pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 5, pp. 389~395 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.5.389

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

루이보스차(*Asphalthus linearis*)의 추출방법에 따른 페놀릭류 함량 변화연구

박신희* · 도영숙 · 김윤성 · 김난영 · 이진희 · 김종화 · 윤미혜
경기도보건환경연구원 안양농수산물검사소

Determination of Phenolic Contents in Rooibos (*Asphalthus linearis*) Tea Depending on the Steeping Temperature and Time

Sin-Hee Park*, Yung-Suk Do, Youn-Sung Kim, Nan-Young Kim, Jin-Hee Lee, Jong-Hwa Kim, and Mi Hye Yoon
Anyang Agro-fishery Products Inspection Center, Gyeonggi province Institute of Health and Environment, Korea
(Received May 31, 2017/Revised June 10, 2017/Accepted September 25, 2017)

ABSTRACT - A simultaneous determination of 5 phenolic acids (gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, trans ferulic acid) and 9 flavonoids (procyanidin b1, aspalathin, rutin, vitexin, hyperoside, isoquercitrin, luteolin, quercetin, chrysoeriol) in rooibos tea has been carried out by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). A validated analysis method in this study was applied to rooibos aqueous infusions. Rooibos tea is an antioxidant-rich tea which has anti-cancer, anti-aging, anti-inflammatory, anti-diabetic effect. Extraction yield of phenolics depends on steeping time and temperature of water. Tea infusions were prepared by placing 1 g of tea leaves or 1 tea bag in 100 mL of boiled water, and then at 3, 6 and 30 minutes intervals the infused teas were taken to carry out the analysis of phenolic contents. Another tea infusion was conducted with cold water (25-30°C) for 30 minuntes. As a result, the total amount of phenolics was highest in rooibos tea steeped with hot water for 30 minutes, followed by 6 minutes, 3 minutes and cold water 30minutes and the result has statistical significance.

Key words : Phenolics, Rooibos Tea, Phenolic Acids, Flavonoids, UPLC-MS/MS

페놀릭류는 식물계에 광범위하게 분포되어있는 대표적인 phytochemical이며 지금까지 8,000종 이상이 발견되었다. 페놀릭류는 적어도 하나 이상의 aromatic ring에 하나 이상의 hydroxyl group을 가진다. 저분자량의 simple aromatic ring 구조부터 고분자량의 complex tannin이나 polyphenol까지 매우 다양하게 존재한다[1,2]. 물질의 구조에 따라 크게 flavonoids와 non-flavonoids로 구분되는데 non-flavonoid에는 phenolic acids, phenolic alcohols, stilbene과 lignan등이 속한다[1]. Flavonoids는 차, 과일, 야채, 향신료, 코코아, 와인등과 같이 식물유래의 식품에 다양하게 존재하며 flavonoids는 섭취 시 인체 내에서 항산화, 항미생물, 심장보호, 소화관 보호, 항골다공증, 항염증, 항암작용을 함으로써 건강에 매우 유익하다[3].

루이보스는 남아프리카의 Western Cape 지역에 있는 세더버그 산 인근지역의 척박한 환경에서 서식하고 있으며, 콩과에 속하는 관목으로 키는 1.5-2 m정도로 자라고 밝은 녹색의 침엽수이면서 작은 노란색 꽃이 핀다[4]. 수확 후 발효과정동안 녹색에서 붉은색으로 변하게 되는데 이는 구성 페놀릭류들의 산화로 인한 결과이며 이 때문에 red tea 혹은 red bush tea라고 불리기도 한다. 1999-2000년까지 루이보스는 연 4,500-6,000 metric tonne이 생산되었으나 생산량의 70-75%가 남아프리카 현지에서 소비되었다[5]. 하지만 2015년 현재 루이보스티의 연 재배량은 12,000 metric tonne이 넘으며 로컬마켓 뿐 아니라 세계적 시장에서 그 수요가 늘어나고 있다[6]. 루이보스티의 가장 큰 특징은 카페인이 거의 없으며, 녹차(*Camellia sinensis* tea)에 비해 매우 적은정도의 tannin을 함유하고 있다는 것이다[7]. 카페인에 민감한 어린이나 임산부에게도 부작용이 거의 없으며 tannin의 양이 적으므로 일반 녹차보다 오랜 시간 우려내어 마셔도 상대적으로 떫은 맛이 매우 적다. 루이보스티에는 다른 식물에서는 아직까지 발견되지 않은 유일한 페놀릭류인 aspalathin과 aspalalinin이라는 flavonoid 단량체가 존재한다[8,9]. 또한 quercetin, isoquercetin, vitexin,

*Correspondence to: Sin-hee Park, Food and Drug Research Division, Gyeonggi-Do Institute of Health and Environment, Suwon 16205, Korea
Tel: 82-31-250-2562, Fax: 82-31-250-2569
E-mail: psh75@gg.go.kr

chrysoeriol, luteolin, hyperoside, rutin, coumaric acid, ferulic acid등 다양한 페놀릭류가 루이보스티에서 검출되었다[10].

차는 우려내는 물의 온도와 우려내는 시간에 따라 그 속에 함유된 유용성분의 추출효율이 달라진다[11]. 루이보스티는 녹차나 홍차, 우롱차에 비해 세계시장에 소개된 지 오래되지 않았으나 여러 연구결과들을 통해 항산화, 항암, 항알러지등 인체에 유익한 작용을 많이 하는 것으로 보고되고 있다[12-14]. 가장 접하기 쉽고 대중적으로 소비량이 높은 녹차의 음용방법은 보통 끓인 물을 80°C정도로 식힌 후 녹차에 붓고 약 3분간 우려내어 마시는 것을 권장하고 있으나 루이보스티는 우려내는 물의 온도와 시간에 따른 유용성분 함량에 대한 연구결과가 많지 않다. 이번연구의 목적은 유익한 페놀릭류를 다량 포함하고 있는 것으로 알려진 루이보스티를 음용할 때 가장 많은 페놀릭류를 추출할 수 있는 물의 온도와 추출시간을 밝히는 것이다.

Materials and Methods

시료

본 연구에 사용한 루이보스티는 경기도내 대형유통매장 및 백화점에서 총 30건 구매하였다. 구매한 루이보스티의 원산지는 30건중 29건은 남아프리카, 1건은 독일이었다.

표준 용액 및 시약

페놀릭류 표준품인 gallic acid, procyanidine B1, chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, aspalathin, vitexin, hyperoside, *trans*-ferulic acid, isoquercitrin, rutin, luteolin, quercetin, chrysoeriol은 Extrasynthese (Genay, France) 제품을 사용하였다.

Hexane, methanol은 Wako (Tokyo, Japan)에서 잔류 농약분석급을 사용하였고 acetonitrile은 Merck (Darmstadt, Germany) GR급을 사용하였다. 각물질의 stock standards는 400~500 mg/L의 농도로 methanol에 녹여 갈색 바이알에 담아 밀봉한 후 사용 전 까지 −20°C에서 냉동보관 하였다. Working standard mix는 stock standard solution을 methanol을 이용하여 원하는 농도로 단계 희석한 후 사용하였다.

분석기기 및 software

루이보스티 시료의 페놀릭류 함량 분석에는 Waters UPLC system (Waters, Milford, MA, USA)과 칼럼은 Cadenza CL-C18, 100 * 2 mm를 이용하여 이동상과 유속을 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. 분석온도는 40°C, injection volume은 5 μL를 주입 하였으며 분석시간은 20분 이 소요되었다. 컬럼을 통해 분리된 compound들의 함량을 측정하기 위해 mass spectrometry를 사용하였는데 Waters Acquity TQD tandem quadrupole mass spectrometer system (Waters, Milford, MA, USA)을 이용하였고 수집된 데이터는 Masslynx 4.1 software를 이용하여 가공하였다.

여러 논문에서 페놀릭류 분석시 ESI 방식의 경우 positive mode보다 negative mode에서 감도가 더 좋다고 보고 되어있다[15,16]. 이번 연구에서도 표준품의 검출조건을 결정할 때 positive, negative mode를 사용하여 비교해본 결과 negative mode에서 더 높은 감도를 보였으므로 실제 실험에서도 ESI negative mode를 이용하여 분석하였다. 나머지 TQD 조건은 Table 2와 같다.

시료전처리 방법

시중 유통 중인 루이보스티의 포장상태에 따라 티백인 경우는 1티백으로 혹은 건조된 분말인 경우 1 g을 정밀히 취하여 찻잔에 넣고 전기 주전자를 이용하여 끓인 물 100 mL를 찻잔에 부어 차를 우려내었다. 루이보스티 속의 페놀릭류 추출을 돕기 위해 2분에 1번씩 찻잔속의 물을 티스푼을 이용하여 부드럽게 저어주었고 찻잔에 물을 부은 후 3분, 6분, 30분이 지난 시점에 추출된 액을 2 mL씩 glass tube에 취하고 40°C로 세팅된 워터배스에서 압축공기를 가하여 증발농축 시켰다. 완전히 증발된 추출액에 메탄올 2 mL을 가하고 vortexing 하여 잘 녹인 후 0.22 μm PTFE syringe filter로 여과하여 분석하였다. 뜨거운 물을 이용한 추출과는 별도로 차가운 물 추출은 상온(20~25°C)의 물을

Table 1. UPLC mobile phase conditions

Flow rate			
Time	A(%)	B(%)	Flow rate (mL/min)
0.0	100	0	
1.0	100	0	
10.0	70	30	
15.0	0	100	0.3
18.0	0	100	
18.1	100	0	
20.0	100	0	

A- 0.1% acetic acid
B- 0.1% acetic acid in Acetonitrile

Table 2. TQD conditions

ESI mode	Negative
Capillary voltage	3.0 kV
Extractor voltage	3.0 V
Source temp.	150°C
Desolvation temp.	400°C
Cone gas flow (N_2)	50 mL/min
Desolvation gas flow (N_2)	750 mL/min
Collision gas (He)	0.17 mL/min
Collision gas pressure	3.7×10^{-3} mbar

동일량 가하고 30분간 추출한 후 동일한 방법으로 전처리하여 페놀릭류의 함량을 측정하였다.

분석물질의 정성을 위한 Ion ratio 구하는 방법

Ion ratio (%) = 정성이온 peak area / 정량이온 peak area × 100

분석방법의 유효성검증방법

시험법의 유효성 검증 항목으로 직선성, LOD, LOQ, linear range, 회수율(%), 정밀성에 대한 실험을 실시하였다.

페놀릭류의 검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)는 32, 65, 125, 250, 500, 1000, 2000 μg/L standard 용액을 각 6회 분석하여 얻어진 데이타를 바탕으로 ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) 가이드 라인[18] 따라 아래의 방법으로 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \sigma/S$$

$$LOQ = 10 \times \sigma/S$$

σ = the standard deviation of the response

S = the slope of the calibration curve

직선성을 평가하기 위하여 0.032 mg/L ~ 4.0 mg/L의 8 단계 농도의 표준품을 조제하고 분석하였는데, 그 결과 얻어진 크로마토그램의 peak 면적과 농도간의 상관관계를 회귀분석을 통해 결정하였다. 회수율 시험은 루이보스티 제품 하나를 대표로 선택하여 농도 1 mg/L의 표준품 혼합액을 가한 후 뜨거운 물로 30분 추출하여 페놀릭류의 함량을 구하고 표준품 혼합액을 가하지 않은 샘플의 페놀릭류 함량을 따로 구하여 그 차이를 계산한 후 회수율로 하였다.

정밀도를 측정하기 위하여 1 mg/L의 표준품 mix를 하루동안 6회 반복 분석하여 interday precision을 구하였고, 연속하지 않은 3일 동안 하루당 6회씩을 분석하여 intraday precision을 구하였다.

통계처리

페놀릭류의 함량 데이타 결과는 3회 평균 ± 표준편차로 표현하였다. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA)을 사용하여 ANOVA분석과 Bonferroni's test를 통해 유의성을 검정하였다. $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

Results and Discussion

TQD (MS/MS) detector 분석 조건설정

UHPLC system을 이용하여 샘플을 분리하기 위한 이동상으로 A (5% acetonitrile)용액과 B (100% acetonitrile)용액에 각각 MS용 acetic acid를 0.1% 농도가 되도록 가하여 이용하였다. TQD detector는 분석 대상 물질에 따라 그 물질에 대한 민감도를 최적화하기 위해 cone voltage와 collision energy 값을 각각 정해주어야 한다. 감도의 최적화를 위한 방법은 다음과 같다. 먼저 페놀릭류 표준품을 개별적으로 5 mg/L의 농도로 조제하고 각각의 표준품 용

Table 3. MS/MS parameters

Compounds	Retention time (min)	Cone Voltage	Quantification transition*	Confirmation transition*	Ion ratio (%)
Gallic acid	1.42-1.43	30	169 > 125(13)		
Procyanidin B1	3.69	30	577 > 289(25)	577 > 407(18)	45.7
Chlorogenic acid	4.03	25	353 > 191(20)		
Caffeic acid	4.73-4.74	25	179 > 135(15)		
p-coumaric acid	6.06-6.09	25	163 > 119(15)	163 > 93(25)	5.0
Aspalathin	6.13-6.16	25	451 > 331(14)	451 > 361(20)	15.0
Rutin	6.36-6.46	50	609 > 300(35)	609 > 271(55)	43.9
Vitexin	6.46-6.53	40	431 > 312(25)	431 > 284(35)	2.2
Hyperoside	6.63-6.73	40	434 > 300(25)		
trans-Ferulic acid	6.7	25	193 > 134(25)	193 > 149(10)	24.8
Isoquercitrin	6.64-6.74	45	463 > 300(25)	463 > 271(40)	49.4
Luteolin	9.71-9.72	45	285 > 133(35)	285 > 107(35)	12.1
Quercetin	9.71-9.74	35	301 > 151(22)	301 > 179(20)	31.6
Chrysoeriol	11.41	40	299 > 284(20)	299 > 256(30)	23.3

* Collision energy (eV) is given in brackets.

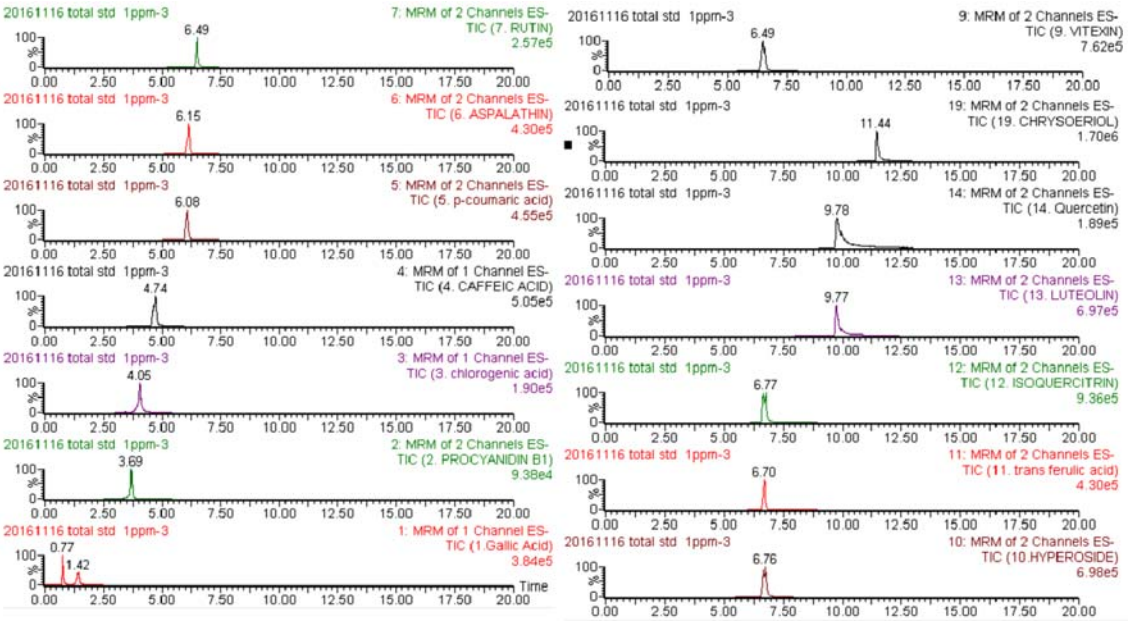

Fig. 1. Chromatograms of 14 phenolic standards (1 mg/kg).

액을 이동상 A와 B를 비율 50 : 50, 유속은 0.1 mL/min으로 direct infusion 방식으로 주입한다. 표준용액 주입 시 표준품에 해당하는 분자량 $[M-H]^-$ 에서 parent ion의 beam이 나오는 것을 확인한 후 cone voltage를 조절하여 parent ion의 감도가 가장 높게 나오는 cone voltage를 결정하는데 cone voltage가 결정되면 collision energy를 조금씩 높여가면서 parent ion을 fragmentation시키고 daughter ion이 가장 잘 검출되는 collision energy값을 찾는다. Daughter ion중 가장 감도가 높게 잘 검출되는 것을 정량이온으로 정하고 두 번째로 잘 나오는 이온을 정성이온으로 정하는데 이와 같은 방법으로 각 14개의 페놀릭류 standard별로 최적의 cone voltage값과 정량 정성 이온별 collision energy 값을 결정하였고(Table 3) 14종 페놀릭류의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 이렇게 최적화된 조건으로 샘플을 분석할 때 샘플에서 나온 peak이 표준품과 동일한 물질인지 확인하기 위해 SANTE기준을 적용하였다[17]. SANTE 기준에 의하면 MS/MS분석시 샘플의 크로마토그램상에 나온 피크가 분석하려는 물질인지 확인하기 위해 먼저 분석물질 peak의 retention time을 standard와 비교할때 ± 0.1 min 이내의 범위에 속해야 한다. 두 번째로는 질량분석기에 의해 수집된 분자량 데이터를 이용하여 확인하는데, 샘플을 분석할 때 standard와 동일한 parent ion이 일차적으로 검출되는지, 또한 parent ion에 collision energy를 가하여 fragmentation시켜 나온 daughter ion의 분자량과 정성, 정량 이온의 비율인 ion ratio가 standard와 비교하여 ± 30% (relative) 범위 내에 속하는지 비교하여 이를 만족하면 standard와 동일한 물질로 판단한다. 하지만 우리가 분석하려는 20개 물질 중 gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid는 정성이온이 검출되지 않았다. 위의 두가지 기준에 의해 샘플에서 검출된 peak이 우리가 분석하려는 물질과 동일한 것으로 확인되면 peak의 intensity를 이용하여 정량하였다.

분석방법의 유효성검증결과

시험법의 유효성 검증 항목으로 직선성, LOD, LOQ, linear range, 회수율(%)에 대한 실험을 실시한 결과 Table 4와 같았다.

LOQ는 0.001~0.101 mg/L로 확인되었고 linear range는 물질에 따라 최소 0.032 mg/L에서 최대 4.0 mg/L로 결정되었다. 직선성은 평가 결과는 R^2값이 0.9817~0.9992로 양호한 결과를 보였다. 회수율 시험은 SANTE 기준에 의하면 70-120% 이내이어야 하며 이번 실험에서 회수율은 asphalatin 94.9% ~ quercetin 112.2% 사이에서 확인되었다.

Precision은 반복실험을 통하여 값이 일정하게 나오는지를 확인하기 위한 유효성 검증인자인데 SANTE 기준에 의하면 RSD (relative standard deviation)가 ≤ 20% 이어야 한다. Precision 측정 결과 interday precision (RSD%)는 chrysoeriol 1.8 ~ rutin 9.2%로 나왔으며 intraday precision (RSD%)은 caffeic acid 1.8 ~ aspalathin 10.0%로 SANTE 기준을 만족하였다.

루이보스티 우려내는 물의 온도 및 채취시간별 페놀릭류 함량

루이보스티에서 검출된 14종의 페놀릭류 중 rutin, aspalathin, vitexin, hyperoside, isoquercitrin, quercetin등이 주로 검출되었고, 그 외에 luteolin, chrysoeriol, *trans*-ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, gallic

Table 4. Regression, R^2, LODs, LOQs, linear range and recovery for studied compounds

Compounds	Regression equation	R^2	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Linear range (mg/L)	Recovery (%)
Gallic acid	35794.8 X + 103.901	0.9979	0.018	0.055	0.032-2.0	100.2
Procyanidin B1	6694.14 X – 13.754	0.9992	0.010	0.029	0.032-2.0	97.9
Chlorogenic acid	25860.8 X + –40.6025	0.9963	0.010	0.031	0.032-4.0	99.3
Caffeic acid	61815 X + 2059.13	0.9931	0.006	0.018	0.032-4.0	103.3
p-coumaric acid	61918.3 X + 2246.84	0.9933	0.006	0.018	0.032-2.0	105.7
Aspalathin	36985.5 X + 368.238	0.9986	0.003	0.009	0.032-4.0	94.9
Rutin	43515 X + 194.98	0.9938	0.000	0.001	0.032-4.0	108.3
Vitexin	115194 X + 2689.71	0.9934	0.001	0.003	0.032-4.0	107.1
Hyperoside	110797 X + 1194.44	0.9976	0.000	0.001	0.032-2.0	102.1
trans-Ferulic acid	47273.1 X + 2618.42	0.9817	0.002	0.006	0.032-2.0	104.4
Isoquercitrin	160823 X + 3378.03	0.9939	0.004	0.013	0.032-2.0	105.9
Luteolin	144598 X + 2033.31	0.9933	0.001	0.002	0.032-2.0	104.2
Quercetin	69678.4 X + 751.953	0.9935	0.034	0.101	0.032-2.0	112.2
Chrysoeriol	196271 X + 9826.48	0.9902	0.002	0.007	0.032-2.0	95.2

Table 5. Comparing individual phenolic contents of Rooibos tea steeping with hot water at 3 min, 6 min, 30 min interval and cold water at 30 min. (unit : mg/100 mL)

	Hot water 3 min	Hot water 6 min	Hot water 30 min	Cold water 30 min
Gallic acid	12.0-83.4	6.7-94.3	5.8-102.7	16.3-66.0
Procyanidin B1	3.0-119.9	5.8-126.9	3.9-148.6	3.2-140.2
Chlorogenic acid	9.1-716.6	9.4-824.9	10.2-814.7	7.6-823.3
Caffeic acid	2.3-82.0	4.0-89.3	3.7-89.7	9.3-60.4
p-coumaric acid	1.8-39.4	1.8-44.4	7.0-50.0	6.2-30.6
Asphalatin	2.4-3166.7	4.5-3444.3	10.3-2686.5	1.4-3193.9
Rutin	5.9-1343.6	7.9-1381.3	18.6-1430.1	35.4-179.2
Vitexin	1.2-252.3	2.4-253.4	8.0-236.4	14.7-207.5
Hyperoside	0.4-321.9	1.1-334.5	3.1-326.7	3.4-973.1
trans-Ferulic acid	1.6-211.4	2.8-222.0	5.0-220.6	2.0-169.0
Isoquercitrin	37.3-301.4	41.2-366.7	2.1-349.3	21.2-206.8
Luteolin	0.2-143.7	0.4-151.1	1.0-141.0	1.6-46.2
Quercetin	10.7-345.6	11.3-331.0	18.8-310.5	11.2-107.9
Chrysoeriol	1.3-71.3	2.0-69.5	6.4-68.1	1.3-20.8
total	2734.3 ± 6.7	2875.6 ± 15.9[a]	2998.3 ± 8.2[a]	1824.9 ± 6.9[a]

a: significantly different ($p > 0.001$) from "Hot water 3 min"

acid, procyanidin B1등이 미량 검출되었다.

루이보스티를 뜨거운 물에 3분, 6분, 30분, 차가운 물 30분에 우려낸 결과 14종 각 페놀릭류의 함량 범위는 Table 5와 같다.

최근 연구결과에 의하면 aspalathin은 green rooibos에서 red rooibos로 발효되면서 그 양이 감소하며 결과적으로 1.2 mg/g ~ 49.9 mg/g이 검출되었다고 보고된 바 있다[19]. 이번 실험에 이용된 루이보스는 전체가 red rooibos로써 aspalathin 함량이 0.01~3.3 mg/g범위에서 검출되었다 (뜨거운 물 30분 기준). Aspalathin를 비롯한 다른 페놀릭류의 함량도 검체별로 크게 차이가 났는데 이는 루이보스차의 제품별 표시함량, 생산날짜 및 포장상태가 다르기 때문으로 유추된다. 루이보스티는 aspalathin 이외에도 rutin (1.3-1.7 mg/g), isoquercitrin (0.01-0.11 mg/g), luteolin (0.02-0.03 mg/g), chrysoeriol (0.01-0.02 mg/g)을 함유하고 있는 것으로 보고 되었고[19], 이번실험에서는 rutin 0.02-1.4 mg/g, isoquercitirn 0.002-0.35 mg/g, luteolin 0.001-0.14 mg/g, chrysoeriol은 0-0.06 mg/g을 함유하고 있음이 확인되었다.

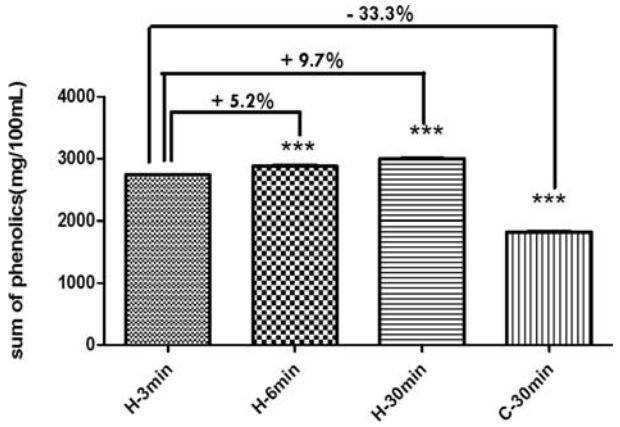

Fig. 2. The total quantities of phenolics represented as a histogram. (n = 3 experiment, '***' denotes significantly different from H-3min, $p < 0.001$).

Hyperoside를 제외한 13종의 페놀릭류 성분들은 뜨거운 물로 추출 시 추출시간이 길어짐에 따라 총 함량이 증가하였다. 동일 실험을 3회 반복시험 하여 평균값을 계산한 결과(Fig. 2) 루이보스티를 우려내는 온도와 시간에 따라 페놀릭류의 총합이 유의성 있게 변하였다($p < 0.001$). 뜨거운 물 3분 추출을 기준으로 할 때, 뜨거운 물 6분 추출은 페놀릭류의 총합이 5.2% 증가하였고, 뜨거운 물 30분 추출은 9.7% 증가하였으나 차가운 물 30분 추출은 오히려 33.3% 감소하였다. 대부분의 페놀릭류는 뜨거운 물에서 더 많이 추출되거나 차가운물에서도 비슷한 수준으로 추출되었으나 특이하게 hyperoside는 뜨거운 물 3분과 비교했을 때 차가운 물 30분에서 추출양이 약 3배 가량 증가하였다. Sara 등[20]에 의하면 green tea는 추출 시간과 온도에 따라 항산화능력이 민감하게 변화하는데 차가운 물에서 2시간 우려낸 것에서 가장 높은 항산화능력을 보였고, black tea는 뜨거운 물로 짧은 시간동안 우려낸 것에서 가장 높은 항산화능을 나타냈다. 이처럼 tea의 종류에 따라 구성 페놀릭류의 종류와 양이 다르므로 가장 높은 항산화능을 나타내는 추출온도와 시간은 다를 수밖에 없다. 루이보스티의 페놀릭류 추출효율은 물의 온도와 시간 두 가지 모두 영향을 받는 것으로 판단되며 상온의 물보다는 끓는물로 우려내는 시간이 길수록 더 많은 페놀릭류가 추출되었다. 총 페놀의 양과 항산화능력은 양의 상관관계가 있으므로[21,22] 페놀릭류의 총합이 가장 많은 뜨거운 물로 30분 추출할 때 항산화 능력이 가장 높을 것으로 추측된다. 루이보스티를 위의 조건과 같이 추출하였을 때 실제 항산화능력도 유사하게 증가하는지를 확인하기 위해서는 추가적인 항상화능 측정실험이 진행되어야 할 것으로 보인다.

Conclusion

국내 유통 중인 루이보스티 30건에 대한 페놀릭류 함량을 triple-quadrupole을 이용하여 동시분석하였다.

1. 루이보스티는 rutin, aspalathin, quercetin, isoquercitirn, vitexin, hyperoside 등의 페놀릭류를 함유하고 있었다.

2. 루이보스티를 우려낼 때 물의 온도와 추출시간에 따라 추출되는 총페놀릭류의 양이 달라졌다. 물의 온도가 높을수록 우려내는 시간이 길수록 더 많은 양의 총페놀릭류가 추출되었다.

루이보스티는 보통 녹차나 홍차를 마실 때 우려내는 시간(3min)보다는 비교적 길게 우려내는 것이 그 속에 함유된 여러 항산화물질들을 더 많이 섭취할 수 있다. 뜨겁게 마실 경우 3분 보다는 6분이 더 많은 유용성분을 음용할 수 있고 차갑게 마시고 싶은 경우라도 소량의 뜨거운 물로 먼저 6분 이상 우려내서 유용성분을 충분히 추출시킨 후 얼음 등을 가하여 차갑게 하여 마시는 방법을 추천한다.

국문요약

루이보스티에서 5종의 phenolic acid (gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid)와 9종의 flavonoid (procyanidin b1, aspalathin, rutin, vitexin, hyperoside, isoquercitrin, luteolin, quercetin, chrysoeriol)를 UPLC-MSMS를 이용하여 동시 분석하였다. 14종 페놀릭류를 동시 분석하기 위하여 기기조건과 유효성을 검증하였고 확립된 분석방법을 이용하여 시중에 유통중인 루이보스티 30건을 채취하여 페놀릭류를 분석하였다. 루이보스티 1 g 혹은 1티백에 뜨거운 물 100 mL을 가하여 3분, 6분, 30분이 경과 후 그리고 차가운 물 (25-30°C)에 30분 우려낸 루이보스티의 페놀릭류 함량을 구하였다. 루이보스티에서 전체 실험대상 페놀릭류 중 rutin과 aspalathin이 가장 많이 추출되어 나왔으며 각각 물질의 함량은 제품별로 달랐다. 페놀릭류 성분의 추출효율은 14종 페놀릭류의 총합 기준으로 뜨거운 물 30분 > 6분 > 3분 > 차가운 물 30분 순으로 높았다.

References

1. Crozier, A., Jaganath, I. B. and Clifford, M. N.: Dietary phenolics: chemistry, bioa-vailability and effects on health. Natural Product Reports, **26**, 1001-1043 (2009).
2. Tsao, R.: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, **2**(12), 1231-1246 (2010).
3. Daniel Del rio, Ana Rodrigues-Mateos, Jeremy P. E. Spencer, Massimiliano Tognolini, Gina Borges, and Alan Crozier.: Dietary(Poly)phenolics in Human Health : Structures, bioavaility, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases, Antioxidants & Redox Signaling, **18**(14), 1818-1892 (2013).
4. Van Wyk, B. E. and Gericke, M.: *People's plants. A Guide to Useful Plants of Southern Africa*. Briza Publications, Preto-

ria, South Africa, pp. 351, (2000).
5. Wilson, N. L. W.: Cape natural tea products and the US market: rooibos rebels ready to raid. Applied Econ. Perspectives and Policy, **27**(1), 139-148 (2005).
6. Republic of south africa, Agriculture, Forestry & Fisheris department: A profile of the South Africa Rooibos market value chain, pp. 1-10 (2015).
7. Morton, J. F.: Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage. Econ. Botany, **37**(2), 164-173 (1983).
8. Joubert, E., Gelderblom, W., Louw, A. and De Beer, D.: South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia spp*. and *Athrixia phylicoides* - a review. J. of Ethno-pharmacology, **119**(3), 376-412 (2008a).
9. Koeppen, B. and Roux, D.: C-glycosylflavonoids. The chemistry of aspalathin. Biochem. J., **99**(3), 604-609 (1966).
10. Rabe, C., Steenkamp, J. A., Joubert, E., Burger, J. F. W. and Ferreira, D.: Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). Phytochemistry, **35**(6), 1559-1565 (1994).
11. Xinguo Su, Jun Duan, Xuewu Duan and Feng Chen.: Polyphenolic profile and antioxidant activities of oolong tea infusion under various steeping conditions. Mol. Sci., **8**(12), 1196-1205 (2007).
12. Shulz H, Joubers E and Shutze W.: Quantification of quality parameters for reliable evaluation of green rooivos (*Asphalthus linearis*). *Eur. Food Res. Technol.* **216**(6), 539-543 (2003).
13. Edenharder R, Sager JW, Glatt H, Muckel E and Platt KL.: Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhlP) in metabolically competent V79 cells. *Mutat. Res.,* **521**, 57-72 (2002).
14. Hasseling PB and Joubert JR.: The effect of rooibos tea on the type I allergic reaction. *S. Afr. Med. J.*, **62**, 1037-1038 (1982).
15. Nováková L1, Vildová A, Mateus JP, Gonçalves T and Solich P.: Development and application of UHPLC-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts, Talanta, **82**(4), 1271-1280 (2010).
16. Gruz, Jiří, Novák, Ondřej and Strnad Miroslav.: Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS, Food Chem., **111**(3), 789-794 (2008).
17. SANTE/EU: Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in food and feed. pp. 1-42 (2015).
18. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures : Test and Methodology Q2(R1). pp. 1-17 (2005).
19. Bramati L, Aquilano F and Pietta P.: Unfermented rooibos tea : Quantitative charaterization of flavonids by HPLC-UV and determiantion of the total antioxidant activity. *J. Agri. Food Chem.*, **51**(25), 7472-7474 (2003).
20. Sara H.A. alipour, Junedah Sanusi and Kanthimathi M S.: Temperature and time of steeping affect the antioxidant properties of white, green, and black tea infusions. *J. Food Sci*., **81**(1), H246-254 (2016).
21. M. Amzad Hossain and Muhammad Dawood Shah.: A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Aravian J. Chem*., **8**(1), 66-71 (2015).
22. Ali Ghasemzadeh, Hawa Z.E. Jaafar and Asmah Rahmat.: Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malysia young ginger (*Zinziber officinale Roscoe*). *Molecules*. **15**(6), 4324-4333 (2010).