

건강기능식품 기능성원료로서 창녕양파추출액의 지표성분 Quercetin 분석법

전선영 · 정은정 · 백정화 · 차용준[†]

창원대학교 식품영양학과

Analytical Method Validation of Quercetin in *Changnyeong* Onion Extract as a Functional Ingredient for Functional Health Food

Seon-Young Jeon, Eun-Jeong Jeong, Jeong-Hwa Baek, and Yong-Jun Cha[†]

Dept. of Food and Nutrition, Changwon National University, Gyeongnam 641-773, Korea

Abstract

Validation of quercetin as a marker compound in the standardization of *Changnyeong* onion extract developed for functional health food was attempted by analytical method. The specificity was satisfied with retention time and photo diode array (PDA) spectrum by analysis of quercetin using HPLC and comparison with standard compound. It showed a high linearity in the calibration curve as coefficient of correlation (R^2) of 0.9986, and the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.2 mg/L and 0.5 mg/L, respectively. Recovery rate test with quercetin concentration of 0.05, 0.075 and 0.1 mg/mL was revealed in the high range of 82.36~95.26%, 82.70~98.24% and 87.91~95.11%, respectively. The intra-day and inter-day precision in quercetin for *Changnyeong* onion extracts was 0.10~3.28% and 0.96~5.79%, respectively. Therefore, application of quercetin was validated in analytical method as a marker compound in *Changnyeong* onion extracts.

Key words: quercetin, validation, onion, marker compound, functional food

서 론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하는 다년생 식물로 quercetin, quercitrin, rutin 등의 flavonoid 물질이 풍부하여 다양한 생리적 기능성을 가지는 것으로 알려져 있다(1,2). 특히 양파의 주된 flavonoid 성분인 quercetin은 벤젠환의 탄소에 -OH기와 탄소의 2와 3사이의 이중결합, 4의 탄소위치에 carbonyl기, 그리고 A고리와 B고리에 결합되어 있는 -OH기에 의해서 항산화 활성을 갖는 구조를 가지고 있어 활성산소의 산화활동을 억제하거나 제거하는 능력이 매우 강하다(3,4)(Fig. 1). 또한 collagen에 의해 촉진되는 혈소판의 활성을 억제시켜 혈행 개선효과를 가지며, 혈액 중의 β -lipoprotein과 β -lipoprotein cholesterol의 작용을 유의적으로 억제하여 혈중지질 농도를 저하시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다(5,6).

이러한 생리적 기능성을 다량 함유한 양파를 소재로, 지역 농가의 소득을 창출하며 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발, 등록하기 위해 지리적 표시 제30호 창녕양파를 이용하여 창녕양파추출액을 제조하였다.

건강기능식품을 개발, 생산 시 표준화 및 규격화는 매우 중요한 부분을 차지하게 된다. 즉, 표준화는 제조공정에서 목표하는 성분을 유지하기 위하여 원재료에서 최종제품까

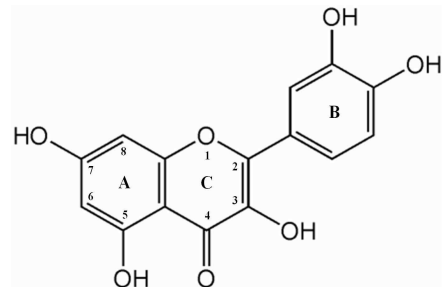


Fig. 1. Chemical structure of quercetin.

지 가공하는데 최소한의 차이를 줄이기 위한 우수제조공정 규범을 말하며 이때 지표성분의 표준화방법이 가장 일반적으로 사용되게 된다. 지표성분은 천연물에서 존재하며 표준화를 위해 선택되는 성분으로써 안정성, 분석기술의 용이성, 시간과 비용 측면의 분석, 연구자 및 개발자를 고려하여 이전부터 사용했거나 사용한 분석을 근거하여 화학적 성분의 표준화를 수행하여야 한다(7). 이와 같이 지표성분을 확인하는 방법은 공인된 방법이나 정밀하다고 판단되는 분석방법을 사용하며 타당성 있는 방법과 신뢰성을 가지는 과학적인 검증으로 validation이 필요하게 된다.

따라서 본 연구에서는 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발할 목적으로 창녕양파추출액의 표준화를 위해

[†]Corresponding author. E-mail: yjcha@changwon.ac.kr
Phone: 82-55-213-3513, Fax: 82-55-281-7480

지표성분으로 quercetin을 설정하였으며, HPLC를 이용하여 지표성분 quercetin의 분석법을 확립하며 그에 따른 유효성 검정을 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 창녕양파추출액은 Cha 등(8)의 방법에 따라 창녕양파(지리적표시제 제30호)를 세척 및 세절한 다음 천연조향제(다시마, 당귀, 천궁, 차즈기, 갈근, 감초)와 함께 가열추출(96~99°C) 후 여과 및 농축하여 제조한 것(9)을 시료로 사용하였다. 분석을 위해 시료는 칭량하여 60% ethanol 40 mL와 6 N HCl 5 mL를 첨가하여 용해시킨 후 95°C에서 2시간 동안 환류 냉각하였다. 이를 회전식감압농축기(N=1000, EYELA, Osaka, Japan)로 농축한 후 60% ethanol을 사용하여 50 mL로 정용한 뒤 0.45 µm filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

표준용액의 조제

표준품 quercetin(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 ethanol로 제조한 것을 표준원액으로 하였다. 이를 water : 5% acetic acid : acetonitrile(40:30:30, v/v)을 이용하여 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL로 단계적으로 희석하여 0.45 µm membrane filter로 여과한 것으로 표준용액으로 사용하였으며, 표준용액을 이용하여 작성한 표준검량선으로부터 quercetin 함량을 구하였다.

HPLC 분석

창녕양파추출액의 quercetin 분석은 Crozier 등(10)과 Wang과 Helliwell(11)의 방법을 변형하여 실시하였으며, Hewlett Packard 1100 series HPLC system(Palo Alto, CA, USA)으로 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같으며, 분석용 칼럼은 ZORBAX C₁₈(4.6×150 mm, 5 µm, XDB-C₁₈, Hewlett Packard Co.)을 사용하였다.

분석법의 유효성 검증

개별인정형 건강기능식품 기능성원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인(12)을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계

(limit of detection, LOD, S/N=3.3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)로 시험법을 검증하였다.

특이성: 표준용액과 전처리방법으로 처리한 창녕양파추출액을 HPLC로 분석한 뒤 크로마토그램을 비교하여 quercetin peak가 분리되는지 확인하였으며 Photo diode array (PDA) spectrum을 측정하여 동일한 spectrum을 나타내는지도 확인하였다.

직선성, 정량한계 및 검출한계: 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL의 단계적으로 희석한 quercetin 표준용액을 HPLC로 분석하여 peak 면적비에 대한 농도비의 관계를 표시하는 표준검량선을 작성하였다. 작성된 표준검량선으로부터 각 농도별 peak의 Signal to Noise(S/N) 비를 구하여 S/N비가 3.3이 될 때 검출한계, S/N비가 10이 될 때 정량한계를 계산하였다.

회수율: 본 연구에서 사용한 전처리법을 이용하여 quercetin이 함유되어 있지 않은 공시료(우유)에 표준용액 0.05, 0.075, 0.1 mg/mL의 세 가지 농도를 각각 첨가하여 회수율 실험을 실시하였다. 각 시험은 3회 9반복하였으며 HPLC로 분석하여 얻어진 면적을 표준용액의 면적과 비교하여 회수율을 구하였다.

정밀성: 시료(창녕양파추출액)를 전처리법에 따라 처리된 시험용액을 inter-day와 intra-day로 나누어 정밀성 실험을 실시하였다. Inter-day는 1일 1구간으로 3일간 진행하였고 intra-day는 1일 3구간(9:00 AM, 3:00 PM, 9:00 PM)으로 나누어 진행하였으며, 각 시험은 구간마다 3회 9반복하여 HPLC로 분석하였다. 분석하여 얻어진 면적을 이용하여 검량선에 의하여 정량한 농도별 검출농도의 표준편차를 검출농도로 나눈 비의 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

특이성 확인

특이성은 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로, 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는 것에 의해 특이성을 확인하게 된다. 표준용액과 시료 전처리방법으로 처리한 창녕양파추출액의 크로마토그램을 비교하여 quercetin peak가 분리되는지를 확인한 결과, Fig. 2와 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액의 피크유지시간과 창녕양파추출액의 피크 유지시간이 일치하였다. 또한 표준용액과 창녕양파추출액의 PDA spectrum을 측정에서도 동일한 spectrum을 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인하였다(Fig. 3).

검량선 및 검출한계, 정량한계 조사

0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL의 단계적으로 희석한 quercetin 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 Fig. 4와 같은 검량선을 나타내었다. 검량선의

Table 1. Analytical conditions of HPLC for a quercetin in Changnyeong onion extracts

Instrument	Condition
Column	ZORBAX C ₁₈ (4.6×150 mm, 5 µm, XDB-C ₁₈)
Mobile phase	Water : 5% acetic acid : acetonitrile (40%:30%:30%)
Detector	PDA detector, 370 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 µL

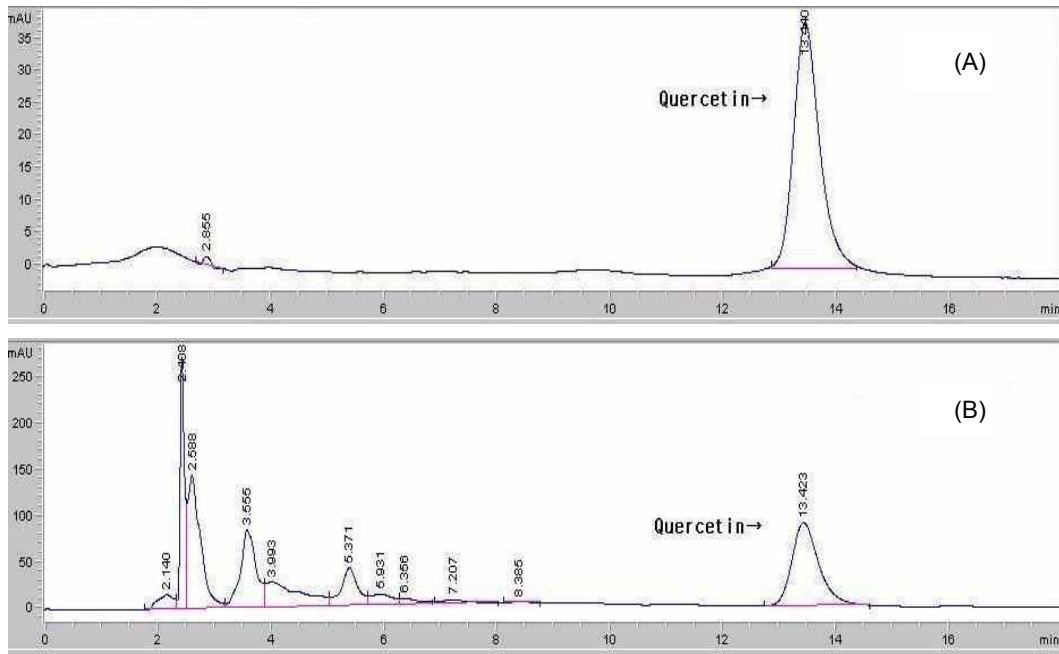


Fig. 2. HPLC chromatograms of quercetin. (A) Standard, (B) *Changnyeong* onion extracts.

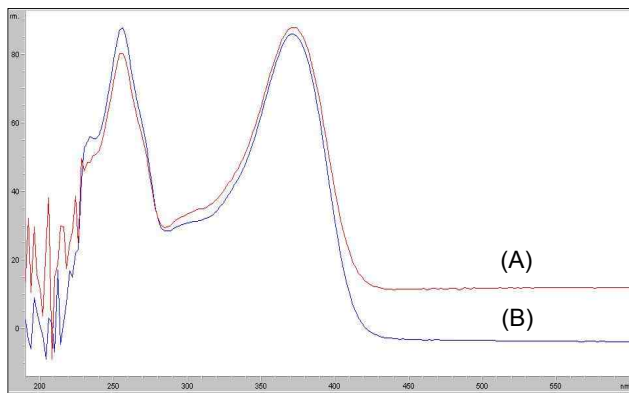


Fig. 3. PDA (Photo diode array) spectrum of quercetin. (A) Standard, (B) *Changnyeong* onion extracts.

상관계수(R^2)는 0.9986로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 0.2 mg/L, 정량한계는 0.5 mg/L 수준으로 나타났다. 이는 시료에 적용할 경우 검출한계는 0.2 mg/L 수준까지 검출이 가능한 것을, 정량한계는 0.5 mg/L 수준까지 정량할 수 있는 분석물질의 최저 농도를 의미하게 된다. Casagrande 등(13)은 quercetin 분석방법의 검증에서 검출한계와 정량한계가 각각 18 ng/mL, 29 ng/mL로 나타났으며, Careri 등(14)은 검출한계 0.12 mg/L, 정량한계 0.35 mg/L로 검출한계에 대해서는 유사한 수준을 나타내었으나, 정량한계는 다소 높은 수준을 보였다. 그러나 본 연구는 창녕양파추출액의 표준화를 위해 설정된 지표성분의 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 충분히 본 연구에서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

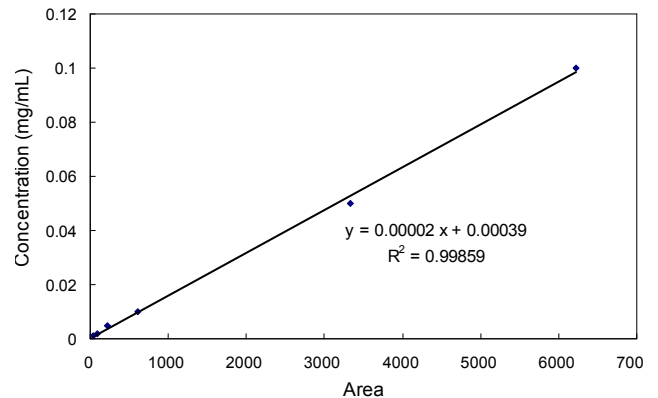


Fig. 4. Calibration curve of quercetin.

회수율 측정

회수율은 quercetin이 함유되어 있지 않은 공시료(우유)에 표준용액 0.05, 0.075, 0.1 mg/mL의 세 가지 농도를 첨가하고 앞의 전처리법에 의해 처리한 뒤 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 quercetin의 회수율은 0.05 mg/mL에서는 82.36~95.26%, 0.075 mg/mL는 82.70~98.24%, 그리고 0.1 mg/mL의 농도에서는 87.91~95.11%의 범위의 회수율을 보였으며, 분석오차 10% 이내를 만족하였다. Wang과 Helliwell(11)은 녹차, 홍차잎, 녹차물에서의 quercetin은 HPLC 분석을 통해 102%의 회수율을, Vuoriene 등(15)의 블랙커런트와인에서도 quercetin에 대해 92~105%의 회수율을 얻었다고 보고하였다.

정밀성 검토

정밀성은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이

Table 2. Recoveries and relative standard deviations of quercetin in HPLC analysis for validation

Concentration ¹⁾ (mg/mL)	Recovery (%)	
	Mean ± SD	RSD ²⁾
0.050	91.18 ± 3.53 ³⁾	3.87
	83.36 ± 0.71	0.86
	82.46 ± 0.13	0.17
0.075	86.32 ± 2.19	2.53
	83.11 ± 0.50	0.60
	97.09 ± 1.03	1.06
0.100	89.92 ± 2.01	2.23
	94.60 ± 0.42	0.44
	94.39 ± 0.66	0.70

¹⁾Concentration of quercetin standard.

²⁾Relative standard deviation.

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

Table 3. Precision of quercetin in *Changnyeong* onion extract for validation

	Precision	
	Mean ± SD (mg/100 g)	RSD (%) ¹⁾
Inter-day ³⁾	23.03 ± 0.69 ²⁾	3.02
	23.83 ± 0.23	0.96
	21.38 ± 0.27	1.26
	21.32 ± 1.24	5.79
	22.52 ± 0.52	2.30
	24.36 ± 1.16	4.77
	19.05 ± 0.54	2.84
	19.39 ± 0.67	3.48
	22.28 ± 0.60	2.73
Intra-day ³⁾	20.83 ± 0.68	3.28
	20.64 ± 0.08	0.40
	19.97 ± 0.20	0.10
	21.28 ± 0.12	0.54
	23.74 ± 0.70	2.98
	21.54 ± 0.13	0.62
	19.63 ± 0.42	2.12
	20.96 ± 0.24	1.15
	21.83 ± 0.19	0.85

¹⁾Relative standard deviation.

²⁾Each data was obtained by triple analysis (n=3).

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

의 근접성을 말한다. Intra-day, inter-day의 정밀도(RSD)를 측정된 결과는 Table 3과 같으며 intra-day에서의 정밀도는 0.10~3.28%를 나타내었고, inter-day에서는 0.96~5.79%의 정밀도를 나타내었다.

이상의 분석결과, 본 연구의 기기분석법과 유효성검증을 통해 건강기능식품 기능성 원료로서의 창녕양파추출액의 표준화를 위해 존재하는 지표성분인 quercetin의 분석이 가능함을 확인하였다.

요 약

개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발한 창녕양

파추출액의 표준화를 위해 지표성분으로 quercetin을 설정하였으며, HPLC를 이용하여 지표성분 quercetin의 분석법을 확립하며 그에 따른 유효성 검정을 실시하고자 하였다. 유효성 검정 결과, 본 시험법에서 표준용액의 피크유지시간과 창녕양파추출액의 피크유지시간이 일치하였으며 동일한 spectrum을 나타내어 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R²)는 0.9986로 높은 직선성을 보여 분석에 적합함을 알 수 있었으며, 검출한계는 0.2 mg/L, 정량한계는 0.5 mg/L로 설정되었다. Quercetin의 회수율은 0.05 mg/mL에서는 82.36~95.26%, 0.075 mg/mL는 82.70~98.24%, 0.1 mg/mL은 87.91~95.11%의 범위의 회수율을 보였으며, intra-day에서의 정밀도(RSD)는 0.10~3.28%, inter-day에서는 0.96~5.79%의 정밀도를 나타내어 창녕양파추출액의 지표성분인 quercetin의 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역연고산업육성사업(2008-2010)인 창녕양파바이오특화사업단의 연구지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Park YK. 1995. Source and processing technology of vegetable juice and the trend of study. *Bulletin of Food Technology* 8: 59-68.
- Augusti KT. 1996. Therapeutic values onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.). *Indian J Exp Biol* 34: 634-640.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bremley PM, Pridham JB. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 22: 375-383.
- Basra AS, Singh B, Malik CP. 1994. Amelioration of the effects of ageing in onion seed by osmotic priming and associated changes in oxidative metabolism. *Biologia Plantarum* 36: 365-371.
- Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M, Sage T, Jordan PA, Williams CM, Lovegrove JA, Gibbins JM. 2003. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *J Thromb Haemost* 1: 1079-1088.
- Sainani GS, Desaw DB, Gorhe NH, Natu SM, Pise DV, Sainami PG. 1979. Effect of dietary garlic and onion on serum lipid profile in Jain community. *Indian J Med Res* 69: 776-780.
- KFDA. 2007. *Guideline for standard of health functional food*. Korea Food & Drug Administration. p 6-13.
- Cha YJ, Kim CS, Lee KH, Noh SK, Jeong EJ, Oh HJ. 2009. Development of concentrated onion extract having antioxidant and anticholesterol activities. *Korean Patent* 10-0895969.
- Jeong YJ, Jeong EJ, Jeon SY, Cha YJ. 2010. Change of volatile compounds in concentrated onion extracts (ONIWELLTM) during storage. *J Life Sci* 20: 113-118.
- Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commer-

- cial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 45: 590-595.
11. Wang H, Helliwell K. 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int* 34: 223-227.
 12. KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc.* Korea Food & Drug Administration. p 1-18.
 13. Casagrande R, Baracat MM, Georgetti SR, Verrijr WA, Vicetini TMC, Rafael JA, Jabor JR, Fonseca MJV. 2009. Method validation and stability study of quercetin in topical emulsion. *Quin Nova* 32: 1939-1942.
 14. Careri M, Corradini C, Elviri L, Nicoletti I, Zagnoni I. 2003. Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *J Agric Food Chem* 51: 5226-5231.
 15. Vuoriene H, Määttä K, Törrönen R. 2000. Content of the flavonols myricetin, quercetin, and kaempferol in finnish berry wines. *J Agric Food Chem* 48: 2675-2680.

(2011년 2월 7일 접수; 2011년 3월 2일 채택)