

울무 새싹 추출물의 Riboflavin과 Coixol의 동시 분석법 검증 및 항산화 활성

이지연¹ · 박정용¹ · 박춘근² · 김동휘² · 지윤정³ · 최수지² · 오명원³ · 황호섭¹ · 이윤지⁴ · 정진태⁴ · 이정훈^{4,†} · 서경혜^{4,†}

Validation of a Method and Evaluation of Antioxidant Activity for the Simultaneous Determination of Riboflavin and Coixol in *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* Stapf Sprouts

Ji Yeon Lee¹, Jung Yong Park¹, Chun-Geon Park², Dong Hwi Kim², Yun-Jeong Ji³, Su Ji Choi², MyeongWon Oh³, Hosop Hwang¹, Yunji Lee⁴, Jintae Jeong⁴, Jeong Hoon Lee^{4,†}, and Kyung Hye Seo^{4,†}

ABSTRACT *Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* (Rom. Caill.) Stapf (CL), which contains riboflavin and coixol, has traditionally been used to treat cancer and arthritis. However, no method for the simultaneous determination of riboflavin and coixol in CL sprouts has been established. In this study, we established and validated a high-performance liquid chromatography–diode array detection (HPLC-DAD) method for the identification and quantification of two reference markers, riboflavin and coixol, in CL sprout extracts. CL sprouts (whole sprouts and leaves) were subjected to extraction with 70% ethanol at room temperature and at 80 °C under reflux conditions. The two extractions were validated with respect to specificity, accuracy, precision, and linearity. The content of the two reference markers was highest in leaves extracted under reflux conditions (riboflavin, 8.23 ± 0.32 mg/g; coixol, 5.95 ± 0.04 mg/g). We also investigated the antioxidant activity of the extracts via 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) scavenging assays. The results indicated that extracts obtained from sprouts under reflux conditions had the strongest antioxidative effects (DPPH half maximal inhibitory concentration [IC₅₀], 68.9 ± 4.1 g/mL; and ABTS, IC₅₀, 34.9 ± 0.1 g/mL). These results can serve as baseline data for the simultaneous determination of the two reference marker compounds, riboflavin and coixol, and development of functional food materials using CL sprouts.

Keywords : bioactive compounds, *Coix lacryma-jobi*, correlation analysis, free radical scavenging, standardization

울무[*Coix lacryma-jobi* var. *ma-yuen* (Rom.Caill.) Stapf]는 초본 식물로 벼과(Poaceae)에 속하며 우리나라의 대부분 지역에서 재배되고 있다(National Forest Seed and Variety Center, 2014; Lim & Do, 2001). 울무 종자는 다른 곡물보다 단백질 및 지질 함량이 높으며 비타민 B₁ (thiamine), 비

타민 B₂ (riboflavin), linoleic acid와 linolenic acid 등 비타민과 지방산이 풍부하고 탄수화물 함량이 낮으며 섬유 함량이 높기 때문에 주로 식품 및 의약품의 원료로 사용된다(National Rural Living Science Institute, 1996; Kim *et al.*, 2000). 또한, 울무 종피를 제거한 종자는 의이인(薏苡仁)이

¹충북대학교 식품공학과 대학원생 (Student, Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Chungbuk 28644, Republic of Korea)

²농촌진흥청 인삼특작부 연구관 (Senior Researcher, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Eumsung 27709, Republic of Korea)

³농촌진흥청 인삼특작부 박사후연구원 (Postdoc, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Eumsung 27709, Republic of Korea)

⁴농촌진흥청 인삼특작부 연구사 (Researcher, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Eumsung 27709, Republic of Korea)

†Corresponding author: Jeong Hoon Lee (Phone) +82-43-871-5670; (E-mail) artemisia@korea.kr
: Kyung Hye Seo; (Phone) +82-43-871-5785 (E-mail) seokh@korea.kr

<Received 10 August, 2019; Revised 21 October, 2019; Accepted 24 October, 2019>

라 하여 항암, 관절염, 부종 등의 약재로 사용되고 지상부는 가축사료로 이용되고 있다(Kim, 2012).

울무 종자는 항염증(Huang *et al.*, 2009), 지방 분화 억제(Lee *et al.*, 2010), 해독(Seo *et al.*, 2009), 항암(Yu *et al.*, 2008) 등의 작용이 보고되었으며, 최근 울무 새싹을 이용하여 대장암 전이 억제연구 결과가 밝혀져 이용가능성이 확대 될 것으로 예상된다(Son *et al.*, 2017). 울무 종자에서 분리된 성분으로는 eriodictyol 및 *p*-coumaric acid (Huang *et al.*, 2009)과 (+)-7-hydroxyamino-octadecanoic acid methyl ester, bis(2-ethylhexyl)phthalate, dehydrodieugenol, piperine, piperanine 및 α -sitosterol (Han *et al.*, 2013)이 있으며, 울무근에서는 coixol (Kwon *et al.*, 2017), (+)-icariol, zhepersionol, 4-hydroxybenzaldehyde (Choi *et al.*, 2017)등이 보고되었다. 이들 중 coixol은 울무 종자, 줄기와 뿌리에서 분석법 검증이 보고된바 있으나(Kwon *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2010), 지금까지 울무 새싹에서 분석법 검증은 이루어진 바가 없다. 울무의 부가가치를 향상시키고, 건강 기능성 식품으로 이용성을 증진시키기 위해서는 울무에 함유된 생리활성물질에 대한 객관적인 분석법 확립과 과학적인 표준화가 필요하다.

본 연구에서는 울무 새싹의 전초와 잎은 riboflavin과 coixol의 동시분석법을 통하여 함량 분석을 하였으며, 항산화 활성을 비교하였다. 본 연구결과를 바탕으로 울무 새싹 연구의 기초 자료를 제공 및 건강기능식품개발을 위한 원료표준화에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용한 울무 새싹은 2015년 8월 국립원예특작과학원 인삼특작부(충북 음성)에서 5일에서 7일 동안 자란 것을 사용하였으며, 이를 전초(*Coix lacryma-jobi*; CL)와 잎(*Coix lacryma-jobi's leaves*; CLL)으로 분류한 후 동결 건조시켜 사용하였다. 건조된 울무새싹(2 g)의 전초와 잎은 분쇄한 후 시료 중량의 10배량의 70% 주정으로 80°C에서 약 3시간씩 3회 환류 추출한 것(-1)과 상온에서 추출한 것(-2)을 사용 하였다. 추출 후 여과 및 농축하여 동결 건조하였다. 추출물(10 mg)은 메탄올(Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea) 1 mL에 녹여 0.45 μ m membrane filter (CTK corporation, Daejeon, Korea)로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였고, 추출물(20 mg)은 DMSO 1 mL에 녹여 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)와 ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 소거능 시험에 사용

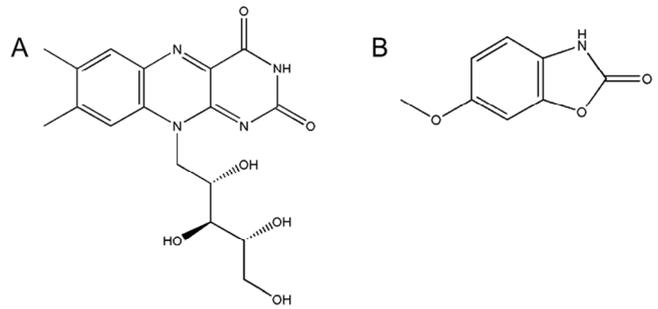


Fig. 1. Chemical structures of riboflavin (A) and coixol (B).

Table 1. Operating conditions for the HPLC analysis of riboflavin and coixol.

Parameter	Condition	
Instrument	HPLC 1100 series (Agilent Technologies)	
Wavelength	260 nm	
Mobile phase	Solvent A : Water (0.01% formic acid) Solvent B : Acetonitrile (0.01% formic acid)	
Flow rate	0.8 ml/min	
Column	INNO C18 (4.6 mm × 250 mm)	
Injection volume	10 μ L	
	Time (min)	B (%)
Gradient conditions	0	25
	5	15
	10	30
	20	50

하였다.

표준용액의 조제

표준물질인 riboflavin은 Sigma-aldrich (MO, USA)에서 구매하여 사용하였고, coixol은 ChemFaces (Wuhan, China)에서 구매하여 사용하였다(Fig. 1). 표준물질을 HPLC 등급의 메탄올로 녹여 2 mg/mL농도의 stock solution을 조제하였다. 조제된 stock solution은 0.45 μ m membrane으로 여과한 후 4°C에 보관하여 사용 전에 희석하여 사용하였다.

HPLC 분석 조건

울무 새싹의 전초와 잎 추출물의 riboflavin과 coixol의 분석을 위해 HPLC 1100 (Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하였고, 분석에 사용된 칼럼은 INNO C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μ m, Youngjin Biochrome, Gyeonggi-do, Korea)이며 분석 조건은 Table 1과 같다.

분석법 검증

HPLC를 활용하여 정량화에 사용 된 분석 방법은 Inter-

national Conference for Harmonization 가이드라인(Guideline, 2005)과 식품의약품안전처의 의약품등 시험방법 validation 가이드라인(NIFDS, 2012)에 기술된 바와 같이 특이성(specificity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy) 및 직선성(linearity)을 통해 검정하였다. 직선성을 통해 얻은 검량선의 기울기와 표준편차를 이용하여 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 이용하여 분석법을 검증하였다.

특이성(specificity)은 표준물질(riboflavin, coixol)과 울무 새싹 추출물의 크로마토그램을 비교하여 선택적으로 분리가 되는지 확인하였다. 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)은 riboflavin과 coixol을 31.25, 62.5, 125 µg/mL의 농도를 사용하여 일내(inter-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 하루에 3회 반복하여 분석하였으며, 일간(intra-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 3일간 반복하여 분석하였다. 얻어진 peak의 면적을 대입하여 각각의 농도를 계산하였으며 첨가한 농도에 대비하여 회수된 농도를 계산 하여 얻어진 값인 회수율(recovery)을 통해 일내 및 일간 정확성을 확인하였다. 각 결과 값의 표준편차를 결과 값의 평균으로 나눈 값인 상대표준편차(relative standard deviation, RSD %)로 일내 및 일간 정밀성을 확인하였다. 직선성(linearity)은 표준용액인 riboflavin과 coixol을 methanol에 용해시켜 각각 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도로 만든 후 HPLC에 3회씩 주입하여 분석 후 회귀분석을 통해 피크 면적간의 결정계수, 기울기 및 y절편을 구하였다. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 신호 대 잡음(signal-to-noise)에 근거하여 계산하였다. 검출한계(LOD)는 $3.3 \times \sigma/S$ (σ : y절편의 표준편차, S: 검량선 기울기의 평균값)을 이용하여 계산하고, 정량한계(LOQ)는 $10 \times \sigma/S$ (σ : y절편의 표준편차, S: 검량선 기울기의 평균값)을 이용하여 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

울무 새싹 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정을 위하여 Kedare & Singh (2011)의 방법을 수정하여 측정하였다. 농도 별로 준비된 추출물 40 µL와 0.25 mM DPPH solution 160 µL vortex한 다음 실온에서 30분간 반응 후 multi plate reader (Synergy H1, Biotek, VT, USA)로 515 nm 흡광도에서 측정하였다. 대조군으로는 에탄올만을 첨가하였으며, 비교를 위해 ascorbic acid (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 양성대조군으로 사용하였다. DPPH 소거능의 정도는 50% 저해농도(IC₅₀, µg/mL)로 나타내었다.

ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정

울무 새싹 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하기 위하여 Brand-Williams *et al.* (1995)의 방법을 수정하여 이용하였다. ABTS⁺ solution은 ABTS tablet (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 7 mM 농도로 H₂O에 용해시킨 후 2.45 mM potassium peroxodisulfate (Sigma-Aldrich, MO, USA)와 1:1 비율로 혼합시켜 16 시간 상온에 둔 후 사용하였다. 각각 다른 농도 별로 준비된 추출물 20 µL와 180 µL ABTS⁺ solution를 vortex로 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응 후 multi plate reader로 732 nm 흡광도에서 측정하였다. 대조군으로는 에탄올을 첨가하였으며, 비교를 위해 ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였다. ABTS⁺ 소거능의 정도는 50% 저해농도(IC₅₀, µg/mL)로 나타내었다.

통계 처리

모든 실험은 평균 ± 표준편차(standard deviation, SD)로 표기하였다. 실험의 통계처리는 SPSS 프로그램(Version 22.0 for Window, SPSS Inc., IL, USA)을 이용하였고, 평균간 비교를 위해 수행한 분산분석(One-way analysis of variance, ANOVA)은 Duncan의 다중검정으로, 상관관계 분석은 Pierson의 상관계수로 모두 5% 유의수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

Riboflavin과 coixol의 동시분석법 검증

울무에는 riboflavin과 coixol이 존재한다고 알려져 있지만, coixol 단일 물질의 표준 분석법만 보고되었다(Zhang *et al.*, 2010). 우리는 울무 새싹의 품질 관리 및 기능성 소재화를 위하여 두 물질의 동시 분석을 실시하였다.

특이성은 불순물과 분해물 배합성분 등이 혼합되어 있는 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 측정할 수 있는 능력을 말한다(NIFDS, 2012). 표준액(riboflavin, coixol)과 모든 울무 새싹 추출물의 크로마토그램을 확인한 결과 다른 혼합물질의 간섭 없이 피크가 각각 분리되었다(Fig. 2). 또한, 표준액과 울무 새싹 추출물의 피크 유지시간 또한 일치하였다. 본 실험의 분석방법은 특이성이 있음을 확인할 수 있다.

정확성은 최소 3가지의 농도로 3반복 이상 측정되어야 하며 알고 있는 농도의 분석에 의한 회수율을 통해 평가된다(Guideline, 2005). Riboflavin과 coixol은 일내(inter-day)에서의 회수율 값이 100.24~103.98%로 매우 양호하였으며, 일간(intra-day)에서도 마찬가지로 회수율 값이 100.28~102.19%로 매우 양호하였다. 정밀성은 표준편차를 평균으로 나눈 값인 상대표준편차(RSD, %)값을 통해 평가되며

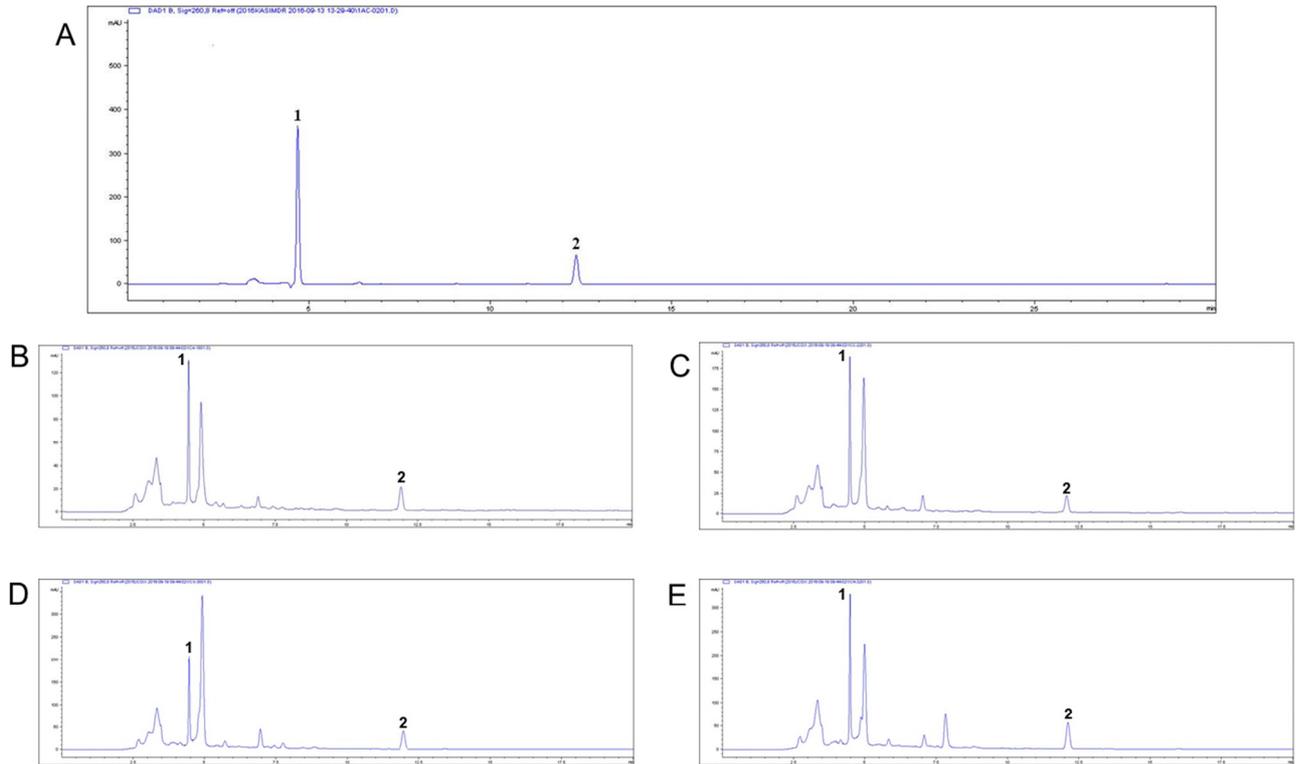


Fig. 2. HPLC analysis chromatograms of riboflavin (1), coixol (2) (1.0 mg/mL each), and extracts of CL and CLL (10 mg/mL each). A, standard mixture; B, CL1; C, CL2; D, CLL1; E, CLL2.

Table 2. Analytical data for inter-day and intra-day accuracy (recovery) and precision (RSD) of standards.

Compound	Con ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)	Inter-day ($n = 3$)				Intra-day ($n = 9$)			
		Amount ($\mu\text{g/mL}$)	SD ²⁾	Recovery	RSD ³⁾	Amount ($\mu\text{g/mL}$)	SD	Recovery	RSD
Riboflavin	31.25	31.43	0.45	101.90	1.43	31.68	0.36	101.38	1.14
	62.5	63.31	0.81	101.29	1.28	63.05	0.84	100.88	1.34
	125	125.30	1.39	100.24	1.11	126.94	1.61	101.55	1.26
Coixol	31.25	32.49	0.63	103.98	1.93	31.34	0.32	100.28	1.02
	62.5	64.25	0.53	102.81	0.83	63.87	0.95	102.19	1.49
	125	127.87	1.11	102.30	0.87	126.97	1.32	101.58	1.04

All values are means. ¹⁾Con: concentration of compound, ²⁾SD: standard deviation, ³⁾RSD: relative standard deviation.

2.5이하의 상대표준편차를 충족시켜야 한다(Guideline, 2005). 표준용액 riboflavin과 coixol은 일간 및 일내의 상대표준편차 값이 모두 1.5이하이므로 그 조건을 충족시키는 분석법으로 나타났다(Table 2).

직선성은 최소 5개의 농도로 측정되어야 하며 측정된 면적 값으로 회귀선을 구한 후 0.999이상의 상관계수를 가지고, y 절편, 회귀선의 기울기 값을 통해 평가되어야 한다(Guideline, 2005). 표준용액 riboflavin과 coixol의 농도 0.0625 mg/mL부터 1 mg/mL까지 분석하여 측정한 결과 상관계수

는 모두 0.999로 나타났으며 회귀선의 방정식은 각각 $Y = 3.2312X - 57.13$ 과 $Y = 1.0642X + 6.987$ 로 나타났다(Table 3). 분석 가능한 riboflavin과 coixol의 검출한계 및 정량한계를 조사한 결과 각각 0.71과 0.31 $\mu\text{g/mL}$ 및 2.17과 0.94 $\mu\text{g/mL}$ 로 결정되었다(Table 3). 분석 시 주입된 양이 10 μL 이므로 이것은 각각 7과 3 ng 및 21와 9 ng에 해당하는 양이다. 표준성분은 원료의 기능성, 특이성, 안정성, 분석가능성 및 용이성이 확보 될 수 있도록 고려하여 설정할 필요가 있다(Kim *et al.*, 2013). 실험결과는 율무 새싹 추출물에 함

Table 3. Calibration curves for determining the LOD and LOQ values of standards ($n = 3$).

Compound	Linear range (mg/mL)	Calibration equation ¹⁾	R ² ²⁾	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Riboflavin	0.31 - 0.5	Y = 3.2312X - 57.13	0.999	0.71	2.17
Coixol	0.31 - 0.5	Y = 1.0642X + 6.987	0.999	0.31	0.94

¹⁾Where the Y and X are the peak area and concentration of the analyses (µg/mL), respectively. ²⁾R² = correlation coefficient for five data points in the calibration curve.

Table 4. Content of standard compounds in CL and CLL.

Samples ¹⁾		Determined amount (mg/g dried weight) ²⁾	
		Riboflavin	Coixol
CL	1	2.55 ± 0.40 ^c	2.03 ± 0.03 ^c
	2	2.00 ± 0.23 ^c	1.17 ± 0.01 ^d
CLL	1	8.23 ± 0.32 ^a	5.95 ± 0.04 ^a
	2	6.76 ± 0.39 ^b	5.41 ± 0.02 ^b

¹⁾CL: Sprout of *Coix lacryma-jobi*, CLL: Sprout leaves of *Coix lacryma-jobi*, 1: Extract at 80°C under reflux, 2: Extracts at room temperature. ²⁾Data are represented as the means ± SD ($n = 3$). Means with different letters on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison tests.

유된 riboflavin과 coixol이 표준성분으로 적합하고 동시에 분석이 가능하며, 분석법을 이용하여 원료표준화에 적용할 수 있다.

울무 새싹 추출물의 riboflavin과 coixol의 함량

울무 새싹의 전초(CL)와 잎(CLL)을 70% 에탄올에서 환류(CL-1, CLL-1)추출물과 상온(CL-2, CLL-2)추출물을 본 연구에서 검토된 riboflavin과 coixol의 동시분석법을 적용하여 분석을 실시하였다. 추출물의 크로마토그램은 Fig. 2에 나타내었고 추출물의 riboflavin과 coixol의 함량은 Table 4에 나타내었다. Riboflavin과 coixol의 함량은 CLL1 (8.23 ± 0.32 및 5.95 ± 0.04 mg/g)에서 가장 높았고 CL2 (2.00 ± 0.23 및 1.17 ± 0.01 mg/g)에는 가장 적었다. Riboflavin과 coixol함량은 울무 새싹의 전초에서 보다 잎에서 더 높게 측정되었으며, 상온 추출보다 환류 추출이 더 높게 측정되었다($p < 0.05$).

Coixol은 울무에 함유된 표준 성분으로 Zhang *et al.* (2010)의 보고에 따르면 울무의 줄기에는 함유되어 있지 않으나 뿌리에는 0.58~0.69 mg/g함유 되어있다고 보고되었으며, 비타민 B군에 속하는 riboflavin은 울무 종자에서 3 mg/g으로 보고되었다(Wrigley *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2010). 위의 결과와 비교해보면 riboflavin과 coixol은 울무 새싹의

Table 5. Antioxidative activity (DPPH and ABTS⁺) of CL and CLL with respect to extraction method.

Samples ¹⁾		DPPH	ABTS ⁺
		(IC ₅₀ , µg/mL)	(IC ₅₀ , µg/mL)
CL	1	126.4 ± 6.1 ^a	52.0 ± 3.6 ^a
	2	129.7 ± 11.5 ^a	53.1 ± 2.9 ^a
CLL	1	68.9 ± 4.1 ^b	34.9 ± 0.1 ^b
	2	118.4 ± 1.7 ^a	35.3 ± 0.4 ^b
Ascorbic acid ²⁾		53.8 ± 0.32 ^c	32.9 ± 0.11 ^b

¹⁾CL: Sprout of *Coix lacryma-jobi*, CLL: Sprout leaves of *Coix lacryma-jobi*, 1: Extract at 80°C under reflux, 2: Extracts at room temperature. ²⁾Ascorbic acid was used for positive control. All values are expressed as means ± SD ($n = 3$). Means with different letters on the bars are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison tests.

잎 추출물에서 더 많이 함유되어 있음을 알 수 있다. 또, 환류 추출이 상온 추출보다 높은 함량으로 나타났는데, 이러한 경향은 상온 보다는 가온하여 환류 추출하는 것이 riboflavin과 coixol의 용출에 더 용이함을 나타낸다.

울무 새싹 추출물의 항산화 활성

자유 라디칼(free radical)은 활성산소 중 하나로, 세포의 사멸 및 노화를 유도하여 인체 내에서 각종 질병을 유발한다고 알려져 있다(Son *et al.*, 2018). DPPH 및 ABTS⁺ 소거능은 매우 간편한 항산화 활성 측정방법으로 알려져 있다(Park, 2014). 울무 새싹에서 항산화 활성을 DPPH 및 ABTS⁺ 소거능으로 측정한 결과, DPPH 라디칼 소거능의 경우 CLL1 (68.9 µg/mL) < CLL2 (118.4 µg/mL) < CL1 (126.4 µg/mL) < CL2 (129.7 µg/mL) 순으로 나타났으며 ABTS⁺ 소거능에서 IC₅₀값은 CLL1 (34.9 µg/mL) < CLL2 (35.3 µg/mL) < CL1 (52.0 µg/mL) < CL2 (53.1 µg/mL) 순으로 DPPH 소거능과 같은 경향으로 나타났다(Table 5). DPPH 라디칼 소거능과 ABTS⁺ 소거능에서 모두 울무새싹의 전초보다 잎에서 더 낮은 IC₅₀값을 나타내었으며, 상온 추출보다 환류 추출에서 더 낮은 IC₅₀값을 나타냈다.

Table 6. Correlation matrix between standard compounds and antioxidant activity.¹⁾

Factors	Riboflavin	Coixol	DPPH (IC ₅₀ ,µg/mL)	ABTS+ (IC ₅₀ ,µg/mL)
Riboflavin	1.000	.986**	-.796**	-.958**
Coixol		1.000	-.743**	-.969**
DPPH			1.000	.668**
ABTS ⁺				1.000

¹⁾significances of difference at ***p* < 0.01 offered by Pearson's correlation coefficient.

율무 새싹 추출물의 riboflavin과 coixol 및 항산화 활성과의 상관관계를 검토하고자 상관관계 분석을 실시하였다. Table 6에 나타낸 바와 같이 riboflavin과 coixol의 함량 모두 DPPH (-0.743 및 -0.969)와 ABTS⁺ (-0.796 및 -0.958) 소거능의 IC₅₀값과 유의적인 상관관계를 보였다. 따라서 본 연구결과에서 얻어진 riboflavin과 coixol의 동시분석법을 적용하여 율무 새싹의 전초와 잎 추출물의 기능성식품 원료의 표준화 및 기능성 지표로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

적 요

율무 새싹 추출물의 riboflavin과 coixol의 원료표준화를 위한 동시분석 조건을 검증하고, 율무 새싹의 전초와 잎 추출물의 항산화 활성과 함량의 상관관계에 대해 조사하였다.

1. HPLC 분석을 위한 riboflavin과 coixol의 피크가 각각 분리되어 특이성을 확인하였고, 일내 및 일간 정확성은 모두 회수율이 100.28%에서 103.98% 사이이며 정밀성은 모두 1.93%이하를 나타내므로 본 실험의 분석조건은 높은 정확성과 정밀성을 가지고 있다.
2. Riboflavin과 coixol의 동시분석 조건의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 조사한 결과 검출한계는 0.71 및 0.31 µg/mL, 정량한계는 2.71 및 0.94 µg/mL이므로 확립된 HPLC 분석조건은 riboflavin과 coixol의 동시분석하기에 무리가 없는 분석법으로 조사되었다.
3. 율무 새싹의 전초와 잎의 riboflavin과 coixol의 함량을 본 연구에서 얻어진 동시분석법을 적용하여 잎의 환류 추출물에서 가장 높은 함량이 나타났다.
4. 항산화 활성 측정 시, DPPH와 ABTS⁺ 소거능에서 모두 율무 새싹의 전초보다 잎에서, 상온 추출보다 환류 추출이 더 낮은 IC₅₀값을 나타내었다. 율무 새싹 추출물의 riboflavin과 coixol 및 항산화 활성과의 상관관계를 실시

한 결과, coixol이 증가할수록 DPPH와 ABTS⁺ 소거능의 IC₅₀값이 유의적으로 감소하는 경향이 나타나므로 원료 표준화 지표뿐만 아니라 기능성 지표로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명 : 율무 등 약용작물 지역특화 생산 기술 개발, 세부과제번호 : PJ01425 101)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌(REFERENCES)

Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *J LWT-Food Sci. Technol.* 28(1) : 25-30.

Choi, Y. H., C. W. Choi, J. Y. Lee, E.-K. Ahn, J. S. Oh, and S. S. Hong. 2017. Phytochemical constituents of *Coix lachryma-jobi* var. ma-yuen roots and their tyrosinase inhibitory activity. *Appl. Biol. Chem.* 60(1) : 49-54.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization, Switzerland. pp. 11-12.

Han, A. R., Y. S. Kil, U. Kang, I. S. Youn, G. Choi, Y. J. Lee, J. W. Nam, J. H. Lee, J. Hong, and S. K. Lee. 2013. Identification of a new fatty acid from the seeds of *Coix lachryma-jobi* var. ma-yuen. *Bull. Korean Chem. Soc.* 34(4) : 1269-1271.

Huang, D. W., C. P. Chung, Y. H. Kuo, Y. L. Lin, and W. Chiang. 2009. Identification of compounds in adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed hull extracts that inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation in raw 264.7 macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 57(22) : 10651-10657.

Kedare, S. B. and R. Singh. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 48(4) : 412-422.

Kim, G. S., D. Y. Lee, S. E. Lee, H. J. Noh, J. H. Choi, C. G. Park, S. I. Choi, S. J. Hong, and S. Y. Kim. 2013. Evaluation on extraction conditions and HPLC analysis method for bioactive compounds of astragali radix. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 21(6) : 486-492.

Kim, H. K., D. W. Cho, and Y. T. Hahm. 2000. The effects of coix bran on lipid metabolism and glucose challenge in hyperlipidemic and diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(1) : 140-146.

Kim, J. 2012. Literature on the quality and effect of job's tears (*Coix lachryma-jobi* L. var. mayuen S.). *Korean J. Agri. History.* 11(1) : 89-122.

Kwon, J. G., C. Seo, Y. H. Choi, C. W. Choi, J. K. Kim, W. Jeong, J. E. Lee, and S. S. Hong. 2017. Validation of method

- determining coixol in *Coix lachryma-jobi* var. ma-yuen roots extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 46(8) : 952-956.
- Lee, M. K., E. J. Shin, Q. Liu, B. Y. Hwang, J. B. Lee, S. Y. Kim, and J. H. Lee. 2010. Inhibitory activity of three varieties of adlay (coix seed) on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Nat. Prod. Sci. 16(4) : 291-294.
- Lim, L. J. and B. S. Do. 2001. Medicinal Plant Database: Korean Medicinal Plant Dictionary. Yeo-Gang Publisher, Seoul, Korea.
- National Forest Seed and Variety Center. 2014. Medicinal plants growing in the mountains of Korea. Korea Forest Service. Chungju, Korea. p. 491.
- National Rural Living Science Institute. 1996. Food Composition Table. Rural Development Administration, Suwon, Korea. pp. 116-117.
- NIFDS. 2012. Validation of drug test methods guideline. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. Cheongju, Korea. 64 p.
- Park, S. J. 2014. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from *Ixeris dentata* Nakai. Culi. Sci. Hos. Res. 20(1) : 133-142.
- Seo, D. S., J. H. Jang, N. M. Kim, and J. S. Lee. 2009. Optimal extraction condition and characterization of antidementia acetylcholinesterase inhibitor from Job's tears (*Coix lachrymajobi* L.). Korean J. Medicinal Crop Sci. 17(6) : 434-438.
- Son, E. S., Y. O. Kim, C. G. Park, K. H. Park, S. H. Jeong, J. W. Park, and S. H. Kim. 2017. *Coix lacryma-jobi* var. ma-yuen Stapf sprout extract has anti-metastatic activity in colon cancer cells in vitro. BMC Complement Altern. Med. 17(1) : 486.
- Son, Y. R., J. H. Lee, H.-H. Park, B. W. Lee, H. J. Kim, S. I. Han, K. S. Woo, B. K. Lee, S. C. Lee, and Y. Y. Lee. 2018. Changes in functional compounds and antioxidant activities in storage duration with accelerated age-conditioning of oats. Korean J. Crop Sci. 63(2) : 149-157.
- Wrigley, C. W., H. Corke, K. Seetharaman, and J. Faubion. 2015. Encyclopedia of food grains. Academic Press. pp. 184-189.
- Yu, F., J. Gao, Y. Zeng, and C. X. Liu. 2008. Inhibition of coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anti-cancer activity. J. Ethnopharmacology. 119(2) : 252-258.
- Zhang, M., X. Ma, W. Xu, T. Tian, and X. Jia. 2010. Determination of coixol in root, testa and stem of *Coix lacrymajobi* L. var. ma-yuen (Roman.) Stapf by HPLC. Medicinal Plant. 1(8) : 95-97.