

토복령(*土茯苓*, *Smilacis Chinae Radix*)으로부터 Dioscin의 분리 및 함량분석

손건호* · 서정학 · 이주미 · 권순진 · 장승엽¹ · 이경순²
안동대학교 식품영양학과, ¹식품의약품안전청, ²충북대학교 약학대학

Isolation and Quantitative Determination of Dioscin from *Smilacis Chinae Radix*

Kun Ho Son*, Jung Hak Seo, Joo Mi Lee, Soon Jin Kwon,
Seung Yeup Chang¹ and Kyong Soon Lee²

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749,

¹Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704,

²College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – The methods for isolation and quantitative determination of dioscin, a spirostanol triglycoside, from the roots of *Smilax china* have been developed. Isolation of dioscin was achieved by silica gel and RP-18 chromatography. The HPLC method used for quantitative determination of dioscin enabled the standardization of the crude drug. It suggests that the content of dioscin in *Smilax china* should be above 0.01%.

Key words – *Smilax china*, Liliaceae, quantitative analysis of dioscin, HPLC method

토복령(*Smilacis Chinae Radix*)은 청미래덩굴(*Smilax china* L., Liliaceae)의 근경을 지칭하는 생약이다. 청미래덩굴은 덩굴성 관목으로서 그 길이는 3cm이며 가시가 있다. 꽃의 개화기는 5월이며 9-10월에 적색의 열매를 맺고, 근경은 옆으로 뻗고 갈색이다. 잎은 호생하고 윤채가 있으며 두껍고 넓은 타원형이며 끝이 갑자기 뾰족해지고 가장자리가 밋밋하고 기부에서 5-7맥이 나오며 다시 그물맥으로 된다.¹⁾

한방에서는 토복령을 이뇨, 해독, 소염, 위암, 식도염 등에 사용하고 있다.²⁾ 토복령의 성분에 관한 연구로는 spirostane 배당체인 prosapogenin A of dioscin, dioscin, gracillin과 furostane 배당체로서 methyl proto-prosapogenin A of dioscin, methyl proto-dioscin, methyl proto-gracillin이 분리되어 모두 6종의 steroid saponin이 분리 보고되었다.^{3,4)} 이중 dioscin은 토복령

의 주성분일뿐 아니라 항돌연변이원성작용,⁵⁾ 항암작용,⁶⁾ PLA₂ 저해작용⁷⁾ 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있어 본 연구에서는 dioscin을 지표물질로 한 정량법을 개발하고자 하였으며 생약 규격집에 규정되어 있는 건조감량, 회분 및 산불용성 회분 기준치와 현재 국내에서 유통되고 있는 토복령의 실험치를 비교·검토하였다.

재료 및 방법

검체 – 2000년 국내 전지역에서 시판되고 있는 토복령 50종을 구입하여 마쇄한 다음 확인 시험을 거쳐 선별한 25종을 시료로 하였다.

확인시험 – 건조하여 분쇄한 토복령 2.0 g씩을 취하여 MeOH 10 ml에 넣어 1시간동안 초음파 진탕하여 여과한 여액을 검액으로 하였다. 따로 표준품 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 표준액 및 검

*교신저자 : Fax : 054-820-5494

액을 각각 5 μ l씩 silica gel TLC plate(Merck 5715)에 점적한 후 CHCl_3 -MeOH- H_2O (7:3:1, 하층부)의 용매로 dioscin의 표준품과 함께 전개하여 10% H_2SO_4 으로 발색시켜 표준품과의 Rf값을 비교하였다.

건조감량 - 검체 2 g를 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터(silica gel)에서 방냉하고 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 함량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 500-550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2.0 g를 취하여 앞의 도가니에 넣어 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500-550°C에서 4시간동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 함량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 무게를 정밀하게 달아 회분량(%)으로 하였다.

산불용성 회분시험 - 회분에 묶은 염산 25 ml를 조심하여 넣고 5분간 조용히 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔유물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 함과 같은 조각으로 무게를 미리 단 백금제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터(silica gel)에서 방냉한 다음 무게를 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

Dioscin의 분리 - 토복령 3.6 kg을 MeOH로 3회 열추출하여 MeOH 추출물 345 g을 얻었다. MeOH 추출물을 다시 *n*-BuOH로 용매 분획하여 분획물 107 g을 얻은 다음 분획 50 g을 silica gel column에 걸어 CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH- H_2O (8:2:0.5, 하층부), CHCl_3 -MeOH- H_2O (7:3:1, 하층부)의 용매로 순차적 용출시켜 10개의 소획분으로 나누었다.

이 중 소획분 6을 다시 silica gel column에 걸어 CHCl_3 -MeOH- H_2O (8:2:0.5, 하층부)의 용매로 용출하여 조 dioscin 분획을 얻은 다음 RP-18 column(MeOH- H_2O =9:1)으로 정제하여 순수한 dioscin을 단리하였다.

Liebermann-Burchard test : positive mp : 290-292°C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, pyridine- d_5) δ 0.70 (3H, d, $J=5.0$ Hz, 27- CH_3), 0.84 (3H, s, 18- CH_3), 1.06 (3H, s, 19- CH_3), 1.15 (3H, d, $J=6.8$ Hz, 21- CH_3), 1.64

(3H, d, $J=6.2$ Hz, rha- CH_3), 1.77 (3H, d, $J=6.1$ Hz, rha- CH_3), 4.96 (1H, d, $J=8.6$ Hz, anomeric H of glucose), 5.31 (1H, brd, $J=4.5$ Hz, H-6), 5.86 (1H, brs, anomeric H of rhamnose), 6.41 (1H, brs, anomeric H of rhamnose).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, pyridine- d_5) δ 37.5(C-1), 30.2(C-2), 78.0(C-3), 39.0(C-4), 140.8(C-5), 121.8(C-6), 32.2(C-7), 31.7(C-8), 50.3(C-9), 37.2(C-10), 21.1(C-11), 39.9(C-12), 40.5(C-13), 56.6(C-14), 32.3(C-15), 81.1(C-16), 62.8(C-17), 16.4(C-18), 19.4(C-19), 42.0(C-20), 15.1(C-21), 109.3(C-22), 31.8(C-23), 29.3(C-24), 30.6(C-25), 66.9(C-26), 17.3(C-27), 100.3(C-1'), 78.6(C-2'), 77.0(C-3'), 78.1(C-4'), 77.8(C-5'), 61.3(C-6'), 102.0(C-1''), 72.6(C-2''), 72.6(C-3''), 74.1(C-4''), 70.4(C-5''), 18.5(C-6''), 102.9(C-1'''), 72.8(C-2'''), 72.9(C-3'''), 73.9(C-4'''), 69.5(C-5'''), 18.7(C-6''').

분석조건 - column: μ Novapak C_{18} (5 μm , 3.9 \times 300 mm); column temp: 25°C mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ =60:40; flow rate: 1.0 ml/min.; detector: UV 218 nm; HPLC: Hewlett Packard 1100

검액의 조제 - 토복령 1.0 g을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 60분 동안 초음파 진탕 한 후 여과하여 total volume을 50 ml로 하여 검액을 조제하였다.

표준 검량선의 작성 - 분리한 dioscin 10 mg을 정밀히 달아 MeOH을 가하여 50 ml로 하여 stock solution으로 하였다. 이를 일정량씩 취하여 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 표준 용액을 조제하였다. 각 표준용액을 20 μl 씩 취하여 HPLC의 chromatogram을 얻고 이로부터 평균 area를 구하였다. dioscin의 회귀 직선방정식은 $y=10.6325x+2.6432$ 이며 상관계수가 0.9999로서 1.0에 접근하므로 농도(x)와 peak area(y)간의 직선성이 인정되었다.

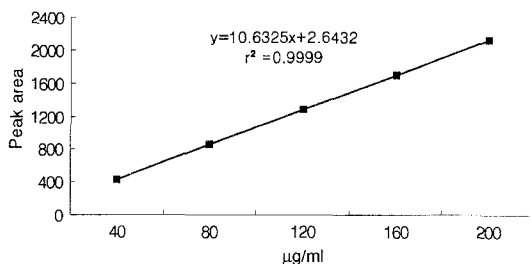
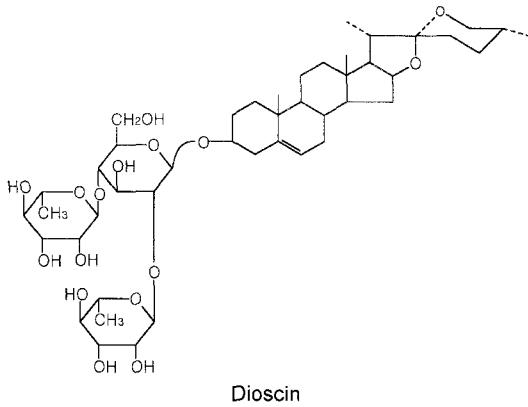


Fig. 1. Calibration curve of dioscin.



결과 및 고찰

Dioscin은 토복령의 주성분으로 그 함량이 많고 서론에서 언급한 바와 같이 생물학적 활성도 보고되어 있어 지표성분으로서 타당하다고 사료된다. 따라서

dioscin을 실험부에서 제시한 바와 같이 토복령의 *n*-BuOH 분획을 silica gel 및 RP-18 column chromatography로 분리하였다. 분리된 화합물의 분광학적 결과는 문헌치와 잘 일치하였다.³⁾ Dioscin을 지표물질로 하여 국내 각 지역에서 구입한 50종의 토복령에 대하여 TLC법으로 확인시험을 하였으나 이 중 25종의 시료만이 표준품과 Rf치가 일치되는 반점을 나타내었다. Dioscin이 확인된 25종의 토복령에 대해서 생약규격집에 규정되어 있는 이화학적 실험을 시행하고 dioscin을 지표물질로 하여 HPLC 정량법을 개발하고 그 함량을 정하였다.

토복령 25종의 건조감량 평균치 및 표준편차는 9.18±0.68%이었다. 생약규격집에는 12.0% 이하로 규정되어 있으며 25개의 시료중 규정에 부적합한 것은 1개도 없으므로 현재의 규정이 타당한 것으로 인정된다. 생약규격집에는 회분은 4.0% 이하, 산불용성 회분은 0.50% 이하로 규정되어 있다. 본 실험에서 회분

Table 1. Content of dioscin, loss of moisture on drying, ash and acid-insoluble ash in commercial Smilacis Chinae Radix

sample	content of dioscin(%)	loss of moisture on drying(%)	ash(%)	acid-insoluble ash(%)
1	0.0208	8.27	2.58	0.29
2	0.0194	9.85	3.32	0.35
3	0.0208	8.27	2.98	0.30
4	0.5673	8.66	3.39	0.70
5	0.5665	9.46	3.57	0.68
6	0.0238	8.61	3.49	0.47
7	0.5662	9.93	2.64	0.47
8	0.5601	9.29	3.08	0.52
9	0.5647	10.31	3.19	0.32
10	0.5642	9.37	2.25	0.19
11	0.5604	8.35	3.49	0.78
14	0.5521	8.88	3.28	0.43
16	0.5532	8.64	3.02	0.30
17	0.0028	8.95	3.31	0.16
19	0.0066	9.54	2.58	0.11
20	0.0074	10.44	7.05	0.43
24	0.0061	9.27	2.35	0.11
26	0.0091	8.34	7.24	0.20
27	0.0136	8.96	2.93	0.44
28	0.0180	8.69	4.88	2.27
30	0.0171	9.15	3.34	0.61
31	0.0208	8.68	3.73	0.66
33	0.0151	9.21	1.91	0.02
34	0.0356	10.00	2.93	0.25
35	0.0150	10.46	3.26	0.28
average±S.D.	0.21±0.27	9.18±0.68	3.43±1.26	0.45±0.43

은 3.43±1.26%, 산불용성회분은 0.45±0.43으로 나타나며 25개의 시료 중 생약규격집의 규정에 맞지 않는 경우는 회분의 경우 3개, 산불용성회분의 경우 7개이었다. 따라서 회분의 경우 현 규정이 타당하나 산불용성회분의 경우 0.7% 이하로 상향조정하는 것이 바람직하다.

Dioscin를 지표물질로서 사용 가능성을 검토하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 분석조건을 검토하기 위하여 여러 가지 용매조건에서 HPLC chromatogram을 얻고 이들을 검토해 본 결과 CH₃CN-H₂O(60:40)을 이동상으로 사용했을 때 가장 좋은 분리능을 얻을 수 있었다. 이 조건에서 dioscin의 retention time은 약 8분에서 나타나며 다른 물질의 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. dioscin의 표준 검량선을 작성하여 정량에 이용할 목적으로 stock solution을 만들고 이를 희석하여 표준용액을 제조하였다. 각 표준용액의 chromatogram으로부터 얻은 peak 면적과 농도와의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 40-200 µg/ml의 농도범위에서 그 직선성이 인정되었으며 이때의 회귀직선 방정식은 $y=10.6325x+2.6432$ 이며 상관계수는 0.9999로서 1.0에 접근하였다.

이상과 같은 조건에서 검액도 HPLC를 실시하여 상기 회귀직선방정식으로부터 dioscin 함량을 구한 결과 9종의 시료는 0.5-0.6%의 함량을 나타낸 반면 나머지 시료는 매우 낮은 함량치를 보이고 있다. 이는 장기간 보관 등으로 인하여 유효성분이 분해된 때문이 아닌가 추정하였으나 정확한 이유는 알 수 없었다. 본 실험결과 25종의 시료 중 dioscin의 평균 함량 및 표준편차는 0.21±0.27%이며 20종의 시료가

0.01% 이상을 나타내고 있으므로 토복령 중 dioscin의 함량 0.01% 이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 2000년도 생약·한약재 품질표준화연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. 약용식물학연구(1980) 약용식물학각론 pp. 103, 진명출판사, 서울.
2. 陳存仁(1984) 圖說韓方醫藥大事典(중국약학대전) vol. 4, pp. 257-259, 동도문화사, 서울.
3. Kim, S. W., Chung, K. C., Son, K. H. and Kang, S. S. (1989) Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax china*. *Kor. J. Pharmacogn.* 20: 76-82.
4. Kim, S. W., Chung, K. C., Son, K. H. and Kang, S. S. (1989) A further furostanol glycoside from *Smilax china*. *Kor. J. Pharmacogn.* 20: 145-146.
5. Kim, S. W., Son, K. H. and Chung, K. C. (1989) Mutagenic effect of steroidal saponins from *Smilax china* rhizomes. *Yakhak Hoeji* 33: 285-289.
6. Sanwa Seiyku Co. JP 03, 271, 2224.
7. Baek, S. H., Kim, S. H., Son, K. H., Chung, K. C. and Chang, H. W. (1994) Inactivation of human pleural fluid phospholipase A₂ by dioscin. *Arch. Pharm. Res.* 17: 218-222.

(2001년 5월 12일 접수)