

우황(Bezoar Bovis)의 성분연구

金寅圭[†] · 朴善求 · 吳賢哲 · 金奎完*

성균관대학교 화학과

*영진약품

(1990. 11. 1 접수)

The Chemical Constituents of *Bezoar Bovis*

In Kyu Kim[†], Sun Ku Park, Hyun Cheol Oh, and Kyu Wan Kim*

Department of Chemistry, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

*Yungjin Pharm. CO., LTD.

(Received November 1, 1990)

요 약. 남미산 시료 우황(*Bezoar Bovis*)으로부터 glycodeoxycholic acid, cholesterol, cholesteryl fatty acid ester, palmitic, stearic methyl ester 외에 새로운 성분으로 8-octadecenoic methyl ester 및 cholesta-3,5-diene을 분리하였다.

ABSTRACT. Two new metabolites have been characterized from the methylene chloride extracts of *Bezoar Bovis*, a well known oriental drug: 8-octadecenoic methyl ester and cholesta-3,5-diene. Their structures were deduced from ¹H-NMR and GC-mass spectra.

서 론

우황은 소(*Bos taurus* Linne var. *domestica* Gmelin)에 병적으로 생긴 담석이다. 구상, 편구상, 사면체 등 여러 가지 모양이 있으나, 어느 경우나 괴상(塊狀)을 이루고 있으며 지름 1~4 cm의 황갈, 적갈색을 띠고 질은 가볍고 연하여 부서지기 쉽다. 이것은 동양의 전통적인 한약재로서 진경, 해열, 해독 등의 작용이 있다하여 강심제, 해열제, 진통제, 진경제 등 많은 열성(熱性) 환자의 치료약으로 쓰여져 왔다.

Kimura²의 우황에 대한 진경작용을 중심으로 한 보고에 따르면, 어떤 우황에 대해서도 진경효과가 인정되고 특히 남미산 우황의 진경효과가 가장 강하고, 인도산 우황은 다른 산지의 것보다 낮은 효과를 나타내고 있다. 우황의 진경효과는 deoxycholic acid를 중심으로 하여 cholic acid 등의 함유공존 성분의 복합 효과에 의존하는 것으로 보인다.

우황의 약리적 성질에 대한 보고는 많지만 이것의 성분과 약리적 효과와의 관계는 확실하게 규명되어

있지 않다. 지금까지 보고된 우황의 성분으로는 bilirubin, free cholesterol, fatty acid cholesteryl esters, free fatty acids, bile acids, amino acids, carotenoids, peptides, lecithins 등과 그의 무기물질이 있다³. 우황의 bile acid 성분으로 보고된 것은 cholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, lithocholic acid, methyl cholate, methyl deoxycholate, methyl chenodeoxycholate, glycocholic acid, taurocholic acid, glycodeoxycholic acid, taurodeoxycholic acid 등이다.

일반적으로 우황 등 한약재는 물을 사용하는 것이 기본이고 실제로도 우황의 수용성 성분의 약리활성이 불용성 성분 보다 더 좋은 것으로 알려져 있음으로, 본 연구의 원래의 목적은 우황의 수용성 성분을 밝히는데 있으며 그 전단계로서 지용성 성분에 대한 보다 철저한 탐색을 한 결과 두 개의 새로운 성분을 발견하게 되어 이를 보고 하고자 한다.

실 험

실험 기기 및 시약. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 Bruker WP80 SY 80 MHz FT-NMR spectrometer를 사용했다. 모든 NMR 스펙트럼은 표준물질로 TMS를 사용했고 δ (ppm)으로 chemical shift를 나타냈으며 용매로는 CDCl_3 (δ 7.259)를 사용했다. GC-mass 스펙트럼은 Hewlett-Packard 사의 GC 5890, column은 SE-30(16 m, 0.2 mm, 100/20/300)을 질량분석기는 MS 5790, Quadrupole, EI를 이용했고 TMS 유도체를 만들어 더욱더 용이한 분리를 했다. Shorty funnel chromatography는 silicagel 60H(Merck)을 사용했으며, preparative TLC는 silicagel 60 GF₂₅₄(Merck)을 사용했다. TLC에 나타난 spot는 자외선형광 및 anisaldehyde 용액, 진한 황산을 사용하여 확인했다.

모든 유기용매는 증류 건조하여 사용했으며 시약은 GR급을 사용했다.

추출. 시료는 남미산 우황(Bezoar Bovis) 55g을 사용했다. 깨끗한 병에 우황을 넣고 3일간 pet. ether에 담가 놓는다. 3일 후 사료로부터 pet. ether 추출액을 조용히 따라내고 남아있는 시료에 dichloromethane을 붓는다. 다시 3일 후, dichloromethane 추출액을 따라내고 동일한 방법으로 methanol 추출액을 얻는다. 각 추출액을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 rotatory evaporator로 용매를 제거한 결과 pet. ether 추출물 0.73g과 dichloromethane 추출물 2g 및 methanol 추출물 2.5g을 얻었다.

Chromatography를 이용한 sterol, 지방산 및 bile acid의 분리. 우황의 pet. ether 추출물, dichloromethane 추출물에 대해 각각 shorty funnel chromatography 분리를 했고, 여러 혼합용매의 극성을 높여가며 분리한 결과 pet. ether 추출물에서 6개 분획과 dichloromethane 추출물에서 13개 분획을 얻었다. Dichloromethane 추출물 분획 중에서 100% dichloromethane 분획으로부터 지방산 methyl ester 혼합물과 2개의 sterol 성분이 얻어졌다.

이들을 TLC(CH_2Cl_2 1 : n-hexane 2.6)로 전개시킨 결과 자외선 형광 및 anisaldehyde 용액 확인에 의해 지방산 methyl ester 혼합물로 여겨지는 spot가 $R_f=0.43$ 에서 나타났고 GC-mass로부터 다음의 3가지 성분을 확인하였다. Palmitic, stearic 8-octadecenoic acid methyl ester(1) : $^1\text{H-NMR}$ (FT-80 MHz,

CDCl_3) δ 0.87(3H, t, H-18), 1.3(22H, CH_2 groups), 2.3(2H, t, H-2), 3.6(3H, s, methyl ester), 5.4(2H, m, H-8, 9), MS(EI) : m/e(relative intensity) 296.00(7), 264.00(35), 222.00(16), 129.00(5), 87.00(42), 55.00(100). cholesta-3,5-diene(2) 이 $R_f=0.72$ 에서 나타났다 : $^1\text{H-NMR}$ (FT-80 MHz, CDCl_3) δ 0.66(3H, s, H-18), 0.86, 0.96(3H, d, H-21), 1.01(3H, s, H-19), 5.42(2H, m, H-3, 6), MS(EI) : m/e(relative intensity) 368.40(56), 353.40(17), 255.25(12), 213.25(15), 147.10(71), 145.10(64), 81.10(100).

이외에도 위와 동일한 실험방법에 의해 R_f 0.81에서 cholesteryl fatty acid ester가 얻어졌으며 이들은 ^1H - 및 ^{13}C -NMR에 의해서 확인되었다.

한편, ethyl acetate의 20% methanol 부분에서 bile acid 혼합물을 얻었는데 이것을 ethyl acetate로 재결정하여 TBDMS 유도체를 만들어 GC-mass 스펙트럼으로 확인한 결과 주성분이 glycodeoxycholic acid임을 밝혀냈다.

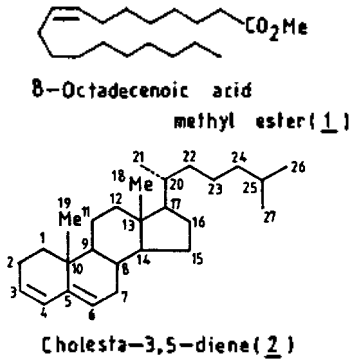
결과 및 고찰

남미산 우황(Bezoar Bovis)을 시료로 사용했으며 덩어리로 된 우황을 분말로 하여 pet. ether, dichloromethane, methanol의 순서로 계속적으로 추출하였다.

각각의 추출물을 용매의 극성을 높여가며 shorty funnel chromatography로 분리했고, 100% dichloromethane 분획에서 지방산 methyl ester의 혼합물과 sterol 성분이 얻어졌고 ethyl acetate-methanol (4 : 1) 분획에서 bile acid 혼합물을 얻었다. 이들을 preparative TLC로 분리 정제하여 한 개의 bile acid 성분과 한 개의 sterol 성분 및 3개의 지방산 methyl ester를 얻었다.

Sterol 성분 중에서는 cholesterol, cholesteryl fatty acid ester 이외에 cholesta-3,5-diene이 얻어졌는데 이것은 1987년 Volkman 등이 남극의 Ace Lake에서 침전물 중의 한 성분으로 보고한 바 있으나, 우황에 존재한다고 밝혀진 것은 이번이 처음이다. 3개의 지방산 methyl ester 성분 중에는 이미 알려져 있는 palmitic, stearic acid methyl ester 이외에 8-octadecenoic acid methyl ester가 확인

되었는데 이 물질의 우황의 성분으로 발견된 것은 이번이 처음이다. 그리고 bile acid 성분 중에는 glycodeoxycholic acid가 얻어졌다. 이것들의 구조는 $^1\text{H-NMR}$ 및 GC-mass 스펙트럼에 의해서 밝혔다.

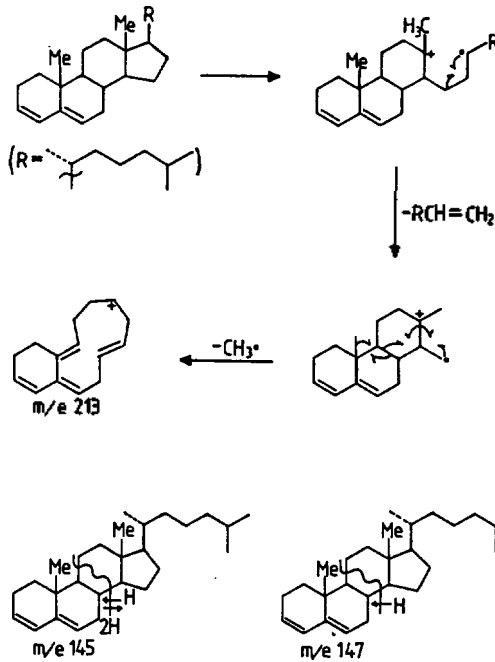


100% dichloromethane 분획을 column chromatography로 최종적으로 분리한 결과 극성이 보다 작은 분획으로부터 sterol 성분인 cholesta-3,5-diene을 얻었고 이것을 $^1\text{H-NMR}$ 및 GC-mass 스펙트럼으로 확인하였다. Cholesta-3,5-diene의 molecular ion peak는 m/e 368(rel. abundance 56%)에서 나타나고, C-19 methyl기가 끊어진 m/e 353(rel. abundance 17%) peak와 C-17과 C-20의 결합이 끊어지면서 C_8H_{17} 이 떨어져나간 m/e 255(rel. abundance 12%)의 peak가 나타난다. 이외에 m/e 213(rel. abundance 15%)과 수소 이동⁵에 의한 m/e 145 및 147이 관찰되고 base peak는 m/e 81에 특징적으로 나타난다. 이상의 값들은 문헌⁶에 알려진 값들과 완전히 일치하였다.

Cholesta-3,5-diene은 GC-mass 조작 중에 cholest-5-en-3-ol에서 -OH기가 제거반응에 의해서 생성된 것이라는 의문을 가질 수 있지만 $^1\text{H-NMR}$ 에 의하면 cholest-5-en-3-ol은 C-3 위치의 양성자(1H, δ 3.5, m)가 나타나는 반면, 목적물의 $^1\text{H-NMR}$ 에는 이 위치의 흡수 peak가 나타나지 않았고 mass 스펙트럼을 살펴보면 목적물의 mass 스펙트럼의 경우는 molecular ion peak가 m/e 368에서 나타나고 base peak가 m/e 81에서 나타나는 반면 cholest-5-en-3-ol의 경우는 molecular ion peak가 m/e 386에서 나타나고 m/e 81의 peak가 약하며 cholesta-3,5-diene에서는 볼 수 없는 m/e 273, m/e 275의

peak가 나타난다.

이외에도 NBS Mass spectrum Data Base를 이용하여 cholesta-3,5-diene 및 cholest-5-en-3-ol acetate 표준물질과의 Match Quality 값(각각 8439 및 7435)으로도 확인할 수 있었다.



또한 다른 sterol 성분으로는 cholesteryl fatty acid ester을 얻었고 이것을 $^1\text{H-}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 로 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ 의 스펙트럼은 C-3 양성자(δ 4.3 ~ 4.8, m, 1H), Δ^5 위치의 고리안 이중결합 탄소 C-6 양성자(δ 5.31, m, 1H), 카르보닐 옆의 α -탄소의 메틸렌 양성자(δ 2.3, t, 2H), 의 흡수 peak을 나타낸다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 흡수 peak을 살펴보면 fatty acid ester로 치환된 탄소 C-3(δ 73.5), 고리안 이중결합의 탄소 C-5, C-6(δ 139.5, 122.4), 카르보닐 탄소(δ 172.8)이다. 이상의 peak는 표준물질 cholesteryl oleate(Aldrich) 값과 일치하였다 [$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 172.8, 139.5, 129.8, 129.6, 122.4, 73.5, 56.6, 56.2, 50.0, 42.3, 39.7, 39.5, 38.1, 37.0, 36.5, 36.2, 35.8, 34.5, 31.8, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.0, 28.2, 27.9, 27.8, 27.1, 24.2, 23.8, 22.7, 22.6, 22.5, 21.0, 19.2, 18.7, 14.0, 11.8].

극성이 보다 큰 분획으로부터는 palmitic acid,

stearic acid, 8-octadecenoic acid의 methyl ester 혼합물을 얻었다. 이들을 $^1\text{H-NMR}$ 및 GC-mass 스펙트럼으로 확인하였고 이들 palmitic acid, stearic acid, 8-octadecenoic acid의 methyl ester의 상대적인 양은 비슷하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면 8-octadecenoic acid methyl ester의 이중결합에 위치한 2개의 양성자(δ 5.4, m), C-2의 양성자(δ 2.3, t, 2H), methyl ester의 methyl기(δ 3.6, s, 3H)의 흡수 peak를 나타낸다.

이들의 GC-mass 스펙트럼을 살펴보면 palmitic acid와 stearic acid methyl ester의 molecular ion peak는 각각 m/e 270와 m/e 298을 나타내며 McLafferty rearrangement로 인한 m/e 74 peak가 가장 강하게 나타나는 특징과 $(\text{CH}_2)_2$ 가 일정하게 fragmentation 되는 것을 볼 수 있다. 그리고 propyl기가 fragmentation된 각각의 m/e 227, m/e 255 peak도 나타난다. Octadecenoic acid methyl ester의 molecular ion peak는 m/e 296에서 나타나고 methanol이 떨어져나간 m/e 264 peak와 m/e 55에서 base peak를 나타낸다. Octadecenoic acid methyl ester의 이중결합의 위치를 결정하기 위하여 이중결합이 각각 C-7, C-8, C-9에 있는 표준물질과 NBS mass spectrum Data Base에서 Match Quality(각각 8862, 9352, 9077)를 비교한 결과 8-octadecenoic acid methyl ester임을 확인할 수 있었다. 에틸 아세트이트-메탄올(4 : 1) 분획에서 얻어진 bile acid 혼합물도 GC-mass 스펙트럼으로 확인하였는데 glycodeoxycholic acid에서 H_2O 가 떨어져 나간 m/e 431 peak가 나타난다. 또한 H_2O 1개가 더 떨어져 나간 m/e 413의 peak와 NHCH_2COOH 가 끊어진 m/e 357의 peak가 나타나며 C-17과 C-20의 결합이 끊어져서 $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}$ 이 떨어져 나간 m/e 273의 peak와 m/e 255에서 base peak가 나타난다. 이상의 값들은 문헌⁶

의 값과 완전히 일치하였다.

결 론

본 연구는 우황의 지용성 성분에 관한 것으로서 우황을 pet. ether, dichloromethane, methanol로 계속적으로 1차 추출한 다음 이 추출물 각각을 shorty funnel chromatography로 용매의 극성을 증가 시켜가며 2차 추출을 했고, 이 추출물을 preparative TLC로 분리 정제하였다. 그 결과 문헌에 보고된 바 있는 cholesterol, cholesteryl fatty acid ester, glycodeoxy cholic acid, palmitic acid methyl ester 및 stearic acid methyl ester 외에 새로운 성분으로 8-octadecenoic acid methyl ester 및 cholesta-3,5-diene을 분리하였다. 이들의 구조는 $^1\text{H-NMR}$ 및 GC-mass 스펙트럼으로부터 밝혀내었다.

인 용 문 헌

1. 한덕용의 공저, "현대생약학" (한국학습교재사, 서울, 1980), p. 322.
2. M. Kimura, *Taisha*, 10, 749 (1973) and other references cited therein.
3. Z. Horii, K. Nagago, and S. Kim, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 1607 (1978).
4. J. K. Volkman *et al.*, C. A. vol. 106, 89744y (1987); *Org. Geochem.*, 10, 671 (1986).
5. (a) F. W. McLafferty, "Interpretation of Mass Spectra" (W. A. Benjamin, inc., 1973), p. 104; (b) L. Tokes, G. Jones, and C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5465 (1968).
6. (a) Heller and Milne, "EPA/NIH Mass spectra Data Base" 2, 3, 2889, 1957, 2198, 2219 (1978); (b) Einar. Stenhagen, *et al.*, "Registry of Mass spectral Data", 2, 2286 (1974).