

오디 추출물로부터 Cyanidin-3-O-rutinoside와 Quercetin-3-O-rutinoside의 함량분석

김민지 · 이지현 · 표재성 · 김혜경*
경성대학교 약학대학

Quantitative Analysis of Cyanidin-3-O-rutinoside and Quercetin-3-O-rutinoside from Extracts of *Morus alba* Fruit

Min-Ji Kim, Ji Hyun Lee, Jae Sung Pyo, and Hye Kyung Kim*
College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 48434, Republic of Korea

Abstract – *Morus alba* fruit contains several anthocyanins and flavonoids like cyanidin-3-O-rutinoside and quercetin-3-O-rutinoside. Extractions from *Morus alba* fruit were performed with five different compositions of ethanol/water [v/v]. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used for the validation and content determination of cyanidin-3-O-rutinoside and quercetin-3-O-rutinoside. The contents of cyanidin-3-O-rutinoside in ethanol extracts (100%, 70%, 40%, 20% and 0%, ethanol/water [v/v]) were 1.150%, 0.822%, 0.749%, 0.663% and 0.597%, respectively. Quercetin-3-O-rutinoside contents of ethanol extracts (100%, 70%, 40%, 20% and 0%, ethanol/water [v/v]) were 0.167%, 0.161%, 0.159%, 0.155% and 0.096%, respectively. The highest contents of cyanidin-3-O-rutinoside and quercetin-3-O-rutinoside were in the ethanol extract with 100% ethanol/water [v/v]. These HPLC analysis method could be used as basic data for standardization of functional food from *Morus alba* fruit.

Keywords – *Morus alba* fruit, Cyanidin-3-O-rutinoside, Quercetin-3-O-rutinoside, Quantitative analysis, HPLC, Validation

오디는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목인 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매로서 5월부터 6월에 채취하여 건조한 후 사용된다.¹⁾ 전통적으로 상심, 상실 및 오심이라고도 불리며, 소갈을 덜어주며 백발을 검게하고, 귀와 눈을 밝게 하며 오장을 이롭게 하는 자양·강장제로써 사용되어져 왔다.^{2,3)}

오디는 한국, 중국 및 일본을 포함한 온대나 아열대 지역에 주로 분포하며,⁴⁾ 당, 유기산, flavonoid 및 anthocyanin 등이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.^{5,6)} 특히, 오디의 메탄올 추출물 내 성분들을 고속역류크로마토그래피(high performance countercurrent chromatography, HPCCC)를 이용하여 분리 정제한 결과, anthocyanin류 중에서는 cyanidin-3-O-rutinoside와 cyanidin-3-O-glucoside가 주요성분으로 분리되었으며⁷⁾ flavonoid류 중에서는 quercetin-3-O-rutinoside가 Sephadex LH-20 column을 이용한 오디 추출 분획물의 주요성분으로 알려져 있다.⁸⁾ 이러한 오디의 성분들은 항산

화⁹⁻¹²⁾, 항당뇨¹³⁻¹⁵⁾ 및 시력개선¹⁶⁾ 효과 등의 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고되고 있다.

이에 따라 본 연구에서는 cyanidin-3-O-rutinoside과 quercetin-3-O-rutinoside를 오디의 지표 성분으로 정하고 오디로부터 이들 물질들의 최적의 추출 용매 조건을 잡기 위하여, HPLC로 확립된 분석법을 이용하여 오디 추출물들로부터 지표성분들의 함량분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용된 오디는 2016년 5월 25일 전북 부안에서 채취하였으며, 한양대학교 약학대학 약학과 김철영 교수에게 의뢰하여 동정하여 사용하였다. 표본은 경성대학교 약학대학 약학과에 보관하였다.

기기 및 시약 – 지표성분으로 정한 cyanidin-3-O-rutinoside와 quercetin-3-O-rutinoside는 Sigma(USA) 제품을 구입하여 사용하였으며, 94% 이상의 순도를 나타냈다. HPLC 분석에 사용된 용매는 HPLC급 J.T. Baker(USA) 제품을, 그 외 분

*교신저자(E-mail): fiona30@ks.ac.kr
(Tel): +82-51-663-4883

석과 시료 추출을 위한 시약 및 용매는 1급 시약과 용매를 구입하여 사용하였다. HPLC는 Hitachi 사(USA)의 LaChrom Elite® HPLC 시스템을 이용하였고, 질량분석기는 AB Sciex 사(USA)의 Triple Quad™ 4500를 사용하였으며, 시료 분리는 Zorbax Eclipse XDB-C18(Hewlett-Packard, 250×4.6 mm, 5 µm) column을 이용하였다.

추출 - 오디 50 g을 환류냉각장치를 이용하여 에탄올과 물의 혼합용매 150 mL로 3시간, 총 2회 추출을 진행 후 감압 농축하고 진공동결건조장치로 동결 건조하여 에탄올 추출물을 얻었다. 이때, 추출용매의 에탄올 조성을 100%, 70%, 40%, 20% 및 0%로 하여 각각 추출하였다.

표준용액 조제 - 지표성분 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside 각 5 mg을 메탄올 10 mL에 용해하여 stock solution으로 하였다. stock solution을 희석하여 cyanidin-3-*O*-rutinoside는 5, 10, 50, 100 및 200 µg/mL와 quercetin-3-*O*-rutinoside는 2, 5, 20, 50 및 100 µg/mL 농도의 표준용액을 조제하였다.

검액 조제 - 100%, 70%, 40%, 20% 및 0% 에탄올 추출물 각 16 mg에 메탄올 40 mL를 첨가하여 30분간 초음파 추출 후 검액으로 사용하였고, 0.2 µm syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 검액으로 사용하였다.

HPLC 분석 - 오디의 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table I 및 Table II과 같이 설정한 다음 이 분석조건에 따라 함량분석을 실시하였다.

LC-MS 분석 - 시료 중 함량분석 대상이 된 피크의 성분 확인을 위해 질량분석기를 이용하여 분자량을 측정하였다. 질량분석기의 조건은 Table III과 같으며, 측정된 질량스펙트럼은 AB Sciex사(USA)의 Analyst® 프로그램을 이용하여 해석하였다.

분석 방법의 검증(Validation) - HPLC 분석법의 신뢰성, 유효성을 검증하기 위해 KFDA(식품의약품안전처)의 가이드라인에 기초하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정량한계(limit of quantitation, LOQ) 측정, 정밀성(precision) 및 정확성(accuracy) 평가를 실시하였다.

특이성(Specificity) - 특이성이란 추출물 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말한다. 지표성분이 오디 추출물 내 다른 물질의 간섭 없이 분리가 되는지 표준용액과 오디 추출물 용액의 chromatogram을 비교하여 peak들의 retention time을 검토하여 확인하였다.

직선성(Linearity) - 직선성이란 검체 중 분석대상물질의 농도에 비례하여일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다. Cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside의 표준용액을 메탄올로 단계적으로 희석하여 cyanidin-3-*O*-rutinoside는 5, 10, 50, 100 및 200 µg/mL와

Table I. HPLC condition of cyanidin-3-*O*-rutinoside

HPLC condition			
Column	Zorbax Eclipse XDB-C18 column		
Flow rate	1.0 mL/min		
Wave length	520 nm		
Injection volume	10 µL		
Mobile solvent	A: 5% Formic acid in water		
	B: Methanol		
Mobile phase	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	5	85	15
	20	75	25
	22	95	5
	26	95	5

Table II. HPLC condition of quercetin-3-*O*-rutinoside

HPLC condition			
Column	Zorbax Eclipse XDB-C18 column		
Flow rate	1.0 mL/min		
Wave length	348 nm		
Injection volume	10 µL		
Mobile solvent	A: 0.1% Phosphoric acid in water		
	B: Acetonitrile		
Mobile phase	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	95	5
	15	82	18
	35	80	20

Table III. LC-MS condition of cyanidin-3-*O*-rutinoside and quercetin-3-*O*-rutinoside

Mass condition	
Scan range	550-650 Da
Ion mode	positive
Curtain gas	20 psi
Ion spray voltage	5500 V
Temperature	400°C
Ion source gas 1	50 psi
Ion source gas 2	50 psi
Declustering potential	80 V
Entrance potential	10 V

quercetin-3-*O*-rutinoside는 2, 5, 20, 50 및 100 µg/mL의 희석된 표준용액들을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였다. 검량선은 $y=ax+b$ (y : peak 면적, x : 시료농도, a : 직선의 기울기, b : y 절편)의 형태로 작성하였다.

검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ) – 검출한계는 시료분석과정에서 배경 노이즈와 확실하게 구분되어지는 분석물질의 최저농도를 의미하며, 정량한계는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 실측될 수 있는 시료 내 분석물질의 최소량을 말한다. 검출한계와 정량한계의 계산은 검량선의 기울기와 회귀직선에서 잔차의 표준편차를 이용하였다.

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) – 동일 시료에 대하여 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 확인하기 위하여 정확성 및 정밀성 평가를 하였다. Cyanidin-3-O-

rutinoside 표준용액은 5, 100 및 200 µg/mL의 범위에서, quercetin-3-O-rutinoside 표준용액은 2, 50 및 100 µg/mL의 범위에서 각 시료 농도당 3일간 반복성 시험과 일 내 3회 반복 반복성 시험을 하였다. 정확성은 표준값과 측정값 사이의 근접성을 계산하여 확인하였으며, 정밀성은 반복 실험하였을 때 측정값들 사이의 근접성, 즉 분산 정도를 계산하여 확인하였다.

함량분석 – Validation 과정을 통하여 확립한 HPLC 분석법으로 오디의 지표성분의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성 등을 갖고 있음을

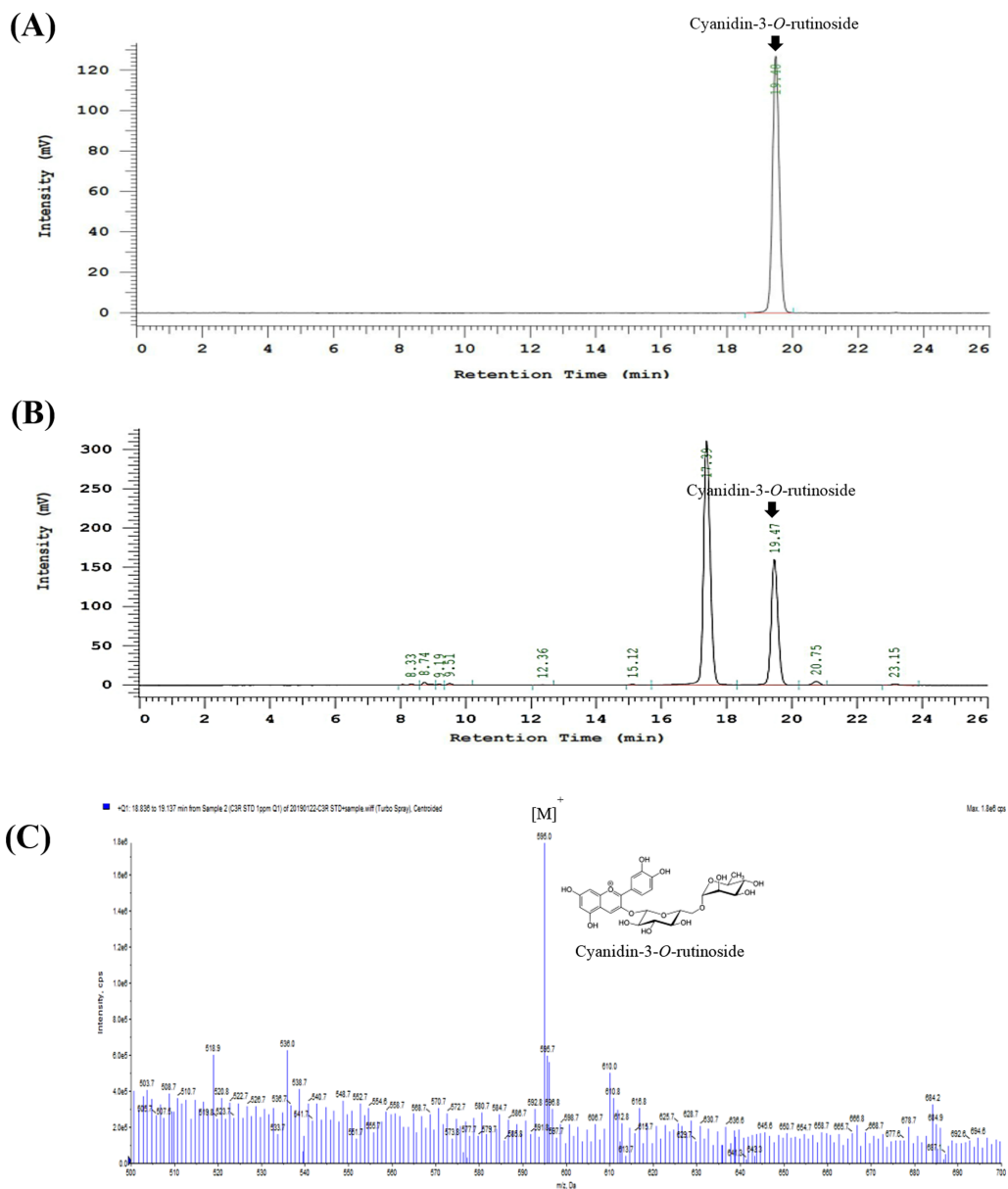


Fig. 1. HPLC chromatograms of cyanidin-3-O-rutinoside standard (A) and ethanol extract from *Morus alba* fruit (B). HPLC conditions as given in Table I. LC-MS spectra of cyanidin-3-O-rutinoside in ethanol extract of *Morus alba* fruit (C).

확인하고, 검증된 분석법으로 오디 용매 조성별 추출물들 내 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside의 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

분석조건 확립 - 지표성분으로 정한 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside의 함량분석을 위한 최적의 분석법이 확립되었다. 이동상 용매의 gradient elution을 적용함으로써 검체의 peak를 이상적으로 분리할 수 있었다.

특이성(Specificity) - 표준용액과 오디 추출물 용액의 chromatogram을 비교하여 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-

3-*O*-rutinoside peak를 확인한 결과, 다른 물질의 간섭 없이 분리 되었으며 표준용액과 오디추출물의 retention time이 일치하는 것을 확인하였다(Fig. 1, 2).

직선성(Linearity) - Cyanidin-3-*O*-rutinoside 표준용액은 5, 10, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서, quercetin-3-*O*-rutinoside 표준용액은 2, 5, 20, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였다. Cyanidin-3-*O*-rutinoside의 검량선의 상관계수(R^2)는 1.000, quercetin-3-*O*-rutinoside의 검량선의 상관계수(R^2)는 1.000으로 매우 높은 직선성을 보였다(Table IV).

검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ) - 검출한계는 cyanidin-3-*O*-rutinoside는 0.11 $\mu\text{g/mL}$ 와 quercetin-3-*O*-rutinoside는 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 수

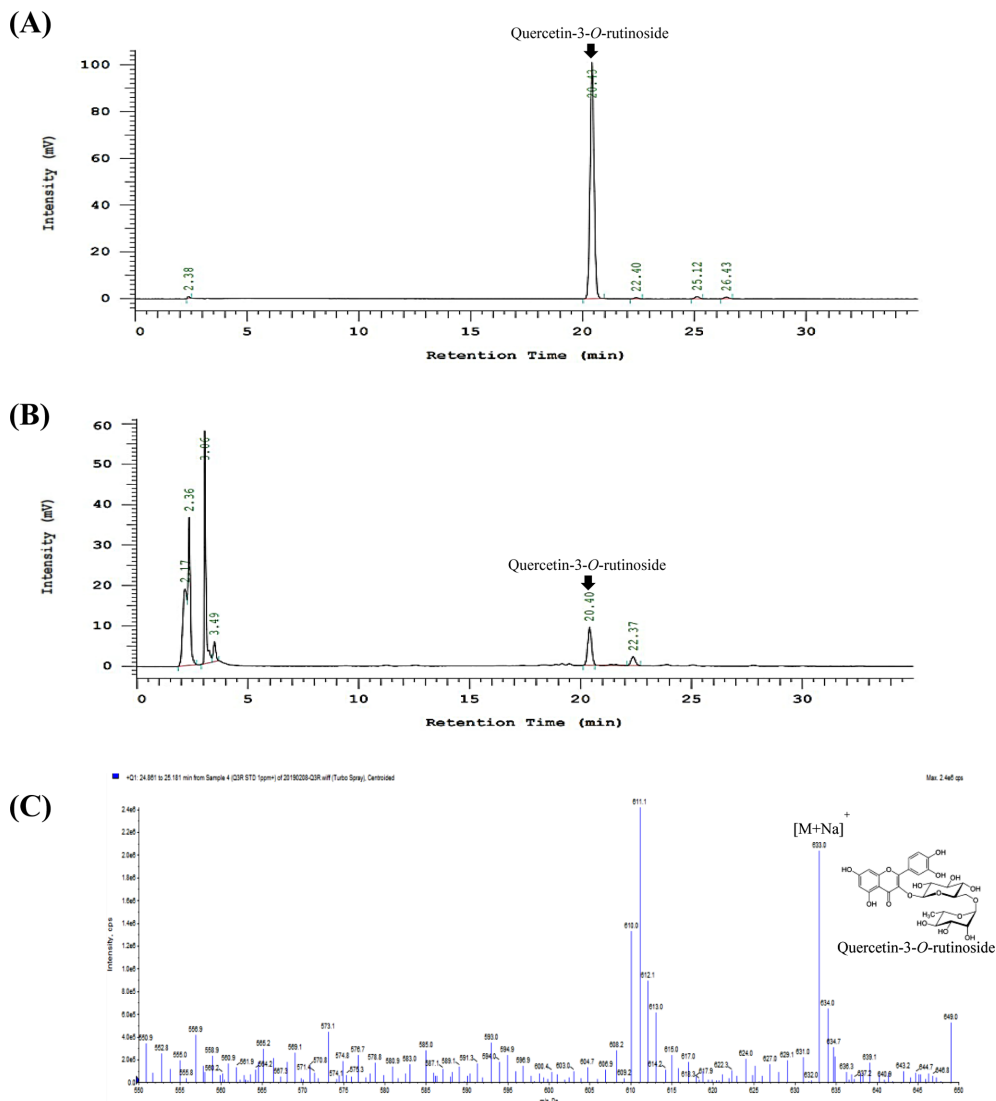


Fig. 2. HPLC chromatograms of quercetin-3-*O*-rutinoside standard (A) and ethanol extract from *Morus alba* fruit (B). HPLC conditions as given in Table II. LC-MS spectra of quercetin-3-*O*-rutinoside in ethanol extract of *Morus alba* fruit (C).

Table IV. Linear ranges, LOQ and LOD of cyanidin-3-*O*-rutinoside and quercetin-3-*O*-rutinoside

Compounds	Linear range (µg/mL)	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient(R ²)	LOQ (µg/mL)	LOD (µg/mL)
Cyanidin-3- <i>O</i> -rutinoside	5~200	20482	-50119	1.000	0.36	0.11
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	2~100	15359	18339	1.000	0.25	0.08

Table V. Precision and accuracy of cyanidin-3-*O*-rutinoside and quercetin-3-*O*-rutinoside

Compounds	Conc. (µg/mL)	Accuracy (bias,%)		Precision (**c.v.,%)	
		*Intra-day	**Inter-day	*Intra-day	**Inter-day
Cyanidin-3- <i>O</i> -rutinoside	5	101.26	101.63	1.11	0.85
	100	98.44	98.50	1.95	1.93
	200	99.96	100.16	1.06	1.41
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	2	91.46	92.37	0.94	1.68
	50	98.06	99.16	0.35	0.41
	100	100.51	100.57	1.81	1.11

*Intra-day: three times per day, **Inter-day: three times analysis of standards per day for three days, **c.v.: co-efficient of variation.

Table VI. Contents of cyanidin-3-*O*-rutinoside and quercetin-3-*O*-rutinoside from extracts of *Morus alba* fruit

Samples	Cyanidin-3- <i>O</i> -rutinoside (%)	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (%)
100% ethanol extract	1.150	0.167
70% ethanol extract	0.822	0.161
40% ethanol extract	0.749	0.159
20% ethanol extract	0.663	0.155
0% ethanol extract	0.597	0.096

준으로 확인되었고, 정량한계는 cyanidin-3-*O*-rutinoside는 0.36 µg/mL와 quercetin-3-*O*-rutinoside는 0.25 µg/mL 수준으로 확인되었다(Table IV).

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) – Cyanidin-3-*O*-rutinoside의 정확성은 98.44~101.63, 정밀성은 0.85~1.95%를 나타내었으며, quercetin-3-*O*-rutinoside의 정확성은 91.46%~100.57%, 정밀성은 0.35~1.81%를 나타내었다(Table V). 전체적으로 정밀성은 모두 2% 이하였으며, 정확성은 91.46%~101.63% 사이의 범위에 있어 정밀성 및 정확성이 높은 분석 방법임을 확인하였다.

함량분석(Content) – 본 연구에서 확립한 분석법을 이용하여 오디 용매 조성별 추출물들에 대한 결정된 지표성분의 함량을 분석하였다. 추출 용매 조성에 따른 지표성분들의 함량은 Table VI와 같이 100% 에탄올 추출물에서 cyanidin-3-*O*-rutinoside는 1.150%, quercetin-3-*O*-rutinoside는 0.167%로서 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 각각의 에탄올 용매 조성에서 cyanidin-3-*O*-rutinoside이 quercetin-3-*O*-rutinoside보다 높은 함량을 나타내었다.

결론

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 오디로부터 지표성분으로 정한 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside의 최적의 추출 용매 조건을 확립하고자, KFDA의 벨리테이션 가이드라인에 따른 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성 및 정밀성 실험을 통하여 분석법의 신뢰성, 유효성을 검증하였다. 확립한 분석법을 이용하여 추출 용매 조성이 다른 오디 추출물들로부터 지표성분의 함량분석을 시행한 결과, 오디 100% 에탄올 추출물에서 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside 두 가지 물질 모두가 가장 높은 함량으로 확인되어졌고, 추출 용매의 에탄올 조성이 높아질수록 지표성분의 함량이 높아지는 경향을 확인할 수 있었다. 또한 추출 용매의 조성이 같은 경우 cyanidin-3-*O*-rutinoside의 함량이 quercetin-3-*O*-rutinoside의 함량보다 높은 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과로 확립된 오디의 성분인 cyanidin-3-*O*-rutinoside와 quercetin-3-*O*-rutinoside의 HPLC를 이용한 분석법은 앞으로 오디를 사용하여 건강기

능식품 및 의약품 개발 시 오디의 제품 표준화에 있어서 중요한 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(No. NRF-2017R1D1A1B03028138)과 2018학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Kim, S. K. (1991) 598-599. Beneficial medicine, mulberry fruit. Young-limsa, Seoul.
- Hur, J. (1994) 2803-2805. Dongeubogam Dongeuhak Institute. Ryogang Pub. Co., Seoul.
- Lee, S. J. (1999) 90-92. Korean Folk Medicine. Seoul Nat'l Univ Press, Seoul.
- Ju, M. J., Kwon, J. H. and Kim, H. K. (2009) Physiological activities of mulberry leaf and fruit extracts with different extraction conditions. *Korean J. Food Preserv.* **16**: 442-448.
- Kim, H. R., Kwon, Y. H., Kim, H. B. and Ahn, B. H. (2006) Characteristics of mulberry fruit and wine with varieties. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**: 209-214.
- Lee, H. W., Shin, D. H. and Lee, W. C. (1998) Morphological and chemical characteristics of mulberry (*Morus*) fruit with varieties. *Korean J. Seric. Sci.* **40**: 1-7.
- Choi, S. J., Jeon, H. J., Lee, C. U., Yoon, S. H., Bae, S. K., Chin, Y. W. and Yoon, K. D. (2015) Isolation and development of quantification method for cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside in mulberry fruit by high-performance countercurrent chromatography and high-performance liquid chromatography. *Nat. Prod. Sci.* **21**: 20-24.
- Pawloska, A. M., Oleszek, W. and Braca, A. (2008) Qualitative analyses of flavonoids of *morus nigra* L. and *morus alba* L. (moraceae) fruits. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 3377-3380.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1994) Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **42**: 2407-2410.
- Arfan, M., Khan, R., Rybarczyk, A. and Amarowicz, R. (2012) Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 2472-2478.
- Jun, H. I., Kim, Y. A. and Kim, Y. S. (2014) Antioxidant Activities of *Rubus coreanus* Miquel and *Morus alba* L. Fruits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**: 381-388.
- Lee, E. J. and Bae, J. H. (2011) Study on the alleviation of an alcohol induced hangover and the antioxidant activity by mulberry fruit. *Korean J. Food Nutr.* **24**: 204-209.
- Kim, T. W., Kwon, Y. B., Lee, J. H., Yang, I. S., Youm, J. K., Lee, H. S. and Moon, J. Y. (1996) A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J. Seric. Sci.* **38**: 100-107.
- Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K. (1994) N-Containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* **259**: 243-255.
- Kamalakkannan, N. and Prince, P. S. (2006) Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**: 97-103.
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R. L. (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.* **45**: 304-309.

(2018. 12. 11 접수; 2019. 1. 14 심사;
2019. 2. 28 게재확정)