

마와 영여자의 기능성 성분 함량분석

이은비 · 박상희 · 김희철 · 장지영 · 윤정민 · 김선정 · 이창일

약품화학과

Analysis of Functional Ingredient Contents of *Dioscorea* and Aerial Bulbil

E. B. Lee, S. H. Park, H. C. Kim, J. Y. Jang, J. M. Yun, S. J. Kim and C. I. Lee

Drug Chemical Division

Abstract

This study was conducted to establish a new assay, LC-MSMS, and the performance of Allantoin and Diosgenin, which are the active ingredients in *Dioscorea* and aerial bulblet. First of all, the test is tested by different extraction methods. For both Allantoin and Diosgenin, reflux-extraction yielded higher yields than sonication-extraction. Bulblet was collected in total 4 times to see the trend of its content. Allantoin was detected in all parts including *Dioscorea* and bulblet. Most of allantoin was higher in *Dioscorea* than bulbil, and there was no significant difference by harvesting time. Diosgenin was not found in *Dioscorea* and was small in bulblet, but it was the highest in the early stage and the content tended to decrease as it matured. The stem and leaves contained Allantoin and Diosgenin, but very little.

Key Words : *Dioscorea*, Aerial bulblet, Aerial Bulbil, Allantoin, Diosgenin, LC-MSMS

I. 연구사업

1. 서 론

흔히 산에서 나는 약이라고 해서 산약(山藥)이라 불리는 부분은 마의 지하부 뿌리인 괴근(근경)을 건조시켜 말린 후 약재로 이용되는 것을 말한다. 마(麻)는 다년생 덩굴성 식물로, 뿌리는 육질인 괴경으로 땅속 깊이 들어간다. 지상으로 덩굴을 만들며 뻗어 올라가는 줄기와 잎사귀 사이에 돋아나는 콩알 같은 형태의 영여자(零餘子)라고 한다. 주아는 자라서 줄기가 되어 꽃을 피우거나 열매를 맺는 쪽을 말하고, 마의 주아(珠芽)를 영여자라고 하는 것이다. 영여자는 적지 않은 수확량에도 불구하고 상업적 이용의 한계가 있어 특별한 용도를 찾지 못하고 폐기되고 있는 실정이었는데¹⁾, 2016년에 식약처로부터 식품에 사용할 수 있는 원료 목록에 추가되어 활용 가능성이 높아지고 있다.

마의 괴근에는 알란토인, 아르기닌, 아밀로오스, 콜린, 사포닌, 뮤신, 디오스게닌 등 다양한 약용성분이 함유되어 있어 혈당 하강 작용, 소화촉진 작용, 거담작용, 자양작용 등의 약리효과가 있는 것으로 알려져 있다.²⁾

본 연구에서는 이러한 성분들 중에 선행연구들을 토대로 지표물질로 가장 가능성성이 높은 알란토인과 디오스게닌이 마의 영여자에도 함유되어 있는지 유무와 그 함량을 비교 분석하기 위한 목적이 있다.³⁾ 현재 마의 지표성분이라고 명확하게 명시되어 있는 성분은 없지만, 본 연구를 통해 알란토인과 디오스게닌을 지표성분으로 설정하는데 근거를 보태고자 한다.

알란토인($C_4H_6N_4O_3$)은 5-ureidohydantoin 또는 glyoxyldiureide라고도 불리며 동물, 식물 및 박테리아를 포함한 대부분의 유기체에서 주요

대사 중간체이다. 알란토인은 자연에서 얻어지는 천연의 질소혼합물로, 흔히 질소저장체라고도 한다. 또한 요산으로부터 생성되는 퓨린 대사체로, 화장품 산업에서 필수적인 첨가제로 사용되고 있다. 피부를 보호하는 역할을 하여 주로 화장품, 구강 위생제품, 약의 성분으로 사용되며, 복용했을 때도 다양한 생리활성을 나타낸다. 알란토인의 유래는 다양하지만, 감자, 고구마, 캄프리 등의 식물보다 마(산약)에 더욱 풍부하게 함유되어 있다.

디오스게닌은($C_{27}H_{42}O_3$)은 스테로이드계 성호르몬 전구체로 화학반응을 통해 dehydroepiandrosterone(DHEA)가 된다. 식물체가 외부로부터 병해충 침입 및 공격에 대항하기 위해 생성하는 방어물질인 식물의 2차대사산물 중 하나로 추정되고 있다. 2차대사산물이란 세포의 정상적인 대사과정에서 부차적으로 생산되어 세포내의 액포나 기타 특수한 장소에 축적되는 물질을 말하며, 한약제의 약리성분의 상당부분이 여기에 속한다. 디오스게닌은 소염, 진통작용과 염증성질환을 위한 치료제 및 기능성화장품 원료로의 사용 가능성이 규명되고 있다.

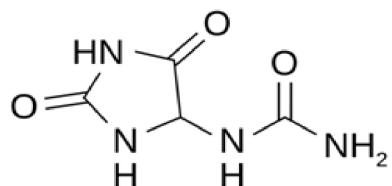


Fig. 1. Chemical structure of Allantoin.

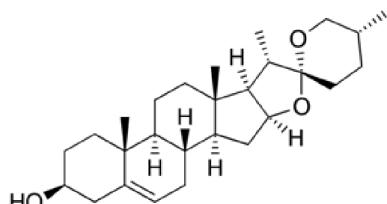


Fig. 2. Chemical structure of Diosgenin.

이처럼 다양한 분야에서 활용도가 높은 알란토인과 디오스게닌 성분을 UPLC를 이용하여 분석하는 방법들에 대한 연구가 상당히 수행되어 있다. 여기서 한층 더 나아가 정확성과 특이성을 더 높일 수 있는 LC-MSMS를 이용한 분석법을 확립하는데 본 연구의 또 다른 목표가 있다.

국내에서 생산되는 마의 80% 이상이 경상북도 안동 등 북부지역을 중심으로 생산되고 있고, 안동시의 경우는 산약(마) 특구로 지정되어 중앙정부로부터 많은 지원을 받아 한약재, 음료, 식품재료, 주류 등 그 이용성이 날로 확대 발전되어가고 있다.⁴⁾ 특히 안동시는 농가 소득을 올리고 농산물 수입개방에 대비해 우수한 산약 생산 및 유통체계를 정착시키는 등 고품질 산약 생산 기반을 조성했다. 이처럼 경북 특산물로서 이용가치가 높은 마와 영여자 등의 새로운 생물소재로의 개발 가능성을 검토하고, 특히 영여자의 활용 방안을 제시해보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

마는 괴경과 잎의 모양 및 원산지에 따라 장마, 단마, 둥근마, 부채마, 단풍마 등으로 구분한다. 본 실험에 사용된 마(麻)는 재배마 3종(단마, 둥근마, 장마)과 야생마 1종(부채마)을 선택하였고, 재배마인 단마, 장마는 2020년 9월에 경북 안동 농수산물도매시장에서 구입하였다. 재배마인 둥근마, 야생마인 부채마와 영여자(零餘子)는 2020년 8월부터 10월 사이에 경상북도 농업기술원 생물자원연구소에서 채취하여 실

험재료로 사용하였다.

영여자, 줄기와 잎은 생물자원연구소에서 재배 중인 단마의 것들을 채취하였다. 영여자는 8/26, 9/14, 10/8, 10/15 총 4번에 걸쳐 채취하였으며, 잎과 줄기는 8/26, 9/14 2번 채취하여 사용하였다.

보통 뿌리줄기를 가을에 채취하여 껍질을 벗긴 후 그늘에 말려 사용하는데, 본 연구에서는 찌거나 말려서 유통하는 산약과는 다르게 어떠한 가공 과정을 거치지 않고 껍질만 제거하여 분쇄 건조 후 바로 실험재료로 사용하였다.

2.2. 일반성분분석

마의 일반성분으로는 회분, 건조감량을 대한 민국 약전의 ‘산약(山藥)’ 시험법에 따라 실험하였다.

2.3. 시료추출(검액의 조제)

본 실험에 사용된 마와 영여자 등에서의 성분 추출을 위해 분쇄시료 0.5 g에 15 ml의 메탄올을 가한 후 초음파추출과 환류추출법으로 추출물을 제조하였다.

초음파추출은 유리병에 분쇄시료와 MeOH을 혼합한 후 50 KHz 초음파를 가하여 30분 동안 추출 후 상층액을 취해 0.2 um 필터를 거쳐 기기분석을 위한 검액으로 하였다.

환류냉각추출은 분쇄시료와 메탄올을 넣은 용기에 냉각관을 부착하여 70°C의 항온수조에서 6시간 추출 후 상층액을 취해 0.2 um 필터를 거쳐 기기분석을 위한 검액으로 하였다.

I . 연구사업

2.4. 기기 및 시약

분석용 기기는 Waters사의 UPLC XEVO-TQ MS를 사용하였다.

Allantoin 표준품은 Sigma-Aldrich사의 품번 97-59-6, 100 g 제품을, Diosgenin 표준품은 Sigma-Aldrich사의 품번 512-04-9, 5 g 제품을 구매하여 사용하였다.

2.5. Allantoin, Diosgenin 함량 분석

마, 영여자, 줄기와 잎에서의 알란토인과 디오스게닌의 함량 측정은 Tao Yi 등⁸⁾의 방법에 따라 메탄올 추출법으로 진행하였다. 각각을 깨끗이 물로 잘 씻어 이물질을 제거하고, 껍질을 얇게 벗긴 다음 두께 2 mm 정도로 절단하여 음건하여 냉장고에 보관하면서 분석시료로 사용하였다. 시료분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말화하였다. 분말 시료 0.5 g을 취한 후 메탄올 0.5 ml을 가한 후, 초음파 추출은 30분간 sonication 후 상층액을 취하고, 환류냉각추출은 70°C로 6시간 추출하여 각각의 추출물을 0.25 nm 필터에 걸러 기기 분석을 위한 시료로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 일반성분

실험에 사용된 재배마 3종(단마, 등근마, 장마)과 야생마 1종(부채마)의 일반성분을 대한민국약 전 회분, 건조감량시험법에 따라 2~3회 실시한 결과, 회분은 69.01~83.53%, 건조감량은 1.19~

1.55%로 나타났다. 마의 회분 결과는 산약 기준이하였지만, 건조감량 수치는 산약 기준치 이상이었다. 일반적으로 유통되는 산약과 같이 오랜 시간동안 건조과정을 거치지 않은 이유일 것이라 사료된다.

$$\text{회분} = (\text{회화 후 도가니 무게} - \text{회화 전 도가니 무게}) / \text{시료 무게} * 100$$

산약기준, 6.0% 이하

$$\text{건조감량} = \{(\text{청량병 무개} + \text{시료 무개}) - \text{건조 후 무개}\} / \text{시료 무개} * 100$$

산약 기준, 14.0% 이하

3.2. LC-MSMS 분석조건

마의 부위별 분석을 위한 LC-MSMS는 Waters의 Acquity UPLC XEVO-TQ MS(USA)를 사용하였으며, 알란토인과 디오스게닌 함량을 구하기 위하여 여러 가지 조건들을 변형시켜서 실험하였고 가장 적합한 분석법을 먼저 확립한 후 심층적인 분석을 진행하였다. 확립된 조건은 Table. 1과 같다.

알란토인의 경우, 0.1% formic acid 를 함유한 Water와 ACN으로 10분간 농도 구배를 주었으며 이 때 BEH Amide 1.7 μm (2.1x100 mm) 컬럼을 이용하였고 유속은 0.4 mL/min으로 하였다.

디오스게닌의 경우, 0.1% formic acid 를 함유한 Water와 MeOH로 10분간 농도 구배를 주었으며 이 때 BEH C₁₈ 1.7 μm (2.1x100 mm) 컬럼을 이용하였고 유속은 0.4 mL/min으로 하였다.

Table 1. Condition of UPLC-MSMS for Allantoin, Diosgenin

Parameter	Allantoin			Diosgenin					
Injection volume	5 ul			5 ul					
Column	BEH Amide 1.7 μ m 2.1x100 mm			BEH C ₁₈ 1.7 μ m 2.1x100 mm					
Column temperature	40°C			40°C					
Flow rate	0.4 mL/min			0.4 mL/min					
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in Water B: 0.1% formic acid in ACN			A: 0.1% formic acid in Water B: MeOH					
Ionization Mode	ESI (Electrospray Ionization), Positive								
Type	Multiple reaction monitoring (MRM)								
	Time(min)	A	B	Time(min)	A	B			
Gradiant program	Initial	0	100	Initial	5	95			
	1	0	100	1	5	95			
	5.5	50	50	5.5	100	0			
	7.5	50	50	7.5	100	0			
	7.6	0	100	7.6	5	95			
	10	0	100	10	5	95			
	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)				
Allantoin	159.05	61.00		15	15				
	159.05	116.00		15	10				
Diosgenin	415.50	253.20		25	25				
	415.50	271.20		25	15				

I. 연구사업

3.3. 크로마토그램, 검량선

1) Allantoin

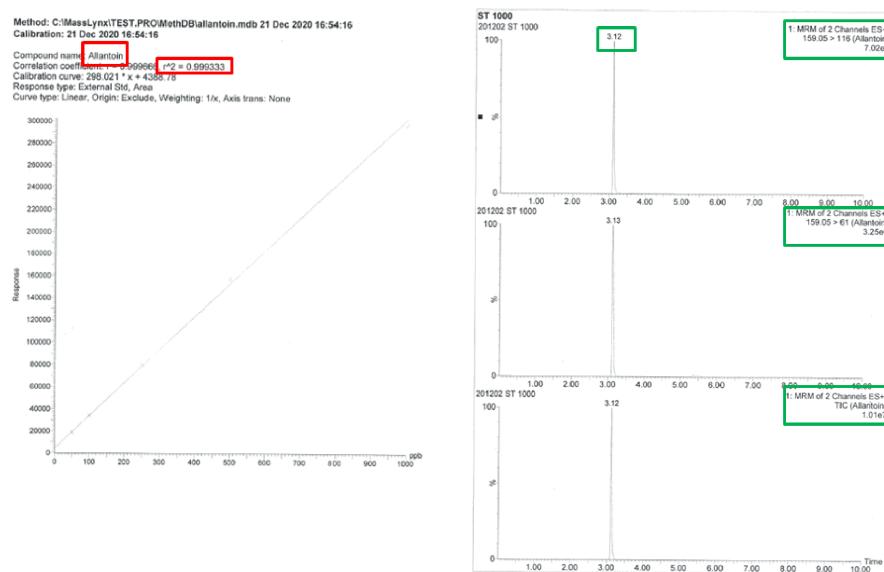


Fig.1. Calibration curve and UPLC chromatogram of Allantoin standard solution.

2) Diosgenin

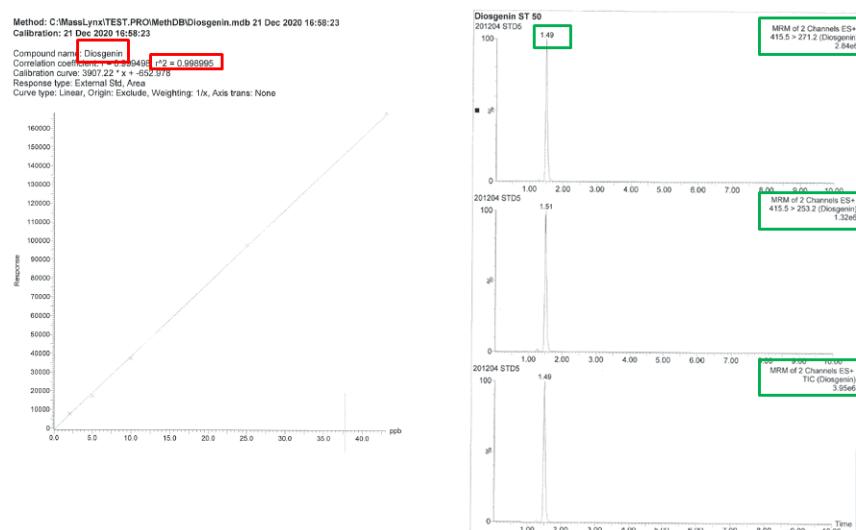


Fig.2. Calibration curve and UPLC chromatogram of Diosgenin standard solution.

알란토인과 디오스게닌 표준용액을 이용하여 LC-MSMS 분석 조건을 설정하였다. 알란토인 분석을 위한 이동상으로 Water와 ACN을 사용하였을 때 알란토인의 retention time은 약 3.12분에 나타났으며, 디오스게닌은 Water와 MeOH를 사용하였을 때 디오스게닌의 retention time은 약 1.49분에 나타났다. 알란토인과 디오스게닌은 다른 성분들과 비교적 잘 분리됨을 알 수 있었다. 다만, 두 물질이 가지는 용해도 및 컬럼 내부 확산 등에 의해 알란토인의 이동상은 ACN, 디오스게닌의 이동상은 MeOH를 사용해야만 분석이 가능하다는 점을 고려해야 한다.

이 때 알란토인의 크로마토그램은 Fig. 1과 같으며, 검량선은 $Y=298.021X+4388.78$, 상관계수(r^2)는 0.9993 이었다.

디오스게닌의 크로마토그램은 Fig. 2와 같으며, 검량선은 $Y=3907.22X-652.978$, 상관계수(r^2)는 0.999 이었다.

3.4. 추출방법에 따른 함량

먼저, 추출방법에 따른 수율을 비교하고자 초음파추출과 환류추출의 두 가지 방법으로 시료를 추출하였다. 추출방법을 달리한 영여자의 알란토인과 디오스게닌의 함량은 Fig. 3, 4와 같다. 알란토인, 디오스게닌 모두 환류추출이 초음파추출보다 더 높은 함량을 나타내었다. 따라서 본 연구의 실험은 더 수율이 높은 환류추출로 진행하였다.

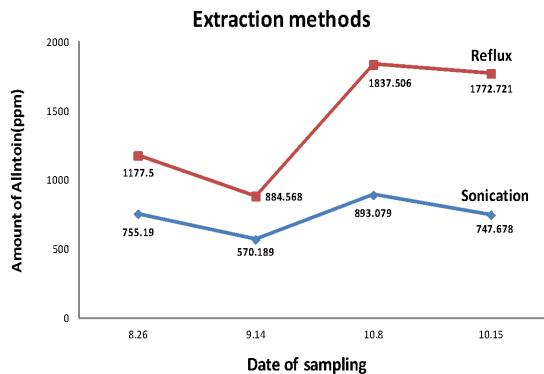


Fig. 3. Contents of Alantoin in aerial bulbil by extraction methods.

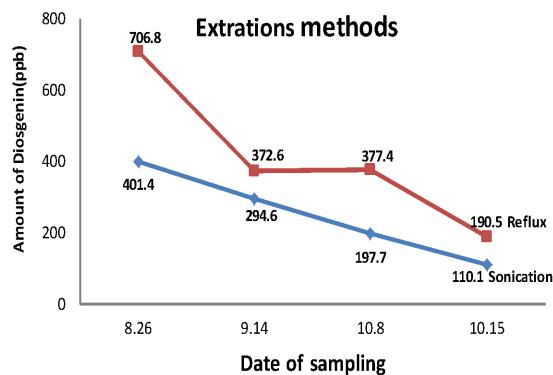


Fig. 4. Contents of Diosgenin in aerial bulbil by extraction methods.

I. 연구사업

3.5. 재배마 및 자연마의 알란토인 및 디오스게닌 함량

실험에 사용된 재배마 3종(단마, 등근마, 장마)과 야생마 1종(부채마)의 알란토인과 디오스게닌 함량을 분석한 결과(Table 2), 재배마와 자연마에서 많은 양의 알란토인이 검출되었다. 또한 디오스게닌은 재배마와 자연마 모두에서 검출되지 않았다.

결론적으로 마의 종류에 따른 알란토인 및 디오스게닌 함량의 특이성은 나타나지 않았다.

Table 2. Contents of Allantoin and Diosgenin in *Dioscorea* spp.

순번	분류	종류	Allantoin (ppm)	Diosgenin (ppb)
1		단마	4852.74	0
2	재배마	등근마	5812.08	0
3		장마	5997.78	0
4	자연마	부채마	4934.10	0

3.6. Allantoin 함량

1) 영여자 알란토인 결과

영여자에서의 알란토인의 시기별 함량 추이를 알아보기 위해, 8~10월 사이에 총 4번의 시료채취를 하였다. 영여자의 수확시기를 고려하여 채취 날짜를 정하였다. 그 결과, 4번의 영여자 채취 시료 모두에서 많은 양의 알란토인이 검출되었지만 흔히 가식부위라고 불리는 마의 괴근(뿌리)에서의 함량보다는 적은 양이 함유되어 있었다. 또한

채취일자에 따른 알란토인 함량의 큰 차이가 나타나지 않았다. (Fig. 5)

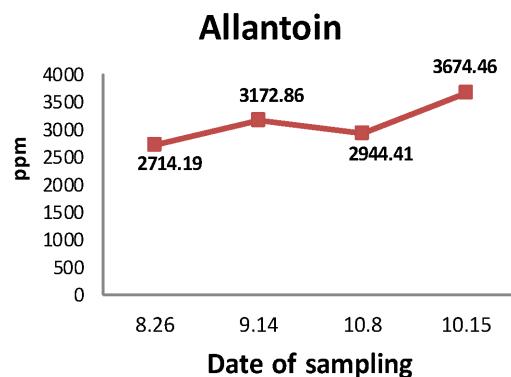


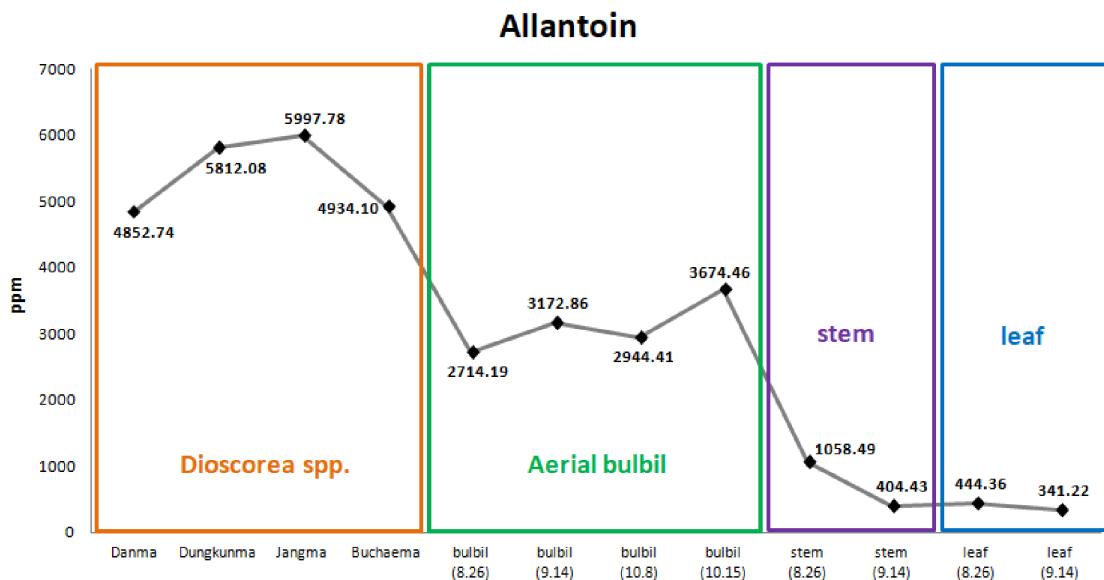
Fig. 5. Contents of Allantoin in aerial bulbil.

2) 마와 영여자의 알란토인 함량비교

앞서 말한 결과들을 토대로 마, 영여자, 줄기와 잎에서의 알란토인 함량을 비교하였다. 영여자보다 마(단마, 등근마, 장마, 부채마)에서 많은 양의 알란토인을 함유하고 있었다. 또한 마와 영여자에 비해 줄기와 잎에서 현저히 적은 양의 알란토인이 검출되었지만 줄기와 잎의 수치는 더 늦게 채취된 것이 알란토인 함량이 낮았다. (Fig. 6)

4가지 마의 종류에 따른 알란토인 함량에는 특별한 특이성을 나타내지 않았다. 영여자에서는 마보다는 낮은 수준의 함량을 나타냈지만 영여자의 열매가 맷하고 시간이 지나 점점 성숙되어 갈수록 알란토인의 양이 증가됨을 알 수 있었다. 잎과 줄기에서는 미량이 나왔고 함량의 특이성을 찾을 수 없었다.

결론적으로 알란토인은 마의 영양성분으로 영여자 초기에는 미량존재하기 시작하며 성숙되어 가면서, 최종 마에서는 그 함량이 최대가 됨을 알 수 있었다.

Fig. 6. Contents of Allantoin in different *Dioscorea* spp. and aerial bulbil.

3.7. Diosgenin 함량

1) 영여자 디오스게닌 결과

4번 채취된 영여자 모두에서 알란토인에 비해 아주 적은 양의 디오스게닌이 검출되었고 채취일자가 늦어질수록 디오스게닌 함량이 감소했다. 다시 말하면, 초기의 영여자일수록 많은 양의 디오스게닌을 함유하고 영여자가 성숙될수록 디오스게닌 함량이 줄어드는 경향이었다. (Fig. 7)

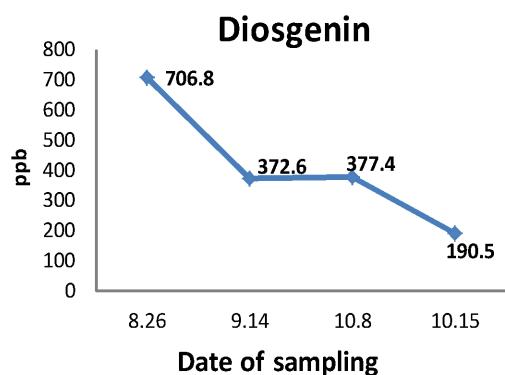


Fig.7. Contents of Diosgenin in aerial bulbil.

I. 연구사업

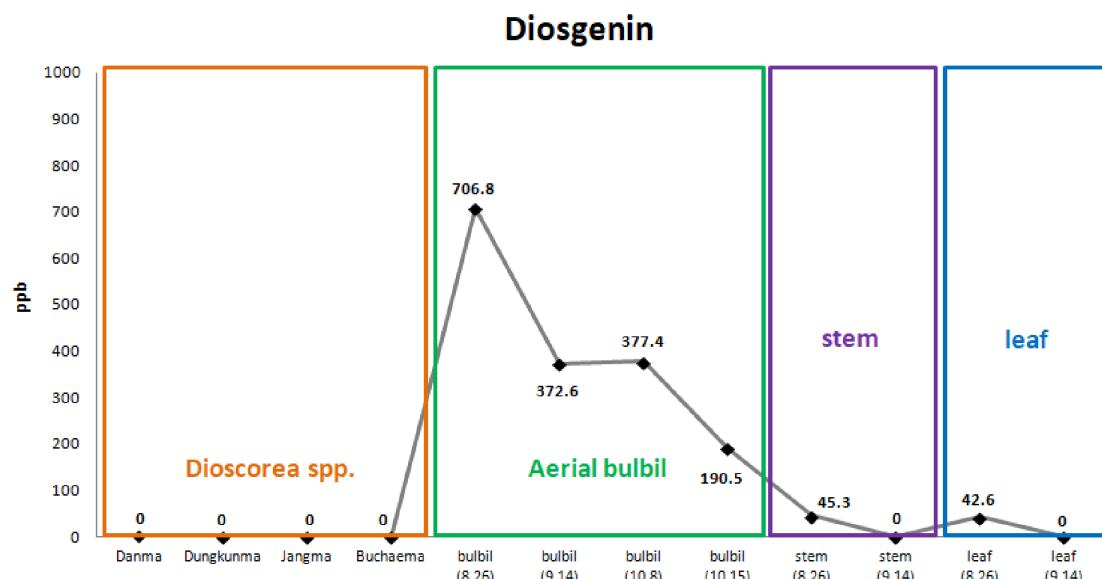


Fig. 8. Contents of Diosgenin in different *Dioscorea* spp. and aerial bulbil.

2) 마와 영여자의 디오스게닌 함량비교

알란토인과 마찬가지로 마, 영여자, 줄기와 잎에서의 디오스게닌 함량을 비교하였다. 마에서는 디오스게닌이 검출되지 않았고, 영여자에 비해 줄기와 잎에서 현저히 적은 양의 디오스게닌이 검출되었다. 잎에서도 디오스게닌이 검출되지 않았고 줄기에서는 42.6~45.3 ppb의 아주 적은 양의 수치가 나왔지만 채취시기에 따른 유의적인 함량 차이를 보이지 않았다. (Fig. 8)

디오스게닌은 식물의 2차 대사 산물이다. 이번 실험에 검출된 양은 ppb 단위로 아주 미량이였지만, 전체적으로 서로 비교해 보면 영여자 초기에는 많은 양이 검출되었으나 시간이 지나고 점점 성숙되어 갈수록, 또는 최종 마로 되면서 줄어드는 경향을 나타냈다.

만약 디오스게닌을 생리활성물질로 이용하려 한다면 초기 영여자를 수확해서 그 원료 물질로 사용해야 된다는 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 마의 부위별 성분에 함유되어 있는 약효성분인 알란토인과 디오스게닌의 함량과 그 차이를 확인하고 LC-MSMS 분석법을 확립하고자 하였다. 기존에 산약이라고 알려진 근경 부분인 마, 마의 씨앗이자 열매인 영여자, 줄기와 잎의 성분을 비교하고 특성을 분석하였다. 특히 영여자에서의 알란토인과 디오스게닌 함량을 보고자 했다.

마의 형태에 따라 구분하고 있는 쿠내산 재배마

3종(단마, 둥근마, 장마)과 야생마 1종(부채마) 및 영여자 등의 기능성 성분인 알란토인과 디오스게닌의 함량을 조사하였다.

채취 및 구매한 마와 영여자로부터 메탄올 추출물을 조제하고 추출법을 달리하여 파일럿 테스트를 진행하여 수율이 더 높은 환류추출을 이용하여 실험을 진행하였다.

알란토인은 대부분 영여자보다 마에서 높은 함량을 나타내었다. 디오스게닌은 마에서는 거의 검출되지 않았고 영여자에서는 대체적으로 적은 함량이었지만 완숙될수록 함량이 줄어드는 경향을 보였다. 다시 말해, 스테로이드성 사포닌 성분은 초기 영여자에 많이 함유되어 있음을 확인하였다. 알란토인은 마에 함유되어 있는 일반적인 영양성 분인데 반해, 식물의 2차대사산물이라고 알려진 디오스게닌은 마에게 중식수단이나 약조건에서 생성되는 방어작용을 하는 성분이라는 연구 결과들의 근거가 될만한 실험결과이다.

영양성분인 알란토인을 화장품이나 식품소재로 활용 할 시는 성숙된 영여자나 마를 이용해야 하며, 생리활성물질인 디오스게닌을 기능성화장품이나 약리물질로 이용하고자 한다면 초기의 영여자를 활용해야 한다.

이상의 결과로, 산약이라 불리는 마의 근경 이외의 영여자에도 기능성 성분이 함유되어 있다는 가설에 힘을 실어주며 마의 벼려지는 부분을 활용함으로서 생산농가의 소득 증대 가능성을 제시하고자 한다.

또한 본 연구를 통해 알란토인과 디오스게닌을 더 정확하게 분리할 수 있는 LC-MSMS 분석법을 확립하였다. 이것을 토대로 마의 영여자에 함유된 성분들을 분석하고 그것을 활용한 식품 소재

화 및 제품 개발을 위한 기초자료를 제공할 수 있을 것이라 사료된다.

다만, 더 빈번하고 긴 채취시기별 함량 분석을 통해 알란토인과 디오스게닌의 함량 차이와 정확한 인과관계를 밝힐 수 있는 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. 박정섭, 이정호, 방극수, “단마와 장마 영여자의 항산화능 및 항돌연변이 활성 검정”, *한국자원식물학회지*, 25(2), 200~208(2012).
2. 장상문, “마(麻)의 품종별 영양성분 및 Diosgenin 함량”, *한국식품영양학회지*, 22(2), 223 ~ 228 (2009).
3. 서창섭, 황대선, 이준경, 하혜경, 김호경, 서영배, 신현규, “포장방법에 따른 산약 지표성분의 함량분석”, *대한본초학회지*, 23(4), 45~49(2008).
4. 경상북도농업기술원 생물자원연구소, 마(산약)의 재배기술(2015).
5. 김경미, 강문경, 김진숙, 김기창, 최송이, “국내산 마 품종별 이화학적 성분 및 항산화 활성”, 동아시아식생활학회지, 25(5), 880~886(2015).
6. 황귀서, “산약(山藥)(Dioscoreae Rhizoma)으로부터 Allantoin의 분리 및 함량분석”, *대한예방한의학회지*, 7(1), 133~138(2003).
7. 박정섭, 이정호, 방극수, “영여자의 항균, 항혈전 및 항산화 활성 평가”, *한국미생물·생명공학회지*, 37(3), 266~272(2009).
8. Tao Yi, Lan-Lan Fan, Hong-Li Chen, Guo-Yuan Zhu,

I . 연구사업

- Hau-Man Suen, Yi-Na Tang, Lin Zhu, Chu Chu,
Zhong-Zhen Zhao, Hu-Biao Chen, “Comparative
analysis of diosgenin in *Dioscorea* species and re-
lated medicinal plants by UPLC-DAD-MS”, *BMC
Biochemistry*, 2014.
9. Seo C.-S, Shin H.-K, “Quantitative Analysis of
Twelve Marker Compounds in Palmiji-hwang-hwan
using Ultra-Performance Liquid Chromatography
Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass
Spectrometry”, *Natural product sciences*, 20(3),
182~190(2014).
10. 식품의약품안전처, 대한민국약전(2020)