
碩士學位論文

HPLC에 의한 植物體中の Ecdysteroid 化合物 分析

濟州大學校 大學院

農化學科



1997年 12月

HPLC에 의한 植物體中の Ecdysteroid 化合物 分析

指導教授 柳 基 中

梁 哲 信

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1997년 12월

梁哲信의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長: _____

委 員: _____

委 員: _____

濟州大學校 大學院

1997년 12월

Analysis of Ecdysteroids in Plant Tissues by HPLC

Churl-Shin Yang

(Supervised by professor Key-Zung Riu)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 12.

목 차

Summary

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
1.1. 식물시료	4
1.2. 기구	4
1.3. 표준품	4
1.4. 시약	4
2. 방법	5
2.1. 식물시료의 전처리	5
2.2. 정제	5
2.3. Boronic esterification	5
2.4. HPLC 조건	6
2.5. 기기안정성	6
2.6. 검량선, 최소검출량, 분리도	6
2.7. 첨가회수율 시험	7
III. 결과 및 고찰	9
1. 표준물질의 분리에 미치는 용매계의 영향	9
1.1. methanol-물 용매계	9
1.2. 2-Propanol-물 용매계	10
2. 재현성, 최소검출량	13
2.1. 재현성	13
2.2. 검량선	13

2.3. 최소검출량 -----	15
3. Boronic esterification에 의한 20,22-diol 분리정제 -----	15
3.1. 에스테르화 반응 수율 -----	18
3.2. 검출감도 -----	18
3.3. 첨가회수율 -----	19
4. 식물체중의 ecdysteroids 함량 -----	22
4.1. 20, 22-diol ecdysteroid 화합물에 대한 선택성 -----	22
4.2. β -Ecdysone -----	27
4.3. Polypodine B -----	27
4.4. α -Ecdysone 및 2-deoxy- β -ecdysone -----	28
IV. 요약 -----	30
V. 참고문헌 -----	31



Summary

The analytical methods were established for separating and determining α -ecdysone, β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone and polypodine B by high performance liquid chromatography(HPLC). Levels of the above four ecdysteroids in 14 plant species were determined by these methods

1. β -Ecdysone and polypodine B could be separated from α -ecdysone and 2-deoxy- β -ecdysone by using methanol-water gradient system as a mobile phase in HPLC. However, β -ecdysone and polypodine B were eluted together with this solvent system.

2. β -Ecdysone and polypodine B could be separated from each other by using 2-propanol-water isocratic system instead of methanol-water gradient in HPLC.

3. The three ecdysteroids with 20,22-diol structure, β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone and polypodine B, could be selectively purified from α -ecdysone and many other interfering compounds by using solid phase phenylboronic acid cartridge.

4. Only β -ecdysone and polypodine B were detected in *Polypodium fauriei* L., *Polypodium vulgare* L., *Achyranthes japonica* Nakai and *Spinacia oleracea* L. among the tested fourteen plant species.

5. The levels of β -ecdysone in rhizomes of *P. fauriei* and *P. vulgare* were 0.0325% and 0.047%, respectively, by fresh weight base. The levels of the ecdysteroid in stem and root of *A. japonica* were 0.0311% and 0.0150%, respectively. The level of ecdysteroid in leaf of *S. oleracea* was 0.0033%.

6. The levels of polypodine B in rhizomes of *P. fauriei* and *P. ulgare* were 0.0040% and 0.0046%, respectively, by fresh weight base. The levels of the ecdysteroid in stem and root of *A. japonica* were 0.0011% and 0.0003%, respectively. The level of the ecdysteroid in leaf of *S. oleracea* was 0.0020%.



I. 서 론

Ecdysteroid 화합물은 곤충의 탈피를 촉진하는 활성을 가지고 있어서 곤충탈피호르몬(insect moulting hormone)으로 불리고 있는데(Fukuda, 1944), 이들중 처음으로 알려진 것은 α -ecdysone으로 1954년도 Butenandt 등에 의해 누에의 유충으로부터 분리되었고 1965년도 Huber등에 의해 구조가 밝혀졌다. 그 후 β -ecdysone이 α -ecdysone 보다 활성이 크고 곤충계에 보편적으로 발견된다는 것이 알려졌고, β -ecdysone 이외에도 유사한 활성을 가진 많은 steroid 화합물이 알려져 ecdysteroids로 불리고 있다.

Ecdysteroid는 cholest-7-en-6-one이라는 steroid핵을 근간으로 여러개의 수산기를 가지고 있는 화합물들인데 대표적인 몇가지 ecdysteroid의 구조는 Fig. 1과 같다. 이들은 그 구조식에서 steroid핵의 탄소 7과 8사이에 2중결합이 하나 있고, 3, 14, 22번 탄소에는 -OH가 있으며, 고리의 6번 탄소가 carbonyl로 되어 있는 것이 공통적 특징이다. 이들은 탄소 2, 5, 20, 25번 위치에 -OH의 존재 유무에 따라 다양한 구조를 가지며 활성도 다르다.

Ecdysteroid는 곤충의 생활사에 필수과정인 변태를 조절하기 때문에 곤충생리연구의 핵심물질로 지목되어 기초연구의 대상이 되고 있을 뿐만아니라, 곤충의 방제 또는 생육조절에 응용하려는 많은 연구가 이루어져왔다. 현재 ecdysteroids 화합물이 상업적으로 이용되고 있는 대표적인 예는 양잠분야인데 누에고치의 형성시기를 조절하는데 사용되고 있다.

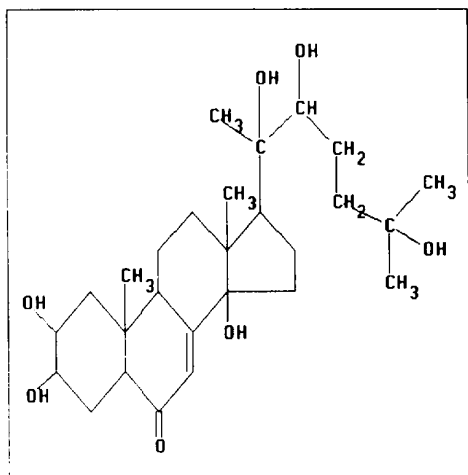
현재 ecdysteroid의 전합성(Kametani 등, 1980)이 알려져 있지만 합성비용이 비싸기 때문에 유기합성에 의해 ecdysteroid를 생산하여 상업적으로 사용하기에는 적합하지 않은 것으로 평가되고 있다. 그런데 ecdysteroid가 비록 곤충에서 분리되었지만 식물계에도 널리 분포하며 식물에 존재하는 ecdysteroid 함량은 곤충보다 월등히 많아 몇몇 식물들은 ecdysteroid 원으로 주목되고 있다(Hocks 와 Wiechert, 1966). 본 연구에서는 ecdysteroid 원으로서 가치가 있는 식물을 선별하는데 뿐만아니라, 생합성경로의 연구, 생물공학적 생산체계확립 및 유전자분리 연구에 필수적인 ecdysteroid 분석방법을 확립하고 몇가지 식물의 ecdysteroid 함량을 조사하였다.

Ecdysteroid는 polyhydroxy 화합물로서 가스크로마토그래피에 의한 분석은 어렵기 때문에 보통 HPLC로 분석한다. 그러나 식물에서는 다양한 천연물질의 성분과 혼재하기 때문에 정성과 정량에는 어려움이 많다. 그러므로 본 연구에서는 HPLC를 이용한 식물체중의 ecdysteroid 분석법을 확립하고, 제주도에 자생 또는 재배되고 있는 미역고사리를 비롯한 14종의 식물에 대하여 ecdysteroid 함량을 분석하였다.

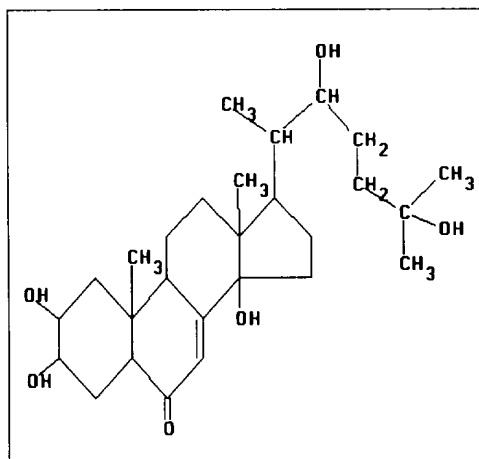
본 실험에서는 식물체 matrix의 복잡성에 따라 1) 추출성분이 HPLC-UV에서 방해물질이 적을 경우, 추출 후 농축을 거쳐 millipore여과 후 직접 HPLC에 주입하여 분석하는 방법, 2) 상기 1)의 방법으로 분석하였을 때 목표 성분이 용리되는 부근에서 방해물질이 소량 있을 때, 검액을 phenyl boronic acid(PBA) 또는 methyl boronic acid(MBA) 등으로 유도체를 만들어 HPLC에 도입하여 retention time을 변경시켜 정성-정량에 방해가 되지 않는 시간대에서 용리되도록 유도체 시약을 선정하여 분석하는 방법(시금치나 우슬같은 같은 시료), 3) 상기 두 방법으로 분리정량이 곤란한 경우, 제 1)과정 감압건고물에 일정량의 alkaline buffer를 용해시켜 PBA고정상에 통과시켜 선택적 공유결합이 이루어지는 특성을 이용하여, 원하는 용리액을 만들어 이를 검액으로 사용하여 분석하는 등 3가지 분석방법을 검토하였다.



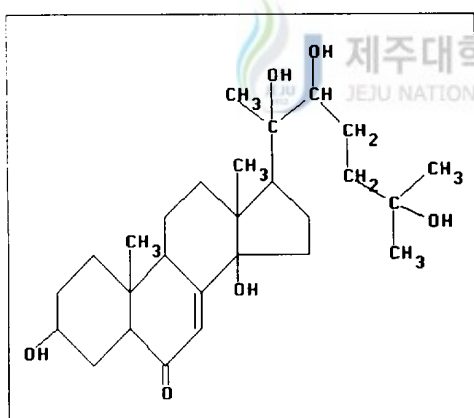
A. 20-hydroxyecdysone
(β -ecdysone)



B. ecdysone
(α -ecdysone)



C. 2-deoxy- β -ecdysone



D. polypodine B

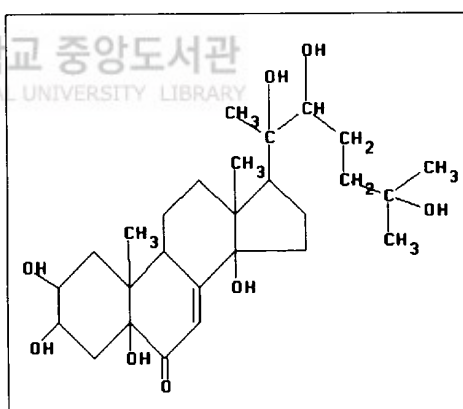


Fig. 1. Chemical structures of typical ecdysteroids.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 식물시료

Ecdysteroid 분석시료로서 시금치(*Spinacia oleracea* L.), 맥문동(*Liriope platyphyllae* Wang et Tang) 상치(*Lactuca sativa* L.), 양배추 (*Brassica oleracea* var. capitata L.), 부추(*Allium tuberosum* Roth), 비파(*Eriobotrya japonica* L.), 주목(*Taxus cupidata* S. et Z.), 국화(*Chrysanthemum morifolium* Romat), 비름(*Amaranthus mangostanus* L.) 및 취나물(*Ligularia fischeri* Ledeb Turcz)은 식물체의 잎을 사용하였다. 나사미역고사리(*Polypodium fauriei* L.)와 미역고사리(*Polypodium vulgare* L.)는 rhizome을 사용하였고, 우슬(*Achyranthes japonica* Nakai)은 줄기 및 뿌리를 사용하였다. 감귤(*Citrus unshia* Markovich)은 과실 껍질을, 감자(*Solanum tuberosum* L.)의 경우는 괴근을 사용하였다.

1.2. 기구

시료의 균질화에 사용된 Blender로는 후드믹서(삼성전자 CR-581W, 400ml), 시료 전처리에는 원심분리기(Heraeus Sepatech사 Megafuge 1.0), Vacuum/Distillation Controller, water bath가 부착된 Aspirator, 그리고 ecdysteroid 화합물의 분리와 정량에는 고속액체크로마토그래피(HPLC)가 사용되었다.

1.3. 표준품

Ecdysteroid 표준품은 Sigma사의 α -ecdysone, β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone 및 polypodine B를 사용하였다.

1.4. 시약

20, 22-diol형 ecdysteroid 정제에 PBA cartridge를 사용하였는데 Varian사의 'Bond Elut LRC'(bonded phase-phenyl boronic를 silica에 화학결합시킨 형)를 사용하였고, 유도체 시약으로 methylboronic acid는 Fluka사 제품, benzeneboronic

acid는 Lancaster Synthesis사 제품을 사용하였고, 기타의 시약은 모두 HPLC grade를 사용하였다. PBA cartridge 고정상 용출액으로 사용된 acidic buffer는 boric acid 200mM과 lactic acid 5%(w/v)를 포함하는 70%(v/v)methanol 수용액이었으며, alkaline buffer는 glycine 100mM 수용액을 1.0N NaOH로 pH를 8.2로 조정한 용액이었다.

2. 방법

2.1. 식물시료의 전처리

식물조직 시료는 blending하고 폴리에틸렌 시료병에 넣어 냉동보관하며 사용하였다. blending한 시료 1~20g을 취하여 시료의 2~40배의 methanol을 가하여 원심분리(2,500rpm×5min)한 후 Advantech Toyo 5C여지(110mm)로 여과한 후 농축수기에 넣었다. 여과잔사를 등량의 methanol로 2회 더 추출하여 추출액들을 수기에 모아서 50℃ 이하의 조건에서 220mbar의 진공으로 먼저 메탄올을 유거시키고, 100mbar진공에서 시료중에 포함되어 있는 잔류수분 등을 모두 유거시켰다.

2.2. 정제

감압건고한 농축수기에 alkaline buffer를 5ml 가하여 초음파를 처리하면서 완전히 성분을 용해시킨 후 0.45 μ m Acrodisc LC PVDF(Gelman, \varnothing 30mm)로 여과하였다. 여과액을 정확히 2ml 취하여 미리 methanol 5ml를 흘려 활성화시킨 PBA카트리지에 분당 1ml의 유속이 되도록 흘려 넣었다. 계속하여 메탄올 5ml로 용출시켜 회수하여 α -ecdysone 시험용 검액으로 하였다. 다시 PBA cartridge에 acidic buffer 5ml를 보내어 β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone 및 polypodine B분석용 검액으로 하였다.

2.3. Boronic esterification

Boronic esterification은 첫째로 HPLC분석에서 표준성분에 대하여 화학적 구조변화를 통하여 β -ecdysone과 polypodine B성분의 분리여부를 판단하고, 둘째로 UV-검출기에서의 감도가 증진되는지의 여부를 확인하고, 셋째로 HPLC의 동일한 이동상조건으로 용리시간이 변경되는 여부를 확인하기 위하여 수행하였다. Boronic esterification시약으로서 PBA, MBA 및 inorganic boric acid를 각각 메탄올과 소량

의 물(무기붕산의 경우)로서 1%(w/v)용액을 조제(reagent solution)후, 약 40ppm level의 α -ecdysone, β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone 및 polypodine B 혼합 표준 용액에 대하여 동량(v/v)의 reagent solution을 첨가(분리하고자 하는 물질은 약 20ppm수준)하여 HPLC에 20 μ l 주입한 후 그 결과를 측정하였다. 이 조건은 반응물질로서 시약의 초과 당량비는 대략 PBA 1000배, MBA 및 무기붕산은 2000배 정도에 해당된다.

시료의 경우는 PBA, MBA시액을 2ml vial에 200 μ l 넣어 실온에서 메탄올을 휘산시킨 후, 정제과정에서의 acidic buffer로 회수한 검액을 200 μ l 씩 넣고 실온에서 1시간 정도 방치하여 반응을 완결시켰다.

2.4. HPLC조건

시료추출 및 정제과정에서 얻은 검액을 20 μ l를 HPLC에 주입하여 각각의 분리도와 칼럼유지 시간(retention time)을 비교분석 하였으며, 이 때의 HPLC조건은 Table 1과 같다.

2.5. 기기안정성

α -ecdysone 56ppm, β -ecdysone 54ppm 및 2-deoxy- β -ecdysone 48ppm의 methanol 혼합표준 용액을 5회 분석하여 상대표준편차(relative standard deviation)를 구하였다.

2.6. 검량선, 최소검출량, 분리도.

1) 검량선

α -ecdysone, β -ecdysone 및 2-deoxy- β -ecdysone의 표준용액에 대하여 각각 농도가 배수가 되도록 하여 6-point에 대하여 농도 대비 HPLC UV detector response로써 peak area와 peak height에 대한 상관관계를 구하였다.

2) 최소검출량

위의 검량선에 사용한 혼합 표준용액을 2배씩 희석하면서 HPLC로 분석하여 최소검출량을 얻었다.

Table 1. Analytical conditions of RP-HPLC

Pump	Quaternary pump, Spectra Physics (TSP), P-4000			
Detector	programmable UV-diode array, Spectra Physics (TSP), UV-3000			
Column	Supelcosil LC- C ₁₈ -DB, 4.6mm×300mm, particle size 5 μ m, P/N=5-8355			
Integrator	S/W PC-1000 (O/S2)			
Injector	Rheodyne injector, 20 μ l loop			
Mobile phase I	time(min)	water(%)	methanol(%)	flow rate(ml/min)
	0.0	100.0	0.0	1.0
	4.0	60.0	40.0	1.0
	20.0	30.0	70.0	1.0
	30.0	5.0	95.0	1.0
	40.0	5.0	95.0	1.0
	41.0	100.0	0.0	1.0
Mobile phase II	15%(v/v) 2-propanol / 85% Water (isocratic), flow rate=1.2(ml/min)			
Other condition	- solvent profile : linear		- equilibration time : 5.0min.	
	- wavelength : UV243nm		- run time : 40.0min.	
	- data rate : 24.0Hz		- rise time : 1.0sec.	
	-Column temperature : ambient			

3) 분리도 및 효율

α -ecdysone, β -ecdysone 및 2-deoxy- β -ecdysone의 표준용액 28, 27 및 24ppm을 주입하여 얻은 chromatogram으로 성분간의 분리도 및 분리효율을 구하였다.

2.7. 첨가회수율 시험

예비실험에 의해 ecdysteroid를 함유하지 않은 것으로 확인된 참비름에 대해 첨가회수율을 검토하였다. 참비름 잎을 마쇄한 시료 6.6814g을 정취하고 α -ecdysone 144.0ppm, β -ecdysone 135.6ppm, 2-deoxy- β -ecdysone 38.8ppm을 함유한 메탄올 혼합표준용액 2ml를 첨가하였다. 메탄올 30ml씩 3회 추출후 원심분리(2,500rpm×5min) 하고 상정액을 취하여 Advantec 5C(Ø110mm)여지로 여과하였다. 여과액을 회전감압농

속기로 50℃이하에서 감압건고시킨 뒤, 고형물 잔사에 5ml의 alkaline buffer를 넣어 초음파 진탕 후 0.45 μ m Acrodisc filter (Gelman PVDF)로 용액을 여과하였다.

미리 메탄올 5ml를 유출시켜 활성화시킨 PBA카트리지에 알칼리 시료추출용액 2ml의 분량을 카트리지에 넣고 메탄올 5ml로 용출시켜 회수하여 α -ecdysone을 분석하였고, 다시 산성완충액 5ml씩 각각 2회 유출하여 시켜 회수하여 β -ecdysone 및 2-deoxy- β -ecdysone을 분석하였다.

이 때 카트리지에 대한 유속은 대략 1ml/min을 유지하기 위하여, 회전감압농축기의 진공측 hose에 three way valve를 부착하여 aspirator와 연결된 vacuum/distillation controller로서 압력을 manual로 조작하여 메탄올의 경우 960mbar(5.0ml/5.2min), 산 및 알칼리 완충액은 940mbar (5.0 ml/5.7min)의 압력으로 조절하여 용리하였다. 각각의 카트리지 유출액 세 가지를 각각 HPLC에 20 μ l씩 주입하여 분석하였다.

이때 사용된 표준용액은 표준물질을 메탄올에 녹여만든 메탄올 혼합표준용액을 산성완충용액으로 6.25배 희석하여 검액의 예상농도와 동일하게 되도록 조정한 것을 사용하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 표준물질의 분리에 미치는 용매계의 영향

역상 고속액체크로마토그래피를 사용하여 ecdysterod를 분석할 때 주로 이용되는 용매는 methanol, 물, acetonitrile 이다(Wilson 등, 1993). 여기서도 주로 이 용매들을 이동상으로 사용하여 β -ecdysone, α -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone 및 polylypodine B를 동시에 분석하고자 시도하였다.

1.1. Methanol-물 용매계

Methanol-물 용매계를 이동상으로 하는 경우는 gradient가 용이하며, peak가 대칭성을 보여 가장 많이 사용되는 용매이다. 메탄올-물 용매계의 분석조건에 따른 실험 결과 Fig. 2의 (A)에서와 같이용리순서는 β -ecdysone, α -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone으로 나타났으며 이는 극성의 순서와 완전히 일치하였다. 이는 Robert J. Grebenok 등(1994)의 결과와 동일하였다. 이 용매계에서 분리도를 측정된 결과 β -ecdysone과 α -ecdysone간에 대해서는 $R=(16.558-13.705) \times 2 / (0.804+0.798)=3.56$, α -ecdysone과 2-deoxy- β -ecdysone간에 대해서는 $R=(18.197-16.558) \times 2 / (0.798+0.797)=2.06$ 으로 모두 2.0이상이었다. R값은 1.5이상일 때를 보통 완전분리 또는 基線分離라하며, 1.0일때는 두 성분이 2%씩 각기 중첩된 상태를 의미한다.

Methanol-물 용매계에 의하여 분리시 각각의 분석성분에 대한 칼람의 분리 효율평가 내용은 Table 2와 같았다.

Table 2에서 보는 바와 같이 세 가지 성분 모두가 tailing factor는 1이하로서 peak tailing은 없었으며 오히려 fronting 되었는데 이는 이동상을 gradient한 결과에 기인하는 것 같았다. column에 대한 종합평가요인으로서 효율, 선택성 및 유지비의 곱으로 표현되는 분리능은 4이상으로 완전분리가 되었다. 이론단수는 칼람의 효율과 분리의 재현성을 결정하는 요인으로 이론단수는 일반적인 분석시 최소 5,000이상이어야 신뢰도가 높은 분석결과가 기대되는데, 여기서는 100,000이상으로 적절한 시스템으로 확인되었다. 이 이동상은 이와같이 여러 가지 장점을 가지고 있지만, β -ecdysone과 polylypodine B간의 분리는 곤란하였다. 메탄올로써 0에서 90%까지 여러

Table 2. Suitability of HPLC system

Component	α -ecdysone	β -ecdysone	2-deoxy- β -ecdysone
Capacity Factor	32.1163	26.4090	35.3948
Tailing Factor*	0.8270	0.8076	0.8933
Plates/meter*	233105	146199	307739
Resolution*	4.73	7.88	4.73
HETP(mm)*	0.00429	0.00684	0.00325

* calculated by the tangent method in United States Pharmacopeia (USP)

-ecdysone과 polypodine B간의 분리는 곤란하였다. 메탄올로써 0에서 90%까지 여러 시간을 주어 gradient조건을 주어도 양자간의 분리는 이루어지지 않았으나, 메탄올 물계를 이용한 경우 성분들의 responsivity와 용출되는 시간은 적절하게 조절할 수 있었다. Richard F. Modlin 등(1994)이 polypodine B의 극성 크기가 β -ecdysone보다 조금 강하기 때문에 polypodine B가 β -ecdysone보다 먼저 분리가 되어 앞서나온다는 추정과는 다른 결과가 나왔다. 그것은 이동상으로 methanol-물 용매계에서는 분리가 불가능하기 때문이었다. 이 양자간의 미분리는 J. Robert등(1994)의 실험에서도 분리가 불가능하여 본 성분을 혼합시킨 실험결과는 나타낼 수가 없었다.

methanol-물 용매계의 이동상에 의한 분리가 불가능하여, 이 두가지 성분을 분리하는데 이동상을 변화시키지 않고서, 분리하고자 하는 성분의 차이점인 tertiary alcohol 중 특히 5번 탄소에 -OH치환기가 있기 때문에 이에 대한 선택적 유도체합성도 필요할 것으로 생각되었다.

1.2 2-Propanol-물 용매계

β -ecdysone과 polypodine B 성분간의 분리를 위하여 유기 이동상으로써 methanol 과 acetonitrile을 조합시켜 분석하였다. acetonitrile-물 용매계를 이동상으로 이용한 경우, methanol-물 용매계 보다 ecdysterod들이 더 빨리 용출되었으며

peak의 대칭성이 보다 떨어졌으며 메탄올-물 용매계와 같이 이 두성분간의 분리는 이루어지지 않았다. 무기 이동상으로 물, ion-paired solution(PIC-A4, B5 및 B6) 및 인산완충액 등을 이용한 mobile phase에서도 β -ecdysone과 polypodine B간에는 분리가 불가능하였고, 이 때 PIC B5와 B6을 사용한 경우는 HPLC의 칼럼상에서 이온 쌍이 형성되어 용리시간은 3배정도 증가하며, peak의 대칭성이 매우 떨어졌다. 이 두 성분의 미분리는 본 실험상의 커다란 delemma를 제기하는데, 이는 peak의 responsity, 분자량과 분자구조, 생물활성도가 서로 비슷한 물질을 분리할 수 없는 장벽이 생긴다는 점이다. 즉 정확히 β -ecdysone과 polypodine B 성분의 합에 가까운 값만이 정성 및 정량이 되었다.

β -ecdysone과 polypodine B 양자간의 분리목적에 Francisco Camps 등(1990)은 적절한 이동상으로 2-propanol-물 용매계를 사용하였다. 이 이동상에서 두 성분간의 분리는 완전하였으나, 나머지 두 성분의 용출이 너무 길어지기 때문에 그들이 사용한 조건보다 극성의 세기를 보다 더 약하게하였고 유속은 좀더 높여 HPLC mobile phase II(Table 1)의 조건으로 설정하였다. 2-propanol-물 용매계에서의 ecdysterod 혼합표준용액은 Fig. 2의 (B)에서와 같이 완전한 분리가 이루어 졌고 β -ecdysone과 polypodine B 성분의 감도도 양호하였다. 그러나 α -ecdysone과 2-deoxy- β -ecdysone의 너무 늦게 용리되었고 상대적으로 감도는 뒤떨어졌다. 이를 개선하려고 isocratic을 변경시켜 gradient조건으로 2-propanol의 혼합비율을 시간별로 증가시켜 용리하였으나, 2-propanol비율이 증가함에 따라 base line이 예민하게 증가하였고 유속의 안정성이 떨어져서 gradient방식은 적용시킬 수 없었다. 또한 isocratic조건으로 1-propanol-물 용매계에서 HPLC에 시료를 도입한 경우, 비극성 물질들이 충분히 용리되지 않아 2~3회 분석 후 분석용 칼럼의 washing과정이 요구되어 분석시간이 길게 되어 실험조작에 번거로움이 수반되었다. 또한 HPLC 시스템의 안정화에 소요되는 시간도 metanol-물 용매계에 비하여 길기 때문에 β -ecdysone과 polypodine B를 분리할 목적이 아니면 2-propanol-물 용매계의 조건보다는 metanol-물 용매계로 사용하는 것이 용이한 것으로 생각된다. 은 제한적으로만 사용하였다.

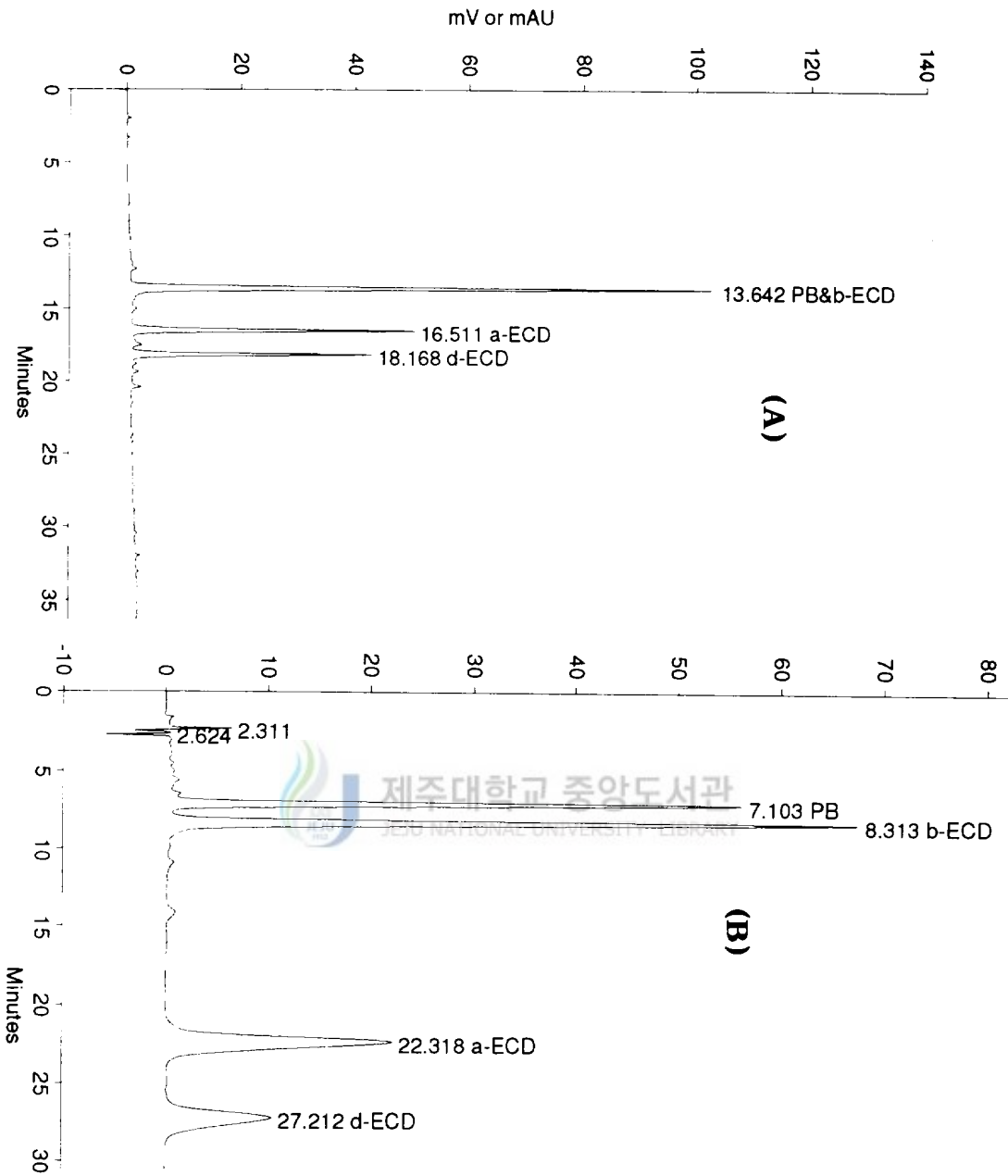


Fig. 2. The chromatograms of standard solution.

(A) Mobile phase : Methanol-Water (Gradient)

(B) Mobile phase : 2-Propanol-Water (Isocratic)

2. 재현성, 검량선 및 최소 검출량

2.1. 재현성

HPLC분석에서 중요한 것은 분석치의 재현성인 바, 이는 상대표준편차(relative standard deviation) 또는 變異係數(co-efficient of variation)로 나타내며

$$RSD(\%) = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N-1}}, \quad \bar{X} = N \text{개 측정치의 평균치}, \quad X_i = \text{개개의 측정치}$$

의 식이 이용된다. α -ecdysone, β -ecdysone, 및 2-deoxy- β -ecdysone의 methanol 혼합 표준용액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 결과는 Table 3에 나타낸 바와 같이 상대표준편차(RSD)가 모두 2.0%이내로서 재현성은 양호하였다. 미국약전(USP)에서는 각 조에 따로 규정이 없는 한 RSD에 대한 규정은 2.0% 또는 그 이하일 경우는 5회 주입한 chromatogram, 2.0%이상일 경우는 6회 주입한 chromatogram으로 부터 얻은 자료를 이용하도록 되어있다(USP XX II /NF, 1990). 따라서 본 실험에서의 기기 안정성 조건은 적절한 것으로 판단되었다.

Table 3. Reproducibility of peak area and height in the chromatogram of each ecdysteroid

ecdysteroids	response	mean ¹⁾	SD ²⁾	RSD(%) ³⁾
β -ecdysone	area	1759167	32800	1.8645
	height	121195	1093	0.9015
α -ecdysone	area	2044371	27811	1.3604
	height	144083	1950	1.3535
2-deoxy- β -ecdysone	area	1620815	20080	1.2389
	height	118245	969	0.8199

¹⁾ mean of 5 replicates, ²⁾ standard deviation, ³⁾ relative standard deviation

2.2. 검량선

α -ecdysone, β -ecdysone, 및 2-deoxy- β -ecdysone의 표준용액을 6점(point)에

대하여 농도 대비 peak area와 peak height에 대한 상관관계를 구한 결과는 Table 4와 같이 직선의 상관계수가 0.9985~1.0000의 범위로서 고도의 유의성이 있었다.

Table 4. Calibration curves for ecdysteroids

ecdysteroids	calibration curves	correlation coefficients
α -ecdysone	$Y=33733.6X + 77018.1$	0.9991***
β -ecdysone	$Y=33624.1X + 79606.5$	0.9992***
2-deoxy- β -ecdysone	$Y=32132.3X + 67671.4$	0.9990***
α -ecdysone	$Z=2306.7X + 7082.5$	0.9986***
β -ecdysone	$Z=2244.7X + 6918.8$	0.9985***
2-deoxy- β -ecdysone	$Z=2314.2X + 6274.2$	0.9985***
α -ecdysone	$Z=6.8440 \times 10^{-2}Y + 1779.2$	0.9999***
β -ecdysone	$Z=6.6793 \times 10^{-2}Y + 1560.0$	0.9999***
2-deoxy- β -ecdysone	$Z=7.2041 \times 10^{-2}Y + 1378.6$	1.0000***

X, Y and Z represent concentration, peak area and peak height, respectively.

*** high significant($\alpha=0.01$)

여기서 농도와 peak height간의 상관계수가 상대적으로 낮은 이유는 mobile phase의 profile을 linear gradient하였기 때문에, 시간의 경과에 따라 methanol비율이 증가하여 base line drift가 일어난 결과에 기인된다고 보인다. 이상의 결과에서 검토된 세가지 물질에 대하여 peak area나 peak height 어느 것으로도 정량이 가능한 것으로 나타났다. 이 세가지 성분들의 기울기와 절편이 모두 비슷하였는데 steroid 핵의 탄소 7번에 있는 1개의 이중결합과, 6번 탄소에 있는 carbonyl기에 의한 의하여 UV 243nm에서 공통 chromophore를 갖고 있어서, 기울기의 동질성에 의하여 이와 유사한 물질의 정량에도 다른 표준물질로 대략적인 정량이 가능할 것으로 보여진다.

2.3. 최소검출량

본 실험에 사용된 기기조건에서 chromatogram상의 peak area가 20,000(microvolt × sec)이 될 때는 표준물질의 확인에서 peak shoulding이 일어나도 구분할 수 있기 때문에, 실제 분석상의 최소 검출량으로 정할 수 있었다. 엄밀한 의미로는 chromatogram상의 noise가 400이므로 3배의 peak크기는 1,200이지만, 여기서는 실용적인 기준으로서 noise의 60배 이상을 최소검출량으로 간주하였다. 이 조건에서 peak area는 ecdysteroid에 따라 32,000~24,600에 해당되는 값으로 최소 검출량은 20ng 이하였다.

3. Boronic esterification에 의한 20, 22-diol 분석

20, 22-diol형태의 ecdysteroid화합물의 boronic ester를 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같았다. Fig. 3의 (A)는 1% PBA의 methanol용액만을 주입하여 얻은 결과로서 12.2분대와 30.3분대에 peak가 존재하여 GC-MS로 확인한 결과 phenyl boronic acid와 세 분자의 phenyl boronic acid에서 3개의 물분자가 탈수되어 형성된 trimer(cyclic boroxine anhydride)로 확인되었다. 산무수물인 이 trimer는 peak의 면적으로 계산한 결과 phenyl boronic acid의 26.4%정도로 계산되었다. 이 trimer는 PBA유도체로 생성된 물질보다는 극성이 크기 때문에 PBA유도체보다 여 약간 먼저 용출되었다. (B)는 PBA 처리전의 메탄올 혼합표준용액을 나타내었고, (C)는 표준용액을 PBA로 반응시킨 후의 크로마토그램으로 α -ecdysone을 제외한 β -ecdysone과 2-deoxy- β -ecdysone은 cyclic boronic ester형성함으로써 극성이 감소되어 retention time이 길어졌다. Fig. 4는 유도체 시약을 methyl boronic acid를 사용한 경우로서 조건은 Fig. 3의 과정과 동일한 방법으로 얻어낸 chromatogram이다. Fig. 4에서 (A)는 1% MBA의 메탄올 용액으로 UV 243nm에서 자외선을 흡수하는 물질이 없었다.

이 두가지 유도체과정을 통하여 ecdysteroid의 20, 22-diol위치에 있는 수산기의 극성을 감소시켜도 HPLC의 methanol-물을 이동상으로 할 때 β -ecdysone과 polypodine B간의 분리는 이루어지지 않았다.

20, 22위치의 탄소에 있는 hydroxy기와 결합하는 반응의 정도는 유기붕산의

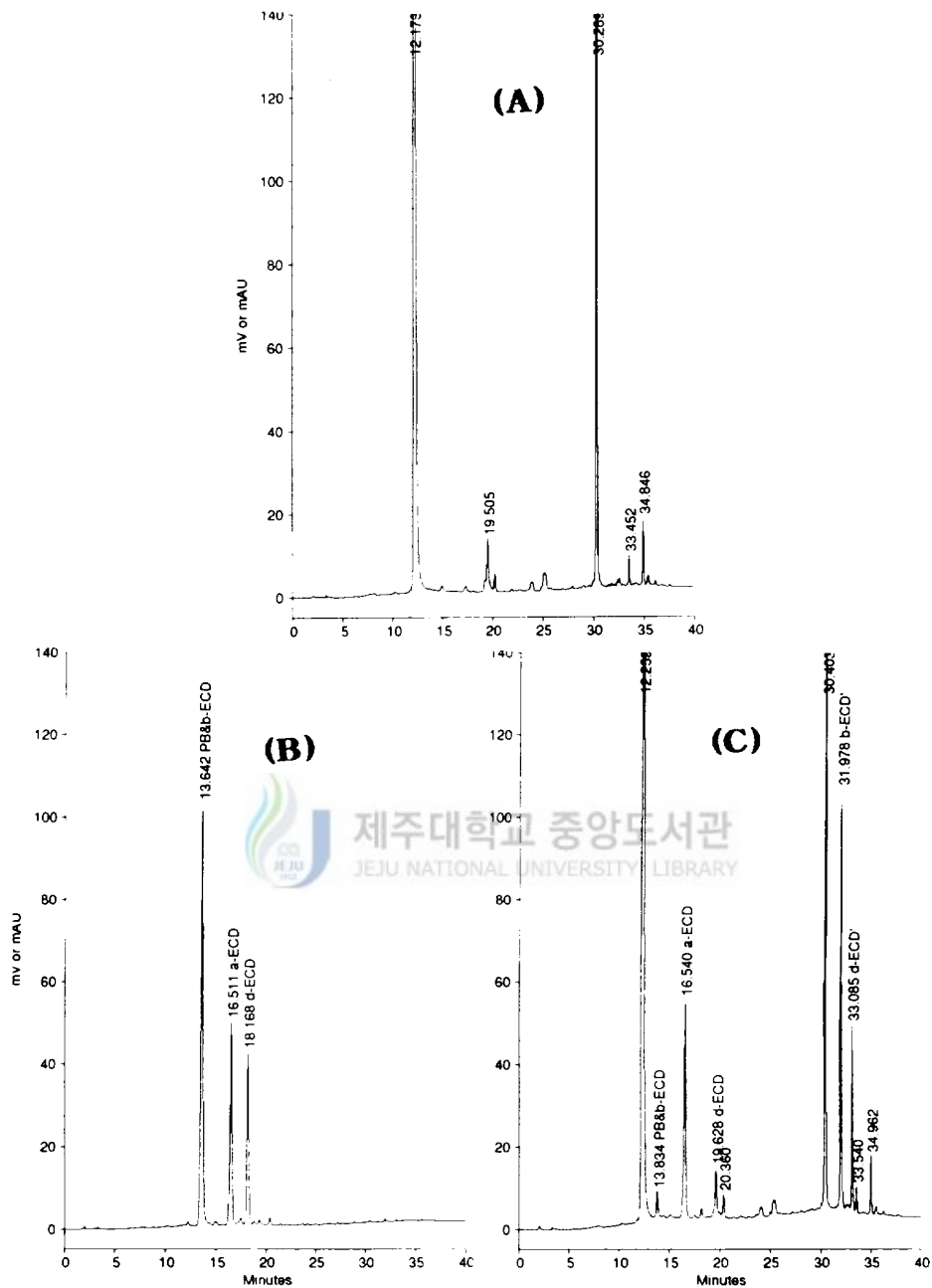


Fig. 3. The chromatograms of PBA derivatives of ecdysteroids.
(A) 1% PBA dissolved in methanol
(B) pre-reaction mixture, (C) post-reaction mixture

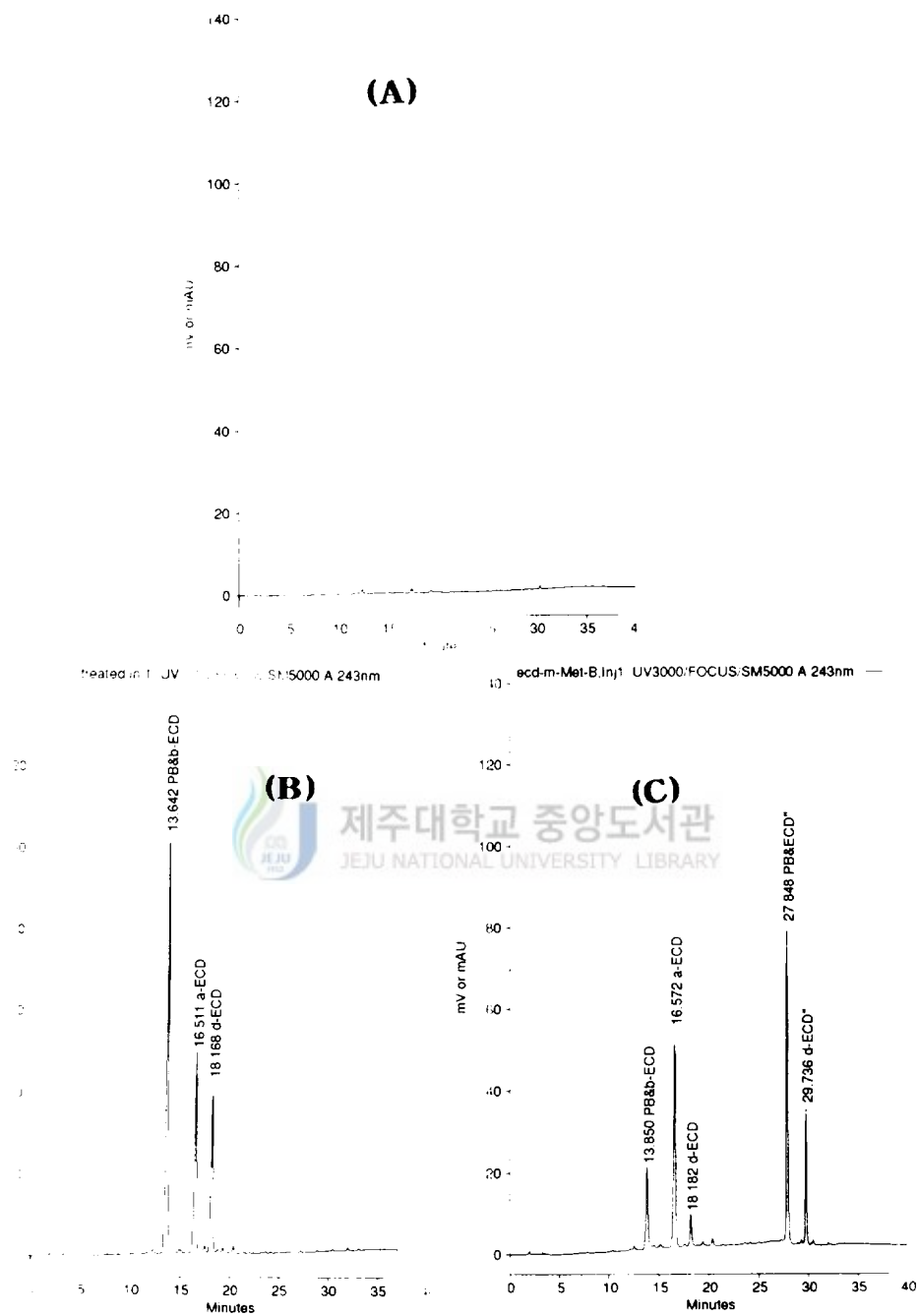


Fig. 4. The chromatograms of MBA derivatives of ecdysteroids.
(A) 1% MBA dissolved in methanol
(B) pre-reaction mixture, (C) post-reaction mixture

phenyl기, methyl기의 순서이며, 무기붕산에 대해서는 전혀 에스터 결합이 형성되지 않았다. 이는 20, 22-diol 상호간의 분자내의 거리가 25.2pm이어서 고리형의 붕산 에스터 결합이 이루어지며, 2,3-diol은 28.0pm이어서 고리형 유기붕산 에스터 결합이 이루어지지 않는다는 보고와 일치하였다(I. D. Wilson 등 1990).

3.1 에스테르화 반응 수율

20, 22-diol을 가진 ecdysteroid에 대한 ester반응수율은 Table 5와 같이 82.5~95.8%로 비교적 높았다. 반응수율의 크기는 PBA-derivatives, MBA-derivatives의 순서이며, 무기붕산은 반응이 일어나지 않았다. Boronic ester는 ecdysteroid의 20, 22위치의 탄소에 결합된 두 개의 -OH와 반응하여 생성되는 것으로서 20번 탄소에 -OH가 없는 α -ecdysone은 ester가 형성되지 않았다.

Table 5. Yield(%) of boronate in esterification of each ecdysteroid

ecdysteroids	PBA derivatives	MBA Derivatives
Polypodine B & β -ecdysone	95.8	82.5
α -ecdysone	0.0	0.0
2-deoxy- β -ecdysone	95.5	82.8

3.2. 검출감도

Ecdystroid 표준용액에 대하여 유도체를 형성시킨 검액을 HPLC에서 분석한 결과는 Table 6과 같이 PBA유도체는 MBA유도체에 비하여 peak의 면적이나 높이에 의한 감도는 높았지만 유도체를 시키지 않은 상태에 비하여 검출감도가 낮았다.

Boronic esterification에서 형성된 유도체 물질들은 가스크로마토그래피(GC)에서 분석이 가능한 다른 물질에 비하여 증기압이 상대적으로 낮고, 분자량도 크며, 극성의 정도가 큰 편(분자에 6~7개의 -OH보유)이어서 GC에 의해서는 분석할 수 없었다. 왜냐하면 boronation을 시켜도, 여전히 분자당 4~5개의 hydroxy group이 남기 때문이다. 따라서 GC에 주입하여 분석하기 위해서는 ecdysterid분자내에 있는 hydroxy group을 전부 유도체화하여 그 극성을 낮추어야 가능할 것으로 보여진다.

이 실험결과 반응률을 고려하여 시료중에 방해성분이 없는 영역에서 용출될 가능성이 있기 때문에, 간편한 분석에는 활용될수 있는 것으로 판단된다. 왜냐하면 분석성

분은 극성이어서, 극성조건으로 추출하였기 때문에 극성의 방해물질이 많은 것은 당연한 일이다. 그러나 -OH기의 숫자를 고려하면 붕소의 치환기를 수소로 할 경우 29~33%가량 극성 감소할 것이며, 붕소와 결합된 탄소가 큰 치환기일수록 유도체는 비

Table 6. Relative peak responses(%) of derivatives compared to mother compounds

ecdysteroids	PBA derivatives		MBA Derivatives	
	Area	Height	Area	Height
polypodine B & β -ecdysone	56.6	96.4	59.4	85.1
α -ecdysone	-	-	-	-
2-deoxy- β -ecdysone	69.2	103.9	62.7	89.9

극성으로 되기 때문에, 본 유도체를 실시함으로써 상대적으로 ecdysteroid의 극성도를 떨어뜨려, 시료중에 존재하는 방해성분과의 분리는 가능할 것이다.

시료중 방해성분들의 극성정도를 실험적으로 파악하여 유기붕산의 치환기를 적절히 변경함으로써, 방해성분들의 용리시간과 유도체의 성분들을 다르게 용리시킬 수 있을 것이다.

3.3. 첨가회수율

Wilson등(1990)의 방법으로 20, 22-diol형태의 ecdysteroid를 PBA고정상에 흡착시키는 경우 알칼리 buffer로 완전하게 이루어졌으며, 이에 대한 회수는 그의 방법을 적용시킬 수가 없었다. 그것은 용리액으로 사용한 25mM의 salicylic acid가 methanol-물 용매계의 이동상에서는 β -ecdysone의 피이크를 완전하게 masking하기 때문에, 이 성분의 정량이 곤란하였다. 따라서 적절하게 사용할 수 있는 회수용액을 찾아내는 데에는 가혹한 조건이 필요하였다. 왜냐하면 고정상으로서 PBA와 공유결합을 이루고 있는 diol화합물들의 화학결합은 거의 완전한 형태로 되어 있어서 메탄올, THF, propylene glycol 등과 3%수준의 lactic acid, acetic acid, 0.1N HCl 및 다른 pH 3.5이상인 용리액들을 서로간에 조합시켜도, 이 성분들의 회수는 불완전하여 회수율이 50%미만이였다. 또 한가지는 UV검출기의 250nm영역에서 흡수대를 지니지 않는 회수용액으로써 가급적 aromatic ring을 지니지 않아야 하는 것도 요구되었다. 따라서 benzene고리에 hydroxy group이 ortho, meta, para위치에 서로 결합된 물질 등도 모

두 실험에서 배제시켰다.

한편 산은 유기산에서 요구되는 것이 단순히 산의 세기에 의하여 회수가 지배되지 않기 때문에 hydroxy유기산이 유효할 것으로 보여졌다. 따라서 hydroxy 유기산 등으로 구성시킨 최적의 회수용액을 사용하여, 가급적 낮은 용질농도와 보다 높은 pH조건에서 유효적절히 용출시키는 일이 개선하여야 할 과제로 나타났다.

최선의 방식은 아니지만 inorganic boric acid와 lactic acid level을 증가시켜서 각각 200mM과 5%(w/v)로하여 methanol 70%(v/v)로 조제하여 회수용액으로 사용한 결과, pH는 무려 1.9-2.0정도가 되었다.

첨가 회수율 측정결과는 Table 7과 같으며, 회수용액의 크로마토그램은 Fig. 5와 같다. (A)는 회수율시험과 동일한 농도로 표준용액을 acidic buffer로 용액을 만든 것이고, (B)는 회수율 시험액을 카트리지에 넣어 최초 methanol 5ml만을 용출시킨 결과 α -ecdysone만이 용출된 결과를 보여주고 있으며, (C)는 계속하여 acidic buffer 5ml를 용출시킨 결과 20, 22위치에 diol구조를 가진 물질로서 β -ecdysone과 2-deoxy- β -ecdysone만이 용리된 결과를 보여주고 있다.

Table 7. Ecdysteroids recoveries of selected steps in the extraction and purification procedure by using PBA cartridge (%)

fraction	β -ecdysone	α -ecdysone	2-deoxy- β -ecdysone
loading effluent (2ml)	ND	2.80	ND
methanol eluent (5ml)	ND	99.97	ND
acidic buffer eluent (5ml)	93.84	ND	91.15
acidic buffer eluent (5+5ml)	6.03	ND	3.95
total recovery	99.87	102.77	95.10

본 회수율 시험한 자료를 이용하여 시료를 카트리지에 넣은 후 처음의 메탄올 용액 (5ml)과 그 다음 단계의 acidic buffer(5ml)만을 취한 경우에 α -ecdysone은 99.97%, β -ecdysone이 93.84% 그리고 2-deoxy- β -ecdysone의 경우는 91.15%의 회수율을 보이

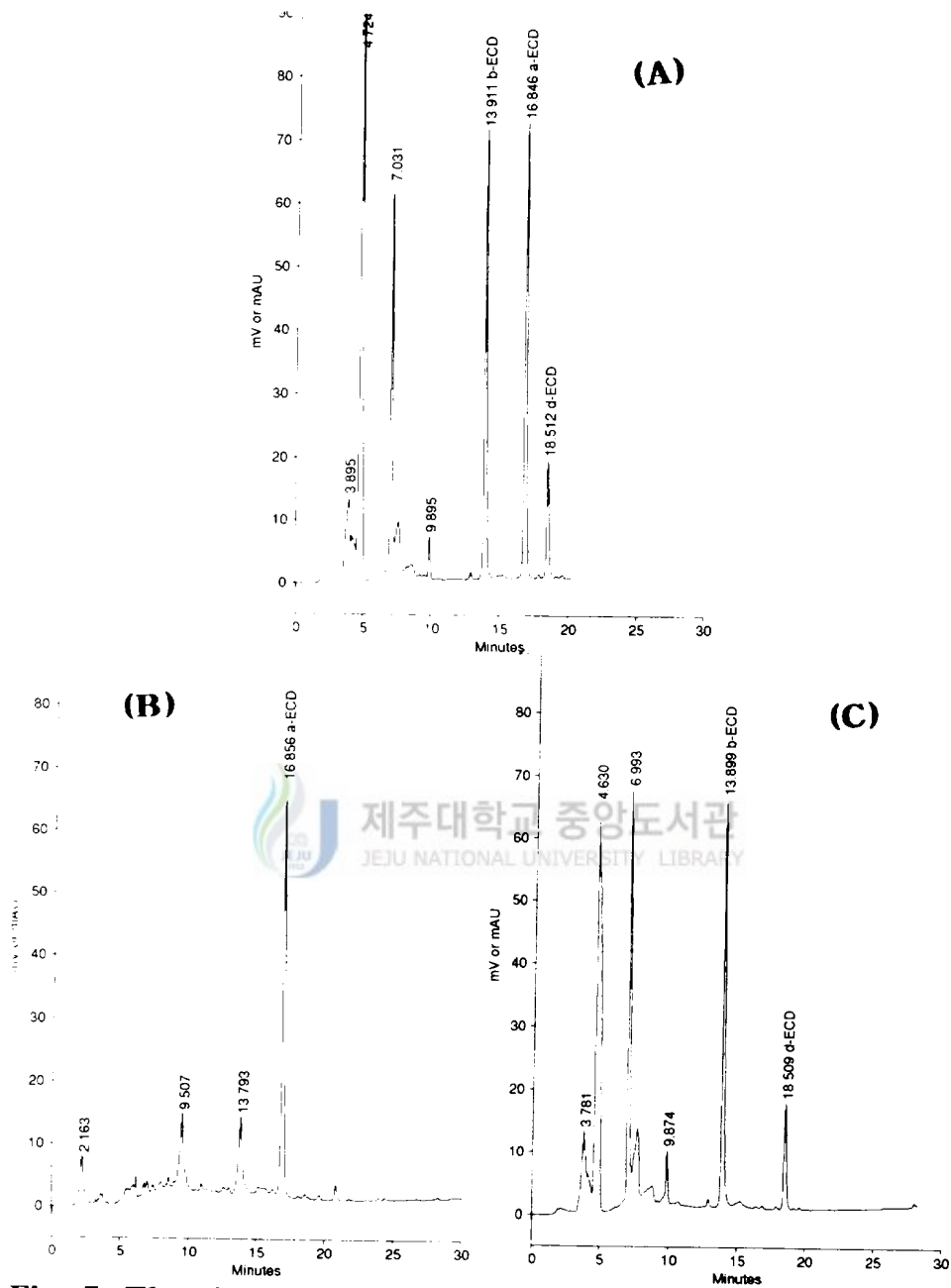


Fig. 5. The chromatograms of ecdysteroids in recovery test.
(A) Standard solution dissolved in acidic buffer
(B) Recovered in methanol fraction, (C) Recovered in acidic buffer fraction

고 있어, 시료를 분석할 때 정제과정에서 methanol 5ml 및 acidic buffer 5ml를 사용하여 ecdysteroid를 회수하고 시험용액으로 사용하였다.

이 회수율 시험을 통하여 ecdysteroid의 정제과정은 PBA고정상에서 매우 선택적 방법에 의하여 분리가 가능하기 때문에, HPLC를 이용한 천연물질 분석시 상존할 수 있는 방해물질의 영향을 받지 않았으며(특히 감귤 peel), 천연계 식물조직중의 고유의 함유량 범위에 따라 적절하게 맞추어서 카트리지에 넣는 시료의량을 증가시키든지 column chromatography를 실시함으로써, 사실상 최소검출한계를 상당히 극복할 수 있을 것으로 판단된다. 더군다나 diol구조를 가진 ecdysteroids에 대해서는, 고정상의 PBA와의 강한 결합을 이용하여 극성의 영역에서부터 비극성의 영역까지 세정용 용매를 자유자재로 사용하여도 분석물질의 손실이 없이 정제가 가능하다는 것을 보여주고 있다.

한편 개선할 과제는 elution solution의 pH를 완화시키는 방법을 찾아내는 일이며, HPLC 주입액으로서 액성의 변동으로 인하여 peak의 shape가 변화되는 것을 방지하는 일이다. 즉 메탄올에 용해한 혼합표준용액과 본 실험에서 사용한 acidic buffer로 만든 혼합표준용액의 주입 결과와 비교할 때, peak의 면적은 후자가 96.58%로 감소한 반면 peak의 높이는 129.30%가 오히려 증가하여 분리도와 검출감도는 오히려 증가하였다. 따라서 회수율 시험시는 표준액을 acidic buffer로 2단계 희석하여 액성이 동일한 조건하에 비교분석하여야 되었으며, 시료의 분석에서도 이를 감안하지 않을 경우에는 peak의 면적이 감소한 것을 고려하여 factor를 도입하여 평가하여야 한다고 사료된다.

또한 시료주입에 의한 column damage가 우려되었으나 주입량이 적은 관계로 문제는 야기되지 않았다. 고정상의 PBA는 탈착이 어떤 특수조건 이외에는 거의 이루어지지 않기 때문에 이 장점은 β -ecdysone분석시 막강한 정제수단으로써 의심의 여지가 없는 것 같았다.

4. 식물체중의 ecdysteroids 함량

4.1. 20, 22-diol ecdysteroid 화합물에 대한 선택성

우슬시료를 추출하여 MBA유도체를 형성시킨 chromatogram은 Fig. 6, 7과 같다. Fig. 6의 (A)는 우슬줄기의 추출액을 다른 정제과정없이 methanol-물 용매계에서 분

석한 결과이고, (B)는 (A)의 성분을 농도의 변화가 없게하여 methyl boronic ester를 형성시킨 것이다. 그런데 성분을 유도체시킨 결과 peak가 27.4분과 27.7분에서 분리도는 나쁘지만 앞서의 13.5분대의 peak가 단일성분이 아니라는 것을 암시하고 있다. 더욱이 이 성분은 20, 22위치에 -OH기를 지닌 ecdysone계열이란 것도 시사하고 있다. Fig. 7은 우슬추출액을 HPLC의 두가지 조건을 연속하여 분석한 결과를 보여주고 있다. (A)는 methanol-물 용매계 조건이고, (B)는 2-propanol-물용매계 조건으로 분석한 것인데, 이는 chromatogram (A)에서 13.5분대의 peak가 단일성분이 아니라는 Fig. 6의 암시된 내용을 구체적으로 구분지워주고 있다. 그리고 메탄올 이동상에서 분리가 불가능했던 polypodine B와 β -ecdysone 이 분리되어 나왔으며, 이 이외의 2종의 ecdysone이 더 포함되어 있는 것을 알 수 있다.

우슬시료에서는 β -ecdysone이외에도 20, 22위치에 -OH를 가진 ecdysone이 Polypodine B를 제외시켜도 2종류 더 있는 것으로 확인되었고 그 양은 responsivity가 동일하다는 가정하에, 함유비율이 β -ecdysone을 1로 하였을 때, 각각 0.24, 0.30 정도의 비율로 검출되었다. polypodine B는 산성완충액의 용출액을 HPLC 2-propanol-물 용매계로 하여 β -ecdysone에 혼재된 성분을 분리하였는데, 그 양은 상대적으로 상당히 근소하였다. 만일에 분리가 어려워 동일한 성분으로 이들을 인지할 경우는 정량 결과는 존재하는 량의 160%정도로 측정될 것이다.

본 연구에서 ecdysone의 분석법이 확립되었으며, 이를 적용하여 천연식물체 시료에 적용시켜 보았다. 그 결과는 상당히 선택성이 우수하였고, diol형태의 ecdysone의 경우는 표준물질이 없어도 존재여부의 예측이 가능하였다. 미역고사리 시료를 이용하여 본 실험법의 전과정을 수행한 분석에서 chromatogram을 Fig. 8에 나타내었다. (A)는 시험용액을 PBA-catridge에 넣은 후 메탄올 5ml를 용리시킨 결과인데, 만일 α -ecdysone이 존재한다면 여기서 용리될 것이다. (B)는 acidic buffer 5ml로 계속하여 용출시킨 결과를 보여준다. 여기서는 ester 결합이 형성되었던 성분만이 용출될 것이다. (C)는 산성완충액으로 용리시킨액에 다시 PBA용액을 처리하여 ester 결합을 시켜서 재확인하여 본 것이다. 이 때는 액성이 강한 산성이어서 PBA유도체 형성은 약 70%정도만 이루어 졌으며, MBA유도체는 전혀 형성되지 않았는데, 이는 pH의 영향이 boronic cyclic ester결합에 상당한 작용을 하고 있는 것으로 보여졌다. 더구나 붕산의 수소대신 치환기의 형태가 반응성에 상당한 영향을 미치고 있는 것으로 나타났으며, 반응성의 정도는 치환기의 탄소수에 어느 정도까지는 비례하는 것으로 보여진다.

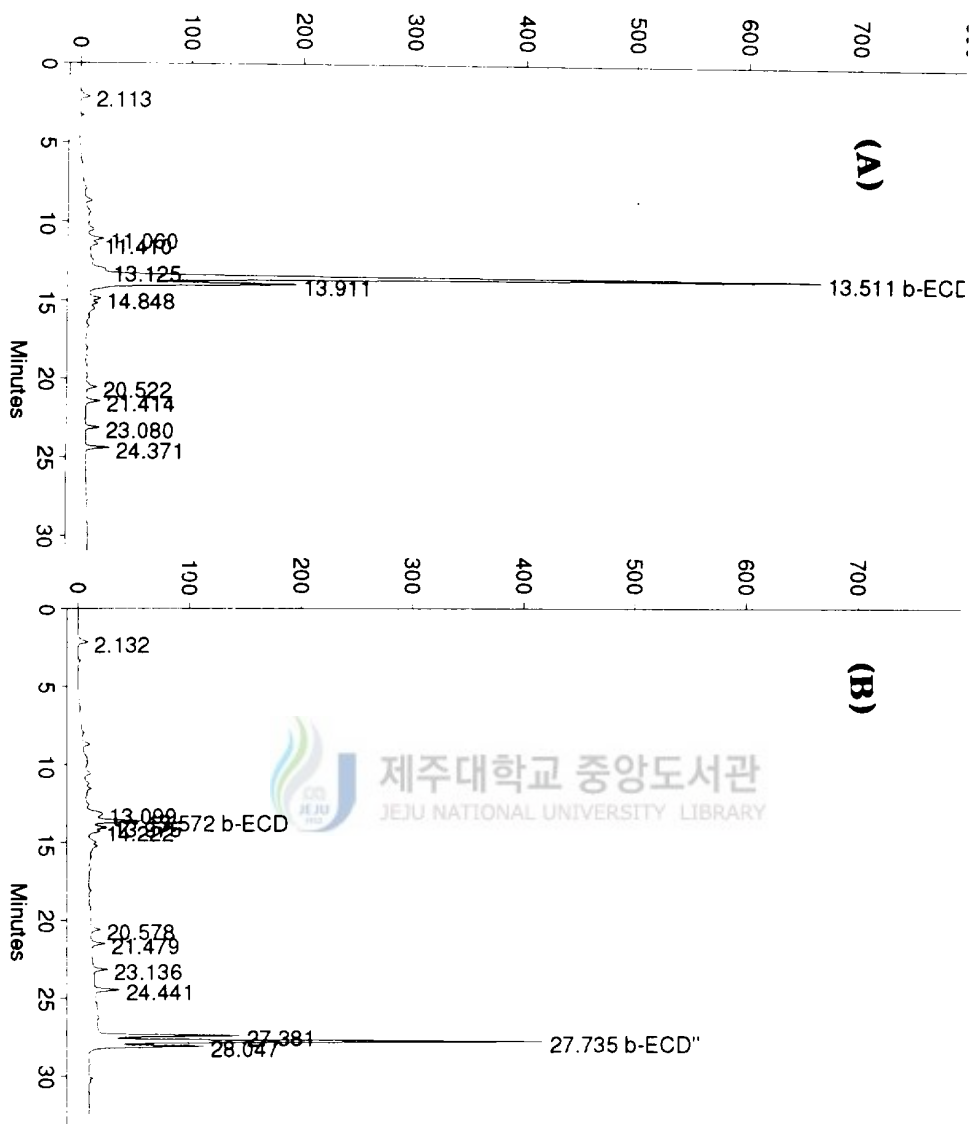


Fig. 6. The chromatograms of the extract and its MBA derivatives from stems of *Achyranthes japonica* Nakai.

(A) Extracts

(B) MBA derivatives

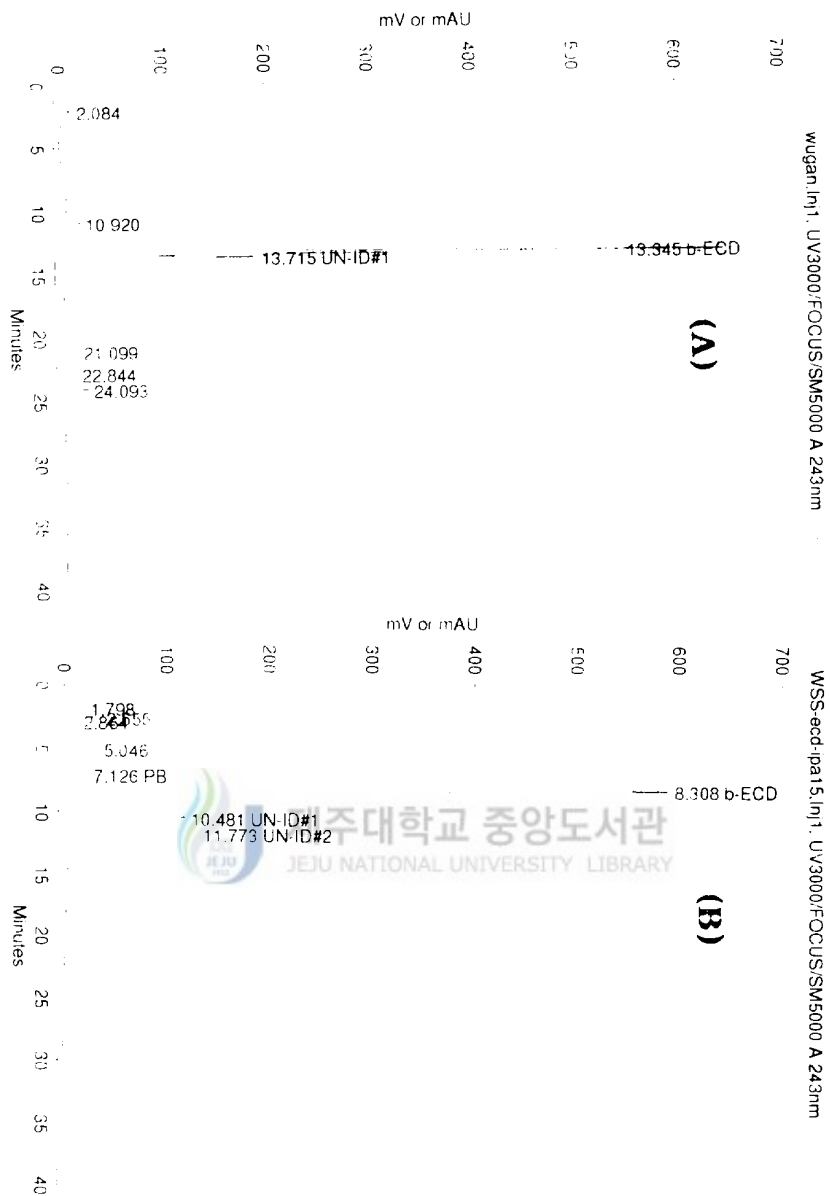


Fig. 7. The chromatograms of the extracts from stems of *Achyranthes japonica* Nakai .

(A) Mobile phase : Methanol-Water (Gradient)

(B) Mobile phase : 2-Propanol-Water (Isocratic)

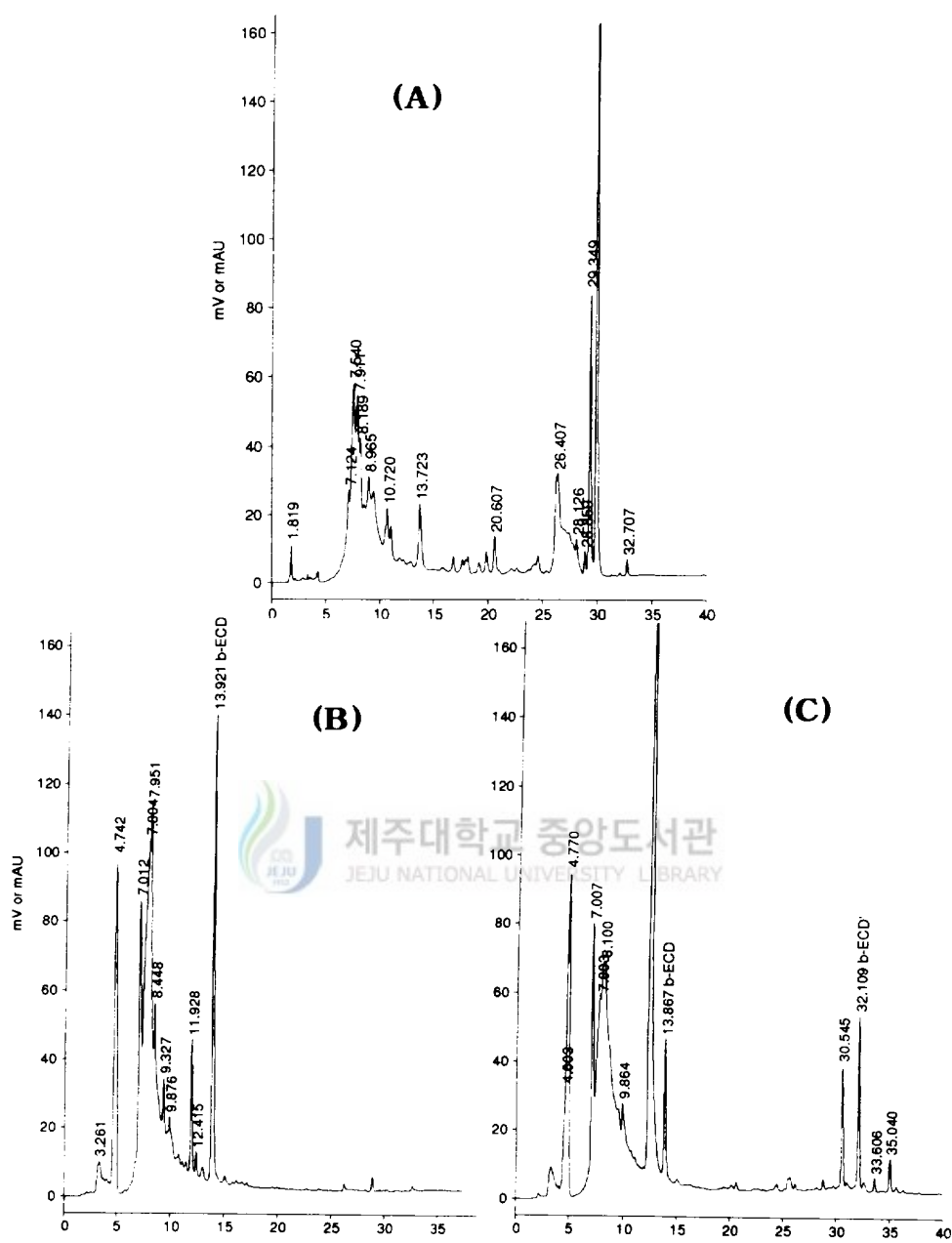


Fig. 8. The chromatograms of the fraction recovered from each step in the purification procedure of extract from rhizome of *Polypodium vulgare* L.
(A) recovered in methanol 5ml
(B) recovered in acidic buffer 5ml, (C) PBA derivatives

4.2. β -Ecdysone

시료중의 β -Ecdysone은 나사미역고사리, 울릉도고사리, 우슬, 시금치 중에서만 검출되었으며, β -ecdysone은 건조물 기준으로서 0.03-0.19% 정도의 분포를 보였다.

*Polypodium vulgare*의 rhizome에서 β -ecdysone함량이 1-2%정도로 보고되었다.(D. Sardiny 등,1974) 본 실험에서의 분석결과와 이들의 보고와는 100배 정도의 차이가 있는데 이는 산지와 계절별로 함유요인의 변화가 있을 수도 있지만 D. Sardiny 등의 실험법에서는 매우 선택적인 정제과정이 없으므로 시료중의 성분 분석시에 불순물이 어느정도 혼재된 상태하에서 실제 값보다는 높게 평가된 것으로 보여진다.

본 실험결과는 Francisco Camp등(1990)이 *Polypodium vulgare*의 rhizome에서 β -ecdysone 함량이 0.04~0.4%라고 보고한 범위내에 분포하는 것으로 파악되어 적절한 분석이 이루어 졌다고 보여진다. 한편 계절별 요인과 지역별 분포비를 파악하기 위해서는 더 많은 표본공간하에서 수행되어야 할 것으로 보여진다. 회수율이 고려되지 않은 측정결과는 Table 8과 같다.

4.3. Polypodine B

분석시료중 에서의 Polypodine B는 β -ecdysone이 검출되었던 시료중에서만 존재 하였으며 그 분포량은 β -ecdysone에 비하여 약 1/10정도로 조사되었다. *Polypodium vulgare*의 rhizome에서 Francisco Camp등(1990)은 polypodine B의 경우 건조물을 기준으로할 때 0.03-0.1%범위에서 분포한다고 보고되었는 데 여기서는 0.02%수준이어서 보다 낮은 값으로 조사되었다. 이는 다른 요인이 충분히 있겠지만, Francisco Camp 등이 사용한 액상분배의 정제과정보다 상당히 선택성이 우수한 방법에 의하여 분석한 결과라고 보여진다. Polypodine B의 분석결과는 Table 9와 같다.

Table 8. Levels of β -ecdysone contents in plant species

Plant	Content	Fresh weight base(% $\times 10^2$)	Dry weight base(% $\times 10^2$)
Rhizome of <i>Polypodium fauriei</i> L.		3.25	18.173
Rhizome of <i>Polypodium vulgare</i> L.		4.78	19.32
<i>Achyranthes japonica</i> Nakai	stem	3.11	7.63
	root	1.50	4.300
leaves of <i>Spinacia oleracea</i> L.		0.33	2.89
peel of <i>Citrus unshia</i> Markovich		ND	ND
leaves of <i>Liriope platyphyllae</i> Wang et Tang		ND	ND
block roots of <i>Solanum tuberosum</i> L.		ND	ND
leaves of <i>Lactuca sativa</i> L.		ND	ND
leaves of <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L.		ND	ND
leaves of <i>Allium tuberosom</i> Roth		ND	ND
leaves of <i>Eriobotrya japonica</i> L.		ND	ND
leaves of <i>Taxus cupidata</i> S. et Z.		ND	ND
leaves of <i>Chrysanthemum morifolium</i> Romat		ND	ND
leaves of <i>Amaranthus mangostanus</i> L.		ND	ND

* ND : not detected

4.4. α -Ecdysone 및 2-deoxy- β -ecdysone

α -Ecdysone과 2-deoxy- β -ecdysone은 분석한 14종의 식물체중에서 검출되지 않았다. 특히 α -ecdysone은 *Polypodium vulgare* L.의 rhizome에서 Francisco Camp등 (1990)의 보고에 따르면 검출한계(0.009%) 미만~0.13%정도의 분포를 보인다고 하였

는 데 20, 22-diol 형태가 아닌 관계로 좀더 분석시료의 량을 증가시키든지 또는 액상 분배계를 병용하여 분석하는 등의 보완적인 방법이 필요할 것으로 보여진다.

Table 9. Levels of polypodine B contents in plant species

Plant	Content	Fresh weight base(% $\times 10^2$)	Dry weight base(% $\times 10^2$)
Rhizome of <i>Polypodium fauriei</i> L.		0.40	2.26
Rhizome of <i>Polypodium vulgare</i> L.		0.46	1.88
<i>Achyranthes japonica</i> Nakai	stem	0.11	0.26
	root	0.03	0.10
leaves of <i>Spinacia oleracea</i> L.		0.20	1.80
peel of <i>Citrus unshia</i> Markovich		ND	ND
leaves of <i>Liriope platyphyllae</i> Wang et Tang		ND	ND
block roots of <i>Solanum tuberosum</i> L.		ND	ND
leaves of <i>Lactuca sativa</i> L.		ND	ND
leaves of <i>Brassica oleracea</i> var. capitata L.		ND	ND
leaves of <i>Allium tuberosom</i> Roth		ND	ND
leaves of <i>Eriobotrya japonica</i> L.		ND	ND
leaves of <i>Taxus cupidata</i> S. et Z.		ND	ND
leaves of <i>Chrysanthemum morifolium</i> Romat		ND	ND
leaves of <i>Amaranthus mangostanus</i> L.		ND	ND

* ND : not detected

IV. 요약

HPLC에 의한 α -ecdysone, β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone 및 polypodine B의 분리정량 조건을 확립하고, 나사미역고사리를 비롯한 14종 식물에 있어서 이들의 함량을 조사하였다.

1. HPLC의 이동상으로서 메탄올-물 용매계를 gradient로 사용했을 때 β -ecdysone과 polypodine B는 α -ecdysone 및 2-deoxy- β -ecdysone으로부터 분리용출되었으나, β -ecdysone과 polypodine B 양자는 함께 용출되었다.

2. β -Ecdysone과 polypodine B는 HPLC의 이동상으로서 2-propanol-물 용매계를 isocratic으로 사용했을 때 상호 분리되었다.

3. Phenylboronic acid cartridge를 이용하여 20,22-diol계 ecdysteroid를 정제했을 때 β -ecdysone, 2-deoxy- β -ecdysone 및 polypodine B는 α -ecdysone과 다른 방해물질들로부터 구분되어 정제되었다.

4. 조사된 14종 식물중 나사미역고사리, 미역고사리, 우슬, 시금치 등 4가지에서 β -ecdysone 과 polypodine B가 검출되었다.

5. β -Ecdysone 함량은 나사미역고사리와 미역고사리의 rhizome 생체중 각각 0.0325%와 0.0478% 였고, 우슬의 줄기와 뿌리는 각각 0.0311%와 0.0150% 였고, 시금치의 잎에서는 0.0033% 였다.

6. Polypodine B의 함량은 나사미역고사리와 미역고사리의 rhizome 생체중 각각 0.0040% 와 0.0046 % 였다. 우슬의 줄기와 뿌리 생체중 각각 0.0011% 와 0.0003% 였다. 시금치의 잎 생체중 에서는 0.0020% 였다.

V. 참고문헌

Fallon, A., R.F.G. Booth, L.D. Bell(1994), "Application of HPLC in Biochemistry(Vol.17)". Elsevier, pp243-259.

Grebenok, R.J. Sudha Venkatachari, John H. Alder (1994) "Biosynthesis of Ecdysone Phosphates in Spinach" Phytochemistry, Vol. 36, No. 6, pp1399-1408

金桐局(1986), "HPLC에 의한 醫藥品의 分析", (株) 藥業新聞出版局, pp10-18, pp41-117

Modin, R.F., P. A. Alfred, F. Tjerneld(1994) "Utilization of temperature-induced phase separation for the purification of ecdysone and 20-hydroxyecdysone from spinach" J. Chromatography pp229-236.

Morgan,E.D., Mandava N.B. ed.(1987), CRC Handbook of Natural Pesticides Vol.III Insect Growth Regulators Part A, CRC Press, pp15-40.

Susan Budavari ed.(1989), "THE MERCK INDEX -An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals" 11th ed., Pub., MERCK & CO., Inc., 547

The United States Pharmacopeial Convention, Inc.(1990), "The United States Pharmacopeia /The National Formulary" USP XXII/NF XVII, pp1557-1568

Wilson, I.D., E.D. Morgan, S.J. Murphy, (1993) "Boronic Esters as Derivatives for Supercritical Fluid Chromatography of Ecdysteroids" J. Chromatography 639, pp281-285.

Wilson, I.D., E.D. Morgan, S.J. Murphy, (1990), "Sample Preparation for the Chromatographic Determination of Ecdysteroids Using Solid-Phase Extraction Methods" Analytica Chimica Acta. 236, Elsevier Science Publisher B.V., pp1545-1565

감사의 글

학업의 길로 인도하여 주시고 본 논문이 완성되기까지 시종 성심껏 지도하여 주신 류기중 교수님께 진심으로 감사드립니다.

그리고 바쁘신 가운데서도 본 논문을 자상하게 교열하여 주신 유장걸 교수님, 현해남 교수님, 아울러 항상 지도와 충고를 하여주신 강순선 교수님, 고정삼 교수님, 김찬식 교수님, 이옥영 박사님 그리고 자연과학대학 화학과 이선주 교수님께 깊은 감사드립니다.

또한 학업을 마칠 수 있도록 지원하여 주신 제주도보건환경연구원 고용구 원장님을 비롯한 모든 직원들과, 동고동락하는 마음으로 실험을 같이하였던 유기화학실험실 진성범, 채현병, 부경환, 이도승 후배들에게도 이 지면을 통하여 감사드립니다.

끝으로 어려운 여건속에서도 사랑과 염려로 보살펴 주신 부모님과 지성으로 내조해 준 아내에게 이 작은 논문을 드립니다.

