

수치에 따른 숙지황 중의 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde 함량분석

황석연 · 황방연 · 최우희 · 정한진¹ · 허재두² · 이경순 · 노재섭*
충북대학교 약학대학, ¹세원제약(주), ²크라운제약(주)

Quantitative Determination of 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde in the *Rehmanniae Radix Preparata* Samples at Various Processing Stages

Suk Yeon Hwang, Bang Yeon Hwang, Woo Hoi Choi, Han Jin Jung¹,
Jae Doo Huh², Kyong Soon Lee and Jai Seup Ro*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, ¹Sewon Pharmaceutical Co., Ltd.,
Namyangju 472-883, ²Crown Pharmaceutical Co., Ltd., Anyang 430-817, Korea

Abstract – In order to determine the content of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) in the *Rehmanniae Radix Preparata*, 5-HMF was isolated from the EtOAc fraction of the *Rehmanniae Radix Preparata* samples and identified by spectroscopic and physicochemical evidences. Twenty one samples prepared on the basis of increasing number of stewing times with wine were analyzed by HPLC. From this analysis, it was revealed that the samples processed under one to nine times of stewing showed increasing pattern in 5-HMF contents. And the samples processed under 9 to 18 times of stewing showed 0.53-0.74% in 5-HMF contents. However, for those samples processed more than 19 times, 5-HMF content profile showed decreasing pattern.

Key words – *Rehmanniae Radix Preparata*, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, quantitative determination, stewing with wine

지황(*Rehmannia glutinosa*)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년초로서 전체에 짧은 털이 있으며 뿌리는 굵고 옆으로 뻗으며 감색이다.¹⁾ 지황은 상태에 따라 생지황(生地黃), 건지황(乾地黃) 및 숙지황(熟地黃)으로 구분되어진다. 생지황(生地黃)은 채약한 뒤 모래에 저장한 신선한 지황의 뿌리로, 한방에서는 청열(淸熱), 양혈(涼血), 생진(生津)의 효능이 있으며, 건지황(乾地黃)은 채약 후 죽도(竹刀)로 거피하고 양건한 지황의 뿌리로, 한방에서는 자음양혈(滋陰涼血) 효능이 있다. 숙지황(熟地黃)은 생지황을 사인(砂仁)이 함유된 술에 담그었다(酒浸)가 술과 함께 찌서 푼건

(曝乾)시킨다. 이것을 9회 반복하여(九蒸九曝) 제품화한 것으로, 이 약은 불규칙한 덩어리 또는 부서진 덩어리로 크기가 고르지 않고 두께가 같지 않으며 표면은 검고 광택이 나며 점성이 크다. 한방에서는 보혈(補血), 자음(滋陰)의 효능이 있어 혈허(血虛), 심계정충(心悸怔忡), 실면(失眠), 붕루(崩漏), 월경부조(月經不調), 신음부족(腎陰不足)으로 인한 골증조열(骨蒸潮熱), 도한(盜汗), 이명(耳鳴), 목현(目眩), 수발조백(鬚髮早白), 유정(遺精), 소갈(消渴) 등에 적용되어 사물탕(四物湯), 육미지황환(六味地黃丸), 숙지황환(熟地黃丸) 등에 배합되어 진다.^{2,3)}

생지황(生地黃)에 관한 성분 연구로는 *R. glutinosa* var. *hueichingensis*로부터 Morota 등⁴⁾이 iridoid gly-

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

coside계의 jioglucoside A, B를 분리하여 보고하였으며, Tomoda 등⁵⁾이 물추출물에서 amino acid, phosphoric acid와 D-glucosamine, D-glucose, D-galactose, D-fructose, sucrose, raffinose, mannotriose, stachyose, verbascose, D-mannitol 등의 carbohydrate를 분리하여 보고하였다. 또한 *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*와 *R. glutinosa* forma *hueichingensis*로부터 Oshio 등⁶⁾이 iridoid glycoside계의 catalpol, leonuride (ajugol), aucubin, melittoside, rehmannioside A, B, C, D를 분리하여 보고하였다.

건지황(乾地黃)에 관한 성분 연구로는 *R. glutinosa* var. *purpurea*로부터 Oshima 등⁷⁾이 sesquiterpenoid계의 1-(4-methyl-2-furanyl)-2-(5-methyl-5-ethenyl-2-tetrahydrofuran-1-yl)-propan-1-one을, Nishimura 등⁸⁾이 glycoside계의 salidroside, decaffeoyl-acteoside, 2-phenylethyl-O-β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside, 2-phenylethyl-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside, n-hexyl-O-β-D-xylopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside, 2-methoxy-4-methylphenyl-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside를, Sasaki 등⁹⁾이 acteoside, 2'-acetylacteoside, martynoside, isoacteoside, jionoside A₁, jionoside B₁, purpureaside C, cistanoside F, jionoside C, D, E, A₂, B₂를 분리하여 보고하였다. *R. glutinosa*로부터는 Yoshikawa 등¹⁰⁾이 rehmannioside A, B, C, rehmapicroside,¹¹⁾ rehmaglutin C, glutinoside¹²⁾를, Kitagawa 등¹³⁾이 rehmaglutin A, B, D¹⁴⁾를 분리하여 보고하였다.

숙지황(熟地黃)에 관한 성분 연구로는 Morota 등¹⁵⁾이 *R. glutinosa* var. *hueichingensis*로부터 cyclopentanoid monoterpene계의 jioglutin A, B, C, jioglucitolide, jiofuran을, Sasaki 등¹⁶⁾이 norcarotenoid계의 trihydroxy-β-ionone, sec-hydroxyaeginetic acid를 분리하여 보고하였다.

이와 같이 지황은 다양한 iridoid glycoside, amino acid, carbohydrate, sesquiterpene, phenol성 물질, monoterpene, norcarotenoid 등의 성분을 함유하며, 여러 가지 생리활성이 연구되고 있는 중요한 생약이다. 종전까지 숙지황(熟地黃)의 품질관리를 위한 지표 물질로서 catalpol, d-mannitol, rehmannioside a-d 등이 사용되어져 왔는데¹⁷⁾ 이는 생지황(生地黃) 및 건지황(乾地黃)에도 존재하는 물질이며 산지 또는 계절별로 함량의 차이가 있을 뿐만 아니라 숙지황(熟地黃)의 제조과정에서 주로 열에 의해서 분해되는 것으로 보

고되는 등 여러 가지 문제점이 발견되었다. 그러나 숙지황(熟地黃)의 성분 중의 하나로서 지황의 숙성(熟成) 과정에서 생성되는 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF)는 생지황(生地黃) 및 건지황(乾地黃)에는 거의 존재하지 않고 숙지황(熟地黃)에만 존재하는 특이성분으로 정량성이 있는 것으로 밝혀져 있다.¹⁸⁾ 이에 의해서 숙지황(熟地黃)의 표준화에 관한 연구가 진행되어 5-HMF를 이용한 숙지황(熟地黃)의 품질관리를 위한 분석법이 확립되었다.^{18,19)} 대한약전(KP) 제 7개정서에도 “이 약을 건조한 것을 정량할 때 5-HMF 0.1% 이상을 함유한다”고 규정되어 있다.²⁰⁾

본 실험에서는 숙지황(熟地黃)으로부터 지표물질인 5-HMF를 순수분리하여 구조동정하고, 숙지황(熟地黃)의 증수(蒸數, 1증-21증)에 따른 5-HMF의 함량변화를 조사하여 9증9폭(九蒸九曝)시의 5-HMF 함량과 그 전후의 함량을 비교해 봄으로써 보다 우수한 숙지황(熟地黃)의 개발 및 유통에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 검체는 숙지황(*Rehmanniae Radix Preparata*)으로서 세원 제약에 의한 1증에서 21증까지의 수지한 시료를 사용하였으며, 제조방법은 지황에 약주(alcohol 10% 이내)를 가하고 찜통에서 100°C의 수증기로 수지하였다. 처음 1증은 5시간동안 처리하고, 2증부터 21증까지는 3시간 30분씩 처리하였다.

실험기기 및 시약 - ¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 Varian Unity-300 spectrometer, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine-5989 A 질량분석기를 사용하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel(70-230 mesh, ASTM 9385, Merck)과 sephadex LH-20(20-100 μ, Pharmacia Fine Chemical Co., Ltd.)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate(0.2 mm, Merck)를 사용하였으며, HPLC system은 YOUNGLIN HPLC 9600 System, M930 Solvent Delivery Pump, M720 UV-VIS Absorbance Detector, Autochro-WIN Data System을 사용하였다.

추출 및 분리 - 숙지황 600 g을 MeOH로 2회 반복추출하여 여과하고 여액에 CH₂Cl₂을 가하여 용매분획한 후 남은 물층을 다시 EtOAc를 가하여 용매분획하였다. 다음으로, EtOAc층은 농축하여 EtOAc 엑스 27 g을 얻었고, 이 EtOAc 엑스를 H₂O→MeOH gra-

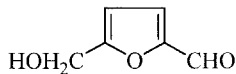


Fig. 1. Chemical structure of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde.

dient를 이동상으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 8개의 fraction으로 나누고, 이 중 fraction 6을 다시 silica gel에 걸쳐 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH}$ gradient를 이동상으로 column chromatography하여 compound 1(280 mg)을 얻었다.

Compound 1—Colorless oil, EI-MS (m/z): 128; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 4.62 (2H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), 6.44 (1H, d, $J=3.5$ Hz), 7.15 (1H, d, $J=3.5$ Hz), 9.46 (1H, s, $-\text{CHO}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 57.91 (CH_2), 110.61 (CH), 123.99 (CH), 152.78 (C), 161.70 (C), 178.44 (C=O).

HPLC 분석조건—column: TSKgel ODS-120T (4.6×15 cm); detector: UV 280 nm; column temperature: 25°C; mobile phase: $\text{H}_2\text{O}:\text{Acetonitrile}=95:5$; flow rate: 1.0 ml/min; injection volume: 10 μl .

검액의 조제—각각의 시료를 세말로 하여 1 g을 정확히 취하고 물 10 ml를 가하여 90°C에서 1시간 반복추출한 후 여과하였다. 여과한 수층을 EtOAc 10 ml씩으로 추출하고 추출액을 감압건조한 후 잔사를 메탄올로 용해하여 정확히 10 ml로 하였다. 이를 50 배로 희석하고 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준검량선의 작성—정량용 5-HMF의 표준품 1.0 mg을 MeOH 10 ml에 용해하고 이것을 MeOH로 10배씩 희석하여 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml로 만들어 검량선용 표준용액으로 하였다. 5-HMF의 회귀방정식은 $y=33578.912x+126.388$ ($r=0.9998$)로 직선성이 인정되었다.

5-Hydroxymethyl-2-Furaldehyde의 함량—전향에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회씩 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 5-HMF의 peak 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식에 대입하여 각각 그 함량을 구하였다(Fig. 3).

결과 및 고찰

대한약전(KP) 제7개정서의 숙지황(*Rehmanniae Radix Preparata*)에 관한 항목에는 “이 약을 건조한

것을 정량할 때 5-HMF 0.1% 이상을 함유한다”고 규정되어 있다. 이에 본 실험에서는 숙지황의 수치(중수)에 따라 지표물질 5-HMF의 함량변화를 고찰하였다. 지표물질 확보를 위하여 숙지황의 ethylacetate 분획에 대하여 sephadex LH-20, silica gel column chromatography를 반복실시하여 compound 1(280 mg)을 순수단리하였다. Compound 1은 colorless oil로 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 4.62에서 2H분의 singlet signal로 CH_2OH 와 δ 9.46에서 1H분의 singlet signal로 CHO가 관찰되었고, δ 6.44와 δ 7.15에서 3, 4번 위치의 proton에 기인하는 doublet signal을 관찰할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 6개의 carbon signal을 관찰할 수 있었고, DEPT spectrum에서는 3개의 methine, 1개의 methylene carbon signal을 관찰할 수 있었다. 이상의 각종 spectral data를 검토하여 compound 1은 숙지황의 지표성분인 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde로 추정하고 물리화학적 성상 및 문헌과 비교하여 구조를 동정하였다.²¹⁾

또한 수치에 따른 숙지황 중의 5-HMF 함량변화를 측정하기 위해 HPLC를 실시하였다. Column으로는 ODS를 사용하였고, 여러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 acetonitrile:water=5:95를 사용하였으며, 또한 검출 파장으로서 280 nm를 사용하였다. 이 조건에서 지표물질인 5-HMF는 t_r 7.8 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다(Fig. 2). 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 회귀직선 방정식은 $y=33578.912x+126.388$ ($r=0.9998$)로 나타났으며, 직선성이 인정되었다. 이 조건으로 1중에서 21중까지의 시료에 대하여 그 함량변화를 측정하였다. 그 결과 1중에서 9중까지는 지표성분의 함량이 점점 증가하는 경향을 보였고, 9중에서 18중까지는 0.53-0.74%로 유지되는 경향을 나타내었

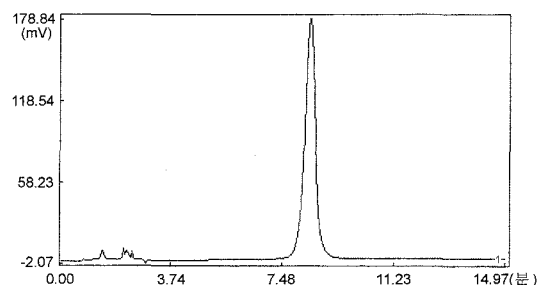


Fig. 2. Typical HPLC Chromatogram of 5-HMF.

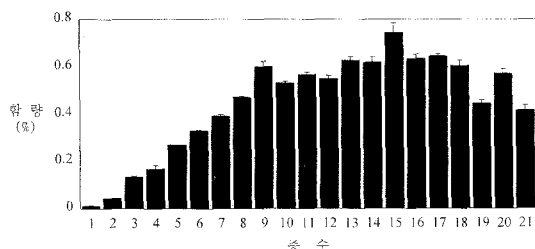


Fig. 3. Contents of 5-HMF in various samples determined by HPLC.

으며 19증 이상에서는 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3).

결론

숙지황(熟地黃)으로부터 지표물질인 5-HMF를 순수 분리하여 구조동정하고, 숙지황의 증수(1증-21증)에 따른 5-HMF의 함량변화를 조사하여 9증9폭(九蒸九曝)시의 5-HMF 함량과 그 전후의 함량을 비교하였다. 수처에 따른 숙지황 증의 함량 변화는 1증에서 9증까지는 지표성분의 함량이 점점 증가하는 경향을 보였고, 9증에서 18증까지는 0.53-0.74%로 유지되는 경향을 나타내며, 19증 이상에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 대한약전 제7개정서에 규정된 숙지황 증의 5-HMF의 함량인 0.1%는 본 실험에 의하면 이는 대략 3증 정도에 해당하는 함량이었다. 또한 숙지황은 glucose, mannitol 등의 당류가 많아 건조시키더라도 점성이 남아있어 분말화하기에는 곤란한 특성이 있었다. 이에 따라 숙지황의 분말화 정도가 5-HMF의 함량 퍼센트에 상당한 영향을 주는 것을 알 수 있었으며 이에 따라 검체를 가능한 한 균일하게 가루로 하기 위한 건조조건을 확립해야 한다고 사료되었다.

인용문헌

1. 李昌福(1993) 大韓植物圖鑑, 680. 鄉文社, 서울.
2. 지형준 외(1998) 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해(제2개정), pp. 341-342, 383-384, 562-563, 한국메디칼인텍스사, 서울.
3. 金在佶, 肖培根(1995) 東洋傳統藥物原色圖鑑, 64. 永林社, 서울.
4. Morota, T., Sasaki, H., Nishimura, H., Sugama, K., Chin, M., and Mitsuhashi, H. (1989) Two iridoid glycosides from *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry* **28**(8): 2149-2153.
5. Tomoda, M., Kato, S. and Onuma, M. (1971) Water-soluble Constituents of *Rehmanniae Radix*. I. Carbohydrates and Acids of *Rehmannia glutinosa* f. *huei-chingensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **19**(7): 1455-1460.
6. Oshio, H., Inouye, H. (1981) Iridoid glycosides of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry* **21**(1): 133-138.
7. Oshima, Y., Tanaka, K. and Hikino, H. (1993) Sesquiterpenoid from *Rehmannia glutinosa* roots. *Phytochemistry* **33**(1): 233-234.
8. Nishimura, H., Sasaki, H., Morota, T., Chin, M. and Mitsuhashi, H. (1990) Six glycosides from *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*. *Phytochemistry* **29**(10): 3303-3306.
9. Sasaki, H., Nishimura, H., Chin, M. and Mitsuhashi, H. (1989) Hydroxycinnamic acid esters of phenethylalcohol glycosides from *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*. *Phytochemistry* **28**(3): 875-879.
10. Yoshikawa, M., Fukuda, Y., Taniyama, T., Cha, B. H. and Kitagawa, I. (1986) Absolute configurations of rehmaionosides A, B and C and rehmapicroside three new ionone glucosides and a new monoterpene glucoside from *Rehmanniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(5): 2294-2297.
11. Yoshikawa, M., Fukuda, Y., Taniyama, T. and Kitagawa, I. (1996) Chemical studies on crude drug processing. IX. On the Constituents of *Rehmanniae Radix* (3). Absolute stereostructures of rehmaionosides A, B, and C, and rehmapicroside, Biologically active ionone glucosides and a monoterpene glucoside isolated from Chinese *Rehmanniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **44**(1): 41-47.
12. Yoshikawa, M., Fukuda, Y., Taniyama, T. and Kitagawa, I. (1986) Absolute stereostructures of rehmaglutin C and glutinonide a new iridoid lactone and a new chlorinated iridoid glucoside from Chinese *Rehmanniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(3): 1403-1406.
13. Kitagawa, I., Fukuda, Y., Taniyama, T. and Yoshikawa, M. (1986) Absolute stereostructures of Rehmaglutins A, B, and D Three new iridoids isolated from Chinese *Rehmanniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(3): 1399-1402.
14. Kitagawa, I., Fukuda, Y., Taniyama, T. and Yoshikawa, M. (1991) Chemical studies on crude drug processing. VII. On the constituents of *Rehmanniae Radix*. (1): Absolute stereostructures of Rehmaglutins A, B, and D isolated from Chinese *Rehmanniae Radix*, the dried root of *Rehmannia glutinosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **39**(5): 1171-1176.
15. Morota, T., Nishimura, H., Sasaki, H., Chin, M., Sugama, K., Katsuhara, T. and Mitsuhashi, H. (1989) Five cyclopentanoid monoterpenes from *Rehmannia*

- glutinosa*. *Phytochemistry* **28**(9): 2385-2391.
16. Sasaki, H., Morota, T., Nishimura, H., Ogino, T., Katsuhara, T., Sugama, K., Chin, M. and Mitsuhashi, H. (1991) Norcarotenoids of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis*. *Phytochemistry* **6**(30): 1997-2001.
 17. 원도희 등 (1991) 상용생약의 성분정량, 198-217. 도서출판 성은, 서울.
 18. Lee, K. S., Ze, K. R., Hong, S. P., Jeong, J. E., Lee, S. Y., Park, A. K. and Wi, Y. M. (1990) Studies on the extraction quantities of the specific components of crude drug preparations based on prescription (IV) - Studies on the analytical method of *Rehmanniae Radix Preparata* and its crude drug preparations-. *The Report of National Institute of Health* **27**: 326-331.
 19. Hwang, B. Y., Kim, M. S., Won, D. H., Kang, S. B., Lee, S. D., Jo, J. H., Kang, S. J., Chi, H. J., Choi, W. H., Ro, J. S. and Lee, K. S. (1997) Studies on the standardization of Suckjihwang, *Chungbuk J. Pharm. Sci.* **12**: 29-37.
 20. 한국약학대학협의회 약전분과회 편지 (1999) 대한약전 제7개정 해설서, 1069-1070. 문성사, 서울.
 21. Shimizu, M., Zenko, Y., Tanaka, R., Matsuzawa, T. and Morita, N. (1993) Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. V. Active components of Hachimi-jio-gan (*Kampo Medicine*). *Chem. Pharm. Bull.* **41**(8): 1469-1471.

(2001년 4월 10일 접수)