국내산 전호잎 추출물의 기능성 원료 표준화를 위한 지표성분 Cynaroside의 RP-HPLC 분석법 유효성 검증

홍준호¹ · 이미진¹ · 조영익^{1,3} · 문성민⁴ · 이슬아² · 김춘성²

¹(재)전남바이오산업진흥원 나노바이오연구센터, ²조선대학교 치의예과
³전남대학교 향장품학 협동과정, ⁴(주)네츄럴큐어

Analytical Method Validation of Cynaroside in Domestic *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. Leaves Extract for Standardization as a Functional Ingredient Using RP-HPLC

Joon Ho Hong¹, Mi Jin Lee¹, Young Ick Jo^{1,3}, Sung Min Moon⁴,
Seul Ah Lee², and Chun Sung Kim²

¹Nano Bio Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation,

²Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University,

³Interdisciplinary Program of Perfume and Cosmetics, Chonnam National University,

⁴Natural Cure Co., Ltd.

ABSTRACT This study was undertaken to establish an analytical method using RP-HPLC for standard determination of cynaroside in the leaves extract of domestic *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm., as a functional ingredient. The analytical method of cynaroside was optimized by HPLC on a reversed-phase octadecyl-silica (ODS) column with a gradient elution of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and methanol at 40°C and flow rate of 1.0 mL/min. The analyte was detected at 345 nm. The specificity was confirmed by the chromatogram obtained from the HPLC analytical method, as well as the results of UV and ESI-TOF mass spectra, and the coefficient of correlation (R^2) obtained was 0.9999, which confirmed this as a suitable analysis with high linearity. The limit of detection (LOD) was 0.26 mg/L, and limit of quantitation (LOQ) was 0.78 mg/L, which was confirmed as a suitable limit level for the analysis of cynaroside content in the *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves extract. The recovery was determined to be 98.55±0.81~102.53±1.11%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.25~1.09%, indicating high accuracy. The intra-day repeatability and the intra-laboratory precision of the daily repetition were confirmed to be 0.86~0.91% and 0.81~1.47%, respectively, for the RSD. These results validate the established HPLC analytical method, by confirming the specificity, linearity, precision, and accuracy to be within the ICH guideline.

Key words: *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves, cynaroside, HPLC, analytical method validation, functional ingredient

서 론

전호(*Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.)는 미나릿과(Apiaceae)에 속하는 다년생 초본으로 높이는 50~120 cm 정도이고, 근생엽과 밑부분의 잎은 잎자루가 길고 삼각형이며 열편은 달걀모양으로 다시 우상 중렬하고 길이 20~50 cm로 중렬편은 긴타원모양으로 예두 또는 예첨두이며 톱니

가 있고 뒷면 백위에 퍼진 백모가 있다. 줄기잎은 어긋나기 하며 근생엽과 비슷하지만 점점 작아져서 엽초만으로 되며, 줄기는 곧추서고 1 m에 달하며 뿌리는 원뿌리이고 연갈색의 형태학적 특징을 보인다(KNA, 2016). 전호는 우리나라를 비롯하여 일본과 중국, 동부유럽과 북미, 아프리카, 중앙아시아 및 뉴질랜드 등 전 세계적으로 널리 분포(Jeong 등, 2007; GBIF, 2019)하고 주로 산과 들의 습한 곳에 군락을 이루며 자생한다(Yang 등, 2017).

전호의 어린 순과 잎, 줄기 등이 식용으로 사용되고 있으며 칼슘과 칼륨, 비타민 C를 다량 함유하고 있고, 뿌리는 약용으로 쓰이는데 한방에서의 생약명은 아삼(蟻蓼)으로 알려져 있다. 어린잎과 줄기는 특유의 향과 약간 쓴맛이 있어 주로 나물로 식용하고 약리학적으로 두통과 신장결석 및 천

Received 19 Jan 2021; Revised 7 Mar 2021; Accepted 8 Mar 2021
Corresponding author: Chun Sung Kim, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 309, Pilmundaero, Dong-go, Gwangju 61452, Korea,
E-mail: cskim2@chosun.ac.kr

Author information: Seul Ah Lee (Researcher), Chun Sung Kim (Professor)

연 자양강장제로 이용되며(Allen과 Hatfield, 2004; Milovanovic 등, 2009), 뿌리는 전통적으로 토전호 또는 아삼(峨參)이라는 약재로서 해열 및 진통 억제(Wahida 등, 2011), 이노작용 촉진(Kozawa 등, 1982), 기침완화에 사용되고 각종 질병 등에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Yong 등, 2009; Koulman 등, 2003). 특히 인도에서는 오랫동안 류머티즘 및 기타 염증성 질환을 치료하는 데 사용되고 있다(Gairola 등, 2014). 전호 뿌리는 항암, 항바이러스, 항균, 간 기능 보호 및 항염 활성 등이 확인된 anthricin, anthricinol, anthriscusin, isoanthricin 및 yatine 등의 약리 성분들이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(Sudo 등, 1998; Guerrero 등, 2013; Hendrawati 등, 2011). 또한 전호 지상부의 주성분으로 chlorogenic acid와 cynaroside가 다량 함유되어 있다고 보고되었고(Svendsen, 1959; Lee 등, 2018a), Žemlička 등(2014)은 전호 지상부에 cynaroside가 0.124 g/kg이 함유되어 있다고 보고하였다. 이외에도 quercetin, rutin, apigenin, daidzin, isoquercetin, genistin 및 sissotrin 등의 항산화 활성을 갖는 플라보노이드 성분들을 분리 동정하였다(Abdulmanea 등, 2012). 전호는 이러한 생리활성 기능과 생리활성 물질이 밝혀지면서 고부가가치 식품소재로서의 가치가 인정되어 울릉도, 흑산도를 중심으로 국내 자생하는 야생 전호를 특산 자원으로 주목하고 농가소득 증대를 위한 대체 작물로서 그 생산량이 점차 증가하고 있는 추세이다.

Cynaroside는 luteolin-7-O-glucoside라는 이름으로도 알려져 있으며 쌍떡잎식물의 잎과 꽃 등의 지상부에 주로 함유되어 있는 flavonoid O-glucosides의 화합물로, 특히 셀러리, 냉이, 적상추, 깻잎, 배, 사과 등과 같은 과채류와 당귀, 신선초, 와송과 같은 약용식물에 일부 함유되어 있다(RDA, 2016; Park 등, 1995). 다양한 식물에 함유되어 있는 cynaroside는 항산화, 항암 및 항염 효과와 같은 다양한 생리활성을 가지고 있다. 환삼덩굴로부터 분리한 cynaroside가 활성산소(reactive oxygen species, ROS)로 알려져 있는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical)과 과산화수소(hydrogen peroxide)를 제거하는 강력한 항산화 효능이 있음을 보고하였고(Park 등, 2000), *Ophiorrhiza mungos*에서 분리한 cynaroside에 대해 COLO 320 DM(대장암), AGS(위암), MCF-7(유방암) 및 A549(폐암) 세포처리 시 β -catenin 단백질 발현 증가, DNA 분절화 및 항산화 효능에 의하여 암세포가 사멸됨을 보고하였다(Baskar 등, 2011). 또한 신선초에서 분리한 cynaroside를 고지 방식으로 유도된 고지혈증 동물모델에 투여 시 총 지질, 중성지질 함량 감소 및 lipase의 활성 증가에 따른 혈중 지질 개선 효과 등이 보고되었다(Park 등, 1995). 이와 같이 다양한 세포실험 및 동물실험에 대한 연구 결과가 보고됨에 따라 cynaroside의 기능성에 대한 연구와 관심이 증가하고 있다.

최근 식품소재는 식생활 및 경제 여건의 발달로 식품의 일차적 기능인 영양과 이차적 기능인 맛과 조직감에 대한

1, 2차적인 단순 기능을 넘어 의료비 증가에 따른 국가 부담 가중, 고령화 사회 진입 및 소비자의 건강 관심 고조로 생체 조절 기능을 강화한 건강기능식품에 대한 수요는 날로 증가하고 있다. 이에 발맞춰 식품산업은 안전성이 담보된 고품질, 고부가가치의 건강기능식품 신제품 개발 방향으로 발전하고 있다. 최종 품질관리 시험 결과 일변도의 평가 및 관리가 적용되는 가공식품의 제품관리와는 다르게 건강기능식품은 원료로부터 최종제품의 출하에 이르기까지 모든 제조공정과 품질관리가 생산계획에 따라 체계적이고 합리적으로 운영되어 특정 품질이 지속적이며 안정적으로 유지될 수 있도록 하는 품질보증 체계의 확립이 그 무엇보다도 중요한 요소로 작용한다. 이를 위해 건강기능식품의 개발은 과학적 근거를 토대로 기능성과 안전성이 입증되어야 할 뿐만 아니라 해당 원료를 특정할 수 있는 표준화가 요구된다. 표준화(standardization)는 생물자원으로 부터 유래한 고유성분의 변동성을 최소화하고 기능성 원료의 제조 단위(batch) 간에 일관성을 유지하기 위해 원재료의 생산에서부터 제조과정 전반에 걸쳐 사용된 기술과 정보를 관리하는 것으로 최종 건강기능식품에 대한 신뢰성을 확보하는 일련의 과정이라 할 수 있으며, 이를 위한 가장 일반적인 방법은 지표성분(marker compound)을 확인하는 것이다. 특히 우리나라는 개별인정형 기능성 원료의 신규 지정을 위해서 당해 원료의 지표성분을 설정하고 그 함량을 제시하도록 규정되어 있다. 지표성분의 규격은 Association of Official Analytical Chemists(AOAC) 등의 국내외 공인된 분석방법을 사용하거나 유효성이 검증된 분석법으로 확인할 수 있으며, 정확한 기준규격을 설정하기 위해서는 분석법의 타당성이 검증되어야 한다.

본 연구진은 국내에서 재배되는 전호잎에 대한 생리활성을 확인하기 위해 RAW 264.7 마우스 대식세포에 내독소(endotoxin)로 알려져 있는 LPS를 처리하여 세포 내 염증 유도 후 전호잎 열수 추출 원료를 처리하여 염증 유도인자로 알려진 iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 발현이 감소함을 확인하였으며, 생후 5일된 백서(SD rat)의 뒷다리 연골세포를 초대배양(primary chondrocyte cell)하고 IL-1 β 를 처리하여 염증 유도 후 관절 연골 파괴인자로 알려져 있는 MMP-13과 ADAMTS-4의 발현이 감소함을 보고하였다(Lee 등, 2018b). 또한 전호잎 열수 추출 원료에서 HPLC를 이용하여 cynaroside를 분리 후 생후 5일 된 백서의 뒷다리 연골세포를 초대배양하고 IL-1 β 를 처리하여 염증 유도 후 관절연골 분해효소(MMP-1, MMP-3, MMP-13)의 발현감소를 확인하였고, 생후 5일 된 백서의 뒷다리 연골조직 배양(articular cartilage organ culture)을 수행 후 cynaroside 처리 시 연골조직에서 연골을 구성하는 프로티오글리칸(proteoglycan) 함량이 증가함을 보고하였다(Lee 등, 2020). 위와 같은 연구 결과는 전호잎 추출물의 항염 효과 및 관절연골을 개선하는 식·의약 기능성 소재 개발 가능성을 보여 주었다. 이에 따라 본 연구에서는 전호의 유효성분 중 함량

Fig. 1. Chemical structure of cynaroside (luteolin-7-O-glucoside).

이 높고 관절 염증 개선 및 보호 효과의 기능성이 규명된 cynaroside를 지표성분으로 설정하였으며, 개별인정형 건강기능식품 원료 개발에 있어 전호잎 추출물 표준화의 일환으로 HPLC-DAD를 이용한 cynaroside의 효율적인 정량 분석법을 확립하고 그에 대한 시험방법의 유효성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용한 전호잎 열수 추출물은 씨에스텍(CS TECH Co., Ltd., Gwangju, Korea)에서 제공받았으며, 추출물은 50°C에서 열풍건조하여 수분함량 10%로 저장 보관한 전호잎을 90°C에서 180분 동안 열수 추출한 후 여과하고 농축한 다음 동결건조하여 분말로 제조한 것을 사용하였다. 표준물질은 cynaroside(luteolin-7-O-glucoside, CAS NO 68321-11-9, purity 99.9%, Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)(Fig. 1)를 사용하였고 water, acetonitrile 및 methanol 등의 용매 및 시약은 HPLC grade와 특급 시약(extra pure grade)으로 Burdick&Jackson Laboratories, Inc.(Muskegon, MI, USA)와 Junsei Chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

시료조제

Cynaroside 표준물질 5 mg을 정밀하게 취하여 50% 메탄올 10 mL에 용해하여 500 mg/L의 표준원액(stock solution)을 조제한 후 50% 메탄올로 희석하여 1~200 mg/L 범위의 표준용액(working solution)을 조제하고 이를 HPLC로 분석하여 표준검량선을 작성하였다. 전호잎 추출물은 50% 메탄올을 가하여 30분 동안 진탕한 다음 0.45 µm PTFE membrane syringe filter(Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

HPLC-DAD 분석

Cynaroside을 분리 분석하기 위해 다중과장 검출기(photo diode array detector, PDA)가 장착된 Nexera XR HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan) 시스템을 사용하였다. 분석컬럼은 Cosmosil 5C18-MS II(4.6×250 mm, 5.0 µm, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)를 사용하였고, 이동

Table 1. HPLC condition for the quantitative analysis of cynaroside

Item	Condition			
HPLC system	Nexera XR (Shimadzu, Kyoto, Japan)			
Column	Cosmosil 5C18-MS II (4.6×250 mm, 5.0 µm, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan)			
Mobile phase	(A) 0.1% TFA/water, (B) 0.1% TFA/acetonitrile			
	Elution mode	Time (min)	A%	B%
		0.0	90	10
		5.0	90	10
		25.0	50	50
	Gradient	35.0	70	70
		40.0	5	95
		45.0	5	95
		45.1	90	10
Flow rate	1.0 mL/min			
Column temp.	40°C			
Detection	PDA 190~600 nm@345 nm			
Injection vol.	10 µL			
Run time	55 min			

상은 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)가 포함된 water(A)와 acetonitrile(B)를 사용하여 1 mL/min의 유량으로 하고 컬럼온도는 40°C를 유지하였다. 검출과장은 345 nm로 설정하였으며 기울기 용리 방법(gradient elution mode)으로 시료 10 µL를 주입하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다.

UPLC-ESI-TOF/MS 분석

Cynaroside의 동정 및 확인시험은 UPLC-ESI-TOF/MS(LCMS-IT-TOF®, Shimadzu)를 사용하였다. 분석컬럼은 Capcell Core C18(2.1 mm I.d.×150 mm L, 2.7 µm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였고 이동상은 HPLC 분석과 동일 용매조성으로 유량은 0.2 mL/min으로 설정하였다. 질량분석은 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI)를 이용하였으며 positive ion mode로 분석하였다. ESI capillary의 전압은 4.5 kV, nebulizing gas와 drying gas는 N₂로 각각 1.5 L/min과 150 kPa로 설정하였다. CDL과 block heater는 200°C로 설정하였고, 데이터 수집 시간은 0.3 min(event time 300 ms, repeat 3, ion accumulation 10 ms)으로 하였으며 분자량 범위는 m/z 100~1,000으로 설정하였다. 질량분석 결과는 Shimadzu LCMS solution(ver. 3.60)과 accurate mass calculator 전용 소프트웨어, formula predictor(ver. 1.20)를 활용하여 해석하였으며, TOF(time of flight)는 주기적인 tune 실행으로 ±0.005 Da 이하의 질량 정확도(mass accuracy)를 유지하면서 본 실험을 수행하였다.

분석법 검증

분석법의 유효성 검증(method validation)은 ICH(Inter-

national Council for Harmonization) 가이드라인(2005)과 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인(MFDS, 2015)을 근거로 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision) 및 정확성(accuracy)을 조사하고 직선성 검증으로 구한 기울기(slope)와 표준편차(standard deviation)를 통해 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 산출하였다. 이를 바탕으로 전호일 열수 추출물 중 지표성분인 cynaroside의 함량을 분석하였다.

특이성: 특이성은 불순물, 분해생성물, 첨가물 등이 혼재되어 있는 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로, 다른 물질과의 간섭 없이 표준용액과 시험용액을 HPLC로 분리하여 성분 peak의 선택적 분리 여부 및 peak 간 간섭 정도 등을 확인하였으며 PDA에 의한 UV spectrum과 LC-ESI-TOF/MS mass spectrum을 비교 분석하였다.

직선성: 직선성은 시험용액 중 분석대상 물질의 양 또는 농도에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로, 농도별로 조제된 표준용액과 시험용액 각각에 대해 HPLC로 3회 반복 측정 후 동일 데이터 조건 변수(peak integration parameter)에 의해 처리된 검출성분의 peak 면적과 각 조제농도 간의 회귀직선의 검량선을 작성하여 기울기, y-절편(y-intercept) 및 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 통해 직선성을 확인하였다.

정밀성: 정밀성은 일정 실험 내에서 동일 시험자가 장치 및 기구 등의 동일한 조건에서 균질 검체에 대해 등분체하여 분석한 각각의 측정값들의 분산 정도(근접성)를 확인하는 것으로, 일정 농도로 조제한 시험용액에 대해 HPLC로 6회 반복 측정하여 peak의 머무름시간(retention time, t_R)과 peak area의 반복 재현성을(repeatability) 확인하였다. 실험실 내 정밀성(intermediate precision)은 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀성으로 3일간 반복하여 측정하고 각 결과값의 표준편차를 결과값의 평균으로 나눈 상대 표준편차(relative standard deviation, RSD%)로 정밀성을 판단하였다.

정확성: 정확성은 측정값과 이미 알고 있는 표준값에 근접한 정도로 실측치가 이론값에 얼마나 가까운가를 확인하는 방법으로, 직선성에 의해 구해진 기저 농도를 산출한 다음 50, 100, 150% 농도에 해당하는 표준용액을 시험용액에 첨가하여 HPLC로 농도별 3회 반복 측정 후 각 검액에 첨가된 실측값과 이론값에 대한 회수율(recovery %)을 구하여 정확성을 확인하였다.

$$\text{회수율(Recovery \%)} = \frac{C_s - C_u}{C_a} \times 100$$

C_s : analyte concentration determined in spiked sample

C_u : analyte concentration in unspiked sample

C_a : analyte concentration added to spiked sample as

theoretical value

검출한계 및 정량한계: 시료 중에 존재하는 분석대상 성분(analyte)의 검출 가능한 최소량 또는 최저농도의 검출한계와 정밀성과 정확성을 담보하는 분석대상 성분의 정량 가능한 최소량 또는 최저농도의 정량한계는 직선성을 통해 산출된 검량선의 기울기와 y-절편의 표준편차에 근거하는 방법으로 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \times \sigma}{S} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

σ : the standard deviation of the response

S : the slope of the calibration curve

결과 및 고찰

분석조건의 확립

전호일 추출물의 확인을 위한 지표성분인 cynaroside에 대한 분석법 확립을 위해 HPLC 분석에 필요한 컬럼, 이동상의 조성 및 UV 검출 파장을 최적화하고 이에 대한 분석법 검증을 실시하였다.

특이성 확인

본 연구에서 기 확립된 HPLC 조건으로 표준용액과 전호일 열수 추출물의 시험용액 크로마토그램을 비교하여 peak 분리 여부를 확인한 결과, 다른 성분과 명확하게 분리되어 다른 물질과의 간섭 없이 단일 peak로 검출되었고 표준용액과 시험용액의 peak 머무름시간은 17.01 ± 0.01 min으로 일치하였으며, 전처리 용매인 50% 메탄올의 바탕용액(blank solution)과 비교 시 용매 peak에 대한 간섭 영향도 없는 것을 확인하였다(Fig. 2). 또한 표준용액과 전호일 열수 추출물의 시험용액의 HPLC 분석 결과인 PDA spectrum에서도 200~600 nm 범위에서 동일 패턴으로 최대흡수 파장(maximum wavelength, $\lambda_{\max}$)이 349 nm로 나타났으며, ESI-TOF/MS를 이용한 positive ion mode의 mass spectrum에서 동일 모분자 이온(molecular ion) peak로 m/z 449.105, $[M+H]^+$ 를 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과를 토대로 본 시험법은 특이성이 있음을 확인하였다.

직선성

시험물질 중 일정 농도 범위에 있는 분석대상 물질의 양 또는 농도에 대하여 신뢰성 있는 선형의 측정값에 대한 확보 여부를 확인하기 위해 cynaroside 표준용액과 전호일 추출물 시험용액 각각의 농도 대비 크로마토그램의 peak 면적을 변수로 검량선을 작성하고 검량선의 상관계수(R^2)를 통해 직선성을 확인하였다. 2.3, 5.6, 11.3, 22.5, 56.3, 112.5, 225.0 mg/L cynaroside 표준용액과 0.52, 1.02, 2.52, 5.03, 10.00 mg/mL로 시험용액을 조제하여 3회 반복으로 HPLC를 분석하여 cynaroside의 검출 peak 면적으로 검량선을 작성하였다(Fig. 4). 전호일 추출물의 시험용액 조제농도

Fig. 2. The HPLC chromatogram of (A) blank (50% MeOH), (B) cynaroside standard solution, and (C) extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves.

Fig. 3. The PDA spectrum and mass spectra using electrospray ionization (positive ion mode) TOF/MS of (A) cynaroside standard solution, and (B) extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves.

0.52~10.00 mg/mL 범위에서 cynaroside는 11.33~219.75 mg/L로 검출되어 표준용액 검량선 범위 이내인 것을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 표준용액 0.99999이고 시험용액 0.99998으로 모두 양호한 직선성으로 나타났다.

정밀성

반복성: 반복성은 균질한 시험물질로부터 복수의 시료를 취해 동일 실험자, 장치와 실험조건 등의 시험환경에서 반복

적으로 시험을 실시하고 각 시험 결과의 일치 정도를 나타내는 것으로 전호잎 열수 추출물을 1.0, 2.5, 5.0 mg/mL로 3개 농도를 조제하여 동일 HPLC 조건으로 6회 반복 분석한 결과, 특이성으로 입증된 cynaroside peak의 머무름시간과 peak area의 RSD%는 각각 0.02~0.09%, 0.86~0.91%로 나타나 2% 이하의 우수한 정밀성을 나타냈다(Table 2).

실험실 내 정밀성: 동일 실험실 내에서 각각 다른 실험일, 시험자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하여 얻은

Fig. 4. Calibration curve of (A) cynaroside standard solution, and (B) extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves.

Table 2. Repeatability of analytical method for cynaroside in extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves

Sample concentration (mg/mL)	RT (min)		Area	
	Mean±SD	RSD% ²⁾	Mean±SD	RSD%
1.0	17.03±0.01 ¹⁾	0.03	600,528±5,457	0.91
2.5	17.03±0.02	0.09	1,532,587±13,210	0.86
5.0	17.02±0.00	0.02	3,043,996±26,375	0.87

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

²⁾Relative standard deviation.

측정값들 사이의 근접성을 확인하는 것으로 본 연구에서는 실험일을 변동요인으로 실험실 내 정밀성을 확인하였다. 반복성 확인과 동일한 조건의 시험용액에 대해 일내 및 일간 정밀성으로 구분하여 3일간 반복하여 HPLC로 분석한 결과, 일내 정밀성은 RSD 0.34~1.13%로 나타났고 일간 정밀성은 RSD 0.81~1.47%로 확인되었다(Table 3).

회수율을 이용한 정확성

정확도는 시험 결과의 품질을 측정하는 것으로 시험 결과의 측정값이 표준값(accepted reference value)에 대해 얼마나 근접한가를 확인하는 것으로 분석 회수율(analytical recovery)의 결과로 판단할 수 있으며, 일반적으로 시료의 준비, 시료로부터 분석대상 물질의 추출, 정량 이전의 일련의 분석과정에 관련된 분석오차를 측정하여 회수율을 산출할 수 있다(MFDS, 2016). 전호일 열수 추출물을 기준농도의 50, 100, 150%에 해당하는 표준용액을 첨가하여 회수율

시험용액을 조제하고 HPLC를 이용하여 농도별로 3회 반복 분석하고 회수율은 기준농도를 고려하여 80~115%, RSD 2.0% 이하를 기준으로 하였다(AOAC, 2002). 회수율 시험용액에 대한 표준값을 산출하고 동일 전처리 및 HPLC로 분석한 결과값을 이용하여 회수율을 계산하였다(Table 4). 각 시험용액에 대한 3개 농도의 회수율은 98.55~102.53%였으며 RSD는 0.25~1.09%로 나타나 본 시험법의 정확성을 확보하였다.

검출한계 및 정량한계

시험법의 검출한계는 0과는 확실하게 구분할 수 있는 분석대상 물질의 최소량 또는 최저농도로 측정값이 시험법과 관련된 불확도보다 클 때 측정값 중 가장 낮은 최솟값을 말하며, 정량한계는 적절한 불확도 수준으로 결정 가능한 분석대상 물질의 최저농도로 규정하고 정량한계의 설정은 가장 일반적으로 검출한계의 3.3배로 산출한다. 전호일 열수 추

Table 3. Intermediate precision of analytical method for cynaroside in extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves

Sample concentration (mg/mL)	Cynaroside of HPLC result (mg/L)			
	Intra-day		Inter-day	
	Mean±SD	RSD%	Mean±SD	RSD%
1.0	21.99±0.17 ¹⁾	0.79	22.14±0.25 ²⁾	1.15
2.5	55.11±0.72	1.31	55.24±0.81	1.47
5.0	109.19±0.37	0.34	109.48±0.88	0.81

¹⁾Values are mean±SD in triplicate per day (n=3).

²⁾Values are mean±SD in triplicate per day for three days (n=9).

Table 4. Recovery of analytical method for cynaroside in extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves

Level	Concentration of the standard sample (mg/L)		Recovery%	
	Added	Recoverd	Mean±SD	RSD%
Low (50%)	25.00	24.64±0.20 ¹⁾	98.55±0.81 ¹⁾	0.82
Medium (100%)	50.00	51.26±0.56	102.53±1.11	1.09
High (150%)	80.00	79.35±0.20	99.19±0.25	0.25

¹⁾Values are recovered & mean±SD (standard deviation) in triplicate (n=3).

Table 5. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of cynaroside

Analyte	Linear range (mg/L)	Linear equation	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cynaroside	1.1 ~ 225	y = 27,745x - 5,090 ¹⁾	0.26	0.78

¹⁾Value of slope and y-intercept in triplicate (n=3) for calibration curve.

Table 6. Content of cynaroside in extract of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves

Lot No (n=3)	Contents (mg/g)		% (w/w)
	Mean±SD	RSD%	
1	22.34±0.17 ¹⁾	0.75	2.23
2	21.62±0.05	0.22	2.16
3	21.33±0.27	1.27	2.13

¹⁾Values are mean±SD in triplicate (n=3).

출물의 직선성 확인 시험용액 3그룹을 HPLC로 분석하고, 그 결과로 검량선을 작성하여 검량선의 기울기와 y-절편을 산출하여 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법(standard deviation of the response of y-intercepts and the slope)으로 검출한계와 정량한계를 계산하였다(Table 5). Cynaroside의 직선성을 도태한 검출한계는 0.26 mg/L, 검량한계는 0.78 mg/L 수준으로 나타났고, 전호잎 열수 추출물의 cynaroside의 함량이 약 2% 수준으로 함유되어 있으므로 전호잎 열수 추출물에서의 검출한계 및 정량한계는 1.3 mg/100 mL와 3.9 mg/100 mL로 확인되었다.

전호잎 추출물의 cynaroside의 함량

본 연구로 확립된 분석법을 이용하여 국내산 건조 전호잎을 열수 추출하고 동결건조한 전호잎 열수 추출물에 함유된 cynaroside 함량을 분석하였다. 3 lot의 전호잎 열수 추출물에 대해 각 50 mg을 정밀하게 취하여 50% 메탄올 20 mL로 정용한 후 30분 동안 진탕하고 여과한 시험용액을 3회 반복하여 분석한 결과는 Table 6과 같다. 전호잎 열수 추출 분말 중 cynaroside의 평균 함량은 2.18%(w/w)로 건강기능식품 기능성 원료 인정규정(MFDS, 2019)에 따라 80~120%의 지표성분 함량 범위를 고려 시 1.74~2.61%(w/w) 범위로 확인되었다.

요 약

본 연구는 항염 효과 및 관절 연골 개선 효과가 있는 전호잎 추출물에 대해 개별인정형 건강기능식품의 기능성 원료 표준화의 일환으로 전호잎 추출물의 지표성분으로 cynaro-

side를 설정하고 이에 대한 HPLC 분석법 확립을 위한 분석법 유효성의 검증을 실시하였다. Cynaroside의 분석은 0.1 % trifluoroacetic acid가 포함된 water와 acetonitrile을 이동상으로 하고 octadecyl-silica의 역상 컬럼을 사용하여 기용기 용리법으로 분리하고 최대흡수파장을 고려하여 345 nm에서 검출하였다. 분석법 유효성 검증은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 등을 확인하였으며 표준물질과 전호잎 추출물 간의 HPLC 크로마토그램의 머무름시간과 UV 및 ESI-TOF/MS spectrum의 일치 여부 등의 비교를 통해 다른 물질과 간섭 없이 분리된 것으로 특이성을 확인하였다. 표준용액과 시험용액의 농도별 검량선의 상관계수는 0.9999 이상으로 나타나 높은 직선성으로 분석에 적합한 것으로 확인되었으며, 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거한 검출한계는 0.26 mg/L였고 정량한계는 0.78 mg/L로 전호잎 추출물의 cynaroside 함량 분석을 위한 적합한 한계수준으로 확인되었다. 전호잎 추출물에 표준물질을 25, 50, 80 mg/L의 3개 수준으로 첨가하고 분석한 회수율은 98.55±0.81~102.53±1.11%였으며, RSD는 0.25~1.09%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 높은 정확성이 있는 것을 확인할 수 있었다. 전호잎 추출물의 조제농도 1.0~5.0 mg/mL 범위에서 일내 반복성은 RSD 0.86~0.91%로 나타났고 일간 반복의 실험실 내 정밀성은 RSD 0.81~1.47%로 확인되어 본 분석법은 정밀성이 있음을 확인하였다. 이상의 결과로 전호잎 추출물의 지표성분인 cynaroside의 HPLC 분석법은 국내외 가이드라인에 적합한 시험법으로 검증되었으며, 본 연구에서 사용한 3회 제조 단위의 전호잎 추출물 중 cynaroside는 2.18%(w/w) 수준으로 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 본 시험법은 전호잎 추출물의 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 표준화의 기초자료로 활용될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 수행하였습니다(과제번호: 317003-4).

REFERENCES

- Abdulmanea K, Prokudina EA, Lanková P, Vaničková L, Koblovská R, Zelený V, et al. Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae family. *Biochem Syst Ecol.* 2012. 45:237-243.
- Allen DE, Hatfield G. Medicinal plants in folk tradition—An ethnobotany of Britain & Ireland. Timber Press, Cambridge, UK. 2004. p 182-183.
- AOAC. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Association of Official Agricultural Chemists, Arlington, VA, USA. 2002. p 19.
- Baskar AA, Ignacimuthu S, Michael GP, Al-Numair KS. Cancer chemopreventive potential of luteolin-7-O-glucoside isolated from *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Nutr Cancer.* 2011. 63:130-138.
- Gairola S, Sharma J, Bedi YS. A cross-cultural analysis of Jammu, Kashmir and Ladakh (India) medicinal plant use. *J Ethnopharmacol.* 2014. 155:925-986.
- GBIF (Global Biodiversity Information Facility). GBIF Secretariat. 2019 [cited 2020 Sep 10]. Available from: <https://www.gbif.org/species/5371742>
- Guerrero E, Abad A, Montenegro G, del Olmo E, López-Pérez JL, San Feliciano A. Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives. *Pharm Biol.* 2013. 51:566-572.
- Hendrawati O, Woerdenbag HJ, Michiels PJA, Aantjes HG, van Dam A, Kayser O. Identification of lignans and related compounds in *Anthriscus sylvestris* by LC-ESI-MS/MS and LC-SPE-NMR. *Phytochemistry.* 2011. 72:2172-2179.
- International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology—ICH harmonised tripartite guideline. ICH, Geneva, Switzerland. 2005. p 1-13.
- Jeong GS, Kwon OK, Park BY, Oh SR, Ahn KS, Chang MJ, et al. Lignans and coumarins from the roots of *Anthriscus sylvestris* and their increase of caspase-3 activity in HL-60 cells. *Biol Pharm Bull.* 2007. 30:1340-1343.
- KNA (Korea National Arboretum). Korea biodiversity information system. 2016 [cited 2020 Sep 14]. Available from: <http://www.nature.go.kr/kbi/plant/pilbk/selectPlantPilbkDtl.do?plantPilbkNo=24418>
- Koulman A, Kubbinga ME, Batterman S, Woerdenbag HJ, Pras N, Woolley JG, et al. A phytochemical study of lignans in whole plants and cell suspension cultures of *Anthriscus sylvestris*. *Planta Med.* 2003. 69:733-738.
- Kozawa M, Baba K, Matsuyama Y, Kido T, Sakai M, Takemoto T. Components of the root of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. II. Insecticidal activity. *Chem Pharm Bull.* 1982. 30:2885-2888.
- Lee MJ, Hong JH, Lee SA, Moon SM, Jin MR, Kim CS. Isolation and identification of phytochemical composition from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. using UPLC-ESI-IT-TOF/MS. Proceedings of the 69th Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2018a Oct 31-Nov 2. Busan, Korea. p 306.
- Lee SA, Moon SM, Han SH, Hwang EJ, Hong JH, Park BR, et al. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Anthriscus sylvestris* leaves. *J Med Food.* 2018b. 21:585-595.
- Lee SA, Park BR, Moon SM, Hong JH, Kim DK, Kim CS. Chondroprotective effect of cynaroside in IL-1 β -induced primary rat chondrocytes and organ explants via NF- κ B and MAPK signaling inhibition. *Oxid Med Cell Longev.* 2020. Article ID 9358080. <https://doi.org/10.1155/2020/9358080>
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Analytical method guideline about validation of drugs and etc. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Chungju, Korea. 2015. p 1-17.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Guideline to documentation for certification of functional ingredients of health functional food. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Chungju, Korea. 2019. p 76-77.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). Standard procedure guideline about analytical method of food and etc. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Chungju, Korea. 2016. p 1-17.
- Milovanovic M, Banjac N, Radovic BV. Functional food: rare herbs, seeds and vegetable oils as sources of flavors and phytosterols. *J Agric Sci.* 2009. 54:81-94.
- Park JC, Cho YS, Park SK, Park JR, Chun SS, Ok KD, et al. Isolation of flavone-7-O-glycosides from the aerial parts of *Angelica keiskei* and anti-hyperlipidemic effect. *Kor J Pharmacogn.* 1995. 26:337-343.
- Park SW, Chung SK, Park JC. Active oxygen scavenging activity of luteolin-7-O- β -D-glucoside isolated from *Humulus japonicus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2000. 29:106-110.
- RDA (Rural Development Administration). Flavonoid data base 1.0: II. Flavonoide library. 2016 [cited 2021 Feb 24]. Available from: <http://koreanfood.rda.go.kr/kfi/fct/fctCompSrch/list>
- Sudo K, Konno K, Shigeta S, Yokota T. Inhibitory effects of podophyllotoxin derivatives on herpes simplex virus replication. *Antivir Chem Chemother.* 1998. 9:263-267.
- Svendsen AB. Isolation of luteolin-7-glycoside from the flowers of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Pharm Acta Helv.* 1959. 34:29-32.
- Wahida B, Amor M, Nabil C. An inventory of ethnomedicinal plants used in Tunisia. In: Rai M, Acharya D, Rios JL, editors. *Ethnomedicinal plants: revitalization of traditional knowledge of herbs*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2011. p 336.
- Yang JE, Lee SA, Moon SM, Han SH, Choi YH, Kim SG, et al. Water extracts of *Anthriscus sylvestris* leaf induces apoptosis in FaDu human hypopharynx squamous carcinoma cells. *Int J Oral Biol.* 2017. 42:47-54.
- Yong Y, Shin SY, Lee YH, Lim Y. Antitumor activity of deoxy-podophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: Induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009. 19:4367-4371.
- Zemlicka L, Fodran P, Lukeš V, Vagánek A, Slovákova M, Staško A, et al. Physicochemical and biological properties of luteolin-7-O- β -D-glucoside (cynaroside) isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm.. *Monatsh Chem.* 2014. 145:1307-1318.