

HPLC를 이용한 생체 시료중의 새로운 플라보노이드 유도체인 DA-6034의 분석

이종진[#] · 손미원 · 유무희 · 장민선 · 김원배 · 이강춘*

동아제약 연구소, *성균관대학교 약학대학

(Received February 2, 1998)

Analysis of DA-6034, a New Flavonoid Derivative in Biological Fluids by HPLC

Jong Jin Lee[#], Miwon Son, Moohi Yoo, Min Sun Jang,
Won Bae Kim and Kang Chun Lee*

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., Kyunggi 449-900, Korea

[#]College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract—A high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of DA-6034 in biological fluids using internal standard. Plasma containing DA-6034 and internal standard was extracted by liquid-liquid extraction at an acidic pH. After evaporation of the organic layer, the drug and internal standard were reconstituted with mobile phase and injected into the column. They were separated by high performance liquid chromatography on inertsil ODS II column at 334 nm. The detection limit of DA-6034 in plasma was 0.02 µg/ml. In this method, the range of recovery and coefficients of variation were 96~110% and 0.40~3.78%, respectively. There was no interference from endogenous substances. Urine and bile were analysed using the deproteinization method and the detection limit of DA-6034 was 1 µg/l.

Keywords □ DA-6034, flavonoid derivative, high performance liquid chromatography.

DA-6034(Fig. 1)는 동아제약에서 합성한 새로운 flavonoid 유도체로서 강력한 장질환 억제작용을 나타내는 물질이다. flavonoids 화합물은 저분자량으로 과일이나 야채 및 음료수등에 폭넓게 존재하며 수많은 유도체가 알려져 있다. 이들 화합물은 항균작용(anti-microbial activity), 항바이러스 작용(anti-viral activity), 혈관계 조절작용(vascular system modulating activity), 간보호작용(liver protective activity), 항염증 및 항알러지 작용(anti-inflammatory and anti-allergic activity), 항암작용(anti-tumor activity), 항산화작용(anti-oxidant activity) 등 다양한 생물활성들이 보고되고 있으며, 작용기전 또

한 활발히 연구되고 있다.

염증성 장질환은 특발성, 비특이성 염증성 질환이며 크게 2개의 질환, 즉 궤양성 장질환(Ulcerative colitis)과 크론씨병(Crohn's disease)이 있다. 발병률이

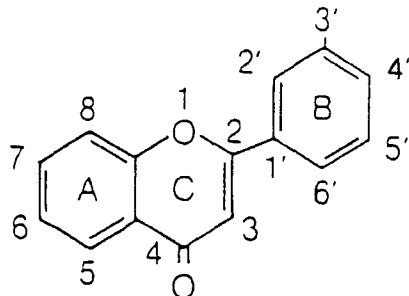


Fig. 1 — Basic structure of DA-6034.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-970-1309 (팩스) 02-975-3231

높은 질환은 아니지만 재발율이 높은 만성 난치성 질환으로서 거의 평생에 걸친 장기간의 치료를 필요로 하는 질환이다. 염증성 장질환은 지난 수십년동안 병인에 대한 활발한 연구가 이루어져 왔으며, 장의 특수 면역체계에 대한 이해가 높아지면서 면역학적 이상에 의해 매개되는 질환으로 알려지고 있다.

본 실험에서는 DA-6034의 생체내 거동 및 배설을 연구하는데 필요한 생체시료중의 약물의 정량법을 high performance liquid chromatography (HPLC)를 통하여 확립하고자 하였으며, DA-6034를 흰쥐에 정맥 투여한 후 얻은 혈장, 뇨 및 담즙을 본 실험방법에 따라 정량하였다.

실험방법

시료 및 시약 - DA-6034와 내부 표준물질로 사용한 DA-6017은 동아제약(주) 연구소에서 합성한 것을 사용하였으며, sodium methanesulfonate는 Aldrich사에서 구입하였다. 내부 표준물질로 사용된 DA-6017은 DA-6034의 A ring에 1개의 methoxyl기가 추가된 flavonoid 유도체이다. Acetonitrile은 Merck사의 HPLC grade 시약을 사용하였으며, ethyl acetate는 Showa사에서 구입하였다. 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

기기 및 측정조건 - HPLC 장치는 Eldex사의 Model 9600 ternary gradient pump, Reodyne injector, Linear UVIS200 detector, Hitachi D-2500 integrator를 사용하였다. 칼럼은 Inertsil ODS-II (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)를 사용하였다. 이동상으로는 5 mM sodium methanesulfonate/10 mM KH₂PO₄ (pH 2.5)와 acetonitrile (7:3, v/v)을 사용하였다.

표준용액 및 시료용액의 조제 - DA-6034를 증류수에 용해하여 2 mg/ml로 조제한 것을 보존용액으로 하고, 증류수로 적당히 희석한 후에 모두 6개의 표준용액을 만들었다. 각 표준용액의 농도는 2, 10, 20, 100, 200, 1000 μ g/ml로 하였다. 흰쥐의 혈장 100 μ l에 표준용액을 가하여 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10 μ g/ml의 혈장시료 용액을 만들었다. 흰쥐의 뇨 및 담즙 100 μ l에 표준용액을 가하여 10, 50, 100 μ g/ml의 시료용액을 만들었다.

혈장중의 약물의 안정성 - 흰쥐, dog 및 human 혈장 1 ml에 DA-6034 (200 μ g/ml) 50 μ l를 가하고 경시적으로 100 μ l씩 취하여 혈장시료 처리방법으로 정량

하였다.

추출과정중의 약물의 안정성 - DA-6034의 농도가 10 μ g/ml인 흰쥐 혈장에 동량의 0.1N-HCl을 혼화하여 실온에 방치한 후, 경시적으로 100 μ l를 취하고 2.5배의 acetonitrile를 가하여 제단백한 후, 혈장중의 약물의 농도변화를 관찰하였다. 이동상중에서의 약물의 안정성을 확인하기 위하여 DA-6034의 농도가 10 μ g/ml인 이동상을 실온에 방치하면서 약물의 농도변화를 관찰하였다.

생체시료의 처리 - 흰쥐의 혈장 100 μ l에 0.1N-HCl 용액 100 μ l, 내부 표준액 (DA-6017, 1 μ g/ml) 100 μ l 및 ethyl acetate 600 μ l를 넣고 혼화한 후, 10,000 rpm에서 3분간 원심분리 하였다. 유기층 500 μ l를 취하여 N₂ gas로 건조 시킨 후, 이동상 200 μ l를 가하여 녹인 후 100 μ l를 HPLC에 주입하였다(Fig. 2). 뇨 및 담즙시료에 내부 표준물질(5 μ g/ml)을 함유한 메탄올 용액을 5배 가하여 혼화, 원심분리한 후, 상등액 10 μ l를 HPLC에 주입하였다. 이때의 HPLC 분석조건은 Table I에 제시하였다.

실험결과 및 고찰

생체시료 및 추출과정중의 안정성 - DA-6034의 흰쥐, dog 및 human 혈장에서의 안정성을 측정된 결과,

100 μ l rat plasma
100 μ l 0.1N-HCl
100 μ l internal standard (1.0 μ g/ml, DA-6017)
600 μ l ethyl acetate

vortex (1 min)
centrifuge (10,000 rpm \times 3 min)

organic layer (500 μ l)

N₂ dry
mobile phase (200 μ l)

HPLC injection (100 μ l ml)

Fig. 2 - Extraction method of DA-6034.

Table I—Analytical condition of HPLC

① Column : Inertsil ODS II (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)
② Mobile phase : 5 mM sodium methanesulfonate/ 10 mM KH ₂ PO ₄ (pH 2.5), acetonitrile=70, 30 (v/v)
③ Wavelength : UV 334 nm
④ Flow rate : 1.0 ml/min
⑤ Injection volume : 100 μ l
⑥ Temperature : Ambient Temp.

Table II—Response factors and recoveries of DA-6034 at various concentrations in rat plasma using the extraction method

Concentration (μ g/ml)	Response factor ^a	C.V. ^b (n=3)	Recovery ^c (%)
0.02	0.944 \pm 0.0173	1.84	96
0.1	0.927 \pm 0.0350	3.78	100
0.2	0.986 \pm 0.0145	1.47	108
1	1.02 \pm 0.0824	0.81	109
2	1.05 \pm 0.0042	0.40	110
10	1.01 \pm 0.0211	1.92	107

^a (Drug peak height divided by its concentration)/(internal standard peak height); mean \pm S.D.

^b Coefficients of variation, (S.D./mean) \times 100

^c Relative recovery compared with water.

24시간 이상 안정하였다. DA-6034는 상온에서 동량의 원위 혈장과 0.1N-HCl 혼합액에서 3시간 이상 안정하였으며, 이동상에서도 3시간 이상 안정하였다. 이와같은 결과를 볼 때 DA-6034는 추출과정중에서 안정한 것으로 사료된다.

혈장중 약물의 정량 - DA-6034를 ethyl acetate의 유기층으로 추출한 후, 역상컬럼(Inertsil ODS-II), 5 mM sodium methanesulfonate/10 mM KH₂PO₄

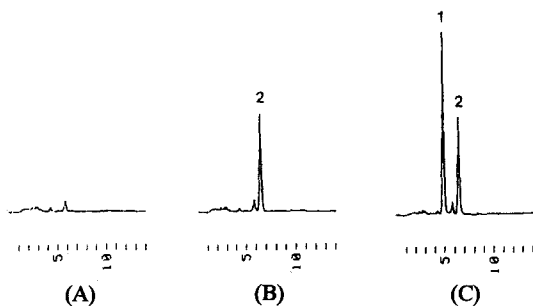


Fig. 3—Chromatograms of blank rat plasma (A), rat plasma spiked with an internal standard (B), and plasma obtained at 15 min after intravenous administration of DA-6034 (5 mg/kg) to rats (C). Peaks: 1=DA-6034; 2=internal standard (1 μ g/ml).

Table III—Response factors and recoveries of DA-6034 at various concentrations in rat urine and bile using the deproteinization method

Concentration (μ g/ml)	Response factor ^a	C.V. ^b (n=3)	Recovery ^c (%)
Urine			
10	0.0124 \pm 0.00034	2.75	95
50	0.0124 \pm 0.00058	4.74	97
100	0.0120 \pm 0.00043	3.55	97
Bile			
10	0.0132 \pm 0.00041	0.81	100
50	0.0128 \pm 0.00012	0.40	101
100	0.0124 \pm 0.00017	1.36	99

^a(Drug peak height divided by its concentration)/(internal standard peak height); mean \pm S.D.

^bCoefficients of variation, (S.D./mean) \times 100

^cRelative recovery compared with water.

(pH 2.5)와 acetonitrile(7:3)의 이동상을 이용하여 334 nm에서 간섭물질의 영향없이 약물을 정량할 수 있었다. 이 조건에서의 DA-6034와 내부 표준물질의 머무름시간은 각각 5.0, 6.7분이었으며, 정량한계는 0.02 μ g/ml(signal to noise=3) 이었다. 혈장시료에 첨가한 DA-6034의 회수율 시험을 0.02~10 μ g/ml의 농도에서 3회 시험한 결과, 상대표준편차는 0.40~3.78% 범위 이내이고 회수율은 96~110%의 양호한 결과를

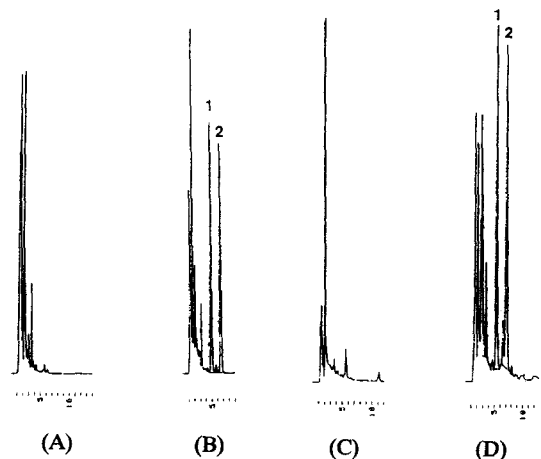


Fig. 4—Chromatograms of blank rat urine (A), rat urine collected between 0~24 hr after intravenous administration of DA-6034 (5 mg/kg) to rats (B), blank rat bile (C), and rat bile collected between 3~4 hr after intravenous administration of DA-6034 95 mg/kg to rats (D). Peaks: 1=DA-6034; 2=Internal standard (5 μ g/ml).

얻었다(Table II). 이와같은 추출법을 이용하여 DA-6034를 정맥투여한 흰쥐의 혈장을 정량하였다(Fig. 3). 혈장중의 DA-6034 농도는 1.92 $\mu\text{g/ml}$ 였다.

노 및 담즙중의 약물의 정량 - 노 및 담즙시료에 내부 표준물질을 함유한 메탄올 용액을 가하여 제단백한 후 정량한 결과, 상대표준편차는 4.74% 이하였고 회수율은 95~101%의 양호한 결과를 얻었다(Table III). 이때의 정량한계는 1 $\mu\text{g/ml}$ (signal to noise=3) 이었다. 이와같은 제단백법을 이용하여 DA-6034를 정맥투여한 흰쥐의 노 및 담즙을 정량하였다(Fig. 4). 노중의 DA-6034 농도는 6.12 $\mu\text{g/ml}$ 였으며, 담즙중의 DA-6034 농도는 8.45 $\mu\text{g/ml}$ 였다.

결 론

1. 혈장중에 함유된 DA-6034를 유기층으로 이행시켜 간섭물질의 영향없이 HPLC로 정량하였다. DA-6034는 0.02~10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 양호한 정량성을 나타내었으며, 정량한계(signal to noise=3)는 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 이와같은 정량방법은 혈장중의 약물 정량 및 약물의 약동력학에 활용할 수 있으리라 사료된다.

2. 노 및 담즙시료를 내부 표준물질을 함유한 메탄올 용액을 가하여 제단백한 후 정량하였다. 이와같은 정량 방법은 약물의 노 및 담즙중 배설량의 측정에 활용할 수 있으리라 사료된다.

3. DA-6034는 혈장에서 안정하였으며, 추출조건에서도 안정한 것으로 확인되었다.

감사의 말씀

이 논문은 경기의약센터의 연구비에 의하여 연구되

었습니다.

문 헌

- 1) N. P. Das : Studies on flavonoid metabolism. *Biomedical pharmacology*, **20**, 3435 (1971).
- 2) J. galvez, M. E. Crespo and J. Jimenez : Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**, 157 (1993).
- 3) I. Ueno and N. Nakano : Metabolic fate of [^{14}C] quercetin in the ACI rat. *Japan. J. Exp. Med.* **53**, 41 (1983).
- 4) D. Cova and L. D. Angelis : Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *International J. Clin. Pharm., therapy and toxicology* **30**, 29 (1992).
- 5) J. Oustrin, M. J. Frauran and L. Commanay : A pharmacokinetic study of 3H-Diosmine. *Drug Res.*, **27(II)**, 9, 1688 (1977).
- 6) A. A. Franke and L. J. Custer : High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. *J. Chromatogr.* **662**, 47-60 (1994).
- 7) P. G. Pietta, C. Gardana, P. L. Mauri, R. Maffei-Facino and M. Carini : Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginko biloba extract. *J. Chromatogr.* **673**, 75 (1995).
- 8) S. J. Konturek and T. Radecki : Antiulcer and gastroprotective effects of colon, a synthetic flavonoid derivative of sophoradin. *J. Pharmacol.* **125**, 185 (1986).