

택사에서 Alisol B 23-Acetate의 분리 및 함량분석

박종철[†] · 허종문 · 김세은

순천대학교 한약자원학과 및 한의약연구소

Isolation and Quantitative Analysis of Alisol B 23-Acetate from the Rhizome of *Alisma orientale*

Jong Cheol Park[†], Jong Moon Hur and Se Eun Kim

Dept. of Oriental Medicine Resources and Research Institute of Korean Oriental Medicine,
Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea

Abstract

Alismatis Rhizoma is an oriental medicine originated from the rhizome of *Alisma orientale* or *Alisma plangtago-aquatica* var. *orientale* (Alismataceae). As a standard compound of this plant, alisol B 23-acetate was isolated from the dichloromethane fraction of *Alisma orientale* and identified by the spectroscopic evidences. A quantitative analysis of alisol B 23-acetate using HPLC method showed that the average content was 0.47±0.11% in 33 samples throughout the various regions of Korea.

Key words: *Alisma orientale*, *Alismae* Rhizoma, quantitative analysis, alisol B 23-acetate, HPLC method

서 론

택사는 우리나라 생산량 중 절반이상을 전남 순천의 해룡면에서 200여 농가가 연 194톤을 생산하고 있다. 이 택사는 한방에서 소변을 잘 보게 하고 부종을 없애주며 택사탕, 육미지황원 등의 한방처방에 이용하는 한약이며 약차의 재료이다.

택사는 *Alisma plangtago-aquatica* var. *orientale* Samuels. (*Alisma orientale* Juzep.)인 질경이택사와 *Alisma canaliculatum* All. Br. et Bouche의 2종류가 기록되어 있으나, 한방에서는 주로 질경이택사를 사용한다. 두종의 택사는 외관상 모양이 비슷하지만 잎의 모양이 질경이택사의 잎은 아래부분이 둥근 모양이며 택사는 피침형 또는 넓은 피침형으로 양끝이 좁고 밑부분이 밑으로 흘러 구별이 가능하다(1).

택사는 신농본초경 상품에 수재되어 있는 중요한 한약재이다. 동의보감에서는 택사의 성질은 차고 맛이 달며 짜고 독이 없으며, 방광에 물린 오줌을 잘 나가게 하고 방광의 열을 없애는 것으로 기재되어 있다(2). 한방에서 택사는 우리 몸의 습기(濕氣)를 빨아들이고, 소변을 잘 보게 하며, 설사를 멈추게 하고 부종을 없애주는 약물이다. 또 남성의 설정(泄精)을 없애주기도 한다. 한방에서는 차가운 성질을 이용하여 갈증과 종양을 없애고 땀을 많이 흘리는 병을 치료한다. 택사는 담미(淡味)를 지니고 있어 습기를 빼주고 배설시

키며, 차가운 성질은 신장의 화기(火氣)를 없애주는 효능이 있다.

택사는 간보호(3), 고지혈증개선(4), 항보체(5), 항알러지작용(6) 등이 알려져 있으며, 성분으로는 많은 triterpenoid, sequeiterpenoid 화합물(7-12)들이 보고되어져 있다.

순천시 해룡면에서 대량 재배되는 택사를 채집하여 지표성분으로 추정되는 화합물을 분리하여 화학구조를 결정하고, HPLC를 이용한 분석법과 정량법을 확립하였다. 그리고 국내에서 구입한 33종의 택사와 중국에서 구입한 5종의 택사에서 지표성분의 함량을 정량하여 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 택사는 두 종류로 나누어서 수집하였다. 지표성분 분리실험에 사용한 택사는 질경이택사(*Alisma orientale* Juzep., *Alisma plangtago-aquatica* var. *orientale* Samuels.)로서 전남 순천시 해룡면 구상마을(2004. 4. 12)과 선월마을(2004. 4. 13)에서 수집하였으며, 감정(샘플명: NM1104)하여 사용하였다. 그리고 HPLC 함량분석용 실험을 위한 택사는 국내 한약국 및 한약방에서 33종, 중국 현지에서 5종을 수집하여 실험하였다. ① 국내 구입산 33종(서울 5종, 부산 5종, 대구 3종, 대전, 광주 5종, 충남 금산 1종, 충남 홍성

[†]Corresponding author. E-mail: flavonoid@empal.com
Phone: 82-61-750-3662, Fax: 82-61-750-3608

1종, 전북 전주1종, 전남 순천 2종, 여수 6종, 경북 영천 1종, 경주 1종, 경남 진주 1종), ② 중국 구입산 5종(광서장죽차지구 3종, 복진성 1종, 사천성 1종)

실험기기

성분분석을 위한 NMR spectrum은 Avance 400(Bruker) spectrometer를 사용하였으며, 측정용매는 CDCl_3 , 내부표준 물질은 TMS를 사용하여 측정하였다. 용매는 특급 및 1급 시약을 사용하였고, 성분 분리를 위한 column chromatography용 충전제는 Kiesel gel 60(70~230 mesh, No. 7734, Merck, Germany)과 Sephadex LH-20을 사용하였으며, 성분 분리 확인을 위한 thin layer chromatography는 precoated Kiesel gel 60 F₂₅₄(No. 5735, Merck, Germany)를 사용하였다. 발색시약은 UV(254 nm)와 50% H_2SO_4 를 분무, 가열하여 발색하였다. HPLC 분석기기는 Hewlett Packard사의 Series 1100을 사용하였다.

성분의 분리

세절한 택사 15 kg를 MeOH로 환류냉각하에서 4시간 추출, 3회 반복하여 MeOH 추출물 2,550 g을 얻었다. MeOH 추출물 2,550 g 중에서 1,327 g을 취해 10% MeOH에 현탁한 후 분획하여 CH_2Cl_2 분획물(120 g), ethyl acetate 분획물과 물 층을 얻었다. CH_2Cl_2 분획물(SiO_2 : 500 g, column: 6.2 cm \times 42.5 cm) 30 g을 silica gel column chromatography를 실시하였다. 전개용매는 CH_2Cl_2 -MeOH(20:1→5:1)를 사용하여 subfraction AOC-170-175에서 단일물질로 추정되는 화합물을 얻었다. Subfraction AOC-170-175를 재칼럼을 실시하여 Sephadex LH-20 column chromatography(전개용매: MeOH)를 이용하여 순수한 AOC-172 화합물을 분리하였다.

HPLC에 의한 지표성분의 함량측정

검액의 조제: 국내 구입 택사 33종과 중국 구입 택사 5종을 실험재료로 사용하였다. 각각 가루로 제조하여 45 mesh를 통과한 택사를 2.0 g으로 정확히 달고, 여기에 MeOH(15 mL)를 가하여 초음파 진탕으로 40°C에서 1시간 추출하였다. 추출후 원심분리하여 얻은 추출액에 MeOH을 가하여 정확히 20 mL로 하여 검액으로 제조하였다.

표준검량선의 작성: Column에서 분리한 화합물 AOC-172 40 mg으로 정밀히 달아 MeOH를 가하여 20 mL로 하여

Table 1. HPLC operating condition

Column	μ Nova-pak C ₁₈ (3.9×300 mm)
Detector	UV 210 nm
Mobile phase	$\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (70:30)
Flow rate	1.0 mL/min
Column temp.	35°C

Stock solution으로 하였다. 이를 일정량씩 취하여 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL 농도의 표준용액을 조제하였다. 각 표준용액 10 μ L씩 취하여 HPLC의 크로마토그램을 얻고 이로부터 평균 area ratio를 구하였다. 화합물의 회귀직선방정식은 $y=159.6731x+13.004$ 이며, 그 직선성을 검정한 결과 그 상관계수가 각각 0.9999로서 1.0에 접근하므로 중량비(x)와 peak area ratio(y)간의 직선성이 인정되었다.

HPLC 분석조건과 지표성분의 정량: HPLC 분석조건은 Table 1과 같으며, 검체 중 지표성분의 함량은 실험부에서와 같이 조제한 검액 일정량을 취하여 HPLC를 3회씩 실시하여 얻은 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각 화합물의 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

지표성분의 화학구조 결정

Column chromatography를 실시하여 subfraction AOC-170-175에서 순수한 물질(AOC-172)을 얻었다. 이 화합물은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 2.00와 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 δ 20.18, 169.03에서 1몰의 acetyl기를 확인할 수 있다. $^1\text{H-NMR}$ data에서 δ 0.90, 0.94, 0.96, 0.97, 0.99, 1.07, 1.24, 1.26에서 8개의 methyl기의 signal을 관찰할 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 δ 219.13에서 ketone기, δ 133.17, δ 137.12에서 C=C 존재를 알 수 있다(Table 2). 화합물 AOC-172는 alisol B 23-acetate로 결정하였으며 문헌치(14)와의 비교에 의해 그 화학구조를 확정하였다(Fig. 1). 이 화합물은 주성분으로 추정되며 지표성분으로 활용하였다.

지표성분의 함량분석결과

지표성분 alisol B 23-acetate를 여러가지 용매와 추출 조건을 달리하여 HPLC를 실시하여 이들의 분리능을 검토한 결과 70% CH_3CN 혼합용매를 사용해서 isocratic elution을

Table 2. NMR data of alisol B 23-acetate isolated from the rhizome of *Alisma orientale*

Items	NMR data
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ	0.90, 0.94, 0.96, 0.97, 1.07, 1.24, 1.26, (3H each, s), 0.99 (3H, d, $J=6.36$ Hz), 1.64 (1H, d, $J=10.70$ Hz, H-9), 2.00 (3H, s, OAc), 2.49 (1H, dd, $J=5.69, 13.20$ Hz, Ha-12), 2.66 (1H, d, $J=8.52$ Hz, H-24), 3.74 (1H, ddd, $J=5.73, 10.72, 10.73$ Hz, H-11), 4.54 (1H, ddd, $J=2.71, 8.53, 10.64$ Hz, H-23)
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ	18.38 (C-26), 19.02 (C-29), 19.06 (C-6), 19.09 (C-21), 20.17 (OCOCH ₃), 22.15 (C-18), 22.83 (C-30), 23.68 (C-27), 24.64 (C-19), 26.83 (C-20), 28.15 (C-16), 28.54 (C-28), 29.65 (C-15), 29.94 (C-1), 32.72 (C-22), 33.18 (C-7), 33.50 (C-12), 35.76 (C-2), 35.93 (C-10), 39.72 (C-8), 45.94 (C-4), 47.48 (C-5), 48.98 (C-9), 56.03 (C-14), 57.45 (C-25), 64.08 (C-24), 69.21 (C-11), 70.52 (C-23), 133.17 (C-17), 137.12 (C-13), 169.02 (OCOCH ₃), 219.13 (C-3)

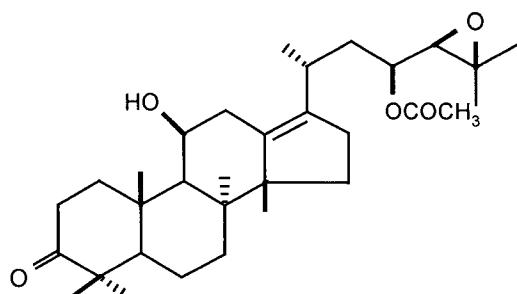


Fig. 1. Alisol B 23-acetate isolated from the rhizome of *Alisma orientale*.

할 때 분리능이 가장 양호하였다. 화합물 alisol B 23-acetate의 표준 검량선을 작성하여 정량에 이용할 목적으로 stock solution을 만들고 이를 희석하여 표준용액을 제조하였다. 각 표준용액의 chromatogram으로부터 얻은 peak 면적과 농도의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 그 직선성이 인정되었으며 이 때의 회귀직선 방정식은 $y=159.6731x+13.004$ 이며, 상관계수가 각각 0.9999로서 1.0에 접근하였다.

HPLC 함량분석결과 국내구입 검체중 alisol B 23-acetate

Table 3. Contents of alisol B 23-acetate in various *Alismae* Rhizoma in Korea

Sample No.	Contents (mg/g)	Contents (%)	Remark
1	6.656	0.6656	Jeonnam Suncheon Haeryong
2	2.507	0.2507	Jeonnam Yeosu
3	4.338	0.4338	Jeonbuk Jeonju
4	5.879	0.5879	Gwangju
5	2.873	0.2873	Daegu
6	6.328	0.6328	Seoul
7	5.067	0.5067	Seoul
8	4.016	0.4016	Busan
9	4.115	0.4115	Gyeongnam Jinju
10	6.307	0.6307	Jeonnam Yeosu
11	4.596	0.4596	Chungnam Geumsan
12	5.750	0.5750	Gyeongbuk Youngcheon
13	4.429	0.4429	Daegu
14	4.501	0.4501	Chungnam Hongseong
15	3.878	0.3878	Daegu
16	3.731	0.3731	Busan
17	3.705	0.3705	Seoul
18	4.289	0.4289	Daejeon
19	4.243	0.4243	Busan
20	6.184	0.6184	Gyeongbuk Gyeongju
21	3.942	0.3942	Seoul
22	4.847	0.4847	Gwangju
23	4.250	0.4250	Seoul
24	5.314	0.5314	Jeonnam Yeosu
25	5.871	0.5871	Jeonnam Yeosu
26	5.561	0.5561	Jeonnam Suncheon
27	3.653	0.3653	Jeonnam Yeosu
28	4.052	0.4052	Gwangju
29	4.324	0.4324	Jeonnam Yeosu
30	5.739	0.5739	Gwangju
31	6.359	0.6359	Gwangju
32	5.432	0.5432	Busan
33	5.515	0.5515	Busan

Table 4. Contents of alisol B 23-acetate in various *Alismae* Rhizoma in China

Sample No.	Contents (mg/g)	Contents (%)	Remark
34	ND	-	廣西壯族自治區
35	ND	-	廣西壯族自治區
36	ND	-	廣西壯族自治區
37	2.691	0.2691	福建省
38	3.277	0.3277	四川省

의 함량은 0.25%에서 0.67%까지 보였다. 이 중 함량이 0.25%~0.30%는 2종, 0.31%~0.40%는 5종, 0.41%~0.50%는 12종, 0.51%~0.60%는 9종, 0.61% 이상은 5종이었다(Table 3). 재배산지에서 직접 구입한 순천시 해룡산 택사(Sample No. 1)가 alisol B 23-acetate의 함량이 0.67%로서 실험에 사용한 검체중 가장 많이 함유하고 있었다. 중국에서 구입한 택사중의 alisol B 23-acetate의 함량은 없거나 또는 0.27%에서 0.33%였다(Table 4). 이 검체들은 한국에서 구입한 택사와 종이 다르거나 또는 재배조건이 상이하하여 이러한 결과가 나온 것으로 추정된다.

이상과 같은 HPLC 조건에서 상기 회귀직선 방정식으로부터 그 함량을 구한 결과 국내 구입산의 택사 33종은 지표 성분 alisol B 23-acetate의 함량이 0.25%~0.67%를 나타내었으며 그 평균값 및 표준편차는 $0.47 \pm 0.11\%$ 이었다. 택사의 표준화를 위해서는 택사 지표성분 alisol B 23-acetate의 함량은 0.25% 이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다. Alisol B 23-acetate은 간보호활성(3)이 있는 화합물로 알려져 있다.

요 약

택사 MeOH 추출물에서 얻은 dichloromethane 분획물을 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 alisol B 23-acetate를 순수히 분리하였다. Alisol B 23-acetate를 여러가지 용매와 추출 조건을 달리하여 HPLC를 실시하여 이들의 분리능을 검토한 결과 70% CH₃CN 혼합용매를 사용할 때 분리능이 가장 양호하였다. 국내 각지에서 수집한 택사 33종과 중국 현지에서 수집한 중국택사 5종에 대해 HPLC를 이용하여 함량 분석을 하였다. 국내구입 검체중 지표성분 alisol B 23-acetate의 함량은 0.25%에서 0.67%까지의 범위를 보였으며 평균값 및 표준편차가 $0.47 \pm 0.11\%$ 이었다. 실험에 사용한 검체 중 재배산지에서 직접 구입한 순천시 해룡산 택사가 alisol B 23-acetate의 함량이 0.67%로서 가장 많았다. 중국에서 구입한 택사에는 alisol B 23-acetate가 포함되어 있지 않거나 0.27%에서 0.33% 함유하였다. 이 검체들은 한국에서 구입한 택사와 종이 다르거나 또는 재배조건이 상이하하여 이러한 결과가 나온 것으로 추정된다. 택사의 표준화를 위해서는 지표성분 alisol B 23-acetate의 함량은 0.25% 이상으로 규정함이 타당하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 2004년도 지방특성화사업 (호남지역 재배 유통한약재의 품질관리사업, 04202기유식935)의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. 이창복. 1985. 대한식물도감. 향문사, 서울. p 75.
2. 허준. 1994. 동의보감 5(탕액, 침구편). 여강출판사, 서울. p 2727.
3. Chang IM, Kim YS, Yun HS, Kim SO. 1982. Liver-protective activities of alisol compounds against CCl_4 intoxication. *Kor J Pharmacog* 13: 112-115.
4. Imai Y, Matsumura H, Aramaki Y. 1970. Hypocholesterolemic effect of alisol A-24-monoacetate and its related compounds in rats. *Jap J Pharmac* 20: 222-228.
5. Lee SM, Kim JH, Zhang Y, An RB, Min BS, Joung H, Lee HK. 2003. Anti-complementary activity of protostane-type triterpenes from *Alismatis Rhizoma*. *Arch Pharm Res* 26: 463-465.
6. Kubo M, Matsuda H, Tomohiro N, Yoshikawa M. 1997. Studies on *Alismatis rhizoma* I anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis Rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). *Biol Pharm Bull* 20: 511-516.
7. Matsuda H, Kageura T, Toguchida I, Murakami T, Kishi A, Yoshikawa M. 1999. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones B 23-acetate and -C 23-acetate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9: 3081-3086.
8. Nakajima Y, Satoh Y, Katsumata M, Tsujiyama K, Ida Y, Shoji J. 1994. Terpenoids of *Alisma orientale* rhizome and the crude drug *Alismatis Rhizoma*. *Phytochemistry* 36: 119-127.
9. Oshima Y, Iwakawa T, Hikino H. 1983. Alismol and alismoxide, sesquiterpenoids of *Alisma Rhizomes*. *Phytochemistry* 22: 183-185.
10. Yoshikawa M, Fukuda Y, Hatakeyama S, Tanaka N, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N. 1993. Sulfoorientalols a, b, c and d, four new biologically active sesquiterpenes from *Alismatis Rhizoma*. *Chem Pharm Bull* 41: 1194-1196.
11. Yoshikawa M, Murakami T, Ikebata A, Ishikado A, Murakami N, Yamahara J, Matsuda H. 1997. Absolute stereostructures of alismalactone 23-acetate and Alismaketone-A 23-acetate, new seco-protostane and protostane-type triterpenes with vasorelaxant effects from Chinese *Alismatis Rhizoma*. *Chem Pharm Bull* 45: 756-758.
12. Yoshikawa M, Murakami T, Ikebata A, Ishikado A, Murakami N, Yamahara J, Matsuda H. 1997. Absolute stereostructures of alismalactone 23-acetate and Alismaketone-A 23-acetate, new seco-protostane and protostane-type triterpenes with vasorelaxant effects from Chinese *Alismatis Rhizoma*. *Chem Pharm Bull* 45: 756-758.

(2004년 11월 30일 접수; 2005년 1월 5일 채택)