

치자의 Geniposide 함량 기준 설정

정명선* · 채흥복* · 최일섭* · 김영호* · 강종성* · 배기환*†

*충남대학교 약학대학

Standardization of Geniposide Content of Gardeniae Fructus

Ming Shan Zheng*, Xing Fu Cai*, Ill sup Choi*, Young Ho Kim*,
Jong Seong Kang*, and Ki Hwan Bae*†

*College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

ABSTRACT : Gardeniae Fructus (*Gardenia jasminoides* Ellis) is widely used as a natural food colorant and as a traditional medicine for the treatment of hepatic and inflammatory diseases. The quality evaluation of Gardeniae Fructus was carried out by HPLC using geniposide as a marker. The geniposide was isolated from commercial Gardeniae Fructus on ODS column using a mixed solvent of acetonitrile-water (v/v 9:91) as mobile phase and a detection wavelength 240 nm. The content of geniposides in twenty different samples was in a range of 1.20% to 7.17% of total tissues and the average was 4.97%.

Key words : Gardeniae Fructus (*Gardenia jasminoides* Ellis), quantitative determination, geniposide, HPLC

서 언

치자는 꼭두서니과 (Rubiaceae)에 속하는 치자나무 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 또는 기타 동속식물의 성숙한 과실로서 해열, 이담, 지혈, 항균, 진정, 해독의 생리활성을 가지고 있어 충혈, 황달, 출혈, 정신불안 등의 증상에 이용된다 (Bae, 2000). 치자의 성분은 주로 iridoid 화합물인 genipin, geniposide, gardenoside, shanzhiside 등과 황색색소 crocin, crocetin, 지방유 등을 함유하고 있다 (Shin *et al.*, 2003). 치자의 주성분인 geniposide는 고설탕 함유식으로 사육된 rat에 대하여 혈장 triglyceride, 인지질, 지질과산화물, glucose, GTP 및 간 triglyceride, 유리 지방산을 감소시키는 것으로 보고되었다 (Han *et al.*, 1994). geniposide를 경구투여할 경우 장내세균이 보유하고 있는 β -glucosidase에 의해 가수분해되어 활성형의 genipin으로 변한 다음 담즙 분비 촉진작용을 나타내는 것으로 보고되어 있다 (Lee *et al.*, 1998). geniposide의 함량분석 방

법으로는 HPLC 방법 (Wang *et al.*, 2001; Ueno *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 1999; Sheu & Hsin, 1998; Arai *et al.*, 1990) 또는 CE법 (Watanabe *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998) 등의 예가 보고되었다. 본 연구는 국내에 유통되고있는 치자의 품질평가를 위하여 geniposide를 지표성분으로 설정하고 HPLC를 이용하여 geniposide의 타당한 함량기준을 마련하기 위하여 착수하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용기기

본 연구에 사용한 치자는 2003년 4월 국내 (서울, 대구, 부산, 광주, 인천, 금산)의 20곳에서 유통되고있는 치자를 구입하여 조말로 한 후 시료로 사용하였다. Column chromatography 용 silica gel은 silica gel 60 (70~230 mesh ASTM)을 사용하였으며, 녹는점은 녹는점 측정기 (SERIES SA 9100, Electrothermal)을 사용하여 측정하였다. Geniposide 분

† Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5925 (E-mail) baekh@cnu.ac.kr
Received March 27, 2004 / Accepted April 19, 2004

치자의 Geniposide 함량 기준 설정

리에는 preparative HPLC (Yamazen model 540)를 사용하였고, geniposide의 정량분석을 위한 HPLC는 SPD-10AV, CBM-10A Detector, LC-10AD Pump을 사용하였다. 시약과 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였으며 HPLC 용매는 HPLC grade 를 사용하였다.

지표성분의 분리

치자 2 kg을 메탄올 (MeOH)로 3회 반복 추출하여 여과한 후 감압농축하여 메탄올 엑스 414 g을 얻었다. 이 추출물을 증류수로 현탁하고 에틸아세테이트 (ethylacetate)와 부탄올 (BuOH)로 차례로 분획하여 에틸아세테이트 엑스 100 g과 부탄올 엑스 94 g을 얻었다. 부탄올층 엑스를 silica gel column chromatography (CH₂Cl₂ : MeOH = 3 : 1)를 수행하여 4개의 분획 (Fr. A1 - Fr. A4)을 얻고 분획 Fr. A3을 RP silica gel column chromatography와 preparative HPLC를 수행하여 geniposide (5.69 g)을 얻었다. 분리한 화합물은 각종 물리화학적 성질과 NMR spectral data로부터 문헌 (Lee et al., 1998; Son et al., 2001)과 비교하여 geniposide로 동정하고 지표성분으로 사용하였다.

시료중 geniposide의 추출시간 설정

건조 시료 250 mg을 분말로 한 후 마개 달린 시험관에 넣고 에탄올 (EtOH), 물, 50% 에탄올을 추출용매 (10 ml×3)로 10, 30, 60, 90, 120분간 별로 추출 효과를 측정하였다.

검액의 조제

건조 시료 250 mg을 분말로 한 후 마개 달린 시험관에 넣고 50% 에탄올 (10 ml)에서 60분간 3회 추출하였다. 에탄올 추출물을 합하여 최종 부피를 30 ml로 조정 후 이를 0.45 μm로 여과하여 검액으로 하였다. Geniposide를 메탄올에 녹여 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 농도의 표준용액을 조제하였다. 검액 및 표준액 10 μl를 취하여 HPLC를 실시하였고, 표준액 농도와 peak 면적을 변수로 하여 검량선을 작성하였다.

HPLC 분석조건

검액 및 표준액의 HPLC 분석을 위하여 고정상으로

Nova-Pak C₁₈ (3.9×150 mm, USA), 이동상으로는 아세토니트릴-물 (v/v 9:91)을 사용하였고 분석은 실온에서 실시하였으며 용매의 유속은 1 ml/min, 240 nm의 검출과정을 사용하였다.

결과 및 고찰

Geniposide의 구조동정

치자로부터 분리한 물질의 물리화학적 성질을 문헌 (Lee et al., 1998)과 비교하여 일치하였으므로 geniposide로 동정하였다.

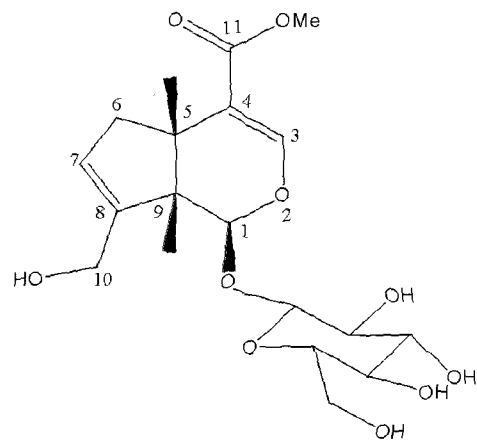


Fig. 1. The structure of geniposide.

추출시간의 설정

에탄올, 물, 50% 에탄올을 추출용매로 각 시간대 별로 추출 효과를 측정해 본 결과 50% 에탄올에서 60분간 추출하는 경우 추출율이 가장 양호하였다 (Table 1).

분석조건 설정

고정상으로 Nova-Pak C₁₈을 사용하여 다양한 조건의 이동상으로 치자 시료중의 geniposide의 분리도를 검토한 결과 아세토니트릴-물 (v/v 9:91)에서 분리도가 가장 양호하였다. 이 조건에서 geniposide는 치자중의 다른 성분과 완전히 분리되었을 뿐만 아니라 유지시간도 6.88분으로 적절하였으므로 이를 최적조건으로 설정하였다 (Fig. 2).

Table 1. Extraction efficiency of geniposide.

| Solvent | Time | | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|----------|--|
| | 10 min. | 30 min. | 60 min. | 90 min. | 120 min. | |
| 50% ethanol | 1.50% | 2.24% | 4.18% | 3.34% | 4.01% | |
| Ethanol | 1.33% | 2.52% | 3.22% | 3.59% | 3.84% | |
| H ₂ O | 1.66% | 1.68% | 1.69% | 1.11% | 1.39% | |

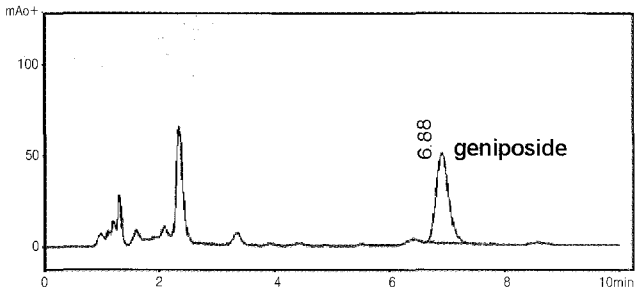


Fig. 2. HPLC chromatogram of geniposide.

직선성 및 범위

0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/ml 농도의 표준용액으로 검량선을 작성한 결과 $y = 43.42X + 0.18$ ($r = 0.9989$)의 양호한 직선성을 나타내었다 (Fig. 3).

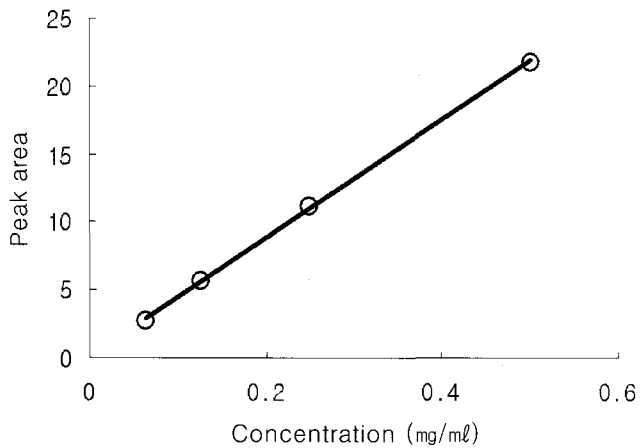


Fig. 3. Calibration curve of geniposide.

분석법 검증

서로 다른 4가지 표준액을 5회 측정하여 구한 일내 (within-day) 정밀도는 3.69~9.95%, 이것을 3일간 반복 측정하여 구한 일간 (between-day) 정밀도는 0.74~3.32%로 나타났다. 표준액으로 측정한 정확도는 검량법 위내에서 94.3~103.4%였다 (Table 2). 시중에서 유통되고 있는 치자 중 geniposide의 함량이 가장 낮은 것으로 분석된 치자시료 (No. 13)에 geniposide를 5.0, 7.0, 10.0 mg/g 첨가한 후 동일한 방법으로 분석하여 회수율을 측정하였다. 7 mg/g과 10 mg/g을 첨가할 경우 회수율은 각각 100.1%, 102.2%으로 나타났으나 5 mg/g을 첨가한 경우는 79.1%로 다소 낮게 나타났다. 대부분의 시료가 geniposide를 1% 이상 함유하는 것으로 나타났으므로 저농도에서의 회수율은 그다지 문제가 되지 않을 것으로 생각된다 (Table 3).

Table 2. Precision and accuracy of standard in different concentrations.

| Conc. (mg/ml) | Precision (%) | | Accuracy (%) |
|---------------|---------------|-------------|--------------|
| | Within-day | Between-day | |
| 0.5000 | 5.94 | 0.74 | 99.4 |
| 0.2500 | 9.95 | 2.40 | 102.4 |
| 0.1250 | 3.69 | 3.13 | 103.4 |
| 0.0625 | 7.37 | 3.32 | 94.3 |

Table 3. Recovery of geniposide.

| Added (mg/g) | Found (mg/g) | Recovery (%) |
|--------------|--------------|--------------|
| 5.00 | 3.96 | 79.1 |
| 7.00 | 7.01 | 100.1 |
| 10.00 | 10.22 | 102.2 |

시료의 함량 분석

국내에서 유통되는 치자 20개 시료를 구입하여 HPLC를 실시하여 각 시료들에 함유된 geniposide의 함량을 구하였다. 그 결과 국내에서 유통되는 치자에 함유된 geniposide의 함량은 1.20~7.17%이었으며 평균함량은 4.97% (변이계수 29.4%)이었다 (Table 4). Geniposide의 box plot

Table 4. Concentration of geniposide.

| No | Purchasing sites | Geniposide (%) |
|------|------------------|----------------|
| 1 | 서울 1 | 6.43±2.63 |
| 2 | 서울 3 | 4.27±0.65 |
| 3 | 서울 2 | 4.17±2.60 |
| 4 | 서울 3 | 6.74±0.19 |
| 5 | 서울 3 | 3.02±0.17 |
| 6 | 대구 1 | 5.36±0.60 |
| 7 | 대구 1 | 3.88±0.05 |
| 8 | 대구 1 | 4.98±0.57 |
| 9 | 부산 1 | 4.26±1.18 |
| 10 | 부산 1 | 6.79±1.16 |
| 11 | 부산 1 | 5.33±1.58 |
| 12 | 광주 1 | 6.41±0.04 |
| 13 | 광주 1 | 1.20±0.15 |
| 14 | 광주 1 | 5.92±0.84 |
| 15 | 인천 1 | 3.88±0.17 |
| 16 | 인천 1 | 5.30±0.09 |
| 17 | 인천 1 | 3.25±0.13 |
| 18 | 금산 1 | 5.03±0.47 |
| 19 | 금산 1 | 7.17±0.08 |
| 20 | 금산 1 | 6.02±0.67 |
| Mean | | 4.97±0.63 |

에서 볼 때 정상 시료군으로부터 벗어나는 시료는 1개 (No. 13) 였다 (Fig. 4). 치자의 일정한 품질유지를 위해서 비정상적으로 나타난 1종의 시료를 제외할 경우 geniposide의 함량 평균은 5.2% (변이계수 23.4%)를 나타내었다. 일원산 점도를 근거로 한 시료수의 25%, 50%, 75%에 해당하는 함량은 각각 4.1%, 5.2%, 6.1%이었다. 정상시료군에서 벗어나는 시료 1개를 제외한 경우 치자중 geniposide의 함량은 3.0~7.2%이었고, 품질관리를 위한 치자중의 geniposide 함량은 3% 이상으로 규정하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

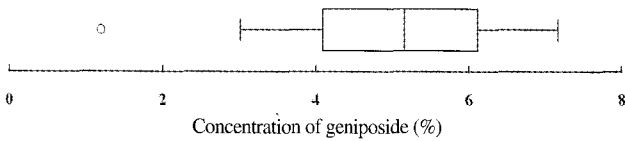


Fig. 4. Box plot of geniposide content.

결론

1. 치자의 주요성분이며 다양한 약리활성이 있는 geniposide를 지표성분으로 하여 HPLC에 의한 품질평가법을 확립하였다.

2. 전국에서 유통되고 있는 치자 20중 정상적인 것으로 판단되는 것의 geniposide의 함량은 3.0~7.2%의 범위를 나타내었으며, 평균함량은 5.2%를 나타내었다. 품질관리상 geniposide의 최저함량은 3%로 규정하는 것이 적당하다고 생각한다.

사사

본 연구는 2003년도 식품의약품안전청의 한약재 품질관리 등 모니터링 사업의 일환으로 이루어졌으며 이에 감사드린다. NMR 측정은 기초과학연구소의 기기를 이용하여 분석하였다.

LITERATURE CITED

- Arai Yuko, Hanai Toshihiko, Nosaka Asuka, Yamaguchi Kenji (1990) Development of crude drug analysis by liquid chromatography, and UV and MS spectrometers. *Journal of Liquid Chromatography* 13(12):2449-64.
- Han YN, Oh HK, Hwang KH, Lee MS (1994) Antioxidant components of Gardenia Fruit. *Korean J. Pharmacogn.* 25(3):226-232.
- Lee DU, Park CH, Kang SI, Min EG, Han YH, Lee CK (1998) Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Korean J. Pharmacogn.* 29(3):204-208.
- Moon YN, Oh JS, Kim JS, Chen PC, Zee OP (2002) Phytochemical compounds from the underground parts of *Gardenia jasminoides* var. *radicans* Makino. *Korean J. Pharmacogn.* 33:1-4.
- Shin YW, Kim DH, Kim NJ (2003) Studies on the processing of crude drugs (VII) - On the constituents and biological activities of *Gardeniae Fructus* by processing. *Korean J. Pharmacogn.* 34:45-54.
- Sheu SJ, Hsin WC (1998) HPLC separation of the major constituents of *Gardeniae Fructus*. *Journal of High Resolution Chromatography.* 21(9):523-526.
- Son KH, Lee MJ, Chang SY, Lee KS (2001) Isolation and quantitative determination of geniposide from the cortex of *Eucommia ulmoides* oliver. *Korean J. Pharmacogn.* 32(2):89-92.
- Ueno Kimiko, Takeda Yoshie, Iwasaki Yoko, Yoshizaki Fumihiko (2001) Simultaneous determination of main components in Sho-seiryu-To by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Natural Medicines (Tokyo, Japan).* 55(2):75-78.
- Wang YX, Li LS, Ren YH (2001) Determination of geniposide in *Gardenia* by high performance liquid chromatography. *Jiangxi Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban.* 25(4):310-312.
- Watanabe Toshiro, Yamamoto Akira, Nagai Shiro, Terabe Shigeru (1998) Separation and determination of yellow gardenia pigments for food and iridoid constituents in *Gardenia Fruits* by micellar electrokinetic chromatography. *Food Sci. Technol. International (Tokyo, Japan).* 4(1):54-58.
- Wu HK, Chuang WC, Sheu SJ (1998) Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A.* 803(1):179-187.
- Zhang DQ, Lu FJ, Tai JX, Wang Q, Fu Q, Liu ZX (1999) Determination of geniposide from *Gardenia jasminoides* by HPLC. *Shipin Kexue (Beijing).* 20(10):59-62.
- Bae KH (2000) *The medicinal plants of Korea*, Kyo-Hak Pub. (Seoul), p. 520.