

포장방법에 따른 산약(山藥) 지표성분의 함량분석

서창섭¹, 황대선¹, 이준경¹, 하혜경¹, 김호경², 서영배³, 신현규^{1,*}

1: 한국한의학연구원 한약제제연구부

2: 한국한의학연구원 한약자원연구부 3: 대전대학교 한의과대학 본초학교실

Quantitative Determination of the Marker Constituent of Dioscoreae Rhizoma by the Packaging Methods

Chang-Seob Seo¹, Dae-Sun Huang¹, Jun-Kyoung Lee¹, Hye-Kyoung Ha¹,
Ho-Kyoung Kim², Young-Bae Seo³, Hyun-Kyoo Shin^{1,*}

1: Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine

2: Department of Herbal Resources Research, Korea Institute of Oriental Medicine

3: Department of Herbology, College of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : To investigate the quantitative determination of marker constituents of Dioscoreae Rhizoma by the packaging methods

Methods : HPLC for the determinations of allantoin in the Dioscoreae Rhizoma, the separation method was performed on an Luna NH₂ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Phenomenes) using solvent water-acetonitrile (2 : 8, v/v%) with photo diode array detector (210nm). The flow rate was 2.0 mL/min.

Results : Retention time of allantoin in HPLC chromatogram was about 4.8 min and calibration curve showed good linearity ($R^2 = 0.9994$) at concentrations from 50.0 to 1000.0 μg/mL of allantoin. Average content of allantoin by packaging methods was 0.16 ~ 0.40%. In addition, weight loss rate (%) of Dioscoreae Rhizoma according to the packaging methods was -0.60 ~ 1.80%.

Conclusions : The variation on content of the marker constituent of Dioscoreae Rhizoma by the packaging methods didn't show difference.

Key words : Dioscoreae Rhizoma, allantoin, HPLC, packaging method

서 론

산약(山藥, Dioscoreae Rhizoma)은 마*Dioscorea batatas* Decaisne 또는 참마*Dioscorea japonica*

Thunberg (마과Dioscoreaceae)의 뿌리줄기(담근체)로서 그대로 또는 썬서 말린 것이다¹⁾. 이 약은 중국이 원산지이지만 한국, 일본, 대만에서도 자생하거나 재배되고 있다. 산약은 뿌리줄기로 원주형 또는 고르

* 교신저자 : 신현규, 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 선임연구부

· Tel : 042-868-9464 · E-mail : hkshin@kiom.re.kr

· 접수 : 2008년 10월 28일 · 수정 : 2008년 12월 17일 · 채택 : 2008년 12월 22일

지 않은 원주형이다. 보통 뿌리줄기를 가을에 채취하여 길쭉질을 벗긴 후 그늘에서 말려 사용한다. 이 약은性は平하고味는甘하다. 뿌리줄기를 산약(山藥)이라고 하며, 예로부터 강장(強壯), 건비(健脾), 보폐(補肺), 보신(補身), 보비위(補脾胃), 익폐현(益肺腎), 자양(滋養), 익정(益精) 및 지사(止瀉) 등의 효능이 있으며, 비허(脾虛)로 인한 설사, 구리(久痢), 식욕부진, 해수, 소갈, 유정, 대하, 빈뇨를 치료 목적으로 사용되어 왔다. 잎겨드랑이에 달리는 주아(珠芽)를 영여자(零餘子)라고 하며, 보허(補虛), 보요각(補腰脚)의 효능이 있다. 또한 열매를 풍차아(風車兒)라고 하며, 이명(耳鳴) 치료를 목적으로 사용되어왔다²⁻⁴⁾. 산약(山藥)의 성분으로는 dioscin과 같은 steroid saponin^{2,5)}, mucilagepolysaccharide^{2,6)}, dioscorin과 같은 storage protein⁷⁾, batasin I, II, III와 같은 phenanthrene 유도체^{2,8)} 등과 전분, allantoin, choline 및 amylase 등이 알려져 있다²⁾. 또한 최근 연구에 따르면 산약(山藥)은 혈액응고에 의한 관상동맥 치료⁹⁾, 면역증가¹⁰⁾, 항산화 효과^{11,12)}, 혈당강하 작용^{13,14)}, 항염증 효과¹⁵⁾, 및 항암 효과^{16,17)} 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 산약(山藥)의 지표성분으로는 allantoin¹⁸⁾과 dioscin¹⁹⁾이 제시되었다. 이에 본 연구는 산약(山藥)의 지표성분으로 allantoin으로 선정한 후 산약(山藥) 일정량을 내열성, 경량성 및 비흡수성이 우수한 polypropylene (PP)과 공기 투과성이 낮은 polyethylene (PE)이 1 : 1로 함유된 포장재질을 이용하여 일반포장(G), 실리카겔이 함유된 일반포장(GS), 진공포장(V), 실리카겔이 함유된 진공포장(VS), 질소치환 포장(N) 및 실리카겔이 함유된 질소치환 포장 (NS) 등의 6가지 방법으로 포장한 후 일정기간 상온에 보관하면서 산약(山藥)의 감모율과 지표성분으로 설정한 allantoin의 성분 함량을 비교함으로써 포장 방법에 대한 산약(山藥)의 보관 기간 설정에 대한 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 산약(山藥, *Dioscoreae Rhizoma*)은 경북 안동에서 재배된 한약재를 수집하여 한국한의학연구원 한약제제연구부에서 동정한 후 실험에 사용하였다. 산약(山藥)의 가공은 대전대학교 서영배 교수에 의해 수행되었으며, 가공방법은 수집된 산약의 뇌두부분을 제거한 후 약 15분 정도 원통세척을 하고 45°C에서 약 48시간 건조시켰다. 이 후 산약(山藥)을

원반절단기를 이용하여 약 5 mm의 두께로 절단한 후 다시 45°C에서 약 17시간 건조시킨 다음 포장하여 사용하였다. Allantoin 표준품은 Fluka (Buchs, Switzerland, purity $\geq 98.0\%$)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용하기 위해 미세분말로 만든 다음 약전표준체(standard sieve No. 30, 600 μm)를 통과한 균질한 재료를 사용하였다.

2. 시약 및 기기

분석용 HPLC는 Shimadzu Co. (Japan) 제품으로 system controller (SCL-10Avp), solvent delivery system (LC-6AD), photodiode array 검출기(SPD-M10A), auto sample injector (SIL-10AF)로 구성되었다. 추출 및 정량분석에 사용된 methanol, acetonitrile 및 탈이온수는 HPLC grade용으로 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 그 외의 시약은 HPLC 또는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

3. 검액 및 표준액의 조제

건조한 산약(山藥) 분말 500 mg을 정밀히 달아 취하고 methanol 50 mL를 가한 후 2시간 동안 환류 추출하였다. 추출물을 냉각시킨 후 여과한 여액을 감압농축하고 methanol 5 mL로 녹인 후 0.20 μm membrane filter로 여과한 후 검액으로 하였다. 따로 allantoin 표준품 5 mg을 정밀히 달아 취하고 HPLC 용 water를 가하여 정확히 5 mL로 한 후 이것을 stock solution으로 하여 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 계열 희석한 후 각각 20 μL 씩 주입하여 얻은 chromatogram의 면적으로부터 검량선을 작성하였다.

4. 지표성분의 함량 측정을 위한 HPLC 분석조건

Column은 Luna NH2 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Phenomenex Torrance, CA, USA)를 사용하였으며, detector는 PDA (210 nm)를 사용하였다. Mobile phase는 water : acetonitrile = 2 : 8 (v/v%)을 사용하였고, flow rate는 2.0 mL/min이었으며, 주입량은 20 μL 였다. 칼럼 온도는 상온을 유지하였으며, 얻어진 data는 LCsolution (Ver1.0)을 사용하였다.

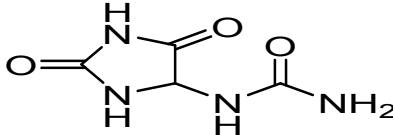


Fig. 1. Chemical structure of allantoin

5. 포장방법

포장 방법은 일반포장(G), 실리카겔이 함유된 일반포장(GS), 진공포장(V), 실리카겔이 함유된 진공포장(VS), 질소치환 포장(N) 및 실리카겔이 함유된 질소치환 포장(NS) 등 6가지 방법으로 포장한 후 실온에서 일정기간 보관하였으며, 포장재는 polypropylene (PP) 과 polyethylene (PE)이 1 : 1로 함유된 것을 사용하였다.

6. 건조감량

칭량병을 미리 105°C에서 30분간 건조하고 그 무게를 정밀하게 달았다. 그 후 산약 2 g을 달아 칭량병에 넣고 그 층의 높이가 5 mm이하가 되도록 편 다음 그 무게를 정밀하게 달고 이것을 105°C에서 6시간 건조한 후 데시케이터(실리카겔)에서 식힌 다음 칭량병을 꺼내어 그 무게를 정밀하게 달았다.

결과 및 고찰

1. 감모율 변화

산약의 감모 정도는 모든 포장방법에서 2.0% 이내로 크지 않았다(Fig. 2.). 보관기간 간에는 보관 6개월 이후에서 감소하다 질소치환 포장 (N)을 제외한 모든 방법에서 12개월 이후에는 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 18개월간 상온에서 보관하면서 감모율을 측정해 본 결과 큰 변화를 보이지 않는 것으로 보아 산약의 감모율 변화에는 포장방법에 많은 영향을 받지 않은 것으로 사료되며, 이는 산약의 유통기간 설정에 대한 기초자료로 활용될 수 있으리라 사료된다.

2. 건조감량

산약의 건조감량시험법에 따라 3회 실시한 결과 모든 포장방법에서 10.04~10.19%로 나타났다(Table 1).

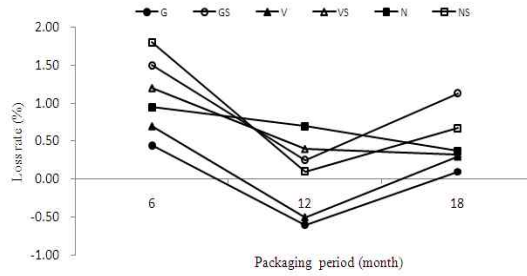


Fig. 2. Weight loss rate (%) of Dioscoreae Rhizoma according to the packaging methods

G: general packaging, GS: general+silica gel packaging, V: vacuum packaging, VS: vacuum+silica gel packaging, N: nitrogen packaging, NS: nitrogen+silical gel packaging

Table 1. The Results of Loss of Drying for the Dioscoreae Rhizoma

Packaging methods	Mean (%)	SD	n=3
			RSD (%)
G	10.04	0.04	0.38
GS	10.19	0.10	1.01
V	10.03	0.03	0.31
VS	10.12	0.07	0.67
N	10.05	0.03	0.33
NS	10.17	0.27	2.62

G: general packaging, GS: general+silica gel packaging, V: vacuum packaging, VS: vacuum+silica gel packaging, N: nitrogen packaging, NS: nitrogen+silical gel packaging

3. HPLC를 이용한 allantoin 정량

산약의 지표성분인 allantoin 표준 용액을 이용하여 HPLC 분석 조건을 설정하였다. Mobile phase로 water : acetonitrile (2 : 8, v/v%)을 사용하였을 때 allantoin의 retention time은 약 4.8분에 나타났으며 다른 성분들과 비교적 잘 분리됨을 알 수 있었다

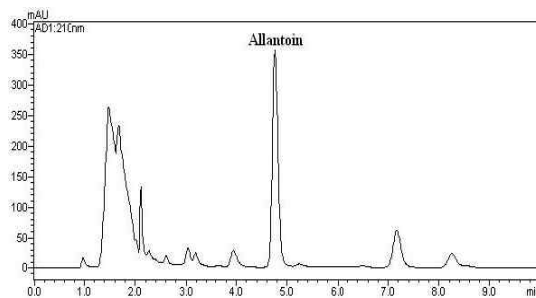


Fig. 3. The HPLC chromatogram of Dioscoreae Rhizoma.

Column: Luna NH₂, injection volume: 20 μL, mobile phase: acetonitrile-water (8:2, v/v%), flow rate: 2.0 mL/min, detector: photodiode array detector (210 nm).

Table 2. Content (%) of allantoin according to the packaging methods (n=3).

Periods(month)	Packaging methods					
	G	GS	V	VS	N	NS
0	0.34	0.36	0.34	0.40	0.34	0.34
6	0.33	0.33	0.29	0.29	0.28	0.31
12	0.36	0.36	0.34	0.23	0.16	0.38
18	0.33	0.29	0.35	0.28	0.30	0.27
Mean±SD	0.34±0.01	0.34±0.03	0.33±0.03	0.30±0.07	0.27±0.08	0.33±0.05

G: general packaging, GS: general+silica gel packaging, V: vacuum packaging, VS: vacuum+silica gel packaging, N: nitrogen packaging, NS: nitrogen+silical gel packaging

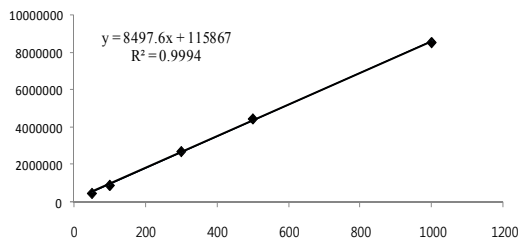


Fig. 4. Calibration curve of standard solution

(Fig. 3). 또한 allantoin의 peak 면적에 대한 검량선 작성 결과 50-1000 µg/mL의 범위 내에서 $y = 8497.6x + 115867$ ($R^2=0.9994$)과 같은 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 4). 구입한 산약의 methanol 추출물을 상기와 같이 확립된 HPLC 분석 조건에 따라 실험한 결과 포장방법에 따른 allantoin의 함량은 0.27-0.34%이었다(Table 2). 따라서 산약의 지표성분인 allantoin의 함량 변화가 크지 않은 것으로 보아 지표성분의 변화에는 포장방법에 대한 영향은 크게 받지 않는 것으로 사료되며, 이는 산약의 유통기간 설정에 대한 기초자료로 활용될 수 있으리라 사료된다.

결론

산약(山藥)의 서로 다른 포장방법에 따른 유통기간을 설정하기 위하여 18개월 동안 보관하면서 감모율, 건조감량 및 지표성분으로 설정한 allantoin의 함량을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 산약(山藥)의 감모율을 18개월 상온에서 보관하면서 측정한 결과 일반포장(G)은 -0.60-0.45%, 실리카겔이 함유된 일반포장(GS)은 0.25-1.50%, 진공포장(V)은 -0.50-0.70%, 실리카겔이 함유된 진공포장(VS)은 0.33-1.20%, 질소치환 포장(N)은 0.37-0.95% 및 실리카겔이 함유된 질소치환 포장(NS)은 0.10-

1.80%로 나타났다.

2. 산약의 건조감량은 일반포장(G)은 $10.04 \pm 0.04\%$, 실리카겔이 함유된 일반포장(GS)은 $10.19 \pm 0.10\%$, 진공포장(V)은 $10.03 \pm 0.03\%$, 실리카겔이 함유된 진공포장(VS)은 $10.12 \pm 0.07\%$, 질소치환 포장(N)은 $10.05 \pm 0.03\%$ 및 실리카겔이 함유된 질소치환 포장(NS)은 $10.17 \pm 0.27\%$ 로 <<대한약전>>기준인 14.0% 이하에 모두 적합한 결과를 보였다.

3. 산약(山藥)의 지표성분인 allantoin 함량을 18개월간 측정한 결과 일반포장(G)은 0.33-0.36%, 실리카겔이 함유된 일반포장(GS)은 0.29-0.36%, 진공포장(V)은 0.29-0.35%, 실리카겔이 함유된 진공포장(VS)은 0.23-0.40%, 질소치환 포장(N)은 0.16-0.34% 및 실리카겔이 함유된 질소치환 포장(NS)은 0.27-0.38%로 나타났다.

이상의 결과로 산약(山藥)의 유통기간 설정에 대한 포장방법은 감모율과 건조감량 및 allantoin의 함량 변화를 분석한 결과 포장별 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 보아 포장방법에 대한 영향은 크지 않는 것으로 사료되며, 또한 보다 정확한 유통기간 설정을 위해 저장방법, 온도 및 습도 등에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007년 보건복지가족부의 '우수한약 발굴 및 품질확보 방안 연구사업'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청. 대한약전제9개정. 서울 : 신일

- 복스, 2008 : 3854.
2. 生藥學研究會 著. 現代生藥學. 서울 : 學窓社. 2000 : 267-8.
 3. 원도희 외. 약용식물도감. 서울 : 식품의약품안전본부. 1997 : 16.
 4. 배기환. 한국의 약용식물. 서울 : 敎學社. 2000 : 551.
 5. Kawasaki T, Yamauchi T. Structures of prosaponin-B and -A of dioscin and concurrence of B with dioscin in the rhizoma of *Dioscorea tokoro* Makino. Chem Pharm Bull. 1968 : 16 ; 1070-5.
 6. Zhao G, Kan J, Li Z, Chen Z. Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots. Carbohydr Polymers. 2005 : 61 ; 125-31.
 7. Gaidamashvili M, Ohizumi Y, Ijima S, Takayama T, Ogawa T, Muramoto K. Characterization of the yam tuber storage proteins from *Dioscorea batatas* exhibiting unique lectin activities. J Biol Chem. 2004 : 279 ; 26028-35.
 8. Sautour M, Mitaine-Offer AC, Miyamoto T, Wagner H, Lacaille-Dubois MA. A new phenanthrene glycoside and other constituents from *Dioscorea opposita*. Chem Pharm Bull. 2004 : 52 ; 1235-7.
 9. Au ALH, Kwok CC, Lee ATC, Kwan YW. Activation of iberiotoxin-sensitive, Ca⁺-activated K⁺ channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. Eur J Pharmacol. 2004 : 502 ; 123-33.
 10. Choi EM, Koo SJ, Hwang JK. Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). J Ethnopharmacol. 2003 : 91 ; 1-6.
 11. Choi EM, Hwang JK. Enhancement of oxidative response and cytokine production by yam mucopolysaccharide in murine peritoneal macrophage. Fitoterapia. 2002 : 73 ; 629-37.
 12. Farombi EO, Britton G, Emerole GO. Evaluation of the antioxidant activity and partial characterization of extracts from browned yam flour diet. Food Res Int. 1999 : 33 ; 493-9.
 13. Brakohiapa LA, Quaye IK, Amoah AG, Harrison EK, Kennedy D, Kido Y, Ofei F. Blood glucose responses to mixed Ghanaian diets in healthy adult males. West Afr J Med. 1997 : 16 ; 170-3.
 14. Morrison EY, Ragoobirsingh D, Peter SA. The Unitarian hypothesis for the aetiology of diabetes mellitus. Med Hypotheses. 2006 : 67 ; 1115-20.
 15. Kim MJ, Kim HN, Kang KS, Baek NI, Kim DK, Kim YS, Kim SH, Jean BH. Methanol extract of *Dioscorea* Rhizoma inhibits pro-inflammatory cytokines and mediators in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. Intern Immunopharmacol. 2004 : 4 ; 1489-97.
 16. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines *in vitro*. Cancer Invest. 2003 : 21 ; 389-93.
 17. Hu K, Yao X. The cytotoxicity of methyl protoneogracillin (NSC-698793) and gracillin (NSC-698787), two steroidal saponins from the rhizomes of *Dioscorea colletii* var *hypoglauca*, against human cancer cells *in vitro*. Phytother Res. 2003 : 17 ; 620-6.
 18. Hwang GS. Isolation and quantitative determination of allantoin from *Dioscoreae* Rhizoma. Kor J Oriental Preventive Medical Society. 2003 : 7 ; 133-8.
 19. Nam DH, Son KH, Kim JY, Kim SD, Lim SK. Quantitative determination of dioscin from *Dioscorea* Rhizoma. Kor J Pharmacogn. 2006 : 37 ; 33-6.