

고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 고삼 중의 oxymatrine 분석에 관한 연구

양승권* · 윤영자 · 남궁미옥

승실대학교 화학과

(2004. 4. 27 접수, 2004. 6. 5 승인)

Determination of oxymatrine in Sophora Radix by High Performance Liquid Chromatography

Seung Kwon Yang*, Young Ja Yun, Nangung Mi Ok

Department of chemistry, Soongsil university

(Received Apr. 27, 2004, Accepted Jun. 5, 2004)

요 약 : 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 고삼 중의 oxymatrine을 분석하였다. acetonitrile을 포함하는 완충용액과 C₁₈컬럼을 이용한 역상 크로마토그래피를 수행하였다. Oxymatrine의 분리는 215 nm에서 UV흡수가 관측되었다. 고삼 중의 oxymatrine의 추출은 다양한 용매와 다양한 추출방법을 사용한 결과, 마쇄한 고삼의 최적의 추출 효율은 80 °C에서 50% ethanol로 5시간 동안 환류가열 하였을 때 가장 높은 효율을 보였다. 대부분의 추출 방법은 복잡한 전처리를 필요로 하지만, 본 연구에서는 승화 추출법으로 복잡한 전처리를 제외시킨 추출법을 고안하였다. 승화 추출은 높은 진공 (1×10^{-3} torr) 과 높은 온도 (200 °C) 에서 수행되었다. 승화 추출법을 사용한 추출 효율은 다른 추출 방법들과 비교해서 전처리 과정을 거치지 않은 장점은 있었으나 추출 효율이 좀 낮았다.

Abstract : A high performance liquid chromatographic method was designed for the quantitative analysis of oxymatrine in Sophora Radix. The separation of oxymatrine was performed by reversed-phase chromatography with a C₁₈ column and a buffered aqueous solution containing acetonitrile, and monitored by UV absorption at 215 nm. Extraction of oxymatrine in Sophora Radix was carried out using various solvents and extraction methods. The optimum extraction efficiency for the crushed Sophora Radix was achieved by reflux at 80 °C in 50% ethanol for five hours. Most extraction methods used to complicate pretreatments. In this study, sublimation was employed for a extraction method without going through complicate pretreatments. Sublimation was carried out under high vacuum (1×10^{-3} torr) and at high temperature (200 °C). Extraction efficiency using Sublimation was found to be inferior to other extraction methods.

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-571-4564 Fax : +82+(0)2-3461-0590

E-mail : ysk1994@bio-core.co.kr

Key words : Oxymatrine, HPLC, Sophora radix

1. 서 론

고삼(苦參, *Sophorae Radix*)은 너삼의 주피를 거의 벗긴 뿌리로 맛이 쓰지만 인삼과 같은 효과가 있다는 뜻에서 고삼이라 한다. 산지는 우리나라와 중국, 일본, 시베리아 등지에 분포하며, 성분으로는 수종의 quinolizidine alkaloids (matrine, oxymatrine, sophoranol, anagyrrine, methylcytisine, baptifoline, sophocarpine, allomatrine), flavonoid, saponin 등이 보고되어 있다.^{1,2}

Oxymatrine은 크록셀 육종², 간세포사에 효과가 있는 것으로 연구되었다. 뿐만 아니라, 치아우식예방제로 개발 가능성이 있다고 보고 되었다. 또한 치은염유아세포의 세포주기 진행을 촉진시킨다.^{4,6}

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용해서 생약으로 쓰이는 식물의 성분인 알칼로이드의 분석은 1979년 Ota Nagayo에 의하여 보고된 후 최근까지 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹¹⁻¹⁹

본 연구에서 고삼의 함유물질로 밝혀진 oxymatrine은 여러 가지 약리작용에 의해서 한방에서의 복용이 점차 늘어나고 있다. 그러나 가열조건 및 추출시간에 대한 연구가 부족하고 간편성을 요구하는 현대에 엑기스제의 사용이 많아질 것에 대한 연구로서, 추출 조건에 따른 함량변화에 대한 체계적인 연구가 확립되어야 할 필요성이 커지고 있다.

이에 본 연구에서는 고삼의 자원식물로서의 가치를 검토하고자 HPLC에 의해 고삼 중의 quinolizidine alkaloid의 한 종류인 oxymatrine의 함량을 정량 분석하였다. 고삼중의 oxymatrine을 HPLC로 분석하는 최적의 조건을 찾고 추출방법, 추출용매, 추출시간에 따른 함량 변화를 연구하였고, 시약을 정제할 때 사용하는 승화법을 바탕으로 각 성분들의 승화 온도가 다르다는 점에서 고삼에 포함된 성분을 승화법으로 1×10^{-3} torr의 진공에서 고온에서 추출하였다. 이에 천연물 추출에 있어서 필요로 하는 전처리 과정을 줄일 수 있는 방법을 연구조사하였다.

2. 실험

2.1. 시료 및 시약

실험에 사용한 고삼은 서울 경동시장에서 구입한 것을 깨끗이 씻어 그늘에서 말린 후 분쇄하여, 데시케이터(실리카 겔)에서 보관하며 사용하였다.

Oxymatrine 표준품은 Waco사에서 구입하였고, 추출 후 전처리에 사용된 HCl과, K_2CO_3 는 Aldrich사, CH_2Cl_2 는 J. T. Baker사의 특급시약을 각각 사용하였고, 실험에 사용한 모든 용매는 J. T. Baker사의 HPLC용 특급시약을 사용하였으며, 모든 용액의 제조에는 탈 이온수(비저항 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, Millipore)를 사용하였다.

또한 본 실험에 사용한 모든 용매는 Millipore사의 membrane filter(기공의 직경 $0.45 \mu\text{m}$)를 사용하여 감압 여과한 후 40분간 ultrasonicator로 초음파를 주사하여 기포를 제거한 것을 사용하였다.

2.2. 기기 및 장치

실험에 사용한 HPLC는 영린기기의 Autochro2000(v1.0) data module software를 사용하고 JASCO사의 PU980 pump, UV 975 detector, Model 7125 Manual Injector가 부착된 것을 사용하였다.

추출시 사용한 진공장치는 Edwards vacuum pump와 ULVAC사의 ULK-06A diffusion pump를 사용하였고, 기기 모형도는 Fig. 1 과 같다.

용매의 기포 제거를 위한 Ultrasonicator는 Branson사

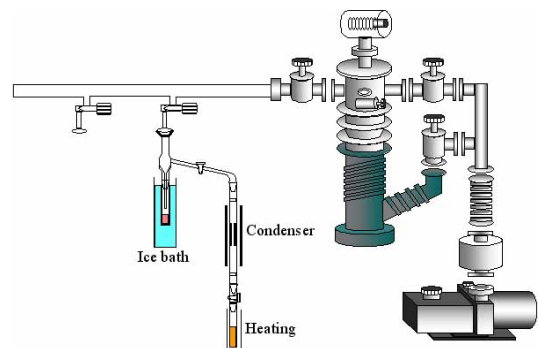


Fig. 1. Diagram for Vacuum Systems.

제품이며, 증류수 제조는 Millipore사의 MillQ-Academic system을 사용하였다. HPLC column으로 GL science의 ODS-2 inertsil (4.6 mm×250 mm, 5 μm)를 사용하고 검출기는 파장 215 nm에서 oxymatrine을 검출하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 최적분리조건

HPLC를 이용한 oxymatrine의 정량분석을 위한 최적의 조건은 Table 1에 나타내어진 것과 같이 acetonitrile : 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)의 부피비가 10 : 90으로 혼합한 용리액에서 가장 양호한 분리가 이루어 졌다 .

Table 1. Analytical conditions of HPLC

Model	JASCO PU980/UV975
Column	ODS-2 inertsil, 4.6 mm × 250 mm
Solvent	Acetonitrile : 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) (1:9, v/v)
Flow rate	1.0 mL/min(constant flow)
Detection	UV 215 nm
Temp	25 °C
Injection volume	20 μL

2.3.2. Separatory funnel liquid-liquid 추출법

Kazuki Saito의 lupine alkaloid 분석을 기초로 하여 시료의 전처리로 서로 섞이지 않는 두 용매에 대한 용질의 상대적 용해도 차이를 이용해서 추출하는 separatory funnel liquid-liquid 추출법을 사용하였다. 시험방법을 간단히 기술하면 다음과 같다.

- (1) 초음파, 환류가열, 달임 등의 방법으로 추출한 시료에 10% HCl을 가하여 pH 2로 만든다
- (2) 시료에 CH₂Cl₂로 2회 분획하여 중성 및 산성 부분을 제거한다.
- (3) 수층에 포화 K₂CO₃를 가하여 pH 10으로 만든다.
- (4) 수층을 CH₂Cl₂로 2회 분획하여 염기성 부분을 얻는다.
- (5) CH₂Cl₂층의 CH₂Cl₂를 증발시킨후 CH₃OH에 녹인다.
- (6) CH₃OH에 녹인 시료를 유기용매용 syringe filter (기공의 직경 0.45 μm)로 여과시킨다.
- (7) 표준물질의 크로마토그램 머무름 시간과 비교하여 정량분석한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

표준검정곡선을 위하여 oxymatrine을 10, 50, 100, 200, 450 mg/L의 농도별로 조제하여 동일한 조건으로 HPLC로 분석하여 각각에 대한 검정곡선을 얻었다. oxymatrine은 감응도 (Y)와 표준물질량 (X)과의 직선의 관계식은 Fig. 2와 같이 $Y = 15.2 \cdot X - 318.3$ 이며 직선성은 $R^2=0.997$ 로 매우 양호하였다.

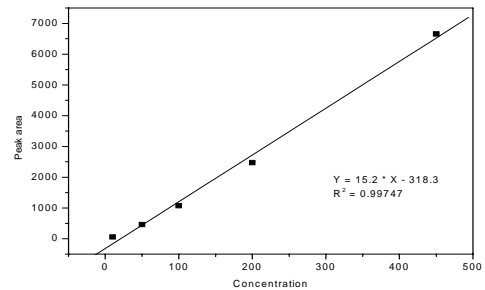


Fig. 2. Calibration curve of oxymatrine

3.2. 초음파 추출

분쇄한 고삼 2.0 g을 아래의 4가지 추출용매 50 mL를 가하여 40 °C에서 20분씩 3회 초음파 추출한 후 얻어진 용액의 농축액을 separatory funnel liquid-liquid 추출법으로 전처리하여 표준물질의 크로마토그램 머무름 시간과 비교하여 정량분석하였다. Fig. 3에서 75% EtOH로 추출하였을 경우 oxymatrine의 함량이 0.57%로 추출효율이 가장 높았다.

3.3. 환류가열

3.3.1. 추출시간 및 추출용매에 따른 고삼 중의 oxymatrine 추출

분쇄한 고삼 2.0 g을 아래의 4가지 추출용매 200 mL를 가하여 2, 3, 4, 5, 6시간동안 각각 환류가열하여 추출한 후 얻어진 용액의 농축액을 separatory funnel liquid-liquid 추출법으로 전처리하여 표준물질의 크로마토그램 머무름 시간과 비교하여 정량분석하였다. Fig. 4를 보면 100% H₂O는 4시간, 25% EtOH는 2시간, 50% EtOH는 5시간, 75% EtOH는 4시간 추출하였을 때, 추

출효율이 가장 좋았다. 각 추출용매에서 가장 추출효율이 좋았던 때를 비교해본 결과 50% EtOH로 5시간 추출 하였을 때, oxymatrine의 함량이 0.75%로 가장 추출효율이 좋았다.

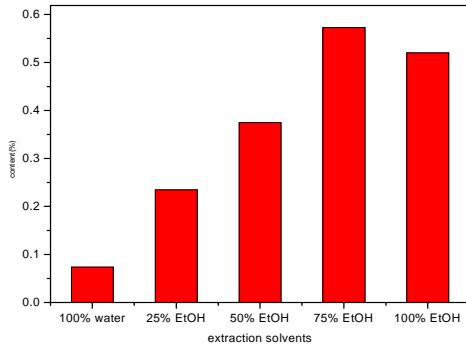


Fig. 3. Content of oxymatrine in Sophorae Radix by ultrasonication.

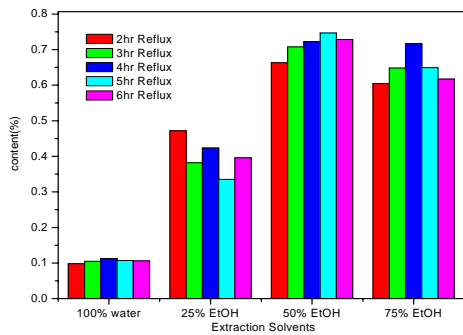


Fig. 4. Content of oxymatrine in Sophorae Radix by reflux.

3.4. 달임

분쇄한 고삼 2.0 g을 100% H₂O로 추출용매 200 mL를 가하여 1, 2, 3시간동안 각각 달임 추출한 후 얻어진 용액의 농축액을 separatory funnel liquid-liquid 추출 방법으로 전처리하여 표준물질의 크로마토그램 머무름 시간과 비교하여 정량분석하였다. 분석한 결과 Fig. 5를 보면 2시간 동안 달였을 때, oxymatrine의 함량이 0.13%로 추출효율이 가장 좋았다.

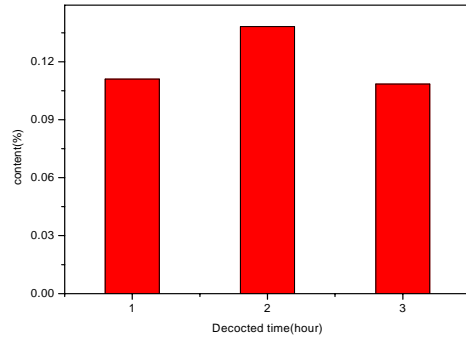


Fig. 5. Content of oxymatrine in Sophorae Radix by decoction.

3.5. 승화

분쇄한 고삼 1.0 g을 진공장치에서 1×10⁻³ torr에서 24시간 동안 50 °C로 하여 수분을 제거하고, 50 °C에서 150 °C까지 24시간 동안 온도를 올려서 승화온도가 낮은 물질을 제거한 후, 50 °C에서 200 °C까지 24시간 동안 천천히 온도를 올린 후, 200 °C에서 시간을 달리하여 얻은 추출물을 메탄올에 녹여, 표준물질의 크로마토그램 머무름 시간과 비교하여 정량분석하였다. 분석한 결과 Fig. 6을 보면 8시간동안 승화추출 하였을 때, oxymatrine의 함량이 0.32%로 추출효율이 가장 높았다.

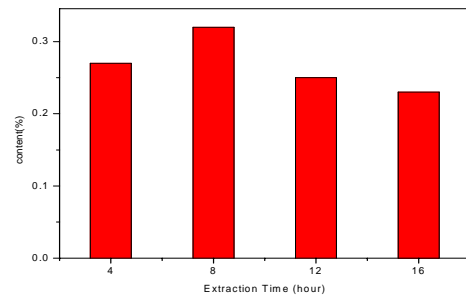


Fig. 6. Content of oxymatrine in Sophorae Radix by sublimation.

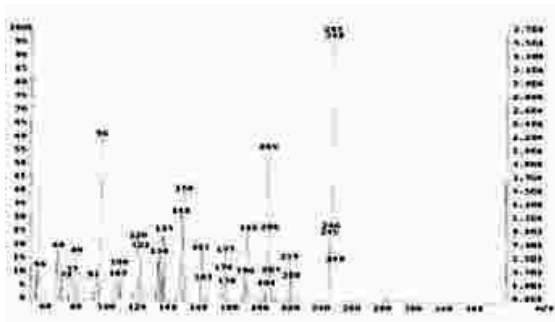
3.6. 고삼 중의 oxymatrine의 확인

50% EtOH로 5시간 동안 환류가열하여 추출한 검액을 HPLC로 분리하여 머무름시간이 7.8분인 oxymatrine 피

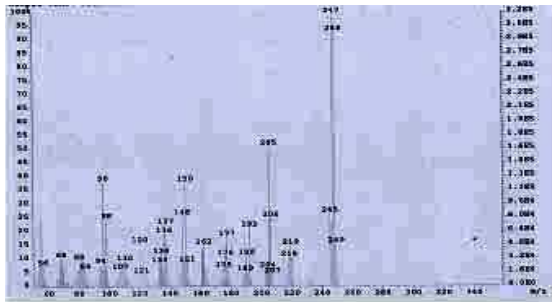
크를 받아 GC-MS (GC; Hewlett-Packard HP6890, Mass; Autospec Micromass. U.K)로 확인한 결과, Fig. 7을 보면 oxymatrine으로 확인할 수 있었다.

Table 1. Analytical conditions of GC/MS

Model	HP6890 / Autospec Micromass
Column	DB-5
Temp	column oven - 1min at 60 °C, ramp to 260°C at 20 °C, 12min at 260 °C, Injector - 260 °C
Injection volume	1 µL



(a)



(b)

Fig. 7. GC-MS spectrum of oxymatrine; (a) oxymatrine standard, (b) Sophorae Radix

3.7. 회수율 및 재현성

분쇄한 고삼 1 g에 대하여 oxymatrine 표준물 2 mg을 첨가하여 구한 회수율은 97.6 %로 양호하였기에 본 실험을 통한 정량법이 타당하다고 보았다. Oxymatrine 표준액의 반복 주입에 의한 재현성 또한 양호하였다.

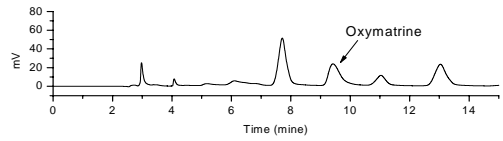


Fig. 8. Chromatogram of oxymatrine ; reflux extraction of Sophorae Radix 1 g in water at 80 °C for 3 hour.

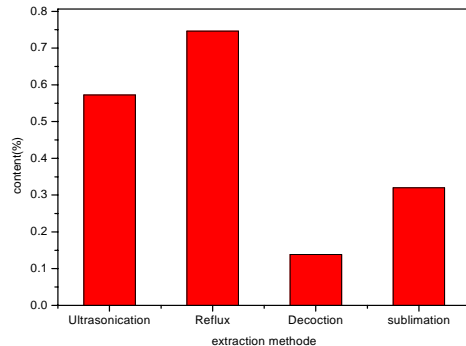


Fig. 9. The effect of extraction methods of oxymatrine in Sophorae Radix.

4. 결 론

본 연구에서는 고삼(苦參, Sophorae Radix)중의 oxymatrine을 HPLC로 분석하는 최적의 조건을 찾고 추출 방법, 추출용매, 추출시간에 따른 함량 변화를 연구하고, 천연물 추출에 있어서 필요로 하는 전처리 과정을 줄일 수 있는 방법을 연구하는데 그 주된 목적이 있었다. 본 연구를 통하여 얻은 결론은 다음과 같이 요약될 수 있다.

- 1) 고삼 중의 oxymatrine을 신속하고 편리하게 분석할 수 있는 최적의 분석조건은 acetonitrile : 5 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)의 부피비가 10 : 90으로 혼합한 용리액에서 가장 양호한 분리가 이루어 졌다.
- 2) 고삼 중의 oxymatrine을 추출해 낼 수 있는 최적 조건을 알아보았다. 분쇄한 고삼을 50% ethanol로 80 °C에서 5시간 환류가열 하였을 때 가장 높은 oxymatrine 함량을 보였으며, 이 때의 고삼 중 oxymatrine 함량은 일반적인 추출법인 초음파 추

출보다 0.18%의 높은 0.75%였다.

- 3) 추출성분들의 승화 온도가 다르다는 점을 이용한 승화추출에서 비록 0.32%의 추출효율을 보였지만, separatory funnel liquid-liquid 추출법과 같은 복잡한 전 처리 과정을 생략할 수 있었다. 승화 추출할 때, 가장 주의해야 할 점은 온도제어이다. 마쇄한 고삼에 있는 수분을 제거하기 위하여 1×10^{-3} torr의 진공에서 24시간 50 °C로 하여 수분을 제거한 후, 50 °C에서 150 °C까지 24시간 동안 온도를 천천히 올려서 승화온도가 낮은 성분들을 제거해 주었다. 그런 다음 유리관을 교체한 후, 50 °C에서 200 °C까지 24시간 동안 천천히 온도를 올린 후, 승화시켜 oxymatine을 추출할 수 있었다. 보다 세밀한 온도제어를 해 준다면, 좀 더 나은 추출효율을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 2003년 숭실대학교 교내 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Ju Sun Kim, Sam Sik Kang, Kyong Soon Lee, Seung-Yeup chang and Do Hee Won, *Kor. J. Pharmacogn.*, **31**(4), 421-425(2000).
- 홍원식. 「약초의 성분과 이용」 일월서각. 408-411(2000).
- SOPHORA. by Subhuti Dharmananda, Ph.D., Director, Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon.
- Tak-Lim Kang, Gwi-Sea Hwang. *대전대학교 한의학연구소 학위논문집*. 47-54(1992).
- Hyun-Ok Lee. *대한구강보건의학회지*. **25**(4), 333-344(2001).
- 김홍식, 신형식. *원광치의학*, **10**(1), 53-67(2000).
- Yoe-Ray Ku, Li-Yun Chang, Jer-Huei Lin, Li-Kang Ho. *J. Pharma. Biomed. Anal*, **28**, 1005-1010(2002).
- Yuan-Shium Chang, Yoe-Ray Ku, Jer-Huei Lin, Kuo-Liang Lu, Li-Kang Ho *J. Pharma. Biomed. Anal*, **26**, 849-855(2001).
- Jing-Zheng Song, Hong-Xi Xu, Song-Jiu Tian, Paul Pui-Hay But. *J. Chromatogr. A*, **857**, 303-311(1999).
- Xi Chen, Changqing Yi. et. al *Anal. Chim. Acta*, **466**, 79-86(2002).
- Ota. Nagayoo, Mino. Yoshiki. et. al. *Shoyakugaku Zasshi*, **33**, 140-145(1997).
- Kazuki saito, Kumiko kobayashi. *J. Chromathgr.* **462**, 333-340(1989).
- Ping Xiao, Hajime Kubo, Hideaki Komiya. et. al. *Phytochemistry*, **50**, 189-193(1999).
- Mahoud H. Mohamed, Hashem A. Hassanean, *Phytochemistry*, **46**, 365-369(1997).
- Mahmoud H. Mohamed, Kazuki Saito et. al *Phytochemistry*, **30**, 3111-3115(1991).
- Qiu, Feng, Zhong-gui, Li, Hao-zhi, Peop. *Rep. China*, **58**, 616-619(2003).
- Jin L X, Cui Y Y, Zhang G D, *Acta Pharmaceutica Sinica*, **28**, 136-139(1993).
- Yang. W, Yang. N. et. al. *China Journal of chinese Materia Medica*, **22**, 732-734(1997).
- Meng. Gendalal, Wang. Yi. et. al. *Yaowu Fenxi Zazhi*, **19**, 114-117(1997).
- Matrine and oxymatine by Subhuti Dharmananda, Ph. D, Director, Institute for Traditional Medicine, Portlane, Oregon.