

山楂子の 크로마토그램 多變量 패턴 分析

임 석 린

대전대학교 한의과대학

Standardization of Crataegus Fructus Using Liquid Chromatogram Pattern

Seok Rhin Lim

College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

It is well known that Crataegus Fructus strengthens the Stomach and Spleen, helps digestion, tonify stomachache, and decreases bleeding. A major component isolated from this herb consist of carotene, riboflavin, quercetin, chlorogenic acid, amygdalin, ursolic acid etc. In this study, we aimed to analyze the changes of liquid chromatogram pattern, one of major standardization method, to determine the quality of Crataegus Fructus.

Key words : Crataegus Fructus, standardization, HPLC, pattern

서 론

山楂은 토산사(Crataegus pinnatifida Bunge var. typica Schneider) 또는 당산사(Chataegus

pinnatifida Bunge var. major N.E.Br.) 및 동속식물의 열매이다. 예로부터 健胃, 收斂, 鎮痛 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 胃腸酵素分泌促進, 腹脹痛, 産後腹痛, 子宮收縮, 止血 등의 목적으로 사용되었다(1-2). 산사자의 성분으로는 carotene, riboflavin, quercetin,

* Corresponding author : Seok Rhin Lim, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Tel. 82-42-229-6770, Fax. 82-42-229-6716 E-mail : lpophlim@dju.ac.kr

cratenacin, chlorogenic acid, amygdalin, ursolic acid, caffeic acid, oleanolic acid, tartaric acid, 보고되고 있다(2).

최근 연구에 의하면, 산사자의 추출물은 위액분비촉진작용(3), 장내이상세균에 대한 항균작용(4), 심장혈관확장작용(5,7), 심장박동증가(6), 진정작용(8) 등의 효능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 또한, 동맥경화증 환자에서 LDL치를 낮추고, NO의 생산을 증가시키는 것으로 보고 되었다(9)

한약재는 산지, 채취시기, 저장과정 등에 따라 균일한 품질을 유지하기 어려운 특성이 있다. 유통되는 한약재가 일정한 유효성과 안전성이 확보되도록 하기 위해서는, 한약재의 품질을 검증하여 일정수준 이상의 약리효과를 나타나게 할 필요성이 있다.

본 연구는 산사자 추출물에 대한 크로마토그램 패턴분석법을 이용하여 품질을 관리하는 것을 목적으로 하여 시행되었으며, 이를 위하여 산사자 추출물의 특이적인 HPLC 크로마토그램을 얻고, 이 다변량 자료를 패턴분석법에 의해 해석하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 기기 및 시약

실험에 사용된 HPLC는 SCL-10A system controller, LC-10AD pump, SPD-10AVP diode array detector (Shimadzu, Kyoto, Japan), Rheodyne 7725 injector로 구성되었다. pH의 측정에는 ATI 370 (Orion, MA, USA)을 3차 증류수의 제조에는 Milli-Q Apparatus (Millipore, MA, USA)를 사용하였다. acetonitrile은 HPLC용으로 J. T. Baker (NJ, USA)로부터 구입하였다. 그 외의 시약은 국내외 특급 및 일급 시약을 사용하였고, 물은 3차

증류수를 0.25 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

2) 시료

시료는 건조한곳에 보관하였고 각각을 다음과 같이 코드화하였다.

표 1. 시료의 학명 및 코드

시료	시료 코드	학명	과명
산사나무 (土山楂)	CPT	Crataegus pinnatifida Bunge var. typica Schneider	장미과
당산사 (山里紅)	CPM	Crataegus pinnatifida Bunge var. major N.E.Br.	장미과
꽃사과 (偽品)	MS	Mallus spp.	장미과

3) 시료 조제

시료를 건조기 (40°C, 4h)에서 완전 건조시켰다. 건조 시료를 분말로 한 후 100 mg을 취해 마개달린 시험관에 넣고 메탄올 5 ml를 넣어 40°C에서 1시간씩 3회 초음파를 이용하여 추출하였다. 추출액을 감압 하에서 용매를 증발 건조시킨 후 잔사에 메탄올 5ml에 넣어 녹였다. 용액을 원심분리 시키고 상정액을 HPLC로 분석하였다. 동일 조건에서 메탄올 대신 에틸아세테이트로 추출하고 용매를 증발시킨 후 메탄올 5 ml에 용해시켜 HPLC 분석하였다.

4) 시료분석

다음 조건으로 HPLC를 이용하여 분석하였다.

HPLC 분석 조건
 Column : Luna 5 μ C18 (ODS, 2.0×150mm)
 Mobile phase
 - A : acetonitrile/water(10:90)
 B : acetonitrile/water(80:20)
 - 0% B to 20% B over 30 min.
 Flow rate : 0.3ml/min
 UV detector : 205nm
 Sample injection : 5μl
 Temperature : Room temp

5) 다변량패턴분석을 위한 통계처리

HPLC 크로마토그램으로부터 피크의 높이를 구하고 서로 대응하는 피크의 상대 높이비를 산출하였다. 이들 산출된 비율의 산술평균 (simple mean) 및 대조한약 피크의 상대적 크기에 따른 가중치를 적용한 가중평균 (weighted mean)을 각각 구하고 이로부터 시료의 함량비율과 유사도를 검토하였다. 계산은 다음과 같은 방법에 따랐다.

- 성분의 상대 높이비 : $R_i = S_p(i)/S_t(i)$ (단, $S_p(i)$ 는 시료크로마토그램의 대응된 i 번째 피크높이, $S_t(i)$ 는 대조시료의 대응된

i 번째 피크높이)

- 산술평균 : $M_s = \sum R_i/n$ (단, $\sum R_i$ 는 남아있는 data 비율의 합계, n 은 남아있는 data 수)

- 가중평균 : $M_w = \sum (R_i/W_i)$ (단, W_i 는 가중치, $W_i = S_t(i)/\sum S_t(i)$)

- 대응도 (Matching ratio, %) = (시료 중 대응된 피크의 수/대조생약 크로마토그램의 피크수)×100

- 유사도 (similarity, %) : $\sum_{i=1}^n N_i \times W_i$,

$N_i = R_i/R_c$ (if $R_i/R_c \leq 1$) or $N_i = R_c/R_i$ (if $R_i/R_c > 1$) (단, N_i 는 i 번째 피크의 평균화된 높이비, R_c 는 패턴인식법에 의해 계산된 시료의 평균함량비) W_i 는 가중치.

실험 결과 및 고찰

1) 메탄을 추출액의 패턴분석

메탄을 추출액을 HPLC로 분석하고 크로마토그램으로부터 특징적인 피크를 선정, 피크의 높이를 측정하였다. 시료와 대조시료에 해당하는 피크의 높이비로부터 산술평균과 가중평균

표 2. 각 시료에 대한 피크의 높이 및 상대높이 비율

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5
CPM	217749	447296	83557	19476	49249
Ri ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CPT	60554	124398	22896	28901	19678
Ri	0.28	0.28	0.27	1.48	0.40
MS	7100	-	-	-	-
Ri	0.03	-	-	-	-

^a : R_i : 대응되는 피크의 높이 비율, $R_i = S_p(i)/S_t(i)$ (단, $S_p(i)$ 는 시료크로마토그램의 대응된 피크높이, $S_t(i)$ 는 대조시료의 대응된 피크높이)

^b : 대응되는 피크가 없는 경우 계산에서 제외하였다.

을 구하고 시료의 품질을 대조시료와 비교하였다.

- 상대 피크 높이비 산출 : 수집된 시료의 HPLC 크로마토그램으로부터 5개의 피크를 골라내어 피크높이 및 상대적 피크높이를 다음 표와 같이 구하였다. 대조시료는 대응되는 피크의 수가 가장 많고 피크의 높이가 대체적으로 높은 CPM으로 설

정하였다.

- 시료에 대한 산술평균의 계산 : 표 3, 그림 1에 대조시료와 대응하는 피크를 선정하고 이것으로부터 계산된 산술평균을 표시하였다.
- 시료에 대한 가중평균의 계산 : 표 4, 그림 2에 가중치로 계산된 가중평균을 표시하였다.

표 3. 각 시료에 대한 산술평균의 비교

각 시료 피크의 Ri 값						ΣRi	Ms ^b
	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5		
CPM	1.00a	1.00	1.00	1.00	1.00	5.0	1.00
CPT	0.28	0.28	0.27	1.48	0.40	2.71	0.54
MS	0.03	-	-	-	-	0.03	0.03

^a Ri : 대응되는 피크의 높이 비율, $Ri = Sp(i)/St(i)$ (단, $Sp(i)$ 는 시료크로마토그램의 대응된 피크높이, $St(i)$ 는 대조시료의 대응된 피크높이)

^b Ms (산술평균) = $\Sigma Ri/n$ (단, ΣRi 는 남아있는 data 비율의 합계, n은 남아있는 data 수)

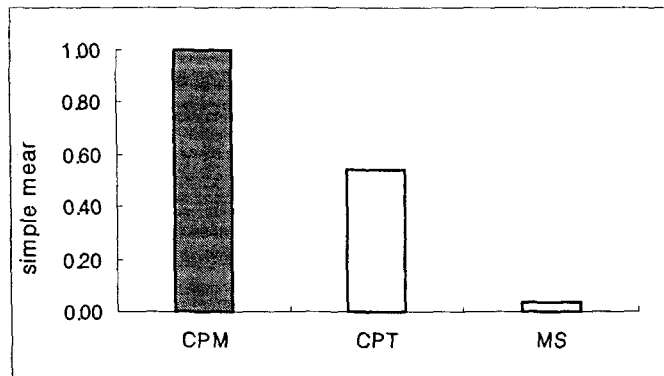


그림 1. 각 시료에 대한 산술평균의 비교

표 4. 각 시료에 대한 가중평균의 비교

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Mw ^b
Wi ^a	0.266	0.547	0.102	0.024	0.060	
CPT	0.074	0.152	0.028	0.035	0.024	0.314
MS	0.009	-	-	-	-	0.009

^a Wi : 가중치, $Wi = St(i)/\Sigma St(i)$

^b Mw (가중평균) = $\Sigma (Ri \times Wi)$

· 대조시료와 각 시료간의 유사도의 비교 : 유사도를 비교하기 위하여 표 5와 같이 평균화된 높이비율을 계산하고 표 6과 같이 유사도와 대응도 (matching ratio)를 구하였다. 대조시료인 CPM에 비해 CPT와 MS의 유사도는 각각 52.16%, 26.64%로 낮았다.

· 각 시료의 품질 비교 : 표7에 산술평균 및 가중평균으로부터 비교된 세가지 시료의 품질을 표시하였다. 당산사를 대조시료로 했을 때 토산사과 꽃사과는 산술평균으로 판단했을 경우 성분함량이 낮은 것으로 나타났다. 크로마토그램에서 보는 바와 같이 당산사과 토산사는 성분상으로

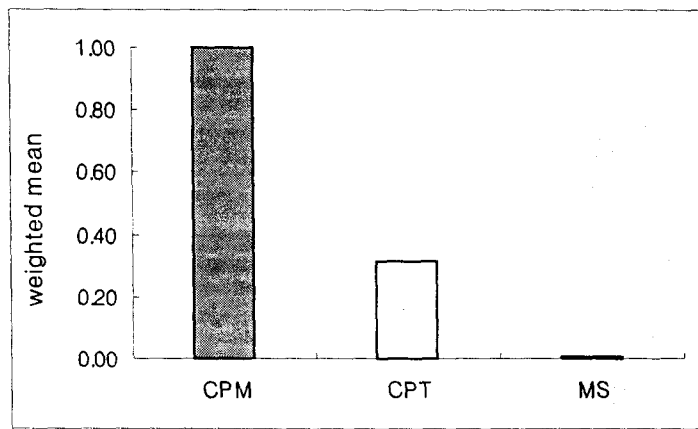


그림 2 각 시료에 대한 가중평균의 비교

표 5. 평균화된 높이비율

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Msb
CPT	0.51	0.51	0.50	0.37	0.74	0.54
MS	1.00	-	-	-	-	0.03

^a Ni : i 번째 피크의 평균화된 높이비율, $N_i = R_i/R_c$ (if $R_i/R_c \leq 1$) or $N_i = R_c/R_i$ (if $R_i/R_c > 1$) (단, N_i 는 i 번째 피크의 평균화된 높이비, R_c 는 패턴인식법에 의해 계산된 시료의 평균함량비), R_i : 대응되는 피크의 높이 비율, $R_i = S_p(i)/S_t(i)$ (단, $S_p(i)$ 는 시료크로마토그램의 대응된 피크높이, $S_t(i)$ 는 대조시료의 대응된 피크높이)

^b Ms : 산술평균

표 6. 대조시료에 대한 각 시료의 유사도 및 대응도

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	유사도 (%) ^b	대응도 (%) ^c
Wi	0.266	0.547	0.102	0.024	0.060		
CPT	13.651	28.043	5.161	0.872	4.436	52.16	100
MS	26.642	-	-	-	-	26.64	20.0

^a $N_i \times W_i \times 100$ (단, N_i 는 각 피크들의 평균화된 면적비율, W_i 는 가중치)

^b 유사도 (%) : $\sum_{k=1}^n (N_k \times W_k)$

^c 대응도 (%) = (시료중 대응된 피크의 수/대조생약 크로마토그램의 피크수)×100

표 7. 대조시료 대비 평균에 의한
각 시료의 품질비교^a

시료	시료코드	산술평균	가중평균	비교
당산사 (山里紅)	CPT	-	-	대조시료
토산사 (土山楂)	CPM	×	×	
꽃사과 (僞品)	MS	×	×	

^a ○ : 성분함량 높음 - Ms 혹은 Mw 값 > 1.0
 △ : 성분함량 보통 - 0.6 ≤ Ms (Mw) ≤ 1.0
 × : 성분함량 낮음 - Ms (Mw) < 0.6

유사성을 보이거나 꽃사과는 성분상으로 유사성이 떨어진다. 표 6에 나타난 것과 같이 대조시료에 대한 나머지 두 시료의 유사도는 각각 52.16%, 26.64%이다.

2) 에틸아세테이트 추출액의 패턴분석

에틸아세테이트 추출액을 HPLC로 분석하고 크로마토그램으로부터 특징적인 피크를 선정, 피크의 높이를 측정하였다. 시료와 대조시료에 해당하는 피크의 높이비로부터 산술평균과 가중평균을 구하고 시료의 품질을 대조시료와 비교하였다.

표 8. 각 시료에 대한 피크의 높이 및 상대높이 비율

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7
CPM	8227	86108	22707	79872	6539	6624	8455
Ri ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
CPT	4189	-	3992	14102	2390	4619	2723
Ri	0.51	-	0.18	0.18	0.37	0.70	0.32
MS	-	6721	2233	-	-	-	-
Ri	-	0.08	0.10	-	-	-	-

^a : Ri : 대응되는 피크의 높이 비율, Ri = Sp(i)/St(i) (단, Sp(i)는 시료크로마토그램의 대응된 피크높이, St(i)는 대조시료의 대응된 피크높이)

^b : 대응되는 피크가 없는 경우 계산에서 제외하였다.

· 상대 피크 높이비 산출 : 수집된 시료의 HPLC 크로마토그램으로부터 7개의 피크를 골라내어 피크높이 및 상대적 피크높이를 다음 표와 같이 구하였다. 대조시료는 대응되는 피크의 수가 가장 많은 CPM로 설정하였다. 대조시료에서 발견되지 않은 피크는 상대높이 비율을 산출할 수 없으므로 표에서는 이것을 표시만 하였을 뿐 실제 계산에는 산입하지 않았다.

· 시료에 대한 산술평균의 계산 : 표 9, 그림 3에 대조시료와 대응하는 피크를 선정하고 이것으로부터 계산된 산술평균을 표시하였다.

· 시료에 대한 가중평균의 계산 : 표 10, 그림 4에 가중치로 계산된 가중평균을 표시하였다.

· 대조시료와 각 시료간의 유사도의 비교 : 유사도를 비교하기 위하여 표 11과 같이 평균화된 높이비율을 계산하고 표 6과 같이 유사도와 대응도 (matching ratio)를 구하였다. 대조시료인 CPM비해 CPT와 MS의 유사도는 각각 32.8%, 44.2%로 낮았다.

표 9. 각 시료에 대한 산술평균의 비교

	각 시료 피크의 Ri 값							ΣRi	Ms ^b
	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7		
CPM	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	7.00	1.00
CPT	0.51	-	0.18	0.18	0.37	0.70	0.32	2.25	0.37
MS	-	0.08	0.10	-	-	-	-	0.18	0.09

a Ri : 대응되는 피크의 높이 비율, $Ri = Sp(i)/St(i)$ (단, $Sp(i)$ 는 시료크로마토그램의 대응된 피크높이, $St(i)$ 는 대조시료의 대응된 피크높이)

b Ms (산술평균) = $\Sigma Ri/n$ (단, ΣRi 는 남아있는 data 비율의 합계, n은 남아있는 data 수)

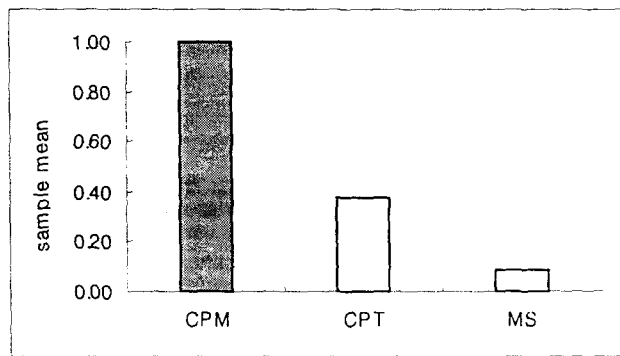


그림 3. 각 시료에 대한 산술평균의 비교

표 10. 각 시료에 대한 가중평균의 비교

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7	Mw ^b
Wi ^a	0.038	0.394	0.104	0.365	0.030	0.030	0.039	
CPT	0.019	-	0.018	0.065	0.011	0.021	0.012	0.15
MS	-	0.031	0.010	-	-	-	-	0.04

^a Wi : 가중치, $Wi = St(i)/\Sigma St(i)$

^b Mw (가중평균) = $\Sigma (Ri \times Wi)$

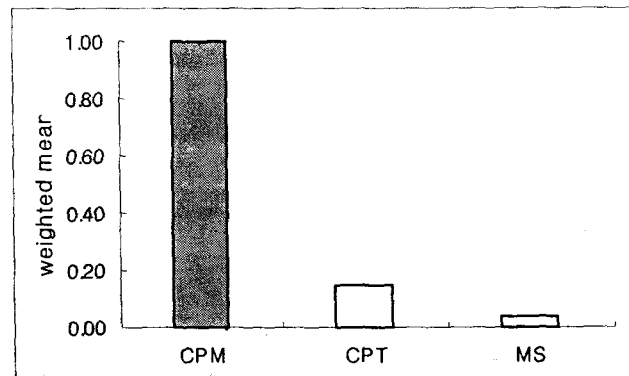


그림 4. 각 시료에 대한 가중평균의 비교

표 11. 평균화된 높이비율

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7	Ms ^b
CPT	0.74	-	0.47	0.47	0.98	0.54	0.86	0.37
MS	-	0.88	0.90	-	-	-	-	0.09

^a Ni : i 번째 피크의 평균화된 높이비율, Ni = Ri/Rc (if Ri/Rc ≤ 1) or Ni = Rc/Ri (if Ri/Rc > 1) (단, Ni는 i 번째 피크의 평균화된 높이비, Rc는 패턴인식법에 의해 계산된 시료의 평균함량비), Ri : 대응되는 피크의 높이 비율, Ri = Sp(i)/St(i) (단, Sp(i)는 시료크로마토그램의 대응된 피크높이, St(i)는 대조시료의 대응된 피크높이)

^b Ms : 산술평균

표 12. 대조시료에 대한 각 시료의 유사도 및 대응도

	Peak1	Peak2	Peak3	Peak4	Peak5	Peak6	Peak7	유사도 (%) ^b	대응도 (%) ^c
Wi	0.038	0.394	0.104	0.365	0.030	0.030	0.039		
CPT	2.768	-	4.879	17.236	2.921	1.627	3.328	32.8	85.7
MS	-	34.871	9.319	-	-	0.181	-	44.2	28.6

^a Ni × Wi × 100 (단, Ni는 각 피크들의 평균화된 면적비율, Wi는 가중치)

^b 유사도 (%) : $\sum_{k=1}^n (Nk \times Wk)$

^c 대응도 (%) = (시료중 대응된 피크의 수/대조생약 크로마토그램의 피크수) × 100

· 각 시료의 품질 비교 : 표 13에 산술평균 및 가중평균으로부터 비교된 세가지 시료의 품질을 표시하였다. 당산사를 대조시료로 했을 때 토산사와 꽃사과는 산술평균으로 판단했을 경우 성분함량이 낮은 것으로 나타났다. 크로마토그램에서 보는바와 같

이 상기의 당산사와 토산사 시료는 성분상으로 약간의 유사성을 보이거나 꽃사과는 유사성이 매우 떨어지는 것으로 보인다. 꽃사과의 경우는 패턴분석의 실효성이 떨어지게 된다. 표 12에 나타난 것과 같이 대조시료에 대한 나머지 두 시료의 유사도는 각각 32.8%, 44.2%이다.

표 13. 대조시료 대비 평균에 의한 각 시료의 품질비교^a

시료	시료코드	산술평균	가중평균	비교
당산사 (山里紅)	CPM	-	-	대조시료
토산사 (土山楂)	CPT	×	×	
꽃사과 (偽品)	MS	×	×	

^a ○ : 성분함량 높음 - Ms 혹은 Mw 값 > 1.0

△ : 성분함량 보통 - 0.6 ≤ Ms (Mw) ≤ 1.0

× : 성분함량 낮음 - Ms (Mw) < 0.6

3) 메탄올 추출액과 에틸아세테이트 추출액의 비교

메탄올 추출액의 크로마토그램과 에틸아세테이트 추출액의 크로마토그램은 상당히 유사하지만 새로운 피크의 출현과 더불어 기존 피크의 크기도 변화하는 것으로 나타났다. 표 14에 메탄올 추출액과 에틸아세테이트 추출액으로부터 구한 각 평균값을 비교하였다. 전체적으로 비교할 때 토산사와 꽃사과의 산술평균

표 14. 메탄올 추출액과 에틸아세테이트 추출액의 평균에 의한 각 시료의 품질비교

시료	시료코드	산술평균 Ms			가중평균 Mw		
		MeOH	EtOAc	mean	MeOH	EtOAc	mean
당산사 (山里紅)	CPM	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
토산사 (土山楂)	CPT	0.54	0.37	0.46	0.31	0.15	0.23
꽃사과 (僞品)	MS	0.03	0.09	0.06	0.01	0.04	0.03

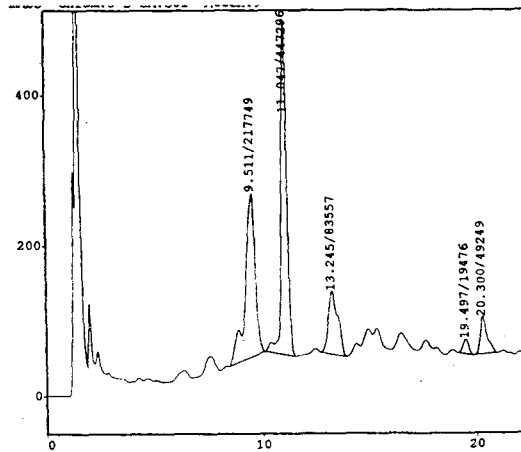


그림 5. Typical Chromatogram of Chataegus pinnatifida Bunge MeOH-Extract

은 작게 나타났고, 꽃사과의 가중평균도 작게 나타났다. 토산사는 꽃사과보다는 당산사에 가깝다는 결론을 내릴 수 있을 것으로 사료된다.

결론

1. 山楂子の 패턴분석결과, 평균합은 토산사 0.85, 당산사 2.00, 꽃사과 0.04로 나타났다.
2. 메탄올 추출물에서 당산사를 대조생약으로 하여 분석한 결과, 산술평균은 당산사 1.0, 토산사 0.54, 꽃사과 0.03으로 나타났다.
3. 메탄올 추출물에서 당산사를 대조생약으로 하여 분석한 결과, 유사도에서 토산사는 52.2%, 꽃사과는 26.6% 이었으며, 피크 대응도에서 토산사 100%, 꽃사과 20%이었다.

로 하여 분석한 결과, 유사도에서 토산사는 52.2%, 꽃사과는 26.6% 이었으며, 피크 대응도에서 토산사 100%, 꽃사과 20%이었다.

4. 에틸아세테이트 추출물에서 당산사를 대조생약으로 하여 분석한 결과, 산술평균은 당산사 1.0, 토산사 0.37, 꽃사과 0.09로 나타났다.

3. 메탄올 추출물에서 당산사를 대조생약으로 하여 분석한 결과, 유사도에서 토산사는 32.8%, 꽃사과는 44.2% 이었으며, 피크 대응도에서 토산사 85.7%, 꽃사과 28.6%이었다.

참고 문헌

1. 중약대사전, 2권 p1092(1985) 小學館
2. 생약학, 생약연구회, p191(1995) 學窓社
3. Nikolov. et al., Farmalsiya., 19, 32-38, 1969
4. Batyuk. US. et al., Khim. Prir. Soedin. 5, 234-9, 1969
5. K. Weinges, et al., Phytochemistry. 3, 263, 1964
6. Undie A.S. et al., J. Ethnopharmacol., 15, 133-44, 1986
7. Savickas A, Ramanauskiene K, Savickiene N, Kazlauskas S, Masteikova R, Chalupova Z., Ceska Slov Farm. 53, 35-8, 2004
8. Xie M, Lu Q, Zhu L, Gu Z., Zhong Yao Cai. 23, 474-6, 2000
9. Chen Z., Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 10, 71-4, 1990