

모란 추출액에서 paeoniflorin과 paeonol 동시 정량 분석 및 화장품 원료의 품질관리 기준 설정

윤기훈^{1,2*} · 지용하² · 이동규¹ · 백수희^{3†}

¹충북대학교 공과대학 공업화학과

²(주)솔레온 기업부설연구소

³순천대학교 약학대학 약학과

(2018년 2월 21일 접수: 2018년 3월 19일 수정: 2018년 3월 21일 채택)

Quantitative Analysis of Paeoniflorin and Paeonol in Peony Extracts and Quality Control Standards

Ki-Hun Yun^{1,2*} · Yong-Ha Chi² · Dong-Kyu Lee¹ · Soo-Heui Paik^{3†}

¹Department of Industrial Engineering Chemistry, Chungbuk National University,
Cheongju, Chungbuk 28644, Republic of Korea

²Research Institute, Soleon, Co. Ltd, Cheongju, Chungbuk 28644, Republic of Korea

³Department of Pharmacy, Sunchon National University, Suncheon, Jeonnam 57922,
Republic of Korea

(Received February 21, 2018; Revised March 19, 2018; Accepted March 21, 2018)

요 약 : 모란은 항염증작용, 항알레르기작용, 항균작용, 중추억제, 위액분비억제, 진경작용 등의 약리활성이 있을 뿐 아니라 항산화작용, 미백작용 등이 보고되면서 화장품 원료, 미용식품으로 다양하게 활용 가능성이 탐색되고 있다. 모란의 뿌리, 잎 및 꽃에서 추출용매와 온도, 시간에 따른 추출액 중 성분의 함량 변화를 비교하였다. Paeoniflorin과 paeonol을 지표성분으로 하여 두 성분의 함량을 동시에 정량분석하기 위한 HPLC 분석법을 설정하고 분석 배치마다 검량선과 QC용 검체를 사용하여 시스템적합성을 확인하면서 시료 분석을 실시하였다. Paeonol은 뿌리에서만 검출되었고 잎과 꽃에서는 검출되지 않았으며, paeoniflorin은 잎, 꽃에서의 농도가 뿌리에서보다 높았다. 추출용매와 섞을 때 뿌리의 절도는 구입 당시의 조각을 그대로 사용할 때보다 적당한 크기로 분쇄한 후 사용할 때 두 성분 모두 높은 농도로 추출되었다. 추출용매로는 30% 1,3-butylene glycol을 사용할 때 농도가 가장 높았다. 추출온도와 시간은 고온, 장시간 일수록 농도가 높아지는 경향을 보였으나 75°C, 4 h 이상에서는 농도 상승이 완만했으며, paeonol은 8 h까지 지속적으로 농도가 상승하는 경향을 보였다. 뿌리, 잎, 꽃의 배합 비율은 2+2+1g/0.5kg로 할 때 두 지표성분의 함량 기준에 도달 가능하다고 판단하였다. 최종적으로 원재료를 2+2+1g/0.5kg로 배합하고 30%

†Corresponding author
(E-mail: shwhite@scnu.ac.kr)

1,3-butylene glycol을 추출용매로 사용하여 75°C에서 4 h 동안 추출하는 방법이 두 지표성분의 활성 농도 기준과 원재료 및 제조공정상의 비용을 함께 고려할 때 적절한 조건이라고 판단하였고, 이 조건에서 10 kg 규모까지 추출액 제조 단위를 스케일업 하였다.

주제어 : 화장품, 모란, 용매추출, 페오니플로린, 페오놀, 고성능액체크로마토그래피

Abstract : Paeony has pharmacological activities such as anti-inflammatory, anti-allergic, anti-bacterial, central inhibitory, gastric secretion inhibition, and antispasmodic activities. In addition, its antioxidant activity and whitening effect being reported, thus it is being explored as raw materials for cosmetics. We compared the changes in the contents of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts, depending on the changes of extracting solvents, temperature and time. The HPLC method was set up for simultaneous analysis, the system suitabilities were confirmed by using the calibration curves and the QC samples for each assay batch. Paeonol was detected only in roots, and paeoniflorin was higher in leaf and flower than root. Higher concentrations of both ingredients were extracted when the root was used after grinding to a suitable size, and when 30% 1,3-butylene glycol was used as the extraction solvent. Also the concentrations tended to increase at higher temperature and longer time, but the increase was gradual at over 75°C and 4 hours. The ratio of root, leaf and flower was determined to be 2+2+1g/0.5kg of batch, reaching the contents criteria of paeoniflorin and paeonol. Finally, we selected as the best extraction condition when the raw materials are mixed with 2+2+1g/0.5kg and extracted with 30% 1,3-butylene glycol as an extraction solvent at 75°C for 4 hours, considering both the concentrations of two components and the cost of raw materials and manufacturing process, The extraction units were scaled up to 10 kg under this condition.

Keywords : cosmetics, Peony, *Paeonia suffruticosa Andrews*, solvent extraction, paeoniflorin, paeonol, HPLC

1. 서론

현대 사회에서 신체의 건강과 외모가 경쟁력 중 하나라는 인식과 함께 화장품에 대한 관심은 남녀 구분 없이 높아지고 있다. 또한 생활수준의 질적 향상과 더불어 단순히 외모를 가꾸는 의미를 넘어서 정신적, 신체적 건강을 함께 고려하여 화장품과 미용용품을 선택하고 있다. 특히 피부에 작용하는 화장품의 경우 다양한 부작용이 발생할 수 있기 때문에 천연 기능성 소재에 대한 중요성이 더욱 높아지고 있으며 그 중에서 미백효과 및 항산화작용을 통한 노화방지에 대한 관련 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 화장품 산업 분야에서도 유기농, 효모, 한방성분이 함유된 천연화장품 시장이 전 세계적으로 꾸준히 성장하고 복합 기능성 제품에 대한 수요가 크게 확대되고 있는 추세이다. 설화수, 더 히스토리 오브 후, 한울, 수려한, 다니한 등 한방성분이 포함된 화장품은 국내

에서 뿐 아니라, 특히 중국으로의 수출량이 급증해 효자 수출상품으로 입지를 탄탄히 굳히고 있다[1, 2].

이처럼 천연화장품에 대한 중요성과 수요증대는 전 세계적 트렌드이지만 이와 관련한 기술적 니즈, 관리 기준 등은 아직 충분히 마련되지 못한 상태이다. 천연 소재로부터 유래한 원료들은 다양한 성분의 복합체로, 단일 유효 성분에 의해 약효가 발현되는 것 뿐만 아니라 함께 존재하는 수많은 성분들의 복합, 상승, 때로는 경쟁작용에 의해 생체에 영향을 미치는 것이 일반적이다. 이로 인해 의약품 개발 분야에서는 약리작용을 나타내는 유효 성분에 대한 기준 규격 설정의 필요성이 제기되고, 첨단 분석기술을 이용한 품질평가 기술 개발 및 기준규격의 과학화, 선진화를 위하여 국내에서 오래전부터 사용하고 사용 빈도가 높은 한약재를 대상으로 단계적으로 유효성분 규명을 위하여 화학적 분리 및 분석, 효능평가 및

기준규격의 평가를 진행해오고 있다[3, 4]. 한편 화장품 기술개발 분야에서는 2013년 이후 화장품 기준 및 시험방법을 폐지하고 제조판매업자에게 화장품의 품질 확보를 위한 자율성, 책임성을 부여하고 있다. 합성 화합물에 비해 천연소재를 사용한 화장품은 천연소재로부터 원료 물질(추출물)을 얻는 과정에서의 안정적인 품질 확보가 완제품의 품질 유지를 위한 주요 인자이며, 이를 위해 천연소재의 채취 및 추출물 제조 과정에서 최적의 기준 및 공정을 설정하고 자체적으로 표준화하려는 노력이 필요하다.

모란(*Paeonia suffruticosa* Andrews)은 작약과(Paeoniaceae)에 속하는 중국원산의 낙엽소관목으로, 꽃이 가지는 관상학적 가치와 식물체가 가지는 생리학적 가치로 인해 King of flowers, Queen of herbs라 불리기도 하는 식물이다. 예로부터 부귀의 상징이며 선비들의 소박한 소망을 담은 책거리 그림에도 부귀와 공명을 염원하는 모란꽃이 그려졌으며 신부의 예복에도 모란꽃이 수놓아졌다[5]. 모란의 주요성분으로는 paeonol, paeonoside, apiopaeonoside 및 paeonolide 등과 같은 phenol 류, paeoniflorin, oxypaeoniflorin, 및 benzoylpaeoniflorin 등과 같은 monoterpene glycoside류, tetragalloylglucose, pentagalloylgucose, hexagalloylglucose, (+)-catechin 및 procyanidin B1 등과 같은 tannin류 및 cis-resveratrol과 suffruticosol A~C 등과 같은 stilbene류 등이 보고되었다[6]. Paeonol과 그 배당체는 뿌리껍질과 목심의 주요 성분으로 줄기에는 없다고 알려져 있는데, 줄기껍질에는 paeonolide, paeoniflorin이 있으며 꽃에는 pelargonin과 paeonin 등의 성분이 있다.

Paeonol은 한방에서 통풍, 류마티즘 관절염의 진통, 피부발진에 대한 항염증 효과 등이 있으며 [7] paeoniflorin은 모란을 포함한 작약속 전 분류군에서 나타나며 진통, 진경, 항염증 효과를 나타내는 것으로 밝혀져 있다[5, 7]. 대한민국약전 및 대한민국약전외한약(생약)규격집에서는 모란의 뿌리껍질인 목단피의 지표성분으로 paeonol을, 모란과 같은 과(Paeoniaceae)에 속하지만 모란에 비해 특히 paeoniflorin을 많이 함유하고 있는 작약은 paeoniflorin을 지표성분으로 지정하고 있다 [8, 9]. 이로 인하여 현재까지 수행된 성분 연구들은 대부분 목본성인 모란에서는 paeonol을 위주로, 초본성인 작약에서는 paeoniflorin을 위주로 한 연구들이었고, 모란에서 두 성분을 모두 대상

으로 한 연구는 거의 수행되지 않았다[5].

한편 모란 추출물에 포함된 성분들의 미백효과, 항산화효과, 세포독성, 항염증효과 및 항균효과 등에 대한 연구 결과들이 보고되면서, 기능성 화장품 소재로의 응용 가능성에도 많은 관심을 보이고 있다. 하지만 아직 기능성화장품 소재로서 유효성분의 함량이나 품질관리 기준이 명확하지는 않은 실정이다. 항산화작용 및 미백작용에 대한 연구들을 살펴보면, 목단피 추출물 125 $\mu\text{g/mL}$ 이 가지는 a,a-diphenyl-b-picrylhydrazyl (DPPH) free radical 소거능이 57.4%였고 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 84.7%로 항산화제로 널리 이용되는 vitamin C 1 mg/mL에 비해 다소 낮으나 우수한 항산화 효과를 보이는 것으로 확인되었다. 또한 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도가 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 nitric oxide (NO) 생성을 염증이 유도되지 않은 대조군과 유사한 정도로 억제함이 확인되었다[11]. 피부 멜라닌의 생합성 과정에 필요한 tyrosinase 활성 억제능은 미백물질 탐색에서 유용하게 사용되고 있는데, 목단피 추출물의 에틸아세테이트 분획 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 양성대조군인 kojic acid와 유사하게 80%의 우수한 tyrosinase 억제 효과를 나타내었으며, 이러한 tyrosinase 억제제는 MTT를 통한 세포독성을 보이지는 않으면서 멜라닌 생성을 감소시킨다고 한다[12]. 또 다른 연구에 따르면 목단피 물 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 DPPH radical 소거활성이 81.3%이며 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하면서도 세포독성은 없는 농도로서, 이는 잘 알려져 있는 한약재인 감초, 인삼, 창출 추출물을 같은 농도로 처리할 때보다 우수한 효능이라고 한다 [13]. 이러한 결과들은 모란 추출액을 미백 및 노화방지 화장품 개발에 활용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

기존 유통되는 모란 추출물들은 뿌리껍질을 주로 사용하고 있는데, 모란의 진초, 즉 뿌리, 줄기, 잎, 꽃을 배합하여 사용하면 모란과 작약의 지표 성분인 paeonol과 paeoniflorin을 모두 얻을 수 있으며, 줄기, 잎, 꽃에 많이 함유된 유용한 미백, 항산화 작용 성분들이 상가적인 효능을 나타낼 것으로 사료된다. 그러므로 paeonol 뿐 아니라 paeoniflorin을 약리성분으로 함께 고려한다면 잎이나 꽃도 충분히 이용할 수 있으며, 특히 모란은 목본성 식물로 초본성인 작약에 비해 한 개체에서 다량의 잎을 수확할 수 있기 때문에 잎의 이용성을 고려할 만한 가치가 충분할 것으로 보

인다[5]. 그럼에도 식물 각 부위의 적정 배합비에 대한 근거는 아직 마련되지 않은 실정이다. 본 연구에서는 앞서 소개한 화장품 소재로서 항산화, 미백 작용에 대한 연구결과들을 바탕으로 paeoniflorin과 paeonol 두 성분을 지표성분으로 동시에 고려하여 각각 60 $\mu\text{g/mL}$ 이상을 농도 기준으로 설정하고, 그 이상을 함유하는 모란 추출액을 제조하고자 하였다. 이를 위하여 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 paeoniflorin과 paeonol 두 성분을 동시 정량하는 분석법을 설정한 후, 모란 전초를 사용하여 뿌리, 잎, 꽃 부위별로 paeoniflorin과 paeonol 성분의 분포를 파악하고 원재료의 배합비율, 용매, 온도, 시간 등의 추출조건에 따른 함량을 비교 검토하여 모란 추출액 제조를 위한 최적의 공정을 제안하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1 시료

실험에 사용된 모란꽃, 모란잎/줄기, 목단피, 모란 묘목은 (쥬카낙스바이오에서 구매 후 40°C 이하에서 음건한 후 그물망에 넣어 보관하였다. 원물 각 2 g을 100°C, 1h 조건에서 수분측정기(FD-610)로 함수율을 측정하여 20% 이내인 것을 확인하고 사용하였다. 모란잎/줄기의 함수율은 7.5 ~ 8.5 %, 모란꽃의 함수율은 약 9.0~16.9%, 목단피의 함수율은 10.2~11.1%로 측정되었다.

2.1.2 시약

추출에 사용된 용매는 2차증류수와 시약용 1,3-butylene glycol(대정화금(주), 시흥, 한국)을 사용하였다.

정량 분석에 사용된 용매와 시약은 HPLC용 acetonitrile 및 물과 초산은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. Paeoniflorin(Paeoniflorin-2015, 99.7%)과 paeonol(Paeonol-2007, 100%) 표준품은 식품의약품안전처(Osong, Korea)로부터 생약 지표성분 표준품을 분양받아 사용하였다.

2.1.3. 기기

추출기(COSMOS-660, 경서 E&P), 혼합기 300 L(송삼산업)로 추출하였으며, 필터(absfil)는 1차. PP 1 μm -PP Pleated, 10", Nom 1 μm , EPDM Gasket, 2차. PP 0.2 μm -PP Pleated, 10", Nom 0.2 μm , EPDM Gasket, 3차. FDM 0.5 μm -FDM Pleated, 10", Abs 0.5 μm , EPDM Gasket, 4차. PES 0.2 μm -PES Membrane Pleated, 10", Abs 0.2 μm , EPDM Gasket 등을 사용하여 여과하였다.

HPLC 시스템은 Waters 2690 HPLC separating system (Milford, MA, USA), UV detector는 Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 분석용 컬럼은 Phenomenex Luna C18(2) column (250 x 4.6 mm, 5 μm , Phenomenex, USA)를 사용하였다.

2.2. 추출액 제조

추출기에 원재료와 추출용매를 혼합하여 총중량 0.5 kg으로 하여 추출기 안에서 여러 추출 조건 하에 추출한 후 추출액을 0.20 μm 멤브레인 필터(Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA)로 여과하여 시험물질을 제조하였다. 시험물질은 시험이 종료되는 기간까지 냉장, 차광보관 하였다. 예비적으로 추출용매 종류의 영향, 원재료 부위 간의 차이, 뿌리의 세질 크기의 영향을 비교하는 단계에서 추출조건을 80°C, 6 h으로 하였으며, 그 후 여러 추출온도에서의 농도를 비교하기 위해 45°C, 60°C, 75°C, 그리고 90°C까지 검토하였다. 추출시간에 따른 차이를 비교하는 단계에서는 추출온도를 75°C로 하였다. 단계적으로 실험한 추출 조건을 Table 1에 요약하였다.

2.3. 정량분석

1) HPLC 분석조건

Paeoniflorin과 paeonol의 분석에 관한 선행 연구들을 참조로 하여 모란 추출액 속의 paeoniflorin과 paeonol의 함량을 동시에 정량하기 위한 방법을 검토하고 본 연구실의 조건에 맞게 변경하고 Table 2에서와 같이 정량분석을 실시하였다[5, 6, 14-17].

Table 1. Conditions for making Peony extracts

목적	비교조건	추출조건
1 추출용매 검토	물, 15, 30, 45% 1,3-BG (1,3-BG)	뿌리+잎+꽃 2+2+2g/0.5kg 80°C, 6 h
2 부위별 농도 검토	뿌리, 잎, 꽃	원재료사용량 1g/0.5kg, 4g/0.5kg 30% 1,3-BG, 80°C, 6 h
3 뿌리의 절도 검토	뿌리조각 크게분쇄(crude) 작게분쇄(<1mm)	원재료사용량 4g/0.5kg 30% 1,3-BG, 80°C, 6 h
4 추출온도 검토	45, 60, 75, 90°C	뿌리, 잎, 꽃 별도 4g/0.5kg 30% 1,3-BG, 6 h
5 추출시간 검토	2, 4, 6, 8 h	뿌리, 잎, 꽃 별도 4g/0.5kg 30% 1,3-BG, 75°C
6 혼합비율 검토	뿌리+잎+꽃 2+2.5+0.5g/0.5kg 2+2+1g/0.5kg 2+1.5+1.5g/0.5kg 2+1+2g/0.5kg	30% 1,3-BG, 75°C, 4 h
7 Scale-up 평가	4+4+2g/1kg 8+8+4g/2kg 40+40+20g/10kg	30% 1,3-BG, 75°C, 4 h

* 1,3-BG: 1,3-Butylene glycol

Table 2. HPLC conditions for the analysis of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts

Column	Phenomenex Luna C18(2) column (250 x 4.6 mm, 5 μm, Phenomenex, USA)		
Column oven	30° C		
Detector	UV 230 nm		
Flow rate	1 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	20 min		
	A: 0.1% Acetic acid in distilled water B: Acetonitrile		
	Time (min)	A (%)	B (%)
Mobile phase	0	78	22
	3.5	78	22
	7	40	60
	14	40	60
	14.1	78	22
	20	78	22

2) 표준용액 및 검액 조제

Paeoniflorin 및 paeonol 표준품에 대한 표준용액은 acetonitrile로 1.0 mg/mL 농도의 표준원액을 조제하여 냉장보관(4°C) 하였다. 두 가지 보관용 표준용액을 혼합한 후 계열 희석하여 검량선

(두 성분 각각 400, 200, 100, 50, 20, 10, 5 μg/mL)과 QC(두 성분 각각 320, 80, 15 μg/mL)용 검액을 조제한 후 증류수로 2배 희석하였다. 함량분석을 하고자 하는 모란 추출액 시료는 acetonitrile로 2배 희석한 후 최종 분석에 사

용하였다.

3) 분석법 검증

분석배치 별로 in-study validation으로 시스템 적합성을 확인하였으며 분석배치의 인정범위는 다음과 같았다[18-20]. (1) 표준검량선은 7개 중 최소 5개(최저정량한계 및 최고정량한계는 제외)의 calibration point로 작성되어야 하며, 작성된 calibration point의 역산출된 농도는 정확도가 $\pm 15\%$ 를 초과하지 않으며 LLOQ에서는 20%까지 허용한다. 이때 표준 검량선의 결정계수 (r^2)는 0.99 이상이어야 한다. (2) QC 시료는 농도당 6개 시료 중 최소 4개에서 정확도가 $\pm 15\%$ 이내에 있어야 하며, 6개의 QC 시료 중에서 2개가 범위를 벗어나는 경우 서로 다른 농도여야 한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분석법 검증

본 실험에서는 모란 중의 성분 분석에 관한 선행연구[1,3,4]를 참고하여, HPLC-UV를 이용한 paeoniflorin과 paeonol의 동시분석 조건을 설정하고 이에 대한 검증을 수행하였다.

이동상인 0.1% acetic acid in distilled water와 acetonitrile을 기울기용리(gradient) 조건으로 20분간 흐르게 하여 paeoniflorin과 paeonol을 분리, 확인하였다. Paeoniflorin이 5.5분에 검출되었고 paeonol이 12.6분에 검출되어 상호 피크간의 간섭 없이 분리된 단일피크로 검출되었다. 공시료, paeoniflorin 및 paeonol 표준품 혼합액, 그리고 시험물질인 모란 추출액의 대표적인 HPLC chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다.

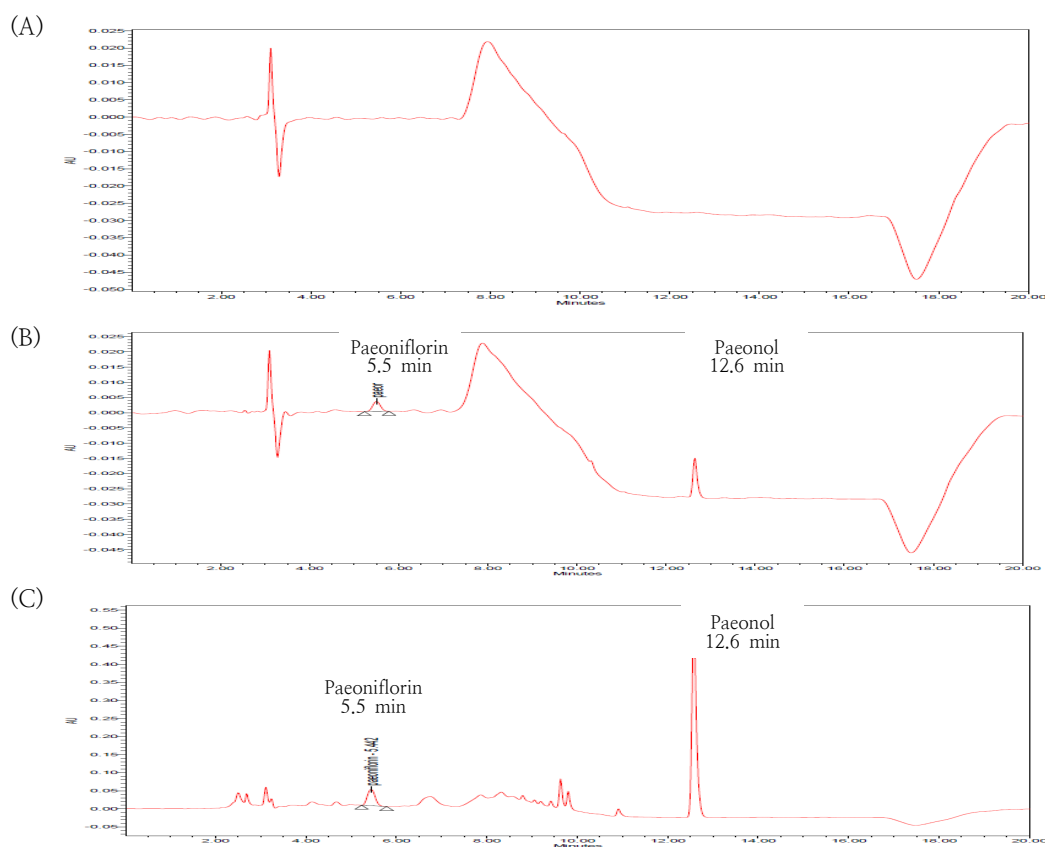


Fig. 1. Representative HPLC chromatograms of a blank (A), mixed standard solution of paeoniflorin and paeonol (B), and Peony extract (C).

모든 분석배치에서 최소정량한계 농도는 5 μ g/mL이었고, 표준검량선의 결정계수(r2)는 paeoniflorin과 paeonol의 모든 batch에서 각각 0.9990 이상으로 좋은 직선성을 보였다. 회귀직선식으로부터 역산출한 검량선 농도의 정밀도(precision)는 전체 정량범위에서 paeoniflorin은 7.7% 이하, paeonol은 5.3% 이하를 나타냈다. 역산출한 검량선 농도의 정확도(accuracy)는 전체 정량범위에서 paeoniflorin은 98.43%~101.8%, paeonol은 94.98~101.8%로 기준에 적합한 결과를 나타내어, 예상할 수 있는 모란 추출액 중 두 성분의 미량까지 검출 및 정량이 가능하였다. 또한 모든 batch에서 3 농도(15, 80, 320 μ g/mL)의 QC 시료의 정밀도는 paeoniflorin은 각각 5.4, 3.0, 3.3%, paeonol은 각각 5.0, 4.9, 4.5%로 나타났으며, QC 시료의 정확도는 paeoniflorin은 98.89%~100.4%, paeonol은 100.4%~100.9%로 기준에 적합한 결과를 보였다.

3.2. 추출 조건에 따른 함량 변화

1) 추출용매 검토

모란 뿌리, 잎, 꽃 각 부위를 2+2+2g/0.5kg of

batch로 배합하여 물, 15% 1,3-BG, 30% 1,3-BG, 45% 1,3-BG 4가지 추출용매에서 80°C, 6 h 동안 추출하여 용매조건을 비교한 결과를 Table 2에 나타내었다. 물에서보다 1,3-BG를 용매로 사용했을 때 추출액 중 paeoniflorin, paeonol 모두 더 높은 농도를 보였다. 1,3-BG의 농도가 높을수록 추출액 중 두 성분의 농도가 높은 경향을 보였으나 30%와 45% 간에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 30% 1,3-BG 용매에서 80°C, 6 h 추출액 중의 paeoniflorin과 paeonol의 농도는 각각 123.5 \pm 4.466 μ g/mL, 117.5 \pm 7.939 μ g/mL이었다.

2) 모란 부위별 농도 검토

뿌리, 잎, 꽃 부위별로 추출 시 paeoniflorin과 paeonol의 농도 수준을 확인하기 위해 각 부위별로 30% 1,3-BG 추출용매에서 80°C, 6 h 동안 추출하여 두 성분의 농도를 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다. 식물 각 부위 원재료의 사용량은 1 g과 4 g 두 방법으로 추출액을 제조하였다. Paeoniflorin은 뿌리 뿐만 아니라 잎, 꽃에서도 다량으로 존재하며 뿌리에 비해 잎, 꽃에서 더 높은 농도를 보인 반면, paeonol은 뿌리에서만

Table 2. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts for different extraction solvents

Solvent	Paeoniflorin		Paeonol	
	Mean (μ g/mL)	SD	Mean (μ g/mL)	SD
물	77.04	10.81	81.21	10.17
15% 1,3-BG	99.97	5.144	100.3	12.29
30% 1,3-BG	123.5	4.466	117.5	
45% 1,3-BG	118.2	7.911	120.2	8.850

* 1 batch contained 2, 2 and 2 g of root, leaf and flower, respectively

Table 3. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts of different parts

Amount of materials	Parts	Paeoniflorin		Paeonol	
		Mean (ug/mL)	SD	Mean (ug/mL)	SD
1g/0.5kg	Root	18.44	3.916	52.64	7.679
	Leaf	42.39	4.300	-	-
	Flower	28.65	2.936	-	-
4g/0.5kg	Root	45.99	9.842	188.7	12.54
	Leaf	124.9	12.17	-	-
	Flower	81.83	6.640	-	-

* 30% 1,3-BG, 80°C, 6 h

존재하고 잎과 줄기에서는 검출되지 않았다. 원재료의 양을 1 g에서 4 g으로 증량하여 추출했을 때도 같은 경향을 보이면서 paeoniflorin과 paeonol의 농도가 sub-proportional하게 증가하는 양상을 보였다.

3) 뿌리 분쇄 크기 검토

추출을 위해 사용하는 모란 뿌리 원재료의 조각 크기 또는 분쇄 정도가 추출 후 paeoniflorin과 paeonol의 농도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 구입한 형태 그대로의 조각(>1 cm), 조각립 형태로 크게 분쇄 및 작게 분쇄(직경<1mm)한 뿌리 4 g를 각각 사용하여 0.5 kg 배치 크기로 추출액을 제조했다. 추출조건은 30% 1,3-BG 추출용매에서 80°C, 6 h 동안 추출하였으며 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 원래의 형태 그대로 사용한 것에 비해 분쇄한 후 추출했을 때 추출액 중의 두 성분의 농도가 더 높았으며 paeonol보다 paeoniflorin의 농도에서 그 차이가 뚜렷했다. 크게 또는 작게 분쇄한 것 중에서는 paeoniflorin의

농도는 $60.48 \pm 8.964 \mu\text{g/mL}$, $64.74 \pm 5.707 \mu\text{g/mL}$, paeonol의 농도는 $208.0 \pm 8.677 \mu\text{g/mL}$, $199.8 \pm 6.928 \mu\text{g/mL}$ 로서 예상보다 차이가 뚜렷하지 않아서 분쇄의 정도가 지표성분의 농도에 미치는 영향이 크지 않은 것으로 판단했다.

4) 추출온도에 따른 부위별 성분의 농도

추출 온도를 45°C, 60°C, 75°C 및 90°C로 달리 하여 추출한 액 중 paeoniflorin과 paeonol의 농도를 비교하기 위하여, 뿌리, 잎, 꽃 각 부위별로 4g/0.5kg of batch 크기로 하여 30% 1,3-BG 추출용매에서 6시간 동안 추출하였다(Fig. 2). 뿌리, 잎, 꽃 모두 추출온도가 높을수록 두 성분의 농도가 높아지는 경향을 보였는데, 75°C에 비해 90°C에서는 유의한 변화를 보이지 않았고 오히려 감소한 경우도 있었다. 75°C에서 추출한 액에서 paeoniflorin과 paeonol의 농도는 뿌리는 $62.58 \pm 4.440 \mu\text{g/mL}$ 및 $205.5 \pm 5.200 \mu\text{g/mL}$, 잎과 꽃에서는 paeoniflorin만 검출되어

Table 4. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts for different root size

Size	Paeoniflorin		Paeonol	
	Mean (ug/mL)	SD	Mean (ug/mL)	SD
뿌리 절편	38.77	5.012	184.5	9.544
크게 분쇄 (crude)	60.48	8.964	208.0	8.677
작게 분쇄 (<1mm)	64.74	5.707	199.8	6.928

* 뿌리 4g/0.5kg, 30% 1,3-BG, 80°C, 6 h

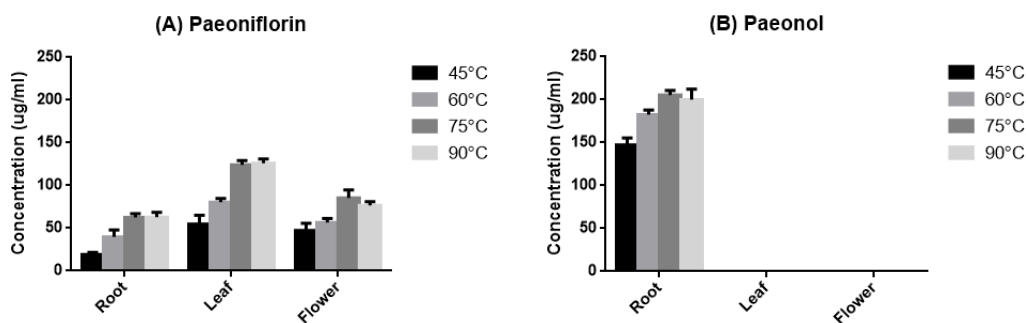


Fig. 2. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts under different extraction temperatures. (A) paeoniflorin, (B) paeonol.

각각 $124.3 \pm 4.999 \mu\text{g/mL}$, $85.24 \pm 9.589 \mu\text{g/mL}$ 이었다.

5) 추출시간에 따른 부위별 성분의 농도

추출시간을 2, 4, 6 및 8 h에서 추출액 중 paeoniflorin과 paeonol의 농도를 비교하기 위하여, 뿌리, 잎, 꽃 각 부위별로 4g/0.5kg batch size로 30% 1,3-BG 추출용매, 75°C 조건에서 추출한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 뿌리, 잎, 꽃 모두 추출시간을 길게 할수록 추출액 중 농도가 높아지는 경향을 보였다. 2 h에서 4 h까지는 비교적 급격한 농도 상승을 보인 반면 1 h 이후로는 농도 상승 기울기가 비교적 완만해졌는데, 4 h 추출 후 paeoniflorin과 paeonol의 농도가 뿌리는 $56.49 \pm 5.652 \mu\text{g/mL}$ 및 $203.1 \pm 11.23 \mu\text{g/mL}$, 잎과 꽃에서는 paeoniflorin만 검출되어 각각 $105.3 \pm 12.17 \mu\text{g/mL}$, $68.32 \pm 11.94 \mu\text{g/mL}$ 이었으며 8시간 추출 후의 농도 대비 paeoniflorin 75%~83%, paeonol 89%의 수준에 도달했다.

추출 온도와 시간의 영향 검토 결과로부터 7 5°C, 4 h 조건에서 추출하는 방법이 목표로 하는 두 지표성분의 기준 농도 이상인 추출액을 얻을 수 있으며, 제조공정 상의 시간, 비용을 함께 고려할 때 최적의 추출조건이라고 판단하였다.

6) 부위별 혼합비율 검토

추출 온도와 시간의 변화가 추출액 중의 paeoniflorin과 paeonol의 농도에 미치는 영향을 검토 결과로부터 30% 1,3-BG 추출용매를 사용하여 75°C에서 4 h 동안 추출하는 방법이, 본 기술개발사업에서 목표로 한 두 지표성분의 기준 농도 이상에 도달하면서 제조공정 상의 시간, 비용을 함께 고려할 때 최적의 추출조건이라고 판단하였다. 이 조건에서 추출할 때 뿌리, 잎, 꽃의 적절한 배합비율을 선정하기 위하여 여러 가지 비율로 배합한 원료로 추출액을 제조한 후 paeoniflorin과 paeonol의 농도를 비교하여 Table 5에 나타내었다. 기준 농도의 paeonol을 얻기에 충분하다고 판단되는 뿌리의 양을 2 g으로 결정

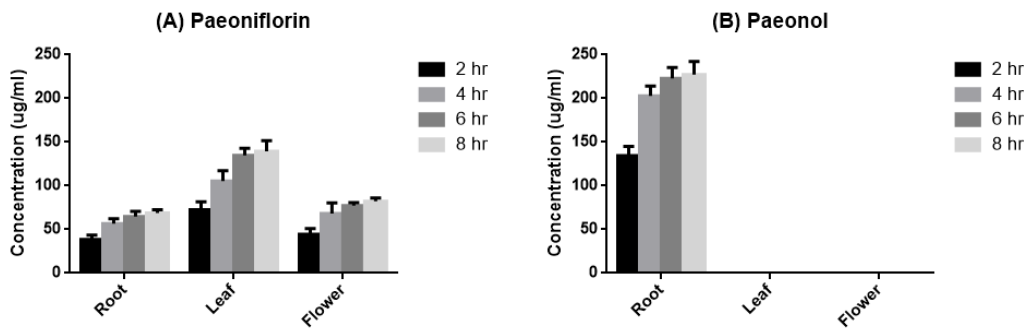


Fig. 3. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts under different extraction times. (A) paeoniflorin, (B) paeonol.

Table 5. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts for different mixtures of parts

Mixtures of parts	Paeoniflorin		Paeonol	
	Mean (ug/mL)	SD	Mean (ug/mL)	SD
2+2.5+0.5g/0.5kg	136.2	5.522	110.9	16.40
2+2+1g/0.5kg	124.7	9.506	118.5	10.86
2+1.5+1.5g/0.5kg	115.2	4.563	124.4	8.775
2+1+2g/0.5kg	109.3	12.467	117.5	9.333

* 30% 1,3-BG, 75°C, 4 h

하고 뿌리, 잎, 꽃 각 부위로부터 예상되는 paeoniflorin의 농도를 고려하여 잎과 꽃의 양을 2.5+0.5g, 2+1g, 1.5+1.5g, 1+2g으로 조절해 보았다. Paeonol의 농도는 모든 배합조건에서 유사한 농도를 보였고, 잎과 꽃의 상대적인 비율이 높을수록 paeoniflorin의 농도가 약간 높은 경향을 보였다. 그 중에서 뿌리, 잎, 줄기 배합비율을 2+2+1g/0.5kg으로 한 추출액에서 paeoniflorin과 paeonol의 농도가 각각 $124.7 \pm 9.506 \mu\text{g/mL}$ 및 $118.5 \pm 10.86 \mu\text{g/mL}$ 이었다.

7) Scale-up

30% 1,3-BG, 75°C, 4 h 추출조건에서 뿌리, 잎, 꽃의 최종 배합비율로 선정된 2+2+1g/0.5kg를 10kg 배치 크기까지 스케일업 하면서 제조하였으며 그 추출액 중의 paeoniflorin과 paeonol의 농도를 Table 6에 나타내었다. 0.5, 1, 2 및 10 kg 제조 단위에서 두 성분의 농도는 각각 117.8~127.6 $\mu\text{g/mL}$ 및 116.3~122.9 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 0.5 kg 배치크기 대비 -5.6%~2.3%, -1.9%~3.7%의 차이를 보였다.

8) Stability

안정성 평가용 모란 추출액을 4주까지 냉장보관하면서 1주, 4주째의 안정성을 평가하기 위하여 두 성분의 농도를 분석하여 Table 7에 나타내

었다. 보관 1일째의 농도 대비 1주째 paeoniflorin과 paeonol 농도의 차이는 각각 -2.6%~1.3%이었고, 4주째에는 각각 -4.4%~1.8%, -4.2%~1.7%였다. 두 성분 모두 냉장(3.4 \pm 0.1°C) 보관 조건에서 최소 4주 동안 안정한 것으로 평가되었다.

4. 결론

1. Paeoniflorin과 paeonol을 두 가지 지표성분으로 하여 항산화, 미백 활성을 위한 천연 화장품 원료로서 모란 전초를 이용할 수 있는 함량 기준을 설정하였다. 뿌리, 잎, 꽃 부위별 두 성분의 함량과 추출용매, 추출온도, 추출 시간, 부위별 배합비율에 따른 paeoniflorin과 paeonol의 함량 변화를 평가하였다.
2. Paeonol은 뿌리에서만 검출되었고 paeoniflorin은 잎, 꽃에서의 농도가 뿌리에서보다 높았다. 뿌리의 질도는 적당한 입자 크기로 분쇄한 후 추출할 때 두 성분 모두 농도가 높았다. 추출용매로는 30% 1,3-butylene glycol을 사용할 때 농도가 가장 높았다.
3. 추출온도와 시간은 고온, 장시간일수록 지표 성분의 농도가 높은 경향을 보였으나 각각

Table 6. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts during scale-up

Scale	Paeoniflorin			Paeonol		
	Mean (ug/mL)	SD	Difference (%)	Mean (ug/mL)	SD	Difference (%)
2+2+1g/0.5kg	124.7	9.506	-	118.5	10.86	-
4+4+2g/1kg	123.0	9.651	-1.4%	120.4	6.478	1.5%
8+8+4g/2kg	117.8	8.948	-5.6%	116.3	9.214	-1.9%
40+40+20g/10kg	127.6	12.59	2.3%	122.9	7.200	3.7%

* 30% 1,3-BG, 75°C, 4 h

Table 7. Concentrations of paeoniflorin and paeonol in Peony extracts under the refrigerated storage condition for 4 weeks

Period	Paeoniflorin			Paeonol		
	Mean (ug/ml)	SD	Difference (%)	Mean (ug/ml)	SD	Difference (%)
1 day	124.7	9.506	-	118.5	10.86	-
1 week	123.5	11.97	-2.6%~1.3%	122.0	9.485	1.2%~4.3%
4 week	120.8	9.961	-4.4%~1.8%	115.5	11.99	-4.2%~1.7%

75°C, 4 h 이상에서는 상승 기울기가 완만해졌다. 뿌리, 줄기, 꽃의 배합 비율은 2+2+1g/0.5kg로 할 때 두 지표성분의 목표 농도에 도달 가능했다.

4. 뿌리, 줄기, 꽃을 2+2+1g/0.5kg 비율로 배합하고 30% 1,3-butylene glycol을 추출용매로 사용하여 75°C에서 4 h 동안 추출하는 방법이 두 지표성분의 함량 기준과 제조공정의 비용을 고려할 때 최적의 조건이라고 판단하였다. 이 조건에서 10 kg의 제조 규모까지 스케일업하고 두 지표성분의 함량이 유지됨을 확인할 수 있었다.
5. 본 연구를 통해 모란의 전초를 사용함으로써 모란과 작약의 지표성분인 paeonol과 paeoniflorin을 동시에 품질관리 기준 이상으로 함유하는 모란추출액을 제조할 수 있었다. 이 기준을 실제 제조과정에 적용하여 화장품 원료로서 모란 추출액의 품질 관리를 위한 내부기준으로 활용할 수 있을 것이다. 또한 액상 화장품 원료인 모란 추출액을 물파우더 등의 다른 화장품 제형에 적용할 때도 활용할 수 있을 것으로 기대하며, 모란 외의 다른 천연 화장품 소재 개발에서도 이같은 품질관리 노력을 지속해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업벤처부의 현장수요형기술개발사업(S2447885)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. *Global Market Report*, "Natural Cosmetics Market Trends in Major Countries", pp.15-032, KOTRA (2015).
2. *Natural Cosmetics Industry Trend Report*, The Foundation of AG. Tech, Commercialization and Transfer, (2013).
3. R. S. Sung, "Quality Control Study of Oriental (herbal) Medicines Using

Ingredient Profile(I)", Ministry of Food and Drug Safety, (2015).

4. R. S. Sung, "Agastachis Herba(KHP). Etc. Study on the 7 Contents Standard Setting", *Final Report of Research and development task*, Ministry of Food and Drug Safety, (2015).
5. K. Choi, Fei Zhao, J. W. Choi, Y. H. Kwon, "Changes of Paeonol and Paeoniflorin Contents in Chinese Moutan (*Paeonia suffruticosa* Andrews) Cultivars with Different Harvesting Times and Their Parts", *Korea J. Medicinal Crop Sci.* Vol.13, No.1 pp. 35-40, (2005).
6. C. S. Seo, J. H. Kim, H. K. Shin, B. S. Kim, "Quantitative Analysis of (+)-Catechin, Paeoniflorin, and Paeonol in Moutan Radicis Cortex and Its Processed Products", *Kor. J. Pharmacogn.* Vol.47, No.3, pp. 237-245, (2016).
7. B. Wang, Z. Pang, Q. Zhang, "Chemiluminescence in the Study of Paeonol", *Chimese Pharmaceutical Journal*, Vol.29, No.1, pp. 35-38, (1994).
8. J. Yu, H. Lang, P. Xia, "The Occurrence of Paeoniflorins and Paeonols in Paeoniaceae", *ACTA Pharmaceutica Sinica*, No.20, pp. 229-234, (1985).
9. *The Korean Pharmacopoeia Eleventh Edition*, Ministry of Food and Drug Safety, (2013).
10. "Test method of Herbal medicine", *The Korean Pharmacopoeia etc. oriental (herbal) medicines codex, VI*, (2014).
11. M. Y. Kim and K. S. Ko, "Study on Cosmeceutical Activities of Moutan Cortex Radicis Extracts", *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol.19, No.6, pp. 1119-1126, (2013).
12. S. J. Hur, K. Y. Kim, E. Y. Park, A. R. Jang, K. S. Yang, W. K. Whang, "Antioxidation Activity and Inhibition of B16F10 Melanoma Cell from Moutan Cortex from Ethanol Extracts", *Journal of the Korean Society for Aesthetics and Cosmetology*, Vol.8, No.1, pp. 1-9,

- (2010).
13. J. K. You, M. J. Chung, D. J. Kim, D. J. Seo, J. H. Park, T. W. Kim, M. Choe, "Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of *Paeonia suffruticosa* Water Extract", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.38, No.3, pp. 292-296, (2009).
 14. Y. G. Kim, G. Y. Lee, Y. W. Cho, M. A. Lee, S. W. Baek, S. H. Sung, C. J. Ma, E. J. Jung, S. H. Kim, E. S. Yang, Y. K. Cho, S. H. Kim, J. H. Park, E. J. Choi, M. J. Lee, E. J. Lee, Report on "KNTP Acquisition and Analysis of Raw Materials for Toxicity Test", Ministry of Food and Drug Safety, (2008).
 15. G. H. Bae, Report on "Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Compounds from *Cinnamoni Ramulus* and *Moutan Root Bark*", Ministry of Food and Drug Safety, (2007).
 16. Y. Ding, E. Wu, J. Chen, H. T. Nguyen, T. H. Do, K. L. Park, K. H. Bae, Y. H. Kim, J. S. Kang, "Quality Evaluation of *Moutan Cortex Radicis* using Multiple Component Analysis by High Performance Liquid Chromatography", *Bull. Korean Chem. Soc*, Vol.30, No.10, pp. 2240-2244, (2009).
 17. Y. Xie, Z. H. Jiang, H. Zhou, W. Z. Ma, Y. F. Wong, Z. Q. Liu, L. Liu, "The Pharmacokinetic Study of Sinomenine, Paeoniflorin and Paeonol in Rats after Oral Administration of a Herbal Product Qingfu Guanjesu Capsule by HPLC", *Biomed. Chromatogr*, No.28, pp. 1294-1302, (2014).
 18. Y. W. Son. *Guidelines for Validation of Test Methods such as Medicines*, Ministry of Food and Drug Safety, (2015).
 19. Y. S. Park, M. H. Oh, H. Lee, J. T. Jung, Y. H. Jo, M. K. Pyo, "Comparison of Malonyl Ginsenoside Contents in Parts of Korean Ginseng", *Kor. J. Pharmacogn*, Vol.48, No.1, pp. 82-87, (2017).
 20. B. R. Jeong, Y. S. Yoon, S. S. Shin, Y. S. Kwon, H. J. Yang, "Simultaneous Determination of (+)-Pseudoephedrine and (-)-Ephedrine in Ephedra Intermedia by HPLC-UV", *Kor. J. Pharmacogn*, Vol.48, No.1, pp. 93-96, (2017).