

## 생물전환을 통한 음나무발효물의 지표성분 설정 및 동시분석법 검증

장원희 · 이화영\* · 이봉진\*\* · 김진만\*\* · †박선주\*

(주)에스티알바이오텍 중앙연구소 연구원, \*(주)에스티알바이오텍 중앙연구소 선임연구원,  
\*\*(주)에스티알바이오텍 중앙연구소 책임연구원

### Validation of Simultaneous Analysis Method of Standard Compounds in Fermented *Kalopanax pictus* Nakai by Bioconversion

Won Hui Jang, Wha Young Lee\*, Bong Jin Lee\*\*, Jean Man Kim\*\* and †Seon Ju Park\*

Researcher, R&D Center, STR Biotech Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea

\*Junior Researcher, R&D Center, STR Biotech Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea

\*\*Senior Researcher, R&D Center, STR Biotech Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea

#### Abstract

The aim of this study was to select compounds for the standardization of fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F), to develop the analysis method using HPLC-PDA and to perform method validation. KP-F is a fermented powder developed to improve the original physiological activities and create a new functionality. Eleutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol were selected as the standard compounds and developed our own method for simultaneous analysis. The analyte was isolated using C18 column with a gradient elution of 0.05 M phosphoric acid in water and methanol as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min and detected at 210 nm. As a result, all standard compounds showed good linearity with an  $R^2$  (coefficient of correlation) of 1.000 and for the limit of detection range of 0.710~0.831  $\mu\text{g/mL}$ , and the limit of quantification as 2.150~2.520  $\mu\text{g/mL}$ . The precision was RSD (%) of less than 4.80%, while the accuracy was 4.70%>RSD (%) for the range 102.44~110.48%. In conclusion, the developed analysis method is suitable for the detection of Eleutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol in KP-F.

Key words: *Kalopanax pictus*, eleutheroside E, acanthoside B, syringaresinol, method validation

#### 서론

음나무(*Kalopanax pictus* Nakai)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 식물로 엄나무, 개두릅나무라고도 하며, 중국, 일본 및 한국에 널리 분포하고 있다. 우리나라에서는 음나무의 새순을 개두릅이라 하여 식용하고 있으며, 음나무의 줄기껍질을 해동피라 하여 한방에서 진통, 류머티즘에 의한 근육마비, 근육통, 관절염 등에 약용하였으며, 다른 약재와 배합하여 신선평단, 해동피산 등의 약제로 사용되었다. 또한, 음나무의 효능은 향균(Kim 등 1998), 항염증(Li 등 2002), 항산화(Choi

등 2002), 항종양(Park 등 2001) 등으로 다수의 논문을 통해 보고되었으며, 성분은 Triterpenoid Saponin인 Kalopanaxsaponin A-G(Lee 등 1989; Shao 등 1989; Sun 등 1990; Sano 등 1991) Lignan인 Eleutheroside E, Acanthoside B, Pinoresinol, Pinoresinol O- $\beta$ -D-glucopyranoside, Pinoresinol di-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 등(Quang 등 2011) 및 Phenol성 화합물이 분리되었다고 보고되었다.

생물전환(Bioconversion)이란 생체전환(Biotransformation), 생물공정(Bioprocessing)과 유사 의미로 사용되며(Cho 등 2011), 미생물발효 및 효소처리 등의 생물학적 방법을 통해 천연물

† Corresponding author: Seon Ju Park, Junior Researcher, R&D Center, STR Biotech Co. Ltd., Chuncheon 24232, Korea. Tel: +82-33-258-6327, Fax: +82-33-258-6332, E-mail: coco4649@strbiotech.co.kr

중 생리활성물질의 구조적 변화를 이끌어 배당체를 비배당체로 전환하여 흡수율 개선, 신규 기능성 생성, 유효성분의 함량 증가에 의한 기존 기능성 증진을 유도하는 기술을 말한다. 천연물 중 생리활성물질은 대부분 배당체로 존재하며, 소장이나 대장 내 미생물에 의해 비배당체로 분해되어 흡수되지만, 분해되지 못한 성분들은 흡수되지 못하고 체외로 배출된다. 배당체의 체내흡수율은 결합 당의 종류, 결합위치에 따라 다르며, 배당체에 비해 비배당체가 체내흡수에 용이하고 효과적인 생리활성을 보인다(Ko & Ahn 2007). 배당체를 보다 체내흡수율이 높으며, 활성이 뛰어난 비배당체로 전환시켜 음나무 고유의 기능성을 증진시키고, 신규 기능성을 창출하고자 생물전환공정을 통하여 제조된 음나무발효물(KP-F)을 건강기능식품 개별인정형 기능성 원료로 표준화하기 위해서는 지표성분 선정 및 분석법 검증이 필요하다(Jo 등 2018). 표준화란 물리적, 화학적, 미생물학적 관리 및 기능성을 관리할 수 있는 지표를 설정하여 관리하는 것으로 천연물 내 고유성분의 변동을 최소화하여 품질유지를 일정화하기 위해 원재료의 생산 및 제조의 전체 과정에 사용된 기술과 정보를 관리하는 것을 말한다.

따라서 본 연구에서는 생물전환을 통해 생산된 음나무발효물을 기능성 원료로 개발하기 위해 전환물질 탐색, 생물전환공정 진행 시간에 따른 전환물질 함량 확인, 원산지별 음나무 및 음나무발효물에서의 지표성분 후보물질의 함량 확인을 통하여 음나무발효물의 표준화가 용이한 지표성분을 선정하였으며, HPLC-PDA를 이용한 동시분석법 설정과 함께 설정된 분석법의 검증을 위해 밸리데이션을 실시하여 확립된 분석 방법의 타당성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 시약

본 연구에 사용된 음나무 수피는 다우리 & 영찬물산(Jecheon, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 음나무발효물은 음나무 수피를 (주)에스티알바이오텍에서 자체적으로 개발한 생물전환공정을 이용하여 제조되었다. 음나무 수피를 건조한 후 분말화하여 액상에서 amylase 효소처리 후 살균공정을 거쳐 배양배지화한 음나무 수피의 액상배지에 표고버섯 균사를 접종하여 생물전환 발효공정의 수행 및 섬유소분해효소를 처리하는 생물전환 효소처리공정 후 90°C에서의 열수추출공정과 동결건조 분말화 공정을 거쳐 음나무발효물을 수득하였다(Lee 등 2017).

실험에 사용된 표준물질은 Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol, Kalopanaxsaponin A( $\alpha$ -Hederin)는 Chemfaces에서, Kalopanaxsaponin B는 식품의약품안전처에서 구매하여 사

용하였으며, 분석에 사용한 시약 Phosphoric acid, Formic acid, Water, Methanol, Ethanol, Acetonitrile은 모두 HPLC 등급을 사용하였다.

### 2. 시료 제조

Kalopanaxsaponin 분석을 위해서 50 mL 용량플라스크에 음나무발효물(KP-F) 0.5 g을 넣은 뒤 MeOH을 사용하여 정용하고 60분간 초음파 추출한 후, 10분간 상온 방냉하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하였으며, Lignan 배당체 분석을 위해서 50 mL 용량플라스크에 음나무발효물(KP-F) 0.5 g을 넣은 뒤 70% EtOH를 사용하여 정용하고 60분간 초음파 추출한 후, 10분간 상온 방냉하여 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하였다.

### 3. Kalopanaxsaponin 분석

분석기기는 Shimadzu HPLC system과 SPD-M20A Diode Array Detector(Shimadzu)를 사용하였으며, 분석 column은 Mightysil RP-18 GP(250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Kanto Chemical Co.)을 사용하였다. 이동상은 0.01% Formic acid/water (A)와 0.001% Formic acid/90% ACN/water(B)를 사용하였고, 이동상의 조건은 0분; B29%, 3분; B29%, 14분; B38%, 15분; B38%, 30분; B57%, 37분; B57%, 38분; B70%, 43분; B70%, 44분; B29%, 55분; B29%로 설정하여 분석하였다. 유속은 분당 1.0 mL, 컬럼 오븐의 온도는 35°C, 검출파장은 210 nm를 사용하였으며, 시료의 주입량은 20  $\mu$ L로 하였다.

### 4. Lignan 배당체 분석

분석기와 분석 column은 Kalopanaxsaponin 분석 시 사용된 장비와 동일하며, 이동상은 0.05 M Phosphoric acid/ water (A)와 MeOH(B)를 사용하였고, 이동상의 조건은 0분; B20%, 40분; B73%, 45분; B100%, 55분; B 100%, 56분; B20%, 65분; B20%로 설정하여 분석하였다. 유속은 분당 1.0 mL 컬럼 오븐의 온도는 25°C, 검출파장은 210 nm를 사용하였으며, 시료의 주입량은 10  $\mu$ L로 하였다.

### 5. 분석법 검증(Method validation)

HPLC-PDA를 이용한 분석방법의 유효성을 검증하기 위해 특이성, 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ), 정밀성 및 정확성을 측정하였다. 특이성은 음나무발효물의 추출물로부터 표준물질이 선택적으로 정확하게 분리되는 것을 확인하였으며, 시료와 표준물질의 chromatogram상 UV spectrum을 비교하여 평가하였다. 직선성은 표준물질 혼합액을 100, 50, 25, 12.5, 62.5, 3.13, 1.56  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 분석 후 얻은 결과를 바탕으로 검량선(Calibration curve)을 작성하여 회귀

방정식(Regression equation) 및 상관계수( $R^2$ )를 구하여 평가하였다. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법에 근거하여 검량 및 정량 가능한 최저농도를 확인하였으며, 검출한계는 3.3×y절편의 표준편차/검량선의 기울기, 정량한계는 10×y절편의 표준편차/검량선의 기울기 식을 이용하여 산출하였다. 정밀성은 피크의 적분 값을 비교하는 방법으로 측정하였으며, 하나의 균일한 시료로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건으로 6회 반복 전처리하여 분석하였고, 1반복 분석당 3회 injection한 후 분석을 통해 산출된 값으로 상대표준편차(RSD%)를 구하여 평가하였다. 정밀성은 음나무발효물(KP-F)에 표준물질 혼합물을 첨가하여 HPLC로 분석하였다. 시료를 6회 반복 전처리하고, 3회 injection하여 총 18회 반복 주입의 가변성을 측정하여 얻어진 피크의 적분 값을 통해 회수율을 구하여 정확성을 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 생물전환공정에 의한 음나무발효물(KP-F)에서의 전환 물질 탐색을 통한 지표성분 후보군 설정

음나무와 생물전환공정에 의해 제조된 음나무발효물(KP-F)에서의 지표성분 함량 차이를 확인하기 위해 HPLC-PDA 분석을 이용하여 분석하였다.

Fig. 1에서 Kalopanaxsaponin 분석법에 의해 분석된 음나무의 15분대 peak B의 area가 음나무발효물에서 줄어들며, 35분대 peak A의 area가 증가하는 것을 확인하였으며, Fig. 2에서 Lignan 배당체 분석법에 의해 분석된 음나무의 19분대 peak E의 area가 음나무발효물에서 줄어들며, 23분대 peak B area

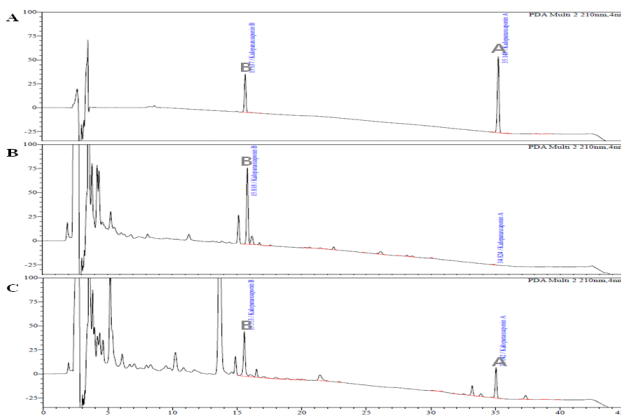


Fig. 1. Chromatogram of (A) standards mixture of Kalopanaxsaponin B and Kalopanaxsaponin A, (B) *Kalopanax pictus* Nakai(KP), (C) Fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F). Peak B is Kalopanaxsaponin B and peak A is Kalopanaxsaponin A.

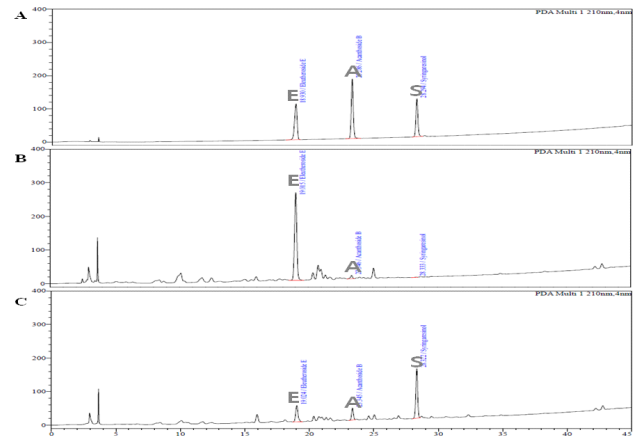


Fig. 2. Chromatogram of (A) standards mixture of Eleutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol, (B) *Kalopanax pictus* Nakai (KP), (C) Fermented *Kalopanax pictus* (KP-F). Peak E is Eleutheroside E, peak A is Acanthoside B and peak S is Syringaresinol.

가 늘어나고, 28분대 peak S가 새로 생기는 것을 확인하였다.

이는 음나무 화합물 중 배당체 화합물이 생물전환공정을 통해 당 분자를 잃으며 나타난 현상으로 예상하여 음나무 대표 배당체 화합물을 이용하여 확인한 결과, 음나무의 Kalopanaxsaponin B(Fig. 1-peak B)의 일부가 생물전환공정을 통해 음나무 발효물에서 Kalopanaxsaponin A(Fig. 1-peak A)로 전환되는 것을 관찰할 수 있었으며, 음나무의 Eleutheroside E(Fig. 2-peak E)가 생물전환공정을 통해 Acanthoside B(Fig. 2-peak A)와 Syringaresinol(Fig. 2-peak S)으로 전환되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 음나무발효물의 지표성분 후보군으로 Kalopanaxsaponin B, Kalopanaxsaponin A, Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol로 설정하였다(Fig. 3).

### 2. 생물전환공정 진행 시간에 따른 음나무의 배당체 함량 변화

생물전환공정을 통해 생산된 음나무발효물을 HPLC로 분석한 결과, 배양시간에 따른 음나무의 Kalopanaxsaponin 및 Lignan 배당체의 함량변화는 Table 1과 같다.

Kalopanaxsaponin B가 배양 전 11.399 mg/g에서 배양시간이 경과함에 따라 함량이 꾸준히 감소하여 배양 50시간 후에 4.703 mg/g이 되었으며, Kalopanaxsaponin A는 배양 전 0.044 mg/g에서 배양 47시간 후에 2.232 mg/g으로 증가하여 Kalopanaxsaponin B가 Kalopanaxsaponin A로 전환되는 것을 확인할 수 있었다.

Eleutheroside E가 배양 전 3.820 mg/g에서 배양시간이 경과함에 따라 함량이 꾸준히 감소하여 배양 50시간 후에 0.554 mg/g이 되었으며, Acanthoside B는 배양 전 0.158 mg/g에서 배

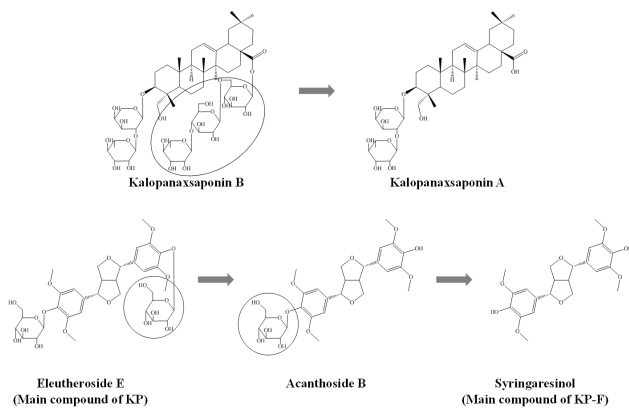


Fig. 3. Compound structures of *Kalopanax pictus* Nakai (KP) converted through Bioconversion.

양 32시간까지 함량이 증가하여 0.779 mg/g이 되었으나, 32시간 후부터 감소하여 50시간에 0.326 mg/g이 되는 것으로 나타났다. 그러나 Syringaresinol은 배양시간이 경과함에 따라 초기 함량 0 mg/g에서 배양 50시간 후 3.947 mg/g으로 증가하여 Eleutheroside E가 Acanthoside B를 거쳐 최종적으로 Syringaresinol로 전환되는 것을 확인할 수 있었다.

3. 원산지별 음나무 및 생물전환공정에 의한 음나무발효물(KP-F)에서의 배당체 함량 조사

음나무발효물의 표준화를 위해 원산지에 따른 21개 시료의 음나무 및 음나무발효물에서 지표성분 후보군의 함량을 HPLC-PDA 분석을 통해 조사하였다(Fig. 4).

음나무의 Kalopanaxsaponin B, Kalopanaxsaponin A, Eleuthero-

Table 1. Content of Kalopanaxsaponins and Lignan glycosides in fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F)

Fermentation time (hr)	Kalopanaxsaponin B (mg/g)	Kalopanaxsaponin A (mg/g)	Eleutheroside E (mg/g)	Acanthoside B (mg/g)	Syringaresinol (mg/g)
0	11.399	0.044	3.820	0.158	0.000
8	8.772	0.952	2.555	0.698	0.338
23	6.744	1.488	2.430	0.747	0.383
32	6.197	1.724	1.474	0.779	1.690
47	5.158	2.286	0.624	0.350	3.601
50	4.703	2.232	0.554	0.326	3.947

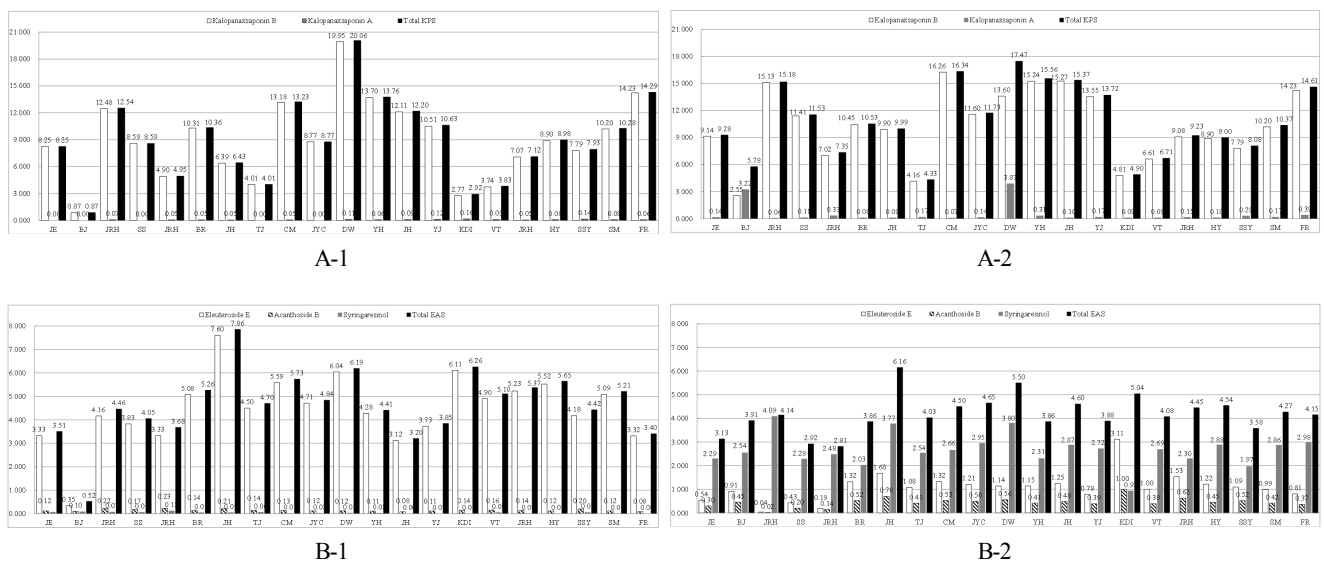


Fig. 4. Content graph of (A-1) Kalopanaxsaponin B and Kalopanaxsaponin A in *Kalopanax pictus* Nakai (KP), (A-2) Kalopanaxsaponin B and Kalopanaxsaponin A in fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F), (B-1) Eelutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol in *Kalopanax pictus* Nakai (KP), (B-2) Eelutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol in fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F).

side E, Acanthoside B, Syringaresinol의 평균 함량은 각각 8.648 mg/g, 0.061 mg/g, 4.475 mg/g, 0.140 mg/g, 0.035 mg/g으로 측정되었으며, 음나무발효물의 Kalopanaxsaponin B, Kalopanaxsaponin A, Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol의 평균 함량은 각각 9.921 mg/g, 0.465 mg/g, 1.085 mg/g, 0.446 mg/g, 2.662 mg/g으로 확인되었다.

Kalopanaxsaponin의 경우, 생물전환공정에 의해 전환이 쉽게 일어나지 않으며, 원산지에 따른 지표성분의 함량 차이가 크게 나타난 반면, Lignan 배당체의 경우 생물전환공정에 의해 전환이 쉽게 일어나며, 원산지에 상관없이 지표성분의 함량 차이가 작게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

이에 음나무발효물의 표준화를 위한 지표성분으로는 비교적 원산지 구분없이 함량 차이가 작게 나타나는 Eleutheroside E(E)와 함께 생물전환공정에 의해 쉽게 전환이 이루어지는 Acanthoside B(A) 및 Syringaresinol(S)를 모두 포함하여 Total EAS의 합을 선정하였다.

#### 4. 특이성

Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol이 선택적으로 정확하게 검출되기 위하여 190 nm에서 400 nm까지 흡광도를 측정하여 최대흡수파장을 분석하였다. 그 결과, 세 가지 지표성분을 동시 분석하기 위해 검출파장을 210 nm로 설정하는 것이 적절하며, Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol의 표준물질과 시료의 UV spectrum이 일치하였다(Fig. 5). 세 가지 지표성분은 다른 성분의 간섭 없이 우수한 분리능을 보였고, retention time은 Eleutheroside E가 19.166분, Acanthoside B가 23.487분, Syringaresinol이 28.479분으로, 표준물질과 일치하여 특이성을 확인하였다(Fig. 6).

#### 5. 직선성 및 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)

표준물질을 1.56-100 µg/mL의 농도범위에서 분석하여 면적 대 농도비로 검량선을 얻었고, 회귀방정식과 상관계수( $R^2$ )를 산출하였다. 그 결과, 회귀방정식은 Eleutheroside E가  $y=57,676.446x+29,534.798$ , Acanthoside B이  $y=58,825.183x+34,409.353$ , Syringaresinol이  $y=81,719.531x+63,029.672$ 로 확인되었으며, 세 가지 표준물질 모두  $R^2 \leq 0.999$ 로 우수한 직선성을 나타내었다. 직선성을 나타내는 범위 내에서 검출한계는 Eleutheroside E가 0.773 µg/mL, Acanthoside B이 0.710 µg/mL, Syringaresinol이 0.831 µg/mL로 나타났으며, 정량한계는 Eleutheroside E가 2.341 µg/mL, Acanthoside B가 2.150 µg/mL, Syringaresinol이 2.520 µg/mL로 확인되었다(Table 2).

#### 6. 정밀성

실험실내 정밀성을 통하여 실험자간의 근접성을 확인하였다. 두 명의 실험자가 균일한 시료를 6회 반복 전처리하여 산

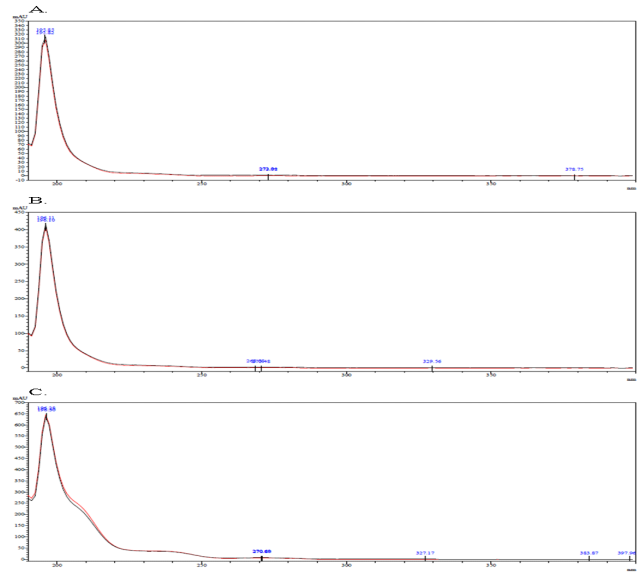


Fig. 5. UV spectrum of (A) Eleutheroside E, (B) Acanthoside B, and (C) Syringaresinol. Red lines are UV spectrum of standard compounds, and black lines are UV spectrum of candidate compounds that same retention time as standards in fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F).

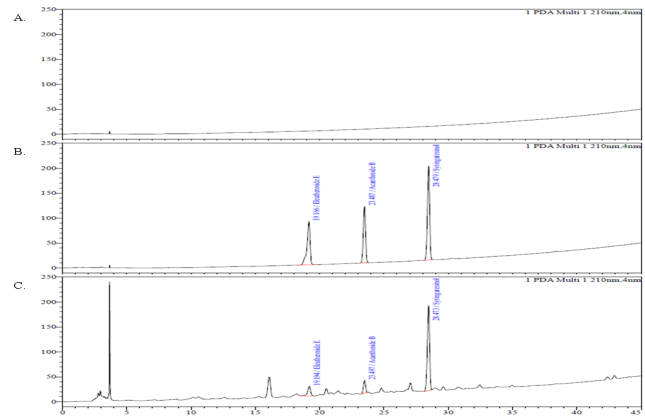


Fig. 6. Chromatogram of (A) Blank (70% EtOH), (B) Standards mixture of Eleutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol, (C) Fermented *Kalopanax pictus* (KP-F).

출된 값으로 상대표준편차(RSD%)를 나타내어 정밀성을 확인하였다. 음나무발효물(KP-F)은 Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol에 대하여 상대표준편차(RSD%)  $\leq 5.00\%$ 로 재현성을 확인하였다. 분석자 A의 경우, Eleutheroside E는 3.638%, Acanthoside B는 4.202%, Syringaresinol은 3.134%로 나타났으며, 분석자 B의 경우, Eleutheroside E는 4.491%, Acanthoside B는 3.535%, Syringaresinol은 1.883%로 확인되었다. 실험자간 정밀성을 확인했을 때, 음나무발효물(KP-F)은 Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol에 대하여 RSD%가 각각

**Table 2. Calibration curves, detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) of Eleutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol**

Compound	Range (µg/mL)	Slope (a)	y Intercept (b)	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Eleutheroside E	1.56~100	57,676.446	29,534.798	1.000	0.773	2.341
Acanthoside B	1.56~100	58,825.183	34,409.353	1.000	0.710	2.150
Syringaresinol	1.56~100	81,719.531	63,029.672	1.000	0.831	2.520

4.530%, 4.798%, 2.585%로 측정되어 5.000% 이내로 우수한 정밀성을 확인하였다(Table 3).

5.000% 이내로 우수한 정확성을 확인하였다(Table 4).

### 7. 정확성

정확성은 3가지 기지농도가 첨가된 시료의 회수율 시험을 통해 참값에 근접한 정도를 확인하였다. 분석시험 측정 결과, Eleutheroside E의 경우, 회수율은 103.810~104.525%로 측정되었으며, RSD(%)는 3.687~4.220%로 확인되었다. Acanthoside B의 경우, 회수율은 108.858~110.480%로 나타났으며, RSD(%)는 3.365~4.598%로 확인되었다. 또한, Syringaresinol의 경우, 회수율은 102.436~103.677%로 측정되었으며, RSD는 1.534~2.126%로 나타내었다. 따라서 음나무발효물(KP-F)의 3개의 화합물에 대하여 회수율이 80~120% 이내, RSD(%) 값이

### 요약 및 결론

본 연구에서는 생물전환공정을 통해 생성된 음나무발효물의 신규 기능성 원료 개발을 위해 생물전환공정에 의한 구조 전환 및 원산지별 함량 확인을 통하여 지표성분을 선정한 후 다성분 동시분석법의 개발, 분석법 검증을 시행하였다. 음나무발효물의 지표성분 선정을 위해 생물전환공정에 의한 음나무발효물에서의 전환물질을 조사하여 배양시간에 따른 배양체의 함량변화를 측정하였다. 그 결과, 배양시간이 경과함에 따라 음나무발효물에서 Kalopanaxsaponin B가 감소하면서 Kalopanaxsaponin A가 증가하는 것으로 생물전환공정이 진행

**Table 3. Precision of fermented *Kalopanax pictus* Nakai (KP-F)**

Compound	Analyst A <sup>a</sup>		Analyst B <sup>b</sup>		Total analyst <sup>c</sup>	
	Mean±S.D. (mg/g)	RSD (%)	Mean±S.D. (mg/g)	RSD (%)	Mean±S.D. (mg/g)	RSD (%)
Eleutheroside E	0.513±0.019	3.638	0.489±0.022	4.491	0.500±0.023	4.530
Acanthoside B	0.469±0.020	4.202	0.437±0.015	3.535	0.452±0.022	4.798
Syringaresinol	2.438±0.076	3.134	2.508±0.047	1.883	2.481±0.064	2.585

<sup>a</sup> Analyst of Won Hui Jang.

<sup>b</sup> Analyst of Seon Ju Park.

<sup>c</sup> Average of analyst A, B.

**Table 4. Accuracy of Eleutheroside E, Acanthoside B, and Syringaresinol**

Compound	Concentration (µg/mL)	Mean±S.D. (mg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Eleutheroside E	3.750	0.389±0.014	104.171	3.873
	4.375	0.454±0.015	103.810	3.687
	5.000	0.524±0.020	104.525	4.220
Acanthoside B	1.500	0.161±0.007	108.858	3.365
	1.750	0.191±0.010	110.385	4.598
	2.000	0.221±0.007	110.480	3.696
Syringaresinol	24.000	2.474±0.054	103.677	1.858
	28.000	2.858±0.046	102.436	1.534
	32.000	3.320±0.063	103.648	2.126

Recovery (%)=(Measured amount - Original amount)/Spiked amount×100%.

됨에 따라 Kalopanaxsaponin B가 Kalopanaxsaponin A로 전환되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 배양시간이 경과함에 따라 Eleutheroside E가 감소하면서, Acanthoside B 및 Syringaresinol이 증가하고, 배양 32시간부터 Acanthoside B이 감소하면서, Syringaresinol이 급격히 증가하는 것을 관찰하여 생물전환공정이 진행됨에 따라 Eleutheroside E가 Acanthoside B를 거쳐 Syringaresinol로 전환되는 것을 확인할 수 있었다. 원산지별 음나무 및 생물전환공정에 의한 음나무발효물에서의 배당체 함량 조사를 통해 Kalopanaxsaponin B보다 Eleutheroside E가 원산지 구분 없이 함량 차이가 비교적 작게 나타나는 것과 생물전환공정에 의해 비교적 쉽게 전환이 이루어지며, Eleutheroside E가 Acanthoside B 및 Syringaresinol로 전환이 이루어지는 것을 확인하였다. 따라서 음나무발효물의 표준화를 위한 지표성분으로 Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol의 합으로 선정하였다. 음나무발효물에서의 Lignan 배당체 동시 분석법 확립을 위해 특이성, 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정밀성, 정확성 실험을 실시하여 분석법을 검증하였다. 그 결과, 표준물질 3개와 음나무발효물의 retention time이 일치하며, 동일한 UV spectrum을 나타내었고, 각 표준물질의 상관계수( $R^2$ ) 값이 0.999 이상으로 우수한 직선성을 확인하였다. Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol의 검출한계는 각각 0.773, 0.710, 0.831  $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었으며, 정량한계는 각각 2.341, 2.150, 2.520  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다. 정밀도 측정 결과, 음나무발효물 내 Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol의 RSD(%)는 4.530%, 4.798, 2.585%로 상대표준편차 5% 미만의 높은 정밀성을 나타내었다. 음나무발효물에서 Eleutheroside E는 103.810~104.525%, Acanthoside B은 108.858~110.480%, Syringaresinol은 102.436~103.677%의 회수율을 보여 분석방법에 대한 정확성을 확인하였다. 이상의 결과를 볼 때 음나무발효물에서의 Eleutheroside E, Acanthoside B, Syringaresinol 성분을 검정하기에 적합한 분석법임을 입증하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2016년도 중소기업청 중소기업융복합기술개발사업(과제번호:S2389154)으로 수행된 연구결과입니다.

## References

Cho YH, Cho JS, Lee GW. 2011. Antioxidant activity of wood vinegar by bioconversion. *J Korea Academia-Industrial Coop Soc* 12:4434-4442

Choi J, Huh K, Kim SH, Lee KT, Lee HK, Park HJ. 2002.

Kalopanaxsaponin A from *Kalopanax pictus*, a potent anti-oxidant in the rheumatoid rat treated with Freund's complete adjuvant reagent. *J Ethnopharmacol* 79:113-118

Jo K, Han SH, Bae SH, Shin JC, Suh HJ. 2018. HPLC validation of valerian ethanol extract as a functional food. *Korean J Food Nutr* 31:104-108

Kim DW, Bang KH, Rhee YH, Lee KT, Park HJ. 1998. Growth inhibitory activities of kalopanaxsaponins A and I against human pathogenic fungi. *Arch Pharm Res* 21:688-691

Ko HR, Ahn SC. 2007. Microbial mimic metabolism of natural products. *J Mar Biosci Biotechnol* 2:11-22

Lee JH, Moon SY, Cho BY, Choi SI, Jung TD, Choi SH, Kim JD, Lee OH. 2017. Stability of ethanolic extract from fermented *Cirsium setidens* Nakai by bioconversion during different storing conditions. *Korean J Food Nutr* 30:388-394

Lee MW, Hwang WK, Hahn DR. 1989. Phytochemical studies on the constituents of the bark of *Kalopanax pictum* var. *maximowiczii*. *Chung-Ang J Pharm Sci* 3:13-19

Li DW, Lee EB, Kang SS, Hyun JE, Whang WK. 2002. Activity-guided isolation of saponins from *Kalopanax pictus* with anti-inflammatory activity. *Chem Pharm Bull* 50:900-903

Park HJ, Kwon SH, Lee JH, Lee KH, Miyamoto Ki, Lee KT. 2001. Kalopanaxsaponin A is a basic saponin structure for the anti-tumor activity of *Hederagenin monodesmosides*. *Plant Med* 67:118-121

Quang TH, Ngan NTT, Minh CV, Kiem PV, Nhiem NX, Tai BH, Thao NP, Luyen BTT, Song SB, Kim YH. 2011. Anti-inflammatory and PPAR subtypes transactivational activities of phenolics and lignans from the stem bark of *Kalopanax pictus*. *Bull Korean Chem Sor* 32:4049-4054

Sano K, Sanada S, Ida Y, Shoji J. 1991. Studies on the constituents of the bark of *Kalopanax pictus* Nakai. *Chem Pharm Bull* 39:865-870

Shao CJ, Kasai R, Xu JD, Tanaka O. 1989. Saponins from roots of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz., Ciquiu: Structures of Kalopanax-saponins C, D, E and F. *Chem Pharm Bull* 37:311-314

Sun WJ, Zhang DK, Sha ZF, Zhang HL, Zhang XL. 1990. Studies on the saponin constituents of *Kalopanax septemlobus* (Thunb.) Koidz. *Yao Xue Xue Bao* 25:29-34

Received 08 March, 2019  
Revised 13 March, 2019  
Accepted 18 March, 2019