

## 지유로부터 Ziyuglycoside I의 함량분석

김호경\* · 김영아 · 황성원 · 고병섭

한국한의학연구원 검사사업부

### Quantitative Analysis of Ziyuglycoside I from Sanguisorbae Radix

Ho Kyoung Kim\*, Young A Kim, Seong Won Hwang and Byoung Seob Ko

Quality Control of Herbal Medicine Department, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

**Abstract** – Sanguisorbae Radix has hemostatic, analgesic and astrigent properties and it has been used for the treatment of burns, scalds and internal hemorrhage. Ziyuglycoside I was isolated from Sanguisorbae Radix and identified by the spectroscopic methods. In order to evaluate the quality of it, quantitative determination of Ziyuglycoside I in Sanguisorbae Radix using HPLC method has been conducted. Quantitative analysis of Ziyuglycoside I showed average 3.005% in 30 samples collected throughout the regions of Korea.

**Key words** – Sanguisorbae Radix, Ziyuglycoside I, Quantitative analysis, HPLC method

지유(地榆, Sanguisorbae Radix)는 오이풀(*Sanguisorba officinalis* Linne) 및 동속근연식물(장미과, Rosaceae)의 뿌리로 한방에서는 냉혈지혈(涼血止血), 해독렴창(解毒斂瘡), 치변혈(治便血)의 효능이 있어 치출혈(痔出血), 혈리(血痢), 붕루(崩漏), 수화탕상(水火燙傷), 용종창독(癰腫瘡毒)에 사용되어 왔다.<sup>1-3)</sup>

그러나 지유의 품질을 평가할 수 있는 지표물질의 선정이나 이를 이용한 성분함량에 관한 연구는 보고된 바 없어 본 연구자는 생약의 품질규격화 연구의 일환으로 지유의 약효 성분인면서 함량이 비교적 많고 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로 한 지유의 성분분석법을 확립하고, 실제 지유 중의 지표성분의 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성분을 정량하여 지유의 품질관리 기준을 설정하고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료** – 본 연구에 사용한 지유는 2001년 9월 국내에서 판매되는 30종을 구입하여 분쇄한 후 시료로 사용하였다.

**시약 및 기기** – Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck), ODS(Lichroprep RP-18, Merck)를 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>

(Merck)와 RP-18 F<sub>254s</sub>(Merck)를 사용하였다. 시약과 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였으며, HPLC용 용매는 HPLC grade(Merck)를 사용하였다. Negative-ion FAB-Mass (matrix: m-NBA)는 VG70-VSEQ(England)를, <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C-NMR은 Bruker AM-500(Germany)를 사용하였으며 HPLC는 Shimadzu LC-10A<sub>VP</sub> System Controller, LC-10AT<sub>VP</sub> Pump, SPD-10A<sub>VP</sub> UV-VIS Detector, SIL-10AD<sub>VP</sub> Auto Injector (Japan)를 사용하였다. 회화로는 Barnstead Thermolyne사의 F4800 Furnace를 사용하였다.

**건조감량시험** – 무게를 단 칭량병에 시료 2~6 g을 넣어 무게를 정밀하게 측정하여 105°C에서 5시간 건조하고, 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 정밀하게 측정하였다. 이것을 다시 105°C에서 1시간마다 무게를 측정하여 항량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

**회분시험** – 사기도가니를 550°C에서 1시간 이상 강열하여 데시케이터에서 방냉한 후 그 무게를 정밀히 달았다. 시료 2~4 g을 사기도가니에 넣어 무게를 정밀하게 측정한 후 회화조에 넣어 서서히 온도를 올리면서 550°C에서 4시간 이상 가열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 데시케이터에서 방냉한 다음 무게를 정밀하게 측정하여 회분량(%)으로 하였다.

**산불용성 회분시험** – 회분에 묻은 염산 25 ml를 천천히 조심스럽게 넣고 5분간 가만히 끓여 불용물을 정량용여과

\*교신저자(E-mail) : hkkim@kiom.re.kr

지를 써서 여과한 후 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한다. 무게를 정밀하게 측정한 사기도가니에서 3 시간 강열(550°C)하여 데시케이터에서 방랭한 후 그 무게를 정밀하게 측정하여 산불용성회분량(%)으로 하였다.

**지표성분의 분리 및 동정** - 지유(4.0 kg)을 MeOH로 15 일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축하여 MeOH 엑스를 제조하였다. MeOH 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 동량의 methylene chloride(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)를 가하여 진탕하고 분획(3회)하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층으로 하였다. H<sub>2</sub>O층은 다시 EtOAc로 앞의 방법과 같이 분획(3회)하여 EtOAc분획을 얻었고, H<sub>2</sub>O층은 다시 *n*-BuOH로 분획(3회)하여 *n*-BuOH층과 H<sub>2</sub>O층을 얻었다. EtOAc분획물(15.8 g)을 ODS column chromatography(70% MeOH)를 실시하여 7개의 fraction을 얻었고 다시 fr. 5를 재결정하여 compound 1을 분리하였다. 각종 spectral data와 비교 검토한 결과 compound 1은 ziyuglycoside I으로 확인되었다(Scheme I).

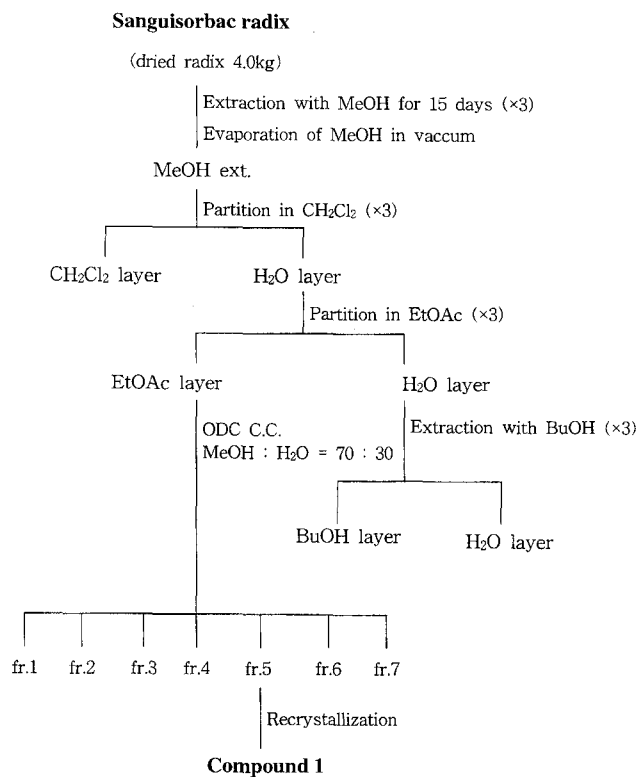
**Compound 1의 물리 화학적 성상** - 백색 결정; FAB(-) Mass(*m/z*) : 765[M-H]<sup>-</sup>, 603[M-glc-H]<sup>-</sup>, 453[M-glc-ara-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (MeOH, 500 MHz) : δ 0.94, 0.99, 1.22, 1.29, 1.42 (each 3H, s, 5 × CH<sub>3</sub>), 1.09 (1H, d, *J*=6.4 Hz, H-30), 1.72 (1H, s, H-29), 2.96 (1H, s, H-18), 3.35 (1H,

dd, *J*=11.4, 3.5 Hz, H-3), 3.85 (1H, d, *J*=11.7 Hz, H-5'), 4.18 (1H, dd, *J*=8.6, 2.6 Hz, H-3'), 4.26 (1H, t, *J*=8.4 Hz, H-2"), 4.51 (1H, brd, *J*=11.5 Hz, H-6"), 4.78 (1H, d, *J*=6.9 Hz, H-1"), 5.58 (1H, brs, H-12), 6.34 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1"); <sup>13</sup>C-NMR (MeOH, 125 MHz) : 38.2 (C-1), 27.2 (C-2), 89.2 (C-3), 39.4 (C-4), 56.4 (C-5), 19.2 (C-6), 34.0 (C-7), 40.0 (C-8), 49.1 (C-9), 37.5 (C-10), 24.5 (C-11), 128.9 (C-12), 139.7 (C-13), 42.6 (C-14), 29.7 (C-15), 26.6 (C-16), 48.2 (C-17), 54.9 (C-18), 73.1 (C-19), 42.6 (C-20), 26.6 (C-21), 37.5 (C-22), 28.7 (C-23), 17.9 (C-24), 16.1 (C-25), 17.3 (C-26), 25.1 (C-27), 177.4 (C-28), 27.5 (C-29), 17.2 (C-30), 108.0 (ara-1), 73.4 (ara-2), 75.1 (ara-3), 70.0 (ara-4), 67.3 (ara-5), 96.3 (glc-1), 74.6 (glc-2), 79.4 (glc-3), 71.7 (glc-4), 79.7 (glc-5), 62.8 (glc-6)

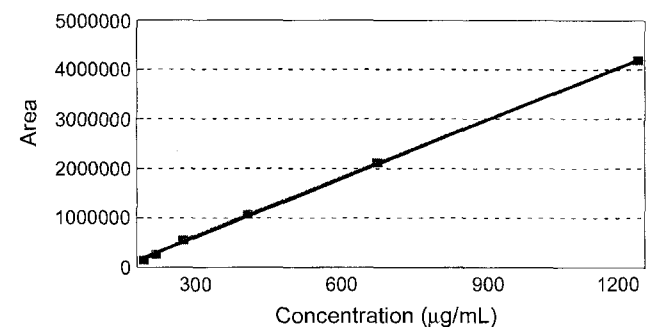
**HPLC 조건** - HPLC는 Shimadzu LC-10A<sub>VP</sub> System으로서 LC-10AT<sub>VP</sub> Pump, SPD-10A<sub>VP</sub> UV-VIS Detector, SIL-10AD<sub>VP</sub> Auto Injector(Japan)를 사용하였다. Column은 Luna C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 33 : 67(v/v)이 되도록 하였다. 유속은 1.0 ml/min으로, UV Detector 파장은 203 nm에서 고정하여 실시하였다.

**표준액의 조제** - Ziyuglycoside I 2.4 mg을 HPLC용 methanol 2 ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 하여 37.5, 75, 150, 300, 600, 1200 μg/ml로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액 10 μl를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하여 얻은 회귀직선 방정식은  $y=3476.192x+17160.905$ 이고 상관계수는 0.9999로서 1.0에 접근하였다(Fig. 1).

**검액의 조제** - 검체 2.0 g을 정확히 평량하여 methanol 15 ml를 가해 30분간 초음파 진탕한 후 3000 rpm에서 원심 분리후에 추출액을 얻고, 잔사를 총 3회 추출하였다. 추출



**Scheme 1.** Extraction and isolation of ziyuglycoside I from Sanguisorbac radix.



**Fig. 1.** Calibration Curve of Ziyuglycoside I.

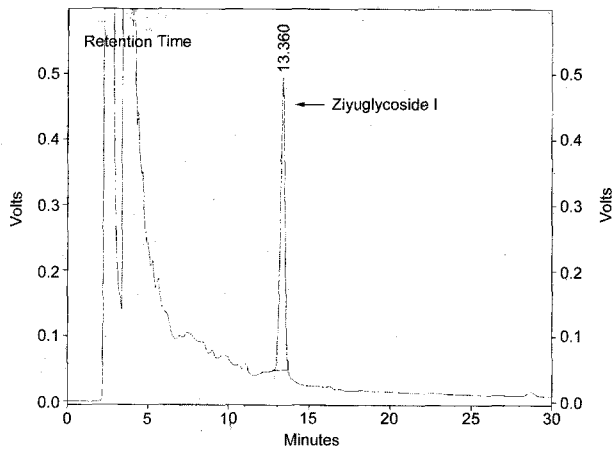


Fig. 2. HPLC Chromatogram of Sanguisorbae Radix

액을 모두 합하여 methanol 5 ml를 가하여 정확히 50 ml를 만들어 0.45 μm membrane filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 각각의 검액을 10 μl씩 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 지표물질의 함량을 구하였다(Fig. 2).

**결과 및 고찰**

국내 시판되고 있는 지유에 대한 품질 표준화 연구의 일환으로 지유의 약효성분이면서 함량이 비교적 많고 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로 하여 지유의 성분 분석법을 확립하고, 실제 지유 중의 지표성분의 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량하여 지유의 품질관리 기준을 설정하고자 하였다.

지유 MeOH 엑스를 제조하여 MeOH 추출물을 증류수로 현탁시킨 다음 동량의 methylene chloride(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)를 가하여 진탕, 분획하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>층으로 하였다. 물층은 다시 EtOAc로 분획하여 EtOAc 및 H<sub>2</sub>O 분획을 얻었다. EtOAc 분획물을 감압농축후 ODS column chromatography를 실시하여 얻은 fraction을 MeOH로 정제하여 compound 1을 단리하였다(Fig. 3). 각종 spectral data와 문헌을 비교 검토한 결과 compound 1은 ziyuglycoside I으로 확인되어 지유의 HPLC로 정량이 가능한 지표성분을 ziyuglycoside I으로 선정하고 표준품을 확보하였다.

Compound 1은 Negative FAB-MS spectrum에서는 m/z 765에서 [M-H]<sup>-</sup>의 molecular ion peak, m/z 603 [M-glc-H]<sup>-</sup>에서 glucose기가 탈락된 fragment peak, m/z 453[M-glc-ara-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>에서 glucose, arabinose 및 water기가 탈락된 fragment peak이 관찰되었다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 0.94, 0.99, 1.22, 1.29, 1.42,

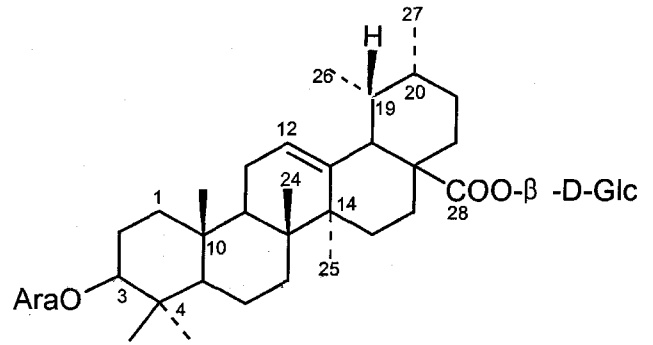


Fig. 3. Chemical Structure of Ziyuglycoside I.

1.72 ppm에서 6개의 tertiary methyl에 기인하는 signal이 singlet으로, δ 1.09 ppm에서 1개의 secondary methyl에 기인하는 signal이 doublet(J=6.4 Hz, C<sub>20</sub>Me)으로 관찰되었으며, δ 5.58 ppm에서 ethylenic proton(H-12)에 기인하는 signal이 brs로 나타나고 δ 2.96 ppm에서 H-18에 기인하는 signal이 singlet으로 관찰되어 C-19에 치환기가 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, δ 4.78(d, J=6.9 Hz)과 6.34(d, J=8.0 Hz) ppm에서 arabinose와 glucose의 anomeric proton을 확인할 수 있어 2개의 당이 결합되어 있음을 확인할 수 있었다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 δ 128.9과 139.7 ppm에서 C-12와 C-13에 기인하는 ethylenic signal을 확인할 수 있어, urs-12-en skeleton을 이루고 있고 δ 96.3과 108.0 ppm에서 glucose와 arabinose의 anomeric carbon을 확인할 수 있었다.

이상의 기기분석 결과 문헌<sup>4,5)</sup>과의 비교로 Compound 1은 ziyuglycoside I으로 확인, 동정하였다.

건조감량시험에서는 평균 및 표준편차는 8.246±1.305% (n=30)로 시료에 따라 5.656%~11.067%로 차이를 보였으나 시료 모두 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>6)</sup>에 규정하고 있는 16.0% 이하였다. 따라서 지유의 건조감량은 16% 이하로 규정하면 타당하리라 생각된다.

회분함량 시험에서는 평균 및 표준편차는 10.711±3.204% (n=30)로 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>6)</sup>에 규정하고 있는 7.0% 이하 보다는 많았으며 시료에 따라 3.985%~17.932%로 차이를 보였으나 시료 3개를 제외하면 지유의 회분함량은 15.0% 이하이므로 회분함량 규정을 15.0% 이하로 하면 회분 함량은 15.0% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

또한 산불용성회분 시험에서 평균 및 표준편차는 1.034±0.466%(n=30)로 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>6)</sup>에 규정하고 있는 1.5% 이하 보다 적었으며 시료에 따라 0.408%~2.512%로 차이를 보였으나 시료 3개를 제외하면 지유의 산불용성회분함량은 1.5% 이하이므로 산불용성회분함량 규정을 1.5% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

**Table I.** The contents of Ziyuglycoside, loss on drying, residue on ignition and residue on acid insoluble ignition from various *Sanguisorbae Radix*

Sample	Amount (%)	Lose on Drying (%)	Residue on Ignition (%)	Residue on Acid Insoluble Ignition (%)
ZY 1	5.197	6.987	8.477	0.754
ZY 2	1.556	5.656	17.932	0.997
ZY 3	2.292	6.626	3.985	0.550
ZY 4	1.819	7.526	10.539	0.901
ZY 5	1.849	6.543	10.578	0.714
ZY 6	2.727	6.381	8.776	1.423
ZY 7	3.464	9.205	7.224	0.857
ZY 8	1.683	8.059	10.037	1.168
ZY 9	1.844	10.331	6.202	0.721
ZY 10	2.530	8.083	11.389	1.453
ZY 11	1.469	6.082	12.782	0.664
ZY 12	1.309	8.929	10.357	0.607
ZY 13	0.968	10.613	8.552	0.408
ZY 14	1.528	7.284	10.762	1.839
ZY 15	1.739	8.390	13.096	0.881
ZY 16	5.453	7.862	13.018	0.848
ZY 17	3.797	8.886	8.536	0.726
ZY 18	4.975	9.124	12.809	1.300
ZY 19	3.328	9.249	11.478	1.397
ZY 20	4.167	7.354	14.570	0.732
ZY 21	4.286	8.912	17.008	2.512
ZY 22	4.047	9.262	7.101	0.543
ZY 23	5.908	11.067	5.662	1.205
ZY 24	1.653	9.396	10.531	0.916
ZY 25	3.486	8.802	10.106	1.370
ZY 26	4.150	8.147	11.697	1.753
ZY 27	1.993	8.486	16.500	0.632
ZY 28	2.017	7.717	10.130	0.616
ZY 29	4.319	8.089	10.733	1.392
ZY 30	4.592	8.320	10.760	1.130
Mean±S.D.	3.005±1.434	8.246±1.305	10.711±3.204	1.034±0.466

지유의 지표물질인 ziyuglycoside I의 함량을 측정하기 위하여 HPLC법을 이용하여 정량하였다. Column으로는 Luna C<sub>18</sub> (4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 33 : 67(v/v)이 되도록 하였다. 유속은 1.0 ml/min으로, UV Detector 파장은 203 nm에서 고정하여 실시하였다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 37.5~1200 μg/ml의 농도에서 직선성이 인정되었으며 회귀직선 방정식은  $y=3476.192x+17160.905$ 이고 상관계수는 0.9999로서 1.0에 접근하였다. 이와 같은 조건에서 전국 각지에서 구입한 지유 30종의 ziyuglycoside I 함량을 시험하여 건조중량(g)중의 함량을 구하여 %를 산출하였다

(Table I). 지유중의 ziyuglycoside I 함량의 평균 및 표준편차는  $3.005\pm 1.434\%(n=30)$ 이었고 함량이 매우 낮은 3개를 제외하면 모두 1.5% 이상의 ziyuglycoside I을 함유하고 있으므로 지유의 표준화를 위한 ziyuglycoside I의 함량은 1.5% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

## 결 론

1. 지유 4.0 kg을 MeOH로 15일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축하여 얻은 MeOH 추출물을 증류수로 현탁 시킨 다음 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc 및 *n*-BuOH로 3회 용매분

확하였다. EtOAc 분획물을 감압농축 후 ODS gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 ziyuglycoside I을 분리, 동정하였다.

2. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해에는 건조감량을 16.0% 이하로 규정하고 있는데 30개의 시료에 대한 건조감량시험 결과, 평균 및 표준편차는  $8.246 \pm 1.305\%$ 로 시료에 따라 5.656%~11.067%로 차이를 보였으나 시료 모두 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해<sup>4)</sup>에 규정하고 있는 16.0% 이하였다. 따라서 지유의 건조감량은 16% 이하로 규정하면 타당하리라 생각된다.

3. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해에는 회분함량을 7.0% 이하로 규정하고 있는데 42개의 시료에 대한 회분시험 결과, 평균 및 표준편차는  $10.711 \pm 3.204\%$ 로 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해에 규정하고 있는 7.0% 이하 보다는 많았으며 시료에 따라 3.985%~17.932%로 차이를 보였으나 시료 3개를 제외하면 지유의 회분함량은 15.0% 이하이므로 회분함량 규정을 15.0% 이하로 하면 회분 함량은 15.0% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

4. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해에는 산불용성 회분함량을 1.5% 이하로 규정하고 있는데 30개의 시료에 대한 산불용성회분 시험 결과, 평균 및 표준편차는  $1.034 \pm 0.466\%$ 로 대한약전에 규정하고 있는 1.5% 이하 보다 적었으며 시료에 따라 0.408%~2.512%로 차이를 보였으나 시료 3개를 제외하면 지유의 산불용성회분함량은 1.5% 이하이므로 산불용성회분함량 규정을 1.5% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

5. 지유의 주성분인 ziyuglycoside I을 지표물질로 하여 HPLC 방법을 확립하여 시료 30종의 ziyuglycoside I 함량

을 시험한 결과, 평균 및 표준편차는  $3.005 \pm 1.434\%$ 이었다. 함량이 매우 낮은 3개를 제외하면 모두 1.5%이상의 ziyuglycoside I을 함유하고 있으므로 지유의 표준화를 위한 ziyuglycoside I의 함량은 1.5% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

## 사 사

본 연구는 2001년도 한국한의학연구원 기관고유사업인 한약재 수처리에 관한 연구의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- 康秉秀, 高雲彩, 金先熙, 盧昇鉉, 徐榮培, 宋昊竣, 辛民教, 安德均, 李尙仁, 李映鍾, 李棣熙, 朱榮丞(1995) 본초학, **392**: 영림사, 서울.
- 이창복(1993) 대한식물도감, **445**: 향문사, 서울.
- 육창수(1993) 원색한국약용식물도감, **278**: 아카데미서적, 서울.
- Wenjuan, Q., Xiue, W., Junjie, Z., Fukuyama, Y., Yamada, T. and Nakagawa, K.(1986) Triterpenoid glycosides from leaves of *Ilex cornuta*. *Phytochemistry* **25**(4): 913.
- Cheng, D. L. and Cao, X. P.(1992) Pomolic acid derivatives from the root of *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **31**(4): 1317.
- 한국의약품수출입협회, 한국의약품시험연구소(2000) 한약(생약)규격집, **436**: 대명기획, 서울.

(2002년 4월 20일 접수)