

익모초로부터 Leonurine의 분리 및 함량분석

홍성수 · 황지상 · 이선아 · 황방연 · 하광원¹ · 제금련¹ · 성낙선¹ · 노재섭 · 이경순*

충북대학교 약학대학, ¹식품의약품안전청

Isolation and Quantitative Analysis of Leonurine from Leonuri Herba

Sung Su Hong, Ji Sang Hwang, Seon A Lee, Bang Yeon Hwang, Kwan Won Ha¹,
Keum Ryon Ze¹, Rack Seun Seung¹, Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,
¹Korea Food and Drug Administrations, Seoul 122-704, Korea

Abstract – For the quality control of Leonuri Herba, alkaloid compound, leonurine, was isolated from the MeOH extract of *Leonurus sibiricus* L. (Labiatae) and identified by the spectroscopic analysis. A quantitative analysis of leonurine using HPLC method showed that the average contents were 0.124 ± 0.065% in 34 samples collected throughout the regions of Korea.

Key words – *Leonurus sibiricus* L., leonurine, quantitative analysis, HPLC

인가 근처나 원야에서 자라는 2년초로서 키는 0.5-1.5 m이고 줄기는 4각형이며 백색털이 있어 전체가 백록색이 돌고 중상부에서 가지가 갈라진다. 근생엽은 엽병이 길며 난상원형이고 엽연은 둔한거치엽이거나 결각상이며 꽃이 필 때 없어진다. 경생엽은 대생으로 엽병이 길고 3개로 갈라지며 열편이 다시 2-3개로 갈라진다. 각 소열편은 거치가 있고 최종 열편은 선상 피침형이며 예두이고 회록색이다. 꽃은 6-9월에 피며 연한 홍자색이고 위부분의 엽액에 층층으로 달려 꿀풀과의 특징을 이룬다.^{1,2)}

익모초는 여자들에게 이로운 풀이란 뜻이며, 서양의 익모초 *L. cardiaca*도 영어로 mother wort라 하여 동양과 같은 의미로 불린다. 동양의 익모초는 한·중·일에 분포하고 있는 *L. sibiricus*, *L. japonicus*, *L. heterophyllus*, *L. mansharicus* 등이 수재되어 있으나 서지학적 연구에 의하면 모두 같은 종으로 보이며 흰 꽃이 피는 *L. heterophyllus fleucanthus*와 토이기익모초로 불리는 *L. turkestanicus*만이 일반익모초

와는 다른 종류로 사료된다. 익모초의 성분으로는 leonurine, stachydrine, leonuridine, rutin, benzoic acid 등이 보고되어 있으며 자음양혈, 화어조경, 해갈 제번의 효능이 있는 것으로 알려져 있다.³⁻¹⁰⁾

본 연구에서는 생약, 한약재에 대한 품질 표준화 연구의 일환으로 익모초의 alkaloid 성분의 하나로서 익모초에서만 분리되었고, 다양한 생리활성이 보고된 leonurine을 지표물질로 선정하여 익모초의 MeOH 추출물을 각종 solvent를 이동상으로 한 column chromatography를 실시하여 그 성분을 분리하고 구조를 동정하였으며, 전국 각처에서 수집된 34종의 익모초 시료를 MeOH로 추출하여 HPLC법으로 그 함량을 측정하였다. 본 실험은 우수한 익모초의 유통을 위하여 leonurine의 함량을 설정하여 품질을 표준화하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 연구에 사용한 시료는 2000년 5월 국내 전 지역에서 시판되고 있는 익모초 34종을 구입

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

하여 마쇄한 후 시료로 사용하였다.

시약 및 기기 - ^1H - 및 ^{13}C -NMR은 Varian Unity-300 spectrometer를 사용하였고, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine-5989A를 사용하였다. UV는 JASCO V500 UV/VIS spectrophotometer (Model LE599, U.K.)를, IR은 FT/IR 300E (JASCO) spectrometer를 사용하여 측정하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel (70-230 mesh, Merck)을, TLC plate는 Kieselgel 60 F_{254} plate (0.2 mm, Merck)를 사용하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였고, HPLC용 용매는 HPLC grade를 사용하였다. 발색시약으로는 Dragendorff 시약을 사용하였다.

확인시험 - 이 약의 가루 5.0 g에 MeOH 40 ml를 넣고 환류냉각기를 달아 수욕상에서 20분간 끓인 후 여과한다. 여액에 HCl 1 ml를 넣고 증발건조한 잔류물에 H_2O 2 ml를 넣어 수욕상에서 2분간 가온하고 여과한다. 여액 1방울을 여과지 위에 떨어뜨리고 바람에 말린 후 Dragendorff 시약을 뿌려 방치해두면 황적색을 나타낸다.

건조감량시험 - 분석용 검체 3 g을 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C 에서 5시간 건조하여 테시케이터(실리카 겔)에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C 에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 함량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 $500\text{--}550^\circ\text{C}$ 에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 $500\text{--}550^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 함량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 달아 회분량(%)으로 하였다.

지표성분의 분리정제 - 익모초 5 kg을 건재상에서 구입 후 정확히 감정하여 세말로 하였다. 70% MeOH로 3회 반복 추출하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이것을 물과 *n*-hexane, EtOAc, 수포화 BuOH로 분획한 후 BuOH extract를 Dianion HP-20P column chromatography를 실시하여 물분획물, 20%, 40%, 60%, 80% 및 100% MeOH 분획물을 각각 얻었다. 이 중 Dragendorff 시약에 양성반응을 보인 60% MeOH 분

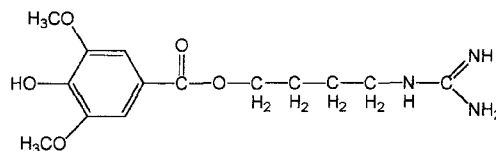


Fig. 1. Chemical structure of Leonurine.

획물을 alumina column chromatography($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 2\%$ HOAc in MeOH)와 Sephadex LH-20 column chromatography(2% HOAc in MeOH)를 시행하여 지표물질인 Leonurine을 얻었다(Fig. 1).

Leonurine - colorless needles; m.p. $195\text{--}196^\circ\text{C}$; λ_{max} (MeOH) nm: 218 (1.3), 277 (0.63); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3150-3400 (OH and NH_2), 1701 (C-O), 1600-1680 (C=NH), 1170-1270; ESI-MS (*m/z*): 312 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 1.58 (2H, m, H-11), 1.88 (2H, m, H-10), 3.30 (2H, m, H-12), 3.86 (6H, s, OMe x2), 4.32 (2H, m, H-9), 7.29 (2H, s, H-2, H-6); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 26.6 (C-10), 27.1 (C-11), 40.4 (C-12), 56.8 (OMe x2), 65.2 (C-9), 108.2 (C-2, C-6), 119.5 (C-1), 144.2 (C-4), 149.5 (C-3, C-5), 158.6 (C-14), 168.4 (C-7).

HPLC의 분석조건 - HPLC는 Young-Lin HPLC 9600 System으로서 M930 Solvent Delivery Pump, M720 UV-VIS Absorbance Detector, Autochro-Win Data System을 사용하였다. Column은 Shiseido ODS (250 \times 4.6 mm I.D.)를 사용하였고, 이동상으로는 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}(0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4) = 20:80$ 을 사용하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 0.7 ml/min, UV detector의 파장은 277 nm에서 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 - 익모초를 세말로 하여 약 1.0 g을 정확히 취하고 MeOH 10 ml를 가하여 실온에서 sonicator로 1시간 동안 추출하여 이중 1 ml를 취하였다. 이를 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준액의 조제 및 검량선의 작성 - 익모초로부터 분리한 정량용 leonurine 1 mg을 1 ml의 MeOH 용액에 용해하고 이것을 MeOH로 희석하여 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml로 만들어 검량선용 표준용액으로 하였고, HPLC 분석은 각각의 표준용액을 취하여 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다(Fig. 2).

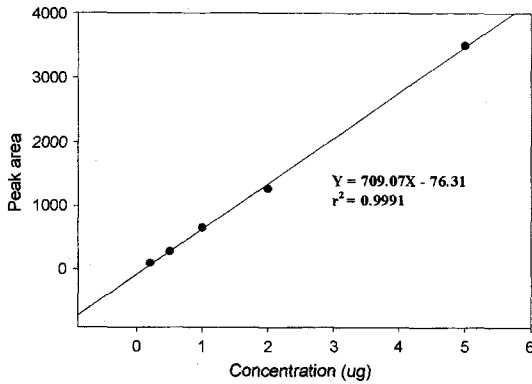


Fig. 2. Calibration Curve of Leonurine.

Leonurine의 함량분석 - 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 검량선에서 구한 회귀 직선 방정식으로부터 각각 leonurine의 함량을 구하였다. 이때 leonurine의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였으며, t_R 은 7.1 min이었다(Fig. 3).

결과 및 고찰

약전 및 생약규격집에 수재되어 있으며 현재 한방에서 널리 이용되고 있는 익모초에 대한 표준화 연구의 일환으로, 익모초의 주성분으로 다양한 생리활성이 보고된 leonurine을 지표물질로 선정하였다. 표준품 확보를 위해 익모초 5 kg을 건재상에서 구입 후 정확히

감정하여 세말로 하였다. 70% MeOH로 3회 반복 추출하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이것을 물과 *n*-hexane, EtOAc, 수포화 BuOH으로 분획한 후 BuOH extract를 Dianion HP-20P column chromatography를 실시하여 물분획물, 20%, 40%, 60%, 80% 및 100% MeOH 분획물을 각각 얻었다. 이중 Dragendorff 시약에 양성반응을 보인 60% MeOH 분획물을 alumina column chromatography($CH_2Cl_2 \rightarrow$ 2% HOAc in MeOH)와 Sephadex LH-20 column chromatography (2% HOAc in MeOH)를 시행하여 지표물질인 leonurine을 얻었다. Leonurine은 IR spectrum에서 $3150-3400\text{ cm}^{-1}$ 에서 -OH로, 1710 cm^{-1} 에서 C-O로, $1600-1680\text{ cm}^{-1}$ 에서 C=NH로 기인하는 band가 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, UV 218 및 277 nm에서 흡수극대를 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 7.29에서 singlet으로 2개의 aromatic proton을 관찰할 수 있었고, δ 3.86에서 2개의 methoxyl기에서 기인하는 singlet signal, δ 1.58과 δ 1.88에서 multiple로 4개의 methylene proton 및 δ 3.30과 δ 4.32에서 multiple로 각각 nitrogen과 oxygen에 근접하는 2개 set의 methylene에서 기인하는 signal이 관찰되었다. 또한, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 11개의 carbon signal을 관찰되었다. ESI-MS spectrum에서는 m/z 312에서 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion peak를 나타내어 분자량 311임을 확인할 수 있었다. 이상의 각종 물리화학적 성상과 spectral data를 문헌과 비교 검토하여 leonurine으로 구조를 동정하였다.¹¹⁾

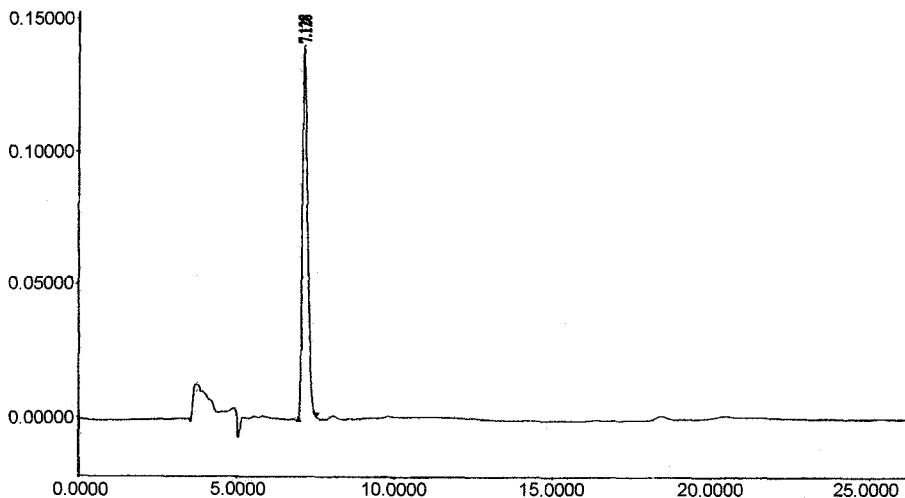


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard Leonurine

Table I. Contents of leonurine, loss of moisture on drying, total ash and acid-insoluble ash in Leonuri Herba

Sample	Content of leonurine(%)	Loss of Moisture on Drying(%)	Total Ash. (%)	Acid insoluble Ash(%)	Remarks
IMC 1	0.28	6.97	11.30	3.06	Seoul
IMC 2	0.19	7.43	10.64	2.30	Seoul
IMC 3	0.14	7.47	7.74	0.88	Seoul
IMC 4	0.07	7.27	6.96	0.28	Seoul
IMC 5	0.07	8.57	6.76	0.48	Seoul
IMC 6	0.10	7.86	7.74	1.56	Seoul
IMC 7	0.16	7.63	7.42	0.73	Seoul
IMC 8	0.09	6.34	6.62	0.67	Seoul
IMC 9	0.14	7.30	5.59	0.52	Seoul
IMC 10	0.10	6.34	5.39	0.45	Seoul
IMC 11	0.08	8.34	6.41	0.66	Seoul
IMC 12	0.13	7.38	5.81	0.65	Seoul
IMC 13	0.20	8.33	15.82	6.92	Daejeon
IMC 14	0.13	8.38	11.21	1.99	Jecheon
IMC 15	0.05	9.81	10.94	1.89	Cheongju
IMC 16	0.04	8.71	9.39	0.87	Daegu
IMC 17	0.11	7.22	7.52	0.91	Daegu
IMC 18	0.12	8.95	10.64	2.54	Andong
IMC 19	0.03	8.30	7.91	0.56	Youngchun
IMC 20	0.05	9.14	11.20	0.86	Hamyang
IMC 21	0.05	8.19	7.64	0.54	Kwangju
IMC 22	n. d.	9.45	4.56	0.42	Wonju
IMC 23	n. d.	7.90	5.30	0.54	Kangnung
IMC 24	n. d.	7.91	6.73	0.83	Chuncheon
IMC 25	0.20	8.44	10.48	0.80	Kwangju
IMC 26	0.16	8.26	10.75	2.09	Kwangju
IMC 27	0.08	8.16	7.72	0.46	Keumsan
IMC 28	0.08	8.40	10.38	0.66	Pusan
IMC 29	0.10	7.37	8.69	1.02	Pusan
IMC 30	0.20	8.01	10.04	1.65	Pusan
IMC 31	0.06	8.14	4.99	0.53	Cheongju
IMC 32	0.10	7.70	12.94	1.50	Chunan
IMC 33	0.11	7.28	7.55	0.93	Jeju
IMC 34	0.41	6.94	9.00	1.25	Suwon
Average \pm S.D.	0.124 \pm 0.066%	7.94 \pm 0.63	8.51 \pm 2.1	1.24 \pm 0.77	

n. d.: not detected

회분시험 결과 평균 $8.51 \pm 2.1\%$ (n=34)로 나타내어 시료 12개가 기준치를 초과하였으며, 건조감량 시험 결과 평균 $7.94 \pm 0.63\%$ (n=34)로 나타났으며 KHP 규정인 13.0% 이하에 34개 시료 모두에서 적합하였다. 산불용성 회분 시험결과 평균 $1.24 \pm 0.77\%$ (n=34)로 나타났으며 KHP 규정인 2.0% 이하에 5개 시료를 제

외한 나머지 시료에서 적합하였다(Table I).

Leonurine은 익모초의 주성분으로 각종 생리활성이 보고되어 있으며, HPLC를 이용하여 쉽게 정량할 수 있으므로 지표성분으로 설정하여 34종의 시료에 대하여 leonurine의 함량을 측정하였다. Column으로는 Shiseido ODS(250 \times 4.6 mm I.D.)를 사용하였고, 여

러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}(0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4) = 20 : 80$ 을 사용하였다. 또한 검출과장으로서 는 최대흡광도인 277 nm를 사용하였다. 이 조건에서 표준품인 leonurine은 t_r 7.1 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 회귀직선 방정식은 $y = 709.07x - 76.31$ ($r = 0.9991$)로 나타났으며, 직선성이 인정되었다. 전국 각지에서 구입한 34종의 익모초(IMC01-IMC34)에 대해 3회 반복 실험하여 상기 회귀직선 방정식으로부터 건조증량(g) 중의 leonurine의 함량(mg)을 구하여 %를 산출하였다(Table 1). 익모초중의 leonurine 함량은 평균 $0.124 \pm 0.06\%$ ($n=34$)을 나타내었으며, 3가지 시료를 제외한 모든 시료에 들어 있었으나 시료에 따라 다소간의 편차가 있었다.

결 론

익모초의 alkaloid성분 중 하나로서, 다양한 생리활성이 보고된 leonurine을 지표물질로 선정하여 익모초의 MeOH 추출물로부터 순수분리하여 구조를 동정하였으며, HPLC에 의한 품질평가법을 확립하였다. 전국 각 지역에 유통되고 있는 익모초 34종(IMC01-IMC34)을 수집하여 회분시험결과 평균 $8.51 \pm 2.1\%$ ($n=34$)로 나타내어 시료 12개가 기준치를 초과하였으며, 건조감량 시험결과 평균 $7.94 \pm 0.63\%$ ($n=34$)로 나타났으며 KHP 규정인 13.0% 이하에 34개 시료 모두에서 적합하였다. 산불용성 회분 시험결과 평균 $1.24 \pm 0.77\%$ ($n=34$)로 나타났으며 KHP 규정인 2.0% 이하에 5개 시료를 제외한 나머지 시료에서 적합하였다. 또한, leonurine 함량을 측정된 결과 평균 $0.124 \pm 0.06\%$ ($n=34$)을 나타내었으며, 익모초의 표준화를 위해서는 leonurine의 함량기준을 0.03% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 2001년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 한국약학대학협의회 약전분과회(1999) p. 1088, 대한약전 제7개정, 문성사, 서울.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순(1998) 완역중약대사전, pp. 4453-4460, 도서출판 정담, 서울.
3. Chen, C. X. and Kwan, C. Y. (2001) Endothelium-independent vasorelaxation by leonurine, a plant alkaloid purified from Chinese mother wort. *Life Sciences* 68: 953-960.
4. Tasdemir, D., Scapozza, L., Zerbe, O., Linden, A., Calis, I. and Sticher, O. (1999) Iridoid glycosides of *Leonurus persicus*. *J. Nat. Prod.* 62(6): 811-816.
5. Morita, H., Gonda, A., Takeya, K., Itokawa, H., and Iitaka, Y. (1997) Cycloleonuripeptide D, A New proline-rich cyclic Decapeptide from *Leonurus heterophyllus*. *Tetrahedron* 53(5): 1617-1626.
6. Morita, H., Gonda, A., Takeya, K., Itokawa, H., Hirano, T., Oka, K. and Shirota, O. (1997) Solution State Conformation of an Immunosuppressive Cyclic Dodecapeptide, Cycloleonurinin. *Tetrahedron* 53(22): 7469-7478.
7. Calis, I., Ersoz, T., Tasdemir, D. and Ruedi, P. (1992) Two phenylpropanoid glycosides from *Leonurus glaucescens*. *Phytochemistry* 31(1): 357-359.
8. Luo, S. R. (1985) Separation and determination of alkaloids of *Leonurus sibiricus*. *Zhong Yao Tong Bao*. 10(1): 32-35.
9. Cheng, K. F., Yip, C. S., Yeung, H. W. and Kong, Y. C. (1979) Leonurine, an improved synthesis. *Experientia* 35(5): 571-572.
10. Sugiura, S., Inoue, S., Hayashi, Y., Kishi, Y. and Goto, T. (1969) Structure and synthesis of Leonurine. *Tetrahedron* 25: 5155-5161.
11. Yeung, H. W., Kong, Y. C., Lay, W. P. and Cheng, K. F. (1977) The Structure and Biological effect of Leonurine. *Planta Med.* 31: 51-56.

(2001년 11월 16일 접수)