

2-Bromoacetyltriphenylene 유도체화제를 이용한 카르복실기 함유성분의 분석법 (III)

감초중 glycyrrhetic acid의 HPLC에 의한 분리정량

정해수 · 예덕천 · 김박광 · 박만기 · 이왕규

서울대학교 약학대학

(Received July 22, 1987)

HPLC Determination of Carboxyl Group using 2-Bromoacetyltriphenylene as Pre-labeling Reagent (III)

Separative determination of glycyrrhetic acid contained in licorice power

Hai Soo Chung, Duk Chun Yeh, Bak-Kwang Kim, Man-Ki Park and Wang Kyu Lee

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

Abstract—A high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of glycyrrhetic acid contained in licorice powder. Glycyrrhetic acid which is hydrolyzate of glycyrrhizin extracted from licorice powder, was determined with good result by HPLC using 2-bromoacetyltriphenylene labeling reagent. The glycyrrhetic acids were labeled with 2-bromoacetyltriphenylene in acetonitrile using 18-crown-6-ether and KOH as a catalyst. Derivatized glycyrrhetic acids were separated from the extracted licorice powder on a reversed-phase column (chemopak C₁₈) using 100% acetonitrile as a mobile phase and monitored by an UV-detector at 268nm. Linearity of calibration curve was obtained between 5 ng and 20 ng, and the lower limit of detection was 2 ng. The recovery of glycyrrhetic acid to licorice powder was about 99.3%. This method was sensitive, reliable and useful for, determination of glycyrrhetic acid.

한방에서 많이 사용하는 감초는 그 효능이 진정, 해열, 해독, 항염증 등의 여러가지 작용이 있다. 또한 최근에 한방의 과학화와 동시에 생약제품이 많이 상품화되고 있으며, 이들 처방에는 대부분 감초가 함유되어 있다.

감초의 주성분은 glycyrrhizin과 그 aglycone인 glycyrrhetic acid, glucuronic acid로 이루어져 있다. 이 주성분들은 여러가지 형태의 제제처방에 사용되고 있으며, 그 각각의 성분에 대한 약리학적 연구가 많이 진행되고 있으며, 이에 따라 분리분석도 많이 연구되고 있다. 이들 정량법에는 glycyrrhizin 및 그염의 형태로 정량하는 법, glycyrrhizin을 가수분해하여 glycyrrhetic acid로 정량하는 법, glucuronic acid로서 정량하는 방법 등이 있다. Glucuronic acid의 중량법과

glycyrrhizin의 중화적정법도 있으나 최근에는 거의 사용하지 않는다.

미량분석법으로 사용되는 것은 TLC-densitometry를 이용하는 법¹⁾, TLC로 분리한 후 UV정량법²⁻³⁾, GC법⁴⁻⁵⁾, HPLC법⁶⁻¹⁴⁾, methylene blue와의 반응을 이용한 비색법¹⁵⁾ 등이 보고되어 있다. 이들 방법 중 HPLC법이 간편하면서 극미량의 정량이 가능하므로 식품 및 생화학분야 등에서 사용되고 있다. 그러나 이 방법들은 glycyrrhetic acid 자체가 자외부 254nm 부근에서 흡광되는 것을 이용한 방법으로 감도는 0.1 μg 정도에 불과하다.

저자들은 생체시료 중의 정량에 충분한 고감도를 얻기 위하여 새로운 UV 흡수유도체화제인 2-bromoacetyltriphenylene (BATP)¹⁶⁾를 glycyrr-

hetic acid에 반응시켜 유도체를 만든 후 HPLC로 정량하는 방법을 보고하고자 한다.

실험 방법

시료 및 시약—감초(시판용), glycyrrhetic acid(東京化成), KOH, K₂CO₃, KHCO₃, methanol(이상 Wako 1급시약), 18-crown-6-ether(Sigma), 2-bromoacetyltriphenylene(BATP, 합성), acetonitrile, tetrahydrofuran(THF), N,N-dimethylformamide(DMF)(이상 HPLC용 시약은 Kokusan Japan), water: Milli Q™ water purification system을 통과시킨 것을 사용하였으며, silica gel(Kiesel gel 60, 70~239mesh, E. Merk Art), pre-coated TLC plate silica gel 60 F 254(E. Merk)을 사용하였다.

기기—HPLC는 Pye-Unicam model PU 4030 controller, PU 4011 pump, PU 4020 UV detector, PU 4810 computing integrator, column(chemopak C₁₈ 8mm i.d.×25cm). UV는 Pye-Unicam PU-8800 UV/vis spectrophotometer을 이용하였다.

표준액—Glycyrrhetic acid(GHA) 47.07mg을 정밀히 평량하여 methanol 100ml에 용해시켰다. 이 액은 0.1μmol/ml이었다.

감초시료액—감초를 세말로 만든 후 약 200mg을 정밀하게 취하고 70% methanol 30ml를 가하여 3시간 환류시키면서 추출한 후 여기에 3N-H₂SO₄ 30ml를 가한 후 1시간 동안 환류시키면서 가수분해를 완결시키고 환류냉각기를 제거한 후 가열하여 methanol을 제거한 후 냉각시켰다. 추출액을 분액여두에 넣고 chloroform 50ml를 가하여 추출하고 chloroform층을 분리하고 다시 chloroform 50ml로 3회 추출하여 chloroform층을 합한 후 감압증류하여 chloroform를 증발시킨 후 잔사를 methanol 100ml를 넣고 용해시킨 후 millipore로 여과한 액을 시료로 사용하였다.

감초엑스 시료액—감초엑스 100mg을 취하여 70% methanol 30ml를 가하여 용해시킨 후 3N-H₂SO₄ 30ml를 가한 후 이후 감초시료액 조작과 동일하게 조작하여 시료액으로 하였다.

반응용시액—KOH용액은 KOH 66mg을 meth-

anol 100ml에 용해시킨 후 이액 1ml를 취하여 methanol을 넣어 50ml를 만들었다. 18-Crown-6-ether액은 18-crown-6-ether 52mg을 acetonitrile 100ml에 용해시켜 만든 후 사용시 적량으로 희석하였다. 2-Bromoacetyltriphenylene액은 triphenylene을 acetylation 한 뒤 bromination한 것을 정제하여 IR, NMR, mass spectrometry에 의해 확인된 2-bromoacetyltriphenylene(λ_{max} 269nm, 이하 BATP) 35mg을 acetonitrile에 용해시켜 10ml로 하였다.

시료 및 표준액과 BATP와의 반응조작—시료 및 표준액을 일정량 취하여 cap tube에 넣고 KOH용액 2배물을 가한 후 N₂ gas를 통하면서 용매를 날려 보낸 다음 18-crown-6-ether 용액 20배물을 넣고 10분간 sonification시킨 후 BATP액 2배물을 넣고 50°C에서 30분간 반응시킨 후 HPLC에 주입하여 분석하였다(Fig. 1).

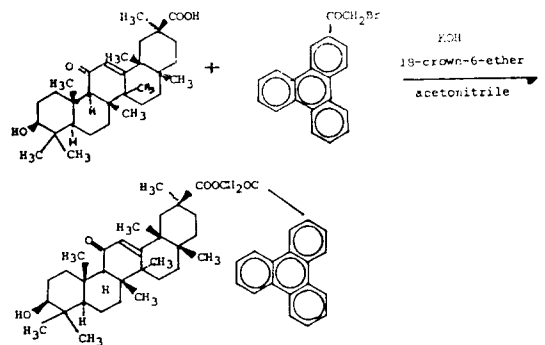


Fig. 1—Esterification of glycyrrhetic acid with 2-bromoacetyltriphenylene.

HPLC 측정조건—칼럼은 chemopak C₁₈ (8 mm i.d.×25cm), 검출과장은 UV 268 nm, 이동상은 100% acetonitrile, 감도는 0.008 AUFS, 유속은 1.3ml/min, chart 속도는 0.25 inch/min, 주입량은 10μl로 하였다.

실험결과 및 고찰

Glycyrrhetic acid—BATP ester 조제—Glycyrrhetic acid 200mg을 methanol 60ml에 용해시킨 후 따로 KOH 10mg을 methanol 60ml에 용해시킨 액을 넣고 혼합한 후 40°C에서 증발

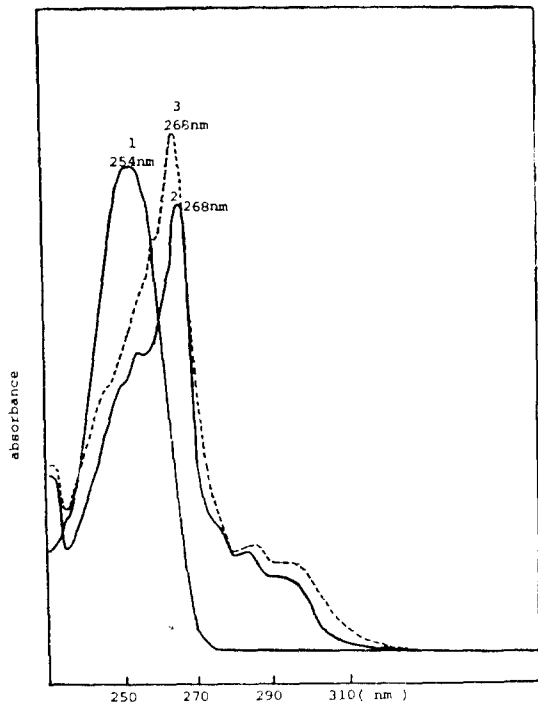


Fig. 2—UV spectra of GHA, B ATP and GHA-B ATP.

Key. 1 : GHA, 2 : B ATP, 3 : GHA-B ATP

건고한 후 18-crown-6-ether 3.1g을 acetonitrile 80ml에 용해시킨 액을 가하고 B ATP 414mg을 acetonitrile 150ml에 용해시킨 액을 가하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 감압증발 건조시킨 후 하기 조건에 따라 column chromatography를 행하여 순수한 product를 얻었다.

Column condition—Silica gel: 200g, column size: 3m 5cm i.d×60cm, elution solvent: dichloromethane, main spot Rf: 0.2. 이 분말을 acetonitrile로 재결정하여 amorphous powder을 얻은 후 이 물질의 분광학적 특성치를 측정할 때 다음과 같았다(Fig. 2).

UV : $\lambda_{\max}^{\text{THF}}$ 268nm, mole 흡광계수 $\epsilon_{\max}^{\text{THF}}$ 74,000

GHA : mole 흡광계수 $\epsilon_{\max}^{\text{THF}}$ 9,600

KOH, KHCO₃ 및 K₂CO₃가 반응에 미치는 영향—Carboxylic acid를 potassium salt로 만들 때 pot-assium 공급원으로서 KOH, KHCO₃ 및 K₂CO₃를 사용하여 흡광도에 미치는 영향을 비

교 검토하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 KHCO₃가 반응이 가장 좋지 않았으며, KOH는 가장 짧은 시간에 가장 높은 peak area를 나타내었다. 그러므로 본 실험에서는 KOH를 사용하였다.

KOH액 및 B ATP의 농도가 반응에 미치는 영향—KOH액의 농도 변화에 따른 영향을 검토하기 위하여 KOH의 농도를 GHA의 mole에 대해서 1배 mole에서 5배 mole까지 변화시킨 결과 KOH농도가 2배 mole에서부터는 최대가 되고 그 이상의 KOH mole수를 증가시켜도 peak area는 일정하였다. 이것은 즉 KOH의 양이 2배 mole수가 되면 반응이 완결된 것을 의미하므로 본 실험에서는 KOH량을 3배 mole이 가장 적합하였다. KOH량이 7 mole배에서부터 recorder response가 감소되며, 10배 mole에서는 분해산물인 듯한 peak가 생성되었다. GHA의 농도 mole에 대해서 B ATP의 농도가 1배 mole일 때는 60% 정도 반응이 이루어졌고 2배 mole에서부터 최고가 된 후 농도가 증가하여도 peak area는 변화하지 않았다. 그러나 B ATP 농도가 너무 과량이면 chromatogram 상에 B ATP의 peak가 너무 크게 나타나며, 부생물 peak도 많이 나타나므로

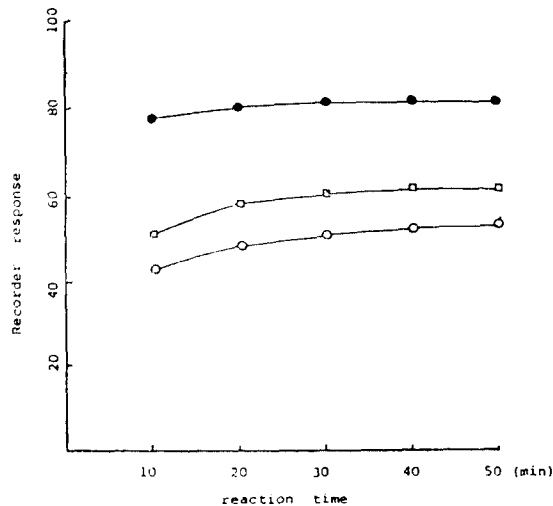


Fig. 3—Effect on the response by adding KOH, K₂CO₃ and KHCO₃ to carboxylic acid. Key. ● : KOH, □ : K₂CO₃, ○ : KHCO₃ temp : 50°C

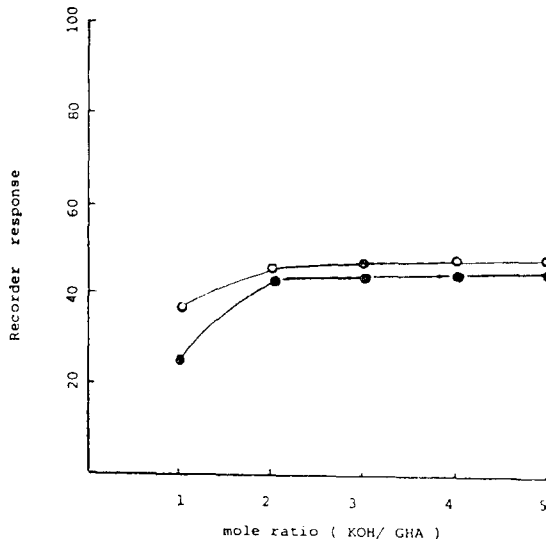


Fig. 4—Effect on the response by the concentration change of KOH and BATP.
○ : KOH, ● : BATP.

BATP의 농도를 3배 mole이 가장 적당하였다 (Fig. 4).

18-Crown-6-ether의 농도가 반응에 미치는 영향—GHA 메타놀 용액 0.1ml를 cap tube에 넣고 KOH 용액 3배 mole, BATP용액 3배 mole를 넣고 18-crown-6-ether 농도를 5배 mole에서 40배 mole까지 농도를 변화시키면서 상기 반응조작에 의해 반응성을 검토한 결과 그 mole비가

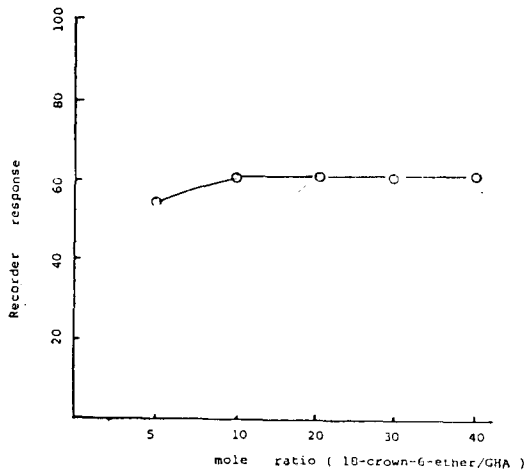


Fig. 5—Effect on the response according to the concentration change of 18-crown-6-ether.

10배 mole에서부터는 변화없이 일정하게 나타났다. 그러므로 본 실험에서는 20배 mole 정도에서 사용하였다 (Fig. 5).

반응온도 및 반응시간—유도체 반응조작에 적합한 반응온도 및 시간 조건을 찾기 위해서 GHA 메타놀용액 0.1ml에 KOH용액을 3배 mole에 해당하는 량을 넣고, 18-crown-6-ether는 20배 mole에 해당량을 넣어 반응을 시켰으며, 반응시간은 30분으로 하고, 온도의 변화를 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C로 변화시키면서 반응성을 비교 검

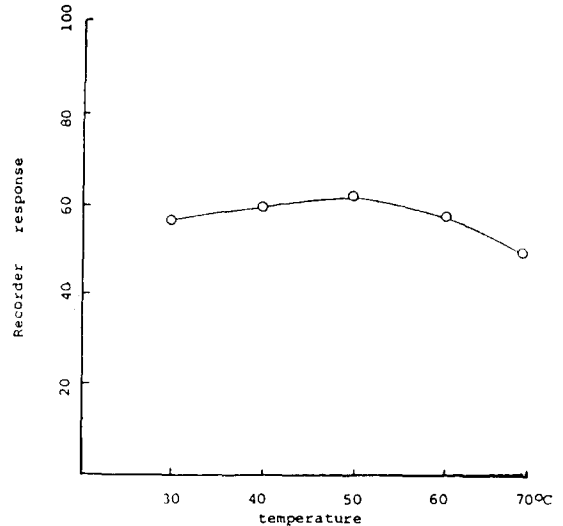


Fig. 6—Effect on the response according to the change of temperature.

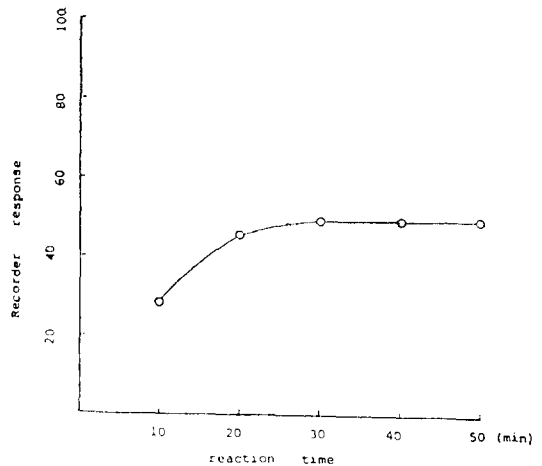


Fig. 7—Effect of reaction time on the response.

토한 결과 50°C가 적합한 온도임을 알았다(Fig. 6). 상기와 동일한 조작을 하여 반응온도를 50°C로 하고 반응시간을 10분, 20분등 10분간격으로 50분까지 변화시켜 가면서 각각의 흡광도를 측정하였다. 이 결과 30분 후부터는 반응이 완결되어 정점에 도달하였다. 그러므로 반응조건은 50°C에서 30분간이 가장 이상적인 반응조건이었다(Fig. 7).

반응용매가 흡광도에 미치는 영향—GHA 메타놀용액에 KOH 용액을 넣어 칼륨염으로 만든 후 methanol을 N₂ gas로 증발건고시키므로 반응에는 영향을 주지 않는다. 실제 반응용매로서 적합성을 검토하기 위하여 DMF, THF 및 acetonitrile을 사용하여 유도체화제인 BATP와 18-crown-6-ether를 용해시켜 비교 검토한 결과 acetonitrile을 사용할 때가 가장 흡광도가 높게 나타났으므로 반응용매로서는 acetonitrile을 택하여 본 실험에 사용하였다(Fig. 8).

GHA와 GHA-BATP ester에 의한 정량감도의 증가—GHA를 유도체화제인 BATP를 사용하여 반응시킨 것과 반응시키지 않은 GHA를 HPLC에 의해서 비교 검토하였다. GHA는 mobile

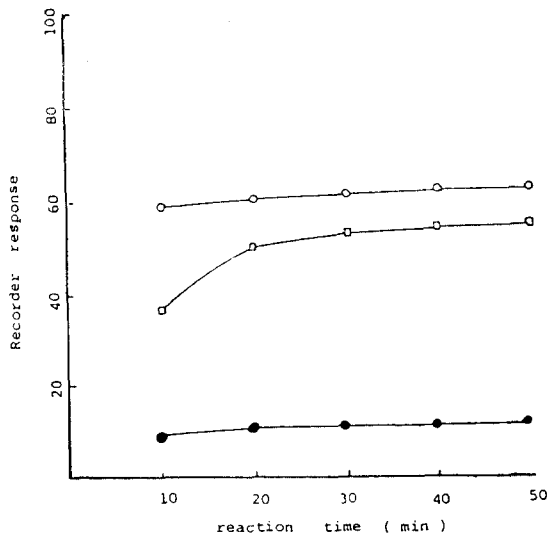


Fig. 8—Effect of solvent used in the extraction procedure.

Key. ○ : acetonitrile, □ : tetrahydrofuran
● : N, N-dimethylformamide
temp. : 50°C, cat. : KOH, crown-ether.

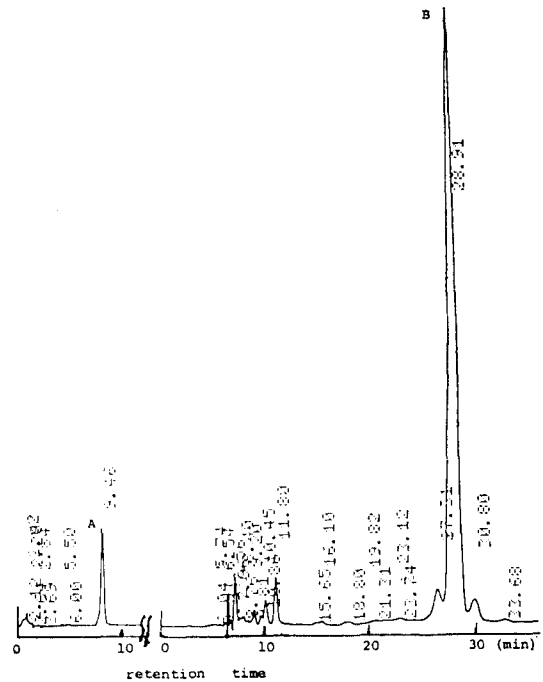


Fig. 9—Chromatogram of GHA and GHA-BATP ester. A : GHA (glycyrrhetic acid) : 254 nm, 70% CH₃CN B : GHA-BATP ester : 268nm, 100% CH₃CN.

phase를 70% acetonitrile로 하고 검출기는 UV 254nm에서 측정하였다. 시료는 10 nmol/ml되게 한 GHA 메타놀용액을 1ml 취하여 상기반응조작에 준해서 유도체를 만든 후 상기 HPLC조건에 준하여 분석하였다. 각각 10 μ l씩 injection하였다. 이때 peak면적을 비교하여 보면 약 10배 정도 유도체화제한 것이 peak면적이 증가되었다(Fig. 9).

검량선 작성—GHA메타놀용액을 적당량 취하여 메타놀용매로 희석하여 1, 2, 3, 4 μ g/ml 농도로 만들어 시료용액으로 하였다. 이액 1ml을 취하여 시험관에 넣고 반응조작법에 따라 반응시킨 후 acetonitrile를 가하여 최종액량을 2ml로 만들고 이액을 HPLC 측정조건하에서 측정하였다. 농도와 peak면적 사이에 양호한 직선성을 나타내었다(5~25ng, Fig. 10).

검출감도 glycyrrhetic acid의 정량—검출 시료메타놀용액 0.1ml를 취하여 cap tube에 넣고 KOH용액을 적당량 희석하여 3 μ g/ml으로 희

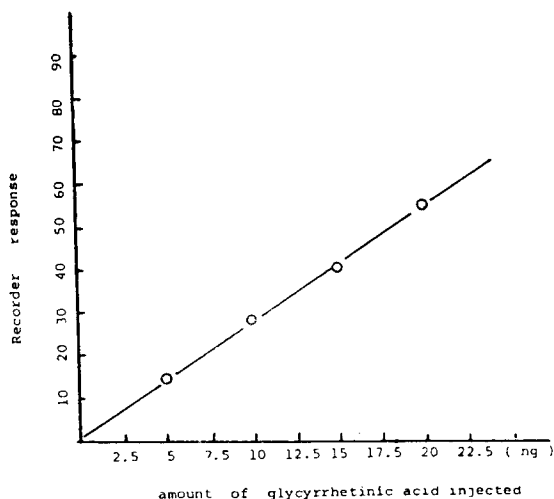


Fig. 10—Calibration curve of glycyrrhetic acid.

석시킨 후 이 액 1ml를 넣고, N_2 gas를 통하여 증발건조 시킨 후 여기에 18-crown-6-ether 용액을 적당량 희석하여 $160\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 0.5ml를 넣고 5분간 sonification시킨 후 BAP 용액을 적당량 희석하여 $12\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 0.5ml를 넣고 50°C 에서 30분간 반응시킨 후 HPLC 측정 조건하에서 측정하였다. 또한 감초시료용액 0.1ml를 취하고 여기에 glycyrrhetic acid의 양을 1, 2, $3\mu\text{g}$ 등을 각각 가하여 회수율을 측정하였다. 그 결과 회수율은 99% 정도 양호하게 나타났다(Table I).

Table I—Recovery of GHA to Licorice powder (n=5)

Assayed μg	Added (GHA) μg	Measured μg	Recovery (%)
4	1	5.1	102
4	2	5.9	98
4	3	7.1	101.4
4	4	7.8	97.5
4	6	9.8	98
Average			99.3%
S. D.			1.87

결 론

감초 성분인 glycyrrhetic acid를 BAP 유도 체화제를 사용하여 HPLC로 분석한 결과 KOH, 18-crown-6-ether 촉매하에서 비교적 간편한 방법으로, glycyrrhetic acid의 카르복실기에 대해 에스테르화가 짧은 시간내에 정량적으로 잘 진행되었으며, 에스테르화가 형성된 후에도 상온에서 안정하였다.

실제로 glycyrrhetic acid를 바로 HPLC로 측정하는 것보다 약 10배 정도 예민하였다. 이때 정량할 수 있는 감도는 0.008 AUFS에서 5~20 ng 범위에서 양호한 직선성을 나타냈으며, 최고 검출감도는 2ng 정도까지 검출이 가능하였다. 또한 생약인 감초를 세말로 만든 후 감초중에 함유한 glycyrrhizin을 가수분해하여 glycyrrhetic acid로 정량한 결과 다른 성분들이 거의 분리정량에 영향을 주지 않았으며, 이 경우 glycyrrhetic acid로서 회수율도 99.3% 정도로 양호하였다. 이상의 결과로 이 정량법은 glycyrrhetic acid나 감초를 함유한 제제의 품질관리에의 활용은 물론 그 감도로 미루어 보아 이러한 제제 복용 후의 생체시료 중의 glycyrrhetic acid의 정량법으로도 활용될 가능성이 시사되었다.

문 헌

- 1) Takino, Y. and Koshioka, M.: Quantitative Determination of Glycyrrhizin acid in Licorice Roots and Extracts by TLC-Densitometry. *Planta Medica*. **36**, 74 (1979).
- 2)昭和 48, 49年度 厚生科學研究報告: 薄層 크로마토그래프法. 生藥, 分析의技法 **333**, 341 (1978).
- 3) Kurono, G. and Sasaki, S.: Studies on the Quantitative Analysis of constituents in Crude Drugs by Thin Layer Chromatography (II). Studies on the Quantitative analysis of Glycyrrhizin in Licorice Root by Thin Layer Chromatography. *Yakugaku Zasshi* **90**, 497 (1970).
- 4) Namba, T., Yoshizaki, M., Tomimori, T., Tsuboi, M. and Kato, K.: Fundamental Studies on the

- Evaluation of the Crude Drug. (IV)¹⁾ Quantitative Analysis of Constituents in the Crude Drug by Rod-Thin-Layer Chromatography with FID (I)²⁾, Determination of Glycyrrhizin in Licorice Roots. *Yakugaku Zasshi* 95r, 809 (1975).
- 5) Nazaki, M., Tsurumi, K. and Fujimura, H.: Determination of Glycyrrhetic acid by Gas chromatography. *Yakugaku Zasshi* 90, 693(1970).
- 6) Ogawa, S., Yoshida, A.: Analytical Studies on the Active Constituents in crude drugs. (I). Determination of Glycyrrhizin in Glycyrrhizae Radix by High Speed liquid Chromatography. *Yakugaku Zasshi* 96, 122 (1976).
- 7) Ogawa, S., Yoshida, A. and Mitani, Y.: Analytical Studies on the active Constituents in Crude Drugs.(II). Determination of Glycyrrhizin in Pharmaceutical Preparations including Glycyrrhizae Radix by High Speed liquid Chromatography. *Yakugaku Zasshi* 96, 1488 (1976).
- 8) Akada, Y. and Tanase, Y.: High-Speed Liquid Chromatographic Determination of Glycyrrhizin in Licorice Roots and Extracts. *Yakugaku Zasshi* 96, 1035 (1976).
- 9) Akada, Y., Sakiya, Y., Kawano, S. and Adachi, S.: Rapid Estimation of Glycyrrhizin in Pharmaceutical Preparations by High Speed Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 26, 1240 (1978).
- 10) Yasuda, K., Shibuya, T., Nozaki, M., Tsurumi, K., Fujimura, H. and Kaneuchi, F.: Simultaneous Determination of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid in plasma by High Speed Liquid Chromatography (I). *Yakugaku Zasshi* 98, 1545 (1978).
- 11) Sakiya, Y., Akada, Y., Kawano, S. and Miyauchi, Y.: Rapid Estimation of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid in plasma by High-Speed Liquid Chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* 27, 1125 (1979).
- 12) Ichikawa, T., Ishida, S., Sakiya, Y. and Akada, Y.: High Performance Liquid Chromatographic Determination of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid in Biological Materials. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 3734 (1984).
- 13) Shimada, K., Sakaguchi, T., Sato, Y., Moridaira, H. and Omata, K.: Simultaneous Determination of Ephedrine and Glycyrrhizin in Human Breast Milk by High Performance Liquid Chromatography. *Yakugaku Zasshi* 104, 347 (1984).
- 14) Paik, N.H., Park, M.K. and Park, J.H.: Studies on Licorice in Drug Preparations(I). Determination of Glycyrrhizin and Glycyrrhetic acid by HPLC. *Yakhak Hoeji* 25, 1 (1981).
- 15) Habib, A.A.M., EL-Sebakhy, N.A., and Kadry, H.A.: New and simple Methylene blue Colorimetric Assay for Glycyrrhizin in Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* 68, 1221 (1979).
- 16) Lee, W.K., Chung, H.S. and Kim, B.K.: UV-HPLC Determination of Carboxyl group using 2-bromoacetyltriphenylene as a pre-labeling Reagent. *Yakhak Hoeji* 30, 311 (1986).