

건강기능식품 기능성 원료로서 곰취잎 추출물의 Caffeoylquinic Acid계 성분 분석법 검증

권진관¹ · 김진규¹ · 서찬곤¹ · 홍성수¹ · 안은경¹ · 서동원² · 오좌섭^{1,2}

¹(재)경기과학기술진흥원

²단국대학교 약학대학

Method for Validation of Caffeoylquinic Acid Derivatives in *Ligularia fischeri* Leaf Extract as Functional Ingredients

Jin Gwan Kwon¹, Jin Kyu Kim¹, Changan Seo¹, Seong Su Hong¹,
Eun-Kyung Ahn¹, Dong-Wan Seo², and Joa Sub Oh^{1,2}

¹Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion

²College of Pharmacy, Dankook University

ABSTRACT An HPLC analysis method was developed for standard determinations of chlorogenic acid, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, and 4,5-di-O-caffeoylquinic acid as functional health materials in *Ligularia fischeri* extract. HPLC was performed on a C₁₈ Kromasil column (4.6×250 mm, 5 μm column) with a gradient elution of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min at 30°C. The analytes were detected at 330 nm. The HPLC method was validated in accordance with the International Conference on Harmonization guideline of analytical procedures with respect to specificity, precision, accuracy, and linearity. The limits of detection and quantitation for the four compounds were 3.0~14.6 and 9.2~44.4 μg/mL, respectively. Calibration curves showed good linearity ($r^2>0.999$), and the precision of analysis was satisfied (less than 0.9%). Recoveries of quantified compounds ranged from 98.96 to 101.81%. This result indicates that the established HPLC method is very useful for the determination of marker compounds in *Ligularia fischeri* leaf extracts.

Key words: *Ligularia fischeri* leaves, caffeoylquinic acid, validation, HPLC, functional health food

서 론

곰취(*Ligularia fischeri*)는 넓은 잎을 특징으로 하는 취의 일종으로(1) 우리나라에서는 주로 전국의 깊은 산 고원지대나 비옥 습윤한 초생지에서 자생하는 국화과(Compositae)의 다년생 초본 식물로(2) 근경은 굵고 줄기 위쪽에 잔털이 있으며, 근생엽은 가장자리에 규칙적인 톱니를 갖는 신장상 심장형 모양을, 경생엽은 아랫부분, 잎은 근생엽에 유사하나 엽병이 짧고 밑 부분이 넓어져서 엽초처럼 되는 형태학적 특성을 보인다(3). 민간에서는 봄에 어린잎을 채취하여 주로 나물용으로 이용했으며(4), 약리학적 측면에서는 예로부터 기침, 가래, 다리 아픔, 요통, 두통, 백일해, 천식에 효험을 나타내고 혈액순환을 활발하게 한다고 알려져 있고 황달, 고혈압, 간장병에 사용했다(5). 중국에서는 곰취의 뿌리와 근경을 타박상, 요통, 진해, 거담 및 각혈 등의 치료에

이용하기도 하였다(6).

곰취는 비타민 A, B, B₁, B₂, C, β-carotene과 niacin 등이 함유되어 있으며, chamomile, jacobine, ameleme 등의 약리성분들이 보고된 바 있다(3). 또한 항돌연변이성 유전 독성 억제 효과(1), 항암 효과(6) 및 항산화 효과(4,7-11) 등이 보고되면서 고부가가치 식품원료로 최근 많은 관심이 증대되고 있다. 특히 곰취의 주성분으로는 폴리페놀 성분들인 caffeoylquinic acid계 성분들이 다량 함유되어 있다고 보고되었고(12), 이외에도 sesquiterpene(13,14), terpenoid(15) 및 flavonoid(11) 등의 성분들이 분리되었다고 보고되어 있다. 그러므로 약리성분이 다량 함유된 곰취를 소재로 하여 개별 인정형 건강기능식품 원료로 개발한다면 곰취 소비 증가와 농가 소득 창출에 도움이 될 것이다.

개별 인정형 건강기능식품 개발 시 기능성 원료의 표준화 및 기준규격 설정은 매우 중요하다. 여기서 기능성 원료의 표준화란 천연물에 함유되어 있는 고유한 성분을 기능/지표 성분으로 설정하고 그것의 변동을 최소화하여 생산되는 배치(batch)에 상관없이 일정한 품질을 유지하기 위해 원재료의 생산에서 제조과정 전반에 걸쳐 관리하기 위해 사용되는

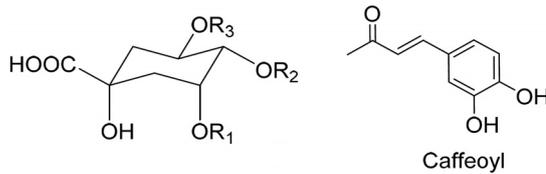


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1~4.

기술과 정보의 관리를 말한다. 표준화를 위해 가장 흔히 사용되는 방법을 '지표성분(marker compounds)'을 사용하는 것이다.

따라서 본 연구에서는 개별 인정형 건강기능식품 원료로 개발하는 데 있어 곱취 추출물의 표준화를 위해 caffeoyl-quinic acid계 성분의 효과적인 동시 분석법을 확립하며 그에 대한 분석법에 대한 validation을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 곱취(*L. fischeri*)는 2012년 5월 인제 정자리에서 채취하여 음건한 후 분쇄하고 50% ethanol을 이용하여 상온에서 24시간 동안 침지한 뒤 2회 추출하였다. 추출물은 여과 및 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말로 제조한 것을 사용하였다. 추출물은 50% ethanol에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

표준용액의 조제

곱취 추출물의 분석에 사용한 표준품 chlorogenic acid (CA), 3,4-di-O-caffeoylquinic acid(3,4-DCQA), 3,5-di-O-caffeoylquinic acid(3,5-DCQA), 4,5-di-O-caffeoylquinic acid(4,5-DCQA)(Fig. 1)는 Shenzhen Chemstrong Scientific(Shenzhen, Guangdong, China)의 것을 사용하였다. 검량선 작성을 위해 각각의 표준품은 CA 7.4 mg, 3,4-DCQA 2.7 mg, 3,5-DCQA 9.8 mg, 4,5-DCQA 5.9 mg을 50% ethanol에 녹여 50 mL로 하여 표준용액을 조제하였다. 이를 50% ethanol에 희석한 표준용액을 이용하여 CA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA 함량을 구하였다.

HPLC 분석

Caffeoylquinic acid계 유도체 화합물을 분석하기 위하여 HPLC 1100 및 HPLC 1200(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Kromasil C₁₈(4.6×250 mm, 5 µm, Eka Chemicals, Bohus, Sweden)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 4종의 caffeoylquinic acid계 성분이 모두 분리되도록 흘러주었으며 검출파장은 330 nm에서 검출하였다.

	R ₁	R ₂	R ₃
1	Caffeoyl	H	H
2	Caffeoyl	Caffeoyl	H
3	Caffeoyl	H	Caffeoyl
4	H	Caffeoyl	Caffeoyl

Table 1. HPLC conditions for the quantitative analysis of chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA

Items	Conditions		
Instrument	HPLC 1100 & 1200 series (Agilent Technologies)		
	A: Water (0.1% TFA) B: Acetonitrile		
	Time (min)	% A	% B
	0	90	10
	20	90	10
Mobile phase	Gradient	30	82
		64	82
		65	0
		75	0
	Post time: 10 min		
Column	Kromasil C ₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 µL		
Detector	330 nm		

분석법 검증

개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 '의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인(16)'을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD, S/N=3.3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)를 분석하여 분석방법을 검증하였다.

특이성: 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼합 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말하는 것으로 확립된 분석법을 통하여 분리된 각각의 피크가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 피크를 검토하여 확인하였으며 Photo diode array(PDA) spectrum을 측정하여 동일한 spectrum을 나타내는지도 확인하였다.

직선성: 분석대상물질의 농도에 대해 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말하는 것으로 곱취 추출물을 0.48, 0.84, 1.2, 1.56, 1.92 µg/mL의 농도로 각각 조제하여 3회 반복 측정하였으며 피크 면적과 시료 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(r^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다.

정밀성: 반복성(repeatability)은 표준용액을 가지고 시간의 변화에 따른 기계의 변화 정도를 보기 위하여 6회 주입하여 면적과 머무름 시간의 반복성을 확인하였다. 실험실 내 정밀성(intermediate precision)은 균일한 검체로부터

여러 번 채취하여 얻은 시료를 동일 실험실 내에서 각각 서로 다른 실험일자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 얻은 측정값들 사이의 근접성으로 상대표준편차(RSD)로 판단하였다. 완전성(robustness)은 일내분석(intra-day)을 1일 3구간 진행하였고 일간분석(inter-day)을 1일 1구간으로 3일간으로 나누어 진행하여 변이성을 측정하였다.

정확성: 시료를 3가지 농도(0.6, 1.2, 1.8 mg/mL)로 조제하고 동일한 분석조건으로 6회 반복 주입하여 얻은 결과를 회수율(recovery)로 나타내어 정확성을 확인하였다.

검출한계 및 정량한계: 시료의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다.

$$\text{정량한계(LOQ)} = 10 \times y \text{ 절편의 표준편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

$$\text{검출한계(LOD)} = 3.3 \times y \text{ 절편의 표준편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

결과 및 고찰

특이성 검증

불순물, 분해물, 배합성분 등이 공존하는 상태에서 다른 성분의 영향을 받지 않고 분석대상물질을 선택적으로 정확

하게 측정할 수 있는 능력으로 표준액과 곰취잎 추출물의 HPLC 크로마토그램을 비교하여 피크가 분리됨을 확인한 결과, 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며 표준액의 피크 유지시간(retention time, RT)과 추출물의 피크 RT가 일치하였다. 또한 blank에서는 표준액과 겹치는 피크가 없었으며 곰취잎 추출물에 표준액을 스파이킹 하여 시험한 결과 회수율은 101.66%로 양호한 결과를 얻었다(Fig. 2). 또한 표준용액과 곰취잎 추출물의 PDA spectrum 측정에서도 동일한 spectrum을 확인하였다(Fig. 3). 위의 결과를 종합했을 때 본 분석방법은 특이성이 있음을 확인할 수 있다.

직선성 확인

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 크로마토그램에 대한 면적과 곰취잎 추출물의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(r^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 곰취잎 추출물을 0.48, 0.84, 1.2, 1.56, 1.92 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다(Fig. 4). CA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA 및 4,5-DCQA의 r^2 값은 각각 0.9999, 0.9999, 0.9999 및 0.9999로 모두 양호한 직선성을 나타내었다.

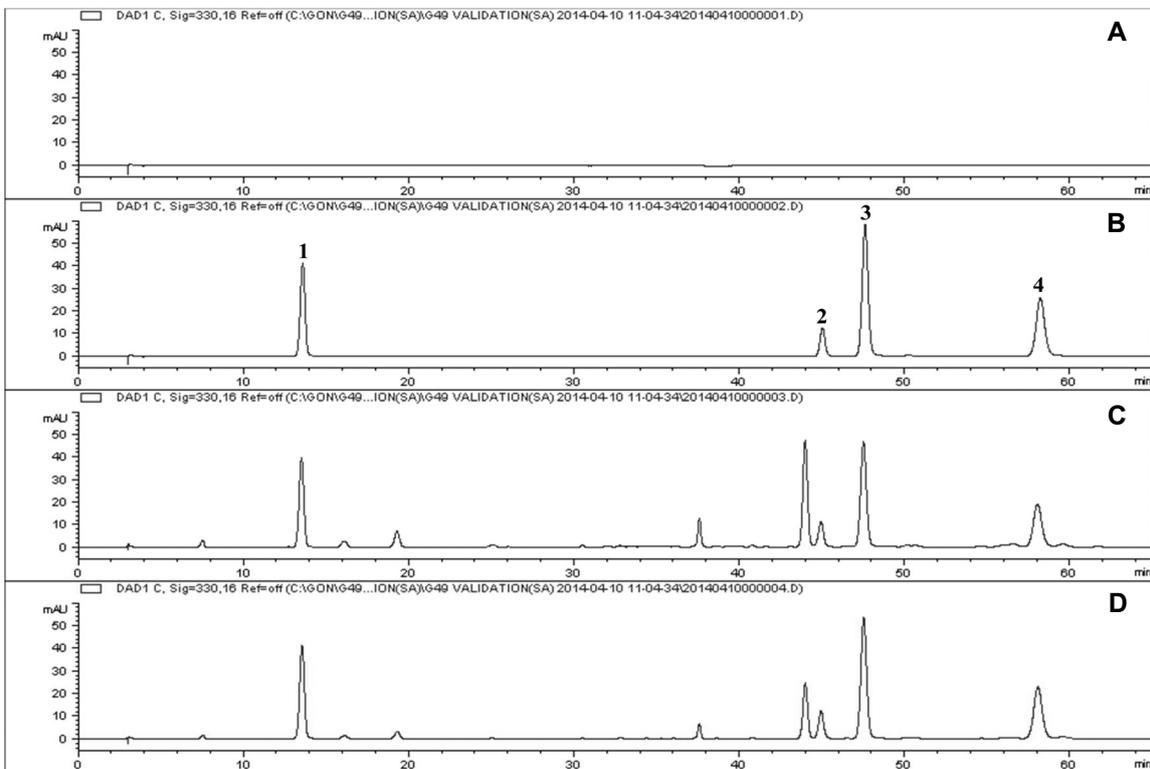


Fig. 2. HPLC chromatograms of chlorogenic acid (1), 3,4-DCQA (2), 3,5-DCQA (3), and 4,5-DCQA (4). (A) blank (50% EtOH), (B) standard solution, (C) *Ligularia fischeri* leaves extract, and (D) recovery test.

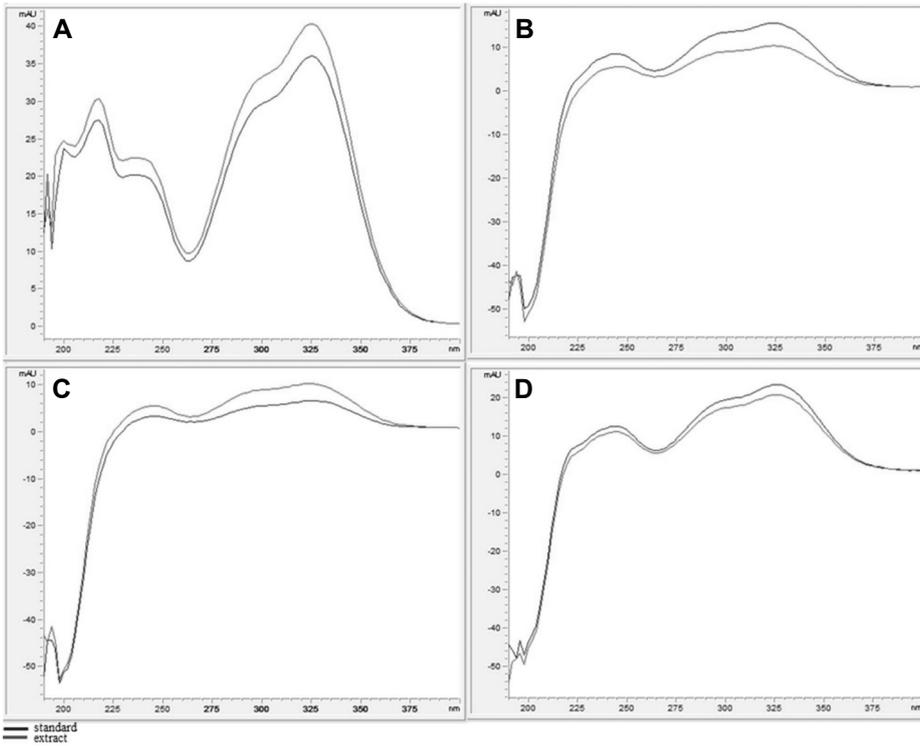


Fig. 3. PDA (photo diode array) spectrum of (A) chlorogenic acid, (B) 3,4-DCQA, (C) 3,5-DCQA, and (D) 4,5-DCQA.

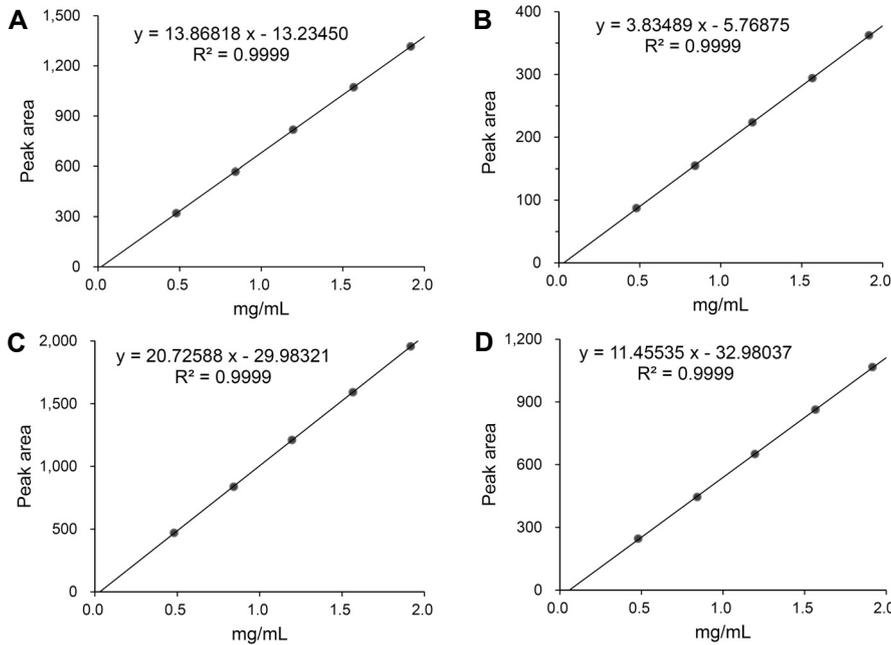


Fig. 4. Calibration curve of (A) chlorogenic acid, (B) 3,4-DCQA, (C) 3,5-DCQA, and (D) 4,5-DCQA.

정밀성 확인

반복성: 균질한 검체로부터 다수의 시료를 취해 반복적으로 시험을 실시할 때 각 시험 결과의 일치 정도를 나타내는 것으로 곱취일 추출물 0.6, 1.2 및 1.8 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분별 3가지 농도의 피크의 RT 및 피크 면적의 RSD는 0.04~0.51%로 나타나 RSD 2% 이하로서 반복성이 있음을 확인하였다(Table 2).

실험실 내 정밀성: 동일 실험실 내에서 각각 서로 다른 실험일, 시험자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하고 얻은 측정값들 사이의 근접성을 나타내는 것으로 칼럼과 HPLC 및 시험일자를 다르게 하여 실시한 실험실 내 정밀성은 각 성분 3가지 농도의 피크의 유지시간 및 피크 면적의 RSD가 0.02~0.90%로 나타나 RSD 2% 이하로서 실험실 내 정밀성이 있음을 확인하였다(Table 3, 4).

완전성: 시험방법 중 일부 조건이 소규모라도 의도적으로

Table 2. Repeatability of chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA analysis

Parameters	Precision								
	Chlorogenic acid		3,4-DCQA		3,5-DCQA		4,5-DCQA		
	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	
Concentration (0.6 mg/mL)	RT	13.547±0.03	0.22	44.894±0.03	0.07	47.493±0.03	0.06	57.966±0.04	0.07
	Area	404.403±0.42	0.10	112.342±0.25	0.23	589.640±1.98	0.34	320.906±0.40	0.12
Concentration (1.2 mg/mL)	RT	13.538±0.02	0.14	44.859±0.02	0.04	47.453±0.02	0.04	57.881±0.02	0.04
	Area	827.111±0.85	0.10	228.859±0.75	0.33	1,212.873±0.81	0.07	671.734±3.45	0.51
Concentration (1.8 mg/mL)	RT	13.495±0.01	0.10	44.867±0.02	0.05	47.453±0.02	0.05	57.908±0.05	0.09
	Area	1,242.400±0.65	0.05	346.378±0.58	0.17	1,827.140±2.88	0.16	1,029.411±2.69	0.26

변경되었을 때 측정값이 영향을 받지 않는지에 대한 척도를 나타내는 것으로 시료를 전처리법에 따라 처리된 시험용액을 intra-day와 inter-day로 나누어 실험을 실시하였다. Intra-day는 1일 3구간 진행하였고 inter-day는 1일 1구간으로 3일간으로 나누어 진행하였다.

Intra-day, inter-day의 정밀도를 측정된 결과는 Table 5와 같으며 intra-day에서의 정밀도는 0.07~0.63%를 나타내었고, inter-day에서는 0.39~0.66%의 정밀도를 나타내었다.

회수율을 이용한 정확성 확인

측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하며, 곰취잎 추출물을 가지고 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입한 후 시험하여 회수율은 95.0~105.0%, RSD는 모두 2.0% 이하로서 정확성을 확인하게 된다.

곰취잎 추출물을 0.6, 1.2 및 1.8 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입한 후 시험하여 얻은 결과 각 성분 3가지 농도의 회수율은 98.96~101.81%였으며 RSD는 0.14~0.89%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다(Table 6).

검출한계 및 정량한계 확인

검출한계는 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 정량한계는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의

최소량을 나타낸다. 곰취잎 추출물의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 각각의 검량선을 작성하여 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 각각의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 반응의 표준편차와 검정곡선의 기울기에 근거하는 방법(standard deviation of the response and the slope)으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다(Table 7). 직선상의 검출한계는 3.0~14.6 µg/mL였으며 정량한계는 9.2~44.4 µg/mL로 나타났다.

요 약

본 연구는 HPLC를 이용해 개별 인정형 건강기능식품 원료로 개발하기 위하여 곰취잎 추출물의 지표성분인 CA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA 및 4,5-DCQA의 동시분석법 설정과 분석법에 대한 검증을 실시하고자 하였다. 그 검증의 결과 표준액과 곰취잎 추출물의 HPLC 크로마토그램을 비교하여 피크가 분리됨을 확인하고 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며, 표준액의 피크 유지시간과 추출물의 피크 유지시간이 일치하였고 동일한 spectrum을 나타내었다. 또한 blank에서 표준액과 겹치는 피크가 없는 것으로 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수는 CA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA 및 4,5-DCQA 각각 0.9999, 0.9999, 0.9999 및 0.9999로 모두 양호한 직선성을 보였으며, 직선상의 검출한계는 3.0~13.2 µg/mL였으며 정량한계는 9.2~39.8 µg/mL로 나타났다. 곰취 추출물 0.6, 1.2 및 1.8 mg/mL의 세 농도의 회수율은 98.96~101.81%였으며 RSD는 0.14~0.89%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다. 정밀성

Table 3. Intermediate precision of chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA analysis

Parameters	Precision								
	Chlorogenic acid		3,4-DCQA		3,5-DCQA		4,5-DCQA		
	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	
Concentration (0.6 mg/mL)	RT	13.399±0.02	0.12	44.643±0.04	0.09	47.192±0.04	0.08	57.525±0.08	0.13
	Area	410.967±1.06	0.26	125.071±0.25	0.20	643.608±1.07	0.17	374.921±0.96	0.26
Concentration (1.2 mg/mL)	RT	13.335±0.04	0.27	44.583±0.04	0.09	47.127±0.05	0.10	57.437±0.08	0.14
	Area	836.648±6.84	0.82	257.016±0.47	0.18	1,305.451±3.30	0.25	770.504±2.21	0.29
Concentration (1.8 mg/mL)	RT	13.266±0.01	0.05	44.505±0.01	0.03	47.036±0.01	0.02	57.272±0.03	0.04
	Area	1,256.677±11.25	0.90	386.189±1.35	0.35	1,944.657±2.82	0.15	1,163.765±5.83	0.50

Table 4. Intermediate precision of chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA analysis by different users

		Chlorogenic acid					
		50%		100%		150%	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
User 1	RT	13.547±0.03	0.22	13.538±0.02	0.14	13.495±0.01	0.10
	Area	404.403±0.42	0.10	827.111±0.85	0.10	1,242.400±0.65	0.05
User 2	RT	13.399±0.02	0.12	13.335±0.04	0.27	13.266±0.01	0.05
	Area	410.967±1.06	0.26	836.648±6.84	0.82	1,256.677±11.25	0.90
		3,4-DCQA					
		50%		100%		150%	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
User 1	RT	44.894±0.03	0.07	44.859±0.02	0.04	44.867±0.02	0.05
	Area	112.342±0.25	0.23	228.859±0.75	0.33	346.378±0.58	0.17
User 2	RT	44.643±0.04	0.09	44.583±0.04	0.09	44.505±0.01	0.03
	Area	125.071±0.25	0.20	257.016±0.47	0.18	44.505±0.01	0.03
		3,5-DCQA					
		50%		100%		150%	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
User 1	RT	47.493±0.03	0.06	47.453±0.02	0.04	47.453±0.02	0.05
	Area	589.640±1.98	0.34	1,212.873±0.81	0.07	1,827.140±2.88	0.16
User 2	RT	47.192±0.04	0.08	47.127±0.05	0.10	47.036±0.01	0.02
	Area	643.608±1.07	0.17	1,305.451±3.30	0.25	1,944.657±2.82	0.15
		4,5-DCQA					
		50%		100%		150%	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
User 1	RT	57.966±0.04	0.07	57.881±0.02	0.04	57.908±0.05	0.09
	Area	320.906±0.40	0.12	671.734±3.45	0.51	1,029.411±2.69	0.26
User 2	RT	57.525±0.08	0.13	57.437±0.08	0.14	57.272±0.03	0.04
	Area	374.921±0.96	0.26	770.504±2.21	0.29	1,163.765±5.83	0.50

Table 5. Precision of chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA in *Ligularia fischeri* extract for validation

		Precision							
		Chlorogenic acid		3,4-DCQA		3,5-DCQA		4,5-DCQA	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
Intra-day		15.05±0.09	0.63	14.90±0.09	0.57	14.94±0.06	0.41	14.81±0.07	0.48
		30.05±0.11	0.37	29.87±0.05	0.15	29.95±0.03	0.10	29.74±0.02	0.07
		60.11±0.12	0.20	59.95±0.06	0.10	60.01±0.04	0.07	59.96±0.06	0.10
Inter-day		15.14±0.10	0.65	14.99±0.09	0.61	15.01±0.07	0.45	14.87±0.07	0.49
		30.22±0.16	0.52	30.02±0.14	0.46	30.09±0.12	0.40	29.88±0.12	0.39
		60.57±0.40	0.66	60.30±0.33	0.54	60.36±0.31	0.51	60.29±0.30	0.50

Table 6. Accuracy of HPLC analysis for chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA

Parameters	Recovery (%)							
	Chlorogenic acid		3,4-DCQA		3,5-DCQA		4,5-DCQA	
	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
0.6 mg/mL	99.48±0.25	0.26	99.45±0.20	0.20	101.81±0.17	0.16	100.94±0.25	0.25
1.2 mg/mL	98.96±0.80	0.81	100.08±0.18	0.18	100.38±0.25	0.25	100.59±0.28	0.28
1.8 mg/mL	99.12±0.88	0.89	100.35±0.35	0.35	99.54±0.14	0.14	101.06±0.50	0.50

은 0.04~0.51%의 정밀도를, 실험실 내 정밀성에서는 0.02~0.90%의 정밀도를 나타내었고 intra-day에서의 정밀도는 0.07~0.63%, inter-day에서는 0.39~0.66%의 정밀도를

나타내어 곰취잎 추출물의 지표성분 CA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA 및 4,5-DCQA의 분석법은 적합한 시험방법임이 검증되었다. 본 분석법이 곰취 추출물 개별 인정형 건강기능식품

Table 7. Limit of detection and limit of quantitation of chlorogenic acid, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, and 4,5-DCQA

Compound	Limit of detection (µg/mL)	Limit of quantitation (µg/mL)
Chlorogenic acid	3.0	9.2
3,4-DCQA	14.6	44.4
3,5-DCQA	8.6	26.2
4,5-DCQA	13.2	39.8

원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업 과제(112060-3)의 지원에 의해 수행된 연구 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ham SS, Lee SY, Oh DH, Jung SW, Kim SH, Chung CK, Kang IJ. 1998. Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 745-750.
2. Cho SD, Kim GH. 2005. Food product development and quality characteristics of *Ligularia fischeri* for food resources. *Korean J Food Preserv* 12: 43-47.
3. Kim JW, Park IK, Youn KS. 2013. Phytochemical compounds and quality characteristics of spray-dried powders with the blanching condition and selected forming agents from pressed extracts of *Ligularia fischeri* leaves. *Korean J Food Preserv* 20: 659-667.
4. Kwon YJ, Kim KH, Kim HK. 2002. Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of *Ligularia fischeri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J Food Preserv* 9: 332-337.
5. Kim SM, Kang SW, Um BH. 2010. Extraction conditions of radical scavenging caffeoylquinic acids from gomchui (*Ligularia fischeri*) tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 399-405.
6. Bae JH, Yu SO, Kim YM, Chon SU, Kim BW, Heo BG. 2009. Physiological activity of methanol extracts from *Ligularia fischeri* and their hyperplasia inhibition activity of cancer cell. *J Bio-Environ Control* 18: 67-73.
7. Choi EM, Ding Y, Nguyen HT, Park SH, Kim YH. 2007. Antioxidant activity of gomchi (*Ligularia fischeri*) leaves. *Food Sci Biotechnol* 16: 710-714.
8. Jeong SW, Kim EJ, Hwangbo HJ, Ham SS. 1998. Effects of *Ligularia fischeri* extracts on oxidation of low density lipoprotein. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1214-1221.
9. Park JA, Kim MK. 1999. Effect of Korean native plant diet on lipid metabolism, antioxidative capacity and cadmium detoxification in rats. *Korean J Nutr* 32: 353-368.
10. Cho YO. 2002. Antioxidative activity of the Korean wild leafy vegetables: *Aster scaber* and *Ligularia fischeri*. *Nutraceuticals & Food* 7: 146-150.
11. Chang SK, Kim JH, Oh HS. 2008. The development of functional cold buckwheat noodles using biological activities of hot water extracts of *Ligularia fischeri* and *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Food Culture* 23: 479-488.
12. Choi J, Park JK, Lee KT, Park KK, Kim WB, Lee JH, Jung HJ, Park HJ. 2005. *In vivo* antihepatotoxic effects of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and the identification of the active component, 3,4-dicaffeoylquinic acid. *J Med Food* 8: 348-352.
13. Wang WS, Zhu QX, Gao K, Jia ZJ. 2000. Sesquiterpenes from *Ligularia fischeri*. *J Chin Chem Soc* 47: 1291-1293.
14. Deng M, Dong W, Jiao W, Lu R. 2009. New eremophilane sesquiterpenes from the roots of *Ligularia fischeri*. *Helv Chim Acta* 92: 495-501.
15. Lee KT, Koo SJ, Jung SH, Choi J, Jung HJ, Park HJ. 2002. Structure of three new terpenoids, spiciformisins a and b, and monocyclosqualene, isolated from the herbs of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and cytotoxicity. *Arch Pharm Res* 25: 820-823.
16. KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc.* Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. p 1-18.