

## 건강기능식품 기능성 원료로써 장흥 차조기 열수 추출물의 지표성분인 로즈마린산 분석법 검증

박성용<sup>1\*</sup> · 김정은<sup>1\*</sup> · 최철웅<sup>2</sup> · 이동욱<sup>2</sup> · 김기만<sup>3</sup> · 윤 구<sup>1</sup> · 윤인수<sup>1</sup> · 문홍섭<sup>1</sup> · 조승식<sup>1</sup>

<sup>1</sup>목포대학교 약학과

<sup>2</sup>전라남도 생물산업진흥재단 천연자원연구원

<sup>3</sup>(주)새롬

### Analytical Validation of Rosmarinic Acid in Water Extract of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo as Functional Health Ingredient

Sung-Yong Park<sup>1\*</sup>, Jung-Eun Kim<sup>1\*</sup>, Chul-Yung Choi<sup>2</sup>, Dong-Wook Lee<sup>2</sup>, Ki-Man Kim<sup>3</sup>,  
Goo Yoon<sup>1</sup>, In-Su Yoon<sup>1</sup>, Hong-Seop Moon<sup>1</sup>, and Seung-Sik Cho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University

<sup>2</sup>Jeonnam Bioindustry Foundation, Institute of Natural Resources Research

<sup>3</sup>Serom Co., Ltd. Research Institute

**ABSTRACT** This study attempted to establish an HPLC analysis method for determination of marker compounds as a part of material standardization for the development of health functional food materials from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. The quantitative determination method of rosmarinic acid as a marker compound of *P. frutescens* Britton var. *acuta* Kudo extract (PFE) was optimized by HPLC analysis using a C18 column (4.6×150 mm, 5 μm) with 0.1% acetic acid as the elution gradient and methanol as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min and detection wavelength of 280 nm. The HPLC/UV method was applied successfully to quantification of the marker compound in PFE after validation of the method with linearity, accuracy, and precision. The method showed high linearity in the calibration curve at a coefficient of correlation ( $R^2$ ) of 0.9995, and the limit of detection and limit of quantitation were 0.36 μg/mL and 1.2 μg/mL, respectively. Relative standard deviation (RSD) values of data from intra- and inter-day precision were less than 3.21% and 1.43%, respectively. Recovery rate test at rosmarinic acid concentrations of 12.5, 25 and 50 μg/mL scored between 97.04~98.98% with RSD values from 0.25~1.97%. These results indicate that the established HPLC method is very useful for the determination of marker compound in PFE to develop a health functional material.

**Key words:** *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, rosmarinic acid, HPLC, validation, functional health food

## 서 론

최근 식습관의 선진화로 만성질환 발병율이 증가하는 추세에 있다. 만성질환에는 비만, 당뇨, 고혈압 및 이상지질혈증(콜레스테롤) 등이 대표적이다. 만성질환은 복합적인 원인에 의해 발생하며 대표적으로 흡연, 운동부족 및 음주 등이 관련이 있다(1). 이 중 알코올 섭취와 건강은 밀접한 관계가 있으며 알코올은 인체 대사에 복잡한 영향을 준다. 특히 알코올은 신체 내에 흡수되어 간에서 대사되므로 간 자체에 많은 부담을 주며, 영양소 대사에도 영향을 미친다(2-4). 현

대인들은 이러한 알코올 섭취 후 증상을 완화하고 만성질환을 예방하기 위해 유효성이 검증된 기능성 소재에 많은 관심을 두고 있다.

차조기(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo)는 1년생 초본으로 laminaceae에 속하며 아시아권에서 식용으로 널리 활용하는 식물이다. 차조기는 항산화, 항알레르기, 항균, 항암 및 당뇨에 효능이 있는 것으로 보고되어 왔으며, 그 구성 성분으로는 anthocyanin, essential oil, vitamin, mineral 및 rosmarinic acid 등이 보고되었다(5-9). 차조기의 약리 활성으로는 차조기 30% 메탄올 추출물을 마우스에 경구 투여 후 강제수영부하시험을 실시한 경우 항우울, 인내력 증강 효과가 보고되었으며, 차조기 추출물의 rosmarinic acid의 함량을 낮추는 경우 면역 증진 효과가 감소하는 것으로 보아 rosmarinic acid가 면역반응에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 또한 차조기 30% 에탄

Received 23 September 2014; Accepted 30 October 2014

Corresponding author: Seung-Sik Cho, Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University, Muan, Jeonnam 534-729, Korea

E-mail: sscho@mokpo.ac.kr, Phone: +82-61-450-2687

\*The first two authors contributed equally to this work.

을 추출물 및 rosmarinic acid를 알레르기성 비염 동물 모델에 적용 시 IL-6(interleukin 6), IL-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ ) 및 TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ )의 mRNA 발현 감소에 의한 염증 억제 효과도 보고되었다(10,11). 따라서 본 연구진은 차조기가 다양한 기능성을 가지고 있는 식물 재료로서 가치가 높다고 판단하였으며 특히 차조기 열수 추출물이 알코올성 간 손상에 유효함을 확인하였다. 따라서 차조기를 활용한 간 손상 개선 기능성 제품을 개발한다면 차조기 소비 증대 및 농가의 부가가치 증대에 도움이 될 것으로 생각되었다. 본 연구진은 차조기 잎을 이용하여 개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료를 개발할 목적으로 차조기의 지표성분으로 rosmarinic acid를 선정하였으며, HPLC법을 이용하여 지표성분의 분석법을 확립하고 그 유효성을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 차조기는 전라남도 장흥군에서 재배한 잎으로써 6월에 채취하여 열수 추출 및 동결건조 후 냉동보관된 것을 천연자원연구원(Jangheung, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 차조기 열수 추출물 분말은 동일한 제조 공정에 따라 생산된 것으로 3 lot를 분양받았다.

### 표준용액의 조제

본 실험에서 사용된 rosmarinic acid 표준품은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. 검량선 작성을 위해 표준품은 methanol에 녹여 1 mg/mL가 되도록 표준 원액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL로 조제하였다. Rosmarinic acid의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

### HPLC 분석

차조기 열수 추출물의 rosmarinic acid 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 1에 요약하였다. HPLC 분석에서 칼럼은 Zorbax extended-C18(4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m, Agilent Tech, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였고, HPLC 장비는 pump, autosampler, column oven, photodiode array UV/VIS detector(Waters HPLC system, Millford, MA, USA)를 사용하였고, 데이터 수집 및 처리를 위해 Empower software program(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하였다. A 용매는 0.1% acetic acid, B 용매는 methanol을 사용하였으며 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 칼럼의 유속은 1 mL/min이었으며 분석시간은 0에서 15분까지 이동상 A를 65%로 용리하였고, 15분에서 25분까지 이동상 B를 100%로 증가시켰다. 이후 30분까지 이동상 A를 65%로 내려 초기 용매 조건으로 조정하였다. UV는 280 nm 파장에서 측정하였으며, 시료는

**Table 1.** Analytical conditions of HPLC for analysis of rosmarinic acid

Parameters	Conditions		
Column	Zorbax extended-C18 (C18, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m)		
Flow rate	1 mL/min		
Injection volume	20 $\mu$ L		
UV detection	280 nm		
Run time	30 min		
Gradient	Time (min)	% A <sup>1)</sup>	% B <sup>2)</sup>
	0	65	35
	5	65	35
	15	65	35
	25	0	100
	30	65	35

<sup>1)</sup>1% acetic acid in water. <sup>2)</sup>Methanol.

20  $\mu$ L를 주입하였다.

### 시험방법의 검증(method validation)

차조기 열수 추출물의 건강기능 식품 기능성 원료 및 기준규격인정 및 품질관리를 위한 벨리데이션은 '의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드라인(식품의약품안전처)'에 기초하여 수행되었다.

**특이성 (specificity):** Rosmarinic acid 표준용액과 전처리한 차조기 열수 추출물 분말을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 retention time과 spectrum을 비교하였다.

**직선성 (linearity):** Rosmarinic acid 표준용액 1 mg/mL를 조제하여 methanol로 순차적으로 희석하여 5~100  $\mu$ g/mL의 시료를 HPLC로 분석한 후 농도에 대한 면적에 대하여 검량선을 작성하고, R<sup>2</sup>값을 확인하였다. 최저 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N) 값이 3.3일 때로, 검출한계(LOD, limit of detection)는 S/N 비율이 10일 때로 계산하였다.

**정확성 (accuracy):** 정확성은 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)의 변이성을 측정하였다. 표준용액은 rosmarinic acid를 10  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL로 조제하여 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)에서 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결과값이 참값에 근접한 정도를 백분율로 나타내었다. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였으며 inter-day의 정확성은 intra-day의 과정을 3일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였다. 각 시험은 구간마다 세 농도를 3회 반복하여 HPLC로 분석하였다.

**정밀성 및 회수율 (precision and recovery):** 정밀성은 12.5  $\mu$ g/mL, 25  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL 농도의 표준용액을 각각 6회 반복하여 상대표준편차를 측정하였다. 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 계산하였다. 회수율은 세 농도의 표준용

액을 6회 반복 시험 후 얻은 면적을 표준용액의 면적과 비교하여 회수율을 구하였다.

**차조기 열수 추출물 내에서의 rosmarinic acid 분석**

천연자원연구원에서 분양받은 세 lot의 차조기 열수 추출물은 50 mg/mL가 되도록 전 처리하고 0.45 µm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 세 번씩 반복 분석하였다. 표준용액의 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 차조기 열수 추출물 시료 중 rosmarinic acid의 농도를 산출하였다.

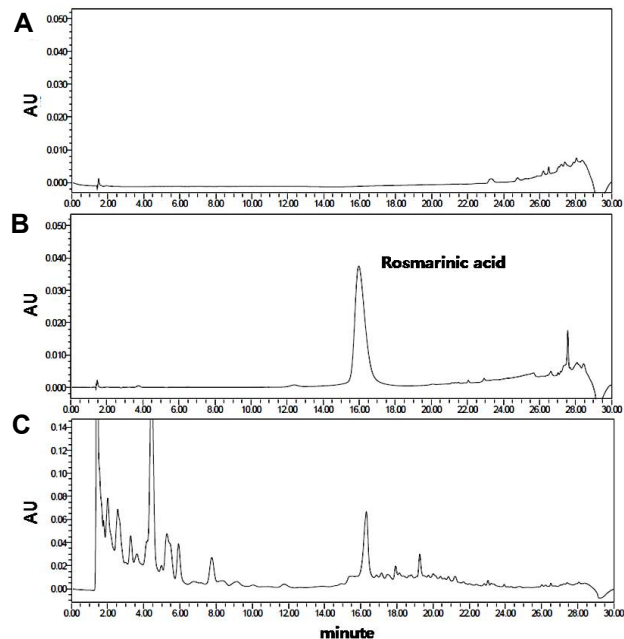
**결과 및 고찰**

**특이성 확인**

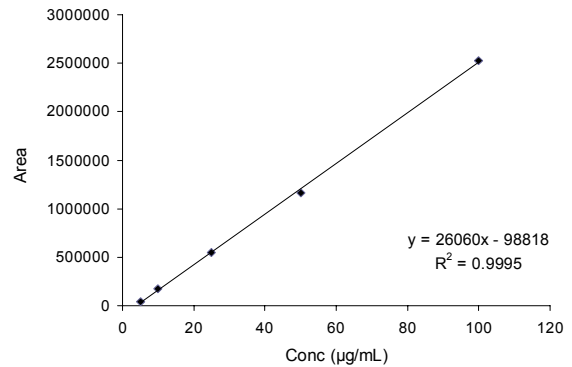
특이성시험을 통해 rosmarinic acid가 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는지 확인하였다. 표준용액과 시료 전처리 방법으로 처리한 차조기 열수 추출물의 크로마토그램을 비교하여 rosmarinic acid peak가 분리되는지를 확인한 결과, Fig. 1과 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액의 피크유지시간과 차조기 열수 추출물의 피크 유지시간이 일치하였다. 본 분석방법이 부형제에 영향을 받는지 검토하기 위해 유당, 미결정셀룰로오스가 포함된 시험액을 조제하여 분석한 결과 본 HPLC 분석법에서는 rosmarinic acid의 검출에 아무 영향을 미치지 않았다 (data not shown).

**직선성, 검출한계 및 정량한계**

5~100 µg/mL의 단계적으로 희석한 rosmarinic acid 표



**Fig. 1.** Chromatogram of (A) blank, (B) rosmarinic acid standard solution, and (C) PFE.



**Fig. 2.** Calibration curve of rosmarinic acid standard solution.

준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 Fig. 2와 같은 검량선을 나타내었다. 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9995로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 0.36 µg/mL, 정량한계는 1.2 µg/mL 수준으로 나타났다. Liu 등(12)은 검출한계 0.06 µg/mL, 정량한계 0.31 µg/mL로 보고하여 본 연구 결과보다는 약간 낮은 수준을 보였다. 본 연구는 차조기 열수 추출물의 표준화를 위해 설정된 지표성분의 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 충분히 본 연구에서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

**정확성, 정밀성 및 회수율**

정확성 결과는 Table 2와 같이 intra-day 분석에서 97.9 ± 1.03~109.24 ± 2.03%로, inter-day 분석에서는 96.92 ± 0.61~99.26 ± 1.43%를 보였다. 정밀성은 세 농도를 각각 6반복 후 RSD 값을 분석하였으며, 회수율은 세 농도를 6반복 후 얻은 시료 면적을 검량선에 근거하여 회수되는 시료 양을 백분율로 계산하였다. Table 3과 같이 rosmarinic acid 성분의 회수율은 97.04~98.98%였으며, RSD는 2% 이내로 나왔다. 농도별로 12.5 µg/mL에서는 97.04%, 25 µg/mL에서는 98.98%, 50 µg/mL에서는 97.84%의 회수율을 보였다. 지표성분으로써 rosmarinic acid에 대한 분석방법의 벨리데이션에 대한 보고는 Liu 등(12)의 연구에서 확인할 수 있었다. Liu 등(12)은 rosmarinic acid 분석법에 대한 연구에서  $R^2$ 는 0.9995 이상으로 91.12%~100.46%의 회수율을 얻었으며 RSD는 2% 이내로 보고하였다. Liu 등(12)이 보고한 검출한계, 정량한계, 회수율 결과는 본 연구 결과와 유사

**Table 2.** Intra- and inter-day accuracy of rosmarinic acid

	Nominal concentration	Mean measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)	RSD (%)
Intra-day	10	10.92	109.24	2.03
	25	24.62	98.49	3.21
	50	48.95	97.90	1.03
Inter-day	10	9.93	99.26	1.43
	25	24.23	96.92	0.61
	50	48.84	97.67	0.49

**Table 3.** Precision of rosmarinic acid

Nominal concentration (µg/mL)	Mean measured concentration (µg/mL)	SD	Recovery (%)	RSD (%)
12.5	12.13	0.23	97.04	1.97
25	24.75	1.66	98.98	0.67
50	48.92	0.12	97.84	0.25

**Table 4.** Amount of rosmarinic acid in PFE

	Mean measured concentration (µg/mL)	SD	RSD (%)	Contents (%)
Lot 1	141.6	28.4	20.1	0.028
Lot 2	158.2	4.4	2.8	0.032
Lot 3	155.8	1.9	1.2	0.031

하여 본 연구진이 설정한 분석 결과 또한 추출물의 성분분석에 효율적인 분석으로 생각된다. 그러나 기존 문헌(12)에서 제시한 rosmarinic acid의 피크 유지시간은 42분으로 본 연구의 16분에 비해 분석시간이 다소 길어 본 연구진의 분석조건이 산업 현장에서 원료 및 제품의 quality control을 위한 HPLC 분석으로는 유리한 것으로 사료된다.

#### 차조기 열수 추출물 내에서의 rosmarinic acid 함량

본 시험법의 검증과정을 통하여 rosmarinic acid에 대한 상기 HPLC 분석법이 기능성 원료 인증을 받기 위한 차조기 열수 추출물 내의 rosmarinic acid의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

검증된 분석법으로 차조기 열수 추출물 세 lot의 함량을 측정하고 분말 중 rosmarinic acid 평균 함량은 0.03%였다. Lot 별 함량은 lot 1은 0.028%, lot 2는 0.032%였으며, lot 3은 0.031%였다(Table 4).

## 요 약

차조기 열수 추출물을 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발하기 위하여 지표성분 표준화를 위한 rosmarinic acid의 분석법 설정과 분석법에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 1% acetic acid가 첨가된 water와 methanol을 이동상으로 하고 Zorbax extended-C18(4.6×150 mm, 5 µm) 칼럼을 사용하여 기울기 용리(gradient elution) 방법으로 분석하였다. 본 연구에서는 분석법을 확립하고 분석법에 대하여 특이성, 직선성, 정확성과 정밀성 그리고 회수율에 대하여 확인하였다. Rosmarinic acid의 검량선은  $R^2=0.9995$ 로 좋은 선형성을 보였으며 정량한계와 검출한계는 각각 1.2 µg/mL와 0.36 µg/mL였다. 일내와 일간 분석에서 상대 표준편차(RSD)는 각각 3.21%와 1.43% 미만으로 나왔다. 정밀성 측정 결과에서는 97.04~98.98%로 나왔고, RSD는 0.25~1.97%였다. 그러므로 HPLC를 이용한 rosmarinic

acid의 분석법이 차조기 열수 추출물 기능성원료 표준화를 위한 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 시험법에 따라 분석한 차조기 열수 추출물 내의 rosmarinic acid의 함량은 세 lot를 3회 분석하였을 때 평균 0.03%로 나왔다. 따라서 본 연구를 통하여 확립된 rosmarinic acid의 분석법이 차조기 열수 추출물 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업(과제번호: R0002463)으로 수행된 연구결과입니다. 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Statistics Korea. 2012. *Annual report on the cause of death statistics*. Daejeon, Korea. p 1-231.
2. Lieber CS. 1970. New pathway of ethanol metabolism in the liver. *Gastroenterology* 59: 930-937.
3. Klatskin G. 1961. Alcohol and its relation to liver damage. *Gastroenterology* 41: 443-451.
4. Banerjee P, Jana S, Chakraborty S, Swarnakar S. 2013. Inflammation and MMPs in alcohol-induced liver diseases and protective action of antioxidants. *Indian J Biochem Biophys* 50: 377-386.
5. Jun HI, Kim BT, Song GS, Kim YS. 2014. Structural characterization of phenolic antioxidants from purple perilla (*Perilla frutescens* var. *acuta*) leaves. *Food Chem* 148: 367-372.
6. Choi SH, Hur JM, Yang EJ, Jun M, Park HJ, Lee KB, Moon E, Song KS. 2008. Beta-secretase (BACE1) inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Arch Pharm Res* 31: 183-187.
7. Choi UK, Lee OH, Lim SI, Kim YC. 2010. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Pseudomonas aeruginosa* using the evolutionary operation-factorial design technique. *Int J Mol Sci* 11: 3922-3932.
8. Kim DH, Kim YC, Choi UK. 2011. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Staphylococcus aureus* using evolutionary operation factorial design technique. *Int J Mol Sci* 12: 2395-2407.
9. Nakanishi T, Nishi M, Inada A, Obata H, Tanabe N, Abe S, Wakashiro M. 1990. Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Chem Pharm Bull* 38: 1772-1774.
10. Oh HA, Park CS, Ahn HJ, Park YS, Kim HM. 2011. Effect of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo and rosmarinic acid on allergic inflammatory reactions. *Exp Biol Med* 236: 99-106.
11. Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Kubo M. 2002. Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae Herba*). *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 22: 15-22.
12. Liu J, Wan Y, Zhao Z, Chen H. 2013. Determination of the content of rosmarinic acid by HPLC and analytical comparison of volatile constituents by GC-MS in different parts of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Chem Cent J* 7: 61.