

탐라오가피의 Eleutheroside B, E 및 β -Glucan 함량 분석 및 분석법 검증

김영현¹ · 배다빈¹ · 박선옥² · 이상종² · 조옥현³ · 이옥환^{1*}

¹강원대학교 식품생명공학과

²(주)에스티알바이오텍

³메사추세츠 주립대학교 의학대학

Method Validation for the Determination of Eleutherosides and β -Glucan in *Acanthopanax koreanum*

Young-Hyun Kim¹, Da-Bin Bae¹, Sun-Ok Park², Sang-Jong Lee²,
Ok-Hyun Cho³, and Ok-Hwan Lee^{1*}

¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

²STR Biotech Co., LTD, Gangwon 200-160, Korea

³University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA

ABSTRACT The aim of this study was to investigate the method validation for the determination of eleutherosides (B and E) and β -glucan in *Acanthopanax (A.) koreanum*. This medicinal plant reportedly mainly included eleutherosides which exhibit the pharmacological effects, and β -glucan substantially enhances the function of the immune system by activating macrophages. The specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD, S/N=3), and limit of quantification (LOQ, S/N=10) were measured by HPLC and enzymatic methods. Our results showed that the coefficient of calibration correlation (R^2) for eleutheroside B and E were 0.9997 and 0.9999, respectively. The limits of detection (LOD) for eleutheroside B and E were 0.050 μ g/mL and 0.025 μ g/mL, respectively. The recovery rate of eleutheroside B and E were revealed in the high range of 100.66~110.04% and 94.26~111.62%, respectively. The inter-day precision of eleutheroside B and E in the root and stem in *A. koreanum* were 1.4~5.0% and 1.1~2.5%, respectively. The intra-day precision of eleutheroside B and E in the root and stem in *A. koreanum* were 2.8~2.9% and 0.4~1.1%, respectively. Furthermore, the inter-day and intra-day precision of β -glucan in the stem, leaf, and fruit of *A. koreanum* were 1.32~5.67% and 8.01~11.76%, respectively. In conclusion, the methods were validated for the detection of eleutherosides and β -glucan in *A. koreanum*.

Key words: *Acanthopanax koreanum*, eleutheroside B, eleutheroside E, β -glucan, method validation

서 론

오가피속(*Acanthopanax(A.)*) 식물은 인삼과 같은 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 낙엽관목이며 한반도와 시베리아 및 중국의 고지대에서 분포하고 있다(1). 오가피속 식물로는 가시오가피(*A. senticosus*), 탐라오가피(*A. koreanum*), 지리오가피(*A. chiisanensis*), 오가피(*A. sessiliflorum*) 등이 있으며 우리나라를 비롯한 동양에서 주로 강장제로서 체력 증진, 근골격 증진(2), 항피로(3) 외에도 항암(4,5), 고혈압, 당뇨병(6,7) 및 노인성 질환을 위한 한약재의 하나로 사용되어 왔다(8).

가시오가피의 주요 성분으로는 lignan glycosides, β -glucan을 포함하는 polysaccharides, flavonoids, cam-

pesterol 및 β -sitosterol 등이 있다(9,10). Lignan계의 배당체인 eleutheroside B와 E는 물리 화학적 외부의 스트레스에 대한 비특이적 적응력을 갖는 'adaptogenic activity'에 있어서 그 효능이 인삼(*Panax ginseng*)과 비슷하며 대부분의 오가피속 식물과 다르게 탐라오가피는 eleutheroside B와 E가 함께 존재하는 것으로 알려져 있다(11,12). 러시아에서는 가시오가피를 시베리아 인삼(Siberian ginseng)으로 명명하기도 하지만 그 작용기전은 인삼과 상이한 것으로 보고되었다(13).

이러한 생리적 기능성을 가지고 있는 오가피속 식물은 현재 가시오갈피등복합추출물(제2011-28호)로 관절 건강에 도움이 되는 건강기능식품원료로서 개별인정형 원료로 등록되어 있으며 지표성분은 eleutheroside E로 표시하였다(14). 하지만 탐라오가피의 경우 eleutheroside B와 E가 동시에 검출되며 이를 지표성분으로 하여 건강기능식품 원료로 사용하기 위해서는 분석 조건 및 분석법 검증에 대한 분석방법 설정이 필요하다. 이외에 탐라오가피에 함유된 다양

Received 29 April 2013; Accepted 31 July 2013

*Corresponding author.

E-mail: loh99@kangwon.ac.kr, Phone: 82-33-250-6454

한 생리활성 물질들 중 면역증진과 연관된 β -glucan 성분을 분석하여 eleutheroside B, E 지표성분과 함께 이용하고자 한다. β -Glucan은 β -glucosyl unit이 $\beta(1\rightarrow3)$ 결합 또는 $\beta(1\rightarrow4)$ 결합으로 이루어져있는 선형의 사슬구조를 이루고 있으며 보리와 같은 곡물의 세포벽을 구성하고 있다(15).

건강기능식품을 개발, 생산하기 위해서는 기능성과 안전성을 과학적으로 입증해야 하며 기능성 원료에 대한 표준화 및 규격화가 필요하다. 표준화는 원료에서 완제품을 생산하는 과정까지 목표성분을 일정하게 유지하기 위한 우수제조 공정규범을 말하며 이때 지표성분의 표준화 방법을 일반적으로 사용한다. 천연물에 존재하는 지표성분은 공인된 방법이나 정밀하다고 판단되는 분석방법을 사용하며 지표성분에 대한 기준 및 규격을 설정하기 위해서는 반드시 분석방법에 대한 과학적 타당성과 신뢰성이 검증되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 오가피속 식물 중 탐라오가피를 건강기능식품 원료로 개발 시 원료의 표준화를 위하여 eleutheroside B, E 및 β -glucan의 분석방법 및 분석법 검증에 대한 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 탐라오가피(*A. koreanum*)는 제주도에 2012년에 재배한 것으로 뿌리 및 줄기 부위를 구입하여 선별한 후, 동결건조 하여 분말화 한 것으로 분석실험에 사용하였다. Eleutheroside B와 E 표준물질(purity \geq 98.0%)과 acetic acid, potassium hydroxide 등의 분석시약들은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 β -glucan 분석에 사용된 enzyme assay kit는 Megazyme Ltd.(Bray, Wicklow, Ireland)에서 구입하여 사용하였다.

Eleutheroside 분석

탐라오가피 뿌리 및 줄기에 함유된 eleutheroside B 및 E를 분석하기 위해 Lee 등(16)의 방법을 변형하여 Fig. 1과 같이 각 부위별 시료 10 g을 추출용기에 넣고 50% MeOH 250 mL를 사용하여 70°C 조건에서 4시간씩 2회 반복 환류 추출 하였다. Filter paper(No. 3, Whatman, Maidstone, Kent, UK)로 여과한 추출물은 회전식 진공 농축기(Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축 후에 동결건조(Ilshinbiobase Co., Ltd., Gyeonggi, Korea) 하여 실험에 사용하였다. 추출방법에 따른 수율은 뿌리와 줄기 각각 12%와 14%를 나타내었다. Eleutheroside B와 E의 HPLC 분석은 Choi 등(17)의 방법을 변형하여 실시하였으며 서로 다른 두 개의 표준물질을 동시분석하기 위해 spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys Co., Ltd., Daejeon, Korea)를 사용하여 190 nm부터 400 nm까지 흡광도를 측정하여 동시분석이 가능한 최대흡수파장을 분석

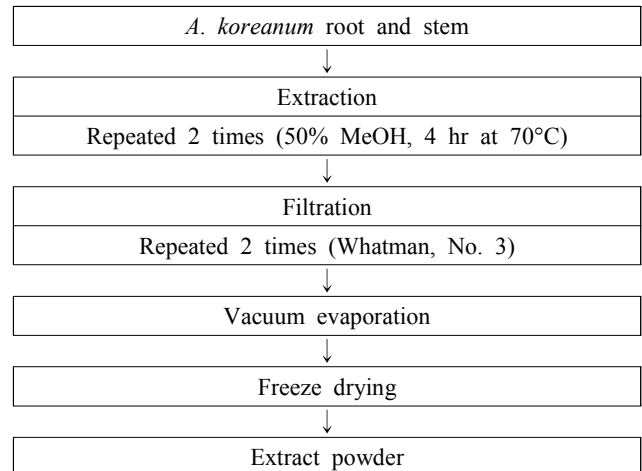


Fig. 1. Procedure for the preparation of *A. koreanum* root and stem extracts.

하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector(Waters Co., Milford, MA, USA)로 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Sunfire™ C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μ m, Waters Co.)을 사용하였다.

β -Glucan 분석

β -Glucan 분석은 mushroom and yeast beta-glucan assay procedure kit(Megazyme Ltd.)를 이용하여 측정하였다(15). 이 방법은 β -glucanase 역가를 갖는 효소를 사용하여 β -glucan만을 특이적으로 가수분해 한 후 유리된 포도당 함량을 측정하는 방법으로 total-glucan과 α -glucan 함량의 차에 의해 구하였다. Total-glucan 함량은 0.5 mm 크기의 체를 통과시킨 시료 50 mg에 hydrochloric acid(37% v/v) 0.75 mL를 넣고 30°C에서 45분 동안 반응시킨 후 증류수 5 mL를 가하여 100°C에서 2시간 동안 교반하였다.

Table 1. HPLC conditions of eleutheroside B and E analysis for *A. koreanum* extracts

Instrument	Conditions		
Column	Sunfire™ C ₁₈ , 5.0 μ m, 4.6 mm \times 250 mm		
Column temp.	25°C		
	Time (min)	Water (%)	Acetonitrile (%)
	0	85	15
Mobile phase (gradient)	5	85	15
	8	80	20
	15	80	20
	20	85	15
	25	85	15
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μ L		
Run time	25 min		

반응이 끝난 혼합물은 상온에서 5분 동안 식힌 후 2 N KOH 5 mL를 첨가하고 200 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)를 사용하여 50 mL로 정용한 뒤 원심분리(1500×g, 10 min) 하여 분리된 상등액 0.05 mL에 exo-1,3- β -glucanase(20 U/mL)와 β -glucosidase(4 U/mL)의 혼합용액 0.05 mL를 첨가하여 40°C에서 60분간 반응시켰다. 반응시킨 용액의 glucose 정량을 위해 GOPOD(glucose oxidase/peroxidase) reagent 1.5 mL를 사용, 20분 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -Glucan은 시료에 2 N KOH 1 mL를 가하여 20분 동안 낮은 온도에서 교반시켜준 후 1.2 M sodium acetate buffer(pH 3.8) 4 mL, amyloglucosidase와 invertase 혼합용액을 0.1 mL 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 원심분리(1500×g, 10 min) 후 상등액 0.05 mL를 GOPOD reagent 1.5 mL와 20분 동안 반응시켜 spectrophotometer를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정, α -glucan으로 환산하였다.

분석법의 유효성 검증

HPLC를 이용한 분석방법은 개별인정형 건강기능식품 기능성원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 의약품 등 분석법 검증에 대한 가이드라인(18)을 근거로 하여 특이성 (specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성 (accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD, S/N=3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)를 사용하였으며, β -glucan 분석방법은 검증을 바탕으로 정밀성과 정확성을 이용하여 과학적으로 분석법의 유효성을 확인하였다.

특이성

표준물질 eleutheroside B와 E 그리고 탐라오가피 뿌리 및 줄기 추출물을 HPLC로 분석한 뒤 chromatogram을 비교하여 eleutheroside B와 E가 선택적으로 분리가 되는지 확인하였으며, PDA(photo diode array) spectrum을 이용하여 동일한 spectrum을 나타내는지 확인하였다.

직선성

표준물질 eleutheroside B는 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125 μ g/mL로 eleutheroside E는 0, 43.75, 87.5, 175, 350 μ g/mL로 제조하여 HPLC를 이용, 3회 반복 측정하였으며 chromatogram에 대한 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다.

정밀성

HPLC를 이용한 분석방법은 추출방법에 따라 추출한 탐라오가피 뿌리 및 줄기 추출물을 일간(inter-day)과 일내 (intra-day)로 나누어 정밀도 실험을 실시하였다. 일간 정밀도는 1일 1구간(16:00)으로 3일간 진행하였고 일내 정밀도

는 1일 3구간(00:00, 08:00, 16:00)으로 나누어 진행하였다. 분석하여 얻어진 면적은 검량선을 이용하여 정량하였으며 β -glucan 분석방법의 정밀도 실험 또한 동일하게 일간 정밀도는 1일 1구간(15:00)으로 3일간 진행하였고 일내 정밀도는 1일 3구간(01:00, 08:00, 15:00)으로 나누어 진행하여 분석하였다. 각각의 정량한 값은 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 나타내었다.

정확성

농도를 알고 있는 탐라오가피 뿌리 추출물에 표준용액 eleutheroside B 31.25, 62.5, 125 μ g/mL와 eleutheroside E 87.5, 175, 350 μ g/mL의 세가지 농도를 각각 첨가하여 HPLC로 분석하였다. 분석하여 얻어진 결과를 아래 식을 이용하여 회수율(recovery)로 나타내어 HPLC 분석방법의 정확성을 확인하였다. β -Glucan 분석방법은 정제하여 β -glucan 함량이 표기된 yeast β -glucan(58.5%)을 분석하여 회수율을 측정하였다.

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_r - C_u)}{C_a} \times 100$$

C_r : Concentration of test sample added standard solution

C_u : Concentration of test sample

C_a : Concentration of standard solution

검출한계 및 정량한계

검출한계와 정량한계는 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하여 저농도에서 검출한계는 신호 대 잡음비가 3:1 일 때, 정량한계는 신호 대 잡음비가 10:1일 때를 검출한계 및 정량한계로 나타내었다(18).

결과 및 고찰

Eleutheroside B와 E의 spectrum 확인

Spectrophotometer를 사용하여 190 nm부터 400 nm까지의 흡수파장을 분석한 결과(Fig. 2), eleutheroside B는 220 nm에서 eleutheroside E는 210 nm에서 각각 최대흡수파장을 나타냈다. Feng 등(19)에 의하면 eleutheroside B와 E를 각각 206 nm와 220 nm에서 분석하였다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 탐라오가피는 다른 오가피속 식물들과는 달리 eleutheroside B와 E가 모두 존재하기 때문에 두 성분을 동시에 분석할 수 있는 동시분석 조건이 요구된다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 eleutheroside E의 경우 최대흡수파장을 220 nm로 하여 eleutheroside B와 함께 동시분석 할 경우 최대흡수파장 영역을 벗어나 peak의 감도가 매우 낮아지게 된다. 따라서 탐라오가피에 함유된 eleutheroside을 동시에 분석하기 위해서는 최대흡수파장을 210 nm로 하여 분석하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

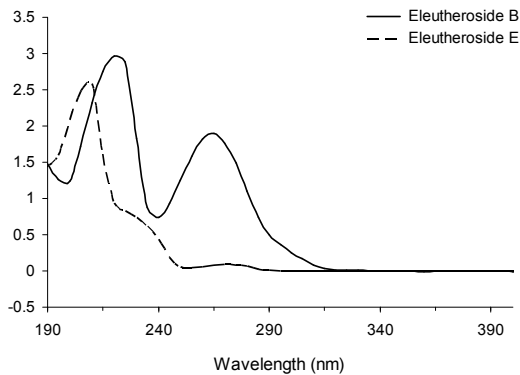


Fig. 2. Spectrophotometer spectrums of eleutheroside B and E.

특이성 확인

특이성은 불순물, 분해물, 추출물 등이 혼합된 상태에서 분석대상물질의 간섭 없이 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 다른 물질의 간섭 없이 분리될 수 있는 것으로 특이성을 확인하게 된다. 표준용액과 탐라오가피로 뿌리 및 줄기로 부터 추출한 용액의 chromatogram을 비교하여 eleutheroside B와 E peak가 분리됨을 확인한 결과 Fig. 3과 같이 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며 표준용액의 peak 유지

시간(retention time, RT)과 추출물의 peak 유지시간이 평균 eleutheroside B는 5.254 min, eleutheroside E는 11.141 min으로 일치하였다. 또한 표준용액과 탐라오가피 뿌리 및 줄기 추출물의 PDA spectrum 결과에서도 동일한 spectrum을 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인하였다 (Fig. 4).

검량선을 이용한 직선성 확인

Eleutheroside B 표준용액은 각각 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 단계적으로 희석하였고 eleutheroside E 표준용액은 0, 43.75, 87.5, 175, 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다(Fig. 5). Eleutheroside B와 E의 상관계수(R^2) 값은 각각 0.9997, 0.9999로 우수한 직선성을 보였다.

정밀성 확인

정밀도(RSD)란 탐라오가피 뿌리 및 줄기 추출물을 정해진 조건에서 분석하였을 때 각 측정 결과 값 사이의 근접성을 말한다. Eleutheroside B와 E는 Table 2와 같이 일간(inter-day) 정밀도에서 각각 1.4~5.0%, 1.1~2.5%를 나타

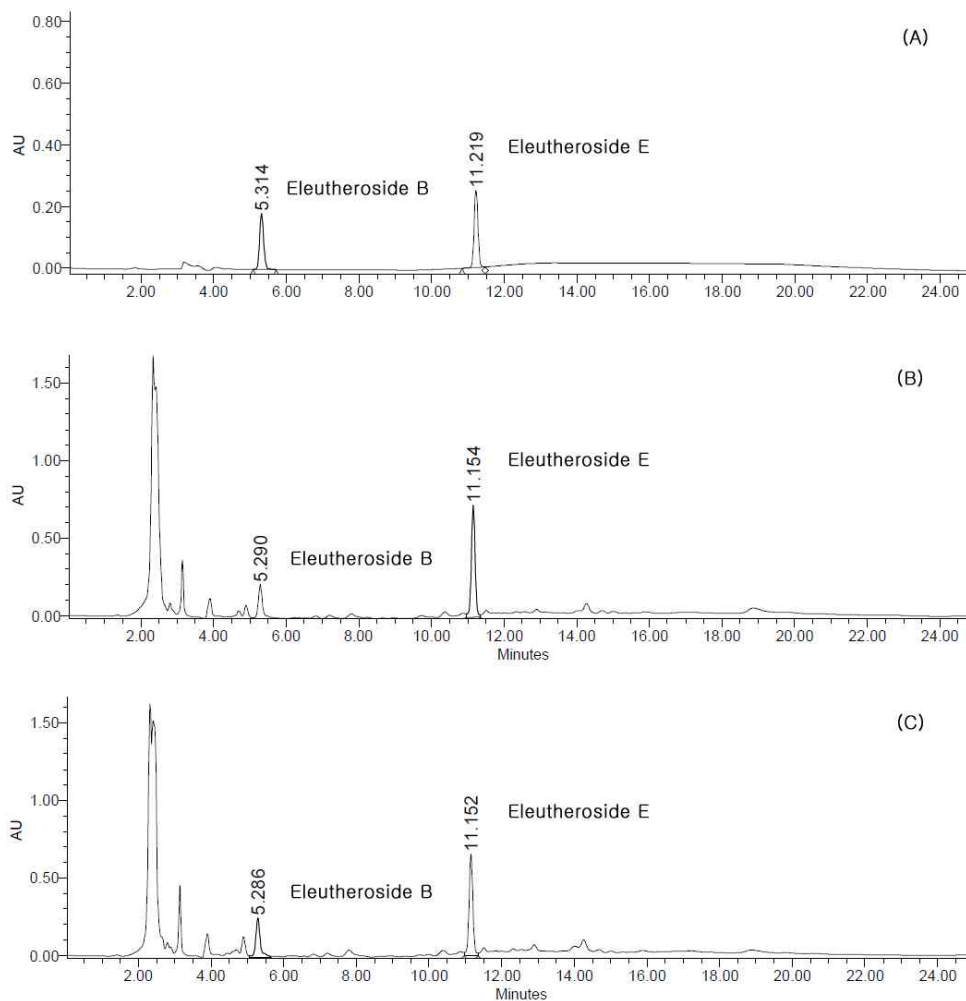


Fig. 3. HPLC chromatograms of eleutheroside B and E. (A) Standard, (B) *A. koreanum* root extract, (C) *A. koreanum* stem extract.

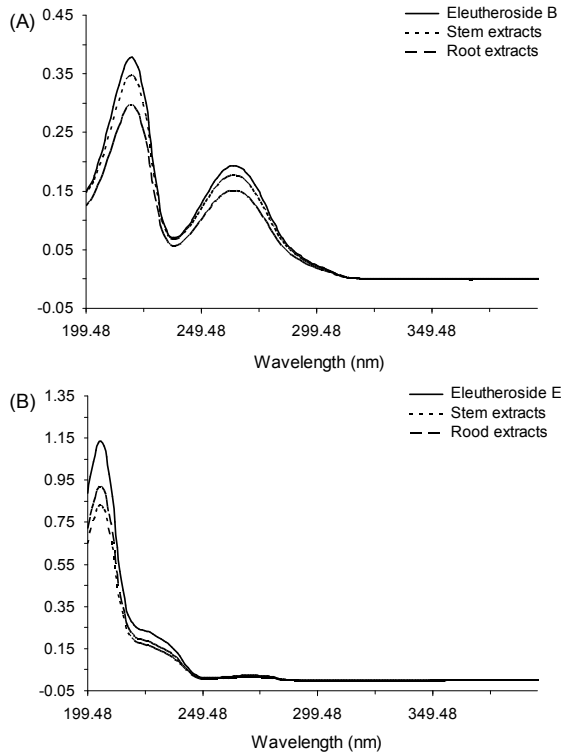


Fig. 4. PDA spectrums of eleutheroside B (A) and eleutheroside E (B) in *A. koreanum* extracts.

내었고 일내(intra-day) 정밀도에서는 2.8~2.9%, 0.4~1.1%로 5% 이하의 정밀도를 나타내었다. Eleutheroside B의 함량은 탐라오가피 뿌리 및 줄기에서 각각 525.7 ± 16.8 , 525.1 ± 21.1 $\mu\text{g/g}$ 이었으며 eleutheroside E의 함량은 뿌리 및 줄기에서 각각 $1,315.3 \pm 22.7$, $1,037.5 \pm 22.2$ $\mu\text{g/g}$ 의 함량을 가지고 있는 것으로 분석되었다. 한편 탐라오가피 줄기, 잎 및 열매의 β -glucan 분석방법의 정밀도 측정 결과, 일간 정밀도와 일내 정밀도는 각각 1.32~5.67%, 8.01~11.76%이었으며 β -glucan 함량은 각각 5.32 ± 0.38 , 4.34 ± 0.32 , $3.71 \pm 0.22\%$ (w/w)이었다(Tabel 3). Lim 등(20)의 보고에 의하면 탐라오가피 줄기의 물과 에탄올 추출물에서도 eleutheroside B가 E보다 적은 함량을 나타내었으며 Park과 Jeong(21)의 표고버섯 β -glucan 함량 분석 결과에서는 4.2%로 탐라오가피 잎의 함량과 비슷한 결과를 나타내었다.

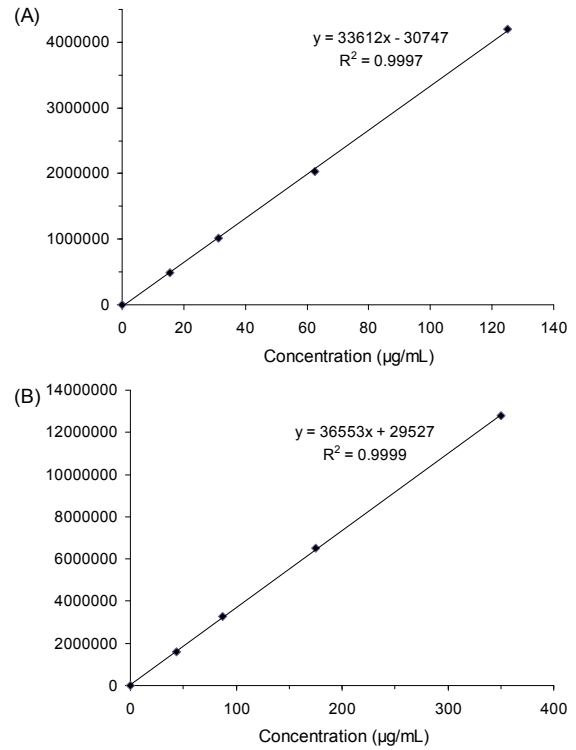


Fig. 5. Calibration curve of eleutheroside B (A) and eleutheroside E (B) standard solution.

회수율을 이용한 정확성 확인

정확성은 회수율을 측정하여 그 결과로 나타내었다. 농도를 알고 있는 탐라오가피 뿌리 추출물에 표준용액을 각각 3가지 농도로 첨가한 뒤 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하였다. Table 4과 같이 eleutheroside B는 첨가된 농도 31.25, 62.5, 125 $\mu\text{g/mL}$ 에 따라 각각 110.04, 103.05, 100.66%의 회수율을 보여주었으며, eleutheroside E는 첨가된 농도 87.5, 175, 350 $\mu\text{g/mL}$ 에 따라 각각 111.62, 107.31, 94.26%로 높은 회수율을 얻었다. Kang 등(22)은 민가시오가피 뿌리 추출물을 이용하여 eleutheroside B와 E의 회수율을 측정한 결과 eleutheroside B는 94.4~101.2%, eleutheroside E는 97.7~102.1% 범위의 회수율을 얻었다고 보고하였다. β -Glucan 분석법의 정확성은 β -glucan이 58.5%(w/w) 함유되어 있는 효모를 이용하여 확인하

Table 2. Precision of eleutheroside B and E analysis for *A. koreanum*

Parameters		Precision			
		Eleutheroside B		Eleutheroside E	
		Mean \pm SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%) ¹⁾	Mean \pm SD ($\mu\text{g/g}$)	RSD (%)
Inter-day ³⁾	Root	513.7 \pm 7.2 ²⁾	1.4	1,298.5 \pm 14.8	1.1
	Stem	516.8 \pm 25.8	5.0	1,023.5 \pm 25.2	2.5
Intra-day ⁴⁾	Root	537.8 \pm 14.9	2.8	1,332.1 \pm 15.1	1.1
	Stem	533.3 \pm 15.6	2.9	1,051.5 \pm 3.9	0.4

¹⁾RSD: Relative standard deviation.

²⁾Each data was obtained by triple analysis (n=3).

³⁾Inter-day: One time analysis of eleutheroside B and E per day for 3 days.

⁴⁾Intra-day: Three times per day.

Table 3. Precision of β -glucan analysis for *A. koreanum*

Parameters		Total-glucan (% w/w)	α -glucan (% w/w)	β -glucan contents (% w/w)	
				Mean \pm SD	RSD (%) ¹⁾
Inter-day ³⁾	Stem	11.55 \pm 0.56 ²⁾	6.17 \pm 0.86	5.38 \pm 0.31	5.67
	Leaf	10.02 \pm 0.19	5.65 \pm 0.15	4.37 \pm 0.06	1.32
	Fruit	7.55 \pm 0.13	3.80 \pm 0.21	3.76 \pm 0.18	4.79
Intra-day ⁴⁾	Stem	12.68 \pm 0.37	7.43 \pm 0.13	5.25 \pm 0.50	9.60
	Leaf	10.87 \pm 0.55	6.56 \pm 0.06	4.31 \pm 0.51	11.76
	Fruit	7.89 \pm 0.18	4.22 \pm 0.14	3.67 \pm 0.29	8.01

¹⁾RSD: Relative standard deviation. ²⁾Mean \pm SD in triplicate (n=3).

³⁾Inter-day: One time analysis of β -glucan per day for 3 days. ⁴⁾Intra-day: Three times per day.

Table 4. Accuracy of HPLC analysis for eleutheroside B and E in *A. koreanum*

Eleutheroside	Concentration ¹⁾ (μ g/mL)	Recovery (%)	
		Mean \pm SD	RSD (%) ²⁾
B	31.25	110.04 \pm 1.85 ³⁾	1.68
	62.5	103.05 \pm 3.13	3.04
	125	100.66 \pm 1.75	1.74
E	87.5	111.62 \pm 6.13	5.49
	175	107.31 \pm 1.58	1.48
	350	94.26 \pm 0.61	0.65

¹⁾Concentration of eleutheroside B and E standard.

²⁾RSD: Relative standard deviation.

³⁾Each data was obtained by triple analysis (n=3).

Table 5. Accuracy of β -glucan analysis for *A. koreanum*

Concentration ¹⁾ (% w/w)	Recovery (%)	
	Mean \pm SD ²⁾	RSD (%) ³⁾
58.5 %	100.03 \pm 2.34	2.33

¹⁾Concentration of β -glucan standard.

²⁾Mean \pm SD in triplicate (n=3).

³⁾RSD: Relative standard deviation.

였으며 회수율을 측정된 결과, Table 5와 같이 100.03%의 높은 회수율을 보였으며 분석오차는 2.34%로 5% 이내의 값을 나타내었다. Rhee 등(23)은 차가버섯을 효소적 방법과 HPLC를 이용하여 β -glucan을 분석한 결과, 1.5%의 분석 오차를 얻었다고 보고하였다.

검출한계 및 정량한계 확인

검출한계와 정량한계는 신호 대 잡음비(signal-to-noise)에 근거하여 분석한 결과 eleutheroside B와 E의 검출한계는 각각 0.050 μ g/mL, 0.025 μ g/mL로 측정되었으며 정량한계는 eleutheroside B와 E에서 모두 0.250 μ g/mL로 나타났다. Kang 등(22)은 오가피 속 식물에 함유되어 있는 eleutheroside B와 E를 측정하기 위한 HPLC 분석법의 검출한계를 eleutheroside B는 0.100 μ g/mL, eleutheroside E는 0.050 μ g/mL로 설정하였다. 이상의 결과를 볼 때, 오가피 속 식물들의 건강기능식품 원료로 이용 시 eleutheroside B와 E는 HPLC를 이용하여 동시분석이 가능하며, β -glucan은 효소적 방법에 의하여 정량분석이 가능한 것으

로 나타났다. 이들 성분들을 오가피속 식물들의 유용성분 및 지표성분으로 선정 시 분석법 검증은 통하여 이들 원료의 표준화가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

탐라오가피를 이용하여 건강기능식품 개발 시 원료의 표준화를 위한 eleutheroside B, E 및 β -glucan의 함량 및 분석법 검증을 실시하였다. 분석법 검증결과, HPLC를 이용한 분석방법에서 표준용액의 피크유지시간과 탐라오가피 뿌리 및 줄기 추출물의 피크유지시간이 일치하였으며 동일한 spectrum을 나타내는 것으로 특이성을 확인하였다. Eleutheroside B와 E의 검량선은 각각 0.9997, 0.9999로 1에 가까운 높은 직선성을 보여주어 분석에 적합함을 알 수 있었다. Eleutheroside B와 E의 검출한계는 각각 0.050 μ g/mL, 0.025 μ g/mL이었고 정량한계는 0.250 μ g/mL로 eleutheroside B와 E가 동일한 값으로 설정되었다. Eleutheroside B의 함량은 탐라오가피 뿌리 및 줄기에서 각각 525.7 \pm 16.8, 525.1 \pm 21.1 μ g/g으로 큰 차이가 없었으며 eleutheroside E의 함량은 뿌리 및 줄기에서 각각 1,315.3 \pm 22.7, 1,037.5 \pm 22.2 μ g/g으로 뿌리에 더 많은 eleutheroside E가 함유되어 있었다. 정밀도(RSD) 측정 결과, eleutheroside B와 E는 일간 정밀도에서 각각 1.4~5.0, 1.1~2.5%의 정밀도를 보여주었으며 일내 정밀도에서는 각각 2.8~2.9, 0.4~1.1%로 일간 정밀도보다 높은 정밀성을 나타내었다. 또한 eleutheroside B는 100.66~110.04%, eleutheroside E는 94.26~111.62% 범위의 회수율을 보여주어 실험방법에 대한 정확성을 검증하였다. β -Glucan 분석법 검증 결과, 100.03%의 회수율을 보였으며 분석오차는 2.33%로 높은 정확도를 보여주었고, 일간(inter-day) 정밀도는 1.32~5.67%이었으며 일내(intra-day) 정밀도는 8.01~11.76%의 정밀성을 나타내었다. 탐라오가피 줄기, 잎 및 열매의 β -glucan 함량은 각각 5.32 \pm 0.38, 4.34 \pm 0.32, 3.71 \pm 0.22%(w/w)로 줄기에 가장 많은 β -glucan이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 본 연구 결과, 지표성분인 eleutheroside B와 E의 HPLC를 이용한 동시분석 방법과 β -glucan 분석방법이 적합한 분석방법임이 검증되었다.

감사의 글

본 연구는 2012년 산학연공동기술개발 국제사업(과제번호: C1008942-01-01)의 일환으로 수행된 것으로 연구비를 지원하여 주신 중소기업청의 한국산학연합회에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee YS, Jung SH, Lim SS, Ji J, Lee SH, Shin KH. 2001. Effects of the water extract from the stem bark of *Acanthopanax senticosus* on hyperlipidemia in rats. *Kor J Pharmacogn* 32: 103-107.
- Douling EA, Redondo DR, Branch JD, Jones S, McNabb G, Williams MH. 1996. Effect of *Eleutherococcus senticosus* on submaximal and maximal exercise performance. *Med Sci Sports Exerc* 28: 482-489.
- Huang LZ, Huang BK, Ye Q, Qin LP. 2011. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus*. *J Ethnopharmacol* 133: 213-219.
- Hacker B, Medon PJ. 1984. Cytotoxic effects of *Eleutherococcus senticosus* aqueous extracts in combination with N6-(delta 2-isopentenyl)-adenosine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against L1210 leukemia cells. *J Pharm Sci* 73: 270-272.
- Hibasami H, Fujikawa T, Takeda H, Nishibe S, Satoh T, Fujisawa T, Nakashima K. 2000. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells. *Oncol Rep* 7: 1213-1216.
- Ko SK, Kim JS, Choi YE, Lee SJ, Park KS, Chung SH. 2002. Anti-diabetic effects of mixed water extract from ginseng radix rubra, acanthopanax cortex, and cordyceps. *Kor J Pharmacogn* 33: 337-342.
- Kim SD, Lee SI, Shin KO. 2005. Effect of *Acanthopanax senticosus* extracts on blood sugar and serum lipid profiles of streptozotocin-induced diabetic rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 547-557.
- Lim SY, Leem JY, Lee CS, Jang YJ, Park JW, Yoon S. 2007. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J Food Sci Technol* 39: 694-700.
- Park KJ, Park SH, Kim JK. 2010. Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 42-46.
- Lu F, Sun Q, Bai Y, Bao S, Li X, Yan G, Liu S. 2012. Characterization of eleutheroside B metabolites derived from an extract of *Acanthopanax senticosus* Harms by high-resolution liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated data analysis. *Biomed Chromatogr* 26: 1269-1275.
- Yang YT, Lim JH, Kim JH, Ko KS, Ko JS. 2008. Changes in major constituents by extracting of *Acanthopanax koreanum* root with water and ethanol solution. *Korean J Food Preserv* 15: 421-426.
- Brekhman II, Dardymov IV. 1969. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol* 9: 419-430.
- Baranov AI. 1982. Medicinal uses of ginseng and related plants in the Soviet Union: recent trends in the Soviet literature. *J Ethnopharmacol* 6: 339-353.
- KFDA. 2012. *The Regulation on Approval of Functional Ingredients for Health Functional Food*. Korea Food & Drug Administration, Osong, Korea. p 1-109.
- Mcclear BV, Glennie-Holmes M. 1985. Enzymatic quantification of (1→3), (1→4)- β -D-glucan in barley and malt. *J Inst Brew* 91: 285-295.
- Lee SH, Kang SS, Cho SH, Ryu SN, Lee BJ. 2005. Determination of eleutheroside B and E in various parts of *Acanthopanax* species. *Kor J Pharmacogn* 36: 70-74.
- Choi JM, Kim KY, Lee SH, Ahn JB. 2010. Manufacturing and characteristics of fruit wine from *Acanthopanax sessiliflorus*. *Food Eng Prog* 14: 1-6.
- KFDA. 2012. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc*. Korea Food & Drug Administration, Osong, Korea. p 1-26.
- Feng SI, Hu Fd, Zhao JX, Liu X, Li Y. 2006. Determination of eleutheroside E and eleutheroside B in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection. *Eur J Pharm Biopharm* 62: 315-320.
- Lim JH, Yang YT, Koh JS. 2007. Extraction of major constituents from *Acanthopanax koreanum* stems with water and ethanol solutions. *Korean J Food Preserv* 14: 67-72.
- Park NY, Jeong YJ. 2006. Quality properties of oak mushroom (*Lentinus edodes*) based on extraction conditions and enzyme treatment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1273-1279.
- Kang JS, Linh PT, Cai XF, Kim HS, Lee JJ, Kim YH. 2001. Quantitative determination of eleutheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res* 24: 407-411.
- Rhee SJ, Cho SY, Kim KM, Cha DS, Park HJ. 2008. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT-Food Sci Technol* 41: 545-549.