

2-Bromoacetyl-6-methoxynaphthalene 을 형광유도체화제로 HPLC 와 SPE 를 이용한 생약제제 중 Ursodeoxycholic acid 의 정량

진창화 · 임수희 · 이기진 · 심형섭 · 조의환* · 염정록#

중앙대학교 약학대학, *삼진제약주식회사

(Received October 30, 2002; Revised November 25, 2002)

Determination of Ursodeoxycholic Acid in Crude Drug Formulations by HPLC and SPE Using Selective Pre-column Derivatization with 2-Bromoacetyl-6-methoxynaphthalene

Chang-Hwa Jin, Su-Hee Lim, Ki-Jin Lee, Hyeong-Sup Sim, Eui-Hwan Cho* and Jeong-Rok Youm#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea

*Samjin Pharmaceutical Co., Ltd, Seoul, Korea

Abstract — A simple and sensitive high performance liquid chromatographic method to quantitate ursodeoxycholic acid in crude drug pharmaceuticals was investigated. Ursodeoxycholic acid react with 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene (Br-AMN) in the presence of triethylamine to form highly fluorescent derivative. The derivatization procedure was performed at 70°C and completed within 30 min. The optimal wavelength of the fluorescence detector are λ_{ex} =300 nm and λ_{em} = 460 nm. The LOD of the ursodeoxycholic acid was 25 ng/ml based on the S/N=3, and the LOQ was 80 ng/ml based on S/N=10. Crude drug pharmaceuticals pretreated by solid phase extraction (Sep-pak C₁₈ cartridge) which were shown very good separation and recovery values for the compound.

Keywords □ Ursodeoxycholic acid, 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene, HPLC, solid phase extraction, pre-column derivatization, crude drug formulations.

곰류와 누투리아(남미산 물개의 일종) 담즙에서 분리된 ursodeoxycholic acid(이하 UDCA로 함)는 대표적인 담즙산으로 간 혈류 증가작용과 미세담도를 통한 노폐물 배설작용, 이담작용, 지방흡수 촉진작용 등과 같은 다양한 약리작용¹⁾을 나타내며 간장 질환 치료제 및 소화제에 많이 사용되고 있고, 제형도 정제, 캡셀, 액제 등 다양하여 각국의 약전 및 문헌에 다양한 정량법이 소개되어 있다.

대한약전²⁾이나 영국약전³⁾ 등에서는 중화적정법을 적용하고 있고 미국약전⁴⁾에서는 굴절률검출기를 이용하거나 UV검출기를 이용하여 HPLC로 정량하고 있다.

그러나 적정법은 원료나 일부제제에 제한적이고, 굴절률검출기를 이용한 정량법은 미량을 포함한 제제에서는 검출감도가 낮아 정량에 어려움이 있고, UV 검출기를 이용한 방법은 UDCA

가 UV영역에서 흡광계수가 작기 때문에 미량이 들어있는 제제나, UV영역에서 강한 흡수를 하는 생약 등이 들어있는 제제의 경우에는 제한적일 수밖에 없다. 한편 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene,^{5,6)} 1-bromoacetylpyrene,⁷⁾ 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin⁸⁾ 등의 유도체시약으로 유도체를 만들어 UV나 형광검출기를 이용하여 HPLC로 정량하는 방법 등이 보고된 바 있고, 담즙산-특이효소(3 α -hydroxysteroid dehydrogenase)를 칼럼에 고정시켜 형성된 NADH를 bioluminescence로 측정하는 post-칼럼법들도 보고된 바 있다.⁹⁻¹¹⁾

저자 등은 Sep-Pak C₁₈ cartridges를 이용하여 생약소화억제를 대상으로 생약제제의 특성상 강한 흡수성을 갖는 물질들과 부형성분 특히 당류 등을 효과적으로 제거하여 시료를 전처리하고 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene(이하 Br-AMN으로 함)으로 UDCA를 형광유도체화하고 HPLC-형광검출기를 이용하여 생약소화억제 중에서 정량법을 검토하여 좋은 결과를 얻었고, 부수적으로 기존의 방법¹²⁾보다 Br-AMN의 수율을 높인 합성법¹³⁾을 얻었다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5601 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) youmjr@cau.ac.kr

실험방법

시약 및 시료 - 시판중인 S사의 C제품과, I사의 W제품(UDCA, 20 mg/75 ml액)을 시료로 사용하였다. UDCA는 USP 표준품을 사용하였고 내부표준물질은 sodium valporate(Welding GMBH & Co, Germany)를 Br-AMN으로 유도체화하여 사용하였다. 2-acetyl-6-methoxynaphthalene은 Janssen Chemica(GR, Belgium)에서 구입하였고, 아세트니트릴, 메탄올, 물은 Brudick & Jackson(HPLC grade, USA), 트리에틸아민, 무수에틸에테르, 무수염화알루미늄, 브롬은 시판 특급시약을 사용하였다.

칼럼크로마토그래피용 실리카 겔은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck, No 7734 Germany)을 사용하였으며, Sep-Pak C₁₈ cartridge는 Waters(Milford, Mass., USA)에서 구입하였다.

기기 - HPLC는 Hitachi사(Japan)의 제품을 사용하였고, 이 시스템은 L-6200 intelligent pump, AS-4200 auto sampler, F-1050 fluorescence detector, D-2500 Chromatointegrator, H-655A column oven으로 구성되었으며, 분석용 칼럼은 Capcell-pak C₁₈ UG 120Å(150×4.6 mm, i.d., Shiseido, Japan)을 사용하였다.

형광광도계는 Hitachi F-2000, ¹H-NMR은 Bruker AMX 500 MHz, MS는 Finnigan MAT95S(Bremen, Germany), IR은 FTIR-8201 Shimadzu(Japan), 반응기는 Pierce chemical company (USA)의 Reacti-Therm III을 사용하였다.

형광유도체화 시약 Br-AMN의 합성(Fig. 1)

0°C에서 250 ml 플라스크에 2-acetyl-6-methoxynaphthalene (6 g, 30 mmol)과 무수 에틸에테르(50 ml)를 가하고, 무수 염화알루미늄(0.1 g, cat)을 가하였다. 반응물을 교반하면서 브롬(5.6 g, 35 mmol)을 서서히 가한 다음 반응물을 1시간동안 교반하고, 생성된 고체를 여과하고 칼럼 크로마토그래피법(*n*-hexane : ethyl acetate = 8 : 1)으로 정제하여 Br-AMN(6.5 g, 78%)을 얻어 구조 및 분자량 등을 확인하였다.

¹H NMR(CDCl₃) δ: 3.96(s, 3H, -OCH₃), 4.55(s, 2H, -CH₂Br), 7.16(t, 1H, naphthalene CH), 7.22(dd, 1H, CH), 7.79(d, 1H, CH), 7.87(d, 1H, CH), 8.00(dd, 1H, CH), 8.44(s, 1H, CH).

MS(m/z, %): 278(100), 200(23), 185(100), 157(36), 128(45).

IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 1682(ketone, CO), 1620, 1481(aromatic, C=C).

UV λ_{max}: CH₃CN(nm) : 316(ε=1.35×10⁴)

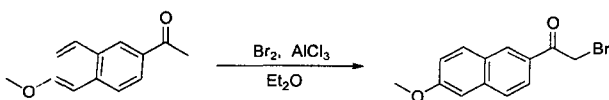


Fig. 1 - Synthesis of 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene.

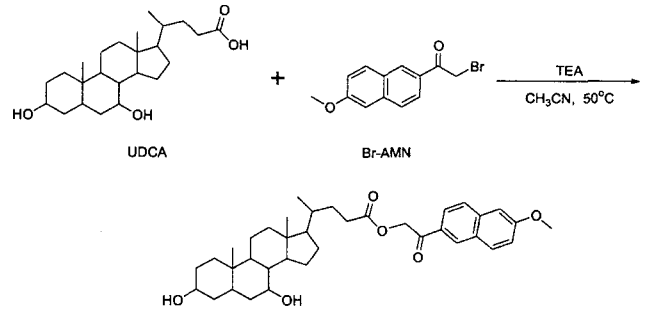


Fig. 2 - Fluorescent derivatization of UDCA.

표준물질의 합성(UDCA의 6-methoxynaphthacylester 화합물)

50°C에서 50 ml 플라스크에 UDCA(785 mg, 2 mmol)와 CH₃CN 20 ml를 가하여 녹이고 Br-AMN(278 mg, 1 mmol)를 가하고 교반하면서 트리에틸아민 1 ml를 가한다. 반응혼합물을 1시간동안 교반하고 식힌 후 감압 농축하여 CH₃CN을 제거하고 칼럼 크로마토그래피법(*n*-hexane : ethyl acetate = 8 : 1)으로 정제하여 UDCA의 6-methoxynaphthacylester 화합물(472 mg)을 얻어(Fig. 2) 구조 및 분자량 등을 확인하였다.

¹H NMR(CDCl₃) δ: 0.69~2.60 (UDCA), 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 5.45(s, 2H, -CH₂O), 7.16(d, 1H, naphthalene CH), 7.22(dd, 1H, CH), 7.79(d, 1H, CH), 7.85(d, 1H, CH), 7.95(d, 1H, CH), 8.36(s, 1H, CH).

MS(m/z, %): 590(100), 200(16), 185(100), 157(12).

IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 3393(OH), 2932, 2864(aliphatic, C-H), 1744(ester, CO-O), 1695(ketone, CO)

UV λ_{max}: CH₃CN(nm) : 312(ε=1.35×10⁴)

Fluorescence λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 460 nm

내부표준물질의 합성(Valproic acid의 6-methoxynaphthacylester 화합물)

위의 표준물질의 합성과 같은 방법으로 sodium valproic (332 mg, 2 mmol)로부터 valproic acid의 6-methoxynaphthacylester 화합물(270 mg)을 얻어 구조 및 분자량 등을 확인하였다.

¹H NMR(CDCl₃) δ: 0.93(t, 6H, -CH₂CH₂CH₃), 1.41(m, 4H, -CH₂CH₂CH₃), 1.50(m, 2H, -CH₂CH₂CH₃), 1.72(m, 2H, -CH₂CH₂CH₃), 2.57(m, 1H, -CH-), 3.95(s, 3H, OCH₃), 5.44(s, 2H, -CH₂O-), 7.15(s, 1H, naphthalene CH), 7.21(dd, 1H, CH), 7.78(d, 1H, CH), 7.83(d, 1H, CH), 7.94(d, 1H, CH), 8.36(s, 1H, CH).

MS(m/z, %): 342(13), 185(100), 180(19), 157(10)

IR ν_{max}^{KBr} (cm⁻¹): 2940(aliphatic, C-H), 1738(ester, CO-O), 1699(ketone, CO), 1622, 1485(aromatic, C=C).

UV λ_{max}: CH₃CN(nm) : 312(ε=1.34×10⁴)

표준액 및 형광유도체화 시액의 조제

UDCA 39.26 mg을 MeOH 5 ml에 녹이고 CH₃CN을 가하여 100 ml로 하였다. 이 용액을 10배 희석하여 표준원액으로 한다. 표준원액과 내부표준원액을 10배 희석하여 표준액으로 한다.

Br-AMN 28 mg을 CH₃CN로 녹여 0.14 mg/ml로하여 형광유도체화 시액으로 사용한다.

내부표준액의 조제

Valproic acid의 6-methoxynaphthacyl ester 40 mg을 CH₃CN을 가하여 100 ml로 하였다. 이 용액을 10배 희석하여 내부표준원액으로 한다(0.4 µg/ml).

검액의 전처리 및 조제

시료를 물로 10배 희석하여 미리 3 ml의 MeOH과 3 ml의 증류수로 활성화시킨 Sep-Pak C₁₈ cartridges column에 1 ml를 loading하고 내부표준원액을 CH₃CN/물(8:2)로 희석하여 40 µg/ml로 한 내부표준액 1 ml를 loading하고 CH₃CN 5 ml로 용출하였다. 용출액을 질소기류하에서 증발 건조하고 이 잔사를 10 ml CH₃CN에 용해하여 검액으로 사용하였다.

표준액 및 검액의 유도체화

표준액 및 검액을 각각 500 µl씩 취하여 micro reaction vessel (5 ml)에 넣고, 유도체화 시액을 500 µl 가한 다음 3% triethylamine 50 µl를 가하고 magnetic bar를 넣은 후 vessel을 cap과 teflon silicon disc로 밀봉한다. vessel을 Reacti-Therm III의 heating block에 넣고 70°C에서 30분간 반응시킨 다음 이것을 HPLC에 주입하였다.

분석조건

이동상은 CH₃CN과 물을 55:45(v/v %)의 조성으로 분석할 때마다 제조하고 필터여과 및 초음파 세척기로 기포를 제거한 후 사용하였다. 칼럼은 Capcell-pak 5C₁₈ UG 120Å(150×4.6 mm, i.d., Shiseido, Japan)을 사용하였으며, 유속은 2.0 ml/min로 하고 시료는 10 µl씩 주입하였다. 칼럼온도는 40°C로 하고 형광 검출기의 파장은 Ex: 300 nm, Em: 460 nm로 하여 검출하였다.

결과 및 고찰

최적 유도체화 조건의 선정

반응온도의 검토 - 반응시간을 30분으로 고정하고 실온, 50, 70, 80°C의 반응온도의 영향을 검토하였을 때 온도가 상승함에 따라 반응성은 증가하였으며 70°C이상부터는 반응성의 증가가 없으므로 반응온도를 70°C로 정하였다(Fig. 4).

반응시간의 검토 - 반응온도를 70°C로 고정하고 10, 20, 30, 40, 50, 60분으로 반응시간을 조절하여 검토하였을 때 시간이 길어짐에 따라 반응성은 증가하였으며 30분 이상부터는 반응성의 증가가 없으므로 반응시간을 30분으로 정하였다(Fig. 5).

유도체화 시액 물비의 검토 - 반응온도를 70°C, 반응시간을 30분으로 고정하고 UDCA 대비 유도체화 시액의 물비를 25, 50, 100배로 조정하여 물비의 영향을 검토하였을 때 50배이상 부터는 반응성의 증가가 없으므로 유도체화 시액의 물비를 50배로 하였다(Fig. 6).

TEA 농도의 검토 - 반응온도 70°C, 반응시간 30분에서 유도체화 시액의 물비를 50으로 고정하고 1, 2, 3, 5%의 TEA농도를 검토하였을 때 3%에서 반응성이 가장 양호하였다(Fig. 7).

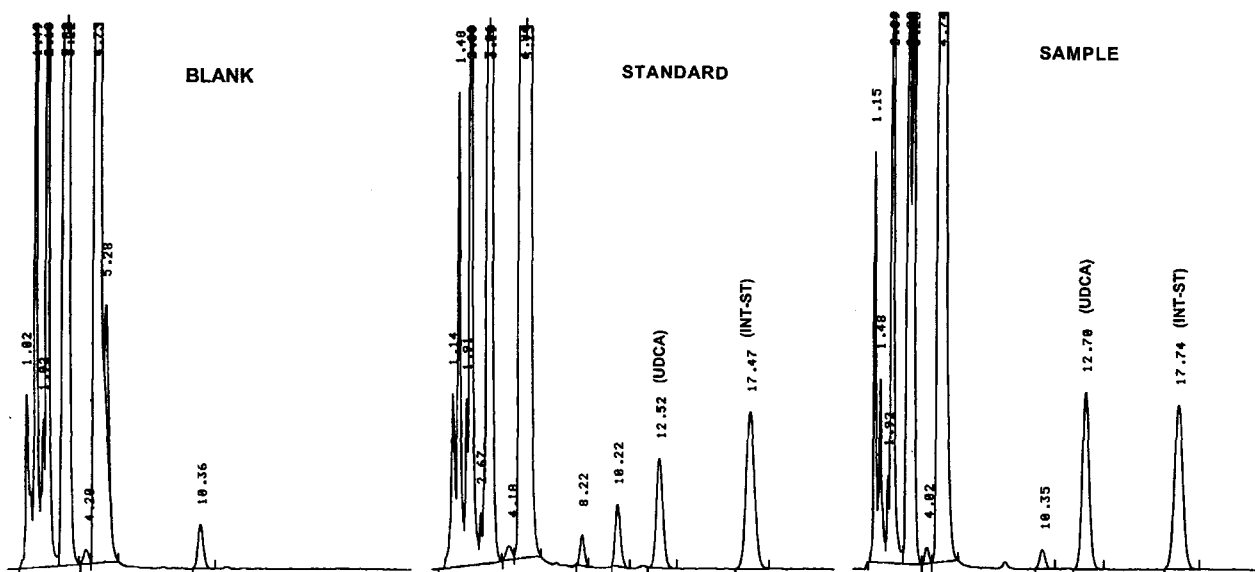


Fig. 3 - Typical chromatogram of blank, standard and sample.

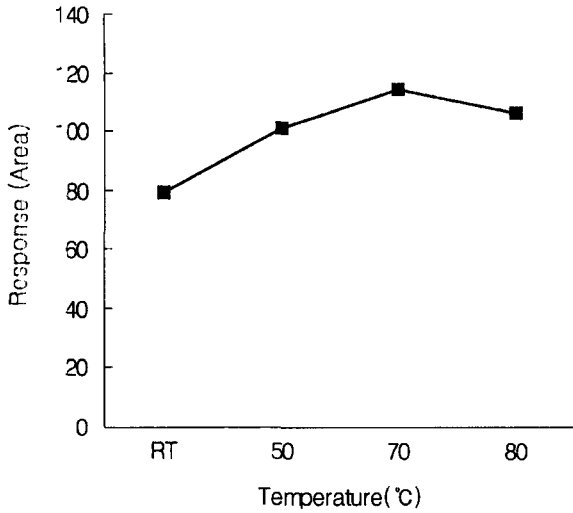


Fig. 4 - Effect of reaction temperature (RT, 50°C, 70°C, 80°C) on the derivatization efficiency.

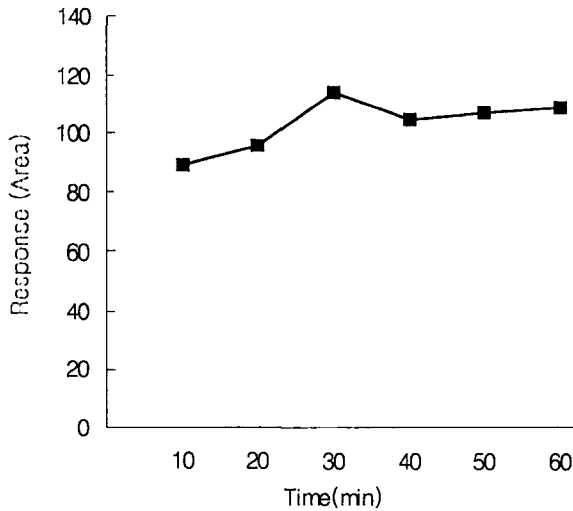


Fig. 5 - Effect of reaction time (10~60 min.) on the derivatization efficiency.

표준액의 검량선 작성

UDCA 표준품의 농도를 1.178, 1.963, 3.926, 5.889, 7.852 µg/ml로 변화시키고 내부표준액의 농도를 4 µg/ml로 하여 유도체화한 후 얻은 표준액, 내부표준액의 크로마토그램 피이크면적비를 계산하여 Fig. 8의 검량선을 얻었다. 상관계수(r^2)가 0.999로 매우 양호한 직선성을 나타내었으며($y=0.1964x - 0.0139$, x: 샘플 농도, y: 피이크면적), 시료 중의 UDCA를 정량하는데 적합하였다.

시료분석

시료에 대하여 위의 조건으로 시판중인 S사의 C제품과 I사의 W제품(UDCA, 20 mg/75 ml액)을 분석한 결과는 Table I과 같고, Fig. 3은 blank, 표준액 및 시료의 크로마토그램으로 다른 방

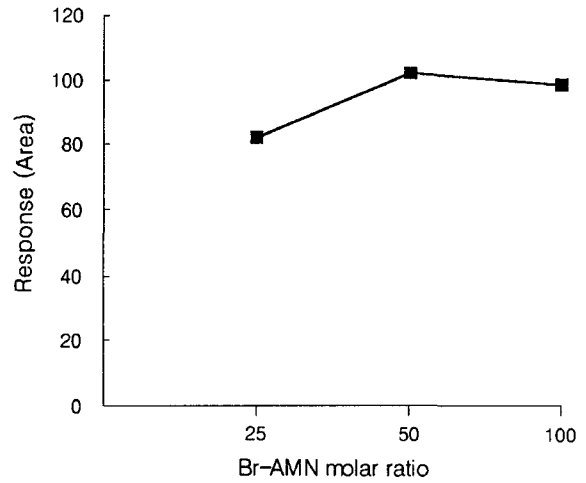


Fig. 6 - Effect of reagent molar ratio (25, 50, 100 times) on the derivatization efficiency.

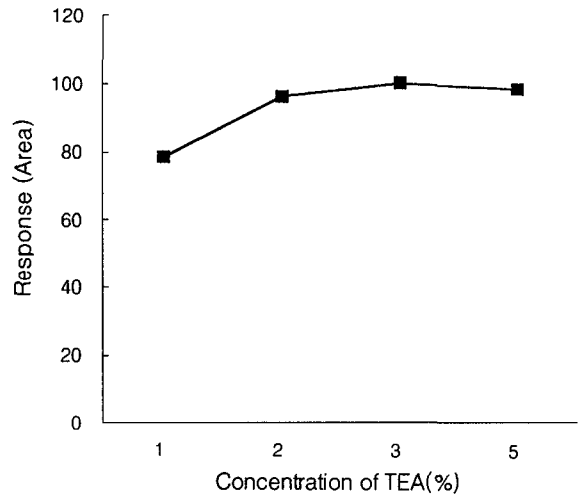


Fig. 7 - Effect of TEA concentration (1~5%) on the derivatization efficiency.

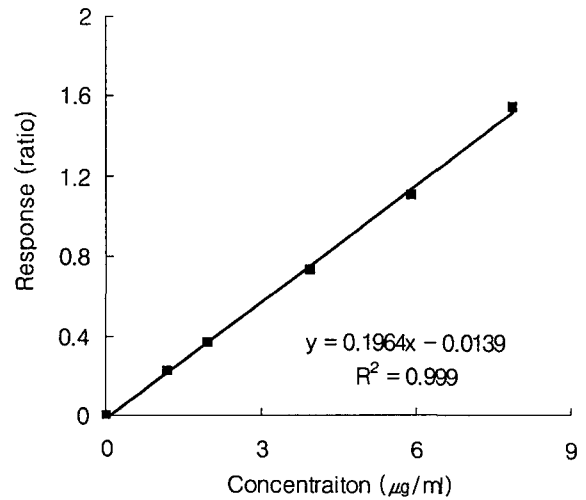


Fig. 8 - Calibration curve of UDCA Standards.

Table I – Assay results of UDCA in herbal medicine

Pharmaceuticals (UDCA, 20 mg/75 ml)*	Found** (%)	RSD (%)
C	97.4	0.85
W	103.7	0.43

*Other ingredients : dl-carnitine · HCl, glycyrrhizia extract, ginseng radix extract, foeniculi fructus tincture, atractylodes rhizoma fluid extract, ginger fluid extract, cinnamomi cortex fluid extract, sod. benzoate, etc.

**Average of three determination was expressed as a percentage of the claimed content.

Table II – Recoveries(%) of UDCA spiked to herbal medicine

Spiked amount ($\mu\text{g/ml}$)	Calculated concentration ($\mu\text{g/ml}$) Mean*	Recovery (%)	RSD (%)**
5	5.13	102.6	1.04
10	10.1	101.0	0.76
20	19.96	99.8	0.52

*Mean (n=3)

**Relative standard deviation.

성분의 영향을 받지 않고 UDCA와 내부표준액이 양호하게 분리 되었음을 보여준다.

회수율

시료에 일정농도의 표준액을 첨가하여 회수율을 측정하였으며 검토한 UDCA의 회수율은 Table II와 같다.

재현성 검토

일정한 농도의 내부표준액을 포함한 표준액을 5회 반복하여 유도체화한 후 얻은 크로마토그램의 피크 면적비를 계산하였을 때 UDCA의 표준편차가 0.33%로 재현성이 양호한 결과를 얻었다.

검출한계 및 정량한계

검출한계(LOD)는 signal-to-noise(S/N)=3에서 측정하였을 때 25 ng/ml였고, 정량한계(LOQ)는 signal-to-noise(S/N)=10에서 측정하였을 때 80 ng/ml였다.

결 론

생약 소화액제 중에 들어있는 UDCA를 분석함에 있어서 생약 성분, 보존제, 당성분 및 기타 부형제 등이 방해할 한다. 이에 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 전처리하여 방해성분을 분리하고, 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene(Br-AMN)을 형광유도체화제로 사용하여 UDCA를 HPLC와 형광광도 검출기를 이용한 미량 정량법을 확립하였다. 반응 조건을 검토한 결과 반응

온도 70°C, 반응시간 30 min, 형광유도체화제 시액의 몰비는 50 배, TEA의 농도를 3%로 하였을 때가 최적이었으며, 이동상은 CH₃CN과 물을 55:45(v/v %)의 조성으로 칼럼은 Capcell-pak 5C₁₈ UG 120Å(150×4.6 mm, i.d., Shiseido, Japan)을 사용하였고, 유속은 2.0 ml/min로 하였으며 시료는 10 μl 씩 주입하였다. 칼럼온도는 40°C, 형광은 Ex: 300 nm, Em: 460 nm에서 검출하였다. 이 방법은 직선성, 회수율, 재현성이 양호한 분석법으로서 검출한계가 25 ng/ml였다. 시료 전처리 방법은 생약제제 외에 생체시료의 전처리에도 응용할 수 있으며, Br-AMN을 이용한 유도체화는 -COOH를 함유한 다른 지방산, 담즙산류뿐만 아니라 prostaglandins, β -lactam antibiotics 등 생물학적으로 중요하고 다양한 시료에 응용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 Br-AMN을 기존의 방법보다 높은 수율과(78%) 간편한 방법으로 합성하였다.

문 헌

- 1) Cho, J. Y., Yeon, J. D., Nam, K. H., Yoo, E. S., Yu, Y. H. and Park, M. H. : Compositional change of hepatic bile acid by multiple administration of DWP305, a combined preparation containing ursodeoxycholic acid and silymarin, in rats. *Yakhak Hoeji*. **40**, 311 (1996).
- 2) *Korean Pharmacopoeia* 7th ed., 대한공정서협회. p. 432(1998).
- 3) *British Pharmacopoeia*, Vol. I., British Pharmacopoeia Commission, p. 1572 (2000).
- 4) *The United States Pharmacopoeia* 24th ed., The United States Pharmacopoeial Convention, Inc., p. 1730 (2000).
- 5) Gatti, R., Cavrini, V. and Roveri, P. : 2-Bromoacetyl-6-methoxynaphthalene : A useful fluorescent labelling reagent for HPLC analysis of carboxylic acids. *Chromatophia*. **33**, 13 (1992).
- 6) Cavrini, V., Gatti, R., Roda, A., Cerre, C. and Roveri, P. : HPLC-fluorescence determination of bile acids in pharmaceuticals and bile after derivatization with 2-bromoacetyl-6-methoxynaphthalene. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **11**, 761 (1993).
- 7) Kamada, S., Maeda, M. and Tsuji, A. : Fluorescence high-performance liquid chromatographic determination of free and conjugated bile acids in serum and bile using 1-bromoacetylpyrene as a pre-labeling reagent. *J. Chromatogr. B*. **272**, 29 (1982).
- 8) Wang, G., Stacey, N. H. and Earl, J. : Determination of individual bile acids in serum by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **4**, 136 (1990).
- 9) Kamada, S., Maeda, M., Tsuji, A., Umezawa, Y. and Kurahashi, F. : Separation and determination of bile acids by high performance liquid chromatography using immobilized 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase and an electrochemical

- detector. *J. Chromatogr.* **239**, 773(1982).
- 10) Ishii, D., Murata, S. and Takeuchi, T. : Analysis of bile acids by micro high-performance liquid chromatography with post-column enzyme reaction and fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* **282**, 569(1983).
- 11) Campbell, G. R., Odling-Smee, G. W., Rowlands, B. J. and Irvine, G. B. : Determination of bile acids and their conjugates in serum by HPLC using immobilized 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase for detection. *Biomed. Chromatogr.* **5**, 75 (1989).
- 12) Cristau, H. J., Torreilles, E., Morand, P. and Christol, H. : Les Tribromures De Phosphoniums. Agent De Bromation De Substrats Organiques, *Phosphorus and Sulfur.* **25**, 357 (1985).
- 13) *Organic Synthesis Collective. II.*, John Wiley & Sons, Inc., p. 480 (1943).