

백출(*Atractylodes Rhizoma Alba*)의 품질평가를 위한 지표성분 분석법 평가

이재웅¹, 김준희², 강병만¹, 안병관^{3*}

¹한국한의학진흥원 한약자원개발본부 약용작물중자보급센터, 선임연구원, ²주임연구원, ³책임연구원

Development of HPLC Method for Quality Assessment of Marker Components in *Atractylodes Rhizoma Alba*

Jae-Woong Lee¹, Joon-Hee Kim², Byoung-Man Kang¹ and Byung-Kwan Ahn^{3*}

¹Researcher, ²Associate Researcher and ³Senior Researcher, Medicinal Crops Seed Supply Center,
National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea

Abstract - Homogenization of quality was important in order to use herbal medicines as pharmaceuticals. To solve this problem, it was important to establish quality standards. *Atractylodes Rhizoma Alba* has no quantitative method in the Korean Pharmacopoeia. Thus, we have researched to improve the quality evaluation method of *Atractylodes Rhizoma Alba* with an HPLC. Atractylenolide III and atracylodin were selected as potential marker compounds. This analytical procedure was subject to validation. According to validation guideline of South Korea's Ministry of Food and Drugs Safety, the specificity, linearity, precision, range, quantitative limits, detection limits and accuracy were measured. Because the specificity, linearity, precision, range, quantitative limits, detection limits and accuracy meet criteria of the guideline, the analytic method was validated. With this analysis, *Atractylodes Rhizoma Alba* and *Atractylodes Rhizoma* analyzed. As a result, both atractylenolide III and atracylodin appear to be suitable standard compounds. it confirmed that *atractylodes Rhizome*, similar to *Atractylodes Rhizoma Alba*, could be distinguished.

Key words - Analysis, Atractylenolide III, *Atractylodes macrocephala* Koidzum, Atracylodin

서 언

삼주(*Atractylodes japonica* Koidzumi)와 큰꽃삼주(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)는 국화과(Compositae) 삼주속(*Atractylodes* spp.) 식물로 뿌리줄기를 그대로 또는 주피를 제거하여 말린 약재를 백출(*Atractylodes Rhizoma Alba*)로 사용하고 있다(Lee *et al.*, 2002). 백출의 '백(白)'은 뿌리의 색이 희다는 뜻이고 '출(朮)'은 탁(濁)하다는 뜻으로, 뿌리의 빛이 희고 형상이 혼탁(混濁)해 보인다는 약재이다. 한의약적으로는 감고온(甘苦溫)한 약성을 가지고 있으며, 보기건비(補氣健脾), 습(濕)을 제하여 이수 작용을 해 주고 땀을 제거하는 효과와 안태 작용이 있으며, 보중익기탕, 오령산, 이중탕, 향사양위탕에 처방되고

특히 위장에 매우 좋다고 알려져 있다(Jerun, 2015; Lee, 1981).

백출의 주요성분으로는 atractylenolide III, atractylenolide I이 알려져 있으며(Dong *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2013), atractyloside A, B와 같은 sesquiterpene glycoside 및 attractan A, B, C 같은 다당체도 보고되어 있다(Kim *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 1977; Yosioka *et al.*, 1974).

한약의 원료가 되는 약용작물의 재배과정이 일반 농산물과 거의 동일하기 때문에 농산물이 가지고 있는 생산 및 유통과정에서의 문제점이 유사하게 적용되고 있으며, 한약재의 품질 불균일성과 위품의 혼입에 따른 사회적 불만이 있다. 특히 백출은 관례적으로 창출과 혼용되어 사용하기도 하는데(Lee *et al.*, 2002), 대한약전에서의 백출은 삼주(*Atractylodes japonica* Koidzumi)와 큰꽃삼주(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)를 기원으로 하고, 창출은 북창출(*Atractylodes chinensis* Koidzumi)

*교신저자: E-mail lee0210@nikom.or.kr

Tel. +82-61-860-2808

과 모창출(*Attractylodes lancea* De Candolle)를 기원으로 규정하고 있다. 삼주와 큰꽃삼주는 잎의 형태나 뿌리줄기로는 정확하게 구별이 힘들고, 각각 백색과 자홍색의 화색으로 구별할 수 있고, 백출과 창출은 엽병의 유무로 구별이 가능하다(Yoon and Ju, 2018). 하지만 한약재 상태에서는 구별이 힘들어 민간에서는 삼주의 햇뿌리를 백출, 묵은 뿌리를 창출로 오용하고 있다. 이에 위품을 구별하기 위한 품질 기준 설정이 필요한 현실이다. 하지만 백출의 품질 관리를 위하여 대한약전에 성상, 확인시험, 순도시험, 회분, 산불용성 회분, 정유함량이 설정되어 있지만 성분에 대한 정량법은 설정되어 있지 않으며, 홍콩중약재표준(HKCMMS)에서는 atractylenolide III가 지표성분으로 설정되어(0.019% 이상) 있으나 창출과의 구별을 위한 품질기준은 제시되어 있지 않았다(The Hong Kong Department of Health, 2019). 이에 백출과 창출을 구별할 수 있는 품질 표준 기준을 설정하여 기원이 명확하고 우수한 품질의 백출을 보급할 수 있게 하고자 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에 사용된 시료는 큰꽃삼주와 창출은 GMP 기관인(주) 그린명품제약에서 제조한 시료(큰꽃삼주 제조번호: GM075-1800101, 창출 제조번호: GM034-1900101)를, 삼주는 대한한의약진흥원 시범재배포(전라남도 장흥군)에서 재배한 시료를 사용하였다. 각 시료는 대한한의약진흥원 약용작물종자보급센터의 안병관박사가 동정하였으며, 표본시료(큰꽃삼주: AMK-2018-1, 삼주: AJK-2018-1, 창출: ALDC-2019-1)는 대한한의약진흥원 한약자원개발본부의 저장고에 보관되어 있다.

기기 및 시약

표준품으로 사용된 Atractylenolide III, atracylodin은 각각 Sigma Aldrich (St. Louis, Oklahoma, USA)와 ChemFaces (Wuhan, China)에서 구입하였고, 각각 99%, 98%의 순도를 사용하였다. 정량분석용 이동상에 사용된 용매인 Water, Acetonitrile (ACN)은 HPLC grade의 J. T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, USA) 사의 제품을 사용하였다. 성분분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) 사의 HPLC 1200을 사용하였다. 시료의 분쇄는 MM200 mixer mill (RETSCH, Dusseldorf, Germany)를 사용하였다.

Table 1. Composition of the mobile phase employed in the gradient LC system

Time (min)	Composition of mobile phase (%)	
	Water	Acetonitrile
0	60	40
10	35	65
20	0	100
20.1	60	40
28	60	40

지표성분 설정 및 분석조건

식품의약품안전평가원에서 발간된 ‘백출(白朮)의 감별 자료집’에 따르면 혼용되어 유통되고 있는 창출에서만 atracylodin이 다량 검출되는 것을 확인할 수 있었다(Yim *et al.*, 1988; National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 2017). 이에 추후 혼용되는 창출에 대한 감별도 가능할 것으로 판단되어 atractylenolide III 및 atracylodin을 대상으로 분석법을 설정하였다. 분석에 사용한 column은 Ascentis express C18 column (4.6 × 100 mm, 2.7 μm particle size, Sigma Aldrich)을 사용하였으며, column temperature는 40°C, injection volume은 10 μL, flow rate는 1 mL/min을 유지하였다. 이동상으로는 (A) water와, (B) acetonitrile을 초음파를 이용하여 degassing 후 사용하였고, gradient system을 이용하여 분석하였다(Table 1). Detector는 UV detector (236 nm)를 사용하였다.

분석법 밸리데이션

분석법 밸리데이션은 한국식품의약품안전처의 ‘의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인’, ‘생약(한약)제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인’ 및 ‘기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드’에 따라 특이성, 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성에 대한 평가를 실행하였다(National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, 2010; 2015; 2019).

특이성

특이성의 입증은 PDA detector를 이용하여 표준품의 흡광도 패턴(200 ~ 400 nm)을 분석하였으며, 시료의 동일 retention time에서의 흡광도 패턴을 비교하였다.

직선성, 범위, LOD, LOQ

직선성, 범위, 검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한

계(Limit of quantification, LOQ)는 5개의 농도(1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 별로 3회 반복 시험을 하였다. 이를 이용하여, 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(x, $\mu\text{g/mL}$)와 피크 면적비(y)에 대한 검량선(calibration curve, $y=ax+b$)을 구하였다. 또한, 검량선으로부터 직선성의 결정계수(coefficient of determination, R^2)를 구하여 결정계수(R^2) 값이 0.995 이상의 직선성을 가지는 구간을 범위로 설정하였다. LOD와 LOQ는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하는 방법을 이용하였으며, 공식은 아래와 같다.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \frac{\sigma}{S}, \quad \text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

σ : y 절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

정밀성(Precision)

정밀성(Precision) 측정은 실험 환경의 변화에 따라 동일한 샘플에 대한 분석 결과의 변화 정도를 확인하기 위하여 상대표준편차(Relative Standard Deviation, RSD, %)를 이용하여 평가하였다. 이는 반복성(Intra-assay precision) 검사는 3가지 농도를 설정을 하여(6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$) 3반복 측정하였으며, ‘기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드’를 참고하여 상대표준편차(RSD, %)가 5% 이상인 경우 측정 날짜, 사람간, 기기 간 편차를 추가적으로 확인해야 하는 것을 기준으로 설정하여 평가하였다.

정확성(Accuracy)

표준액 3가지 농도(6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$)를 각 3회 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차 정도(회수율, %)로서 정확성을 평가하였다. 그 범위는 90%에서 110% 사이의 범위를 이상적 범위라고 설정하여 평가하였다.

추출조건 설정

설정된 지표성분에 대한 최적의 추출용매 및 추출시간을 확인하고자 성분분석을 진행하였다. 공시재료를 MM200 mixer mill을 이용하여 초당 25회로 1.5분간 작동하여 분쇄하였다. 추출용매는 100%, 80%, 60% MeOH을 이용하였으며(50 mg/10 mL), 초음파 추출기를 이용하여 30분, 60분, 90분간 추출하였다. 추출액은 0.2 μm syringe filter를 이용하여 여과 후 검액으로 사용하였다.

큰꽃삼주, 삼주 및 창출의 성분함량

큰꽃삼주, 삼주 및 창출의 성분 차이를 확인하고자 성분분석을 진행하였다. 분석에 사용된 시료는 공시재료를 MM200 mixer mill을 이용하여 초당 25회로 1.5분간 작동하여 분쇄하였다. 추출용매는 80% MeOH을 이용하였으며(50 mg/10 mL), 30분간 초음파 추출기를 이용하여 추출하였다. 추출액은 0.2 μm syringe filter를 이용하여 여과 후 검액으로 사용하였다. 지표 성분은 5개의 농도(1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)를 사용하여, 검량선을 구하였으며, 시료의 면적비를 검량선에 대입하여 성분함량을 계산하였다. 분석조건은 앞서 설정한 조건을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

분석법 밸리데이션

특이성

PDA detector를 이용하여 atractylenolide III 표준품의 흡광도(236 nm)를 분석한 결과 5.03분에서 peak를 얻었으며, sample을 분석한 결과 이와 동일한 retention time을 갖는 peak를 얻을 수 있었으며, 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인하였다(Fig. 1). PDA detector를 이용하여 atracylodin 표준품의 흡광도(236 nm)를 분석한 결과 14.73분에서 peak를 얻었으며, sample을 분석한 결과 이와 동일한 retention time을 가지는 peak를 얻을 수 있었으며, 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

직선성, 범위, LOD, LOQ

Atractylenolide III 표준품을 5개의 농도(1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 별로 3회 반복 분석하여 검량선 및 직선성의 결정계수(R^2)를 계산해본 결과 1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 결정계수가 0.999 이상인 직선성을 확보할 수 있었다(Fig. 2). 그리고 얻어진 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기를 이용하여 LOD와 LOQ를 계산한 결과 각각 0.244 $\mu\text{g/mL}$ 와 0.740 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Table 2). Atracylodin 표준품을 5개의 농도 5개의 농도(1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) 별로 3회 반복 분석하여 검량선 및 직선성의 결정계수(R^2)를 계산해 본 결과 1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 결정계수가 0.999 이상인 직선성을 확보할 수 있었다(Fig. 2). 그리고 얻어진 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기를 이용하여 LOD와 LOQ를 계산한 결과 각각 0.160 $\mu\text{g/mL}$ 와 0.484 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Table 2). 두 성분 모두 농도 범위 1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 사이

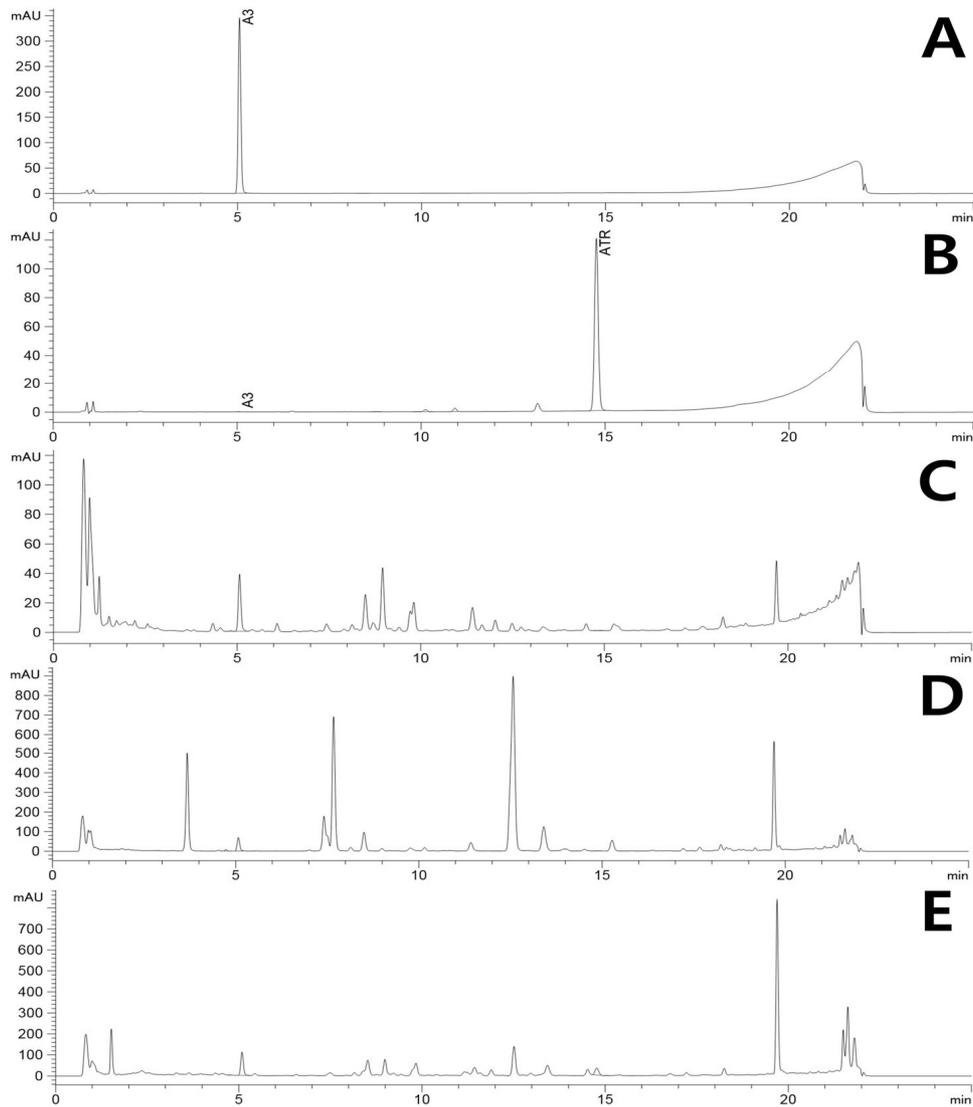


Fig. 1. HPLC chromatograms using UV detection at 236 nm. A: Atractylenolide III standard, B: Atractylodin standard, C: *Atractylodes macrocephala* Koidzumi extract, D: *Atractylodes japonica* Koidzumi extract, E: *Atractylodes lancea* De Candolle extract.

에서의 직선성은 모두 결정계수가 0.999 이상이었으며, 정량한 계는 모두 1 µg/mL보다 낮아 정상적인 범위에서 분석이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

Atractylenolide III 표준품을 3개의 농도(6.25, 12.5, 25 nm)로 3반복을 진행하여 정밀성과 정확성을 동시에 확인하였으며, 회수율은 각각 95.1, 93.7, 96.1%, 상대표준편차(%)는 농도 별로 0.907, 0.195, 0.888로 측정되었다(Table 3). Atractylodin 표준품을 3개의 농도(6.25, 12.5, 25 nm)로 3반복을 진행하여 정밀

성과 정확성을 동시에 확인하였으며, 회수율은 94.4, 93.5, 94.8%, 상대표준편차(%)는 농도 별로 각각 0.592, 0.637, 0.494로 측정되었다(Table 3). 두 성분 모두 정밀성의 지표인 상대표준편차는 모두 5% 이하였으며, 정확성의 지표인 회수율은 90%에서 110% 사이의 범위에서 나와 정밀성 및 정확성이 높은 분석 방법임을 확인하였다.

추출조건 설정

설정한 지표성분에 대한 최적의 추출용매 및 추출시간을 확인하고자 성분분석을 진행한 결과(Table 4) atractylenolide III

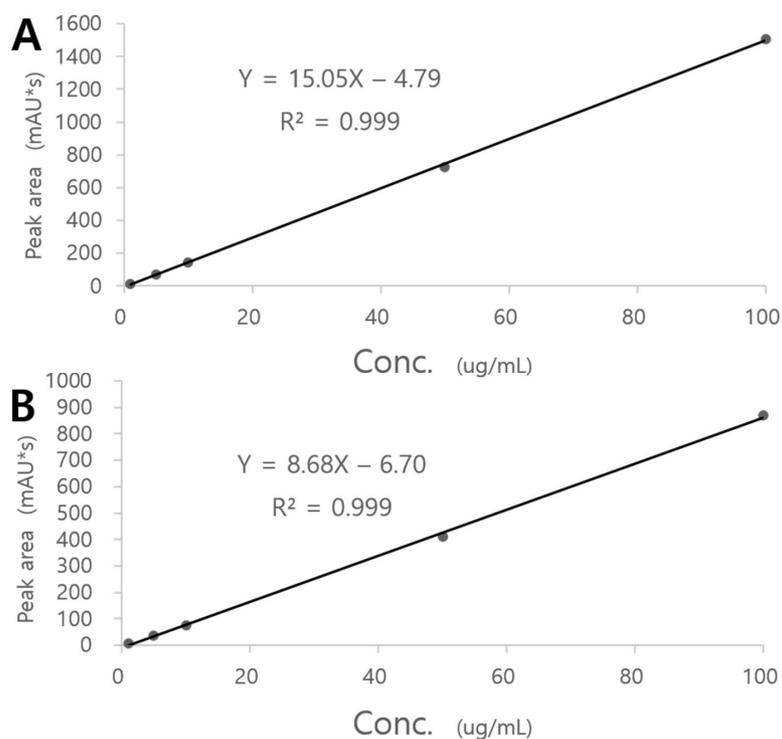


Fig. 2. Calibration Curve of atractylenolide III (A) and atractylodin (B).

Table 2. The linearity, regression equation, coefficient of determination (R²), and LOD and LOQ for measurement of standard components by HPLC

Components	Regression equation ^z	R ² (n=3)	LOD ^y (μg/mL)	LOQ ^x (μg/mL)
atractylenolide III	Y=15.05x - 4.79	0.999	0.244	0.740
atractylodin	Y=8.71x - 8.76	0.999	0.223	0.675

^zY: peak area, x: amount (μg/mL).

^yLOD (Limit of detection) = 3.3 * (SD of the response/slope of the calibration curve).

^xLOQ (Limit of quantitation) = 10 * (SD of the response/slope of the calibration curve).

Table 3. Analytical results of accuracy test for standard materials by HPLC

Components	Spiked amount (μg/mL)	Measured amount (μg/mL, n=3)	RSD ^z (%)	Recovery ^y (%)
atractylenolide III	6.25	6.00 ± 0.053	0.907	95.1
	12.5	11.69 ± 0.023	0.195	93.7
	25	23.73 ± 0.215	0.888	96.1
atractylodin	6.25	5.89 ± 0.029	0.592	94.4
	12.5	11.67 ± 0.074	0.637	93.5
	25	23.65 ± 0.140	0.494	94.8

^zRSD (%) = (SD/Mean)×100.

^yRecovery (%) = [amount found/amount spiked] × 100%.

Table 4. Component content according to ultrasonic extraction time and solvent

Extraction time	Extraction solvent	Atractylenolide III (%)	Atractylodin (%)
30 min	100% MeOH	0.072 ± 0.011	0.049 ± 0.009
	80% MeOH	0.090 ± 0.001	0.056 ± 0.005
	60% MeOH	0.086 ± 0.003	0.060 ± 0.003
60 min	100% MeOH	0.051 ± 0.010	0.062 ± 0.001
	80% MeOH	0.076 ± 0.003	0.056 ± 0.010
	60% MeOH	0.077 ± 0.006	0.051 ± 0.009
90 min	100% MeOH	0.070 ± 0.014	0.047 ± 0.002
	80% MeOH	0.085 ± 0.002	0.043 ± 0.008
	60% MeOH	0.082 ± 0.002	0.035 ± 0.013
120 min	100% MeOH	0.072 ± 0.011	0.033 ± 0.009
	80% MeOH	0.085 ± 0.004	0.040 ± 0.016
	60% MeOH	0.080 ± 0.003	0.051 ± 0.008

Table 5. Ingredient content of *Atractylodes Rhizome Alba* and *Atractylodes Rhizome*

Components (%)	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	<i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi	<i>Atractylodes lancea</i> De Candolle
atractylenolide iii	0.040 ± 0.01	0.023 ± 0.002	0.065 ± 0.001
atractylodin	N.D. ^z	N.D.	0.056 ± 0.005

^zN.D.=Not detect.

는 80% MeOH에서 추출이 가장 잘 되었으나 60% MeOH과 큰 차이를 보이지 않았으며 추출시간에는 크게 영향받지 않았다. Atractylodin은 용매와 추출시간에 큰 영향 받지 않았으나 추출 시간이 길어질수록 편차가 크게 나타나는 것을 확인하였다. 이에 추출용매는 80% MeOH로 추출시간은 30분으로 추출조건을 설정하였다.

큰꽃삼주, 삼주 및 창출의 성분함량

큰꽃삼주, 삼주 및 창출의 성분함량 차이를 확인하고자 성분 분석을 진행한 결과(Fig. 1, Table 5) 모든 시료에서 atractylenolide III이 검출 되었으나 atractylodin는 창출에서만 검출 되어 백출과 창출의 구별이 가능한 것으로 확인되었다.

적 요

백출의 기원 감별 및 품질기준 설정을 위하여 atractylenolide III과 atractylodin을 지표성분으로 설정하였다. HPLC를 이용하여 선정된 지표물질인 atractylenolide III과 atractylodin의 특

이성, 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성에 대한 평가를 실시한 결과 모두 양호한 결과가 나타나 분석법에 문제는 없었으며, 백출과 창출을 각각 분석한 결과 위품인 창출에서만 atractylodin이 검출이 되어 위품 구별이 가능한 지표물질로 손색이 없었다.

사 사

본 연구는 한국한의학진흥원 ‘한약자원 표준화 및 고도화’ 사업 (CC1000005)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Dong, H., L. He, M. Huang and Y. Dong. 2008. Anti-inflammatory

- components isolated from *Atractylodes macrocephala* Koidz. Nat. Prod. Res. 22(16):1418-27 (GBR).
- Jerun, U. 2015. Comparative study on efficacy of *Atractylodes* rhizome recorded in traditional medical literature and in recent pharmacological article. Korean Herb. Med. Inf. 3(2):1-16 (in Korean).
- Kim, S.Y., O.H. Kwon, J.H. Cho and J.H. Lim. 2001. Effects of flower removal on growth and content of essential oil in *Atractylodes macrocephala* Koidz. Korean J. Plant Res. 14(2):152-156 (in Korean).
- Lee, J., Y. Kim, S. Hong and C. Kim. 2002. Studies of taxonomic origins of *Atractylodes* rhizoma Alba and *Atractylodes* rhizoma. Korean Journal of Oriental Medicine 8:55-63 (in Korean).
- Lee, S.I. 1981. Studies on the diuretic action of Oryeongsan and Kami - Oryeongsan. Korean J. Pharmacogn. 12:31-43 (in Korean).
- National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. 2010. Guidelines for setting the ingredient profile of herbal medicines. Cheongju, Korea. pp. 5-15 (in Korean).
- _____. 2015. Test methods such as pharmaceuticals validation guidelines. Cheongju, Korea. pp. 5-15 (in Korean).
- _____. 2017. Discrimination of *Atractylodes* rhizome white. Cheongju, Korea. pp. 44-48 (in Korean).
- _____. 2019. Guidelines for writing submission materials for recognition functional raw material. Cheongju, Korea. pp. 21-47 (in Korean).
- Nishikawa, Y., T. Seto, Y. Watanabe and I. Yasuda. 1977. Studies on the components of *Atractylodes* III. new sesquiterpenoid in the rhizome of *Atractylodes japonica* Koidzumi. Yakugaku Zasshi 97:515-518 (in Japanese).
- The Hong Kong Department of Health. 2019. Chinese materia medica standards volume 3. Hong Kong, China. p. 273 (in Chinese).
- Yim, D.S., S.C. Yu and H.J. Chi. 1988. Phytochemical study on the rhizome of *Atractylodes japonica* from Korea. Korean J. Pharmacogn. 19(4):228-232 (in Korean).
- Yoon, J.H. and Y.S. Ju. 2018. A study on identification keys of *Araliae continentalis* Radix and its adulterants: Focused on external·internal morphology and pattern analysis. Korean J. Herbol. 33(2):29-43 (in Korean).
- Yosioka, I., T. Tani, M. Hirose and I. Kitagawa. 1974. Diacetyl-*Atractylodes* diol, a new acetylenic compound from *Atractylodes japonica* Koidzumi. Chem. Pharm. Bull. 22(8):1943-1945 (in Japanese).
- Yun, B.R., J.B. Weon, B. Lee, J. Lee, M.R. Eom and C.J. Ma. 2013. Quantitative analysis of *Atractylodes* I and III in *Atractylodes japonica*. Korean J. Pharmacogn. 44(1):53-59 (in Korean).

(Received 27 July 2020 ; Revised 29 October 2020 ; Accepted 05 November 2020)