

어젠다코드	2-6-3		구분	세부완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	H03	작목구분코드	FR-03-FR35
과제종류	농업공동연구		세부사업(약어)	지역주력산업	
과제명	시니어 프랜들리 웰니스 메디케어 발효유제품개발 및 상품화				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	임영순		부장	서울에프엔비	
연구기간	2018 ~ 2019		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 유산균 종균 선발 및 발효유 개발			(주)서울에프엔비	임영순	'18~'19
2) 참당귀 추출물의 효능평가			강원대학교	주진우	'18~'19
3) 참당귀 잎 제조공정 표준화			농식품연구소	김희연	'18~'19
4) 기능성물질의 물성변화 및 구조특징 분석			서울대학교	유대웅	'18~'19
색인용어	참당귀 잎, 향당노, 발효유				

ABSTRACT

This study was conducted for the method of cultivation for the simultaneous harvesting of the roots and leaves of *Angelica gigas* Nakai. The roots of *Angelica gigas* Nakai, are used as a medicinal ingredient, but all the *Angelica gigas* Nakai, leaves are discarded. Effects of harvesting time, fertigation levels on yield and quality of the roots and leaves were evaluated. The quantitative determination method of decursin as a marker compound of roots and leaves of *Angelica gigas* Nakai, extract was analysed by HPLC using a C18 column (3×150mm, 3µm) with 0.1% TFA in water and acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.5mL/min and detection wavelength of 330nm. As a result, the decursin content of the N 10kg / 10a treatment was the highest. Method development and validation of decursin for the standardization of *Angelica gigas* Nakai as a functional ingredient and health food were accomplished. The quantitative determination method of decursin as a marker compound of aerial parts of *Angelica gigas* Nakai extract (AAGE) was optimized by HPLC analysis using a C18 column (3×150mm, 3µm) with 0.1% TFA in water and acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min and detection wavelength of 330 nm. The HPLC/PDA method was applied successfully to quantification of the marker compound in AAGE after validation of the method with linearity, accuracy, and precision. The method showed high linearity in the calibration curve at a coefficient of correlation (R2) of 0.9994 and the limit of detection and limit of quantitation were 0.011µg/mL and 0.033µg/mL, respectively. Relative standard deviation (RSD) values of data from intra- and inter-day precision were less than 1.10% and 1.13%, respectively. Recovery of decursin at 0.5, 1, 5 and 10µg/mL were 92.38 ~ 104.11%. These results suggest that the developed HPLC method is very useful for the determination of marker compound in AAGE to develop a health functional material.

1. 연구목표

고령자의 경우 저작과 소화능력이 감소함에 따라 식품의 섭취가 제한적이고 이로 인해 영양성분 결핍현상 등 여러 문제점이 유발하게 된다. 이를 해소하기 위한 건강지형 시니어 맞춤형 식품 제조 기술 개발이 필요하나 관련 식품산업 기반이 미흡한 것으로 판단된다. 본 연구에서는 시니어 프렌들리 소비시장에 대한 기술적 경쟁력을 확보할 수 있는 기술개발(고부가 식품산업, 고부가 바이오 소재산업, 네트워크 및 기업지원)을 수행함으로써 지역산업 투자확대를 창출하는 비즈니스 모델 구축 및 지역 산학연관 기관 간 협력을 통한 컨소시엄 구성하고, 항당뇨 효능이 뛰어난 참당귀 잎 소재에 발효유를 적용시킴으로 시니어 맞춤형 발효유제품 개발 기술을 확립으로 기존 발효유 제품대비 기능성이 강화된 제품 및 건강기능 식품개발을 위한 참당귀 잎 추출물의 제조 공정 표준화 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

<제3부과제: 참당귀 잎 제조공정 표준화>

(시험 1) 참당귀 잎 재배 및 시비처리에 따른 생산량 검정시험

가. 본 연구는 비료(N, P, K) 함량에 따른 참당귀 잎의 생산량을 검정하기 위하여 강원도 평창군 소재의 포장에서 수행되었다. 질소처리구는 무처리구를 포함하여 N 2.5, 5, 7, 10kg/10a로 총 5처리구로 설정하였으며 각 처리구당 5구획 반복 수행하였다. 재배 후 수확된 참당귀 시료를 잎과 뿌리로 분리하여 생체중을 측정하였으며 생육 기간 동안 6월과 9월에 참당귀 지상부의 초장, 엽장, 잎자루, 클로로필을 측정하는 생육조사를 진행하였다.

(시험 2) 참당귀 소재의 지표성분 설정

가. 참당귀 잎 지표성분 스크리닝(HPLC)

참당귀 건조분말 시료를 100% 에탄올에 추출하고 감압여과하여 0.45 μ m membrane filter에 통과 시킨 다음 HPLC를 이용하여 분석하였다(표 1). 참당귀 잎의 지표성분 확인을 위하여 표준품과 비교 분석하였다.

나. 참당귀 잎 분말제조를 위한 용매선정

참당귀 잎의 물과 에탄올 비율에 따른 추출용매 선정을 위해 추출용매별 amylase 저해활성을 검정하였다. 참당귀 잎의 추출용매 비율은 에탄올 0, 20, 40, 60, 80, 100%이었으며 추출용매별 참당귀 잎의 α -amylase에 대한 저해활성은 starch를 기질로 하여 측정하였다. 반응에 사용된 시약으로 α -amylase, starch, 3,5-dinitrosalicylic acid, sodium potassium tartarate, NaOH, acarbose, potassium phosphate buffer 조제에 사용된 KH_2PO_4 및 KH_2PO_4 는 Sigma Co. (St Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. 시료 0.5 μ L에 pancreatin 기원의 12 unit/ml α -amylase 50 μ L와 0.2M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 50 μ L를 첨가하여 혼합한 후 37 $^\circ\text{C}$ 에서 20분 동안 반응시켰다.

반응이 끝난 후 1% starch 용액 100 μ L을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 DNS 발색시약 (3,5-dinitrosalicylic acid and 30% sodium potassium tartarate in 0.5M NaOH)을 250 μ L 첨가한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 10분 간 가열하여 발색시켰다. 발색이 된 반응액을 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 냉각하고 이 반응액의 3배의 증류수를 가하여 교반한 후 ELISA reader (FLUOstar Omega, BGM LABTECH, Ortenberg, Germany)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 변화로부터 효소 저해 활성을 계산하였다. 대조구로는 경구용 혈당강하제로 쓰이는 acarbose를 사용하였다.

$$\alpha\text{-Amylase inhibitory activity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료처리구의 흡광도}}{\text{무무처리구의 흡광도}}\right) \times 100$$

다. 참당귀 잎 추출물 조제

본 실험에 사용된 참당귀 잎은 강원도 평창에서 재배되었으며 수확 후 이물질을 제거하고 건조한 다음 분쇄하여 추출물 조제 시료로 사용하였다. 참당귀 잎 건체 시료에 60% 에탄올을 첨가하고 3회 반복 추출 후 추출액을 여과하여 감압농축하고 부형제로 30% dextrin을 첨가한 다음 분무건조 하여 분말 시료를 조제하였다.

라. 지표성분의 벨리데이션 설정

(1) HPLC 분석

조제된 3 lot의 분무건조 추출물을 각각 0.1g씩 정확하게 칭량하고 메탄올 100mL을 가하여 최종 농도가 1mg/mL이 되게 재용해 한 다음 0.45 μ m membrane filter에 통과시켜 HPLC 분석용 시료로 사용하였으며 모든 분석은 3반복 실시하였다. 참당귀 지상부 추출물 및 decursin 표준용액의 분석은 Nano Space SI-2 HPLC (Shiseido, Japan)를 사용하였다. 컬럼은 Cadenza CD-C₁₈(150 \times 3mm, 3 μ m, Imtakt, Kyoto, Japan)을 사용하였고, 0.1% TFA와 100% acetonitrile을 이동상으로 사용하여 시료 주입량 5 μ L, 컬럼 온도 50 $^{\circ}$ C, 유속 500 μ L/min으로 25분 동안 분석하였다(표 1).

(2) 표준용액의 조제

표준품으로 사용된 decursin 1mg에 10mL 메탄올을 첨가하고 용해시켜 100 μ g/mL의 농도로 표준원액을 조제하였다. 이 표준원액을 단계적으로 희석하여 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μ g/mL 농도의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석에 사용하였으며 분석된 peak 면적값에 0.97을 곱하여 표준품의 순도를 보정하였다.

(3) 분석시약

본 실험에 사용된 decursin(\geq 97%, HPLC)은 Sigma Co. (St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고 추출 및 HPLC분석에 사용된 용매는 Merck Co. (Kenilworth, NJ, USA)의 HPLC 등급을 사용하였다.

(4) 분석법의 검증(method validation)

참당귀 지상부 추출물의 기능성 식품 원료 개발을 위한 벨리데이션은 ‘의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드(식품의약품안전처)’를 바탕으로 decursin의 농도별 표준용액을 HPLC로 분석하여

특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision), 정확성(accuracy)을 측정하였다.

특이성은 시료 내에 존재할 수 있는 불순물, 분해물 등의 영향을 받지 않고 해당성분을 특이적으로 측정할 수 있는 정도를 나타내며 특이성 검정을 위하여 decursin의 농도별 표준용액과 참당귀 지상부 추출액을 HPLC로 분석하고 측정되는 머무름 시간과 크로마토그램을 비교하였다.

직선성은 decursin 표준용액의 농도에 비례하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 농도별 표준용액의 peak 면적과 농도 간 회귀분석에 의한 표준 검량선을 작성하고 산출된 검량선의 결정계수(coefficient of determination, R²)를 통하여 직선성을 확인하였다. Decursin 표준용액의 검량선에서 기울기와 y절편의 표준편차를 구하고 아래의 식에 근거하여 정량한계(LOQ)와 검출한계(LOD)를 산출하였다. (LOQ = 10 × σ/S, LOD = 3.3 × σ/S, σ: y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

정확성은 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)을 통하여 측정하였다. 정확성은 농도별 표준용액의 일내분석과 일간분석을 통하여 측정된 값(measured value)이 참값(true value)에 근접한 정도를 백분율로 나타내었으며 일내분석은 농도별 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였고 일간분석은 일내분석 과정을 3일 동안 반복 분석하여 변이성을 확인하였다. 일내분석 및 일간분석 시 각 구간마다 3농도 3회 반복 측정하였다. 정밀성은 일내분석과 일간분석에서 얻어진 표준용액의 평균값과 표준편차를 근거로 상대표준편차를 측정하여 평가하였으며 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 나타내었다.

회수율은 농도별로 조제된 지표성분과 함량이 확인된 시료를 혼합 후 분석하여 회수되는 지표성분의 양으로 측정하였다. Decursin 표준정량곡선에서 직선성이 확인된 0.5, 1, 5, 10μg/mL 농도의 표준용액에 참당귀 추출물을 혼합하여 HPLC로 3회 반복 분석하고 측정된 값으로부터 회수율과 상대표준편차를 산출하였다.

표 1. 지표성분을 측정을 위한 HPLC 분석조건

Classification	Condition		
Instrument	Nano Space SI-2 (Shiseido, Japan)		
Column	Cadenza CD-C18 (150 × 3 mm, 3 μm)		
Column temp °C	50		
Mobile phase	Eluent A: 0.1% TFA Eluent B: acetonitrile		
Injection volume	5 μL		
Detector	UV 330 nm		
Run time	25 min		
Gradient table			
Time (min)	Flow rate (μL)	%A	%B
initial	500	25	75
3	500	25	75
4	500	50	50
18	500	50	50
19	500	25	75
25	500	25	75

(시험 3) 참당귀 잎 발효유의 지표성분 모니터링

참당귀 잎 추출물이 함유된 발효유의 공정별 지표성분 함량을 분석하기 위하여 추출용매별 참당귀 잎 추출물의 decursin 함량을 HPLC로 측정하여 비교하였다. 추출용매는 50% 메탄올, 100% 메탄올, DMSO, 증류수를 각각 사용하였다. 추출용매별 decursin 함량을 분석한 후 선정된 추출용매를 사용하여 시제품 발효유의 decursin 함량을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

〈제 3세부과제: 참당귀 잎 제조공정 표준화〉

(시험 1) 참당귀 잎 재배 및 시비처리에 따른 생산량 검정시험

가. 질소처리에 따른 생산력 검정 및 생육조사

참당귀 잎 소재 생산을 위한 비료(N, P, K) 함량에 따른 생산량을 검정하기 위하여, 평창소재 포장에서 수행하였다. 비료 질소시비량에 따른 참당귀 잎과 뿌리의 생산량 및 지표성분의 함량을 분석하기 위해 시비별 처리 N2.5, 5, 7.5, 10 kg/10a에 따른 포장시험결과, 1차 년도에 N5 처리구 이상은 모두 N2.5 처리구에 비해 지상부 및 지하부 생체중이 높음을 확인하였다. 2차 년도에 질소 시비량에 따른 참당귀 잎과 뿌리의 생산량은 모두 N2.5 처리구에 비해 N7.5 kg/10a 처리구 이상에서 지상부 및 지하부 생체중이 높음을 확인하였다. 1차 년도 대비 2차 년도 참당귀 지상부의 수확량보다 지하부의 수확량이 다소 높았는데 이는 재배환경 및 기상환경에 따라 생산량에 차이가 있는 것으로 판단된다.



5월 중



7월 상



9월 중

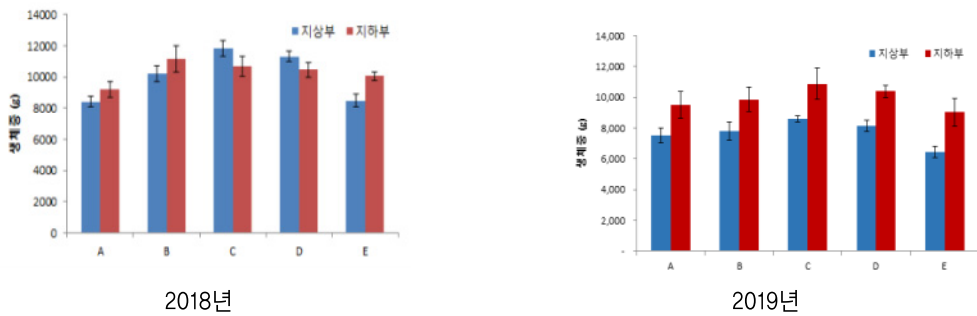


10월 중

그림 1. 참당귀 포장 전경



그림 2. 수확된 참당귀 시료 및 건체 분말 사진



(A: N2.5kg/10a, B: N5kg/10a, C: N7.5kg/10a, D: N10kg/10a, E: 무처리)

그림 3. 비료처리별 참당귀 지상부와 지하부의 생체중

평창소재 시험포장에서 비료(N, P, K) 함량에 따른 참당귀의 생육조사 결과는 표 2와 같다.

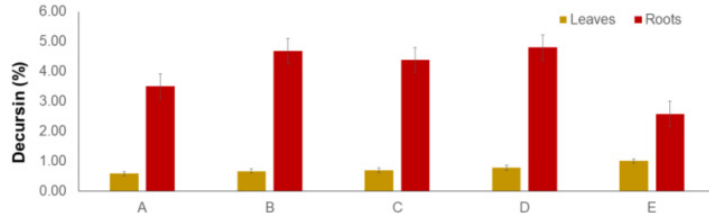
표 2. 생육조사 결과

조사일	처리구	초 장	엽 장	잎자루	클로로필
6월4일	무처리	14.42	10.42	3.11	41.34
	관행*	16.05	10.20	3.40	44.68
	A (N 2.5kg/10a)	15.47	10.88	3.95	42.25
	B (N 5kg/10a)	16.17	10.62	3.90	42.63
	C (N 7.5kg/10a)	15.66	11.22	3.84	41.20
	D (N 10kg/10a)	15.59	11.37	4.03	41.17
9월9일	무처리	29.48	27.28	15.90	42.53
	관행	21.72	17.10	27.06	41.23
	A (N 2.5kg/10a)	28.26	27.38	16.04	41.31
	B (N 5kg/10a)	28.68	25.84	19.00	41.13
	C (N 7.5kg/10a)	28.78	26.72	17.62	40.70
	D (N 10kg/10a)	28.48	26.94	16.44	41.39

* 관행: N · P₂O₅ · K₂O(6:4:4kg/10a)

나. 질소처리별 참당귀의 지표성분 분석

질소시비량에 따른 참당귀 잎과 뿌리의 지표성분의 함량을 분석하기 위해 시비별 처리 N2.5, 5, 7.5, 10에 따른 분석결과, N 10kg/10a 처리구의 decursin 함량이 다른 처리구에 비해 높음을 확인하였다.



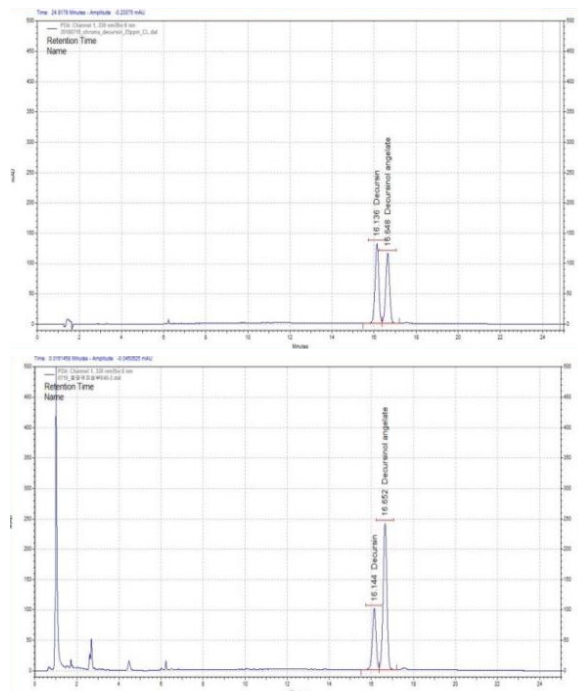
(A: N2.5kg/10a, B: N5kg/10a, C: N7.5kg/10a, D: N10kg/10a, E: 무처리)

그림 4. 참당귀 잎과 뿌리의 질소 시비별 지표성분 decursin의 함량

(시험 2) 참당귀 소재의 지표성분 설정

가. 참당귀 잎 지표성분 스크리닝(HPLC)

참당귀 잎의 지표성분을 스크리닝한 결과, decursin과 decursin angelate를 확인하였으며(그림 5), 참당귀 잎의 decursin과 decursin angelate 함량은 각각 0.7%, 1%로 분석되었다.



(위: 표준품, 아래: 추출물)

그림 5. 참당귀 잎 추출물의 지표성분 스크리닝 크로마토그램

나. 참당귀 잎 분말제조를 위한 용매선정 및 추출물 조제

물과 에탄올 비율에 따른 추출용매 선정을 위해 추출용매별 α -amylase 저해활성을 검정한 결과, 60% 에탄올 추출물을 기준으로 에탄올 함량이 높아질수록 α -amylase 저해활성은 감소하는 경향이었고, 지표성분의 함량은 비슷한 수준으로 유지되었다(그림 6). 이에 따라 참당귀 잎 분무건조 추출을 위한 용매로 60% 에탄올이 선정되었다. 참당귀 잎 전체 분말시료를 분무건조 공정에 따라 건조분말 추출물을 조제하였다(표 3).

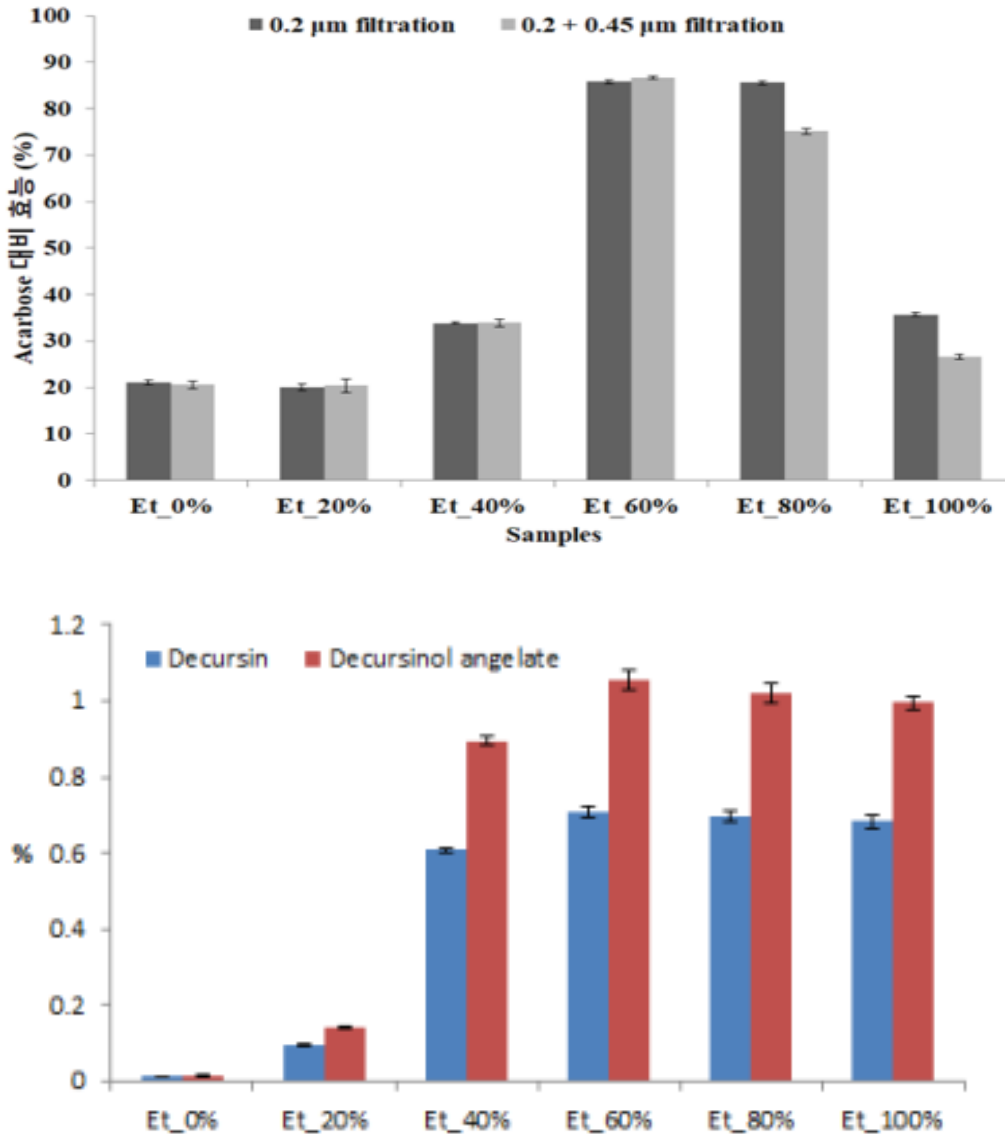


그림 6. 참당귀 잎 추출물의 amylase 저해활성(위) 및 지표성분 함량(아래)

표 3. 참당귀 잎 추출물의 분무건조 조건

제품제조공정		문서번호				
		제정일자				
당귀잎추출분말(주정60%) 701g		개정일자				
		개정번호		0	page	1/1
번호	제조공정	사용설비, 기기	조건, 관리항목	관리기준	빈도	비고
1	원료투입	추출-농축시스템	당귀잎(부직포) 주정(60%)	5kg		10배수
2	추출	추출-농축시스템	온도 시간	70 ON 순환추출		
3	여과	하우징여과기	필터사이즈	10 μ m		40L(2%)
4	농축	추출-농축시스템	온도 시간	70 4hr		5L(16%)
5	혼합/용해		농축액 텍스트린	5L(16%) 340g		고형분대비 30%
6	건조	S/D(중)	IN OUT	150 90		loss 30%
7	수율		중량	701g		701g(14.02%)

다. 설정된 지표성분의 벨리데이션 설정

지표성분으로 선정된 decursin을 HPLC분석을 통하여 분석법 확립 및 유효성 검정을 수행하였다. 참당귀 지상부 추출물의 기능성 식품 원료 개발을 위한 벨리데이션은 '의약품등 분석법의 벨리데이션 가이드(식품의약품안전처)'를 바탕으로 decursin의 농도별 표준용액을 HPLC로 분석하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision), 정확성(accuracy)을 측정하였다.

(1) 특이성(specificity)

HPLC 분석 결과, 참당귀 지상부 추출물 내에 혼합되어 있을 가능성이 있는 다른 성분들로부터 decursin만 선택적으로 측정되었으며 다른 물질의 간섭 없이 성분이 분리되는 것을 확인하였다. HPLC분석을 통하여 얻어진 크로마토그램 상에서 표준용액 및 참당귀 지상부 추출물의 decursin peak 머무름 시간은 15.7분대로 동일하였으며 spectrum도 일치하는 것으로 본 분석법의 특이성을 검정하였다(그림 7).

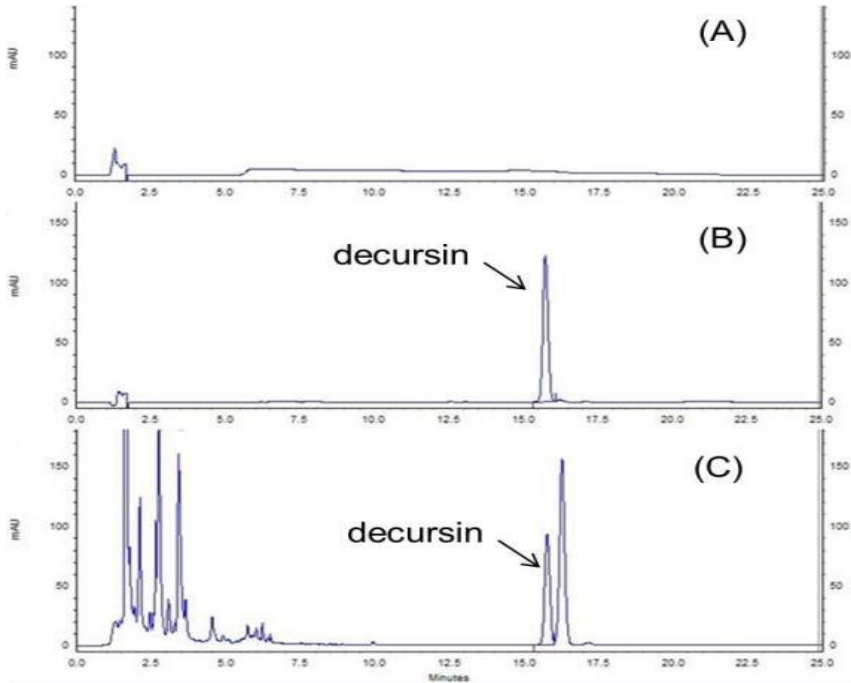


그림 7. 크로마토그램 (A): Blank , (B): decursin, (C): 참당귀잎 추출물

(2) 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ)

Decursin 표준용액을 0.1 ~ 10 μ g/mL로 희석한 다음 HPLC로 분석하여 작성된 표준 검량선의 상관계수(R²)는 0.9994으로 매우 우수한 직선성을 나타내었다(그림 8). 이 검량선으로부터 산출된 기울기와 y절편의 표준편차로 계산된 정량한계(LOQ)는 0.034 μ g/mL이었고 검출한계(LOD)는 0.011 μ g/mL인 것으로 나타났다. 정량한계는 검체 중 정확성과 정밀성을 가진 정량값으로 나타낼 수 있는 분석 대상물질의 최저농도를 의미하며 검출한계는 검체 내 존재하는 분석 대상물질의 검출 가능한 최저농도를 의미한다. 따라서 참당귀 지상부 추출물에 함유되어 있는 decursin의 함량은 0.034 μ g/mL 농도 수준까지 정량이 가능하며 0.011 μ g/mL 농도 수준까지 검출이 가능하다.

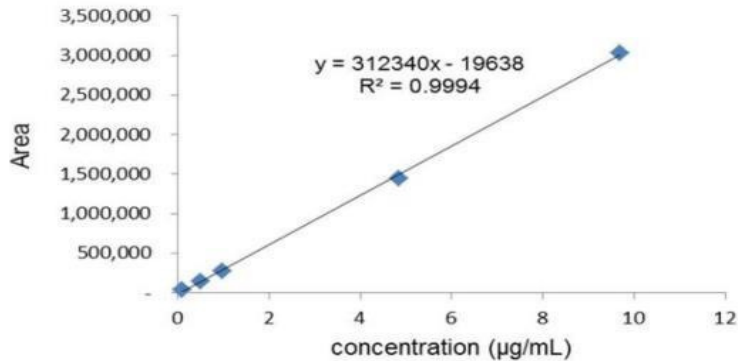


그림 8. Decursin 표준품의 검량선

(3) 정밀성(precision), 정확성(accuracy)

정확성은 농도별 표준용액의 일내분석과 일간분석을 통하여 측정된 값(measured value)이 참값(true value)에 근접한 정도를 백분율로 나타내었으며 측정된 값들로부터 상대표준편차(RSD)를 구하여 정밀성을 검증하였다. 일간분석의 정확성 및 상대표준편차는 각각 96.49 ~ 104.35%, 0.53 ~ 1.10%이었으며 일내분석의 정확성 및 상대표준편차는 각각 97.23 ~ 100.14%, 0.26 ~ 1.15%이었다(표 3). 각각의 분석에서의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로 나타나 decursin 분석법의 정확성 및 정밀성이 있음을 알 수 있었다(표 4).

표 4. Decursin의 정밀성과 정확성

	Nominal concentration (μ g/mL)	Mean measured concentration (μ g/mL)	Accuracy (%)	RSD ¹⁾ (%)
Intra-day ²⁾	2.5	2.54 ⁴⁾	104.35	0.53
	5	4.68	96.49	1.10
	10	9.74	100.37	0.72
Inter-day ³⁾	2.5	2.36	97.23	0.26
	5	4.86	100.14	1.15
	10	9.57	98.66	0.58

¹⁾ Relative standard deviation.

²⁾ Intra-day: tree times per day.

³⁾ Inter-day: one time analysis of decursin per day for 3 days.

⁴⁾ Each data was obtained by triple analysis (n=3).

(4) 회수율(Recovery)

회수율은 참당귀 지상부 추출물이 혼합된 농도별 표준용액의 검출 농도와 추출물이 혼합되지 않은 농도별 표준용액의 검출 농도 차이를 구하고 이 값을 참당귀 지상부 추출물만 분석하여 검출된 농도 값으로 나누어 측정하였다. 표준품 농도별 지표성분의 회수율은 92.38 ~ 104.11%의 범위였으며 분석오차 10% 이내로 측정되었다. 지표성분 회수율에 대한 상대표준편차는 모두 0.5% 이내인 것으로 나타나 decursin 분석법의 정확성을 확인할 수 있었다(표 5).

표 5. Decursin의 회수율 측정

Concentration (μ g/mL)	Recovery(%)	RSD(%)
0.5	104.11 ± 0.14	0.14
1	97.69 ± 0.20	0.20
5	92.38 ± 0.04	0.05
10	98.19 ± 0.39	0.40

(5) 참당귀 지상부 추출물의 decursin 함량

본 연구의 분석법 검증을 통하여 decursin에 대한 HPLC 분석법이 참당귀 지상부 추출물에 함유

되어 있는 지표성분의 정량에 적용할 수 있는 특이성, 우수한 직선성, 정확성 및 정밀성 등이 있음을 확인하였음. 본 분석법으로 참당귀 지상부 분무건조 분말시료의 decursin 평균 함량은 0.359%이었으며, 기준 규격을 80 ~120%로 설정하였을 때 기준값은 0.287 ~ 0.431% 인 것을 확인할 수 있었음(표 6).

표 6. 참당귀 지상부 추출물의 decursin 함량

Lot No.	Contents (% , mean \pm SD)
1	0.370 \pm 0.019 ¹⁾
2	0.349 \pm 0.012
3	0.358 \pm 0.010

¹⁾ Each data was obtained by triple analysis (n=3).

라. 참당귀 잎 발효유의 지표성분 모니터링

○ 참당귀 잎 추출물의 시제품 공정별 지표성분 모니터링

- 추출용매별 참당귀 추출물의 decursin의 분석결과, 메탄올과 DMSO 용매의 decursin함량은 8,290 ~ 8,760mg/kg으로 LC 분석 시 간섭이 적은 메탄올로 결정하였다(표 7). 공정별 발효 제품을 메탄올에 추출하여 각 제품에 함유되어 있는 decursin의 함량분석한 결과는 표 8과 같다.

표 7. 추출용매별 참당귀 추출물의 decursin의 분석결과

추출용매별	Decursin의 함량 (mg/kg)
50% MeOH	8,290 \pm 20
MeOH	8,550 \pm 40
DMSO	8,760 \pm 20
증류수	3,720 \pm 20

표 8. 참당귀 발효유, 액상차, 알긴산첨가발효유의 지표성분 분석결과(추출용매 MeOH)

시료명	Decursin의 함량 (mg/kg)
알긴산 0.9%, 분말1%(입고일 8/30)	95.58 \pm 2.35
알긴산(입고일 8/30)	93.61 \pm 1.26
0.1%첨가 발효유(입고일 9/20)	10.78 \pm 0.12
1%첨가 발효유(입고일 9/20)	78.55 \pm 0.10
액상차 F 참당귀잎 0.5%	5.84 \pm 0.04
액상차 R 참당귀 잎 0.5%	8.06 \pm 0.06

4. 적 요

〈제3세부과제: 참당귀 잎 제조공정 표준화〉

(시험 1) 참당귀 잎 재배 및 시비처리에 따른 생산량 검정시험

가. 질소시비량에 따른 참당귀 잎의 지표성분 함량은 N 10kg/10a 처리구의 decursin 함량이 다른 처리구에 비해 높음을 확인하였다.

(시험 2) 참당귀 소재의 지표성분 설정

가. 본 연구에서는 건강기능성 식품 소재 개발을 목적으로 참당귀 잎 추출물의 표준화를 위하여 decursin을 지표성분으로 선정하고 HPLC분석을 통하여 decursin의 분석법을 확립하고 유효성 검정을 수행하였다. 유효성 검정 결과, decursin 표준용액과 참당귀 잎 추출물의 retentiontime 및 spectrum이 일치하는 특이성을 확인하였다. 표준검량선의 상관계수(R²)는 0.9994로 매우 우수한 직선성을 나타내었으며 정량한계(LOQ)는 0.034 μ g/mL이었고 검출한계(LOD)는 0.011 μ g/mL이었다. Decursin의 intra-day 분석에서 정확성 및 상대표준편차는 각각 96.49 ~ 104.35%, 0.53 ~ 1.10%, inter-day 분석에서 정확성 및 상대표준편차는 각각 97.23 ~ 100.14%, 0.26 ~ 1.15%인 것으로 나타나 본 시험법의 정확성 및 정밀성을 확인 할 수 있었다. 표준품 농도별 지표성분의 회수율은 92.38 ~ 104.11%의 범위였으며 분석오차 10% 이내로 측정되었다. 이는 본 연구에서 수행된 HPLC 분석법이 참당귀 잎 추출물의 지표성분인 decursin을 분석하고 표준화하는데 적합한 시험법임을 의미한다.

(시험 3) 참당귀 잎 발효유의 지표성분 모니터링

가. 참당귀 발효유, 액상차, 알긴산첨가발효유의 지표성분 분석결과, 알긴산 0.9%, 분말1% 첨가한 발효유의 decursin 함량이 95.58 \pm 2.35 mg/kg로 가장 높게 나타났다.

5. 인용문헌

- Houghton, P. J., Soumyanth, A. 2016. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes with particular reference to Phyllanthus amarus. J Ethnopharmacol., 107:449-455.
- Ki Yeon Lee, Su Young Hong, Jeong Hae Jeong, Jae Hyung Lee, Sang Hyun Lim, Nam Ki Heo, Hee Yeon Kim. 2015. Biological activities of extract from aerial parts of Angelica gigas Nakai. J. Agricultural, Life and Environ. Sci., 27(1):15-22.
- Jin Gwan Kwon, Chan Gon Seo, Yun Hyeok Choi, Jin Kyu Kim, Won Sik Jeong, Ji Eun Lee, Kyeong Hee Oh, Seong Su 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.
- 허수학. 2017. 농산자원으로부터 인지기능 개선 기능성소재를 이용한 고령친화형 제품 개발 및 사업화 기획 최종보고서. pp. 1-44. 농림축산식품부.

박기환, 김돈규, 어중혁, 이흥진, 길동영, 김용기, 최원선, 장영애, 안희정. 2015. 소화율 향상 및 연하장애 개선을 위한 고령친화형식품 가공 기술 개발 보고서. pp.1-392. 중앙대학교 산학협력단. 농림축산식품부.

6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2018(1년)	학술발표	Analytical Validation of Decursin in Aerial Parts of Angelica gigas Nakai
2019(2년)	학술발표	Studies on Cultivation for simultaneous harvesting of Angelica gigas Nakai roots and leaves
	영농정보	참당귀 잎과 뿌리 동시 활용을 위한 질소 시비량
	기술이전	참당귀 잎의 항염 및 항당뇨 기능성 조성물
	논문게재	참당귀 지상부 추출물의 지표성분 decursin의 분석법 개발 및 검증

성과지표명	연도	1년차(2018)		2년차(2019)		계	
		목 표	실 적	목 표	실 적	목 표	실 적
논문 게재	SCI						
	비SCI	1			1	1	1
학술 발표	국제						
	국내	1	1	1	1	2	2
영농 활용	기술						
	정보			1	1	1	1
기술이전					1		1
계		2	1	2	4	4	5

7. 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도	
					'18	'19
과제책임자	서울에프엔비	부장	임영순	과제 총괄	○	○
3세부책임자	농식품연구소	농업연구사	김희연	세부주관 수행	○	○
공동연구자	농식품연구소	농업연구사	박아름	품질조사 지원	○	○
	농식품연구소	농업연구사	이효영	품질조사 지원	○	○
	농식품연구소	공업서기	최병철	현장조사 지원	○	○
	농식품연구소	운전서기	윤석원	현장조사 지원	○	○
	농식품연구소	공무직	김태희	품질조사 지원	○	○
	농식품연구소	연구원	김용춘	현장조사 지원	○	○