

# 꾸지뽕나무 열매 isoflavonoid 화합물에 대한 정량분석법 개발<sup>1</sup>

윤순영<sup>2</sup> · 김석주<sup>2</sup> · 심수진<sup>3</sup> · 이학주<sup>3,†</sup>

## Development of Quantitative Analytical Method for Isoflavonoid Compounds from Fruits of *Cudrania Tricuspidata*<sup>1</sup>

Sun Young Yoon<sup>2</sup> · Seok Ju Kim<sup>2</sup> · Su Jin Sim<sup>3</sup> · Hak-Ju Lee<sup>3,†</sup>

### 요 약

본 연구는 꾸지뽕나무 열매에서 분리 및 정제한 isoflavonoid 성분에 대하여 Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)을 이용하여 분석법을 개발하고 검증하고자 하였다. 꾸지뽕나무 열매를 methanol로 추출하여 *n*-hexane, ethyl acetate, 물 순으로 분액 후, ethyl acetate 추출물을 silica gel 컬럼과 sephadex LH-20 컬럼을 사용하여 4종의 isoflavonoid들을 분리하였다. 분리한 4종의 isoflavonoid들은 기기분석(UV-Vis spectroscopy, ESI-MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR)을 통하여 alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein, 4'-*O*-methylalpinumisoflavone으로 확인 및 동정하였다. 이 성분들을 2% acetic acid 용액(용매 A)과 2% acetic acid가 함유된 MeOH 용액(용매 B)을 기용기 이동상으로 하여 C<sub>18</sub> 컬럼이 장착된 UPLC로 분석하였다. 분석 조건은 ICH (International Conference on Harmonisation) 가이드라인에 기술된 선택성, 직선성, 정량한계, 검출한계, 정확성 및 정밀성을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다. 또한 검증한 분석방법을 이용하여 꾸지뽕나무 열매의 채취시기별 함량을 조사하였다. 그 결과, 미숙과는 7월과 8월에 각 성분의 함량이 증가하였다가 9월에는 감소하였고, 성숙과의 경우 9월 미숙과 보다 각 성분들이 전반적으로 많이 함유되어 있었다.

### ABSTRACT

In this study, an analytical method to evaluate the quality of isoflavonoid compounds purified and isolated from the fruits of *Cudrania tricuspidata* was developed and validated using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). The fruits of *C. tricuspidata* were extracted with methanol and further fractionated with *n*-hexane, ethyl acetate and water. The resulting ethyl acetate extract separated into four isoflavonoid compounds by a combination of silica gel

<sup>1</sup> Date Received March 2, 2016, Date Accepted May 10, 2016

<sup>2</sup> 국립산림과학원 화학미생물과. Division of Wood Chemistry & Microbiology, Department of Forest Products, National Institute of Forest Science, Seoul, 02455, Republic of Korea

<sup>3</sup> 국립산림과학원 산림약용자원연구소. Forest Medicinal Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Yeongju, 36040, Republic of Korea

<sup>†</sup> 교신저자(Corresponding author): 이학주(email: leehj99@korea.kr)

and sephadex LH-20 column chromatography. The structures of the compounds were elucidated as alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl genistein, 6,8-diprenyl orobol, 4'-O-methylalpinumisoflavone by various techniques such as UV-Vis, ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Finally, a method to characterize the compounds was developed by using the UPLC equipped with a  $\text{C}_{18}$  column and a gradient mobile phase system consisting of 2% acetic acid in water (solvent A) and 2% acetic acid in methanol (solvent B). The developed method was validated with the parameters such as selectivity, linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, and precision, which are defined by the ICH (International Conference on Harmonization). Using the validated method, the compounds in the fruits harvested in different months were also quantitatively analyzed. We propose this approach this approach can readily be utilized as an efficient evaluation method to quantify the extracts of *C. tricuspidata*.

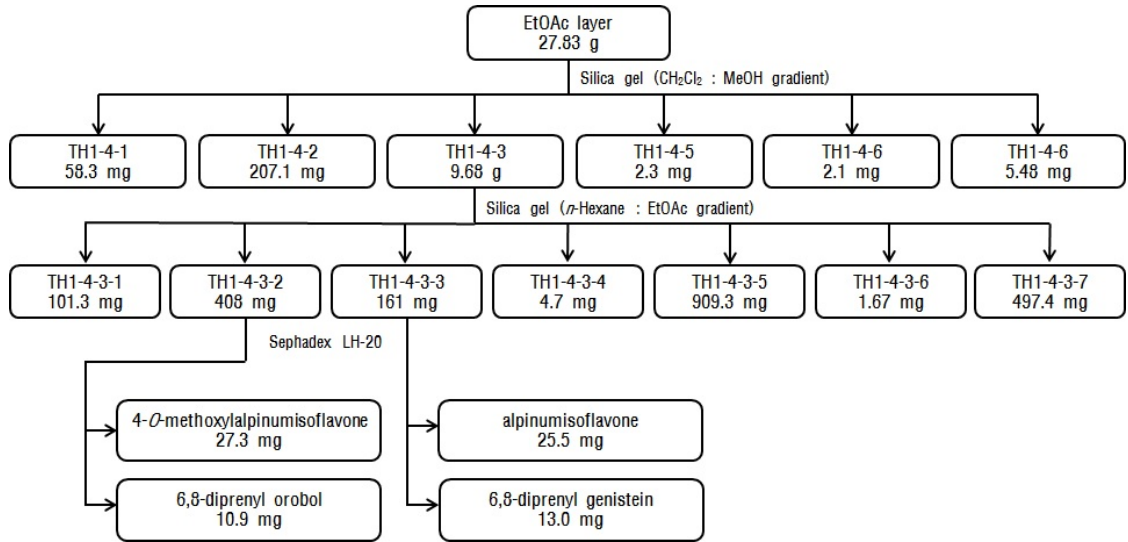
**Keywords:** *Cudrania tricuspidata*, alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl genistein, 6,8-diprenyl orobol, 4'-O-methylalpinumisoflavone, ultra performance liquid chromatography, validation

## 1. 서 론

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하며 동아시아 전역에 널리 분포되어 있는 낙엽 소교목 또는 관목이다. 꾸지뽕나무 잎과 열매는 식품원료로서 사용가능하고 한방에서는 잎, 열매, 줄기 등이 약용으로 사용하고 있으며 민간에서는 암 치료를 위해 사용하고 있다(Choi 등, 2012; Jung 등, 2013; Koh 등, 2014; Kim 등, 2014). 꾸지뽕나무 열매의 methanol (MeOH) 및 ethanol (EtOH) 추출물에서는 polyphenol과 flavonoid들의 함량이 높고 항산화 활성이 좋다고 보고된 바 있으며(Youn과 Kim, 2012; Choi 등, 2009), Seo 등(2013)은 발효된 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 polyphenol이 면역 증강 효과가 있다고 보고하였다. 꾸지뽕나무 열매의 methylene chloride 추출물은 뇌에서 monoamine의 산화를 억제하는 효과가 있으며, 이와 관련된 12가지의 prenyl 및 benzyl flavonoid들이 분리 및 동정되었다(Xiang 등, 2005; Xiang 등, 2009). 또한 Jeong 등(2010)은 꾸지뽕나무 열매가 산화 스트레스에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 있다고 보고하였으며, Lee 등(2015)은 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 6,8-diprenyl orobol이 동맥경화억제, 간 보호작용, 항염증 등의 활성이 있다고 보고하였다. 이처럼 다양한 활성을 가진 것으로 나타난 꾸지뽕나무는 최근 꾸지뽕 열매 음료, 꾸지뽕 잎 차 등이 개발되어 시판되는 등 기능성식품으로 개발이 진행되고 있다

(Kim, 2012).

한편, 식품 류의 isoflavonoid 화합물의 분석은 기본적으로 알코올을 이용하여 추출한 다음 acetic acid를 함유한 물과 acetonitrile을 기울기 이동상으로 사용한 HPLC 분석법(Mauricio 등, 2003; Radka 등, 2007) 또는 acetic acid를 함유한 물과 MeOH를 기울기 이동상으로 사용한 HPLC 분석법(Qizhen 등, 2001; Mauricio 등, 2005)이 사용되고 있다. 상기한 분석법은 일부 조건을 변형하고 검증되어 건강기능식품공전에 soybean isoflavonoids의 함량기준에 관한 규정으로 사용되고 있다. 또한 Association of Official Agricultural Chemists (AOAC)나 미국약전(The United States Pharmacopeial, USP) 표준제조기준(Monograph method)에서도 기본적으로 차이가 없다(AOAC, 2008; USP, 2011). 그러나 이들은 모두 콩류를 사용한 식품을 기준으로 한 규정으로, 꾸지뽕나무 열매에 대한 함량기준에 관한 규정은 없기 때문에 건강기능식품으로 개발하기 어려운 실정이며, 함량기준에 관한 규정을 만들기 위해서는 함량분석법의 개발 및 검증이 반드시 필요하다. 따라서 본 연구는 우리나라 전국각지에서 재배되며 민간에서 약용으로 사용하고 있으나 꾸지뽕나무 열매의 성분 함량기준에 관한 규정이 없는 점에 착안하여 주성분인 isoflavonoid 성분을 분리 동정하고, UPLC-PDA를 이용 다성분 함량분석을 실시하여 꾸지뽕나무 열매에 대한 성분 분석방법을 개발하고 검증한 후, 시기별 함량을 조사하여 가이드라인을 설정하는데 목



**Scheme 1.** The column chromatography flow-chart for separation and isolation of 4 isoflavonoid compounds from EtOAc extracts of fruits of *C. tricuspidata*.

적이 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료 및 시약

본 실험에서 물질 분리에 사용한 꾸지뽕나무(*C. tricuspidata*) 열매는 2013년 9월 함평꾸지뽕나무 영농조합 농장(전북 함평군 학교면 죽정리)에서 채취하였다. 시기별 함량 조사에 사용한 꾸지뽕나무 열매는 전남 함평에서 각각 2014년 6, 7, 8, 9월에 15일 ± 5일을 전후하여 채취하였다. 6월~8월의 꾸지뽕나무 열매는 모두 미숙과이고, 9월에는 미숙과와 성숙과를 각각 구분하여 채취한 열매를 시료로 사용하였다.

함량분석법 개발을 위해 표준물질로 사용한 alpinumisoflavone (95%), 6,8-diprenyl genistein (95%), 6,8-diprenyl orobol (95%), 4'-O-methylalpinumisoflavone (95%)은 한국한방산업진흥원 천연물 물질은행에서 구입하여 사용하였다. 추출에 사용된 발효주정(95.1~96.9%)은 에스에스팜 주식회사에서 구입하였다. 분획, 정제 및 UPLC 분석에서 사용한 MeOH,

*n*-hexan, ethyl acetate (EtOAc), methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), glacial acetic acid은 HPLC 등급의 J.T.Baker (USA)제품을 사용하였고, water는 Fisher Science (USA)제품을 사용하였다.

### 2.2. 추출 및 용매분획

채취한 꾸지뽕나무 열매(10.7 kg)는 40℃에서 건조기로 72시간 건조한 후, 여기서 얻어진 꾸지뽕나무 열매는 MeOH을 사용하여 실온에서 72시간 동안 침적시켜 추출하였다. 얻어진 추출물(630.95 g)은 40℃에서 진공농축기로 농축한 후, 물질 분리용 시료로 사용하였다. 열매추출물은 증류수에 현탁 시킨 후 *n*-hexane (48.43 g), EtOAc (27.83 g) 및 증류수를 사용하여 순차적으로 용매분획 하였다.

### 2.3. 물질분리

물질분리를 위해 상기의 EtOAc 가용부(27.83 g)로부터 용출용매를  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH을 사용한 silica gel column으로 분획한 후, 박층크로마토그래피

(Thin Chromatography, TLC)로 확인하여 6개의 분획물 (TH1-4-1-TH-1-4-6)로 나누었다. 다시 분획물 TH1-4-3 (9.68 g)으로부터 *n*-hexane : EtOAc를 용출용매로 사용한 silica gel column을 이용하여 분획한 후, TLC로 확인하여 7개의 분획물(TH1-10-1-TH-1-10-7)로 나누었으며, 다시 분획물(TH1-10-2)와 분획물(TH1-10-3)으로부터 Sephadex LH-20 등을 이용하여 각각 화합물들을 분리·정제하였다(Scheme 1).

## 2.4. 기기분석

분리된 화합물들은 UV-Vis spectroscopy (Optizen pop, Korea), ESI-MS (Waters Q-TOF micromass spectroscopy, USA) 및  $^1\text{H} \cdot ^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy (Varian 500 MHz, USA) 등의 기기를 사용하여 구조를 동정하였다.

### 2.4.1. 화합물 1 (alpinumisoflavone)

Yellow needle. ESI-MS  $m/z$  337  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . UV  $\lambda_{\text{max}}$  281 nm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.1 (1H, s, 5-OH), 7.81 (1H, s, H-2), 7.35 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-2', H-6'), 6.84 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3', H-5'), 6.72 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-4''), 6.34 (1H, s, H-8), 5.63 (1H, d,  $J = 10.0$  Hz, H-3'''), 1.47 (6H, s, H-5'', H-6'', - $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  181.1 (C-4), 159.7 (C-7), 157.4 (C-9), 157.0 (C-5), 156.2 (C-4'), 152.8 (C-2), 130.4 (C-2', C-6'), 128.3 (C-3''), 123.7 (C-3), 122.8 (C-1'), 115.8 (C-3', C-5'), 115.6 (C-4''), 106.2 (C-10), 105.6 (C-6), 95.0 (C-8), 78.2 (C-2''), 28.4 (C-5'', C-6''- $\text{CH}_3$ ).

### 2.4.2. 화합물 2 (6,8-diprenyl orobol)

Yellow needle. ESI-MS  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 421  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . UV  $\lambda_{\text{max}}$  272 nm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.1 (1H, s, 5-OH), 7.87 (1H, s, H-2), 6.95 (1H, d,  $J = 1.1$  Hz, H-2'), 6.80 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.73 (1H, dd,

$J = 8.1, 1.1$  Hz, H-6'), 5.23 (1H, m, H-2''), 5.21 (1H, m, H-2'''), 3.45, (2H, m, H-1''), 3.43 (2H, m, H-1'''), 1.83 (3H, s, H-4''), 1.82 (3H, d,  $J = 0.9$  Hz, H-5'''), 1.75 (3H, s, H-5''), 1.73 (3H, d,  $J = 0.9$  Hz, H-4''').

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  181.9 (C-4), 163.6 (C-9), 160.0 (C-7), 157.4 (C-5), 153.4 (C-2), 144.8 (C-4'), 144.1 (C-3'), 135.6 (C-3''), 134.5 (C-3'''), 123.6 (C-3), 122.8 (C-1'), 121.5 (C-2'''), 121.4 (C-6'), 121.4 (C-2''), 116.6 (C-2'), 115.6 (C-5'), 110.6 (C-6), 105.8 (C-10), 105.7 (C-8), 26.0 (C-5''), 25.9 (C-4'''), 21.8 (C-1''), 21.8 (C-1'''), 18.1 (C-4''), 18.0 (C-5''').

### 2.4.3. 화합물 3 (6,8-diprenyl genistein)

Yellow needle. ESI-MS  $m/z$  407  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 405  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . UV  $\lambda_{\text{max}}$  270 nm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.1 (1H, s, 5-OH), 7.82 (1H, s, H-2), 7.26 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-2', H-6'), 6.77 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3', H-5'), 5.18 (1H, m, H-2''), 5.14 (1H, m, H-2'''), 3.40 (2H, m, H-1''), 1.76 (3H, d,  $J = 1.1$  Hz, H-4''), 1.75 (3H, d,  $J = 0.7$  Hz, H-5'''), 1.69 (3H, d,  $J = 1.1$  Hz, H-5''), 1.66, (3H, d,  $J = 0.7$  Hz, H-4''').

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  181.6 (C-4), 159.7 (C-7), 157.6 (C-5), 156.6 (C-4'), 153.5 (C-9), 152.8 (C-2), 135.6 (C-3''), 134.2 (C-3'''), 130.4 (C-2', C-6'), 123.4 (C-3), 122.7 (C-1'), 121.7 (C-2'''), 121.4 (C-2''), 115.8 (C-3', C-5'), 110.4 (C-6), 105.9 (C-10), 105.4 (C-8), 26.0 (C-5''), 25.9(C-4'''), 21.8 (C-1''), 21.8 (C-1'''), 18.1 (C-5'''), 18.0 (C-4'').

### 2.4.4. 화합물 4 (4'-O-methylalpinumisoflavone)

Yellow needle. ESI-MS  $m/z$  351  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 349  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . UV  $\lambda_{\text{max}}$  282 nm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.2 (1H, s, 5-OH), 7.82 (1H, s, H-2), 7.45 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3', H-5'), 6.73 (1H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-4''), 6.33 (1H, s, H-8), 5.62 (H, d,  $J = 10.1$  Hz, H-3''), 3.84

(3H, s, H-4', -OCH<sub>3</sub>), 1.47 (6H, s, H-5'', H-6''-CH<sub>3</sub>).  
<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 181.0 (C-4), 159.9 (C-4'), 159.7 (C-7), 157.3 (C-9), 157.1 (C-5), 152.6 (C-2), 130.3 (C-2', C-6'), 128.3 (C-3''), 123.6 (C-3), 123.1 (C-1'), 115.6 (C-4''), 114.2 (C-3', C-5'), 106.2 (C-10), 105.7 (C-6), 95.0 (C-8), 78.2 (C-2''), 55.5 (C-4', -OCH<sub>3</sub>), 28.4 (C-5'', C-6'', -CH<sub>3</sub>).

## 2.5. UPLC 분석

추출조건은 식약처에서 발간한 건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서(Korea Food & Drug Administration, 2008)를 바탕으로 추출용매별, 추출시간별, 추출횟수 및 건조방법을 각각 실험하여 추출 수율이 높은 방법으로 추출 조건을 설정하였고, 정량 분석을 위한 시료의 전처리 및 UPLC 분석 조건은 건강기능식품공전 3-54 분석방법을 변형하여 사용하였다(Korea Food & Drug Administration, 2014).

### 2.5.1. 표준물질의 조제

표준물질로 사용한 alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein, 4'-O-methylalpinumisoflavone 2.0 mg을 정밀히 측정하고 10 ml 부피플라스크에 넣은 다음 MeOH을 가하여 완전히 녹인 후 이를 표준원액으로 사용하였다. 표준원액은 MeOH을 사용하여 각각 200, 100, 50, 25, 12.5 µg/ml로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

### 2.5.2. 시험용액의 조제

동결 건조한 꾸지뽕나무 열매 10 g을 50% 주정 100 ml를 사용하여 상온에서 24시간 침적시켜 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 6 여과지를 사용하여 여과한 다음, 회전 진공농축기로 40℃에서 농축하여 조추출물을 제조하였다. 제조된 조추출물은 동결건조기로 건조 후 지표성분 함량 분석시료로 사용하였으며, 각 실험은 3회 반복하였다.

50 ml conical 시험관에 꾸지뽕나무 열매 조추출물 200 mg와 80% MeOH 10 ml를 넣은 후 vortex

mix로 5분간 교반하고, 1시간 동안 초음파 추출을 실시하였다. 추출용액은 원심분리기에서 10분간 3000 rpm으로 원심 분리한 다음 상등액을 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과하고, 그 여과액을 검액으로 사용하였다.

### 2.5.3. UPLC 분석 조건

표준물질과 꾸지뽕나무 열매 추출물의 분석은 Photodiode Array (PDA) detector가 장착된 Waters Acquity I-class UPLC system (Waters, USA)을 사용하여 분석하였다. 컬럼은 Waters Acquity C18 column (1.7 µm, 150 × 2.1 mm, USA)을 사용하였고 컬럼 온도는 40℃를 유지하였다. 이동상은 0.25 ml/min의 유속으로 2% acetic acid 용액(용매 A)과 2% acetic acid가 함유된 MeOH 용액(용매 B)을 20 : 80의 비율로 시작하여 6분, 14 : 86 → 7분, 0 : 100, 1분 유지 → 9분, 20 : 80, 3분 유지의 비율로 12분간 용매 비율을 변화시켜 사용하였다. 시료 주입량은 2 µl이었고, PDA 검출기는 UV 270 nm에서 측정하였다. 각 isoflavone의 함량은 식 (1)을 사용하여 계산하였다.

$$\text{Isoflavone 함량}(\mu\text{g/g}) = A \times (B / S) \times P \dots (1)$$

A : 시료의 농도(µg/ml)

B : 시험용액의 전량(ml)

S : 시료채취량(g)

P : 표준품의 순도

### 2.5.4. UPLC를 이용한 분석법 검증(validation)

꾸지뽕나무 열매 추출물에서 분리한 4가지 주성분을 지표로 하여 분석법을 설정하고 International Conference on Harmonisation (ICH, 2005) 가이드라인을 기준으로 분석법을 검증하였다. 4가지 표준물질을 농도별로 반복측정하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)을 측정하여 분석법을 검증하였다.

특이성(specificity)은 4가지 표준물질을 혼합하였

을 경우 피크가 확실하게 분리되어 나타나는 것으로 확인하였다.

직선성(linearity)은 각 농도별 표준물질을 3회 반복측정한 것을 이용하여 검량선 식과 상관계수(correlation coefficient,  $R^2$ )를 구하여 직선성을 확인하였다.

LOD와 LOQ는 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정된 평균값으로 검량선 식을 구하고, y절편의 표준편차와 기울기를 사용하여 식 (2), (3)에 따라 계산하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma / S \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / S \dots\dots\dots (3)$$

$\sigma$ : y절편의 표준편차

S: 검량선의 기울기

정확성(accuracy)은 일정농도의 표준물질을 3회 반복 측정하여 UPLC 크로마토그램에서 표준물질 피크 면적의 결과로 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)를 확인하여 측정하였다.

정밀성(precision)은 반복성(repeatability)과 실험실 내 정밀성(intermediate precision)으로 확인하였다. 반복성은 확립된 분석방법에서 시행한 최저 시험농도(25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 100%에 해당하는 농도(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 표준용액을 조제하여 3회 반복 측정하고 이에 따른 결과를 RSD%로 확인하였다. 실험실 내 정밀성은 다른 실험자가 각각 4개의 표준용액을 조제한 후 3회 반복 측정하고 이에 따른 결과를 RSD%로 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 물질의 분리 및 구조동정

##### 3.1.1. 화합물 1

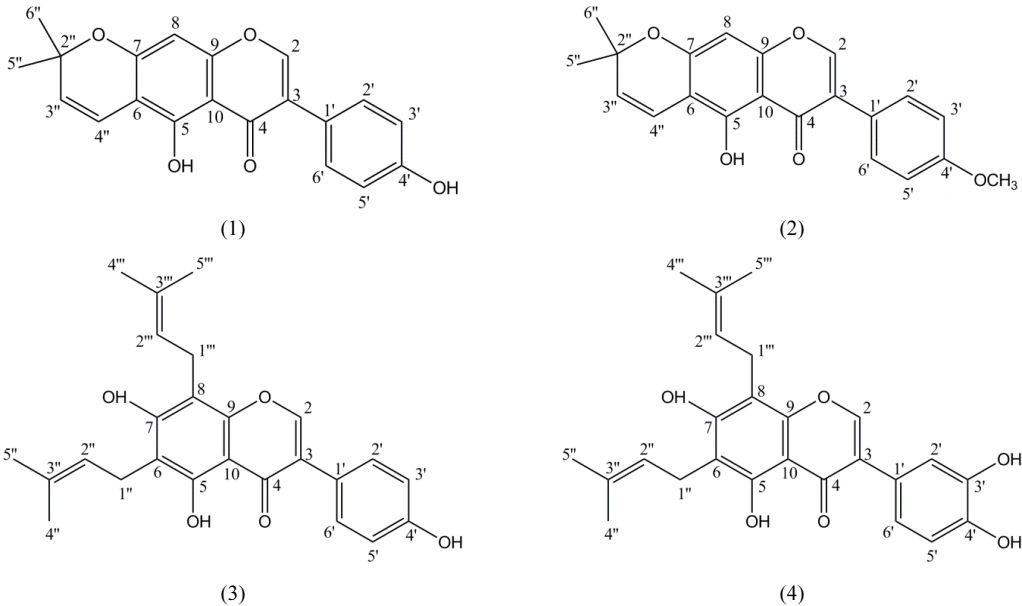
화합물 1은 노란색 침상결정체로 분리되었으며, 질량분석기(ESI-MS)로 측정된 결과 positive 분자이온 피크가  $m/z$  337  $[\text{M} + \text{H}]^+$ 을 나타냈다. UV 측정에서  $\lambda_{\text{max}}$  281 nm에서 최대 파장을 나타냈다.

화합물 1의  $^1\text{H}$  NMR에서  $\delta_{\text{H}}$  13.1의 위치에 singlet로 나타나는 isoflavone 골격의 C-5위치에 분자간 수소결합(intramolecular hydrogen-bonded)에 기인된 OH기의 존재를 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR에서의  $\delta_{\text{C}}$  157.0의 시그널은 C-5위의 탄소에 귀속하였다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  7.35 (2H, d, H-2', H-6')와  $\delta_{\text{H}}$  6.84 (2H, d, H-3', H-5')의 4H의 해당하는 수소에 나타난 2개의 doublet 시그널( $J = 8.6$  Hz)은 전형적인 1-, 4-, 2-치환 벤젠핵의 존재를 나타내고 있다.  $\delta_{\text{H}}$  1.47에 나타난 6H에 해당하는 시그널은 분자구조 내에 2개의 메틸기(H-5'', H-6'')에서 기인하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 화합물 1의  $^{13}\text{C}$  NMR에서  $\delta_{\text{C}}$  156.2은 C-4', 130.4은 C-2', C-6', 그리고  $\delta_{\text{C}}$  115.8은 C-3', C-5'의 탄소에 각각 귀속하였다. 이상의 기기분석 결과와 문헌 등을 비교한 결과, 화합물 1은 isoflavone 골격의 화합물에 C-6, C-7 위에 지환구조가 결합한 alpinumisoflavone으로 구조동정 하였다(Uddin 등, 2011; Fig. 1).

##### 3.1.2. 화합물 2

화합물 2는 노란색 침상결정체로 분리되었으며, 질량분석기(Mass spectrometry)로 측정된 결과 positive 분자이온 피크가  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , negative 분자이온 피크가  $m/z$  421  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 를 각각 나타냈다. UV 측정에서  $\lambda_{\text{max}}$  272 nm에서 최대 파장을 나타냈다.

화합물 2의  $^1\text{H}$  NMR에서  $\delta_{\text{H}}$  6.95 (1H, d, H-2'), 6.80 (1H, d, H-5'), 6.73 (1H, dd, 1.1 Hz, H-6')의 3H의 해당하는 수소에 나타난 2개의 doublet와 1개의 double doublet ( $J = 8.1, 1.1$  Hz) 시그널은 전형적인 1-, 3-, 4-, 3치환 벤젠핵의 존재를 나타내고 있다.  $\delta_{\text{H}}$  5.23 (1H, m), 3.43 (2H, m), 1.83 (3H, s), 1.75 (3H, s)와  $\delta_{\text{H}}$  5.21 (1H, m), 3.45, (2H, m), 1.82 (3H, d), 1.73 (3H, d)을 통해서 2개의 3-methylbut-3-enyl (prenyl) group이 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 화합물 2의  $^{13}\text{C}$  NMR에서  $\delta_{\text{C}}$  144.8는 C-4', 144.1는 C-3' 및 116.6는 C-2'의 탄소, 그리고 2개의 prenyl group가 결합한  $\delta_{\text{C}}$  110.6는 C-6,  $\delta_{\text{C}}$  105.7는 C-8 위의 탄소에 각각 귀속하였다. 이상의 기기분석 결과와 문헌 등을 비교하여 화합물 2는 C-6 위와 C-8 위에



**Fig. 1.** Structures of 4 isoflavonoids. The isoflavonoids are (1) alpinumisoflavone, (2) 4'-O-methylalpinumisoflavone, (3) 6,8-diprenyl genistein, (4) 6,8-diprenyl orobol.

2개의 prenyl group이 결합한 6,8-diprenyl orobol로 구조동정 하였다(Uddin 등, 2011; Fig. 1).

### 3.1.3. 화합물 3

화합물 3은 노란색 침상결정체로 분리되었으며, 질량분석기(ESI-MS)로 측정된 결과 positive 분자이온 피크가  $m/z$  407  $[M+H]^+$ , negative 분자이온이  $m/z$  405  $[M-H]^-$ 를 각각 나타냈다. UV 측정에서  $\lambda_{max}$  270 nm 최대 파장을 나타냈다.

화합물 3의  $^1H$  NMR의  $\delta_H$  7.26 (2H, d)와  $\delta_H$  6.77 (2H, d)의 4H에 해당하는 수소에 나타난 2개의 doublet ( $J = 8.5$  Hz) 시그널은 전형적인 1-, 4-, 2치환 벤젠핵의 존재와  $\delta_H$  5.18 (1H, m), 5.14 (1H, m), 3.40 (2H, m), 1.76 (3H, d,  $J = 1.1$  Hz), 1.75 (3H, d,  $J = 0.7$  Hz), 1.69 (3H, d,  $J = 1.1$  Hz), 1.66 (3H, d,  $J = 0.7$  Hz)의 시그널들은 화합물 3의 분자구조에 결합한 2개의 prenyl기에 유래하는 프로톤에 각각 기인한다. 또한 화합물 3의  $^{13}C$  NMR에서 2개의 prenyl group가 결합한  $\delta_C$  110.4는 C-6,  $\delta_C$  105.4는 C-8 위의 탄소에 각각 귀속하였다. 이상의 기기분석 결과와

문헌 등을 비교하여 화합물 3은 C-6, C-8 위의 탄소에 2개의 prenyl기가 부분구조로 결합된 6,8-diprenyl genistein으로 구조동정 하였다(Uddin 등, 2011; Fig. 1).

### 3.1.4 화합물 4

화합물 4는 노란색 침상결정체로 분리 되었으며, 질량분석기(ESI-MS)로 측정된 결과 positive 분자이온이  $m/z$  351  $[M+H]^+$ , negative 분자이온이  $m/z$  349  $[M-H]^-$ 를 각각 나타냈다. UV 측정에서는  $\lambda_{max}$  282 nm에서 최대 파장을 나타냈다.

화합물 4의  $^1H$  NMR에서  $\delta_H$  3.84 (3H, s, H-4')의 singlet 시그널은 전형적인 메톡실기(-OCH<sub>3</sub>)에 유래하는 프로톤에 귀속하였으며,  $\delta_H$  1.47의 나타나는 6H에 해당하는 singlet 시그널은 메틸기(-CH<sub>3</sub>)에 유래하는 것으로 확인할 수 있었다. 화합물 4의  $^{13}C$  NMR에서는  $\delta_C$  181.0은 C-4,  $\delta_C$  157.1은 C-5,  $\delta_C$  123.6은 C-3 위의 탄소에 각각 귀속하였다. 또한  $\delta_C$  55.5는 C-4' 위의 메톡실기,  $\delta_C$  28.4은 C-5'', C-6'' 위의 메틸기에 기인하는 탄소임을 확인 하였다. 이상

**Table 1.** Linearity of preservatives and correlation coefficients of standard compounds

Standard	Linear range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Slope	Intercept	Correlation coefficient ( $R^2$ )
alpinumisoflavone	12.5~200	42987	-41929	1.0000
6,8-diprenyl orobol	12.5~200	33146	-79712	0.9997
6,8-diprenyl genistein	12.5~200	45217	-29455	1.0000
4'-O-methylalpinumisoflavone	12.5~200	44682	-39243	1.0000

**Table 2.** LOD and LOQ of standard compounds

Standard	LOD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
alpinumisoflavone	2.89	8.77
6,8-diprenyl orobol	1.27	3.84
6,8-diprenyl genistein	0.84	2.54
4'-O-methylalpinumisoflavone	0.86	2.61

의 기기분석 결과와 문헌 등을 비교하여 화합물 4는 C-4' 위에 메톡실기가 결합한 4'-O-methylalpinumisoflavone로 확인 및 구조동정 하였다(Uddin 등, 2011; Fig. 1).

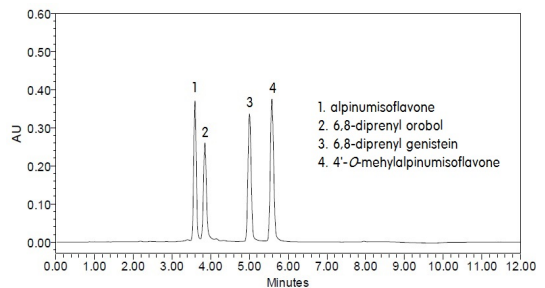
### 3.2. UPLC를 이용한 분석법 검증(validation)

#### 3.2.1. 특이성

Alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein, 4'-O-methylalpinumisoflavone을 혼합한 표준용액 분석 결과, 성분들의 머무름 시간은 각각 Rt. 3.59, 3.88, 4.98, 5.57분에 나타남으로써 명확하게 분리되었으므로 그 특이성을 확인하였다(Fig. 2).

12.5~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  범위의 표준용액을 각각 3회 반복하여 분석한 다음 검량선 식을 산출하였고, 그 결과 검량선 상관계수가 0.999 이상의 직선성을 보였다 (Table 1).

본 분석방법에 의한 LOD와 LOQ는 상술한 식 (2)와 (3)에 의하여 결정하였으며 그 결과, alpinumisoflavone은 각각 2.89  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6,8-diprenyl orobol은 각각 1.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6,8-diprenyl genistein은 각각 0.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4'-O-methylalpinumisoflavone은 각각 0.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유효한 측정이 가능



**Fig. 2.** UPLC chromatogram of standard compounds.

한 것으로 나타났다(Table 2).

본 분석방법의 정확성을 확인하기 위해 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에 대하여 3회 반복 실험하였으며, 검량선 식에 의해 구해진 값과 주입한 실제 값(참값)을 비교한 회수율(Recovery)을 계산하였다. 그 결과, alpinumisoflavone은  $100.01 \pm 0.79\%$ , 6,8-diprenyl orobol은  $97.10 \pm 1.10\%$ , 6,8-diprenyl genistein은  $99.90 \pm 0.32\%$ , 4'-O-methylalpinumisoflavone은  $98.69 \pm 0.67\%$ 의 회수율을 보였고 RSD는 전체적으로 3%를 넘지 않는 정확성을 보였다.

본 분석방법의 반복성을 확인하기 위하여 표준물질 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에 대하여 3회 반복 실험을 실시하였고, 실험실 내 정밀성을 확인하기 위하여 실험자를 변경하여 표준물질 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 제조,



**Table 3.** Accuracy of standard compounds

Standard	Injected conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Observed conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recovery (%)	RSD* (%)
alpinumisoflavone	25	25.16 $\pm$ 0.32	100.62 $\pm$ 1.27	1.27
	50	49.73 $\pm$ 0.17	99.45 $\pm$ 0.33	0.34
	100	99.92 $\pm$ 0.77	99.92 $\pm$ 0.77	0.77
	Total		100.01 $\pm$ 0.79	
6,8-diprenyl orobol	25	24.41 $\pm$ 0.03	97.64 $\pm$ 0.14	0.12
	50	47.91 $\pm$ 0.31	95.83 $\pm$ 0.63	0.65
	100	97.82 $\pm$ 2.53	97.82 $\pm$ 2.53	2.59
	Total		97.10 $\pm$ 1.10	
6,8-diprenyl genistein	25	24.92 $\pm$ 0.04	99.68 $\pm$ 0.16	0.16
	50	50.10 $\pm$ 0.35	100.20 $\pm$ 0.70	0.70
	100	99.82 $\pm$ 0.08	99.82 $\pm$ 0.08	0.08
	Total		99.90 $\pm$ 0.32	
4'-O-methylalpinumisoflavone	25	24.73 $\pm$ 0.37	98.90 $\pm$ 1.49	1.50
	50	48.85 $\pm$ 0.08	97.70 $\pm$ 0.17	0.16
	100	99.46 $\pm$ 0.37	99.46 $\pm$ 0.37	0.37
	Total		98.69 $\pm$ 0.67	

\* Relative standard deviation

**Table 4.** Repeatability of analytical results about 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of standard compounds

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		Peak area ( $\mu\text{V}^*\text{sec}$ )			
		alpinumisoflavone	6,8-diprenyl orobol	6,8-diprenyl genistein	4'-O-methylalpinumisoflavone
50	1	2087529	2219243	2219243	2145457
	2	2098041	2250838	2250838	2139310
	3	2101249	2237367	2237367	2145926
Mean		2095606	1508474	2235816	2143564
SD		7176	10370	15854	3692
RSD* (%)		0.34	0.69	0.71	0.17

\* Relative standard deviation

3회 반복 실험을 하였다. 그 결과, alpinumisoflavone은 0.34 RSD%, 6,8-diprenyl orobol은 0.69 RSD%, 6,8-diprenyl genistein은 0.71 RSD%, 4'-O-methylalpinumisoflavone은 0.17 RSD%의 반복성을 나타내었고(Table 4), 실험실 내 정밀성은 alpinumisoflavone이 0.23 RSD%, 6,8-diprenyl orobol이 0.30 RSD%, 6,8-diprenyl genistein이 0.18 RSD%, 4'-O-methylalpinumisoflavone이 0.90 RSD%의 정밀

성을 보였다(Table 5).

### 3.3. 확립된 분석법을 이용한 시기별 꾸지뽕나무 열매 추출물의 함량분석

전라남도 함평에서 재배된 꾸지뽕나무 열매의 시기별 alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein 및 4'-O-methylalpinumisoflavone의

**Table 5.** Intermediate precision of analytical results about 50 µg/ml of standard compounds

Conc. (µg/ml)	Peak area (µV*sec)			
	Alpinumisoflavone	6,8-diprenyl orobol	6,8-diprenyl genistein	4'-O-methylalpinumisoflavone
1	2063918	1480771	2233456	2194680
50	2069634	1481122	2237122	2163111
3	2069634	1488649	2229132	2158790
Mean	2064602	1483514	2233237	2172194
SD	4726	4450	4000	19594
RSD* (%)	0.23	0.30	0.18	0.90

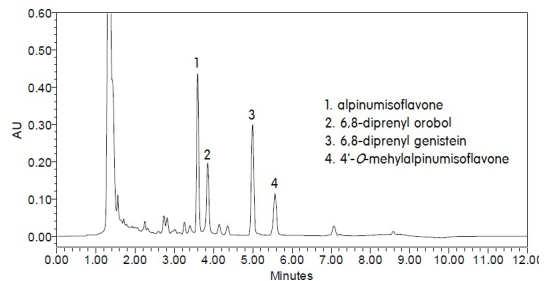
\* Relative standard deviation

**Table 6.** Alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein and 4'-O-methylalpinumisoflavone contents in crude extracts from fruits of *C. tricuspidata* by collected time

Collected time (month)	Alpinumisoflavone (µg/g)	6,8-diprenyl orobol (µg/g)	6,8-diprenyl genistein (µg/g)	4'-O-methylalpinumisoflavone (µg/g)
6	689.00 ± 3.89	2014.65 ± 6.97	2213.16 ± 8.32	126.88 ± 0.36
7	3065.65 ± 38.23	3535.27 ± 36.59	6030.59 ± 53.01	1069.87 ± 12.53
8	3222.06 ± 24.59	3686.16 ± 29.92	5262.81 ± 43.14	1804.69 ± 14.26
9 (unripe)	1590.18 ± 19.75	1036.66 ± 18.29	1362.78 ± 21.87	617.57 ± 9.90
9 (ripe)	1208.55 ± 12.88	2955.22 ± 32.21	3441.55 ± 34.06	1065.43 ± 10.22

함량을 조사하였으며, 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 꾸지뽕나무 열매 미숙과는 7월과 8월에 각 성분의 함량이 증가하였다가 9월에 감소하였다. 6,8-diprenyl genistein이 7월에 6030.59 ± 53.01 µg/g으로 많은 함유량을 보였고, alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol 및 4'-O-methylalpinumisoflavone은 8월에 각각 3686.16 ± 29.9 µg/g, 3222.06 ± 24.59 µg/g, 1804.69 ± 14.26 µg/g으로 많이 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 꾸지뽕나무 열매 성숙과의 경우 9월 미숙과보다 각 성분들이 전반적으로 많이 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 또한 9월 미숙과를 제외한 모든 시료에서 6,8-diprenyl genistein이 높은 함량을 나타냈다.

꾸지뽕나무 열매 추출물에서 4개 화합물의 성분이 모두 검출되며, Fig. 3과 같이 각 화합물에 대한 성분들의 머무름 시간이 각각 3.59, 3.88, 4.98, 5.57분에 나타남으로써 명확하게 분리되어 지표 성분으로 사용 가능할 것으로 판단된다.



**Fig. 3.** UPLC chromatogram of crude extracts from unripe fruits of *C. tricuspidata* collected in September.

본 연구에서는 꾸지뽕나무 열매의 성분을 밝히고 각 성분의 함량 분석을 위한 method validation 행하여 동시분석법을 개발하였다. 기존 문헌 조사에서는 꾸지뽕나무 가지에 대한 지표성분의 동시분석법 개발(Seo, 2012)이 있으나 꾸지뽕나무 열매에 대한 지표성분 분석은 찾을 수 없어 연구를 수행하였다. 또한 각 성분들에 대한 시기별 함량을 제시함으로

꾸지뽕나무 열매를 이용한 제품 개발에 활용할 수 있는 자료를 제공하며, 향후 꾸지뽕나무 열매의 지표 성분 설정에 방향을 제시하고자 하였다. 추후 지표 성분 설정을 위해서는 지역별, 시기별 꾸지뽕나무 열매의 함량 분석이 필요하다고 사료된다.

## 4. 결 론

꾸지뽕나무 열매를 methanol로 추출하고 용매 분획하여 얻은 ethyl acetate 가용부를 column chromatography를 실시하여 4종의 성분을 분리 및 정제하였다. 각종 기기분석(UV spectroscopy, ESI-MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR)을 통하여 alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein, 4'-O-methylalpinumisoflavone으로 확인 및 구조를 동정하였다. 분리된 성분들을 기준으로 하여 UPLC 분석조건을 확립하였고, 이 조건은 ICH 가이드라인을 기준으로 분석법 검증을 실시하여 선택성, 직선성, 정량한계, 검출한계, 정확성 및 정밀성을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

확립한 분석 조건을 바탕으로 UPLC를 이용하여 꾸지뽕나무 열매의 시기별 alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein 및 4'-O-methylalpinumisoflavone의 함량을 조사한 결과, 꾸지뽕나무 열매 미숙과는 7월과 8월에 각 성분의 함량이 증가하였다가 9월에 감소하였고, 6,8-diprenyl genistein 이 7월에 6030.59 ± 53.01 µg/g으로 많은 함유량을 보였고, alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol 및 4'-O-methylalpinumisoflavone은 8월에 각각 3686.16 ± 29.9 µg/g, 3222.06 ± 24.59 µg/g, 1804.69 ± 14.26 µg/g으로 많이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 꾸지뽕나무 열매 성숙과의 경우 9월 미숙과보다 각 성분들이 전반적으로 많이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합하여 꾸지뽕나무 열매에서 alpinumisoflavone, 6,8-diprenyl orobol, 6,8-diprenyl genistein, 4'-O-methylalpinumisoflavone 등 4개 성분을 분리 및 동정 하였고, UPLC를 이용하여 성분분석법을 개발하였으며, 분석법 검증을 통하여 분석법

의 타당성을 검증하였다. 이는 꾸지뽕나무 열매를 활용한 식품 및 건강기능식품 개발에 기초자료로서 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 추후 지역별, 채취시기별 꾸지뽕나무 열매 추출물에 대한 함량 분석이 필요하며, 이러한 함량 분석을 통하여 지표성분을 설정할 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2016년도 국립산림과학원 석·박사연구원십의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Choi, S.R., You, D.H., Jang, I., Ahn, M.S., Song, E.J., Seo, S.Y., Choi, M.K., Kim, Y.S., Kim, M.K., Choi, D.G. 2012. Cytotoxicity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau. Korean Journal of Medicinal Crop Science 20(3): 153-158.
- Choi, S.R., You, D.H., Kim, J.Y., Park, C.B., Kim, D.H., Ryu, J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. Korean Journal of Medicinal Crop Science 17(2): 115-120.
- Collison, M.W. 2008. Total soy isoflavones in dietary supplements, supplement ingredients, and soy foods. Journal of AOAC International 91(3): 489-500.
- International Conference on Harmonisation (ICH). 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- Jeong, C.H., Choi, G.N., Kim, J.H., Kwak, J.H., Jeong, H.R., Kim, D.O., Heo, H.J. 2010. Protective effects of aqueous extract from *Cudrania tricuspidata* on oxidative stress-in-

- duced neurotoxicity. Food Science and Biotechnology 19(4): 1119-1117.
- Jung, G.T., Ju, I.O., Choi, S.R., You, D.H., Noh, J.J. 2013. Food nutritional characteristics of fruit of *Cudrania tricuspidata* in its various maturation stages. The Korean Society of Food Preservation 20(3): 330-335.
- Kim, H.J. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau. MS Thesis, Chonnam National University, Korea.
- Kim, S.J., Lee, K.-T., Youe, W.-J., Lee, S.-S., Kim, Y.S. 2014. Structure analysis of water-soluble polysaccharides extracted from the unripe fruit of *Cudrania tricuspidata*. Journal of The Korean Wood Science and Technology 42(6): 740-746.
- Koh, B.S., Park, H.J., Kim, S.R., Moon, I.J., Leem, D.W., Park, K.H., Lee, J.H., Park, J.-W. 2014. Adverse drug reactions after taking the extract of *Cudrania tricuspidata*. Allergy Asthma & Respiratory Disease 2(5): 387-390.
- Korea Food & Drug Administration (KFDA). 2008. Guide on standardization of functional raw material for health functional food developer. KFDA. Korea. pp. 40-47.
- Korea Food & Drug Administration (KFDA). 2014. Health Functional Food Code. KFDA. Korea. pp. 340-347.
- Lee T.H., Kwon, J.Y., Lee, D.H., Mar, W.C. 2015. Effects of *Cudrania tricuspidata* fruit extract and its active compound, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-6,8-diprenylisoflavone, on the high-affinity IgE receptor-mediated activation of Syk in mast cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63: 5459-5467.
- Mauricio A.R., Miguel P., Carmelo G.B. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A 1012: 119-128.
- Mauricio A.R., Miguel P., Carmelo G.B. 2005. Solid-phase extraction of soy isoflavones. Journal of Chromatography A 1076: 110-117.
- Qizhen D., Zhonghua L., Yoichiro I. 2001. Preparative separation of isoflavone components in soybeans using high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A 923: 271-274.
- Radka M., Petr H., Pavel H., Vojtech A., Sona K., Ladislav H., Marie S. 2007. Determination of isoflavones using liquid chromatography with electrochemical detection. Acta Chimica Slovenica 54: 92-97.
- Seo, M.J., Kang, B.W., Park, J.U., Kim, M.J., Lee, H.H., Kim, N.H., Kim, K.H. Rhu, E.J., Jeong, Y.K. 2013. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. Journal of Life Science 23(5): 682-688.
- Seo, J.Y. 2012. Simultaneous analysis of main compounds from *Cudrania tricuspidata* stem by HPLC. MS Thesis, Chung-Ang University, Korea.
- Uddin, G.M., Lee, H.J., Jeon, J.S., Chung, D.H., Kim, C.Y. 2011. Isolation of prenylated isoflavonoids from *Cudrania tricuspidata* fruits that inhibit A2E photooxidation. Natural Product Sciences 17(3): 206-211.
- USP Monograph. 2011. USP32-NF29; Soy isoflavones. The United States Pharmacopeial Convention pp. 1236.
- Xiang, H.H., Hong, S.S., Hwang, J.S., Heong, S.H., Hwang, J.H., Lee, M.H., Lee, M.K., Lee, D.H., Ro, J.S., Hwang, B.Y. 2005. Monoamine oxidase inhibitory constituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. Archives of Pharmacal Research 28(12): 1324-1327.
- Xiang, H.H., Hong, S.S., Qinghao, J., Dayu, L., Kim, H.K., Lee, J., Kwon, S.H., Lee, D.H., Lee, C.K., Lee, M.K., Hwang, B.Y. 2009. Prenylated

- and benzylated flavonoids from the fruits of *Cudrania tricuspidata*, *Journal of Natural Products* 72(1): 164-167.
- Youn, K.S., Kim, J.W. 2012. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activities of extracts from mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit subjected to different drying methods. *Journal of the Korea society of food science and nutrition* 41(10): 1388-1394.