pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 4, pp. 216~224 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.4.216

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

발효노니 다당체 분말의 deacetylasperulosidic acid, 총당 및 단당류 분석법 검증

권희연 · 최지수 · 김수진 · 김은민 · 엄지현 · 김보경 · 이재연 · 김용덕*
(주)NST바이오

Validation of an Analytical Method for Deacetylasperulosidic acid, Total Sugar and Monosaccharide Analysis in Fermented *Morinda citrifolia* Polysaccharide Powder

Heeyeon Kwon, Jisoo Choi, Soojin Kim, Eunmin Kim, Jihyun Uhm, Bokyung Kim, Jaeyeon Lee, Yongdeok Kim*
NSTBIO Co., Ltd., Incheon, Korea

(Received July 04, 2022/Revised July 20, 2022/Accepted July 26, 2022)

ABSTRACT - This study was aimed at validating the analysis methods for deacetylasperulosidic acid (DAA), total sugar, galacturonic acid, glucose, and galactose, which are the indicator components of fermented *Morinda citrifolia* polysaccharide extract (Vitalbos). We modified the previously reported methods for validating the analytical methods. The specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) were measured using phenol-sulfuric acid method and high-performance liquid chromatography (HPLC). The retention time and spectrum of the standard solution of Vitalbos coincided, confirming the specificity. The calibration curve correlation coefficient (R^2), of five indicator components, ranged from 0.9995–0.9998, indicating excellent linearity of 0.99 or more. The intra-day and inter-day precision range of the assay was 0.14–3.01%, indicating a precision of less than 5%. The recovery rate was in the range of 95.13–105.59%, presenting excellent accuracy. The LOD ranged from 0.39 to 0.84 μg/mL and the LOQ ranged from 1.18 to 2.55 μg/mL. Therefore, the analytical method was validated for DAA, total sugar, galacturonic acid, glucose, and galactose, in Vitalbos. The indicator component content in Vitalbos was determined using a validated method. The contents of DAA, total sugar, galacturonic acid, glucose, and galactose were 2.31±0.06, 475.92±5.95, 72.83±1.05, 71.63±2.44, and 67.30±2.31 mg/g of dry weight, respectively. These results suggest that the developed analytical method is efficient and could contribute to the quality control of Vitalbos, as a healthy functional food material.

Key words: Method validation, Deacetylasperulosidic acid, Monosaccharide, Polysaccharide, *Morinda citrifolia*

*Morinda citrifolia*는 동남 아시아, 남태평양, 중앙아메리카 등 열대 기후에 자생하는 열매를 맺는 다년생 식물이다[1]. 노니라고 널리 알려져 있으며 잎과 열매 모두 전통 폴리네시아 의학에서 다양한 질병을 치료하는데 오랜 기간 사용되어오고 있다[2]. 노니에는 gallic acid, chlorogenic acid, catechin, rutin 등 페놀 및 플라보노이드계 화합물들이 풍부하게 존재하여 항산화 활성이 우수하다고 보고되었으며[3,4], 최근에는 노니의 항암[5], 항박테리아[6], 간 보호[7], 면역 증진[8] 등 다양한 생리활성 기능이 보고되며 건강기능식품 소재로서의 이용 가능성이 높이 평가되고 있다. 특히 노니의 주요 지표성분으로 deacetylasperulosidic acid (DAA), asperulosidic acid (AA) 등의 iridoid계 화합물과 coumarin계의 scopoletin을 함유하고 있으며[4,9], 이러한 iridoid계 성분들은 항비만[10], 면역 증진[11], 항당뇨[12] 등에 우수한 효능을 나타낸다고 보고된 바 있다.

천연물 내 존재하는 다당체(polysaccharides)는 우수한 면역조절 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 이러한 면역

*Correspondence to: Dr. Yongdeok Kim, NSTBIO, Incheon, 21984, Korea
Tel: +82-32-715-5912, Fax: +82-32-715-5913
E-mail: ydkim@nstbio.co.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.

증진 작용은 다당체의 분자 구조와 연관이 깊다[13]. 고분자 다당체는 toll like receptor 4 (TLR 4)와 같은 면역세포 표면의 수용체에 쉽게 결합하여 내부 신호전달을 자극시키고 염증성 cytokine의 분비 촉진, T세포 및 B세포의 활성화를 일으킨다[14]. 다당체의 면역기능 증진에 대한 우수성이 널리 알려짐에 따라 옥수수 부산물[15], 알로에[16], 황기[17], 영지버섯[18], 홍삼[19] 등 다양한 천연물로부터 분리한 다당체를 이용한 다양한 연구들이 수행되고 있다.

본 연구진은 발효노니로부터 다당체 추출 조건을 최적화한 발효노니 다당체 추출물(Vitalbos)를 개발한 바 있으며, 이에 대하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 면역활성이 우수함을 확인한 바 있다[20]. 천연물 유래 건강기능식품 개발을 위하여 기능성 원료에 대한 원료 표준화 및 규격 설정이 필요하다. 그중 소재의 유효성과 안전성을 관리하기 위하여 지표성분의 함량을 통한 품질 관리가 중요하며, 분석 방법의 신뢰성 검증을 위한 시험법 validation이 매우 중요하다.

따라서 본 연구에서는 면역 활성 증진 효능을 갖는 Vitalbos를 건강기능식품 소재로 활용하기 위해 DAA, 총당 함량, 단당류 3종(galacturonic acid, glucose 및 galactose)을 지표성분으로 설정하고, 지표성분에 대한 효과적인 분석법 설정 및 validation을 실시하였다.

Materials and Methods

실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 발효노니 다당체 추출 분말(Vitalbos)은 인도네시아 자바섬에서 수확되었으며 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 깨끗이 세척한 노니 열매 1,000 kg을 0.2% *Lactobacillus brevis* (NST707)을 이용하여 37±2°C에서 2주간 발효시켰다. 이후 발효물을 여과하여 불순물을 제거하고 농축하여 발효노니 추출물(10 Brix)을 제조하였다. 발효노니 추출물 180 L를 95% 에탄올 720 L와 혼합 후 24±2°C에서 24시간 동안 정치하여 다당체를 침전시켰다. 상등액을 제거하고 정제수 100 L를 첨가하여 다당체를 완전히 용해시키고 동결건조한 것을 최종시료로 하였다.

DAA 표준물질은 Phytolab (St. Dutendorfer, Vestenbergsgreuth, DE)에서 구입하였으며 galacturonic acid, glucose, galactose, phenol, formic acid, phosphoric acid 및 3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP)은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA.)에서 구입하였다. Sulfuric acid는 Duksan Co., Ltd. (Ansan, Korea), sodium acetate는 Samchun Co., Ltd. (Seoul, Korea)에서 구입하였으며 trifluoroacetic acid는 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였다. Acetonitrile 및 methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

표준용액 및 시험용액의 조제

DAA 0.01 g을 micro balance (AND, HR-202i, Japan)로 정밀히 칭량하여 10 mL 부피플라스크에 넣고 methanol로 정용하여 sonicator (Hwashin Tech Co., Ltd., SONIC420, Korea)에서 완전히 용해시켜 사용하였다. Galacturonic acid, glucose 및 galactose 표준용액과 Vitalbos는 0.1 g을 micro balance로 정밀히 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣고 증류수로 정용하여 sonicator에서 완전히 용해시켜 사용하였다.

Deacetylasperulosidic acid 분석

Deacetylasperulosidic acid의 HPLC 분석을 위하여 Kim 등[21]의 방법을 변형하여 분석법을 확립하였다. 분석에는 Shimadzu HPLC system과 Shimadzu SPD-M20A Photodiode Array Detector (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)을 사용하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다. 분석용 column은 Symmetry C18 (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하여 분석하였다.

Table 1. HPLC conditions for deacetylasperulosidic acid analysis

Instrument	Conditions		
Column	Symmetry C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm), Waters Corporation		
Column temp.	25°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	A[a] (%)	B[b] (%)
	0	100	0
	5	100	0
	40	65	35
Detector	Shimadzu SPD-M20A Photodiode Array Detector (235 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	5 μL		
Run time	40 min		

[a] 0.1% formic acid in Water.
[b] Acetonitrile.

총당 함량 분석

총당 함량 분석을 위하여 Saha & Brewer[22]의 페놀-황산법을 변형하여 분석법을 확립하였다. Vitalbos 및 농도별 glucose 표준액을 0.1 mL씩 1.5 mL tube에 넣고 5% phenol 용액 0.1 mL을 넣어 혼합하였다. 이후 진한 황산 0.5 mL을 넣고 20분간 정치시킨 뒤 10분간 방냉한 것을 microplate reader (Molecular Devices Ltd., ASV11D, San Jose, CA, U.S.A.)에서 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단당류 3종(galacturonic acid, glucose, galactose) 분석

Galacturonic acid, glucose 및 galactose의 HPLC 분석을 위하여 Honda 등[23]의 PMP 유도체화 방법을 변형하여 분석법을 확립하였다. 시료의 가수분해를 위하여 갈색 시약병에 시료 50 mg을 정밀히 칭량한 후 2 M trifluoroacetic acid 3 mL을 첨가하여 dry oven (SallyGen, SG-150DO, Korea)으로 100°C에서 8시간 동안 가열하였다. 방냉 후 2 M NaOH 용액으로 pH를 7.0까지 보정한 뒤 50 mL로 정용한 것을 시료로 하였다. 가수분해된 시료 및 농도별 단당류 표준용액을 0.2 mL씩 1.5 mL tube에 첨가한 후 0.5 M PMP-MeOH 용액 0.2 mL 및 0.3 M NaOH 0.2 mL을 첨가하여 혼합하였다. Water Bath (SallyGen, SG-150DO, Korea)로 70°C에서 1시간 반응시키고 실온방냉하였다. 고형물이 생성되도록 0.3 M HCl 0.2 mL을 첨가하여 혼합 후, chloroform 0.4 mL을 첨가하여 교반하였다. 원심분리기 (Hanil Scientific Inc., Combi 514R, Korea)로 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 0.45 μm PVDF membrane으로 여과한 것을 분석시료로 하였다. 분석에는 Shimadzu HPLC system과 Shimadzu SPD-20A Ultraviolet/vis Detector (Shimadzu Corp.)을 사용하였으며, 분석조건은 Table 2와 같다. 분석용 column은 X-bridge C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm), Waters Corporation을 사용하여 분석하였다.

분석법 유효성 검증

분석법의 유효성 검증(Method validation)은 ICH (International Conference for Harmonization) 가이드라인을 근거로 하여 직선성(Linearity), 특이성(specificity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 분석하여 검증하였다[24].

검증된 분석법을 바탕으로 Vitalbos 내의 지표성분인 DAA, 총당 함량, 단당류 3종(galacturonic acid, glucose 및 galactose)의 함량을 측정하였다.

특이성

DAA, galacturonic acid, glucose 및 galactose 분석방법의 특이성을 평가하기 위하여 HPLC에 주입된 시료에서 시험물질 peak 위치에 간섭하는 peak의 존재 여부를 확인하였다. 시험은 표준 sample로부터 chromatogram을 얻고, 시험물질이 포함된 sample의 chromatogram과 비교하여 시험물질의 머무름시간 근처에 간섭 peak의 존재 여부와 PDA spectrum을 통해 동일한 spectrum을 나타내는지를 확인하였다.

직선성

분석방법의 직선성은 농도별로 조제한 검량선 시료로부터 얻은 chromatogram에서 시험물질의 peak 면적을 시험물질의 농도에 대한 계산식으로 산출하여 평가하였다. 모든 분석은 3회 진행하였으며 최소차승법으로 계산한 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통해 직선성을 검증하였다. DAA 표준물질은 7.34, 14.69, 29.38, 58.75, 117.5,

Table 2. HPLC conditions for galacturonic acid, glucose and galactose analysis

Instrument	Conditions		
Column	X-bridge C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm), Waters Corporation		
Column temp.	40°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	A[a] (%)	B[b] (%)
	0	50	50
	2	50	50
	2	0	100
	50	0	100
Detector	Shimadzu SPD-M20A Photodiode Array Detector (245 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	50 min		

[a] 10% Acetonitrile / 90% 100 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0, adjusted with phosphoric acid).
[b] 20% Acetonitrile / 80% 100 mM Sodium acetate buffer (pH 5.0, adjusted with phosphoric acid).

235 μg/mL의 농도로 제조하였고, 총당 함량 측정을 위한 glucose 표준물질은 31.19, 62.38, 124.75, 249.5, 499 μg/mL의 농도로 제조하여 사용하였다. 단당류 HPLC 분석을 위한 galacturonic acid는 3.56, 7.11, 14.22, 28.44, 56.88, 113.75 μg/mL, glucose는 3.90, 7.81, 15.61, 31.22, 62.44, 124.88 μg/mL, 그리고 galactose는 3.89, 7.77, 15.55, 31.10, 62.19, 124.38 μg/mL의 농도로 제조하여 분석에 사용하였다.

정밀성 및 정확성

분석방법의 정밀성 및 정확성은 일내(intra-day), 일간(inter-day)에서 조제한 검량선의 농도를 반복 분석하여 얻어진 정량값의 변동계수(%)로 평가하였다. 일내 3회 분석을 수행하여 일내 정밀성을 평가하고, 일간 3회 이상의 시료를 분석하여 정밀성을 평가한다. 정확성은 측정된 정량값이 이론값과 비교하여 80-120% 이내의 값을 나타내는지 평가하였다. 농도를 알고 있는 Vitalbos에 농도별 표준용액을 각각 첨가해 일내 및 일간 정밀성 및 정확성을 측정하였다. DAA는 14.69, 58.75, 235 μg/mL, 총당 함량 측정을 위한 glucose 표준물질은 31.19, 124.75, 499 μg/mL 농도로 측정하였다. 단당류 HPLC 분석을 위한 galacturonic acid는 7.11, 28.44, 113.75 μg/mL, glucose는 7.81, 31.22, 124.88 μg/mL, 그리고 galactose는 7.77, 31.10, 124.38 μg/mL의 농도를 정밀성 및 정확성 측정에 사용하였다.

검출한계 및 정량한계

검량선 시료로부터 얻은 표준편차와 검량선의 기울기를 통해 분석법의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 산출하였다. 검량선의 기울기와 표준편차를 근거하여 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$LOD = 3.3 \times \text{Standard deviation} / \text{Slope of calibration curve}$$
$$LOQ = 10 \times \text{Standard deviation} / \text{Slope of calibration curve}$$

Results and Discussion

특이성 검증

특이성이란 시료 속에 존재하는 불순물, 분해물 및 기타 성분들에 의해 분석대상물질이 영향을 받지 않고 선택적으로 분리하여 측정할 수 있는 능력을 말한다. 표준용액과 Vitalbos의 chromatogram을 비교하여 DAA 및 단당류 3종(galacturonic acid, glucose 및 galactose)의 머무름시간을 확인한 결과, 두 물질의 머무름 시간이 일치하는 것을 확인하였다. 또한 표준용액과 Vitalbos의 PDA spectrum의 결과에서도 동일한 spectrum을 나타내어 4가지 물질이 다른 성분의 간섭 없이 선택적으로 분리 검출되었음을 확인하였다(Fig. 1, Fig. 2).

직선성

DAA 표준용액을 7.34, 14.69, 29.38, 58.75, 117.5, 235 μg/mL 농도로 단계적으로 조제한 표준용액을 HPLC로 분석한 결과 상관계수(R^2) 값은 0.9998로 나타났다(Fig. 3a). 총당 함량에 사용된 glucose 표준용액은 31.19, 62.38, 124.75, 249.5, 499 μg/mL 농도로 희석하여 사용하였으며 R^2 값은 0.9995로 계산되었다(Fig. 3b). 단당류 분석에 사용된 galacturonic acid 표준용액은 3.55, 7.11, 14.22, 28.44, 56.88, 113.75 μg/mL, glucose 표준용액은 3.9, 7.81, 15.61, 31.22, 62.44, 124.88 μg/mL, galactose 표준용액은 3.89, 7.77, 15.55, 31.1, 62.19, 124.38 μg/mL의 농도로 희석하

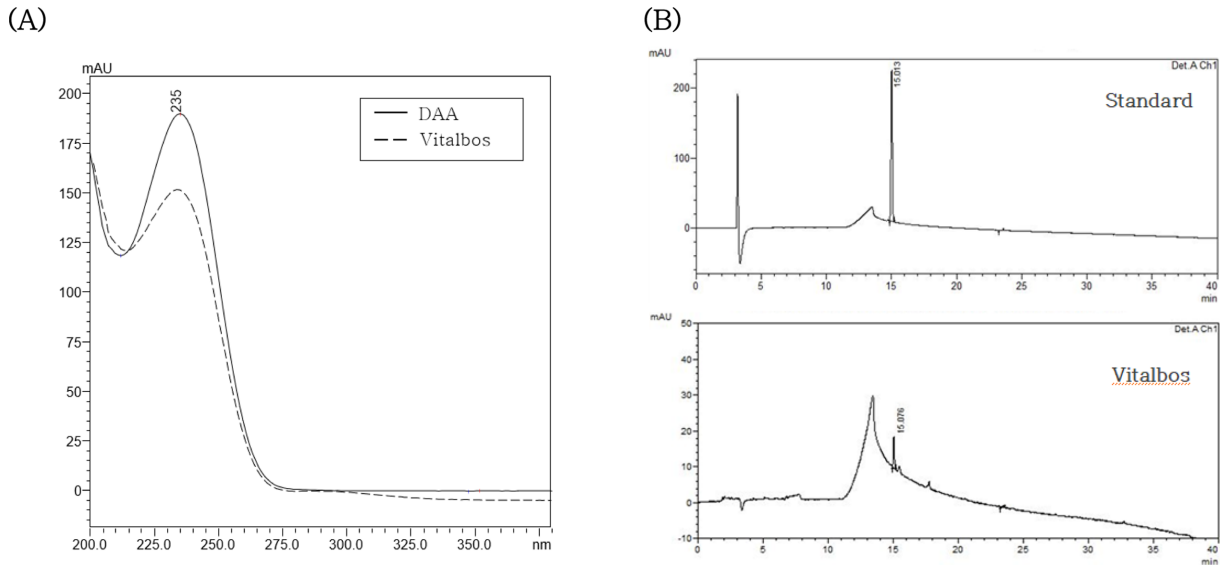

Fig. 1. PDA spectrums (A) and HPLC chromatograms (B) of deacetylasperulosidic acid and Vitalbos.

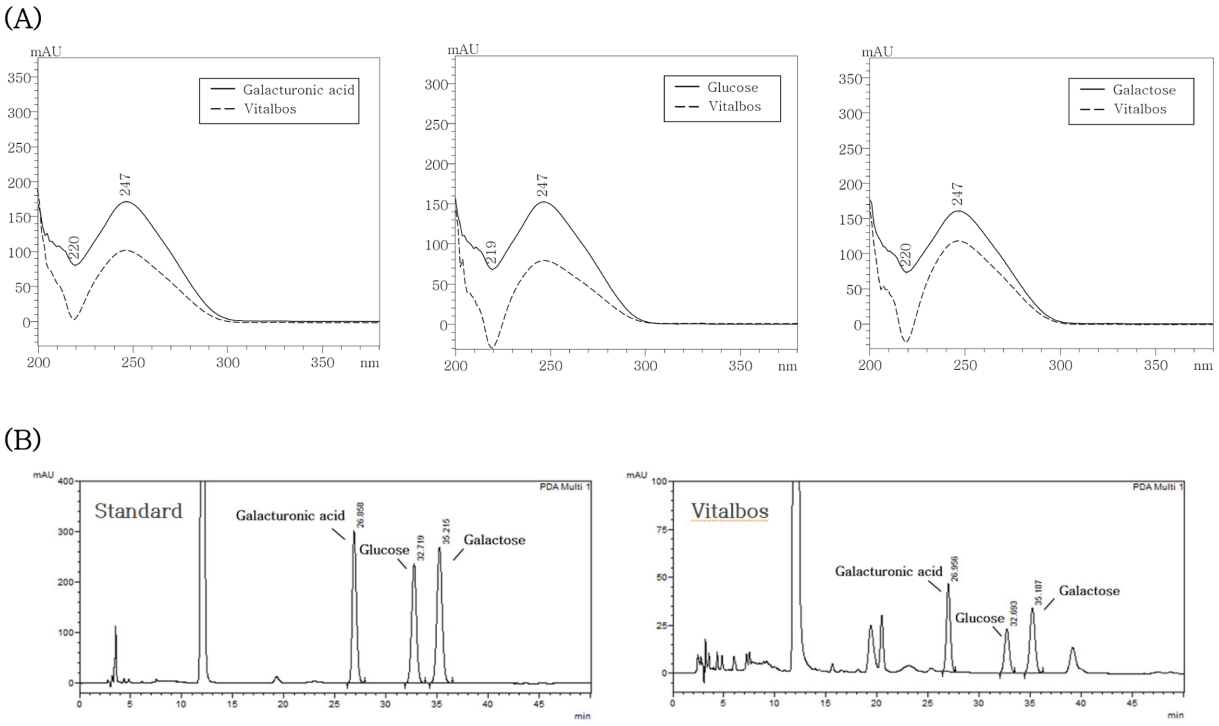

Fig. 2. PDA spectrums (A) and HPLC chromatograms (B) of galacturonic acid, glucose, galactose and Vitalbos.

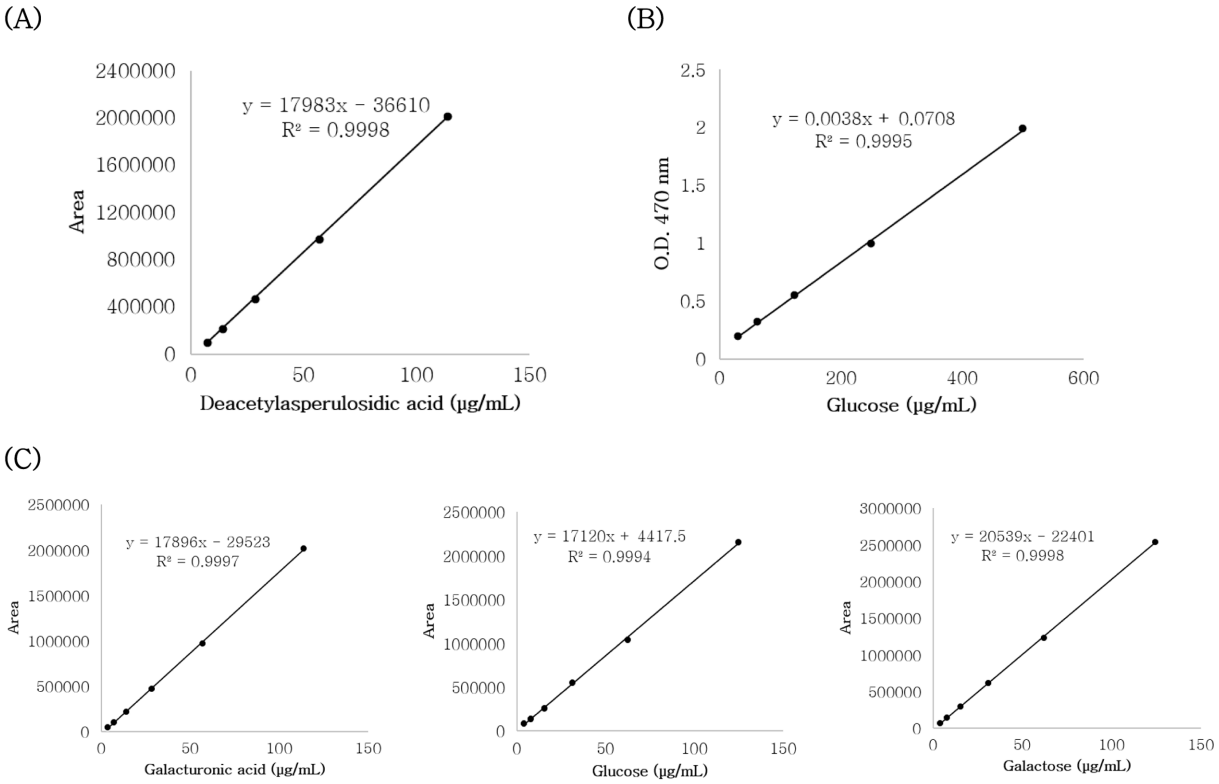

Fig. 3. Linearity of standard curve of deacetylasperulosidic acid (A), total sugar (B), galacturonic acid, glucose and galactose (C).

여 사용하였다. Galacturonic acid, glucose 및 galactose의 R^2 값은 각각 0.9997, 0.9994 및 0.9998로 나타났다. 세가지 지표성분 모두 R^2 값이 0.99 이상으로 우수한 직선성을 나타내었다.

Table 3. Precision and accuracy of deacetylasperulosidic acid, total sugar, galacturonic acid, glucose and galactose

Analytes		Concentration (μg/mL)	Mean±SD (μg/mL)	RSD[1)] (%)	Recovery (%)
Deacetylasperulosidic acid	Intra-day	14.69	14.00±0.21[2)]	1.52	95.31
		58.75	61.82±0.08	0.14	105.22
		235	238.74±1.04	0.44	101.59
	Inter-day	14.69	13.97±0.49	3.50	95.13
		58.75	60.62±0.98	1.61	103.18
		235	233.89±2.52	1.08	99.53
Total sugar	Intra-day	31.19	32.63±0.23	0.71	104.61
		124.75	125.22±0.62	0.49	100.37
		499	502.19±0.33	0.07	100.64
	Inter-day	31.19	32.93±0.33	1.01	105.59
		124.75	125.40±1.08	0.86	100.52
		499	500.79±3.50	0.70	100.36
Galacturonic acid	Intra-day	7.11	7.32±0.19	2.62	103.01
		28.44	27.95±0.14	0.51	98.27
		113.75	114.35±0.48	0.42	100.53
	Inter-day	7.11	7.21±0.15	2.05	101.42
		28.44	27.85±0.20	0.73	97.93
		113.75	113.43±1.44	1.27	99.72
Glucose	Intra-day	7.80	8.06±0.24	3.01	103.23
		31.22	31.87±0.08	0.24	102.10
		124.88	125.74±0.27	0.22	100.69
	Inter-day	7.80	8.17±0.15	1.80	104.68
		31.22	32.01±0.19	0.60	102.54
		124.88	125.81±0.42	0.34	100.75
Galactose	Intra-day	7.77	8.02±0.11	1.41	103.16
		31.09	31.12±0.21	0.66	100.10
		124.38	124.88±0.25	0.20	100.41
	Inter-day	7.77	8.04±0.12	1.55	103.39
		31.09	31.19±0.26	0.85	100.31
		124.38	125.16±0.50	0.40	100.63

[1)] RSD: Relative standard deviation.
[2)] Value are mean±SD in triplicate (n=3).

정밀성 및 정확성

정밀성이란 하나의 검체에 대한 일련의 연속적인 분석으로 얻은 분석 결과값의 근접성을 의미한다. 정확성은 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 측정값이 근접한 정도를 의미한다. 분석법의 정밀성을 검증하기 위하여 일내 및 일간에서 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 확인하였으며, 분석의 정확성은 회수율을 측정하여 평가하였다. DAA, 총당 함량, galacturonic acid, glucose 및 galactose의 분석방법의 정밀성 및 정확성은 Table 3과 같다.

DAA의 일내 및 일간 정밀성은 각각 0.14-1.52%, 1.08-3.50%를 나타내었으며, 회수율은 95.13-105.22%를 나타내었다. 총당 함량에 대한 일내 및 일간 정밀성은 각각 0.07-0.71%, 0.70-1.01%으로 나타났으며, 회수율은 100.36-105.59%를 나타내었다. 단당류 3종에 대한 정밀성은 0.22-3.01% 범위를 나타냈으며 회수율은 97.93-104.68%로 나타났다. 세가지 지표성분 모두 5% 미만의 우수한 정밀성을 나타내었으며, 회수율은 95.13-105.59%로 우수한 정확성을 보였다.

Table 4. Correlation coefficients of the calibration curves, and limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) of deacetylasperulosidic acid, total sugar, galacturonic acid, glucose and galactose

Analytes	Range (μg/mL)	slope	intercept	Correlation coefficient (R^2)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Deacetylasperulosidic acid	7.34-235	17983	-36610	0.9998	0.39	1.18
Total sugar	31.19-499	0.0038	0.0708	0.9995	0.84	2.55
Galacturonic acid	3.55-113.75	17896	-29523	0.9997	0.71	2.14
Glucose	3.9-124.88	17120	4417.5	0.9994	0.81	2.44
Galactose	3.89-124.38	20539	22401	0.9998	0.48	1.45

Table 5. Content of deacetylasperulosidic acid, total sugar, galacturonic acid, glucose and galactose in Vitalbos[1)]

Sample	Analytes	Compounds (mg/dry weight g)	
		Mean±SD	RSD[2)] (%)
Vitalbos	Deacetylasperulosidic acid	2.31±0.06	2.60
	Total sugar	475.92±5.95	1.25
	Galacturonic acid	72.83±1.05	1.45
	Glucose	71.63±2.44	3.40
	Galactose	67.30±2.31	3.44

[1)]Vitalbos: Polysaccharide from fermented *Morinda citrifolia*.
[2)]RSD: Relative standard deviation.

검출한계 및 정량한계

검출한계란 검체 중 분석대상 물질의 검출 가능한 최소량을 의미하며 정량한계는 정량값으로 나타낼 수 있는 대상물질의 최소량을 나타낸다. DAA의 검출한계와 정량한계는 각각 0.39 μg/mL, 1.18 μg/mL로 측정되었으며 총당 함량의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.84 μg/mL, 2.55 μg/mL로 나타났다. 단당류 3종에 대한 검출한계 및 정량한계는 galacturonic acid에서 0.71 μg/mL 및 2.14μg/mL, glucose에서 0.81 μg/mL 및 2.44 μg/mL, galactose에서 0.48 μg/mL 및 1.45 μg/mL로 측정되었다 (Table 4). 위 결과를 통해 Vitalbos 시료에서 DAA, 총당 함량, galacturonic acid, glucose 및 galactose의 정량분석이 가능한 것으로 나타났다.

Vitalbos의 지표성분 함량분석

분석법 검증을 통해 확립된 분석법을 이용하여 Vitalbos 시료 내 DAA, 총당 함량, galacturonic acid, glucose 및 galactose의 함량을 분석한 결과는 Table 5와 같다. Vitalbos 시료 내의 DAA 함량은 2.31±0.06 mg/dry weight g, 총당 함량은 475.92±5.95 mg/dry weight g 함유하는 것으로 분석되었다. Galacturonic acid는 72.83±1.05 mg/dry weight g, glucose는 71.63±2.44 mg/dry weight g, 그리고 galactose는 67.30±2.31 mg/dry weight g만큼 함유되어 단당류 3종의 합은 211.76 mg/dry weight g로 나타났다. Jin 등[25)]은 노니열매로부터 다당체를 분리하여 단당류 조성을 분석한 바 있으며 galacturonic acid (58.55%), galactose (4.44%), glucose (21.13%), rhamnose (4.84%), 및 arabinose (2.16%)만큼 함유된 것으로 나타났다. Sousa 등[26)]의 연구에서는 브라질산 노니열매로부터 추출한 다당체의 단당류 조성은 galacturonic acid (29.1 mol%), galactose (30.9 mol%), arabinose (31.0 mol%), rhamnose (5.4 mol%) 및 mannose (3.6 mol%)라고 보고한 바 있으며 베트남산 노니열매에서 추출한 다당체와 조성을 비교하여 천연물 내 다당체의 구성은 재배지에 따라 의존적이라고 보고한 바 있다. 본 연구에서의 단당류 조성과는 차이를 보였으며 이는 다당체 추출 조건 및 노니의 원산지에 따른 차이일 것으로 판단된다. Son 등[27)]은 인삼에서 분리한 다당체에서 면역 효능 및 단당류 조성을 분석한 바 있다. 인삼 다당체 내의 구성 당은 mannose, glucose, galactose, arabinose가 확인되었으며 glucose와 galactose가 90% 이상 포함된 것으로 나타났다. 그중 galactose의 함량이 높을수록 임파구 증식능이 증가하였다고 보고하였다. 마카에서 분리된 다당체를 이용한 연구에서는 단당류 조성이 arabinose (26.21%), mannose (11.81%), glucose (53.66%) 및 galactose (8.32%)인 수용성 다당체가 대식세포를 활성화시켜 TNF-α, Interleukin-6 등 염증성 cytokine의 발현과 nitric oxide 생성을 촉진하여 면역 기능을 효과적으로 증진시킨다고 보고한 바 있다[28)]. Chen 등[29)]의 연구에서는 rhamnose, arabinose, glucose, galactose의 몰비율이 1:1.37:2.94:3.49로 구성된 궐마 유래 다당체가 면역억제 마우스모델에서 면역 기능을 효과적으로 개선하였으며, 약화된 면역 시스템에서 다당류의 치료

능력을 높이 평가한 바 있다. 현재까지 이루어진 선행연구들을 참고하였을 때, 다당류의 면역증진 효능은 단당류 조성 및 글리코시드 결합 구조와 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다. Vitalbos의 우수한 면역증진 효능은 galactose를 구성당으로 포함하는 다당체와 관련이 있을 것으로 예상되며, 추후 개발 소재에 대한 구조적 구명이 이루어진다면 다당체를 이용한 건강기능식품 소재 개발에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2020년도 중소벤처기업부의 중소기업기술개발사업(S2840161)의 지원으로 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 발효노니 다당체 추출물(Vitalbos)을 건강기능식품 소재로 활용하기 위해 DAA, 총당 함량, 단당류 3종(galacturonic acid, glucose 및 galactose)을 지표성분으로 설정하고, 지표성분에 대한 효과적인 분석법 설정 및 검증을 위해 수행되었다. 기존에 보고된 분석법 검증 방법을 수정하여 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 고성능 액체크로마토그래피와 페놀-황산법을 이용하여 측정하였다. 그 결과 DAA 및 단당류 3종의 표준용액과 Vitalbos의 머무름 시간이 일치하였으며 스펙트럼 또한 동일하여 분석법의 특이성을 확인하였다. 지표성분의 검량선 상관계수(R^2)는 0.9995-0.9998 범위로 0.99 이상의 우수한 직선성을 나타냈다. Intra-day 및 inter-day 정밀도는 0.14-3.01%의 범위로 5% 미만의 우수한 정밀도를 나타냈고 회수율은 95.13-105.59% 범위에서 우수한 정확도를 보였다. DAA 분석의 LOD와 LOQ는 각각 0.39 μg/mL 및 1.18 μg/mL이었으며 총당 함량의 LOD 및 LOQ는 각각 0.84 μg/mL 및 2.55 μg/mL로 측정되었다. 단당류 3종에 대한 LOD는 0.48-0.81 μg/mL의 범위였으며, LOQ는 1.45-2.44 μg/mL 범위에서 정량분석이 가능한 것으로 나타났다. 분석법 검증 결과, 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성 모두 우수한 분석법임을 검증하였으며, LOD와 LOQ 또한 Vitalbos 분석에 적합하였음을 확인하였다. 검증된 분석법을 이용하여 Vitalbos의 지표 성분 함량을 측정하였을 때, DAA, 총당 함량, galacturonic acid, glucose 및 galactose의 함량은 각각 2.31±0.06 mg/dry weight g, 475.92±5.95 mg/dry weight g, 72.83±1.05 mg/dry weight g, 71.63±2.44 mg/dry weight g 및 67.30±2.31 mg/dry weight g으로 측정되었다. 본 연구에서 검증된 분석법을 사용했을 때 Vitalbos의 지표성분 3종에 대하여 우수한 재현성으로 정량분석이 가능하였으며, 건강기능식품 소재로의 품질관리에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Heeyeon Kwon https://orcid.org/0000-0002-1142-7777
Jisoo Choi https://orcid.org/0000-0002-6354-9477
Soojin Kim https://orcid.org/0000-0002-7977-6279
Eunmin Kim https://orcid.org/0000-0001-5691-7414
Jihyun Uhm https://orcid.org/0000-0003-4589-7176
Bokyung Kim https://orcid.org/0000-0002-2057-0698
Jaeyeon Lee https://orcid.org/0000-0002-2073-850X
Yongdeok Kim https://orcid.org/0000-0003-0670-6103

References

1. Wang, M.Y., West, B.J., Jensen, C.J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A.K., Anderson, G., *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol. Sin.*, **23**, 1127-1141 (2002).
2. Dixon, A.R., McMillen, H., Etkin, N.L., Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). *Econ. Bot.*, **53**, 51-68 (1999).
3. Ramamoorthy, P.K., Bono, A., Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *J. Eng. Sci. Technol.*, **2**, 70-80 (2007).
4. Wang, R., Wang, L., Zhang, L., Wan, S., Li, C., Liu, S., Solvents effect on phenolics, iridoids, antioxidant activity, antibacterial activity, and pancreatic lipase inhibition activity of noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit extract. *Food Chem.*, **377**, 131989 (2022).
5. WANG, M.Y., Su, C., Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **952**, 161-168 (2001).
6. Olatunde, O.O., Benjakul, S., Huda, N., Zhang, B., Deng, S., Ethanolic Noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf extract dechlorophyllised using sedimentation process: Antioxidant, antibacterial properties and efficacy in extending the shelf-life of striped catfish slices. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **56**, 2804-2819 (2021).
7. Wang, M.Y., Nowicki, D., Anderson, G., Jensen, J., West, B., Liver protective effects of *Morinda citrifolia* (Noni). *Plant Foods Hum. Nutr.*, **63**, 59-63 (2008).
8. Hong, Y.H., Yi, Y.S., Han, S.Y., Aziz, N., Kim, H.G., Park, S.H., Hossain, M.A., Baik, K.S., Choi, S.Y., Lee, J.S., Kim, J.H., Cho, J.Y., *Morinda citrifolia* noni water extract enhances innate and adaptive immune responses in healthy mice, *ex vivo*, and *in vitro*. *Phytother. Res.*, **33**, 676-689 (2019).
9. Choi, S.I., Kwon, H.Y., La, I.J., Jo, Y.H., Han, X., Men, X., Lee, S.J., Kim, Y.D., Seong, G.S., Lee, O.H., Development

and validation of an analytical method for deacetylasperulosidic acid, asperulosidic acid, scopolin, asperuloside and scopoletin in fermented *Morinda citrifolia* L.(Noni). *Separations*, **8**, 80 (2021).
10. Esakkimuthu, S., Nagulkumar, S., Darvin, S. S., Buvaneswaragurunathan, K., Sathya, T.N., Navaneethakrishnan, K.R., Kumaravel, T.S., Murugan, S.S., Shirota, O., Balakrishna, K., Pandikumar, P., Ignacimuthu, S., Antihyperlipidemic effect of iridoid glycoside deacetylasperulosidic acid isolated from the seeds of Spermacoce hispida L.-A traditional antiobesity herb. *J. Ethnopharmacol.*, **245**, 112170 (2019).
11. Choi, S.I., Han, X., Men, X., Lee, S.J., Kim, Y.D., La, I.J., Seong, G.S., Lee, O.H., Enhancement of Immune Activities of Fermented *Morinda citrifolia* L.(Noni) and Six Marker Compounds. *J. Food Hyg. Saf.*, **37**, 29-37 (2022).
12. Sundaram, R., Naresh, R., Shanthi, P., Sachdanandam, P., Antihyperglycemic effect of iridoid glucoside, isolated from the leaves of Vitex negundo in streptozotocin-induced diabetic rats with special reference to glycoprotein components. *Phytomedicine*, **19**, 211-216 (2012).
13. Sun, W., Hu, W., Meng, K., Yang, L., Zhang, W., Song, X., Qu, X., Zhang, Y., Ma, L., Fan, Y., Activation of macrophages by the ophiopogon polysaccharide liposome from the root tuber of *Ophiopogon japonicus*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **91**, 918-925 (2016).
14. Wang, Y.Q., Mao, J.B., Zhou, M.Q., Jin, Y.W., Lou, C.H., Dong, Y., Shou, D., Hu, Y., Yang, B., Jin, C.Y., Shi, H.C., Zhao, H.J., Wen, C.P., Polysaccharide from Phellinus Igniarius activates TLR4-mediated signaling pathways in macrophages and shows immune adjuvant activity in mice. *Int. J. Biol. Macromol.*, **123**, 157-166 (2019).
15. Shin, S., Kim, S.H., Lee, H.S., Kwon, D.J., Jeon, S.H., Effects of Corn-Derived Arabinoxylan-Containing Polysaccharides on Innate Immune Activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **49**, 119-126 (2020).
16. Im, S.A., Park, C.S., Lee, C.K., Immunoaugmenting Activity of Acemannan, the Polysaccharides Isolated from *Aloe vera* Gel. *Kor. J. Pharmacogn.*, **47**, 103-109 (2016).
17. Yang, S.J., Lee, S.Y., Lee, H., Park, Y.C., Choi, S.K., Yu, C.Y., Chung, I.M., Lim, J.D., Adjuvant Effect of Polysaccharides from Aboveground Parts of *Astragalus membranaceus*. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, **24**, 408-419 (2016).
18. Kim, S.W., Kim, E.S., Studies on the Immunomodulating Effects of Polysaccharide Extracted from *Ganoderma lucidum* on Macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 148-153 (1997).
19. Kim, K.H., Jung, I.S., Chung, H.Y., Jo, S.K., Yun, Y.S., Preclinical Evaluation of Polysaccharides Extracted from Korean Red-ginseng as an Antineoplastic Immunostimulator. *Korean J. Ginseng Sci.*, **21**, 78-84 (1997).
20. Choi, S.I., La, I.J., Han, X., Men, X., Lee, S.J., Oh, G., Kwon, H.Y., Kim, Y.D., Seong, G.S., Kim, S.H., Lee, O.H., Immunomodulatory Effect of Polysaccharide from Fermented *Morinda citrifolia* L. (Noni) on RAW 264.7 Macrophage and Balb/c Mice. *Foods*., **11**, 1925 (2022).
21. Kim, S.H., Seong, G.S., Choung, S.Y., Fermented *Morinda citrifolia* (Noni) alleviates DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice through modulating immune balance and skin barrier function. *Nutrients*, **12**, 249 (2020).
22. Saha, A.K., Brewer, C.F., Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.*, **254**, 157-167 (1994).
23. Honda, S., Togashi, K., Taga, A., Unusual separation of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of aldoses by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **791**, 307-311 (1997).
24. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology* Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, p 1-13.
25. Jin, M., Wang, Y., Yang, X., Yin, H., Nie, S., Wu, X., Structure characterization of a polysaccharide extracted from noni (*Morinda citrifolia* L.) and its protective effect against DSS-induced bowel disease in mice. *Food Hydrocoll.*, **90**, 189-197 (2019).
26. Sousa, S.G., Oliveira, L.A., de Aguiar Magalhães, D., de Brito, T.V., Batista, J.A., Pereira, C.M.C., de Souza Costa, M., Mazulo, J.C.R., de Carvalho Filgueiras, M., Vasconselos, D.F.P., da Silva, D.A., Barros, F.C.N., Sombra, V.G., Freitas, A.L.P., de Paula, R.C.M., de Andrade Feitosa, J.P., dos Reis Barbosa, A.L., Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia Linn* (Noni). *Carbohydr. Polym.*, **197**, 515-523 (2018).
27. Son, H.J., Shim, J.Y., Ahn, J.Y., Yun, Y.S., Song, J.Y., Representative Parameter of Immunostimulatory Ginseng Polysaccharide to Predict Radioprotection. *J. Radiat. Prot. Res.*, **33**, 99-104 (2008).
28. Zhang, M., Wang, G., Lai, F., Wu, H., Structural characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii*. *J. Agric. Food Chem*., **64**, 1921-1931 (2016).
29. Chen, J.R., Yang, Z.Q., Hu, T.J., Yan, Z.T., Niu, T.X., Wang, L., Cui, D.A., Wang, M., Immunomodulatory activity in vitro and in vivo of polysaccharide from *Potentilla anserina*. *Fitoterapia*, **81**, 1117-1124 (2010).