



## 배암차즈기 추출물의 기능성원료 표준화를 위한 지표성분으로서 Hispidulin의 분석법 평가

전윤정\* · 곽호영\* · 최종길\* · 이제혁\*\* · 최수임\*†

\*주와이디생명과학연구소, \*\*공주대학교 식품영양학과

### Analytical Method for the Validation of Hispidulin as a Marker Compound for the Standardization of *Salvia plebeia* R. Br. Extracts as a Functional Ingredient

Yoon Jung Jeon\*, Hoyoung Kwak\*, Jong Gil Choi\*, Je Hyuk Lee\*\* and Soo Im Choi\*†

\*YD Life Science Research Institutes, YD Life Science Co. Ltd., Seongnam 13207, Korea.

\*\*Department of Food and Nutrition, Kongju National University, Yesan 32439, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** In the present study, we established an HPLC (high performance liquid chromatography)-analysis method for the determination of marker compounds as a part of the material standardization for the development of health-functional foods from *Salvia plebeia* R. Br. extract.

**Methods and Results:** The quantitative determination method of hispidulin as a marker compound was optimized by HPLC analysis using a YMC hydrosphere C18 column with a gradient elution system. This method was validated using specificity, linearity, accuracy, and precision tests. It showed a high linearity in the calibration curve with a coefficient of correlation ( $r^2$ ) of 0.999995. The method was fully validated, and was sensitive, with the limit of detection (LOD) at  $0.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and limit of quantification (LOQ) at  $0.27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The relative standard deviation (RSD) values of the data from intra- and inter-day precision were 0.05 - 0.22% and 0.32 - 0.42%, respectively, and the intra- and inter-day accuracy of hispidulin were 99.5 - 102.3% and 98.8 - 101.5%, respectively. The average content of hispidulin in *Salvia plebeia* R. Br. extract was  $3.945 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (0.39%).

**Conclusions:** These results suggest that the developed HPLC method is very efficient, and that it could contribute to the quality control of *Salvia plebeia* R. Br. extracts as a functional ingredient in health functional foods.

**Key Words:** *Salvia plebeia* R. Br. Hispidulin, HPLC Analysis, Method Validation

#### 서 언

배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 일년생 또는 이년생 직립초목으로 우리나라 전 지역에서 자생한다. 영문으로는 common sage라 하고, 설견초, 나인초, 수양이 (水羊耳), 과송청 (過冬靑)이라고도 하며, 경엽 (어린잎)은 식용으로 이용되고 있으며, 한방에서는 향기로운 가지가 달린 풀이라 하여 여지초 (荔枝草)라 불리며 약용으로 사용되고 있다 (Shirsat *et al.*, 2015). 예로부터 기침, 천식, 간염, 설사, 염증 등에 대한 효과가 알려져 있다 (Lim *et al.*,

2007). 현재 배암차즈기 추출물에 대한 항산화, 항균, 항알레르기, 항염증, 콜레스테롤 유출 촉진 효과, 항관절염 효과 등이 보고되어 있다 (Choi *et al.*, 2015a; Jeong *et al.*, 2012; Jo *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012).

배암차즈기의 주요 성분으로 flavonoid, polyphenol, saponin, 강심배당체, 불포화 스테롤, 정유 등이 있으며 종자의 지방유 등이 보고되어 있고 (Gu and Weng, 2001; Shin *et al.*, 2001), 이외에 caffeic acid, luteolin-7-O-glucoside, rosmarinic acid, hispidulin, hispidulin-7-O-glucoside, nepetin (Jin *et al.*, 2008), plebeianol A, diterpenoids (Zhang *et al.*, 2015) 등

†Corresponding author: (Phone) +82-2-6959-5665 (E-mail) langdeve@naver.com

Received 2016 May 19 / 1st Revised 2016 May 31 / 2nd Revised 2016 June 19 / 3rd Revised 2016 July 11 / Accepted 2016 July 18

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 성분이 함유되어 있다. 이 중 hispidulin이라는 성분은 벤조디아제핀 수용체-리간드 역할을 하는 플라보노이드 계열의 화합물로, 항혈전제 및 항진균제와 같은 특성과 AMPK를 활성화시키는 연구가 보고 되어 있으며 (Yang *et al.*, 2010), 다른 연구로는 glioblastoma multiforme 뇌종양 세포에서 mTOR 억제 및 p21을 유도기전으로 암세포 증식을 억제하는 것으로 보고되어 있다 (Lin *et al.*, 2010).

배암차즈기 경엽의 경우 식품으로 사용이 가능한 소재로 자체의 안전성이 있어 원재료에 대한 소비자의 거부감이 적고, 국내외에서 쉽게 구입 가능한 소재로서 다양한 형태의 제제화가 가능할 것으로 기대된다.

전국에 고루 퍼져 서식하고 있는 자생식물로 생육 범위가 없고, 시설재배와 노지재배가 모두 가능하다. 2009년 파주 농림기술센터 표준 재배기술이 배포되어 재배 및 수급이 용이해졌으며, 2년생으로 농가에서 일반적으로 7월에 파종하여 9월 모종 후 겨울을 지내고 3-4월에 순이 돌아 어린잎을 나물로 식용하고, 6월말에서 7월초 종자를 확보하며 전초는 생약으로 사용되고 있다. 사계절이 뚜렷한 한국의 입지조건은 고품질의 특산물을 만들어내는 특징이 있어 일본, 미국, 유럽 등에 기능성 고급 생 채소 및 고급 차로 수출될 가능성이 높은 고부가가치대 곡복 작물의 최적 작물이라 할 수 있다. 또한 배암차즈기는 면역질환에 효과가 있다고 알려져 있어 그에 대한 관심도 증가하고 있어, 추가적인 항비만 효능이 과학적으로 제시된다면 체지방 감소 관련 기능성 식품으로서 개발될 가능성이 매우 크다.

건강기능식품 개발, 생산 시 표준화 및 규격화는 매우 중요한 부분을 차지하게 된다. 기능성 원료 인정을 위해서는 기능성과 안전성을 과학적으로 입증하고 기능 및 지표성분을 선정하여 표준화하고 기능성 원료에 대한 기준규격을 설정하고 관리하여야 한다. 건강기능식품에서의 표준화란 제조공정에서 원재료에서 최종제품까지 가공하는데 목표하는 성분을 유지하기 위하여 천연물질에 함유되어 있는 고유한 성분의 변동을 최소화하여, 생산되는 배치 (batch)에 상관없이 일정한 품질을 유지하기 위해 원재료의 생산에서부터 제조 과정 전반에 걸쳐 사용된 기술과 정보를 관리하는 우수제조공정 규범을 말하며 이때 지표성분의 표준화방법이 가장 일반적으로 사용되게 된다. 이러한 기능성을 표준화되게 관리하기 위한 가장 일반적인 지표가 기능성분 또는 지표성분이다.

지표성분은 해당 성분의 농도와 효능 간의 상관관계가 뚜렷하지 않을 경우에 원재료를 확인할 수 있고, 대표할 수 있는 성분으로, 지표성분 분석을 위해서는 분석법을 설정하는 과정이 필요하며, 설정된 분석법의 타당성과 재현성, 그리고 신뢰성이 있는 결과를 얻을 수 있는지에 대한 과학적인 검증으로 분석법의 유효성 검증 (method validation)이 필요하다 (KFDA, 2008).

본 연구자들은 선행연구에서 배암차즈기 경엽 (지상부)과 전초의 주정 및 용매분획물에 대한 지방세포분화 및 지방축적 억제 효능을 비교 측정하였고 비만관련 기능성 소재 또는 식품첨가물로서의 가능성을 확인하였다 (Choi *et al.*, 2015b). 또한 3월말에서 4월 중순까지 재배된 어린잎 (지상부)을 채취하여 용매비율별 추출방법을 확인한 결과, 주정 50%용매추출물에서 가장 고르고 선명한 성분 피크들을 확인할 수 있었으며 동일 기간에 지역별 (고창, 부여, 여주, 진주, 대구 등)로 재배된 배암차즈기의 성분패턴을 확인한 결과, 유사한 패턴의 성분을 확인하였다. 선행연구에서 지표성분을 설정하기 위해 현재 확인되어진 금보배추 추출물의 주요 5종 성분 (luteolin-7-O-glucoside, rosmarinic acid, hispidulin-7-O-glucoside, nepetin, hispidulin)에 대하여 추출법 및 시간 경과에 따라 분석한 결과 가장 안정한 활성성분인 hispidulin을 최종 지표성분으로 선정하였다.

본 연구에서는 배암차즈기의 농가 소득 확대뿐만 아니라 다양한 효능을 갖는 배암차즈기의 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로의 개발을 위한 원료 표준화를 위해 배암차즈기 추출물의 지표성분으로서 hispidulin을 설정하였으며, HPLC를 이용하여 지표성분 hispidulin의 분석법을 확립하고 분석법의 유효성 검증을 실시하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물의 성분분석에 사용한 hispidulin 성분 (Fig. 1)은 순도 100% 제품을 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Hispidulin 분석에는 DAD (diode array detector)가 부착된 Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고, 분석 컬럼은 YMC Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm, 5.0 μm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) 컬럼을 사용하였다. 그 외 이동상 용매 phosphoric acid (Daejung Chemicals and Metals Co. Ltd., Siheung, Korea)와 methanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)은 HPLC 분석용으로 구입하여 사용하였다. 그 외 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 또는 Junsei Chemical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)의 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

### 2. 표준용액의 조제

Hispidulin 표준품 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 mg을 정확히 달아, 50% MeOH 50 ml 용매에 녹여 0.1 mg · ml<sup>-1</sup> 농도로 만들고 이를 초음파 추출하여 0.20 μm syringe filter로 여과한 것을 표준용액으로 하였다. 이를 0.8,

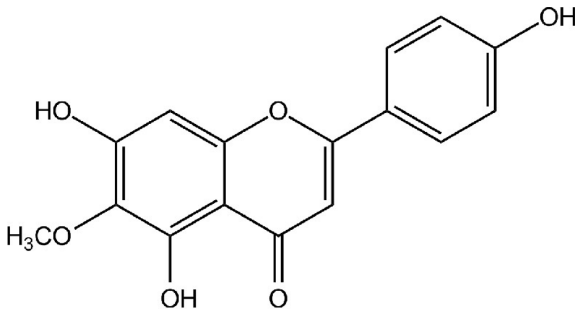


Fig. 1. Chemical structure of hispidulin.

2, 4, 10, 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 단계 희석한 뒤 0.20  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

### 3. 배암차즈기 추출물 분석 시료

본 실험에 사용된 배암차즈기는 경기도 여주 농가에서 채배된 것으로 경엽 지상부를 4월 중순에 수확하여 음지에서 건조한 것을 시료로서 사용하였다. 실험에 사용된 배암차즈기 경엽 표본 (GC-Y-201404)은 (주)와이디생명과학 기업부설 연구소에 보관되어 있다. 선행연구 (Choi *et al.*, 2015b)로부터 지방세포 분화 억제 효과를 나타낸 최적화된 배암차즈기 추출물 (YD-204B)을 제조하기 위해 지상부 204 kg을 음건하여 얻은 건조 32 kg을 분쇄하지 않고, 15 배수의 50% 주정 (Duksan Pure Chemicals Co. Ltd., Ansan, Korea)으로 12-16시간씩 2회 반복 추출하여 얻어진 추출액을 감압여과 후 65 brix가 될 때까지 진공감압농축을 실시한 후 동결건조하여 제조한 분말시료로 하였다.

### 4. HPLC 분석조건

배암차즈기 추출물의 hispidulin 분석을 위해 YMC Hydrosphere C18 (150  $\times$  4.6 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ , YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan) 컬럼을 사용하였다. 이동상 A에는 0.1% phosphoric acid가 첨가된 tertiary distilled water를, 이동상 B에는 methanol을 이용하여 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 유속으로 시료를 10  $\mu\text{L}$  주입하여 분석하였고 UV는 254 nm 파장에서 측정하였다. HPLC 이동상의 기울기 용리에 따른 분석 조건은 Table 1에 나타내었다. 분석시간은 0분에서 5분까지 이동상 A를 70% 용리하였고, 5분에서 25분까지 이동상 B가 45%, 25분에서 35분까지 이동상 B가 80%, 35분에서 40분까지 100%가 되도록 한 다음, 40분에서 45분까지 이동상 B를 100% 유지하면서 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 유속으로 분석을 실시하였다.

### 5. 정량분석법 검증 (Method validation)

표준검량선은 hispidulin의 표준용액 제조법에 따라 제조하였고, 시험용액은 배암차즈기 추출물을 50% methanol에 녹여

Table 1. Analytical condition of HPLC for hispidulin.

Parameters	Conditions		
Column	YMC Hydrosphere C18 (150 $\times$ 4.6 mm, 5.0 mm)		
Flow rate	1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$		
Injection volume	10 $\mu\text{L}$		
Run time	45 min		
UV detection	254 nm		
Gradient	Time (min)	% A <sup>1)</sup>	% B <sup>2)</sup>
	0	70	30
	5	70	30
	25	55	45
	35	20	80
	40	0	100
	42	0	100
	45	70	30

<sup>1)</sup>0.1% Phosphoric acid in water. <sup>2)</sup>Methanol.

2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  농도로 제조하여 사용하였다. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인을 근거로 하여 특이성 (specificity), 직선성 (linearity) 및 범위 (range), 검출한계 (LOD; limit of detection, S/N = 3.3), 정량한계 (LOQ; limit of quantification, S/N = 10), 정확성 (accuracy), 정밀성 (precision) 및 회수율 (recovery)을 측정하여 분석법의 재현성 (reproducibility)을 검증하였다.

특이성은 시험용액 및 hispidulin 표준용액을 HPLC로 분석한 후 크로마토그램상의 머무름 시간 (retention time)과 DAD를 통해 UV spectrum을 비교하고 인접한 피크와의 분리도를 측정하여 적합 여부를 판단하였다.

직선성은 hispidulin의 표준용액 제조법에 따라 제조한 후 이를 HPLC로 분석하여 농도에 대한 피크의 면적의 관계를 나타내는 표준검량선에서 검량선의 상관관계수 ( $r^2$ )를 계산하였다. 또한 작성된 표준검량선으로부터 각 농도별 피크의 신호 대잡음 (S/N)비를 구하여 S/N비가 3.3이 될 때의 LOD와 S/N비가 10이 될 때 LOQ를 계산하였다.

정확성과 정밀성은 hispidulin 표준물질 (2, 5, 10  $\mu\text{g}$ )을 시료에 넣은 후 분석하여, 표준물질을 가한 시료의 검출반응과 순수 표준물질의 검출반응을 비교하는 spiking과 recovery 방법으로 실험하여 참값을 정확히 회수할 수 있는지 회수율 계산을 통해 확인하였다. 하루 동안 3종의 농도조건에서 지표성분 표준품에 대하여 5회 분석하여 intra-day precision을 평가하고, 또 5일 동안 반복적으로 분석하여 inter-day precision을 각각 평가하여 정밀도 및 정확도를 조사함으로써 분석법의 재현성을 검증하였다. 상대표준편차 (RSD; relative standard deviation)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율 (%)로 계산하였다.

### 6. 배암차즈기 추출물의 지표성분 hispidulin 분석

배암차즈기를 50% 주정도로 추출하여 얻은 배암차즈기 추출분말 40 mg 씩을 50% MeOH 20 ml 을 첨가하여 초음파 추출하여 2 mg · ml<sup>-1</sup> 농도로 만들고 이를 0.20 μm syringe filter 로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 세 번씩 반복 분석하였다. 표준용액의 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 배암차즈기 추출분말 시료 중의 hispidulin의 함량을 산출하였다.

### 7. 통계분석

본 실험 결과는 Graphpad Prism<sup>®</sup> Version 5.0 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, USA) 프로그램을 이용하여 평균 ± 표준편차 (means ± SD)로 표시하였다. 통계적 유의성은 분산분석 (One-way ANOVA)로 분석한 후, Tukey's Multiple Comparison Test (TMCT)로 p < 0.05 수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 특이성 확인

불순물, 분해물, 배합성분 등의 여러 가지 다른 성분들이 혼합되어 있는 배암차즈기 (*Salvia plebeia* R. Br.) 추출분말 중에 분석대상물질인 hispidulin을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는지를 확인하기 위해 서로 가장 근접하게 용리하는 2개 성분의 분리도 (Rs; resolution)를 이용해 확인하였다. 분리도는 두 피크가 얼마나 잘 분리되었는지를 나타내는 척도이며, 피크가 완전히 분리한다는 것은 분리도 1.5 이상을 의미한다 (MFDS, 2014).

Hispidulin 표준용액과 시료 전처리 방법으로 처리한 배암차즈기 추출액을 이용하여 크로마토그램상에서 hispidulin 피크가 분리되었는지 또한 hispidulin만을 선택적으로 정확하게 측

정할 수 있는지를 확인한 결과, 인접해 있는 배암차즈기 추출액 내의 다른 물질 피크와의 간섭 없이 hispidulin 피크가 분리됨을 확인하였으며, 또한 표준용액과 배암차즈기 추출물의 UV spectrum에서도 동일한 spectrum을 나타내었다 (Fig. 2).

Hispidulin 표준용액의 머무름 시간은 34.244분이었고, 배암차즈기 추출액의 hispidulin 피크의 머무름 시간은 34.238분으로 표준용액과 시험용액의 지표성분의 피크 유지시간이 일치하였으며, 인접한 피크와의 분리도 (Rs) 계산 결과 9.04의 높은 분리도를 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인하였다.

### 2. 직선성 및 범위, 검출한계 정량한계

Hispidulin 표준용액을 단계적으로 희석하여 검체 중 일정 농도 범위에 있는 hispidulin의 양에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지 확인하였다. Hispidulin의 표준용액 (0.1 mg · ml<sup>-1</sup>)을 0.8, 2, 4, 10, 20 μg · ml<sup>-1</sup>로 단계적으로 희석한 후 HPLC로 분석하여 표준검량선을 작성하였다 (Table 2). 검량선의 상관계수 (r<sup>2</sup>)는 0.999995으로 높은 직선성을 보였으며, 기준 함량 (3.945 mg · g<sup>-1</sup>, 0.39%)의 20 - 507%를 범위로 설정하였다.

검출한계와 정량한계는 신호 대 잡음비 (signal-to-noise)에 근거하여 분석하였다. 결과, 신호 대 잡음비 (S/N)가 3.3배일 때의 LOD는 0.09 μg · ml<sup>-1</sup>였고 S/N비가 10배일 때의 LOQ는 0.27 μg · ml<sup>-1</sup>로 확인되었다. 이는 시료에 적용할 경우 0.09 μg · ml<sup>-1</sup> 수준까지 검출이 가능하고, 정량할 수 있는 분석물질의 최저 농도가 0.27 μg · ml<sup>-1</sup> 수준임을 의미한다.

### 3. 정확성, 정밀성 및 회수율

정밀성 (RSD)이란 하나의 균질화된 시료로부터 취한 여러 개의 등분체로 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 개개 측정치의 근접성을 말하며, 정확성이란 실험 측정값이 이미 알

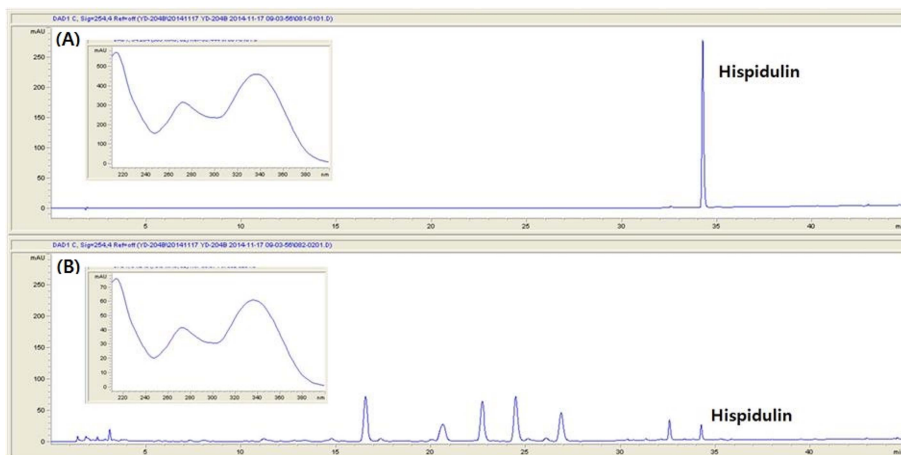


Fig. 2. HPLC chromatogram and UV spectrum of hispidulin. (A); standard, (B); *Salvia plebeia* R. Br. extracts.

**Table 2.** Calibration data for hispidulin.

Compound	Calibration curve	Correlation coefficient ( $r^2$ )	Concentration range ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LOD <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LOQ <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
Hispidulin	$y = 21.90x + 2.611$	0.999995	0.8 - 20	0.09	0.27

<sup>1)</sup>Limit of detection. <sup>2)</sup>Limit of quantification.

**Table 3.** Accuracy and precision data for HPLC analysis of hispidulin in the *Salvia plebeia* R. Br. extracts.

Compound	Spiked concentration ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	Intra-day precision			Inter-day precision		
		Measured ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD <sup>1)</sup> (%)	Accuracy <sup>2)</sup> (%)	Measured ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	RSD (%)	Accuracy (%)
Hispidulin	9.713	9.817 ± 0.009	0.093	101.104	9.766 ± 0.031	0.315	100.541
	12.293	12.566 ± 0.028	0.224	102.276	12.479 ± 0.052	0.417	101.519
	16.279	16.200 ± 0.008	0.049	99.528	16.087 ± 0.061	0.377	98.818

All values are presented as the means ± SD (n = 5). <sup>1)</sup>Relative standard deviation. <sup>2)</sup>Accuracy (%); [mean measured value / normal value (spiked amount)] × 100.

고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하는 것으로, 분석하고자 하는 성분을 원료에서 분리할 수 있는가를 확인하는 시험이다.

분석법의 재현성을 검증하기 위해 지표성분에 대한 하루 동안의 5회 반복 분석 (intra-day)과 5일 동안의 반복 분석 (inter-day)하여 정밀도를 평가하여 RSD로 나타내었다 (Table 3). Hispidulin 표준물질에 대하여 intra-day 및 inter-day 모두 RSD ≤ 5%로 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다. 측정 결과, intra-day와 inter-day의 정밀도는 RSD값으로 각각 0.05 - 0.22%와 0.32 - 0.42%로 나타났고, intra-day와 inter-day의 정확도는 각각 99.5 - 102.3%와 98.8 - 101.5%로 나타났다.

회수율은 이미 알고 있는 농도의 순수 hispidulin 표준용액과 일정한 농도 (0.1 mg · mL<sup>-1</sup>)의 표준용액을 각기 다른 부피 (20, 50, 100 μL) 만큼 첨가한 시료를 HPLC를 이용하여 분석한 후 각 첨가군의 검출농도를 확인하고, 이를 이론량에 대한 검출량의 백분율로 계산하였다. Hispidulin 성분의 회수율은 98.818 - 101.519% 이내였고, RSD 또한 0.5% 이내 (0.315 - 0.417%)로 나타났다. 농도별로 9.713 μg · mL<sup>-1</sup> (20 μL 첨가군)에서는 100.541%, 12.293 μg · mL<sup>-1</sup> (50 μL 첨가군)에서는 101.519%, 16.279 μg · mL<sup>-1</sup> (100 μL 첨가군)에서는 98.818%의 높은 회수율을 보였다. 따라서 본 연구의 HPLC 분석법이 배암차즈기 추출물의 지표성분의 함량분석을 위한 정확도와 정밀도가 높은 방법임을 검증하였다.

#### 4. 배암차즈기 추출물의 Hispidulin 함량

본 시험법의 분석법 검증 과정을 통하여 hispidulin에 대한 상기 HPLC 분석법이 건강기능식품 기능성 원료 인증을 위한 배암차즈기 추출물의 지표물질로서 hispidulin 정량에 적합한 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성 등을 갖고 있음을 확인하였다.

**Table 4.** Content of hispidulin in *Salvia plebeia* R. Br. extracts.

Lot No. (n = 3)	Mean ± SD (mg · g <sup>-1</sup> )	RSD <sup>1)</sup> (%)	Content (%)
1	3.916 ± 0.009	0.220	0.392
2	3.955 ± 0.008	0.191	0.396
3	3.962 ± 0.004	0.102	0.396
Average			0.394

All values are presented as the means ± SD (n = 3). <sup>1)</sup>Relative standard deviation.

검증된 분석법으로 배암차즈기 추출분말 (YD-204B)의 지표 성분 함량을 측정된 결과, 분말 중 hispidulin의 평균 함량은 0.39 ± 0.08%로 확인되었다 (Table 4). 지표물질 hispidulin 함량 기준으로 기준규격 설정을 위해 분석 결과치에서의 최소값의 80%, 최대값의 120%로 하한치와 상한치를 설정하였고, 본 연구의 분석법에 따른 결과치로서 최소값 0.3907%, 최대값 0.3966%를 기준으로 하한치 (최소값의 80%)는 0.31%, 상한치 (최대값의 120%)는 0.48%로 설정하였다. Ren 등 (2014)은 high-speed counter-current chromatography를 이용 3가지 분석용매 모드 (elution mode)를 통해 배암차즈기로부터 hispidulin을 포함한 9가지 성분을 분석하였다. de Oliveira 등 (2001)은 *Eupatorium littorale*로부터 hispidulin을 분리하여 0.21%로 정량하였다.

본 연구는 배암차즈기의 체지방 감소 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발에 있어 원료의 표준화를 위해 HPLC를 이용하여 hispidulin의 분석법을 확립하고 분석법에 대한 유효성 검증 (validation)을 실시하고자 하였다. 0.1% phosphoric acid가 첨가된 water와 methanol을 이동상으로 YMC Hydrosphere C18 (150 × 4.6 mm, 5.0 μm) 컬럼을 사용하여 기울기 용리 방법으로 분석한 결과, 본 시험법에서 표준용액의 피크유지시간과

배암차즈기 추출물의 hispidulin 피크의 유지시간이 일치하고 9.04의 높은 분리도 (Rs)를 나타내었으며, UV spectrum이 일치하는 특이성을 확인하였다.

검량선의 상관계수 ( $r^2$ )는 0.999995로 높은 직선성을 나타냈으며, 검출한계 (LOD)는  $0.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 정량한계 (LOQ)는  $0.27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 확인하였다. 분석법의 재현성을 검증하기 위한 일내 및 일간 분석에서 정밀도 (RSD)는 각각 0.05 - 0.22%와 0.32 - 0.42%로 나타났으며, 정확도 (accuracy)는 각각 99.5 - 102.3%와 98.8 - 101.5%로 나타내어 본 분석법이 지표성분의 함량분석을 위한 적합한 시험방법임을 검증하였다. 본 시험법에 따라 분석한 배암차즈기 추출물 내의 hispidulin의 평균 함량은 약  $3.945 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (0.39%)로 상대표준편차는 0.5%이하였다.

따라서 이상의 분석결과를 통해 HPLC를 이용한 배암차즈기 추출물 (YD-204B)의 지표성분으로서 hispidulin의 분석법이 적합한 시험방법임이 검증되었으며, 본 연구 결과의 확립된 hispidulin 분석법이 배암차즈기 농가의 소득 확대뿐만 아니라 배암차즈기 추출물의 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발에 있어 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과와 일부로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Choi JK, Oh HM, Park JH, Choi JH, Sa KH, Kang YM, Park PH, Shin TY, Rho MC and Kim SH.** (2015a). *Salvia plebeia* extract inhibits the inflammatory response in human rheumatoid synovial fibroblasts and a murine model of arthritis. *Phytomedicine*. 22:415-422.
- Choi SI, Kwak H, Kim JY, Choi JG and Lee JH.** (2015b). Antiadipogenic effects of *Salvia plebeia* R. Br. extracts by extraction conditions in 3T3-L1 preadipocytes. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:245-252.
- de Oliveira BH, Nakashima T, de Souza Filho JD and Frehse FL.** (2001). HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 12:243-246.
- Gu L and Weng X.** (2001). Antioxidant activity and components of *Salvia plebeia* R. Br: A Chinese herb. *Food Chemistry*. 73:299-305.
- Jeong HR, Sung MS, Kim YH, Ham HM, Choi YM and Lee JS.** (2012). Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 41:888-894.
- Jin XF, Lu YH, Wei DZ and Wang ZT.** (2008). Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Salvia plebeia* R. Br. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 48:100-104.
- Jo SY, Lee UY, Kim EY, Lee SJ, Her JW and Yoon TJ.** (2010). A study on the anti-inflammatory and anti-allergic effect of *Salvia plebeia* R. extracts. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 41:31-37.
- Korea Food and Drug Administration(KFDA).** (2008). Guideline for standard of health functional food. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea. p.1-5.
- Lim JA, Yun BW and Baek SH.** (2007). Antioxidative activity and nitrite scavenging ability of methanol extract from *Salvia plebeia* R. Br. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:183-188.
- Lin YC, Hung CM, Tsai JC, Lee JC, Chen YLS, Wei CW, Kao JY and Way TD.** (2010). Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase(AMPK). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:9511-9517.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2014). Gas and liquid chromatography in general test method. Ministry of Food and Drug Safety. Osong, Korea. p.2104-2108.
- Park SH, Kim JL, Kang MK, Gong JH, Han SY, Shim JH, Lim SS and Kang YH.** (2012). Sage weed(*Salvia plebeia*) extract antagonizes foam cell formation and promotes cholesterol efflux in murine macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*. 30:1105-1112.
- Ren DB, Qin YH, Yun YH, Lu HM, Chen XQ and Liang YZ.** (2014). Separation of nine compounds from *Salvia plebeia* R. Br. using two-step high-speed counter-current chromatography with different elution modes. *Journal of Separation Science*. 37:2118-2125.
- Shin MK, Kim SK, Lee SK, Yang EY, Lee HO and Baek SH.** (2001). Cytotoxicity and antimicrobial effect of the extract of *Salvia plebeia*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 32:55-60.
- Shirsat RP, Suradkarand SS and Koche DK.** (2015). Phytochemical composition and pharmacological aspects of *Salvia plebeia* R. Br: A mini review. *Indian Journal of Applied Research*. 5:362-364.
- Yang JM, Hung CM, Fu CN, Lee JC, Huang CH, Yang MH, Lin CL, Kao JY and Way TD.** (2010). Hispidulin sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by AMPK activation leading to Mcl-1 block in translation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:10020-10026.
- Zhang BB, He BQ, Sun JB, Zeng B, Shi XJ, Zhou Y, Niu Y, Nie SQ, Feng F, Liang Y and Wu FH.** (2015). Diterpenoids from *Salvia plebeia* R. Br. and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Molecules*. 20:14879-14888.