

고속액체크로마토그래피에 의한 玄蔘根 중 *p*-Methoxycinnamic acid의 정량

신국현*, 이상현, 지형준

서울대학교 천연물과학연구소

Determination of *p*-Methoxycinnamic Acid in Scrophulariae Radix by High Performance Liquid Chromatography

Kuk Hyun Shin*, Sanghyun Lee and Hyung-Joon Chi

Natural Products Research Institute, Seoul National University,
Seoul 110-460, Korea

Abstract – A new method for quantitative determination of *p*-methoxycinnamic acid in Scrophulariae radix by high performance liquid chromatography was established. A reversed-phase system with SPHERI-5 RP-18 5 micron (250 × 4.6 mm) column using TFA (0.05%) and acetonitrile as a mobile phase was developed. *p*-Methoxycinnamic acid and N-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol as an internal reference were detected at 310 nm and the analysis was successfully carried out within 50 min.

Key words – Scrophulariae radix; *p*-methoxycinnamic acid; N-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol; HPLC.

흑삼(黑蔘) 및 원삼(元蔘)이라 부르기도 하는 현삼(玄蔘)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본으로서, 그 뿌리는 한방에서 해열 및 소염제로 쓰이며, 청혈작용 때문에 해독제로도 쓰이고 있다.¹⁾

우리나라에 분포되어 있는 현삼은 주로 *Scrophularia buergeriana* (*S. oldhami* Oliver)이며, 그 근연식물로서 큰개현삼 (*S. kakudensis*), 토현삼(*S. koraiensis*), 설령개현삼 (*S. borlalin koreana*), 섬현삼 (*S. takesimensis*) 등이 알려져 있으나, 매우 드물다. 수입품으로서 중국에서 수입되는 현삼근 *S. ningpoensis*가 기원식물로 많이 쓰인다.

그 성분상을 보면 지상부에는 scrophularin, iridoid, 8-(O-methyl-*p*-coumaroyl)-harpagide, harpaside 외에 정유성분과 미량의 alkaloids 등이 함유되어 있고, *S. buergeriana*의 뿌리에는 주성분으로서 *p*-methoxycinnamic acid가 보고되어 있다.

禹^{2,3)}는 한국산 현삼 (*S. oldhami*)의 뿌리로부터

주성분인 *p*-methoxycinnamic acid를 분리하여 해열 및 진통작용이 있음을 밝혔고, 申⁴⁾ 등은 소염작용이 있음을 밝힌 바 있으나, 본 약재 품질평가의 기초가 되는 성분함량 분석법 검토는 전혀 되어있지 않다.

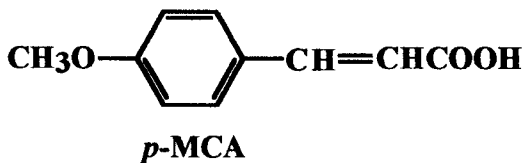
따라서 본 연구에서는 현삼근의 주성분인 *p*-methoxycinnamic acid를 지표성분으로 HPLC에 의한 함량 분석방법을 검토하여 새로운 분석법을 확립하였으며, 이를 이용하여 한국산 현삼과 수입품의 성분을 비교 분석한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

검체 – 본 연구에 사용한 한국산 현삼근은 1996년 10월경 경북 안동지방에서 자생하는 *S. buergeriana*를 채집하였으며, 중국산은 서울 경동시장에서 구입하여 식물학적으로 확인한 후 사용하였다. 그리고 표본은 본 연구소에 보관하였다.

시약 – 분석용 시약은 특급시약을 사용하였고, 분

*교신저자 : Fax 02-762-8322



석 실시 전에 membrane filter로 여과하여 사용하였다. 표준물질로서 *p*-methoxycinnamic acid는 현삼근으로부터 분리하여 사용하였고, 내부표준물질로는 합성한 *p*-methoxycinnamic acid derivative인 *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol를 사용하였다.⁵⁾

p-Methoxycinnamic acid의 분리 - 현삼 2 kg을 95% methanol로 3시간씩 5회 반복 온침하여 얻은 methanol ext.를 ether로 3회 반복 추출하고, 이 ether 용액을 NaHCO₃ 용액으로 진탕한 다음 수층을 HCl로 중화시켜 생긴 침전을 ethanol로 재결정하여 무색승화성 침상물질 0.97 g을 얻었다.²⁾

MP: 172~174 °C (clarification point 187 °C); EIMS (70 eV): *m/z* 178[M⁺], 161 (M⁺-C₁₀H₉O₂), 133 (M⁺-C₉H₉O); ¹H-NMR (300 MHz) CDCl₃ δ: 3.85 (3H, s, OCH₃), 6.32(2H, d, *J*=15.9 Hz, H-8), 6.63 (2H, dd, *J*=2.1, 8.7 Hz, H-3,5), 7.51 (2H, dd, *J*=2.1, 8.7 Hz, H-2,6), 7.74(1H, d, *J*=15.9 Hz, H-7); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 55.4 (OCH₃), 114.4 (C-3, C-5), 116.5(C-8), 126.9 (C-1), 130.2 (C-2, C-6), 146.8 (C-7), 161.9 (C-4), 167.7 (C-9).

분석기기 - HPLC는 Spectra-Physics사의 Liquid chromatography(SP 8800)로서 detector(Spectra 100) 및 integrator(SP 4270)가 부착된 것을 사용하였고, column은 SPHERI-5 RP-18 5micron(250×4.6 mm)을 사용하였다.

HPLC의 분석조건 - 이동상으로서 TFA(0.05%) 용액과 acetonitrile을 gradient로 혼합하여 사용하였다. Gradient는 TFA : Acetonitrile=90 : 10으로 시작하여 50분 후 TFA : Acetonitrile=50 : 50이 되도록 하였다. HPLC는 실온에서 실시하였고, 용매의 유속은 1 ml/min, UV detector의 파장은 310 nm에 고정하여 실시하였다.

검액의 조제 - 현삼근 10 g을 methanol로 5회 수욕상에서 가열 환류 추출하고, 추출액을 합하여 감압 농축 건조하여 한국산은 7.13 g, 중국산은 6.77 g의 methanol ext.를 각각 얻었다. 한국산 0.41 g, 중국산은 0.38 g methanol ext.를 각각 methanol에 용해시키고, 따로 내부표준물질 0.11 mg/ml metha-

nol 용액을 조제한 후 각 용액을 1:1로 혼합한 액 10 μl를 column에 주입하여 HPLC를 실시하였다. 아울러 methanol ext.를 다시 ether 및 ethyl acetate 등으로 계통분획한 후 각 분획물에 대하여서도 HPLC를 실시하였다.

표준검량선의 작성 - 내부표준물질로서 *p*-methoxycinnamic acid derivative를 0.11 mg/ml의 methanol용액으로 고정시키고, *p*-methoxycinnamic acid 1.17 mg/ml액을 기준으로 5단계로 희석한 액과 각각 1:1로 혼합한 다음 이 액 10 μl를 column에 주입하여 HPLC를 실시하고, 각각의 peak area를 산출한 후 peak area의 비와 절대농도를 plot하여 표준검량선을 작성한 결과는 Fig. 1에 표시한 바와 같으며 그 회귀직선의 방정식은 $Y=1.085X-0.065$ ($r=0.998$)로서 표준물질 0.23~11.67 μg범위에서 직선성이 인정되었다.

결과 및 고찰

현삼근의 주성분이며 정량분석의 지표물질로서 *p*-methoxycinnamic acid(**1**)를 순수 분리하여 정제된 것을 methanol에 용해시킨 후 SPHERI-5 RP-185 micron(250×4.6 mm) column에 주입하고, 가장 분리능이 양호한 용매계를 추적한 결과 *p*-methoxycinnamic acid가 다른 성분들에 방해없이 없이 독립된 peak로 나타남을 확인하였으며, t_R 는 32.9 min이었다. 시료 주입시 오차를 최소로 하기 위하여 필요한 내부표준물질을 선정하기 위하여 수종의 물질들을 동일 HPLC

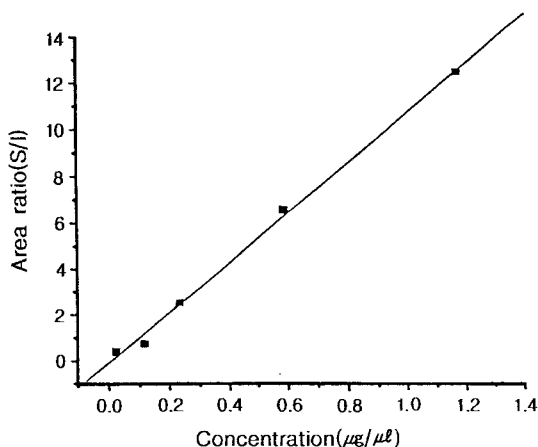


Fig. 1. Calibration curve for *p*-methoxycinnamic acid. S, *p*-methoxycinnamic acid I, *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol (Int. ref.)

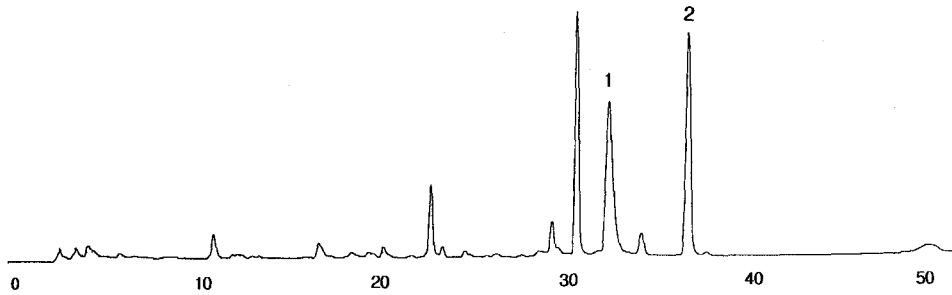


Fig. 2. HPLC chromatogram of methanol ext. from *Scrophulariae radix* 1, *p*-methoxycinnamic acid 2, *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol (Int. ref.)

분석조건에서 column에 주입하고, 그 t_R 에 의하여 비교 검토한 결과 t_R 이 37.1 min에서 독립된 peak를 나타내는 *p*-methoxycinnamic acid derivative인 *N*-(*p*-methoxycinnamoyl)-*p*-aminophenol 이 가장 적절한 물질임을 알았다.

실험부의 HPLC조건과 분석조작에 따라 현삼근 methanol ext., 또는 methanol ext.를 ether, ethylacetate 및 n-BuOH 등으로 분획한 것 일정량을 methanol에 용해시킨 후 따로 조제한 내부표준물질 을 1:1로 혼합하고 HPLC를 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 methanol ext.의 전형적인 pattern 을 갖는 chromatogram을 얻을 수 있었는데, t_R 을 50 min으로 할 경우에 *p*-methoxycinnamic acid가 확실히 분리되었으며, 표준검량선에 대입하여 현삼근 methanol ext. 및 ether, ethylacetate, 및 n-BuOH의 각 분획물 중의 *p*-methoxycinnamic acid 함량을 산출한 결과는 Table I 및 II와 같았다.

Table I에서 보는 바와 같이 methanol ext.중의 *p*-methoxycinnamic acid 함량은 한국산의 경우 0.133~0.147%의 분포를 보였으며, 중국산의 경우는 0.0167~0.0173%를 보여 한국산의 함량이 약 8배 높음을 알 수 있었다.

한편, 현삼의 methanol ext.를 ether, ethylacetate 및 n-BuOH로 계통분획하여 각 분획물 중의 *p*-methoxycinnamic acid 함량을 구하여 그 추출물을 검토한 결과 Table II에서 보는 바와 같이 ether분 획에 가장 많이 분포함을 알았으며, HPLC chromatogram상의 *p*-methoxycinnamic acid의 peak pattern으로 보아, 본 실험 조건하에서는 methanol ext.를 그대로 HPLC를 실시하여 *p*-methoxycinnamic acid 정량을 실시하는 것이 합당하다는 사실을 알았다.

Table I. *p*-Methoxycinnamic acid content in MeOH extract of *Scrophulariae radix*

Samples	Amount of ext. (%)	<i>p</i> -MCA content (%)
Korea	71.3	0.140 ± 0.0067 ^{a)}
China	67.7	0.017 ± 0.0003

^{a)}Mean ± S.D. of triplicate determinations.

Table II. *p*-Methoxycinnamic acid content in subfractions of MeOH extract of *Scrophulariae radix*

Samples	Amount of ext. (%)	<i>p</i> -MCA content (%)	
Korea	Ether	0.117	0.124 ± 0.0045 ^{a)}
	Ethyl acetate	0.069	0.004 ± 0.0002
	Buthanol	0.965	0 ± 0
China	Ether	0.077	0.002 ± 0.00006
	Ethyl acetate	0.047	0.0008 ± 0.00013
	Buthanol	0.33	0 ± 0

^{a)}Mean ± S.D. of triplicate determinations.

사 사

본 연구에 소요된 경비의 일부는 1997년도 생약·한약재 품질 표준화 연구(보건복지부)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 지형준, 이상인 (1988) 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 한국메디칼인텍스사, 서울.
- 우원식 (1963) 현삼(玄參)의 유효성분, *p*-Methoxycinnamic acid에 관한 연구 I. *p*-Methoxycinnamic acid의 동정 및 그 해열작용. 약학회지 7: 55-57.
- 우원식 (1965) *p*-Methoxycinnamic acid의 진통

작용. 약학회지 9: 31-33.

4. Shin, K. H., Lee, E. B. and Woo, W. S. (1970)

Antiinflammatory action of *p*-methoxycinnamic acid. *Yakhak Hoeji* 14: 45-50.

5. Lee, E. B., Shin, K. H. and Woo, W. S.

(1968) Synthesis and pharmacology of *p*-methoxycinnamic acid derivatives. *J. Med. Chem.* 11: 1262-1263.

(1999년 5월 6일 접수)