

광반응 HPLC를 이용한 시호 사포닌의 분석

신영근 · 조경희 · 권수진 · 도영미 · 황귀서* · 박정일* · 박만기

서울대학교 약학대학, *경원대학교 한의과대학

(Received October 12, 1995)

Analysis of Saikosaponins by HPLC with Photoreduction Fluorescence Detection

Young Geun Shin, Kyung Hee Cho, Soo Jin Kwon, Young Mi Do,
Gwi Seo Hwang*, Jeong Hill Park* and Man Ki Park

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

*College of Oriental Medicine, Kyungwon University, Kyungki 461-701, Korea

Abstract—A high performance liquid chromatography using photoreduction fluorescence detection was described for the analysis of saikosaponins. Saikosaponins were separated on an NH₂ column using acetonitrile and aqueous 2-*tert*-butylanthraquinone(*t*-BAQ) as mobile phase. Column effluent was passed through a 40 cm PTFE capillary tube coiled around a 10W UV lamp to reduce *t*-BAQ to a highly fluorescent dihydroxyanthracene derivative which was detected by a fluorescence detector. The optimal concentration of *t*-BAQ was found to be 6×10^{-5} M and the optimal reaction time to be 2 seconds. The detection limit for saikosaponin a and d by this method was found to be about 280 ng and 80 ng. The dynamic linear range was over two orders and the correlation coefficient of the calibration curve of them was 0.998.

Keywords □ Photoreaction HPLC, photoreduction fluorescence detection, 2-*tert*-butylanthraquinone, analysis of saikosaponins, *Bupleurum falcatum*.

HPLC는 미량의 시료를 신속하고 간편하게 분석할 수 있는 방법으로 현재 널리 사용되고 있으나, GC의 FID처럼 모든 물질을 감도 높게 검출할 수 있는 검출기가 없다. UV 흡수가 있는 물질은 UV 검출기를 사용하여 손쉽게 검출할 수 있지만 UV 흡수가 없는 물질의 경우 검출하기가 어렵다. 따라서 이러한 물질을 분석하기 위해서 분석 대상 물질을 유도체화하는 방법이 이용되는 데, 여기에는 컬럼전(pre-column) 유도체화 방법과 컬럼후(post-column) 유도체화 방법이 있다.

광반응 HPLC법은 컬럼후 유도체화 방법의 하나로 측정대상물을 컬럼에서 분리한 후 검출기에 들어가기 전에 photon을 이용해서 반응시켜 검출감도를 높이거나

선택성을 좋게하는 것이다.¹⁾ 이 중 하나인 photoreduction fluorescence 검출법은 10⁻⁵의 낮은 quantum yield를 가진 anthraquinone계 유도체가 분석물질과 광반응하여 수소를 받아 photoreduction이 일어나 0.7 정도의 높은 quantum yield를 가진 dihydroxyanthracene 유도체로 되어 발생하는 형광을 측정함으로써 미량의 분석물질을 간접적으로 정량할 수 있다.²⁻³⁾ 이 방법에 의해 분석할 수 있는 물질은 수소원자를 내놓을 수 있는 물질, 즉 alcohol, aldehyde, allylic 또는 benzylic hydrocarbon, amine, ether, saccharide등이 있다. 이 반응은 anthraquinone이 360 nm 또는 250 nm의 빛을 흡수하면서 시작되는 데⁴⁻⁵⁾, 360 nm의 빛에 의해 n-π*로의 전이가 일어나 singlet state(S)로 된후 intersystem crossing이 일어나 lowest triplet state(T)로 되면 화합물의 수소를 받아

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7857 (팩스) 02-874-8928

free radical intermediate를 형성하는 일련의 반응을 통해 dihydroxyanthracene이 생성된다.

Gandelman과 Birks는 분석 대상 물질이 O₂ 존재 하에 anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) 첨가 용액과 photooxygenation reaction을 일으켜 생성된 H₂O₂의 농도를 luminol의 chemiluminescence 법으로 정량하는 방법⁶⁾을 제시하였다. 또한, O₂를 제거하면서 AQDS를 형광등에 감긴 1m의 PTFE관을 통과시킬 때 photoreduction에 의해 생성된 9,10-dihydroxyanthracene-2,6-disulfonate (AQH₂DS)의 농도를 형광 검출기로 측정함으로써 alcohol을 정량하는 방법을 연구하였다.⁷⁾ 이어 Gandelman등은 8W-fluorescent black lamp에 12.5 m의 PTFE관을 감아 이 방법으로 saccharide와 cardiac glycoside의 정량³⁾을 하였는데, saccharide의 검출한계는 약 400 ng이었다. 또한 이들은 AQDS대신 2-*tert*-butylanthraquinone (*t*-BAQ)을 첨가하여 cardiac glycoside와 saccharide를 검출하였는데 이때 AQDS에 비해 감도가 약 4배 정도 좋아서 cardiac glycoside의 검출한계는 약 2 ng이었고, saccharide의 검출한계는 약 80 ng이었다⁸⁾. 1989년 Birks등은 이 반응을 역이용해 quinone류인 vitamin K등의 정량을 하였다⁹⁾. 저자 등은 이 방법을 인삼 사포닌의 분석에 적용시켜 UV보다 2-3배 정도 감도 좋게 분석한 바 있다.¹⁰⁻¹¹⁾

광반응 HPLC는 photon을 이용하는 반응이므로 반응을 위해 별도의 반응용기와 교반 등의 장치가 필요없어 설치가 간단하며, 일반화학반응에 비해 반응속도가 매우 빨라 band broadening이 적다. 또한 photoreduction fluorescence 방법은 분석 대상 물질에 대한 선택성이 커서 다른 방해물질의 영향을 적게 받으면서 분석 물질만을 선택적으로 검출할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 이러한 광반응 HPLC방법을 시호 (*Bupleurum falcatum*, Umbelliferae)의 사포닌 분석에 응용하였다.

실험 방법

시약

2-*tert*-butylanthraquinone(FW 264.32, m.p. 98~100°C)은 Aldrich사에서 구입하였으며, 아세토니트릴에서 재결정한 후 물로 씻어 갈색병에 보관하여 사용하였다. HPLC에 사용한 아세토니트릴은 Merk사의

HPLC용 용매를 쓰고, 물은 Millipore Super Q RO-60을 이용해서 정제한 탈이온수를 사용하였다. 기타 시약은 시약급을 사용하였으며, 시호는 경동시장에서 구입하였다.

기기 및 장치

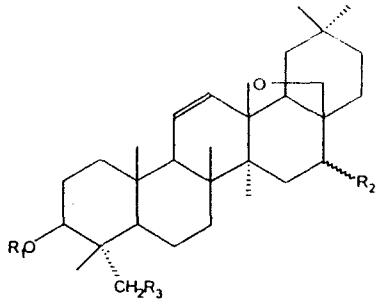
HPLC에 사용한 펌프는 Hitachi L-6000과 L-6200이고, Rheodyne 7125 20 μ l loop injector를 사용하였다. 컬럼은 Shisheido NH₂ (250×4.6 mm, 입자경 5 μ m)와 Lichrosorb RP-18 (250×10 mm, 입자경 7 μ m)을 사용하였으며, 검출기는 Hitachi F-1050 형광검출기와 Hitachi L-4000 자외선 검출기를 이용하였고, Shimadzu C-R4A Chromatopac을 기록기로 사용하였다. 광반응기는 진보¹⁰⁻¹¹⁾와 동일한 것을 사용하였다. 즉, 10W 자외선등 주위에 PTFE capillary tube를 감아 용매가 PTFE tube를 통과하면서 반응이 일어나도록 하였다. 반응기 주위를 알루미늄 호일로 감싸 반사로 인한 광반응 효과를 증대시켰다.

시호 사포닌의 분리

시호 480 g을 분쇄하여 메탄올 약 1.4 liter로 2시간 동안 초음파 추출하는 조작을 3회 반복 실시하여 메탄올 추출물 33 g을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 물로 현탁시키고 부탄올로 3회 추출하여 부탄올 추출물 15 g을 얻었다. 부탄올 추출물을 대상으로 클로로포름 : 메탄올의 비율을 5 : 1에서 7 : 3으로 순차적으로 변화시키면서 실리카겔 컬럼을 실시하여 7개의 분획으로 나누었다. 이 중 2~5번 분획에 대해 semi-preparative HPLC를 실시하여 화합물 A, B, C, D를 분리하였다. (HPLC조건 : 30% → 50% 아세토니트릴 수용액, UV 203 nm, RP-18 컬럼) 분리한 4가지 화합물의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FAB mass 자료를 문헌의 자료와 비교함으로써 saikosaponin a, c, d, 23-O-acetylsaikosaponin a임을 각각 확인하였다.¹⁴⁻¹⁶⁾

시호 사포닌의 HPLC

Shisheido NH₂ 컬럼을 고정상으로 하여 6×10⁻⁵ M의 *t*-BAQ를 녹인 89% 아세토니트릴수용액을 이동상으로 하였으며, 유속은 1.0 ml/min으로 하였다. 용리액은 10 W 자외선 살균등에 감긴 40 cm PTFE tube(내경: 0.5 mm, 외경: 1.5 mm)를 통과하게 하여 2초간 광반응시키고 이를 형광검출기로 검출하였다. 형



	R ₁	R ₂	R ₃
saikosaponin a	glc-fuc-	β-OH	OH
saikosaponin c	glc-glc-	β-OH	H
	rham		
saikosaponin d	glc-fuc-	α-OH	OH
23-O-acetylsaikosaponin a	glc-fuc-	β-OH	-OOCCH ₃

Fig. 1 — The structures of saikosaponins.

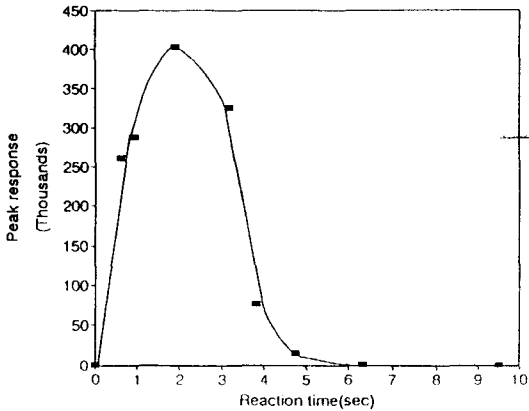


Fig. 2 — The effect of the reaction time on peak intensity of saikosaponin a. (eluent: 89% AcCN with 6×10^{-5} M *t*-BAQ, reactor: 10 W UV lamp with 40 cm PTFE tube)

광검출기는 여기파장 400 nm, 발광파장 500 nm로 고정하였다. UV 검출기로 비교시 89% 아세토니트릴 수용액을 이동상으로 하여 203 nm의 파장에서 시호 사포닌을 검출하였다.

결과 및 고찰

최적 조건 확립

반응 시간을 최적화하기 위해 반응관 길이와 유속을 변화시켜 가며 saikosaponin a의 피크강도의 변화를 관찰하였다. Fig. 2는 반응 시간에 따른 피크강도의 변

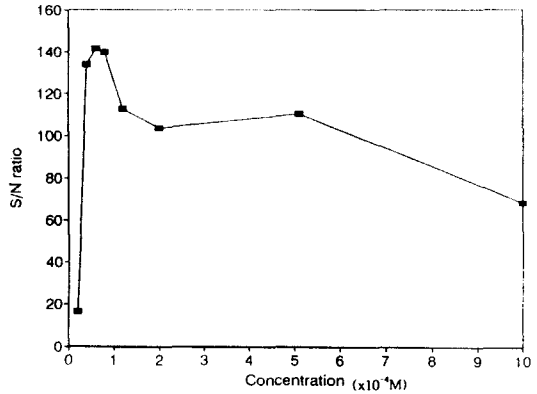


Fig. 3 — The effect of the concentration of *t*-BAQ on S/N ratio of saikosaponin a.

화를 보인 것인데 2초에서 최적임을 알수 있었다. 따라서 반응관의 길이는 40 cm, 유속은 1.0 ml/min으로 고정하였다.

광반응 시약의 농도를 최적화하기 위하여 *t*-BAQ의 농도를 2×10^{-5} M에서 1×10^{-3} M까지 변화시켜 가면서 saikosaponin a의 피크강도 변화를 측정하였다. 이때, 피크강도는 광반응 시약의 농도가 증가할수록 증가했다. 그러나, noise도 같이 증가했으므로 고농도의 용액보다 6×10^{-5} M일때가 S/N비는 최고를 나타냈다. Noise가 일어나는 원인은 Birks가 제시했듯이⁸⁾ 광반응 시약이 물과 반응하거나 아세토니트릴에 들어 있는 불순한 amine류와 반응하기 때문이라 생각된다. HPLC용급 아세토니트릴을 사용하고, 광반응 시약을 재결정하고, 이동상을 실험직전에 조제하므로써 이러한 noise signal을 줄일 수 있었다(Fig. 3).

검량선

Saikosaponin a와 d의 경우 검량선의 dynamic linear range는 10^2 이상이었고(1~100 µg), 그 상관계수는 0.998로 양호한 직선성을 나타내었다. Saikosaponin a의 검출한계는 약 280 ng이고, saikosaponin d의 검출한계는 약 80 ng이었다. 이는 UV 검출기와 비슷하였다.

Chromatography

시호의 부탄을 추출액을 HPLC로 분리한 후 광반응을 이용한 형광검출법과 UV 검출법으로 saikosaponin을 검출하였다. Fig. 4는 saikosaponin a, c, d, 23-O-acetylsaikosaponin a 등을 UV 검출법과 광

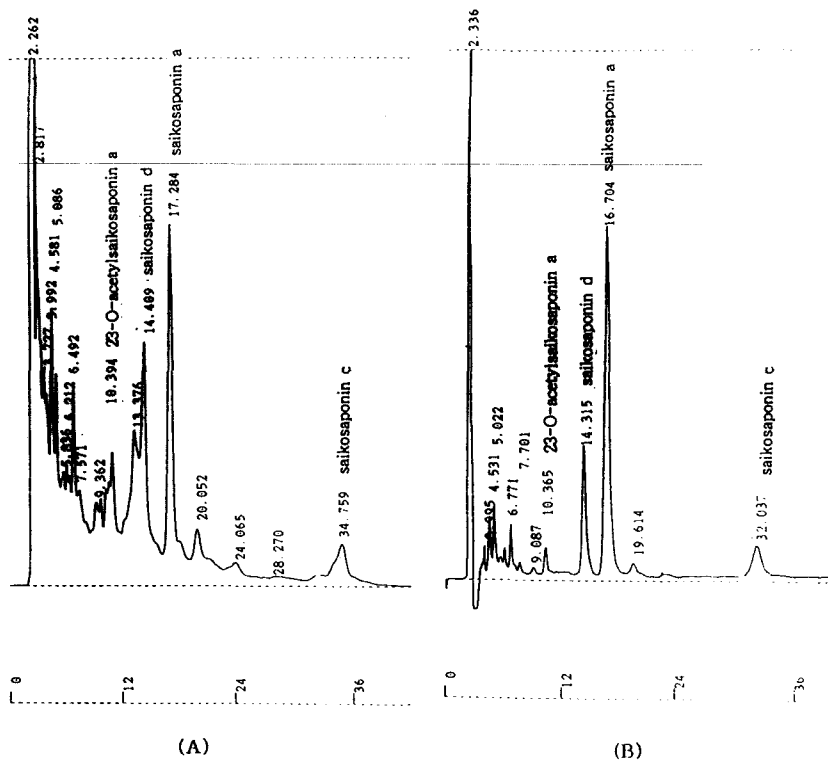


Fig. 4—The chromatogram of BuOH extract of Bupleuri Radix with UV detection(A) and Photoreduction Fluorescence(PRF) detection(B)
 (A) UV detection: 203 nm, mobile phase: 89% AcCN. (B) PRF detection: reaction time 2 sec, 6×10^{-5} M *t*-BAQ in 89% AcCN, Fluorescence detector λ_{EX} 400 nm, λ_{EM} , 500 nm.

반응을 이용한 형광검출법으로 확인한 결과이다. UV 검출법의 경우 각 사포닌 피크 주위에 동시에 물질들이 같이 검출되어 chromatogram이 복잡한 반면, 광반응 HPLC방법은 이러한 성분들이 방해받지 않고 보다 더 선택적으로 사포닌들을 검출할 수 있었다.

결론

1. 시호 사포닌을 광반응 HPLC법을 이용하여 분석하였다. 이 때, NH_2 컬럼을 고정상으로 *t*-BAQ를 포함한 89% 아세트니트릴 수용액을 이동상으로 사용하여 시호 사포닌을 분리하였고, 이를 10 W UV등에 감긴 40 cm PTFE관을 통과시켜 2초간 용리액을 광반응시킨 후 형광검출기로 검출하였다.

2. *t*-BAQ의 농도, 광반응 시간등을 변화시킨 결과 *t*-BAQ의 농도가 약 6×10^{-5} M일때, 반응시간이 약 2초일 때 분석물질의 피크강도가 최대이었다.

3. 최적 조건 하에서 saikosaponin a와 d의 검출한계는 각각 280 ng, 80 ng으로 나타났다. 이 방법의 dynamic linear range는 10^2 이상이었으며 검량선의 상관 계수는 0.998로 양호한 직선성을 보였다.

4. 이 방법은 UV 흡수 방해물질때문에 UV 검출법으로는 검출이 힘든 다른 종류의 사포닌에 대해서도 응용이 가능할 것으로 기대된다.

문헌

- 1) Frei, R. W., Jansen, H. and Brinkman, U. A. Th.: Postcolumn reaction detectors for HPLC. *Anal. Chem.* **57**, 1529A (1985).
- 2) Birks, J. W.: *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*, VCH 2, **153** (1989).
- 3) Gandelman, M. S., Birks, J. W., Brinkman U. A.

- Th. and Frei, R. W.: Liquid chromatographic detection of cardiac glycosides and saccharides based on the photoreduction of anthraquinone-2,6-disulfonate. *J. Chromatogr.* **282**, 193 (1983).
- 4) Bridge, N. K.: Effect of wavelength on the flash photolysis of quinones. *Trans. Fara. Soc.* **56**, 1001 (1960).
- 5) Wilkinson, F.: Transfer of triplet state energy and the chemistry of excited state. *J. Phys. Chem.* **66**, 2569 (1962).
- 6) Gandelman, M. S. and Birks, J. W.: Photooxygenation-chemiluminescence high performance liquid chromatography detector for the determination of aliphatic alcohols, aldehydes, ethers and saccharides. *J. Chromatogr.* **242**, 21 (1982).
- 7) Gandelman, M. S. and Birks, J. W.: Photoreduction-fluorescence detection of aliphatic alcohol, aldehydes and ethers in liquid chromatography. *Anal. Chem.* **54**, 2131 (1982).
- 8) Gandelman, M. S. and Birks, J. W.: Liquid chromatographic detection of cardiac glycosides and saccharides and hydrocortisone based on the photoreduction of 2-*tert*-butylanthraquinone. *Anal. Chem. Acta.* **155**, 159 (1983).
- 9) Poulsen, J. R. and Birks, J. W.: Photoreduction fluorescence detection in quinones in high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **61**, 2267 (1988).
- 10) Park, M. K., Kim, B. K., Park, J. H., Shin, Y. G. and Cho, K. H.: High performance liquid chromatographic determination of ginsenoside using photoreduction fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, **18**, 2077 (1995).
- 11) Kim, B. Y., Lee, M. Y., Cho, K. H., Park, J. H. and Park, M. K.: Analysis of ginseng saponins by HPLC with photoreduction fluorescence detection. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 328 (1992).
- 12) Han, D. S.: *Pharmacognogy*, Dong Myoung Sa, Seoul, p213 (1988).
- 13) Kimata, H., Hiyama, C., Yahara, S., Tanaka, O., Ishikawa, O. and Aiura, M.: Application of HPLC to the analysis of crude drugs separatory determination of saponins of bupleuri radix. *Chem. Pharm. Bull.* **27**, 1836 (1979).
- 14) Ding, J. K., Fujino, H., Kasai, R., Fujimoto, N., Thnaka, O., Zhou, J., Matsuura, H. and Fuwa, T.: Chemical evaluation of bupleurum species collected in yunnan, China. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 1158 (1986).
- 15) Yamasaki, K., Kasai, R., Masaki, R., Okihara, M. and Tanaka, O.: Application of C-13 NMR to the structural elucidation of acylated plant glycosides. *Tetrahedron Letters*, **14**, 1231 (1977).
- 16) Ishii, H., Nakamura, M., Seo, S., Tori, K., Tozyo, T. and Yoshimura, Y.: Isolation, characterization and nuclear magnetic resonance spectra of new saponins from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2367 (1980).