

2-Bromoacetyltriphenylene 유도체화제를 이용한 카르복실기 함유 성분의 분석법(II)

담즙산 혼합물의 HPLC에 의한 분리정량

박 만 기 · 정 해 수 · 양 호 길

서울대학교 약학대학

(Received March 11, 1987)

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

Separative determination of bile acids by HPLC

Man Ki Park, Hai Soo Chung and Ho Gil Yang

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

Abstract—A high performance liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of free and glycine conjugated bile acids. Free and glycine conjugated bile acids were extracted from bear gall bladder by methanol and from serum using a Sep-pak C₁₈ cartridge. The extracted bile acids were labeled with 2-bromoacetyltriphenylene in acetonitrile using 18-crown-6-ether as a catalyst. Derivatized bile acids were separated from the individual bile acids on a reversed-phase column (Chemcosorb 5-ODS-H) using acetonitrile-methanol-water(10:50:30) as a mobile phase and monitored by an UV-detector at 254nm. Linearities of calibration curve were obtained between 4 ng and 24 ng, and recoveries from bear gall bladder sample were higher than 94%.

Bile acids는 웅담, 돈담 등 담즙산 생약의 주요 성분으로서 시판 담즙산 생약의 품질평가적 측면에서 중요할 뿐 아니라, 혈청이나 담즙 등 생체시료 중의 유리형 담즙산 및 그 포함체들의 분리동정은 임상학적 연구대상으로서 부각되어¹⁻³⁾ 최근 이들에 대한 미량분석법이 계속 연구되고 있다. 이 담즙산의 분리정량법 중에는 사람의 혈청이나 담즙에 존재하는 유리형 및 포함형 담즙산을 직접 정량하는 방법으로서 TLC법⁴⁻⁵⁾, GC법⁶⁻⁷⁾, GC-Mass법⁸⁻¹¹⁾ 등이 있으며 최근에는 HPLC를 이용한 방법이 개발되고 있다. 그러나 거의 모든 담즙산은 UV광을 흡수하는 성질이 없으므로 HPLC에 의한 분리조작 전에 UV흡수 유도체화제로서 1-*p*-nitrobenzyl-3-*p*-tolyltriazine¹²⁾, *p*-chlorobenzyl chloride¹³⁾, *o*-(*p*-nitrobenzyl)-N, N-diisopropylisourea¹⁴⁾, phenacyl bromide¹⁵⁾ 등이 사용되어져 왔다. 이들 방법을 담즙에서의 담

즙산을 분리정량하는 정도의 분석법으로는 유용하나 혈청 중에 존재하는 극미량의 담즙산을 정량하는 데는 그 감도가 다소 불충분하므로, 보다 높은 감도를 얻을 수 있는 형광 유도체화제로서 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin¹⁶⁾, 1-anthroyl nitrile¹⁷⁾, 1-bromoacetylpyrene¹⁸⁾ 등과 postcolumn을 이용한 NADH 형광 검출법¹⁹⁻²⁰⁾이 소개됨으로서 검출한계가 10ng 정도인 고감도로서 혈청 중의 담즙산도 정량 가능함이 밝혀져 왔다.

저자들은 HPLC를 이용해 비교적 간단한 방법으로 고감도의 정량이 가능한 새로운 UV흡수 유도체화제인 2-bromoacetyltriphenylene²¹⁾을 사용하여 웅담, 돈담 등과 같은 건조 담즙생약 뿐만 아니라, 사람의 혈청 중 극미량 존재하는 유리 및 glycine 포함 담즙산의 분리정량에 관해 실험한 결과 양호한 결과를 얻어 이에 대해 보

고하고자 한다.

실 험 방 법

시약 및 기구—cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid, ursodeoxycholic acid, glycocholic acid, glycodeoxycholic acid, glycolithocholic acid(이상 Fluka AG, chem 및 Sigma), 18-crown-6-ether (Aldrich), KOH (Junsei), acetonitrile, MeOH(이상 Merck), Sep-pak C₁₈ cartridge (Waters Assoc.), solvent clarification system kit (Millipore, 0.45 μ m filter).

기기—HPLC(Pye Unicam 모델)는 PU 4030 controller, PU 4011 pump, PU 4020 UV detector, PU 4810 computing integrator, sonic cleaner (25.3KHz, DAWE)을 사용하였다.

표준액—cholic acid 표준액(2 μ mol/ml)은 cholic acid 16.5mg을 취하여 메탄올에 용해시켜 20ml로 하였다. Bile acid 혼합표준액(각 400 μ g/ml)은 각각의 유리형 및 glycine 포함형 담즙산을 4.0mg씩 취하여 메탄올에 용해시켜 10ml로 하였다.

시료용액—Bear gall 시료 용액은 황갈색의 건조 담낭 1g을 취해 세절로 만들고 수욕상에서 메탄올 30ml로 1시간씩 3회 환류추출한 뒤 여과한

여액을 60°C에서 감압농축하였다. 이 잔사를 petroleum ether 20ml로 1시간씩 3회 환류추출한 뒤 여과한 여액을 버려서 유지성분을 제거하고, 그 잔사를 vacuum desicator에서 건조시켜 764mg의 건조잔사를 얻었다(yield 76.4%). 상기조각에서 얻은 응답 추출물 100mg을 메탄올에 용해시켜 10ml로 하였다. Human serum 시료는 사람의 혈액 20ml를 채혈하여 원심분리(4,000G, 10min.)한 뒤 상층액을 냉장보관하면서 사용하였다.

반응용 시약—KOH용액은 KOH 66mg을 메탄올 100ml에 용해시킨 후 이액 8ml를 취하고 메탄올을 가해 20ml로 만들었다(4 μ mol/ml). 18-crown-6-ether 용액은 18-crown-6-ether 264mg을 acetonitrile에 용해시켜 20ml로 하였다(50 μ mol/ml). BATP용액은 triphenylene을 acetylation한 뒤 bromination한 것을 정제하여 IR, NMR, Mass spectrometry에 의해 확인된 2-bromoacetyltriphenylene(λ_{max} 269nm, 이하 BATP)²¹⁾ 35mg을 acetonitrile에 용해시켜 10ml로 하였다(10 μ mol/ml).

시료 및 표준액과 BATP와의 반응조각—시료 및 표준액을 일정량 취하여 cap tube에 넣고 KOH 용액을 2배 물 가한 후 N₂ 가스를 통하면서 용매를 날려 보낸 다음 18-crown-6-ether용액 50배

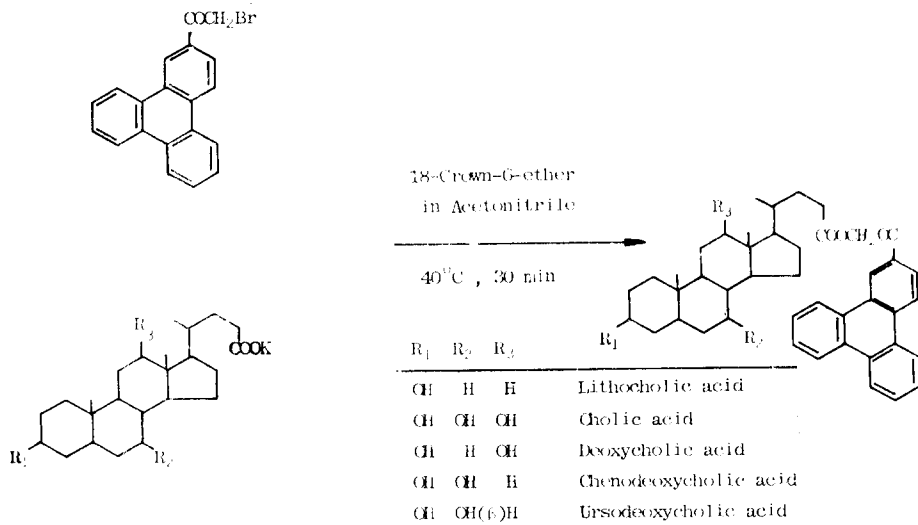


Fig. 1—Esterification of bile acids with 2-bromoacetyltriphenylene.

물을 넣고 10분간 초음파세척기에서 sonication 한 후 BATP용액 2배 물을 가하여 40°C에서 30분간 반응시켜 HPLC에 주입하여 분석하였다 (Fig. 1).

HPLC 측정조건—칼럼은 chemcosorb 5-ODS-H (4.0mm i.d.×15cm), 이동상은 CH₃CN:MeOH:H₂O=100:50:30(bear gall sample), 100:50:35 (serum sample), 유속은 2.0ml/min., 검출과장은 UV 254nm, 감도는 0.02 aufs, 차트속도는 0.25cm/min., 주입량은 5 μ l로 하였다.

실험결과 및 고찰

KOH 및 BATP의 농도가 반응에 미치는 영향—Cholic acid 표준액 0.5ml(1 μ mol)를 취해 KOH 및 BATP의 물비를 각각 0.5배에서 8배의 범위에서 변화시키면서 반응조작한 후 반응성을 검토한 결과 HPLC chromatogram의 peak height를 비교하였을 때 KOH 및 BATP의 물비가 2배 일때 가장 높았다(Fig. 2).

18-crown-6-ether의 농도가 반응에 미치는 영향—Cholic acid 표준액 0.5ml를 취해 18-crown-6-ether의 물비를 0배에서 150배의 범위에서 변화시키면서 반응조작한 후 반응성을 검토한 결과 그 물비가 40~70배일때가 적당하였다(Fig. 3).

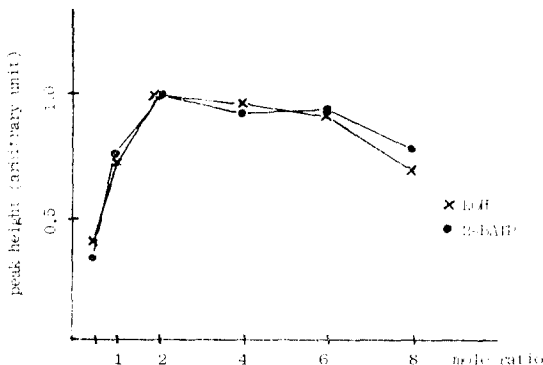


Fig. 2—The effects of mole ratio of KOH & 2-bromoacetyltriphenylene to cholic acid on derivatization at 40°C, 30min. Cholic acid:KOH:18-Crown-6-ether:2-BATP=1:×:50:2
1:2:50:•

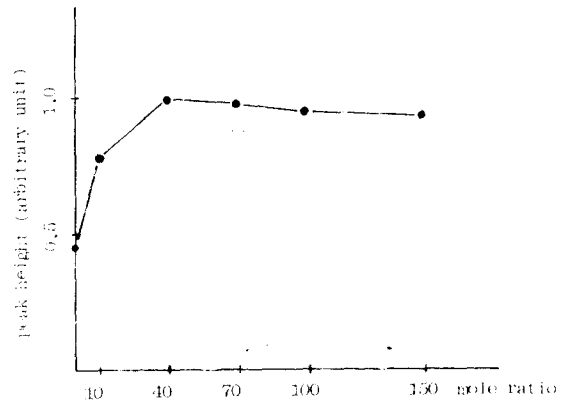


Fig. 3—The effect of mole ratio of 18-crown-6-ether to cholic acid on derivatization at 40°C, 30min. Cholic acid:KOH:18-Crown-6-ether:2-BATP=1:2:•:2

반응온도 및 반응시간—유도체 반응조작에 적합한 반응온도 및 시간조건을 찾기위해 bile acid 혼합표준액 400 μ l를 취하고 이에 대해 KOH용액 1.6ml, 18-crown-6-ether용액 3.2ml, BATP용액 0.8ml를 각각 가하고 온도는 25°, 40°, 60°, 80°C에서, 시간은 80분까지 20분 간격으로 반응조작한 후 각 담즙산의 peak area를 비교검토한 결과 비교적 완화된 조건인 40°C, 30min. 조건에서 훌륭한 반응이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 4).

유리형 및 glycine 포함형 담즙산의 분리 및 검량선 작성—상기 HPLC 측정조건에서 8종의 유리형 및 glycine 포함형 담즙산은 gradient solvent system을 사용하지 않고서도 양호한 분리가 가능하였으며(Fig. 5), bile acid 혼합표준액을 단계적으로 희석하여 각 bile acid의 농도를 80 μ g/ml~400 μ g/ml가 되도록 용액을 만든 후 이 액을 500 μ l씩 취하며 반응조작법에 따라 반응시킨 뒤 acetonitrile을 가하여 최종액량을 5ml로 만들고 HPLC에 3 μ l씩 주입하여 실험한 결과 시료의 주입량과 peak area 사이에 양호한 직선성을 나타내었다(24~120ng). 또한 human serum중의 담즙산을 정량하기 위해 시료의 농도를 1/5 수준으로 낮추어 동일한 처리를 거쳐 실험한 결과 주입량 4.8ng~24ng의 범위에서 양호한 검량선을 얻을 수 있었다(Fig. 6).

웅담 메탄올 추출물 중 유리형 및 glycine

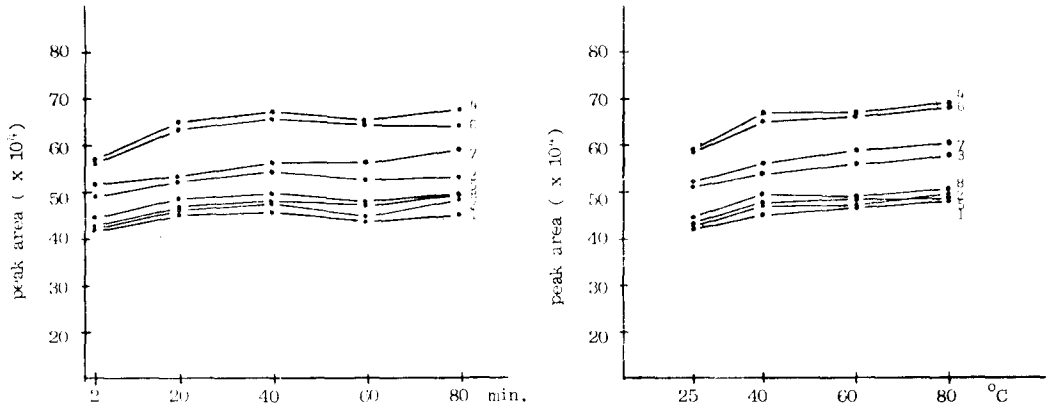


Fig. 4—Reaction condition of derivatization. (each 100ng injected)

1. Glycocholic acid, 2. Glycodeoxycholic acid, 3. Ursodeoxycholic acid, 4. Cholic acid, 5. Glycolithocholic acid, 6. Chenodeoxycholic acid, 7. Deoxycholic acid, 8. Lithocholic acid.

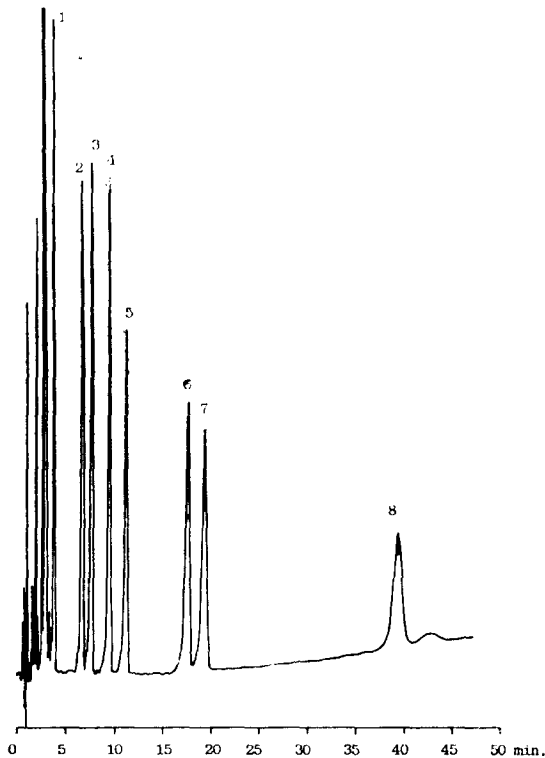


Fig. 5—Chromatogram of standard free and glycine conjugated bile acids. Peaks: 1. glycocholic acid, 2. glycodeoxycholic acid, 3. ursodeoxycholic acid, 4. cholic acid, 5. glycolithocholic acid, 6. chenodeoxycholic acid, 7. deoxycholic acid, 8. lithocholic acid.

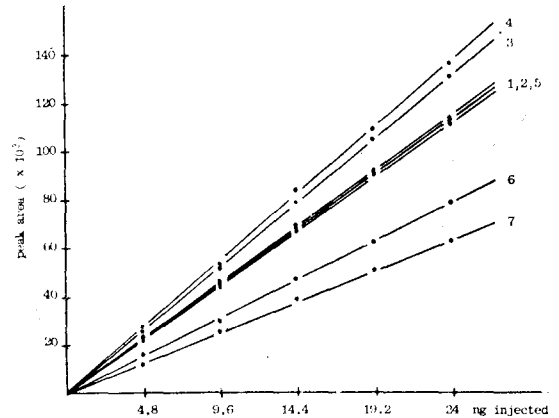


Fig. 6—Calibration curves obtained by standard bile acid mixture. 1. Glycocholic acid, 2. Glycodeoxycholic acid, 3. Ursodeoxycholic acid, 4. Cholic acid, 5. Glycolithocholic acid, 6. Chenodeoxycholic acid, 7. Deoxycholic acid.

포합형 담즙산의 분리정량—bear gall 시료 용액 100 μ l를 취한 뒤 KOH용액 300 μ l, 18-crown-6-ether 용액 600 μ l, BATP용액 150 μ l를 가하여 반응조작하고 이액에 acetonitrile을 가하여 최종액량을 2ml로 만든 후 5 μ l 주입하여 실험하였다 (Fig. 7). 이때 glycolithocholic acid 및 lithocholic acid를 제외한 6종의 담즙산을 분리정량할 수 있었다.

응답 메탄을 추출물에 대한 담즙산의 회수율 측정—응답 MeOH Ext. 100mg에 8종의 담즙산

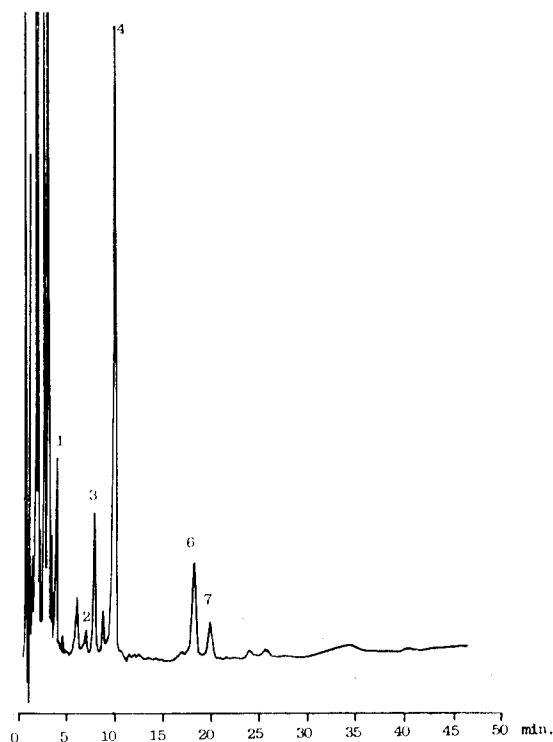


Fig. 7—Chromatogram of bile acids in Bear Gall. Peaks: 1. glycocholic acid, 2. glycodeoxycholic acid, 3. ursodeoxycholic acid, 4. cholic acid, 6. chenodeoxycholic acid, 7. deoxycholic acid.

을 각 4mg씩 취하여 섞고 MeOH을 가해 10ml 용액으로 한후 이액 100 μ l를 취한 뒤 KOH용액 0.7ml, 18-crown-6-ether용액 1.4ml, B ATP용액 350 μ l를 각각 가하여 반응조작하고 이액에

acetonitrile을 가하여 최종액량을 2ml로 만든 후 3 μ l 주입하여 회수율을 측정한 결과 glycocholic acid, chenodeoxycholic acid의 회수율이 94.8%로 가장 낮았으며 다른 것들은 모두 96% 이상의 회수율을 보였다(Table I).

Human serum 중 유리형 및 glycine 포함형 담즙산의 분리정량—Human serum 200 μ l를 취하여 원심분리관에 넣고 MeOH 1ml를 가한 후 초음파세척기에서 10분간 sonication한 뒤 원심분리(4,000G, 5min.)한 상층액 600 μ l를 microtest tube에 취하였다. 이액에 N₂ gas를 통하여 증발건조시킨 후 0.05M phosphate buffer(pH 7.0) 1ml를 가해 녹이고 이액을 Sep-pak C₁₈ cartridge에 10ml/min.의 유속으로 통과시켰다. 이 cartridge에 20% MeOH 2ml를 먼저 통하여 버리고 80% MeOH 4ml를 2분간 천천히 통과시킨 액을 받아 감압증발시킨 후 MeOH 500 μ l를 가해 녹인 액을 시료액으로 하였다. 시료액에 대하여 KOH 용액 20 μ l, 18-crown-6-ether용액 60 μ l, B ATP용액 10 μ l를 각각 가하여 반응조작한 후 acetonitrile을 가하여 최종액량을 200 μ l로 만들고 이액 10 μ l를 주입하여 실험하였다(Fig. 8). 이때 glycocholic acid 및 lithocholic acid를 제외한 6종의 담즙산을 분리정량할 수 있었다.

Human serum에 대한 담즙산의 회수율측정—Human serum 200 μ l를 취하여 원심분리관에 넣고 MeOH로 10배 희석한 bile acid 혼합표준액을 20 μ l 가한 후 상기 human serum중 담즙산의 분리정량 조작과 동일한 처리를 하여 회수율을

Table I—Recoveries of free and glycine conjugated bile acids added to bear gall. (n=5)

Bile acids	Assayed (mg/100mg MeOH Ext.)	Added	Recovered \pm SD	Recovery \pm SD(%)
Glycocholic acid	2.53	4.0	6.32 \pm 0.73	94.8 \pm 1.8
Glycodeoxycholic acid	0.75	4.0	4.65 \pm 0.07	97.5 \pm 1.6
Ursodeoxycholic acid	1.75	4.0	5.63 \pm 0.05	96.9 \pm 0.9
Cholic acid	8.19	4.0	12.05 \pm 0.16	96.5 \pm 3.9
Glycolithocholic acid	NE*	4.0	4.03 \pm 0.11	100.9 \pm 2.8
Chenodeoxycholic acid	1.67	4.0	5.46 \pm 0.10	94.8 \pm 2.4
Deoxycholic acid	0.58	4.0	4.52 \pm 0.07	98.4 \pm 1.7
Lithocholic acid	NE	4.0	3.96 \pm 0.07	98.9 \pm 1.8

NE* : not estimated

Table II—Recoveries of free and glycine conjugated bile acids added to human serum. (n=5)

Bile acids	Assayed ($\mu\text{g/ml}$ human serum)	Added	Recovered \pm SD	Recovery \pm SD(%)
Glycodeoxycholic acid	1.642	4.0	4.74 \pm 0.04	77.4 \pm 1.1
Ursodeoxycholic acid	0.190	4.0	3.72 \pm 0.03	88.3 \pm 0.5
Cholic acid	0.194	4.0	4.06 \pm 0.13	96.8 \pm 3.0
Glycolithocholic acid	0.396	4.0	3.98 \pm 0.12	89.7 \pm 2.6
Chenodeoxycholic acid	10.266	4.0	14.12 \pm 0.71	96.2 \pm 6.5
Deoxycholic acid	0.627	4.0	4.47 \pm 0.17	96.0 \pm 3.6

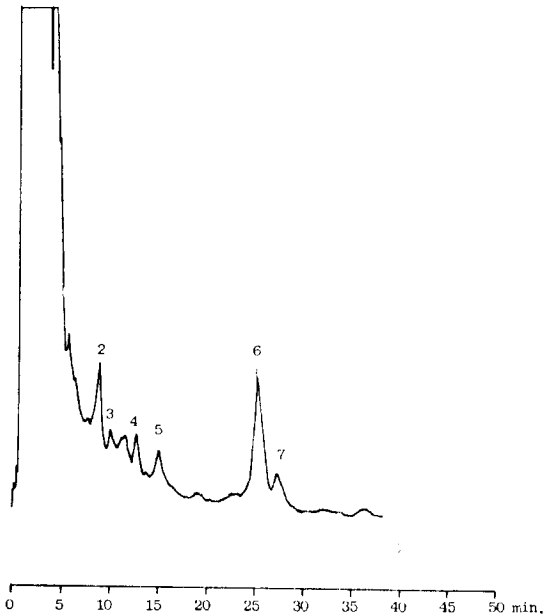


Fig. 8—Typical chromatogram of bile acids in normal human serum. Peaks: 2. glycodeoxycholic acid, 3. ursodeoxycholic acid, 4. cholic acid, 5. glycolithocholic acid, 6. chenodeoxycholic acid, 7. deoxycholic acid.

측정한 결과 분리상이 다소 좋지 못한 glycodeoxycholic acid를 제외한 담즙산들의 회수율은 90% 정도 이상이었다(Table II).

결론

BATP 유도체화제를 사용하여 담즙산을 정량한 결과 KOH, 18-crown-6-ether 촉매하에서 비교적 간편한 방법으로, 담즙산의 카르복실기에 대해 에스테르화가 짧은 시간내에 정량적으로

잘 진행되었으며, 8종의 유리형 및 glycine 포함형 담즙산을 HPLC로 분리한 결과 40분내에 반응부산물에 방해받지 않고 잘 분리되었다. 또한 검출감도 0.008 au에서 1ng까지 검출이 가능하였으므로 종래의 유도체화제들 보다 고감도의 유도체화제로서 생체시료중에 존재하는 극미량의 담즙산도 정량가능한 것으로 판단되었다. 이 방법을 이용해 응답중의 담즙산을 분리 정량하고 그 회수율을 측정한 결과 94% 이상의 양호한 회수율을 나타내었고, 혈청중의 담즙산은 Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용한 간단한 전처리를 함으로써 간편하게 분리정량할 수 있었으며 회수율도 양호하였다. 이상과 같은 결과로서 자외부에서 높은 감도로 검출될 수 있는 유도체화제인 2-bromoacetyltriphenylene을 사용하여 생체내의 물론 여러 영역에서 담즙산 정량에 널리 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

문헌

- 1) Boyd, G.S., Eastwood, M.A. and Maclean, N.: Bile acids in the rat; studies in experimental occlusion of the bile duct. *J. Lipid. Res.* 7, 83 (1966).
- 2) Ota, M., Tsunoda, H. and Hoshita, T.: Metabolism of bile acids. III.; metabolism of chenodeoxycholic acid. *Yakugaku Zasshi* 98, 108 (1978).
- 3) Hepner, G.W., Hofmann, A.F. and Thomas, P.J.: Metabolism of steroid and amino acid moieties of conjugated bile acids in man. *J. Clin. Invest.* 51, 1889 (1972).; 52, 433 (1973).
- 4) Shepherd, R.W., Bunting, P.S., Khan, M., Hill, J.G., Soldin, S.J. and Gall, D.G.: A rapid,

- sensitive method for accurate analysis of individual bile acids in biological fluids by HP-TLC and densitometry. *Clin. Biochem.* 11, 106 (1978).
- 5) Batta, A.K., Salen, G. and Shefer, S.: Thin-layer chromatography of conjugated bile acids. *J. Chromatogr.* 168, 557 (1979).
 - 6) Karlaganis, G. and Paumgartner, G.: Determination of bile acids in serum by capillary gas-liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* 92, 19 (1979).
 - 7) Clayton, P.T. and Muller, D.P.R.: A simplified gas-liquid chromatographic method for the estimation of non-sulphated plasma bile acids. *Clin. Chim. Acta* 105, 401 (1980).
 - 8) Shino, M., Neju, Y., Tateyama, T., Sakaguchi, K., Katayama, K., Tsutsumi, J. and Kawabe, K.: Determination method of bile acids in biological materials by mass fragmentography. *Yakugaku Zasshi* 99, 421 (1979).
 - 9) Yanagisawa, J., Itoh, M., Ishibashi, M., Miyazaki, H. and Nakajama, F.: Microanalysis of bile acid in human liver tissue by selected ion monitoring. *Anal. Biochem.* 104, 75 (1980).
 - 10) Karlaganis, G., Schwarzenbach, R.P. and Paumgartner, G.: Analysis of serum bile acids by capillary gas-liquid chromatography—mass spectrometry. *J. Lipid. Res.* 21, 377 (1980).
 - 11) Tohma, M., Nakata, Y., Yamada, Y., Kurosawa, T., Makino, I. and Nakagawa, S.: Quantitative determination of ursodeoxycholic acid and its deuterated derivative in human bile by gas chromatography—mass fragmentography. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 137 (1981).
 - 12) Okuyama, S., Uemura, D. and Hirata, Y.: High performance liquid chromatographic separation of individual bile acids; free, glycine and taurine conjugated bile acids. *Chem. Lett. Jap.*, 679 (1976).
 - 13) Shaikh, B., Pontzer, N.J., Molina, J.E. and Kelsey, M.I.: Separation and determination of UV-absorbing derivatives of fecal bile acids metabolite by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 85, 47 (1978).
 - 14) Okuyama, S., Uemura, D. and Hirata, Y.: High performance liquid chromatographic analysis of individual bile acids; free, glycine and taurine conjugated bile acids. *Bull. Chem. Soc. Jap.* 52, (1), 124 (1979).
 - 15) Mingrone, G., Greco, A.V. and Passi, S.: Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation and quantification of individual human bile acids. *J. Chromatogr.* 183, 277 (1980).
 - 16) Okuyama, S., Uemura, D. and Hirata, Y.: The improved method of high performance liquid chromatographic separation of individual bile acids; free and glycine conjugated bile acids. *Chem. Lett. Jap.* 461 (1979).
 - 17) Goto, J., Saito, M., Chikai, T., Goto, N. and Nambara, T.: Determination of serum bile acids by high performance liquid chromatography with fluorescence labeling. *J. Chromatogr.* 276, 289 (1983).
 - 18) 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.* 272, 29 (1983).
 - 19) Okuyama, S., Kokubun, N., Higashidate, S., Uemura, D. and Hirata, Y.: A new analytical method of individual bile acids using high performance liquid chromatography and immobilized 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in column form. *Chem. Lett. Jap.* 1443 (1979).
 - 20) Arisue, K., Ogawa, Z., Kohda, K., Hayashi, C. and Ishida, Y.: HPLC analysis of bile acids using a new technique of post column reaction. *Jap. J. Clin. Chem.* 9, 104 (1980).
 - 21) 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).