

울무근 추출물의 Coixol 성분 분석법 검증

권진관¹ · 서찬근¹ · 최윤희¹ · 최춘환¹ · 김진규¹ · 정원식¹ · 이지은¹ · 오경희² · 홍성수¹

¹(재)경기도경제과학진흥원

²한솔생명과학(주)

Validation of Method Determining Coixol in *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* Roots Extract

Jin Gwan Kwon¹, Changon Seo¹, Yun-Hyeok Choi¹, Chun Whan Choi¹, Jin Kyu Kim¹,
Wonsik Jeong¹, Ji Eun Lee¹, Kyeong Hee O², and Seong Su Hong¹

¹Bio-center, Gyeonggido Business and Science Accelerator

²Hansolbio Co., Ltd.

ABSTRACT An high performance liquid chromatography (HPLC) analysis method was developed for standard determination of coixol as a functional cosmetic material in *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots extract. HPLC was performed on a C₁₈ Unison US column (4.6×250 mm, 5 μm column) using 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 290 nm. The HPLC method was validated in accordance with the International Conference on Harmonization guideline of analytical procedures with respect to specificity, precision, accuracy, and linearity. The limit of detection and quantitation were 0.07 and 0.25 mg/mL, respectively. Calibration curves showed good linearity (R²>0.9995), and the precision of analysis was satisfied (less than 0.29%). Recoveries of quantified compounds ranged from 98.36 to 100.30%. This result indicates that the established HPLC method is very useful for the determination of a marker compound in *C. lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots extracts.

Key words: *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*, coixol, validation, HPLC, functional cosmetic material

서 론

울무(*Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* Stapf)는 벼과(Gramineae)의 1년생 초본으로, 원산지는 중국, 동남아시아 등 아열대아시아에 널리 분포한다(1,2). 국내에서는 경기도 연천군의 대표적인 작물로 국내 생산량의 대부분을 차지하고 있다. 울무는 부위별로 다양하게 사용되고 있으며, 종자는 식품과 한약재로 활용되는데, 종피를 제거한 씨를 의이인(薏苡仁)이라 하여 향암, 부종, 관절염 등에 사용되고 있다. 또한, 줄기와 잎은 가축의 사료로 이용하며 뿌리는 신경통과 황달에 효능이 있다고 알려져 있다(3,4).

울무로부터 분리된 성분으로는 benzoxazinoid(5), fatty acid(6), lignan(7), phenolic acids(5,7), phenolic amides(5) 등이 있으며 이러한 성분들의 향암(8), 미백 효과(9), 항염증(10,11) 및 항알레르기 활성(12) 등이 보고된 바 있다.

울무 종자에 대한 쓰임새나 연구는 활발하게 이루어지고 있지만, 부산물을 이용한 연구는 미비한 실정이다. 본 연구

진은 울무 부산물을 이용하여 새로운 부가가치를 창출하고 현대인들의 관심이 높은 미백기능성 화장품 개발을 위해 울무근 추출물의 tyrosinase 활성 및 유효성분으로 benzoxazoline 계열 성분인 coixol을 동정하여 보고하였다(7).

따라서 본 연구에서는 미백 효과가 있는 울무근 추출물을 기능성 화장품으로 개발하기 위해 울무근 추출물의 coixol을 지표 및 유효성분으로 선정하고 이 성분을 이용한 원료 표준화를 위한 효과적인 분석법을 확립하여 그에 대한 분석법 validation을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 울무근(*C. lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots)은 경기도 연천군 농가에서 재배한 울무의 뿌리를 채취 후 건조한 다음 70% 에탄올을 이용하여 상온에서 48시간 동안 침지한 후 2회 추출하였다. 추출물은 여과 및 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말(수율 10%)로 제조한 것을 사용하였다. 추출물은 70% 에탄올에 녹여 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

Received 31 May 2017; Accepted 14 July 2017

Corresponding author: Seong Su Hong, Bio-center, Gyeonggido Business and Science Accelerator, Suwon, Gyeonggi 16229, Korea
E-mail: bestgene@gbsa.or.kr, Phone: +82-31-888-6120

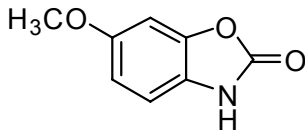


Fig. 1. Chemical structure of coixol.

표준용액의 조제

율무근 추출물의 분석에 사용한 표준품 coixol(Fig. 1)은 BioBioPha(Kunming, China)에서 구입하여 사용하였다. 검량선 작성은 coixol 10.0 mg을 70% 에탄올에 녹여 100 mL로 하여 표준인액을 조제하였다. 이를 70% 에탄올에 희석한 표준용액을 이용하여 coixol 함량을 구하였다.

HPLC 분석

율무근 추출물의 coixol을 분석하기 위하여 HPLC 1100 및 HPLC 1200(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Unison US-C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm, Imtakt, Portland, OR, USA)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 coixol 성분이 분리되도록 흘려주었으며 검출파장은 290 nm에서 검출하였다.

시험방법의 검증(method validation)

기능성 화장품 원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 ‘의약품 등 시험방법 밸리테이션 가이드라인(13)’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

하여 확인하였으며, photodiode array(PDA) spectrum을 측정하여 동일한 spectrum을 나타내는지도 확인하였다.

직선성: 분석대상물질의 농도에 대해 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말하는 것으로 율무 추출물을 1.8, 3.15, 4.5, 5.85, 7.2 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 동일 실험실 내에서 각각 서로 다른 실험일자, 시험자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 얻은 측정값들 사이의 근접성으로 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 판단하였다. 완건성(robustness)은 일내분석(intra-day)은 1일 3구간 진행하였고 일간분석(inter-day)은 1일 1구간으로 3일간으로 나누어 진행하여 변이성을 측정하였다.

정확성: 시료를 3가지 농도(2.25, 4.5, 6.75 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.

$$\text{정량한계(LOQ)} = 10 \times y\text{절편의 표준편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

$$\text{검출한계(LOD)} = 3.3 \times y\text{절편의 표준편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

결과 및 고찰

특이성 검증

불순물, 분해물, 배합성분 등의 공존하는 상태에서 다른 성분의 영향을 받지 않고 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 표준액과 율무근 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 율무근 추출물에 표준액을 스파이킹하여 시험한 결과 회수율은 98.88%로서 양호한 결과를 얻었다(Fig. 2). 또한, 표준용액과 율무 추출물의 PDA spectrum 측정에서도 동일한 spectrum을 확인하였다(Fig. 3). 위의 결과를 종합했을 때 본 분석방법은 특이성이 있음을 확인할 수 있다.

Table 1. HPLC conditions for the quantitative analysis of coixol

Items	Conditions		
Instrument	HPLC 1100 & 1200 series (Agilent Technologies)		
Mobile phase	A: Water (0.1% trifluoroacetic acid)		
	B: Acetonitrile		
Gradient	Time (min)	% A	% B
	0	82	18
	35	82	18
	36	0	100
	70	0	100
	Post time: 10 min		
Column	Unison US-C ₁₈ (4.6×250 mm, 5 μm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 μL		
Detector	290 nm		

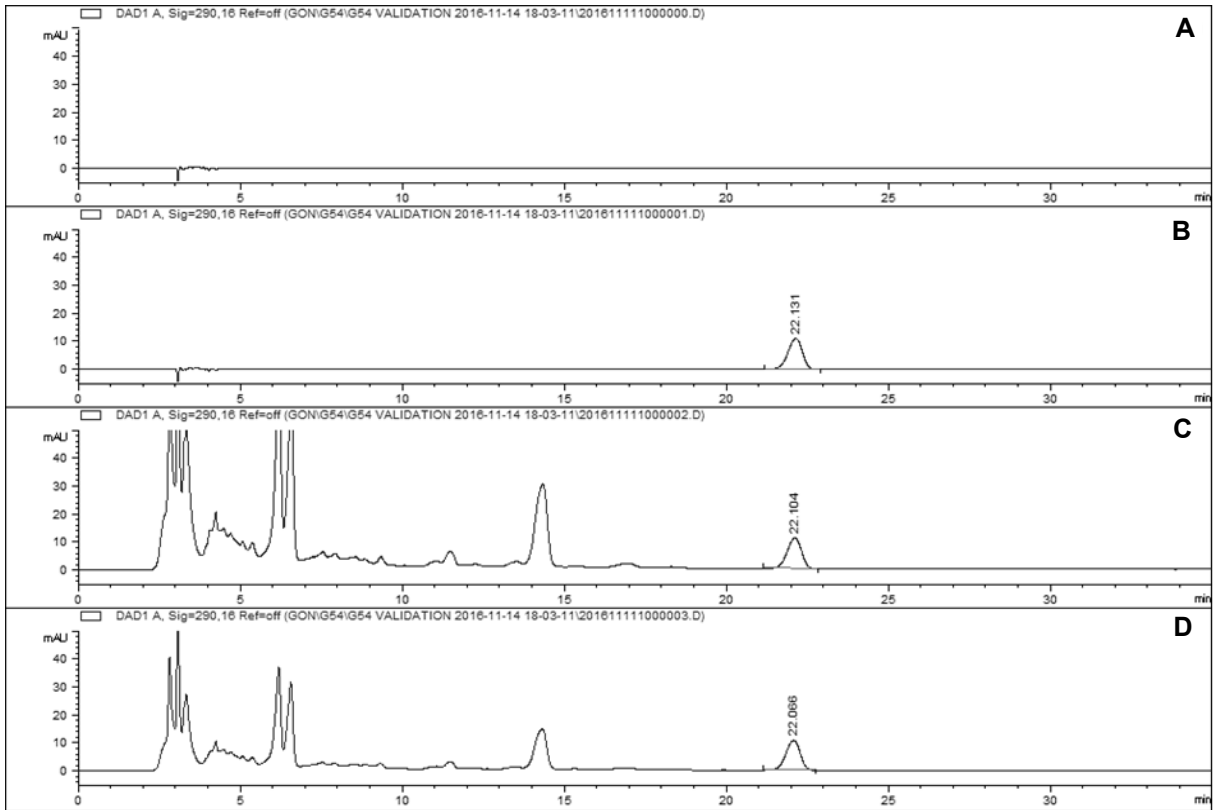


Fig. 2. HPLC chromatograms of coixol. (A) Blank (70% EtOH), (B) standard solution, (C) *C. lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots extract, and (D) recovery test.

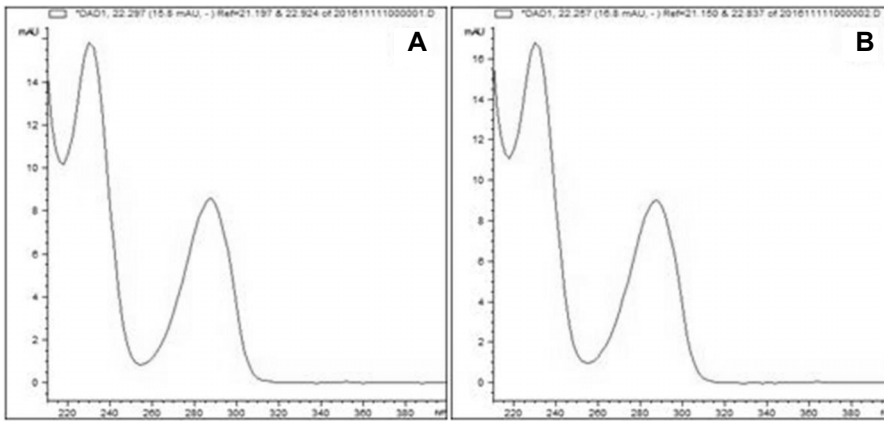


Fig. 3. PDA (photodiode array) spectrum of coixol. (A) Standard solution, (B) *C. lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots extract.

직선성 확인

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양 (또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 크로마토그램에 대한 면적과 울무근 추출물의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 울무 추출물을 1.8, 3.15, 4.5, 5.85, 7.2 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다(Fig. 4). Coixol의 상관계수(R^2) 값은 0.9995로 모두 양호한 직선성을 나타내었다.

정밀성 확인

반복성: 균질한 검체로부터 다수의 시료를 취해 반복적으로 시험을 실시할 때 각 시험 결과의 일치 정도를 나타내는 것으로 울무근 추출물 2.25, 4.5 및 6.75 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPCL 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 성분별 3가지 농도의 피크의 RT 및 피크 면적의 RSD는 0.05~0.29%로 나타나 RSD 2% 이하로서 반복성이 있음을 확인하였다(Table 2).

실험실 내 정밀성: 동일 실험실 내에서 각각 서로 다른 실험일, 시험자, 기구 또는 장비 등을 이용하여 분석 실험하

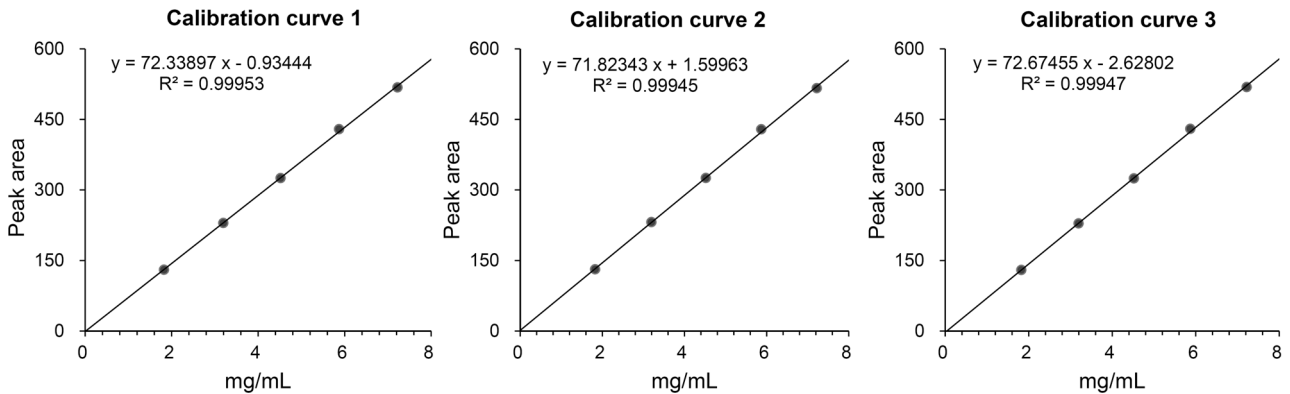


Fig. 4. Calibration curves of coixol.

Table 2. Repeatability of coixol analysis

Instrument	Parameters	Precision		
		Mean±SD	RSD (%)	
HPLC 1100 series	Concentration	RT (min)	22.044±0.01	0.05
	(2.25 mg/mL)	Area	163.736±0.48	0.29
	Concentration	RT (min)	22.027±0.02	0.09
	(4.5 mg/mL)	Area	321.241±0.85	0.26
	Concentration	RT (min)	22.078±0.02	0.10
	(6.75 mg/mL)	Area	488.492±1.41	0.29

여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 나타내는 것으로 칼럼과 HPLC 및 시험 일자를 다르게 하여 실시한 실험실 내 정밀성은 각 성분 3가지 농도의 피크 유지시간 및 피크면적의 RSD는 0.03~0.29%로 나타나 RSD 2% 이하로서 실험실 내 정밀성이 있음을 확인하였다(Table 3, 4).

완전성: Intra-day, inter-day의 정밀도를 측정된 결과는

Table 3. Intermediate precision of coixol analysis

Instrument	Parameters	Precision		
		Mean±SD	RSD (%)	
HPLC 1200 series	Concentration	RT	21.991±0.01	0.06
	(2.25 mg/mL)	Area	183.412±0.39	0.21
	Concentration	RT	21.985±0.01	0.03
	(4.5 mg/mL)	Area	362.006±0.36	0.10
	Concentration	RT	21.986±0.01	0.05
	(6.75 mg/mL)	Area	554.006±1.54	0.28

Table 4. Intermediate precision of coixol analysis by different users

		Coixol					
		50%		100%		150%	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
User1	RT	22.044±0.01	0.05	22.027±0.02	0.09	22.078±0.02	0.10
	Area	163.736±0.48	0.29	321.241±0.85	0.26	488.492±1.41	0.29
User2	RT	21.91±0.01	0.06	21.985±0.01	0.03	21.986±0.01	0.05
	Area	183.412±0.39	0.21	362.006±0.36	0.10	554.006±1.54	0.28

Table 5와 같으며 intra-day에서의 정밀도는 0.37~1.64%를 나타내었고, inter-day에서는 0.36~0.81%의 정밀도를 나타내었다.

회수율을 이용한 정확성 확인

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

울무근 추출물을 2.25, 4.5 및 6.75 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분 3가지 농도의 회수율은 98.36~100.30%였으며 RSD는 0.26~0.29%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. 울무 추출물의 직선성 시험용액 3개의 그룹에 대한 각각의 검량선을 작성하여 검량선의 기울기와 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 계

Table 5. Precision of coixol in *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots extract for validation

	Precision	
	Mean±SD	RSD (%)
Intra-day	114.69±1.88	1.64
	223.64±0.84	0.37
	338.47±2.26	0.67
Inter-day	114.25±0.41	0.36
	222.36±1.81	0.81
	337.22±2.16	0.64

Table 6. Accuracy of HPLC analysis for coixol

Concentration (mg/mL)	Recovery (%)	
	Mean±SD	RSD (%)
2.25	98.36±0.29	0.29
4.5	98.49±0.26	0.26
6.75	100.30±0.29	0.29

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

Instrument	Limit of detection (mg/mL)	Limit of quantitation (mg/mL)
HPLC 1100 series (Agilent Technologies)	0.07	0.23
HPLC 1200 series (Agilent Technologies)	0.08	0.25

산하였다(Table 7). 직선상의 검출한계(LOD)는 0.07~0.08 mg/mL였으며, 정량한계(LOQ)는 0.23~0.25 mg/mL로 나타났다.

요 약

본 연구는 HPLC를 이용하여 율무근 추출물을 기능성 화장품 원료로 개발하기 위하여 지표성분인 coixol의 분석법 설정과 분석법에 대한 검증 실시하고자 하였다. 표준액과 율무근 추출물은 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며, 표준액과 추출물의 피크 유지시간이 일치한 spectrum을 나타내었다. 또한, blank에서 표준액과 겹치는 피크가 없는 것으로 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9995로 모두 양호한 직선성을 보였으며, 직선상의 검출한계는 0.07~0.08 mg/mL였고 정량한계는 0.23~0.25 mg/mL로 나타났다. 율무근 추출물 2.25, 4.5 및 6.75 mg/mL 세 농도의 회수율은 98.36~100.30%였으며 RSD는 0.26~0.29%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다. 정밀성은 0.05~0.29%의 정밀도(RSD)를, 실험실 내 정밀성에서는 0.03~0.29%의 정밀도(RSD)를 나타내었고, intra-day에서의 정밀도(RSD)는 0.37~1.64%, inter-day에서는 0.36~0.81%의 정밀도를 나타내어 율무근 추출물의 지표성

분 coixol의 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 분석법은 율무근 추출물의 기능성화장품 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며(114144-3), 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee DH, Jeon YG, Eun JS. 2005. Effect of the seeds of *Coix Lachryma-Jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf. on the proliferation of L1210 cells, a leukemic cell-lines. *Korean J Orient Physiol Phathol* 19: 705-709.
- Kim JK, Lee HS. 2000. Tyrosinase-inhibitory and radical scavenging activities from the seeds of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* [Roman] Stapf. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1409-1413.
- Kim JD. 2012. Literature on the quality and effect of Job's tears (*Coix lachryma-jobi* L. var. *mayuen* S.). *Korean J Agricultural History* 11: 89-122.
- Song MY, Jung HW, Park YK. 2016. Antiobesity effect of water extract of *Coix lachrymajobi* var. *mayuen* in high fat fed C5BL/6 mice. *J Korean Med Obes Res* 16: 27-35.
- Kim SY, Choi CW, Hong SS, Shin H, Oh JS. 2015. A new neolignan from *Coix lachryma-jobi* var. *mayuen*. *Nat Prod Commun* 11: 229-231.
- Han AR, Kil YS, Kang U, Youn IS, Choi G, Lee YJ, Nam JW, Lee JH, Hong J, Lee SK, Seo EK. 2013. Identification of a new fatty acid from the seeds of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *Bull Korean Chem Soc* 34: 1269-1271.
- Hong SS, Choi CW, Choi YH, Oh JS. 2016. Coixlachryside A: A new lignan glycoside from the roots of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf. *Phytochemistry Lett* 17: 152-157.
- Wu WH, Chen TY, Lu RW, Chen ST, Chang CC. 2012. Benzoxazinoids from *Scoparia dulcis* (sweet broomweed) with antiproliferative activity against the DU-145 human prostate cancer cell line. *Phytochemistry* 83: 110-115.
- Choi YH, Choi CW, Lee JY, Ahn EK, Oh JS, Hong SS. 2017. Phytochemical constituents of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen* roots and their tyrosinase inhibitory activity. *J Appl Biol Chem* 60: 49-54.
- Al-Taweel AM, Perveen S, El-Shafae AM, Fawzy GA, Malik A, Afza N, Iqbal L, Latif M. 2012. Bioactive phenolic amides from *Celtis africana*. *Molecules* 17: 2675-2682.
- Otsuka H, Hirai Y, Nagao T, Yamasaki K. 1988. Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*. *J Nat Prod* 51: 74-79.
- Hong SS, Jeong W, Kim JK, Kwon JG, Lee JY, Ahn EK, Oh J, Seo DW, Oh JS. 2014. Neolignan inhibitors of antigen-induced degranulation in RBL-2H3 cells from the needles of *Pinus thunbergii*. *Fitoterapia* 99: 347-351.
- KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc.* Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. p 1-18.