

Validation of Analytical Methods for Unripened *Rubus crataegifolius*, *Gardenia jasminoides* and *Ulmus macrocarpa* Marker Compounds for Standardization of Natural Complex LS-RUG-com Preparation as Functional Ingredient

Young Ik Lee¹, Su Jin Pyo¹, Hee Jin Lee¹, Hye Jung Yoon¹, Ho Yong Sohn² and Jin Sook Cho^{1*}

¹Lee's Biotech Co., #415, C Dong, 17 Techno 4-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34013, Korea

²Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received October 17, 2023 / Revised December 3, 2023 / Accepted December 20, 2023

LS-RUG-com preparation in a complex extract from mixture of three natural plants. *Rubus crataegifolius*/unripened, *Gardenia jasminoides* and *Ulmus macrocarpa* that have been widely used in traditional functional health food. This study was conducted to establish the HPLC analysis methods that can be used to establish quantitative analysis of *R. crataegifolius*, *G. jasminoides* and *U. macrocarpa* for standardization of LS-RUG-com preparations. HPLC analysis methods for simultaneous determination of ellagic acid and geniposide and single determination of catechin-7-O-β-D-apiofuranoside were established for the quality control of natural plants complex (LS-RUG-com). Validation of HPLC analysis were performed by checking specificity, accuracy, precision, limit of detection and quantitation, and linearity following ICH (International Council for Harmonisation) guideline. As the result of quantitative analysis, the contents of ellagic acid, geniposide and catechin-7-O-β-D-apiofuranoside in each plant extracts were 11.2 mg/g (ellagic acid) and 72 mg/g (geniposide) and 10.2 mg/g (catechin-7-O-β-D-apiofuranoside). The contents of ellagic acid, geniposide and catechin-7-O-β-D-apiofuranoside in LS-RUG-com were 4.62~6.82 mg/g (ellagic acid), 19.2~28.8 mg/g (geniposide) and 1.36~2.04 mg/g (catechin-7-O-β-D-apiofuranoside) respectively.

Key words : *Gardenia jasminoides* (geniposide), HPLC analysis, LS-RUG-com, *Rubus crataegifolius* (ellagic acid), *Ulmus macrocarpa* (catechin-7-O-β-D-apiofuranoside)

서 론

최근 천연물 및 천연물 소재에 대한 연구의 증대로 다양한 천연물 소재의 건강 관련 연구가 이루어지고 있다. 천연물 소재는 품종, 생육조건, 수확시기, 전처리 방법에 따라 유용성분의 함량과 생물학적 효능에 차이가 나타난다. 따라서 천연물 소재를 이용한 식의약품 소재 개발을 위해서는 천연물 추출물 및 분말의 품질 확보 및 표준화된 품질 규격화가 이루어져야 하며, 천연물 소재의 지표성분에 대한 함량 기준 및 이화학적 규격에 관한 정확한 평가 지표 및 품질 관리가 필요하다. 본 연구는 산딸기 (*Rubus crataegifolius* / 지표물질; ellagic acid), 치자(*Gardenia jasminoides* / 지표물질; geniposide), 유백피(*Ulmus macrocarpa* / 지표물질; catechin 7-O-β-D apiofuranoside) 3종을

혼합하여 개발된 위 건강 기능소재의 표준화를 위해 진행되었다[4, 13, 14]. 상기 3종의 천연물은 개별 종에 대한 많은 연구가 이루어졌으며 특히 위 건강 관련하여 많은 연구가 이루어지고 있다[1, 2, 6, 8, 11, 12]. 본 연구에서는 위염, 위궤양, 역류성 식도염의 예방 및 개선과 헬리코박터 억제 복합 기능을 가진 위 건강 기능소재 개발을 위해, 산딸기, 치자 및 유백피 3종을 혼합하여 제조된 복합 천연물(LS-RUG-com)을 개발한 바[7, 9, 10], 이의 유효성 및 안전성 확립을 위하여, 품질 규격화, 성분 기준 규격을 위한 이화학적 연구 및 특히 성분을 지표물질로한 정확한 정량분석법을 확립하고자 하였다. 이를 위해 상기 복합 천연물(LS-RUG-com) 소재의 산딸기(RC), 치자(GJ) 및 유백피(UM)를 대상으로, 식품의약품안전처의 기준 규격 지침에 따라 기준 및 시험법을 실시하였다[5]. 두 소재의 지표 성분 ellagic acid, geniposide의 HPLC 동시분석법 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside 단독분석법을 개발, 정량분석을 실시하였으며, 정량분석법의 검증은 위하여, ICH 가이드라인[3]에 준해 실시하였다. 시험분석법으로 특이성(Specificity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision) / 반복성(repeatability), 재현성(reproducibility), 검출한계(detection limit), 정량한계(quantitation limit) 및 직선성

*Corresponding author

Tel : +82-42-862-5016, Fax : +82-42-862-5017

E-mail : nabucco1@hanmail.net

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.

(linearity) 검사를 수행하였다. 이러한 동시 및 단독 정량 분석법을 활용, 복합 천연물(LS-RUG-com)의 원료 및 제품에 있어서 ellagic acid, geniposide 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside의 지표물질 함량을 측정하고, 개발 복합 천연물 LS-RUG-com의 품질 표준화를 확립하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 산딸기 미숙과(*R. crataegifolius* / unriped)와 유백피(*Ulmus macrocarpa*)는 각각 주정을 이용하여 60°C에서 8시간 동안 2회 반복 추출 농축하고, 농축액에 dextrin을 첨가하여 분무건조하여 분말화 하였으며, 치자(*Gadenia jasminoides*)는 증류수를 이용하여 85°C에서 8시간, 2회 반복 추출 농축하고, 농축액에 dextrin을 첨가하여 분무건조하여 분말화하였다. 산딸기 미숙과, 치자, 유백피 분말을 혼합하여 제조한 복합 천연물(LS-RUG-com)을 제조하였다. 상기 3종의 추출 및 농축은 (주)삼우다연(금산, 충남)에서 실시하였으며, 분말화는 (주)Fine F&T (세종, 충남)에서 실시하였다. 지표성분함량 검증은 한국기능식품연구원(KHFF)에서 검증하였다.

기기 및 시약

실험에 사용된 HPLC는 UV detector를 장착한 HPLC-UV 1260 시리즈 시스템(Agilent co. Santa clara, CA, U.S.A)을 사용하였으며, 시료 전처리 과정에서는 SD 250-H (Mujigae, Korea), 소형교반기(Genicee, Scientific Industries, U.S.A), 미량저울(BP1215, Sartorius, Germany)을 사용하였다. 표준품은 ellagic acid (≤95%, Sigma, U.S.A), Geniposide (≤99%, Wako, Japan) 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside (≤97%, 한국한약진흥원)를 사용하였다. Ellagic acid 및 geniposide는 전처리 단계에서 메탄올(Methanol, Burdick & Jackson, U.S.A), 트리플루오르아세트산(Trifluoroacetic acid, Junsei chemical, Japan)을 사용하였다. 동시분석용 컬럼은 Luna 5u C18(2) (4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex)를 사용하였다. Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside는 전처리 단계에서 methanol, 에틸아세테이트(ethyl acetate, Samchun, Korea), 트리플루오르아세트산(trifluoroacetic acid, Junsei-chemical, Japan)을 사용하였다. HPLC 분석용 컬럼은 YMC-Triant (4.6×250 mm, 5 μm, YMC)를 사용하였다.

표준용액의 조제

표준용액의 조제를 위해 ellagic acid 2.0 mg, geniposide 10 mg 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside를 10 mg을 각각 정밀히 칭량하여 메탄올 10 ml에 각각 용해한 것을 표준원액으로 사용하였다(Ellagic acid: 200 ppm, Geniposide:

1,000 ppm, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside: 1,000 ppm). 분석에는 표준원액을 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

시험용액의 조제

분말화된 산딸기, 치자, 유백피 시료를 각각 70% 메탄올에 2 mg/ml 농도로 조제하여 30분간 초음파 추출하였으며, 0.22 μm syringe filter를 사용하여 여과 후 HPLC 시험용액으로 사용하였다. 복합 천연물 LS-RUG-com의 경우, 50.0 mg을 정밀히 달아 25 ml 부피플라스크에 넣은 후 70% 메탄올로 전체 부피의 약 70%까지 정용하고, 30분간 초음파 추출 후 메탄올로 표시선까지 맞춘다음 0.2 μm PTFE filter를 사용하여 여과 후 HPLC 시험용액으로 사용하였다.

HPLC 분석

산딸기 미숙과 및 치자 추출물의 ellagic acid 및 geniposide 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1A에 요약하였다. 유백피 추출물의 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside 단일 동시 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1B에 요약하였다. HPLC는 UV-detector를 장착한 HPLC-UV1260 시리즈 시스템(Agilant Co., Santa Clara, CA., USA)과 Luna 5u (4.6×250 mm, 5 μm, phenomenex)을 사용하였으며 이동상은 0.1% Trifluoroacetic acid가 첨가된 water (A 용매) 및 0.1% Trifluoroacetic acid가 첨가된 99.9% acetonitrile (B 용매)을 구배조건을 적용하여 50분간 분석하였다. Ellagic acid 및 geniposide 동시분석을 위하여, 0에서 5분까지 A를 95%로 용리하였고, 10분에서 40분까지 이동상 B를 70%까지 증가시켰다. 이후 41분에 A를 95%로 조정해 초기용매조건으로 조정하였다. 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 시료는 40°C에서 10 μl를 주입하고 유속 1.0 ml/min으로 조정하였으며, UV는 254 nm 파장에서 측정하였다(Table 1A). Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside 단일분석을 위하여 0에서 5분까지 A를 90%로 용리하였고, 40분에서 50분까지 이동상 B를 70%까지 증가시켰다. 이후 51분에 A를 90%로 조정해 초기용매조건으로 조정하였다. 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 시료는 40°C에서 10 μl를 주입하고 유속 0.6 ml/min으로 조정하였으며, UV는 280 nm 파장에서 측정하였다(Table 1B).

시험분석법의 검증(method validation)

산딸기(미숙과), 치자 및 유백피 분석법 확립을 위한 밸리데이션은 ‘의약품 등 분석법의 밸리데이션 가이드라인(식품의약품 안전처)’을 참고로 하여 수행되었다[5].

특이성(specificity)

분석의 특이성은 혼합시료 내에서 분석대상 물질을 정

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of ellagic acid, geniposide and catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

(A) Ellagic acid and geniposide

Parameter	Condition
Column	Luna 5u C18(2) / Agilent 1260 series (4.6×250 mm, 5 μm, Phenomenex)
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	254 nm
Injection vol.	10 μl
Column temp	40°C

	Time (min)	% A ¹⁾	% B ²⁾
	0.00	95	5
	10.00	90	10
	20.00	83	17
Mobile phase	35.00	65	35
	36.00	30	70
	40.00	30	70
	41.00	95	5
	50.00	95	5

¹⁾Water (0.1% Trifluoroacetic acid)

²⁾Acetonitrile (0.1% Trifluoroacetic acid)

(B) Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

Parameter	Condition
Column	Agilent 1260 series YMC-Triart C18 (4.6×250 mm, 5 μm, YMC)
Flow rate	0.6 ml/min
Detector	280 nm
Injection vol.	10 μl
Column temp	40°C

	Time (min)	% A ¹⁾	% B ²⁾
	0.00	90	10
	40.00	78	22
Mobile phase	45.00	30	70
	50.00	30	70
	50.10	90	10
	60.00	90	10

¹⁾Water (0.1% Trifluoroacetic acid)

²⁾Acetonitrile (0.1% Trifluoroacetic acid)

확하게 분석할 수 있는지 확인하는 것을 의미하며, 표준품과 혼합시료를 분석하여 얻은 HPLC 크로마토그램에서 ellagic acid, geniposide 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside가 다른 물질의 간섭없이 성분이 분리되는지를 확인하고, UV스펙트럼을 비교하는 것으로 평가하였다.

정확성 (accuracy)

분석의 정확성은 알고 있는 참값에 측정값이 근접해 있는 정도를 말하므로, 시료에 각각의 지표성분을 세 가

지 다른 농도로 첨가하여 반복 분석한 후 회수율을 계산하여 측정하였다(Table 2A, B). 이미 농도를 알고 있는 표준물질(ellagic acid 및 geniposide)을 복합 천연물 LS-RUG-com에 각각 50%(3 μg, 12.5 μg/ml), 100%(6 μg, 25 μg/ml), 150%(9 μg, 37.5 μg/ml)의 농도로 각각 첨가하여 5회 반복 분석한 후 다음의 식으로 회수율을 측정하였다. 또한, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside의 경우, 이미 알고 있는 표준물질을 복합천연물(LS-RUG-com)에 각각 50%(4 μg), 100%(8 μg), 150%(12 μg)의 농도로 각각 첨가하여 5회 반복하여 분석한 후 다음 식으로 회수율을 측정하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{측정값} - \text{시료에 존재하는 지표성분의 양}}{\text{첨가한 지표성분의 양}} \times 100$$

정밀성 (precision) : 정밀성을 분석하기 위하여 ①반복성 및 ②재현성을 측정하였다.

① **반복성 (repeatability) :** 반복성은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)를 말하며, 이를 확인하기 위해 복합천연물 LS-RUG-com을 10, 20 및 30 mg을 정밀히 달아 70% 메탄올 용액을 첨가하여 30분간 초음파 추출한 뒤 0.22 μm 멤브레인 필터로 여과하고 HPLC로 분석하여 ellagic acid 및 geniposide의 함량을 확인하였으며, 5회 반복 측정하여 상대표준편차(Relative standard deviation/RSD)값을 분석하였다. Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside의 경우, 복합 천연물 LS-RUG-com을 10, 20 및 30 mg을 정밀히 달아 상기 시험용액 조제 방법대로 분석시료를 조제하고 HPLC로 분석하여 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside의 함량을 확인하였으며, 5회 반복 측정하여 상대표준편차(RSD)값을 분석하였다.

② **재현성 (reproducibility) :** 재현성은 동일 실험실 내에서 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 분석장비 등을 이용하여 분석 실험해서 얻은 측정값들 사이의 근접성을 말하므로, 복합 천연물 LS-RUG-com을 5회씩 반복 측정한 후 이들 뒤에 다시 측정하여 일일 및 일간 정밀도(재현성)을 확인하였다. 복합 천연물 LS-RUG-com을 10, 20 및 30 mg을 정밀히 달아 70% 메탄올 용액을 첨가하여 30분간 초음파추출한 뒤 0.22 μm 멤브레인 필터로 여과하고 HPLC로 각 시험용액 당 5회 반복 측정하여 함유된 ellagic acid 및 geniposide의 함량을 분석하여 재현성을 확인하였으며 5회 반복 측정하여, 상대표준편차(RSD) 값을 분석하였다. Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside 재현성 측정을 위하여 복합 천연물 LS-RUG-com 10 mg, 20 mg 및 30 mg을 정밀히 달아 상기 시험 용액 조제 방법대로 분석 시료를 조제하고 HPLC로 분석하여 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside의 함량을 확인하였으며, 5회 반복 측정하여 상대표준편차(RSD)값을 분석하였다.

Table 2. Accuracy for the determination of ellagic acid, geniposide and catechin 7-O-β-D-apiofuranoside

(A) Ellagic acid and geniposide

	Number of test	Adding Concentration (ug/ml)		
		3 (50%)	6 (100%)	9 (150%)
Ellagic acid	1	103.21	106.07	96.14
	2	101.65	96.61	99.87
	3	101.87	97.96	99.90
	4	99.87	96.66	99.12
	5	104.91	101.58	98.85
	Average recovery rate by content (%)	102.30	99.78	98.78
	Total average rate (%)	100.28		
Recovery rate section (%)	98.78 ~ 102.30			
	Number of Times	Adding Concentration (ug/ml)		
		12.5 (50%)	25 (100%)	37.5 (150%)
Geniposide	1	95.88	93.09	92.15
	2	94.92	98.43	102.30
	3	94.39	91.60	101.23
	4	92.97	94.12	103.21
	5	97.07	93.10	99.60
	Average recovery rate by content (%)	95.05	94.07	99.70
	Total average rate (%)	96.27		
Recovery rate section (%)	94.07 ~ 99.70			

(B) Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

	Number of test	Adding Concentration (ug/ml)		
		4 (50%)	8 (100%)	12 (150%)
	1	100.30	103.69	96.79
	2	103.79	96.63	96.54
	3	101.38	96.25	97.54
	4	98.22	98.50	94.15
	5	101.38	98.46	98.17
Average recovery rate by content (%)		101.02	98.70	96.84
Total average rate (%)		98.85		
Recovery rate section (%)		96.84 ~ 101.02		

검출 한계 및 정량 한계(limit of detection ; LOD / limit of quantitation : LOQ)

검출 한계는 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 정량 가능할 필요는 없다. 한편 정량 한계는 적절한 정밀도와 정확도를 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질을 정량 할 수 있는 최저 농도를 말한다. 검출 한계(LOD)와 정량 한계(LOQ)를 분석하기 위해, 1.0 mg/ml 농도의 ellagic acid, geniposide, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside 표준 원액을 100% 메탄올을 첨가하여 순차적으로 희석하여 0.09~50 µg/ml 농

도의 10개 시료를 조제하였다. 이후 각각의 시료를 분석하여 ellagic acid, geniposide 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside에 대한 검량선을 구하였으며, 총 3회 반복 분석하여 검량선 기울기 평균(S) 및 y절편의 표준편차(σ)를 구한 후 다음 식을 사용하여 검출 한계 및 정량 한계를 계산하였다.

$$\text{검출한계 (LOD)} = 3.3 \times \sigma / S \left(3.3 \times \frac{y\text{절편 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}} \right) \times 100$$

$$\text{정량한계 (LOQ)} = 10 \times \sigma / S \left(10 \times \frac{y\text{절편 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}} \right) \times 100$$

직선성(linearity)

직선성은 적절한 정밀도, 정확도 등을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말하며, 결정계수(r2) 값이 0.990 이상이어야 한다. 본 분석의 직선성을 확인하기 위해, 1.0 mg/ml의 ellagic acid 및 geniposide 표준원액을 100% 메탄올을 첨가하여 순차적으로 희석하여 3.125~50 µg/ml 농도의 5개 시료로 조제하였다. Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside의 경우 0.6~50 µg/ml 농도의 5개의 시료를 조제하였다. 각 시료로부터 HPLC 분석결과와 검

량선을 구하였으며, 총 3회 반복하여 결정계수(R2) 값이 0.990 이상인지의 여부를 확인하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

분석 특이성 확인

Ellagic acid와 geniposide 표준 용액과 산딸기 및 치자의 추출 용액의 chromatogram을 비교한 결과, ellagic acid와 geniposide가 Fig. 1A과 같이 완벽히 RT (retention time)값이 일치하며 표준 용액과 시험 용액이 동일한 spectrum을

Table 3. Repeatability for the determination of ellagic acid, geniposide and catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

(A) Ellagic acid and geniposide

	Number of test	Sample amount		
		10 mg	20 mg	30 mg
Ellagic acid	1	5.39	5.86	5.09
	2	5.43	5.93	5.19
	3	5.42	5.97	5.31
	4	5.52	5.75	5.32
	5	5.52	5.90	5.26
	Analysis value (mg/g)	5.46	5.88	5.23
	RSD (%)	1.10	1.46	1.82
RSD interval (%)		1.10 ~ 1.82		
	Number of test	Sample amount		
		10 mg	20 mg	30 mg
Geniposide	1	23.89	24.66	25.35
	2	24.00	24.80	25.46
	3	23.86	24.94	26.11
	4	23.95	24.02	26.06
	5	23.99	24.58	25.74
	Analysis value (mg/g)	23.94	24.60	25.74
	RSD (%)	0.26	1.43	1.32
RSD interval (%)		0.26 ~ 1.43		

*RSD: Relative standard deviation = standard deviation / mean × 100

(B) Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

	Number of test	Sample amount		
		10 mg	20 mg	30 mg
Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside	1	1.56	1.53	1.49
	2	1.57	1.54	1.47
	3	1.51	1.61	1.50
	4	1.53	1.52	1.44
	5	1.56	1.55	1.49
	Analysis value (mg/g)	1.55	1.54	1.48
RSD for sample analysis value (%)		1.48	2.48	1.52
RSD interval (%)		1.48 ~ 2.48		

*RSD: Relative standard deviation = standard deviation / mean × 100

나타내므로 본 시험법의 특이성(specificity)을 확인하였다(Fig. 1A). 또한, Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside 표준용액과 유백피 추출용액의 chromatogram을 비교한 결과, Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside가 Fig. 1B과 같이 완벽히 RT 값이 일치하며 표준용액과 시험용액이 동일한 spectrum을 나타내므로 본 시험법의 특이성(Specificity)을 확인하였다(Fig. 1B).

정확성 확인

Table 2와 같이 ellagic acid 첨가 농도 3, 6 및 9 μg/ml에 따라 각각 102.30, 99.78, 및 98.78%의 회수율을 보여주었으며, geniposide가 첨가된 농도 12.5, 28.0 및 37.5 μg/ml에

따라 각각 95.05, 94.07 및 99.70% 회수율이 나타났다. 복합 천연물 LS-RUG-com의 경우 ellagic acid의 전체평균 회수율은 100.28%이고, 회수율 구간(%)는 98.78~102.30으로 확인되었다. 또한 geniposide의 전체 회수율은 96.27%이고, 회수율 구간(%)는 94.07~99.70로 확인되어 정확성(accuracy)를 확인하였다(Table 2A). Table 2B와 같이 Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside 첨가 농도 4, 8 및 12 μg/ml에 따라 각각 101.02, 98.70 및 96.84%의 회수율이 확인되었다. 복합 천연물 LS-RUG-com의 경우 Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside의 전체평균 회수율은 98.85%이고, 회수율 구간(%)는 96.84~101.02%로 정확성(accuracy)이 확인되었다(Table 2B).

Table 4. Reproducibility for the determination of ellagic acid, geniposide and catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

(A) Ellagic acid and geniposide			
Number of test	Day of sample test		
	2022.08.04	2022.08.06	
Ellagic acid	1	5.39	5.68
	2	5.43	5.64
	3	5.42	5.52
	4	5.52	5.59
	5	5.52	5.54
Analysis value (mg/g)		5.46	5.59
RSD (%)		1.14	
Number of test	Day of sample test		
	2022.08.04	2022.08.06	
Geniposide	1	23.89	23.15
	2	24.00	22.68
	3	23.86	23.08
	4	23.95	23.45
	5	23.99	23.14
Analysis value (mg/g)		23.94	23.10
RSD (%)		2.52	

*RSD: Relative standard deviation = standard deviation / mean × 100

(B) Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

Number of Test	Day of sample test		
	2023.01.17	2023.01.19	
1	1.53	1.52	
2	1.54	1.61	
3	1.61	1.56	
4	1.52	1.59	
5	1.55	1.55	
Analysis value (mg/g)		1.54	1.56
RSD (%)		0.85	

*RSD: Relative standard deviation = standard deviation / mean × 100

정밀성(precision) 확인

① **반복성** : 분석의 반복성(repeatability) 확인 결과 ellagic acid 함량에 대한 RSD구간은 1.10~1.82%로 확인되었으며, geniposide 함량에 대한 RSD 구간은 각각 0.26~1.43%으로 식품의약품안전처 건강기능식품 지표 물질 밸리데이션 가이드라인에 부합하였다(Table 3A). 분석의 반복성 확인 결과 Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside 함량에 대한 RSD구간은 1.48~2.48%로 확인되었으며, 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 반복성(repeatability)이 밸리데이션 가이드라인에 부합하였다(Table 3B).

② **재현성** : 재현성(reproducibility) 확인 결과 LS-RUG-com의 ellagic acid 함량 상대표준편차(RSD%)는 1.14%로 확인되었으며, geniposide 함량에 대한 상대표준편차(RSD%)는 2.52%로 확인되어 ellagic 및 geniposide 함량이 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질가이드 라인에 부합

Table 5. Determination of ellagic acid, geniposide and catechin-7-O-β-D-apiofuranoside LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification)

(A) Ellagic acid and geniposide			
Sample	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)	
Ellagic acid	0.118	0.395	
Geniposide	0.468	1.561	

LOD = 3.3 × σ/s, LOQ = 10 × σ/s

σ : standard deviation of the response, s : slope of the calibration curve

(B) Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside

Sample	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
Catechin-7-O-β-D apiofuranoside	0.182	0.608

LOD = 3.3 × σ/s, LOQ = 10 × σ/s

σ : standard deviation of the response, s : slope of the calibration curve

함을 확인하였다(Table 4A). 또한, LS-RUG-com의 Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside 함량 상대표준편차(RSD%)는 0.85 %로 확인되었으며, 이는 식품의약품안전처 건강기능식품 지표물질 가이드라인에 부합함을 확인하였다(Table 4B).

검출 한계 및 정량 한계 확인

Ellagic acid 경우, 검량선의 기울기(S) 및 표준편차(σ)를

이용하여 얻은 검출한계(limit of detection)는 0.118 μg/ml로 확인되었고, 정량 한계(limit of quantitation)는 0.395 μg/ml로 확인되었다. Geniposide의 경우, 검출 한계는 0.468 μg/ml이고 정량 한계는 1.561 μg/ml로 확인되었다(Table 5A). Catechin 7-O-β-D-apiofuranoside 경우, 검량선의 기울기(S) 및 표준편차(σ)를 이용하여 얻은 검출한계(detection limit)는 0.182 μg/ml로 확인되었고, 정량한계(quantitation

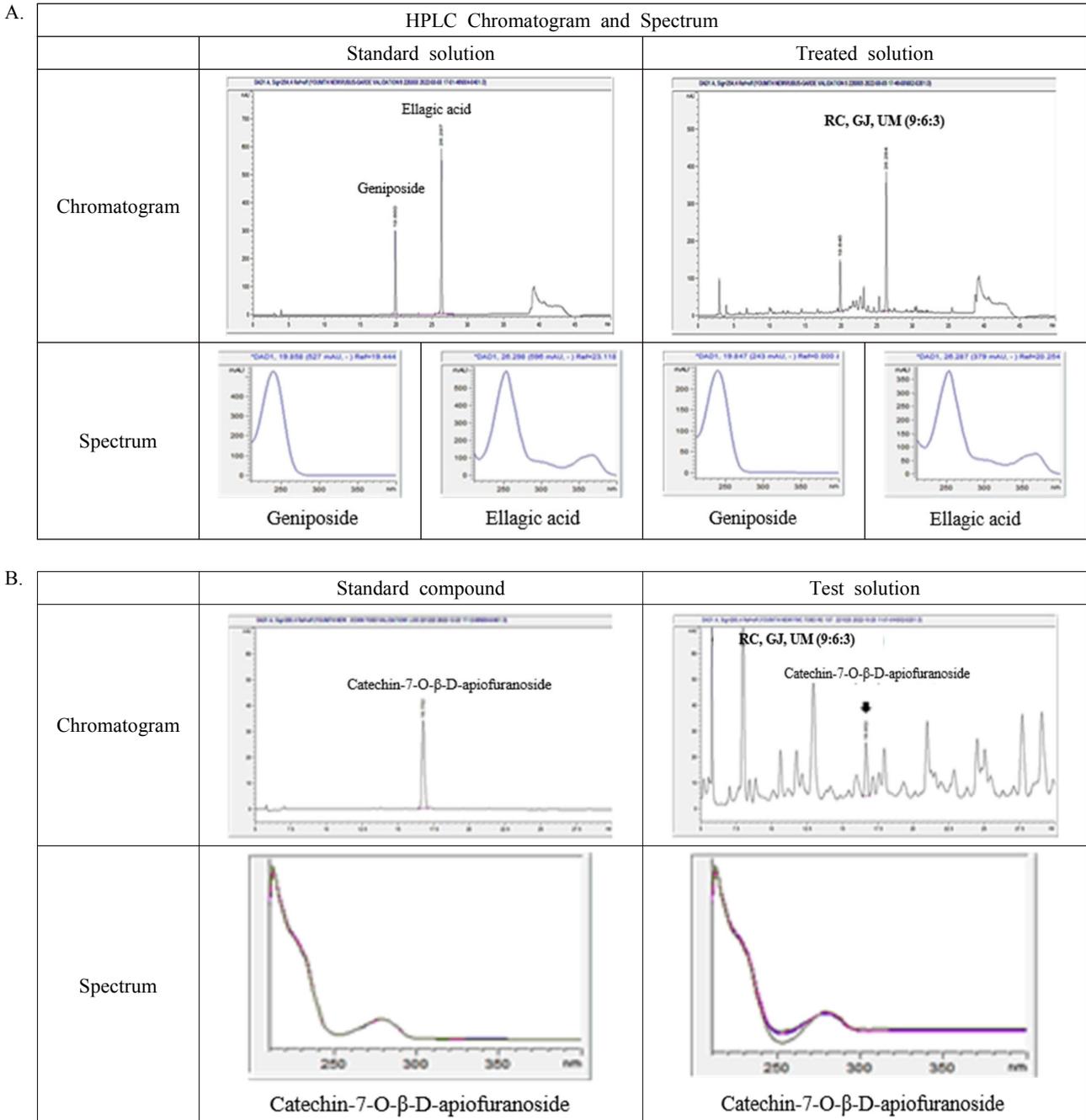


Fig. 1. Chromatogram of standard solution (ellagic acid, geniposide and Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside) and treated solution (ellagic acid, geniposide and Catechin-7-O-β-D-apiofuranoside).

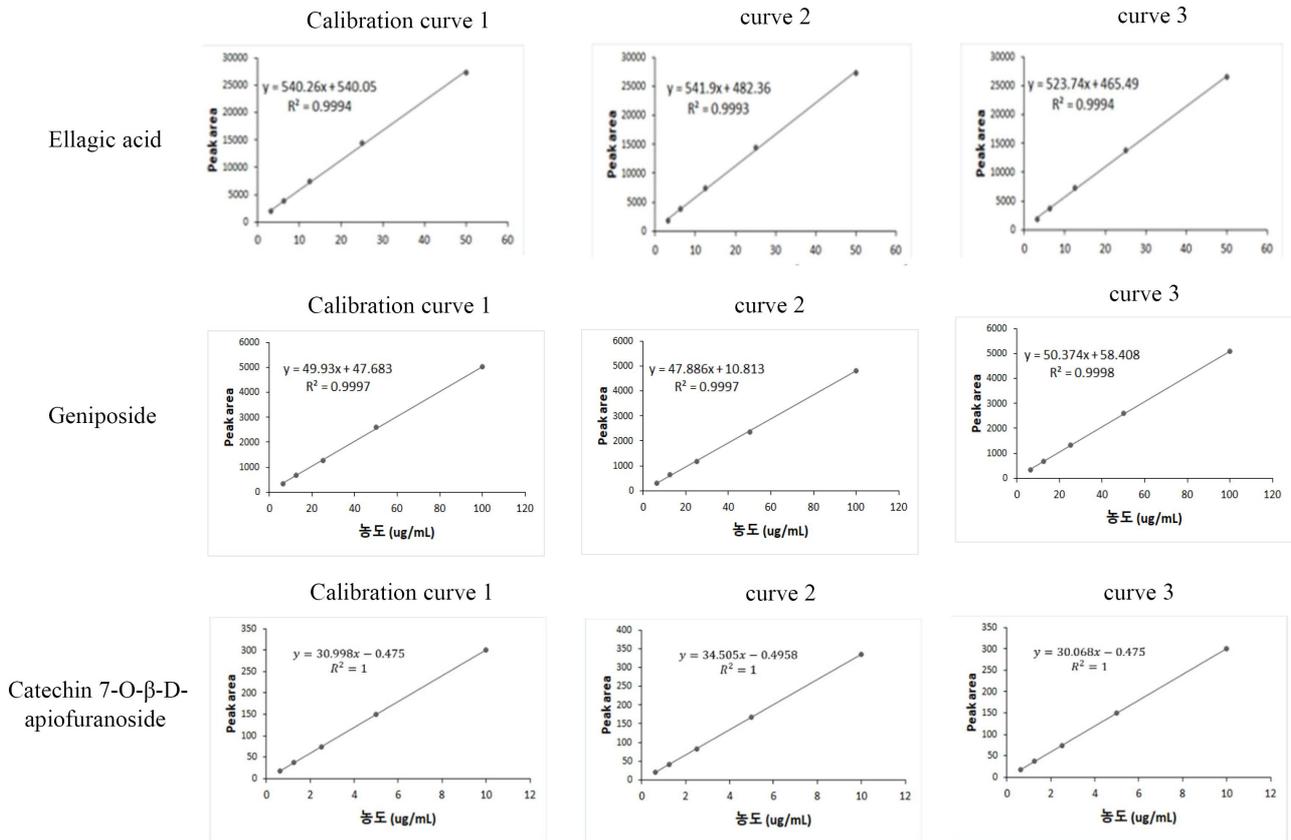


Fig. 2. Calibration curves of (A) ellagic acid and (B) geniposide and (C) catechin-7-O-β-D-apiofuranoside.

limit)는 0.608 μg/ml로 확인되었다(Table 5B).

직선성 확인

본 분석의 ellagic acid 및 geniposide의 검량선 작성 결과, 2가지 표준품 모두에서 검량선의 상관계수(r²) 값이 0.999 이상으로 5개 농도 범위에서 매우 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 2A, B). 이러한 상기 결과는 본 HPLC 동시 분석법이 산딸기, 치자 분석에 적합하며, 신뢰성이 있음을 제시하고 있다(Fig. 2A, B).

또한 catechin 7-O-β-D-apiofuranoside의 검량선 작성 결과, 검량선의 상관계수(r²) 값이 0.999이상으로 5개 농도 범위에서 매우 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 2C). 이러한 상기 결과는 본 HPLC 분석법이 유백피 분석에 적합하며, 신뢰성이 있음을 제시하고 있다(Fig. 2C).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Bi, W. P., Man, H. B. and Man, M. Q. 2014. Efficacy and safety of herbal medicines in treating gastric ulcer: a review. *World J. Gastroenterol.* **20**, 17020-17028.
2. Chen, S., Zhao, X., Sun, P., Qian, J., Shi, Y. and Wang, R. 2017. Preventive effect of *Gardenia jasminoides* on HCL/ethanol induced gastric injury in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **133**, 1-8.
3. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2011.
4. Kim, M., Lee, Y. J., Shin, J. C. and Choi, S. E. 2020. Chemotaxonomic significance of Catechin 7-O-beta-D-apiofuranoside in *Ulmus* species. *JKWST.* **48**, 888-895.
5. Korea Food and Drug Administration. 2019. Guide to submission materials for the recognition of functional ingredient.
6. Lee, J. H., Lee, D. U. and Jeong, C. S. 2009. Gardenia jasminoides Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 1127-1131.
7. Lee, Y. I., Kim, J. S., Cho, J. S., Kim, H. K. and Hussain, A. 2019. Standardized combined plant extract, RUG-com, reduces bacterial levels and suppresses acute and chronic inflammation in Balb/c mice infected with CagA+ *Helico-*

- bacter pylori*. *Prev. Nutr. Food Sci.* **24**, 426-433.
8. Nam, J. H., Jung, H. J., Choi, J., Lee, K. T. and Park, H. J. 2006. The anti-gastropathic and anti-rheumatic effect of niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid isolated from the unripe fruits of *Rubus coreanus* in a rat model. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 967-970
 9. Park, J. U., Cho, J. S., Kim, J. S., Kim, H. K., Jo, Y. H., Rahman, M. A. A. and Lee, Y. I. 2020. Synergistic effect of *Rubus crataegifolius* and *Ulmus macrocarpa* against *Helicobacter pylori* clinical isolates and gastritis. *Front. Pharmacol.* **20**, 11:4.
 10. Park, J. U., Kang, J. H., Rahman, M. A. A., Hussain, A., Cho, J. S. and Lee, Y. I. 2019. Gastroprotective effects of plants extracts on gastric mucosal injury in experimental Sprague-Dawley rats. *Biomed. Res Int.* **2019**, 8759708.
 11. Park, J. W., Bu, Y. M., Bae, J. H., Lee, B. J., Ko, S. J., Kim, J. S. and Ryu, B. H. 2011. Protective effects of *Ulmus macrocarpa* on experimental colitis mice models. *Orient. Pharm. Exper. Med.* **11**, 107-112
 12. Sangiovanni, E., Vrhovsek, U., Rossoni, G., Colombo, E., Brunelli, C., Brembati, L., Trivulzio, S., Gasperotti, M., Mattivi, F., Bosisio, E. and Dell'Agli, M. 2013. Ellagitannins from *Rubus* berries for the control of gastric inflammation: *in vitro* and *in vivo* studies. *PLoS One* **8**, e71762.
 13. Sung, Y. Y., Lee, A. Y. and Kim, H. K. 2014. The *Gardenia jasminoides* extract and its constituent, geniposide, elicit anti-allergic effects on atopic dermatitis by inhibiting histamine *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* **156**, 33-40.
 14. Yun, K. M. and Chung, H. S. 2016. Physicochemical characteristics and antioxidant activities of cookies with red raspberry (*Rubus crataegifolius*). *Food Eng. Prog.* **20**, 53-58.

초록 : 천연복합소재 LS-RUG-com의 기능성원료 표준화를 위한 산딸기 미숙과, 치자 및 유백피 지표성분의 분석법 검증

이영익¹ · 표수진¹ · 이희진¹ · 윤혜정¹ · 손호용² · 조진숙^{1*}

(¹리즈바이오텍, ²안동대학교 식품영양학과)

산딸기, 치자, 유백피의 혼합물인 복합 천연물 LS-RUG-com이 위염, 위궤양, 식도성 역류염 및 *Helicobacter*를 억제함을 확인한 바, LS-RUG-com을 건강기능식품 개별인정형 소재로 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 소재 개발을 위한 LS-RUG-com 분석방법을 확립하고자 하였으며, 산딸기, 치자 및 유백피의 지표 물질을 HPLC/UV system을 이용하여 분석방법을 최적화하였다. 본 연구에서는 분석법 validation을 입증하기 위하여 특이성(specificity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계 및 정량한계(detection & quantitation limit) 및 직선성(linearity)을 평가하였으며, 그 결과 본 연구의 HPLC/UV 동시 분석법이 산딸기, 치자 분석에 적합하며, 신뢰성이 있음을 증명하였다. 또한 유백피의 HPLC/UV 단독 분석법이 적합하며 신뢰성이 있음을 증명하였다.