

¹H-NMR을 이용한 계피의 *t*-cinnamaldehyde 정량분석

송명종 · 유종수 · 백남인*

경희대학교 생명공학원 및 식물대사연구센터

Quantitative Analysis of *t*-Cinnamaldehyde of *Cinnamomum cassia* by ¹H-NMR Spectrometry

Myoung-Chong Song, Jong-Su Yoo and Nam-In Baek*

Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University,
Suwon 449-701, Korea

Received June 9, 2005; accepted June 29, 2005

trans-Cinnamaldehyde, a major component of *Cinnamomum cassia*, was quantitatively analyzed using the ¹H-NMR spectrometry. Applicability of this method was confirmed through observing the variation of chemical shift in the ¹H-NMR spectrum of *t*-cinnamaldehyde and the integration value according to various sample concentrations or running temperatures. When the ¹H-NMR spectrometry was run for *t*-cinnamaldehyde (7.1429 mg/ml) at 19, 25, 30, 40 and 50°C, the chemical shifts of the doublet methine signal due to an aldehyde group were observed at 9.7202, 9.7184, 9.7169, 9.7142 and 9.7124 ppm, respectively, to imply that the running temperature had no significant variation in the chemical shift of the signal. The integration values of the signal were 1.37 (19°C), 1.37 (25°C), 1.37 (30°C), 1.37 (40°C) and 1.37 (50°C), respectively, to also indicate running temperature gave no effect on the integration value. When the sample solutions with various concentrations such as 0.4464, 0.8929, 1.7857, 3.5714, 7.1429 and 14.286 mg/ml were respectively measured for the ¹H-NMR at 25°C, the chemical shifts of the aldehyde group were observed at 9.7206, 9.7201, 9.7196, 9.7192, 9.7185 and 9.7174 ppm. Even though the signal was slightly shifted to the high field in proportion to the increase of sample concentration, the alteration was not significant enough to applicate this method. The calibration curve for integration values of the doublet methine signal due to the aldehyde group vs the sample concentration was linear and showed very high regression rate ($r^2 = 1.0000$). Meantime, the ¹H-NMR spectra (7.1429 mg/ml CDCl₃, 25°C) of *t*-cinnamaldehyde and *t*-2-methoxycinnamaldehyde, another constituent of *Cinnamomum cassia*, showed the chemical shifts of the aldehyde group as δ_H 9.7174 (9.7078, 9.7270) for the former compound and δ_H 9.6936 (9.6839, 9.7032) for the latter one. The difference of the chemical shift between two compounds was big enough to be distinguished using the NMR spectrometer with 0.45 Hz of resolution. The contents of cinnamaldehyde in *Cinnamomum cassia*, which were respectively extracted with *n*-hexane, CHCl₃, and EtOAc, were determined as 94.2 mg/g (0.94%), 137.6 mg/g (1.38%) and 140.1 mg/g (1.40%) *t*-cinnamaldehyde in each extract, respectively, by using the above method.

Key words: ¹H-NMR, quantitative analysis, *Cinnamomum cassia*, *t*-cinnamaldehyde, *t*-2-methoxycinnamaldehyde

서 론

천연소재를 이용한 건강기능성 식품이나, 한약재를 이용한 한 방제품 중에 원재료가 함유되어 있는지의 여부, 나아가서는 어느 정도의 양으로 함유되어 있는지를 결정하는 일은 제품의 품

질관리를 위하여 반드시 필요하다. 뿐만 아니라 식물의 육종 및 식물생명공학과 관련된 분야에서는 품종간의 차이를 간단하게 정량적으로 분별할 수 있는 방법이 필요하다. 이 경우 원재료 중에 함유되어 있는 주요성분을 지표성분으로 하여 정량분석 함으로써 위의 목적을 이룰 수가 있다. 지금까지는 HPLC나 GC를 이용하여 분석하는 방법이 주로 이용되어 왔다. 하지만 HPLC의 경우는 시료의 전처리기가 매우 복잡하고, 기기의 안정화에 소요되는 시간도 매우 길며, 뿐만 아니라 기기의 감도도 낮은 경우가 많아서 지표성분의 함유농도가 낮은 시료를 분석

*Corresponding author

Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr

하는 데에는 어려움이 있다. GC의 경우에는 전처리가 상대적으로 간단하고, 감도도 높은 편이나, 극성 화합물을 분석해야 하는 경우에는 유도체화해야 할 필요가 있으며, 화합물의 화학적 구조에 따라 유도체화하여도 적용이 불가능한 경우도 매우 많다. 따라서 이를 대체할만한 간단하면서도 감도도 좋고 재현성이 높은 분석방법을 개발할 필요성이 대두되어 왔다.

수년전부터 NMR spectrometry를 이용하여 원재료중의 지표성분을 분석하고자 하는 시도가 이루어져 왔다. 사과즙 중에 함유되어 있는 chlorogenic acid¹⁾나 (-)-epicatechin²⁾을 'H-NMR을 이용하여 정량분석한 연구결과와 2D NMR을 이용하여 포도주의 품종을 구별한 연구결과³⁾ 및 camptothecin과 유도체들에 대한 'H-NMR과 HPLC 정량분석법의 비교⁴⁾ 등이 발표되기는 하였으나, 아직 그 수는 매우 적다. 따라서 저자 등은 'H-NMR을 이용하여 원재료중의 지표성분을 간단하게 분석할 수 있는지의 가능성을 타진하기 위하여 본 연구를 시작하였다.

'H-NMR은 다른 핵종의 NMR에 비하여 감도가 매우 높고, signal의 intensity(integration value)도 농도 의존적으로 나타난다. 따라서 짧은 시간에 정량적인 분석이 가능한 방법이다. 저자 등은 'H-NMR 스펙트럼에서 측정온도에 따라서 주요 signal의 chemical shift 나 integration 값의 변화되는 정도가 거의 없고, 측정시료의 농도에 따라서 chemical shift 값의 변화 되는 정도가 매우 작으며, 그리고 integration 값은 농도에 따라서 정량적으로 변화하는 것을 확인함으로써 이 방법을 정량분석하는 데에 적용할 수 있을지를 결정하고자 하였다.

이 실험을 위하여 계피의 주성분인 *t*-cinnamaldehyde⁵⁾를 사용하였다. 한편 분석하고자 하는 signal과 비슷한 chemical shift를 보이는 성분의 경우에는 원래 분석하고자 하는 성분의 signal과 구별이 되어야 정량분석이 가능하다. 따라서 계피의 함유 성분 중에서 *t*-cinnamaldehyde와 유사한 구조를 갖는 *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 'H-NMR 스펙트럼에서 주요 signal인 aldehyde의 chemical shift 값을 서로 비교하였다. 위의 과정을 통하여 확립된 방법을 이용하여 직접 계피 중의 *t*-cinnamaldehyde를 정량하였다.

재료 및 방법

실험재료. 계피(*Cinnamomum cassia* BLUME)는 수원시 소재 한약재상에서 구입하였으며, 우석대학교 약학대학 김대근 교수가 동정하였다. 추출에 사용한 용매인 chloroform(CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc) 및 *n*-hexane는 대정화학주식회사(시흥, 한국)에서 특급시약을 구입하였다. NMR 측정에 사용한 CDCl₃는 Merck(Damstadt, Germany), 표준시료인 *t*-cinnamaldehyde와 *t*-2-methoxycinnamaldehyde는 Aldrich(St. Louis, USA)에서 각각 구입하였다.

기기 및 측정. Varian Unity Inova 400 FT NMR spectrometer (California, USA)를 사용하여 400 MHz에서 'H-NMR을 측정하였으며, resolution 0.45 Hz, spectral width 4600.0 Hz(center of spectral width 5.02 ppm), acquisition time 2.5초, recycle delay 2.0초, flip angle 90°로 64K data point의 signal을 12 scan하여 data를 얻었다. TMS를 내부표준물질로 사용하여 0

ppm으로 맞추었고, integration값은 0.7 ml의 CDCl₃를 사용하여 측정하였을 때, 7.26 ppm 부근에서 관측된 CDCl₃의 signal을 1로 맞추었다.

온도 조건에 따른 'H-NMR 측정. *t*-Cinnamaldehyde 5 mg을 0.7 ml의 CDCl₃에 녹여서, 기기의 측정온도 19, 25, 30, 40 및 50°C에서 각각 'H-NMR을 측정하였다.

농도 조건에 따른 'H-NMR 측정. *t*-Cinnamaldehyde 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg을 각각 0.70 ml의 CDCl₃에 녹여서 시료를 조제한 후, 25°C에서 'H-NMR을 측정하였다.

비교물질의 'H-NMR 측정. *t*-2-Methoxycinnamaldehyde 10.0 mg을 0.7 ml의 CDCl₃에 녹인 후, 25°C에서 'H-NMR을 측정하였다.

계피로부터 *t*-cinnamaldehyde 분석의 조제 및 NMR측정. 계피 건조 분말 10 g을 *n*-hexane, CHCl₃, 및 EtOAc 각각 100 ml를 사용하여 실온에서 24시간 진탕추출하였다. 추출액을 여과하고 감압농축하였다. 각 농축물 중에서 10.0 mg씩을 취하여 0.7 ml의 CDCl₃에 녹인 후 25°C에서 'H-NMR을 측정하였다. 또한 추출물 10.0 mg과 *t*-cinnamaldehyde 및 *t*-2-methoxycinnamaldehyde 10.0 mg을 각각 합쳐서 0.7 ml의 CDCl₃에 녹여서 동일한 조건에서 'H-NMR을 측정하였다.

분자모델 프로그램을 이용한 *t*-cinnamaldehyde 및 *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 'H-NMR spectrum 예측. 계피 중의 주요 성분인 *t*-cinnamaldehyde와 계피의 또 다른 유사구조 화합물인 *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 'H-NMR 스펙트럼을 예측하고자 하였다. 사용한 프로그램은 ACD/ChemSketch (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada)로 최소에너지를 보이는 분자식을 그린 후 spectrum을 계산하였다.

결과 및 고찰

기능성식품 또는 한약재를 이용한 제품의 경우 품질이나 효능의 일관성을 유지하기 위해서는 활성을 나타내는 소제가 동일한 품질의 것을 계속 사용하여야 한다. 따라서 활성소재 중에 함유되어 있는 활성성분 혹은 어떤 경우에는 주요성분이 그 제품 중에 기준 양 이상으로 함유되어 있는가를 정량적으로 분석해야 할 필요가 있다. 지금까지 비극성의 휘발성이 높은 성분의 경우에는 GC/MS가 주로 이용되어 왔고, 극성이 높은 휘발성이 낮은 배당체 등의 성분의 경우에는 HPLC가 주로 이용되어 왔다. 하지만 위 방법은 전처리 과정의 복잡성이나 사용의 제한성 때문에 이 방법을 대체할만한 정량분석법의 개발이 필요하게 되었다. 대안의 하나로서 'H-NMR을 이용한 정량분석법에 관하여 그동안 꾸준히 그 장점과 편의성이 제기되어 왔다. 그럼에도 불구하고 실제로 이 방법을 이용하여 지표성분의 정량분석 결과를 발표한 예는 아직 매우 적다.

NMR 측정에서 이용 가능한 원소 중에서 질량수 1의 동위원소인 proton은 천연존재비가 99.98%로 질량수 13의 carbon-13이 1.108%인데 비하여 매우 높으며, 그 자기회전비(γ , radian/Tesla)도 267.53으로 carbon-13에 비하여 4배 정도가 높다. 따라서 분석 시 carbon-13 등 주요한 다른 원소에 비하여 감도가 매우 높으므로, 제품 중에 소량으로 함유되어 있는 활성성분의

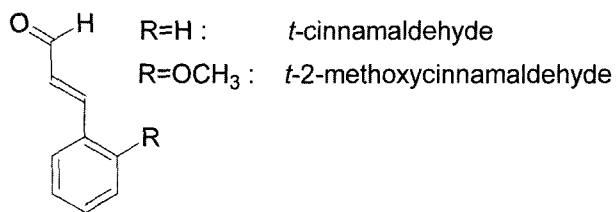


Fig. 1. Chemical structure of t-cinnamaldehyde and t-2-methoxycinnamaldehyde.

분석이 가능할 것으로 예측 되었다. 다만 ¹H-NMR을 정량분석 법에 이용하기 위해서는 측정 조건에 따라서 chemical shift나 integration 값에 있어서 일정한 경향을 보여야 한다. 따라서 본 실험에서는 측정온도나 시료의 농도를 달리함에 따라 어떻게 chemical shift나 integration 값이 변화하는지를 보고자 하였다. 혹은 유사한 구조를 갖는 화합물에서 동일한 관능기의 signal의 chemical shift 값이 어느 정도 변화하는지 파악함으로써 ¹H-NMR이 시료중의 지표성분을 정량분석 하는 데에 어느 정도 적용가능한지를 결정하고자 하였다.

계피 중의 주요성분인 t-cinnamaldehyde(Fig. 1)를 지표성분으로 사용하여 분석하였다. 계피는 감기약, 소화약, 혈액순환약, 월경통약 등으로서 다른 약과 배합하여 치료에 예로부터 사용되어 왔고,⁶⁻⁷⁾ 항진균활성,⁸⁾ 항알러지,⁹⁾ B형 바이러스 억제 효과¹⁰⁾ 등의 약리활성 연구결과가 보고 되어있다. 계피 중에는 지금까지 약 60여종 정도의 화학성분이 분리, 동정되었으며, 계피나무의 껍질에는 정유 1~2%가 함유되어 있고 그 중에서도 t-cinnamaldehyde는 정유성분 중에 75~90% 정도가 함유되어 있는 것으로 보고 된 가장 다량 함유되어 있는 성분이다.⁶⁾ 뿐만 아니라, t-cinnamaldehyde는 지금까지 항진균작용,⁸⁾ apoptosis 유도작용,¹¹⁾ nitric oxide synthase에 대한 억제작용¹²⁾ 등이 알려져 있다.

t-Cinnamaldehyde의 경우 ¹H-NMR 스펙트럼에서 phenyl 기

에서 유래한 수소(H-2,6, H-3,5, H-4)는 7.24-7.57 ppm 사이에서 복잡하게 signal이 관측되고, propane 부분의 olefine 수소(H-7, H-8)도 비슷한 위치인 6.75(dd), 7.51(d) ppm에서 관측되어 서로 간에 signal이 중첩되어 분별하기가 어렵다. 하지만 aldehyde 수소(H-9)는 chemical shift가 다른 signal들 보다 월등히 저자장(약 9.72 ppm)에서 관측되므로 이번 실험을 위해 가장 적당한 것으로 판단되어 이 signal을 이용하여 실험하기로 하였다.

측정온도를 달리하였을 때, ¹H-NMR spectrum 상에서 t-cinnamaldehyde의 aldehyde signal이 어떻게 달라지는가 보기 위하여 7.1429 mg/ml 농도의 시료를 19, 25, 30, 40 및 50°C 에서 각각 4반복 측정하였다. TMS를 내부표준물질로 하여 0 ppm으로 맞추었을 때, doublet으로 관측되는 aldehyde signal의 chemical shift는 Table 1에서 보는 바와 같이 19°C의 9.7202 ppm에서 온도가 올라감에 따라 50°C의 9.7124 ppm까지 고자장으로 이동하는 것으로 나타났다. Integration 값은 TMS의 경우는 측정시료 간에 함유되어 있는 양이 조금이라도 달라 질 수 있으므로 기준으로 삼기에 적절하지 못한 것으로 생각되어, 동일한 부피(0.70 ml)의 용매를 사용하여 측정시료를 조제하였기 때문에 7.26 ppm에서 관측되는 CDCl₃의 signal을 1로 맞추었다. Table 1에서와 같이 측정온도를 달리했을 때, aldehyde signal의 integration 값은 1.37로 차이가 나타나지 않았다. 측정온도가 달라짐에 따라 시료용액의 밀도나 점도가 달라질 수도 있고, 화합물 분자 간 또는 분자 내에서 수소결합 등의 원소 간의 인력이 영향을 받을 수도 있다. 또한 화합물중의 proton 핵의 공명에 필요한 에너지의 값도 차이가 날 수 있다. 하지만 이 실험결과에서 보는 것처럼 측정 온도가 19°C에서 50°C 사이에서는 시료중의 지표성분의 정량분석에 오류를 가져올 정도의 변화는 관측되지 않는 것으로 판명되었다.

측정시료의 농도가 달라짐에 따라 ¹H-NMR 스펙트럼에서의 signal의 chemical shift와 integration 값이 어떻게 달라지는가

Table 1. Chemical shifts and integration values of the signal due to aldehyde group in the ¹H-NMR spectrum of t-cinnamaldehyde according to running temperature (400 MHz, CDCl₃, 5.0 mg/0.7 ml)

Temp. (°C)	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 4	mean±SE***
19	9.7201 (9.7297, 9.7105)	9.7202 (9.7298, 9.7106)	9.7201 (9.7296, 9.7106)	9.7202 (9.7298, 9.7106)	9.7202±0.0102 (9.7297, 9.7106)
	I.v.** 1.37	1.37	1.37	1.37	1.37±0.0
25	9.7183 (9.7279, 9.7087)	9.7184 (9.7280, 9.7088)	9.7183 (9.7280, 9.7087)	9.7184 (9.7280, 9.7088)	9.7184±0.0103 (9.7280, 9.7088)
	I.v. 1.37	1.37	1.37	1.37	1.37±0.0
30	9.7170 (9.7261, 9.7078)	9.7171 (9.7262, 9.7079)	9.7169 (9.7261, 9.7076)	9.7169 (9.7266, 9.7072)	9.7169±0.0100 (9.7263, 9.7076)
	I.v. 1.37	1.37	1.37	1.37	1.37±0.0
40	9.7142 (9.7233, 9.7050)	9.7142 (9.7233, 9.7050)	9.7142 (9.7231, 9.7052)	9.7143 (9.7231, 9.7054)	9.7142±0.0096 (9.7232, 9.7051)
	I.v. 1.37	1.37	1.37	1.37	1.37±0.0
50	9.7124 (9.7215, 9.7032)	9.7124 (9.7215, 9.7032)	9.7124 (9.7213, 9.7035)	9.7125 (9.7216, 9.7033)	9.7124±0.0097 (9.7215, 9.7033)
	I.v. 1.37	1.37	1.37	1.37	1.37±0.0

*δ indicates the chemical shift (ppm) of the doublet methine signal and its split values (the values in the parenthesis) at the low and high field.

**I.v. indicates the integration value of the doublet methine signal.

***The value indicates the mean and standard error of four replications.

Table 2. Chemical shifts of the signal due to aldehyde group in the ¹H-NMR spectrum of *t*-cinnamaldehyde according to sample concentrations. (400 MHz, CDCl₃, 25°C)

Conc. (mg/ml)	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 4	mean±SE**
0.4464	9.7210* (9.7306, 9.7114)	9.7203 (9.7300, 9.7105)	9.7201 (9.7297, 9.7105)	9.7210 (9.7306, 9.7114)	9.7206±0.0103 (9.7302, 9.7110)
0.8929	9.7210 (9.7306, 9.7114)	9.7203 (9.7300, 9.7105)	9.7192 (9.7288, 9.7096)	9.7201 (9.7297, 9.7105)	9.7201±0.0103 (9.7298, 9.7105)
1.7857	9.7201 (9.7297, 9.7105)	9.7192 (9.7288, 9.7096)	9.7201 (9.7297, 9.7105)	9.7192 (9.7288, 9.7096)	9.7196±0.0103 (9.7292, 9.7101)
3.5714	9.7201 (9.7297, 9.7105)	9.7182 (9.7288, 9.7096)	9.7183 (9.7279, 9.7087)	9.7192 (9.7288, 9.7096)	9.7192±0.0103 (9.7288, 9.7096)
7.1429	9.7192 (9.7288, 9.7096)	9.7183 (9.7279, 9.7087)	9.7183 (9.7279, 9.7087)	9.7183 (9.7279, 9.7087)	9.7185±0.0103 (9.7281, 9.7089)
14.286	9.7174 (9.7270, 9.7078)	9.7174 (9.7270, 9.7078)	9.7174 (9.7270, 9.7078)	9.7174 (9.7270, 9.7078)	9.7174±0.0103 (9.7270, 9.7078)

*Each data indicate the chemical shift of the doublet methine signal and its split values (the values in the parenthesis) at the low and high fields.

**The value indicates the mean and standard error of four replications.

보기 위하여, 25°C에서, *t*-cinnamaldehyde 0.4464, 0.8929, 1.7857, 3.5714, 7.1429 및 14.286 mg/ml의 농도로 시료를 조제한 후 각각 4반복 측정하였다. Table 2에 나타난 것처럼, 시료의 농도가 진해질수록 aldehyde기의 signal이 9.7206(9.7302, 9.7110) ppm부터 9.7174(9.7270, 9.7078) ppm까지에서 관측되어, 농도 의존적으로 조금씩 일정하게 고자장으로 shift 하였다. Table에는 나타내지 않았지만 시료의 농도를 극단적으로 200.00 mg/ml로 진하게 했을 때, 9.6620 ppm에서 관측되어 0.4464 mg/ml 농도로 측정된 시료의 경우보다 0.0586 ppm 고자장에서 관측되어 유의성 있는 차이를 보여 주었다. 하지만 일반적으로 ¹H-NMR의 경우 측정시료의 농도를 10 mg/ml 이하로 하여 측정하는 것이 대부분이고, 또한 천연소재 중에 함유되어 있는 지표성분의 함량은 그 이하의 농도인 경우가 대부분이므로 이 방법의 적용에 특별한 문제가 없을 것으로 판단되나, 간혹 시료 중의 지표성분의 함량이 극단적으로 높은 경우에는 측정시료의 농도를 일정 수준이하로 맞추기 위하여 관측하고자 하는 signal의 integration 값이 용매 signal의 integration 값보다 높아지지 않도록 조절하면 문제가 없을 것으로 판단되었다. 측정시료의 농도가 높아짐에 따라 integration 값이 어떻게 달라지는지를 보기 위한 측정결과는 Fig. 2에서처럼 농도증가에 따라 integration 값도 정비례하게 증가하여 이번 실험의 측정농도 내에서는 농도와 integration 값 간에 1차 직선을 보여 주었다. 4개 반복 모두 회귀율(r^2)이 0.9996 이상을 보여주었고, 4반복 평균값의 경우는 회귀율이 1.0000을 보여 주어, 정량분석시에 이 방법을 이용하면 매우 정확도가 높은 값을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

한편, 계피 및 근연약제로부터 현재까지 *t*-cinnamaldehyde를 비롯하여 약 60여종의 성분이 분리, 동정되었다. 그 중에는 *t*-cinnamaldehyde와 같이 구조 중에 aldehyde기를 갖는 유사구조 화합물로 benzaldehyde, *c*-2-methoxycinnamaldehyde, *t*-2-methoxycinnamaldehyde 등이 있는데,¹³⁾ 특히 *t*-2-methoxycinnamaldehyde (Fig. 1)의 경우는 aldehyde의 수소로부터 5개의 공유결합을 거쳐서 떨어진 phenyl기의 ortho 위치에 산소가 결합한 화합물이다. 따라서 이 위치에 결합한 산소의 전자 당김효과가 aldehyde

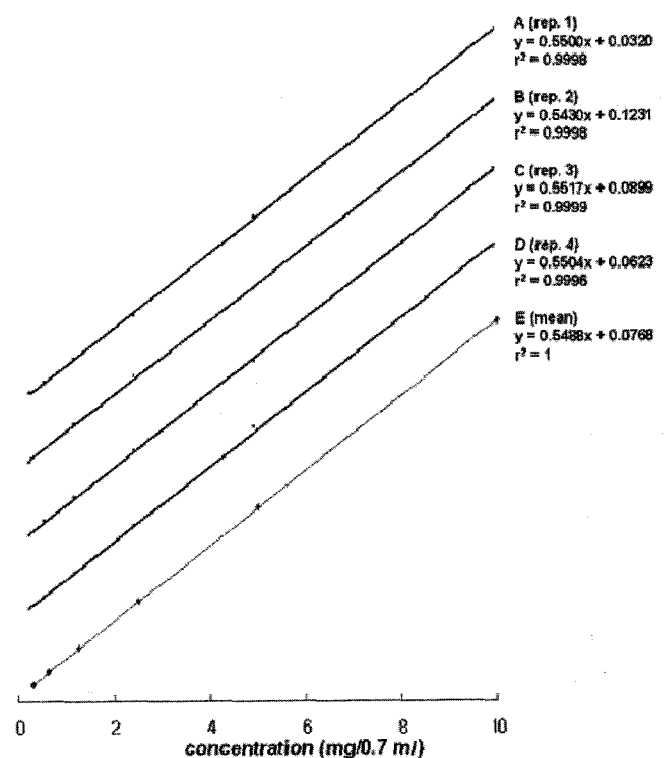


Fig. 2. Regression curve of *t*-cinnamaldehyde concentration vs integration values of the aldehyde signal in the ¹H-NMR spectra (400 MHz, CDCl₃), which were measured at 25°C with four replications. A-D indicates the result of each measurement and E the mean value.

의 proton 핵까지 영향을 미칠 것으로는 생각하기 어렵다. 따라서 *t*-cinnamaldehyde와 *t*-2-methoxycinnamaldehyde 두 화합물의 aldehyde기 signal의 chemical shift의 값에 있어서 유의적인 차이가 관측되지 않는다면, 이 방법을 정량분석에 적용하는데 부정적인 요소로 작용하게 될 것이다. 이 사실을 확인하기 위하여 ACD/ChemSketch(Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada)를 이용하여 두 화합물의 ¹H-NMR에 있어서의 aldehyde기 signal의 chemical shift 값을 계산하였다. *t*-

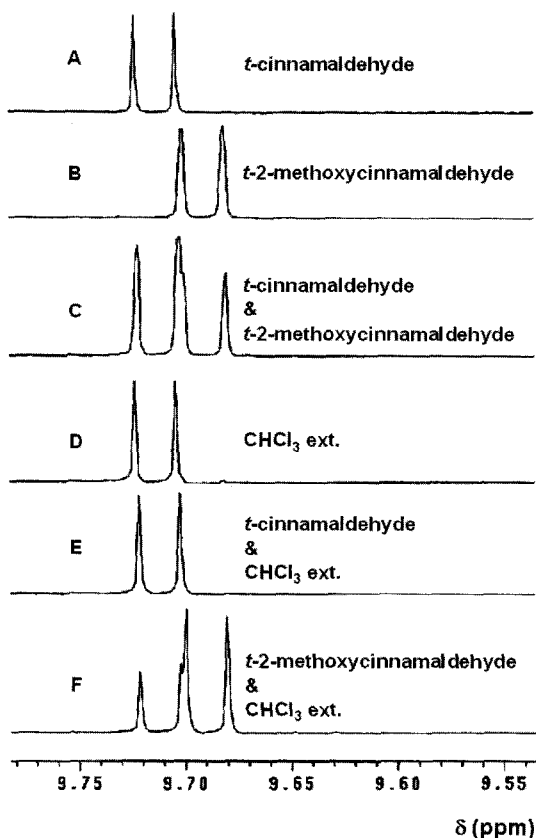


Fig. 3. ¹H-NMR spectra of *t*-cinnamaldehyde, *t*-2-methoxycinnamaldehyde, CHCl₃ extracts of *Cinnamomum cassia* and their mixtures (400 MHz, CDCl₃, 7.1429 mg/ml, 25°C).

Cinnamaldehyde의 경우는 9.6800(9.6896, 9.6706) ppm으로 나타났고, *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 경우는 9.6300(9.6396, 9.6206) ppm에서 나타나 chemical shift의 차이는 0.0500 ppm 이었고, 특히 *t*-cinnamaldehyde의 가장 저자장 signal은 9.6896 ppm, *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 가장 고자장 signal은 9.6206 ppm으로 서로 간에 0.0690 ppm의 차이가 있을 것으로 나타나, 이번에 사용한 400 MHz NMR spectrometer의 resolution이 0.45 Hz이기 때문에 두 화합물의 aldehyde기 signal의 구별은 충분히 가능할 것으로 예측되었다. 실제로 위 기기를 사용하여 두 화합물의 ¹H-NMR을 측정하였을 때, Fig. 3의 A에서처럼 *t*-cinnamaldehyde의 경우는 9.7174 ppm(9.7078, 9.7270 ppm)에서 관측되었고, *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 경우는 Fig. 3의 B에서처럼 9.6936 ppm(9.6839, 9.7032 ppm)에서 관측되어 chemical shift의 차이는 0.0238 ppm이었고, *t*-cinnamaldehyde의 가장 저자장 signal은 9.7270 ppm, *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 가장 고자장 signal은 9.6839 ppm으로 서로 0.0431 ppm의 차이를 나타내어, 두 화합물의 aldehyde signal은 충분히 구별되는 것으로 나타났다. 두 화합물을 동일 농도 즉 10.0 mg 씩을 합하고 0.7 ml의 농도에 녹여서 측정할 ¹H-NMR의 경우 Fig. 3의 C에서 나타난 것처럼 *t*-cinnamaldehyde의 doublet signal의 고자장부분과 *t*-2-methoxycinnamaldehyde의 저자장 부분이 다소 겹치기는 했지만, 전체 적으로 signal을 확실히 구별할 수 있는 것으로 나타났다.

위의 방법에 따라 계피 중의 *t*-cinnamaldehyde를 정량분석하기 위하여 계피 건조분말을 CHCl₃로 추출, 농축한 후, 농축물 중에서 10 mg을 0.7 ml의 CDCl₃에 녹여서 25°C에서 ¹H-NMR을 측정하였다. Fig. 3의 D에서처럼 aldehyde기의 doublet methine signal이 9.7174 ppm(9.7078, 9.7270 ppm)에서 관측되어 *t*-cinnamaldehyde와 동일한 위치로 판명되었다. 이를 확인하기 위하여 이 추출물 10.0 mg과 *t*-cinnamaldehyde 10.0 mg을 합쳐서 0.7 ml의 CDCl₃에 녹인 후 ¹H-NMR을 측정하였으며 (Fig. 3의 E), 아울러 *t*-2-methoxycinnamaldehyde와도 동일하게 ¹H-NMR을 측정하였다(Fig. 3의 F). 전자의 경우는 1종의 doublet methine signal만이 관측되었고, 후자의 경우는 2개의 doublet methine signal이 관측되어, 계피 추출물에서는 *t*-cinnamaldehyde만이 주로 관측되었고, 다른 성분의 경우는 관측 한도 이하의 농도일 것으로 판명되었다.

최종적으로 계피 건조분말을 추출용매를 *n*-hexane, CHCl₃ 및 EtOAc로 각각 달리하여 추출하였을 때의 분석결과를 조사하고자 하였다. 건조분말 10 g을 3종 용매로 추출하고 농축하였을 때 각각 303.4, 386.7 및 456.7 mg의 추출물이 얻어져, EtOAc 용매로 추출했을 때 가장 높은 수율을 보여 주었다. 얻어진 각 추출물 중에서 각각 10.0 mg을 취하고 0.7 ml의 CDCl₃에 녹여서 25°C에서 ¹H-NMR을 측정하였으며, 얻어진 스펙트럼의 aldehyde signal의 integration 값을 표준곡선($y = 0.5488x + 0.0768$, $r^2 = 1.0000$)과 비교하여 계피 중의 함량을 측정하였다. *n*-Hexane, CHCl₃ 및 EtOAc를 추출용매로 사용하였을 때, 계피 중의 *t*-cinnamaldehyde의 함량은 각각 0.94%, 1.38% 및 1.40%로 나타났다. 추출용매 간에 다소 차이가 나타났는데, *t*-cinnamaldehyde의 용해도의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 문헌에 보고 된 HPLC 분석법을 통한 함량이 부위별로 1.20~3.73%까지로 나타난 것과 비교할 때 정량분석적으로 유효범위에 안에서 나타남을 보였다.⁵⁾ 따라서 이 방법은 계피의 지표성분인 *t*-cinnamaldehyde를 정량분석 하는데 있어서 비교적 간편하고 정확한 방법이라고 판명되었다.

하지만, cinnamaldehyde의 경우는 휘발성이 높은 물질로 주로 GC/MS를 이용해서 분석하게 되는데, GC/MS를 이용하는 경우에도 건조분말을 유기용매로 추출한 후, 추출물을 직접 GC에 주입하게 되므로, ¹H-NMR을 이용하는 방법과 비교할 때, 두 가지 방법 모두 전처리 과정의 간편성은 비슷할 것으로 생각된다. 다만 결과의 재현성이나 정확성에서 어느 방법이 우수한지는 면밀한 반복실험에 의하여 결정할 필요가 있을 것이다.

또한 이 경우에서처럼 cinnamaldehyde는 ¹H-NMR 스펙트럼에서 aldehyde signal이 다른 signal들과 뚜렷하게 구별되어 저자장(9-10 ppm)에서 관측되기 때문에, 다른 signal들과의 중첩에 의한 chemical shift 구분의 어려움이나, integration 값의 계산에 있어서의 오류가 없다. ¹H-NMR 방법을 정량분석에 이용하고자 할 때는, 일반적으로 aldehyde기, phenyl기, acetal의 signal과 같이 비교적 저자장에서 관측되어 고자장 영역의 methine 또는 methylene signal과 중첩되지 않거나, 고자장에서 관측된다고 하더라도 methoxy, acetyl 및 그 외의 singlet methyl기처럼 다른 signal들과 구별하기 쉬운 signal을 주로 이용해야 할 것으로 생각된다. 하지만 모든 화합물의 경우에 이와 같이 유

용한 signal이 존재할 수 있는 것은 아니므로, 중첩하는 signal을 사용하게 될 경우, 이를 개선하기 위한 측정조건의 개발이나, 그 외 값을 보정하게 될 때 보정치의 신뢰도를 높일 수 있는 다양한 방법이 도입되어야 할 것이다.

한편, 이 방법의 전처리 과정의 간편성을 획기적으로 높이기 위해서는 시료를 생체 상태에서 직접 중수소용매로 추출한 후, 이 추출액을 이용하여 바로 $^1\text{H-NMR}$ 을 측정하여야 한다. 이 경우 수분함량이 높은 시료로부터 지표성분을 수율 좋게 직접 추출할 수 있는 중수소용매의 선택이 중요하고, 또한 $^1\text{H-NMR}$ 측정시 수분 suppression을 정교하게 수행할 수 있도록 측정기술을 숙달하여야 한다.

하지만 휘발성이 낮은 극성 물질을 지표성분으로 분석할 경우에는 일반적으로 HPLC를 이용하게 되는데, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하는 방법은 HPLC법에 비해 전처리 과정이 간편하고, 정확도와 감도가 매우 높기 때문에 확실히 장점이 있다. 추후 이러한 특성을 갖는 다양한 시료에 대하여 $^1\text{H-NMR}$ 을 이용한 정량분석법의 확립이 이루어져야 할 것이다.

초 록

계피(계지, *Cinnamomum cassia*)의 주요성분인, *trans*-cinnamaldehyde를 $^1\text{H-NMR}$ 분광법을 이용하여 정량분석하였다. 핵자기 공명법을 이용한 정량분석의 응용가능성을 확인하기 위하여, *t*-cinnamaldehyde의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 시료의 농도와 측정온도를 변화시킴에 따라 chemical shift의 변화와 적분값의 변화를 관찰하였다. *t*-Cinnamaldehyde(7.1429 mg/ml)를 19, 25, 30, 40 및 50°C 하에서 $^1\text{H-NMR}$ 측정된 결과, aldehyde methine signal(doublet)의 chemical shift가 9.7202, 9.7184, 9.7169, 9.7142 및 9.7124 ppm에서 관측되었다. 이는 측정온도는 signal의 chemical shift의 변화에 중요한 변수가 되지 않는다는 것을 의미하였다. 또한, aldehyde signal의 적분값이 1.37(19°C), 1.37(25°C), 1.37(30°C), 1.37(40°C) 및 1.37(50°C)로써, 측정온도가 signal의 적분값에는 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 동일한 온도 25°C에서 0.4464, 0.8929, 1.7857, 3.5714, 7.1429 및 14.286 mg/ml의 농도의 시료에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과, aldehyde기의 chemical shifts는 각각 9.7206, 9.7201, 9.7196, 9.7192, 9.7185 및 9.7174 ppm에서 나타났다. 이는 각 시료의 농도가 증가함에 따라서 aldehyde의 signal이 고자장으로 약간 이동하는 것으로 나타났다. Aldehyde기의 doublet methine signal의 적분값과 각 시료의 농도에 따른 calibration curve는 직선으로 나타났으며, 매우 높은 회귀율($r^2=1.0000$)을 보였다. *t*-Cinnamaldehyde와 aldehyde기를 갖는 물질로써, *C. cassia*의 또 다른 구성성분인 *t*-2-methoxycinnamaldehyde(7.1429 mg/ml CDCl_3 , 25°C)에 대해서, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정된 결과, *t*-cinnamaldehyde는 δ_{H} 9.7174(9.7078, 9.7270)에서 관측되었다. *t*-2-Methoxycinnamaldehyde는 δ_{H} 9.6936(9.6839, 9.7032)에서 관측되었다. 따라서, 두 화합물의 chemical shift의 차이는 resolution 값이 0.45 Hz인 NMR 스펙트럼 상에서 충분히 구분할 수 있을 정도로 나타났다. 위의 방법을 이용하여, 추출용매에 따른 *C. cassia* 내의 *t*-cinnamaldehyde의 함량을 분석한 결과, *n*-hexane,

CHCl_3 및 EtOAc로 추출하였을 때에, 각각 94.2 mg/g(0.94%), 137.6 mg/g(1.38%), 140.1 mg/g(1.40%)으로 결정되었다.

Key words: $^1\text{H-NMR}$, quantitative analysis, *Cinnamomum cassia*, *t*-cinnamaldehyde, *t*-2-methoxycinnamaldehyde

감사의 글

본 연구는 과학기술부 · 한국과학재단 지정 우수연구센터인 경희대학교 식물대사연구센터와 농촌진흥청 바이오그린 21 사업에서 지원하는 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- Berregi, I., Santos, J. I., Campo, G., Miranda, J. I. and Aizpurua, J. M. (2003) Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by ^1H NMR spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **486**, 269-274.
- Berregi, I., Santos, J. I., Campo, G. and Miranda, J. I. (2003) Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by ^1H NMR. *Talanta* **61**, 139-145.
- Košir, I., Kocjančič, M. and Kidrič, J. (1998) Wine analysis by 1D and 2D NMR spectroscopy. *Analisis* **26**, 97-101.
- Li, C-Y, Lin, C-H and Wu, T-S. (2005) Quantitative analysis of camptothecin derivatives in *Northapodytes foetida* using $^1\text{H-NMR}$ method. *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 347-349.
- Ryu, K. S. and Song, B. W. (1980) Quantitative analysis of cinnamic acid and cinnamic aldehyde in cinnamon crude drugs. *Bull. Kyung Hee Pharma. Sci.* **8**, 27-30.
- Jung, B. S. and Shin, M. K. (1990) In *HyangYakDaeSaJun*, Young Lim Sa (3rd ed.), Seoul, p. 452.
- Han, D. S. (2001) In *SaengYakHak*, Dong Myung Sa, Seoul, pp. 110-113.
- Bang, K. H., Rhee, Y. H. and Min, B. S. (1997) Purification and properties of an antifungal component, AF-001, from *Cinnamoni Cortex*. *Korean J. Mycol.* **25**, 348-353.
- Park, K. H., Koh, D. S. and Lim, Y. H. (2001) Anti-allergic compound isolated from *Cinnamomum cassia*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 40-42.
- Kang, S. Y., Kim, T. G., Park, M. S., Han, H. M., Jung, K. K., Kang, J. H., Moon, A. R. and Kim, S. H. (1999) Inhibitory effects of *Eugenia caryophyllate*, *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the replication of HBV in HepG2 2.2.15 cells. *J. Appl. Pharmacol.* **7**, 133-137.
- Ka, H., Park, H. J., Jung, H. J., Choi, J. W., Cho, K. S., Ha, J. and Lee, K. T. (2003) Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer Lett.* **196**, 143-152.
- Sharma, N., Tripathi, P., Athar, M. and Raisuddin, S. (2001) Inhibition of benzo[a]pyrene- and cyclophosphamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutat. Res./Fund. Mol. M.* **480**, 179-188.
- Wang, Y., Zhou, X., Liu, J., Yang, Y., Shi, J. and Wang, M. (2003) HPLC determination of three main components in *Ramulus Cinnamomum*. *Yaowu Fenxi Zazhi* **23**, 128-130.