

HPLC 및 GC/MSD를 이용한 식물중의 Higenamine 함량 분석

정교순*, 윤혜숙, 서영배, 한영희¹, 송운선², 류재천²

서울대학교 천연물과학연구소, ¹상명대학교 자연과학대학 화학과,

²한국과학기술연구원 Doping Control Center

Analysis of Higenamine Contents in Plants with HPLC and GC/MSD

Kyo Soon Chung*, Hye Sook Yun-Choi, Young Bae Suh,
Young Hee Hahn¹, Yun Seon Song² and Jae Chun Ryu²

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460;

¹Department of Chemistry, Sangmyung University, Seoul 110-743; and ²Doping Control
Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. BOX 131, Seoul 136-791, Korea

Abstract - Higenamine is known as a cardiotoxic principle of Aconiti tuber. The analytical procedures were established for the detection of higenamine in plants. The amounts of higenamine in several Aconiti tubers and the embryo of *Nelumbo nucifera*, another plant species known to contain higenamine, were determined. The H₂O soluble fraction prepared from MeOH extract was first treated with AD-2 resin and then applied to either HPLC or GC/MSD systems. With HPLC, 6.4~19.2 µg/g of higenamine were detected from various Aconiti tubers and 182.3 µg/g of higenamine from the embryo of *Nelumbo nucifera*. The results obtained with GC/MSD also provided comparable data with those obtained with HPLC.

Key words - Higenamine, *Aconitum* sp., *Nelumbo nucifera*, HPLC, GC/MSD.

부자(Aconite root, Aconiti tuber)는 미나리아 제비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본인 *Aconitum*속 식물의 뿌리로 동양의학상 중요한 생 약으로서 강심, 해열, 이뇨, 신경통, 류마티스성 관절염, 각종 풍종의 치료제로서, 쇼크시의 구급목적 으로 널리 사용되어왔다.^{1,2)} *Aconitum*속 식물은 전 세계적으로 170여종이 분포하고 있고, 우리나라 각지에도 40여종이 자생하며, 그 덩이뿌리는 식물의 종류, 채취부위, 채취후 처리방법 등에 따라 초오, 오두, 부자, 측자, 포부자, 백부자 등의 생약명으로

불리운다.³⁾

부자류 생약의 주성분으로는 aconitine, hypaconitine, mesaconitine 등 지각 및 운동신경의 마비, 호흡장애 등을 일으키는 맹독성 aconitine계 열 알칼로이드성분⁴⁾과 강심작용성분으로 알려진 higenamine(*dl*-demethylcoclaurine) 등이 보고되어 있다. 부자류 생약들은 장시간 끓이거나 고온고압처리 하는 등의 여러가지 수처방법들이 알려져 있으며 생약으로 사용하기 위하여는 반드시 수처리 후 사용하여야 하는 것으로 밝혀져있고 이러한 수처리과정에서 맹독성 diterpene alkaloid들은 가수분해, 에스테르교환반응, 산화 등의 반응을 거쳐

*교신저자 : Fax 0331-290-8420

저독성인 물질들로 변하거나 lipoaconitine계열의 수용성이 낮은 물질로 변화됨이 밝혀졌다.⁵⁾

Higenamine은 Kosuge와 Yokoda에 의하여 부자의 강심작용 성분으로서 분리되었고, 1-(4'-hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline의 구조를 가짐이 밝혀진 물질로서⁶⁾ 생체내에서 아드레날린 β -수용체에 작용함으로써 강심 및 혈관이완 작용을 하는 것으로 밝혀졌으며 심장수축력을 증가시키고 심장박동수를 높여주고 혈압을 하강시키는 등의 작용을 가지며, 이외 항혈전작용 및 내독소쇼크 억제작용 등을 가짐이 보고되고 있다.⁷⁻¹²⁾ Higenamine은 또한 알카리성 용액에서는 매우 불안정하며 산성용액에서는 안정한 것으로 밝혀져¹³⁾ 부자류 생약들을 물로 추출하였을 때 추출용액의 액성이 pH 5.0~5.5로서 수용액에서 장시간 가열하거나 고온 고압처리하는 등의 각종 부자류 수치처리과정에서 aconitine계 알칼로이드 성분들과는 달리 안정할 것으로 추정되었다. 그러나 부자류 생약의 성분중 aconitine계 알칼로이드들의 분석방법 및 함량의 비교분석방법 등에 관한 여러편의 논문이 보고되어 있으나^{14,15)} 생약중의 강심작용 성분인 higenamine의 분석방법에 관하여 연구된 바가 별로 없다. 이에 본 연구자들은 HPLC 및 GC/MSD를 이용한 higenamine 분석방법을 확립하고 이를 이용하여 각종 부자류 생약중의 함량을 비교 분석하여 보고하는 바이다. Higenamine을 함유하는 것으로 보고된 바 있는 연자씨 배아¹⁶⁾의 higenamine함량 또한 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약-본 실험에 사용된 이삭바꽃 (*Aconitum kusnezofii* Rehb.)은 설악산 십이선녀탕계곡에서, 한라돌쩌귀 (*Aconitum napiforme* Le'v. et Vent.)는 지리산 삼원계곡에서 1993년 10월에 채집하였으며, 加工부자말은 일본 三和生藥株式會社제품을 사용하였고 이외의 식물생약들은 경동시장에서 구입하여 서울대학교 천연물과학연구소 지형준교수님의 감정을 받아 사용하였다. N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA), N-methylbistrifluoroacetamide (MBTFA) 및 내부표준물질로 사용한 (\pm)-tetrahy-

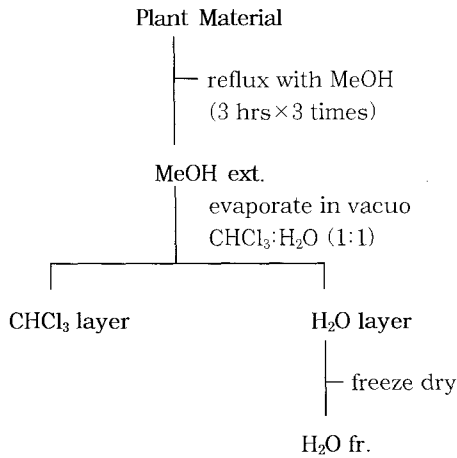
dropapaveroline · HBr(THP)은 Sigma Company(U.S.A.)로부터 구입하였고, AD-2 resin (particle size:0.15~0.2 mm)은 Serva Co. Heidelberg, F.R.G.)에서 구입하여 acetone, methanol 및 증류수로 세척하여 활성화시켜 사용하였으며, HPLC 이동상의 조제에는 Fisher Chem. Co.의 HPLC급 용매를 사용하였다. Higenamine · HBr은 기존의 방법에 의하여 *p*-methoxyphenylacetic acid와 homoveratrylamine으로부터 본 실험실에서 합성하여 mp, NMR, IR 등을 확인하여 사용하였다.¹⁷⁾

기기-HPLC system(Spectra Physics Co., U.S.A.); Solvent delivery system:ternary HPLC pump(SP 8800) Detector:UV variable wavelength detector(SP 100), Recorder:integrator (SP 4270), GC/MSD(EI) system(Hewlett Packard Co., CA, USA):Gas Chromatograph (HP 5890A) Mass Selective Detector((HP 5970B) selected ion monitoring(SIM) mode.

HPLC 및 GC/MSD 분석조건-HPLC column은 RP-18(4.6 mm×250 mm, 10 μ m, Lichrosorb, Merck Co.)를 사용하였으며, mobile phase(이동상) 8% CH₃CN/0.05 N NaH₂PO₄-0.05 N Trichloroacetic acid mixed buffer(pH 2.8)를 유속 1.0 ml/min.으로 용류시켰으며, UV 284 nm에서 물질들을 검출하였다. 시료용액은 각각 10 μ l를 주입하여 분석을 수행하였다.

GC/MSD(EI) column은 fused silica capillary SE-30; SS(0.2 mm×13 m, film thickness 0.11 μ m)을 사용하였고, injection temp.은 280 $^{\circ}$ C, transfer line temp.:300 $^{\circ}$ C, injection mode:split (10:1)에서 carrier gas로서 helium을 0.31 ml/min.으로 흘렸다. 150 $^{\circ}$ C/100(min.)/300 $^{\circ}$ C(8 min.), electron impact energy:70 eV의 조건하에서 실험하였다.

시료의 추출-각각의 생약시료 100 g을 Scheme 1에 정리한 바와 같이 100% MeOH로 3시간씩 3회 수욕상에서 반복 추출한 후, 감압 농축하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이 MeOH엑스에 CHCl₃과, H₂O을 동량 가한 후 진탕 방치하여 분획한 후, H₂O층은 동결건조하여 H₂O 분획을 얻었다. 생약 1g에 해당하는 각각의 H₂O분획 동결건조 분말을 각 1 ml의 0.05

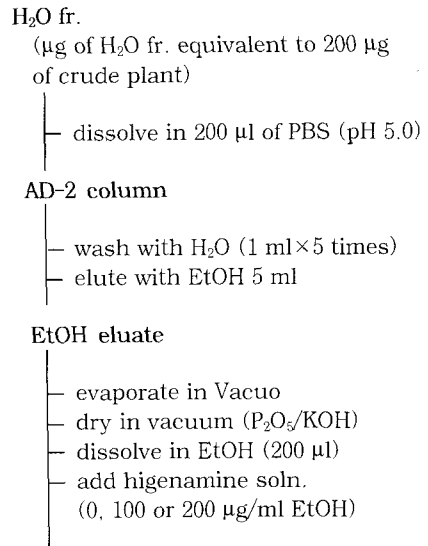


Scheme 1. Extraction procedure of the plant sample.

N phosphate buffered saline(PBS, pH 5.0)용액에 용해시킨 후, Scheme 2와 같이 처리하여 분석하였다. 즉 미리 활성화시킨 AD-2 resin 2g을 glass bead를 끼운 pasteur pipette(0.6×4 cm)에 넣어 준비한 추출 column에 200 µl씩을 부하한 후, H₂O 5 ml(1 ml×5회)로 세척하고 100% EtOH 5 ml로 용출시켰다. 용출액으로부터 용매를 제거한 후 P₂O₅ 존재하에 진공에서 완전히 습기를 제거하고 다시 EtOH 200 µl에 용해시켜서 시료용액을 준비하였다.

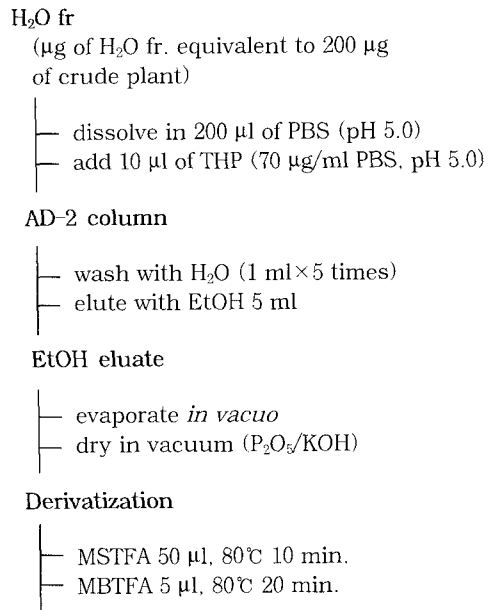
HPLC에 의한 분석 - 시료용액중의 higenamine의 함량분석은 표준물 첨가법을 이용하여 실시하였다(Scheme 2). 이를 각각의 시료용액 40 µl에 blank로 EtOH 또는 higenamine 표준용액(100 또는 200 µg/ml EtOH) 10 µl씩을 첨가하여 혼합하였다. 시료용액에 blank 또는 higenamine 표준용액을 첨가한 분석용 시료용액 각 10 µl를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

GC/MSD에 의한 분석 - 각 생약 200 µg에 해당하는 H₂O분획을 기재된 바와 같이 AD-2 column에 부하하였고, 여기에 내부표준물질인 THP(70 µg/ml PBS, pH 5.0) 10 µl를 함께 부하한 후, 위에서와 같이 세척하고 EtOH로 용출시켰으며 용매를 제거한 후 완전히 건조시켰다(Scheme 3). 건조된 잔사에 MSTFA 50 µl를 가하고 80℃에서 10분간 가열하여 TMS 유도체화를 시키고 실온으로 식힌 후, 다시 MBTFA 5 µl를 가하여 80℃에서 20분간 가열



HPLC analysis

Scheme 2. Pretreatment of the plant extract (H₂O fr.) for HPLC (C₁₈ column) analysis.



GC/MSD analysis

Scheme 3. Pretreatment and derivatization procedure of the plant extract (H₂O fr.) for GC/MSD analysis.

하여 TFA 유도체화시켰다. 위와 같이 유도체화시킨 시료용액 각 2 µl를 GC/MSD에 주입하여 분석하였다. Higenamine 각 50.0, 40.0, 20.0, 10.0 또는

5.0 µg/ml PBS(pH 5.0) 용액을 제조하여 위 (Scheme 3)와 같이 처치한 후 각 2 µl를 주입하여 분석하고 검량곡선을 작성하였으며 위의 검량곡선에 의하여 식물시료중의 higenamine 함량을 분석하였다.

결과 및 고찰

식물검체들은 우선 MeOH로 추출한 후 H₂O분획을 얻어 실험하였다. Higenamine은 구조에 2개의 OH기와 1개의 amine기 등의 기능기를 가지고 있어 엑기스를 CHCl₃와 H₂O로 분획할 때 H₂O층으로 이행하였다. H₂O분획은 HPLC또는 GC/MSD로 분석하기전에 AD-2 resin을 이용하여 전처리하였다. C₁₈ cartridge를 사용하여 전처리하였을 때 다른 성분들을 좀더 효과적으로 제거할 수 있었으나 higenamine의 회수율 또한 60% 이하로서 매우 낮은 회수율이 높은 AD-2 resin을 사용하였으며 Scheme 2 또는 3과 같이 처리하였을 때 higenamine의 회수율은 약 90%였다.

박 등은 다량(10 mg/Kg 또는 40 mg/Kg)의 higenamine을 토기에 정맥주사한 후 혈액내의 higenamine을 HPLC를 이용하여 측정한다¹³⁾ 그러나 식물검체 엑기스에는 higenamine의 농도가 매우 낮을 뿐 아니라 각종 식물 성분들이 공존하고 있어서 Sep-pak C₁₈, AD-2 resin 등에 의한 전처리과정을 거쳐 분석하여도 higenamine peak 이외의 많은 peak들을 볼 수 있었으며 박 등이 확립한 분석조건에서는 higenamine peak를 식물체에서 유래하는 다른 peak들과 분리하여 관찰할 수 없었다.

본 연구자들은 reversed phase column인 RP-18을 이용하여 8% CH₃CN/0.05 N NaH₂PO₄-TCA 혼합 buffer(pH 2.8)을 유속 1.0 ml/min.으로 용류시킴으로서 retention time 약 17분(16.30~18.88 분)에서 식물시료중의 다른 간섭물질로부터 higenamine의 peak를 상당히 분리할 수 있었으며 UV 284 nm에서 검출하여 일관성있는 결과를 얻을 수 있었다.

식물시료에는 여러가지 물질들이 공존하여 있어서 HPLC로 분석할 때 내부표준물질의 사용이 분석적 의미를 갖지 못한다. 즉 식물시료 추출물의 분석

시 그 화학조성에 따라 동일물질이라도 상당한 시간적 차이를 두고 검출됨이 관찰된다. Higenamine 또한 retention time이 16.30~18.88분으로서 일정하지 않았으므로 표준물 첨가법(standard addition method)으로서 peak 높이의 변화율을 기준으로 정량분석을 시행하였다. Fig. 1은 higenamine만을 HPLC에 주입하여 얻은 chromatogram이며 Fig. 2~4는 *A. japonicum*(processed powder, 가공부자) 추출시료를 표준물 첨가법에 의하여 정량 분석한 예이다. Fig. 2~4의 실험결과로부터 Fig. 5와 같은 calibration curve를 얻고, y=0에서 검량곡선이 만나는 점, 즉 5.904 µg/mL로부터 아래와 같은 계산에 의하여 생약 1 g당 함유된 higenamine양을 계산할 수 있었다.

$$5.904 \mu\text{g/ml} \times \frac{50}{40} \times 200 \text{ ml}/200 \text{ g} = 7.38 \mu\text{g/g}$$

HPLC에 의한 식물시료중의 higenamine함량 분석결과는 Table 1에 정리하였다. *Aconitum*속 식물중에는 *A. carmichaeli*(천오), *A. kusnezoffii*

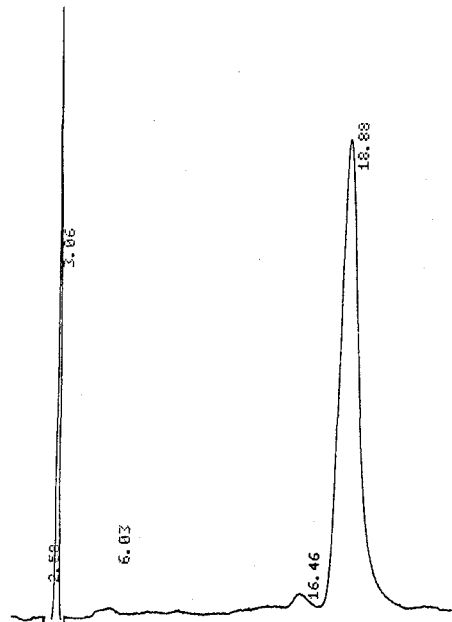


Fig. 1. HPLC chromatogram of higenamine (50 µg/ml) after treatment with AD-2 resin. Column:RP-18 (4.6×250 mm, 10 µm Lichrosorb), Mobile phase: 8% CH₃CN/0.05 N NaH₂PO₄-TCA mixed buffer (pH 2.8), Flow rate:1.0 ml/min, Detection:284 nm (aufs:0.002), Injection volume:10 µl.

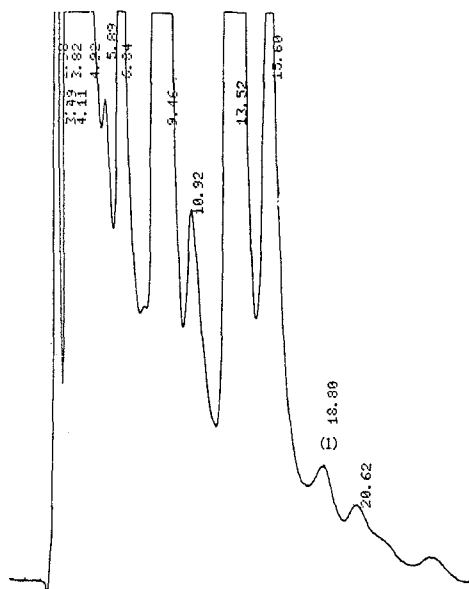


Fig. 2. HPLC chromatogram of the extract of processed Aconite root powder after treatment with AD-2 resin. (1):higenamine. The analysis was performed at the condition described in Fig. 1.

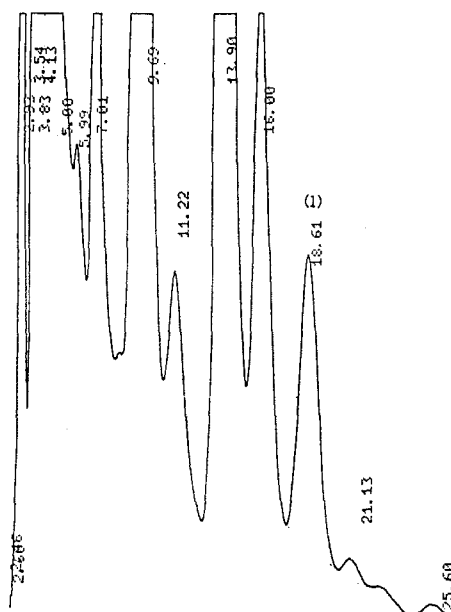


Fig. 4. HPLC chromatogram of the extract of processed Aconite root powder after treatment with AD-2 resin with the addition of standard higenamine (40 µg/ml). (1):higenamine. The analysis was performed at the condition described in Fig. 1.

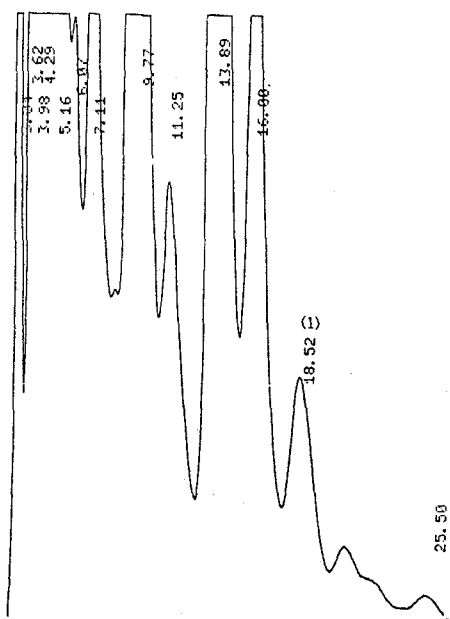


Fig. 3. HPLC chromatogram of the extract of processed Aconite root powder after treatment with AD-2 resin with the addition of standard higenamine (20 µg/ml). (1):higenamine. The analysis was performed at the condition described in Fig. 1.

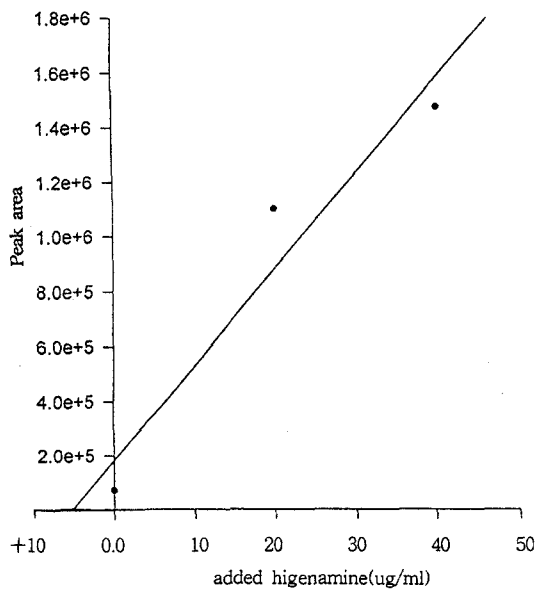


Fig. 5. Calibration curve for higenamine contents in processed Aconite root powder by standard addition method. Each data was obtained from the average of minimum three experiments.

Table I. Contents of higenamine in plant materials determined by HPLC and GC/MSD

Plant name	Higenamine ($\mu\text{g/g}^*$)	
	HPLC	GC/MSD
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx. (root, 천오)	19.2	12.7
<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx. (root processed, 포부자)	11.1	18.2
<i>Aconitum koreanum</i> Rapaics (root, 백부자)	7.4	9.2
<i>Aconitum kusnezofii</i> Rechb. (primary root, 이삭바꽃)	19.2	29.6
<i>Aconitum napiforme</i> Lév. et Vent (primary root, 한라돌쩌귀)	6.4	22.1
<i>Aconitum napiforme</i> Lév. et Vent (secondary root, 한라돌쩌귀)	7.2	11.0
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. (embryo, 연자씨배아)	182.3	189.6
Processed Aconite Root powder (<i>A. japonicum</i> Thunb., 가공부자말)	7.4	11.1

*g of crude plant

(primary root)에서 $19.2 \mu\text{g/g}$ 으로 higenamine 함량이 가장 높게 검출되었으며 포부자(*A. carmichaeli*의 수치품)에서 $11.1 \mu\text{g/g}$ 으로서 조금 낮게 검출되었고, 이외의 *Aconitum*속 식물시료에 $6.4 \sim 7.4 \mu\text{g/g}$ 으로서 higenamine 함량이 낮았다. 이외 higenamine 함유 식물로 알려진 *Nelumbo nucifera* 배아에서는 $182.3 \mu\text{g/g}$ 의 higenamine이 검출되어 *Aconitum*속 식물뿌리의 약 10배 이상인 것으로 밝혀졌다.

류 등은 higenamine을 랫트에 정맥주사한 후 GC/MSD를 이용하여 혈액 또는 뇨중의 higenamine과 그 대사산물을 분석하여 보고한 바 있다.¹⁸⁾ 이러한 GC/MSD 분석법을 이용하여 식물시료 중의 higenamine을 분석하여 HPLC에 의한 분석결과와 비교하였다. 즉 Scheme 3에 정리한 바와 같이 AD-2 column 통과 후 MSTFA 및 MBTFA와 반응시켜 시료를 유도체화하여 실험하였다. 본 실험에서는 류 등이 사용한 길이가 17 m인 fused silica capillary SE-30 컬럼보다 길이가 짧은 13 m 컬럼을 사용하였으며 higenamine은 retention time 9.213 분에서 peak를 보이며 O-trimethylsilylation 및 N-trifluoroacetamidation된 higenamine의 특징적 m/z 404의 mass ion peak(tetrahydroisoquinoline fragment)를 보였으며 내부표준물질로 사용한 tetrahydropapaveroline(THP)은 10.219분에서 역시 m/z 404 mass ion peak를 보였다. Higenamine과 내부표준물질인 THP의 peak height로부터 higenamine의 검량곡선(Fig. 6)을 작성하였으며 위의 검량곡선에 의해서 식물시료 중의 higenamine의 함량을 분석하여 Table I에 정리하였다.

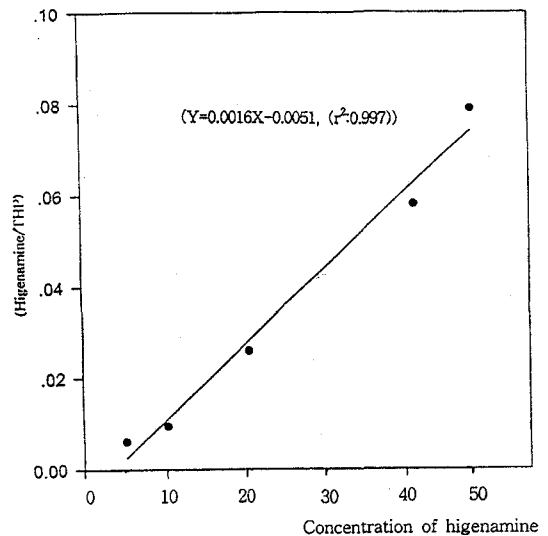


Fig. 6. Calibration curve for higenamine by internal standard method using GC/MS.

GC/MS에 의한 식물시료 중의 higenamine의 분석결과를 HPLC에 의한 분석결과와 비교하여 보았을 때 천오의 경우, 각각 $18.2 \mu\text{g/g}$ 과 $19.2 \mu\text{g/g}$ 으로서 유사한 값을 얻었으며 그의 다른 식물시료의 higenamine 분석결과도 근사한 분석치를 나타내었다. 특히 연자씨 배아의 경우 HPLC로 분석하였을 때 $182.3 \mu\text{g/g}$ 으로서 부자류 생약에서 higenamine 함량이 약 10배 높았으며 GC/MSD에 의한 결과도 $189.6 \mu\text{g/g}$ 으로서 higenamine의 함량이 상당히 높은 것으로 나타났다.

결 론

부자류 생약 중의 강심작용 성분인 higenamine

함량을 HPLC와 GC/MSD를 이용하여 분석하였다. Higenamine은 HPLC 또는 GC/MSD를 사용하여 분석할 때 부자류 식물 뿌리에 6.4~29.6 $\mu\text{g/g}$, 연자씨배아에 약 180 $\mu\text{g/g}$ 이 함유된 것으로 밝혀졌으며 HPLC에 의한 분석치와 GC/MSD에 의한 분석치에 큰 차이가 없었기에 식물의 higenamine함량 검색에 2종의 방법 모두 이용이 가능할 것으로 사료되었다.

인용문헌

- Bensky, D. and Gamble, A. (1986) (compiled and translated). Chinese herbal medicine materia medica. 428-431. Eastland Press, Seattle.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992), Chinese drugs of plant origin. Chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, Springer-Verlag, 19-44. Berlin Heiderberg.
- 中國 學科學院 葯物研究所 (1979) 中葯志 第一冊, 137. 人民互生出版社, 北京.
- 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚恭男 (1982) 和漢葯物學, 81. 南山堂, 東京.
- Kitagawa, I., Chen, Z. L., Yoshihara, M. and Yoshigawa, M. (1984) Chemical studies on crude drug processing IV. Aconiti tuber(3) Quantitative determination of Aconite alkaloids in Aconiti tuber by means of high performance liquid chromatography, *Yakugku Zasshi* 104(8):867-872.
- Kosuge, T., Yokoda, M. and Agasawa, M. (1978) Studies on the cardiac principle in Aconite root. Isolation and structural determination of higenamine. *Yakugaku Zasshi* 98: 1370-1375.
- Kosuge, T. (1976) Studies on cardiotonic principle of Aconite root. *Chem. Pharm. Bull.* 24(1): 176-178.
- Chang, K. C. (1983) The effect of higenamine upon the interval strength relation in isolated rabbit heart. *Korean J. Pharmacol.* 19(2): 9-16.
- Park, C. W., Chang, K. C. and Lim, J. K. (1984) Effects of higenamine on isolated heart adrenoceptor of rabbit. *Arch. International Pharmacodyn Therap.* 267: 279-288.
- Chang, K. C., Lim, J. K. and Park, C. W. (1986) Synthesis of higenamine and its cardiovascular effects in rabbit: Evidence for β -adrenoceptor agonist. *Korean J. Pharmacol.* 22: 96-104.
- Kim, N. S., Hong, C. Y., Park, C. W. and Lim, J. K. (1986) An experimental study on the adrenergic effect of higenamine in rabbit cardiovascular system. *Korean Circulation J.* 16: 1-18.
- Yun-Choi, H. S. and Kim, M. H. (1994) Higenamine reduced mortalities in the mouse models of thrombosis and endotoxic shock. *Yakhak Hoeji* 38: 191-196
- Park, S. O., Hong, C. H., Paik, S. W. and Yun-Choi, H. S. (1987) Determination of blood concentration of higenamine by high pressure liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.* 10 (1): 60-66.
- Hikino, H. and Konno, C. (1981) Determination of aconitine alkaloids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 211: 123-128.
- Hikino, H., Murakami, M., Konno, C. and Watanabe, H. (1983) Determination of aconitine alkaloids in *Aconitum* roots. *Planta Medica* 48: 67-71.
- Koshiyama, H., Ohkuma, H., Kawaguchi, H., Hong, H. S. and Chen, Y. P. (1970) Isolation of 1-(p-Hydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (demethylco-claurine), an active alkaloid from *Nelumbo nucifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 18(12): 2564-2568.
- Chang, K. C., Yun-Choi, H. S., Lim, J. K. et al. (1984) Synthesis of higenamine, a cardiotonic principle of Aconite root. *Arch. Pharm. Res.* 7(2): 133-136.
- Ryu, J. C., Song, Y. S., Kim, M. S., Cho, J. H. and Yun-Choi, H. S. (1993) Identification of higenamine and its metabolites in rat by gas chromatography/mass spectrometry. *Arch. Pharm. Res.* 16(3): 213-218.

(1997년 12월 4일 접수)