

## 고창 복분자의 기능성원료 표준화를 위한 지표성분으로서 Ellagic Acid의 분석법 개발

김윤정<sup>1,2</sup> · 한송희<sup>1,2</sup> · 전지영<sup>1,2</sup> · 황민호<sup>1,2</sup> · 임용진<sup>1,2</sup> · 채수완<sup>1,2,3</sup> · 김민걸<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교병원 임상시험센터

<sup>2</sup>전북대학교병원 의생명연구원

<sup>3</sup>전북대학교 의학전문대학원 약리학교실

### Method Development of Ellagic Acid as Marker Compound for Standardization of Gochang Bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) as Functional Ingredient

Yunjeong Kim<sup>1,2</sup>, Song-Hee Han<sup>1,2</sup>, Ji-Yeong Jeon<sup>1,2</sup>, Minho Hwang<sup>1,2</sup>, Yong-Jin Im<sup>1,2</sup>,  
Soo-Wan Chae<sup>1,2,3</sup>, and Min-Gul Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Clinical Trial Center and <sup>2</sup>Biomedical Research Institute of Chonbuk National University Hospital, Jeonbuk 561-712, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Pharmacology, College of Medicine, Chonbuk National University, Jeonbuk 561-712, Korea

#### Abstract

Method development and validation of ellagic acid for the standardization of Gochang Bokbunja as a functional ingredient and health food were accomplished. A Symmetry<sup>®</sup> (C18, 4.6×250 mm, 5.0 μm) column was used with a gradient elution system of 1% formic acid in water and acetonitrile. This method was validated according to specificity, linearity, accuracy, precision test, and recovery test. Specificity was confirmed with identical retention time, and calibration curves of ellagic acid showed good linear regression ( $R^2 > 0.9996$ ). Relative standard deviations (RSD) of data from the intra- and inter-day experiments were less than 2.28% and 2.84%, except in the low limit of quality control (LLOQ, 1 μg/mL) sample. The results of the recovery test were from 89.17% to 97.92% with RSD values from 0.05 to 0.14%. Therefore, we performed analysis of ellagic acid as a marker compound in Gochang Bokbunja extracts. The amount of ellagic acid in Gochang Bokbunja was about 1.918 μg/mg (0.192%) in the three times analysis, and RSD was less than 2.36% by the validated method. These results suggest that the developed HPLC method is simple, efficient, and could contribute to the quality control of Gochang Bokbunja extract as a functional ingredient.

**Key words:** ellagic acid, marker compound, Bokbunja, validation, functional food

#### 서 론

복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과(Rosaceae)의 낙엽활엽 덩굴성 식물로 중국이 원산지로서 알려져 있으며, 한국, 중국, 일본 등지에서 자생하고 전 세계 약 700종이 분포하고 있다(1). 우리나라에서는 중남부지역이 주요산지로, 특히 전북 고창군은 전국 생산량의 51.2%를 차지할 정도로 전국 최대의 복분자 생산지이다. 복분자는 주로 초여름에 검붉은 열매를 수확하여 식용하고 있으나, 예로부터 한방에서는 복분자의 미성숙 과실을 사용하였다(2). 동의보감에 간 기능을 강화하여 시력을 증진시키고, 기운을 돋우며 정액부족, 발기부전 및 성기능을 높여주고 소변의 배설을 쉽게 해주어 천연 자연강장제 외에 남성의 전립선 및 배뇨기에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(2,3). 최근에는 복분자가

항암과 항염증 작용 또한 뛰어난 것으로 보고되고 있다. 이러한 복분자의 효능에 대한 관심이 증대됨에 따라 복분자 열매의 각종 생리활성 물질과 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 복분자 열매에 존재하는 생리활성 물질의 종류로는 sanguin H-4, gallic acid, quercetin, ellagic acid 및 다양한 페놀산 등이 있다(4). 특히, ellagic acid는 raspberry나 strawberry 등과 같은 다양한 과일과 채소에 있는 폴리페놀화합물로서 항암작용과 항산화작용, 항섬유화작용을 나타내는 것으로 과거 연구 결과 알려졌다으며, ellagic acid의 항암작용은 일부 암을 대상으로 연구한 결과 전립선암세포, 자궁경부암세포, 대장암세포, 구강암과 백혈병 세포에서 항암효과와 세포자살을 방지하는 효과(anti-apoptotic effect)를 나타내는 것으로 알려져 있다(5-7).

복분자의 기능성이 알려짐에 따라 소비자의 수요가 증가

\*Corresponding author. E-mail: mgkim@jbctc.org  
Phone: 82-63-250-2532, Fax: 82-63-250-2349

하고 있으며, 이를 충족시키기 위해서는 우선적으로 복분자를 개별인정형 건강기능식품의 기능성 원료로 인정받는 것이 필요하다. 기능성 원료로 표준화 되어 관리되면 소비자들은 일정한 품질의 제품을 공급받을 수 있고, 개발된 제품의 수요가 많아지면 그에 따른 농가 소득도 창출할 수 있다.

기능성 원료 인정을 위해서는 기능성과 안전성을 과학적으로 입증하고 기능 및 지표성분을 선정하여 표준화하고 기능성 원료에 대한 기준규격을 설정하고 관리하여야 한다(8). 기능성 원료에 존재하는 성분의 효능과 원료의 효능이 유사하면 기능성분(biological active compound)으로, 유사성이 낮으면 지표성분(marker compound)으로 구분이 되는데, 실제적으로 기능성분은 효능과 해당 성분의 농도 간에 반드시 상관성이 있어야 하므로 양이 적거나 기능성과의 관계를 확실히 증명하기 어려운 경우 기능성분에 대한 표준화에 어려움이 있다. 지표성분은 해당 성분의 농도와 효능 간의 상관관계가 뚜렷하지 않을 경우에 원재료를 확인할 수 있고, 대표할 수 있는 성분이다. 지표성분 분석을 위해서는 분석법을 설정하는 과정이 필요하며, 설정된 분석법이 재현성이 있고 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있는지에 대한 검증과정이 분석법 밸리데이션이 필요하다(9).

본 연구에서는 건강기능식품으로서 고창복분자의 개별인정형 원료 표준화를 위하여 복분자 미숙과 추출물 속에 존재하는 ellagic acid를 지표성분으로 선정하였고, HPLC를 이용한 분석법 설정과 확립된 분석법에 대한 밸리데이션을 실시하고자 하였다. 최근의 ellagic acid 분석법에는 DAD(diode array detector)를 이용하거나 질량분석기(mass spectrometry)를 이용한 방법들이 있으며, 국내에서 복분자내의 지표성분으로서 ellagic acid의 표준화를 위해서는 가장 범용적인 장비를 이용한 분석법을 확립해야한다(10). 따라서 본 연구에서는 ellagic acid의 품질관리 표준화할 수 있도록 HPLC를 이용한 분석법을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 복분자 열매는 전라북도 고창군에서 재배된 미성숙한 과실로서 6월에 채취하여 열수추출 동결건조 분말화를 하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관한 것을 고창 복분자연구소로부터 분양받아 사용하였다. 복분자 추출물 분말은 동일한 제조공정에 따라 생산된 것으로 3개의 lot를 분양받았다.

### 표준용액의 조제

본 실험에서 ellagic acid(purity 99%) 표준품과 ellagic acid를 녹이기 위해 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 표준품 ellagic acid를 DMSO로 녹여 1 mg/mL가 되도록 표준원액을 제조한 후 methanol(Fisher Scientific Korea, Seoul, Korea)

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of ellagic acid

Parameters	Conditions		
Column	Symmetry <sup>®</sup> (C18, 4.6×250 mm, 5.0 μm)		
Flow rate	0.5 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	32 min		
Gradient	Time (min)	% A <sup>1)</sup>	% B <sup>2)</sup>
	0	90	10
	7	90	10
	28	45	55
	32	30	70
	35	90	10
40	90	10	
UV detection	254 nm		

<sup>1)</sup>1% formic acid in water. <sup>2)</sup>Acetonitrile.

로 희석하여 10 μg/mL의 표준용액을 제조하였다. 제조된 표준원액과 표준용액은 4°C에서 냉장보관 하였다. 검량선 작성을 위해 10 μg/mL의 표준용액을 methanol을 이용하여 순차적으로 희석하여 1 μg/mL, 2 μg/mL, 4 μg/mL, 8 μg/mL로 조제하였다. Ellagic acid의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

### HPLC 분석

고창 복분자의 ellagic acid 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1에 요약되어 있다. HPLC 분석에서 칼럼은 Symmetry<sup>®</sup>(C18, 4.6×250 mm, 5.0 μm, Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였고, UV/VIS 검출기를 가진 Gilson GX-281 Preparative HPLC System(Middleton, WI, USA)을 사용하였다. 이동상 A에는 1% formic acid(Fisher Scientific Korea)가 첨가된 water(Fisher Scientific Korea)를, 이동상 B에는 acetonitrile(Fisher Scientific Korea)를 이용하였다. 분석시간은 0분에서 7분까지 이동상 A를 90%로 용리하였고, 7분에서 28분까지 이동상 B가 55%가 되도록 한 다음, 28분에서 32분까지 이동상 B를 70%로 유지하고, 32분에서 40분까지 이동상 B를 10%를 유지하면서 0.5 mL/min의 유속으로 분석을 실시하였다. UV는 254 nm 파장에서 측정하였으며 시료 주입량은 10 μL를 사용하였다.

### 시험방법의 검증(method validation)

**특이성(specificity):** Ellagic acid 표준용액과 전 처리한 고창 복분자 분말을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 retention time과 spectrum을 비교하였다.

**직선성(linearity):** Ellagic acid 표준용액 10 μg/mL를 조제하여 methanol로 순차적으로 희석하여 1~10 μg/mL의 시료를 HPLC로 분석한 후 농도에 대한 면적에 대하여 검량선을 작성하고, R<sup>2</sup>값을 확인하였다. 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)값이 3.3일 때로, 검출한계(LOD, limit of detection)는

S/N 비율이 10일 때로 계산하였다.

**정확성과 정밀성(accuracy and precision):** 정확성과 정밀성을 확인하기 위한 과정으로 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)의 변이성을 측정하였다. 표준용액 ellagic acid를 최저정량농도(low limit of quality control, LLQC, 1 µg/mL), 저농도(low quality control, LQC, 2 µg/mL), 중간농도(medium quality control, MQC, 4 µg/mL), 고농도(high quality control, HQC, 8 µg/mL)로 조제하여 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)에서 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다. 정확성은 기지량의 분석물질을 함유한 intra-day와 inter-day 시료를 반복 측정하여 결과값이 참값에 근접한 정도를 백분율로 나타내었다. Intra-day의 정밀성은 하루 동안 일정농도의 표준용액을 HPLC로 5회 분석하여 그 변이성을 측정하였으며, inter-day의 정밀성은 intra-day의 과정을 5일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였다. 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 계산하였다.

**회수율(recovery):** 알고 있는 농도(1, 2, 4, 8, 10 µg/mL)의 ellagic acid 표준물질을 시료에 넣은 후 분석에 의해 회수되는 회수율을 측정하였다. HPLC로 세 농도의 세 반복 실험을 통하여 회수되는 정도를 확인하였고, 회수율은 백분율로 계산하였다.

#### 고창복분자 내에서의 ellagic acid 분석

고창 복분자연구소로부터 분양받은 세 lot의 고창 복분자 미숙과 분말 0.5 g씩을 water 100 mL로 100°C에서 환류추출하였고, 0.45 µm syringe filter로 여과하여 2배 희석하여 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 세 번씩 반복 분석하였다. 표준용액의 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된

검량선에 의해 복분자 추출물 시료 중 ellagic acid의 농도를 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 특이성

특이성 실험은 여러 가지 다른 성분들이 혼합되어 있는 복분자 분말 중에 ellagic acid만을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는지를 확인하기 위해 실시하였다. HPLC를 이용하여 표준용액에서의 ellagic acid와 추출물에서의 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 확인하였는데 농도별로 같은 머무름 시간에 분석되었다. Ellagic acid 표준용액과 고창복분자 시료 전처리 시험용액의 spectrum이 동일하고, 크로마토그램상의 머무름 시간이 Fig. 1과 같이 22.2분대로 동일하여 특이성을 확인하였다. 이 결과는 Dhooghe 등(11)이 HPLC를 이용하여 *Phyllanthus amarus* 추출물에서의 ellagic acid를 분석하였을 때 머무름 시간이 27분대였던 것에 비하여 비교적 빠른 분석시간이었다.

### 직선성

검체 중 일정 농도 범위에 있는 ellagic acid의 양에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지 실험한 시험으로 ellagic acid 표준원액을 단계적으로 희석하여 직선성을 확인하였다. 표준검량선은 Fig. 2와 같이 1~10 µg/mL 범위에서 상관계수( $R^2$ )가 0.9996으로 선형성을 나타내었다. 또한 S/N 비에 의한 LLOQ와 LOD는 각각 1 µg/mL와 0.3 µg/mL였다.

### 정확성

실험결과가 참값이나 표준값이 근접한 정도를 측정하였다. 정확성 결과는 Table 2와 같이 intra-day 분석에서 98.77

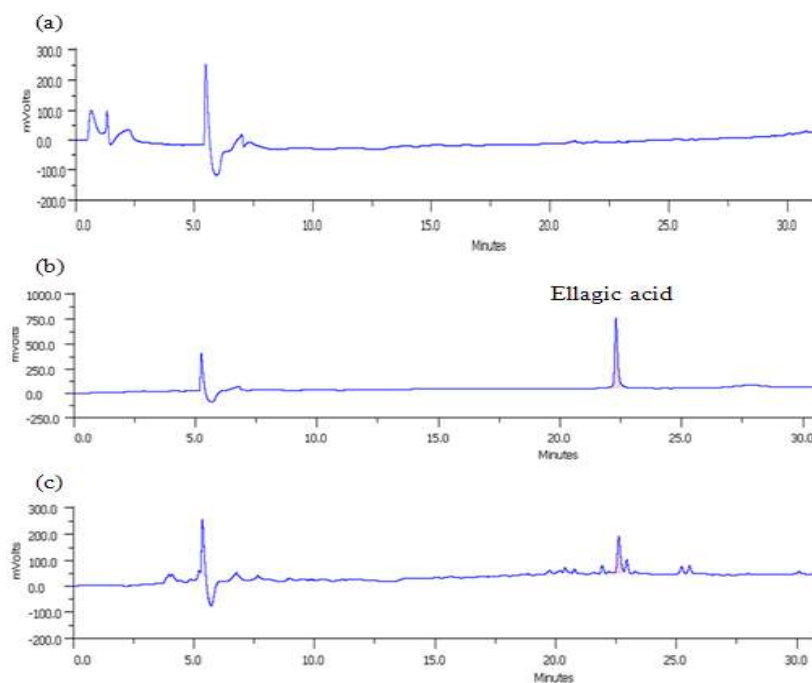


Fig. 1. Chromatogram of (a) blank, (b) ellagic acid standard solution and (c) Gochang Bokbunja extract.

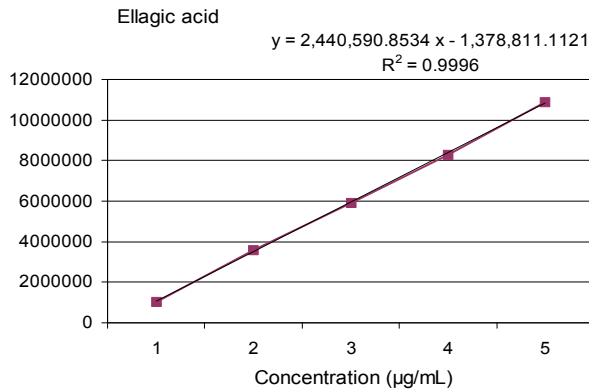


Fig. 2. Calibration curve of ellagic acid standard solution.

Table 2. Intra- and inter-day accuracy and precision of ellagic acid (n=5)

	Nominal concentration (µg/mL)	Mean measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)	RSD <sup>1)</sup> (%)
Intra-day	1.00	1.04	103.69	2.28
	2.00	1.98	98.77	1.71
	4.00	3.98	99.50	0.75
	8.00	7.97	99.58	0.30
Inter-day	1.00	1.02	91.33	2.84
	2.00	1.98	102.89	1.33
	4.00	3.99	100.81	1.27
	8.00	8.00	104.33	0.12

<sup>1)</sup>Relative standard deviation.

~103.69%로, inter-day 분석에서는 91.33~104.33%로 참값에서 15%를 벗어나지 않는 정확성을 보였다. 회수율은 이미 알고 있는 농도의 ellagic acid 표준용액을 검체에 넣은 후 분석에 의해 회수되는 양을 백분율로 계산하였다. Ellagic acid 성분의 회수율은 89.17~97.92% 이내로 나왔고, RSD는 0.2% 이내로 나왔다. 농도별로 1.00 µg/mL에서는 92.45%, 2.00 µg/mL에서는 96.21%, 4.00 µg/mL에서는 94.86%, 8.00 µg/mL에서는 97.92%, 10.00 µg/mL에서는 89.17%의 회수율을 보였다(Table 3). Panichayupakarananta 등(12)은 석류 껍질에서 ellagic acid 분석법에 대한 연구에서 R<sup>2</sup>은 0.9995 이상으로 98.5%의 회수율을 얻었다.

정밀성

균일한 시료로부터 여러 번 채취하여 시험했을 때 시험결과 간의 근접성을 확인하였다. 일내 반복성은 하루에 표준용액을 5번 분석하여 측정하였고, 5일 동안 반복 분석하여 일

Table 3. Recovery of ellagic acid (n=5)

Concentration (µg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
1.00	92.45±0.13	0.14
2.00	96.21±0.08	0.08
4.00	94.86±0.05	0.05
8.00	97.92±0.09	0.09
10.00	89.17±0.11	0.12

Each value is presented as mean±SD.

Table 4. Amount of ellagic acid in Gochang Bokbunja extracts (n=3)

Lot number	Mean (µg/mg)	RSD (%)	Contents (%)
1	2.260±0.05	2.356	0.226
2	1.576±0.01	0.254	0.158
3	1.920±0.02	1.102	0.192

Each value is presented as mean±SD.

간 반복성을 시험하여 RSD로 나타내었다(Table 2). Ellagic acid 표준물질에 대하여 일내와 일간 모두 RSD≤5%로 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다. Intra-day에서의 정밀도(RSD)는 0.30~2.28%, inter-day에서는 0.12~2.84%의 정밀도를 나타내었다. 2.28%와 2.84%는 최저정량한계에서의 RSD 값으로 Dhooghe 등 (11)의 결과에서는 intra-day에서 2.57%였고 inter-day에서 2.54%였으며, Panichayupakarananta 등(12)은 intra-day 1.36%, inter-day 4.40%의 결과를 얻어 상대적으로 본 연구의 정밀성 결과가 양호하다고 판단하였다.

고창복분자 내에서의 ellagic acid 함량

본 시험법의 검증과정을 통하여 ellagic acid에 대한 상기 HPLC 분석법이 기능성 원료 인증을 받기 위한 고창복분자 내의 ellagic acid의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 검증된 분석법으로 고창 복분자연구소로부터 분양받은 세 lot의 미숙과 건조분말의 함량을 측정된 결과 분말 중 ellagic acid 함량의 평균은 0.192%, 기준값은 0.192%의 80~120%로 기준 규격을 설정하였을 때(13), 함량은 0.15~0.23%였다(Table 4).

요 약

고창 복분자의 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발하기 위하여 지표성분 표준화를 위한 ellagic acid의 분석법 설정과 분석법에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 1% formic acid가 첨가된 water와 acetonitrile을 이동상으로 하고 Symmetry<sup>®</sup>(C18, 4.6×250 mm, 5.0 µm) 칼럼을 사용하여 기울기용리(gradient elution) 방법으로 분석하였다. 본 연구에서는 분석법을 확립하고 분석법에 대하여 특이성, 직선성, 정확성과 정밀성 그리고 회수율에 대하여 확인하였다. Ellagic acid의 검량선은 R<sup>2</sup>=0.9996으로 좋은 선형성을 보였으며 LLOQ와 LOD는 각각 1 µg/mL와 0.3 µg/mL였다. 일내와 일간 분석에서 상대표준편차(RSD)는 각각 2.28%와 2.84% 미만으로 나왔다. 회수율 측정결과에서는 89.17~97.92%로 나왔고, RSD는 0.05~0.14%였다. 그러므로 HPLC를 이용한 ellagic acid의 분석법이 고창 복분자 추출물의 기능성원료 표준화를 위한 지표성분 분석을 위한 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 시험법에 따라 분석한 고창 미숙과 복분자 추출물 내의 ellagic acid의 함량은 세 lot를 3번씩 분석하였을

때 약 1.92 µg/mg(0.192%)이 나왔으며 RSD값은 2.36% 이하였다. 따라서 본 연구를 통하여 확립된 ellagic acid의 분석법이 고창 복분자의 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 본다.

### 감사의 글

본 연구는 2010년 지역 농식품 선도클러스터 육성사업지역의 일환으로 (재)고창복분자연구소의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 문 헌

1. An YH, Kim YH. 2007. Distribution and ecological characteristics of native *Rubus coreanus* in Korea. *Kor J Env Eco* 21: 176-185.
2. Bae GH. 2000. *The medicinal plant of Korea*. Kyohasa Publishing Co., Ltd, Seoul, Korea. p 231.
3. Jeong JS, Sin MK. 1996. *Encyclopedia of oriental medical*. Young Rim Republ., Seoul, Korea. p 461.
4. Lee YA, Lee MW. 1995. Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J Pharmacogn* 26: 27-30.
5. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D. 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* 16: 360-367.
6. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, Pihlaja K. 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J Ethnopharmacol* 81: 327-336.
7. Mertens-Talcott SU, Percival SS. 2005. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 218: 141-151.
8. KFDA. 2007. *Guideline for standard of health functional food*. Korea Food & Drug Administration. p 6-13.
9. KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc*. Korea Food & Drug Administration. p 1-18.
10. Mertz C, Cheynier V, Günata Z, Brat P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 55: 8616-8624.
11. Dhooghe L, Meert H, Cimanga RK, Vlietinck AJ, Pieters L, Apers S. 2011. The quantification of ellagic acid in the crude extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). *Phytochem Anal* 22: 361-366.
12. Panichayupakarananta P, Issuriya A, Sirikatitham A, Wang W. 2010. Antioxidant assay-guided purification and LC determination of ellagic acid in pomegranate peel. *J Chromatogr Sci* 48: 456-459.
13. KFDA. 2008. *Guideline of standard of functional ingredient for health functional food development*. Korea Food & Drug Administration. p 53-59.

(2012년 7월 24일 접수; 2012년 9월 10일 채택)