

## HPLC를 이용한 酸棗仁의 成分 分析

申 國 鉉

서울대학교 生藥研究所

(Received May 15, 1982)

### Determination of *Zizyphus* Seed Components by HPLC

Kuk Hyun Shin

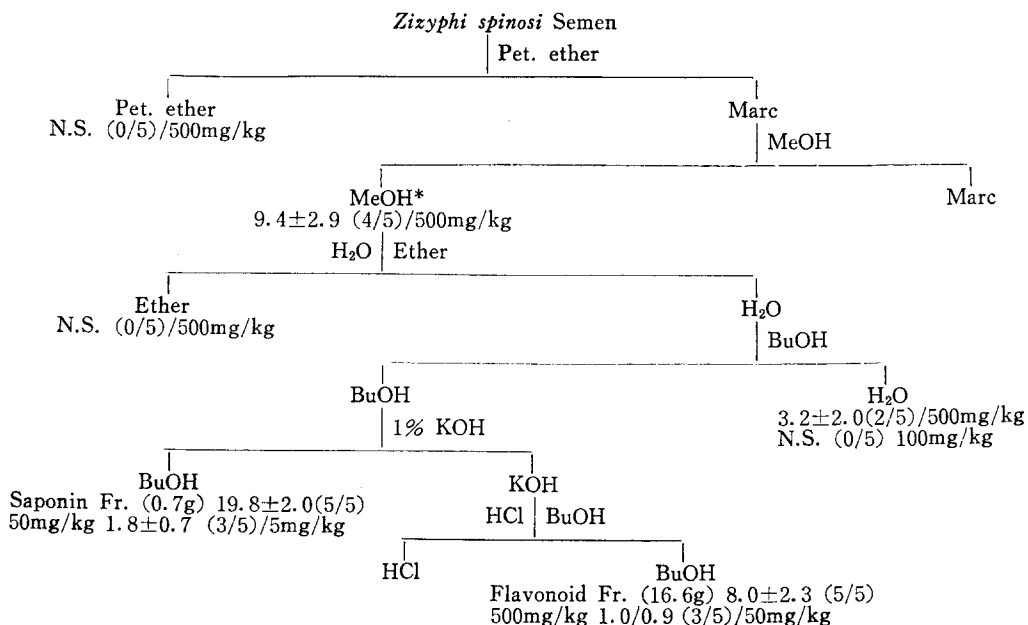
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110, Korea

生藥抽出物中の 有効成分 내지는 標的成分에 對한 分析法 確立은 天然醫藥品の 品質管理 및 評價를 위해 그 必要性이 指摘되고 있다. 즉 治療目的으로 使用할 生藥에 對하여 그 外觀上의 評價에만 그치지 않고 좀더 正確한 化學的 評價를 加해주기 위해서도 보다 再現性있는 分析方法이 開發되어야 할 것이다. 生藥에는 單一成分이 아니라 有効成分으로 推定되고 證明된 類似한 構造의 成分群이 多數 含有되어 있는 경우가 많으며 어느 한두개의 成分이 그 生藥의 全體를 代表한다고 쉽사리 단정할 수 없기 때문에 各成分別로 分離分析을 하지 않으면 안된다. 要컨대 單一回 分析으로 生藥의 全體成分相을 代表하는 spectrum을 얻는다는 것은 容易하지 않으며 이러한 意味에서 現在 날로 각광을 받고 있는 高速液體chromatography(HPLC)法이 이러한 問題를 解決할 수 있는 가장 잘 接近된 方法으로서 活用되어 질 수 있다고 思料되며 最近 이 方法을 利用하여 天然物 成分의 分析條件을 檢討한 實驗例가<sup>1)</sup> 增加一路에 있다. 이 方法은 藥効成分이나 標的成分을 化學的 變形을 加하지 않은 狀態로 直接分析 可能하며, 分析時間이 짧고 간편하며, 精度가 높다는 點 等의 長點이 있으며 1975년에는 美國藥典의 公定分析法의 하나로 채택되어 있다.

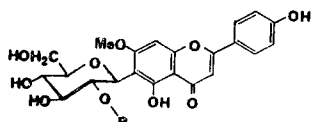
따라서 著者 等은 HPLC法을 利用하여 酸棗仁의 成分 分析을 試圖하였으며 分析對象成分으로서 그 含量이 比較的 뚜렷하며 藥効成分으로 評價된 flavonoid들을 選擇하였다. 즉 酸棗仁에서 分離 確認된 鎮靜作用成分으로서 C-glycosylflavone인 spinosin과 3種의 acylspinosin 및 微量의 基成分인 swertisin을 標的成分으로하여 column의 種類, 分離溶媒系에 따른 chromatogram의 pattern과 分離定量 條件에 對하여 檢討하였다.

### 實驗 結果 및 考察

標的成分의 選擇一定量對象成分으로서 그 含量이 比較的 키야 하며 可能한 限 藥効成分이어야 한다는 點에서 酸棗仁의 有効成分相에 對한 檢討를 試圖하였다. <Scheme 1>에 表示한 바와 같이 酸棗仁을 各種 有機溶媒로 分割抽出하고 各 分割物에 對하여 鎮靜作用을 측정한 結果 flavonoid fraction과 saponin fraction에 뚜렷한 活性이 나타남을 觀察하였다.<sup>2)</sup> 이 結果에 依하면 saponin fraction의 活性이 flavonoid fraction의 그것에 比하여 約 10倍 강한 것으로 나타났으나 그 含量을 比較하면 flavonoid fraction 16g에 對하여 saponin fraction이 0.7g으로 約 24배나 flavonoid fraction이 더 큰 含量比를 나타내었다. 따라서 flavonoid가 酸棗仁의 藥効作用의 主體를 이루고 있음을 알 수 있으며 flavonoid fraction으로부터 成分의 單離를 試圖하여 構造 기지의 swertisin과 새로운

Scheme I- Fractionation of flavonoids.<sup>2)</sup>

\* Sleeping time±S.E./dose(No. Anim. slept/No. Anim. used) 38mg/kg Hexob.: ataxia; no sleep (N.S.)

Scheme II. Structures of bioactive flavonoids<sup>2)</sup>.

Swertisin	R=H
Spinisin	R=Gluc
Acylspinisin A	R=6'''-Sinapoyl-Gluc
Acylspinisin B	R=6'''-Feruloyl-Gluc
Acylspinisin C	R=6'''-p-Coumaroyl-Gluc

Activity: Potentiation of barbiturate hypnosis. Inhibition of ladder climbing, Caffeine induced hyperactivity, Hole crossing.

flavonoid成分인 spinisin 및 3種의 acylspinisin인 sinapoylspinisin, feruloylspinisin, p-coumaroyl spinisin 등이 單離 그 化學構造가 밝혀졌다<sup>3,4)</sup>(Scheme 2). 이들 flavonoid들의 鎮靜作用의 強度는 swertisin과 spinisin이 비슷하게 가장 強하고 acylated spinisin들은 이에 비하여 弱하였다.<sup>2)</sup> 그 含量分布를 TLC上에서 비교하여 보면 spinisin과 acylated spinisin들의 含量이 비슷하게 가장 크고 swertisin은 거의 흔적량 存在하였다.

分離系의 選擇—單離된 各種 flavonoids를 標的成分으로 하고 酸棗仁을 benzene으로 前處理한 후 methanol로 抽出하여 얻은 extract를 對象으로 여러가지 混合溶媒系와 column에 依하여 그 分離能을 檢討한 結果 reverse phase인 COPELL-ODS column과 移動相으로서 tetrahydrofuran : H<sub>2</sub>O (4 : 53)의 polar한 溶媒系가 酸棗仁 flavonoid分離에 適合함을 認知하였다. 이때 使用한 기기는 Pye Unicam製 LC-20 separator, detector는 SP6-400 variable UV detector로 330nm에서 실시하였다. 이와 같은 條件下에서 순수한 flavonoid의 混合物에 對하여 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram과 분석조건을 Fig. 1에 表示하였다. Spinisin 그리고 그 polarity에 따라 sinapoylspinisin, feruloylspinisin의 순으로 전개되었다. 이때 同一한 phenolic compound의 誘導體인 N-(p-methoxy-

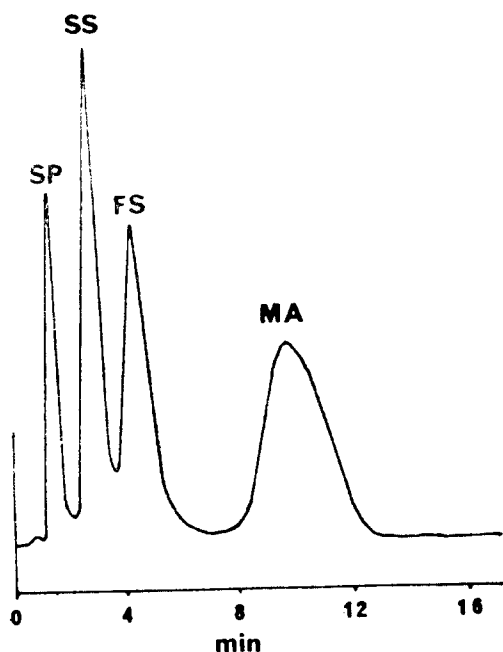


Fig. 1- HPLC chromatogram of the standard flavonoid mixture. Analytical conditions; column, COPELL-ODS, 2mm I.D.×25cm; eluent, tetrahydrofuran: H<sub>2</sub>O (4:53); flow rate, 1.7ml/min; pump pressure, 32 bar; chart speed, 0.5cm/min; detector, UV (330nm).

Table I- HPLC parameters for flavonoids

Compounds	$t_R$	$t'_R$	$k'$	$\alpha$	$R$
Spinosin	1.48	0.70	0.89	3.02	1.35
Sinapoyl spinosin	2.88	2.10	2.69	1.69	0.80
Feruloyl spinosin	4.32	3.54	4.54	2.55	1.57
N-( <i>p</i> -Methoxycinnamoyl)- <i>p</i> -amino-phenol	9.80	9.02	11.66		

$t_R$ ; retention time,  
 $t'_R$ ; net retention time,  
 $k'$ ; capacity factor of column,  
 $\alpha$ ; relative retention,  
 $R$ ; resolution.

$t_0=0.78$ min. Solvent mixture; Tetrahydrofuran: H<sub>2</sub>O (4:53), Flow rate; 1.7ml/min.

cinnamoyl)-*p*-aminophenol<sup>5)</sup>이 internal standard로 利用될 수 있음을 觀察하였다.

이 chromatogram의 分離 pattern을 column의 capacity factor, retention time, relative retention, resolution등을 計算하여 더 자세히 檢討하였다(Table I). Baseline separation은 모든 flavonoid에서 良好한 편이며 특히 spinosin과 sinapoylspinosin의 relative retention은 3.02이고 resolution은 >1.00으로 우수하였다. Sinapoylspinosin과 feruloylspinosin의 resolution이 0.8로서 1.00보다는 적은 값을 나타내나 relative retention이 1.5>로 分析可能한 程度

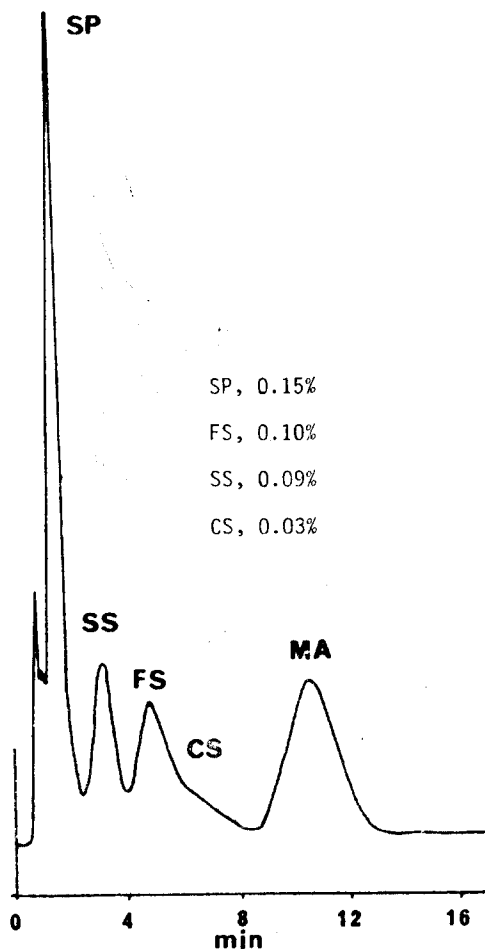


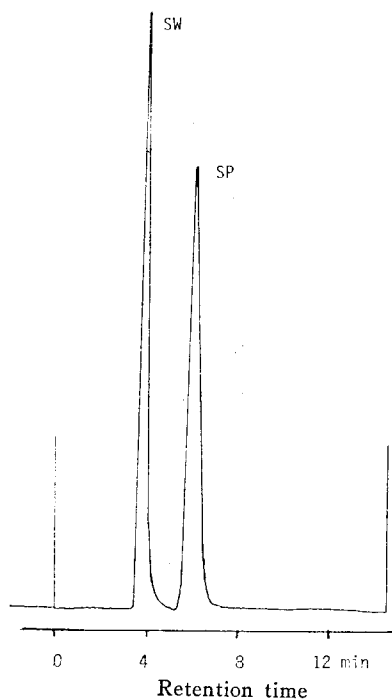
Fig. 2- HPLC chromatogram of methanol extract of *Zizyphus* seeds.

로 充分한 값을 나타내었으며 分離能이 약간 떨어지는 것은 plate number가 比較的 적어서 column의 efficiency가 낮기 때문에 思料되나 分析時間이 12分以內로 매우 짧다는 長點이 있으며 全體pattern 分析과 定量性에는 지장이 없음을 알았다.

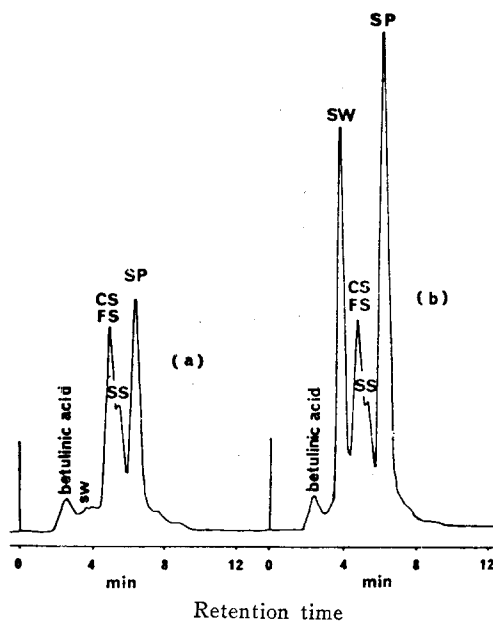
유감스럽게도 spinosin과 swertisin이 이 分析條件下에서는 分離되지 않았으나 酸棗仁中の swertisin 含量이 極히 적으므로 spinosin定量에는 支障이 없음을 알 수 있다.

酸棗仁을 benzene으로 前處理後 methanol로 抽出한 extract를 reverse-phase system에서 HPLC를 실시하여 얻은 전형적인 chromatogram을 Fig. 2에 表示하였다. 標準 flavonoid混合物의 chromatogram과 同一 retention time에서 各 flavonoid의 peak를 관찰할 수 있었다. Feruloylspinosin에 起因하는 band의 변두리에 shoulder로 나타나는 peak는 微量으로 存在하는 p-coumaroylspinosin에 起因하는 peak임을 알 수 있다. 또한 이 HPLC pattern은 酸棗仁의 flavonoid fraction의 HPLC pattern과 매우 一致하였으며 ether이나 saponin등의 다른 fraction에서는 전혀 peak를 觀察할 수 없는 것으로 미루어 보아 거의 100%의 flavonoid가 나타내는 peak의 pattern임을 認知하였다.

Reverse-phase system에 依해서는 polarity 관계로 swertisin과 spinosin이 전혀 分離되지 않았으나 normal-phase system인 silica gel colume(partisil 10)과 移動相으로 EtOAc : MeOH:H<sub>2</sub>O(100:



**Fig. 3-** HPLC chromatogram of spinosin(SP) and swertisin(SW). Analytical conditions; column, partisil-10, 2mm I.D.×25cm; eluent, EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:16.5:13.5); flow rate, 1.7ml/min; pump pressure, 32 bar; chart speed, 0.5cm/min; detector, UV(330nm).



**Fig. 4-** HPLC chromatogram of methanol extract of *Zizyphus* seeds. Analytical conditions; column, partisil-10, 2mm I.D.×25cm; eluent, EtOAc: MeOH: H<sub>2</sub>O (100:16.5:13.5); flow rate, 1.7ml/min; pump pressure, 32 bar; chart speed, 0.5cm/min; detector, UV (330nm).

16.5:13.5)를 利用하여 HPLC를 실시한 結果 Fig. 3에 表示한 바와 같이 swertisin과 spinosin이 明確하게 分離되는 事實을 觀察할 수 있었다. 이 分析 條件下에서 다시 酸棗仁의 methanol extract를 注入하여 HPLC를 실시한 結果를 Fig. 4a에 表示하였다. 이 條件下에서는 3種의 acylspinosin들의 分離가 reverse-phase system에 比하여 뚜렷하지 못하였으나 swertisin과 spinosin이 明確하게 分離됨을 再確認하였다(Fig. 4b). 또한 Fig. 4a 및 4b에 의하여 swertisin의 酸棗仁 中の 含有量은 극히 微量임이 분명히 밝혀졌다. Chromatogram의 全體 pattern도 reverse-phase system과는 현저히 差를 알 수 있으며 이 normal-phase system에서는 benzene 抽出時 除去되지 않은 微量의 betulinic acid나 다른 未知成分으로 생각되는 peak를 觀察할 수 있었다.

**檢量線의 作成—酸棗仁 中の flavonoid를 실제로 定量하는데 利用할 수 있는 檢量線을 作成키 위해 spinosin, 및 2種의 acylated spinosin (sinapoylspinosin과 feruloylspinosin) 一定量씩을 0.075% N-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol의 methanol 溶液에 溶해하고 단계적으로 methanol 一定量씩으로 희석한 후 그 5 $\mu$ 를 column에 注入하고 reverse-phase system에 의하여 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 각 peak area를 求하고 注入한 sample量에 對하여 internal standard와 試料의 peak area와의 比를 plot하여 各 flavonoid의 檢量線을 作成한 結果 10 $\mu$ 까지 直線性을 나타내었다. 그 回歸直線은 각각 spinosin,  $Y_1=0.0149+0.060X_1$ , feruloylspinosin  $Y_2=-0.014+0.062X_2$ , sinapoylspinosin,  $Y_3=-0.0054+0.054X_3$ 이며 correlation coefficient는 각각  $r_1=1.0003$ ,  $r_2=0.9992$ ,  $r_3=0.9999$ .로서 모두가 1.00值에 接近함을 알았다(Fig. 5).**

**酸棗仁 中の flavonoids 定量—Reverse-phase system을 利用하여 酸棗仁 中の flavonoid의 定量을 試圖하였다.**

酸棗仁 4g을 benzene 50ml로 5시간씩 3回 抽出하고 殘渣를 다시 methanol 25ml로 5時間씩 8回 抽出한 다음 methanol 抽出液을 合하여 減壓濃縮 乾固하였다. 乾燥한 抽出物을 다시 0.075% N-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol 2ml에 溶해시킨 다음 不溶物을 3,000rpm에서 15분간 遠心分離하고 그 上澄液 一定量을 column에 注入하였다. 各 flavonoid의 檢量線으로부터 spinosin, sinapoylspinosin, feruloylspinosin 및 *p*-coumaroylspinosin의 含量을 求한 結果 各 各 0.15, 0.10, 0.09 및 0.03%(w/w)이었다(Fig. 2). 이때 *p*-coumaroylspinosin의 定量은 feruloylspinosin의 檢量線을 利用하여 그 apparent content를 求하였다.

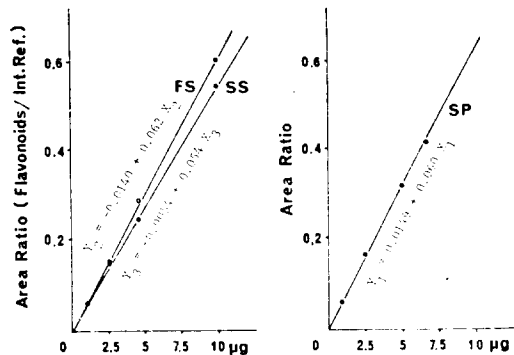


Fig. 5- Calibration curves for flavonoids.

## 結 論

HPLC法에 依하여 生藥의 品質管理를 위한 成分分析을 실시함에 있어서는 특히 다음 3가지 條件 1. 有效成分 내지는 標의 成分의 大部分이 分離되는 條件 2. 主成分群을 同時에 分析할 수 있는 條件, 3. 藥理活性成分을 抱括하는 pattern分析의 確立등을 目標로 실시함이 가장 바람직하나 이에 앞서 定量對象이 될 수 있는 成分群의 單離, 構造決定이 先行되어야 하며 本 實驗結果에서 미루어 알 수 있는 바와 같이 類似한 成分이 多數 含有된 生藥에 對한 成分相을 正確하게 파악하고 나아가서 분석조건을 검토하기 위해서는 어느 한가지 條件에 局限하지 않고 하나 以上의 件

혀 다른 條件下에서 그 分離pattern을 검토하는 것이 타당하다고 思料된다. 또한 單一生藥의 成分 pattern分析의 確立이 이루어짐으로서만 混合生藥分析條件의 검토가 可能하게 될 것이다.

### 文 獻

1. Kingston, D.G.I., High Performance liquid chromatography of natural products. *J. Nat. Prod.*, **42**, 327 (1979).
2. Woo, W.S., Shin, K.H. and Kang, S.S., Symposium on the recent advances in natural products research. *Kor. J. Pharmacog.*, **11**, 141(1980).
3. Woo, W.S., Kang, S.S., Shim, S.H., Wagner, H., Chari, V.M., Seligmann, O. and Obermeier, G., The structure of spinosin from *Zizyphus vulgaris* var. *spinousus*. *Phytochemistry*, **18**, 353(1979).
4. Woo, W.S., Kang, S.S., Wagner, H., Seligmann, O. and Chari, V.M. Acylated Flavone-C-Glycoside from the seeds of *Zizyphus jujuba*. *Phytochemistry*, **19**, 2791 (1980).
5. Lee, E.B., Shin, K.H. and Woo, W.S., Synthesis and pharmacology of *p*-methoxycinnamic acid derivatives. *J. Med. Chem.*, **11**, 1262 (1968).