

HPLC에 의한 목초액 중의 유기산, 페놀 및 벤조피렌의 분석법 개발

이계원# · 김아람 · 조재수

건양대학교 제약공학과, 제제 개발실

(Received September 2, 2007; Revised December 6, 2007)

HPLC Analysis of Organic Acids, Phenol, and Benzopyrene in *Wood Vinegar*

Gye Won Lee#, A Ram Kim and Jae Soo Cho

Laboratory of Galenic Technology, Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nosan 320-711, Korea

Abstract — The organic acids (formic acid, acetic acid and propionic acid), phenol and benzopyrene in *wood vinegar* were determined by HPLC. An Atlantis™dC₁₈ column with a acetonitrile:0.1% phosphoric acid (5:95, organic acids), acetonitrile: water (10:90, phenol), 100% acetonitrile (benzopyrene) as a mobile phase was used. Retention time of acetic acid, formic acid, propionic acid, phenol and benzopyrene was 4.77, 3.73, 9.08, 30.97 and 6.10 min, respectively. The calibration curves of organic acids, phenol, benzopyrene were linear over the concentration range of 30~500, 60~1000, and 3~50 µg/ml with correlation coefficient of above 0.999. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of acetic acid, formic acid, propionic acid, phenol, and benzopyrene was 1.71 and 5.19, 1.11 and 3.35, 4.87 and 14.74, 6.45 and 19.55, 0.08 and 0.24 µg/ml, respectively. The coefficients of variation for intra- and inter-day assay were 0.21~4.14 and 0.07~1.19%, respectively and the precision was 95~115%. From this study, we suggest that HPLC is suitable method for the determination of organics in *wood vinegar* and could be applied to quality control of *wood vinegar*.

Keywords □ HPLC, organic acids, phenol, benzopyrene, *wood vinegar*

숯을 제조하는 과정에서 발생하는 연기로부터 채취되는 목초액은 초산을 주성분으로 하는 강한 산성(pH 3)의 액체이다.¹⁾ 이는 사용목적에 따라 다른 제법으로 만들어지고 있으며 초산의 신맛과 더불어 고유의 탄내를 가지고 있다.

목초액은 80~90%의 물과 초산 등 200종류 이상의 화합물을 함유하고 있으며 중요한 성분은 유기물 중 초산이 약 50% 이상 함유되어 있지만 목초액의 80% 이상이 수분으로 전 용액 중의 초산은 약 3% 정도이다.²⁻⁵⁾

현재 국내에서 생산되는 목초액의 대부분은 농업분야에서는 토지 개량제, 식물생장조절제, 원예용 등으로 유기 농업에, 축산업에서는 가축의 육질이나 계란의 품질개선, 약취제거 등의 용도로 사용하고 있다.

목초액에는 다량의 유기산뿐만 아니라 피부에 침투하기 쉬운 성분을 함유하고 있어 피부표면에 기생하는 바이러스, 곰팡이균의 살균작용이 뛰어나며 피부표면의 각질 연화나 수렴작용, 여

드름, 노인성의 건성 피부염, 만성 습진과 옴 등의 피부질환에 효과가 탁월한 것으로 밝혀졌다.⁶⁻⁸⁾ 또한 약물 중독 시 해독, 당뇨, 변비, 소화불량, 무좀, 중이염, 암 등의 여러 가지 질환에 대하여 효과가 있어 민간의료에서 많이 사용되어 오고 있다.

여러 가지 효능을 가지고 있는 목초액은 천연물 신약이나 화장품 원료로서의 가능성이 있지만 타르, 페놀, 메탄올, 크레졸, 벤조피렌 등과 같은 유해 성분이 함유되어 있을 뿐만 아니라 고유의 탄내취로 인해 그 적용이 제한되어지고 있다.^{9,10)} 따라서 목초액을 피부에 직접 바르거나 식품, 음료 및 화장품 등에 첨가제로 사용하기에 적합하도록 하기 위해서는 조목초액의 정제 및 탈취가 요구된다.

현재 목초액을 정제하기 위한 여러 가지 방법 등이 개발되고 있으며 잘 정제된 목초액은 유기산(3% 정도)을 주성분으로 미량의 미네랄과 비타민 등으로 이루어져 있다. 유기산들은 체내에서 대사 과정이나 면역성 및 건강에 유익한 결과를 주리라 예상되고 있어 목초액의 효능을 나타내기 위해서는 유기산의 함량은 매우 중요하다 할 수 있다.¹¹⁾

천연물 신약 또는 피부 적용제로서의 목초액의 신용도와 가치를 높이기 위해서는 주성분 및 유해성분에 대한 설정기준이 필

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-730-5460 (팩스) 041-735-9117
(E-mail) pckmon@konyang.ac.kr

요하다.

따라서 본 실험에서는 목초액 중의 주성분인 유기산(초산, 프로피온산 및 개미산)과 유해성분인 페놀 및 벤조피렌의 HPLC 분석법을 개발하여 목초액과 같은 생약 함유 천연물 신약 개발 연구의 기초 연구 및 이를 이용한 제품개발에 대한 기초자료로 제시하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

시약으로는 목초액((주) 젠트로, Korea), 초산, 개미산, 프로피온산, 페놀 및 벤조피렌 Sigma사(U.S.A.) 그리고 HPLC용 아세토니트릴과 메탄올을 사용하였다.

기기로는 HPLC(2690 alliance system, Waters, U.S.A.)를, 컬럼은 AtlantisTMdC₁₈(4.6*250 mm, 5 μm, Waters, U.S.A.)을 Detector는 996 PDA를 사용하였다. 또한 Vortex mixer, Syringe driven filter unit: Millipore PVDF, 0.45 μm, 13 mm(U.S.A.)를 사용하였다.

분석 방법 및 밸리데이션

실험에 사용한 HPLC 장치는 Waters 2690 alliance system, 검출 파장은 초산, 개미산 및 프로피온산 230 nm, 페놀 및 벤조피렌 280 nm, 컬럼은 AtlantisTMdC₁₈(4.6*250 mm, 5 μm, Waters, U.S.A.), 온도는 25°C, 데이터 처리장치로는 컴퓨터(Pentium II, Window XP)와 Waters alliance system millennium 32 data system을 사용하였다. 이 때 이동상은 유기산(초산, 개미산 및 프로피온산)은 아세토니트릴 : 물(10 : 90), 페놀은 아세토니트릴 : 물(10 : 90), 벤조피렌은 100% 아세토니트릴 그리고 유속은 1.0 ml/min이었다.¹²⁾

HPLC를 이용한 분석법의 타당성을 검토하는 밸리데이션은 특이성, 직선성, 검출한계와 정량한계 그리고 정확성 및 정밀성을 이용하여 검토하였다.¹³⁻¹⁵⁾

특이성

목초액과 목초액에 기지농도의 표준품을 각각 spiking하여 정량적으로 늘어나는지의 여부를 검토하였다. 즉 유기산과 페놀은 목초액 1 ml, 표준액(초산: 20 mg/ml, 개미산 및 프로피온산: 1 mg/ml, 페놀: 0.1 mg/ml) 1 ml 및 물 3 ml를, 벤조피렌은 목초액 1 ml와 표준액(0.1 mg/ml) 1 ml를 가하여 15초간 vortexing한 다음 syringe filter로 여과하여 30 μl를 HPLC에 주입하여 검토하였다.

직선성

유기산, 페놀 및 벤조피렌 표준품을 각각 100 mg씩 정밀히

달아 메탄올에 녹여 정확히 100 ml로 하여 표준원액으로 한 다음 이를 적당히 희석하여 각 농도별 표준액에 대하여 분석 조건에 의한 피크 면적 비를 구하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선으로부터 직선식의 상관계수(기준: R²=0.99 이상)를 구하여 직선성을 검토 하였고, 3번 반복 실험하여 평가 하였다. 이 때 검량선의 범위는 유기산은 31.25~500 μg/ml, 페놀과 벤조피렌은 각각 62.5~1000과 3.125~50 μg/ml이었다.

검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)

검량선의 직선성 범위가 좋은 부분을 이용하여 다음과 같은 식을 이용하여 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 산출하였다.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma / S (S/N=3)$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma / S (S/N=10)$$

이 때 σ 는 절편의 평균표준편차이며 s는 기울기의 평균을 의미한다.

정확성과 정밀성

정확성은 분석물질의 참값(농도)에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균 시험결과와 근접성을 의미하며, 기지량의 분석물질을 함유한 시료를 반복적으로 분석함으로써 구해진다. 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체(Aliquots)로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 의미한다.

정확성과 정밀성은 미리 결정되어진 정량한계의 2배 농도, 검량선 작성 시 최고 농도의 70~80% 농도 및 이들 두 가지 농도의 중간 농도를 제조하여 측정하였다. 즉 초산, 개미산, 프로피온산, 페놀 및 벤조피렌을 각각 10, 180 및 350, 7, 178 및 350, 29, 190 및 350, 39, 370 및 700 그리고 0.485, 18 및 35 μg/ml의 농도범위에서 하루에 6회씩 3일간 실험을 행하여 정확성을 측정하였으며, 일간과 일내 정밀성은 동일한 농도 범위를 가지고 상대표준편차(% CV)를 이용해 산출하였다.

목초액의 분석

개발된 분석방법을 이용하여 실제 목초액((주) 젠트로)과 시중에서 유통되고 있는 시판 목초액을 이용하여 물로 적당히 희석하여 주성분인 유기산과 유해물질인 벤조피렌과 페놀을 측정하였다. 이 때 (주) 젠트로에서 생산되어지는 목초액은 서로 다른 세 가지 lot를 가지고 세 번 씩 분석하였다.

결과 및 고찰

특이성

특이성은 시료 내 다른 물질의 공존 시 해당 분석물질을 분

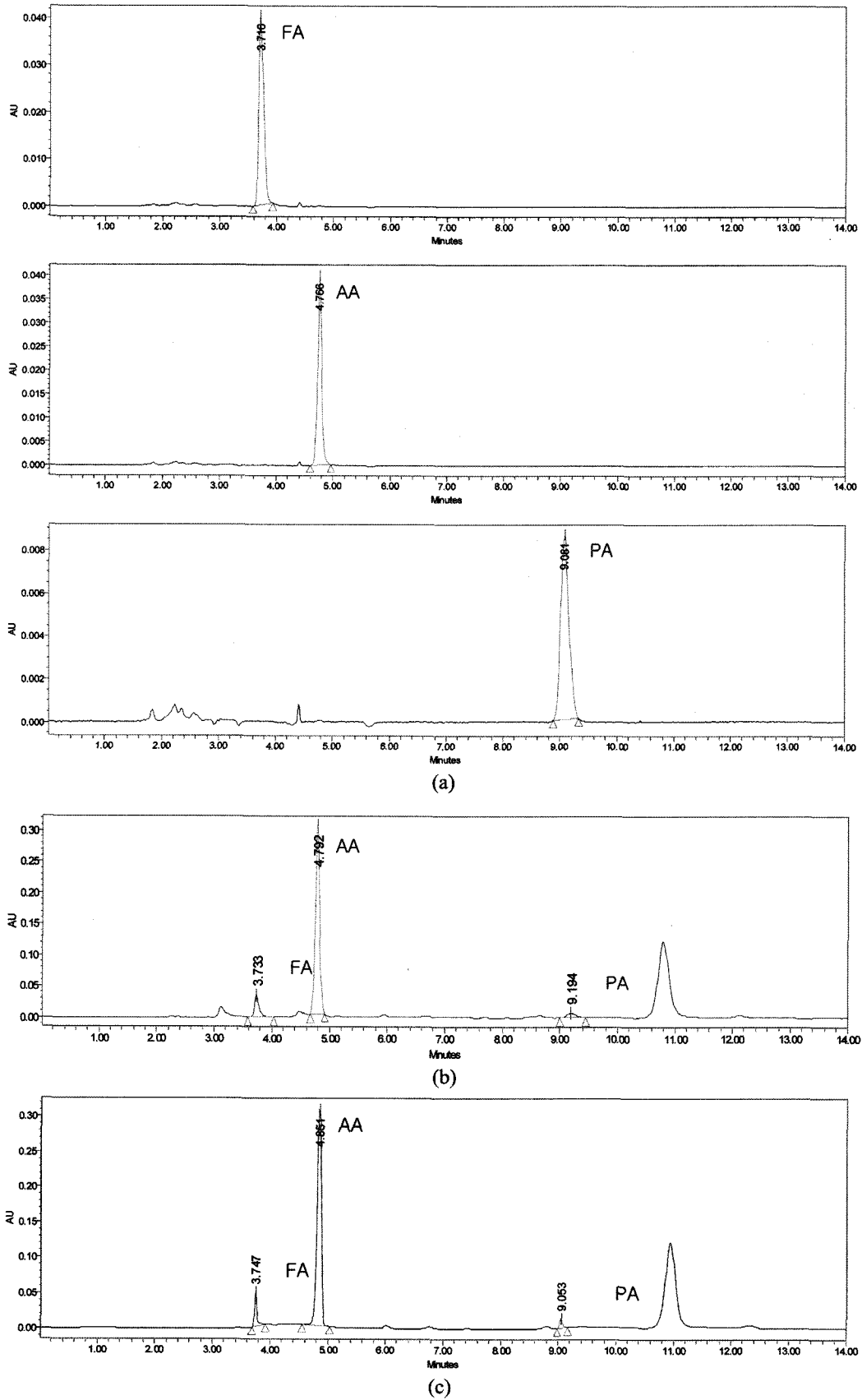


Fig. 1 – HPLC chromatograms of organic acids (a), *wood vinegar* (b) and spiked *wood vinegar* with organic acids (c).

리하고 정량하는 분석 능력을 나타낸다. 표준액(유기산, 페놀 및 벤조피렌), 목초액 및 표준액(초산: 20 mg/ml, 개미산 및 프로피온산: 1 mg/ml, 페놀 및 벤조피렌: 0.1 mg/ml)으로 spiking 한 목초액의 크로마토그램을 Fig. 1, 2 및 3에 나타내었다. 이때 표준품에서 초산, 개미산, 프로피온산, 페놀 및 벤조피렌의 피크 유지 시간은 각각 4.77, 3.73, 9.08, 30.97 및 6.10분이었으며 기지 농도의 표준품으로 spiking한 크로마토그램에서도 일정하게 나타난 것으로 보아 목초액의 기타 다른 성분들과 명확하게 분리할 수 있었음을 확인할 수 있었다. 또한 목초액에 기지 농도의 표준품을 spiking하여 얻어진 면적은 목초액의 면적과 표준품의 면적을 더한 값과 같으므로 다른 물질과의 간섭이 없이 완전히 분리하여 분석할 수 있는 양호한 방법이라고 사료

되어진다.

직선성

유기산(초산, 개미산 및 프로피온산), 페놀 및 벤조피렌을 각각 31.25~500, 62.5~1000, 3.125~50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조하여 HPLC로 분석하였을 때, 얻은 피크면적을 Y축으로 표준액 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하여 나타내었다(Fig. 4). 이때 검량선 식은 $Y=166.54 \times \text{초산 농도} - 30.792 (r=1.0000)$, $Y=493.24 \times \text{개미산 농도} - 1454.3 (r=1.0000)$, $Y=178.51 \times \text{프로피온산 농도} - 863.71 (r=0.9999)$, $Y=4440.6 \times \text{페놀 농도} - 16616 (r=1.0000)$, $Y=129714 \times \text{벤조피렌 농도} + 30376 (r=1.0000)$ 으로 모두 양호한 직선성을 나타내었다.

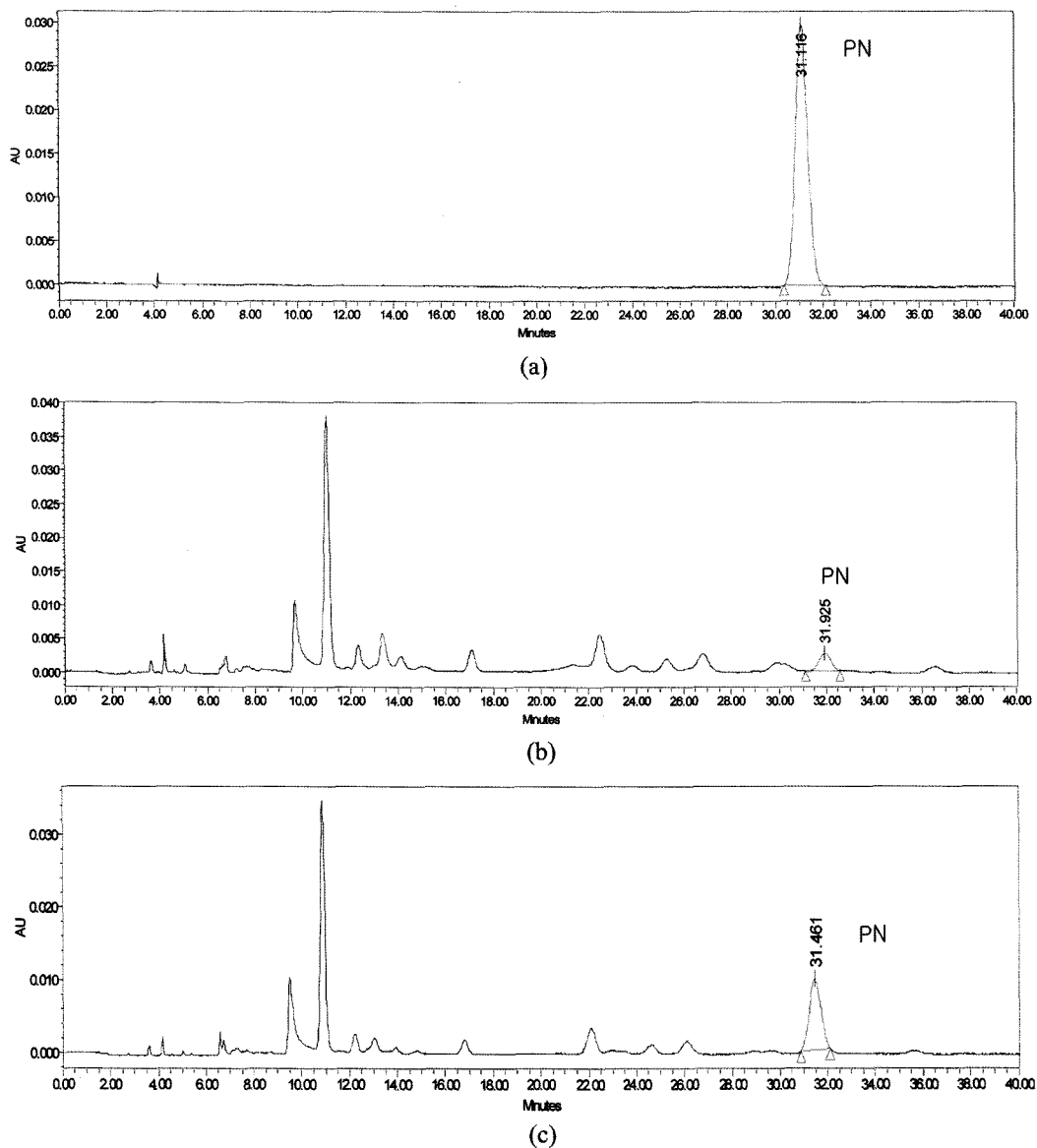


Fig. 2 - HPLC chromatograms of phenol (a), wood vinegar (b) and spiked wood vinegar with phenol (c).

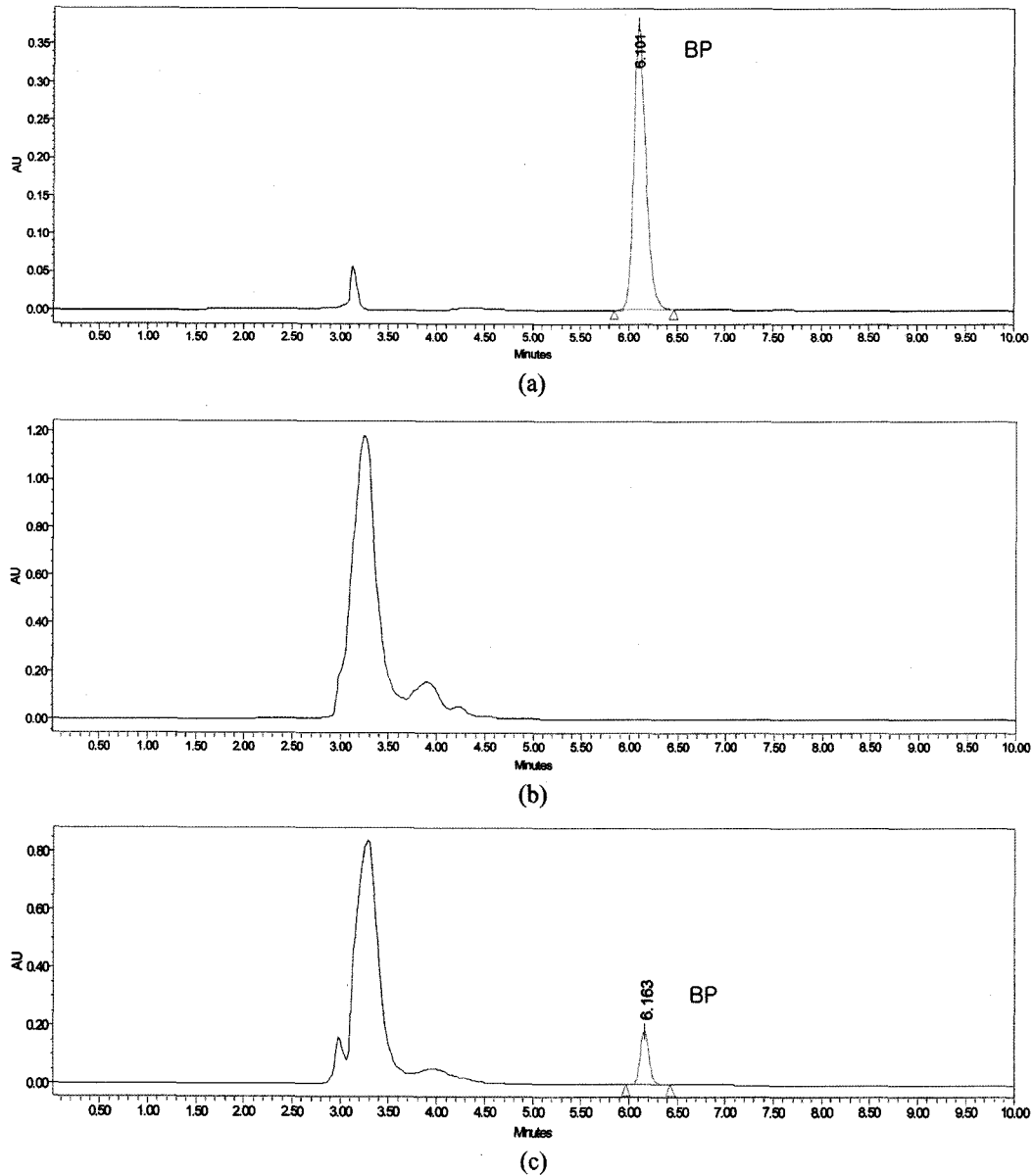


Fig. 3 – HPLC chromatograms of benzopyrene (a), wood vinegar (b) and spiked wood vinegar with benzopyrene (c).

검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)

가장 직선성이 좋은 부분을 이용하여 유기산, 페놀 및 벤조피렌의 검출한계와 정량한계를 구하여 Table I에 나타내었다. 즉 아세트산과 개미산에서 정량한계(LOD)와 검출한계(LOQ)는 비슷하였으나 특히 프로피온산은 더 높아 14.74와 4.87 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 이었다. 또한 벤조피렌은 더 낮은 농도범위인 0.08 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 의 검출 한계를 나타내었다.

정확성과 정밀성

결정되어진 정량한계의 2배 농도, 검량선 작성 시 최고 농도의 70~80% 농도 그리고 이들 두 가지 농도의 중간농도를 이용

하여 하루에 6번 시행하여 일내 정밀성(Repeatability, % CV로 표시)을, 3일 동안 반복 시행하여 일간 정밀성(Reproducibility, % CV)을 구하여 Table III에 나타내었다.

일반적으로 밸리테이션에서 요구되어지는 정확성은 평균값이 실측값의 $\pm 15\%$ 이내(최저 정량한계 $\pm 20\%$)이고, 정밀성은 상대표준편차가 $\pm 15\%$ (최저정량한계 $\pm 20\%$)이내이어야 한다. 이때 분석방법의 정밀성은 모든 표준품에서 일내와 일간 정밀성은 0.21~4.14와 0.07~1.19% 이었고 정확성은 모두 95~115%의 이내로 나타났다. 이로부터 유기산, 페놀 및 벤조피렌에 대한 HPLC 분석법은 목초액을 이용한 시험에 이용될 수 있는 적합한 정밀성과 정확성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

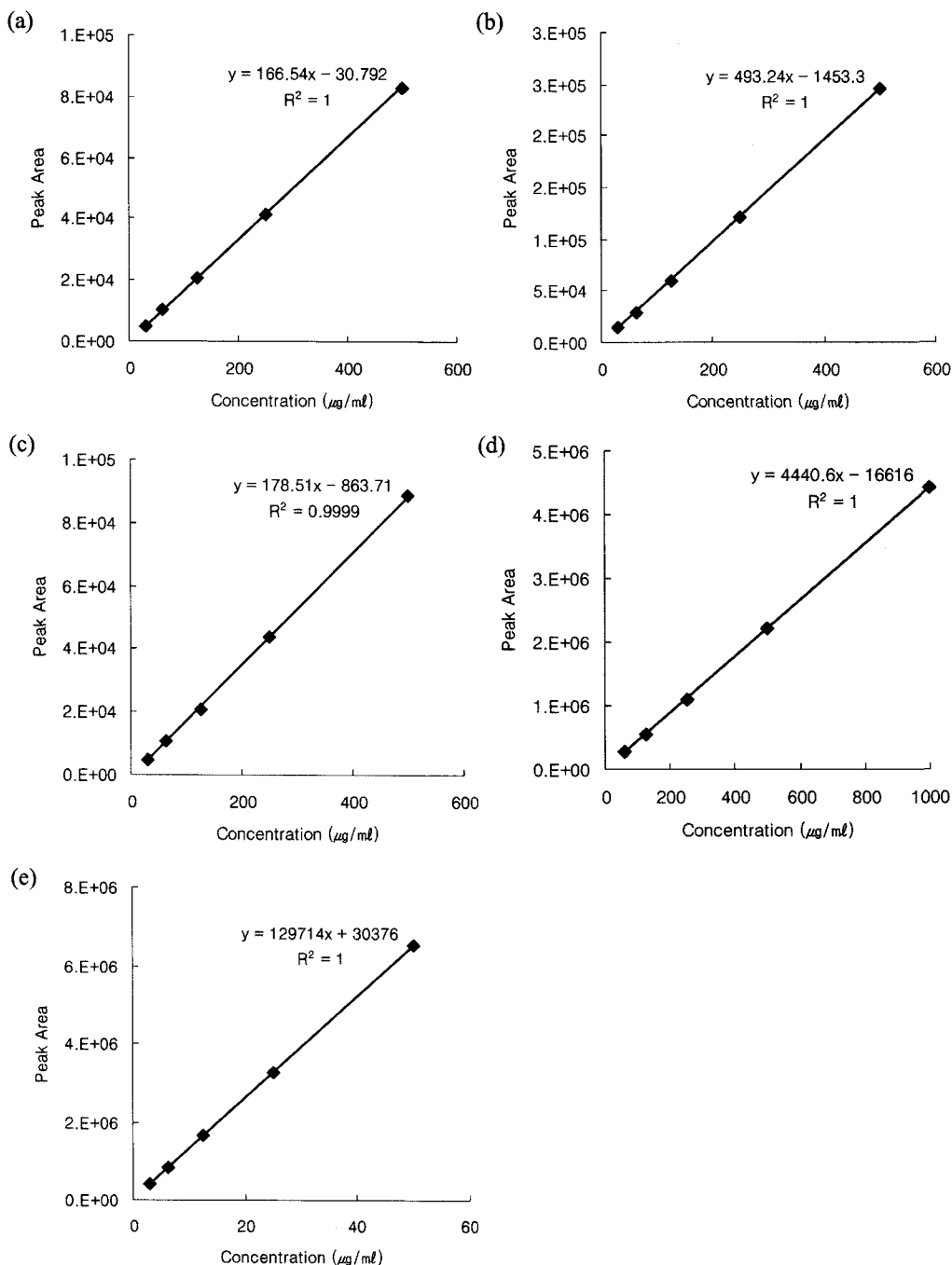


Fig. 4 – Linearity of the standard calibration curve of acetic acid (a), formic acid (b), propionic acid (c), phenol (d) and benzopyrene (e).

목초액의 분석

타당성이 검증된 분석법을 이용하여 기준에 시판되고 있는 목초액과 새로 인산과 과산화수소 혼합액을 넣어 산화반응을 이용하여 정제되어진 목초액 중에 들어있는 유기산, 페놀 및 벤조피렌을 실제로 분석한 결과를 Table IV에 나타내었다.

실제 목초액에 들어있는 유기산, 페놀 및 벤조피렌은 다른 피크의 영향을 받지 않고 분석할 수 있었다. 즉 유해성분인 벤조피렌은 검출되지 않았고, 페놀은 시판 목초액과 정제 목초액에서

각각 636.44와 207.06 $\mu\text{g/ml}$ 으로 정제과정에 의해 감소한 것으로 나타났다. 또한 유기산의 함량은 정제 목초액과 시판 목초액에서 각각 5.85, 0.22, 0.21과 3.28, 0.24, 0.14 $\mu\text{g/ml}$ 으로 프로피온산과 개미산은 차이가 없었지만 유기산 중 가장 많이 들어있다고 알려진 초산은 두 가지 모두 기준인 3% 이상을 나타내었으나 정제 목초액에서 더 많이 검출되었다. 따라서 목초액을 천연물 신약이나 화장품 원료로서 개발할 때 확립된 HPLC 분석법은 주성분과 유해성분인 페놀에 대한 규격을 설정하는데 이용

Table I – The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) for the determination of organic acids, phenol and benzopyrene

Standard	µg/ml	
	LOD	LOQ
Acetic acid	1.71	5.19
Formic acid	1.11	3.35
Propionic acid	4.87	14.74
Phenol	6.45	19.55
Benzopyrene	0.08	0.24

될 것으로 기대되어진다.

결론적으로 특이성, 직선성, 검출한계와 정량한계 그리고 정확성 및 정밀성을 통하여 타당성이 검증된 유기산, 페놀 및 벤조피렌의 HPLC 분석법은 목초액의 주성분 및 유해성분에 대한 기준 규격을 설정할 수 있는 근거를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 이를 이용한 제품개발에 대한 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 기대되어진다.

결 론

최근 화장품 및 의약품 등의 분야에서 다양하게 이용되어질

것으로 기대되어지는 목초액에 대한 신용도와 가치를 높이기 위해서는 주성분 및 유해성분에 대한 설정기준이 필요하므로 목초액 중의 유기산(초산, 개미산 및 프로피온산), 페놀 및 벤조피렌을 HPLC를 이용하여 분석법을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 목초액의 각 성분은 Atlantis™dC₁₈ 컬럼을 이용하여 온도 25°C, 검출과장 유기산 230 nm, 페놀과 벤조피렌 280 nm, 이동상 유기산은 아세트니트릴 : 0.1% 인산(5 : 95), 페놀은 아세트니트릴 : 물(10 : 90), 벤조피렌은 100% 아세트니트릴, 유속 1.0 ml/min에서 정량하였을 때 양호하게 분리되었다.

2. 초산, 개미산, 프로피온산, 페놀 및 벤조피렌의 피크유지시간은 각각 4.77, 3.73, 9.08, 30.97 및 6.10분이었다.

3. 유기산, 페놀 및 벤조피렌 모두 30~500, 60~1000, 3.125~50 µg/ml의 농도 범위에서 상관계수가 0.999 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다.

4. 초산, 개미산, 프로피온산, 페놀 및 벤조피렌의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 1.71과 5.19, 1.11과 3.35, 4.87과 14.74, 6.45와 19.55, 0.08과 0.24 µg/ml이었다.

5. 일내, 일간 정밀성은 각각 0.21~4.14와 0.07~1.19%이었고, 정확성은 95~115%이었다.

Table II – Precision and accuracy for the determination of organic acids, phenol and benzopyrene (Mean ± SD, n=6)

Conc. (µg/ml)	Accuracy (%)		% CV	
	Intra assay	Inter assay	Intra assay	Inter assay
Acetic acid	10	108.23±4.48	4.14	0.63
	180	112.13±1.53	1.37	0.75
	350	98.93±1.73	1.75	0.95
Formic acid	7	106.25±3.11	2.93	0.46
	178	99.49±0.71	0.71	0.47
	350	98.42±0.20	0.21	0.27
Propionic acid	29	102.59±1.81	1.77	0.51
	190	99.97±0.33	0.33	1.19
	350	99.86±0.29	0.29	0.07
Phenol	39	108.78±2.92	2.69	0.00
	370	106.23±0.26	0.25	0.40
	700	98.42±0.20	0.21	0.27
Benzopyrene	0.485	101.27±1.13	1.12	0.39
	18	103.48±0.75	0.72	0.26
	35	105.63±0.59	0.56	0.17

Table III – The amount of organic acids, phenol and benzopyrene in wood vinegar (Mean ± SD, n=3)

Sample	Conc. (µg/ml)				
	Formic acid	Acetic acid	Propionic acid	Phenol	Benzopyrene
A	0.22±0.00	5.86±0.01	0.21±0.00	205.55±7.13	-
	0.22±0.00	5.81±0.03	0.21±0.00	209.79±8.71	-
	0.22±0.00	5.89±0.01	0.21±0.00	205.83±5.86	-
B	0.24±0.00	3.28±0.01	0.14±0.02	636.44±2.67	-

- no detection.

A: wood vinegar of Gentro B : commercial wood vinegar.

이상의 실험 결과를 바탕으로 타당성이 검증된 유기산, 페놀 및 벤조피렌의 HPLC 분석법은 목초액과 같은 생약 함유 천연물 신약에 대한 기준 규격을 설정할 수 있는 근거를 제공할 수 있을 뿐만 아니라 이를 이용한 제품개발에 대한 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 사료되어진다.

참고문헌

- 1) Seo, K. I., Ha, K. J., Bae, Y. I., Jang, J. K. and Shim, K. H. : Antimicrobial activities of oak smoke flavoring. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **7**, 337 (2000).
- 2) Yasuhara, A. *et al.* : Volatile compounds in pyrolytic liquids from Karamatu and Chisima-sasa. *Agric. Bio. Chem.* **51**, 3049 (1987).
- 3) Yoshimura, H. : Promoting effect of wood vinegar compounds on the mycelial growth of two Basidiomycete. *Tran. Myco. Soc., Japan*, 141 (1993).
- 4) Hwang, B. Y., Cho, J. H., Chin, Y. M. and Yoshihiro, S. : Component analysis of softwood vinegar. *J. Kor. For. En.* **20**, 28 (2001).
- 5) Lee, K. M., Jeong, G. T. and Park, D. H. : Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vinegar. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 381 (2004).
- 6) Mitsuyoshi, Y. and Genji, U. : By-products of wood carbonization III. *Mokuzai Gakkaishi* **33**, 521 (1987).
- 7) Lee, F. Z., Choi, S. H. and Eun, J. B. : The nitrite scavenging and electron ability of bamboo smoke distillates made by steel kiln and earth kiln. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 719 (2002).
- 8) Kim, Y. H., Kim, S. K., Kim, K. S. and Lee, Y. H. : Composition of constituents of commercial wood vinegar liquor in Korea. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 262 (2001).
- 9) Kim, S. P. and Nam, C. H. : Method of Apply oligeneous acid extraction and it's refining. *KR 10-2007-0011199* (2007).
- 10) Ku, C. S., Mun, S. P., Park, S. B. and Kwon, S. D. : Physicochemical changes of vinegars obtained from bamboo and wood during long term aging. *Mokche Konhak* **30**, 74 (2002).
- 11) Byun, M. W. : A method for refining wood vinegar and refined wood vinegar. *KR 10-0718235* (2007).
- 12) Park, K. Y., Choi, S. B., Lee, G. C., Kim, N. S., Jeong, W. G., Koh, S. Y., Park, S. B., Choi, K. Y. and Cheong, E. H. : A study on the analytical method of monitoring compounds in drinking water (II)-chlorophenols, benzo(α)pyrene. *Rep. Inst. Health & Environ.* **12**, 133 (2001).
- 13) U. S. Pharmacopeia National Formulary, USP 26-NF 21, 3th Ed., Mack Printing Company: Easton, U.S.A., 2439 (2003).
- 14) Beuving, G. : Validation of analytical Methods. Validation Seminar, Istanbul, 31 May-01 June (2001).
- 15) Reiley, C. M. and Fell, F. : Development and validation of analytical methods. *Prog. Pharm. Biomed. Anal.* **3**, 20 (1996).