

Measurement of the Anti-oxidative Properties of Extract from Medicinal Plants Using an On-line HPLC-DPPH Assay

Do-Youn Im¹, Byoung-Sik Pyo², Sun-Min Kim² and Kyoung-In Lee^{3*}

¹Division of Liberal Arts and Teacher Training, Kwangju Women's University, Gwangju 62396, Korea

²Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 58245, Korea

³Bio-center, Dongshin University, Naju 58205, Korea

Received August 24, 2016 / Revised September 21, 2016 / Accepted September 23, 2016

Natural anti-oxidative compounds have important disease prevention and food preservation properties, in addition to anti-bacterial, anti-inflammation, anti-cancer, and skin whitening effects. High-performance liquid chromatography (HPLC), with an ultra violet (UV) detector coupled to a reverse phase C18 column and an online measurement system for 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radicals, was used to search for potent antioxidative compounds in crude extracts. The online HPLC-DPPH assay was then applied to confirm antioxidative compounds in water extracts from Radix of *Pueraria lobata*, Rhizoma of *Zingiber officinale*, Fructus of *Chaenomeles sinensis*, Cortex of *Ulmus pumila*, and Radix of *Astragalus membranaceus*. To determine the yields of the extracts, the Brix% of each extract solution was measured using a refractometer. When the relative DPPH radical scavenging ability values of the water extracts were compared with those of a positive control (ascorbic acid), the water extracts of *P. lobata*, *C. sinensis*, and *U. pumila* were 7.77%, 4.71%, and 4.19%, respectively. The results suggest that this method provides a useful assay for rapid measurement of DPPH radical scavenging abilities and conformation of antioxidative compounds in natural products. Moreover, it can reduce the time spent on the separation of active compounds from natural materials, such as medicinal plants, in addition to the use of reagents for separation.

Key words : Anti-oxidative ability, DPPH radical scavenging, HPLC

서론

활성성분의 분리나 추출 수율의 증대 등의 목적을 위해 다양한 유기용매를 사용할 수 있지만 상용화 단계나 임상실험 단계에서 안전성을 확보하기 위한 근거를 도출하기 위해 추가적인 시간과 막대한 연구비용이 수반되는 경우가 많다. 그래서 일반적으로 약용식물 재료를 이용한 추출물 형태 제품의 활용도를 높이기 위해서는 추출에 사용되는 용매에 제한을 둘 수밖에 없어진다. 최근에는 이산화탄소처럼 인체에 무해한 소재를 이용한 초임계 유체 추출 기술을 적용하여 여러 가지 제품의 생산에 활용되고 있지만 높은 추출비용과 추출성분의 선택성 등의 이유로 인해 아직까지 사용이 제한적인 상황이다 [9]. 결과적으로 물이나 발효 공법으로 제조된 에탄올 등이 현재로서는 가장 용이하게 사용될 수 있는 추출 용매인데 특히 열수 추출의 형태로 이용되는 물은 비교적 높은 끓는점과 점

도 등의 특성으로 인해 비극성 또는 일부 지용성 성분을 제외한 다양한 성분을 추출할 수 있는 장점을 가짐으로써 약용식물 추출에 자주 이용된다[12]. 한편, 물을 추출 용매로 사용된 경우 농축과 건조의 공정을 거침으로써 고체상의 추출물을 얻는 경우가 많다. 이런 공정의 경우 물의 물리화학적 특성상 추출액이 높은 온도에 추가적으로 노출됨으로써 성분의 변화를 나타내게 되는 경우가 발생하게 된다. 물론 진공 장치를 부가적으로 사용하거나 동결건조와 같이 가열이 거의 없는 방법을 적용할 수도 있지만 상대적으로 긴 시간과 비용이 필요하게 된다. 이러한 경우 농축이나 건조 공정 이전에 추출액 단계의 품질검사나 관련 활성 실험을 진행할 경우가 발생된다. 또한 용매인 물을 제거한 고체상의 추출물이 아닌 액상의 추출액을 그대로 최종 제품으로 활용하는 경우에도 마찬가지로 검사나 실험이 요구된다.

항산화 활성은 항균, 항염증, 피부 미백 등 다양한 활성과 관련성을 가지는 것으로 알려져 있다[3, 6, 7, 13]. 항산화 활성을 측정하는 다양한 방법 중 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능은 ascorbic acid와 같은 대조군을 이용하여 결과의 비교가 용이한 장점을 가지고 있어서 약용이나 기능성 식물 추출물 시료의 항산화 활성 측정에 가장 일반적으로 활용되고 있다[1, 8, 10]. 일반적으로 spectrophotometer나 micro-plate reader와 같은 분광학적 장비를 이용하는

*Corresponding author

Tel : +82-61-336-3104, Fax : +82-61-336-3118

E-mail : kilee@bic.re.kr

This is an Open-Access article 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.

DPPH radical 소거능 측정 실험법에서는 수십~수백 μM 범위의 DPPH radical 용액을 사용하여 시료 용액과 일정 비율로 혼합한 후 일정 시간 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 최종 소거능을 산출하게 된다. 이때 시료가 추출물이나 분획물 등 여러 성분이 혼합된 형태일 경우 특정 성분의 활성이라기보다는 다양한 성분의 병합적인 효과인 경우가 대부분이며, 활성을 가지는 성분의 함량이 낮을 경우 활성 자체가 미약하게 나타나게 됨으로써 활성 성분의 존재가 무시될 가능성이 있다.

최근 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)를 이용하여 실시간으로 항산화 관련 활성을 검토하기 위한 연구가 국내외에서 진행되고 있으며[4, 11, 14], 국내에서도 일부 연구가 시도되고 있다[2, 5]. 그러나 시료 특성에 따라 활성의 검출조건 설정이 다양하고 HPLC 분석이 필수적인 과정이 아닌 경우가 있어 아직까지 기존의 spectrophotometer나 micro-plate reader 기기를 활용하는 경우가 많은 실정이다. 하지만 이러한 기기 측정법은 추출물이나 분획물과 같이 다양한 성분이 혼재되어 있는 생약과 같은 천연물 시료 특성상 측정 결과 역시 다양한 성분의 병합 효과가 작용한다는 한계점이 있다. 또한 최근 HPLC를 활성 성분의 분리 정제에 활용하는 연구가 빈번히 수행되고 있는데 성분을 분리하면서 각 성분의 활성을 예측하여 선택성을 높이는 방법이 있다면 불필요한 성분을 분리하는데 낭비될 수 있는 시간이나 시약 등을 줄일 수 있으므로 유용하게 활용될 것이다.

본 연구에서는 추출에 있어서 안전성 등의 장점으로 인해 가장 빈번히 사용되는 용매 중 하나인 물을 사용한 수종의 약용식물 추출액의 항산화 활성 측정이 성분 분리 조건 설정이나 분석을 위한 HPLC 분석과 동시에 이루어 질 수 있도록 시스템을 구성하여 그 유용성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료

갈근(Radix of *Pueraria lobata*), 건강(Rhizoma of *Zingiber officinale*), 모과(Fructus of *Chaenomeles sinensis*), 유근피(Cortex of *Ulmus pumila*), 황기(Radix of *Astragalus membranaceus*)는 전남 화순에 위치한 전남생약농업협동조합에서 구입한 것을 사용하였으며, 표본은 동신대학교 바이오센터에 보관하였다.

추출물의 조제

각 시료를 blender (Warning, USA)로 분쇄 후 열수 추출을 실시하였다. 추출은 분쇄된 각 시료 100 g에 증류수 1.5 l를 혼합하여 100°C에서 2시간씩 2회 반복하여 실시하였다. 추출액은 원심분리기(Hitachi, Japan)를 이용하여 침전물을 제거한 후 여과를 실시하여 실험에 사용하였다.

추출물 농도 측정

추출액 단계에서 수율이나 고형분의 함량을 예측하기 위해 PR-101 refractometer (Atago, Japan)를 사용하여 각 추출액의 농도를 측정하였으며, 측정 결과를 Brix%로 나타내었다.

HPLC를 이용한 online DPPH radical 소거능 측정

각 추출액 시료의 HPLC profile 확인과 DPPH radical 소거능 측정을 위해 Agilent 1100 series HPLC와 column으로서 TSKgel ODS-80 (4.6×150 mm, 5 μm)을 기본 장비 구성으로 하여 분석을 실시하였다. Column oven의 온도는 30°C로 설정하였으며, Table 1에 나타난 조건과 같이 분석시간에 따라 이동상의 조성에 변경을 주었다. 전체적인 시스템의 구성은 Fig. 1과 같이 구성하였으며, 최종 시료주입량은 20 μl 로 결정하였다. Methanol에 50 μM 농도로 용해시킨 DPPH radical 용액을 공급하기 위하여 Shimadzu LC-10ADvp pump를 추가로 설치하였으며, 최종 소거능 측정을 위한 reaction tubing의 길이는 재현성 있는 radical 소거 반응 여부를 설정단계에서 확인 후 1 m로 설정하였다.

Table 1. Mobile phase gradient for HPLC analysis

Time (min)	A (distilled water, %)	B (methanol, %)
0	90	10
10	70	30
20	5	95
26	5	95
27	90	10
40	90	10

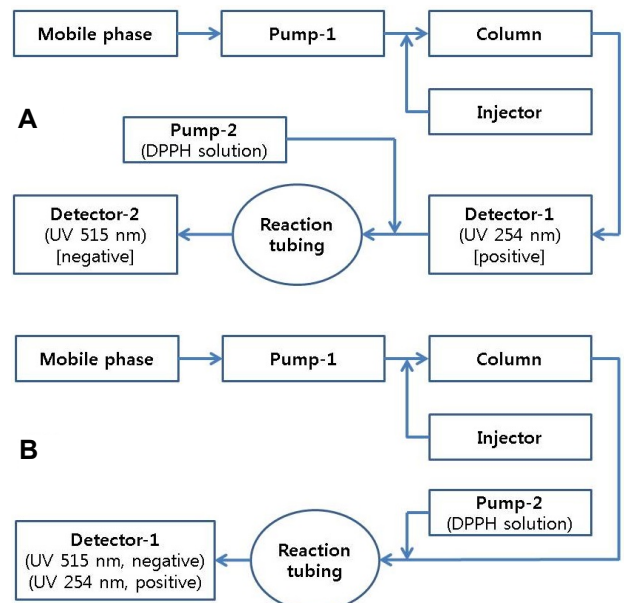


Fig. 1. Schemes of online HPLC-DPPH radical scavenging ability measurement system. (A) Dual detector system. (B) Single detector system.

통계분석

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차(mean ± SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행한 후 사후분석으로 Duncan's multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

온도 및 시간에 따른 DPPH radical 안정성

일반적인 성분 분석을 위한 HPLC 분석은 30분~1시간 전후의 시간이 소요된다. 본 연구를 위해 설정한 분석 조건에서도 시료 1회 분석 당 40분이 소요된다. 이는 연속적으로 실시되는 분석 과정 중 DPPH radical 용액이 분석 장소의 실온에 최소 40분에서 600분(10시간, 1일 최대 분석 시간 가정)동안 방치되는 것으로 온도나 빛에 민감한 시약 특성을 검토할 필요가 있게 된다. 빛의 경우 갈색 유리병과 같은 수준 이상의 불투명 용기를 사용함으로써 변화를 억제시킬 수 있으므로 본 연구에서는 분석 과정에 노출되는 온도에 대한 영향을 조사하였다.

Table 2의 결과와 같이 40°C 이하의 온도에서는 5시간까지는 유의한 변화가 없는 것으로 확인되었고 10시간 이후에는 초기 흡광도의 81.7% 정도가 유지되는 것으로 나타났다. 실온을 30°C 수준 이하로 유지한다면 10시간 이후에도 초기와 거의 동일한 수준임을 알 수 있었으며, 극단적인 고온인 60°C의 온도에서는 3시간 이후부터 흡광도가 낮아지는 현상이 발견되었다. 따라서 장시간 분석 및 측정이 실시되는 환경의 온도는 가급적 30°C를 초과하지 않는 수준으로 관리하여야 할 것으로 판단되었다.

DPPH radical 소거능 측정 조건의 최적화

HPLC로 불리는 액체크로마토그래피는 기체크로마토그래피와 함께 다양한 성분의 정성 및 정량 분석을 위해 기본적으로 사용되는 분석 기기이다. 특히 약용 식물 등에서 유래한 천연물 성분분석에 활용도는 상당히 높으며, 최근 들어 보급

이 확대되고 있는 검출기인 질량분석기(mass spectroscopy)의 폭넓은 활용에도 HPLC의 분리 기능이 필수적이다. 이러한 분리 분석을 위해 HPLC에 필수적인 구성 요소가 고정상 역할을 수행하는 column이다. 본 연구의 진행을 위해 시료 주입량과 이동상 유속 등을 감안하여 분석에 가장 보편적으로 이용되는 역상의 octadecyl silica (ODS; C18) 기반의 고정상을 사용하면서 충전제 입자 크기가 5 µm이고 내경과 길이가 각각 4.6 mm, 150 mm인 것을 기준으로 사용하였다. 이러한 규격의 column을 사용할 경우 분리 분석에 적합한 이동상 유속은 일반적으로 0.5~1 ml/min 범위에서 결정된다.

또한 분석의 정확성을 위해서 column 규격을 감안한 적절한 시료 주입량이 필요하다. 일반적인 분석용 column의 경우 내경이 2~6 mm, 길이가 50~300 mm 수준이며, 고정상 입자 크기는 1.8~5 µm 정도이다. 이로 인해 정상적인 분석 결과를 얻을 수 있는 시료의 적정 주입량(용매 제외)은 200 µg 이하이며, 최대 1 mg 수준을 초과하기 어렵다. 표준물질이나 고형화된 추출물을 적당한 용매에 재용해시켜 실험을 진행해야 하는 경우와 같이 농도를 분석 전에 알 수 있는 상황이라면 적정 시료 주입량을 설정하기 용이하지만 추출물처럼 농도를 모르는 경우에는 설정 자체가 어려울 수 있다. 따라서 시료인 추출액 중 고형분 농도를 예측하기 위해 본 연구에서는 refractometer를 활용하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 각 추출액의 굴절률은 0.9~3.5 Brix%로 확인되었다. 일반적으로 1 Brix%는 고형분 농도 1%와 유사하게 계산될 수 있으므로 10 mg/ml 농도로 환산할 수 있게 된다. 이는 다시 10 µg/µl로 표현될 수 있으므로 5 Brix%의 추출액을 기준으로 20 µl를 기기에 주입하게 되면 1 mg의 고형분 양을 사용하는 결과를 가져온다. 이를 바탕으로 본 연구를 위한 추출액의 기기 주입량은 20 µl로 설정하였다. 다만 시료액의 농도가 상대적으로 낮거나 높은 경우에는 주입량은 적절한 수준으로 증감시켜야 한다.

DPPH radical 소거능 측정에 사용되는 DPPH radical 용액의 용매로서는 radical 안정성 및 용해도 등을 고려하여 methanol이 가장 많이 사용되고 있다. 따라서 HPLC 분석에 사용되는 이동상도 기본적으로 물과 methanol로 결정하였다. 또한 DPPH radical 소거능을 동시에 측정하기 위해서는 반응에 사용되는 DPPH radical 용액의 농도 및 혼합 유속을 적절히 조

Table 2. Thermal stability of DPPH radical solution

Time (hr)	Relative absorbance* (%)			
	20°C	30°C	40°C	60°C
0	100.0±0.8**	95.6±4.5	97.4±7.9	100.6±6.4
1	99.7±1.3	95.7±3.6	95.8±2.2	96.7±3.8
2	96.2±1.0	98.8±0.7	100.4±1.3	92.9±1.4
3	97.6±0.7	96.1±0.9	98.7±4.3	72.6±7.8
5	94.5±0.3	94.8±1.6	92.4±2.7	56.4±4.7
10	93.6±0.4	95.4±1.1	81.7±5.1	31.3±5.8

*Relative absorbance; ratio of value compared to control (20°C, 0 hr). **Values are mean ± SD (n=3).

Table 3. DPPH radical scavenging abilities of the extracts

Sample	Sum of peak area	Brix%	Relative ability* (%)
PR	6,773±192	3.5±0.1	7.77±0.22 ^{B**}
CF	2,465±127	2.1±0.0	4.71±0.24 ^C
UC	938±63	0.9±0.0	4.19±0.28 ^D
ZR	121±14	1.8±0.0	0.27±0.03 ^E
AR	2±1	1.2±0.0	0.01±0.00 ^F
VC	249±19	(0.01) ^{***}	100.00±7.63 ^A

$$*Relative\ activity(\%) = \left[\frac{As/(Bs/Bc)}{Ac} \right] \times 100$$

As : Sum of peak area of sample, Ac : Peak area of positive control(ascorbic acid),

Bs : Brix% of sample solution, Bc : calculated Brix% of positive control(ascorbic acid)

**Different superscript letters in the same column show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

***Value of calculation by conversion mg/ml into %. PR; Radix of *Pueraria lobata*, CF; Fructus of *Chaenomeles sinensis*, UC; Cortex of *Ulmus pumila*, ZR; Rhizoma of *Zingiber officinale*, AR; Radix of *Astragalus membranaceus*, VC; Ascorbic acid (positive control).

절할 필요가 있다. DPPH radical 용액의 농도가 높으면 시료 중 항산화 효과가 확인되기 어렵고 농도가 낮으면 효과의 비교가 어려워질 수 있다. 유속의 경우 상대적으로 고속으로 공급하면 baseline이 안정화되는 효과가 있으나 검출기에 허용압력을 초과할 수 있는 위험이 있기 때문에 적정 수준의 유량을 선택하여야 한다. 본 연구를 위해 사전에 진행된 실험 결과, DPPH radical 용액의 농도는 20~100 μ M 범위에서 0.2~0.5 ml/min 정도가 가장 양호한 것으로 나타났다.

한편, 성분 분석과 DPPH radical 소거능 측정을 위한 검출 조건이 다르고 분리 성분과 DPPH radical과의 반응으로 인한 성분의 화학적 변화로 인해 동시분석을 위한 시스템에서 검출기는 기본적으로 2대가 필요하게 된다(Fig. 1A). 검출기가 2대인 경우는 Fig. 1A와 같이 reaction tubing 전·후에 각각의 검출기를 배치하여 시료의 성분 분석과 DPPH radical 소거능을 한번의 시료 주입으로 완료할 수 있게 된다. 그러나 일반적인 분석 기기의 경우 다른 종류의 검출기를 한 대씩 설치하여 운영하는 경우가 많으므로 Fig. 1B와 같은 조건에서 DPPH radical 용액의 공급을 차단한 상태에서 성분 분석을 우선 실시한 후 2차로 DPPH radical 용액을 공급하면서 측정파장을 변경하여 소거능을 측정할 수 있다. 또한 항산화 활성이 중요 지표로 설정된 분석이라면 먼저 DPPH radical 소거능 측정용 분석을 실시한 후 활성이 확인된 시료만을 선별하여 2차로 성분 분석을 실시하는 것도 제한된 조건 내에서 효율적인 방법이 될 것으로 판단된다. 한편, DPPH radical 소거능 측정을 위한 검출기의 경우 측정 조건 중 polarity를 negative로 설정하면 결과 확인이나 peak의 면적 비교에 용이할 수 있다.

약용식물 추출액의 DPPH radical 소거능 측정

고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 항산화 관련 활성을 검토하기 위한 연구가 국외에서 진행되었으며, 국

내에서도 일부 연구가 시도되었었다[2, 4, 5, 11, 14]. 이와 같은 방법은 성분분석이나 분리 목적으로 사용되는 HPLC 사용과정에서 목적 성분이나 분리물의 항산화 활성을 동시에 확인할 수 있다는 장점을 가짐으로써 보다 효율적인 연구에 도움을 줄 수 있다. 본 연구에서는 다양한 시료의 추출물에 적용할 수 있는 측정방법의 구현을 위해 갈근, 건강, 모과, 유근피, 황기 등 5종의 시판 약용식물의 열수 추출액을 대상으로 DPPH radical 소거능을 측정하였으며, 동일한 분석 조건에서의 HPLC profile 분석 결과와 비교하였다. 측정결과 가장 소거능이 높은 시료는 갈근 열수 추출액인 것으로 나타났으며, 4~5종의 항산화 활성 기여 성분이 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 2A). 모과 추출액에서도 높은 소거능을 가진 2종의 성분이 확인되었으며(Fig. 2B), 유근피 추출액 중에도 3종 이상의 DPPH radical 소거 활성을 가진 성분이 확인되었다(Fig. 2C). 한편, Fig. 2D와 Fig. 2E에서와 같이 건강과 황기 열수 추출액의 측정 결과에서는 상대적으로 약한 소거능을 보인 성분이 확인되었거나 소거능이 거의 없는 것을 볼 수 있었다. 대조군으로 항산화 활성이 우수한 것으로 알려진 ascorbic acid를 동일한 조건에서 측정한 결과, Fig. 2F와 같이 소거능을 확인할 수 있었다. 이와 같은 분석 결과를 바탕으로 확인된 peak의 면적을 산출한 후 refractometer를 활용하여 사전에 측정한 추출액의 예상 농도를 반영한 상대적인 DPPH radical 소거능을 계산할 수 있었다. Table 3에 나타난 바와 같이 대조군으로 사용된 ascorbic acid를 기준으로 갈근 추출물이 7.77%로 가장 높은 소거능 수준을 보여주었다.

항산화 활성은 항균, 항염증, 피부 미백 등 다양한 활성과 관련성을 가지는 것으로 알려져 있는데, 항산화 활성을 측정하는 다양한 방법 중 DPPH radical 소거능은 ascorbic acid와 같은 대조군을 이용하여 결과의 비교가 용이한 장점을 가지고 있어서 약용이나 기능성 식물 추출물 시료의 항산화 활성 측

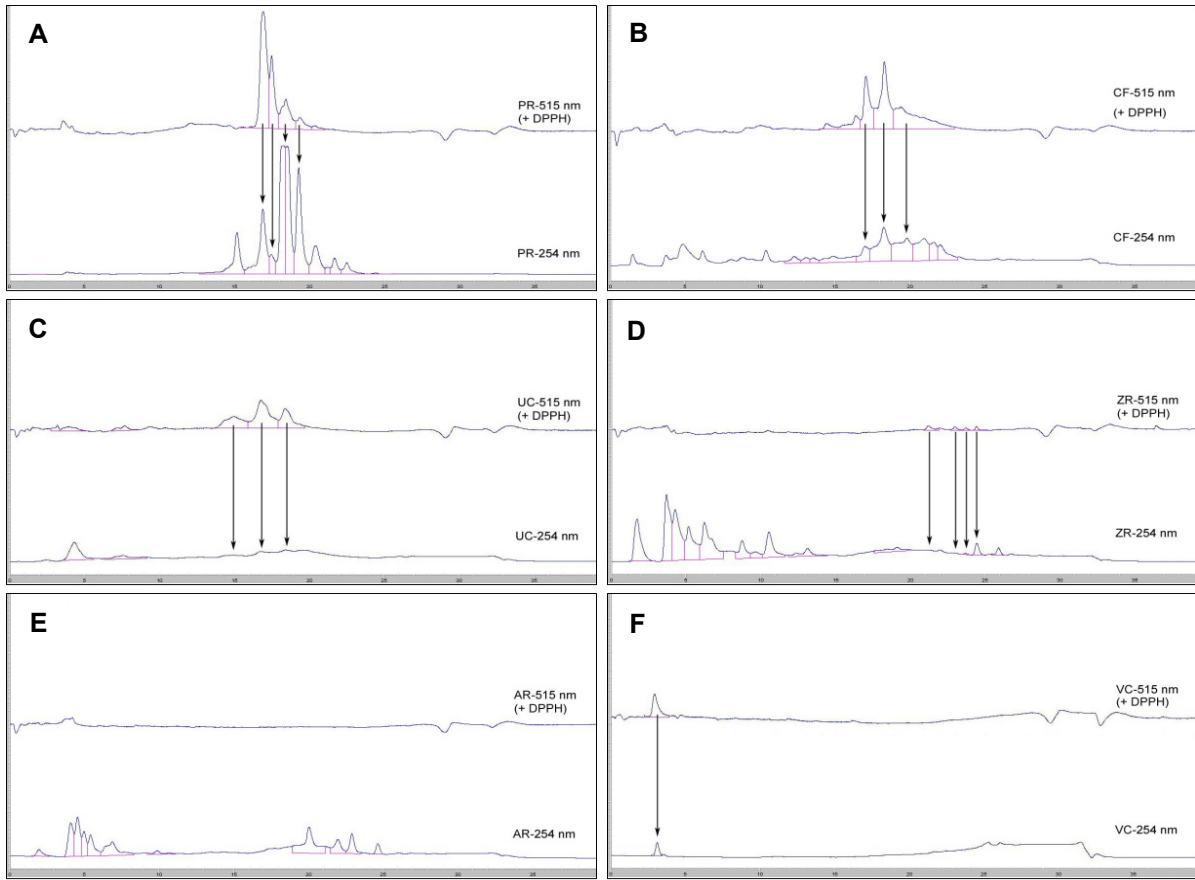


Fig. 2. LC-UV detector profiles and DPPH radical scavenging effects of samples. (A) Radix of *Pueraria lobata*. (B) Fructus of *Chaenomeles sinensis*. (C) Cortex of *Ulmus pumila*. (D) Rhizoma of *Zingiber officinale*. (E) Radix of *Astragalus membranaceus*. (F) Ascorbic acid (positive control).

정에 가장 일반적으로 활용되고 있다. 그러나 일반적인 연구에서는 추출물이나 분획물, 분리 활성성분 등을 농축이나 건조 등의 방법으로 용매를 제거한 후 소거능 측정에 적합한 용매를 사용하여 농도별로 시료를 조제하는 과정을 거치는 경우가 많아서 시간과 시약, 관련 연구 인력적인 면에서 낭비적인 요소로 작용될 수 있다. 본 연구에서는 열수 추출물을 원심분리와 여과 등 단시간에 처리할 수 있는 최소한의 전처리를 거친 추출액을 그대로 사용하여 HPLC를 이용한 각종 성분 분석을 실시한 후 대표적 항산화 활성 측정법인 DPPH radical 소거능을 성분 분석과 동시에 진행할 수 있도록 세부적인 조건을 설정하였다. 실험 조건을 유용성을 확인하기 위해 5종의 약용식물 추출물을 동일한 조건으로 분석하여 비교하였으며, 추출액의 고형분 농도를 예측할 수 있는 refractometer 측정 결과를 반영하여 보다 객관적인 항산화 활성 비교에 활용하였다. 이와 같은 측정 방법을 응용한다면 다양한 약용식물 추출물과 같은 천연 소재 관련 연구에 있어서 유효한 성분의 분리나 활성의 비교에 있어서 신속성과 정확성 등을 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Cha, B. C. 2015. Changes in the constituents and antioxidant activity in accordance with the processing conditions of *Citrus unshiu* Markovich. *Kor. J. Pharmacogn.* **46**, 23-30.
2. Hong, J. S., Kang, B. G., Jang, Y. S., Kim, S. H., Wang, Z., Park, Y. H., Park, J. H. and Lim, S. S. 2014. Studies on standardization of licorice based on its active components with on-line HPLC bioassay system. *Kor. J. Plant Res.* **27**, 401-414.
3. Im, D. Y. and Lee, K. I. 2014. Antioxidative activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Arctium lappa* roots and analysis of phenolic compounds. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**, 141-146.
4. Inoue, K., Baba, E., Hino, T. and Oka, H. 2012. A strategy for high-speed countercurrent chromatography purification of specific antioxidants from natural products based on on-line HPLC method with radical scavenging assay. *Food Chem.* **134**, 2276-2282.
5. Jeon, Y. E., Lee, Y. S., Lim, S. S., Kim, S. J., Jung, S. H., Bae, Y. S., Yi, J. S. and Kang, I. J. 2009. Evaluation of the antioxidant activity of the fruiting body of *Phellinus linteus* using the on-line HPLC-DPPH method. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 472-479.

6. Kim, J. S. 2014. Antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antimicrobial activities of extracts from *Maesa japonica* (Thunb.). *Kor. J. Med. Crop Sci.* **22**, 289-294.
7. Kim, J. Y., Kim, S. Y., Kwon, H. M., Kim, C. H., Lee, S. J., Park, S. C. and Kim, K. H. 2014. Comparison of antioxidant and anti-inflammatory activity on chestnut, chestnut shell and leaves of *Castanea crenata* extracts. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **22**, 8-16.
8. Kim, N. Y., Park, D. S. and Lee, H. Y. 2015. Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **23**, 37-42.
9. Lee, S. E., Kim, S. M., Lim, W. C., Kang, K. C. and Pyo, H. B. 2014. Comparison of volatile compounds from *Thymus magnus* Nakai by three different extraction methods. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **40**, 171-178.
10. Li, H. and Jeong, J. M. 2015. Antioxidant activities of various berries ethanolic extract. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **23**, 49-56.
11. Malherbe, C. J., Willenburg, E., de Beer, D., Bonnet, S. L., van der Westhuizen, J. H. and Joubert, E. 2014. Iriflophenone-3-C-glucoside from *Cyclopia genistoides*: isolation and quantitative comparison of antioxidant capacity with mangiferin and isomangiferin using on-line HPLC antioxidant assays. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **951-952**, 164-171.
12. Park, H. J., Kim, A. J., Cheon, Y. P. and Lee, M. S. 2015. Anti-obesity effects of water and ethanol extracts of black ginseng. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 314-323.
13. Song, J. H. and Lee, S. R. 2015. Anti-oxidant and inhibitory activity on NO production of extract and its fractions from *Rosa davurica* Pall. leaves. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **23**, 20-26.
14. Zhang, H., Xi, W., Yang, Y., Zhou, X., Liu, X., Yin, S., Zhang, J. and Zhou, Z. 2015. An on-line HPLC-FRSD system for rapid evaluation of the total antioxidant capacity of Citrus fruits. *Food Chem.* **172**, 622-629.

초록 : HPLC와 DPPH radical 소거능 측정 방법의 결합에 의한 약용 식물 추출물의 항산화 활성 비교

임도연¹ · 표병식² · 김선민² · 이경인^{3*}

(¹광주여자대학교 교양교직과정부, ²동신대학교 한약재산업학과, ³동신대학교 바이오센터)

본 연구에서는 일반적으로 분리 및 분석에 가장 빈번히 사용되고 있는 C18 column과 UV 검출기가 장착된 액체크로마토그래피(HPLC)와 항산화 활성 측정에 사용되는 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정 방법을 결합한 HPLC-DPPH 동시 측정법의 최적화와 유용성 확인을 약용식물의 추출물을 대상으로 실시하였다. 최종적으로 적용된 HPLC-DPPH 동시 측정법의 유용성은 갈근, 건강, 유근피, 모과, 황기 등 5종 약용식물의 열수추출물과 대조군으로서 ascorbic acid의 라디칼 소거능을 측정하여 확인하였다. HPLC-DPPH 동시 측정에 앞서 추출액 중 고형분 함량을 refractometer를 사용하여 측정함으로써 추출 수율에 따른 활성 차이를 보정할 수 있도록 하였다. 갈근, 모과, 유근피 열수추출물의 라디칼 소거능이 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 비교하여 7.77%, 4.71%, 4.19%로서 다른 열수추출물보다 상대적으로 높은 것으로 확인되었다. 이와 같은 측정법은 실제 활성 성분의 분리 및 분석에 있어서 불필요한 시간 및 시약의 낭비를 줄일 수 있는 유용한 수단이 될 수 있을 것으로 판단된다.