

장수풍뎅이 유충으로부터 지표성분(Inosine)의 분리 및 정량분석

이진희 · 송명중 · 양혜정 · 방면호¹ · 정동준 · 김영채 · 김세영 · 노영덕 · 정성현² · 백남인*

경희대학교 생명과학대학, ¹강화군 특화작목연구소, ²경희대학교 약학대학

Isolation and Quantitative Analysis of Inosine as an Index Component from Larva of *Allomirina dichotoma*

Jin-Hee Lee, Myoung-Chong Song, Hye-Jung Yang, Myun-Ho Bang¹, Dong-Jun Chung, Young-Chai Kim, Se-Young Kim, Young-Deok Rho, Sung-Hyun Chung² and Nam-In Baek*

College of Life Sciences, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

¹Ganghwa Agricultural R&D Center, Incheon 417-830, Korea

²College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Received August 28, 2006; Accepted September 27, 2006

A repeated silica gel column chromatography of *n*-BuOH fraction from the larva of *Allomirina dichotoma* afforded a purified nucleic acid, which was identified as inosine on the basis of the spectroscopic data including IR, MS and NMR. The HPLC analysis of the index component using silica based NH₂-column exhibited the contents in the hot air-dried and Far-IR-dried larvae of *Allomirina dichotoma* as 0.003 % and 0.055 %, respectively.

Key words: *Allomirina dichotoma*, larva, inosine, index component, HPLC, quantitative analysis

서 론

곰뻥이는 주로 장수풍뎅이과(Dynastidae)에 속하는 갑충류의 유충을 일컫는 이름이다. 한방에서는 제초¹라고 하며, 어혈을 풀어주고 혈액순환을 개선시키며 간기능을 강화시키므로 월경 불통, 유즙불통, 간암, 간염 및 간경화로 인한 복수 등에 대하여 일정한 정도의 효과가 있을 것으로 생각되어 예로부터 약용으로 사용되어 왔다²⁻⁵. 한국에서는 매미, 풍뎅이, 사슴벌레, 잠자리 등의 3령 유충이 주로 위와 같은 용도를 기대하며 약용으로 사용되고 있는데, 최근 들어 이러한 곰뻥이의 효능에 관한 연구가 보고 되고 있다.⁶⁻⁸

이렇듯 민간에서는 오래전부터 곰뻥이가 약용으로 이용되어 왔고, 현재도 그 용도가 더욱 확대되어 가며 소비량도 증가하고 있는 추세이다. 하지만 식품의약품 안전청에서는 아직 곰뻥이를 식용불가식품^{9,10}으로 분류하여 그 사용을 금지하고 있다. 뿐만 아니라 곰뻥이의 효능을 나타내는 성분이 무엇인가에 대한 연구도 이루어져 있지 않은 것은 물론이고, 곰뻥이에 함유되어 있는 성분에 관한 연구도 전무한 상태이다. 현재까지는 곰뻥이 중의 풍부한 단백질이 간의 기능을 좋게 할 것이라는 정도가 보고되고 있을 뿐이다.^{1,10} 따라서 곰뻥이의 주요 성분을

분리, 동정할 필요가 있으며, 이렇게 분리된 성분은 지표성분으로서 곰뻥이 사육이나 제품 제조시 품질관리에 이용할 수 있을 것이며, 활성성분 규명연구에도 이용할 수 있을 것으로 기대한다.

충청북도 영동군 지역에서는 참나무를 이용하여 넓은 지역에서 버섯을 재배하고 있는데, 버섯 수확 후 남은 참나무가 장수풍뎅이의 서식처로 알맞아 자연적으로 장수풍뎅이(*Allomirina dichotoma* L.)가 많이 서식하고 있다. 따라서 이 지역의 농가에서는 버려진 참나무를 톱밥으로 만들어 장수풍뎅이를 인공적으로 양식하여 유충을 수확하고 있으며, 이를 이용하여 추출물 등의 제품을 만들어 수익을 올리고 있다. 따라서 저자 등은 이번 실험에서 영동지역에서 양식하는 장수풍뎅이의 유충으로부터 지표성분을 분리하기 위하여 수종의 주요성분을 분리, 동정하였다. 분리된 성분 중에서 inosine을 장수풍뎅이 유충의 지표성분으로 HPLC를 이용한 정량분석방법을 확립하였다. 또한 농가에서는 수확 후 장수풍뎅이를 건조할 때, 몇가지 다른 방법을 사용하고 있는데, 건조방법을 달리한 유충 시료 중에 함유되어 있는 inosine의 함량을 측정하였다. 이번 시험결과는 장수풍뎅이가 약용으로 인정되고 사용될 경우 품질을 관리하기 위한 지표성분으로 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

실험재료. 장수풍뎅이 유충(3령)을 영동군 농업기술관리센터로부터 제공받았다. 열풍건조시료는 수확한 유충에서 변을 제

*Corresponding author

Phone: 82-31-201-2661; Fax: 82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

거 후, 건조기에서 60°C에서 1시간 가열하고 다시 50°C에서 48시간 동안 건조한 것을 사용하였으며, 원적외선 건조시료는 변을 제거한 유충을 원적외선 건조기에서 55시간 건조한 것을 사용하였다.

시약 및 기기. Column chromatography(이하 cc)용 silica gel은 Keisegel 60(63~200 µm, Merck, Germany)를 사용하였고, thin layer chromatography(이하 TLC)는 Merck사에서 생산한 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였다.

NMR은 Inova AS 400 FT-NMR spectrometer(Varian, USA)로 측정하였고, IR spectrum은 Spectrum One System(Perkin-Elmer, USA)로 측정하였다. FAB/MS는 JMSAX 700(JEOL, Japan)로 측정하였고, UV spectrophotometer는 UV-1601(Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 지표성분 분석에 사용한 HPLC는 Shimadzu LS20(Shimadzu, Japan)을 사용하였다.

장수풍뎡이 유충으로부터 주요 성분의 분리. 열풍건조한 유충 2 kg을 세절한 후, 80% MeOH 용액(20 l)에 24시간 담가서 실온에서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 남은 것은 동일한 방법으로 1회 더 추출하였다. 얻어진 여액을 합쳐 감압농축하여 MeOH 추출물 388 g을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 ethyl acetate(이하 EtOAc, 4 l, 2회)로 분배 추출하였으며, 물층은 다시 *n*-butanol(이하-BuOH, 4 l, 2회)로 분배 추출하였다. 각층을 감압농축하여, EtOAc 분획 58 g, ALDE), -BuOH 분획(22 g, ALDB)과 H₂O 분획(310 g, ALDW)을 얻었다.

n-BuOH 분획(20 g)으로부터 silica gel (250 g) c.c. (φ 5 × 30 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 15 : 3 : 1 → 12 : 3 : 1 → 10 : 3 : 1 → 8 : 3 : 1 → 7 : 3 : 1 → 65 : 35 : 10 → 6 : 4 : 1)를 실시하여 12개의 분획물(ALDB-1~ALDB-12)를 얻었다. ALDB-5 분획(2 g)을 silica gel (200 g) c.c. (Φ 5.5 × 8 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 9 : 3 : 1)하여 ALDB 5-2(1, 53 mg)을 분리, 정제하였다.

화합물 1 (triglyceride). yellowish oil; IR (KBr, ν) 1735, 1655 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 5.34-5.30 (m, olefine-H), 3.82 (1H, br. s, glycerol-H), 3.42 (2H × 2, m, glycerol-H), 2.25 (2H, t, *J* = 8.0 Hz), 1.97 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.52 (2H, m, allyl CH₂-H), 1.36-1.18 (CH₂-H), 0.87 (t, *J* = 7.6 Hz, terminal methyl-H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ) 173.01 (carbonyl-C), 130.9-128.8 (olefine-C), 73.7 (glycerol-C), 67.6 (glycerol-C), 64.0 (glycerol-C), 34.1-19.2 (methylene-C), 13.7 (terminal methyl-C).

ALDB-6 분획(4.6 g)을 silica gel (200 g) c.c. (Φ 5 × 9 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 9 : 3 : 1)하여 16개의 분획물(ALDB-6-1~ALDB-6-16)을 얻었다. 그 중에서 ALDB-6-10(1 g)을 다시 silica gel (150 g) c.c. (Φ 4 × 10 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O = 9 : 3 : 1)하여 8개의 분획물(ALDB-6-10-1~ALDB-6-10-8)을 얻었으며, ALDB-6-10-3 분획(198 mg)으로부터 silica gel c.c. (150 g, Φ 3.5 × 11 cm, CHCl₃-MeOH = 5 : 1)하여 ALDB 6-10-3-7(2, 15 mg)을 분리하였다.

화합물 2 (inosine). IR (KBr, ν) 3540, 3325, 1703, 1546 cm⁻¹; neg. FABMS *m/z* 267 [M-H]⁻, 221, 207, 147; ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅, δ) 8.91 (1H, s, H-8), 8.30 (1H, s, H-2), 5.89 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-1'), 4.57 (1H, dd,

J = 5.2, 5.6 Hz, H-2'), 4.25 (1H, dd, *J* = 5.6, 2.8 Hz, H-3'), 4.09 (1H, ddd, *J* = 4.0, 2.8, 2.8 Hz, H-4'), 3.74 (1H, dd, *J* = 2.8, 12.8 Hz, H-5'a), 3.66 (1H, dd, *J* = 4.0, 12.8 Hz, H-5'b); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅, δ) 158.6 (C-6), 148.6 (C-4), 146.2 (C-2), 140.3 (C-8), 124.3 (C-5), 88.5 (C-1'), 85.7 (C-4'), 74.1 (C-2'), 70.4 (C-3'), 61.5 (C-5').

ALDB-6-12 분획(874 mg)을 다시 silica gel (150 g) c.c. (Φ 4 × 10 cm, CHCl₃-MeOH = 5 : 1 → 3 : 1 → 1 : 1)하여 ADB 6-12-10(3, 46 mg)을 분리하였다.

화합물 3 (glycosyldiglyceride). IR (KBr, ν) 3370, 1735, 1605 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, pyridine-*d*₅, δ) 5.71 (olefine-H), 4.39 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, anomer-H), 4.14-3.51 (sugar and glycerol-H), 2.46-1.67 (allyl methylene-H), 1.30 ((CH₂)*n*-H), 0.86 (terminal methyl-H); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅, δ) 173.4, 173.3 (carbonyl-C), 128.3-124.6 (olefine-C), 103.4 (anomeric-C, galactosyl), 74.7 (C-5, galactosyl), 73.2 (C-3, galactosyl), 71.1 (C-2, galactosyl), 70.9 (C-3, glycerol), 68.9 (C-4, galactosyl), 68.3 (C-2, glycerol), 65.0 (C-1, glycerol), 61.2 (C-6, galactosyl), 34.5-22.9 (methylene-C), 14.3 (terminal methyl-C).

지표성분 inosine의 HPLC 분석. HPLC는 Shimadzu LS20을 사용하였다. Inosine 0.2 mg을 MeOH 10 ml(HPLC grade)에 녹인 후 UV/visible spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 200-800 nm에서 흡수 특성을 조사하였다.

HPLC의 주입구는 Model 7725i(20 µl sample loop, Rheodyne, USA)를 사용하였으며, 검출기는 UV-detector(SPD-20A, Shimadzu, Japan)로 파장 250 nm에서 측정하였다.

Reverse phase column은 Symmetry C₁₈(5 µm, 250 × 4 mm, Waters, USA)를 사용하였으며, 용출용매는 MeOH-H₂O의 혼합용매를 각각 1 : 2와 1 : 3을 사용하여 1.0 ml/min의 유속으로 흘렸다. 이 때, inosine의 retention time(이하 r.t.)는 각각 3'25"와 3'27"로 나타났다.

Ordinary column은 LiChrosorb Si 60(5 µm, 250 × 4 mm, Merck, Germany)를 사용하였으며, 용출용매는 CHCl₃-MeOH의 혼합용매를 각각 2 : 1과 5 : 2의 비율로하여 1.0 ml/min의 유속으로 흘렸다. 이 때, inosine의 r.t.는 각각 8'49"와 9'36"로 나타났다.

Amine column은 LiChrospher 100 NH₂(5 µm, 250 × 4 mm, Merck, Germany)를 사용하였으며, 용출용매의 조건으로는 CHCl₃-MeOH(2 : 1), CHCl₃-MeOH-pyridine(200 : 100 : 1), CHCl₃-MeOH-acetic acid(200 : 100 : 1), 그리고 CHCl₃-MeOH-acetic acid(960 : 200 : 1)의 혼합용매를 각각 1.0 ml/min의 유속으로 흘렸다. 이 때 inosine의 r.t.는 각각 28'05", 3'8", 6'26"와 15'41"로 나타났다.

Inosine에 대한 표준검량선을 작성하기 위하여, 분리능이 가장 높은 아민column조건 [LiChrospher 100 NH₂ (5 µm, 250 × 4 mm), CHCl₃-MeOH-acetic acid = 960 : 200 : 1, inosine r.t. 15'41"]을 적용하였다. Inosine 500, 250, 125, 62.25, 31.125 µg/ml 용액을 제조한 후, 각각 20 µl씩을 주입하였다.

건조를 달리한 장수풍뎡이 유충의 지표성분 inosine의 정량 분석. 열풍건조한 굼벵이와 원적외선 건조기로 건조한 장수풍

땀이 유충을 세절한 후, 각각 10 g 씩을 80% MeOH 용액(300 ml × 2)으로 실온에서 추출하고, 여과한 후 감압농축하였다. 농축물을 물 50 ml에 현탁 시킨 후, EtOAc(50 ml, 2회)와 *n*-BuOH(40 ml, 2회)로 분배 추출하였다. 이 중 *n*-BuOH 층을 감압 농축하여 열풍건조한 시료와 원적외선으로 건조한 시료로부터 농축물을 각각 162 mg과 153 mg을 얻었다. 건조방법을 달리한 각각의 시료에서 16 mg과 15 mg을 취한 후, SPE(Strata C18-T, 3 ml)를 MeOH-H₂O(1:1) 6 ml를 사용하여 여과하였다. 여과물을 농축한 후, 각 시료를 HPLC용 MeOH 500 μ에 녹여 분석하였다. HPLC를 이용한 분석조건은 inosine 표준검량선 작성 시와 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

충북 영동지역에서는 버섯재배 시 사용하고 남는 참나무 폐목이 많아서 장수풍뎡이의 서식처로 적당하고, 기후조건도 알맞아 장수풍뎡이의 자연 서식밀도가 매우 높다. 이에 착안하여 영동지역의 농가에서는 버섯재배 폐목인 참나무를 톱밥으로 만들어 장수풍뎡이를 양식하여 왔다. 그리고, 3령기의 유충을 수확하여 약용으로 이용하고 있으며, 그 소비량 및 생산량이 매년 증가하고 있다. 이렇듯 굽뎡이가 민간에서는 약용으로 사용되고 있음에도 불구하고, 품질을 관리하기 위한 기본적인 연구도 전혀 이루어져 있지 않았다. 특히, 굽뎡이의 원료로써의 가치를 평가하기 위해서는, 원료의 품질검사로써 지표성분의 정량분석 실험이 필요하다. 저자 등은 굽뎡이에 함유된 주요성분으로써, 다른 생물체의 성분과 구별할 수 있는 지표성분을 분리, 동정하여 지표성분을 확보하고자 하였다. 또한, 이 지표성분을 이용하여 민간에서 사용하는 건조방법에 따른 굽뎡이상품의 지표성분의 함유량을 정량분석하는 방법을 확립하고자 하였다. 따라서, 3령기의 장수풍뎡이 유충으로부터 주요성분을 분리, 동정하고, 지표성분을 결정하였다. 이렇게 확보한 지표성분에 대하여 HPLC를 이용하여 정량분석법을 확립하였다. 또한 영동지역에서는 장수풍뎡이 유충을 열풍건조하거나 원적외선 건조기로 건조하여 약재로 조제하는데, 건조처리가 다른 시료 중의 지표성분을 정량 분석하였다.

열풍건조한 시료를 세절한 후 80% MeOH 용액으로 추출하였다. 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH과 물로 분배 추출하였으며, 각 층에 대하여 다양한 전개용매를 사용하여 silica gel 및 ODS TLC로 함유성분을 추정하였다. EtOAc 분획물은 비극성화합물의 함량이 매우 높게 나타났으며, 발색양상으로 부터 대부분이 지방산인 것으로 판명되었다. 이는 굽뎡이의 표피를 구성하고 있는 큐티클 층의 지질화합물이 건조 시 고온 산화 반응에 의해, 지방산으로 분해되었을 것으로 판단되었다. *n*-BuOH 층의 경우는 지질화합물 외에도 glycosylglyceride나 색소 및 핵산류의 물질이 함유되어 있는 것으로 추정되었다. 물 층의 경우는 terpene 배당체의 존재가 확인되었으나, 극성이 매우 높아 분리에 어려움이 있을 것으로 판단되었다. 따라서 *n*-BuOH 층으로부터 silica gel c.c.를 반복하여 주요성분을 분리하였으며, 결과적으로 3종 화합물을 각각 53 mg(1, 2.7 mg %), 15 mg (2, 0.8 mg %) 및 46 mg(3, 2.3 mg %) 분리, 정제하였다.

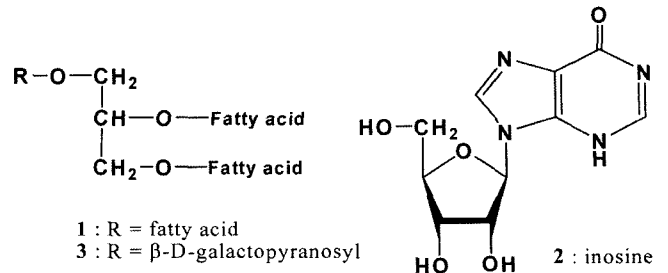


Fig. 1. Chemical structures of major components from the larva of *Allomirina dichotoma*.

화합물 1은 IR 스펙트럼에서 carbonyl(1735 cm⁻¹)과 이중결합(1655 cm⁻¹)의 흡수밴드가 관측되었다. ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) 스펙트럼의 고자장 영역에서 다수의 methylene(δ 1.36-1.18)과 말단 methyl(δ 0.87) 수소 시그널이 관측되었고, oxygenated methylene(δ 3.82)과 oxygenated methine(δ 3.42) 수소 시그널이 관측되었으며, 저자장 영역에서 몇 개의 olefine methine(δ 5.30-5.34) 수소 시그널이 관측된 점으로부터 지질화합물인 것을 알 수 있었다. ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) 스펙트럼에서는 고자장 영역에서 1개의 methyl(δ 13.7)과 다수의 methylene(δ 19.2-34.1) 탄소 시그널이 관측되었고, oxygenated methylene(δ 64.0)과 methine(δ 67.6) 탄소 시그널이 관측되었다. 저자장 영역에서는 olefine methine(δ 128.8-130.9)과 carbonyl(δ 173.0) 탄소 시그널이 관측되었다. 따라서 화합물 1은 glycerol의 3개의 수산기에 각각 지방산이 ester 결합하고 있는 triglyceride로 판명되었다.

화합물 2는 IR 스펙트럼에서 공역 ketone(1703 cm⁻¹), 수산기 및 아민기(3540, 3325 cm⁻¹)와 이중결합(1546 cm⁻¹)의 흡수밴드가 관측되었다. ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-d₅) 스펙트럼에서 heterocycle의 olefine methine(δ 8.91, 8.30), 당의 anomer(δ 5.89), oxygenated methine(δ 3.74-4.57) 및 methylene(δ 3.66, 3.74) 수소 시그널이 관측되었다. ¹³C NMR(100 MHz, pyridine-d₅) 스펙트럼에서, purine 염기에서 온 공역 ketone carbonyl(δ 158.62), nitrogenated olefine quaternary(δ 124.25, 148.55) 및 nitrogenated olefine methine(δ 140.32, 146.24) 탄소 시그널이 관측되었다. 또한 anomer δ 88.5) 및 당부의 oxygenated methine(δ 70.4, 74.1, 85.7)과 oxygenated methylene(δ 61.5) 탄소 시그널로부터 ribose가 purine염기의 아민기와 사이에서 탈수 축합한 것으로 판명되었다. 분자량은 negative FAB/MS의 [M-H]⁻ 이온(*m/z* 267)으로부터 268로 결정하였다. 위의 결과를 문헌¹³⁾과 비교한 결과 화합물 2는 핵산화합물인 inosine으로 구조 동정하였다.

화합물 3은 IR 스펙트럼에서 carbonyl(1735 cm⁻¹), 이중결합(1605 cm⁻¹) 및 수산기(3370 cm⁻¹)의 흡수가 관측되었다. ¹H-NMR 스펙트럼(400 MHz, pyridine-d₅)의 고자장 영역에서 다수의 methylene(δ 1.30-2.46)과 말단 methyl(δ 0.86) 수소 시그널이 관측되었다. 또한 anomer(δ 4.39)와 당부의 oxygenated methine 및 methylene(δ 3.51-4.14) 수소 시그널이 관측되어 glycosylglyceride로 추정되었다. ¹³C-NMR(100 MHz, pyridine-d₅) 스펙트럼에서 ester carbonyl(δ 173.3, 173.4), olefine methine

(δ 124.6-128.3), methylene(δ 22.9-34.5) 및 methyl(δ 14.3) 수소 시그널이 관측되어 지방산의 존재가 확인되었다. 또한 당부의 anomer(δ 103.4) 및 oxygenated methylene(δ 61.2)과 oxygenated methine(δ 68.9, 71.1, 73.2, 74.7)의 탄소 시그널로부터 D-galactopyranose 가 결합한 배당체로 판명되었다. 이 외에 glycerol 의 탄소 시그널(δ 65.0, 68.3, 70.9)이 관측되었다. 당의 결합양식은 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 anomer 수소의 짝지음상수(J)가 7.6 Hz로 관측되어 β -결합하고 있는 것으로 판명되었다. 따라서 화합물 3은 β -D-galactosyldiglyceride로 구조동정되었다.

위에서 얻어진 3개의 화합물 중에서 glyceride와 galactosylglyceride는 대부분의 생물체포 중에 공통적으로 함유되어 있는 물질로 곰팡이에만 들어 있는 특이성분이라고 할 수는 없어서, 지표성분으로 사용하기에는 적합하지 않다고 판단되었다. 특히, 곰팡이를 비롯하여 곤충류의 표피는 수분의 증산을 억제하기 위하여 cuticle과 같은 지질화합물이 다량 함유되어 있기 때문에 위의 두 성분은 더욱이 지표성분으로 사용하기에는 적합하지 않다. 하지만 화합물 2는 nucleoside 화합물인 inosine으로 생체세포에서 분리된 상태로는 잘 발견되지 않는 화합물이다. 현재까지 거미의 일종인 Parawixia bistrata 의 독,¹¹⁾ 곰팡이,¹²⁾ 해면¹³⁾ 등에서 분리, 보고되어 있을 뿐이다. 뿐만 아니라 inosine은 면역조절과 신경보호 활성을 갖는 것으로 보고되고 있어서,^{14,20)} 곰팡이의 지표성분으로 매우 적합한 것으로 판단되었다. 따라서 곰팡이 중에 함유되어 있는 inosine의 정량분석법을 확립하고, 확립한 방법을 이용하여 열풍과 원적외선 2가지 방법으로 건조한 곰팡이 시료 중에 함유되어 있는 inosine을 정량하고자 하였다.

화합물 2, inosine, 은 염기구조 중에 공역이중결합을 가지고 있으므로, HPLC 분석시에 UV detector를 이용하는 것이 감도나, 안정화에 있어서 매우 유리하므로 UV detector를 사용하기로 하였다. 이 때 UV detector의 흡수파장을 결정하기 위하여 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 inosine의 UV 흡수 spectrum을 측정하였다. 153 nm와 250 nm에서 최대 흡수 파장이 관측되었으나, HPLC 검출기에서는 가장 흡광도가 높은 파장 250 nm의 자외선을 사용하기로 하였다.

지표성분 inosine을 reverse phase column인 ODS를 이용하여 HPLC 분석하였다. 용출용매($\text{MeOH-H}_2\text{O} = 1:2$)를 1.0 ml/min로 흘렸을 때, 지표성분은 3'29"에서 검출되었다. Peak는 매우 깨끗하였으나, 지표성분이 너무 빨리 용출될 경우 곰팡이 중에 함유되어 있는 다른 성분과 분리되지 않고 중첩될 가능성이 매우 높으므로 rt.를 늦추기 위하여 용출용매의 극성을 높였다. 용출용매를 $\text{MeOH-H}_2\text{O} = 1:3$ 으로 측정하였을 때, rt.는 3'28"로 거의 차이를 보이지 않았다. 용출속도를 늦추기 위해 물의 함유비율을 높이면 column에 걸리는 압력이 매우 높아지게 되므로 현실적으로 활용에 매우 어려움이 있을 것으로 판단되었다. 따라서 column을 순상인 silica gel로 바꾸어 분석하였다.

순상인 silica gel column에 대하여, 용출용매는 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH} = 2:1$ 을 사용하고, 다른 조건은 ODS를 사용했을 때와 동일한 조건으로 측정하였을 때, 지표성분인 inosine의 rt.는 8'49"였으나 검출 peak의 tailing 현상이 매우 심하였다. 용출용

매를 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH} = 5:2$ 로 극성을 낮추어서 다시 측정하였을 때, 지표성분의 rt.는 9'36"였고, 검출 peak의 tailing 현상도 여전히 심하였다. 따라서 순상 특성을 가졌으면서, 담체의 극성을 높인 NH_2 (amine)-column을 이용하여 분석 하였다.

NH_2 column에 순상 column과 동일한 용출용매($\text{CHCl}_3\text{-MeOH} = 2:1$)를 사용했으며, 용출용매 외의 모든 측정조건은 위와 동일하게 측정하였다. 이 조건에서의 지표성분 rt.는 28'5"였으나, 검출 peak의 tailing 현상이 심하게 나타났다. 지표성분인 inosine은 질소를 함유한 염기성 성분이므로 용출용매의 pH를 조절하여 측정하여 보았다. 동일한 용출용매에 pyridine을 첨가하여 ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-pyridine} = 200:100:1$) 염기성화 시킨 후 측정하였을 때, 지표성분의 rt.는 3'8"였으나, 용매가 혼합되면서 가스가 발생하는 등의 원인으로 추정되는 noise가 대량 발생하고, 물질의 peak가 확인되지 않을 정도로 안정화 되지 않았다. 따라서 용출용매에 acetic acid를 첨가하여 ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-acetic acid} = 200:100:1$) 산성화 시킨 후 측정하여 보았다. 지표성분의 rt.는 6'26"였고, 검출 peak의 tailing 현상도 상당히 개선되었다. R.t.를 늦추기 위하여 극성을 낮춘 용출용매에 acetic acid를 첨가하여 ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-acetic acid} = 960:200:1$) 측정하였다. 지표성분의 rt.는 15'41"로 적당했고, tailing 현상도 한층 개선되었다. 따라서 HPLC를 이용하여 지표성분을 분석하는 방법을 다음과 같이 확립하였다. 주입구는 Model 7725i(20 μl sample loop, Rheodyne, USA)에, amine column은 LiChrospher 100 NH_2 (5 μm , 250 \times 4 mm, Merck, Germany)를, 검출기는 UV detector로 250 nm에서 측정하였고, 용출용매 조건으로는 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-acetic acid}(960:200:1)$ 를 1.0 ml/min(constant flow)의 속도로 용출하였을 때, inosine은 15'41"에서 검출되었다.

위에서 확립한 조건으로 HPLC에서 지표성분인 inosine의 주입농도와 peak area에 대한 표준검량선을 작성하였다. Inosine의 최종 주입량을 0.625에서 10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ 까지 7단계의 농도로 주입했을 때 시료량에 대하여 peak area가 일차적으로 정비례하게 나타났으며, 회귀방정식은 1차방정식 $y = 12.888x - 0.5417$ 로 표시되었고, 이 때 회귀계수 (r^2)은 0.9998로 매우 높게 나타났다. 따라서 위의 농도 범위 내에서 표준검량선을 사용하는 데에는 문제가 없다고 판단되었다.

열풍건조한 시료와 원적외선 건조기로 건조한 시료 중에 함유되어 있는 inosine의 양을 위에서 확립한 조건으로 분석하였을 때 각각 0.003% 및 0.055%로 나타났다. 원적외선 건조기로 건조한 장수풍뎅이 유충 중의 함량이 열풍으로 건조한 유충 중의 함량보다 18배 정도 높게 나타났다. 이는 열풍으로 건조할 때, 고온에 의하여 표준시료인 inosine이 분해되었기 때문인 것으로 추정된다.

결론적으로 이번 실험에서 충북영동지역에서 사육한 장수풍뎅이 유충으로부터 지표성분으로 inosine을 분리 동정하였으며, HPLC를 이용하여 inosine의 정량분석방법을 확립하였고, 이 방법을 이용하여 장수풍뎅이 유충으로부터 지표성분의 정량분석을 수행하였다. 따라서 장수풍뎅이 유충의 사육이나 약용제품 제조시의 품질관리에 이 방법이 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

초 록

장수풍뎡이 유충의 MeOH 추출물에서 얻어진 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 핵산성분을 분리하였으며, NMR, MS 및 IR 등의 스펙트럼 데이터를 해석하여 inosine으로 동정하였다. Inosine을 지표성분으로 하여 NH₂-column을 이용한 HPLC 분석방법을 확립하였고, 열풍건조한 시료와 원적외선 건조기로 건조한 장수풍뎡이 유충 시료 중의 inosine의 함량을 각각 0.003% 및 0.055%로 정량분석하였다.

Key words: 장수풍뎡이, 곰뱅이, inosine, 지표성분, HPLC, 정량분석

감사의 글

본 연구는 충북 영동군 농업기술센터에서 지원하는 ‘장수풍뎡이 유충 추출물 제조 및 지표성분 분석’의 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Li, S. (1998) In *Ben Cao Gang Mu, Compendium of Materia Medica*. Renmin Weisheng Chubanshe, Peking.
- Heo, J. (2005) In *Donggeui Bogam* (3rd ed.). YeoGang Press, Seoul.
- Korea Food & Drug Administration (2002) In *The Korean Herbal Pharmacopoeia*. Dongwon-Moonwhasa, Seoul.
- Jiang, S. X. and Yi, X. Y. (1982) In *Dictionary of Chinese Materia Medica*. Shanghai Scientific & Technical Publishers, Shanghai.
- Shin, M. K. (1997) In *Clinical Traditional Herbalogy* (5th ed.). Younglimsa, Seoul.
- Kang, I. J., Kim, H. K., Chung, C. K., Kim, S. J. and Oh, D. H. (2000) Effect of *Protaetia orientalis* (Groy et Perchlon) Larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 479-484.
- Kang, I. J., Chung, C. K., Kim, S. J., Nam, S. M. and Oh, S. H. (2001) Effect of *Protaetia orientalis* (Groy et Perchlon) larva on the lipid metabolism in carbon tetrachloride administered rats. *Korean J. Soc. Electron Microscopy* **31**, 9-18.
- Ahn, M. Y., Ryu, K. S., Lee, Y. W. and Kim, Y. S. (2000) Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 477-481.
- The Korean Pharmaceutical Association & Herb Medicine Policy Committee (2001) In *(WeonSaeg) HanYagDoGam*. Academy Press, Seoul.
- Hong, J. O. (1994) In *Gagongsigpumwi Weonryoro Sayonghal Su Itneun Dongsigmule Gwanhan Yeongu*. Korea Advanced Food Research Institute, Seoul.
- Rodrigues, M. C. A., Guizzo, R., Gobbo-Neto, L., Ward, R. J., Lopes, N. P. and Ferreira dos Santos, W. (2004) The biological activity in mammals and insects of the nucleosidic fraction from the spider *Parawixia bistrriata*. *Toxicon*. **43**, 375-383.
- Gao, J. M., Shen, J., Zhang, A. L., Zhu, W., Zhang, X. and Liu, J. K. (2003) Chemical constituents of the fungus *Leccinum extremiorientale*. *Youji Huaxue* **23**, 853-857.
- Lidgren, G., Bohlin, L. and Christophersen, C. (1988) Studies of Swedish marine organisms. Part X. Biologically active compounds from the marine sponge *Geodia baretii*. *J. Nat. Prod.* **51**, 1277-1280.
- Starling, R. D., Trappe, T. A. and Short, K. R. (1996) Effect of inosine supplementation on aerobic and anaerobic cycling performance. *Med. Sci. Sports Ex.* **28**, 1193-1198.
- Yao, Q. and Gao, G. (2005) Effects of inosine on praxiology and the level of dopamine in striatum of mice with Parkinson disease. *Zhongguo Linchuang Kangfu* **9**, 55-57.
- Devous, M. D. and Lewandowski, E. D. (1987) Inosine preserves ATP during ischemia and enhances recovery during reperfusion. *Am. J. Physiol.* **253**, 1224-1233.
- Macdonald, G. J., Burcher, E., Fisher, W. K., Bagnara, A. S., Barrow, K. D., Thompson, E. O. P. and Duffield, A. M. (1981) Uridine and inosine: pressor nucleosides from man, rat and dog. *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci.* **59**, 167-78.
- Lewandowski, E. D., Johnston, D. L. and Roberts, R. (1991) Effects of inosine on glycolysis and contracture during myocardial ischemia. *Circul. Res.* **68**, 578-87.
- Darlington, D. N. and Gann, D. S. (2005) Purine nucleosides stimulate Na/K ATPase, and prolong survival in hemorrhagic shock. *J. Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* **58**, 1055-1060.
- Tomaselli, B., Podhraski, V., Heftberger, V., Boeck, G. and Baier-Bitterlich, G. (2005) Purine nucleoside-mediated protection of chemical hypoxia-induced neuronal injuries involves p42/44 MAPK activation. *Neurochem. International* **46**, 513-521.