

금은화의 품질 평가

나민균,¹ 하티탄훙,¹ 안인파,¹ 이상명,¹ 김영호,¹ 이종필,² 성락선,² 이경순,³ 배기환^{1*}

¹충남대학교 약학대학, ²식품의약품안전청, ³충북대학교 약학대학

Quality Evaluation of Lonicerae Flos

MinKyun Na,¹ Ha Thi Thanh Huong,¹ Ren Bo An,¹ Sang Myung Lee,¹ Young Ho Kim,¹

Jong Pill Lee,² Rack Seon Seong,² Kyong Soon Lee³ and KiHwan Bae^{1*}

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764,

²Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704,

³College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – Lonicerae Flos, the flower of *Lonicera japonica* Thunb., has been used as a diuretic, stomachic, antipyretic, analgesic and anti-inflammatory agent in Korea. In order to evaluate the quality of Lonicerae Flos, the method of isolation and quantitative determination of luteolin 7-O-β-D-glucoside as a reference standard compound has been developed. Different specimens of Lonicerae Flos were collected from twenty Korean markets and were analyzed with HPLC using the mobile phase of MeOH-4.5% acetic acid solution (16.5:83.5). The average content of luteolin 7-O-β-D-glucoside from Lonicerae Flos in Korean markets was $0.43 \pm 0.34\%$.

Key words – *Lonicera japonica* Thunb., Lonicerae Flos, luteolin 7-O-β-D-glucoside, HPLC, quantitative determination.

금은화(Lonicerae Flos)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*Lonicera japonica* Thunb.)의 꽃으로 한방에서는 이노, 건위, 청열해독(淸熱解毒), 옹종정창(癰腫疔瘡), 외감풍열(外感風熱), 열독사리(熱毒瀉痢) 등에 사용되어 왔다.^{1,2)} 인동덩굴은 민간에서 오래전부터 항염증제로 알려져 왔으며, 특히 기관지염 등의 상기도 감염 및 신경통 치료에도 사용되어 왔다. 우리나라에는 주로 인동덩굴(*L. japonica*)이 분포되어 있으며, 근연식물로서 털인동(*L. japonica* Thunb. var. *repens* (Sieb.) Rehder)과 잔털인동덩굴(*L. japonica* Thunb. var. *repens* (Sieb.) Rehder for. *chinensis* (Watson) Hara)이 분포되어 있다.³⁾ 대한약전 7개정에는 금은화의 기원식물로 인동덩굴(*L. japonica* Thunb.)의 꽃을 규정하고 있지만,⁴⁾ 중화인민공화국약전에는 인동덩굴(*L. japonica* Thunb.) 이외에도 *L. hypoglaca* Miq., *L. cofusa* DC., *L. dasystyla* Rehd.가 수재되어 있다.⁵⁾ 금은화의 성분으로는 iridoid 성분인 loganin, vogeloside, epi-vogeloside 및 tannins과 triterpeno-

ids 등이 보고되어 있으며,^{6,7)} flavonoid 화합물인 lonicerin, luteolin, apigenin, quercetin, ochnaflavone, astragalins 및 이들의 배당체 등이 보고된 바 있다.^{8,9)} 이러한 금은화의 성분은 산지나 채집시기 등에 따라서 성분의 종류 및 함량이 있어서 많은 차이가 있음이 보고되었다.^{10,11)} 따라서 본 연구에서는 금은화의 주성분인 luteolin 7-O-β-D-glucoside를 지표성분으로 하여 HPLC에 의한 품질평가법을 확립하였으며, 이를 이용하여 국내에서 유통되고 있는 금은화의 성분을 비교 분석한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료 – 본 연구에 사용한 금은화는 1999년 국내(서울, 경기도 안양, 경기도 광명, 강원도 원주, 대전, 대구, 충북 충주, 충남 논산, 충남 금산, 경북 안동, 경남 진주, 경남 밀양, 전북 전주, 광주, 제주도) 20개 지역에서 판매되는 금은화 및 전주와 계룡산에서 채집한 것을 마쇄한 후 검체로 사용하였다.

기기 – 융점은 Electrothermal 9100 (England)을, IR

*교신저자 : Fax 042-823-6566

은 JASCO Report-100을, MS는 JMS-HX110 (Japan)을, NMR은 Bruker DRX-300 (300 MHz, Germany)을 사용하여 측정하였고, 회화로는 Electronic Murffle Furnace SEF-301 (Korea)을, HPLC는 Shimadzu (LC-10AD pump; CTO-10A oven, SPD-10AV UV detector, Japan)의 것을, column은 Waters Nova-Pak C₁₈ (3.9×150 mm)을 사용하였다.

지표성분의 분리 - 금은화 3 kg을 40°C에서 MeOH로 3회 반복하여 추출하여 MeOH ex. 550 g을 얻었다. MeOH ex.를 물로 현탁시킨 후 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol로 용매분획하였고, 이 중 ethyl acetate 분획을 *n*-hexane-ethyl acetate (1:1→1:5)의 이동상으로 silica gel column chromatography를 실시하여 10개의 소분획을 얻었다. 소분획 7을 반복해서 reverse phase C₁₈ column chromatography를 실시하였고, 주성분으로 석출되는 황색물질을 얻었다.

Luteolin 7-O-β-D-glucoside - Pale yellow amorphous powder (MeOH), m.p. 273-275°C (uncorrected). UV λ_{max} nm (log ε) (MeOH): 203 (0.94), 259 (0.44), 351 (0.48). IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3400 (OH), 1660(C=O), 1600, 1500, 1430, EI-MS (70 eV) *m/z*: 448 [M⁺]. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.08 (1H, d, *J*=7.2 Hz, anomeric H-1"), 6.43 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-6), 6.74 (1H, s, H-3), 6.78 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-8), 6.89 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H-5), 7.42 (1H, dd, *J*=2.1, 8.2 Hz, H-6'), 7.45 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-2'), 12.98 (1H, br, 5-OH). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.52 (C-2), 103.11 (C-3), 181.89 (C-4), 161.16 (C-5), 99.56 (C-6), 162.95 (C-7), 94.74 (C-8), 156.96 (C-9), 105.36 (C-10), 121.23 (C-1'), 116.01 (C-2'), 145.86 (C-3'), 150.16 (C-4'), 113.50 (C-5'), 119.20 (C-6'), 99.92 (C-1"), 73.13 (C-2"), 77.17 (C-3"), 69.58 (C-4"), 76.40 (C-5"), 60.64 (C-6").

검액의 조제 - 건조한 금은화 2.0 g을 MeOH 20 ml로 2시간 환류추출하였다. 여과한 후 잔사를 20 ml MeOH로 세척하고, 감압 농축하여 물 20 ml에 현탁시킨 후 ethyl acetate 20 ml로 세 번 추출하였다. 그 추출액을 합하여 감압농축한 후 HPLC MeOH 20 ml로 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과한 것을 검액으로 하였다.

표준검량선의 작성 - luteolin 7-O-β-D-glucoside을 메탄올에 녹여 200, 300, 400, 600, 1200 μg/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 μl를 취

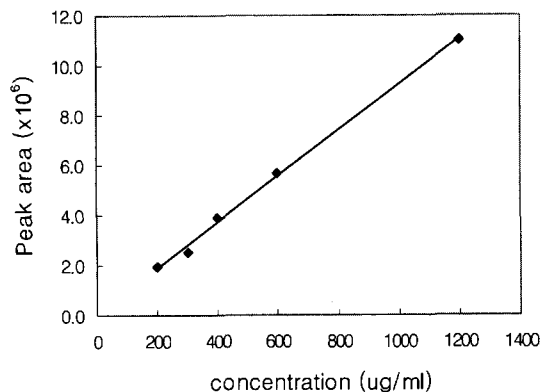


Fig. 1. Calibration curve of luteolin 7-O-β-D-glucoside.

하여 HPLC를 실시하였고, peak 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성한 결과 200~1200 μg/ml에서 $y=9240x+19540$ ($r=0.9990$)의 직선성을 나타내었다(Fig. 1).

HPLC 분석조건 - HPLC를 이용한 분석조건은 다음과 같다. Column은 Nova-Pak C₁₈ (3.9×150 mm, Waters)을, 검출기는 자외부흡광광도계 (측정파장 347 nm)를 사용하였으며, 이동상으로는 MeOH-4.5% acetic acid soln. (16.5:83.5), 온도는 40°C, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 10 μl로 하여 분석하였다.

luteolin 7-O-β-D-glucoside의 함량 - 각 검액 10 μl씩을 정확히 취하여 위의 분석조건으로 표준물질과 시장에서 구입한 금은화에 대해 HPLC를 실시하였다. 각 검액에서 얻어진 피크면적을 검량선에 대입하여 각 시료들에 함유된 luteolin 7-O-β-D-glucoside의 함량을 구하였다.

확인시험 - 검체 0.5 g에 물 10 ml를 넣고 끓여 여과한 여액에 염화제이철시액 1~2방울을 넣었을 때 남색을 나타내는지 확인하였다. 또한 검체 2.0 g에 에탄올 10 ml를 넣고 수욕상에서 2분간 끓여 여과한 여액에 금속 마그네슘 0.1 g 및 염산 2~3 방울을 넣었을 때의 변화를 확인하였다.

건조감량 - 분석용 검체 3 g을 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달아 함량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2 g을 취하여 앞의 도가니에

넣어 그 무게를 정밀하게 달아 500~550°C에서 4시간 이상 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하고 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다.

산불용성회분시험 - 회분에 묶은 염산 25 ml를 넣고 5분간 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 항과 같은 조작으로 무게를 미리 단 백금제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터에서 방냉하고 그 무게를 달아 산불용성회분량으로 하였다. 이렇게 하여 얻은 값이 규정 값보다 클 경우에는 항량이 될 때까지 강열하였다.

결과 및 고찰

금은화의 주성분이며 정량분석의 지표물질로 luteolin 7-O-β-D-glucoside를 순수 분리하였다. 금은화를 methanol로 추출한 후 순차적으로 용매분획 하였고, 그 중 ethyl acetate 분획물에 대해 n-hexane-ethyl acetate (1:1→1:5)를 이동상으로 silica gel column chromatography를 실시하여 10개의 소분획을 얻었다. 이중 소분획 7을 반복해서 reverse phase C₁₈ column chromatography를 실시하여 주성분을 분리하였다. 이 화합물의 이화학적 성상 및 ¹H-, ¹³C-NMR spectral data를 문헌치¹²⁾와 비교하여 분리된 화합물이 luteolin 7-O-β-D-glucoside임을 확인할 수 있었다.

이상과 같이 분리 확인된 luteolin 7-O-β-D-glucoside(Fig. 2)를 지표물질로 하여 HPLC를 실시하였다. 분석조건을 검토한 결과, 고정상으로 Nova-Pak C₁₈ column (3.9×150 mm, Waters)을 사용하고, 이동상으로 MeOH-4.5% acetic acid soln. (16.5:83.5)을 사용하며, 유속은 1.0 ml/min, 온도는 40°C일 때 retention time이 약 18.3분으로 다른 물질의 peak와 분리되므로 적합한 분석조건으로 선택하였다. 표준용액

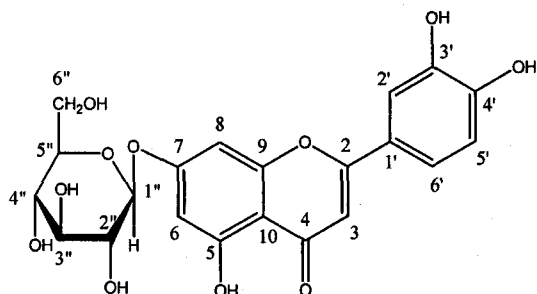


Fig. 2. Structure of luteolin 7-O-β-D-glucoside.

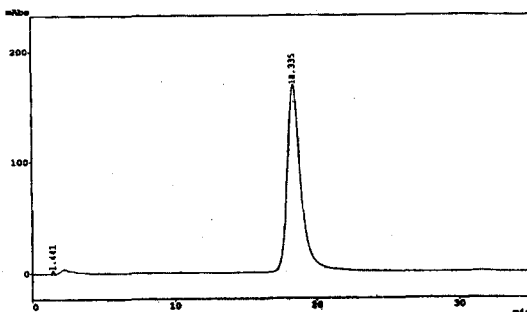


Fig. 3. HPLC chromatogram of luteolin 7-O-β-D-glucoside stationary phase: Nova-Pak C₁₈, mobile phase: MeOH-4.5% HAc(16.5:83.5) flow rate: 1 ml/min, detector: UV 347 nm, oven temperature: 40°C.

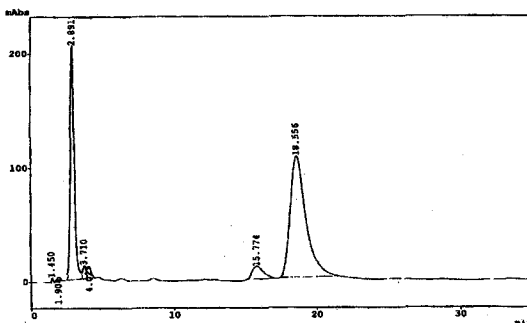


Fig. 4. HPLC chromatogram of Lonicerae Flos sample stationary phase: Nova-Pak C₁₈, mobile phase: MeOH-4.5% HAc (16.5:83.5) flow rate: 1 ml/min, detector: UV 347 nm, oven temperature: 40°C.

10 μ를 취하여 이 분석조건으로 HPLC를 실시하였고 (Fig. 3), peak 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성한 결과 200~1200 μg/ml의 농도범위에서 y=9240x+19540 (r=0.9990)의 직선성을 나타내었다(Fig. 1). 같은 조건으로 국내 20개 지역에서 판매되는 금은화 검액에 대해 HPLC를 실시하였고 (Fig. 4), 각 검액에서 얻어진 피크면적을 검량선에 대입하여 각 시료들에 함유된 luteolin 7-O-β-D-glucoside의 함량을 구하였다(Table I). 그 결과 금은화에 함유된 luteolin 7-O-β-D-glucoside의 함량은 0.43±0.34%로 시료간의 편차가 심했다. 20개의 검체 가운데서 luteolin 7-O-β-D-glucoside의 함량이 1%를 넘는 것이 2개 있었으며, 0.1% 이하의 것도 1개 있었으나 이것은 *L. japonica* Thunb.와 속은 같으나 종이 다른 식물에서 유래한 것으로 추정된다. 이상의 결과를 근거로 하여 금은화 중의 luteolin 7-O-β-D-glucoside 함량은 오차한계를 고려하여 0.1% 이상으로

Table I. The content of luteolin 7-O-β-D-glucoside in Lonicerae Flos

Sample	luteolin 7-O-β-D-glucoside (%)	Collection place	Sample	luteolin 7-O-β-D-glucoside (%)	Collection place
1	0.80 ± 0.05	서울	12	1.21 ± 0.03	충북 충주
2	1.23 ± 0.13	서울	13	0.22 ± 0.03	충남 논산
3	0.31 ± 0.04	서울	14	0.24 ± 0.02	충남 금산
4	0.27 ± 0.02	서울	15	0.30 ± 0.02	경북 안동
5	0.06 ± 0.01	서울	16	0.25 ± 0.03	경남 진주
6	0.22 ± 0.07	대전	17	0.49 ± 0.02	경남 밀양
7	0.52 ± 0.16	대구	18	0.22 ± 0.02	전북 전주
8	0.23 ± 0.01	대구	19	0.12 ± 0.02	광주
9	0.16 ± 0.02	경기 안양	20	0.43 ± 0.02	제주도
10	0.21 ± 0.02	경기 광명	21	0.68 ± 0.03	전북 전주
11	0.93 ± 0.05	강원 원주	22	0.34 ± 0.03	계룡산

Values are mean ± S.D. for three measurements

Table II. Loss on drying, ash and acid-insoluble ash of Lonicerae Flos

Samples	Loss on drying(%)	Ash(%)	Acid-insoluble Ash(%)
1	13.21	11.61 ± 0.77	3.10 ± 0.28
2	12.19	6.99 ± 0.68	0.25 ± 0.09
3	11.16	7.33 ± 0.14	0.23 ± 0.05
4	11.93	7.49 ± 0.24	0.27 ± 0.01
5	14.07	10.53 ± 0.16	3.31 ± 0.37
6	10.80	10.47 ± 0.34	0.55 ± 0.43
7	10.96	6.87 ± 0.56	0.36 ± 0.00
8	12.89	10.10 ± 0.45	0.78 ± 0.06
9	12.08	13.76 ± 0.96	3.17 ± 0.42
10	10.25	8.30 ± 0.31	0.42 ± 0.05
11	14.17	12.31 ± 1.22	2.50 ± 0.07
12	14.37	9.37 ± 0.13	2.60 ± 0.11
13	11.13	10.33 ± 0.39	1.20 ± 0.03
14	11.57	10.16 ± 0.60	1.05 ± 0.26
15	13.89	8.58 ± 0.35	0.63 ± 0.03
16	10.67	7.92 ± 1.39	0.27 ± 0.01
17	11.93	7.31 ± 0.34	0.17 ± 0.11
18	10.73	10.78 ± 0.43	0.65 ± 0.18
19	11.92	10.78 ± 0.46	2.22 ± 0.40
20	11.47	6.30 ± 0.71	0.06 ± 0.00
21	11.52	7.21 ± 0.16	0.38 ± 0.09
22	11.78	8.02 ± 0.23	0.43 ± 0.06
AV ± S.D.	12.05 ± 1.26	9.21 ± 2.01	1.12 ± 1.12

Values are mean ± S.D. for three measurements

규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

국내 20개 지역에서 시판되는 검체에 대하여 대한 약전규정에 적합한지를 평가하기 위하여 확인시험을 실시한 결과 염화제이철시액 반응에 모두 양성을 나타내었고, 에탄올 추출한 여액에 금속 마그네슘 0.1g 및 염산 2~3 방울을 넣었을 때 모두 옅은 황갈색~적갈색을 나타내었으므로 flavonoids의 존재를 확인할 수 있었다. 건조감량 시험에서는 모든 검체가 대한약전규정의 15.0% 이하에 적합하였고, 건조감량 평균은 12.05 ± 1.26%로 검체에 따라 큰 편차를 보이지 않았다(Table II). 회분시험 결과 대한약전에서는 9.0% 이하로 규정하고 있으나, 평균은 9.21 ± 2.01%로, 9개 지역에서 판매되는 검체만이 9.0% 이하로서 적합하였고, 나머지 11개 지역에서 판매되는 것들은 규정에 적합하지 않았다(Table II). 산불용성회분에 관한 규정은 따로 없었다. 22종의 검체에 대한 산불용성회분 시험결과, 평균 1.12 ± 1.12%로 편차가 심하게 나타났다. 시료에 따라 2.5% 이상의 큰 값을 보인 것도 있었으나 대부분은 1.0% 이하로 나타났다(Table II).

결 론

1. 금은화의 주성분인 luteolin 7-O-β-D-glucoside를 지표성분으로 하여 HPLC에 의한 품질평가법을 확립하였다.

2. 전국 20여개 지역에서 유통되고 있는 금은화를 수집하여 luteolin 7-O-β-D-glucoside의 함량을 분석한 결과, 평균함량은 0.43%로 나타났다.

3. 건조감량 시험결과 평균 12.05 ± 1.26%로 모든

검체가 대한약전규정의 15.0% 이하에 적합하였으나, 회분은 평균 $9.21 \pm 2.01\%$ 로 9개 지역의 검체 만이 대한약전규정의 9.0% 이하에 적합하였고, 나머지 11개 지역에서 판매되는 것들은 규정에 적합하지 않았다. 산불용성회분에 관한 규정은 따로 없었으나 시험 결과, 평균 $1.12 \pm 1.12\%$ 로 편차가 심하게 나타났다.

사 사

본 연구는 1999년도 생약·한약재 품질 표준화연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드린다. 또한 NMR 및 MS 측정은 기초과학연구소의 기기를 이용하여 분석하였으므로 이에 감사드린다.

인용문헌

1. Shougakukan (1985) The Dictionary of Chinese Drugs. Vol. III, 2027. Shanghai Science and Technologic Publisher and Shougakukan, Tokyo.
2. 韓國生藥學教授協議會 (1995) 本草學, 207-209. 사단법인 대한약사회, 서울.
3. 李永魯 (1996) 韓國植物圖鑑, 751. 교학사, 서울.
4. 대한민국 보건복지부 (1998) 대한약전 제7개정, 제2부, 797-800. 서울.
5. 중화인민공화국 위생부 약전위원회 (1995) 중화인민공화국약전, 1부, 189. 광동과기출판사, 광주.
6. Hideaki, K., Masanori, K. and Akira, U. (1988) Iridoid glucosides from *Lonicera japonica* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 3664-3666.
7. Son, K. H., Jung, K. Y., Chang, H. W., Kim, H. P. and Kang, S. S. (1994) Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Lonicera japonica*. *Phytochemistry* 35: 1005-1008.
8. Son, K. H., Park, J. O., Chung, K. C., Chang, H. W., Kim, H. P., Kim, J. S. and Kang, S. S. (1992) Flavonoids from the aerial parts of *Lonicera japonica*. *Arch. Pharm. Res.* 15: 365-370.
9. Son, K. H., Kim, J. S., Kang, S. S., Kim, H. P. and Chang, H. W. (1994) Isolation of flavonoids from *Lonicera japonica*. *Korean J. Pharmacog.* 25: 24-27.
10. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese Drugs of Plant Origin, 621-625. Springer-Verlag, Berlin.
11. Kawai, H., Kuroyanagi, M., Umehra, K., Ueno, A. and Satake, M. (1988) Studies on the saponins of *Lonicera japonica* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 4769-4775.
12. Paul, F., Kusum, S., Lorraine, R. and Maureen, C. (1988) Luteolin 7-O-(6"-O-malonyl)-β-D-glucoside and trans-chlorogenic acid: Oviposition stimulants for the black swallowtail butterfly. *Phytochemistry* 27: 3439-3448.

(2000년 7월 27일 접수)