

시판품 숙지황중의 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) 함량분석

김호경 · 전원경 · 김영아 · 고병섭
한국한의학연구원

Abstract

Quantitative Analysis of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) in the commercial *Rehmanniae Radix Preparata*

Kim Hokyoung, Jeon Wonkyung, Kim Younga, Ko Byoungsob
Korea Institute of Oriental Medicine,

Rehmanniae Radix Preparata attributes good blood circulation and it has been used for the treatment of dizziness, men's sterility, excessive loss of blood and weakness. On the quality control of commercial *Rehmanniae Radix Preparata*, quantitative determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) using HPLC method has been conducted. Quantitative analysis of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) in commercial *Rehmanniae Radix Preparata* showed average of $0.136 \pm 0.057\%$ in 14 samples collected throughout the regions of Korea.

Key words : *Rehmanniae Radix Preparata*, Quantitative analysis, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF), HPLC method

I. 서론

지황(地黃)은 현삼과(*Scrophulariaceae*)에 속한 다년생 초목인 *Rehmannia glutinosa* LIBOSCHITH var. *purpurea* MAKINO의 뿌리로 근엽과 잔뿌리를 제거하여 깨끗이 씻은 것을 생지황(生地黃, *Rehmanniae Radix Crudus*)이라 하고 생지황을 양건한 것을 건지황(乾地黃, *Rehmanniae Radix*) 이라하고 황주, 백주 또는 사인주(砂仁酒)로 구증구폭한 것을 숙지

황(熟地黃, *Rehmanniae Radix Preparata*)이라 한다.^{1,2,3)}

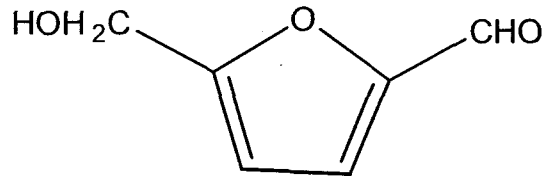
생지황은 청열생진(淸熱生津), 양혈지혈(涼血止血)의 효능이 있어 자감초탕(炙甘草湯), 치열풍상음(治熱風傷陰), 설강번갈(舌絳煩渴), 발반발진(發斑發疹), 토혈(吐血), 녹혈(衄血), 인후동통(咽喉腫痛)에 사용되고, 건지황은 청열량혈(淸熱涼血), 양음생진(養陰生津) 등의 효능이 있어 궁귀교에탕(芎歸膠艾湯), 삼물황금탕(三物黃芩湯) 등 숙지황은 자음보혈(滋陰補

血), 익정진수(益精眞水) 등의 효능이 있어 사물탕(四物湯), 육미지황탕(六味地黃湯) 등의 처방에 각각 사용된다.^{4,5,6)}

숙지황의 약성 및 효능이 생지황 및 건지황과 차이가 나는 것은 그 제조과정에서 함유성분의 함량 및 성상이 변화되기 때문인 것으로 알려져 있다. 생지황 및 건지황에 함유되어 있는 성분으로는 iridoid로서 rehmaglutin A, B, C 및 D, iridoid 배당체로서 catalpol, aucubin, leonuride, melittoside, rehmannioside A, B, C 및 D 등, riffinose, manninotriose 등 당류, lysine, histidine 등 아미노산과 β -sitosterol과 stigmasterol 등이 알려져 있다.^{7,8,9,10,11,12)} 숙지황은 제조과정이 되풀이됨에 따라 건지황의 주성분인 stachyose의 함량은 급격히 감소되고, catalpol의 농도는 점진적으로 감소되며, glycosides 들은 완전히 분해되거나 그 함량이 현저히 낮아지는데 비하여 다당류의 분해로 單糖類의 농도는 증가하고 단당류의 분해산물인 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF) 등이 새

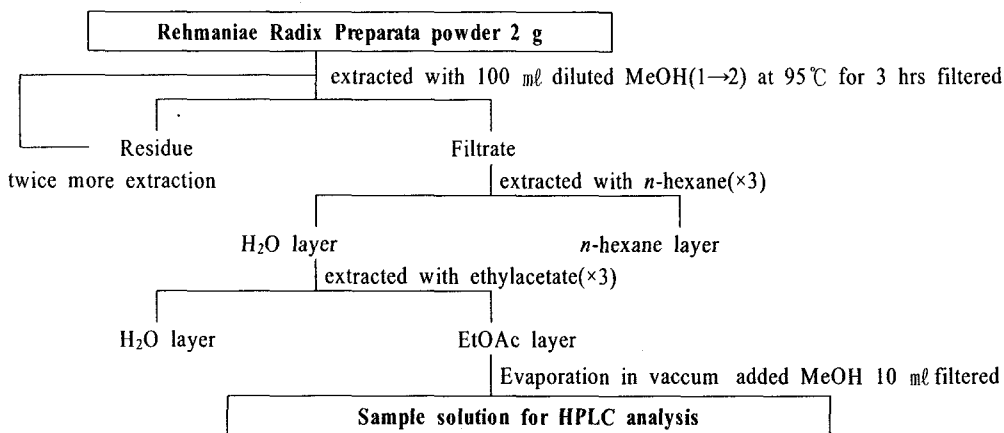
로 만들어진다고 알려져 있다.^{13,14)}

Fig. 1. Chemical structure of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF)



본 연구에서는 숙지황의 품질표준화에 관한 연구의 일환으로 시중에서 유통되고 있는 숙지황을 구입하여 시료로 하여 품질평가를 시도하였다. 각각의 시료에 대해 대한약전 일반시험법에 의하여 HPLC로 정량이 가능한 성분을 지표성분으로 한 숙지황의 산지(국내산, 중국산)에 따른 지표성분의 함량, 건조감량, 회분함량 및 산불용성 회분함량을 비교 분석하고자 한다.

Fig. 2. Procedure for 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF) analysis of Rehmanniae Radix Preparata



II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용한 숙지황은 2001년 서울, 대전, 대구 약령시장에서 판매되는 국내산 7종과 중국산 7종을 구입하여 분쇄한 후 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 분석용 시약 중 표준물질인 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF)는 Wako사(Japan)에서 구입하여 사용하였으며, 시료의 추출 및 분석에는 1등급 용매를 사용하였고 methanol, hexane, ethylacetate는 TEDIA사(U.S.A) HPLC grade 제품을 사용하였다. 분석 기기로 사용된 HPLC는 Shimadzu사(Japan)의 SCL-10Avp system controller, SIL-10ADvp auto injector, SPD-10Avp UV-VIS detector, LC-10ATvp liquid chromatograph를 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F254(Merck)와 RP-18 F254s(Merck)를 사용하였다. 회화로는 Barnstead Thermolyne사의 F4800 Furnace를 사용하였다.

3. 건조감량시험

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

4. 회분시험

사기도가니를 550℃에서 1시간 이상 강열하여 데

시케이터에서 방랭한 후 그 무게를 정밀히 달았다. 시료 2~4g을 사기도가니에 넣어 무게를 정밀하게 측정 후 회화로에 넣어 서서히 온도를 올리면서 550℃에서 4시간 이상 가열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 데시케이터에서 방랭한 다음 무게를 정밀하게 측정하여 회분량(%)으로 하였다.

5. 산불용성 회분시험

회분에 묽은 염산 25ml를 천천히 조심스럽게 넣고 5분간 가만히 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과한 후 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조하였다. 무게를 정밀하게 측정된 사기도가니에서 3시간 강열(550℃)하여 데시케이터에서 방랭한 후 그 무게를 정밀하게 측정하여 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

6. HPLC 조건

HPLC는 Shimadzu LC-10Avp System으로서 SCL-10Avp system controller, LC-10ATvp liquid chromatograph, SPD-10Avp UV-VIS detector, SIL-10ADvp auto injector(Japan)를 사용하였다. Column은 Luna C₁₈(4.6 × 250mm, 5μm, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 CH₃CN : H₂O = 10 : 90(v/v)가 되도록 하였다. 유속은 1.0 ml/min으로, UV Detector 파장은 280 nm에서 고정하여 실시하였다.

7. 표준액의 조제

5-HMF 1.016mg을 HPLC용 methanol 2ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 하여 254, 127, 25.4, 5.08 μg/ml로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액 10 μl

를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하여 얻은 회귀직선 방정식은 $y=72678.124x+619451.587$ 이고 상관계수는 0.992로서 1에 접근하였다.

8. 검액의 조제

검체 2.0g을 정확히 평량하여 물 100 ml를 가해 95℃ 수욕상에서 3시간 동안 환류냉각하면서 추출하였다. 잔사는 같은 과정을 3번 반복한 후 여액을 모아서

n-hexane 300 ml로 3회 추출하여 제거하였다. 남은 수층은 ethylacetate 300 ml로 3회 추출하였고 ethylacetate 층을 모아서 감압건조한 후 methanol로 용해하여 정확히 20 ml로 만들어 0.45 μ m syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다(Scheme I). 각각의 검액을 10 μ l씩 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 지표물질의 함량을 구하였고 검체에 대해 3회 반복 실험하여 5-HMF의 함량(mg)을 구하여 %로 산출하였다.

Table 1. Contents of 5-HMF, loss on drying, residue on ignition and residue on acid insoluble ignition of Rehmaniae Radix Preparata (%)

Sample	5-HMF Amounts	Lose on Drying	Residue on Ignition	Residue on Acid Insoluble Ignition
Korea				
RRP-K1	0.144	15.115	2.466	0.130
RRP-K2	0.212	14.804	4.061	1.092
RRP-K3	0.150	13.783	2.357	0.136
RRP-K4	0.151	14.808	3.249	0.753
RRP-K5	0.217	10.014	3.679	0.673
RRP-K6	0.135	11.328	2.625	0.521
RRP-K7	0.183	13.457	3.735	1.074
China				
RRP-C1	0.152	12.030	4.456	1.419
RRP-C2	0.086	10.510	3.107	0.446
RRP-C3	0.106	15.123	2.862	0.559
RRP-C4	0.028	15.047	5.168	1.849
RRP-C5	0.062	17.084	3.148	0.857
RRP-C6	0.079	13.343	4.077	1.137
RRP-C7	0.196	20.954	3.118	0.687
Average	0.136 \pm 0.057	14.100 \pm 2.808	3.436 \pm 0.804	0.810 \pm 0.476

III. 결과 및 고찰

본 연구에서는 국내에 시판되고 있는 숙지황의 품질 표준화 연구의 일환으로 숙지황의 산지(국내 산, 중국산)에 따른 지표성분의 함량, 건조감량, 회

분함량 및 산불용성 회분 함량을 대한약전 일반시험법에 규정하고 있는 방법에 의해 3회 반복 시험하여 얻은 평균치를 Table I에 정리하였다.

숙지황의 지표물질인 5-HMF의 함량을 측정하기 위하여 HPLC법을 이용하여 정량하였다. HPLC의

분석조건으로는 Phenomenex C18 column을 이용하여 CH₃CN : H₂O = 10 : 90(v/v)을 유속 1.0 ml/min으로 용출시킴으로써 retention time 7분대에서 5-HMF의 peak를 양호하게 분리할 수 있었다. Fig. 2는 숙지황의 지표물질 및 시료를 HPLC에 주입하여 얻은 chromatogram이고 이러한 실험 결과로부터 calibration curve를 얻었고 검량선에 대한 상관계수는 0.992로서 1에 접근하여 이를 이용하여 각 시료들의 함유된 표준물질의 함량을 구하였다.

숙지황중의 5-HMF 함량의 평균 및 표준편차는 0.136±0.057%(n=14)로 대한약전에 규정하고 있는 0.1%보다 많았으며 시료에 따라 0.028%~0.217%로 차이를 보였으나 시료 4개를 제외하면 숙지황의 5-HMF 함량은 0.1% 이상으로 나타났다. 국내에서 유통 중인 숙지황을 산지별로 5-HMF의 함량을 비교하였을 경우 국내산(0.170%)이 중국산(0.101%)보다 함량이 높았고 국내산의 경우 기준치에 못 미치는 시료가 없었고 중국산은 4개였다.

건조감량 시험에서 평균 및 표준편차는 14.100±2.808%(n=14)이었고 시료에 따라 10.014%~20.954%

의 차이를 보였으나 시료 1개를 제외하면 숙지황의 건조감량은 20.0% 이하이므로 건조감량 규정을 20% 이하로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다. 산지별 건조감량은 중국산(14.870%)이 국내산(13.330%)보다 높았다.

회분함량 시험에서 평균 및 표준편차는 3.436±0.804%(n=14)로 시료에 따라 2.357%~5.168%로 차이를 보였으나 14개의 시료 모두 대한약전에 규정하고 있는 6.0% 이하보다 낮았다. 따라서 숙지황의 회분함량은 6.0% 이하로 규정하면 타당하리라 생각된다. 산지별 회분함량은 중국산(3.705%)이 국내산(3.167%)보다 높았다.

산불용성회분 함량시험에서 평균 및 표준편차는 0.810±0.476%이었고 14개의 시료 모두 대한약전에 규정하고 있는 2.5% 이하였으며 시료에 따라 0.130%~1.849%로 차이를 보였다. 따라서 숙지황의 산불용성회분함량 규정을 2.5% 이하로 하면 타당하리라 생각된다. 산지별 회분 함량은 중국산(0.993%)이 국내산(0.626%)보다 높았다.

Fig. 3. HPLC chromatogram of 5-HMF standard and extract from Rehmanniae Radix Preparata

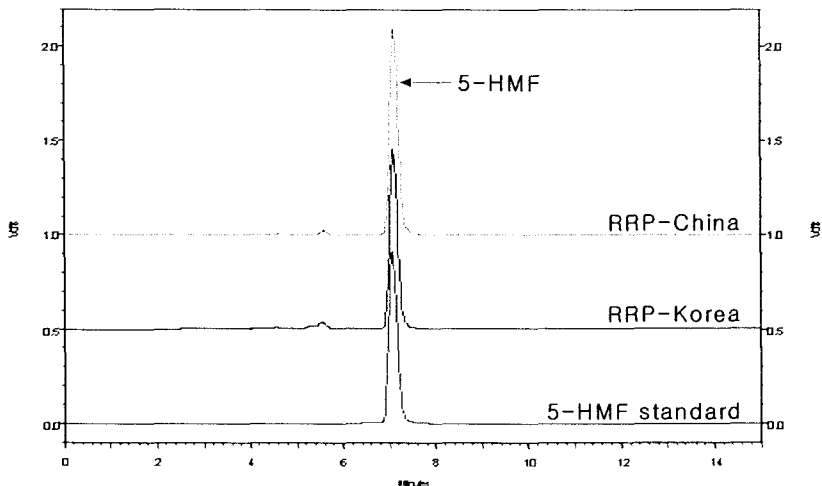


Table 2. Amounts of 5-HMF, loss on drying, residue on ignition and residue on acid insoluble ignition of Rehmaniae Radix Preparata (%)

Region	5-HMF	Loss on drying	Residue on ignition	Residue on acid insoluble ignition
Korea	0.170±0.034	13.330±1.948	3.167±0.687	0.626±0.394
China	0.101±0.057	14.870±3.450	3.705±0.872	0.993±0.506
Total	0.136±0.057	14.100±2.808	3.436±0.804	0.810±0.476

IV. 결론

1. 대한약전에는 숙지황 중의 5-HMF 함량을 0.1% 이상으로 규정하고 있는데 14개의 시료에 대한 지표물질 함량시험 결과, 평균 및 표준편차는 $0.136\pm 0.057\%$ 로 시료에 따라 $0.028\% \sim 0.217\%$ 로 차이를 보였으나 4개를 제외하고는 지표물질 함량이 0.1% 이상으로 나타났다.

2. 숙지황 시료 14개에 대한 건조감량 시험에서 평균 및 표준편차는 $14.100\pm 2.808\%$ 로 시료에 따라 $10.014\% \sim 20.954\%$ 의 차이를 보였으나 1개를 제외하고는 건조감량이 20.0% 이하이므로 숙지황의 건조감량은 20% 이하로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

3. 대한약전에는 숙지황 중의 회분함량을 6.0% 이하로 규정하고 있는데 14개의 숙지황 시료에 대한 회분함량 시험 결과 평균 및 표준편차는 $3.436\pm 0.804\%$ 로 시료에 따라 $2.357\% \sim 5.168\%$ 로 차이를 보였으나 시료 모두 대한약전에 규정하고 있는 6.0% 이하이었다. 따라서 숙지황의 회분함량은 6.0% 이하로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

4. 대한약전에는 숙지황 중의 산불용성회분 함량을 2.5% 이하로 규정하고 있는데 14개의 시료에 대한 산불용성회분 시험 결과, 평균 및 표준편차는 $0.810\pm 0.476\%$ 로 대한약전에 규정하고 있는 2.5% 이하보다 낮았으며 시료에 따라 $0.130\% \sim 1.849\%$ 로 차이를 보였다. 따라서 숙지황의 산불용성회분 함량은 2.5% 이하로 규정하는 것이 타당하다고 생각된다.

참고 문헌

1. 식품의약품 안전청 대한약전 제8개정 편찬위원회(2002) 대한약전 제 8개정, 1369, 1479.(주)약업신문, 서울.
2. 한의학대사전 편찬위원회편(1998) 한의학대사전, 78. 도서출판 정담, 서울.
3. 안상욱, 김영길, 김민희, 이현용, 성낙술(1999) 국내산 건지황과 숙지황의 생리활성 비교 藥作誌, 7(4): 257-262.
4. 안덕균, 김창민, 신민교, 이경순(1998) 중약대사전, 168-176. 도서출판 정담, 서울.
5. 안덕균, 김호철 공편(1997) 한약포제학, 168-175. 일중사, 서울.
6. 한의과대학, 방제학교수 공편(1999) 방제학, 434-435. 영림사, 서울.
7. 김남재, 정은아, 김희정, 심상범, 김종우(2000) 地黃의 품질평가. 생약학회지, 31(2): 130-141.
8. 생약연구회 著(1997) 현대 생약학, 263-265. 학창사, 서울.
9. 약품 식물학 연구회 著(1996) 신약품식물학, 365-366. 학창사, 서울.

10. 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏 編(1982) 和漢藥物學, 74-75. 南山堂, 東京.
11. 北川 勳, 三川 湖, 庄司順三, 友田正司, 西康五夫 (1991) 生藥學, 第 4版, 137-138, 廣川書店, 東京.
12. Morota, T., Sasaki, H., Nishimura, H., Sugama, K., Chin, M. and Mitsahashi, H.(1989) Two iridoid glycosides from *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry*, 28: 2149-2153.
13. Chen-Kuo Shih, Young-Jong Son, and Young-Yong Lee(1999) Changes in the carbohydrate contents of *Rehmanniae Radix* during Processing. *Kor. J Herbology*. 14(2): 1-11.
14. 안상욱, 김영길, 김민희, 이현용, 성낙술(1999) 국내산 건지황과 숙지황의 생리활성비교. *약용작물학회지*, 7(4): 257-262.