

복분자 추출물의 기능성 원료 표준화를 위한 지표성분 Ellagic acid 분석법

채규서 · 손락호 · 박송이 · 김기안 · 이태범 · 권지웅*
(재)고창복분자연구소

Analytical Method Validation of Ellagic Acid as a Marker Compound for the Standardization of Black Raspberry Extract as a Functional Ingredient

Kyu Seo Chae, Rak Ho Son, Song Yie Park, Ki-An Kim, Tae-Bum Lee, and Ji-Wung Kwon*

Gochang Black Raspberry Research Institute

Abstract

Validation of ellagic acid as a marker compound in the standardization of black raspberry extract developed for functional health food, was attempted by an analytical method. Ellagic acid was validated for its LOD (limit of detection), LOQ (limit of quantitation), precision, accuracy, and recovery by HPLC relative to the black raspberry extract. It showed a high linearity in the calibration curve with a coefficient of correlation (R^2) of 0.9999. The LOD and LOQ were 0.6 $\mu\text{g/mL}$ and 1.9 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of the recovery test were 89%-100%. The intra-day and inter-day precision in the ellagic acid for black raspberry extract was 0.28-1.96% and 0.69-2.49%, respectively. Therefore, the application of ellagic acid was validated in analytical method as a marker compound in black raspberry extract.

Key words: black raspberry, ellagic acid, marker compound, validation, functional food

서 론

우리나라에서 재배되고 있는 복분자는 장미과의 낙엽성 관목으로 대부분 외래종 복분자(*Rubus occidentalis*) (Eu et al., 2010; Choung & Lim, 2012)로 복미가 원산지이다. 줄기에 가시가 있는 것이 특징이고, 성장이 왕성한 첫해의 가지에는 5 개의 어린 잎이 자라고, 화기의 말단 가지에는 3 개의 어린 잎이 자란다. 복분자에는 약 1.7%의 안토시아닌이 함유되어 있으며(Xue et al., 2001), 주요 안토시아닌은 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-sambubioside, cyanidin-3-xylosylrutinoside 등이 알려져 있다(Nyboom, 1968). 복분자의 붉은색을 나타내는 주요 색소 화합물로는 cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3-rhamnoglucoside-5-glucose이 있고(Daravingas & Cain, 1966), 엘라그산(ellagic acid)과 각종 안토시아닌 등이 풍부하여 천연 항산화제로도 유용하다고 보고되어 있다(Park et al., 2007). 식용으로 사용되는 복분자는 항산화활

성, 혈관신생억제 및 식도암에 효과가 있는 것으로 알려져 있고(Wang & Lin, 2000; Liu et al., 2005; Stoner et al., 2006), 또한 최근에 복분자 열매, 잎, 줄기 추출물이 콜레스테롤과 혈압 개선에 효과가 있다고 보고되어 있다(Lee et al., 2014).

건강기능식품을 개발하고 생산하기 위해서는 표준화 및 규격화가 매우 중요한 부분을 차지하는데, 천연물 유래 식품 소재는 오랜 섭취 경험을 통해 그 효능과 안전성을 확보하고 있지만 생산지, 토양, 채취시기, 재배조건 등에 따라 품질에 차이가 있으며, 이를 가열하고 추출하는 과정에서 주요 성분의 함량 차이가 있다. 이러한 천연물 유래 식품소재의 기능성과 안전성을 과학적으로 입증하기 위해 지표성분의 함량을 통한 품질관리법이 유용하게 쓰이고 있으며, 이는 기능성 원료에 대한 기준규격을 설정하고 품질관리의 지표로 활용될 수 있을 것이다(KFDA, 2007).

이에 본 연구에서는 복분자(*Rubus occidentalis*) 추출물을 제조하고, 복분자 추출물에서 11 종의 화합물에 대한 함량을 분석한 결과(Choi et al., 2013)를 바탕으로 함량이 가장 많은 ellagic acid(Fig. 1)를 지표성분으로 선정하였으며, 이를 지표물질로 활용하기 위하여 식물체내에서 ellagitannins 형태(Huang et al., 2005)로 존재하는 ellagic acid의 편차를 줄이고, 정확한 정량을 위해 추출물을 사용한 방법(Choi et al., 2013)을 변형하여, 산가수분해를 통해 탄닌을 제거한 후

*Corresponding author: Ji-Wung Kwon, 558 Bokbunjaro, Buanmyun, Gochanggun, Jeollabukdo 585-943, Korea
Tel: +82-63-560-5190; Fax: +82-63-563-6680
E-mail: kjwung@hanmail.net
Received August 25, 2014; revised September 29, 2014; accepted October 1, 2014

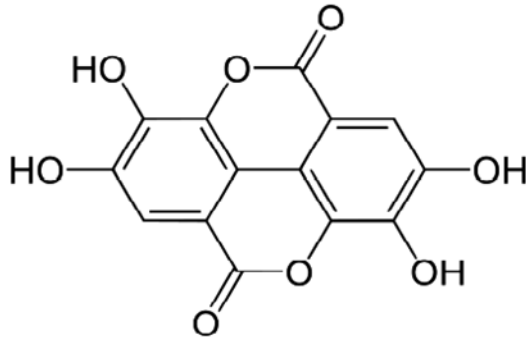


Fig. 1. Structure of ellagic acid.

ellagic acid의 분석법을 확립하고, 이를 검증(validation)하고자 하였다.

재료 및 방법

복분자 추출물 제조

복분자(*Rubus occidentalis*)는 전북 고창군에서 재배된 것을 구입하여 냉동 보관하여 사용하였다. 복분자 중량 10 배의 용매를 첨가한 후 2시간 동안 농축 추출기(Cosmo 660, Kyungseo machine, Incheon, Korea)를 이용하여, 80°C에서 2 회 가열 추출하였다. 추출물은 여과하여 농축한 후 동결 건조(PVTFD10R, Ilsinbiobase, Dongduchen, Gyeonggido, Korea)하여 사용하였다.

표준용액의 조제

Ellagic acid(A analytical standard, purity 95%, Sigma Co. St. Louis, MO, USA) 표준품 약 5 mg을 메탄올 25 mL에 용해시킨 후 1 mg/mL로 만들어 표준원액을 제조하였고, 이를 메탄올로 희석하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL 농도가 되도록 표준용액을 만들었다. 제조된 표준원액과 표준용액은 4°C에서 냉장보관 하였다.

시험용액의 조제

복분자 추출물 0.1 g을 진처리 용매(EtOH : Distilled Water:HCl = 60 : 20 : 20) 10 mL에 녹인 후 환류추출장치가 부착된 water bath를 이용하여 90°C에서 가수분해 하였다. 가수분해 용액은 실온에서 냉각하고 메탄올로 정용(100 mL)하여 0.45 µm syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 사용하였다.

HPLC 분석

복분자 추출물의 ellagic acid 분석은 HPLC(ACQUITY H-class, Waters, Co, Milford, MA, USA)를 이용하였으며, 분석용 컬럼은 Shiseido capcellpak C18 UG(5 µm, 4.6×250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 이동

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of ellagic acid on black raspberry extract

| Parameters | Conditions | | |
|--------------------|---|-------|-------|
| HPLC model | ACQUITY H-class (Waters) | | |
| Column | Shiseido capcellpak C18 UG (5 µm, 4.6×250 mm) | | |
| Column Temperature | 35°C | | |
| Flow rate | 1.0 mL/min | | |
| Injection | 10 µL | | |
| Mobile phase | A : 0.1% Phosphoric acid in water | | |
| | B : Methanol | | |
| Gradient step | Time (min) | A (%) | B (%) |
| | 0 | 70 | 30 |
| | 8.5 | 65 | 35 |
| | 12.0 | 55 | 45 |
| | 15.0 | 45 | 55 |
| | 18.0 | 30 | 70 |
| | 25.0 | 70 | 30 |
| 35.0 | 70 | 30 | |
| Detector | PDA detector (370 nm) | | |

상으로는 0.1% phosphoric acid in water(A)와 methanol(B)을 사용하였고, 1.0 mL/min의 유속으로 시료 10 µL를 주입하여 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

분석법의 유효성 검증(Method validation)

지표성분에 대한 분석법의 유효성 검증은 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인(KFDA, 2004)을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 회수율(recovery)을 통해 시험법을 검증하였다.

특이성: Ellagic acid 표준용액과 복분자 추출물을 HPLC로 분석한 뒤 크로마토그램상의 retention time과 비교하여 ellagic acid 피크가 분리되는지 확인하였다.

직선성 및 검출 · 정량 한계: 단계적으로 희석한 ellagic acid 표준용액을 HPLC로 분석하여 농도에 대한 면적에 대하여 검량선을 작성하고, R²값을 확인하였다. 각 성분에 대한 검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantification, LOQ)는 표준용액의 크로마토그램을 사용하여 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 \times (\text{standard deviation} / \text{slope of calibration curve})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (\text{standard deviation} / \text{slope of calibration curve})$$

회수율: 회수율은 알고 있는 농도(4.25, 8.50, 17.00 µg/mL)의 ellagic acid 표준물질을 시료에 넣어 시험용액을 조제한 후 분석에 의해 회수되는 양을 백분율로 환산하였다.

정밀성: 정밀성을 확인하기 위해 반복성과 재현성을 실시하였다. 반복성은 1 일 3 회로 나누어 일내분석(intra-day)을, 재현성은 1 일 3 회로 3 일 동안 반복하여 일간분석(inter-day)을 진행하였다.

결과 및 고찰

특이성

특이성은 불순물, 분해물, 배합성분 등 여러 가지 다른 성분들이 혼합되어 있는 복분자 추출물 중 ellagic acid만을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는지를 확인하기 위하여 ellagic acid 표준용액과 복분자 추출물 중 ellagic acid의 retention time을 확인하였다. 그 결과 검출된 ellagic acid peak가 동일 시간대인 약 12분대에 검출되어 동일 물질임을 확인하였으며 시험용액에서 ellagic acid peak가 단일 peak로 다른 peak와 완전히 분리됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

직선성 및 검출 · 정량한계

검체 중 일정 농도 범위에 있는 ellagic acid의 양에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지를 확인하기 위하여 ellagic acid 표준물질의 직선성을 평가하였다. 표준검량선은 Fig. 3과 같이 6.25-200 µg/mL 농도에서 상관계수 (R²)가 0.9999로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 0.6 µg/mL, 정량한계는 1.9 µg/mL이었다. 이는 시료에 적용할 경우 검출한계는 0.6 µg/mL 수준까지 검출이 가능한 것을, 정량한계는 1.9 µg/mL 수준까지 정량할 수 있는 분석물질의 최저 농도를 의미한다. Rakesh 등(Rakesh et al., 2012)은 ellagic acid 분석방법의 검증에서 R²은 0.998이었고, 검출한계와 정량한계가 각각 0.66 µg/mL, 2.40 µg/mL로 본 시험법이 검출한계와 정량한계 모두 낮은 수준까지 분석이 가능하여 지표성분 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증하였다.

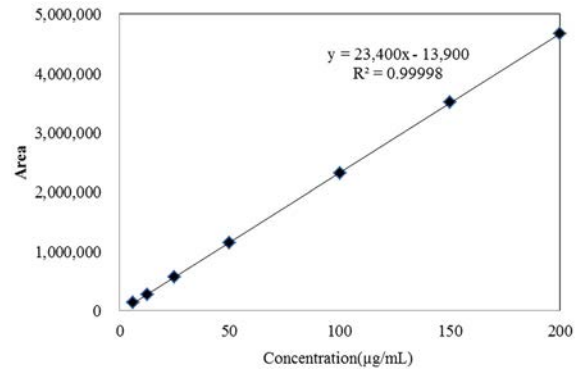


Fig. 3. Calibration curve of ellagic acid standard.

회수율

회수율을 확인하기 위하여 일정 양을 시료에 넣은 후 분석에 의해 회수되는 양을 확인하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 ellagic acid의 회수율은 4.25 µg/mL 농도에서 97-100%, 8.50 µg/mL 농도에서 96-98%, 17.00 µg/mL 농도에서 89-95%의 범위의 회수율은 보였다. Kim 등(Kim et al., 2012)은 ellagic acid 분석방법의 검증에서 89-97%의 회수율을 얻어 본 시험법과 유사한 결과를 보였다.

정밀성

하나의 균일한 시료로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 반복 분석하였을 때, 분석물질에 대한 각각 측정치간의 근접성을 확인하였다. Inter-, intra-day의 정밀도(RSD)를 측정 한 결과는 Table 3와 같으며 inter-day의 정밀도는 0.28~1.96%이었으며, intra-day의 정밀도는 0.69-2.49%이었다.

이상의 분석결과, 본 시험법의 유효성검증을 통하여 ellagic acid에 대한 상기 HPLC 분석법이 건강기능식품 기능성 원료로 인증받기 위한 완숙된 복분자의 지표성분인

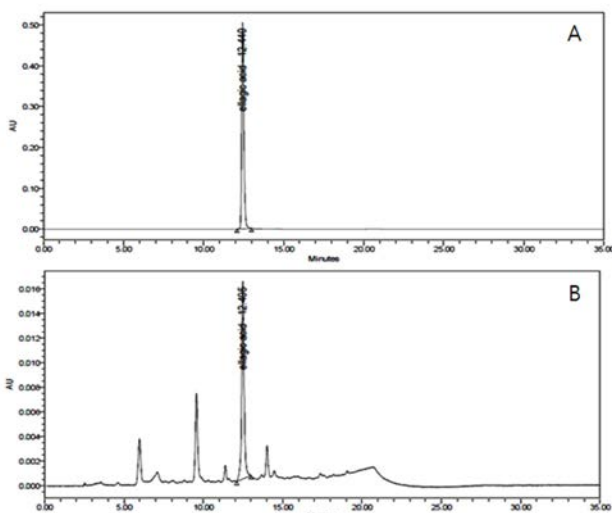


Fig. 2. HPLC chromatogram pattern of ellagic acid in extract from black raspberry. A) Ellagic acid standard B) Black raspberry extract.

Table 2. Recovery of ellagic acid in HPLC analysis for validation

| Concentration ¹⁾ (µg/mL) | Recovery (%) | |
|--|---------------------------|-------------------|
| | Mean±SD | RSD ²⁾ |
| 4.25 | 100.22±1.45 ³⁾ | 1.44 |
| | 97.54±3.53 | 3.62 |
| | 97.47±3.58 | 3.68 |
| 8.5 | 98.07±2.30 | 2.35 |
| | 96.97±2.23 | 2.30 |
| | 96.95±1.87 | 1.93 |
| 17 | 95.03±3.08 | 3.24 |
| | 95.53±2.33 | 2.44 |
| | 89.08±4.56 | 5.12 |

¹⁾Concentration of ellagic acid standard added in sample

²⁾Relative standard deviation

³⁾Each value represents the mean±SD (n=3).

Table 3. Precision of ellagic acid in black raspberry extract for validation

| | precision (%) | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | Mean±SD (mg/g) | RSD (%) ¹⁾ |
| Inter-day ³⁾ | 9.02±0.03 ²⁾ | 0.28 |
| | 9.03±0.14 | 1.55 |
| | 9.07±0.12 | 1.32 |
| | 9.09±0.16 | 1.76 |
| | 8.57±0.08 | 0.93 |
| | 8.69±0.17 | 1.96 |
| | 8.48±0.14 | 1.65 |
| | 8.60±0.16 | 1.86 |
| | 8.90±0.12 | 1.35 |
| Intra-day ³⁾ | 8.88±0.10 | 1.13 |
| | 8.75±0.16 | 1.18 |
| | 8.73±0.07 | 0.80 |
| | 8.45±0.21 | 2.49 |
| | 8.08±0.18 | 2.23 |
| | 8.40±0.16 | 1.91 |
| | 8.69±0.06 | 0.69 |
| | 8.80±0.09 | 1.02 |
| | 8.92±0.12 | 1.35 |

¹⁾Relative standard deviation

²⁾Each value represents the mean±SD (n=3).

³⁾Inter-day: one time analysis of ellagic acid per day for 3 days, Intra-day: three times per day

ellagic acid의 분석이 가능함을 확인하였다.

요 약

복분자를 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발하기 위하여 지표성분 표준화를 위한 ellagic acid의 분석법 설정과 분석법에 대한 검증(validation)을 실시하였다. 그 결과 ellagic acid의 검량선은 $R^2=0.9999$ 으로 좋은 선형성을 보였으며, 검출한계 0.6 µg/mL, 정량한계는 1.9 µg/mL였다. 회수율을 측정한 결과에서는 89.0-100.0%로 나왔고, 상대표준편차(RSD)는 0.05-0.14%를 보였으며, 일내와 일간 분석에서 RSD는 각각 0.28-1.96%와 0.69-2.49%로 나왔다. 따라서 본 연구를 통해 복분자 추출물의 지표물질인 ellagic acid의 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다.

감사의 글

본 연구는 고창군 지역농식품 선도클러스터 육성사업과 고창복분자연구소 건립사업의 일환으로 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

References

- Choi HR, Lee SJ, Lee JH, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. 2013. Cholesterol-lowering effects of unripe black raspberry water extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1899-1907.
- Choung MG, Lim JD. 2012. Antioxidant, anticancer and immune activation of anthocyanin fraction from *Rubus coreanus* Miquel fruits (ripe black raspberry). *Korean J. Med. Crop Sci.* 20: 259-269.
- Daravingas G, Cain RF. 1966. The anthocyanidin pigments of black raspberries. *J. Food Sci.* 31: 927-936.
- Eu GS, Park MR, Baek SH, Yun SJ. 2010. Phylogenetic relationship of *Rubus* cultivated in Korea revealed by chloroplast DNA spacers. *Korean J. Med. Crop Sci.* 18: 266-272.
- Huang W, Ni J, Brothwick AGL. 2005. Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of calonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus* SHL 6. *J. Process Biochem.* 40: 1245-1249.
- Kim YJ, Han SH, Jeon JY, Hwang MH, Im YJ, Chae SW, Kim MG. 2012. Method development of ellagic acid as marker compound for standardization of gochang bokbunja(*Rubus coreanus* Miquel) as functional ingredient. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1554-1558.
- KFDA. 2004. Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea. p. 1-18.
- KFDA. 2007. Guideline for standard of health functional food. Korea Food & Drug Administration. Seoul, Korea. p. 6-13.
- Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Chae KS, Jeong JT, Lee TB. 2014. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 22: 177-187.
- Liu Z, Schwimer J, Liu D, Greenway FL, Anthony CT, Woltering EA. 2005. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *J. Agr. Food Chem.* 53: 3909-3915.
- Nyblom N. 1968. Cellulose thin layers for anthocyanin analysis, with special reference to the anthocyanins of black raspberries. *J. Chromatography A.* 38: 382-387.
- Park YK, Choi SH, Kim SH, Han JY, Chung HG. 2007. Changes in antioxidant activity, total phenolics and vitamin C content during fruit ripening in *Rubus occidentalis*. *Korean J. Plant Res.* 20: 461-465.
- Rakesh K, Vishal R, Madhavi G. 2012. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of embelin, rottlerin and ellagic acid in vidangadi churna. *J. Pharm. Analysis* 2: 366-371.
- Stoner GD, Chen T, Krestry LA, Aziz RM, Reinemann T, Nines R. 2006. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms. *Nutrition and Cancer.* 54: 33-46.
- Wang SY, Lin HS. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivate and developmental stage. *J. Agr. Food Chem.* 48: 140-146.
- Xue H, Aziz RH, Sun N, Cassady JM, Kamendulis LM, Xu Y, Stoner GD, Klaunig JE. 2001. Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis* 22: 351-356.