

HPLC-ELSD를 이용한 시호 중의 saikosaponin 유도체의 확인법 개발

김보미 · 윤기동 · 한경림 · 김진웅[†]

서울대학교 약학대학

(2008년 2월 1일 접수 · 2008년 2월 18일 승인)

Determination of saikosaponin derivatives in Bupleuri Radix using HPLC-ELSD

Bomi Kim, Kee Dong Yoon, Kyung Reem Han, and Jinwoong Kim[†]

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

(Received February 1, 2008 · Accepted February 18, 2008)

ABSTRACT – A HPLC-ELSD method was developed to determine saikosaponin derivatives from Bupleuri Radix. Eight saikosaponins, saikosaponin c, i, h, a, b₂, g, b₁ and d, were analyzed under optimized HPLC conditions [column: Eclipse XDB C₁₈ (150×4.6 mm i.d., 5 μm; mobile phase: H₂O with 0.1% CH₃COOH (v/v) for solvent A and AcCN with 0.1% CH₃COOH (v/v) for solvent B, gradient elution; flow rate: 1 mL/min; injection volume: 20 μL]. Good linearity was achieved in the range from 62.5 to 250 μg/mL for each compound, and intra-day precision and accuracy at each concentration level varied between 0.05 and 5.45% and between 93.9 and 109.6%, respectively, whereas those for inter-day variations were between 0.91 to 2.73% and 94.3 to 106.1%. This HPLC-ELSD method was applied for the determination of saikosaponins from Bupleuri Radix samples, and saikosaponin a (0.79±0.20 mg/g), c (0.33±0.06 mg/g) and d (0.48±0.15 mg/g) were observed as major compounds. The other saikosaponins were shown under limit of quantification level thus couldn't be quantified. The present study suggested that the introduced HPLC-ELSD method is selective and reliable, and not only saikosaponin a, but also saikosaponin c and d should be employed as the standard markers for Bupleuri Radix.

Key words – Bupleuri Radix, HPLC-ELSD method, saikosaponin a, c and d

시호(*Bupleurum falcatum* L.)는 미나리과의 여러해살이 풀이며 전국 각지의 산야지 초원에 자생하며 예로부터 뿌리를 약재로 사용하여 왔다.¹⁾ 시호는 해열, 진통, 해독, 소염, 간염에 효과가 있어 한국, 중국, 일본에서 2000년 넘게 사용이 되어 왔다. 시호의 주요 성분으로 올레아난 사포닌 계열의 saikosaponin a, saikosaponin c, saikosaponin d의 세 가지 주요성분과 그 외에 다양한 미량의 saikosaponin 유도체가 보고 되었으며,^{2,4)} 이러한 시호사포닌은 면역기능 강화, 항염증, 항암, 항 HBV 활성 등 다양한 약리활성이 알려져 있다.⁵⁻¹¹⁾

시호의 확인시험은 대한약전에 TLC를 이용한 saikosaponin a의 확인법이 있으며, 건조한 것을 정량할 때 0.3% 이상의 saikosaponin을 함유해야 함을 명시하고 있다.¹²⁾ 하지만 시호는 saikosaponin a 이외에 상기한 다수의 saikosaponin들이 존재하여 시호의 생리활성 및 품질에 영향을 미치는 바, 시호의 성분과 효능에 대한 관계를 이해하기 위해

서는 주요 성분들을 분석할 수 있는 믿을만한 정성 또는 정량법에 대한 체계적인 연구의 필요성이 요구되고 있다.

사포닌 계열 화합물의 분석에는 TLC, DCCC, MEKC 등이 사용되나 주로 HPLC-UV를 이용한 방법이 상용되고 있다. 그러나 사포닌 계열 화합물들은 발색단의 부재로 인하여 UV의 극단파장(203~210 nm) 영역에서 확인할 수 있어 이동상의 선택 및 기울기 용리에 많은 제한이 있다. HPLC-UV의 방법을 보완하여 최근에는 HPLC/MS를 이용한 시호 사포닌 분석법에 대한 연구가 있으며, Liao 등은 HPLC/ESI/MS/MS를 이용하여 시호 및 소시호탕에 함유된 saikosaponin a 및 c의 함량 분석법을 개발한 바 있고,¹³⁾ Liu 등은 HPLC/DAD/ESI/MS를 이용하여 혈부축어탕(血府逐湯)의 saikosaponin b₁, b₂ 및 2'-O-acetylsaikosaponin b₂를 분석한 보고가 있다.¹⁴⁾ 이러한 HPLC/MS를 이용한 방법은 HPLC/UV에 비하여 감도가 우수하고 selected ion monitoring (SIM) 및 selected reaction monitoring (SRM)방법을 이용하여 원하는 성분을 검출할 수 있는 장점이 있다. HPLC/MS와 함께 사포닌 분석에 주로 사용되는 방법으로는 HPLC/ELSD 방법이 있으며 이는 이동상을 기화시킨 후 기

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)880-9175, E-mail : jwkim@snu.ac.kr

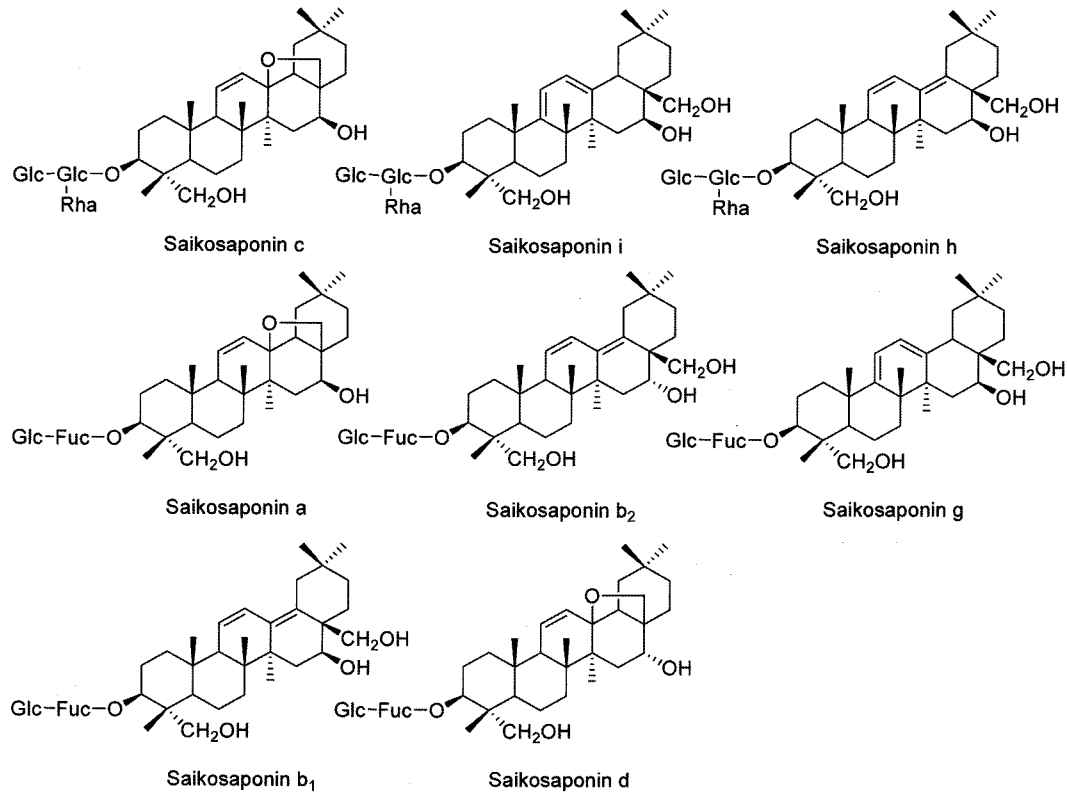


Figure 1—Chemical structures of eight saikosaponin derivatives.

화되지 않은 용질분자를 평산란시키는 검출방법을 이용하므로 UV에 비하여 감도가 매우 좋으며, 용질 분자에 대한 정량성이 매우 우수하고, 이동상의 조건에 거의 제한을 받지 않아 안정된 HPLC 크로마토그램을 확보할 수 있는 장점이 있어 사포닌 분석에 있어 HPLC/UV 법에 대한 대안이 되고 있다. 한편 HPLC/ELSD 방법을 이용하여 시호에 함유된 saponin 함량 분석법에 도입된 예가 없으며, 이에 본 연구는 시호가 함유한 성분인 8종의 saikosaponin 유도체들에 대한 정량, 정성분석을 위하여 HPLC-ELSD 방법을 사용한 분석법을 확립하였으며 이를 통해 한약재의 품질평가를 위한 지침을 마련하고자 한다.

실험 방법

식물 재료

실험에 사용된 시호는 서울의 경동시장에서 구입하여 부산대학교 박중희 교수의 감정을 받아 사용하였고, 표본은 서울대학교 약초원에 보관하였다.

시약 및 기기

표준품으로 사용된 saikosaponin a (SSa), b₂ (SSb₂), c

(SSc), d (SSd) (이상 Wako Pure Chemical industries Ltd., 일본)은 시판물을, saikosaponin h (SSh), i (SSi), g (SSg), b₁(SSb₁)은 문헌에 보고된 방법에 의하여 합성하여 MS 및 ¹H NMR 및 ¹³C NMR을 이용하여 구조를 확인하였으며,¹⁵⁻¹⁸⁾ 이를 HPLC로 정제하여 98% 이상의 순도를 가지는 화합물을 표준품으로 사용하였다(Figure 1). HPLC 용 아세토니트릴과 증류수(Fisher Scientific Korea Ltd., 한국) 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시판품을 사용하였다. 분석을 위하여 사용된 HPLC는 두개의 pump (321 pump)와 자동주입기(234 autoinjector)로 구성된 Gilson HPLC 시스템(Middleton, 미국)을 이용하였고, 자료 수집과 분석은 Gilson Unipoint 프로그램을 사용하였다. 검출기로는 ELSD (Sedex 75, Sedere, 프랑스)를, 분석을 위한 HPLC용 컬럼은 Eclipse XDB C₁₈ (150×4.6 mm i.d., Agilent, 미국)을 사용하였다.

HPLC 분석조건

이동상은 0.1% acetic acid (solvent A)와 0.1% acetic acid가 포함된 AcCN (solvent B)을 사용하였으며 solvent B의 비율을 25% (0~10분), 25~55% (10~45분), 90% (45~50분, 컬럼의 세척), 25% (50~60분)로 순차적으로 조

절하였다. 상온의 조건에서 분석을 실시하였으며, 유속은 1 mL/min으로 하였고 검출기로 ELSD를 사용하였으며, detection chamber의 온도는 75°C로 질소압은 3 bar로 유지하였다. 시료의 주입량은 20 µL로 하였다.

표준물질에 대한 정량곡선의 작성

SSa, SSb₁, SSb₂, SSc, SSd, SSg, SSi, SSh 등 8종의 시호 사포닌 표준품 약 1 mg을 정확하게 달아 각각을 메탄올에 녹여서 2 mg/mL의 용액을 만든 후 4°C에서 냉장보관시키고, 각각의 용액을 동량(125 µL)으로 취해 혼합하여 각 성분의 농도를 250 µg/mL로 한 뒤 이를 다시 메탄올로 연속적으로 희석하여 그 최종농도를 62.5, 83.3, 125, 250 µg/mL로 하여 검량선용 표준용액을 조제하였다. 각각의 표준용액 20 µL를 취하여 분석을 실시한 후 피크면적을 산출하여 농도변화에 따른 calibration curve를 작성하였고, [SSc: $Y=59580X-2554824$ ($R^2=0.9991$); SSi: $Y=44995X-1850437$ ($R^2=0.9985$); SSh: $Y=49645X-2141662$ ($R^2=0.9989$); SSa: $Y=54589X-1900173$ ($R^2=0.9983$); SSb₂: $Y=56810X-1984067$ ($R^2=0.9986$); SSg: $Y=48516X-2025320$ ($R^2=0.9997$); SSb₁: $Y=59689X-1558353$ ($R^2=0.9999$); SSd: $Y=53536X-1916202$ ($R^2=0.9991$)], 하루에 3회 시행하여 일내 정밀성과 정밀성 구하였으며 연속하여 3일간 실험을 행하여 일간 정밀성 및 정확성을 구하였다. 정밀성은 측정값에 대한 상대표준편차(RSD %)로 나타내었으며, 정확성은 실험치에 대한 이론치의 백분율(%)로 표시하였다.

검액의 조제 및 표준물질의 정량

시호 4종을 잘게 분쇄하여 1 g을 정확하게 달아 각각을 메탄올 100 mL를 가하여 1시간 초음파 추출한 후 여과하여 얻은 액을 감압하에 농축하였으며, 잔사에 50% 메탄올 용액 6 mL를 가하여 녹인 용액 1 mL를 취하여 0.45 µm membrane filter에 여과시킨 액을 검액으로 하여, 이 액 20 µL를 HPLC에 주입하였다. 이때 얻어진 피크면적을 미리 작성된 검량선에 적용하여 시호 시료에 함유된 표준물질의 함량을 산출하였다.

결과 및 고찰

표준물질의 함량분석법 검증

본 시험방법에 따라 8종의 saikosaponin 유도체의 표준물질에 대하여 HPLC-ELSD로 분석한 결과 최적의 HPLC 크로마토그램을 얻을 수 있었으며 이에 대한 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다. 표준물질의 검출한계농도(LOD) 및

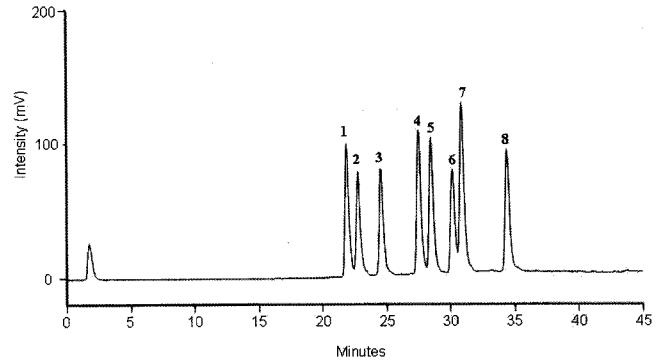


Figure 2—HPLC-ELSD chromatogram for mixture of eight saikosaponin standards. 1: SSc; 2: SSi; 3: SSh; 4: SSa; 5: SSb₂; 6: SSg; 7: SSb₁; 8: SSd

정량한계 농도(LCQ)는 각각 2.5 µg/mL 및 10 µg/mL 이하였으나, 8가지 표준물질에 대한 동시분석을 위해서는 실험 농도범위에 모두 일관된 직선성을 얻어야 하므로 검량선을 위한 정량 초기 농도를 62.5 µg/mL로 정하였다. 표준물질의 머무름 시간은 22.22분(SSc), 22.99분(SSi), 24.78분(SSh), 27.99분(SSa), 28.94분(SSb₂), 30.57분(SSg), 31.30분(SSb₁), 34.92분(SSd)이었고, 표준물질 농도에 대한 피크면적에 따른 검량선을 작성하였으며, 8종의 표준물질에 대한 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값이 0.9983~0.9999 범위에 있어 해당 농도(62.5~250 µg/mL)에 대하여 양호한 직선성을 가짐을 확인하였다. 또한 이 농도 범위에 있어서 8종의 표준물질에 대한 일내 정밀성은 0.05~5.45% 범위내에 있었고 정확성은 93.9~109.6% 범위내에 있었다. 한편 일간 정밀성은 0.91~2.73% 범위내에 있었으며 일간 정확성은 94.3~106.1% 범위내에 있음을 확인해 모두 $\pm 15\%$ 범위내에 있어 확실성을 확보할 수 있었다(Table I). 이로부터 본 HPLC-ELSD 분석법은 시호에 함유된 8종의 saikosaponin 유도체를 동시에 분석하기 위한 충분한 감도와 정밀성, 정확성 및 확실성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

시호에 함유된 표준물질의 함량분석

산지별 시호 4종의 100% 메탄올 추출물을 대상으로 상기 확립된 HPLC-ELSD 분석법을 사용하여 시호 중 함유된 8종의 saikosaponin 유도체의 함량을 분석하였다. 그 결과 SSa, SSc 그리고 SSd가 시호에서 가장 주요한 성분임을 확인할 수 있었으며, SSa는 0.79 ± 0.01 mg/g, SSc는 0.33 ± 0.06 mg/g 그리고 SSd는 0.48 ± 0.15 mg/g의 함량을 보였다(Figure 3, Table II). 또한 시호에 포함된 다른 성분들과 양호하게 분리되어 이 분석법이 적합한 방법임을 확인하였다. 주요한 3종의 saikosaponin 유도체 외 나머지 5종의 saikosaponin 유도체들은 본 분석법의 측정한계 이하의 미량으로

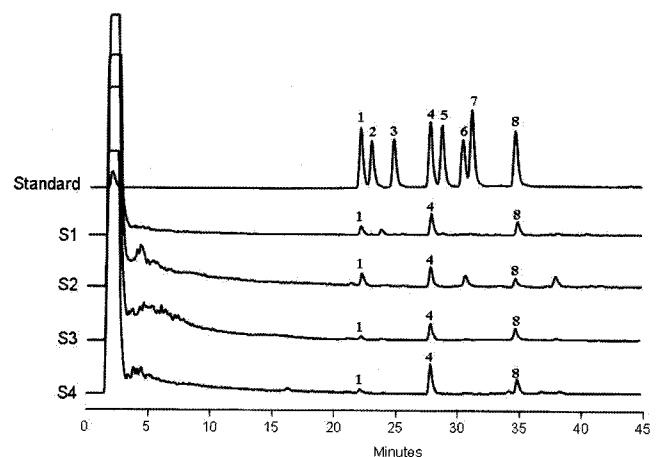
Table I—Intra- and Inter-day Variations for Eight Saikosaponin Derivatives ($n=3$)

Compound	Conc. (mg/mL)	Precision (RSD %)		Accuracy (%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
SSc	62.5	3.40	2.73	108.6	104.9
	83.3	2.60	2.55	97.7	98.1
	125	3.26	2.50	95.6	98.0
	250	0.33	1.40	100.8	100.4
SSi	62.5	1.91	0.30	105.3	106.1
	83.3	0.05	0.64	101.4	97.9
	125	4.85	0.80	94.8	97.2
	250	0.84	0.77	100.8	100.5
SSh	62.5	4.15	2.73	107.1	105.4
	83.3	2.69	1.68	100.1	98.2
	125	2.20	0.99	94.7	97.6
	250	0.78	0.91	100.9	100.5
SSa	62.5	2.35	0.92	107.1	103.7
	83.3	5.45	1.22	99.9	94.3
	125	0.10	1.27	94.8	102.3
	250	1.82	0.55	100.9	99.8
SSb ₂	62.5	1.58	0.96	108.4	102.3
	83.3	3.42	1.63	99.5	95.1
	125	1.67	1.47	94.2	102.7
	250	1.15	0.51	101.0	99.7
SSg	62.5	3.46	0.98	109.6	103.0
	83.3	4.21	1.90	98.8	98.0
	125	1.61	2.34	93.9	99.5
	250	2.09	0.18	101.6	100.2
SSb ₁	62.5	3.57	1.28	104.0	98.4
	83.3	2.68	0.51	99.6	101.5
	125	4.11	1.81	97.5	99.9
	250	2.85	0.82	100.4	100.0
SSd	62.5	1.69	0.44	106.1	105.3
	83.3	0.76	0.19	99.8	95.3
	125	3.67	2.36	95.7	100.2
	250	1.14	1.82	100.7	100.1

존재함을 알 수 있었다. 따라서 시호의 품질평가법을 위한 표준물질의 선정은 SSa, SSc 그리고 SSd가 되어야 타당할 것으로 사료된다.

Table II—Quantification of Saikosaponin Derivatives in Four Bupleuri Radix Samples ($n=3$)

Sample	Content level (mean±S.D.)		
	SSa (mg/g)	SSc (mg/g)	SSd (mg/g)
S1	1.05±0.02	0.30±0.02	0.70±0.01
S2	0.70±0.02	0.42±0.01	0.44±0.01
S3	0.59±0.01	0.29±0.02	0.39±0.01
S4	0.81±0.02	0.29±0.02	0.40±0.01
Mean	0.79±0.20	0.33±0.06	0.48±0.15

**Figure 3**—HPLC-ELSD chromatograms of four Bupleuri Radix samples (S1 ~ S4). 1: SSc; 2: SSi; 3: SSh; 4: SSa; 5: SSb₂; 6: SSg; 7: SSb₁; 8: SSd

결 론

시호가 함유한 성분에 대한 정성, 정량적인 HPLC 분석법을 개발하여 신뢰성 있는 품질 평가법에 대한 지침을 마련하고자, 시호가 함유하고 있는 8종의 saikosaponin 유도체들에 대한 HPLC-ELSD 동시분석법을 확립, 검증하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 8종의 saikosaponin 유도체는 62.5~250 µg/mL의 농도 범위에서 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값이 0.9983~0.9999 범위에 있어 해당 농도에 대하여 양호한 직선성을 가짐을 확인하였다.

2. 확립한 분석법을 검증한 결과 일내 정밀성 및 정확성은 각각 0.05~5.45%, 93.9~109.6% 범위내에 있었으며, 일간 정밀성 및 정확성은 각각 0.91~2.73%, 94.3~106.1% 범위내에 있어 이 분석법이 충분한 감도, 정확성, 정밀성이 있음을 확인할 수 있었다.

3. 본 분석법을 통하여 산지별 4종의 시호에 대한 saikosaponin 함량분석을 한 결과 SSa는 $0.59 \pm 0.01 \sim 1.05 \pm 0.02$ mg/g, SSc는 $0.29 \pm 0.02 \sim 0.42 \pm 0.01$ mg/g 그리고 SSd는 $0.39 \pm 0.01 \sim 0.70 \pm 0.01$ mg/g의 범위에 있었으며 그 외 5종의 saikosaponin 유도체는 측정한계 이하의 미량으로 존재함을 알 수 있어 시호의 품질평가법을 위한 표준물질의 선정은 SSa, SSc, SSd가 우선시 되어야 함이 타당하다고 사료된다.

참고문헌

- 1) K. Bae, *The Medicinal Plants of Korea*, Kyo-Hak, Seoul, Korea, p. 372 (1999).
- 2) N. Ebata, H. Nakajima, K. Hayashi, M. Okada and M. Maruno, Saponins from the root of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry*, **41**, 895-901 (1996).
- 3) L. Pistelli, A. Cammilli, A. Manunta, A. Marsili and I. Morelli, Triterpenoid saponins and flavonoid glycoside from *Bupleurum falcatum* subsp. *cernuum*. *Phytochemistry*, **33**, 1537-1559 (1993).
- 4) H. Ishii, S. Seo, K. Tori, T. Tozyo and Y. Yoshimura, The structure of saikosaponin-E and acetylsaikosaponins, minor components isolated from *Bupleurum falcatum* L., determined by C-13 NMR spectroscopy. *Tetrahedron Lett.*, **18**, 1227-1230 (1977).
- 5) H. Kohno, M. Yamazaki, N. Jyumonji, N. Yamaguchi and S. Odashima, An investigation of the immune suppression induced by some saikosaponin derivatives. *Int. J. Immuno-*

- pharmacol.*, **10**, 845-850 (1998).
- 6) N. Yamaguchi, H. Kohno, M. Tawara and S. Odashima, Effect of saikosaponin derivatives upon the immune response against T-dependent and T-independent antigens in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, **7**, 827-832 (1985).
- 7) P. Bermejo Benito, M.J. Abad Martinez, A.M. Silvén Sen, A. Sanz Gmez, L. Fernández Matellano, S. Sánchez Contreras and A.M. Díaz Lanza, In vivo and in vitro antiinflammatory activity of saikosaponins. *Life Sci.*, **63**, 1147-1156 (1998).
- 8) W.S. Wu and H.Y. Hsu, Involvement of p-51INK4band p-16INK4a gene expression in saikosaponin a and TPA-induced growth inhibition of HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 183-187 (2001).
- 9) Y.L. Hsu, P.L. Kuo and C.C. Lin, The proliferative inhibition and apoptotic mechanism of Saikosaponin D in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life Sci.*, **75**, 1231-1242 (2004).
- 10) J.C. Chen, N.W. Chang, J.G. Chung and K.C. Chen, Saikosaponin-A induces apoptotic mechanism in human breast MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cells. *Am. J. Chin. Med.*, **31**, 363-377 (2003).
- 11) L.C. Chiang, L.T. Ng, L.T. Liu, D.E. Shieh and C.C. Lin, Cytotoxicity and anti-hepatitis B virus activities of saikosaponins from *Bupleurum* species. *Planta Med.*, **69**, 705-709 (2003).
- 12) 대한약정 8개정 의약품 각조 제 2부
- 13) B.C. Liao, S.S. Hsiao, M.R. Lee, T.T. Jong and S.T. Chiang, Quality control of Chinese medicinal preparations LC/ESI(+)/MS/MS analyses of saikosaponin-a and -c as markers of *Bupleuri radix* samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, 1174-1178 (2007).
- 14) L. Liu, Y. Cheng and H. Zhang, Phytochemical analysis of anti-athrogenic constituents of Xue-Fu-Zhu-Yu-Tang using HPLC-DAD-ESI-MS. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1295-1301 (2004).
- 15) H. Ishii, M. Nakamura, S. Seo, K. Tori, T. Tozyo and Y. Yoshimura, Isolation, characterization, and nuclear magnetic resonance spectra of new saponins from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2367-2383 (1980).
- 16) K. Tori, S. Seo, Y. Yoshimura, M. Nakamura, T. Yutaka and H. Ishii, Carbon -13 NMR spectra of saikosaponin A, C, D and F isolated from *Bupleurum falcatum* L. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 4167-4170 (1976).
- 17) T. Kuboata and H. Hinoh, The constitution of saponins isolated from *Bupleurum falcatum* L. *Tetrahedron Lett.*, **9**, 303-306 (1967).
- 18) A. Shimaoka, S. Seo and H. Minato, Saponins isolated from *Bupleurum falcatum* L.; Components of saikosaponin-B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2043-2048a (1975).