

국내 유통 한약재 중 Aristolochic Acid 분석

- 연구노트 -

강숙경 · 송경빈*

충남대학교 식품공학과

Detection of Aristolochic Acid from Medicinal Herbs Marketed

Sook-Kyung Kang and Kyung Bin Song*

Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

Aristolochic acid has been known to be a carcinogenic compound and to cause Chinese herbs nephropathy (CHN). To determine the content of aristolochic acid in various medicinal herbs marketed domestically, samples of *Aristolochia fangchi*, *Aristolochia fructus*, *Aristolochia radix*, *Asiasari radix*, *Saussureae radix*, and *Akebia caulis* were analyzed using TLC and HPLC. The optimal conditions for TLC and HPLC using C_{18} column were established for the quantitative analysis of aristolochic acid. This study showed that *Aristolochia fangchi* and *Aristolochia fructus* examined in this study contain aristolochic acid of 3.9 and 2.3 mg/g sample, respectively. In contrast, aristolochic acid was not detected in the other samples.

Key words: aristolochic acid, *Aristolochia fangchi*, detection, HPLC

서 론

Aristolochic acid는 nitrophenanthrene carboxylic acid로서 취방울덩굴과(Aristolochiaceae)에 속하는 광방기(*Aristolochia fangchi*), 관목통(*Aristolochia manshuriensis*), 청목향(*Aristolochia contorta*) 등의 함유성분으로 알려져 있으며 aristolochic acid I과 aristolochic acid II(Fig. 1) 및 다수의 유도체로 구성되어 있다(1,2). Aristolochic acid I과 aristolochic acid II는 aristolactam으로 전환되어 이것이 DNA와 결합하여 7-(deoxyadenosin- N^6 -yl) aristolactam I이나 II 등을 형성하여 돌연변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(3). Aristolochic acid는 1993년 벨기에에서 기존 Chinese herbs의 대체품을 함유한 다이어트 식이를 장기간 섭취한 환자들로부터 신장장애가 관찰됨으로써(1,2) 국제적인 관심을 받게 되었는데 이는 Chinese herb들의 유사한 일반명 때문에 발생한 것으로 밝혀졌다. 그 후 유럽지역과 미국에서도 Chinese herbs nephropathy(CHN) 환자들에 대한 보고가 있었으며(3) CHN 환자들의 조직검사를 통하여 신장암이 발견됨으로써 발암성 물질로도 알려지게 되었다(4-6). 따라서 2001년 FDA는 발암성 성분의 하나로 밝혀진 aristolochic acid를 함유하고 있는 식물의 학명과 일반명 등을 작성하여 사용 시 주의를 권고하고 있다.

발암성 성분인 aristolochic acid를 함유하고 있는 대표적인 한약재인 광방기는 '방기'라는 일반명으로 불리면서 대한

약전에 *Sinomenium acutum*(Menispermaceae)의 덩굴성 줄기 및 뿌리줄기로 규정되어 있는 방기로 오인되어 혼용되고 있다. 그외 국화과의 *Saussurea lappa clarke*을 기원으로 하는 목향과 명칭이 유사한 청목향(*Aristolochia contorta*)으로 혼용될 수 있고 또한 으름덩굴과(Lardizabalaceae)에 속하는 목통(*Akebia quinata*)이 취방울덩굴과의 관목통(*Aristolochia manshuriensis*)과도 혼용될 수 있다(7,8). 이렇게 식물분류학적으로 다른 생약이 동일한 이름으로 대체되어 사용되었을 경우 각 생약은 함유된 주요성분과 약리작용이 다르기 때문에 원래의 약효를 나타낼 수 없을 뿐 아니라 aristolochic acid의 경우와 같이 유해작용을 나타내는 성분이 함유되어 있는 경우에는 심각한 국민 건강문제를 발생시킬 수 있다. 따라서 2000년 국내 유통 방기에 대한 화학적 성분분석이 실시되었으며 그 결과 방기 검체의 70% 이상에

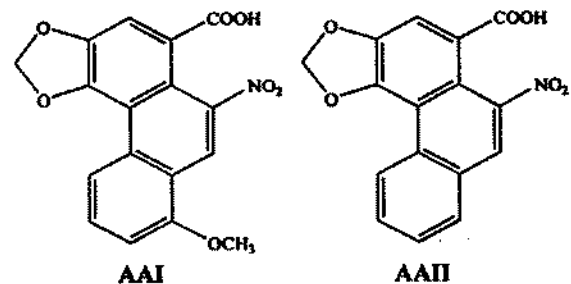


Fig. 1. Structure of aristolochic acids (AA).

*Corresponding author. E mail: kbsong@cnu.ac.kr
Phone: 82 42 821 6723, Fax: 82 42 825 2664

서 aristolochic acid가 검출되어 국내 유통 방기의 대부분이 규격품이 아닌 것으로 보고되었다(9). 그 후 비규격품 방기에 대한 수거 및 폐기 조치가 이루어지고 aristolochic acid 함유 생약에 대한 품질관리 대책과 aristolochic acid의 독성에 대한 연구가 이루어져 오고 있다.

따라서 본 연구에서는 2001년 비규격 방기에 대한 품질관리 대책이 시행된 이후 최근 방기 유통품에 대한 aristolochic acid 함유 여부를 검사하고 명칭이 유사하여 혼용될 가능성이 높은 목통, 목향 등의 한약재를 대상으로 aristolochic acid 함유 여부를 알아보기 위해 수행하였으며 또한 비교 분석을 위하여 취방울덩굴과 한약재 중 마두령과 청목향에 대하여서도 조사 분석하여 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료 및 시약

방기와 목통은 2002년 강원, 서울, 인천, 대전, 광주, 대구, 부산 등 7개 지역에서 구입하였으며 마두령, 세신, 청목향, 목향은 대전에서 구입하였다. Aristolochic acid(AAI, AAI)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서, sinomenine는 Aldrich Chem. Co.(Sheboygan, WI, USA)에서 구입하였고 실험에 사용된 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

시료의 추출 및 제조

메탄올 100 mL에 분쇄한 견체 1 g을 넣고 40°C에서 3시간 동안 초음파 추출을 하였다. 추출 후 여과한 다음 40°C에서 감압 농축한 후 농축물을 메탄올 10 mL에 녹여 0.45 µm PVDF syringe filter에 통과시켜 시료를 제조하였다.

알칼로이드 확인시험

시료 1 g을 메탄올 100 mL에 취하여 초음파 추출하여 감압 농축한 후 2 N HCl 20 mL에 녹인 것을 다시 에테르 20 mL로 추출하여 수용액층을 취하였다. 이것을 암모니아수로 알칼리화 시킨 후 클로로포름 20 mL로 추출하여 증발 농축한 후 2 N HCl 2 mL에 녹여 Mayer 시액과 Wagner 시액 2~3 방울 가하여 침전생성 여부를 관찰하였다.

Thin-layer chromatography(TLC)에 의한 분석

시료의 주요 알칼로이드 성분인 sinomenine, tetrandrine, fanchinoline 및 aristolochic acid를 표준액으로 하여 TLC(TLC plate, silica gel 60 F₂₅₄, 10×10 cm)를 전개용매(chloroform: methanol, v/v)를 사용하여 행하였다. 전개 후 UV 254 및 365 nm에서 spot을 확인하였고 anisaldehyde-sulfuric acid로 발색시켜 다시 확인하였다.

HPLC에 의한 aristolochic acid 분석

HPLC(Shiseido Co., Japan) 분석조건은 column으로 Capcell pak C₁₈ MG(4.6×15 mm, Shiseido Co., Japan)를 사용하여 40°C에서 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)와 70% ace-

tonitrile을 7:3(v/v)의 비율로 elution 시켜 aristolochic acid I과 II가 분리되는 조건을 설정하여 시료를 분석하였다. 정량 분석을 위하여 aristolochic acid 표준품을 메탄올에 녹인 다음 5, 10, 20, 30배 희석하여 3반복 주입으로 얻어진 chromatogram의 peak area 계산 결과로부터 standard curve를 작성하여(Fig. 2) 시료에서의 aristolochic acid의 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용된 방기 시료에서 aristolochic acid를 검색하기 전 먼저 시료를 외형적으로 분류하였는데 식물체의 중심부에 작은 원형의 테두리가 있고 이 테두리 밖에서부터 빗살이 뻗어 나가는 형태를 가진 type I과 식물체 중심부에 원형 테두리가 없이 빗살이 중심부로 모이는 형태를 가진 type II로 나눌 수 있다(Fig. 3). 외형적으로 분류된 시료들에 대해 대한약전의 Dragendorff 시액을 이용한 알칼로이드 확인시험과 Mayer 시액과 Wagner 시액을 이용한 일반적인 알칼로이드 확인시험을 행하였다. 시험결과 type I의 시료에서만 전형적인 알칼로이드 침전반응을 보였는데 이를 통해 type I의 견체에는 sinomenine을 비롯한 알칼로이드 성분이 함유되어 있음을 추정할 수 있었으나 특정 알칼로이드의 함유 여부를 판별할 수는 없었다. 따라서 TLC를 수행하여 방기의 주요 알칼로이드와 aristolochic acid의 함유 여부를 관찰한 바, 방기 type I의 경우 sinomenine과 동일한 R_f 값(0.33)의 위치에서 육안 관찰 시 spot이 관찰되었으며 UV 254 nm에서 다시 확인되었다. 또한 type II의 경우 aristolochic acid와 동일한 R_f 값(0.41)의 위치에서 spot이 관찰되었다(data not shown). 본 연구를 통해 2001년 이후 방기에 대한 수입과 유통부분의 품질관리가 시행되고 있음에도 불구하고 aristolochic acid가 방기 type II 유통 제품으로부터 확인됨으로써 여전히 수입관리 및 수거 폐기조치의 미흡함에 문제가 있음을 알 수 있었다. 또한 목통, 마두령, 세신, 청목향, 목향을

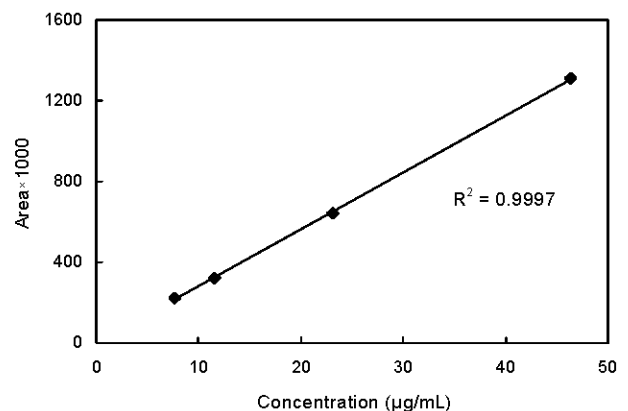


Fig. 2. Standard curve for quantitative analysis of aristolochic acids.

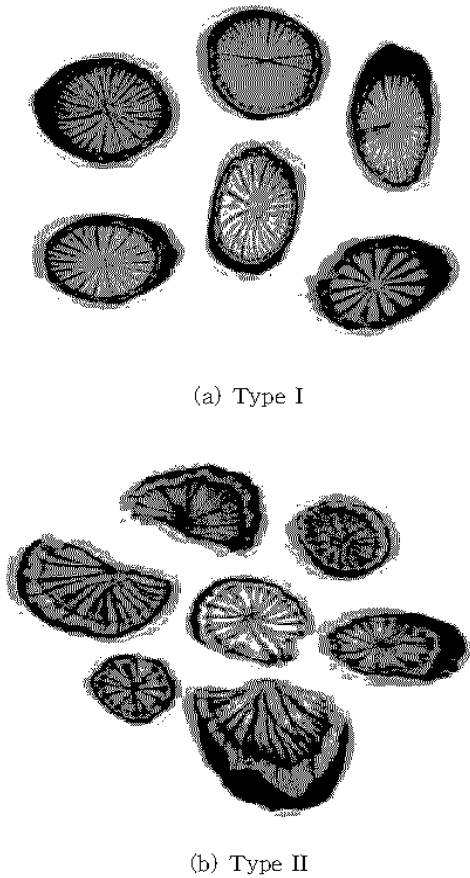


Fig. 3. Types of *Aristolochia fangchi* samples.

대상으로 TLC를 수행하여 aristolochic acid 함유여부를 알아보았다. 쥐방울덩굴과에 속하는 청목향, 마두령, 세신 중 마두령 검체에서만 aristolochic acid와 동일한 Rf의 spot이 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 방기뿐만 아니라 마두령에서도 aristolochic acid가 함유되어 있다는 것을 보여 주는데 이는 Ze 등(10)의 보고와 일치하였다.

시료 중 aristolochic acid의 함유량이 낮아 TLC상으로 검색이 되지 않을 가능성이 있으므로 HPLC를 통한 좀더 정확

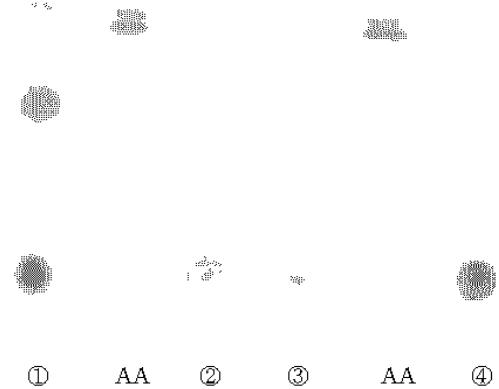


Fig. 4. Thin-layer chromatography of aristolochic acid in herbal medicines.

Solvent system; chloroform : methanol, v/v.
1) *Aristolochia fructus*. 2) *Asiasari radix*. 3) *Aristolochia radix*. 4) *Saussurea radix*.

한 검색이 요구되었다. HPLC를 이용하여 최적 분리 조건을 수립한 후 시료들을 분석한 결과 방기의 type II 시료와 마두령 시료에서는 aristolochic acid가 검출되었으나 목향, 목통, 쥐방울덩굴과의 청목향과 세신 시료에서는 검출되지 않았으며 또한 type I 방기 시료의 경우 알칼로이드 성분이 sinomenine인 것으로 확인되었다(Fig. 5). 그리고 본 연구 결과 TLC와 HPLC를 통하여 aristolochic acid가 검출된 type II의 방기 시료와 마두령을 대상으로 정량분석을 수행하였다. Aristolochic acid standard를 이용하여 작성된 standard curve (Fig. 2)를 기초로 한 정량분석 결과 aristolochic acid I과 II를 합한 aristolochic acid의 총량의 경우 검출된 방기 type II 시료에서 3.9 mg/g 함유되어 있는 것으로 나타났고 마두령에서는 2.3 mg/g 함유되어 있는 것으로 분석되었다. 이러한 aristolochic acid 함량 결과는 Ze 등(10)의 보고와는 많이 다른, 높은 수치를 보이는 것으로 수집된 시료의 차이에 기인한 것으로 사료되나 본 연구 결과에서 보여주는 함량은 실제로 문제가 될 수 있는 함량으로써 한약재 유통 관리에 있

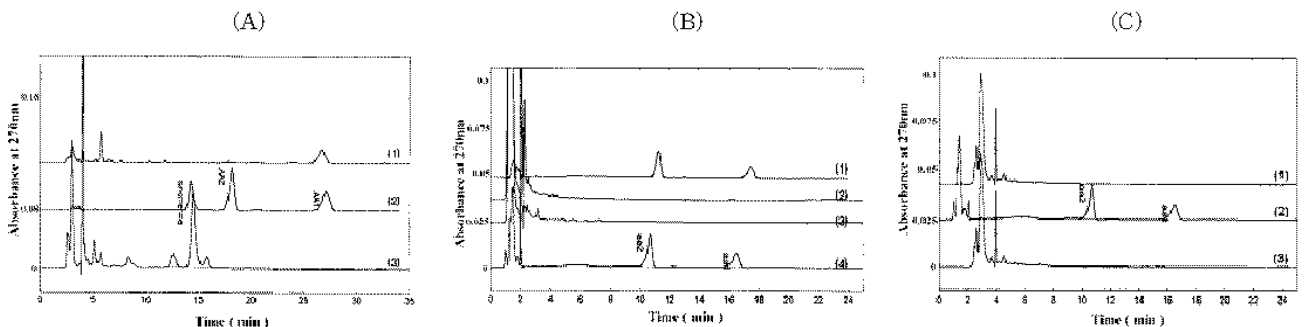


Fig. 5. Quantitative analysis for the content of aristolochic acid in herbal medicines using HPLC.

All the chromatograms were overlapped in one figure for good comparison.

(a) 1) Type II. 2) sinomenine and aristolochic acid standard. 3) Type I. (b) 1) *Aristolochia fructus*. 2) *Aristolochia radix*. 3) *Asiasari radix*. 4) aristolochic acid standard. (c) 1) *Saussureae radix*. 2) Aristolochic acid standard. 3) *Akebia caulis*.

어 보다 유의를 필요로 한다 하겠다.

따라서 본 연구 결과에 비추어 볼 때 국내 유통 중인 방기 type II 및 마두령에서 aristolochic acid가 상당량 검출됨에 따라 국민 건강 문제를 고려하여 현재 대부분 수입되어 유통되고 있는 한약재들의 유통 부문 및 품질 규격에 관한 보다 엄격한 관리 및 조치가 취해져야 한다고 사료된다.

요 약

국내 유통 중인 한약재에 발암물질로 알려진 aristolochic acid 함유 여부를 검사하고자 방기, 목통, 목향, 마두령, 세신, 청목향 등을 대상으로 aristolochic acid 검출 유무 및 정량분석을 수행하였다. 시료에 대한 TLC와 C₁₈ column을 이용한 HPLC의 aristolochic acid 최적 분석 조건을 수립하였고 aristolochic acid 정량분석 결과 방기 type II에는 3.9 mg/g, 마두령에는 2.3 mg/g이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 그 외 목향, 목통, 세신, 청목향 등 시료에서는 aristolochic acid가 검출되지 않았다.

문 헌

1. Vanhaelen M, Vanhaelen Fastre R, But P, Vanherweghem J. 1994. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 343: 174.
2. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. 2002. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* 17: 265 277.
3. Gotzl E, Schimmer O. 1993. Mutagenicity of aristolochic acids (I, II) and aristolochic acid I in new YG strains in *Salmonella typhimurium* highly sensitive to certain mutagenic nitro amines. *Mutagenesis* 8: 17 22.
4. Lord GM, Tagore R, Cook T, Gower P, Pusey CD. 1999. Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK. *Lancet* 354: 481 482.
5. Pezzuto JM, Swanson SM, Mar W, Che CT, Cordell GA, Fong HH. 1998. Evaluation of the mutagenic and cytostatic potential of aristolochic acid (3,4 methylenedioxy 8 methoxy 10 nitrophenanthrene 1 carboxylic acid) and several of its derivatives. *Mutation Res* 206: 447 454.
6. Nortier JL, Martinez MM, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierriux MF, Pauw LD, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem J. 2000. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *New Eng J Med* 342: 1686 1692.
7. Choi H, Lee S, Suh Y. 1997. PCR mediated RFLP to identify 'Bangpoong' a crude drug. *Korean J Pharm* 28: 1 8.
8. Hashimoto K, Higuchi M, Makino B, Sakakibara I, Kubo M, Komatsu Y, Maruno M, Okada M. 1999. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. *J Ethnopharm* 64: 185 189.
9. Hoe OS, Lee JH, Kim SE, Joo IS, Shin DW, Lee JH, Kim JY, Kang SK, Lee HK, Paek SW, Moon BW, Kim JS. 2000. Chemical analysis of circulated Sinomeni stem. *Ann Report KFDA* 4: 111 118.
10. Ze KR, Sung RS, Lee JP, Park SY, Jung YJ, Cho CH, Cho SY, Ha KW, Lee HS, Lee HK. 2001. Quantitative analysis of aristolochic acids in circulating herbal medicines in Korea. *Ann Report KFDA* 5: 167 174.

(2003년 5월 27일 접수; 2003년 8월 19일 채택)