

2-Bromoacetyltriphenylene 유도체화제를 이용한 카르복실기 함유성분의 분석법 (I)

프로스타글란딘 E₂와 F₂α 혼합물의 HPLC에 의한 분리정량

이 왕 규 · 정 해 수 · 김 박 광

서울대학교 약학대학

(Received November 11, 1986)

UV-HPLC Determination of Carboxyl Group Using 2-Bromoacetyltriphenylene as a Pre-labeling Reagent

The isolative determination of prostaglandin E₂ and F₂α by HPLC

Wang Kyu Lee, Hai Soo Chung and Bak-Kwang Kim

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

Abstract—A new UV labeling reagent was developed and used in HPLC for the determination of prostaglandin E₂ which have weak UV light-absorbing property. This reagent, 2-bromoacetyltriphenylene, was synthesized by the bromination of 2-acetyltriphenylene which was obtained from triphenylene by Friedel-Crafts reaction. The wave length maximum ($\lambda_{\max}^{\text{CH}_2\text{CN}}$) of this reagent was 268nm. Prostaglandin E₂ was extracted from prostaglandin E₂- β -cyclodextrin using a Sep-pak C₁₈ cartridge. The prostaglandin E₂ was labeled with 2-bromoacetyl-triphenylene in acetonitrile using 18-crown-6-ether as catalyst. Derivatized prostaglandins were separated on a reversed-phase column (Radial-pak) μ -Bondapak C₁₈ using acetonitrile: water=60:40 as mobile phase. The effluent was monitored by UV detector at 254nm filter kit. Linearity of calibration curve was obtained between 30ng and 140ng, and the lower limit of detection was 5ng.

프로스타글란딘 E₂(이하 PGE₂)는 임신말기에 서의 진통유발 및 진통촉진에 사용되는 약물로서, 물리화학적으로 매우 불안정하기 때문에 냉동실에 보관하여야 하며, 프로스타글란딘을 β -cyclodextrin(이하 β -CD)으로 포접화한 것을 제화하고 있다. 프로스타글란딘은 구조들이 서로 유사하며, 복용량이 극미량이므로 이에 대한 미량분석법이 계속 연구되고 있는 실정이다. 프로스타글란딘의 정량법으로는 비수적정법을 비롯하여 형광분석법,¹⁻³⁾ UV-분광광도법,⁴⁾ radio-immunoassay⁵⁻⁷⁾, GC⁸⁻¹⁵⁾법 등이 보고된 바 있다. 프로스타글란딘 종류에 따라 측정가능성의 유무, 감도, 재현성, 간편성 등을 고려할 때 문제점들을 많이 내포하고 있다. PGE₂의 UV-분광광도법은 강알카리로 처리하여 PGA₂를 거쳐,

PGB₂로 된 것을 측정하는 방법으로 미량 및 분리정량이 불가능하다. 그러므로 최근에는 PG에 UV 또는 형광의 유도체화제를 이용하여 유도체를 만든 후 HPLC에 의한 분리정량법이 연구되고 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾

저자들은 일반적으로 현재 많이 활용되고 있는 자외부 유도체화제보다 반응이 간편하고, 생성된 유도체가 안정하며, 고 감도의 자외부 유도체화제를 개발하여 검토하였다. Acetyl bromide 기를 triphenylene에 도입시켜 2-bromoacetyltriphenylene(이하 BATP)을 합성하여, 새로운 자외부 유도체화제를 만들어 구조가 서로 다른 물질에 반응시켜 유도체화제로서의 가치를 검토하고자 하였다.²²⁻²⁵⁾ 먼저 이 유도체화제를 이용하여 PGE₂와 PGF₂α의 혼합물에 대하여 실험해 본 결

과, 각 물질들을 양호하게 분리분석을 할 수 있었으므로 이에 보고하고자 한다.

실 험 방 법

시료 및 시약—Triphenylene(Aldrich), CS₂, HCl, CHCl₃ acetylchloride, 브롬 무수 AlCl₃(이상 1급 Wako), 메탄올, 메탄올(이상 merck), N,N'-diisopropylethylamine, 프로스타글라린 E₂, F₂α(Sigma 및 Ono Pharm. 사), 프로스타글라린 E₂-β-cyclodextrin (Ono pharm. 사., PGE₂로서 7% 함유), acetonitrile(kokusan), 18-crown-6-ether(Sigma), KOH, K₂CO₃, KHCO₃, tetrahydrofuran(이상 Junsei),

기기—HPLC: Waters 모델 254(detector 모델 440; 254nm, 280nm 필터 Kit, Recorder; Texas instruments)

표준액—PG E₂ 1mg을 정밀히 평량하여 메탄올 20ml에 용해시키고, 이액 3.5ml을 취하여 여기에 메탄올을 가하여 25ml로 만들었다. 이액을 차광용기에 넣어 냉동실에 보관하여 3일 이내에 사용하였다. 이때 농도는 20nmol/ml이다.

시료용액—PGE₂-β-CD를 PGE₂로써 1mg에 해당하는 량을 취하여 증류수 10ml을 넣고 초음파 세척기에서 10분간 sonification 시킨후 5% 염산액을 써서 pH3으로 조절한 후 Sep-pak C₁₈ cartridge에 10ml/min의 유속으로 통과시킨후 증류수 20ml로 충분히 세척하고 메탄올 10ml을 사용하여 PGE₂를 용출시킨후 메탄올을 넣어 20ml로 만들었다. 이액 3.5ml을 취해 다시 메탄올을 가해 25ml로 만들었다.

*Sep-pak C₁₈ cartridge는 사용전에 메탄올로 습윤시키고 증류수로 세척한 후 pH3 염산액으로 처리한 후 사용하였다.

KOH용액—KOH 66mg을 평량하여 메탄올 100ml에 용해시킨후 이액 1ml을 취하여 메탄올을 넣어 50ml로 만들었다.

BATP용액—BATP 3.5mg을 acetonitrile에 용해시켜 50ml로 만든후 사용시 적량으로 희석하였다.

18-Crown-6-ether액—18-crown-6-ether 52mg을 취하여 acetonitrile에 용해시켜 100ml로 만든후 사용시 적량으로 희석하였다.

2-Acetyltriphenylene의 합성—삼구 flask에 carbondisulfide 140ml와 triphenylene 6.7g을 넣어 상온에서 교반하여 용해시켰다. 온도를 10°C로 한다음 acetylchloride 40ml을 넣고 내용물을 투명하게 용해시킨후 얼음을 넣어 온도를 5°C로 내린다음 무수 AlCl₃ 6.7g을 소량씩 가하였다. 온도를 서서히 올려주어 20°C에 도달될때까지 2시간동안 계속 교반하였다. 이 내용물을 냉각된 10% 염산액 200ml에 서서히 넣어 1시간 교반한후 분액여두에 넣어 유기용매층을 얻은 후 무수 Na₂SO₄를 넣어 탈수시킨후 감압하에서 증발건조시켰다. 얻은 2-acetyltriphenylene을 에탄올로 재결정하여 침상결정을 얻었다.

2-Acetyltriphenylene의 브롬화에 의한 BATP합성—CHCl₃ 130ml와 acetic acid 80ml에 acetyltriphenylene 5.2g을 넣고, 교반하여 용해시킨후 에틸 50ml을 가하였다(A액), 별도로 CHCl₃ 10ml와 에틸 10ml 혼액에 브롬 1.05ml을 넣어 잘 혼화시켰다(B액), A액을 취해 계속 교반하면서 분액여두속에 들어 있는 B액을 소량씩 적가하였다. 약 30분정도 경과한 후 부터 일부 반응물의 침전이 석출되기 시작하였다. 브롬액을 전부 가한 후 계속 교반하면서 3시간 동안 반응시켰다. 상온에서 30분간 방치 후 다시 냉장고에서 1시간 방치한 후 침전을 여과하여 2-bromoacetyltriphenylene 5.62g을 얻었다. 이것을 벤젠으로 재결정하여 순수한 침상결정을 얻었다. mp: 177°~178°C, UV: λ_{max}^{CH₂CN} 252nm, 269nm, 몰 흡광계수 ε_{max}^{CH₂CN} = 78,000, IR: 1,690cm⁻¹(C=O, conjugated ketone), 1,260

cm⁻¹($\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{C}-\text{C}-\text{C}- \end{array}$), 1,160cm⁻¹(-CH₂Br), mass m/e: 350(M⁺+2, C₂₀H₁₃OBr⁸¹, 32.1%), 348(M⁺, C₂₀H₁₃OBr⁷⁹, 30.2%), 255(M⁺-CH₂Br, 91.9%), 227(M⁺-COCH₂Br, 64.5%), 226(M⁺-COCH₂Br-H, 100%), 113(41.5%), 112(18.7), ¹H-NMR(CDCl₃) δppm: 4.62(3H, S, -

COCH₂), 7.74(3H, m,) 8.19(1H, d×d, J=1.8, 8.7Hz), 8.72(6H, m), 9.32(1H, d, J=1.8Hz)

시료 및 표준액과 B ATP와의 반응조작—시료 및 표준액 각각 0.5ml을 취하여 시험관에 넣고 KOH액을 2배 물을 넣고 N₂가스를 통하면서 증발건고시킨 후 18-crown-6-ether액 20배 물을 넣고 10분간 sonification시킨 후 B ATP액 2배 물 농도를 넣어 40°C에서 40분간 반응시킨 후 냉각시켜 HPLC에 의해서 분석하였다.

HPLC측정조건—HPLC: Waters 모델 254, 검출기: UV detector 254nm, 칼럼: Radialpak, column, μ-Bondapak C₁₈(8mm id×10cm). 감도: 0.02 aufs, 이동상: CH₃CN : H₂O=60 : 40, 유속: 1.5ml/min, 차트 속도: 0.1inch/min, 주입량: 20μl

실험결과 및 고찰

측정조건의 검토—칼럼은 극성이 큰 용매를 사용하기에 적합한 μ-Bondapak C₁₈을 선택하였으며, PGE₂-B ATP의 흡수는 269nm 부근에서 흡수극대를 나타내었으나 HPLC의 UV detector가 254, 280nm 필터를 사용하게 되어 있어 두 파장을 비교 검토한 결과 254nm가 280nm보다

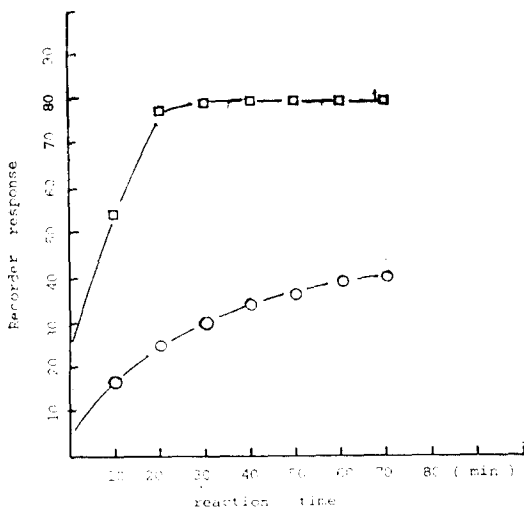


Fig. 1—Effect of solvent in reaction.
 □ acetonitrile, ○ tetrahydrofuran.
 temp. : 40°C, cat. : KOH-crown-ether

에민하였으므로 본 실험은 254nm에서 측정하였다. 이동상으로서 적합성을 가지면서 PGE₂-B ATP 에스테르의 용해성을 고려하여 수종의 용매를 단독 및 혼합액으로 하여 관찰한 결과 60% acetonitrile액이 가장 양호하였다.

반응용매가 흡광도에 미치는 영향—PGE₂를 KOH methanol용액으로 칼럼염을 만들어 질소가스로 증발건고 시켰다. THF, acetonitrile에 B ATP와 18-crown-6-ether을 용해시킨 것을 사용하여 비교 검토해 본 결과 acetonitrile이 적합한 용매라는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). acetonitrile이 THF보다 흡광도가 크게 나타났으므로 촉매와 B ATP의 용매로는 acetonitrile을 사용하였다.

KOH, KHCO₃ 및 N,N-diisopropylethylamine이 반응에 미치는 영향—PGE₂를 칼럼염으로 만드는데 칼럼공급원으로 KOH 및 KHCO₃를 사용하였으며, 이외 촉매로 N,N-diisopropylethylamine을 사용하여 비교 검토한 결과 KOH가 가장 적합하였다(Fig. 2). 반응성이 좋은 KOH를 10배 물과량 사용하였을 때에도 PGE₂의 분해 산물은 자외부에서 나타나지 않았으며 흡광도도 3배정도 높게 나타났다.

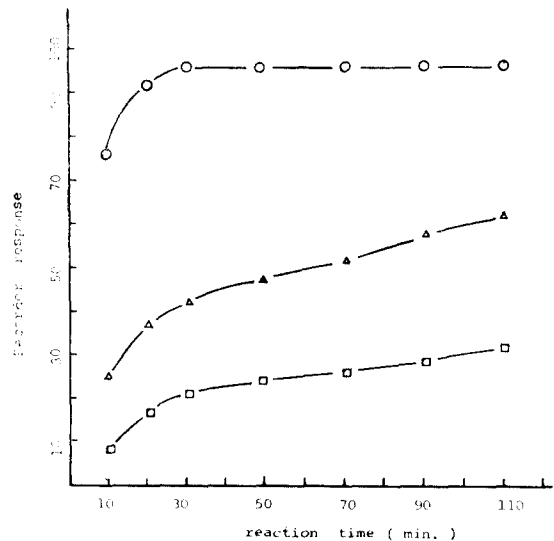


Fig. 2—Dependence of the reaction yield of prostaglandin E₂ B ATP ester (40°C).
 ○=catalyzed with KOH-crown ether
 △=catalyzed with KHCO₃-crown-ether
 □=catalyzed with N,N-diisopropylethylamine

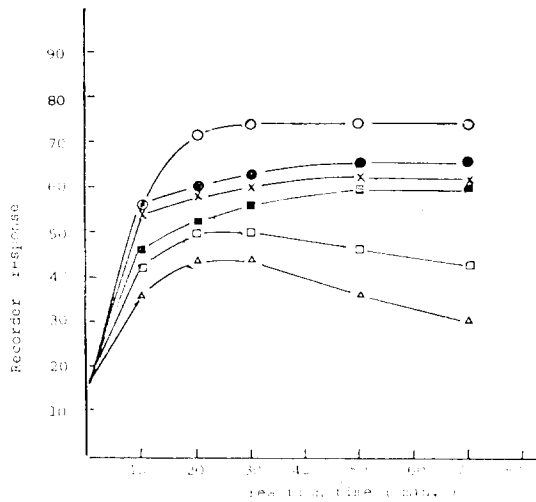


Fig. 3—Effect of reaction on the temperature
 ■—20°C, ●—30°C, ○—40°C, ×—50°C,
 □—60°C, △—70°C
 cat : KOH-crown-ether,
 solvent : acetonitrile(sonification)

반응온도 및 반응시간—PGE₂는 열에 의해서 매우 불안정하므로 적합한 반응온도를 찾기 위해서 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°C에서 각각 반응시간을 70분까지 10분간격으로 반응시켜 흡광도를 측정하였다. 각 온도별로 반응시간에 대한 흡광도는 40°C에서 30분간이 가장 이상적인 반응조건이었다(Fig. 3).

KOH와 BATP의 농도가 반응에 미치는 영향—PGE₂는 온도 및 KOH에 매우 불안정하므로 KOH의 농도를 PGE₂ 몰농도에 대해서 0.5배, 1배, 1.5배 등으로 6배 몰까지, BATP의 농도는 1배 몰~6배 몰까지 각각 반응시켜 흡광도에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 4), KOH 농도가 2배에서 4.5배까지는 일정한 흡광도를 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 급속히 흡광도가 감소하기 시작하였다. BATP의 농도는 2배 이상에서 흡광도가 정점에 도달하였으며, 6배 몰까지 일정하게 나타났다. 그러므로 KOH의 농도는 2배~3배, BATP의 농도는 3배 정도가 가장 적합하였다.

검량선 작성—표준액을 단계적으로 희석하여 PGE₂의 농도가 1.0μg/ml~7μg/ml이 되도록 용

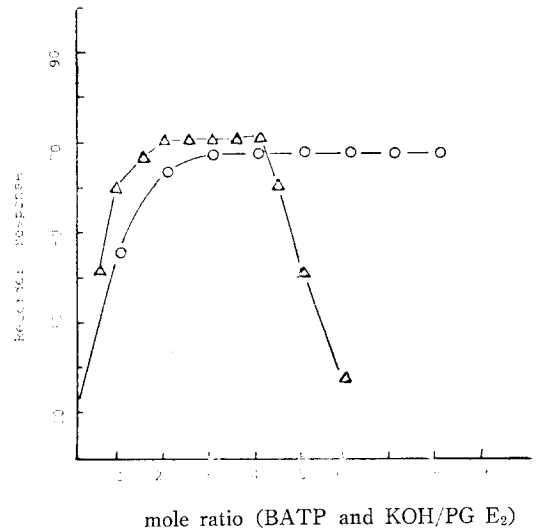


Fig. 4—Effect of reaction with different concentration of BATP and KOH
 ○ : BATP, △ : KOH(40°C, 30min)

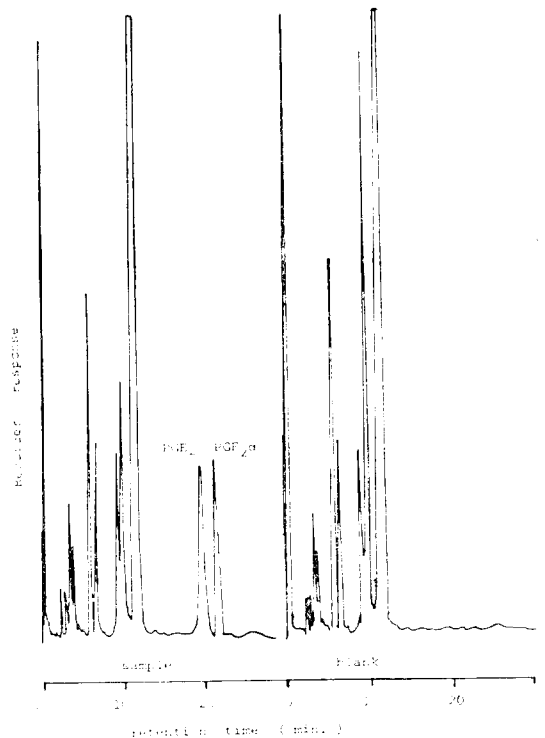


Fig. 5—Chromatogram of separated PG E₂-BATP ester and PG F₂α-BATP ester.
 mobile phase: acetonitrile:water=60 : 40

Table I—Recovery of PG E₂ add to PG E₂ tablet (n=5)

Assayed μg/ml	Added μg/ml	Measured μg	Recovery %
0.5	0.1	0.61	101.6
0.5	0.2	0.69	98.6
0.5	0.3	0.81	101.3
0.5	0.5	0.99	99.0
0.5	1	1.48	98.7
Average			99.8
S.D.			1.1

액을 만든후 이액을 각각 1ml을 취하여 시험관에 넣고 반응조작법 및 HPLC측정조건하에서 실험한 결과, 농도와 피크의 높이간에 Beer법칙이 성립되어 양호한 직선성을 나타내었다.

PGE₂와 PGF₂α의 분리—PGE₂와 PGF₂α의 혼합물을 반응시켜 HPLC를 측정할 결과 전연 영향을 받지 않았으며 동시분리정량이 가능하였다 이외의 프로스타글란딘도 분리정량이 가능하리라 사료된다(Fig. 5).

응용—시중에 시판되고 있는 정제 Prostarmon E 정제 (Ono Pharm. Co., PGE₂-β-CD중 PGE₂로서 0.5mg 함유) 10정을 취해 상법에 준하여 조작한 후 PGE₂ 1mg에 해당하는 양을 취하여 상기 시료용액 조작법에 따라 시료액을 만들었다. 이액 0.5ml을 취하여 시험관에 넣고 상기 반응조작법 및 HPLC측정조건하에서 분석하였다(Table I). 그 결과, 정량성이 양호하게 나타났으며, 같은 방법으로 7회 측정하여 회수율을 검토한 결과, 양호하게 나타났다.

결 론

BATP의 유도체화제는 상온에서 보관시 매우 안정하며 현재 개발된 carboxy기의 유도체화제보다 분자흡광계수가 3배정도 강한 흡광계수를 갖고 있으며, carboxylic acid와 에스테르를 형성한 후에도 상온에서 안정하였다. 또한 프로스타글란딘 E₂의 카르복실기를 KOH, 18-crown-6-ether축매하에서 BATP와의 에스테르화가 저

온에서 잘 진행되었으며, HPLC로 분석할 때 30ng~140ng범위에서 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 반응시간이 짧으며, 반응부산물인 PGE₂와 PGF₂α의 분리정량에 방해를 주지 않았으며, 감도 0.005auf에서 5ng까지 검출이 가능하였다. 시판되고 있는 PGE₂ 정제(PGE₂-β-CD로 된 제제)도 간단한 전처리를 함으로써 간편히 정량할 수 있었으며 회수율도 양호하였다. 이 방법을 이용하면 각종 시료중의 미량성분정량과 더불어 여러 종류의 프로스타글란딘을 동시분리정량하는 것도 가능하리라 사료된다.

문 헌

- Gantt, C.L., Kizlaitis, L.R., Thomas, D.R. and Greslin J.G.: Fluorescenc of prostaglandin E₁. *Anal. Chem.* **40**, 2190(1968).
- Turk, J., Weiss, S.J., Davis, J.E. and Needleman, P.: Fluorescent derivatives of prostaglandins and thromboxanes for liquid chromatography. *Prostaglandins*. **16**, 291 (1978).
- Ohno, Hiroyuki, Miyamoto Tsumoru, Nishibori Saiko and Hirata Fumio.: Use of enzyme on the Fluorometry for prastaglandins. *Yakugaku Zasshi*. **92**, 1111 (1972).
- Samuelsson, B.: Quantitative determination of prostaglandins in human semen. *Clin. Chim. Acta.* **10**, 566 (1964).
- Inagawa, Toshiwo, Ohki Shiro, Sawada Masafumi, Hirata Fumio: Studies on Extraction, Separation and Estimation of prostaglandins by Radioimmunoassay. *Yakugaku Zasshi*, **92**, 1187 (1972), **93**, 471 (1973).
- Caldwell, B.V., Burstein, S., Brock, W.A. and speroff, L.: Radioimmunoassay of the prostaglandins, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 171 (1971).
- Jaffe, Bernard M. et. al.: Radioimmunoassay Measurement of prostaglandin E, A, and F in human plasma. *J. Clin. Invest.* **52**, 398 (1973).
- Samuelsson, Bengt. Mats Hamberg: Quantitative gas chromatography of prostaglandin E₁ at the nanogram nanogram level: Use of deuterated

- carrier and multiple-ion analyzer. *Anal. Biochem.* **38**, 301 (1970).
- 9) Fitzpatrick, F.A., String fellow, D.A. Mallove, J. and Rigavo, M: Glass capillary gas chromatography with electroncapture detection of prostaglandins. *J. Chromat.* **177**, 51 (1979).
 - 10) Daley, J. D., Rosenfeld, J.M., and Younplai, E.V.: Synthesis of estrogen methyl ethers by extractive alkylation. *Steroids.* **27**, 481 (1976).
 - 11) Rosenfeld, J., Ting, T.L., and phatak, A.: Extractive alkylation of prostaglandins. *Prostaglandins.* **21**, (1). 41 (1981).
 - 12) Greving, J.E., Jonkman, J.H.G. and De zeeuw, R.A.: Determination of carboxylic acids in the picomole range after derivatization with pentafluorobenzyl bromide and electron capture gas chromatography. *J. Chrom.* **148**, 389 (1978).
 - 13) Fitzpatrick, F.A., M.A. and kaiser, D.G.: Oximes for highperformance liquid and electron capture gas chromatography of prostaglandins and thromboxanes. *Anal. Chem.* **49**, 1032. (1977).
 - 14) Fitzpatrick, F.A.: Separation of prostaglandins and thromboxanes by gas chromatography with glass capillary columns. *Anal. Chem.* **50**, 47 (1978).
 - 15) Middleditch, B.S. and Desiderio, D.M.: Gas chromatography of trimethylsilyl and alkyl oxime-trimethylsilyl derivaties of some prostaglandins. *Prostaglandins.* **2**, 115 (1972).
 - 16) Carr, K., Sweetman, B.J. and Frolich, J.C.: High performance liquid chromatography of prostaglandins Biological Applications. *Prostaglandins.* **11**, 3 (1976).
 - 17) Lustgarten, R.K.: High performance liquid chromatographic Separation of C-15 Epimers of 15-methyl prostaglandin E₂ Methyl ester and 15-methyl prostaglandin E₂. *J. Pharm. Sci.* **10**, 1533 (1976).
 - 18) Morozowich, W. and Douglass, S.L.: Resolution of prostaglandin p-nitro phenacyl ester by liquid chromatography and conditions for rapid quantitative p-nitro phenacylation. *Prostaglandins.* **10**, 19 (1975).
 - 19) Duges, W.: 4-Bromomethyl-7-methoxy coumarin as a new Fluorescence label for fatty acid. *Anal. Chem.* **49**, 442 (1977).
 - 20) Johnson, R.A., Morton, D.R., Kinner, J.H., Gorman, R.R., Mcgurie, J.C. and sun, F.R.: The chemical structure of prostaglandin X (Prostacyclin). *Prostaglandins.* **12**, 915 (1976).
 - 21) Fitzpatrick, F.A.: High performance liquid chromatographic Determination of prostaglandins F₂, E₂ and D₂ from in vitro Enzyme Incubation. *Anal. Chem.* **48**, 499 (1976).
 - 22) Barker, C.C., Emmerson, R.G. and periam, J.D.: The Monosubstitution of Triphenylene. *J. Chem. Soc.* 4482 (1955).
 - 23) Cowper, R.M. and Davidson, C.H.: Phenacyl bromid Org. Syn. Coll. Vol. **2**, pp.480.
 - 24) Klingenberg, J.J.: p-bromomandelic acid. Org. Syn. Coll. Vol. **4**, pp.110.
 - 25) Fieser, L.F. and Fieser, M.: "Bromination of carbonyl compounds" Reagent for Org. Syn. 161.