

HPLC-DAD를 이용한 차조기 잎의 Isoegomaketone 및 Perillaketone의 동시분석법 확립

남보미 · 이승영 · 김진백 · 강시용 · 진창현*
한국원자력연구원

Simultaneous Determination of Isoegomaketone and Perillaketone in *Perilla frutescens* (L.) Britton Leaves by HPLC-DAD

Bo Mi Nam, Seung Young Lee, Jin-Baek Kim, Si-Yong Kang, and Chang Hyun Jin*
Korea Atomic Energy Research Insititute, Jeongeup, Jeollabukdo 580-185, Korea

Abstract – This study developed an HPLC analysis method for the determination of isoegomaketone (IK) and perillaketone (PK) in *Perilla frutescens* (L.) Britton leaves. *P. frutescens* ethanol extract was optimized through an HPLC analysis using a C18 column (250 X 4.6 mm, D, S-5 μ m, 12 nm) with gradient elution of water and acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min and a UV detection wavelength of 254 nm. The results of this method showed linearity in the calibration curve at a coefficient of correlation (R^2) of IK 0.9995, PK 0.9998. The limits of detection (LOD) for IK and PK were 0.234 μ g/mL and 0.952 μ g/mL. The limits of quantification (LOQ) for IK and PK were 0.017 μ g/mL and 0.043 μ g/mL. The inter-day precision RSDs of IK and PK in the *P. frutescens* were 1.25 to 2.69% and 0.36 to 1.10%, respectively, and the intra-day precision RSDs of IK and PK were 0.96 to 2.51% and 0.90 to 1.93%, respectively. The accuracies of IK and PK were 96.31 to 97.92% and 101.26 to 105.14%. In conclusion, this method was applied successfully to the detection of IK and PK in *P. frutescens*.

Key words – *Perilla frutescens* (L.) Britton, Isoegomaketone, Perillaketone, HPLC-DAD

차조기(*Perilla frutescens* (L.) Britton)는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 초본식물로 중국, 일본, 우리나라 및 동아시아가 원산지이며 식용으로 널리 재배되고 있다. 예로부터 차조기는 몸을 덥게 하고 독을 없애 기를 내려 주어 소화, 중독, 해독 등의 질환을 다스리는 한약재로 사용되어 왔다.¹⁻³⁾ 차조기의 주요 성분으로는 rosmarinic acid, luteolin, apigenin, caffeic acid, egomaketone, isoegomaketone(IK) 및 perillaketone(PK) 등이 보고되어 왔으며, 항산화, 항균, 항염증, 항암 등 다양한 생리활성 효능이 검증되었다.⁴⁻⁷⁾

그 중 essential oil계의 IK와 PK는 차조기의 특유 향을 내는 대표적인 방향성 성분으로 다양한 생리활성 연구가 진행되고 있다. 특히, IK는 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 단백질 발현을 억제하여 nitric oxide(NO) 생성을 저해 함으로써 뛰어난 항염증 효능을 보였으며^{8,9)} 피부암이나 대장암 세포주를 이용한 항암실험에서 암세포의 성장을 저해 또는 사멸을 유도하는 효과를 나타내는 등 다양한 연구

가 보고되었다.¹⁰⁻¹²⁾

따라서 본 연구진은 IK가 다양한 효능을 가진 유효성분으로 연구 가치가 높고, 이 성분을 확인하는 공인된 방법이나 과학적인 분석법이 필요하다고 판단하였다. 현재 HPLC를 이용하여 차조기의 phenolic 화합물의 분석법은 많이 개발되어¹³⁾ 왔으나 essential oil성분인 IK와 PK의 분석 연구는 미흡한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 차조기 잎 추출물에서 IK와 PK의 표준화를 위하여 HPLC-DAD 방법을 통해 동시분석법을 확립하였으며, 확립된 방법의 타당성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용한 차조기는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에서 재배한 잎으로 종자에 200 Gy 감마선 처리 후 안정화 시킨 돌연변이 품종이다. 그 중 IK 함량이 기존의 품종보다 높은 차조기를 선발하여 수확 후 건조하여 사용하였다. 이 표본은 현재 한국원자력연구원 첨단

*교신저자(E-mail): chjin@kaeri.re.kr
(Tel): +82-63-570-3162

방사선연구소 방사선육종연구팀 김진백 박사를 통해 검증하였고 방사선육종센터에서 보관 중이다.

기기 및 재료 - Open column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70-230 mesh, Merck, ASTM)을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄precoatedplate (Art.552, Merck)를 사용하였고, TLC 발색시약은 anisaldehyde 10% H₂SO₄을 사용하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 1급 또는 특급을 각각 사용하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR은 JNM-ECA500(Jeol, Japan)을 사용하였다. Preparative HPLC로는 YMC사 LC-Forte/R을 사용하였고 정제용 column으로는 Phenomenex Luna Silica(250×10.00 mm, 5 μ, 100A)를 이용하였다. 분석용 HPLC기기는 Agilent 1100 series system 이고 column은 YMC-Triart C18(250×4.6 mm, D, S-5 μm, 12 nm) 사용하였다.

지표물질 분리 - 건조한 후 분쇄한 1.2 kg의 차조기 잎을 100% methanol(10 L)으로 상온에서 24시간 동안 2회 추출하였다. Filter paper(NO.4 Whatman international, UK)를 이용하여 여과 하였으며 이를 진공농축기를 이용한 감압 농축으로 methanol 추출물 200 g을 얻었다. 증류수 1 L에 추출물을 녹인 후 분별 깔때기를 이용하여 차례대로 N-hexane, chloroform, ethyl acetate 그리고 N-butanol을 각각 1 L씩 3회 반복하여 분획하였다. N-hexane층을 농축하여 얻은 30 g 중 15 g을 N-hexane:ethyl acetate(1:0-1:1)의 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 10개의 분획(PH1-PH10)으로 나누었다. 이 중 PH4분획(200 mg)을 N-hexane:ethyl acetate(10:1) 용매를 사용하여 preparative HPLC(YMC, Koera)로 정제 후 노란색 oil상 1(60 mg)과 2(45 mg) 화합물을 얻었다. 그 구조는 ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트럼 측정 후 문헌과^{14,15)} 비교하여 1(IK) 과 2(PK)를 확인 후 정량 분석을 위한 지표 물질로 사용하였다(Fig. 1, Table I).

분석시료 제조 - 차조기(*Perilla frutescens* (L.) Britton) 잎 10 g을 ethanol 100 ml를 사용하여 45°C 조건에서 6시간 추

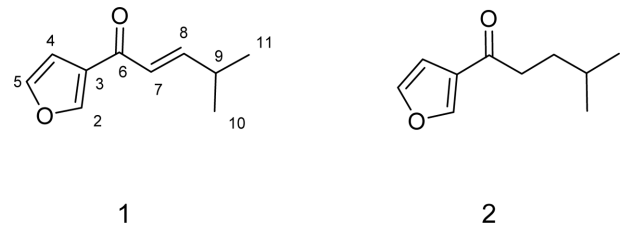


Fig. 1. Structures of isoeogomaketone (1) and perillaketone (2) isolated from *P. frutescens*.

출 하였다. Filter paper로 여과한 추출물은 감압농축 후 수율을 계산하였다. 이 추출물 10 mg을 1 ml의 methanol에 녹여 syringe filter(0.45 μm)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

분석조건 - 이동상은 A(water)와 B(acetonitrile) 두 용매를 사용하였고 A:B (55:45-45:55)의 조건으로 30분간 용리 하였다. column 온도는 25°C이고 이동상의 흐름속도는 1.0 ml/min, 검출파장은 254 nm를 사용하였으며 injection volume 은 10 μl를 주입하였다.

분석법의 검증(Validation) - ICH Guideline에 기초하여 확립된 동시분석법에 대한 검증으로써 직선성 확인, 검출한계 및 정량한계 측정, 반복 실험을 통한 정밀성 그리고 회수율 시험을 통한 정확성 평가를 실시하였다.^{16,17)}

특이성(Specificity) 검토 - IK와 PK 표준용액을 차조기 잎 추출물로부터 선택적으로 정확하게 측정 할 수 있도록 peak가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되는 것을 확인 하였다. 크로마토그램 상의 UV 흡수 spectrum을 판단하고 모두 일치 하는 경우 peak 특이성을 인정 하였다.

직선성 확인(Linearity) - 분리한 IK와 PK를 methanol에 녹여서 1 mg/ml stock solution을 만들었다. 20-100 μg/ml 농도에서 실험을 실시하였으며 HPLC를 이용하여 면적 대 농도비의 관계로 검량선을 얻었다. y=ax+b의 형태로 식을 구하여 상관계수(R²)의 값을 통해 직선성(linearity)을 판단하

Table I. ¹H-NMR (500 MHz) and ¹³C-NMR (125 MHz) spectral data of 1-2 in CDCl₃ (δ in ppm)

| Position | 1 | | 2 | |
|----------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | δ _H | δ _C | δ _H | δ _C |
| 2 | 8.03 (s) | 147.2 | 8.00 (s) | 147.7 |
| 3 | | 129.3 | | 128.2 |
| 4 | 6.81 (d, 1.5) | 109.2 | 6.73 (d, 1.5) | 109.1 |
| 5 | 7.44 (d, 1.5) | 144.2 | 7.40 (d, 1.5) | 144.3 |
| 6 | | 184.2 | | 195.7 |
| 7 | 6.47 (dd, 15.5, 1.5) | 124.1 | 2.70 (t, 7.0) | 38.9 |
| 8 | 7.00 (dd, 15.5, 7.0) | 154.6 | 1.58 (m) | 33.6 |
| 9 | 2.52 (m) | 31.3 | 1.58 (m) | 28.2 |
| 10 | 1.10 (d, 6.5) | 21.4 | 0.89 (d, 6.5) | 22.7 |
| 11 | 1.09 (d, 6.5) | 21.4 | 0.89 (d, 6.5) | 22.7 |

었다. R^2 값이 0.999이상인 경우 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

검출한계(LOD)-정량한계(LOQ) 측정 - 검량 및 정량 가능한 최저농도 확인을 위해 검출 한계(LOD)와 정량 한계(LOQ)는 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하여 저농도에서 검출한계는 신호 대 잡음비가 3:1 일때, 정량 한계는 신호 대 잡음비가 10:1일 때를 나타내었다.

정밀성 평가(Precision) - 확립된 분석법의 실험 환경의 변화에 따른 결과의 변이를 평가하는 것으로 상대표준편차(RSD%)를 통해 정밀성을 판단하였다. 정밀성 평가는 inter-day는 1일 3구간으로 6시간 간격으로 진행하였고, intra-day는 1일 1구간으로 3일간 실험을 진행하여 분석하였다.

정확성 평가(Accuracy) - 회수율(Recovery) 시험을 통한 정확성(Accuracy) 평가는 유효성분 IK, PK 농도 비율을 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ 로 달리하여 함량이 확인된 차조기 잎 추출물과 혼합 후 직선성이 확인되는 농도구간에서 3회씩 측정하여 판단하였다.

결과 및 고찰

특이성 확인 - IK와 PK를 선택적으로 정확하게 측정하기

위해 spectrometer를 이용하여 100 nm에서 400 nm까지 흡수파장을 분석하였다. 그 결과 다른 물질의 간섭 없이 성분이 분리되는 것을 확인하였고 IK와 PK를 동시분석 하기 위해서는 흡수 파장을 254 nm로 설정하여 분석하는 것이 적절한 것으로 나타났다. Fig. 2에서 보는 것과 같이 각각의 retention time은(A) IK 17 min, (B) PK 21 min으로 측정되었고 (C) 차조기 잎 추출물의 크로마토그램 결과에서도 IK와 PK의 peak가 일치하였다. spectrum 또한 서로 일치하여 본 시험법의 특이성을 확인 하였다.

직선성, 검출한계 및 정량한계 확인 - IK와 PK 표준 용액을 2~100 $\mu\text{g/ml}$ 로 단계적으로 희석 제조하여 HPLC 측정값을 검량선으로 작성하였다. 검량선의 R^2 값은 각각 IK는 0.9995, PK 0.9998로 높은 직선성을 보였다. 검량선의 기울기와 Y절편의 표준편차를 이용하여 검출한계와 정량한계를 구한 결과 IK는 0.234 $\mu\text{g/ml}$, 0.952 $\mu\text{g/ml}$, PK는 0.017 $\mu\text{g/ml}$, 0.043 $\mu\text{g/ml}$ 수준으로 나타났다(Table II).

정밀성 및 정확성 측정 - 정밀성을 평가하기 위해 세가지 농도를 기준으로 하여 inter-day와 intra-day 실험을 3회 반복 측정하여 평가하였다. 그 결과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)가 각각 inter-day에서의 IK 1.25~2.69%, PK 0.36~1.10%를 나타내었고 intra-day IK

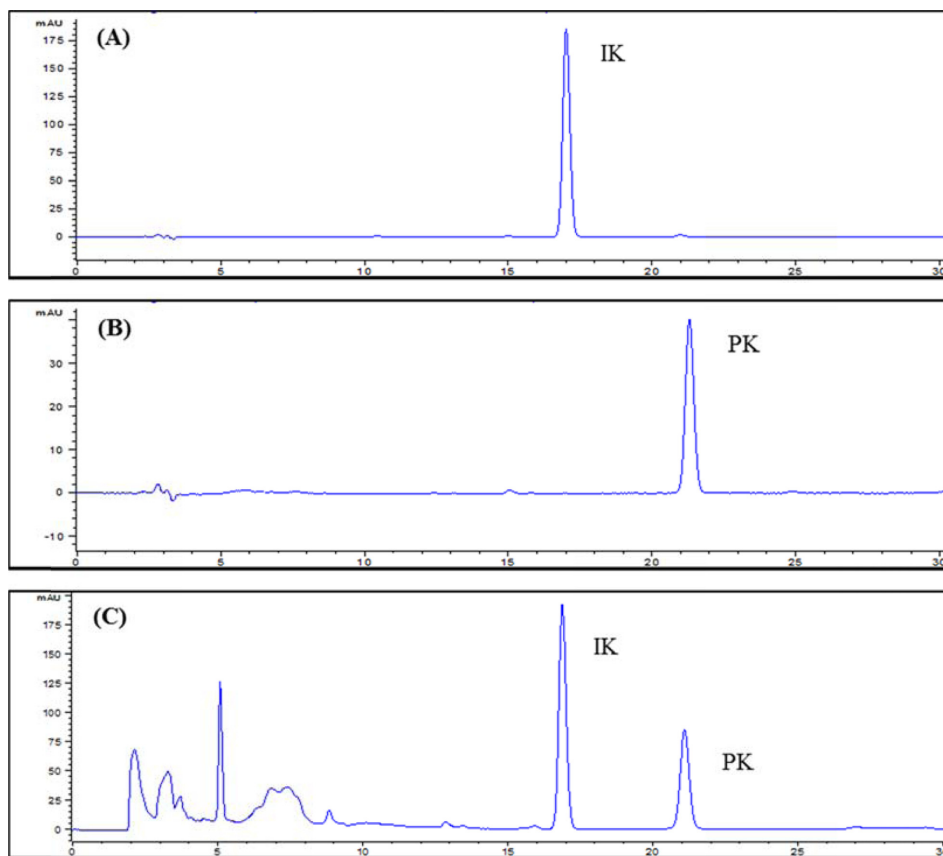


Fig. 2. HPLC chromatogram of isogomaketone (A), perillaketone (B), and *P. frutescens* of EtOH extract (C) at 254 nm.

Table II. Calibration curve, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) of isodomaketone and perillaketone by HPLC

| Compound | Concentration (µg/ml) | Regression equation | R ² | LOD (µg/ml) | LOQ (µg/ml) |
|----------------|-----------------------|---------------------|----------------|-------------|-------------|
| Isoegomaketone | 10~100 | y=40.677x+3.46 | 0.9995 | 0.234 | 0.952 |
| Perillaketone | | y=8.4435x-0.98 | 0.9998 | 0.017 | 0.043 |

Table III. Precision of isoegomaketone and perillaketone

| Compound | Concentration (µg/ml) | Inter-day | | Intra-day | |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------|---------|
| | | Mean±SD ¹⁾ (µg/ml) | RSD ²⁾ (%) | Mean±SD (µg/ml) | RSD (%) |
| Isoegomaketone | 20 | 20.11±0.54 | 2.69 | 19.66±0.07 | 0.36 |
| | 40 | 40.79±0.51 | 1.25 | 40.30±0.44 | 1.10 |
| | 60 | 60.79±1.02 | 1.68 | 60.89±0.21 | 0.35 |
| Perillaketone | 20 | 20.08±0.50 | 2.51 | 19.27±0.17 | 0.90 |
| | 40 | 39.51±0.58 | 1.47 | 39.63±0.76 | 1.93 |
| | 60 | 60.31±0.58 | 0.96 | 60.84±1.16 | 1.91 |

1) Value are mean±standard deviation in triplicate (n=3).

2) Relative standard deviation.

Table IV. Accuracy of isoegomaketone and perillaketone

| Compound | Spiked amount (µg) | Measured amount (µg) | RSD (%) | Recovery (%) |
|----------------|--------------------|----------------------|---------|--------------|
| Isoegomaketone | 10 | 9.74±0.07 | 0.81 | 97.41 |
| | 20 | 19.58±0.46 | 2.34 | 97.92 |
| | 40 | 41.77±0.77 | 1.63 | 96.31 |
| Perillaketone | 10 | 10.12±0.34 | 3.36 | 101.26 |
| | 20 | 21.03±0.82 | 3.94 | 105.14 |
| | 40 | 41.77±0.75 | 1.81 | 104.43 |

Recovery (%) = (amount found - original amount) / amount spiked × 100%

0.96~2.51%, PK 0.90~1.91%로 모두 3% 이내를 만족하였다(Table III). 정확성을 확인하기 위해 회수율 시험을 통해 평가 하였다. 함량이 확인된 차조기 잎 추출물에 IK와 PK를 각각 세농도로 첨가한 후 지표성분의 양이 정확하게 회수되는지를 확인하였다. 그 결과 IK 회수율이 96.31~97.41%, RSD 값이 0.81~1.63%를 나타내었고 PK는 회수율 101.26~105.14%, RSD 값이 1.81~3.36%의 범위로 나타났다. 이와 같은 정밀성 정확성 결과를 토대로 분석법의 유의성과 표준화가 가능함을 확인 하였다(Table IV).

결론

본 연구는 차조기 잎 methanol 추출물로부터 column chromatography를 이용하여 IK와 PK를 분리 동정하여 문헌과 비교하였고, 유효성분의 표준화를 위한 분석법 검증 연구하였다. 분석법 확립을 위해 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정밀성 정확성 실험을 통해 차조기 잎의 IK와 PK 성

분을 검정하는데 적합한 분석법임을 확인 하였다. 결론적으로 본 논문에서 검증한 분석법은 차조기 잎의 IK와 PK 함량분석에 있어서 중요한 기초자료로 이용 할 수 있을 것으로 기대된다.

사사

이 논문은 2015년도 한국원자력연구원의 연구개발 프로그램과 정부 (미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었으며(방사선기술개발사업, No. 2012M2A2A6010575) 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Jun, H. I., Kim, B. T., Song, G. S. and Kim, Y. S. (2014) Structural characterization of phenolic antioxidants from purple *perilla* (*Perilla frutescens* var. *acuta*) leaves. *Food Chem.* **148**: 367-372.

2. Peng, Y., Ye, J. and Kong, J. (2005) Determination of phenolic compounds in *Perilla frutescens* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* **53**: 8141-8147.
3. Ahn, H. (2006) Available components of chajogi (*Perilla sikokiana*) at different harvest periods. *Korea J. Food Preserv.* **13**: 8141-8147.
4. Kim, J. M., Kim, D. J., Kim, T. H., Kim, H. S. and Choe, M. (2010) Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of water extract from *Perilla semen* in RBL-2H3 cells. *Korean J. Nutr.* **43**: 367-373.
5. Yang, S. Y., Kang, J. H. and Lee, K. W. (2013) Protective effect of functional *perilla frutescens* hot-water extract against tert-butyl hydroperoxide-induced liver oxidative damage in rats. *J. Fd. Hyg. Safety* **28**: 146-151.
6. Lee, J. H., Park, K. H., Lee, M. H., Kim, H. T., Seo, W. D., Kim, J. Y., Baek, I. Y., Jang, D. S. and Ha, T. J. (2013) Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean *perilla (perilla frutescens)* cultivars. *Food Chem.* **136**: 843-852.
7. Zhou, X. J., Yan, L. L., Yin, P. P., Shi, L. L., Zhang, J. H., Liu, Y. J. and Ma, C. (2014) Structural characterisation and antioxidant activity evaluation of phenolic compounds from cold-pressed *perilla frutescens* var. *arguta* seed flour. *Food Chem.* **164**: 150-157.
8. Jin, C. H., Lee, H. J., Park, Y. D., Choi, D. S., Kim, D. S., Kang, S. Y., Seo, K. I. and Jeong, I. Y. (2010) Isoegomaketone inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon- β -STAT-1 pathway. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 860-867.
9. Park, Y. D., Jin, C. H., Choi, D. S., Byun, M. Y. and Jeong, I. Y. (2011) Biological evaluation of isoegomaketone isolated from *Perilla frutescens* and its synthetic derivatives as anti-inflammatory agents. *Arch. Pharm. Res.* **34**: 1277-1282.
10. Kwon, S. J., Lee, J. H., Moon, K. D., Jeong, I. Y., Ahn, D. U., Lee, M. K. and Seo, K. I. (2014) Induction of apoptosis by isoegomaketone from *perilla frutescens* L. in B16 melanoma cells is mediated through ROS generation and mitochondrial-dependent, -independent pathway. *Food Chem. Toxicol.* **65**: 97-104.
11. Cho, B. O., Jin, C. H., Park, Y. D., Ryu, H. W., Byun, M. W., Seo, K. I. and Jeong, I. Y. (2011) Isoegomaketone induces apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways in human DLD1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**: 1306-1311.
12. Lee, J. H., Cho, H. D., Jeong, I. Y., Lee, M. K., Seo, M. W. and Seo, K. I. (2014) Sensitization of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-resistant primary prostate cancer cell by isoegomaketone from *perilla frutescens*. *J. Nat. Prod.* **77**: 2438-2443.
13. Park, S. Y., Kim, J. E., Choi, C. Y., Lee, D. W., Kim, K. M., Yoon, G., Yoon, I. S., Moon, H. S. and Cho, S. S. (2015) Analytical validation of rosmarinic acid in water extract of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo as functional health ingredient. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 85-88.
14. Park, Y. D., Lee, Y. M., Kang, M. A., Lee, H. J., Jin, C. H., Choi, D. S., Kim, D. S., Kang, S. Y., Kim, W. G. and Jeong, I. Y. (2010) Phytochemical profiles and *in vitro* anti-inflammatory properties of *Perilla frutescens* cv. Choolyupjasa mutants induced by mutagenesis with γ -ray. *Food Sci. Biotechnol.* **19**: 305-311.
15. Bassoli, A., Borgonovo, G., Caimi, S., Scaglioni, L., Morini, G., Moriello, A. S., Marzo, V. D. and Petrocellis, L. D. (2009) Taste-guided identification of high potency TRPA1 agonists from *Perilla frutescens*. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 1636-1639.
16. Lee, B. H., Jin, Y. M., Weon, J. B., Yang, H. J., Yun, B. R. and Ma, C. J. (2012) Simultaneous determination of three compounds in ejung tang by HPLC-DAD and LC-ESI-MS. *Kor. J. Pharmacogn.* **43**: 10-15.
17. Avula, B., Wnag, Y. H., Wang, M., Smillie, T. J. and Khan, I. K. (2012) Simultaneous determination of sesquiterpenes and pyrrolizidine alkaloids from the rhizomes of *Petasites hybridus* (L.) G.M. et Sch. and dietary supplements using UPLC-UV and HPLC-TOF-MS methods. *J. Pharmaceut. Biomed.* **70**: 53-63.

(2015. 12. 15 접수; 2016. 3. 8 심사; 2016. 3. 10 게재확정)