

HPLC를 이용한 기능성 원료 지표성분으로서 장수 오미자 분말 중 Schizandrin의 분석법 개발

김윤정^{1,2*} · 하 나^{1,2*} · 한송희^{1,2} · 전지영^{1,2} · 황민호^{1,2} · 임용진^{1,2} · 이선영^{1,3} · 채수완^{1,2,4} · 김민걸^{1,2†}

¹전북대학교병원 의생명연구원, ²전북대학교병원 임상시험센터
³전북대학교병원 방사선종양학과, ⁴전북대학교 의학전문대학원 약리학교실

Confirmation of Schizandrin as a Marker Compound in *Jangsu Omija* Powder

Yunjeong Kim^{1,2*}, Na Ha^{1,2*}, Song-Hee Han^{1,2}, Ji-Young Jeon^{1,2}, Minho Hwang^{1,2},
Yong-Jin Im^{1,2}, Sun Young Lee^{1,3}, Soo-Wan Chae^{1,2,4}, and Min-Gul Kim^{1,2†}

¹Biomedical Research Institute, ²Clinical Trial Center, and ³Dept. of Radiatio Oncology,
Chonbuk National University Hospital, Jeonbuk 561-712, Korea

⁴Dept. of Pharmacology, Chonbuk National University Medical School, Jeonbuk 561-712, Korea

Abstract

We studied the development of schizandrin as a marker compound in *Jangsu Omija*. Schizandrin was validated for its LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation), precision, accuracy, and recovery by HPLC relative to Omija powder. It showed a high linearity in the calibration curve with a coefficient of correlation (R^2) of 0.9990. The LOD and LOQ were 0.2 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The intra- and inter-day precision of schizandrin calibration standards was 0.06~0.66% and 0.13~1.19%, respectively, and the intra- and inter-day accuracy of schizandrin was 98.35~103.30% and 98.35~103.00%, respectively. Overall, schizandrin was validated through our analytical methods as a marker compound in *Jangsu Omija*.

Key words: schizandrin, method development, Omija, HPLC, validation

서 론

오미자(*Schizandra chinensis* (Turez.) Baill.)는 오미자과(*Schizandraceae*)에 속하는 낙엽성 목본인 덩굴식물이며 붉은 색의 과실을 생약재 및 식품원료로 이용하는 주요 약용식물이다(1). 오미자나무과에는 2속 3종이 국내에 분포하고 있는데, 오미자나무속(*Schizandrae*)에는 주로 약용으로 쓰이는 오미자(*S. chinensis*)와 제주도에 분포하며 열매가 흑색을 띠는 흑오미자나무(*S. nigra*)가 있다(2). 오미자의 효능으로는 혈압강하작용 및 알콜해독작용이 있는 것으로 알려져 있고 암 예방 활성(3,4), 노화 억제 활성(5), 면역 조절 작용 및 항균활성(6) 등 다양한 생리적 기능이 보고되고 있으며 천연 오미자 추출물의 약리, 화학적 특성 및 분석(7), 오미자 추출물의 생리활성(8) 등 여러 가지 오미자에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 오미자의 과실에 함유된 성분은 schizandrin, gomisin A, gomisin N 등 주로 리그난 화합물로 각 리그난의 평균 함량은 schizandrin 0.70%, gomisin A 0.20%, gomisin N 0.59%이고(9), 그 외에 정유, 색소 등 다양

한 성분이 함유되어 있다(10,11). 특히 schizandrin(Fig. 1)은 혈당저하작용, 항 케양작용, 만성간염치료효과, 중추신경흥분작용 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다(12). 또한 간 손상을 유도하는 사염화탄소(CCl_4)로부터 보호한다고 보고되었다(13). 그리고 부교감신경시스템의 활성화 또는 글루타민산염 수송체를 조절하고 세포 밖의 글루타민산염의 정도를 줄여 중추신경계에 어느 정도 영향을 준다고 보고되었다(14). 이러한 생리적 기능을 다량 함유한 오미자는 국

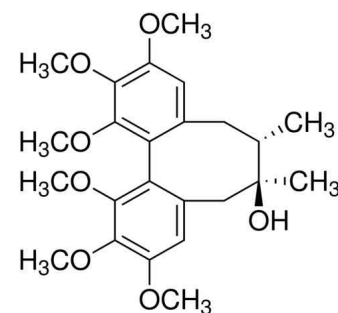


Fig. 1. Structure of schizandrin.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: mgkim@jbtc.org
Phone: 82-63-250-2532, Fax: 82-63-250-2349

내에서 경북 문경, 상주, 경남 거창, 충북 단양, 충주, 전북 장수, 진안, 무주 등에서 생산되고 있는데, 이 중에서 특히 장수 오미자는 장수군에서 지역특화작목으로 선정하여 농가소득과 지역경제 활성화를 위해 가공투자가 이루어지는 작물이다. 장수 오미자는 전국 생산량의 20%를 차지하고 재배면적의 꾸준한 증가세로 장수 오미자를 건강기능식품 개별인정원료로 개발한다면 더 많은 농가소득 창출과 부가가치 상승에 큰 도움이 될 것이다. 건강기능식품 개발에서 표준화 및 규격화는 매우 중요한 부분을 차지하게 된다. 건강기능식품에서의 표준화란 천연물질에 함유되어 있는 고유한 성분의 변동을 최소화하여, 생산되는 배치(batch)에 상관없이 일정한 품질을 유지하기 위해 원재료의 생산에서부터 제조 과정 전반에 걸쳐 사용된 기술과 정보를 관리하는 것을 말한다. 이러한 기능성을 표준화되게 관리하기 위한 가장 일반적인 지표가 기능성분 또는 지표성분이다(15). 본 연구에서는 오미자의 성분 중 함량이 높고 특이성분인 schizandrin을 지표성분으로 설정하였으며(9,16), HPLC를 이용하여 schizandrin의 분석법을 확립하고자 하였다. 분석법의 타당성은 분석에 사용하는 시험법이 시험목적에 적합하고 시험법의 오차가 허용되는 정도라는 것을 과학적으로 입증하는 것으로 선정된 분석법이 재현성이 있고 의도한 목적에 부합되는 신뢰성이 있는 결과를 얻을 수 있다는 것을 증명하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 건강기능식품의 개별인정형 원료로서 오미자의 표준화를 위해 schizandrin을 지표성분으로 선정하여 HPLC를 이용한 schizandrin의 분석법을 확립하며 그에 대한 분석법 검증과정을 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 실험에 사용한 표준품은 schizandrin(purity 99%, Wako pure chemical, Osaka, Japan)을 사용하였고 water와 acetonitrile, 그리고 methanol 등의 용매는 Fisher(Fisher scientific Korea Ltd, Seoul, Korea)로부터 구입하였으며, HPLC 등급으로 사용하였다.

표준용액의 조제

Schizandrin 표준품 10 mg을 정밀히 재어 메탄올 10 mL에 용해시켜 1 mg/mL로 만들어 표준원액을 제조한 후, 메탄올로 희석하여 2, 4, 8, 10, 16 및 20 µg/mL 농도가 되도록 표준용액을 만들었다. QC(quality control) 용액은 2, 4, 10 및 16 µg/mL의 농도로 표준용액과 같은 방법으로 만들어서 -20°C에 보관하였다.

시험용액의 조제

장수 RED산업육성사업단에서 구입한 9월에 채취된 세 lot의 건조 오미자 분말 2 g을 메탄올 100 mL를 이용하여

Table 1. HPLC condition for schizandrin

Instrument	Condition
Column	Symmetry C18 (4.6×250 mm, particle size: 5 µm)
Mobile phase	A: water, B: acetonitrile
Isocratic condition	A: 40, B: 60
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	10 µL
Detector	UV-Vis 254 nm

환류 추출하였다. 추출액을 0.45 µm syringe를 이용하여 필터하여 시험용액으로 사용하였다.

HPLC 분석

Schizandrin의 분석을 위해 사용된 기기는 HPLC GILSON UV-Vis(254 nm, GILSON, Middleton, WI, USA)를 사용하였다. 분석칼럼은 C18(symmetry® 4.6×250 mm, particle size: 5 µm)이었으며 이동상으로는 water(A)와 acetonitrile(B)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 시료 10 µL를 주입하여 등용리 용매조건(isocratic condition)으로 분석하였다. HPLC의 분석 조건은 Table 1과 같다.

분석법 검증

Schizandrin 표준용액은 schizandrin 표준원액을 메탄올에 희석한 후 혼합하여 제조하였으며, 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 회수율(recovery)을 측정하였다.

특이성: 특이성은 불순물, 분해물, 배합성분 등의 다른 물질의 공존 시 해당 분석물질을 분리하고 정량하는 분석 능력으로 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는 것에 의해 특이성을 확인하였다. 표준용액과 동일한 전처리방법으로 처리한 오미자추출액을 HPLC로 분석한 뒤 크로마토그램을 비교하여 schizandrin 피크가 분리되는지 확인하였다.

검량선, 검출한계 및 정량한계: 검량선은 기기의 반응과 분석물질의 기지농도와의 관계를 나타낸다. 2, 4, 8, 10, 16, 20 µg/mL로 단계적으로 희석한 schizandrin 표준용액을 HPLC로 분석하여 표준용액의 피크 면적에 대한 schizandrin의 농도비의 관계를 표시하는 표준 검량선을 작성하였다. 검출한계는 시료분석법과정으로 배경 노이즈와 확실하게 구분되어지는 분석물질의 최저농도를 말하는 것으로 시료 대 잡음 비율(S/N ratio, signal to noise ratio)이 3.3일 때, 정량한계는 적합한 정밀성과 정확성으로 정량적으로 실측될 수 있는 시료 내 분석물질의 최저량을 말하는 것으로 S/N ratio가 10일 때 표준편차와 표준 검량선의 기울기를 이용하여 계산하였다(detection limit=3.3σ/S, quantitation limit=10σ/S, σ: 반응의 표준편차, S: 표준검량선의 기울기).

정밀성, 정확성 및 회수율: 정밀성은 하나의 균질화 된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 말하며, 정확성은

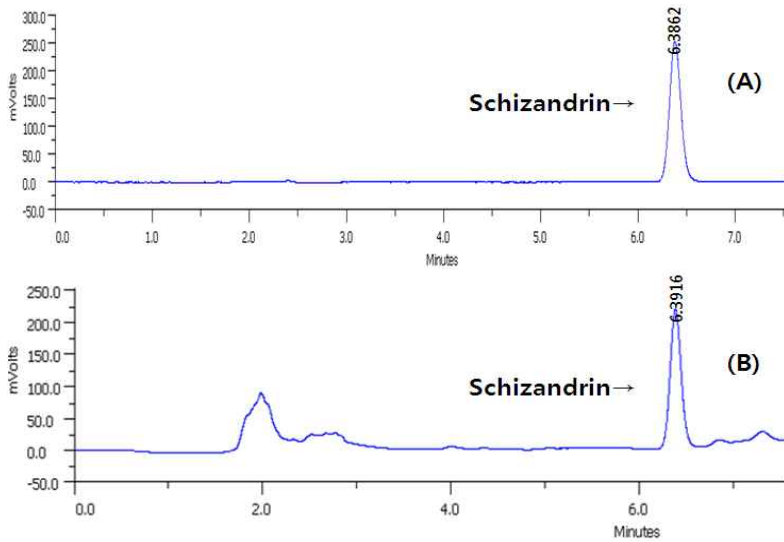


Fig. 2. HPLC chromatograms of schizandrin. (A) Standard (B) Omija extracts.

분석물질의 함값에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균시험 결과의 근접성을 말한다. 회수율은 시료에 분석물질을 가한 후 추출하여 얻어진 시료의 검출반응과 기지농도의 순수 표준물질의 검출반응을 비교한 값으로 표준품을 전처리법에 따라 처리된 시험용액을 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 분석으로 나누어 정밀성, 정확성 및 회수율 실험을 실시하였다. 일내분석은 1일 5회로 나누어 진행하였고, 일간분석은 1일 2회로 5일간 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

특이성

표준 용액과 같이 시료 전처리 방법으로 처리한 오미자추출액의 크로마토그램을 비교하여 schizandrin 피크가 분리되는 지를 확인한 결과 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었다(Fig. 2). 표준용액의 머무름 시간은 6.3862분이고 오미자 추출액의 머무름 시간은 6.3916분으로 표준용액의 피크 유지시간과 오미자 추출액의 피크 유지시간이 일치하였다.

검량선 및 검출한계, 정량한계 조사

검량선은 schizandrin의 표준용액을 2, 4, 8, 10, 16, 20 µg/

mL로 단계적으로 희석한 후 HPLC로 분석하여 검량선을 Fig. 3과 같이 나타내었다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9990으로 높은 직선성을 보여 본 농도를 범위(range)로 설정하였다. 검출한계는 0.2 µg/mL이었고 정량한계는 0.5 µg/mL로 확인할 수 있었다.

정밀성, 정확성 검토 및 회수율 측정

일내, 일간분석의 정밀성, 정확성 및 회수율을 측정하였다. 표준용액에서 일내분석의 결과는 Table 2, 3과 같으며 상관계수(R^2)는 0.9992로 높은 유의수준으로 보였고 변동계

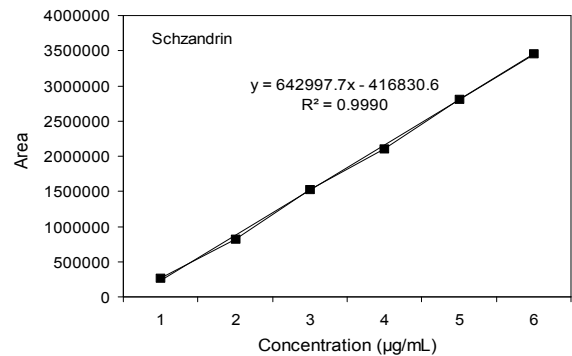


Fig. 3. Calibration curve of schizandrin standard solution.

Table 2. Calculated concentrations of schizandrin in calibration standards

Parameter	Calibration (µg/mL)						R^2	
	2	4	8	10	16	20		
Intra-day ¹⁾	Mean	2.07	3.93	7.99	9.98	16.01	20.02	0.9992
	CV (%) ³⁾	0.66	0.52	0.50	0.29	0.06	0.11	—
	Accuracy (%)	103.30	98.35	99.83	99.78	100.04	100.12	—
	RE (%) ⁴⁾	3.30	-1.65	-0.18	-0.22	0.04	0.12	—
Inter-day ²⁾	Mean	2.03	3.93	7.99	9.98	16.04	19.99	0.9993
	CV (%)	1.19	0.26	0.26	0.27	0.16	0.13	—
	Accuracy (%)	103.00	98.35	99.90	99.76	100.25	99.99	—
	RE (%)	3.00	-1.65	-0.10	-0.24	0.25	-0.01	—

¹⁾Intra-day: five times per day. ²⁾Inter-day: two times analysis of schizandrin per day for five days.

³⁾Coefficient of variation. ⁴⁾Relative error.

Table 3. Recovery of schizandrin in calibration standards

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%), mean \pm SD	
	Intra-day	Inter-day
2	103.50 \pm 0.01 ¹⁾	103.18 \pm 0.02 ²⁾
4	97.50 \pm 0.02	98.43 \pm 0.01
8	99.88 \pm 0.04	99.91 \pm 0.02
10	99.80 \pm 0.03	99.88 \pm 0.03
16	100.06 \pm 0.01	100.35 \pm 0.03
20	100.10 \pm 0.02	99.96 \pm 0.03

¹⁾Each data was obtained by five times analysis (n=5).

²⁾Each data was obtained by five days analysis (n=10).

수(CV, coefficient variation)는 0.06~0.66%를 나타내었다. 정확성(accuracy)은 98.35~103.30%를 나타냈으며 상대오차(RE, relative error)는 -1.65~3.30%로 나타났다. 회수율은 97.50~103.50%의 범위로 나타났으며 분석오차가 10% 이내였다. QC 시료들의 일내분석 결과는 Table 4, 5와 같으며 변동계수는 0.24~0.36%를 나타내었고 정확성은 98.05~102.90%를 나타냈으며, 상대오차는 -0.20~2.90%로 나타났다. 일내분석에서 회수율은 98.05~102.90%의 범위로 나타났다.

표준용액에서 일내분석의 결과는 Table 2, 3과 같으며 상관계수(R^2)는 0.9993으로 높은 유의수준으로 보였으며, 변동계수는 0.13~1.19%를 나타내었고 정확성은 98.35~103.00%를 나타냈으며, 상대오차는 -1.65~3.00%로 나타났다. 일내분석에서 회수율은 98.43~103.18%의 범위로 나타났으며 일내분석과 마찬가지로 분석오차가 10% 이내였다. QC 시료

Table 4. Calculated concentrations of schizandrin in quality control samples

Parameter	Calibration ($\mu\text{g/mL}$)			
	2	4	10	16
Mean	2.06	3.92	10.02	16.03
Intra-day ¹⁾ CV (%) ³⁾	0.36	0.25	0.28	0.24
Accuracy (%)	102.90	98.05	100.18	100.16
RE (%) ⁴⁾	2.90	-0.20	0.18	0.16
Mean	2.06	3.92	9.99	16.14
Inter-day ²⁾ CV (%)	0.97	0.34	0.75	1.67
Accuracy (%)	103.15	98.08	99.98	100.88
RE (%)	3.15	-1.93	-0.02	0.88

¹⁾Intra-day: five times per day (n=5).

²⁾Inter-day: two times analysis of schizandrin per day for five days (n=10).

³⁾Coefficient of variation.

⁴⁾Relative error.

Table 5. Recovery of schizandrin in quality control samples

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%), mean \pm SD	
	Intra-day	Inter-day
2	102.90 \pm 0.01 ¹⁾	103.23 \pm 0.02 ²⁾
4	98.05 \pm 0.01	98.12 \pm 0.13
10	100.18 \pm 0.03	99.84 \pm 0.08
16	100.16 \pm 0.04	100.91 \pm 0.27

¹⁾Each data was obtained by five times analysis (n=5).

²⁾Each data was obtained by five days analysis (n=10).

Table 6. Amount of schizandrin in Jangsu Omija powder

Lot number (n=3)	Mean ($\mu\text{g/mg}$)	RSD (%)	Contents (%)
1	4.010 \pm 0.22 ¹⁾	5.492	0.401
2	4.148 \pm 0.23	5.634	0.415
3	4.080 \pm 0.18	4.314	0.408

¹⁾Each value is presented as mean \pm SD.

의 일내분석 결과는 Table 4, 5와 같으며 변동계수는 0.34~1.67%를 나타내었고 정확성은 98.08~103.15%를 나타냈으며, 상대오차는 -1.93~3.15%로 나타났다. 일내분석에서 QC 시료의 회수율은 98.12~103.23%의 범위로 나타났다.

장수오미자 내에서의 schizandrin 함량

본 시험법의 검증과정을 통하여 schizandrin에 대한 상기 HPLC 분석법이 기능성 원료 인증을 받기 위한 장수 오미자 내의 schizandrin의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 및 회수율 등을 갖고 있음을 확인하였다. 검증된 분석법으로 장수 RED산업육성사업단에서 구입한 세 lot의 오미자 분말의 함량을 측정하고 분말 중 schizandrin의 함량의 평균은 0.408%, 기준값은 0.408%의 80~120%로 기준 규격을 설정하였을 때(17) 함량은 0.33~0.49%이었다(Table 6).

Schizandrin의 분석법은 이미 대한약전(18) 상에 '오미자' 항목에 acetonitrile:water:formic acid(70:30:0.1)를 이동상으로 하는 정량법이 나와 있으나, 표준품(10 $\mu\text{g/mL}$)을 이용한 본 분석법과의 비교실험 결과 본 분석법이 1분 이상 빠른 결과를 나타내었다(Fig. 4). 따라서 본 분석법을 이용하여 장수 오미자의 지표성분 분석 및 표준화가 용이하여 장수 오미자 분말의 건강기능식품원료 인정에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 HPLC를 이용하여 건강기능식품 기능성 원료로서 오미자의 지표성분인 schizandrin의 분석법을 확립하고 이에 대한 분석법 검증을 실시하고자 하였다. 그 결과 본 시험법에서 표준용액의 피크유지시간과 오미자추출액의 피크유지시간이 일치하여 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9990 이상으로 높은 유의수준을 보여 분석에 적합함을 알 수 있었으며, 검출한계는 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정되었다. 일내, 일내분석에서 정밀도를 나타내는 변동계수(CV, coefficient variation)는 표준용액에서 각각 0.06~0.66%, 0.13~1.19%로 나타내었고 정확성(accuracy)은 각각 98.35~103.30%, 98.35~103.00%로 나타내어 오미자의 지표성분인 schizandrin의 분석법이 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 분석법에 따라 장수오미자분말에서 schizandrin을 분석한 결과 대한약전의 분석법보다 빠르게 다른 물질의 간섭 없이 분석 가능하여 건강기능식품

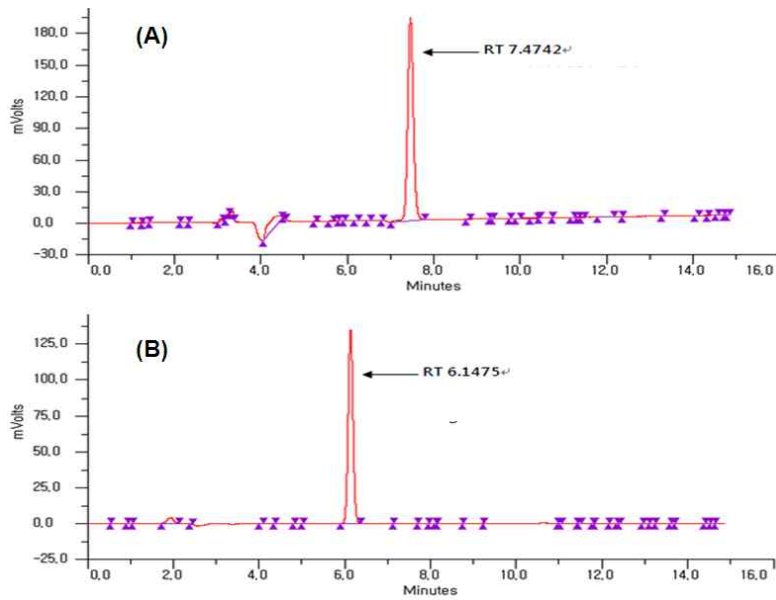


Fig. 4. Comparison of schizandrin analysis method between the Korean Pharmacopoeia and this study for standard solution (10 µg/mL).

의 기능성원료 표준화에 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

문헌

1. Lee CB, Kim YS, Kim JS, Lee JS. 1989. *Taxonomy of the Plants*. Hyangmunsa, Seoul, Korea. p 209.
2. Lee CB. 1989. *Illustrated guide to Korean flora*. Hyangmunsa, Seoul, Korea. p 375.
3. Nomura M, Nakachiyama M, Hida T, Ohtaki Y, Sudo K, Aizawa T, Aburada M, Miyamoto KI. 1994. Gomisin A, a lignan component of *Schizandra* fruits, inhibits development of preneoplastic lesions in rat liver by 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene. *Cancer Lett* 76: 11-18.
4. Ohtaki Y, Hida T, Hiramatsu K, Kanitani M, Ohshima T, Nomura M, Wakita H, Aburada M, Miyamoto KI. 1996. Deoxycholic acid as an endogenous risk factor for hepatocarcinogenesis and effects of gomisin A, a lignan component of *Schizandra* fruits. *Anticancer Res* 16: 751-755.
5. Nishiyama N, Chu PJ, Saito H. 1996. An herbal prescription, S-113m, consisting of biota, ginseng and schizandra, improves learning performance in senescence accelerated mouse. *Biol Pharm Bull* 19: 388-393.
6. Li XJ, Zhao BL, Liu GT, Xin WJ. 1990. Scavenging effects on active oxygen radicals by schizandrin with different structures and configurations. *Free Radic Biol Med* 9: 99-104.
7. Sung KC. 2011. A study on the pharmaceutical & chemical characteristics and analysis of natural omija extract. *J Korean Oil Chemists' Soc* 28: 290-298.
8. Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ, Lee BG, An BJ, Kim JH, Kwon OJ. 2007. Biological activity of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 198-203.
9. Kim KS, Kang SS, Ryu SN. 2002. Quantitative analysis of lignans from fruits of *Schizandra chinensis*. *Kor J Pharmacogn* 33: 272-276.
10. Tang W, Eisenbrand G. 1992. *Traditional and Modern medicine*. SpringerVerlag, Berlin, Germany. p 903-917.
11. Kim OC, Jang HJ. 1994. Volatile components of *Schizandra chinensis* Baillon. *Agric Chem Biotechnol* 39: 30-36.
12. Moon KS. 1984. Components and advantages of the medical herb. In *Science encyclopedia*. Ilwolsokak, Seoul, Korea. p 205-208.
13. Zhang MH, Chen H, Li LZ, Song YF, Xu YF. 2002. Deoxy-schizandrin and schizandrin protect liver against carbon tetrachloride induced damage. *Med J Chin People's Armed Police Force* 13: 395-396.
14. Li HT, Gang HU. 2004. Study on the protective effects of Schizandrin on 6-OHDA-induced apoptosis of cultured PC12 cells. *J Nanjing University TCM* 20: 96-98.
15. KFDA. 2008. *Guideline for standard of health functional food*. Korea Food & Drug Administration, Korea. p 1-3.
16. Koo DC, Suh WS, Baek SY, Shim SH. 2011. Quantitative determination of lignans from *Schizandra chinensis* by HPLC. *Kor J Pharmacogn* 42: 233-239.
17. KFDA. 2008. *Guideline of standard of functional ingredient for health functional food development*. Korea Food & Drug Administration, Korea. p 53-59.
18. KFDA. 2012. *The Korean Pharmacopoeia*. Korea Food & Drug Administration, Korea. p 76-77.

(2012년 8월 6일 접수; 2013년 1월 31일 채택)