

썸바귀, 질경이, 소리쟁이 에탄올 추출 혼합물에 대한 주요 성분 동시 분석

김가람^{1#} · 김은남^{1#} · 비라수렌 바야르마² · 민연홍² · 정길생^{1*}

¹계명대학교 약학대학, ²탑월드(주)

Simultaneous Quantitative Analysis of Mixtures of *Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev, *Plantago asiatica* L. and *Rumex crispus* L. Ethanol Extracts

Ga-Ram Kim^{1#}, Eun-Nam Kim^{1#}, Bayarmaa Birasuren², Yeonhong Min², and Gil-Saeng Jeong^{1*}

¹College of Pharmacy, Keimyung University, Daegu, Dalgubeol-daero 1095, (42601), Korea

²Topworld, Chungbuk, Cheongju-si, Osong-eup, Osong-Saengmyeong-1-ro, 194-41, Chungbuk C&V Center, (28160), Korea

Abstract – Recently, consume for functional cosmetics containing natural products has been greatly increased. In order to develop it as a natural cosmetic material, we selected *Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev, *Plantago asiatica* L. and *Rumex crispus* L. that have antioxidant and anti-inflammatory effects. In this study, simultaneous quantitative analysis of the isolated compounds and natural product complexes (Mix.) were validated using high performance liquid chromatography (HPLC). The isolated six compounds were shown in a large linearity with a correlation coefficient (R^2) of 0.99. The limit of detection (LOD) of chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin chrysophanol and physcion were 0.36 $\mu\text{g/mL}$, 0.36 $\mu\text{g/mL}$, 0.37 $\mu\text{g/mL}$, 0.30 $\mu\text{g/mL}$, 0.22 $\mu\text{g/mL}$ and 0.12 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The limit of quantification (LOQ) of chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin chrysophanol and physcion were 1.10 $\mu\text{g/mL}$, 1.08 $\mu\text{g/mL}$, 1.12 $\mu\text{g/mL}$, 0.99 $\mu\text{g/mL}$, 0.66 $\mu\text{g/mL}$ and 0.35 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Content analysis showed chlorogenic acid ($0.19 \pm 0.02\%$), plantamajoside ($0.48 \pm 0.01\%$), acteoside ($0.65 \pm 0.01\%$), emodin ($1.15 \pm 0.11\%$), chrysophanol ($0.73 \pm 0.01\%$) and physcion ($0.69 \pm 0.09\%$). Therefore, the results of this study may provide for basic data of standardization research natural cosmetic material development on the *I. dentatum*, *P. asiatica* and *R. crispus*.

Keywords – HPLC, Quantitative, *Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev, *Plantago asiatica* L., *Rumex crispus* L.

오늘날의 화장품은 한국, 일본, 중국을 중심으로 천연물 소재 제품들이 주로 개발되고 있으며,¹⁾ 최근 소비자들의 수요가 증가하고 있어 천연 화장품 시장이 성장하는 추세이다.²⁾ 천연물은 수 많은 단일 유효성분이 모인 혼합물로 함께 존재하는 성분들에 의해 상승(上昇), 상가(相加), 길항(拮抗) 효과가 나타나는데,³⁾ 실제로도 천연물의 항산화, 항염증, 미백 등의 효과가 사람 피부에 효과가 있다고 보고된 바 있다.⁴⁾ 하지만 천연물 소재 기능성 화장품의 경우 유효성분의 함량을 알 수 없어 제품의 기능성에 대한 문제가 꾸준히 제기되고 있다.²⁾ 본 연구에서는 천연 화장품 소재로 개발하

기 위해 여러 천연물들 중에서 항산화 및 항염증 효과를 가지는 썸바귀, 질경이, 소리쟁이를 선정하였다.

썸바귀(*Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev)는 국화과(Asteraceae)에 속하는 식물로, 동아시아에 널리 분포되어 있다.⁵⁾ 한방에서 고채(苦菜)라고도 불리고 해열, 진정, 최면, 건위, 소화불량, 폐렴 등에 사용되어 왔으며, 오늘날에는 항염증, 항알레르기, 항암, 항산화 및 구강건조증 개선 등의 효과에 대해 연구되었다.⁶⁻¹⁰⁾ 썸바귀에는 aliphatics, triterpenoids, cynaroside, sesquiterpene glycosides류의 화합물이 다량 함유되어 있다.¹¹⁾

질경이(*Plantago asiatica* L.)는 질경이과(Plantaginaceae)에 속하며, 썸바귀와 같이 동아시아에서 널리 재배되고 있다.¹²⁾ 차전초(車前草)라고도 알려져 있으며, 예로부터 중국

#These two authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): gsjeong@kmu.ac.kr

(Tel): +82-53-580-6649

과 일본에서는 이노제나 천식, 염증 치료에 사용하였다.¹³⁾ 또한, 질경이는 항산화 및 미백효과, 면역조절, 항염증, 부종억제 효과 등이 있으며,¹⁴⁻¹⁷⁾ phenylethanoid glycosides, phenolics, polysaccharides 등의 화합물이 다량 함유되어 있어 많은 연구가 진행되어 있다.¹⁸⁾

소리쟁이(*Rumex crispus* L.)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하며, 습지에서 잘 자라는 식물로 전 세계에 분포되어 있다.^{19,20)} 소리쟁이의 종자를 양재인(羊蹄仁)이라고도 부르며, 피부병, 방광염, 비장질환 등 여러 종류의 보조치료제로 사용될 뿐만 아니라 또한 황달, 기능성 자궁출혈, 토혈 등에도 사용되어왔다.²¹⁾ 소리쟁이의 뿌리는 양재근(羊蹄根) 또는 우이대황(牛耳大黃)이라 하고, 버짐과 같은 피부병 치료에 사용되어왔다.²²⁾ 최근에는 항염증, 항비만, 항암, 항균 및 항산화 등 다양한 효과가 밝혀졌으며,²³⁻²⁶⁾ emodin, chrysophanol과 같은 anthraquinone 유도체가 다량 함유되어 있다.²⁴⁾

썩바귀, 질경이, 소리쟁이 3종의 추출물에 대해서 이미 다양한 연구가 진행되어 있으며 3종 모두 화장품 소재로의 개발 가능성이 제기된다. 본 연구에서는 썩바귀, 질경이, 소리쟁이로부터 얻어진 3종의 추출물을 혼합하여 천연화장품의 소재로 개발하기 위해 HPLC를 이용한 동시분석법으로 썩바귀, 질경이, 소리쟁이로부터 분리된 6종 화합물(썩바귀-chlorogenic acid; 질경이-plantamajoside, acteoside; 소리쟁이-emodin, chrysophanol, physcion)의 함량을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 썩바귀, 질경이, 소리쟁이는 주식회사 탑월드로부터 제공받았으며, 계명대학교 정길생 교수가 동정하였다. 표본은 계명대학교 약학대학 생약학연구실에 보관하였다(썩바귀, KMU-2020-0630-1; 질경이, KMU-2020-0630-2; 소리쟁이, KMU-2020-0630-3).

기기 및 시약 – 본 실험에서 지표물질 추출을 위해 사용된 ethanol은 대정화금(Siheung, Korea)사 제품을 사용하였다. 함량분석을 위해 Shimadzu(Tokyo, Japan)사의 HPLC-UV system을 사용하였으며, 컬럼은 Phenomenex(Torrance, CA, USA)사의 C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피에 사용한 충전제는 Merk(NJ, USA)사의 70-230 mesh silica gel을 사용하였다. 구조 동정을 위해 NMR(nuclear magnetic resonance) spectrum은 Jeol(Tokyo, Japan)사의 JNM-ECZ500S 모델을 사용하였다. NMR 용매 CD₃OD, DMSO-*d*₆, CDCl₃는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 화합물의 분자량은 Agilent 6120 series ESI-MS(Electrospray ionization mass spectrometry)를 사용하여 측정하였다.

지표성분 분리 – 건조된 썩바귀(25.40 g), 질경이(19.37 g), 소리쟁이(72.30 g)를 각각 ethanol로 65°C에서 3시간동안 열

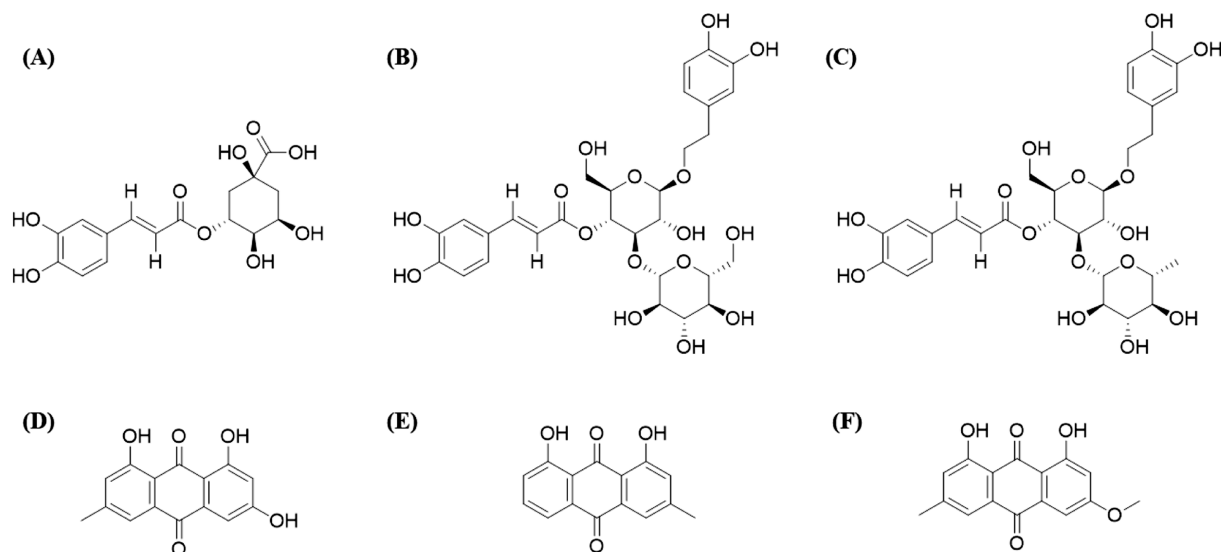
수 추출 후 여과 및 감압 농축을 하여 썩바귀(21.39 g), 질경이(4.38 g), 소리쟁이(12.21 g)의 ethanol 추출물을 얻었다. 그 후 3종의 화합물에 대한 ethanol 추출물을 각각 증류수로 현탁시켜 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate로 계통 분획하였다. 썩바귀 *n*-hexane 분획 1.81 g에 대해 CHCl₃:MeOH (5:1-1:1) 용매조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획(A1~9)을 얻었다. 소분획 A6에 대해 Sephadex LH-20(MeOH:H₂O=1:1)을 이용하여 17개의 분획(A6-1~17)을 얻었고, 그 중 A6-8로부터 chlorogenic acid (6.51 mg)을 얻었다. 질경이 EtOAc 분획 1.03 g에 대해 CHCl₃:EtOH(100:0-10:90) 용매조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획(B1~8)을 얻었으며, 소분획 B2에 대해 Sephadex LH-20(CHCl₃:EtOH100:0-80:20)을 이용하여 7개의 분획(B2-1~7)을 얻었다. 그 중 B2-2에서 Sephadex LH-20(EtOH:H₂O=90:0-70:30)을 이용하여 plantamajoside(7.81 mg)를 얻었으며, 소분획 B2-5에서 acteoside (6.90 mg)을 얻었다. 소리쟁이 CHCl₃ 분획물 3.46 g을 CHCl₃:MeOH(99:1-1:1) 용매조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획(C1~15)을 얻었다. 그중 소분획 C7을 CHCl₃:Acetone(4:1) 용매조건으로 silica gel column을 실시하여 10개의 소분획(C7-1~10)을 얻었으며, 소분획 C7-3을 *n*-hexane:ether(49:1-1:1) 용매조건으로 silica gel column을 실시하여 emodin(14.5 mg)을 얻었고 C7-4에서 physcion(3.82 mg)을 얻었다. 소리쟁이의 *n*-hexane 분획 1.63 g을 *n*-hexane:Acetone:MeOH(70:9:1-50:9:1) 용매조건으로 silica gel column을 실시하여 소분획 D1~9를 얻었으며, 소분획 D6을 *n*-hexane:EtOAc(3:1) 용매조건으로 silica gel column을 실시하여 8개의 분획을(D6-1~8) 얻었다. 그중 소분획(C1-3)에 대하여 Sephadex LH-20(EtOH:H₂O=90:0-10:90)를 이용하여 chrysophanol(7.10 mg)을 얻었다.

Chlorogenic Acid – White powder; ESI-MS: *m/z* 353.2 [M-H]⁻ (C₁₆H₁₈O₉), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.49 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-7'), 7.02 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H-2', 2''), 6.92 (1H, dd, *J*=2.1, 8.2 Hz, H-6', 6''), 6.74 (1H, d, *J*=8.2 Hz H-5', 5''), 6.22 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-8), 5.28 (1H, ddd, *J*=4.5, 9.4, 9.4 Hz, H-5), 4.10 (1H, ddd, *J*=1.8, 4.9, 4.9 Hz, H-3), 3.66 (1H, dd, *J*=3.1, 8.8 Hz, H-4), 2.02-2.22 (2H, m, H-2, 6). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 175.7 (C-7), 167.3 (C-9'), 148.3 (C-4'), 145.7 (C-7''), 145.5 (C-3'), 126.4 (C-1'), 121.7 (C-6'), 115.1 (C-5'), 113.9 (C-2', 8'), 74.7 (C-1), 72.0 (C-4), 70.6 (C-5), 69.9 (C-3), 37.4 (C-6), 36.9 (C-2).

Plantamajoside – Yellow amorphous powder; ESI-MS: *m/z* 639.3 [M-H]⁻ (C₂₉H₃₆O₁₆), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.58 (1H, d, *J*=15.9 Hz, H-7'''), 7.08 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2'''), 6.97 (1H, dd, *J*=1.9, 8.2 Hz, H-6'''),

Table I. HPLC conditions for quantitative analysis

Parameters	Conditions																							
Analytical column	Phenomenex C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)																							
HPLC	Shimadzu HPLC system																							
Detector	Diode Array detector (290 nm)																							
Solvent	Solvent A: 0.1% formic acid in water Solvent B: Acetonitrile																							
	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Final time (min)</th> <th colspan="2">Solvent</th> </tr> <tr> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Final time (min)	Solvent		A (%)	B (%)	0	90	10	15	80	20	25	80	20	40	20	80	45	90	10	50	90	10
Final time (min)	Solvent																							
	A (%)	B (%)																						
0	90	10																						
15	80	20																						
25	80	20																						
40	20	80																						
45	90	10																						
50	90	10																						
Flow rate	1.0 mL/min																							
Column oven temperature	30°C																							
Injection volume	10 μl																							
Run time	50 min																							

**Fig. 1.** Structures of chlorogenic acid (A), plantamajoside (B), acteoside (C), emodin (D), chrysophanol (E) and physcion (F).

6.77 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'''), 6.70 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-2), 6.67 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.55 (1H, dd, $J=1.9, 8.0$ Hz, H-6), 6.31 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8'''), 4.97 (1H, t, $J=9.3$ Hz, H-4'), 4.52 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1'''), 4.40 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.03 (1H, m, H-8a), 3.93 (1H, t, $J=9.3$ Hz, H-3'), 3.71 (1H, m, H-8b), 3.65 (1H, m, H-6'a), 3.61 (1H, m, H-6'a), 3.55 (1H, m, H-5'), 3.52 (1H, m, H-6'), 3.49 (1H, m, H-6''b), 3.47 (1H, m, H-2'), 3.30

(1H, m, H-3''), 3.22 (1H, t, $J=9.2$ Hz, H-4''), 3.18 (1H, m, H-5''), 3.12 (1H, m, H-2''), 2.79 (2H, m, H-7). ^{13}C -NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 167.2 (C-9'''), 148.4 (C-5'''), 146.1 (C-7'''), 145.5 (C-4'''), 144.8 (C-3), 143.3 (C-4), 130.0 (C-1), 126.3 (C-1'''), 121.8 (C-2'''), 119.9 (C-6), 115.8 (C-5), 115.2 (C-2), 114.9 (C-3'''), 113.9 (C-8'''), 113.8 (C-6'''), 104.4 (C-1''), 102.7 (C-1'). 82.8 (C-3''), 76.6 (C-5''), 76.3 (C-3''), 74.7 (C-2''), 74.5 (C-5'), 73.7

(C-2'), 70.9 (C-7), 69.9 (C-4''), 69.5 (C-4'), 61.0 (C-6'), 60.9 (C-6), 35.2 (C-8).

Acteoside – Yellow amorphous powder; ESI-MS: m/z 623.3 [M-H]⁻ (C₂₉H₃₆O₁₅), ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 7.58 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-7'''), 7.03 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-2'''), 6.93 (1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-6'''), 6.76 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'''), 6.67 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 6.66 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.55 (1H, dd, $J=2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.27 (1H, d, $J=15.6$ Hz, H-8'''), 5.16 (1H, brs, H-1''), 4.36 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 4.03 (1H, m, H- α), 2.77 (2H, m, H₂- α), 1.07 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-6). ¹³C-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 166.9 (C-9'''), 148.5 (C-4'''), 146.7 (C-7'''), 145.5 (C-3'''), 144.8 (C-3), 143.3 (C-4), 130.1 (C-1), 126.3 (C-1'''), 121.9 (C-6'''), 119.9 (C-6), 115.8 (C-2), 115.1 (C-5), 114.9 (C-5'''), 113.8 (C-2'''), 113.3 (C-8'''), 102.9 (C-1'), 101.7 (C-1''). 80.3 (C-3'), 74.9 (C-5'), 74.7 (C-2'), 72.4 (C-4'), 71.0 (C-3'), 70.9 (C-8), 70.7 (C-2''), 69.2 (C-5'''), 69.1 (C-4'), 61.0 (C-6'), 35.2 (C-7), 17.1 (C-6'').

Emodin – Yellow powder; ESI-MS: m/z 269.1 [M-H]⁻ (C₁₅H₁₀O₅), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.07 (1H, s, -OH), 11.93 (1H, s, -OH), 11.40 (1H, br s, -OH), 7.39 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-4), 7.18 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-2), 7.10 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-5), 6.55 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-7), 2.38 (3H, s, -CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 190.2 (C-9), 181.8 (C-10), 166.1 (C-8), 164.9 (C-1), 161.9 (C-6), 148.7 (C-3), 135.5 (C-10a), 133.2 (C-4a), 124.6 (C-4), 121.0 (C-2), 113.8 (C-9a), 109.4 (C-5), 109.3 (C-8a), 108.4 (C-7), 22.0 (-CH₃).

Chrysophanol – Yellow powder; ESI-MS: m/z 253.2 [M-H]⁻ (C₁₅H₁₀O₄), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 11.92 (1H, s, -OH), 11.84 (1H, s, -OH), 7.78 (1H, dd, $J=8.4, 7.6$ Hz, H-6), 7.68 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5), 7.51 (1H, d, $J=0.8$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7), 7.27 (1H, d, $J=0.8$ Hz, H-2), 2.46 (3H, s, -CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 192.2 (C-9), 182.0 (C-10), 162.1 (C-8), 161.8 (C-1), 149.7 (C-3), 137.9 (C-6), 133.8 (C-10a), 133.5 (C-4a), 124.9 (C-2), 124.6 (C-7), 121.1 (C-4), 119.9 (C-5), 116.4 (C-8a), 114.3 (C-9a), 22.2 (-CH₃).

Physcion – Yellow powder; ESI-MS: m/z 283.1 [M-H]⁻ (C₁₆H₁₂O₅), ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.33 (1H, s, -OH), 12.13 (1H, s, -OH), 7.61 (1H, br s, H-4), 7.35 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-5), 7.07 (1H, br s, H-2), 6.67 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-7), 3.95 (3H, s, -OCH₃), 2.44 (3H, s, -CH₃). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 190.9 (C-9), 182.1 (C-10), 166.6 (C-8), 165.3 (C-1), 162.6 (C-6), 148.5 (C-

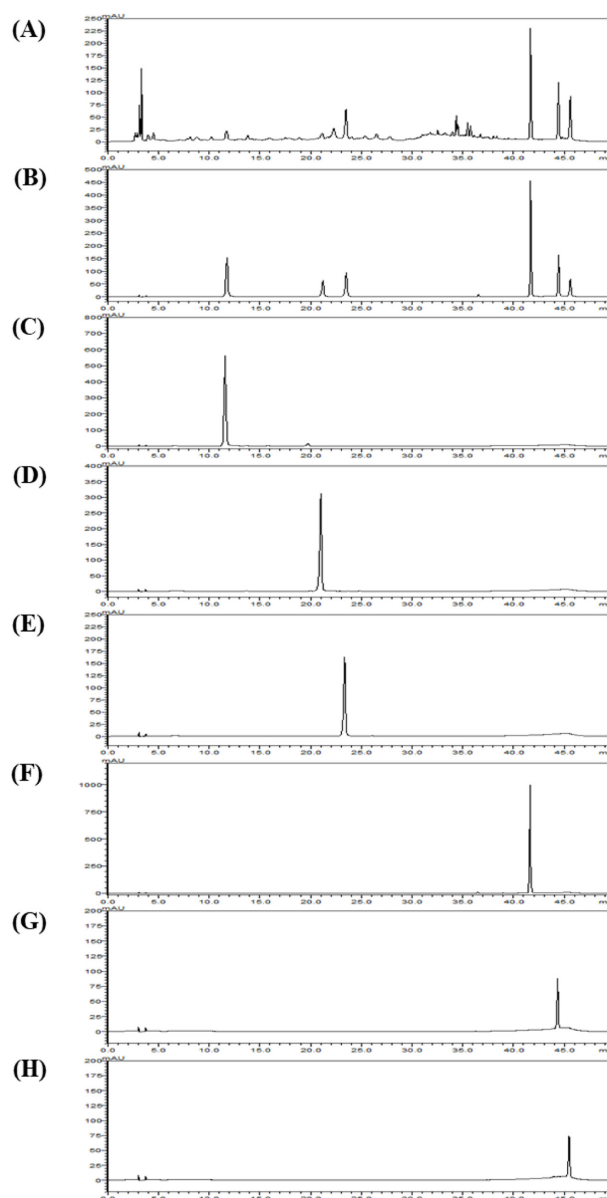


Fig. 2. HPLC chromatogram of the ethanol extracts mixture (A), 6 mixture standard (B), chlorogenic acid (C), plantamajoside (D), acteoside (E), emodin (F), chrysophanol (G) and physcion (H).

3), 135.3 (C-10a), 133.3 (C-4a), 124.6 (C-4), 121.4 (C-2), 113.7 (C-9a), 110.3 (C-8a), 108.3 (C-5), 106.8 (C-7), 56.2 (-OCH₃), 22.3 (-CH₃).

표준용액 및 분석시료 조제 – 실험에 사용된 지표물질 chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol 및 physcion을 1 mg으로 칭량하여 MeOH로 각각 1 mg/mL의 농도로 조제한 후 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 μ g/mL으로 계열 희석하여 검량선 표준용액으로 사용하였다. 분석시료는 소리쟁이, 썩바귀 및 질경이 에탄올 추출

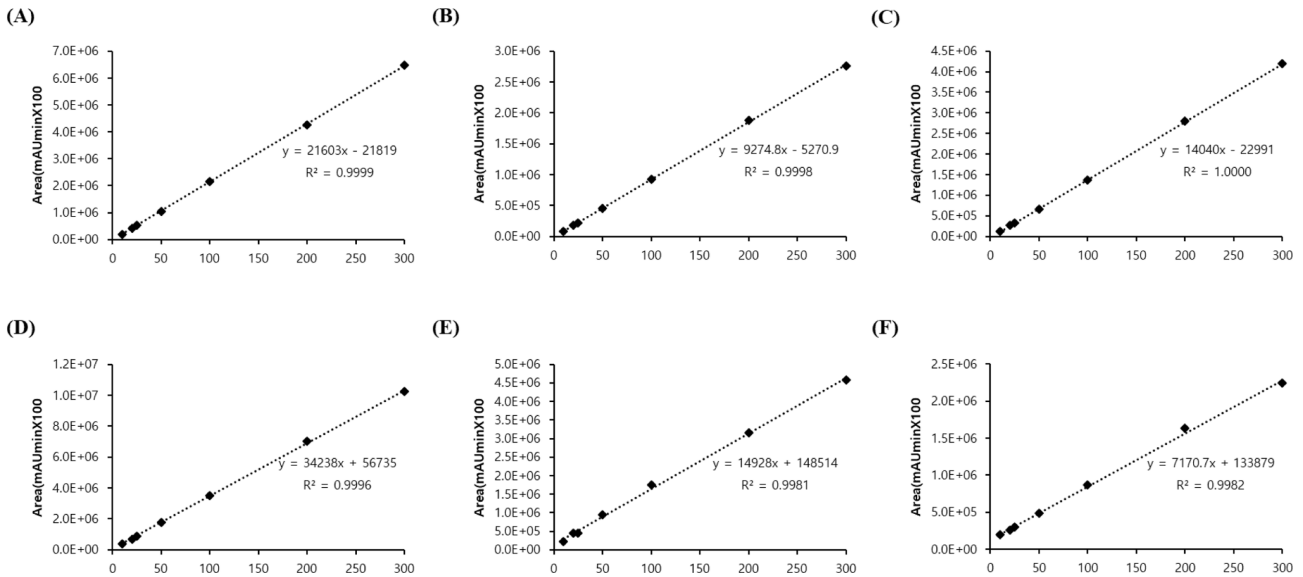


Fig. 3. Calibration curve of chlorogenic acid (A), plantamajoside (B), acteoside (C), emodin (D), chrysophanol (E) and physcion (F).

물(1:1:1, v/v)을 균등하게 혼합하였으며, 균등 혼합물을 10 mg 칭량 후 MeOH 1 mL에 녹여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 사용하였다.

HPLC 분석조건 – 썬바귀, 질경이 및 소리쟁이에서 분리한 chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol 및 physcion의 분석을 위한 HPLC 분석조건은 Table I과 같이 설정한 후 이 조건에 따라 분석을 진행하였다. HPLC 분석을 위한 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B)을 사용하였으며, 분리능을 높이기 위해 water에 0.1% formic acid를 첨가하였고, 기울기 용리 조건을 바꿔주었다. 컬럼은 Phenomenex(Torrance, CA, USA)사의 C18(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)을 사용하였다. Column oven temperature는 30°C를 유지하였으며, flow rate는 1.0 mL/min로 구성되었다. UV파장은 290 nm에서 분석하였다.

직선성 평가 – 지표물질의 직선성을 확인하기 위해 chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol 및 physcion을 MeOH에 녹여 1 mg/mL로 제조하였다. MeOH로 녹인 지표물질은 5, 10, 20, 50, 100, 200 및 300 μ g/mL의 농도로 계열 희석 하여 사용하였다. 분석결과에 기초하여 6개의 지표물질에 대한 검량선을 작성하였으며, 회귀직선방정식은 $y=ax+b$ (a:직선의 기울기, b: y 절편, x: 시료의 농도, y: peak의 면적)의 형태로 작성하였다. 검량선을 바탕으로 상관계수(R^2) 값을 구하였고, 검량선의 R^2 값을 통해 직선성을 판단하였다.

검출한계(Limit Of Detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ) 측정 – 분석하고자 하는 지표물질의 검출과 정량이 가능한 최소 농도를 확인하기 위해 $LOD=$

$3.3 \times (\text{표준편차/검량선의 기울기})$, $LOQ=10 \times (\text{표준편차/검량선의 기울기})$ 의 식에 따라 측정하였다.

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) 평가 – 6가지 지표물질에 대한 정량분석의 타당성을 검증하기 위해 반복 실험을 진행하였다. Intra-day test는 직선성이 확인된 3개의 농도인 15, 45, 150 μ g/mL에서 하루 이내에 3회 반복 측정된 결과를 얻었으며, 그 결과를 바탕으로 상대표준편차를 구하여 평가하였다. Inter-day test는 intra-day와 같이 3개의 농도로 3회 반복 측정된 결과를 통해 상대표준편차를 구하여 평가하였다. 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 평가하였고, RSD%의 값이 3.00%이내인 경우 높은 정밀성을 가지는 것으로 판단하였다.

함량분석 – 썬바귀, 질경이, 소리쟁이로부터 분리한 화합물 6종에 대해 HPLC-UV를 이용해 함량분석을 실시하였다. 지표물질의 chromatogram으로부터 피크 면적 값을 구하여 chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol 및 physcion에 대한 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 썬바귀(chlorogenic acid), 질경이(plantamajoside, acteoside) 소리쟁이(emodin, chrysophanol, physcion)에서 화합물을 분리하였다(Fig. 1). 이미 보고된 문헌을 바탕으로 분리된 화합물 6종의 ^1H 및 ^{13}C -NMR spectrum과²⁷⁻³⁰⁾ 질량분석의³¹⁻³³⁾ 결과를 비교하여 chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol, physcion로 동정하였다.

Table II. Calibration curves, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of six compounds

Compounds	Linear range (µg/mL)	Regression equation	R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Chlorogenic acid	5~300	y=21603x-21819	0.9999	0.36	1.10
Plantamajoside		y=9274.8x-5270.9	0.9998	0.36	1.08
Acteoside		y=14040x-22991	1.0000	0.37	1.12
Emodin		y=34238x+56735	0.9996	0.30	0.99
Chrysophanol		y=14928x+148514	0.9981	0.22	0.66
Physcion		y=7170.7x+133879	0.9982	0.12	0.35

Table III. Precision and accuracy results of compounds chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol, and physcion (n=3)

Compound	Concentration (µg/mL)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Mean±SD (µg/mL)	RSD(%)	Accuracy(%)	Mean±SD (µg/mL)	RSD(%)	Accuracy(%)
Chlorogenic acid	15	15.80±0.03	0.19	105.32	13.95±0.32	2.33	93.00
	45	45.08±0.24	0.52	100.18	42.23±0.13	0.31	93.84
	150	145.71±1.15	0.79	97.14	145.26±1.41	0.97	96.84
Plantamajoside	15	15.79±0.00	0.03	105.25	15.20±0.07	0.49	101.36
	45	44.44±0.14	0.32	98.76	44.35±0.18	0.41	98.56
	150	145.20±1.49	1.02	96.80	145.96±1.19	0.82	97.31
Acteoside	15	16.50±0.02	0.15	110.00	15.81±0.11	0.67	105.41
	45	44.44±0.15	0.34	98.76	44.32±0.12	0.27	98.48
	150	144.06±1.51	1.05	96.04	145.29±1.15	0.79	96.86
Emodin	15	14.67±0.26	1.79	97.77	14.34±0.02	0.13	95.61
	45	44.43±0.29	0.65	98.72	44.70±0.30	0.66	99.34
	150	148.52±2.15	1.45	99.01	148.00±1.08	0.73	98.67
Chrysophanol	15	13.84±0.06	0.46	92.28	15.89±0.15	0.97	105.90
	45	41.69±0.57	1.37	92.65	46.79±1.38	2.95	103.97
	150	141.55±1.57	1.11	94.36	148.37±1.50	1.01	98.91
Physcion	15	14.84±0.28	1.89	98.96	14.51±0.30	2.06	96.71
	45	50.85±0.55	1.09	112.99	50.65±1.15	2.27	112.55
	150	152.72±1.06	0.69	100.72	153.96±4.23	2.75	102.64

따라서 본 연구에서는 분리된 화합물 6종을 지표물질로 선정하여 분석을 진행하였다. 분리된 지표물질을 각각 MeOH에 용해 시킨 후 HPLC-UV로 측정된 결과 피크 머무름 시간은 각각 chlorogenic acid(11.6분), plantamajoside(21.0분), acteoside(23.4분), emodin(41.6분), chrysophanol(44.3분), physcion(45.5분)에서 검출되었으며, 소리쟁이, 썬바귀, 질경이 3가지 추출물의 균등 혼합물과 지표물질의 chromatogram을 비교하여 다른 성분들에 간섭이 없음을 확인하였다(Fig. 2). 또한 지표물질 6종의 검량선 면적으로부터 회귀직선방정식을 얻었으며, R²값은 각각 0.9999, 0.9998, 1.0000,

0.9996, 0.9981, 0.9982로 뛰어난 직선성을 나타냈다(Fig. 3). 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 chlorogenic acid가 0.36, 1.10 µg/mL, plantamajoside가 0.36, 1.08 µg/mL, acteoside가 0.37, 1.12 µg/mL, emodin이 0.30, 0.99 µg/mL, chrysophanol이 0.22, 0.66 µg/mL, physcion이 0.12, 0.35 µg/mL로 확인되었다(Table II). 직선성이 확인된 농도인 15, 45, 150 µg/mL을 기준으로 하여 Intra-day와 Inter-day test를 3회 반복하여 진행되었으며, 상대표준편차(RSD%)값을 구하여 정밀성을 판단하였다. 그 결과 상대표준편차 값이 intra-day, inter-day 모두 3.00% 이하로 우수한 정밀성을 나

Table IV. The contents of chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, chrysophanol, emodin and physcion in ethanol extracts mixture samples ($n=3$)

Sample	Contents (%w/w)					
	Chlorogenic acid	Plantamajoside	Acteoside	Emodin	Chrysophanol	Physcion
EtOH extract mixture	0.19±0.02	0.48±0.01	0.65±0.01	1.15±0.11	0.73±0.01	0.69±0.09

타내었다. 정확성 결과에서는 intra-day는 각각 chlorogenic acid가 97.14~105.32%, plantamajoside가 96.80~105.25%, acteoside가 96.04~110.00%, emodin이 97.77~99.01%, chrysophanol이 92.28~94.36% 그리고 physcion이 96.71~112.55%의 범위를 나타냈으며, inter-day는 chlorogenic acid가 93.00~96.84%, plantamajoside가 97.31~101.36%, acteoside가 96.86~105.41%, emodin이 95.61~99.34%, chrysophanol이 98.91~105.90% 그리고 physcion이 96.71~112.55%의 범위를 나타냈다(Table III). 본 연구에서 HPLC-UV를 이용한 분석법을 바탕으로 쑥바귀, 질경이, 소리쟁이 추출물의 혼합물로부터 분리한 6가지 지표물질을 분리하여 함량을 분석하였다. 그 결과 chlorogenic acid는 0.19±0.02%, plantamajoside는 0.48±0.01%, acteoside는 0.65±0.01%, emodin은 1.15±0.11%, chrysophanol은 0.73±0.01%, physcion은 0.69±0.09%로 확인되었다(Table IV).

본 연구에서는 천연 화장품 소재로 개발하기 위해 쑥바귀, 질경이, 소리쟁이의 ethanol 추출물로부터 분리된 chlorogenic acid, plantamajoside, acteoside, emodin, chrysophanol, physcion 6종의 화합물을 NMR과 LC/MS 분석을 통해 구조동정 하였으며, 검증된 분석법을 통해 3종 추출물의 혼합물에 대한 함량을 확인하였다. 본 연구의 결과는 향후 천연 화장품 소재 개발에 있어 기초연구자료의 기반이 될 수 있을 것이라 사료되며, 생리활성에 대한 추가적인 연구가 진행된다면 천연 화장품 개발에 있어 기초적인 연구 기반을 확립할 수 있을 것이라 판단된다.

인용문헌

- Han, S. K., Kim, H. T., Kim, Y. M., Park, S. M., Lee, J. N., Oh, S. H. and Ha, H. Y. (2016) Improvement of dermal compactness by mixed extracts of three medicinal herbs. *J. Invest. Cosmetol.* **12**: 221-225.
- Ham, H. N., Shrestha, A. C., Kim, J. E., Lee, T. B., Yoo, B. W., Kim, M. S., Kim, K. S., Lee, Y. M., Kim, J. Y. and Leem, J. Y. (2018) Simultaneous analysis of the compounds of natural cosmetic resources containing *Chrysanthemum zawadskii*, *Perilla frutescens*, *Rosa multiflora* and their anti-oxidative activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **49**: 312-321.
- Yun, K. H., Chi, Y. H., Lee, D. K. and Paik, S. H. (2018) Quantitative analysis of paeoniflorin and paeonol in peony extracts and quality control standards. *Appl. Sci.* **35**: 235-246.
- Lee, G. B., Yeom, A. R., Kim, D. W., Park, C. M., Joung, M. S., Lee, G. Y. and Jeong, C. S. (2018) Evaluation of *Alcea rosea* L. callus extract as a natural cosmetic ingredient. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* **44**: 295-302.
- Park, J. H., Park, S. J., Yoo, G., Kwak, H. J., Oh, Y. and Kim, S. H. (2017) Chemical profiling of the aerial parts and roots of *Ixeris dentata* using LC QTOF-MS combined with multivariate chemometric analysis. *Herb. Med.* **3**: 12.
- Karki, S., Park, H. J., Nugroho, A., Kim, E. J., Jung, H. A. and Choi, J. S. (2015) Quantification of major compounds from *Ixeris dentata*, *Ixeris dentata* Var. *albiflora*, and *Ixeris sonchifolia* and their comparative anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Med. Food.* **18**: 83-94.
- Lee, E. (2011) Effects of *Ixeris dentata* extract on the production of pro-inflammatory cytokines in the LPS stimulated rat and raw 264.7 cells. *Korean J. Plant Res.* **24**: 604-612.
- Park, E. K., Sung, J. H., Trinh, H. T., Bae, E. A., Yun, H. K., Hong, S. S. and Kim, D. H. (2008) Lactic acid bacterial fermentation increases the antiallergic effects of *Ixeris dentata*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 308-313.
- Lee, H. N., Shin, S. A., Choo, G. S., Kim, H. J., Park, Y. S., Park, B. K., Kim, B. S., Kim, S. K., Cho, S. D., Nam, J. S., Choi, C. S. and Jung, J. Y. (2016) Anticancer effects of *Ixeris dentata* (Thunb. ex Thunb.) nakai extract on human melanoma cells A375P and A375SM. *J. Ethnopharmacol.* **194**: 1022-1031.
- Bhattacharai, K. R., Lee, H. Y., Kim, S. H., Park, J. S., Kim, H. R. and Chae, H. J. (2018) Potential application of *Ixeris dentata* in the prevention and treatment of aging-induced dry mouth. *Nutrients.* **10**: 1989.
- Shin, S. A., Lee, H. N., Choo, G. S., Kim, H. J., Che, J. H. and Jung, J. Y. (2017) *Ixeris dentata* (Thunb. Ex Thunb.) Nakai extract inhibits proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells through Akt/NF-κB pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 275.
- Ahn, J. H., Jo, Y. H., Kim, S. B., Turk, A., Oh, K. E., Hwang, B. Y., Lee, K. Y. and Lee, M. K. (2018) Identification of antioxidant constituents of the aerial part of *Plantago asiatica* using LC-MS/MS coupled DPPH assay. *Phytochem. Lett.* **26**: 20-24.

13. Li, L., Liu, C., Liu, Z., Tsao, R. and Liu, S. (2009) Identification of phenylethanoid glycosides in plant extract of *Plantago asiatica* L. by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Chin. J. Chem.* **27**: 541-545.
 14. Yoon, M. Y., Kim, H. J. and Lee, S. J. (2019) The effect of antioxidant and whitening action on *Plantago asiatica* L. leaf ethanol extract for health care. *Technol. Health Care.* **27**: 567-577.
 15. Huang, D. F., Xie, M. Y., Yin, J. Y., Nie, S. P., Tang, Y. F., Xie, X. M. and Zhou, C. (2009) Immunomodulatory activity of the seeds of *Plantago asiatica* L. *J. Ethnopharmacol.* **124**: 493-498.
 16. Kim, B. H., Park, K. S. and Chang, I. M. (2009) Elucidation of anti-inflammatory potencies of *Eucommia ulmoides* bark and *Plantago asiatica* seeds. *J. Med. Food.* **12**: 764-769.
 17. Murai, M., Tamayama, Y. and Nishibe, S. (1995) Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Planta Med.* **61**: 479-480.
 18. Hong, S. H., Oh, G. W., Kang, W. G. and Kim, O. J. (2016) Anticoccidial effects of the *Plantago asiatica* extract on experimental *Eimeria tenella* infection. *Lab. Anim. Res.* **32**: 65-69.
 19. Uzun, M. and Demirezer, L. O. (2019) Anti-aging power of *Rumex crispus* L.: Matrixmetalloproteinases inhibitor, sun protective and antioxidant. *S. Afr. J. Bot.* **124**: 364-371.
 20. Lee, S. S., Kim, D. H., Yim, D. S. and Lee, S. Y. (2007) Anti-inflammatory, analgesic and hepatoprotective effect of semen of *Rumex crispus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 334-338.
 21. Park, J. A., Choi, M. O. and Kim, H. S. (2010) An analysis on physical and chemical features and components of each part of the *Rumex crispus* L. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **8**: 193-201.
 22. Cho, Y. B., Kim, J. Y., Kwon, N. W., Hwang, B. Y., Kim, J. G., Woo, S. H. and Lee, M. S. (2019) Purification and identification of cytotoxic compounds from the root of *Rumex crispus* L. *Korean J. Med. Crop Sci.* **27**: 208-217.
 23. Park, E. S., Song, G. H., Kim, S. H., Lee, S. M., Kim, Y. G., Lim, Y. I., Kang, S. A. and Park, K. Y. (2018) *Rumex crispus* and *Cordyceps militaris* mixture ameliorates production of pro-inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in C57BL/6 mice splenocytes. *Prev. Nutr. Food Sci.* **23**: 374-381.
 24. Park, S. J., Choi, J. H., Jung, Y. S. and Yu, M. H. (2013) Inhibitory effect of *Rumex crispus* L. fraction on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**: 90-96.
 25. Shiwani, S., Singh, N. K. and Wang, M. H. (2012) Carbohydrase inhibition and anti-cancerous and free radical scavenging properties along with DNA and protein protection ability of methanolic root extracts of *Rumex crispus*. *Nutr. Res. Pract.* **6**: 389-395.
 26. Jeong, G. T., Lee, K. M. and Park, D. H. (2006) Study of antimicrobial and antioxidant activities of *Rumex crispus* extract. *Korean Chem. Eng. Res.* **44**: 81-86.
 27. Liu, W., Nisar, M. F. and Wan, C. (2020) Characterization of phenolic constituents from *Prunus cerasifera* Ldb leaves. *J. Chem.* **2020**: 1-5.
 28. Geng, F., Yang, L., Chou, G. and Wang, Z. (2010) Bioguided isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitors from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Phytother. Res.* **24**: 1088-1094.
 29. He, F., Chen, L., Liu, Q., Wang, X., Li, J. and Yu, J. (2018) Preparative separation of phenylethanoid and secoiridoid glycosides from *ligustri lucidi fructus* by high-speed counter-current chromatography coupled with ultrahigh pressure extraction. *Molecules.* **23**: 3353.
 30. Guo, S., Feng, B., Zhu, R., Ma, J. and Wang, W. (2011) Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. *Molecules.* **16**: 1201-1210.
 31. Silinsin, M. and Bursal, E. (2018) UHPLC-MS/MS phenolic profiling and in vitro antioxidant activities of *Inula graveolens* (L.) Desf. *Nat. Prod. Res.* **32**: 1467-1471.
 32. Li, Y., Gan, L., Li, G. Q., Deng, L., Zhang, X. and Deng, Y. (2014) Pharmacokinetics of plantamajoside and acteoside from *Plantago asiatica* in rats by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **89**: 251-256.
 33. Chen, X., Tong, L., Wang, X., Zhang, L., Ma, X., Zhou, S. and Liu, C. (2013) Identification and characterization of anthraquinones in *Cassia tora* L. by liquid chromatography connected with time of flight mass spectrometry and ion trap mass spectrometry. *Asian J. Chem.* **25**: 7840-7842.
- (2020. 9. 2 접수; 2020. 9. 22 심사; 2020. 9. 25 게재확정)