

## 역상 액체 크로마토그래피에 의한 구절초 중 Chlorogenic Acids와 Linarin의 동시 정량분석

金宅濟<sup>†</sup> · 李泰龍 · 朴虎君

한국과학기술연구원 화학분석실, 천연물화학연구실

(1991. 10. 9 접수)

### Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Linarin in *Chrysanthemum Sibiricum* Fisher by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Taek-Jae Kim<sup>†</sup>, Tae-Ryong Lee, and Ho-Koon Park

Chemical Analysis Laboratory and Natural Product Chemistry Laboratory

Korea Institute of Science and Technology, Seoul 131, Korea

(Received October 8, 1991)

**요 약.** 역상 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 구절초 중 chlorogenic acid(CA), 3,4-o-dicaffeoyl quinic acid(3,4-DCQA), 4,5-o-dicaffeoyl quinic acid(4,5-DCQA)와 linarin의 동시 정량분석법이 새로이 확립되었다. 시료를 20 ml 메탄올로 4시간 추출하고 그 추출물을 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge와 용출액으로 4 ml 메탄올-물(1:1)을 사용해서 분리, 정제하였다. HPLC 정량법으로 Bondapak C<sub>18</sub> 컬럼(30 cm×3.9 mm i.d., 10 μm)과 이동상으로 메탄올 -5 mM 인산수용액(30:70)의 기울기 용출방식이 사용되었다. 위 정량분석법을 이용해서 시중 구절초 중 그 함량범위는 CA에서 0.35~0.55%, 3,4-DCQA에서 0.46~0.76%, 4,5-DCQA에서 0.077~0.231% 및 linarin에서 0.16~2.72%이었다.

**ABSTRACT.** Simultaneous determination of chlorogenic acid (CA), 3,4-o-dicaffeoyl quinic acid (3,4-DCQA), 4,5-o-dicaffeoyl quinic acid (4,5-DCQA) and linarin in *Chrysanthemum sibiricum* Fisher was newly established by a reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). Sample was extracted with 20 ml methanol for 4 hrs. The extract was cleaned up by using Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge and 4 ml methanol-H<sub>2</sub>O(1:1) as eluent. Their determination was performed by means of RP-HPLC with Bondapak C<sub>18</sub> column (30 cm×3.9 mm i.d., 10 μm) and gradient elution mode as methanol-5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution (30:70). The established method was applied to various samples purchased. As a result, their content ranges showed to be 0.35~0.55% for CA, 0.46~0.76% for 3,5-DCQA, 0.077~0.23% for 4,5-DCQA and 0.16~2.72% for linarin, respectively.

### 서 론

九折草(*Chrysanthemum sibiricum* Fisher)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 그의 산지는 우리나라, 일본, 중국북부 등에 분포하고 있다. 구절초는 민간약으로 줄기와 잎을 가을에 채취하여 환을 만들거나 달여서 부인 대불증 또는 진위, 신경통, 정혈 등에 사용하여 왔다.

안 등에 의한 약효에 관한 연구에서 구절초의

煎湯을 사용하여 동물실험결과에서 장관 및 자궁에 대한 수축억제작용이 있어 소화기 질환과 부인과 질환에 응용할 수 있다고 보고하였다<sup>1</sup>.

구절초의 성분연구로는 잎의 추출물에서 단리해서 화학구조를 구명한 결과, flavone glycoside계로서 acacetin이 aglycon으로 된 linarin(acacetin-7-O-rutinoside)의 화학구조라고 이 등이 보고한 바가 있다<sup>2</sup>.

또한 구절초 중 polyacetylenic 화합물에 대해

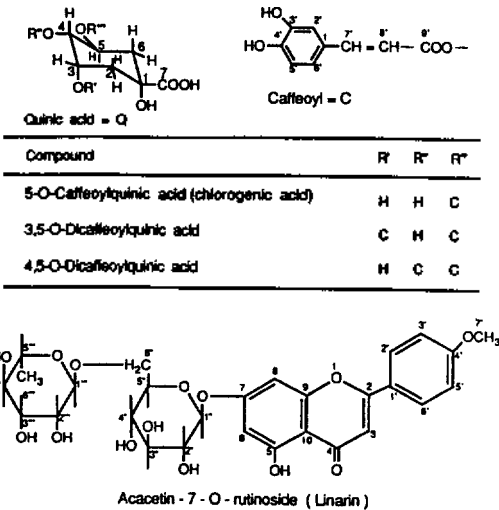


Fig. 1. Chemical structures of chlorogenic acids and linarin.

UV와 TLC-정색반응 등의 결과로 분획물에서 존재함을 막 등이 확인, 보고한 바가 있으나<sup>3</sup>, 그외의 다른 화합물에 대한 연구가 지금까지 발표된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 성분 연구로서 구절초 중 linarin과 caffeic acid(CA), 3,5-o-dicaffeoyl quinic acid(3,5-DCQA) 및 4,5-o-dicaffeoyl quinic(4,5-DCQA)의 새로운 동시 분리, 정량법을 개발, 확립하는데 연구 목적이 있고, 이를 활용하여 시중에 유통되고 있는 구절초를 구입하여 그들 화합물의 함량분포를 조사하였다. 연구대상 화합물의 화학구조는 Fig. 1에 나타났다.

실 험

재료 및 시약

구절초는 경동시장내 JJ. 한의원, H.S. 한의원, H. B.D. 한의원 등에서 자연 건조상태의 것을 구입하여 20 mesh 정도로 분쇄하여 사용하였다.

약재에서 성분의 추출, 불순물과의 분리제거에 사용된 용매로서 MeOH, 인산(J.T. Baker, U.S.A.)는 모두 일급시약을 사용하였고, 방해물과의 분리목적으로 solid phase extraction법인 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge와 Sep-Pak phenyl cartridge(Waters Asso., U.S.A.)가 사용되었다. HPLC용 이동상 용매로

MeOH(J.T. Baker, U.S.A)과 탈염 증류수가 사용되었고 표준물로 chlorogenic acid, 3,4-o-dicaffeoyl quinic acids 4,5-o-dicaffeoyl quinic acid와 linarin은 본 연구실에서 단리, 정제하였고 그 순도가 98%이상의 것을 사용하였다.

장치 및 분석 기기

시료를 분쇄하기 위해 분쇄기(Thomas Wiley Mill, 3383-L형, U.S.A.)가 사용되었고, 정량용 기기는 441형 HPLC(Waters Asso., U.S.A.)에 510형 pump, U<sub>6</sub> K injector, variable UV 검출기 및 solvent delivery 장치가 부착된 것을 사용하였다.

HPLC컬럼은 30 cm×3.9 mm i.d., 10 μm인 Bondapak C<sub>18</sub>(Waters Asso., U.S.A)이었고, 이동상 용매는 MeOH-5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 수용액이며, 그 유속은 1.0 ml/min이었고 UV 검출기의 분석파장은 330 nm를 사용하였다.

실 험

정량분석. 가. 추출과 불순물 분리 제거

자연 건조상태의 구절초를 20 mesh 정도로 분쇄한 시료 0.5 g에 MeOH 20 ml를 넣고 4시간 동안 환류하여 추출하였다. 추출액을 여과하고 거른액을 25 ml가 되도록 MeOH로 채우고 이 중 1.0 ml를 취해 감압 농축시킨 후 30% MeOH 수용액 4 ml를 가해 녹이고 Sep-Pak C<sub>18</sub> Cartridge에 주입하였다. 50% MeOH 수용액 4 ml로 용출시켜 모은 용출용액을 감압농축시킨 다음에, MeOH-5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 수용액(30 : 70) 5 ml에 녹이고 HPLC로 분석하였다.

나. HPLC에 의한 분석법

CA, 3,5-DCQA와 4,5-DCQA 및 linarin의 정량을 위한 가장 적합한 HPLC 조건은 다음과 같다. 분리방법은 역상기법으로 C<sub>18</sub> 컬럼과 용리 용매로서는 MeOH-5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 수용액의 조성이 30 : 70에서 용매기울기로 70 : 30까지 15분 동안 변화시켜 주고 다시 10분간 이 조건에서 등용매용리하였다.

위의 최적조건을 설정하기 위해 이동상 용매 중 인산의 농도(1.0 mM~10 mM)가 머무른 시간에 미치는 영향을 검토하였고, 설정된 HPLC 조건에서 각 화합물의 머무른 시간과 봉우리 넓이의 재현성을

살펴보았다.

각 화합물의 정량용 표준 검정곡선을 작성하기 위해 CA의 농도범위는 9.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 92  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 3,5-DCQA의 농도는 7.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 72  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로, 4,5-DCQA의 농도는 1.44  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 14.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 그리고 linarin의 농도는 17  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 해서 10  $\mu\text{l}$ 씩 HPLC에 주입하여 분석하였다.

**성분분석.** 앞에서 확립된 분석법을 이용하여 H. S., H.B.D., W.C., J.J. 및 M.I. 한의원으로부터 구입한 구절초 중 CA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA 및 linarin의 3회 분석한 평균함량과 그의 상대 표준편차를 조사평가하였고, 각 성분별 구절초간의 함량분포도 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 정량 분석

구절초 중 CA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA 및 linarin의 분리, 정량을 위한 실험과정을 간략하게 표시하면 Fig. 2와 같다.

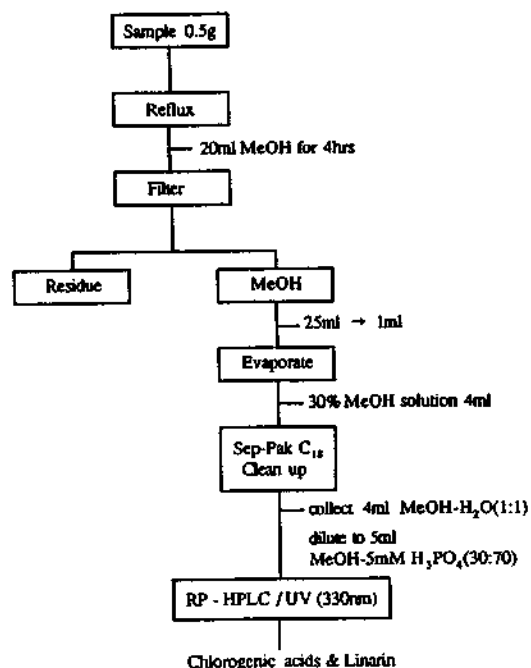


Fig. 2. Analytical procedure of *Chrysanthemum sibiricum* Fisher.

**추출과 불순물 분리 제거.** MeOH에 의한 정량적인 추출실험과정을 살펴보면 구절초(J.J. 한의원) 시료를 추출시간별 각 화합물의 추출효율(%)은 Table 1에서 보여 주는 바와 같다.

그 결과에서 추출시간으로서 4시간이면 CA, DCQAs 및 linarin의 추출효율이 99% 이상이었기 때문에 추출시간은 4시간으로 정하였다.

추출물 중 방해물을 분리, 제거하고 분석 성분의 정량적인 회수가 가능한 최적조건을 설정하기 위해서 시료를 가한  $C_{18}$  cartridge의 50% MeOH 수용액 1ml의 용출액별 분석한 CA, DCQAs와 linarin 회수율은 Table 2와 같다. 용출액 3ml만 받으면 이들 화합물의 회수율이 98% 이상이 되기 때문에 총 용출량은 4ml로 정하였다. 용출량별 각 화합물의 용출차례는 HPLC에서의 머무름 경향과 일치하였다.

또한  $C_{18}$  cartridge 흡착 처리 전후의 방해물 제거효과는 증량법으로 56%가 되었고 HPLC 크로마토그램에서 일부 방해물의 제거효과가 확인되었다.

**HPLC에 의한 분석.** 화합물의 분리, 정량을 위한 HPLC 조건은 분석성분의 용해 특성상 역상기법(reversed-phase mode)으로  $C_{18}$  컬럼을 선택하였고, 각 화합물의 구조가 약산과 지용성(lipophilic)

Table 1. Extraction efficiency(%) of CA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA and linarin extracted from *Chrysanthemum sibiricum* Fisher purchased from J.J.

Compound	Extraction time, hr			
	1	2	3	4
CA	88.5	9.1	1.8	0.6
3,5-DCQA	92.8	5.3	1.5	0.4
4,5-DCQA	86.5	10.5	2.2	0.5
Linarin	95.4	3.6	0.9	0.1

Table 2. Elution recovery (%) of CA, 3,4-DCQA, 4,5-DCQA and linarin from extract by using Sep-Pak  $C_{18}$  cartridge/50% MeOH solution

Elution Volume, ml	CA	3,5-DCQA	4,5-DCQA	Linarin
0 ~ 1.0	99.9	98.4	97.9	82.4
1.0 ~ 2.0	0.1	1.5	1.7	16.3
2.0 ~ 3.0	—	0.1	0.3	1.2
3.0 ~ 4.0	—	—	0.1	0.1

Table 3. Effect of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentration in a Mobile phase on retention times of analytes

Analyte	T <sub>R</sub> , min			
	1 mM	5 mM	10 mM	5 mM <sup>a</sup>
CA	7.64	7.62	7.64	8.62
3,5-DCQA	13.0	13.0	13.0	14.3
4,5-DCQA	14.5	14.4	14.5	15.7
Linarin	18.3	18.3	18.3	19.6

<sup>a</sup> 5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in MeOH-5 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O binary system.

Table 4. Repeatability of retention time and peak area of chlorogenic acids and linarin (n=3)

Compounds	Retention time, min		peak area	
	Mean	RSD(%)	Mean	RSD(%)
CA	8.70	0.35	1,780	0.68
3,5-DCQA	14.10	0.41	10,420	0.34
4,5-DCQA	15.50	0.38	2,200	0.36
Linarin	19.38	0.30	25,100	0.37

RSD; Relative standard deviation.

이어서 최적 실험조건이 단순한 면에서 ion-pair기법보다 ion suppression기법이 유리하다고 판단되어 이동상 용매로서 MeOH-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 수용액이 사용되었고 조성은 30 : 70에서 70 : 30까지 15분간 용매기울기를 하고 10분간 등용매 용리한 결과에서 성분의 봉우리 모양과 분리능이 우수하였다.

UV 검출기에서 분석과장의 선택은 김 등<sup>4</sup>이 발표한 각 화합물의 UV 결과에서 보여준 바와 같이 330 nm가 최적 파장으로 정하였다.

Ion suppression 기법에서 컬럼수명을 보호하기 위한 용액의 pH 범위는 2.0에서 8.0이어야 하고 분석성분이 약산인 관계로 이동상 용매의 pH 범위는 2에서 5이면 만족스러운 결과를 준다고 알려져 있다.<sup>5,6</sup> 이동상 용매로서 수용액 중 인산의 함량이 1 mM (pH 2.96), 5 mM (pH 2.40) 및 10 mM (pH=2.20)을 사용해서 분석한 HPLC 크로마토그램에서 머무른 시간(Table 3) 뿐만 아니라 봉우리 모양 및 분리능이 같은 결과를 보였다. 따라서 한쪽 용매로서 수용액 중 인산의 농도는 5 mM로 선택, 사용하였다.

그러나 MeOH이나 H<sub>2</sub>O의 각 이동상 용매에 똑 같이 5 mM 인산 농도로 만든 이동상 용매를 사용한

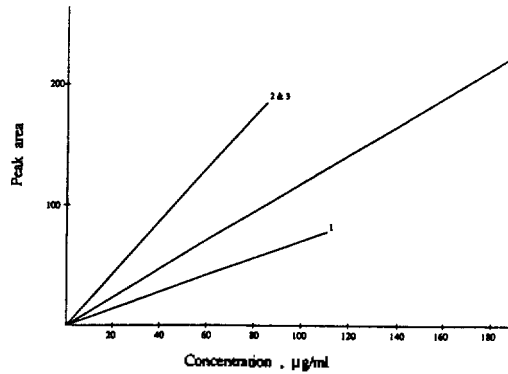


Fig. 3. Standard calibration curves of (1) chlorogenic acid, (2) 3,5-DCQA, (3) 4,5-DCQA and (4) linarin.

결과에서는 각 화합물의 머무른 시간이 1분 정도 지연되었다. 이런 결과는 이동상 용매 중 인산농도가 용질과 정지상간의 상호인력에 영향을 주었다고 판단된다.

위에서 확립된 HPLC 조건에서 구절초 중 분석성분에 대한 머무른 시간과 봉우리 넓이의 재현성을 살펴 본 결과는 Table 4에 나타났다. 각성분별 머무른 시간의 용리범위는 8.70분에서 19.38분이고 그 상대표준편차(RSD)는 0.41% 이하였고 봉우리 넓이의 각 성분함량별 상대표준편차(RSD)는 0.68% 이하로서의 결과를 나타냈다.

주어진 HPLC 분석조건에서 chlorogenic acids 화합물별 용리거동과 순서를 살펴보면 지용성의 크기 차례대로 monocaffeoyl quinic acid로서 CA가 먼저 용출되고 다음으로 DCQA의 차례이고 그의 위치 이성질체간의 용리순서는 3,5- 및 4,5-이성질체이었다.

각 이성질체간의 치환기의 결합위치가 상이해서 각 화합물이 컬럼의 정지상과의 친화력 즉, 이성질체간의 lipophilicity가 다르기 때문에 얻어진 결과라고 판단된다.

이런 결과는 Morishita 등의 연구<sup>7</sup>와 잘 일치하나 purdon 등의 결과<sup>8</sup>와는 다르다.

화합물의 정량을 하기 위해 CA, 3,5-와 4,5-DCQA 및 linarin의 표준검정곡선은 Fig. 3에서 보여주는 바와 같고, 그 결과에서는 CA는 9.2 µg/ml에서 92 µg/ml, 3,5-DCQA는 7.2 µg/ml, 72 µg/ml, 4,5-DCQA는 1.44 µg/ml에서 14.4 µg/ml, 그리고 lina-

Table 5. The contents(%) of chlorogenic acids and linarin in *Chrysanthemum sibiricum* Fisher purchased from the various sources (n=3)

Sample	CA		3,5-DCQA		4,5-DCQA		Linarin	
	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD	Mean	RSD
H.S.	0.42	2.4	0.66	1.1	0.106	1.5	2.72	0.45
H.B.D.	0.45	1.6	0.54	1.3	0.114	2.9	2.64	0.46
W.C.	0.55	1.8	0.76	1.3	0.140	2.5	2.30	0.50
J.J.	0.35	2.0	0.46	2.7	0.077	2.1	1.63	0.43
H.I.	0.23	1.9	0.46	1.4	0.231	1.4	0.16	2.30

CA; Chlorogenic acid, 3,5-DCQA; 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-DCQA; 4,5-dicaffeoylquinic acid, RDS; Relative standard deviation.

rin은 17 µg/ml에서 170 µg/ml의 10배 농도범위에서 각각 원점을 지나는 직선관계였다.

특히 3,5-DCQA와 4,5-DCQA는 이성질체로서 330 nm에서의 흡수계수는 같은 값을 가졌다.

#### 성분분석

앞서 확립된 분석법을 활용하여 시중 한의원에서 구입한 구절초 중 CA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA 및 linarin 함량은 Table 5와 같고, 그 결과 CA 함량은 0.23%~0.55%, 3,5-DCQA의 함량은 0.46%~0.76%, 4,5-DCQA의 함량은 0.077%~0.231%이었고, linarin의 함량은 0.16%~2.72% 범위이었다. 각 시료별 및 성분별 상대표준편차는 2.9% 이하였다. 시료별 성분함량을 비교하면 H.S., H.B.D.와 W.C. 시료 중 각 함량이 비슷하지만 그에 대해 J.J.와 H.I.의 경우에는 함량이 전반적으로 낮았다.

#### 결론

국내 구절초 중 chlorogenic acids와 linarin의 동시 정량분석법에 관한 연구의 결론은 아래와 같이 요약될 수 있다.

1. 구절초 중 chlorogenic acid, 3,5- 와 4,5-dicaffeoyl quinic acids, 및 linarin의 새로운 동시 분리, 정량분석법이 연구, 확립되었다. 분리, 정량법은 RP-HPLC로서 C<sub>18</sub> 컬럼과 MeOH-5 mM 인산 수용액 (30 : 70)의 이동상 용매기술기이었다.

2. 추출과정은 메탄올 20 ml로 4시간 추출하면

CA, 3,4-DCQA, 4,5-DCQA와 linarin의 추출률이 99% 이상이었다. 불순물의 분리제거법으로 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge와 용출액으로 50% MeOH 수용액 4 ml를 사용하면 화합물의 용출회수율이 99% 이상이었다.

3. 시중 구절초 중 chlorogenic acids와 linarin의 함량을 분석한 결과에서 chlorogenic acid 함량범위는 0.23%~0.55%, 3,5-DCQA는 0.46%~0.76%, 4,5-DCQA는 0.077%~0.231% 및 linarin은 0.16%~2.72%이었다.

#### 인용문헌

1. 김종호, 안덕균, "본초분과학회지", 4, 15 (1989).
2. 이용주, *J. of Pharm. Soc. of Korea*, 11, 7 (1967).
3. 박대성, 문창규, 박노양, "서울대학교 약학대학논문집", 1, 132. (1976).
4. 박호군 등, "천연물 중 유효성분 분석에 관한 연구", KIST 연구보고서, (1991).
5. C. F. Poole and S. A. Schuette, "Contemporary Practice of Chromatography", p. 526, Elsevier, New York, U.S.A., (1984).
6. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd Ed., p. 294, Wiley-Interscience, New York (1979).
7. H. Morishita, *J. of Chromatography*, 315, 253 (1984).
8. M. P. Purdon and D. A. McCamey, *J. of Food Science*, 52, 1681 (1987).