

국내유통 복분자와 토종복분자의 이화학적 특성과 엘라그산 함량 비교연구

정성희, 유혜영, 서지호, 이용재, 한민우*

KGC인삼공사 R&D본부, 연구원

A Study on the Comparison of Chemical Characterization and Ellagic Acid Content Between Distribution Bokbunja and Korean Native Bokbunja

Sung Hee Jung, Hye Young Yu, Ji Ho Seo, Yong Jae Lee and Min Woo Han*

Researcher, KGC ginseng Research Institute, Daejeon 34128, Korea

Abstract - The purpose of this study was to compare the chemical properties of the bokbunja distributed in Korea with the content of the bioactive substance ellagic acid. The bokbunja was *Rubus coreanus* group and *Rubus occidentalis* group were compared, domestic bokbunja and import bokbunja were compared. In bokbunja, free sugar was 30.89 ± 0.7 mg/g of *Rubus coreanus* and 29.05 ± 0.87 mg/g of *Rubus occidentalis*. and 27.28 ± 7.4 mg/g of domestic bokbunja and 21.58 ± 6.73 mg/g of import bokbunja. The free amino acids was 4.50 ± 0.08 mg/g of *Rubus coreanus* and 5.05 ± 0.08 mg/g of *Rubus occidentalis*. and 4.13 ± 1.09 mg/g of domestic bokbunja and 3.75 ± 0.31 mg/g of import bokbunja. Validation of the ellagic acid method was confirmed by comparing the retention time and spectrum of the standard and extract using HPLC. The calibration curve (R^2) showed linearity of 0.9999. As a result of analyzing the ellagic acid content of each extraction solvent, DMSO and methanol mixture extracts were high, and *Rubus coreanus* was 2.56 mg/g and *Rubus occidentalis* was 3.16 mg/g, which was not significantly different ($p < 0.05$) In addition, the ellagic acid content of domestic bokbunja and import bokbunja was 2.83 mg/g and 2.99 mg/g, which was not significantly different ($p < 0.05$).

Key words – Amino acid, Ellagic acid, Free sugar, *Rubus coreanus*, *Rubus occidentalis*

서 언

복분자(*Rubus coreanus* Miquel) 또는 복분자 딸기라 불리는 열매는 장미과(Rosaceae) 산딸기속(Rubus)에 속하는 나무딸기류(rambles) 중 하나로 한국, 중국, 일본 등지에서 자생하며(An and Kim, 2007), 국내산 토종복분자(*Rubus coreanus* Miquel)는 야생 산딸기를 선별하여 시험재배 후 황성, 곡성, 광양 등의 일부 지역에서 재배 육성되고 있다(Kim *et al.*, 2014). 현재 국내 복분자 주산지인 전북 고창, 순창 등의 지역에서는 1960년대 말 북미산 *R. occidentalis* 품종이 도입되어 재배되고 있으며, 중국에서 수입된 화동복분자 품종인 *R. chingii*와 함께 국내에

서 대부분 유통중이다(Lee and Kim, 2018).

대한민국약전에서는 복분자를 ‘복분자딸기 *Rubus coreanus* Miquel (장미과 Rosaceae)의 채 익지 않은 열매이다’라고 규정(MFDS, 2019a)하고 있으며 한방에서는 미숙과를 복분자(覆盆子)라고 하며 보간신(補肝腎), 이뇨제의 효능이 있고, 정력감퇴, 빈뇨를 치료한다고 알려져 있다(Cha *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2003). 외래종복분자로 알려져 있는 *R. occidentalis*는 항산화(antioxidation), 식도암(esophageal cancer) 등에 효과가 있는 것으로 보고되었고, 중국의 화동복분자(*R. Chingii* Hu)는 중국에서 수세기 동안 야뇨증, 요로 치료를 위해 처방되어 왔다고 알려져 있다. 이처럼 같은 복분자라 하더라도 품종에 따라 나타나는 효과도 다르며 성숙도, 추출방법에 따라 유효성분 함량에 차이를 보인다(Kim *et al.*, 2014). 복분자 열매에 존재하는

*교신저자: E-mail greenman@kgc.co.kr

Tel. +82-42-870-3047

생리활성 물질 중 ellagic acid는 과일과 채소에 있는 폴리페놀 화합물로서 항산화작용과 전립선, 대장암세포, 구강암 등의 항암효과와 콜레스테롤 억제 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며(Kim *et al.*, 2012) 미숙한 복분자에서는 생리활성 물질인 ellagic acid의 함량이 높게 확인되었다. 또한 복분자 열매는 숙성단계에 따라 생리활성 물질에 함량에 차이를 나타낸다고 보고되었으며 미숙과추출물은 완숙과추출물보다 ellagic acid 함량이 5.3배 더 높은 함량을 나타냈다(Choi *et al.*, 2013).

이에 본 연구에서는 국내에서 재배, 유통되고 있는 미숙한 형태에 복분자의 화학적 성분 및 지표성분으로 ellagic acid의 함량을 비교하여 제품개발과 지표성분의 기준설정에 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 실험에 사용된 복분자는 미숙과의 형태로서 토종복분자 (*R. coreanus* Miquel)는 광양에서 재배되고 있는 복분자, 외래종 서양복분자(*R. occidentalis* L.)는 고창에서 재배되고 있는 복분자를 농가에서 채취하여 시험에 사용하였다. 시험에 사용한 시료를 NCBI의 BLAST 상동성 검색결과 시험에 사용된 *R. coreanus*의 ITS 염기서열(AY818196, FJ472906, EF034123)과 98% 이상 일치하였으며, *R. occidentalis*의 염기서열(AF055758)과도 일치 하였다. 유전자분석과 시험에 사용된 토종복분자와 서양복분자시료는 한국인삼공사 분석연구소에서 보관하고 있다. 그 밖의 시료는 경동약령시장과 금산약령시장으로부터 구매하였으며 국내유통 복분자는 재배지역이 서로 다른 국내산 복분자 6점과 고창에서 재배되는 외래종 서양복분자를 포함하여 총 7점으로 하였고, 수입산(중국) 복분자는 7점의 시료로 하였다. 각 시료는 광양 토종복분자, 고창 서양복분자와 국내산 복분자 와 수입산(중국) 복분자의 2그룹씩 각각 나누어 비교실험 하였다. 복분자 시료는 분쇄기로 분말화 한 뒤 100 mesh 체를 통과시켜 균질화하여 사용하였다.

유리당 분석

복분자 함량 분석은 Park *et al.* (2008)의 방법에 준하여 분석하였으며, 복분자 분말 0.1 g을 정밀히 달아 증류수 10 mL을 넣고 충분히 분산시킨 후 이를 초음파추출기(30분)에서 추출하였다. 추출된 시료는 원심분리기(3,000 rpm, 4°C, 10분) 후 얻어진 상층액을 취하여 적정농도로 희석한 후 0.2 µm membrane

syringe filter로 여과한 것을 유리당 분석용액으로 사용하였다. 복분자의 유리당 정량 분석을 위한 표준물질은 Sigma-aldrich에서 제조한 galactose, fructose, glucose, sucrose, lactose, maltose의 6종을 사용하였다. 유리당 기기분석은 PAD (pulsed amperometric detector)가 연결된 HPAEC (High performance anion-exchange chromatography)를 사용하였다. 컬럼은 CarboPac PA1 (3 mm × 250 mm)를 사용하였으며, 이동상 용매 A는 Distilled water, 이동상 용매 B는 250 mM NaOH를 사용하여 1.0 mL/min의 유속으로 시료 주입량은 1.0 µL로 정량 분석하였다.

무기성분 분석

무기성분은 식품첨가물의 기준 및 규격의 일반시험법(MFDS, 2019c)에 준하여 분석하였으며, 복분자 분말을 Bassel에 0.5 g을 정밀히 달아 넣고 증류수 1 mL와 65% 질산 4 mL을 넣고 Ultrawave 에서 220°C (1500 W, 30분)로 시료를 분해하였다. 분해가 끝난 시료는 냉각시킨 후 증류수를 이용하여 25 mL 정용 플라스크에 옮겨 정용하고 이 용액을 분석용액으로 하였다. 분석기기는 ICP-OES를 사용하여 무기성분의 함량을 정량, 분석 하였다.

무기성분 분석을 위한 표준용액은 ICP multi-element standard solution IV을 사용하였다.

유리 아미노산 분석

복분자의 유리 아미노산 함량 분석은 In *et al.* (2017)의 방법에 준하여 분석하였으며, 복분자 시료를 10 mL conical tube에 시료 0.5 g을 정밀히 달고 증류수 10 mL를 첨가하여 충분히 균질화 한 후 이를 초음파추출기(30분)에서 추출하였다. 추출된 시료는 원심분리기(3,000 rpm, 4°C, 10분) 후 얻어진 상층액을 0.2 µm membrane syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 여과한 시험용액 10 µL은 250 µL vial에 넣고 여기에 AccQ-Fluor borate buffer 용액 70 µL를 가해 혼합시킨다. 이 혼합액에 아미노산의 형광 유도체화를 위하여 20 µL AccQ-Fluor reagent를 가하여 다시 5초간 균질화 하였다. 이 균질화한 혼합 용액은 수욕상(55°C, 10분)에서 유도체화 시킨 후, 이를 최종 분석시료로 하였다. 분석기기는 Fluorescence Detector가 연결된 Waters 2690 HPLC로 분리, 정량하였다. 이동상용매 A는 AccQ-Tag Eluent A와 초순수를 200 : 800 (v/v) 비율로 혼합 후 pH 4.98 조제하였으며, 이동상용매 B는 Acetonitrile, 이동상용매 C는 증류수를 사용하였다. 컬럼은 Discovery C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)을 이용하였다.

Ellagic acid 추출용매 조건의 최적화

복분자의 생리활성 물질인 ellagic acid의 추출용매조건에 따른 초음파추출법 최적화를 위하여 Lee and Kim (2018)의 용매 조건을 참고하여 추출법을 최적화하였다. 복분자 분말 100 mg을 15 mL conical tube에 정밀히 달은 후 추출용매 조건은 5 mL dimethyl sulfoxide와 5 mL methanol을 가한 혼합용매 추출, 50% 메탄올 추출, 5% 에탄올을 추출의 각각 용매조건에 따라 30 분 동안 초음파 추출하였다. 추출물은 원심분리(3,000 rpm, 4℃, 10분)를 하여 상층액을 취한 후 0.2 μm membrane syringe filter로 여과하여 ellagic acid 분석용 시험용액으로 사용하였다.

Ellagic acid 분석법의 유효성 검증

복분자 중 ellagic acid 성분의 분석법을 검증하기 위하여 식품의약품안전평가원에서 고시한 기능성원료인정을 위한 제출 자료 작성 가이드라인(MFDS, 2019b)에 근거하여 분석법 검증을 수행하였다. 분석법의 검증은 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy), 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification)에 대하여 확인하였다. 특이성(Specificity)은 복분자의 ellagic acid가 표준용액과 비교하여 머무름시간 및 다른 피크의 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다. 직선성(Linearity)

은 ellagic acid의 표준품을 이용하여 7가지 농도(0.48, 4.8, 12.0, 24.0, 48.0, 120.0, 240.0 μg/mL) 범위에서 검량선을 작성하고 얻은 결정계수 (R^2)를 통하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다. 정밀성(Precision)은 반복성과 재현성을 확인하였으며, 반복성은 3가지 시료양(100 mg, 250 mg, 500 mg)에 대해 5회 반복 측정하여 측정값들 사이의 상대표준편차(RSD)를 구하였으며, 재현성은 시험일을 변동요인으로 주어 3일간 측정하여 얻어진 측정값들 사이의 상대표준편차를 구하였다. 반복성과 재현성의 기준은 AOAC 가이드라인(2005)에 근거하여 검증하였다. 정확성(Accuracy)은 복분자 추출물을 농축한 복분자 농축액을 3가지 농도(15.10 μg/mL, 30.20 μg/mL, 51.63 μg/mL)로 첨가하여 5반복 분석 후 회수율을 확인하였고 기준은 AOAC 가이드라인 회수율(2005)에 근거하여 검증하였다. 검출한계(Limit of detection)와 정량한계(Limit of quantification)는 표준용액의 크로마토그램을 이용하여 얻어진 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하여 계산하였다. 검출한계(LOD) = $3.3 \times \sigma/S$, 정량한계(LOQ) = $10 \times \sigma/S$ 여기서 σ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다.

Ellagic acid 분석

Ellagic acid의 분석에 사용된 표준물질은 ellagic acid (sigma-

Table 1. HPLC analytical condition for analysis of ellagic acid

Analytical condition																						
Device	Waters Ailiance HPLC 2695 + PDA 2996 System																					
Detector	UV 254 nm																					
Column	Osaka SODA CAPCELL PAK C18, 4.6 mm × 250 mm, 5μm																					
Column temp.	35℃																					
Sample tray temp.	10℃																					
Injection volume	10 μL																					
Flow rate	1.0 mL/min																					
Mobile phase	· Solution A : 1.0% formic acid in water · Solution B : 1.0% formic acid in acetonitli																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>24</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A	B	0	85	15	5	80	20	10	75	25	20	40	60	24	0	100	25	85	15
Time (min)	A	B																				
0	85	15																				
5	80	20																				
10	75	25																				
20	40	60																				
24	0	100																				
25	85	15																				

aldrich)이며, Dimethyl sulfoxide 이용하여 245.0 µg/mL의 농도로 표준용액을 조제한 후 이를 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 분석기기는 UV Detector가 연결된 Waters Alliance HPLC 2695을 사용하였으며, 컬럼은 Osaka SODA CAPCELL PAK C18 (4.6 mm × 250 mm)을 사용하였다. 이동상 A는 0.1% formic acid in water, 이동상 B는 0.1% formic acid in Acetonitrile를 사용하여 1.0 mL/min의 유속으로 분석하였다. UV는 254 nm 파장에서 측정하였고, 시료 주입량은 10 µL로 하였다(Table 1).

통계분석

본 시험에서 얻어진 결과는 SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, USA) program을 사용하여 통계분석을 하였으며, *t*-test를 이용하여 실험결과의 유의성을 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

유리당 분석

미숙한 형태의 복분자에서는 glucose, fructose 2종이 검출되었으며, sucrose, galactose, lactose, maltose는 검출되지 않았다. 복분자 4그룹 시료의 유리당 함량을 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. 총 유리당의 함량은 토종복분자의 glucose는 19.03 mg/g, 서양복분자의 glucose는 16.29 mg/g으로 토종복분자의 glucose 함량이 높게 나타났다. 또한 국내산 복분자와 수입산(중국) 복분자의 총 유리당 함량은 각각 27.28 mg/g, 21.58 mg/g으로 국내산 복분자의 함량이 수입산(중국)에 비해 높

게 나타났으며($p < 0.05$) 복분자의 유리당 구성비는 glucose가 fructose보다 높은 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 Cha *et al.* (2001)은 복분자 딸기의 이화학적 특성에 관한 연구에서도 미숙 복분자의 유리당 조성은 glucose와 fructose으로 완숙과로 되어가면서 sucrose가 생성됨을 보고하여 미숙한 복분자의 유리당 구성성분이 본 실험결과와 일치함을 확인하였다.

무기성분 분석

복분자의 무기질과 유해 금속함량은 ICP를 이용하여 Na, Ca, K, Mg, Fe, Al, Cu, Zn, Mn, P, Co을 분석하였다. 측정된 결과는 Table 3와 같았다. 전체적으로 K의 함량이 가장 높았고 위해금속인 Co는 검출되지 않았다. 이는 Kim and Shin (2011)은 숙성(미숙과, 중간숙과, 완숙과)에 따른 토종 복분자 딸기의 무기질 함량을 비교한 연구결과에서도 숙성과 관계없이 K 함량이 가장 높았으며, 그 외는 Ca > Mg > P 등의 순으로 조성비가 높다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다.

유리 아미노산 분석

복분자의 유리 아미노산 분석은 17종의 아미노산 표준물질을 사용하여 분석하였으며 유리 아미노산 함량을 측정된 결과는 Table 4에 나타내었다. 주요 유리 아미노산으로는 threonine > asparagine > arginine > glutamine 등의 순으로 함유되어 있었으며 cysteine은 검출되지 않았다. 위와 같은 결과는 Lee and Do (2000)에 복분자 열매의 화학성분 및 휘발성 향기성분에 관한 연구에서 가장 적게 함유되어 있는 유리 아미노산으로는 methionine 및 cysteine으로 보고하여 본 실험 결과와 유사한 경향을 보인 반면 함유량이 많은 유리 아미노산으로는 aspartic

Table 2. Free sugar contents of Rubus Fruit (*R. coreanus*, *R. occidentalis*, domestic Bokbunja, import Bokbunja) (Unit: mg/g, dry basis)

Free sugar	<i>R. coreanus</i>	<i>R. occidentalis</i>	Domestic Bokbunja	Import Bokbunja
Glucose	19.03 ± 1.32 ^z	16.29 ± 0.32	14.80 ± 4.05	11.89 ± 1.45
Fructose	11.85 ± 0.74	12.76 ± 0.58	12.47 ± 4.01	7.21 ± 1.28
Galactose	n.d. ^y	n.d.	n.d.	n.d.
Maltose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sucrose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lactose	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	30.89 ± 0.70	29.05 ± 0.87	27.28 ± 7.40	21.58 ± 6.73

^zMean Values ± standard deviations (n=3).

^yNot detected.

Table 3. Mineral contents of Rubus Fruit (*R. coreanus*, *R. occidentalis*, domestic Bokbunja, import Bokbunja) (Unit: mg/100 g, dry basis)

Componens	<i>R. coreanus</i>	<i>R. occidentalis</i>	Domestic Bokbunja	Import Bokbunja
Na	20.42 ± 0.27 ^z	2.27 ± 0.13	3.47 ± 2.90	10.40 ± 1.629
Ca	1,301.92 ± 1.77	1,146 ± 13.09	1,189.43 ± 123.22	1,349.13 ± 119.47
K	1,246.75 ± 30.3	1,563.83 ± 27.24	1,542.42 ± 87.21	1,410.08 ± 145.34
Mg	473.23 ± 1.25	415.75 ± 0.87	426.86 ± 38.82	474.20 ± 43.49
Fe	46.71 ± 8.40	8.01 ± 0.27	11.16 ± 6.05	30.55 ± 19.16
Al	85.86 ± 4.33	9.67 ± 0.44	14.59 ± 10.53	37.52 ± 12.45
Cu	0.97 ± 0.02	0.97 ± 0.02	0.95 ± 0.04	1.00 ± 0.06
Zn	2.76 ± 0.13	2.52 ± 0.06	2.58 ± 0.15	2.94 ± 0.84
Mn	10.58 ± 0.2	17.28 ± 0.17	15.37 ± 3.24	9.52 ± 0.75
P	201.33 ± 5.86	227.08 ± 4.11	226.73 ± 25.48	190.60 ± 13.73
Co	n.d. ^y	n.d.	n.d.	n.d.
Total	3,390.62 ± 45.83	3,393.33 ± 44.10	3,417.63 ± 192.65	3,515.94 ± 310.83

^zMean Values ± standard deviations (n=3).^yNot detected.Table 4. Free amino acid contents of Rubus Fruit (*R. coreanus*, *R. occidentalis*, domestic Bokbunja, import Bokbunja) (Unit: mg/g, dry basis)

components	<i>R. coreanus</i>	<i>R. occidentalis</i>	Domestic Bokbunja	Import Bokbunja
Asparagine	0.75 ± 0.02 ^z	0.84 ± 0.01	0.65 ± 0.19	0.67 ± 0.08
Serine	0.14 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.20 ± 0.09	0.10 ± 0.01
Glutamine	0.25 ± 0.01	0.49 ± 0.03	0.41 ± 0.18	0.21 ± 0.04
Glycine	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Histidine	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Arginine	0.51 ± 0.01	1.00 ± 0.06	0.78 ± 0.25	0.51 ± 0.07
Threonine	1.63 ± 0.02	1.25 ± 0.03	0.99 ± 0.22	1.47 ± 0.19
Alanine	0.19 ± 0.01	0.23 ± 0.00	0.21 ± 0.06	0.14 ± 0.02
Proline	0.50 ± 0.01	0.58 ± 0.02	0.48 ± 0.24	0.28 ± 0.07
Cysteine	n.d. ^y	n.d.	n.d.	n.d.
Tyrosine	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.00
Valine	0.18 ± 0.00	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.12 ± 0.02
Methionine	tr ^x	tr	tr	tr
Lysine	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Isoleucine	0.12 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.01
Leucine	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Phenylalanine	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01
Total	4.50 ± 0.08	5.05 ± 0.08	4.13 ± 1.09	3.75 ± 0.31

^zMean Values ± standard deviations (n=3).^yn.d.: not detected.^xtr: trace.

acid 및 glutamic acid 등의 순으로 본 실험에서 주요 아미노산의 조성결과와는 차이를 보였다. 이는 Kim and Shin (2011)의 연구 결과로 미숙한 복분자의 구성아미노산과 단백질의 농도가 숙성된 복분자보다 높게 확인되었으며, 중간숙과와 완숙과로 과실이 익어감에 따라 아미노산 함량은 감소한다고 보고하여 복분자의 수확시기의 차이에 따른 숙성정도가 아미노산의 조성에 영향을 주는 요인일 것으로 판단되었다.

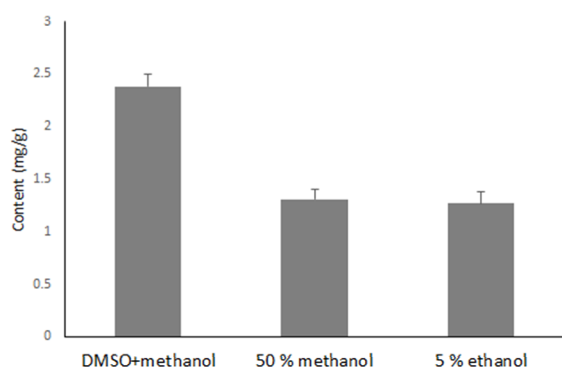


Fig. 1. Comparison of extraction efficiency for ellagic acid obtained with various solvent.

Ellagic acid 추출용매 조건의 최적화

추출용매에 따른 추출효율을 비교한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. ellagic acid의 용매별 추출함량은 DMSO (dimethyl sulfoxide)와 methanol을 1 : 1로 첨가하여 추출하였을 경우 2.38 mg/g, 50% methanol 1.31 mg/g, 5% ethanol 1.27 mg/g의 순으로 추출효율이 높은 것을 확인하였다. 이에 본 연구에서는 복분자의 ellagic acid의 추출을 위한 최적의 조건으로 시료 100 mg을 정밀히 달은 후 DMSO 5 mL와 methanol 5 mL을 가하여 초음파추출을 30분으로 하는 방법으로 분석에 적용하였다.

Ellagic acid 분석법의 유효성 검증

특이성(Specificity)

시험용액과 ellagic acid 표준용액에 크로마토그램의 머무름 시간과 UV 흡수파장 스펙트럼을 비교하여 특이성을 확인한 결과 피크의 머무름 시간이 9.5분으로 동일한 것을 확인하였으며, 해당 피크의 UV 흡수파장 스펙트럼 패턴이 서로 일치하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

직선성(Linearity), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)

복분자의 성분분석을 위한 ellagic acid 표준물질에 대하여 0.48, 4.8, 12.0, 24.0, 48.0, 120.0, 240.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 7수준 농도

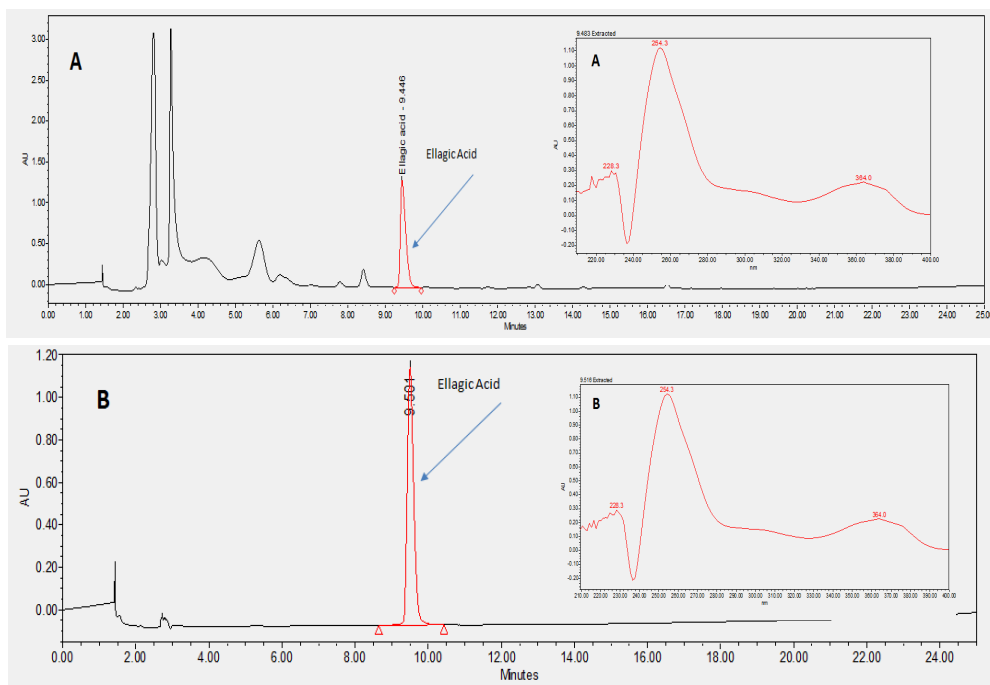


Fig. 2. Comparison HPLC chromatogram and UV spectra of ellagic acid in Rubus Fruit; (A) Rubus Fruit, (B) standard.

범위에서 검량선을 작성하였으며, 검량선의 결정계수 (r^2)가 0.999 이상의 직선성을 나타내었다(Fig. 3). Ellagic acid의 검

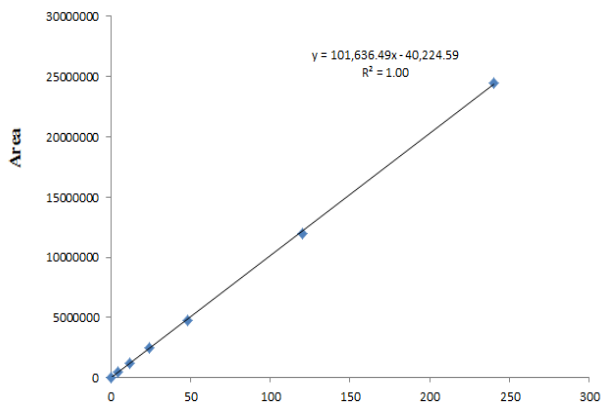


Fig. 3. Calibration curve of ellagic acid.

Table 5. Precision of ellagic acid contents : intra-day (Unit: mg/g)

	Samples		
	100 mg	250 mg	500 mg
1	2.71	2.68	2.68
2	2.73	2.68	2.69
3	2.69	2.70	2.69
4	2.69	2.72	2.68
5	2.65	2.69	2.69
Mean	2.61	2.62	2.64
Stdev	0.03	0.02	0.01
RSD(%)	1.05	0.84	0.34
Total RSD(%)	0.89		

Table 6. Precision of ellagic acid contents : inter-day (Unit: mg/g)

Repetitions	Inter-day		
	0 day	1 day	2 day
1	2.68	2.67	2.69
2	2.69	2.56	2.72
3	2.69	2.66	2.55
4	2.68	2.68	2.78
5	2.69	2.61	2.26
Mean	2.69	2.64	2.60
Total mean	2.64		
Total stdev	0.12		
RSD(%)	4.39		

출한계와 정량한계는 표준용액을 적정 농도로 희석한 뒤 3회 반복 분석하였고, 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하였으며, 검출한계(LOD)는 0.49 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계(LOQ)는 1.64 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정하였다.

정밀성(Precision)

정밀성은 반복성(Repeatability)과 재현성(Reproducibility)을 확인하였으며, 반복성은 반복성을 시험한 결과 측정값들의 상대표준편차는 0.89%이며(Table 5), 재현성의 상대표준편차는 4.39%로 나타났다(Table 6). 이 결과값은 식품의약품안전평가원에서 고시한 기능성원료인정을 위한 제출자료 작성 가이드라인에 고시된 기준 중 함량이 0.1% (1 mg/g)일 때의 기준(반복성: 3% 이내, 재현성: 6% 이내)에 만족하는 결과를 나타내었다.

정확성(Accuracy)

회수율 평가를 위하여 표준물질 대신에 복분자 추출물을 농축시킨 복분자 농축액을 첨가하여 시험하였으며, 복분자 농축액의 ellagic acid 농도는 349,66 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 시료 100 mg을 정밀히 취한 후 복분자 농축액을 각각 0.5 mL (15.10 $\mu\text{g/mL}$), 1 mL (30.20 $\mu\text{g/mL}$), 1.5 mL (45.30 $\mu\text{g/mL}$)의 3수준으로 첨가하였고, 5회 반복 분석한 후 얻어진 함량의 회수율을 구하였다. 회수율의 결과값은 90.09 ~ 99.73%로 나타났으며(Table 7), 기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드라인에 고시된 기준(MFDS, 2019b) 중 함량이 0.1% (1 mg/g)일 때의 기준(회수율: 90 ~ 108%)에 만족하는 결과를 나타내었다.

Ellagic acid 함량

토종복분자, 서양복분자, 국내산 및 수입산(중국) 복분자의 ellagic acid의 함량을 분석한 결과는 Table 8에 나타내었다. ellagic acid의 함량은 토종복분자 2.56 mg/g, 서양복분자 3.16 mg/g이며, 국내산 복분자 1.69~5.09 mg/g, 수입산(중국) 복분자 2.37~3.79 mg/g의 범위로 확인되었다. 국내산 복분자와 수입산(중국) 복분자의 함량을 평균값으로 비교 할 경우, 각각 2.83 mg/g와 2.99 mg/g으로 시료간의 유의 차이는 없었다($p < 0.05$). 이와 같은 결과는 Lee and Kim (2018)의 중국 재배종 복분자(*R. chingii*)와 국내 재배종 복분자(*R. occidentalis*)의 ellagic acid 함량은 차이가 없다고 보고하여 본 실험의 결과와 일치함을 확인하였다.

Table 7. Recovery of ellagic acid contents (n=5) (Unit: %)

	Content recovery		
	Added 50% (15.10 $\mu\text{g/mL}$)	Added 100% (30.20 $\mu\text{g/mL}$)	Added 150% (45.30 $\mu\text{g/mL}$)
1	92.79	90.81	92.29
2	98.99	93.00	95.09
3	98.38	96.07	94.32
4	90.36	90.17	90.51
5	99.73	90.09	93.98
Mean	96.05	92.03	93.24
Total mean	93.57		
Range	90.09 ~ 99.73		

Table 8. Ellagic acid contents in dried Rubus Fruit (Unit: mg/g)

Sample No.	Sample name	Contents (mg/g)
1	<i>R. coreanus</i> (Gwangyang)	2.56 \pm 0.03 ^z
2	<i>R. occidentalis</i> (Gochang)	3.16 \pm 0.03
3	Domestic A	5.09 \pm 0.06
4	Domestic B	1.69 \pm 0.07
5	Domestic C	2.36 \pm 0.21
6	Domestic D	1.99 \pm 0.12
7	Domestic E	2.62 \pm 0.12
8	Domestic F	2.92 \pm 0.09
Domestic Bokbunja (No.2 ~ 8) Mean		2.83 \pm 1.12
9	Import A	2.37 \pm 0.21
10	Import B	3.06 \pm 0.23
11	Import C	3.79 \pm 0.31
12	Import D	2.86 \pm 0.18
13	Import E	3.07 \pm 0.32
14	Import F	3.31 \pm 0.25
15	Import G	2.48 \pm 0.10
Import Bokbunja (No.9 ~ 15) Mean		2.99 \pm 0.49

^zMean Values \pm standard deviations (n=3).

적 요

본 연구는 국내에서 유통되고 있는 복분자, 서양복분자, 국내산 및 수입산(중국) 복분자들을 대상으로 유리당, 무기성분, 유리 아미노산의 함량을 분석하여 비교하였으며, 생리활성 물질인 ellagic acid의 분석법을 검증한 후 각각의 시료별 함량을

분석하여 지표성분 기준설정에 활용하고자 하였다. 미숙한 복분자의 유리당 구성은 glucose와 fructose가 확인되었으며, 총 유리당의 함량은 국내산 복분자(27.28 mg/g)가 수입산(중국) 복분자(21.58 mg/g)보다 높게 나타났다. 복분자의 무기성분 조성은 K의 함량이 가장 높았으며, 주요 아미노산은 threonine, asparagine, arginine, glutamine으로 확인되었고 cysteine은 검출되지 않았다. 추출용매별 ellagic acid 함량을 분석한 결과 dimethyl sulfoxide 와 methanol을 1 : 1로 첨가하여 추출하였을 경우 2.38 mg/g으로 가장 높게 나타났으며, 복분자, 서양복분자, 국내산 및 수입산(중국) 복분자의 시료 간 ellagic acid의 함량에는 차이가 없음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 2020년 (주)한국인삼공사의 연구지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- An, Y.H. and Y.H. Kim. 2007. Distribution and ecological characteristics of native *Rubus coreanus* in Korea. Korean J. EnvEco. 21:176-185.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. Association of official Analytical Chemists. Tacoma. WA (USA). pp. 114-118.
- Cha, H.S., M.K. Lee, J.B. Hwang, M.S. Park and K.M. Park. 2001. Physicochemical characteristics of *Rubus coreanus* Miquel. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30(6):1021-1025.
- Choi, H.R., S.J. Lee, J.H. Lee, J.W. Kwom, H.K. Lee, J.T. Jeong and T.B. Lee. 2013. Cholesterol-lowering effects of unripe Black Raspberry water extract. J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr. 42(12):1899-1907.
- In, G., N.G. Ahn, B.S. Bae, M.W. Lee, H.W. Park, K.H. Jang, B.G. Cho, C.K. Han, C.K. Park and Y.S. Kwak. 2017. In situ analysis of chemical components induced by steaming between fresh ginseng, steamed ginseng and red ginseng. J. Ginseng Res. 41:361-369.
- Kim, J.M. and M.S. Shin. 2011. Characteristics of *Rubus Coreanus*

- Miq. fruits at different ripening stages. Korean J. Food Sci. Technol. 48(3):341-347.
- Kim, L.S., S.H. Youn and J.Y. Kim. 2014. Comparative study on antioxidant effect of extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43(9):1357-1362.
- Kim, Y.J., S.H. Han, J.Y. Jeon, M.H. Hwang, Y.J. IM, S.W. Chae and M.G. Kim. 2012. Method development of ellagic acid as marker compound for standardization of Gochang Bokbunja (*Rubus coreanus* Miquel) as functional ingredient. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 41(11):1554-1558.
- Lee, J.W. and J.H. Do. 2000. Chemical compounds and volatile flavor of *Rubus coreanum*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 13(5):453-459.
- Lee, K.H. and S.H. Kim. 2018. Comparison of ellagic acid contents in korean and chinese cultivated species of unripe Black Raspberries. Korean J. Food Preserv. 25(5):549-556.
- Ministry Food and Drug Safety (MFDS). 2019a. The Korean Pharmacopoeia (12th ed). Ministry Food and Drug Safety Cheongju, Korea. pp. 49-50 (in Korean).
- _____. 2019b. Guidelines for preparation of submission data for recognition of functional. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. pp. 25-32 (in Korean).
- _____. 2019c. Food Additives Code, Cheongju, Korea. pp. 1819-1971 (in Korean).
- Park, B.H., Chae K.Y. and J.S. Hong. 2008. Physicochemical characteristics of jujube concentrates prepared by boiling. J. East Asian Soc. Diet. Life. 18(2):190-197.
- Shin, K.S., P.J. Park, H.O. Boo, J.Y. Ko and S.S. Han. 2003. Chemical components and comparison of biological activities on the fruit of natural Bogbunja (*Rubus coreanus* Miquel). Korean J. Plant. Res. 16(2):109-117.

(Received 16 November 2020 ; Revised 16 March 2021 ; Accepted 18 March 2021)