

건강기능식품 원료로서 길초근 주정 추출물의 지표성분 분석법 검증

조경애* · 한성희** · 배송환*** · 신중철**** · 서형주**

*고려대학교 대학원 의생명융합과학과, **고려대학교 대학원 BK Plus 사업단
한경대학교 식품생물공학과, *(주)네오크레마

HPLC Validation of Valerian Ethanol Extract as a Functional Food

Kyungae Jo*, Sung Hee Han**, Song-Hwan Bae***, Jung Cheul Shin**** and †Hyung Joo Suh**

*Dept. of Integrated Biomedical and Life Science, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Korea

**BK21Plus, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

***Dept. of Food and Biotechnology, Hankyong National University, Gyeonggi 17579, Korea

****Neo Cremar Co. Ltd., Seoul 05836, Korea

Abstract

The purpose of this study was to establish valerenic acid as a marker compound for the standardization of ethanol extract of *Valeriana officinalis* (valerian) root as a functional health food. We established valerenic acid as a marker compound using HPLC. HPLC was used to quantify the marker compound in the valerian extract after validation of methods with linearity, accuracy, and precision. The specificity for retention time was met by comparative analysis of the valerian extract and standard compound using HPLC. The method showed high linearity of the calibration curve with a coefficient of correlation (R^2) of 0.9999. The limit of quantification (LOQ) was 10 $\mu\text{g/mL}$. The accuracy of measurement was 99.88~100.68% and the relative standard deviation (RSD) value was 0.59%. In addition, our analytical method yielded a 29% mean content of valerenic acid in the valerian ethanol extract. These results indicate that the established HPLC method facilitated the determination of marker compounds in the valerian extract for the standardization of health functional foods.

Key words: *Valeriana officinalis*, valerenic acid, HPLC, validation, functional health food

서 론

길초근(*Valeriana officinalis*)은 북아메리카, 유럽 및 아시아의 온대 지역에 널리 분포하는 다년생 식물로 수면장애 및 불면증에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 길초근 뿌리 추출물은 유럽과 미국에서 수면장애, 불안, 신경통을 치료하는데 사용되어왔다(Ross SM 2009).

길초근은 동물실험과 임상시험 모두에서 불안 완화, 진정 및 수면 유도효과가 입증되었으며, 길초근의 뿌리 추출물은 마우스에서 운동성 감소와 관련된 진정 작용과 항경련 효과가 있고(Leuschner 등 1993), 불면증을 겪고 있는 환자에게 길

초근 추출물 450 mg을 복용하게 했을 때 수면 잠복기가 유의적으로 감소했다는 보고가 있다(Leathwood & Chauffard 1985). 또한, 깊은 수면인 NREM 수면(non-rapid eye movement sleep)이 증가하고, 얇은 수면인 REM 수면(rapid eye movement sleep)이 감소하여 수면의 질을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Donath 등 2000).

이러한 길초근의 수면 촉진 물질은 아직 밝혀지지 않았지만, valerenic acid, valepotriates 및 그 유도체가 진정 작용에 기여한다는 보고가 있으며(Shohet 등 2001), 그 중 valerenic acid는 최면 효과를 가지는 주요 화합물로 이는 수면에 영향을 미치는 뇌의 GABA 수용체에 직접 결합하는 것으로 알려져

† Corresponding author: Hyung Joo Suh, BK21Plus, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea. Tel: +82-2-3290-5639, Fax: +82-2-940-2859, E-mail: suh1960@korea.ac.kr

있다(Yuan 등 2004). 최근 연구에 따르면 길초근의 valerenic acid가 항불안과 항경련에 효과가 있다고 보고되어 있다(Becker 등 2014; Hintersteiner 등 2014).

이러한 생리적 기능성을 함유한 길초근을 소재로 건강기능식품을 개발, 생산 시 표준화 및 규격화는 매우 중요한 부분을 차지하며, 지표성분 표준화 방법이 가장 일반적으로 사용되게 된다. 지표성분을 확인하는 방법은 공인된 방법을 사용하여 타당성과 신뢰성을 가지는 과학적인 검증으로 밸리데이션이 필요하게 된다.

따라서 본 연구에서는 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료를 개발할 목적으로 길초근의 표준화를 위해 지표성분으로 valerenic acid를 설정하였고, high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 지표성분 valerenic acid의 분석법을 확립하며, 그에 따른 유효성 검증을 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 길초근(*Valeriana officinalis*)는 경동시장 한약재 판매점을 통해 평창산을 구입하였으며, 경기대학교 식품생명공학과에서 종(species)을 확인하였다(voucher number: K KU-F-16-3). Debnath 등(2013)의 방법에 따라 길초근의 뿌리를 세척 및 세절한 다음 8배수의 70% 주정을 이용한 가온 환류추출(80°C)을 한 후, 여과 및 30 brix로 감압농축(R-100, BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)하여 동결건조(ilShinBioBase Co. Ltd.)한 것을 시료로 사용하였다. 분석을 위해 시료는 20 mg을 칭량하여 100% methanol 1 mL에 용해시킨 후 0.45 µm filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

2. 표준용액 조제

본 연구에 사용된 valerenic acid 표준품은 Chromadex Co. (Irvin, US)의 것을 구입하였으며, 검량선 작성을 위해 표준품을 500 µg/mL의 농도가 되도록 ethanol로 제조한 것을 50% methanol를 이용하여 10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL로 단계적으로 희석하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것을 사용하였다.

3. HPLC 분석

길초근 주정 추출분말의 valerenic acid의 분석은 Donovan 등(2004)의 방법을 변형하여 실시하였으며, HPLC 분석 조건은 Table 1에 요약하였다. HPLC 장비는 Agilent 1260 series (Agilent, USA)를 사용하였고, 분석용 컬럼은 Eclipse Plus-C18 (150×4.6 mm, 5 µm, Agilent, USA)을 사용하였으며, 용매는

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of valerenic acid

Name	Condition
Detector	UV 225 nm
Column	Eclipse Plus-C18 (150×4.6 mm, 5 µm)
Mobile phase	A: 0.5% phosphoric acid B: methanol A : B = 20 : 80 (Isocratic)
Flow rate	1.0 mL/min
Column oven tem.	35°C
Injection volume	20 µL
Run time	20 min

0.5% phosphoric acid와 methanol을 20:80의 비율로 혼합하여 사용하고, 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 컬럼의 유속은 1 mL/min이었고, 분석시간은 20분이었다. UV는 225 nm 파장에서 측정하였으며, 시료는 20 µL를 주입하였다.

4. 분석법의 유효성 검증

제품의 수면기능성이 유지될 수 있는 함량대로 정확히 제조되어졌는지에 대한 검증 및 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록하기 위한 지표성분으로 ‘의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인(식품의약품안전처)’을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 최소정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/ N=3.3) 등 5개 항목을 대상으로 시험법을 검증하였다.

1) 특이성

Valerenic acid 표준용액과 전처리한 길초근 주정 추출물 분말을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 retention time과 spectrum을 비교하였다. 시험용액 1은 시료(20 mg/mL), 시험용액 2는 표준용액(80 µg/mL), 시험용액 3은 시험용액 1과 2를 1:1 비율로 혼합하여 HPLC 분석을 3회 반복 실시하여 기대값에 대한 측정값을 평가하였다.

2) 직선성 및 최소정량한계

10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL로 단계적으로 희석한 valerenic acid 표준용액을 HPLC로 분석하여 peak 면적비에 대한 농도비의 관계를 표시하는 표준검량선을 작성하여 R²값을 계산하였다. 최소정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N) 값이 3.3일 때로 계산하였다.

3) 정확성

표준용액을 30, 80, 160 µg/mL로 조제하여 일간분석(inter-day)으로 일내분석(intra-day)을 3일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였으며, 표준용액을 1일 3구간에서 HPLC 분석을 통해 재현성을 확인하였다. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결과 값이 참값에 근접한 정도를 백분율로 나타내었다.

4) 정밀성

시료(길초근 주정 추출물, 20 mg/mL)를 6회 반복하여 상대표준편차를 측정하였다. 상대표준편차(Relative Standard Deviation: RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 계산하였다.

5. 길초근 주정 추출물 내에서의 valerenic acid 분석

본 연구에 사용된 길초근 주정 추출물은 20 mg/mL가 되도록 전 처리하고, 0.45 µm filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 세 번씩 반복 분석하였다. 표준용액의 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 길초근 주정 추출물 시료 중 valerenic acid의 농도를 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 특이성 확인

특이성 시험을 통해 valerenic acid가 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는지를 확인하였다. 표준용액과 시료 전 처리 방법으로 처리한 길초근 주정 추출물의 크로마토그램을 비교하여 valerenic acid가 분리되는지를 확인한 결과, Fig. 1

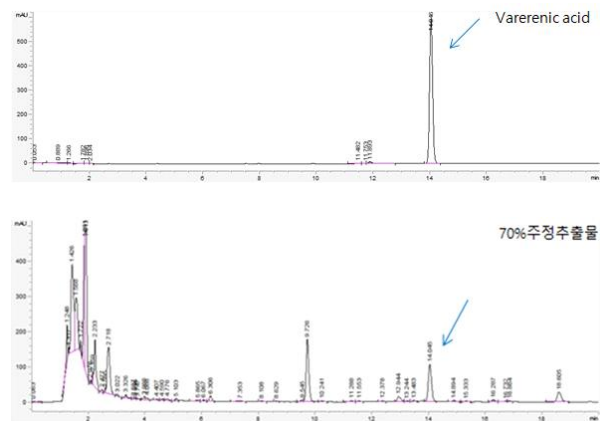


Fig. 1. Chromatogram of (A) valerenic acid standard solution, (B) valerian ethanol extract.

과 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며, 표준용액의 피크 유지시간과 길초근 추출물의 피크 유지시간이 일치하였다. 또한 Table 2와 같이 길초근 추출물(시험용액 1), 표준용액(시험용액 2) 및 길초근 추출물과 표준용액의 혼합물(시험용액 3)을 반복 측정하였을 때 각각 42.32 µg/mL, 80.76 µg/mL, 60.65 µg/mL 수준으로 기대값 대비 정확성이 98.92~100.95%로 시험용액 1, 2, 3 모두 기준(100±15%)을 만족하였고, RSD(%) 또한 0.17~0.71%로 기준인 15% 이내로 분석되었다.

2. 직선성 및 최소정량한계

10~200 µg/mL의 단계적으로 희석한 valerenic acid 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며, Fig. 2와 같

Table 2. Specificity of valerenic acid

Sample	Test	Expected concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)	Mean (µg/mL)	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Test solution 1	1		57.79				
	2	58.05 ¹⁾	58.14	57.81	0.32	0.55	99.59
	3		57.50				
Test solution 2	1		80.10				
	2	80.00 ²⁾	81.12	80.76	0.57	0.71	100.95
	3		81.05				
Test solution 3	1		69.18				
	2	69.02 ³⁾	68.89	68.66	0.67	0.98	99.47
	3		67.90				

¹⁾ Expected concentration of test solution 1: [amount of valerian root extract × average content of valerenic acid (%)] = 20,000 µg/mL × (0.2902/100) = 58.05 µg/mL.

²⁾ Expected concentration of test solution 2: concentration of standard solution = 80 µg/mL.

³⁾ Expected concentration of test solution 3: [expected concentration of test solution 1 (µg/mL) + expected concentration of test solution 2 (µg/mL)] / 2 = (58.05+80)/2 = 69.02 µg/mL.

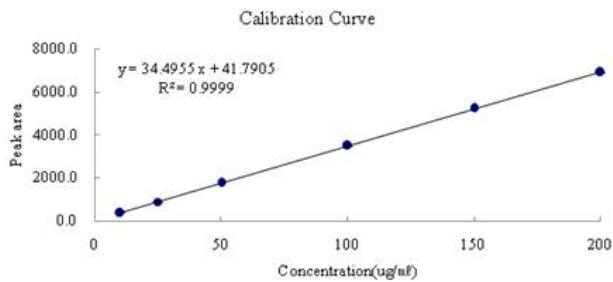


Fig. 2. Calibration curve of valerenic acid standard solution.

은 검량선을 나타내었다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9999였으며, Table 3과 같이 $98.42 \pm 1.35 \sim 101.12 \pm 0.22$ 로 나타나, 높은 직선성을 보였다. 또한, 최소 정량한계는 $10 \mu\text{g/mL}$ 수준으로 나타났다. 지표성분으로서 valerenic acid에 대한 분석 방법 벨리데이션에 대한 보고는 Gary WS(2005)와 Goppel & Franz(2004)의 연구에서 확인할 수 있었다. Gary WS(2005)는 valerenic acid 분석방법의 검증에서 R^2 은 0.9999 이상으로, Goppel & Franz(2004)는 R^2 은 0.9989로 본 연구와 유사한 수준을 보였다. 따라서 본 연구는 길초근 추출물의 표준화를 위해 설정된 지표 성분의 분석을 위한 정량한계를 검증한 것으로 충분히 활용이 가능할 것으로 사료된다.

3. 정확성, 정밀성 및 길초근 추출물 내의 valerenic acid 함량

정확성의 결과는 Table 4와 같이 valerenic acid의 inter-day 분석에서 $99.88 \pm 0.18 \sim 100.68 \pm 0.34$ 를 보였다. 정밀성의 결과

Table 3. Limit of quantitation of valerenic acid

Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
	Test 1	Test 2	Test 3				
10	9.71	9.97	9.84	9.84	0.12	1.35	98.42
25	25.25	25.09	25.13	25.16	0.08	0.33	100.64
50	50.66	50.44	50.57	50.56	0.11	0.22	101.12
100	100.59	100.32	100.54	100.48	0.14	0.14	100.48
150	150.79	150.44	150.97	150.73	0.27	0.18	100.49
200	198.93	199.39	198.85	199.06	0.29	0.15	99.53

Table 4. Inter-day accuracy of valerenic acid

Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)			Mean ($\mu\text{g/mL}$)	SD	RSD (%)	Accuracy (%)
	1 day	2 day	3 day				
30	29.92	30.13	30.10	30.05	0.11	0.38	100.16
80	80.39	80.86	80.38	80.54	0.28	0.34	100.68
160	160.06	159.86	159.49	159.80	0.29	0.18	99.88

Table 5. Precision of valerenic acid

Test	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean ($\mu\text{g/mL}$)	Mean content ¹⁾ (%)	SD	RSD (%)
1	58.30				
2	57.60				
3	58.00				
4	58.44	58.05	0.29	0.34	0.59
5	57.70				
6	58.25				

¹⁾ Mean content of valerenic acid (%): $58.05 \mu\text{g/mL} / 20,000 \mu\text{g/mL} \times 100 = 0.2902\%$.

는 Table 5와 같이 시료를 6번 반복 후 RSD 값을 분석하여 0.59%로 나타내었으며, 길초근 추출물 내의 valerenic acid의 평균 함량은 0.29%(0.2925 mg/g of extract)였다. Tania & Brian (2004)은 14종류의 길초근 제품의 valerenic acid 함량은 21~2,661 ppm으로 분석하였으며, Shoget 등(2001)은 valerenic acid 및 그 유도체가 길초근 제품에 0.01~6.32 mg/g 포함되어 있다고 보고하였고, 길초근 추출물에 함유되어 있는 valerenic acid를 기준으로 0.5 mg/kg을 mice에 경구투여하였을 때 항불안 효과를 나타내고, 이때 valerenic acid와 그 유도체인 acetoxy valerenic acid의 비율이 12:1로 함유되어 있을 때 그 효과가 가장 유의적인 것으로 나타났다(Becker 등 2014). 본 연구에서 70% 주정으로 추출한 valerenic acid의 함량은 이전에 연구된 여러 추출방법을 고려했을 때 일반적인 분석 범위

안에 포함된다는 것을 확인할 수 있다. 또한, Gary WS(2005)는 valerianic acid 분석법에 대한 연구에서 RSD는 0.2%이내로 나타났으며, retention time의 경우, Goppel & Franz 2004)는 valerianic acid는 87.55분으로 보고하였다. 본 연구에서는 valerianic acid의 retention time은 14.04분으로 나타나, 본 연구진이 설정한 분석 방법이 추출물의 성분분석에 효율적인 분석으로 생각된다.

요약 및 결론

진정 및 수면증진 효과가 알려져 있는 길초근을 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발하기 위하여 주정 추출하여 지표성분으로 valerianic acid를 설정하였으며, HPLC를 이용하여 지표성분 표준화를 위한 valerianic acid의 분석법 설정과 분석법에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 유효성 검정을 위해 특이성, 직선성, 최소검량한계, 정확성 및 정밀성을 확인하였다. 본 연구 결과, 길초근 추출물 분석 시 지표물질이 다른 물질의 간섭 없이 안정하게 분석되는 것을 확인하였으며, 표준용액과 추출물의 피크유지시간이 일치하여 특이성을 확인하였다. Valerianic acid의 검량선은 $R^2=0.9999$ 로 좋은 선형성을 보였으며, 최소정량한계는 10 µg/mL로 설정되었다. 정확성 측정 결과에서는 99.88~100.68%가 나왔고, 정밀성 측정 결과, 상대표준편차(RSD)는 0.59%였다. 그러므로 HPLC를 이용한 valerianic acid의 분석법이 길초근 주정 추출물 기능성 원료 표준화를 위한 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 시험법에 따라 분석한 길초근 주정 추출물 내의 valerianic acid의 함량은 6회 분석하였을 때 평균 0.29%가 함유되어 있었다. 따라서 본 연구를 통하여 확립된 valerianic acid의 분석법이 길초근 주정 추출물 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2014년 연구재단 중견연구지원사업(과제번호: 2014R1A2A1A11052187)의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

References

Becker A, Felgentreff F, Schroder H, Meier B, Brettstrom A. 2014. The anxiolytic effects of a valerian extract is based on valerianic acid. *BMC Complement Altern Med* 14:267

Debnath T, Park DK, Lee BR, Jin HL, Lee SY, Samad NB, Lim BO. 2013. Antioxidant activity of inonotus obliquus grown on germinated brown rice extracts. *J Food Biochem* 37:

456-464

- Donath F, Quispe S, Diefenbach K, Maurer A, Fietze I, Roots I. 2000. Critical evaluation of the effect valerian extract on sleep structure and sleep quality. *Pharmacopsychiatry* 33: 47-53
- Donovan JL, Devane CL, Chavin KD, Wang JS, Gibson BB, Gefroh HA, Markowitz JS. 2004. Multiple night-time doses of valerian (*Valeriana officinalis*) had minimal effects on CYP3A4 activity and no effect on CYP2D6 activity in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos* 32:1333-1336
- Gray WS. 2005. Use of solid phase extraction for improving HPLC assays of triterpene glycosides in gotu kola (*Centella asiatica*), parthenolide in feverfew (*Tanacetum parthenium*), and valerianic acids in valerian (*Valeriana officinalis*). *J Liq Chromatogr Relat Technol* 28:581-592
- Goppel M, Franz G. 2004. Stability control of valerian ground material and extracts: A new HPLC-method routine quantification of valerianic acids and lignans. *Pharmazie* 59:446-452
- Hintersteiner J, Haider M, Luger D, Schwarzer C, Reznicek GM, Jager W, Khom S, Mihovilovic MD, Hering S. 2014. Esters of valerianic acid as potential prodrugs. *Eur J Pharmacol* 735:123-131
- Leathwood PD, Chauffard FI. 1985. Aqueous extract of valerian reduces latency to fall asleep in man. *Planta Med* 51:144-148
- Leuschner J, Muller J, Rudmann M. 1993. Characterisation of the central nervous depressant activity of a commercially available valerian root extract. *Arzneimittelforschung* 43: 638-641
- Ross SM. 2009. Sleep disorders: A single dose administration of valerian/hops fluid extract (dormesan) is found to be effective in improving sleep. *Holist Nurs Pract* 23:253-256
- Shohet D, Wills RB, Stuart DL. 2001. Valepotriates and valerianic acids in commercial preparations of valerian available in Australia. *Pharmazie* 56:860-863
- Tania L, Brian CF. 2004. *In vitro* activity of commercial valerian root extracts against human cytochrome P450 3A4. *J Pharm Pharmaceut Sci* 7:265-273
- Yuan CS, Mehendale, Xiao YP, Aung HH, Xie JT, Ang MK. 2004. The gamma-aminobutyric acidergic effects of valerian and valerianic acid on rat brainstem neuronal activity. *Anesth Analg* 98:353-358

Received 17 November, 2017
Revised 13 December, 2017
Accepted 12 January, 2018