

HPLC를 이용한 정공등의 다성분 동시함량분석

전혜진 · 유정 · 황완균[#]

중앙대학교 약학대학

(Received August 12, 2013; Revised August 22, 2013; Accepted August 22, 2013)

Simultaneous Quantification Analysis of Multi-components on *Erycibae Caulis* by HPLC

Hye Jin Jeon, Ting Liu and Wan Kyunn Whang[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Koera

Abstract — In this study, we developed and validated the HPLC method using the isolated components from *Erycibae caulis*. Their structures were elucidated by spectroscopic methods including UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FAB-Mass and ESI-Mass as Compound 1 (crypto-chlorogenic acid), Compound 2 (scopolin), Compound 3 (neochlorogenic acid) and Compound 4 (3,4-di-O-caffeoylquinic acid). Major three compounds and scopoletin were decided as representative components of *Erycibae caulis*. We established HPLC analytical method by using the representative components and 20 commercial samples which were collected considering to various cultivated area. The HPLC fingerprinting was successfully achieved with an AKZO NOBEL Kromasil 100-5C18 column. The mobile phase consisted of 0.5% acetic acid in water (A) and methanol (B) using gradient method of 85(A) to 50(A) for 35min. The fingerprints of chromatograms were recorded at an optimized wavelength of 330 nm. This developed analytical method was validated with specificity, selectivity, accuracy and precision. And it is suggested that scopolin, scopoletin, neochlorogenic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid were more than 0.162%, 0.133%, 0.057%, 0.044%, respectively. In addition, principal component analysis (PCA) was performed on the analytical data of 20 different *Erycibae caulis* samples in order to classify samples collected from different regions. We hope that this assay can be readily utilized as quality control method for *Erycibae caulis*.

Keywords □ *Erycibae caulis*, *Erycibe obtusifolia*, components, Convolvulaceae, crypto-chlorogenic acid, scopolin, neochlorogenic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, scopoletin, HPLC, PCA

정공등 *Erycibe obtusifolia* Bentham은 메꽃과(Convolvulaceae)의 덩굴성 식물로서 줄기는 거풍제습(風除濕), 소증지통(消止痛) 등 효능이 있고 류머티스, 반신불수(半身不遂), 부종 등의 치료제로 사용한다.⁴⁾ 또한 염증, 면역조절, 축동(縮瞳), 심혈관, 중추신경계 등²⁾의 질환에 민간약으로도 중국에서 널리 이용되어 왔다.⁵⁻¹¹⁾ 전세계에 약 66종이 분포하며 주로 아시아 지역에 자생하며 일부는 호주에 있다. 중국에는 11종(Table I)³⁾이 존재하며 주로 운남성, 광서성, 광둥성 또는 대만 등지에 분포되어 있다.

현재 정공등은 KHP(대한약전 외 한약규격집),¹⁾ CP(중국약전)에 같이 *Erycibe obtusifolia* Bentham(丁公藤)과 *Erycibe schmidtii* Craib(光葉丁公藤)를 모두 기원으로 기재되어 있지만 JP(일본약전)에서 기재되어 있지 않다.

정공등은 한국에서 재배되지는 않지만 최근 중국에서 정공등을 이용한 항염증, 혈압강하, 항암, 면역기능조절 또는 해열 등 다양한 용도로 사용되고 있어 정공등을 이용한 다양한 제제개발이 진행되고 있다. 또한 주성분으로 scopolin과 scopoletin 등의 성분 함량이 높고 류머티스 관절염의 치료에 효능이 있어 정공등의 수입이 늘어나고 있는 실정이나 한국에서의 정공등의 품질평가에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서는 중국과 우리나라에 수입되는 정공등의 품질평가 방법이 미비함에 착안하여 주성분인 coumarin류와 chlorogenic acid류를 분리하여 기기분석을 실시하여 구조를 규명한 후 검체 20종을 채취하고 이와 함께 HPLC-UV 방법을 이용 다성분 함량분석을 실시하여 정공등의 원료에 대한 다성분 함량분석방법을 개발하는데 그 목적이 있고 나아가 다성분 패턴을 이용 PCA 군집 분석을 통하여 기원종을 구분하는데 그 목적이 있다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5611 (팩스) 02-825-5611
(E-mail) whang-wk@cau.ac.kr

Table I - Species of the genus of *Erycibe* in China

약재명	라틴명	산지
정공등(丁公藤)	<i>Erycibe obtusifolia</i> Benth.	중국 광둥, 광서, 운남등
다화정공등(多花丁公藤)	<i>Erycibe myriantha</i> Merr.	중국 광둥 남부, 해남
분녹정공등(粉綠丁公藤)	<i>Erycibe glaucescens</i> Wall.	중국 운남
광엽정공등(光葉丁公藤)	<i>Erycibe schmidtii</i> Craib	중국 운남 동남부, 광서 서남부, 광둥
요맥정공등(凹脈丁公藤)	<i>Erycibe elliptilimba</i> Merr. et Chun	중국 광둥, 해남
모엽정공등(毛葉丁公藤)	<i>Erycibe hainanensis</i> Merrill	중국 광둥, 해남
소엽정공등(疏葉丁公藤)	<i>Erycibe oligantha</i> Merr. et Chun	중국 광둥, 해남
대만정공등(台灣丁公藤)	<i>Erycibe henryi</i> Prain	중국 대만
수모정공등(綉毛丁公藤)	<i>Erycibe ferruginea</i> C. Y. Wu	중국 운남
요산정공등(瑤山丁公藤)	<i>Erycibe sinii</i> How	중국 광서
추서정공등(錐序丁公藤)	<i>Erycibe subspicata</i> Wall. ex G. Don	중국 운남 남부, 광서

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 정공등(*Erycibe obtusifolia* Benth.)은 중국 호남중의과대학 유향전교수에게 의뢰하여 식물학적 감정을 한 후 분리 실험에 사용하였으며 중국에서 유통되는 검체는 직접 중국에서 20점(중국 유통품)을 수집하여 중앙대학교 약품자원식물학교실에서 기원에 대한 식물학적 감정을 거친 후 사용하였다.

실험기기 및 시약

본 실험에 사용한 기기로는 UV-VIS spectrophotometer (Optizen 2120UV, Korea), FAB-MS(VG 70-VSEQ, England, Source-ionized by 35 keVCs+ ion beam, Matrix-glycerol), ¹H-NMR spectrometer(Varian Gemini 2000, 600 MHz, U.S.A.), ¹³C-NMR spectrometer(Varian Gemini 2000, 125 MHz, U.S.A.) 등을 사용하였고 분석용 기구 및 시약으로는 TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Germany), Diaion-HP 20(Nippon Rensui Co., Japan), Sephadex-LH 20(25~100 μm, Pharmacia, Sweden), MCI gel CHP20P(75~150 μm, Mitsubishi, Japan) 등을 사용하였다. 분석을 위한 HPLC 분석장비는 Waters 600, Waters 2489 detector, Waters 717 plus Autoamplifier와 Column은 AKZO NOBEL. KR-100-5C18(4.6×250 mm, 5 μm), Filter는 Whatman PVDF syringe filter 13 mm 0.45 μm을 사용하였다. 추출 및 분획에 사용된 methanol, ethanol, chloroform, ethyl acetate, butanol의 시약은 Samchun pure chemical(Korea) 제품을 사용하였다.

추출 및 분리

정공등 3 kg에 methanol을 가하여 상온에서 2주일간 3회 추출한 다음 감압 농축하여 엑스를 얻었으며 이 methanol 추출물(340 g)을 증류수에 현탁 시킨 후 chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 진탕 반복추출 후, 분액깔때기에서 분획하여 각각 chloroform, ethyl acetate, butanol, water 분획 34 g, 31 g,

41 g, 209 g을 얻었다. 그 후 물 엑스에 ethyl acetate를 가하여 진탕 반복추출하고 분액깔때기에서 분획하여 ethyl acetate 층과 물층을 분취한 후 이를 감압 농축하여 ethyl acetate 엑스 31 g을 얻었다. 잔사를 포함하여 4개의 분획으로 나눈 후, 아래 Scheme 1의 방법으로 분리하였으며 총 4개의 compound를 순수 분리하였다(Scheme 1).

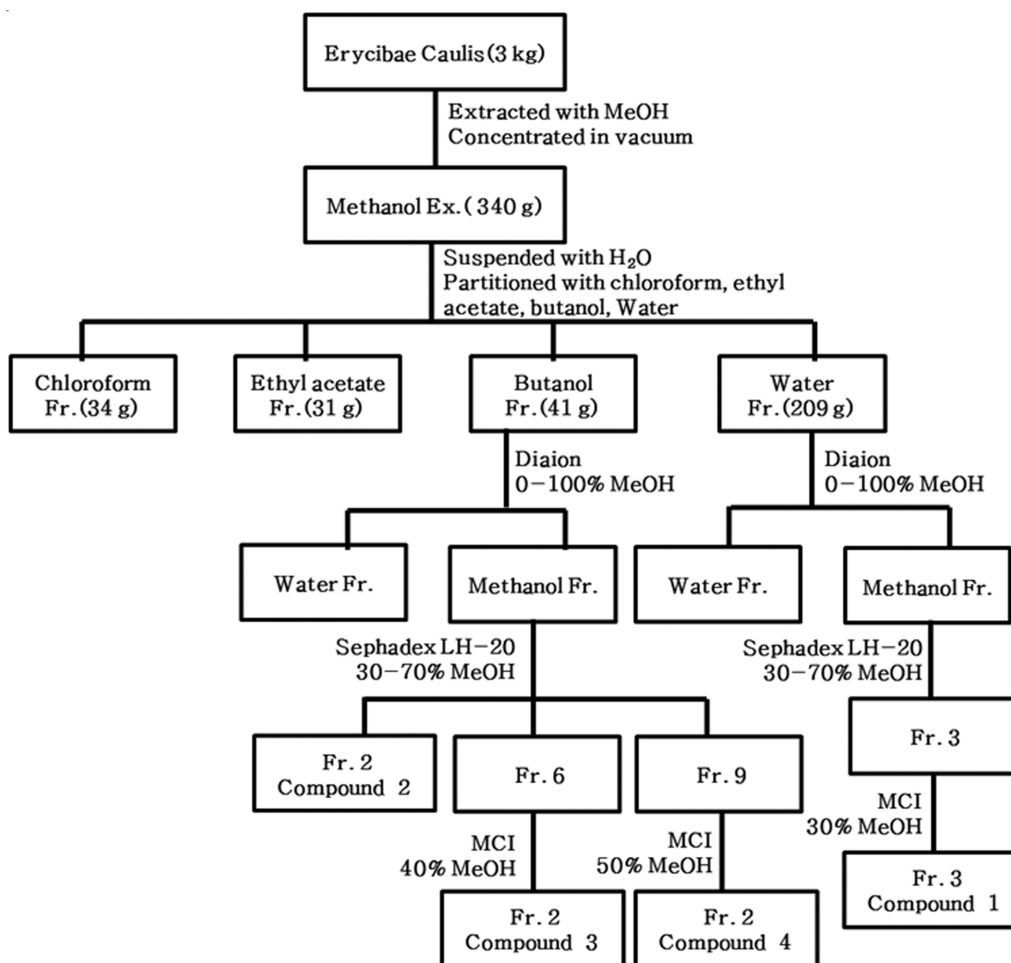
성분의 분리 및 구조 확인

Compound 1-(+) ESI-MS(*m/z*): 356[M]⁺, ¹H-NMR: DMSO-*d*₆, δppm: 7.48(1H, d, *J*=16.2 Hz, H-7'), 7.03(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'), 6.98(1H, dd, *J*=1.8, 2.4 Hz, H-6'), 6.75(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.25(1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8'), 4.65(1H, dd, *J*=2.4, 3 Hz, H-4), 4.08(1H, br s, H-3), 3.98(1H, dd, *J*=8.4 Hz, H-5), 1.98(1H, d, *J*=10.2 Hz, H-2), 1.92(1H, d, *J*=10.8 Hz, H-6), 1.84(1H, d, *J*=8.4 Hz, H-2), 1.82(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-6), ¹³C-NMR: DMSO-*d*₆, δppm.

Compound 2-(+) FAB-MS(*m/z*): 355[M+H]⁺, ¹H-NMR: DMSO-*d*₆, δppm: 7.94(1H, d, *J*=9 Hz, H-4), 7.27(1H, s, H-5), 7.14(1H, s, H-8), 6.30(1H, d, *J*=9.6 Hz, H-3), 5.07(1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1'), 3.80(3H, s, OMe), 3.68(1H, d, *J*=10.2, H-5'), 3.43(2H, m, H-2', 3'), 3.28(1H, m, H-6'), 3.15(1H, m, H-6'), ¹³C-NMR: DMSO-*d*₆, δppm.

Compound 3-(+) ESI-MS(*m/z*): 356[M]⁺, ¹H-NMR: DMSO-*d*₆, δppm: 7.42(1H, d, *J*=16.2 Hz, H-7'), 7.04(1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'), 6.99(1H, dd, *J*=2.4, 1.8 Hz, H-6'), 6.77(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-5'), 6.16(1H, d, *J*=15.6 Hz, H-8'), 5.08(1H, dd, *J*=18.6, 4.2 Hz, H-5), 3.93(1H, br s, H-3), 3.57(1H, d, *J*=6 Hz, H-4), 2.02(2H, m, H-2 and H-6), 1.95(1H, dd, *J*=3, 4.2 Hz, H-6), 1.79(1H, dd, *J*=7.2, 7.8 Hz, H-2), ¹³C-NMR: DMSO-*d*₆, δppm.

Compound 4-(+) ESI-MS(*m/z*): 520[M]⁺, ¹H-NMR: DMSO-*d*₆, δppm: 7.46(2H, dd, *J*=15.6 Hz, H-7', 7''), 7.03(2H, dd, *J*=1.8, 2.4 Hz, H-2', 2''), 6.96(2H, dd, *J*=2.4, 1.8 Hz, H-6', 6''), 6.74(2H, dd, *J*=6.4, 4.2 Hz, H-5', 5''), 6.22(2H, dd, *J*=



Scheme 1 – Extraction and isolation of the Compounds 1~4 from Erycibae Caulis.

16.2 Hz, H-8', 8''), 5.43(1H, dt, $J=18.6, 4.2$ Hz, H-3), 4.93 (1H, dd, $J=3$ Hz, H-4), 4.09(1H, dd, $J=6$ Hz, H-5), 1.95~2.17(4H, m, H-2 and H-6), $^{13}\text{C-NMR}$: DMSO- d_6 , δ ppm.

HPLC 전처리 방법 및 기기분석

SAMPLE 수집 – 본 실험에서 사용한 정공등은 총 20점으로 중국에서 정공등으로 유통되고 있는 것을 수집하여 검체로 사용하였다(Table II).

원생약의 검액조제 – 정공등을 균질하게 분쇄하여 50호 체로 친 후 0.5 g을 정밀히 달아 methanol 10 mL를 넣고 60분간 초음파 추출한 다음 여과 한다. Membrane filter(0.45 μm)로 여액을 여과하고 이중 10 μL 를 취하여 각 검액으로 사용하였다.

표준생약의 조제 – 정공등에서 분리한 compound 2, 3, 4와 scopoletin을 1 mg 정확하게 취하여 methanol 1 mL를 가한 후 단계별로 희석하여 사용하였다.

HPLC 분석조건 – Column은 AKZO NOBEL Kromasil 100-5C $_{18}$ (4.6 \times 250 mm, 5 μm)을 사용하였고, 이동상으로는 methanol

Table II – Sample list for experiments of *Erycibe obtusifolia* Bentham

No.	Origin	Purchased place
1	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangxi, China
2	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangxi, China
3	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangxi, China
4	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangxi, China
5	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangxi, China
6	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangxi, China
7	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangdong, China
8	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangdong, China
9	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangdong, China
10	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Guangdong, China
11	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hunan, China
12	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hunan, China
13	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hunan, China
14	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hunan, China
15	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hunan, China
16	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hunan, China
17	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hubei, China
18	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hubei, China
19	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hubei, China
20	<i>Erycibe obtusifolia</i> Bentham.	Hubei, China

과 0.5% acetic acid를 15:85 → 50:50의 비율로 시작하여 35 분간 용매비율을 변화시켜 사용하였으며, 1.0 ml/min의 유속을 유지하며 UV 330 nm에서 측정하였다.

HPLC를 이용한 분석법 검증(validation) - 정공동에서 분리한 3 가지 주성분을 지표로 하여 HPLC-UV를 이용한 다 성분 동시분석법을 설정하였고 이에 대하여 ICH(International Conference on Harmonization) 가이드라인을 기준으로 분석법 검증을 실시하였다. 각각 농도의 표준액을 반복 측정하여 선택성(specificity), 직선성(linearity), 정량한계(LOQ), 검출한계(LOD), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)¹²⁾을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

가) 특이성(specificity)

분석물질에 대하여 특이적이고 식별성을 가진 방법임을 입증하기 위해 compound 2, 3, 4 및 scopoletin을 혼합하였을 경우 peak가 확실하게 분리되어 나타나는 것으로 특이성을 확인하였다.

나) 직선성(linearity)

1~200 µg/ml의 농도의 compound 2, 3, 4 및 scopoletin의 표준액을 조제하여 각각의 샘플을 확립된 분석법을 이용하여 3회 주입하였다. 이를 이용하여 검량선을 작성하였으며 검량선으로부터 직선식의 상관계수(correlation coefficient)를 구하여 직선성을 확인하였다.

다) 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검량선의 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정한 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다.

$$LOD = 3.3 * \sigma/S^{12)}$$

$$LOQ = 10 * \sigma/S^{12)}$$

(σ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였으며 표준편차(σ)는 정량한계 내에 있는 분석대상물질을 포함한 검체를 사용하여 특이적인 검량선을 작성한 후 y 절편의 표준편차를 표준편차 σ 로서 이용하였다.

라) 정확성(accuracy)

일정농도의 compound 2, 3, 4 및 scopoletin의 표준액을 조제하여 각각의 샘플을 확립된 분석법을 이용하여 3회 주입하였다. 이와 같은 방법으로 실험하여 HPLC 크로마토그램에서 지표 성분과 피크면적의 결과로 회수율과 상대표준편차(RSD%)를 확인하여 정확성을 측정하였다.

마) 정밀성(precision)

(1) 반복성(repeatability)

시험농도의 100%에 해당하는 농도로 compound 2, 3, 4 및 scopoletin의 표준액을 조제하여 분석법의 전 조작을 3회 반복

측정하였다. 이에 따른 결과를 상대표준편차(RSD%)로 확인하였다.

(2) 실험실내 정밀성(intermediate precision)

다른 실험자가 각각 4개의 표준액을 조제한 후 3회 주입하여 실험실 내 정밀성을 측정하였으며 측정된 결과를 피크 면적비의 상대표준편차(RSD%)로 확인하였다.

결 과

물질의 분리 및 동정

Scheme 1와 같이 분획한 후 주성분을 함유하는 Water와 butanol 분획에서 compound 5종을 분리하여 각종기기분석을 이용 확인 동정하였다.

Compound 1 - Compound 1은 무색 결정으로서 silica gel TLC에서 chloroform : methanol : water=25 : 16 : 4로 전개 후 UV lamp(254 nm)에서 비추었을 때 Rf 0.43 부근에서 노란색 반점으로 나타난다. ESI-MS spectrum에서 m/z 356에서 M⁺의 molecular ion peak를 관찰 할 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서 δ 7.03(1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), δ 6.98(1H, dd, J=1.8, 2.4 Hz, H-6')과 δ 6.75(1H, d, J=8.4 Hz, H-5')는 ABX 구조로 나타난 동시에 δ 7.48(1H, d, J=16.2 Hz, H-7)과 δ 6.25(1H, d, J=15.6 Hz, H-8') 같이 AB 구조로 나타나니까 Compound 1에서 존재한 caffeoyl 구조를 확인할 수 있었다.

또는 ¹H-NMR spectrum에서 δ 4.65(1H, dd, J=2.4, 3 Hz, H-4), δ 4.08(1H, br S, H-3)과 δ 3.98(1H, dd, J=8.4 Hz, H-5) 그리고 δ 1.98(1H, d, J=10.2 Hz, H-2), δ 1.92(1H, d, J=10.8 Hz, H-6)과 δ 1.84(1H, d, J=8.4 Hz, H-2), δ 1.82(1H, d, J=7.8 Hz, H-6)부분은 quinic acid가 나타난 ¹H-NMR로 확인할 수 있었다.

이상의 결과와 문헌을 비교하여,^{13,14)} 이 compound를 (1R,3S,4R,5S)-4-((E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-1,3,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid 즉, crypto-chlorogenic acid(C₁₆H₁₈O₉)로 확인 동정하였다.

Compound 2 - Compound 2는 흰색의 결정으로서 silica gel TLC에서 chloroform : methanol : water=90 : 20 : 2 전개 후 UV lamp(365 nm)에서 비추었을 때 Rf 0.30 부근에서 파란색 반점으로 나타난다. Positive FAB-MS spectrum에서 m/z 355에서 M+H의 molecular ion peak를 관찰 하였다.

¹H-NMR에서 δ 7.94(1H, d, J=9 Hz, H-4), δ 6.30(1H, d, J=9.6 Hz, H-3), 또는 2개 방향 신호 δ 7.27(1H, s, H-5)와 δ 7.14(1H, s, H-8) singlet 형태로 나타난다. δ 5.03(1H, d, J=7.2 Hz, H-1)에서는 당과 방향환에 연결된 수소 신호가 나타나고 H-8의 신호가 낮게 나타나니까 당은 H-7 위치에 방향환과 연결된 것을 확인할 수 있다.

이상의 결과와 문헌을 비교하여,^{3,15)} 이 compound를 (β -D-

glucopyranosyloxy)-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one 즉, scopolin으로 확인 동정하였다.

Compound 3 – Compound 3은 백색의 무정형 결정으로 silica gel TLC에서 chloroform : methanol : water=6 : 4 : 1 전개 후 UV lamp(254 nm)로 비추었을 때 Rf 0.31 위치에서 노란색 반점으로 나타난다. ESI-MS spectrum에서 m/z 356에서 M^+ 의 molecular ion peak를 관찰 할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 $\delta 7.04(1\text{H}, d, J=1.8 \text{ Hz}, \text{H-2}')$, $\delta 6.99(1\text{H}, dd, J=1.8, 2.4 \text{ Hz}, \text{H-6}')$ 과 $\delta 6.77(1\text{H}, d, J=8.4 \text{ Hz}, \text{H-5}')$ 는 ABX 구조로 나타난 동시에 $\delta 7.42(1\text{H}, d, J=16.2 \text{ Hz}, \text{H-7}')$ 과 $\delta 6.16(1\text{H}, d, J=15.6 \text{ Hz}, \text{H-8}')$ 같이 AB 구조로 나타나니까 Compound 3에서 존재한 caffeoyl 구조를 확인할 수 있었다.

또는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 $\delta 5.08(1\text{H}, dd, J=18.6, 4.2 \text{ Hz}, \text{H-5})$, $\delta 3.93(1\text{H}, br s, \text{H-3})$ 과 $\delta 3.57(1\text{H}, d, J=6 \text{ Hz}, \text{H-4})$ 그리고 $\delta 2.02(2\text{H}, m, \text{H-2 and H-6})$ 과 $\delta 1.95(1\text{H}, dd, J=3, 4.2 \text{ Hz}, \text{H-6})$, $\delta 1.79(1\text{H}, dd, J=7.2, 7.8 \text{ Hz}, \text{H-2})$ 부분은 quinic acid가 나타난 $^1\text{H-NMR}$ 로 확인할 수 있었다.

이상의 결과와 문헌을 비교하여,¹⁶⁾ 이 compound를 (1R,3S,4R,5S)-5-((E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-1,3,4-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid 즉, neochlorogenic acid($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$)로 확인 동정하였다.

Compound 4 – Compound 4는 백색의 무정형 결정으로 silica gel TLC에서 chloroform : methanol : water=6 : 4 : 1 전개 후 UV lamp(254 nm)로 비추었을 때 Rf 0.31 위치에서 노란색 반점

으로 나타난다. ESI-MS spectrum에서 m/z 520에서 M^+ 의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 $\delta 7.03(2\text{H}, dd, J=1.8, 2.4 \text{ Hz}, \text{H-2}')$, $\delta 6.96(2\text{H}, dd, J=2.4, 1.8 \text{ Hz}, \text{H-6}')$ 과 $\delta 6.74(2\text{H}, dd, J=6.4, 4.2 \text{ Hz}, \text{H-5}')$, $\delta 5'$)는 2개 ABX 구조로 나타난 동시에 $\delta 7.46(2\text{H}, dd, J=15.6 \text{ Hz}, \text{H-7}')$ 과 $\delta 6.22(2\text{H}, dd, J=16.2 \text{ Hz}, \text{H-8}')$ 같이 2개 AB 구조로 나타나니까 Compound 4에서 존재한 2개 caffeoyl 구조를 확인할 수 있었다.

또는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 $\delta 5.43(1\text{H}, dt, J=18.6, 4.2 \text{ Hz}, \text{H-3})$, $\delta 4.93(1\text{H}, dd, J=3 \text{ Hz}, \text{H-4})$ 과 $\delta 4.09(1\text{H}, dd, J=6 \text{ Hz}, \text{H-5})$ 그리고 $\delta 1.95\sim 2.17(4\text{H}, m, \text{H-2 and H-6})$ 부분은 quinic acid가 나타난 $^1\text{H-NMR}$ 로 확인할 수 있었다.

이상의 결과와 문헌을 비교하여,¹⁷⁾ 이 compound를 3,4-di-O-caffeoylquinic acid로 확인 동정하였다(Fig. 1).

정공등에서 주성분으로 분리하여 동시분석 가능한 3개의 compound 2, 3, 4와 scopolin의 가수분해 물질인 scopoletin을 표준물질로 하여 HPLC를 통한 정공등의 분석법 개발 및 함량 모니터링을 실시하였다.

HPLC를 이용한 분석법 검증(validation)

특이성(Specificity) – Compound 2, 3, 4와 scopoletin을 이들 성분의 머무름 시간은 각각 compound 2가 약 15.5 min, compound 3이 약 14.2 min, compound 4가 약 24 min, scopoletin이 약 30.6 min에 명확하게 분리되어 나타나는 것을 확인할 수 있었

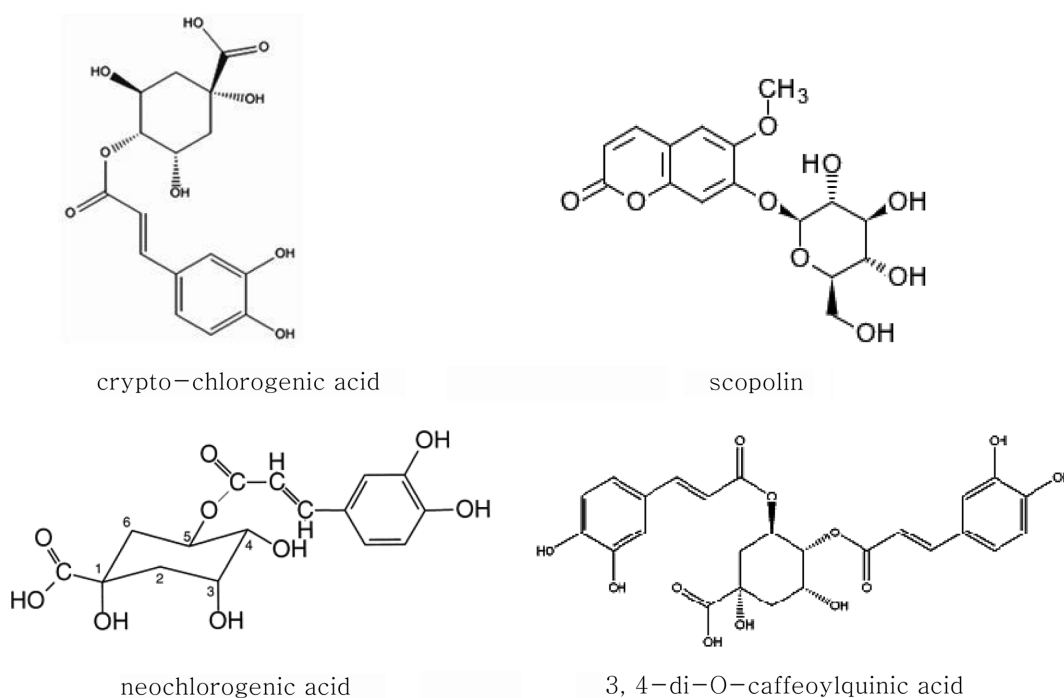


Fig. 1 – Structure of compounds 1~4.

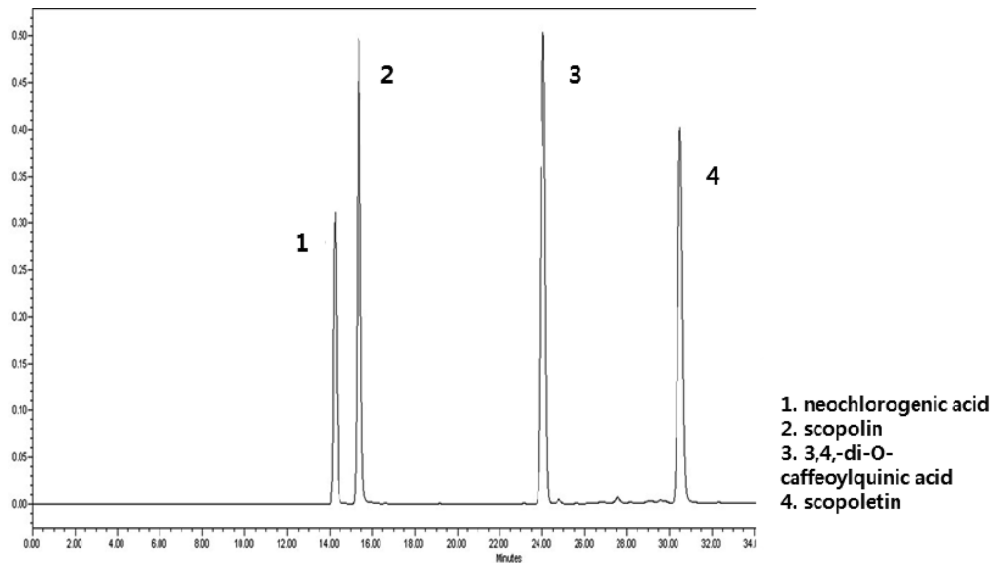


Fig. 2 – HPLC chromatogram of standards.

다(Fig. 2).

직선성(Linearity) – Compound 2, 3, 4와 scopoletin의 표준액을 1~200 $\mu\text{g}/\text{m}$ 의 범위에서 4가지 성분 모두 검량선 상관계수가 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 3, Table III).

검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) – 검출한계와 정량한계는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 앞서 서술한 식에 의하여 결정하였으며 Table IV과 같이 나타내었다.

정확성(accuracy) – 확립된 분석방법의 정확성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 3번 반복 실험하였으며, 3개의 농도를

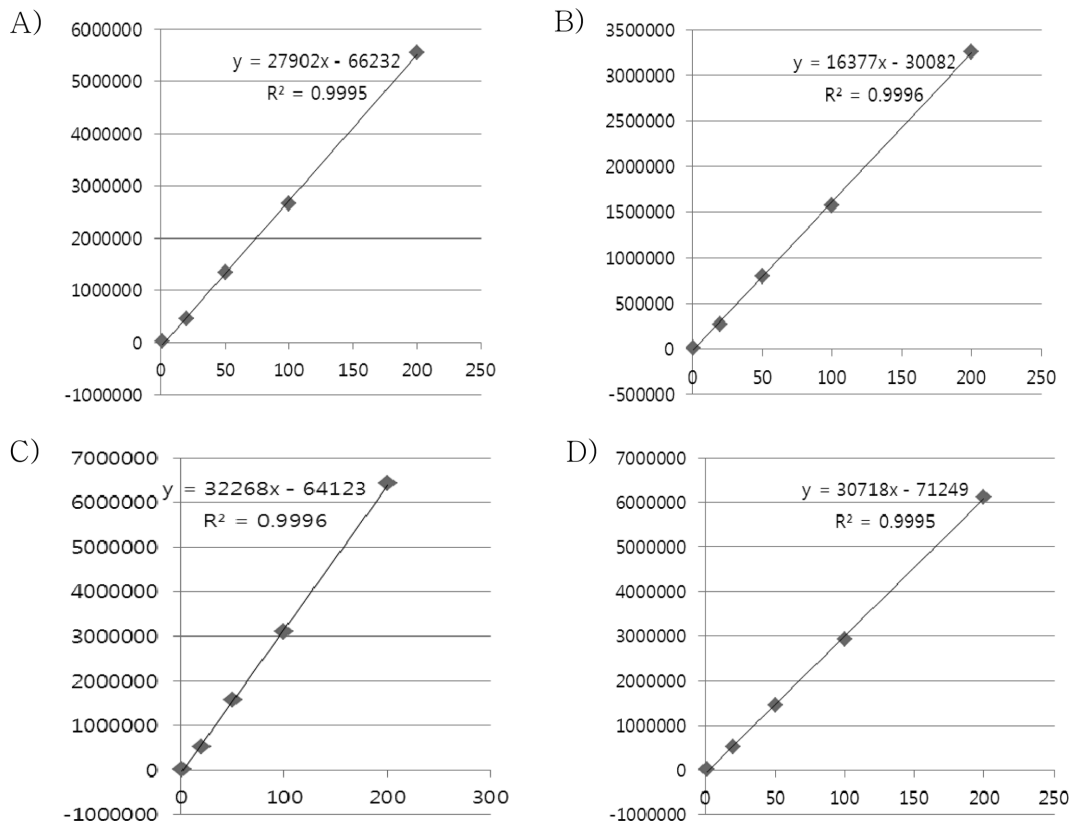


Fig. 3 – Calibration curve of standards. A) scopolin B) neochlorogenic acid C) 3, 4-di-O-caffeoylquinic acid D) scopoletin.

Table III – Calibration graphs and linear ranges

Standard	Linear range (µg/ml)	Slope	Intercept	Correlation coefficient
Scopolin	1~200	27902	-66232	0.9995
Neochlorogenic acid	1~200	16377	-30082	0.9996
3, 4-di-O-caffeoylquinic acid	1~200	32268	-64123	0.9996
Scopoletin	1~200	30718	-71249	0.9995

Table IV – LOD and LOQ of compounds

Standard	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Scopolin	3.82	11.57
Neochlorogenic acid	3.38	10.24
3, 4-di-O-caffeoylquinic acid	4.65	14.08
Scopoletin	1.19	3.62

Table V – Accuracy of compounds

Standard	Fortified conc. (µg/ml)	Observed conc. (µg/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
Scopolin	20	19.06±0.29	95.32	3.10
	50	51.19±0.43	102.99	0.43
	100	99.45±0.18	99.45	1.41
Neochlorogenic acid	20	19.15±0.082	95.77	1.66
	50	51.36±0.16	102.71	0.65
	100	99.5±0.05	99.5	1.05
3, 4-di-O-caffeoylquinic acid	20	18.88±0.15	94.39	1.50
	50	51.79±0.32	103.59	0.53
	100	99.33±0.09	99.33	1.01
Scopoletin	20	21.72±0.34	108.60	2.07
	50	47.25±0.49	94.50	0.82
	100	101.03±0.21	101.03	1.68

Table VI – Repeatability of analytical results

Conc. (µg/ml)	Peak area (mV [*] sce)				
	Scopolin	Neochlorogenic acid	3, 4-di-O-caffeoylquinic acid	Scopoletin	
50	1	1382244	764498	1548492	1447469
	2	1385271	769022	1550415	1456070
	3	1393926	774498	1563674	1471080
Mean		1387080	769339.3	1554194	1458206
SD		5950.995	5007.547	8266.319	11949.59
RSD (%)		0.43	0.65	0.53	0.82

Table VII – Intermediate precision of analytical results

Conc. (µg/ml)	Peak area (mV [*] sce)				
	Scopolin	Neochlorogenic acid	3, 4-di-O-caffeoylquinic acid	Scopoletin	
50	1	1393726	774498	1556405	1471080
	2	1325644	772531	1523456	1452468
	3	1385949	755137	1513151	1444526
Mean		1368440	767388.7	1531004	1456025
SD		37265.56	10655.74	22593.28	13629.61
RSD (%)		2.72	1.39	1.48	0.94

주입하여 검량선에 따라 구해진 값과 참값을 비교한 회수율로 구하였다. 그 값은 compound 2이 95.32~102.99%, compound 3는 95.77~102.71%, compound 4는 94.39~103.59%, scopoletin은 94.50~108.60%의 정확성을 나타내었다. 이를 통하여 분석법의 정확성을 확보하였다(Table V).

정밀성(precision) – 확립된 분석 방법의 반복성을 확인하기 위하여 같은 농도에 대하여 3번 반복실험을 하였으며, 실험실 내 정밀성을 확인하기 위하여 실험자 등을 변경 후 4가지 시료에 대하여 반복실험 하였다.

① 반복성(repeatability)

각 성분피크 면적비의 표준편차를 각 성분피크 면적비의 평균 값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 compound 2는 0.43%의 정밀성을 나타내었고 compound 3은 0.65%, compound 4는 0.53%, scopoletin은 0.82%의 반복성을 나타내었다(Table VI).

② 실험실내 정밀성(repeatability)

측정한 결과를 피크면적비의 상대표준편차로서 나타내었으며 전체적으로 3% 이내의 비교적 만족스러운 정밀성을 보이고 있으므로 이를 통하여 분석법의 정밀성을 확보하였다(Table VII).

확립된 분석법을 통한 정공등의 함량 모니터링

지역별로 수집한 20개의 시료를 검증된 분석법을 이용하여 HPLC 함량 모니터링을 실시하였다(Fig. 4, Table VIII).

HPLC를 이용한 모니터링 결과, 정공등은 수집한 샘플 모두에서 유사한 패턴을 보였으며, 평균적으로 scopolin 0.25±0.062%, scopoletin 0.2±0.068%, neochlorogenic acid 0.102±0.062%, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid 0.073±0.042%를 함유하고 있는 것

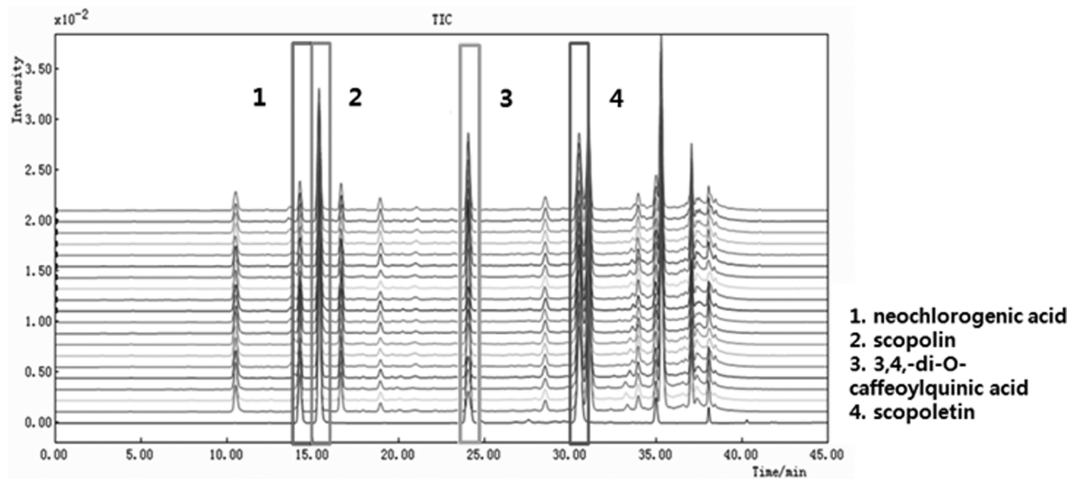


Fig. 4 – HPLC chromatograms of *Erycibe obtusifolia* Benth.

Table VIII – Contents from *Erycibe obtusifolia* Benth. (%)

No.	Scopolin	Neochlorogenic acid	3, 4-di-O-caffeoylquinic acid	Scopoletin
1	0.173	0.064	0.107	0.138
2	0.173	0.066	0.107	0.140
3	0.188	0.070	0.109	0.152
4	0.205	0.075	0.115	0.164
5	0.162	0.064	0.104	0.133
6	0.186	0.072	0.113	0.152
7	0.222	0.060	0.068	0.157
8	0.216	0.057	0.071	0.150
9	0.272	0.072	0.083	0.186
10	0.263	0.070	0.086	0.179
11	0.307	0.137	0.051	0.239
12	0.293	0.133	0.050	0.226
13	0.301	0.134	0.050	0.234
14	0.320	0.100	0.053	0.251
15	0.346	0.156	0.058	0.268
16	0.317	0.141	0.053	0.249
17	0.309	0.147	0.048	0.249
18	0.294	0.146	0.046	0.237
19	0.334	0.164	0.052	0.266
20	0.277	0.121	0.044	0.218
Mean	0.258	0.103	0.073	0.199
SD	0.061	0.039	0.027	0.048
RSD (%)	23.6	37.86	36.99	24.12

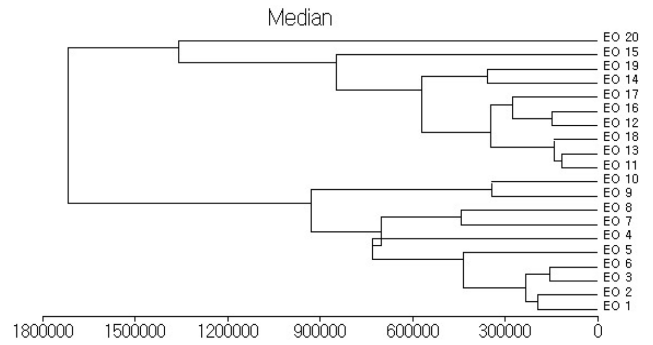


Fig. 5 – Cluster analysis graph of 20 *Erycibe obtusifolia* samples.

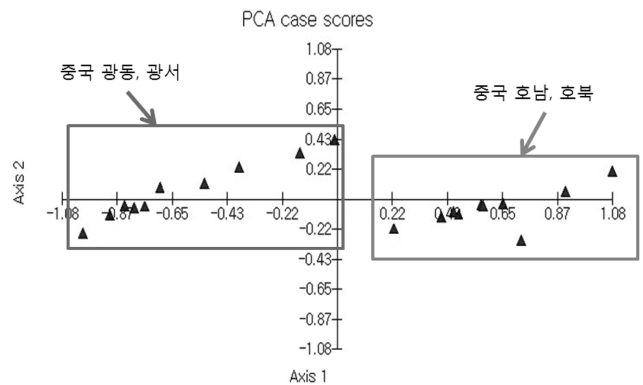


Fig. 6 – Principal component analysis 2D-plotting of 20 *Erycibe obtusifolia* samples.

을 확인할 수 있었다(Table VIII).

PCA를 이용한 군집분석

HPLC/UV를 이용한 함량분석에서 정공둥의 지표물질 5가지를 포함한 주변 피크들을 포함하여 총 10개 피크의 면적을 변수로 하여 군집 분석(cluster analysis)과 주성분 분석(principal component analysis)에 적용하여 패턴분석을 하였다. 군집 분석과 주성분 분석에는 Kovach Computery Services사의 Multi-

Variate Statistical Package(Version 3.13p) 프로그램을 사용하였고, 총 20개 정공둥의 4종의 지표물질 면적을 변수로 하여 군집 분석을 실시하였다(Fig. 5, 6).

그 결과, 정공둥은 지역별로 시판되고 있는 유통품은 함유된 성분이 비슷하지만 각 성분함량이 차이를 보였으며, 중국 호남, 호북성 그리고 광둥, 광서성 지역의 것이 4종의 함량기준을 이

용한 군집 분석을 통하여 확인할 수 있었다.

결 론

정공등(丁公藤)은 한국에서 재배되지는 않지만 최근 중국에서 정공등을 이용한 항염증, 혈압강하, 항암, 면역기능조절 또는 해열등 다양한 용도로 사용되고 있어 정공등을 이용한 다양한 제재개발이 진행되고 있다. 또한 주성분으로 scopolin과 scopoletin 등의 성분 함량이 높고 류머티스 관절염의 치료에 효능이 있어 정공등의 수입이 늘어나고 있는 실정이나 한국에서의 정공등의 품질평가에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서는 중국과 우리나라에 수입되는 정공등의 품질평가 방법이 미비함에 착안하여 주성분인 coumarin류와 chlorogenic acid류를 분리하여 기기분석을 실시하여 구조를 규명한 후 검체 20종을 채취하고 이와 함께 HPLC-UV 방법을 이용 다성분 함량분석을 실시하여 정공등의 원료에 대한 다성분 함량분석방법을 개발하는데 그 목적이 있고 나아가 다성분 패턴을 이용 PCA 군집 분석을 통하여 기원종을 구분하는데 그 목적이 있다.

먼저 천연물화학적 방법으로 methanol로 추출하고, 주성분이 함유되어 있는 butanol과 water 분획을 column chromatography를 실시하고 4종 coumarin 성분과 chlorogenic acid 성분을 분리하였다.

각종 기기분석($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FAB-Mass, ESI-Mass)을 통하여 compound 1은 (1R,3S,4R,5S)-4-((E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-1,3,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid인 crypto-chlorogenic acid($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$)로, compound 2는 7-(β -D-glucopyranosyloxy)-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one 인 scopolin($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$), compound 3은 (1R,3S,4R,5S)-5-((E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-1,3,4-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid인 neochlorogenic acid($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$)으로, Compound 4는 3,4-di-O-caffeoylquinic acid로 확인 동정하였다. 분리된 compound 2, 3, 4와 scopolin의 가수분해물인 scopoletin을 지표 성분으로 설정하여 HPLC 분석조건을 확립하였다.

ICH 가이드라인을 기준으로 분석법 검증 실시하여 단계별로 희석한 표준액을 반복측정하여 선택성(specificity), 직선성(linearity), 정량한계(LOQ), 검출한계(LOD), 정확성(accuracy), 및 정밀성(precision)을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

이상의 가이드라인을 바탕으로 HPLC를 이용하여 국내 및 중국에서 유통되고 있는 정공등 20종에 대한 함량평가를 실시한 결과 전체 시료에서 scopolin $0.25 \pm 0.062\%$, scopoletin $0.2 \pm 0.068\%$, neochlorogenic acid $0.102 \pm 0.062\%$, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid $0.073 \pm 0.042\%$ 를 함유하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 HPLC를 이용한 함량평가 결과를 이용한 다변량분석(PCA)을 통하여 중간 또는 지역별 유사성 실험을 실시하였으며 그 결과 지역별로 시판되고 있는 정공등 유통품은 함유된 성분이 패턴은 비슷하지만 각 성분함량에서 큰 차이를 보이고 있어 산지를 확인하는데 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 중국 뿐만 아니라 우리나라에 수입 유통되는 정공등에 대하여 주성분인 scopolin, scopoletin, neochlorogenic acid 및 3,4-di-O-caffeoylquinic acid등 4종을 이용 다성분 함량 품질 평가 방법을 개발하였으며 또한 PCA군집 분석을 통하여 유통품의 주산지를 확인 할 수 있어서 앞으로 정공등을 이용한 의약품 및 기능성 식품개발에 기초자료로서 제공 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) 식품의약품안전청 : 대한약전외한약(생약)규격집수제생약(KHP).
- 2) 상해과학기술출판사 : 중화본초 제6권, 506 (1999).
- 3) Liu Jian : Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Erycibe Obtusifolia* Benth. Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, PR China (2007.9).
- 4) 북경학원출판사 : 중약 현대연구 및 응용(Modern study and application of material medica) 5477 (1999).
- 5) Silván, A. M., Abad, M. J., Bermejo, P., Sollhuber, M. and Villar, A. : Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *J. Nat. Prod.* **59**, 1183 (1996).
- 6) Silván, A. M., Abad, M. J., Bermejo, P. and Villar, A. : Effects of compounds extracted from *Santolina oblongifolia* on TXB (2) release in human platelets. *Inflammopharmacol.* **6**, 255 (1998).
- 7) Li, Y., Dai, Y., Liu, M., Pan, R., Luo, Y. B., Xia, Y. F. and Xia X. F. : Scopoletin induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes from adjuvant arthritis rats by a mitochondrial-dependent pathway. *Drug Develop. Res.* **70**, 378 (2009).
- 8) Kim, H. J., Jang, S. I., Kim, Y. J., Chung, H. T., Yun, Y. G., Kang, T. H., Jeong, O. S. and Kim, Y. C. : Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE2 from from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia.* **75**, 261 (2004).
- 9) Pan, R., Dai, Y., Gao, X. H. and Xia, Y. : Scopolin isolated from *Erycibe obtusifolia* benth stems suppresses adjuvant-induced rat arthritis by inhibiting inflammation and angiogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 859 (2009).
- 10) Liu, X. L., Zhang, L., Fu, X. L., Chen, K. and Qian, B. C. : Effects of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. *Acta. Pharmacol. Sin.* **22**, 929 (2001).
- 11) Kim, E. K., Kwon, K. B., Shin, B. C., Seo, E. A., Lee, Y. R., Kim, J. S., Park, J. W., Park, B. H. and Ryu, D. G. : Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells,

- accompanied by activations of nuclear factor BNF-Kb and caspase-3. *Life Sci.* **77**, 824 (2005).
- 12) 식품의약품안전청 의약품평가부 : 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인. 식품의약품안전청 1 (2004)
- 13) Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Ling, S. K., Tan, S. P., Lim, K. K. and Khoo, M. G. H. : Caffeoylquinic acids from leaves of *Etilingera* species (Zingiberaceae). *Food Science and Technology* **42**, 1026 (2009).
- 14) Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K. and Mitani, T. : Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5512 (2000).
- 15) Teh, C. H., Morita, H., Osamu, C. and Kit-Lam : 2,3-Dehydro-4 α -hydroxylogilactone, a novel quassinoid and two known phenyl propanoids from *Eurycoma longifolia* Jack. *Food Chem.* **120**, 794 (2010).
- 16) Tolonen, A., Joutsamo, T., Mattila, S., Kamarainen, T. and Jalonen, J. : Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and 1H-NMR methods. *Phytochem. Anal.* **13**, 316 (2002).
- 17) Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. and Namba, T. : Four Di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 1479 (1996).