

결명자로부터 aurantio-obtusin의 분리 및 함량분석

주혜경 · 황방연 · 강신정¹ · 장승엽¹ · 원도희¹ · 노재섭 · 이경순*

충북대학교 약학대학, ¹식품의약품안전청

Isolation and Quantitative Analysis of Aurantio-obtusin from Cassiae Semen

Hei Kyoung Ju, Bang Yeon Hwang, Shin Jung Kang¹, Seung Yeup Chang¹,

Do Hee Won¹, Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763,

¹Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract – For the quality control of Cassiae Semen, anthraquinone compound, aurantio-obtusin, was isolated from the MeOH extract of Cassiae Semen (Leguminosae) and identified by the spectroscopic analysis. A quantitative analysis of aurantio-obtusin using HPLC method showed that the average contents of aurantio-obtusin were 0.03±0.01% in 50 samples collected throughout the various regions of Korea.

Key words – Cassiae Semen, Leguminosae, quantitative analysis of aurantio-obtusin, HPLC.

결명자(決明子)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 초결명(*Cassia obtusifolia* L.) 또는 긴강납차(*Cassia tora* L.)의 씨로서 짧은 원기둥 모양이며 길이 3~6 mm, 지름 2~3.5 mm이고 한 쪽 끝은 뾰족하고 다른 한 쪽 끝은 매끈하다. 양쪽의 옆에 황갈색의 넓은 세로줄 및 띠가 있고 종피는 굵으며 윤이나는 갈색으로 잘 익은 것을 약용으로 한다. 현재 시중에 유통되고 있는 결명자는 대부분이 *Cassia tora* L.이었다. 한방에서는 건위, 정장, 이뇨, 완하제로 사용되며 또한 야맹증, 고혈압, 간염이나 녹내장 등의 안과 질환에도 이용된다.¹⁻²⁾ 최근에는 간장보호효과, 항균작용, radical scavenging activity, antimutagenic activity, antiallergic activity, cAMP phosphodiesterase 저해작용 등이 알려져 있다.³⁻⁷⁾

현재까지 알려진 결명자의 성분으로는 free anthraquinone으로서 chrysophanol, physcion, emodin, obtusifolin, chryso-obtusin, obtusin, aurantio-obtusin과 anthraquinone glycoside로서 gluco-obtusifolin, gluco-

aurantio-obtusin, cassiaside, rubrofusarin gentiobioside, alaternin 1-O-β-D-glucopyranoside, chryso-obtusin 1-O-β-D-glucopyranoside 및 naphthalene 유도체로서 cassitoroside 그리고 bianthraquinone, C-glycosidic flavonoid 등이 알려진 바 있다.⁸⁻¹⁶⁾

본 연구에서는 생약, 한약재에 대한 품질 표준화 연구의 일환으로 결명자의 anthraquinone 성분의 하나로써 결명자에서만 분리되었고, 다양한 생리활성이 보고된 aurantio-obtusin을 지표물질로 선정하여 결명자의 MeOH 추출물을 각종 solvent를 용매로 한 silica gel column chromatography를 실시하여 그 성분을 분리하고 구조를 동정하였으며, 전국 각처에서 수집된 50종의 결명자 시료를 MeOH로 추출하여 HPLC법으로 그 함량을 측정하였다. 본 실험은 우수한 결명자의 유통을 위하여 aurantio-obtusin의 함량을 설정하여 품질을 표준화하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

실험재료 – 본 연구에 사용한 시료는 2000년 국내

전 지역에서 시판되고 있는 결명자 50종을 구입하여 마쇄한 후 시료로 사용하였다.

시약 및 기기 - ^1H - 및 ^{13}C -NMR은 Varian Unity-300 spectrometer를 사용하였고, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine-5989A를 사용하였다. UV는 JASCO V500 UV/VIS spectrophotometer(Model LE 599, U.K.)를, IR은 FT/IR 300E(JASCO) spectrometer를 사용하여 측정하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel(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% vanillin-sulfuric acid를 사용하였다.

확인시험 - 검체 가루를 데시케이터(실리카겔)에서 48시간 말린 다음 0.1 g을 슬라이드글라스 위에 놓고 안지름, 높이 각 10 mm의 유리고리를 얹고 물로 적신 여과지를 위에 덮고 천천히 가열하였다. 여과지 위에 붙은 승화물에 수산화칼륨시액 1방울을 떨어뜨릴 때 반응을 관찰하였다.

건조감량시험 - 분석용 검체 3 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 항량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2 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 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 달아 회분량(%)으로 하였다.

지표성분의 분리정제 - 결명자 3 kg을 구입 후 정확히 감정하여 세말로 하였다. MeOH(5 L)로 3회 반복 추출 후 여과, 농축하여 MeOH 엑스 273.8 g을 얻었다. 이것을 물과 CH_2Cl_2 으로 분획한 후 CH_2Cl_2 층을 CH_2Cl_2 :MeOH gradient를 전개용매로 한 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 fraction(Fr. 1~Fr. 8)으로 나누었다. Fr. 6을 다시 Hexane:EtOAc = 5:1인 전개용매를 이동상으로 한 silica gel

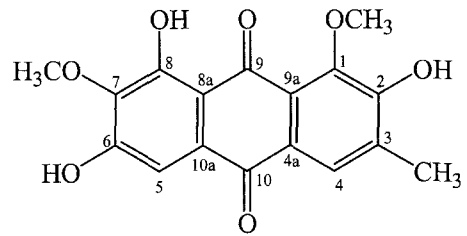


Fig. 1. Chemical structure of aurantio-obtusin.

column chromatography를 실시하여 7개의 fraction(Fr. 6-A~Fr. 6-G)을 얻고, Fr. 6-E를 MeOH로 재결정하여 주황색의 침상 결정(300 mg)을 단리하였다. 각종 spectral data와 비교 검토한 결과 aurantio-obtusin으로 확인되었다(Fig. 1).

Aurantio-obtusin - orange needles, mp 263~265°C; UV, λ_{max} (MeOH) 202, 285 nm; IR, $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3350 (OH), 1660 (non-chelated C=O), 1630 (chelated C=O) cm^{-1} ; EI-MS, m/z 330 $[\text{M}]^+$; ^1H -NMR, (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2.23 (3H, s, 3- CH_3), 3.75 (3H, s, 1-O CH_3), 3.78 (3H, s, 7-O CH_3), 7.38 (1H, br s, H-5), 7.72 (1H, br s, H-4), 13.22 (1H, s, 8-OH); ^{13}C -NMR, (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 147.23 (C-1), 155.49 (C-2), 132.02 (C-3), 125.88 (C-4), 124.89 (C-4a), 107.67 (C-5), 156.62 (C-6), 139.42 (C-7), 156.96 (C-8), 111.11 (C-8a), 187.18 (C-9), 123.72 (C-9a), 180.41 (C-10), 128.52 (C-10a), 16.48 (3- CH_3), 60.01 (1-O CH_3), 61.22 (7-O CH_3).

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(150×4.6 mm I.D.)를 사용하였고, 이동상으로는 MeOH:H₂O:HClO₄ = 62:38:0.1을 사용하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector의 파장은 285 nm에서 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 - 결명자를 세말로 하여 약 1.0 g을 정확히 취하고 MeOH 10 ml을 가하여 실온에서 sonicator로 1시간 동안 추출하여 이중 1 ml을 취하였다. 이를 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준액의 조제 및 검량선의 작성 - 결명자로부터 분리한 정량용 aurantio-obtusin의 표준품 1 mg을 1 ml의 MeOH 용액에 용해하고 이것을 MeOH로 희석

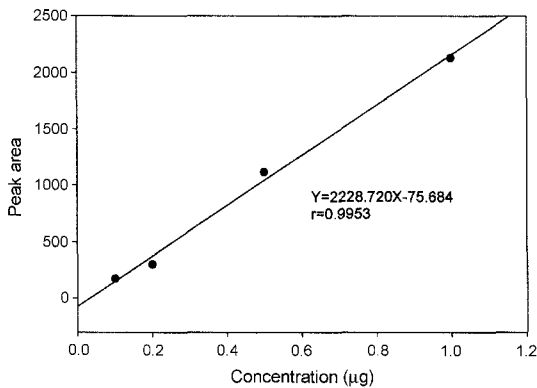


Fig. 2. Calibration Curve of Aurantio-obtusin.

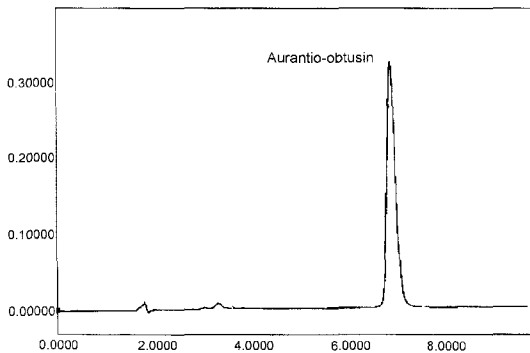


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard Aurantio-obtusin.

하여 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml로 만들어 검량선용 표준용액으로 하였고, HPLC를 각각의 표준용액을 취하여 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다(Fig. 2).

Aurantio-obtusin의 함량분석 - 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 검량선에서 구한 회귀직선 방정식으로부터 각각 aurantio-obtusin의 함량을 구하였다. 이 때 aurantio-obtusin의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였으며, t_r 은 5.5 min이었다(Fig. 3).

결과 및 고찰

약전 및 생약규격집에 수재되어 있으며 현재 한방에서 널리 이용되고 있는 결명자에 대한 표준화 연구의 일환으로, 결명자의 주성분으로 다양한 생리활성이 보고된 aurantio-obtusin을 지표물질로 선정하였다. 표

준품 확보를 위하여 결명자를 MeOH로 추출한 후, CH_2Cl_2 으로 분획하고 CH_2Cl_2 -MeOH gradient를 전개용매로 한 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 fraction으로 나누었다. Fr. 6을 다시 Hexane-EtOAc(5:1)의 전개용매를 이동상으로 한 silica gel column chromatography를 반복 실시하여 7개의 fraction을 얻고, Fr.-6-E에서 지표물질인 aurantio-obtusin(300 mg)을 순수분리정제 하였다. 순수하게 단리된 물질은 orange needle crystal로 mp 263~265°C를 나타내었고, UV spectrum에서는 285 nm에서 흡수극대를 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 2.23에서 3H분의 singlet signal로 3번 위치의 methyl proton을 확인할 수 있었고, δ 3.75, 3.78에서 각각 3H분으로 1번, 7번 위치의 methoxyl proton을 관찰할 수 있었다. 또한, aromatic field에서는 δ 7.72, 7.38에서 singlet으로 4번, 5번의 proton을 관찰할 수 있었고, δ 13.22에서는 1H분의 singlet으로 hydrogen bonding하고 있는 8번의 OH signal을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 및 DEPT spectrum에서는 총 17개의 carbon signal을 확인할 수 있었으며, δ 16.48에서 3번의 $-\text{CH}_3$ carbon, δ 60.01, 61.22에서 1번, 7번의 $-\text{OCH}_3$ carbon을 관찰할 수 있었다. 또한, δ 187.18, 180.41에서 9번, 10번의 carbonyl carbon을 관찰할 수 있었다. EI-MS spectrum에서는 m/z 330에서 molecular ion peak를 나타내었다. 이상의 각종 물리화학적 성상과 spectral data를 문헌과 비교 검토하여 aurantio-obtusin으로 구조를 동정하였다.¹⁷⁻¹⁸⁾

전국 각 지역으로부터 구입한 시료를 가열하여 여과지 위에 붙은 승화물에 수산화칼륨시액 1방울을 떨어뜨렸을 때 50종 시료 모두에서 적색을 나타내어 anthraquinone 반응에 양성을 나타내었다. 순도시험 결과 이물질량은 평균 $0.46 \pm 0.35\%$ ($n=50$)를 나타내었으며 대한약전 제 7개정의 규정인 1.0% 이하에 대체적으로 적합하였다. 회분함량시험에서는 평균 $3.96 \pm 0.50\%$ ($n=50$)로 나타났으며 대한약전 제 7개정의 규정인 5.0% 이하에 50개 시료 모두에서 적합하였다. 건조감량 시험에서는 평균 $10.73 \pm 1.10\%$ ($n=50$)로 나타났으며 12% 이하로 규정하는 것이 적합하다고 사료된다(Table I).

Aurantio-obtusin은 결명자의 주성분으로 각종 생리활성이 보고되어 있으며, HPLC를 이용하여 쉽게 정량할 수 있으므로 지표성분으로 설정하여 50종의 시료에 대하여 aurantio-obtusin의 함량을 측정하였다.

Table I. Contents of aurantio-obtusin, acid-insoluble ash and loss on drying in Cassiae Semen

sample	Content of Aurantio-obtusin (%)	Acid-insoluble Ash (%)	Loss on Drying (%)	Collection Place
KM 01	0.019	4.35	9.10	Seoul
KM 02	0.021	4.38	11.03	Seoul
KM 03	0.009	4.35	7.92	Seoul
KM 04	0.013	4.10	11.16	Seoul
KM 05	0.021	4.15	10.56	Seoul
KM 06	0.024	4.23	10.42	Seoul
KM 07	0.037	4.00	10.26	Seoul
KM 08	0.044	4.25	11.53	Seoul
KM 09	0.031	3.98	10.68	Seoul
KM 10	0.019	4.95	11.34	Seoul
KM 11	0.017	3.83	10.60	Seoul
KM 12	0.018	4.55	7.75	Kunpo
KM 13	0.017	4.40	10.80	Kwangmyung
KM 14	0.014	2.10	11.43	Kwangmyung
KM 15	0.016	3.68	10.43	Kwangmyung
KM 16	0.013	3.68	10.68	Sungnam
KM 17	0.018	3.85	10.56	Anyang
KM 18	0.015	2.95	11.75	Anyang
KM 19	0.031	4.43	9.79	Anyang
KM 20	0.015	4.28	8.95	Hwasung
KM 21	0.050	3.88	12.57	Cheongju
KM 22	0.015	3.83	9.58	Chungju
KM 23	0.030	3.58	11.48	Taejon
KM 24	0.021	4.00	11.35	Taejon
KM 25	0.016	4.13	10.90	Keumsan
KM 26	0.024	3.45	10.45	Nonsan
KM 27	0.012	3.98	8.62	Kwangju
KM 28	0.011	3.65	10.19	Kwangju
KM 29	0.026	4.38	8.88	Kwangju
KM 30	0.033	3.70	11.02	Icksan
KM 31	0.029	3.98	11.85	Jeonju
KM 32	0.037	3.85	12.45	Taegu
KM 33	0.023	4.15	11.45	Taeju
KM 34	0.034	3.65	10.46	Andong
KM 35	0.012	3.15	11.38	Youngchon
KM 36	0.033	3.50	12.08	Uisung
KM 37	0.038	3.80	11.86	Pusan
KM 38	0.026	3.75	10.42	Pusan
KM 39	0.036	4.80	10.93	Pusan
KM 40	0.031	3.75	11.33	Masan
KM 41	0.038	3.90	12.23	Masan
KM 42	0.015	4.40	9.32	Masan
KM 43	0.040	3.15	11.22	Milyang
KM 44	0.051	4.15	10.91	Ulsan
KM 45	0.030	4.00	11.64	Ulsan

Table I. Continued.

sample	Content of Aurantio-obtusin (%)	Acid-insoluble Ash (%)	Loss on Drying (%)	Collection Place
KM 46	0.041	4.15	11.34	Chinju
KM 47	0.034	3.45	10.71	Kangnung
KM 48	0.011	4.85	9.44	Wonju
KM 49	0.020	4.50	12.01	Chuncheon
KM 50	0.035	3.90	11.81	Jeju
Average ± S.D.	0.03 ± 0.01	3.96 ± 0.50	10.73 ± 1.10	

Column으로는 TSKgel ODS-120T_M를 사용하였고, 여러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 MeOH : H₂O : HClO₄ = 62 : 38 : 0.1을 사용하였으며, 또한 검출파장으로서는 최대흡광도인 285 nm를 사용하였다. 이 조건에서 표준품인 aurantio-obtusin은 t_R 5.5 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 회귀직선 방정식은 $y=2228.720x-75.684(r=0.995)$ 로 나타났으며, 직선성이 인정되었다.

전국각지에서 구입한 50종의 결명자(KM01~KM50)에 대해 3회 반복 실험하여 상기 회귀직선 방정식으로부터 건조중량(g)중의 aurantio-obtusin의 함량(mg)을 구하여 %를 산출하였다(Table 1). 결명자중의 aurantio-obtusin 함량은 평균 0.03±0.01%(n=50)을 나타내었으며, 모든 시료에 함유되어 있었지만 시료에 따라 다소간의 편차가 있었다.

결 론

결명자의 anthraquinone성분 중 하나로서, 다양한 생리활성이 보고된 aurantio-obtusin을 지표물질로 선정하여 결명자의 MeOH 추출물로부터 순수분리하여 구조를 동정하였으며, HPLC에 의한 품질평가법을 확립하였다. 전국 각 지역에 유통되고 있는 결명자 50종(KM01~KM50)을 수집하여 순도시험 결과 이물량은 평균 0.46±0.35%(n=50)를 나타내었고, 회분함량시험에서는 평균 3.96±0.50%(n=50)를 나타내었으며, 이것은 대한약전 제7개정 규정한 1.0% 이하(이물량) 및 5.0% 이하(회분함량)에 50개 시료 모두에서 적합하였다. 건조감량 시험에서는 평균 10.73±1.10%(n=50)로 나타났으며 12% 이하로 규정하는 것이 적합하다고 사료된다. 또한, aurantio-obtusin 함량을 측정된 결과 평균 0.03±0.01%(n=50)을 나타내었으며, 결명자

의 표준화를 위해서는 aurantio-obtusin의 함량기준을 0.02% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 2000년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 한국약학대학협의회 약진분과회 (1999) 대한약전 제7개정, 1028, 문성사, 서울.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 (1998) 원역중약대사전, 199-203, 도서출판 정담, 서울.
3. Wong, S. M., Wong, M. M., Seligmann, O. and Wagner, H. (1989) New Antihepatotoxic Naphthopyrone Glycosides from the Seeds of *Cassia tora*. *Planta Med.* **55**: 276-280.
4. Choi, J. S., Lee, H. J. and Kang, S. S. (1994) Alaterin, cassiaside and rubrofusarin gentiobioside, radical scavenging principles from the seeds of *Cassia tora* on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Arch. Pharm. Res.* **17**(6): 462-466.
5. Choi, J. S., Lee, H. J., Park, K. Y., Ha, J. O. and Kang, S. S. (1997) *In vitro* Antimutagenic Effects of Anthraquinone Aglycones and Naphthopyrone Glycosides from *Cassia tora*. *Planta Med.* **63**: 11-14.
6. Kitanaka, S., Nakayama, T., Shibano, T., Ohkoshi, E. and Takido, M. (1998) Antiallergic Agent from Natural Sources. Structures and Inhibitory Effect of Histamine Release of Naphthopyrone Glycosides from Seeds of *Cassia obtusifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.* **46**(10): 1650-1652.
7. Nikaido, T., Ohmoto, T., Sankawa, U., Kitanaka, S. and Takido, M. (1984) Inhibitors of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase in Cassia Seed. *Chem. Pharm. Bull.* **32**(8): 3075-3078.
8. Takido, M. (1958) Studies on the Constituents of the

- Seeds of *Cassia obtusifolia* L. I. *Chem. Pharm. Bull.* **6**: 397-400.
9. Takido, M. (1960) Studies on the Constituents of the Seeds of *Cassia obtusifolia* L. II. The Structure of Obtusin, Chryso-obtusin, and Aurantio-obtusin. *Chem. Pharm. Bull.* **8**: 246-251.
 10. Takido, M. and Takahashi, S. (1964) Studies on the Constituents of the Seeds of *Cassia obtusifolia* L. III. The Structures of Gluco-obtusifolin and Gluco-aurantio-obtusin. *Shoyakugaku Zasshi* **17**: 43-44.
 11. Kitanaka, S., Kimura, F. and Takido, M. (1985) Studies on the Constituents of the Seeds of *Cassia obtusifolia* L. The Structures of Two New Anthraquinone Glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **33**(3): 1274-1276.
 12. Wong, S. M., Wong, M. M., Seligmann, O. and Wagner, H. (1989) Anthraquinone Glycosides from the Seeds of *Cassia tora*. *Phytochemistry* **28**(1): 211-214.
 13. Choi, J. S., Jung, J. H., Lee, H. J., Lee, J. H. and Kang, S. S. (1995) A Naphthalene Glycoside from *Cassia tora*. *Phytochemistry* **40**(3): 997-999.
 14. Koyama, J., Morita, I., Tagahara, K. and Aqil, M. B. (2001) Bianthraquinones from *Cassia siamea*. *Phytochemistry* **56**(8): 849-851.
 15. Rao, K. V., Damu, A. G., Jayaprakasam, B. and Gunasekar, D. (1999) Flavonol Glycosides from *Cassia hirsuta*. *J. Nat. Prod.* **62**(2): 305-306.
 16. Hatano, T., Mizuta, S., Ito, H. and Yoshida, T. (1999) C-Glycosidic Flavonoids from *Cassia occidentalis*. *Phytochemistry* **52**(7): 1379-1383.
 17. Choi, J. S., Jung, J. H., Lee, H. J. and Kang, S. S. (1996) The NMR Assignments of Anthraquinones from *Cassia tora*. *Arch. Pharm. Res.* **19**(4): 302-306.
 18. Yun-Choi, H. S., Lee, J. R., Kim, J. H., Kim, Y. H. and Kim, T. H. (1987) Potential Inhibitors of Platelet Aggregation from Plant Sources, IV. Platelet Anti-Aggregatory Components of *Cassia* Semen. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**(4): 203-206.

(2001년 5월 14일 접수)