

자근으로부터 acetylshikonin의 분리 및 함량분석

황석연, 황방연, 강삼식,¹ 김창민,² 박정일,³ 배기환,⁴ 손건호,⁵

이승호,⁶ 장승엽,⁷ 강신정,⁷ 노재섭, 이경순*

충북대학교, ¹천연물과학연구소, ²강원대학교, ³서울대학교, ⁴충남대학교,

⁵안동대학교, ⁶영남대학교, ⁷식품의약품안전청

Isolation and Quantitative Analysis of Acetylshikonin from Lithospermi Radix

Suk Yeon Hwang, Bang Yeon Hwang, Sam Sik Kang,¹ Chang Min Kim,² Jeong Hill Park,³

KiHwan Bae,⁴ Kun Ho Son,⁵ Seung Ho Lee,⁶ Seung Yeup Chang,⁷

Shin Jung Kang,⁷ Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee*

Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ¹Natural Products Research Institute, Seoul 110-460,

²Kangwon National University, Chuncheon 200-701, ³Seoul National University, Seoul 151-742,

⁴Chungnam National University, Taejon 305-764, ⁵Andong National University, Andong 760-749,

⁶Yeungnam University, Kyongsan 712-749, ⁷KFDA, Seoul 122-704, Korea

Abstract – Lithospermi Radix has been used in traditional medicine for antimicrobial, anti-inflammatory, immunostimulating, antitumor and wound-healing activities. For the quality control of this drug, acetylshikonin was isolated from the hexane extract of *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae) and identified by the spectroscopic evidences. A quantitative analysis of acetylshikonin using HPLC method showed that the average contents were $0.084 \pm 0.026\%$ in 31 samples collected throughout the various regions of Korea.

Key words – *Lithospermum erythrorhizon*; Boraginaceae; quantitative analysis; acetylshikonin; HPLC method.

자근(紫根)은 지치과(Boraginaceae)에 속하는 지치(*Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC.)의 뿌리로 특이한 냄새가 있으며, 바깥면은 어두운 자색~자갈색을 띠고 피부는 거칠고 얇게 벗겨지기 쉽다. 대부분 꼬인 깊은 세로홈이 있으며, 꺾어지기 쉽고 꺾인 면은 입상이며 쪼개진 틈이 많다.¹⁾ 한방에서는 주로 양혈, 청혈, 해독의 목적으로 사용되어 왔고, 해열약으로 쓰이며 투진(透疹)의 효과가 매우 강하기 때문에 홍역(紅疫)의 발진에 사용되어진다.²⁾ 현재까지 알려진 성분으로는 naphthoquinone pigment로 shikonin, acetylshikonin, isobutylshikonin, isovalerylshikonin 등과 lithospermic acid, polysaccharide로 lithosperman A, B, C 등이 있다. 생리활성으로는 항균작

용을 비롯한 상면(傷面)의 신생육아형성 촉진작용 등이 보고되었다. 또한 lithospermic acid에 대해 anti-gonadal activity 및 항염효과가 보고되었으며, lithosperman A, B, C에 대해 혈당강하 작용이 보고되었다. 그 외에도 analgesic effect, antiinflammatory effect, antiamebic effect 등 다양한 생리활성이 보고되어 있다.³⁻⁸⁾ 그러나 현재 시판 중인 자근에 대해서는 자근의 품질을 평가할 수 있는 지표물질의 선정이나 이를 이용한 함량분석에 대한 연구는 없었다. 따라서 본 연구에서는 생약·한약재에 대한 표준화 연구의 일환으로 자근의 주성분으로서 색소성분 중의 하나인 acetylshikonin을 지표물질로 선정하여 HPLC법에 따라 정량하여 자근의 품질관리 기준을 설정함으로써, 우수 한약재 유통에 기여하고자 하였다.

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

재료 및 방법

실험재료 - 본 연구에 사용한 자근은 1999년 전국 각지 41개 지역에서 구입하여 분쇄기로 마쇄한 다음 확인시험을 거쳐 선별한 31종의 시료를 사용하였다.

시약 및 기기 - ^1H - 및 ^{13}C -NMR은 Varian Unity-300 spectrometer를 사용하였고, ESI-MS는 Finnigan Navigator mass spectrometer를 사용하였다. column chromatography용 담체는 silicagel (70-230 mesh, Merck)을, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.2 mm, Merck)를 사용하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였고, HPLC용 용매는 HPLC grade를 사용하였다. 발색시약으로는 10% sulfuric acid 및 10% vanillin-sulfuric acid를 사용하였다.

확인시험 - 검체 가루 0.5 g을 시험관에 넣고 가열할 때 적색의 증기를 내며 관의 위쪽 벽에 응축되어 적갈색의 기름방울이 생성된다. 또한, 검체가루 또는 절편 0.5 g에 에탄올 1 ml를 넣어 흔들어 섞어 얻은 적색용액에 수산화나트륨 시약 1방울을 넣을 때 액은 청자색으로 변색하는지를 확인하였다.

건조감량시험 - 분석용 검체 2 g을 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터 (실리카 겔)에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 함량이 되었을 때의 감량을 건조감량 (%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 3 g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500~550°C에서 4시간 동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 함량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 달아 회분량 (%)으로 하였다.

산불용성회분시험 - 회분에 묶은 염산 25 ml를 조심하여 넣고 5분간 가만히 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 함과 같은 조작으로 무게를 미리 단 백금제, 석영제 또는 사기제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터 (실리카 겔)에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 산불용성회분량 (%)으로 하였다.

지표성분의 분리정제 - 자근 3 kg을 분쇄기로 마쇄한 다음 hexane (6L)으로 실온에서 3회 반복추출하여 hexane 엑스 20 g을 얻었다. 이 hexane층을 silicagel column chromatography를 이용하여 hexane-ethylacetate의 gradient로 용출시켜 7개의 fraction으로 나누었다. 이중 fraction 3을 재결정하여 acetylshikonin 500 mg을 순수 분리하였다. 순수 분리된 acetylshikonin을 silicagel TLC plate에 점적한 후 hexane : ethylacetate=5 : 1의 전개용매로 전개시켰을 때 0.44에서 R_f 값을 나타내었다.

Acetylshikonin - 적갈색 침상결정, mp 107~108 °C; $\alpha_{\text{D}}^{25} = +296$ (c=0.03, isopropanol); UV, λ_{max} (MeOH) : 560 nm (log ϵ 3.62), 520 nm (log ϵ 3.84), 489 nm (log ϵ 3.79), 276 nm (log ϵ 3.89); IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 1730 and 1605 cm^{-1} ; positive ESI-MS, m/z 353 [M+Na]⁺; ^1H -NMR, (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.58 (3H, s, 15-CH₃), 1.69 (3H, s, 16-CH₃), 2.14 (3H, s, OCOCH₃), 2.47 (1H, dt, $J=7.0, 14.7\text{Hz}$, H-12a), 2.62 (1H, dt, $J=7.0, 14.7\text{Hz}$, H-12b), 5.12 (1H, br t, $J=7.0\text{Hz}$, H-13), 6.02 (1H, br t, $J=7.0\text{Hz}$, H-11), 6.99 (1H, br s, H-3), 7.18 (2H, s, H-6, H-7), 12.43 (1H, s, OH-5), 12.58 (1H, s, OH-8); ^{13}C -NMR, (125 MHz, CDCl_3) δ : 176.69 (C-1), 148.23 (C-2), 131.47 (C-3), 178.20 (C-4), 167.54 (C-5), 132.91* (C-6), 132.75* (C-7), 167.01 (C-8), 111.85** (C-9), 111.59** (C-10), 69.54 (C-11), 32.85 (C-12), 117.68 (C-13), 136.14 (C-14), 17.95 (C-15), 25.77 (C-16), 169.77 (OCOCH₃), 20.98 (OCOCH₃), *, **Assignments are interchangeable

HPLC의 분석조건 - HPLC는 Young-Lin HPLC 9600 System으로서 M930 Solvent Delivery Pump, M720 UV-VIS Absorbance Detector, Autochro-Win Data System을 사용하였다. column은 TSKgel ODS-120T_M (150×46 mm I.D.)를 사용하였고, 이동상으로는 acetonitrile : water=70 : 30을 사용하였다. HPLC는

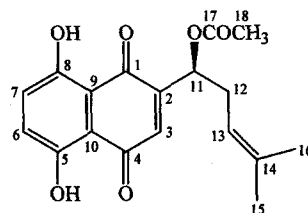


Fig. 1. Chemical structure of acetylshikonin.

실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector의 파장은 520 nm에서 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 - 자근 검체 1.0 g을 정확히 취하고 hexane 15 ml를 가한 후 sonicator로 1시간 초음파 진탕하여 추출하고 여과하여 감압건조한 후 메탄올로 용해하여 정확히 15 ml로 하였다. 이를 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준액의 조제 및 검량선의 작성 - 자근으로부터 순수분리한 acetylshikonin 10 mg을 MeOH 10 ml에

용해하고 이것을 MeOH로 희석하여 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml의 농도로 만들어 검량선용 표준용액으로 조제하였다. 각각의 표준용액 10 µl씩을 취하여 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다.

Acetylshikonin의 함량분석 - 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 검량선에서 구한

Table I. Contents of loss on drying, ash, acid-insoluble ash and acetylshikonin in Lithospermi Radix

Sample	Loss on Drying (%)	Ash(%)	Acid-insoluble Ash(%)	함량(%)	구입처
JG01	11.24	4.45	1.75	0.090	서 울
JG02	9.97	4.25	1.85	0.056	서 울
JG03	10.45	4.30	1.60	0.067	서 울
JG04	10.19	3.70	1.55	0.118	서 울
JG05	11.34	4.05	1.30	0.091	서 울
JG06	12.76	5.70	2.80	0.108	서 울
JG07	12.71	4.90	2.00	0.081	서 울
JG08	13.19	5.05	2.15	0.057	서 울
JG09	11.96	4.30	1.60	0.068	서 울
JG10	11.15	4.80	1.20	0.059	경기도
JG11	14.92	5.30	2.10	0.079	경기도
JG12	13.61	5.50	2.95	0.072	경기도
JG13	9.61	4.50	1.30	0.074	경기도
JG14	11.21	5.10	1.70	0.060	경기도
JG15	14.86	4.05	1.40	0.061	경기도
JG16	12.65	4.45	1.65	0.120	청 주
JG17	11.71	4.45	2.00	0.075	충 남
JG18	12.26	5.45	2.40	0.088	광 주
JG19	10.30	4.55	1.55	0.127	진 주
JG20	11.35	4.60	1.65	0.102	밀 양
JG21	11.80	5.20	1.75	0.095	강 룡
JG22	11.70	4.65	1.50	0.132	마 산
JG23	12.40	4.95	1.75	0.098	마 산
JG24	10.24	4.10	1.30	0.114	원 주
JG25	9.37	7.43	2.95	0.056	울 산
JG26	9.24	6.20	2.45	0.066	울 산
JG27	11.09	6.85	2.90	0.086	전 주
JG28	10.37	5.80	2.15	0.051	안 동
JG29	11.42	5.45	2.00	0.083	부 산
JG30	11.31	4.50	0.95	0.090	부 산
JG31	12.43	6.20	2.20	0.166	부 산
Average ± S.D.	11.57 ± 2.34	4.99 ± 1.52	1.88 ± 0.95	0.084 ± 0.026	

회귀직선 방정식으로부터 각각 acetylshikonin의 함량을 구하였다. 이 때 acetylshikonin의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였으며, t_R 은 9.7 min이었다.

결과 및 고찰

국내에 시판되고 있는 자근에 대한 표준화 연구의 일환으로, naphthoquinone 유도체로서 자근의 주성분으로 HPLC법을 이용하여 쉽게 정량할 수 있는 물질인 acetylshikonin을 선정하였다. 표준품 확보를 위하여 자근 hexane extract로부터 silicagel column chromatography 및 재결정을 통하여 순수 분리 정제한 후 지표물질로 사용하였다. 이 화합물은 각종 이화학적 성상 및 UV, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT 등의 각종 기기분석을 통하여 구조를 동정하였으며, 이것은 모두 문헌치와 잘 일치하였다.⁹⁻¹⁰⁾

전국 각 지역으로 부터 31종의 시료를 구입하여 에탄올로 추출한 용액에 수산화나트륨을 가했을 때 모두 청자색을 나타내었으며, 또한, silicagel TLC에 점적한 후 hexane : ethylacetate=5 : 1의 전개용매로 전개시켰을 때 모든 시료에서 R_f 0.44에서 나타나는 반점을 확인할 수 있었다. 건조감량 시험에서는 평균 $11.57 \pm 2.34\%$ ($n=31$)를 나타내었으며, 15% 이하로 규정하는 것이 적합하다고 사료되었다. 회분함량 시험에서는 평균 $4.99 \pm 1.52\%$ ($n=31$)를 나타내었으며, 31종의 시료 모두 약전규정인 11% 이하에 적합하였다. 또한, 산불용성회분함량 시험에서는 평균 $1.88 \pm 0.95\%$ ($n=31$)를 나타내었으며, 31종의 시료 모두 약전규정인 3.5% 이하에 적합하였다.

자근의 지표물질인 acetylshikonin의 함량을 측정하기 위하여 HPLC법을 이용하여 정량하였다. Column으로는 ODS를 사용하였고, 여러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 acetonitrile : water=70 : 30을 사용하였으며, 또한 검출과장으로서 이 화합물의 최대흡광도인 520 nm를 사용하였다.¹¹⁻¹²⁾ 이 조건에서 표준품인 acetylshikonin은 t_R 9.7 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 50~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 직선성이 인정되었으며, 회귀직선 방정식은 $y=694.6886x-96.071$ ($r=0.999$)로 나타났다. 이상과 같은 조건에서 전국 각지에서 구입한 31종의 자근 (JG1~JG31)에 대해 3회

반복 실험하여 상기 회귀직선 방정식으로부터 건조중량(g)중의 acetylshikonin의 함량(mg)을 구하여 %를 산출하였다(Table I). 자근 중의 acetylshikonin의 함량은 평균 $0.084 \pm 0.026\%$ ($n=31$)를 나타내었다. 따라서, 자근의 표준화를 위해서는 acetylshikonin의 함량기준을 0.05% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 1999년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 지형준, 이상인 (1998) 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서, 504, 한국메디칼인텍스사, 서울.
2. 김재길, 초배근 (1995) 동양전통약물원색도감, 45, 영림사, 서울.
3. 생약학연구회 (1998) 현대생약학, 532, 학창사, 서울.
4. Ozaki, Y., Ohno, A., Saito, Y. and Satake, M. (1994) Accelerative effect of shikonin, alkannin and acetylshikonin on the proliferation of granulation tissue in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**(8): 1075-1077.
5. Ozaki, Y., Ohno, A., Abe, K., Saito, Y. and Satake, M. (1993) Comparative study on the accelerative effect of "Koushikon" and "Nanshikon" and their constituents on proliferation of granuloma tissue in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **16**(7): 683-685.
6. Konno, C., Mizuno, T. and Hikino, H. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of lithospermans A, B and C, glycans of *Lithospermum erythrorhizon* Roots. *Planta Med.*, **51**(2): 157-158.
7. Kim, H. and Ahn, B. Z. (1990) Antitumor effects of acetylshikonin and some synthesized naphthazaris on L1210 and S-180 systems. *Yakhak Hoeji*, **34**(4): 262-266.
8. Sankawa, U., Otsuka, H., Kataoka, Y., Iitaka, T., Hoshi, A. and Kuretani, K. (1981) Antitumor activity of shikonin, alkannin and their derivatives. II. X-ray analysis of cyclo-alkanin luecoacetate, tautomerism of alkannin and cycloalkannin and antitumor activity of alkannin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(1): 116-122.
9. Inoue, K., Akaji, M. and Inouye, H. (1985) Quinones and related compounds in higher plants. X XI. New findings on the proton and carbon-13 nuclear mag-

- netic resonance spectra of shikonin. *Chem. Pharm. Bull.*, **33(9)**: 3993-3997.
10. Hisamichi, S. and Yoshizaki, F. (1982) Studies on the shikon I. Structures of new minor pigments and isolation of two isomers of shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon* SIEB. et ZUCC. *Shoyakugaku Zasshi*, **36(2)**: 154-159.
 11. Ikeda, Y., Ishida, N., Fukaya, C., Yokoyama, K., Tabata, M., Fukui, H. and Honda, G. (1991) Determination of the ratio between optical isomers, shikonin and alkannin by high performance liquid chromatography analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, **39(9)**: 2351-2352.
 12. Kang, J. S., Ahn, B. Z. and Blaschke, G. (1998) Enantiomeric ratio of shikonin derivatives as a possible key for the determination of the origin of *Lithospermi Radix*. *Arch. Pharm. Res.*, **21(5)**: 565-569.

(2000년 6월 23일 접수)