pISSN 1225-4339 eISSN 2287-4992
Korean J. Food Nutr. Vol. 36. No. 2, 093~102 (2023)
https://doi.org/10.9799/ksfan.2023.36.2.093

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

병풀(*Centella asiatica*) 착즙액과 추출물의 Asiaticoside 분석법 검증 및 항산화 활성

김연숙 · 신현영[*] · 하은지[**] · 구자평[**] · 정세빈[**] · 김가을에[**] · 정미연[***] · †유광원[****]
한국교통대학교 식품영양학전공 대학원생, [*]고려대학교 대학원 의생명융합과학과 러닝헬스시스템 융합전공 대학원생,
[**]한국교통대학교 식품영양학전공 학부생, [***]㈜참선진녹즙 연구소장, [****]한국교통대학교 식품영양학전공 교수

Validation of Asiaticoside as Marker Compound of *Centella asiatica* Juice and Extract, and Its Antioxidant Activity

Yeon Suk Kim, Hyun Young Shin[*], Eun Ji Ha[**], Ja Pyeong Koo[**], Se Bin Jeong[**], Gaeuleh Kim[**], Mi Yeun Joung[***] and †Kwang-Won Yu[****]

Graduate School Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
[*]Graduate School Student, Transdisciplinary Major in Learning Health System, Dept. of Integrated Biomedical & Life Science, Korea University, Seoul 02841, Korea
[**]Undergraduate Student, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
[***]Food R&D Center Director, Corporation ChamSunJin Green Juice, Jincheon 27865, Korea
[****]Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea

Abstract

Centella asiatica (*C. asiatica*) has been widely used in food, cosmetics, and pharmaceutical industry as a functional material. In a previous study, we have investigated not only pharmacological effects such as antioxidative and anti-inflammatory effects, but also analyzed various functional ingredients. In this study, triterpenoids were analyzed using HPLC-DAD to determine marker compounds among functional ingredients. When triterpenoids were analyzed, asiaticoside from *C. asiatica* was determined as an optimal marker compound. Next, specificity, linearity, limited of detection (LOD), limited of quantification (LOQ), precision, accuracy, and range were evaluated using HPLC-DAD to determine asiaticoside contents in *C. asiatica* juice and extracts. The specificity was elucidated by chromatogram and retention time using an established analytical method. The coefficient of correlation obtained was 0.9996. LOD was 4.99 μg/mL and LOQ was 15.12 μg/mL. Intra- and inter-day precision of asiaticoside were determined to be 0.48~1.68% and 0.08~1.09%, respectively. Furthermore, the recovery rate of asiaticoside was 98.88% and the analytical range of Field-70E was determined to be 0.625~10 mg/mL. As a results of evaluating ABTS, DPPH, and FRAP antioxidative effect, Field-70E showed potent antioxidant activities. Results of this study could be used as basic data for quality standardization of *C. astiatica* juice and extracts.

Key words: *Centella asiatica*, marker compounds, asiaticoside, validation, HPLC-DAD

서 론

병풀(*Centella asiatica*)은 병을 치료하는 풀이라는 뜻으로, 미나리과(Apiaceae)의 다년생 초본식물로서 국내에서는 호랑이 풀이라고 불리며 주로 마다가스카르, 인도, 중국 등 아시아를 포함한 고온 다습한 환경에서 자라는 것으로 알려져 있다(Eom 등 2021). 국내에서는 남해와 제주도 일대에서 자생하는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 남부 지방뿐만 아니라 충북 충주에서도 재배되는 것으로 알려져 있다(Choi 등 2021a). 병풀은 다양한 약리적인 효과로 과거부터 전통요법을 통해

† Corresponding author: Kwang-Won Yu, Professor, Major in Food and Nutrition, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea. Tel: +82-43-820-5333, Fax: +82-43-820-5850, E-mail: kwyu@ut.ac.kr

약용으로 이용되어 왔으며, 항염증 효과를 통한 면역조절(Eom 등 2022) 및 면역 자극 효과(Ha 등 2009)뿐만 아니라 피부 관련 기능성으로 항산화, 피부염 개선효과(Shin 등 2020), 주름개선(Bylka 등 2013) 및 피부 개선(Kwon 등 2012) 등의 효능이 보고되고 있다. 또한, 식품 및 화장품 분야뿐만 아니라 제약 분야에서는 상처 치료제의 주요 성분으로 활용되고 있으며, 최근에는 '노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소 밀도를 유지하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음'이라는 눈 건강 개선에 관한 건강기능 식품 기능성 원료 개별인정을 획득한 것으로 알려져 있다(Park 등 2020). 이러한 병풀은 많은 기능성이 입증되어 수요가 급격하게 증가하고 있는 실정이나, 국내 원료는 수입 원료에 비해 원료 공급과 가격경쟁 등의 이유로 산업적으로 활용하기에는 어려움이 따르는 실정이며, 현재 국내에서 안정적인 원료 공급을 통해 산업적으로 활용 가능한 병풀 재배에 지속적으로 연구 및 개발 중인 것으로 알려져 있다(Choi 등 2020; Oh 등 2021).

병풀은 식품의약품안전처 기준에 따라 식용가능한 생물소재로 등록되어 있으며, 기능성 식품 소재로서 응용할 수 있는 다양한 생리활성을 지니고 있다. 따라서, 병풀을 개별인정형 원료로 개발하고자 하는 연구가 지속적으로 행해지고 있으므로 병풀에 함유된 지표성분을 발굴하고 이를 분석하는 것은 매우 중요하다. 병풀의 대표적인 유효성분은 트리테르페노이드 계열의 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid를 포함하는 것으로 알려져 있으며, 폴리페놀 계열의 chlorogenic acid, caffeic acid, ellagic acid, 1,5 및 3,4-dicaffeoyl quinic acid와 플라보노이드 cynaroside, scutellarin 및 miquelianin 등이 존재하는 것으로 알려져 있다(Shin 등 2021). 트리테르펜 중 높은 함량을 차지하는 madecassoside는 상처치유(Liu 등 2008), 관절염 개선(Li 등 2009) 및 항산화 효과(Bian 등 2012) 등의 효능을 가지며, asiaticoside의 경우 항균 및 항진균 활성을 가져 상처치유 및 피부질환에 대한 예방효과를 가지고 있어 시판 중인 상처치료제의 주요 성분으로 알려져 있다(Kil 등 2018).

한편, 식품의약품안전처에 따르면 개별인정형 기능성 원료의 인증은 건강기능식품의 지표성분(또는 기능성분)의 시험법을 제시하고 지표성분의 함량을 제시하도록 규정하고 있다. 또한, 지표성분에 대한 규격은 Association of Official Analytical Chemists(AOAC) 등의 공인된 분석방법을 이용하거나 유효성이 입증된 분석법 혹은 정확한 규격을 설정하기 위한 분석법의 타당성 및 신뢰성이 검증되어야 한다. 본 연구진은 국내에서 재배되는 병풀 추출물의 ABTS, DPPH 라디칼 소거능과 FRAP assay를 통한 항산화 활성을 검토하였고, RAW 264.7 대식세포주와 HaCaT 피부세포주를 이용하여 항염증 활성을 확인하였다(Shin 등 2020). 또한, 유효성분의 함량과 생리활성에 적합한 건조방법 및 부위에 따른 성분의 함량과 생리활성을 규명하였으며(Eom 등 2021; Eom 등 2022), 트리테르페노이드, 폴리페놀 및 플라보노이드 등을 유효성분으로 분석하였다(Shin 등 2021). 앞선 연구에서 병풀의 기능성 식품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였으며, 본 연구에서는 트리테르페노이드 4종을 분석하고 피크의 분리도 및 함량 등을 고려하여 최적 지표물질 선정과 분석법 검증을 진행하였다. 설정된 지표물질을 이용하여 제품 생산에 적용하고 이를 통한 제품 표준화로 소비자들에게 일정한 품질의 제품 공급에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 이는 향후 개별인정형 건강기능식품 원료로 적용하기 위한 타당성과 신뢰성을 확보하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

재료 및 방법

1. 시료 제조

본 연구에서 사용된 병풀(*C. asiatica*)은 2022년 충청북도 충주시의 농업회사법인 ㈜병풀농원(Chungju, Korea)에서 제공받았으며, 생육환경에 대한 유효성분의 함량을 분석하기 위해 각각 토경(field) 및 수경(hydroponics) 재배를 통해 얻은 병풀을 이용하였다. 병풀은 제공받은 즉시 착즙액으로 조제되거나, 열수추출 및 70% 주정추출을 위해 60℃에서 열풍건조하였으며 이후, 각각 착즙, 열수 및 70% 주정 추출을 통해 착즙액과 추출물을 조제하였다. 착즙액(juice)은 ㈜참선진 녹즙(Jincheon, Korea)에서 세척하여, 착즙(HH-SBF11, Hurom Co., Ltd., Seoul, Korea) 및 여과(Advantec, Tokyo, Japan)를 거쳐 조제되었고, 열수추출물(HE; hot-water extract)의 경우 건조된 원물 2 g에 증류수 98 mL의 비율(2%)로 13시간 동안 90℃에서 추출을 진행한 후 여과 과정을 거쳐 산업적으로 조제되었다. 반면, 70% 주정 추출물(70E; 70% ethanol extract)의 경우 건조된 원물의 20배의 70% 주정을 첨가하여 상온에서 3일간 교반한 후 여과를 거쳐 실험실에서 조제되었다. 조제된 착즙액과 추출물은 8% Brix 미만의 농도로 농축(Eyera, Tokyo, Japan)하고 동결건조(FD8508, Ilshin Biobase, Seoul, Korea)하여 분석에 이용되었다.

2. 표준용액 및 시료 조제

표준물질인 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다(Fig. 1). 표준물질은 HPLC 등급의 methanol (MeOH)에 용해하고 4 mg/mL 농도의 stock solution으로 조제하였다. 조제된 stock solution은 각각 섞어 1 mg/mL의 working solution으로 조제한 후 0.2~1 mg/mL로 희석하여 0.2 μm

membrane filter(PALL, Port Washington, NY, USA)로 여과한 후 분석에 이용되었다. 시료의 경우, 착즙액과 열수추출물은 물에 용해하였으며, 70% 주정 추출물은 70% 주정에 용해하여 분석에 이용되었다.

3. HPLC 분석조건

재배환경에 따른 병풀 착즙액 및 추출물의 유효성분 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid는 YMC-Triart C18 컬럼이 장착된 HPLC YL-9100 series로 분석하였다. 분석 용매는 deionized water와 acetonitrile을 이용하여 gradient 조건을 사용하였으며, DAD detector의 파장은 205 nm에서 분석되었다. 자세한 분석조건은 Table 1에 나타냈다.

4. 분석법 검증

지표물질에 대한 분석법의 검증(method validation)은 '건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(NIFDS 2021)'를 근거하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy)을 분석하고 직선성 검증을 통해 계산된 기울기와 표준편차를 이용하여 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limited of quantification, LOQ)를 산출하였다. 이를 토대로 병풀 착즙액과 추출물에 함유한 asiaticoside를 분석함으로써 해당 성분에 대한 분석법 검증을 진행하였다.

1) 특이성

특이성은 분석 대상 물질을 정확하게 분리해 측정할 수 있는 능력을 의미하며 MeOH, 표준물질 및 시료를 이용하여 분석하였으며, 검증 대상인 asiaticoside와 시료의 HPLC chromatogram을 비교하여 peak의 간섭여부와 분리정도를 확인함으로써 특이성을 판단하였다.

2) 직선성

직선성은 표준물질의 일정 농도 범위 내에 직선적인 값을 나타내는 능력을 의미하며, 표준물질을 MeOH에 용해하여 0~0.95

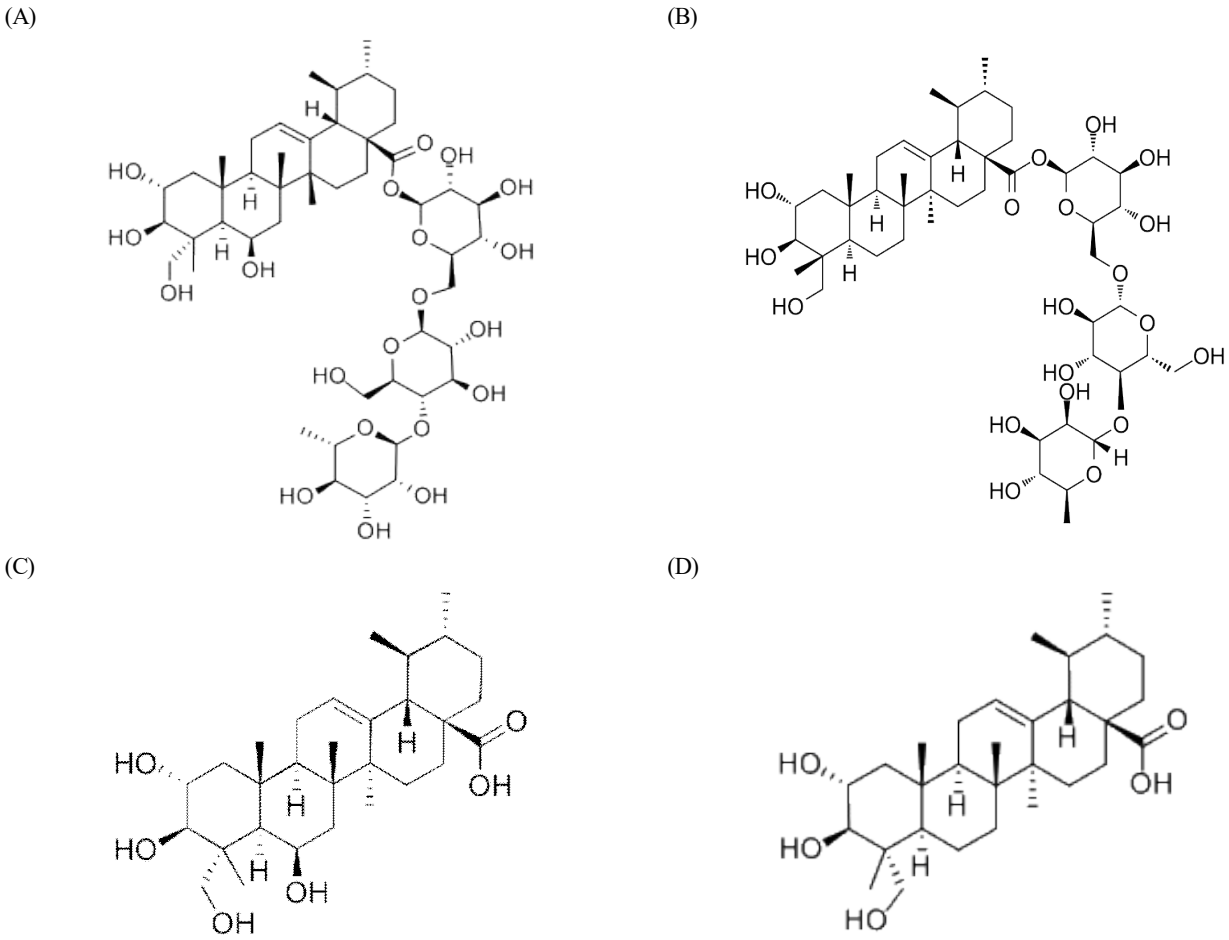

Fig. 1. Chemical structure of (A) madecassoside, (B) asiaticoside, (C) madecassic acid, and (D) asiatic acid.

Table 1. HPLC conditions for the quantitative analysis of triterpenoids

Analysis	Conditions		
Instrument	YL-9100 series (Young Lin Co. Ltd, Anyang, Korea)		
Column	YMC-Triart C18 (150×4.6 mm, 3 μm, YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)		
Column temp.	30℃		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	Deionized water (%)	Acetonitrile (%)
	0	79	21
	9	79	21
	12	77	23
	20	77	23
	24	65	35
	30	65	35
	32	56	44
	34	33	67
	42	33	67
	45	0	100
	50	79	21
	65	79	21
Flow rate	0.8 mL/min		
Injection volume	20 μL		
Detector	UV at 205 nm		
Data calculator	Clarity system		

mg/mL로 순차적으로 희석하고 농도에 대한 면적의 검량선을 작성하였다. HPLC를 통한 분석은 각각 3회 반복하였으며 분석한 값을 토대로 결정된 검량선을 통해 기울기(slope), 표준편차(standard deviation) 및 상관계수(R^2)를 확인하였다.

3) 검출한계 및 정량한계

검출한계는 검출 가능한 최소량, 정량한계는 정량 값으로 나타낼 수 있는 분석대상 성분의 최소량을 뜻한다. Asiaticoside의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 앞선 직선성에서 계산된 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하여 아래와 같은 식을 이용하여 계산되었다.

LOD=3.3×σ/S

LOQ=10×σ/S

σ: standard deviation of intercept

S: mean of slope

4) 정밀성

정밀성은 균일한 표준물질로부터 여러 번 분석한 결과를 통해 측정하였을 때 각각의 측정값의 근접성을 의미하고 직선성에 의해 산출된 농도 범위에서 0.24, 0.48 및 0.71 mg/mL의 농도에 해당하는 표준물질을 반복 측정하여 재현성(repeatability)을 확인하였다. 또한, 정밀성(intermediate precision)은 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀성으로 나타냈으며, 3일간 반복하여 측정하고 그에 대한 상대표준편차(relative standard deviation, RSD %)로 정밀도를 판단하였다.

5) 정확성

정확성은 참값에 근접한 정도를 의미하여 분석값이 얼마나 근접하는지를 나타내며, 직선성에 의해 산출된 농도 범위에서 0.24, 0.48 및 0.71 mg/mL의 농도에 해당하는 표준물질을 분석한 후 5회 반복 측정에 따른 참값과 분석값에 대한 회수율(recovery %)을 산출하여 분석법의 정확성을 확인하였다.

6) 분석 범위 설정

재배환경에 따른 병풀 착즙액과 추출물에 함유된 asiaticoside를 지표물질로 활용하기 위해 분석법 검증을 마친 표준물질 asiaticoside를 이용하여 검출한계 및 정량한계 등을 고려하여 시료의 분석 농도 범위를 설정하였다.

5. 항산화 활성

재배환경과 추출용매에 따른 착즙액 및 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 Shin 등(2020)의 방법을 참고하여 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS, Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA)와 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich)를 이용한 자유 라디칼 소거능과 ferric reducing antioxidant power(FRAP) 활성을 분석하였다. L-ascorbic acid(Sigma-Aldrich)를 표준물질로 이용하여 시료의 상대적인 항산화능을 비교하였으며, 시료 처리에 대한 라디칼 소거능은 μg AEAC(ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)/mg으로 나타냈으며, FRAP 활성은 μg AE(ascorbic acid equivalent)/mg로 나타냈다.

6. 통계처리

모든 시험은 각각 조건에 맞게 3번 이상 반복하여 실시하였으며 결과를 평균±표준편차(SD)로 나타낸 후 통계분석은 Statistical Package for Social Science(SPSS V 26, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. HPLC를 통해 정량한 값은 분산의 동질성을 비교하기 위해 Leven's test를 실시하였다. 측정값들이 동질성을 갖는 경우 분산분석(ANOVA)을

실시한 후 각 측정값의 유의성을 Duncan's multiple range test 검증하여 $p<0.05$ 수준에서 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 재배환경에 따른 병풀 착즙액과 추출물의 유효성분 함량 분석

토경 및 수경재배 병풀 착즙액과 추출물의 지표성분 결정을 위하여 유효성분인 트리테르페노이드 4종에 대한 분석을 진행하여 각각의 크로마토그램과 함량을 Fig. 2와 Table 2에 나타냈다. 착즙액(juice)의 경우 재배환경에 관계없이 madecassoside, madecassic acid 및 asiatic acid는 검출되지 않았으나, asiaticoside의 경우 토경 착즙액(Field-juice)은 3.70 μg/mg의 함량을 나타냈으며, 수경 착즙액(Hydroponics-HE)은 2.22 μg/mg를 함유하는 것으로 확인되었다. 열수추출물의 경우에는 토경 재배는 asiaticoside만이 4.82 μg/mg을 함유하는 것으로 확인되었으며 수경재배의 경우 madecassoside(3.64 μg/mg) 및 asiaticoside(6.68 μg/mg)를 함유하고 있었다. 반면, 70% 주정추출물은 4개의 유효성분을 모두 함유하고 있었는데, 토경 70% 주정추출물(70E)은 madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 각각 17.94, 35.27, 0.94 및 0.74 μg/mg를, 수경 70% 주정추출물은 7.85, 24.30, 0.97 및 2.17 μg/mg의 유효성분 함량을 나타냈다. 유효성분이 모두 함유된 70% 주정추출물에서 madecassoside는 토경이 수경재배보다 약 2.3배 증가되었고, asiaticoside는 약 1.5배 증가, asiatic acid는 수경이 토경보다 2.9배 증가한 반면, madecassic acid는 유사한 수준으로 나타나 재배환경에 따라 유효성분의 큰 차이를 확인할 수 있었다. 한편, Shin 등(2021)의 연구에서 병풀을 건조방법 및 부위에 따라 분리하여 상온에서 교반하여 냉수추출을

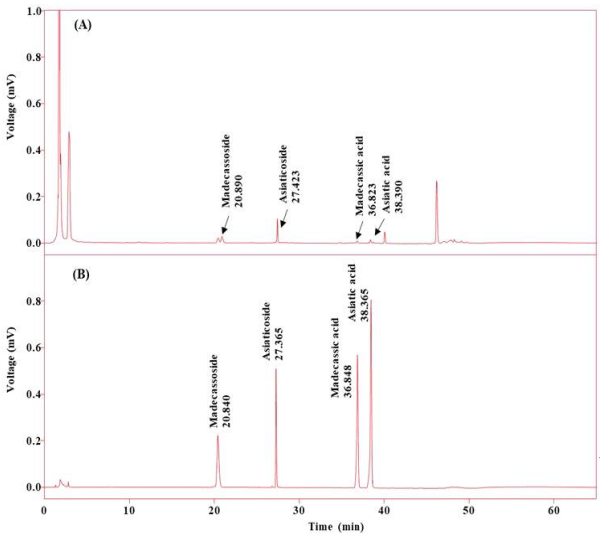

Fig. 2. HPLC chromatogram of (A) Field-70E and (B) standard mixture.

진행한 경우, 상기 주요 트리테르페노이드는 검출되지 않은 것으로 보고하였는데, 본 연구에서 열과 용매를 처리하지 않고 압력과 교반을 통해 얻어진 착즙액도 검출량이 적은 결과를 나타내어, 극성이 현저히 높은 물보다는 열과 70% 주정을 처리하는 것이 트리테르페노이드 성분을 효과적으로 추출할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, Shin 등(2020)의 연구에서 추출용매에 따른 주요 트리테르페노이드 성분 4종(madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid)은 70% 주정 추출물이 가장 높게 함유하고 있다고 보고하여 본 연구결과와 일치되는 경향을 나타냄으로써 이후 식품 소재로 활용가능한 수준에서 주정의 농도를 조정하여 트리테르페노이드 성분들을 효과적으로 획득할 수 있는 추출방법을 제공할 수 있을

Table 2. Contents of major triterpenoids in *C. asiatica* juice and extracts

Sample		Madecassoside (μg/mg)	Asiaticoside (μg/mg)	Madecassic acid (μg/mg)	Asiatic acid (μg/mg)
Field	Juice	n.d[1)]	3.70±0.15[e]	n.d	n.d
	HE[2)]	n.d	4.82±0.15[d]	n.d	n.d
	70E[3)]	17.94±0.44[a]	35.24±1.61[a]	0.94±0.01	0.74±0.03
Hydroponics	Juice	n.d	2.22±0.02[f]	n.d	n.d
	HE	3.64±0.03[c]	6.68±0.03[c]	n.d	n.d
	70E	7.85±0.11[b]	24.30±0.56[b]	0.97±0.02	2.17±0.05

[1)] Not detected.
[2)] HE: hot-water extracts.
[3)] 70E: 70% EtOH extracts.
All results of composition content are expressed as mean±S.D. for three independent experiments. Different letters within a column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test.

것으로 판단된다.

또한, 트리테르페노이드 4종의 유효성분에 대한 HPLC 분석결과, madecassoside의 경우, 피크 분리도가 다소 양호하지 않으며, madecassic acid 및 asiatic acid는 착즙액과 열수추출물에서 검출되지 않는 소량이라는 점에서 지표물질로 이용하기에는 어려움이 있음을 확인하였다. 그러나, 본 연구에서 지표물질로 선정한 asiaticoside는 다른 3종의 성분(madecassoside, madecassic acid 및 asiatic acid)에 비해 착즙액 및 추출물에서 모두 검출되었을 뿐만 아니라 시료에서 피크 분리도가 우수한 점, 머무름 시간 및 높은 유효성분의 함량 등을 고려하여 최적 지표성분인 asiaticoside에 대한 컬럼, 이동상의 조성 및 검출파장 등을 확인하고 지표물질에 대한 분석법 검증을 진행하였다.

2. 분석법 검증

1) 특이성

특이성은 분석대상 물질을 불순물로부터 정확하게 분리해 측정할 수 있는 능력을 의미하며, 다른 물질들과 간섭 없이 표준물질과 시료의 HPLC 분석을 통해 해당 물질의 peak의 선택적 분리여부와 간섭정도 등을 측정하였다(Kwon 등 2022). 본 연구에서 확립한 HPLC 조건으로 표준용액과 병풀 착즙액 및 추출물의 크로마토그램을 비교하여 peak의 분리여부를 확인한 결과, asiaticoside는 다른 피크와 간섭 없이 단일 피크로 검출되었으며, 표준용액의 머무름 시간은 27.4분대, 시료의 경우 27.4분대로 일치하였다(Fig. 2). 또한, 전처리 용매인 MeOH과 비교 시 용매 피크에 대한 간섭이 없는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과를 토대로 해당 분석법이 특이성을 가지는 것으로 확인되었다.

2) 직선성

직선성은 분석대상 물질의 농도에 비례하여 표준물질의 일정 농도범위에서 직선적인 값을 나타내는 능력을 말하며(Hong 등 2021), 분석법이 일정 농도 범위에 있는 검체 중 분석대상 물질의 양에 대한 직선적인 값에 대한 확보 여부를 확인하고자 asiaticoside 표준용액을 각각의 농도에 대한 피크 면적으로 검량선을 작성하고 상관계수(R^2)를 통해 직선성을 확인하였다. 표준용액을 각각 0.19, 0.38, 0.57, 0.76 및 0.95 mg/mL로 조제하여 각각 3회 반복으로 HPLC를 분석하여 크로마토그램과 검량선을 작성하였다(Fig. 3). 검량선의 상관계수는 0.9996으로 확인되어 우수한 직선성이 입증되었고 머무름 시간은 27.3~27.6분대로 확인되었으며 지표성분의 함량을 계산할 수 있는 회귀방정식(y=2,719.6524x－3.6730)이 산출되었다. 이러한 결과를 토대로 해당 분석법이 직선성을 가지는 것으로 확인되었다.

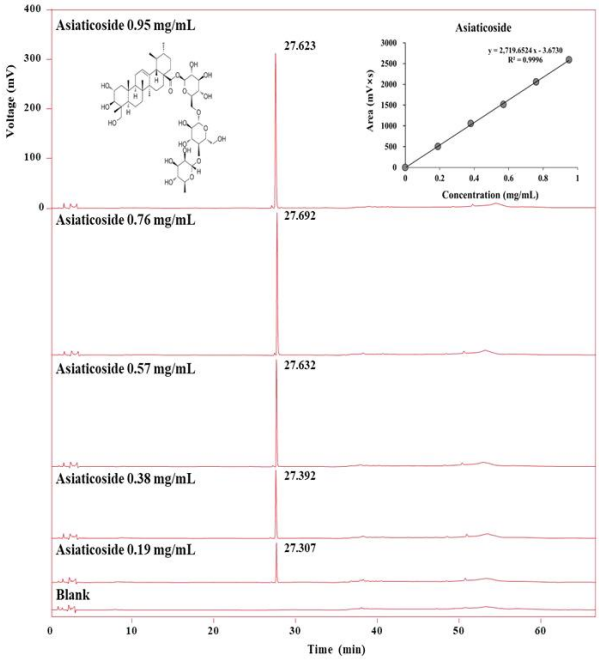

Fig. 3. HPLC chromatogram of asiaticoside and blank.

3) 검출한계 및 정량한계

검출한계는 시료 중에 분석하고자 하는 성분의 검출 가능한 최소량 혹은 최저농도를 뜻하며, 정량한계는 정확성과 정밀성을 가진 정량값으로 나타낼 수 있는 분석대상성분의 최소량을 뜻한다(Choi 등 2021b). 검출한계 및 정량한계의 값이 낮을수록 해당 물질이 주어진 분석법에서 검출이 용이하다는 의미를 나타내며(Choi 등 2022), 직선성 확인을 위해 작성된 검량선의 intercept와 slope를 종합하여 검출한계와 정량한계를 산출하였다(Table 3). 지표물질 asiaticoside의 검출한계는 4.99 μg/mL로 확인되었으며, 정량한계는 15.12 μg/mL로 확인되었다.

4) 정밀성

정밀성은 균일한 표준물질로부터 일정한 조건에서 여러 번 분석한 결과를 통해 측정하였을 때 각각의 측정값의 근접성을 의미한다(Han 등 2022). 직선성을 평가한 농도 범위에 있는 지표성분의 3가지 농도(0.24, 0.48 및 0.71 mg/mL)에 대하여 정밀성을 분석하였다. 동일 실험실에서 서로 다른 실험일, 분석자, 장비 또는 기구를 사용하여 얻은 측정 값들 사이의 근접성을 확인하는 것으로 본 연구에서는 분석일을 요인으로 실험실 내 정밀성을 확인하였다. 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 변동성을 분석한 결과, asiaticoside는 일내 0.48~

1.68%의 RSD를 나타냈으며, 일간 0.08~1.09%의 RSD를 나타냈다(Table 4).

5) 정확성

정확성은 이미 알고 있는 참값에 근접한 정도를 의미하며 분석값이 참값에 얼마나 근접하는지를 나타낸다(Lee 등 2021). 분석시료에 직선성을 평가한 농도 범위에 있는 세가지 농도를 첨가하여 분석해서 회수율을 확인하여 정확성을 평가한 결과, 회수율은 98.63~102.21%로 측정되었으며, 평균 회수율은 98.88%로 확인되었으며, ±5% 미만의 정확성을 나타냈다(Table 5).

6) 지표물질 asiaticoside 함량 및 분석 범위 결정

분석법 검증을 통해 확립된 HPLC 분석법으로 재배환경에 따른 병풀 착즙액 및 추출물 6종에 대한 지표물질로 선정된 asiaticoside를 분석하고 각각의 함량을 산출한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 토경재배 병풀의 70% 주정 추출물이 가장 높은 함유량(33.32 μg/mg)을 나타내었고, 수경재배 70% 주정 추출물(21.93 μg/mg), 수경 열수추출물(6.21 μg/mg), 토경 열수추출물(4.35 μg/mg), 토경 착즙액(3.33 μg/mg) 및 수경 착즙액(1.85 μg/mg)의 순으로 확인되었다(p<0.05). 이는 앞선 표준물질의 혼합액을 통해 계산된 함량과 유사한 것으로 확인되었으며, 지표물질 asiaticoside는 다른 유효성분 3종(madecassoside, madecassic acid 및 asiatic acid)과 같이 주정 추출 시 높은 추출율을 나타내었으며, 열수추출물보다도 적었지만 다른 3종 화합물과는 달리 착즙액에서도 확인이 될 뿐만 아니라 트리테르페노이드 4종 중에서 가장 높은 함량을 함유하는 것으로 확인되어 지표물질로 적합한 것으로 확인되었

Table 3. Linearity regression, limited of detection (LOD), and limited of quantification (LOQ) for asiaticoside

Analyte	Range (μg/mL)	Correlation coefficient (R^2)	σ[1)]	S[2)]	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Asiaticoside	0~950	0.9996	4.11	2,719.65	4.99	15.12

1) Standard deviation of intercept.
2) Mean of slope.

Table 4. Precision of intra- and inter-day variabilities for asiaticoside

Variability		Concentration (mg/mL)	Area	Observed (mg/mL)	Mean±S.D.	RSD[1)] (%)
Intra-day	1	0.24	618.44	0.23	0.23±0.00	1.68
	2	0.48	1,303.20	0.48		
	3	0.71	1,886.13	0.69		
	1	0.24	620.05	0.23	0.48±0.00	0.48
	2	0.48	1,312.79	0.48		
	3	0.71	1,933.62	0.71		
	1	0.24	601.34	0.22	0.70±0.01	1.24
	2	0.48	1,314.97	0.48		
	3	0.71	1,908.70	0.70		
Inter-day	1	0.24	640.21	0.24	0.24±0.00	1.09
		0.48	1,318.94	0.49		
		0.71	1,908.70	0.70		
	2	0.24	654.17	0.24	0.49±0.00	0.08
		0.48	1,319.25	0.49		
		0.71	1,900.58	0.70		
	3	0.24	649.67	0.24	0.71±0.01	0.90
		0.48	1,317.33	0.49		
		0.71	1,933.62	0.71		

1) RSD: Relative standard deviation.

Table 5. Recovery rate of analytical method for asiaticoside

Analyte	Concentration (mg/mL)	Recovery (%)		
		Recovered	Mean±S.D.	Mean
Asiaticoside	0.24	0.23±0.01	98.81±2.99	98.88±2.38
	0.48	0.49±0.00	102.21±0.21	
	0.71	0.70±0.01	98.63±0.89	

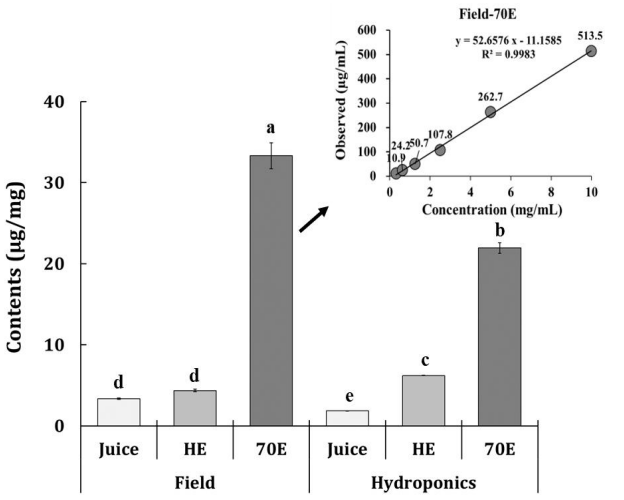

Fig. 4. Contents of asiaticoside in *C. asiatica* juice and extract. All results of composition content are expressed as mean±S.D. for three independent experiments. Bars with different letters are significantly different (p<0.05) according to Duncan's multiple range test. HE: hot-water extracts, 70E: 70% EtOH extracts.

다. 또한, 지표물질을 가장 많이 함유하였던 토경 재배 70% 주정 추출물의 분석 범위를 설정하기 위해서 시료를 농도별로 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도에서 재 분석한 결과(Fig. 4), asiaticoside의 함량은 각각 10.9, 24.2, 50.7, 107.8, 262.7 및 513.5 μg/mL를 나타냈다. 0.3125 mg/mL의 농도 분석 시 10.9 μg/mL의 지표물질의 함량을 나타내어 검출한계인 4.99 μg/mL는 초과하였으나, 정량한계인 15.12 μg/mL는 도달하지 못해 시료의 분석 범위는 0.3125 mg/mL를 제외한 0.625~10 mg/mL로 설정하였다.

3. 항산화 활성

정상적인 대사과정에서 생성되는 자유 라디칼은 인체 내에서 지질, 단백질, DNA 및 효소 등을 파괴하여 세포 조직에 염증, 피부 노화, 암 등의 심각한 손상을 야기하는 것으로 알려져 있다(Choi 등 2016). 이를 개선할 수 있는 항산화 활성은 염증, 피부 개선 및 항암 등 다양한 생리활성과 밀접한 관련을 가지고 있으며, 기능성 소재로서 항산화 활성이 갖는 의의는 클 것으로 예상된다. 따라서 재배환경에 따른 병풀 착즙액 및 추출물의 항산화 활성을 평가하였으며, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거능 결과는 Fig. 5A에 나타냈다. ABTS 라디칼 소거활성의 경우, 토경 70% 주정 추출물(53.9 μg AEAC/mg)과 수경 열수추출물(52.0 μg AEAC/mg)에서 우수하게 나타났

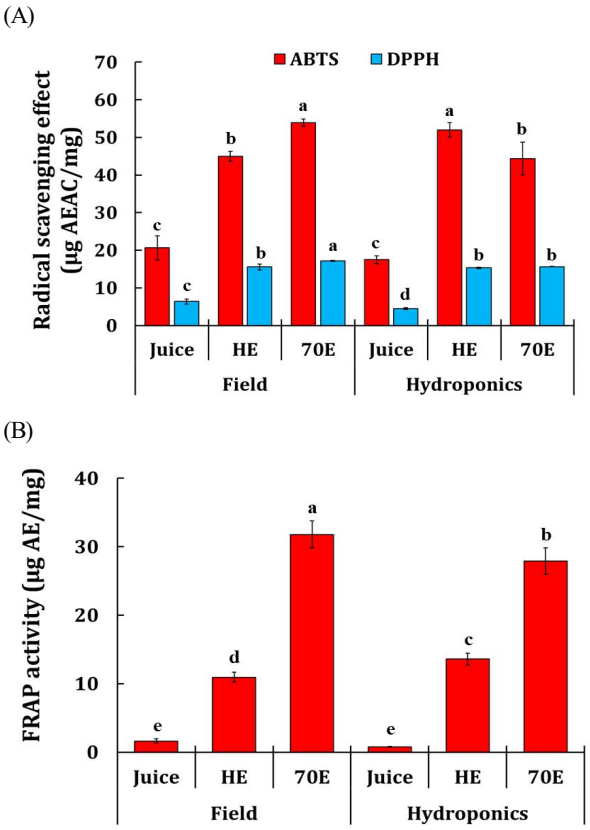

Fig. 5. Antioxidant activity of *C. asiatica* juice and extract. (A) ABTS and DPPH radical scavenging effect and (B) FRAP activity. All results of composition content are expressed as mean±S.D. for three independent experiments. Bars with different letters are significantly different (p<0.05) according to Duncan's multiple range test. HE: hot-water extracts, 70E: 70% EtOH extracts.

으며 토경 및 수경 착즙액은 상대적으로 낮은 ABTS 소거능을 보였다. DPPH 라디칼 소거활성 결과에서도 유사한 경향을 나타냈는데, 토경 70% 주정 추출물(17.2 μg AEAC/mg)에서 가장 우수한 라디칼 소거능을 보였으며, 수경 착즙액(4.5 μg AEAC/mg)은 낮은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈다. Benzie & Strain (1996)의 연구에 따라 ferric ion(Fe^{3+}) 복합체를 ferrous ion(Fe^{2+})의 형태로 환원시키는 원리를 이용하여 항산화 활성을 평가한 결과는 Fig. 5B에 나타내었다. 분석결과, 토경 70% 주정추출물이 31.8 μg AE/mg으로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 반면 수경 착즙액은 0.8 μg AE/mg으로 상대적으로 가장 낮은 활성을 나타냈다. 종합적으로, 라디칼 소거능 및 FRAP 활성을 통한 항산화 활성 평가결과, 토경 70% 주정 추출물이 가장 우수한 항산화 활성을 나타냈으며 이는 항산화 활성 관련 기능성 소재로서 활용가능 할 것으로 사료된다.

요약 및 결론

병풀(*C. asiatica*)은 식품, 화장품 및 제약 산업에서 기능성 물질로서 널리 사용되고 있다. 선행연구에서 항산화, 항염증 등 약리적인 효과뿐만 아니라, HPLC를 통해 다양한 기능성 성분을 분석하였으며 본 연구에서는 기능성 성분의 검증을 위해 HPLC-DAD를 통해 분석법 검증을 진행하였다. Madecassoside, asiaticoside, madecassic acid 및 asiatic acid 등의 트리테르페노이드에 대해 분석을 진행하였으며, 분석 결과, 기능성/지표성분으로 asiaticoside를 선정하였다. HPLC-DAD를 사용하여 asiaticoside 함량을 결정하기 위한 특이성, 직선성, 검출 한계(LOD), 정량 한계(LOQ), 정밀성, 정확성, 분석 범위를 평가하였다. 특이성은 확립된 분석방법을 사용하여 크로마토그램과 머무름 시간으로 설명하였으며, 직선성을 확인하기 위해 얻어진 상관계수(R^2)는 0.9996으로 나타났으며, LOD 및 LOQ는 각각 4.99 및 15.12 μg/mL로 나타났다. asiaticoside의 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 정밀성은 각각 0.48~1.68%, 0.08~1.09%로 나타났으며, asiaticoside의 회수율은 98.88%로 나타났다. 검증된 분석법으로 확인한 토경 70% 주정추출물(Field-70E)의 분석범위는 0.625~10 mg/mL로 나타났다. 또한, 항산화 활성을 분석 결과, 70% 주정추출물(Field-70E)의 ABTS 및 DPPH의 라디칼 소거활성과 FRAP에서 각각 53.9 μg AEAC/mg, 17.2 μg AEAC/mg, 31.8 μg AE/mg의 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 본 분석 방법이 asiaticoside 분석에 적합한 것으로 시사되었으며, 병풀 착즙액 및 추출물의 식품/건강기능식품 소재로의 산업적 적용 가능성에 대한 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2022년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(2021RIS-001; 핵심기술개발사업).

References

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76

Bian D, Liu M, Li Y, Xia Y, Gong Z, Dai Y. 2012. Madecassoside, a triterpenoid saponin isolated from *Centella asiatica* herbs, protects endothelial cells against oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol* 26:399-406

Bylka W, Znajdek-Awiżeń P, Studzińska-Sroka E, Brzezińska M. 2013. *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol Alergol* 30:46-49

Choi EY, Heo SI, Kwon YS, Kim MJ. 2016. Anti-oxidant activity and anti-inflammatory effects of *Spiraea fritschiana* Schneid extract. *Korean J Med Crop Sci* 24:31-37

Choi HM, Kim SG, Kim HY, Woo SO, Kim S, Moon HJ, Han SM. 2022. Determination of spermidine in freeze-dried royal jelly using ultra performance liquid chromatography. *J Apic* 37:51-57

Choi JN, Lee HJ, Lee YJ, Jeong JT, Lee JH, Chang JK, Park CG. 2020. Growth characteristics and asiaticoside content, and antioxidant activities in *Centella asiatica* by cultivation and irrigation methods. *Korean J Med Crop Sci* 28:254-259

Choi JN, Oh MW, Lee HJ, Lee JH, Jeong JT, Lee YJ, Chang JK, Park CG. 2021a. Comparison of growth characterisitics, asiaticoside content and antioxidant activities of *Centella asiatica* (L.) Urb. *Korean J Plant Resour* 34:44-51

Choi SI, Han X, Men X, Lee SJ, Park MH, Lee OH, Yang JM, Choi YE, Cho JH. 2021b. Development and validation of an analytical method for 2-furoic acid in *Benincasa hispida* extracts (HR1901-W). *J Agric Life Environ Sci* 33:311-320

Eom HJ, Shin HY, Ji YM, Kwon NR, Yoon HS, Kim IJ, Song Y, Yu KW. 2021. Nutritional components and physiological activity of *Centella asiatica* cultured in Chungju by drying method. *Korean J Food Nutr* 34:165-173

Eom HJ, Shin HY, Park HJ, Kim KH, Kim JH, Yu KW. 2022. Functional components and physiological activity in different parts of *Centella asiatica*. *Korean J Food Preserv* 29:749-

761

Ha JH, Kwon MC, Kim Y, Jeong SS, Jeong MH, Hwang B, Lee HY. 2009. Enhancement of immuno-modulatory of *Centella asiatica* L. Urban with edible polymer through nano-encapsulation process. *Korean J Med Crop Sci* 17:257-265

Han X, Choi SI, Men X, Lee S, Oh G, Jin H, Oh HJ, Kim E, Kim J, Lee BY, Lee OH. 2022. Modification and validation of an analytical method for dieckol in *Ecklonia stolonifera* extract. *J Food Hyg Saf* 37:143-148

Hong JH, Lee MJ, Jo YI, Moon SM, Lee SA, Kim CS. 2021. Analytical method validation of cynaroside in domestic *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. leaves extract for standardization as a functional ingredient using RP-HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 50:395-402

Kil YS, Sin SM, Lee DY, Min JW, Yang K, Lee SW, Kim YH, Goo YM. 2018. Analysis of triterpene glycoside levels and antioxidant activity in the different shoot tissues of *Centella asiatica* (L.) Urban. *J Life Sci* 28:917-922

Kwon JG, Jung YW, Choi YH, Lee JE, Jeong W, Lee JA, Choi CW, Ahn EK, Choi Y, Hong SS. 2022. Development and validation of an analytical method for the detection of resveratrol and trans-scirpusin A as functional ingredients *Smilax sieboldii* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51: 1171-1177

Kwon KJ, Choi SJ, Yoon Y. 2012. Improving effects of the cleanser containing *Centella asiatica* extracts and charcoal and pearl powder on the facial skin. *Korean J Aesthet Cosmetol* 10:581-586

Lee JH, Jeong KO, Im SY, Lee SJ. 2021. Analytical method validation of ellagic acid as an antioxidative marker compound of the *Rubus occidentalis* extract. *Korean J Food Preserv* 28:663-673

Li H, Gong X, Zhang L, Zhang Z, Luo F, Zhou Q, Chen J, Wan J. 2009. Madecassoside attenuates inflammatory response on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Phytomedicine* 16: 538-546

Liu M, Dai Y, Li Y, Luo Y, Huang F, Gong Z, Meng Q. 2008. Madecassoside isolated from *Centella asiatica* herbs facilitates burn wound healing in mice. *Planta Med* 74:809-815

National Institute of Food and Drugs Safety Evaluation [NIFDS]. 2021. Guide to preparation of submission materials for recognition of functional ingredients for health functional food. pp.42-49. *National Institute of Food and Drugs Safety Evaluation*. Report No. 0769-04

Oh S, Park S, Lee S, Park Y, Jang KI, Yu KW, Kim D, Shin H. 2021. Comparison of growth characteristics and physiological activity of two *Centella asiatica* cultivars in greenhouse soil culture. *J Bio-Environ Control* 30:351-358

Park DW, Jeon H, So R, Kang SC. 2020. *Centella asiatica* extract prevents visual impairment by promoting the production of rhodopsin in the retina. *Nutr Res Pract* 14:203-217

Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim JE, Lee KH, Bae YJ, Yu KW. 2020. Bioactive compounds, anti-oxidant activities and anti-inflammatory activities of solvent extracts from *Centella asiatica* cultured in Chungju. *Korean J Food Nutr* 33:692-701

Shin HY, Kim H, Jung S, Jeong EJ, Lee KH, Bae YJ, Suh HJ, Jang KI, Yu KW. 2021. Interrelationship between secondary metabolites and antioxidant capacities of *Centella asiatica* using bivariate and multivariate correlation analyses. *J Appl Biol Chem* 64:82

Received 13 January, 2023
Revised 14 February, 2023
Accepted 24 February, 2023