

HPLC-UV를 이용한 천마의 Gastrodin과 Gastrodigenin의 동시분석법 확립

강교빈¹ · 전진범¹ · 유귀재² · 권은아³ · 윤준원³ · 강병철³ · 김승현² · 성상현¹ · 장영표^{4*} · 양희정^{5*}

¹서울대학교 약학대학, ²연세대학교 약학대학, ³서울대학교병원 의생명연구원,

⁴경희대학교 약학대학, ⁵강원대학교 약학대학

Simultaneous Determination of Gastrodin and Gastrodigenin in *Gastrodia elata* by HPLC-UV

Kyo Bin Kang¹, Jin Bum Jun¹, Guijae Yoo², Euna Kwon³, Jun-Won Yun³, Byeong-Cheol Kang³,
Seung Hyun Kim², Sang Hyun Sung¹, Young Pyo Jang^{4*} and Heejung Yang^{5*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

²College of Pharmacy, Yonsei Institute of Pharmaceutical Sciences, Yonsei University, Incheon 21983, Korea

³Department of Experimental Animal Research, Biomedical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul 03080, Korea

⁴College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

⁵College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract – *Gastrodia elata* has been widely used as a traditional medicinal herb. However, in Korean Pharmacopeia, neither a marker constituent nor an analytical procedure for *G. elata* has been established. In this study, we suggest gastrodin and gastrodigenin as marker constituents of *G. elata*, and propose an analytical procedure for simultaneous quantification of these constituents by high-performance liquid chromatography-ultraviolet spectroscopy (HPLC-UV). The analytical method was validated for its linearity, precision, accuracy, and specificity. Based on the validated method, gastrodin and gastrodigenin in 14 commercial *G. elata* samples were quantified.

Keywords – HPLC analysis, *Gastrodia elata*, Gastrodin, Gastrodigenin, Method validation

천마(*Gastrodia elata* Blume)는 난초과(Orchidaceae)의 다년 생 기생식물로서 그 덩이줄기를 약용하여 생약 천마(*Gastrodiae Rhizoma*)로 사용한다.¹⁾ 천마의 주성분은 phenolic 유도체로서 gastrodin, gastrodigenin, gastrol, 4-hydroxybenzaldehyde, parishin 등이 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 천마는 두통, 어지럼증, 류마티즘, 경련, 간질등의 치료를 위하여 오랫동안 널리 사용되어 왔다.⁵⁾ 천마는 그 쓰임에 비하여 지표성분 및 함량 기준이 대한민 국약전에 규정되어 있지 않아 품질 관리의 과학화가 필요한 생약이라 할 수 있다. 중국 및 일본의 약전은 천마를 *G. elata*의 덩이줄기를 찢 것으로 규정하고 있으나,^{6,7)} 대한민국 약전 11개정에서는 천마의 덩이줄기를 찢서 건조한 것을 사용하는 것으로 되어 있으나, 시중에는 생천마와 찢천마가 동시에 유통되고 있다.¹⁾ LC-QTOF/MS법을 활용한 연구에

서 찢천마가 생천마에 비해 gastrodin, parishin, parishin B 등을 포함한 주요 phenol 유도체의 함량이 높음이 밝혀졌으나,⁸⁾ LC-QTOF/MS법은 접근성의 문제로 생약의 기준시험 법으로 활용하기에는 현실적인 어려움이 있다.

이에 본 연구에서는 천마의 주성분인 gastrodin(**1**)과 gastrodigenin(=4-hydroxybenzylalcohol, **2**) (Fig. 1)에 대한 HPLC-UV 기반의 동시분석법을 개발하고 개발된 동시분석법을 이용하여 시중에 유통되는 천마 시료 내의 화합물 **1** 및 **2**의 함량을 정량하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 14종의 천마 시료를 시중에서 구입하였다. 시료 1-4는 전북 무주산, 시료 5-14는 중국산이며 시료 4 및 12-14은 생천마, 시료 1-3, 5-11은 찢천마이다. 모든 시료는

*교신저자(E-mail): yjang@khu.ac.kr, heejyang@kangwon.ac.kr
(Tel): +82-2-961-9421, +82-33-250-6919

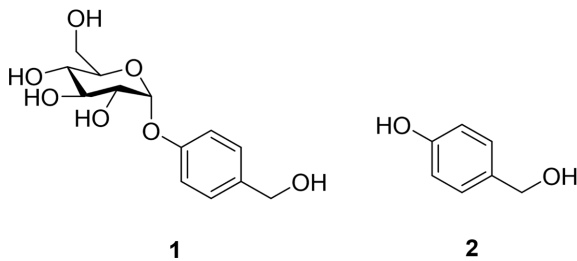


Fig. 1. Chemical structures of gastrodin (1) and gastrodigenin (2).

강원대학교 권용수 교수로부터 감별하였으며, 서울대학교 약학대학 표본실에 보관하였다(SNUP-GE-1~14).

시약 및 기기 - 분석에 사용된 HPLC grade 용매는 Avantor performance Materials Inc.(Center Valley, PA, USA)에서 구매하였다. 화합물 1과 2는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MP, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC 분석을 위한 기기로 Pump, autosampler, column oven, diode array detector로 구성된 Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하였으며, 분석용 컬럼은 YMC Triart C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 μm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) column을 사용하였다.

시료 준비 - 천마 8.0 g 에 증류수 40.0 mL을 가하여 40°C에서 2시간 동안 초음파 추출한 뒤 추출액 1.0 mL을 취하여 30% MeOH로 4배 희석한 후 0.20 μm 시린지 필터 (Sartorius, Goettingen, Germany)로 여과하여 HPLC 분석용 시료로 하였다.

분석 조건 - HPLC 이동상으로 A(0.1% formic acid)와 B(acetonitrile)의 혼합액을 이용하였다. B의 비율을 2%에서 10%로 20분간 증가시키는 linear gradient 조건으로서 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 컬럼의 온도는 35°C, 자외선 검출파장은 220 nm, 주입용량은 5 μL로 설정하였다.

분석법의 검증(Validation) - 분석법에 대한 검증으로 직선성, 검출한계와 정량한계, 정확성, 정밀성, 특이성을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

1. 직선성(Linearity) - 화합물 1과 2을 30% MeOH에 5 mg/mL 농도로 녹인 후 200, 150, 100, 50, 25 μg/mL의 농도로 희석하여 5개의 농도로 검량선을 작성하였고 이에 대한 상관계수(R²)를 통하여 직선성을 측정하였다.

2. 검출한계와 정량한계(Limit of Detection and Limit of Quantitation) - ICH guideline에 따라 $LOD = 3.3 \times (\sigma/S)$, $LOQ = 10 \times (\sigma/S)$ 계산식을 이용하여 계산하였다. σ 는 검량선의 직선 방정식의 y축 값의 표준편차이며 S는 검량선의 직선 방정식의 기울기 값이다. 검출한계는 분석 시 기기에서 검출 될 수 있는 지표물질의 최소값을 나타내고, 정량한계는 검출한계의 3배값으로 기기에서 정량 할 수 있는 최소값을 의미한다.

3. 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) 평가 - 화합물 1 및 2의 혼합물을 3가지 농도로 제조한 후 일내에 6회 반복 측정하여 나온 면적값의 상대표준편차값을 구하여 일내 정밀성(intraday precision)을 측정하였고, 화합물 1 및 2의 혼합물을 하루에 1회 3일 간격으로 3회 반복 측정하여 나온 값의 상대표준편차를 구하여 일간 정밀성(interday precision)을 측정하였다. 정확성은 천마 시료에 화합물 1과 2를 3개의 농도를 선택하여 첨가하여 검량선을 근거로 피크의 면적값을 계산하고 이를 3회 반복 측정하여 피크의 면적값을 구하여 원래의 농도로 환산하여 시료의 회수율을 구하고 그에 대한 상대표준편차값(RSD)을 구하여 측정하였다.

4. 특이성(Specificity) - PDA 검출기를 이용하여 화합물 1 및 2의 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하고 천마 시료의 크로마토그램 내에서 지표물질 피크의 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하여 각 스펙트럼을 비교하여 지표물질의 특이성을 판단하였다.

결과 및 고찰

천마의 약리성분으로 알려진 gastrodin(1)과 gastrodigenin(2)을 천마의 지표성분으로 제안하고 이들의 동시분석법을 개발하였다.^{9,10)} 개발한 분석법에 대한 검증을 다음과 같이 수행하였다.

분석조건의 확립 - Water와 acetonitrile의 혼합물을 이동상으로 하여 acetonitrile의 비율을 2%에서 10%로 증가시키는 gradient 조건으로 20분간 실험을 진행하여 화합물 1과 2의 peak를 확인하였다. 화합물 1은 11.4분에, 화합물 2는 17.1분에 검출되어 상호 피크간의 간섭 없이 분리된 단일피크로 검출되었다(Fig. 2).

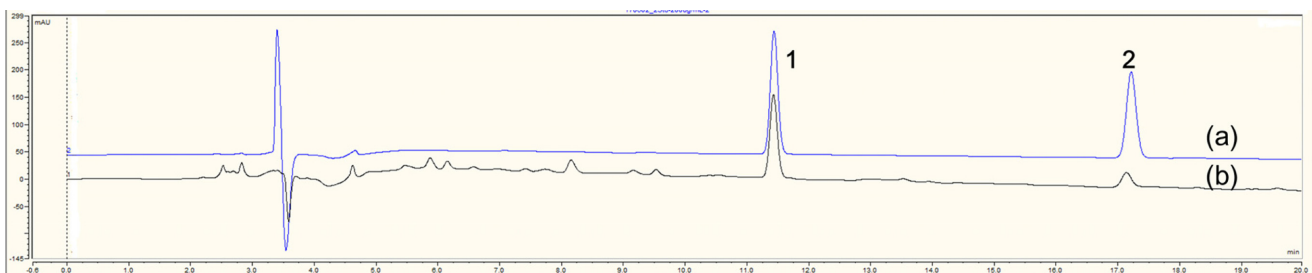


Fig. 2. HPLC chromatograms of (a) a mixture of compounds 1 and 2 and (b) the *G. elata* extract.

Table I. Calibration curves, LODs and LOQs of compounds **1** and **2** in *G. elata*

Compounds	t_R (min)	Linear regression equation	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
1	11.4	$y = 0.1580x + 0.0890$	0.9998	0.1048	0.3175
2	17.1	$y = 0.1482x + 0.6817$	0.9986	2.6856	8.1380

Table II. Precision and accuracy results of compounds **1** and **2** in *G. elata*

Compounds	Precision				Accuracy		
	Intraday		Interday		Spiked amount ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	RSD (%)
	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)			
1	200	2.614	200	3.104	100	99.06	0.912
	100	3.612	100	3.048	50	103.88	1.211
	25	3.941	25	3.956	25	102.53	0.783
2	200	1.677	200	2.261	100	104.02	2.144
	100	4.347	100	4.616	50	102.98	0.826
	25	2.136	25	1.008	25	98.69	1.974

직선성(Linearity) – 화합물 **1**, **2**를 200, 150, 100, 50, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 택하여 검량선을 작성한 결과, 상관계수(R^2)가 화합물 **1**은 0.9998, 화합물 **2**는 0.9986을 나타내어 높은 직선성을 확인하였다. 그에 대한 직선 방정식은 화합물 **1**은 $y = 0.1580 + 0.0890$ 화합물 **2**는 $y = 0.1482x + 0.6817$ 의 식을 나타내었다(Table I).

검출한계와 정량한계 – 검량선의 직선 방정식의 y 절편 값의 표준편차와 직선 방정식의 기울기를 이용하여 ICH guideline에 따라 계산한 결과, 화합물 **1**의 검출한계는 0.1048 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내었고 정량한계는 0.3175 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내었으며 화합물 **2**의 검출한계는 2.6856 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내었고 정량한계는 8.1380 $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내었다(Table I).

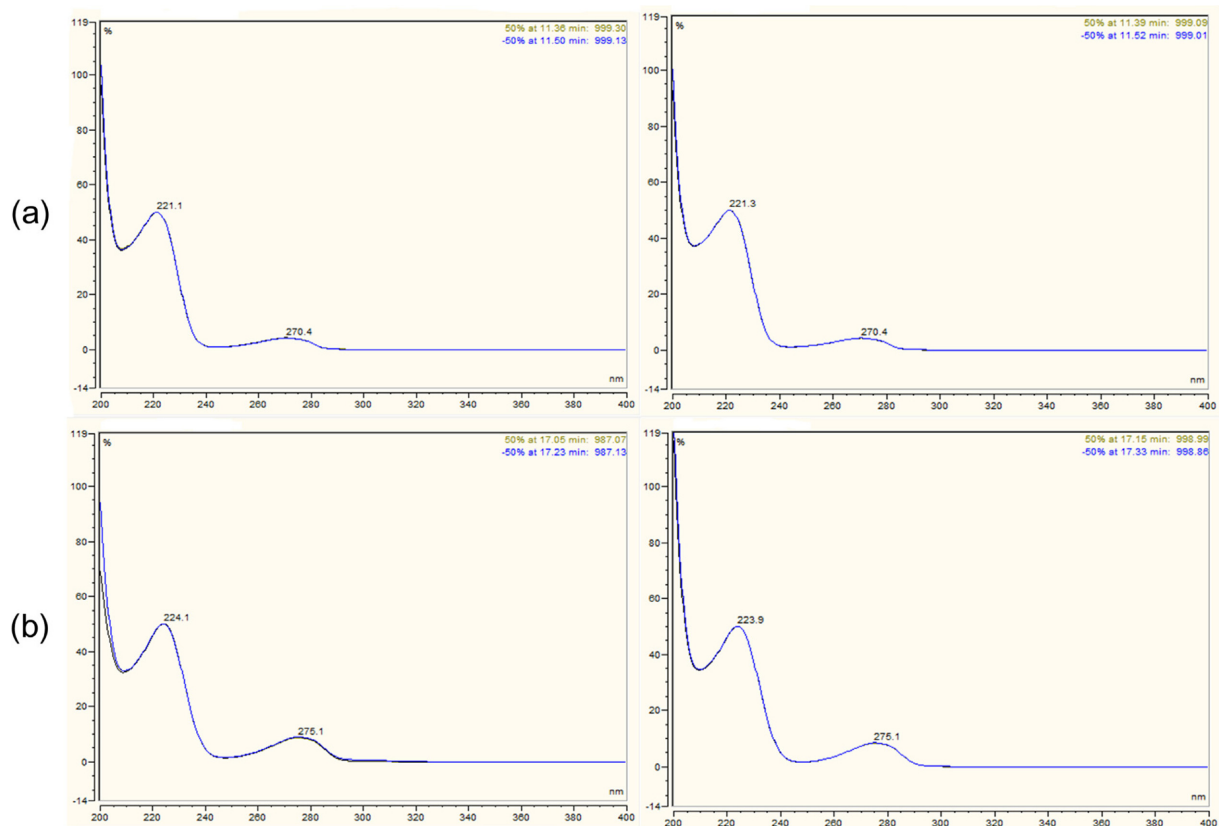
**Fig. 3.** UV spectra of (a) compounds **1** and (b) **2**, acquired in the standard mixture (left) and in the *G. elata* (right).

Table III. Contents of compounds **1** and **2** in 14 *G. elata* samples

No.	Sample		1 (%)	2 (%)
	Processing	Origin		
1	Steamed	Jeonbuk, S. Korea	0.350	0.091
2	Steamed	Jeonbuk, S. Korea	0.243	0.072
3	Steamed	Jeonbuk, S. Korea	0.475	0.100
4	Raw	Jeonbuk, S. Korea	0.178	0.376
5	Steamed	Hubei, China	0.238	0.097
6	Steamed	Hubei, China	0.509	0.082
7	Steamed	Hubei, China	0.946	0.007
8	Steamed	China	0.409	0.072
9	Steamed	China	0.333	0.086
10	Steamed	China	0.784	0.042
11	Steamed	Sichuan, China	0.172	0.019
12	Raw	Tibet ^a	0.177	0.444
13	Raw	Tibet ^b	0.153	0.027
14	Raw	Gansu, China	0.119	0.129

a: collected in Spring, b: collected in Winter.

정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) – 화합물 **1**과 **2**의 일내 정밀성(intraday precision)과 일간 정밀성(interday precision)을 측정된 결과, 모두 5.0% 이하의 값을 나타내었다(Table II). 분석법의 정확성의 경우 화합물 **1**과 **2** 모두 $\pm 5.0\%$ 내의 정확성 안에서 RSD 3.0% 이하의 오차로 준수한 정확성을 나타내었다(Table II).

특이성(Specificity) – 천마 시료에서 나타내는 지표성분의 피크와 화합물 **1** 및 **2**의 피크에 대한 자외선 흡수 스펙트럼을 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 화합물 **1**과 **2**의 흡수 스펙트럼과 같은 위치에 나타난 천마 성분의 흡수 스펙트럼이 동일한 것을 확인하여 높은 특이성을 확인하였다.

확립된 분석조건을 이용하여 14종의 천마 시료 내의 gastrodin과 gastrodigenin의 함량을 정량한 결과 기존 문헌의 결과와 같이 찢천마의 gastrodin 함량이 대체로 높게 나타남을 확인하였다(Table III).⁸⁾ 생천마의 경우 gastrodin보다 aglycone인 gastrodigenin의 함량이 더 높게 나타났으나, 13번 시료인 티벳 동마(冬麻)의 경우는 그런 경향이 나타나지 않았다. 이를 통하여 건조 방법뿐만 아니라 천마의 채취 시기 또한 천마의 약리 성분의 함량에 큰 영향을 끼침을 확인할 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 ICH guideline에 따라 HPLC-UV를 이용한 천마의 gastrodin과 gastrodigenin의 동시분석법을 개발하고 이를 이용하여 각기 다른 산지와 건조방법의 천마 시료 14

종의 성분을 정량하였다. 본 연구의 분석법을 활용하여 천마 및 천마를 함유한 제제의 약리성분의 정확한 분석을 수행할 수 있을 것으로 기대하며, 천마의 품질 관리를 위한 연구자료로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

사 사

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처의 연구개발비(16182 한약안 227)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 식품의약품안전처. (2014) 대한민국약전 제11개정, 약업신문.
2. Hayashi, J., Sekine, T., Deguchi, S., Lin, Q., Horie, S., Tsuchiya, S., Yano, S., Watanabe, K. and Ikegami, F. (2000) Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. *Phytochemistry* **59**: 513-519.
3. Taguchi, H., Yosioka, I., Tamasaki, K. and Kim, I. H. (1981) Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 55-62.
4. Li, Z., Wang, Y., Ouyang, H., Lu, Y., Qiu, Y., Feng, Y., Jiang, H., Zhou, X. and Yang, S. (2015) A novel dereplication strategy for identification of two new trace compounds in the extract of *Gastrodia elata* using UHPLC/Q-TOF-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **988**: 45-52.
5. Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and

- Modern Medicine, Springer-Verlag, New York, pp. 545-547
6. Chinese Pharmacopoeia Commission. (2005) Pharmacopoeia of the People's Republic of China, People's Medical Publishing House, Beijing, pp. 39.
 7. Japanese Pharmacopoeia Committee. (2006) The Japanese Pharmacopoeia, 15th ed, The Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokyo, pp. 1289.
 8. Kwon, J., Kim, N., Lee, D., Han, A.-R., Lee, J. W., Seo, E.-K., Lee, J.-H. and Lee, D. (2014) Metabolomics approach for the discrimination of raw and steamed *Gastrodia elata* using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **94**: 132-138.
 9. Chen, W. C., Lai, Y. S., Lin, S. H., Lu, K. H., Lin, Y. E., Pan-yod, S., Ho, C. T. and Sheen, L.Y. (2016) Anti-depressant effects of *Gastrodia elata* Blume and its compounds gastrodin and 4-hydroxybenzyl alcohol, via the monoaminergic system and neuronal cytoskeletal remodeling. *J. Ethnopharmacol.* **182**: 190-199.
 10. Hsieh, M. T., Wu, C. R. and Chen, C. F. (1997) Gastrodin and p-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition, on the passive avoidance task in rats. *J. Ethnopharmacol.* **56**: 45-54.
- (2017. 7. 26 접수; 2017. 9. 1 심사; 2017. 9. 5 게재확정)