

## 柴胡 사이코사포닌 定量分析方法 比較

김관수\* · 이승택\* · 성낙술\* · 이정일\* · 채영암\*\*

### Comparison of Analytical Methods for Saikosaponins in *Bupleurum falcatum* L.

Kwan Su Kim\*, Seoung Tack Lee\*, Nak Sul Seong\*, Jung Il Lee\* and Young Am Chae\*\*

**ABSTRACT** : Extraction methods and instrumental analytical conditions were compared to establish a fast and appropriate analytical method to determine saikosaponins in *Bupleurum falcatum*. Using HPLC, analysis of diene-saikosaponin treated with 2% acid was faster than that of saikosaponin itself. Among various extraction methods, extraction by standing in methanol at room temperature showed highest efficiency, and extraction with boiling methanol was shorter in analytical time and showed good chromatogram. And we could analyze many samples faster using HPTLC but the analytical accuracy was low. In extraction and analysis of saikosaponins, extraction with boiling methanol and acidic treatment was fast and easy analytical method. And for selecting useful lines in component breeding, we think TLC method was better.

柴胡 (*Bupleurum falcatum*) 는 미나리과 (Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본식물로서 그 뿌리를 생약재로 이용하는 주요 약용식물중의 하나이다.<sup>4)</sup> 시호뿌리는 saikosaponin과 sterol, 지방산등을 함유하고 있으며 해열, 진통, 항염 등의 약리작용을 가지고 있는데, 주성분이며 생리활성을 나타내는 물질은 saikosaponin a, b1, b2, c, d이다. 그 중 saikosaponin a와 d가 주작용을 하고 있으며 saikosaponin d의 작용이 더 강한 것으로 알려져 있다.<sup>2,3,6,7)</sup> 시호의 종류는 시호 (*B. falcatum*), 참시호 (*B. scorozonaefolium*), 개시호 (*B. logiradiatum*), 등대시호 (*B. euphorbiodes*), 섬시호 (*B. latissimum*), 북시호 (*B. chinensis*) 등 다양

한데<sup>1)</sup>, 약재로 이용되는 좋은 시호 (*B. falcatum*)이다. 시호는 국내자생종인 재래시호와 일본도입종인 삼릉시호 두가지가 주로 재배되고 있다.

약용식물인 시호는 생약재로 이용하기 때문에 외관적 특성뿐만 아니라 성분적 특성이 매우 중요하며 시호에 대한 품질평가중 성분함량 분석이 중요한 평가항목이 된다. 약용작물은 육종상 선발대상형질 중의 하나가 유효성분함량이어서 선발시 성분을 검정하여야 하여 성분함량 분석은 절대정량면에서 차이가 나지만 성분평가를 위한 간이검정기술 개발이 필요하다. 또한 많은 약용작물은 뿌리를 약재로 이용하기 때문에 재배나 육종상 목표 대상은 뿌리가 되며 성분검색시료도 뿌리가 되어

\* 작물시험장 (National Crop Experiment Station, RDA, Suwon, Korea)

\*\* 서울대학교 농업생명과학대학 (College of Agric. & Life Sci., SNU, Suwon, Korea)

식물개체의 생사 즉 개체유지여부 문제가 발생된다. 따라서 분석시료의 부위를 외관특성과 아울러 잎, 줄기나 화기등에 함유하는 특정성분과의 상관을 분석하여 간접적으로 성분을 평가할 수 있는 기술개발이 요구된다.

시호뿌리의 saikosaponin 추출 및 정량방법은 현재 매우 다양한 방법으로 이루어지고 있다. 추출방법으로는 상온침지법, 가온환류법, 초음파추출법 등이 있으며, 사용기기로는 TLC와 HPLC가 주로 사용되고 있는데, HPLC를 이용한 정량법에서도 산(acid)처리하여 diene형 사포닌을 분석하는 방법과 사포닌 자체를 직접 정량하는 방법이 있다.<sup>8, 9, 10, 11, 12, 13</sup> 그 중 상온침지 추출하고 HPLC를 이용하여 사포닌 자체를 검출, 정량하는 분석방법을 많이 사용하는데 이방법은 분석시간이 길며 저파장의 검출시 방해물질로 인해 물질분리가 어렵다. 또한 시료분석점수가 많아지면 컬럼이 쉽게 오염되어 컬럼세척시간이 필요하며 결국 추출 및 정량분석시 매우 긴 시간이 소요된다.

이와 같은 사포닌 분석의 시간단축을 위해, 본 실험은 위의 분석방법들을 비교하여 보다 간편하고 신속 정확한 정량방법을 찾아내고자 하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 분석시료는 삼도(三島)시호(*Bupleurum falcatum*)로서 60±5℃에서 24시간 건조하고 마쇄하여 사용하였다. 이용된 분석기기는 HPLC로 Waters사와 Thermo Separation Products 사, HPTLC로 CAMAG사 기기를 이용하였다. 시료조제는 건조된 시호뿌리를 40mesh로 마쇄하여 그 중 1g을 추출에 사용하고 Methanol을 추출용매로 하여 1회 30ml씩 3회하여 추출하고 그 추출액을 합하여 총 100ml로 맞추었다. 추출방법은 상온침지 3일간, 가온환류 1시간, 2시간, 초음파추출 30분, 60분 등으로 3회 하였으며 산처리는 2% HCl/50% MeOH용액으로 16시간 상온에서 하였다.<sup>9</sup> 분석시료를 정제하기 위해 Ether로 탈지하고 기기분석시료액은 Sepak처리하였다.

분석방법과 기기조건은 표 1과 표 2와 같다. 방법 1은 사포닌자체 saikosaponin a와 saikosaponin d를 직접 정량하기 위한 방법으로 UV 203nm에서 검출하였으며, 방법 2는 산처리한 diene형 사포닌 saikosaponin b1과 saikosaponin b2를 UV 254nm에서 검출하였다. 방법 3은 HPTLC법으로서 역상 TLC에 시료액을 점적하고, TLC전개용매는 Methanol : Water=7 : 1를 사용하여 10% 황산으로 발색시킨 다음 흡광도(254nm)를 측정, 표준물질과 비교하여 정량하였다.

Table 1. Tested methods of instrumental analysis for saikosaponin determination.

	Instrument	Detection form
Method 1	HPLC	Saikosaponin a, d
Method 2	HPLC	Diene-saponin (saikosaponin b1, b2)
Method 3	HPTLC	Saikosaponin a, d

Table 2. Analytical conditions for saikosaponins determination.

	Method 1(HPLC)	Method 1(HPLC)
Column	μ-Novapak C18 (3.9×150mm)	μ-Novapak C18 (3.9×150mm)
Mobile phase	Acetonitrile : Water (35 : 65)	Methanol : Water (75 : 25)
Flow rate	1 ml/min	1 ml/min
Detection	UV 203nm	UV 254nm

Table 2. (continued)

	Method 3(HPTLC)	
Plate material	HPTLC Silica Plate RP-18 F 254s(Merck)	
Solvent system	Methanol : Water=7 : 1	
Detection	10% sulphuric acid, UV 254nm	

시호 saikosaponin a (Sa) 와 d (Sd) 를 산처리하면 diene형인 saikosaponin b1 (Sb1) 과 b2 (Sb2) 로 변환되어 최대흡수파장이 203nm에서 254nm로 이동하며 그 구조식은 그림 1과 같다.<sup>9)</sup>

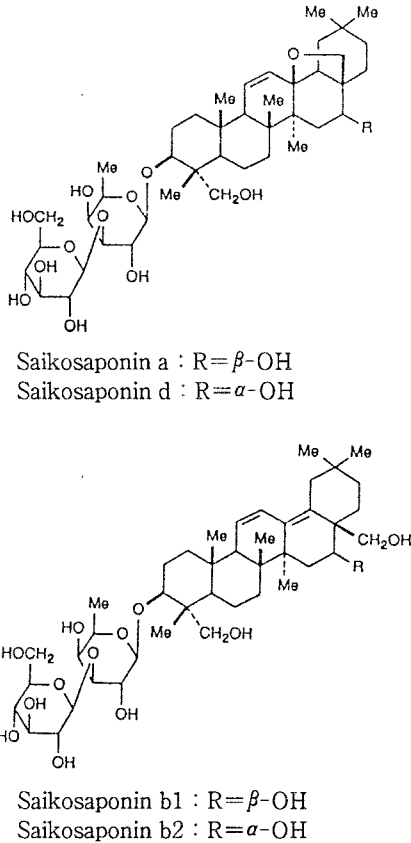


Fig 1. Chemical structure of saikosaponins

## 결과 및 고찰

시호의 주 약리성분인 saikosaponin a와 d에 대한 성분분석법을 비교하고자, 추출 후 산처리 diene형 사포닌과 무처리 사포닌을 각각 검출방법을 달리하여 기기분석한 결과 얻은 HPLC chromatogram은 그림 2와 같은데 산처리 분석방법으로 분석시간이 단축되었다. 그림 2에서 보듯이 saikosaponin a와 d의 머무름 시간은 산처리 방법에서 각각 4.6분, 6.9분대에 나타나고 무처리 방

법에서 9.7분, 30.1분대에 나타났다. 그리고 분석시료 점당 시간은 분석기조건에 따라 다른데 본 시험조건에서 시료층 목적성분 saikosaponin의 기타성분이 컬럼을 완전히 통과하여 다음시료에 영향을 주지 않을때까지 산처리가 약 15분, 무처리 50분정도 소요되었다. 실제 무처리의 saponin을 한점 분석하는데 30cm길이의 컬럼을 사용하고 유속 1ml/min일때 1시간이상 걸린다. 기기분석조건은 표 2와 같고 표준물질 saikosaponin a와 d, diene화된, 즉 산처리된 saikosaponin b1, b2에 대한 검량선과 회귀식은 그림 3과 같다.

HPLC를 이용하여 전처리 방법별로, 추출방법별로 정량한 결과는 표 3과 표 4와 같다. 분석방법 1과 2를 비교할 때 사포닌 함량은 방법 1에서 더 많이 나왔는데 이는 산처리된 saikosaponin의 diene형으로의 변환율에 차이가 있는 것으로 생각되며, 추출방법별로는 상온침지, 가온환류, 초음파순으로 추출수율이 낮았다. 초음파 추출의 경우 분석물질종류와 추출용매에 따라 다르지만 시호사포닌의 추출의 경우 수율이 매우 낮아 성분정량을 위한 추출법으로는 적당하지 않았다.

Table 3. Determination of saikosaponins with different analytical methods. (Unit : %)

Method 1		Method 2			
Sa	Sd	Total	Sb1 (Sa)	Sb2 (Sd)	Total
0.458	0.518	0.979	0.435	0.489	0.924

\* Method 1; detection of saikosaponin a (Sa) and d (Sd), Method 2; detection of diene-saikosaponin b1 (Sb1) and b2 (Sb2) in HPLC analysis.

Table 4. Determination of saikosaponins with different extraction methods.

Extraction method	Saikosaponin (%)			
	Sb1 (Sa)	Sb2 (Sd)	Total	
Room temperature	0.435	0.489	0.924	
Boiling	0.431	0.469	0.900	
Methanol	0.439	0.477	0.916	
Sonication	30min	0.333	0.358	0.691
	60min	0.335	0.350	0.685

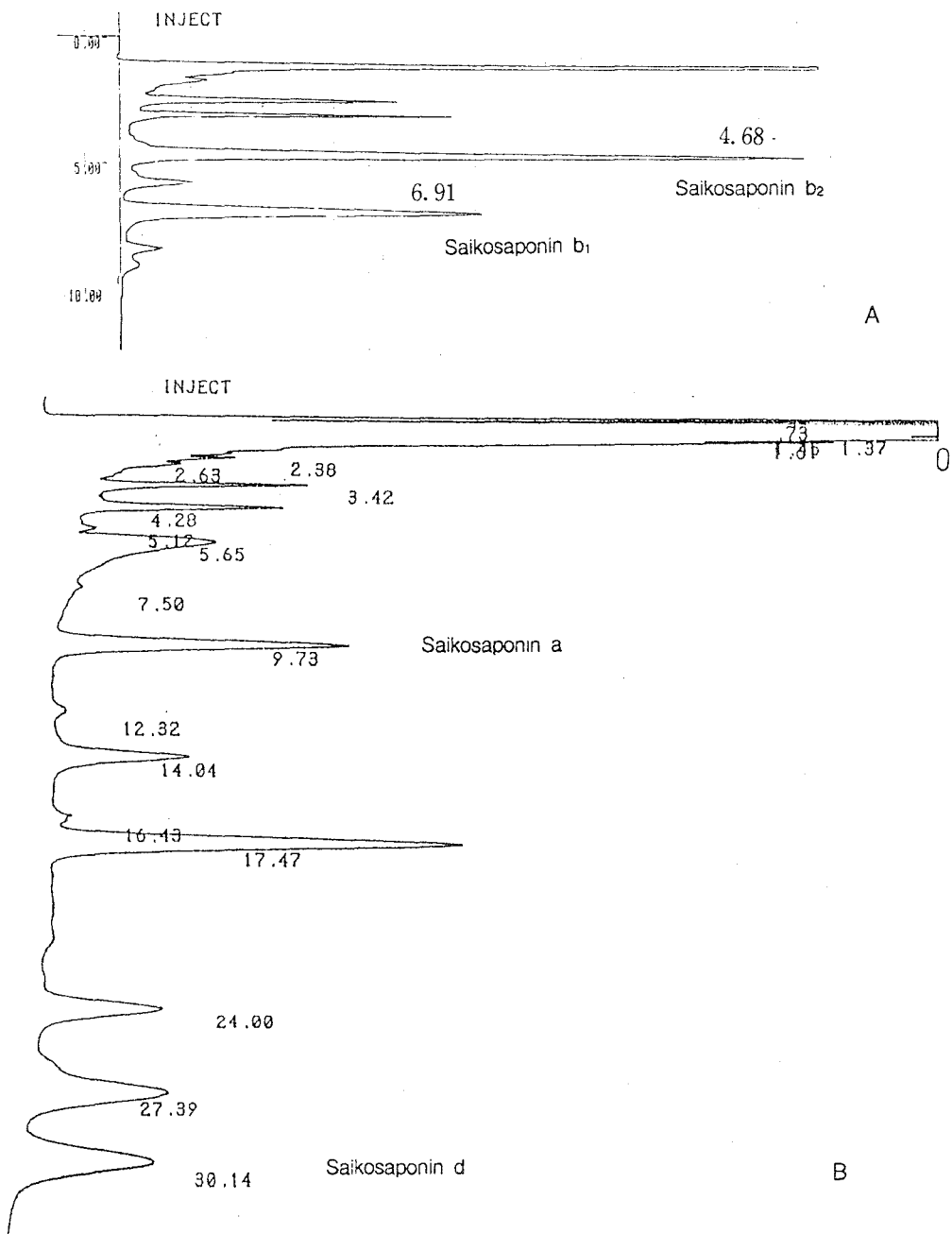


Fig. 2. HPLC chromatograms of saikosaponin a and d.  
 A : Saikosaponin b<sub>1</sub> and b<sub>2</sub> chromatograms  
 B : Saikosaponin a and d chromatograms

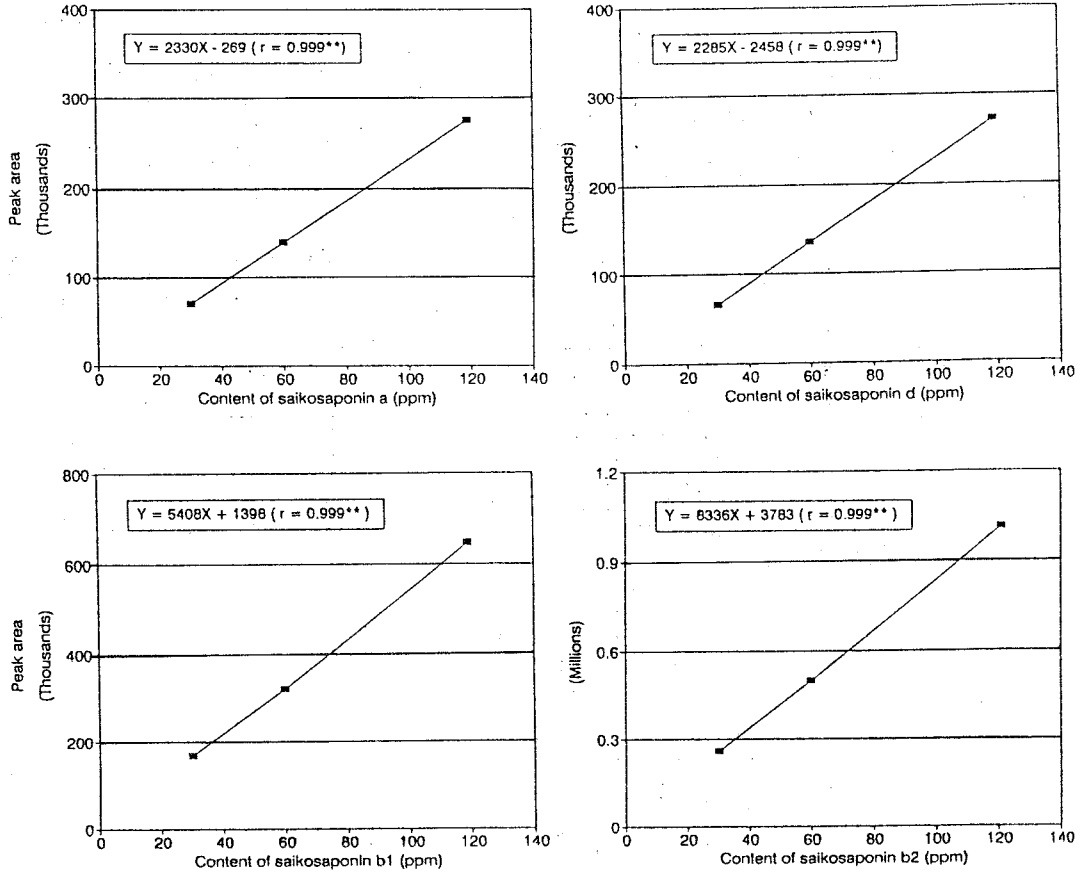


Fig. 3. Calibration curves of saikosaponins and diene-saikosaponin in HPLC analysis.

분석정확성면에서 산처리하지 않은 saikosaponin 을 상온침지하여 추출 분석하는 것이 가장 양호한 것으로 판단된다. 그러나 이 방법은 추출 및 분석시간이 길며 203nm의 저파장 검출시 방해물질로 인해 크로마토상 물질분리의 어려움이 따른다. 그러나 육종상 신속한 선별을 위한 성분검색을 위해서는 좀 더 간단하고 신속한 분석방법이 요구된다. 따라서 본 시험중 가온환류추출하고 산처리하여 diene화된 saikosaponin b1, b2를 분석하여 상호비교한 것이 매우 효율적이라 생각된다.

HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatogram) 는 TLC를 이용한 분석기기로서 추출액을 TLC plate에 점적하고 TLC전개용매로 전개 후 발색하여 분리된 각 밴드나 점에 대한 동정과

정량을 하는 것이다. 이 방법은 TLC Scanner에 의해 각 TLC상 분리된 물질의 밴드나 점들의 흡광도를 읽고 표준물질과 비교하는 것으로 HPLC보다 더욱 신속한 방법이다.

그림 4는 HPTLC를 이용하여 추출방법별 시료와 표준액을 점적전개한 후 발색시킨 TLC밴드 패턴이다.

그림 4와 같이 전개된 TLC Plate를 Scanner에 의해 흡광도를 측정하여 표준물질에 대한 검량선을 작성하였으며 (그림 5) 추출방법별 saikosaponin 정량을 한 결과는 표 5와 같다. saikosaponin d에 대한 검량선의 상관유의성이 낮았는데 시료액의 점적이나 용매전개 등의 기술적인 문제가 있으리라 생각된다.

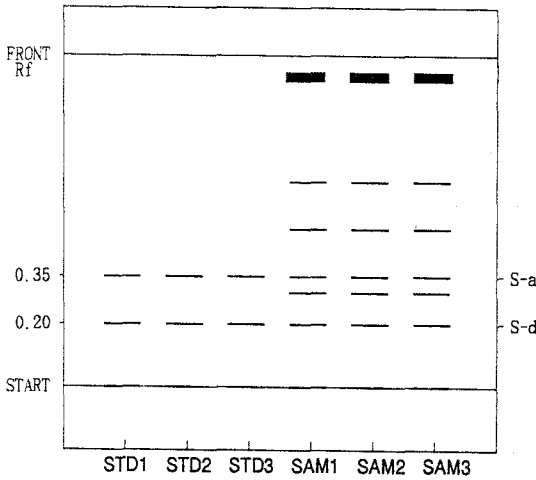


Fig 4. TLC band pattern of saikosaponins and samples.

\* STD1;30ppm saikosaponin, STD2;60ppm, STD3;120ppm, SAM1;extracion by standing in methanol at room temp., SAM2;boiling methanol, SAM3;sonication

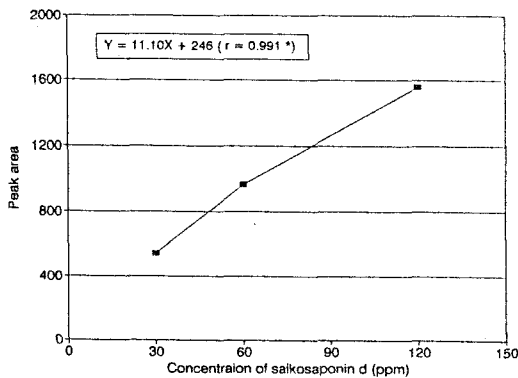
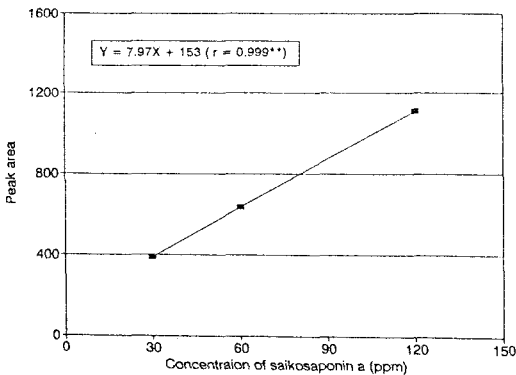


Fig. 5. Calibration curves of saikosaponins in HPTLC anlysis.

Table 5. Saikosaponins content with different extraction methods in HPTLC analysis.

Extraction method	Saikosaponin (%)		
	Sb1 (Sa)	Sb2 (Sd)	Total
Room temperature	0.592	0.589	1.182
Boiling methanol (1hr)	0.514	0.553	1.067
Sonication (30min)	0.473	0.414	0.887

역상 TLC를 이용하여 saikosaponin a와 d는 양호하게 분리되었으며 scanning결과 그림 6과 같은 TLC chromatogram을 얻을 수 있었다.

HPTLC법에서도 HPLC법과 동일하게 상온침지, 가온환류, 초음파 추출법순으로 추출효율이 높았으나 HPLC법과 함량차이가 나며 기술적인 문제점이 있으며 정확성이 떨어지는 것으로 생각된다. 그러나 성분의 함량을 육종상 선발목표로 들때 신속하고 간단한 검정기술이 요구되는데 TLC를 이용하면 다량의 시료를 신속하게 상대비교할 수 있을 것이라 생각된다.

본 시험을 종합비교해 볼 때 시호의 성분평가를 위해서 가온추출하고 산처리하는 방법을 이용한 정량법이 적당하리라 생각되며 성분육종상 우수한 개체나 계통을 선발시 신속한 방법으로 상대비교할 수 있는 방법으로는 HPTLC법이 좋을 것으로 생각된다.

## 적 요

柴胡 saikosaponin 定量에 대한 抽出方法 및 器機分析條件別 比較分析試驗결과는 다음과 같다.

1. HPLC를 이용한 시호 사포닌 정량은 산처리하는 방법에서 무처리 방법보다 분석시간이 더 단축되었다.

2. 추출방법상 상온추출이 수율이 높으나 가온환류추출에 의해 분석시간이 짧고 양호한 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

3. 시호 사포닌 분석시 HPTLC법이 HPLC법보다 대량신속측면에서 양호하나 신뢰도가 떨어졌다.

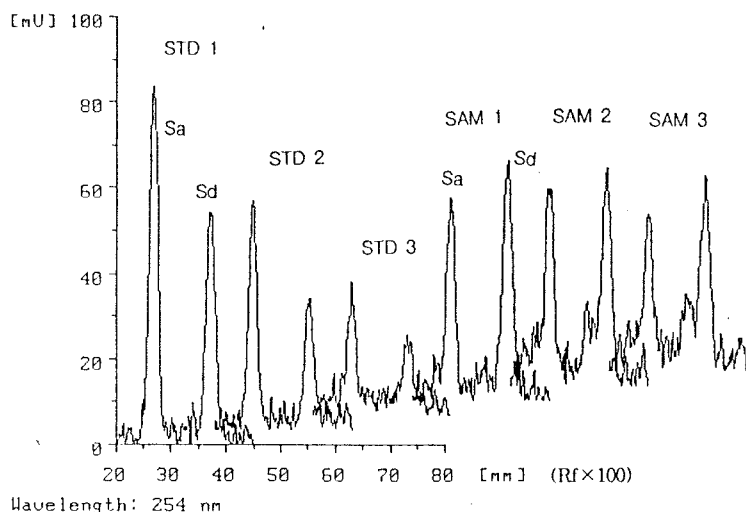


Fig. 6. HPTLC chromatograms of saikosaponin a and d in standards and samples. STD1, 2, 3, SAM1, 2, 3 were the same as in Fig. 4.

4. 따라서 시호 사포닌의 추출 및 분석은 가온환류추출과 산처리하는 분석방법이 신속한 분석방법으로 적당하였으며, 성분유종을 위한 간이검정기술로서는 TLC 이용 분석이 유리할 것으로 생각되었다.

## 인용문헌

1. 김윤식, 윤창영. 1990. 한국산 시호속의 분류학적 연구. 한국식물학회지 20(4) : 209-242.
2. 이정식, 이정규, 최종원. 1993. 시호 사포닌류의 약리작용(I). 생약학회지 24(1) : 69-77.
3. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. 1993. 시호 사포닌류의 약리작용(II). 생약학회지 24(2) : 153-158.
4. 이창복. 1982. 대한식물도감. 향문사. 577
5. 장기운, 최강주, 고성룡, 박중상, 김현경. 1993. 약효지표성분 분석법 확립에 의한 약용작물 품질관리. 농업논문집(92 농업산학협동) 35 : 61-76.
6. 채영복. 1988. 한국유용식물 자원연구총람. 한국화학연구소. 64
7. 한대석. 1991. 생약학. 동명사. 213
8. 한대석, 이덕근. 1985. HPLC에 의한 시호 saponin의 분리 및 정량. 생약학회지 16(3) : 175-179.
9. Shimaoka A., S. Seo and H. Minato. 1975. Saponins isolated from *Bupleurum falcatum* L.; components of saikosaponin b. J. Chem. Soc. Perkin Transaction I 2043.
10. Kimata H., C. Hiyama, S. Yahara, O. Tanaka, O. Ishikawa and M. Aiura. 1989. Application of High Performance Liquid Chromatography to the Analysis of Crude Drugs: Separatory Determination of Saponins of Bupleuri Radix. Chem. Pharm. Bull. 27(8) : 1136-1841.
11. 寺内正裕, 金森久幸, 坂本征則, 魏池昭二三, 加藤桂子, 神田博史. 1993. 高速液體クロマトグラフィーによる柴胡中のサイコサポニン-a, -c, -d의同時分析. 生藥學雜誌 47(2) : 213-217.
12. 赤堀昭, 香川清水, 島岡有昌. 1975. 柴胡ムエキス中のsaikosaponin의定量(第3報): Saikosaponin의抽出法. 生藥學雜誌 29(2) : 99-105.
13. 木全裕子, 藤岡尚美, 田中治, 富崎幸男. 1980. 二波長クロマトグラフデンシトメリー-しこよるサイユサポニンの分離定量とその栽培シマサイユの品質評價への應用. 生藥學雜誌 34(4) : 311-315.