

고체발효 숙지황의 지표성분 함량분석

박화용 · 엄영란 · 마진열*
한국한의학연구원 신한방제제연구센터

Quantitative Analysis of Marker Substance in Fermented Rehmanniae Radix Preparata

Hwayong Park, Young Ran Um and Jin Yeul Ma*

Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine
JeonMin-Dong 461-24, Yusung-Gu, Daejeon, Korea

Abstract – Medicinal plant *Rehmanniae Radix* has long been used as traditional herbal medicine in Korea. In this study, we investigated quantitative changes of marker substance 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) in *Rehmanniae Radix Preparata* fermented with *Ganoderma lucidum*, *Paecilomyces japonica*, honey, and Nuruk, using HPLC according to the Korean Pharmacopoeia. As a result, 5-HMF was decreased in SDT and SYT, and increased in SST and SNT, comparing with control group. Quantitative increasing of 5-HMF is not exactly in direct proportion with fermentation, and it is need further studies to elucidate mechanism of quantitative changes by converted and newly produced substances with fermentation.

Key words – *Rehmanniae Radix Preparata*, fermentation, 5-HMF

지황(地黃, *Rehmanniae Radix*)은 중국 북부가 원산지로서 알려져 있는 현삼과의 다년생 초본으로서 약용식물로 재배되고 있으며 한방에서는 그 뿌리를 가공하여 약재로 사용하고 있는데 가공하지 않은 신선한 것을 생지황 또는 선지황이라하고 건조시킨 것은 건지황, 증숙하여 건조시킨 것을 숙지황(熟地黃, *Rehmanniae Radix Preparata*)이라고 한다.¹⁾ 생지황과 건지황에 대한 최초의 기록은 <神農本草經>에서 찾아볼 수 있으며, 숙지황은 <雷公炮炙論>에 최초로 기록되어있는데 이후 장은암은 지황을 구증구포(九蒸九曝)의 방법으로 증숙시킨 것을 숙지황이라 한다 하였다.²⁾ <本草綱目>에서는 술에 담가 사인가루를 첨가하고 찐 다음 그늘에 말리는 과정을 9회 반복한 것을 숙지황이라 하였고,³⁾ <本草求真>에서는 지황에 술과 사인가루를 함께 넣고 구증구포하면 맛이 달게되고 자색이 흑색으로 변화하고 腎經으로 직접 들어가 작용한다고 하였다.⁴⁾ 생지황은 신선한 지황의 뿌리로서 약성이 차고 맛은 감고(甘苦)하며 청열(淸熱), 양혈(涼血), 생진(生津)의 효능이 있고, 건지황은 생지황의 껍질을 제거하고 양건한 지황의 뿌리로서 약성이 양(涼)하고 맛은 감(甘)하여 자음보혈(滋陰補血)의 효능과 함께 허약

체질, 토혈, 코피, 자궁출혈, 생리불순, 변비 등에 사용하고 있다. 한편, 숙지황은 생지황이나 건지황을 사인이 함유된 술에 침지시킨 후 술과 함께 찌고 건조시키는 과정을 9회 반복(구증구포)한 것으로서 약성은 미온(微溫)하고 맛이 감(甘)하며 자음보혈의 효능 외에도 생리불순, 허약체질, 어린이 발육부진, 치매, 조루, 발기부전 등에 사용되고 있다.^{5,6)} 생화학적 성분에 있어서, 생지황과 건지황은 β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, rehmanin, fatty acids, catalpol, glucose, γ -butyl amino acid, carbohydrate, norcarotenoid, stachyose, arginine 등의 성분이 함유되어있으며, 숙지황은 stachyose, verbascose, mannotriose, raffinose, sucrose, glucose, fructose, galactose 등의 당류와 소량의 catalpol, vitamin A, arginine, mannitol, β -sitosterol 등이 함유되어있는 것으로 보고되어있다.⁷⁻¹¹⁾ 숙지황의 수지와 약재로의 제조과정에서 반복적인 증숙과 이후 건조과정이 있음으로 해서 건지황에 존재하던 stachyose와 catalpol의 농도가 감소하며 glycoside 들은 완전히 분해되거나 함량이 대폭 감소하는데 비하여 숙지황에서는 다당류가 분해되어 단당류의 농도가 증가하고 분해산물인 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) 등이 생성되는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 숙지황의 품질관리를 위한 지표물질로 예 전에는 주로 catalpol, d-

*교신저자 (E-mail): jyma@kiom.re.kr
(Tel): +82-42-868-9466

mannitol, rehmannioides a-d 등이 사용되었는데,¹⁵⁾ 이들 지표물질은 생지황과 건지황 모두에 존재하고 또한 산지와 채취시기에 따라서도 함량의 차이가 있으며, 숙지황의 제조과정 중의 열처리 과정에서 분해되는 등의 문제가 있어 최근에는 숙지황에만 존재하는 특이성분으로서 증숙과정에서 단당류의 분해산물로 생성되는 5-HMF를 이용한 숙지황의 품질관리를 위한 분석법이 보고되어있다.^{16,17)} 이와 관련하여 대한약전에 숙지황은 5-HMF를 지표물질로 0.1% 이상 함유하도록 규정하고 있다. 본 연구에서는 한약재 발효에 주로 사용되고 있는 영지버섯, 동충하초, 꿀, 그리고 누룩을 발효원으로 하여 숙지황을 발효시킨 후 발효원에 따라 변화하는 지표성분을 HPLC를 이용하여 분석하고자 하였으며, 이를 위하여 대한약전 제9개정판의 정량법¹⁸⁾에 고시되어있는 숙지황의 지표성분 5-HMF에 대하여 발효 전·후의 함량분석을 통해 발효된 숙지황의 지표성분 변화를 관찰하고자 하였다.

실험재료 및 방법

재료

1) 약재

본 실험에 사용한 숙지황 (*Rehmanniae Radix*)은 영천 현대약업사에서 구입하여 사용하였으며 추출수율의 향상을 위해 잘게 분쇄한 후 사용하였다.

2) 발효균주 및 발효물

숙지황의 발효에 사용된 균주는 동충하초(*Paecilomyces japonica*)와 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 품종으로 자실체에서 분리하여 사용하였다. 꿀은 영월농협에서 제조한 아카시아꿀을 사용하였으며 누룩은 부산시 금정구 산성누룩을 사용하였다.

시약 및 기기

시료의 추출에 사용한 유기용매는 대정화학주식회사에서 생산한 특급 시약을 사용하였으며 기기분석을 위한 HPLC 용매는 J.T. Baker사의 특급시약을 사용하였다. 그 외는 모두 특급 시약을 사용하였다. HPLC 분석기기는 Shimadzu Corp. (Japan)의 system controller (SCL-10A vp), solvent delivery system (LC-6AD), photodiode array detector (SPD-M10A vp), auto sample injector (SIL-10AF), degasser (DGU-14A)를 사용하였으며 HPLC column은 RStech 사의 C18 Optimapak (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 동충하초, 영지버섯 균주 보관용 배지는 PDA (Potato Dextrose Agar, Difco 사)를 사용하였으며 액체종균 생산용 배지는 PDB (Potato Dextrose Broth, Difco 사)를 사용하였다. 균사 성장을 위해 항온배양기 (HST-301M-3D)와 진탕 배양기(HST-201M-SLI)를 사용하였으며 꿀과 누룩 발효를 위해서는 dry oven (JSOF-150, Korea)을 이용하였다.

시료 전처리 및 실험 방법

(1) 고체발효

1) 동충하초와 영지버섯 균주의 배양

균주는 PDA (Potato Dextrose Agar) 평판배지를 이용하여 4°C에서 보존하면서 30일 간격으로 계대배양 하였다. 균사 성장을 위한 PDA 평판배지는 25°C 항온 배양기에서 20일간 배양하였다.

2) 동충하초와 영지버섯 액체종균의 생산

PDB (Potato Dextrose Broth) 배지는 500 ml 삼각플라스크에 각각 200 ml씩 넣어 121°C에서 15분간 살균한 다음 냉각시켜 사용하였다. PDA 평판배지에서 20일간 배양된 균사의 가장자리 부위를 직경 5 mm cork borer를 사용하여 각각 4조각을 채취 한 후 PDB 액체 배지에 접종한 후 25°C에서 7일간 진탕배양 (120 rpm)하여 액체 종균을 생산하였다.

3) 동충하초와 영지버섯의 고체발효

숙지황 분말에 동충하초, 영지버섯 액체종균 현탁액을 각각 10% (v/v) 수준으로 접종하여 생육온도 25°C, 상대습도 80%를 유지하면서 30일간 고체발효를 실시하였다.

4) 꿀과 누룩의 고체발효

꿀 발효는 숙지황 가루 500 g에 희석한 꿀(꿀 150 ml + 생수 150 ml) 300 ml를, 누룩 발효는 숙지황 가루 500 g에 누룩 발효액(누룩 50 g에 고두밥 500 g을 넣어 섞은 후 발효시킴) 300 ml를 넣은 후 각각의 시료를 dry oven에서 37°C를 유지하면서 22일간 고체발효를 실시하였다.

고체발효에 있어서 균류의 종류 및 발효 대상물질의 성상에 따라 발효기간에 많은 차이가 있는데, 일반적으로 고체발효기간이 30일이 경과하게 되면 곰팡이 균사의 호흡열에 의한 고체기질의 수분증발 및 균사의 노후와 퇴화가 야기되면서 유기산 및 노폐물 등의 축적으로 인하여 발효물질의 상태가 빠른 속도로 극히 불량해지는 경향이 크다. 본 연구에서는 동충하초와 영지버섯, 그리고 꿀과 누룩에 대한 최적의 고체발효조건을 잡기 위하여 다양한 조건과 발효기간을 설정하여 시험발효를 실시하여 관찰한 결과(data not shown), 위의 실험방법에 서술한 바와 같은 조건에서 가장 만족스러운 결과를 얻었으며 따라서 위와 같은 방법을 발효조건으로 삼아 연구를 진행하였다.

(2) 건조감량 시험

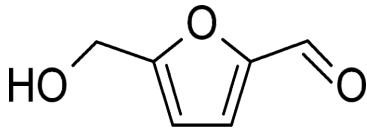
대한약전 9개정의 건조감량 시험법¹⁹⁾에 따라 무게를 단칭량병에 시료 3.0g을 넣어 무게를 정밀하게 측정하여 105°C에서 6시간 건조하고, desiccator에서 방냉한 후 그 무게를 함량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

(3) 검액의 조제

대한약전 9개정의 정량법²⁰⁾에 따라 검체를 가능한 한 잘게 잘 자른 후 2 g을 정밀하게 달아 50% methanol 100 ml를 넣어 3시간 환류추출하여 여과하였다. 잔류물에 50% methanol 100 ml를 넣어 같은 방법으로 조작하였다. 여액을

Table I. Conditions of HPLC analysis

Column	C18 (4.6×250 mm, 5 μm, Optimapak, RStech)
Flow rate	1.0/min
Detector	UV 280 nm
Injection volume	10.0 μl
Column temperature	Room Temperature
Mobile phase	H ₂ O(A), CH ₃ CN(B)
Analytical condition	A : B = 95 : 5

**Fig. 1.** Chemical structure of 5-HMF.

모두 합한 다음 hexane 200 ml로 2회 추출하고 hexane층은 버렸다. 남은 물층을 부피가 반 이하가 되도록 감압 농축한 후 ethyl acetate 100 ml로 2회 추출하고 추출액을 합하여 감압 조건에서 용매를 기화시켜 제거하였다. 잔류물은 methanol에 녹여 20 ml로 하여 0.45 μm syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였으며, HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 5-HMF 함량을 구하였고 시료에 대해 3회 반복하여 지표성분의 함량(%)을 산출하였다.

(4) 표준품의 준비

실험에 사용한 지표물질인 5-HMF는 식품의약품안전청에서 분양 받았으며 지표물질을 methanol에 용해한 후 각각 0.5, 0.3, 0.1, 0.05 mg/ml의 농도로 희석하여 검량선을 작성하였다.

(5) 기기 분석조건

HPLC 이용한 기기 분석조건과 지표물질 5-HMF의 화학적 구조는 아래 Table I 및 Fig. 1과 같다.

결과 및 고찰

건조감량 - 숙지황의 건조감량 시험법에 따라 3회 실시한 결과는 Table II와 같다. 모든 발효된 숙지황 추출물은 발효하지 않은 control에 비하여 건조감량이 높게 나타났으며 이는 발효 후 수분 함량이 높아지는 것을 보여주며, 검액의 조제시 이를 감안하여 검체무게를 측정하였다.

숙지황의 HPLC 분석 - 숙지황의 지표성분과 발효된 숙지황 추출물에 대한 HPLC 그래프는 Fig. 2에서와 같이 나타났으며 이들의 함량은 Table III에 나타내었다. 숙지황의 지표성분인 5-HMF의 검량선은 $y = 73139x + 327686$ ($r^2=0.9997$)으로 양호한 직선성을 나타냈으며(Fig. 3) HPLC chromatogram에서 retention time은 약 15.12분대에서 확인

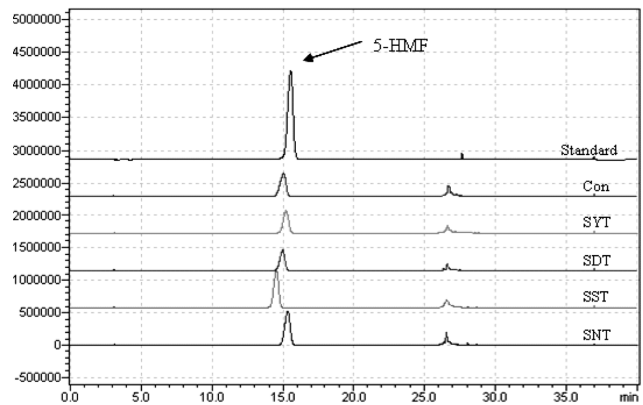


Fig. 2. HPLC chromatogram of 5-HMF standard and Rehmanniae Radix extract according to fermentation. Standard; 5-HMF, Con: control (Rehmanniae Radix extract), SDT; Rehmanniae Radix extract fermented with *Paecilomyces japonica*, SYT; Rehmanniae Radix extract fermented with *Ganoderma lucidum*, SST; Rehmanniae Radix extract fermented with honey, SNT; Rehmanniae Radix extract fermented with Nuruk.

Table II. The results of Loss of Drying for Rehmanniae Radix extract according to fermentation (n=3). Con: control (Rehmanniae Radix extract), SDT; Rehmanniae Radix extract fermented with *Paecilomyces japonica*, SYT; Rehmanniae Radix extract fermented with *Ganoderma lucidum*, SST; Rehmanniae Radix extract fermented with honey, SNT; Rehmanniae Radix extract fermented with Nuruk

Sample	Con	SDT	SYT	SST	SNT
Mean±SD (%)	15.582±0.15	45.122±0.16	41.812±0.16	21.920±0.40	28.182±0.31

Table III. Content of 5-HMF standard in Rehmanniae Radix extract according to fermentation (n=3). Con: control (Rehmanniae Radix extract), SDT; Rehmanniae Radix extract fermented with *Paecilomyces japonica*, SYT; Rehmanniae Radix extract fermented with *Ganoderma lucidum*, SST; Rehmanniae Radix extract fermented with honey, SNT; Rehmanniae Radix extract fermented with Nuruk.

Sample	Con	SDT	SYT	SST	SNT
5-HMF contents (Mean±SD, %)	0.133±0.02	0.103±0.02	0.116±0.01	0.186±0.01	0.173±0.01

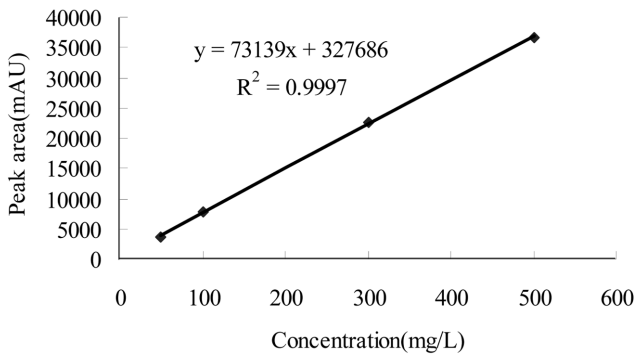


Fig. 3. Calibration curve of standard solution.

되었다. 발효된 숙지황 추출물의 그래프에서도 지표성분은 다른 성분들과 비해 비교적 잘 분리되었음을 알 수 있었다 (Fig. 2). 분리된 지표성분의 함량은 SDT, SYT, Con, SNT, SST의 순으로 나타났으며, SDT와 SYT의 경우 발효하지 않은 control 보다 지표성분 함량이 감소하였으나, SNT, SST는 발효 후 control 보다 지표성분 함량이 증가한 것을 알 수 있었다(Table III).

결론

숙지황을 동충하초, 영지버섯 균사체, 꿀, 누룩을 이용하여 발효시킨 후 변화되는 지표성분 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF)의 함량을 분석한 결과 5-HMF의 함량은 control 대비 SDT, SYT 실험군에서 감소하였으며 SST, SNT 실험군에서는 증가하였다. 따라서 숙지황의 발효와 지표성분 5-HMF의 함량증가는 서로 정비례하지 않는 것으로 사료되며, 발효 후의 정확한 지표성분 변화 mechanism의 규명을 위해서는 지표성분이 발효에 따라 전환 또는 생성되는 새로운 물질의 동정과 함께 발효 전·후에 따른 다양한 효능연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

사사

본 연구는 한국한의학연구원 기관고유사업(P09020)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 전국한의과대학교수공편저 (1995) 본초학, 190-192, 580-581. 영림사, 서울.
2. 장은암, 엽천사, 진수원 (1981) 本草三家合註, 89. 정보출판사, 서울.
3. 이시진 (1981) 본초강목, 1021. 인민위생출판사, 북경.
4. Liping, Z., Jun, L., Zhenling, Z. and Lei, W. (2005) A study on the historical change of preparation method of Radix Rehmanniae Preparata. *Journal of Henan University of Chinese*

Medicine **20**(2): 69-71.

5. 전국한의과대학교수공편저 (1995) 본초학, 190-192. 영림사, 서울.
6. 국가중의약관리국 중화본초편위원회 (1999) 중화본초7권, 376-389. 상해과학기술출판사, 상해.
7. 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희 (1986) 한약임상응용, 354-355. 정보사, 서울.
8. 정보섭, 신민교 (1998) 도해 향약(생약) 대사전, 906-909. 영림사, 서울.
9. Tomoda, M., Miyamoto, H. and Shimizu, N. (1994) Structural features and anti-complementary activity of rehmanna SA, a polysaccharide from the root of *Rehmannia glutinosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 1666-1668.
10. Tomoda, M., Miyamoto, H., Shimizu, N., Gonoda, R. and Ohara, N. (1994) Characterization of two polysaccharides having activity on the reticuloendothelial system from the root of *Rehmannia glutinosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 625-629.
11. Tomoda, M., Miyamoto, H., Shimizu, N., Gonoda, R. and Ohara, N. (1994) Two acidic polysaccharides having reticuloendothelial system-potentiating activity from the raw root of *Rehmannia glutinosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **17**: 1456-1459.
12. Liu, Z. Y. (1984) Comparison of monosaccharide contents between the raw and prepared roots of *Rehmannia*. *Chung Yao Tung Pao* **9**: 17-18.
13. Ni, M., Bian, B. and Wang, H. (1992) Constituents of the dry roots of *Radix Rehmanniae Libosch*. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **17**: 297-298.
14. Bian, B., Ni, M. and Wang, H. (1991) Analysis and comparison of acidic constituents in petroleum ether-soluble fraction of *Radix Rehmanniae* and its processed products. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **16**: 339-341.
15. 원도희 등 (1991) 상용생약의 성분정량, 198-217. 도서출판 성은, 서울.
16. Lee, K. S., Ze, K. R., Hong, S. P., Jeong, J. E., Lee, S. Y., Park, A. K. and Wi, Y. M. (1990) Studies on the extraction quantities of the specific components of crude drug preparations based on prescription (IV) - Studies on the analytical method of *Rehmanniae Radix Preparata* and its crude drug preparations. *The Report of National Institute of Health.* **27**: 326-331.
17. Hwang, B. Y., Kim, M. S., Won, D. H., Kang, S. B., Lee, S. D., Jo, J. H., Kang, S. J., Chi, H. J., Choi, W. H., Ro, J. S. and Lee, K. S. (1997) Studies on the standardization of *Sukjiwhang*. *Chungbuk J. Pharm. Sci.* **12**: 29-37.
18. 식품의약품안전청 (2008) 대한약전 제9개정, 969-970. 신일북스, 서울.
19. 식품의약품안전청 (2008) 대한약전 제9개정, 1125. 신일북스, 서울.
20. 식품의약품안전청 (2008) 대한약전 제9개정, 942. 신일북스, 서울.

(2010년 1월 23일 접수)