

기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드[민원인 안내서]에 따른 개똥쑥 열수추출분말의 Scopoletin 분석을 위한 HPLC 분석법 밸리데이션

김선희¹ · 윤기동^{2*}

¹성균관바이오텍 기업부설연구소, ²가톨릭대학교 약학대학

HPLC Method Validation for Quantitative Analysis of Scopoletin from Hot-Water Extract Powder of *Artemisia annua* Linné

Seon-Hee Kim¹ and Kee Dong Yoon^{2*}

¹Sungkyun Biotech Co. Ltd., Suwon 16648, Korea

²College of Pharmacy, The Catholic University of Korea, Bucheon 14662, Korea

Abstract – In this study, we shortly introduced the HPLC method validation guideline for the analysis of functional food which was released from the Ministry of Food and Drug Safety of Korea in Dec 2018. The HPLC method validation was performed through the aforementioned HPLC method validation guideline in order to quantitate scopoletin content from the hot-water extract powder of *Artemisia annua* Linné. The HPLC method was validated by evaluating specificity, accuracy, precision, limit of quantitation and linearity. All parameters were in the suitable ranges which are designated in the guideline, which indicated the current HPLC method is reliable to quantitate the scopoletin content from the hot-water extract of *A. annua*.

Keywords – *Artemisia annua*, Hot-water extract, Scopoletin, HPLC method validation guideline

쑥속(*Artemisia* species) 식물인 개똥쑥(*Artemisia annua* Linné)은 국화과(Compositae)에 속하는 한해살이풀로서 우리나라 전역을 포함한 아시아 지역 및 유럽, 북아메리카에 폭넓게 분포하며, 전통적으로 청호(菁蒿)라고 하여 해열 및 지혈의 목적으로 사용되어 온 생약이다.¹⁾ 일반적으로 개똥쑥의 전초를 꽃이 필 때 즙을 채취하여 사용하며 이 식물의 가장 잘 알려진 주성분으로는 항말라리아 의약품으로 사용되는 artemisinin이 있고 이외의 다양한 페놀성 성분과 정유성분이 보고되고 있다.^{1,2)} 본 연구진의 이전 연구에서는 국내 자생하는 개똥쑥 열수추출물의 주요 함유성분으로 artemisinin이 아닌 쿠마린 계열 성분인 scopoletin과 5종의 caffeoylquinic acid 유도체 성분을 보고한 바 있으며 이들 성분이 개똥쑥을 원료로 하는 제품에 대하여 품질평가를 위한 지표물질로서의 가능성이 있음을 제시하였다.³⁾

많은 천연물 연구자들이 건강기능식품 개발에 있어 천연물 원료에 함유된 지표성분을 이용하여 HPLC 분석법을 개발하고 이의 밸리데이션을 수행하여 전문지에 게재하고 있

다. 일반적으로 분석법 검증은 공인된 국제표준을 따름을 명시하고 있는 경우가 있지만, 연구자들마다 다른 방법을 사용하거나 또는 시대에 맞지 않는 오래된 방법을 사용하고 있어 어떠한 것이 타당한 분석방법인지에 대한 혼선이 존재한다. 이는 제품을 생산하는 기업의 경우 국제표준의 가이드라인을 반드시 지켜야 하지만, 논문 게재를 목적으로 하는 연구자의 경우 이러한 가이드라인을 따르는 것이 의무사항이 아니기 때문이며, 규정에 맞지 않는 HPLC 분석법 밸리데이션 결과가 실제 식품의약품안전처와 같은 관리기관에서 요구하는 분석법 자료로 인정되지 못하는 경우가 발생할 수 있다. 식품의약품안전처의 규정에서는 건강기능식품의 기능성분(또는 지표성분)의 시험법은 우선으로 「건강기능식품의 기준 및 규격」, 「식품의 기준 및 규격」, 「식품첨가물의 기준 및 규격」, 국제식품규격위원회 (Codex Alimentarius Commission, CAC) 규정, AOAC 방법 등에 따라 국내·외에서 공인된 방법을 사용하여야 한다고 명시되어 있다.⁴⁻⁶⁾ 따라서 관리기관이 국제표준 가이드라인을 엄격히 따르고 실정에 맞는 시험법을 제시하는 경우 해당시험법을 사용하는 것이 이러한 혼선을 최소화하는 방법이라 사료되며, 동시에 연구자들은 개량된 분석법에 대한 추세를

*교신저자(E-mail): kdyoon@catholic.ac.kr,
(Tel): +82-2-2164-4091

인지하고 적용하는 것이 바람직하다고 여겨진다.

현재 개똥썩 열수추출물을 건강기능식품 개별인정 원료로 개발하려는 시도가 진행되고 있으며 이에 원료 또는 제품의 품질을 지속적으로 평가하기 위해 지표성분을 이용한 HPLC 분석법이 요구된다. 본 논문에서는 식품의약품안전처에서 제시한 건강기능식품에 대한 HPLC 분석법 검증에 대한 가이드라인 내용을 간략히 소개하며, 가이드라인에서 제시한 방법 및 형식에 맞게 scopoletin을 지표성분으로 이용한 개똥썩 열수추출분말의 HPLC 분석법 밸리데이션을 수행한 내용을 보고하여 건강기능식품 개발에 관심이 있는 천연물 연구자들에게 참고가 되며, 건강기능식품 개발 시 HPLC 분석법 수행에 대한 혼선을 줄이고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – HPLC 밸리데이션 시험에 사용한 개똥썩 열수추출분말(Lot # SBAAWP-171117-01)과 실험실 규모에서 생산한 열수추출분말 시료 3종은 (주)성균바이오텍에서 제공한 것을 사용하였으며, 열수추출분말에 사용된 개똥썩은 국내에서 재배된 것으로 (주)성균바이오텍 건강기능식품 품질관리책임자(한성훈)가 검증하였다. 지표성분인 scopoletin 표준품은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다(Catalog #: S2500-50MG; 순도: 99% 이상). HPLC에 사용된 유기용매는 대정금속화학에서 구입하였고 탈이온수는 Millipore Milli-Q water purification system를 이용하여 생산하였다.

표준용액의 조제 – Scopoletin 표준물질 약 10 mg을 정밀히 달아 50% 메탄올 10 ml에 녹여 농도가 1.0 mg/ml인 표준원액으로 하였으며 밸리데이션 시험법 항목에 맞게 위 용액을 50% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액을 조제하였다.

시험용액의 조제 – 개똥썩 열수추출물 분말 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g을 취하여 50% 메탄올 100 ml를 가한 후 30분간 초음파추출하여 각각 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 mg/ml 농도가 되도록 조제하였다. 각 용액을 다시 50% 메탄올을 이용하여 10배 희석하여 0.45 µm 멤브레인 필터를 이용하여 여과한 후 밸리데이션 시험법 항목에 적용하는 시험용액으로 하였다.

HPLC 분석조건 – HPLC 분석은 binary pump, online degasser, autosampler, PDA(photodiode array detector)로 구성된 Agilent 1260 Infinity HPLC system을 이용하였다. 컬럼은 Luna C18 컬럼(4.6×250 mm I.D., 5 mm, Phenomenex, USA)를 사용하였으며, 유기 이동상(A)은 메탄올(0.1% TFA)이고, 수성 이동상(B)은 탈이온수(0.1% TFA)를 사용하였다. 검출파장은 345 nm이며, 유속은 1.0 ml/min이었다. 샘플의 온도는 25°C로 유지하였다. 이동상의 농도구배는 이동상은 20–40% A(0–30 min), 40–100% A(30–31 min), 100%

A(31–35 min), 100–20% A(35–35.5 min), 20% A(35.5–45 min)이었다. 표준용액 및 시험용액은 20 µl를 주입하였다.

특이성 평가 – 표준용액(scopoletin 10 µg/ml 농도)과 시험용액(개똥썩 열수추출분말 용액 2 mg/ml 농도)의 HPLC 크로마토그램을 통해 scopoletin 피크 및 인근 물질 피크의 머무름 시간 및 scopoletin의 UV 스펙트럼 비교를 통해 시험법의 특이성을 측정하였다.

정확도 평가 – 개똥썩 열수추출물 1.5 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 ml를 첨가하여 30분간 초음파추출하였다. 해당 용액을 1.0 ml 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 ml를 첨가하여 10배 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터를 이용하여 여과하였다. 10배 희석한 개똥썩 열수추출물 시료 900 µl에 각각 blank로서 50% 메탄올 용액 및 10.0 µg/ml, 20.0 µg/ml, 30.0 µg/ml에 해당하는 scopoletin 용액을 100 µl 첨가하여, 첨가한 scopoletin 최종 농도가 0 µg/ml, 1.0 µg/ml, 2.0 µg/ml, 3.0 µg/ml이 되도록 희수를 시험용액을 조제하였다. 정확도는 50%메탄올 첨가한 대조군과 scopoletin을 첨가한 실험군(최종농도 1.0 µg/ml, 2.0 µg/ml, 3.0 µg/ml) 간의 농도차이를 계산하여 확인하였으며, 해당 정확도 시험은 표준액 제조를 포함하여 일련의 과정을 총 3회 반복하였다.

일내정밀도(반복성) 평가 – 개똥썩 열수추출분말 1.0, 2.0, 3.0 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 ml를 첨가하여 30분간 초음파추출 하였다. 각 해당 용액을 1.0 ml 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 ml를 첨가하여 각각 1.0, 2.0, 3.0 mg/ml의 농도가 되도록 10배 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터를 이용하여 여과하였다. 각 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 측정하여 함유된 scopoletin의 함량을 µg/ml 단위로 계산한 뒤 이를 희석배수를 고려하여 개똥썩 열수추출분말 1.0 g에 함유된 scopoletin 함량인 µg/g 단위로 환산하였다. 일내정밀도 시험은 검량곡선을 위한 표준액 제조를 1회로 하여 검량곡선을 작성하고 각 개똥썩 열수추출분말 무게당 5회 따로 조제한 시험용액을 측정하여 수행하였다.

일간정밀도(재현성) 평가 – 개똥썩 열수추출물 1.5, 2.5 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 ml를 첨가하여 30분간 초음파추출 하였다. 각 해당 용액을 1.0 ml 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 ml를 첨가하여 각각 1.5, 2.5 mg/ml의 농도가 되도록 10배 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터를 이용하여 여과하였다. 각 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 측정하여 함유된 scopoletin의 함량을 µg/ml 단위로 계산한 뒤 이를 희석배수를 고려하여 개똥썩 열수추출분말 1.0 g에 함유된 scopoletin 함량인 µg/g 단위로 환산하였다. 일간정밀도 시험은 검량곡선을 위한 표준용액 조제와 각 2개 농도의 시험용액 조제하여 각 시험용액 당 5회 반복 측정하였으며 이 과정을 5일 반복 수행하였다.

정량한계 측정 - 농도가 1.0 mg/ml의 scopoletin 표준원액을 50% 메탄올을 첨가하여 순차적으로 희석하여 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 10, 50, 100 µg/ml의 총 7개 농도로 조제하였다. 희석한 scopoletin 표준용액을 HPLC를 이용하여 측정하였으며 농도별 면적을 구하여 검량선을 구하였다. 상기과정을 총 3회 반복하였으며 정량한계는 검량선 기울기 평균(S) 및 y 절편의 표준편차(σ)를 이용하였으며 계산식은 아래와 같다.

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma / S$$

직선성 평가 - 농도가 1.0 mg/ml의 scopoletin 표준원액을 50% 메탄올을 첨가하여 순차적으로 희석하여 0.25, 0.5, 2.5, 10, 25 µg/ml의 총 5개 농도로 조제하였다. 희석한 scopoletin 표준용액을 HPLC를 이용하여 측정하였으며 농도별 면적을 구하여 검량선을 구하였다. 표준용액 제조를 총 3회 반복하여 측정하였으며 결정계수(r^2) 값이 0.990 이상인지의 여부를 확인하였다.

개똥속 열수추출분말의 Scopoletin 함량 측정 - 실험실 규모에서 생산된 3개의 개똥속 열수추출분말 1.0 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 ml를 첨가하여 30분간 초음파추출 하였다. 각 해당 용액을 1.0 ml 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 ml를 첨가하여 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 10배 희석한 후 0.45 µm 멤브레인 필터를 이용하여 여과하였다. 이 과정을 각 시료당 3번 반복하여 총 9개의 시험용액을 조제하였으며, 각각의 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 측정하여 함유된 scopoletin의 함량을 µg/ml 단위로 계산한 뒤 이를 희석배수를 고려하여 개똥속 열수추출분말 1.0 g에 함유된 scopoletin 함량인 µg/g 단위로 환산하였다.

결과 및 고찰

식품의약품안전처 고시 시험방법 밸리데이션 항목 및 내용 - 가장 최근의 HPLC를 이용한 건강기능식품 시험방법 밸리데이션에 대한 내용은 2018년 12월 식품의약품안전처에서 공정한 '기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(민원인 안내서)⁴⁾에 기재되어 있으며 이는 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2018-73호, 2018.10.12)」⁵⁾에 따라 기능성 원료 신청 시 요구되는 신청서 작성방법 및 제출자료 요건을 알기 쉽게 설명하기 위한 자료이다. 현재 '건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정'은 제2019-69호(시행 2019.8.5)가 가장 최근 개정·고시된 것이나,⁶⁾ 가이드라인(민원인 안내서)의 경우 2018년 12월에 고시된 것이 현재 가장 최근의 것이라 그 내용을 본 논문에서 소개하였으며, 본 민원인 안내서의 5번 항목인 '지표성분(또는 기능성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료'에 HPLC 분석법 밸리데이

션에 대한 내용 및 방법 예시가 구체적으로 수록되어 있다. 분석법 밸리데이션은 (1) 특이성 (2) 정확도 (3) 정밀도(반복성, 재현성) (4) 정량한계 (5) 직선성의 순서로 5개 항목에 대하여 그 방법 및 기준을 정해 놓았으며 이를 Table I, 2에 기재하였다.

많은 수의 논문에서는 정확도 및 정밀도 측정 시 지표성분만을 사용하여 표준용액 및 작업용액을 조제한 후 회수율 및 일간·일내정밀도를 측정하는 방법이 사용되지만, Table I의 식품의약품안전처가 고시한 분석법에서는 실제 분석해야 할 추출물 등의 시료를 대상으로 하여 검체량 별 정량분석을 통한 지표성분의 실제 함량값의 상대표준편차를 측정하는 방법을 이용함으로써 지표성분만을 위한 분석법 밸리데이션이 아닌 실제 분석시료에 함유된 지표성분 정량을 통한 밸리데이션이라는 점을 확실히 하였다.

재현성(reproducibility)의 경우 '단일 실험실에서 수행할 경우 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 시험장비 등으로 시험하여 얻은 측정값들 사이의 근접한 정도의 값 비교가 필요하다' 라는 측면을 볼 때 단일 실험실내 정밀성으로 표현되며, 일간정밀도(inter-day precision)가 재현성에 포함된다. 다만 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인에는 재현성을 '실험실간 정밀성'으로 규정하였는데⁷⁾ 이는 건강기능식품 시험법 밸리데이션의 내용과 차이가 있어 용어사용에 주의가 필요하다.

개똥속의 지표성분으로써 Scopoletin의 선정 - 기존연구에서 개똥속의 지표성분으로 5종의 caffeoyl quinic acid 유도체 성분 및 쿠마린 성분인 scopoletin을 제시하였으나, 실제 분석 시 caffeoyl quinic acid 유도체 성분은 산지에 따라서 그 함량이 불균일하고³⁾ 일부 성분은 구입 후 -20°C 냉동고에 보관 후 HPLC로 분석하였을 때 peak tailing이 심하게 발생하여 HPLC 분석에 지장이 있었으며 이에 scopoletin에 비하여 화학적 안정성이 상대적으로 떨어진다고 판단되어 개똥속 열수추출분말의 지표성분대상에서 제외하였다. 따라서 scopoletin을 본 시험방법을 위한 지표성분으로 설정하였다.

특이성 평가 - HPLC 크로마토그램의 비교를 통해 본 scopoletin 분석조건에서 간섭물질의 영향이 없음을 확인하였고, scopoletin 표준용액과 개똥속 열수추출물 시험용액의 scopoletin 성분에 대한 머무름 시간 및 UV 스펙트럼이 일치함을 확인하였다(Table III).

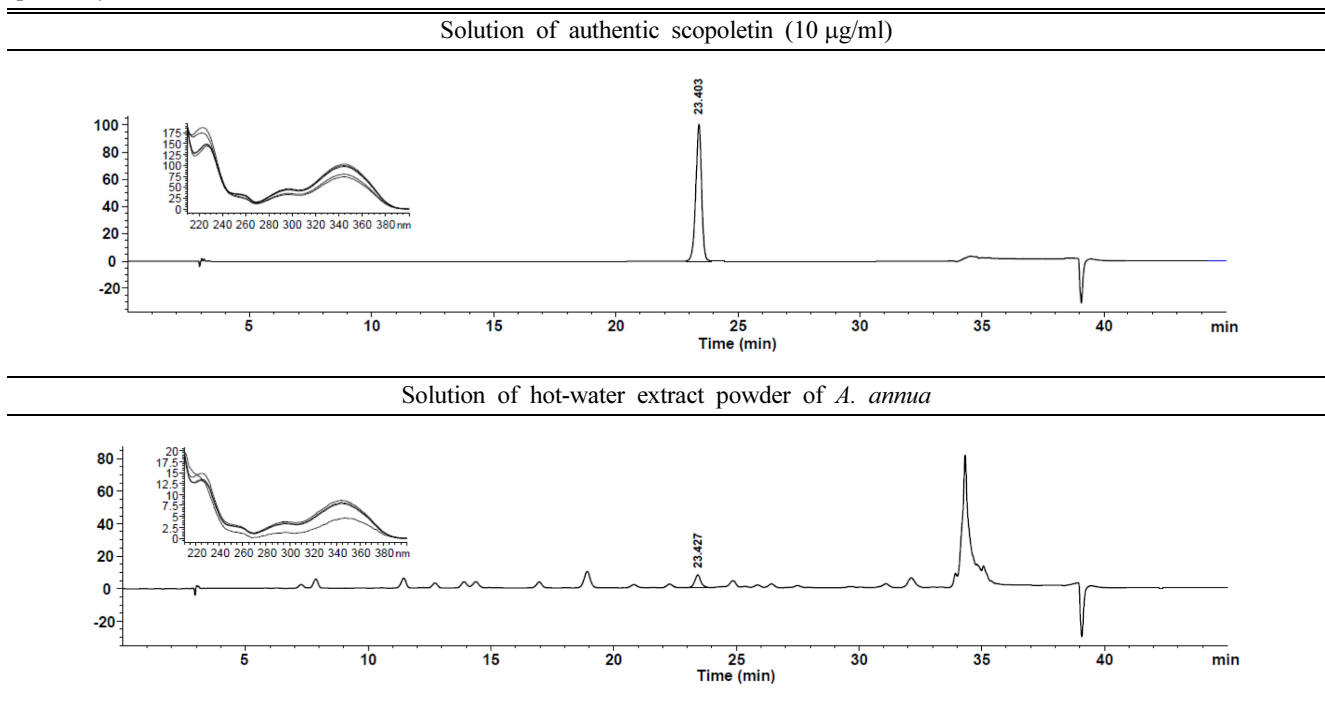
정확도 평가 - 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 확인하였고, 시료에 존재하는 참값과 가까운 농도를 시료에 추가하여 회수율을 측정하였다. 대조군에 해당하는 개똥속 열수추출분말 시험액의 scopoletin 농도는 대략적으로 2.0 µg/ml이었으며 따라서 이의 50, 100, 150% 농도에 해당하는 1.0, 2.0, 3.0 µg/ml 농도의 scopoletin을 첨가하여 정확도 시험을 수행하였다. 시험결과 전체 회수율 평균은 100.58%였고,

Table I. The contents of HPLC method validation according to the HPLC method validation guideline for the analysis of functional food from the Ministry of Food and Drug Safety of Korea (Dec 2018)

밸리데이션 항목	정의	내용	적용		
			기능성분(지표성분)		유해물질 (정량시험)
			정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	(1) 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있어야 한다. (2) 크로마토그래피 기반 분석법의 경우 분석대상물질 및 인근 물질 피크의 머무름 시간 및 분석 대상 물질의 스펙트럼 혹은 질량분석 등의 자료를 제시해 HPLC 해야 한다.	예	예	예
정확도 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참조값에 근접한 정도	(1) 시료에 이미 알고 있는 분석물질 함량의 50%, 100% 및 150% 등 3개 이상으로 첨가하여 3회 이상 반복 측정하고, 회수율을 구한다. * 반복 측정의 경우 전처리부터 분석까지 일련의 과정 포함한다. * 회수율(%) = $C_f / C_u \times 100$ (C_f : 분석한 분석대상물질의 함량; C_u : 첨가한 분석대상물질의 함량) * 지표물질 함량에 따른 회수율 기준 (Table II)	예	아니오	예
정밀도 (Precision)	균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	(1) 정밀도 자료로서 반복성과 재현성 자료 모두 제출해야 한다. (2) 반복성의 경우 3개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도 (상대표준편차)를 구한다. (3) 재현성의 경우 각 실험실 간 1개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도를 구한다. * 단 단일 실험실에서 수행할 경우 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 시험장비 등으로 시험하여 얻은 측정값들 사이의 근접한 정도의 값 비교가 필요하다. * 반복측정의 경우 전처리부터 분석까지의 일련의 과정을 포함한다. * 지표물질 함량에 따른 반복성 및 재현성 기준 (Table II)	예	아니오	예
정량한계 (Quantitation limit)	적절한 정밀도와 정확도를 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	(1) 분석대상물질을 포함한 검체의 피크와 공시험 검체 피크를 비교하며, 신호 대 잡음비가 10:1인 함량으로 설정한다. (2) 검량선의 기울기(S) 및 표준편차(σ)를 이용한다 (정량한계 = $10 \times \sigma / S$). * (1) 또는 (2) 방법을 사용한다.	아니오	아니오	예
직선성 (Linearity)	적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	(1) 분석대상물질의 함량을 5개 이상으로 하며, 측정하고자 하는 함량 범위에 고르게 분포하도록 하고, 최소 2회 이상 반복 측정한다. (2) 정확도 및 정밀도를 확인할 수 있는 범위를 포함해야 한다. (3) 결정계수(r^2)가 0.990 이상이어야 한다.	예	아니오	예

Table II. The criteria of accuracy (recovery rate, %) and precision (repeatability and reproducibility, RSD%) according to the HPLC method validation guideline for the analysis of functional food

Concentration of standard compound	Accuracy		Precision	
	Recovery rate (%)	Repeatability (RSD%)	Repeatability (RSD%)	Reproducibility (RSD%)
100% (100 g/100 g)	98 ~ 101	1		2
≥ 10% (10 g/100 g)	95 ~ 102	1.5		3
≥ 1% (1 g/100 g)	92 ~ 105	2		4
≥ 0.1% (1 mg/g)	90 ~ 108	3		6
0.01% (0.1 mg/g)	85 ~ 110	4		8
10 mg/kg	80 ~ 115	6		11
1 mg/kg	75 ~ 120	8		16
10 µg/kg	70 ~ 125	15		32

Table III. The HPLC chromatogram of authentic scopoletin and hot-water extract powder of *A. annua* for the evaluation of specificity**Table IV.** Accuracy (recovery test) results of scopoletin in the hot-water extract powder of *A. annua*

Repetition #	Added amounts of scopoletin		
	1.0 µg/ml	2.0 µg/ml	3.0 µg/ml
1	95.33%	99.43%	100.45%
2	102.55%	102.48%	102.15%
3	101.48%	100.66%	100.73%
Mean recovery rate (%)	99.79%	100.86%	101.11%
Net recovery rate (%)		100.58	
Range of recovery rate (%)		95.33 – 102.55	

Table V. The intra-day precision (repeatability) results of scopoletin in the hot-water extract powder of *A. annua* (n = 5)

Repetition #	Amount of hot-water extract powder of <i>A. annua</i>		
	1.0 g	2.0 g	3.0 g
1	1436.77	1427.15	1426.43
2	1444.25	1403.22	1413.47
3	1483.12	1459.30	1412.48
4	1507.05	1444.34	1433.91
5	1508.54	1469.02	1471.79
Mean	1475.95	1440.61	1431.62
SD	33.99	26.22	24.19
RSD (%)	2.30	1.82	1.69
Range of RSD (%) 1.69 – 2.30			

Table VI. The intra-day precision (reproducibility) results of hot-water extract powder of *A. annua* using scopoletin (n = 50)

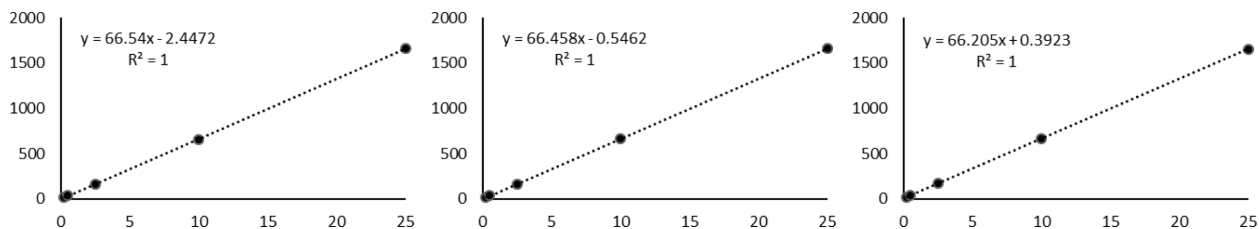
Day	Repetition #	Amount of hot-water extract powder of <i>A. annua</i>		
		1.5 g	2.5 g	Scopoletin contents (µg/g)
1	1	1373.08	1	1371.57
	2	1363.25	2	1393.39
	3	1413.37	3	1355.07
	4	1396.66	4	1405.77
	5	1411.40	5	1358.01
2	1	1342.09	1	1384.52
	2	1415.98	2	1392.10
	3	1359.59	3	1409.60
	4	1405.29	4	1411.35
	5	1405.29	5	1368.77
3	1	1375.72	1	1367.12
	2	1357.14	2	1309.01
	3	1349.31	3	1374.16
	4	1404.09	4	1349.51
	5	1405.06	5	1328.38
4	1	1372.64	1	1360.14
	2	1377.59	2	1382.10
	3	1371.65	3	1383.29
	4	1414.19	4	1376.16
	5	1431.99	5	1394.56
5	1	1348.95	1	1363.97
	2	1345.07	2	1378.51
	3	1351.86	3	1358.73
	4	1355.74	4	1370.37
	5	1367.38	5	1389.57
Mean		1380.58	Mean	1373.43
SD		27.03	SD	23.68
RSD (%)		1.96	RSD (%)	1.72
Net RSD (%) 1.85				

Table VII. The limit of quantitation (LOQ) for scopoletin analysis in the hot-water extract powder of *A. annua*

Repetition #	Range ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation	r^2
1	0.1 – 100	$y = 66.880x + 6.3704$	0.9999
2	0.1 – 100	$y = 66.697x + 6.8479$	0.9999
3	0.1 – 100	$y = 66.707x + 6.7742$	0.9999
Mean of slope (S)	66.76	Standard deviation of intercept (σ)	0.257
LOD ($10 \times \sigma/S$)		0.038 $\mu\text{g/ml}$	

Table VIII. The linearity for scopoletin analysis in the hot-water extract powder of *A. annua*

Repetition #	Range ($\mu\text{g/ml}$)	Regression equation	r^2
1	0.1 – 25.0	$y = 66.540x - 2.4472$	1
2	0.1 – 25.0	$y = 66.458x - 0.5462$	1
3	0.1 – 25.0	$y = 66.205x + 0.3923$	1

**Table IX.** The scopoletin contents in the hot-water extract powder of *A. annua* produced on a laboratory scale

Repetition #	Scopoletin contents ($\mu\text{g/g}$)		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
1	1374.11	1377.06	1677.83
2	1399.17	1357.89	1661.61
3	1396.23	1390.32	1692.58
Mean \pm SD ($\mu\text{g/g}$)	1389.84 \pm 13.70	1375.09 \pm 16.31	1677.31 \pm 15.49

회수율 구간은 95.33–102.55%이었다. 이는 Table II의 식품 의약품 안전처 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드 라인의 회수율시험 기준인 지표물질 0.1-1% 농도에 해당하는 회수율 기준(90-108%)에 부합되는 결과이며, 따라서 본 시험법의 정확성을 확인하였다(Table IV).

일내정밀도(반복성) 평가 – 시료량의 변화에 따른 반복 정밀도를 확인하기 위해 개똥썩 열수추출물 1.0, 2.0, 3.0 g 을 취하여 5회 반복 측정하였으며 상대표준편차(RSD) 구간 은 1.69–2.30% 이었으며, 이는 지표물질 1% 농도범위의 반복성 3% 이내인 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인에 부합하여 본 시험법의 일내정밀 도를 확인하였다(Table V).

일간정밀도(재현성) 평가 – 실험일 간 반복정밀도를 확인 하기 위해 개똥썩 열수추출물 1.5, 2.5 g에 해당하는 시험용 액을 조제하여 두 개의 시험용액을 1일 5회씩 총 5일 반복 측정하였다. 총 50번의 측정에 대한 scopoletin 함량의 상대

표준편차(RSD%)는 1.85%로, 이는 0.1–1.0% 지표물질 농 도범위의 재현성 기준 6% 이내인 식품의약품안전처 건강 기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인에 부합하여 본 시험법의 일간정밀도를 확인하였다(Table VI).

정량한계 측정 – 7개 농도(0.1–100.0 mg/ml) 로 희석한 표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기와 y 절편 값을 이 용하여 정량한계를 구하였다. 기울기 평균은 66.76이며 y 절 편 의 표준편차는 0.257로 이를 통해 정량한계는 0.038 $\mu\text{g/ml}$ 로 계산하였다(Table VII).

직선성 평가 – 정량한계 측정 시 사용한 7개의 농도에서 직선성이 잘 보장되는 표준용액을 5개 농도로 다시 지정하 여 0.25–25.0 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 직선성을 확인하였다. 시험 시 발생할 수 있는 오차범위를 확인하기 위해 3회 반복 측정 하였고 3개의 시험 모두 검량선의 상관계수(r^2) 값이 1로 5 개의 농도범위에서 매우 우수한 직선성을 나타내었다(Table VIII).

개똥쑥 열수추출분말의 Scopoletin 함량 측정 – 실험실 규모에서 생산한 3개의 개똥쑥 열수추출분말에 대하여 scopoletin 함량을 측정하였다(Table IX). 측정결과 1, 2번 시료의 scopoletin 함량은 각각 1389.84 ± 13.70 , 1375.09 ± 16.31 $\mu\text{g/g}$ 이었으며 3번 시료의 경우 1677.31 ± 15.49 $\mu\text{g/g}$ 으로 다른 2개에 비하여 높게 측정되어 실험실에서의 소규모 생산 이더라도 차이가 발생함을 확인하였다.

결 론

개똥쑥 열수추출분말에 함유된 scopoletin의 함량측정을 위해 HPLC 분석법 밸리데이션을 수행하였다. HPLC 밸리데이션은 식품의약품안전처에서 공시한 ‘기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드 [민원인 안내서]’에 따라 수행되었으며, 특이성, 정확도, 정밀도, 정량한계, 직선성이 모두 제시하는 가이드라인에 부합하였다. 이에 본 HPLC 분석법이 신뢰성이 있음을 검증하였으며 본 HPLC 분석법 밸리데이션은 예시로써 건강기능식품 개발에 있어 HPLC 분석을 수행하는 천연물 연구자들에게 참고가 될 것으로 사료된다.

사 사

개똥쑥에 대한 식물정보는 ‘천연약물도감 I·II’(배기환 저)에서 발췌하였으며 이에 본 귀중한 도서를 저술하시고 기증해 주신 충남대학교 약학대학 배기환 명예교수님께 감사의 말씀을 드립니다.

본 연구는 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업(#117053-3) 및 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업(#2018R1A6A1A03025108)을 통하여 수행되었습니다.

인용문헌

1. 배기환 (2019) 천연약물도감 I·II, p 261 (II). 교학사, 서울.
2. Luz Estella Mesa, L. E., Lutgen, P., Velez, I. D., Segura, A. M. and Robledo, S. M. (2015) *Artemisia annua* L., potential source of molecules with pharmacological activity in human diseases. *Am. J. Phytomed. Clin. Ther.* **3**: 436-450.
3. Rho, T., Park, C., Kim, S. H. and Yoon, K. D. (2018) Five dicaffeoylquinic acid derivatives and a coumarin from the hot-water extract of *Artemisia annua*. *Kor. J. Pharmacogn.* **49**: 219-224.
4. 식품의약품안전처 (2018) 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드[민원인 안내서].
5. 식품의약품안전처 (2018) 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처고시 제2018-73호, 2018. 10. 12).
6. 식품의약품안전처 (2019) 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처고시 제2019-69호, 2019. 8. 5).
7. 식품의약품안전평가원(2015) 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인.

(2020. 1. 28 접수; 2020. 2. 21 심사;
2020. 3. 2 게재확정)