

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)의 근경으로부터 Anemarsaponin B의 분리 및 함량분석

손건호*, 이주미, 이승호¹, 박정일², 강신정³, 장승엽³, 이경순⁴

안동대학교 식품영양학과, ¹영남대학교 약학대학, ²서울대학교 약학대학,
³한국식품의약품 안전청, ⁴충북대학교 약학대학

Isolation and Quantitative Determination of Anemarsaponin B from the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge

Kun Ho Son*, Joo Mi Lee, Seung Ho Lee¹, Jeong Hill Park²,
Shin Jung Kang³, Seung Yeup Chang³ and Kyong Soon Lee⁴

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

¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea,

²College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea,

³Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea, and

⁴College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract - A method for isolation and quantitative determination of anemarsaponin B from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* has been developed. Isolation of anemarsaponin B was achieved by silica gel and RP-18 column chromatography. The HPLC method for quantitative determination of anemarsaponin B provided a method for standardization of the crude drug. It suggested that the content of anemarsaponin B in *Anemarrhena asphodeloides* is about 0.12-1.48%.

Key words - *Anemarrhena asphodeloides*: quantitative determination of anemarsaponin B: HPLC method.

지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 초본으로써 이 식물의 근경은 해열, 당뇨, 소염, 진해, 거담 등의 목적으로 사용되고 있다. 동의보감에서는 이 생약이 골 열의 허소를 치료하고 음기를 보한다고 기술하고 있다.¹⁾ 이 식물의 근경에 함유되어 있는 성분의 연구로는 anemarsaponin B, smilageninoside, degalactotigonin, F-gitonin, timosaponin A-III 등의 steroid saponin과 mangiferin, isomangiferin 등의 xanthone glycoside가 보고되어 있다.²⁻⁷⁾

*교신저자 : Fax 0571-850-5494

본 연구에서는 지모의 품질 표준화를 위한 연구의 일환으로 이 생약의 특이성분이며, 그 함량비가 높고, 생물활성이 있는 물질을 지표로 하는 정량법을 개발하고자 한다. 지금까지 보고된 지모의 성분 중 anemarsaponin B는 이 생약의 특이 성분이며 그 함량이 가장 많을 뿐만 아니라, *in vitro*에서 PAF-induced rabbit platelet aggregation을 억제한다는 보고⁸⁾도 있어 본 연구자는 지모로부터 anemarsaponin B를 분리하여 표준품을 확보하고 이 물질을 지표 성분으로 하여 전국에서 수집된 24종의 생약을 대상으로 HPLC 법으로 정량하였으므로 그

결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

검체-1998년 국내 전 지역에서 시판되고 있는 지모 53여종을 구입하여 마쇄한 다음 확인 시험을 거쳐 선별한 24종의 지모 생약에 대해서 다음과 같이 이화학적 실험을 실시하였다.

확인시험-건조하여 분쇄한 검체 2.0 g씩 취하여 MeOH 10 ml를 넣어 1시간 동안 흔들어 추출하여 여과한 여액을 검액으로 하였다. 따로 표준품 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 표준액 및 검액을 각각 5 µl씩 silica gel TLC plate에 점적한 후 CHCl₃-MeOH-H₂O(52:28:8, 하층부)의 전개 용매로 TLC를 실시하여 10% H₂SO₄으로 발색시켜 표준품과의 Rf 값을 비교하였다.

건조감량-검체 2 g을 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 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 2.0 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 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 항과 같은 조작으로 무게를 미리 단 백금제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터(silica gel)에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

Anemarsaponin B의 분리-건조한 지모 3 kg을 MeOH 수욕상에서 6시간씩 3회 열추출하여 추출액을 회전증발기로 농축하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이 MeOH 엑스를 증류수에 현탁한 후 분액여두에

옮겨 n-BuOH로 분획한 다음 n-BuOH 층을 농축 건조하여 황갈색 분말상의 n-BuOH 분획을 얻었다. 이 n-BuOH 분획을 silica gel column (70-230 mesh, Merck 7734)에 걸여 CHCl₃-MeOH-H₂O(52:28:8, 하층부)로 용출시켜 7개의 소분획으로 나누었다. 이 중 소분획 6을 다시 silica gel column (230 mesh 이상, Merck 7729)에 걸여 CHCl₃-MeOH-H₂O (52:28:8, 하층부)로 용출시켜 anemarsaponin B 조결정을 얻었다. 이 조결정을 RP-18 column(MeOH-H₂O=5:5→6:4→7:3, gradient)에 걸여 단일물질을 얻은 후 aqueous MeOH로 재결정하여 백색 침상의 결정을 얻었다.

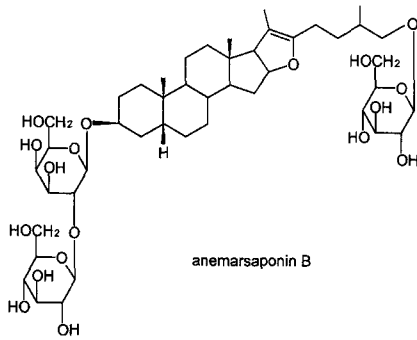
Mp 253-254°C (dec.). Liebermann-Burchard test: positive. Molish test: positive.

¹H-NMR(500 MHz, pyridine-*d*₅) δ 0.71 (3H, s, CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 1.05 (3H, d, *J*=6.5 Hz, 27-CH₃), 1.64 (3H, s, 21-CH₃), 4.86 (1H, d, *J*=7.7 Hz, anomeric proton), 4.96 (1H, d, *J*=7.6 Hz, anomeric proton), 5.32 (1H, d, *J*=7.8 Hz, anomeric proton). ¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ 31.0 (C-1), 27.0 (C-2), 75.2 (C-3), 31.0 (C-4), 37.0 (C-5), 26.8 (C-6), 26.9 (C-7), 35.2 (C-8), 40.2 (C-9), 35.2 (C-10), 21.3 (C-11), 40.1 (C-12), 43.8 (C-13), 54.7 (C-14), 31.4 (C-15), 84.6 (C-16), 64.7 (C-17), 14.4 (C-18), 24.0 (C-19), 103.6 (C-20), 11.8 (C-21), 152.4 (C-22), 34.4 (C-23), 23.6 (C-24), 33.7 (C-25), 75.2 (C-26), 17.2 (C-27), 102.6 (gal C-1), 81.9 (gal C-2), 77.0 (gal C-3), 69.8 (gal C-4), 76.6 (gal C-5), 62.8 (gal C-6), 106.2 (glc C-1), 75.6 (glc C-2), 78.0 (glc C-3), 71.7 (glc C-4), 78.5 (glc C-5), 62.8 (glc C-6), 105.2 (C-26-glc C-1), 75.2 (C-26-glc C-2), 78.6 (C-26-glc C-3), 71.7 (C-26-glc C-4), 78.6 (C-26-glc C-5), 62.2 (C-26-glc C-6).

HPLC의 분석조건-본 실험에 사용한 HPLC는 Hewlett Packard사의 Series 1100로서 실험조건은 다음과 같다.

Column: ODS Hypersil(5 µm, 200×4.6 mm); column temp.: 25°C.

Mobile phase: CH₃CN-H₂O=30:70; flow rate: 1.0 ml/min.; detector: UV 221 nm.



검액의 조제 - 지모 2.5 g을 MeOH을 가하여 4시간 환류냉각하여 여과한 후 total volume을 50 ml로 하여 검액으로 사용하였다.

표준 검량선의 작성 - 분리한 anemarsaponin B 50 mg을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 50 ml로 하여 stock solution으로 하였다. 이를 일정량씩 취하여 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml 농도의 표준

용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 µl씩 취하여 HPLC를 3회 실시하여 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area을 구하였다. anemarsaponin B의 회귀직선방정식은 $y=3144.1092x-3.696$ 이며 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 0.9999로서 1.0에 접근하므로 농도(x)와 peak area(y)간의 직선성이 인정되었다.

Anemarsaponin B의 함량 - 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회씩 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식 으로부터 각각 anemarsaponin B의 함량을 구하였다. 이때 anemarsaponin B의 peak는 표준품 과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였다.

결과 및 고찰

국내 전역에서 수집한 52조의 검체에 대하여 ane-

Table I. Content of Anemarsaponin B, ash, acid-insoluble ash and loss of moisture on drying in Anemarrhenae rhizoma

sample	content of anemarsaponin B	loss of moisture on drying (%)	ash (%)	acid-insoluble ash (%)
1	0.2590	10.13	5.58	1.01
2	0.4023	9.00	5.66	0.70
3	1.0739	8.09	0.47	0.32
4	1.0687	10.02	5.31	0.59
5	1.1569	10.03	5.08	0.36
6	0.2140	10.38	5.12	0.38
7	1.4012	9.63	6.81	0.64
8	1.1117	8.32	5.05	0.49
9	0.2693	11.32	4.86	0.51
10	0.7403	9.94	6.22	0.46
11	0.2659	9.62	5.69	0.79
12	1.4800	8.84	8.00	2.94
13	0.2079	13.54	8.02	0.59
14	0.1261	12.04	5.88	0.59
15	0.2243	11.47	4.81	0.61
16	0.2386	8.67	5.56	0.72
17	0.4206	3.28	4.26	0.39
18	1.1686	11.29	5.15	0.69
19	0.2678	13.20	4.70	0.62
20	0.2845	12.08	5.39	0.53
21	0.6768	11.57	4.81	0.53
22	1.1169	10.84	5.28	0.55
23	0.1853	10.35	5.17	0.33
24	1.0188	11.00	8.19	0.68
average	0.6408±0.0950	10.19±2.05	5.46±0.11	0.67±0.31

marsaponin B을 대조물질로 하여 TLC로 확인해 본 결과 전 품목이 같은 pattern을 보이고 또한 표준품과 동일 Rf치 및 동일 색상의 반점을 나타내었다. 따라서 지역적 안배를 고려하여 24종을 선별하여 다음 실험을 수행하였다.

24종의 생약을 대상으로 한 건조감량시험에서 평균치 및 표준편차는 10.19 2.05%이었다. 이 중 12%를 초과한 검체는 4개뿐이었으므로 지모의 건조감량은 12%이하로 설정하는 것이 바라직하다고 생각된다. 지모는 근경을 약용으로 하는 생약이므로 각각 회분 및 산불용성 회분 함량을 측정하여 보았다. 그 결과 회분시험의 경우 평균 및 표준편차는 5.46 ± 0.11%이었으며 24종 중 8.0%를 초과하는 것은 2종이었다. 따라서 회분은 8.0%이하로 설정하는 것이 타당하다. 산불용성 회분의 경우 1.0%를 초과하는 시료가 2종임으로 1.0%이하로 설정하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

지모의 HPLC법 정량에 필요한 지표물질로 anemarsaponin B를 이 생약으로부터 분리하였다. 지모의 MeOH 엑스로 얻은 n-BuOH 가용성 분획을 silica gel column(Merck 7734)에 걸고 CHCl₃-MeOH-H₂O(52:28:8, 하층부)의 용매로 용출시켜 7개의 소분획으로 나누었다. anemarsaponin B는 당을 3분자 함유하고 있어 지모의 saponin 중 비교적 극성이 큰 배당체이므로 소분획 6에서 이 화합물이 용출됨을 알 수 있었다. 소분획 6을 다시 같은 용매 system으로 silica gel column(Merck 7729) chromatography하여 비교적 정제된 조분획을 얻은 다음 RP-18 column chromatography (MeOH-H₂O=5:5 → 6:4 → 7:3, gradient)를 수행하여 모든 조건(normal phase 및 reverse phase HPLC)에서 순수한 화합물을 얻었다. 이 물질로부터 얻은 ¹H 및 ¹³C-NMR data는 문헌에 보고된 anemarsaponin B의 data와 완전히 일치하였다.⁸⁾

이상과 같이 분리하여 그 구조 및 순도가 확인된 anemarsaponin B를 지표물질로 하여 24종의 생약에 대해서 이 물질의 함량을 정하였다. 먼저 지모를 MeOH로 추출하여 여러 가지 용매와 추출 조건 하에서 HPLC를 실시하여 그 분리능을 검토한 결과 CH₃CN-H₂O(30:70)에서 가장 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 이 조건에서 anemarsaponin B의

retention time은 약 10분이며 다른 물질의 peak와는 baseline separation이 이루어지므로 정량성 있는 결과를 얻을 수 있었다. Anemarsaponin B의 표준 검량선을 작성하여 HPLC정량에 이용하기 위하여 stock solution을 만들고 이를 희석하여 농도를 변화시킨 5가지 표준용액을 제조하였다. 각 표준용액을 HPLC에 injeciton하여 얻은 chromatogram의 peak면적과 농도와의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 0.2-1.0 mg/ml의 농도 범위에서 그 직선성이 인정되었으며 회귀직선방정식은 $y=3144.1092x-3.696$ 이었다. 이때의 상관계수는 0.9999로서 1.0에 접근하였다.

이상과 같은 조건에서 검액도 HPLC를 실시하여 회귀직선방정식을 이용하여 anemarsaponin B의 함량을 구한 결과 0.12-1.48%의 넓은 범위를 나타내었으며 그 평균값 및 표준편차는 0.6408±0.0950%이었다. 따라서 지모 중 anemarsaponin B의 함량은 0.2%이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다.

사 사

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

인용문헌

1. 허 준 (1992) 동의보감 393. 근영출판사, 서울.
2. Kawasaki, T., Yamauchi, T. and Itakura, N. (1963) Saponins of timo (*Anemarrhena rhizoma*). I. *Yakugaku Zasshi* 83(9): 892-896.
3. Kawasaki, T. and Yamauchi, T. (1963) Saponins of timo (知母: *Anemarrhena rhizoma*). II. Structure of timosaponin A-III. *Chem. Pharm. Bull.* 11(10): 1221-1224.
4. Morita, N., Shimizu, M. and Fukuta, M. (1965) Studies on the medical resources. XXIV. Chimonin in *Anemarrhena rhizoma*. *Yakugaku Zasshi* 85(4): 374-375.
5. Niwa, A., Takeda, O., Ishimaru, M., Nakamoto, Y., Yamasaki, K., Kohda, H., Nishio, H., Segawa, T., Fujimura, K. and Kuramoto, A. (1988) Screening test for platelet aggregation inhibitor in natural products. The active principle of *Anemarrhena rhizoma*. *Yakugaku Zasshi* 108

- (6): 555-561.
6. Nahumo, S., Kishi, S. I., Inoue, T. and Nagai, M. (1991) Saponins of *Anemarrhenae* rhizoma. *Yakugaku Zasshi* 111(6): 306-310.
 7. Sun, X. H., Kizu, H. and Tomimori, T. (1992) Quantitative analysis of timosaponin B-II, timosaponin A-III and mangiferin in *Anemarrhenae* rhizoma and Kampo prescriptions containing this crude durg. *Shoyakugaku Zasshi* 46(1): 19-24.
 8. Dong, J. X. and Han, G. Y. (1991) A new active steroidal saponin from *Anemarrhena asphodeloides*. *Planta Med.* 57: 460-462.

(1999년 4월 9일 접수)