

## 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)으로 부터 Tanshinone IIA의 분리 및 함량분석

손건호\*, 박미정, 이승호<sup>1</sup>, 박정일<sup>2</sup>, 강신정<sup>3</sup>, 장승엽<sup>3</sup>, 이경순<sup>4</sup>

안동대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>영남대학교 약학대학,

<sup>2</sup>서울대학교 약학대학, <sup>3</sup>한국식품의약품 안전청, <sup>4</sup>충북대학교 약학대학

## Isolation and Quantitative Determination of Tanshinone IIA from the Rhizomes of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Kun Ho Son\*, Mi Jung Park, Seung Ho Lee<sup>1</sup>, Jeong Hill Park<sup>2</sup>,

Shin Jung Kang<sup>3</sup>, Seung Yeup Chang<sup>3</sup> and Kyong Soon Lee<sup>4</sup>

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

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea,

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea,

<sup>3</sup>Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea, and

<sup>4</sup>College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract**—The rhizomes of *Salvia miltiorrhiza* Bunge(Labiatae) has been used in Chinese traditional medicine for the treatment of coronary heart diseases and myocardial infarction. As a part of a research for standardization of crude oriental drugs, we have determined the content of tanshinone IIA in *Salvia miltiorrhiza* purchased from various regions of Korea. The HPLC method by which quantitative analysis was conducted, showed reproducible results and chromatographic isolation of tanshinone IIA was accomplished successively.

**Key words**—*Salvia miltiorrhiza*: quantitative determination of tanshinone IIA: HPLC method.

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본으로 40-80 cm 정도 자라며 줄에 황백색의 털이 나 있다. 이 식물의 뿌리는 약용으로 사용하는데, 근경이 짧고 거칠며 전단에는 보통 줄기가 붙었던 자국이 남아 있으며 긴 원주형으로 1-2개 또는 여러 개로 갈라졌고 길이 8-25 cm, 지름 3-10 mm이다. 바깥 면은 적갈색-어두운 적갈색이며 거칠고 세로 주름이 있다. 한방에서는 이 생약을 活血, 驅瘀血, 安神, 鎮痛, 消腫 등에 사용하고 있다.<sup>1,2)</sup>

\*교신저자 : Fax 0571-850-5494

단삼의 화학적 성분으로는 대부분이 tanshinone I, IIA, IIB, dihydrotanshinone, cryptotanshinone, neotanshinone A, B, C, isotanshinone I, IIB, isocryptotanshinone 등의 furo-1, 2 또는 furo-1, 4-naphthoquinone moiety를 가지는 abietane-type diterpenoid 색소이며,<sup>3-6)</sup> rosemarinic acid, lithospermate B, magnesium lithospermate B 같은 phenolic 화합물도 알려져 있다.<sup>7)</sup> 생물활성에 대한 연구로는 심장관상 혈관계에서 혈류량을 증가시키고 심근경색증을 예방하여 해열작용, 항균작용, 소염작용, 항암작용과

신부전증 개선 효과 등이 보고되어 있다.<sup>8,9)</sup>

본 연구에서는 생약의 품질 표준화 사업의 일환으로 단삼의 특이적 또는 약효성분을 지표물질로 확보하고 국내에서 유통되고 있는 단삼으로부터 이 지표물질의 함량을 정하여 그 품질확보 및 규격기준을 설정하고자 한다. 위에서 열거된 단삼의 성분 중 tanshinone IIA는 tanshinone I 및 cryptotanshinone와 더불어 가장 함량이 많은 diterpenoid이며 사람의 암세포 주에 대해서 독성이 있는 물질로 보고되고 있어<sup>10)</sup> 본 연구에서는 tanshinone IIA를 지표물질로 하여 단삼으로부터 분리하고, 분리된 화합물의 구조를 확인한 후 단삼으로부터 이 물질의 함량을 HPLC법으로 정량 하였다.

## 재료 및 방법

**검체**-1998년 국내 전 지역에서 시판되고 있는 단삼 51종을 구입하여 마쇄한 다음 확인 시험을 거쳐 선별한 25종의 검체에 대해서 다음과 같이 이화학 실험을 실시하였다.

**확인시험**-건조하여 분쇄한 단삼 2.0 g씩 취하여 MeOH 10 ml를 넣어 1시간 동안 초음파 진탕하여 여과한 여액을 검액으로 하였다. 따로 표준품 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 표준액 및 검액을 각각 5  $\mu$ l씩 silica gel TLC plate (Merck 5715)에 점적한 후 Hexane-EtOAc (4:1)의 용매로 tanshinone IIA의 표준품과 함께 전개하여 UV 254 nm의 lamp 및 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 발색시켜 표준품과의 Rf값을 비교하였다.

**건조감량**-검체 2 g를 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터 (silica gel)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 2.0 g를 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 잔유

물을 함량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다.

**산불용성 회분시험**-회분에 묽은 염산 25 ml를 조심하여 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용 여과지에 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔유물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 함과 같은 조작으로 무게를 미리 단 백금제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터(silica gel)에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

**Tanshinone IIA의 분리**-건조한 단삼 5 Kg을 MeOH 수욕상에서 6시간씩 3회 열 추출하여 추출액을 농축하여 MeOH 엑스를 얻었다. MeOH 엑스를 증류수에 현탁한 후 분액 여두에 옮겨 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 분획한 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층을 농축 건조하여 얻어진 분획물을 silica gel column(70-230 mesh, Merck 7734)에 걸어 Hexane  $\rightarrow$  Hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1:1)로 gradient elution시켜 tanshinone IIA를 단리하였다. 이 tanshinone IIA를 EtOAc로 반복하여 재결정하여 황적색 침상의 결정을 얻었다.

Mp 215-216°C.

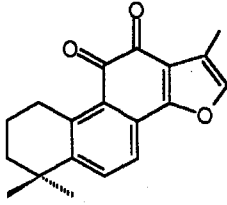
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.63, 7.54 (2H, ABq, J=8.2 Hz, H-6 and H-7), 7.22 (1H, d, J=1.2 Hz, H-15), 3.18 (2H, brt, J=6.3 Hz, 1-CH<sub>2</sub>), 2.25 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 1.18-1.63 (4H, m, 2-CH<sub>2</sub> and 3-CH<sub>2</sub>), 1.31 (6H, s, 18-CH<sub>3</sub> and 19-CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  29.9 (C-1), 19.1 (C-2), 37.8 (C-3), 34.6 (C-4), 144.4 (C-5), 133.4 (C-6), 120.2 (C-7), 127.4 (C-8), 126.5 (C-9), 150.1 (C-10), 183.6 (C-11), 175.7 (C-12), 119.9 (C-13), 161.7 (C-14), 141.3 (C-15), 121.1 (C-16), 8.8 (C-17), 31.8 (C-18), 31.8 (C-19)

**HPLC의 분석조건**-Tanshinone IIA 정량에 사용한 HPLC는 Hewlett Packard사의 Series 1100 으로서 다음 조건에서 실험을 하였다.

Column: ODS Hypersil(5  $\mu$ m, 200 $\times$ 4.6 mm); column temp: 20°C. mobile phase: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O=75:25; flow rate: 1.0 ml/min.; detector: UV 268 nm

**검액의 조제**-단삼 0.5 g에 MeOH을 가하여 1시



tanshinone IIA

간 초음파 진탕 한 후 여과하여 total volume을 50 ml로 하여 검액으로 사용하였다.

**표준 검량선의 작성** - 분리한 tanshinone IIA 2 mg을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 50 ml로 하여 stock solution으로 하였다. 이를 일정량씩 취하여 8.0, 16.0, 24.0, 32.0, 40.0 µg/ml 농도의 표준 용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 µl씩 취하여 HPLC를 3회 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 면적을 구하였다. Tanshinone IIA의 회귀직선 방정식은  $y = 57.7723x + 6.2628$ 이며 그 직선성을 검증한 결과 상관계수가 0.9999로서 농도(x)와 peak area(y)간의 직선성이 인정되었다.

**Tanshinone IIA의 함량** - 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회씩 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 tanshinone IIA의 peak 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식에 대입하여 각각 tanshinone IIA의 함량을 구하였다.

## 결과 및 고찰

국내 전역에서 구입한 51종의 단삼에 대해서 tanshinone IIA를 대조물질로 하여 TLC법으로 확인 시험을 한 결과 1종만 나머지 검체와 전혀 다른 pattern을 나타내었다. 따라서 50종의 검체 중 지역적 안배를 하여 선별한 25종에 대하여 이화학적 실험을 수행하였다.

검조감량 시험에서 14.81-8.99%의 분포를 보이고 있어 비교적 높은 수분 함량을 보이고 있으며 평균값 및 표준편차는  $11.71 \pm 1.80\%$ 이었다. 대한약전에는 12.0%이하로 규정되어 있으며 이 규정을 적용하면 25종 중 10종이 부적합하다고 판정되므로 기준을 13%이하로 상향조정하는 것이 바람직하다고 생각된다. 회분 함량은 대한약전에는 4.0% 이하로 규정되어 있으나 본 연구의 실험결과로는 이 기준에 해당되는 생약은 1개도 없으며 25종 평균치 및 표준편차가  $11.09 \pm 0.47\%$ 로 나타나 약전 기준과는 심각한 차이를 보이고 있다. 따라서 회분 함량도 12%이하로 상향조정하는 것이 바람직 할 것이다. 산불용성 회분은 25종 중 21종이 4.0%이하였으며 평균 및 표준편차는  $2.86 \pm 0.27\%$ 이었다.

단삼의 품질 표준화를 위해서는 유효성분을 지표로 하는 함량시험법의 확립이 가장 중요한 문제이다. 단삼의 성분 중 가장 보고가 많은 것이 abietanetype의 diterpenoid pigment이며 이 중 tanshinone IIA는 비교적 초기에 분리 확인되었으며 가장 함량비가 높은 물질이다. 따라서 본 연구에서는 tanshinone IIA를 지표물질로 설정하여 HPLC법으로 함량시험을 하였다. 먼저 tanshinone IIA를 column chromatography 법으로 실험부에 제시된 방법에 의하여 분리 하였다. 분리된 tanshinone IIA의  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR data를 문헌치와 비교 확인 하였을 때 모든 점에서 잘 일치하였다. 위와 같이 분리된 tanshinone IIA를 지표성분으로 하여 Table 1과 같이 추출조건을 달리 하여 이 화합물의 peak 면적을 구하여 보았을 때 MeOH로 1시간 동안 초음파 진탕하는 조건에서 가장 양호한 결과를 얻었다. HPLC 정량방법을 정하기 위해 여러 가지 이동상으로 HPLC를 실시하여 이들의 분리능을 검토한 결과  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}(75:27)$  용매를 사용하는 isocratic elution을 할 때 그 분리능이 가장 양호하였다. 이

**Table I.** Content of tanshinone IIA on extraction condition

solvent	$\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1)	$\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1)	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
time	1 hr	12 hrs	1 hr	1 hr	4 hrs	12 hrs
method	sonication	percolation	sonication	reflux	reflux	percolation
Tanshinone IIA peak area	660.4038	593.2959	799.9493	652.8828	728.8814	716.1121

**Table II.** Content of tanshinone IIA, ash, acid-insoluble ash and loss of moisture on drying in *Salvia miltiorrhizae* radix

sample	content of tanshinone IIA (%)	loss of moisture on drying (%)	ash (%)	acid-insoluble ash (%)
1	0.1327	10.26	11.45	2.82
2	0.1445	10.61	9.92	2.98
3	0.0775	11.35	12.25	2.34
4	0.1137	8.99	11.26	3.07
5	0.0991	11.72	14.73	2.63
6	0.0988	13.84	11.09	2.86
7	0.0947	9.37	16.87	4.79
8	0.1010	9.83	10.21	1.99
9	0.1999	9.01	9.97	1.66
10	0.0911	9.92	6.31	1.48
11	0.0996	11.20	10.52	2.84
12	0.0745	12.98	6.90	0.89
13	0.0963	12.39	9.80	2.85
14	0.0926	10.33	7.34	2.61
15	0.0652	10.62	10.03	1.32
16	0.0776	10.59	12.50	2.11
17	0.0752	13.36	9.93	1.21
18	0.0835	13.66	11.87	6.36
19	0.1098	14.54	12.86	4.44
20	0.1529	14.81	10.88	4.35
21	0.0645	13.61	9.99	2.33
22	0.1129	11.71	14.42	5.06
23	0.1093	14.02	13.78	3.88
24	0.0902	12.42	11.48	2.86
25	0.1032	11.71	10.98	1.74
average	0.1024±0.0061	11.71±1.80	11.09±0.47	2.86±0.27

때 tanshinone IIA의 retention time은 9.50분에 나타나며 다른 물질의 peak와 겹치지 않고 baseline separation이 이루어짐을 관찰할 수 있었다. Tanshinone IIA의 표준 검량선을 작성하기 위하여 stock solution을 만들고 이를 희석하여 농도 변화시킨 5가지 표준용액을 제조하였다. 각 표준용액을 HPLC에 injection하여 얻은 chromatogram의 peak면적(y)과 농도(x)와의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 8.0-40.0 µg/ml의 농도 범위에서 그 직선성이 인정되었으며 회귀직선 방정식은  $y=57.7723x+6.2638$ 이며 상관계수는 0.9999였다.

이상과 같은 조건에서 검액도 HPLC를 실시하여 회귀직선 방정식을 이용하여 tanshinone IIA의 함량을 구한 결과 평균값 및 표준편차는 0.1024±0.0061%이었다. 따라서 단삼 중 tanshinone IIA의 함량은 0.07% 이상으로 규정함이 타당하다고 사

료된다.

## 사 사

본 연구는 1998년도 생약·한약재 품질표준화연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 육창수 (1989) 원색 한국 약용식물도감, 478. 아카데미서적, 서울.
2. 김재길 (1984) 원색 천연 약물 대사전(上), 160. 남산당, 서울.
3. Luo, H. W., Wu, B. J., Wu, M. U., Yong, Z. G., Niwa, M. and Hirata, Y. (1985) Pigments from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 24(4): 815-

- 817.
4. Luo, H. W., Ji, J., Wu, M. U., Yong, Z. G., Niwa, M. and Hirata, Y. (1986) Tanshinlactone, a novel seco-abietanoid from *Salvia multiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* 34(8): 3166-3168.
  5. Ikeshiro, Y., Hashimoto, I., Iwamoto, Y., Mase, I. and Tomita, Y. (1991) Diterpenoids from *Salvia multiorrhiza*. *Phytochemistry* 30(8): 2791-2792.
  6. Ikeshiro, Y., Mase, I. and Tomita, Y. (1989) Abietane type diterpenoids from *Salvia multiorrhiza*. *Phytochemistry* 28(11): 3139-3141.
  7. Kang, H. S., Chung, H. Y., Jung, J. H., Kang, S. S. and Choi, J. S. (1977) Antioxidant effect of *Salvia multiorrhiza*. *Arch. Pharm. Res.* 20(5): 496-500.
  8. Yagi, A., Fujimoto, K., Tanonaka, K., Hirai, K. and Takeo, S. (1989) Possible active components of tan-shen (*Salvia multiorrhiza*) for protection of the myocardium against ischemia-induced derangements. *Planta Med.* 55: 51-54.
  9. Okamura, N., Sato, M., Yagi, A., Tanonaka, K. and Takeo, S. (1992) An application of HPLC for identification of abietane-type pigments from *Salvia multiorrhiza* and their effects on post-hypoxic cardiac contractile force in rats. *Planta Med.* 58: 571-573.
  10. Ryu, S. Y., Lee, C. O. and Choi, S. U. (1997) *In vitro* cytotoxicity of tanshinones from *Salvia multiorrhiza*. *Planta Med.* 63: 339-342.

(1999년 4월 9일 접수)