

생약 자원으로서 荳子葉의 품질관리를 위한 주요 페놀성분 동시분석

김상준¹, 김선영¹, 장선일², 정승일^{1*}

1. (재)전주 생물소재연구소

2. ㈜아토큐엔에이

Simultaneous Determination of Polyphenols for the Quality Control of *Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara Leaves as Korean Herbal Medicines

Kim Sang-jun¹, Kim Seon-young¹, Jang Seon-il², Jeong Seung-il^{1*}

1. Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju

2. Ato Q&A corporation, Jeonju

Abstract

The leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara were an annual and mint herb to have various potential functions. Phenolic components related to the antioxidant activity of multi-functions were analyzed for the quality control in *P. frutescens* leaves. Phenolic contents such as phenolic acid, cinnamic acid derivatives and flavonoids were shown from the methanol aqueous extracts using HPLC. The separation was performed on a reverse-phase C18 column using mobile phase composed of aqueous formic acid/acetonitrile mixtures at a flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The detection was carried out on a DAD detector. This method was validated include selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantitation.

Keywords: *Perilla frutescens*, phenolic components, antioxidants, validation, HPLC

서론

최근에는 현대인의 食生活의 변화에 따라 中焦에 이상 현상이 각종 생활습관병으로서 건강상의 문제로 많이 부각되고 있는 현실이다. 예로부터, 荳子和 荳子葉은 藥用으로서, 더 나아가 食用으로서 한국 식탁에서 사랑을 받아온 식물로 ‘東醫寶鑑’에서 ‘荳子是 性質이 따뜻하고 맛은 매우며 毒性은 없다. 氣를 내리고 기침과 갈증을 그치게 하고 肺를 녹여주고 中焦를 補하며 精髓를 補充해 준다’라고 했으며, ‘本草綱目’에서는 ‘임자엽은 생약으로서 그 쓰임이 中焦를 고르게 하고 냄새가 나는 것을 없애며, 氣가 치미는 것을 치료하고, 여러가지 벌레한테 물린 데와 陰囊이 부은데 찢어 붙인다’고 되어 있다.

* Correspondence: 정승일(Jeong Seung-il. Tel: +82-63-711-1050 Fax: +82-63-711-1051 E-mail: sijeong@jbi.re.kr)

· Received 2015-03-16, accepted 2015-03-19.

이러한 임자는 *Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara (꿀풀과, Labiatae)에 속하고, 한국, 중국, 일본 등지에서 자라는 한해살이풀인 들깨의 씨를 말한다. 임자엽은 들깨의 잎으로 蘇葉과는 다른 종에 속하는 다른 아종이다. 하지만, 대한민국한약외(생약)규격집 제4개정에서는 임자로서만 규격이 설정하여 관리하고 있고, 임자엽의 세부 규격 사항은 설정되어 있지 않다.

우리나라에서만 잎채소로서 식품으로 이용되고 있다고 보고되어 있는 임자엽이지만, 일본에서는 임자엽과 유사한 紫蘇葉으로서 많이 이용된다고 한다. 다만, 잎채소로서 보다는 색소 추출용이나 장식용으로 주로 이용한다. 임자엽에는 몸 안의 활성산소종을 제거하는 폴리페놀성 성분으로서 유효한 성분을 다량 함유되어 있다. 이러한 임자엽을 이용한 항돌연변이 관련 연구로서, 곰팡이 독소인 aflatoxin B1에 의해 유발되는 돌연변이가 임자엽에 의해 억제되는 효과가 있으며, 이러한 효과를 나타내는 물질로서 phytol 및 methyl-11, 14, 17-eicosatrienoate 등이 동정되어 보고된 바 있다¹⁾. 또한, 임자엽에는 항산화 작용을 하는 안토시아닌 성분이 풍부해 인체의 노화를 방지하고, 비타민 C도 다량 함유되어 피부미용과 주름 개선에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다²⁾. Polyphenol계 화합물로서 rosmarinic acid와 luteolin 성분이 멜라닌 색소를 억제하기 때문에 미백효과는 물론 기미, 주근깨 생성 예방에도 효과가 있다고 연구된 바 있다²⁾. 임자엽의 독특한 향은 perilla ketone과 limonen 성분 때문인데, 고기의 냄새나 생선의 비린내를 제거하는데 효과적이며 방부제 역할을 하기 때문에 생선회를 먹을 때 함께 섭취하면 식중독을 예방할 수 있다고 알려져 있다³⁾. 항산화 성분으로서 임자엽 중에는 apigenin, luteolin 및 naringenin과 같은 flavonoids와 phenolic acids로서 gallic acid, syringic acid, vanillic acid 등과 같은 benzoic acid류, caffeic acid, chlorogenic acid 등과 같은 cinnamic acid류이 함유되어 있으며, 그 외에도 lignan 및 lignin 성분들이 보고되어 있다⁴⁻⁶⁾.

이전의 많은 연구 결과에서 항산화 성분들의 정성 결과는 제시되어 있으나, 임자엽 내에서의 동시 분석에 대한 분석법 밸리데이션은 확인되어 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 임자엽의 항산화 성분으로서 주요 phenol 성분에 대한 분석법 밸리데이션을 실시하고, 추가적인 polyphenol 성분을 추가 검토하여 식약공용 한약재로서 임자엽을 활용한 제품개발에서 소재의 표준화를 위해 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 사용한 임자엽은 *Perilla frutescens* Britton var. *japonica* Hara의 잎으로 남천들깨 종으로서 2014년 전북 전주에서 수확하여 사용하였으며, 세척하여 건조한 다음 분쇄기(RT-02, MHK Co., Japan)를 사용하여 40mesh로 분쇄한 분말을 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 시료의 추출

임자엽의 추출방법은 분쇄시료 약 50g을 취하여 증류수를 10배의 부피로 가한 후 60°C 부근에서 가온하여 추출·여과한 다음 동결건조하였다. 또한, 분석용 시료를 위하여 70% 메탄올 수용액을 10배 수로 가한 후 1시간 동안 초음파 추출하여 농축하였다. 추출 후 농축 분말은 냉동고에 보관한 다음 실험에 사용하였다.

3. Polyphenols 및 flavonoids 함량 측정

임자엽 추출물에 대한 총 polyphenol 함량 및 총 flavonoid 함량의 측정 방법은 다음과 같다. 총 polyphenol 함량은 Kwon 등⁷⁾의 방법을 참고로 하고, 일부 변경하여 측정하였다. 추출물을 10mg·mL⁻¹을 제조하여 50μL에 7% sodium carbonate 50μL와 0.2N Folin-Ciocalteu reagent 50μL를 가한 후 10초 동안 vortex하였다. 혼합물은 상온에서 90분 동안 반응시킨 다음, MULTISKAN GO(Thermo Scientific, USA)의 96-well microplate reader를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 gallic acid equivalent(mg·g⁻¹)로서 사용하였고, 검량범위는 6.25~100μg·mL⁻¹로서 검량선은 $y=0.0148x$ 의 기울기를 통하여 측정치를 구하였다. 총 flavonoid 함량은 Adewusi 등⁸⁾의 방법을 참고로 하고, 일부 변경하여 확인하였다. 추출물을 10μg·mL⁻¹을 제조하여 0.5mL에 2% aluminium chloride 수용액과 1:1 비율로 가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물은 MULTISKAN GO(Thermo Scientific, USA)의 96-well microplate reader를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 flavonoid 함량은 quercetin equivalent(mg·g⁻¹)로서 사용하였고, 검량범위는 3.12~100μg·mL⁻¹로서 검량선은 $y=0.0124x$ 의 기울기를 통하여 측정치를 구하였다.

4. 항산화 활성 측정

임자엽 추출물의 DPPH radical scavenging에 대한 활성은 Liyana-Pathiranan 등⁹⁾의 방법을 참고로 하고 일부 변경하여 수행하였다. 96-Well microplate를 이용하여 추출물 15μL에 0.135mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 메탄올 용액을 185μL를 가한 후 vortex한 다음 암조건 하에서 상온으로 30분 동안 반응시켰다. 혼합 시료는 MULTISKAN GO(Thermo Scientific, USA)의 96-well microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 항산화 성분으로서 trolox가 사용되었으며, DPPH radical scavenging 활성 평가는 다음의 방정식을 활용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : DPPH 메탄올 용액의 흡광도

A_{sample} : DPPH 용액 + 추출물/표준용액의 흡광도

임자엽 추출물의 ABTS radical scavenging에 대한 활성은 Re 등¹⁰⁾의 방법을 참고로 하고, 일부를 변경하여 7.4mM ABTS[2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(diphenyl-2-picryl-hydrazyl)]와 2.6mM potassium persulfate를 혼합하여 실온 암조건 하에서 12시간 이상 반응시킴으로써 radical을 형성시켰다. 실험하기 바로 전에 ABTS 용액을 732nm에서 흡광도가 0.700이 되도록 하고 희석한 용액에 임자엽 추출물 50μL를 가하여 암소에서 10분 동안 반응시킨 후 732nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 활용한 ABTS radical scavenging 활성 평가는 다음의 방정식을 활용하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} : ABTS 메탄올 용액의 흡광도

A_{sample} : ABTS 용액 + 추출물/표준용액의 흡광도

5. 임자엽에 대한 주요 polyphenol 성분

임자엽에 대한 주요 polyphenol 성분은 이미 보고^{5,6)}되어 있는 성분을 선정하되 (재)전주생물소재연구소에서 수행한 사전 분석 결과를 바탕으로 하여 주요 polyphenol 성분을 확인하였다. 임자엽 추출물 중의 주요 성분은 figure 1에서 제시한 것처럼 7성분이었으며, phenolic acids로서 caffeic acid(1), ferulic acid(3), rosmarinic acid(5)이 선정되었고, 주요 flavonoids로서 luteolin-7-O-D-glucuronide(2), apigenin-7-O-D-glucose(4), quercetin (6), luteolin(7)으로 선택하여 밸리레이션을 수행하였다.

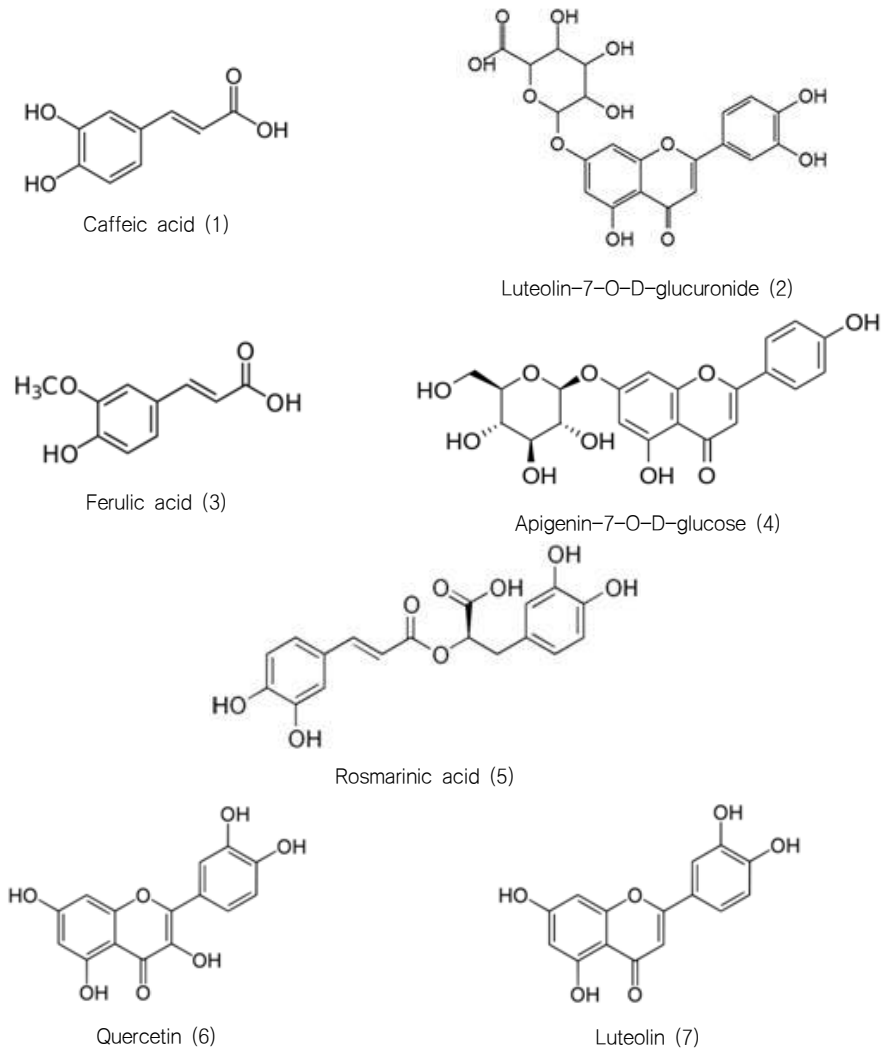


Figure 1. 임자엽 추출물에 대한 주요 polyphenol 성분의 화학적 구조

6. HPLC를 이용한 주요 polyphenol 성분 분석법 확립

건조된 분말 임자엽을 2~5g씩 취하여 70% 메탄올 수용액으로 10배의 비율로 재용해한 후 1시간 동안 초음파 추출하였다. 추출물은 0.45 μ m 크기의 시린지 필터를 이용하여 여과한 다음 검액으로 사용하였다. 임자엽 추출물에 대한 분석법 확립을 위하여 Agilent 1200 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)가 이용되었으며, 검액은 Shiseido사(Japan)의 CapCellPak MGII C18 분석용 컬럼(4.6 \times 150mm ID, 3 μ m 입자크기)을 사용하였다. 분석을 위한 컬럼은 35 $^{\circ}$ C에서 유지되었다. 각 성분을 분석하기 위한 검출기 Agilent 1200의 MWD(multi-wavelength detector)가 사용되었으며, 자외선 흡광도는 254, 280, 320nm에서 수행하였다. 각 성분의 분리를 위해 사용된 이동상은 0.5% 개미산 수용액(A)과 0.5% 개미산이 함유된 아세토니트릴(B) 혼합용매이었다. 각 성분 분리는 시간 대비 용매 조성 비율에 따른 gradient 분리방법을 사용하였으며, 초기 5분 동안 10% B로 유지하였고, 15분-20% B, 20분-30% B, 25분-30% B, 35분-40% B, 40분-70% B, 45분-70% B, 50분-10% B의 조건이었으며, 유속은 0.5mL \cdot min $^{-1}$ 이었고, HPLC에는 10 μ L가 주입되었다. 이상의 과정은 일내 및 일간 안정성을 확보하면서 분석법을 확립하였다.

7. 통계 처리

본 연구과정에서의 실험은 3회 반복으로 수행되었으며, 평균치와 표준편차로 나타내어 재현성 확인을 위하여 정밀성은 (relative standard deviation, RSD, %)로 표기하였다. 임자엽 추출물 중의 항산화 활성 확인을 위한 실험에서 임자엽 추출물에 대한 주요 polyphenol 성분의 정량 농도의 산출은 표준물질에 대한 peak 면적비와 조제 농도를 이용하였고, 가중 최소자승법에 따르는 검량선의 회귀식을 이용해 농도를 산출하였다. 검량선의 작성 및 농도의 산출에는 Agilent Chemstation software(Agilent 1200 series)를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. Polyphenols 및 flavonoids 함량 측정

총 polyphenol 함량 및 총 flavonoid 함량은 아래 table 1과 같이 측정치를 확인하였다. 임자 종자에서는 총 polyphenol 함량이 1.38 \pm 0.07mg \cdot g $^{-1}$ (GAE)으로 확인되었고, 임자엽에서는 0.77 \pm 0.02mg \cdot g $^{-1}$ 으로 확인되었다. 임자엽의 열수추출물에서의 총 polyphenol 함량은 46.45 \pm 0.25mg \cdot g $^{-1}$ 으로 나타났다. Table 1에서 보듯이, 70% 메탄올 수용액을 이용한 추출물 중의 총 polyphenol 함량보다 열수추출 조건에서의 총 polyphenol 함량이 높게 나타났다. 하지만, 임자엽의 총 flavonoid 함량의 결과에서는 열수추출 후에는 2.07 \pm 0.04%이었고, 70% 메탄올 수용액 추출 후에는 8.82 \pm 0.38%로서 70% 메탄올 수용액을 이용한 추출 조건에서 약 4배 높은 결과치 mg \cdot g $^{-1}$ (QUE)를 확인하였다. 임자엽의 각 추출 조건에 따른 항산화 활성으로서 열수추출 방법으로 추출하여 동결건조한 후 31.25~1,000 μ g \cdot mL $^{-1}$ 농도로 DPPH radical 소거 활성을 측정하고, ABTS radical scavenging 활성을 확인하였다. 임자엽의 열수추출물은 DPPH radical 소거능이 23.31 \pm 0.02%이었으나, 70% 메탄올 수용액 추출물의 DPPH radical scavenging 활성은 약 88.56 \pm 0.62%로 결과로 나타났다. 또한, ABTS radical scavenging

활성에서는 열수추출물은 약 72.19±0.82%이었으나, 70% 메탄올 추출물에서는 94.71±0.25%로 확인되었다(Table 2). 이러한 결과를 통하여 임자엽을 이용한 항산화 기능성을 활용하기 위해서는 알코올 추출물로서 추후 생약의 당제 활용을 위해서는 추출 조건 및 기능성 부분을 검토하여 제품에 적용해야 할 것으로 사료된다.

Table 1. 임자엽 추출 조건에 따른 총 polyphenol 및 총 flavonoid 함량(mg·kg⁻¹)

Sample information	Extraction	Total polyphenols*	Total flavonoids†
<i>P. frutescens</i> seed meal	70% MeOH aq.	1.38±0.07	17.01±0.71
<i>P. frutescens</i> leaves	70% MeOH aq.	0.77±0.02	8.82±0.38
	Water	46.45±0.25	2.07±0.04

Data represent mean±SD (n=3).

* Expressed as mg gallic acid·g⁻¹ of dry sample materials.

† Expressed as mg quercetin·g⁻¹ of dry sample materials.

Table 2. 임자엽 추출물의 DPPH 및 ABTS radical scavenging ability(%)

Sample information	Extraction	DPPH activity*	ABTS activity†
<i>P. frutescens</i> seed meal	70% MeOH aq.	87.82±0.49	94.28±0.07
<i>P. frutescens</i> leaves	70% MeOH aq.	88.56±0.62	94.71±0.25
	Water	23.31±0.02	72.19±0.82

Data represent mean±SD (n=3).

* Radical scavenging activity (%) of ascorbic acid as the control was 91.33%.

† Radical scavenging activity (%) of trolox as the control was 94.86%.

2. HPLC를 이용한 주요 polyphenol 성분 분석법 확립

시료의 분석은 (재)전주생물소재연구소에서 확립된 방법으로 HPLC를 이용하였으며, 앞서 수행한 항산화 효능 검증에서 열수추출 조건보다 70% 메탄올 수용액 추출조건에서 항산화 활성이 더 높게 나타났기 때문에, 임자엽에 대한 밸리데이션은 70% 메탄올 수용액 추출 후 분석법 적용을 확인하였다. 밸리데이션은 표준물질의 특이성/선택성, 직선성, 검량한계(LODs) 및 정량한계(LOQs)를 포함하여 수행하였다. Repeatability의 확인을 위해서 일내 및 일간 정밀성 및 정확성으로 구분하여 분석법 밸리데이션을 실시하였다. Phenol 성분으로서 선택한 표준 성분으로 caffeic acid(1), luteolin-7-O-glucoside(2), ferulic acid(3), apigenin-7-O-glucoside(4), rosmarinic acid(5), quercetin(6), luteolin(7)을 선정하여 분석을 수행하였다. 각 성분에 대한 LODs의 농도는 0.2~0.5µg·mL⁻¹에서 확인되었으며, 각 성분별 LODs의 signal to noise ratio(S/N ratio)는 3 이상으로 특이성을 확보하였다. LODs의 선택성을 확인하기 위하여 각 성분별 RPA(relative peak area)와 RRT(relative retention time)를 평가하였다. 평가 결과는 table 3에서 보듯이, 각 성분별 RPA의 RSD(relative standard deviation,%)는 0.38~3.96%로서 재현성을 확보하였다. 또한, RRT에 대한 재현성 부분도 RSD(%)가 1.0% 이하로 나타남으로써 해당 성분별 선택성을 확인하였다. 또한, 각 성분별 직선성을 확인하기 위하여 검량농도는 luteolin-7-O-glucuronide(2)의 경우 2.0~100.0µg·mL⁻¹으로 설정하였고, 이 외의 다른 6성분에 대한 검량 농도는 1.0~50.0µg·mL⁻¹으로 설정하여 평가하였다(table 4, 5).

Table 3. 임자엽 추출물 중 표준성분 분석을 위한 LODs 선택성 평가

Analytes	LODs			
	RPA (mean±SD)	RSD (%)	RRT (mean±SD)	RSD (%)
CAA*	1.65±0.02	0.91	0.66±0.00	0.06
LTG*	1.02±0.04	3.96	0.89±0.00	0.10
FEA*	1.74±0.01	0.38	0.91±0.00	0.01
APG*	0.84±0.00	0.49	0.95±0.00	0.02
ROA*	1.00	0.00	1.00	0.00
QUT*	1.02±0.01	0.61	1.25±0.00	0.03
LUT*	1.04±0.02	1.53	1.26±0.00	0.03

* Analyte was expressed as free form.

The abbreviation mean CAA: caffeic acid, LTG: luteolin-7-O-glucuronide, FEA: ferulic acid, APG: apigenin-7-O-glucoside, ROA: rosmarinic acid, QUT: quercetin, LUT: luteolin.

RSD(%): the relative standard deviation; RPA: relative peak area; RRT: relative retention time.

Table 4. 임자엽 추출물 중 각 phenolic components 별 검량농도의 정확성(%)

Nominal Conc. (µg·mL ⁻¹)	Accuracy (%) of Calibration curves on Intra-day						
	CAA*	LTG*	FEA*	APG*	ROA*	QUT*	LUT*
1 / 2	4.49	2.17	7.32	4.40	5.47	0.37	2.01
2 / 4	0.56	0.85	1.07	0.05	1.03	-0.11	0.20
5 / 10	-0.89	0.55	-1.15	-0.96	-0.41	-0.06	0.06
10 / 20	-1.43	-1.63	-1.69	-1.16	-1.87	-0.66	-0.80
20 / 40	0.20	0.34	-0.10	0.21	0.09	0.66	0.59
50 / 100	0.03	1.00	0.09	0.02	0.06	-0.08	-0.06

* Analyte was expressed as free form.

Calibration range of LTG was from 2 µg/mL to 100 µg/mL.

The abbreviation mean CAA: caffeic acid, LTG: luteolin-7-O-glucuronide, FEA: ferulic acid, APG: apigenin-7-O-glucoside, ROA: rosmarinic acid, QUT: quercetin, LUT: luteolin

Table 5. 임자엽 추출물 중 각 phenolic components 별 검량농도의 직선성(%)

Analytes	$y=ax + b$		Correlation Coefficient (r^2)	Detection (nm)	Range (µg/mL)	t_R (min)
	Slope (a)	b				
CAA*	108.266	12.4360	0.99997	320	1 ~ 50	17.6
LTG*	36.479	4.3057	0.99998	254	2 ~ 100	23.7
FEA*	112.880	16.3279	0.99997	320	1 ~ 50	24.1
APG*	56.231	6.3687	0.99997	320	1 ~ 50	25.3
ROA*	66.059	14.3758	0.99995	320	1 ~ 50	26.5
QUT*	71.928	1.0837	0.99998	254	1 ~ 50	33.0
LUT*	76.141	-3.7081	0.99998	254	1 ~ 50	33.4

* Analyte was expressed as free form.

The abbreviation mean CAA: caffeic acid, LTG: luteolin-7-O-glucuronide, FEA: ferulic acid, APG: apigenin-7-O-glucoside, ROA: rosmarinic acid, QUT: quercetin, LUT: luteolin

Table 6. 임자엽 추출물 중 각 phenolic components 별 일내 정밀성(%)과 정확성(%)

Sample ID	Precision(CV, %) and accuracy(RE, %) of QCs on Intra-day							
	CAA*	LTG*	FEA*	APG*	ROA*	QUT*	LUT*	
LOQ	CV(%)	0.69	0.13	0.02	0.27	1.14	0.48	0.55
	RE(%)	-4.95	-2.26	-7.31	-4.58	-6.23	-0.03	-2.39
LQC	CV(%)	0.48	6.77	0.37	0.53	0.42	0.19	0.34
	RE(%)	-0.27	-4.43	-0.83	0.26	-0.74	0.83	-0.10
MQC	CV(%)	0.02	0.05	0.03	0.05	0.18	0.08	0.06
	RE(%)	0.83	-0.03	1.11	0.94	0.43	0.12	-0.12
HQC	CV(%)	0.52	0.34	0.50	0.44	0.43	0.20	0.08
	RE(%)	2.34	1.30	2.69	2.42	1.87	1.59	1.46

* Analyte was expressed as free form.

CV(%): Standard deviation of calculated concentration / mean calculated concentration × 100

RE(%): (Concentration - nominal concentration) / nominal concentration × 100

The abbreviation mean CAA: caffeic acid, LTG: luteolin-7-O-glucuronide, FEA: ferulic acid, APG: apigenin-7-O-glucoside, ROA: rosmarinic acid, QUT: quercetin, LUT: luteolin

Table 7. 임자엽 추출물 중 각 phenolic components 별 일간 정밀성(%)과 정확성(%)

Sample ID	Precision(CV, %) and accuracy(RE, %) of QCs on Inter-day							
	CAA*	LTG*	FEA*	APG*	ROA*	QUT*	LUT*	
LOQ	CV(%)	0.75	1.63	1.05	0.85	0.75	0.82	1.02
	RE(%)	-4.43	-1.24	-6.46	-3.89	-5.99	0.63	-1.66
LQC	CV(%)	0.51	4.38	1.64	0.34	0.59	0.20	0.50
	RE(%)	0.08	-2.87	-1.46	0.38	-0.44	0.85	-0.49
MQC	CV(%)	0.59	0.40	0.62	0.62	0.52	0.57	0.50
	RE(%)	2.71	1.51	3.09	2.79	2.20	1.98	1.81
HQC	CV(%)	1.01	0.92	1.06	1.04	1.04	1.03	1.08
	RE(%)	0.72	0.17	1.08	0.62	0.53	0.35	0.09

* Analyte was expressed as free form.

CV(%): Standard deviation of calculated concentration / mean calculated concentration × 100

RE(%): (Concentration - nominal concentration) / nominal concentration × 100

The abbreviation mean CAA: caffeic acid, LTG: luteolin-7-O-glucuronide, FEA: ferulic acid, APG: apigenin-7-O-glucoside, ROA: rosmarinic acid, QUT: quercetin, LUT: luteolin

각 성분별 검량 농도에 대한 정확성(%)은 -1.69~7.32%로서 ICH guide line(The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) 중 검량선의 최저 농도(LOQ)는 정밀성 및 정확성이 ±20% 이하이어야 한다는 기준에 만족하였고, 다른 농도에서는 ±15% 이하이어야 한다는 기준에 만족함을 확인하였다. Blank 시료에 대한 표준 성분별 검량선 확인 결과 linearity($r^2 \geq 0.99$)는 유의하였다(table 5). 분석법의 repeatability를 확인하기 위하여 일내 또는 일간 정밀성 및 정확성에 대한 QC의 평가 결과는 table 6에서처럼, caffeic acid(1)의 경우 LOQ의 농도는 검량농도의 정량한계 농도로서($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)로 설정되었으며, 정밀성(CV, %)은 0.69%이었고, 정확성(RE, %)은 -4.95%로서 ±20% 이하이어야 한다는 기준에 만족하였다. 다른 농도로서 LQC(저농도)는 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로, MQC(중농도)는 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로, HQC(고농도)는 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 로 설정하여 평가하였다. 일내 정밀성 및 정확성 확인 결과, 정밀성은 0.02~0.69%로서 1.0% 이하로 나타났으며, 정확성은 -4.95~2.34%로서 ±5% 이하로 확인되었다. 함유량이 많은 주성분으로서 rosmarinic acid(5)의 LOQ의 일내 정밀성은 1.14%, 정확성은 -6.23%로서 나타나

±20% 이하이어야 한다는 기준에 만족하였다. 다른 농도에서도 정밀성은 1.0% 이하로 나타났으며, 정확성은 -6.23~1.87%로서 나타났다. 또한, 다른 phenol 성분들에서도 평가 결과, 모두 기준에 만족함을 확인하였다. 일간 정밀성 및 정확성의 평가 결과는 table 7에서처럼, 정밀성은 0.20~4.38%로서 5% 이하로 나타났고, 정확성은 -6.46~2.79%로서 ±15% 이하이어야 한다는 기준에 만족하였다. 이러한 결과를 통하여 본 연구에서 설정된 분석방법은 임자엽 중 phenol 성분의 동시분석법으로 적합함을 확인하였다. 확립된 분석법에 의하여 해당 phenol 성분에 대한 HPLC 상의 chromatogram은 아래 figure 2에서 제시하였으며, figure 2(B)에서는 UV 320nm에서 검출되는 성분을 대표적으로 나타냈다. 다만, UV 254nm에서 검출되는 성분(peak 2, 6, 7)은 함량 결과로서 table 8에서 나타났다.

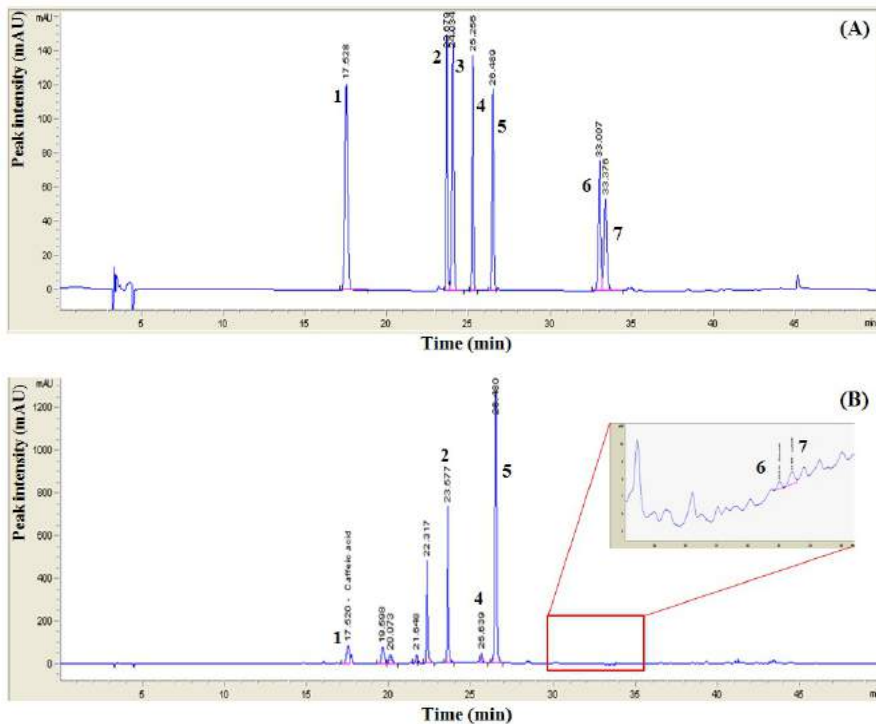


Figure 2. 임자엽 추출물 중의 HPLC 크로마토그램. (A) 표준용액 중의 phenol 성분, (B) 임자엽 추출물의 주요 phenol 성분. (1) caffeic acid, (2) luteolin-7-O-D-glucuronide, (3) ferulic acid, (4) apigenin-7-O-D-glucoside, (5) rosmarinic acid, (6) quercetin, (7) luteolin

Table 8. 임자엽 및 荳子 추출물 중 부위별 phenolic components 함량(mg·kg⁻¹) 확인

Sample ID	Extract	Acquired results (mg/kg)						
		CAA*	LTG*	FEA*	APG*	ROA*	QUT*	LUT*
P. frutescens seed	70% MeOH	11.30	695.42	N.D.	261.94	2051.22	10.43	7.65
P. frutescens leaves	70% MeOH	379.92	1955.38	1.07	69.79	5365.32	10.16	10.90
	Water	59.94	90.77	0.74	1.54	136.11	1.02	0.52

* Analyte was expressed as free form.

The abbreviation mean CAA: caffeic acid, LTG: luteolin-7-O-glucuronide, FEA: ferulic acid, APG: apigenin-7-O-glucoside, ROA: rosmarinic acid, QUT: quercetin, LUT: luteolin

N.D.: Not detected.

3. 임자엽에 대한 주요 polyphenol 성분

임자엽 항산화 효능에 대한 유효성분으로서 정량분석을 실시하여 부위 별 및 추출 조건 별 함량($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)을 확인하였다. Table 8에서와 같이, caffeic acid(1)는 종자에서의 함량($11.30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)과 비교하였을 때, 70% 메탄올 수용액 추출물($372.92\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)과 열수추출물의 조건($59.94\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)에서 약 5~30배 정도의 함량 차이를 확인하였다. 또한, luteolin-7-O-glucuronide(2), rosmarinic acid(5) 및 luteolin(7)의 성분에서 각각 $1955.38\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $5365.32\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $10.90\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 등 부위 별 함량 차이를 확인하였다. 다만, apigenin-7-O-glucoside(4)는 종자 부위에서 $261.94\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 으로서, 임자엽보다 약 3배 정도 많은 함량을 나타냈으며, quercetin(6)의 함량은 서로 유사하였다.

결론

본 연구에서 생약 자원으로서의 임자엽에 대한 항산화 성분으로서 활성을 확인하였고, polyphenol 성분에 대한 다성분 동시분석법을 확립하였다. 다성분으로서 확인된 phenol 성분은 caffeic acid(1), caffeic acid, luteolin-7-O-glucoside(2), ferulic acid(3), apigenin-7-O-glucoside(4), rosmarinic acid(5), quercetin(6), luteolin(7)을 선정하여 분석법 밸리데이션을 수행하였다. 특히, rosmarinic acid는 다른 성분들과 상대적으로 3~20배 많은 함량을 함유하고 있음을 확인하였다. 또한, luteolin-7-O-glucuronide 성분이 두 번째로 많은 비율(약 2~5배)로 차지하고 있어 향후 임자엽을 활용한 제제의 관리나 제품 개발에서 중요한 기능성 지표가 될 것으로 사료된다. 또한, 임자엽은 칼륨, 칼슘, 철 등의 무기질이 많은 알칼리성 식약 공용소재인데, 특히, 칼슘, 구리, 철, 칼륨, 마그네슘, 나트륨, 인, 아연의 무기질 함량을 평가한 결과, 다른 무기질에 대비 임자엽에서는 칼슘 및 칼륨이 상대적으로 높은 함량을 나타냈다(data not shown). 따라서, 항산화 성분으로서 phenol 성분과 무기질의 기능성을 적용한 추가 연구를 통하여 생약 자원으로서 임자엽의 활용도와 이해도를 높이는 계기될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 전라북도 '산학연 핵심기술개발 및 사업화 지원사업 (2013하 C11)'의 지원으로 수행하였다.

참고문헌

1. Oh SI. Screening for antioxidative and antimutagenic capacities in 7 common vegetables taken by Korean. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003;32:1344-50.
2. Lee HS, Lee HA, Hong CQ, Yang SY, Hong SY, Park SY, Lee HJ, Lee KW. Quantification of caffeic acid and rosmarinic acid and antioxidant activities of hot-water extracts from leaves of *Perilla frutescens*. Korean J. Food Sci. Technol. 2009;41(3):302-6.
3. Choi YM, Lee YG. Comparative studies on the amino acids and flavor compounds some varieties

- of *Perilla* leaves cultivated in Mirang area. *J. Life Sci.* 2004;14(6):931-7.
4. Mohammad Asif. Phytochemical study of polyphenols in *Perilla frutescens* as an antioxidant. *Avicenna J. Phytomedicine.* 2012;2(4):169-78.
 5. Lee JH, Park KH, Lee MH, Kim HT, Seo WD, Kim JY, Baek IY, Jang DS, Ha TJ. Identification, characterization and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing from the seed of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chem.* 2013;136:843-52.
 6. Zhou XJ, Yan LL, Yin PP, Shi LL, Zhang JH, Liu YJ, Ma Chao. Structural characterization and antioxidant activity evaluation of phenolic compounds from cold-pressed *Perilla frutescens* var. *arguta* seed flour. *Food Chem.* 2014;164:150-7.
 7. Kwon YR, Cho SM, Hwang SP, Kwon GM, Kim JW, Youn KS. Antioxidant, physiological activities and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Portulaca oleracea* extracts with different extraction methods. *J. Korean Soc Food Sci. Nutr.* 2014;43(3):389-96.
 8. Adewusi EA, Moodley N, Steenkamp V. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African J. Botany.* 2011;77(3):638-44.
 9. Liyana-Pathiranan CM, Shahidi F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:2433-40.
 10. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biol. Med.* 1999;26:1231-7.
 11. Monika Skowyra, Victor Falguera, Nurul A. M. Azman, Francisco Segovia, Maria P. Almajano. The effect of *Perilla frutescens* Extracts on the oxidative stability of model food emulsions. *Antioxidants.* 2014;3:38-54.

