

추출용매 조건에 따른 비파 잎 추출물의 항산화 활성 및 유효성분의 분석법 밸리데이션

김현희^{1,†} · 허미라^{2,†} · 이송미³ · 임순호^{1,*}

¹동신대학교 제약공학과, ²동신대학교 뷰티미용학과, ³동신대학교 식품영양학과

Validation of analytical method and antioxidant properties of *Eriobotrya japonica* Lindl. Leaf extract according to extraction solvent

Hyun-Hee Kim^{1,†}, Mi-Ra Heo^{2,†}, Songmi Lee³, and Soon-Ho Yim^{1,*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University

²Department of Cosmetology, Dongshin University

³Department of Food and Nutrition, Dongshin University

Abstract The antioxidant properties of *Eriobotrya japonica* leaf extract were investigated using DPPH and ABTS radical scavenging assay. The 80% ethanol extract of leaves (IC₅₀ values for DPPH and ABTS were 13.9 and 10.9 µg/mL, respectively) and young leaves (IC₅₀ values for DPPH and ABTS were 20.7 and 17.3 µg/mL, respectively) showed high radical scavenging activity. Additionally, the quantitative method for estimation of ellagic acid and chlorogenic acid from *E. japonica* leaves was optimized by HPLC/DAD. This method showed high linearity of the calibration curve with a coefficient of correlation (R^2) equal to 0.999. The LOD values for ellagic acid and chlorogenic acid were 2.35 and 0.73 µg/mL, respectively, whereas LOQ values were 7.13 and 2.22 µg/mL, respectively. Recovery of the two compounds was 99.7-108.0% with RSD values less than 5.31%. These results suggest that 80% ethanol extract of *E. japonica* leaves could serve as a potential source of natural antioxidant for us in various industrial applications.

Keywords: *Eriobotrya japonica*, antioxidant, ellagic acid, chlorogenic acid, validation

서 론

약용식물에서 추출한 파이토케미컬(phytochemical)은 염증, 암, 당뇨병, 고혈압 및 항노화와 같은 우리 몸의 생리활성에 작용하여 건강에 도움이 된다고 알려져 있다(Dillard와 German, 2000). 그 중 페놀류와 플라보노이드류는 항산화, 항균, 항암, 항염증 등 다양한 생리활성을 나타내는 중요한 성분으로 당뇨병, 고혈압뿐만 아니라 순환기 장애와 피부 노화 등을 억제하는 항산화 기능을 지니 각종 질환 예방 및 치료에 중요한 역할을 한다(Cicerale 등, 2010). 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 우리 몸속에서 호흡 과정과 에너지 대사과정에서 생성된 강한 산화력을 가지게 된 물질을 말하며, 우리 몸의 세포와 DNA에 손상을 입혀 당뇨, 암과 같은 각종 만성 질환과 피부 노화를 일으키는 물질이다(Lee 등, 2005). 약용식물에 존재하는 항산화제인 terpenoid, polyphenol, flavonoid 등은 활성산소종에 의한 손상을 예방하여 인체 건강 유지에 중요한 역할을 한다(Shahidi와 Ambigaipalan, 2015). 피부 노화는 생리적 요인들의 기능 감소에 의해 발생하는

내인성 노화(intrinsic aging)와 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있으며, 가장 큰 영향을 미치는 외인성 노화는 자외선과 호흡을 통해 생성되는 활성산소종이 주된 원인이며 이를 제거하는 항산화제는 피부 노화를 예방하고 지연시키는데 효과가 증명되면서 식품, 의학, 미용 등 다양한 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있다(Afaq와 Mukhtar, 2006; Bowden, 2004; Lee, 2014). 인간의 몸에 유해한 활성산소의 형성 및 축적을 억제하는데 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), polyphenol, flavonoid, vitamin C 등의 항산화 물질들이 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Bowden, 2004; Das 등, 1999). 그러나 지금까지 우수한 항산화 효과로 널리 사용되어온 BHA와 BHT 등의 합성 항산화제는 체내 간세포 microsomal enzyme의 활성증가, 암을 유발시키는 등의 부작용이 보고되고 있다(Ahn 등, 2005; Heo와 Wang, 2008; Joung 등, 2007; Park과 Lim, 2009). 특히 식품산업에서는 합성 항산화제 사용의 위험성에 대한 우려가 커져 천연물질에 대한 관심이 날로 높아지고 있으며(Naveed 등, 2018), 합성 항산화제보다 안전하고 효과적으로 활성산소종을 제거할 수 있는 천연 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 천연물로부터 효과적으로 추출하는 방법에 관한 관심이 집중되고 있다(Bauer, 2000; Lee, 2014).

비파(*Eriobotrya japonica* Lindl.)는 장미과(Rosaceae)의 잎으로 긴 원형의 도란형으로 황갈색의 섬모가 덮여있고 광택이 난다(Cho와 Kim, 2013). 중국, 스페인, 일본 등 광범위하게 자라며 우리나라에서는 제주도 경남 및 전남지방 등 온화한 기후조건에 주로 자생하며, 재배뿐 아니라 비파 가공 산업도 활발하게 이루어

[†]These two authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Soon-Ho Yim, Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University, Naju 58245, Korea
Tel:+82-61-330-3275

E-mail: virshyim@dsu.ac.kr

Received April 29, 2019; revised May 31, 2019;

accepted June 4, 2019

지고 있다. 또한, 민간요법에서 비파 과실이나 잎은 진해, 거담, 구토, 토혈, 이뇨 등에 효과가 있으며 호흡 진정과 갈증 해소에 도 효능이 있다고 보고되고 있다(Eom 등, 2009; Lee 등, 2016b; Shin 등, 2012). 비파에는 다양한 ursolic acid, oleanolic acid 등과 같은 terpenoid계열 화합물과 quercetin 등과 같은 플라보노이드 계열 화합물 등의 생리활성 성분들이 다량 함유되어 있어 항산화, 항염증, 항암 활성 등이 연구되었다(Lee 등, 2004; Lv 등 2008; Whang 등, 1996). 특히 비파 잎에는 ellagic acid, chlorogenic acid 외에도 ursolic acid, neochlorogenic acid, kaempferol 등의 항산화 활성을 가지는 물질들이 있으며 이와 같은 성분은 여러 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되어져 있다(Lee 등, 2004; Shin 등, 2012). 이렇게 비파 잎으로부터 수많은 항산화 물질이 분리, 보고되어져 있지만(Bae 등, 2002) 비파 잎에 비하여 상대적으로 어린잎에 대한 항산화 활성 등 생리활성에 대한 과학적 연구와 품질 규격 및 가공제조 공정 표준화를 위한 chlorogenic acid와 ellagic acid의 유효성 분석에 관한 연구 또한 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 비파의 부위별 생리활성을 보았을 때 비파의 잎이 종자, 과육보다 폴리페놀 등의 유용한 화합물을 다량 함유하고 있다는 점을 착안하여(Lee 등, 2016b) 비파 잎과 비파 어린잎을 대상으로 수율 증대 및 유용활성물질의 손실을 최소화하는 다양한 추출 조건(열수, 20% 에탄올, 80% 에탄올)에서 *in vitro* 항산화 활성을 비교 평가하고 이를 바탕으로 HPLC를 이용하여 chlorogenic acid와 ellagic acid의 함량분석 및 분석법에 대한 유효성을 검증하는 밸리데이션을 수행함으로써 비파 잎으로부터 HPLC-DAD 방법으로 확립된 chlorogenic acid와 ellagic acid 성분의 품질 규격 및 공정 표준화와 천연 항산화제 개발을 위한 기초정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시료 추출물 제조

본 연구에서 사용된 비파 어린잎은 2016년 3-4월에 채취하고, 비파 잎은 6-7월에 수확된 시료로 전남생약농업협동조합 내 비파 과수원에서 (Goheung, Korea)에서 비파 잎을 동정하여 사용하였다. 비파 시료는 신선한 잎을 수세 후 dry oven에서 80°C에서 5시간 동안 가열 건조한 잎을 약 직경 1 cm 이하로 전남생약농업협동조합에서 분쇄하여 사용하였다. Folin-Ciocalteu reagent, ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), tannic acid, quercetin, ellagic acid, L-ascorbic acid 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, ellagic acid, chlorogenic acid 분석을 위한 methanol, acetonitrile 등은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) 제품을 사용하였으며 그밖에 사용된 추출 용매 및 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

시료 추출물 제조

비파 잎 시료를 대상으로 항산화 물질 등 손실을 최소화할 수 있는 에탄올 용매 비율에 따른 다양한 추출 조건은 예비 실험을 통하여 열수추출, 20% 에탄올, 80% 에탄올로 선정하였다. 비파 잎과 비파 어린잎을 각각 1.5 kg에 10배의 증류수를 추출 용매로 사용하여 100°C에서 4시간, 10배의 20% 에탄올에 95°C에서 4시간, 10배의 80% 에탄올에 90°C에서 4시간 초고속 진공 저온 농축기(COSMOS660-50L, Kyungseo Machines Co, Incheon, Korea) 추출 후, 동량의 열수, 20% 에탄올, 80% 에탄올을 두 번 가하여

추출과정을 반복하였다. 추출물을 초고속 진공 저온 농축기로 약 30°Bx로 농축하였다. 농축된 시료는 -70°C에서 24시간 냉동시킨 후 동결 건조하여 4°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량분석은 Moreno 등(2000)의 실험방법을 응용하여 측정하였다. 분석을 위해서 각 시료 100 µL을 80% ethanol 990 µL에 희석하고, 100 µL를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분간 방치한 후 분광광도계(Mecasys Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 표준물질 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량(mg QE/sample of 100 g)을 구하였다.

$$\text{Absorbance} = 0.0468 \mu\text{g quercetin} + 0.0195 \quad (R^2 = 0.99)$$

DPPH radical scavenging 측정

DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 시료의 항산화 활성을 측정방법 중 하나인 Blois (1958)의 실험방법을 응용하여 측정하였다. 99.9% ethanol을 사용하여 DPPH (2.0×10⁻⁴ M) 용액 100 µL와 각 농도별로 시료 100 µL을 96 well plate에 가한 후 잘 혼합하여 30분 간 상온에서 반응을 시킨 후 517 nm에서 ELISA reader (Mecasys Co.)를 이용하여 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 아래와 같은 방법으로 항산화 활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: absorbance of control

B: absorbance of test sample

ABTS radical scavenging 측정

ABTS 라디칼의 소거 활성을 통해 시료의 항산화 활성을 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 빛에 의한 라디칼 소모를 최소화하기 위하여 37°C 암소에서 24시간 동안 반응시켜 라디칼을 생성시켰다. Radical stock solution은 734 nm에서 흡광도 값이 0.68±0.020 되도록 phosphate buffer saline (pH 7.4)로 희석하였다. 각 농도별로 시료를 10 µL에 희석한 ABTS radical 용액 990 µL을 가하여 암소에서 1분 동안 방치한 후 734 nm에서 분광광도계(Mecasys Co.)로 측정하였다. 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 아래와 같은 방법으로 항산화 활성을 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: absorbance of control

B: absorbance of test sample

표준용액의 제조

Ellagic acid 표준물질은 1 N NaOH를 함유한 증류수를 사용하였으며, 이 용액을 희석하여 농도가 10-100 µg/mL가 되도록 표준용액을 만들었다. Chlorogenic acid 표준물질은 증류수에 녹인 후 4°C 냉장보관 하였으며, 10-80 µg/mL가 되도록 표준용액을 만들었다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for quantification of ellagic acid and chlorogenic acid

Parameters	Conditions						
Standard	Ellagic acid			Chlorogenic acid			
Column	SHISEIDO [UG120, AOAD30428, CAPCELL PAK 4.6×250 mm]						
Column temperature	40°C			25°C			
Flow rate	0.7 mL/min			1 mL/min			
Injection volume	10 µL			10 µL			
Mobile phase	A:	0.1% Formic acid in water			A:	0.1% Formic acid in water	
	B:	100% Acetonitrile			B:	100% Acetonitrile	
Gradient step	Time (min)	A (%)	B (%)	Time (min)	A (%)	B (%)	
	0	90	10	0	95	5	
	5	90	10	15	85	15	
	25	40	60	30	70	30	
	30	20	80	45	0	100	
	35	90	10	50	0	100	
40	90	10					
UV Wavelength	254 nm			280 nm			

HPLC 분석

분석대상 페놀성분 ellagic acid 및 chlorogenic acid 함량 측정을 위해 autosampler와 DAD detector를 장착한 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. 분석용 컬럼으로 SHISEIDO CAPCELL PAK (4.6×250 mm, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid를 함유한 3차 증류수(solvent A), 100% acetonitrile (solvent B)을 이용하여 분석조건은 Table 1과 같다.

HPLC 분석법의 유효성 검증(Method validation)

지표 성분에 대한 분석법의 유효성 검증은 의약품 등 분석법의 밸리데이션 가이드라인(KFDA, 2004)에 따라 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision) 등을 판단하여 분석 방법을 검증하였다.

직선성 및 검출 정량한계-Ellagic acid 및 chlorogenic acid의 standard solution을 5개의 농도가 되도록 용액을 만들어 실험을 진행하였으며, 이 표준용액들을 HPLC상에서 retention time 및 regression equation ($y=ax+b$ y: peak area, x: concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$))을 이용하여 결정계수(determination coefficient, R^2)를 확인하였다. 각 성분에 대한 검출한계 및 정량한계는 표준용액의 크로마토그램을 사용하여 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하였다.

정확성 및 정밀성-정확성과 정밀성 모두 동일농도의 지표 성분에 대하여 일간(inter-day) 및 일내(intra-day)변동을 알아보기 위해 정확성 및 정밀성 평가를 실시하였다.

함량분석

표준품 분석을 통해 작성한 검량선을 토대로 peak area 값을 대입하고 비례식을 이용하여 계산하였다. 시료는 syringe filter (0.45 μM , Hyundaimicro Co., Ltd, Seongnam, Korea)로 여과한 용액을 시험용액으로 사용하였다.

통계분석

본 실험에서 제시된 모든 실험 결과는 3회 반복 측정된 평균

값±표준편차(Mean±SD)로 나타내었다. 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, IL, Korea)를 이용하여 수행하였으며 각 실험군 간의 통계적 유의성 검정은 일원 배치 분산분석 one-way analysis of variance (ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 있는 경우 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 실시하였다. $p<0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

추출물의 수율

추출용매 조건에 따른 비과 잎의 항산화 활성을 검증하기 위하여 비과 잎 및 비과 어린잎을 식품용으로 적합한 열수와 에탄올을 농도별로 20% 에탄올, 80% 에탄올로 추출하였다. 추출물들을 동결건조 시킨 후 고형분 함량을 추출 수율로 계산하였고 추출물의 수율은 Table 2와 같다. 추출물의 수율은 항산화 활성의 측정에 있어 중요한 요소로 작용하며 추출물의 생리활성이 우수하여도 추출물의 수율이 낮을 경우 실질적으로 시료를 사용하는 데 있어 경제성이 떨어지기 때문에 추출 수율은 기능성 추출물의 다양한 제품화에 고려되어야 할 중요한 요인이다(Ham 등, 2015). 비과 잎 및 어린잎의 80% 에탄올 추출물의 추출 수율은 22.0% 와 23.9%로 비교적 높았으며 비과 잎의 20% 에탄올 추출물이 9.4%로 가장 낮은 수율을 보였다. 이는 시료에 대한 물과 에탄올의 혼합비의 변수로 추출 수율의 차이를 보이는 것으로 사료되며, 추출 수율이 10% 이상이면 경제성이 있는 것으로 알려

Table 2. The extraction yield of various solvent extracts obtained from 1,500 g of dry weight *E. japonica* Lindl.

Sample	Dry weight (g)	Yields (wt%) ¹⁾	
<i>E. japonica</i> Lindl. leaf	Water	300	20.0
	20% EtOH	141	9.4
	80% EtOH	330	22.0
<i>E. japonica</i> Lindl. young leaf	Water	324	21.6
	20% EtOH	319	21.2
	80% EtOH	358	23.9

¹⁾Yield (% w/w)=(dry weight of extract, g/weight of dry *E. japonica* Lindl., 1,500 g)×100

Table 3. Total flavonoid contents of various solvent extracts from *E. japonica* Lindl.

Sample	Total flavonoid contents (mg QE/g ¹⁾)	
<i>E. japonica</i> Lindl. leaf	Water	292.8±1.4 ^{2(a3)}
	20% EtOH	443.2±1.9 ^b
	80% EtOH	2,149.7±1.7 ^c
<i>E. japonica</i> Lindl. young leaf	Water	184.6±2.4 ^b
	20% EtOH	81.6±5.9 ^a
	80% EtOH	502.3±1.6 ^c

¹⁾mg QE/g: quercetin equivalents per 100 g of sample

²⁾Values are means of triplicate determination±SD.

³⁾Different letters are significantly different ($p<0.05$).

져 있어(Park 등, 2003) 비파 잎 및 어린잎은 경제적으로 활용 가능성이 있는 식물 소재로 보인다.

총 플라보노이드 함량

생체 내 산화작용을 억제하는 것으로 알려진 플라보노이드는 천연물의 항산화능을 결정하는데 중요한 화합물로 면역증진에 가장 도움 되는 물질(Lee와 Kim, 2009; Middleton 등, 1994)로 자유라디칼을 소거하는 능력을 가지고 있어, 과산화 지질 생성 억제 등의 효과를 나타내어 항산화 지표로서 이용 될 수 있다(Song 등, 2015). 본 연구에서는 비파 잎 및 어린잎의 추출용매 조건별 플라보노이드의 함량을 측정하여 총플라보노이드 화합물의 함량을 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다(Table 3). 비파 잎은 80% 에탄올 추출물이 2,149.7 mg QE/g로 가장 높게 나타났으며, 20% 에탄올 추출물, 열수 추출물 순이었다. 어린잎의 경우 비파 잎과 같이 80% 에탄올 추출물이 502.3 mg QE/g로 가장 높은 값을 나타내었고 열수 추출물, 20% 에탄올 추출물 순으로 총 플라보노이드를 함유하고 있었다. 기존에 연구된 장미과 식물인 복분자(Cho 등, 2008) 95% 에탄올 추출물이 249.8 mg QE/g의 총플라보노이드 함량을 나타낸 것에 비해 다소 높은 플라보노이드 함량을 가지고 있는 것으로 보아 비파 잎, 비파 어린잎은 높은 항산화 효능을 나타내리라 사료된다. 또한 비파 잎 및 어린잎의 80% 에탄올 추출물이 20% 에탄올, 열수 추출물 보다 더 효과적인 추출 방법을 시사하고 있다.

항산화 활성

활성산소종을 제거할 수 있는 항산화제를 찾으려는 연구들이 이루어지고 있으며 식물 추출물의 복잡한 반응으로 인해 수많은 기술이 이용가능하나, 항산화 활성의 단일 절차는 특성화 할 수 없기에 본 연구는 신뢰성을 입증하기 위하여 두 가지의 항산화능 분석법을 사용하여 시료의 항산화 정도를 측정하였다. 다양한 용매로 추출한 비파 잎 및 어린잎의 DPPH radical 소거활성을 농도에 따라 측정한 결과 0.8-100 µg/mL의 농도에서 농도가 증가할수록 높은 소거활성을 보였다(Fig. 1). 기존 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid는 1.5625-6.25 µg/mL에서 43.2-91.0%의 가장 높은 소거 활성을 보였으며(data not shown), 2.45 µg/mL 농도에서 50% 이상 소거활성(IC₅₀)을 나타내었다(Table 4). 모든 추출물 시료에서 25 µg/mL에서 유의적으로 70% 이상의 높은 소거활성을 나타내었다. 비파 잎과 어린잎의 80% 에탄올 추출물 IC₅₀은 각각 13.9, 20.7 µg/mL으로 가장 낮은 값을 보였고 어린잎은 모든 추출물에서 20.7-27.4 µg/mL으로 비파 잎보다 낮은 값을 나타내었다(Table

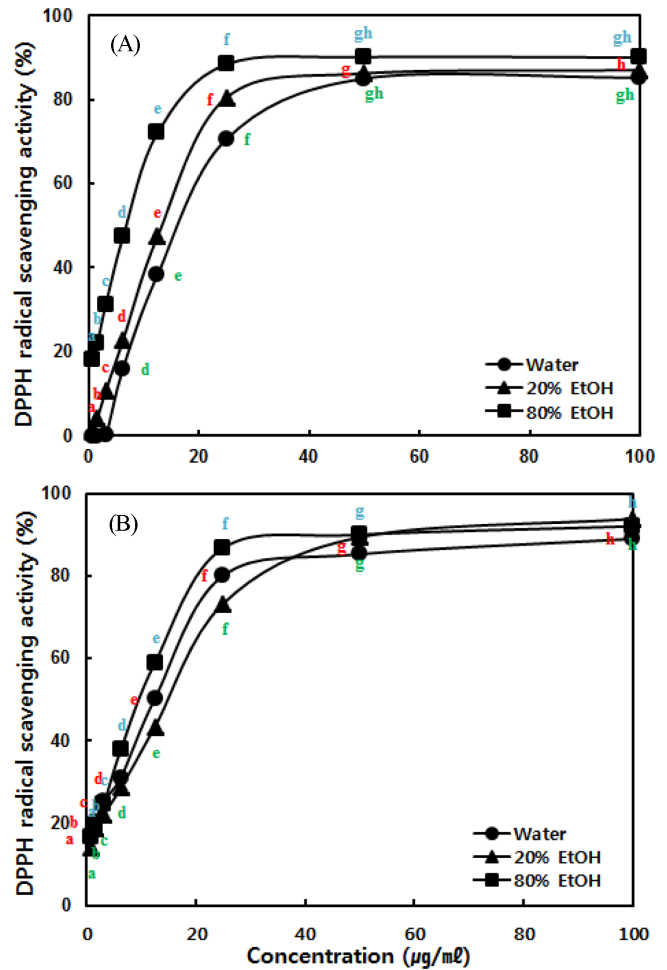


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of various solvent extracts from *E. japonica* Lindl. leaf (A) and young leaf (B). The effective concentration of test sample required to scavenge DPPH radical scavenging activity linear regression analysis of dose-response curve plotting between % inhibition and concentrations. The values are indicated as means±standard deviation of three independent experiments. Means with different letters (a-h) are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

4). 비파 잎 및 어린잎의 80% 에탄올 추출물의 라디칼 소거 활성이 12.5-50 µg/mL 각각의 농도에서 72.1-90.1% 및 58.9-89.9%의 소거활성능 가장 높게 나타났는데 이는 플라보노이드의 함량이 다량 함유되어 비교적 높은 소거 활성이 보인 결과 추정된다(Fig. 1). 이는, Koba 등(2007)의 연구에서 비파의 과육, 씨앗, 과피의 용매별 추출물에 DPPH radical 소거활성 평가에서 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 높은 항산화 효과가 있음을 보고한 결과와 일치하였다.

ABTS radical 소거활성법은 실제 항산화 활성과 높은 상관성을 나타내는 시험법이다. ABTS는 peroxidase, H₂O₂와 반응시킨 활성 양이온 라디칼이며, 항산화 물질에 의해 제거되면 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 활용하여 항산화 활성을 측정한다(Park 등, 2016). 다양한 용매 조건으로 추출한 비파 잎 및 어린잎의 5-80 µg/mL 농도에서 ABTS radical 소거능을 비교한 결과는 DPPH radical 소거 활성 실험과 일치한 결과양상을 보였다(Fig. 2). 모든 추출물 시료에서 농도가 증가할수록 소거능이 유의성 있게 증가 하였으며, 20 µg/mL 농도에서 50% 이상

Table 4. Values of IC₅₀ (μg/mL) for antioxidant activity of various solvent extracts from *E. japonica* Lindl. leaf, young leaf and L-ascorbic acid

Sample		DPPH radical scavenging activity, IC ₅₀ ¹⁾ (g/mL)	ABTS radical scavenging activity, IC ₅₀ ¹⁾ (g/mL)
L-Ascorbic acid		2.45±0.05 ²⁾	2.37±0.05
<i>E. japonica</i> Lindl. leaf	Water	39.0±0.7 ³⁾	18.0±0.1 ^c
	20% EtOH	33.5±0.2 ^b	13.5±0.1 ^b
	80% EtOH	13.9±0.3 ^a	10.9±0.3 ^a
<i>E. japonica</i> Lindl. young leaf	Water	25.2±0.1 ^b	21.0±0.3 ^c
	20% EtOH	27.4±0.1 ^c	19.0±0.2 ^b
	80% EtOH	20.7±0.3 ^a	17.3±0.2 ^a

The effective concentration of test sample required to scavenge DPPH and ABTS radical activity by 50% (IC₅₀ value) was obtained by SIGMA PLOT.

¹⁾IC₅₀ means is the concentration of sample required for scavenging radical by 50%.

²⁾Values are means of triplicate determination±SD.

³⁾Different letters are significantly different ($p < 0.05$).

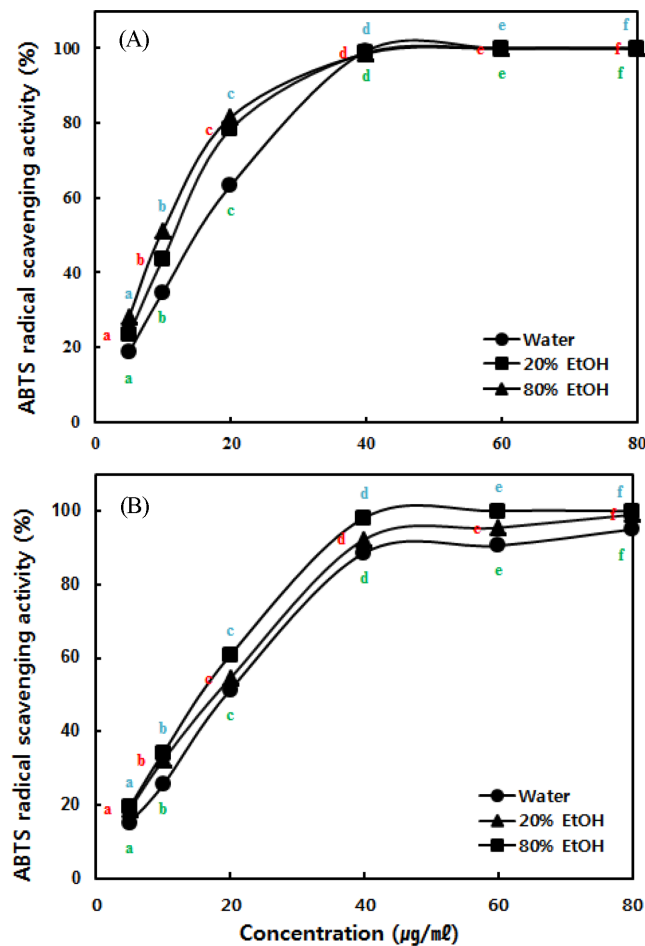


Fig. 2. ABTS radical scavenging activities of various solvent extracts from *E. japonica* Lindl. leaf (A) and young leaf (B). The effective concentration of test sample required to scavenge ABTS radical scavenging activity linear regression analysis of dose-response curve plotting between % inhibition and concentrations. The values are indicated as means±standard deviation of three independent experiments. Means with different letters (a-f) are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

의 높은 소거 활성을 나타내었다. L-ascorbic acid는 2.5-4.5 μg/mL에서 53.8-96.5%의 높은 ABTS radical 소거 활성을 보였으며 (Fig. 2), IC₅₀ 값은 2.36 μg/mL으로 확인되었다(Table 4). 특히, 어린잎의 열수, 20% 에탄올, 80% 에탄올 추출물에서 각각 IC₅₀ 값이 21.0, 19.0, 17.3 μg/mL이었으며, 비파 잎의 열수 추출물의 항산화 활성이 비슷하거나 낮은 결과를 보였다. 본 연구에서 ABTS radical 소거활성 실험 결과가 DPPH radical 소거 활성보다 비교적 높은 활성을 나타내었는데, 이것은 ABTS가 친수성 시료와 소수성 시료의 radical 소거활성을 모두 측정할 수 있어서 높은 항산화능을 나타내기 때문이다(Choi와 Shin, 2015; Lee 등, 2016a; Re 등, 1999). 그리고, 천연물 기준으로 보았을 때 비파 잎 및 어린잎의 열수 추출물에서 각각 IC₅₀ 값은 18.0와 21.0 μg/mL으로 높은 항산화 활성을 나타내었다(Table 4). 또한, Lee와 Kim(2009)의 연구에서 비파 잎 80% 에탄올 추출물에서 항산화 소거능 SD₅₀ 1.71 mg/mL로 가장 효과가 좋았던 결과와 일치하였다. 이러한 항산화 활성은 식품성분의 산화를 억제할 수 있으며 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있는 천연 항산화제로서 활용이 가능한 잠재적인 가치를 확인하였다.

HPLC 분석조건 확립

일정 농도 범위에 있는 ellagic acid 및 chlorogenic acid의 양에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지 확인하기 위하여 직선성을 평가하였으며, ellagic acid 및 chlorogenic acid의 standard solution을 HPLC로 반복 측정하여 검량선을 구하였고 결정계수 (R^2) 값은 0.9994-0.9999로 1과 거의 유사한 값이므로 높은 직선성을 보였다. Ellagic acid의 검출한계는 시험법이 각 성분별 분석 농도보다 낮은 검출한계와 정량한계를 보여주어 지표 성분 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증하였다(Table 5).

Ellagic acid 및 chlorogenic acid의 표준용액을 각각 저농도 및 고농도로 일정량을 첨가한 뒤 분석에 의해 회수되는 양을 통해 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 확인하였다. Ellagic acid의 정확성은 100.0-101.0% 이내로 확인하였으며, chlorogenic acid는 99.7-108.0% 사이에서 확인되었다(Table 6). 이는 식품의약품안전처 가이드라인 기준치인 회수율 오차 90-110%이내를 만족한다. 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 ellagic acid 0.20-5.31%, chlorogenic acid 0.29-0.73%의 양호한 값을 나타내어 식품

Table 5. Linear ranges, LOD, LOQ, contents of ellagic acid and chlorogenic acid in *E. japonica* Lindl. leaf

Compounds	Linear Range (g/mL)	Response Slope (a)	Response Factor (b)	R ²	LOD (g/mL) ¹⁾	LOQ (g/mL) ²⁾	Contents (mg/g) ³⁾
Ellagic acid	10-100	132.05	-237.46	0.9999	2.35	7.13	4.21±0.04
Chlorogenic acid	10-80	16.883	-5.3248	0.9994	0.73	2.22	5.13±0.06

¹⁾LOD (Limit of detection)=3.3×(standard deviation/slope of calibration curve)

²⁾LOQ (Limit of quantitation)=10×(standard deviation/slope of calibration curve)

³⁾The values are indicated as means±standard deviation of three independent experiments.

Table 6. Accuracy of the of ellagic acid and chlorogenic acid in *E. japonica* Lindl. leaf

Compounds	Spiked Conc. (g/mL)	Detected Conc. (g/mL)	Recovery (%) ¹⁾	RSD (%) ²⁾
Ellagic acid	10	9.53±0.51	100.0	5.31
	50	47.47±0.37	100.1	0.77
	100	95.92±0.49	101.0	0.51
Chlorogenic acid	10	10.30±0.04	108.0	0.38
	40	38.24±0.12	100.2	0.32
	80	76.09±0.73	99.7	0.68

¹⁾Recovery (%)=[(Amount found-Original amount)/Amount spiked]×100

²⁾RSD: relative standard deviation

Table 7. Precision of ellagic acid and chlorogenic acid in *E. japonica* Lindl. leaf

Compounds	Concentration (g/mL)	Accuracy (%)		Precision (c.v.,%)	
		Intra-day ¹⁾	Inter-day ²⁾	Intra-day ¹⁾	Inter-day ²⁾
Ellagic acid	10	100.0	100.0	5.31	5.30
	50	100.1	99.0	0.66	0.88
	100	101.0	100.1	0.20	0.82
Chlorogenic acid	10	108.0	108.0	0.38	0.39
	40	100.3	100.2	0.29	0.34
	80	100.5	99.0	0.63	0.73

¹⁾Intra-day: three times per day

²⁾Inter-day: one time analysis of ellagic acid and chlorogenic acid per day for 3 days

의약품안전처의 가이드라인 기준치인 상대표준편차 5% 이하를 만족하였다(Table 7).

페놀은 활성산소종(oxygen free radical)에 의해 손상된 DNA, 단백질 및 효소를 보호하는 항산화 물질중 하나이며, 생물학적 및 다양한 약리학적 효과로 인해 최근 주목을 받고 있다. 폴리페놀의 대표적인 화합물의 ellagic acid와 chlorogenic acid는 천연 화합물로서 비파 잎의 주요 활성 성분으로 알려져 있으며 항염, 항산화 및 항바이러스에 효과가 보고되고 있다(Bucak 등, 2019; Naveed 등, 2018). 특히, ellagic acid는 benzo[alpha]pyrene에 의해 유발된 발암에 대해 항암활성을 나타내며, chlorogenic acid는 지방대사 및 포도당을 조절할 수 있다고 보고되어지고 있다(Khanduja 등, 1999; Naveed 등, 2018). 플라보노이드 함량 및 항산화 활성과 폴리페놀의 상관성을 확인하기 위하여 항산화 활성이 가장 뛰어난 비파 잎 80% 에탄올 추출물에 ellagic acid 및 chlorogenic acid 함량분석을 하였다(Table 5). 비파 잎 80% 에탄올 추출물에 ellagic acid 함량은 4.21±0.04 mg/g을 함유하고 있었으며, chlorogenic acid 함량은 5.13±0.06 mg/g의 함유량을 나타냈다. 비파 잎에는 ellagic acid, chlorogenic acid외에도 ursolic acid, cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, kaempferol 등의 항산화 활성을 가지는 물질들이 있으며 이들 성분은 여러 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Lee 등, 2004; Shin 등, 2012). 비파 잎의 ellagic acid 및 chlorogenic acid를 비롯한 생리활성물

질이 항산화활성에 있어서 어떤 작용을 하는 것인지 생리활성물질의 분리 및 구조 동정, 표준물질을 이용하여 동시분석 및 특성 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구 결과 비파 잎의 추출 수율과 추출물의 항산화성, 유효성분 등을 검토할 때 열수추출물과 80% 에탄올 추출물에서 수율, 플라보노이드 함량, 항산화능(DPPH, ABTS)이 가장 우수하였다. 수율과 항산화성 및 유효성분 함량을 고려한 추출 조건으로 비파 잎을 산업적으로 활용하여 각종 가공식품 및 건강 기능성 식품을 개발하기 위한 좋은 천연 소재로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 다양한 생리활성을 가진다고 알려진 비파의 잎과 이에 비하여 연구가 미흡한 비파 어린잎에 대한 항산화 활성 등 생리활성에 대한 과학적 연구 근거를 제공하여 산업적 이용 증대 및 고부가가치 소재 개발을 목적으로 비파 잎 및 비파의 어린잎을 열수, 20% 에탄올, 80% 에탄올 용매를 이용하여 추출, 용매 조건에 따른 추출물의 항산화 활성 및 주요성분의 함량을 비교 분석하였다. 추출물의 수율이 가장 높았던 비파 잎 및 어린잎의 80% 에탄올 추출물 플라보노이드 함량은 2194.7 mg QE/g 및 502.3 mg QE/g으로 장미과 식물과 비교해 보았을 때 높은 함

량을 나타내었으며, DPPH radical 소거 활성 및 ABTS radical 소거 활성은 모든 추출물 시료에서 농도 의존적으로 유의성 있는 항산화 활성을 보였고, 비파 잎의 80% 에탄올 추출물에서 DPPH 와 ABTS radical 소거 활성 IC₅₀ 값이 13.9와 10.9 µg/mL로 분석되어 비파 어린잎 보다 항산화 활성이 높게 나타났다. 그리고 비파 잎에 함유되어 있는 페놀성 화합물 중 항산화 효능이 입증된 ellagic acid와 chlorogenic acid 성분의 표준화를 위하여 HPLC-DAD를 이용하여 chlorogenic acid와 ellagic acid의 함량분석 및 분석법에 대한 밸리테이션을 수행하여 유효성을 검증하였다. 이상의 결과 비파 잎 80% 에탄올 추출물은 높은 항산화 활성을 나타내어 비파 잎의 산업적으로 활용 가능성을 확인하였으며, 각종 가공식품 및 건강 기능성 식품 개발가치가 한층 높아질 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 논문은 2018년 동신대학교 학술연구비와 2018년 전라남도 전남테크노파크의 지역수요맞춤형 연구개발사업 지원을 받아 연구되었습니다.

This research was supported by the Donshin University research grants and by the Jeollanam-do (2018 R&D supporting program operated by Jeonnam Technopark).

References

- Afaq F, Mukhtar H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.* 15: 678-684 (2006)
- Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Nowell S, Davis W, Garza C, Neugut AI, Ambrosone CB. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *Am. J. Epidemiol.* 162: 943-952 (2005)
- Bae YI, Chung YC, Shim KH. Antimicrobial and antioxidant activities of various solvent extract from different parts of loquat (*Eriobotrya japonica*, Lindl.). *Korean J. Food Preserv.* 9: 97-101 (2002)
- Bauer G. Reactive oxygen and nitrogen species: Efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.* 20: 4115-4139 (2000)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200 (1958)
- Bowden GT. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat. Rev. Cancer.* 4: 23-35 (2004)
- Bucak MN, Bodu M, Başpınar N, Güngör Ş, İli P, Acibaeva B, Topraggaleh TR, Dursun Ş. Influence of ellagic acid and ebselen on sperm and oxidative stress parameters during liquid preservation of ram semen. *Cell J.* 21: 7-13 (2019)
- Cho HS, Kim KH. Quality characteristics of cookies prepared with loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1799-1804 (2013)
- Choi MH, Shin HJ. Anti-oxidative and anti-melanogenesis effects of blueberry extract. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 13: 261-266 (2015)
- Cho WG, Han SK, Sin JH, Lee JW. Antioxidant of heating pork and antioxidative activities of *rubus coreanus* Miq. extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 820-825 (2008)
- Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 458-79 (2010)
- Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A. Cardioprotection of red wine: Role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25: 115-120 (1999)
- Dillard CJ, German JB. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1744-1756 (2000)
- Eom HJ, Kim SM, Pyo BS, Lee KI. Changes of physiological activity by drying temperature in leaf of *Eriobotrya japonica*. *Korean J. Pharmacogn.* 40: 178-183 (2009)
- Ham H, Woo KS, Lee B, Park J, Sim E, Kim BJ. Antioxidant compounds and activities of methanolic extracts from oat cultivars. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1660-1665 (2015)
- Heo S, Wang M. Antioxidant activity and cytotoxicity effect of extracts from taraxacum mongolicum H. *Korean J. Pharmacogn.* 39: 255-259 (2008)
- Joung YM, Park SJ, Lee KY, Lee JY, Suh JK, Hwang SY, Park KE, Kang MH. Antioxidative and antimicrobial activities of liliun species extracts prepared from different aerial parts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 452-457 (2007)
- Khanda K, Gandhi R, Pathania V, Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem. Toxicol.* 37: 313-318 (1999)
- Koba K, Matsuoka A, Osada K, Huang YS. Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. *Food Chem.* 104: 308-316 (2007)
- Lee H, Kim YK, Lee HJ, Lee JJ. Effects of loquat (*eriobotrya japonica* lindl.) ethanol extracts of different aerial parts on antioxidant activity and antiproliferation of human cancer cells. *Korean J. Community Living Sci.* 27: 211-220 (2016a)
- Lee KI, Kim SM. Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* lindl. leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 267-273 (2009)
- Lee MH, Son YK, Han YN. Tissue factor inhibitory sesquiterpene glycoside from *Eriobotrya japonica*. *Arch. Pharm. Res.* 27: 619-623 (2004)
- Lee S, Kim M, Kim D, Choi H. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *inonotus obliquus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 139-147 (2005)
- Lee SH, Jang M, Kim GH. Antioxidative effects of extracts from different parts of *epimedium koreanum nakai*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 188-193 (2016b)
- Lee SN. The Antioxidant Effect of Rutin in Human Dermal Fibroblasts Damaged by Reactive Oxygen Species. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 12: 831-836 (2014)
- Lv H, Chen J, Li WL, Zhang HQ. Studies on the triterpenes from loquat leaf (*Eriobotrya japonica*). *J. Chinese Med. Materi.* 31: 1351-1354 (2008)
- Middleton EJ, Kandaswami C. Potential health promoting properties of citrus flavonoids. *Food Technol.* 48: 115-119 (1994)
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
- Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, Ahmad F7, Babazadeh D, FangFang X, Modarresi-Ghazani F, WenHua L, XiaoHui Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.* 97: 67-74 (2018)
- Park G, Sim Y, Lee W, Sung SH, Oh MS. Protection on skin aging mediated by antiapoptosis effects of the water lily (*nymphaea tetragona georgi*) via reactive oxygen species scavenging in human epidermal keratinocytes. *Pharmacology* 97: 282-293 (2016)
- Park YO, Lim HS. Antioxidant activities of bamboo (*sasa borealis*) leaf extract according to extraction solvent. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1640-1648 (2009)
- Park SH, Lim HY, Han JH. A study of medicinal herbs for functional food application-(I) nutritional composition and scolpectin analysis of *Artemisia capillaries*. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 13: 552-560 (2003)
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *J. Funct. Foods*, 18: 820-897 (2015)
- Shin HJ, Kim KH, Hwang HR, Kim NY, Kim SH, Yook HS. Antioxidant activities of extract fractions of leaves from loquat (*Eriobotrya japonica* lindl.) by cultivars. *J. Korean Soc. Food Sci.*

- Nutr. 41: 1029-1034 (2012)
- Song WY, Byeon SJ, Choi JH. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Sasa borealis* extracts. J. Agric. Life Sci. 49: 145-154 (2015)
- Whang TE, Lim HO, Lee JW. Anticancer effect of *Eriobotrya japonica* lindl by specificity test with several cancer cell lines. Korean J. Med. Crop Sci. 4: 314-320 (1996)