

Steroidal Saponin을 이용한 위유, 황정의 분류 및 함량 분석법 개발

김성건 · 신소영 · 문예지 · 서지윤 · 김호경* · 황완균[#]

중앙대학교 약학대학, *한국한의학연구원

(Received September 14, 2010; Revised October 6, 2010; Accepted October 12, 2010)

Content Analysis and Classification for Polygonati Odorati Rhizoma and Polygonati Rhizoma by Steroidal Saponin

Sungun Kim, So Young Shin, Ye Ji Moon, Ji Yoon Seo, Ho Kyoung Kim* and Wan Kyunn Whang[#]

College of Pharmacy Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstract — In present study, classification and quality control of Genus Polygonatum were developed using the isolated from Polygonati Odorati Rhizoma and Polygonati Rhizoma. 3 components were isolated from Butanol fractions of Polygonati Rhizoma, and 2 components were isolated from Hexane and Butanol fractions of Polygonati Odorati Rhizoma. All the components were obtained using silica gel and ODS column chromatography. The compounds were identified as adenosine, 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, 22-O-methyl-14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, β-Sitosteryl-3-O-β-D-D-glucopyranoside, 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside through physicochemical data, spectroscopic methods (¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass) according references. The quality control of genus Polygonatum were conducted using HPLC quantitative analysis of 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside in 30 samples collected throughout Korea and China. This method provided a tool for standardization of mix or misusing of the commercial Odorati Rhizoma and Polygonati Rhizoma. As a result, contained quantity of 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside was measured 0.008±0.006% and 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(13)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside was measured 0.026±0.012%.

Keywords □ Polygonati rhizoma, Polygonati odorati rhizoma, steroidal saponin, origin, content analysis

위유(Polygonati Odorati Rhizoma)와 황정(Polygonati Rhizoma)은 같은 백합과(Liliaceae)로, 예로부터 한방에서 지소갈(止消渴), 자양강장(滋養強壯), 병후허약(病後虛弱), 보중익기(補中益氣), 구복경신(久服經身), 조근골(助筋骨), 윤심폐(潤心肺), 보제허(補諸虛), 지한열(止寒熱) 등에 유효하다고 널리 쓰여왔으며 명의별록 상품에 수재된 이래 여러 본초고전에 인용된 중요한 약재이다.¹⁻⁵⁾ 또한 민간에서 자양·강장 효과 외에도 당뇨, 갈증해소, 영양불량, 폐결핵 감시작용, 혈압저하, 말기암의 보조 치료제 등에 효

능이 있다고 보고되어 있다.⁶⁾

우리나라 약전에 위유는 등굴레 *Polygonatum odoratum* Duce var. *pluriflorum* Ohwi 또는 기타 동속근연식물의 근경이라고 수재되었고, 황정은 층층갈고리등굴레 *Polygonatum sibricum* Redoute, 진황정 *Polygonatum falcatum* A. Gray, 전황정 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl, 또는 다화황정 *Polygonatum cyrtonema* Hua(백합과 Liliaceae)의 근경으로서 쥘 것이라고 수록 되어있다.⁷⁾ 또한 중국약전(CP),⁸⁾ 일본약전(JP)⁹⁾ 에도 수재되어 있으며 일본에서는 등굴레를 '의수' *Polygonatum falcatum*(진황정)과 황정으로 구별하여 판매하고 있고, 중국에서는 *Polygonatum odoratum*의 근경을 'Yuzhu'(玉竹), *Polygonatum sibricum*의 근경을 'Huangjing'(黃精)으로 판매하고 있다.¹⁰⁾ 하

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5611 (팩스) 02-825-5611
(E-mail) whang-wk@cau.ac.kr

지만 두 생약재의 성상 및 임상적 효능의 유사성으로 인하여 국내 약령시장에서는 이 두 생약재를 엄밀한 기준 없이 광범위하게 혼용하여 판매하고 있으며, 기원식물에 차이가 있어 성분 및 활성에 차이가 있음에도 불구하고, 우리나라 공정서의 성상 및 관능시험, 이화학적 품질평가에 대한 기준만이 설정되어 있고, 각 생약재에 대한 성분 분리 및 분류학적 검토 연구 등¹¹⁻¹⁴⁾ 이루어져 있으나 성분차이 및 함량에 관한 연구와 두 생약재를 구분할 수 있는 명확한 기준이 없는 실정이다.

본 실험에서는 민간의약에서 다빈도로 사용되는 대표적인 Polygonatum 속 위유와 황정의 주요성분이 steroidal saponin이라는 사실에 의거 본 실험을 진행하였으며, 두 생약으로부터 steroidal saponin을 포함하는 분획물로부터 총 화합물 5종을 분리하여 성분구조를 규명하였고 두 식물의 기원을 구분짓는 화합물을 지표성분으로 설정하여, 유통 및 재배되고 있는 약재 30여종의 원료를 수집하고, 두 지표성분을 이용하여 위유와 황정의 비교분석과 함량 기준치를 설정하기 위한 분석법을 개발하고, 이를 이용하여 혼·오용이 예상되는 황정 및 위유의 구별 마커(marker)를 개발할 목적으로 시도하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용한 등골레(*P. odoratum* var. *pluriflorum*)는 국내 영천에서 직접 채취하여 식물학적 감정을 거친 후 음건한 5.4 kg을 사용하였고, 황정은 국내 자생지인 제천을 직접 방문하여 기원식물인 층층갈고리 등골레(*P. sibiricum*)를 채취하여 식물학적 감정을 거친 후 음건한 6.5 kg을 재료로 사용하였으며, 표본은 중앙대학교 약학대학 약품자원식물학교실에 보관하였다.

실험기기 및 시약

본 실험에서는 UV/VIS(Optizen 2120UV, KOREA), FAB-MS spectrometer(VG 70-VSEQ, England, Source-ionized by 35 keV Cs⁺ ion beam, Matrix-glycerol), ¹H-NMR spectrometer(Bruker Avance-500, 500 MHz, Germany), ¹³C-NMR spectrometer(Bruker Avance-500, 125 MHz, Germany), TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Germany), ODS gel(75 μm, Waters, U.S.A), Silica gel(70~230 μm. Mesh, Merck, Germany), 분석을 위한 HPLC 분석장비는[WatersTM 600 pump controller, WatersTM 2489 detector, WatersTM 717 plus Autosampler]와 Column은 Chromolith Performance RP 18(4.6×100 mm, MERCK), Filter는 Whatman PVDF Syringe Filter 13 mm 0.45 μM을 사용 하였다.

추출 및 분리

위유 - 음건한 위유 5.4 kg에 생약무게 3배의 Methanol을 가

하여 상온에서 3회 추출한 후 여과하고, 감압 농축하여 추출물 600 g을 얻었으며 이 Methanol 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 Hexane, Ethyl acetate, Butanol 순으로 진탕 반복추출 후, 분액 깔때기에서 분획하여 각각의 Hexane, Ethyl acetate, Butanol, Water 분획 66 g, 7.7 g, 31.6 g, 493 g을 얻었다. 이중 Butanol분획(31.6 g)을 silica-gel column chromatography(Chloroform : Methanol : Water=60 : 20 : 3)를 실시하여 3개의 분획(1~3)으로 나누었으며, 이 중 분획 2를 재차 silica-gel column chromatography(Chloroform : Methanol : Water=60 : 15 : 2)를 이용하여 백색 결정의 화합물 I(32 mg)을 분리하였다. 또한 분획 3을 silica column chromatography(Chloroform : Methanol=90 : 30)를 이용하여 나눈 분획들 중 분획 3-1을 ODS column chromatography(50% Ethanol)을 이용하여 얻은 분획 3-1-1을 Prep TLC(Chloroform : Methanol : Water=10 : 6 : 1)를 이용하여 백색결정의 화합물 II(23 mg)와 화합물 III(12 mg)을 얻어, 총 3개의 화합물을 분리하였다.

황정 - 음건한 황정 6.5 kg을 생약무게 3배의 Methanol을 가하여 상온에서 3회 추출한 후 여과하고, 감압 농축하여 추출물 506 g을 얻었으며 위유와 같은 방법으로 용매 분획하여 Hexane, Ethyl acetate, Butanol, Water 순으로 각각 49 g, 15 g, 108 g, 450 g을 얻었다. Hexane분획(49 g)을 column chromatography(Chloroform : Methanol=10 : 1)를 이용하여 분획(1, 2)로 나누었으며, 이중 분획2에서 백색결정의 화합물 IV(28 mg)을 얻었다. Butanol분획(108 g)을 Silica gel column chromatography(Ethyl acetate : Acetone : Water=10 : 8 : 1)를 실시하여 5개의 분획(1~5)로 나누었으며, 이중 분획 2를 ODS column chromatography(60% Methanol)를 이용하여 다시 분획(2-1~2-3)을 나누었고 분획 2-1을 Prep. TLC(Chloroform : Methanol : Water=10 : 6 : 1)를 이용하여 백색결정의 화합물 V(20 mg)를 분리, 총 2개의 화합물을 분리하였다.

화합물 I(adenosine) - (-)FAB-MS(m/z): 266[M-H]⁻, ¹H-NMR(DMSO-*d*₆) δppm: 8.35(1H, s, J=8.75 Hz, H-8), 8.15(1H, s, H-2), 5.89(1H, d, J=6.2 Hz, H-1'), 4.62(1H, dd, J=4.9, J=10.0 Hz, H-2'), 4.15(1H, d, J=2.0 Hz, H-3'), 3.97(1H, dd, J=3.2 Hz, J=6.4 Hz, H-4'), 3.68(1H, m, H-5'), 3.56(1H, m, H-5'), ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆) δppm: 152.40(C-2), 149.08(C-4), 119.37(C-5), 156.17(C-6), 139.93(C-8), 87.93(C-1'), 73.46(C-2'), 70.67(C-3'), 85.90(C-4'), 61.69(C-5').

화합물 II(14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside) - (-)FAB-MS(m/z): 1031[M-H]⁻, ¹H-NMR(Pyridine-*d*₅) δppm: 0.8(3H, s, H-18), 0.88(3H, s, H-19), 1.08(3H, d, J=7.0 Hz, H-27), 1.16(3H, d, J=7.0 Hz, H-21), 4.91(1H, d, J=7.5 Hz, H-1'), 5.19(1H, d, J=8.0 Hz, H-

1"), 5.26(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), 5.59(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), ¹³C-NMR(Pyridine-*d*₅) δppm; aglycone: 37.95(C-1), 30.48(C-2), 78.69(C-3), 39.71(C-4), 141.49(C-5), 122.11(C-6), 32.64(C-7), 32.12(C-8), 50.74(C-9), 37.51(C-10), 21.58(C-11), 40.34(C-12), 42.94(C-13), 57.10(C-14), 32.75(C-15), 81.82(C-16), 65.57(C-17), 15.37(C-18), 21.58(C-19), 40.92(C-20), 16.84(C-21), 110.23(C-21), 30.60(C-22), 30.60(C-23), 28.03(C-24), 34.49(C-25), 75.56(C-26), 19.86(C-27) Sugar: Gal-103.22(C-1), 73.66(C-2), 75.80(C-3), 80.36(C-4), 76.71(C-5), 61.04(C-6), Glc(inter 4 Gal): 105.32(C-1), 81.67(C-2), 87.22(C-3), 70.96(C-4), 79.23(C-5), 62.95(C-6), Glc(terminal 2Glc)- 105.43(C-1), 71.24(C-2), 78.21(C-3), 71.51(C-4), 79.13(C-5), 63.18(C-6), 26-O-Glc: 105.64(C-1), 75.48(C-2), 78.80(C-3), 71.51(C-4), 78.30(C-5), 63.47(C-6).

화합물 III(22-O-methyl-14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside) - (-) FAB-MS(m/z): 1063[M-H]⁻, ¹H-NMR(Pyridine-*d*₅) δppm; 0.82(3H, s, H-18), 0.89(3H, s, H-19), 1.08(3H, d, J=7.0 Hz, H-27), 1.19(3H, d, J=7.0 Hz, H-21), 4.87(1H, d, J=7.5 Hz, H-1'), 5.21(1H, d, H-1"), 5.26(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), 5.59(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), ¹³C-NMR (Pyridine-*d*₅) δppm; aglycone: 38.02(C-1), 30.70(C-2), 79.481(C-3), 39.80(C-4), 141.78(C-5), 122.39(C-6), 32.47(C-7), 32.16(C-8), 50.82(C-9), 37.58(C-10), 21.57(C-11), 40.28(C-12), 41.36(C-13), 57.14(C-14), 32.82(C-15), 82.02(C-16), 64.79(C-17), 16.80(C-18), 19.93(C-19), 41.05(C-20), 16.96(C-21), 113.41(C-22), 31.58(C-23), 28.73(C-24), 35.07(C-25), 75.73(C-26), 18.14(C-27), 47.97(C-22-OMe), Sugar: 103.42(C-1), 73.85(C-2), 76.19(C-3), 80.59(C-4), 76.94(C-5), 61.15(C-6), Glc(terminal 4Glc)- 105.63(C-1), 81.99(C-2), 87.24(C-3), 71.39(C-4), 79.31(C-5), 63.06(C-6), Glc(terminal 2Glc)- 105.84(C-1), 75.89(C-2), 79.12(C-3), 71.57(C-4), 79.31(C-5), 63.48(C-6), 26-O-Glc- 105.95(C-1), 75.48(C-2), 78.80(C-3), 72.36(C-4), 78.30(C-5), 63.63(C-6).

화합물 IV(β-Sitosteryl-3-O-β-D-D-glucopyranoside) - (-) FAB-MS(m/z): 575[M-H]⁻, ¹H-NMR(Pyridine-*d*₅) δppm; 5.68(1H, m, H-3), 1.27(3H, s, H-18), 1.32(3H, d, J=7.0 Hz, H-21), 1.22(3H, d, H-27), 1.20(3H, d, H-26), 1.19(3H, m, H-29), 0.99(3H, s, H-19), 5.68(1H, d, J=7.5 Hz, H-1'), ¹³C-NMR(Pyridine-*d*₅) δppm; aglycone 37.8(C-1), 30.6(C-2), 78.5(C-3), 39.7(C-4), 141.3(C-5), 122.3(C-6), 32.4(C-7), 32.6(C-8), 50.7(C-9), 37.3(C-10), 21.6(C-11), 40.3(C-12), 42.9(C-13), 57.2(C-14), 24.9(C-15), 28.9(C-16), 55.6(C-17), 12.3(C-18), 19.6(C-19), 36.8(C-20), 19.3(C-21), 34.6(C-22), 26.8(C-23),

46.4(C-24), 29.8(C-25), 19.8(C-26), 20.3(C-27), 23.8(C-28), 12.5(C-29), Sugar- 102.9(C-1), 75.7(C-2), 78.8(C-3), 72.1(C-4), 78.9(C-5), 63.2(C-6).

화합물 V(14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside) - (-) FAB-MS(m/z): 1047[M-H]⁻, ¹H-NMR(Pyridine-*d*₅) δppm; 1.28(3H, d, H-21), 1.05(3H, d, H-27), 0.84(3H, s, H-18), 0.84(3H, s, H-19), 5.61(1H, d, J=7.5 Hz, H-1'), 5.28(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), 5.23(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), 5.483(1H, d, J=7.5 Hz, H-1"), ¹³C-NMR (Pyridine-*d*₅) δppm; aglycone- 37.30(C-1), 29.96(C-2), 78.58(C-3), 39.08(C-4), 141.02(C-5), 121.66(C-6), 32.03(C-7), 32.16(C-8), 50.09(C-9), 36.86(C-10), 20.84(C-11), 39.55(C-12), 40.63(C-13), 56.40(C-14), 32.09(C-15), 81.34(C-16), 61.05(C-17), 16.07(C-18), 19.20(C-19), 40.33(C-20), 16.22(C-21), 112.68(C-22), 31.44(C-23), 28.73(C-24), 34.34(C-25), 65.89(C-26), 17.40(C-27), Sugar: Gal- 102.69(C-1), 73.12(C-2), 74.99(C-3), 79.85(C-4), 76.21(C-5), 60.43(C-6), Glc(terminal 4Glc)- 105.23(C-1), 81.25(C-2), 86.50(C-3), 70.84(C-4), 78.74(C-5), 62.32(C-6), Glc(terminal 2Glc)- 105.10(C-1), 75.26(C-2), 78.52(C-3), 71.62(C-4), 79.31(C-5), 62.90(C-6), Xyl(terminal 3Glc)- 104.91(C-1), 75.48(C-2), 78.06(C-3), 70.41(C-4), 67.27(C-5).

HPLC를 이용한 위유, 황정의 전처리방법 및 기기분석

샘플의 수집 - 함량 모니터링에 사용한 위유와 황정은 각각 30 점으로 국내의 약령시장에서 유통되고 있는 한약 규격품을 지역 별로 수집, 분류하고 분쇄하여 사용하였다(Table I, II).

원생약의 검액조제 - 위유 및 황정 시료를 균질하게 분쇄하여 1.0 g을 정밀히 달아 Methanol 10 ml를 넣고 60분간 초음파 추출한 다음 여과한다. 잔류물에 다시 Methanol 10 ml를 넣고 이를 2회 더 반복, 총 3회 반복 조작하고 여액을 모두 합한 다음 이를 감압 농축하고 Water 30 ml를 넣고 여기에 동량의 Ethyl acetate를 넣어 분획한 후(2회반복), 여액의 수층을 동량의 수포화 BuOH을 넣어 다시 분획한다(2회반복). 이후 Butanol분획층을 감압 농축하고, Methanol 1 ml에 녹인 후, 0.45 μm membrane filter로 여액을 여과하고 이 중 10 μl를 취하여 각 검액으로 하였다.

표준용액의 조제 - 위유와 황정에서 분리하여 얻은 화합물 중 위유에서 특이적으로 검출되는 화합물 II(14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside)와 황정에서 특이적으로 검출되는 화합물 V(14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside)를 선정하여 각각 1000 mg을 정밀하게 취하고 Methanol 5 ml를 가한 후 단계

Table I – Sample list for experiments of Polygonati Odorati Rhizoma

| No. | Origin | Place of purchase | No. | Origin | Place of purchase |
|-----|-------------|-------------------|-----|-------------|-------------------|
| 1 | North Korea | Kyungdong market | 16 | Domestic | Jechun market |
| 2 | Domestic | Kyungdong market | 17 | Domestic | Daegu market |
| 3 | North Korea | Kyungdong market | 18 | Domestic | Daegu market |
| 4 | China | Kyungdong market | 19 | Domestic | Daegu market |
| 5 | Domestic | Kyungdong market | 20 | Domestic | Daegu market |
| 6 | North Korea | Kyungdong market | 21 | Domestic | Daegu market |
| 7 | Domestic | Kyungdong market | 22 | North Korea | Daegu market |
| 8 | Domestic | Kyungdong market | 23 | Domestic | Youngchun market |
| 9 | Domestic | Kyungdong market | 24 | North Korea | Youngchun market |
| 10 | Domestic | Kyungdong market | 25 | China | Youngchun market |
| 11 | Domestic | Kyungdong market | 26 | Domestic | Youngchun market |
| 12 | Domestic | Jechun market | 27 | North Korea | Youngchun market |
| 13 | Domestic | Jechun market | 28 | Domestic | Youngchun market |
| 14 | Domestic | Jechun market | 29 | Domestic | Youngchun market |
| 15 | Domestic | Jechun market | 30 | Domestic | Youngchun market |

Table II – Sample list for experiments of Polygonati Rhizoma

| No. | Origin | Place of purchase | No. | Origin | Place of purchase |
|-----|----------|-------------------|-----|----------|-------------------|
| 1 | Domestic | Daegu market | 16 | Domestic | Jechun market |
| 2 | Domestic | Daegu market | 17 | Domestic | Jechun market |
| 3 | China | Daegu market | 18 | China | Jechun market |
| 4 | Domestic | Daegu market | 19 | Domestic | Jechun market |
| 5 | Domestic | Daegu market | 20 | China | Jechun market |
| 6 | Domestic | Daegu market | 21 | Domestic | Youngchun market |
| 7 | Domestic | Daegu market | 22 | Domestic | Youngchun market |
| 8 | Domestic | Daegu market | 23 | Domestic | Youngchun market |
| 9 | China | Kyungdong market | 24 | China | Youngchun market |
| 10 | Domestic | Kyungdong market | 25 | China | Youngchun market |
| 11 | Domestic | Kyungdong market | 26 | China | Youngchun market |
| 12 | Domestic | Kyungdong market | 27 | China | China |
| 13 | Domestic | Kyungdong market | 28 | China | China |
| 14 | China | Kyungdong market | 29 | China | China |
| 15 | Domestic | Kyungdong market | 30 | China | China |

Table III – HPLC analytical condition on Polygonati Odorati Rhizoma and Polygonati Rhizoma

| | |
|------------------|---|
| Detector | UV 203nm |
| Column | Chromolith Performance RP 18 (4.6×100 mm) |
| Mobile phase | acetonitrile : water=20 : 80→35 : 65 |
| Flow rate | 2.5 ml/min |
| Injection volume | 10 μ l |

별로 희석하여 사용하였다.

HPLC 분석조건 – 컬럼은 Chromolith Performance RP 18 (4.6×100 mm)을 사용하였고, 이동상으로는 Acetonitrile과 Water를 20 : 80→35 : 65의 비율로 혼합하여 사용하였고, 2.5 ml/min의 유속을 유지하며 UV 203 nm에서 측정하였다(Table III).

HPLC를 이용한 분석법 검증(validation)

다양한 조건에서 분석법을 검토하여 결정된 위유와 황정의

분석법에 대하여 ICH 가이드라인을 기준으로 HPLC를 이용한 분석법 검증 결과 각 농도의 표준액을 반복 측정하여 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정량한계(LOQ), 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.¹⁵⁾

특이성(Specificity) – 분석물질에 대하여 불순물, 분해 산물, 기질물질과 같이 예상할 수 없는 구성성분의 존재 하에서 분석물질을 확실하게 분석하는 능력으로, 분석할 물질들의 상호간에 분리능이 양호한 방법임을 검증하기 위해 화합물 II와 화합물 V를 혼합하였을 경우 성분이 확실하게 분리되는 것에 의해 특이성을 확인하였다.

직선성(Linearity) – 10~1000 μ g/ml 농도의 화합물 II와 화합물 V 표준액을 조제하여 각각의 샘플을 확립된 HPLC 조건을 이용하여 3회 주입하였다. 이를 이용하여 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(X축)와 피크 면적비(Y축)에 대한 검량선을 작성하였으며 검량선으로부터 직선식의 상관계수(correlation coefficient)

를 구하여 직선성을 확인하였다.

정량한계(LOQ) – 검량선의 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정 한 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 정량한계를 확인하였다.

$$LOQ=10 * \delta S$$

(δ : y절편의 표준편차 S: 검량선의 기울기)

정확성(Accuracy) – 확립된 분석방법의 정확성을 확인하기 위하여 화합물 II 와 V, 3가지 농도(80, 100, 120 $\mu\text{g}/\text{m}$)의 표준액

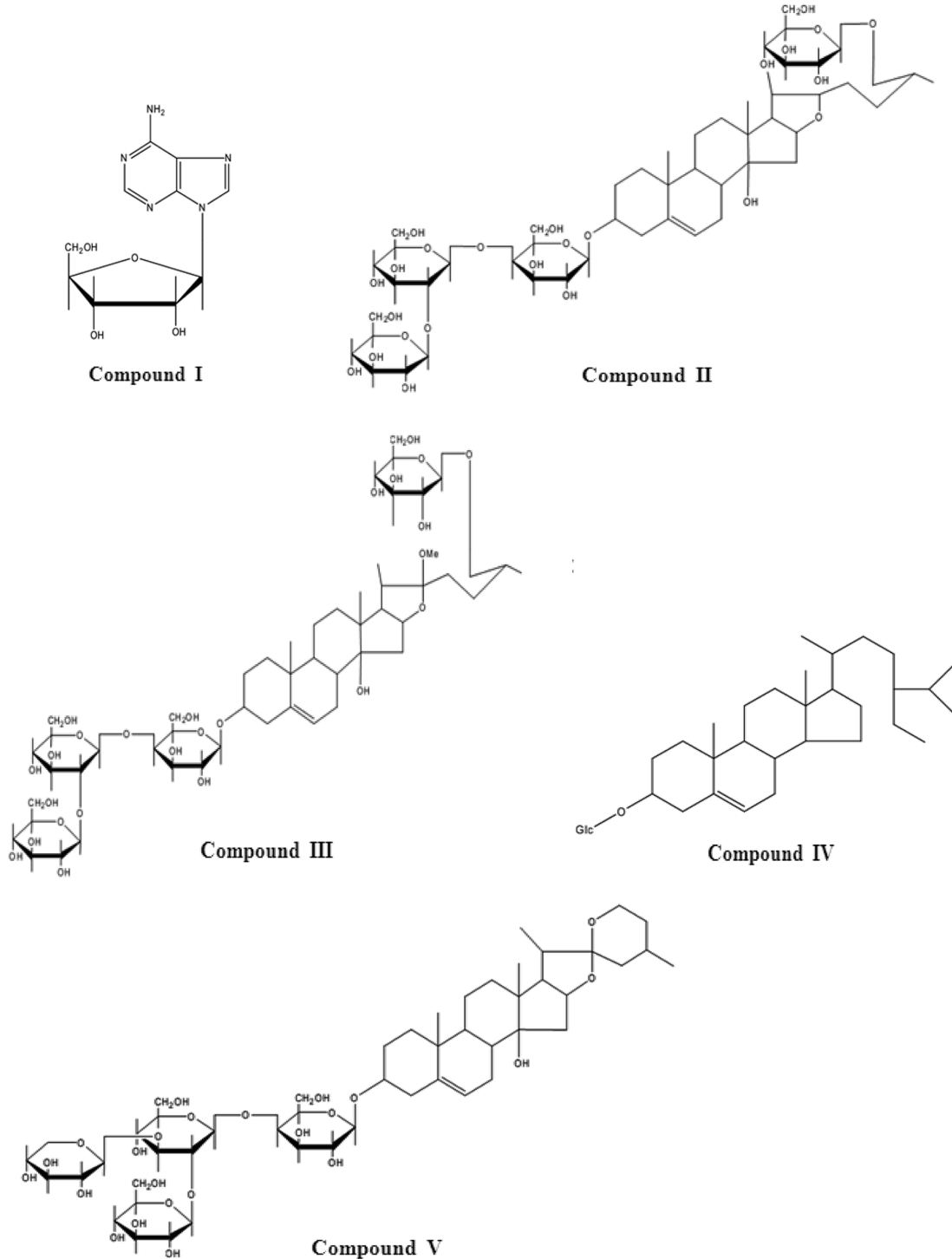


Fig. 1 – Structure of Compound I~V.

을 3회 반복측정 하였으며, 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

정밀성(Precision) - 확립된 분석 방법의 정밀성을 확인하기 위하여 같은 농도에 대하여 6번 반복 측정하여 결과값의 편차 정도인 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 평가하였다. 정밀성 평가를 위해 일내(Intra-day), 일간(Inter-day) 정밀성을 확인하고자 동일한 시료를 6회 반복 실험하였다. 일내 정밀성은 표준 용액을 하루 동안에 6회 반복 실험하여 측정하였고, 일간 정밀성은 표준 용액을 하루 간격으로 날짜를 변경하여 6일 동안 반복 실험하여 측정하여 정밀성의 정도를 평가하였다.

실험결과 및 고찰

위유와 황정의 주성분인 steroidal saponin이 함유되어 있는 Butanol분획¹⁶⁾에서 ODS gel, silica gel column chromatography를 이용하여 5개의 화합물을 분리하였고, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Mass 등의 기기분석 및 참고문헌과의 비교를 통하여 화합물 I을 adenosine, II를 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, 화합물 III를 22-O-methyl-14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, 화합물 IV를 β-Sitosteryl-3-O-β-D-D-glucopyranoside, 화합물 V를 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside로 확인동정 하였다¹⁷⁻²²⁾(Fig. 1).

분리 정제된 화합물 중 화합물 II와 V를 표준물질로 하여 위유와 황정의 HPLC 패턴을 비교분석한 결과 위유에서는 화합물 II, 황정에서는 화합물 V가 함유되어 있는 것을 확인하였다. 이들 성분을 표준물질로 설정하여 HPLC를 이용한 분석법 검증과, 위유와 황정의 함량 모니터링을 실시 하였다.

HPLC를 이용한 분석법 검증(validation)

특이성(Specificity) - 확립된 HPLC조건으로 분석한 위유와 황정의 지표물질 화합물 II와 V, 2가지 성분의 머무름 시간은 화합물 II가 약 12분, 화합물 V가 약 39.2분 이었고 위유와 황정 추출물의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 명확히 분리 되어 다른 물질과의 간섭이 없음이 확인되었다.

직선성(Linearity) - 화합물 II와 V를 0.01~1 mg/ml의 범위에서 농도별로 제조하여 확립된 HPLC 조건으로 분석을 실시하여 x 축은 농도, y축은 피크면적으로 하여 검량선을 작성한 결과, Table V에서 나타난 것과 같이 직선성(R²) 이 2가지 성분 모두 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 2, Table IV).

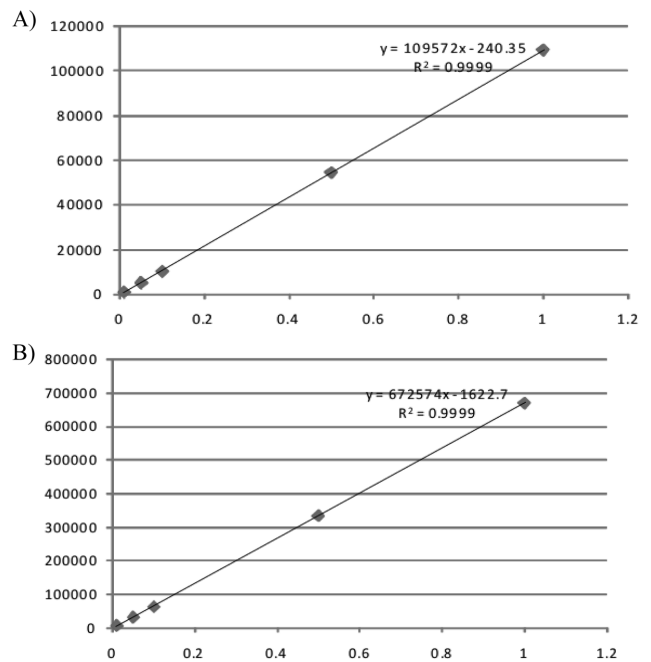


Fig. 2 - Calibration curve of standards. A) Compound II B) Compound V.

Table IV - Calibration graphs, Linear ranges and LOQ

| Compound | Linear range (mg/ml) | Slope | Intercept | Correlation coefficient (R ²) | LOQ (ng/ml) |
|-------------|----------------------|--------|-----------|---|-------------|
| Compound II | 0.01~1 | 109572 | 240.35 | 0.999 | 200 |
| Compound V | 0.01~1 | 672574 | 1622.7 | 0.999 | 200 |

LOQ=10 * σ/S(σ: 반응의 표준편차 S: 검량선의 기울기).

정량한계(LOQ) - 정량한계는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 앞서 서술한 식에 의하여 결정하였으며 화합물 II와 V의 LOQ값을 0.2 μg/ml로 정하였다.

정확성(Accuracy) - 확립된 분석방법의 정확성을 확인하기 위하여 화합물 II와 V의 3가지 농도의 표준액을 3회 측정하였고, 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 그 값은 화합물 II가 98.2~102.2%, 화합물 V가 99.4~103.6으로 각각의 농도에서 양호한 값을 나타내었다. 이를 통해 분석법의 정확성을 확보하였다(Table V).

정밀성(Precision) - 확립된 분석방법의 반복성을 확인하기 위하여 2가지 성분의 표준물질을 같은 농도에 대하여 일내(Intra-day), 일간(Inter-day)으로 나누어 6회 반복 실행하였으며 결과 값의 편차 정도인 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 평가하였다. 일내(Intra-day test) 정밀성 실험결과 화합물 II가 1.81%, 화합물 V는 1.97%로, 일간(Inter-day test) 정밀성 실험결과 화합물 II가 1.65%, 화합물 V는 1.83%의 값을 나타내어 모두 2% 이내 범위를 만족시켜 분석법의 정밀성을 확인 할 수 있었다(Table VI).

Table V – Accuracy of analytical result

| Conc. (%) | Area | Recovery (%) | Bias (%) | RSD |
|-------------|---------|--------------|----------|------|
| Compound II | | | | |
| 80 | 1 | 43799 | 100.7 | 0.7 |
| | 2 | 43218 | 99.4 | -0.6 |
| 100 | 3 | 44293 | 101.8 | 1.8 |
| | 1 | 54599 | 100.3 | 0.3 |
| 120 | 2 | 55296 | 101.6 | 1.6 |
| | 3 | 55658 | 102.2 | 2.2 |
| 120 | 1 | 64359 | 98.5 | -1.5 |
| | 2 | 64208 | 98.2 | -1.8 |
| | 3 | 64910 | 99.3 | -0.7 |
| | Average | 100.22 | 0.22 | 0.92 |
| Compound V | | | | |
| 80 | 1 | 273430 | 102.4 | 2.4 |
| | 2 | 265784 | 99.6 | -0.4 |
| 100 | 3 | 265254 | 99.4 | -0.6 |
| | 1 | 344393 | 103.1 | 3.1 |
| 120 | 2 | 339348 | 101.0 | 1.0 |
| | 3 | 340691 | 102.0 | 2.0 |
| 120 | 1 | 415678 | 103.6 | 3.6 |
| | 2 | 404392 | 100.8 | 0.8 |
| | 3 | 410986 | 102.5 | 2.5 |
| | Average | 101.60 | 1.60 | 1.38 |

Table VI – Precision (Inter-day & Intra-day) of analytical results

| | Conc. (%) | Compound II | Compound V |
|--------------------|-------------------|-------------|------------|
| Inter-day (n=6) | 100 | 1 | 60124 |
| | | 2 | 61567 |
| | | 3 | 62338 |
| | | 4 | 63214 |
| | | 5 | 61989 |
| | | 6 | 63012 |
| | Mean | 62040.67 | |
| | SD | 1123.32 | |
| | RSD(%) | 1.81 | |
| | Intraday (n=6) | 100 | 1 |
| 2 | | | 59296 |
| 3 | | | 60493 |
| 4 | | | 61845 |
| 5 | | | 61449 |
| 6 | | | 60658 |
| Mean | | 60556.67 | |
| SD | 997.68 | | |
| RSD(%) | 1.65 | | |

확립된 분석법을 통한 위유와 황정의 함량 모니터링

위유에서 분리한 화합물 II(14-hydroxylfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside)가 Rt 12 min에서 단일 피크로 나타남을 확인 할 수 있었고 30점에 대한 화합물 II의 함량은 평균 0.008±0.006%로 나타났다.

황정에서 분리한 화합물 V(14-hydroxylfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-

Table VII – The compound II and V contents from 30 samples Polygonati Odorati Rhizoma and Polygonati Rhizoma

| No. | Origin | Contents (%) | No. | Origin | Contents (%) |
|-----|-------------|--------------|-------------|----------|--------------|
| 1 | North Korea | 0.017 | 1 | Domestic | 0.052 |
| 2 | Domestic | 0.001 | 2 | Domestic | 0.043 |
| 3 | North Korea | 0.023 | 3 | China | 0.038 |
| 4 | China | 0.011 | 4 | Domestic | 0.015 |
| 5 | Domestic | 0.004 | 5 | Domestic | 0.010 |
| 6 | North Korea | 0.031 | 6 | Domestic | 0.028 |
| 7 | Domestic | 0.002 | 7 | Domestic | 0.033 |
| 8 | Domestic | 0.010 | 8 | Domestic | 0.011 |
| 9 | Domestic | 0.005 | 9 | China | 0.008 |
| 10 | Domestic | 0.008 | 10 | Domestic | 0.015 |
| 11 | Domestic | 0.004 | 11 | Domestic | 0.023 |
| 12 | Domestic | 0.004 | 12 | Domestic | 0.030 |
| 13 | Domestic | 0.004 | 13 | Domestic | 0.029 |
| 14 | Domestic | 0.004 | 14 | China | 0.024 |
| 15 | Domestic | 0.004 | 15 | Domestic | 0.043 |
| 16 | Domestic | 0.004 | 16 | Domestic | 0.019 |
| 17 | Domestic | 0.008 | 17 | Domestic | 0.026 |
| 18 | Domestic | 0.007 | 18 | Domestic | 0.017 |
| 19 | Domestic | 0.006 | 19 | Domestic | 0.014 |
| 20 | Domestic | 0.004 | 20 | China | 0.023 |
| 21 | Domestic | 0.007 | 21 | Domestic | 0.010 |
| 22 | North Korea | 0.009 | 22 | Domestic | 0.027 |
| 23 | Domestic | 0.006 | 23 | Domestic | 0.018 |
| 24 | North Korea | 0.012 | 24 | Domestic | 0.030 |
| 25 | China | 0.005 | 25 | Domestic | 0.042 |
| 26 | Domestic | 0.006 | 26 | Domestic | 0.026 |
| 27 | North Korea | 0.018 | 27 | China | - |
| 28 | Domestic | 0.010 | 28 | China | - |
| 29 | Domestic | 0.010 | 29 | China | - |
| 30 | Domestic | 0.006 | 30 | China | - |
| | Mean | 0.008 | Mean | 0.026 | |
| | SD | 0.006 | SD | 0.012 | |

glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside)를 표준물질로 하여 유통 황정 30점에 대한 함량분석을 실시하였을 때 각각 Rt 39.2 min에서 단일 피크로 나타남을 확인 할 수 있었고 30점에 대한 화합물 V의 함량은 평균 0.026(±0.012)%로 나타났다 (Table VII).

결론

위유와 황정은 국내의 약령시장에서 유통상의 혼합 또는 위품으로 큰 문제점을 야기하고 있다. 일본 및 중국에서는 위유와 황정을 구별하여 사용 및 관리하는데 반하여 국내에서는 이들의 기원식물이 다름에도 불구하고 "둥굴레"라는 이름으로 혼용하여 사용하고 있는 실정므로, 위유와 황정의 지표성분, 함량 및 그 성분을 이용한 함량분석을 통하여 위유와 황정을 구분할 목적으로 본 연구를 진행하였다. 지표성분을 얻기위해 각각의 생약에 대하여 천연물 화학적인 방법을 통하여 5개의 화합물을 분리하였으며 각종 기기분석(NMR, Mass)을 통하여 adenosine, 14-

hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, 22-O-methyl-14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside, β-Sitostery-3-O-β-D-D-glucopyranoside, 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside로 확인동정 하였다.

이들 성분 중 위유와 황정을 구분할 수 있는 지표성분으로 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside과 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside 두가지 성분을 이용하여 TLC 및 HPLC를 이용하여 확인 한 결과 화합물 II는 위유에서만, 화합물 V는 황정에서만 관찰됨을 확인하였다.

ICH 가이드라인을 기준으로 HPLC를 이용한 분석법 검증 결과 각 농도의 표준액을 반복 측정하여 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정량한계(LOQ), 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

위 방법을 통하여 HPLC 분석을 실시한 결과 위유는 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranosyl-26-O-β-D-glucopyranoside가 평균 0.008±0.006%으로 나타났으며, 황정은 14-hydroxyfurost-5-ene-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-β-D-galactopyranoside가 0.026±0.012%로 함유되어 있음을 알 수 있었다. 또한 위유에서는 화합물 V가, 황정에서는 화합물 II가 각각 관찰되지 않았으며 이러한 차이는 위유와 황정의 기원식물의 차이로 인한 것으로 생각되며 동속의 식물이긴 하나 서로 다른 을 알 수 있었다.

이와 같은 HPLC실험결과를 토대로 다빈도로 사용되는 한약재인 위유와 황정의 품질관리를 위한 과학적인 근거를 제시하고, 위유와 황정의 혼용이라는 유통상의 큰 문제점을 극복할 수 있는 방향을 제시하는데 큰 의의를 가질 것이라 사료된다. 더 나아가 감별이 어려운 동속식물들을 기본적인 관능평가 뿐 아니라 이러한 화학적 감별법(Chemotaxonomy)을 이용한 접근은 유전자적 감별법(Genomotaxonomy)과 더불어 생약 감별의 과학화에 기여를 할 수 있을 것으로 생각되며 앞으로 많은 부분에 응용할 수 있는 가능성이 기대된다.

참 고 문 헌

1) 陶弘景 : 名醫別錄, 人民生出版社, 北京, 18 (1986).

- 2) 唐徽 : 經史證類大觀本草, 崇文社 (1976).
- 3) 李珍 : 本草綱目, 高文社, 417 (1973).
- 4) 許浚 : 東醫報鑑, 湯液篇, 南山堂, 719 (1974).
- 5) 鄉藥集成方, 卷七十八 草部上品卷上 (1943).
- 6) Ahn, D. G. : Restorative of Korea. *Yeollin Chakdle*, Seoul, Korea, p. 307 (1993).
- 7) 식품의약품안전청 : 대한약전외 한약(생약) 규격집, 서울 (2007).
- 8) Chinese Pharmacopoeia Commission : PHARMACOPOEIA OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA (I), p. 334 (2005).
- 9) 일본약국방 제14개정판 : 광천서점, 동경 (2001).
- 10) 한대석, 한덕룡, 유승조, 백완숙 : 한국·중국·일본의 생약비교연구, 한국의약품수출입협회, 영림사, 서울, p. 142 (1996).
- 11) Lee, M. Y., Kim, K. H., Kim, Y. H., Oh, S. H., Kang, J. K. and Ko, B. S. : A Taxonomic examination of *Polygonatum Rhizoma* and *Polygonati Odorati Rhizoma* based on RAPD analysis. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, 265 (2004).
- 12) Qin, H. L., Li, H., Wang, P. and Si, L. X. : The New secondary metabolite from *Polygonatum odoratum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **29**, 42 (2004)
- 13) Liu, T., Li, Z. and Liu, C. : Analysis of *Polygonatum odoratum* and its substitutes by RAPD. *Zhongguo Yaozue Zazhi* **37**, 734 (2002).
- 14) Jang, C. G. : A taxonomic review of Korea *Polygonatum* (Ruscaceae). *Kor. J. Plant Tax.* **32**, 417 (2002).
- 15) 식품의약품안전청 의약품안전국 의약품평가부 : 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인, 식품의약품안전청, 서울 p. 18 (2004).
- 16) Lim, S. J. and Park, H. J. : The effect of Butanol fraction of *Polygonatum odoratum* with selenium on blood glucose level and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Nutr.* **33**, 703 (2000).
- 17) Domondon, D. L., He, W., De Kimpe, N., Hfte, M. and Poppe, J. : β-Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulat in mushroom production. *Phytochem.* **65**, 181 (2004).
- 18) Zhang, J., Ma, B. P., Kang, L. P., Yu, H. S., Yang, Y., Yan, X. Z. and Dong, F. T. : Furostanol Saponins from the fresh Rhizomes of *Polygonatum kingianum*. *Chem. Pharm. Bull.* **54**, 931 (2006).
- 19) Son, K. H., Do, J. C. and Kang, S. S. : Steroidal saponins from the Rhizome of *Polygonatum sibiricum*. *J. Nat. Prod.* **53**, 333 (1990).
- 20) Chang, I. M., Yun, H. S. and Kazuo, Y. : Revision of ¹³C NMR Assignments of β-sitosterol and β-sitostery-3-O-β-D-glucopyranoside Isolated from *Plantago asiatica* Seed. *Kor. J. Pharmacogn.* **12**, 12 (1981).
- 21) Pao, L. H., Kim, H. G., Ru, R. W. and Chun, N. L. : Benzoquinones, a homoisoflavanone and other constituents from *Polygonatum Alte-lobatum*. *Phytochem.* **44**, 1369 (1997).
- 22) Wang, D., Li D., Zhu, W., Zhang, J. F. and Peng, P. : Steroidal saponins from the rhizomes of *Polygonatum odoratum*. *Nat. Prod. Res.* **23**, 940 (2009).