

芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall.)에서 paeoniflorin 抽出方法 및 HPLC 分析條件

鄭名根* · 姜光熙*

Extraction Methods and HPLC Analysis Conditions of Paeoniflorin in Peony, *Paeonia lactiflora* Pall.

Myoung Gun Chung* and Kwang Hee Kang*

ABSTRACT : To find out the most reasonable analysis conditions of paeoniflorin, different paeoniflorin extraction methods and various UV detector wavelengths were conducted with paeonia radix of 4-year old Euisung local variety.

The most reasonable paeoniflorin extraction time by reflux apparatus was 1hr, and by ultrasonic apparatus was 3hrs, and those methods were completed only once. Concentration of paeoniflorin by reflux apparatuses at 1hr, and 2hrs, of extracting time were higher than those of ultrasonic apparatus, and the differences were highly significant. However, the differences of paeoniflorin concentration at 3hrs, and 4hrs, in two methods were not significant. In comparing paeoniflorin concentration of many lines, ultrasonic extracting apparatus was more simple and effective than the reflux apparatus.

Paeoniflorin was more reasonable sensitivity at 240nm, and albiflorin was 254nm by HPLC. When paeoniflorin and albiflorin were analyzed simultaneously, 254nm was more stable than any other wavelength.

Key word : *Paeonia radix*, Euisung local variety, Reflux apparatus, Ultrasonic apparatus, Paeoniflorin, UV detector wavelength

작약근의 주요성분은 paeoniflorin, albiflorin, benzoic acid, oxy-paeoniflorin 등으로 알려져 있는데^{1-3,5-9)}, 이중 paeoniflorin은 작약의 주 약리효과와 약리실험 결과가 일치하여 작약을 대표하는 유효성분으로서 품질을 평가하는 중요한 지표물질이 된다^{2,4,5,7-9)}.

약용작물의 성분추출은 흔히 환류추출법을 이용

하며¹⁰⁾, 작약에서도 paeoniflorin을 환류장치에 의해 추출하지만 연구자에 따라서 추출용매의 선택 및 추출시간, 추출횟수에 다소 차이를 보인다.

작약근의 paeoniflorin 정량은 HPLC(High Performance Liquid Chromatography), GC(Gas chromatography), TLC(Thin layer chromatography) 등을 주로 이용하지만, 최근 이들 중 분

* 嶺南大學校 農畜產大學(College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan 721-749, Korea)

〈'94. 8. 18 接受〉

석의 재현성이 뛰어나고, 표준물질의 농도에 따라 쉽게 정량이 가능한 HPLC분석을 가장 많이 이용한다²⁾. 그러나 HPLC분석시 추출성분간의 용해도 차이로 기인한 공존물질의 방해와 색소의 영향으로 분리상태가 불량할 수 있고, 여러성분을 동시에 정량하고자 할 때 일부 성분들의 peak가 overlap 될 수 있으므로 적절한 HPLC 분석조건이 요구된다.

본 실험은 작약근 품질검정에 있어 paeoniflorin 함량 조사방법의 기초자료를 얻고자 paeoniflorin 추출방법과 추출시간을 달리하여 그 차이를 확인하고, 작약근 성분분석에 적합한 HPLC분석조건을 구명할 목적으로 본 실험을 수행하였다.

材料 및 方法

공시재료는 경북 영천군 고경면 작약 재배농가의 정식 4년차인 의성품종(*Paeonia lactiflora* Pall.)에서 5개체를 선정하고, 1993년 6월 17일 수확하였다. 수확된 작약근을 수세한 뒤 생근의 굵기가 27 mm 이상인 뿌리를 선별하여 상온에서 30일간 건조한 후 60mesh로 분쇄하여 분석시료로 이용하였다.

작약근의 paeoniflorin 추출방법은 일반적으로 환류추출법과 최근 분석물질의 추출작업이 용이하여 식품분석에 많이 이용되고 있는 초음파추출법으로 달리 하였으며, 두 추출방법간의 효율을 비교하고, 각각의 방법에서 적정 추출시간을 찾고자 하였다.

환류추출법에서 추출시간에 따른 paeoniflorin 함량 조사는 분쇄시료 1.0g을 취하여 메탄올 100 ml를 추출용매로 하고, 60℃ 조건에서 20min., 40 min., 60min.으로 추출시간을 달리하였으며, 추출 횟수에 대한 실험은 1시간 추출을 1회로 하여 동일한 방법으로 4회까지 추출한 후 각 용매를 감압농축하여 100ml로 만든 뒤 HPLC에서 분석하였다.

초음파추출법은 환류추출법과 마찬가지로 분쇄시료 1.0g을 메탄올 100ml에, 60℃ 조건으로 추출하였으며, 추출시간을 30min., 60min., 120min.으로 달리 추출하여 분석하였다.

또한 환류추출과 초음파추출의 효율비교는 두 방법 모두 시료 1.0g, 메탄올 100ml, 60℃ 조건에서 추출 시간을 1hr., 2hr., 3hr., 4hr.으로 달리하여 paeoniflorin추출 효율을 비교하였다.

HPLC 분석조건에 관한 실험은 작약근 추출물에서 최대의 흡광도를 찾아 최적의 UV detector 조건을 모색하기 위해 UV scanner(Pharmacia 80-2092-26)를 이용하였으며, 표 1의 분석조건 가운데 UV detector 파장만 달리하여 다른 조건은 동일한 상태로 분석하였고, 시료용액은 환류추출법에 의해 취해진 것을 이용하였다.

본 실험에 이용된 paeoniflorin 표준품은 일본 화광 순약 주식회사의 순수 정제품을 이용하였으며, Ultrasonic cleaner는 미국 Branson사의 Model 2200을 사용하였다.

Table 1. HPLC operating conditions for the analysis in paeonia radix

Column	:	μ -Bondapark C ₁₈
Detector	:	UV 254 nm
Sensitivity	:	0.05 AUFS
Mobil phase	:	30% Methanol
Flow rate	:	1.0 ml /min.
Chart speed	:	0.5 cm /min
Intergrator	:	Young-in D520B

結果 및 考察

1. 추출방법에 따른 paeoniflorin 함량변화

환류추출 및 초음파추출법으로 추출한 작약근 추출물을 HPLC 분석하였을 때 추출방법에 따른 chromatogram의 변화는 없었으며, paeoniflorin peak는 두 추출방법 모두 10.2분대에 존재하였다(그림 1).

환류추출법에서 추출시간을 20min., 40min., 60min.으로 달리하였을 때 paeoniflorin의 함량은 표 2와 같이 각각 2.66%, 2.75%, 2.92%로서 추출시간이 20min., 40min., 60min.으로 증가됨에 따라 추출된 paeoniflorin 함량도 증가되었다(표 2). 환류추출에서 60min.을 1회로 하여 1회에서 4회까지 추출횟수를 달리하였을 때 paeoniflorin함량 변

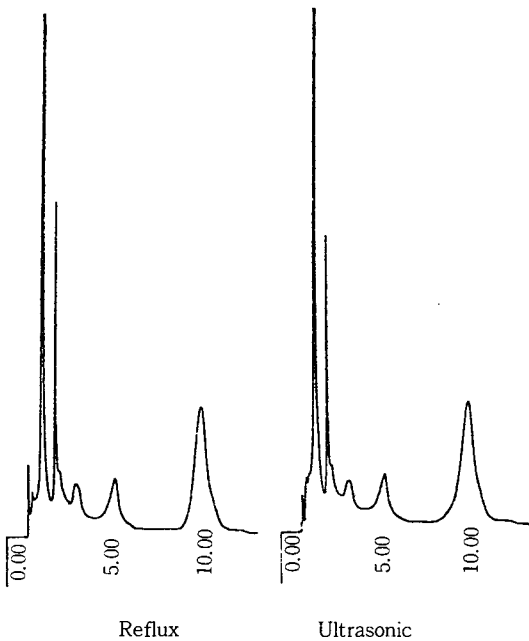


Fig. 1. HPLC chromatograms of paeonia radix, Euisung variety using reflux and ultrasonic apparatus.

화는 표 3과 같이 각각 2.92%, 2.81%, 2.98%, 3.07%로서 1~4회까지의 추출횟수에 따른 일정한 경향이 없었으며, 추출 횟수에 따른 통계적 차이도 인정되지 않았다. 그러므로 환류추출법에서 메탄올을 추출용매로 이용할 경우 60min., 1회 추출이 가장 알맞다고 평가된다.

그러나, Akada 등¹⁾은 물을 추출용매로 이용할 경우 paeoniflorin추출효율이 가장 높았으며, 추출시간이 20min., 1회로 완전하게 추출된다고 보고한 바 있다.

초음파추출법에서 추출시간을 30min., 60min., 120min.으로 달리 하였을 때 paeoniflorin 함량은 표 4와 같이 각각 2.36%, 2.64%, 2.62%로서 30min.의 추출이 60min., 120min.의 추출보다 약 0.26% 낮은 경향이었지만 paeoniflorin 함량의 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

환류추출 및 초음파추출법에서 각각 방법의 적정 추출시간을 모색하고 동일시간에서 두 방법을 상호 비교하기 위해 각각 추출시간을 1hr.~4hr.까지로 달리하여 paeoniflorin 함량을 조사한 결과는

Table 2. Changes of paeoniflorin concentration by extraction time using reflux apparatus

Extraction time	Paeoniflorin concentrations(%)
20 min.	2.66 b
40 min.	2.75 ab
60 min.	2.92 a

The same letters in a column means are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 3. Changes of paeoniflorin concentration by extraction number using reflux apparatus

Number of extraction	Paeoniflorin concentrations(%)
1	2.92 a
2	2.81 a
3	2.98 a
4	3.07 a

The same letters in a column means are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 4. Changes of paeoniflorin concentration by extraction time using ultrasonic cleaner

Extraction time	Paeoniflorin concentrations(%)
30 min.	2.36 a
60 min.	2.64 a
120 min.	2.62 a

The same letters in a column means are not significantly different at the 5% level by DMRT.

표 5와 같다. 환류추출법은 추출시간을 1hr.~4hr.까지 달리하여도 paeoniflorin 함량의 통계적 유의차는 인정되지 않아 1hr.의 추출로도 충분한 결과를 얻었다. 반면, 초음파추출법 중 1hr., 2hr의 추출은 2.64%, 2.62%로 다소 낮은 경향을 보이거나 3hr. 이상이면 paeoniflorin 함량의 통계적 차이가 없다는 결과를 얻었다.

초음파추출과 환류추출의 추출시간에 따른 효율을 비교하면 2hr.까지는 0.28%, 0.32%로 두 추출법간의 paeoniflorin 추출효율이 고도의 유의차를 나타내지만, 3hr. 이상에서는 두 추출법간의 유의

Table 5. Changes of paeoniflorin concentration by different extraction methods and times in paeonia radix, Euisung variety

Extraction method	Extraction time				Means
	1 hr.	2 hr.	3 hr.	4 hr.	
Ultrasonic	2.64 b ¹⁾	2.62 b	2.87 a	2.84 a	2.74
Reflux	2.92 a	2.94 a	2.94 a	2.93 a	2.93
Difference	0.28**	0.32**	0.07 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.19*

¹⁾ The same letters in a row means are not significantly different at the 5% level by DMRT.

*,** : Significant at 5% and 1% level. ns : non-significance.

차는 없었다. 그러나 전체 시간대에 따른 환류추출법과 초음파추출법간의 paeoniflorin 함량을 비교하면 환류추출이 0.19% 더 높게 나타나 그 차이는 유의하며, 특히 초음파 추출시간이 2hr. 이하인 경우에 초음파추출법이 환류추출법보다 낮게 평가되었다.

따라서 작약근 중 paeoniflorin의 정확한 양을 용출시켜 정량할 때에는 환류장치를 이용하는 것이 정확하다고 생각되나, 다수 품종의 paeoniflorin 함량을 상대적으로 비교할 때에는 분석작업이 용이한 초음파추출장치를 이용하는 것이 더 실용적이며, 추출시간은 3hr.이 가장 적당하다고 판단된다.

2. 작약근 추출물의 HPLC분석조건

작약근 함유성분 중 paeoniflorin과 albiflorin은 모두 분자량이 480이므로 메탄올 및 메탄올/물에 용해되는 organic soluble이다. 이들 물질의 분리에 이용되는 column은 silicagel에 비극성 화합물인 C₁₈을 화학적으로 결합시킨 것을 이용하며, 이동상(mobil phase)은 극성이 강한 MeOH(6.6)과 H₂O(9.0)을 이용한 역상(Reverse phase)조건에서, Detector는 가장 광범위하게 사용되는 UV detector를 흔히 사용하고, 그 분석파장은 254nm, 혹은 230nm에서 paeoniflorin 및 albiflorin 정량 분석이 이루어지고 있다.

UV Detector 중 fixed wavelength UV detector는 파장이 210, 254, 280nm 등으로 제한되어 있지만, variable wavelength UVdetector는 190~

400nm까지의 파장대역을 가지므로 추출용매 중 UV에 흡광도를 나타내는 모든 유기물질을 감지할 수 있는 장점이 있어 최근 많이 이용되고 있다.

작약근 추출물 중 paeoniflorin의 정량분석은 흔히 HPLC를 이용하며, 그 분석조건은 연구자에 따라 다소 차이가 있다.

Beer-Lambert law($A = \epsilon \cdot b \cdot c$, A : 흡광도 또는 감도, ϵ : 몰흡광계수, b : HPLC cell의 상수, c : 시료의 농도)에 의하면 시료의 농도와 HPLC cell의 상수가 일정할 때 흡광도를 높이려면 몰흡광계수가 높아져야 한다. 그러나 각 물질은 일정파장에서 일정한 흡광계수를 가지므로 결국 흡광계수를 높이려면 최대 흡광계수를 나타내는 파장이 주어져야 한다.

작약근 추출물에서 최대 흡광도를 나타내는 파장을 찾기 위해 UV scanner를 이용하여 scanning 한 결과 225nm와 275nm에서 2개의 흡광 peak가 존재하는 것을 알 수 있었다(그림 2).

UV scanner를 이용하여 scanning 한 결과 얻어진 225nm, 275nm와 UV detector의 표준파장인 254nm, 그리고 HPLC 상에서 임의로 200nm부터 300nm까지 10nm씩 파장을 달리한 결과 paeoniflorin의 흡광 peak가 높았던 240nm 등 4종류의 서로 다른 파장에서 작약근 추출물의 chromatogram을 비교하여 보면 파장에 따라 paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin 등의 peak height나 분리상태가 서로 다른 양상을 보이는 것을 알 수 있었다(그림 3).

275nm에서 paeoniflorin peak와 albiflorin으로 추정되는 peak의 height는 낮았으며, oxypaeoniflorin으로 추정되는 peak는 앞의 물질과 완전히

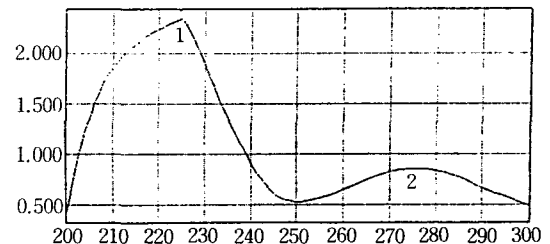


Fig. 2. UV scanning chart of paeonia radix extraction.

분리되지 않았으나, 상대적으로 높은 감도를 나타내었다.

표준파장인 254nm에서 paeoniflorin peak와 albiflorin으로 추정되는 peak는 비교적 안정적으로 분리가 이루어졌으며, 특히 albiflorin으로 추정되는 peak는 비교적 다른 파장에서보다 높은 감도를 나타내었고, oxypaeoniflorin은 base line이 없어 peak로 인정되지 않았다.

240nm의 파장에서 paeoniflorin peak는 상당히 높은 감도를 나타내었으며, peak의 모양도 sharp하고, 분리효율을 나타내는 이론단수도 다른파장에 비해 높았으나, albiflorin으로 추정되는 peak는 254nm에 비해 상당히 낮은 흡광도를 보였고, oxypaeoniflorin peak 또한 254nm와 같이 peak로 인정되지 않았다.

Scanning 결과 최대 흡광도를 나타낸 225nm에서 paeoniflorin peak는 다른 처리된 파장에 비해 최대 흡광도를 나타내었지만 tailing 현상과 함께 이론단수가 낮게 평가되었고, albiflorin으로 추정되는 peak는 모양이 shoulder형으로 일그러진 상태였으며, oxypaeoniflorin peak는 앞 물질과의 overlap 현상으로 분리가 이루어지지 않아 base

line drift를 나타내었다.

따라서 작약근 추출물에서 paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin이 최대 흡광도를 나타내는 파장이 서로 다르게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 여러 성분을 동시 정량시에는 254nm가 비교적 안정적이지만 각각의 성분을 정확히 정성, 정량할 때에는 paeoniflorin peak는 240nm, albiflorin으로 추정되는 peak는 254nm, oxypaeoniflorin으로 추정되는 peak는 275nm가 가장 효과적으로 판단된다.

摘 要

경북 영천군 고정면 작약 재배농가의 정식 4년차인 의성품종(*Paeonia lactiflora* Pall.)을 1993년 6월 17일 수확하고, 굵기가 27mm 이상인 뿌리를 선별하여 paeoniflorin 추출방법 및 HPLC 분석조건에 대한 조사결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 초음파추출 및 환류추출법에 의한 작약근 추출물의 HPLC chromatogram은 상호간의 차이가 없었으며, 두 추출법 모두에서 paeoniflorin

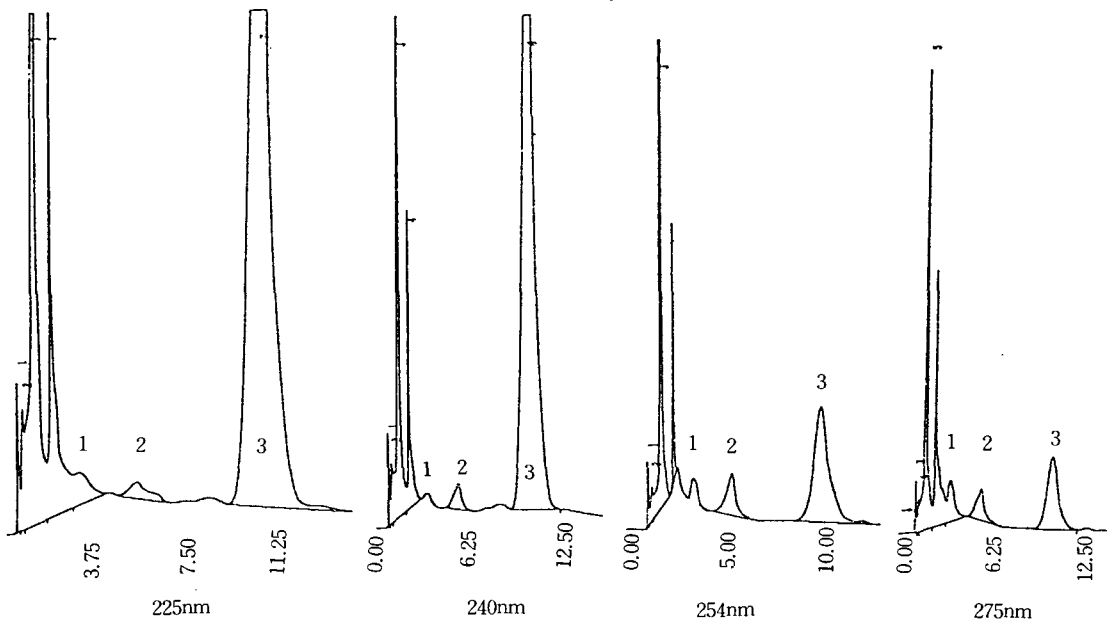


Fig. 3. HPLC chromatograms of paeonia radix extraction with different UV detector wavelengths. 1: Oxypaeoniflorin 2: Albiflorin 3: Paeoniflorin

retention time이 10.2분대에 peak가 존재하였다.

2. 환류추출법에 의한 paeoniflorin 추출은 60min., 1회로 충분하였다.
3. 초음파추출에서 추출시간이 1hr.~2hr.까지의 paeoniflorin함량은 동일시간의 환류추출보다 각각 0.28%, 0.32% 낮게 평가되었고 3hr.~4hr.의 추출에서는 두 방법간에 차이가 없었다.
4. 초음파 추출법은 분석작업이 용이함으로 다수 계통의 상대적 비교시에는 환류추출법보다 효과적이다.
5. 작약추출물 중 paeoniflorin, albiflorin을 HP-LC를 이용하여 분석할 때 높은 감도를 보이는 가장 효과적인 UV Detector 파장은 각각 240 nm, 254nm이고, 동시정량시에는 254nm가 비교적 안정적이었다.

引用文獻

1. Akada Yoshinobu, Sadako Kawano, Yai-chiro Tanase. 1980. High speed liquid chromatographic analysis of drug 12. Yakugaku zasshi 100(9):958-996.
2. 鄭名根. 1993. 작약(*Paeonia lactiflora* Pall.)의 생육시기 및 건조방법에 따른 성분변화. 嶺南大學校 碩士學位論文.
3. 張基運, 金昭年, 徐寬錫, 金必柱, 李喜德. 1989. 施肥管理에 따른 芍藥 生育特性和 有效成分 研究. 韓土肥誌. 22(4):315-322.
4. 張相文, 金鍾完, 崔炆. 1987. 土壤理化學性 및 N, P, K 吸收量과 芍藥根 中の paeoniflorin 含量의 關係. 大邱大 農科研集 1(別策) pp: 1-8.
5. 琴惠允. 1985. 高速液體 Chromatography에 의한 白芍藥 中 paeoniflorin의 定量. 德成女子大學校 碩士學位論文.
6. 李喜德. 1992. 芍藥의 繁殖方法과 芍藥/牡丹接木根의 有效成分 比較. 韓作誌 37(3):283-287.
7. Masao Yoshizaki, Tsuyoshi Tomimori, Shige-yoshi Yoshioka, Tsuneo Namba. 1977. Fundamental studies on the crude drug V. quantitative analysis constituents in crude by rod-thin-layer chromatography with FID. (2). determination of paeoniflorin and albiflorin in paeony roots. Yakugaku zasshi 97(8):916-921.
8. Shimizu Mineo, Takejirp Hashimoto, Satoshi Ishikawa, Fumiya Kurosaki, Naokata Morita. 1979. Analysis of constituents in crude drugs by high-speed liquid chromatography. I. quantitative Analysis of paeoniflorin in paeony roots. Yakugaku zasshi 99(4):432-435.
9. 宋保完. 1980. 韓國產 芍藥 中の Benzoic Acid 및 Paeoniflorin의 含量. 慶熙大學校 碩士學位論文.
10. 農村振興廳 作物試驗場. 1989. 藥用植物 遺傳資源의 體系의 蒐集 및 特性 研究. 科學技術處. pp. 151-153.