

두충(杜冲, *Eucommiae Cortex*)으로부터 Geniposide의 분리 및 함량분석

손건호* · 이주미 · 장승엽¹ · 이경순²

안동대학교 식품영양학과, ¹식품의약품안전청, ²충북대학교 약학대학

Isolation and Quantitative Determination of Geniposide from the Cortex of *Eucommia ulmoides* Oliver

Kun Ho Son*, Joo Mi Lee, Seung Yeup Chang¹, Kyong Soon Lee²

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749,

¹Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, ²College of Pharmacy,

Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – Geniposide, an iridoid glucoside, was isolated from the cortex of *Eucommia ulmoides* by repeated silica gel chromatography and identified by its spectral data. The quantitative determination of geniposide with HPLC has been developed and this method provided a tool for standardization of the commercial *Eucommiae Cortex*.

Key words – *Eucommia ulmoides*, Eucommiaceae, quantitative analysis of geniposide, HPLC

두충(*Eucommiae cortex*)은 두충나무(*Eucommia ulmoides* Oliver, Eucommiaceae)의 수피를 지칭하는 생약이다. 두충나무는 낙엽성 고목으로 높이 10 m에 달하며, 잎은 타원형이고 끝이 뾰족하며 고르지 않은 톱니가 있다. 꽃은 4~5월경 옅은 녹색으로 피며 자웅 이주로서 수꽃은 적갈색이며 6~10개의 짧은 수술이 있고, 암꽃은 짧은 자루에 1개씩 붙는다.¹⁾ 우리나라의 중남부에서 재배되나 중국이 원산지이며 중국 남부에서 대량 재배되고 있다. 두충의 효능은 강장, 요통, 관절통, 관절염, 진정, 진통, 이뇨 등이 알려져 있다.²⁾

두충의 성분에 관한 연구로는 aucubin, harpagide acetate, ajugoside, reptoside, eucommiol, ulmoside, eucommioside I, geniposidic acid, geniposide 및 4-deoxyeucommiol 등의 iridoid 유도체³⁻⁶⁾와 mediore-sinol di-O-β-D-glucopyranoside, olivil di-O-β-D-glucopyranoside, pinosinol di-O-β-D-glucopyranoside, eucommin A, liriodendrin, syringaresinol O-β-D-

glucopyranoside 등의 lignan 배당체⁷⁻¹¹⁾가 주성분으로 보고되어 있으며 활성에 관한 연구보고는 pinosinol di-O-β-D-glucopyranoside의 혈압강하작용,¹²⁾ geniposidic acid와 aucubin의 collagen 합성 증진작용,¹³⁾ geniposide의 저혈당작용¹⁴⁾ 및 간보호작용¹⁵⁾ 등이 있다.

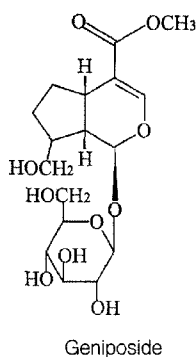
본 연구에서는 국내 여러 지역에서 실제 유통되는 두충에 대해 그 건조감량, 회분, 산불용성회분을 측정하여 대한약전의 기준치와 비교 검토하고 그 지표 성분의 분리 및 정량법을 개발함으로써 두충의 품질관리 기준을 설정하고자 하였다.

위에서 보고된 성분중 iridoid 배당체인 geniposide는 두충의 주요성분이며 그 생물학적 활성이 규명되어 있으므로 geniposide를 지표물질로 하여 두충으로부터 분리하고, 분리된 화합물의 구조 동정 및 이 물질의 함량을 HPLC법으로 정하였다.

재료 및 방법

*교신저자 : Fax : 054-820-5494

검체 – 1999년 국내 전 지역에서 시판되고 있는 두



총 50종을 구입하여 마쇄한 다음 확인 시험을 거쳐 선별한 25종을 시료로 하였다.

확인시험 - 건조하여 분쇄한 두충 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 씩 silica gel TLC plate(Merck 5715)에 점적한 후 CHCl_3 -MeOH-H₂O(70:18:1)의 용매로 geniposide의 표준품과 함께 전개하여 UV 254 nm의 lamp 및 10% H₂SO₄으로 발색시켜 표준품과의 Rf값을 비교하였다.

건조감량 - 검체 2 g를 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시게이터(silica gel)에서 방냉하고 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 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2.0 g를 취하여 앞의 도가니에 넣어 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500-550°C에서 4시간동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다.

산불용성 회분시험 - 회분에 묽은 염산 25 ml를 조심하여 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용 여과지를 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 무게

를 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

Geniposide의 분리 - 두충 5.6 kg을 MeOH로 3회 열추출하여 MeOH 추출물 660 g을 얻었다. MeOH 추출물을 단계적으로 용매분획하여 Hexane 분획(27 g), EtOAc 분획(72 g), *n*-BuOH 분획(98 g)을 각각 얻은 다음 *n*-BuOH 분획을 silica gel column에 걸어 EtOAc 및 불포화 EtOAc의 용매를 순차적으로 내려 8개의 소분획으로 나누었다. 이중 소분획 7을 다시 silica gel column에 걸어 CHCl_3 -MeOH(95:5)의 용매를 사용하여 geniposide를 분리하였다.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.50 (1H, d, *J*=1 Hz, H-3), 5.79 (1H, m, H-7), 5.16 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1), 4.70 (1H, d, *J*=7.9 Hz, anomeric H-1'), 4.30 and 4.18 (1H each, d, *J*=14.2 Hz, CH₂-10), 3.70 (3H, s, OCH₃), 3.21 (1H, m, H-5), 2.80 (1H, m, H-6A), 2.71 (1H, br t, *J*=7.6 Hz, H-9), 2.10 (1H, m, H-6B)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 98.3 (C-1), 153.3 (C-3), 112.5 (C-4), 36.6 (C-5), 39.7 (C-6), 128.3 (C-7), 144.8 (C-8), 47.0 (C-9), 61.4 (C-10), 100.3 (C-1'), 74.9 (C-2), 79.8 (C-3'), 71.5 (C-4'), 78.4 (C-5'), 62.7 (C-6'), 169.5 (COO), 51.7 (OCH₃)

HPLC의 분석조건 - column: μ Bondapak C₁₈(10 μ m, 3.9 \times 300 mm); column temp: 35°C mobile phase: CH₃CN-H₂O=17:83; flow rate: 1.0 ml/min.; detector: UV 254 nm

검액의 조제 - 두충 5.0 g을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 30분 동안 초음파 진탕 한 후 여과하여 total volume을 50 ml로 하여 검액을 조제하였다.

표준 검량선의 작성 - 분리한 geniposide 20 mg을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 50 ml로 하여 stock solution으로 하였다. 이를 일정량씩 취하여 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml 농도의 표준 용액을 조제하였다. 각 표준용액을 10 μ 씩 취하여 HPLC의 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area를 구하였다. Geniposide의 회귀직선방정식은 $y=154.01\pm 2.33x$ 이며 상관계수가 0.9998로서 1.0에 접근하므로 농도(x)와 peak area(y)간의 직선성이 인정되었다.

결과 및 고찰

Geniposide는 두충의 주성분으로 그 함량이 많고 UV발색단을 분자내에 함유하여 쉽게 검출될 뿐만 아

Table I. Content of geniposide, loss of moisture on drying, ash and acid-insoluble ash in *Eucommiae Cortex*

sample	content of geniposide(%)	loss of moisture on drying(%)	ash(%)	acid-insoluble ash(%)
1	0.11	7.09	5.79	3.00
3	0.22	9.76	5.57	2.98
6	0.12	8.87	6.76	3.71
8	0.18	8.79	6.48	3.59
9	0.20	9.72	5.88	2.29
10	0.26	8.99	5.79	2.86
17	0.23	9.84	6.61	3.15
20	0.06	9.68	5.99	3.33
21	0.24	8.92	5.46	2.73
22	0.15	8.69	6.50	3.80
24	0.21	9.28	6.30	3.85
25	0.25	9.46	5.25	2.78
26	0.18	10.48	5.0592	2.68
28	0.16	10.59	5.23	2.95
29	0.36	9.45	5.59	2.81
30	0.00	6.02	9.39	4.52
32	0.25	8.95	5.73	3.17
33	0.31	9.21	6.87	3.95
34	0.29	9.21	6.33	3.39
35	0.07	8.79	6.42	3.87
36	0.42	9.59	6.62	3.93
40	0.14	9.24	5.85	3.50
42	0.09	8.05	6.66	3.78
46	0.44	9.18	5.37	2.61
47	0.45	9.63	5.77	3.05
	0.21±0.12	9.10±0.95	6.13±0.86	3.29±0.54

나라 서론에서 언급한 바와 같이 생물학적 활성도 보고되어 있어 지표성분으로서 타당하다고 사료된다. 따라서 이 화합물을 지표 물질로 얻기 위하여 두층을 실험부에 제시한 방법으로 추출·분획 및 분리 과정을 거쳐 geniposide를 분리하였다. geniposide의 분광학적 data는 문헌에서 보고된 결과와 잘 일치하였다.⁴⁾

분리된 geniposide를 지표물질하여 TLC법으로 국내 각 지역에서 구입한 50여 종의 두층에 대하여 확인시험을 시행한 결과 모든 시료에서 이 물질이 확인되었다. 이 중 지역적으로 안배를 하여 25종을 선별하여 이화학적 실험 및 함량시험을 시행하였다.

두층 25종의 건조감량 평균치 및 표준편차는 9.10±0.95%이었다. KP에는 10.0% 이하로 규정되어 있으며 25개의 시료중 규정에 부적합한 것은 2개뿐이었으므로 현재의 규정이 타당한 것으로 인정된다. KP에는 회분은 8.0% 이하, 산불용성 회분은 6.0% 이하로 규

정되어 있다. 25개의 시료모두 회분 및 산불용성회분 실험결과 적합한 것으로 나타나 현재의 규정이 타당한 것으로 인정된다.

geniposide를 지표물질로서 사용 가능성을 검토하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 분석조건을 검토하기 위하여 여러 가지 용매조건에서 HPLC chromatogram을 얻고 이들을 검토해 본 결과 CH₃CN-H₂O(17:83)을 이동상으로 사용했을 때 가장 좋은 분리능을 얻을 수 있었다. 이 조건에서 geniposide의 retention time은 약 6분에서 나타나며 다른 물질의 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. geniposide의 표준 검량선을 작성하여 정량에 이용할 목적으로 stock solution을 만들고 이를 희석하여 표준용액을 제조하였다. 각 표준용액의 chromatogram으로부터 얻은 peak 면적과 농도와의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 0.1-0.4 mg/ml의 농도범위에서 그

직선성이 인정되었으며 이때의 회귀직선 방정식은 $y=154.01 \pm 2.33$ 이며 상관계수는 0.9998로서 1.0에 접근하였다.

이상과 같은 조건에서 검액도 HPLC를 실시하여 상기 회귀직선방정식으로부터 geniposide 함량을 구한 결과 0.06-0.45%의 범위를 나타내었으며 그 평균값 및 표준편차는 $0.21 \pm 0.12\%$ 이었다. 25개의 시료 중 geniposide 함량이 0.1% 미만인 경우는 4개뿐이었으므로 두층 중 geniposide의 함량은 0.1% 이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 1999년도 생약·한약재 품질표준화연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. 육창수(1989) 원색 한국약용식물도감, pp. 134, 아카데미서적, 서울.
2. 김재길(1984) 원색 천연약물대사전, pp. 439, 남산당, 서울.
3. Bianco, A., Bonini, C., Guiso, M., Lavarone, C. and Trogolo, C. (1978) Iridoids 26. Ulmoside (aucubigenin-1- β -isomaltoside), a new iridoid from *Eucommia ulmoides*. *Gazz. Chim. Ital.* 108: 17-20.
4. Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe, S. (1986) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. IV. Isolation of a new sesquiligann glycoside and iridoids, *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4933-4938.
5. Gewali, M., Hattori, M. and Namba, T. (1988) constituents of the stems of *Eucommia ulmosides* Oliv. *Shoyakugaku Zasshi* 42: 247-248.
6. Hattori, M., Che, Q., Gewali, M., Nomura, Y., Tezuka, Y., Kikuch, T. and Namba, T. (1988) Studies on Du-Zhong leaves (III). Constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* (I). *Shoyakugaku Zasshi* 42: 76-80
7. Takeshi, D. (1983) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. I. Isolation of (+)-medioresinol di-O- β -D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2993-2997.
8. Takeshi, D., Takako, I. and Sansei, N. (1985) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. III. Isolation and structure of three new lignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3651-3657.
9. Takeshi, D., Takako, I., Shizuka, K. and Sansei, N. (1986) The constituents of *Eucommia ulmosides* Oliv. III. Isolation and structure a new lignan glycoside. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 523-527.
10. Takeshi, D., Takako, I., Shizuka, K. and Sansei, N. (1987) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. V. Isolation of dihydroxydehydrodiconiferyl alcohol isomers and phenolic compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1785-1789.
11. Takeshi, D., Tkedo, I., Shizuka, K. and Sansei, N. (1987) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. VI. Isolation of a new sesquiligann and neolignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1803-1807.
12. Shi, O., Ravikumar, P., Huang, F., Buckner, C. and Whitlock, H. (1976) Isolation and synthesis of pinorensinol diglucoside, a major antihypertensive principle of Tu-chong (*Eucommia ulmosides* Oliver). *J. Am. Chem. Soc.* 98: 5412-5413.
13. Yanmei, L., Takahiro, S., Koichi, M., Katsuya, K., Qing-ming, C. and Shushichi, T. (1998) The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 1306-1310.
14. Toshihiro, M., Yumi, N., Momoyo, I., Masataka, M. and Atsushi, K. (1996) Hypoglycemic activity and structure-activity relationship of iridoidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 160-161.
15. Chang, H. M., Yeung, H. W., Tso, W. W. and Koo, A. (1985) Advances in Chinese medical materials research p.221, World Scientific Publ. Co., Singapore.

(2001년 3월 28일 접수)