



HPLC-UVD method validation for quantitative analysis of camelliaside A in hot-water extract of soybean (*Glycine max* L.) leaves

Jeong Ho Kim · Seung Hwan Lee · Si Won Moon · Ki Hun Park

콩잎 열수추출물의 지표성분인 camelliaside A의 정량분석을 위한 HPLC-UVD 분석법 밸리데이션

김정호 · 리승환 · 문시원 · 박기훈

Received: 28 July 2022 / Accepted: 30 August 2022 / Published Online: 30 September 2022
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract Soybean (*Glycine max* L.) leaves have been researched as functional food stuff actively, but there is no validation method to control quality of soybean leaves (SL). In this study, we annotated seven kaempferol derivatives to confirm camelliaside A as index metabolite in SL using UHPLC-ESI-TOF-MS. HPLC-UVD validation method of camelliaside A in hot-water extract of SL was established according to validation guideline of functional foods from the Ministry of Food and Safety of Korea. The HPLC-UVD method was validated with reliable parameters for examining specificity, accuracy, precision, limit of detection and quantification and linearity. The established method gave the suitable ranges to quantify camelliaside A from the hot-water extract of soybean leaves.

Keywords Camelliaside A · HPLC-UVD · Soybean leaves · Validation

서론

콩(*Glycine max* L.)은 콩과(Leguminosae)에 속하는 한해살이 식물로 아시아, 유럽, 북아메리카 등에 넓게 재배되고 있다. 콩은 그 종자가 약 35%의 탄수화물, 40%의 단백질 및 20%의 지방으로 구성되어 있는 주요작물이다. 콩은 이소플라본 및 소아사포닌 등 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 갱년기, 항산화 및 항암등에 높은 활성이 보고되고 있다[1,2].

콩잎은 식품의약품안전처에 식용가능한 생물소재로 등재되어 있을뿐만 아니라 폴리페놀계 및 소아사포닌계 생리활성 대사체가 높은 함량으로 축적되어 있다[3]. 최근에는 콩잎을 이용한 기능성식품소재 관련연구가 활발히 진행되고 있다. 콩잎의 2차 대사체는 생육시기에 따라 종류 및 함량의 수준이 차이가 난다. kaempferol 유도체는 대부분의 생육시기(V1-R2)에 함량의 수준이 일정하게 유지되고, pterocarpan 및 coumestan계 대사체는 R3 (열매를 맺는 이후 시기)부터 축적되기 시작한다[4,5]. 콩잎 추출물의 항비만효과 및 인슐린저항성 개선효과가 동물실험에서 관찰되었고[6], 또한 coumestan 화합물이 높은 농도로 함유된 콩잎추출물의 항비만효과가 인체적용시험에서 보고되고 있다[7]. kaempferol 유도체가 높은 농도로 함유된 콩잎추출물은 글루코스 항상성(glucose homeostasis)을 개선하는 것으로 보고되었다[8]. 콩잎의 coumestrol은 protein kinase CK II를 저해하는 기작으로 유방암과 대장암 세포의 노화를 촉진하는 효과를 나타내었다[9]. 콩잎 추출물은 Adiponectin 수용체 및 AMP-activated kinase (AMPK)를 활성화시켜 고혈당 및 국소성지방간 감소효과를 나타내고, 활성지표물질은 kaempferol 유도체로 보고되고 있다[10].

최근에는 콩 식물체에 에틸렌을 처리하여 isoflavone (daidzein 및 genistein 유도체) 고함유 콩잎이 생성되는 생합성 기작과 대

Ki Hun Park (✉)
E-mail: khpark@gnu.ac.kr

Division of Applied Life Science (BK21 plus), IALS, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

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.

사체농업 기술이 개발되었다[3,11]. isoflavone 고함유 콩잎은 난소가 제거된 갱년기 쥐의 체지방 감소뿐만 아니라 장간막, 신장 및 간의 지방축적을 현저히 감소시켰다[12]. 또한 isoflavone 고함유 콩잎은 갱년기 쥐의 골다공증 개선에 높은 활성을 나타내었다[13].

콩잎은 식품의약품안전처 기준 식용가능한 생물소재로 등록되어 있고, 상기 기술한 바와 같이 기능성 식품소재로 응용할 수 있는 높은 생리활성을 갖고 있다. 따라서, 콩잎의 열수추출물을 개별인정형원료로 개발하려는 연구가 진행되고 있으며 콩잎의 정체성을 나타낼 수 있는 원료에 함유된 지표물질을 발굴하고 이를 이용한 HPLC 분석법을 개발하는 것은 대단히 중요하다. 특히, 콩잎의 지표물질을 밸리데이션할 수 있는 분석법은 현재까지 보고된 바가 없다.

식품의약품안전처의 규정에는 건강기능식품의 기능성분(또는 지표성분)의 시험법을 ‘건강기능식품의 기준 및 규격’, ‘식품의 기준 및 규격’, ‘식품첨가물의 기준 및 규격’, ‘국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC) 및 AOAC 방법 등에 따라 공인된 방법을 사용하여야 한다’고 기술되어 있다. 따라서, 국제표준 가이드라인을 엄격히 따르고 콩잎 분석에 적합한 효과적인 시험법을 제시하고자 한다.

본 연구에서는 콩잎에 함유된 kaempferol 유도체 7종을 UHPLC-ESI-Q-TOF/MS로 동정하고, 이들 중 camelliaside A를 콩잎의 지표물질로 선정하였다. 또한, 식품의약품안전처에서 제시한 건강기능식품에 대한 가이드라인에 따라 콩잎열수추출물에서 HPLC-UV를 이용하여 camelliaside A를 정량분석할 수 있는 밸리데이션을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

HPLC 밸리데이션 시험에 사용한 시료는 경상남도 진주 농업기술센터에서 분양받은 대두콩(*Glycine max* L.)을 경상국립대학교 농장시험포에서 재배하여 생산한 콩잎을 사용하였다. 구체적으로는 건조한 콩잎 1 kg에 물 20 L를 넣어 100 °C에서 5시간 열수추출하고, 열수추출물을 동결건조한 분말시료 3종을 사용하였다. 지표성분인 Camelliaside A 표준품은 Biofron (Tustin, La Mirada, CA, USA)에서 구입하였다(Catalog #: BD-P0164, 순도: 98%). HPLC에 사용된 유기용매 및 탈이온수는 덕산화학에서 구입하였다.

UHPLC-Q-TOF/MS 분석

콩잎의 대사체분석은 Photodiode array (PDA) 검출기가 장착된 Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japan) 및 질량분석기 X500R (AB Sciex, Framingham, MA, USA)을 사용하였다. 용리속도는 0.3 mL/min으로 하고, 용매 A (0.1% acetic acid가 포함된 물)와 용매 B (0.1% acetic acid가 포함된 acetonitrile)의 기울기 농도를 조절하였다. 분리는 InfinityLab Poroshell 120 C18 컬럼 (2.1×100 mm, 2.7 μm, Agilent)을 이용하였고, 이온화는 electrospray ionization (ESI)의 positive mode로 다음과 같은 source parameter를 설정하였다; Ionspray voltage 5500 V, Ion source temperature 450 °C,

Curtain gas pressure 30 psi, Nebulizer gas pressure 50 psi, Heating gas pressure 50 psi, Decclustering potential 50 V. MS spectra의 검출 분자량 범위는 50-1000 *m/z*로 하였으며, MS/MS spectra는 10-30 eV의 collision energy ramp로 50-1000 *m/z*의 범위로 검출하였다. 컬럼의 온도는 30 °C로 하였고 기울기 농도 용리는 다음과 같이 하였다; 0-2 min (5% B), 2-35 min (5-25% B), 35-45 min (25-50% B) 및 45-50 min (50-90% B). 머무름시간 (*t_R*), *m/z* ratio 및 ion intensity 등의 정보는 Sciex OS software (AB Sciex)로 수집하였다.

시험방법 밸리데이션 항목 및 내용

HPLC를 이용한 지표물질 분석방법 밸리데이션은 식품의약품안전처에서 공정한 작성 가이드라인에 따랐다[14]. 분석법 밸리데이션은 특이성, 정확도, 정밀도(반복성 및 재현성), 검출 및 정량한계, 직선성 등 5개 항목의 기준에 맞게 수행하였다(보충자료 참고). 실제 분석해야될 콩잎 열수추출물 분말시료를 대상으로 검체량별 정량분석을 통한 지표성분(camelliaside A)의 실제 함량 값의 상대표준편차를 측정하는 방법을 이용하였다. 이를 통해 지표성분만을 위한 분석법 밸리데이션이 아닌 실제 분석 시료에 함유된 지표성분 정량관련 밸리데이션을 수행하였다.

표준용액의 조제

Camelliaside A 표준물질 10 mg을 정밀히 달아 50% 메탄올 10 mL에 녹여 표준원액(Stock solution)으로 하였다. 밸리데이션 시험법 항목에 맞게 위 표준원액을 50% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액을 조제하였다.

시험용액의 조제

콩잎 열수추출분말 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g을 취하여 50% 메탄올 100 mL을 가한 후 30분간 초음파추출하여 각각 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 mg/mL 농도가 되도록 조제하였다. 각 용액을 다시 50% 메탄올로 10배 희석하여 0.45 μm 멤브레인 필터를 이용하여 여과한 후 밸리데이션 시험법 항목에 맞게 사용하였다.

HPLC 분석조건

HPLC 분석은 binary pump, autosampler, PDA (photodiode array detector) 등이 장착된 Thermo Scientific Ultimate 3000 UHPLC로 수행하였다. 컬럼은 Poroshell 120 C18 컬럼 (2.1×100 mm, 2.7 μm, Agilent, USA)을 사용하였다. 용리용액으로 용매 A (0.1% acetic acid가 포함된 물)와 용매 B (0.1% acetic acid가 포함된 acetonitrile)를 사용하였다. 이동상의 농도 구배는 0-5 min (95% A), 5-7 min (93% A), 7-15 min (85% A), 15-50 min (50% A), 50-60 min (10% A)이었다. 표준용액 및 시험용액의 주입부피는 2.5 μL로 하였다.

특이성 평가

표준용액(Camelliaside A, 10 μg/mL)와 시험용액(콩잎 열수추출분말 용액, 2 mg/mL)의 HPLC 크로마토그램을 통해 Camelliaside A의 피크 및 인근 물질 피크의 머무름 시간 및 Camelliaside A의 UV 스펙트럼 비교를 통해 시험법의 특이성을 측정하였다.

정확도 평가

콩잎 열수추출분말 1.5 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출하였다. 해당용액을 1 mL 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 mL를 첨가해 10배 희석한 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하였다. 10배 희석한 콩잎 열수추출물 900 μL 에 각각 blank로서의 50% 메탄올 용액 및 10.0, 20.0, 30.0 $\mu\text{g/mL}$ 에 해당하는 Camelliaside A 용액을 100 μL 첨가하여 회수율 시험용액을 조제하였다. 정확도는 50% 메탄올을 첨가한 대조군과 Camelliaside A를 첨가한 실험군(최종농도; 1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{g/mL}$)간의 농도차이를 계산하여 확인하였다. 해당 정확도 시험은 총 3회 반복하였다.

일내정밀도(반복성) 평가

콩잎 열수추출분말 1.0, 2.0, 3.0 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출하였다. 각 용액을 1.0 mL 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 mL를 첨가하여 각각 1.0, 2.0, 3.0 mg/mL의 농도가 되도록 10배 희석한 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하였다. 각 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 측정하여 Camelliaside A 함량을 $\mu\text{g/mL}$ 단위로 계산한 뒤 이를 희석배수를 고려하여 콩잎 열수추출분말 1.0 g에 함유된 Camelliaside A 함량을 $\mu\text{g/g}$ 단위로 환산하였다. 일내정밀도 평가는 각 콩잎 열수추출분말 무게당 5회 따로 조제한 시험용액을 측정하여 수행하였다.

일간정밀도(재현성) 평가

콩잎 열수추출분말 1.5, 2.5 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출하였다. 해당용액을 1.0 mL 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 mL를 첨가하여 각각 1.5, 2.5 mg/mL의 농도가 되도록 희석한 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하였다. 각 10배 희석한 시험용액을 HPLC로 분석하여 함유된 Camelliaside A 함량을 $\mu\text{g/mL}$ 단위로 계산한 뒤 이를 희석배수를 고려하여 콩잎 열수추출분말 1.0 g에 함유된 Camelliaside A 함량을 $\mu\text{g/g}$ 단위로 환산하였다. 각 시험용액당 5회 반복측정하였으며 이 과정을 5일 반복하여 수행하였다.

검출한계 및 정량한계 측정

농도가 1.0 mg/mL인 Camelliaside A 표준원액을 50% 메탄올로 희석하여 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 총 7개 농도로 조제하였다. 희석한 Camelliaside A 표준용액을 HPLC를 이용하여 측정하였으며 농도별 면적을 구하여 검량선을 구하였다. 상기과정을 총 3회 반복하였으며 검출한계(Limit of Detection, LOD) 및 정량한계(Limit of Quantification, LOQ)는 검량선 기울기의 평균(S) 및 y절편의 표준편차(σ)를 이용하여 구하였으며 계산식은 아래와 같다.

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

직선성 평가

농도가 1.0 mg/mL인 Camelliaside A 표준원액을 50% 메탄올로 순차적으로 희석하여 0.25, 0.5, 2.5, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 총 5개

농도로 조제하였다. 희석한 Camelliaside A 표준용액을 HPLC로 측정하여 농도별 면적을 계산하여 검량선을 구하였다. 표준용액 제조를 총 3회 반복하여 측정하였으며 결정계수(r^2) 값을 확인하였다.

콩잎 열수추출분말의 Camelliaside A 함량 측정

각기 다른 콩잎으로 생산된 3개의 콩잎 열수추출분말 1.0 g을 정밀히 달아 50% 메탄올 용액 100 mL를 첨가하여 30분간 초음파추출하였다. 해당용액을 1.0 mL 취하여 유리 바이알에 넣은 후 50% 메탄올 9.0 mL를 첨가하여 1.0 mg/mL 농도가 되도록 희석한 후 0.45 μm 멤브레인 필터를 이용해 여과하였다. 이 과정을 각 시료당 3회 반복하여 총 9개의 시험용액을 조제하였다. 각각의 용액을 HPLC로 분석하여 희석배수를 고려해 콩잎 열수추출분말 1.0 g에 함유된 Camelliaside A의 함량을 $\mu\text{g/g}$ 단위로 나타내었다.

결과 및 고찰

UHPLC-ESI-Q-TOF-MS를 이용한 kaempferol 유도체 분석

UHPLC-ESI-Q-TOF-MS의 positive mode에서 콩잎에 함유된 7종의 kaempferol 유도체를 충분한 수준의 감도, 머무름시간 (t_R), 분해능으로 분리하였다. Fig. 1A은 콩잎 열수추출물의 BPI (base peak intensity) 크로마토그램이고, Fig. 1B는 UV 350 nm 파장에서 검출한 크로마토그램이다. 350 nm 파장에서는 플라보놀 골격을 갖는 kaempferol 유도체가 선택적으로 검출되었다.

Fig. 1A 및 1B에 있는 피크 1 ($t_R=20.01$ min)의 분자이온 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 은 757.2194로 관찰되었고, 주요조각이온으로 glucose 1분자가 떨어져나간 m/z 595.1654 ($[\text{M}+\text{H}]^+-162$ amu), glucose 1분자와 rhamnose 1분자가 떨어져나간 m/z 449.1065 ($[\text{M}+\text{H}]^+-162$ amu-146 amu) 및 모분자인 kaempferol의 분자이온 m/z 287.0530이 관찰되어 이 화합물은 kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside로 동정되었다. 분자이온 m/z 757.2178을 갖는 피크 2 ($t_R=20.59$ min)는 MS 및 MS/MS 스펙트럼의 양상이 피크 1과 동일하게 나타나 피크 1 화합물의 부분입체이성질체인 camelliaside A로 동정되었다. 피크 1 및 2의 구분은 시중에서 구입한 지표물질과의 t_R 를 비교하여 실시하였다. 피크 3 ($t_R=21.05$ min)은 분자이온 m/z 611.1613과 주요조각이온으로 glucose 1분자가 떨어져나간 m/z 449.1074 ($[\text{M}+\text{H}]^+-162$ amu) 및 glucose 1분자와 galactose 1분자가 떨어져나간 모분자인 kaempferol 분자이온 m/z 287.0533 ($[\text{M}+\text{H}]^+-162$ amu-162 amu)이 관찰되어 이 화합물은 panasenoside로 동정되었다. 분자이온 m/z 611.1619를 갖는 피크 5 ($t_R=21.55$ min)는 MS 및 MS/MS 스펙트럼의 양상이 피크 3과 동일하게 나타나 피크 3 화합물의 구조이성질체인 kaempferol-3-gentiobioside로 동정되었다. 피크 3과 5 화합물은 시중에서 구입한 지표물질과의 t_R 를 비교하여 구별 하였다. 피크 4 ($t_R=21.55$ min)의 분자이온은 m/z 741.2244에서 관찰되었고 주요조각이온으로 rhamnose 2분자가 떨어져나간 m/z 449.1079 ($[\text{M}+\text{H}]^+-146$ amu-146 amu)와 kaempferol 분자이온 m/z 287.0533이 관찰되어 이 화합물을 mauritianin으로 동정하였다. 피크 6 ($t_R=24.47$ min)은 m/z

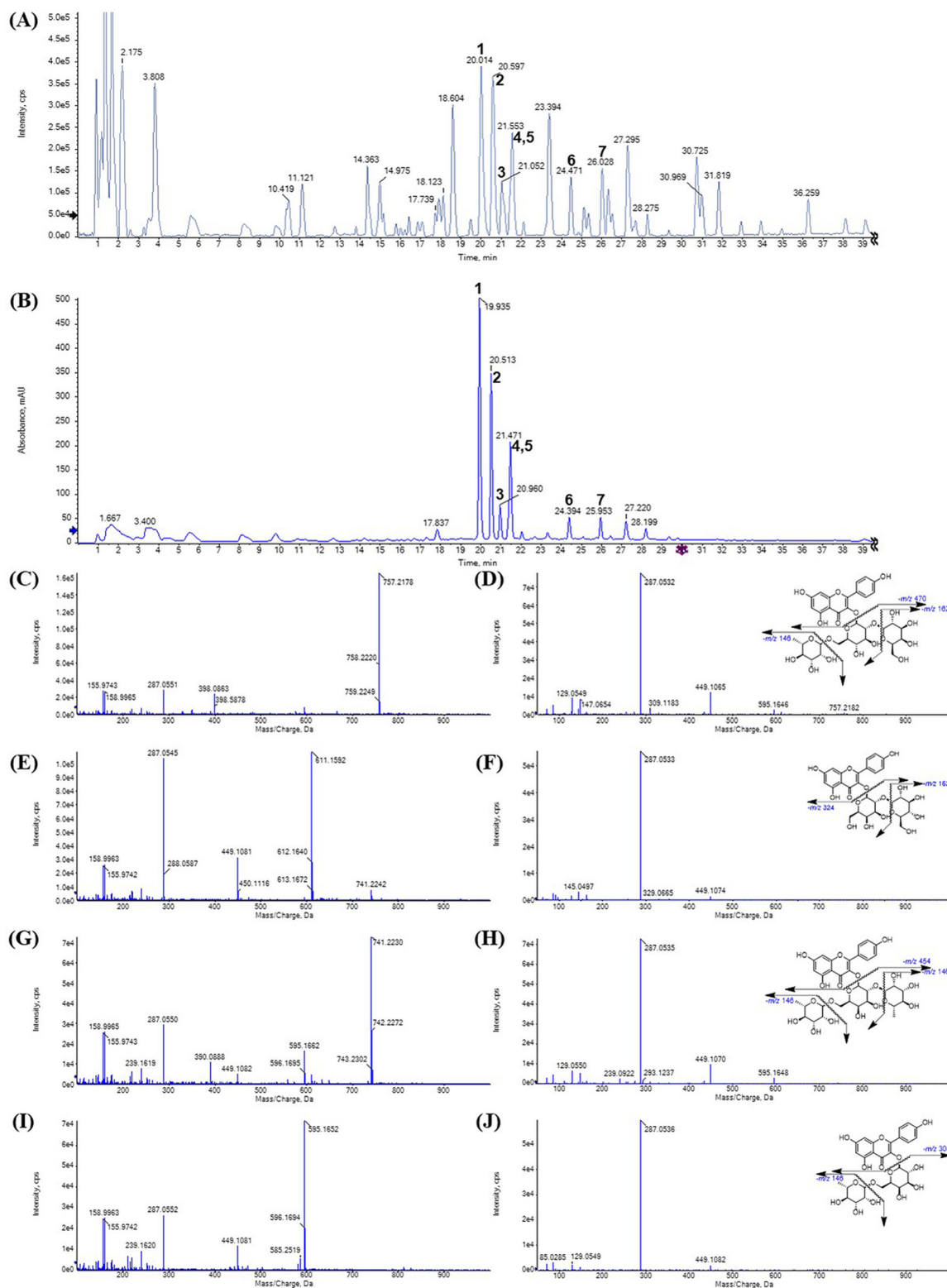


Fig. 1 (A) BPI chromatogram of hot-water extract of soybean leaves by UHPLC-ESI-Q-TOF/MS. (B) UHPLC chromatogram of hot-water extract of soybean leaves at UV 350 nm. Peak 1, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside; peak 2, camelliaside A; peak 3, panasenoside; peak 4, mauritianin; peak 5, kaempferol-3-gentiobioside; peak 6, biorobin; peak 7, nicotiflorin. (C and D) MS and MS/MS spectra of camelliaside A. (E and F) MS and MS/MS spectra of panasenoside. (G and H) MS and MS/MS spectra of mauritianin. (I and J) MS and MS/MS spectra of biorobin

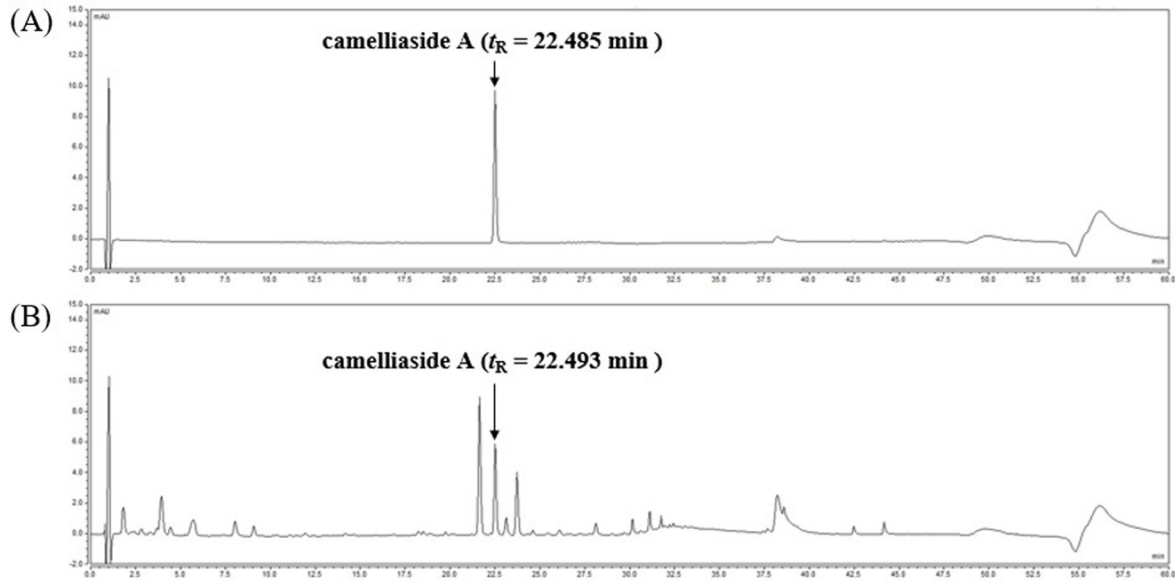


Fig. 2 HPLC chromatograms at UV 350 nm. (A) 10 µg/mL of camelliaside A standard solution. (B) hot-water extract of soybean leaves at UV 350 nm

595.1652에서 관찰된 분자이온 $[M+H]^+$ 과 주요조각이온 449.1082 ($[M+H]^+-146$ amu) 및 모분자인 kaempferol의 분자이온 m/z 287.0536이 관찰되어 biorobin으로 동정되었다. 분자이온 m/z 595.1663을 갖는 피크 7 ($t_R=26.02$ min)은 MS 및 MS/MS 스펙트럼의 양상이 피크 6 화합물과 동일하게 나와 피크 6의 부분입체이성질체인 nicotiflorin으로 동정되었다. 피크 6과 7의 구분은 시중에서 구입한 지표물질의 t_R 을 비교하여 실시하였다. 요약하면, 콩잎에서 7종의 캠퍼페롤 유도체의 구조를 MS 및 MS/MS 스펙트럼과 시중에서 구입한 6종의 지표물질의 t_R 을 비교하여 정확하게 동정하였다. 구조동정한 7종의 kaempferol 유도체에서 피크 1 (kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-galactopyranoside)의 함량이 가장 높게 관찰되었으나 지표물질을 시중에서 구입할 수 없었다. 두 번째로 함량이 높은 피크 2 (camelliaside A)는 순도 98% 이상의 지표물질로 구입할 수 있어 camelliaside A를 콩잎 대사체 밸리데이션을 위한 지표물질로 선택하였다.

콩잎의 지표성분으로써 camelliaside A의 선정

콩잎의 지표성분에 대한 기존연구는 없다. 콩잎은 캠퍼페롤 유도체를 특징적으로 함유하고 있음이 선행연구에서 잘 알려져 있다. 앞에 기술하였듯이 7종의 캠퍼페롤 유도체를 LC-ESI-Q-TOF-MS로 구조동정하고, 이들 캠퍼페롤 유도체는 350 nm의 UV 파장에서 선택적으로 높은 감도로 검출됨을 확인하였다. 이들 중 함량이 가장 높은 피크 kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranosyl(1→6)-β-D-galactopyranoside는 시중에서 높은 순도의 지표물질을 구입할 수 없어, 두 번째로 함량이 높고 98% 이상의 순도로 시중에서 구입할 수 있는 camelliaside A를 본 시험법의 지표성분으로 설정하였다.

특이성(Specificity) 평가

콩잎의 캠퍼페롤 유도체를 선택적으로 검출할 수 있는 350 nm

의 UV 파장에서 얻은 HPLC 크로마토그램을 비교분석하였다. Camelliaside A 표준용액의 머무름시간($t_R=22.485$ min)과 콩잎 열수추출물 분말 시험용액 내의 camelliaside A의 머무름시간($t_R=22.493$ min)이 잘 일치함을 확인하였고, 또한 제시한 분석 조건에서 간섭물질의 영향이 없음을 확인하였다(Fig. 2).

정확도(Accuracy) 평가

콩잎 열수추출물 분말 분석시료에 함유된 camelliaside A의 함량과 가까운 농도의 camelliaside A를 시료에 추가하여 분석하는 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 확인하였다. 대조군에 해당하는 열수추출분말 시험액의 camelliaside A의 농도는 대략적으로 8.04 µg/mL이었다. 이의 50, 100 및 150% 농도에 해당하는 4, 8 및 12 µg/mL 농도의 camelliaside A를 첨가하여 정확도 시험을 수행하였다. 그 결과 회수율의 평균은 96.68%였고, 회수율 구간은 95.44-99.38%이었다(Table 1). 이는 식품의약품 안전처의 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인 중 회수율 시험기준인 90-108%에 부합하는 결과이다[14].

일내정밀도(반복성) 평가

콩잎 열수추출물 분말 1.0, 2.0 및 3.0 g을 취하여 5회 반복 측

Table 1 Accuracy (recovery test) results of camelliaside A in the hot-water extract powder of soybean leaves

Repetition #	Spiked amounts of camelliaside A		
	4.0 µg/mL	8.0 µg/mL	12.0 µg/mL
1	95.75	96.56	99.38
2	97.34	96.20	97.43
3	95.44	96.05	95.99
Mean recovery rate (%)	96.18	96.27	97.60
Net recovery rate (%)	96.68		
Range of recovery rate (%)	95.44-99.38		

Table 2 The intra-day precision (repeatability) results of camelliaside A (CA) in the hot-water extract powder of soybean leaves (n =5)

Repetition #	Amount of hot-water extract powder of soybean leaves		
	1.0 g CA contents (µg/g)	2.0 g CA contents (µg/g)	3.0 g CA contents (µg/g)
1	5752.31	5724.75	5690.61
2	5738.70	5724.71	5683.80
3	5752.31	5707.74	5699.69
4	5765.93	5694.12	5699.65
5	5731.89	5700.93	5686.07
Mean	5748.23	5710.46	5691.97
SD	13.27	13.91	7.46
RSD (%)	0.23	0.24	0.13
Range of RSD (%) 0.13–0.24			

Table 3 The inter-day precision (reproducibility) results of hot-water extract powder of soybean leaves using camelliaside A (n =50)

Day	Repetition #	Amount of hot-water extract powder of soybean leaves		
		1.5 g Camelliaside A contents (µg/g)	2.5 g Camelliaside A contents (µg/g)	
1	1	6022.09	5960.20	
	2	6067.47	5932.97	
	3	5949.49	5938.42	
	4	5944.95	5962.92	
	5	5990.33	5949.31	
2	1	6062.93	6104.50	
	2	5972.17	6099.05	
	3	5954.02	6030.99	
	4	5985.79	6044.60	
	5	5885.96	6071.83	
3	1	5777.05	5954.75	
	2	5895.03	5941.14	
	3	5790.66	5943.86	
	4	5772.51	5922.08	
	5	5849.65	5946.59	
4	1	6031.17	5883.96	
	2	5963.10	5927.53	
	3	6099.23	5905.75	
	4	6003.94	5916.64	
	5	5963.10	5924.80	
5	1	6044.78	5807.73	
	2	6026.63	5824.06	
	3	5967.64	5821.34	
	4	6044.78	5840.40	
	5	5972.17	5919.36	
	Mean	5961.46	Mean	5942.99
	SD	87.78	SD	77.72
	RSD (%)	1.47	RSD (%)	1.31
Net RSD (%) = 1.39				

Table 4 The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for camelliaside A analysis

Repetition #	Range (µg/mL)	Regression equation	r ²
1	0.1-100	y=0.1491x-0.0113	1
2	0.1-100	y=0.1457x-0.0022	1
3	0.1-100	y=0.1445x-0.0069	1
Mean of slopes (S)	0.1464	Standard deviation of intercept (σ)	0.0074
LOD (3.3σ/S)		0.167 µg/mL	
LOQ (10σ/S)		0.505 µg/mL	

Table 5 The linearity and standard curves for camelliaside A analysis

Repetition #	Range (µg/mL)	Regression equation	r ²
1	0.25-50	y=0.1493x-0.0158	0.9999
2	0.25-50	y=0.1457x-0.0028	0.9999
3	0.25-50	y=0.1458x-0.0029	0.9999

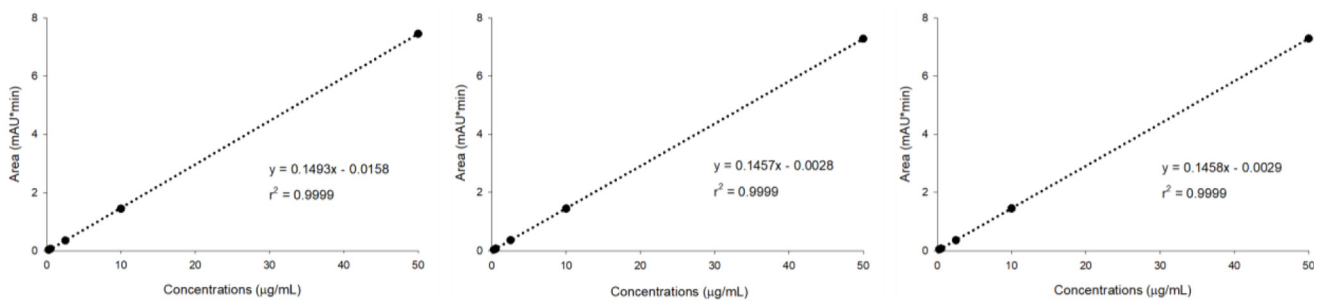


Table 6 The camelliaside A contents in the hot-water extract powder of soybean leaves

Repetition #	Camelliaside A contents (µg/g)		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
1	5777.63	5775.40	5692.79
2	5833.45	5835.74	5757.95
3	5850.25	5859.40	5729.08
Mean±SD	5820.44±31.04	5823.51±35.37	5726.61±26.66

정하여 시료량의 변화에 따른 반복정밀도를 확인하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 상대표준편차(RSD) 구간 0.13-0.24%로 본 시험법의 일내정밀도를 확인하였다. 이는 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인에 부합하였다[14].

일간정밀도(재현성) 평가

실험일간 정밀도는 콩잎열수추출물 분말 1.5 및 2.5 g을 각각 50% 메탄올 100 mL로 추출 후 10배 희석한 시험액을 이용하여 측정하였다. 시험용액을 1일 5회씩 5일 반복하여 총 50회의 측정에 따른 camelliaside A 함량은 0.59-0.61% 수준으로 측정되었고 이들의 상대표준편차 (RSD)는 1.39%로 계산되었다 (Table 3). 이는 0.1-1.0%의 지표물질 농도범위의 재현성 기준 6% 이내로 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 밸리데이션 가이드라인을 만족하였다[14].

검출한계 및 정량한계 측정

Camelliaside A 표준용액을 7개 농도(0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 10,

50 및 100 µg/mL)로 조제하여 3회 분석하였다. 정량한계는 검량선의 기울기와 y 절편값을 이용하여 구하였다. 기울기 평균은 0.1464이며, y 절편값의 표준편차는 0.0074로 나타났다. 이를 통해 검출한계는 0.167 µg/mL, 정량한계는 0.505 µg/mL로 계산되었다(Table 4).

직선성 평가

정량한계 측정시 사용한 표준용액의 농도범위(0.1-100 µg/mL)에서 직선성이 잘 보장되는 5개 농도(0.25, 0.5, 2.5, 10 및 50 µg/mL)를 지정하여 직선성을 확인하였다. 오차범위 확인을 위해 3회 반복 측정하였다. Table 5와 같이 3개의 시험군 모두에서 검량선의 상관계수 (r²) 값이 0.9999로 매우 우수한 직선성을 나타내었다.

콩잎 열수추출물 분말의 camelliaside A 함량 측정

실험실 규모에서 콩잎을 열수추출하여 동결건조한 3개의 콩잎 열수추출물 분말에 대하여 camelliaside A 함량을 분석하였다.

Table 6에 나타난 바와 같이 3개 시료의 camelliaside A 함량은 5820.44, 5823.51 및 5726.61 µg/g로 각각 분석되었다. 품종과 생육시기가 동일한 콩잎을 대상으로 분석하여 각 함량의 차이가 적게 나타남을 확인하였다.

콩잎 열수추출물에서 kaempferol 유도체 7종을 UHPLC-Q-TOF-MS로 동정하고 지표물질로 camelliaside A를 선정하였다. 콩잎 열수추출물 분말에 함유된 camelliaside A의 함량분석을 위한 HPLC 분석법 밸리데이션을 식품의약품안전처에서 공시한 기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드에 따라 수행하였다. HPLC 분석법의 신뢰성은 가이드라인에서 제시한 특이성, 직선성, 정확도, 정밀도, 정량한계 등의 평가값으로 검증하였다. 본 분석법 밸리데이션은 콩잎을 이용한 기능성식품 개발 및 천연물 연구자들의 활성소재연구에 중요한 자료로 활용될 것이다.

초 록

콩잎의 기능성식품소재연구가 활발히 진행되고 있지만 기능성 식품소재로서 콩잎을 관리할 수 있는 밸리데이션 방법은 제시되지 않고있다. 본 연구에서는 콩잎에서 7개의 kaempferol 유도체를 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS로 동정하고 이들 중 camelliaside A를 지표물질로 선정하였다. 콩잎열수추출물에서 camelliaside A를 정량할 수 있는 HPLC-UVD 밸리데이션 방법을 식품의약품안전처의 건강기능성식품에 대한 가이드라인에 따라 구축하였다. 개발된 HPLC-UVD 밸리데이션 방법은 특이성, 정확도, 일내정밀도, 일간정밀도, 검출한계, 정량한계 및 직선성에서 가이드라인을 만족하는 결과값으로 검증되었다. 또한 camelliaside A 분석법을 콩잎열수추출물에 적용하여 적합한 수준의 평가값을 얻었다.

Keywords 밸리데이션 · 콩잎 · Camelliaside A · HPLC-UVD

감사의 글 This research was supported by the Bio and Medical Technology Development Program of the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (No. NRF2020M3A9I3038523) and Rural Development Administration (PJ015732), Republic of Korea. The BK21 plus program supported scholarships for all students. The researchers received no external funding.

Declaration of Competing Interest The authors declare no competing financial interest.

References

- Kim IS (2022) Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites on plants. *Food Sci Biotechnol* 31: 515–526. doi: 10.1007/s10068-022-01070-7
- Sugiyama A (2019) The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond—A review. *J Adv Res* 19: 67–73. doi: 10.1016/j.jare.2019.03.005
- Ban YJ, Song YH, Kim JY, Baiseitova A, Lee KW, Kim KD, Park KH (2020) Comparative investigation on metabolites changes in soybean leaves by ethylene and activation of collagen synthesis. *Ind Crops Prod* 154: 112743. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112743
- Yuk HJ, Lee JH, Curtis-Long MJ, Lee JW, Kim YS, Ryu HW, Park CG, Jeong TS, Park KH (2011) The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent α -glucosidase inhibitory activity. *Food Chem* 126: 1057–1063. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.125
- Yuk HJ, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Jang KC, Seo WD, Kim JY, Kang KY, Park KH (2011) Pterocarpans profiles for soybean leaves at different growth stages and investigation of their glycosidase inhibitions. *J Agric Food Chem* 59: 12683–12690. doi: 10.1021/jf203326c
- Kim UH, Yoon JH, Li H, Kang JH, Ji HS, Park KH, Shin DH, Park HY, Jeong TS (2014) Pterocarpans-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic β -cell proliferation in type 2 diabetic mice. *Molecules* 19: 18493–18510. doi: 10.3390/molecules191118493
- Ryu R, Jeong TS, Kim YJ, Choi JY, Cho SJ, Kwon EY, Jung UJ, Ji HS, Shin DH, Choi MS (2016) Beneficial effects of pterocarpans-high soybean leaf extract on metabolic syndrome in overweight and obese Korean subjects: Randomized controlled trial. *Nutrients* 8. doi: 10.3390/nu8110734
- Li H, Ji HS, Kang JH, Shin DH, Park HY, Choi MS, Lee CH, Lee IK, Yun BS, Jeong TS (2015) Soy Leaf Extract Containing Kaempferol Glycosides and Pterocarpans Improves Glucose Homeostasis by Enhancing Pancreatic β -Cell Function and Suppressing Hepatic Lipid Accumulation in db/db Mice. *J Agric Food Chem* 63: 7198–7210. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01639
- Lee YH, Yuk HJ, Park KH, Bae YS (2013) Coumestrol induces senescence through protein kinase CKII inhibition-mediated reactive oxygen species production in human breast cancer and colon cancer cells. *Food Chem* 141: 381–388. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.053
- Li H, Kim UH, Yoon JH, Ji HS, Park HM, Park HY, Jeong TS (2019) Suppression of Hyperglycemia and Hepatic Steatosis by Black-Soybean-Leaf Extract via Enhanced Adiponectin-Receptor Signaling and AMPK Activation. *J Agric Food Chem* 67: 90–101. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04527
- Yuk HJ, Song YH, Curtis-Long MJ, Kim DW, Woo SG, Lee YB, Uddin Z, Kim CY, Park KH (2016) Ethylene Induced a High Accumulation of Dietary Isoflavones and Expression of Isoflavonoid Biosynthetic Genes in Soybean (*Glycine max*) Leaves. *J Agric Food Chem* 64: 7315–7324. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02543
- Xie C liang, Kang SS, Cho KM, Park KH, Lee DH (2018) Isoflavone-enriched soybean (*Glycine max*) leaves prevents ovariectomy-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Funct Foods* 43: 165–172. doi: 10.1016/j.jff.2018.02.014
- Xie CL, Park KH, Kang SS, Cho KM, Lee DH (2021) Isoflavone-enriched soybean leaves attenuate ovariectomy-induced osteoporosis in rats by anti-inflammatory activity. *J Sci Food Agric* 101: 1499–1506. doi: 10.1002/jsfa.10763
- Korea Food & Drug Administration (2021) Guideline for Recognition of Functional Ingredients for Health Functional Foods, Cheongju