

영릉향으로부터 분리된 Foenumoside B의 부위별 함량비교 연구

엄영란 · 목소연 · 신재혁 · 김슬기 · 조병헌 · 조용백*
한국콜마(주) 생명과학연구소

Study on Contents Comparison of Foenumoside B in Different Parts of *Lysimachia foenum-graecum*

Young Ran Um, So Youn Mok, Shin Jae-Hyuck, Seul-Ki Kim,
Byoung-Heon Cho and Yong Baik Cho*

Pharmaceutical R&D center, Kolmar Korea Co.,Ltd, Sejong-city 339-851, Korea

Abstract – *Lysimachia foenum-graecum* (LF) has been used for home remedy of common cold and headache in China. Foenumoside B from LF has been reported for anti-obesity effects. We used foenumoside B as a marker for content evaluation of different parts of LF. Ethanol extract of LF was used for isolation of foenumoside B and purified further by column chromatography. The structure was identified as foenumoside B by interpretation of spectroscopic analysis, including ¹H-, ¹³C-NMR and FT-ICR-MS. High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to compare the quantitative level of foenumoside B in different parts of LF. Foenumoside B contents in the leaf, stem, and aerial part showed significant differences. Contents of foenumoside B was detected highly in the leaf extracts. The results would be useful for efficient extraction of foenumoside B in LF.

Key words – *Lysimachia foenum-graecum*, Foenumoside B, HPLC

영릉향(*Lysimachia foenum-graecum*)은 중국의 운남과 광서지방에 주로 분포하며 예로부터 향기나무와 해충기피제로 주로 사용되어 왔으며 중국의 민간요법에서는 감기와 두통치료제로 주로 사용되어 왔다.¹⁾ 최근 연구에서는 영릉향 메탄올 추출물에 대하여 항산화 활성과 에탄올 추출물의 항비만 활성이 보고된 바 있다.^{2,3)} 지금까지 연구된 성분으로는 영릉향의 지상부로부터 oleanane-type triterpene saponins 계열인 21-O-angeloylbarringtonenol C, foenumoside A-E, lysimachiagenoside A, C-F 이 분리 보고 된 바 있으며 이중 foenumoside A-E의 경우 아라키돈산 대사 효소를 저해하는 효과가 알려진 바 있다.^{4,7)} 특히 foenumoside B는 지방세포 분화를 억제할 뿐만 아니라 고지방식이로 유도된 비만 쥐에서의 항비만 효과가 밝혀져 있다.⁸⁾

이에 본 연구에서는 foenumoside B를 영릉향 지상부 추출물로부터 분리, 정제하였으나 수득률이 낮아 효율적인 분리를 위한 방법을 모색하고자 영릉향을 지상부와 지상부를

있과 줄기로 나누어 분리한 후 각각의 시료를 추출하여 함량을 비교 분석 하였다.

그 결과 foenumoside B에 대하여 영릉향의 부위에 따른 함량에 차이가 있음을 보여줌으로써 foenumoside B를 활용한 신약개발 및 기능성 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 영릉향은 Bioland에서 분양 (중국 광서지방) 받아 중국과학원 근명식물연구소 손한동 교수로부터 감정 후 사용하였다. 영릉향 표본(NDM10107)은 한국콜마 생명과학연구소 천연물연구팀 표본실에 보관 중이다.

시약 및 기기 – 시료의 추출에 사용한 유기용매는 대정화금주식회사에서 생산한 특급 시약을 사용하였으며 기기분석을 위한 HPLC 용매는 J.T Baker사의 특별시약을 사용하였다. 그 외는 모두 특급 시약을 사용하였다.

HPLC 분석기기는 Shimadzu Cp. (Japan)의 system controller (CBM-20A), solvent delivery system (LC-

*교신저자(E-mail): ybcho59@kolmar.co.kr
(Tel): +82-44-860-6600

20AD), UV-Vis detector (SPD-20A), auto sample injector (SIL-20A), degasser (DGu-20A_{SR})를 사용하였으며 HPLC column은 YMC사의 C18 Triart YMC-Pack ODS-AQ (4.6×150 mm, 3 μm)을 사용하였다.

Semi-preparative HPLC 분석기기는 Shimadzu Cp. (Japan)의 system controller (CBM-20A), solvent delivery system (LC-20AP), auto sampler (SIL-10AP), UV-Vis detector (SPD-20A), fraction collector (FRC-10A)를 사용하였으며 column은 Agilent사의 Eclipse PrepHT, Zorbax, XDB C18 (21.2×250 mm, 7 μm)을 사용하였다.

MS 스펙트럼은 한국기초과학지원연구원의 15T FT-ICR 기기로서 ESI negative mode로 측정하였으며 NMR 스펙트럼은 Bruker사 500 MHz NMR spectrometer를 이용하여 측정하였다.

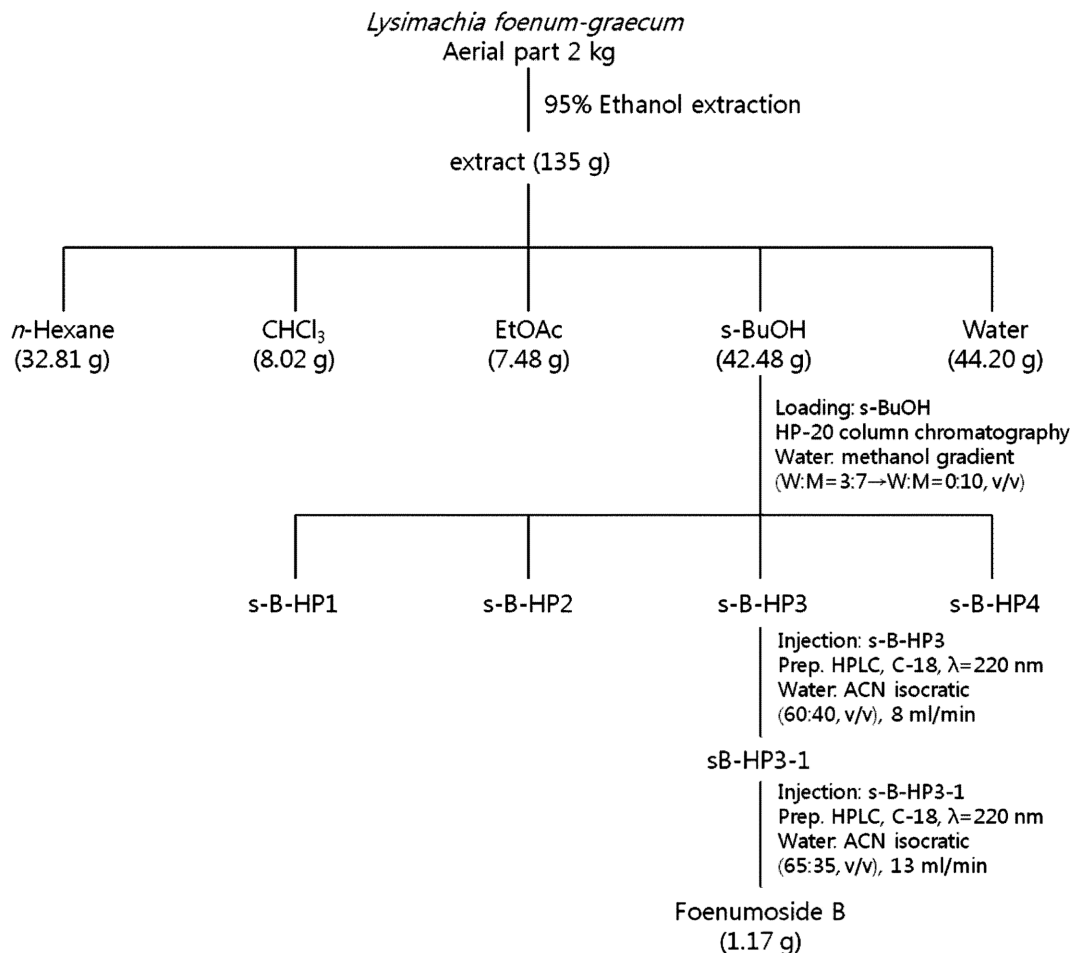
성분 분리 - 영릉향 지상부 2 kg에 16 L의 95% 에탄올을 넣어 상온에서 40시간 동안 1차 추출 한 다음 여과하고 잔사에 8 L의 95% 에탄올을 가하여 상온에서 4시간 동안 2차 추출한 다음 여과하였다.

여액을 감압농축 하여 136.79 g(6.8%)의 에탄올추출물을 수득하였다. 이 중 135 g을 증류수 2 L에 현탁 한 뒤 단계적으로 용매 분획하여 *n*-Hexane 분획(32.81 g, 24.3%), CHCl₃ 분획(8.02 g, 6.2%), EtOAc 분획(7.48 g, 5.8%), saturated BuOH(*s*-BuOH) 분획(42.49 g, 32.7%)을 수득하였다.

s-BuOH 분획물을 Diaion HP-20 resin (350 g, 60 mm×500 mm, in 70% → 100% MeOH)에 충전 한 다음 column chromatography를 수행하여 4개의 소분획물(HP1-HP4)을 수득하였다. HP3 분획물을 semi-preparative HPLC를 수행하여 HP3-1(ACN:H₂O=40:60)을 분리한 다음 ACN:H₂O=35:65 조건으로 순수 정제하여 화합물 1을 수득하였고 분리 과정은 Scheme 1에 나타내었다.

화합물 1은 ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrum 및 FT-ICR-MS 을 측정하여 문헌과 비교하여 foenumoside B임을 확인한 후 이를 함량분석 실험에 사용하였다.⁸⁾ ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectral data의 assignment의 결과를 Table I에 나타내었다.

Foenumoside B – White powder, ICR-MS(ESI negative);



Scheme. 1. Isolation of foenumoside B.

Table I. ^1H - and ^{13}C -NMR data of foenumoside B (pyridine- d_5 , δ in ppm, J in Hz)

No.	^{13}C	^1H (multi, J =Hz)	No.	^{13}C	^1H (multi, J =Hz)
1	39.28	0.88 (1H, overlapped) and 1.52 (1H, overlapped)	1'	168.91	
2	26.81	1.85 (2H, overlapped)	2'	129.91	
3	89.49	3.19 (1H, dd-like)	3'	136.48	5.94 (1H, m)
4	39.89		4'	16.26	2.05 (3H, d, J =5.5)
5	56.08	0.71 (1H, d, J =11.5)	5'	21.07	2.00 (3H, s)
6	18.79	1.27 (1H, J =12) and 1.49 (1H, J =14)	1"	171.07	
7	33.48	1.27 (1H, m) and 1.55 (1H, overlapped)	2"	21.41	1.98 (3H, s)
8	40.39		Ara-1	104.91	4.94 (1H, s)
9	47.33	1.72 (1H, m)	Ara-2	81.32	4.60 (1H, overlapped)
10	37.16		Ara-3	72.76	4.75 (1H, overlapped)
11	24.29	1.90 (2H, overlapped)	Ara-4	74.91	4.60 (1H, overlapped)
12	124.4	5.48 (1H, s)	Ara-5	64.27	3.85 (1H, overlapped) and 4.40 (1H, overlapped)
13	143.09		Glc-1	105.89	5.41 (1H, d, J =7.5)
14	42.18		Glc-2	78.50	4.30 (1H, overlapped)
15	35.03	1.67 (1H, overlapped) and 1.90 (1H, overlapped)	Glc-3	77.62	4.30 (1H, overlapped)
16	68.02	4.75 (1H, s)	Glc-4	72.24	4.25 (1H, m)
17	47.56		Glc-5	78.50	4.30 (1H, overlapped)
18	40.93	2.88 (1H, br d, J =10.5)	Glc-6	63.32	4.52 (1H, m) and 4.40 (1H, m)
19	47.67	1.41 (1H, overlapped) and 3.11 (1H, m)	Rha-1	101.94	6.44 (1H, s)
20	36.49		Rha-2	73.14	4.75 (1H, overlapped)
21	81.58	6.49 (1H, d, J =10.1)	Rha-3	73.14	4.71 (1H, d, J =9.0)
22	71.45	4.52 (1H, overlapped)	Rha-4	75.28	4.30 (1H, overlapped)
23	28.43	1.19 (3H, s)	Rha-5	69.76	5.06 (1H, m)
24	17.02	1.00 (3H, s)	Rha-6	19.36	1.82 (3H, d, J =7.5)
25	16.02	0.85 (3H, s)	Glc2-1	103.42	5.30 (1H, d, J =6.8)
26	17.41	1.05 (3H, s)	Glc2-2	76.76	3.8 (1H, overlapped)
27	27.75	1.82 (3H, s)	Glc2-3	79.98	4.22 (1H, overlapped)
28	66.82	4.25 (1H, overlapped) and 4.32 (1H, overlapped)	Glc2-4	72.19	4.15 (1H, m)
29	30.17	1.14 (3H, s)	Glc2-5	78.80	3.80 (1H, overlapped)
30	20.63	1.32 (3H, s)	Glc2-6	63.00	4.31 (1H, overlapped) and 4.48 (1H, overlapped)

$m/z=1215.6166$ (calcd. for $\text{C}_{60}\text{H}_{95}\text{O}_{25}$), ^1H -NMR (Pyridine d_5 , 500 MHz) and ^{13}C -NMR (Pyridine d_5 , 125 MHz) see Table I.

표준액과 검액의 제조 – Foenumoside B 10 mg을 정확히 달아 메탄올에 녹여 standard stock solution을 제조하였으며 이를 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도가 되게 희석하여 working standard solution을 제조하였다.

영롱향을 지상부, 잎, 줄기로 나누어 잘게 분쇄한 다음 각각 5 g씩 달아 메탄올 40 mL를 넣고 상온에서 24시간 추출한 다음 filter paper를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압 농축하여 그 무게를 잰 후 메탄올을 넣어 정확히 100 mL

로 한 다음 0.45 μm syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다.

HPLC 분석조건 – 표준액 및 검액을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC에 사용하였다. HPLC 이동상은 A용액으로 water, B용액으로 acetonitrile을 사용하였으며 분석에 대한 조건은 Table II와 같다. HPLC로 분석하여 얻은 표준액과 검액의 chromatogram의 면적을 구하여 표준품의 회귀직선 방정식으로부터 foenumoside B의 함량을 계산하였고 3회 반복 측정된 검액에 함유된 foenumoside B의 함량(%)을 산출하였다.

Table II. Mobile phase condition of HPLC analysis

HPLC condition			
Column	YMC Triart, C18 (4.6×250 mm, 3 μm)		
Flow rate	1.0 ml/min		
UV length	220 nm		
Injection volume	20.0 ul		
Column Temp.	Room temp.		
	Time(min)	H ₂ O	ACN
	0	59	41
Mobile phase	15	59	41
	30	40	60
	40	0	100

결과 및 고찰

영릉향은 주로 중국에서 전통의약품으로 사용되어왔다. 영릉향의 주요 활성성분으로 triterpenoid saponins 계열 화합물들이 분리 보고되었으나 이들의 영릉향 내에서의 함량 분석에 대한 연구는 보고된 바 없다. 그 중 foenumoside B는 급성 염증의 화학매개체 중요물질로써 천식이나 류마티스관절염 같은 자가알레르기병을 유발할 수 있는 아라키돈산 대사효소 및 지방세포분화 저해 활성을 가지고 있어 항염증 및 항비만 효능이 있는 것으로 보고된 바 있다.^{4,8)}

본 연구에서는 이와 같은 활성을 지닌 foenumoside B의 영릉향으로부터 추출효율을 높일 수 있는 방법 및 학술적인 자료를 구축하고자 영릉향으로부터 foenumoside B를 분리, 정제한 다음 이를 이용하여 영릉향 내 부위별 함량분석을 수행하였다. 영릉향 지상부를 95% 에탄올로 추출하고 이를 계통 분획하여 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, 및 *s*-BuOH

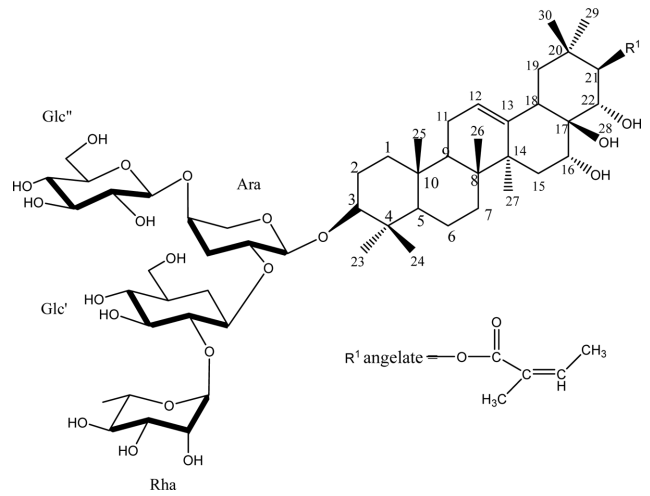


Fig. 1. Chemical structure of foenumoside B.

분획물을 수득한 다음 이 중 saponins 계열이 주로 함유되어있다고 알려진 *s*-BuOH 분획물 층으로부터 open column chromatography 및 semi-preparative HPLC 를 사용하여 화합물 1을 분리하였으며 1D 및 2D NMR data와 MS 측정을 통한 구조식과 분자량을 문헌과⁸⁾ 비교하여 영릉향의 활성물질중의 하나인 foenumoside B로 최종 구조 동정 하였다(Fig. 1). 화합물 1의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectral data의 assignment 결과를 Table I에 나타내었다. 또한 foenumoside B의 부위별 함량을 측정하기 위하여 Table II의 조건으로 분석을 수행하였다.

분석 결과 foenumoside B의 피크 유지시간은 28.88 min로 검출되었으며(Fig. 2) 1, 5, 10, 50, 100 μg/mL의 5가지 농도범위에서 측정하여 얻어진 foenumoside B의 검량선 상관계수는 0.9999로 1.0에 근접한 매우 양호한 직선성을 갖는 것으로 확인할 수 있었다(Table III).

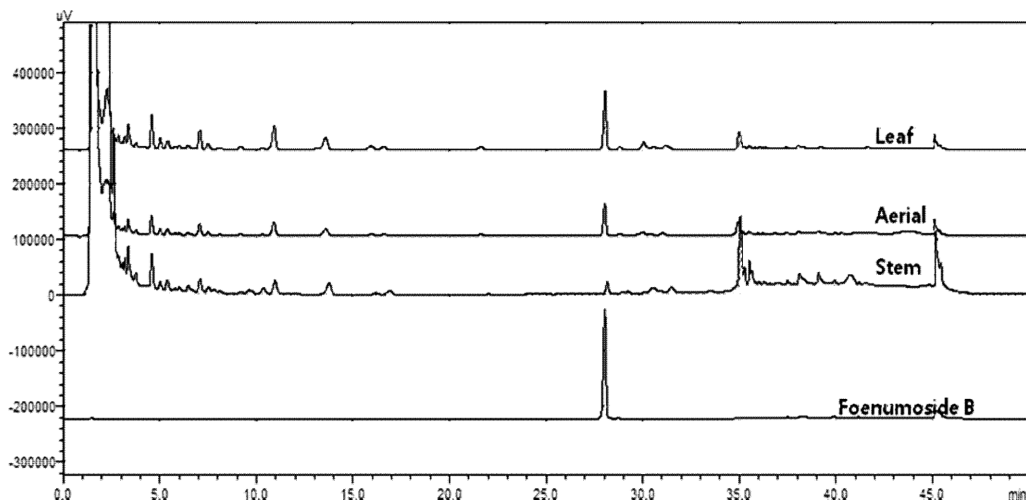


Fig. 2. HPLC chromatogram of extracts at the different part of *Lysimachia foenum-graecum*.

Table III. Calibration curve equation of foenumoside B

Constituent	Equation	R ²
Foenumoside B	y=94477x+1104.8 ^{a)}	0.9999

^{a)}y: peak area, x: concentration

Table IV. Content of foenumoside B in different parts of *Lysimachia foenum-graecum*

Constituent	parts	Content(w/w, %)
Foenumoside B	Leaf	2.32±0.26
	Stem	0.32±0.07
	Aerial	1.58±0.09

Values are mean±SD.

영릉향의 잎, 줄기, 지상부 에탄올 추출물을 가지고 HPLC를 이용하여 분석한 결과 모든 부위에서 foenumoside B가 검출되었으며 식물 건조 중량당 foenumoside B 함량을 평가하였을 때 잎 부위가 2.32±0.26%로 가장 높은 함량을 나타내었으며 그 다음으로 지상부(1.58±0.09%), 줄기(0.32±0.07%)순으로 나타났다(Table IV).

결 론

영릉향의 95% 에탄올 추출물 중 s-BuOH 분획층에서 화합물 1종을 분리하였으며, NMR과 MS spectral data로부터 구조를 확인한 결과 foenumoside B인 것으로 구조 동정하였다. Foenumoside B의 영릉향의 부위별 함량을 분석해본 결과 잎 > 지상부 > 줄기 순서로 검출되었다.

이상의 결과는 영릉향의 기능성 활성성분인 foenumoside B 추출 및 분리에 대한 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각되며 함량이 높은 지상부, 잎과 함께 이를 이용한 다양한 기능성 소재 및 의약품으로서의 개발 가능성을 확인하였다.

사 사

본 연구는 충청광역경제권 선도산업육성사업에 의하여 연구되었음.

인용문헌

1. *The Health Administration of Beijing* (1998) Capital Normal University Press. p. 274, Beijing.
2. Li, H. Y., Hao, Z. B., Wang, X. L., Huang, L. and Li, J. P. (2009) Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresour. Technol.* **100**: 970-974.
3. Seo, J. B., Choe, S. S., Jeong, H. W., Park, S. W., Shin, H.J., Choi, S. M., Park, J. Y., Choi, E. W., Kim, J. B., Seen, D. S., Jeong, J. Y. and Lee, T. G. (2011) Anti-obesity effects of *Lysimachia foenum-graecum* characterized by decreased adipogenesis and regulated lipid metabolism. *Exp. Mol. Med.* **43**: 205-215.
4. Shen, Y. H., Weng, Z. Y., Zhao, Q. S., Zeng, Y. Q., Rios, J. L., Xiao, W. L., Xu, G. and Sun, H. D. (2005) Five new triterpene glycosides from *Lysimachia foenum-graecum* and evaluation of their effect on the arachidonic acid metabolizing enzyme. *Planta Med.* **71**: 770-775.
5. Li, X. R., Li, Z. M., Du, S. S., Wang, G. L. and Lin, R. C. (2009a) Two triterpenes from *Lysimachia foenum-graecum*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **11**: 128-131.
6. Li, X. R., Li, Z. M. and Lin, R. C. (2009b) Two new triterpenes from *Lysimachia foenum-graecum*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **11**: 529-533.
7. Li, X. R., Xin, B., Wang, G. L., Dai, Z. and Lin, R. C. (2010) Two new triterpenes from *Lysimachia foenum-graecum*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **12**: 204-208.
8. Seo, J. B., Park, S. W., Choe, S. S., Jeong, H. W., Park, J. Y., Choi, E. W., Seen, D. S., Jeong, J. Y. and Lee, T. G. (2012) Foenumoside B from *Lysimachia foenum-graecum* inhibits adipocyte differentiation and obesity induced by high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**: 800-806.

(2014. 2. 14 접수; 2014. 3. 2 심사; 2014. 3. 17 게재확정)