

HPLC에 의한 柴胡 Saponin의 분리 및 정량

韓 大 錫 · 李 德 根

서울대학교 약학대학

Separation and Determination of Saikosaponins in Bupleuri Radix with HPLC

Dae Suk HAN and Dug Keun LEE

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

Abstract—The optimal condition for the determination of saikosaponin a and d, the major pharmacologically active saponins of the roots of *Bupleurum falcatum*, was studied with the conversion of these saponins into diene saponins (saikosaponin b_1 and b_2). The complete separation and quantitative analysis of these saponins were performed by the method of high performance liquid chromatography using NH_2 column. The conversion of saikosaponin a and d into diene saponins under gastric pH was calculated. Thirty-three percent of saikosaponin a was converted to saikosaponin b_1 and 63 percent of saikosaponin d was converted to saikosaponin b_2 .

Keywords—Umbelliferae · Bupleuri radix · *Bupleurum falcatum* · saikosaponins · high performance liquid chromatography · NH_2 column · gastric pH

「柴胡」는 漢方에서 매우 중요한 생약으로 植柴胡(*Bupleurum falcatum* L.)의 뿌리를 주원료로 사용한다. 주요 성분으로는 saikosaponin a, saikosaponin d, saikosaponin c 등의 oleanane계 saponin이며,^{1,2)} 柴胡의 약리작용은 주로 saikosaponin a와 d에 의한 것으로 보고되어 있다.^{3,4,5)}

한편, saikosaponin의 분리와 정량에 관한 연구결과도 여러 차례 보고된 바 있는데,^{6,7,8)} HPLC에 의한 정량법은 1979년부터 보고되어 있다. 즉, kimata 등은 octadecylsilylated(ODS) column을 사용하여 saikosaponin a와 d를 b_1 , b_2 로 변화시켜 분리 정량하였고,⁹⁾ Kaizuka 등은 silica column을 사용하여 saikosaponin을 분리하였다.¹⁰⁾ 그 외에도 HPLC에 의한 분리방법은 여러 차례 보고되어 있다.^{11,12)}

저자들은 앞서 보고된 HPLC에 의한 saikosaponin의 분리도를 더욱 증진시키기 위해 ODS column과 silica column의 중간극성을 갖고 있

는 NH_2 column을 사용하여 새로운 saikosaponin의 분리방법을 설정하였다. 또한 이 방법을 이용하여 saikosaponin의 胃液과 동일한 pH에서의 변화를 관찰하였다. 이에 그 결과를 보고하고자 한다.

saikosaponin a와 d는 매우 불안정한 allyl oxide 결합을 갖고 있으므로 가벼운 산처리에도 diene saponin으로 변화하는 특성이 있다. 즉 saikosaponin a는 saikosaponin b_1 으로, saikosaponin d는 saikosaponin b_2 로 변화된다(Fig. 1). 한편 saikosaponin a와 d는 uv 220nm 이상에서는 흡수를 나타내지 않아 검출에 난점이 있다. 그러나 그의 diene saponin은 254nm에서도 흡수가 관찰되므로 검출이 용이하게 된다. 따라서 본 실험에서는 이 점을 이용하여 saikosaponin a와 d를 b_1 과 b_2 로 변화시켜 실험을 실시하였다.

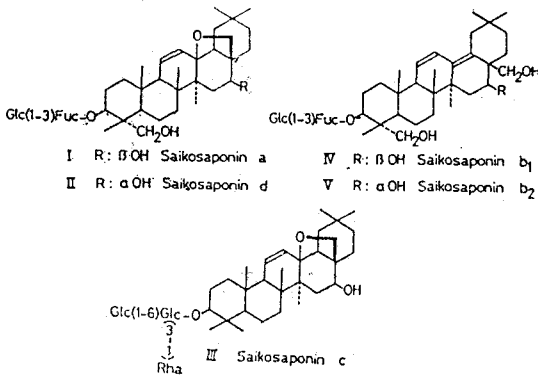


Fig. 1. Structures of saikosaponins

실험 방법

1. 실험재료, 機器, 시약

1) 실험재료

1984년 7월에 경동시장에서 구입한 植柴胡 6 kg을 세절하여 사용하였다.

2) 표준품

WAKO社에서 구입한 saikosaponin a와 d를 표준품으로 사용하였다.

3) 시 약

HPLC에 사용된 용매는 모두 HPLC用을 사용하였고, 증류수는 탈이온 처리하였으며 사용 전에 milipore filter로 여과하여 사용하였다. 그 외 추출 및 조제용은 일급시약을 사용하였다.

4) 기기(機器)

High performance liquid chromatography (Waters Associates, Model 244), UV detector (Waters Associates, Model 450), column(Lichrosorb NH₂, 4mm i.d.×25cm, Merck)

2. 실험 방법

1) 분리 및 검량선 작성

가) 시료액 조제방법

saikosaponin a, d표준품을 각각 1mg씩 취하여 5% HCl-MeOH용액 0.5ml에 용해시켜 실온에서 16시간 방치시킨 후, 2% NaOH로 중화하여 MeOH로 각각을 2ml로 하고 그 혼합액을 시료액으로 하였다.

이 방법은 이미 H. Kimata등에 의해 보고된 바 있으며,⁹⁾ 위와 같은 조건에 의해서 saikosaponin a 및 d는 거의 정량적으로 b₁, b₂로 변화된다고 하였다.

나) 분리조건

고정상으로서 NH₂ column을 사용하였고 이동상으로 CHCl₃ : MeOH : H₂O : 2%NaOH=40 : 10 : 1 : 0.1의 혼합용매를 사용하였다. 流速은 1.2ml/min으로 하였고 검출은 UV 254nm에서 실시하였다. (감도 : 0.1 aufs)

다) 검량선 작성

saikosaponin표준품 a와 d를 각각 1mg씩 취해 가)의 방법으로 처리하여 b₁, b₂로 변화시켜서 총 2ml로 한 후 각각 5μl, 10μl, 15μl, 20μl, 25μl를 injection하여 검량선을 작성하였다.

2) MeOH extract 및 water extract

가) MeOH extract

植柴胡 5g을 MeOH 200ml로 2시간 동안 수욕상에서 추출하여 감압농축한 후 1)의 가) 방법에 따라 처리하여 총 용적을 20ml로 하였다.

나) water extract

植柴胡 14g을 증류수 1,000ml로 3시간 약탕관에서 추출하여 MeOH extract와 동일한 방법으로 총 용적을 80ml로 하였다.

3) 胃液과 동일한 pH에서의 saikosaponin의 변화

가) 胃液과 동일한 pH액 제조(제 1액)

대한약전 일반시험법중 봉해시험법항의 제 1액을 제조하여 사용하였다.¹³⁾

나) 실험 방법

植柴胡 14g을 증류수 1,000ml로 3시간 약탕관에서 추출한 후 그 여액을 반으로 나누어 각각을 감압농축하였다. 그중 하나에 제 1액을 10ml 가해 36.5°C항온조에서 2시간 반응시킨 다음 2%NaOH로 중화하여 총 20ml로 하였다(fraction II). 다른 하나는 증류수로 용해하여 총용적을 20ml로 하였다. (fraction I)

나) 정 량

MeOH extract 및 water extract는 각각 20μl, 40μl를 injection하였고 fraction I 과 II는 각각 20μl씩 injection하였다.

결과 및 고찰

1) 분리도 및 검량선 작성

분리도와 검량선은 Fig. 2,3과 같다. NH₂ colu-

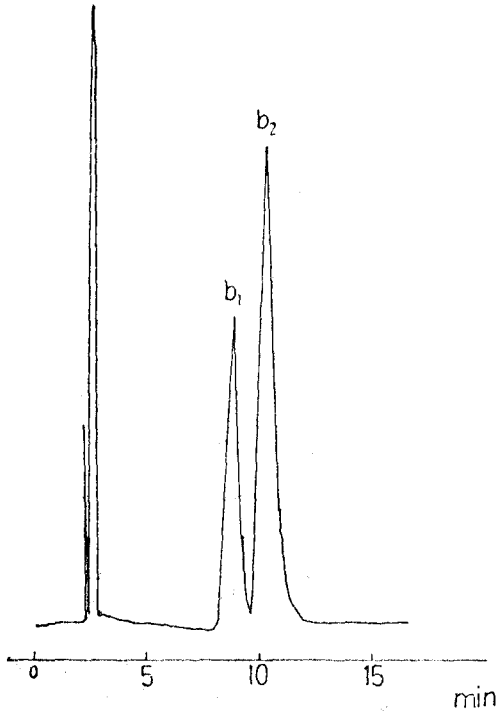


Fig. 2. High Performance Liquid Chromatogram of saikosaponin b_1 and b_2 Column; Lichrosorb NH_2 (4mm i.d. \times 25cm), Mobile phase; $CHCl_3$: MeOH : H_2O : 2% NaOH (=40 : 10 : 1 : 0.1) Flow rate; 1.2ml/min Temp; room temperature Detector; UV 254 nm

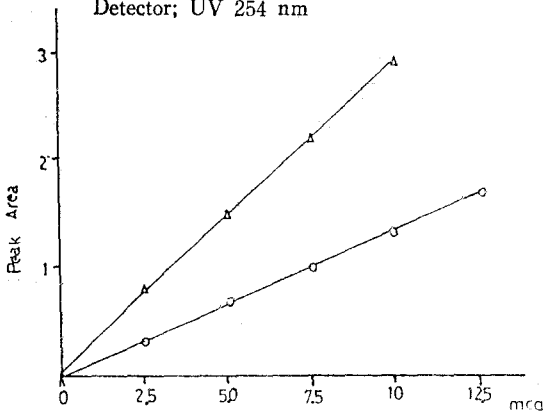


Fig. 3. Calibration curve

○ : saikosaponin b_1 △ : saikosaponin b_2

mn에 의한 saikosaponin의 분리능 각종 용매 system, MeOH/water, CH_3CN /water, CH_3CN /MeOH, $CHCl_3$ /MeOH/water등에서 그 분리능이 양호하지 못했지만 $CHCl_3$ /MeOH/water에 2% NaOH를 소량 가해 약알칼리성을 만들어줌으로

써 양호하게 분리할 수 있었다. ODS column을 사용했을 때는 Kimata등과 Shimizu등의 문헌에서 보듯이^{9,11} 20분 이상의 retention time이 소요되었으나 본 실험에서는 retention time을 15분 내로 단축시켜 앞으로 柴胡 및 柴胡製劑의 품질 평가에 보다 신속하게 이용할 수 있게 하였다. 또한 ODS column보다 값이 싼 NH_2 column을 사용함으로써 경제적인 면에서도 도움이 되도록 하였다.

2) MeOH extract와 water extract의 비교

MeOH extract와 water extract의 chromatogram을 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과는 Table I과 같다. MeOH extract가 water extract보다 약 2배 정도의 함량을 나타내었는데, 柴胡의 효능을 saponin수준에서 본다면 효율적인 면에서의 추출은 alcohol을 사용하는 것이 더 바람직하다고 볼 수 있겠다.

3) 胃液과 동일한 pH에서의 saikosaponin의 변

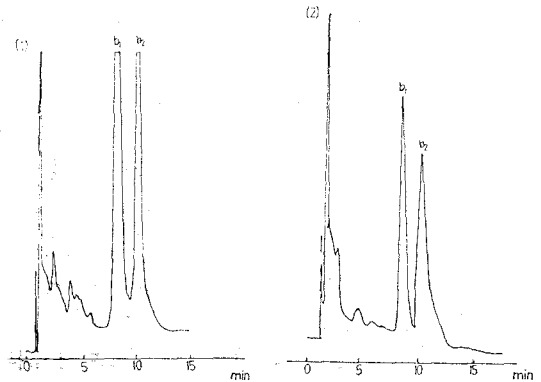


Fig. 4. High Performance Liquid Chromatogram of extracts of MeOH(1) and water (2)

Table I. Contents of saikosaponins in the MeOH and water extracts (% in crude dugs)

	saikosaponin b_1 (=a)		saikosaponin b_2 (=d)	
	(%)	Average	(%)	Average
MeOH ext.	0.62	0.62	0.35	0.36
	0.61		0.36	
	0.62		0.37	
water ext.	0.30	0.30	0.21	0.22
	0.29		0.22	
	0.30		0.22	

Table II. Contents of saikosaponins in the fraction I and II (% in crude drugs)

	b ₁		b ₂		a		d	
	(%)	Average	(%)	Average	(%)	Average	(%)	Average
fraction I (extraction)	0.02	0.02	0.07	0.07	0.28	0.28	0.15	0.15
	0.02		0.06		0.28		0.16	
	0.02		0.07		0.28		0.15	
fraction II (gastric pH)	0.10	0.10	0.14	0.14	0.20	0.20	0.08	0.08
	0.09		0.14		0.21		0.08	
	0.11		0.13		0.19		0.09	

화

fraction I 과 fraction II 의 chromatogram을 Fig. 5에 나타내었다. saikosaponin b₁과 b₂를 검량선에 의해 구한 다음 Table I의 water extract의 결과를 토대로 saikosaponin a와 d를 산출하여 Table II에 나타내었다.

Table II에서 보듯이 fraction I, 즉 제 1액에 반응시키기 前의 성분 함량 순위는 saikosaponin a>d>b₂>b₁順이었으나 반응 후의 順位는 a>b₂>b₁>d로 되었다.

또한 최초의 생약으로부터 추출 시 및 제 1액에서의 변화율을 살펴보면 saikosaponina는 추출시 6.7%가 b₁으로 변화되었고 2시간 동안의 제 1액에서 총 33%가 b₁으로 변화되었다. saikosaponin d는 추출시 이미 32%가 b₂로 변화되었고 제 1액까지의 총 변화율은 63%로 나타났다.

이상에서 저자들은 saikosaponin a가 d보다 일반적으로 더 안정하다고 볼 수 있었으며 柴胡의 주성분 saikosaponin a와 d가 추출과정과 胃腸을 통과하는 과정에서 상당한 양이 b₁, b₂로 변화될 수 있음을 관찰하였다. 따라서 柴胡나 柴胡를

포함하는 漢方처방中の saikosaponin의 함량을 중심으로 품질평가 또는 효능을 검토할 때는 이와 같은 점을 고려해야 할 것으로 사료된다.

결 론

柴胡의 주성분 saikosaponin a와 d를 b₁과 b₂로 변화시켜 NH₂ column을 사용한 HPLC로 고감도의 chromatogram을 얻었다. 그 용매 system은 CHCl₃ : MeOH : water : 2%NaOH=40 : 10 : 1 : 0.1이었다.

柴胡의 MeOH extract는 water extract보다 약 2배의 saikosaponin함량을 보였다.

saikosaponin a와 d의 胃液과 동일한 pH에서의 변화는 최초의 생약으로부터 계산할 때 각각 33%, 63%의 감소를 보였다.

<1985년 8월 20일 접수 : 9월 5일 수리>

문 헌

1. Shibata, S., Kitagawa, I., Takahashi, R. and Fujimoto, H.: *Yakugaku Zasshi* 86, 1132 (1966)
2. Kubota, T. and Hinoh, H.: *Tetrahedron Lett.* 3, 303 (1968)
3. 山本昌弘 : 代謝, 10, 233 (1973)
4. Abe, H., Sakaguchi, M., Konish, H., Tani, T. and Arich, S.: *Planta Medica*, 34, 160 (1978)
5. Abe, H., Odashima, S. and Arichi, S.: *Planta Medica*, 34, 287 (1978)
6. Akahori, A., Kagawa, K. and Shimaoka, A.: *Syoyakugaku Zasshi*, 29, 99(1975)
7. Hiai, S., Oura, H., Kitai, A. and Kanai, K.:

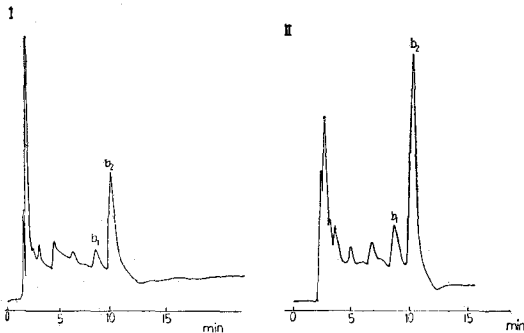


Fig. 5. High performance liquid chromatogram of fraction I and II

- Planta Medica*, 29, 247 (1976)
8. Otsuka, H., Kobayashi, S. and Shibata, S.: *Planta Medica*, 33, 152 (1978)
 9. Kimata, H., Hiyama, C., Yahara, S., Tanaka, O., Ishikawa, O. and Ajura, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 27, 1836 (1979)
 10. Kaizuka, H. and Takahashi, K.: *J. of Chromatography*, 258, 135 (1983)
 11. Shimizu, K., Amagaya, S. and Ogihara, Y.: *ibid.*, 268, 85 (1983)
 12. Arichi, S. Tani T. and Kubo, M.: *Med. J. Kinki Univ*, 4, 59 (1979)
 13. 한국약학대학협의회 약전분과회 : 대한약전 제 4 개정 제1·2부 해설, 문성사, 서울, pp.1071 (1982)