creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000334500

2020년 8월
석사학위 논문

미선나무 잎의 무기성분 및 지표성분 분석

조선대학교 대학원

식 품 영 양 학 과

정 지 영

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

미선나무 잎의 무기성분 및 지표성분 분석

Analysis of Inorganic Elements and Indicator compound form *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves

2020년 8월 28일

조선대학교 대학원

식 품 영 양 학 과

정 지 영

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

미선나무 잎의 무기성분 및 지표성분 분석

지도교수 김 경 수

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2020년 5월

조선대학교 대학원

식 품 영 양 학 과

정 지 영

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

정지영의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 복 희 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 재 준 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 경 수 (인)

2020년 6월

조선대학교 대학원

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· V

제 1 장 서 론 ····· 1

제 2 장 재료 및 방법 ····· 5

제 1 절 실험재료 및 기기 ····· 5

1. 시료 ····· 5

2. 시약 및 재료 ····· 5

3. 분석기기 ····· 6

제 2 절 무기성분 분석 ····· 7

1. 무기성분 분석을 위한 전처리 조건 ····· 7

2. 무기성분 분석을 위한 기기조건 및 방법 ····· 9

3. 무기성분 표준용액 제조 ····· 11

4. 분석법 검증 ····· 11

제 3 절 비휘발성 성분 분석 ····· 12

1. 미선나무의 flavonoid 분석 ····· 12

가. UV-spctrophotometer를 이용한 flavonoid 분석 ····· 12

나. HPLC를 이용한 flavonoid 분석 ····· 14

2. 미선나무의 지표성분 분석 ····· 17

가. HPLC를 이용한 screening 분석 ····· 17

나. HPLC를 이용한 지표성분 분석 ····· 19

3. 분석법의 유효성검증 ····· 22

가. 직선성(Linearity) ····· 22

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 특이성(Selectivity) ····· 22
다. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) ····· 22
라. 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) ····· 23
4. Flavonoid 성분 및 지표성분의 정성 및 정량 ····· 23

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 24

제 1 절 무기성분 분석 결과 ····· 24
1. 무기성분 분석법의 유효성 검증 ····· 24
가. 유효성 검증 ····· 24
나. CRM을 통한 분석법의 소급성 확인 ····· 26
2. 다량원소 분석 결과 ····· 28
3. 미량원소 분석 결과 ····· 30
제 2 절 비휘발성 유기성분 분석 결과 ····· 33
1. 미선나무의 flavonoid 분석 결과 ····· 33
가. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 분석 결과 ····· 33
나. HPLC를 이용한 미선나무의 flavonoid 성분 분석 결과 ····· 38
2. 미선나무의 지표성분 분석 결과 ····· 42
가. 용매별 screening을 위한 HPLC 분석 결과 ····· 42
나. 지표성분 선정 및 추출 조건 성립 ····· 45
다. 지표성분 분석법의 유효성 검증 ····· 50
라. 지표성분 정량 결과 ····· 52

제 4 장 요약 ····· 54

참고문헌 ····· 56

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. Biological classification of *A. distichum* Nakai ····· 3
Table 2. ICP-OES and ICP-MS operating condition and measurement parameters for analysis of elements ····· 10
Table 3. HPLC condition for flavonoid analysis ····· 16
Table 4. HPLC condition for screening analysis of ethyl acetate and methanol extracts ····· 18
Table 5. HPLC condition for indicator compound analysis ····· 21
Table 6. Method validation parameters of inorganic elements using ICP-OES and ICP-MS ····· 25
Table 7. Validation results of analytical method using certified reference material (NIST-1570a) by ICP-OES and ICP-MS ····· 27
Table 8. Macro and trace and toxic elements content in *A. distichum* Nakai ····· 32
Table 9. Total polyphenol and total flavonoid amount of different extract in *A. distichum* Nakai ····· 36
Table 10. Results of linear range, correlation coefficient for determining flavonoid by HPLC method ····· 39
Table 11. Result of the analysis of the flavonoid amount in *A. distichum* Nakai ··· 41
Table 12. Comparison of verbascoside amount in *A. distichum* Nakai ····· 48
Table 13. Validation result of analysis method for *A. distichum* Nakai ····· 51
Table 14. Amount verbascoside components in *A. distichum* Nakai ····· 53

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

그 림 목 차

Fig 1. Flow chart of microwave digestion process ····· 8
Fig 2. Comparison of macro elements content in *A. distichum* Nakai ····· 29
Fig 3. Comparison of major trace (a), minor trace and toxic (b) elements content in *A. distichum* Nakai ····· 31
Fig 4. Standard curve of total polyphenol compound content(a: gallic acid) and total flavonoid content(b: rutin) ····· 35
Fig 5. Total polyphenol and total flavonoid content of different solvent condition in *A. distichum* Naki ····· 37
Fig 6. Chromatogram of flavonoid standard ····· 38
Fig 7. Standard curve of flavonoid rutin hydrate(a) and quercetin-3-glucoside(b) · 39
Fig 8. HPLC chromatograms of step down extracts according to wavelength ····· 43
Fig 9. HPLC chromatograms & UV spectrums of the expected indicator in ethyl-acetate and methanol extract ····· 44
Fig 10. Chromatogram and UV spectrum of verbascoside ····· 45
Fig 11. HPLC chromatograms and UV spectrums of methanol (a), ethanol (b) and water (c) in *A. distichum* Nakai by reflux extraction ····· 49
Fig 12. Standard curve of vebascoside ····· 51
Fig 13. Chemical structure of verbascoside ····· 52

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Analysis of Inorganic Elements and Indicator compound form *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves

Jeong, Ji Young
Advisor : Prof. Kim, Kyong Su, Ph.D.
Department of Food and Nutrition
Graduate School of Chosun University

Abeliophyllum distichum Nakai(*A. distichum* Nakai) is the only native plant in South Korea. It mainly protects the body from chemical or physical stimulate. This study was conducted on *A. distichum* Nakai and their macro, trace and toxic element concentration, total polyphenol compound, total flavonoid, flavonoid and indicator compound were determined by modern instrument techniques, such as ICP-OES, ICP-MS, UV-spctroptometer and HPLC.

First part, the powder sample of *A. distichum* Nakai was digested by microwave combustion system and macro elements(Ca, Fe K, Mg, Na, P, S and Zn) were analyzed by Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry(ICP-OES) and trace and toxic elements(Li, Be, V, Cr, Co, Mn, Ni, Cu, Ga, Se, Rb, Ag, Cs, Ba, Pb, As and Cd) were determined by Inductively coupled plasma-mass spectrometer(ICP-MS). The following analysis methods have been validated by the analyzed reference material(NIST-1570a) for sensitivity, linearity, precision and spikings to achieve satisfactory results in all cases. Among the macro elements, the Ca(551.45±5.599 mg/kg) and K(348.17±4.384 mg/kg) were the highest amount compare to other determined macro elements. In addition, among the trace elements, Mn(164.37±6.507 μg/kg) and Ba(11.50±0.203 μg/kg) were the highest. The levels of toxic elements, including Pb, As and Cd were counted very low amount compare to recommended WHO guideline and therefore did not found to pose any threat to

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

consumers.

Second part, the total polyphenol compound and flavonoid analysis of *A. distichum* Nakai using UV-spctrophotometer showed 74.192 mg GAE/g in 50% ethanol solvent, and the total flavonoid content was the hight 57.280 mg RE/g in 100% ethanol. In addition, high performance liquid chromatography(HPLC) were used for the quantification of flavonoid and indictor compounds. Different polar solvent(methanol and ethanol) and extraction procedure(soxhlet, reflux, and ultrasonication) were applied to select the highest amount of major phenol and flavonoid compounds in *Abeliophyllum distichum* Nakai. Whereas, 50% ethanol with reflux extraction was showed the highest amount of rutin hydrate(11.511±1.143 mg/g) and quercetin-3-glucoside(2.939±0.244 mg/g) in *Abeliophyllum distichum* Nakai. In the analysis of the *Abeliophyllum distichum* Nakai indicator compound, the ultrasonication extract using 50% ethanol, was confirmed to be 407.02 mg/100 mL. In conclusion, this study has the potential to be utilized in the food industry by identifying the physicochemical components using the extract of *Abeliophyllum distichum* Nakai.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 1 장 서 론

평균수명의 증가로 인한 우리나라의 고령화율은 현재 14.8%이며, 건강기능식품에 대한 소비자 관심도는 중국, 일본, 러시아, 미국, 영국, 프랑스 및 독일 중 1위로 확인되고 있다(한국보건산업진흥원, 2016). 현재 우리나라의 건강기능식품의 수요량은 매년 증가하고 있으며 건강기능 식품 시장판매 매출액은 2019년 기준 4조 5,821억 원, 2018년도 4조 4,268억 원에 달하였으며 2018년 기준대비 7%의 성장을 기록하고 있다(한국건강기능식품협회, 2020). 또한, COVID-19, MERS등의 면역관련 질환의 유행으로 이를 미연에 예방하고자하자 건강기능식품의 수요가 증가하고 있는 실정이다(KANTAR, 2015).

건강기능식품에 사용되는 원료로는 고시된 원료 및 성분과 별도로 인정한 원료 및 성분으로 나누어진다. 통합식품안전정보망에서 발표한 2018년 건강기능식품 판매액 상위 5개 제품은 홍삼(11,096 억 원), 개별인정형 제품(3,226 억 원), 프로바이오틱스(2,994 억 원), 비타민 및 무기질(2,484 억 원), 밀크씨슬 추출물(823 억 원)으로 보고되었으며, 총합은 전체 건강기능식품 판매율의 81.7%로 편중되어 있다. 고시형 건강기능 식품 외 매출 상위 2위인 개별 인정형 제품의 구입율도 늘고 있는 반면, 2004년부터 2018년 동안의 수입 원료 415건, 국내 제조 181건으로 확인되었으며, 대부분의 개별 인정형 제품은 수입 원료로 확인되었다(식품의약품안전평가원, 2018).

개별 인정형 원료 사건 중 2015년 가짜 백수오 사건으로 건강기능식품 산업에 타격을 주었다(Choi & Kim, 2018). 백수오 사건으로 인해 기능성 원료 인정의 제도적 기준 등이 강화되었으며 새로운 원료의 인정건수가 점차 감소하였다. 현재 개별 기능성 원료를 인정받기 위하여 이와 유사한 원료가 존재할 시 이를 구분할 수 있는 지표성분 및 성상 등 과학적 근거가 요구되고 있다(식품의약품안평가원, 2018).

최근 건강기능식품 개발 시 인체에 안정적인 천연 항산화제에 대한 관심이 증가하고 있으며(Woo et al., 2010), 합성 화합물에 대하여 부작용이 없는 대안으로 천연 항산화제인 약용식물에 관한 관심이 증가하고 있다(Krishnaiah et al., 2011; Juntachote and Berghofer et al., 2005). 또한 건강기능식품의 연구 동향으로 국내의

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

자생식물을 활용하여 새로운 효능을 확인하는 연구가 이뤄지고 있다(진성규, 2019).

미선나무(*Abeliophyllum distichum* Nakai)는 꿀풀목, 물푸레나무과, 미선나무속에 속하며 국내에서만 자생하는 나무이며, 열매가 성숙한 형태가 부채를 펴놓은 모양과 같아 미선(美扇)이라고 명명되었다(Table 1). 또한, 세계 단 1속 1종뿐인 천연기념물 14호로 멸종위기 야생생물Ⅱ급 및 희귀식물로 지정되고 있다. 우리나라는 미선나무가 자라는 곳 자체를 보호하고 있으며, 현재 총 5곳으로 충청북도 괴산지역과 전라북도 부안지역이 지정되어있다. 미선나무는 상아미선나무(*Abeliophyllum distichum* for. ebumeum), 둥근미선나무(*Abeliophyllum distichum* var. rotundicarpum), 분홍미선나무(*Abeliophyllum distichum* for. lilacinum) 및 푸른미선나무(*Abeliophyllum distichum* for. viridicalynum)로 분류된다(Lee et al., 1976). 미선나무는 같은 물푸레나무과 식물인 개나리와 생김새가 유사하며, 보통 '흰색 개나리'로 인식되고 있다. 미선나무의 꽃은 개나리보다 작으며 매우 달콤한 향을 지닌 흰색의 꽃으로 국내외에서는 관상수로도 주목받고 있다.

미선나무는 2016년도에 안정성 및 건전성이 입증되어 '미선나무 잎 추출물(분말)의 한시적 인정(2016-10호)으로 식품 분야에서 확대 기반이 구축되었으며, 이후 2019년 식품원료 한시적 기준 제2019-2호로 인정받았다. 미선나무의 일반성분 실험결과 탄수화물(3.4%), 조단백(0.5%), 조지방(0.2%)로 확인되었다. 또한, 대표 중금속 4종인 Pb, Cd, As 및 Hg의 분석결과 0.0334, 0.0334, 0.0172, 0.0037 mg/kg으로 중금속 노출에 대해 안전 수준으로 보고되고 있으며, 섭취량을 평가한 결과 줄기 추출물이 사용된 대상 식품의 안전성이 확보되었다(식품의약품안전처, 2019). 미선나무에 함유된 수용성 비타민 분석 시 thiamine(0.10 mg/g), niacin(0.19 mg/g) 및 ascorbic acid(1.32 mg/g)의 함량이었으며, UV-spectrophotometer를 이용한 선행연구 결과 미선나무 잎의 total phenolic compound 및 total flavonoid 함량은 50.64 및 96.47 mg/g로 확인되었다(Kwon & Kang et al., 2014).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Biological classification of *A. distichum* Nakai

Scientific name	*Abeliophyllum distichum* Nakai
General name	White forsythia
Order	*Lamiales*
Family	*Oleaceae*
Genus	*Abeliophyllum*
Species	*Distichum*
Shape	

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

미선나무 관련 연구로는 Park(2011)의 연구에서 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radica(DPPH) 및 라디칼 소거 활성을 평가한 결과에서 94.72%로 높은 항산화 능력을 확인하였으며, 발암 유발성 판단 확인을 위하여 마우스의 골수세포를 이용한 소핵시험 결과와 대조군 비교 시 특정한 반응 증상이 관찰되지 않았다. 이외에 존재하는 연구로는 미선나무의 생태적 특성 및 자생지와 관련된 연구, 미선나무 추출물의 피부주름, 피부노화개선, 미백효과에 관한 연구 및 항염증, 항암 활성 등이 있다(You et al., 2004; Kim & Lee, 2015; Jang & Park, 2017; Chang et al., 2018).

현재 미선나무의 항암 활성, 체지방 감소 등 건강기능식품 개발에 관한 연구가 진행되고 있으나, 실상 구체적인 연구가 부족한 상태이다. 또한, 민간에서 고기의 연육작용 및 염증 질환등에 미선나무 추출물을 사용하고 있으나, 이를 뒷받침한 과학적 근거가 미흡한 실태이다(농림축산식품부, 2015). 기존의 미선나무에 대한 대부분의 선행연구는 일반성분 및 항산화 능력 등에 관한 연구가 존재하나, 이화학적 성분을 연구한 사례가 없었다.

본 연구에서는 국내 유일 희귀식물인 미선나무의 무기성분 및 지표성분을 확보한 분석법 개발 연구가 필요하다고 판단되어, 미선나무의 이화학 지표성분을 설정하고 분석법을 개발하였다. 개발한 미선나무의 지표성분 분석법은 쉽고 간단한 전처리와 최소한의 비용 및 시간 등을 고려하여 조건을 설정하였으며, 그 외 다량원소 8종, 미량원소 17종 및 이화학적 성분 데이터 확보를 위한 연구를 진행하였다.

본 연구는 국내 유일 자생식물인 미선나무의 다량 및 미량 원소 데이터 구축 및 flavonoid성분 및 지표성분을 개발함으로써, 현재 식품원료로 지정된 미선나무추출물을 이용한 건강기능식품 및 식품산업에 포괄적으로 사용할 수 있는 과학적 근거자료로 활용될 수 있을 것이다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 실험재료 및 기기

1. 시료

본 연구를 위하여 우리나무영농조합법인(Goesan, Korea)으로 부터 공급받은 미선나무 잎을 표준시료로 사용하였다. 실험을 위하여 공급받은 미선나무 잎의 이물질과 흙을 증류수로 수세 후, 물기를 제거하고 농산물건조기(GN-012, HanilGNCO. Co. Ltd., Jangsun, Korea)를 이용하여 40℃ 조건에서 수분함량 15% 이내가 되도록 건조하였다. 분석 시료로 사용하기 위하여 건조물을 균질화 후 사용하였으며, 건조한 시료의 보관은 -20℃ 이하에서 보관하였다.

2. 시약 및 재료

본 연구에서 사용한 증류수는 HPLC grade의 water(Fisher scientific, USA)와 Mili-Q ultra pure water purification system(Millipore Co., Massachusetts, USA)에 의해 18.2 MΩ 수준으로 정제된 증류수를 사용하였다.

다량 무기원소 및 미량 무기원소 분석을 위한 표준용액은 100 mg/kg Multi-Element Calibration Standard(Perkin Elmer Co., CT, USA)을 사용하였다. 시료 분해 시 사용한 용매는 HNO_3(Dong Woo Fine Chem Co., Iksan, Korea)과 H_2O_2(Dong Woo Fine Chem Co., Iksan, Korea)를 이용하였다. ICP-OES와 ICP-MS 분석 시 사용한 Ar gas는 고 순도(99.9998%)를 사용하였다.

비휘발성 유기성분 분석을 위한 시료 추출 시 *n*-hexane, ethyl acetate, methanol, ethanol 및 acetonitrile 등의 유기 용매는 모두 HPLC grade(Fisher scientific, New Hampshire, USA)를 구매하여 분석에 사용하였다. 또한, 2N Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

carbonate, diethylene glycol, sodium hydroxide, dimethyl sulfoxide(DMSO) trifluoroacetic acid 및 phosphoric acid등 사용된 기타 시약은 Sigma-Aldrch 사의 분석용 특급시약을 이용하였다. 분석에 사용한 표준물질로는 gallic acid, rutin, rutin hydrate, quercetin-3-glucoside 및 verbascoside(Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)을 구매하여 사용하였다. 분석 시 사용한 필터는 filter paper(No.2 Whatman, International Ltd., England)와 PDVF syringe filter(0.45 μm , Whatman, International Ltd., England)를 사용하였다.

3. 분석기기

무기성분 분석을 위하여 Microwave(Top wave, Analytik Jena, AG., Uberlingen, Germany)로 시료를 분해한 후 ICP-OES(Optima 5300DV, Perkin Elmer Co., CT, USA)와 ICP-MS(Elan DRC Ⅱ, Perkin Elmer Co., CT, USA)를 이용하여 분석하였다. 비휘발성 유기성분 분석을 위한 기기로는 shaking incubator(HB-201SF, Hanbaek Scientifi CO., Hwaseong, Korea), centrifuge(Combi R515, Hanil Science CO., LTD, Daejeon, Korea), water bath(HB-205WM, Hanbaek Scientifi CO., Hwaseong, Korea), UV-spctrophotometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 HPLC-PAD(LC-20A HPLC system, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2 절 무기성분 분석

1. 무기성분 분석을 위한 전처리 조건

무기성분 분석을 위한 시료 전처리 방법으로 건식 분해 방법과 습식 분해 방법이 있으며, 본 연구에서는 건식 분해 방법보다 무기성분 손실이 적고, 일정 온도와 압력을 제어할 수 있어 효율적 분해가 가능한 top wave microwave system을 이용한 습식 분해 방법을 사용하였다.

강산을 이용하여 유기물을 가열 분해하기 위하여 균질화된 미선나무 잎 분말 0.5g을 teflon vessel에 넣어 7 mL 70% HNO_3(purity 70%, Dong Woo Fin Chem Co., Korea)와 1 mL 30% H_2O_2(purity 30%, Dong Woo Fin Chem Co., Korea)를 첨가하였다. Top wave microwave system 프로그램의 온도 조건으로 5분 동안 80℃로 온도 상승 후, 5분간 50℃로 온도를 낮춰주고 15분 동안 190℃로 온도 상승시켜 20분 동안 유지하였다(Nho, 2018). 최종 분해물의 양이 20.0 g이 되도록 50 mL centrifuge tube에 정용해준 뒤 ICP-OES 및 ICP-MS의 분석용액으로 이용하였다(Fig 1).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

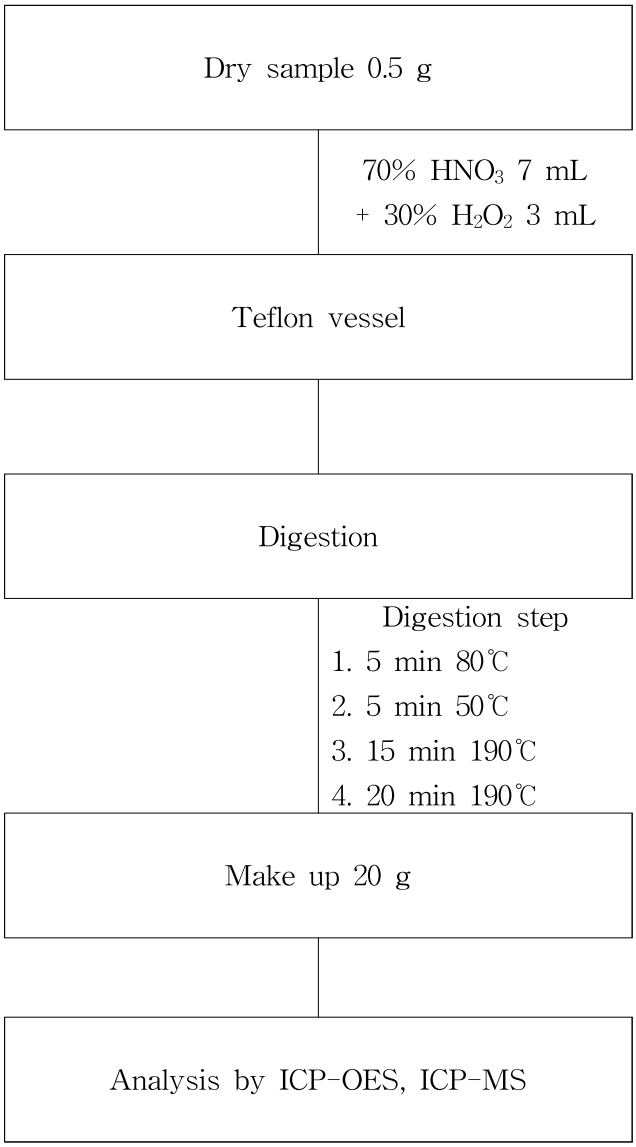


Fig 1. Flow chart of microwave digestion process.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 무기성분 분석을 위한 기기조건 및 방법

무기성분 분석을 위해 미량원소 분석 시 Inductively coupled plasma-mass spectrometry(Elan DRC Ⅱ, Perkin Elmer Co., CT, USA), 다량원소 분석 시 Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry(Optima 8300, Perkin Elmer Co., CT, USA)를 이용하여 분석하였다. Ar gas를 이용하여 유도결합플라즈마를 원자화 및 탈 용매화 하여 여기 된 원자가 바닥상태일 때의 에너지를 분광시켜 얻은 특정한 세기 및 파장으로 원자의 농도를 측정하는 원리를 이용하였다(Nho, 2018).

미량원소 분석 시 5% HNO_3를 이용하여 10분간 세척 후 daily performance를 사용하여 ^{115}In, ^{238}U의 감도를 확인 후 분석에 진행하였다.

ICP-OES를 이용한 다량원소는 Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S 및 Zn 총 8종을 분석하였다. 기기조건으로 RF generator 27.12 MHz, Rf power 1.4kW로 설정해주었으며, Ar gas는 분당 nebulizer 0.94 L/min, auxiliary 1.5L/min, plasma 16 L/min로 흘러주었다. 분석 전 대기시간은 30min이며, 이후 세척시간 또한 30min를 주었다.

ICP-MS를 이용한 미량원소는 Li, Be, V, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Ga, Se, Rb, Ag, Cs, Ba, Pb, As 및 Cd 총 17종을 분석하였다. 사용한 ICP-MS는 DRC modeⅡ를 이용하였으며, RF generator는 40 MHz, Rf power 1.4 kW으로 설정한 뒤 Ar gas는 nebulizer 1.05, auxiliary 2.0, coolant 17 L로 흘러주었다. Torch로는 demountable를 사용하였으며, interface cone은 platinum을 사용하였다(Table 2).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. ICP-OES and ICP-MS operating condition and measurement parameters for analysis of elements

Descriptions	Conditions
ICP-OES(Optima 5300DV, Perkin elmer, Norwalk, USA)	
RF generator (MHz)	27.12
Rf power (kW)	1.4
Nebulizer	Seaspray
Spray chamber	Cyclonic
Argon gas flow (L/min)	
Nebulizer	0.94
Auxiliary	1.5
Plasma	16
Read delay (sec)	30
Rinse (sec)	30
ICP-MS(Elan DRC mode Ⅱ, Perkin elmer, Norwalk, USA)	
RF generator (MHz)	40
Rf power (kW)	1.4
Argon gas flow (L/min)	
Nebulizer	1.05
Auxiliary	2.0
Coolant	17
Dwell time (ms)	6.0
Sample uptake flow (mL/min)	1.0
Reaction gas	Ar
Spray chamber	Cychronic type
Torch	Demountable
Interface cone	Platinum

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 무기성분 표준용액 제조

무기성분 분석을 위하여 100 mg/kg Multi-Element Calibration Standard(Perkin Elmer Co., CT, USA)을 24.5% HNO_3로 희석하여 분석에 사용하였다. 다량원소 분석 시 100 mg/kg multi stock solution을 희석하여 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 mg/kg으로 제조하였으며, 미량원소 분석을 위해 100 mg/kg multi stock solution을 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25 μg/kg 농도로 제조하여 검량선 작성의 표준용액으로 사용하였다(Hong et al., 2017).

4. 분석법 검증

분석법의 유효성 검증을 위하여 검출한계(Limit of Detection, LOD), 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ), 정확성(Accuracy) 그리고 정밀성(Precision)을 실시하였다. 시료 속에 존재하는 분석 대상의 존재를 확인할 수 있는 최소농도를 검출한계라고 말하며, 분석 가능한 최저농도의 시료를 7회 이상 분석한 결과를 구하여 표준 편차의 3배에 기울기로 나누어주었다. 시료 속에 분석 대상물질을 정량할 수 있는 최소농도를 정량한계라고 하며, 분석 가능한 최저농도 시료에 표준편차의 10배에 기울기로 나누어준 값을 정량한계라고 표현하였다. 전처리된 시료에 일정량의 표준용액을 첨가(spiking)하여 일반 시료와 같은 방법으로 최종 결과 값에서 임의로 첨가한 외부 표준물질의 회수율을 측정하였다. 실험의 반복을 통해 일치도를 검증하였으며, 동일한 농도의 표준용액을 7회 이상 측정해 반복 측정하여 변이계수(RSD %)를 산출하였다.

추가로 NIST(National institute of standards and technology)으로부터 인증표준물질(Certificated reference material, CRM)인 Spinach leaves(NIST-1570a)를 구매하였다. 인증표준물질을 사용하여 본 연구와 같은 조건으로 분석을 수행하였고 결과 값과 표준 값을 비교하여 분석의 정확성을 확보하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3 절 비휘발성 성분 분석

1. 미선나무의 flavonoid 분석

가. UV-spctrophotometer를 이용한 flavonoid 분석

1) 시료 추출

건조된 미선나무 잎 1.0 g을 10 mL 50%, 100% methanol, ethanol를 첨가한 후 shaking incubator를 이용하여 150 rpm에서 24 시간 동안 추출해 주었다. Centrifuge(Combi R515, Hanil Science CO., LTD, Daejeon, Korea)를 이용하여 3,500 rpm에서 15분 동안 분리하였으며, 이후 상층액을 PDVF syringe filter(0.45 μm , Whatman, International Ltd., England)로 여과 후 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 분석의 시료용액으로 사용하였다.

2) 총 폴리페놀 함량

미선나무의 총 폴리페놀 함량은 Folins-Ciocalteu방법을 이용하여 측정하였다(Singleton & Rossi, 1965). 시료 추출물 1.0 mL와 5.0 mL 0.2 N Folin-Ciocalteu's reagent(Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, M, USA)를 첨가하여 혼합 후 5분 동안 반응시켜주었다. 이후 4 mL 7.5% Na_2CO_3를 첨가하여 암소에서 60분 동안 정치 후 UV-spctrophotometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량을 구하기 위하여 gallic acid를 사용하였으며 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도의 표준검량곡선을 작성하였다. 총 폴리페놀 함량 계산은 mg gallic acid equivalent(GAE)/g로 나타내었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3) 총 플라보노이드 함량

미선나무의 총 플라보노이드 함량은 Davis방법을 이용하여 측정하였다(Chane et al., 2002). 미선나무의 추출물 1.0 mL와 2.0 mL diethylene glycol를 첨가하여 혼합 후 20μL 1N NaOH를 넣고 water bath에서 60분 동안 반응시켜주었다. 반응시킨 용액을 진탕 후 UV-spctrophotometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin를 사용하여 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도의 표준검량곡선 작성하여 mg rutin equivalent(RE)/g로 나타내었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. HPLC를 이용한 flavonoid 분석

식물체 내에 존재하는 이차대사 산물은 추출 용매의 용해도와 분석 대상의 화합물과 관련이 있으며, 화합물을 정제 및 분리하기 위해 추출용매와의 상관관계가 필요하다. 또한, 분석대상의 화합물은 추출방법과 용매에 따라 분석 효율이 달라진다. 이에 미선나무의 flavonoid 성분 및 지표성분 선정을 위한 추출조건이 필요하며, 본 연구는 추출용매와 추출방법을 변경하여 최적의 추출조건을 선정하였다.

1) 추출용매 선정을 위한 시험 용액 제조

미선나무의 flavonoid 성분 분석을 위한 추출용매 선정 시 순차적 추출 시 *n*-hexane, methanol 용매, 환류추출 시 50%, 100% methanol, ethanol 및 water를 사용하였으며, 초음파 추출에는 methanol, ethanol 및 water를 이용하였다.

2) 추출방법에 따른 시험 용액 제조

추출효율을 극대화하기 위하여 순차적, 환류, 초음파 추출방법을 실시하였다. 순차적 추출은 시료 15.0 g과 용매 100 mL을 사용하여 추출하였다. 환류 추출은 75℃ 수온상에서 시료 15.0 g과 추출용매 100 mL를 이용하여 추출하였으며, 초음파추출은 건조시료 1.0 g과 25 mL의 용매를 사용하여 상온의 온도조건에서 시행하였다. 추출액은 모두 Whatman No.2 filter paper를 이용해 여과하였으며, 0.45 μm PVDF syringe filter로 재 여과하였다. 이후 여과된 용액은 분석시험용액으로 사용하였다.

3) Flavonoid 성분 표준용액 제조

미선나무의 flavonoid 성분 확인을 위하여 rutin hydrate, quercetin-3-glucoside의 표준물질을 각각 1000 mg/kg의 표준용액으로 만든 후 methanol로 희석하여 200 mg/kg의 mixture standard를 제조하였다. Mixture standard는 200 mg/kg을 0.5, 1, 2,

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5, 10, 20, 40, 60, 80 및 100 mg/kg로 희석 후 표준용액을 제조하여 분석에 사용하였다.

4) Flavonoid 성분 분석을 위한 분석기기 조건

미선나무의 성분 확인 위한 HPLC-PDA 분석조건을 수립하였다. 분석 대상 성분으로는 rutin hydrate 및 quercetin-3-glucoside로 선정하였으며 λ_{max}는 330, 370 nm로 지정하였다. 기울기 용리 조건으로 A 용매 0.1% trifluoroacetic acid가 함유된 water, B 용매는 acetonitrile을 사용하였다. 25분간 B 용매 20%로 흘러주고 이후 40%로 상승시켜 1분간 유지 후 100%로 상승시켜 6분 동안 유지 시켜주었다. 다음 분석을 위하여 7분간 20% 조건으로 기기 상태를 유지해주었다(Table 4).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. HPLC condition for flavonoid analysis

Descriptions	Conditions	
HPLC(LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)		
Detector	PDA (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Wave length (nm)	330, 370	
Column	Capcell pak C_{18} MGⅡ (4.6× 250 mm, 5μm, Shiseido, Japan)	
Oven temp.(℃)	40	
Injection vol.(μL)	20	
Flow rate (mL/min)	0.7	
Mobile phase	(A) 0.1% trifluoroacetic acid in water, (B) Acetonitrile	
Gradient elution	Time (min)	B conc. (%)
	0.0	20
	25.0	40
	26.0	100
	32.0	100
	33.0	20

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 미선나무의 지표성분 분석

가. HPLC를 이용한 screening 분석

1) 용매별 screening 분석을 위한 시험용액 제조

비휘발성 유기성분 분석을 시행하기 위해 soxhlet 장치에 균질화된 시료 5.0 g과 100 mL *n*-hexane, ethyl acetate, methanol 순으로 75℃에서 8시간 동안 추출하였다. 추출용액은 Whatman No.2 filter paper로 여과 후 100 mL mass flask에 정용한 뒤, PDVF syringe filter(0.45 μm , Whatman, International Ltd., England)로 재 여과하여 고성능 액체 크로마토그래피(LC-20A HPLC system, Shimadzu, Kyoto, Japan)분석에 사용하였다.

2) HPLC screening을 위한 분석기기 조건

HPLC-PDA를 이용하여 극성도별 추출물인 *n*-hexane, ethyl acetate 및 methanol을 스크리닝을 진행하였다. 비극성 용매인 *n*-hexane 추출물은 분석을 위해 순상컬럼(normal-phase)인 silica column(4.6× 250 mm, 5 μm, Shiseido, Japan)을 사용하였으며, 극성용매인 methanol 추출물과 ethyl acetate 추출물은 역상컬럼(reverse phase)인 C_{18} MGⅡcolumn(4.6× 250 mm, 5 μm, Shiseido, Japan)을 사용하여 gradient elution 조건에서 분석하였다. 분석 column oven 온도는 40℃로 설정하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었으며 분석 추출물은 10 μL를 주입하였다. 이동상 A 용매는 water, B 용매는 acetonitrile을 사용하여 분석하였다. 분석조건은 0~57.0분간 B pump를 10~60%으로 흘러주었으며, 60.1~65.0분까지 100%로 상승시켜준 후 5분간 유지 해주었다. 이후 다시 10% 조건으로 다음 분석을 위해 기기를 안정화해 주었다(Table 3).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. HPLC condition for screening analysis of ethyl acetate and methanol extracts

Descriptions	Conditions	
HPLC(LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)		
Detector	PDA (Photo diode array, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Wave length (nm)	190~800	
Column	Capcell pak C_{18} MGⅡ (4.6× 250 mm, 5μm, Shiseido, Japan)	
Oven temp.(℃)	40	
Injection vol.(μL)	10	
Flow rate (mL/min)	1.0	
Mobile phase	(A) water, (B) Acetonitrile	
Gradient elution	Time (min)	B conc. (%)
	0.0	10
	57.0	60
	60.1	100
	65.0	100
	65.1	10

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. HPLC를 이용한 지표성분 분석

1) 추출용매 선정을 위한 시험 용액 제조

지표물질 분석을 위해 사용한 추출용매는 순차적 추출 시에는 미선나무의 스크리닝에 사용한 hexane, ethyl acetate 및 methanol를 이용하였으며, 환류추출 시 methanol, ethanol 및 water, 초음파 추출 시 각각 50%, 100% 비율의 methanol과 ethanol를 사용하였다.

2) 추출방법에 따른 용매 제조

순차적 추출, 환류 추출, 초음파 추출방법을 통하여 추출 효율을 비교하였으며, 극성도에 따른 지표성분 추출 효율을 확인하기 위하여 건조시료 15.0 g과 *n*-hexane, ethyl acetate 및 methanol 100 mL를 사용하여 추출하였다. 환류추출은 순차적 추출 결과를 바탕으로 시료 15.0 g에 각각 100 mL methanol, ethanol 및 water를 이용한 추출을 시행하였다. 초음파 추출 비교 시 건조시료 1.0 g과 추출용매 25 mL를 이용해 상온 온도와 60℃ 온도 조건에서 용매 비율별 효율을 확인하고자 하였으며 모든 추출액은 whatman No.2 filter paper와 0.45 μm syringe filter로 여과 후 HPLC-PDA 분석을 위한 용액으로 사용하였다.

3) 지표성분 표준용액 제조

지표성분 분석을 위하여 verbascoside의 표준물질을 1000 mg/kg의 stock solutiond을 제조 후 10, 20, 50, 100, 200 mg/kg로 희석하여 표준용액을 분석하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4) 지표성분 분석을 위한 분석기기 조건

미선나무의 지표물질 분석을 위한 HPLC 기기 조건은 지표성분으로 선정한 verbascoside의 최대흡수 파장인 330 nm에서 확인되었다. Gradient 용매 조건으로 A 용매는 0.1% H_3PO_4가 함유된 water와 B 용매는 acetonitrile을 사용하였다. B pump 10% 용리 조건으로 분석을 시작하여 7분 후 25%로 8분 동안 유지 시켜준 후 23분부터 60%로 상승시켜 준 다음 25분부터 100% 조건으로 5분 동안 흘려주고 2분간 10%로 다시 안정화시켜주었다(Table 5).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. HPLC condition for indicator compound analysis

Descriptions	Conditions	
HPLC(LC-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)		
Detector	PDA (Photo diode array, Shimadzu, Kyoto, Japan)	
Wave length (nm)	330	
Column	Capcell pak C_{18} MGⅡ (4.6× 250 mm, 5μm, Shiseido, Japan)	
Oven temp.(℃)	40	
Injection vol.(μL)	10	
Flow rate (mL/min)	1.0	
Mobile phase	(A) 0.1% Phosphoric acid in water, (B) Acetonitrile	
Gradient elution	Time (min)	B conc. (%)
	0.0	10
	7.0	25
	15.0	25
	23.0	60
	25.0	100
	30.0	100
	32.0	10

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 분석법의 유효성 검증

가. 직선성(Linearity)

직선성을 만족하기 위하여 verbascoside 표준물질을 이용하여 standard curve를 작성하였다. Verbascoside는 10, 20, 50, 100 및 200 mg/kg으로 제조 후 각각 3회 반복 측정하여 결과값을 산출하였다. 농도별 peak area값을 계산하여 standard curve를 작성하였으며, 추출물의 농도 값이 제조한 측정범위 내에 포함되는지 확인하였다.

나. 특이성(Selectivity)

미선나무 추출물의 verbascoside성분의 RT(retention time)와 UV spectrum이 표준물질과 일치하는지를 확인하였다.

다. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계(Limit of Detection)는 시료에 존재하는 분석하고자 하는 대상 물질을 확인할 수 있는 최소 농도를 말하며, 최저 농도를 7회 이상 반복 분석 후 확인된 표준편차의 3.3배를 해주어 기울기로 나누어준 것이다.

정량한계는(Limit of Quanitation)는 분석하고자 하는 대상물질을 정량할 수 있는 최소농도를 뜻하며 반복 분석 후 표준편차의 10배 후 기울기로 나누어준 것이다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

정밀성(Precision)은 반복 측정한 값의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)로 하였다.

정확성(Accuracy)을 확인하기 위하여 표준물질 외부 첨가법을 사용하였으며, 전처리한 실험 용액과 포함되어 있는 대상물질의 함량과 비슷한 농도의 표준품을 첨가하여 동일한 방법으로 분석하였다.

4. Flavonoid 성분 및 지표성분의 정성 및 정량

본 연구에서 검증한 최적의 분석 조건으로 HPLC-PDA를 이용하여 분석하였으며, 해당 성분의 머무름 시간과 UV spectrum의 일치를 확인 한 후 정성하였다. Sigma사에서 구매한 표준물질을 이용하여 stock solution 용액을 제조 후 농도별로 희석하여 사용하였으며, peak area로 작성한 검량선을 이용하여 정량을 하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 무기성분 분석 결과

1. 무기성분 분석법의 유효성 검증

가. 유효성 검증

미선나무 추출물의 검출한계는 다량원소 0.029~0.068 μg/g, 미량원소 0.022~0.153 μg/g이었으며, 정량한계는 다량원소 0.088~0.225 μg/g, 미량원소 0.067~0.463 μg/g로 확인되었다. 검출한계 및 정량한계에서 0.029 μg/g, 0.088 μg/g으로 다량원소 중 P가 우수한 결과를 보였으며, 미량원소 중에서 0.022 μg/g, 0.067 μg/g로 Cu 또한 우수한 결과로 확인되었다. 분석대상 무기원소의 검량선 모두 0.9920 이상의 직선성을 확인하였으며, 그 중 Cu, Gu 및 Se이 0.9990 이상으로 우수한 직선성을 보였다. 모든 분석 시료의 검출 값은 제조한 검량선 범위에 포함하였다. 변동계수는 동일 시료를 7회 반복 측정하여 얻은 결과 값으로 다량 무기원소와 미량 무기원소 모두 0.5~5.0% 이내로 정밀성을 확인하였다(Table 6).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Method validation parameters of inorganic elements using ICP-OES and ICP-MS

Element	Corr. Coeff (R^2)	LOD[1)]	LOQ[2)]	CV%[3)]
Macro elements (μg/g)				
Ca	0.9982	0.039	0.117	2.094
Fe	0.9954	0.047	0.143	0.825
K	0.9927	0.048	0.146	1.305
Mg	0.9969	0.034	0.102	1.270
Na	0.9988	0.029	0.089	0.563
P	0.9972	0.029	0.088	0.702
S	0.9936	0.068	0.225	1.012
Zn	0.9928	0.047	0.142	0.903
Trace elements (ng/g)				
Li	0.9975	0.083	0.252	2.022
Be	0.9988	0.058	0.177	1.944
V	0.9959	0.043	0.131	3.529
Cr	0.9964	0.031	0.093	4.644
Co	0.9925	0.047	0.143	4.086
Mn	0.9954	0.050	0.150	4.432
Ni	0.9966	0.039	0.119	3.320
Cu	0.9999	0.022	0.067	3.087
Ga	0.9998	0.048	0.144	4.470
Se	0.9990	0.101	0.307	2.435
Rb	0.9974	0.103	0.034	3.028
Ag	0.9964	0.046	0.139	5.061
Cs	0.9980	0.046	0.141	4.924
Ba	0.9997	0.086	0.260	2.250
Toxic elements (ng/g)				
Pb	0.9955	0.115	0.348	2.112
As	0.9967	0.037	0.112	4.453
Cd	0.9985	0.046	0.140	4.980

[1)]Limit of Detection, [2)]Limit of Quantification, [3)]Coefficient of Variation

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. CRM을 통한 분석법의 소급성 확인

미국국립표준기술연구소에서 구입한 Spinach leaves(NIST-1570a)를 이용하여 본 연구와 동일한 분석방법으로 무기성분 분석법의 소급성을 확인하였다. ICP-OES를 이용한 다량원소의 정확도는 95.7~101.9%이었으며, ICP-MS를 이용하여 측정한 미량원소의 정확도는 92.0~98.5%로 나타났다. 본 연구 측정한 결과 CODEX 기준인 90~100%와 AOAC의 기준인 70~125%로 확인되어 분석법에 대한 신뢰성을 확보하였다(Table 7).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Validation results of analytical method using certified reference material(NIST-1570a) by ICP-OES and ICP-MS

Element	Certified value (μg/g)	Observed value (μg/g)	Recovery (%)
Macro element			
Ca	15,260 ± 66[1)]	14,820 ± 38	97.1
K	29,000 ± 260	27,752 ± 114	95.7
Mg	8,910 ± 90	9,081 ± 10	101.9
Na	18,210 ± 230	17,790 ± 80	97.7
Zn	82.312 ± 3.901	80.246 ± 0.581	97.8
Trace elements			
V	0.570 ± 0.031	0.556 ± 0.047	96.5
Co	0.392 ± 0.051	0.387 ± 0.072	97.4
Mn	76.012 ± 1.212	72.881 ± 0.087	95.8
Ni	2.141 ± 0.058	2.017 ± 0.031	93.9
Cu	12.274 ± 0.687	11.497 ± 0.251	93.4
Se	0.117 ± 0.0009	0.115 ± 0.003	98.3
Toxic elements			
Cd	2.896 ± 0.078	2.669 ± 0.057	92.0
As	0.068 ± 0.012	0.067 ± 0.013	98.5

[1)] Mean ± Standard deivation (n=3)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 다량원소 분석 결과

ICP-OES를 이용하여 Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S 및 Zn을 분석하였고, 분석결과를 Fig 2, Table 8에 제시하였다.

미선나무의 다량원소 분석결과 주요 원소로 Ca, K이었으며, Ca > K > Zn > P > Mg > S > Fe > Na 순으로 확인되었다. 미선나무 잎의 Ca의 평균함량은 551.456 mg/kg로 확인되었으며, 칼슘은 체내 뼈 건강 역할을 하며, 칼슘의 섭취량은 체내 콜레스테롤과 상관관계가 있다고 보고되고 있다(Jacqmain et al., 2003). 2015년 보건복지부 기준 칼슘의 평균필요량은 성인 20대 남성 기준인 650 mg/day이며, 미선나무의 Ca 함량은 20대 여성의 기준인 530 mg/day를 충족시키는 양으로 확인되었다. Kwon 등(2014)의 연구결과 미선나무 잎의 Ca, Fe, Na 및 Mg의 함량은 166.17, 3.61, 1.59, 37.72 mg/100g로 보고되고 있으며, 본 연구의 분석 결과와 선행연구비교시 높은 함량을 확인할 수 있었다.

다량원소에서 두 번째로 높은 K의 평균 함량은 348.173 mg/kg로 확인되었으며, 신체 총량의 98% 세포에 존재하는 미량원소로 세포의 삼투압 작용, 체내 수분 평형 역할을 한다고 알려졌다(Sawka, 2005). Choi 등(2020)연구에서 국내 자생식물인 현사시나무(*Populus Tomentiglandulosa*)추출물의 다량 무기질 분석결과 K 907.5 mg/100g으로 가장 높은 함량을 보였으며 본 연구의 미선나무 K의 함량과 3.8배 정도 차이를 보였다. 또한, 같은 쌍떡잎식물인 순비기나무(*Vitex rotundifolia*)줄기에서 K의 함량은 1,469.20 mg%, Ca는 496.60 mg%, Mg는 344.20 mg%로 보고되고 있으며, 이는 미선나무와 다른 결과를 확인할 수 있었다(Lee et al., 2008).

이외의 다량 무기질 성분인 Zn, Fe, Mg, Na, P 및 S의 경우 200 mg/kg 미만의 함량으로 확인되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

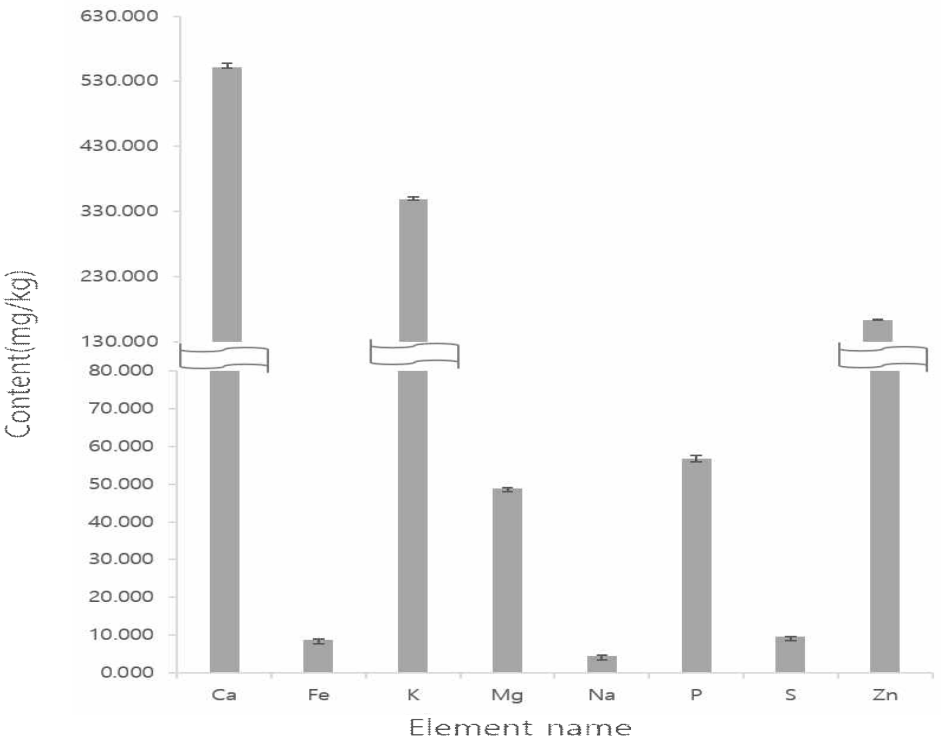


Fig 2. Comparison of macro elements content in *A. distichum* Nakai.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 미량원소 분석 결과

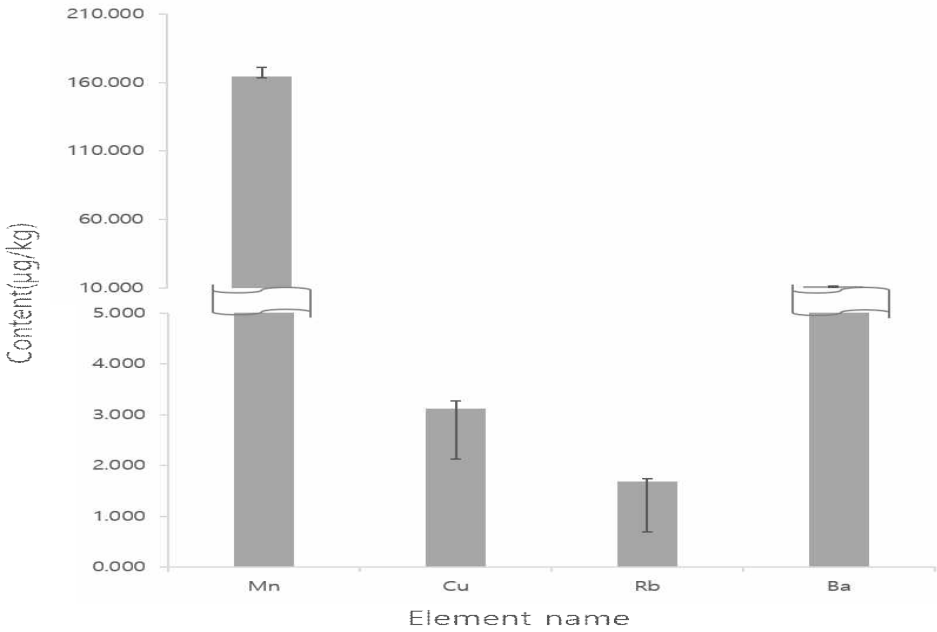
미량원소는 Li, Be, V, Cr, Co, Mn, Ni, Cu, Ga, Se, Rb, Ag, Cs, Ba, Pb, As 및 Cd를 ICP-MS를 이용하여 분석하였으며 Fig 3, Table 8에 제시하였다. 미선나무의 미량원소 분석결과 함량 순으로 Mn > Ba > Cu > Rb > Ni > Cr > Li > V > Se > Co > Be > Cs > Ag로 확인되었다.

미선나무의 주요원소로 Mn과 Ba는 각각 164.379, 11.505 μg/kg의 함량으로 확인되었다. Mn은 엽록소 형성과 인체 연골조직과 뼈의 형성에 기여하며 마그네슘, 철 및 칼슘과의 길항작용을 한다(Nho, 2018). 또한, 식물 체내에서 유해활성산소를 없애는 superoxide dismutase 효소의 보조인자 역할을 한다고 알려졌다.

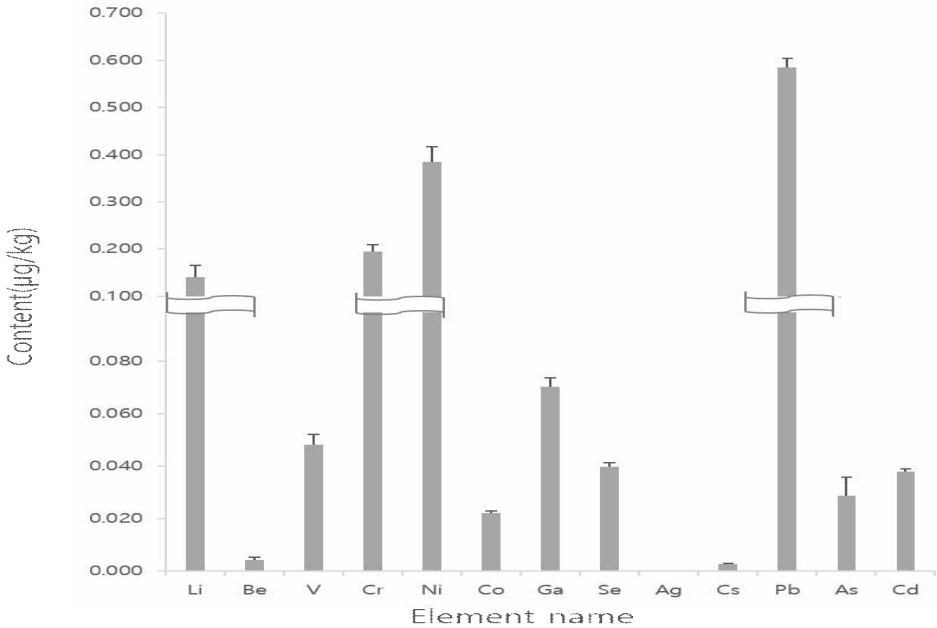
Lee 등(2007)의 연구에서 세계 10종 중 국내 1종만 자생하는 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata* Bureau) 잎의 무기질 함량 분석결과 Mn 1.99 mg/g, Ba 0.02 mg/g 및 Cu 0.01 mg/g으로 확인되었으며, 꾸지뽕나무와 미선나무의 미량원소와 비교 시 미선나무의 미량원소는 낮은 함유량을 나타냈다. 또한, 자귀나무(*Albizzia julibrissin Duraz*)잎의 결과 Mn 2.82 mg%, Cu 0.76 mg%로 보고되고 있으며(Lee et al., 2010), 미선나무의 미량원소 결과와 차이를 확인하였다.

Ag의 경우 미선나무에서 불검출 되었으며, Mn을 제외한 Li, Be, V, Cr, Co, Ni, Cu, Ga, Se, Rb, Cs 및 Ba은 100 μg/kg 미만의 농도로 확인되었다. 독성원소 3종 분석결과는 Pb(0.058 μg/kg), Cd(0.038 μg/kg) 및 As(0.029 μg/kg)이었으며, 중금속 검출량은 모두 안전수준으로 확인되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



(a)



(b)

Fig 3. Comparison of major trace (a), minor trace and toxic (b) elements content in *A. distichum* Nakai.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Macro and trace and toxic elements content in *A. distichum* Nakai

Elements	*Abeliophyllum distichum* Nakai
Macro elements (mg/kg)	
Ca	551.456 ± 5.599[1)]
Fe	8.764 ± 0.243
K	348.173 ± 4.384
Mg	48.931 ± 0.076
Na	4.531 ± 0.108
P	56.839 ± 0.839
S	9.512 ± 0.052
Zn	163.509 ± 0.314
Trace elements (μg/kg)	
Li	0.140 ± 0.026
Be	0.004 ± 0.001
V	0.048 ± 0.004
Cr	0.195 ± 0.014
Co	0.022 ± 0.001
Mn	164.379 ± 6.507
Ni	0.385 ± 0.032
Cu	3.126 ± 0.151
Ga	0.070 ± 0.004
Se	0.040 ± 0.001
Rb	1.687 ± 0.048
Ag	ND[2)]
Cs	0.003 ± 0.000
Ba	11.505 ± 0.203
Toxic elements (μg/kg)	
Pb	0.585 ± 0.019
As	0.029 ± 0.007
Cd	0.038 ± 0.001

[1)]Mean ± Standard deviation (n=3)

[2)]ND=Not detected

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 2 절 비휘발성 유기성분 분석 결과

1. 미선나무의 flavonoid 분석 결과

가. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 분석 결과

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석하기 위하여 분석 조건과 같은 방법으로 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/kg 농도의 gallic acid와 rutin을 이용하여 분석하였으며 두 화합물의 직선성은 모두 0.999이상으로 나타났다(Fig 4). 미선나무 잎의 추출 용매별 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 결과를 Table 9, Fig 5과 같이 나타냈다.

미선나무 잎의 총 폴리페놀 함량은 50% methanol 추출물의 경우 64.961±0.961 mg GAE/g로 나타났으며, 50% ethanol 74.192 ± 0.693, 100% methanol 75.282 ± 1.059, 100% ethanol 53.423 ± 0.192 mg GAE/g으로 확인되었다. 50% ethanol 및 100% methanol 사용 시 유의적으로 비슷한 함량을 나타냈음을 확인할 수 있었다. 총 플라보노이드 함량은 50% methanol 및 50% ethanol 추출 시 26.982 ± 0.618, 27.220 ± 0.916 mg GAE/g로 함량의 차이는 크게 차이나지 않았지만, 100% methanol 추출과 100% ethanol 추출에서 53.232 ± 0.994, 57.280 ± 2.152 mg RE/g으로 이전 용매와 두 배 정도의 높은 함량으로 추출됨을 확인할 수 있었다.

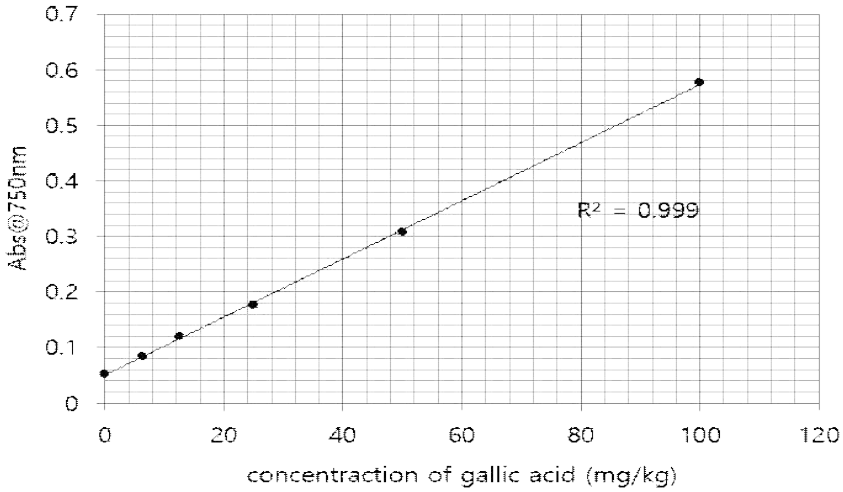
Kwon 등(2014)의 연구결과 미선나무의 잎과 줄기의 70% methanol 추출 시 총 폴리페놀은 각각 50.64 ± 0.16 mg/g, 13.53 ± 0.22 mg/g이었으며, 총 플라보노이드는 96.47 ± 0.15 mg/g, 18.53 ± 0.82 mg/g로 확인되었다. 본 연구의 추출용매 별 총 폴리페놀 함량과 비교 시 다소 높은 함량으로 확인되었으나, 총 플라보노이드 같은 경우 낮은 함량의 결과를 보였다. 또한, Kim 등(2015)의 연구에서 미선나무와 같은 물푸레나무과인 물푸레나무(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)의 용매별 총 폴리페놀 함량 비교 시 껍질의 methanol 추출물에서 6.2 mg/g으로 확인되었으며, Lee 등(2010)의 연구에서 같은 *Oleaceae*속인 이팝나무(*Chionanthus retusus*) 꽃을 사용한

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

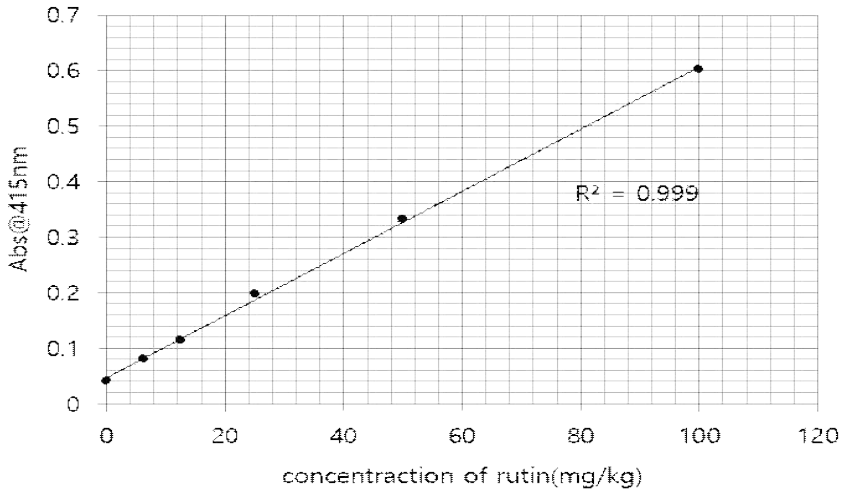
ethanol추출물에서 총 폴리페놀 36.02 mg/g, 총 플라보노이드 33.41 mg/g로 보고되고 있으며, 미선나무에 함유된 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드가 비교적 높음을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 추출 용매별 미선나무 잎의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량을 확인하였으며, 50% ethanol 추출 시 가장 높은 총 폴리페놀 함량과 100% ethanol 추출 시 가장 높은 총 플라보노이드 함량을 확인할 수 있었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



(a)



(b)

Fig 4. Standard curve of total polyphenol compound content(a : gallic acid) and total flavonoid content(b : rutin).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. Total polyphenol and total flavonoid amount of different extract in *A. distichum* Nakai

Solvent	Total polyphenol compound (mg GAE[1)]/g)	Total flavonoid (mg RE[2)]/g)
50% Methanol	64.961 ± 0.961[3)]	26.982 ± 0.618
50% Ethanol	74.192 ± 0.693	27.220 ± 0.916
100% Methanol	75.282 ± 1.059	53.232 ± 0.994
100% Ethanol	53.423 ± 0.192	57.280 ± 2.152

[1)]Gallic acid equivalent

[2)]Rutin equivalent

[3)]Mean ± Standard deviation (n=3)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

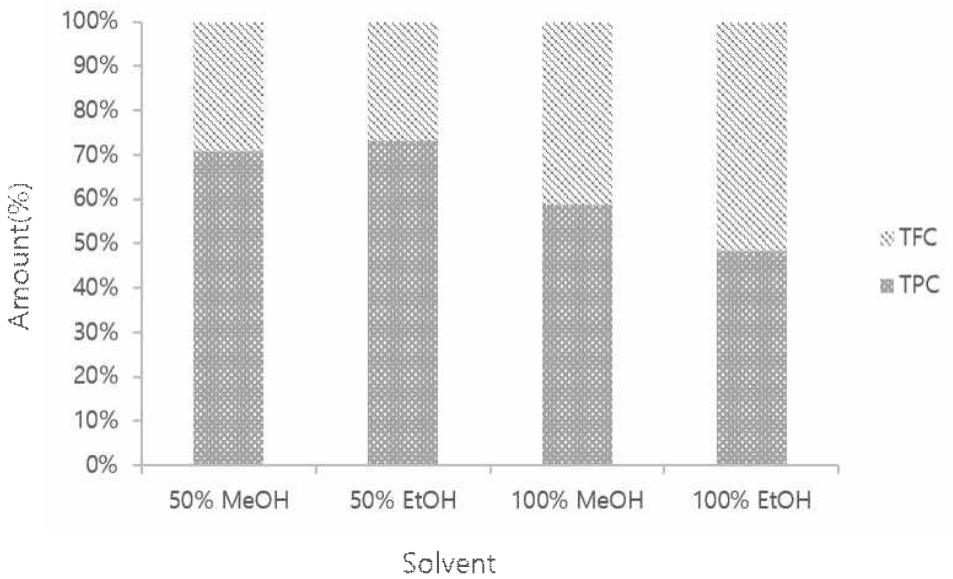


Fig 5. Total polyphenol and total flavonoid content of different solvent condition in *A. distichum* Naki.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. HPLC를 이용한 미선나무의 flavonoid 성분 분석 결과

1) 미선나무의 flavonoid 성분 분석

HPLC를 이용한 미선나무의 flavonoid 분석 시 rutin hydrate quercetin-3-glucoside의 유무를 확인하였다. 분석결과는 표준품의 UV spectrum과 RT의 일치로 화합물을 확인하였다. Mix standard의 RT는 rutin hydrate 12.748 min, quercetin-3-glucoside 14.481 min이었으며(Fig 6), 제조한 검량선의 직선성은 모두 0.9998 이상으로 우수한 결과를 보여주었다(Table 10, Fig 7)

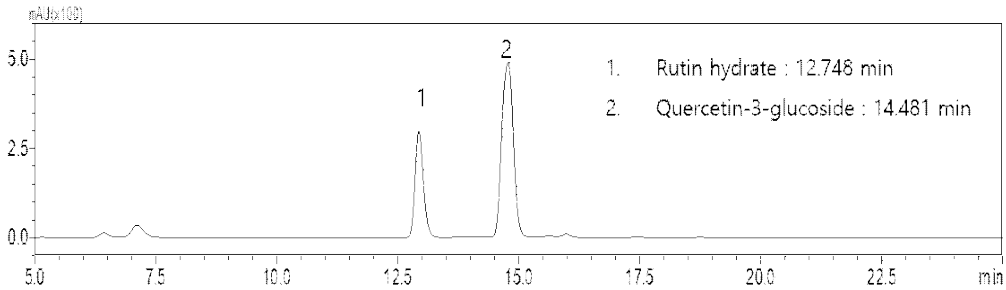
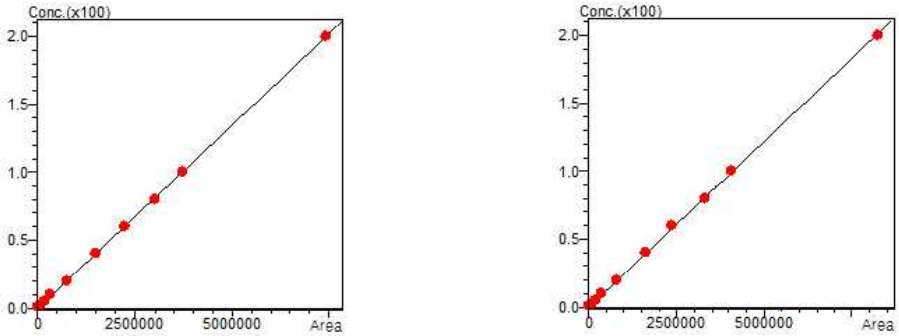


Fig 6. Chromatogram of flavonoid standard.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 10. Results of linear range, correlation coefficient for determining flavonoid by HPLC method

	λ (nm)	Linear range (mg/L)	Equation	Correlation coefficient
Rutin hydrate	370	0.5~200	$y=2.69\times10^{-5}x$	0.9999
Quercetin-3-glucoside	330	0.5~200	$y=2.44\times10^{-5}x$	0.9998



(a) (b)

Fig 7. Standard curve of flavonoid rutin hydrate(a) and quercetin-3-glucoside(b).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2) 추출 용매 선정 결과

미선나무의 flavonoid 성분 분석을 위하여 최적의 추출 용매를 선택하였다. 순차적 추출 결과 hexane 추출물에서 flavonoid 성분이 확인되지 않아 이후 분석에 극성 용매인 methanol, ethanol 및 water를 이용하여 추출하였다. Flavonoid류는 여러 종류의 배당체 형태를 가지고 있으므로 본 연구에서는 50, 100% 비율별 용매 추출을 통한 분석 효율을 확인하였다. 분석결과 100% methanol 용매 사용 시 100% ethanol보다 분석 효율이 더 높았으나, 비율별 용매추출을 통한 결과 50% ethanol 추출물에서 rutin hydrate, quercetin-3-glucoside가 가장 높은 효율을 나타냈다. 또한, water 용매를 이용한 미선나무 추출물에서는 분석대상이 미량이거나 확인되지 않았다. 본 실험에서 미선나무의 flavonoid 성분 분석을 위한 최적의 추출용매로 50% ethanol을 최종 선정하였다.

3) 추출 조건 선정 결과

효율적인 추출 조건을 성립하기 위하여 순차적 추출, 환류 추출, 초음파 추출을 통한 flavonoid 추출 효율을 비교하였다. 순차적 추출방법을 이용한 methanol 추출물에서 rutin hydrate, quercetin-3-glucoside 함량은 각각 5.296 ± 0.144, 1.317 ± 0.240 mg/g로 확인되었으며, 오랜 시간이 소요되나 함량은 추출시간보다 낮은 수준으로 확인되었다. 환류추출을 이용한 용매별 비율별 추출 시 50, 100% methanol 추출물에서 rutin hydrate의 함량은 6.248 ± 0.155, 5.370 ± 0.116 mg/g이었으며, quercetin-3-glucoside의 함량은 2.648 ± 0.263, 1.404 ± 0.436 mg/g로 확인되었다. 50% ethanol 추출물의 경우 rutin hydrate 11.511 ± 1.143 mg/g, quercetin-3-glucoside 2.939 ± 0.244 mg/g이었으며, 100% ethanol 추출 시 3.231 ± 0.220, 1.272 ± 0.251 mg/g로 확인되었다. 환류추출과 초음파 추출은 유사한 결과값을 나타내었으며, 용매에 따른 추출 효과를 확인하여 flavonoid 분석 시 50% ethanol를 이용한 환류추출을 최적의 추출조건으로 선정하였다(Table 11).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 11. Result of the analysis of the flavonoid amount in *A. distichum* Nakai

(mg/g)

Extraction	Condition		Rutin hydrate	Quercetin-3-glucoside
	Solvent	Temp., Run Time		
Step soxhlet	Hexane	75℃, 8h	ND[1)]	ND
	MeOH	75℃, 8h	5.296 ± 0.144[2)]	1.317 ± 0.240
Reflux	50% MeOH	75℃, 2h	6.248 ± 0.155	2.648 ± 0.263
	100% MeOH	75℃, 2h	5.370 ± 0.116	1.404 ± 0.436
	50% EtOH	75℃, 2h	11.511 ± 1.143	2.939 ± 0.244
	100% EtOH	75℃, 2h	3.231 ± 0.220	1.272 ± 0.251
	H_2O	100℃, 2h	ND	ND
Ultrasonication	MeOH	Ambient, 30 min	8.183 ± 0.308	1.438 ± 0.296
	EtOH	Ambient, 30 min	6.060 ± 0.301	1.303 ± 0.292
	H_2O	Ambient, 30 min	ND	ND

[1)]ND=Not detected

[2)]Mean ± Standard deviation (n=3)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 미선나무의 지표성분 분석 결과

가. 용매별 screening을 위한 HPLC 분석 결과

1) Screening 추출 용매 선정

극성도별 용매추출 시 *n*-hexane, ethyl acetate 및 methanol 추출물을 고성능 액체크로마토그래피를 이용해 분석하였으며, screening test결과를 통하여 적합한 용매를 분석 추출용매로 선택하였다. 분석파장은 190~800 nm 범위로 지정하였으며, 203, 230, 254, 280 및 330 nm 파장에서 비교 분석을 실시하였다(Fig 8).

비극성 성질인 *n*-hexane 추출물의 203 nm 파장에서 하나의 큰 peak가 확인되었으며 230, 254 및 330 nm의 파장별 차이는 확인되지 않았다. 중간 극성인 ethyl acetate의 파장별 비교 시 *n*-hexane 추출물에 비하여 많은 peak을 확인할 수 있었으며, methanol 추출물의 파장별 비교 시 *n*-hexane, ethyl acetate보다 높은 분리도와 다수의 peak가 확인되었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

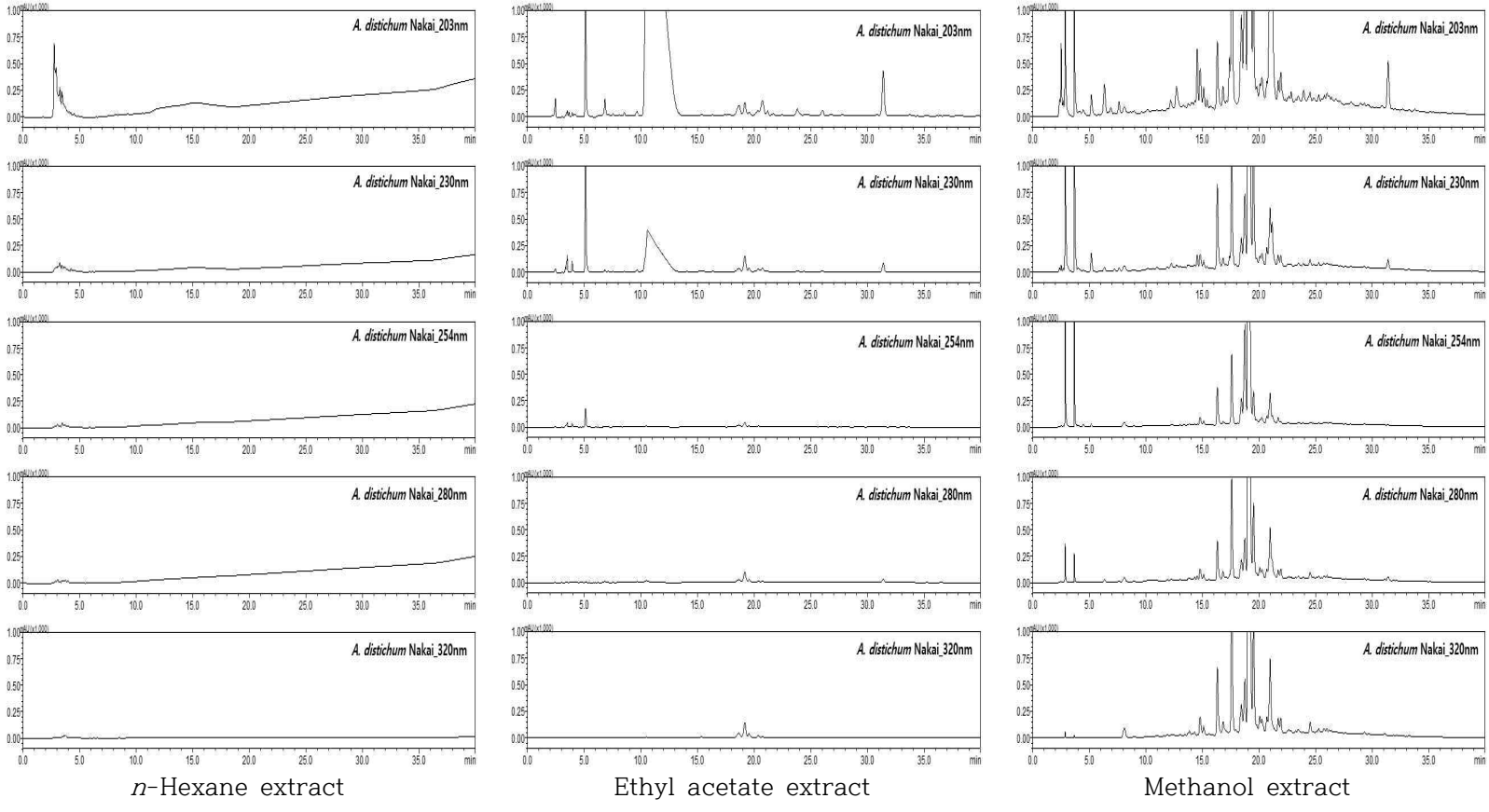


Fig 8. HPLC chromatograms of step down extracts according to wavelength.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2) HPLC screening 결과

미선나무의 성분과 지표물질 full-screening을 실시하기 위하여 HPLC-PDA를 이용하여 soxhlet법을 통한 ethyl acetate, methanol 추출물을 190~800 nm 파장에서 분석하였다. HPLC 기기조건은 제2장, 제3절 2. 나의 조건으로 분석하였다. PDA 조건은 에너지가 큰 203 nm로 설정하였고, hexane 추출물에서는 특정 peak를 확인할 수 없었다. Ethyl acetate와 methanol추출물 비교 시 공통된 unknown peak가 확인하였으며, unknown peak는 RT 19.12 min, UV spectrum λ_{max} 330 nm로 두 추출물에서 동일한 peak임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 unknown peak를 미선나무의 지표성분으로 추정하여 지표물질 탐색에 참고하였다(Fig 9).

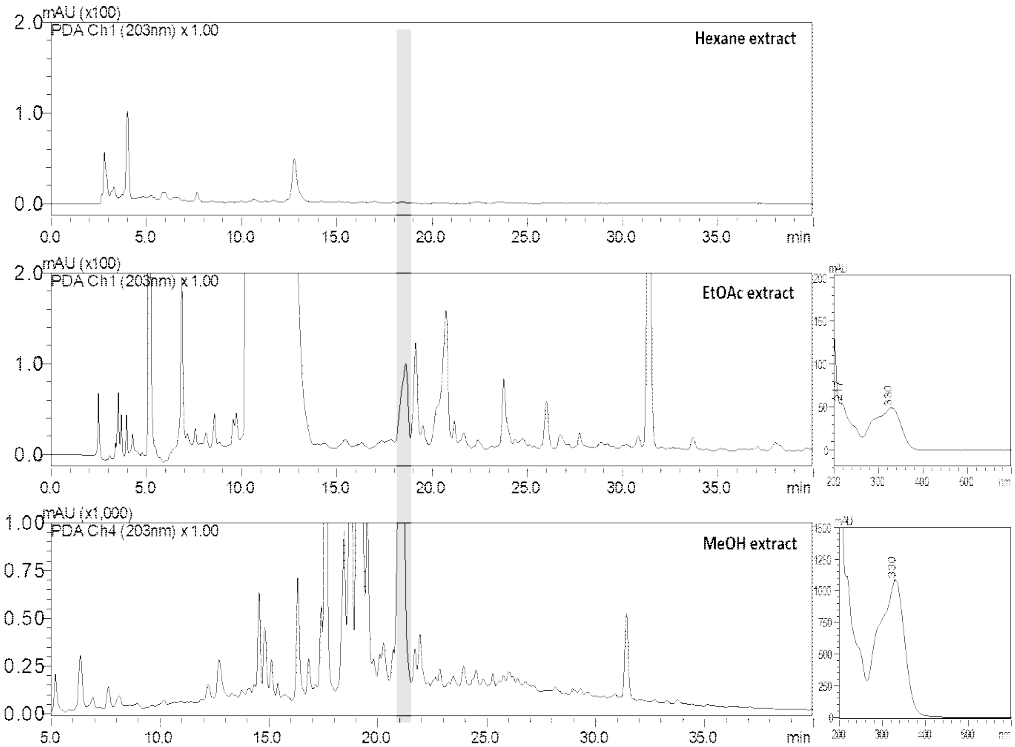


Fig 9. HPLC chromatograms & UV spectrums of the expected indicator in ethyl acetate and methanol extract.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 지표성분 선정 및 추출 조건 성립

1) 지표성분 선정 및 정성

용매별 극성도 추출물을 full-screening test를 통해 확인된 unknown peak을 중점으로 성분을 추정하였다. 기존 선행연구에서 같은 *oleaceae*속과 식물과 쌍떡잎식물인 *magnoliaceae*속, *loganiaceae* 속 등에서 verbascoside가 발견된다고 보고되고있다(He et al., 2011). 본 screening결과에서 발견한 unknown peak와 verbascoside의 표준물질 비교 시 동일한 RT와 최대 흡수 파장 330 nm로 동일한 성분임을 확인하여 미선나무의 지표성분으로 verbascoside를 선정하였다(Fig 10). Verbascoside는 acteoside로 불리며, caffeoly phenylethanoid glucoside류로 주로 아시아의 쌍떡잎식물에서 확인되며(He et al., 2011), 일반적으로 식물체에 소량 존재한다고 알려졌다(Imakura et al., 1985; Jang et al., 2018). Oh 등(2003)의 연구에서 ACE 억제 활성능력 등이 있다고 확인되었으며 verbascoside에 대한 부작용이 적다고 보고되고 있다.

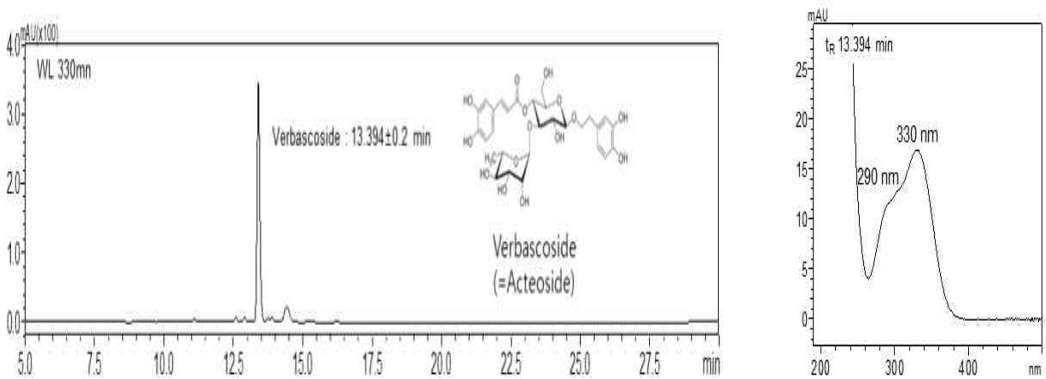


Fig 10. Chromatogram and UV spectrum of verbascoside.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2) 추출 용매 선정 결과

미선나무의 지표성분 확립을 위한 추출용매는 순차적 추출 시 hexane, ethyl acetate, methanol를 이용하였다. 환류 추출에 사용된 용매는 methanol, ethanol 및 water이었으며, 초음파 추출 시 methanol과 ethanol을 사용하여 각각 50, 100% 비율별 추출 효율을 확인하였다. 천연물 추출 시 ethanol용매가 주로 사용되고 있으며, 본 연구 결과 ethanol 용매가 methanol보다 높은 추출 효율을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 미선나무 지표성분 분석 시 100% ethanol를 최종 추출용매로 선택하였다.

3) 추출 조건 선정 결과

본 연구에서 미선나무의 지표성분의 효율을 최적화하기 위해 순차적 추출, 환류 추출 및 초음파 추출방법으로 분석하였다(Table 12). HPLC 기기조건은 제 2장, 제 3절, 다., (2), (다)의 방법으로 진행하였다. 순차적 추출방법을 이용한 *n*-hexane 추출물에서 지표성분이 발견되지 않았으나, ethyl acetate 추출물에서 20.860 ± 0.501 mg/100 mL, methanol 추출물에서 725.267 ± 1.576 mg/100 mL로 확인되었다. 순차적 추출을 통한 극성용매 추출 시 verbascoside 성분이 분리됨을 확인할 수 있었나, 순차적 추출은 다른 추출방법에 비하여 오랜 시간이 소요되나 추출 효율은 추출시간에 비하여 비교적 낮은 수준으로 확인되었다. 환류 추출 시 극성용매인 methanol, ethanol 및 water 용매를 이용하였다. 환류 추출 결과 순서대로 847.052 ± 1.050, 921.601 ± 1.279, 70.772 ± 0.645 mg/100 mL로 확인되었으며(Fig 11), ethanol 추출물에서 비교적 높은 verbascoside mg/100 mL 함량을 확인할 수 있었다. 초음파 추출을 이용한 방법으로 분석용매의 50, 100% 비율과 온도 조건에 따른 verbascoside의 함량을 확인하였다. 용매 비교 결과 상온에서의 50% methanol, 50% ethanol 추출 함량 비교 시 150.436 ± 0.919, 248.375 ± 0.936 mg/100 mL이었으나 60℃ 온도 조건에서 337.09 ± 0.045, 422.160 ± 0.301 mg/100 mL이었다. 100% methanol, 100% ethanol 추출물은 상온에서 236.318 ± 0.446 mg/100mL, 332.301 ± 0.246 mg/100mL로 확인되었으며, 60℃에서 402.259 ± 0.537 mg/100mL, 470.022 ± 0.576 mg/100mL로 보다 높은

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

온도에서 추출 효율이 향상됨을 확인할 수 있었다. 환류 추출과 초음파 추출의 분석 효율 비교 시 추출함량에 대하여 결과는 유의하였으나, 환류 추출 시 시간과 전처리과정이 다소 복잡하였다. 또한, 초음파 추출은 에너지 충격으로 압력효과를 유도하여 높은 추출 효율을 높여 주며, 추출온도에 따라 추출량의 증가를 확인할 수 있으며 이에 천연물 분석 시 효과적인 방법으로 판단되었다(Chung et al., 2000).이에 본 연구에서 짧은 분석 시간과 간단한 추출 방법을 이용한 초음파 추출을 최적의 추출조건으로 선택하였다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 12. Comparison of verbascoside amount in *A. distichum* Nakai

Extraction	Condition		Verbascoside
	Solvent	Temp., Run Time	mg/100 mL extract
Step soxhlet	Hexane	75℃, 8h	ND[1)]
	EtOAc	75℃, 8h	20.860 ± 0.501[2)]
	MeOH	75℃, 8h	725.267 ± 1.576
Reflux	MeOH	75℃, 2h	847.052 ± 1.050
	EtOH	75℃, 2h	921.601 ± 1.279
	H_2O	100℃, 2h	70.772 ± 0.645
Ultrasonication	50% MeOH	Ambient, 30 min	150.436 ± 0.919
		60℃, 30 min	337.094 ± 0.045
	50% EtOH	Ambient, 30 min	248.375 ± 0.936
		60℃, 30 min	422.160 ± 0.301
	100% MeOH	Ambient, 30 min	236.318 ± 0.446
		60℃, 30 min	402.259 ± 0.537
	100% EtOH	Ambient, 30 min	332.301 ± 0.246
		60℃, 30 min	470.022 ± 0.576

[1)]ND=Not detected

[2)]Mean ± Standard deviation(n=3)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

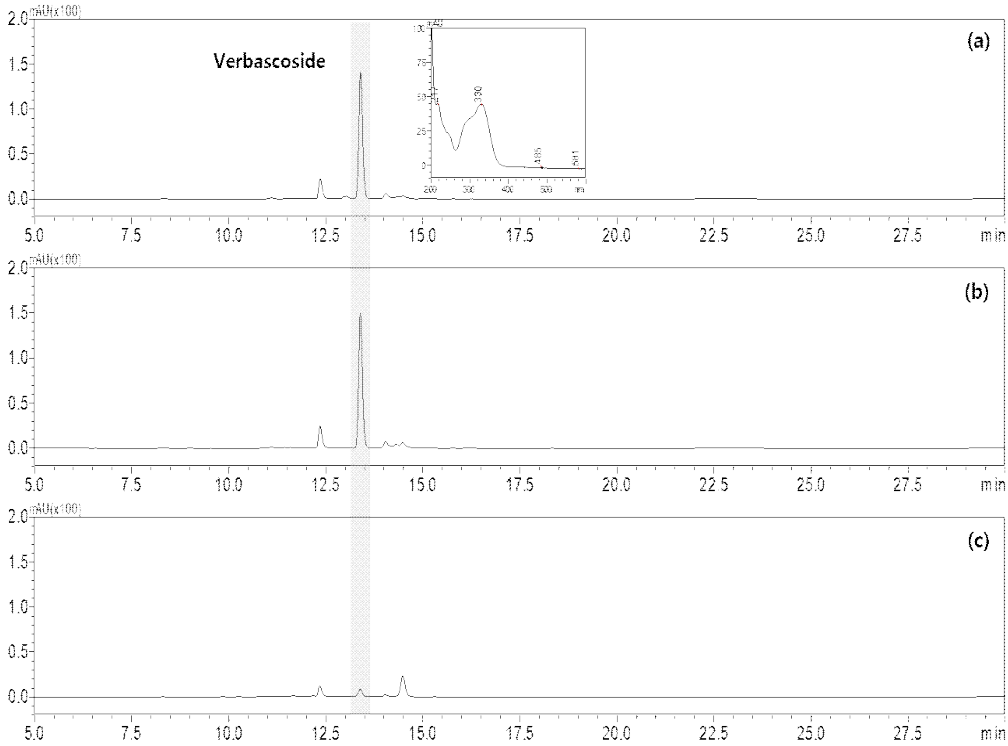


Fig 11. HPLC chromatograms and UV spectrums of methanol (a), ethanol (b) and water (c) in *A. distichum* Nakai by reflux extraction.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 지표성분 분석법의 유효성 검증

본 연구에서 미선나무의 지표성분 분석법의 신뢰도 및 정확성을 확보하기 위하여 유효성 검증을 실시하였다. 직성선, 특이성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정확성으로 진행하였으며, 본 실험법의 검증하였다.

미선나무의 지표성분인 verbascoside의 직선성을 확인하기 위하여 10, 20, 50, 100 및 200 mg/kg으로 표준품을 제조 후 검출된 peak area값으로 검량선을 작성하였다. 검량선의 직선성(Correlation coefficient)은 0.9970로 우수한 직선성을 확인할 수 있었다. 특이성으로는 verbascoside의 RT는 13.394분 이였으며, 미선나무 극성도별 추출물의 unknown peak와 표준품의 UV spcetrum은 330nm으로 동일함을 확인하였다(Table 13, Fig 12). 분석법의 검출한계(LOD)의 결과는 0.273 mg/kg, 정량한계(LOQ)는 0.819 mg/kg 으로 확인되었으며, 외부 표준물질 첨가법을 이용한 정확성 측정결과 98.2로 측정되었다. 상대표준편차로 확인한 정밀성 결과 2.74%로 확인되었다. 유효성 검증을 통하여 본 분석법은 AOAC에서 제시한 기준에 적합한 결과 값을 얻었다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

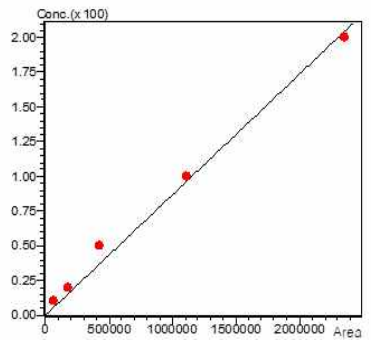
Table 13. Validation result of analysis method for *A. distichum* Nakai

	λ (nm)	Equation	Correlation coefficient	LOD[1)] (mg/kg)	LOQ[2)] (mg/kg)	Accuracy	RSD[3)] (%)
Verbascoside	330	$y=8.69\times10^{-5}x$	0.9970	0.273	0.819	98.2	2.74

[1)]LOD(Limit of Detection)

[2)]LOQ(Limit of Quantification)

[3)]RSD(Relative standard deviation)



Verbascoside

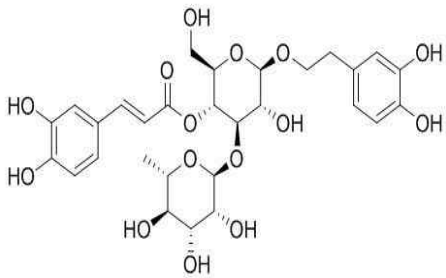
Fig 12. Standard curve of verbascoside

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 지표성분 정량 결과

미선나무의 verbascoside의 정량을 위해 표준품을 농도별로 제조 후 검량선을 작성하였다. 정량을 위하여 분석시료는 3회 반복 측정하여 산출하였다. 최종 추출용매인 100% ethanol 추출물에서 82.958 ± 0.703 mg/g로 확인되었다(Table 14). Jang & Park (2018)의 건조방식에 따른 미선나무 잎 추출물의 생잎(13.2 mg/g) 및 건조 잎(9.5mg/g)의 verbascoside함량 비교 시 본 연구에서 82.958 ± 0.703 mg/g로 높은 결과를 확인하였다. 또한, 미선나무와 같은 *Oleaceae*속인 올리브 잎을 이용한 초임계 추출 시 verbascoside 함량은 43.6 mg/kg로 확인되었으며(Bastante et al., 2018), Xie 등(2019)의 연구에서 *logniaceae*속에 속하는 *Buddleja officinalis*잎의 verbascoside 함량은 20-35 mg/g로 보고되고 있다. 이에 미선나무에 존재하는 verbascoside 성분이 다량 함유됨을 확인할 수 있었다.

연구결과를 통하여 최종 미선나무의 지표성분으로 verbascoside를 선정하였으며 이에 미선나무의 verbascoside 성분을 이용한 건강기능식품 개발과 식품산업에서 발전 전망이 있다고 판단된다.



Verbascoside

Fig 13. Chemical structure of verbascoside

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 14. Amount verbascoside components in *A. distichum* Nakai

(mg/g)

Extraction	Condition		Verbascoside Contents (mg/kg)
	Solvent	Temp., Run Time	
Ultrasonication	100% EtOH	60℃, 30 min	82.958 ± 0.703[1)]

[1)]Mean±Standard deviation (n=3)

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 4장 요 약

본 연구는 국내 유일 자생 식물인 미선나무의 무기성분, flavonoid 성분 및 지표성분 분석법 개발을 위하여 무기성분 분석 시 ICP-OES 및 ICP-MS, 비휘발성 유기성분 분석 시 HPLC-PDA를 이용하였다.

미선나무의 다량 및 미량원소 분석을 위한 전처리 기기로 top wave microwave system을 이용하였으며, 다량원소 8종, 미량원소 14건, 독성원소 3건을 기반으로 데이터를 산출하였다. 분석법의 정확성을 확인하기 위하여 Spinach leaves(NIST-1570a)를 분석하여 분석법의 신뢰성을 확보하였다. 미선나무의 다량원소 분석결과 Ca 및 K의 함량은 551.456, 348.173 mg/kg로 높은 함량이 확인되었으며, 미량원소 분석결과 Mn 및 Ba의 함량이 164.379, 11.505 ug/kg로 미량원소 중 높은 함량을 차지하였다. 또한, 미선나무의 독성원소 4종에 대한 결과 값은 모두 안전한 수준으로 검출되었다.

비휘발성 성분분석을 위하여 UV-spctrophotometer를 이용한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드분석을 실시하였으며, 50% methanol, 50% ethanol, 100% methanol 및 100% ethanol 용매별 추출물을 분석하였다. 분석결과 50% ethanol 추출물에서 74.192±0.693 mg GAE/g로 가장 높은 함량을 총 폴리페놀 결과 100% ethanol 추출물에서 57.280±2.152 mg RE/g의 함량을 확인하였다.

또한, HPLC-PDA기기를 사용하여 soxhlet장치를 이용한 비극성, 중간극성, 극성용매를 순차적 추출하였다. 이후 screening test 용매로 이용하였으며, 미선나무의 ethyl acetate, methanol 추출물에서 공통으로 unknown peak을 확인하였다. 참고문헌과 선행연구 결과 unknown peak를 verbascoside로 추정하였으며, 표준품을 구매하여 UV spectrum과 retention time 비교 후 같은 물질임을 확인하였다.

미선나무의 flavonoid 함량을 분석하기 위하여 rutin hydrate, quercetin-3-glucoside를 분석하였다. 다양한 추출용매와 순차적 추출, 환류 추출, 초음파 추출을 통하여 미선나무의 flavonoid 성분 및 지표성분을 분석하였다. Flavonoid 분석결과 최적의 추출방법인 50% ethanol를 이용한 환류 추출 시 rutin hydrate 11.511 mg/g, quercetin-3-glucoside 2.939 mg/g로 확인되었다. 미선나무의 지표성분 분석 시 100%

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ethanol 용매를 사용할 시 methanol 추출보다 높은 verbascoside 함량을 확인할 수 있었으며, 상온의 온도조건보다 60℃조건의 초음파 추출에서 효율이 증대하였다. 최적의 추출조건으로 분석 시 verbascoside의 함량은 470.022 mg/100 mL이었으며, 정량 분석 결과 82.958±0.703으로 확인할 수 있었다. 또한, 분석법의 신뢰도 확보를 위한 유효성 검증을 실시하였으며 모두 우수한 결과를 보였다.

본 연구는 국내 유일 자생식물인 미선나무의 다량 및 미량 원소 데이터 구축 및 flavonoid 성분 및 지표성분인 verbascoside의 HPLC 분석법을 개발하였으며, 2019년 식품원료로 지정된 미선나무 추출물을 이용한 건강기능식품 및 식품에 포괄적으로 사용할 수 있는 과학적 근거자료로 활용될 수 있을 것이다.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참 고 문 헌

농림축산식품부. (2015). 미선나무의 민간전래 효과를 활용한 고기능성 피부미용 및 면역강화 소재 기술 개발보고서. 11-1543000-00858-01

보건복지부. (2015). 한국인 영양소섭취기준. 11-1352000-001546-14, 한국영양학회

법제처. (2016). 건강기능식품에 관한 법률, 법률 제 14476호

박재호. (2016). 미선나무의 민간전래 효과를 활용한 고기능성 피부미용 및 면역강화 소재 기술 개발 보고서

식품의약품안전처. (2016). 미선나무 잎 추출물(분말)의 한시적 인정(제2016-10호)

식품의약품안전처. (2017). 2016 건강기능식품 국내 시장 규모 동향 분석

식품의약품안전평가원. (2018). 개별인정형 기능성 원료 인정관련 개정사항

식품의약품안전처. (2019). 미선나무 줄기 추출물 한시적 기준 규격 결과보고서

식품의약품안전처. (2020). 한 눈에 보는 영양표시 가이드라인. 11-147000-000372-01

진성규. (2019). 국내(외) 약용식물의 및 의약 제품 동향. BRIC View 2019-T30

칸타 월드패널(KANTAR). (2015). 국내 건강기능식품 시장의 변화

통합식품안전정보망. (2018). 2018년 건강기능식품 매출액 기준

한국건강기능식품협회. (2020). 국내 건강기능식품 시장 규모

한국보건산업진흥원. (2016). 국가별 건강에 대한 소비자 관심도

Bastante, C. C., Cardoso, L. C., Ponce, M. F., Serrano, C. M., & de la Ossa-Fernandez, E. M. (2018). Characterization of olive leaf extract polyphenols loaded by supercritical solvent impregnation into PET/PP food packaging films. Journal of Supercritical Fluids, 140, 196-206.

Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., & Lattanzio, V. (2012). Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(7), 1822-1829.

Chae, S. K., Kang, G. S., Ma, S. J., Bang, K. W., Oh, M. W., & Oh, S. H. (2002).

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Standard food analysis. Paju: Jigu-moonwha sa, 381-382

Chang, S. J., Jeon, N. B., Park, J. W., Jang, T. W., Jeong, J, B., & Park, J. H. (2018). Antioxidant activities and anti-inflammatory effects of fresh and air-dried *Abliophyllum distichum* Naki leaves. Korean Journal of Food Preservation, 25(1), 27-35.

Choi, J. Y. (2018). Determination of adulteration in ginseng(*Panax ginseng*) products by multi-target profiling method.

Choi, J. Y. & Kim, K. S. (2018). Detection of adultrated food using multi-target profiling Method. Safe Food. 13(1), 19-25.

Choi, S. I., Hwang, S. J., Lee, O, H., & Kim, J. D. (2020). Antioxidant activity and component analysis of *Populus Tomentiglandulosa* extract. Korean Journal of Food Science and Technology , 52(2).

Chung, K. W., Kim, W. I., Hong, I. K .& Park, K. A. (2000). Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. Applied Chemistry, 4(2), 149-152

He, J., Hu, X. P., Zeng, Y., Li, Y., Wu, H. Q., Qiu, R. Z., Ma, W. J., Li, T., Li, C. Y., & He, Z. D. (2011). Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities. Journal of Asian Natural Products Research, 13(5), 449-464.

Hong, V., & Wrolstad, R. E. (1990). Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(3), 708-715.

Hong, Y. S., & Kim, K. S. (2017). Effect of cooking methods on elemental composition of pumpkin (Cucurbitaceae spp.). Korean Journal of Food and Nutrition Science, 46(10), 1195-1204.

Imakura. Y., Kobayash. S., & Mima. A. (1985). Bitter phenyl propanoid glycosides from *Campsis chinensis*. Phytochemistry, 24(1), 139-146.

Jacqmain, M., Doucet, E., Després, J. P., Bouchard, C., & Tremblay, A. (2003). Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. The

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

American Journal of Clinical Nutrition, 77(6), 1448-1452.

Jang, S. J., Jeonnam-bae., Park, J. W., Jang. T. W., Jung, J. B., & Park, J. H. (2018). Antioxidant activities and anti-inflammatory effects of fresh and air-dried *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves. Korean Journal of Food Preservation, 25(1), 27-35.

Jang, T. W., & Park, J. H. (2018). Antioxidant activity and inhibitory effects on oxidative DNA damage of callus from *Abeliophyllum distichum* Naki. Korean Journal of Plant, 31(3), 228-236.

Jang, T. W., & Park, J. H. (2017). Antioxidative Activities and Whitening Effects of Ethyl Acetate Fractions from The Immature Seeds of *Abeliophyllum distichum*. Korean Journal of Life Sciences, 27(5), 536-544.

Juntachote, T., & Berghofer, E. (2005). Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. Food Chemistry, 92(2), 193 - 202.

Kamal-Eldin, A., Görgen, S., Pettersson, J., & Lampi, A. M. (2000). Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: comparison of different chromatographic columns. Journal of Chromatography A, 881(1-2), 217-227.

Kim, B. R., Lee, J. S., Kim, D. Y., Kim, B. K., Lee, H. S., Lee, S. W., & Kwon, H. J., (2015). Antioxidant and Antibacterial Activities of the bark of *Fraxinus Rhynchophylla* Hance. Korean Journal of Aesthet Cosmetol, 13, 339-344.

Kim, N. Y., & Lee, H. Y. (2015). Enhancement of Anti-wrinkle Activities of *Abeliophyllum distichum* Nakai through Low Temperature Extraction Process. Korean Journal of Medicinal Crop Science, 23 (3), 231-236.

Kwon, S. B., Kang, H. J., Kim, M. J., Kim J. H., Shin, H. S., & Kim, K, S. (2014). Analysis on the components and safety evaluation of *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves and stems. Journal of Environmental Health Sciences, 40(3), 234-244.

Lee, J. S., Han, G. C., Han, G. P., & Kozukue, N. (2007). Total polyphenol content

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

and antioxidant activity of *Cudrania tricuspidata* Bureau. Journal of the East Asian Dietary Life Society, 17(5), 696-702.

Lee, T. B. (1976). New Forms of *Abeliophyllum distichum*. Korean Journal of Plant Taxonomy, 7(1), 21-22.

Lee, Y. S., Joo, E, Y., & Kim, N. W. (2008). Analysis on the Components of the *Vitex rotundifolia* Fruit and Stem. Korean Journal of Food and Nutrition, 37(2), 184-189.

Lee, Y. S., Jang, M. J., & Seo, S. J. (2010). Antioxidant and Anti-aging Activity of Extracts from *Chionanthus retusus* Flower. Korean Journal of the Society of Beauty Sciences, 15(3), 229-237.

Lee, Y. S., Hong, C. Y., Seo, S. J., & Kim, N. W. (2010). Analysis on the Useful Nutrition Components of the *Albizzia julibrissin* Stems and Leaves. Korean Journal of the Society of Food Science and Nutrition, 39(8), 1143-1148.

Li, L., Tsao, R., Liu, Z., Liu, S., Yang, R., Young, J. C., & Fu, Z. (2005). Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago* psyllium L. by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A, 1063(1-2), 161-169.

Lopez-Laredo, A. R., Gomez-Aguirre, Y. A., Medina-Perez, V., Salcedo-Morales, G., Sepulveda-Jimenez G., & Trejo-Tapia G. (2012). Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated Castilleja tenuiflora benth. Acta Pphysiologiae Plantarum, 34(6), 2435-2442.

Nho, E. Y. (2018). Analysis of inorganic elements and development of arsenic speciation in Grains.

Oh, H., Kang, D. G., Kwon, T. O., Jang, K. K., Chai, K. Y., Yun, Y. G., Chung, H. Taeg., & Lee, H. S. (2003). Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. Phytotherapy Research, 17(7), 811-813.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Park, J. H. (2011). Antioxidant activities and inhibitory effect on oxidative DNA damage of extracts from *Abeliophylli distichi* Folium. Korean Journal of Herbology. 26(4), 95-99.

Sawka, M. N. (2005). Dietary reference intakes for water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. Chapter 4-Water (No. MISC04-05). US Army Research Institute of Environmental Medicine in Natick MA.

Singleton, V. L., & Rossi. J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.

Woo, J. H., Shin, S. L., & Lee, C. H. (2010). Antioxidant effect of 80% ethanol extracts obtained from three *Dendranthema* species. Korean Journal of Plant Resources, 23(1), 47-53.

Xie, G., Xu, Q., Li, R., Shi, L., Han, Y., Zhu, Y., Gang, W., & Qin, M. (2019). Chemical profiles and quality evaluation of *Buddleja officinalis* flowers by HPLC-DAD and HPLC-Q-TOF-MS/MS. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 164, 283-295

You, J. H., Cho, H. W., Jung, S. G., & Lee, C. H. (2004). Correlation analysis between growth and environmental characteristics in *Abeliophyllum distichum* habitats. Korean Journal of Environment and Ecology, 18(2), 210-220.