

## 칼잎용담의 Secoiridoid 배당체

정 보 섭 · 이 용 화

서울대학교 약학대학

### Secoiridoid Glucosides from the Root of *Gentiana uchiyamana* Nakai

Bo-Sup CHUNG and Yong-Hwa LEE

College of Pharmacy, Seoul National University

*Gentiana uchiyamana* Nakai is a perennial herb in Gentianaceous plants. From the root of *Gentiana uchiyamana* Nakai, the bitter secoiridoid glucosides were isolated and identified as gentiopicroside and swertiamarin. A high-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of bitter component, *i.e.* gentiopicroside in the roots of *Gentiana scabra* and *G. uchiyamana* Nakai was developed, using a  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column and methanol-water mobile phases. The content of gentiopicroside was calculated from calibration curve previously prepared using the standard, 3.55% in the roots of *Gentiana scabra* and 1.58% in *Gentiana uchiyamana* Nakai.

칼잎용담(*Gentiana uchiyamana* Nakai)은 용담과(Gentianaceae)에 속하는 다년생 초본이다. 용담과 식물은 온대지방에서 자라며 전세계적으로 70속 1,100종이 알려져 있고, 우리나라에서는 *Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* (Miq.) Max.(용담), *G. uchiyamana* Nakai(칼잎용담), *G. axillariflora* var. *coreana*(Nak.) Kudo(큰용담), *G. algida* Pall.(산용담), *G. scabra* var. *buergeri* for. *stenophylla*(Ohwi)(진퍼리용담), *G. jamesii* Hemsl(비로용담), *G. pseudo-aquatica* Kusnezoff(흰 그늘용담), *G. triflora* Pall.(과남풀), *G. squarrosa* Ledeb(구슬봉이), *G. thunbergii*(G. Don) Griseb.(봄 구슬봉이), *G. zolingeri* Fawc.(큰 구슬봉이)등이 자라고 있다.<sup>1)</sup>

용담과 식물은 예로부터 고미건위약으로 사용되어 왔으며, 그 고미성분에 대한 연구가 진행되어 1862년 Kromeyer가 *G. lutea* L.에서 Asahina등이 *G. scabra* Bunge에서 gentiopicroside를 분리하였고<sup>2)</sup> Korte, Canonica,<sup>3)</sup> Inouye<sup>4)5)</sup> 등이 구조를 밝혀 보고하였다. Gentiopicroside는

*Gentiana*속, *Swertia*속 식물에 공통으로 함유되어 있으며<sup>5)</sup> 다른 secoiridoid 배당체인 amarogentin, amaroswerin, swertiamarin, sweroside, morroniside 등도 발견되었다.<sup>5)</sup> Wagner 등은 *G. pannonica* Scop.에서<sup>6)</sup> Stefanou 등은 *G. burseri*에서<sup>7)</sup> amaropanin(deoxyamarogentin)을 분리하였고 Inouye등은 *G. triflora*에서 trifloroside라는 새로운 secoiridoid 배당체를 분리 보고하였다.<sup>8)</sup> 이들 성분의 생합성에 관하여는 Inouye등이 mevalonic acid, loganin(loganic acid)에서 secologanin을 경유하여 sweroside, swertiamarin, gentiopicroside가 생합성되는 경로를 해명하였다.<sup>9)10)</sup>

이들 성분의 정량법에 관하여는 Hayashi가 TLC-UV와 TLC-DM을 사용하여 *Gentianae Radix*, *G. scabrae Radix*,<sup>11)</sup> *G. triflora*종의 gentiopicroside를 정량하였다.<sup>12)</sup> Akada등은 HP LC를 사용하여 *Gentianae Radix*, *G. scabrae Radix*종의 gentiopicroside를 정량하였고<sup>13)</sup> Takino등은 용담과 식물 중의 gentiopicroside, ama-

rogentin, amaroswerin을 정량하였으며<sup>14)</sup> Sticher 등도 *G. lutea*와 *G. purpurea*종의 gentiopicroside를 정량하였다.<sup>15)</sup>

*Gentiana*속 식물의 뿌리, 근경은 예로부터 사용되어 온 중요한 생약이며 그 중에서도 용담이 주로 쓰여지고 칼잎용담은 민간약으로만 쓰이고 있다. 저자들은 이 동양적 거대형인 칼잎용담 뿌리의 조성성분과 함량이 아직 밝혀지지 않았으므로 그 조성성분과 함량을 밝혀서 *Gentiana scabrae Radix*만을 사용할 것이 아니라 이 식물도 용담과 같이 고미진위약으로 공용할 수 있는 가능성을 규명하기 위하여 이 실험을 하였다.

## 실 험

### 가. 재료, 시약 및 기기

강원도 오대산에서 1980년 8~9월에 채집한 칼잎용담(*Gentiana uchiyamana* Nakai)의 뿌리를 그늘에서 말려 가루로 만들었다.

시약은 분석용 1급 시약을, 용매는 모두 사용 직전에 증류하여 사용하였다. column chromatography용 흡착제로는 230mesh 이하의 Kiesel gel 60(E. Merck)와 200~300mesh의 Alumina (Watio Co.)를, TLC용으로는 Kiesel gel 60 GF<sub>254</sub>(E. Merck)를 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 다음과 같다.

M.P. Apparatus: Gallenkamp(uncorrected)

IR Spectra: Beckman IR-20A

NMR Spectra: Varian EM-360 (60 MHz)

UV Spectra: Unicam SP 1750 Ultraviolet Spectrophotometer

(Unicam AR 25 Linear Recorder)

UV lamp: Compact 4-Watt UV lamp

### 나. 추출, 분리 및 확인

1) 추출 및 분획: 시료 300g을 MeOH 800ml를 가하여 수욕상에서 8시간 동안 환류병각 하에서 4회 추출한 후 감압농축하였다. 여기에 소량의 증류수를 가하고 Et<sub>2</sub>O로 추출하여 비극성물질을 제거하고 이 수층을 n-BuOH로 추출하여 n-BuOH분획을 얻었다.

2) Gentiopicroside의 분리 및 확인: n-BuOH

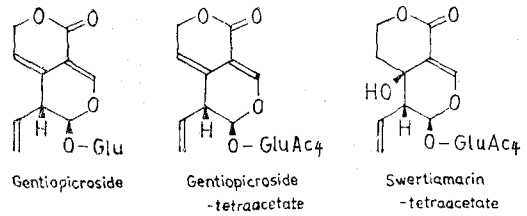


Fig. 1. Chemical structure of substances

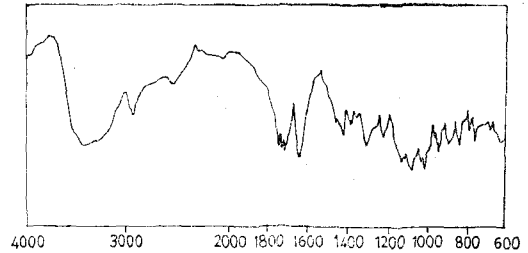


Fig. 2. IR spectrum of Gentiopicroside (film on KBr disc)

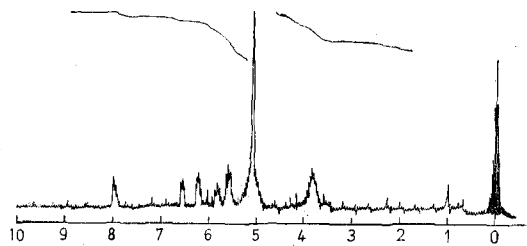


Fig. 3. NMR spectrum of Gentiopicroside (in D<sub>2</sub>O, 60MHz, external TMS standard)

분획을 Silica gel column (3×110cm, 용리액 CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O=30:10:1)에서 Chromatography하여 분리한 결과 단일한 물질 gentiopicroside를 얻었다.

이를 EtOAc에서 재결정하여 미황색의 amorphous powder를 얻었으며 이 물질은 서로 다른 용매조성을 가진 3가지 전개용매들의 TLC에서 단일한 spot를 나타내었다. 이 gentiopicroside를 표준물질과 혼용시험, TLC, IR, NMR, UV, HPLC로 비교 동정하였다.

m.p.: 190~191°

Liebermann-Buchard 반응: 양성(자주~빨강)

Anthrone test: 양성(청록색)

IR  $\nu$  max cm<sup>-1</sup>: 3450 (-OH); 1710 (C=O);

1617 (C=C).

NMR  $\delta$ : 5.69 (d, 1H C<sub>1</sub>-H); 7.49 (d, 1H C<sub>3</sub>-H); 6.13 (1H C<sub>6</sub>-H); 3.35 (1H C<sub>9</sub>-H); 5.00 (2H C<sub>10</sub>-H); 5.00~6.13 (m, 10H, C<sub>7</sub>-H, C<sub>8</sub>-H and protons of sugar).

UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm: 270.

3) Gentiopicroside-tetraacetate의 확인 :

Gentiopicroside 100mg을 무수피리딘 3ml에 녹이고 무수초산 4ml를 넣어서 실온에서 24시간 반응시킨 후 냉수 100ml에 가하여 반응을 중지시키고 석출된 침전을 여과한 후 잔사를 CHCl<sub>3</sub>으로 추출하고 감압 농축하여 gentiopicroside-tetraacetate를 얻었다.

이를 무수에 탄올에서 재결정하여 m.p. 138°의 무색판상결정을 얻었다.

이 gentiopicroside-tetraacetate를 표준물질과 혼용시험, TLC, IR, NMR, UV spectrum으로 비교 동정하였다.

IR  $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$ : 1755 (C=O); 1612 (C=C); 1240 C-O-C).

NMR  $\delta$ : 5.41 (d, 1H C<sub>1</sub>-H); 7.38 (d, 1H C<sub>3</sub>-H); 5.28~5.70 (4H, C<sub>6</sub>-H, C<sub>8</sub>-H, C<sub>10</sub>-H); 5.05 (1H C<sub>7</sub>-H); 3.30 (1H C<sub>9</sub>-

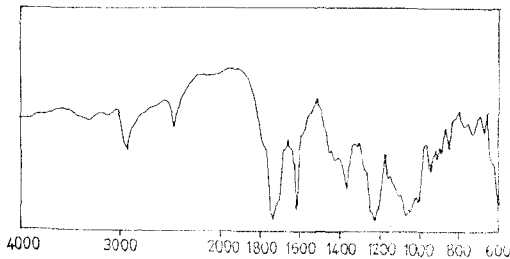


Fig. 4. IR spectrum of Gentiopicroside-tetraacetate (film on KBr disc)

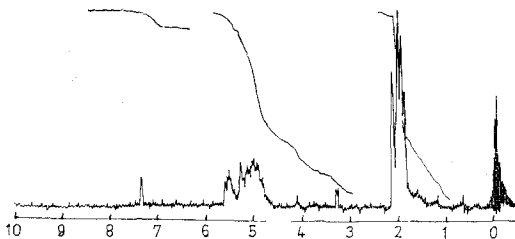


Fig. 5. NMR spectrum of Gentiopicroside-tetraacetate (in CDCl<sub>3</sub>, 60MHz, internal TMS standard)

H); 1.95~2.10 (12H, 4CH<sub>3</sub>CO-).

UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm:272.

4) Swertiamarin-tetraacetate의 분리 및 확인 :

앞에서 얻은 n-BuOH분획을 Alumina column (2.5×90cm, 용리액 Aceton: H<sub>2</sub>O=10:1)에서 용리하여 얻은 fr. 2~3(1fr. 100ml)을 상법에 의해 acetylation 시키고 이를 preparative TLC (Benzene: EtOAc=1:1)로 전개시킨 후 UV-lamp로 검출하여 흑색으로 나타나는 부분(Rf. 0.35)을 긁어모아 CHCl<sub>3</sub>로 수욕상에서 1시간 가온 추출하여 swertiamarin-tetraacetate를 얻었다.

이를 무수 EtOH로 재결정하여 m.p. 188°의 무색침상 결정성물질을 얻었다.

이 swertiamarin-tetraacetate를 표준품과의 혼용시험, TLC, IR, NMR, UV spectrum으로 비교 동정하였다.

IR  $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$ : 3540 (-OH); 1750, 1710 (C=O); 1620 (C=C); 1230 (C-O-C).

NMR  $\delta$ : 5.50 (d, 1H; C<sub>1</sub>-H); 7.50 (s, 1H; C<sub>3</sub>-H); 1.67~1.95 (m, 2H; C<sub>6</sub>-H) 4.30~4.90 (m, 2H; C<sub>7</sub>-H); 5.30~5.45 (m, 3H, C<sub>8,10</sub>-H); 2.85~3.10 (m, 1H; C<sub>9</sub>-H); 2.12~2.21 (12H; 4CH<sub>3</sub>CO-).

UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm:234.

다. 정량시험

1) 표준물질 및 시료 : 표준물질은 Inouye 교수가 보내 준 gentiopicroside를 사용하였고, 시료는 서울시내의 한의원에서 구입한 *Gentiana scabrae Radix*와 오대산에서 채집한 *Gentiana uchiyamana* Nakai의 뿌리를 그늘에서 말려 가루

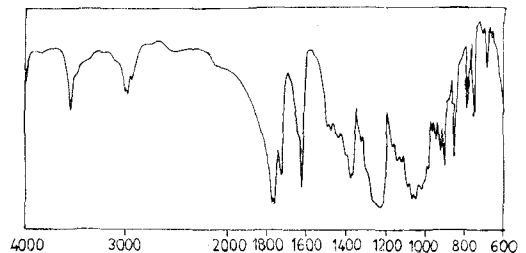


Fig. 6. IR spectrum of Swertiamarin-tetraacetate (film on KBr disc)

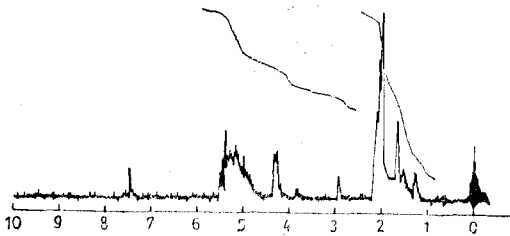


Fig. 7. NMR spectrum of Swertiamarin-tetraacetate (in  $CDCl_3$ , 60MHz, internal TMS standard)

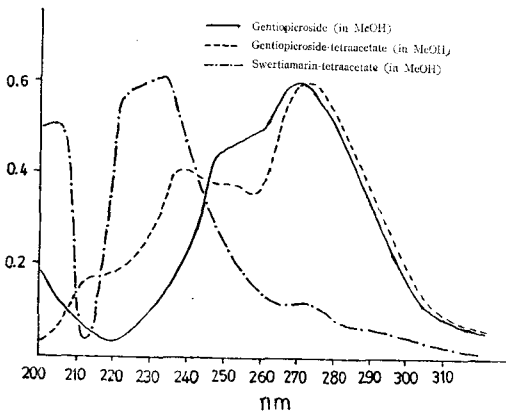


Fig. 8. UV spectrum of substances.

로 만들어 사용하였다.

2) 분석기기

Pump: Waters Model 6000A Solvent Delivery System.

Column: Waters  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  (P/N 27324 S/N) 3.9mm I.D.  $\times$  30cm

Detector: Waters Model 440 Absorbance Detector

Integrator: Pye Unicam DP 101 Computing Integrator

Recorder: Phillips PM 8221 Pen Recorder

3) 정량조건 : 이 실험에 사용한 HPLC의 조건은 다음과 같다.

Column: Waters  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  (P/N 27324 S/N) 3.9mm I.D.  $\times$  30cm

Integrator: Pye Unicam DP 101 Computing Integrator

Detector: UV 254 nm

Mobile phase: MeOH:  $H_2O$ =30:70

Flow rate: 1.0ml/min

Sensitivity: 0.1 AUFS

Sample size: 10 $\mu$ l

Chart speed: 0.5cm/min

4) 검량선의 작성 : 표준 gentiopicroside를 위의 조건에서 0.64, 1.28, 1.92, 2.56, 3.20, 3.84, 4.48, 5.12, 5.76, 6.40 $\mu$ g을 각각 column에 주입시켜 computing integrator에서 계산하여 나온 peak area로 검량선을 작성한 결과 Fig. 9와 같이 양호한 직선성을 나타내었다.

회귀직선 방정식은 다음과 같다.

$$Y=0.713X-0.169 \quad (r=0.998)$$

Y: peak area, X: amount ( $\mu$ g), r: coefficient of correlation

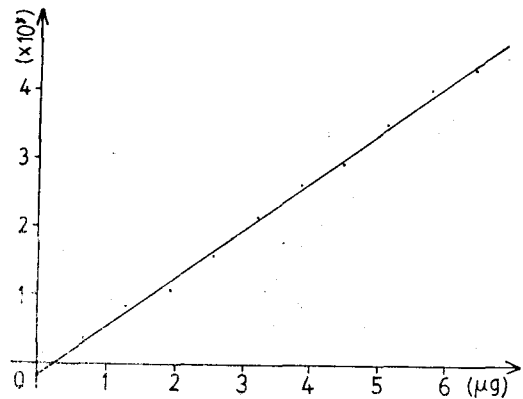


Fig. 9. Calibration curve of Gentiopicroside

5) 실험조작 : 시료의 가루를 250mg을 달아 증류수 100ml를 가하여 수욕상에서 2시간씩 3회 추출한다. 이를 여과하여 감압 농축시킨 후 20ml의 measuring flask에 옮기고 MeOH:  $H_2O$ =30:70의 용매로 20ml까지 채운 다음 millipore filter (FM 0.5 $\mu$ m)로 여과한 시액을 위의 같은 조건에서 10 $\mu$ l씩 column에 주입하였다.

결과 및 고찰

용담 (*Gentiana scabrae Radix*)과 칼잎용담 (*Gentiana uchiyamana Nakai*)의 chromatogram은 Fig. 10 및 11과 같고 gentiopicroside의 retention time은 8.33min였다.

각 시료에 일정량의 gentiopicroside를 첨가 실

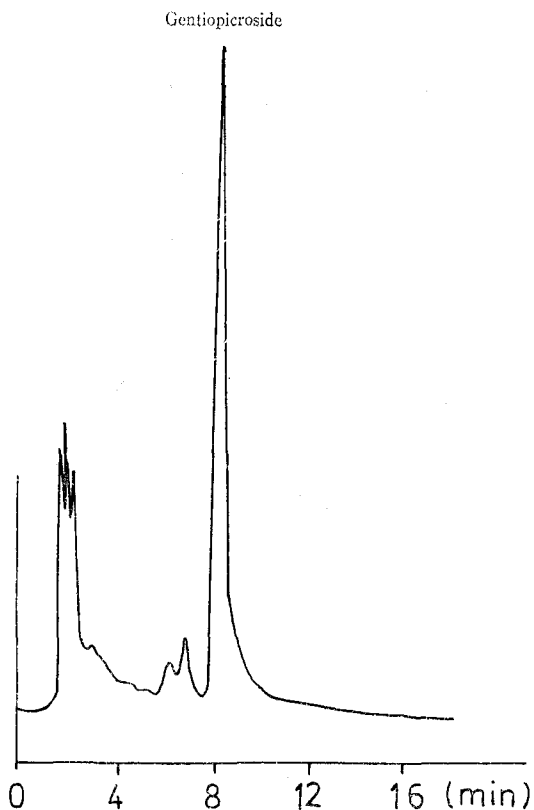


Fig. 10. Chromatogram of *G. scabrae Radix*.

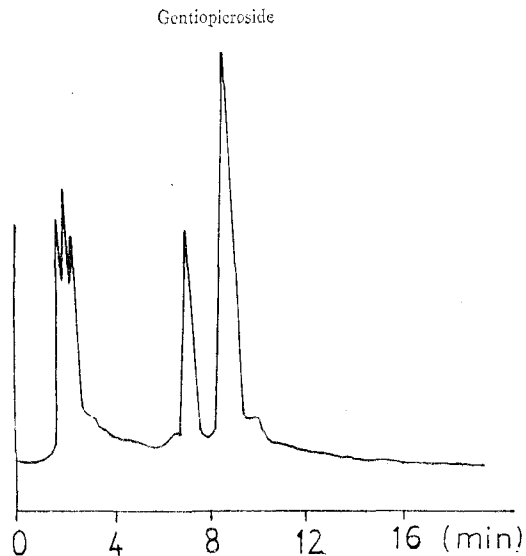


Fig. 11. Chromatogram of *G. uchiyamana Nakai*

험하여 회수율을 구한 결과 용담에서는 96.93%, coefficient of variation(c.v.)는 1.61%였고 칼 잎용담에서는 97.62%, c.v.는 1.33%였다. 이 결과로 보아 HPLC 방법은 용담류의 정량 방법으로 매우 유용하며 품질평가에 도움이 된다는 것을 알 수 있었다.

Table I. Precision and recovery rates in standard addition test to *G. scabrae Radix*

Amount of sample taken ( $\mu\text{g}$ )	Amount of Gen. added ( $\mu\text{g}$ )	Gen. amount in sample ( $\mu\text{g}$ )	Total Gen. (%)	Recovery rate (%)
10.000	none	0.355	3.55	—
10.000	0.080	0.415	4.15	95.40
10.000	0.080	0.419	4.19	96.32
10.000	0.080	0.431	4.31	99.08
average recovery rate				96.93
c.v.				1.61

Table II. Precision and recovery rates in standard addition test to *G. uchiyamana Nakai*

Amount of sample taken ( $\mu\text{g}$ )	Amount of Gen. added ( $\mu\text{g}$ )	Gen. amount in sample ( $\mu\text{g}$ )	Total Gen. (%)	Recovery rate (%)
10.000	none	0.158	1.58	—
10.000	0.080	0.235	2.35	98.74
10.000	0.080	0.228	2.28	95.80
10.000	0.080	0.234	2.34	98.32
average recovery rate				97.62
c.v.				1.33

시료의 gentiopicroside 함량 분석은 3회씩 행하였으며 표품을 사용하여 작성한 회귀직선 방정식으로부터 각 시료 중의 gentiopicroside의 함량을 산출한 결과 용담중의 평균함량은 3.55%, c.v.는 4.95%였고 칼잎용담중의 평균함량은 1.58%, c.v.는 2.81%였다.

**Table III.** Determination of Gentiopicroside contents in *G. scabrae Radix*

Amount of sample taken ( $\mu\text{g}$ )	Amount of Gen. in sample ( $\mu\text{g}$ )	Gen. content (%)	Average (%)
125.00	4.422	3.538	
125.00	4.181	3.345	3.552
125.00	4.718	3.774	
		c.v.	4.95

**Table IV.** Determination of Gentiopicroside contents in *G. uchiyamana* Nakai

Amount of sample taken ( $\mu\text{g}$ )	Amount of Gen. in sample ( $\mu\text{g}$ )	Gen. content (%)	Average (%)
125.00	2.021	1.617	
125.00	2.004	1.603	1.579
125.00	1.896	1.517	
		c.v.	2.81

## 결 론

칼잎용담(*Gentiana uchiyamana* Nakai)의 뿌리에서 secoiridoid glucoside인 gentiopicroside와 swertiamarin을 분리 확인하였다.

용담과 칼잎용담 뿌리중의 gentiopicroside를 HPLC방법으로 정량한 결과 용담에는 3.55%, 칼잎용담에는 1.58%가 함유되어 있음을 알 수 있었다.

<1982년 3월 8일 접수>

## 참 고 문 헌

1. Lee Tchang Bok: Illustrated Flora of Korea, Seoul, 1979.
2. Asahina, Y.J. Asano and Y. Weno: *Chem. Ber.*, **69** (1), 771 (1936)
3. Canonica, L. F. Pelizzoni, P. Manitto and G. Tommi: *Tetrahedron*, **16**, 192 (1961)
4. Inouye H. and Y. Nakamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **18** (9), 1856 (1970)
5. Inouye H. and Y. Nakamura: *Yakugaku Zasshi*, **91** (7), 755 (1971)
6. Wagner H. and K. Vasirian: *Phytochemistry*, **13**, 615 (1974)
7. Stefanou E. and K. Hostettmann: *Phytochemistry*, **15**, 330 (1976)
8. Inouye, H. S. Ueda, Y. Nakamura, K. Inoue, T. Hayano and H. Matsumura: *Tetrahedron*, **30** (4), 571 (1974)
9. Inouye, H. S. Ueda, K. Inoue and Y. Takeda: *Chem. Pharm. Bull.*, **22** (3), 676 (1974)
10. Inouye, H. S. Ueda and Y. Nakamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **18** (10), 2043 (1970)
11. Hayashi T.: *Yakugaku Zasshi*, **96** (3), 356 (1970)
12. Hayashi, T. T. Matsuda and K. Yoneda: *Yakugaku Zasshi*, **96** (5), 679 (1976)
13. Akada, Y. S. Kawano, M. Yamagishi and Y. Tanase: *Yakugaku Zasshi*, **99** (10), 1047 (1979)
14. Takino, Y. M. Koshioka, H. Kawaguchi, T. Miyahara, H. Tanizawa, Y. Ishii, M. Higashino and T. Hayashi: *Planta Med.*, **38**, 344 (1980)
15. Sticher O. and B. Meier: *Planta Med.*, **40**, 55 (1980)