

Simultaneous HPLC Determination of Marker Compounds for the Standardization of *Hedyotis diffusa*

Han-Yeol Bang¹, Eun-Ju Yang², Jeong-Ah Kim² and Kyung-Sik Song^{2*}

¹Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received July 25 10, 2013 / Revised August 2 9, 2013 / Accepted August 2, 2013

From a 95% ethanolic extract of *H. diffusa*, four marker compounds (HD1~HD4) were isolated, which were relatively unique and exist in comparably high contents. The structures of marker compounds were identified as digitolutein (1), 2-hydroxy-3-methylanthraquinone (2), (*E/Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester (4:1 mixture) (3), and (*E/Z*)-6-*O*-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester (4:1 mixture) (4), respectively, on the basis of ¹³C and ¹H-NMR analyses. The calibration curves of marker compounds showed high linearity, as their correlation coefficient (R^2) were in the range of 0.9991~0.9999. In addition, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.03~0.07 µg/ml and 0.099~0.231 µg/ml, respectively. The intra-day/inter-day precision and accuracy were 0.23~2.00%/0.25~1.16% and 94.60~108.44%/94.73~110.23%, respectively. The optimal HPLC conditions for the simultaneous quantification of HD1~HD4 were as follows: stationary phase; Merck Chromolith RP-18e (100×4.6 mm, 5 µm), column temp.; room temperature, UV detection at 280 nm, flow rate; 2.0 ml/min, injection volume; 10 µl, mobile phase; start with the mixture of 80% solvent A (H₂O containing 0.5% acetic acid) and 20% solvent B (methanol containing 0.5% acetic acid) and gradually decrease solvent A to 40% in 9 min., then retain this condition to 18 min. Under the HPLC condition, the four marker compounds 1~4 were successfully separated without any interference of other constituents. The results obtained in this study are expected to be helpful for the development of nutraceuticals and natural medicines and for the quality control of this plant.

Key words : Anthraquinone, *Hedyotis diffusa*, HPLC quantification, iridoid, simultaneous analysis

서 론

백운풀(*Hedyotis diffusa* Willd.)은 쌍떡잎식물 꼭두서니목 꼭두서니과의 한해살이 풀이며 백화사설초라고도 한다. 중국, 일본, 대만 등에 분포하고 있으며 국내에서는 제주도 한라산, 전남 백운산 습지 등에 서식하고 있다. 예로부터 민간에서는 유사한 외형을 지닌 중국산 산방화이초(*H. corymbosa*)를 항암제로 수입하여 사용해왔다. 그로 인해 우리나라 토종 백운풀은 멸종위기에 처하게 되었으며, 국내 학계에서 초차 토종 백운풀에 대한 연구는 소외되고 있는 형편이다. 더구나 국내에서 백운풀로 재배되는 것은 산방화이초로 백운풀과의 명확한 구분 없이 혼용하여 연구재료로 사용하고 있다. 토종 백운풀은 엽액에서 짧은 꽃대에 흰 꽃이 1개 또는 2개가 대생으로 피는 특징이 있는 반면, 산방화이초는 엽액에서 긴 꽃대에 취

산화서로 피는 모양을 볼 수 있다. 잎의 모양도, 백운풀은 더 가늘고 뾰족하나 산방화이초는 상대적으로 두껍고 둔탁한 편이다. 또한 백운풀은 마우스 경구 급성독성시험 결과 투여 후 60일 동안 생존율에 변화를 주지 않았으며, 체중 및 간에 대한 영향으로 간 기능 검사 지표인 aspartate aminotransferase (ALT), alanine aminotransferase (AST)와 지방질 역시 안전한 것으로 평가되었다[2].

백운풀은 항암, 면역, 항염, 항산화, 간보호, 신경보호 등의 다양한 효과를 지닌 것으로 알려져, 중국과 한국에서는 민간 요법으로서 암 치료를 위해 사용되고 있을 뿐 아니라[4, 13], 그 효과가 과학적으로 입증되어 다수의 논문 및 특허가 보고되었다[7, 10].

한편, 최근 생활수준 향상 및 의료기술 발달에 따른 평균수명 연장에 의해 심장질환, 암, 당뇨 등 만성 또는 난치성 질환의 발병률이 증가하고 있다. 따라서 각종 질환에 대한 예방적 개념이 도입되어 전통약물은 치료보다는 발병 이전에서의 역할이 증대되었고, 한방 의약시장의 규모 또한 커지고 있는 실정이다[1]. 이러한 전통약물의 수요가 증가됨에 따라 이들의 정확한 효능 및 안전성에 대한 평가 역시 중요한 항목으로 요구되기 시작하였으며, 그 요구를 충족하기 위하여 약효성분이나 특이성분을 지표로 하는 품질평가법이 개발되고 있는 추세이다. 중국은 이러한 추세에 발맞추어 의약산업 10차 5개

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-8565, Fax : +82-53-950-8557

E-mail : kssong@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

년 계획(2001~2005)에 따라 전국적인 규모로 중국 한약재의 지표성분과 함량 등을 규격화하여 품질 표준을 정하였고 공정서에 수재된 생약 551 품목 중 약 200 품목에 대하여 지표성분의 정량분석을 위한 품질평가법을 수립하였다[9]. 반면 우리나라는 공정서에 수재된 생약은 520 품목이지만 지표성분의 품질평가법이 확립된 품목은 약 50 품목에 불과하다. 이에 따라 2005년부터 식품의약품안전청 주관으로 한약재과학화 사업을 추진하여 한약재로부터 지표성분 분리, 활성 탐색 및 분석법 개발을 통한 한약재 표준화 연구가 진행 중이지만 한약재의 품목이 한정적이어서 대상 한약재 외의 여타 천연물 소재에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다[8].

따라서, 건강기능식품 및 천연물신약 소재로서 우수함이 입증된 백운풀로부터 이 식물이 대표적으로 함유하고 있는 iridoid와 anthaquinone을 분리, 정제하고 그 구조를 동정하였으며, 아울러 산업화를 위한 기초 자료를 제공하기 위하여 이들에 대한 최적 동시분석조건을 개발하여 정량법 및 유효성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

건조된 백운풀(*H. diffusa*, 10.8 kg)은 부산광역시에 소재하는 대도농산에서 재배한 것을 제공받아 사용하였으며, 표본은 본 연구실에 보관하였다(voucher specimen no. KNUNPC-HD-1). Column chromatography용 resin은 Merck 사(Germany)의 Kieselgel 60 (Art.7734와 Art.9385)을 사용하였고, TLC plate 또한 Merck사의 precoated Kieselgel 60F254 (Art.5715) 및 RP-18 (Art.1.15685) 등을 사용하였다. 분석용 HPLC column은 Merck 사의 Merck Chromolith RP-18e (4.6×100 mm), Agilent사 (CA, USA)의 Agilent EclipseXDB-C18 (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였다.

HPLC는 Waters Breeze HPLC system을 사용하였으며, MPLC는 Yamazen MPLC system (GR-200)을 이용하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR spectra는 Bruker Avance Digital 400 spectrometer (Karlsruhe, Germany)로 400과 100 MHz에서 각각 측정하였다. Chemical shift는 TMS를 표준물질로 하여 δ (ppm)로 나타내었다.

추출 및 정제

건조된 백운풀 지상부(10.8 kg)를 약 10 l의 95% EtOH (ethanol)로 80°C에서 5 시간 동안 2 회 반복 환류추출 하였다. EtOH 추출액을 여과지로 여과 후 감압 농축하여 1,326.3 g의 백운풀 EtOH 추출물을 얻을 수 있었으며, CH₂Cl₂ (dichloromethane), EtOAc (ethyl acetate) 및 *n*-BuOH (butanol)를 이용하여 순차적으로 분획하였다. CH₂Cl₂ 층은 포화 NaCl 용액으로 back washing한 후, 무수 Na₂SO₄로 탈수하고 감압 농축하

여 CH₂Cl₂ 가용성 분획 343.1 g을 얻을 수 있었다. 또한 EtOAc 층과 *n*-BuOH 층에 대해서도 탈수 및 감압 농축을 실시하여 EtOAc 및 *n*-BuOH 가용성 분획 84.96 g과 208.6 g을 각각 얻었다.

CH₂Cl₂ 가용성 분획(343.1 g) 중 9.26 g을 이용하여 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과, Fr. C1~C5의 5개의 분획을 얻을 수 있었으며, Fr. C3 (1.21g)를 silica gel 컬럼 크로마토그래피(3×45 cm, *n*-Hexane-CH₂Cl₂=5:1 to 1:1)하여 Fr. C3-1~C3-4의 4개 분획으로 나누었다. 이 중 Fr. C3-2로부터 주황색 단일화합물 HD1 4.3 mg을 얻었다.

또한 Fr. C3-4 (1.04 g)에 대한 silica gel 컬럼 크로마토그래피(3×57 cm, *n*-hexane-CHCl₃=1:1 to 100% CHCl₃ → CHCl₃-MeOH (methanol)=100:1 to 50:1 → 100% MeOH)를 실시하여 4개의 분획으로 나누고, 그 중 Fr. C3-4-2로부터 주황색 분말 HD2 60.0 mg을 얻었다.

한편, EtOAc가용성 분획(84.96 g)을 대상으로 silica gel 컬럼 크로마토그래피(11×53 cm, *n*-hexane-CHCl₃=1:1 to 100% CHCl₃ → CHCl₃:MeOH=100:1 to 3:1 → 100% MeOH)를 실시한 결과, Fr. E1 ~ E6의 6개 분획을 얻었으며 이들 중 Fr. E5를 다시 silica gel 크로마토그래피(8×42 cm, CHCl₃-MeOH=10:1 to 7:1)하여 2.4 g의 HD 3를 분리할 수 있었다.

HD4는 Fr. E4 (7.24 g)를 silica gel 컬럼 크로마토그래피(9×38 cm, CHCl₃-MeOH=8:1 to 5:1 → 100% MeOH)하여 Fr. E4-1~E4-4의 4개 분획으로 나누고, 이 중 Fr. E4-2를 MPLC (Yamazen ODS-S-50B, 2630 mm, 30~100% MeOH, 5 ml/min)로 재정제하여 얻었다(884.9 mg).

NMR 분석

HD1 (digitolutein). ¹H-NMR (400 MHz, chloroform-*d*) δ: 8.24~8.26 (2H, m, H-5 and H-8), 7.99 (1H, s, H-4), 7.75~7.77 (2H, m, H-6 and H-7), 6.75 (1H, s, OH), 4.03 (3H, s, OCH₃), 2.41 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, chloroform-*d*) δ: 182.55 (C-9), 182.44 (C-10), 153.76 (C-3), 146.02 (C-4), 134.49 (C-10a), 133.77 (C-6), 133.67 (C-7), 132.98 (C-8a), 131.33 (C-2), 126.98 (C-5), 126.78 (C-8), 126.68 (C-1), 126.50 (C-9a), 123.52 (C-4a), 62.16 (OCH₃), 16.34 (CH₃).

HD2 (2-hydroxy-3-methylanthraquinone). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*) δ: 11.08 (1H, s, OH), 8.14~8.18 (2H, m, H-5 and H-8), 7.97 (1H, s, H-4), 7.86~7.92 (2H, m, H-6 and H-7), 7.55 (1H, s, H-1), 2.29 (3H, s, CH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*) δ: 182.95 (C-10), 181.77 (C-9), 161.74 (C-3), 134.79 (C-7), 134.34 (C-6), 133.55 (C-8a), 133.53 (C-10a), 133.43 (C-4a), 132.34 (C-2), 126.92 (C-5), 126.89 (C-8), 125.36 (C-9a), 111.58 (C-4), 16.57 (CH₃).

HD3 [(*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, as a major form]. ¹H-NMR (400 MHz, methanol-*d*) δ: 7.51 (1H, s, H-3), 7.62 (1H, d, *f*=16.0 Hz, H-7'), 7.46 (2H, d, *f*=8.4 Hz,

H-2' and H-6'), 6.80 (2H, d, $f=8.4$ Hz, H-3' and H-5'), 6.33 (1H, d, $f=16.0$ Hz, H-8'), 5.85 (1H, m, H-7), 5.67 (1H, m, H-6), 5.30 (1H, d, $f=6.0$ Hz, H-1), 4.69 (1H, d, $f=8.0$ Hz, Glc-1), 4.39 (1H, d, $f=16.0$ Hz, H-10), 4.22 (1H, d, $f=16.0$ Hz, H-10), 3.88 (1H, d, $f=12.0$ Hz, Glc-6), 3.65 (3H, s, H-12), 3.20-3.42 (4H, m, Glc-2, Glc-3, Glc-4, and Glc-5), 3.20 (1H, d, $f=9.0$ Hz, H-5), 3.11 (1H, m, H-9). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, methanol- d_6) δ : 168.91 (C-11), 168.62 (C-9'), 161.02 (C-4'), 153.93 (C-3), 150.15 (C-8), 146.43 (C-7'), 131.04 (C-2' and C-6'), 127.19 (C-7, exchangeable), 127.15 (C-1', exchangeable), 116.72 (C-3' and C-5'), 115.33 (C-8'), 109.83 (C-4), 100.22 (Glc-1), 97.85 (C-1), 83.55 (C-6), 78.31 (Glc-3), 77.83 (Glc-5), 74.74 (Glc-2), 71.44 (Glc-4), 62.66 (Glc-6), 60.92 (C-10), 52.11 (C-12), 46.96 (C-9), 42.33 (C-5).

HD4 [(E)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester, as a major form]. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4) δ : 7.66 (1H, d, $f=15.2$ Hz, H-7'), 7.56 (2H, d, $f=8.0$ Hz, H-2' and H-6'), 7.52 (1H, br s, H-3), 6.96 (1H, d, $f=8.1$ Hz, H-3' and H-5'), 6.39 (1H, d, $f=15.2$ Hz, H-8'), 5.85 (1H, t, $f=1.2$ Hz, H-7), 5.69 (1H, m, H-6), 5.32 (1H, d, $f=6.3$ Hz, H-1), 4.70 (1H, d, $f=8.1$ Hz, H-10'), 4.39 (1H, d, $f=16.2$ Hz, H-10), 4.22 (1H, d, $f=16.2$ Hz, H-10), 3.89 (1H, dd, $f=11.7$ and 1.8 Hz, Glc-6), 3.83 (3H, s, -OMe), 3.65 (4H, m, H-12, Glc-6), 3.39 (1H, t, $f=9.0$ Hz, H-5), 3.36 (1H, dd, $f=7.2$ and 5.4 Hz, Glc-5), 3.32~3.27 (2H, m, Glc-3 and Glc-4), 3.22 (1H, dd, $f=9.0$ and 8.2 Hz, Glc-2), 3.09 (1H, t, $f=7.2$ Hz, H-9). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, methanol- d_4) δ : 169.20 (C-11), 168.76 (C-9'), 163.23 (C-4'), 154.34 (C-3), 150.44 (C-8), 146.37 (C-7'), 131.25 (C-2' and C-6'), 128.44 (C-10), 127.45 (C-7), 116.57 (C-8'), 115.65 (C-3' and C-5'), 110.07 (C-4), 100.50 (Glc-1), 98.35 (C-1), 83.85 (C-6), 78.44 (Glc-3), 77.94 (Glc-5), 74.90 (Glc-2), 71.57 (Glc-4), 62.78 (Glc-6), 61.21 (C-10), 56.17 (C4'-OMe), 52.38 (C-12), 46.97 (C-9), 42.51 (C-5).

HPLC 분석

고정상으로는 Merck사의 Chromolieth RP-19e (4.6×100 mm, 5 μm)를 사용하였으며, 실온에서 유속은 2.0 ml/min, 10 μl 를 injection volume으로 설정하였다. 이동상으로는 0.5% acetic acid가 포함된 H_2O (A)와 MeOH (B)을 사용하여 최초 80 (A):20 (B) (v/v)로 시작하여 9분 후 40 (A):60 (B)으로 gradient를 준 후, 18분까지 유지시키고, 20분에 다시 80 (A):20 (B)가 되도록 조건을 설정하였다. 분리된 화합물을 동시에 검출할 수 있는 적정파장으로 280 nm를 선택하였다.

분리된 화합물의 순도 측정

분리된 표준품의 순도 측정을 위한 HPLC 조건은 다음과

같다. 즉, 고정상으로는 Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6×250 mm, 5 μm), 검출은 UV 280 nm, 유속은 0.9 ml/min, 컬럼 온도는 25°C, 이동상으로는 0.5% acetic acid가 포함된 H_2O (A)와 MeOH (B)을 사용하여 최초 (A) 95%로 시작하여 50분 후 50%가 되도록 gradient를 준 후, 5분간 유지하는 조건을 설정하였다.

검량선 작성 및 validation

설정된 HPLC 조건을 이용하여 검량선 작성 및 지표성분의 validation을 실시하였다. 각각의 지표성분을 MeOH에 용해하여 1 mg/ml로 조제하고 이를 stock solution으로 하였다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 총 6개의 구간을 설정하였으며 0.45 μm membrane filter로 여과하여 여액을 HPLC에 주입하고, 검출된 peak area와 농도와의 상관관계를 이용하여 검량선을 작성하였다. 분석기기의 LOD (limit of detection)는 signal대 noise의 비를 3으로 설정하였으며, LOQ (limit of quantification)는 LOD×3.3일 때의 농도로 구하였다. 또한 일내 정밀성과 반복성을 검토하기 위하여 하루 3반복 측정하였으며, 일간 정밀성과 반복성은 3일 동안 반복 측정하여 값을 도출하였다.

결과 및 고찰

지표성분의 분리 및 구조동정

백운풀의 지표성분 설정을 위하여 백운풀을 EtOH로 추출한 다음, 추출물에 대해 각종 크로마토그래피를 실시한 결과, HD1~HD4의 네 가지 화합물을 얻을 수 있었다. 화합물 HD1은 주황색 분말로 얻어졌으며, $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과, δ 4.03에서 methoxyl group에 의한 singlet이 관측되었으며, δ 2.41에서 methyl singlet이 검출되었다. 또한 δ 6.75에서 hydroxyl proton resonance를 관찰할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 δ 182.55와 δ 182.44에서 ketone 유래의 signal이 관측되었으며, δ 62.16와 δ 16.34에서 나타난 peak는 각각 methoxyl group과 methyl group 유래인 것으로 판단되었다. 이상의 결과를 볼 때, 이 화합물은 anthraquinone의 일종일 것으로 예측되었으며 NMR data를 문헌치와 비교하여 digitolutein (2-hydroxy-1-methoxy-3-methylanthraquinone)으로 구조 동정할 수 있었다[18]. 이 화합물은 앞서 기술한 조건에서 HPLC로 분석하였을 때 95.2%의 순도를 나타내었다.

HD2는 주황색 분말로 얻어졌으며 육안적 성상 및 TLC에서의 거동이 HD1과 매우 유사하였을 뿐 아니라, NMR spectrum 역시 매우 비슷한 양상을 나타내었다. 즉, $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과 δ 2.29에서 methyl group에 의한 single이 관측되었으며 δ 11.08에서는 수소결합한 hydroxyl proton resonance가 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 분석 결과, 2개의 ketone (δ 182.95, 181.77) 및 한 개의 methyl proton (δ 16.57)이 관측되어 HD1과 같은

anthraquinone의 일종으로 판단되었다. 한편, HD1과는 달리 HD2에서는 methoxyl proton이 발견되지 않아 HD2는 2-hydroxy-3-methylantraquinone으로 예측되었으며 이 구조는 NMR 분석치를 문헌치와 대조하여 확정하였다[16]. 분리된 HD2는 앞서 기술한 HPLC 분석 조건으로 분석 시 93.5%의 순도를 나타내는 것으로 확인되었다.

HD3는 10% 황산을 이용한 정성반응에서 진한 청색으로 발색되었다. 순도확인을 위한 HPLC 분석에서 2개의 peak가 관측되었으며, 그 면적 비율은 약 4:1이었다. ¹H-NMR spectrum에서 major peak로 나타나는 δ 7.62/6.33 (*J*=16.0 Hz)과 minor signal로 나타나는 δ 6.86/5.78 (*J*=12.0 Hz)이 흔해져 있는 양상으로 미루어, HD3는 C-7'과 C-8'이 *trans* 및 *cis*의 두 가지 configuration으로 존재하는 혼합물일 것으로 예상되었다. 그 이외에 iridoid 계열 화합물에 특징적인 δ 7.51 (H-3), 5.85 (H-7) 등의 signal 들이 관측되었으며, δ 7.46 (2H) 및 6.80 (2H)에서 나타나는 전형적인 1,4-disubstituted benzene ring의 signal, δ 3.65의 methoxyl proton들로 미루어 이 화합물은 (*E*)- 및 (*Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester가 약 4:1로 혼합된 화합물인 것으로 판단되었으며 문헌치와의 비교에 의해 확인하였다[3]. 일반적으로 (*E*)- 및 (*Z*)-configuration은 열 및 빛 등의 에너지가 가해지면 쉽게 상호 전환될 수 있는 것으로 알려져 있으며, 실제로 분리된 HD3를 약 24 시간 동안 UV254 nm에 방치할 경우 약 10.8% 증가하였다(데이터 미제시). 따라서 HD3는 단일 이성질체를 분리하는 과정 중에서, 또는 분리하였다 하더라도 분석 과정 중에서 상호전환이 일어나게 되므로, 혼합물의 상태로 정량하도록 하였다. 두 이성질체의 합으로서 HD3의 순도는 99% 이상이었다.

HD4 역시 HD3과 같이 10% 황산에 진한 청색으로 발색되었으며, 순도확인을 위한 HPLC 분석에서 HD3과 동일하게 2개의 peak가 4:1로 나타났다. 다만, ¹H-NMR 분석 결과, HD4에서는 HD3에 비해 한 개 많은 methoxyl group이 δ 3.83 (3H, s)에서 발견되어 HD3 구조 중 *p*-coumaroyl moiety의 hydroxyl group이 methoxyl group으로 치환된 (*E*)-6-*O*-methox-

ycinnamoyl scandoside methyl ester일 것으로 예상하였다. 이 구조는 기존의 문헌치와 NMR data를 비교하여 확정하였다[14]. 두 이성질체의 합으로서 HD4의 순도는 사용한 HPLC 조건에서 99% 이상이었다. 분리한 표준품의 구조는 Fig. 1에 제시하였다.

검량선 작성 및 validation

한편, HD1~4 이외에도 ursolic acid, daphylloside, geniposide 등의 화합물이 본 실험을 통해 분리되었으나 식물에 널리 분포되어 있는 성분이거나 또는 미량 존재하는 성분으로서 지표성분은 첫째, 성분을 대표할 수 있을 정도로 함유량이 높을 것, 둘째, 분리하기 쉬운 것, 셋째, 가능한 그 식물에 특이적인 화합물일 것, 넷째, 분석방법이 간단할 것 등, 지표성분으로서의 조건을 충족하기 어려워 지표성분으로서 HD1~4을 설정하게 되었다.

HD1~4의 검량선을 작성한 결과 상관계수(R²)는 각각 0.9991, 0.9999, 0.9993, 0.9998로 높은 직선성을 보였으며, LOD (limit of detection)는 각각 0.05, 0.06, 0.03, 0.07 µg/ml로, LOQ (limit of quantification)는 0.165, 0.198, 0.99, 0.231 µg/ml 수준이었다(Table 1). 또한 면적 비에 대한 재현성 RSD (Relative Standard Deviation, %)는 각각 0.16, 0.90, 1.18, 0.58%의 값을 보였으며(Table 2) 일내 CV (Coefficient of Validation, %)는 각각 0.23, 2.00, 1.18, 0.26%를, 일내 정확도는 102.80, 96.08, 108.44, 94.60%로 나타났다(Table 3). 한편, 일간 CV (%)는 각각 0.25, 1.16, 0.98, 0.30%를, 일간 정확도는 102.82, 98.58, 110.23, 94.73%이었다(Table 4).

최적 HPLC 분석 조건 확립

백운풀 추출물의 지표성분으로 설정한 화합물의 정량을 위해 최적 HPLC 조건을 검토한 결과, column은 Merck Chromolith RP-18e (100×4.6 mm, 5 µm), 실온, 유속 2.0 ml/min, injection volume 10 µl, 이동상으로는 0.5% acetic acid가 포함된 H₂O (A)와 methanol (B)을 사용하여 최초 80% (A)로 시작

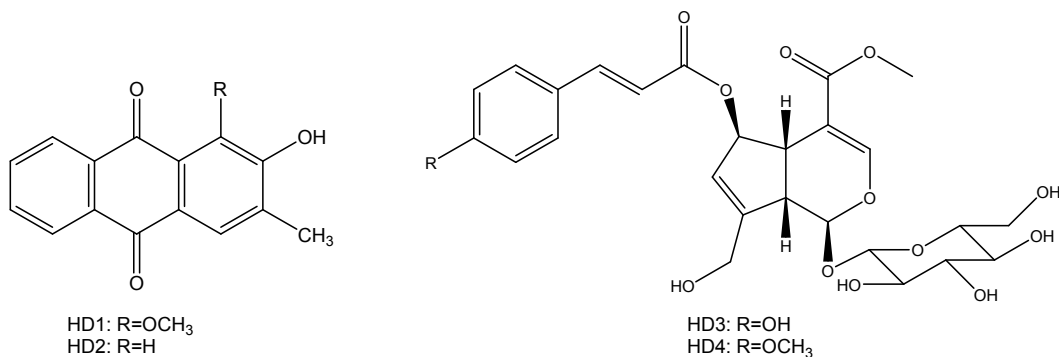


Fig. 1. The structures of marker compounds 1-4 isolated from *H. diffusa*. HD1: digitoluein, HD2: 2-hydroxy-3-methylantraquinone, HD3: (*E/Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, HD4: (*E/Z*)-6-*O*-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methylester.

Table 1. Range, linearity, LOD, and LOQ

Compound	Linear range (μg)	Slope	Intercept	Correlation coefficient	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
HD1	0.1-0.5	1407361	41508	0.9991	0.05	0.165
HD2	0.1-0.5	1482718	-27516	0.9999	0.06	0.198
HD3	0.1-0.5	559421	-43370	0.9993	0.03	0.099
HD4	0.1-0.5	516425	19517	0.9998	0.07	0.231

Table 2. Reproducibility of peak area

Compound	Spiked Conc. (μg)	Peak area		
		Average	SD	RSD (%)
HD1	0.25	0.2597	0.0004	0.16
HD2	0.25	0.2506	0.0002	0.90
HD3	0.25	0.2711	0.0032	1.18
HD4	0.25	0.2378	0.0014	0.58

Table 3. Intra-day accuracy and precision

Compound	Spiked Conc. (μg)	Peak area			
		Observed Conc. (μg)	SD	CV (%)	Accuracy (%)
HD1	0.25	0.2597	0.0004	0.16	102.80
HD2	0.25	0.2506	0.0002	0.90	90.08
HD3	0.25	0.2711	0.0032	1.18	108.44
HD4	0.25	0.2378	0.0014	0.58	94.60

Table 4. Inter-day accuracy and precision

Compound	Spiked Conc. (μg)	Peak area				
		Observed Conc. (μg)	SD	Bias	CV (%)	Accuracy (%)
HD1	0.25	0.2571	0.0007	-0.0071	0.25	102.82
HD2	0.25	0.2464	0.0029	0.0036	1.16	98.58
HD3	0.25	0.2756	0.0027	-0.0256	0.98	110.23
HD4	0.25	0.2368	0.0007	0.0132	0.30	94.73

하여 9 분 후 40% (A)가 되도록 gradient를 준 다음 18분까지 유지하는 조건을 설정하였다. PDA (photodiode array detector)를 이용하여 전체의 과장을 분석한 후, 적정과장을 280 nm로 설정하였으며, 이 방법으로 백운풀 ethanol 추출물을 분석할 경우 다른 성분의 방해 없이 20 분 이내에 모든 지표성분을 분석할 수 있었다(Fig. 2).

백운풀 중 함유되어 있는 성분의 정량법과 관련한 논문으로는 비색정량법에 의해 total flavonoid를 정량하거나[15], p-coumaric acid, oleanolic acid 등과 같이 백운풀에 특징적이라기 보다는 대부분의 식물에 공통적으로 들어 있는 일반 성분을 대상으로 하는 정량법 개발이 대부분이며[12, 17], 백운풀에 특이적으로 다량, 다수 함유되어 있는 것으로 알려져 있는 iridoid와 anthraquinone에 대한 보고는 드물다. Iridoid 계통의 화합물인 scandoside 유도체 단일 성분에 대한 정량법이 보고

되었으며[3, 6], 2 종의 anthraquinone을 동시분석한 것 등이 보고되어 있다[5]. 한편, 다성분의 동시분석법으로는 caffeic acid, quercetin, campherenol의 3 종 화합물을 HPLC로 정량한 보문이 보고되었을 뿐이며[11] 백운풀의 특성을 잘 나타낼 수 있는 iridoid와 anthraquinone에 대한 동시분석법 개발은 이루어지고 있지 않다.

본 연구에서 확립한 방법은 기존에 백운풀 중의 anthraquinone만을 동시 분석하는 방법[5] 및 2 종의 iridoid를 분석하는 기존의 방법[3]에 비하여 서로 다른 두 가지 골격을 갖는 4 종의 화합물을 동시에 분석함에도 불구하고 분석에 소요되는 시간이 20 분 이상 단축되어 매우 효율성이 높다고 판단된다. 본 연구결과는 백운풀을 소재로 하는 건강기능식품이나 천연물신약 개발 및 제품화, 그리고 이들의 산업화 시 품질관리에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

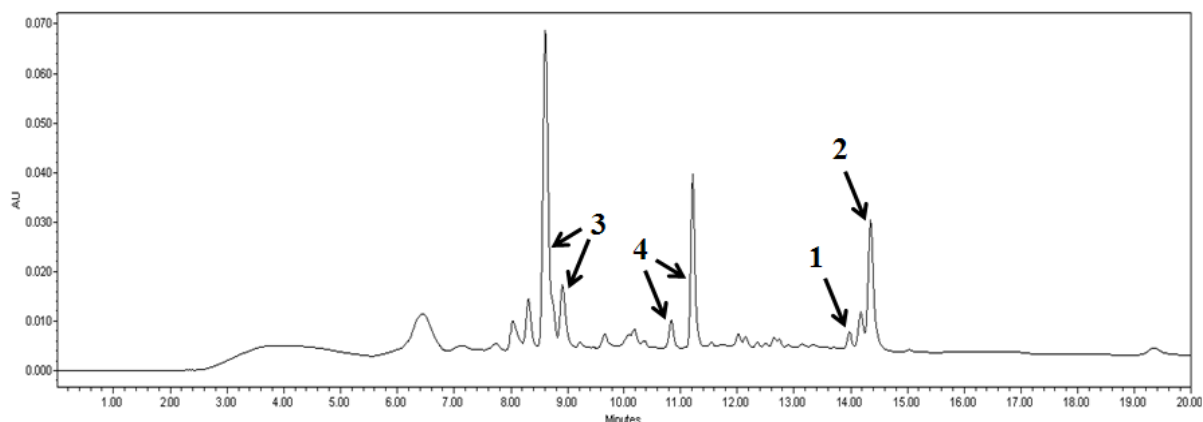


Fig. 2. Typical HPLC profile of *H. diffusa*. Column: Merck Chromolith RP-18e (100×4.6 mm, 5 μm), Temperature: room temperature, Flow rate: 2.0 ml/min, Injection volume: 10 μl Mobile phase: A) H₂O + 0.5% acetic acid, B) methanol + 0.5% acetic acid, Detection: 280 nm, Run time: 20 min.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부가 지원하고, 농림기술기획평가원이 관리하는 고부가가치 식품기술개발사업(No. 1100-16-3)의 지원에 의해 수행되었음을 감사하게 생각합니다.

References

- Byun, M. S., Seo, B. N. and Kim, K. W. 2008. Analysis of flower teas for their oriental medicinal efficacy through literature. *Flower Res J* **26**, 449-453.
- Kim, S. C., Lee, S. S. and Li, J. I. 2001. Pharmacologic evaluation of some anti-cancer plants in China and its clinical use of traditional Chinese medicine. *Plant Res* **14**, 85-91.
- Liang, Z. T., Jiang, Z. H., Leung K. S. Y. and Zhao, Z. Z. 2006. Determination of iridoid glucosides for quality assessment of Herba Oldenlandiae by high-performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull* **54**, 1131-1137.
- Lin, J., Wei, L., Xu, W., Hong, Z., Liu, X. and Peng, J. 2011. Effect of *Hedyotis Diffusa* Willd extract on tumor angiogenesis. *Mol Med Rep* **4**, 1283-1288.
- Li, J., Yu, L., Ma, L., Li, Y. and Guo, X. 2008. Simultaneous HPLC determination of two anthraquinones in *Hedyotis diffusa* Willd. of different sources. *Yaowu Fenxi Zazhi* **28**, 1478-1480.
- Liu, K., Guo, Y., Zhu, D., Ma, L. and Guo, X. 2006. HPLC quantitative analysis of *E*-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester in *Hedyotis diffusa* Willd. *Yaowu Fenxi Zazhi* **26**, 1385-1387.
- Liu, X. 2013. A chinese medicinal composition for treating liver cancer. *Faming Zhuanli Shengqing* CN 103191267 A 20130710.
- Oh, M. H., Jo, U., Jang, S. Y., Park, J. Y., Lee, J. P., Sung, L. S., Gang, I. H., Kim, J. H., Kim, J. H., Kim, H. U., Yuk, C. S. and Park, J. H. 2004. Project for Establishment and Renewal of Herbal Drug Regulations (III). *Korea Food and Drug Administration* **8**, 165-175.
- Park, H. J. 2009. Simultaneous HPLC quantification of (*E*)-harpagoside, *p*-methoxycinnamic acid, and *p*-methoxycinnamic acid methyl ester in *Scrophulariae Radix*. *Kyungpook Natl Univ MS thesis*, 1-2.
- Quan, X. Q. 2011. Action of *Hedyotis diffusa* and its effective components for the treatment of cancer. *Zhongyi Xuebao* **26**, 1155-1157.
- Shao, Z., Jia, X., Shi, F., Wang, J. and Chen, Y. 2009. Simultaneous determination of caffeic acid, quercetin and campher-enol from *Hedyotis diffusa* Willd by HPLC. *Zhongchengyao* **31**, 1894-1897.
- Tang, X. L., Liu, J., Li, G. Q., Qiu, P. J. and Zhong, H. M. 2008. A rapid method for the quantitative determination of *p*-coumaric acid in *Hedyotis diffusa* from different sources. *Zhongguo Xian dai Yingyong Yaoxue* **25**, 408-410.
- Xu, B. J. and Sung, C. K. 2005. Chemical constituents and pharmacological activities of *Hedyotis diffusa*. *Nat Prod Sci* **11**, 1-9.
- Xu, G. H., Kim, Y. H., Chi, S. W., Choo, S. J., Ryoo, I. J., Ahn, J. S. and Yoo, I. D. 2010. Evaluation of human neutrophil elastase inhibitory effect of iridoid glycosides from *Hedyotis diffusa*. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 513-515.
- Yang, Y., Xu, J., Liu, Y. H. and Xiong, J. 2011. Study on quantitative determination of total flavonoids in *Hedyotis diffusa* Willd by colorimetry. *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan* **29**, 313-316.
- Zhang, F. X., Brian W. and Hadfield, J. A. 1996. Preparation of naturally occurring anthraquinones. *Synthetic Comm* **26**, 49-62.
- Zhang, Y., Tan, X., Cui, X., Jiang, G. and Zhu, Y. 2010. Quantitative determination of ursolic acid and oleanolic acid in Baihuasheshecao (Herba Hedyotis diffusae) produced from different places by HPLC. *Beijing Zhongyiyao Daxue Xuebao* **33**, 274-276.
- Zhou, Y. J., Wu, K. S., Zeng, G. Y., Tan, J. B., Xu, K. P., Li, F. S. and Tan, G. S. 2007. Studies on constituents of *Oldenlandia diffusa*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **32**, 590-593.

초록 : 백운풀의 지표성분 설정 및 품질표준화를 위한 정량 분석법

방한열¹ · 양은주² · 김정아² · 송경식^{2*}

(경북대학교 약학대학 ¹농화학과, ²약학과)

백운풀의 품질표준화를 위하여 지표 성분을 설정하고자 하였다. 백운풀의 에탄올 추출물 중 비교적 백운풀에 특이하고, 다량 함유되어 있는 화합물을 분리한 다음 ¹H 및 ¹³C-NMR을 이용하여 구조 동정한 결과, HD1 (digitolutein), HD2 (2-hydroxy-3-methylanthraquinone), HD3 [(*E/Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, 4:1] 및 HD4 [(*E/Z*)-6-*O*-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester, 4:1]의 4 종 화합물을 표준품으로 확보할 수 있었다. HD1~4의 검량선을 작성한 결과 상관계수(R^2)는 각각 0.9991, 0.9999, 0.9993, 0.9998로 높은 직선성을 보였으며, LOD는 0.05, 0.06, 0.03, 0.07 µg/ml로, LOQ는 0.165, 0.198, 0.99, 0.231 µg/ml 수준으로 나타났다. 또한 면적 비에 대한 재현성 RSD (%)는 각각 0.16, 0.90, 1.18, 0.58%의 값을 보였으며 일내 CV (%)는 0.23, 2.00, 1.18, 0.26%를, 일내 정확도는 102.80, 96.08, 108.44, 94.60%로 나타났다. 한편, 일간 CV (%)는 각각 0.25, 1.16, 0.98, 0.30%, 일간 정확도는 102.82, 98.58, 110.23, 94.73%였다. 백운풀 추출물 중 설정한 4 종 지표성분의 정량을 위한 최적 HPLC 조건을 검토한 결과, 고정상은 Merck Chromolith RP-18e (100×4.6 mm, 5 µm), 컬럼 온도는 실온, 검출은 UV 280 nm, 유속 2.0 ml/min, injection volume 10 µl, 이동상으로는 0.5% acetic acid가 포함된 H₂O (A) 와 methanol (B)을 사용하여 최초 80% (A)로 시작하여 9분 후 40% (A)가 되도록 gradient를 준 다음 18분까지 유지하는 조건을 설정하였다. 이 방법으로 백운풀 ethanol 추출물을 분석할 경우 다른 성분의 방해 없이 20분 이내에 모든 지표성분을 분석할 수 있었다. 연구결과는 백운풀의 건강기능식품 및 천연물신약 개발 및 품질관리에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.