

우슬로부터 20-Hydroxyecdysone의 분리 및 함량분석

손건호*, 황지현, 이승호¹, 박정일², 강신정³, 장승엽³, 이경순⁴
안동대학교 식품영양학과, ¹영남대학교 약학대학, ²서울대학교 약학대학,
³한국식품의약품 안전청, ⁴충북대학교 약학대학

Isolation and Quantitative Determination of 20-Hydroxyecdysone from *Achyranthis Radix*

Kun Ho Son*, Ji Hyun Hwang, Seung Ho Lee¹, Jeong Hill Park²,
Shin Jung Kang³, Seung Yeup Chang³ and Kyong Soon Lee⁴

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749,
¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, ²College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, ³Korea Food and Drug Administration,
Seoul 122-704, and ⁴College of Pharmacy, Chungbuk National
University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – Separation and quantitative determination of 20-hydroxyecdysone from *Achyranthis Radix* has been conducted by using HPLC method. 20-hydroxyecdysone in a methanol extract from the raw drug was separated on a reverse phase column using a CH₃CN-H₂O (18:82) solvent system and the average content is 0.0931±0.0048%. For the preparation of authentic standard, we isolated 20-hydroxyecdysone from the roots of *Achyranthes fauriei* by SiO₂ and RP-18 column chromatography.

Key words – *Achyranthis Radix*; quantitative determination of 20-hydroxyecdysone; HPLC method.

우슬은 쇠무릎 (*Achyranthes fauriei* 또는 *Achyranthes bidentata*, Amaranthaceae) 의 뿌리를 지칭하는 생약으로 한방에서 이뇨, 진통, 소종, 통경, 정혈 등의 목적으로 사용하고 있다. 쇠무릎은 다년생 초본으로 즐기는 골게 서고 높이는 약 1 m 이상 자란다. 잎은 마주나며 엽병이 있고 타원형으로 잎 밑이 썩기 모양이고 끝이 날카로우며 길이는 10-20 cm내외이다. 꽃은 녹색의 수상화로서 8-9월에 피며 정생하거나 엽액에서 나온다.¹⁾

우슬의 성분예 관한 연구로는 oleanolic acid를 비당부로 하는 saponin²⁻⁵⁾과 polysaccharide 및 20-hydroxyecdysone, inokosterone 등의 phytoecdys-

teroid에 대한 보고가 되어 있다.^{6,7)}

우슬의 생물학적 활성에 관한 연구로는 항염증, 항산화, 간 보호, 항암작용 등이 다양하게 보고되어 있으나^{8,9)} 구체적인 성분과 활성이 관련되어 보고된 경우는 없었다. 본 연구에서는 생약의 품질 표준화 사업의 일환으로 우슬의 특이적 또는 약효성분을 지표물질로 확보하고 국내에서 유통되고 있는 우슬로부터 이 지표물질의 함량을 정하여 그 품질확보 및 규격기준을 설정하고자 한다.

위에서 보고된 성분 중 20-hydroxyecdysone은 우슬의 주요 성분일 뿐 아니라 그 분자구조에 α , β -unsaturated ketone group을 가지고 있어 UV detector에 검출이 용이한 점을 고려하여 이 물질을

*교신저자 : Fax 0571-850-5494

지표로 한 정량법을 개발하였다.

실험방법

검체 - 1998년 국내 전 지역에서 시판되고 있는 우슬 54종을 구입하여 분쇄기로 마쇄한 다음 확인 시험을 거쳐 24종을 선별하여 다음과 같이 이화학적 실험을 실시하였다.

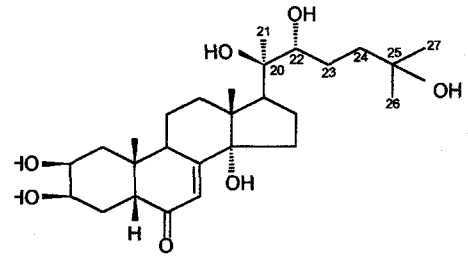
확인시험 - 건조하여 분쇄한 검체 2.0 g씩 취하여 MeOH 10 ml에 넣어 1시간동안 초음파 진탕하여 여과한 여액을 검액으로 하였다. 따로 표준품 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 표준액 및 검액을 각각 5 μ l씩 silica gel TLC plate (Merck 5715)에 점적한 후 CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0.5, 하층부)의 전개용매로 TLC를 실시하여 UV 254 nm의 lamp와 10% H₂SO₄으로 발색시켜 표준품과의 Rf값을 비교하였다.

건조감량 - 검체 2 g를 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시게이터 (silica gel) 에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 항량이 되었을 때의 감량을 건조감량 (%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 도가니를 500-550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2.0 g를 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500-550°C에서 4시간동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 회분량 (%)으로 하였다.

산불용성 회분시험 - 회분에 묶은 염산 25 ml를 조심하여 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용 여과지에 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔유물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 항과 같은 조작으로 무게를 미리 단 백금제 도가니에서 3시간 강열하여 데시게이터 (silica gel) 에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 산불용성 회분량 (%)으로 하였다.

20-Hydroxyecdysone의 분리 - 검체 3 Kg에 MeOH을 가하고 수욕상에서 6시간씩 3회 열 추출한 다음 추출액을 회전증발기로 농축하여 MeOH 엑스를 얻었다. MeOH 엑스를 증류수에 현탁한 후 분액 여



20 - hydroxyecdysone

두에 옮겨 *n*-BuOH로 분획한 다음 *n*-BuOH 분획을 silica gel column (CHCl₃:MeOH=7:1, Merck 7734)에 걸어 6개의 소분획으로 나누었다. 이 중 20-hydroxyecdysone이 함유된 소분획 5를 다시 silica gel column (CHCl₃:MeOH:H₂O=8:2:0.5, 하층부, Merck 7729)에 걸어 silica gel TLC상에 단일반점을 얻었다. 이는 silica gel과 같은 normal phase plate에서는 단일반점으로 나타나지만 reverse phase HPLC상에서 3가지 peak의 혼합물로 확인되므로 이 분획을 RP-18 column에 걸어 CH₃CN-H₂O (10: 90→18:82)로 gradient elution 시킨 후 얻은 물질을 H₂O로 재결정하여 순수한 20-hydroxyecdysone을 얻었다. 이 물질은 reverse phase HPLC에서도 단일 peak를 나타내었다.

Mp 237-239°C. Liebermann-Burchard test: positive. IR ν cm⁻¹ (KBr) 3429 (OH), 1651 (α, β -unsaturated C=O). FAB-MS *m/z* (rel. int.) 503 [M+ Na]⁺ (23.59), 481 [M+H]⁺ (57.44), 363 (C-20/C-22 fission) (22.51).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD+DMSO-*d*₆) δ : 0.91 (3H, s, 18-CH₃), 0.99 (3H, s, 19-CH₃), 1.22 (9H, s, 21, 26 and 27-CH₃), 2.36-2.44 (2H, m, H-5 and H-17), 3.17 (1H, m, H-9), 3.34 (1H, d, *J*=10.0 Hz, H-22), 3.85 (1H, m, H-2), 3.95 (1H, brd, *J*=2.4 Hz, H-3), 5.81 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-7)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD+DMSO-*d*₆) δ : 38.0 (C-1), 69.1 (C-2), 68.9 (C-3), 33.0 (C-4), 52.2 (C-5), 206.4 (C-6), 122.6 (C-7), 168.1 (C-8), 35.5 (C-9), 39.7 (C-10), 22.0 (C-11), 33.3 (C-12), 49.0 (C-13), 85.5 (C-14), 32.3 (C-15), 22.0 (C-16), 50.9 (C-17), 18.6 (C-18), 25.0 (C-19), 78.2 (C-20), 21.7 (C-21), 78.7 (C-22), 27.8 (C-23), 42.9 (C-24), 71.6 (C-25), 29.7 (C-26) 30.4 (C-27).

HPLC의 분석조건 - 본 실험에 사용한 HPLC는 Hewlett Packard사의 Series 1100로서 실험조건은 다음과 같다.

column: ODS Hypersil (5 μ m, 200 \times 4.6 mm); column temp: 35°C. mobile phase: CH₃CN-H₂O = 18:82; flow rate: 1.0 ml/min.; detector: UV 254 nm

검액의 조제 - 우슬 2.5 g를 MeOH을 가하여 1시간 초음파 진탕 한 후 여과하여 total volume을 50 ml로 하였다.

표준 검량선의 작성 - 분리한 20-hydroxyecdysone 5 mg을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 50 ml로 하여 stock solution으로 하였다. 이를 일정량씩 취하여 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 μ g/ml 농도의 표준 용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 μ g씩 취하

여 HPLC의 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area을 구하였다. 20-hydroxyecdysone의 회귀직선방정식은 $y = 10.2034x + 1.9524$ 이며 상관계수가 0.9999로서 1.0에 접근하므로 농도 (x)와 peak (y) 간의 직선성이 인정되었다.

20-Hydroxyecdysone의 함량 - 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회씩 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각 20-hydroxyecdysone의 함량을 구하였다. 이때 20-hydroxyecdysone의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였다.

결과 및 고찰

국내 전 지역에서 수집한 시판 검체에 대하여 20-

Table I. Content of 20-hydroxyecdysone, ash, acid-insoluble ash and loss of moisture on drying in *Achyranthis radix*

sample	content of 20-hydroxyecdysone(%)	loss of moisture on drying(%)	ash (%)	acid-insoluble ash (%)
1	0.1293	9.69	15.02	5.06
2	0.0707	9.45	10.01	3.44
3	0.1199	8.78	8.53	2.22
4	0.1178	9.41	8.43	2.00
5	0.0516	10.24	8.37	1.06
6	0.0823	9.29	10.46	1.63
7	0.1339	10.29	10.98	2.27
8	0.0978	8.73	10.65	5.26
9	0.0865	8.41	7.88	0.95
10	0.1236	8.43	6.14	0.88
11	0.0943	9.91	12.94	2.40
12	0.1213	9.38	9.07	1.68
13	0.1047	9.48	11.73	3.44
14	0.0865	9.16	8.81	1.36
15	0.0837	10.19	13.27	2.68
16	0.0617	11.01	10.28	2.88
17	0.0921	7.80	7.59	1.58
18	0.0556	9.27	10.70	3.12
19	0.1209	9.88	8.67	1.02
20	0.0955	10.99	11.69	1.97
21	0.0813	11.30	8.76	1.57
22	0.0657	11.32	6.97	1.21
23	0.0776	11.57	8.86	1.38
24	0.0804	14.94	6.43	1.05
Average	0.0931	9.96	9.67	2.17
sd	0.0048	1.45	0.46	0.25

hydroxyecdysone 표준품을 대조 물질로 하여 TLC 법으로 확인 시험을 한 결과 모두 표준품과 동일한 반점을 나타내었으며 나머지 pattern들도 잘 일치하였다. 또한 건조감량 시험에서는 평균 및 표준편차가 $9.96 \pm 1.45\%$ 이었다. 우슬은 뿌리를 약용하는 생약이므로 각각 회분 및 산불용성 회분 함량을 측정하여 본 결과 회분은 $9.67 \pm 0.46\%$ 이었으며, 산불용성 회분은 $2.17 \pm 0.25\%$ 이었다.

우슬의 성분 중 지표물질인 20-hydroxyecdysone의 함량을 측정하기 위하여 이 물질의 분리를 시도하였다. *n*-BuOH 가용성 분획을 silica gel column에 걸고 CHCl_3 -MeOH (7:1) 용매 system으로 반복 column을 실시하여 단일 반점으로 얻었으나 이것을 RP-column으로 겹정해 본 결과 혼합물로 확인되었으며 NMR spectrum에서도 20-hydroxyecdysone의 흡수 peak외에 다수의 불순 peak가 관찰되었다. 문헌의 보고로 미루어 볼 때 우슬에 함유되어 있는 inokosterone 등의 ecdysteroid가 silica gel에서 분리가 안되어 같이 함유된 것으로 사료되어 HPLC와 같은 용매 조건에서 다시 RP-18 column chromatography를 실시하여 순수한 20-hydroxyecdysone을 얻었다. 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data는 문헌의 보고와 완전히 일치하였으며 HPLC chromatogram에서도 단일 peak로 나타나 그 순도가 입증되었다.¹⁰⁾

이상과 같이 분리 확인된 20-hydroxyecdysone을 지표물질로서 사용 가능성을 검토하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 분석조건을 검토하기 위하여 여러 가지 조건에서 HPLC chromatogram을 얻고 이들을 비교해 본 결과 $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (18:82)를 이동상으로 사용했을 때 가장 좋은 분리능을 얻을 수 있었다. 이 조건에서 20-hydroxyecdysone의 retention time은 약 7분에서 나타나며 다른 물질의 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. 20-hydroxyecdysone의 표준 검량선을 작성하여 정량에 이용할 목적으로 stock solution을 만들고 이를 희석하여 표준용액을 제조하였다. 각 표준용액의 chromatogram으로부터 얻은 peak 면적과 농도와의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 20~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 그 직선성이 인정되었으며 이때의 회귀직선 방정식은 $y = 10.2034x + 1.9524$ 이며 상관계수는 0.9999로서 1.0에 접근하였다. 이상과 같은 조건에서 검액도 HPLC를 실시하여 상기 회귀직선방정식으로부터 그 함량을 구한 결과 0.05~0.13

%을 나타내었으며 그 평균값 및 표준편차는 $0.0931 \pm 0.0048\%$ 이었다. 따라서 우슬 중 20-hydroxyecdysone의 함량은 0.07% 이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 1998년도 생약·한약재 품질표준화연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 옥창수 (1989) 원색 한국 약용 식물도감, 175, 아카데미서적, 서울.
2. Han, D. R. and Lee, M. W. (1991) Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (I) oleanolic acid bisdesmoside from the root. *Yakhak Heoji* 35: 457-460.
3. Ida, Y., Satoh, Y., Katoh, M., Katsumata, M., Nagasao, M., Yamaguchi, K., Kamei, H., and shoji, J. (1994) Achyranthosides A and B, novel cytotoxic saponins from *Achyranthes fauriei* root. *Tetrahedron Lett.* 35: 6887-6890.
4. Ida, Y., Satoh, Y., Katsumata, M., Nagasao, M. and shoji, J. (1995) Achyranthosides C and D, novel glucuronide saponins from *Achyranthes fauriei* root. *Chem. Pharm. Bull.* 43: 896-898.
5. Ida, Y., Katsumata, M., Satoh, Y. and Shoji, J. (1994) Glucuronide saponins of oleanolic acid from *Achyranthes fauriei* roots. *Planta Med.* 60: 286-287.
6. Takemoto, T., Ogawa, S. and Nishimoto, N. (1967) Studies on the constituents of *Achyranthis radix*. II. Isolation of the insect-moulting hormones. *Yakugaku Zasshi* 87: 1469-1473.
7. Takemoto, T., Ogawa, S., Nishimoto, N., Hirayama, H. and Taniguchi, S. (1968) Studies on the constituents of *Achyranthis radix*. VII. The insect-moulting substances in *Achyranthes* and *Cyathula* genera "supplement". *Yakugaku Zasshi* 88: 1293-1297.
8. Shimomura, H., Sashida, Y. and Nakata, H.

- (1981) Plant growth regulating activities of crude drugs and medicinal plants. *Shoyakugaku Zasshi* 35: 173-179.
9. Kiso, Y., Suzuki, Y., Konno, C., Hikino, H., Hashimoto, I. and Yagi, Y. (1982) Liver-protective drugs. 3. The validity of the oriental medicines. 38. Application of carbon tetrachloride-induced liver lesion in mice for screening of liver protective crude drugs. *Shoyakugaku Zasshi* 36: 238-244.
10. Bandara, M. R., Jayasinghe, L., Karunaratne, V., Wannigama, G. P., Bokel, M., Kraus, W. and Sotheeswaran, S. (1989) Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens*. *Phytochemistry* 28: 1073-1075.

(1999년 8월 8일 접수)