

육두구(*Myristica fragrans* Houttuyn) 내의 myristicin의 분리 및 HPLC를 이용한 함량분석 방법 밸리데이션

김수환* · 이동호 · 권수한¹ · 임병호 · 이상훈 · 민범찬
삼양사 의약연구소 분석센터, ¹충북대학교 화학과

Isolation and Quantitative Determination Method Validation of myristicin from *Myristica fragrans* Houttuyn

Soo-Hwan Kim*, Dong-Ho Lee, Soo-Han Kwon¹, Buyng-Ho Lim, Sang-Hun Lee, and Bum-Chan Min

Analytical Science Center, Samyang Medical R&D Center, Daejeon 305-717, Korea

¹Department of Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract – *Myristica fragrans* has been used for the treatment of stomachache in East Asia. It is very important to determine the amount of myristicin in *Myristica fragrans*, because excess myristicin causes side effects. In this study, we developed and validated the method for determination contents of myristicin in *Myristica fragrans* which was purchased from various regions of Korea. The average content of myristicin in *Myristica fragrans* was 2.10% with the validated HPLC analysis method.

Key words – Myristicin, *Myristica fragrans*, quantitative analysis, validation

육두구는 육두구나무과에 속하는 상록교목인 육두구나무 (*Myristica fragrans* Houttuyn)의 익은 열매를 말린 것으로 인도네시아, 말레이반도 등의 열대지방에 주로 자생한다. 영문으로는 nutmeg 라고 하며 사향 향기가 나는 호두라는 뜻으로 열매는 길이가 4~6 cm 정도의 크기로 성숙하고 그 안에 종자가 들어 있으며, 한방에서는 그 종인을 약재로 이용해 왔다. 육두구는 4~6월 및 11~12월 각 한 번씩 이른 아침에 채취한 성숙한 과실의 종피를 제거한 종인을 석회수에 하루 정도 담가두었다가 불로 건조시켜 약재로 사용한다. 육두구는 온성과 방향성이 높아 오래된 설사, 복부팽만, 구토, 식욕감퇴 등에 쓰이며 방향성 건위제, 강장제, 항신료 등으로도 사용한다.¹⁻³⁾ 주성분으로는 정유가 2~9%를 차지하며, *d*-camphen 및 β -pinene, myristicin, terpinen-4-ol, licarin B, safrole, methylengenol 등이 함유되어 있다. 이러한 성분 중 과량의 myristicin은 정상적인 사람에 대하여 환각작용이 있으며, Myristicin은 사람의 대뇌에서 흥분작용을 나타내므로 육두구 복용 시 주의해야 한다.⁴⁻⁶⁾

지금까지 육두구의 성분 및 용도에 관한 연구가 수행되었으나, 부작용을 나타내는 myristicin의 함량 측정을 위한 방

법은 규격화 되지 않았다. 이번 연구에서는 육두구에 포함된 myrisiticin의 함량을 측정하기 위한 방법을 HPLC를 이용하여 개발하였고, 그 방법을 밸리데이션 하였다.

실험 방법

실험재료 – 본 연구에 사용한 육두구는 2005년 10월 시중 6개 건재상에서 구입하여 충북대 권수한 교수님께 감정 후 실험에 사용하였으며, 표본은 삼양사 (표본번호 MR0510-002)에 보관되어 있다. 실험에 사용된 육두구 시료는 6점이었으며, 서울에서 3점 (시료 번호 1~3), 대전 1점 (4), 대구 2점 (5~6)을 구입했고 서울에서 구입한 3점 중 2점과 대구에서 구입한 1점 (시료번호 2, 3, 6)은 중국산이었다.

시약 및 기기 – HPLC는 HP 1100 (Hewlett Packard, USA)을 사용하였으며, NMR spectrum은 Advance DPX-400 (400 MHz, Bruker, Germany)를 사용하여 측정하였고, GC/MS는 질량검출기로 QP 5050A (Shimadzu, Japan)가 장착된 GC 17A (Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 표준품 myristicin (87%)은 Sigma社에서 구입하였으며, HPLC 분석 및 육두구 성분 추출에 사용된 용매는 모두 HPLC급 시약으로 Fisher社에서 구입하여 사용하였다.

*교신저자(E-mail): guesswhat@samyang.com
(FAX): 042-865-8039

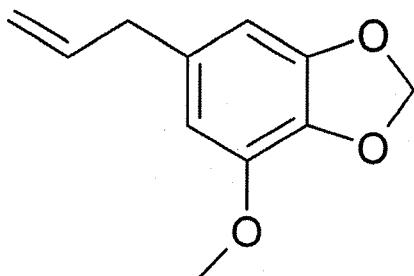


Fig 1. Chemical structure of myristicin.

표준액의 조제 – 육두구에서 분리된 성분이 myristicin임을 확인한 후, myristicin의 정량을 위하여 myristicin (Sigma, 87%, Fig. 1) 표준품으로 검량선을 작성하였다. 표준액을 조제하기 위하여 표준품 myristicin 100 mg을 정확히 청량하고 volumetric flask에 넣고 HPLC용 메탄올 10 mL를 눈금까지 맞춰 8.7 mg/mL 스톡 솔루션을 만들고 -70°C에 보관하였다. 준비된 스톡 솔루션을 물/아세토나이트릴 (6/4, v/v)로 100배 희석하여 87 µg/mL로 만들고 0.174, 1.74, 3.48, 8.40, 17.4, 43.5 µg/mL로 단계적으로 희석하여 검량용 표준용액을 조제하였다. 각각의 표준용액 10 µL를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하였다.

검액(QC)의 조제 – Myristicin 100 mg을 정확히 청량하고 volumetric flask에 넣고 HPLC용 메탄올 10 mL를 눈금까지 맞춰 8.7 mg/mL 스톡 솔루션을 만들고, 이를 다시 메탄올/물 (9/1, v/v)으로 1.74, 17.4, 87 µg/mL의 농도의 검액 10 mL를 준비하였다. 검액을 실온에서 5 mL의 n-hexane으로 3회 추출하여 탈지한 다음 남아있는 메탄올/물 층을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하고, 여액을 검액으로 사용하였다. 각각의 검액을 10 µL씩 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적을 구하여 표준액으로부터 얻은 회귀직선 방정식을 이용하여 각각의 myristicin의 함량을 구하였다.

HPLC 분석 조건 – 컬럼은 Curosil PFP(4.6 × 250 mm, 5 µm, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 물/아세토나이트릴 (6/4, v/v)을 사용하였으며, 검출기는 UV 210 nm, 이동상의 속도는 1.0 mL/min, 분석시간은 60분이었다.

정확도, 정밀도 실험 – 위에서 조제된 QC 샘플을 정량 분석하여 얻은 결과로부터 정량한계, inter-batch 및 intra-batch의 정확도와 정밀도를 조사하였다.

Myristicin의 추출 – 6종의 육두구 각 200 g을 건조 및 분쇄하여 메탄올로 3일간 실온에서 3회 반복 추출, 여과 및 감압 농축한 후, 메탄올/물 (9/1, v/v) 2 L에 녹여 n-헥산 1 L로 3회 반복 추출하여 탈지하고 남은 메탄올/물 (9/1, v/v) 층을 최종 부피가 25 mL가 되도록 농축하고, 그 중 1 mL를 취하여 메탄올로 분석 농도가 검량선 범위 내에 들어가도록 100배 희석한 후 HPLC로 분석하였다.

Myristicin 성분의 확인 – NMR과 GC/MS 분석을 위해 HPLC 크로마토그램의 피크 중 myrisiticin 표준품과 RT가 동일한 피크를 기준으로 RT.35.5~38.5분 부분을 반복 fraction하여 용액을 분취 후 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하였다. 여과액은 40°C 질소로 용매를 제거하고 남아있는 미황색 오일 성분을 얻었다. 미황색 오일 성분의 분자량은 HP-5MS (5% phenyl methyl polysiloxane 30 m × 0.25 mm) column을 사용하고, 오븐온도 70°C에서 280°C까지 분당 10°C 상승시키면서 분석하는 조건으로 GC/MS를 이용하여 측정하였다. 미황색 오일 성분을 CDCl₃에 녹이고 NMR을 이용하여 ¹³C 및 ¹H 스펙트럼을 얻었으며, 내부표준물질은 TMS로, chemical shift는 ppm으로 표시하였다. 육두구에서 얻은 미황색 오일 성분의 NMR, GC/MS의 결과가 표준품 myristicin과 동일함을 확인하였다.

결과 및 고찰

육두구에서 추출된 myristicin 확인 – 수집된 6종의 시료는 외관상 일치하였고 HPLC로 반복 fraction하여 분취한 성분을 40°C 질소로 남아있는 용매를 제거하여 미황색 오일을 얻었으며, 이에 대한 NMR과 GC/MS 분석결과는 다음과 같다. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.29 (2H, d, *J*=6.4 Hz, H-7), 3.88 (3H, s, OMe), 5.06 (1H, d, *J*=10.0 Hz,

Table I. Intra-day, inter-day quality control results of myristicin

Batch	Conc. (µg/mL)	1.74	17.4	87.0
Intra-day 1 (n=3)	Accuracy ^a (%)	109.0	100.5	100.8
	Precision ^b (%)	0.1	3.5	3.1
Intra-day 2 (n=3)	Accuracy (%)	102.5	99.9	101.4
	Precision (%)	1.7	2.5	1.8
Intra-day 3 (n=3)	Accuracy (%)	104.2	101.4	102.8
	Precision (%)	2.3	4.4	4.6
Inter-day (n=9)	Accuracy (%)	93.5	91.7	97.5
	Precision (%)	3.9	3.2	2.2

^aAccuracy (%): The percentage of measured concentration compared to the nominal concentration, (measured/expected) × 100

^bPrecision (%): Coefficient of Variation, SD/average × 100

Table II. Intra-day and Inter-day Standard Curve equation of myristicin

Intra-day			Inter-day		
Slope	Intercept	r ²	Slope	Intercept	r ²
80.129	18.376	0.9994	81.293	19.333	0.9996
			80.323	16.954	0.9997
			81.336	18.270	0.9997

Table III. The contents of myristicin from various *Myristica fragrans* Houttuyn

No. of Sample	1	2	3	4	5	6
	2.24	2.38	1.99	2.04	2.22	2.00
Content (%)	2.33	2.10	1.89	2.32	2.17	2.19
	2.29	2.09	2.05	1.99	1.98	1.92
SD	0.22	0.16	0.08	0.18	0.13	0.14
Average	2.16	2.19	1.98	2.12	2.12	2.04
Total Average			2.10			

H-9a), 5.07 (1H, *d*, *J*=17.2 Hz, H-9b), 5.93 (1H, *m*, H-8), 5.93 (2H, *s*, OCH₂O), 6.35 (1H, *d*, *J*=1.4 Hz, H-6), 6.38 (1H, *d*, *J*=1.4 Hz, H-2); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): d 133.5 (C-1), 107.7 (C-2), 137.4 (C-3), 148.9 (C-4), 143.5 (C-5), 102.7 (C-6), 40.2 (C-7), 134.6 (C-8), 115.9 (C-9), 56.6 (OMe), 101.2 (OCH₂O); GC/MS (m/z): 192 (M⁺), 177, 165, 147, 131, 119, 91, 77, 65에서 피크가 확인되었고, 표준품 myristicin의 NMR spectrum, GC/MS 상의 피크가 일치하여 육두구에서 추출한 미황색 오일 성분이 myristicin임을 확인하였다(Fig. 1).

검량곡선을 이용한 정확도 및 정밀도 실험 – 검량선 범위 내의 3가지 농도의 검액 시료 (1.74, 17.4, 87.0 µg/mL)에 대하여 intra-day, inter-day의 정확도 및 정밀도를 측정한 결과, intra-day에서는 정확도 99.9~104.2%, 정밀도 0.1~4.6%를 나타내었고, inter-day에서는 정확도 91.7~97.5%, 정밀도 1.5~3.9%를 나타내었다. 또한 농도 1.74~87.0 µg/mL의 범위에서 3회에 걸쳐 검량선을 작성하였고, 그 정확도는 모두 ±5% 이내였으며, 검량선의 결정계수(*r*²)는 모두 0.9994 이상으로 선형성을 나타내었다(Table I~II).

Myristicin 함량 – 6종의 육두구의 myristicin의 함량을 측정한 결과, 각각의 시료에 함유된 myristicin의 함량은 평균 2.10%이었다(Table III).

결 론

1. 육두구 중의 myristicin의 함량을 정확하고 정밀하게 측정하기 위하여 분석법을 확립하고, 그 분석법의 유효성을

검증하였다.

2. 검증된 분석법을 통하여 총 6종의 육두구에서 myristicin의 함량을 측정한 결과는 평균 2.10%였다.

인용문헌

1. Hattori, M., Hada, S., Kawata, Y., Tezuka, Y., Kikuchi, T. and Namba, T. (1987) New 2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignans from the aril of *Myristica fragrans*, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**: 3315-3322.
2. Han, H. S., Kil, K. J. and Lee, Y. J. (2005) A Study on Morphological Characteristics of myristicae Semen, *Kor. J. Herbology*, **20**(1): 103-109.
3. Kim, H. W., Huh, K. T. and Choi, C. U. (1989) Changes in the Volatile Flavor Components of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houttuyn) during Aging, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**(6): 760-765.
4. Shin, K. H. and Woo, W. S. (1990) Inhibition and Induction of Hepatic Mixed Function Oxidase by Phenylpropanoids from the Seeds of *Myristica fragrans*, *Korean Biochem. J.*, **23**(1): 122-127.
5. Harborne, J. B., Heywood, V. H. and Williams, C. A. (1969) Distribution of myrisitcin of the umbelliferae, *Phytochemistry*, **8**: 1729-1732.
6. Wulf, L. W., Nagel, C. W. and Branen, A. L. (1978) Analysis of Myristicin and Falcarinol in Carrots by High-pressure Liquid Chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, **26**(6): 1390-1393.
7. Kim, S. H., Shin, D. S., Oh, M. N., Chung, S. C., Lee, J. S. and Oh, K. B. (2004) Inhibition of the Bacterial Surface Protein Anchoring Transpeptidase Sortase by Isoquinoline Alkaloids, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(2): 421-424.
8. Marston, K., Hostettmann, K. and Msomthi, J. D. (1995) Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchanani* by centrifugal partition chromatography, *Journal of Natural Products*, **58**(1): 128-130.
9. Kim, S. H., Shin, D. S., Oh, M. N., Chung, S. C., Lee, J. S. and Oh, K. B. (2004) Inhibition of Sortase, a Bacterial Surface Protein Anchoring Transpeptidase, by β-Sitosterol-2-O-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(11): 2477-2479.

(2006년 12월 15일 접수)