한약재 품질표준화 연구사업단

대황(大黃)

Rhei Radix et Rhizoma

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

생약연구과

○ 한글명(한자명) : 대황(大黃)

○ 영　　명 : Rhubarb

○ 라 틴 명 : Rhei Radix et Rhizoma

○ 기원식물 : 장엽대황(掌葉大黃) *Rheum palmatum* Linne, 탕구트대황 *R. tanguticum* Maximowicz ex Balf. 또는 약용대황(藥用大黃) *R. officinale* Baillon(여뀌과 Polygonaceae)의 뿌리 및 뿌리줄기로서 주피를 제거한 것이다.

○ 약용부위 : 뿌리

1. 성상

이 약은 뿌리 및 뿌리줄기로 달걀모양, 긴 달걀모양 또는 원기둥모양이며, 때로 가로 및 세로로 잘려서 다듬어져 있으며, 길이 5 ~ 15 cm, 지름 4 ~ 10 cm이다. 바깥쪽은 껍질이 거의 벗겨져 있다. 피부의 대부분이 제거된 것은 바깥면이 황갈색 ~ 연한 갈색이고 흰색의 가는 그물눈 모양을 보이며, 질은 치밀하고 단단하다. 코르크층이 남아 있는 것은 바깥면이 어두운 갈색 또는 흑적색을 띠고 주름이 있으며, 질은 거칠면서 무르다. 이 약의 횡단면은 섬유성이 아니며, 연한 회갈색 또는 갈색이고, 흑갈색에 흰색, 연한 갈색이 뒤섞인 복잡한 무늬가 있으며, 이 무늬는 형성층 부근에서 때로 방사상을 이룬다. 안쪽의 수에는 지름 1 ~ 3 mm의 갈색의 작은 원의 중심에서 방사상을 이루는 선문과 같은 조직으로 되어 있고 이 조직은 고리모양으로 배열되거나 또는 불규칙하게 흩어져 있다. 이 약의 횡단면을 현미경으로 볼 때 장엽대황(掌葉大黃)은 뿌리줄기의 코르크층과 피부가 대부분 제거되었지만 부분적으로 남아있을 때도 있다. 사부수선은 3 ~ 4 열이며 비교적 곧고 안에는 갈색 물질이 들어있다. 형성층은 납작한 세포로 되어있다. 목부수선은 비교적 촘촘하고 2~4열의 세포로 되어있으며 그 안에는 진한 갈색물질이 들어있다. 도관은 드물고 성글며 중앙을 향하여 배열한다. 수부는 넓고 주로 유세포로 되었으며 다수의 이형유관속이 하나의 울타리 속에 들어 있거나 또는 흩어져 있다. 이형유관속은 형성층이 고리모양이고 중앙에는 사부가 있으며 형성층 근처에는 점액강이 보일 때가 있고 형성층의 바깥쪽에는 목부가 있으며 수선은 별모양으로 뻗어나고 그 안에는 진한 갈색물질이 들어있다. 유세포에는 전분립이 많이 들어 있고 대형의 옥살산칼슘 집정도 들어있다. 탕구트대황은 뿌리줄기의 사부수선이 2 ~

3 열이고 물결 모양으로 구부러졌으며 사부에는 점액강이 많고 동심성의 고리를 이루어 배열하며 목부수선이 없고 성점안에는 점액강이 많다. 약용대황(藥用大黃)은 뿌리줄기의 사부수선이 1 ~ 2 열이고 곧으며 사부에는 점액강이 없고 목부수선도 없으며 성점 안에도 점액강이 없다.

Fig.1 약재 (출처 : 한약재관능검사해설서)

2. 기원

한국, 중국, 일본의 공정서를 비교한 결과를 아래 표에 나타내었다.

Table1. KP11, CP2015, JP16 official compendium

구분	생약명	기원	함량기준
KP11	Rhei Radix et Rhizoma	*Rheum palmatum* Linné, *Rheum tanguticum* Maximowicz ex Balf. *Rheum officinale* Baillon	sennoside A 0.25 % 이상, aloe emodin-8-O-β-glc + emodin + rhein + chrysophanol + physion 의 합 1.5% 이상
CP2015	Rhei Radix et Rhizoma	*Rheum palmatum* L *Rheumta nguticum* Maxim. ex Ba!f, *Rheum officinale* Baill.	sennoside A 0.25 % 이상, aloe emodin-8-O-β-glc + emodin + rhein + chrysophanol + physion 의 합 1.5% 이상
JP16	Rhei Rhizoma	*Rheum palmatum* Linné, *Rheum tanguticum* Maximowicz ex Balf. *Rheum officinale* Baillon *Rheum coreanum* Nakai	sennoside A 0.25 % 이상

3. 한방에서의 용도

효능은 체내에 과다하게 축적되어 있는 열을 내리므로 피부반진·변비·혈압 상승을 치료하고 안구 충혈과 동통을 치료한다. 소량 복용하였을 때에는 건위 소화작용을 보이지만 1회 4 g 이상을 복용하면 설사를 일으키게 된다. 또한, 이질초기증상에도 쓰이며, 열로 인한 토혈·코피·급성황달에도 유효하고, 피부의 종기가 발열·동통·발적이 심한 증상, 그리고 탕화상 등에 널리 활용된다. 또한, 충수돌기염의 초기증상에 현저한 치료반응을 나타내고, 어혈성으로 인한 월경불통, 적취증가에도 활용된다.

4. 성분분리 연구

(1) 국내·외 연구 현황

한국에서 재배되는 대황은 종대황으로 *R. undulatum* L.의 뿌리줄기이다. 대황의 성분은 주로 anthraquinone 유도체, dianthrone 배당체인 sennoside, phenol 유도체, chromone 배당체, tannin 및 관련 화합물, stilbene 배당체, naphthalene 배당체, phenylbutane 배당체 등에 대해 연구되었다.

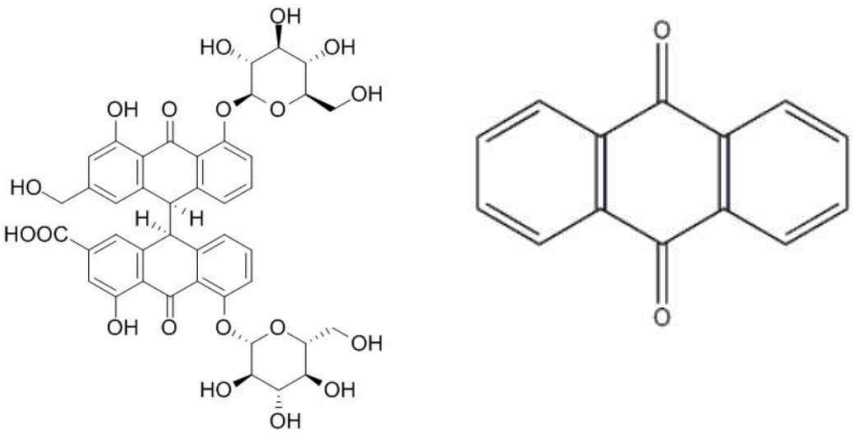


Fig2. 대황의 주요성분(sennoside, anthraquinone)

(2) 성분 분리 및 동정

가. 시료 정보

Table2. Sample information

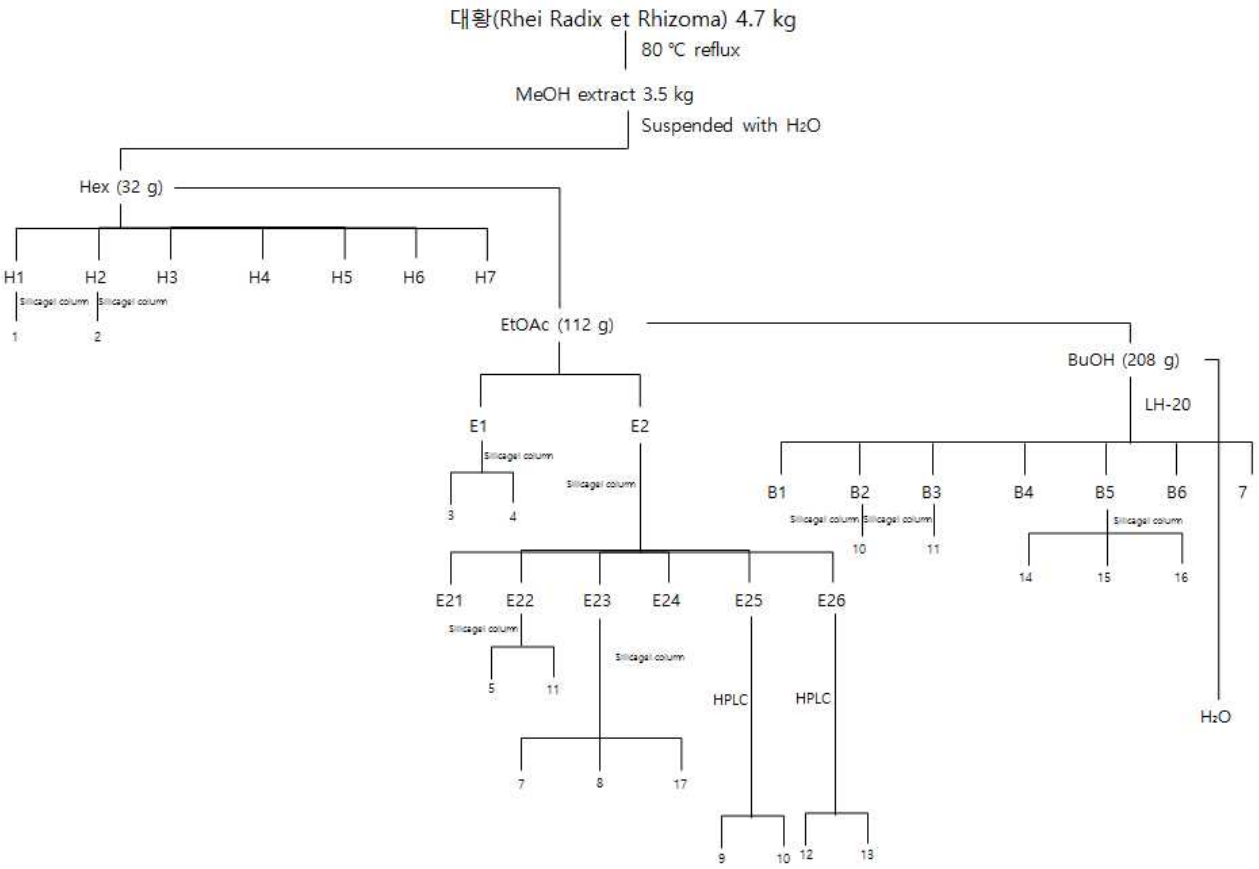
생약명	기원식물학명	산지	형태
대황	*Rheum palmatum* L. *Rheum tanguticum* Maxim. *Rheum officinale* Baillon	한국산	뿌리

나. 대황 추출물 제조

대황 4.7 kg을 메탄올로 80℃에서 3번 환류 추출하여 대황 추출물을 제조하였다.

다. 성분 분리 과정

대황 4.7 kg에 메탄올을 가하여 80℃에서 3번 환류 추출한 후 여과하였다. 여과액을 40~45℃에서 감압 농축하여 메탄올 추출물 3.5 kg을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수 2 L에 현탁시킨 후 hexane, EtOAc 및 BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물들을 농축하여 hexane 분획물 (32 g), EtOAc 분획물 (112 g), BuOH 분획물 (208 g) 및 H_2O 분획물을 얻었다. Hexane 분획물을 column chromatography을 이용하여 7개의 세분획으로 나누었고, 다시 silica gel column을 이용하여 2개의 화합물을 분리하였다. EtOAc 분획물을 column chromatography을 이용하여 2개의 세분획으로 나누었고, silica gel column 및 HPLC를 이용하여 9개의 화합물을 분리하였다. BuOH 분획물을 LH-20을 이용하여 7개의 세분획으로 나누었고, silica gel column을 이용하여 6개의 화합물을 분리하였다.



scheme 1. 대황 추출 분획 및 분리도

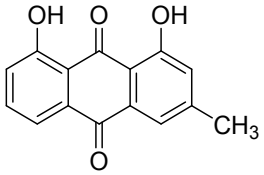
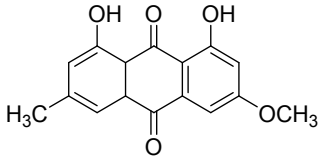
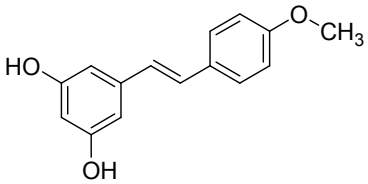
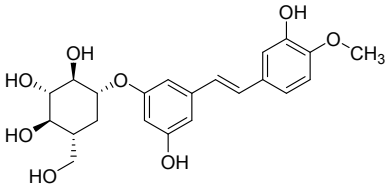
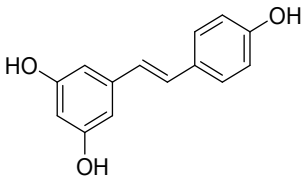
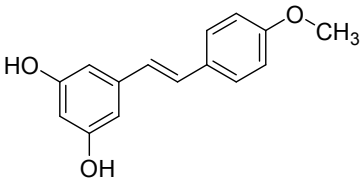
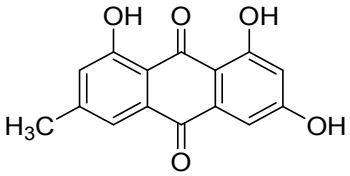
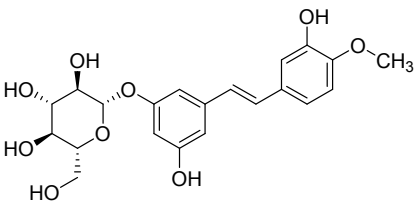
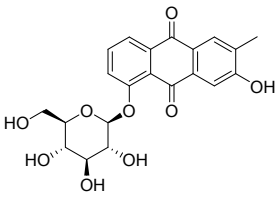
라. 성분 분리 현황

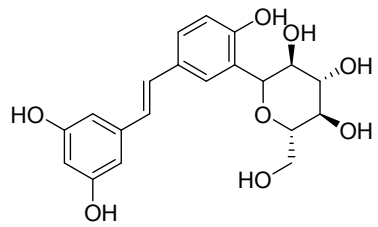
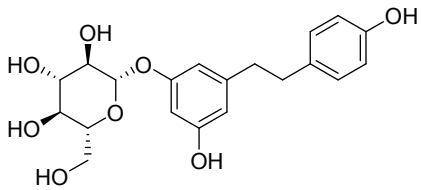
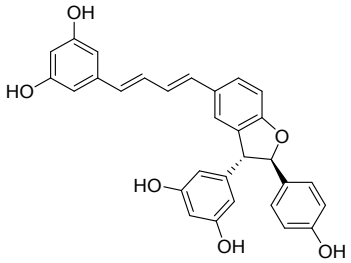
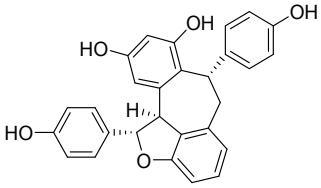
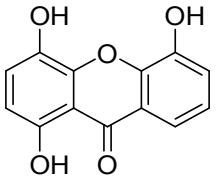
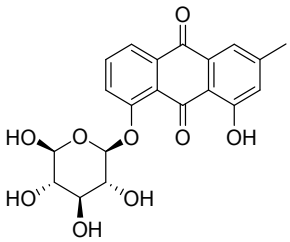
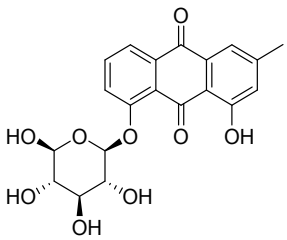
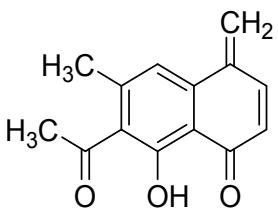
Table3. Component segregation status

물질명	분리량 (mg)	비고
chrysophanol (1)	804	-
physcion (2)	402	-
desoxrhapontincin (3)	602	-
rhaponticin (4)	650	-
resveratrol (5)	400	-
desoxyrhapontigenin (6)	962	-
emodin (7)	350	분석법 검토, 효능검색
rhapontigenin (8)	204	분석법 검토, 효능검색
chrysophanol-8-*O*-*β*-glc (9)	320	-
piracetannol-3`-*O*-*β*-glc (10)	306	-
piceid (11)	5	-
ε-Viniferin (12)	2	-
ampelopsin B (13)	3	-
Isorhaponticin (14)	402	-
emodin-8-*O*-*β*-glc (15)	9	분석법 검토, 효능검색
aloe emodin-8-*O*-*β*-glc (16)	102	-
2-Methoxy-stypandrone (17)	50	-

마. 분리 성분의 화학구조

Table4. Chemical structure

구조	화합물명 (compound number)
	chrysophanol (1)
	physcion (2)
	desoxrhapontincin (3)
	rhaponticin (4)
	resveratrol (5)
	desoxyrhapontigenin (6)
	emodin (7)
	rhapontigenin (8)
	chrysophanol-8-*O*-*β*-glc (9)

	piracetannol-3`-*O*-*β*-glc (10)
	piceid (11)
	ε-viniferin (12)
	ampelopsin B (13)
	isorhaponticin (14)
	emodin-8-*O*-*β*-glc (15)
	aloe emodin-8-*O*-*β*-glc (16)
	2-methoxy-stypandrone (17)

바. 성분 분리 결과

대황으로부터 chrysophanol (1), physcion (2), desoxrhapontincin (3), rhaponticin (4), resveratrol (5), desoxyrhapontigenin (6), emodin (7), rhapontigenin (8), chrysophanol-8-*O*-*β*-glc (9), piracetannol-3`-*O*-*β*-glc (10), piceid (11), ε-viniferin (12), ampelopsin B (13), isorhaponticin (14), emodin-8-*O*-*β*-glc (15), aloe emodin-8-*O*-*β*-glc (16), 2-methoxy-stypandrone (17) 등 총 17개의 화합물을 분리하였고 분광학적 방법을 이용하여 화합물의 구조를 동정 하였다.

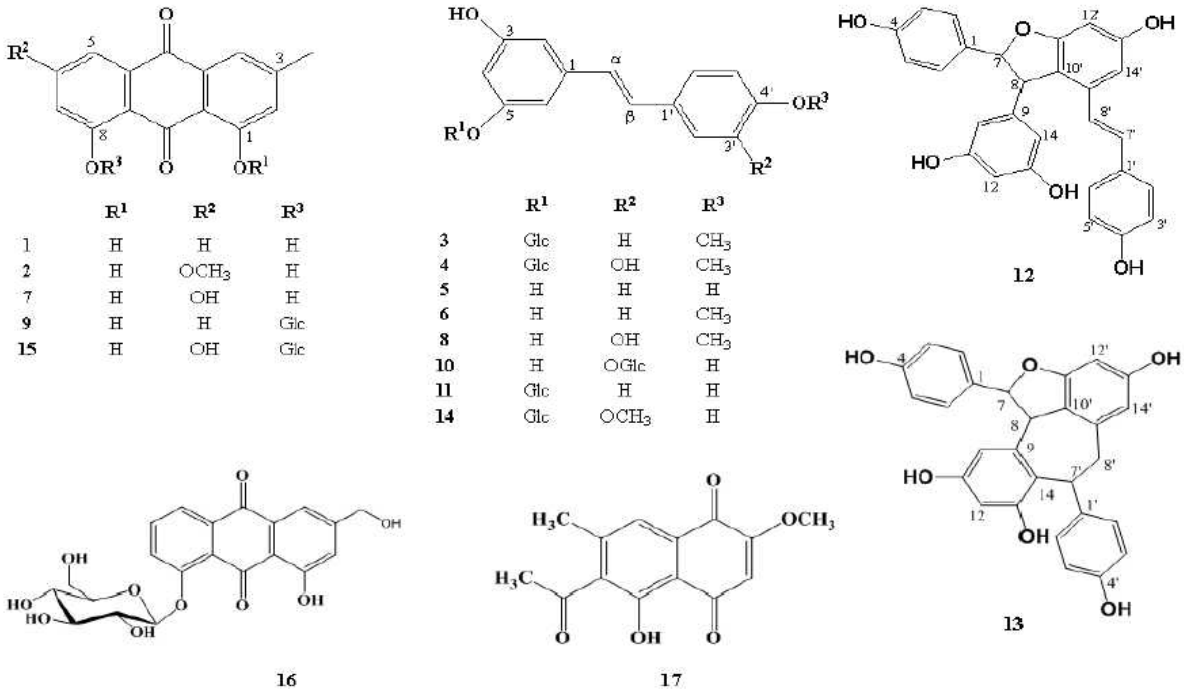


Fig3. Chemical structure

사. 지표성분 및 내부표준물질 선정

대계의 성분 중 함량이 많고 활성원인물질로 생각되어지는 네 개의 화합 sennoside A, rhaponticin (4), emodin (7), emodin-glucoside (15) 을 지표물질로 선정하였다.

5. 분석법 연구

(1) 연구수행 방법 및 연구내용

가. 수집시료 및 감별

종대황은 대황과 형태와 성분이 다르므로 대황으로 사용하여서는 안된다. 건조된 약재로 유통시에 대황, 종대황 및 양제근은 뿌리가 절단되므로 정확한 약재선별에 어려움이 있었으나, 본 연구에서 유전자 분석으로 이들을 효율적으로 구분하였다. 따라서 개발된 대황의 선별마커는 약재의 위품판별의 활용가치를 높여줄 것으로 사료된다. 한편, 장엽대황, 당고특대황, 약용대황의 유전자 분석결과 각각의 식물은 서로 혼종되어 속간 구분에 한계가 있었다.

나. 분석대상 성분

대황 시료 100 mg을 취하여 굵은 가루로 만든 다음 질량을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 1% v/v eugenol의 메탄올용액(내부표준액) 200 uL를 가한 후 70 % ethanol로 표선을 채웠다. 용액을 60분 초음파로 처리하여 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가하였다.

(2) 연구결과

가. TLC 분석법 개발

① TLC 분석

30개의 대황 추출시료와 종대황의 지표물질인 rhapoticin을 TLC판에서 ethyl acetate-methanol-water-acetic acid 혼합액(100:18:2:0.1, v/v/v/v)를 전개용매로 전개하였다. rhapoticin은 Rf 값 0.57에서 뚜렷한 적갈색을 나타내었다. 동일한 대황시료를 지표물질인 sennoside A와 함께 ethyl acetate- isopropano-water 혼합액(4:4:2, v/v/v)을 전개용매로 전개하였을 경우 sennoside A는 Rf 값 0.54에서 붉은색의 반점을 나타내었다.

Table.5 TLC condition

extracts	Mobile phase	Detection	TLC plate
(1) extract (2) rhapoticin	Ethyl acetate : MeOH : water : acetic acid (100 : 18 : 2 : 0.1)	UV	Normal (Silica)
(1) extract (2) sennoside A	Ethyl acetate : isopropano : water (4 : 4 : 2)	UV	Normal (Silica)

나. HPLC 분석법 개발

① 대황 추출법 최적화

대황 시료 100 mg을 취하여 굵은 가루로 만든 다음 질량을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 1% v/v eugenol의 메탄올용액(내부표준액) 200 ul를 가한 후 70% ethanol로 표선을 채웠다. 용액을 60분 초음파로 처리하여 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가하였다.

Table6. The optimal condition of sample preparation

Extracting method	Solvent	Time
sonication	70% EtOH	60 min

② 시료제조 방법

추출액 시료 1 mL를 미리 무게를 측정한 에펜도르프 튜브에 넣고 Techne사(England)의 모델명 FSC4000D 증발기에서 질소기류를 통하면서 수분을 증발시킨 후 잔류물의 무게를 측정하여 전탕용수 mL 당 총 추출량으로 하였다.

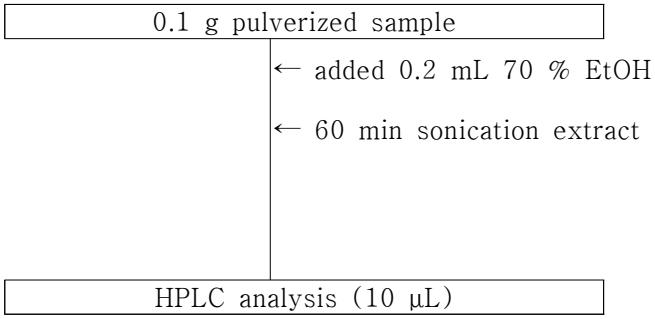


Fig4. Overall analytical procedures of extracts

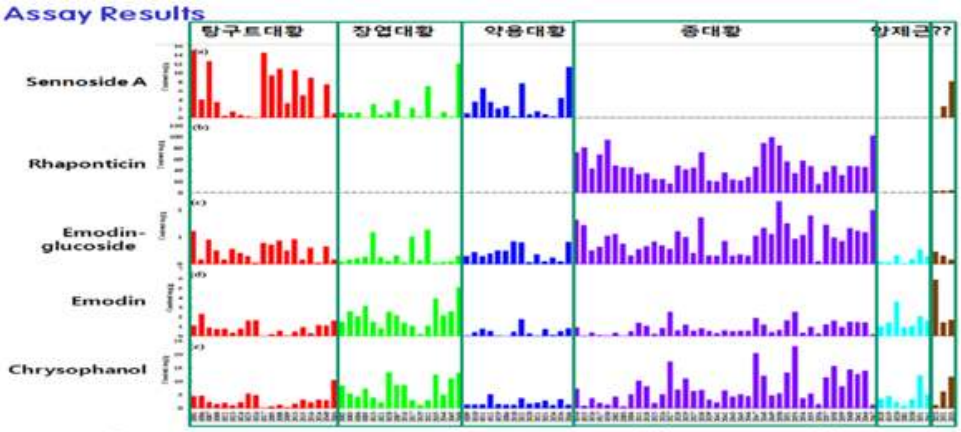
③ 분석조건

Table6. HPLC analysis condition

Mobile phase	A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile-
Detector	UV 280 nm
Column	Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate	0.45 mL/min
Column temp.	30 ℃
Injection volume	10 μL
Gradient (기울기용리, B%)	0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B

다. 함량 모니터링 및 통계

52점의 대황 시료로부터 sennoside A, emodin, chrysophanol 을 eugenol을 internal standard로 하여 분석하였다. 분석결과 sennoside A, emodin, chrysophanol의 평균 함량은 각각 3.87±4.27 mg/g, 1.25±1.23 mg/g, 4.05±3.58 mg/g로 나타났으며, 세 지표성분 sennoside A, emodin, chrysophanol의 총합량은 8.72±4.93 mg/g이었다. 각 지표성분별 소정의 방법으로 함량 기준을 정했을 경우 sennoside A는 0.016%이나 emodin과 chrysophanol은 설정이 불가하였다. 세 지표성분의 합함량을 기준으로 설정할 경우 0.24%가 적당할 것으로 판단되었다.



Distribution of the contents of (a) sennoside A, (b) rhaponticin, (c) emodin-glc, (d) emodin and (e) chrysophanol for 98 rhubarb samples

Fig5. Distribution of the contents

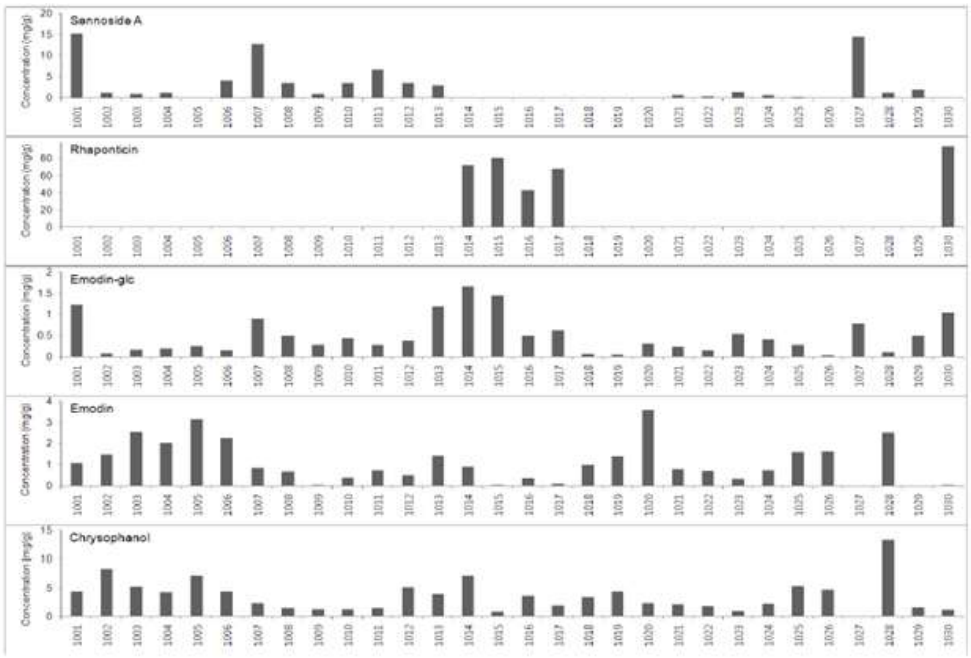


Fig6. The content of maker compounds in the samples

라. 대황의 패턴분석

표본의 수가 너무 작은 양제근과 호장근을 제외하고 패턴분석을 시도하였다. 5개의 지표성분을 이용할 경우 분류는 이루어지지 않았으며, 지표성분 5가지를 포함하여 추가로 공통특성을 갖는 피크를 선별하고 분석한 결과 주성분분석과 군집분석에서 종대황과 그 외의 종분류는 명확하게 이루어져 원산지의 분류는 가능하였다. 시료를 이루는 종내의 개수가 적은 문제는 있으나 LDA와 PLS-DA에 의하여 판별분석을 시도한 결과 판별의 정확도가 80%이상으로 높게 나타나 시료의 수와 지표성분의 수를 증가시키면 종의 판별도 가능하리라 판단되었다.

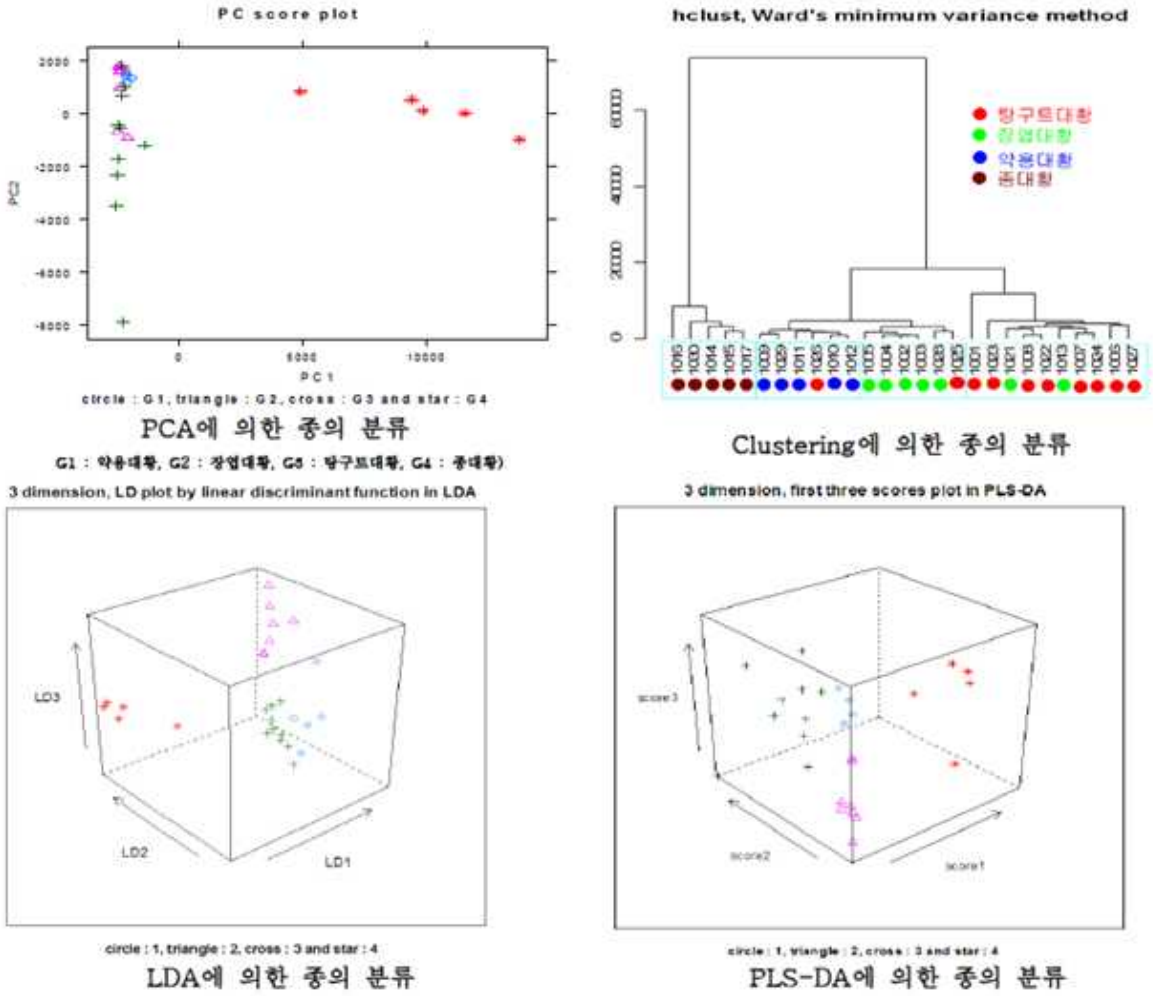


Fig7. PCs score plot by PCA and dendrogram by Clustering

1. 산지 분류

국산 6점, 중국산 22점 및 산지의 기원을 모르는 70점으로 구성된 대황 표본의 원산지 분류에 있어서 선형판별분석법을 이용하여 분석하였다. 5개의 marker compound를 이용하여 분석한 결과 판별의 정확도는 약 93%로 나타났으며, 반면에 5개의 marker compound에 해당하는 피크를 포함하여 17개의 공통피크를 이용하여 분석하였을 경우 판별의 정확도는 100%로 나타났다. 산지별 특성은 LDA에 의하여 뚜렷하게 구별어질 것으로 판단되었다.

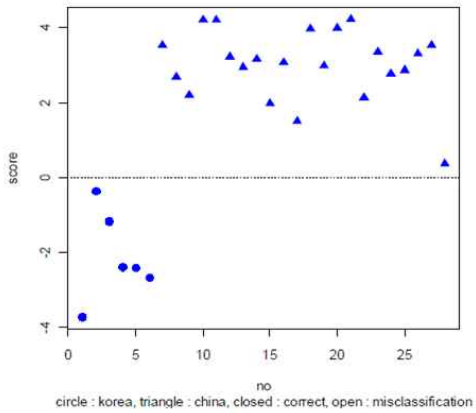
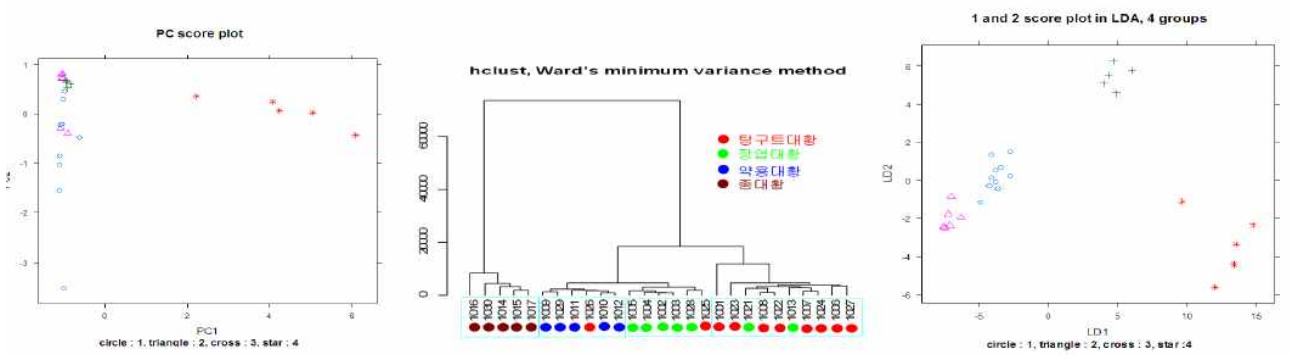


Fig8. Score plot for discrimination of origin by LDA

2. 종 분류

전체 시료 98점 중 종을 아는 27점을 training set으로 하여 분석한 후 나머지 종을 모르는 미지정 시료 71점을 testing set으로 종을 예측·판별하였다. 탕구트대황을 제1종, 장엽대황을 제2종, 약용대황을 제3종, 종대황을 제4종으로 하여 종별 패턴분석을 시행하였으며, 다양한 통계적 분석방법을 이용하여 비교분석하였다. PCA와 군집분석을 이용하여 분석할 경우 종대황의 분류는 가능하나 그 외의 종들은 종들 간의 특성이 유사하여 분류하기에는 어려움이 있는 것으로 판단되었다. LDA를 이용하는 경우 높은 판별의 정확도를 보였으나 사용된 변수에 비해 검체의 개수가 충분하지 않은 것으로 판단되어 과적합(overfitting)의 발생가능성을 배제할 수 없었으며, 검체의 개수를 늘인다면 종의 분류에서 다른 방법들에 비해 분류가능성이 가장 높은 분석방법으로 판단되었다.



PCA에 의한 종의 분류　　군집분석에 의한 종의 분류　　LDA에 의한 종의 분류

Fig8. Group species

마. 대황의 함량(%) 규격 설정

Table7. Content of standard settings

Compound	mean	SD	RSD	규격함량
sennoside A	0.387	0.427	110.3	0.016
emodin	0.125	0.123	98.6	설정불가
chrysophanol	0.405	0.358	88.5	설정불가
세 지표성분 합	0.872	0.493	56.6	0.24

6. 약리활성 연구

1. 신경 퇴행성 질환 효능연구

당고특대황의 물추출물(30-100 μg/mL) 및 에탄올추출물(6-10 μg/mL), 약용대황의 물추출물(3-10 μg/mL) 및 에탄올추출물(3-10 μg/mL), 종대황의 물추출물(3-6 μg/mL) 및 에탄올추출물(3-6 μg/mL), 장엽대황은 물추출물(3-6 μg/mL) 및 에탄올추출물(3-6 μg/mL)은 dopamine 함량을 증가시킨다.

2. 간보호 활성

대황의 70% 에탄올추출물과 물추출물은 CCl_4 로 유도된 간세포 독성 억제 효과를 나타내는데, 활성성분인 chrysophanol-8-O-Glc, emodin, rhaponticin, resveratrol, isorhaponticin, desoxyrhaponticin는 CCl_4 유도 간세포 독성을 현저히 억제시킨다.

3. 위염 및 위궤양 활성

(1) Helicobacter pylori 균에 대한 항균 효과

대황의 70% 에탄올추출물 100 μg/㎖, 약용 대황의 70% 에탄올추출물 50 μg/㎖, 장엽대황의 70% 에탄올추출물 및 물추출물 각각 50, 100 μg/㎖에서 H.pylori균에 대한 항균작용을 확인하였고, rhaponticin, rhapontigenin, piracetannol-3′-O-glc은 10 μM/㎖에서 H. pylori균에 대한 항균작용을 한다.

(2) Acid neutralizing capacity

70% 에탄올추출물 및 물추출물에서 대황, 양제근, 약용대황, 장엽대황, 종대황은 제산력을 억제시킨다. Emodin, resveratrol, isorhaponticin, rhaponticin, rhapontigenin, physcion, chrysophanol-8-O-glc, desoxyrhapontigenin, 2-methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-glc, piracetannol-3′-O-glc, chrysophanol, sennoside A, sennoside B, desoxyrhaponticin에서 제산력의 억제작용을 한다.

(3) HCl · ethanol induced gastritis

70 % 에탄올추출물 및 물추출물 500 mg/kg에서 대황은 각각 91.8, 45.6 %, 양제근은 73.2, 43.3 %, 약용대황은 49.5, 53.8 %, 장엽대황은 75.6, 65.0 %, 종대황은 48.6, 71.0%로 gastric lesion을 억제한다. 대황의 위염 보호작용은 항산화작용과 H.pylori균에 대한 항균작용 및 제산력 억제작용에 기인한다.

4. 항염 효능 결과

(1) 대황 물추출물 70%, 에탄올추출물 70%

대황의 70% 에탄올추출물은 LPS 유도된 RAW 264.7 macrophages에서 NO 생성을 억제하고. EMSA로 NF-kappaB DNA binding affinity 를 억제함을 확인하였고, COX-2, iNOS 등의 염증 매개인자의 단백질 발현을 억제였다.

(2) 대황의 단일 화합물

대황의 6가지 anthraquinone 계열 화합물 중 aloe-emodin, emodin, rhein 이 높은 NO 생성 억제효과를 보였으며, chrysophanol 과 phscion 도 약간의 NO 생성 억제 효과를 보였다. 6 가지 anthraquinone 화합물의 iNOS, COX-2 protein 발현 억제 효과를 확인하였다. 종대황의 7가지 stilbene 계열 화합물 중 rhaponticin, desoxyrhapontigenin, resveratrol, desoxyrhaponticin 이 NO 생성 억제 효과를 보였으며, desoxyrhapontigenin 과 desoxyrhaponticin의 NF-κB 억제 효과와 iNOS, COX-2 protein 발현 억제 효과를 확인하였다.

(3) 대황의 기본생약과 비교생약의 in vivo 항급성염증 동물실험 : 50, 250 mg/kg에서 농도의존적으로 족 부종 감소하였다.

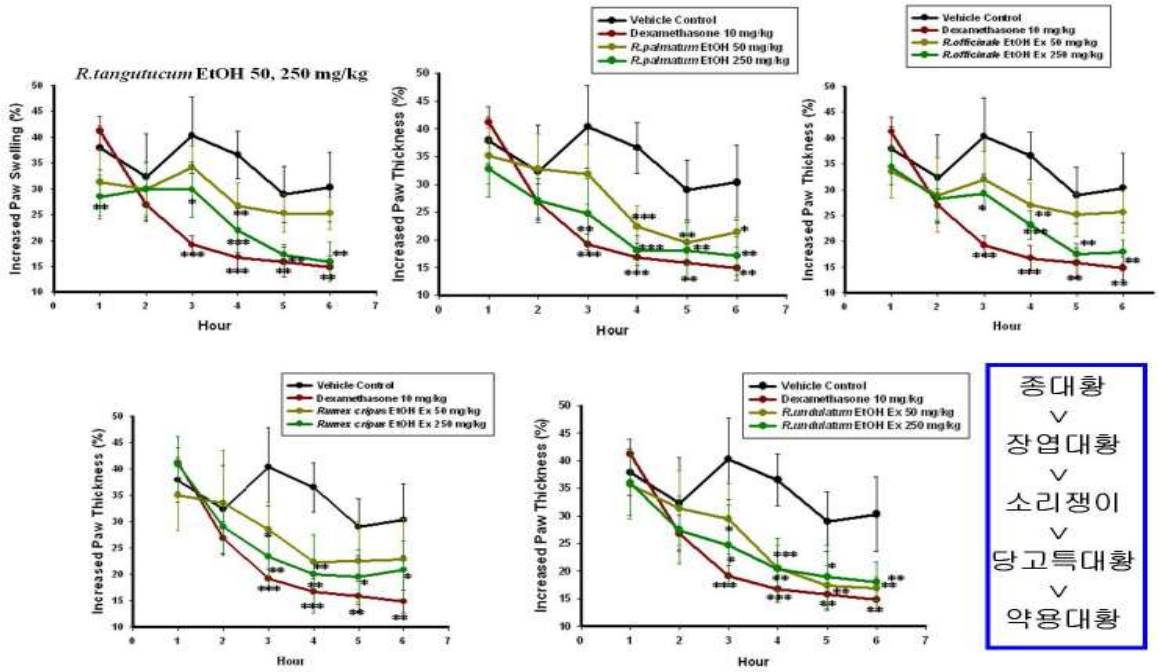


Fig9. Density dependent

5. 항알러지 효능 검색 및 약리효과 규명

대황은 in vitro에서 5-LOX와 hexosaminidase release를 억제하였다. 대황 에탄올추출물의 hexosaminidase release 저해능에 대한 IC50는 180.1 ug/mL로 나타나, 우수한 항알러지 활성을 보유함을 확인하였다. 종대황의 성분 중 stilbene계 물질들인 desoxyrhapontogenin 및 resveratrol등의 물질들에서 5-LOX 저해능과 hexosaminidase 분비저해능을 보였다. 대황의 anthraquinone 유도체들에서는 emodin이 유의성있게 5-LOX와 hexosaminidase 분비를 억제하였다. Emodin의 hexosaminidase release에 대한 IC50 값은 7 uM로 나타났다.

6. 항암 활성

HCT 116-xenograft nude mouse model에서 chrysophanol-8-O-Glc는 농도 의존적으로 tumor 성장을 억제 하였다. 약물 투여에 따른 피부나 몸무게 변화 등 다른 부작용은 관찰되지 않았다. 사람 대장암 HCT 116세포에서 chrysophanol-8-O-Glc IC50는 9.87 mg/mL로, G2/M phase arrest를 나타내었다.

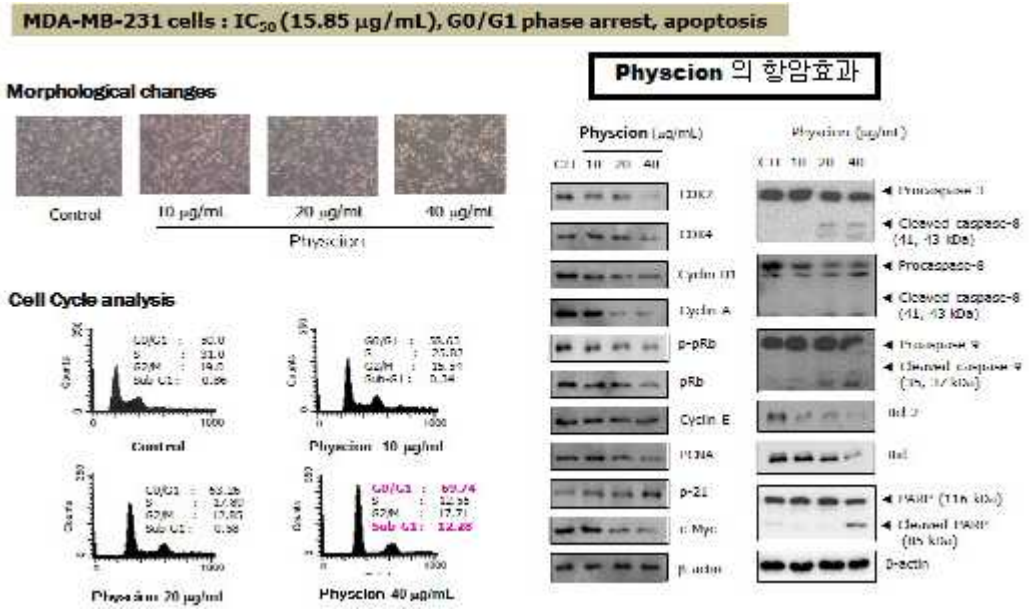


Fig10. Anticancer of physcion

사람 유방암 MDA-MB-231세포에서 physcion IC50는 15.85 mg/mL로, G0/G1 phase arrest와 apoptosis를 나타내었다.

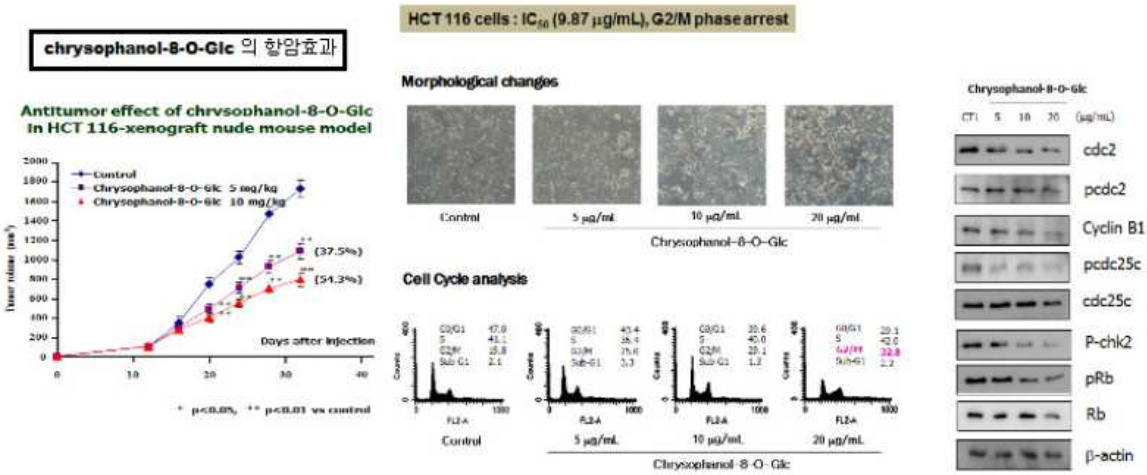


Fig11. Anticancer of chrysophanol-β-O-Glc

Table8. Synthesis of compounds activity

구분	화합물	효능
대황	2-Methoxy-4-hydroxyanthraquinone-5-O-Glc	위염 보호 작용, 항관절염, 항골다공증
	Emodin	신경 교세포 활성, 간보호 활성, 항염증, 항알러지
	Physcion	기억력 개선, 항관절염, 항암, 항골다공증
	Chrysophanol	혈소판 응집 억제
	Chrysophanol-8-O-glc	간보호 활성, 출혈시간 지연 효능, 항암
종대황	Rhaponticin	간보호 활성, 위염 보호 작용, 항염증
	Isorhaponticin	간보호 활성, 위염 보호 작용
	Rhapontigenin	-
	Desoxyrhaponticin	간보호 활성, 항염증
	Desoxyrhapontigenin	신경 교세포 활성, 간보호 활성, 항염증, 항암
	Resveratrol	신경 교세포 활성, 간보호 활성, 항염증, 항관절염, 항암
	Piracetannol-3`-O-glc	-

7. 최신 연구 동향

- 최근 5년(2011 ~ 2016)간 보고된 논문

구분	제목	주요내용
약리·독성	Lipoxygenase Inhibitory Constituents from *Rhubarb*. (참고문헌 3)	Lipoxygenase 저해성분
	The Effects of *Rheum palmatum* L. on the Pharmacokinetic of Major Diterpene Alkaloids of Aconitum carmichaelii Debx. in Rats. (참고문헌 4)	부자 알칼로이드의 약동학에 미치는 영향
	Rheum palmatum L. Attenuates High Fat Diet-Induced Hepatosteatosis by Activating AMP-Activated Protein Kinase. (참고문헌 5)	지방간 조절작용
	Deoxyrhapontigenin, a Natural Stilbene Derivative Isolated From *Rheum undulatum* L. Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. (참고문헌 6)	항암작용(ER 스트레스 관련 유방암 세포사멸 유도)
	Association of a Methanol Extract of R*heum undulatum* L. Mediated Cell Death in AGS Cells with an Intrinsic Apoptotic Pathway. (참고문헌 7)	항암작용
	The Apoptotic Effect of the Hexane Extract of *Rheum undulatum* L. in Oral Cancer Cells through the Down-regulation of Specificity Protein 1 and Survivin. (참고문헌 8)	항암작용(Sp1 및 survivin 저해관련 구강암 세포사멸 효과)

1) 대황에서 리폭시게나아제 억제 구성성분 확인

연구방법 : 건조된 대황을 에탄올추출하여 hexane, EtOAc, BuOH로 분획을 나눈 후 15개의 화합물을 분리하여 분광학적인 방법을 통해 구조를 동정한 후 ABTS assay를 측정하였다.

연구결과 : 대황 에탄올 추출물로부터 얻은 EtOAC 및 BuOH 분획물은 lipoxygenase를 저해(IC_{50} values of 26.7 and 42.9 g/mL)하는 것으로 나타난 반면, hexane 분획물은 저해활성이 나타나지 않았다. Lipoxygenase의 저해율을 측정한 결과, 1, 2, 7, 9, 15번의 anthraquinones 화합물은 저해활성이 나타나지 않았으나, stillbenes 화합물인 3, 6, 8, 12, 14번 화합물은 IC_{50} = 6.7 ~ 74.1 uM의 저해율을 나타내었다. 한편, 양성대조군인 baicalein 및 (+)-catechin은 IC_{50} = 3.4 uM 및 IC_{50} = 19.7 uM 저해율이 나타났다. 또한 stillbenes 화합물은 1.16 ~ 4.64 범위에서 ABTS 자유 라디칼 소거활성을 나타냈다.

결론 : 대황 유래 stillbenes 화합물은 lipoxygenase 저해활성을 나타내므로 항염증작용이 기대된다. (참고문헌 3)

2) 대황 뿌리 추출물속 테르펜 알칼로이드의 약동학적 효능

연구방법 : 12마리의 쥐에게 무작위로 대황추출물을 투여하였다. Fuzi 그룹에는 38.4 mg/kg를 경구투여하였고 Fuzi-Dahaung 그룹은 Dahuang anthraquinones을 76.8 mg/kg 투여하여 비교하였고, aconitine (AC), mesaconitine (MC), and hypaconitine (HC), benzoylaconine (BAC), benzoylmesaconine (BMC), benzoylhypaconine (BHC), and aconine (ACN)를 사용하여 UPLC Mass spectrometry method를 이용하였다.

연구결과 : AUClast of diester diterpene alkaloids (DDAs)는 58.20, 169.78, 278.48 ngh/mL for AC, MC, and HC의 수치로 대황그룹에서 나타났고, Fuzi group (71.62, 183.13, 410.59 ngh/mL for AC, MC, HC) 보다 낮게 나타난 점을 주목해야한다. CL/F는 HC와 결합 후 173.88 to 218.85 mL/h AC, 433.22 to 800.21 mL/h for MC, 1150.61 to 1307.30 mL/h으로 나타났다.

결론 : Fuzi diterpene의 알칼로이드는 약물 동태에 크게 영향을 주고 독성의 호환반응을 줄일 수 있다. (참고문헌 4)

3) 대황 추출물의 유방암 세포 억제 효과

연구방법 : 대황의 MeOH 추출물을 dichloromethane, ethyl acetate 등으로 분획을 진행한 후 HPLC를 이용하여 deoxyrhapontigenin을 분리하였고 NMR을 이용하여 구조동정을 하였다. 약의 저해율과 세포독성을 알아보기 위한 실험을 진행하였다.

연구결과 : 대황에서 분리한 stilbene 성분인 deoxyrhapontigenin(DR)은 autophagy 및 paraptosis 비의존적으로 유방암 세포사멸을 유도하였다. DR은 세포질의 소포체(ER)에서 유래하는 액포의 생성을 유도하였는데, 이러한 ER 스트레스는 DR을 처리한 인체 유방암세포에서 활성화되었다. 따라서 DR은 유방암 세포에서 ER 스트레스가 관여하는 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다.

결론 : 유방암 세포에 대한 DR의 세포독성 작용은 ER 스트레스 매개의 세포사멸 유도효과에 기인한다. (참고문헌 5)

4) 대황의 지방간 억제 효능

연구방법 : 간에 축적된 지방이 Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)의 공통대사장애를 나타내기 때문에 고지방에 의해 유발된 지방간의 포화상태에 따른 RP의 효과 메커니즘에 대해 알기 위하여 6주간 rats에게 대황을 경구투여하여 몸무게, 포도당 내성, 인슐린 내성, 간기능검사(TG)등을 측정하였다.

연구결과 : PCR을 통하여 lipogenic와 lipolysis 유전자들의 표현은 정량적 실시간으로 측정되었다. AMP-activated protein kinase(AMPK)를 Western blotting를 통해 acetyl-CoA를 이용하여 인산화를 측정하였고, 몸무게의 감소 혈당량 감소 등을 확인하고 과도한 지방 축적을 줄여 주고 간세포의 lipogenic 유전자 발현을 억제함을 확인하였다.

결론 : AMPK 및 ACC의 인산화 증대 관찰을 통해 low-dose RP는 최소한 부분적으로 활성화된 활동을 촉진함으로써 HER을 최소화할 수 있음을 확인하였다. (참고문헌 6)

5) 대황의 추출물과 AGS세포와의 연관

연구방법 : MERL의 항암 효과를 조사하는데 AGS 세포에 다양한 농도의 MERL과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)assays를 진행하여 미토콘드리아의 막전위(MMP), 카스파아제 분석을 하였다.

연구결과 : 대황의 메탄올 추출물은 AGS세포의 증식을 억제한다. 추출물은 pro-caspase-8 과 pro-caspase - 9를 감소하게 하고 caspase-3을 증가하게 만든다. 또한 (tBid)과의 Bcl2 대항제인 (Bax)단백질을 감소시켜서 B 세포의 림프종 량을 감소시켜 미토콘드리아가 안정화 된다.

결론 : 세포 사멸은 대황의 메탄올 추출물이 매개 역할을 하면서 AGS세포 중의 경로를 통해 세포가 사멸된다. (참고문헌 7)

6) 대황추출물의 암세포 사멸 효과

연구방법 : 인체 구강암 세포인 HN22 및 SCC15 세포주에 대한 증식억제(MTT assay) 및 세포사멸효과(FACS analysis)를 측정한다.

연구결과 : 대황의 hexane 분획물(HERL)은 구강암 세포주에서 세포생존율을 감소시키고, 세포사멸을 유도하였다. HERL은 세포사멸 유도 단백질인 Sp1 및 survivin을 저해함으로써 구강암 세포사멸을 유도하였다.

결론 : 구강암 세포에서 HERL의 세포사멸 유도작용은 Sp1 및 survivin 단백질 조절이 중요한 역할을 한다. (참고문헌 8)

8. 종합고찰

기원: 한국약전과 중국약전에는 *Rheum palmatum* Linne, *Rheum tanguticum* Maximowicz ex Balf., *Rheum officinale* Baillon를 기원식물로 하였고 일본약전에는 *Rheum palmatum* Linne, *Rheum tanguticum* Maximowicz ex Balf., *Rheum officinale* Baillon, *Rheum coreanum* Nakai를 기원식물로 한다.

성분:

- **anthraquinone 화합물** : chrysophanol (1), physcion (2), emodin (7), chrysophanol-8-*O*-*β*-glc (9), isorhaponticin (14), (15), aloe emodin-8-*O*-*β*-glc (16) 등이 분리되었다.
- **dianthrone 화합물** : sennoside 등이 분리되었다.
- **stilbene 화합물** : desoxrhapontincin (3), rhaponticin (4), resveratrol (5), desoxyrhapontigenin (6), rhapontigenin (8), piracetannol-3`-*O*-*β*-glc (10), piceid (11), ε-viniferin (12), ampelopsin B (13), 2-methoxy-stypandrone (17) 등이 분리되었다.

분석:

- 지표성분: 대황의 anthraquinone, dianthrone, stilbene의 성분중 주성분 sennoside A, rhaponticin (4), emodin (7), emodin-8-*O*-*β*-glc (15) 을 지표물질로 선정하였다.
- 정량분석: HPLC 분석방법을 이용하여 지표성분 4종에 대한 동시분석법을 설정하였다.

HPLC analysis condition

Mobile phase	A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile-
Detector	UV 280 nm
Column	Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate	0.45 mL/min
Column temp.	30 ℃
Injection volume	10 μL
Gradient (기울기용리, B%)	0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B

약리:

- 사하작용
  - 활성성분은 anthraquinone유도체이고 대표적인 성분으로는 sennoside이다. 대황은 대장에서 작용하는 사하제이며, 사하 효과는 sennoside 함량과 비례한다.

- 항미생물작용
  - Aloe-emodin은 herpes simplex virus type 2, type 3, 그리고 varicella-zoster virus, pseudorabies virus, influenza virus에 유효하다.
  - Emodin과 rhein은 human cytomegalovirus에 유효하다.
  - 대황의 물추출물은 hepatitis B virus polymerase를 저해한다.
  - 대황은 NADH dehydrogenase의 전자전달계 효소를 저해함으로서 Coryne bacterium diphtheriae, Bacillussubtilis, Yersinia pestis, Salmonella typhi, Streptococcus hemolyticus, Neisseria gonorrhea, Shigelladysenteriae 등의 성장을 저해하였다.

- 항균작용
  - 대표적인 항균효과를 나타내는 성분으로는 1,9-dihydroxyanthraquinone 유도체인 3-caroxyrhein, hydroxyaloe-emodin, hydroxy - emodin이다.
  - 대황의 에탄올추출물 및 ether추출물은 무좀균인 Tricophyton, Epidermophyton, Sporotrichum 등에 유효하며, 또한 Staphylococcus aureus 및 그 항생제 내성종에 대한 항생제의 항균 효과를 증강시킨다.

- 항암 및 항돌연변이작용
  - emodin의 복강내 투여는 생쥐의 mummary carcinoma를 45 % 이상 억제하였고, rhein 및 emodin은 murine melanoma를 76 % 및 73 % 억제하였다.
  - rhei, emodin 및 aloe-emodin은 murine leukemia p388을 이식한 생쥐의 생존일을 증가시켰고, Ehrlich ascite carcinoma와 leukemia L1210 를 억제하였다
  - palmatin, crysophanein 및 physcionin은 역시 암세포에 대한 세포독성을 나타낸다.

- 항염증작용
  - emodin과 rhein은 LPS로 유도한 iNOS의 활성을 저해한다.
  - emdin은 관절염에서 염증반을을 억제하며, 아토피성 피부염 모델에서 염증을 완화시킨다.

응용: 대장성사하, 소염성건위약, 변비에 의한 복통, 화농성종창 등

※ 별첨

(1) 대황의 지표성분 검토

(2) 대황의 분석 가이드라인

(3) 대황의 지표성분 표준품 제조 가이드라인

9. 참고문헌

1. 한약재 품질 표준화 연구 사업단 연구개발과제 최종보고서(2009~2011), 한약재 품질 표준화 연구 사업단

2. 대한민국약전 외 한약(생약)규격집

3. Ngoc TM, Minh PT, Hung TM, Thuong PT, Lee I, Min BS, Bae K. Lipoxygenase Inhibitory Constituents from *Rhubarb*. Arch Pharm Res. 2008 May;31(5):598-605.

4. Li Y, Li YX, Zhao MJ, Yuan A, Gong XH, Zhao MJ, Peng C. The Effects of *Rheum palmatum* L. on the Pharmacokinetic of Major Diterpene Alkaloids of Aconitum carmichaelii Debx. in Rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2016 Jun 29.

5. Yang M, Li X, Zeng X, Ou Z, Xue M, Gao D, Liu S, Li X, Yang S. *Rheum palmatum* L. Attenuates High Fat Diet-Induced Hepatosteatosis by Activating AMP-Activated Protein Kinase. Am J Chin Med. 2016;44(3):551-64.

6. Venkatesan T, Jeong MJ, Choi YW, Park EJ, El-Desouky SK, Kim YK. Deoxyrhapontigenin, a Natural Stilbene Derivative Isolated From *Rheum undulatum* L. Induces Endoplasmic Reticulum Stress- Mediated Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. Integr Cancer Ther. 2016 May 4.

7. Hong NR, Park HS, Ahn TS, Jung MH, Kim BJ. Association of a Methanol Extract of *Rheum undulatum* L. Mediated Cell Death in AGS Cells with an Intrinsic Apoptotic Pathway. J Pharmacopuncture. 2015 Jun;18(2):26-32.

8. Choi ES, Cho SD, Jeon JG, Cho NP. The Apoptotic Effect of the Hexane Extract of *Rheum undulatum* L. in Oral Cancer Cells through the Down-regulation of Specificity Protein 1 and Survivin. Lab Anim Res. 2011 Mar;27(1):19-24.

9. 한약재관능검사해설서 (대황 사진)

[별첨 1] 지표성분 검토

화학적 지표물질 제시	효능적 지표물질 제시 (약리학효능)	분석적 지표물질 제시 (함량기준 ug / g)	종합의견
sennoside A	-	0.25 % 이상	대황의 성분 중 함유량이 다른 성분보다 미량이지만 지표물질로 적합하다.
emodin-glucoside	-		지표성분으로써 필요함
emodin	신경 교세포 활성, 간보호 활성, 항염증, 항알러지	-	간 보호 활성과 항염증 활성이 뛰어남
rhaponticin	간보호 활성, 위염 보호 작용, 항염증	-	간 보호 활성과 항염증 활성이 뛰어남
결론	대황의 화학성분들이 효능이 뛰어나기 때문에 대황의 지표성분으로 적절하다고 판단.		

[별첨 2] 분석 가이드라인

<table>
<tr><th colspan="5">대황
(Rhei Radix et Rhizoma)</th></tr>
<tr><td rowspan="4">기원</td><td>약전</td><td>생약명</td><td colspan="2">기원</td></tr>
<tr><td colspan="2">대한약전 Rhei Radix et Rhizoma</td><td colspan="2">Rheum palmatum Linné,
Rheum tanguticum Maximowicz ex Balf.
Rheum officinale Baillon</td></tr>
<tr><td colspan="2">중국약전 Rhei Radix et Rhizoma</td><td colspan="2">Rheum palmatum L
Rheumta nguticum Maxim. ex Ba!f, Rheum officinale Baill.</td></tr>
<tr><td colspan="2">일본약전 Rhei Rhizoma</td><td colspan="2">Rheum palmatum Linné,
Rheum tanguticum Maximowicz ex Balf.
Rheum officinale Baillon
Rheum coreanum Nakai</td></tr>
<tr><td>지표 성분</td><td colspan="4">sennoside A, emodin-glucoside, emodin, rhaponticin</td></tr>
<tr><td>검액 제조</td><td colspan="4">대황 시료 100 mg을 취하여 굵은 가루로 만든 다음 질량을 정밀하게 달아 10 mL 용량플라스크에 넣고 1% v/v eugenol의 메탄올용액(내부표준액) 200 ul를 가한 후 70% ethanol로 표선을 채웠다. 용액을 60분 초음파로 처리하여 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가하였다.</td></tr>
<tr><td rowspan="6">분석 조건</td><td colspan="2">Detector (검출)</td><td colspan="2">UV 280 nm</td></tr>
<tr><td colspan="2">Column (분리관)</td><td colspan="2">Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Flow rate (유속)</td><td colspan="2">0.45 mL/min</td></tr>
<tr><td colspan="2">Column temperature (컬럼온도)</td><td colspan="2">30 °C</td></tr>
<tr><td colspan="2">Injection volume (주입량)</td><td colspan="2">10 μL</td></tr>
<tr><td colspan="2">Mobile phase (이동상용매)</td><td colspan="2">A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile−</td></tr>
<tr><td colspan="2">Gradient (기울기용리, B%)</td><td colspan="2">0 min, 20% B; 10 min, 20% B; 18 min, 30% B; 25 min, 100% B−</td></tr>
<tr><td rowspan="2">함량 평균치</td><td colspan="2" rowspan="2">총 52점</td><td colspan="2">sennoside A + emodin + chrysophanol</td></tr>
<tr><td colspan="2">0.24 %</td></tr>
<tr><td rowspan="2">함량 제안</td><td colspan="3">공정서 기준</td><td>함량제안</td></tr>
<tr><td>KP</td><td>CP</td><td>JP</td><td>KP</td></tr>
<tr><td>sennoside A 0.25 % 이상</td><td>sennoside A 0.25 % 이상</td><td>5가지 성분 total 1.5 % 이상</td><td>sennoside A, emodin, chrysophanol 합 함량 0.24 % 이상</td></tr>
</table>

[별첨 3] 지표성분 표준품 제조 가이드라인

① sennoside A

□ 대황 (Rhei Rhizoma) 로부터 sennoside A 분리

□ 물리화학적 특성

○ 성상 - yellow amorphous powder

○ 이명 -
(R*,R*)-5,5′-Bis(β-D-glucopyranosyloxy)-9,9′,10,10′-tetrahydro-4,4′-dihydroxy-10,10′-dioxo-[9,9′-bianthracene]-2,2′-dicarboxylic acid

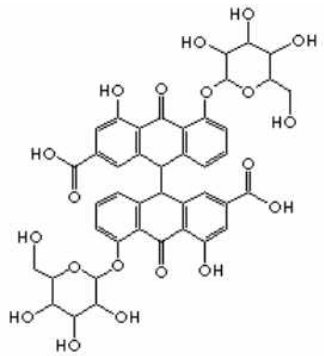
○ CAS number - 8013-11-4

○ 분자식 - $C_{42}H_{38}O_{20}$ (MW 862.74)

○ 용해도 - -

○ 녹는점(℃) - 200 ~ 240 ℃

○ 구조



□ 확인

○ 분광학적으로 분석하여 구조를 동정

- ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS 등 [붙임 1 참조]

○ 분석법 개발 [붙임 2 참조]

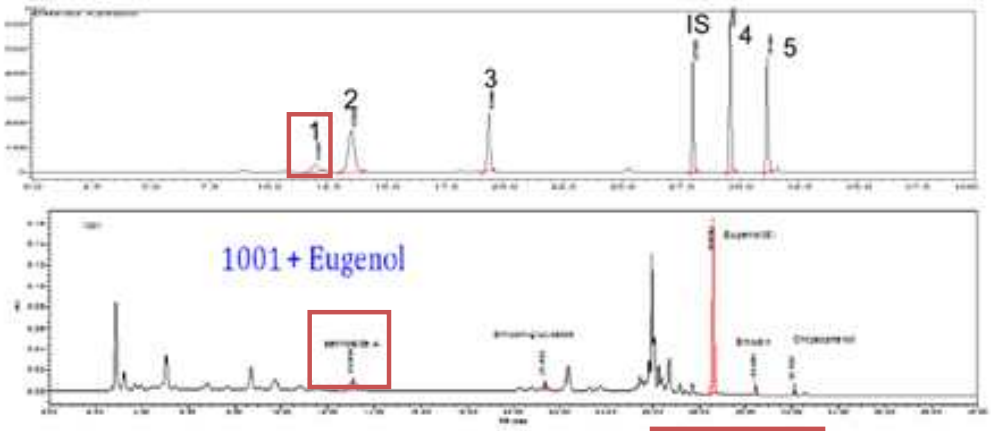
□ 순도평가

1) 분석법 개발

※ 대한민국약전 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침에 따라 분석법을 밸리데이션 [붙임 3 참조]

○ HPLC 분석조건

Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile−
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



Chromatograms of standard mixture and sample. 1. Sennoside A, 2. Rhaponticin, 3. Emodin-glucoside, 4. Emodin, 5. Chrysophanol

[붙임 1] 구조 동정

□ ^{1}H-NMR (DMSO-*d6*, 500 MHz)

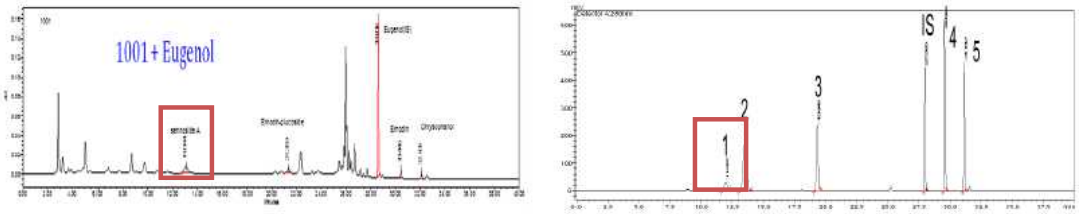
δ Aglycone : 11.359 (2H, s, 3-COOH, 3-COOH), 7.699 (2H, m, H-6, H-6), 7.432 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-7, H-7), 7.248 (2H, d, *J* = 1.2 Hz,H-2,H-2), 5.014 (2H, s, H-10, H-10); Glucose : 4.764 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1, H-1), 3.759 and 3.161 - 3.484 (2H each, d, *J* = 11.3 Hz, m, H-6, H-6), 3.484 - 3.161 ppm (8H, m, H-2, H-2, H-3, H-3, H-4, H-4, H-5, H-5)

□ ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*, 125 MHz)

δ Aglycone : 186.91 (C-9, C-9), 166.23 (3-COOH, 3-COOH), 159.49 (C-1, C-1), 158.13 (C-8, C-8), 142.96 (C-10a, C-10a), 138.78 (C-4a, C-4a), 135.88 (C-3, C-3), 135.56 (C-6, C-6), 124.37 (C-8a, C-8a), 122.92 (C-5, C-5), 122.07 (C-9a, C-9a), 120.09 (C-4, C-4), 118.70 (C-7, C-7), 117.04 (C-2, C-2), 54.40 (C-10, C-10); Glucose : 104.12 (C-1, C-1), 78.04 (C-5, C-5), 75.85 (C-3, C-3), 74.07 (C-2, C-2), 70.28 (C-4, C-4), 61.34 ppm (C-6, C-6)

[붙임 2] 분석법 개발

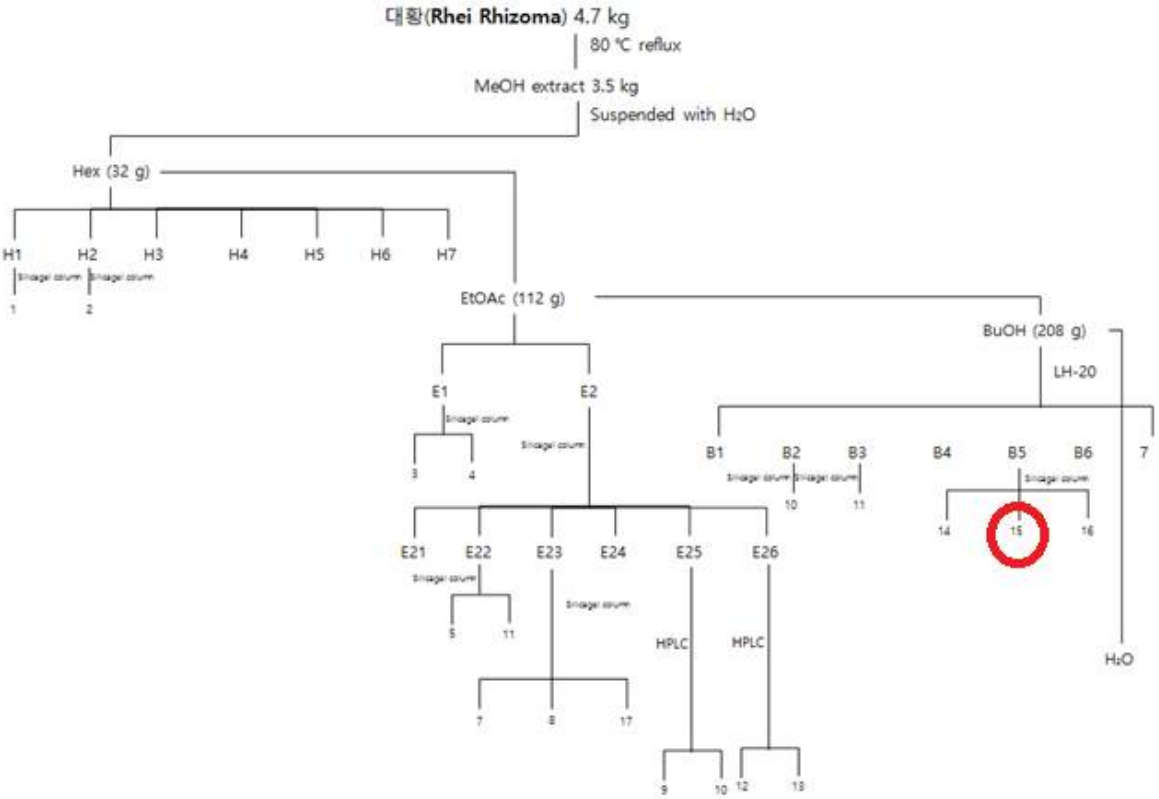
Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



HPLC chromatogram of Rhubarb sample 1001 and standard mixture.
· marker compounds : sennoside A, emodin-glucoside, emodin, rhaponticin
· internal standard : eugenol

② emodin-glucoside

□ 대황 (Rhei Rhizoma) 로부터 emodin-glucoside 분리



□ 물리화학적 특성

○ 성상 - yellow powder

○ 이명 - 1,6-dihydroxy-3-methyl-8-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyanthracene-9,10-dione

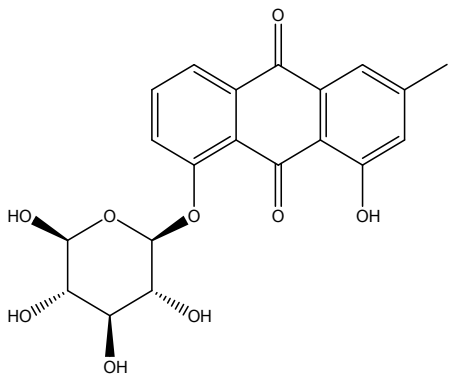
○ CAS number - 23313-21-5

○ 분자식 - $C_{21}H_{20}O_{10}$ (MW 432)

○ 용해도 - -

○ 녹는점(℃) - 1096 ℃

○ 구조



□ 확인

○ 분광학적으로 분석하여 구조를 동정

- ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS 등 [붙임 1 참조]

○ 분석법 개발 [붙임 2 참조]

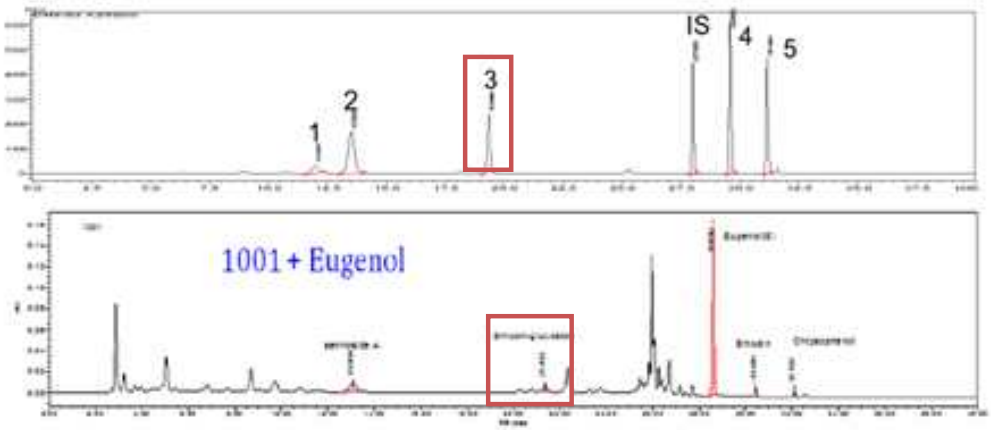
□ 순도평가

1) 분석법 개발

※ 대한민국약전 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침에 따라 분석법을 밸리데이션 [붙임 3 참조]

○ HPLC 분석조건

Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



Chromatograms of standard mixture and sample. 1. Sennoside A, 2. Rhaponticin, 3. Emodin-glucoside, 4. Emodin, 5. Chrysophanol

[붙임 1] 구조 동정

□ ^{1}H-NMR (DMSO-*d6*, 400 MHz)

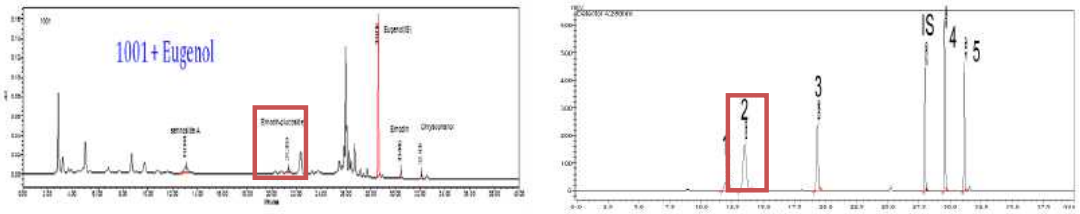
δ 7.67 (1H, br s, H-4), 7.52 (1H, br s, H-2), 7.06 (1H, d, J = 2.8 Hz, H-5), 6.58 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), Glu: 4.63 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1′′), 3.72 (1H, dd, J = 4.0, 10.8 Hz, H-6′′), 3.52 (1H, m, H-3′′), 3.49 (1H, m, H-6′′), 3.48 (1H, m, H-5′′), 3.43 (1H, m, H-4′′), 3.36 (1H, m, H-2′′)

□ ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*, 100 MHz)

δ 186.2 (C-9), 182.1 (C-10), 164.5 (C-6), 164.2 (C-8), 158.3 (C-1), 134.3 (C-4a), 134.1 (C-10a), 121.5 (C-4), 118.4 (C-2), 108.2 (C-5), 107.1 (C-7), 100.7 (C-1′), 77.3 (C-5′), 76.5 (C-3′), 73.4 (C-2′), 69.6 (C-4′), 60.6 (C-6′)

[붙임 2] 분석법 개발

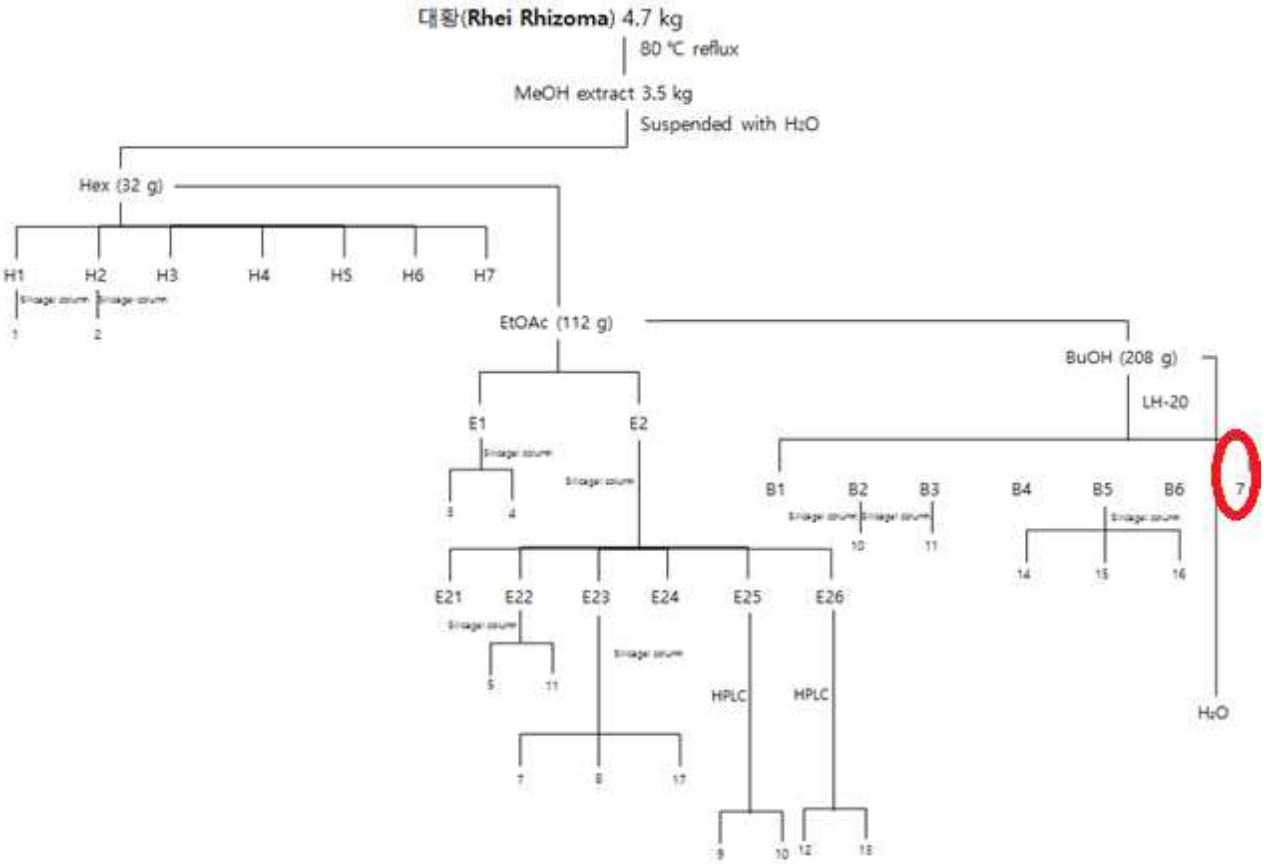
Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



HPLC chromatogram of Rhubarb sample 1001 and standard mixture.
· marker compounds : sennoside A, emodin-glucoside, emodin, rhaponticin
· internal standard : eugenol

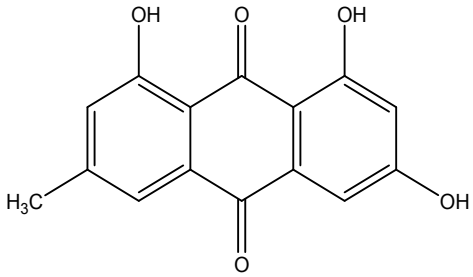
③ emodin

□ 대황 (Rhei Rhizoma) 로부터 emodin 분리



□ 물리화학적 특성

○ 성상 - yellow powder
○ 이명 - 1,3,8-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione
○ CAS number - 518-82-1
○ 분자식 - $C_{15}H_{10}O_5$ (MW 270)
○ 용해도 - -
○ 녹는점(℃) - 39 ℃
○ 구조



□ 확인

○ 분광학적으로 분석하여 구조를 동정
- ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS 등 [붙임 1 참조]

○ 분석법 개발 [붙임 2 참조]

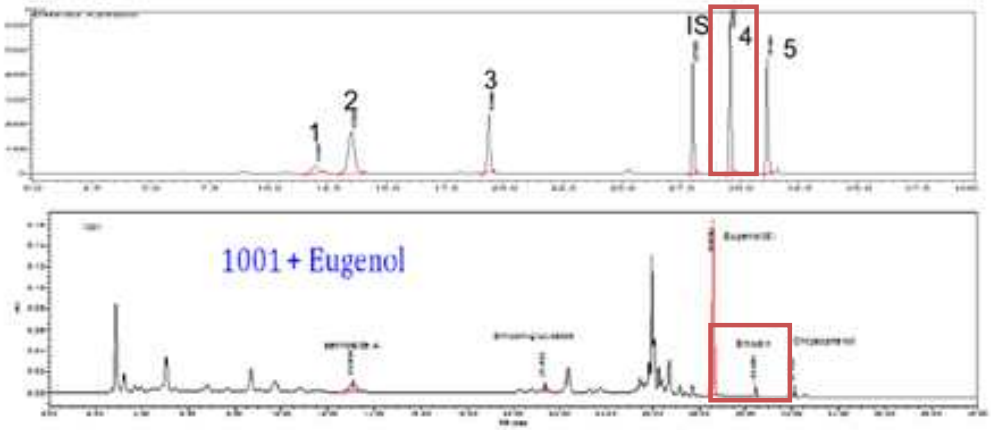
□ 순도평가

1) 분석법 개발

※ 대한민국약전 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침에 따라 분석법을 밸리데이션 [붙임 3 참조]

○ HPLC 분석조건

Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile−
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



Chromatograms of standard mixture and sample. 1. Sennoside A, 2. Rhaponticin, 3. Emodin-glucoside, 4. Emodin, 5. Chrysophanol

[붙임 1] 구조 동정

□ ^{1}H-NMR (DMSO-*d6*, 400 MHz)

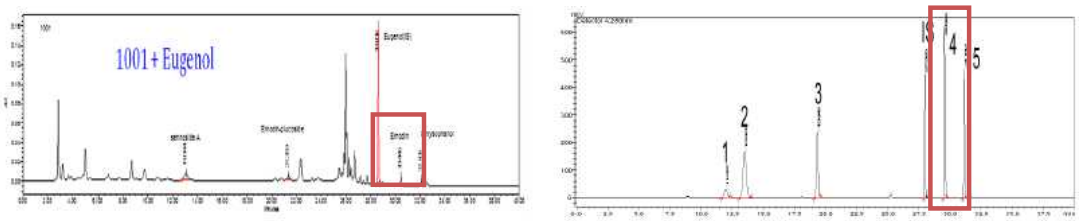
δ 7.24 (1H, brs, H-4), 6.91 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-5), 6.75 (1H, brs, H-2), 6.29 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-7), 2.47 (3H, s, 3-CH_3)

□ ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*, 100 MHz)

δ 190.9 (C-9), 181.5 (C-10), 166.0 (C-6), 165.4 (C-8), 162.4 (C-1), 148.8 (C-3), 135.9 (C-10a), 133.6 (C-4a), 124.2 (C-2), 120.8 (C-4), 113.8 (C-9a), 109.6 (8a), 109.1 (C-5), 108.1 (C-7), 21.3 (3-CH_3)

[붙임 2] 분석법 개발

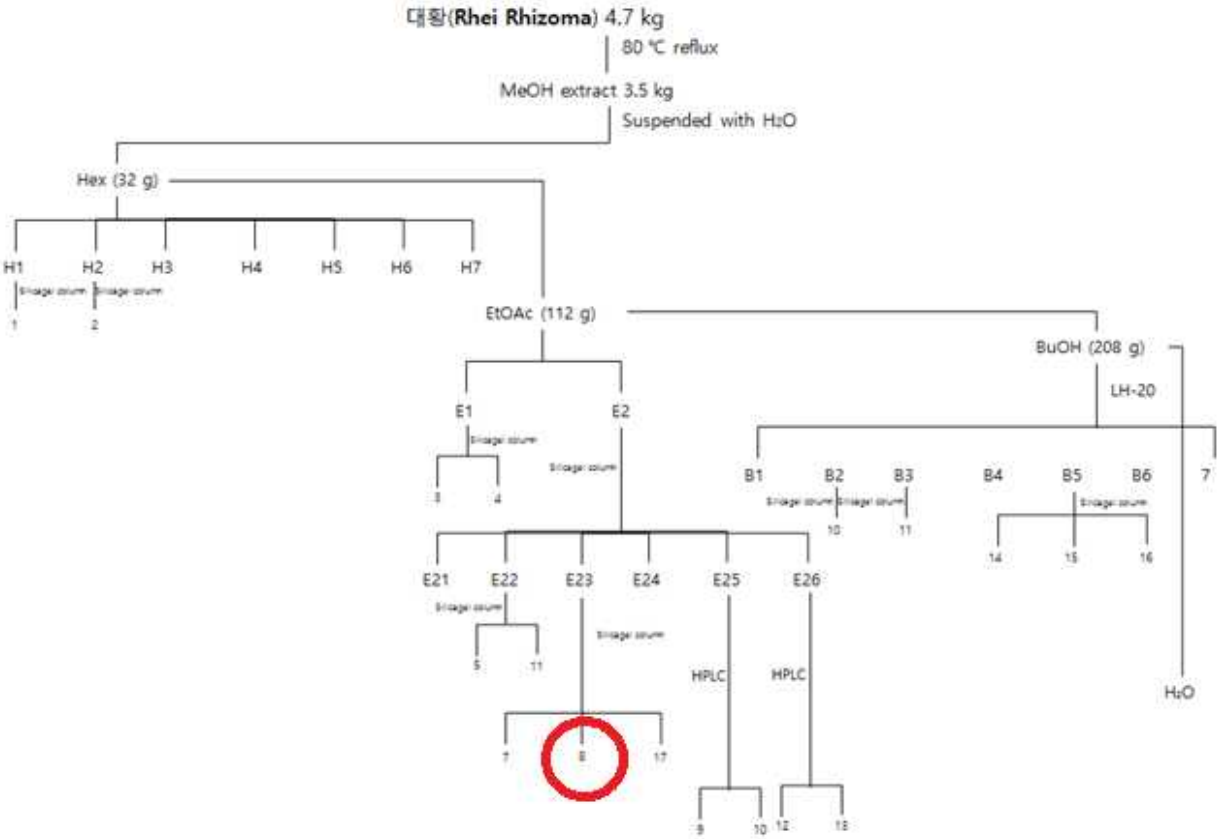
Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile-
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



HPLC chromatogram of Rhubarb sample 1001 and standard mixture.
· marker compounds : sennoside A, emodin-glucoside, emodin, rhaponticin
· internal standard : eugenol

④ rhaponticin

□ 대황 (Rhei Rhizoma) 로부터 rhaponticin 분리



□ 물리화학적 특성

○ 성상 - white crystals

○ 이명 - (2S,3R,4S,5S,6R)-2-[3-Hydroxy-5-[(E)-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethenyl]phenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol

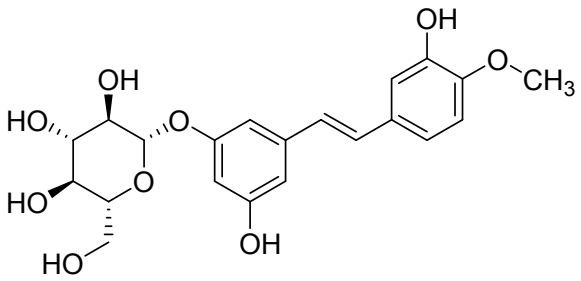
○ CAS number - 155-58-8

○ 분자식 - $C_{21}H_{24}O_9$ (MW 420)

○ 용해도 - -

○ 녹는점(℃) - -

○ 구조



□ 확인

○ 분광학적으로 분석하여 구조를 동정

- ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS 등 [붙임 1 참조]

○ 분석법 개발 [붙임 2 참조]

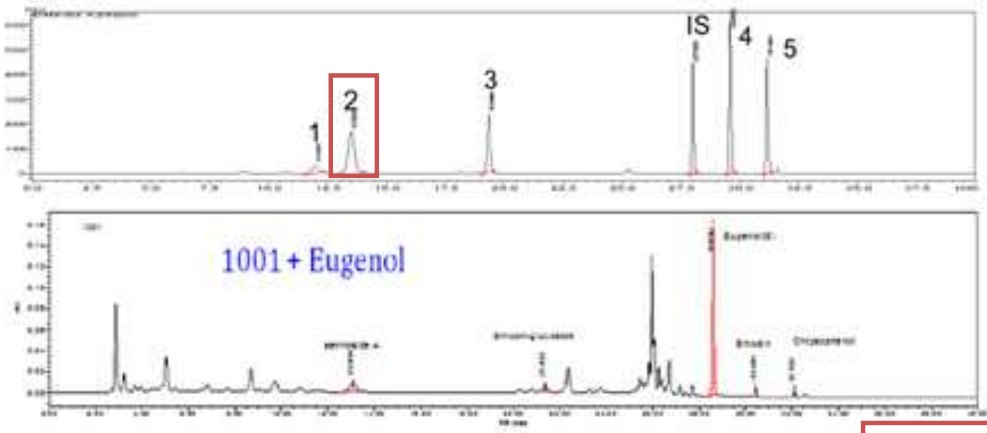
□ 순도평가

1) 분석법 개발

※ 대한민국약전 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침에 따라 분석법을 밸리데이션 [붙임 3 참조]

○ HPLC 분석조건

Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile−
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



Chromatograms of standard mixture and sample. 1. Sennoside A, 2. Rhaponticin, 3. Emodin-glucoside, 4. Emodin, 5. Chrysophanol

[붙임 1] 구조 동정

□ ^{1}H-NMR (DMSO-*d6*, 400 MHz)

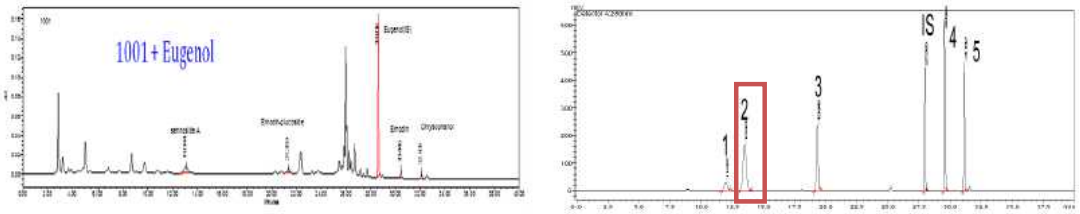
δ 7.44 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2′), 6.97 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-α), 6.84 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-β), 6.95 (1H, dd, J = 1.6, 6.4 Hz, H-6′), 6.89 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5′), 6.79 (1H, brs, H-2), 6.61 (1H, brs, H-6), 6.46 (1H, brs, H-4), 3.86 (4′-OCH_3), Glu: 4.89 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1′′), 3.93 (2H, dd, J = 2.4, 12.0 Hz, H-6′′), 3.80 (1H, m, H-3′′), 3.71 (1H, m, H-5′′), 3.48 (1H, m, H-4′′), 3.36 (1H, m, H-2′′)

□ ^{13}C-NMR (DMSO-*d6*, 100 MHz)

δ 160.6 (C-3), 159.8 (C-5), 149.2 (C-4′), 147.8 (C-3′), 141.3 (C-1), 132.2 (C-1′), 130.1 (C-α), 127.6 (C-), 120.3 (C-6′), 113.8 (C-2′), 112.8 (C-5′), 108.5 (C-6), 107.2 (C-2), 104.3 (C-4), 102.5 (C-1′′), 78.2 (C-5′′), 75.1 (C-2′′), 71.6 (C-4′′), 62.7 (C-6), 56.5 (4′-OCH_3)

[붙임 2] 분석법 개발

Detector (검출) : UV 280 nm
Column (분리관) : Optimapak C18 (250 x 4.60 mm, 5 μm)
Flow rate (유속) : 0.45 mL/min
Column temperature (컬럼온도) : 30 °C
Injection volume (주입량) : 10 μL
Mobile phase (이동상용매) : A. 0.05 M phosphoric acid, B. acetonitrile
Gradient (기울기용리, B%) : 0 min, 20 % B; 10 min, 20 % B; 18 min, 30 % B; 25 min, 100 % B



HPLC chromatogram of Rhubarb sample 1001 and standard mixture.
· marker compounds : sennoside A, emodin-glucoside, emodin, rhaponticin
· internal standard : eugenol