

섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 잔틴산화효소 저해 효능 및 HPLC-UV를 이용한 유효성분의 함량 분석

강동현^{1,2} · 한은혜³ · 진창배¹ · 김형자¹

¹한국과학기술연구원 분자인식연구센터

²경희대학교 약학대학

³고려은단 R&D부

Inhibitory Effects of Ethanolic Extracts from *Aster glehni* on Xanthine Oxidase and Content Determination of Bioactive Components Using HPLC-UV

Dong Hyeon Kang^{1,2}, Eun Hye Han³, Changbae Jin¹, and Hyoung Ja Kim¹

¹Molecular Recognition Research Center, Korea Institute of Science and Technology

²College of Pharmacy, Kyung Hee University

³R&D Center, Koreaeundan Co., Ltd.

ABSTRACT This study aimed to establish an optimal extraction process and high performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV) analytical method for determination of 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA) as a part of materials standardization for the development of a xanthine oxidase inhibitor as a health functional food. The quantitative determination method of 3,5-DCQA as a marker compound was optimized by HPLC analysis using a Luna RP-18 column, and the correlation coefficient for the calibration curve showed good linearity of more than 0.9999 using a gradient eluent of water (1% acetic acid) and methanol as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and a detection wavelength of 320 nm. The HPLC-UV method was applied successfully to quantification of the marker compound (3,5-DCQA) in *Aster glehni* extracts after validation of the method with linearity, accuracy, and precision. Ethanolic extracts of *A. glehni* (AGEs) were evaluated by reflux extraction at 70 and 80°C with 30, 50, 70, and 80% ethanol for 3, 4, 5, and 6 h, respectively. Among AGEs, 70% AGE at 70°C showed the highest content of 3,5-DCQA of 52.59±3.45 mg/100 g *A. glehni*. Furthermore, AGEs were analyzed for their inhibitory activities on uric acid production by the xanthine/xanthine oxidase system. The 70% AGE at 70°C showed the most potent inhibitory activity with IC₅₀ values of 77.01±3.13~89.96±3.08 µg/mL. The results suggest that standardization of 3,5-DCQA in AGEs using HPLC-UV analysis would be an acceptable method for the development of health functional foods.

Key words: *Aster glehni*, xanthine oxidase inhibitor, 3,5-dicaffeoylquinic acid, quantitative determination, health functional foods

서 론

통풍(gout)은 혈액 중 요산의 농도가 높아져 고요산혈증으로 인한 요산결정체가 관절이나 인대 등에서 염증성 질환을 유발시키는 대사성 질환 중의 하나이다(1). 통풍은 주로 50대 이후 성인 남성에서 빈번하게 발생하였으나 최근 식생활의 서구화로 인해 30~40대에서도 발병률이 증가하는 것으로 보고되고 있으며, 비만, 고지혈증, 고혈압 등 대사성 질환도 고요산혈증을 증가시키는 요인으로 밝혀졌다(2). 임상에서 통풍치료제로 혈액 중 요산의 농도를 감소시키는 잔

틴산화효소(xanthine oxidase, XOD) 저해제인 allopurinol이 주로 사용되고 있으나 과민성증후군(hypersensitivity syndrome)으로 발열, 홍반, 호산구 증가, 간염, 신부전 등과 같은 심각한 부작용이 보고되고 있다(3). 최근 XOD 저해제로 Febuxostat가 개발되어 사용되고 있으나 심혈관계 부작용이 보고되어 보다 안전한 약물개발이 시급한 실정이다(4). 이에 최근 저자 등은 천연물로부터 XOD 저해제를 탐색하던 중 울릉도 특산식물인 섬썩부쟁이(*Aster glehni*) 에틸아세테이트 추출물(AGE)로부터 고요산혈증 개선 효능을 발견하고 유효성분을 분리하여 잔틴산화효소 저해 효능을 보고하였다(5).

나물로 식용이 가능한 섬썩부쟁이는 항경련, 진정 효능, 항산화, 항염, 고지방 식이에서의 지방흡수 억제 효능 등이 보고되었고, 함유된 성분은 dicaffeoylquinic acids 유도체를 비롯하여 caffeoyl glucoside derivatives, terpenes 등

Received 8 August 2016; Accepted 12 September 2016

Corresponding author: Hyoung Ja Kim, Molecular Recognition Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, Korea

E-mail: khj@kist.re.kr, Phone: +82-2-958-5187

이 보고되었다(5-9).

본 연구에서는 혈중요소산 감소에 도움을 주는 건강기능식품 개발을 위하여 다양한 섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 XOD 저해 효능을 검색하고 표준화를 위하여 함량이 높은 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)를 지표성분으로 선정하여 high performance liquid chromatography-ultraviolet (HPLC-UV)을 활용한 함량 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 섬썩부쟁이는 2015년 10월에 울릉도에서 지상부를 채취하여 전문가(육장수 경희대학교 약학대학 명예교수)의 동정을 받아 사용하였으며, 증거시료(971-12A)는 한국과학기술연구원 표본실에 보관하고 있다. 섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 성분분석에 사용한 3,5-DCQA는 섬썩부쟁이 에틸아세테이트 분획에서 분리한 것으로 기기 분석을 활용한 구조분석 후 사용하였다(Fig. 1)(4,10).

시약 및 기기

Xanthine oxidase와 allopurinol은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 효능검색에 사용한 검출기는 Epoch microplate spectrophotometer(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 295 nm에서 흡광도를 측정하여 억제 효능을 분석하였다.

High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

HPLC 기기는 Waters 1500 Series System, Waters 2998 PDA Detector(Waters, Worcester, MA, USA), Luna C18 (5 μm, 250×4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였으며 분석에 사용된 모든 용매는 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입한 HPLC급 용매를 사용하였다. 이동상으로는 메탄올과 1% 초산용액을 사용하

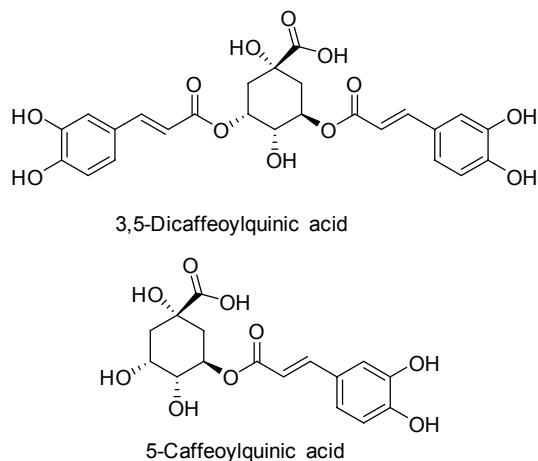


Fig. 1. Structures of 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA) and 5-caffeoylquinic acid (5-CQA).

Table 1. Mobile phase condition for HPLC-UV analysis

Time (min)	% A (MeOH)	% B (1% HOAc in H ₂ O)
Initial	30	70
10	40	60
20	60	40
30	80	20
40	100	0
50	30	70

여 1 mL/min의 유속으로 시료 10 μL를 주입하여 gradient condition으로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. 분석시료는 320 nm에서 크로마토그램을 추출하여 3,5-DCQA 피크 면적을 얻은 다음 표준화합물의 검량곡선으로부터 각 화합물의 함유량을 계산하였다.

지표성분 용액 제조 및 분석법 검증(validation)

3,5-DCQA 1 mg을 정밀히 취하여 메탄올 1 mL에 용해시켜 표준용액을 제조한 후 메탄올로 희석하여 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 및 7.81 μg/mL 농도에서 반복 측정하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정량한계(LOQ), 검출한계(LOD), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)을 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다(11).

특이성: 3,5-DCQA 표준용액과 섬썩부쟁이 에탄올 추출물을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 retention time과 spectrum을 비교하였다.

직선성: 3,5-DCQA 표준용액의 크로마토그램은 320 nm에서 추출한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성한 후 회귀방정식을 얻고 이 식의 상관계수(R²)를 계산하여 Fig. 2에 나타내었다.

검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ): 검량선의 y절편의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로, 표준용액을 단계별로 3회 반복 측정한 평균값으로 검량선을 작성하여 다음의 식에 따라 계산하여 검출한계와 정량한계를 확인하였다.

$$LOD = 3.3 \times \sigma / S; LOQ = 10 \times \sigma / S$$

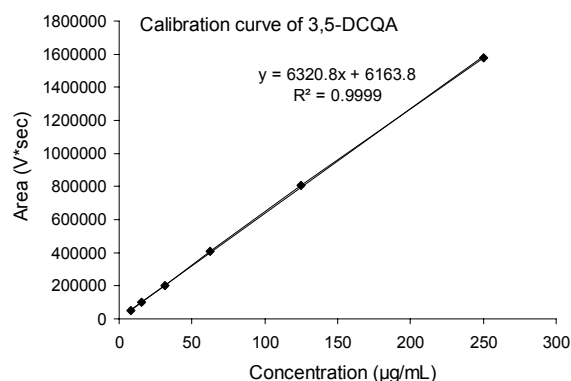


Fig. 2. Calibration curve of 3,5-DCQA.

σ : y절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

기울기 S는 분석대상물질의 검량선으로부터 구하였으며 표준편차(σ)는 정량한계 내에 있는 분석대상 물질을 포함한 검체를 사용하여 특이적인 검량선을 작성한 후 y절편의 표준편차를 표준편차 σ 로서 이용하였다.

정확성: 일정농도의 3,5-DCQA 표준액을 조제하여 각각의 샘플을 일내분석(intra-day)과 일간분석(inter-day)의 변이성을 측정하였다. 시험농도의 100%에 해당하는 농도로 3,5-DCQA의 표준액을 조제하여 분석법의 전 조작을 3회 반복 주입하여 검량선에 따라 구해진 값과 참값을 비교한 회수율로 나타내었다.

정밀성: 성분피크 면적비의 표준편차를 각 성분피크 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율로서 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 확인하여 정밀성을 나타내었다.

시험용액의 추출조건

섬썩부쟁이 에탄올 추출은 95% 에탄올(Samchun Chemical, Gyeonggi, Korea)을 사용하였다. 제조공정의 추출조건을 검토하기 위하여 섬썩부쟁이 건시료 10 g에 150 mL의 30, 50, 70, 80% 에탄올을 사용하여 70 및 80°C에서 3, 4, 5, 6시간 동안 각각 환류 추출한 후 종료시점에 상층액을 취하여 0.45 μ m PVDF syringe filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. 추출물은 감압 여과한 후 농축하고 진공 상태로 완전 건조시켜 에탄올 추출물을 수득하였으며 잔틴산화효소(XOD) 저해 효능 검색에 사용하였고 같은 방법으로 총 3회 실시하였다.

잔틴산화효소 저해 효능 검색

잔틴산화효소 저해 효능은 Noro 등(12)의 방법을 약간 수정하여 검색하였으며, 잔틴과 잔틴산화효소가 반응하여 생성되는 요산의 양을 spectrophotometry를 이용하여 측정하였다.

96 well plate(UV plate)에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)와 잔틴산화효소 40 μ L, 검색시료 10 μ L를 넣고 25°C에서 10분간 pre-incubation 한다. 여기에 0.2 mM 잔틴용액 120 μ L를 넣어서 반응을 시작하여 25°C에서 30분간 반응시킨다. 대조군은 시료 대신 DMSO를 가하여 반응시킨 후, 1 N HCl 10 μ L를 가하여 반응을 정지한다. 반응액은 UV spectrophotometer로 295 nm에서 흡광도를 측정하여 % inhibition을 구하며, 저해 효능은 다음 식에 의하여 산출하였고 IC₅₀는 잔틴산화효소를 50% 억제하는 시료의 농도를 의미한다.

$$I (\%) = 100 - \frac{\text{시험물질 처리 후 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

지표성분의 분석법 검증

섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 건강기능 식품 기능성 원료 및 기준규격인정 및 품질관리를 위한 벨리태이션은 식품의약품안전처의 의약품 등 분석법의 벨리태이션 가이드라인에 기초하여 수행되었다(11).

표준용액과 같이 시료 전처리 방법으로 처리한 섬썩부쟁이 추출액의 크로마토그램을 비교하여 3,5-DCQA 피크가 분리되는지를 확인한 결과 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되어 특이성을 확인할 수 있었다. 표준용액 3,5-DCQA의 머무름 시간(Rt)은 15.108분이고 섬썩부쟁이 추출액에서의 3,5-DCQA의 머무름 시간은 15.208분으로 피크 유지 시간이 거의 일치하였다(Fig. 3). 또한, 섬썩부쟁이 에탄올 추출물에서 분리한 3,5-DCQA 표준용액의 검량곡선은 3회 반복 실험하여 얻은 평균값으로 계산하였으며 $y=6320.8x+6163.8$, 상관관계(R^2)=0.9999로 나타나 매우 우수한 직선성을 나타내었다. 여기서 y는 peak area 값이며 x는 농도(μ g/mL)이다(Fig. 2).

검출한계와 정량한계는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 앞서 서술한 식에 의하여 결정하였으며, 검출한계는 2.68 μ g/mL, 정량한계는 8.11 μ g/mL로 확인할 수 있었다.

3,5-DCQA 표준용액 일내(intra-day), 일간(inter-day) 분석의 정밀성, 정확성 및 회수율을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. Intra-day 분석에서 회수율은 시료 면적을 검량선에 근거하여 회수되는 시료 양을 백분율로 계산한 결과 91.81~101.08%의 범위로 나타났으며, 상대오차(relative error, RE)는 10% 이내였다. 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 0.20~4.41%를 나타내 5% 이내의 정밀성을 나타내었다. Inter-day 분석은 95.04~103.61%를 나타내 우수한 회수율을 보여주고 있으며, RE는 0.97~4.96%로, RSD는 0.39~4.05%로 나타나 정확성과 정밀성을 확인할 수 있었다.

섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 지표성분 분리

섬썩부쟁이 EtOAc 분획(AGEF, 971E)으로부터 다양한 column chromatography를 실시하여 3,5-DCQA를 분리하여 구조를 동정한 후 지표물질로 이용하였다. 3,5-DCQA와 상대적인 함량 비교를 위하여 섬썩부쟁이 에탄올 추출물에 함유되어 있는 5-caffeoylquinic acid(5-CQA)도 분리하여 비교 분석하였다.

3,5-DCQA: A pale yellow powder; FABMS(negative-ion mode): $m/z=515$; [α]_D²¹-154.4°(c 0.71, MeOH); CD nm(MeOH): 340($\Delta\epsilon$, -39.6), 289(23.1); ¹H NMR(300 MHz, CD₃OD): δ 2.15(dd, 1H, $J=14.2$, 6.40 Hz, H-2_{ax}), 2.21(m, 2H, H-6), 2.31(dd, 1H, $J=14.1$, 3.4 Hz, H-2_{eq}), 3.96(dd, 1H, $J=7.8$, 3.2 Hz, H-4), 5.42(m, 2H, H-3, 5),

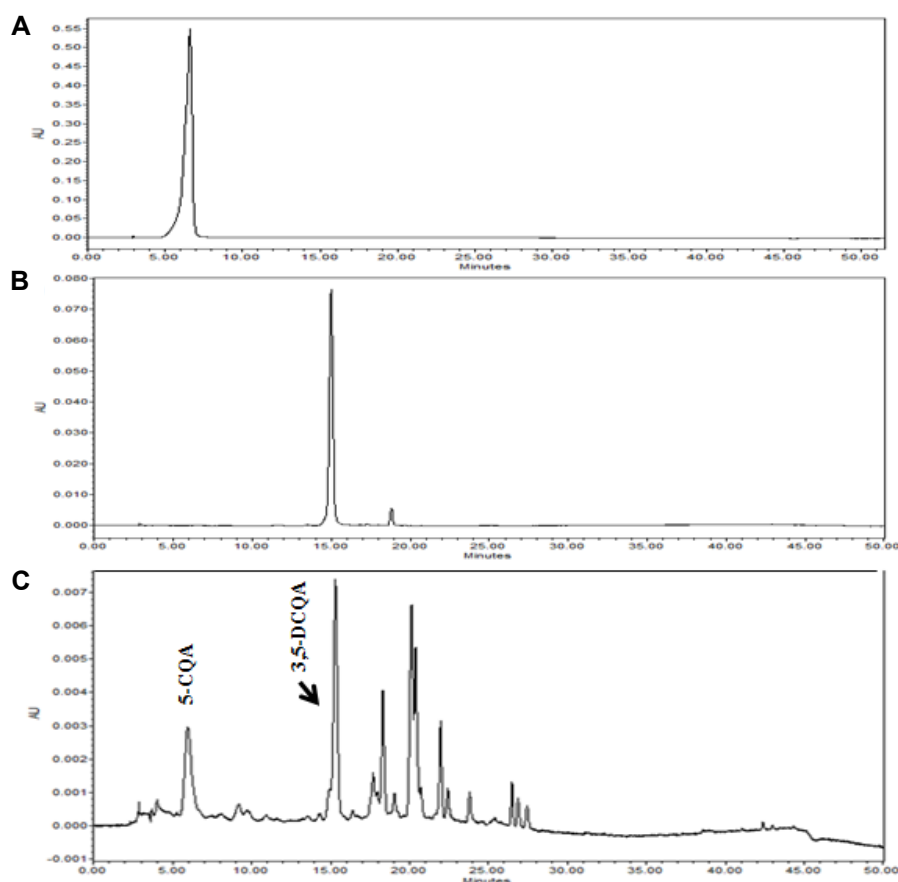


Fig. 3. Chromatogram of (A) 5-CQA, (B) 3,5-DCQA, and (C) 70% ethanol extract of *A. glehni*.

Table 2. Accuracy and repeatability of analytical results for 3,5-DCQA in calibration standards

Concentration (µg/mL)	Observed conc. (µg/mL)		Recovery (%)	RSD (%) ¹⁾	RE (%) ²⁾	
	Mean	SD				
Intra-day ³⁾	250	244.07	10.82	97.63	4.41	2.37
	125	125.14	5.46	100.11	4.33	0.11
	62.5	63.17	0.33	101.08	0.51	1.08
	31.2	30.23	0.35	96.74	1.14	3.26
	15.6	14.93	0.05	95.57	0.31	4.43
	7.81	7.17	0.02	91.81	0.20	8.19
Inter-day ³⁾	250	255.33	5.11	102.13	1.99	2.13
	125	129.51	0.71	103.61	0.55	3.61
	62.5	63.59	0.25	101.74	0.39	1.74
	31.2	30.95	0.66	99.03	2.07	0.97
	15.6	15.15	0.34	96.93	1.56	3.07
	7.81	7.42	0.11	95.04	4.05	4.96

¹⁾RSD: relative standard deviation. ²⁾RE: relative error.

³⁾Intra- and inter-day: three times per day and two times analysis of 3,5-DCQA for two days, respectively.

6.27, 6.35(d, each 1H, $J=15.9$ Hz, H-8'), 6.77(d, 2H, $J=8.2$ Hz, H-5'), 6.96, 6.97(dd, each 1H, $J=8.2, 1.9$ Hz, H-6'), 7.06, 7.07(d, each 1H, $J=1.8$ Hz, H-2'), 7.58, 7.62(d, each 1H, $J=15.9$ Hz, H-7'); ¹³C NMR(75 MHz, CD₃OD): δ 35.1(C-6), 36.9(C-2), 69.9(C-4), 71.1(C-5), 71.7(C-3), 73.9(C-1), 114.1, 114.2(C-2'), 114.3, 114.6 (C-5'), 115.5, 115.5(C-8'), 122.1, 122.1(C-6'), 126.8, 127.0(C-1'), 145.7, 145.7(C-7'), 146.1, 146.3(C-3'),

148.4, 148.4(C-4'), 167.5, 168.0(C-9'), 176.6(COOH).

5-CQA: HRESIMS $m/z=377.0852[M+Na]^+$; $[\alpha]_D^{20}+18.7^\circ$ (c 1.0, MeOH); ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD): δ 7.49 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7'), 6.97(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.87(1H, dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 6.70(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.21(1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'), 5.29(1H, m, H-5), 4.08(1H, m, H-3), 3.63(1H, dd, $J=9.2, 3.2$ Hz, H-4), 2.03(4H, m, H-2, 6).

Table 3. Contents of 3,5-DCQA and 5-CQA in ethanolic extracts from *Aster glehni* (at 80°C)

Sample	3,5-DCQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g	5-CQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g
80°C-30% AGE-3h	25.50±4.11	31.39±0.19
4h	22.76±3.56	31.79±2.91
5h	20.82±2.74	32.95±4.23
6h	26.09±3.70	36.39±0.44
80°C-50% AGE-3h	18.99±1.16	30.81±2.62
4h	29.64±2.14	26.11±1.55
5h	26.11±4.82	30.50±2.84
6h	28.90±6.53	33.75±1.32
80°C-70% AGE-3h	28.03±4.99	30.11±4.66
4h	39.50±5.85	33.26±3.09
5h	31.93±2.79	33.58±4.71
6h	45.06±4.22	30.56±2.02
80°C-80% AGE-3h	37.01±8.99	28.51±2.26
4h	38.87±2.77	25.32±0.54
5h	40.50±7.01	27.67±2.75
6h	33.64±4.09	25.31±2.13

AGE: ethanolic extracts of *A. glehni*.

섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 지표성분 함량 비교

섬썩부쟁이 에탄올 추출물(AGE)의 기능성 원료 개발을 위해 30, 50, 70, 80% 에탄올을 사용하여 70과 80°C에서 3, 4, 5, 6시간 동안 환류 추출하여 각각의 AGE를 수득하였다. 다양한 AGE에서의 3,5-DCQA의 함량 분석은 3회 반복 실험하여 계산하여 평균±표준편차로 나타내었다. 또한, 이 에탄올 추출물에 높은 함량을 나타내고 있는 5-CQA도 분석하여 3,5-DCQA의 함량과 비교하였다.

다양한 에탄올 용액과 추출시간으로 80°C에서 추출한 섬썩부쟁이 추출물에서의 3,5-DCQA의 함량은 Table 3에서 나타나듯이 70% 에탄올 용액으로 6시간 동안 추출하였을 때 45.06±4.22 mg/*A. glehni* 100 g으로 가장 높게 측정되었으며, 80% 에탄올 용액 추출물은 40.50 mg(5시간 추출)과 33.64 mg/*A. glehni* 100 g(6시간 추출)으로 6시간 추출물에서 가장 낮은 3,5-DCQA의 함량을 나타내고 있다. 한편 5-CQA 함량은 추출에 사용한 에탄올의 함량과 무관하게 약 30 mg/*A. glehni* 100 g 함량을 나타내고 있으며, 80% 에탄올 추출물에서 25~28 mg/*A. glehni* 100 g의 비교적 낮은 함량을 나타내었다. 그러므로 80°C에서 추출할 경우에는 70% 이상의 에탄올을 사용하여 추출하며 80% 에탄올을 사용할 경우에는 5시간 이내에서 추출하는 것이 3,5-DCQA의 함량이 높은 추출물을 수득할 것으로 예상된다.

70°C에서 추출한 섬썩부쟁이 추출물의 3,5-DCQA 함량은 Table 4에 나타난 바와 같이 80°C에서 추출한 에탄올 추출물보다 다소 높게 측정되었다. 그중에서도 70% 에탄올 추출물의 경우 6시간 추출물을 제외하고 모두 3,5-DCQA의 함량이 50 mg/*A. glehni* 100 g 이상으로 높게 측정되었으며, 80% 에탄올 추출물에서도 42~47 mg/*A. glehni* 100 g으로 우수한 함량을 나타내고 있다. 그러므로 70°C에서 추출

Table 4. Contents of 3,5-DCQA and 5-CQA in ethanolic extracts from *A. glehni* (at 70°C)

Sample	3,5-DCQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g	5-CQA mg/ <i>A. glehni</i> 100 g
70°C-30% AGE-3h	36.26±0.31	27.86±1.64
4h	33.88±1.67	22.78±0.86
5h	24.64±4.02	27.30±0.86
6h	31.85±4.33	35.18±3.03
70°C-50% AGE-3h	42.89±2.43	15.06±0.28
4h	37.60±0.62	22.46±2.01
5h	41.05±7.41	21.07±3.33
6h	43.86±1.05	24.92±0.13
70°C-70% AGE-3h	50.76±8.30	16.39±0.12
4h	52.59±3.45	26.12±2.91
5h	51.64±8.76	30.33±4.19
6h	47.55±6.95	38.77±0.27
70°C-80% AGE-3h	47.30±5.07	21.32±3.39
4h	43.50±5.94	21.78±4.10
5h	47.02±3.00	25.34±5.15
6h	42.78±2.97	18.81±2.00

할 경우에는 70% 에탄올을 사용할 때 3,5-DCQA 함량이 높은 추출물을 효과적으로 수득할 것으로 예상된다.

한편 5-CQA 함량은 70% 에탄올 용액으로 6시간 추출하였을 때 38.77 mg/*A. glehni* 100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으나, 80°C에서 추출한 경우와 유사하게 에탄올 함량이나 추출시간 변화에 따른 5-CQA 함량 변화는 미미하게 나타나 3,5-DCQA 함량과 다소 상이한 결과를 보여주었다. 그러므로 AGEs에서의 표준화를 위해서는 지표성분으로 3,5-DCQA를 선정함이 타당할 것으로 생각한다.

섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 잔틴산화효소 저해 효능 비교

잔틴과 잔틴산화효소의 반응으로 생성된 요산은 고요산혈증 유발물질로, XOD를 억제하는 기능성 식품 개발을 위하여 섬썩부쟁이 에탄올 추출물을 제조하여 XOD 억제 효능을 검색하였으며 알로푸리놀을 대조약물로 사용하여 결과를 Table 5에 나타내었다.

잔틴산화효소 저해 효능은 70°C에서 추출한 섬썩부쟁이 추출물의 경우 70% AGE에서 IC₅₀ 값이 77.01±3.13~89.96±3.08 µg/mL의 비교적 우수한 효능을 나타내고 있다. 이 결과는 Table 4의 에탄올 추출물의 3,5-DCQA 함량 분석과 일치하는 결과를 나타내고 있는데, 3,5-DCQA 함량이 높은 추출물에서 잔틴산화효소 저해 효능도 우수하게 나타나고 있음을 알 수 있었다.

80°C에서 추출한 섬썩부쟁이 추출물의 경우에는 30% AGE에서 IC₅₀ 값이 65.66±15.85~93.38±10.97 µg/mL로 나타나 검색한 에탄올 추출물 중에서 가장 우수한 저해 효능을 나타내 3,5-DCQA 함량 분석과 다소 상이한 결과를 나타내고 있다. 이는 에탄올의 함량이 낮은 추출물의 경우 XOD 저해 효능의 큰 편차에 기인한 것으로 생각하며, 추출에 사용한 에탄올 함량 변화, 추출온도 및 추출시간 변화에 따른 영향을 반영하지 못하고 대부분 AGE 간에 오차 범위 내에

Table 5. Xanthine oxidase inhibitory effects of ethanolic extracts from *A. glehni*

Sample	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	Sample	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾
70°C-30% AGE-3h	101.52±19.77	80°C-30% AGE-3h	65.66±15.85
4h	88.33±11.67	4h	66.06±9.50
5h	129.27±13.68	5h	93.38±10.97
6h	100.17±21.42	6h	78.31±16.97
70°C-50% AGE-3h	94.92±13.00	80°C-50% AGE-3h	71.10±21.50
4h	111.78±13.68	4h	80.40±2.83
5h	125.75±11.04	5h	167.57±32.42
6h	91.63±15.25	6h	190.17±28.93
70°C-70% AGE-3h	77.01±3.13	80°C-70% AGE-3h	84.49±10.77
4h	79.74±4.66	4h	85.02±5.56
5h	89.96±3.08	5h	85.49±5.51
6h	78.78±10.57	6h	78.79±7.40
70°C-80% AGE-3h	91.11±15.71	80°C-80% AGE-3h	84.51±9.17
4h	80.80±7.03	4h	82.47±10.82
5h	99.64±7.15	5h	95.22±7.07
6h	90.76±8.12	6h	103.45±4.07

All data were expressed as a mean±SD.

¹⁾IC₅₀ is the concentration of a sample needed to inhibit 50% of xanthine oxidase; allopurinol (positive control): IC₅₀=2.14±0.21 µM.

서 유사한 효능을 나타내고 있다.

이상의 결과를 종합하면, 섬썩부쟁이는 70°C에서 70% 에탄올로 추출한 AGE가 52.59±3.45 mg/*A. glehni* 100 g의 함량을 나타내 가장 우수하게 나타났으며, 3,5-DCQA의 함량에 따라 잔틴산화효소 저해 효능이 나타났기에, HPLC-UV를 이용한 3,5-DCQA 함량 분석 방법이 섬썩부쟁이 에탄올 추출물의 표준화에 유용할 것으로 생각한다.

요 약

섬썩부쟁이로부터 고요산혈증 개선에 도움을 주는 기능성 식품 개발을 위하여 최적의 에탄올 추출물 탐색과 high performance liquid chromatography-ultraviolet(HPLC-UV) 분석방법에 의한 validation을 실시하였다. 지표성분으로 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA)를 선정하여 표준화를 실시하였으며 검출법 확립을 위한 3,5-DCQA 정량 분석은 Luna RP-18 칼럼(4.6×250 mm, 5 µm)을 이용하여 1% 초산용액과 메탄올을 전개용매로 사용하였다. 용출은 1.0 mL/min의 유속으로 기울기 용출(gradient elution) 방법을 이용하였으며, 320 nm 파장에서 검출한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성하여 분석하였다. 본 연구에서 확립한 분석법으로 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 회수율을 검색하였다. 3,5-DCQA의 검량선으로부터 상관계수(R²) 0.9999의 우수한 직선성과 intra-day와 inter-day 분석에서 90% 이상의 회수율과 5% 미만의 RSD를 나타내 정밀성과 정확성을 입증하였다. 검출한계는 2.68 µg/mL였고 정량한계는 8.11 µg/mL로 나타났다. 섬썩부쟁이 에탄올 추출물(AGE)은 70과 80°C에서 30, 50, 70, 80% 에탄올로 3, 4, 5, 6시간 동안 각각 추출하였으며, 지표물질의 검량곡선을

활용하여 각각의 AGE로부터 3,5-DCQA의 함량을 분석하였다. 본 시험법으로 분석한 3,5-DCQA의 함량은 70°C에서 추출한 70% AGE가 52.59±3.45 mg/*Aster glehni* 100 g의 함량을 나타내 가장 우수하게 나타났다. 그러나 섬썩부쟁이 추출물에 함유된 5-caffeoylquinic acid(5-CQA)의 함량 비교분석은 에탄올 함량이나 추출 시간에 따른 함량 변화가 미미하게 나타났다. 또한, 다양한 AGE에 대하여 XOD 저해 효능을 검색하였을 때, 3,5-DCQA의 함량이 가장 높은 70°C에서 추출한 70% AGE에서 우수한 효능을 나타내 기능성 원료 표준화를 위한 적합한 분석법임이 검증되었다. 따라서 본 연구를 통하여 확립된 3,5-DCQA의 분석법은 섬썩부쟁이 에탄올 추출물로부터 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 유용한 자료로 활용될 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품 기술개발사업(과제번호: 115 005-3)의 지원을 받아 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Choi HK, Ford ES, Li C, Curhan G. 2007. Prevalence of the metabolic syndrome in patients with gout: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum* 57: 109-115.
2. Sundström J, Sullivan L, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. 2005. Relations of serum uric acid to longitudinal blood pressure tracking and hypertension incidence.

- Hypertension* 45: 28-33.
3. Hande KR, Noone RM, Stone WJ. 1984. Severe allopurinol toxicity. Description and guidelines for prevention in patients with renal insufficiency. *Am J Med* 76: 47-56.
 4. Schumacher HR Jr, Becker MA, Lloyd E, MacDonald PA, Lademacher C. 2009. Febuxostat in the treatment of gout: 5-yr findings of the FOCUS efficacy and safety study. *Rheumatology (Oxford)* 48: 188-194.
 5. Son MJ, Jin C, Lee YS, Lee JY, Kim HJ. 2015. Characterization of caffeoylglucoside derivatives and hypouricemic activity of the ethyl acetate fraction from *Aster glehni*. *Bull Korean Chem Soc* 36: 503-512.
 6. Nugroho A, Kim MH, Choi J, Choi JS, Jung WT, Lee KT, Park HJ. 2012. Phytochemical studies of the phenolic substances in *Aster glehni* extract and its sedative and anticonvulsant activity. *Arch Pharm Res* 35: 423-430.
 7. Lee HM, Yang G, Ahn TG, Kim MD, Nugroho A, Park HJ, Lee KT, Park W, An HJ. 2013. Antiadipogenic effects of *Aster glehni* extract: *in vivo* and *in vitro* effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 859624.
 8. Kim HH, Park GH, Park KS, Lee JY, An BJ. 2010. Anti-oxidant and anti-inflammation activity of fraction from *Aster glehni* Fr. Schm. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38: 434-441.
 9. Kim MH, Nugroho A, Choi J, Park HJ. 2011. The extract of *Aster glehni* leaves rich in caffeoylquinic acids prevents atherogenic index, oxidative stress, and body weight increase in high-fat diet-induced rats. *Kor J Pharmacogn* 42: 54-60.
 10. Kim HJ, Lee YS. 2005. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Med* 71: 871-876.
 11. KFDA. 2004. *Analytical method guideline about validation of drugs and etc.* Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. p 1-18.
 12. Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S. 1983. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull* 31: 3984-3987.