

## 건강기능식품 원료로서 나주 배박 추출물의 지표성분 분석법 벨리데이션

조은정<sup>1\*</sup> · 방미애<sup>2\*</sup> · 조승식<sup>1</sup>

<sup>1</sup>목포대학교 약학과

<sup>2</sup>전라남도 생물산업진흥재단 식품산업연구센터

### Validation of Analytical Method of Marker Compounds in Extract of Pear Pomace as a Functional Health Ingredient

Eun-Jung Cho<sup>1\*</sup>, Mi-Ae Bang<sup>2\*</sup>, and Seung-Sik Cho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University

<sup>2</sup>Department Jeonnam Bioindustry Foundation, Food Research Institute

**ABSTRACT** This study was conducted to establish an HPLC analysis method for determination of marker compounds as part of materials standardization for development of health functional food materials from pear pomace. The quantitative determination method of caffeic acid and chlorogenic acid as marker compounds of pear pomace extract (PPE) was optimized by HPLC analysis using a C18 column (5×250 mm, 5 μm) with a 0.2% elution gradient of acetic acid and methanol as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min and detection wavelength of 330 nm. The HPLC/UV method was applied successfully to the quantification of marker compounds in PPE after validation of the method with linearity, accuracy, and precision. The method showed high linearity of the calibration curve with a coefficient of correlation ( $R^2$ ) of 0.9999, and limit of detection and limit of quantification were 1.14 μg/mL (caffeic acid) and 1.61 μg/mL (chlorogenic acid) as well as 4.9 μg/mL (caffeic acid) and 4.9 μg/mL (chlorogenic acid), respectively. Relative standard deviation values from intra- and inter-day precision were less than 3.1% (caffeic acid) and 4.0% (chlorogenic acid), respectively. Recovery rates of caffeic acid and chlorogenic acid at 12.5, 25, and 50 μg/mL were 93.66~106.32% and 97.33~105.68%, respectively. An optimized method for extraction of caffeic acid and chlorogenic acid in PPE was established through diverse extraction conditions, and the validation indicated that the method is very useful for evaluation of marker compounds in PPE to develop a health functional food material.

**Key words:** pear pomace, HPLC, validation, functional health food

## 서 론

배는 원산지에 따라 동양배(*Pyrus pyrifolia*), 서양배(*Pyrus communis*) 및 중국배(*Pyrus ussuriensis*)로 분류되며, 한국에서 주로 재배되는 동양배는 다른 종의 배와 다르게 외관이 아름답고 당도가 높으며 육질이 부드러워 껍질이 풍부한 조직감이 좋은 특징을 가진다(1). 배는 우리나라에서 기호도가 높은 과일 중의 하나이며 그중 3만톤은 가공 품용으로 이용되어 착즙은 약 60% 정도 이루어지고 있다(2). 가공 후의 배박은 약 30% 정도가 발생되고 있고 기타 부산물은 일부 퇴비화하는 데 활용이 된다(3). 배박에는 충분한 인체 유효 성분들이 남아있으나 최근까지도 이를 활용한 식의약 소재 개발은 거의 되지 않고 있다.

배 과일 조직의 세포벽은 다당류인 펙틴(35%), 셀룰로오스(20~30%), 헤미셀룰로오스(25%)와 당단백질(5~10%) 그리고 미량의 페놀계 물질로 구성되어 있으며(4), 배박의 주성분은 펙틴으로 이루어져 있어 효소 처리(exopolysaccharidase)에 의한 펙틴 추출, 발효배박(fermented pear pomace) 생산 등의 연구가 일부 이루어지고 있다(2,4). 배의 과피에는 caffeic acid, chlorogenic acid, arbutin, catechin, epicatechin, p-coumaroylquinic acid와 rutin 등 일부 배당체들이 밝혀졌으며, 특히 배의 폴리페놀 분획물이 혈장과 간에서 총 지질과 콜레스테롤 및 중성지질을 감소시키는 효과가 우수한 것으로 알려져 있고 호흡기계 질환이나 대사성 질환에 활용되며 배박 물 추출물에서 지방 합성 억제 및 인슐린 저항성 개선 효과가 보고되었다(1,3).

페놀성 화합물인 chlorogenic acid는 caffeic acid와 quinic acid의 에스테르 결합으로 형성된 폴리페놀 화합물이며(5), *in vivo* mouse model에서 caffeine과 병용 처리 시 간의 지질대사를 조절하여 지방 축적을 억제하는 것으로 보고되었다(6). 최근 본 연구진은 배박 추출물에서 caffeic

Received 13 July 2015; Accepted 22 September 2015

Corresponding author: Seung-Sik Cho, Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University, Muan, Jeonnam 58554, Korea

E-mail: sscho@mokpo.ac.kr, Phone: +82-61-450-2687

\*These authors contributed equally to this work.

acid와 chlorogenic acid를 확인하였고, 배박 추출물이 3T3-L1 세포에서 지방세포 저해 및 apoptosis를 유발함을 확인하여 배박 추출물의 항비만 소재 개발 가능성을 확인하였다(7).

본 연구진은 배박이 다양한 기능성을 가진 식품재료로 가치가 높다고 판단하였으며, 실험적으로 배박 추출물이 지방세포의 대사를 억제함을 확인하였다. 본 연구진은 배박의 건강기능성 식품 개별 인정형 소재를 개발할 목적으로 배박의 지표성분으로 caffeic acid 및 chlorogenic acid를 선정하였으며, HPLC법을 이용하여 지표성분의 분석법을 확립하고 그 유효성을 검증하여 확립된 분석법을 바탕으로 배박 내 지표성분의 추출 조건을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 caffeic acid 및 chlorogenic acid 표준품은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용매들은 특급으로 Wako Pure Chemical Industries.(Osaka, Japan)로부터 구입하였다.

본 실험에 사용한 배박은 전라남도 좋은영농조합법인에서 신고배로 만든 배박을 분양받아 사용하였다. 분양받은 배박은 100 mL 용량 플라스크에 10 g씩 나누어 넣은 후, 물, 25, 50, 75, 100% 에탄올 용액으로 2일간 냉침 추출하고 건조하여 실험에 사용하였다. 추출물은 50 mg/mL의 최종농도가 되도록 methanol에 녹였으며 HPLC 분석 전 필터 여과한 여액을 시료로 사용하였고 모든 분석은 3회 반복 실험하였다.

**표준용액의 조제:** 검량선 작성을 위해 표준품은 methanol에 녹여 1 mg/mL가 되도록 표준원액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL로 조제하였다. 표준품의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

#### HPLC 분석

배박 추출물의 caffeic acid 및 chlorogenic acid 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 1에 요약하였다. HPLC 분석에서 칼럼은 Capcellpak-C18(4.6×250 mm, 5 µm, Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였고, HPLC 장비는 pump, autosampler, column oven, photodiode array UV/VIS detector(Waters HPLC system, Millford, MA, USA)를 사용하였으며, 데이터 수집 및 처리를 위해 Empower software program을 사용하였다. A 용매는 0.2% acetic acid, B 용매는 methanol을 사용하였으며 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 칼럼의 유속은 0.8 mL/min이었으며 분석시간은 0에서 5분까지 이동상

**Table 1.** Analytical conditions of HPLC for analysis of caffeic acid and chlorogenic acid

Parameters	Conditions		
Column	Capcellpak-C18 (C18, 4.6×250 mm, 5 µm)		
Flow rate	0.8 mL/min		
Injection volume	10 µL		
UV detection	330 nm		
Run time	15 min		
Gradient	Time (min)	% A <sup>1)</sup>	% B <sup>2)</sup>
	0	75	25
	5	75	25
	10	50	50
	14	75	25
	15	75	25

<sup>1)</sup>0.2% acetic acid. <sup>2)</sup>Methanol.

A를 75%로 용리하였고, 5분에서 10분까지 이동상 B를 50%로 증가시켰다. 이후 14분까지 이동상 A를 75%로 내려 초기 용매 조건으로 조정하였다. UV는 330 nm 파장에서 측정하였으며, 시료는 10 µL를 주입하였다.

#### 시험분석법의 검증(method validation)

배박 추출물의 분석법 확립을 위한 벨리데이션은 ‘의약품 등 분석법의 벨리데이션 가이드라인(식품의약품안전처)’을 참고하여 수행되었다(8).

**특이성 (specificity):** Caffeic acid 및 chlorogenic acid 혼합용액과 전처리 한 배박 추출물 분말을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 retention time과 spectrum을 비교하였다.

**직선성 (linearity):** Caffeic acid 및 chlorogenic acid 혼합용액 1 mg/mL를 조제하여 methanol로 순차적으로 희석하여 6.25~100 µg/mL의 시료를 HPLC로 분석한 후 농도에 대한 면적에 대하여 검량선을 작성하고 R<sup>2</sup>값을 확인하였다. 최저정량한계(LOQ, 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.

**정확성 (accuracy):** 정확성은 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)의 변이성을 측정하였다. 표준용액은 caffeic acid 및 chlorogenic acid를 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL로 혼합 조제하여 intra-day와 inter-day에서 HPLC 분석의 재현성을 확인하였다. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결과값이 참값에 근접한 정도를 백분율로 나타내었다. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였으며 inter-day의 정확성은 intra-day의 과정을 3일 동안 반복하여 그 변이성을 측정하였다. 각 시험은 구간마다 3농도 3회 반복하여 HPLC로 분석하였다.

**정밀성 (precision) 및 회수율 (recovery):** 정밀성은 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL 농도의 표준용액을 각각 6회

반복하여 상대표준편차를 측정하였다. 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 표준편차를 평균으로 나누어 백분율로 계산하였다. 회수율은 3농도 표준용액을 6반복 시험 후 얻은 면적을 표준용액의 면적과 비교하여 회수율을 구하였다.

### 배박 추출물 내에서의 caffeic acid 및 chlorogenic acid 분석

배박 추출물은 50 mg/mL가 되도록 전처리 하고 0.45 µm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 세 번씩 반복 분석하였다. 표준용액의 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 배박 추출물 시료 중 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 농도를 산출하였다.

### 배박에서의 caffeic acid 및 chlorogenic acid 추출조건 확인

배 착즙박의 추출방법은 에탄올 농도를 달리한 조건에 따른 추출특성을 분석하였다. 농도에 따른 추출특성 시험은 저온에서 2일 동안 에탄올 농도 0, 25, 50, 75, 100%에서 2회 추출하였으며, 이때 얻어진 각 추출물은 농축 및 동결건조시켜 분말화하였다. 분말화된 시료는 전문적인 HPLC 방법으로 분석하였다.

### 통계처리

모든 분석의 통계처리는 엑셀프로그램을 이용하여 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 특이성 확인

특이성 시험을 통해 표준품들이 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는지 확인하였다. 표준용액과 시료 전처리 방법으로 처리한 배박 추출물의 크로마토그램을 비교하여 표준품 peak가 분리되는지를 확인한 결과, Fig. 1과 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액의 피크 유지시간과 배박 추출물의 피크 유지시간이 일치하였다. 본 분석방법이 부원료에 영향을 받는지 검토하기 위해 유당, 미결정셀룰로오스가 포함된 시험액을 조제하여 분석한 결과 본 HPLC 분석법에서는 표준품의 검출에 아무 영향을 미치지 않았다(data not shown).

### 직선성, 검출한계 및 정량한계

6.25~100 µg/mL의 단계적으로 희석한 caffeic acid, chlorogenic acid 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 Fig. 2와 같은 검량선을 나타내었다. Caffeic acid 및 chlorogenic acid의 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9999로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 1.61 µg/mL, 1.14 µg/mL, 정량한계는 4.9 µg/mL, 3.5 µg/mL 수준으로 나타났다. 본 연구는 배박 추출물의 표준화를 위해 설정된 지표성분의 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 충분히 본 연구에서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

### 정확성, 정밀성 및 회수율

정확성 결과는 Table 2와 같이 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 intra-day 분석에서는  $96.27 \pm 3.10 \sim 97.97 \pm$

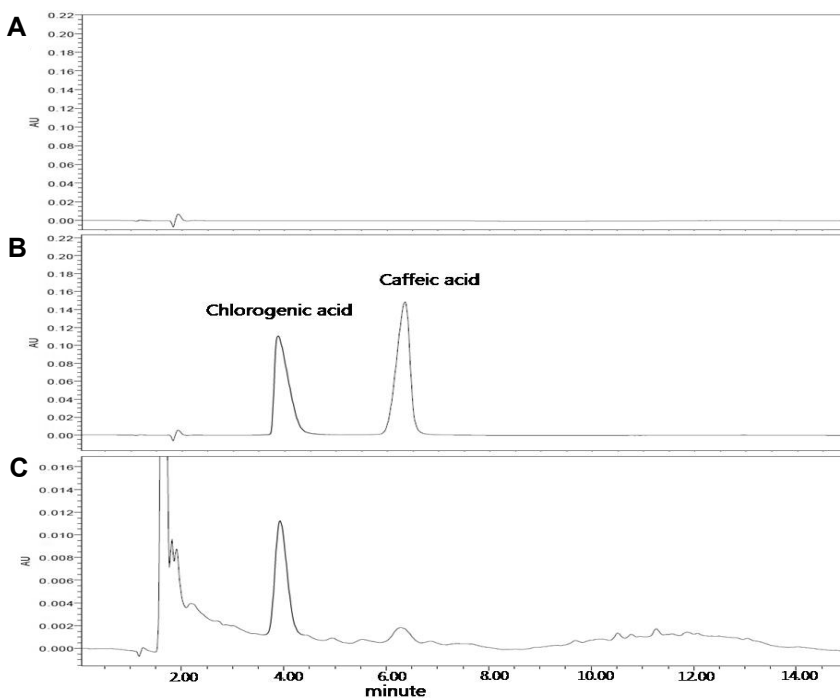


Fig. 1. Chromatogram of (A) blank, (B) caffeic acid and chlorogenic acid standard solution, and (C) PPE.

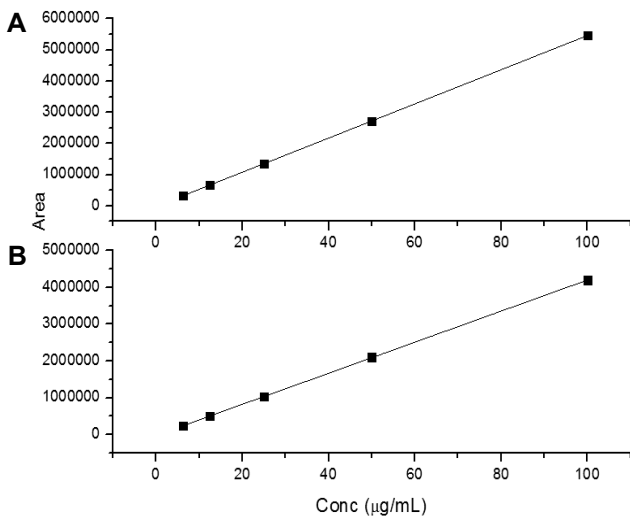


Fig. 2. Calibration curve of (A) caffeic acid and (B) chlorogenic acid standard solution.

2.83%,  $94.52 \pm 3.04 \sim 97.38 \pm 2.30\%$ 로, inter-day 분석에서는  $96.05 \pm 1.72 \sim 99.02 \pm 3.06\%$ ,  $95.54 \pm 0.60 \sim 97.02 \pm 2.99\%$ 를 보였다. 정밀성은 세 농도를 각각 6반복 후 RSD 값을 분석하였으며, 회수율은 세 농도를 6반복 후 얻은 시료 면적을 검량선에 근거하여 회수되는 시료 양을 백분율로 계산하였다. Table 3과 같이 caffeic acid 및 chlorogenic acid 표준품의 회수율은 93.66~106.32%, 97.33~105.68%였으며, RSD는 3.16%, 2.84% 이내로 나왔다. 농도별로 12.5 µg/mL에서는 93.66%, 97.33%, 25 µg/mL에서는 102.41%, 103.61%, 50 µg/mL에서는 106.32%, 105.68%의 회수율을 보였다. 지표성분으로서 caffeic acid 및 chlorogenic acid에 대한 분석방법 벨리테이션에 대한 보고는 Pellati 등

(9)의 연구에서 확인할 수 있었다. Pellati 등(9)은 caffeic acid 및 chlorogenic acid 분석법에 대한 연구에서  $R^2$ 은 0.9999 이상으로 각각 98.95~102.82%, 96.59~103.83%의 회수율을 얻었으며 RSD는 2%, 3% 이내로 보고하였다. Pellati 등(9)이 보고한 검출한계, 정량한계 및 회수율은 본 연구 결과와 유사하였다. 그러나 retention time의 경우 chlorogenic acid는 3.01분, caffeic acid는 4.03분으로 보고하였다. 본 연구에서 chlorogenic acid의 retention time은 4분이었으며, caffeic acid의 retention time은 6.5분으로 Pellati 등(9)의 보고보다는 다소 느린 retention time을 보였다. 본 연구진의 분석에 사용된 배박 추출물의 경우 분석시작 3분 이내에서 다수의 물질이 용출되는 것으로 보아 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 독립적인 분석은 retention time을 4분 이후로 설정하는 것이 효율적으로 생각되었다.

**배박 추출물 내에서의 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 함량**

본 시험법의 검증과정을 통하여 caffeic acid 및 chlorogenic acid에 대한 상기 HPLC 분석법이 배박 추출물 내의 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

배박을 100% 물로 추출했을 때 caffeic acid 및 chlorogenic acid는 각각 0.18 mg/g, 0.17 mg/g로써 약 1:1의 비율로 추출이 되었다. 그러나 에탄올 투입비가 높을수록 chlorogenic acid는 0.50 mg/g까지 추출율이 향상했으나, caffeic acid는 추출율이 감소되었다(Table 4). 서론에서 기술한 바와 같이 caffeic acid 및 chlorogenic acid는 콜레스

Table 2. Intra- and inter-day accuracy of caffeic acid and chlorogenic acid

	Nominal (conc, µg/mL)	Mean measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)	RSD (%)	Mean measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)	RSD (%)
		Caffeic acid			Chlorogenic acid		
Intra-day	12.5	12.24	97.90	1.86	12.17	97.38	2.30
	25	24.06	96.27	3.10	23.63	94.52	3.04
	50	48.98	97.97	2.83	47.87	95.79	2.94
Inter-day	12.5	12.01	96.05	1.72	11.94	95.54	0.60
	25	24.57	98.29	4.06	24.08	96.35	3.77
	50	49.51	99.02	3.06	48.51	97.02	2.99

Table 3. Precision of caffeic acid and chlorogenic acid

Nominal concentration (µg/mL)	Mean measured concentration (µg/mL)	SD	Recovery (%)	RSD (%)	Mean measured concentration (µg/mL)	SD	Recovery (%)	RSD (%)
	Caffeic acid				Chlorogenic acid			
12.5	11.66	3.09	93.66	3.16	12.16	2.71	97.33	2.84
25	25.59	0.56	102.41	0.53	25.90	0.55	103.61	0.54
50	53.16	0.44	106.32	0.41	52.84	0.51	105.68	0.49

**Table 4.** Content of caffeic acid and chlorogenic acid extracted by different solvent ratio (H<sub>2</sub>O/ethanol, v/v)

Ethanol (v/v, %)	Caffeic acid (mg/g)	Chlorogenic acid (mg/g)
0	0.18±0.01	0.17±0.012
25	0.16±0.02	0.36±0.013
50	—	0.37±0.011
75	—	0.49±0.008
100	—	0.50±0.007

Each values was the mean±SD.

테를 흡수 저하 등과 관련이 있어 배박 추출물의 기능성 소재 개발 가능성이 높은 것으로 기대된다. 특히 배박의 용매 추출 시 에탄올 투입 비율에 따른 두 성분의 추출 패턴이 달라지는 특성이 있어 추후 용매 종류, 온도, 추출시간에 따른 caffeic acid 및 chlorogenic acid 추출 비율을 도출하고, 생산 공정 적용 가능성을 타진한다면 유효성분이 caffeic acid 및 chlorogenic acid로 규격화된 기능성 소재 개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구진은 배박 추출물이 지방세포 대사를 저해함을 확인하였으며, 배박을 건강기능식품 개별 인정형 소재로 개발하고자 하였다. 소재 개발에 앞서 배박 분석방법을 확립하고자 하였으며, 본 연구에서는 배박에서 확인된 성분인 caffeic acid 및 chlorogenic acid를 HPLC/UV system을 이용해 분석방법을 최적화하였다. 분석법이 타당한지를 검토하기 위하여 분석법 벨리데이션을 수행하였으며, 직선성, 일간 일내 정확성, 정밀성 검출한계 및 검량한계를 확인하였다. 본 시험분석법으로 배박 추출물 분석 시 지표물질이 다른 물질의 간섭 없이 안정되게 분석되는 것을 확인하였다. 따라서 본 분석방법은 배박 추출물 기능성 원료 표준화를 위한 시험법으로 적합한 것으로 판단되었다. 본 시험법에 따라 에탄올 투입량에 따른 배박 추출물 내의 caffeic acid 및 chlorogenic acid의 함량을 분석하였으며, 에탄올 투입에 따른 대

상 성분의 추출율을 조절할 수 있음을 보여주었다. 따라서 본 연구를 통하여 확립된 분석법이 배박 추출물 개별 인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 기초 자료로 활용될 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(313019-03-2-HD020)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Cho JY, Park KY, Lee KH, Lee HJ, Lee SH, Cho JA, Kim WS, Shin SC, Park KH, Moon JH. 2011. Recovery of arbutin in high purity from fruit peels of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Food Sci Biotechnol* 20: 801-807.
2. Yuk HG, Choi JH, Cho YJ, Ha JU, Hwang YI. 1999. Investigation of reactive conditions to extract pectin with exo-polygalacturonase from pear pomace. *Korean J Food Sci Technol* 31: 971-976.
3. Rhyu J, Kim MS, You MK, Bang MA, Kim HA. 2014. Pear pomace water extract inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract* 8: 33-39.
4. Park YM, Kim JK. 1997. Characterization of the degradation of pear fruit cell wall by pectolytic enzymes and their use in fruit tissue liquefaction. *Kor J Hort Sci Technol* 38: 255-262.
5. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131: 66-71.
6. Zheng G, Qiu Y, Zhang QF, Li D. 2014. Chlorogenic acid and caffeine in combination inhibit fat accumulation by regulating hepatic lipid metabolism-related enzymes in mice. *Br J Nutr* 112: 1034-1040.
7. Rhyu J, Kim MS, You MK, Bang MA, Kim HA. 2014. Pear pomace water extract inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract* 8: 33-39.
8. Korean Food and Drug Administration. <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=689> (accessed Sep 2012).
9. Pellati F, Benvenuti S, Magro L, Melegari M, Soragni F. 2004. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *J Pharm Biomed Anal* 35: 289-301.