

UHPLC-DAD 및 다변량분석법을 이용한 참당귀의 산지감별법 연구

김정률 · 이동영 · 성상현 · 김진웅*

서울대학교 약학대학

Geographical Classification of *Angelica gigas* using UHPLC-DAD Combined Multivariate Analyses

Jung-ryul Kim, Dong Young Lee, Sang Hyun Sung, and Jinwoong Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-Gu, Seoul 151-742, Korea

Abstract – Geographical classification of *A. gigas* was performed in the present study using UHPLC-DAD combined with multivariate data analysis techniques. Six active constituents were isolated from *A. gigas*; nodakenin, marmesin, decursinol, demethylsuberosin, decursin and decursinol angelate. One hundred sixty eight *A. gigas* samples were simultaneously determined using UHPLC-DAD. A principal component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was used to classify the samples according to geographical origins (Korea and China). The origins of *A. gigas* from Korea and China were correctly classified by 81.6% and 93.8% using PLS-DA Y prediction. This result demonstrates the potential use of UHPLC-DAD combined with multivariate analysis techniques as an accurate and rapid method to classify *A. gigas* according to their geographical origin.

Key words – *Angelica gigas*, UHPLC-DAD, PCA, PLS-DA

참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 한국과 중국 동북부에 자생하며 그 뿌리를 당귀라고 하여 약으로 사용한다. 당귀는 전통적으로 대표적인 보혈제로 사용되었으며, 진통, 진경 등의 작용이 있어 한방에서 부인과 질환이나 혈액 순환을 위해 사용된다.¹⁾ 주요 성분으로는 coumarin계 화합물인 decursin, decursinol, decursinol angelate, nodakenin 등이 있으며 이외에도 β -sitosterol, α -pinene, limonene 등이 알려져 있다.²⁾

한국에서는 생약 ‘당귀’의 기원식물로 참당귀를 많이 사용하고 있지만, 중국과 일본에서는 각각 중국당귀(*A. sinensis* (Oliv.) Diels)와 일당귀(*A. acutiloba* Kitagawa)를 당귀의 기원식물로 사용하고 있다.³⁾ 또한 참당귀 역시 중국 길림성, 요령성 등에서 많이 재배되고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 일반적으로 대부분의 생약은 건조 후 절단하여 보관 및 유통되므로 이를 걸으로 판별해 내기가 쉽지 않다. 그러므로 국산 당귀를 과학적으로 판별할 수 있는 근거의 마련 및 판별법의 개발이 필요한 실정이다.

UHPLC(Ultra high performance liquid chromatography)

는 2 μ m 이하의 pore size를 가지는 컬럼 충전재를 사용하여 HPLC보다 향상된 분석능을 가지는 분석기술이다. 또한 UHPLC는 기존의 HPLC와 비교하여 1/3~1/6 정도의 짧은 시간에 분석을 할 수 있다.⁴⁾

본 연구에서는 UHPLC-DAD를 이용하여 한국산과 중국산 참당귀를 분석하였다. UHPLC의 분석능과 빠른 분석시간을 이용하여 수집한 168종을 전수 분석하였다. 또한 168종의 분석시료를 빠르고 균일한 조건으로 추출할 수 있도록 가압용매추출(Pressurized liquid extraction, PLE)법을 이용하여 시료를 제조하였다. 그리고 제조된 시료에 대해 기존에 분리한 6종의 coumarin 계열의 함량을 정량분석함과 동시에 UHPLC-DAD에서 얻은 크로마토그램을 주성분 분석(Principal component analysis, PCA), 부분최소자승판별 분석(Partial least square discriminant analysis, PLS-DA)과 같은 다변량분석법에 적용하여 산지 판별을 시도하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 연구에서 분석에 사용된 당귀 168종 중 국산 87종은 중앙대학교 약학대학 황완균 교수가, 중국산 81

*교신저자(E-mail): jwkim@snu.ac.kr
(Tel): +82-2-880-9175

중은 대전대학교 서영배 교수가 수집한 것을 사용하였다. 국산 87종은 경북 봉화, 충북 제천, 강원 홍천, 강원 평창 및 경남 함양에서 수집되었으며 중국산은 모두 길림성 지역에서 수집되었다.

기기 및 시약 - 추출용매는 시약용 용매(Daejung Chemical & Metals Co. Ltd., Korea)를 사용하였고, UHPLC용 용매는 HPLC grade 용매(Fisher Scientific Korea Ltd., Korea)를 사용하였다. 그 외에 분석용 1급 시약(Sigma-Aldrich Co. USA)을 사용하였다. PLE에 사용한 기기는 ASE 200(Dionex, USA)을 이용하였고, UHPLC system은 Waters ACQUITY™ Ultra Performance Liquid Chromatography(Waters, USA)을 사용하였다.

시료제조 - 건조시킨 당귀를 각각 분쇄기를 이용하여 분쇄시킨 후 20호체(850 µm)를 통과한 것 중 100호체(150 µm)를 통과하지 못한 것을 모아 가압추출용 시료로 사용하였다. 당귀 분말 1.0g과 구조토 1.5g을 혼합하여 22 ml stainless steel cell에 넣고 ASE 200을 사용하여 100% MeOH로 추출하였다. 추출 조건은 온도 80°C, 압력 1000 psi, preheating 5 min, heating 5 min, static 5 min, flush volume 60%, purging 90 sec였다.

또한 nodakenin(4.6 mg), marmesin(4.0 mg), decursinol(3.0 mg), demethylsuberosin(22.0 mg), decursin(14.1 mg), decursinol angelate(10.3 mg) 등의 6종의 coumarin 계열의 물질을 참당귀에서 분리한 뒤, 문헌과 비교하여 구조를 확인하였고,^{5,9)} 이들을 50% MeOH용매에 녹이고 각각의 적합한 농도를 설정하여 분석에 사용하였다.

UHPLC 분석 - 가압액추출을 통해 얻은 시료를 50 ml로 맞춘 후 nylon membrane syringe filter(17 mm, 0.2 µm)로 여과하여 UHPLC용 시료로 사용하였다. 분석 조건은 Waters ACQUITY BEH C₁₈(1.7 µm, 2.1×100 mm) column을 사용하여 sample 온도 5°C, column 온도 30°C, 파장 330 nm에서 이동상은 water(0.1% formic acid)와 acetonitrile(0.1% formic acid)을 사용하였으며 유속은 0.4 ml/min, 시료 주입량은 1 µl였다. 이동상 조건은 Table I에 표시하였다.

다변량 분석 - 다변량분석을 위해 UHPLC 분석을 통해 얻

Table I. Mobile phase condition of UHPLC

Time (min)	Water (0.1% formic acid)	AcCN (0.1% formic acid)
0	70	30
2.3	70	30
2.5	50	50
7.7	50	50
7.9	10	90
9	10	90

*Re-equilibration time : 3 min

은 크로마토그램을 시간에 따른 피크의 강도로 수치화 하고, 이를 MATLAB R2011b(Mathworks, USA)에서 correlation optimized warping 알고리즘을 이용하여 peak alignment를 수행하였다. 이 후 SIMCA-P 11.5(Umetrics, Sweden)을 사용하여 PCA와 PLS-DA를 시행하여 국산과 중국산 참당귀의 구분되는 양상을 파악하였다.

결과 및 고찰

분석법 Validation - 6가지 표준물질에 대하여 각각 확립된 UHPLC 조건으로 분석한 결과, 모두 correlation coefficient(R²)가 0.9997 이상을 나타냈고, 검출한계는 0.1-28.9 ng이었으며 검량한계는 0.5-87.5 ng으로 나타났다. 정밀성(precision)은 intra-day, inter-day 모두 RSD값이 3% 이하였으며, 정확성(accuracy)은 97-103%로 분석법이 유의성이 있음을 확인하였다(Table II, III).

당귀의 정량 - UHPLC를 통한 분석으로 얻은 크로마토그램을 Empower software 2.0의 integrate 기능을 이용하여 각 성분의 peak의 넓이를 측정하였다. 넓이는 calibration curve의 식을 이용하여 농도로 환산하였다. 정량의 결과 국산과 중국산의 함량비교에서 전반적으로 demethylsuberosin과 decursinol angelate를 제외한 네 성분이 한국산에서 함량이 더 높은 것으로 나타났다. 특히하게도 산지별 decursin과 decursinol angelate의 함량의 비율을 비교한 결과 한국산에

Table II. Linearity, limit of detection(LOD) and limit of quantitation(LOQ) of compounds 1-6 by UHPLC-DAD

Compound	Range (µg/ml)	Regression equation ^{a)}	R ^{2b)}	LOD (ng)	LOQ (ng)
Nodakenin (1)	14 ~ 550	y = 2,612.827x + 2.209	0.9997	5.1	15.4
Marmesin (2)	3.2 ~ 160	y = 6,815.545x + 2.454	0.9999	0.4	1.2
Decursinol (3)	2 ~ 100	y = 11,087.906x + 6.342	1.0000	0.1	0.5
Demethylsuberosin (4)	4.8 ~ 240	y = 6,132.513x + 4.021	0.9999	0.4	1.3
Decursin (5)	20 ~ 1,000	y = 7,336.981x + 140.998	0.9998	28.9	87.5
Decursinol angelate (6)	37 ~ 1,470	y = 5,217.940x + 57.891	0.9999	16.1	48.9

a) y: peak area, x: concentration(µg/ml)

b) correlation coefficient

Table III. Inter-day variation of compounds 1~6 by UHPLC-DAD

Compound	Precision				Accuracy		
	Interday		Intraday		Spiked amount (μg)	Measured amount (μg)	Accuracy (%)
	Spiked amount (μg)	RSD (%)	Spiked amount (μg)	RSD (%)			
Nodakenin (1)	0.5500	2.00	0.1400	1.00	0.2240	0.2237	99.87
	0.3500	0.44	0.0690	0.64	0.1850	0.1848	99.91
	0.0140	1.12	0.0350	0.50	0.1470	0.1508	102.56
Marmesin (2)	0.1600	0.79	0.0320	0.56	0.0240	0.0237	98.83
	0.0800	0.18	0.0160	0.13	0.0220	0.0219	99.63
	0.0030	1.08	0.0080	1.11	0.0190	0.0188	98.78
Decursinol (3)	0.1000	0.17	0.0200	0.48	0.0150	0.0147	98.14
	0.0500	0.86	0.0100	1.09	0.0120	0.0119	99.27
	0.0020	3.06	0.0050	0.46	0.0100	0.0100	99.52
Demethylsuberosin (4)	0.2400	0.60	0.0480	0.37	0.0340	0.0332	97.77
	0.1200	0.32	0.0240	0.76	0.0300	0.0300	100.08
	0.0050	1.48	0.0120	1.12	0.0270	0.0267	99.05
Decursin (5)	1.0000	0.87	0.2000	0.65	0.5920	0.5946	100.44
	0.5000	0.48	0.1000	0.65	0.4810	0.4832	100.45
	0.0200	1.81	0.0500	0.55	0.3710	0.3634	97.96
Decursinol angelate (6)	1.4700	0.79	0.3700	0.64	0.6640	0.6477	97.55
	0.9200	0.18	0.1800	0.55	0.5490	0.5300	96.54
	0.0370	1.08	0.0920	0.19	0.4350	0.4241	97.49

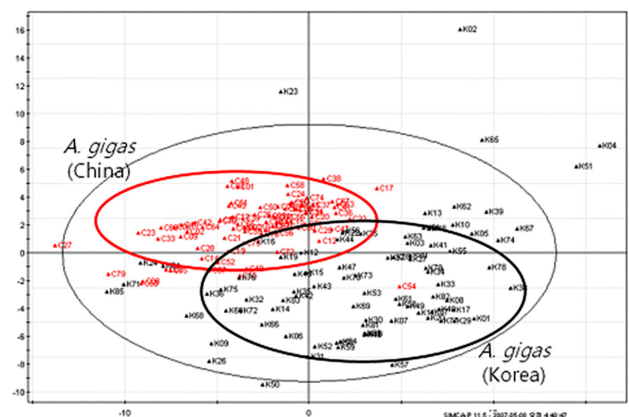
Table VI. The average amount of compounds (mg/g) 1~6 of *A. gigas* using UHPLC-DAD

	Nodakenin (1)	Marmesin (2)	Decursinol (3)	Demethylsuberosin (4)	Decursin (5)	Decursinol angelate (6)
<i>A. gigas</i> (Korea)	19.380 \pm 4.149	0.605 \pm 0.236	0.390 \pm 0.204	2.005 \pm 0.752	46.105 \pm 9.365	43.685 \pm 10.528
<i>A. gigas</i> (China)	13.215 \pm 1.314	0.470 \pm 0.078	0.235 \pm 0.076	2.010 \pm 0.339	32.850 \pm 4.317	44.970 \pm 5.705

서는 decursin의 비율이 더 높은 것으로 나타났지만 중국산에서는 decursinol angelate의 비율이 더 높은 것으로 나타났다(Table IV).

PCA 분석 - 168 종의 모든 당귀 시료를 대상으로 주성분 분석을 시행하였다. PC1과 PC2를 이용한 2D score plot에서 주로 PC2를 기준으로 중국산은 주로 양의 값을, 국산은 주로 음의 값을 갖는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이를 어느 성분이 결과에 주로 영향을 미쳤는지를 확인하기 위해 PC2의 loading plot을 분석한 결과 앞서 정량분석의 결과와 마찬가지로 decursin과 decursinol angelate의 비율이 이러한 결과에 큰 영향을 미쳤음을 확인하였다(Fig. 2).

PLS-DA 분석 - 보다 확실한 산지 판별 모델의 수립을 위해 국산과 중국산 참당귀의 분석결과를 각각 1, 0으로 그룹을 지정한 이후 PLS-DA를 시행하였다. 분석결과 한국산 87종 중 71종을 한국산, 1종을 중국산, 15종을 no class로 판별하였고, 중국산 81종 중 71종을 중국산, 1종을 한국산, 4

**Fig. 1.** PCA score plot of *A. gigas* (PC1: 46.53%, PC2: 22.04%).

종을 no class로 판별하여 최종적으로 한국산의 판별율은 81.6%였으며, 중국산의 판별율은 93.8%였다(Fig. 3).

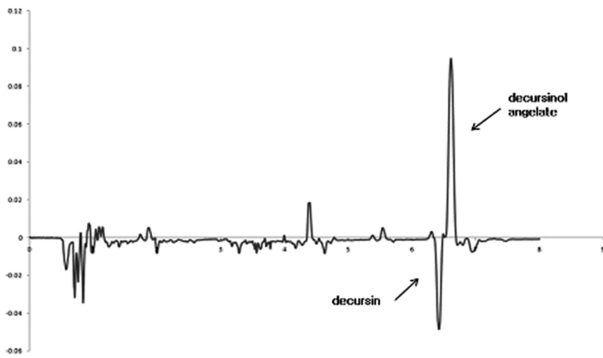


Fig. 2. PC2 loading plot of *A. gigas*.

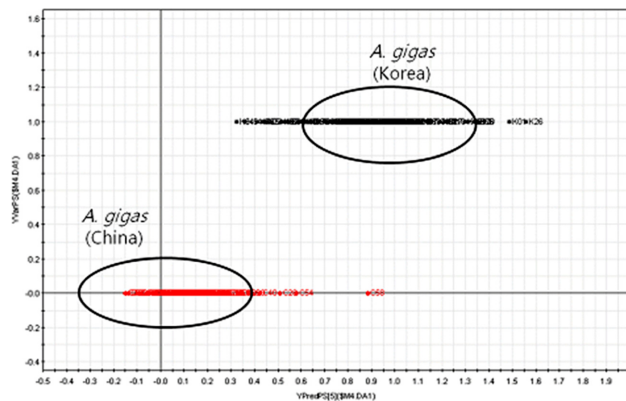


Fig. 3. PLS-DA Y prediction of *A. gigas*.

결론

참당귀(*A. gigas*)의 분석에 UHPLC-DAD와 다변량 분석법을 도입하여 보다 과학적이고 신속한 산지 판별법을 수립하였다. 우선 분리한 nodakenin, marmesin, decursinol, demethylsuberosin, decursin, decursinol angelate를 대상으로 각 산지별로 validation 및 정량실험을 수행하였으며 그 결과 국산과 중국산 참당귀의 함량 비교에서 평균적으로 한국산에서 demethylsuberosin과 decursinol angelate를 제외한 네 성분의 함량이 중국산 보다 높은 것을 확인할 수 있었다. UHPLC-DAD의 크로마토그램에 대하여 PCA와 PLS-DA를 통하여 다변량 분석을 수행한 결과 PCA에서는 2D score plot에서 PC2에 의해 한국산과 중국산이 구분되는 것을 확인하였고. Loading plot에서 이는 decursin과 decursinol

angelate에 의한 것임을 확인하였다. 이것을 PLS-DA Y prediction을 통하여 각각의 판별율을 확인한 결과 한국산의 판별율은 81.6%, 중국산의 판별율은 93.8%로 나타났다. 이상의 산지판별 결과는 당귀의 산지 분석에 UHPLC-DAD법이 경쟁력이 있음을 시사한다. 또한 향후 당귀 이외의 생약에도 효과적으로 사용될 수 있으리라 판단된다.

인용문헌

1. Heo, J. S., Cha, J. Y., Kim, H. W., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Heo, S. J., and Cho, Y. S. (2010) Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem mixture and root from *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Sci.* **20**: 750-759.
2. Park, Y. H., Lim, S. H., Kim, H. Y., Park, M. H., Lee, K. J., Kim, K. H., Kim, Y. G., and Ahn, Y. S. (2011) Biological activities of extracts from flowers of *Angelica gigas* Nakai. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **40**: 1079-1085.
3. Piao, X. L., Park, J. H., Cui, J., Kim, D. H., and Yoo, H. H. (2007) Development of gas chromatographic/mass spectrometry-pattern recognition method for the quality control of Korean Angelica. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**: 1163-1167.
4. Swartz, M. E. (2005) UPLCTM: An introduction and review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **28**: 1253-1263.
5. Kong, L. Y. and Yao, N. H. (2000) Coumarin-glycoside and ferulate from *Peucedanum decursivum*. *Chin. Chem. Lett.* **11**: 315-318.
6. Joo, S. H., Lee, S. C., and Kim, S. K. (2004) UV absorbent, marmesin, from the bark of thanakha, *Hesperethusa crenulata* L. *J. Plant Biol.* **47**: 163-165.
7. Lee, J. H., Bang, H. B., Han, S. Y., and Jun, J. G. (2007) An efficient synthesis of (+)-decursinol from umbelliferone. *Tetrahedron Lett.* **48**: 2889-2892.
8. An, R. B., Park, B. Y., Kim, J. H., Kwon, O. K., Lee, J. K., Min, B. S., Ahn, K. S., Oh, S. R., and Lee, H. K. (2005) Coumarins and chromones from *Angelica genuflexa*. *Nat. Prod. Sci.* **11**: 79-84.
9. Rye, K. S., Hong, N. D., Kim, N. J., and Kong, Y. Y. (1990) Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. Isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**: 64-68.

(2013. 11. 29 접수; 2013. 12. 12 심사; 2013. 12. 17 게재확정)