

닥나무 추출물의 Marmesin 성분 분석법 검증

권진관¹ · 서찬근¹ · 홍성수¹ · 서동완² · 오좌섭² · 김진규¹

¹(재)경기과학기술진흥원
²단국대학교 천안캠퍼스 약학대학

Validation of Method Determining Marmesin in *Broussonetia kazinoki* Extract

Jin Gwan Kwon¹, Changon Seo¹, Seong Su Hong¹, Dong-Wan Seo²,
Joa Sub Oh², and Jin Kyu Kim¹

¹Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion
²College of Pharmacy, Dankook University

ABSTRACT An HPLC analysis method was developed for standard determination of marmesin as a functional health material in *Broussonetia kazinoki* extract. HPLC was performed on a C₁₈ Kromasil column (4.6×250 mm, 5 μm) with a gradient elution of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min at 30°C. The analyte was detected at 330 nm. The HPLC method was validated in accordance with International Conference on Harmonization guidelines for analytical procedures with respect to specificity, precision, accuracy, and linearity. The limit of detection and quantitation were 6.2 and 18.6 μg/mL, respectively. Calibration curves showed good linearity (r²>0.9999), and the precision of analysis was satisfactory (less than 0.3%). Recoveries of quantified compound ranged from 100.35 to 101.18%. This result indicates that the established HPLC method is very useful for the determination of marker compounds in *B. kazinoki* extracts.

Key words: *Broussonetia kazinoki*, marmesin, validation, HPLC, functional health food

서 론

고령화 및 건강지향의 열풍으로 천연물은 식의약품, 한방 화장품, 향료 및 색소 등 다양한 용도의 산업소재로 이용되고 있으며 관련 산업이 급성장하고 있다. 하지만 대부분의 소재들이 값싼 중국산을 사용하고 있는 실정으로 국내 천연물 소재의 신용도 개발 등이 시급한 과제로 대두하고 있다(1).

닥나무(*Broussonetia kazinoki*)는 뽕나무과(Moraceae)로 한국, 대만과 일본에 널리 자생하고 있는 낙엽활엽 관목으로 주로 낮은 산지에서 자생하며 동의보감에 닥나무의 과실은 저실자(楮實子)라 하여 요통이나 부종 치료에 효능이 있고, 잎은 저엽(楮葉)이라 하여 자풍, 신양, 악창 등에 사용하며, 닥나무 껍질은 저수피(楮樹皮)라 하여 수종(水腫)과 창만(脹滿)을 주치하며 이뇨작용이 있다고 기재되어 있다(2). 닥나무 부위별로 다양한 효능이 있다고 알려져 왔으나

전통적으로 닥나무는 약재로 쓰이는 것보다 주로 전통한지를 만드는 주재료로 사용되어 왔으며 한지 산업의 급격한 쇠퇴로 수요가 점차 줄어들고 있는 실정이다(3).

닥나무에서 분리된 성분으로는 1,3-diphenylpropane derivatives, isoprenylated flavans(4,5), isoprenylated flavonol(6) 및 alkaloids(7) 등이 있으며 이러한 성분들의 세포독성, 아토피 치료, 항산화, 항염 및 미백 효과 등이 보고된 바 있다(8-12). 최근에는 항비만, 항당뇨, 항당뇨 합병 및 항암 등의 질환에 효능이 있는 것이 보고되었다(13-16).

혈관신생은 기존의 모세혈관으로부터 새로운 혈관이 생기는 것으로 암, 류마티스 관절염, 만성염증 등 여러 가지 질환들의 발생과 진행을 결정하는 한 요인으로 주목받고 있으므로 질병 치료 목적의 혈관신생 억제 물질을 탐색하고 개발하려는 시도들이 활발하게 진행되고 있다(17).

저자들은 닥나무 줄기 추출물로부터 쿠마린계 성분인 marmesin을 분리하여 혈관신생 억제효능을 평가하여 새로운 혈관신생 억제 성분으로 보고하였다(18).

따라서 본 연구에서는 혈관신생 억제 효능을 갖는 닥나무 추출물을 다양한 대사성 질환 관련 기능성 식품으로 개발하기 위해 닥나무 추출물의 marmesin을 지표 및 유효성분으로 선정하고 이 성분을 이용한 원료 표준화를 위한 효과적인

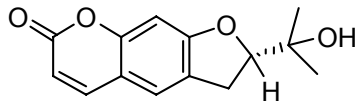


Fig. 1. Chemical structure of marmesin.

분석법을 확립하고 그에 대한 분석법 validation을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 닥나무(*B. kazinoki*)는 2014년 10월 전주 농가에서 재배한 가지를 채취하여 분쇄한 다음 60% 에탄올을 이용하여 상온에서 48시간 동안 침지하여 2회 추출하였다. 추출물은 여과 및 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말(수율: 7.8%)로 제조한 것을 사용하였다. 추출물은 60% 에탄올에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

표준용액의 조제

닥나무 추출물의 분석에 사용한 표준품 marmesin(Fig. 1)은 Chengdu Biopurify Phytochemicals(Chengdu, China)에서 구입하여 사용하였다. 검량선 작성은 marmesin 5.0 mg을 60% 에탄올에 녹여 50 mL로 하여 표준원액을 조제하였다. 이를 60% 에탄올에 희석한 표준용액을 이용하여 marmesin 함량을 구하였다.

HPLC 분석

닥나무 추출물의 marmesin을 분석하기 위하여 HPLC 1100 및 HPLC 1200(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Kromasil C₁₈(4.6×250 mm, 5 µm, Eka Chemicals, Bohus, Sweden)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 marmesin 성분이 분리되도록 흘려주었으며 검출파장은 330 nm에서 검출하였다.

시험방법의 검증(method validation)

건강기능식품 기능성 원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 '의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인(19)'을 근거로 하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD, S/N=3.3) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)를 분석하여 분석방법을 검증하였다.

특이성: 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼합 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말하는 것으로 확립된 분석법을 통하여 분리된 각각의 피크가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 피크를 검토

Table 1. HPLC conditions for the quantitative analysis of marmesin

Items	Conditions		
Instrument	HPLC 1100 & 1200 series		
	A: Water (0.1% TFA)		
	B: Acetonitrile		
	Time (min)	% A	% B
Mobile phase	0	75	25
	30	75	25
	31	0	100
	45	0	100
	Post time: 10 min		
Column	Kromasil C ₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 µL		
Detector	330 nm		

하여 확인하였으며 Photo diode array(PDA) spectrum을 측정하여 동일한 spectrum을 나타내는지도 확인하였다.

직선성: 분석대상물질의 농도에 대해 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말하는 것으로 닥나무 추출물을 1.04, 1.82, 2.6, 3.38, 4.16 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 3회 반복 측정하였으며 피크면적과 시료 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R²) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다.

정밀성: 반복성(repeatability)은 피크면적과 머무름 시간의 재현성은 표준용액을 가지고 시간의 변화에 따른 기계의 변화 정도를 보기 위하여 6회 주입하여 면적과 머무름 시간의 재현성을 확인하였다. 실험실 내 정밀성(intermediate precision)은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 같은 실험실 내에서 각각 서로 다른 실험일자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 얻은 측정값들 사이의 근접성으로 상대표준편차(RSD)로 판단하였다. 완전성(robustness)은 일내분석(intra-day)는 1일 3구간 진행하였고 일간분석(inter-day)는 1일 1구간으로 3일간으로 나누어 진행하여 변이성을 측정하였다.

정확성: 시료를 3가지 농도(1.3, 2.6, 3.9 mg/mL)로 조제하고 동일한 분석조건으로 6회 반복 주입하여 얻은 결과를 회수율(recovery)로 나타내어 정확성을 확인하였다.

검출한계 및 정량한계: 시료의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y절편을 구하였다. 검량선에서 기울기의 평균값과 y절편에 대한 표준편차를 구하여 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다.

정량한계=10×y절편의 표준편차/검량성 기울기의 평균값

검출한계=3.3×y절편의 표준편차/검량성 기울기의 평균값

결과 및 고찰

특이성 검증

불순물, 분해물, 배합성분 등의 공존하는 상태에서 다른 성분의 영향을 받지 않고 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 표준액과 닥나무 추출물의 HPLC 크로마토그램을 비교하여 피크가 분리됨을 확인한 결과 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며 표준액의 피크 유지시간(retention time, RT)과 추출물의 피크 RT가 일치하였다. 또한, blank에서는 표준액과 겹치는 피크가 없었으며 닥나무 추출물에 표준액을 스파이킹하여 시험한 결과 회수율은 100.53%로서 양호한 결과를 얻었다(Fig. 2). 또한, 표준용액과 닥나무 추출물의 PDA spectrum 측정에서도 같

은 spectrum을 확인하였다(Fig. 3). 위의 결과를 종합했을 때 본 분석방법은 특이성이 있음을 확인할 수 있다.

직선성 확인

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 크로마토그램에 대한 면적과 닥나무 추출물의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 닥나무 추출물을 1.04, 1.82, 2.6, 3.38, 4.16 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다(Fig. 4). Marmesin의 상관계수(R^2) 값은 0.9999로 모두 양호한 직선성을 나타내었다.

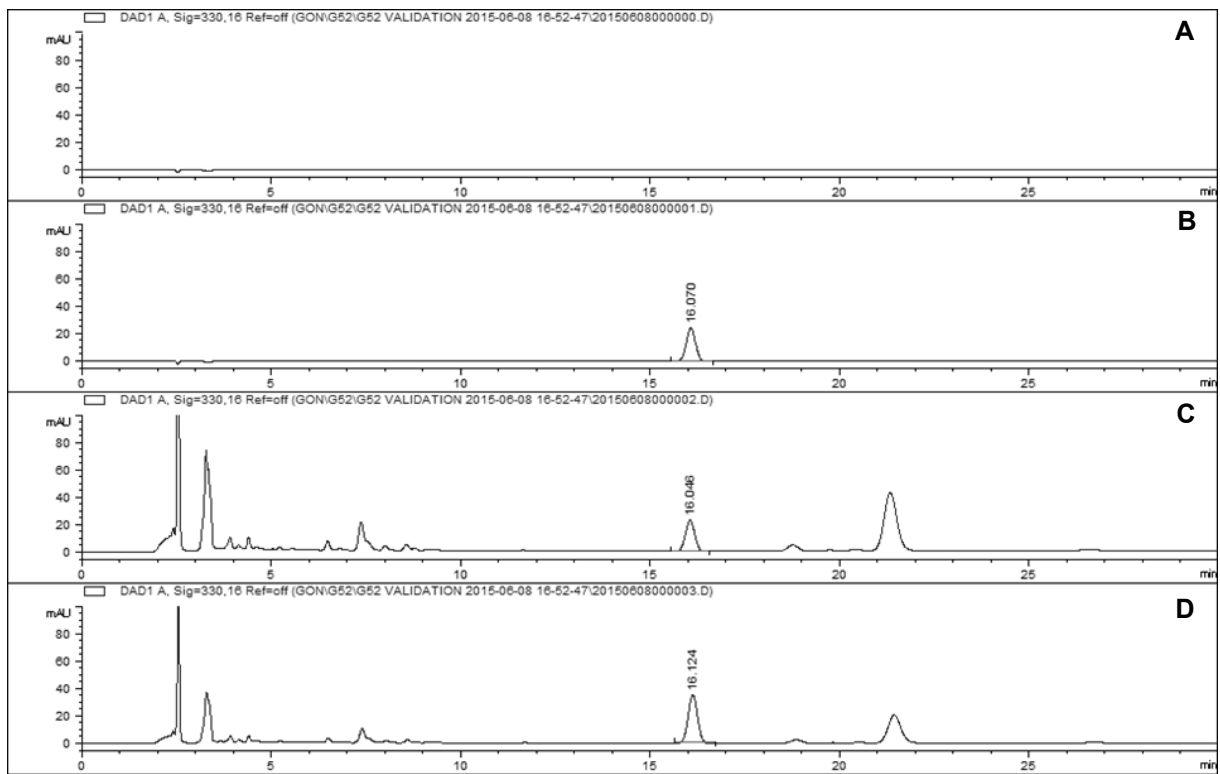


Fig. 2. HPLC chromatograms of marmesin. A: blank (60% EtOH), B: standard solution, C: *Broussonetia kazinoki* extract, and D: recovery test.

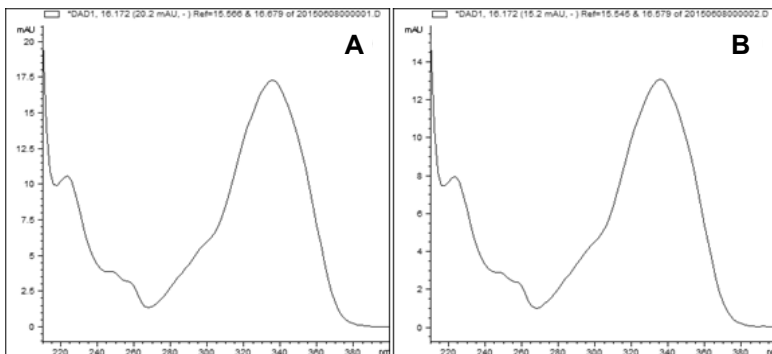


Fig. 3. PDA (Photo diode array) spectrum of marmesin. A: standard solution, B: *Broussonetia kazinoki* extract.

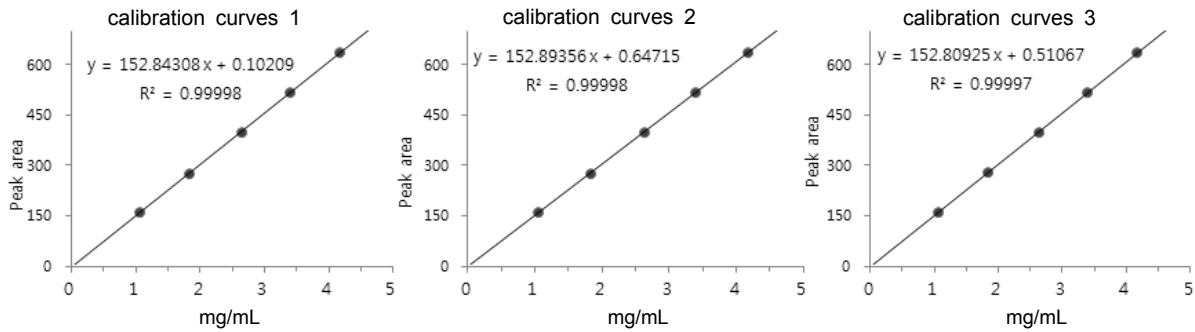


Fig. 4. Calibration curves of marmesin.

Table 2. Repeatability of marmesin analysis

Parameters		Precision	
		Mean±SD	RSD (%)
Concentration (1.3 mg/mL)	RT	15.784±0.01	0.04
	Area	199.820±0.53	0.26
Concentration (2.6 mg/mL)	RT	15.763±0.01	0.06
	Area	401.531±1.17	0.29
Concentration (3.9 mg/mL)	RT	15.788±0.01	0.04
	Area	605.416±1.83	0.30

Table 3. Intermediate precision of marmesin analysis

Parameters		Precision	
		Mean±SD	RSD (%)
Concentration (1.3 mg/mL)	RT	16.112±0.01	0.07
	Area	191.203±0.15	0.08
Concentration (2.6 mg/mL)	RT	16.079±0.004	0.03
	Area	382.589±0.22	0.06
Concentration (3.9 mg/mL)	RT	16.179±0.03	0.17
	Area	576.929±0.90	0.16

정밀성 확인

반복성: 균질한 검체로부터 다수의 시료를 취해 반복적으로 시험을 시행할 때 각 시험 결과의 일치 정도를 나타내는 것으로 닥나무 추출물 1.3, 2.6, 3.9 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 성분별 3가지 농도의 피크의 RT 및 피크면적의 RSD는 0.04~0.30%로 나타나 RSD 2% 이하로서 반복성이 있음을 확인하였다(Table 2).

실험실 내 정밀성: 같은 실험실 내에서 각각 서로 다른 실험일, 시험자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 나타내는 것으로 칼럼과 HPLC 및 시험 일자를 다르게 하여 실시한 실험실 내 정밀성은 각 성분 3가지 농도의 피크의 유지시간 및 피크면적의 RSD는 0.03~0.30%로 나타나 RSD 2% 이하로서 실험실 내 정밀성이 있음을 확인하였다(Table 3, 4).

완건성: Intra-day, inter-day의 정밀도(RSD)를 측정된 결과는 Table 5와 같으며 intra-day에서의 RSD는 0.25~0.42%를 나타내었고, inter-day에서는 0.32~0.70%의 RSD를 나타내었다.

회수율을 이용한 정확성 확인

측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하며, 닥나무 추출물을 가지고 기재된 방법으로 기준 농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 같은 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 회수율은 95.0~105.0%, RSD는 모두 2.0% 이하로서 정확성을 확인하게 된다.

닥나무 추출물을 1.3, 2.6, 3.9 mg/mL의 세 농도로 조제하고 같은 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분 3가지 농도의 회수율은 100.35~101.18%였으며 RSD는 0.27~0.30%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다(Table 6).

검출한계 및 정량한계 확인

검출한계는 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량을 말하며 정량한계는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 나타낸다. 닥나무 추출물의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 각각의 검량선을 작성하여 검량선의 기울기

Table 4. Intermediate precision of marmesin analysis by different users

		Marmesin					
		50%		100%		150%	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
User1	RT	15.784±0.01	0.04	15.763±0.01	0.06	15.788±0.01	0.04
	Area	199.820±0.53	0.26	401.531±1.17	0.29	605.416±1.83	0.30
User2	RT	16.112±0.01	0.07	16.079±0.004	0.03	16.179±0.03	0.17
	Area	191.203±0.15	0.08	382.589±0.22	0.06	576.929±0.90	0.16

Table 5. Precision of marmesin in *Broussonetia kazinoki* extract for validation

	Precision	
	Mean±SD	RSD (%)
Intra-day	64.56±0.27	0.42
	131.03±0.36	0.27
	195.58±0.48	0.25
Inter-day	64.68±0.45	0.70
	130.96±0.61	0.47
	195.56±0.63	0.32

Table 6. Accuracy of HPLC analysis for marmesin

Concentration (mg/mL)	Recovery (%)	
	Mean±SD	RSD (%)
1.3	100.35±0.27	0.27
2.6	100.70±0.29	0.29
3.9	101.18±0.31	0.30

Table 7. Limit of detection and limit of quantitation of marmesin

Instrument	Limit of detection (µg/mL)	Limit of quantitation (µg/mL)
HPLC 1100 series	2.8	8.4
HPLC 1200 series	6.2	18.6

와 y절편을 구하였다. 각각의 검량선에서 기울기의 평균값과 y절편에 대한 표준편차를 구하여 반응의 표준편차와 검정곡선의 기울기에 근거하는 방법(standard deviation of the response and the slope)으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다(Table 7). 직선상의 검출한계(LOD)는 2.8~6.2 µg/mL였으며 정량한계(LOQ)는 8.4~18.6 µg/mL로 나타났다.

요 약

본 연구는 HPLC를 이용하여 닥나무 추출물을 건강기능식품 원료로 개발하기 위하여 지표성분인 marmesin의 분석법 설정과 분석법에 대한 검증을 하고자 하였다. 표준액과 닥나무 추출물은 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며, 표준액과 추출물의 피크 유지시간이 일치한 spectrum을 나타내었다. 또한, blank에서 표준액과 겹치는 피크가 없는 것으로 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관관계수(R^2)는 0.9999로 모두 양호한 직선성을 보였으며, 직선상의 검출한계는 2.8~6.2 µg/mL였고 정량한계는 8.4~18.6 µg/mL로 나타났다. 닥나무 추출물 1.3, 2.6, 3.9 mg/mL의 세 농도의 회수율은 100.35~101.18%였으며 정밀도는 0.27~0.30%로 나타나 정밀도 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다. 정밀성은 0.04~0.30%의 정밀도를, 실험실 내 정밀성에서는 0.03~0.30%의 정밀도를 나타내었고 intra-day에서의 정밀도는 0.25~0.42%, inter-day에서는 0.32~0.70%의 정밀도를 나타내어 닥나무 추출물의 지표성분 marmesin의 분

석법은 적합한 시험방법임이 검증되었다. 본 분석법은 닥나무 추출물의 건강기능식품 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 생각한다.

감사의 글

본 논문은 산림청 임업과학기술개발사업 과제(S121313L070120112)의 지원에 의해 수행된 연구 결과의 일부로서 감사드립니다.

REFERENCES

- Park HK, Park CB. 2009. A trend analysis of herbal crop industry. Abstract presented at Annual Meeting of the Korean Society of Breeding Science. Daejeon, Korea. p 36.
- Heo J. 2005. *Donguibogam*. Bubin Publishers, Seoul, Korea. p 1323.
- Choi TH, Cho NS. 1996. New Korean traditional paper-making from paper mulberry (I). *J Korea TAPPI* 28: 49-59.
- Ikuta J, Hano Y, Nomura T, Kawakami Y, Sato T. 1986. Components of *Broussonetia kazinoki* SIEB. I. Structures of two new isoprenylated flavans and five new isoprenylated 1, 3-diphenylpropane derivatives. *Chem Pharm Bull* 34: 1968-1979.
- Ko HH, Yen MH, Wu RR, Won SJ, Lin CN. 1999. Cytotoxic isoprenylated flavans of *Broussonetia kazinoki*. *J Nat Prod* 62: 164-166.
- Zhang PC, Wang S, Wu Y, Chen RY, Yu DQ. 2001. Five new diprenylated flavonols from the leaves of *Broussonetia kazinoki*. *J Nat Prod* 64: 1206-1209.
- Tsukamoto D, Shibano M, Okamoto R, Kusano G. 2001. Studies on the constituents of *Broussonetia* species VIII. Four new pyrrolidine alkaloids, broussonetines R, S, T, and V and a new pyrrolidine alkaloid, broussonetine U, from *Broussonetia kazinoki* Sieb. *Chem Pharm Bull* 49: 492-496.
- Lee JK, Ha H, Lee HY, Park SJ, Jeong SI, Choi YJ, Shin HK. 2010. Inhibitory effects of heartwood extracts of *Broussonetia kazinoki* Sieb on the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1802-1806.
- Park SA, Ha JH, Park SN. 2013. Antioxidative activity and component analysis of *Broussonetia kazinoki* SIEB extracts. *Appl Chem Eng* 44: 177-183.
- Lee HJ, Park JH, Jang DI, Ryu JH. 1997. Antioxidant components from *Broussonetia kazinoki*. *Yakhak Hoechi* 41: 439-443.
- Ryu JH, Ahn H, Lee HJ. 2003. Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. *Fitoterapia* 74: 350-354.
- Jang DI, Lee BG, Jeon CO, Jo NS, Park JH, Cho SY. 1997. Melanogenesis inhibitor from paper mulberry. *Cosmetics & Toiletries* 112: 59-62.
- Ahn JH, Liu Q, Lee C, Ahn MJ, Yoo HS, Hwang BY, Lee MK. 2012. A new pancreatic lipase inhibitor from *Broussonetia kazinoki*. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 2760-2763.
- Lee H, Li H, Jeong JH, Noh M, Ryu JH. 2016. Kazinol B from *Broussonetia kazinoki* improves insulin sensitivity via Akt and AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Fitoterapia* 112: 90-96.
- Bae UJ, Jang HY, Lim JM, Hua L, Ryu JH, Park BH. 2015.

- Polyphenols isolated from *Broussonetia kazinoki* prevent cytokine-induced β -cell damage and the development of type 1 diabetes. *Exp Mol Med* 47: e160.
16. Jung YC, Han S, Hua L, Ahn YH, Cho H, Lee CJ, Lee H, Cho YY, Ryu JH, Jeon R, Kim WY. 2016. Kazinol-E is a specific inhibitor of ERK that suppresses the enrichment of a breast cancer stem-like cell population. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 294-299.
 17. Griffioen AW, Molema G. 2010. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52: 237-268.
 18. Kim JH, Kim JK, Ahn EK, Ko HJ, Cho YR, Lee CH, Kim YK, Bae GU, Oh JS, Seo DW. 2015. Marmesin is a novel angiogenesis inhibitor: Regulatory effect and molecular mechanism on endothelial cell fate and angiogenesis. *Cancer Lett* 369: 323-330.
 19. KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc.* Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. p 1-18.