

유색미 함유 Alkaloid 분리 및 정량

정하숙*[†] · 신진철** · 우원식***

*덕성여자대학, **작물과학원, ***서울대학교

I. 서 언

식물의 건조함량 가운데 탄소(carbon)가 40% 구성되어 있는 것에 비하여 질소(nitrogen)는 단지 2% 구성되어 있지만 식물에는 많은 수의 질소함유 유기물이 존재하고 있다. Alkaloid는 아미노산 다음으로 존재하는 질소함유 화합물로 약 16,000가지 물질이 알려져 있다. Alkaloid는 식물의 2차 대사산물(secondary metabolites) 중에서 가장 종류가 많은 화합물로서 일반적으로 1개 이상의 질소원자가 포함된 고리(ring)를 가진 염기성 물질을 의미하며, 강력한 생리 활성을 갖고 있으므로 의약품으로 사용되는 것이 많다.

II. 분석방법

Alkaloid는 화학구조가 대단히 다양하고 그 수가 많기 때문에 그들을 식물추출물에서 단순한 크로마토그래피(chromatography; 고정상과 이동상간의 흡착 또는 분배를 이용한 분리법) 방법만으로는 확인이 어렵다. Alkaloid는 염기성(alkali) 화합물로 용해도나 기타 물리화학적 성질이 서로 다르기 때문에 식물을 약산성(1M HCl 또는 1% 초산(acetic acid)) 알코올로 추출한 후 암모니아수(NH₄OH)로 침전시키는 과정을 반복하여 alkaloid 이외의 화합물을 제거한 후 얻게 된다. 다음으로 여지 크로마토그래피(PC; Paper chromatography), 또는 박층 크로마토그래피(TLC; Thin layer chromatography)를 하여 시료를 특정 용매를 사용하여 전개시킨 후 alkaloid 확인 시약으로 확인한다.

1. 장치 및 기구

- 1) 추출기
- 2) 농축기(Evaporator)
- 3) PC
- 4) TLC

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-901-8593 (E-mail) hasook@duksung.ac.kr

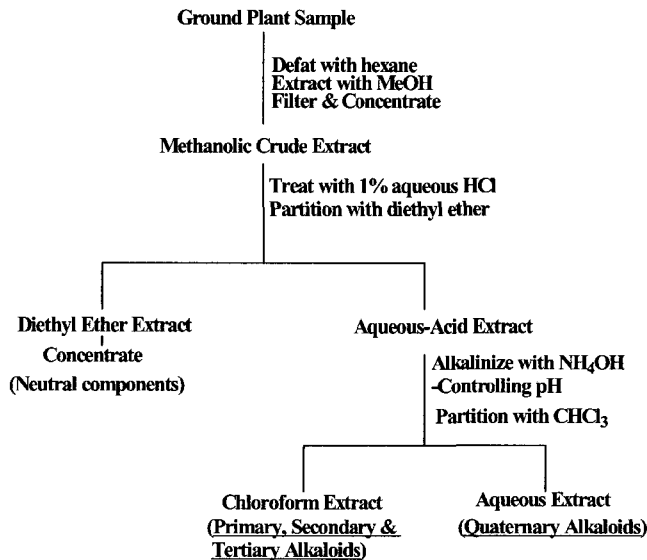
2. 시약

- 1) 10% Hydrochloric acid(HCl)
- 2) Diethyl ether
- 3) 10% Ammonia water(NH₄OH)
- 4) Chloroform(CHCl₃)
- 5) PH paper
- 6) Mayer 시약 : Hg₂Cl₂ 1.4 g과 KI 4.9 g을 증류수 100 ml에 녹인다.

3. 조작

1) Alkaloid 검출법

시료 alcohol 추출물을 1% HCl 20-30 ml에 용해하고 40-50 ml의 diethyl ether로 분획한 후 수층(aqueous-acid extract, lower layer)을 분리하여 10% NH₄OH로 alkali성으로 한 다음 CHCl₃ 20-30 ml로 분획하여 CHCl₃ 층을 취하고 증발, 농축한 후 소량의 HCl에 용해하고, 필요시 여과한 후, Mayer 시약에 의한 백탁 또는 백색 침전의 유무로 alkaloid 존재를 확인한다(Scheme 1).



Scheme 1. Extraction and Fractionation of Alkaloids from Plant.

2) Alkaloid 확인시약

- (1) Dragendorff 시약 : ① Bismuth subnitrate 0.6 g을 HCl 2 ml와 증류수 10 ml를 넣어 녹인 용액과 ② KI 6 g을 증류수 10 ml에 녹인 용액을 미리 조제한 후 사용시 HCl 7 ml와 증류수 15 ml에 ① 용액과 ② 용액을 혼합한 후 증류수로 400 ml로 희석하

여 즉시 사용한다.

(2) Iodoplatinate 시약

① 여지 크로마토그래피(PC) : 5% platinum chloride 용액 10ml를 2% KI 240 ml에 혼합한 후 증류수 200 ml로 희석하여 사용한다.

② 박층 크로마토그래피(TLC) : 5% platinum chloride 10 ml와 HCl 5 ml, 2% KI 240 ml를 혼합하여 사용한다.

(3) Marquis 시약 : Formaldehyde 1ml를 H₂SO₄ 10 ml에 녹인 것으로 TLC에 사용한다.

III. 유색미 함유 alkaloid 분리 및 화학구조 구명

1. 장치 및 기구

- 1) 추출기
- 2) 농축기
- 3) Büchner funnel(분액여두)
- 4) Open glass column
- 5) 용점측정기
- 6) Vis/UV, IR, MS, NMR spectrometer
- 7) HPLC

2. 시약

- 1) Ethyl alcohol(EtOH)
- 2) Acetone
- 3) 0.5% HCl/EtOH
- 4) Silica gel
- 5) Sephadex LH-20
- 6) TLC plate
- 7) 10% H₂SO₄
- 8) FeCl₃ 시약
- 9) Dragendorff 시약
- 10) DMSO(Dimethylsulfoxide)
- 11) Acetic anhydride(무수초산)/pyridine

3. 조작

1) 시료

유색미(*Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*) 과피 부분(aleurone layer) 5 kg을 농촌진흥청 작물

과학원에서 공급받아 실험에 사용한다. 식물학적 검정은 작물과학원에서 행한다.

2) 추출, 분획 및 농축

시료를 우선적으로 acetone(10 l)으로 5회 반복 환류 추출하여 시료에 함유된 지방성분을 제거시킨 후, 여과, 농축하여 잔사(residue)를 얻는다. 잔사 부분을 실온에서 0.5% HCl/EtOH(10 l)로 3회 반복 추출하여 다시 여과, 농축하여 추출물을 얻는다.

3) 화합물의 분리

추출시료를 silicag gel을 고정상으로 하여 open column chromatography를 행한다. 이동상 용매로는 CHCl₃/MeOH을 혼합하여 99:1 → 88:12까지 순차적으로 용출하여, 각각을 TLC 하여 UV lamp(254, 370 nm) 관찰, 10% H₂SO₄ 및 alkaloid 확인시약으로 발색하여 동일 pattern을 나타내는 분획물을 합쳐 모두 9개의 subfraction으로 이 가운데 생리활성이 우수한 subfraction을 CHCl₃:MeOH(92:8)로 column chromatography를 행하고, 이 가운데 subfraction 16을 다시 Sephadex LH-20으로 re-column chromatography를 행하여 순수 화합물을 얻는다(1).

4) 화학구조 결정

분리된 화합물을 MeOH로 재결정한 후, 기기분석을 통해 화합물의 물리·화학적 특징을 구명한다.

5) 화합물의 acetylation

분리된 화합물 5 mg을 DMSO 0.2 ml에 녹인 후 2 ml 무수초산-pyridine(1:1) 용액을 넣어 실온에서 24시간 반응시킨 후 증류수를 넣어 혼합한 후, CHCl₃로 분획하여, CHCl₃ 분획물을 농축하고 silica gel column chromatography를 수행(CHCl₃:MeOH; 99:1)하여 미황색의 acetate 화합물을 얻는다(2; 1.8 mg).

6) 화합물의 정량분석

국내산 유색미(*Oryza sativa* cv. *Heuginjubyeo*) 과피 10 g을 80°C에서 acetone 100 ml로 5회 환류 추출하여 극성이 비교적 낮은 물질을 제거한 후 잔사를 0.5% HCl/EtOH로 실온에서 24시간, 3회 추출한 후 농축한다. 추출물을 diethylether/H₂O로 분획하여 수층에 10% NH₄OH를 가한 후 CHCl₃로 분획하여 CHCl₃ 가용성 분획층을 모아 증류수로 세척한 후 여과 농축한다(Scheme 1). 준비된 시료 100 mg을 특급 EtOH 10ml에 녹인 후 Sep-Pak C₁₈ SPE cartridges로 여과시킨 후 10 μl를 취하여 HPLC 분석에 사용한다. HPLC는 Spectra Physics(SP-8800), 이동상으로는 toluene:acetone:EtOH:conc-ammonia(40:40:6:2), flow rate는 0.5 ml/min, 파장은 289 nm에서 측정한다.

7) 표준 검량선의 작성

순수 분리된 alkaloid를 특급 EtOH에 용해시킨 후 단계적으로 희석하여 검량선용 표준용액으로 만들어 μ-Bondapak C₁₈ reverse-phase HPLC column에 주입하여 분석하고, 표준 검량

선은 alkaloid 함량에 대한 peak area를 plot하여 얻은 점으로부터 작성한다.

4. 결과

1) 화학구조 결정

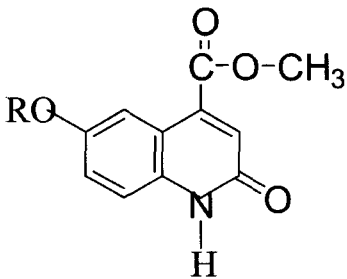
발색시약 및 MS, UV, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 및 NOE spectrum을 통해 화합물1의 분자량은 219(M⁺; C₁₁H₉NO₄)이고 용점이 320° 이상인 미 황색 상의 alkaloid 화합물로 확인하였다. 또한 화합물의 hydroxy group 위치를 확인하기 위하여 acetylation시켜 acetate 화합물을 단리한 후, ¹H NMR spectrum을 비교하여 화합물1의 화학구조를 4-carbomethoxy-6-hydroxy-2-quinolone으로 규명하였다(Fig. 1-3).

2) Alkaloid 1

m.p.>320°, pale yellow needles (MeOH); UVmax (MeOH) (log ε): 242 (4.8), 280 (4.4), 382 (4.2) nm: max (MeOH+HCl) (log ε): 242 (4.7), 280 (4.4), 380 (4.1) nm: max (MeOH+NaOH) (log ε): 246 (4.9), 290 (4.6), 424 (4.1) nm; IR (KBr) max: 3365 (OH, NH), 1708, 1658 (CO), 1624 (CN) cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) 11.95 (1H, s, NH), 9.54 (1H, s, OH), 7.49 (1H, d, J=2.6 Hz, H-5), 7.24 (1H, d, J=8.9 Hz, H-8), 7.08 (1H, dd, J=2.6, 8.9 Hz, H-7), 6.88 (1H, s, H-3), 3.92 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) 165.9 (s, COO), 160.1 (s, C-2), 152.4 (s, C-6), 138.9 (s, C-9), 132.8 (s, C-10), 124.2 (d, C-3), 120.6 (d, C-7), 116.8 (d, C-8), 116.2 (s, C-4), 109.5 (d, C-5), 52.7 (q, OCH₃); HR EIMS *m/z* 219.0531 (calcd for C₁₁H₉NO₄, 219.0530); EIMS (70eV) *m/z* 219 [M]⁺ (100), 188 [M-OCH₃]⁺ (19), 160 [M-OCH₃-CO]⁺ (40), 132 [M-OCH₃-CO-CO]⁺ (43).

3) Alkaloid 2

m.p.178°(MeOH); UVmax (MeOH) (log ε): 242 (4.5), 280 (4.4), 382 (4.3) nm: max (MeOH+HCl) (log ε): 242 (4.6), 280 (4.4), 381 (4.1) nm: max (MeOH+NaOH) (log ε): 244



1 R = H
2 R = Ac

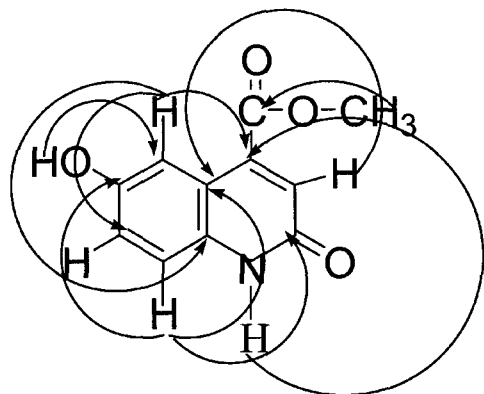


Fig. 1. Structure of Alkaloids 1 and 2.

Fig. 2. Selective HMBC correlations for Alkaloid 1.

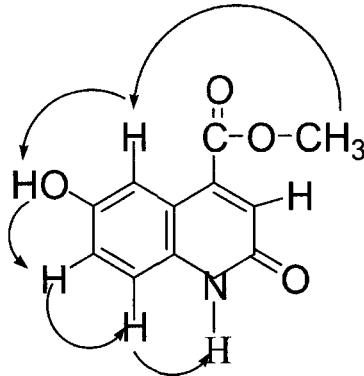


Fig. 3. Observed NOESY correlations for Alkaloid 1.

(4.4), 281 (4.3), 380 (4.1) nm; IR (KBr) max: 3370 (NH), 1708, 1658 (CO), 1624 (CN), 1236 (acetate) cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) 11.74 (1H, s, NH), 8.19 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-5), 7.40 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-8), 7.33 (1H, dd, $J=2.6, 8.9$ Hz, H-7), 6.91 (1H, s, H-3), 4.07 (3H, s, OCH_3), 2.33 (3H, s, CH_3COO); HR EIMS m/z 261.0638 (calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_5$, 261.0639) EIMS (70 eV) m/z 261 $[\text{M}]^+$ (8), 230 $[\text{M}-\text{OCH}_3]^+$ (3), 219 $[\text{M}-\text{HOAc}]^+$ (100), 188 $[\text{M}-\text{HOAc}-\text{OCH}_3]^+$ (15), 160 $[\text{M}-\text{HOAc}-\text{OCH}_3-\text{CO}]^+$ (64), 132 $[\text{M}-\text{HOAc}-\text{OCH}_3-\text{CO}-\text{CO}]^+$ (89).

4) 화합물의 HPLC chromatogram

Toluene:acetone:EtOH:conc-ammonia(40:40:6:2)를 이동상으로 하여 0.5 ml/min의 유속으로 289 nm에서 측정된 chromatogram은 그림(Fig. 4)과 같으며, 순수 분리한 alkaloid 화합물의 retention time은 12.48 min이었다.

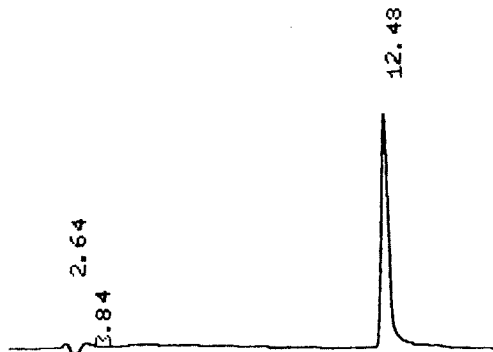


Fig. 4. HPLC chromatogram of alkaloid 1 as a standard.

5) 화합물의 정량분석

순수 분리된 alkaloid의 표준 검량선에서 회귀직선 방정식은 $Y = 295.5X + 202.3$ 이었고 γ^2 은 0.995로 나타났으며, 시료 추출물을 EtOH에 용해시킨 후 순수 화합물과 동일한 조건에서

같은 retention time을 보여주는 peak와 확인하여 시료에 함유된 alkaloid 함량을 확인하였다 (Table 1).

Table 1. Content of alkaloid in *Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*.

Sample	Alkaloid (mg/100 g of aleurone layer weight) ^a
Heugjinjubyeo	16.8

^aMean values in triplicate

참고문헌

1. Gray, A. I. 1993. In alkaloids and sulphur compounds. Waterman, P.G., Ed.; Academic Press: London, pp 271-308.
2. Woo, W. S. 2001. Study on natural products chemistry. Seoul Natl. Univ., Seoul. pp 347-366.
3. Chung, H. S. and W. S. Woo. 2001. A quinolone alkaloid with antioxidant activity from the aleurone layer of anthocyanin-pigmented rice. *J. Nat. Prod.* 64(12) : 1579-1580.
4. Chung, H. S. 2002. A quinolone alkaloid, from the aleurone layer of *Oryza sativa* cv. *Mihyangbyeo*, inhibits growth of cultured human leukemia cell. *Nutraceuticals & Food.* 7(2) : 119-122.

Analysis and quantification of Alkaloid from Heugjinjubyeo

Ha Sook Chung*[†], Jin Chul Shin** and Won Sick Woo***

**Food and Nutrition, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea*

***National Institute of Crop Science, R.D.A., Suwon 441-857, Korea*

****NPRI, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea*

+82-2-901-8593, hasook@duksung.ac.kr