Journal of the Korean Chemical Society
2005, *Vol. 49, No. 2*
Printed in the Republic of Korea

사자발쑥에 포함된 유파티린의 추출 및 정제

김은철 · 한순구 · 노경호*
인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술연구센터
(2004. 11. 11 접수)

Extraction and Purification of Eupatilin from *Artemisia Princeps* PAMPAN

Yinzhe Jin, Soon Koo Han, and Kyung Ho Row*
Center for Advanced Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received November 11, 2004)

요 약. 쑥의 추출물은 항염작용, 항암 등 약용으로 많이 사용되고 있다. 본 실험에서는 제조용 크로마토그래피를 이용하여 사자발쑥에 포함되어 있는 유파티린을 추출하고 분리하기 위해서 최적조업조건을 실험적으로 구하였다. 사자발쑥을 에탄올로 추출하고 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트로 각각 분배하여 용매추출을 하였다. 액체 크로마토그래피의 이동상 조성과 주입 부피는 각각 water/acetonitrile/TFA=50/50/0.5(vol.%), 20 μl 이었다. 유속은 1.0 ml/min이며 UV wavelength는 370 nm 이었다. 유파티린이 함유된 피크를 제조용과 분석용 컬럼을 이용하여 분취하였고 LC-CE-MS로 정성분석을 하여 유파티린을 확인하였다.

주제어: 유파티린, 사자발쑥, HPLC, 추출

ABSTRACT. The extracts of the whole herb of *Artemisia princeps* PAMPAN have been used for the treatment of inflammation, cancer and other disorders. In this experiment to extract and separate eupatilin contained in *Artemisia princeps* PAMPAN using a preparative chromatography, the optimum operating conditions were experimentally determined. eupatilin was extracted from the leaf and trunk of *Artemisia princeps* PAMPAN by ethanol. The resulting solution was further partitioned with n-hexane, chloroform and ethyl acetate. The mobile phase composition and the injection volume were water/ acetonitrile/TFA=50/50/0.5 (vol. %) and 20 μl, respectively. The flow rate was fixed at 1.0 ml/min and UV wavelength was 370 nm. The measured retention time of eupatilin was approximately 8.6 min. The solution which contained eupatilin was collected by preparative and analytical column, and was identificated by LC-CE-MS.

Keywords: Eupatilin, *Artemisia Princeps* PAMPAN, HPLC, Extraction

서 론

삶의 질의 향상을 위한 소비자 관심이 증가함에 따라서 의약품의 유효성 및 안정성이 중요하게 대두되었다. 선진국에서는 이미 전 세계에 분포하는 자원 식물에 대한 경제적 효용가치를 평가하고, 보다 다양한 식물종의 확보에 주력하고 있으며, 이들로부터 신기능성 의약품 소재를 분리 생산하는 체계적인 개발을 하고 있다. 신의약품 개발의 기초자원으로서 천연물은 중요한 비중을 차지하며 천연물 추출물에 의한 연구는 날로 각광 받고 있다.

천연물 중의 하나인 쑥(*Artemisia*)은 국화과(compositae)에 속하는 초본 식물로서 약 400여종의 artemisia속 식물 중 300여종이 우리나라에서 추정되고 있지만 실제 보고된 것은 40종 내외이다.[1,2] 쑥은 식용으로만 사용될 수 있는 것과 약용으로만 사용될 수 있는 것, 식

용과 약용으로 같이 사용할 수 있는 것으로 나눌 수 가 있다.[3] 쑥은 여러 가지 효소와 핵산을 함유한 풍부한 엽록체를 가지고 있으며 식물성 섬유질과 단백질, 양질의 미네랄과 다양한 비타민을 함유하고 있다.[4] 또한 강한 알칼리성 식품으로, 산성 체질을 개선하고 피를 맑게 해주며 약재로서 신체의 부조화를 막아 혈액과 소화를 도우며, 인체에 해로운 물질을 제압, 제거하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 쑥에는 비타민A와 C가 많이 함유하고 있어 면역력을 높여주고, 감기 예방에 도움을 준다. 쑥의 유효성분으로는 isocoumarin, coumarin, diterpenlactone, flavonoid, phellandrene, couprol, cadinene, cineol, artemisinin, 유파티린 등이 밝혀졌다. 이 중 artemisinin은 말라리아 치료제로 이용되고 있으며, 최근 연구결과 이 성분이 암 치료에 효과가 있는 것으로 알려졌다.[5] 쑥의 약리작용으로는 쑥의 물 추출물이 혈장응고 억제작용을 나타내고 쑥으로부터 추출한 플라본은 항암효과가 있다고 알려졌다.[6] 또한 항균작용과 항산화작용을 하여 알려지나 염증에 효과가 좋다고 한다. 이 중 유파티린(eupatilin)은 artemisia 속 식물들이 돌연변이 억제현상을 일으킨다고 하였으며, 혈당의 상승, 저하 및 약리적 활성에 관여한다고 보고되어졌다.[7] 최근에는 유파티린의 위 점액 분비 촉진에 의한 위벽 보호 작용이 기존에 쓰이던 시메티딘보다 3.5배 강한 작용을 보인다고 한다. 또한 유파티린을 주입하여 흰쥐에서 위궤양에 유효한 결과를 나타내고 있다.[8]

유파티린은 5,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone으로 지칭되고 있으며 화학적 구조식은 $C_{18}H_{16}O_7$이고 분자량은 344.3이며 융점이 232~233 °C이다. 유파티린의 화학적 구조식은 *Fig.* 1에 나타냈다. 사자발쑥은 식용과 약용이 모두 가능하며 그 생물활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 사자발쑥의 약리적효과로는 항균작용, 기관지 확장작용, 모세혈관작용,[9] 혈액응고 억제작용,[10] 혈액강하작용,[11] 항위염 및 항위궤양 효과[12] 등 약리적 효과가 보고되어 있다.

액체 크로마토그래피는 혼합된 시료성분이 액상 이동상과 고체상 고정상 사이를 흐르면서 흡착작용, 분배작용, 이온교환작용, 분자크기, 배제작용 등에 의해 각각의 단일성분으로 분리되는 것으로 성분의 정성 및 정량의 분석 목적과 정제, 분리 등의 분취 목적에 이용되고 있다.[13] 본 실험의 목적은 사자발쑥에 포함된 유파티린을 정성적으로 확인하고 최적의 추출조건을 확립하는 것이다.

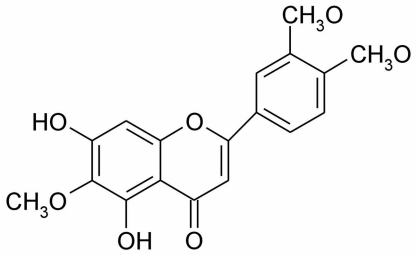

Fig. 1. Chemical structure of eupatilin.

실 험

시 약

본 실험에 사용된 쑥은 경동시장에서 구입한 사자발쑥(강화약쑥)이다. 이동상에 첨가한 TFA(trifluoroacetic acid)는 Sigma에서 구입하였다. 아세토나이트릴, 에탄올, 헥산, 클로로포름과 에틸아세테이트는 HPLC grade용(Duksan Chemical Co., Korea)을 사용하였고 물은 2차 증류한 증류수를 감압 펌프(Waters, Milford, MA, U.S.A)와 필터(TF-0.2 μm)를 이용하여 감압 여과한 후에 사용하였다.

기 기

HPLC 시스템으로는 Waters 600s Multisolvent Delivery System이 부착된 Waters 616 liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.), Rheodyne injector(20 μl sample loop)가 사용되었다. 데이터 저장 시스템은 HP Vectra 500 PC에 설치된 Millennium 3.2. UV 검출기는 2487 UV dual channel detector(Waters, Milford, MA, U.S.A.)를 사용하였다. 이동상은 water/acetonitrile/TFA를 사용하였고, UV wavelength는 370 nm로 고정하였다. 제조용 컬럼(3.90×300 mm)에 입자크기가 15 μm인 C_{18}(Lichrospher, Merck, Germany)을 사용하였다. 분석용 컬럼(4.6×250 mm, 5 μm) C_{18}컬럼 (RS-tech Co., Korea)을 구입하여 사용하였다. LC-CE-MS(Liquid Chromatography-Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometer)를 사용하여 유파티린의 정성분석을 하였다. LC-CE-MS의 모델명은 UATTRO LC Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometer이며 HP-1100 HPLC와 HP-3D Capillary Electrophoresis를 사용하였다.

방 법

본 실험에서는 강화에서 재배된 약쑥 2 g에 100% 에탄올 60 ml를 넣고 25 °C에서 30분동안 초음파 추출을 하였다. 추출액을 여과지를 사용하여 여과한 후, 동량의 순수한 물을 가하여 회전식 증발기를 사용하여 30 ml로 농축하였다. 농축액에 추출물/헥산(1/1, 부피비)의 비율로 헥산을 첨가하여 혼합하고, 층 분리를 하였다. 헥산층에서 물층을 분리하여 추출물/클로로포름(1/1, 부피비)의 비율로 혼합하여 다시 층 분리를 하였다. 클로로포름층에서 물층을 분리하여 물층/에틸아세테이트(1/1, 부피비)의 비율로 혼합하여 층 분리를 하였다. 층 분리가 이루어진 에틸아세테이트층에서 유파티린이 더 많이 분배되었다(*Fig.* 2). 이러한 방법으로 얻어진 시료를 RP-HPLC에서 물, 아세토나이트릴, TFA를 이동상으로 사용하고, 이동상의 유속을 1.0 ml/min으로 하였다. UV wavelength는 370 nm로 고정하고, 시료 20 μl를 제조용 컬럼(3.9×300 mm, C_{18} 15 μm)에 주입하여 유파티린을 분취하였다(*Fig.* 3). 제조용 컬럼으로 분취한 피크(*Fig.* 3에서의 피크 #1)를 또 분석용 컬럼(4.6×250 mm, C_{18} 5 μm)에 통과하여 두 개의 피크(#2, #3)를 포집하였다(*Fig.* 5). 포집한 두 개의 피크를 LC-CE-MS로 정성분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

HPLC는 컬럼에 충진된 다공성 흡착제와 이동상간의 확산, 입자사이의 흡착과 탈착의 메커니즘으로 분리가 된다. 표면적이 큰 충진제를 사용하면 분리효과가 좋기 때문에 결과적으로 미세한 구멍이 많이 필요하게 된다.[14,15] HPLC에서 주로 사용되는 입자의 세공크기는 100 Å으로, 최적 이동상의 조성을 실험적으로 구하여 사자발쑥의 추출물을 분리하였다.

사자발쑥에서 뛰어난 위궤양 치료효과를 가지는 유파티린을 추출하기 위하여 초음파 장치를 이용하여 온도와 추출시간을 변수로 하고 100% 에탄올을 추출용매로 사용하였다. 온도는 25 °C, 추출시간은 30분의 조건에서 실험을 수행하였다. 사자발쑥의 에탄올 추출물을 동량의 부피비로 하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트의 순서대로 층 분리를 수행하였다(*Fig.* 2). 헥산과 클로로포름으로 층 분리를 하여 쑥에 포함된 각종 효소와 단백질, 식물성 섬유질, 미네랄, 비타민 등 유파티린의 추출에 필요하지 않는 물질들을 제거하였다. 그 다음에 에틸아세테이트로 층 분리를 하고 제조용 컬럼과 분석용 컬럼을 사용하여 피크를 포집하였고 LC-CE-MS로 정성분석을 하였다.

에틸아세테이트층을 제조용 컬럼(3.9×300 mm, C_{18} 15 μm)에 주입하여 피크 #1을 분취하였다(*Fig.* 3). 이동상으로 water/acetonitrile/TFA=50/50/0.5(vol.%)을 사용하고 주입부피를 20 μl로 하였을 때, 피크 #1의 체류시간은 9.6 min이었다. 제조용 컬럼에서는 15 μm의 큰 입자크기를 가진 충진제를 사용하였으므로, 유파티린을 포함한 한개 혹은 한개 이상의 성분이 포함되었다고 판단되었다. 충진제의 입자크기가 크게 되면

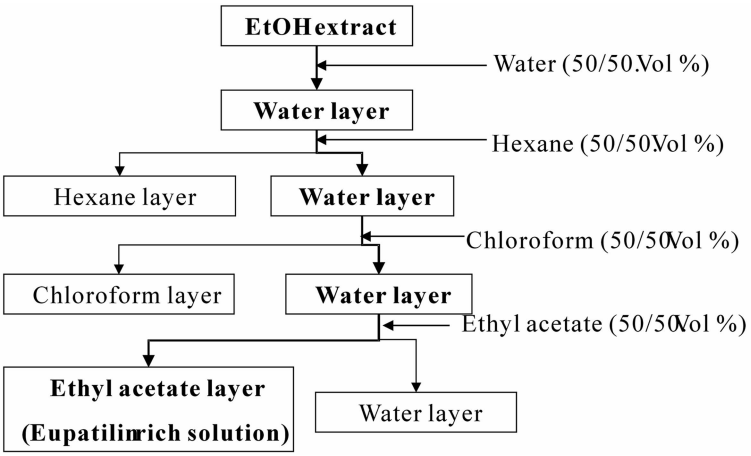

Fig. 2. Extraction steps of *Artemisia princeps* PAMPAN.

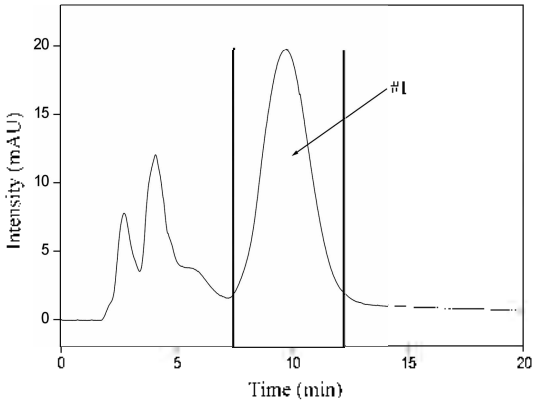

Fig. 3. Chromatogram of eupatilin by ethanol (mobile phase: water/acetonitrile/TFA=50/50/0.5(vol. %), injection volume 20 μl).

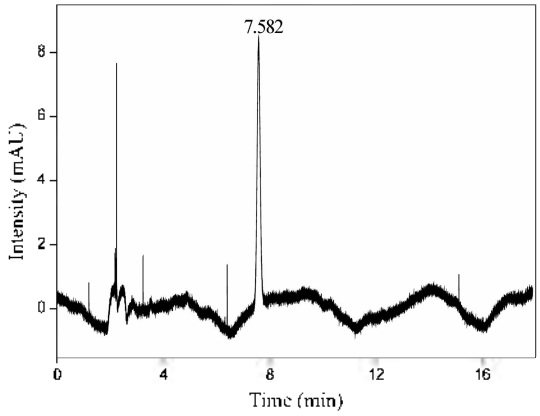

Fig. 5. Chromatogram of eupatilin from #2 in *Fig.* 4 (mobile phase: water/acetonitrile/TFA=50/50/0.05(vol.%), injection volume 20 μl).

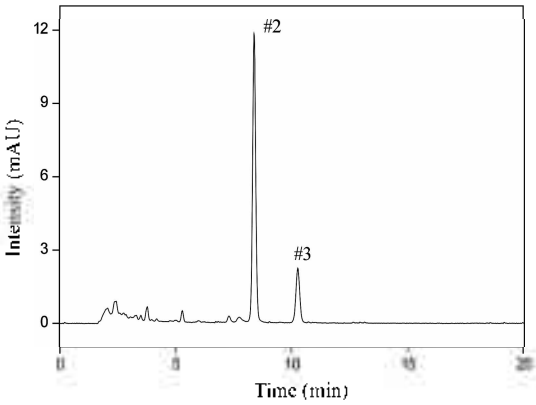

Fig. 4. Chromatogram of eupatilin by ethanol (the same experimental condition as in *Fig.* 3).

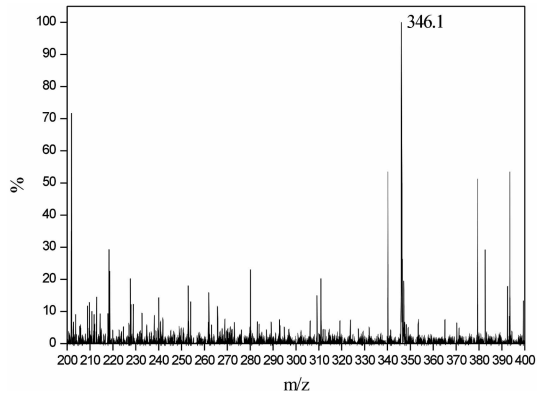

Fig. 6. Mass spectrum of peak #2 in *Fig.* 4 (the same experimental condition as in *Fig.* 5).

컬럼내의 충진제의 전체 표면적이 상대적으로 작아지고 미세한 구멍이 적으며 분리효과가 좋지 못하다. 피크 #1의 포집한 용액을 분석용 컬럼(4.6×250 mm, C_{18} 5 μm)에 다시 주입함으로써 두 개의 분리가 잘 된 피크 #2와 #3을 분취할 수 있었다(*Fig.* 4). 시료가 분석용 컬럼을 통과할 때도 제조용 컬럼을 통과할 때와 마찬가지로 이동상 조성으로 water/acetonitrile/TFA 50/50/0.5(vol.%)을 사용하였고 주입부피를 20 μl로 하였다. 이러한 조건하에서 포집한 피크 #2와 #3의 체류시간은 각각 8.6 min, 10.5 min 이었다. 피크 #2와 #3를 각각 분획하여서 LC-CE-MS로 정성분석을 수행하였다.

사자발쑥에서 추출한 피크 #2와 #3을 LC-CE-MS로 분석한 결과를 *Fig.* 5과 *Fig.* 6으로 나타냈다. 피크 #3을 LC-CE-MS로 분석한 결과, 본 연구에서 추출 및 정제하여 얻으려는 타겟물질인 유파티린의 분자량과 차이가 있었기에 그에 대하여서는 언급하지 않겠다. LC-CE-MS의 사용에서 이동상으로서의 TFA 사용량은 0.05%로 줄어들었다. 이동상 중에서 TFA의 사용량이 줄어들었기 때문에 피크 #2의 체류시간은 7.582 min으로 나타났다. 피크 #2의 질량을 측정한 결과 *Fig.* 6에서 보는바와 같이 분자량이 346.1인 물질의 확률이 100%로 가장 높았다. 실험기기의 제한으로 인하여 측정한 분자량에 1을 감하여야 실제 측정하려는 분자량이 나온다. 즉 피크 #2를 측정한 결과 분자량은 실제로 345.1이 나왔다. 실험상의 오차로 인하여 약간의 차이가 있을 수 있는데 이 수치는 유파티린의 분자량인 344.3과 아주 접근하였다. 사자발쑥에서 추출한 피크 #2는 유파티린이 컬럼을 지나면서 생성된 피크라

는 것을 알 수 있었다.

결 론

사자발쑥을 에탄올로 추출하고 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트로 각각 분배하였다. 추출효율을 증가시키기 위해서 초음파를 사용하였고 30분 동안 추출하였다. 유파티린이 제일 많이 분배된 에틸아세테이트층을 제조용 컬럼을 통과시킴으로써 피크 #1을 얻을 수 있었다. 포집한 피크 #1을 분석용 컬럼에 통과함으로써 피크 #2, #3을 분취할 수 있었다. 크로마토그래피에서 이동상 조건과 주입부피는 각각 water/acetonitrile/ TFA=50/50/0.5(vol.%), 20 μl이었다. LC-CE-MS로 정성분석을 진행한 결과에 이하면 피크 #2가 유파티린으로 확인되었으며 체류시간은 8.6 min이었다.

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀생물분리기술연구센터의 지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Lee, S. J. *Kor. J. Raw Med.* **1975**, *6*, 75.
2. 농촌진흥청; 표준 영농교본, 산채류재배; **1990**, 88.
3. 박희영; 강효신 *동서의학*, **1985**, *10*(2).
4. Y. Koshihara; T. Neichi; S. Murota; A. Lao; Y. Fujimoto; T. Tatsuno. *FEBS Letters.* **1983**, *158*, 41.
5. D. Xie; L. Wang; H. Ye, G. Li. *Org. Cult.* **2000**, *63*, 161.
6. K. W. Yun; S. K. Cho. *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 353.
7. H. J. Seo; Y. J. Surh. *Mutation Res.* **2001**, *496*, 191.
8. S. H. Kim; S. H. Kim; S. D. Lee; W. B. Kim; M. G. Lee; N. D. Kim. *Res. Comm. Mole. Path. and Pharm.* **1997**, *97*, 165.
9. D. L. Morris. *Science.* **1948**, *107*, 254.
10. 한룡남; 양현옥; 한병훈 *약학회지*, **1984**, *28*(2), 69.
11. 김윤호 한양대, 학위논문(석사), **1981**.
12. 문순애 동덕여대, 학위논문(석사), **1993**.
13. Ravanat, J. L.; Douki, T.; Incardona, M. F.; Cadet, J. *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 3185.
14. Roper, D. K.; Lightfoot, E. N. *Journal of Chromatography A.* **1995**, *702*, 3.
15. Koo, Y. M.; Row, K. H. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **2000**, *11*, 807.