

페놀성 화합물을 이용한 현지초의 UPLC 다성분 동시분석 개발

김세건¹ · 라미차네 라마칸타² · 이경희² · 판데야 프라카스 라즈² · 심상연² · 정현주^{2*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부,
²원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소

Simultaneous Analysis of Phenolic Compounds in *Geranium thunbergii* Using UPLC

Se-Gun Kim¹, Ramakanta Lamichhane², Kyung-Hee Lee², Prakash Raj Pandeya²,
Sang-Yeon Shim² and Hyun-Ju Jung^{2*}

¹Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

²Department of Oriental Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute,
College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

Abstract – The aim of this study was to develop a UPLC method for simultaneous analysis of 8 phenolic compounds including gallic acid (1), protocatechuic acid (2), methyl gallate (3), ellagic acid (4), kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside (5), kaempferitrin (6), afzelin (7) and kaempferol-7-rhamnoside (8) isolated from *Geranium thunbergii* which has been traditionally used as anti-diarrheal agent. The UPLC method was optimized and validated using Halo C18 column (4.6×100 mm, 2.7 μm) consisting of MeOH and 0.1% formic acid at 260 nm in 25 minutes. In quantitative analysis of 8 compounds in MeOH extract of *G. thunbergii*, contents of 4-6 were 12.39, 20.52 and 21.45 mg/g, respectively. These compounds were measured as major phenolic compounds in *G. thunbergii* and can be useful as marker compounds for its quality control. These results suggest that the UPLC method can be contributed as basic data for quality evaluation of herbal preparations.

Keywords – *Geranium thunbergii*, UPLC, Phenolic compounds, Method validation

생약으로 사용하는 천연물은 예로부터 민간에서 임상경험을 바탕으로 질병에 대한 치료의 목적으로 사용하여 왔다. 천연물은 합성의약품에 비하여 부작용이 적으면서 장기간 복용이 가능한 장점을 가지고 있어 건강기능식품의 원료 및 의약품으로 개발되어 왔다.¹⁾

현초(*Geranium thunbergii*, 玄草)는 노관초(老鸛草) 또는 이질풀로 불리는 여러해살이풀로 지상부를 약용으로 사용하며, 한국, 대만, 일본 등 아시아에 분포하는 식물성 생약이다. 현초의 성미(性味)는 평(平)하고 고(苦)·미신(微辛)하며, 전통적으로 장염에 의한 설사, 중기, 피부병 등의 치료에 사용되어 왔다. 최근까지의 연구결과에 의하면 현초 알콜추출물은 항산화 효과, 간보호 효과, 항비만 효과, 항염 효과 등의 약리작용을 가지는 것으로 보고되었으며, 구성성분으로

는 kaempferitrin, quercetin, (-)-epicatechin, kaempferol-7-rhamnoside, brevifolin, corilagin, pyrogallol, ellagitannin, geraniin, gallic acid, protocatechuic acid 등의 페놀성 화합물이 주요성분으로 알려져 있다.²⁻⁵⁾ 다양한 생리활성을 가진 현초는 현재 식품의약품안전처의 ‘대한민국약전의 한약생약 규격집’에서 대조생약을 기준으로 TLC(thin layer chromatography)를 통하여 페놀성 화합물의 유무를 판단하는 확인 시험법만이 존재할 뿐 지표성분에 대한 기준이 규정되어 있지 않다. 현재까지 *geranium* 속(genus) 식물에 대한 성분 프로파일링 및 분석연구⁶⁻⁸⁾가 일부 보고되었지만 현초에 대한 분석법 및 지표성분 설정에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 새로운 과학적 품질평가가 필요한 실정이다. 생약의 품질관리 및 품질평가는 관능검사 및 형태학적 검사 등이 있어왔지만, 현재는 HPLC와 같은 분석기기에 의하여 지표성분의 화학적 성질에 따라 다양한 검출기(ultraviolet/visible, refractive index, mass spectrometer, evaporative

*교신저자(E-mail): hyun104@wku.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6814

light scattering 등)를 사용하여 생약 또는 생약제제의 품질 평가를 점차 쉽고 편리하게 진행해 가고 있는 실정이다.⁹⁻¹²⁾ 본 연구에서는 현초로부터 분리된 8종의 페놀성 화합물을 사용하여 기존의 HPLC보다 고성능이면서 분석시간의 단축, 용매소비를 줄일 수 있는 경제성 및 성분 분리도가 우수한 UPLC(ultra performance liquid chromatography)로 단일성분에 대한 개별적인 분석이 아닌 다성분 동시분석법을 개발하여 신속하고 정확하며 효율적인 현초의 품질관리 및 품질평가의 기준을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 현초(*G. thunbergii*)는 광주에 소재한 약업사에서 구입하여 원광대학교 정현주 교수가 감별하였으며, 식물표본(OPC 10-0306)은 원광대학교 약학대학 한약학과 표본실에 보관하였다.

시약 - 현초 구성성분의 분리는 SK chemicals(Seongnam, Korea)의 methanol, chloroform, *n*-butanol을 사용하였고, silica gel(40-63 μ m, Art. No. 9385), TLC plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Art. No. 5715)는 Merck (Kenilworth, NJ, USA)의 제품을 사용하였다. ODS-A(75 μ m

는 YMC(Kyoto, Japan)로부터 구입하였으며, NMR 측정 용매는 Cambridge Isotope Laboratories(Andover, MA, USA)의 것을 사용하였다. 분석용매 methanol과 water는 Burdik & Jackson(Muskegon, MI)의 HPLC 등급을 사용하였다.

추출 및 구성성분 분리 - 음건된 현초 9.5 kg을 60°C에서 MeOH로 3회 환류 추출한 후 감압농축하여 MeOH 추출물 973 g을 얻었다. 이 추출물을 10% MeOH에 현탁하여 CHCl₃ (242 g), *n*-BuOH(305 g) 순으로 분획하였다. *n*-BuOH 분획물 150 g에 대하여 CHCl₃-MeOH(7:1→0:1, v/v)로 silica gel column chromatography를 실시한 다음 10개의 소분획(GTB1-10)으로 나누고, GTB6에 대하여 10% MeOH를 이동상으로 사용하고 Watchers RP18 flash cartridge column (40-60 μ m, 30 g, Isu industry co., Seoul, Korea)이 장착된 medium pressure liquid chromatography(MPLC)를 이용하여 화합물 **1**(378 mg), 화합물 **2**(51 mg) 및 화합물 **3**(640 mg)을 얻었다. 화합물 **4**(2.4 g)는 GTB8-9로부터 MPLC에 RP18 flash cartridge column(40-60 μ m, 30 g)과 이동상 20% MeOH를 사용하여 분리하였다. GTB7에 대하여 MeOH-H₂O(35:65→10:0, v/v)로 ODS column chromatography를 통하여 소분획 GTB7-1과 GTB7-2로 나누고, GTB7-1에 대하여 SiO₂ flash cartridge column(40-63 μ m, 30 g)을 장착한

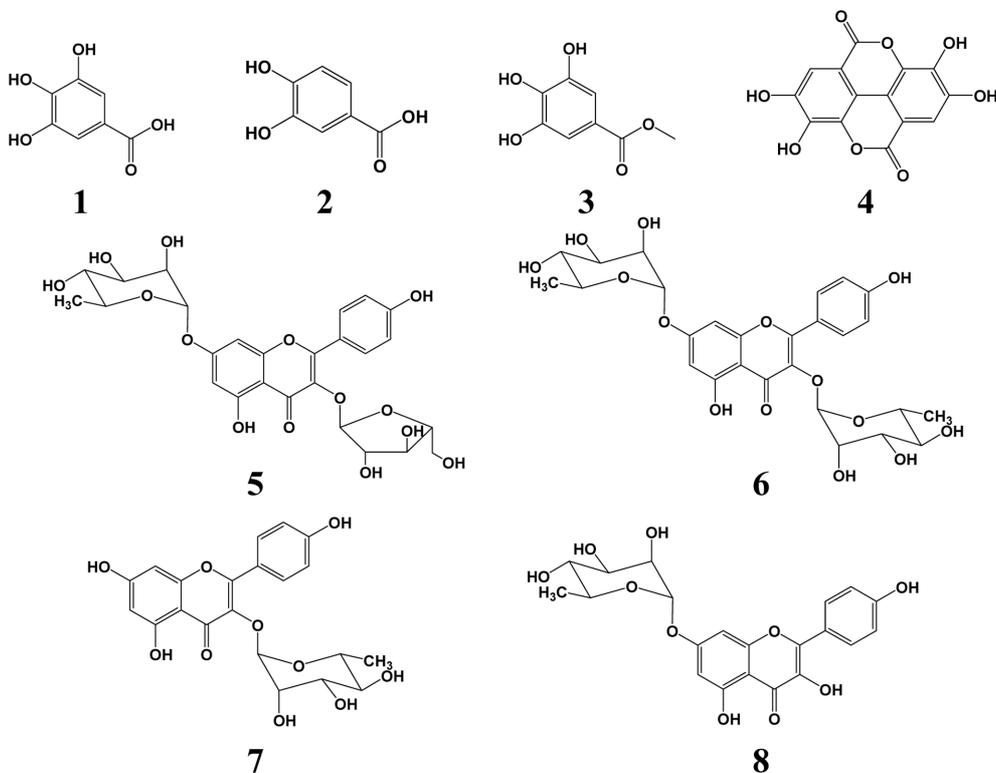


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-8 isolated from MeOH extract of *G. thunbergii*. 1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: methyl gallate, 4: ellagic acid, 5: kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside, 6: kaempferitrin, 7: afzelin, 8: kaempferol-7-rhamnoside

MPLC를 이용하여 CHCl_3 -MeOH(5:1)로 화합물 **5**(2.3 g)와 **6**(5.9 g)을 얻었으며, GTB7-2를 MPLC에 RP18 flash cartridge column(40-60 μm , 30 g)과 이동상 50% MeOH를 사용하여 화합물 **7**(57 mg)과 화합물 **8**(288 mg)를 얻었다. 현초 부탄을 분획물로부터 분리된 화합물 **1-8**은 문헌치¹³⁻¹⁶와 비교하여 그 구조를 동정하였으며 기지물질로 확인되었다(Fig. 1).

Gallic acid (1): white powder; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): δ 7.05 (2H, s, H-2, 6); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): δ 109.1 (C-2, 6), 120.6 (C-1), 138.3 (C-4), 145.1 (C-3, 5), 169.2 (C-7).

Protocatechuic acid (2): white powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 6.78 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.28 (1H, dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, H-6), 7.33 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 115.7 (C-5), 117.1 (C-2), 122.3 (C-1), 122.4 (C-6), 145.4 (C-3), 150.6 (C-4), 167.9 (C-7).

Methyl gallate (3): white powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 3.74 (3H, s, OCH_3), 6.93 (2H, s, H-2, 6); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 51.6 (OCH_3), 108.5 (C-2, 6), 119.3 (C-1), 138.4 (C-4), 145.6 (C-3, 5), 166.3 (C=O).

Ellagic acid (4): brown powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 7.45 (2H, s, H-5, 5'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 108.2 (C-1, 1'), 110.8 (C-5, 5'), 112.9 (C-6, 6'), 136.9 (C-2, 2'), 140.1 (C-3, 3'), 148.7 (C-4, 4'), 159.7 (C-7, 7').

Kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside (5): light yellow powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 1.12 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-6"), 3.25-3.33 (2H, m, H-5" and 4"), 3.43 (1H, m, H-5"), 3.56 (1H, m, H-4"), 3.64 (1H, m, H-3"), 3.74 (1H, m, H-3"), 3.84 (1H, s, H-2"), 4.17 (1H, s, H-2"), 4.66 (1H, $J=5.5$ Hz, H-5"), 5.56 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-1"), 5.65 (1H, s, H-1"), 6.45 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.84 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.90 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 8.01 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2', 6'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 17.9 (C-6"), 60.9 (C-5"), 69.8 (C-2"), 70.1 (C-5"), 70.2 (C-3"), 71.6 (C-4"), 77.1 (C-3"), 82.1 (C-2"), 86.4 (C-4"), 94.6 (C-8), 98.4 (C-1"), 99.4 (C-6), 105.6 (C-10), 108.1 (C-1"), 115.4 (C-3', 5'), 120.6 (C-1'), 130.9 (C-2', 6'), 133.71 (C-3), 155.9 (C-9), 157.3 (C-2), 160.1 (C-4'), 160.8 (C-5), 161.7 (C-7), 177.95 (C-4).

Kaempferitrin (6): light yellow powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 0.80 (3H, d, $J=5.5$ Hz, H-6"), 1.13 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-6"), 3.10-3.17 (2H, m, H-4", 5"), 3.31 (1H, m, H-4"), 3.42 (1H, m, H-5"), 3.48 (1H,

m, H-3"), 3.63 (1H, m, H-3"), 3.84 (1H, s, H-2"), 3.98 (1H, s, H-2"), 5.30 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-1"), 5.55 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-1"), 6.46 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 6.92 (2H, d, $J=9.2$ Hz, H-3', 5'), 7.79 (2H, d, $J=9.2$ Hz, H-2', 6'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 18.0 (C-6"), 18.5 (C-6"), 70.4 (C-2"), 70.6 (C-2"), 70.7 (C-5"), 70.8 (C-3"), 70.9 (C-3"), 71.2 (C-5"), 71.7 (C-4"), 72.2 (C-4"), 95.2 (C-8), 99.0 (C-1"), 100.0 (C-6), 102.4 (C-1"), 106.4 (C-10), 116.0 (C-3', 5'), 120.9 (C-1'), 131.3 (C-2', 6'), 135.1 (C-3), 156.7 (C-9), 158.4 (C-2), 160.7 (C-4'), 161.5 (C-5), 162.3 (C-7), 178.5 (C-4).

Afzelin (7): yellow powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 0.78 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-6"), 3.06 (1H, m, H-5"), 3.13 (1H, m, H-4"), 3.47 (1H, m, H-3"), 3.97 (1H, br s, H-2"), 5.29 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-1"), 6.21 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 6.91 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.75 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', 6'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 18.0 (C-6"), 70.6 (C-2"), 70.7 (C-3"), 71.2 (C-4"), 71.6 (C-5"), 94.3 (C-8), 99.3 (C-6), 102.3 (C-1"), 104.6 (C-10), 115.9 (C-3', 5'), 121.1 (C-1'), 131.2 (C-2', 6'), 134.7 (C-3), 157.1 (C-9), 157.8 (C-2), 160.6 (C-4'), 161.8 (C-5), 164.9 (C-7), 178.3 (C-4).

Kaempferol-7-rhamnoside (8): yellow powder; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz): δ 1.12 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-6"), 3.31 (1H, m, H-4"), 3.44 (1H, m, H-5"), 3.64 (1H, br s, H-3"), 3.64 (1H, br s, H-2"), 5.55 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-1"), 6.42 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-8), 6.93 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3' and 5'), 8.09 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', 6'); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 125 MHz): δ 18.5 (C-6"), 70.4 (C-2"), 70.7 (C-5"), 70.8 (C-3"), 72.2 (C-4"), 94.9 (C-8), 99.0 (C-1"), 99.4 (C-6), 105.3 (C-10), 116.0 (C-3' and 5'), 122.1 (C-1'), 130.2 (C-2', 6'), 136.6 (C-3), 148.1 (C-9), 156.3 (C-2), 159.9 (C-4'), 161.0 (C-5), 162.0 (C-7), 176.7 (C-4).

분석시료 전처리 및 UPLC 분석조건 - 현초 MeOH 추출물에 MeOH를 넣어 10 mg/mL로 만들고 초음파로 30분간 추출한 다음 0.2 μm PTFE membrane filter를 이용하여 여과한 후 분석에 사용하였다. 8종의 화합물에 대한 UPLC 분석은 diode array detector, binary pump, autosampler가 장착된 Waters(Minneapolis, MN, USA) ACQUITY UPLC I-Class를 사용하였으며 분석조건은 Table I과 같다.

분석법 검증 - 현초 내 8종의 화합물에 대한 UPLC 분석법 밸리데이션은 식품의약품안전처의 “의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인”에 따라 정량시험법 밸리데이션 파라미터인 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 정량한계(limit of quantifi-

Table I. Chromatographic conditions for compounds **1-8** in MeOH extract of *G. thunbergii*

Parameter	Condition																																	
Column	Halo C18 (4.6×100 mm, 2.7 μm, Advanced materials technology, Wilmington, DE, USA)																																	
Flow rate	1.8 mL/min																																	
Column temperature	50 °C																																	
Injection volume	4 μL																																	
Wavelength	260 nm																																	
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>MeOH (%)</th> <th>0.1% formic acid</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>1</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>3</td><td>15</td><td>85</td></tr> <tr><td>5</td><td>15</td><td>85</td></tr> <tr><td>6</td><td>22</td><td>78</td></tr> <tr><td>9</td><td>22</td><td>78</td></tr> <tr><td>13</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>18</td><td>30</td><td>70</td></tr> <tr><td>20</td><td>33</td><td>67</td></tr> <tr><td>25</td><td>60</td><td>40</td></tr> </tbody> </table>	Time (min)	MeOH (%)	0.1% formic acid	0	5	95	1	5	95	3	15	85	5	15	85	6	22	78	9	22	78	13	30	70	18	30	70	20	33	67	25	60	40
Time (min)	MeOH (%)	0.1% formic acid																																
0	5	95																																
1	5	95																																
3	15	85																																
5	15	85																																
6	22	78																																
9	22	78																																
13	30	70																																
18	30	70																																
20	33	67																																
25	60	40																																
Mobile phase																																		

cation) 및 검출한계(limit of detection, LOD)를 평가하였다. 특이성은 8종의 표준품과 시료 내 동일한 머무름 시간을 가지는 피크의 UV spectrum 패턴의 일치여부로 판단하였으

며, 직선성은 8종 표준품의 5개 구간 농도를 설정하여 상관 계수(R^2) 0.99 이상에서 평가하였다. 검출한계와 정량한계는 signal대 noise 비가 3:1과 10:1에서 각각 평가하였다. 정밀성은 직선성 범위 내에 있는 3가지 농도에서 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀도를 측정하여 상대표준차(relative standard deviation, RSD %) 10% 이내에서 정밀성을 평가하였으며,¹⁷⁾ 정확성은 8종 표준품의 3가지 농도를 첨가하여 ±15% 범위에서 회수율(recovery)로 평가하였다.¹⁷⁾

결과 및 고찰

분석조건 최적화 – 현초 MeOH 추출물로부터 분리된 8종의 페놀성 화합물 gallic acid (**1**), protocatechuic acid (**2**), methyl gallate (**3**), ellagic acid (**4**), kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside (**5**), kaempferitrin (**6**), afzelin (**7**) 및 kaempferol-7-rhamnoside (**8**)에 대한 UPLC 분석법을 최적화하고자 다양한 용매조성의 변화(pH 변화 등), 컬럼의 종류, 컬럼 온도 등을 탐색하였다(data 미제시). 그 결과, 이 동상을 MeOH와 0.1% formic acid의 혼합용매 조건과 Halo C18(4.6×100 mm, 2.7 μm) 역상컬럼에서 컬럼 오븐 온도를 50°C로 설정하였을 때, 지표성분의 양호한 피크분리도를 가지는 것으로 확인되었고, 검출파장 260 nm에서 25분 내에 모든 지표성분의 분석이 가능하였으며, **1-8**의 retention time은 각각 1.45, 2.78, 4.27, 15.07, 19.33, 19.77, 22.05, 23.82

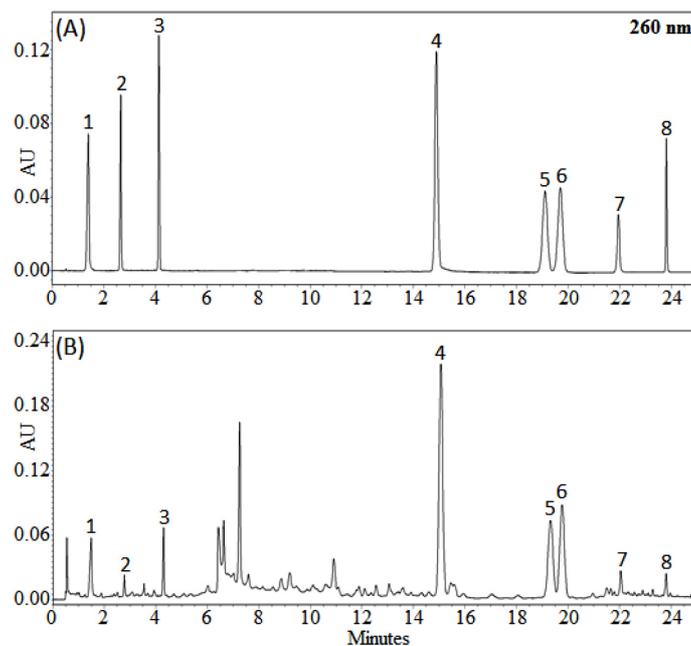


Fig. 2. UPLC chromatograms of (A) standard mixture **1-8** and (B) MeOH extract of *G. thunbergii*. **1**: gallic acid, **2**: protocatechuic acid, **3**: methyl gallate, **4**: ellagic acid, **5**: kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside, **6**: kaempferitrin, **7**: afzelin, **8**: kaempferol-7-rhamnoside.

분에 검출되었다(Fig. 2). 특히 4-6의 합은 총 피크면적의 50% 이상을 차지하는 주요성분으로 확인되었다.

특이성(Specificity) – PDA(photo diode array, 200-400 nm) 검출기로 지표성분과 시료 내 동일한 retention time을 가지는 피크의 UV spectrum을 추출하여 패턴을 비교한 결과, 동일한 UV 흡수패턴을 가지는 것으로 확인되었으며 현초 내 8종의 페놀성 화합물에 대한 UPLC 분석법은 특이성을 나타내었다(Fig. 3).

직선성(Linearity), 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification) – 화합물 1-8를 7.81-125.0, 3.91-62.50, 7.81-125.0, 15.63-250.0, 31.25-500.0, 31.25-500.0, 7.81-125.0, 7.812-125.0 µg/mL로 각각 만든 후 UPLC로 분석하여 검량선의 상관계수(R²)로 직선성을 평가하였

다. 그 결과, 화합물 8종에 대한 검량선의 상관계수는 0.99 이상으로 우수한 직선성을 나타내었으며 정량 할 수 있는 회귀방정식을 작성하였다(Table I). 화합물 8종의 검출한계와 정량한계는 0.04-0.10 µg/mL와 0.12-0.22 µg/mL로 감도가 높았으며, 미량성분도 분석이 가능함을 알 수 있었다(Table II).

정밀성(Precision) – 화합물 1-8에 대하여 직선성에 사용한 표준용액의 3가지 농도(7.81-250.0 µg/mL)를 선택하여 일내(intra day) 및 일간(inter day precision) 반복 분석의 정밀도를 평가하였다. 그 결과, 일내 및 일간 정밀도의 상대표준편차(RSD) 값은 0.06-3.96%, 0.11-3.18%로 각각 나타내어 4% 미만의 우수한 정밀성을 가지는 것으로 확인되었다(Table III).

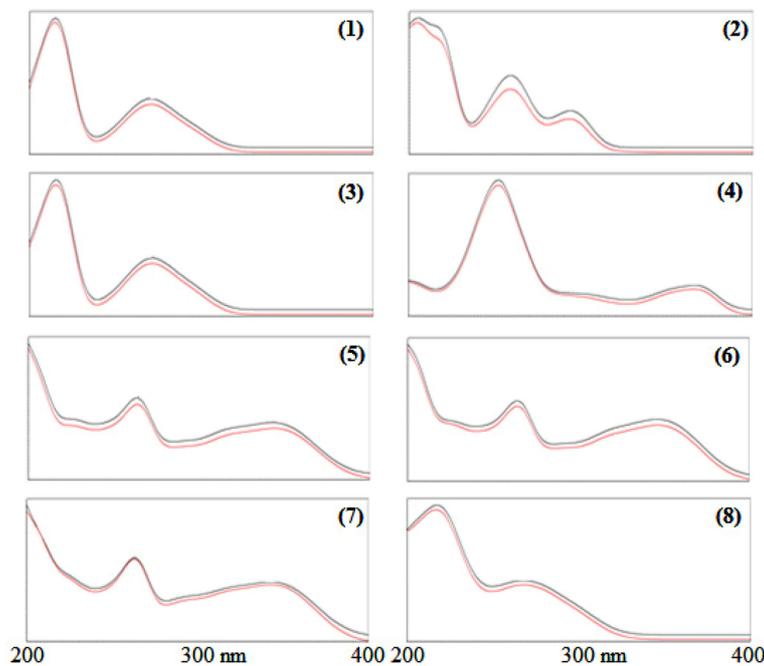


Fig. 3. UV spectra of eight standards (1-8, black curve) and MeOH extract of *G. thunbergii* (red curve).

Table II. Analyzed data of linearity regression, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for compounds 1-8

Compound	Regression equation ^a	R ^{2b}	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
1	Y = 7117.5x + 3277.9	0.9998	0.07	0.22
2	Y = 12074.8x + 7734.1	0.9995	0.04	0.12
3	Y = 7167.6x + 16160.5	0.9994	0.05	0.16
4	Y = 17932.3x - 7141.2	0.9999	0.04	0.12
5	Y = 4869.5x + 34389.9	0.9997	0.10	0.22
6	Y = 5248.7x + 25688.5	0.9996	0.07	0.22
7	Y = 7603.5x + 301.6	0.9996	0.06	0.19
8	Y = 6743.6x + 3332.8	0.9999	0.04	0.12

^aY: peak area, x: sample concentration (µg/mL); ^bR²: correlation coefficient

Table III. Precision data of compounds **1-8** in different concentrations

Compound	Conc. ^a ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day		Inter-day	
		Mean \pm SD	RSD ^b (%)	Mean \pm SD	RSD (%)
1	15.63	15.68 \pm 0.08	0.51	15.90 \pm 0.05	0.34
	31.25	31.30 \pm 0.33	1.04	31.84 \pm 0.39	1.22
	62.50	62.80 \pm 1.10	1.75	62.90 \pm 0.26	0.42
2	7.81	7.91 \pm 0.09	1.18	7.88 \pm 0.03	0.41
	15.63	15.81 \pm 0.14	0.86	15.11 \pm 0.02	0.11
	31.25	31.55 \pm 0.67	2.13	31.08 \pm 0.16	0.53
3	15.63	15.99 \pm 0.23	1.45	16.01 \pm 0.17	1.08
	31.25	31.58 \pm 0.36	1.15	30.99 \pm 0.53	1.71
	62.50	62.90 \pm 0.18	0.28	62.31 \pm 0.16	0.26
4	31.25	31.12 \pm 1.17	3.77	31.56 \pm 1.00	3.18
	62.50	62.20 \pm 1.68	2.70	62.14 \pm 1.47	2.37
	125.0	124.6 \pm 0.16	0.13	124.8 \pm 0.70	0.56
5	62.50	62.90 \pm 1.16	1.85	62.80 \pm 0.63	1.00
	125.0	124.8 \pm 1.27	1.02	125.4 \pm 0.54	0.43
	250.0	249.1 \pm 5.83	2.34	250.9 \pm 5.32	2.12
6	31.25	31.81 \pm 0.44	1.39	31.11 \pm 0.51	1.64
	62.50	63.00 \pm 0.35	0.56	62.91 \pm 0.62	0.99
	125.0	124.1 \pm 0.83	0.67	125.8 \pm 1.84	1.46
7	7.81	7.78 \pm 0.26	3.34	7.99 \pm 0.18	2.25
	15.63	15.11 \pm 0.53	3.51	15.87 \pm 0.18	1.11
	31.25	31.01 \pm 0.02	0.06	31.88 \pm 0.06	0.19
8	7.81	7.79 \pm 0.03	0.44	7.82 \pm 0.02	0.20
	15.63	15.10 \pm 0.22	1.46	15.90 \pm 0.21	1.34
	31.25	31.44 \pm 1.25	3.96	31.99 \pm 0.87	2.73

^aConc.: concentration, ^bRSD: relative standard deviation

정확성(Accuracy) – 현초 MeOH 추출물에 화합물 **1-8**를 7.81-250.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 3가지 농도를 선택하여 첨가한 후 실험결과의 참값에 근접한 정도를 측정하기 위하여 회수율(Recovery)로 정확성을 평가하였다. 그 결과, 화합물 8종에 대한 회수율의 범위는 96.72%에서 104.18%로 나타났으며 화합물 **5**(kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside)의 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가하였을 때 참값에 가장 근접한 100.07%의 회수율을 보였고 전체적으로 5% 이내의 우수한 정확도를 나타내었다(Table IV).

함량평가 – 본 연구에서는 현초의 주요성분으로 알려진 페놀성 화합물의 프로파일 작성 및 품질평가를 위한 다성분 동시분석법을 개발하고자 하였다. 현초 MeOH 추출물로부터 단리된 8종의 화합물을 이용하여 UPLC 다성분 동시 분석법을 최적화였고 밸리데이션을 통하여 분석법에 대한 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성을 확인하였다. 확립된 분석법

을 적용하여 현초 MeOH 추출물 내 화합물 **1-8**의 함량분석 결과(Table V), **5**(kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside) 및 **6**(kaempferitrin)이 현초 MeOH 추출물 내 각각 20.52, 21.45 mg/g로 가장 많은 함유량을 가지는 플라보노이드 계열 물질이었으며 **4**(ellagic acid)는 12.39 mg/g로 탄닌 계열의 주요물질로 확인되었다. 화합물 **4-6**은 현초 MeOH 추출물 내 5%이상 차지하는 주요성분으로 확인되었으며 이외의 화합물 5종은 1% 미만의 함유량을 나타내어 3종의 화합물이 페놀성 화합물의 주요 성분임이 확인되었다. 생약의 품질관리 기준 물질은 기능성 성분 또는 주성분을 지표물질로 설정하는데, 본 분석결과를 통하여 8종의 페놀성 화합물 중 화합물 **4-6**은 현초 품질관리 및 이를 이용한 생약제제의 품질평가를 위한 주요 지표물질로 설정 가능함을 알 수 있었으며 시중에 유통되는 국산 및 수입산 현초에 대한 추가 분석연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table IV. Recovery data of compounds **1-8** in different concentrations

Compound	Spiked amount ($\mu\text{g/mL}$)	Measured amount ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	RSD (%)
1	15.63	15.47 \pm 0.18	98.96	1.18
	31.25	32.53 \pm 0.75	104.09	2.31
	62.50	63.46 \pm 1.05	101.53	1.66
2	7.81	8.02 \pm 0.11	102.69	1.38
	15.63	16.08 \pm 0.08	102.88	0.52
	31.25	32.07 \pm 0.58	102.61	1.82
3	15.63	16.12 \pm 0.34	103.12	2.08
	31.25	32.02 \pm 0.92	102.46	2.86
	62.50	63.41 \pm 1.02	101.45	1.61
4	31.25	30.63 \pm 1.23	98.00	4.01
	62.50	60.59 \pm 1.96	96.94	3.23
	125.00	125.36 \pm 2.98	100.29	2.38
5	62.50	62.54 \pm 1.29	100.07	2.07
	125.00	130.23 \pm 0.98	104.18	0.75
	250.00	252.35 \pm 3.53	100.94	1.40
6	31.25	30.23 \pm 0.75	96.72	2.48
	62.50	61.65 \pm 0.37	98.64	0.60
	125.00	127.15 \pm 0.89	101.72	0.70
7	7.81	7.98 \pm 0.22	102.22	2.74
	15.63	16.16 \pm 0.22	103.36	1.34
	31.25	31.80 \pm 0.48	101.75	1.50
8	7.81	7.68 \pm 0.08	98.38	1.03
	15.63	15.50 \pm 0.42	99.20	2.68
	31.25	32.18 \pm 1.26	102.98	3.91

Recovery (%) = (spiked amount \times 100)/measured amount

Table V. Contents of compounds **1-8** in MeOH extract of *G. thunbergii*

Compound	Content (mg/g of extract)	RSD (%)
1	3.85 \pm 0.10	2.72
2	0.51 \pm 0.02	3.18
3	3.88 \pm 0.06	1.57
4	12.39 \pm 0.11	0.86
5	20.52 \pm 0.42	2.05
6	21.45 \pm 0.29	1.34
7	1.38 \pm 0.02	1.61
8	1.22 \pm 0.02	1.24

ellagic acid(**4**), kaempferol-3-arabinofranosyl-7-rhamnoside (**5**), kaempferitrin (**6**), afzelin (**7**), kaempferol-7-rhamnoside (**8**) 등 8종의 화합물에 대한 프로파일 작성 및 다성분 동시 분석법을 Halo C18 (4.6 \times 100 mm, 2.7 μm)컬럼, 0.1% formic acid가 함유된 water와 MeOH을 이동상으로 하여 최적화 및 분석법을 검증하였다. 화합물 **4-6**은 현초 MeOH 추출물에 존재하는 주요물질로 확인되었으며 현초의 품질관리를 위한 지표물질로 설정 가능함을 알 수 있었다. 이러한 분석결과는 한약재 및 생약제제에 대한 품질평가를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2015년도 정부(미래부)의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2015M3A9A5031098).

결 론

UPLC를 이용하여 현초 MeOH 추출물 내 페놀성 화합물 gallic acid (**1**), protocatechuic acid (**2**), methyl gallate (**3**),

인용문헌

1. Sung, M. S., Jung, H. Y., Choi, J. H. Lee, S. C. Choi, B. H. and Park, S.S. (2014) Preparation of functional healthy drinks by *Acanthopanax senticosus* extracts. *J. Life. Sci.* **24**: 959-966.
 2. Liu, Q. H., Jeong, J. E., Choi, E. J., Moon, Y. H. and Woo, E. R. (2006) A new furofuran lignan from *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. *Arch. Pharm. Res.* **29**: 1109-1113.
 3. Pokharel, Y. R., Liu, Q. H., Oh, J. W., Woo, E. R. and Kang, K. W. (2007) 4-Hydroxy-kobusin inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1097-1101.
 4. Takuo, O., Takashi, Y. and Kazuko. M. (1975) Brevifolin, corilagin and other phenols from *Geranium thunbergii*. *Phytochemistry* **14**: 1877-1878.
 5. Takuo, O., Kazuko, M., Kaoru, S. and Tsutomu, H. (1979) Constituents of *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc.: VII. High-Performance reversed-phase liquid chromatography of hydrolysable tannins and related polyphenols. *J. Chromatogr. A.* **171**: 313-320.
 6. Wu, Q. Y., Zhou, Y., Jin, X., Guan, Y., Xu, M. and Liu, L. F. (2011) Chromatographic fingerprint and the simultaneous determination of five bioactive components of *Geranium carolinianum* L. water extract by high performance liquid chromatography. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 8740-8749.
 7. Li, F., Jin, X., Yao, L., Dong, C. X., Gong, Y. J. and Liu, L. F. (2010) Study on the dynamic variation of active components in *Geranium carolinianum* from different collection time. *Zhong Yao Cai* **33**: 1545-1548.
 8. Liu, D., Su, Z., Wang, C., Gu, M. and Xing, S. (2010) Separation and purification of hydrolyzable tannin from *Geranium wilfordii* Maxim by reversed-phase and normal-phase high-speed counter-current chromatography. *J. Sep. Sci.* **33**: 2266-2271.
 9. Kim, O. S., Seo, C. S. and Shin, H. K. (2013) Simultaneous determination of Gumiganghwal-tang and its anti-atherosclerotic effect. *Kor. J. Orient. Pre. Med. Soc.* **17**: 165-176.
 10. Seo, C. S., Kim, O. S. and Shin, H. K. (2014) Quantitative determination and antioxidant effects of Cheonwangbosimdan. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**: 300-314.
 11. Kwon, Y. J., Jang, G. C., Rha, H. H., Kim, Y. H. and Rhee, M. S. (2005) The study of sugar analysis in licorice extract by HPLC. *J. Kor. Soc. Tobacco. Sci.* **27**: 114-119.
 12. Ko, J., Lee, M. S., Kwak, B. M., Ahn, J. H., Park, J. S. and Kwon, J. H. (2013) Determination of isomaltooligosaccharides in yoghurts by using HPLC-ELSD. *Korean. J. Food. Sci. An.* **33**: 417-424.
 13. Choi, S. J., Kim, J. K., Jang, J. M. and Lim, S. S. (2012) Inhibitory effect of the phenolic compounds from *Geranium thunbergii* on rat lens aldose reductase and galactitol formation. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **20**: 222-230
 14. Youn, K. and Jun, M. (2013) *In vitro* BACE1 inhibitory activity of geraniin and corilagin from *Geranium thunbergii*. *Planta Med.* **79**: 1038-1042.
 15. Sohretoqlu, D., Sabuncuoqlu, S. A., Sakar, M. K., Ozgunes, H. and Sterner, O. (2010) Antioxidant effects of secondary metabolites from *Geranium psilostemon*. *Nat. Prod. Commun.* **5**: 899-902.
 16. Lu, C. H., Li, Y. Y., Li, L. J., Liang, L. Y. and Shen, Y. M. (2012) Anti-inflammatory activities of fractions from *Geranium nepalense* and related polyphenols. *Drug Discov. Ther.* **6**: 194-197.
 17. Kim, Y., Han, S. H., Jeon, J. Y., Hwang, M. H., Im, Y. J., Lee, S. Y., Chae, S. W. and Kim, M. G. (2013) Validation of LC-MS/MS method for determination of ginsenoside Rg1 in human plasma. *Anal. Sci. Technol.* **26**: 221-227.
- (2018. 1. 15 접수; 2018. 2. 12 심사; 2018. 2. 23 게재확정)