약학회지 제40권 제 2 호 149~154(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 2

HPLC에 의한 *Zea mays* 불검화추출물과 그의 함유제제 중 β-시토스테롤의 정량

김경호# · 박우선 · 심창구*
강원대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(Received November 9, 1995)

Determination of β-sitosterol in Unsaponifiable Fraction of *Zea mays* and Related Drug Preparations by HPLC

Kyeong Ho Kim#, Woo Sun Park and Chang Gu Shim*
College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
**College of pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

Abstract—A high-performance liquid chromatographic method for the determination of β-sitosterol in the unsaponifiable fraction of *Zea mays* L. and its related drug preparations using a cholesterol as an internal standard was investigated. They were saponified with 20% methanolic KOH solution. Phytosterols in the reaction mixture were extracted with diethyl ether and separated on silica gel TLC plate with n-hexane-diethyl ether (40 : 60) as the solvent and then were scraped off. They were separated by reversed phase high performance liquid chromatography on Inertsil ODS-2 column with detection at 205 nm. Cholesterol and β-sitosterol were resolved from interferences by adjusting the acetonitrile content in the MeOH-tetrahydrofuran-H_2O eluent. The detection limit of β-sitosterol was 0.43 μg.

Keywords □ β-Sitosterol, Unsaponifiable fraction, *Zea mays* L., HPLC.

Zea mays L.의 불검화 정량 추출물은 치아지지조직질환, 치은염 및 치주증의 치료제의 원료로서 사용되고 있다. *Zea mays* L.의 불검화 정량 추출물 중에는 phytosterol, triterpene alcohol, tocopherols, carotenoids 및 hydrocarbons 등이 함유되었으나 특이성분은 아직 보고된 바 없다. *Zea mays* L.의 불검화 정량 추출물과 이를 함유한 제제의 품질관리를 위하여 대표적인 함유 성분인 β-sitosterol을 지표물질로 한 신속하고 간편한 HPLC 분석법을 검토하였다.

식물유 중의 β-sitosterol의 분석법으로 시료를 검화하고 불검화 추출물을 추출한 후 TLC 또는 Florisil® column chromatography로 전처리하고 GLC로 분석하는 방법[1], on-line LC-GC에 의한 분석법[2], 또는 solid phase extraction로 전처리하고 HPLC 또는 GC로 분석하는 법[3], Florisil® column chromatography로 전처리한 후 HPLC로 분리 정량하는 방법[4], 유도체 화해서 GC로 분석하는 방법[5], TLC 또는 Sep-Pak으로 전처리하여 GC로 분석하는 방법[6,7] 및 GC/MS로 분석하는 방법[8] 등 복잡한 간섭물질을 제거하기 위하여 다양한 전처리 과정이 보고되어 있으나 아직 의약품 제제에 대한 적용은 보고된 바 없다.

본 실험에서는 *Zea mays* L.의 불검화 정량 추출물 원료와 이를 함유한 제제, 즉 당의정 및 서방정의 품질관리를 위해 이들 중 지표물질인 β-sitosterol를 정량할 때 검화, 불검화물의 추출 및 TLC의 과정을 통하여 최적의 전처리과정과 RP-HPLC에서 간섭물질 피크의 영향을 받지 않는 최적의 이동상의 조성 등을 검토하였다.

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0361-50-6918 (팩스) 0361-55-7865

Table I — Condition of high-performance liquid chromatography

Column	: Inertsil ODS-2 (5 µm, 4.6×150 mm)
Mobile phase	: acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran, water (67.5/22.5/0.9/10, v/v)
Detection wave length	: 205 nm
Flow rate	
Injection volume	: 10 µl
Column oven temperature	: 35℃

실험방법

시료 및 시약 – *Zea mays* L.의 불검화 정량 추출물(시료 1)과 그의 제제인 당의정(시료 2), 서방정(시료 3)을 (주)동국 제약에서 제공받아 시료로서 사용하였다. β-sitosterol 표준물질과 내부표준물질인 cholesterol은 Sigma사에서 구입하였고, 발색 시약인 2′,7′-dichlorofluorescein은 Sigma사에서 구입하여 ethanol에 녹여 0.2%(w/v)으로 조제하여 사용하였다. diethyl ether, anhydrous sodium sulfate, chloroform, hexane은 Tedia사에서 구입하였다. TLC plate로는 Merck사의 pre-coated TLC plate Silica Gel 60 F-254 (5×10)을 사용하였고, HPLC용 용매는 Merck사 제품을 사용하였다. 검화용액으로는 MeOH성 KOH 20%(w/v)을 사용하였고 기타의 시약들은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

기기 및 측정조건 – Shimadzu HPLC system, 즉 2대의 LC-6A pump, Rheodyne Injector, CTO-6A column oven, SPD-6AV UV-VIS spectrophotometric detector, SCL-6A system controller와 C-R6A chromatopac data processor를 사용하였다. 컬럼은 Inertsil ODS-2 (5 µm, 4.6×150 mm)를 사용하였다. 이동상으로는 acetonitrile, MeOH, tetrahydrofuran, water (67.5/22.5/0.9/10, v/v)을 이용하였다.

표준 용액의 조제 – β-sitosterol 표준품을 chloroform에 용해하여 20 mg/ml로 조제하여 보존용액으로 하고, chloroform으로 적당히 희석한 후에 모두 5개의 표준 용액을 만들었다. 각 표준용액의 농도는 0.5, 1, 2, 3, 10 mg/ml였고, 내부표준물질인 cholesterol을 각각 2 mg/ml가 되도록 넣었다.

전처리 절차의 검토 – HPLC 분석시 간섭물질의 영향을 최소화하기 위하여 시료 중 불완전한 검화물에 대한 검화과정의 유무, 수용성 간섭물질을 제거하고 불검화물을 ether로 추출하는 과정의 유무, 불검화추출물 중 phytosterol fraction만을 semi-preparative TLC로 분취하는 과정에 따라 전처리과정을 3가지로 나누어 검토하였다.

METHOD I

Saponification – 시료 1은 약 50 mg, 시료 2, 3은 약 200 mg을 각각 취한 후 cholesterol을 각각 2 mg씩 넣었다. 시료에 검화용액을 20 ml 가한 후, 수욕에서 1시간 환류시켰다.

Unsaponifiable Extraction – 감압농축기에서 MeOH을 증발시키고 물 60 ml에 현탁시킨 후 불 검화 정량 추출물을 diethyl ether로 30 ml씩 3회 추출 하고 그 추출액을 증류수 60 ml로 세척하였다. 수층은 제거하고 ether층만 취하여 anhydrous sodium sulfate column에 통과시켰다. 감압농축기에서 용매를 증발, 건조시킨 후에 남은 잔사를 chloroform 500 µl에 녹여 이 액을 TLC 용 시료로 하였다.

TLC를 통한 간섭물질의 제거 – TLC용 시료 1은 40 µl, 시료 2, 3은 100 µl씩 syringe에 취하여 silica gel plate 1개에 점적하고 동시에 β-sitosterol 표준액도 점적한 후, n-hexane과 diethyl ether (40 : 60)의 혼합용매로 전개하였다. β-sitosterol 표준액의 전개영역을 2′,7′-dichlorofluorescein으로 발색 시켜 Rf치를 확인하고 이 부분을 긁어내어 fritted glass filter에서 chloroform과 diethyl ether 10 ml로 각각 2회 추출하였다. 감압농축기에서 추출물을 증발, 건조시킨 후에 남은 잔사를 chloroform 500 µl에 녹여 이 액을 HPLC용 검액으로 하였다.

HPLC에 의한 분석 – 위의 시료 검액 10 µl을 Table I의 HPLC 조건에 따라 내부표준법으로 정량하였다.

METHOD II

Saponification을 생략한 전처리 – 시료 1은 50 mg, 시료 2, 3은 각각 200 mg를 취한 후 cholesterol을 각각 2 mg씩 넣었다. 검화을 생략하고 diethyl ether 30 ml로 sonicator에서 30분 추출한 후 증류수 60 ml로 세척

하고 ether층을 증발 건고한 후 chloroform 500 μl에 용해하여 TLC용 검액으로 하였다. 이하 Method I과 같은 TLC에 의한 간섭물질의 제거조작을 행하였다.

METHOD III

TLC만을 행한 전처리 - 시료 1은 50 mg, 시료 2, 3

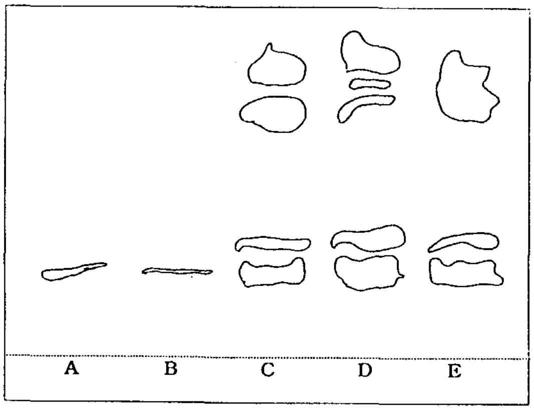

Fig. 1 — Preparative TLC on silica gel 60F-254 of unsaponifiable matter of *Zea mays* L. and its preparations, using n-hexane-dietyl ether (40 : 60) as the solvent and 2',7'-dichlorofluoresceine as a spray reagent.
A=β-sitosterol; B=cholesterol (internal standard); C=Unsaponifiable matter of *Zea mays* L. (sample 1); D=Conventional tablet (sample 2); E=Sustained release tablet (sample 3)

은 각각 200 mg를 취한 후 cholesterol을 각각 2 mg씩 넣었다. chloroform 30 ml로 sonicator에서 30분 추출한 후 여과하여 증발건고 시켰다. chloroform 500 μl에 용해한 후 Method I과 같이 TLC를 통하여 간섭물질을 제거하고 바로 HPLC로 분석하였다.

이동상 조성의 검토 - 이동상으로 acetonitrile, MeOH, tetrahydrofuran, water (67.5/22.5/0.9/10, v/v)을 사용하였는데, 그 중 acetonitrile과 MeOH의 비가 간섭물질과 내부표준물질의 분리에 어떻게 영향을 미치는가를 조사하기 위해 tetrahydrofuran과 water의 비는 변화시키지 않고 acetonitrile과 methanol의 비만 변화시켰다. acetonitrile과 MeOH의 비의 합을 100으로 보았을 때, 그 비를 각각 0 : 100, 25 : 75, 50 : 50, 75 : 25, 100 : 0으로 하여 이동상을 조제한 후 전처리한 시료 1(Method I)을 HPLC에 주입하였다.

결과 및 고찰

TLC 및 Phytosterol 구획의 분취 - 발색 시약을 분무하였을 때 β-sitosterol은 녹색의 형광을 나타내었다. β-sitosterol의 Rf치는 0.15～0.17의 범위에 있었다.

그 외에도 Rf값 0.85 부근에서 강한 점이 나타났고 β-sitosterol의 위치와 가까운 Rf 0.25 부근에서도 점

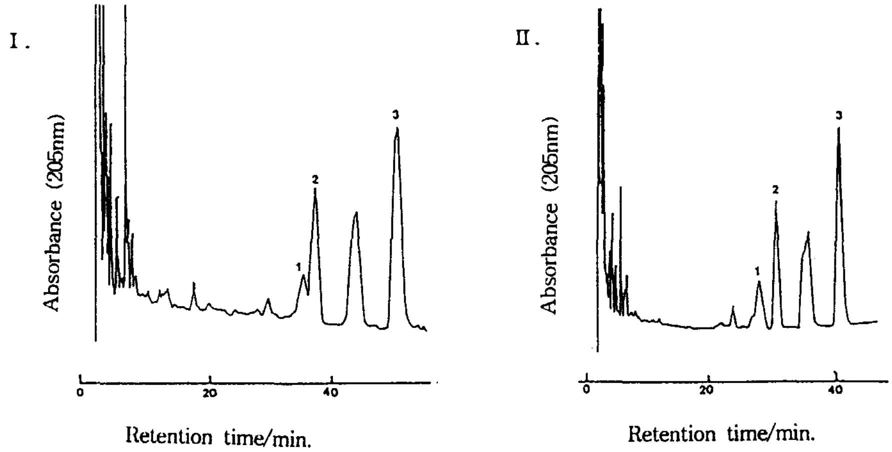

Fig. 2 — HPLC chromatograms of unsaponifiable matter of *Zea mays* L. showing the separation of cholesterol and interfering material according to the mobile phase composition.
I - acetonitrile 25% (MeCN/MeOH/THF/Water=22.5/67.5/0.9/10, v/v)
II - acetonitrile 75% (MeCN/MeOH/THF/Water=67.5/22.5/0.9/10, v/v)
(1 : interfering material, 2 : cholesterol, 3 : β-sitosterol)

이 나타났다. TLC는 이러한 시료의 간섭물질들을 효과적으로 제거하는 것으로 나타났다. cholesterol이 나타나는 위치가 β-sitosterol의 영역안에 존재하는 것으로 보아서 (Fig. 1), 내부표준물질로서 cholesterol이 적당한 조건을 가지고 있음을 알 수 있었다.

이동상 조성에 따른 간섭 peak의 거동 – 처음에 이동상으로 MeOH, water, THF와 acetonitrile 소량을 사용하여 분석하였으나 그 결과의 편차가 매우 심하였다. 내부표준물질인 cholesterol (Fig. 2의 2번 peak)이 간섭물질의 peak(Fig. 2의 1번 peak)와 완전히 분리되지 않은 결과였다. 이는 Fujimoto[6] 등이 유지 중의 sterol을 RP-HPLC로 분리할 때 이동상을 MeOH/THF(99/1)로 사용하여 cholesterol과 공존하는 간섭물질의 피크를 분리하지 못했던 결과와 일치하였다.

4가지 용매 즉 MeOH, water, THF, acetonitrile을 단독 또는 혼합액으로 하여 분리 정도를 관찰한 결과, cholesterol과 간섭물질의 분리는 acetonitrile의

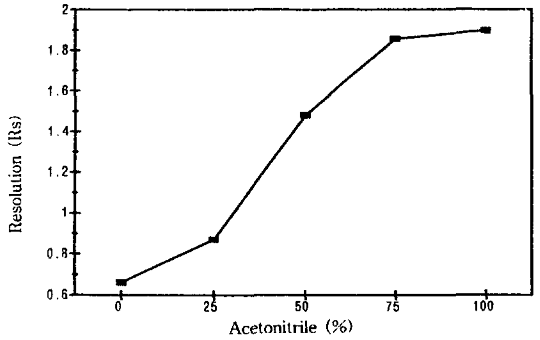

Fig. 3 — Effect of acetonitrile in the mobile phase on the resolution of interfering materials and cholesterol (internal standard).

비에 영향을 받는다는 것을 알았다. MeOH과 acetonitrile의 조성비율만 변화시켜 분석해 본 결과 Fig. 3에서와 같이 actonitrile의 비가 75 ~ 100% 사이(이동상 전체 100% 중 67.5 ~ 90%)에서 Rs값이 1.5 이상으로 양호한 분리를 보여 주었다.

THF를 넣지 않은 경우는 시료에 따라 분리가 이루어지지 않거나 피크 높이의 5분의 1이 되는 곳에서 약간 분리되었다. acetonitrile을 빼고 MeOH, water, THF만 사용하였을 때에는 β-sitosterol의 분리도 완전하지 않았다. 본 실험에서는 acetonitrile 75%를 선택하여 사용하였다.

전처리 절차에 따른 영향 – 시료 1, 2, 3을 이상과 같은 전처리를 통하여 HPLC로 분석한 결과는 Table II와 같다.

같은 시료를 4회 반복 실험하여 β-sitosterol의 농도 및 편차를 구하였다. Method I ~ III을 비교해 볼 때 전처리 방법이 간단해 질수록 β-sitosterol의 농도가 감소하였다. 그 원인은 앞의 결과에서 고찰하였듯이 internal standard인 cholesterol의 피크와 겹치는, 공존하는 간섭물질의 제거정도의 차이에 기인한 것이다. 전처리가 간단할수록 cholesterol과 간섭물질과의 분리가 양호하지 않았고 그 부분의 chromatogram이 더 복잡하였다(Method II, III). 간섭물질로 인하여 cholesterol의 피크의 면적이 크게 평가되어 상대적으로 β-sitosterol의 농도가 더 작은 것으로 계산되는 오류를 나타냈다. 그러나 전처리과정이 가장 복잡한 Method I의 경우는 Method II, III의 경우의 간섭물질이 완전히 제거되었고, 그래도 남아있는 다른 공존 간섭물의 피크는 이동상을 acetonitrile, MeOH, tetrahydrofuran, water (22.5/67.5/0.9/ 10)을 사용하여 완

Table II — Comparison of sample pretreatment methods for the determination of β-sitosterol in unsaponifiable matter of *Zea mays* L. and its preparations

Sample pretreatment method*	Contents of β-sitosterol (w/w%)					
	Unsaponifiable matter of Zea mays L.		Conventional Tablet		Sustained release Tablet	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
Method I	12.2883	2.9280	1.0093	6.4203	1.2063	8.1904
Method II	12.6559	4.0906	0.8530	8.5111	0.9997	13.3769
Method III	10.7729	7.5076	0.5350	11.120	0.7795	19.4735

Method I : through the saponification, unsaponifiable extraction and TLC separation.
Method II : through the unsaponifiable extraction and TLC separation without saponification.
Method III : through the TLC separation
* was shown in Experimental

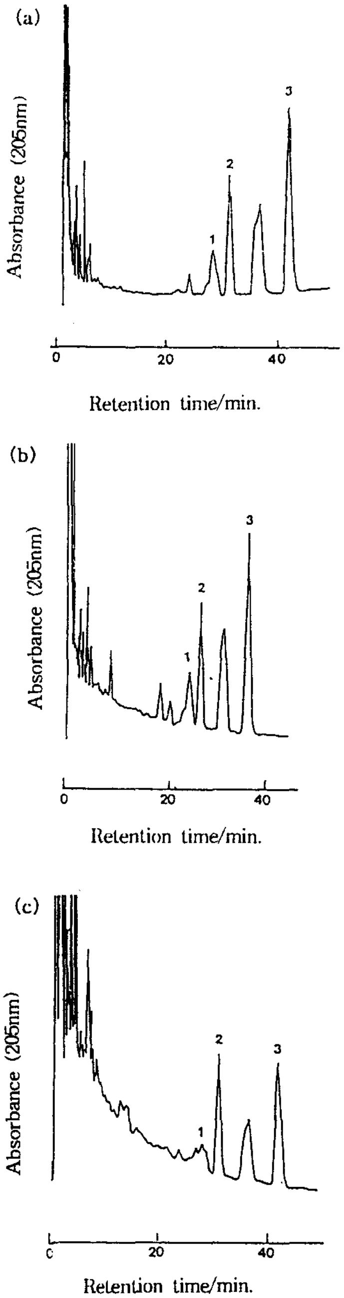

Fig. 4 — HPLC chromatograms of unsaponifiable matter *Zea mays* L. according to the sample pretreatment methods.
(a) Method I, (b) Method II, (c) Method III
(1 : interfering material, 2 : cholesterol, 3 : β-sitosterol)

전히 분리할 수 있었다.

각 시료의 전형적인 chromatogram을 Fig. 4 (Method I)에 나타내었다. 같은 시료를 가지고 실온에서 HPLC에 주입하였을 때, 지연시간이 1시간 이상으로 나타났으며 피크가 넓게 나타나서 정확한 분석을 하기가 어려웠다. Oven의 온도를 35°C로 올렸을 때 지연시간이 40분 정도로 감소하였고 column efficiency가 크게 증가되었다.

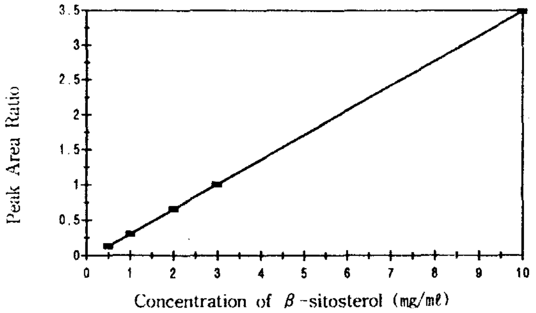

Fig. 5 — Calibration curdve of β-sitosterol.

검량선 - 0.5 ~ 10 mg/m*l* 농도 범위의 β-sitosterol 표준용액을 이상과 같은 최적조건에서 HPLC로 분석하였다. 내부표준물질로 cholesterol을 사용하여 β-sitosterol과 cholesterol의 면적의 비로 검량선을 작성하였다. 각 표준용액 10 μ*l* 주입시 β-sitosterol은 Y = 0.3537X-0.0502 (r = 0.9955)로 Fig. 5에서와 같이 거의 원점을 지나는 양호한 직선성을 나타내었다. 이때 β-sitosterol의 검출 한계(S/N = 3)는 0.43 μg이었다.

결 론

1. *Zea mays* L. 원료 및 그 제제에 함유되어 있는 β-sitosterol을 검화과 용매 분획을 거쳐 TLC로 간섭물질을 제거한 후에 HPLC로 정량하였다. 이는 제제의 품질관리에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

2. β-sitosterol은 0.5 ~ 10 mg/m*l* 농도범위에서 상관계수가 0.9955로 양호한 직선성을 나타내었고, 검출한계(S/N = 3)는 0.43 μg이었다.

3. *Zea Mays* L. 원료와 그 제제는 67.5%의 acetonitrile, 22.5%의 MeOH, 0.9%의 THF, 10%의 water를 이용하여 내부표준물질인 cholesterol과 미지의 간섭물질을 양호하게 분리할 수 있었다(Rs = 1.9).

문 헌

1) Kovacheva, E., Ganchev, G., Neicheva, A.,

Javanova, I., Konoushlieva M. and Andreev, V., : Gas chromatographic determination of sterols in fat-soluble concentrates obtained from plant materials. *J. Chromatogr.* **509**, 79 (1990).

2) Grob, Konrad, and Lanfranchi, Mauro. : Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr.* **471**, 397 (1989).

3) Amelio, M., Rizzo, R. and Varazini, F. : Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr.* **606**, 179 (1992).

4) Fujimoto, N., Katai, M. and Meguri, H. : Determination of sterols in fat by high-performance liquid chromatography. *Bunseki Kagaku* **35**, 482 (1986).

5) Smith, R. L., Sullivan, D. M. and Richter E. F. : Determination of phytosterols in butter samples by using capillary column gas chromatography. *J. AOAC Int.* **70**, 912 (1987).

6) Bello, A. C. : Rapid isolation of the sterol fraction in edible oils using a silica cartridge. *J. AOAC Int.* **75**, 1120 (1992).

7) Frega, N., Bocci, F. and Lercker, G., : Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary coumn. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **69**, 447 (1992).

8) Pizzoferato, L., Nicoli, S. and Lintas C. : GC-MS characterization and quantification of sterols and cholesterol oxidation products. *Chromatogrphia* **35**, 269 (1993).