

## HPLC에 의한 가시오가피 및 오가피 중 Hyperin의 정량

이상현 · 정하숙\* · 신국현 · 김박광#

서울대학교 약학대학, \*덕성여자대학교 자연과학대학

(Received July 12, 2004; Revised August 11, 2004)

### Determination of Hyperin in *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* by HPLC

Sanghyun Lee, Ha Sook Chung\*, Kuk Hyun Shin and Bak-Kwang Kim#

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

\*College of Natural Sciences, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — A new high performance liquid chromatographic method was applied for the determination of hyperin in *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus*. The stationary phase used was  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> reverse-phase column and a mobile phase program was a gradient of acetonitrile and distilled water at a flow rate of 1.0 ml/min. Hyperin was detected at 210 nm, and the analysis was successfully carried out within 20 min. Hyperin was detected in the one year-grown and two years-grown stem of *A. senticosus* (0.47 and 0.13 mg/g, respectively) and *A. sessiliflorus* (0.14 and 0.03 mg/g, respectively). Hyperin was detected in the main and branch root of *A. sessiliflorus* (0.30 and 0.09 mg/g, respectively). But there is no detection of hyperin in the main and branch root of *A. senticosus*.

**Keywords** □ *Acanthopanax senticosus*, *A. sessiliflorus*, Araliaceae, HPLC, Hyperin

가시오가피(*Acanthopanax senticosus*) 및 오가피(*A. sessiliflorus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 오가피속(*Acanthopanax*) 식물로 낙엽 활엽 관목이다. 대부분의 오가피속 식물은 고산 지대나 아한대 지방에 분포하는 저온성 식물로서 예로부터 중국과 우리나라에서는 오가피속 식물의 근피(根皮)와 수피(樹皮)를 오가피(五加皮)라고 하여 한약재로 널리 사용되어 왔으며,<sup>1)</sup> 신농본초경(神農本草經), 본초강목(本草綱目), 동의보감(東醫寶鑑) 등에서는 강장(強壯), 강정(強精), 중풍(中風), 신경통(神經痛), 당뇨(糖尿) 등에 이용된다고 하였다.

오가피속 식물에 존재하는 화학물질 중 주성분을 나타내는 hyperin은 aldose reductase inhibition 작용 및 여러 생리활성<sup>2-5)</sup>이 보고되었으며, 최근에는 특히 오가피속 생약이 건강보조식품 뿐 아니라 건강 기능성 식품으로서 그 소비가 꾸준히 증가하고 있다. 따라서 이들 오가피속 생약에 함유된 생리활성 물질들의 함량을 구명하기 위한 표준화된 정량법 등을 확립하여 양질의 오가피속 식물을 안정적으로 공급하는 것이 중요

하다.

Hyperin의 정량에 대한 연구는 *Acanthopanax senticosus*,<sup>6)</sup> *Epimedium koreanum*,<sup>7)</sup> *Hypericum perforatum*,<sup>8)</sup> *Sanguisorba officinalis*<sup>9)</sup> 및 apple<sup>10,11)</sup> 등에서 이루어졌으나, 오가피속 식물에서 부위별로 비교 연구된 바는 없다.

본 연구는 hyperin을 함유하는 양질의 오가피 원료를 안정적으로 공급할 수 있도록 하기 위한 연구의 일환으로, 가시오가피 및 오가피를 대상으로 HPLC를 이용해 각 부위별 hyperin 함량을 비교 분석하였다.

### 실험방법

#### 실험재료

본 연구에 사용한 가시오가피 및 오가피의 재료는 충남 공주에서 재배한 3년생을 2003년 10월 하순에 채취한 것으로 충남 공주교육대학교 조선행 교수로부터 감정을 받아 사용하였다.

#### 시약

분석용 시약은 특급시약을 사용하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-880-7841 (팩스) 02-878-1652  
(E-mail) kimbk2@snu.ac.kr

### Hyperin의 분리 및 화학구조 규명

가시오가피 줄기를 MeOH로 추출한 다음 용매의 유전율에 따라 *n*-hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 및 *n*-BuOH로 각각 분획하였다. 그 중 EtOAc 분획을 open column chromatography를 실시하여 CHCl<sub>3</sub> : MeOH(gradient) 용매조성으로 용출하여 노란색의 결정을 얻었다. 얻어진 결정을 IR, positive FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR 등의 기기분석을 이용하여 화학구조를 규명하였다.

### 검액의 조제

10 g의 건조한 가시오가피와 오가피를 마쇄하여, 50% MeOH로 4시간씩 5회 동안 환류추출한 후, 여과하여 농축하였다. 건조된 추출물을 50% MeOH에 용해시킨 후 10 μl를 취하여 column에 주입하여 HPLC 분석을 실시하였다.

### 표준 검량선의 작성

Hyperin을 50% MeOH에 용해시킨 후 단계적으로 희석하여 검량선용 표준용액으로 만들어 column에 주입하고 HPLC를 실시하여 chromatogram을 얻었다. 검량선은 hyperin의 양에 대한 peak area를 plot하여 얻은 점으로부터 작성하였다.

### 분석기기

HPLC는 Spectra Physics(SP-8800) HPLC로 uv-detector(Spectra 100) 및 integrator(SP 4270)가 부착된 것을 사용하였고, column은 μ-Bondapak C<sub>18</sub> reverse-phase(4.6×220 mm)를 사용하였다.

### 분석조건

이동상으로 acetonitrile(CH<sub>3</sub>CN)과 trifluoroacetic acid(TFA)가 0.05% 함유된 H<sub>2</sub>O를 gradient로 혼합하여 사용하였다. Gradient는 H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN(90 : 10)으로 시작하여 30분 후 H<sub>2</sub>O : CH<sub>3</sub>CN(50 : 50)이 되도록 하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, flow rate는 1.0 ml/min, 파장은 210 nm에서 측정하였다.

### 실험결과 및 고찰

오가피의 주요성분 중의 하나인 hyperin을 정량하는 것은 품질평가에 있어서 중요하다. 본 연구는 가시오가피 및 오가피에서 hyperin의 함량을 확인하였는데, 표준물질로 사용된 hyperin은 가시오가피 줄기에서 직접 분리하여 사용하였다. Fig. 1의 구조에서 보는 바와 같이, 이 성분은 각종 spectrum에서 flavonoid가 보이는 전형적인 pattern을 확인했으며, 각종 data의 값이 문헌치와 비교하여 hyperin과 일치하므로 hyperin으로 동정하였다.<sup>2,12,13)</sup>

IR  $\nu_{\max}$ (KBr): 3316(OH), 2900, 1655, 1607, 1060 cm<sup>-1</sup>;

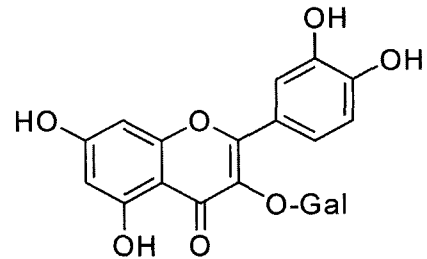


Fig. 1 – Structure of hyperin.

positive FAB-MS: *m/z* 465 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.64(1H, s, 5-OH), 7.67(2H, dd, *J*=2.0, 8.5 Hz, H-6'), 7.53(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2'), 6.82(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 6.41(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-8), 6.21(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 5.38(1H, d, *J*=7.8 Hz, anomeric H-1); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 177.9(C-4), 164.5(C-7), 161.6(C-5), 156.6(C-2, C-9), 148.9(C-4'), 145.2(C-3'), 133.9(C-3), 122.4(C-6'), 121.5(C-1'), 116.3(C-5'), 115.6(C-2'), 104.3(C-10), 102.2(gal C-1), 99.1(C-6), 93.9(C-8), 76.2(gal C-5), 73.6(gal C-3), 71.6(gal C-2), 63.3(gal C-4), 60.5(gal C-6).

가시오가피의 주요 생리활성 성분 중의 하나인 hyperin을 순수 분리하여 정제한 것을 MeOH에 용해시킨 후 μ-Bondapak C<sub>18</sub> reverse-phase column에 주입하고, 용매계는 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O (+0.05% TFA)로 30분 후 50 : 50으로 하는 농도구배 혼합용매를 사용하여 얻은 chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 hyperin의 retention time(*t<sub>R</sub>*)은 14.48 min이었다. 대상물질의 calibration curve에서 hyperin의 회귀직선 방정식은 Y=2024.3X+2519.4였고, *r*<sup>2</sup>은 0.9945으로 4.06~260 μg/ml 범위 내에서 직선성이 인정되었으며, Fig. 3에 나타내었다.

가시오가피 및 오가피의 각 부위별 추출물을 MeOH에 용해시킨 후 μ-Bondapak C<sub>18</sub> reverse-phase column에 주입하고, 분리능이 양호한 용매계로 CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O(+0.05% TFA)로 30분 후 50 : 50으로 하는 농도구배 혼합용매를 사용한 경우에 분리능이 좋았으며, 다른 성분들의 방해를 받지 않는다는 사실을 확인했고, 그 전형적인 chromatogram을 Fig. 4(일년생 줄기)와 Fig. 6

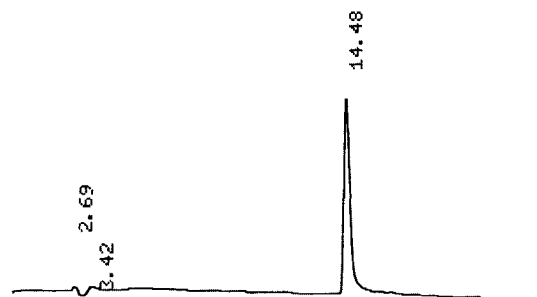


Fig. 2 – HPLC chromatogram of hyperin as a standard.

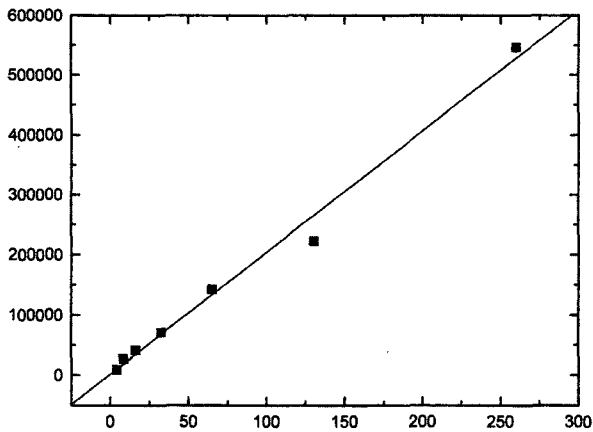


Fig. 3 - Calibration curve for hyperin (X axis:  $\mu\text{g/ml}$ ; Y axis: Area).

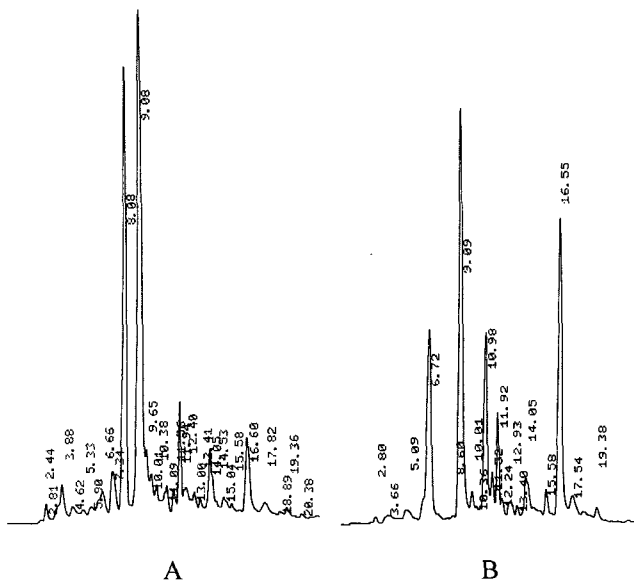


Fig. 4 - HPLC chromatograms of the MeOH extracts from the one year-grown stem of *A. senticosus* (A) and *A. sessiliflorus* (B).

(주근)에 각각 나타내었다. 이 chromatogram에서 보는 바와 같이  $t_R$ 이 14.48 min에 나타나는 peak인 hyperin과 표준품의 spike test를 실시하여 완전히 일치함을 확인하였고, 그 결과를 일년생 줄기의 경우는 Fig. 5에 나타내었고, 주근의 경우는 Fig. 7에 각각 나타내었다.

각 추출물의 hyperin 함량은 Table I에 나타내었다. 가시오가피 및 오가피의 일년생 줄기(one year-grown stem)의 MeOH 추출물 중의 hyperin 함량은 가시오가피의 경우는 0.47 mg/g이었고, 오가피의 경우는 0.14 mg/g이었으며, 이년생 줄기(two years-grown stem)의 MeOH 추출물에서는 가시오가피의 경우는 0.13 mg/g이었고, 오가피의 경우는 0.03 mg/g이었다. 반면에 가시오가피 및 오가피의 뿌리의 MeOH 추출물 중의 hyperin 함량은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 가시오가피의 경우는 주근(主根,

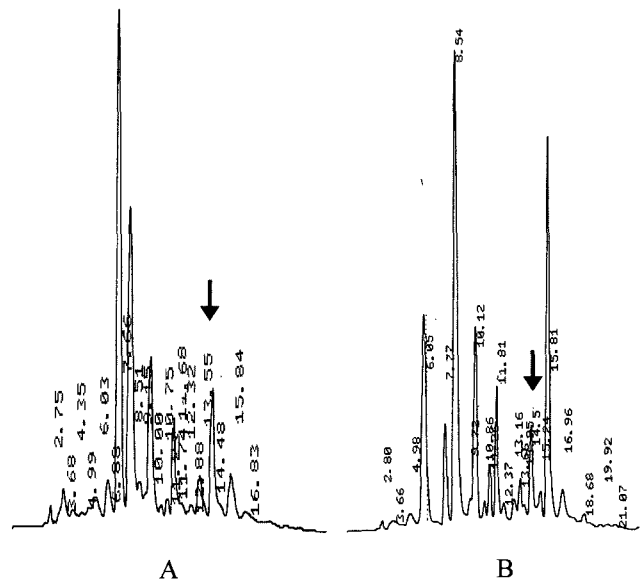


Fig. 5 - HPLC chromatograms of the MeOH extracts from the one year-grown stem of *A. senticosus* (A) and *A. sessiliflorus* (B) spiked with a standard hyperin.

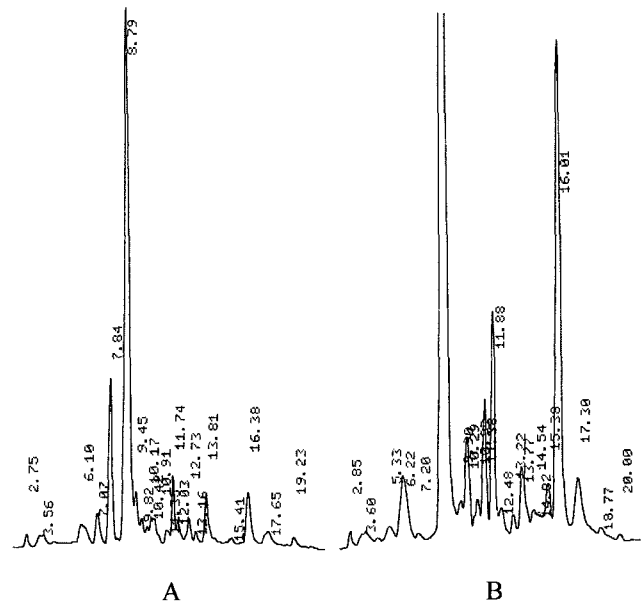


Fig. 6 - HPLC chromatograms of the MeOH extracts from the main root of *A. senticosus* (A) and *A. sessiliflorus* (B).

main root) 및 세근(細根, branch root)에서 검출되지 않았고, 오가피의 경우는 주근에서 0.30 mg/g이었고, 세근에서 0.09 mg/g이었다.

이상의 결과에서 hyperin은 가시오가피 및 오가피의 줄기에서의 존재가 확인되었으며, 뿌리에서는 가시오가피에서는 확인되지 않고 오가피에서만 확인되었다. Hyperin의 함량은 가시오가피의 경우는 일년생 줄기에서 많이 존재함을 알았고, 오가피의

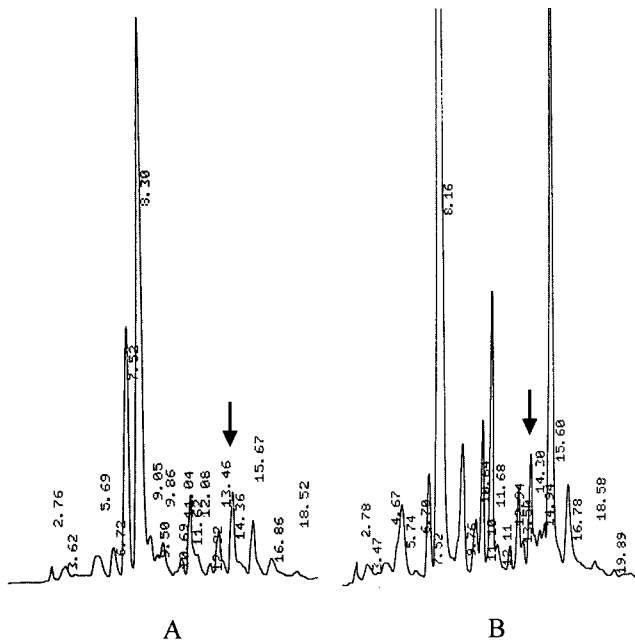


Fig. 7 – HPLC chromatograms of the MeOH extracts from the main root of *A. senticosus* (A) and *A. sessiliflorus* (B) spiked with a standard hyperin.

Table I – Content of hyperin in *A. senticosus* (A) and *A. sessiliflorus* (B)

Samples	MeOH ext. (mg/g)	Content (mg/g)
<b>A</b>		
One year-grown stem	120	0.47±0.08
Two years-grown stem	77	0.13±0.02
Main root	104	-
Branch root	141	-
<b>B</b>		
One year-grown stem	77	0.14±0.09
Two years-grown stem	81	0.03±0.01
Main root	125	0.30±0.02
Branch root	196	0.09±0.01

All experiments were triplicates.

경우는 주근에서 많이 존재함을 확인할 수 있었다.

연구결과는 앞으로 건강식품 산업분야에서 보다 더 체계화되고 규격화된 양질의 오가피속 식물을 공급하기 위한 기초자료로 사용될 것으로 사료된다.

### 결 론

본 연구는 가시오가피 및 오가피의 MeOH 추출물 중의 hyperin 함량을 확인한 결과 가시오가피 및 오가피의 일년생 줄기의 MeOH 추출물 중의 hyperin 함량은 가시오가피의 경우는 0.47 mg/g이었고, 오가피의 경우는 0.14 mg/g이었으며, 이년생 줄기의 MeOH 추출물에서는 가시오가피의 경우는 0.13 mg/g이었고, 오

가피의 경우는 0.03 mg/g이었다. 반면에 가시오가피 및 오가피 뿌리의 MeOH 추출물 중 hyperin 함량은 가시오가피의 경우는 주근 및 세근에서 검출되지 않았고, 오가피의 경우는 주근에서 0.30 mg/g이었고, 세근에서 0.09 mg/g이었다.

### 감사의 말씀

본 연구를 위해 가시오가피 및 오가피 재료를 제공해 주시고 감정해 주신 충남 공주교육대학교 조선행 교수님과 서울대학교 약학대학 BK21의 지원에 깊이 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Yook, C. S., Lee, D. H. and Seo, Y. K. : A new forma of *Acanthopanax* species (I). *Kor. J. Pharmacogn.* **7**, 179 (1976).
- 2) Lee, S., Jung, S. H., Lee, Y. S. and Shin, K. H. : Hyperin, an aldose reductase inhibitor from *Acanthopanax senticosus* leaves. *Nat. Prod. Sci.* **9**, 4 (2003).
- 3) Kim, J. H. and Yang, K. S. : Antilipid peroxidative effect of *Houttuynia cordata*. *Yakhak Hoeji* **45**, 494 (2001).
- 4) Lee, M. H., Son, Y. K. and Han, Y. N. : Tissue factor inhibitory flavonoids from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 842 (2002).
- 5) Lee, S., Shin, D. S., Oh, K. B. and Shin, K. H. : Antibacterial compounds from the leaves of *Acanthopanax senticosus*. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 40 (2003).
- 6) Chen, M., Song, F., Guo, M., Liu, Z. and Liu, S. : Analysis of flavonoid constituents from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 264 (2002).
- 7) Sha, M., Cao, A. and Yang, S. : Determination of hyperin in *Epimedium koreanum* Nakai by HPLC. *China J. Chin. Materia Medica* **20**, 357 (1995).
- 8) Wu, Y., Zhou, S. D. and Li, P. : Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* by HPLC analysis. *Acta Pharmaceut. Sin.* **37**, 280 (2002).
- 9) Sha, M., Cao, A., Wang, B., Liu, C., Geng, J. and Liu, W. : Determination of hyperin in *Sanguisorba officinalis* L. by high performance liquid chromatography. *Chin. J. Chromatogr.* **16**, 226 (1998).
- 10) Chinnici, F., Gaiani, A., Natali, N., Riponi, C. and Galassi, S. : Improved HPLC determination of phenolic compounds in cv. golden delicious apples using a monolithic column. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3 (2004).
- 11) Lommen, A., Godejohann, M., Venema, D. P., Hollman, P. C. and Spraul, M. : Application of directly coupled HPLC-NMR-MS to the identification and confirmation of quercetin

- glycosides and phloretin glycosides in apple peel. *Anal. Chem.* **72**, 1793 (2000).
- 12) Kang, S. S., Um, B. H., Kim, J. S. and Ahn, B. T. : Isolation of flavonoids from *Evodiae Fructus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**, 9 (1997).
- 13) Lee, S., Kim, B. K., Cho, S. H. and Shin, K. H. : Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 280 (2002).