

## 지모의 유효성분 분리 및 HPLC 정량 분석

김금숙\* · 박창기\* · 성재덕\* · 김현태\* · 한상익\* · 곽용호\*

### Isolation and HPLC Analysis of Timosaponin A III from Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE

Geum Soog Kim\*, Chang Kie Park\*, Jae Duck Seong\*, Hyun Tae Kim\*,  
Sang Ik Han\* and Yong Ho Kwack\*

**ABSTRACT** : Timosaponin A III, an active and major compound, was isolated from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. The quantitative analysis of timosaponin A III was performed by a high performance liquid chromatographic (HPLC) method using ELSD and the useful extraction method for HPLC analysis was examined as well. This HPLC method can be utilized as the standard analytical method for the evaluation of the quality of *Anemarrhena rhizoma* in the steps of breeding and cultivation. Additionally, the HPLC analysis method can be useful for the evaluation of the quality of *Anemarrhena rhizoma* sold as a traditional medicine in current markets.

**Key words** : *Anemarrhena asphodeloides*, timosaponin A III, HPLC, ELSD, extraction method.

## 서 언

지모 (*Anemarrhena asphodeloides* BUNGE)는 다년생 초본으로 근경을 약재로 사용하며 수확은 재배하여 3년부터 채취하고 이용방법에 따라 껍질째 말린 근경으로서 모지모(毛知母)와 껍질을 벗겨 말린 뿌리 줄기인 광지모(光知母)로 나눈다(鄭 杓 申, 1990 ; 中藥大事典 편찬위원회, 1998). 주요 약효로는 혈당강하작용, 해열작용, 혈소판 응집작용, 이뇨작용, 항암작용 등이 보고되어 있으며 한방에서는 소염, 해열, 지사, 이뇨, 진통약으로 이

용되고 있다(Lee et al., 1995 ; 中藥大事典 편찬위원회, 1998).

지모의 주성분으로는 근경에 총 saponin이 약 6% 함유되어 있으며 그 중에서 timosaponin A I, A II, A III, A IV와 timosaponin B I, B II 등이 검출되었고 최근에는 anemarsaponin F, G 등 새로운 spirostanol glycoside 류가 보고되었다(Ma et al., 1997). 이들의 sapogenin은 거의 sasarsapogenin 이고 일부는 markogenin, neogitogenin 및 lilagenin 등이며(Ma et al., 1997; 中藥大事典 편찬위원회, 1998) 그의 성분으로는 다량의 환원당, 점액질, 탄닌산, 지방유 등이 함유되어 있고 또 최

\* 영남농업시험장 (National Yeongnam Agricultural Experiment Station, R. D. A. Miryang 627 - 130, Korea)

〈 '98. 9. 22 接受 〉

근 Ichiki et al. (1998)에 의해 항당뇨 활성이 밝혀진 mangiferin (chimonin)이 약 0.5%정도 함유되어 있다.

이상과 같이 지모의 주요 약효 및 성분에 대한 연구가 많은 반면, 고품질의 지모 품종육성이나 재배법 개선 및 안전한 생약으로서의 지모의 품질 평가 등에 적용할 수 있는 품질 분석법에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 지표성분에 근거한 구체적인 간편한 지모의 품질 분석법에 대한 연구의 일환으로, 먼저 지모의 유효성분을 분리 정제하고 그 유효성분을 지표성분화하여 보다 합리적이고 간편한 분석법을 HPLC법으로 구명하고자 하였으며 그 결과를 다음과 같이 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

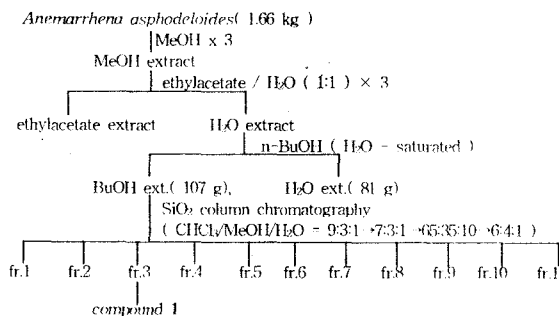
### 실험재료

본 시험에 사용한 지모는 경남 밀양시에 소재한 영남농업시험장 약용식물 유전자원포에서 재배중인 밀양종을 수확하여 수세후 뿌리를 절단하여 60℃에서 열풍건조하였으며 건조된 뿌리를 분쇄하여 추출에 사용하였다.

### 추출 및 유효성분의 분리, 정제

분쇄한 지모는 MeOH로 48시간씩 3회 상온에서 추출한 후 회전 진공 농축기에서 감압농축하여 MeOH ext.를 얻었다. MeOH ext.는 ethylacetate : H<sub>2</sub>O (1 : 1) 용매로 3회 분배 추출하여 물층과 ethylacetate층으로 나누었다. 물층은 동량의 수포화-n-BuOH로 수차례 분배 추출하여 n-BuOH층과 물층으로 다시 나누고 조사포닌 함유층인 n-BuOH층은 다시 감압농축하여 n-BuOH ext.를 얻었다. n-BuOH ext.로부터 유효성분을 분리하기 위해 silica gel column chromatography를 실시하였다. 이때 용출용매로는 CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 혼합용매계로서 9 : 3 : 1→7 : 3 : 1→65 : 35 : 10→6 : 4 : 1의 비율로 극성을 높여가며 gradient solvent system을 사용하여 물질을 분리, 정제하였다. 1차 SiO<sub>2</sub> column chromatography에 의해 분리된 소분획 3 (fr. 3)는 C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridge (H<sub>2</sub>O→H<sub>2</sub>O : MeOH (4 : 1→1 : 4)→MeOH)를 이용하므로써 불

순물을 제거, 정제하여 화합물 1를 순수 분리 하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. The isolation of compound 1 from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*.

### 추출조건 및 HPLC 분석조건 검색

지모의 HPLC 분석조건과 더불어 HPLC 분석을 위한 시료의 최적 추출조건 구명을 위해 상온 (25℃)에서의 진탕추출과 40℃, 60℃, 80℃에서의 환류추출 등이 검토되었으며 각각의 추출조건에서 화합물 1의 추출 회수율과 총 함량을 조사하였다.

각각의 추출조건에 따라 지모 분쇄시료 1g을 80% MeOH로 30ml씩 3회 추출 후 최종 100ml로 정용하여 HPLC 분석에 사용하였고 HPLC 정량시에는 0.45μm membrane filter에 여과한 시료를 20μl 주입하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 화합물 1의 구조

화합물 1은 흰색분말로서 얻었으며 구조동정을 위해 NMR spectrum을 관측하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 18번과 19번 methyl proton에서 기인하는 두 개의 singlet signal이 δ0.80과 0.95에서 각각 관측되고 또 δ1.05 (*J*=6.0Hz)와 1.13 (*J*=6.5Hz)에서 27번과 21번 methyl proton에서 기인하는 doublet signal들이 관측되어 이 화합물이 steroidal saponin의 화합물인 것으로 추정되었다. 한편 당부의 anomeric proton에서 기인한 δ4.90 (*J*=7.0Hz)과 5.27 (*J*=7.5Hz)에서의 doublet

Table 1.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, pyridine- $d_5$ ) spectra data for aglycon moiety of compound 1.

Carbon	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J on Hz)
Aglycon		
1	30.8	1.83m <sup>a</sup>
2	27.0	
3	75.4	4.30 (brs)
4	30.8	1.44m <sup>a</sup>
5	36.8	2.12m
6	26.7	
7	26.7	
8	35.4	
9	40.1	1.67m <sup>b</sup>
10	35.2	
11	21.1	1.34m
12	40.2	1.29m <sup>b</sup>
13	40.8	
14	56.4	
15	32.1	2.01m
16	81.3	4.59m
17	62.1	1.81m
18	16.5	0.80 (s)
19	23.9	0.95 (s)
20	40.2	1.91m
21	14.8	1.13 (d, 6.5)
22	109.7	
23	26.3	
24	26.1	
25	27.5	
26	65.0	3.35 (d, 11.0), 4.06 (d, 11.0)
27	16.2	1.05 (d, 6.0)

<sup>a, b</sup> Assignment with the same superscript may be reversed in each column.

signal들이 관측되고 그 결합상수 (J) 가 7Hz 내외인 것으로 보아 이 화합물이 당부에 2분자의 당을 가지며 그 입체 결합구조는  $\beta$ -form 인 것으로 추론되었다 (Fig. 1).

$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서도 역시 anomeric carbon에 기인하는 signal이  $\delta$ 102.5와 106.0에서 관측되고 또한 HMQC spectrum에서도 이 두 anomeric carbon과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum의 두 anomeric proton과의 상호 correlation이 관측되므로써 이 화합물은 2분자의 당을 가진 steroidal saponin임을 입증하였다. 한편,  $^{13}\text{C-NMR}$

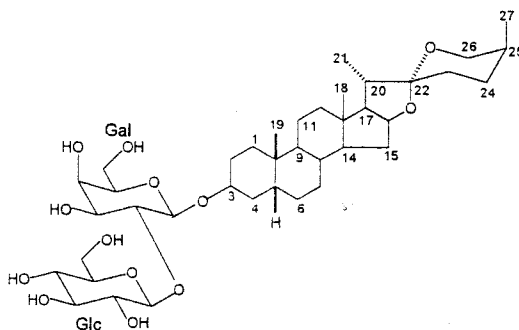


Fig. 1. Structure of timosaponin AIII.

spectrum의  $\delta$ 109.7에서 ketal carbon signal이 관측되므로써 이 화합물이 spirostan계의 steroidal saponin인 것으로 추정하였다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서,  $\delta$ 81.9, 75.2, 69.8 및 76.5에서의 carbon signal들을 각각 galactose의 C-2, C-3, C-4, C-5로 동정하였는데, 이 중에서 C-2의 carbon signal이 일반 galactose에서의 chemical shift 값보다 저자장으로 약  $\delta$ 5~6ppm 정도 shift되어  $\delta$ 81.9에서 나타난 것으로 보아 다른 1분자의 당이 galactose의 C-2 위치에 1 $\rightarrow$ 2 결합을 하고 있는 것으로 추론하였다. 이것은 HMBC spectrum에서  $\delta$ 5.27 (Glc-1)의 proton signal과  $\delta$ 81.9 (Gal-2)의 carbon signal 사이의 correlation이 관측되므로써 확인되었다 (Fig. 2). Galactose에 결합된 당은  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum 관측 결과 ( $\delta$ 106.0, 76.9, 77.9, 71.6, 78.4, 62.9) glucose인 것으로 확인 하였으며,  $^1\text{H-NMR}$  COSY, HMQC, HMBC spectrum의 분석으로 galactose와 glucose의 각 carbon, proton들의 chemical shift 값들도 동정하였다.

한편 HMBC spectrum의 proton, carbon signal들의 correlation이 비당부의 C-3 ( $\delta$ 75.4) 과 galactose의 H-1 ( $\delta$ 4.90) 사이에서도 관측되므로써 비당부 C-3에 2분자의 당부가 결합된 것으로 추론할 수 있었다 (Fig. 2). 비당부의 carbon signal의 chemical shift 값을  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 검토한 결과 비당부는 (25S)-sarsasapogenin인 것으로 확인되었으며 이것은 문헌치와도 일치하였다 (Agrawal et al., 1985 ; Bernardo et al., 1996 ; Dragalin & Kintia, 1975).

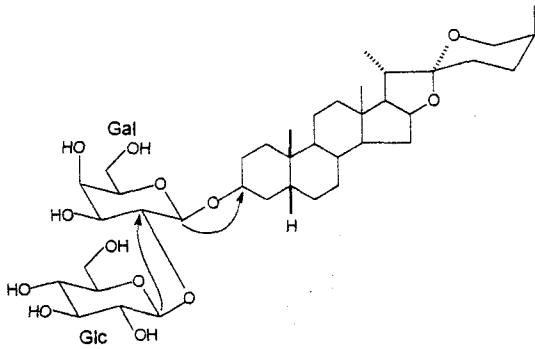


Fig. 2. Planar structure of glycon moieties of compound 1 elucidated by the HMBC data.

Table 2.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, pyridine- $d_5$ ) spectra data for the sugar moieties of compound 1.

Carbon	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J on Hz)
O-3-Galactose		
H-1'	102.5	4.90 (d, 7.0)
H-2'	81.9	4.66 (dd, 10.0, 8.5)
H-3'	75.2	4.27 (d, 9.5)
H-4'	69.8	4.56 (brs)
H-5'	76.5	4.01 (brs)
H-6 <sub>a</sub> , 6 <sub>b</sub>	62.7	4.41 - 4.50 m
O-2-Glucose		
H-1''	106.0	5.27 (d, 7.5)
H-2''	76.9	4.03 (dd, 8.5, 6.0)
H-3''	77.9	4.18 (dd, 8.5, 8.5)
H-4''	71.6	4.27 (dd, 9.5, 8.5)
H-5''	78.4	3.83 (brs)
H-6 <sub>a</sub> , 6 <sub>b</sub>	62.9	4.41 - 4.50 m

결국 화합물 1은 (25*S*)-sasarsapogenin-3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranoside] 인 timosaponin AIII로 확인되었으며 이것의 chemical shift 값들은 문헌치와도 일치하였다 (Saito et al., 1994).

## 2. Timosaponin AIII의 HPLC 분석조건

Timosaponin AIII는 지모의 주요 saponin 중의 한 성분으로 혈당강하작용의 주성분으로 알려져 있다 (Kimura et al., 1996 ; Nakashima et al., 1993). Lee et al. (1995)은 지모의 항암활성을 확인하고 그 주요 활성성분으로 timosaponin AIII를 분리, 보고한 바 있다. 결국 지모의 품질분석을 위해 지모의 주요 saponin 성분이면서 주요 활성성분인 timosaponin AIII를 지모의 지표성분으로 하는 것이 타당하다고 판단하였다. 따라서 timosaponin AIII를 지표성분으로 한 지모의 적합한 HPLC 분석조건을 검토하고자 하였다.

Timosaponin AIII의 HPLC 분석시 검출기는 “증기화 광산란 검출기(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)”를 사용하였다. 예비시험에서 timosaponin AIII가 UV의 특이 파장에서 흡광도를 보이는 반응을 가지고 있지 않기 때문에 UV 검출기 사용은 부적합하였으며 RI 검출기 역시 감도가 낮은 단점 때문에 분석에는 적합하지 않았다. Sun et al. (1992)은 지모 및 지모 배합 한방방제 중 timosaponin BII, timosaponin AIII 및 mangiferin 등을 HPLC법으로 RI 검출기와 UV 검출기를 사용하여 정량분석하였다. 그러나 감도가 낮은 RI 검출기를 사용하여 timosaponin BII, timosaponin AIII 등을 분석하기 위해서는 1차 추출액인 MeOH 분획을 바로 사용할 수 없으며 보다 정제, 농축한 BuOH 분획을 얻은 후 HPLC 분석을 해야하므로 분석시간 및 분석비용 면에서 불합리한 점이 많다. 따라서 본시험에서는 특정 반응이나 발색단이 없어도 용매는  $\text{N}_2$  가스에 의해 증기화되고 성분 입자만이 레이저 광에 의해 산란되어 그 산란도를 측정하는 원리가 적용되는 ELSD를 사용하였다. ELSD는 기존의 UV, RI 검출기의 단점을 크게 보완하면서 감도가 상대적으로 아주 높아 timosaponin AIII같은 saponin 류의 분석에는 아주 적합할 것으로 예상되었다. HPLC 분석 조건으로 column은 Inertsil ODS-2(4.6 x 250mm, 5 $\mu\text{m}$ , GI Sciences Inc.)을 사용하고 이동상은 60% acetonitrile를 0.9ml/min의 유속으로 사용하여 ELSD 조건을 검토한 결과, 표 3과 같은 조건일 때 지모 MeOH 추출액 중

Table 3. The condition of HPLC for timosaponin AIII analysis.

Column	Inertsil ODS-2 (4.6 x 250mm, 5 $\mu$ m)
Mobile phase	Acetonitrile : H <sub>2</sub> O (60 : 40)
Flow rate	0.9ml/min
Injection volume	20 $\mu$ l
Detector	ELSD detector (Alltech MKIII ELSD)
	- Drift tube temp. : 120 $^{\circ}$ C
	- N <sub>2</sub> gas flow rate : 2.75 SLPM

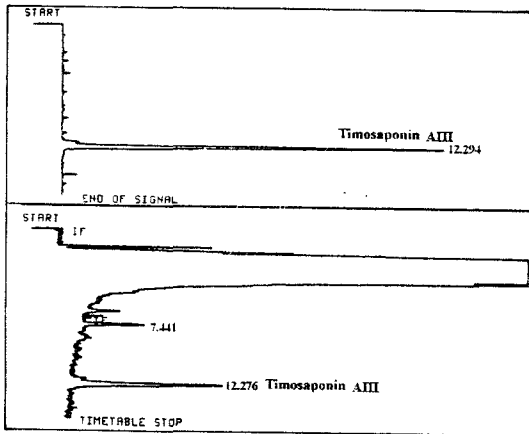


Fig. 3. HPLC-profile of timosaponin AIII; up : timosaponin AIII purified from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*, down : timosaponin AIII in MeOH extract from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*.

의 timosaponin AIII를 용이하게 정량할 수 있었다 (Fig. 3).

Timosaponin AIII의 표준곡선은 그림 2와 같이 작성하였으며 이 표준곡선의 상관 계수는  $R^2=0.9972$ 로서 지모 MeOH 추출액 중의 timosaponin AIII 정량분석에 적용하기에 적합하였다 (Fig. 4).

### 3. 추출조건

Timosaponin AIII의 HPLC 분석 조건의 검토와 더불어 지모 시료 중의 timosaponin AIII의 최적 추출조건을 검토하였다.

80% MeOH를 추출용매로 하여 추출조건별 timosaponin AIII의 함량 및 추출 회수율을 살펴보

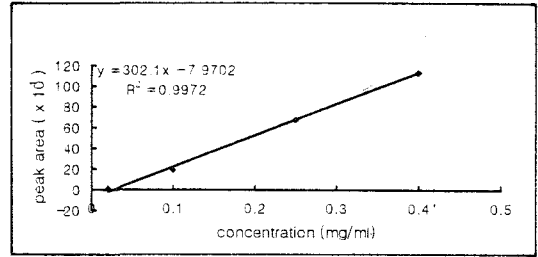


Fig. 4. Standard curve of timosaponin AIII.

Table 4. Extraction methods for timosaponin AIII from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*.

Extraction method	No. of extraction	Content (%) <sup>†</sup>	Recovery rate (%) <sup>†</sup>	Total content (%)
25 $^{\circ}$ C (shaking)	1	0.86	68.0	1.27
	2	0.41	32.0	
40 $^{\circ}$ C (reflux)	1	0.47	61.4	0.76
	2	0.29	38.6	
60 $^{\circ}$ C (reflux)	1	0.51	62.0	0.82
	2	0.31	38.0	
80 $^{\circ}$ C (reflux)	1	0.95	66.5	1.43
	2	0.48	33.5	
CV (%)				4.36
LSD (0.05)				0.09

<sup>†</sup>Timosaponin AIII (g) / dried sample (g) x 100.

<sup>†</sup>Content in each extraction no. / total content x 100.

면 (Table 4), 상온진탕 및 환류 추출 모두 3회째 추출에서는 timosaponin AIII가 극미량으로 검출되어 정량이 불가능하였으며 모든 추출조건에서 1회 추출에 60%이상의 회수율을 보였다. 특히 상온 진탕 추출과 80 $^{\circ}$ C 환류 추출에서 1회 추출시 각각 68%, 66.5%의 회수율을 나타내었다. 총 timosaponin AIII의 함량은 80 $^{\circ}$ C 환류 추출과 25 $^{\circ}$ C 환류 추출시 건물 중에 대하여 각각 1.43%, 1.27% 였으며 60 $^{\circ}$ C와 40 $^{\circ}$ C 환류 추출시는 각각 0.82%, 0.76%로 그 함량이 앞의 두 추출조건보다 적었다. 따라서 지모의 timosaponin AIII의 HPLC 분석을 위해서는, 지모 분쇄시료 1g을 80% MeOH로 30ml씩 80 $^{\circ}$ C에서 총 2회 환류 추출 후 최종 100ml로 정용하여 HPLC 분석에 사용하는 것이 가장 적합하였다.

이상에서 제시된 지모의 지표성분의 분석법은

품질을 보다 객관적으로 평가할 수 있는 기준이 되어 농업적 측면에서 지모의 품종육성 및 재배법 개선 연구에 적용될 수 있을 뿐 아니라, 수확이후 생약제로서 유통되는 과정에서도 품질관리의 유용한 분석 수단이 될 수 있다고 사료된다.

## 적 요

지모의 고품질 품종 육성 및 재배법 개선과 유통 중인 생약으로서의 안전성을 위한 품질 평가 기준을 설정하기 위해 지모의 지표성분의 HPLC 분석법을 확립하고자 하였다. 먼저 지모의 유효성분을 분리하고 지표성분화 한 후 HPLC 분석 정량법을 검토하므로써 지모의 품질 분석법을 구명한 결과는 다음과 같다.

지모를 MeOH로 대량 추출하여 계통 추출법으로 용매분배 후 조사포닌 분획인 n-BuOH ext.를 얻었으며 이 n-BuOH ext.을 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 1을 순수 분리·정제하였다.

화합물 1의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spectra 및 2D NMR spectra 등을 검토한 결과 화합물 1은 지모의 주요 약효성분인 timosaponin AIII로 확인되었다.

Timosaponin AIII은 지모의 주요 성분이자 혈당 강하작용과 항암활성 등의 주요 약효를 보이는 성분으로 지모의 품질 평가 기준으로서 지모의 지표 성분으로 하기에 적합하였다.

Timosaponin AIII의 HPLC 분석법 확립을 위해 ELSD 검출기가 사용되었으며 ODS계 컬럼을 사용하고 60% acetonitrile를 이동상으로 하여 0.9ml/min의 유속으로 분석을 한 것이 가장 적절한 timosaponin AIII의 HPLC 분석 조건이었다.

Timosaponin AIII의 HPLC 분석을 위한 지모 시료의 추출조건 검토에서는 1g 분말시료를 80% MeOH를 추출용매로 할 때 80°C에서 총 2회 환류 추출하는 것이 성분의 총 회수율을 가장 높이는 추출조건이었다.

## LITERATURES CITED

Agrawal, P. K., D. C. Jain, R. K. Gupta and R. S. Thakur. 1985. Carbon-13 NMR spectroscopy of

steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry* 24(11) : 2479-2496.

Bernardo, R. R., A. V. Pinto and J. P. Parente. 1996. Steroidal saponin from *Smilax officinalis*. *Phytochemistry* 43(2) : 465-469.

Dragalin, I. P. and P. K. Kintia. 1975. Steroidal saponin of *Yucca filamentosa* : Yuccoside C and protoyuccoside C. *Phytochemistry* 14 : 1817-1820.

Ichiki, H., T. Miura, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, K. Tanigawa and M. Okada. 1998. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.* 21(12) : 1389-90.

Kimura, M., I. Kimura and F. J. Chen. 1996. Combined potentiating effects of Byakko-ka-ninjin-to, its constituents, rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*, timosaponin AIII, and calcium on pilocarpine-induced saliva secretion in streptozotocin-diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 19(7) : 926-931.

Lee, S. H., S. Y. Ryu, S. U. Choi, Z. S. No, S. K. Kim, C. O. Lee and J. W. Ahn. 1995. Antitumor agent from the rhizome of *Anemarrhena asphodeloides*. *Kor. J. Pharmacogn.* 26(1) : 47-50.

Ma, B., B. Wang, J. Dong, X. Yan, H. Zhang and A. Tu. 1997. New spirostanol glycosides from *Anemarrhena asphodeloides*. *Planta Med.* 63(4) : 376-379.

Nakashima, N., I. Kimura and M. Kimura. 1993. Isolation of pseudoprototimosaponin AIII from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Nat. Prod.* 56(3) : 345-350.

Saito, S., S. Nagase and K. Ichinose. 1994. New steroidal saponins from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE (Liliaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 42(11) : 2342-2345.

Sun, X. H., H. Kizu and T. Tomimori. 1992. Quantitative analysis of timosaponin B-II and timosaponin A-III and mangiferin in *Anemarrhena rhizoma* and kampo prescriptions containing this crude drug. *Shoyakugaku Zasshi.* 46(1) : 19-24.

鄭普燮, 申民教. 1990. (圖解) 鄉藥(生藥) 大事典 植物篇. 永林社. pp. 203-204

中藥大事典 편찬위원회. 1998. (完譯) 中藥大事典. 鼎談社. pp. 5095-5103.