

숙지황, 건지황 및 생지황 중 숙지황의 특이성분 검색

홍선표 · 김용철 · 김경호* · 박정일 · 박만기[†]

서울대학교 약학대학

*강원대학교 약학대학

(1993. 12. 2. 접수)

Characteristic Component of *Rehmanniae Radix Preparata* Compared to *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Crudus*

Sun Pyo Hong, Young Chul Kim, Kyeong Ho Kim*, Jeong Hill Park, Man Ki Park[†]

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

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

(Received Dec. 2, 1993)

요약: 생지황을 구증구폭하여 제조한 숙지황은 품질관리를 위한 지표물질이 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 생지황, 건지황과 숙지황을 methanol로 추출하고 ether, butanol, 수층으로 용매 분획하고 각 분획별로 TLC로 성분분석한 결과 ether층에서 숙지황의 특이성분이 나타났고, ether층을 증발농축하고 chloroform/methanol을 이동상으로 한 silica gel column으로 분리하고 다시 chloroform/methanol/물(7:1:1)의 preparative TLC로 단리하여 이 성분이 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde(5-HMF)임이 규명되었다. 5-HMF는 생지황과 건지황에서는 숙지황에 비해 극히 미량이 존재하였다.

Abstract: *Rehmanniae Radix Preparata* is manufactured with *Rehmanniae Radix* according to KP V. For quality control of *Rehmanniae Radix Preparata*, its standard component is required. The methanol extracts of *Rehmanniae Radix crudus*, *Rehmanniae Radix*, *Rehmanniae Radix preparata* were divided into the three groups of ether, butanol and aqueous fraction by liquid-liquid separation. In the comparative TLC of ether fraction, the characteristic component of *Rehmanniae Radix preparata* was found. The ether fraction was evaporated and separated on the silica gel column with chloroform-methanol and further separated on the preparative silica gel TLC with chloroform-methanol-water. The component was elucidated as 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde(5-HMF). 5-HMF was not found in *Rehmanniae Radix crudus* and found in *Rehmanniae radix* in much less quantities than *Rehmanniae Radix Preparata*.

Key words: *Rehmanniae Radix preparata*, 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde

1. 서론

한방에서는 같은 생약일지라도 가공처리를 달리하여 한방임상에 적용하는 경우가 있다. 이때 함유 성분이 변화되어 약효를 달리한다고 예상할 수 있다. 불면

증의 치료에 사용되는 산조인(*Zizypus jujuba* Miller : Rhamnaceae)의 경우 볶아서 사용하면 주성분인 Sanjoinine-A(Franguloline)가 열처리에 의해 이성체인 Sanjoinine-Ah1로 변화되어 그 진정효과가 더 증가됨이 밝혀졌다.¹

한방에서 변용생약 중의 하나인 지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz var *purpurea* Makino 또는 *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis* chao et Schin의 뿌리)은 근엽과 잔뿌리를 제거하고 흙을 깨끗이 씻은 것을 생지황 또는 선지황(*Rehmanniae Radix Crudus*), 생지황을 말린 것을 건지황(*Rehmanniae Radix*), 생지황을 황주 또는 백주에 넣고 구증구폭한 것을 숙지황이라고 분류하고, 각각 약리를 달리하여 사용하고 있다.²⁻⁴

지황의 성분으로는 phytosterol류, 당류, 아미노산, iridoid glycosides, inorganic elements, chryseoriol, luteoline 등이 보고되어 있고⁵⁻⁸, Oshio Haruji 등⁹은 iridoid glycoside인 Rehmannioside A, B, C, D를 단리, 구조를 규명하고, 그 중 Rehmannioside D가 당뇨병 자연발증 쥐에 대해 약한 혈당강하작용을 나타낸다고 보고하였고 또한 생지황, 건지황, 숙지황 및 지상부 중의 iridoid glycoside인 leonuride, aucubin, monomellitioside, catapol, dihydrocatapol 및 rehmannioside A, B, C, D를 gas chromatography로 분석하여, 가공에 의해 triglycoside인 rehamannioside D는 거의 분해되지 않고 diglycoside인 mellitioside, rehamannioside A, B는 1/3 가량 분해되고, monoglycoside인 leonuride, aucubin과 catapol은 거의 대부분 분해한다고 하였다.¹⁰ Z. Liu¹¹는 생지황과 숙지황 중의 monosaccharide가 각각 1.64g/10g, 5.16g/10g으로 가공에 의해 숙지황 중 monosaccharide가 증가한다고 보고하였다.

숙지황의 품질관리를 위한 지표물질을 찾기 위하여 지황의 가공에 따른 성분상의 변화를 검색하고 숙지황 중의 특이성분을 단리하여 그 구조를 규명하였다.

2. 실험

2. 1. 시약

생지황, 건지황, 숙지황은 전북 전주 소재 한의원에서 직접 가공한 것을 제공받았고 생지황은 -20°C 로

보관하여 사용하였다. 컬럼용 실리카겔은 Kieselgel 60(70-230 mesh ASTM, Merck Art. 7734), 분취용 TLC plate는 Kieselgel 60 GF₂₅₄(Merck Art. 5715)를 사용하였으며 발색은 UV 254nm, 10% H₂SO₄ 용액 및 2,4-Dinitrophenyl hydrazine 시약을 사용하였다. 생약을 추출할 때는 공업용을 규정에 따라 정제하여 사용하였고 그외 모든 시약은 1급(EP)을 사용하였다.

2. 2. 기기

NMR은 Bruker WP 80 SY Spectrometer, 질량분석기는 Shimadzu QP-1000 GC/MS system, IR은 Perkin Elmer 1710 FT-IR, UV는 Pye Unicam SO 1750 UV spectrophotometer, HPLC는 Bio-Rad Model 1330 pump, ERC-8710 UV variable detector 와 Pye Unicam PU 4810 Computing Integrator를 사용하였다.

2. 3. 생지황, 건지황, 숙지황의 성분 비교

2. 3. 1. 추출 및 용매분획

생지황, 건지황, 숙지황 각각 300g을 조말로 하여 메탄올 1L를 가하고, 5시간씩 3회 가열 추출한 뒤 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이를 물에 분산시키고, ether로 3회 추출하고 감압 농축하여 ether 분획을 얻었다. 다시 n-butanol로 3회 추출하여 n-butanol 분획을 얻고 나머지를 수층으로 하였다.

2. 3. 2. TLC pattern 비교 분석

생지황, 건지황, 숙지황의 메탄올 추출액, ether 분획, n-butanol 분획을 각각 CHCl₃-MeOH(20:1)을 전개용매로 TLC를 실시하고 UV lamp, 10% H₂SO₄로 발색시켜 spot의 차이를 조사하였다. R_f=0.37의 spot(Spot I)가 숙지황에서만 강하게 나타났다.

2. 4. Spot I의 분리

숙지황 1kg을 조말로 하여 메탄올 1.5L로 3회에 걸쳐 가열 추출한 여액을 합하여 감압 농축하고 물에 분산시키고 ether로 3회 추출하고 감압 농축하여 ether 분획 5.3g을 얻었다. 이 ether 분획 5.3g을 대상으로 flash silica column chromatography를 행하였다. 용매는 CHCl₃-MeOH 60:1로부터 시작하여 50:1, 40:1, 20:1, 10:1로 순차적으로 용출시키고, TLC test 후 R_f=0.37의 spot가 나타나는 fraction만 모아서 pre-

parative TLC(CHCl₃-MeOH=20:1)를 실시하여 Rf=0.37 band 370mg을 분리하였다.

Mass [EI, m/z] (Rel. Int%) : 126(M⁺, 100), 109 (34.6), 97(45.6), 95(4.0), 69(56.2) ; ¹H-NMR (80MHz, CDCl₃, ppm) : 2.28(1H, s), 4.71(2H, s), 6.49, 6.54(1H, d), 7.19, 7.23(1H, d), 9.59(1H, s) ; ¹³C-NMR(20MHz, CDCl₃, ppm) : 57.45(6-C), 109.86(4-C), 122.74(3-C), 152.30(5-C), 160.87(2-C), 177.65(1-C) ; UV(MeOH) λ_{max} 276.8 ; IR ν_{max}(KBr, cm⁻¹) : 3400, 2940, 2860, 1750, 1520, 1400, 1200, 1030.

2. 5. Spot I의 함량

생지황, 건지황, 속지황을 조말로 하고 약 5g씩 정밀히 평취하고 80% MeOH 50ml를 가하여 50℃에서 2시간 추출 여과하였다. 잔사에 대하여 같은 조작을 2번 반복한 여액을 모아서 감압 농축한 다음 물을 가하여 정확히 50ml로 하였다. 이 중 20ml를 취하여 색이 없어질 때까지 분액깔때기에서 n-hexane 20ml씩으로 세척하였다. 수층을 ethylacetate 20ml씩으로 5회 추출하고 추출액을 합하여 감압 건조한 후 메탄올에 용해

하여 정확히 20ml로 하고 0.45μm 멤브레인 필터로 여과한 액을 HPLC용 검액으로 하였다. 컬럼은 Shimpak ODS(10μm, 4.6mm i.d.×15cm)를 사용하였고 이동상은 물:CH₃CN=95:5를 용리시키고 검출은 UV 280nm를 사용하였다.(Fig. 1).

3. 결과 및 고찰

3. 1. Spot I의 구조

메탄올 추출액과 ether 분획에서 속지황에서만 나타나는 Rf=0.37의 spot는 2,4-Dinitrophenylhydrazine과 반응하여 hydrazone을 형성하면서 담황색으로 발색되는 것으로 보아 aldehyde의 존재를 추정하였고, IR spectrum에서 1750cm⁻¹의 band와 ¹H-NMR에서 9.59ppm의 singlet peak가 aldehyde의 존재를 뒷받침해 주었다. Ether 분획 소량을 취해 건조한 후 pyridine을 용매로 하여 무수초산과 반응시켰더니 목적 성분의 polarity가 낮아져 TLC상에서 R_f치가 높아졌다. 이와 같이 acylation되는 것으로 보아서 OH기가 있음을 알 수 있었다. IR spectrum에서 3400cm⁻¹의 O-H

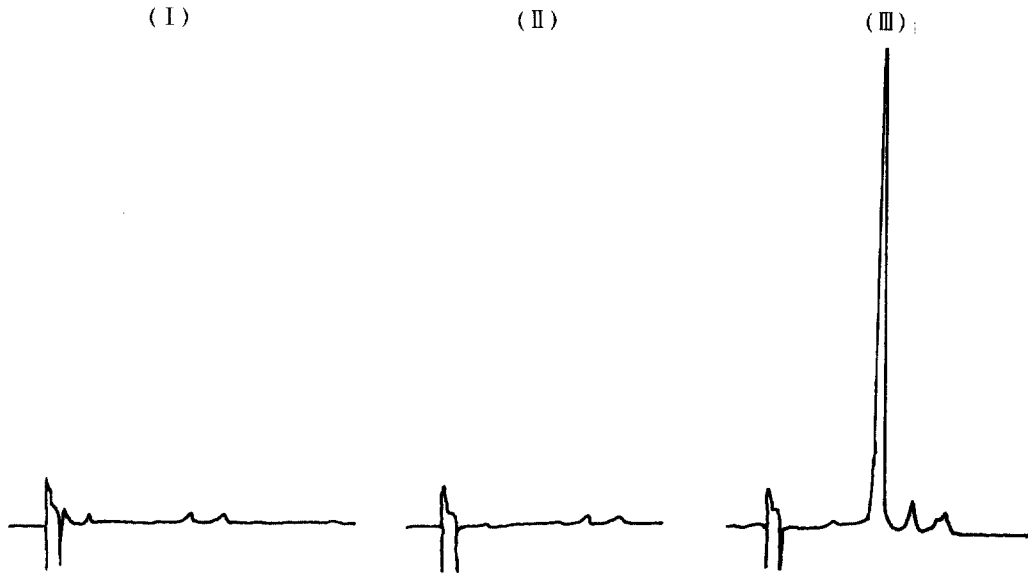


Fig. 1. Chromatogram of the crude drugs prepared from Rehmannia glutinosa

- I : Rehmanniae Radix Crudus
- II : Rehmanniae Radix
- III : Rehmanniae Radix Preparata

Table 1. Content of 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde in crude drug prepared from *Rehmannia glutinosa*.

	Content of 5-HMF* (mg/g)	Relative Content** (%)
<i>Rehmanniae Radix Crudus</i>	0.000195	0.0148
<i>Rehmanniae Radix</i>	0.000204	0.0155
<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	1.318	100

*5-HMF : 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde

$$\text{** Relative Content} = \frac{\text{Content of 5-HMF in R. Radix Crudus or R. Radix}}{\text{Content of 5-HMF in R. Radix Preparata}} \times 100$$

stretching vibration band의 존재를 확인했고, $^1\text{H-NMR}$ 에서 D_2O 처리를 한 후 2.28ppm의 peak가 소실한 것으로 $-\text{OH}$ 기의 존재를 확인할 수 있었다. Mass spectrum에서 m/e 95($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$), m/e 97($\text{M}^+ - \text{CHO}$), n/e 109($\text{M}^+ - \text{OH}$)의 fragment peak들이 이 group들의 존재를 증명해 주었다. IR에서 vinyl ether에 의한 1520, 1400, 1200 및 1303cm^{-1} 의 peak가 관찰되었으며, $^1\text{H-NMR}$ 에서 6.49, 6.54와 7.19, 7.23ppm의 한 쌍의 doublet은 전형적인 furan ring을 나타냈고, $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 177.65ppm의 $-\text{CHO}$ 와 57.45ppm의 methylene carbon 및 160.87ppm과 152.37, 122.74 및 109.87ppm의 vinyl carbon의 존재를 알 수 있었으며, τ 값을 1/2J인 6.25msec로 한 attached proton test에서 upper side에 57.45ppm의 methylene carbon을 재확인하였고, 152.37, 160.87ppm이 upper side에 위치하므로 furan ring의 nonprotonated carbon임을 알 수 있었고 177.65ppm의 peak가 lower side에 존재하므로 $-\text{CHO}$ 임을 재확인할 수 있었다.

이상과 같은 결과를 토대로 숙지황에서만 나타나는 $R_f=0.37$ 의 물질은 기지 물질인 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde임을 알 수 있었다.

3. 2. Spot I의 함량

생지황, 건지황, 숙지황의 메탄올 추출액 중 비극성 간섭물질을 n-hexane으로 추출 제거하고 당이 많이 함유된 수층 중의 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde를 ethylacetate로 추출하여 역상 HPLC로 분석했을 때 재현성있는 양호한 크로마토그램을 얻을

수 있었다. 건조 중량(g)당 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde의 함량은 숙지황에는 1.318mg/g이었고, 생지황과 건지황에는 숙지황 중의 함량의 0.014%, 0.015%로 극히 미량 존재하였다.(Table 1). 따라서 5-(hydroxymethyl)-2-furancarboxaldehyde는 생지황, 건지황, 숙지황 중에서 숙지황의 품질관리를 위한 이화학적 지표물질로 활용될 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

생지황, 건지황, 숙지황을 제공하여 주신 전주 남양당 한약방의 김태진 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

1. B. H. Han, Y. N. Han, and M. K. Park, *Arch. Pharm. Res.*, **10**(3), 200(1987).
2. 辛民教, 原色臨床本草學, 南山堂, 218, 1986.
3. 小學館, 中藥大辭典(第2卷), 350, 1985.
4. 東京生藥研究會, 漢方藥의 評價와 開發技術, 249, 1983.
5. K. Iso, *Yakugaku Zasshi*, **91**(5), 593(1971).
6. T. Masashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**(7), 1455(1971).
7. T. Masashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**(11), 2411(1971).
8. H. Toshiko, *Shoyakugaku Zasshi*, **36**(1), 1(1982).
9. O. Haruju and I. Hiroyuki, *Photochemistry*, **21**(1), 133(1982).
10. O. Haraju, N. Yosimoto and I. Hiroyuki, *Shoyakugaku Zasshi*, **35**(A), 291(1981).
11. Zhongyu Liu, *Zhonggyao Tongbao*, **9**(1), 17(1984).