생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
33(2) : 96 ~ 99 (2002)

왕불류행 중 20-Hydroxyecdysone의 함량분석

김호경* · 이혜원 · 황성원 · 고병섭
한국한의학연구원 검사사업부

Quantitative Analysis of 20-hydroxyecdysone in Melandrii Herba

Ho Kyoung Kim*, Hye Won Lee, Seong Won Hwang and Byoung Seob Ko
Quality Control of Herbal Medicine Department, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

Abstract – 20-Hydroxyecdysone was isolated from Melandrii Herba and identified by the spectroscopic methods. In order to evaluate the quality of it, quantitative determination of 20-hydroxyecdysone in Melandrii Herba using HPLC method has been conducted. Content of 20-hydroxyecdysone in Melandrii Herba showed average 0.0138% in 42 samples collected throughout the regions of Korea.

Key words – Melandrii Herba, 20-Hydroxyecdysone, Quantitative analysis, HPLC method.

왕불류행(王不留行, Melandrii Herba)은 장구채(*Melandrium firmum* Rohrbach) 및 그 밖의 동속근연식물(석죽과, Caryophyllaceae)의 열매가 익었을때 지상부를 건조한 것으로 한방에서는 활혈통경(活血通經), 하유소종(下乳消腫), 치부녀경폐(治婦女經閉)의 효능이 있어 경통(經通), 유즙불통(乳汁不通), 유옹종통(乳癰腫痛) 등에 사용되어 왔다.[1-2] 저자 등은 천연물 약품 화학적 방법으로 본 식물에서 성분분리를 실시하여 3종류의 ecdysteroid를 보고한 바 있다.[3]

그러나 왕불류행의 품질을 평가할 수 있는 지표물질의 선정이나 이를 이용한 성분함량에 관한 연구는 보고된 바 없어 본 연구자들은 생약의 품질규격화 연구의 일환으로 왕불류행의 약효성분이면서 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로한 왕불류행의 성분분석법을 확립하고, 실제 왕불류행 중의 지표성분의 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량하여 왕불류행의 품질관리 기준을 설정하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 연구에 사용한 왕불류행은 2000년 5월 국내(광주, 군산, 금산, 대구, 대전, 마산, 부산, 서울, 성남, 순천, 안동, 영주, 울산, 원주, 의성, 익산, 전주, 제주, 진주, 청주, 평택)에서 판매되는 42종을 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_{254} (Merck)와 RP-18 F_{254s}(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, ^1H 및 ^{13}C-NMR은 Bruker AM-500(Germany)를 사용하였으며 HPLC는 Shimadzu LC-10A_{VP} System Controller, LC-10AT_{VP} Pump, SPD-10A_{VP} UV-VIS Detector, SIL-10AD_{VP} Auto Injector(Japan)를 사용하였다. 회화로는 Barnstead Thermolyne 사의 F4800 Furnace를 사용하였다.

건조감량시험 – 무게를 단 칭량병에 시료 2~6 g을 넣어 무게를 정밀하게 측정하여 105°C에서 5시간 건조하고, 데시케이터에서 방랭한 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 방랭한 후 그 무게를 정밀히 달았다. 시료 2~4 g을 사기도가니에 넣어 무게를 정밀하게 측정한 후 회화로에 넣어 서서히 온도를 올리면서 550°C에서 4시간 이상 가열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 데시케이터에서 방랭한 다음 무게를 정밀하게 측정하여 회분량

*교신저자(E-mail) : hkkim@kiom.re.kr

(%)으로 하였다.

산불용성회분시험 – 회분에 묻은 염산 25 ml를 천천히 조심스럽게 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용여과지를 써서 여과한 후 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한다. 무게를 정밀하게 측정한 사기도가니에서 3시간 강열(550°C)하여 데시케이터에서 방랭한 후 그 무게를 정밀하게 측정하여 산불용성회분량(%)으로 하였다.

지표성분의 분리 및 동정 – 전보[3]에 따라서 실시하였다.

20-Hydroxyecdysone의 물리 화학적 성상 – 전보[3] 참조

HPLC 조건 – HPLC는 Shimadzu LC-10A_{VP} System으로서 LC-10AT_{VP} Pump, SPD-10A_{VP} UV-VIS Detector, SIL-10AD_{VP} Auto Injector(Japan)를 사용하였다. Column은 Luna C_{18}(4.6 × 250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 CH_3CN : H_2O=21 : 79(v/v)이 되도록 하였다. 유속은 0.5 ml/min으로, UV Detector 파장은 254 nm에서 고정하여 실시하였다.

표준액의 조제 – 20-hydroxyecdysone 1.0 mg을 HPLC용 methanol 2.0 ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 하여 500, 250, 125, 31.25, 15.625 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=22730.297x+3975.672이고 R^2=1.000이었다.

검액의 조제 – 검체 4.0 g을 정확히 평량하여 methanol 40 ml를 가해 실온에서 3회 추출, 여과 및 감압농축하여 methanol 추출물을 얻었다. Methanol 추출물을 증류수 10 ml에 녹인 후 동량의 ether로 3회 탈지한 다음 물층을 감압농축하였다. 이를 HPLC용 methanol 10 ml에 용해시킨 후 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.

결과 및 고찰

국내에서 시판되고 있는 왕불류행에 대한 품질 표준화 연구의 일환으로 왕불류행의 약효성분이면서 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로 하여 왕불류행의 성분분석법을 확립하고, 실제 왕불류행 중의 지표성분의 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량하여 왕불류행의 품질관리 기준을 설정하고자 하였다.

왕불류행 4.0 kg을 MeOH로 15일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축하여 얻은 추출물을 증류수에 현탁시킨 다음 CH_2Cl_2, EtOAc 및 n-BuOH로 용매분획하였다. n-BuOH 분획물을 Amberlite XAD-4, Sephadex LH-20 및 silica gel을 사용한 column chromatography를 반복실시하여 단일 반점을 얻었으나 NMR spectrum과 HPLC에 의해 혼합물로 확인되어 Recycling Preparative HPLC(MeOH : CH_3CN = 60 : 40)를 실시한 후 순수한 20-hydroxyecdysone을 단리하였다. 이 화합물의 각종 spectral data와 문헌값은 완전히 일치하여 왕불류행의 HPLC로 정량이 가능한 지표성분을 20-hydroxyecdysone으로 선정하고 표준품을 확보하였다(Fig. 1).

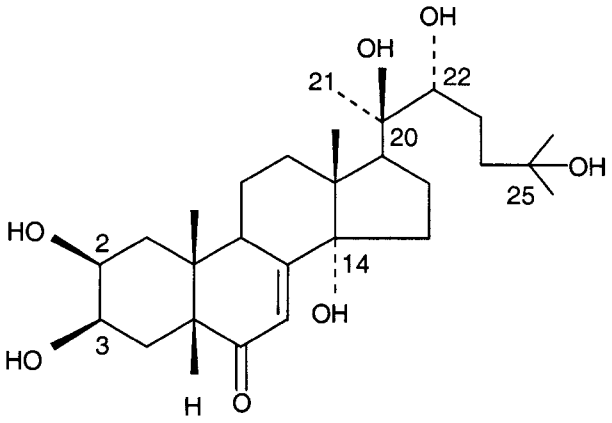

Fig. 1. Chemical structure of 20-hydroxyecdysone.

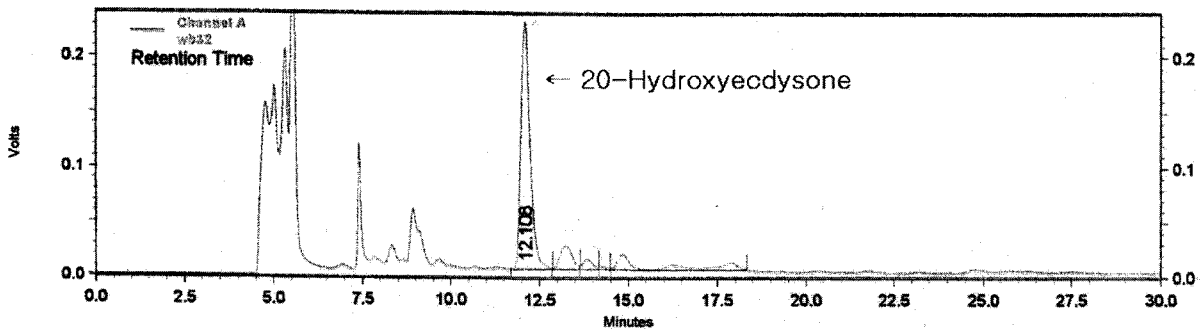

Fig. 2. HPLC chromatogram of extract from Melandrii Herba.

건조감량시험에서는 평균 및 표준편차는 7.001±1.184% (n=42)로 시료에 따라 4.332%~9.144%로 차이를 보였으며, 시료 31개는 대한약전 및 대한약전외 한약 규격 주해[4]에 규정하고 있는 8.0% 이하였다. 시료 3개를 제외하면 왕불유행의 건조감량은 8.5% 이하이므로 건조감량 규정을 8.5% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

회분함량시험에서는 평균 및 표준편차는 7.324±1.720% (n=42)로 시료 모두 대한약전 및 대한약전외 한약 규격 주해[4]에 규정하고 있는 3.0% 이하 보다는 많았다. 시료 3개를 제외하면 왕불유행의 회분함량은 10% 이하이므로 회분함량 규정을 10% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

또한, 산불용성회분 시험에서는 평균 및 표준편차는 1.194±0.618%(n=42)로 대한약전 및 대한약전외 한약 규격 주해[4]에 규정하고 있는 1.0% 이하 보다는 많았으며 시료 20개는 1.0% 이하로써 규정에 적합하였다. 시료 2개를 제외하면 왕불유행의 산불용성회분 함량은 2.0% 이하이므로 산불용성회분 함량을 2.0% 이하로 하면 타당하리라 생각된다.

왕불류행의 지표물질인 20-hydroxyecdysone의 함량을 측정하기 위하여 HPLC법을 이용하여 정량하였다. Column으로는 ODS를 사용하였고 가장 분리능이 양호한 용매계로 $CH_3CN : H_2O = 21 : 79$(v/v)가 되도록 하였다. 또한 유속은 0.5 ml/min으로 하였고 검출파장은 254 nm에서 고정하여 실시하였다(Fig. 2). 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 15~500 μg/ml의 농도에서 직선성이 인정되었으며 회귀직선 방정식은 $y=22730.297x+3975.672$($R^2=1.000$)으로 나타났다(Fig. 3). 이와 같은 조건에서 전국 각지에서 구입한 왕불류행 42종의 20-hydroxyecdysone함량을 시험하여 건조중량(g)중의 함량을 구하여 %를 산출하였다. 왕불류행 중의 20-hydroxyecdysone 함량의 평균 및 표준편차는 0.0138±0.0127%(n=42)이었고 함량이 매우 낮은 8개를 제외하면 모두 0.005% 이상의 20-hydroxyecdysone을 함유하고 있으므로 왕불류행의 표준화를 위한 20-hydroxyecdysone의 함량

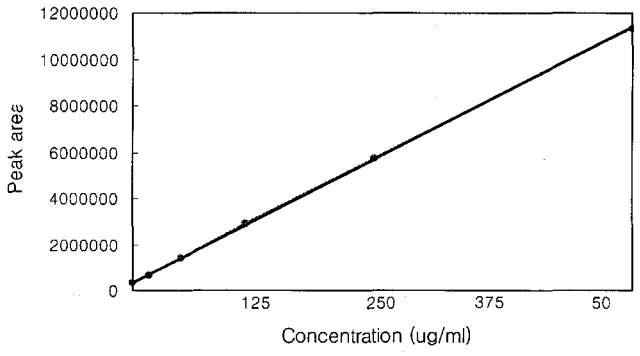

Fig. 3. Calibration curve of 20-hydroxyecdysone.

Table I. The contents of 20-hydroxyecdysone, loss on drying, total ash and acid-insoluble ash from various Melandrii Herba

Sample	Amount (%)	Loss on Drying (%)	Total Ash (%)	Acid-Insoluble Ash (%)
WB 1	0.0052	7.475	7.995	1.214
WB 2	0.0035	7.241	8.094	1.327
WB 3	0.0075	6.114	5.188	0.852
WB 4	0.0170	8.349	4.678	0.688
WB 5	0.0037	4.332	6.153	0.749
WB 6	0.0088	4.507	6.377	1.456
WB 7	0.0084	5.648	7.500	1.205
WB 8	0.0129	4.681	9.433	1.342
WB 9	0.0289	4.430	8.358	1.119
WB 10	0.0113	5.194	10.130	1.763
WB 11	0.0119	7.459	6.310	0.940
WB 12	0.0077	8.242	6.217	1.076
WB 13	0.0036	6.539	7.836	3.906
WB 14	0.0060	6.955	8.775	2.888
WB 15	0.0046	6.604	6.638	0.821
WB 16	0.0089	6.340	7.695	0.770
WB 17	0.0083	6.543	7.560	1.859
WB 18	0.0088	7.160	6.093	0.767
WB 19	0.0111	7.197	6.839	0.865
WB 20	0.0127	8.157	8.106	1.398
WB 21	0.0027	6.493	5.638	1.068
WB 22	0.0101	6.530	8.103	1.260
WB 23	0.0089	6.654	7.794	0.800
WB 24	0.0045	7.228	5.116	0.918
WB 25	0.0019	7.664	4.961	0.878
WB 26	0.0084	6.930	7.332	1.079
WB 27	0.0106	6.490	6.017	1.074
WB 28	0.0196	6.520	7.071	0.752
WB 29	0.0208	7.187	6.301	0.831
WB 30	0.0623	6.890	5.825	0.657
WB 31	0.0352	6.621	9.123	1.287
WB 32	0.0451	6.848	12.459	1.914
WB 33	0.0144	8.730	6.134	0.938
WB 34	0.0117	4.612	5.875	0.615
WB 35	0.0073	8.465	6.013	0.959
WB 36	0.0031	8.023	5.201	0.518
WB 37	0.0116	9.144	11.419	1.412
WB 38	0.0137	8.294	9.523	1.320
WB 39	0.0316	8.068	8.209	1.511
WB 40	0.0414	7.835	7.651	0.683
WB 41	0.0157	8.500	9.258	1.749
WB 42	0.0096	8.153	6.591	0.906
Mesn±S.D.	0.0138 ±0.0127	7.001 ±1.184	7.324 ±1.720	1.194 ±0.618

은 0.005% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다 (Table I).

결 론

1. 왕불류행 MeOH 추출물의 n-BuOH 분획으로부터 각종 column chromatography를 실시하여 지표물질인 20-hydroxyecdysone을 분리, 동정하였다.

2. 건조감량은 8.5% 이하로 회분 함량은 10% 이하로, 산불용성 회분 함량은 2.0% 이하로 정하는 것이 타당하다고 생각된다.

3. 왕불류행의 주성분인 20-hydroxyecdysone을 지표물질로 하여 HPLC 방법으로 함량을 분석한 결과, 20-hydroxyecdysone의 함량은 0.005% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

사 사

본 연구는 2000년도 생약・한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 康秉秀, 高雲彩, 金先熙, 盧昇鉉, 徐榮培, 宋昊埈, 辛民敎, 安德均, 李尙仁, 李暎鍾, 李棣熙, 朱榮丞(1995) 본초학, 436. 영림사, 서울.
2. 이창복(1993) 대한식물도감, 335. 향문사, 서울.
3. Kim, H. K., Jeon, W. K. and Ko, B. S (2001) Ecdysteroids from Melandrii Herba. *Yakhak Hoeji* **45**(5): 455.
4. 지형준(1998) 대한약전 및 대한약전외 한약 규격 주해, 447, 한국메디칼인덱스사, 서울.

(2002년 4월 20일 접수)