

마의 Saponin 성분분석

손건호[†] · 권순태

안동대학교

I. 서 언

마과식물(*Dioscoreaceae*)중 야생종은 부채마(*Dioscorea nipponica* Makino), 도꼬로마(*D. tokoro* Makino), 참마(*D. japonica* Thunberg), 각시마(*D. tenuipes* Franch), 단풍마(*D. quinqueloba* Thunberg) 등과 같이 다양하나, 재배마는 *D. opposita* Thunberg 또는 *D. batatas* Decaisne으로 분류되는 한 종만이 재배되고 있다. 마의 분포 및 분류에 관한 많은 연구에도 불구하고 형태적으로 비슷한 종의 분류에 학자들 간의 논란이 있다. 한편 마과식물은 자연상태에서 교잡이 이루어지고 염색체의 자연배가에 의한 다양한 유전적 변이가 발생하여 전 세계적으로 650여종의 변종이 있는 것으로 알려져 있다(이, 2002). 마의 근경에는 전분 8-24%, 단백질 2-3%정도가 함유되어 있고, 비타민 C, B₁이 풍부하며, amylose, cholin 등과 cryptogenin, dioscin 등의 saponin 관련 물질이 주요 약용성분으로 알려져 있다. 그러나, 마는 오랜 기간 약용식물로 사용되어 왔음에도 불구하고 아직 약리성분의 함량을 이용한 품질표준화 연구가 되어 있지 않은 실정이다. 마의 주요 약효는 혈중 콜레스테롤 함량저하, 동맥경화증 완화, 혈압강하, 신장강화 및 당뇨병, 대하증, 야뇨증, 정력부족, 노화방지 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(농림부, 1997; 임, 1991).

마의 saponin 성분에 관해서는 주로 야생마를 중심으로 연구되었는데, 단풍마(*D. quinqueloba*) 근경에서 diosgenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, dioscin 및 gracillin 등 3종류의 saponin이 밝혀졌고(손 등, 1993), 부채마(*D. nipponica*)에는 다른 종류의 약용식물보다 최고 수백 배에 해당하는 diosgenin이 검출되었으며, 재배마보다 약 150배가 더 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Kim 등, 1991). Saponin 중 dioscin은 생체의 암화나 종양을 일으키는 원인인 돌연변이원성물질이나 발암성물질에 대항하여 돌연변이나 발암성을 억제하는 활성을 가진 것으로 알려져 있다. 또한 항암작용과 염증에 관련된 phospholipase A₂(PLA₂) 저해작용 등이 보고되어 있다(Tal과 Goldberg, 1982; 김 등, 1989; Baek 등, 1994; Tobarí 등, 2000).

본 고에서는 마과식물의 주요 saponin으로 알려진 dioscin, diosgenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside(prosapogenin A of dioscin) 및 diosgenin 3-O- β -D-glucopyranoside(prosapogenin C of dioscin)의 추출과 분리과정, 정성 및 정량분석법을 소개한다(화학구조, 그림 1).

[†]Corresponding author: (Phone) +82-54-820-5494 (E-mail) sonkh@andong.ac.kr

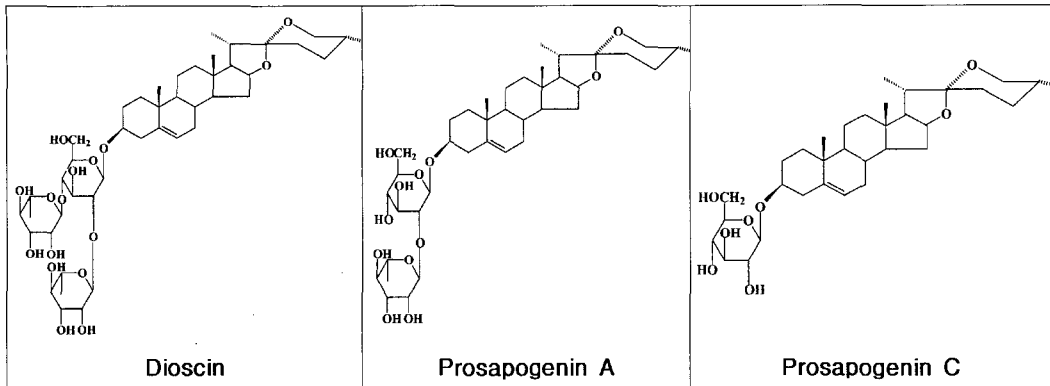


그림 1. 마과식물의 주요 saponin의 분자구조.

II. 분석방법

1. 장치 및 기구

- 1) 분쇄기
- 2) 환류 냉각장치
- 3) 수욕(Water bath)
- 4) 분획기(Fraction collector)
- 5) 감압농축장치(Rotary evaporator)
- 6) Glass column
- 7) Column chromatography용 silica gel(Merck 7734)
- 8) TLC chamber 및 silica gel TLC plate(Merck 5715)
- 9) NMR
- 10) HPLC 분석시스템(SCL-10A system controller, LC-10AD pump, SPD-10A UV detector, Shimadzu Co., Japan)

2. 시약

증류수, methanol, chloroform, ethylacetate, H₂SO₄

3. 추출 및 saponin의 분리정제

- 1) 부채마 근경 3 kg을 분쇄기로 세절한 후 환류 냉각장치를 사용하여, 25°C에서 MeOH 500 ml로 72시간동안 3회 연속 추출한다.
- 2) MeOH 추출액을 여과지를 사용한 깔대기로 여과한 후 76 cmHg에서 감압, 농축하여

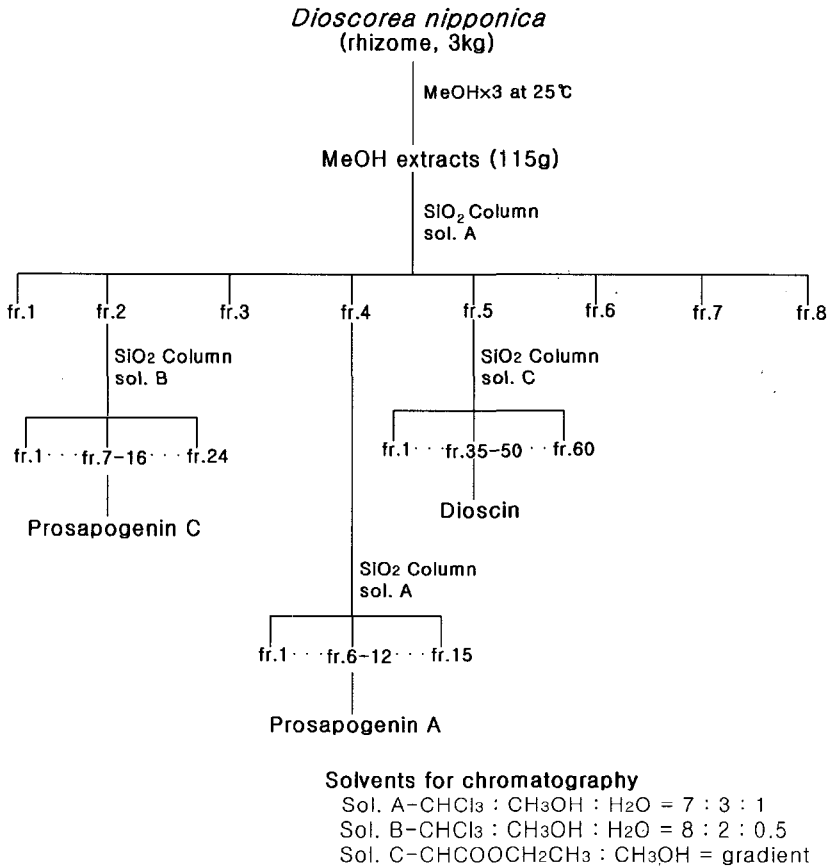


그림 2. 마의 saponin 분리과정.

부채마 MeOH 추출물을 얻는다.

- 3) MeOH 추출물 약 25 g을 column(Merck 7734 silica gel 900 g)에, CHCl₃:CH₃OH:H₂O =7:3:1(하층부)의 용매를 사용하여 전개시킨다. 전개 60분 후부터 2000 ml씩 8개의 분획을 수득한다.
- 4) 8개의 분획 중 5번 분획을 CH₃COOCH₂CH₃:CH₃OH=98:2의 용매로부터 CH₃COOCH₂CH₃:CH₃OH=95:5의 용매까지 단계적으로 극성을 높여가며, chromatography를 실시하여 전개를 시작한 후, 30분 후부터 500 ml씩 60개의 분획을 수득한다.
- 5) 수득된 분획 중 35에서 50번까지의 분획으로부터 dioscin을 얻는다.
- 6) 8개의 분획 중 4번 분획을 CHCl₃:CH₃OH:H₂O=7:3:1(하층부)의 용매로 column chromatography를 실시하여, 전개 후 15분부터 500 ml씩 유출시킨 15개의 소분획 중 6번에서 12번 소분획으로부터 prosapogenin A를 얻는다.
- 7) 8개의 분획 중 2번 분획을 CHCl₃:CH₃OH:H₂O=8:2:0.5(하층부)의 용매로 column chromatography를 실시하여, 전개 후 30분부터 500 ml씩 유출시킨 24개의 소분획 중 7에서 16번까지의 소분획으로부터 prosapogenin C를 얻는다(그림 2).

3. TLC에 의한 정성분석

- 1) 순수분리 확인된 표준품(dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C) 각 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 표준액을 준비한다.
- 2) 검액은 부채마를 MeOH를 이용하여 추출한 추출농축액을 사용한다.
- 3) 표준액과 검액을 각각 5 µl씩 silica gel TLC plate(Merck 5715)에 점적한다.
- 4) CHCl₃:MeOH:H₂O=52:28:8(하층부)의 용매로 전개하여 10% H₂SO₄으로 발색시켜 표준품과 Rf값을 비교한다.

4. 정량분석

- 1) 검액의 조제: 건조된 부채마 1.0 g을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 60분 동안 초음파 진탕 한 후 여과하여, 총 부피를 100 ml로 하여 검액을 조제한다.
- 2) 표준 검량선의 작성: 분리한 dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C 각각을 1 mg씩 정밀히 달아 MeOH을 가하여 stock solution을 조제하며, 이를 0.01, 0.1, 1, 10 µg/µl 농도의 표준용액을 조제한다.
- 3) 각 표준용액을 20 µl 씩 취하여 <표 1>과 같은 조건으로 HPLC의 chromatogram 을 얻고 이로부터 평균 peak area를 구한다.

표 1. HPLC chromatography 분석조건.

| 요 인 | 분 석 조 건 |
|--------------|--|
| Column 종류 | Mightsil RP-18 GP250-4.6(Kanto Chemical Co.) |
| Column 온도 | 40°C |
| Mobile phase | CH ₃ CN:H ₂ O=75:25 |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Detector | UV 218 nm |

- 4) Dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C 의 각각의 retention time과 회귀직선방정식은 <표 2>와 같이 계산된다.
- 5) Dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C의 함량계산 : 전항에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 이상 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각 dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C의 함량을 구한다.
- 6) 정량분석은 MultiChro 2000(Yulin Co. Korea) 분석프로그램을 이용하여 자동정량이 가능하며, 이때 dioscin, prosapogenin A, prosapogenin C의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인한다.

표 2. 마과식물 saponin의 HPLC retention time과 회귀직선 방정식.

| 물질명 | Retention time(분) | 회귀방정식(y: peak area, x: 농도) | 상관계수 |
|----------------|-------------------|-----------------------------|-------|
| Dioscin | 5.44 | $y = 214451.78x - 8603$ | 0.992 |
| Prosapogenin A | 6.48 | $y = 138769x$ | 0.986 |
| Prosapogenin C | 9.47 | $y = 253675x + 4.41e^{-12}$ | 0.981 |

III. 결 과

Dioscin, prosapogenin A 및 prosapogenin C의 물리화학적 성질 및 분광학적 data는 다음과 같다(표 3).

표 3. Dioscin의 물리화학적 성질 및 분광학적 data.

| | |
|--|--|
| Mp.: 290-292°C | $[\alpha]_D^{25}$: -112.3° (c. 0.3 in MeOH) |
| IR(KBr, cm ⁻¹) 3420, 1640, 1100-1000, 920, 900, 866, 838(900>920, 25(R)-spiroketal), 811 | |
| ¹ H NMR(300 MHz, pyridin-d ₅) δ 0.81(1H, s, H-18), 1.01(1H, s, H-19), 1.09(1H, d, J=6.9Hz, H-21), 0.69(1H, d, J=5.2 Hz, H-27), 5.30(1H, brd, J=4.6 Hz, H-6), 1.52(3H, d, J=6.2 Hz, Rha-CH ₃), 1.66(3H, d, J=6.1 Hz, Rha-CH ₃), 4.82(1H, d, J=7.4 Hz, anomeric H), 5.62(1H, brs, anomeric H), 6.17(1H, s, anomeric H). | |
| ¹³ C NMR(75.5 MHz, pyridin-d ₅) δ 37.4, 29.9, 78.0, 38.8, 140.7, 121.5, 32.0, 31.6, 50.6, 37.0, 20.9, 39.8, 40.3, 56.5, 32.2, 80.9, 62.8, 16.2, 19.3, 41.8, 14.8, 109.0, 31.7, 29.1, 30.4, 66.7, 17.1, 100.1, 79.5, 76.5, 77.7, 77.6, 61.8, 101.7, 72.1, 72.2, 73.9, 70.1, 18.2, 102.7, 72.4, 72.5, 73.6, 69.2, 18.3 | |

표 4. Prosapogenin A의 물리화학적 성질 및 분광학적 data.

| | |
|---|--|
| Mmp.: 238-240°C | $[\alpha]_D^{25}$: -12.5°(c. 0.4 in MeOH) |
| IR(KBr, cm ⁻¹) 3410, 1650, 1100-1000, 920, 900, 865, 837(900>920, 25(R)-spiroketal), 811 | |
| ¹ H NMR(300 MHz, pyridin-d ₅) δ 0.81(1H, s, H-18), 1.01(1H, s, H-19), 1.09(1H, d, J=6.9Hz, H-21), 0.68(1H, d, J=5.7 Hz, H-27), 5.28(1H, brd, J=4.8 Hz, H-6), 1.67(3H, d, J=6.3 Hz, Rha-CH ₃), 4.92(1H, d, J=7.2 Hz, anomeric H), 6.20(1H, s, anomeric H). | |
| ¹³ C NMR(75.5 MHz, pyridin-d ₅) δ 37.4, 30.0, 77.9, 38.8, 140.8, 121.5, 32.0, 31.6, 50.2, 37.0, 20.9, 39.8, 40.3, 56.5, 32.2, 80.9, 62.8, 16.1, 19.2, 41.8, 14.8, 109.0, 31.7, 29.1, 30.4, 66.7, 17.1 100.3, 79.3, 77.8, 71.8, 77.9, 62.6, 101.7, 72.2, 72.6, 73.9, 69.2, 18.4 | |

표 5. Prosapogenin C의 물리화학적 성질 및 분광학적 data.

| | |
|--|--|
| Mp.: 247-249°C | |
| IR(KBr, cm ⁻¹) 3450, 1650, 1070, 1045, 1025, 920, 900, 865, 835(900>920, 25(R)-spiroketal), 810 | |
| ¹ H NMR(300 MHz, pyridin-d ₅) δ 0.70(3H, d, J=5.2Hz, 27-CH ₃), 0.83(3H, s, 18-CH ₃), 0.92(3H, s, 19-CH ₃), 1.13(3H, d, J=6.9Hz, 21-CH ₃), 5.01(1H, d, J=7.7Hz, anomeric H), 5.31(1H, brd, J=4.4Hz, H-6) | |
| ¹³ C NMR(75.5 MHz, pyridin-d ₅) δ 37.3, 30.0, 78.3, 39.1, 140.7, 121.5, 32.0, 31.5, 50.1, 36.9, 20.9, 39.7, 40.3, 56.5, 32.1, 80.9, 62.7, 16.2, 19.2, 41.8, 14.8, 109.1, 31.6, 29.1, 30.4, 66.7, 17.1, 102.4, 75.1, 78.0, 71.5, 78.2, 62.7 | |

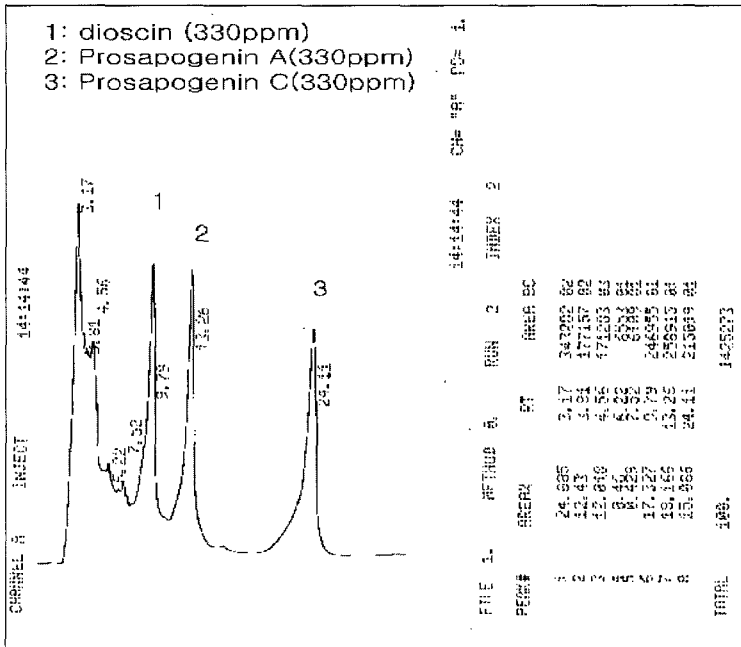


그림 3. Dioscin, prosapogenin A, C의 HPLC chromatogram.

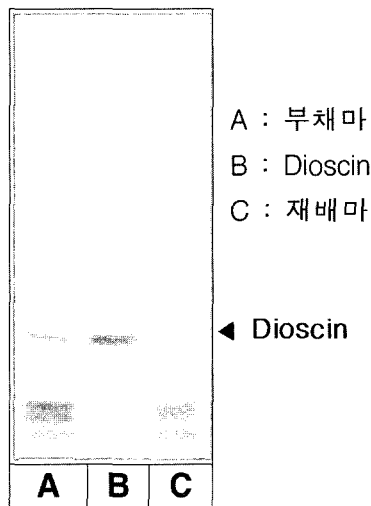


그림 4. 부채마와 재배마 추출물과 dioscin 표준물질의 TLC 결과. Plate: Silica(Merck 5715), 용매 $\text{CHCl}_3:\text{MeO}:\text{H}_2\text{O}=52:28:8$.

Dioscin, prosapogenin A 및 prosapogenin C의 HPLC chromatogram은 (그림 3)과 같다. 정성분석을 위해 야생마인 부채마와 재배마의 dioscin을 TLC 한 결과, 부채마에는 dioscin이 뚜렷이 나타나지만 재배마에는 dioscin의 함량이 아주 낮아 검출되지 않는 것을 볼 수 있다 (그림 4).

참고문헌

1. Baek, S. H., S. H. Kim, K. H. Son, K. C. Chung and H. W. Chang. 1994. Inactivation of human pleural fluid phospholipase A₂ by dioscin. *Arch. Pharm. Res.* 38 : 218-222.
2. Kim, C. M., K. H. Son, S. H. Kim and H. P. Kim. 1991. Steroidal sapogenin contents in some domestic plants. *Arch. Pharm. Res.* 35 : 305-310.
3. Kim, S. W., K. H. Son and K. C. Chung. 1989. Mutagenic effect of steroidal saponins from *Smilax china* rhizomes. *Arch. Pharm. Res.* 33 : 285-289.
4. Tal, B. and I. Goldberg. 1982. Growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells in batch and continuous cultures. *Planta Medica* : 107-110.
5. Tobar, A., M. Teshima, J. Koyanagi, M. Kawase, H. Miyamae, K. Yoza, A. Takasaki, Y. Nagamura, and S. Saito. 2000. Spirostanols obtained by cyclization of pseudosaponin derivatives and comparison of anti-platelet agglutination activities of spirostanolglycosides. *Eur. J. Med. Chem.* 511-527.
6. 농림부. 1997. 단마 무분기 양질다수성 신품종 육성 및 저장 가공이용법 개발. 농림부 현장애로기술사업보고서. 1-82.
7. 손건호, 정근영, 도재철. 1993. 단풍마 근경의 Saponin 성분에 관한 연구. 생약학회지. 187-191.
8. 이영로. 2002. 원색한국식물도감. 교학사. 947-949.
9. 임재하. 1991. 마의 최아제배에 관한 연구. 경북대학교석사논문. 1-26.

Analysis of Saponins in Dioscoreaceae

Kun-Ho Son[†] and Soon-Tae Kwon

*Andong National University, Kyungpook 760-749, Korea
+82-54-820-5494, sonkh@andong.ac.kr*