

## 딸기 품종별 추출물의 항산화활성 및 지표성분 밸리데이션

용예슬<sup>1,‡</sup> · 이송미<sup>2,‡</sup> · 변나영<sup>1</sup> · 선상욱<sup>1</sup> · 김민정<sup>3</sup> · 장서우<sup>3</sup> · 장원석<sup>4</sup> · 이선이<sup>5</sup> · 임순호<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>동신대학교 제약공학과, <sup>2</sup>동신대학교 식품영양학과, <sup>3</sup>전라남도 농업기술원,  
<sup>4</sup>충청남도 농업기술원, <sup>5</sup>국립원예특작과학원

### Antioxidant activities and Validation of Analytical Method of Marker compounds in strawberry fruits from various cultivars

Ye Seul Yong<sup>1,‡</sup>, Songmi Lee<sup>2,‡</sup>, Na-Young Byun<sup>1</sup>, Sangouk Sun<sup>1</sup>, Min-Jung Kim<sup>3</sup>, Seo Woo Jang<sup>3</sup>,  
Won Suk Jang<sup>4</sup>, Sun Yi Lee<sup>5</sup>, and Soon-Ho Yim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University

<sup>2</sup>Department of food and Nutrition, Dongshin University

<sup>3</sup>Jeollanamdo Agricultural Research & Extension Services

<sup>4</sup>Chungcheongnamdo Agricultural Research & Extension Services

<sup>5</sup>National Institute of Horticultural and Herbal Science

**Abstract** In this study, we investigated antioxidant capacity of 20 strawberry extract using the DPPH and ABTS assay and HPLC-DAD validation method. The total polyphenolic and flavonoids contents of 20 strawberry extracts were 22.77-107.61 mg TAE/100 g FW and 17.58-44.12 mg QE/100 g FW. The Aiberry and Elie star showed the highest total polyphenol and flavonoid contents, respectively. The DPPH radical scavenging activity of what was 1540.6-1124.0  $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g FW}$  and Derunoka showed the highest activity. The ABTS radical scavenging activity was 6352.3-4592.3  $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g FW}$  and FA23 showed the highest activity. The HPLC-DAD method for the quantitation of ellagic acid results showed high linearity in various concentration ranges, and the limit of detection was 2.35  $\mu\text{g/mL}$ . The limit of quantification was 7.12  $\mu\text{g/mL}$ . Relative standard deviation values from intra-and inter-day precision were less than 5.31%. Recovery rate at 10, 50, and 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, were 100.0-101.0% with relative standard deviation (RSD) values less than 5.30%. These results provide viable information for the validation of antioxidant capacity in strawberry fruits.

**Keywords:** strawberry, ellagic acid, antioxidant, validation

## 서 론

인간의 질병 및 노화는 대사과정 중 발생하는 superoxide anion radical ( $\text{O}_2^-$ ), hydroxy radical ( $\text{HO}\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 등과 같은 활성산소종의 산화반응에 기인하며(Choi 등, 2003), 이러한 활성산소종은 강력한 산화력으로 여러 대사과정에서 라디칼을 생성시켜 생체조직을 공격하고 세포막 및 단백질 분해, 지방산화, DNA합성 및 광합성 억제, 염록체의 파괴 등 심각한 생리적인 장애를 유발한다(Lee 등, 2005). 생체 내에는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione reductase 등의 항산화 효소와 glutathione, thioredoxin 등과 같은 항산화제가 존재하여 활성산소종으로 인한 손상을 방어하는 기전을 가지고 있지만, 과도한 스트레스에 노출된 현대인들에게는 복잡한 생활 속에서 보다

효과적이고 안전한 식이성 항산화제의 필요성이 증가하고 있다(Lee와 Lee, 2016). 최근 현대인의 생활수준 향상과 소비자들의 인식 변화 등으로 인해 천연물로부터 유래된 기능성 식품 소재 개발과 그와 관련된 연구가 증가하고 있으며(Lee와 Yim, 2012), 항산화 화합물을 천연물에서 얻고자 하는 관심 또한 커지고 있어 베리류나 체리류의 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Park 등, 2008).

딸기(*Fragaria ananassa* Duch.)는 장미과에 속하는 다년생 식물로 당분과 유기산이 많고 비타민 C, 폴리페놀, quercetin, ferulic acid, ellagic acid, flavonol류 등 항산화 물질을 포함하는 다양한 기능성 성분들을 가지고 있다(Kim 등, 2010). 이러한 항산화물질은 항암작용, 항돌연변이작용, 콜레스테롤 저하작용 등의 기능을 가지고 있고, 만성질환 심혈관계질환 퇴행성 신경계질환을 억제하는 것으로 알려져 있다(Meyers 등, 2003). 특히 ellagic acid는 항산화, 죽종(atheroma) 형성억제, 항세포사멸효과 기능을 가지고 있고 에스트로젠 수용체 조절제 기능을 가지고 있으며 인간섬유아세포의 광자극에 의한 손상을 억제하고 콜라겐의 발현을 조절하는 기능을 가지고 있다(Kim 등, 2016; Papoutsis 등, 2005; Türk 등, 2010). 또한 ellagic acid는 체내의 과산화 지질 형성을 억제하여 활성 유리기에 의한 조직손상을 예방하고 체내의 주요한 해독 효소들의 활성을 촉진함으로써 발암 억제 효과가 있으며(Mass

<sup>‡</sup>These two authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Soon-Ho Yim, Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University, Naju, Jeonnam 58245, Korea  
Tel:+82-61-330-3275

E-mail: virshyim@dsu.ac.kr

Received November 8, 2019;

accepted December 3, 2019

등, 1991), 피부암(Mukhtar 등, 1986), 소장암 및 간암 등의 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다(Shimogaki 등, 2000).

지금까지 HPLC를 이용한 ellagic acid의 분석은 기존에 많이 연구되어 왔으나 딸기 품종에 대한 연구는 아직까지 미비한 실정이다(Lee 등, 2014). 따라서 본 연구에서는 국립원예특작과학원과 충청남도농업기술원에서 재배, 수확한 20종의 딸기의 항산화능을 평가하고, ellagic acid의 함량분석 및 분석법에 대한 유효성을 검증하는 밸리데이션을 수행함으로써 다양한 딸기 품종으로부터 천연 항산화제 개발 및 ellagic acid 지표성분과 함량 기준 설정을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 시약 중 Folin-Ciocalteu reagent, tannic acid, quercetin, ellagic acid, 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), (+/-)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) 등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, ellagic acid 분석을 위한 methanol, acetonitrile 등은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) 제품을 사용하였으며 그 밖에 사용된 추출용매 및 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 시료 및 추출물 제조

본 연구에 사용한 시료는 2017년 국립원예특작과학원과 충청남도농업기술원 딸기연구소에서 재배, 수확된 Aiberry 등 20품종을 제공받아 사용하였다(Table 1). 실험에 사용한 20종의 딸기 시료는 성장시기가 유사한 붉은 색의 원숙과를 수확하여 실험에 사용하였으며, 고속 진공 저온 농축기(COSMOS660-50L, Kyungseo Machines Co, Incheon, Korea)로 추출 후, 동량의 water를 두 번 가하는 추출과정을 반복하였다. 이 추출물을 초고속 진공 저온 농축기로 약 30°C로 농축하고 -70°C의 deep freezer에서 24시간

**Table 1. Parentage and Origin of 20 strawberry cultivars**

NO	Cultivar	Parentage	Origin
1	Aiberry	Unknown	Japan
2	Syuko	Jeongbo×Haruyoe	Japan
3	Derunoka	Bogyochosang×Dana	Japan
4	Northwest	Brightmore×US-Oreg.456	USA
5	Kuryumi-52	Unknown	Japan
6	Linn	MDUS 3184×ORUS 2414	USA
7	Cascade	Shasta×Northwest	USA
8	Comet	Earlibelle×ARK 5063	USA
9	Aska	Unknown	Japan
10	Camino Real	Cal 89.230-7×Cal 90.253-3	USA
11	Albion	Diamante×Cal94.16-1	USA
12	Sweet charlie	FL80-456×Pajaro	USA
13	Elie star	Unknown	USA
14	FA11	Unknown	EU
15	FA12	Unknown	EU
16	FA13	Unknown	EU
17	FA23	Unknown	EU
18	FA25	Unknown	EU
19	FA19	Unknown	EU
20	Micmac	Tioga×Guardsman	Canada

냉동시킨 후 동결건조하여 4°C 보관하여 실험에 사용하였다. 동결건조 된 딸기 시료 추출을 위해 전처리 용매(Ethanol:Distilled Water:HCl=60:20:20)에 녹여 90°C에서 3시간 동안 가수분해하였다. 추출용액은 실온에서 냉각 후 메탄올로 정용하여 syringe filter (0.45 µm, Hyundaimicro Co., Ltd, Korea)로 여과한 용액을 시험용액으로 사용하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 응용하여 수행하였다(Singleton 등, 1999). 시험용액 500 µL에 Folin-Ciocalteu 시약 500 µL를 가하고 혼합한 후 실온에 3분간 반응시켜 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 500 µL을 가하여 혼합한 후 실온에 1시간 방치하고 UV-Visible spectrometer (Neogen, Optizen 2120 UV, Sejong, Korea) 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 표준물질로 하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량(mg TAE/100 g FW (fresh weight))을 구하였다.

$$\text{Absorbance} = 0.0468 \mu\text{g tannic acid} + 0.0195 \quad (R^2 = 0.99)$$

### 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량분석은 Moreno 등(2000)의 방법을 응용하여 측정하였다. 분석을 위해서 각 시료 100 µL를 80% ethanol 990 µL에 희석하고, 그 중 100 µL를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분간 방치한 후 분광광도계(Mecasys Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 작성한 표준 곡선으로부터 함량(mg QE/100 g FW)을 구하였다.

$$\text{Absorbance} = 0.0468 \mu\text{g quercetin} + 0.0195 \quad (R^2 = 0.99)$$

### DPPH radical scavenging activity 측정

시료의 항산화 활성 측정법 중 하나인 DPPH radical scavenging activity를 Brand-Williams 등(1995)의 실험방법을 일부 변형하여 측정하였다. 시료용액 50 µL와 2.0×10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 950 µL를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시키고 ELISA reader (MECASYS, Optizen 2120 UV, Daejeon, Korea)를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아래와 같은 방법으로 DPPH radical scavenging activity (%)을 구하였으며, trolox를 표준물질로 검량선을 작성하여 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, µmol TEAC/100 g FW)를 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: absorbance of control

B: absorbance of test sample

### ABTS radical scavenging activity 측정

항산화 활성 측정법 중 하나인 ABTS radical 소거 활성은 Thaipong 등(2006)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하고 37°C 암소에서 24시간 동안 반응시켜 라디칼을 생성시켰다. Radical stock solution은 734 nm에서 흡광도 값이 0.68±0.020 되도록 Phosphate Buffer Saline (pH 7.4)로 희석하였다. 시료 10 µL와 희석한 ABTS radical 용액 990 µL를 혼합하여 암소에서 1 분 동안 방치한 후 734 nm에서 분광광도계(Neogen, Optizen 2120

UV, Sejong, Korea)로 측정하였으며 아래와 같은 방법으로 ABTS radical scavenging activity (%)를 구하였고, trolox를 표준물질로 검량선을 작성하여 trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC,  $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$ )를 산출하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

A: absorbance of control

B: absorbance of test sample

**표준용액의 제조**

Ellagic acid 표준물질(analytical standard, purity 95%)을  $1 \times 10^{-2}$  N NaOH에 녹인 후 4°C 냉장보관 하였으며, 이 용액을 희석하여 농도가 10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 standard solution을 만들었다.

**분석법의 유효성 검증(method validation)**

지표성분에 대한 분석법의 유효성 검증은 의약품 등 분석법의 밸리데이션 가이드라인(KFDA, 2015)에 따라 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)등을 판단하여 분석 방법의 유효성을 검증하였다.

**직선성 및 검출정량한계**

5개 농도의 ellagic acid standard solution이 HPLC상에서 나타나는 retention time 및 regression equation ( $y=ax+b$  y: peak area, x: concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ))을 이용하여 결정계수(Determination coefficient,  $R^2$ )를 확인하였다. 각 성분에 대한 검출한계 및 정량한계는 표준용액의 크로마토그램을 사용하여 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하였다.

**정확성 및 정밀성**

정확성과 정밀성 모두 동일농도의 지표성분에 대하여 일간(inter-day) 및 일내(intra-day) 변동을 알아보기 위해 정확성 및 정밀성 평가를 실시하였다. 정확성은 분석물질의 참값(농도)에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균 시험결과와 근접성을 의미하며, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세가지 농도범위에서 3회 반복 측정하여 상대표준편차 및 회수율을 계산하였다. 정밀성은 inter-day(일간)와 intra-day(일내)로 나누어 실험을 진행하였으며, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 3회 반복 측정하여 상대표준편차를 계산하였다.

**안정성(Stability)**

보관기간에 따른 ellagic acid 지표성분의 화학적 안정성을 확인하기 위하여 실온에서 24시간 보관한 후 ellagic acid의 함량을 측정하였다.

**Ellagic acid 함량 분석**

딸기 추출물의 ellagic acid 함량은 autosampler와 DAD detector를 장착한 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Santa clara, CA, USA)를 사용하였고 분석 조건은 Table 2와 같다. 분석용 컬럼은 YMC ODS (4.6×250 mm, Kyoto, Japan)를 사용하였고 이동상은 0.1% formic acid를 함유한 3차 distilled water (solvent A), 100% acetonitrile (solvent B)를 이용하였으며 분석조건은 Table 2과 같다. 1 mL/min의 유속으로 254 nm 파장에

**Table 2. Analytical conditions of HPLC for ellagic acid analysis**

Parameters	Conditions
Column	YMC ODS 5 $\mu\text{m}$ 250×4.6 mm
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
UV detection	254 nm
Run time	40 min
	Time (min)      A (%)      B (%)
	0                    90                10
Gradient	5                    90                10
condition	25                   40                60
	30                   20                80
	35                   90                10
	40                   90                10

**Table 3. Content of total polyphenols and flavonoids in 20 strawberry cultivars**

Sample	Total polyphenol contents (mg/100g FW <sup>1)</sup> )	Flavonoid contents (mg/100g FW)
Aiberry	107.61±4.75 <sup>(2)3)</sup>	17.58±0.00 <sup>a</sup>
Syuko	96.58±3.62 <sup>b</sup>	19.18±0.11 <sup>ab</sup>
Derunoka	95.87±5.42 <sup>b</sup>	21.23±0.00 <sup>bcd</sup>
Northwest	71.87±17.71 <sup>g</sup>	23.03±0.11 <sup>def</sup>
Kuryumi-52	67.02±9.38 <sup>fg</sup>	19.56±0.11 <sup>abc</sup>
Linn	41.85±2.16 <sup>d</sup>	23.22±10.77 <sup>def</sup>
Cascade	66.04±1.78 <sup>fg</sup>	17.58±8.85 <sup>a</sup>
Comet	107.19±1.21 <sup>i</sup>	21.81±6.00 <sup>cd</sup>
Aska	27.21±0.17 <sup>ab</sup>	20.01±0.88 <sup>bc</sup>
Camino Real	31.29±0.46 <sup>bc</sup>	23.35±2.28 <sup>def</sup>
Albion	95.10±0.75 <sup>b</sup>	22.71±3.75 <sup>def</sup>
Sweet charlie	60.92±0.50 <sup>ef</sup>	22.38±2.50 <sup>de</sup>
Elie star	21.77±0.00 <sup>g</sup>	44.12±0.00 <sup>i</sup>
FA11	24.88±0.04 <sup>ab</sup>	19.88±0.22 <sup>bc</sup>
FA12	37.25±0.04 <sup>cd</sup>	22.51±0.19 <sup>def</sup>
FA13	56.26±2.79 <sup>e</sup>	28.47±13.92 <sup>g</sup>
FA23	66.68±0.14 <sup>fg</sup>	23.09±0.68 <sup>def</sup>
FA25	45.51±0.04 <sup>d</sup>	24.82±0.19 <sup>f</sup>
FA19	44.55±0.04 <sup>d</sup>	35.21±0.19 <sup>h</sup>
Micmac	63.87±0.33 <sup>efg</sup>	24.63±1.64 <sup>ef</sup>

<sup>1)</sup>FW: fresh weight

<sup>2)</sup>Values are mean±standard deviation (n=3).

<sup>3)</sup>Values with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p<0.05$ .

서 측정하였으며, 시료는 10  $\mu\text{L}$  주입하여 ellagic acid 함량을 측정하였다.

**통계처리**

모든 실험은 3번 반복하여 측정하였으며 실험 결과는 SPSS Statistics (Ver. 22.0, SPSS Inc., IL, USA)를 이용하여 평균치와 표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 그리고 각 실험군 간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test로  $p<0.05$  수준에서 상호 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량

과실에 함유되어 있는 페놀성 화합물은 과실의 색과 맛 등의 일반적인 품질과 항산화 등 건강기능성을 제공하고 세균과 바이러스로부터 식물을 보호하고 저장기간을 연장시켜주는 역할을 하는 중요한 성분이다(Tosun 등, 2009). 본 실험에서 품종별 딸기 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량을 tannic acid와 quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다(Table 3). 총 폴리페놀 함량은 Aiberry와 Comet에서 107.61과 107.19 mg TAE/100 g FW로 가장 높은 값을 나타내었고, Syuko, Derunoka, Albion 순으로 96.58±3.62, 95.87±5.42, 95.10±0.75 mg TAE/100 g FW의 폴리페놀 함량을 나타내었으며 유의적 차이가 있었다. Scalzo 등(2005)은 이탈리아 딸기 Don, Idea, Camarosa, Onda, Patty, Svev 6종의 총 폴리페놀 함량을 1,093-2,128 mg/L로 보고하였고, Pineli 등(2011)은 Osogrand종에서 2,234.62 mg/kg FW, Camino Real에서 1,743.47 mg/kg FW로 보고하고 있어 본 실험의 딸기 품종 보다 더 높은 함량을 보이고 있다. 또한 설향 딸기와 장희 딸기 성숙과의 총 폴리페놀 함량을 보고한 Lim 등(2016)의 연구에 의하면 229.18 mg GAE/100 g와 39.11 mg CE/100 g으로 본 실험 결과보다 높은 값을 나타내었고, Chaves 등(2017)이 보고한 7종 딸기의 총 폴리페놀 함량은 1.6-2.54 mg TAE/g FW로 본 실험 결과와 유사한 값을 보였다.

플라보노이드 함량은 Elie star에서 44.12 mg QE/100 g FW로 가장 높은 값을 보였고, FA19 35.21±0.19, FA25 24.82±0.19, FA13 28.47±13.92, Micmac 24.63±1.64 mg QE/100 g FW 순으로 나타났다. 설향 딸기와 장희 딸기의 성숙과의 총 폴리페놀 함량을 보고한 Lim 등(2016)의 연구에서 52.32 mg CE/100 g와 39.11 mg CE/100 g로 보고하였고, Bae 등(2019)의 연구에서도 546.12 mg/100 g sample로 본 연구결과 보다 높은 값을 보였다. 다양한 형태의 베리류의 항산화활성을 실험한 Kim 등(2018)의 연구에서는 복분자의 경우 731.08 mg/100 g FW, 야생복분자는 362.41 mg/100 g FW의 함량을 보여 본 실험의 결과보다 높은 값을 보였으며, Lee 등(2014)의 연구에서 야생딸기는 10.91-14.90 mg/100 g FW의 값을 보고하고 있다. 이상의 결과로부터 품종에 따라 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량의 차이를 나타내는 것을 알 수 있었다.

### 항산화 활성

DPPH와 ABTS free radical scavenging activity에 의한 항산화 측정법은 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 탐색하는데 많이 활용되고 있다(Lee 등, 2014). DPPH와 ABTS를 이용하여 free radical 소거능을 측정한 후 trolox equivalent 값을 산출하여  $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$ 로 나타냈다(Table 4). 본 실험에 사용된 20종 딸기의 DPPH free radical scavenging activity는 1540.6-1124.0  $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$  범위로 나타났으며 Derunoka가 1.541  $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$ 로 가장 높은 값을 나타내었고 Elie star, Micmac, Aska, FA11 순서로 DPPH free radical scavenging activity를 보였다. 폴란드에서 재배된 딸기 90종의 DPPH free radical scavenging activity를 확인한 Nowicka 등(2019)의 연구에 의하면 751.57  $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$ 의 활성을 나타내었고, Pineli 등(2011)은 Osogrand종에서 12.83  $\mu\text{mol TEAC}/\text{g}$ , Camino Real은 10.10  $\mu\text{mol TEAC}/\text{g}$ 로 보고하고 있어 본 실험의 딸기 종 보다 다소 낮은 활성을 보였다.

ABTS free radical scavenging activity 측정법은 ABTS와 potassium persulfate와의 반응에서 생성된 ABTS radical이 시료의 항

Table 4. Antioxidant activities of 20 strawberry cultivars

	DPPH ( $\mu\text{mol TEAC}^{(1)}/100 \text{ g FW}^{(2)}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$ )
Aiberry	1259.1±30.3 <sup>c3)4)</sup>	4592.3±20.8 <sup>b</sup>
Syuko	1203.1±33.7 <sup>b</sup>	4545.7±8.8 <sup>a</sup>
Derunoka	1540.6±2.3 <sup>k</sup>	5082.3±5.8 <sup>f</sup>
Northwest	1217.3±13.7 <sup>b</sup>	5012.3±15.3 <sup>e</sup>
Kuryumi-52	1124.0±14.9 <sup>a</sup>	4689.0±10.0 <sup>e</sup>
Linn	1337.1±3.5 <sup>de</sup>	5575.7±5.8 <sup>k</sup>
Bious	1352.6±8.0 <sup>efg</sup>	5072.3±5.8 <sup>f</sup>
Comet	1331.7±13.9 <sup>d</sup>	5535.7±5.8 <sup>j</sup>
Aska	1390.2±3.8 <sup>hi</sup>	5049.0±10.1 <sup>f</sup>
Camino Real	1374.4±2.0 <sup>ghi</sup>	4969.0±0.00 <sup>d</sup>
Albion	1363.5±6.8 <sup>fgh</sup>	5322.3±30.6 <sup>i</sup>
Sweet charlie	1364.0±5.4 <sup>fgh</sup>	4952.3±11.5 <sup>d</sup>
Elie star	1421.1±9.2 <sup>j</sup>	5065.7±15.3 <sup>f</sup>
FA11	1396.0±7.0 <sup>ij</sup>	5249.0±26.5 <sup>h</sup>
FA12	1389.3±12.3 <sup>hi</sup>	5769.0±26.5 <sup>i</sup>
FA13	1379.7±10.6 <sup>ghi</sup>	5759.0±10.0 <sup>i</sup>
FA23	1343.7±44.1 <sup>def</sup>	6165.7±32.1 <sup>m</sup>
FA25	1372.2±14.1 <sup>fghi</sup>	6352.3±30.6 <sup>n</sup>
FA19	1361.5±9.2 <sup>efgh</sup>	5355.7±41.6 <sup>i</sup>
Micmac	1387.7±10.5 <sup>hi</sup>	5189.0±36.1 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

<sup>2)</sup>FW: fresh weight

<sup>3)</sup>Values are mean±standard deviation (n=3).

<sup>4)</sup>Values with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p<0.05$ .

산화물질에 의해 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 원리로 단시간에 측정할 수 있으며, 소수성과 친수성에 모두 적용이 가능한 방법이다. 20종의 딸기 추출물의 ABTS free radical scavenging activity를 비교 측정하여 Table 4에 나타내었다. ABTS free radical scavenging activity 실험결과 6352.3-4592.3  $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g FW}$ 의 범위를 나타내었으며, FA23 추출물이 가장 높은 활성을 보였으며 FA13, FA11, FA12, Linn 순서로 ABTS free radical scavenging activity를 보였다. 다양한 형태의 베리류의 항산화활성을 실험한 Kim 등(2018)의 연구에서는 복분자의 경우 72  $\mu\text{mol TEAC}/\text{g}$ , 블랙베리 20  $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ 의 함량을 보여 본 실험의 결과보다 낮은 값을 보였으며, Lee 등(2015)의 연구에서 블랙라즈베리가 2.99 mmol TEAC/100 g FW, 블루베리 1.47 mmol TEAC/100 g FW, 라즈베리 0.77 mmol TEAC/100 g FW의 값을 보고하였는데 이는 본 실험 결과에 비해 낮은 값이었다. 이상의 결과를 종합해 보면 본 실험의 딸기 추출물 중의 항산화 물질들이 전자 공여 작용을 통해 반응성 높은 free radical을 제거하여 불포화지방산, 유전자, 단백질 등 중요 생체분자의 산화를 방지해 줄 것으로 생각된다(Fan 등, 2011).

### 분석법의 유효성 검증(method validation)

딸기에 함유된 ellagic acid의 분석법을 확립하기 위해 다양한 용매 및 파장 조건에서 실험을 수행하였다. 이동상 조건은 water 용매의 경우 0.1% formic acid를 사용하는 것이 더 좋은 분리능을 얻을 수 있었으며, 유기용매의 경우 methanol보다 acetonitrile을 사용하는 것이 더 분리능이 높았다. 측정 파장은 ellagic acid의 최대 흡수 파장인 254 nm를 이용하여 측정하였다.

**Table 5. Calibration curve, linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ) of ellagic acid**

Compound	Concentration (µg/mL)	Regression equation	R <sup>2</sup>	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ellagic acid	10-100	y=133.74x-424.09	1	2.35208	7.12752
		y=133.86x-300.35	0.9998		
		y=133.05x-237.46	0.9999		

**Table 6. Precision of ellagic acid**

Compound	Concentration (µg/mL)	Inter-day		Intra-day	
		Mean±SD <sup>1)</sup> (µg/mL)	RSD <sup>2)</sup> (%)	Mean±SD (µg/mL)	RSD (%)
Ellagic acid	10	9.53±0.5	5.31	9.53±5.30	5.30
	50	47.74±0.31	0.66	47.19±0.41	0.88
	100	96.34±0.19	0.20	95.49±0.7	0.82

<sup>1)</sup>Value are mean±standard deviation (n=3).

<sup>2)</sup>Relative standard deviation.

**Table 7. Accuracy of ellagic acid**

Compound	Spiked amount (µg/mL)	measured amount (µg/mL)	RSD (%)	Recovery (%)	Recovery average
Ellagic acid	10	9.50±0.50	5.3	93.8	100.0
				103.0	
				103.0	
	50	47.69±0.31	0.7	99.3	100.1
				100.5	
				100.5	
100	95.38±0.19	0.2	100.8	101.0	
			101.0		
			101.2		

Recovery (%)=(amount found-original amount)/amount spiked×100%.

**Table 8. Analytical result of ellagic acid stability test**

Compound	0 h	24 h	Recovery (%)
Ellagic acid	92.83	96.42	99.26

일정 농도 범위에서 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지 확인하기 위하여 10-100 µg/mL로 단계적으로 희석한 ellagic acid 표준용액을 HPLC로 3회 반복 분석하여 검량선을 작성하였다. Ellagic acid의 검량선의 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9998-1.000으로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 2.35 µg/mL, 정량한계는 7.12 µg/mL 수준으로 미량의 경우에도 검출과 정량이 가능함을 확인하였다(Table 5). 따라서 이러한 결과로 딸기 추출물의 표준화 방법으로 지표 성분분석의 정량한계와 검출한계를 검증한 것으로 충분히 본 연구에서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

정밀성은 intra-day와 inter-day 분석에서 10, 50 및 100 µg/mL의 세 구간의 농도를 3회 반복 후 얻은 면적을 검량선에 근거하여 농도별로 평균에 대한 상대표준편차(RSD)를 구하여 계산하였다. 농도에 따른 RSD 값은 범위 intra-day 실험에서 0.82-5.30%, inter-day 실험에서 0.20-5.31%로 모두 5% 이내의 우수한 정밀성을 나타내었다. 정밀성 결과 농도별로 10 µg/mL에서는 5.30%, 50 µg/mL에서는 0.88%, 100 µg/mL에서는 0.82%의 RSD값을 각각 나타내었다(Table 6). 정확성을 확인하기 위해 세 구간에서 수행한 결과 회수율이 평균 100.0-101.0%가 나타났으며, RSD 값은 0.2-5.3%의 범위로 나타났었다(Table 7). 정밀성과 정확성 실

**Table 9. Contents of ellagic acid in 20 strawberry cultivars**

Sample	Ellagic acid Content (µg/mL)
Aiberry	15.4±0.4 <sup>b1)2)</sup>
Syuko	14.4±0.1 <sup>d</sup>
Derunoka	13.6±0.4 <sup>e</sup>
Northwest	13.1±0.1 <sup>f</sup>
Kuryumi-52	15.1±0.1 <sup>c</sup>
Linn	12.2±0.1 <sup>h</sup>
Bious	12.3±0.1 <sup>gh</sup>
Comet	10.4±0.1 <sup>i</sup>
Aska	22.9±0.1 <sup>a</sup>
Camino Real	12.4±0.0 <sup>gh</sup>
Albion	12.6±0.3 <sup>g</sup>
Sweet charlie	12.4±0.2 <sup>gh</sup>
Elie star	12.4±0.0 <sup>gh</sup>
FA11	13.7±0.1 <sup>e</sup>
FA12	9.6±0.3 <sup>k</sup>
FA13	13.6±0.1 <sup>e</sup>
FA23	9.5±0.1 <sup>kl</sup>
FA25	9.2±0.1 <sup>l</sup>
FA19	10.1±0.0 <sup>j</sup>
Micmac	9.6±0.3 <sup>k</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±standard deviation (n=3).

<sup>2)</sup>Values with different letters within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05

험을 통해 본 분석법의 유의성이 있음을 확인하였다.

지표성분인 ellagic acid의 화학적 안정성 유지여부를 확인하기 위하여 최종 농도인 100 µg/mL을 24시간 실온보관하며 함량 변화를 측정하였다(Table 8). 그 결과 24시간 전·후의 ellagic acid의 평균 회수율이 99.2%로 3.95%의 함량변화를 나타냈으며, ellagic acid의 24시간 동안 화학적 안정성을 확인하였다.

**추출물에서의 ellagic acid HPLC 함량 분석**

Ellagic acid는 딸기에서 가장 중요한 페놀성 화합물로 여러 방어 활성을 보이고 있다고 알려져 있다(Pineli 등 2011). 20종 딸기 추출물에서의 ellagic acid 함량을 분석한 결과 9.2-22.9 µg/mL 범위로 나타났고, Asca 추출물에서 22.9 µg/mL로 가장 높은 ellagic acid 함량을 나타냈었다(Table 9). Aiberry, Kuryumi-52, Syuko, mic-

mac 추출물 순서로 ellagic acid을 많이 함유하고 있었다. Pineli 등(2011)는 Osogrand종의 딸기에서는 194.03 mg/kg FW, Camino Real은 166.88 mg/kg FW로 보고되어 있고, Kim 등(2010)의 딸기 실험에 의하면 1.1-15.0 mg/100 g FW로 본 실험결과와 비슷한 수준이었다.

## 요 약

본 연구에서는 다양한 품종의 딸기 추출물로부터 천연물을 이용한 천연 항산화제 개발을 위하여 농업기술원에서 시료를 제공받아 항산화 활성을 평가하고, ellagic acid 함량 분석 및 분석법 검증에 대한 밸리데이션을 수행하였다. 총 폴리페놀 함량은 22.77-107.61 mg/100 g FW로 다양하게 나타났으며, 플라보노이드 함량 또한 17.58-44.12 mg/100 g FW으로 다양하게 나타났다. 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량 결과 Aiberry와 Elie star에서 가장 많은 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 나타내었다. DPPH free radical scavenging activity은 1540.6-1124.0 µmol TEAC/100 g FW 범위를 나타내었고, Derunoka가 1.541 µmol TE/100 g FW로 가장 높은 값을 나타내었다. ABTS free radical scavenging activity 실험결과 6352.3-4592.3 µmol TEAC/100 g FW의 범위를 나타내었으며, FA23 추출물이 가장 높은 활성을 보였다. Ellagic acid 표준물질에 대한 검량선의 상관계수( $R^2$ )값은 0.9998-1.0000으로 매우 높은 직선성을 보였으며, 딸기 추출물의 ellagic acid 함량은 9.2-22.9 µg/mL을 나타냈으며, 그 중 Asca 추출물이 22.9 µg/mL로 가장 높은 ellagic acid 함량을 나타내었다. 밸리데이션 결과 정확성은 평균 100-101%의 회수율을 나타내었고, 정밀성 또한 농도 별로 10 µg/mL에서는 5.31, 5.30%, 50 µg/mL에서는 0.66, 0.88%, 100 µg/mL에서는 0.20, 0.82%의 RSD값을 나타내었다. 본 연구의 결과를 종합하여 보면 다양한 딸기품종 추출물은 높은 항산화 효능을 나타내며, 이는 자유라디칼의 산화를 억제하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드의 높은 함량에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 천연항산화제 표준화를 위한 지표성분으로서 ellagic acid 정량분석 및 밸리데이션을 수행함으로써 본 실험에서 사용된 딸기추출물의 천연 항산화제로서의 개발 가능성과 함량분석에 대한 기준 설정을 위한 기초자료를 시사한다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ011941052019)의 지원으로 기능성 함량 분석 연구가 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Bae MJ, Kim EN, Choi HK, Byun KH, Chung KH, Yoon JA, An JH. Quality characteristics and antioxidant activities of strawberries according to various extraction methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 48: 728-738 (2019)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
- Chaves VC, Calvete E, Reginatto FH. Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria×ananassa* duch) cultivars. *Sci Hortic-Amsterdam* 225: 293-298 (2017)
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. Antioxidative effect of some commercial products in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727 (2003)
- Fan ZL, Wang ZY, Liu JR. Cold-field fruit extracts exert different antioxidant and antiproliferative activities *in vitro*. *Food Chem.* 129: 402-407 (2011)
- Kim SK, Bae RN, Hwang HS, Kim MJ, Sung HR, Chun CH. Comparison of bioactive compounds contents in different fruit tissues of june-bearing strawberry cultivars. *Kor. J Hort. Sci. Technol.* 28: 948-953 (2010)
- Kim KS, Han SH, An IS, Ahn KJ. Protective effects of ellagic acid against UVA-induced oxidative stress in human dermal papilla. *Kor. J Aesthet. Cosmetol.* 14: 191-200 (2016)
- Kim JS, Moon YS, Kwak EJ. Comparison of phenolic composition, content, and antioxidant activity in Raspberries and Blackberries. *Kor. J Hort. Sci. Technol.* 36: 115-127 (2018)
- Korean Food and Drug Administration. Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Seoul, Korea. 1-18 (2015)
- Lee SH, Lee SW. Contents and antioxidant activity of polyphenol compounds in Lentil extracts by variety. *Korean J Food & Nutr* 45: 973-979 (2016)
- Lee YJ, Jeon BJ, Sung SH. Quantitative analysis of ellagic acid in water-lily (*Nymphaea tetragona georgi*) using HPLC-UVD. *Kor. J Pharmacogn.* 45: 84-87 (2014)
- Lee Y, Lee JH, Kim SD, Chang MS, Jo IS, Kim SJ, Hwang KT, Jo HB, Kim JH. Chemical composition, functional constituents, and antioxidant activities of berry fruits produced in Korea. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1295-1303 (2015)
- Lee SW, Lee HJ, Yoo MH, Lim HK, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. *Korea J Food Sci Technol* 37: 233-240 (2005)
- Lee HH, Moon YS, Yun HK, Park PJ, Kwak EJ. Contents of bioactive constituents and antioxidant activities of cultivated and wild Raspberries. *Kor. J Hort. Sci. Technol.* 32: 115-122 (2014)
- Lee KY, Yim DY. Skin-related physiological activities of garlic extract and fractions. *J Kor Soc Cosm* 18: 858-864 (2012)
- Lim S, Hwang H, Shin Y. Physicochemical properties and antioxidant activities of 'Selhyang' and 'Janghee' strawberries from different ripening stages grown in Korea. *J East Asian Soc. Diet. Life* 26: 80-87 (2016)
- Mass JL, Galletta GJ, Stoner GD. Ellagic acid, and anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review. *Hortscience* 26: 10-14 (1991)
- Meyers KJ, Watkins CB, Pritts MP, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric. Food Chem.* 51: 6887-6892 (2003)
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
- Mukhtar H, Das M, Bickers DR. Inhibition of 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenicity in BALB/c mice by chronic oral feeding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. *Cancer Res.* 46: 2262-2265 (1986)
- Nowicka A, Kucharska AZ, Ketowska AS, Fecka I. Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria×ananassa* duch. *Food Chem.* 270: 32-46 (2019)
- Papoutsi Z, Kassi E, Tsiapara A, Fokialakis N, Chrousos GP, Moutsatsou P. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ERα and ERβ. *J Agric. Food Chem.* 53: 7715-7720 (2005)
- Park YK, Choi SH, Kim SH, Chang YS. Functional composition and antioxidant activity from the fruits of *Rubus coreanus* according to cultivars. *Mokchae Konghak* 36: 102-109 (2008)
- Pineli LLO, Moretti CL, Santos MSS, Campos AB, Brasileiro AV, Córdova AC, Chiarello MD. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. *J Food Compos. Anal.* 24: 11-16 (2011)
- Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21: 207-213 (2005)
- Shimogaki H, Tanaka Y, Tamai H, Masuda M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ellagic acid on melanogenesis inhibition. *Int. J Cosmet. Sci* 22: 291-303 (2000)
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-raventos RM. Analysis of total

- phenols and other oxidation substrate and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178 (1999)
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins BD. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos. Anal.* 19: 669-675 (2006)
- Tosun M, Ercisli S, Karlidag H, Sengul M. Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *J. Food Sci.* 74: 575-579 (2009)
- Türk G, Sönmez M, Ceribasi AO, Yüe A, Atessahin A. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. *Int. Immunopharmacol.* 10: 177-182 (2010)