

## HPLC 에 의한 한국산 칙차의 분석

김명희·박성배  
서울특별시 보건환경연구소

### Studies on the Content of Pueraria Radix in the Tea by HPLC

M. H. Kim and S. B. Park

Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment,  
Seoul 140, Korea

**ABSTRACT**-This studies was performed to investigate the quality control of Pueraria Radix tea. Experimental subjects were 8 kinds of tea and wet and dry Pueraria Radix which were collected from the Seoul area.

For standards, Daidzein and Daidzin were isolated from Pueraria Radix. Analysis method was carried out by HPLC using  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column and UV 254 nm detector.

Samples were extracted with methanol by Cold method (at room temperature for 24 hours) and Hot extraction method (at 100°C for 4 hours)

Pueraria radix contained 0.08% Daidzein and 0.66% Daidzin

Most of the Pueraria Radix tea contained extract of Pueraria Radix less than the labeled amounts listed.

**Keywords** □ Pueraria Radix tea, Quality control, HPLC, Daidzein, Daidzin

칙차의 주원료인 갈근(葛根)은 콩과 식물인 칙의 뿌리로 주피를 제거한 후, 생약제제로 많이 사용되어 왔으며 우리나라에서 생산, 시판되는 것은 주로 Puerariae thunbergiana로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 이러한 갈근의 주성분은 다량의 전분이외에 isoflavonoids인 Daidzin, Daidzein 및 Puerarin(Fig. 1) 등이며 이 중 일부는 그 생합성까지도 밝혀지고 있다<sup>3,4,5)</sup>.

최근 국산차의 개발에 따라 갈근이 기호식품인 다류(茶類)로 상품화되고 있으나 이에 대한 뚜렷한 성분의 정량방법이 확립되어 있지 않아 품질관리가 어려운 실정이다. 보사부에서 제정한 다류의 성분배합 기준에는 농축액기스 및 분말액기스차의 경우 칙차는 순액기스 고형분을 6% 이상 배합해

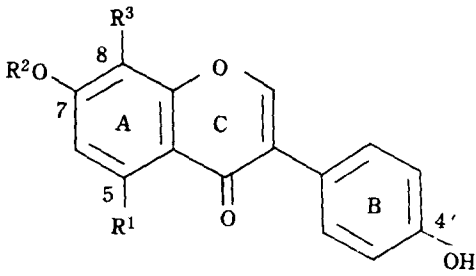
야 되는 것으로 규정하고 있으나 최종 제품에서의 규격시험은 고형차류에서는 성상, 수분, 타알색소 및 중금속만을, 액상차의 경우는 상기 시험외에 세균, 대장균군만을 추가 규제하고 있을 뿐 그 주성분의 함량은 규제하지 않고 있다<sup>6)</sup>.

따라서 저자 등은 시판 갈근으로 부터 Daidzin과 Daidzein을 분리, 정제하고 이를 표준품으로 하여 종래의 TLC법<sup>2)</sup>보다 신속하고 정확하게 그 성분을 분석할 수 있는 HPLC 방법을 시도하였으며 이에 따라 시판 칙차의 성분을 분석한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

**재료**—시료는 서울의 경동시장에서 구입한 3종의 건조갈근 및 생갈근을 사용하였으며 시판 고형칙차 6종과 액상칙차 2종을 구입 시험하였다.

Received for publication 15 September, 1987  
Reprint requests; Dr. S.B. Park at the above address



DAIDZEIN: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H  
 DAIDZIN: R<sup>1</sup> = R<sup>3</sup> = H; R<sup>2</sup> = Glucose  
 PUERARIN: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H; R<sup>3</sup> = Glucose

Fig. 1. Components of Pueraria Radix

시약—methanol, acetonitrile은 Merk 사 제품의 HPLC용을, 증류수는 millipore 순수제조기를

통과하여 사용하였고 기타 시약은 특급을 사용하였다.

방법—표준품인 Daidzin과 Daidzein을 분리하기 위하여 시중에서 구입한 생갈근을 세절, 건조후 일정량(약 500g)을 methanol로 실온에서 24시간 추출하고 이를 50°C 이하로 감압 농축하여 건조물을 얻고 이를 Fig. 2에 제시된 바와 같은 방법으로 실험하였다. column chromatography에 사용된 glass column은 내경이 2.2cm로, silicagel 60(70~230 mesh)을 20cm길이로 충전시켜 실험하였으며 mobile phase는 분당 1m/의 속도로 elution하였다. column chromatography에서 얻어지는 각 tube의 여액을 TLC로 확인하여 Rf치가 0.9 정도되는 fraction과 0.7 정도되는 fraction을 각기 모아서 이를 감압, 농축하여 Fr. 1

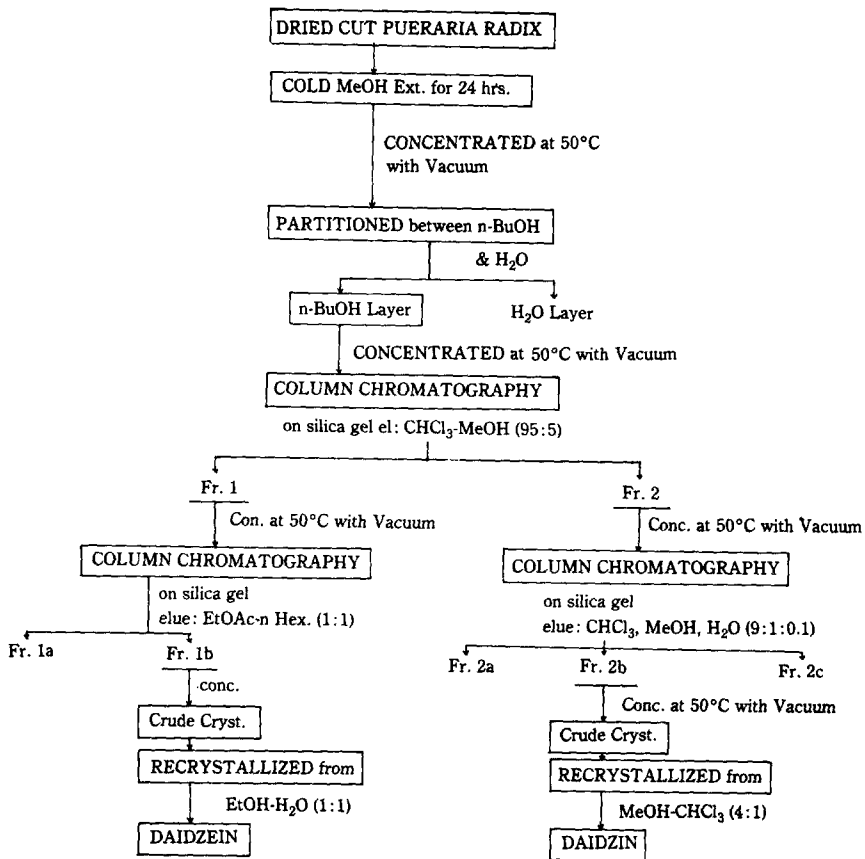


Fig. 2. Standard Isolation Procedure

과 Fr. 2로 하였다. 이를 다시 column chromatography를 행하여 Fr. 1에서는 2개의 fraction중 1b를 재결정하여 Daidzein으로 추정되는 물질을, 그리고 Fr. 2에서는 2b fraction을 농축 재결정하여 Daidzin으로 추정되는 물질을 얻었다. 분리, 정제하여 얻은 두 가지 물질을 Hayakawa 등<sup>3)</sup>의 방법으로 TLC로 확인한 바 1b fraction은 Rf치가 0.9되는 단일 spot로 나타났으며 상품화된 Carl Roth사의 Daidzein과 일치되었다. 이를 다시 HPLC상에서 확인한 바 Fig. 3에 제시된 바와 같이 단일성분의 peak로 Retention time이 standard와 일치되어 Daidzein이 분리, 정제되었음을 보였다.

Daidzin으로 추정되는 2b fraction도 TLC와 HPLC로 확인한 결과 단일성분의 peak로 특히 TLC상에서 Rf치가 0.7 정도되는 단일 spot가 p-anisaldehyde로 발색, 확인되어 Daidzin이 분리되었음을 알 수 있었다.

비교표준시료는 생침을 시중에서 구입하여 생침, 건조침분말, 칩즙, 수침엑기스분 및 에타놀엑기스분으로 만들어 각기 이 시료 일정량에 적당량의 유당을 가하고, methanol로 실온에서 24시간 추출하는 방법과 methanol을 가하고 4시간 가열 추출하는 두 가지 방법을 실시하였다. 이는 시판 칩차의 경우 그 함량표기를 Extract로만 하지않고 즙 혹은 건조침으로 표기하는 예가 있어 표준품이 없더라도 이들 표준시료로 그 분석이 가능하리라

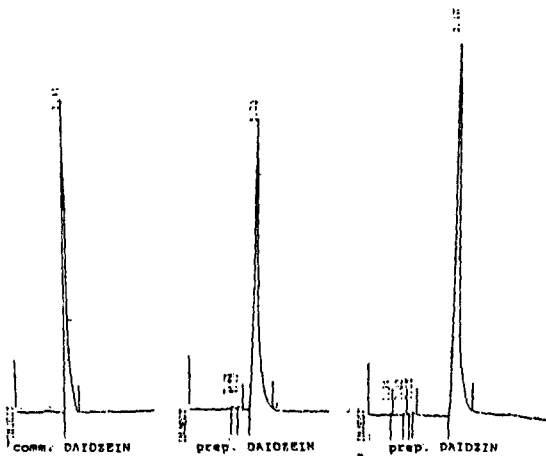


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Standards

Table 1. Analytical Condition of HPLC

Model	Waters 244
Injector	Universal U6K
Pump	6000 A
Detector	254 nm (UV)
Mobile phase	18% CH <sub>3</sub> CN 0.05M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> CN (85:15)
Flow rate	1.0, 0.7 ml/min.
AUFS	0.1
Chart speed	0.5 cm/min.
Sample size	2-5 ul

생각되어 시도하였다.

대상시료인 칩차 역시 methanol을 가하고 4시간 가열 추출하는 방법과 24시간 실온에서 추출하는 두 가지 방법을 실시하였다. 즉 시료 15g을 정확히 평취하고 methanol 70 ml를 가하고 수욕상에서 soxhlet 추출기로 4시간 환류 추출하고 잔류물을 methanol로 세척, 전량을 100 ml로 하여 검액으로 하였으며 이를 millipore로 여과 후 Table 1에 기재된 조건에 따라 HPLC를 행하였다.

실온에서 냉침 추출 역시 동량의 시료를 정확히 취하여 methanol 70 ml를 가하고 흔들어 섞으며 실온에서 5시간 침출한 후 이를 실온에서 19시간 방치한 후 일정량으로 하여 millipore로 여과한 후 HPLC를 행하였다. HPLC에서 얻어진 각 peak는 Computer에 의해 area로 계산, 정량하였으며 각 시료는 2회씩 반복 실험을 행하였다.

## 결과 및 고찰

이상의 방법으로 분리 정제한 Daidzin과 Daidzein의 HPLC Chromatogram이 Fig. 3에 제시되었다.  $\mu$ -Bondapak column을 사용하여 0.05 M-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: CH<sub>3</sub>CN (85:15)를 mobile phase로 분석한 결과 Daidzein은 5.40분대에서, 그리고 Daidzin은 8.47분대의 Retention time을 나타내며 양호하게 분리되었다. 그러나 mobile phase를 18% CH<sub>3</sub>CN만을 사용하였을 경우는 Daidzin만이 5.25분대에서 나타났으며 Daidzein은 20분까지도 나타나지 않았다.

이들 각 표준품의 Injection양을 변화시켜 검량

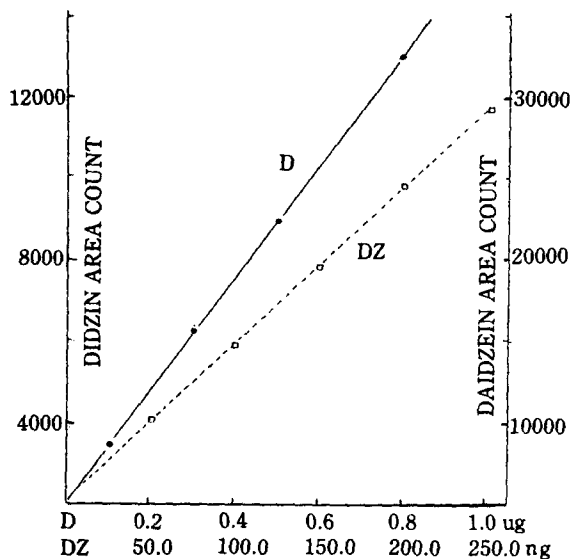


Fig. 4. Calibration curve of Daidzein and Daidzin

선을 작성한 결과 Daidzin은 1.0  $\mu\text{g}$ 까지 Daidzein은 250ng까지 linear하게 나타났으며 이를 기

준으로 하여 각 시료중의 Daidzein과 Daidzin 함량을 계산하였다 (Fig. 4).

HPLC의 mobile phase 변화에 따른 분석결과를 검토하기 위하여 18%  $\text{CH}_3\text{CN}$ 만을 용매로 한 경우는 Daidzein과 Daidzin의 표준물질중 Daidzin만이 5.27분에서 나타났으며 같은 엑기스나 시료1에서도 5.23분에 Daidzin의 peak를 나타내었으나 시료2의 경우는 5분대의 Retention time을 갖는 peak는 나타나지 않았다 (Fig. 5).

이들 시료를 HPLC의 용매조건을 바꾸어 얻은 Chromatogram이 Fig. 6에 제시되었다. 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Buffer와 Acetonitrile을 용매로 사용한 결과 Daidzein이 5.40분, Daidzin은 8.45분대에서 peak를 나타냈으며 시료1에서 이들 두 성분의 peak를 현저히 분리 정량할 수 있었다. 그러나 시료2의 경우는 역시 이들 두 성분의 peak가 확인되지 않음으로서 같은 것이 전혀 함유되지 않았음을 알 수 있었다.

다음 추출방법의 차에 따른 Daidzein과

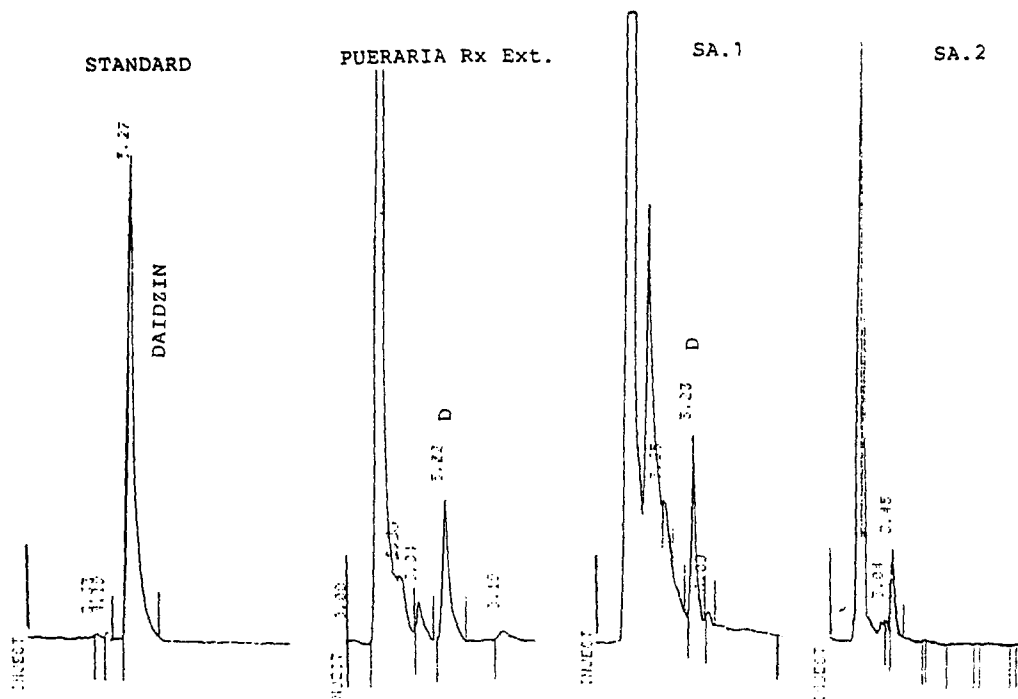
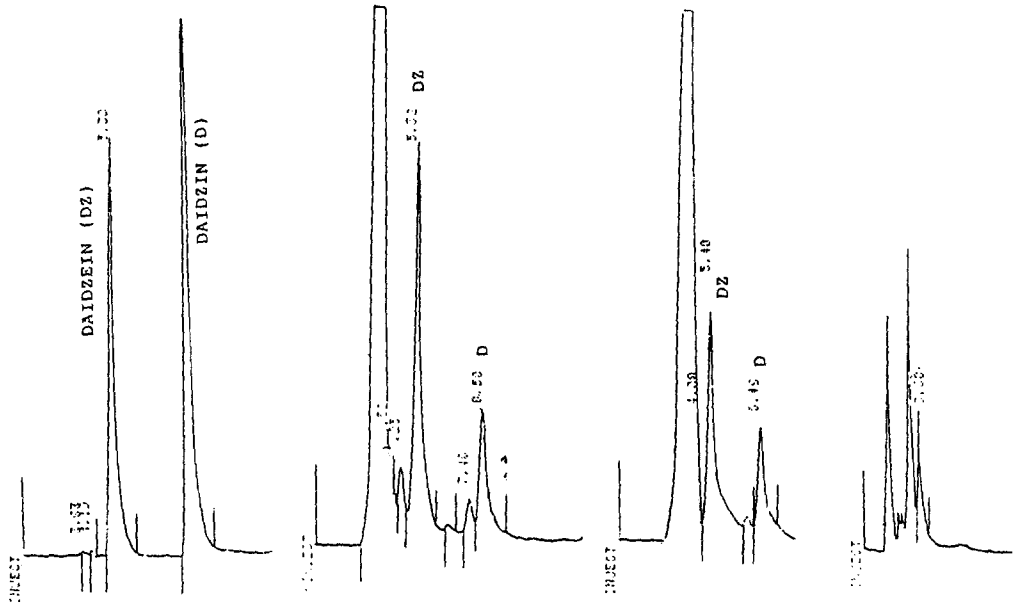


Fig. 5. HPLC Chromatogram of Samples

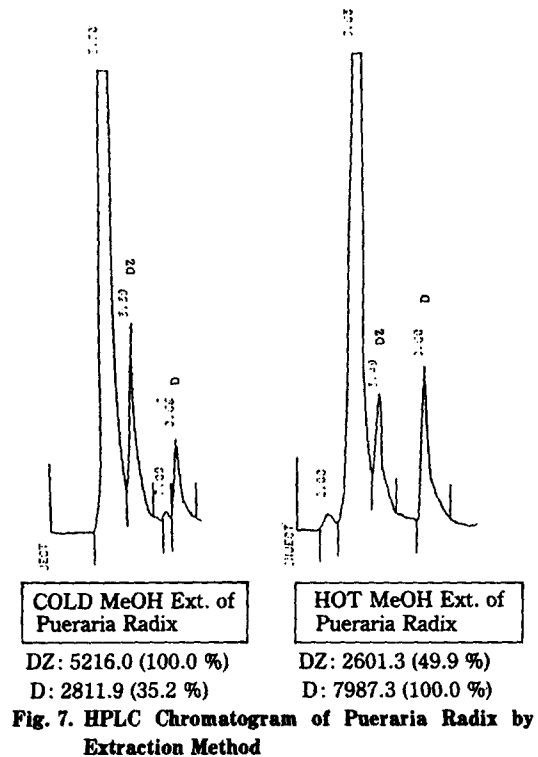
Column: u-Bondapak  $\text{C}_{18}$  Flow rate: 1.0 ml/min. Mobile phase:  $\text{CH}_3\text{CH} : \text{H}_2\text{O}$  (18:82) AUFS: 0.1 Detector: 254 nm (UV) Chart speed: 0.5 cm/min.



**Fig. 6. HPLC chromatogram of Samples**

Column: u-Bondapak C<sub>18</sub> Flow rate: 0.7 ml/min. Mobile phase: 0.05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: H<sub>2</sub>O (85:15) Detector: 254 nm (UV) AUFS: 0.1 Chart speed: 0.5 cm/min.

Daidzin의 함량변화를 비교 검토하기 위하여 동량의 갈근을 실온에서 24시간 methanol로 추출한 것(Cold extraction method)과 methanol을 가하고 4시간 가열 추출한(Hot extraction method) 추출물을 HPLC에 injection하여 얻은 chromatogram이 Fig. 7에 제시되었다. 이에 의하면 Cold extraction method에 의한 추출시에는 Daidzein의 함량이 Hot extraction method에 비하여 2배 정도 높게 나타나는 반면 Daidzin은 오히려 후자에 비하여 약 1/3 정도만이 검출되었다. 따라서 Cold method에 의하면 Daidzein의 추출율이 양호하였으며 Hot extraction method로 추출시는 Daidzin이 양호하게 추출됨을 알 수 있었고 추출하려는 성분에 따라 같은 iso-flavonoid 계통의 물질이라 하더라도 그 방법을 달리 선택해야 될 것으로 사료된다. 또한 가열 추출시 Daidzein의 함량이 낮아지는 것은 온도에 영향을 받아 Daidzein이 분해되는지 혹은 Daidzin으로 전환되므로서 daidzein의 함량이 감소되는 반면 Hot extraction method에서 Daidzin의 함



**Table 2. Concentration of Daidzein and Daidzin by Extraction Method**

	Dried Pueraria Rx		Pueraria Rx Juice	
	Daidzein	Daidzin (ug/g)	Daidzein	Daidzin (ug/ml)
Cold Extraction	800.1 ± 31.5	2930.2 ± 113.9	203.2 ± 11.9	1010.8 ± 49.3
Hot Extraction	407.9 ± 18.7	6630.7 ± 241.2	104.9 ± 10.6	1700.5 ± 80.4

(Mean ± SD)

량이 증가되었는지의 여부는 본 실험만으로는 이렇다할 단정을 내리기가 어렵다.

한국산 건조킵 3종과 3종의 생킵의 즙중 Daidzein과 Daidzin의 함량을 각기 2회씩 반복 실험한 결과가 Table 2에 제시되었다. Cold extraction method에 의한 Daidzein 함량은 갈근의 경우는 800.1 ± 31.5 μg/g 생킵즙중에는 203.2 ± 11.9 μg/g으로 나타났으며 Hot extraction method에 의한 Daidzin 함량은 갈근이 6630.7 ± 241.2 μg/g, 생킵즙이 1700.5 ± 80.4 μg/g으로 나타났다. 이런 결과는 Hayakawa 등<sup>3)</sup>이 발표한 한국산 킵중의 Daidzein과 Daidzin 함량이 각각 0.03%, 0.15%인 것이 비하여 훨씬

높게 나타났다. 이는 추출방법의 차이와 재배산지나 채취시기 등이 서로 다른데 기인하는 것이라 사료된다.

다음 Cold extraction method에 의한 시판 킵차중의 Daidzein 함량과 생킵, 생킵즙, 킵의 건조분말, 에타놀엑기스분 및 수침엑기스분으로서의 함량의 Table 3에 제시되었다. 고휘차류에서는 시료1과 5의 Daidzein 함량이 높게 나왔으며 이는 생킵으로서의 약 5% 정도, 킵즙으로는 5.3, 5.5% 정도가 함유된 것으로 나타났으며 킵건조분말로는 1.2%, 그리고 수성엑기스 및 에타놀엑기스분으로는 0.6% 정도 함유된 것으로 나타났다. 기타 시료3과 6에서는 엑기스분이 0.4, 0.2% 정도

**Table 3. Contents of Pueraria Radix Preparations in Cold MeOH EX of Sample**

	Powder						Liquid	
	SA.1	SA.2	SA.3	SA.4	SA.5	SA.6	SA.7	SA.8
Daidzein (ug/g)	40.8	—	27.5	—	42.5	13.1	127.9	146.6
Daidzin (ug/g)	101.5	—	40.6	—	50.0	90.2	2370.8	1490.9
Wet P. Rx	5.1%	—	3.4	—	5.3	1.6	16.0	18.4
Juice	5.3	—	3.7	—	5.5	1.8	17.2	19.1
Dry Powder	1.2	—	0.8	—	1.2	0.5	4.1	4.4
Dry H <sub>2</sub> O Ex	0.6	—	0.4	—	0.6	0.2	2.1	2.2
Dry EtOH Ex	0.6	—	0.4	—	0.6	0.2	2.0	2.1

**Table 4. Contents of Pueraria Radix Preparations in Hot MeOH Ex of Sample**

	Powder						Liquid	
	SA.1	SA.2	SA.3	SA.4	SA.5	110.1	SA.7	SA.8
Daidzein (ug/g)	21.8	—	10.8	—	35.1	15.2	89.9	77.5
Daidz in (ug/g)	180.9	—	89.5	—	60.0	110.1	3080.7	1900.4
Wet P. Rx	2.7%	—	1.4	—	0.9	1.7	35.7	28.7
Juice	2.5	—	1.4	—	0.9	1.7	36.6	29.4
Dry Powder	0.8	—	0.4	—	0.3	0.5	10.7	8.6
Dry H <sub>2</sub> O Ex.	0.4	—	0.2	—	0.1	0.3	5.5	4.4
Dry EtOH Ex.	0.4	—	0.2	—	0.1	0.2	5.2	4.2

함유되었으나 시료2와 4에서는 칩의 성분이 전혀 함유되지 않은 것으로 나타났다.

반면 액상차의 경우는 분말차류에 비하여 Daidzein 함량이 3배 이상 많이 함유된 것으로 나타났다으며 이는 수성 및 에타놀엑기스분으로 2% 이상을 함유한 것이었다.

또한 Hot extraction method로 추출한 각 시료차종의 Daidzein, Daidzin 함량과 비교표준물질의 함유율을 Daidzin peak를 기준으로 환산한 결과가 Table 4에 제시되었다. 이에 따르면 시료 1의 경우 Daidzin의 함량이 분말차류에서 가장 높게 나타났으며 이는 생침으로서는 2.7%, 수성 및 에타놀엑기스분으로는 각각 0.4%가 함유된 것으로 나타나는 반면 시료2와 4는 전혀 칩의 성분이

검출되지 않았다. 액상차의 경우는 Daidzin을 기준으로 환산하였을 때 생침으로는 30% 정도, 즙으로 30~40%가 함유된 것으로 보이며 엑기스분은 4~5%함유한 비율이었다. 이는 분말차에 비하여 액상차가 Daidzin 함량이 10배 이상 높게 나타난 결과이다.

이상을 종합하여 보면 종래의 TLC법에 비하여 HPLC를 이용함으로써 칩차의 성분분석은 신속하고 정확한 결과를 얻었으며 본 방법에 따라 시판 칩차를 분석한 결과 고행차류에서는 대부분 그 함량이 표기량에 비하여 현저히 낮거나 전혀 함유되지 않은 예도 있어 앞으로 국산차의 보급을 필요로 하는 시기에 이들 다류의 품질관리가 시급한 문제라 생각된다.

## 국문요약

시판 갈근으로 부터 Isoflavanoid 성분인 Daidzein과 Daidzin을 분리 정제하고 이를 표준물질로 하여 시판 칩차 8종에 대한 칩성분 분석을 HPLC 방법으로 시도하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 칩차의 성분 분석법은 종래의 TLC법에 비하여 HPLC를 이용, 신속하고 정확하게 분석할 수 있었다.
2. 추출방법에 따라 성분함량이 크게 영향을 받아 Daidzein을 분석할 경우는 냉침법이, Daidzin의 분석시는 가열 추출법이 양호하였다.
3. 한국산 갈근종 Daidzein과 Daidzin은 0.08% 및 0.66% 함유되었다.
4. 시판 칩차중 고행차류는 칩의 성분이 표기량에 비하여 매우 적게 함유되거나 전혀 함유되지 않은 예도 있으며 액상차의 경우는 엑기스 고행분이 4~5%가 함유되었다.

## 참고문헌

1. 한덕용외 7인 : 현대생약학, 진명출판사, 서울. p. 342(1980).
2. Shibata, S., Murakami, T. and Nishikawa, Y.: Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drug. *Yakugaku Zasshi* 79, 757 (1959).
3. Hayakawa, J., Noda, N., Yamada, S and Uno, K.: Studies on Physical and Chemical Quality Evaluation of Crude Drug Preparation I. Analysis of *Pueraria Radix* and Species *Puerariae*. *Yakugaku Zasshi*, 104, 50 (1984).
4. Inoue, T. and Fujita, M.: Biosynthesis of Isoflavon C-Glycoside in *Pueraria* Root. *Chem. Pharm. Bull.*, 22, 1422 (1974).
5. Ingham, J.L., Tahara, S. and Dziedzic, S.Z.: A Chemical Investigation of *Pueraria Mirifica* Root. *Z. Naturforsch.*, 41, 403 (1986).
6. 保健社會部 : 食品 等の 規格 및 基準. p. 140, 304(1986).