

HPLC-UV를 이용한 맛두릅나무 줄기의 지표 성분 동시 분석법 확립

유남호¹ · 권용수² · 김명조^{1*}

¹강원대학교농업생명과학대학, ²강원대학교 약학대학

Establishment of HPLC-UV Analysis Method Validation for Simultaneous Analysis of Standard Compounds of *Oplopanax elatus* Nakai Stem

Nam Ho Yoo¹, Yongsoo Kwon² and Myong Jo Kim^{1*}

¹College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Korea

²College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, 24341, Korea

Abstract – In our previous study, we found uracil, adenosine, protocatechuic acid, syringin (eleutheroside B) and scoparone (6, 7-dimethoxycoumarin) in the *Oplopanax elatus* Nakai Stem. High-performance liquid chromatography (HPLC) -UV was used to quality and quantify the internal marker compounds in the *O. elatus* extract after validation of method with linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy and precision. The specificity assessment visually confirmed that the substance was detected without the introduction of other substances. The established method showed high linearity of the calibration curve and coefficient of correlation (R^2) of over the 0.999. HPLC was reported as five standard compounds equivalent using the following linear equation based on the calibration curve. The accuracy of measurement was 84.34 ~ 119.74% and the relative standard deviation (RSD) value was 0.28 ~ 1.60%. In addition, our established method showed high repeatability. The RSD value was 1.10 ~ 6.81%. So, we found the amount of the internal marker compounds in the *O. elatus* extract. These results demonstrated that can be used to quality evaluation of the *O. elatus*.

Keywords – High Performance Liquid Chromatography, *Oplopanax elatus* Nakai, Protocatechuic Acid, Scoparone, Syringin

맛두릅 나무(*Oplopanax elatus* Nakai)는 미나리목(Apiales) 두릅나무과(*Aralicaerae*)에 속하는 낙엽관목으로, 높이 2-3 m이며, 원줄기는 갈라지지 않고, 줄기에 긴 가시가 많다.¹⁾ 맛두릅 나무 줄기에 관한 이전 연구에서 uracil, adenosine, protocatechuic acid, syringin, scoparone을 동정하였다(Fig. 1).²⁾ 동물과 식물에서 반응에 대해 uracil은 조효소 역할을 하는데, 그 과정은 fluorine이 uracil과 반응하면서 5-fluorouracil이 생성된다. 생성된 5-fluorouracil은 핵산의 복제 과정에서 uracil로 인식되는 항암제이다.³⁾ Adenosine은 Haskó에 의하면 저산소증, 허혈 및 발작 활동에서 조직 손상을 예방하는 세포 보호제의 기능을 한다고 보고하였다.⁴⁾ Protocatechuic acid는 항 혈전,⁵⁾ 항 바이러스 작용이⁶⁾ 보고되어 있으며, syringin은 면역조절작용,⁷⁾ scoparone은 항 염증⁸⁾ 및 항암⁹⁾ 효과가 보고 되었다. 따라서 분리된 5가지의 물질이 항염 및 항암 생리활성에 관련

된 성분이라고 판단하였다. 본 연구는 HPLC-UV를 이용하여 맛두릅 줄기에서 분리해낸 5개의 지표물질이 동시에 분석할 수 있는 분석법을 확립하였고, 타당성을 검증하기 위하여 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계, 정량한계 등의 분석법 밸리데이션을 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 연구에 사용한 맛두릅 나무의 줄기는 2012 년도에 화악산에서 채집하였다. 강원대학교 약학대학 권용수교수가 감정하여 동정하였고, 현재 강원대학교 약학대학 표본실(KNUPH-S-12-2)에 보관하고 있다.

시약 및 기기 – 지표성분으로 사용한 uracil, adenosine, protocatechuic acid, syringin(Eleutheroside B), scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin)은 Sigma-Aldrich(St. louis, MO, US)에서 구입하여 사용하였다.

사용한 장비는 Waters사(Milford, MA, US)의 e2695 system을 이용하여 분석하였으며, detector는 Waters사의

*교신저자(E-mail): kimmjo@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-33-250-6413

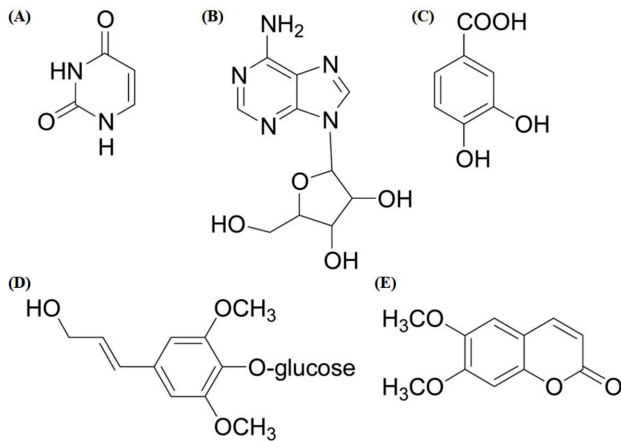


Fig. 1. The structures of standards; (A) Uracil, (B) Adenosine, (C) Protocatechuic acid, (D) Syringin and (E) Scoparone.

2489 UV-Vis detector를 사용하여 측정하였다. Column은 Shiseido사(Tokyo, Japan)의 Capcell pak C18(4.6×250 mm, 5 μm)를 사용하였다. 동결건조기는 Ilshin Lab Co.(Yangju-si, Korea) 제품을 사용하였고, 농축기는 Eylea사(Tokyo, Japan)의 N-1200A를 사용했으며, water bath는 Eylea사(Tokyo, Japan)의 SB-651을 사용하였다.

분석 시료 준비 - HPLC 분석을 위한 시료는 건조된 팻 두릅 줄기 100 g을 정밀히 칭량한 후, distilled water 2000 ml에 85°C, 7시간 환류 추출하였고, filter paper(Whatman Co., Buckinghamshire, UK) grade 2로 여과한 후 동결 건조하여 4.1 g의 동결 건조된 분말을 얻었다. 동결 건조된 분말 2 g을 정밀히 칭량한 후 distilled water 40 ml에 녹여 ethyl ether(Daejung chemicals & metals Co., Siheung-si, Korea) 40 ml에 1회 분획 후 water 부분을 취하였다. 그리고 수포화 BuOH(Daejung chemicals & metals Co., Shheung-si, Korea) 20 ml씩 3회 반복 분획하여 수포화 BuOH 분획 층을 취한 후 45°C에서 감압농축하였다. 감압농축을 통해 얻어진 827 mg 중에 1 mg을 정밀히 칭량한 후 MeOH(Avantor Performance Materials Co., Delaware, PA, US) 1 ml에 녹여 0.2 μm syringe filter(Whatman Co., Buckinghamshire, UK)로 여과하여 분석 시료로 사용하였다.

표준용액 조제 - Uracil, adenosine, protocatechuic acid, syringin은 각각 5 mg을 micro-tube에 정밀히 칭량한 후 water(Avantor Performance Materials Co., Delaware, PA, US) 1 ml로 녹였으며, scoparone은 5 mg을 micro-tube에 정밀히 칭량한 후 MeOH 1 ml로 녹였다. 검량선 작성을 위해 각각의 표준용액을 모두 혼합하여 1000 μg/ml 농도가 되도록 제조한 후, water를 이용하여 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 μg/ml로 단계적으로 희석하였고, 0.2 μm syringe filter로 여과하여 표준용액으로 사용하였다.

HPLC 분석 - HPLC 분석 조건은 Table I에 요약하였다.

Table I. Analytical conditions of HPLC

Injection volume		10 μl	
Column	CAPCELL PAK C18 5 μm, 4.6 mm×250 mm (Shiseido)		
Temp.	30°C		
Detector	265 nm		
Flow rate	0.5 ml/min		
Time	0.2% Acetic acid in water	(B) Acetonitrile	
0	100	0	
5	100	0	
35	80	20	
50	70	30	
60	40	60	
65	40	60	

이동상은 (A) 0.2% acetic acid in water (pH2.8), (B) acetonitrile을 사용하여 gradient 분석을 하였으며, flow rate는 0.5 ml/min, injection volume은 10 μl로 하였다. 분석에 이용한 UV 파장은 265 nm로 설정하여 분석하였다.

분석법 밸리데이션 - 한국 식품의약품안전처에서 고시한 의약품 밸리데이션 가이드라인에 따라 특이성, 직선성 및 최소검출 및 정량한계, 정확성, 정밀성의 분석법 밸리데이션을 수행하였다.

특이성 - 표준물질(uracil, adenosine, protocatechuic acid, syringin, scoparone)이 다른 물질과의 간섭 없이 단일성분이 분리되는지를 크로마토그램을 통해 시각적으로 확인하였다.

직선성 - 6가지 농도(0.5, 1, 5, 10, 25, 50 μg/ml)로 희석한 표준용액을 3반복한 후 면적 값에 대한 농도 비로 표준검량선을 작성하여 R²값을 계산하였다.

최소 검출한계 및 정량한계 - 검출한계는 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)값 3:1로 산출하였다. 정량한계는 신호 대 잡음비 10:1로 산출하였다.

정확성 - 분석대상물질인 표준용액을 LOQ 기준으로 세 가지 농도(0.5, 1, 2.5 μg/ml)의 표준물질을 시료(1000 μg/ml)에 첨가하여 분석한 후 회수율로 측정하였다.

정밀성 - 반복정밀성(Repeatability)으로 시료(1000 μg/ml)을 6회 반복하여 상대표준편차(RSD: relative standard deviation)를 측정하였다. 또한, 실험실내 정밀성(Intermediate precision)으로 6회 반복하여 상대표준편차를 측정하였다.

결과 및 고찰

특이성 확인 - 용매 크로마토그램을 통해, 이용한 용매가 표준물질 및 시료 크로마토그램에 영향을 주지 않음을 확

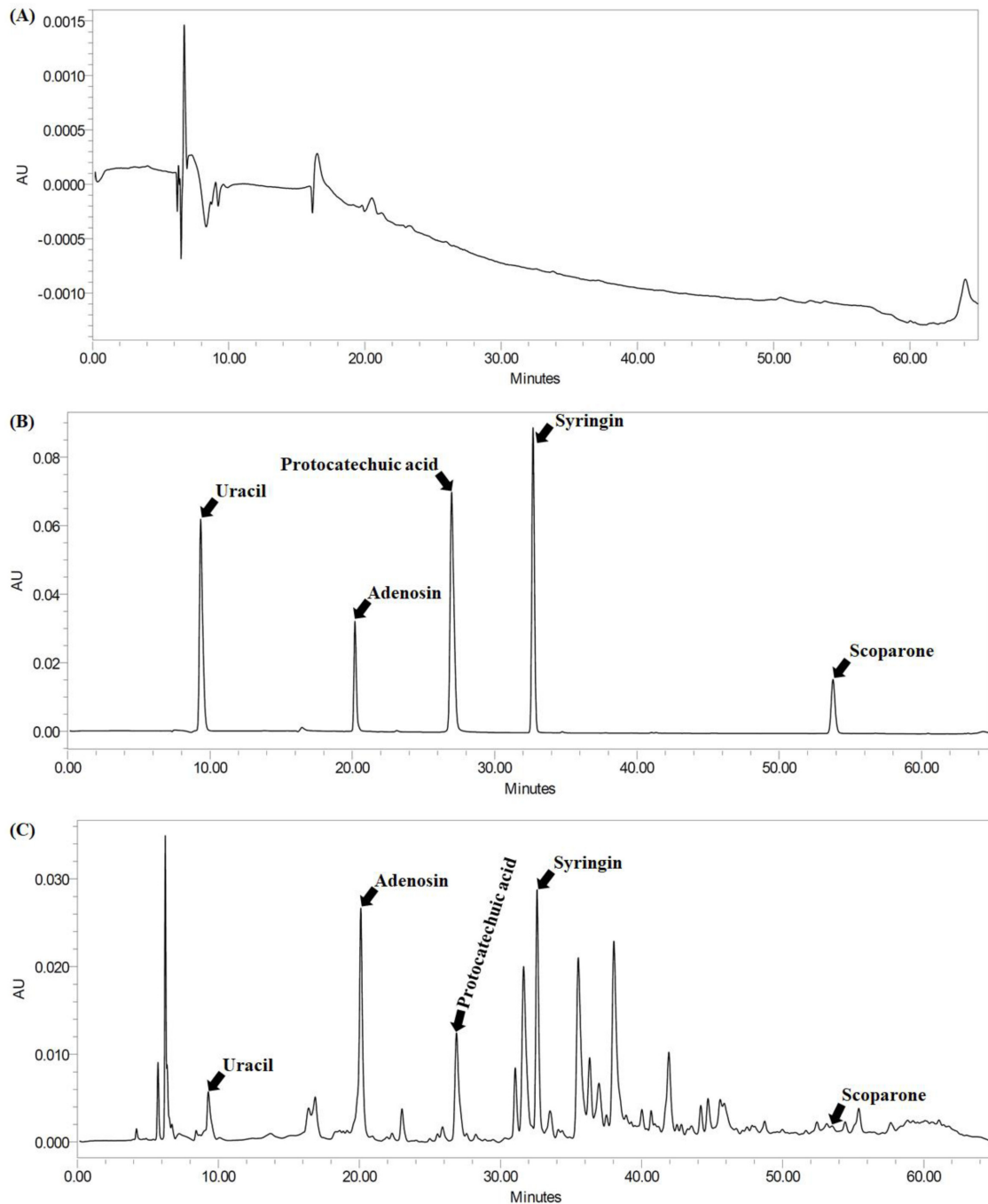


Fig. 2. HPLC chromatogram of (A) solvent blank, (B) standard mixture and (C) n-BuOH layer of *O. elatus* extract.

인하였다(Fig. 2-A). 표준물질의 크로마토그램에서 각각 지표화합물의 보존시간은 uracil 9.360분, adenosin 20.183분, protocatechuic acid 26.992분, syringin 32.737분, scoparone 53.865분에 검출이 되었다(Fig. 2-B). 시료의 크로마토그램에서는 uracil 9.297분, adenosin 20.114분, protocatechuic acid 26.896분, syringin 32.618분, scoparone 53.533분에 검출이 되었다(Fig. 2-C). 표준물질의 크로마토그램과 시료의

크로마토그램을 비교하였을 때, 다른 물질의 간섭 없이 표준 물질들의 보존 시간이 일치함을 확인하였다(Fig. 2-B, C).

직선성 및 최소검출, 정량한계(LOD, LOQ) – 0.5~50 µg/ml 범위에서 6가지 농도(0.5, 1, 5, 10, 25, 50 µg/ml)를 3반 복하여 검량선 및 상관계수(R^2)를 계산하였다. 그 결과, 0.999 이상의 상관계수를 통하여 신뢰성 있는 검량선을 얻었다 (Table II). 신호 대 잡음비로 얻어진 LOD는 uracil 0.134 µg/

Table II. Linearity, LOD and LOQ of standard

Standard	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Calibration curve	Correlation coefficient (R^2)	LOD* ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ** ($\mu\text{g/ml}$)
Uracil	0.5	$Y=33880x + 8347.8$	0.999968	0.134	0.449
	1				
	5				
	10				
	25				
	50				
Adenosin	0.5	$Y=14800x + 372.12$	0.999952	0.304	1.015
	1				
	5				
	10				
	25				
	50				
Protocatec huic acid	0.5	$Y=54229x - 20180$	0.999848	0.144	0.481
	1				
	5				
	10				
	25				
	50				
Syringin	0.5	$Y=44867x - 27.144$	0.99971	0.106	0.356
	1				
	5				
	10				
	25				
	50				
Scoparone	0.5	$Y=11899x + 135.28$	0.99943	0.648	2.162
	1				
	5				
	10				
	25				
	50				

*LOD = Limit of detection

**LOQ = Limit of quantitation

ml, adenosin 0.304 $\mu\text{g/ml}$, protocatechuic acid 0.144 $\mu\text{g/ml}$, syringin 0.106 $\mu\text{g/ml}$, scoparone 0.648 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인했으며, LDQ는 uracil 0.449 $\mu\text{g/ml}$, adenosin 1.015 $\mu\text{g/ml}$, protocatechuic acid 0.481 $\mu\text{g/ml}$, syringin 0.356 $\mu\text{g/ml}$, scoparone 2.162 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인하였다(Table II).

정확성 - Sample(1000 $\mu\text{g/ml}$)에 분석대상물질인 표준용액을 3가지 농도(0.5, 1.5, 2.5 $\mu\text{g/ml}$) 주입하여 3가지 농도에 대해 3회 반복 기기분석과 정량을 하였다. 회수율을 확인하였을 때 80~120%의 기준에 적합한 결과로써, uracil은 평

균 116.75%, adenosine은 평균 102.59%, protocatechuic acid는 평균 94.51%, syringin은 평균 92.73%, scoparone은 평균 114.19%로 확인하였다. RSD(%)는 기준인 15%이내와 비교하였을 때, uracil은 평균 0.42%, adenosine은 평균 0.86%, protocatechuic acid는 평균 2.45%, syringin은 평균 0.76%, scoparone은 평균 0.66%로 안정적인 결과를 얻었다. 자세한 내용은 Table III에 정리하였다.

정밀성 - 동일 농도의 시료에 대하여 변동을 확인하기 위해서 한국 식품의약품안전처에서 고시한 의약품 밸리데이

Table III. Results of accuracy test through recovery rate

Sample	Standard	Test	Expected concentration* (µg/ml)	Measured concentration (µg/ml)	Mean (µg/ml)	SD	RSD** (%)	Accuracy*** (%)
Sample 1000 µg/ml + 0.5 µg/ml standard	Uracil	1	4.1	4.73	4.74	0.01	0.28	115.37
		2		4.74				115.68
		3		4.76				116.02
	Adenosin	1	32.08	30.02	30.57	0.49	1.59	93.56
		2		30.80				96.02
		3		30.91				96.34
	Protocatechuic acid	1	5.67	4.88	4.97	0.08	1.60	86.05
		2		5.00				88.24
		3		5.03				88.66
	Syringin	1	9.77	8.24	8.38	0.12	1.48	84.34
		2		8.45				86.45
		3		8.46				86.63
	Scoparone	1	1.52	1.66	1.66	0.01	0.76	108.95
		2		1.66				108.95
		3		1.68				110.39
Sample 1000 µg/ml + 1.5 µg/ml standard	Uracil	1	5.1	5.89	5.88	0.03	0.43	115.41
		2		5.90				115.69
		3		5.85				114.73
	Adenosin	1	33.08	32.25	32.21	0.17	0.51	97.48
		2		32.36				97.82
		3		32.03				96.83
	Protocatechuic acid	1	6.67	6.10	6.11	0.02	0.26	91.44
		2		6.13				91.83
		3		6.10				91.41
	Syringin	1	10.77	9.61	9.60	0.04	0.38	89.18
		2		9.63				89.44
		3		9.56				88.77
	Scoparone	1	2.52	2.87	2.88	0.01	0.39	113.89
		2		2.87				113.85
		3		2.89				114.64
Sample 1000 µg/ml + 2.5 µg/ml standard	Uracil	1	6.1	7.24	7.28	0.04	0.54	118.64
		2		7.28				119.31
		3		7.32				119.93
	Adenosin	1	34.08	39.07	39.22	0.19	0.48	114.63
		2		39.43				115.70
		3		39.16				114.91
	Protocatechuic acid	1	7.67	8.51	8.00	0.44	5.50	110.94
		2		7.76				101.20
		3		7.73				100.82
	Syringin	1	11.77	12.12	12.15	0.05	0.42	102.99
		2		12.21				103.74
		3		12.12				102.98
	Scoparone	1	3.52	4.20	4.19	0.04	0.84	119.40
		2		4.22				119.74
		3		4.15				117.87

*Expected concentration = (Amount of n-BuOH layer of *O. elatus* in 2000 µg/ml) + (Amount of standard in 1, 3 and 5 µg/ml)

**RSD = (Standard deviation / mean) * 100

***Accuracy = (Measured concentration / expected concentration) * 100

Table IV. Result of repeatability

Sample concentration (µg/ml)	Standard	Test	Measured concentration (µg/ml)	Mean* (µg/ml)	SD**	RSD (%)
1000	Uracil	1	3.89	3.60	0.25	6.81
		2	3.49			
		3	3.47			
		4	3.41			
		5	3.95			
		6	3.42			
	Adenosine	1	31.19	31.58	0.35	1.10
		2	32.07			
		3	31.90			
		4	31.41			
		5	31.63			
		6	31.30			
	Protocatechuic acid	1	5.08	5.17	0.06	1.18
		2	5.24			
		3	5.23			
		4	5.14			
		5	5.19			
		6	5.15			
	Syringin	1	9.17	9.27	0.11	1.22
		2	9.46			
		3	9.35			
		4	9.21			
		5	9.27			
		6	9.18			
Scoparone	1	0.98	1.02	0.03	2.99	
	2	1.04				
	3	0.99				
	4	1.05				
	5	1.03				
	6	1.04				

*Mean = Measured concentration / 6

**SD = Standard deviation

선 가이드라인에 따라 반복정밀성과 실험실내 정밀성으로 평가하였다. 그 결과, 반복정밀성에서 상대표준편차(RSD)는 uracil에서 6.81%, adenosine은 1.10%, protocatechuic acid는 1.18%, syringin은 1.22%, scoparone은 2.99%로 안정적인 결과를 얻었다(Table IV). 또한, 재 추출 및 재 전처리를 통한 실험실내 정밀성에서 상대표준편차(RSD)는 uracil에서 10.06%, adenosine은 12.71%, protocatechuic acid는 10.62%, syringin은 10.62%, scoparone은 12.85%의 결과를 얻어 기준인 15%이내에 적합함을 확인하였다(Table V).

결 론

맛두릅 나무 줄기에 관한 이전 연구를 통해 동정해 낸 uracil, adenosine, protocatechuic acid, syringin, scoparone를 지표성분으로 밸리데이션 시험을 진행하였다. 전처리 과정을 통해 맛두릅 나무의 매쉬, 온도 및 추출시간의 영향이 없이 다양한 추출 조건에서도 안정적으로 5가지의 지표물질이 분석되는 분석법을 확립하였다. 확립된 분석법은 직선성, 정확성, 특이성, 정밀성을 이용하여 식품의약품안전처

Table V. Result of intermediate precision

Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Standard	Test	Measured concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean ($\mu\text{g/ml}$)	SD	RSD (%)
1000	Uracil	1	3.06	3.53	0.36	10.06
		2	3.95			
		3	3.67			
		4	3.12			
		5	3.70			
		6	3.68			
	Adenosine	1	37.31	31.87	4.05	12.71
		2	35.32			
		3	31.76			
		4	28.49			
		5	26.48			
		6	31.87			
	Protocatechuic acid	1	6.04	5.32	0.57	10.62
		2	5.82			
		3	5.30			
		4	4.94			
		5	4.49			
		6	5.34			
	Syringin	1	10.75	9.28	1.10	11.87
		2	10.23			
		3	9.23			
		4	8.56			
		5	7.70			
		6	9.23			
Scoparone	1	1.29	1.09	0.14	12.85	
	2	1.21				
	3	1.09				
	4	0.93				
	5	0.95				
	6	1.08				

가이드 라인에 맞추었다. 정밀성 확인에서 상대표준편차 (RSD)의 차이는 실험실내 정밀성 확인을 위해 재 추출 및 재 전처리를 하여 분석된 데이터를 반복정밀성 데이터와 비교하였기 때문에 판단된다. 하지만, 이 결과는 기준인 15% 이내에 적합한 RSD(%) 값으로써 재현성을 확인할 수 있었다. 이에 따라 본 연구를 통하여 확립된 분석방법이 땃두릅나무의 품질평가에 이용될 수 있음을 확인하였고, 더 나아가 땃두릅나무의 식품등록을 위한 기초자료로 활용 가능 할 것으로 판단된다.

사 사

본 논문의 연구는 산림청(한국임업진흥원) 산림과학기술 연구개발사업(과제번호: 2017038B10-1819-BA01)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

1. 이우철 (1996) 원색 한국기준식물도감, 251, 아카데미서적, 서울.

2. Kwon, Y. S., Yoo, J. H., Yoo, N. H., Kim, M. J., Kim, H. P., Yang, H. J. and Chun, W. J. (2018) Chemical Constituents of *Oplopanax elatus* Stem. *Kor. J. Pharmacogn.* **49**: 23-27.
3. Brown, E.G (1998) Ring Nitrogen and Key Biomolecules: The biochemistry of N-heterocycles. Lluwer Academic Publishers, Boston.
4. Haskó, G (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* **25**: 33-39.
5. Park, J., Lee, B., Choi, H., Kim, W., Kim, H. J. and Cheong, H. (2016) Antithrombosis activity of protocatechuic and shikimic acids from functional plant *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc needles. *J. Nat. Med.* **70**: 492-501.
6. Dai, X. Q., Cai, W. T., Wu, X., Chen, Y. and Han, F. M. (2017) Protocatechuic acid inhibits hepatitis B virus replication by activating ERK1/2 pathway and down-regulating HNF4 α and HNF1 α *in vitro*. *Life Sci.* **180**: 68-74.
7. Sharma, U., Bala, M., Kumar, N., Singh, B., Munshi, R. K. and Bhalerao, S. (2012) Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*. *J. Ethnopharmacol.* **141**: 918-926.
8. Cho, D. Y., Ko, H. M., Kim, J., Kim, B. W., Yun, Y. S., Park, J. I., Ganesan, P., Lee, J. T. and Choi, D. K. (2016) Scoparone inhibits LPS-simulated inflammatory response by suppressing IRF3 and ERK in BV-2 microglial cells. *Molecules* **21**: E1718.
9. Kim, J. K., Kim, J. Y., Kim, H. J., Park, K. G., Harris, R. A., Cho, W. J., Lee, J. T. and Lee, I. K. (2013) Scoparone exerts anti-tumor activity against DU145 prostate cancer cells via inhibition of STAT3 activity. *PLOS One* **8**: e80391.

(2019. 5. 20 접수; 2019. 6. 14 심사; 2019. 6. 17 게재확정)