

人蔘 Extract 中の α -pyrrolidone 檢定

徐 廷 祥

Suh Chung Sang : Determination of α -Pyrrolidone in Panax ginseng Extracts

The determination of α -pyrrolidone in ginseng extract by gas liquid chromatography (GLC) was established. α -Pyrrolidone in extract was tentatively identified by comparison of the relative retention time of sample peak with those of reference compound and coinjection noted peak enhancement. The α -pyrrolidone peak elimination was demonstrated by formation of oxime when treated with excess of $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ and NaOH , allowed to stand at room temperature for 5 minute. The elimination was also observed when samples were treated by the same procedure. The above method was proved to be useful for the determination of α -pyrrolidone in ginseng extract and in ginseng extract mixed with 51 plant extracts.

序 論

人蔘에서 期待하는 特異有效成分은 아직도 研究對象으로 남아 있으며 따라서 有效成分만을 分離하여 製劑化할 수 있는 段階에는 이르지 못하고 있다. 이러한에도 不拘하고 人蔘에 對한 關心은 漸次 높아지고 있으며 그 實證으로 人蔘이 輸出生藥中の 首位를 堅持하고 있을뿐만 아니라 그 輸出量도 增加一路에 있는 것을 들 수 있다. 이러한 實情에 隨伴하여 人蔘製劑도 輸出對象으로 登場하였고 또한 새로운 開發의 企圖도 促求되고 있음으로 製劑의 品質管理를 爲한 製劑中の 人蔘 extract 檢定問題가 要請되고 있다.

人蔘 extract 檢定을 爲하여 適用될 수 있는 人蔘特殊成分으로는 柴田氏¹⁾가 報告한 配糖體類와 著者 및 共同研究者²⁾가 證明한 α -pyrrolidone 을 들 수 있다. 이 成分들은 모두 人蔘의 微量成分임으로 extract level 에서 化學的方法으로 檢定하는 것은 至難한 일이라고 생각된다.

著者は 위와같은 見地에서 α -pyrrolidone 을 key component 로 하는 人蔘 extract 檢定을 gas liquid chromatography (GLC)로 試圖하였다.

α -pyrrolidone 을 key component 로 選定한 것은 配糖體類의 GLC 에 있어서는 揮發性 誘導體로 誘導하는 번거로운 前處理가 따를뿐만 아니라 標準用 配糖體의 分離가 또한 번거로운

* College of Literature, Jeon Puk National University, Jeon Ju, Korea

일이었던 까닭이다. 이에 反하여 α -pyrrolidone 은 入手가 容易할뿐만 아니라 물을 爲始한 極性溶媒와 非極性有機溶媒에도 잘 溶解됨으로 人蔘 extract 의 prefractionation 溶媒에 拘得없이 α -pyrrolidone 이 溶出될 수 있는 利點도 감안하였던 까닭이다.

本 研究에서는 一般的으로 人蔘의 水性 extract 또는 ethanol 性 extract 가 製劑에 使用되고 있는 點에 立却하여 兩種의 extract 을 對象으로 하여 α -pyrrolidone 檢出의 GLC 最適條件을 檢討하였고 그 條件下에서 製劑中の 人蔘 extract 檢定이 可能한 基本檢定法을 檢討하였다.

實 驗

Preparation of sample extracts- 人蔘 約 100g 을 잘게 썰고 蒸溜水 또는 95% EtOH 約 300ml 과 같이 水浴上에서 3時間 溫浸濾過한 다음 그 濾液을 거의 蒸發濃縮시키고 다시 benzene 300ml 을 3 回로 나누어 加하면서 水浴上에서 蒸發시킨 無水狀態의 extract 를 調製하여 GLC sample 로 하였다. 人蔘 extract 가 foreign extract 와 混合된 狀態에서 人蔘 extract 의 檢定이 可能 한가를 檢討하기 爲하여 Table I 의 list (※는 alkaloid 植物)와 같은 51 種 植物의 extract 를 調製함에 있어서도 위와같은 方法으로 extract 를 調製하였다.

Gas chromatography- 人蔘 extract 中の α -pyrrolidone 檢定條件을 決定하기 爲하여 標品 α -pyrrolidone (Tokyo Kasei Organic Chemical, Reagent grade)의 identifiable peak 을 觀察할 수 있고, sample 人蔘 extract 에 添加하였을때에도 再現性이 있는 GLC 條件을 目標로하여 다음 같은 GLC 條件을 設定하였다.

Gas chromatograph: YANAGIMOTO GCG-5DH

Column: Stainless steel (ϕ 4mm \times 1.5m), 1% SE-30/Celite (Tokyo Kasei org. chemical)

Temperature: FID-detector, 280; Column, 150-250 programing (20°/min.); Injector port, 310°.

Carrier gas: N₂, 24ml/min.

Sensitivity: 10⁸

Attenuator: 1/16

Chart speed: 10mm/min.

上記 GLC 條件下에 서는 標品 α -pyrrolidone 의 retention time 은 0.8 이었다 (cf. Fig.2).

Oxime formation of α -pyrrolidone in EtOH- Extract sample 에서 α -pyrrolidone peak 를 確認 할때 oxime formation 에 따르는 α -pyrrolidone peak 의 消去興否를 檢討함으로써 α -pyrrolidone peak 을 再確認키 위하여 檢液을 다음같이 處理하였다. α -pyrrolidone 5 γ /ml 溶液 1ml (λ max EtOH 194m μ) 에 固形 NaOH 約 0.2g 을 加하여 alkali 性으로 하고 (λ max NaOH-EtOH 198m μ) NH₂OH·HCl 約 0.25g 을 加한 混合液을 充分히 振盪하고 室溫에서 5分間 放置하고 그 上澄液 (λ max EtOH (Oxime) 228.5m μ) 을 oxime 檢液으로 하였다. Oxime 檢液은 oxime formation 處理前의 檢液이 α -pyrrolidone peak 을 나타내는데 反하여 그 peak 을 消去시켰다.

GLC of aqueous and ethanolic extract under same condition of α -pyrrolidone- 위에서 設定된 α -pyrrolidone 의 GLC 條件下에서 人蔘 extract 에서도 α -pyrrolidone 의 identifiable peak

가 出現되는가를 試圖하였다. Aqueous 및 EtOH 性 extract 의 95% EtOH 溶液으로부터 2% EtOH 溶液을 調製하여 檢液으로하였다(cf. Fig. 3).

Distillation of extract-Extract 溶液에서 α -Pyrrolidone 檢定이 不可能하였을 때에는 Sample extract 適宜量을 EtOH 에 溶解시키고 所要量을 正確히 取하고 먼저 EtOH 를 蒸發시킨 殘渣에다 다시 蒸溜水를 加한 다음 3% NaOH 溶液으로 만들고 水浴上에서 3時間 加溫後 繼續 加溫蒸發시킨다음 CHCl_3 20ml/extract(g)으로 三回抽出한 CHCl_3 合液을 水浴上에서 蒸發시킨다. 이와같이 處理된 最終殘渣를 139°C (α -pyrrolidone bp_{12} 138°C^{31}) 電氣浴上에서 10^{-2} mmHg 減壓下에 5分間 蒸溜하여 얻은 少量의 蒸溜物을 一定한 internal reference compound-EtOH 溶液에 溶解시켜서 α -pyrrolidone 의 檢液으로 한다(cf. Fig. 4) 本實驗에 있어 蒸溜 sample 量과 蒸溜되는 α -pyrrolidone 量은 sample 量이 적을 때는 반드시 α -pyrrolidone 檢定值가 再現性을 나타 내지 않았으므로 再現性있는 sample 量의 範圍를 檢定해야 하였다(cf. Fig.5).

Calibration curve and internal reference- α -Pyrrolidone peak 의 面積 또는 높이를 재기 위해서 α -pyrrolidone GLC 條件下에서 retention time 2.5 에 位置하는 phenacetin (Merk, reagent grade) 250mg/25ml EtOH 溶液에 標品 α -pyrrolidone 125, 250, 500 r 씩을 各各 溶解시키고 各 濃度溶液의 GLC 에서 α -pyrrolidone peak/phenacetin peak 높이의 比에 對應하는 α -pyrrolidone 量을 plot 하였다(cf. Fig. 1.).

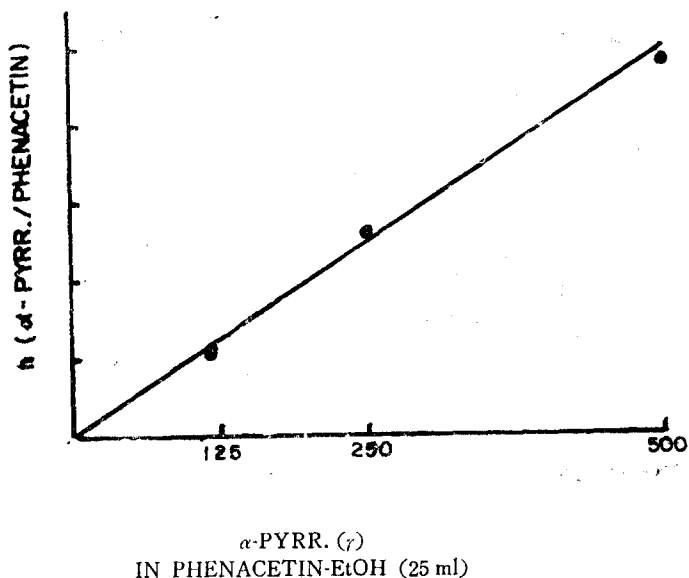


Fig 1. Calibration curve for α -pyrrolidone

Determination of α -pyrrolidone in ginseng extract. 各 sample extract 의 適宜量을 取하고 上記한 distillation 法에 의하여 蒸溜된 distillate 全量을 phenacetin 250mg/25ml EtOH 溶液을 加하여 1ml (本實驗範圍에서는 distillate 가 1ml 未滿이었다)로하여 GLC 檢液으로하고

extract sample 量에 對하여 α -pyrrolidone 檢定量의 再現性이 있는 範圍의 檢定値를 取하였다 (cf. Table II).

Determination of α -pyrrolidone in ginseng extract mixed with foreign extracts- 人蔘 extract 가 foreign extract 에 混合되었을 때에도 α -pyrrolidone 의 檢定이 可能한가를 檢討하기 위하여 이미

Table I. PLANT MATERIAL FOR FOREIGN EXTRACTS

- Chlorauthnus japonica
- Actinidia polygamna Maxi.
- Ginkgo biloba L.
- ※ Croton Tiglium L.
- ※ Picrorhiza Kurroa Royle
- ※ Coptis japonica
- ※ Carthamus tinctorius L.
- Glycyrrhiza uralensis Fisch et DC
- Scilla sinensis Merrill
- Potenstilla fragarioides L. var. spregelina Maxi.
- Sorbaria stellipilla Schneid var. typica Scheneid
- Rhododendron mucronulatum Turc.
- Epilobium pyrricholophum Fr. et Sav. form typicum Nakai
- Lepisorus Ussuriensis ching
- Alnus japonica Steudel
- Meehania Unticifolia Makino
- Spiraea prunifolia Sieb. & Zucc. var. simpliciflora Makai
- Morus alba L.
- Empetrum rdgrum L. var. japonicum Koch
- Fiwa japonica G. Mel
- Dendrobenthamia japonica Hatch form minor Nakai
- Ciraium Xanthacantum Nakai
- Aruncus americanus Rafin
- Lycopodium clavatum L. var. nipponicum Nakai
- Cayratia japonica Merr
- verbena officinalis L.
- Cycas revoluta Thunb.
- Lactuca triangulata Maxi.
- Stephanandra incisa Zabel
- Mcaasakia japoni Nakai
- Syneilesis palmata Maxi.
- Helianthus ammus L.

Opuntia Ficus-indica Mill
Cryptomeria japonica D. Don
Crataefus Maximowiczii Schneid
Primula jasoana Miquel
Nerium indicum Mill
Galium verum L.
Attemisia montana Panpan
Calypttranthe petiolaris Nakai var. *Cordifolia* Nakai
Rhododendron mueronulatum Tucz var. *ciliatum* Nakai
Ficus carica L.
Citrus Natsudaidai Hayata
Tetrapanas papyriferun Koch
Gnaphalium Luteo-album L.
Camellia japonica L.
Ilex crenata thumberg var. *microphylla* Maxi.
Symphytum perogrimum L.
Musa Baszoo Sieb. & Zucc.
Sapina sargentii Nakai
Mallotus japonicus Linefill

※ Alkaloid plant

α -pyrrolidone 이檢定된 人蔘 extract 을 51 種의 extract 各 2~3g 식을 混合한 狀態에서 上記한 distillation 法에 의하여 檢液을 調製하고 α -pyrrolidone 을 檢定하였다(cf. Table II).

結果 및 檢討

人蔘의 水性 또는 ethanol 性 extract 中の α -pyrrolidone 을 檢定하기 爲하여 標品 α -pyrrolidone 5 γ /ml EtOH 溶液을 檢液으로 하고 實驗記載條件下에서 relative retention time 0.8를 決定하였다(cf. Fig. 2).

GLC 에 있어 異物質이면서도 retention time 이 同一하게 觀察되는 例가 있으므로 α -pyrrolidone 檢液의 前處理을 通하여 peak 의 移動 또는 消去 等の 現象으로 α -pyrrolidone 의 retention time 을 再確認코져 하였다. 卽 實驗記載와 같이 處理하여 α -pyrrolidone 의 oxime formation 에 의한 retention time 0.8 의 消去를 觀察할수 있었다(cf. Fig. 2).

本實驗에서의 oxime formation 處理가 果然 oxime 을 生成함으로써 retention time 0.8 의 peak 가 消去되었는가는 UV-absorption 測定으로 確認할 수 있었다. 卽 carbonyl compound 를 NaOH 로 處理할때 enolisation 이 誘起되던 長波長으로 shift 하고 oxime 을 形成할때 長波長으로 shift 하는 現象⁴⁾과 本實驗에서 oxime formation 處理에 있어서의 吸收波長 移動성이 一致하였던 것이다.

위와 같은 oxime formation 處理와 아울러 標品 pyrrolidone 을 檢液에 添加할때 retention

time 0.8의 peak enhancement을 통하여 α -pyrrolidone의 retention time을 決定하였다(cf. Fig. 2).

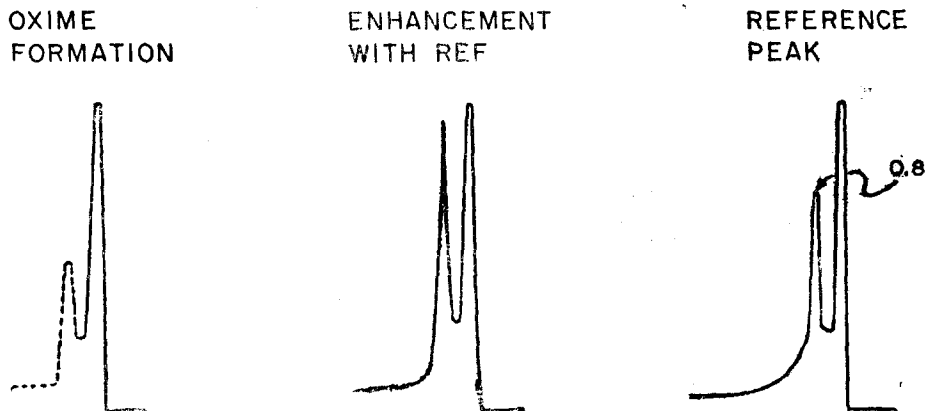


Fig. 2. Observation of peak enhancement occurred by additional α -pyrrolidone and peak elimination by oxime formation

標本 α -pyrrolidone의 retention time 決定과 同一한 條件下에서 extract sample를 對象으로 하는 α -pyrrolidone 檢定을 試圖하였을때는 水性 extract의 2% EtOH 檢液에서는 solvent peak가 retention time 0.8 領域을 cover하지 않는 sample size에서는 α -pyrrolidone은 檢出되지 못하였다. EtOH性 extract 2% EtOH 檢液의 경우는 retention time 0.8 領域에 multiple peak가 겹쳐서 α -pyrrolidone의 選別이 不可能하였다. 이 結果는 solvent peak에 接近하는 領域에서 나타나는 multiple peak의 消去를 爲한 前處理와 아울러 α -pyrrolidone의 含量을 높이는 extract sample의 前處理가 必要하게 되었다(cf. Fig. 3).

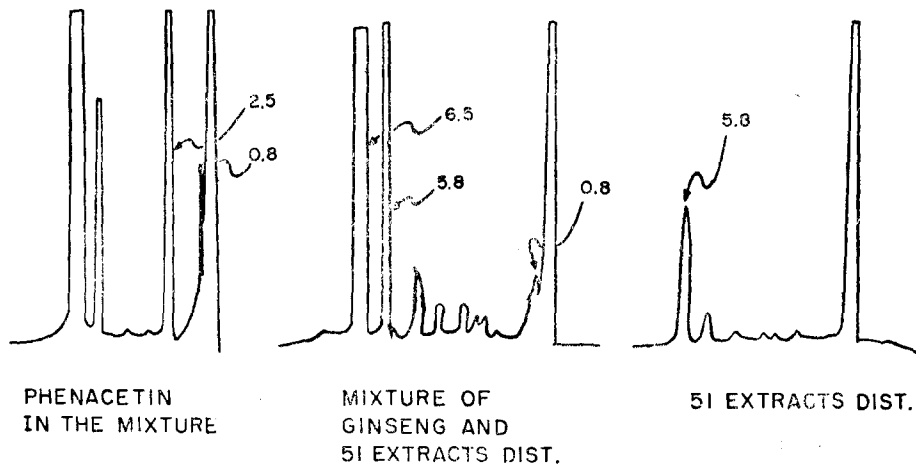


Fig. 3. GLC of aqueous and ethanolic extract and foreign extracts.

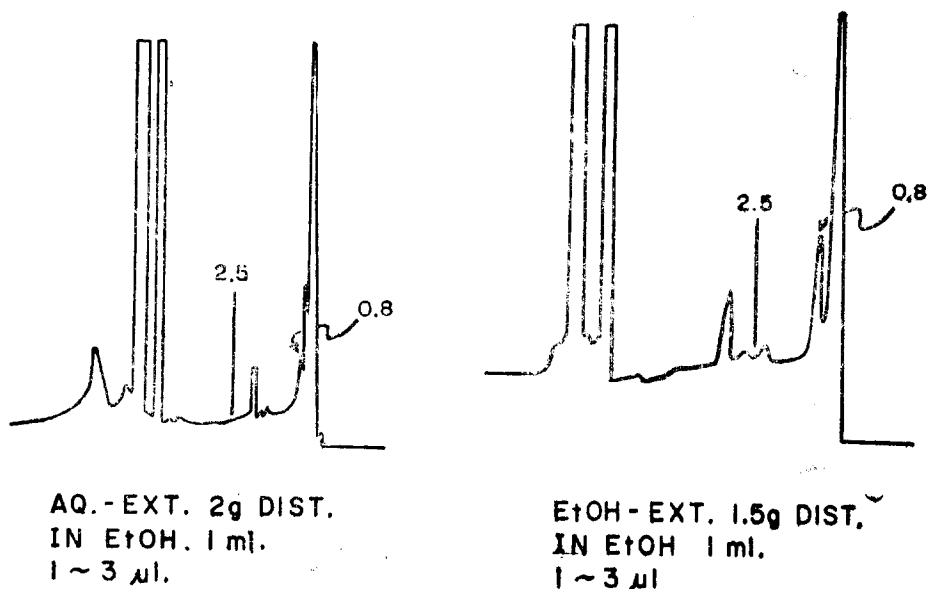


Fig. 4. GLC of aqueous and ethanolic extract-distillate.

위에서 보는 바와 같은 solvent peak 에 接近하는 multiple peak 는 ester 類에 基因할 것이라 고 豫測하고 아울러 α -pyrrolidone 의 濃度を 높일 수 있는 prefractionation 을 試圖하였다. 即 6年生白蔘의 水性 및 ethanol 性 extract 를 各各 約 1.5g 을 實驗記載와 같이 濃 alkali 處理 後에 CHCl_3 抽出液을 蒸發시킨 殘渣를 다시 10^{-2}mm Hg 減壓下에서 蒸溜한 蒸溜物을 EtOH 1 ml 에 溶解시키고 注入하면 α -pyrrolidone retention time 0.8 의 peak 을 觀察할 수 있었다 (cf. Fig. 4). 위와 같이 sample extract 의 prefractionation 處理에 의한 distillate 의 GLC 에 있어 sample 量과 distillate 量이 定量的인 要因이라는 前提에서만 α -pyrrolidone 의 檢定量을 信賴 할수 있음으로 sample 量如何에 不拘하고 α -pyrrolidone 檢定量은 再現性이 있는 것인가를 檢討 하여보았다. 水性 extract 와 EtOH 性 extract 로부터 實驗記載와 같이 處理하여서 얻은 distillate 을 α -pyrrolidone 의 calibration curve 設定에 使用했던 phenacetin ethanol 溶液 1 ml 에 溶解시 키고 α -pyrrolidone 을 測定하여 다음과 같은 測定値를 얻었다.

	Ext.	2.5	2	1.5	1	0.75	0.5
pyrrolidone (γ)							
from aq.-ext.		26	23	19	16	4	2
from ETOH-ext.		29	22	21	15.7	7	—

以上과 같은 檢定值結果에 의하면 extract 0.5와 0.75g의 sample 量의 α -pyrrolidone 檢定值는 直線에서 顯著히 離脫 되었으므로 이것들을 除外하고 求한 두 回歸線 $Y=6.773X+9.15$ (相關係數 0.999)와 $Y=8.27X+7.47$ (相關係數 0.965) 間에는 有意性있는 差를 認定할 수 없었다($p<0.05$) (cf. Fig. 5).

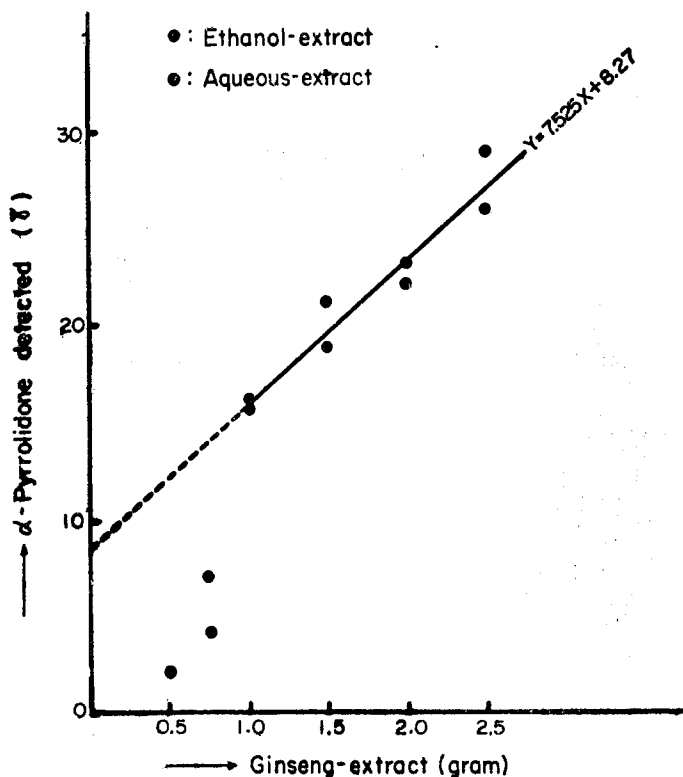


Fig. 5. Reproducibility of α -pyrrolidone in various sample size.

이 結果는 人蔘(白蔘)를 EtOH 로 抽出하든가 또는 물로 抽出하여도 α -pyrrolidone 의 抽出 效果는 同一한 結果를 보였다. 따라서 各種人蔘 extract 및 Table I의 list 植物 extract 51種 (2-3g)와 6年生白蔘 extract의 混合物 檢定에 있어서도 實驗記載와 같은 前處理와 sample 과 α -pyrrolidone 量間의 再現性있는 範圍의 sample 量을 取하여 檢定하였다(cf. Table I, II)

人蔘 extract 가 foreign extract 에 混在할때에도 適當한 sample 에서는 α -pyrrolidone 檢定值의 再現性이 있었다.

Table II. α -PYRROLIDONE DETERMINATION

MATERIAL (GROWN YEAR)	From AQ-EXT.		From EtOH-EXT.	
	EXT. (g)	α -PYRR. (γ)/(g)	EXT. (g)	α -PYRR. (γ)/(g)
GINSENG (6)	1.12	16.7	1.05	16.2
	1.05	15.9	1.07	15.8
	1.32	15.1	1.21	15.4
	1.72	6.4		
SIDE ROOT (6)	1.41	7.1		
	1.27	6.9		
GINSENG (4)			12.4	4.7×10^{-1}
GINSENG (3)			15.7	4.2×10^{-1}
			13.2	3.9×10^{-1}
			12.7	4.2×10^{-1}
51-FOREIGN EXT.			140.2(2~3)	0
51-FOREIGN EXT. PLUS GINSENG (6) EXT.			139.9+1.7	14.9

Table II에 의하면 各種 人蔘 extract 間의 α -pyrrolidone 檢定値의 差異는 顯著하나 이 差異는 人蔘의 生育年數와 關聯 시킬수는 없다. 即 各種 人蔘間의 生育年數와 α -pyrrolidone 關係性을 따질 수 있는 sampling이 困難하였던 까닭이다. 다만 市販人蔘에서 調製한 extract에서 α -pyrrolidone의 檢定을 檢討하였을 뿐이다.

α -pyrrolidone을 key component으로 하여 人蔘 extract 量을 算出하려는 本研究에서 考慮되어야 할 問題는 天然에 分布되고 있는 glutamic acid가 條件에 따라서는 pyrrolidone carboxylic acid⁵⁾의 形態로도 存在하게 됨으로 本實驗에서의 distillation method 過程에서 尿酸이 decarboxylation에 의하여 α -pyrrolidone으로 化生할수 있는것을 생각 할수 있는 點이다. 이뿐만 아니라 γ -aminobutyric acid도 加熱에 의하여 α -pyrrolidone을 生成하게됨으로 本實驗의 方法만으로는 foreign extract에서의 α -pyrrolidone peak의 由來를 判斷하기 困難하게되었다. 本實驗 方法으로 γ -aminobutyric acid을 含有하고 있는 林檎³⁾ 果汁을 (2kg의 林檎을 mixer로 分碎하고 壓搾 하였다) 人蔘 extract를 製造한 方法으로 處理하고 實驗記 載와같이 蒸溜하였으나 아무 distillate를 얻지 못하였고 glutamic acid 3g을 亦是 同一 한 方法으로 處理하여 보았으나 distillate를 얻지 못하였다. 이러한 檢討의 結果는 distillate를 얻지 못하였다 하여 上記 한바와 같은 α -pyrrolidone의 生成을 否定하는 根據는 될수 없으며 다만 植物과 含量이 問題 될 것이다. 이러한 檢討와 아울러 pyrroline系 alkaloid가 本實驗過程에서 α -pyrrolidone으로 化生할수도 있는가를 檢討하기 爲하여 Datura alba 葉 70g에서 얻은(人蔘 extract 製造에 의한) extract와 atropine을 本實驗方法에 의하여 處理하고 그 GLC를 檢討 하였으나 α -pyrrolidone의 peak (0.8)와 人蔘 extract을 51種의 foreign extract에 混合하였을때 特徵의이었던 peak (6.5)의 retention time과 一致하는 peak는 發見할수 없었다.

以上과 같은 結果를 綜合하여 볼때 本 實驗의 結果는 人蔘 extract와 配合되는 foreign

extract 와의 混合體에서 foreign extract 에는 retention time 0.8 (α -pyrrolidone)의 peak 가 出現치 않을때에 適用될수있는 方法이며 萬一 retention time 0.8에서 peak 가 出現하는 경우에 있어서는 retention time 6.5 와 α -pyrrolidone (0.8)을 人蔘 extract 의 定性 peak 로 하고 retention time 6.5 가 檢定 對象 peak 로 適用되어야 할것이다. 또 retention time peak 6.5 와 0.8의 比(internal reference 와 두 peak 의 ratio)의 決定은 retention time 0.8이 foreign extract 의 α -pyrrolidone 에서 基因하였는가 與否을 判斷하게 될것이다. 다음 α -pyrrolidone 이 人蔘 extract 의 原成分인가 artifact 인가는 追窮中에 있다.

References

- 1) Shoji Shibata et al., Chem. Pharm. Bull., 14 (6), 595(1966).
- 2) Lin Keun Woo et al., This Journal.
- 3) Beilstein, "Handbuch der organische Chemie" Band XXI, p. 236
- 4) Robert M. Siverstein, "Spectrometric identification of organic compounds" p.98 (1964).
- 5) White, "Principle of Biochemistry" p. 96