

Analysis of quercetin in extract of *Hovenia dulcis* Thunb

SooJung Hu[★], Jae-Myoung Oh, Hyun-Suk Oh, Myung-Hee Moon,
Yun-Young Bae, Sung-Hye Lee, Ji-An Kim and Yong-Eui Koo

Nutrition and Functional Food Research Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and
Drug Safety Evaluation #187 Osongsaengmyeong 2ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si,
Chungcheongbuk-do 28159, Korea

(Received May 23, 2016; Revised October 25, 2016; Accepted November 25, 2016)

헛개나무과병추출물 중 퀘르세틴 분석

허수정[★] · 오재명 · 오현숙 · 문명희 · 배윤영 · 이성혜 · 김지안 · 구용의

식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀

(2016. 5. 23. 접수, 2016. 10. 25. 수정, 2016. 11. 25. 승인)

Abstract: Based on the Korean Health Functional Food Act, health functional foods are dietary supplements containing nutrients or other substances that have nutritional or physiological effects. Since generic health functional food items have been expanded, this project was performed to develop a standardized analytical method of examining such sale items. The method exhibited high linearity in the quercetin calibration curve ($R^2 > 0.999$) over concentrations of 0-40 $\mu\text{g/mL}$. The limits of detection and quantitation for quercetin were 0.12 $\mu\text{g/mL}$ and 0.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while quercetin recovery was 97.1-105.4 % with standard deviations of 1.15-3.11 %. To verify the accuracy of the analytical methods, the labeled amounts of purchased health functional foods were monitored. The recovery rate for multiple quercetin concentrations ranged from 82.5-105.1 % of the labeled amounts. Thus, the new method was suitable for all cases.

요약: 「건강기능식품에 관한 법률」에 따라 건강기능식품이란 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품을 말한다. 또한, 건강기능식품은 고시화한 원료와 영업자가 개별적으로 신청한 개별인정형 원료로 나누어진다. 그 중 개별인정형 원료의 시험법은 고시화를 위해 표준화가 필요하며 2가지 이상의 원료가 복합적으로 혼합되어 제조될 경우 제품에 대한 적용성 검토가 요구된다. 개별인정형 원료 중 헛개나무과병추출물의 지표성분인 퀘르세틴을 대상으로 전처리방법을 표준화하였으며, 표준화한 퀘르세틴 시험법의 밸리데이션을 수행한 결과 회수율은 97.1~105.4%, 표준편차는 1.15~3.11%였다. 검량선의 직선성은 결정계수(R^2)가 0.999 이상을 나타냈고 검출한계는 0.12 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 0.36 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타냈다. 표준화한 퀘르세틴 시험법의 적용성 검토를 위해 헛개나무과병추출물의 유통제품을 수거하여 분석한 결과, 퀘르세틴 표시 함량 대비 82.5~105.1%로 적합하였다.

Key words: health/functional food, quercetin, analytical method

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-4403 Fax : +82-(0)43-719-4400

E-mail : sjhu01@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

「건강기능식품에 관한 법률」 제3조제1호에 따라 건강기능식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다. 이하와 같다)한 식품을 말한다. 또한 동법 제14조제1항 및 제15조제1항에 따라 판매를 목적으로 하는 건강기능식품을 고시화한 원료와 제14조제2항 및 제15조제2항에 따라 영업자가 개별적으로 신청하는 개별인정형 원료로 나누어진다. 고시형 원료는 「건강기능식품의 기준 및 규격」에 적합하게 제조·가공·생산·수입할 경우 특별한 인정 절차 없이 판매가 가능하나, 개별인정형 원료는 안전성, 기능성, 기준·규격에 관한 과학적인 근거 자료 등의 검토를 통하여 식품의약품안전처장으로부터 건강기능식품으로 인정을 받아야 제조 및 수입 등이 가능하다. 개별인정된 기능성 원료를 고시화할 경우 여러 제형의 제품이 제조·유통될 수 있으며 각 기능성 원료별 시험법은 주로 원료 중심의 시험법이다. 따라서 개별인정된 원료의 시험법은 표준화가 필요하며 2 가지 이상의 원료가 복합적으로 혼합되어 제조될 경우 이에 대한 적용성 검토가 요구된다. 이와 같이 개별인정된 기능성 원료 중 헛개나무(*Hovenia dulcis*)는 갈매나무과로 지구자, 지구목이라고 불리며 귀한 한방재료로 쓰여왔다. 9~10월에 얻을 수 있는 열매는 갈색이 돌고 단단한 핵으로 싸인 씨앗이 있으며 달다. 호리개나무, 불개나무, 호개나무 등으로 불리기도 하는 헛개나무의 열매에는 포도당, 사과산, 칼슘을 비롯한 후량구라닌, 호베닌, 호베느시드, 하벤산 등의 성분이 함유되어 있다. 특히, 알콜을 분해하는 능력이 뛰어나 숙취해소에 좋다고 알려져 있다. Na 등^{1,3}은 헛개나무과병추출물이 간 손상과 관련된 ALT와 AST를 감소시키는데 탁월한 효과가 있다는 것을 밝혔다. Yoshikawa 등^{4,6}은 헛개나무의 열매와 씨가 간 보호 작용과 alcohol 섭취에 의한 근육이완을 억제하는 효과를 가진다고 보고하였으며, Hase 등^{7,8}도 헛개나무의 열매가 사염화탄소나 D-galactosamine, lipopolysaccharide에 의해 발생하는 간 손상을 억제하고 간독성을 저해하는 효과에 대해 다수의 연구를 보고하였다. 따라서 식약처에서는 “알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음”의 기능성을 인정하였으며 안전성과 기능성을 확보할 수 있는 하루 섭취량은 헛개나무과병추출 분말로서 2,460 mg이다. 따라서 본 연구에서는 원료 중심의 개별인정형 건강기능식품 중 헛개나무과병추출물을 대상으로 지표성분인 퀘르세틴

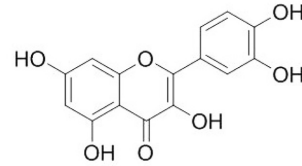


Fig. 1. Chemical structure of quercetin.

(Quercetin)(Fig. 1)의 표준화한 시험법을 확립하고 제품에 대한 적용성을 검토하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

헛개나무과병추출 분말의 지표성분인 퀘르세틴(Quercetin) 표준품과 초산(Acetic acid)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 용매로서 메탄올(Methanol), 아세토니트릴(Acetonitrile), 에틸아세테이트(Ethyl acetate)는 Merck사(Whitehouse station, USA)로부터 HPLC grade를 구입하여 사용하였고 시료 전처리와 이동상에 사용되는 물은 증류수(Distilled water)를 사용하였다.

2.2. 기기

고속액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography)는 자외부흡광도검출기(UV Detector)가 장착된 HPLC/UVD (Shiseido, Japan)를 사용하였으며, 컬럼은 C₁₈ column (25 cm × 4.6 mm I.D, 5 μm)을 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 표준용액 조제

퀘르세틴 약 5 mg을 정밀히 달아 메탄올 50 mL에 녹여 표준원액으로 하고 메탄올로 희석하여 1, 5, 10, 20, 40 μg/mL의 농도로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 하였다.

2.3.2. 시험법 표준화

개별인정형으로 인정받은 헛개나무과병추출 분말 중 퀘르세틴 시험법은 시료를 증류수에 용해하여 100 °C에서 3 시간 환류추출 후 원심분리하여 에틸아세테이트층을 분획하고 증발건조한 것을 메탄올에 녹여 액체크로마토그래피/자외부흡광도검출기를 이용하여 분석하는 방법으로 전처리 조건을 변화시켜 최적의 표준화된 전처리 방법을 확립하고자 하였다. 첫

번째, 시료량 비교를 위해 시료 채취량을 2.5 g, 5 g, 10 g, 25 g으로 비교 실험하였으며 두 번째, 환류 여부 비교를 위해 3시간 환류추출과 환류추출을 하지 않는 것을 비교 실험하였다. 세 번째, 분획에 사용되는 에틸아세테이트 양 비교를 위해 물 100 mL를 기준으로 에틸아세테이트의 양을 200 mL, 125 mL, 100 mL, 50 mL으로 달리하여 비교 실험하였다. 네 번째 전처리 과정 중 에틸아세테이트 정치 시간 비교를 위해 0 시간, 4 시간, 12 시간, 18 시간, 24 시간으로 비교 실험하였다.

2.3.3. 밸리데이션 및 적용성

표준화된 시험법에 대한 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ), 정확도(Accuracy) 및 정밀도(Precision) 등의 밸리데이션을 수행하였다. 또한, 적용성 검토를 위해 개별인정형 헛개나무과병추출 분말에 대한 제품은 그 기능성과 함량을 「건강기능식품 표시기준」에 따라 표기한 제품을 대상으로 선정하였으며, 단순 부원료로 사용하였거나 그 기능성 및 지표성분의 함량을 표기하지 않은 제품은 대상에서 제외하였다. 헛개나무과병추출 분말 시료제품은 4건을 수거하였다.

2.3.4. 기기 분석

퀘르세틴을 정량분석하기 위해 자외부흡광광도검출기가 장착된 HPLC/UVD(Shiseido, Japan)를 사용하였다. 퀘르세틴 분석에 사용된 이동상 및 기기조건은

Table 1. Operating conditions of HPLC/UVD

Parameters	Conditions		
Instrument	Nanospace System (Shiseido, Japan)		
Detector	UVD (370 nm)		
Column	Capcell pak-C ₁₈ (25 cm × 4.6 mm I.D, 5 μm) A - 2% Acetic acid, B - 2% Acetic acid / 45% ACN		
Mobile phase	Time (min)	A(%)	B(%)
	0	50	50
	18	100	0
	20	50	50
	22	50	50
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Column oven temperate	30 °C		

Table 1과 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시험법 표준화

개별인정형으로 인정받은 헛개나무과병추출 분말 중 퀘르세틴 시험법은 전처리 시간이 최소 하루이상 소요되기 때문에 신속하고 정확하게 전처리 시간을 간소화 할 수 있는 최적의 분석조건 확립을 위해 시험법의 개선이 필요하였다. 인정서의 전처리과정을 보면 시료의 양, 용매, 시간 등이 많이 소요되어 시료의 전처리 조건을 조절함으로써 전처리 시간 단축 가능 여부를 검토하였다. 첫 번째 시료량 비교에서는 시료 채취량을 2.5 g, 5 g, 10 g, 25 g으로 비교하였으며 시료 중 퀘르세틴 함량은 각각 5.41 μg/g, 5.41 μg/g, 5.42 μg/g, 5.36 μg/g으로 시료량에 따라 검출되는 퀘르세틴의 함량 차이가 없음을 확인하였으며, 전처리 시 범위 설정에 있어 시료량 대신 퀘르세틴 함량으로 설정하였다. 두 번째 환류추출여부는 인정서 시험법인 3 시간 환류추출과 환류추출을 하지 않은 경우를 비교하였으며, 3 시간 환류추출로 실험한 결과 4.89 μg/g, 4.46 μg/g, 4.68 μg/g, 4.76 μg/g으로 나타났다. 환류추출을 하지 않은 경우의 실험 결과는 5.41 μg/g, 5.41 μg/g, 5.42 μg/g, 5.36 μg/g으로 나타났다. 따라서 3시간 환류추출을 하는 것보다 환류추출을 하지 않은 결과가 퀘르세틴 함량에 보다 더 근접하여 환류추출과정을 제외하였다. 세 번째 분획에 사용되는 에틸아세테이트 양 비교에서 기존 시험법은 물 350 mL : 에틸아세테이트 500 mL 비율로 물과 에틸아세테이트의 양이 많아 분획하는데 어려움이 있었다. 그리하여 물 100 mL를 기준으로 하였을 때, 에틸아세테이트의 양을 200 mL, 125 mL, 100 mL, 50 mL으로 달리하여 퀘르세틴의 함량을 비교해 본 결과 각각 5.27 μg/g, 5.40 μg/g, 5.63 μg/g, 5.38 μg/g으로 퀘르세틴 함량에 차이가 없어 물과 동량의 에틸아세테이트 100 mL를 첨가하여 분획하는 것으로 결정하였다. 마지막 네 번째 에틸아세테이트 정치 시간을 비교하였을 때 인정서 시험법은 12 시간 정치로 전처리에 많은 시간이 소요되었다. 이에 정치 시간을 0 시간, 4 시간, 12 시간, 18 시간으로 다양하게 비교해 본 결과 그 함량은 각각 5.36 μg/g, 5.16 μg/g, 5.29 μg/g, 5.36 μg/g으로 퀘르세틴 함량에 차이가 없어 정치 시간을 별도로 설정하지 않았다.

3.2. 밸리데이션 및 적용성

3.2.1. 특이성(Specificity)

특이성을 확인하기 위하여 퀘르세틴과 시료에서의 분리도 및 머무름 시간을 확인하였다. 표준용액과 시료에서 퀘르세틴의 머무름시간이 11.6분에서 일치하였으며, PDA 스펙트럼으로 표준용액과 시료에서의 퀘르세틴 패턴이 일치함을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3).

3.2.2. 직선성(Linearity)

시료 중 퀘르세틴 함량의 농도범위를 중간값으로 설정하여 총 6개의 농도 1, 5, 10, 20, 30, 40 µg/mL에 대한 직선성을 검토하였다. 오차범위 확인을 위해 각 농도에 대해서 3반복 실험을 수행하였으며 실험결과 검량선의 결정계수(R^2)는 0.999 이상이었다(Fig. 4).

3.3.3 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

표준용액 1, 5, 10, 20, 30, 40 µg/mL를 각각 3회 연속 분석하여 검량선을 작성하고 검량선의 y 절편의 표준편차 및 기울기 평균 값을 이용하여 다음 식에 따라 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 구하였다. 그 결과 퀘르세틴의 검출한계는 0.12 µg/mL이며, 정량한계는 0.36 µg/mL로 나타났다(Fig. 5).

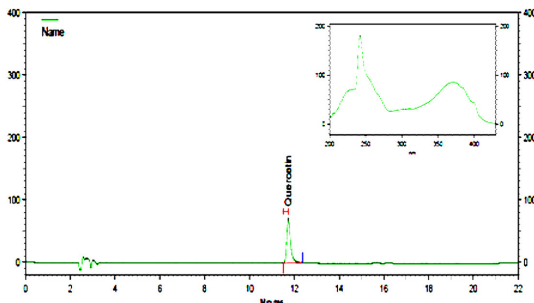


Fig. 2. HPLC chromatogram and spectrum of quercetin at 355 nm in standard.

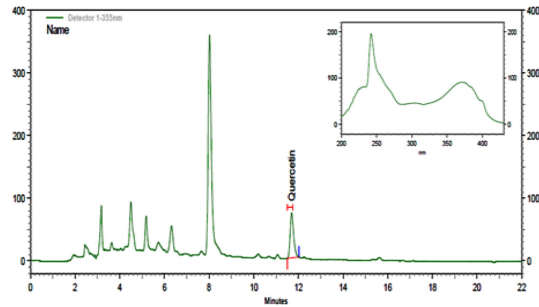


Fig. 3. HPLC chromatogram and spectrum of quercetin at 355 nm in sample.

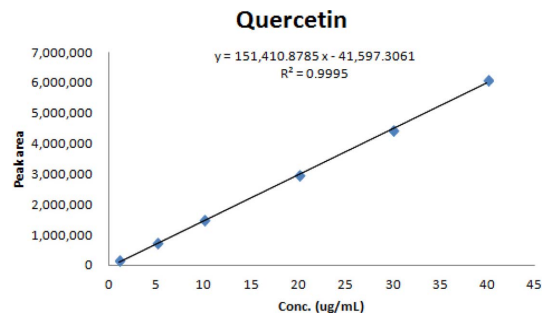


Fig. 4. Calibration curve of quercetin standard.

$$\text{검출한계(LOD)} = 3 \times \frac{\delta}{S}, \quad \text{정량한계(LOQ)} = 10 \times \frac{\delta}{S}$$

δ : 검량선, y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

3.2.4. 정확도(Accuracy) 및 정밀도(Precision)

퀘르세틴 함량을 알고 있는 시료에 퀘르세틴 표준용액을 각각 4.89 µg/g, 9.90 µg/g, 14.45 µg/g를 첨가하여 정확도를 나타내는 회수율과 정밀도를 나타내는 상대표준편차를 구하였다. 그 결과 회수율은 각각 105.4%, 101.6%, 97.1%였으며, 상대표준편차는 각각 2.24%, 1.15%, 3.11%이었다(Table 2).

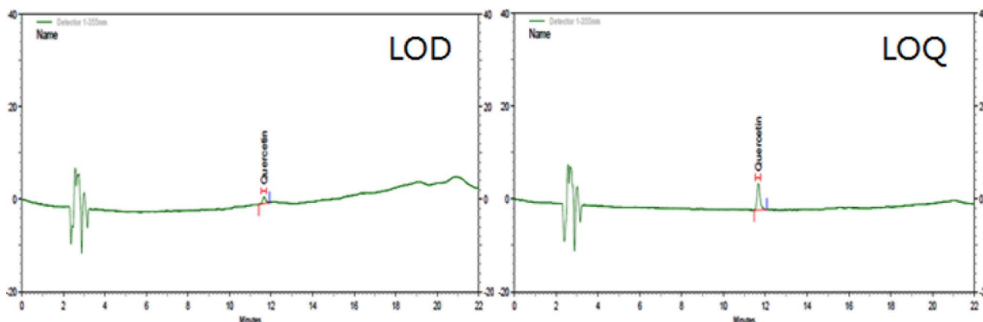


Fig. 5. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for quercetin.

Table 2. Accuracy and Precision of HPLC analysis for quercetin

Treatment	Quercetin contents (µg/g) in Sample	Spiked contents (µg/g)		
		4.89	9.90	14.45
1	5.36	10.70	15.71	19.88
2		10.95	15.61	18.82
3		10.42	15.56	18.44
4		10.92	15.26	19.64
5		10.99	15.39	19.43
Measured mean (µg/g)		10.80	15.51	19.24
RSD(%)		2.24	1.15	3.11
Recovery mean(%)		105.4	101.6	97.1

3.2.5. 유통 제품에 대한 적용성 검토

수거한 헛개나무과병추출 분말에 대하여 표준화한 시험법(Fig. 6)으로 퀘르세틴 함량을 분석함으로써 적용성 검토를 수행하였다. 그 결과 총 4건의 헛개나무과병추출 분말 제품은 표시 함량 대비 82.5~105.1%로 적합하였다(Table 3). 이와 같이 표준화한 시험법의 적합성 검토 결과, 유통되고 있는 헛개나무과병추출 분말 제품은 기준규격에 적합하였다.

4. 결 론

개별인정형 원료 중 헛개나무과병추출물의 지표성분인 퀘르세틴의 인정서 시험법을 표준화하였다. 인정서 시험법의 전처리과정 중 시료채취량, 환류여부, 분획

Table 3. The quercetin contents of Health functional foods

Sample	Compound	Form	Labeled (µg/g)	Found (µg/g)	Result (%)
1	Quercein	Tablet	6.89	6.14	89.0
2		Tablet	6.37	6.18	97.0
3		Tablet	7.05	7.41	105.1
4		Tablet	6.75	5.58	82.6

에 사용되는 에틸아세테이트 양, 에틸아세테이트 정치 시간 등을 비교 실험하였다. 표준화한 퀘르세틴 시험법의 밸리데이션을 수행한 결과 회수율은 97.1~105.4%, 표준편차는 1.15~3.11%였다. 검량선의 직선성은 결정 계수(R²)가 0.999 이상을 나타냈고 검출한계는 0.12 µg/mL, 정량한계는 0.36 µg/mL를 나타냈다. 헛개나무과병추출물의 유통제품에 대한 표준화한 퀘르세틴 시험법의 적용성 검토를 위해 4건의 검체를 수거하여 분석한 결과, 퀘르세틴 표시 함량 대비 82.5~105.1%로 적합하였다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처의 연구개발비(15161식품안014)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. C. S. Na, N. C. Chung, K. H. Yang, S. H. Kim, H. S. Chung and M. S. Dong, *Yakhak Hoeji*, **48**, 34-40 (2004).
2. C.-S. Na, H. K. Kim, J. B. Kim, H. J. Roh, N.-N. Um, H.-J. Noh, D.-S. Na, M.-S. Dong and C. Y. Hong, *Yakhak Hoeji*, **57**(5), 348-356 (2013).
3. C. Y. Hong, J. B. Kim, H.-J. Noh and C.-S. Na, *J. Food Hygiene and Safety*, **30**(1), 115-119 (2015).
4. K. Yoshikawa, T. Ueda, O. Muraoka, H. Aoyama, H. Matsuda, H. Shimoda, J. Yamahara and N. Murakami, *Chem. Pharmaceut. Bull.*, **43**(3), 532-534 (1995).
5. K. Yoshikawa, M. Nagai, M. Wakabayashi and S. Arihara, *Phytochem.*, **34**(5), 1431-1433 (1993).
6. K. Yoshikawa, Y. Nagai, M. Yoahida and S. Arihara, *Chem. Pharmaceut. Bull.*, **41**(10), 1722-1725 (1993).
7. K. Hase, M. Ohsugi, Q. Xiong, P. Basnet, S. Kadota and T. Namba, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**(4), 381-385

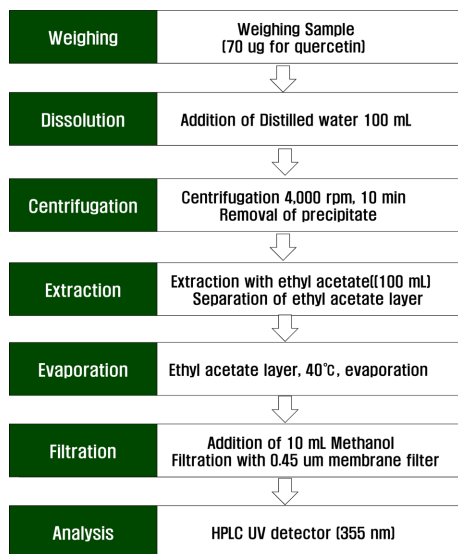


Fig. 6. Analytical method for notifying of quercetin.

- (1997).
8. S.-H. Kim, C.-S. Na, J.-H. Song, H.-S. Kim and M.-S. Kim, The Effect of Hepatotoxicity Improvement and Alcohol Detoxification of *Hovenia dulcis var. koreana*, Vol. 507, Korea Forest Research Institute, Republic of Korea, 2013.