

메틸 5-히드록시 디나프토 [1, 2-2', 3'] 푸란-7, 12 디온 6-카복시레이트의 미량분석

박유미 · 장혜선 · 강경환 · 김경남 · 장성기 · 김박광*

서울대학교 약학대학

(Received June 4, 1993)

Micro-Analysis of Methyl 5-Hydroxydinaphtho[1, 2-2', 3'] furan-7, 12-dione-6-carboxylate

You Mie Park, Hae Seon Jang, Kyoung Hwan Kang, Kyung Nim Kim,
Seong Ki Jang and Bak-Kwang Kim[#]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 152-742, Korea

Abstract—UV and high performance liquid chromatographic methods for the quantitative analysis of methyl 5-hydroxy-dinaphtho [1, 2-2', 3'] furan-7, 12-dione-6-carboxylate(MHDDC) in urine and blood were developed. The correlation coefficients of the calibration curves of MHDDC in chloroform, methanol and dioxane solution were 0.999, 0.997 and 0.998, respectively. MHDDC was resolved within 15 min and had a detection limit of 2~5 ng at S/N=3 by using a reversed-phase column with two solvents (MeOH, HAc).

Keywords □ Methyl 5-hydroxy-dinaphtho[1, 2-2', 3']furan-7, 12-dione-6-carboxylate, *Paulownia tomentosa* stem, UV, HPLC, urine, blood.

Paulownia tomentosa Steud의 성분연구로는 푸란퀴논계 화합물이 건염염료로서 알려져 있으며,¹⁾ 이 푸란퀴논을 모핵으로 갖는 물질로서 dinaphtho [2, 1-2', 3']furan-8, 13-dione과 dinaphtho[1, 2-2', 3']furan-7, 12-dione,^{2,3)} 또 케놀화합물과 2, 3-dichloro-1, 4-naphthoquinone을 축합시켜 푸란퀴논 화합물을 합성한 논문,⁴⁾ 그외 catapol과 syringin,⁵⁾ aucubin과 확인되지 않은 iridoid glycoside류, coniferin, acteoside⁶⁻⁸⁾ 그리고 lignan인 paulownin, sesamin, (+)-piperidol,^{9,10)} methyl 5-hydroxy-dinaphtho[1, 2-2', 3']furan-7, 12-dione-6-carboxylate (MHDDC : C₂₂H₁₂O₆)를 분리,¹¹⁾ 구조확인,¹²⁾ 합성법¹³⁾ 및 물성¹⁴⁾ 등이 보고되어 있다.

본 연구는 MHDDC에 대한 계속적인 연구로서 이 물질에 대한 대사체 분석을 시도할 목적하에 뇨 및

혈액중의 미량 MHDDC를 흡광광도 및 HPLC방법을 이용하여 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기

시료물질인 메틸 5-히드록시 디나프토[1, 2-2', 3'] 푸란 7, 12-디온 6-카복시레이트 (MHDDC)는 이미 발표된 논문¹³⁾에 따라 합성을 하였다(mp 233~235 °C). HPLC에 사용한 메탄올은 Riedel-deHaen사의 HPLC용을 사용하였다. 뇨와 혈액은 건강한 성인으로부터 얻어 냉동 보관하였으며, 참오동나무는 1989년 경동시장 한약상에서 구입하였다.

사용기기로는 Shimadzu UV-2100 UV-visible recording spectrophotometer, 액체크로마토그래피는 Hitachi사의 L-6000 pump, L-6200 intelligent pump,

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

Hitachi L-4200 UV-VIS detector, Shimadzu c-R4A chromatopac Integrator 및 칼럼은 Hibar Lichrosorb RP-18 (250 mm×4 mm, 7 μm)를 사용하였다.

표준품 MHDDC의 정량

흡광광도법에 의한 정량—MHDDC의 클로로포름 용액, 메탄올용액 및 디옥산용액 농도를 각각 1×10^{-5} M ~ 2×10^{-4} M, $2 \sim 8 \times 10^{-5}$ M 및 $2 \sim 8 \times 10^{-5}$ M로 조제한 후 각 용액을 1 cm셀을 사용하여 흡광광도계로 각각의 최대 흡광파장 451 nm, 443 nm 및 440 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성하여 둔 검량선을 사용하여 검액중의 성분함량을 분석하였다.

그러나 이 경우에는 액성 등 반응조건에 따라 흡광도가 달라지므로, 본 실험에서는 반응조건에 영향을 받지 않는 수렴점에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한 후 이것을 사용하여 MHDDC를 정량하였다.

액체크로마토그래피법에 의한 정량—아래에 표시하여 둔 Table I의 조건하에서 정량하였다.

참오동나무 메탄올엑기스중 MHDDC의 정량

HPLC용 검액의 조제—MHDDC표준액의 조제는 실험실에서 합성한 MHDDC 1 mg을 메탄올 50 ml에 녹인 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 MHDDC의 표준액으로 하였다.

메탄올엑스 검액의 조제는 참오동나무줄기를 세절하여 50g을 정확히 달아 메탄올 500 ml를 넣고 70 °C에서 3회 환류추출한 액을 감압농축하여 메탄올에 녹여 100 ml로 표선을 맞추고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC용 검액으로 하였다.

HPLC에 의한 MHDDC 정량—참오동나무줄기의 메탄올엑기스중의 MHDDC를 Table I과 같은 조건하에서 HPLC를 이용하여 정량하였다.

노 및 혈액중의 MHDDC 정량

Table I—Analytical conditions of HPLC

Column	: Hibar Lichrosorb RP-18 (250 mm×4 mm, 7 μm)
Mobile phase	: MeOH : HAc buffer(pH 3.0)=87 : 13
Flow rate	: 1.0 ml/min
Aufs	: 0.01
Detection	: UV 254 nm
Injection volume	: 10 μl

노 및 표준액의 조제—노 및 증류수 1 ml에 각각 1, 2, 4, 8, 10 μg/ml의 MHDDC가 함유되도록 단계적으로 희석시킨 용액 각각 1 ml씩을 넣고 클로로포름 5 ml씩을 가하여 1분간 진탕하고 10분간 원심분리하였다. 수층을 제거하고 클로로포름층에 대해 소량의 무수 황산나트륨으로 탈수한 후 이를 취하여 감압건조하며 이 조작을 3회 반복하여 얻은 잔사를 1 ml의 메탄올에 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC용 노 및 표준액의 검액으로 하였다.

혈액시료액의 조제—혈액 1 ml에 각각 1, 2, 4, 8, 10 μg/ml의 MHDDC가 함유되도록 단계적으로 희석시킨 용액 각각 1 ml씩을 넣고 여기에 아세트나트릴 1 ml를 가하여 진탕하고 원심분리하여 얻은 상층액에 클로로포름 5 ml를 가하여 1분간 진탕한 후 10분간 원심분리하였다. 수층을 제거하고 클로로포름층에 대해 소량의 무수 황산나트륨으로 탈수한 후 이를 취하여 감압건조하고 이 조작을 3회 반복하여 얻은 잔사를 1 ml의 메탄올에 녹인 다음 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC용 혈액의 검액으로 하였다.

HPLC에 의한 MHDDC 정량—위의 방법대로 조제한 혈액, 노 및 표준액의 검액을 Table I과 같은 조건에 따라 HPLC를 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

MHDDC 클로로포름용액 농도를 1×10^{-5} M ~ 2×10^{-4} M로 조제한 후 각 클로로포름용액을 1 cm셀을 사용하여 흡광광도법으로 최대 흡광파장 451 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 및 2.0×10^{-4} M 클로로포름용액 일 때 흡광도는 각각 0.194, 0.396, 0.867, 1.661, 3.226이며 상관계수(r)는 0.999로서 양호한 직선성을 나타내었다. 메탄올용액의 경우에는 농도가 2, 4, 6, 8×10^{-5} M 일 때 최대 흡광파장 443 nm에서의 흡광도가 각각 0.07, 0.197, 0.299, 0.394로서, 상관계수(r)는 0.999였으며, 그리고 디옥산용액의 경우에는 농도가 2, 4, 6 및 8×10^{-5} M 일 때 최대 흡광파장 440 nm에서의 흡광도는 각각 0.141, 0.281, 0.424, 0.563였으며, 상관계수(r)는 0.999로서 모두 양호한 직선성을 나타내었다. 이때 사용한 blank용액은 각각 클로로포름, 메탄올, 디옥산이었다.

그러나 이 경우에는 액성 등 반응조건에 따라 흡광도가 달라지므로, 본 실험에서는 반응조건에 영향을

Table II—Absorbance of organic at isobestic point

Solution	Iso. Point	Concentration	Absorbance	r
MeOH	497 nM	2×10^{-5} M	0.039	0.999
		4×10^{-5} M	0.073	
		6×10^{-5} M	0.108	
		8×10^{-5} M	0.141	
Dioxane	495 nm	1×10^{-4} M	0.146	0.997
		2×10^{-4} M	0.292	
		3×10^{-4} M	0.442	
		4×10^{-4} M	0.586	

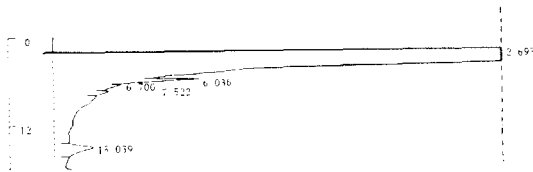


Fig. 1—HPLC chromatogram of *Paulownia tomentosa* Stem.

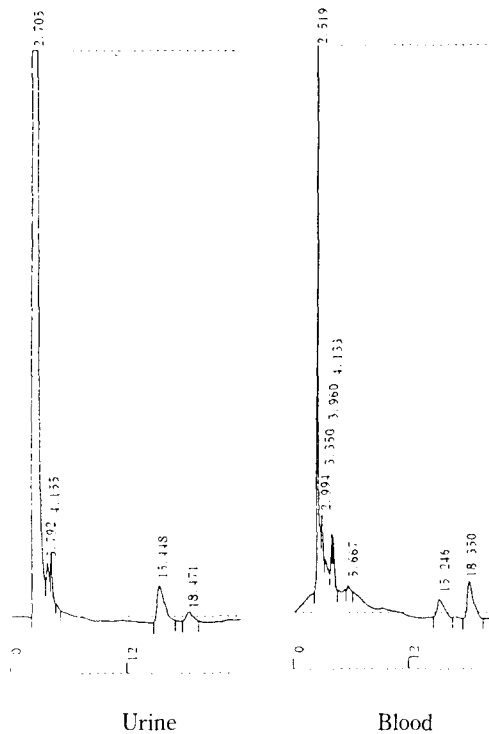


Fig. 2—HPLC chromatogram of MHDCC in Urine and Blood.

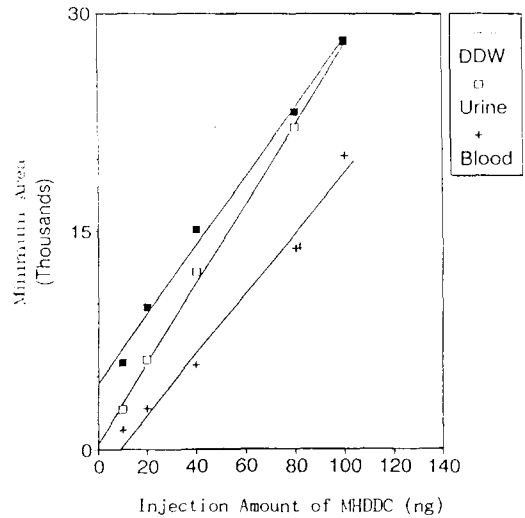


Fig. 3—Standard calibration curves of MHDCC in urine, blood and DDW solution.

받지 않는 수렴점에서의 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한 후 이것을 사용하여 MHDCC를 정량하였다.

즉 메탄올용액의 농도가 $2, 4, 6$ 및 8×10^{-5} M 일 때 수렴점 497 nm에서의 흡광도 및 상관계수(r), 그리고 디옥산용액의 농도가 $1, 2, 3$ 및 4×10^{-4} M 일 때 수렴점 497 nm에서의 흡광도와 상관계수(r)를 Table II에 표시하였다. 이 검량선을 사용하여 시료 용액중의 성분함량을 분석하였다.

그리고 HPLC를 이용하여 역상 칼럼과 MeOH : HAc buffer(pH 3.0)=87 : 13 용매조건하에서 MHDCC표준품의 검량선을 작성한 결과 상관계수 0.999로서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 같은 조건하에서 참오동나무 메탄올엑스 중 MHDCC를 정량한 결과 그 함량은 0.0097%이었다(Fig. 1).

뇨 및 혈액중 MHDCC의 HPLC분석은 Table I의 조건하에서 Fig. 2와 같이 MHDCC의 피크가 15분대에 용리되었으며, 뇨 및 혈액시료의 경우에도 방해없이 분리할 수 있었다. 그리고 뇨, 혈액 및 증류수에 함유된 MHDCC표준함량에 대한 검량선은 Fig. 3과 같이 상관계수가 각각 0.993, 0.999, 0.992로서 양호한 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 S/N=3에서 2~5 ng이었다.

이상의 결과들은 이 물질에 대한 중요한 정량방법으로서, 특히 MeOH : HAc buffer(pH 3.0)=87 : 13의

이동상으로 HPLC분석을 행하므로서 간편하게 극미량까지 정량할 수 있어 이 물질의 대사체 분석 등에서 널리 응용되리라 사료된다.

감사의 말씀

이 연구는 1992년도 서울대학교 신의약품 개발연구센터 연구비 일부로 수행되었음. 이 연구를 수행함에 있어서 혈액을 제공하여 준 김종국 교수에게 심심한 감사를 드린다.

문헌

- 1) Tilak, B. D. and Venkiteswaran, M. R.: Benzobisnaphthofuran) Quinones. *J. Sci. Ind. Res.* **16B**, 400 (1957).
- 2) Walker, M. S., Miller, R. L. and Kuder, J. E.: The emission spectra of dinaphtho[2, 1-2', 3']furan-8,13-dione and dinaphtho[1, 2-2', 3']furan-7, 12-diones. *J. Phy. Chem.* **76**, 2240 (1972).
- 3) Walker, M. S., Miller, R. L. and Kuder, J. E. and Miller, R. L.: The absorption spectra of dinaphtho [2,1-2', 3']furan-8, 13-dion and dinaphtho[1, 2-2', 3']furan-7, 12-diones. *J. Phys. Chem.* **75**, 3257 (1971).
- 4) Seiichi, I. and Makoto, T.: Synthesis of dibenzofuran-type and dinaphthofuranquinone-type fused furans. *Nippon Kagaku Zasshi* **5**, 743 (1988).
- 5) Yoneiti, K. and Sawada, H.: Constituents of the bark of *Paulownia tomentosa* Steud. *Yakugaku Zasshi* **79**, 1226 (1959).
- 6) Hegnauer, R. and Kooiman, P.: *Planta Med.* **33**, 1 (1978).
- 7) Adriani, C., Bonini, C., Iavarone, C. and Trogolo, C.: Isolation and characterization paulownioside, a new highly oxygenated iridoid glucoside from *Paulownia tomentosa*. *J. Nat. Prod.* **44**, 739 (1981).
- 8) Sticher, O. and Lahlub, M. F.: *Planta Med.* **46**, 145 (1982).
- 9) Takahashi, K., Tanabe, Y., Kobayashi, K. and Nakagawa, N.: Studies on constituents of medical plant (4), chemical structure of paulownin, a component of wood of *Paulownia tomentosa* Steud. *Yakugaku Zasshi* **83**, 1101 (1963).
- 10) Ina, H., Ono, M., Sashida, Y. and Iida, H.: (+)-piperitol from *Paulownia tomentosa*. *Planta Med.* **53**, 504 (1987).
- 11) Park, Y. M., Jang, S. K., Kim, Y. S. and Kim, B. K.: The constituents of *Paulownia tomentosa* Stem. *Yakhak Hoeji* **35**, 301 (1991).
- 12) Park, I. Y., Kim, B. K. and Kim, Y. B.: Constituents of *Paulownia tomentosa* Stem(III). *Arch. Pharm. Res.* **15**(1), 52 (1992).
- 13) Jang, S. K., Park, Y. M., Kim, Y. S., Kang, K. H., Kim, Y. S. and Kim, B. K.: Study on constituents of *Paulowenia tomentosa* Stem(II). *Yakhak Hoeji* **35** (6), 483 (1991).
- 14) Jang, H. S., Park, Y. M., Kang, K. H., Woo, Y. A., Park, J. H. and Kim, B. K.: Physico-chemical properties and mechanism of color change of methyl 5-hydroxy-dinaphtho [1, 2-2', 3'] furan-7, 12-dione-6-carboxylate. *Yakhak Hoeji* **37**(2), 198s (1993).