

건강기능식품 기능성 원료로서 고흥 유자 추출물의 지표성분 Naringin 분석법

문소현 · 고은영 · Awraris Derby Assefa · 박세원

건국대학교 생명자원식품공학과

HPLC Method Validation of Naringin Determination in Goheung Yuzu Extract as a Functional Ingredient

So-Hyun Moon, Eun-Young Ko, Awraris Derby Assefa, and Se-Won Park

Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University

ABSTRACT An HPLC method for determination of naringin was developed to standardize it as a marker compound in Goheung yuzu extract as a functional health food. Optimum results were obtained by C-18 column chromatography using solvent mixtures (A: 0.5% acetic acid, B: acetonitrile) as the stationary phase and mobile phase. The method was fully validated and sensitive with a limit of detection (LOD) of 0.0218 mg/L and limit of quantification (LOQ) of 0.0661 mg/L. The method showed high linearity (coefficient of correlation=0.9986) and high accuracy, as recovery rates of naringin at concentrations of 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL were in the ranges of 95.74~98.25%, 97.67~101.01%, 97.33~104.64%, and 95.53~106.82%, respectively. Intra-day and inter-day variation, which are measures of method precision, were 1.39~1.95% and 0.17~1.49%, respectively. Therefore, the method could be used without modification for determination of naringin as a marker compound in Goheung yuzu extracts.

Key words: yuzu, naringin, validation, functional food, marker compound

서 론

감귤류의 일종인 유자(*Citrus junos* SIEB ex TANAKA)는 운향과 감귤속, 후생감귤아속에 속한 상록관목의 열매로 장귤과 밀감류와의 자연교잡종 과목이며 국내에서는 전라남도 고흥, 완도, 진도, 장흥과 경상남도 거제, 통영, 남해 그리고 제주도 등지에서 재배되고 있다. 유자는 감귤, 오렌지, 자몽 등이 과육을 위주로 이용하는 것과는 달리 과육과 과피를 모두 이용할 수 있으며(1), 향기가 좋고 신맛이 강하며 유기산과 비타민 A와 C가 풍부하고 항산화능, 항암효과, 항균작용이 있다고 알려져 있다(2,3). 최근 연구 결과에 따르면 항산화 역할을 하는 비타민 C와 E 그리고 과일에 많이 들어 있는 polyphenol과 flavonoids 물질이 질병을 억제하는데 효과가 있다고 밝혀졌다(4,5). 특히 유자를 포함하는 감귤류의 과피에 많이 함유되어 있는 flavonoid류의 하나인 naringin은 인체에 독성이 없고 콜레스테롤 억제효과와 백혈병 세포를 정상세포로 변화시키는 작용, 유방암 세포증식 저해작용, 항산화 효과, 항염증, 천연 항균제 등 다양한 생리활성을 가지고 있다고 보고되었다(1,6,7). 최근 건강기능 증진 효과가 알려지면서 다양한 생리활성 성분으로 각광받고 있

는 naringin은 자연에서 유리상태(aglycone)로 존재하거나 rhamnose, rutinose, glucose 등의 다양한 당과 결합하여 배당체의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다(8). Naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside; naringinone-7-rhamnoglucoside)의 화학식은 $C_{27}H_{32}O_{14}$ 이고 분자량은 580.53 g/mol로 인체에 독성이 없으면서 천연 항균제로도 알려져 있으며, 항염증, 항산화, 항암, 혈중 지질 저하, 항고혈압 등에 효과 있는 성분으로 보고되어 있다(9-12)(Fig. 1). 반면 유자는 수확기가 11월에서 12월로 한정되어 있고, 저장성이 좋지 않아 대부분이 수확 즉시 당 절임 형태인 유자차, 유자청의 원료로 사용되거나 음료로 많이 이용되어 왔으며 시럽, 소스 등으로 가공되어 이용하고 있다(2). 최근 유자의 기능성이 밝혀지면서 소비를 활성화하기 위한 기술 및 상품이 개발되고 있다. 특히 생활패턴의 서구화로 인한 성인병 발병률의 증가로 점차 기호식품에 대한

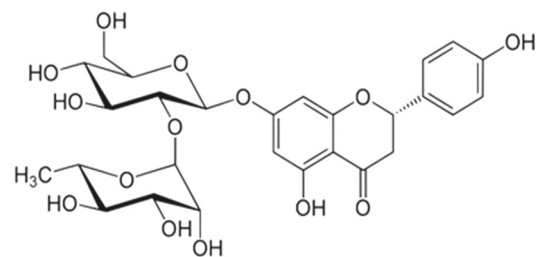


Fig. 1. Chemical structure of naringin.

Received 1 August 2014; Accepted 15 September 2014

Corresponding author: Se-won Park, Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
E-mail: sewpark@konkuk.ac.kr, Phone: +82-2-450-3739

소비자의 인식이 바뀌기 시작함에 따라 성인병과 만성질환 예방을 위해 꾸준히 섭취할 수 있는 기능성 식품을 개발하고 확대하는 것 또한 중요하게 대두되고 있다(13). 이렇게 생리 활성 성분이 다량 함유된 유자를 소재로 개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발, 등록하기 위해 고흥 유자를 이용하여 유자 추출물을 제조하였다.

건강기능식품을 개발, 생산 시 원료 표준화 및 규격화는 중요한 부분을 차지하게 되는데 제조공정에서 목표하는 성분을 유지하기 위해 원재료에서 최종 제품까지 가공하는 데 최소한의 차이를 줄이기 위한 우수제조공정 규범을 표준화라고 하며 이때 지표성분의 표준화 방법이 가장 일반적으로 사용되게 된다. 지표성분은 천연물에서 존재하며 표준화를 위해 선택되는 성분으로써 원재료의 사용 여부를 확인할 수 있는 성분이며 제조공정의 표준화를 관리할 수 있는 성분으로 특이성, 대표성, 안정성, 분석기술의 용이성, 안정성 등이 고려되어야 한다. 이와 같이 지표성분을 확인하는 방법은 공인된 방법이나 정밀하다고 판단되는 분석방법을 사용하며 신뢰성을 가지는 과학적인 검증으로 시험법 validation이 필요하게 된다.

따라서 본 연구에서는 개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발할 목적으로 고흥 유자 추출물의 표준화를 위해 지표성분으로 naringin을 설정하였으며, HPLC를 이용하여 지표성분 naringin의 분석법을 확립하며 그에 따른 유효성 검증을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 유자 추출물은 전남 고흥 유자를 세척 및 조분쇄 한 다음 70% ethanol을 이용하여 33~38°C에서 7시간 동안 순환 추출 후 여과 및 농축하여 고형분 대비 60%의 텍스트린을 첨가하여 분말로 제조한 것을 시료로 사용하였다. 시료는 0.05 g을 칭량하여 100% 메탄올 1 mL를 넣고 20분간 sonication 한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 취해 0.45 µm filter로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

표준용액의 조제

표준품 naringin(95%, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)을 1 mg/mL의 농도가 되도록 메탄올로 제조한 것을 표준원액으로 하였다. 이를 메탄올을 이용하여 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 mg/mL로 단계적으로 희석한 표준용액을 이용하여 표준 검량선으로부터 naringin 함량을 구하였다.

HPLC분석

유자 추출물의 naringin 분석은 Yu 등(14)의 분석법을 변형하여 분석법에 이용하였으며 Agilent 1100 series

Table 1. Analytical conditions of HPLC for a naringin in yuzu extracts

Instrument	Condition
Column	Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 µL)
Mobile phase	A solvent: 0.5% acetic acid in water B solvent: acetonitrile 5~18% B (5 min; linear gradient), 18~18% B (30 min; isocratic), 18~100% B (35 min; linear gradient)
Detector	DAD detector, 280 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	25°C
Injection volume	10 µL

system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 binary pump(DE43618438, Agilent Technologies)와 UV detector(DAD: G1315B, Agilent Technologies)로 분석하였다. 분석조건은 Table 1과 같으며 분석용 칼럼은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6(5 µL, Kanto Chemical, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

분석법의 유효성 검증

개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료로 등록하기 위해 지표성분 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인을 근거로 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of detection) 및 정량한계(limit of quantitation)로 시험법의 유효성 검증을 실시하였다.

특이성: 특이성은 공존이 예측되는 불순물, 분해물, 배합 성분들이 서로 영향을 받지 않고 특이적으로 측정할 수 있는 능력을 의미하며, 시료에서 분석대상물질을 선택적으로 측정할 수 있는 정도를 나타내는 특이성의 검증을 위하여 표준 용액과 전처리 방법으로 처리한 유자 추출물을 HPLC로 분석한 뒤 크로마토그램을 비교하여 naringin peak가 분리되는지를 확인하였고 peak 간 간섭 정도를 측정하였으며, diode array detector(DAD) system을 이용하여 동일한 spectrum을 확인하였다.

직선성, 정량한계 및 검출한계: 검체 중 분석대상물질의 농도에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 의미하는 직선성을 검증하기 위해 여섯 개 농도의 검체를 2반복하여 분석하여 얻은 값의 peak 면적비와 농도비의 관계를 알 수 있는 회귀분석을 통하여 표준 검량선을 얻었다. 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 mg/mL로 단계적으로 희석한 naringin 표준용액을 HPLC로 분석하여 peak 면적비에 대한 농도비의 관계를 표시하는 표준 검량선을 작성하였다. 또한 직선성 검증을 통해 얻은 검량선의 기울기와 표준편차를 통해 정량한계 및 검출한계를 구하였으며, 검출한계(LOD)는 시료에 포함되는 분석대상물의 검출이 가능한 최소량 또는 최저 농도, 정량한계(LOQ)는 검체 중에 포함되어 있는 분석대상물의 정량이 가능한 최소량 또

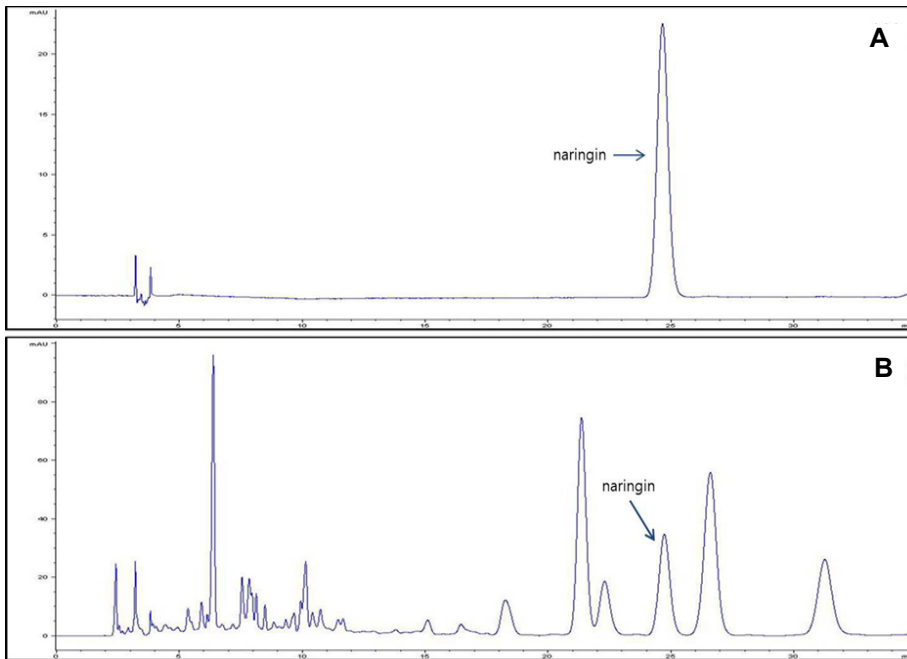


Fig. 2. The HPLC chromatograms of naringin (A) standard and (B) yuzu extracts.

는 최저 농도로 LOD와 LOQ는 ICH Q2B guideline의 계산식을 따랐으며 보통 signal-to-noise ratio에 의해 결정되며(LOD는 S/N이 3:1로, LOQ는 10:1), 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 산출하였다. 검출한계 식은 $LOD=3.3 \times \sigma/S$ 로 σ 는 반응의 표준편차를 의미하고, S는 검량선의 기울기를 의미하며 정량한계는 $LOQ=10 \times \sigma/S$ 의 계산식으로 산출하였다.

회수율: 이미 알고 있는 표준용액을 검체에 넣은 후 분석에 의해 회수되는 회수율을 측정하는 것으로 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg의 naringin 표준품을 메탄올 1 mL에 각각 녹인 것과 시험샘플 0.05 g을 메탄올 1 mL에 녹인 것 그리고 시험샘플 0.05 g을 각각 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL의 표준용액에 녹인 것을 사용하여 회수율 실험을 실시하였다. 각 시험은 3회 10반복으로 진행되었으며 HPLC로 분석하여 얻어진 면적을 표준품, 시험샘플, 시험샘플과 표준품의 면적과 서로 비교하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation)를 이용하여 회수율을 구하였다.

정밀성: 시험샘플을 전처리법에 따라 처리된 시험용액을 inter-day와 intra-day로 나누어 정밀성 실험을 실시하였다. Inter-day는 1일 1구간으로 6일간 진행하였고 intra-day는 1일 3구간 6시간마다(9:00 AM, 3:00 PM, 9:00 PM) 진행하였으며 각 3회씩 반복하여 HPLC로 분석하였다. 얻어진 면적은 검량선에 의해 정량한 농도별 검출 농도의 표준편차를 검출 농도로 나눈 비의 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

특이성 확인

특이성은 불순물 등과 혼합된 상태에서 분석대상물질을

선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 다른 물질의 간섭 없이 성분이 분리되는 것에 의해 확인하게 된다. HPLC를 통해 표준용액과 시료 전처리 방법으로 처리한 유자 추출물의 크로마토그램을 비교하여 naringin peak가 분리되는지를 확인한 결과 다른 물질의 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액의 retention time이 동일하고 spectrum 또한 일치하는 것으로 본 시험법의 특이성을 확인하였다(Fig. 2, 3).

검량선 및 검출한계, 정량한계 조사

1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 0.02 mg/mL로 단계적으로 희석한 naringin 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며, 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9986으로 높은 직선성을

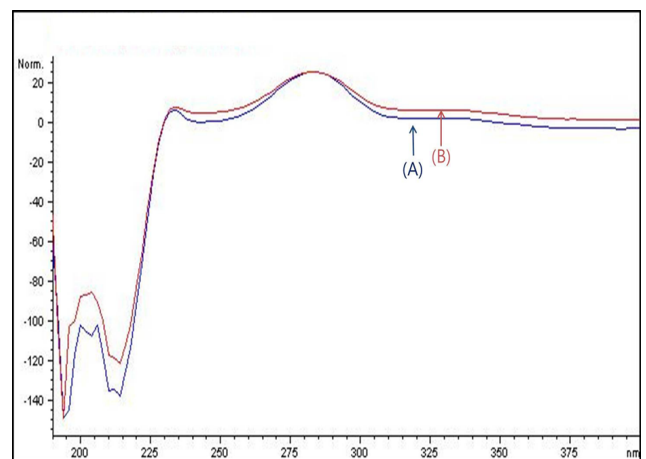


Fig. 3. UV spectral shapes by DAD (diode array detector) spectrum of naringin (A) standard and (B) yuzu extracts.

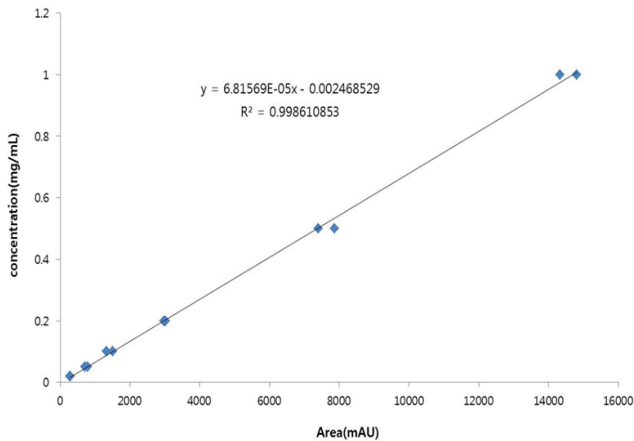


Fig. 4. Calibration curve of naringin.

보였으며(Fig. 4) 직선성 검증을 통해 얻은 검량선의 기울기와 표준편차를 통해 검출한계를 구한 결과, 검출한계는 0.0218 mg/L, 정량한계는 0.0661 mg/L 수준으로 나타났다. 이는 시료에 적용할 경우 검출한계는 0.0218 mg/L까지 검출이 가능한 것을, 정량한계는 0.0661 mg/L 수준까지 정량할 수 있는 분석물질의 최저 농도를 의미하게 된다. Musmade 등(15)은 naringin 분석법에서 검출한계에 대해서는 17 ng/mL로 유사한 수준을 보였으며, 정량한계에 대해서는 50 ng/mL로 다소 높은 수준을 보였다. 유자 추출물의 표준화를 위해 설정된 지표성분의 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

회수율 측정

회수율은 유자 추출물 0.05 g을 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL의 농도의 naringin 표준품 용액 1 mL에 각각 녹여 전처리법에 의해 처리한 뒤 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하여 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL의 단계적으로 4가지 농도로 희석한 naringin 표준품을 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하여 빼주었으며, 유자 추출물 0.05 g을 3회 10 반복으로 1 mL 메탄올에 녹여 앞에 전처리법에 의해 처리한 뒤 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하여 나눈 값으로 회수율을 얻었다. Table 2에 나타난 바와 같이 naringin의 회수율은 1 mg/mL에서는 95.75~98.25%, 0.5 mg/mL에서는 97.67~101.01%, 0.1 mg/mL에서는 97.33~104.64%, 0.05 mg/mL에서는 95.53~106.82%의 범위의 회수율을 얻었으며 분석오차 10% 이내를 만족하였다. Ribeiro와 Ribeiro(16)는 자몽주스에서 naringin에 대해 105.93~110.90%의 회수율을 보였으며, Calabro 등(17)은 버가못주스에서 93.42%의 naringin 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 deviation of measured amount for naringin in HPLC analysis for validation

Concentration (mg/mL) ¹⁾	Recovery (%)	
	Mean±SD	RSD ²⁾
1	97.91±0.34 ³⁾	0.34
	96.93±0.95	0.98
	96.72±0.98	1.01
0.5	98.49±0.82	0.83
	98.88±0.67	0.67
	100.16±0.85	0.94
0.1	103.02±1.62	1.57
	103.50±1.06	1.02
	98.29±0.96	0.98
0.05	96.90±1.37	1.42
	105.13±1.69	1.61
	98.91±1.93	1.96

¹⁾Concentration of naringin standard.

²⁾Relative standard deviation.

³⁾Each data was obtained by 10 times analysis.

Table 3. Precision of measured amount for naringin in yuzu extract for validation

Concentration (mg/mL)	Precision	
	Mean±SD (mg/100 g)	RSD (%) ¹⁾
Intra-day ²⁾	152.67±2.58 ⁴⁾	1.69
	150.90±2.09	1.39
	152.76±2.97	1.95
Inter-day ³⁾	158.17±1.27	0.80
	146.67±0.63	0.43
	156.21±1.82	1.16
	154.17±0.26	0.17
	149.11±1.22	0.82
	153.26±2.28	1.49

¹⁾Relative standard deviation.

²⁾Intra-day: tree times per day.

³⁾Inter-day: one time analysis of naringin per day for 6 days.

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

의 근접성을 말한다. Intra-day, inter-day의 정밀도(RSD)를 측정된 결과는 Table 3과 같으며, 하루에 일정시간(6시간)을 두고 반복하여 분석한 intra-day에서의 정밀도는 1.39~1.95%를 나타내었고, 하루(24시간) 간격을 두고 6일 동안 분석한 inter-day에서는 0.17~1.49%의 정밀도를 나타내어 표준편차 2% 이내를 만족하였다.

이상의 분석 결과, 본 연구의 기기분석법과 유효성 검증을 통해 건강기능식품 기능성 원료로서의 유자 추출물의 표준화를 위해 지표성분인 naringin의 분석이 가능함을 확인하였다.

요 약

개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료로 개발한 고흥 유자 추출물의 표준화를 위해 지표성분으로 naringin을 설정하였으며, HPLC를 이용하여 지표성분 naringin의 분석법을 확

립하고 그에 따른 유효성분 검정을 실시하고자 하였다. 유효성 검정 결과, 본 시험법에서 표준용액의 retention time과 고흥 유자 추출물의 retention time이 일치하는 것을 확인할 수 있었으며 동일한 spectrum을 나타내어 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9986으로 높은 직선성을 보였으며 검출한계는 0.0218 mg/L, 정량한계는 0.0661 mg/L로 설정되었다. Naringin의 회수율은 1 mg/mL에서는 95.75~98.25%, 0.5 mg/mL에서는 97.67~101.01%, 0.1 mg/mL에서는 97.33~104.64%, 0.05 mg/mL에서는 95.53~106.82%의 범위의 회수율을 얻었으며 intra-day에서의 정밀도(RSD)는 1.39~1.95%, inter-day에서는 0.17~1.49%의 정밀도를 나타내어 고흥 유자 추출물의 지표성분 naringin의 분석법은 적합한 시험법임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ009074)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yang HS, Eun JB. 2011. Fermentation and sensory characteristics of Korean traditional fermented liquor (*Makgeolli*) added with citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) juice. *Korean J Food Sci Technol* 43: 438-445.
2. Kim HY, Kim E, Kim DH, Oh MJ, Shin TS. 2009. The nutritional components of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed diets with yuza (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka). *J Fish Aquat Sci* 42: 215-223.
3. Lee YJ, Kim SI, Han YS. 2008. Antioxidant activity and quality characteristics of yogurt added yuza (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) extract. *Korean J Food & Nutr* 21: 135-142.
4. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in food: fruits. *J Agric Food Chem* 49: 5315-5321.
5. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011.
6. Lee SL, Seo CS, Kim JH, Shin HK. 2011. Contents of poncirin and naringin in fruit of *Poncirus trifoliata* according to different harvesting times and locations for two years. *Kor J Pharmacogn* 42: 138-143.
7. Chae SC, Kyo EG, Choi SH, Ryu GC. 2008. Protective effect naringin on carbon tetrachloride induced hepatic injury in mice. *J Environ Toxicol* 23: 325-335.
8. Singleton VL. 1981. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Fd Res* 27: 149-242.
9. Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S. 2004. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm* 54: 243-250.
10. Kim HJ, Oh GT, Park YB, Lee MK, Seo HJ, Choi MS. 2004. Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sci* 74: 1621-1634.
11. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1134-1145.
12. Balestrieri ML, Castaldo D, Balestrieri C, Quagliuolo L, Giovane A, Servillo L. 2003. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. *J Lipid Res* 44: 380-387.
13. Yoo KM, Lee CH, Hwang IK. 2008. Preparation of chocolate added with yuza (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) and its antioxidant characteristics. *Korean J Food Cookery Sci* 24: 222-227.
14. Yu HY, Park SW, Chung IM, Jung YS. 2011. Anti-platelet effects of yuzu extract and its component. *Food Chem Toxicol* 49: 3018-3024.
15. Musmade KP, Trilok M, Dengale SJ, Bhat K, Reddy MS, Musmade PB, Udupa N. 2014. Development and validation of liquid chromatographic method for estimation of naringin in nanoformulation. *J Pharm* doi: 10.1155/2014/864901.
16. Ribeiro IA, Ribeiro MHL. 2008. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control* 19: 432-438.
17. Calabro ML, Galtieri V, Cutroneo P, Tommasini S, Ficarra P, Ficarra R. 2004. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in *Citrus bergamia* juice. *J Pharm Biomed Anal* 35: 349-363.