

오가피로부터 Acanthoside D의 분리 및 함량분석

홍성수 · 황지상 · 이선아 · 황방연 · 하광원¹ · 제금련¹ · 성낙선¹ · 노재섭 · 이경순*

충북대학교 약학대학, ¹식품의약품안전청

Isolation and Quantitative Analysis of Acanthoside D from Acanthopanax Cortex

Sung Su Hong, Ji Sang Hwang, Seon A Lee, Bang Yeon Hwang, Kwan Won Ha,¹

Keum Ryon Ze¹, Rack Seun Seung¹, Jai Seup Ro and Kyong Soon Lee*

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

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

Abstract – The *Acanthopanax* genus belonging to the Araliaceae family is widely used as a traditional medicine having tonic and sedative effects. For the quality control of Acanthopanax Cortex, lignan compound, acanthoside D, was isolated from the MeOH extract of *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman. (Araliaceae) and identified by the spectroscopic analysis. A quantitative analysis of acanthoside D using HPLC method showed that the average contents were $0.081 \pm 0.058\%$ in 39 samples collected throughout the regions of Korea.

Key words – *Acanthopanax sessiliflorum*, Araliaceae, quantitative analysis of acanthoside D, HPLC.

오가피(五加皮)는 오갈피과(Araliaceae)에 속하는 오갈피나무 *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman 또는 기타 동속식물의 뿌리, 줄기 및 가지의 껍질로서 관상 또는 반관상으로 길이 5-10 cm, 지름 5-8 mm, 두께 1 mm정도이고, 바깥면은 황갈색-어두운 회색으로 평탄하며 군데군데 가시가 있거나 또는 그 자국이 있고 비교적 어린 가지의 껍질에는 회백색의 반점이 있다. 안쪽면은 황백색이며 섬유성이므로 자르기 어렵고, 이 약은 특이한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰다.^{1,2)} 한방에서 오가피는 주로 자양, 강장, 강정, 신경통, 음위, 진경, 근골동통, 산기복통, 요설동통 등의 효능이 있어 주로 강장약으로 신경통, 중풍, 고혈압, 당뇨병 및 류마티스성 관절염 등의 치료에 이용되고 있다. 현재까지 알려진 오가피속 식물의 성분으로는 eleutheroside A, B, B₁, B₄, C, D, E, I, K, L, M과 chlorogenic acid, sesamin, caffeic acid, β -sitosterol,

oleanolic acid 등이 알려져 있다.³⁻¹²⁾

본 연구에서는 생약, 한약재에 대한 품질 표준화의 일환으로 오가피의 lignan 성분 중 하나인 acanthoside D(=eleutheroside E)을 지표물질로 선정하여 오가피의 MeOH 추출물을 각종 solvent를 이동상으로 한 silica-gel column chromatography를 실시하여 그 성분을 분리, 구조를 동정하였으며, 전국 각처에서 수집된 39종의 오가피 시료를 50% MeOH로 추출하여 HPLC 법으로 그 함량을 측정하였다. 본 실험은 우수한 오가피의 유통을 위하여 acanthoside D의 함량을 설정하여 품질을 표준화하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 연구에 사용한 시료는 2001년 5월 국내 전 지역에서 시판되고 있는 오가피 39종을 구입하여 마쇄한 후 시료로 사용하였다.

시약 및 기기 – ¹H- 및 ¹³C-NMR은 Varian Unity-

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

300 spectrometer를 사용하였고, ESI-MS는 Finnigan Navigator mass spectrometer를 사용하였다. UV는 JASCO V500 UV/VIS spectrophotometer (Model LE599, U.K.)를, IR은 FT/IR 300E (JASCO) spectrometer를 사용하여 측정하였다. Column chromatography용 담체는 silica gel (70-230 mesh, Merck)을, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plate (0.2 mm, Merck)를 사용하였다. 시약 및 용매는 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였고, HPLC용 용매는 HPLC grade를 사용하였다. 발색시약으로는 10% vanillin-sulfuric acid를 사용하였다.

건조감량시험 - 분석용 검체 3g을 미리 무게를 단 칭량병에 넣어 그 무게를 정밀하게 달아 105°C에서 5시간 건조하여 데시케이터(실리카 겔)에서 방냉하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 이것을 105°C에서 건조하고 1시간마다 무게를 정밀하게 달아 항량이 되었을 때의 감량을 건조감량(%)으로 하였다.

회분시험 - 미리 백금제 도가니를 500-550°C에서 1시간 강열하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 분석용 검체 약 2g을 취하여 앞의 도가니에 넣어 그 무게를 정밀하게 달고 처음에는 약하게 가열하고 천천히 온도를 높여 500-550°C에서 4시간 동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 정밀하게 달았다. 다시 잔유물을 항량이 될 때까지 회화하여 방냉한 다음 그 무게를 달아 회분량(%)으로 하였다.

산불용성 회분시험 - 회분에 묶은 염산 25ml를 넣고 5분간 끓여 불용물을 정량용 여과지를 써서 여과하여 취하고 열탕으로 잘 씻어 잔류물을 여과지와 함께 건조한 다음 회분의 항과 같은 조작으로 무게를 미리 단 백금제 도가니에서 3시간 강열하여 데시케이터(실리카 겔)에서 방냉하고 그 무게를 달아 산불용성 회분량(%)으로 하였다.

지표성분의 분리정제 - 오가피 5kg을 건재상에서 구입 후 정확히 감정하여 세말로 하였다. 50% MeOH로 3회 반복 추출하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이것을 물과 CH₂Cl₂, EtOAc, 수포화 BuOH으로 분획한 후 BuOH층을 CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:45:10을 이동상으로 한 silicagel column chromatography를 실시하여 5개의 fraction으로 나누었다. Fr.II를 H₂O→MeOH gradient를 이동상으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 Fr.II-2에서 지표물질인 acanthoside D를 얻었다(Fig. 1).

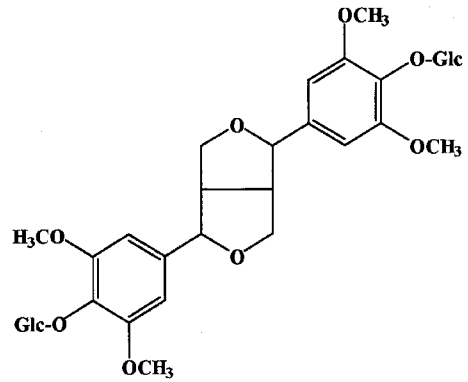


Fig. 1. The structure of Acanthoside D.

Acanthoside D - colorless needles; m.p. 269-270 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -18.5 (c=0.5, 50% EtOH), UV(log ϵ), λ_{max} (MeOH) nm: 210.2 (4.81), 276.2 (3.41); IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3350 (OH), 2932 (C-H), 1591, 1508; ESI-MS (m/z): 741 [M-H]⁺; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 3.00-3.80 (m, glc H-2, 6), 3.76 (12H, s, OMe x4), 4.20 (4H, m, H-9, 9'), 4.67 (2H, d, $J=4.0$ Hz, H-7, 7'), 4.88 (2H, br d, $J=7.0$ Hz, glc H-1 x2), 6.66 (4H, s, H-2, 2', 6, 6'); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 54.45 (C-8, 8'), 57.25 (OMe x4), 72.19 (C-9, 9'), 85.92 (C-7, 7'), 105.02 (C-2, 2', 6, 6'), 134.48 (C-1, 1'), 137.93 (C-4, 4'), 153.46 (C-3, 3', 5, 5'), 103.46, 74.99, 77.34, 70.74, 78.06, 61.73 (glc C-1, 6 x2)

HPLC의 분석조건 - HPLC는 Young-Lin HPLC 9600 System으로서 M930 Solvent Delivery Pump, M720 UV-VIS Absorbance Detector, Autochro-WIN Data System을 사용하였다. Column은 Shiseido ODS (250×4.6 mm, I.D.)를 사용하였고, 이동상으로는 CH₃CN:H₂O = 15:85를 사용하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector의 파장은 210 nm에서 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 - 오가피를 세말로 하여 약 1.0g을 정확히 취하고 50% MeOH 10ml을 가하여 실온에서 sonicator로 1시간 동안 추출하여 이중 1ml을 취하였다. 이를 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

표준액의 조제 및 검량선의 작성 - 오가피로부터 분리한 정량용 acanthoside D 1mg을 1ml의 MeOH 용액에 용해하고 이것을 MeOH로 희석하여 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml로 만들어 검량선용 표

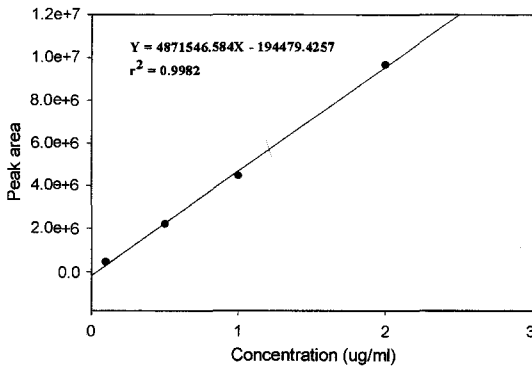


Fig. 2. Calibration Curve of Acanthoside D.

준용액으로 하였고, HPLC를 각각의 표준용액을 취하여 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다(Fig. 2).

Acanthoside D의 함량분석 - 전향에서 조제한 각 검액으로 HPLC를 3회 반복 실시하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 검량선에서 구한 회귀직선 방정식으로부터 각각 acanthoside D의 함량을 구하였다. 이때 acanthoside D의 peak는 표준품과 직접적으로 spike test를 실시하여 확인하였으며, t_R 은 13.9 min이었다(Fig. 3).

결과 및 고찰

약전 및 생약규격집에 수재되어 있으며 현재 한방에서 널리 이용되고 있는 오가피에 대한 표준화 연구의 일환으로, 오가피의 주성분으로 다양한 생리활성이 보고된 acanthoside D를 지표물질로 선정하였다. 표준품 확보를 위하여 오가피를 50% MeOH로 3회 반복

추출하여 MeOH 엑스를 얻었다. 이것을 물과 CH₂Cl₂, EtOAc, 수포화 BuOH으로 분획한 후 BuOH층을 CHCl₃:MeOH:H₂O = 65:45:10을 이동상으로 한 silicagel column chromatography를 실시하여 5개의 fraction으로 나누었다. Fr.II를 H₂O→MeOH gradient를 이동상으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 Fr.II-2에서 지표물질인 acanthoside D를 순수분리 정제하였다. 순수하게 단리된 물질은 colorless needles로 m.p. 269°C를 나타내었고, UV spectrum에서는 210 nm에서 흡수극대를 나타내었다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 6.66에서 singlet으로 4개의 aromatic proton을 관찰할 수 있었고, δ 3.76에서 4개의 methoxy기에서 기인하는 singlet signal, δ 4.67에서 2개의 oxymethine 및 δ 4.20에서 2개의 methylene에서 기인하는 signal이 관찰되어 lignan 화합물로 추정하였으며, δ 4.88에서는 2개의 glucose에서 기인하는 anomeric proton이 J=7.0 Hz로 나타났으며, δ 3.00-3.80에서는 2개의 glucose에서 기인하는 signal을 관찰할 수 있었다. 또한, ¹³C-NMR spectrum에서는 총 17개의 carbon signal을 관찰되어 대칭화합물인 liriodendrin으로 추정할 수 있었다. ESI-MS spectrum에서는 m/z 741에서 [M-H]⁺ ion peak를 나타내어 분자량 742임을 확인할 수 있었다. 이상의 각종 spectral data를 검토하여 compound 1은 (-)-syringaresinol-di-O-β-D-glucopyranoside인 acanthoside D로 추정하고 문헌과 비교하여 구조를 동정하였다.^{13,14)}

순도시험결과 목부조직 및 가는 가지는 대한약전 제7개정 규정의 규정인 2.0% 이하에는 부적합하였고, 이물은 1.0% 이하에 적합하였다. 회분시험은 중국산과 국산의 차이가 현저하게 나타났으며 각각의 측정결과는

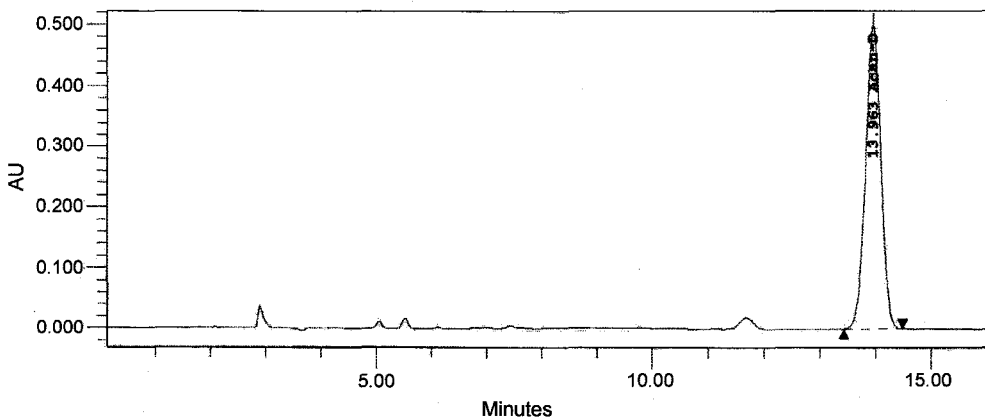


Fig. 3. HPLC chromatogram of standard Acanthoside D.

Table I. *Acanthopanax Cortex*의 목부조직 및 가는가지, 이물, 건조감량, 회분, 산불용성회분 및 acanthoside D의 함량

Sample	acanthoside D 함량(%)	목부조직 및 가는가지(%)	이물 (%)	건조감량 (%)	회분함량(%)		산불용성회분 함량(%)	Collection Place
					중국산	한국산		
OGP 1	0.129	10.61	-	10.41	8.48		0.58	Kwangju
OGP 2	0.220	3.14	-	7.32	15.3		0.94	Seoul
OGP 3	0.059	17.27	-	8.33	6.82		0.49	Seoul
OGP 4	0.183	6.77	-	7.73	12.35		1.32	Keumsan
OGP 5	0.082	10.88	-	9.75	10.52		0.63	Seoul
OGP 6	0.019	9.61	-	8.88	10.06		3.64	Daejon
OGP 7	0.151	2.62	-	6.67	12.18		0.84	Daegu
OGP 8	0.047	0.82	-	8.97	6.53		0.6	Cheongju
OGP 9	0.216	0.95	-	9.84	16.39		1.44	Jeonju
OGP 10	0.252	0.26	-	6.77	16.2		0.28	Seoul
OGP 11	0.159	1.00	-	8.37	17.2		0.82	Jechon
OGP 12	0.075	2.15	-	6.9	13.02		0.9	Andong
OGP 13	0.006	4.03	-	8.52	7.79		0.74	Seoul
OGP 14	0.079	1.83	-	7.17	9.08		0.56	Daegu
OGP 15	0.084	4.01	-	6.99	13.17		0.52	Andong
OGP 16	0.109	2.93	-	6.77	11.55		0.65	Kangnung
OGP 17	0.096	8.05	-	10.92	9.05		0.59	Hwasoon
OGP 18	0.014	3.05	-	7.9	8.37		1.96	Jeju
OGP 19	0.089	2.39	-	7.18	10.07		0.75	Daegu
OGP 20	0.133	0.92	-	6.52	19.72		0.8	Seoul
OGP 21	0.022	17.19	-	5.37		4.96	0.3	Seoul
OGP 22	0.007	23.32	-	5.81		4.86	0.29	Seoul
OGP 23	0.011	2.57	-	7.32		4.86	0.27	Seoul
OGP 24	0.059	5.73	-	7.34		2.74	0.2	Keumsan
OGP 25	0.076	59.29	-	7.3		3.86	0.19	Chuncheon
OGP 26	0.017	3.15	-	10.93		4.94	0.78	Cheongju
OGP 27	0.005	3.64	-	6.29		5.1	0.47	Seoul
OGP 28	0.009	4.03	-	7.45		4.64	0.53	Seoul
OGP 29	0.004	4.63	0.5	6.74		4.3	0.46	Seoul
OGP 30	0.133	2.55	-	6.64		3.82	0.67	Seoul
OGP 31	0.127	6.16	-	7.92		9.79	0.9	Youngchon
OGP 32	0.032	3.45	-	7.42		5.58	0.54	Seoul
OGP 33	0.074	2.87	-	7.58		7.86	0.81	Daegu
OGP 34	0.010	1.86	-	7.49		5.41	0.72	Daejeon
OGP 35	0.007	9.17	-	9.3		5.06	0.6	Seoul
OGP 36	0.045	44.61	-	7.02		3.27	0.4	Kwangju
OGP 37	0.013	2.77	-	6.21		5.7	0.95	Hwamyang
OGP 38	0.059	53.53	-	6.25		3.42	0.47	Pusan
OGP 39	0.107	1.79	-	7.17		8.75	1.34	Jecheon
Average ±S.D.	0.081±0.058	8.86±8.56	0.01	7.68±1.04	11.7 ±3.02	5.21 ±1.25	0.73±0.32	

중국산 11.7±3.02% (n=20), 국산은 5.21±1.25% (n=19)를 나타내 국산은 대한약전 제7개정 규정의 8.0% 이하에 적합하였으나 중국산은 부적합하였다. 산

불용성시험결과 평균 0.73±0.32% (n=39)로 나타났으며 대한약전 제7개정 1.0% 이하에 대체로 적합하였으나, 중국산 일부에서 규정을 벗어나는 것이 있었

다. 따라서, 회분 및 산불용성 회분에 대한 엄격한 관리가 요구된다. 건조감량 시험결과 평균 $7.68 \pm 1.04\%$ ($n=39$)로 나타났으며 12% 이하로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다(Table I).

Acanthoside D는 오가피의 주성분으로 각종 생리활성이 보고되어 있으며, HPLC를 이용하여 쉽게 정량할 수 있으므로 지표성분으로 설정하여 39종의 시료에 대하여 acanthoside D의 함량을 측정하였다. Column으로는 Shiseido ODS (250×4.6 mm, I.D.)를 사용하였고, 여러 용매계를 이용하여 HPLC chromatogram을 얻고 가장 분리능이 양호한 용매계로서 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 15:85$ 를 사용하였으며, 또한 검출파장으로는 최대흡광도인 210 nm를 사용하였다. 이 조건에서 표준품인 acanthoside D는 t_r 13.9 min에서 나타났으며, 다른 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건임을 알 수 있었다. 지표물질을 사용하여 검량선을 작성한 결과 회귀직선 방정식은 $y = 4871546.584x - 194479.426$ ($r^2 = 0.998$)로 나타났으며, 직선성이 인정되었다.

전국각지에서 구입한 39종의 오가피(OGP01-OGP39)에 대해 3회 반복 실험하여 상기 회귀직선 방정식으로부터 건조중량(g)중의 acanthoside D의 함량(mg)을 구하여 %를 산출하였다(Table 1). 오가피중의 acanthoside D 함량은 평균 $0.081 \pm 0.058\%$ ($n=39$)를 나타내었으며, 모든 시료에 함유되어 있었지만 시료에 따라 다소간의 편차가 있었다.

결 론

오가피의 lignan성분 중 하나로서, 다양한 생리활성이 보고된 acanthoside D를 지표물질로 선정하여 오가피의 MeOH 추출물로부터 순수분리하여 구조를 동정하였으며, HPLC에 의한 품질평가법을 확립하였다. 전국 각지역에 유통되고 있는 오가피 39종(OGP01-OGP39)을 수집하여 순도시험결과 목부조직 및 가느가지 8.86 ± 8.56 ($n=39$)는 대한약전 제7개정 규정한 2.0% 이하에는 부적합하였는데 현재 유통되는 오가피 중 몇몇은 가지채로 판매되고 있었다. 이물은 1.0% 이하에 적합하였다. 회분시험은 중국산 $11.7 \pm 3.02\%$ ($n=20$), 국산은 $5.21 \pm 1.25\%$ ($n=19$)를 나타내 국산은 대한약전 제 7개정 규정한 8.0% 이하에 적합하였으나 중국산은 부적합하였다. 산불용성 시험결과 평균 $0.73 \pm 0.32\%$ ($n=19$)로 나타났으며 대한약전

제7개정의 1.0% 이하에 대체로 적합하였으나, 중국산 일부에서 규정을 벗어나는 것이 있었다. 따라서, 회분 및 산불용성 회분에 대한 엄격한 관리가 요구된다. 건조감량 시험결과 평균 $7.68 \pm 1.04\%$ 로 나타났으며 12% 이하로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다. 또한, acanthoside D 함량을 측정한 결과 평균 $0.081 \pm 0.058\%$ ($n=39$)을 나타내었으며, 오가피의 표준화를 위해서는 acanthoside D의 함량기준을 0.01% 이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

사 사

본 연구는 2001년도 생약·한약재 품질표준화연구(식품의약품안전청)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 한국약학대학협의회 약전분과회(1999), 대한약전 제7개정, p. 1078. 문성사, 서울.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순(1998) 원역중약대사전, pp. 3907-3914. 도서출판 정담, 서울.
3. Kim, S. K., Kim, Y. G., Lee, M. K., Ham, J. S., Lee, J. H. and Lee, H. Y. (2000) Comparison of biological activity according to extracting solvents of four *Acanthopanax* root bark. *Korean J. Medicinal Corp. Sci.* 8(1): 21-28.
4. Ahn, J. K., Lee, W. Y., Oh, S. J., Park, Y. H., Hur, S. D. and Choi M. S. (2000) The Contents of Chlorogenic acid and Eleutheroside E in *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms. *Jour. Korean For. Soc.* 89(2): 211-222.
5. Miyakoshi, M., Ida, Y., Isoda, S. and Shoji, J. (1993) 3 alpha-hydroxyoleanane-type triterpene glycosyl esters from leaves of *Acanthopanax spinosus*. *Phytochemistry* 34(6): 1599-602.
6. Sawada, H., Miyakoshi, M., Isoda, S., Ida, Y. and Shoji, J. (1993) Saponins from leaves of *Acanthopanax sieboldianus*. *Phytochemistry* 34(4): 1117-1121.
7. Zhao, Y. Q., Yang, S. S., Liu, J. H. and Zhao, G. R. (1993) Chemical constituents of *Acanthopanax senticosus* (Rupt. et Maxim.) Harms. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 18(7): 428-429.
8. Wang, J. Z., Tsumura, H., Ma, N., Shimura, K. and Ito, H. (1993) Biochemical and morphological alterations of macrophages and spleen cells produced by antitumor polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta Med.* 59(1): 54-58.

9. Wang, J. Z., Tsumura, H., Shimura, K. and Ito, H. (1992) Antitumor activity of polysaccharide from a Chinese medicinal herb, *Acanthopanax giraldii* Harms. *Cancer Lett.* 65(1): 79-84.
10. Kohda, H., Tanaka, S. and Yamaoka, Y. (1990) Saponins from leaves of *Acanthopanax hypoleucus* Makino. *Chem. Pharm. Bull.* 38(12): 3380-3383.
11. Nishibe, S., Kinoshita, H., Takeda, H. and Okano, G. (1990) Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem Pharm Bull.* 38(6): 1763-1765.
12. Wagner, H., Heur, Y. H., Obermeier, A., Tittle, G. and Bladt, S. (1982) Die DC- and HPLC-Analyse der Eleutherococcus Droge. *Planta Med.* 44: 193-198.
13. Abe, F. and Yamauchi, T. (1988) 9 α -Hydroxypinoresinol, 9 α -Hydroxymedioresinol and related lignins from *Allamanda nerifolia*. *Phytochemistry* 27(2): 575-577.
14. Vermes, B., Seligmann, O. and Wagner, H. (1991) Synthesis of Biologically Active Tetrahydrofuranlignan-(Syringin, Pinoresinol)-Mono- and Bis-Glucosides. *Phytochemistry* 30(9): 3087-3089.

(2001년 11월 16일 접수)