

HPLC에 의한 원지 중 알칼로이드 성분의 정량

박만기 · 박정일 · 김보연* · 김종문 · 임경진 · 한병훈**

서울대학교 약학대학

*연변의학원 약학부

**서울대학교 천연물과학연구소

(1993. 3. 26. 접수)

Analysis of alkaloids in *Polygala tenuifolia* by HPLC

Man Ki Park, Jeong Hill Park, Bao-Yuan Kim*, Jong Moon Kim, Kyung-Jin Liem, Byung Hoon Han**

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Faculty of Pharmaceutical Science, Yanbian Medical College, Jilin 133000, China

**Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received Mar. 26, 1993)

요약 : 원지(*Polygala tenuifolia*, Polygalaceae)에 함유되어 있는 β -carboline계의 알칼로이드를 HPLC를 이용하여 정량하는 방법을 검토하였다. 고정상으로는 RP-18 컬럼을 사용하였고, 이동상으로는 CH_3CN 과 0.01M 인산완충액(pH=3.5)을 기울기 용리시켰으며, UV254nm에서 검출하였다. 알칼로이드 분획을 얻기 위한 전처리 방법으로 산, 염기 처리에 의한 용매추출법과 양이온교환수지(Amberlyst 15)를 이용한 고상추출법을 비교한 결과 양이온 교환수지를 이용한 방법에서 더 나은 크로마토그램을 얻을 수 있었으며, 정량 결과 원지 중 알칼로이드 함량은 각각 harman $2.8 \times 10^{-3}\%$, norharman $1.7 \times 10^{-3}\%$, 1-carbomethoxy- β -carboline $1.3 \times 10^{-3}\%$, 1-carboethoxy- β -carboline $1.4 \times 10^{-3}\%$, perlolyrine $3.3 \times 10^{-3}\%$ 로 나타났다.

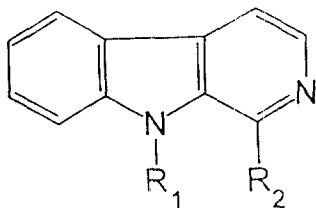
Abstract : β -Carboline alkaloids of *Polygala tenuifolia* (Polygalaceae), an expectorant, tonic and sedative drude drug, were determined by HPLC. The alkaloids were separated by RP-18 column with gradient elution of 0.01M potassium phosphate buffer(pH=3.5) and acetonitrile and detected at UV 254nm. Two methods for the preparation of alkaloid fraction were compared. One was solvent extraction method using acid and base, and the other was solid phase extraction with ion exchange resin (Amberlyst 15). A more refined HPLC chromatogram was obtained using the solid phase extraction method. The alkaloidal contents in *P. tenuifolia* determined by this method were : harman $2.8 \times 10^{-3}\%$, norharman $1.7 \times 10^{-3}\%$, 1-carbomethoxy- β -carboline $1.3 \times 10^{-3}\%$, 1-carboethoxy- β -carboline $1.4 \times 10^{-3}\%$ and perlolyrine $3.3 \times 10^{-3}\%$, respectively.

Key Words : *Polygala tenuifolia*, Polygalaceae, β -carboline alkaloid, HPLC, determination

1. 서론

원지(*Polygala tenuifolia*)는 한방에서 오래 전부터 거담, 강장, 진정의 목적으로 많이 사용되어 온 생약으로 그 화학적 성분으로는 polygalitol, N-acetyl-D-glucosamine, glucose, fructose¹, 3, 4, 5-trimethoxy cinamic acid², xanthone 유도체² 및 wonjisaponins A, B, C, D, E, F, G^{3,4} 등이 보고된 바 있다. 김 등⁵이 원지 중 알칼로이드의 존재를 밝혔으며, 한 등⁶에 의해서 이 알칼로이드 성분이 분리되고 그 구조가 확인되었다. 원지 중 알칼로이드 성분은 모두 β -carboline 계열에 속하며 이 물질들은 원지 이외에도 인삼⁸, 구기자⁹, 더덕¹⁰, 고목¹¹에서도 존재함이 알려져 있다. β -carboline 계열의 알칼로이드들은 환각성 물질로 알려져 있는데¹², 에탄올이 체내에서 산화되어 생긴 acetaldehyde가 tryptamine과 축합하여 harman(β -carboline계 물질)을 생성해 이 harman에 의해 환각 상태가 나타난다는 보고도 있다¹³. 원지를 비롯하여 인삼, 구기자, 더덕 등 강장제로 사용하고 있는 생약에서 같은 계열인 β -carboline계 알칼로이드가 분리되고 있는 점은 주목할 만한 일이다.

본 실험은 이들 생약 중의 β -carboline계 물질을 정량하고자, 이들 알칼로이드를 함유하고 있는 것으로 보



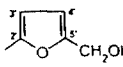
Compound	R ₁	R ₂
Harman	H	CH ₃
Norharman	H	H
1-Carbomethoxy- β -carboline	H	COOCH ₃
1-Carboethoxy- β -carboline	H	COOC ₂ H ₅
1-Carbobutoxy- β -carboline	H	COOC ₄ H ₉
Perlolyrine	H	

Fig. 1. Structure of β -Carboline Alkaloids

고된 원지를 대상으로 이 물질들의 HPLC를 이용한 동시 분석법을 확립하고 정량을 위한 시료처리 방법을 개선하고자 하였다.

본 연구에서 분석 대상으로 한 여섯 가지 알칼로이드는 harman, norharman, 1-carbomethoxy- β -carboline, 1-carboethoxy- β -carboline, 1-carbobutoxy- β -carboline, perlolyrine으로 이들의 화학적 구조는 Fig. 1과 같다.

2. 실험

2. 1. 시약

생약은 경동시장에서 구입하여 사용하였고 추출용매는 1급 시약을 사용하였다. HPLC용 아세토니트릴은 Merck 제품(독일)을, 비수용 이온교환수지인 Amberlyst 15는 Sigma 제품(미국)을 사용하였고 기타 시약은 특급을 사용하였다.

표준품 β -carboline계 알칼로이드는 원지로부터 분리 확인된 것, 또는 저자 등이 합성한 것을 사용하였다⁶.

2. 2. 기기

HPLC는 Hitachi HPLC L-6200 및 L-6000 펌프, 자외선 검출기 (Hitachi, L-4200, Japan)를 사용하였고 IBM-PC 호환 기종에 사용할 수 있도록 본 실험실에서 제작한 소프트웨어를 사용하여 크로마토그램을 기록하였다.⁷ HPLC 컬럼은 μ -Bondapak C₁₈(4.6 mm i.d. × 15cm, Waters, U.S.A.)을 사용하였다.

2. 3. 표준액의 조제

Norharman 1.5mg, harman 1.4mg, perlolyrine 1.2mg, 1-carbomethoxy- β -carboline 1.3mg, 1-carboethoxy- β -carboline 1.3mg, 1-carbobutoxy- β -carboline 1.9mg을 각각 에탄올 1ml에 녹인 액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 표준액으로 하였다.

2. 4. 원지 알칼로이드 분획의 분리

2. 4. 1. 용매추출에 의한 방법

한 등이 사용한 방법⁸을 이용하여 원지 중 알칼로이드 분획을 얻었다. 원지 150g을 메탄올 250ml로 3시간 씩 3회 환류추출한 후 여과하고, 용매를 감압농축하여 얻은 잔사를 물 250ml에 분산시키고 같은 부피의 에테르로 3회 추출하였다. 이 에테르층을 5% 염산 250ml로

3회 추출하고 5% 염산추출액에 진한 암모니아수를 가하여 pH를 9로 맞춘 후, CHCl_3 250mL로 3회 추출하여 얻은 CHCl_3 층을 대상으로 다시 위의 용매 추출에 의한 전처리를 반복하여 더욱 정제한 후 Na_2SO_4 로 탈수, 농축한 후 에탄올 1ml에 녹이고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 후 HPLC에 주입하여 정량하였다.

2. 4. 2. 이온교환수지를 이용한 고상추출법

원지 150g을 메탄올 250ml로 3시간씩 3회 환류추출한 후 여과하고, 용매를 감압농축하여 얻은 잔사를 250ml 물에 현탁시켜 같은 부피의 에테르 250ml로 3회 추출하고 에테르 추출액을 농축하여 남은 잔사를 CHCl_3 : EtOH : H_2O = 5:5:1 용액에 녹여 이것을 시료로 하여 이온교환수지 Amberlyst 15 컬럼(3cm i.d. \times 30cm)을 통과시켰다. 이온교환수지는 시료를 가하기 전에 미리 탈이온수로 세척해서 컬럼에 충전시킨 뒤, 5% HCl, 에탄올성 1N NH_4OH , 에탄올성 5% HCl, CHCl_3 : EtOH : H_2O = 5:5:1 순서대로 세척하여 놓았다. 시료를 가하고 CHCl_3 : EtOH : H_2O = 5:5:1 용액 150ml로 비알칼로이드 성분을 제거한 후, 에탄올성 1N NH_4OH 로 용리시켜 알칼로이드 분획만을 얻었다. 이 액을 에탄올 1ml에 녹이고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 액을 검액으로 하여 HPLC에 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 원지 알칼로이드의 HPLC 분리 조건

원지 중의 알칼로이드를 정량하기 위하여 컬럼은 μ -Bondapak C_{18} (4.6mm i.d. \times 15cm, Waters, U.S.A.)을 사용하였고, 이동상으로는 0.01M 인산 완충액(pH=3.5)과 아세트니트릴 혼액을 90 : 10의 비율로 시작하여 45분에 용매의 비율이 60 : 40에 이르도록 유속 0.7ml/min으로 기울기 용리시켰으며 UV 254nm에서 검출하였다.

이 조건에서 6가지 β -carboline 알칼로이드를 완전히 바탕선 분리할 수 있었다(Fig. 2).

3. 2. 원지 중의 알칼로이드의 정량

원지 중의 알칼로이드를 분리 정량하기 위한 시료 전처리 방법으로서 용매, 추출법과 이온 교환수지를 이

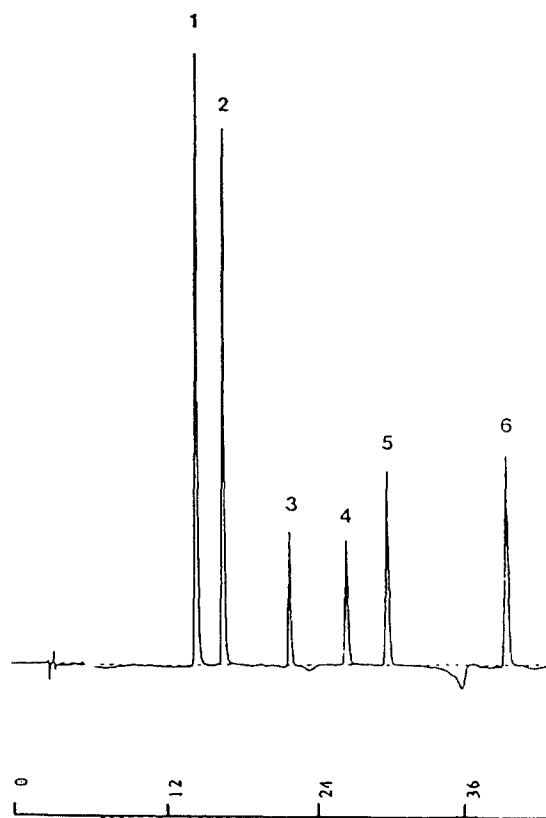


Fig. 2. Chromatogram of standard alkaloids

1. Norharman, 2. Harman, 3. Perlolyrine,
4. 1-Carbomethoxy- β -carboline,
5. 1-Carboethoxy- β -carboline,
6. 1-Carbobutoxy- β -carboline

Column: μ -Bondapak C_{18} (4.6 mm i.d. \times 15cm, Waters, U.S.A.)

Flow-rate : 0.7ml/min,

Detector : UV 254 nm, AUFS 0.02.

용하는 방법을 비교하였다.

용매 추출법에 의해 알칼로이드 분획을 얻고 이 분획을 이용하여 알칼로이드를 정량하고자 하였으나 방해물질이 효과적으로 제거되지 않아 각 알칼로이드의 피크와 다른 피크가 겹쳐 각 알칼로이드의 정량이 어려웠다. 용매추출을 2회 반복하여 알칼로이드 분획을 얻은 경우, 일부 알칼로이드의 정량이 가능하였으나 그 외의 알칼로이드는 여전히 제거되지 않은 방해물질과 피크가 겹쳐 정량이 어려웠으며, 이온교환수지를 이용

한 고상 추출법에 의해 알칼로이드 분획을 얻는 방법에 비해 알칼로이드 성분의 손실이 컸다.

2. 4. 2와 같은 이온교환수지를 이용한 고상 추출법으로 원지의 알칼로이드 분획을 얻어 동일한 조건에서 HPLC를 실시하여 크로마토그램을 얻었다(Fig. 3). 그 결과 용매추출법보다 방해물질이 효과적으로 제거되어 적은 양의 생약으로도 각 알칼로이드의 정량이 가능하였다. 또한 이온교환수지를 이용한 고상 추출법이 용매추출법에 비해 시간, 용매가 훨씬 적게 소요되어 매우 경제적인 전처리법임을 알 수 있었다.

β -carboline계 알칼로이드들의 피크는 표준품들을

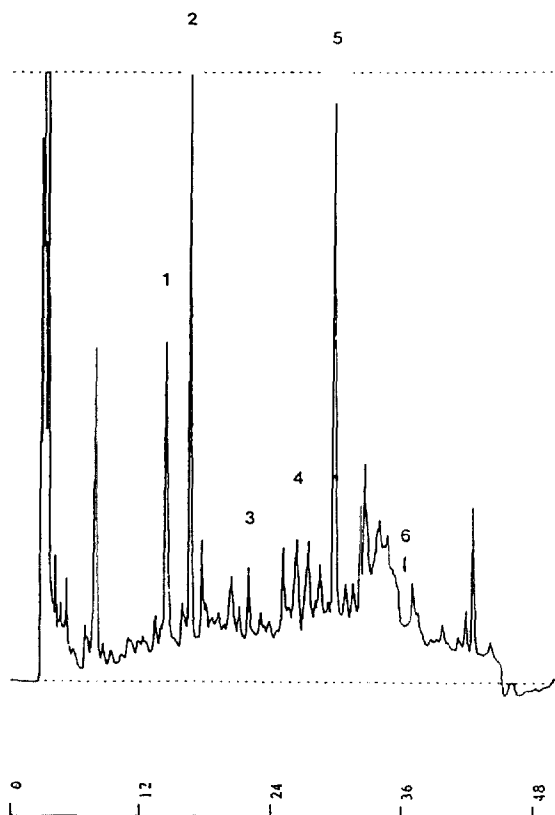


Fig. 3. Chromatogram of alkaloid fraction of *Polygala tenuifolia* obtained by extraction with cation exchange column(Conditions as in Fig. 2.).

1. Norharman, 2. Harman, 3. Perlolyrine,
4. 1-Carbomethoxy- β -carboline,
5. 1-Carboethoxy- β -carboline.

같이 주입하여 위치를 확인하였고 각각의 알칼로이드의 함량은 표준품의 검량선으로부터 구하였다. 이 때 각각의 알칼로이드의 검량선의 상관계수는 0.997~0.999로 양호한 직선성을 보였다. 원지 중 알칼로이드의 함량은 Table 1과 같다.

Table 1. Analytical Results of Alkaloids in *Polygala tenuifolia*.

	method A*	method B*
Harman	$1.3 \times 10^{-4}\%$	$2.8 \times 10^{-3}\%$
Norharman	1.5×10^{-4}	1.7×10^{-3}
1-Carbomethoxy- β -carboline	3.1×10^{-5}	1.3×10^{-3}
1-Carboethoxy- β -carboline	—	1.4×10^{-3}
1-Carbobutoxy- β -carboline	—	—
Perlolyne	3.0×10^{-5}	3.3×10^{-3}

*method A : solvent extraction

method B : ion-exchange solid phase extraction

참고 문헌

1. Takiura, K. and Honda, S.: Sugar Components of the Root of *Polygala tenuifolia*. *Yakugaku Zasshi*, **84**, 1223(1964).
2. Ito, H., Taniguchi, H., Kita, T., Matsukui, Y., Tachikawa, E. and Fujita, T.: Xanthones and a Cinnamic Acid Derivatives from *Polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, **16**, 1614(1977).
3. Sakuma, S. and Shoji, J.: Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* Willdenow (I), Isolation of Saponins and the Structures of onjisaponins G. and F. *Chem. Pharm. Bull.*, **29** (9), 2431(1989).
4. Sakuma, S. and Shoji, J.: Studies on the Constituents of the Root of *Polugala tenuifolia* Willdenow (II), On the Structures of Onjisaponins A, B and E. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 810(1982).
5. Kim, J. H.: Studies on the alkaloid from *Polygala tenuifolia* Willdenow, *Yakhak Hoeji*, **8**, 59(1964).
6. Han, B. H., Park, J. H., Park, M. K., and Han, Y. N.: β -carboline Alkaloids of *Polygala tenuifolia*, *Arch Pharm. Res.*, **8** (4), 243(1985).
7. Park, M. K., Park, J. H., Cho, J. H., Kim, N. Y., Kang, J. S.: Chemometric Tool of Chromatographic Pattern Recognition for the Analysis of Com-

- plex Mixtures, *Arch Pharm. Res.*, **15** (4), 376(1992).
8. Han, B. H., Park, M. K., Han, Y. N. and Woo, L. K.: Alkaloidal Components of *Panax ginseng*. *Arch Pharm. Res.*, **9** (1), 21(1986).
 9. Han, B. H., Park, J. H., Park, M. K. and Han, Y. N.: Studies on the Alkaloidal Components of the Fruits of the Fruits of *Lycium chinense*. *Arch Pharm. Res.*, **8** (4), 249(1985).
 10. Chang, Y. K., Kim, S. Y. and Han, B. H.: Chemical Studies on the Alkaloidal Constituents of *Codonopsis lanceolata*. *Yakhak Hoeji*, **30** (1), 1 (1986).
 11. Ohmoto, T. and Koike, K.: Studies on the Constituents of *Picrasma quassioides* BENNET. III., The Alkaloidal Constituents. *Chem. Pharm. Bull.*, **32** (9), 3579(1984).
 12. Reske, D. B. and Ferguson, N. S., *J. Heterocycle Chem.*, **19**, 45(1982).
 13. Rommelspacher H., Strauss S. and Lindeman J.: Excretion of Tetrahydroharman and Harmane into the Urine of Man and Rat after a Load with Ethanol, *FEBS Lett.*, **109** (2), 209(1980).