC. Reversed-phase column (Du pont ODS) was used and the mobile phase was acetonitrile and water (60:40). The effluent was detected at 550nm using an U.V. detector and the retention time was approximately 9.2min. The concentration was quantitated by measuring the area and the detection limit was 0.2 μ g.

Gypsophila saponin은 Gypsophila식물의 뿌리 부분에 많이 함유되어있다¹⁾. 이것은 현재 cough syrup의 거담제로 사용되고 있다.

Gypsogenin은 gypsophila saponin을 가수분해하여 얻어지는데¹⁾, 이것의 정량법은 현재 확립되어 있는 것이 없다. 본 실험에서 이것의 정량법 개발의 하나로 현재 널리 사용되는 HPLC를 이용하려 하였다. gypsogenin은 구조상 UV광을 매우 민감하게 흡수하는 관능기가 없어서 UV-spectrophotometric detector를 사용할 수 없다. 그런데, gypsogenin의 구조에 aldehyde기가 있음에 착안하여 aldehyde기와 쉽게 정량적으로 반응하는 2, 4-Dinitrophenylhydrazine을 pre-labeling reagent로 사용하였다.^{2~4)} 그결과 350nm에서 민감하게 흡광하는 유도체를 만들어 HPLC에 적용한 결과 gypsogenin을 양호하게 분리, 정량할 수 있었다.

또한, 본 실험에서는 E. Merck제 crude saponin과 국산 *Gypsophila oldhamiana* 중의 gypsogenin의 함량을 구하여 비교해 보았다.

實驗方法

試料 및 試藥—Crude saponin(E. Merck제), *Gypsophila oldhamiana*, Gypsogenin표준품은 gypsophila saponin을 가수분해, 추출, 정제하여 사용⁵⁾하였으며, DNPH용액은 2, 4-Dinitrophenylhydrazine(E. Merck제 특급)을 0.5g을 2N HCl 1,000ml에 용해하여 차광한 후 냉장고에 보관하고 사용할 때 0.1%로 희석하여 사용하였다. Ethylacetate(和光제 특급제), Carbon tetrachloride (ROTS제 HPLC용), Acetonitrile(ROTS제 HPLC용), 증류수(ROTS제 HPLC용)을 사용하였으며, 기타 시약은 和光純藥製 특급 및 일급시약을 사용했다. 표준용액은 Gypsogenin-2, 4-DNPH 7.0mg을 CCl₄에 용해하여 표준용액으로 하였다. gypsogenin-2, 4-DNPH는 실험방법대로 만들어 정제하여 사용하였다. gypsogenin-2, 4-DNPH는 Fig. 1과 같은 반응과 정을 거치고, UV스펙트럼은 Fig. 2와 같다.

機器—Shimadzu Model LC-4A High Performance Liquid Chromatograph를, Integrator는 Shimadzu C-R2A data processor를 사용하였고,

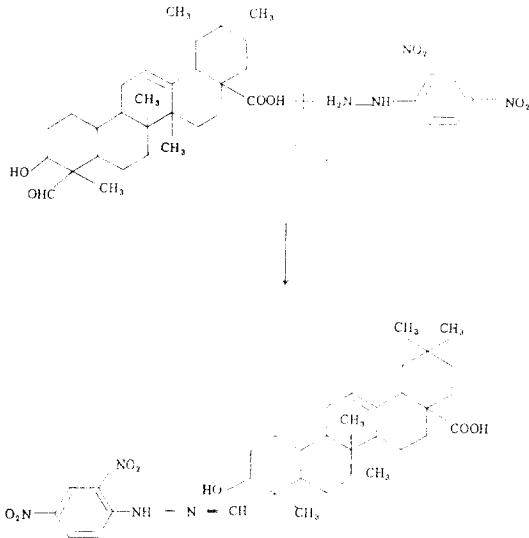


Fig. 1-Schematic diagram of formation of 2, 4-dinitrophenylhydrazone of Gypsogenin.

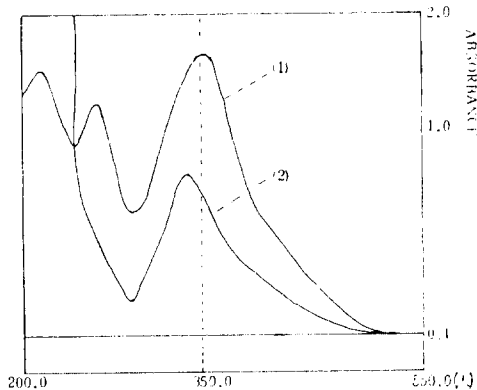


Fig. 2-U.V. Absorption spectra of 2, 4-DNPH derivative of Gypsogenin and 2, 4-DNPH
(1) 2, 4-DNPH
(2) Gypsogenin-2, 4-DNPH

column은 Du Pont ODS(0.4mm i.d.×15cm)를 사용하였다.

Spectrophotometer는 Shimadzu UV-VIS spectrophotometer UV-260형을 사용하였다.

實驗操作—Gypsophila saponin 5g을 취하여 5% HCl 200ml로 14시간 가수분해시킨후 여과하고, methanol 50ml로 추출하고, 감압증발건조하여 황갈색 결정을 얻었다. 이 결정 4mg을 methanol 2ml에 용해하여 0.1% 2, 4-DNPH용액

Table I-Conditions of HPLC

Column	DuPont ODS(0.4mm i.d.×15cm)
Mobile phase	60% acetonitrile
Detection	UV 550nm
Flow rate	1.0ml/min
Sensitivity	0.2 μ g
Chart speed	0.5cm/min
Injection volume	2 μ l

5ml를 가하고 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 그리고, CCl₄ 20ml로 4회에 걸쳐 추출하고 그 추출액을 2N HCl로 세척하고 감압증발건조하였다. 이를 다시 methanol 2ml에 용해하여 HPLC에 2 μ l주입하였다.

HPLC 조건은 Table I에 나타냈다.

結果 및 考察

Gypsophila olphamiana중의 **gypsophila saponin**의 추출—건조, 세절한 *Gypsophila oldhamiana* 100g을 ethyl acetate로 추출, 여과하여 잔사를 methanol로 추출하여 여과했다. 그 여액을 증발 농축하여 gypsophila saponin 9.41g을 얻었다.

Gypsophila saponin의 가수분해—E. Merck제 crude saponin(gypsophila saponin)과 위에서 추출한 gypsophila saponin을 각각 5g을 취하여 5% HCl 200ml로 2시간에서 20시간까지 가수분해했다. 그결과 12시간 이상에서는 수율이 일정하였다. 본 실험에서는 14시간 가수분해하였다.

가수분해 시간에 대한 영향을 Fig. 3에 나타냈다.

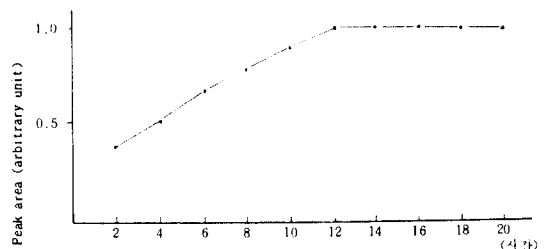


Fig. 3-Effect of hydrolysis time in the hydrolysis of Gypsophila saponin.

실온에서 2, 4-DNPH반응에 미치는 시간의 영향—Gypsogenin 1mg에 0.1% 2, 4-DNPH용액 20ml를 가하여 실온에서 20분, 40분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 동안 반응시켜 위의 실험방법대로 행하였다.

그결과 3시간 이후에는 반응이 완결되어 본 실험에서는 4시간동안 반응시켰다. (Fig. 4)

Gypsogenin-2, 4-DNPH의 정량—Column은 Du pont ODS(0.4mm i.d.×15cm)를 사용하였고, mobile phase는 60% Acetonitrile을 사용하여 정량한 결과 Fig. 5와 Fig. 6과 같이 양호한 분리정량이 되었다.

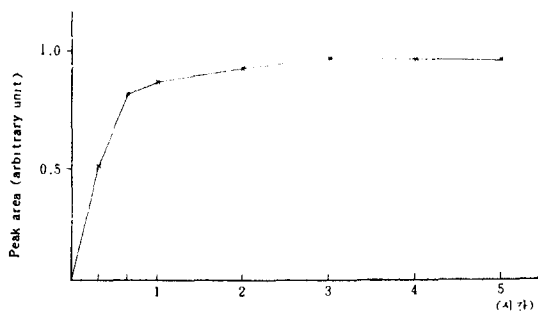


Fig. 4—Effect of reaction time on derivatization at room temperature.

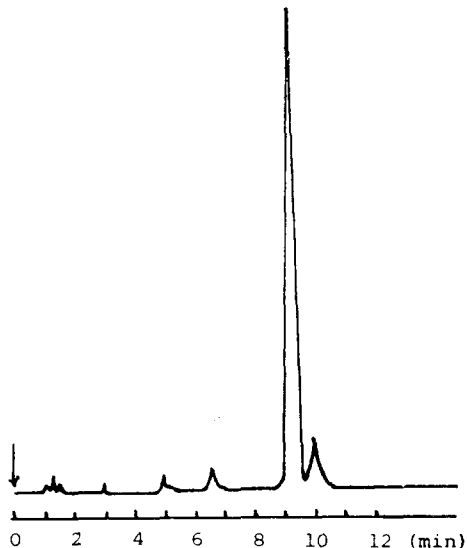


Fig. 5—Chromatogram of 2, 4-DNPH derivative of gypsogenin in *Gypsophila oldhamiana*.
Column: Du pont ODS (0.4mm i.d.×15cm)
Mobile phase: 60% acetonitrile
UV detector: 350nm

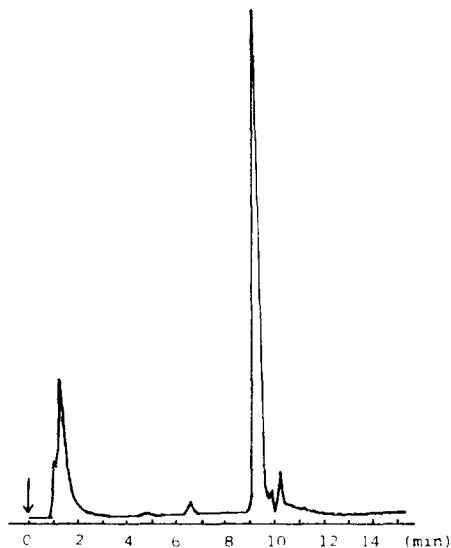


Fig. 6—Chromatogram of 2, 4-DNPH derivative of gypsogenin in crude saponin.
Column: Du pont ODS (0.4mm i.d.×15cm)
Mobile phase: 60% acetonitrile
UV detector: 350nm

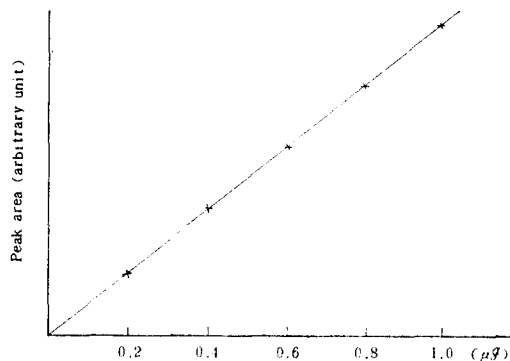


Fig. 7—Calibration curve of Gypsogenin.

檢量線—Gypsogenin-2, 4-DNPH 7.0mg을 정밀히 달아 methanol에 용해하여 전체를 25ml로 하였다. 이를 각각 4ml, 3ml, 2ml, 1ml를 취하여 10ml가 되도록 희석하였다.

이를 각각 Table I의 조건에서 검량선을 작성한 결과 Fig. 7과 같이 양호한 직선성을 나타냈다.

回收率—*Gypsophila* saponin 100mg에 gypsogenin을 1mg, 3mg, 5mg을 첨가하고 위의 실험방법대로 행하였다.

Table II-Recovery of Gypsogenin in Gypsophila saponin

Amount added (mg)	Amount found (mg)	Recovery (%)	C.D (n=5)
1	0.992	99.2	1.2
3	2.983	99.4	0.9
5	5.014	100.3	1.3

Table III-Content of Gypsogenin

Sample	content(%)
Gypsophila oldhamiana	0.6
crude saponin	9.9

이때의 회수율은 Table II에서와 같이 매우 양호하였다.

Gypsogenin의 함량—E. Merck제 crude saponin과 국산 Gypsophila oldhamiana중의 gypsogenin의 함량을 구해본 결과를 Table III에 나타냈다.

結 論

E. Merck제 crude saponin(gypsophila saponin)

과 국산 생약 *Gypsophila oldhamiana*중에 들어 있는 gypsogenin을 2, 4-Dinitrophenylhydrazine 유도체를 형성하여 HPLC로 양호한 정량이 이루어졌다.

Column은 Reverse Phase인 Du Pont ODS를 사용하였고, gypsogenin의 함량은 crude saponin에서 9.9%, 국산 Gypsophila oldhamiana에서 0.6%로 나타났다. 또한 gypsogenin은 0.2 μ g까지 정량이 가능했다. 앞으로 제제중의 gypsogenin의 정량에 적용 가능하리라 사료된다.

文 獻

- 1) 九谷 昇, 夏禹麟根, 藥學雜誌, 64, 18 (1944).
- 2) Karl Blau, Handbook of Derivatives for Chromatography, 391 (1978).
- 3) Daniel R. Knapp, Handbook of Analytical Derivatization Reaction, 340 (1979).
- 4) Tuß, H., Neitzert, V. Method for Determination of Formaldehyde in Air in the pptv-Range by HPLC after Extraction as 2, 4-Dinitrophenylhydrazone, *Fresenius Z. Anal., Chem.* 312, 613 (1982).
- 5) 北川 勲, 吉川雅之, 藥學雜誌, 104, 162 (1984).