

국내산 컴프리의 형태학적 특성 및 Pyrrolizidine Alkaloids 분석

김희연[†] · 홍진환 · 김동술 · 한상배 · 이은주 · 강길진 · 정형욱 · 강신정 · 홍영표 ·
안영순 · 육창수* · 박종희** · 배기환*** · 김창민 · 송인상

식품의약품안전청, *경희대학교 약학대학
부산대학교 약학대학, *충남대학교 약학대학

Studies on Morphological Properties and Pyrrolizidine Alkaloids Analysis of Comfrey Cultivating in Korea

Hee-Yun Kim[†], Jin-Hwan Hong, Dong-Sul Kim, Sang-Bae Han, Eun-Ju Lee, Kil-Jin Kang,
Hyung-Wook Chung, Shin-Jung Kang, Young-Pyo Hong, Young-Sun An, Chang-Soo Yook*,
Jong-Hee Park**, Ki-Hwan Bae***, Chang-Min Kim and In-Sang Song

Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

*College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

**College of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

***College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the morphological properties and pyrrolizidine alkaloids of comfrey cultivating in Korea. 12 comfrey samples cultivating in Korea was selected and their appearance (whole plant, leaves, root etc.) were observed by expert and microscopy for morphological analysis. It is confirmed that their species are *Symphytum officinale* Linnaeus. Samples were extracted by hot MeOH and ultra-sonification. Their extracts contained pyrrolizidine alkaloids, which was identified by TLC analysis. By spraying thin-layer chromatograms of pyrrolizidine alkaloids stable purple spots were developed. But the extracts of chicory, pumpkin and sesame leaves did not show any purple spots. Same HPLC pattern were displayed at about 30 min of retention time by HPLC analysis for comfrees. However, the extracts of chicory, pumpkin and sesame leaves did not show peaks at one and the same time.

Key words: comfrey, pyrrolizidine alkaloids, *Symphytum officinale*

서 론

컴프리 속(屬)은 털이 많은 다년생 초본으로 세계에 26종(種)이 분포하고 있으며, 이중 *Symphytum asperum*, *Symphytum officinale*, *Symphytum x uplandicum*의 3가지 종이 독성이 있는 것으로 분류된다. 컴프리(*Symphytum officinale* Linnaeus)는 유럽 원산이며 재배작물로 들여와 각처에서 재배도 하고 야생상으로 퍼져나가 자라는 귀화식물이다. 다년생 초본이며 높이 60~90 cm이고 짧은 털이 있으며 가지가 갈라지고 날개도 약간 있다. 잎은 호생(互生)하며 난상 피침형이고 끝이 길게 뾰족해지며 밑부분의 것은 엽병이 있으나 윗부분의 것은 없고 잎이 달린 곳에서 밑으로 흘러 날개처럼 된다. 6~7월에 꽃이 피고 꽃은 자주색, 연한 홍색 및 백색이며 화축(花軸)은 1~2회 2개씩 갈라지고 끝이 꼬리처럼 말려서 밑을 향한다. 꽃받침은 녹색이며 5개로 갈라지고 화관은

넓은 통형으로서 윗 부분이 종처럼 약간 벌어지며 알개 5개로 갈라지고 5개의 수술은 통부(筒部)에 붙어 있다. 8월에 열매가 성숙되고 분과는 4개의 분과로 되면 난형이다. 용도는 주로 식용, 약용, 관상용에 쓰이고 잎을 차로 사용하며, 민간에서는 전(全草) 및 잎을 보약(補益), 고혈압, 진정(鎮靜) 등에 약으로 이용하여 왔다(1,2).

컴프리는 pyrrolizidine alkaloids(PAs)를 함유하고 있다(3-8). PAs의 함량은 식물의 부위(뿌리, 잎, 꽃, 싹 등)에 따라 다르고 기후, 토양조건과 수확시기에 따라서도 차이가 난다(9,10). 또한, Mattocks(3)는 식품으로 이용되는 Russian comfrey 잎의 알카로이드 함량은 컴프리의 자란정도에 따라 다르다고 보고하였다. 독성이 있는 PAs의 함량은 식물이 생장하는 시기에 가장 높고 잎이 다 자랐을 때 감소한다. 뿌리의 PAs함량은 잎보다 훨씬 더 높고, 건조된 잎이 신선한 잎보다 더 높은 함량을 가진다(11).

[†]Corresponding author. E-mail: pmheekim@kfda.go.kr
Phone: 82-2-380-1686. Fax: 82-2-354-1399

PAs는 alkaloids의 한 종류로서 pyrrolizidine 핵을 가지고 있다(Fig. 1). Fig. 1에서 보는 바와 같이 간에 독성을 일으키는 모든 PAs는 pyrrolizidine 핵의 1과 2번 위치에 이중결합을 가지고 측쇄에 CH₂OH기가 에스테르 결합을 하고 있다. PAs중에서도 retrorsine과 같이 cyclic diester를 가지는 것들이 가장 독성이 강하다. 이러한 물질들은 급성독성(acute toxicity)을 나타낸다.

Non-cyclic diesters 물질은 중간 정도의 독성을 가지고, monoesters를 가지는 것들은 독성이 가장 약하다. PAs는 식물에서 질소산화물형태(N-oxides)로도 관찰되는데 이들의 독성은 PAs의 독성을 나타내는 순서와 동일하다. 즉, PAs의 독성을 강한 순서대로 나타내면 cyclic diesters > non-cyclic diesters > monoester 순이다. 이러한 PAs의 독성은 dihydro-pyrrolizine 유도체라고 불리는 반응성이 강한 대사산물인 pyrroles이 hepatic mixed function oxidase enzymes인 cytochrome P-450에 의해서 간에서 작용하기 때문에 나타난다(13). 이러한 PAs로서 컴프리에 존재하는 것들은 retronecine, lycopsamine, intermedine, 7-acetyllycopsamine, 7-acetylintermedine, symphytine, symlandine, echimidine, uplandicine 등이라고 WHO(13), US FDA(14)는 보고하고 있다.

전 세계적으로 PAs를 함유한 식물을 섭취하여 간정맥폐색성질환(HVOD)이 유발되었다는 보고(8,15-20)가 있다. HVOD는 급성으로 발생하며, 치명적인 간부전을 유발할 수 있다. 덜 심각한 경우, 간질환이 아급성형태로 진행될 수 있다. 회복 후에도 간경화를 포함하여 만성간질환에 주의하여야 하며, 소량일지라도 PAs를 장기간 섭취하면 간경변의 발생 위험이 있을 수 있다. 컴프리와 같이 PAs를 함유한 식물에 의해 유발되는 간장해의 정도는 복용하는 사람의 연령, 체중, 성별, 간기능 및 총 섭취량과 식물의 부위 (잎, 뿌리)에 의해 달라질 수 있다(6,21). PAs는 동물과 사람에게 간독성을 일으키고, 이들의 일부는 실험동물에 종양을 유발시키는 것이 보여지고 있다(5). 간에 대한 컴프리의 효과를 연구하기 위해서 Russian comfrey로부터 추출한 PAs를 3 그룹의 쥐(rat)

에게 먹였다. 1 그룹의 rat에게는 1회당 200 mg/kg body, 2 그룹은 100 mg/kg body, 3 그룹은 50 mg/kg body를 1주일에 3번씩 3주간 먹였다. 그 결과 모든 쥐(rat)의 간손상을 전자현미경으로 관찰하였으며, 간 손상 정도는 투여된 PAs의 양에 의존적이었다(16).

서유럽에서 comfrey는 관절염, 정맥염, 통풍(痛風)과 같은 염증성 질환과 설사치료를 위해서 사용되어 왔으나, 최근에 컴프리 잎의 사용이 인간에게는 간에 독성을 일으키고 설치류에는 발암을 일으키는 위험인자로 인정되었다(17). 성장이 빠르고 잎이 많은 식물인 컴프리는 미국에서 차, 정제, 캡슐, 티크, 찜질약 및 로션으로서 광범위하게 사용되었다. 1985년 이래로 컴프리의 경구 투여에 의하여 간장의 혈류를 차단하는 질환인 간정맥폐색성질환(hepatic veno-occlusive disease)이 7차례 발생하였으며 1명이 사망했다고 보고되었다(21). 따라서, 미국 FDA에서는 2001년 7월 6일자로 컴프리[학명: *Symphytum officinale*(일반적인 컴프리), *S. asperum*(프릭클리 컴프리), *S. x uplandicum*(러시아 컴프리, *S. officinale*와 *S. asperum*의 변종)](15,22)가 간기능 손상과 암 유발물질로 입증됨에 따라 식품에서 이의 사용 및 이를 이용한 제품의 판매금지 조치를 내렸다(23).

이와 관련하여 국내에서 컴프리는 현행 식품공전(24)에 그 잎만을 다량원료로 사용할 수 있으며, 다량 이외의 식품에는 부원료로서 사용토록 고시하여 식품원료로 인정하여 왔으나, 컴프리(학명: *Symphytum officinale*, *S. asperum*, *S. x uplandicum*)가 간기능 손상과 암 유발물질로 입증되어 컴프리의 유해성이 인정됨에 따라 우리나라에서도 컴프리를 식품원료로 사용금지(25)하였다.

따라서 본 연구는 현재 국내에서 재배되고 있는 컴프리의 형태학적 특성 및 pyrrolizidine alkaloids 살펴봄으로써 국내에서 재배되고 있는 컴프리가 위에서 언급한 종류와 동일한지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 시료는 국내에서 재배되는 지역(Fig. 2), 즉 충북 옥천(식품의약품안전청 생약재배장), 충북 음성, 전북 전주, 전남 장성, 전남 광주, 강원도 강릉, 강원도 양구, 경북 대구, 경북 상주, 경북 영덕, 경남 양산, 경남 통영에서 직접 채취한 컴프리(comfrey)를 신속하게 실험실로 옮겨 바람이 잘 통하는 음지에서 건조시킨 다음 세절(細切)하고 분말화하여 냉장실에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

형태학적 관찰

각 지역에서 채취된 시료의 전초, 뿌리, 잎 등을 육안으로 관찰한 후 일점크기로 절단하여 잎의 뒷면을 편평하게 한 후 입체현미경(Stemi 2000-C Stereomicroscope, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany)으로 표면의 모양을 관찰하였다.

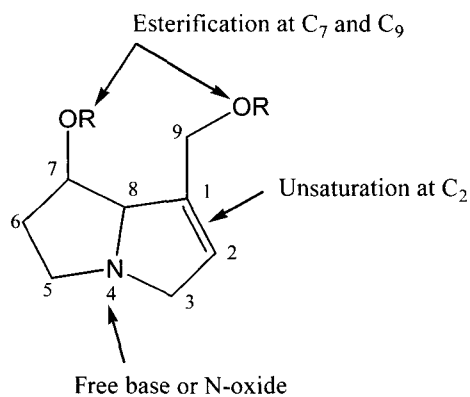


Fig. 1. Requirement of biological activity for pyrrolizidine alkaloids (12).

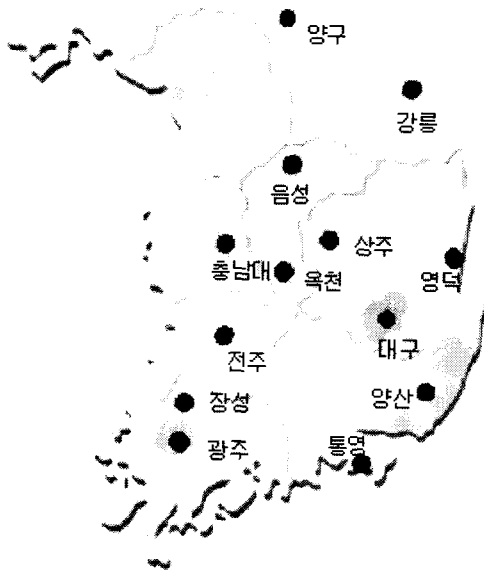


Fig. 2. The location of comfrey cultivating area selected in Korea.

시료의 전처리

시료의 전처리는 Cooper 등(26)의 방법에 준하여 실시하였다. 각 지역에서 채취된 컴프리 분말 일정량을 취하여 hot methyl alcohol(Merck Co.)을 가한 후 교반기(Thermo stirrer FT-1, Japan)를 이용하면서 추출을 하고 다시 초음파세척기(Branson 8210, USA)에서 20분간 추출하여 여과하는 과정을 3회 반복하였다. 이렇게 추출된 추출물을 회전감압농축기(Heidolph vv-2011, Germany)를 이용하여 농축하고, 농축된 잔사에 100 mL의 물을 가한 후 2 N-H₂SO₄를 이용하여 pH를 3~4로 조정하고, 과량의 아연 분말을 첨가하여 하룻밤 동안 방치하였다. 여과 후 분액여두에 동량의 CHCl₃을 가하여 층 분리를 하였다. 분리된 물층에 25% NH₄OH를 이용하여 pH를 8~9로 맞춘 후 동량의 CHCl₃을 가하여 3회 반복 추출하였다. 추출된 CHCl₃ 층을 회전감압농축기로 농축하여 MeOH에 녹여서 TLC 분석용 및 HPLC 분석용 시료로 사용하였다.

TLC 분석

Molyneux and Rottman의 방법(27)에 준하여 실시하였다. 전 처리된 시료의 일정량을 TLC plate(silicagel 60 pre-coated plate(glass), Aldrich Co.)에 점적하고 건조시킨 후 전개용매(chloroform : methanol : 17% ammonium hydroxide = 82.5 : 15.5 : 2)를 사용하여 전개시킨 후 건조시켰다. 여기에 2단계 발색법을 실시하였다. 먼저, 발색 1단계시약을 분무하여 1차 발색을 시키고 건조기에서 1분간 건조시킨 후 발색 2단계시약으로 다시 분무하여 발색을 시킨 후 건조기에서 건조하여 나타나는 밴드를 관찰하였다.

발색 1단계시약은 o-chloranil(tetrachloro-o-benzoquinone) 1 g을 benzene 100 mL에 녹여서 1% 용액을 조제하여 사용하였고, Ehrlich's reagent [4-(dimethyl-amino) benzal-

dehyde] 2 g을 boron trifluoride diethyl etherate 2 mL이 함유된 absolute ethanol 100 mL에 녹여서 발색 2단계시약으로 하였다. 발색반응의 원리는 알카로이드와 반응하여 일시적이지만 짙은 청색을 나타내는 o-chloranil로 PAs를 처리하면 PAs가 산화되어 pyrroles이 형성되고, 이것이 pyrrole-specific인 Ehrlich's reagent와 반응하여 특징적인 purple 색을 나타낸다.

HPLC 분석

TLC 분석용 시료를 0.45 µm nylon syringe filter(Waters Co.)로 여과하여 HPLC pattern을 분석하였다. HPLC는 Nanospace SI-2(Shinseido Co.)를 이용하였고 컬럼은 C₁₈(4.6 × 150 mm)을 사용하였다. 이동상으로는 A 용매로 lauryl sulfate(1→128)+H₃PO₄(1), B 용매로 acetonitrile을 gradient로 사용하였는데 A : B의 비율은 초기에 80 : 20, 40분까지 40 : 60, 50분까지 40 : 60을 하였다. 검출기는 UV detector(파장 218 nm)를 사용하였다.

결과 및 고찰

형태학적 관찰

본 실험에 사용된 컴프리중 식품의약품안전청 옥천재배장에서 재배되고 있는 *Symphytum officinale*을 기준으로 하여 형태학적인 관찰을 실시하였다(Fig. 3). 컴프리의 전초, 잎, 줄기, 뿌리 등을 상세하게 관찰한 결과 높이는 60~90cm이었고, 전체에 백색의 털이 나있었다. 줄기는 분지되고 다소 지르러미가 있었다. 잎은 유상피침형으로 끝부분은 길게 뾰족하며, 하부위 잎에는 엽병이 있고, 상부의 잎에는 엽병이 없고, 잎의 부들기는 뿌리로 흘러내려, 줄기의 지르러미로 되어 있다. 화축은 1회 또는 2회 2번씩 갈라지고, 짧게 전갈의 꼬리 모양으로 말린 화수를 내고 있어 전국 12개 지역에서 채취한 컴프리가 같은 증임을 확인할 수가 있었다. 따라서 이를 좀더 세부적으로 확인하기 위하여 각각의 컴프리 시료의 잎 표면

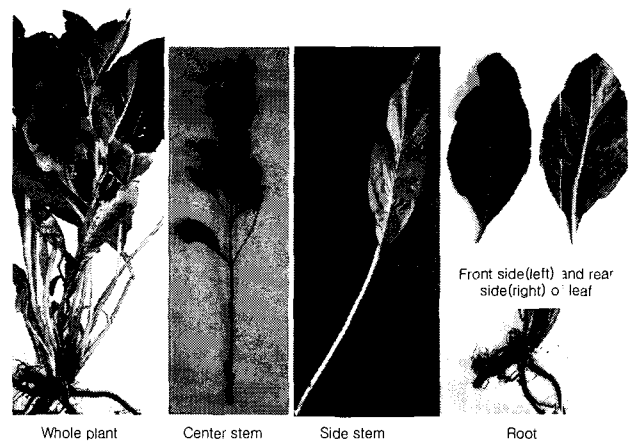


Fig. 3. Photographs of *Symphytum officinale* Linnaeus cultivating in Okcheon.

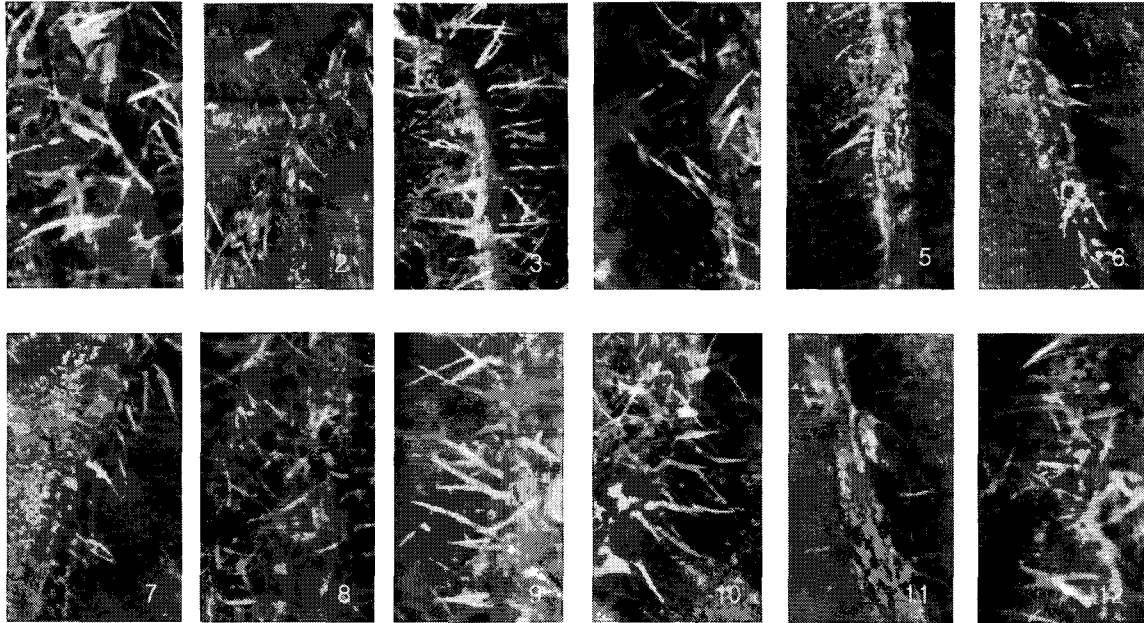


Fig. 4. Photomicrographs of comfrey leaves cultivating in Korea (2.5×1.6).

을 일정한 크기로 절단하여 잎의 뒷 표면을 현미경으로 관찰 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 12개 지역에서 채취된 모든 컴프리가 같은 모양의 털이 같은 방향으로 향해서 나 있는 것을 확인할 수 있었다.

TLC에 의한 pyrrolizidine alkaloids 확인

전처리된 시료를 가지고 TLC 분석을 실시하였다. 그 결과 1차 발색시약(1% o-chloranil benzene용액)으로 발색시켰을 때 컴프리 시료들이 전개된 TLC plate는 노란색 바탕에 blue spot을 나타내었으나 실온에서 급속하게 사라졌고, 건조기 내에서는 1분 이내에 사라졌다. 그러나 다시 2차 발색시약(Ehrlich's reagent)으로 발색시켰을 때는 pyrrole에 특징적인 안정한 purple spot을 보여주었다(Fig. 5). 1차 발색시약으로 발색하였을 경우에 나타나는 blue spot은 아마도 pyrrolizidine으로부터 hydride ion이 빠져나감으로서 1% o-chloranil benzene용액과 pyrrolizidine이 복합체를 형성하기 때문일 것이다. 그 후에 carbonium ion으로부터 proton이 빠

져나감으로서 pyrrole이 생성되어 Ehrlich's reagent와 반응하여 착색화합물을 형성하게 되는 것이다(27). 그러나 흔히 알카로이드 발색시약으로 사용되는 시약인 Dragendorff's reagent, iodoplatinate 등은 특이적인 색깔을 나타내지 않았다. Pyrrolizidine alkaloids를 함유하고 있지 않은 치커리, 깻잎 및 호박잎은 2가지 발색시약에 어떠한 반응도 나타내지 않았다.

따라서 본 실험에 사용된 12개 컴프리 시료는 간에 독성을 일으키는 것으로 알려진 pyrrolizidine alkaloids를 함유하고 있음이 TLC 분석에 의하여 확인되었다.

HPLC pattern

TLC 분석에 사용된 시료 일정량을 가지고 HPLC 패턴을 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 컴프리 시료들은 retention time 30분 근처에서 특이적인 피크를 나타내었다. 이 피크의 높이는 컴프리의 뿌리에서 가장

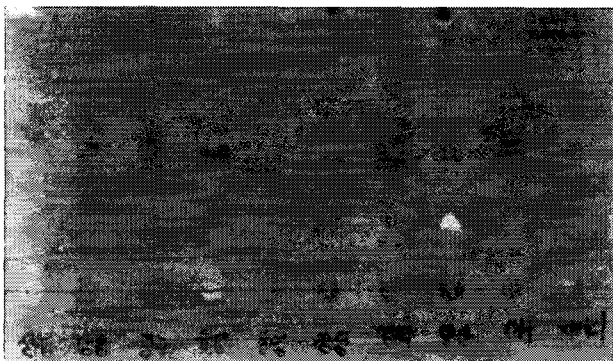


Fig. 5. TLC chromatogram of comfrey cultivating in Korea.

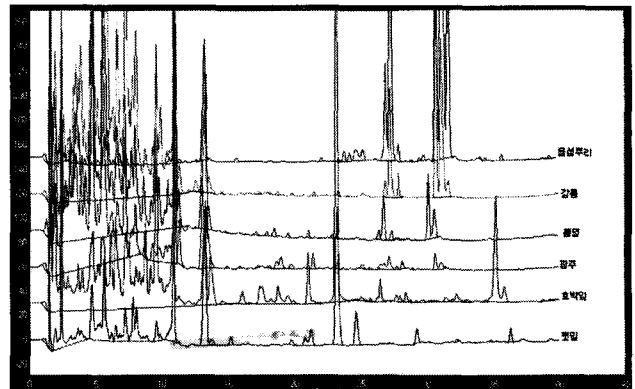


Fig. 6. HPLC chromatogram of comfrey cultivating in Korea.

높게 나타났다. 그러나 치커리, 깻잎 및 호박잎에서는 이러한 피크가 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 형태학적 관찰을 통해 전국 12개 지역에서 채취한 컴프리가 같은 종임을 확인할 수가 있었고, TLC에 의한 pyrrolizidine alkaloids 확인과 HPLC pattern이 이를 뒷받침하였다. 따라서 형태학적 특성 및 pyrrolizidine alkaloids 시험방법을 확립함으로써 식품안전관리시스템을 구축하는데 기초자료로 활용코자 한다.

요 약

본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 컴프리의 형태학적 특성 및 pyrrolizidine alkaloids을 분석하기 위해서 수행되었다. 국내에서 채취한 12개 지역의 컴프리를 대상으로 형태학적인 연구를 실시한 결과 모두 한 종류의 *Symphytum officinale*임을 확인할 수 있었다. 또한 이들 시료를 hot methanol과 ultra-sonification으로 추출하여 pyrrolizidine alkaloids 함유 여부를 확인하기 위하여 TLC 시험을 실시한 결과, 12개 시료의 컴프리는 o-chloranil과 Ehrlich's reagent의 발색시약이 pyrrolizidine alkaloids와 반응하여 특이적인 purple spot을 나타내었다. 그러나 치커리, 호박잎 및 깻잎을 사용하여 동일한 시험을 실시한 결과 purple spot이 관찰되지 않음을 알 수 있었다. HPLC 패턴을 분석 결과, 12개 시료의 컴프리는 retention time 30 부근에 특이적인 peak를 나타내었으나, 치커리, 호박잎 및 깻잎은 peak를 나타내지 않았다. 따라서 국내 재배중인 컴프리 12종은 형태학적 특성 및 pyrrolizidine alkaloids로 조사한 결과, *S. officinale* 종임을 확인할 수 있었다.

문 헌

- 김태정. 1996. 한국의 자원식물 III. 서울대학교 출판부, 서울. p 303.
- 두산동아. 1999. 두산세계대백과사전. Vol 25, p 324.
- Mattocks AR. 1980. Toxic pyrrolizidine alkaloids in comfrey. *Lancet* 22: 1136-1137.
- Couet CE, Crews C, Hanley AB. 1996. Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from comfrey (*Symphytum officinale*). *Natural Toxins* 4: 163-167.
- Abbott PJ. 1988. Comfrey: assessing the low-dose health risk. *Med J Aust* 149: 678-682.
- Betz JM, Eppley RM, Taylor WC, Andrzejewski D. 1994. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum* sp.). *J Pharm Sci* 83: 649-653.
- Roeder E. 2000. Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 55: 711-726.
- Huxtable RJ. 1992. The myth of beneficent nature: the risks of herbal preparations. *Ann Intern Med* 117: 165-166.
- Danninger T, Hagemann U, Schmidt V, Schoenhoefer PS. 1983. Toxicity of pyrrolizidine alkaloid-containing medicinal plants. *Pharm Ztg* 128: 289-303.
- Hartmann T, Zimmer M. 1986. Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of 2 annual *Senecio* species. *J Plant Physiol* 122: 67-80.
- Mattocks AR. 1986. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press, London, New York.
- Russell JM, Roitman JN. 1980. Specific detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J Chromatography A* 195: 412-415.
- WHO. 1988. Pyrrolizidine Alkaloids. World Health Organization, Geneva.
- U.S. FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. Pyrrolizidine Alkaloids. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap42.html>.
- Tyler VE. 1993. *The honest herbal: a sensible guide to the use of herbs and related remedies*. 3rd ed. The Haworth Press, New York. p 97-100.
- Yeong ML, Clark SP, Waring JM, Wilson RD, Wakefield, SJ. 1991. The effects of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. *Pathology* 23: 35-38.
- Stickel F, Seitz HK. 2000. The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutr* 3: 501-508.
- Stickel F, Seitz HK, Hahn EG, Schuppan D. 2001. Liver toxicity of drugs of plant origin. *Z Gastroenterol* 39: 225-232, 234-247.
- Steenkamp V, Stewart MJ, Zuckerman M. 2000. Clinical and analytical aspects of pyrrolizidine poisoning caused by South African traditional medicines. *Ther Drug Monit* 22: 302-306.
- Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE, Seawright AA. 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res* 15: 443, 53-67.
- US FDA. 1993. Illnesses and Injuries Associated With the Use of Selected Dietary Supplements, U.S. FDA Center for Food safety and Applied Nutrition.
- Huxtable RJ. 1989. *Toxicants of plant origin*. Cheeke PR, ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. Vol 1, Chapter 3, p 41-86.
- US FDA. July 6, 2001. FDA advises dietary supplement manufacturers to remove comfrey products from the market. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/dspltr06.html>.
- 식품의약품안전청. 2001. 제3. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격. 식품공전. p 31.
- 식품의약품안전청. 2001.8.6. 식품의 기준 및 규격중 개정안 입안예고. 식품의약품안전청공고 제2001-71호.
- Cooper RA, Bowers RJ, Beckham CJ, Huxtable RJ. 1996. Preparative separation of pyrrolizidine alkaloids by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatography A* 732: 43-50.
- Molyneux RJ, Rottman JN. 1980. Specific detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J Chromatography* 195: 412-415.

(2003년 4월 19일 접수; 2003년 7월 9일 채택)