

## 하고초(夏枯草, *Prunellae Herba*)로부터 Ursolic acid의 함량분석

김주선 · 강삼식\* · 이경순<sup>1</sup> · 장승엽<sup>2</sup> · 원도희<sup>2</sup>

서울대학교 천연물과학연구소, <sup>1</sup>충북대학교 약학대학, <sup>2</sup>식품의약품안전청

### Quantitative Determination of Ursolic acid from *Prunellae Herba*

Ju Sun Kim, Sam Sik Kang,\* Kyong Soon Lee,<sup>1</sup> Seung-Yeup Chang<sup>2</sup> and Do Hee Won<sup>2</sup>

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460,

<sup>1</sup>Dept. of Pharmacy, Chung Buk National University, Cheongju 360-763,

<sup>2</sup>Natural Medicines Standardization Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

**Abstract**—Ursolic acid was isolated from *Prunellae Herba* (*Prunella vulgaris* var. *lilacina*) and identified by direct comparison with an authentic sample. A method of analysis for the evaluation of ursolic acid was developed based on extraction of ground plant material, followed by quantitative determination using capillary gas chromatography of the TMS derivative. Quantitative analysis by GC after derivatisation under mild silylating conditions showed 0.31% ursolic acid in 20 samples collected throughout regions of Korea while no ursolic acid was detected in the samples of the whole plant of *Thesium chinense*, a substitute for *Prunellae Herba* in southern regions of Korean peninsula.

**Key words**—*Prunella vulgaris* var. *lilacina*, Labiatae, quantitative analysis of ursolic acid, GC, *Thesium chinense*, Santalaceae.

하고초(夏枯草, *Prunellae Herba*)는 꿀풀(*Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai, Labiatae)의 화수(花穗)를 건조한 것으로 화축(花軸)에 많은 포엽 및 꽃받침이 붙어 있고 거의 원주형으로 길이 3~6 cm, 지름 10~15 mm, 겉은 회갈색이고 질은 가볍다. 위쪽에는 화관이 남아 있으며 아래쪽에는 줄기가 있고 꽃받침 속에 4분과가 있다. 포엽은 심장형~편심장형이며 꽃받침과 백상에는 백색의 털이 있다. 산지는 한국, 중국, 일본 등지이며, 청간(淸肝), 이뇨(利尿), 소염(消炎), 소종(消腫), 해열(解熱), 혈압강하(血壓降下) 등에 쓰이는 생약재이다.<sup>1-4)</sup> 성분으로는 전초로부터 oleanolic acid, ursolic acid,<sup>5)</sup> rutin, hyperoside, *cis*- 및 *trans*-caffeic acid,<sup>6)</sup> vitamin, carotenoid, tannin, 유기산 등이 보고<sup>7)</sup>되었고, 꽃으로부터 ursolic acid<sup>8,9)</sup>뿐 아니라 delphinidin과 cyanidin의 glycoside,<sup>6)</sup> *d*-camphor, *d*-fenchone 및 fenchyl alcohol 등<sup>10)</sup>이 보고되었다. 이

외에 지상부로부터 sterol( $\alpha$ -spinasterol, stigmast-7-en-3 $\beta$ -ol)과 각종 ursane 및 oleanane계 triterpenoid들이 보고되어 있다.<sup>11)</sup> 또한 최근에는 *Prunella vulgaris*의 화수로부터 saponin 성분인 vulgarsaponin B, vulgarsaponin A, triterpene계인 ursolic acid, 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$  dihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -24-trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid-28-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester, flavonoid인 quercetin, hyperoside와 ethyl caffeate 및 sterol, fatty acids 등을 분리하여 보고하였다.<sup>12,13)</sup> 활성에 관하여서는 최근에 하고초의 전초로부터 물추출물의 human immunodeficiency virus type-1 억제활성,<sup>14)</sup> 항산화 활성,<sup>15)</sup> 하고초로부터 분리한 polysaccharided의 herpes simplex virus type 1과 2에 대한 활성<sup>16)</sup> 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 하고초의 품질 표준화를 위해 각종 이화학적 시험을 실시하고, 주성분의 하나인 ursolic acid를 지표물질로 하여 분석법을 개발하였다. 또한 현재 국내에서 유통되고 있는 하고초는 하고초 이외에

\*교신저자 : Fax : 02-743-3323

대용품으로 토하고초(土夏枯草)라고 부르는 제비꽃(*Thesium chinense* TURCZ., Santalaceae)이 유통되고 있는 실정인 바 그 타당성이 밝혀진 바 없으므로 이를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**검체** - 1999년 국내에서 시판되고 있는 하고초를 지역별로 40여개 구입하여 이중 20개를 선별하였다. 선별된 하고초 약 50 g 씩을 마쇄한 후 각 검체로 사용하였다. 또한 구입한 하고초중 제비꽃을 선정하여 50 g을 마쇄한 후 제비꽃 검체로 사용하였다

**이화학적 실험** - 대한약전내 생약시험법에 따라 다음과 같이 이화학적 시험을 실시하였다.

1) 회분 : 사기제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 도가니의 뚜껑을 열어 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 올려 500~550°C에서 4시간 이상 강열하여 회화한 후 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔류물을 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다. 방냉은 데시케이터(실리카겔)에서 하였다.

2) 산불용성 회분 : 회분에 묽은염산 25 ml을 조심하여 넣고 5분간 가만히 끓여 불용성물을 정량용여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분에서와 같은 조작으로 무게를 미리 단 사기제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터(실리카겔)에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

**GC의 분석조건** - 본 실험에 사용한 GC system은 Hewlett Packard 5890 Series II Plus를 사용하였으며 분석은 다음과 같은 조건에서 실시하였다.

Column : DB-1 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); column temp. : 250°C (2 min)→300°C (10°C/min, 1 min)→310°C (5°C/min, 8 min); carrier gas : He (0.8 ml/min); detector : FID; detector temp. : 325°C; injector temp. : 250°C; chart speed : 0.5 cm/min.

**Ursolic acid의 분리** - 검체를 MeOH로 수욕상에서 추출하여 얻은 MeOH 액스에 증류수를 가하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 분획하였다. 농축하여 얻은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획을 hexane-EtOAc (10:2)용매로 silica gel column chro-

matography를 실시하여 ursolic acid를 얻고 이를 표준품과 직접적으로 대조하여 확인하였다.

**검액의 조제** - 마쇄한 검체 5.0 g에 CHCl<sub>3</sub> 100 ml를 가하여 60~65°C에서 1시간씩 4회 추출한 후 얻어진 CHCl<sub>3</sub> 액스를 CHCl<sub>3</sub> 5 ml에 용해한 후 이 용액 200 μl를 취하여 N<sub>2</sub> gas로 용매를 제거한 후 pyridine : hexamethyldisilazane : trimethylchlorosilane(5:4:1) 용액 200 μl를 가해 밀봉하여 용해시킨 후 75°C에서 20분간 반응 시켰다.<sup>17)</sup> 이 반응액을 실온으로 한 후 검액으로 사용하였다.

**표준 검량선의 작성** - ursolic acid 2.0 mg을 정량하여 pyridine : hexamethyldisilazane : trimethylchlorosilane (5:4:1) 용액 200 μl를 가해 밀봉하여 용해시킨 후 75°C에서 20분간 반응 시켰다.<sup>17)</sup> 이 반응액을 stock solution으로 하여 CHCl<sub>3</sub>로 희석시켜 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 1 μl를 취하여 GC를 실시하여 얻은 chromatogram으로 부터 면적을 구한 후 이들 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다. 이때 회귀직선 방정식은  $y=43192.13x-7630.54$  ( $r^2=0.9999$ )이었다(Fig. 1 참조).

**Ursolic acid의 함량** - 위에서 조제한 각 검액으로 GC를 실시하여 얻은 chromatogram에서 면적을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 ursolic acid의 함량을 구하였다. 이때 ursolic acid의 peak은 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였다.

## 결과 및 고찰

1999년 국내에서 시판되고 있는 하고초를 지역별로 40여개 검체를 구입하여 그중 20개 검체를 선별하였

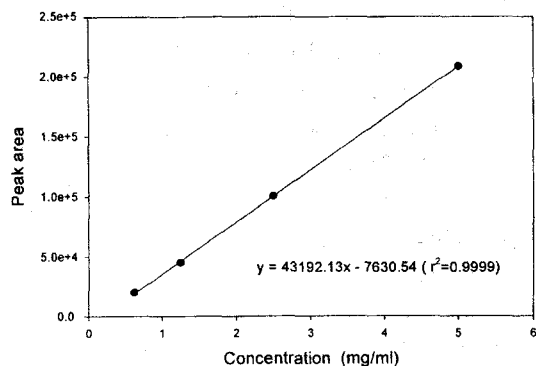
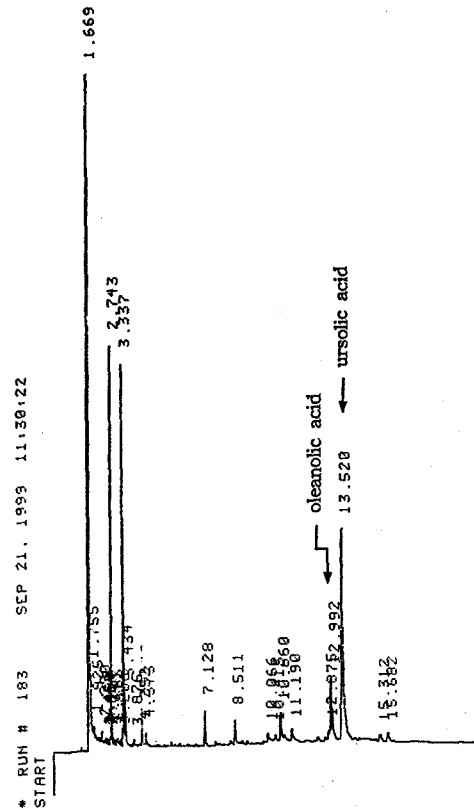


Fig. 1. Ursolic acid의 표준 검량선.

**Table I.** 하고초의 회분, 산불용성회분 및 ursolic acid의 함량

Sample	회분함량 (%)	산불용성회분함량 (%)	ursolic acid 함량 (%)
HG-01	10.35	0.92	0.329
HG-02	18.84	8.40	0.262
HG-03	14.76	5.29	0.251
HG-04	10.04	2.10	0.231
HG-05	14.31	6.60	0.270
HG-06	14.02	5.06	0.279
HG-07	10.77	1.68	0.330
HG-08	10.82	2.61	0.290
HG-09	8.56	0.91	0.242
HG-11	12.67	4.27	0.264
HG-13	9.29	2.32	0.288
HG-16	11.48	1.98	0.364
HG-17	10.31	1.28	0.327
HG-18	13.33	3.21	0.373
HG-19	10.32	1.89	0.468
HG-20	10.28	1.37	0.459
HG-22	10.24	2.78	0.325
HG-23	10.95	2.96	0.296
HG-26	12.60	3.60	0.245
HG-27	14.61	5.80	0.228
Average	11.93 ± 2.46	3.25 ± 2.05	0.310 ± 0.068

다. 선별된 검체로 약진규격이 적합한지를 평가하기 위하여 하고초에 대한 이화학적 시험으로 대한약전에 명시된 회분량과 산불용성회분량을 대한약전내 생약 시험법에 따라 각각의 함량을 분석하였다. 그 결과를 Table I에 나타낸 바 20개 검체중 6개 검체가 대한약전에 명시된 기준 함량을 초과하는 것으로 나타났다. 20개 검체의 평균 회분량은  $11.93 \pm 2.46\%$ , 산불용성회분량은  $3.25 \pm 2.05\%$ 로 대한약전의 함량기준인 13.0% 이하와 5.0% 이하는 회분량 15.0% 이하, 산불용성회분량 6.0% 이하로 하는 것이 적합할 것으로 사료된다. 다음은 하고초의 ursolic acid를 지표물질로 하여 gas chromatography를 실시하였다. 소량의 ursolic acid에 pyridine : hexamethyldisilazane : trimethyl-chlorosilane(5:4:1) 용액(이후 PHT 용액) 200  $\mu$ l를 가해 밀봉하여 용해한 후 75°C에서 20분간 반응 시켜 TMS화 하여 여러 가지 조건에서 gas chromatography를 실시한 결과 Fig. 2에서와 같이 DB-1 (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) capillary column을 사용하여 250°C (2 min)  $\rightarrow$  300°C (10°C/min, 1 min)  $\rightarrow$  310°C (5°C/min, 8 min)의 oven 온도조건에서 가장 좋은 결과를

**Fig. 2.** 하고초의 GC chromatogram.

얻을 수 있었다. 이때 ursolic acid의 retention time은 약 13.5분에서 나타나 다른 물질들의 peak와 잘 분리되므로 적합한 분석조건임을 확인하였다. 이어 표준검량선을 작성하기 위하여 ursolic acid 2.0 mg을 정량하여 PHT 용액 200  $\mu$ l를 가해 밀봉하여 용해시킨 후 75°C에서 20분간 반응 시켰다. 이 반응액을 실온으로 한 후  $\text{CHCl}_3$ 로 희석시켜 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 1  $\mu$ l를 취해 GC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 면적을 구한 후 이들 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다(Fig. 1 참조). 이때 회귀직선 방정식은  $y=43192.13x-7630.54$ 이었으며 상관계수  $r^2$  값은 0.9999로 매우 양호한 직선관계를 확인 할 수 있었다. 마쇄한 검체 5.0 g에  $\text{CHCl}_3$  100 ml를 가하여 60~65°C에서 1시간씩 4회 추출한 후 얻어진  $\text{CHCl}_3$  엑스를  $\text{CHCl}_3$  5 ml에 용해한 후 이 용액 200  $\mu$ l를 취하여  $\text{N}_2$  gas로 용매를 제거한 후 PHT 용액 200  $\mu$ l를 가해 밀봉하여 용해시킨 후 75°C에서 20분간 반응 시켰다. 이 반응액을 실온

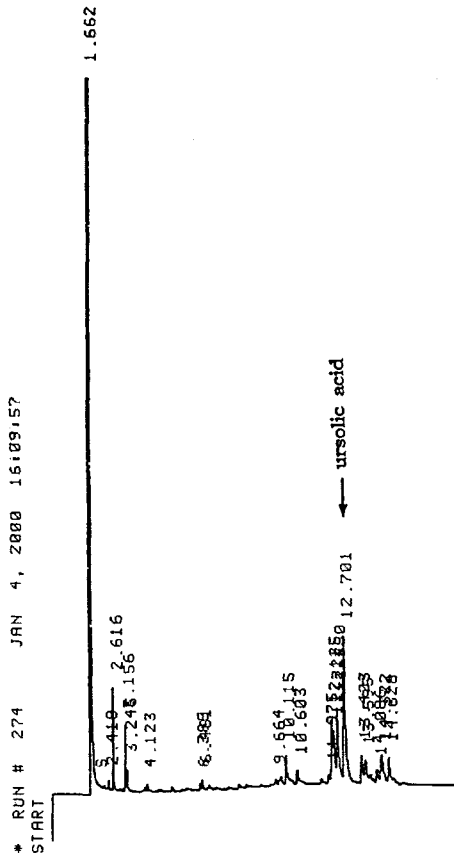


Fig. 3. 하고초 줄기의 GC chromatogram.

으로 한 후 검액으로 사용하여 같은 조건에서 GC를 실시하였다. 여기에서 얻은 chromatogram으로 부터 ursolic acid의 peak 면적을 구한 후 상기 회귀직선방정식으로부터 그 함량을 구한 결과 Table I에서와 같이 0.228~0.468%를 나타내었으며 평균  $0.310 \pm 0.068\%$ 를 나타내었다. 따라서 하고초에 ursolic acid의 함량은 0.25% 이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다. 참고로 하고초 줄기부분만의 ursolic acid 함량을 20개 검체중 2개 검체를 무작위로 선별하여 같은 방법으로 분석한 결과 평균  $0.266 \pm 0.0002\%$ 의 함량을 나타내었다(Fig. 3 참조).

현재 국내에서 유통되고 있는 하고초는 꿀풀과의 하고초(*Prunella vulgaris* var. *lilacina* Nakai)와 단향과의 제비꽃(*Thesium chinense* TURCZ.)이 시판되고 있는 실정인데 이들은 다른 과(科)에 속하는 전혀 다른 식물이다. 하고초로 대용되고 있는 제비꽃에 대하여 하고초와의 비교를 위해 각 MeOH 엑스의 TLC를 실시한 결과 성분조성에 많은 차이가 있는 것으로 나

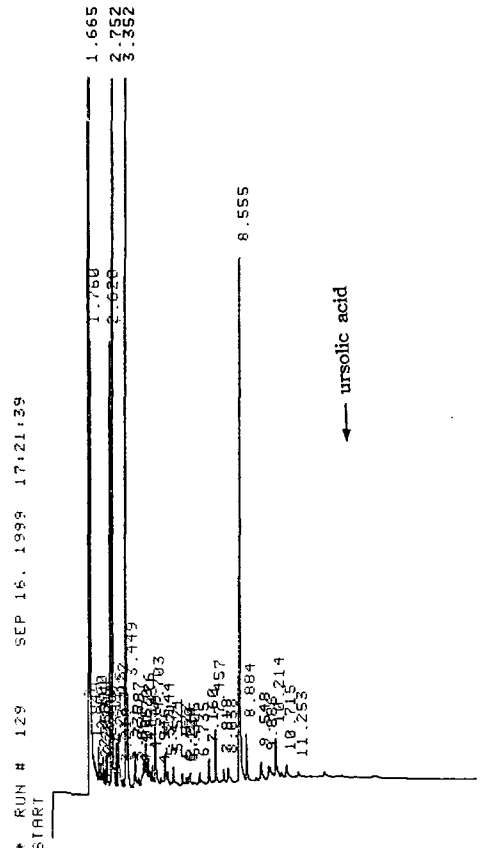


Fig. 4. 제비꽃의 GC chromatogram.

타났으며, TLC뿐만 아니라 GC에서도 하고초의 주성분의 하나인 ursolic acid의 함량을 분석한 결과 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 제비꽃에는 ursolic acid가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 하고초로 대용되고있는 제비꽃은 그 식물이 다르고, 성분이 매우 상이하므로 하고초 대용으로의 사용은 불가하다고 판단되었다.

## 사 사

본 연구에 소요된 경비의 일부는 1999년도 생약한약재 품질 표준화연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 韓大錫 (1988) 生藥學, pp. 345-346. 東明社, 서울.
2. 金在佶 (1992) 原色天然藥物大事典, p. 176. 南山堂,

- 서울.
3. 약전분과회 (1999) 대한약전(제7개정 해설서), pp. 1104-1105. 문성사, 서울.
  4. Perry, L. M. (1980) Medicinal Plant of East & Southeast Asia. Attributed Properties and Uses, p. 192. The MIT Press, London.
  5. Sandra, J. (1963) Phytochemical studies of *Prunella vulgaris* and *Prunella grandiflora*-I. Saponin and triterpene compounds. *Dissertationes Pharm.* 15: 333-341 [*Chem. Abstr.* (1964) 61,6042 g].
  6. Sandra, J. (1963) Phytochemical studies of *Prunella vulgaris* and *Prunella grandiflora*- Flavonoids and phenolicarboxylic acids. *Dissertationes Pharm.* 15: 483-489 [*Chem. Abstr.* (1964) 61,7357 h].
  7. Dorosh, N.M. and Domaratskaya, O.P. (1954) Phytochemical studies on plants of the *Prunella vulgaris* variety and of the type of the common meadow geranium. *Nauch. Studenschesk. Obshchestva L'vov. Med. Inst.* 64-67 [*Chem. Abstr.* (1956) 50,8812 g].
  8. Shimano, T., Mizuno, M., Okamoto, H. and Adachi, I. (1956) Studies on Triterpenoids. IX. On the New Component of *Prunella*, Ursolic acid. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 76: 974-975.
  9. Lee, K.-H., Lin, Y.-M., Wu, T.-S., Zhang, D.-C., Yamagishi, T., Hayashi, T., Hall, I.H., Chang, J.-J., Wu, R.-Y. and Yang, T.-H. (1988) The Cytotoxic Principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hypis capitata*: Ursolic acid and Related Derivatives. *Planta Med.* 54: 308-311.
  10. Baslas, K.K. (1955) Essential Oil from *Prunella vulgaris* Linn. *J. Indian Chem. Soc.* 32: 228-230.
  11. Kojima, H. and Ogura, H. (1986) Triterpenoids from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry* 25: 729-733.
  12. Wang, Z.J., Zhao, Y.Y., Tu, G.Z., Hong, S.L. and Chen, Y.Y. (1999) Studies on the Chemical Constituents from *Prunella vulgaris*. *Acta Pharm. Sin.* 34: 679-681.
  13. Tian, J., Xiao, Z.Y., Chen, Y.Y. and Wang, Z.I. (2000) Structure Identification of Vulgarsaponin A. *Acta Pharm. Sin.* 35: 29-31.
  14. Lam, T.L., Lam, M.L., Au, T.K., Ip, D.T.M., Ng, T.B., Fong, W.P. and Wan, D.C.C. (2000) A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life Sciences* 67: 2889-2896.
  15. Liu, F. and Ng, T.B. (2000) Antioxidative and Free Radical Scavenging Activities of Selected Medicinal Herbs. *Life Sciences* 66: 725-735.
  16. Xu, H.X., Lee, S.H.S., Lee, S.F., White, R.L. and Blay, J. (1999) Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 44: 43-54.
  17. Galon, T., H ke, D. and Dräger, B. (1999) Identification and Quantification of Betulinic Acid. *Phytochem. Anal.* 10: 187-190.

(2000년 11월 20일 접수)