

## 山藥(*Dioscoreae Rhizoma*)으로부터 Allantoin의 분리 및 함량분석

黃 貴 緒

暎園大學校 韓醫科大學

## Isolation and Quantitative Determination of Allantoin from *Dioscoreae Rhizoma*

Gwi Seo Hwang

College of Oriental Medicine, Kyungwon University, Sunnam 461-701

### Abstract

It is well known that *Dioscoreae Rhizoma* tonifies and benefits the Spleen and Stomach, benefits the Lung and nourishes the Kidney. A major component isolated from this herb consist of dioscin, diosgenin, allantoin, starch, alanin, mucilage, choline, amylase, and glycoprotein. In this study, we aimed to measure the content of allantoin, one of major component, to determine the quality of *Dioscoreae Rhizoma*.

**Key words** : *Dioscoreae Rhizoma*, standardization, HPLC, allantoin

### 서 론

山藥은 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg) 또는 마(*Dioscorea batatas* Decaisne)의 뿌리줄기의 주피를 벗겨 그대로 또는 찌서 말린 것이

다. 예로부터 健脾, 補肺, 固腎, 益精 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 滋養強壯, 止渴, 鎮咳, 止瀉 등의 목적으로 사용되었다.<sup>1-2)</sup>

최근 연구에 의하면, 산약의 추출물은 항진균 작용,<sup>3)</sup> 종양세포에 대한 억제작용,<sup>4)</sup> 당뇨병에서의 혈당강하작용,<sup>5-6)</sup> 지질과산화물 생성억제작용<sup>7)</sup> 등의 효능을 가지고 있는 것으로 알려져

\* Corresponding author : Dept. of Preventive Oriental Medicine, Kyungwon University.

Tel : 82-31-750-5421. E-mail : Seoul@mail.kyungwon.ac.kr

산약의 성분으로는 steroid계열의 diosgenin 과 그것의 saponin인 dioscin, 수면 유발물질인 batatasin I, II, III 등과 allantoin, mucilage, choline, amylase, 다량의 당단백질, 전분, mannan, 각종 아미노산 등이 분리 보고되고 있다.<sup>8-13)</sup>

한약재는 산지, 채취시기, 저장과정 등에 따라 균일한 품질을 유지하기 어려운 특성이 있다. 유통되는 한약재가 일정한 유효성과 안전성이 확보되도록 하기 위해서는, 한약재의 품질을 검증하여 유효물질이 일정수준 이상 함유되도록 할 필요성이 있다. 본 연구에서는 山藥에서 allantoin을 분리하고 성분함량을 분석함으로써 山藥에 대한 품질관리 방법과 기준을 정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 검 체

실험용 생약(한약재)은 서울 경동시장의 한약 유통업체에서 구입하여 사용하였으며, 재배산약(식산약) 12가지와 자연산 산약(생산약) 6가지를 구별하여 실험에 사용하였다.

### 성상확인시험

산약은 원주형 또는 부정원주형을 이루고 길이 5~15cm, 지름 10~40mm이며 때로는 세로 혹은 가로로 자른 것도 있다. 바깥면은 유백색~황색을 띤 흰색이고 껍은 면은 평탄하고 분질 또는 각질 이며 유백색이다. 질은 단단하며 꺾어지기 쉽다. 이 약은 거의 냄새 및 맛이 없다.

### 발색확인시험

1) 산약 가루 0.5g에 클로로포름 2ml를 넣고

수욕상에서 2~3분간 가온한 다음 여과한 여액에 무수초산 0.5ml를 넣고 흔들어서 섞은 다음 황산 0.5ml를 가만히 넣을 때 경계면이 매우 얇은 홍색~홍갈색을 나타내고 위층이 청록색~녹색을 나타내는 경우 적합하다고 판정하였다(Liberman Burchard test).

2) 산약 가루 0.5g에 물 10ml를 넣어 조심하여 약 5분간 끓인 다음 여과하였다. 여액에 묽은 요오드시액 1방울을 넣을 때 반응액이 적자색을 나타내는 경우 적합하다고 판정하였다(I2-starch test).

### 회분정량

대한약전의 회분측정법에 따라, 미리 사기제 도가니를 500~550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분말로 만든 산약 검체 약 2g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 올려 500~550°C에서 4시간 이상 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하였다. 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다. 이 방법으로 탄화물이 남아 함량이 되지 않을 경우에는 에탄올 소량을 넣어 적시고 유리 막대로 탄화물을 부수고 소량의 에탄올로 유리 막대를 씻어 에탄올을 조심하여 증발시킨 다음, 앞에서와 같은 방법으로 조작한 후 무게를 측정하였다.

### 산불용성 회분정량

회분에 묽은 염산 25ml를 조심하여 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 항과 같은 조작으로 무게를 미리 단 사기제 도가니에서 3시간 강열하여 실리카겔 데시케이터에서

서 3시간 강열하여 실리카겔 데시케이터에서 방냉한 다음 그 무게를 정밀히 달아 산 불용성 회분량(%)으로 하였다.

### Allantoin 분리

산약 15kg에 MeOH를 넣고 80C에서 24시간 2회 추출하였다. 추출액을 Evaporator에서 감압건조한 후, 물에 현탁시켰다. 수층을 Ethylacetate와 BuOH층으로 분획하고, ethylacetate층은 다시 acetone층으로 분획을 나누었다. Chromatography를 이용하여 각각의 분획에서 결정으로 석출된 물질들을 분리하였다. 수층으로부터 분리된 물질에 대한 NMR, IR, MS 등을 이용하여 allantoin을 확인하였다.

### 산약 검액의 제조

위에서 기술한 산약을 실험에 사용하기 위하여, 분쇄기를 이용하여 가루로 만들었다. 데시케이터에 하루 이상 방치한 후 사용하였다. 약 분말 5g을 정밀히 달아 취하고 메타놀 100ml를 가한 후, 수욕상에서 3시간 동안 환류추출하였다. 추출물을 냉각시킨 후 여과한 여액에 잔류물 및 여지를 메타놀 50ml로 씻어 합하였다. 이 액을 감압농축하고 용량 플라스크에 옮긴 다음 메타놀을 가하여 정확히 50ml로 하였다. 다시 여과지(Alltech Nylon 66 mesh)를 사용하여 여과한 다음 검액으로 하였다.

### 표준액 제조

Allantoin 표준품 20mg을 정확히 달아 탈이온수 50ml에 녹인 후 산약 검액 제조시와 같은 방법으로 여과하고 일정한 비율로 희석하였다. 이 중 10 $\mu$ l를 취하여 HPLC를 행하고 얻어진 각 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하였다. 회귀직선의 방정식은  $y=37.294x+2.04(r=0.997)$ 이었다.

### HPLC 분석조건

Allantoin 함량을 구하기 위하여 Table I에 표시한 조건대로 HPLC를 행하였다.

Table I. HPLC

Column : NH <sub>2</sub> -column(5 $\mu$ m $\times$ 300mm)
Detector : UV 210nm
AUFS : 0.02
Flow rate : 1.0ml/min
Injection Volume : 10 $\mu$ l
Eluent : MeOH/Acetonitrile(2/8)

### Allantoin 함량분석

산약 중의 allantoin 함량검색을 목적으로 검액 및 표준액에 대하여 HPLC를 행하여 얻어진 chromatogram에서 면적을 구하여 회귀방정식으로부터 각각의 allantoin 함량을 구했다.

### 실험 결과

#### Allantoin 분리 및 확인

산약 15kg을 MeOH로 추출하여 분획한 결과, ethylacetate 분획에서 123g, BuOH 분획에서 107.3g의 혼합물을 얻었다. 각각의 층에서 물질 분리를 시도하여 ethylacetate 층에서 5가지, BuOH 층에서 6가지 화합물을 분리하였으며, 수층으로부터 분리한 물질에서 allantoin을 얻었다. 이 물질들에 대한 NMR 및 IR spectrum data를 이용하여 분석하여 allantoin임을 확인하였다. 얻어진 Allantoin의 분자량은 158, m.p.는 230 $^{\circ}$ C이었다.

타나 적합하게 판정되었으며, 산불용성회분은 거의 검출되지 않아 적합하였다(Table II, III).

성상 및 회분, 산불용성회분 정량

산약은 대부분 껍질을 벗긴 후, 절단하여 유통되고 있었다. 연구에 사용된 산약의 색깔은 유백색으로부터 황색을 띤 백색, 약간 갈색이 있는 유백색 등으로 다양하였다. 크기도 직경 10~50mm 정도로 다양하였다. 이 약은 거의 냄새가 없었으며, 특별한 맛이 없었다. 회분정량시험에서 대부분의 산약은 기준치 이하로 나

Allantoin 정량

산약의 함량지표물질로 선정된 allantoin에 대한 검량선 작성 결과는  $y=37.294x+2.043$ 이었으며,  $r=0.996$ 이었다. MeOH 추출물에 대한 HPLC 시행하였으며, 지표물질인 allantoin의 retention time은 약 12.9분이었다. 실험 결과, 재배산약인 식산약에서의 allantoin 함량은  $0.26 \pm 0.12\%$  이

Table II. The yields of allantoin contents, ash and insoluble ash of *Dioscoreae batatas*(cultivated)

No. of Sample	L-B test, I2-starch test	ash (%)	acid-insoluble ash (%)	allantoin (%)
A	○	3.6	0.12	0.26
B	○	4.1	0.06	0.28
C	○	3.6	0.03	0.13
D	○	4.6	0.11	0.33
E	○	4.4	0.17	0.35
F	○	4.1	0.28	0.22
G	○	1.7	0.02	0.08
H	○	3.8	0.48	0.19
I	○	4.2	0.31	0.49
J	○	3.8	0.05	0.42
K	○	4.3	0.01	0.17
L	○	4.3	0.34	0.21

\*\* Content of allantoin =  $0.26 \pm 0.12$  (%)

Table III. The yields of allantoin contents, ash and insoluble ash of *Dioscoreae batatas*(natural)

No. of Sample	L-B test, I2-starch test	ash (%)	acid-insoluble ash (%)	allantoin (%)
M	○	2.8	0.44	0.51
N	○	2.8	0.28	0.64
O	○	4.0	0.15	0.23
P	○	2.8	0.36	0.68
Q	○	3.7	0.03	0.30
R	○	2.7	0.11	0.80

\*\*Content of allantoin =  $0.53 \pm 0.22$ (%)

allantoin의 함량은 약  $0.53 \pm 0.22\%$ 이었다(Table III).

## 고 찰

山藥은 참마(*Dioscorea japonica Thunberg*) 또는 마(*Dioscorea batatas Decaisne*)의 뿌리줄기의 주피를 벗겨 그대로 또는 찌서 말린 것이다. 山藥은 자연산 생산약과 재배한 식산약으로 구분되어 유통되고 있으며, 식산약을 찌서 말린 것을 증산약이라 한다. 시중에 유통되는 거의 대부분의 산약은 마 뿌리의 껍질을 벗기고 절단한 것을 건조한 것이었다. 식산약은 생산약에 비하여 백색에 가까운 유백색이었으며 단단하지 못하고 잘 부스러지는 특징이 있었다. 그러나 생산약은 유백색이 주를 이루지만 갈색계통의 착색된 것들이 섞여 있었고 식산약에 비해 전반적으로 단단한 형태를 가지고 있었다.

山藥의 성분은 전분을 비롯한 다양한 형태의 당이 대부분이며, 다른 성분은 소량으로 존재하여 분리 및 검출이 용이하지 않다. *Dioscorea batatas*(산약)에는 특이 성분으로 batatasin I, II, III가 함유되어 있지만 모두 함량이 낮아 품질표준화의 지표성분으로 하기에는 적절치 못한 것으로 판단된다. 또한, 산약의 성분으로 steroidal saponin계열 화합물인 dioscin과 이 화합물에서 당이 제거된 diosgenin 등이 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 dioscin 등의 특이 성분을 지표성분으로 하기 위한 실험들을 수행하였다. Dioscin이 함유된 것으로 판단되는 BuOH 분획 및 EtAc 분획에 대하여 여러 용매 조건에서 분리를 시도하였다. 그 결과, TLC 및 HPLC 용매조건을 결정하기가 매우 어려웠다. 이는 극성과 비극성이 매우 큰 두가지 성분이 결합된 steroid계 saponin인 dioscin의 물성 때문으로 보인다. 따라서, dioscin이 다른 성분과 완전히 분리되었는지를 평가하기가 어려웠고,

지표물질로 선정하여 표준화 물질로 하기에는 정밀성에서 문제가 될 것으로 판단되었다. 지표물질로 삼은 allantoin은 수층으로부터 분리되며, 분자량은 230이었다. 산약 중의 allantoin 함량을 측정하기 위하여  $\text{NH}_2$ -column을 사용하여 HPLC를 시행한 결과, retention time은 약 12.5분이었으며, 식산약 중의 allantoin 함량은 평균  $0.26 \pm 0.12\%$ , 생산약 중의 allantoin 함량은 평균  $0.53 \pm 0.22\%$ 으로 나타나 생산약에서의 함량이 높았다.

이상의 결과를 토대로, 산약의 품질표준화 작업의 지표물질은 allantoin으로 하며, 함량기준은 0.1% 이상으로 정하면 좋을 것으로 사료된다.

## 결 론

1) 山藥의 회분함량의 기준은 대한약전에 6% 이하로 되어 있으나, 사용된 검체에서 회분함량은 1.7~4.6%로 나타났다.

2) 산불용성회분함량은 0.01~0.44%로 대한약전기준인 0.5% 이하에 적합하였다.

3) 山藥 중의 allantoin 함량은 재배품이  $0.26 \pm 0.12\%$ , 자연산이  $0.53 \pm 0.22\%$ 였다.

이상의 결과, 산약의 품질규격은 회분 5% 이하, 산불용성회분 0.5% 이하, allantoin 0.1% 이상이 적합할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 중약대사전, 2권 p992(1985) 小學館
2. 생약학, 한대석, p159(1992) 東明社
3. Aderiya B.I. et al., Folia Microbial. Praha., 41, 407-12, 1997
4. Hu K. et al., Planta Med. 62, 573-5, 1996
5. Hikino H., et al., Planta Med. 52, 168-71,

5. Hikino H, et al., *Planta Med.* 52, 168-71, 1986
6. Arghiniknam M, et al., *Life Sci.*, 59, PL147-57, 1996
7. Undie A.S. et al., *J. Ethnopharmacol.*, 15, 133-44, 1986
8. Hashimoto T., et al., *Phytochemistry*, 13, 2849-52, 1974
9. Kiho T. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 270-275, 1985
10. Hikino H. et al., *Planta Med.*, 52, 168-72, 1986
11. Tsukamoto T. et al., *Yahakuzasshi*, 77, 1225-29, 1957
12. Kawasaki T. et al., *Chem. Pharm. Bull.* 16, 1070-75, 1986
13. Kawase J. et al., *J. Chromatography*, 252, 209-216, 1982