

## 아미노 결합 정지상 HPLC 컬럼을 이용한 마 껍질의 allantoin 함량 분석

이미정<sup>1</sup> · 김자민<sup>2</sup> · 김훈성<sup>1</sup> · 한동엽<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 농업생명과학대학 식품공학부

<sup>2</sup>경북대학교 농업과학기술연구소

<sup>3</sup>경북대학교 농생명융합공학과

## Quantitative Analysis of Allantoin in *Dioscorea japonica* Peel Using an Amino Bonded-Phase HPLC Column

Mijeong Lee<sup>1</sup>, Ja Min Kim<sup>2</sup>, Hunseong Kim<sup>1</sup>, Dongyup Hahn<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu, Korea

<sup>2</sup>Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu, Korea

<sup>3</sup>Department of Integrative Biology, Kyungpook National University, Daegu, Korea

(Received July 16, 2021/Revised August 11, 2021/Accepted August 19, 2021)

**ABSTRACT** - Yam (*Dioscorea japonica*) is widely utilized as food and a pharmaceutical ingredient as it contains a variety of valuable constituents. Allantoin is one of the bioactive components in yam that is used in pharmaceutical and cosmetic industry. This study was conducted to analyze and compare the allantoin content of yam flesh and peel by HPLC analytical method using an amino bonded-phase column to make up for the limitations of the previous HPLC analytical methods. The allantoin contents of yam flesh and peel were  $3.09 \pm 0.025$  and  $3.91 \pm 0.11$  mg/g (dry weight), respectively. The results of this study indicated that yam peel has higher allantoin content than yam flesh, and that the discarded yam peel could be used as a source for high value-added functional materials.

**Key words** : Yam, *Dioscorea japonica*, Allantoin, HPLC, Amino bonded-phase

마(yam, *Dioscorea* sp.)는 다년생 덩굴과 식물로 동아시아 열대 및 아열대 지역에 널리 재배되고 있으며 전 세계적으로 알려진 품종은 약 650 여종이며, 국내에서는 덩이 뿌리 모양에 따라 장마(*D. batatas*), 참마(*D. japonica*)와 둥근마(*D. bulbifera*)가 전국적으로 재배되고 있다<sup>1,2</sup>. 마의 지상부는 덩굴이며 지하부 뿌리줄기는 식용으로 이용되고 있을 뿐만 아니라 콜레스테롤 저해<sup>3</sup>, 항당뇨<sup>4</sup>, 혈당저해<sup>5</sup>, 항비만<sup>6</sup> 및 항산화<sup>7</sup> 등 다양한 약리효과로 약용으로도 이용되고 있다. 마는 기본 영양소는 물론 요오드, 철분, 칼

슘, 인 등 인체에 없어서는 안 될 미량원소를 다량 함유하고 있어 영양적 가치가 높으며<sup>8</sup>, saponins<sup>9</sup>, phenanthrenes<sup>10-12</sup>, 뮤코다당류(mucopolysaccharides)<sup>13</sup>, 디오스게닌(diosgenin)<sup>14</sup>, allantoin<sup>15</sup> 등 생리활성을 가지는 다양한 대사산물이 다량 함유되어 있다.

Allantoin (Fig. 1)은 purine 유도체 중 하나로 식물체가 질소를 저장하기 위해 만들거나 조직 내 암모니아의 해독 과정으로 생산되는 화합물로서<sup>16</sup> 주로 뿌리줄기에 저장되는 특징이 있어 마의 뿌리는 다른 식물체에 비해 allantoin 함량이 높다고 보고되어 마의 대표적인 기능성 물질로 잘 알려져 있다<sup>15</sup>. Allantoin은 상처 치료와 세포증식을 촉진하여 피부궤양 치료에 효과적이며<sup>17-19</sup>, 장 점막을 보호하고 종양의 성장을 억제시키며 혈장 포도당을 감소시킨다고 보고되고 있으며<sup>20</sup> 치아 플라그(plaque)와 건선 치료용 연고의 대표 성분으로도 사용되고 있다. 이외에도 allantoin은 항산화<sup>20</sup> 및 항고혈압<sup>21</sup> 등의 다양한 범위에서의 약리 효과도 알려져 활용 범위가 넓고 높은 부가가치를 지닌다.

\*Correspondence to: Dongyup Hahn, Ph.D., School of Food Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University  
80 Daehak-ro, Buk-gu, Daegu 41566, Korea  
Phone,+82-53-950-5756; Fax,+82-53-950-6750  
E-mail: dohahn@knu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

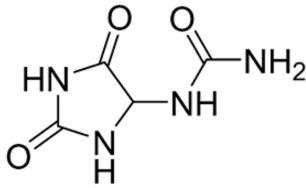


Fig. 1. Structure of allantoin.

따라서 마에 함유된 allantoin의 분석은 기능성 소재로서의 가치 평가와 연구 개발에 매우 중요하지만 비교적 강한 극성을 띄는 특성상 일반적인 역상 크로마토그래피를 이용한 신뢰성 높은 분석 방법을 제시하기 어려웠다. LC-MS/MS, GC-MS 등 질량분석기기를 이용한 allantoin 분석법은 정밀하고 높은 신뢰성을 주지만, 시료와 완충용액 준비에 별도의 시간과 노동력이 필요하여 다소 복잡하다는 단점이 있다<sup>22-26</sup>. 반면, HPLC (high performance liquid chromatography)는 편리하고 정확한 분석법을 확립할 수 있어 대상시료에 따라 컬럼과 이동상 용매를 선택하여 다양한 분석실험에 사용한다. 이온교환수지컬럼과 인산칼륨( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )완충용액을 이용한 allantoin 분석법은 가장 보편적이고 오래 활용된 분석법이나, 완충용액을 사용할 경우 염이 석출되거나 혼합방식에 따라 다른 결과값을 도출할 수 있어 완충용액을 사용하지 않고 적용이 가능한 분석법을 개발할 필요가 있다<sup>27</sup>. Liu 등<sup>20</sup>은 HPLC 기기에 octadecyl-silica (ODS) 역상 컬럼을 이용하여 마의 속과 껍질의 allantoin 함량을 각각 정량분석한 결과를 보고하였으나, 친수성 화합물인 allantoin을 ODS 컬럼에 주입하여 분석한 결과, 크로마토그램상에 나타난 머무름 시간이 지나치게 짧았으며, 다른 물질과의 분리가 충분하지 않아서 신뢰할 수 있는 분석 결과로 보기 어렵다. Yoon 등<sup>28</sup>은 효과적인 분석을 위해 극성 화합물인 allantoin을 싸이아노(cyano) 결합 정지상 컬럼을 이용한 HPLC 정량분석법을 제시하였다. 그러나 논문 상에 나타난 크로마토그램도 다른 물질과 구별되는 효과적인 분리능을 보여준 것으로 보이지 않으며, 마 근경 전체를 대상으로 한 allantoin의 분석이었다. 본 연구에서는 선행 연구들의 단점을 보완하여 완충용액의 사용 없이 HPLC를 이용하여 친수성 화합물 분리에 적합한 아민(amine) 결합 정지상 컬럼을 이용하여 마의 allantoin 함량을 정량 분석하고자 하였다. 또한 마의 가공과정에서 주로 폐기 부산물로 배출되는 마 껍질의 allantoin 함량을 마 속(flesh)의 allantoin의 함량과 비교 분석하고자 하였다.

## Materials and Methods

### 실험재료

본 연구에서 사용한 참마(*Dioscorea japonica*)는 안동에

서 2020년도에 수확한 것으로, 필창농산(Andong, Korea)에서 구입하였다. 마는 수세한 후 껍질을 벗겨 마 속(flesh)과 껍질로 분리하였으며 동결 건조하고 각각 분말로 만들어 실험에 사용하였다. 표준물질로 사용한 allantoin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 분석 기준물질 등급으로 구입하였다. Ethanol (EtOH, extra pure grade)은 Duksan Pure Chemicals Co. (Ansan, Korea)에서 구입하여 시료 추출에 이용하였다. HPLC 이동상으로 methanol (MeOH, HPLC grade), acetonitrile (ACN, HPLC grade) 및 water ( $\text{H}_2\text{O}$ , HPLC grade)를 사용하였으며, J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다.

### 추출 및 전처리

분말화한 마 속과 마껍질 시료를 각각 1 g을 250 mL 플라스크에 칭량하고 50% EtOH (100 mL)을 첨가한 후, sonicator (Branson 3210, Emerson, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 30분간 처리하고 12시간 동안 25°C에서 추출하였다. 추출액은 filter paper로 여과하고 감압 농축한 후, 남아있는 용매와 수분 제거를 위해 12시간 동안 동결 건조를 수행하여 마 속과 마껍질의 추출 동결건조물을 각각 207.1 mg, 144.4 mg을 얻었다. 각각의 건조물에 MeOH을 첨가하여 각각 40 mg/mL 농도로 맞추고 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter (Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하여 시료를 준비하였다.

### 표준용액 제조

Allantoin 기준 시약 10 mg을 칭량하여 HPLC용 water 1 mL에 녹여서 10 mg/mL 농도의 stock standard solution을 조제하였다. 이를 분석 조건 확립 및 유효성 검증 실험을 위해 연속적으로 시료를 희석하여 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL 농도의 기준 시료를(400  $\mu\text{L}$ ) 제조하고 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter (Advantec)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

### HPLC 분석 조건 유효성 검증

추출물에 함유된 allantoin 분석 조건의 유효성 검증을 위해 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantitation) 측정, 반복 실험을 통한 정밀성(precision) 평가를 식품의약품안전평가원의 가이드라인<sup>29</sup>을 참고하여 결과를 도출하였다.

농도가 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL인 표준시료 allantoin에 대하여 HPLC 분석을 시행하여 얻은 크로마토그램상의 peak 면적 값을 이용해 검량선을 작성한 후 결정계수( $R^2$ )를 이용하여 직선성을 확인하였다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 allantoin의 크로마토그램을 통해 구한 검량선의 y 절편에 대한 표준편차를 기술키로 나눈 값에 각각 3.3, 10을 곱하여 계산하였다. 정확성 및 정

밀성은 동일한 시료에 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL 농도의 allantoin 기준물질을 첨가하고 하루에 3번 반복 측정하여 이론적 예상값과 비교하고 RSD (relative standard deviation, %)를 도출하여 판단하였다.

### HPLC 분석

분석에 사용한 HPLC 기기는 photodiode array (PDA) detector Waters 2996 (Waters, Milford, MA, USA), quaternary pump로 구성된 Waters 2695 (Waters)를 사용하여 정량분석을 수행하였다. 검출기에서 allantoin의 검출 파장은 210 nm로 설정하였으며, 정지상으로서 아민(amine) 결합 정지상 컬럼(HECTOR-M-Carbohydrate column, 250 × 4.6 mm, 5 μm, RS tech corporation, Daejeon, Korea)을 사용하여 분석을 수행하였다. 마 속과 마 껍질 추출물 시료를 10 μL씩 주입하여 분석하였으며, 이동상으로는 H<sub>2</sub>O (A)와 ACN (B)을 사용하였고 0.8 mL/min의 유속으로 95%의 ACN을 isocratic condition으로 30분간 분석하였다.

## Results and Discussion

### HPLC 분석 조건 유효성 검증

마 속과 마 껍질의 allantoin을 선택적으로 정확하게 측정하기 위한 특이성 시험을 실시한 결과 머무름 시간이 12.18분으로 나타났다(Fig. 3). 시료 내 allantoin의 함유 여부는 속과 껍질 추출물의 HPLC 분석 결과 UV 스펙트럼과 머무름 시간이 표준용액과 대조하여 동일하게 나타나 시료 내 allantoin이 함유되어있는 것으로 판단하였다. ACN을 80%와 90%로 사용하였을 때, allantoin의 머무름 시간

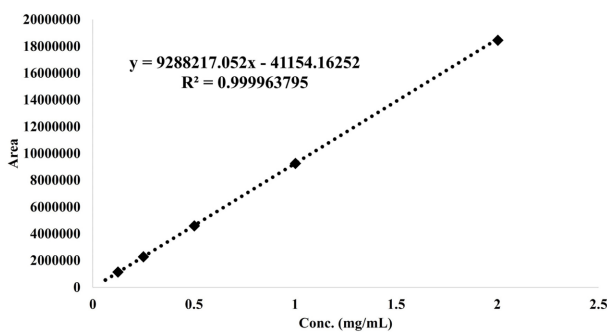


Fig. 2. Calibration curve of allantoin.

Table 1. Calibration parameters of allantoin by HPLC

Compound	Regression equation <sup>1)</sup>	Range (mg/mL)	R <sup>2</sup>	LOD <sup>2)</sup> (mg/mL)	LOQ <sup>3)</sup> (mg/mL)
Allantoin	$y = 9288217.052x - 41154.16252$	0.0625 - 2	0.9999	0.0229	0.0694

<sup>1)</sup>y: peak area, x: concentration (mg/mL).

<sup>2)</sup>LOD: Limit of detection.

<sup>3)</sup>LOQ: Limit of quantitation.

은 각각 5.4분과 7.5분으로 지나치게 짧았다. 이는 시료 내 혼합되어있는 다른 극성 화합물들과의 구분이 어려운 단점이 있어 ACN을 95%의 조건을 이용하여 머무름 시간을 12.81분으로 늦추어 다른 peak와 뚜렷한 구분이 가능하도록 하였다.

검량선 작성을 위해 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도로 allantoin 표준용액을 제조하여 HPLC 측정값으로 직선성을 평가하였다. 3회 반복 분석하여 검량선을 구하였고 결정계수(R<sup>2</sup>) 값은 0.9999로 1에 가까운 높은 직선성을 보였다(Fig. 2). 검출한계(LOD)는 0.0229 mg/mL, 정량한계(LOQ)는 0.0694 mg/mL의 수준으로 나타났다(Table 1). Haghi 등<sup>30)</sup>은 실크와 옥수수속 씨앗을 메탄올로 추출하고 C18 컬럼을 이용하여 allantoin을 정량하였다. 가장 흔하게 사용하는 HPLC 컬럼인 C18을 사용하면서도

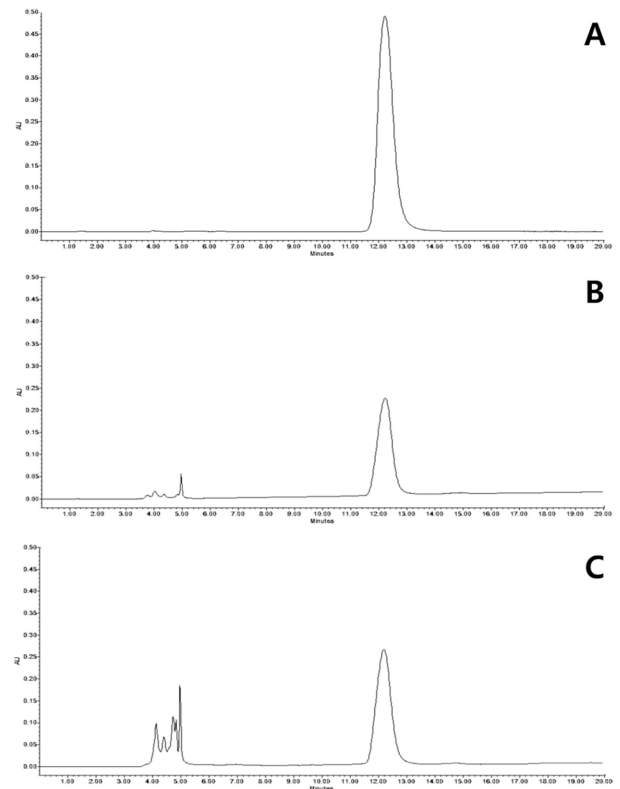


Fig. 3. HPLC chromatogram of allantoin (A), *Dioscorea japonica* flesh (B) and *Dioscorea japonica* peel (C) extracts monitored at the wavelength of 210 nm.

**Table 2.** Result of intra-day validation of allantoin (n=3)

Compound	Spiking Conc. (mg/mL)	Accuracy (%)	Precision (RSD%) <sup>1)</sup>
Allantoin	0.0625	96.0±1.18	1.47
	0.125	96.0±2.40	2.50
	0.25	96.0±0.95	0.99
	0.5	98.0±0.51	0.52
	1	98.0±0.56	0.57
	2	99.5±0.90	0.90

<sup>1)</sup>RSD: Relative standard deviation.

검출한계(LOD)는 0.05 µg/mL, 정량한계(LOQ)는 0.2 µg/mL로 본 연구보다 훨씬 우수하였으나, pH 3.0으로 조정된 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 완충용액을 이동상으로 사용해야 하는 단점이 있었다. 본 연구에서는 다양한 화합물과 시료를 HPLC로 분석하는 연구 환경에서 특정 분석 시료를 위한 완충 용액 사용을 하지 않아 이동상 제조, 기기 세척 및 안정화 과정의 번거로움을 생략할 수 있는 장점이 있다. 특히 마에는 allantoin 함량이 비교적 높은 편으로 마 시료의 allantoin 분석에는 LOD와 LOQ가 고도로 낮은 분석법의 필요성이 크지 않다.

정확도와 정밀성을 측정하기 위해 시료에 allantoin을 6개의 농도로 다르게 첨가하고 각각 3회 반복 측정하여 얻은 상대표준편차(RSD) 값을 분석하였다. 정확도는 96.0-99.5%로 나타났고, RSD는 0.52-2.50%로 나타나 식품의약품안전평가원의 가이드라인<sup>29)</sup> 기준치인 5% 이하를 만족하여 마 속과 마 껍질에 함유된 allantoin 분석법의 표준화가 가능함을 보였다(Table 2).

#### 아미노 결합 HPLC 컬럼을 이용한 마 속 및 껍질의 allantoin 함량 분석

Allantoin은 친수성 화합물로서 보통의 실험실에서 흔히 사용하는 ODS 컬럼과 같은 역상 컬럼으로 분석 시 머무름 시간이 매우 짧아 다른 화합물과의 peak 분리가 거의 일어나지 않아 정확한 분석이 어렵다. Liu 등<sup>20)</sup>은 마의 껍질과 속을 탈이온수로 추출하고 ODS 컬럼을 이용하여 속에는 13.68±0.48 mg/g, 껍질에서는 18.65±0.65 mg/g의 allantoin이 함유되어 있다고 보고하였다. 하지만 머무름 시간이 짧고 다른 물질들의 peak가 섞여 순수한 allantoin을 정량했다고 보기 어렵다. Yoon 등<sup>28)</sup>은 싸이아노(cyano) 결합 정지상 컬럼을 이용한 마의 allantoin 분석법을 확립하였고 품종과 재배 지역에 따라 다양한 종류의 마 근경 전체를 건조한 후 95%의 EtOH로 추출한 시료를 분석하여, 4.0±0.09에서 7.1±0.12 mg/g 수준의 allantoin이 함유되어 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 아민 결합 정지상 컬럼을 이용하여 머무름 시간을 12.18분에 다른 화합물과의 분리가 잘 이루어졌음을 확인하였고, allantoin을 마 속과 껍질에서 분

석하였다. 건조 중량을 기준으로 마 속의 allantoin 함량은 3.09±0.02 mg/g, 마 껍질의 allantoin 함량은 3.91±0.11 mg/g으로 마 껍질의 allantoin 함량이 마 속보다 더 높은 것으로 확인하였다.

마는 갈변이 심하고 부패가 빨리 일어나는 등 저장성이 제한되어 있어서 수확 후 껍질을 제거한 뒤 건조하여 분말화 하여 저장하거나 유통시키는 비율이 높다<sup>31)</sup>. 이러한 가공과정에서 비가식 부위인 껍질은 폐기되는데, 본 연구의 결과로는 마의 껍질 부위가 껍질을 제거한 속 보다 고부가가치 성분 중 하나인 allantoin의 중량 대비 함량이 높은 것으로 나타났다. 최근 연구에서는 마 껍질에 함유된 phenanthrene 화합물들이 항염증<sup>32)</sup>, 미세먼지에 의한 폐손상 억제<sup>33)</sup>, 항패혈증 효과<sup>34)</sup> 등이 입증된 바 있으며, 이들의 대부분은 마 속이 아닌 마 껍질에 분포함을 규명한 바 있다<sup>10)</sup>. 본 연구 결과는 이전 연구 결과들과 더불어 폐기되는 식품 가공 부산물인 마 껍질이 고부가가치 산물의 원천이 될 수 있으며, 이를 산업적으로 활용하는 연구 개발이 필요함을 시사한다. 본 연구를 통해 비교적 감도는 낮은 편이지만, 마 소재의 allantoin 분석에 충분하며, 분해능이 우수하고 특수한 염을 첨가하는 이동상을 사용하지 않는 비교적 간편한 방법을 통해 마 속과 마 껍질의 기능성 물질 allantoin 함량을 분석하여 후속 연구에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

#### Acknowledgement

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 유용농생명자원산업화기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호: 121049-02).

#### 국문요약

마에는 다양한 기능성 성분이 함유되어 있어서 식용 및 약용으로 다양하게 이용되고 있다. 특히 allantoin은 대표적인 마의 2차 대사산물로서 의약품 및 기능성 화장품 제조에도 활용되는 고부가가치 산물이다. 본 연구에서는 아

미노 결합 정지상 HPLC 컬럼을 이용하여 마의 속과 껍질의 allantoin 함량을 분석하였다. Allantoin 표준용액의 검량선의 결정계수( $R^2$ )값은 0.9999로 높은 직진성을 보였으며, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.0229 mg/mL 및 0.0694 mg/mL로 설정되었다. 마 속과 껍질의 건조중량 기준 allantoin 함량은 각각  $3.09 \pm 0.02$  mg/g,  $3.91 \pm 0.11$  mg/g으로 속보다 껍질에 더 많은 allantoin이 함유되어있음을 확인하였다. 따라서 이러한 결과를 토대로 향후 농업부산물인 마껍질이 새로운 고부가가치 기능성 소재로 활용될 수 있음을 확인하였다.

### Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

### ORCID

Mijeong Lee <https://orcid.org/000000026060846X>  
 Ja Min Kim <https://orcid.org/0000000225656087>  
 Hunseong Kim <https://orcid.org/0000000252063607>  
 Dongyup Hahn <https://orcid.org/0000000265346702>

### References

- Duan, Y., Kim, G.H., Joung, S.J., Kim, H.S., Nutritional evaluation of Korean yam (*Dioscorea batatas* DECNE). *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **33**, 391-400 (2016).
- Lee, H., Seo, D.H., Kim, H.S., Effect of starch extraction solutions on extraction and physicochemical property of Chinese yam (*Dioscorea batatas*) starch. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **50**, 191-197 (2018).
- Kwon, C.S., Son, I.S., Shim, J.H., Kwun, I.S., Chung, K.M., Effects of yam on lowering cholesterol level and its mechanism. *Korea J. Food & Nutr.* **32**, 637-643 (1999).
- Kwon, E.K., Choi, E.M., Koo, S.J., Effects of mucilage from yam (*Dioscorea batatas* Decne) on blood glucose and lipid composition in alloxan-induced diabetic mice. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **33**, 795-801 (2001).
- Kang, T.H., Choi, S.Z., Lee, T.H., Son, M.W., Kim, S.Y., Characteristics of antidiabetic effect of *Dioscorea rhizoma*(1)-Hypoglycemic effect. *Korean J. Food & Nutr.*, **21**, 425-429 (2008).
- Kwon, C.S., Sohn, H.Y., Kim, S.H., Kim, J.H., Son, K.H., Lee, J.S., Lim, J.K., Kim, J.S., Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1451-1456 (2003).
- Hou, W.C., Hsu, F.L., Lee, M.H., Yam (*Dioscorea batatas*) tuber mucilage exhibited antioxidant activities *in vitro*. *Planta Med.*, **68**, 1072-1076 (2002).
- Wanasundera, J.P., Ravindran, G., Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **46**, 33-39 (1994).
- Sautour, M., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Dongmo, A., Lacaille-Dubois, M.A., Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Med.*, **70**, 90-92 (2004).
- Kim, M., Gu, M.J., Lee, J.G., Chin, J., Bae, J.S., Hahn, D., Quantitative analysis of bioactive phenanthrenes in *Dioscorea batatas* decne peel, a discarded biomass from post-harvest processing. *Antioxidants*, **8**, 541 (2019).
- Kum, E.J., Park, S.J., Lee, B.H., Kim, J.S., Son, K.H., Sohn, H.Y., Antifungal activity of phenanthrene derivatives from aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne. *J. Life Sci.*, **16**, 647-652 (2006).
- Lu, Y., Jin, M.H., Park, S.J., Son, K.H., Son, J.K., Chang, H.W., Batatasin, I., A naturally occurring phenanthrene derivative, isolated from tuberous roots of *Dioscorea batatas* suppresses eicosanoids generation and degranulation in bone marrow derived-mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1021-1025 (2011).
- Choi, E.M., Koo, S.J., Hwang, J.K., Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol.*, **91**, 1-6 (2004).
- Narula, A., Kumar, S., Bansal, K.C., Srivastava, P.S., *In vitro* micropropagation, differentiation of aerial bulbils and tubers and diosgenin content in *Dioscorea bulbifera*. *Planta Med.*, **69**, 778-779 (2003).
- Fu, Y.C., Ferng, L.H.A., Huang, P.Y., Quantitative analysis of allantoin and allantoic acid in yam tuber, mucilage, skin and bulbil of the *Dioscorea* species. *Food Chem.*, **94**, 541-549 (2006).
- Drewes, S.E., van Staden, J., Determination of allantoin in Protea seed. *Phytochemistry*, **14**, 751-753 (1975).
- Araújo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C.F., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M., Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta. Cir. Bras.*, **25**, 460-466 (2010).
- Go, H.K., Rahman, M., Kim, G.B., Na, C.S., Song, C.H., Kim, J.S., Kim, S.J., Kang, H.S., Antidiabetic effects of yam (*Dioscorea batatas*) and its active constituent, allantoin, in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Nutrients*, **7**, 8532-8544 (2015).
- Zhang, Z., Gao, W., Wang, R., Huang, L., Changes in main nutrients and medicinal composition of Chinese yam (*Dioscorea opposita*) tubers during storage. *J. Food Sci. Technol.*, **51**, 2535-2543 (2014).
- Liu, Y., Li, H., Fan, Y., Man, S., Liu, Z., Gao, W., Wang, T., Antioxidant and antitumor activities of the extracts from Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) flesh and peel and the effective compounds. *J. Food Sci.*, **81**, 553-564 (2016).
- Chen, M.F., Tsa, J.T., Chen, L.J., Wu, T.P., Yang, J.J., Yin, L.T., Yang, Y.I., Chiang, T.A., Lu, H.L., Wu, M.C., Antihypertensive action of allantoin in animals. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 690135 (2014).
- Berthemy, A., Newton, J., Wu, D., Buhrman, D., Quantitative determination of an extremely polar compound allantoin

- in human urine by LC-MS/MS based on the separation on a polymeric amino column. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19**, 429-434 (1999).
23. Czauderna, M., Kowalczyk, J., Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **744**, 129-138 (2000).
  24. George, S.K., Dipu, M.T., Mehra, U.R., Singh, P., Verma, A.K., Ramgaokar, J.S., Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **832**, 134-137 (2006).
  25. Shingfield, K.J., Offer, N.W., Determination of allantoin in bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **706**, 342-346 (1998).
  26. Terzuoli, L., Pandolfi, M., Arezzini, L., Pizzichini, M., Marinello, E., Pagani, R., Separation and determination of liver uric acid and allantoin. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **663**, 143-147 (1995).
  27. Sagara, K., Ojima, M., Suto, K., Yoshida, T., Quantitative determination of allantoin in *Dioscorea* rhizome and an Oriental pharmaceutical preparation, hachimi-gan, by high-performance liquid chromatography. *Planta Med.*, **55**, 93 (1989).
  28. Yoon, K.D., Yang, M.H., Chin, Y.W., Park, J.H., Kim, J.W., Determination of allantoin in *Dioscorea Rhizoma* by high performance liquid chromatography using cyano columns. *Nat. Prod. Sci.*, **14**, 254-259 (2008).
  29. Hwang, I.G., Moon, G.I., Jang, M.I., Kim, S.H., Ko, Y.H., Jo, Y.J., Lee, S.M., Kang, Y.W., Heo, E.J., Im, H.S., Seo, I.W., Kang, T.S., 2016. Guideline on standard procedures for preparing analysis method. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea, pp. 2-16.
  30. Haghi, G., Arshi, R., Safaei, A., Improved high-performance liquid chromatography (HPLC) method for qualitative and quantitative analysis of allantoin in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1205-1209 (2008).
  31. Kwon, J.B., Kim, M.S., Sohn, H.Y., Evaluation of antimicrobial, antioxidant, and antithrombin activities of the rhizome of various *Dioscorea* species. *Korean J. Food Preserv.*, **17**, 391-397 (2010).
  32. Lim, J.S., Hahn, D., Gu, M.J., Oh, J., Lee, J.S., Kim, J.S., Anti-inflammatory and antioxidant effects of 2, 7-dihydroxy-4, 6-dimethoxy phenanthrene isolated from *Dioscorea batatas* Decne. *Appl. Biol. Chem.*, **62**, 29 (2019).
  33. Lee, W., Jeong, S.Y., Gu, M.J., Lim, J.S., Park, E.K., Baek, M.C., Kim, J.S., Hahn, D., Bae, J.S., Inhibitory effects of compounds isolated from *Dioscorea batatas* Decne peel on particulate matter-induced pulmonary injury in mice. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **82**, 727-740 (2019).
  34. Jeong, S.Y., Kim, M., Park, E.K., Kim, J.S., Hahn, D., Bae, J.S., Inhibitory functions of novel compounds from *Dioscorea batatas* Decne peel on HMGB1-mediated septic responses. *Biotech. Bioproc. Eng.*, **25**, 1-8 (2020).