



연잎, 상엽, 건조 무 혼합 추출물의 지표성분 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 분석법 개발 및 검증

장길웅 · 박은영 · 최승현 · 최선일 · 조봉연 · 심완섭 · 한응호 · 조현덕¹ · 이옥환*

강원대학교 식품생명공학과, ¹하람

Development and Validation of Analytical Method for Wogonin, Quercetin, and Quercetin-3-O-glucuronide in Extracts of *Nelumbo nucifera*, *Morus alba* L., and *Raphanus sativus* Mixture

Gill-Woong Jang, Eun-Young Park, Seung-Hyun Choi, Sun-il Choi, Bong-Yeon Cho, Wan-Sup Sim, Han-Xinggao, Hyun-Duk Cho¹, and Ok-Hwan Lee*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

¹Haram Co. Ltd. Jeungpyeong 27914, Korea

(Received May 30, 2018/Revised June 17, 2018/Accepted July 2, 2018)

ABSTRACT - The aim of this study was to develop and validate an analytical method for determining the presence of wogonin, quercetin, and quercetin-3-O-glucuronide in extracts of *Nelumbo nucifera*, *Morus alba* L., and *Raphanus sativus* mixtures. We evaluated the specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) of analytical methods for wogonin, quercetin, and quercetin-3-O-glucuronide using high performance liquid chromatography. Our result showed that the correlation coefficients of the calibration curve for wogonin, quercetin, and quercetin-3-O-glucuronide were 0.9999. The LOD for wogonin, quercetin, and quercetin-3-O-glucuronide ranged from 0.09 to 0.16 and those for the LOQ ranged from 0.26 to 0.48 µg/mL. The inter-day and intra-day precision values of wogonin, quercetin, and quercetin-3-O-glucuronide ranged from 0.74 to 1.87 and from 0.28 to 1.12%, respectively. The inter-day and intra-day accuracies were 99.96~115.88% and 99.73~114.81%, respectively. Therefore, the analytical method was validated for the detection of wogonin, quercetin, and quercetin-3-O-glucuronide in extracts of *Nelumbo nucifera*, *Morus alba* L., and *Raphanus sativus* mixtures.

Key words : Wogonin, Quercetin, Quercetin-3-O-glucuronide, HPLC, Method validation

연잎(*Nelumbo nucifera*)은 예로부터 출혈성 위궤양이나 위염, 치질, 출혈, 설사, 야뇨증, 각종 독성 물질에 대한 중화작용을 하는 것으로 알려져 민간치료제로 사용되어 왔고 폴리페놀 성분과 quercetin이나 rutin과 같은 플라보노이드 성분들을 다량 함유하고 있어 항산화, 미백 등의 가능성을 기대할 수 있다¹⁻³. 상엽(*Morus alba* L.)은 중국에서 열병 치료, 혈압 강하, 관절 강화, 시력 개선, 간 개선 등에 오랫동안 사용됐고 최근 보고에 따르면 당뇨병 또한 예방할 수 있는 것으로 알려졌으며^{4,7}, 면역 결핍 바이러

스 및 다양한 호흡기 바이러스에 대해 강력한 항바이러스 활성을 나타내는 플라보노이드가 풍부하게 함유되어 있다고 보고된 바 있다⁸. 십자화과 채소인 무(*Raphanus sativus*)는 혈당저하, 이뇨작용, 정장작용, 해열, 지혈작용, 니코틴 제거 작용 및 담석증 치료 등과 같은 생리활성 효과들이 있는 것으로 알려져 있으며^{9,10}, 항산화 작용을 나타내는 물질인 식이섬유, phenol계, flavonoid계 색소 및 방향족 amine 등이 다량으로 함유되어 있다고 보고되어 이들의 생리활성 성분에 대한 연구들이 진행되고 있다¹¹⁻¹⁵. 이와 같은 생리적 기능들을 가지고 있다고 알려져 있는 연잎, 상엽, 건조 무에는 활성산소를 억제해 항산화 효과에 도움을 주는 flavonoid계 물질 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide가 함유되어 있어 다양한 기능성 연구가 수행되고 있다^{16,17}. 이러한 기능성을 나타내는 소재는 단일로 사용되었을 때 보다 혼합 추출물로 사용할 때 시너

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Tel: 82-33-250-6454, Fax: 82-33-259-5561

E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

지효과로 인해 그 효능이 증가된다고 연구가 보고된 바 있어 다양한 혼합물에 대해 연구가 진행 중에 있으나¹⁸⁻²⁰⁾, 연잎, 상엽, 건조 무의 혼합물에 대해서는 아직 연구된 바가 없다.

최근 세계화에 따른 식생활의 서구화로 다양한 건강문제가 야기되고 있어 생리활성을 나타내는 기능성 식품에 대한 소비자의 관심 및 수요가 증가하고 있고 다양한 소재의 제품이 개발되고 있다. 건강 기능성 식품을 개발하기 위해서는 기능성과 안전성이 과학적 실험을 통해 확인되어야 하며 원료와 지표성분에 대한 표준화가 요구된다²¹⁾. 표준화란 원료의 생산부터 제품의 제조 과정 전반에 걸쳐 사용된 정보와 기술들을 기록하고 관리함으로써 원료가 함유하고 있는 고유 성분들의 변동을 가능한 한 적게 하여 원료와 제품의 품질이 최대한 일정하게 유지하는 것을 말하며, 표준화는 지표성분을 일반적인 지표로 이용한다. 제품에서 원료의 기능성이 유지되는 것은 지표성분의 함유량을 통해 확인할 수 있으므로 이를 확인하기 위해 공인된 분석방법 또는 정밀한 분석방법을 사용해야 하며, 규격에 정확한 기준을 설정하기 위해 분석방법의 신뢰성 및 타당성이 검증되어야 한다²²⁾. 연잎, 상엽, 무의 경우 각 원료에 함유된 지표성분 분석법은 다양하게 연구되어 온 반면, 세 가지 소재의 복합추출물에 함유된 flavonoid계 물질의 동시 분석법이 보고되어 있지 않아 그들의 지표성분인 wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide의 동시 분석법의 신뢰성 및 타당성을 확보하기 힘든 실정이다.

따라서 본 연구에서는 연잎, 상엽, 건조 무 혼합추출물에 함유되어 있는 지표성분 wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide의 동시 분석법 개발 및 유효성 검증(method validation)에 대한 연구를 실시하였다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에서 사용된 혼합 추출물은 하랍(Jeungpyeong, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, 혼합 추출물은 연잎(Leaves of *Nelumbo nucifera*), 상엽(Leaves of *Morus alba L.*), 건조 무(Dried *raphanus sativus*)를 13가지 비율로 혼합해 각각 열수와 에탄올 추출한 후, 여과하고 농축하여 동결건조기(Ilshinbiobase Co., Ltd, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 동결건조물로 제조한 뒤 실험에 사용하였다(Table 1).

표준물질 wogonin은 ChromaDex, Inc (Irvine, CA, USA), quercetin은 Sigma Aldrich (St. Louis, MI, USA), quercetin-3-O-glucuronide는 Extrasynthese (Genay, France)에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 acetonitrile은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), phosphoric acid는 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Mixture ratio of *Nelumbo nucifera*, *Morus alba L.* and *Raphanus sativus*

Samples	Mixture ratio (unit: g)		
	<i>Nelumbo nucifera</i>	<i>Morus alba L.</i>	<i>Raphanus sativus</i>
M1	80	20	0
M2	70	30	0
M3	60	40	0
M4	50	50	0
M5	80	0	20
M6	70	0	30
M7	70	20	10
M8	60	30	10
M9	60	20	20
M10	50	30	20
M11	100	0	0
M12	0	100	0
M13	0	0	100

Table 2. HPLC conditions of wogonin, quercetin and quercetin-3-O-glucuronide analysis for extracts of *Nelumbo nucifera*, *Morus alba L.* and *raphanus sativus* mixture

Instrument	Conditions		
Column	Waters SunFire™, C ₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Waters)		
Column temp.	30°C		
	Time (min)	A ¹⁾	B ²⁾
	0	5	95
	5	25	75
Mobile phase (Gradient)	15	25	75
	25	50	50
	28	60	40
	33	70	30
	40	5	95
Detector	Water 996 Photodiode Array Detector (334 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	40 min		

¹⁾Acetonitrile

²⁾0.1% Phosphoric acid

Wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide 분석

Wogonin, quercetin과 quercetin-3-O-glucuronide의 HPLC 분석은 Yang 등²³⁾의 분석방법을 변형하여 실시했으며, 세 개의 표준물질을 동시 분석하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)로 분석조건은 Table 2와 같으며 분석용 column은 Waters SunFire™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Waters)이었다.

표준용액 및 시험용액의 조제

Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide 표준물질을 각각 5 mg 취한 뒤, 10 mL 정용플라스크를 이용해 500 µg/mL의 농도가 되도록 DMSO로 표선까지 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. Working solution은 제조된 stock solution을 이용하여 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL이 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였다. 시험용액은 동결 건조된 시료 26종(혼합 비율을 달리한 열수 및 에탄올 추출물 각 13종)을 각각 25 mg을 칭량한 후 25 mL 정용플라스크를 이용해 1000 µg/mL의 농도가 되도록 DMSO로 표선까지 채운 뒤, 이를 0.45 µm syringe filter (Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 시험용액으로 했다.

분석법의 유효성 검증

분석법의 유효성 검증(method validation)은 ICH (International Conference for Harmonization) 가이드라인²⁴⁾을 근거로 하여 개발된 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 이용하여 분석법의 유효성을 검증하였다.

특이성

표준물질 wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide 및 혼합 추출물을 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram을 비교하여 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide가 선택적으로 분리가 되는지 확인했으며 photodiode-array (PDA) spectrum을 확인하여 동일한 spectrum을 나타내는지 확인하였다.

직선성

Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide 표준물질을 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 제조해 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정했으며, 각 표준물질의 peak에 대한 면적과 농도비의 관계를 표시하는 검량선을 작성하고 작성한 검량선으로부터 얻어진 상관계수(correlation coefficient, R²) 값을 통해 직선성을 확인하였다.

정밀성 및 정확성

정확성 및 정밀성을 구하기 위하여 지표성분의 함량을 알고 있는 연잎, 상엽, 건조 무 혼합추출물에 표준용액 wogonin, quercetin과 quercetin-3-O-glucuronide를 25, 50, 100 µg/mL의 농도씩 각각 첨가하였다. 일내(Intra-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 하루에 3회 반복하여 HPLC로 분석하였으며, 일간(Inter-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 3일간 반복하여 HPLC로 분석하였다. 분석하여 얻어진 peak의 머무름 시간(retention time)과 PDA spectrum을 비교하여 정성을 하고 작성한 검량선에 시험용

액의 peak 면적을 대입하여 wogonin, quercetin과 quercetin-3-O-glucuronide의 농도를 계산하였다. 각 결과 값의 표준편차를 결과 값의 평균으로 나눈 비인 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 일내 및 일간 정밀성을 확인했으며, 정확성은 다음 식을 이용하여 첨가한 농도에 대비하여 회수된 농도를 계산함으로써 회수율을 구해 정확성을 확인하였다.

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_f - C_u)}{C_a} \times 100$$

C_f: Concentration of spiked sample

C_u: Concentration of sample

C_a: Concentration of standard

검출한계 및 정량한계

Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하는 방법을 사용했으며 다음 식을 이용하여 확인하였다.

Limit of detection (LOD)

Limit of quantitation (LOQ)

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ: The standard deviation of the response

S: The slope of the calibration curve

Results and Discussion

Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 크로마토그램

연잎, 상엽, 건조 무 추출물에 함유된 지표성분을 구명하기 위해서는 문헌에 보고된 성분들에 대한 동시분석법이 요구되어 기존의 분석법²³⁾을 참고하여 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide 표준물질들에 대한 최대흡수파장을 검토한 결과, 각각 275.6, 255.6, 256.7 nm에서 최대흡수파장을 나타냈다(Fig. 1). 각 물질의 최대흡수파장인 275.6, 255.6, 256.7 nm 및 기존 보고된 논문의 분석 파장인 334 nm에 따른 세 물질의 peak 면적을 비교하여 최적 면적 값을 나타내는 파장 값을 확인한 결과, 334 nm에서 세 물질의 최적 peak 면적 값을 나타내 최적분석파장은 334 nm로 설정하였다.

특이성 및 직선성

특이성이란 추출물, 불순물 등이 혼합되어 있는 시료에서 분석대상물질을 선택적으로 측정할 수 있는 능력을 말한다. 표준용액과 혼합 추출물의 chromatogram을 비교하여 wogonin, quercetin과 quercetin-3-O-glucuronide의 peak

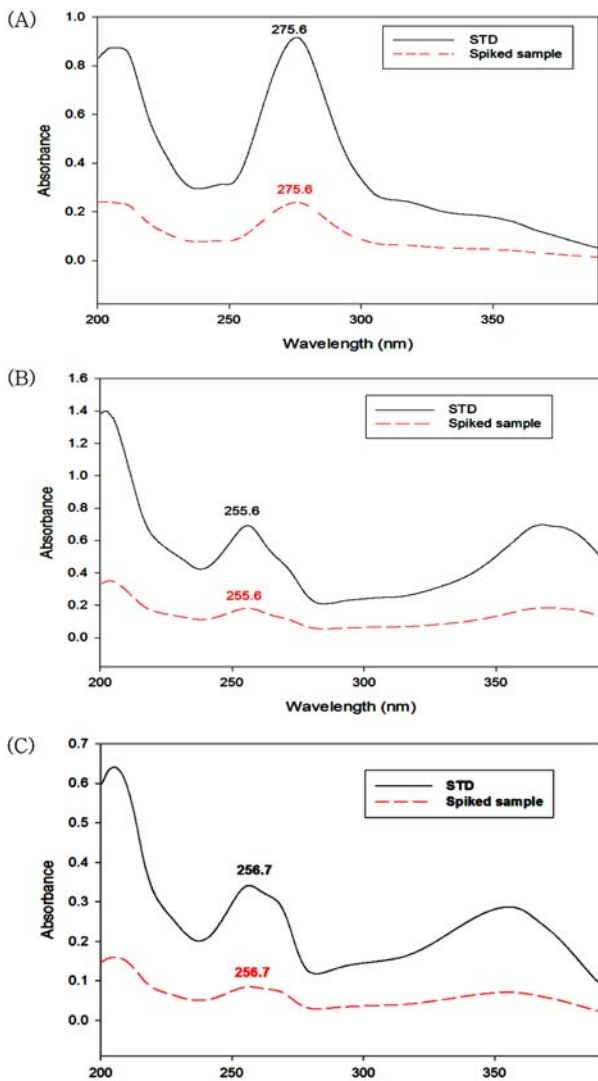


Fig. 1. PDA spectrums of wogonin (A) quercetin (B) and quercetin-3-O-glucuronide (C) in STD, Spiked sample and extracts of *Nelumbo nucifera*, *Morus alba* L. and *Raphanus sativus* mixture.

를 확인한 결과 Fig. 2와 같이 quercetin-3-O-glucuronide는 다른 성분들의 간섭 없이 선택적으로 분리되었음을 확인했으나 wogonin과 quercetin의 경우 혼합 추출물에서 검출되지 않았다. Quercetin-3-O-glucuronide는 혼합 추출물과 표준용액에서의 머무름 시간과 일치한 것을 확인하였으며, 표준용액과 혼합 추출물의 PDA spectrum 결과에서도 동일한 spectrum을 나타냈으며 이를 통해 특이성을 확인하였다(Fig. 2).

한편, wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide 표준용액을 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 결과, wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide의 표준검량선은 각각 $y = 12627x - 6405.8$, $y = 25056x - 23503$, $y = 17782x - 11835$ 로 나타났으며 상관계수(R^2) 값은 세 가지 성분 모두 0.9999

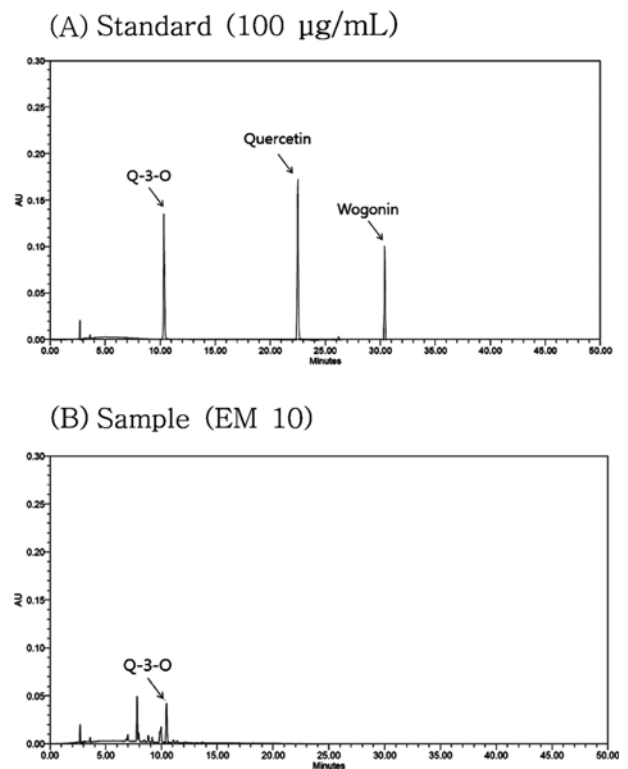


Fig. 2. HPLC chromatograms of wogonin, quercetin and quercetin-3-O-glucuronide Standard (A), *Nelumbo nucifera*, *Morus alba* L. and *Raphanus sativus* (50:30:20) mixture extracts. (B).

로 나타나 우수한 직선성을 보였다(Table 4).

정밀성 및 정확성

농도를 알고 있는 연잎, 상엽, 건조 무 혼합 추출물에 표준용액을 각각 저농도(3.125 µg/mL), 중농도(12.5 µg/mL), 고농도(50 µg/mL)로 첨가한 뒤 HPLC로 분석했을 때, 각 측정 결과 값 사이의 근접성을 확인하여 정밀성을 평가하며, 회수율을 측정하여 정확성을 평가하였다. 정밀성의 결과는 상대표준편차(RSD)로 확인했다. Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 정밀성은 Table 3과 같이 일간 정밀성에서 각각 0.76~1.24%, 0.90~1.40%, 0.74~1.87%를 나타냈으며 일내 정밀성에서는 0.12~1.06%, 0.28~1.12%, 0.52~0.92%로 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타냈다. 정확성은 회수율을 측정하여 나타내며 Table 3과 같이 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 일간 정확성은 99.99~107.97%, 99.96~115.88%, 99.73~111.91%를 나타냈고 일내 정확성은 100.36~108.88%, 99.77~114.81%, 99.91~112.44%로 우수한 정확성을 나타내었다.

검출한계 및 정량한계

검출한계와 정량한계는 ICH 가이드라인에 근거하였으며 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 검

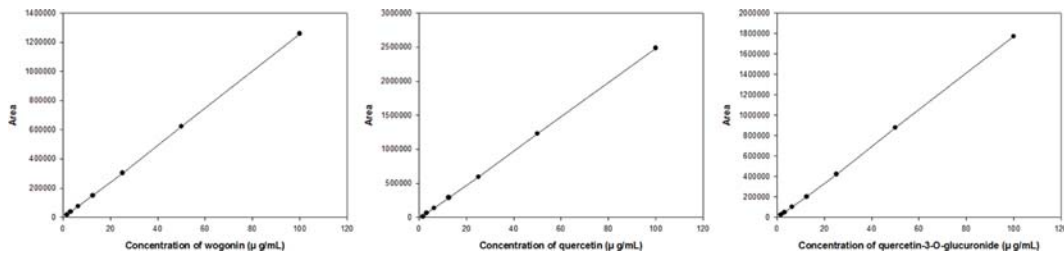


Fig. 3. Calibration curve of wogonin, quercetin and quercetin-3-O-glucuronide standard solution.

Table 3. Precision and accuracy of wogonin, quercetin and quercetin-3-O-glucuronide analysis for *Nelumbo nucifera*, *Morus alba L.* and *raphanus sativus* extracts

Analytes	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	RSD ²⁾ (%)	Recovery (%)	
Wogonin	3.125	3.40 \pm 0.04 ¹⁾	1.06	108.88	
	Intra-day	12.5	12.65 \pm 0.05	0.37	101.21
		50	50.18 \pm 0.06	0.12	100.36
	Inter-day	3.125	3.37 \pm 0.04	1.24	107.97
		12.5	12.50 \pm 0.13	1.06	100.01
		50	50.00 \pm 0.38	0.76	99.99
Quercetin	3.125	3.59 \pm 0.01	0.28	114.81	
	Intra-day	12.5	12.57 \pm 0.14	1.12	100.57
		50	49.89 \pm 0.16	0.32	99.77
		Inter-day	3.125	3.62 \pm 0.04	1.09
	12.5		12.55 \pm 0.18	1.40	100.36
	50		49.98 \pm 0.45	0.90	99.96
Quercetin-3-O-glucuronide	3.125	3.51 \pm 0.03	0.74	112.44	
	Intra-day	12.5	12.67 \pm 0.12	0.92	101.34
		50	49.96 \pm 0.26	0.52	99.91
		Inter-day	3.125	3.50 \pm 0.07	1.87
	12.5		12.58 \pm 0.17	1.35	100.61
	50		49.86 \pm 0.37	0.74	99.73

¹⁾Values are mean \pm SD in triplicate (n = 3)

²⁾Relative standard deviation

Table 4. Correlation coefficients of the calibration curves, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of wogonin, quercetin and quercetin-3-O-glucuronide analysis for *Nelumbo nucifera*, *Morus alba L.* and *raphanus sativus* extracts

Analytes	Range ($\mu\text{g/mL}$)	Slope	Intercept	Correlation coefficient(R ²)	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Wogonin	1.56-100	12627	-6405.8	0.9999	0.16	0.48
Quercetin	1.56-100	25056	-23503	0.9999	0.09	0.26
Quercetin-3-O-glucuronide	1.56-100	17782	-11835	0.9999	0.15	0.45

출한계는 각각 0.16 $\mu\text{g/mL}$, 0.09 $\mu\text{g/mL}$, 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었으며 정량한계는 각각 0.48 $\mu\text{g/mL}$, 0.26 $\mu\text{g/mL}$, 0.45 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 이상의 결과를 통해 연잎, 상엽 및 건조 무 혼합 추출물의 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide은 HPLC를 이용해 동시분석이 가능하며 정량 분석이 가능한 것으로 나타났다(Table 4).

연잎, 상엽, 건조 무 혼합 추출물의 wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide 함량분석

확립된 분석법을 이용하여 혼합 추출물 내 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 함량분석 결과 wogonin과 quercetin은 혼합 추출물 내에서 검출되지 않았다. 이러한 결과는 Sultana와 Anwar²⁵⁾ 및 Beevi 등²⁶⁾의 연

Table 5. Concentration of quercetin-3-O-glucuronide in samples

Sample	Compounds (mg/dry weight g)		
	Mixture ratio (<i>N. nucifera</i> : <i>M. alba</i> L. : <i>R sativus</i>)	AVG ¹⁾ ± SD ²⁾	RSD ³⁾
WM ⁴⁾ 1	80 : 20 : 0	6.76 ± 0.09	1.39
WM2	70 : 30 : 0	4.82 ± 0.04	0.83
WM3	60 : 40 : 0	4.56 ± 0.01	0.29
WM4	50 : 50 : 0	4.27 ± 0.00	0.09
WM5	80 : 0 : 20	4.27 ± 0.01	0.33
WM6	70 : 0 : 30	3.35 ± 0.01	0.36
WM7	70 : 20 : 10	4.92 ± 0.07	1.44
WM8	60 : 30 : 10	4.92 ± 0.01	0.20
WM9	60 : 20 : 20	3.93 ± 0.02	0.50
WM10	50 : 30 : 20	3.71 ± 0.01	0.14
WM11	100 : 0 : 0	6.71 ± 0.01	0.20
WM12	0 : 100 : 0	1.78 ± 0.02	1.08
WM13	0 : 0 : 100	ND ⁵⁾	-
EM ⁶⁾ 1	80 : 20 : 0	37.82 ± 0.08	0.21
EM2	70 : 30 : 0	34.34 ± 0.04	0.13
EM3	60 : 40 : 0	32.90 ± 0.04	0.13
EM4	50 : 50 : 0	17.18 ± 0.02	0.12
EM5	80 : 0 : 20	25.23 ± 0.03	0.10
EM6	70 : 0 : 30	17.56 ± 0.01	0.05
EM7	70 : 20 : 10	26.04 ± 0.02	0.10
EM8	60 : 30 : 10	18.93 ± 0.04	0.20
EM9	60 : 20 : 20	19.59 ± 0.03	0.16
EM10	50 : 30 : 20	15.99 ± 0.02	0.11
EM11	100 : 0 : 0	50.95 ± 0.61	1.19
EM12	0 : 100 : 0	6.73 ± 0.04	0.60
EM13	0 : 0 : 100	ND	-

¹⁾Average of concentration²⁾Standard deviation³⁾Relative standard deviation⁴⁾Extracts of mixture by water⁵⁾Not detected⁶⁾Extracts of mixture by ethanol

구와도 같은 경향으로 시료로 사용된 작물의 품종, 환경 및 생산시기에 따라 flavonoid 성분들의 함량이 달라지며 추출공정의 표준화에 따라 주요 지표성분의 함량이 달라질 수 있기 때문인 것으로 사료된다²⁷⁾. Quercetin-3-O-glucuronide의 함량은 11번 비율(100:0:0)로 에탄올을 이용해 추출한 샘플에서 가장 높은 함량을 나타냈으며 복합추출물 중에서는 1번(80:20:0) 샘플에서 높은 수준을 보였다. 이는 연잎 추출물에 quercetin-3-O-glucuronide가 다량 함유되어 있기 때문인 것으로 사료된다. 전체 샘플들의 quercetin-3-O-glucuronide 함유량은 불검출~50.95 mg/dry weight g의 함량을 가지고 있는 것으로 분석되었다(Table 5).

Acknowledgments

본 연구는 2017년도 중소벤처기업부의기술개발사업지원에 의한 연구임[S2491053].

국문요약

본 연구는 연잎, 상엽, 건조 무 혼합 추출물의 wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide의 함량 분석 및 해당 표준물질들의 동시 분석법의 개발 및 검증을 실시하였다. 분석법은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계를 통하여 분석법의 신뢰성을 검증했다. HPLC를 이용한 분석방법에서 표준용액의 머무름 시간과 연잎, 상엽, 건조 무 혼합 추출물 중 quercetin-3-O-glucuronide의 머무름 시간이 일치하였으며 동일한 spectrum을 나타내는 것을 확인해 분석법의 특이성을 검증하였다. Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 검량선은 상관계수 값이 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide 모두 0.9999로 우수한 직선성을 보여 분석에 적합함을 알 수 있었고 정밀성과 정확성은 농도를 아는 시료에 인위적으로 저농도, 중농도, 고농도의 표준물질을 첨가해 계산하였다. Wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide의 정밀성은 일간 정밀성, 일내 정밀성으로 확인했으며 세 가지 성분들의 일간 정밀성은 각각 0.76~1.24%, 0.90~1.40%, 0.74~1.87% 수준으로 확인되었고, 일내 정밀성은 0.12~1.06%, 0.28~1.12%, 0.52~0.92%로 5% 이하의 우수한 정밀성을 보였다. 정확성의 측정 결과 wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 일간 정확성은 99.99~107.97%, 99.96~115.88%, 99.73~111.91%를 나타냈고 일내 정확성은 100.36~108.88%, 99.77~114.81%, 99.91~112.44%로 우수한 수준의 정확성을 보였다. Wogonin, quercetin 및 quercetin-3-O-glucuronide의 검출한계는 각각 0.16 µg/mL, 0.09 µg/mL, 0.15 µg/mL로 측정됐으며 정량한계는 각각 0.48 µg/mL, 0.26 µg/mL, 0.45 µg/mL로 나타나 저농도에서도 검출이 가능함을 확인할 수 있었다. 분석법 검증결과, 확립된 분석법은 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계가 모두 우수한 분석법임이 검증됐으며, 검증된 분석법을 이용해 연잎, 상엽, 건조 무 혼합 추출물의 wogonin, quercetin, quercetin-3-O-glucuronide의 함량을 분석한 결과 wogonin과 quercetin은 검출이 되지 않았지만 quercetin-3-O-glucuronide는 함량을 가지고 있는 것으로 확인됐다. 본 연구 결과 에탄올로 추출한 11번(EM11) 샘플에서 quercetin-3-O-glucuronide의 함량이 가장 높게 나왔으며 열수와 에탄올로 추출한 샘플들이 함유하고 있는 quercetin-3-O-glucuronide의 함량은 불검출~50.95 mg/dry weight g 수준으로 함유되어 있는 결과를 보였다.

References

- Lee, K.S., Kim, M.G., Lee, K.Y.: Antioxidative activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **35**, 182-186 (2006).
- Deng, S., Deng, Z., Fan, Y., Peng, Y., Li, J., Xiong, D., Liu, R.: Isolation and purification of three flavonoid glycosides from the leaves of *Nelumbo nucifera* (Lotus) by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **877**, 2487-2492 (2009).
- Choi, S.J., Kim, S.Y., Jeong, Y.J., Ku, C.S., Ha, B.J., Chae, H.J.: Stability evaluation of the cosmetics containing lotus leaf extract. *KSBB Journal.*, **26**, 83-86 (2011).
- Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamakazi, Y., Shiwaku, K., Yamane, Y.: Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.*, **97**, 25-31 (2006).
- Doi, K., Kojima, T., Makino, M., Kimura, Y., Fujimoto, Y.: Studies on the constituents of the leaves of *Morus alba* L. *Chem Pharm Bull.*, **49**, 151-153 (2001).
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W.: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, **64**, 555-559 (1999).
- Lee, H.O., Jeon, Y.S., Kim, M.Y.: The antioxidative effects and isolation and characterization of the extracts from *Morus alba* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **24**, 94-100 (2011).
- Du, J., He, Z.D., Jiang, R.W., Ye, W.C., Xu, H.X., Paul, P.H.: Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry.*, **62**, 1235-1238 (2003).
- Jung, D.H.: Biochemical activity of food. Seonjinmunwhasa, Seoul., 72-74 (1998).
- Jung, M.S., Lee, G.S., Chae, H.J.: In vitro biological activity assay of ethanol extract of radish. *Appl Biol Chem.*, **47**, 67-71 (2004).
- Son, J.Y., Son, H.S., Cho, W.D.: Antioxidant effect of onion skin extract. *Korean J Soc Food Sci.*, **14**, 16-20 (1998).
- Kang, J.A., Kang, J.S.: Effect of garlic and onion on plasma and liver cholesterol and triacylglycerol and platelet aggregation in rats fed basal cholesterol supplemented diets. *Korean J Nutr.*, **30**, 132-138 (1997).
- Lee, S.H., Hwang, I.G., Lee, Y.R., Joung, E.M., Jeong, H.S., Lee, H.B.: Physicochemical characteristics and antioxidant activity of heated radish (*Raphanus sativus* L.) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **38**, 490-495 (2009).
- Kwon, O.C., Woo, K.S., Kim, T.M., Kim, D.J., Hong, J.T., Jeong, H.S.: Physicochemical characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment. *Korean J Food Sci Technol.*, **38**, 331-336 (2006).
- Kim, H.Y., Woo, K.S., Hwang, I.G., Lee, Y.R., Jeong, H.S.: Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J Food Sci Technol.*, **40**, 166-170 (2008).
- Moon, J.H., Tsushida, T., Nakahara, K., Terao, J.: Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med.*, **30**, 1274-1285 (2001).
- Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J., Katan, M.B.: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.*, **62**, 1276-1282 (1995).
- Pedrielli, P., Skibsted, L.H.: Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *J Agric Food Chem.*, **50**, 7138-7144 (2002).
- Wang, S., Meckling, K.A., Marcone, M.F., Kakuda, Y., Tsao, R.: Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem.*, **59**, 960-968 (2011).
- Liu, R.H.: Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.*, **78**, 517S-520S (2003).
- Kim, Y.H., Bae, D.B., Park, S.O., Lee, S.J., Cho, O.H., Lee, O.H.: Method validation for the determination of eleutherosides and β -glucan in *Acanthopanax koreanum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **42**, 1419-1425 (2013).
- Choi, S.H., Yoo, C.K., Hwang, J.H., Lee, G.B., Lee, Y.J., Lee, B.Y., Lee, O.H.: Modification and validation of analytical method for oxypaeoniflorin and paeoniflorin in *Moutan cortex radiceis* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, **46**, 1091-1096 (2017).
- Yang, H.M., Sun, C.Y., Liang, J.L., Xu, L.Q., Zhang, Z.B., Luo, D.D., Chen, H.B., Huang, Y.Z., Wang, Q., Lee David, Y.W., Yuan, J., Li, Y.C.: Supercritical-Carbon dioxide fluid extract from *Chrysanthemum indicum* enhances anti-tumor effect and reduces toxicity of bleomycin in tumor-bearing mice. *Int J Mol Sci.*, **18**, 465 (2017).
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1-13 (2005).
- Sultana, B., Anwar, F.: Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.*, **108**, 879-884 (2008).
- Beevi, S.S., Narasu, M.L., Gowda, B.B.: Polyphenolics profile, antioxidant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus sativus* L. *Plant Foods Hum Nutr.*, **65**, 8-17 (2010).
- Oomah, B.D., Mazza, G., Kenaschuk, E.O.: Flavonoid content of flaxseed. Influence of cultivar and environment. *Euphytica.*, **90**, 163-167 (1996).