

가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)에서 polyacetylene계 화합물인 falcarinol의 동정

김성주 · 장규섭*
충남대학교 식품공학과

Separating of Falcarinol from *Acanthopanax senticosus*

Seong-Ju Kim and Kyu-Seob Chang*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

To detect falcarinol in *Acanthopanax senticosus*, its stem and bark were extracted with methanol, fractionated with petroleum ether and diethyl ether, and separated by silica gel column chromatography. Resulting six crude samples were compared with standard falcarinol through TLC on silica gel plates. Fraction 6 showed R_f value of 0.46 similar to that of standard falcarinol. Through analytical reverse phase HPLC/PDA, UV spectra of standard falcarinol and fraction 6 recorded between 200 and 340 nm showed identical peaks and UV spectra patterns. GC/MS revealed standard falcarinol and fraction 6 have equal retention times of 7.4 and 8.5 min before and after TMS-derivatization, respectively. Standard falcarinol and fraction 6 showed more similar spectrum patterns after TMS-derivatization than before. These results confirm presence of falcarinol in *A. senticosus*.

Key words: polyacetylene, falcarinol, *Acanthopanax senticosus*, HPLC, GC/MS

서 론

가시오가피 나무의 학명은 *Acanthopanax senticosus*(Rupr. et Max.) Harms.로서 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽활엽 관목이며 중국의 흑룡강 유역, 만주, 러시아 우수리강 유역에 분포하고 우리나라에서는 추풍령, 팽릉, 지리산, 가야산 이북, 치악산 등 중부 이북에 자생한다. 전통적으로 한의학에서는 오가피는 맛은 맵고 따뜻하여 하초(下焦) 즉 간(肝)과 신(腎)에 작용하며 거풍습, 장근골, 활혈화어 등의 효능이 있다고 해왔으며, 오가피의 근피를 이용하여 만드는 술인 오가피주는 저혈압, 피로회복, 어혈, 강장, 강정, 활력, 근육강화 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 가시오가피와 같은 두릅나무과(Araliaceae)의 식물인 인삼의 경우 인삼의 석유에테르 추출물 중 일부 분획이 항암작용이 있다고 발표된 이래 인삼의 비사포닌 비단백분획에 대한 약리효능 연구가 많이 진행되고 있다(1,15). 인삼에서 동정된 항암성분들은 대부분 polyacetylene계 화합물이며, 최근 polyacetylene계 화합물에 대한 세포독성(2), 암세포 증식 억제 효과(3) 밝혀져 천연물로부터 polyacetylene 추출을 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다.

이러한 polyacetylene 화합물 중 falcarinol(heptadeca-1,9-dien-

4,6-dien-3-ol; panaxynol)은 산형과, 두릅나무과 등에서 발견되는 polyacetylene화합물이며 인삼의 뿌리로부터 처음 동정되었다(4,5). 산형과에서는 5속 20여종의 식물에 falcarinol이 존재하는 것으로 알려져 있고 falcarinol은 식물이 병원균의 침입을 받을 때 생성되는 타감물질(phytoalexin)의 일종으로 항균활성뿐만 아니라 암세포에 대한 세포독성효과, 인체 내 혈액응고억제 등의 다양한 약리활성도 나타낸다고 보고되고 있다(4-6).

가시오가피는 최근 면역 및 항암효과, 항 스트레스작용, 항 당뇨작용, 혈압강하 작용, 항 바이러스 작용 등의 많은 생리활성이 알려지면서 그 수요가 증대 되고 있으며, 과거 수입에만 의존하던 것이 재배기술의 발달로 국내에서도 가시오가피의 생산량이 증가하고 있는 추세이다(7,8).

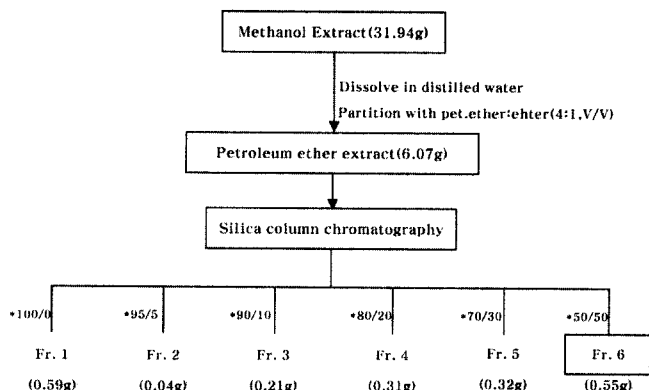
그러나 가시오가피의 유효성분은 대부분 열수 추출을 통한 극성물질의 추출과 생리활성 연구에만 치중되었고, 또한 falcarinol은 인삼에서는 동정된 바 있으나 가시오가피에서는 아직 존재 여부가 밝혀져 있지 않으므로 이에 본 연구는 다량의 생리활성성분을 가진 가시오가피로부터 polyacetylene 화합물 중 falcarinol의 동정을 실시하였고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에 사용한 가시오가피는 2004년 금산약재시장에서 자연건조 된 것을 구입하여 80 mesh의 체를 통과할 정도로 분쇄한 후 -4°C에서 보관하면서 공시재료로 사용하였다. 본 실험의 추출용매는 특급시약 또는 HPLC grade를 사용하였다. Silica

*Corresponding author: Kyu-Seob Chang, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, 220 Gungdong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-6727
Fax: +82-42-821-8897
E-mail: changks@cnu.ac.kr



* n-Hexane/ether(v/v)

Fig. 1. Extraction and fraction of crude polyacetylene.

gel chromatography용 재료는 silica gel 60(Merck, 0.063-0.3 mm)를 사용하였고, thin layer chromatography(TLC)는 silica gel 60F₂₅₄ plate(Merck, Glass sheet, 20×20 cm)를 사용하였다. Falcarinol 표준품(순도 = 97%)은 KT&G 중앙연구소로부터 제공 받아 사용하였다. 본 실험은 크로마토그래피 비교분석법에 준하여 실험하였다(9).

가시오가피의 석유에테르 분리 및 소분획 조제

건조한 가시오가피 300 g을 분말화 하고 methanol 1 L을 가 하여 6시간 동안 3회 환류추출 한 후 0.5 µm filter로 여과하였다. 여과한 methanol extract를 진공농축 하여 완전히 건조 시킨 후 25 mL의 증류수와 petroleum ether-ether(4 : 1, v/v) 용액 100 mL을 가하여 partitioning을 실시하였다. 잔사는 다시 같은 용량의 petroleum ether-ether(4 : 1, v/v) 용액으로 2회의 partitioning을 더 실시하여 그 여액을 합친 후 sodium sulfate anhydrous로 탈수 여과하고 petroleum ether-ether extract를 silica gel column(3×40 cm, 350 mL)에서 hexane과 ether의 비율을 Fig. 1에서와 같이 바꾸면서 6개의 분획물을 얻었다(10).

TLC(thin layer chromatography)에서의 분리특성

TLC를 이용한 polyacetylene계 성분 분리 실험은 Han 등(11)의 실험을 일부 수정하여 실시하였으며, falcarinol 표준품과 6개의 석유에테르 소분획물들을 전개시킨 후 10% H₂SO₄로 발색시켰다. 전개용매는 petroleum ether : ether = 7 : 3을 사용하였다.

HPLC/Photo diode array(PDA)에 의한 UV 흡수 pattern

HPLC를 사용한 falcarinol 분석 조건은 Hansen 등(12)의 방법을 사용하여 표준품과 분획물 간의 동일 retention time에서 Photo Diode Array 를 사용하여 UV spectrum를 조사하였다. HPLC 분석에는 ODS column인 Warwes Nova-Pak® C₁₈(150 mm×3.9 mm i.d.)를 사용하였고, 분석기기는 Waters 2695 HPLC system/Photodiode array(PDA) detector(Waters 2996)를 사용하였다. 이동용매 조건은 Table 1과 같다.

GC에 의한 분리 특성

석유에테르 분획물과 falcarinol 표준품을 Nho 등(13,14)의 방법에 의하여 BSA(N,O-bis-trimethylsilylacetamide, Pierce Co., USA)로 silylation시켜 TMS 유도체를 조제한 후 GC로 분석하고 TMS 유도체화 전, 후의 GC profile을 비교하였다. 이 때

Table 1. HPLC separation solvent condition for the analysis of falcarinol

| | Solvent A ¹⁾ | Solvent B ²⁾ | Solvent C ³⁾ |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 min | 50% | 31% | 19% |
| 21 min | 70% | 11% | 19% |

¹⁾Solvent A (methanol : water : trifluoroacetic acid = 95 : 4.5 : 0.5, v/v/v).

²⁾Solvent B (methanol : water : trifluoroacetic acid = 5.0 : 94.5 : 0.5, v/v/v).

³⁾Solvent C (methanol : tetrahydrofuran = 50 : 50, v/v).

⁴⁾Solvent gradient: linearly programmed.

⁵⁾Operation temperature: 35°C.

⁶⁾Flow rate: 1.0 mL/min.

⁷⁾Injection volume: 20 µL.

Table 2. GC condition for the analysis of falcarinol

| | Description |
|----------------|--|
| Column | HP-1 fused silica capillary (0.25 µm×0.25 mm×30 m) |
| Temperature | 200°C (3 min)-260°C, 4°C/min |
| Carrier gas | He 1.0 mL/min (Split ratio = 25 : 1) |
| Detector | FID |
| Injection vol. | 5.0 µL |
| GC model | Hewlett-Packard 6950 |

Table 3. GC/MS condition for the identification of falcarinol

| | Description |
|---------------|--|
| Column | DB-5MS fused silica capillary (0.25 µm×0.25 mm×30 m) |
| Temperature | 100°C (3 min)-260°C, 3°C/min |
| Carrier gas | He 1.0 mL/min, (Splitless) |
| Detector | Total ion current (TIC) |
| MS ionization | 70eV, EI |
| GC/MS model | Treckma 2000, Hewlett-Packard 5890 GC/5972MSD |

TMS 유도체는 시료를 질소기류 하에서 농축 건조 한 후 BSA 100 µL을 가하고 70°C에서 15분간 반응시켜 조제하였다. GC 분석 조건은 Table 2와 같다.

GC/MS에 의한 mass fragment ion 분석

Falcarinol 표준품과 석유에테르 분획물을 Table 3의 조건으로 mass spectrum의 유사성을 조사하였으며, BSA에 의한 TMS 유도체와 전과 후의 mass spectrum을 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

TLC(thin layer chromatography)에서의 분리특성

UV ramp(254 nm) 상에서와 10% H₂SO₄로 발색 후 fraction 6에서 falcarinol 표준품과 동일한 band를 확인하였으며 falcarinol 표준품의 R_f값은 0.46이고 fraction 6에서도 동일한 R_f값을 보였다.

HPLC/Photo diode array(PDA)에 의한 UV 흡수 pattern

Falcarinol 표준품의 retention time은 5.773분 이었고, Fig. 2에서 보는 바와 같이 fraction 6에서 falcarinol로 추정되는 peak의 retention time이 5.633분으로 매우 유사하였다. 따라서 표준품의 falcarinol peak와 fraction 6에서의 falcarinol로 추정되는 peak의 UV spectrum(200-340 nm)을 비교한 결과는 Fig. 3과 같

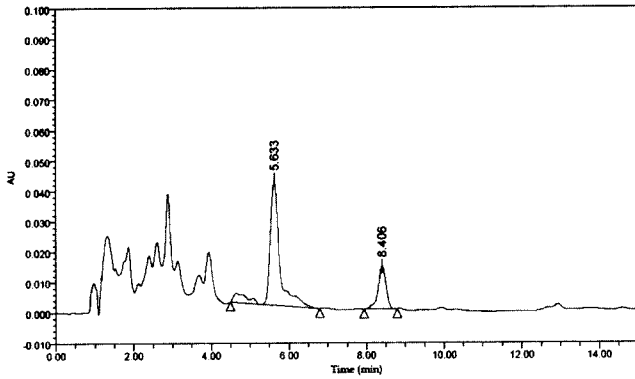


Fig. 2. HPLC/PDA chromatogram of fraction 6.

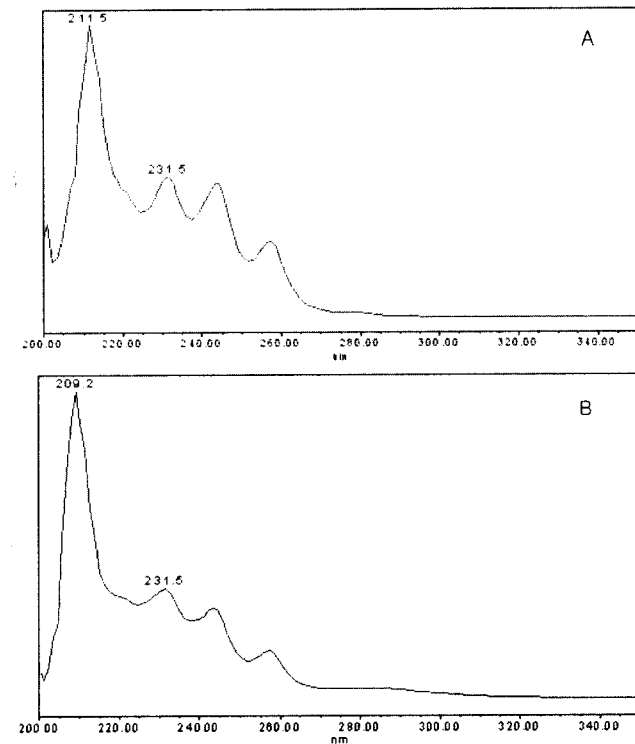


Fig. 3. UV spectrum of standard and fraction 6 by HPLC/PDA. A: standard, B: fraction 6.

이 표준품과 분획물은 일치한 UV spectrum을 보였다. Falcarinol은 탄소 4번, 5번, 6번, 7번에 acetylene기를 가지고 있는 구조적 특징이 있으며 이로 인하여 UV spectrum 상에서는 전형적인 acetylene 흡수 pattern을 보이는 것으로 알려져 있다(10). 또한 본 실험결과는 Sohn(15)과 Kim(16)이 보고한 전형적인 falcarinol의 UV 흡수 pattern과도 동일한 결과를 보였으며 이로서 fraction 6의 분획물에 polyacetylene 화합물인 falcarinol이 분리된 것으로 보였다. 이는 falcarinol의 반극성적인 성질로 용매극성도 차이에 의한 분획과정에 있어서 column내의 용매상태가 반극성에 가까울 때 분획이 유리하게 작용한 것으로 사료된다.

GC에 의한 분리 특성

TMS 유도체화 전, 후의 falcarinol 표준품과 fraction 6 분획물의 GC profile을 Fig. 4, 5에 나타내었다. HP-1 fused silica capillary column 상에서 falcarinol 표준품은 매우 양호하게 분리되었다. Fig. 4, 5에서 볼 수 있듯이 falcarinol 표준품과 fraction 6 분획물의

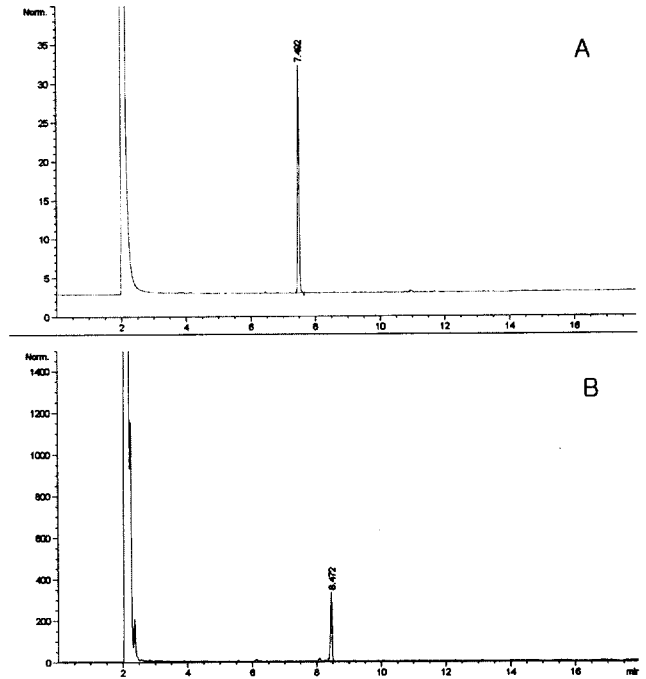


Fig. 4. GC profile falcarinol standard before TMS-derivatization and after TMS-derivatization.

A: before TMS-derivatization, B: after TMS-derivatization.

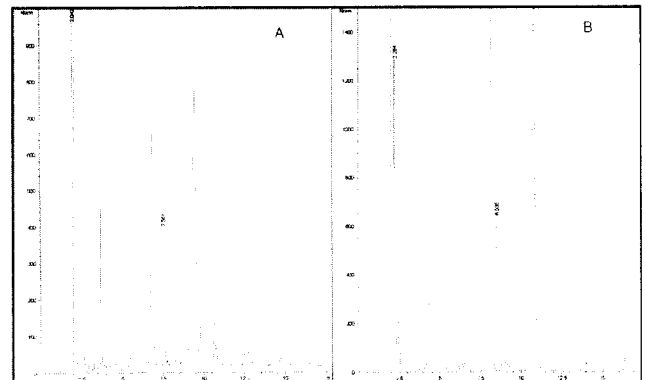


Fig. 5. GC profile petroleum ether-ether extract before TMS-derivatization and after TMS-derivatization,

A: before TMS-derivatization, B: after TMS-derivatization.

retention time은 모두 동일하였고, TMS 유도체 전은 7.5분, TMS 유도체 조제 후에는 8.5분으로 약 1분 가량 증가하였으며, 또한 TMS 유도체화 후에 표준품과 fraction 6의 falcarinol peak의 감도는 매우 증가하였다. 이러한 감도의 차이는 falcarinol을 비롯한 polyacetylene 화합물이 그 구조 말단에 -OH기를 가지고 있기 때문에 TMS유도체가 -OH기에 선택적으로 결합하고 이로 인해 분자량을 증가시켜 GC 분석에 있어 분리 감도를 높이는 것으로 보고되고 있다. 이러한 TMS 유도체화는 polyacetylene 화합물의 분리 및 분석에 적합한 것으로 알려져 있다(11,12).

GC/MS에 의한 falcarinol 확인

TMS 유도체화 전후의 falcarinol 표준품과 fraction 6 분획물의 동일 retention time의 peak의 mass spectrum을 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. TMS 유도체화 전의 mass spectrum은 falcarinol 표준품과 fraction 6 분획물 사이에 매우 유사한 경향을 보

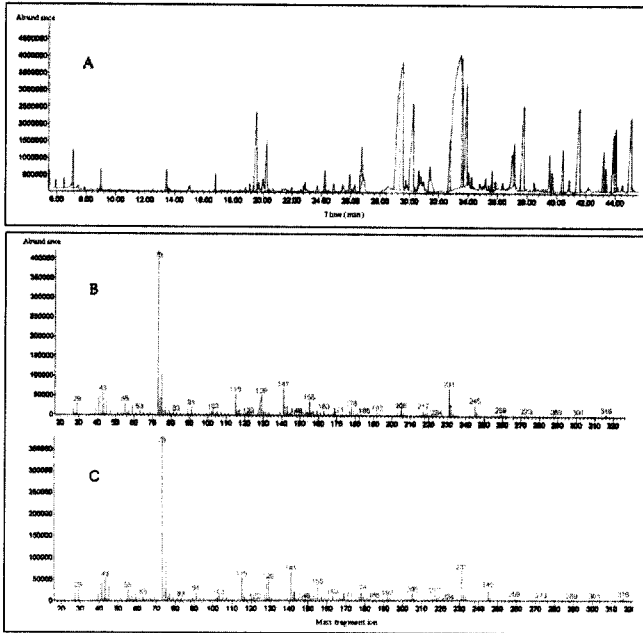
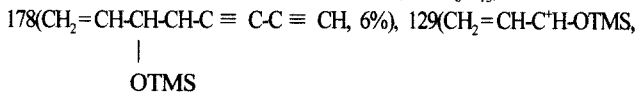


Fig. 6. Mass Spectra of fraction 6 and standard after TMS-derivatization.

A: chromatogram of fraction 6 after TMS-derivatization, B: fraction 6 after TMS-derivatization, C: standard after TMS-derivatization.

였고, Kim(16)의 보고와도 유사한 경향을 보였다. Fig. 6에서의 peak I의 mass spectrum과 TMS 유도체화 된 falcarinol 표준품과의 mass spectrum 비교에서 알 수 있듯이, TMS 유도체화 후에는 falcarinol 표준품과 peak I의 mass spectrum은 모두 동일한 pattern을 나타내었는데, TMS 유도체화 된 fraction 6의 mass fragment ion은 m/z 316(M^+ , 2%), 231($M^+ - C_6H_{13}$),



OTMS

13%) 및 73(TMS, 100%)로서 falcarinol-TMS의 mass fragment ion과도 일치한 결과를 보였다. 이상의 표준품과 분획물을 크로마토그래피법을 이용한 비교분석의 결과들로 미루어 가시오가피에서 falcarinol이 검출되었음을 확인하였다.

요 약

가시오가피에서 polyacetylene 성분 중 falcarinol을 탐색하기 위해 TLC, HPLC/PDA, GC, GC/MS를 이용하여 falcarinol 표준품과 소분획물 사이의 비교 분석을 통하여 가시오가피에서 falcarinol을 동정하였다. 가시오가피 추출물을 silica gel column 상에서 용매의 극성차이에 의해 6개의 분획물을 얻었고, 6개의 분획물과 falcarinol 표준품과의 TLC 상에서 전개시킨 결과 fraction 6 분획물에서 falcarinol과 동일 band의 물질을 분리하였다. Fraction 6의 분획물과 falcarinol 표준품을 HPLC/PDA로 분석한 결과 falcarinol 표준품의 peak와 동일 retention time의 peak를 fraction 6에서 분리하여 200-340 nm 상에서 UV spectrum을 관찰한 결과 동일한 UV spectrum pattern을 보이는 것을 확인하였다. 이는 전형적인 polyacetylene 화합물의 UV spectrum pattern이었으며, 기존에 보고된 falcarinol의 UV spectrum 과도 동일하였다. GC로 TMS 유도체화 전,후의 retention time 을 확인한 결과 표준품과 fraction 6에서 동일한 결과를 보였다.

TMS 유도체화 후에는 7.5분에서 8.5분으로 약 1분 정도 retention time이 증가하였고, detection 감도 또한 증가하였다. Falcarinol 표준품과 fraction 6 분획물을 TMS 유도체화 후에 GC/MS로 mass fragment ion을 분석한 결과 표준품과 동일한 경향을 보였고 이는 기존의 보고와도 일치하였다(16). 본 실험결과들로 미루어 가시오가피에도 polyacetylene 성분인 falcarinol이 존재하는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 2004년 지역대학 우수과학자 지원 연구사업(R05-2004-000-12696-0)의 일부로 수행된 것이며 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Shim SH, Koh HY. Polyacetylene compound from *Panax Ginseng* C.A. Meyer. *Bul. Korean Chem. Soc.* 4: 183-188 (1983)
2. Matsuda H, Murakami T, Kageura T, Ninomiya K, Toguchida I, Norihisa N, Yoshikawa M. Heptaprotective and nitric oxide production inhibitory activities of coumarin and polyacetylene constituents from the roots of *Angelica Furfijuga*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 2191-2196 (1998)
3. Kim HY, Lee YH, Kim SI. Antihepatotoxic components of Korean ginseng: effect on lipid peroxidation. *Korean Biochem. J.* 22: 12-18 (1989)
4. Takahashi M, Yoshikura M. Studies on the components of *Panax ginseng radix* C.A. Meyer. *J. Pharmacol. Soc. Jpn.* 84: 752 (1964)
5. Hiroaka N, Chang JI, Bohm RL, Bohm BA. Furanocoumarin and polyacetylenic compound composition of wild *Glehnia littoralis* in North America. *Biochem. System. Ecol.* 30: 321-325 (2002)
6. Sohn HJ, Jang GC, Rah HH, Lee KS. Occurrence of falcarinol (*n*-heptadeca-1,9-dien-4,6-dien-3-ol) in the umbelliferous plants. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 33: 120-124 (1990)
7. Park MS, Kim YJ, Park HK, Chang YS, Lee JH. Using air temperature and sunshine duration data to select seed production site for *Eleutherococcus Senticosus* Max. *Korean J. Crop Sci.* 40: 444-450 (1995)
8. Park HK, Park MS, Kim TS, Kim S, Choi KG, Park KH. Characteristics of embryo growth and dehiscence during the after-ripening period in *Eleutherococcus senticosus*. *Korean J. Crop Sci.* 42: 673-677 (1997)
9. The European Agency for Evaluation of Medicinal Products. Human medicines evaluation unit. Validation of analytical procedures. Methodology. 3AQBa: 107-117 (1996)
10. Kim SI. Studies on the cytotoxic components of the Korean ginseng roots. Ph.D. thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea (1988)
11. Han BH, Song BJ, Ro HS. Time course change in composition of ginseng polyacetylenes. *Korean J. Pharmacol.* 7: 191-193 (1976)
12. Hansen SL, Purup S, Christensen LP. Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L.). *J. Sci. Food Agric.* 83: 1010-1017 (2003)
13. Nho KB, Sohn HJ. Comparative studies on methods of extracting polyacetylene compounds from white ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* 13: 198-201 (1989)
14. Nho KB, Sohn HJ. Determination of the concentration of panaxynol, panaxydol, and panaxytriol by capillary-GC(FID). *Korean J. Ginseng Sci.* 13: 183-188 (1989)
15. Sohn HJ. Safety and antihepatotoxicity of petroleum ether soluble components from the Korean ginseng roots. Ph.D. thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea (1992)
16. Kim YH. Studies on the chemical components and biological activities of *Acanthopanax koreanum*. Ph.D. thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (1986)