

다양한 율피 원료 중 엘라그산 함량분석을 위한 분석법 검증

서수현¹ · 김보름¹ · 양세은² · 김정복^{1*}

¹유한대학교 건강생명학부 유한생명바이오학과
²(주)에니랩

Validation of Analytical Methods for Ellagic Acid Content Analysis of Various *Castanea crenata* Inner Shell Raw Materials

Su Hyeon Seo¹, Bo Reum Kim¹, Se Eun Yang², Jung Bok Kim^{1*}

¹Dept. of Yuhan Biotechnology, School of Bio-Health Sciences, Yuhan University Bucheon, Korea
²(Co.) Anylab, Seoul, Korea

(Received August 6, 2024/Revised September 30, 2024/Accepted October 7, 2024)

ABSTRACT - Ellagic acid is a polythene compound found in fruit and nutshell derived food extracts. According to previous reports, ellagic acid displays anticancer, anti-inflammatory, and antidiabetic effects. A major component of *castanea crenata* inner shell is ellagic acid. We confirmed the presence of ellagic acid in inner shell samples using solvents including distilled water, methanol, and ethanol. Ethanol and methanol yielded the best extraction results. In developing a high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-Vis spectrophotometer (UV/Vis) based analytical method for ellagic acid in foods, we found that a C18 column yielded the best resolution among all tested columns and mobile phases. We also performed method validation, including linearity, inter-day, intra-day, precision, accuracy, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). We established a calibration curve spanning 1 µg/mL to 50 µg/mL with a satisfactory coefficient of determination of 0.9999. The precision and accuracy of ellagic acid from spiked samples at levels of 2, 5, and 50 µg/mL ranged from 0.04 to 0.23% with relative standard deviations (RSD) between 99.8 and 105.9%. The detection limit was 0.165 µg/mL and the Limit of Quantitation was 0.499 µg/mL. The ellagic acid concentration in *C. crenata* inner shells was 0.002-0.0936 mg/g.

Key words: Ellagic acid, *Castanea crenata* inner shell, Method validation, HPLC-UV/vis

일반적으로 밤은 밤나무, 약밤나무 등 밤나무속 견과류로 구분되는 식물의 열매 중 하나이다. 밤나무의 눈은 4월경에 나오며 이후 약 2개월 간의 개엽 시기를 거쳐 개화시기를 갖은 후 9월 경에 열매를 맺는다. 국내 통계 자료에 의하면 한국은 중국에 이어 세계 밤 생산 2위 국가로 전 세계 밤 생산량의 7% 가량을 차지한다. 국내 밤 주요 산지는 부여, 공주, 충주, 청양, 하동, 합천 순으로 보고되었다¹⁾. Hong 등²⁾의 문헌에 의하면 밤의 주성분은 수

분 65.3%, 조단백질 6.6%, 조지방 0.9%, 조섬유 2.3%, 조회분 1.7% 내로 함유하고 있으며, 그 외 탄닌 성분의 경우 밤에 존재하는 polyphenol 화합물 중에 gallic acid가 가장 많은 것이라는 연구 결과가 보고되었다.

밤의 경우 한약재로도 사용되고 있는데 한의학에서는 만성 구토증과 당뇨병을 치료하고 위장과 신장을 튼튼하게 한다고 확인되었다. 특히 밤의 속껍질인 율피는 최근 다양한 건강기능식품으로 만들어 판매되어지고 있다. 너도밤나무과(Beech)의 다년생 초목인 밤나무 열매의 속껍질인 율피에는 탄올엑스를 함유하는 기능성 화합물의 약제학적 특성 및 피부생리 개선 효과, 미백제 탐색³⁾, 밤 열매와 밤 내피, 외피 추출물의 항균 효과⁴⁾가 있다고 보고되어져 있다. 또한 율피중 존재하는 gallic acid와 그 유도체들은 다양한 암세포에서 항암 효과가 있다고 보고 되었다⁵⁻⁷⁾. Gallic acid의 유도체 물질 중 하나인 ellagic acid는 건강에 유익한 효과를 나타 낼 수 있는 생물학적 활성이 있

*Correspondence to: Jung Bok Kim, Dept. of Yuhan Biotechnology, School of Bio-Health Sciences, Yuhan University Bucheon 14780, Korea
Tel: +82-2-2610-0872, Fax: +82-2-2610-0874
Email: amsam@yuhan.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

다고 여러 문헌에서 보고 되어져 있고, 특히 다양한 역학 및 실험 연구 결과에서 항암, 항염증, 항바이러스, 항균, 항동맥경화증, 항고혈압, 항고혈당, 심장 보호 및 항섬유증 작용 효과가 있다고 보고되었다⁸⁻¹⁴.

Ellagic acid의 국내외 연구 방법으로 율피, 솔잎, 호프에 존재하는 ellagic acid 분석을 위해 high-performance liquid chromatography (HPLC) UV-Vis에 cosmosil packed column (4.6×150 mm 5 μm)을 사용하였으며, 증류수와 methanol을 이동상으로 UV검출기(254 nm)를 이용해서 측정하였다. 율피중에 ellagic acid가 16.5% 존재한다는 것을 확인하였지만 분석법 검증의 미실시로 신뢰성 확보가 다소 어려운 것으로 확인된다¹⁵. Chae 등¹⁶은 복분자 중 존재하는 ellagic acid 분석을 위해 HPLC-photo diode array (PDA)에 Shiseido capcellpak C18 UG (4.6×250 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하였고, 0.1% phosphoric acid in water와 methanol의 gradient를 이용하여 370 nm에서 측정하였다. 그 결과 6.25-200 μg/mL 검량선 범위에서 결정계수(R²)가 0.9999, 검출한계는 0.6 μg/mL, 정량한계는 1.9 μg/mL로 확인되었다. Rakesh 등¹⁷은 ellagic acid RP-HPLC-PDA를 이용하여 분석한 결과 R²은 0.998이었고, 검출한계와 정량한계가 각각 0.66 μg/mL, 2.40 μg/mL로 지표성분 분석 가능한 농도를 확인하였다. Kim 등¹⁸은 고창 복분자 시료중 ellagic acid 분석을 위해 Symmetry® column (C18, 4.6×250 mm, 5.0 μm)을 이용하여 분석한 결과 limit of quality control (LOQ, 1 μg/mL), ellagic acid 가 1.918 μg/mg (0.192%), 회수율 확인 결과 89-97%로 확인되었다. 본 연구 결과들은 기존의 보고된 ellagic acid의 논문보다 효과적인 시료 전처리 유기 용매를 선정하고 실험하였으며, 검출한계와 정량한계 또한 기존 연구 논문보다 낮은 결과 값을 도출하여 미량으로 존재할 수 있는 건강기능식품 원료와 제품에서의 지표물질 분석이 가능하게 되었다. 유효성 검증을 위해 국내 외 다양한 method validation 가이드라인을 참고하여 여러가지 method parameter들을 적용하였고, 유효성을 검증하여 객관적이고 과학적인 실험 결과 도출을 통해 실험 과정과 실험 결과에서 분석 결과에 영향을 줄 수 있는 다양한 오차들의 종류와 값을 산출하여 보다 높은 신뢰성 있는 실험 결과를 도출하였다. 따라서 본 연구에서는 율피 속 ellagic acid의 시료 전처리와 유효성이 검증된 미량의 성분까지도 분석할 수 있는 분석법 확립을 통해 최근 건강기능식품의 원료, 완제품 개발, 품질관리에 이용될 수 있는 분석법의 활용 가능성을 제시하였다. 또한 다양한 추출 용매와 매트릭스를 적용하여 제품생산 비용 절감에 참고가 될 수 있는 객관적인 실험 결과를 도출하였다. 향후 본 연구 결과를 이용하여 ellagic acid 개별 성분에 대한 활성, 독성 연구, 기준규격 설정 및 관리의 참고자료로 사용될 수 있다고 판단된다.

Materials and Methods

시약 및 재료

분석법 개발과 정량분석에 사용된 표준품은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)사에서 ellagic acid를 구입하여 사용하였다. 시료 전처리 및 분석에 사용한 methanol은 J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA)사에서 제조한 HPLC 등급을 구매하여 사용하였다. 이동상 제조에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich사에서 판매되는 phosphoric acid 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외 시험에 사용된 일반 시약들은 특급 시약 및 HPLC 등급을 사용하였다. 본 연구 결과인 증류수와 유기용매인 methanol, ethanol의 함량과 ellagic acid의 함량을 비교하기 위해 엑셀을 이용하여 반복 횟수의 평균과 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD)의 결과를 산출하였다.

시료구입 및 시료 전처리 방법

본 실험에서 사용된 밤과 율피, 율피 가루는 2023년 10월 서울 소재 전통 및 약령시장에서 구입하였다. 실험에서 사용된 밤 품종은 국내에서 소비되는 품종으로 서산, 옥광, 이평, 석추, 중국산을 구입하여 사용하였고, 가공된 율피와 율피가루의 원산지는 공주, 아산지역의 제품을 구입하여 실험을 진행했다. 구입된 밤에 제 실험재료인 율피를 얻기 위해 겉껍질을 제거한 후 율피를 채취하여 드라이오븐 80-85°C에서 48시간 건조된 시료를 마이크로 분쇄기(POLYMIX PS-MFC 90D, Kinematic AG, Malterns, Switzerland)를 이용해 균질화를 시행한 후 시험재료로 사용하였다. 건조된 율피와 가공된 율피 분말 0.5 g 칭량 후 10 mL 부피플라스크에 methanol 또는 ethanol을 이용하여 30분간 초음파추출 하였다. 추출 후 상등액을 0.45 μm membrane filter를 이용하여 여과 후 HPLC에 주입하였다.

기기분석 조건

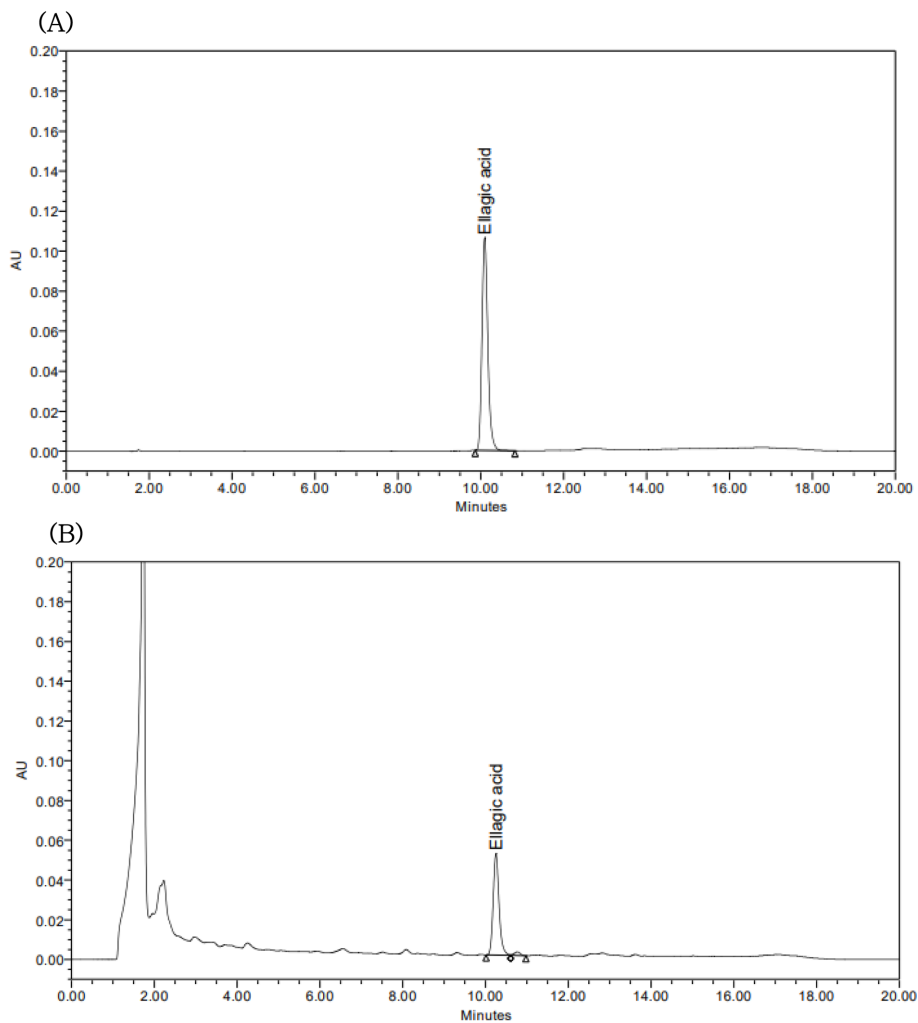
율피 중의 ellagic acid의 정량분석을 위한 HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 분석을 위해 사용한 HPLC는 Waters (Arc, Milford, MA, USA)사 HPLC 제품을 이용하였다. 분석용 컬럼은 Aegispak C18-L (4.6×150 mm, 5 μm, Aegispak, Seongnam, Korea)을 사용하였고, 이동상은 A (1.2% phosphoric acid in DW)와 B (methanol)를 이용하여 최초 B용매(methanol) 농도를 30%로 시작하여 15.0분 60%, 15.1분까지 B용매를 30%로 유지하는 gradient 방법을 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 10 μL, 컬럼 온도는 35°C이었다(Table 1). Fig. 1과 같이 표준용액과 시료 중 존재하는 ellagic acid의 retention time은 10 분으로 확인되었다.

시험법 유효성 검증

본 연구에서는 matrix 선정을 위해 시중에 유통되고 있

Table 1. Instrumental conditions of ellagic acid with HPLC-UV/Vis

HPLC	Column	Aegispak C18-L (4.6×150 mm, 5 μm)				
	Oven temp.	35°C				
	Mobile phase	A: 1.2% phosphoric acid in DW B: Methanol				
	Gradient	Time (min)	0.0	15.0	15.1	20.0
		A (%)	70	40	70	70
		B (%)	30	60	30	30
	Flow rate	10 mL/min				
	Injection vol.	10 μL				
	Detector	254 nm				

**Fig. 1.** Chromatogram of ellagic acid standard 5 μg/mL (A) and sample (B) with HPLC-UV/Vis.

는 시료를 분석하였고, 선택성과 특이성이 확보된 시료를 공시료인 blank로 선정하여 International Conference on Harmonization (ICH) 가이드라인 등 국내외 가이드라인에 따라 method validation을 실시하였다^{19,20}. 분석 물질과 matrix의 방해와 간섭을 확인하기 위해 유효성 검증 항목

으로 선택성, 특이성, 직선성, 정밀성, 정확도 및 검출한계와 정량한계를 확인하였다. 정확도와 정밀도를 산출하기 위해 검량선내 서로다른 농도 3가지를 선택하여 일내와 일간 총 3일에 걸쳐 분석한 결과의 평균으로 정확도를 산출하였고 상대표준편차를 이용하여 정밀도를 측정하였다.

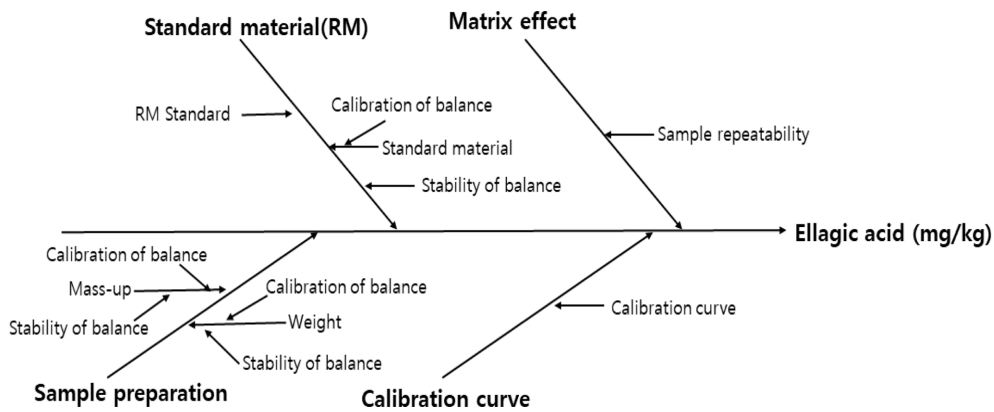


Fig. 2. Fish bone diagram of uncertainty.

또한 검출한계와 정량한계의 경우 임의의 저농도를 선정하여 7회 반복 분석한 표준편차를 이용하여 검출 한계는 $3.3 \times \text{표준편차/기울기}$, 정량한계는 $10 \times \text{표준편차/기울기}$ 식으로 산출하였다. 또한 율피 중에 존재하는 ellagic acid 성분의 측정불확도 산출을 위해 시험과정과 결과도출 과정에서 발생하는 다양한 오차들을 불확도 요인으로 선정하였다. 본 연구에서의 불확도 요인은 표준품의 순도, 표준품의 제조, 검량선 3가지 농도, 검량선(회귀분석), 시료의 반복 측정 등 총 6가지와 그 세부적인 내용으로 Fig. 2와 같이 설정하였다. 불확도 요인들의 유효자유도와 표준불확도를 산출하여 연산을 통해 합성 측정불확도를 산출하는 방법을 이용하였다. 합성 불확도를 포함인자를 이용한 확장 불확도로 산출하여 율피 중 ellagic acid 정량분석 결과에 측정 불확도로 적용하였다²¹⁻²³. 증류수와 유기용매인 methanol, ethanol의 함량과 ellagic acid의 함량을 비교하기 위해 해당 용매를 이용하여 3회 반복 추출과 분석을 실시하였고, 평균과 상대표준편차(RSD) 결과를 비교 검토하였다.

Results and Discussion

추출 용매별 실험결과

유기용매와 증류수 비율에 따른 원료에 존재하는 유효성분의 추출 결과는 건강기능식품의 제품화를 위한 공정 단순화와 비용 절감에 중요한 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 율피에 존재하는 목적 성분인 ellagic acid를 추출하기 위해 100% methanol을 포함한 다양한 증류수와 유기용매 비율을 사용하여 실험을 수행하였다. 실험을 위해 시료는 총칭복도의 원산지를 가지고 있는 석추 품종을 이용하여 추가적인 유기용매별 차이를 실험하였다. Table 5의 결과에서 율피 중에 존재하는 ellagic acid의 함량은 100% methanol에서 0.077 mg/g으로 가장 높게 검출되었고, 50% methanol과 ethanol에서 0.048 mg/g, 증류수에서는 0.011 mg/g로 확인되었다. 유기용매의 비율이 낮을수록

ellagic acid의 함량이 일정하게 적어지는 것을 확인하였다 (Table 6). 본 실험 결과를 바탕으로 제품화에 필요한 유기용매 선택에 참고 자료가 될 수 있다.

시료전처리 및 분석법 확립

국내에 유통되고 있는 시료 8가지 품종의 분석 시료인 율피를 얻기위해 길썩질을 제거한 후 율피를 채취하여 드라이오븐 80-85°C에서 48시간 건조된 시료를 마이크로 분쇄기를 이용해 가루화 하여 시험재료로 사용하였다. 건조된 율피와 가공된 율피 분말 0.5 g 칭량 후 10 mL 부피플라스크에 methanol 등 다양한 유기용매를 이용하여 30분간 초음파추출을 하였다. 추출 후 상등액을 0.45 μm membrane filter를 이용하여 여과 하는 방식을 이용하여 시료 전처리를 하였다. Ellagic acid의 함량을 측정하기위해 다양한 이동상 용매와 조건을 확인하였다. 특히 본 연구에서는 이동상 A (1.2% phosphoric acid in DW)와 B (methanol)를 이용하여 최초 B용매(methanol) 농도를 시간대비 조성변화를 이용하는 gradient를 사용하여 짧은 시간에 ellagic acid의 정성 및 정량분석이 가능한 분석조건을 확립하였다. 또한 건강기능식품의 제조 비용 절감을 위해 다양한 용매와 용매 농도별 시험을 진행한 결과 ellagic acid의 함량은 100% methanol에서 가장 높게 검출되었고 증류수에서는 ellagic acid의 함량이 가장 낮게 측정되었다. 또한 유기용매의 농도 비율별 시험결과 유기용매의 비율이 낮을수록 ellagic acid의 함량이 낮아지는 결과를 확인하였다.

선택성 및 특이성

국내의 유통되고 있는 율피 시료를 이용하여 blank로 선정하였고, 유효성과 신뢰성이 확보된 시료전처리와 분석법을 적용하여 분석물질 주변의 피크간섭과 matrix effect를 확인하여 선택성과 특이성을 확인하였다.

직선성

확립된 시료 전처리법을 이용하여 ellagic acid가 검출되

Table 2. Linearity result of ellagic acid in matrix

Day	Conc. ($\mu\text{g/mL}$, n=3)				
	1	2	10	20	50
1 day	1.11	2.33	10.41	20.53	50.22
2 day	1.13	2.36	10.54	20.82	50.96
3 day	1.11	2.35	10.46	20.72	51.05
Mean	1.12	2.35	10.47	20.69	50.74
SD	0.01	0.02	0.06	0.14	0.45
Precision (%)	0.9	0.8	0.6	0.7	0.9
Accuracy (%)	111.5	117.3	104.7	103.5	101.5

Day	R^2	Slope	Intercept	LOD	LOQ
				Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	
1 day	0.9999	185887.3	59930.9		
2 day	0.9999	188611.2	58853.6	0.165	0.499
3 day	0.9999	189048.7	47080.1		

지 않은 시료에 ellagic acid를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도의 stock solution을 이용하여 5가지의 농도로 희석하여 검량선 용액으로 사용하였다. 검량선의 농도 범위는 1-50 $\mu\text{g/mL}$ 였고, HPLC를 이용하여 3회 반복 분석한 결과 $R^2=0.9999$ 이상의 직선성을 나타내었으며, 검량선 각각의 농도에 대한 정밀도는 0.9% 이하로 확인되었고, 정확도는 101.5-117.3%로 나타났다. 검출한계는 0.165 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 0.499 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Table 2).

일내, 일간 정밀성 및 정확성

검량선 내 서로 다른 농도 3가지 5, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 이용하여 3회 반복 분석하여 일내, 일간 정밀도와 정확도를 측정하였다. 일내 정밀도는 0.09-0.18%, 정확도는 99.9-105.8%로 확인되었다. 일간 정밀도는 0.04-0.23%, 정확도는 99.8-105.9%로 확인되었다(Table 3).

측정불확도 산출결과

유효 증에 존재하는 ellagic acid 함량분석을 위한 측정

불확도를 산출하기 위해 설정된 불확도 요인은 총 6가지로 표준품의 순도, 표준품의 제조, 검량선 3가지 농도, 검량선(회귀분석), 시료의 반복 측정으로 불확도 요인을 설정하였다. 설정된 불확도 요인별 표준 불확도의 유효자유도를 산출하여 합성상대표준불확도, 합성표준불확도를 산출하였고, 이 결과에 포함인자(K)를 적용하여 확장 불확도를 산출하였다. 그 결과 ellagic acid의 측정 불확도는

Table 3. Result of accuracy and precision in intra and inter-day

Type	QC Conc. $\mu\text{g/mL}$ (n=3)		
	5	20	50
Mean (n=3)	5.3	20.1	49.9
Intra-day Precision (%)	0.18	0.17	0.09
Accuracy (%)	105.8	100.5	99.9
Mean (n=3)	5.3	20.2	49.9
Inter-day Precision (%)	0.23	0.23	0.04
Accuracy (%)	105.9	100.8	99.8

Table 4. Expanded uncertainty of ellagic acid

Parameters of Uncertainty	Result	Unit
Certified Concentration	0.40	mg/kg
The result of uncertainty	0.40 \pm 0.01 (k=2, 95% confidence level)	mg/kg
Expanded uncertainty (U)	0.01	mg/kg
Coverage factor (k)	2	dimensionless unit
Degrees of freedom (veff)	1840	dimensionless unit
Combined Standard Uncertainty (uc)	0.01	mg/kg
Combined relative Standard Uncertainty (ur/r)	0.018	dimensionless unit

Table 5. Information and ellagic acid of samples (n=3)

Sample	Sample name	Conc.(mg/g) n=3	RSD%
Sample 1	Chestnut 1	0.0308	0.12
Sample 2	Chestnut 2	0.0267	0.12
Sample 3	Chestnut 3	0.0767	0.09
Sample 4	Chestnut 4	0.0483	0.13
Sample 5	Dryed <i>Castanea crenata</i> inner shell form Seo-san	0.0936	0.15
Sample 6	Dryed <i>Castanea crenata</i> inner shell form Gong-gju	0.0002	2.96
Sample 7	<i>Castanea crenata</i> inner shell Powder form Asan	0.0720	0.08
Sample 8	Health functional food product	0.0236	0.08

Table 6. Result of ellagic acid in solvents (n=3)

No	Solvents	Average of ellagic acid Conc. ($\mu\text{g/mL}$) n=3	RSD (%)
1	D.W ^{a)}	0.011	0.1
2	100% MeOH ^{b)}	0.077	1.0
3	10% MeOH ^{c)}	0.017	0.3
4	20% MeOH ^{d)}	0.018	2.1
5	50% MeOH ^{e)}	0.048	0.3
6	10% EtOH ^{f)}	0.012	2.7
7	20% EtOH ^{g)}	0.020	2.0
8	50% EtOH ^{h)}	0.048	0.7

^{a)} 100% Distilled water (H₂O).

^{b)} 100% Methanol.

^{c)} H₂O:Methanol=90:10(v/v).

^{d)} H₂O:Methanol=80:20(v/v).

^{e)} H₂O:Methanol=50:50(v/v).

^{f)} H₂O:Ethanol=90:10(v/v).

^{g)} H₂O:Ethanol=80:20 (v/v).

^{h)} H₂O:Ethanol=50:50(v/v).

0.40±0.01 mg/kg (신뢰수준 95%, K=2)로 비교적 낮은 측정불확도 값을 산출하였다(Table 4).

시료분석 및 추출 용매별 결과

국내에 유통되고 있는 시료 8가지 품종의 정보는 Table 5과 같이 정리하였고, 확보된 시료를 분석한 결과 Table 5와 같이 총 8종 시료에서 ellagic acid의 함량은 0.0002-0.0936 mg/g, RSD%는 0.08-2.96%로 확인되었다. 또한 Table 6과 같이 추출 유기용매별 실험결과 0.011-0.077 $\mu\text{g/mL}$ (n=3), RSD%는 0.1-2.7%로 확인되었다(Table 6).

Conclusions

현재 율피를 이용하여 다양한 건강기능식품이 개발되고 있다. 현재 건강기능식품 공전에서는 율피 중에 존재하는

ellagic acid 함량 분석의 대한 시험법이 부재한 상황이다. 따라서 율피를 이용하여 다양한 효과와 효능을 가진 건강기능식품을 제조자와 품질관리에 필요한 유효성과 신뢰성이 검증된 분석법이 필요한 실정이다. 기존 문헌들에서는 함량분석 위해 일부 유효성 검증을 시도하였지만 정량 분석을 위해 다소 미비하고 그 한계성이 확인되었다. 또한 건강기능식품 제조에 있어 필수적인 추출 용매의 다양성이 정보가 부족한 상황이다. 국내에서 생산되는 다양한 품종의 율피 중에 존재하는 ellagic acid 함량에 대한 본 연구의 조사 결과를 토대로 원료 선정의 문제점 해결에 참고 자료가 될 수 있다. 다양한 유효성 검증 요소의 확대 적용을 통해 확립된 분석법을 적용하여 다양한 율피 중에 존재한 ellagic acid의 정량분석을 수행할 수 있다. 이는 율피를 이용한 원료 선정과 제품화 비용 절감을 위해 추출 용매 및 향후 전임상과 임상에 사용될 ellagic acid의 함량 분석의 참고 자료가 될 수 있다.

Acknowledgement

본 과제는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학연협력 선도전문대학 육성사업(LINC 3.0)의 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 기존 율피 중에 존재하는 ellagic acid 정량 할 수 있는 분석법을 확립하였다. 본 실험에서 사용된 밤과 율피, 율피 가루는 2023년 10월 서울 소재 전통 및 약령시장에서 구입하였다. 실험에서 사용된 밤 품종은 국내에서 소비되는 품종으로 서산, 옥광, 이평, 석추, 중국산을 구입하여 사용하였고, 가공된 율피와 율피가루의 원산지는 공주, 아산지역의 제품을 구입하여 실험을 진행했다. 율피중에 존재하는 ellagic acid의 함량은 100% methanol에서 0.077 mg/g으로 가장 높게 검출되었고, 50% methanol

과 ethanol에서 0.048 mg/g, 증류수에서는 0.011 mg/g로 확인되었다. 유기용매에 비율이 낮을수록 ellagic acid의 함량은 순차적으로 줄어들음을 확인하였다. Waters사의 HPLC 이용하였으며 분석용 컬럼은 Aegispak C18-L을 사용하였고, 이동상은 A (1.2% phosphoric acid in DW)와 B (methanol)를 이용하여 gradient 를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 10 µL, 컬럼 온도는 35°C이었다. 검량선 작성을 위해 1-50 g/mL 범위에서 상관관계수(R²) 0.9999 이상의 직선성을 확인하였다. 검량선내 3개 농도를 이용하여 정밀도와 정확성을 측정된 결과, 일내 정밀도는 0.09-0.18%, 정확도는 99.9-105.8%, 일간 정밀도는 0.04-0.23%, 정확도는 99.8-105.9% 범위내로 확인되었다. 국내에 유통되고 있는 시료 8가지 품종의 정보는 Table 10과 같이 정리하였고, 확보된 시료를 분석한 결과 총 8개 시료에서 ellagic acid의 함량은 0.0002-0.0936 mg/g로 확인되었다. Ellagic acid의 검출 한계는 3개 시료에서 검출한계 0.016 µg/mL, 정량한계 0.499 µg/mL로 확인되었다. Ellagic acid 측정 불확도 산출 결과 0.40±0.01 mg/kg (신뢰수준 95%, K=2)로 비교적 낮은 측정불확도 값을 산출하였다. 따라서 본 연구에서는 율피 중 ellagic acid 정성 및 정량분석을 위해 유효성이 검증된 분석법 확립으로 인하여 율피 중 ellagic acid의 기준규격 설정 및 관리에 참고 자료가 될 수 있고, 향후 ellagic acid를 이용한 건강기능식품 개발에 있어 품종, 지역 및 추출용매에 따른 실험결과를 바탕으로 건강기능식품 기준규격 관리와 활성 및 독성시험 연구의 근거 자료가 될 수 있다고 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Su Hyeon Seo <https://orcid.org/0009-0005-6130-896X>
 Bo Reum Kim <https://orcid.org/0009-0008-7529-9541>
 Se Eun Yang <https://orcid.org/0009-0000-6716-0912>
 Kim Jung Bok <https://orcid.org/0009-0007-8738-3970>

References

- Lee, E.H., Hong, S.H., Cho, Y.J., Biological activities of extracts from Okkwang (*Castanea crenata*) chestnut bur. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **46**, 572-580 (2017).
- Jeon, H.N., Park, H.W., Kim, D.H., Comparative analysis of Gallic acid content by chestnut varieties. *JKAIS*, **21**, 362-368 (2020).
- Yang, M.J., Kim, M.G., Lim, S., Ann, H.S., Ahn, R.M., Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis.

Yakhak Hoeji, **43**, 494-501 (1999).

- Cha, B.C., Lee, H.W., Choi, M.Y., Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 28-34 (1998).
- Serrano, A., Palcios, C., Roy, G., Cespon, C., Vilar, M.L., Nocito, M., Gonzalaz-Porque, P., Derivatives of gallic acid induce apoptosi in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **350**, 49-54 (1998).
- Yoshika, K., Katoka, T., Hayashi, T., Hasegawa, M., Ishi, Y., Hibasami, H., Induction of apoptosi by gallicacid in human stomach cancer KATO II and colon adenocarcioma COLO cell lines. *Oncol. Rep.*, **7**, 1221-1223 (2000).
- Salucci, M., Stval, L.A., Maini, G., Bugianesi, R., Vannii, V., Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcioma cels. *Br. J. Cancer*, **86**, 1645-1651 (2002).
- González-Sarrías, A., Miguel, V., Merino, G., Lucas, R., Morales, J.C., Tomás-Barberán, F., Álvarez, A.I., Espín, J. C., The gut microbiota ellagic acid-derived metabolite urolithin A and its sulfate conjugate are substrates for the drug efflux transporter breast cancer resistance protein (ABCG2/BCRP). *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 4352-4359 (2013).
- Rogerio, A.P., Fontanari, C., Borducchi, É., Keller, A.C., Russo, M., Soares, E.G., Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H., Anti-inflammatory Effects of lafoensia pacari and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur. J. Pharmacol.*, **580**, 262-270 (2008).
- Goodwin, E.C., Atwood, W.J., DiMaio, D., High-throughput cell-based screen for chemicals that inhibit infection by simian virus 40 and human polyomaviruses. *J. Virol.*, **83**, 5630-5639 (2009).
- Nohynek, L.J., Alakomi, H.L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.M., Puupponen-Pimiä, R.H., Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr. Cancer*, **54**, 18-32 (2006).
- Lall, R.K., Syed, D.N., Adhami, V.M., Khan, M.I., Mukhtar, H., Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 3350-3376 (2015).
- Santos, I.S., Ponte, B.M., Boonme, P., Silva, A.M., Souto, E.B., Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. *Biotechnol. Adv.*, **31**, 514-523 (2013).
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U., Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, **21**, 901 (2016).
- Oh, S.H., Kim, Y.W., Kim, M.A., The antioxidant activities of acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop. *Korean J. Food Culture*, **19**, 399-406 (2004).
- Chae, K.S., Son, R.H., Park, S.Y., Kim, K.A., Lee, T.B., Kwon, J.W., Analytical method validation of ellagic acid as a marker compound for the standardization of black raspberry extract as a functional ingredient. *Food Eng. Prog.*, **18**, 355-358 (2014).
- Patel, R.K., Patel, V.R., Patel, M.G., Development and vali-

- dation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of embelin, rottlerin and ellagic acid in vidangadi churna. *J. Pharm. Anal.*, **2**, 366-371 (2012).
18. Kim, Y.J., Han, S.H., Jeon, J.Y., Hwang, M.H., Im, Y.J., Chae, S.W., Kim, M.G., Method development of ellagic acid as marker compound for standardization of gochang bok-bunja (*Rubus coreanus* Miquel) as functional ingredient. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**, 1554-1558 (2012).
 19. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2013. Korea food additives code, Part 7. practical commentary on residual pesticide analysis methods method validation, MFDS, Cheongju, Korea.
 20. International Conference on Harmonization (ICH), (2024, September 30). International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH), Q2 (R1): validation of analytical procedure: text and methodology. Retrieved from <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
 21. International Organization for Standardization (ISO), (1993). Guide to the expression of uncertainty in measurements, ISO, Geneva, Switzerland.
 22. National Institute of Standards and Technology (NIST), 1993. Guideline for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results. NIST Technical Note 1297, NIST, Gaithersburg, MD, USA.
 23. Eurachem, 2000. Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2nd ed, Eurachem, London.