

고속액체크로마토그래피에 의한 알로에 제제 중의 알로에신의 정량

김경호* · 김현주 · 박정일* · 신영근*

강원대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

(Received December 5, 1995)

Determination of Aloesin in Aloe Preparations by HPLC

Kyeong Ho Kim*, Hyun Ju Kim, Jeong Hill Park*, Young Geun Shin*

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The contents of aloesin in aloe preparations were determined by HPLC. Aloesin was extracted 3 times with ethanol for 30 minutes. The ethanol extract was concentrated and suspended in saturated NaCl aqueous solution and successively partitioned with dichloromethane, n-butanol. Prepared samples were analyzed by HPLC on a reverse column (Inertsil ODS-2). In assay, internal standard was a puerarin and regression of calibration curve was 0.998. Recoveries of aloesin added to aloe preparation were 98~123(%)

Keywords □ Aloesin, Aloe, Aloe vera, Aloe arborescence, HPLC.

원래 생약으로서 '노회'의 의미는 Aloe ferox 또는 이 식물과 Aloe africana, Aloe spicata와의 잡종의 잎에서 얻은 즙액을 건조한 것인데, 현재는 다양한 제제형태로 알로에 함유제제가 시판되고 있다.

알로에는 고대로부터 토착의학에서 화상이나 기타의 피부질환¹⁻³⁾에 사용해 왔고, 실제로 알로에 중에는 많은 생리활성 물질을 함유하고 있어서, 외상 뿐만 아니라 소화기계의 질병 치료에 도움이 된다.

또한, 최근에는 건강식품이나 화장품 등으로 그 사용이 확대되고 있으며, 미용에 관한 연구도 역시 활발하게 진행되고 있다.

알로에는 Aloe bardensis Mill이외의 300종 이상의 기원 식물이 보고⁴⁾되어 있는데, 남아프리카에만 Aloe 속 식물이 약 130여종이나 분포되어 있다.

알로에 전체잎 추출액의 특이성분 중 현재까지 학계에 보고⁵⁾된 것은 9,10-Anthraquinones(Aloe-emodin),

9-Anthranol과 9-Anthrones, Tetrahydro-9-Anthrols, Anthraquinone-O-glycosides, Anthranol-O-glycosides, Anthrone-O-glycosides, Anthrone-C-glycosides(Barbaloin), Anthraquinone diglycosides, C-와 O-glycosides가 혼합되어진 Anthrone(Aloinoside A, B), Anthraquinone과Anthranols의 이합체, Dimerglycosides, 4-Chromones 유도체(Aloesin), 6-Phenylpyran-2-one 유도체(Aloenin), 2-Naphthoic acid 유도체 등이 있으며, 알로에에 함유된 성분의 정량법으로는 생리 활성 성분인 barbaloin에 대하여 각종 알로에와 알로에를 함유한 식품 및 의약품내의 HPLC정량법⁶⁾, 비색법을 이용한 UV 정량법⁷⁾과 음식물내의 barbaloin의 LC 정량법⁸⁾등이 보고되었으며, 알로에를 함유한 화장품에 있어서도 GC를 이용한 barbaloin과 aloenin의 정량⁹⁾, HPLC를 이용하여 로션에서 aloenin의 정량¹⁰⁾등이 보고된 예가 있다.

그러나, Barbaloin을 포함한 Anthrone유도체들은 알로에 원료 자체에만 많이 함유되어 있을 뿐, 현재 유통되고 있는 알로에 가공제품에는 거의 함유되어 있지

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0361-50-6918 (팩스) 0361-50-7865

않으며, Aloenin도 *Aloe arborescence*에만 다량함유되어 있고, *Aloe vera*에는 거의 함유되어 있지 않은 성분이다. 따라서 현재 유통되고 있는 모든 알로에 함유제제의 품질관리에 적용할 만한 정량법은 아직 확립되어 있지 않은 상태이다.

이에 본 연구에서는 현재 알로에 가공제품으로 널리 이용되고 있는, 알로에 잎 전체를 사용한 제품과 알로에의 껍질을 벗기고 남은 겔 부분만을 사용한 제품, 이 두 가지 제제를 시료로 하고, *Aloe vera* 이외에 *Aloe arborescence*에도 다량 함유되어 있고, 알로에 잎 전체를 사용한 제품과 알로에의 껍질을 벗기고 남은 겔 부분만을 사용한 제품에도 다량 함유되어 있는 chromone-C-glycoside인 aloesin¹¹⁾을 지표성분으로 하는 HPLC 정량법을 검토하여 알로에 및 그 제품의 품질 관리에 적용하고자 하였다.

실험방법

시약 및 시료 - *Aloe vera* 잎의 껍질을 벗기고 남은 겔을 동결 건조하여 200 : 1로 농축한 분말(시료 1)과 *Aloe vera* 잎 전체를 그대로 동결 건조한 후 분쇄한 것(시료 2)을 시료로서 사용하였고, puerarin은 Sigma사의 것을 사용하였다. ethanol, dichloromethane, ethylacetate, n-butanol은 모두 시판 1급 시약을 사용하였고, HPLC 이동상으로는 3차 증류수를 0.22 μm filter로 여과한 물과 J. T. Baker 사(USA)의 HPLC용 methanol을 사용하였다.

기기 - 추출에 사용한 기기는 새한 ultrasonic cleaner와 동양 기기 제작회사의 향은 수욕기를 사용하였고, HPLC는 Shimadzu사 제품으로 LC-9A pump, SPD-6AV detector, SCL-6B system controller와 Chromatopac C-R4AD data processor를 사용하였다. Column은 Inertsil[®] ODS-2 (5 μm , 4.6 \times 150 mm)를 사용하였고, 이동상은 10%에서 70% MeOH로 60분간 기울기 용리하고 70% MeOH에서 20분간 유지하였다.

추출조건의 검토 - 시료 1 약 0.5 g, 시료 2 약 0.2 g을 각각 취하고, ethanol 10 ml을 가하여 초음파 추출과 가열 환류 추출을 30, 60, 90, 120, 150, 180분씩 한 후 각 추출액을 감압 농축하여 1ml의 ethanol에 녹이고 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 HPLC 시액으로 사용하였다.

Table I— HPLC condition for the analysis of aloesin in aloe preparations

Column	: Intertsil ODS-2 (5 μm , 4.6 \times 150 mm)
Mobile phase	: 10%→70% MeOH gradient
Detection wave length	: 293 nm
Flow rate	: 0.8 ml/min
Sensitivity	: 0.04 AUFS
Injection amount	: 10 μl
Temperature	: Ambient

간섭물질의 제거 - 시료 1, 2 약 10 g을 ethanol로 100 ml씩 30분씩 3회 추출하고 그 추출액을 농축하여 ethanol로 정확히 250 ml로 하였다. 이 중 50 ml를 취하여 감압 농축하고 dichloromethane 2 ml, 증류수 2 ml에 현탁시킨 후 층분리하여 dichloromethane층을 분취하였다. 같은 방법으로 2회 반복하여 이를 합하고 감압 농축하여 ethanol 1 ml에 용해하고 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 HPLC용 dichloromethane 분취시료로 하였다. 남은 수층에 대하여 ethylacetate와 n-butanol로 상기의 방법대로 실시하여 HPLC용 ethylacetate, n-butanol과 수층의 분취시료를 얻었으며, 각 시료를 HPLC에 주입하였다.

그리고 위와 같은 방법으로 추출한 시료 1, 2의 추출액을 20 ml 취하여 감압 농축한 후 dichloromethane 2 ml와 NaCl 수용액 1 ml에 현탁시키고, 층분리하여 dichloromethane층을 얻고 남은 NaCl 수용액은 n-butanol 2 ml로 층분리하였다. 각 층은 상기와 같은 방법으로 하여 dichloromethane층, n-butanol층, NaCl 수용액층의 HPLC용 시액을 제조하여 HPLC에 주입하여, 앞에서 하였던 방법과 비교하였다.

회수율의 측정 - 10 ml screw cap test tube에 시료 1 약 0.5 g, puerarin 1 mg/ml의 ethanol 용액 0.1 ml, aloesin 0.2 mg/ml ethanol 용액 0.1 ml를 2 mg/ml용액 0.1, 0.2 ml을 넣고, 시료 2의 경우에는 시료 2 약 0.2 g, puerarin 1 mg/ml의 ethanol용액 0.2 ml, aloesin 2 mg/ml의 ethanol용액으로 0, 0.2, 0.3 ml를 각각 넣고 ethanol을 가하여 초음파로 30분씩 3회 추출하였다. Ethanol 추출액은 감압 농축하여 dichloromethane 2 ml, NaCl 수용액 1 ml에 현탁시키고, 층분리하여 NaCl 수용액층만 얻어 그 조작을 2회 반복하였다. 남은 NaCl 수용액 층에 n-butanol 2 ml를 가하고 층분리하여 n-butanol을 분취한 후 같은 조

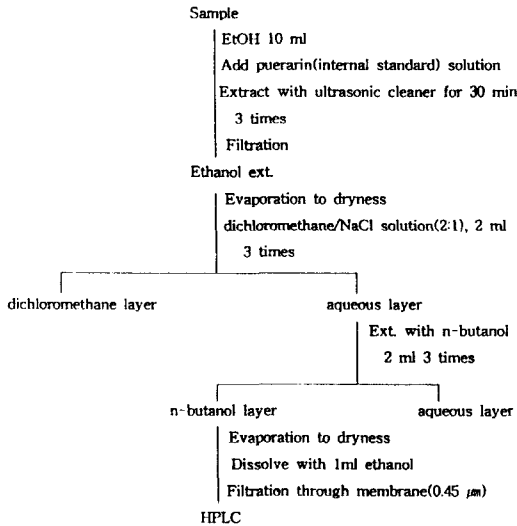
작을 2회 반복하여 이를 합하고 감압 농축하여 ethanol 1 ml에 녹이고 membrane filter (0.45 μm)로 여과하여 HPLC용 시액을 얻어 Table I의 조건하에서 HPLC에 주입하였다.

Aloe 원료 및 제제중 aloesin의 정량 - 알로에 겔을 동결 건조하여 농축한 분말을 함유한 제제는 약 0.5 g 해당량 (Aloe vera의 겔을 동결 건조하여 농축한 분말 0.5 g, Aloe arborescence의 겔을 동결 건조하여 농축한 분말 0.5 g, Tablet A 0.8 g, Tablet B 0.6 g, Capsule A 1.4 g)을, 알로에 잎 전체를 동결 건조한 것을 함유한 제제는 약 0.2 g 해당량 (Aloe arborescence의 잎 전체를 동결 건조한 분말 0.2 g)을 취하여, 내부 표준 물질 (puerarin) 1 mg/ml의 ethanol용액을 0.1 ml를 넣고, ethanol을 가하고 초음파로 30분간 3회 추출하

였다. 추출액은 Scheme I의 방법대로 행하여 HPLC용 시액을 만들었고 HPLC에 주입하여 내부 표준법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

추출 조건의 검토 - 초음파 기기를 사용했을 때와 환류 추출하였을 때 추출량의 정도를 시간별로 비교한 것



Scheme I— Sample preparation for the analysis of aloesin in aloe preparations.

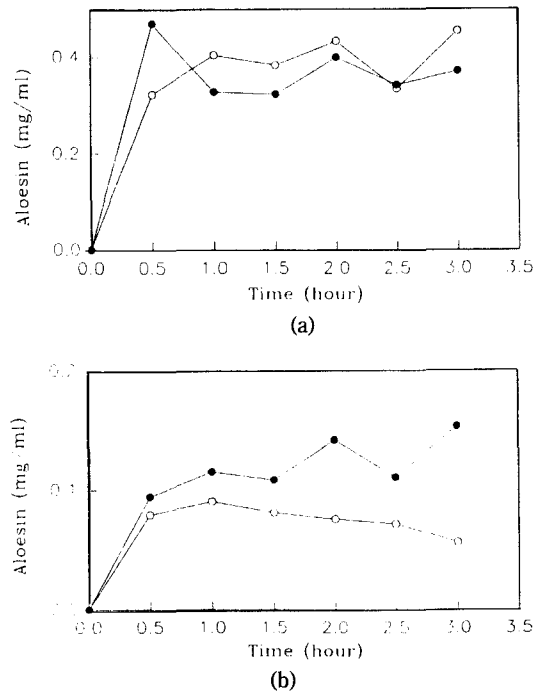


Fig. 1— Effect of the method and time on the extraction of aloesin. ((a) sample 1 and (b) sample 2) ○—extract with ultrasonic cleaner, ●—extract with reflux.

Table II— Relative distribution of aloesin and ethanol ext. in dichloromethane, ethylacetate, n-butanol and aqueous fraction

Fraction	Sample 1		Sample 2	
	aloesin(%)*	extracts(%)**	aloesin(%)	extracts(%)
Dichloromethane	1.2	1.6	2.2	19.8
Ethylacetate	6.4	8.8	6.7	24.3
n-Butanol	79.8	24.0	78.0	13.1
H ₂ O	12.6	65.5	13.0	42.3

* $\frac{\text{weight of aloesin in each solvent}}{\text{total weight of aloesin in ethanol extract}} \times 100$

** $\frac{\text{weight of extract partitioned to each solvent}}{\text{total weight of ethanol extract}} \times 100$

이 Fig. 1에 나타나 있다.

두가지 방법에 의해 추출되어진 aloesin의 양은 현저한 차이를 보이지 않으며, 추출시간에 있어서도 두드러진 변화를 보이지 않았다.

가열 환류시 시료 1에서는 추출시간이 길어질수록 aloesin의 함량은 감소하고 HPLC chromatogram에서 다른 peak들이 증가되었다. 이에 aloesin 추출방법을 조작이 간편한 초음파 추출로 30분씩 3회 반복하는 것으로 정하였다.

간섭물질의 제거 - 일반적인 용매 분획을 사용하였을 때의 결과가 Table II에 나타나 있다. 많은 비극성 물질이 dichloromethane과 ethylacetate에 의해서 제거됨을 볼 수 있었지만, ethylacetate를 사용한 층분리에서 aloesin이 전체량 중 7%정도가 수층에서 ethylacetate층으로 이행하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 수층에서도 aloesin이 전체량의 13% 정도 잔류하였다. 이러한 층분리에 있어서의 문제점을 해결하기 위하여 수용액 대신 NaCl 포화수용액을 사용하였고 ethylacetate에 의한 층분리를 생략하였다. 이에 알로에의 ethanol extract를 dichloromethane과 NaCl 포화수용액을 이용하여 층분리를 한 결과 aloesin이 n-butanol층 이외의 층으로 이행하는 것을 방지할 수 있었고, 알로에의 ethanol extract에 다량 함유되어있는 비극성, 극성 간섭물질을 제거할 수 있었다. 결과적으로 dichloromethane, n-butanol, NaCl 포화수용액을 사용한 용매 분획으로 비극성, 극성 간섭물질을 효과적으로 제거하였다.

검량선 - aloesin 0.01, 0.05, 0.2, 0.6, 1.0 mg/ml의 ethanol 용액에 내부 표준 물질로서 puerarin 0.1

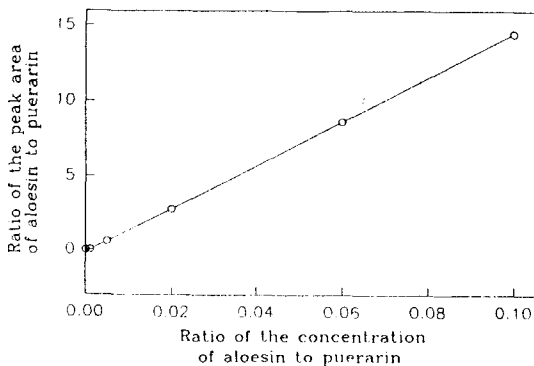


Fig. 2—Calibration curve of aloesin ($Y=146.19X-0.14$, $r=0.998$).

mg을 첨가하여 Table I의 조건하에서 HPLC를 행하여 aloesin peak 면적 대 puerarin peak 면적의 비를 y축으로 aloesin의 농도 대 puerarin의 농도비를 x축으로 하여 검량선을 작성하였으며, 검량선은 $Y=146.19X-0.14(r=0.998)$ 로 양호한 직선성을 나타내었다.

Fig. 3는 ethanol 알로에 추출액의 HPLC chromatogram상에서 puerarin이 다른 간섭물질의 영향을 받지않는 내부 표준 물질임을 보여주고 있다.

회수율 - 회수실험의 결과를 Table IV에 나타내었다. 시료 1에서 첨가되어진 aloesin이 0.10 mg일 때 $112.0\pm 3.08\%$ 의 회수율을, 첨가 aloesin이 0.40 mg일 때 $100.1\pm 3.24\%$ 의 회수율을 보여 주고 있으며, 시료

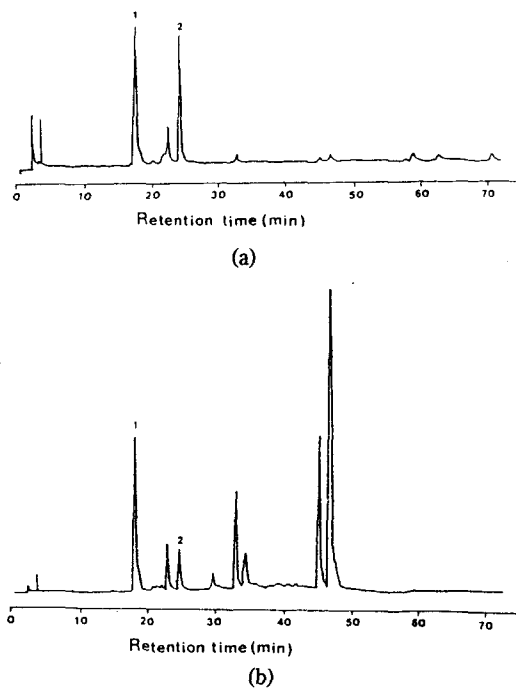


Fig. 3—HPLC chromatograms of (a) sample 1 and (b) sample 2. Peak 1 indicates aloesin and peak 2 indicates puerarin was used as an internal standard.

Table III—Relative distribution of aloesin in dichloromethane, n-butanol and NaCl saturated aqueous fraction

Fraction	Sample 1	Sample 2
	aloesin (%)	aloesin (%)
Dichloromethane	N.D.	N.D.
n-Butanol	97.5	98.3
NaCl aq.	N.D.	N.D.

Table IV— Recovery of aloesin in sample 1 and sample 2 (n=3)

Amount added(mg)	Amount measured(mg)		Recovery(%)±S.D.	
	sample 1	sample 2	sample 1	sample 2
0.10	0.112	-	112.0±3.08	-
0.20	0.196	-	98.0±1.70	-
0.40	0.400	0.41	100.1±3.24	102.3±4.02
0.60	-	0.74	-	123.1±3.40

Table V— Contents of aloesin in various aloe preparations

Sample name	Amount measured (mg/g)
Freezed dried powdr of the gel of <i>Aloe vera</i>	0.09
Freezed dried powder of the gel of <i>Aloe arborescence</i>	0.13
Freezed dried powder of the whole leaf of <i>Aloe arborescence</i>	0.59
Commercial Tablet A	0.40
Commercial Tablet B	0.31
Commercial Capsule C	0.007

2에서도 aloesin 0.40 mg첨가시 회수율 102.3±4.02%로 비교적 양호한 회수율을 보여 주고 있다.

Aloe 제제중의 aloesin정량 - *Aloe vera* 이외에 *Aloe arborescence*를 함유한 제제에 위의 분석법을 적용하여 제제내의 aloesin을 정량한 것을 Table V에 나타냈다. 이것으로 알로에 겔을 동결 건조한 분말은 0.09 ~ 0.13(mg/g) 정도의 aloesin을 함유하며, 알로에 잎 전체를 동결 건조한 것은 0.59(mg/g) 정도로 알로에 겔을 동결 건조한 것보다 많은 양의 aloesin을 함유하고 있다는 것을 알 수 있었다. 그리고 알로에를 함유한 정제와 캡슐제를 상기의 방법에 의해서 정량할 수 있었다.

문 헌

- Crewe, J. E. and M. D.: Aloe in the Treatment of Burns and Scalds. *Minne sota Medicine* **22**, 538 (1985).
- Biltz, J. J., Smith, J. W. and Gerard, J. R.: *Aloe vera* gel in peptic ulcer therapy : preliminary report. *J. Am. Osteop. Assoc.* **62**, 731 (1963).
- Lee, L. M., Hagggers, J. P., Robson, M. C. and Hagstrom, W. J.: The therapeutic efficacy of *Aloe vera* cream in thermal injuries : Two case report. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **16**, 768 (1980).
- Hans, W. R. and Anette B. : Thin layer chromatographic screening and high performance liquid chromatographic determination of 5-hydroxyaloin A in the genus aloe. *Z. Naturforsch* **8c**, 1 (1993).
- Renolds, T.: The compounds in aloe leaf exudates : a review. *Botanical Journal of Linnean Society* **90**, 157 (1985).
- Yamamoto, M., Ishikawa, M. and Masui, T.: High performance liquid chromatographic determination of barbaloin in aloe. *Bull. Shizuoka. Pref. Inst. Publ. Hlth. and Environ. Sci.* **28**, 35 (1985).
- Rai, P. P. and Turner, T. D.: A method for the estimation of anthraquinones using densitometric thin layer chromatography. *J. Chromatography* **104**, 196 (1975).
- Yamamoto, M., Ishikawa, M., Masui, T., Nakazawa, H. and Kabasawa, Y.: Liquid chromatographic determination of barbaloin(Aloin) in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 493 (1985).
- Nakamura, H., Kan, T., Kishimoto, K., Ikeda, K., Amemiya, T., Ito, T. and Watanabe, Y.: Gas chromatographic and spectrometric determination of aloe components in skin care cosmetics. *EISEI KAGAKU*, **35**, 219 (1989).
- Nakano, M., Tetsuo, T. and Kaneshima, H.: Analysis of plant components in cosmetics (Part1) & determination of aloenin, A component of aloe arborescens mill., in Sotion, Japan

- (道衛研所報), **35**, 98 (1985).
- 11) Hayness, L. J. and Holdsworth, D. K.: C-Glycosyl compounds. part. aloesin, a C-glycosyl-chromone from Aloe sp., *J. Chem. Soc. (C)*, **74**, 2581 (1970).