생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
48(1) : 77 ~ 81 (2017)

갈대이삭으로부터 Tricin의 분리 및 함량 분석

우현심[1] · 이승영[2] · 황병수[2] · 정상철[2] · 김대욱[2]*
[1]국립경상대학교 응용생명과학부, [2]국립낙동강생물자원관 담수생물특성연구실

Isolation and Quantitative Analysis of Tricin from Ears of *Phragmites communis*

Hyun Sim Woo[1], Seung-Young Lee[2], Buyng Su Hwang[2], Sang-Chul Jeong[2] and Dae Wook Kim[2]*
[1]*Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea*
[2]*Freshwater Bioresources Utilization Bureau, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Korea*

Abstract – The aim of this study was to investigate a validation method for determination of tricin in *Phragmites communis* ears. Tricin was isolated with chromatographic methods and used as the standard substances for quantitative analysis. The structural determination was characterized by comparing their NMR spectral data with values reported in the literature. For validation, the specificity, linearity, precision, accuracy, detection limits, and quantification limits of tricin was measured by HPLC. The results show that the specificity was satisfied with retention time and diode array detector (DAD) spectrum by analysis of tricin using HPLC. The limits of detection (LOD) for tricin was 0.84 mg/ml. Recovery of tricin was 98.80~108.22% with R.S.D values less than 2%. Intra-day and inter-day precisions of tricin in *P. communis* ears were 99.96~100.96% and 99.01~100.40%, respectively. Therefore, application of tricin was validated by an analytical method as major compound in *P. communis* ears.

Keywords – Tricin, *Phragmites communis* ears, HPLC, Quantitative analysis

Tricin(5,7,4′-trihydroxy-3′,5′-dimethoxyflavone)[1]은 flavonoid의 일종으로, 구조적으로 두 개의 phenyl rigngs(benzoyl system, cinnamoyl system)과 하나의 heterocyclic ring[2]으로 구성되어 있다. Tricin은 독성이 낮고, 항산화, 항박테리아, 항균, 살충작용, 항암, 항알러지, 항 HIV, 항염증등 다양한 생리활성이 보고되어 tricin에 대한 관심이 증가하고 있다.[3-6] 대부분의 tricin 화합물은 화본과(Gramineae) 식물인 밀, 쌀, 보리등의 껍질에서 분리되었다. 게다가 대나무, 야자나무, 사탕수수에서도 분리되었고, 초목의 종자, 열매에서도 보고된다.[7,8] 대나무 및 귀리껍질 에탄올 추출물에서 분리된 tricin 화합물은 혈액순환 개선효과 및 항염증 효과, 중성지방의 축적을 69% 억제하여 지방 세포 분화를 억제하는 항비만에 효과가 있다.[9,10]

갈대(*Phargmites communis*)는 화본과(Gramineae)의 다년생 초본으로 봄에서 가을 사이에 채취하여 수염뿌리를 제거하고 햇볕에 말린 것을 약재로 사용하며, 부위에 따라 뿌리줄기를 노근, 줄기를 노경, 잎을 노엽, 꽃을 노화라고 하며 한방에서 진토, 소염, 이뇨 해열, 해독에 사용하였다.[11] 노근 추출물의 기억력 회복효과 및 세포 보호효능등과 같은 생리활성 연구와 주요활성성분으로 b-sitosterol, p-coumaric acid, vanilic acid, methyl gallate등 보고되었다.[12,13] 갈대의 지하부에 대한 성분 및 활성 연구는 활발히 진행되었으나 지상부에 대한 연구가 제대로 되어 있지 않은 실정이다. 이에 본 연구는 갈대 지상부에 속하는 갈대이삭을 메탄올로 추출하여 각종 column chromatography법을 이용하여 주요 성분 tricin을 분리한 후, 분광학적인 방법으로 분자구조를 규명하였다. 또한 갈대이삭의 추출용매별 tricin 함량 및 확인시험을 HPLC-DAD 방법으로 확립하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약 – 추출물 및 분획용 시약, TLC 및 column 용 시약 등은 특급시약을 사용하였다. 화합물 분리에 사용

*교신저자(E-mail) : dwkim@nnibr.re.kr
(Tel) : +82-54-530-0937

한 기기는 YMC사의 Multiple Preparative HPLC LC-Forte/R chromatography system를 사용하였고 충진제는 YMC gel ODS-A(15 μm)를 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F254plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)를 사용하였으며, UV의 검색은 254와 365 nm에 측정하였다. NMR 스펙트럼은 Bruker-AM spectrometer(500 MHz for ^{1}H and 125 MHz for ^{13}C)기기로 DMSO-d_6 용매를 이용하여 측정하였다. HPLC는 Agilent사의 1260 infinity 기기를 통하여 측정하였고, column은 Agilent사의 ZORBAX Eclipse plus C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm-particle size)를 이용하였다.

식물재료 – 본 실험에 사용된 갈대이삭은 2016년 경북 상주시 낙동보 주변에서 채취 후 음건하여 사용하였으며, 국립낙동강생물자원관 박진희박사가 동정하였다. 그 표본은 현재 국립낙동강생물자원관 수장고에 보관하였다.

추출 및 분획 – 갈대이삭 420 g을 10 L 삼각 플라스크에 methanol(5 L) 넣고, 실온에서 5일간 빛을 차단하여 방치하였다. 이와 같이 3번 반복하여 얻은 것을 0.45 μm 필터로 여과한 후 여과액을 45°C에 감압 농축하여 methanol 추출물 9 g(2.1%)을 얻었다. Methanol 추출물 9 g에 3차 증류수 500 ml를 넣어 잘 용해시킨 후, 2 L분획 깔때기에 넣고 동일한 부피의 ethyl acetate(500 ml)를 넣어 ethyl acetate 분획을 얻었다. 이와 같이 2번 반복하여 45°C에 감압 농축하여 ethyl acetate 분획물 3 g(33.3%)를 얻었다.

지표물질 분리 – Ethyl acetate 분획물(3 g)를 사용하여 1차 분리하였다. ODS gel이 충진되어 있는 30×460 mm glass column에 분획물을 100 mg/ml의 농도로 조제하여 5 ml 주입하고 water-acetonitrile 혼합용매(100:1, 70:30, 50:50, 20:80, 0:100)의 조건으로 분당 35 ml씩 용출시켜 분리하였다. MPLC상에서 순차적으로 분리된 5개의 1차 분획층들(Fr1-5) 중 지표성분 분획으로 확인된 Fr-4(240 mg)를 두 차례 Sephadex LH-20(GE Healthcare Life Sciences) column chromatography를 80% MeOH 용매 조건으로 화합물 **1**(43 mg)을 얻었다.

Tricin (**1**) – Yellow powder; HREIMS *m/z* 330.0740 $[M]^{+}$; ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 12.97 (1H, brs, 5-OH), H-7.32 (2H, s, H-2′, 6′), 6.97 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, d, *J*=3.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J*=3.0 Hz, H-6), 3.89 (6H, s, 3′,5′-OCH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ 182.1 (C-4), 164.8 (C-7), 164.0 (C-2), 161.8 (C-5), 157.8 (C-8a), 148.6 (C-3′, 5′), 140.2 (C-4′), 120.8 (C-1′), 104.7 (C-2′, 6′), 104.0 (C-4a and 3), 99.3 (C-6), 94.6 (C-8), 56.8 (C-2×OCH_3).

표준용액 조제 – Tricin은 DMSO로 녹여 1 mg/ml가 되도록 표준원액을 제조한 후 methanol(Fisher Scientific Korea, Seoul, Korea)로 희석하여 200 μg/ml의 표준용액을 제조하였다. 이를 이용하여 3.12 μg/ml~200 μg/ml의 농도에 이르는 일곱 농도의 working standard solution을 제조하여 실험에 사용하였다. 제조된 표준용액은 4°C에서 냉장 보관하였다. Tricin의 함량을 구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

HPLC 분석 – 갈대이삭의 tricin 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table I에 요약하였다. HPLC 분석에서 칼럼은 ZORBAX Eclipse Plus C18(4.6×150 mm, 5 μm, Agilent, USA)을 사용하였고, HPLC 장비는 pump, auto sample, column oven, DAD(Agilent 1260 infinity HPLC system, Agilent Technologies, USA)를 사용하여, 데이터 수집 및 처리를 위해 open lab software program을 사용하였다. 이동상 A는 0.1% formic acid가 첨가된 water를, 이동상 B는 0.1% formic acid가 첨가된 acetonitrile을 사용하였으며 모든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 칼럼의 유속은 1.0 ml/min이었으며 분석 시간은 0에서 6분까지 이동상 A를 95%로 용리하였고, 6분에서 30분까지 이동상을 B를 70%가 되도록 한 다음, 30분에서 35분까지 이동상B를 70%로 유지하고, 35분에서 45분까지 이동상 B를 100%가 되도록 한 다음 45분에서 50분까지 이동상 B를 100%로 유지하면서 분석을 실시 하였다. 이후 50분까지 이동상 A를 95%로 내려 초기 용매 조건으로 조정하였다. UV는 350 nm 파장에서 측정하였으며, 시료는 10 μl를 주입하였다(Table I).

분석 방법의 검증(Validation) – HPLC 분석법의 재현성 및 정확도를 검증하기 위해 ICH(International conference on Harmonization)의 가이드라인에 기초하여 직선성(linearity),

Table I. Analytical condition of HPLC for a tricin in *Phragmites communis* ears extracts

Parameter	Condition		
Column	ZORBAX Eclipse plus C_{18} (4.6×150 mm, 5 μm)		
Flow rate	1.0 ml/min		
Injection volume	10 μl		
UV detection	350 nm		
Run time	50 min		
Gradient	Time (min)	% A[1)]	% B[2)]
	0	95	5
	6	95	5
	30	30	70
	35	30	70
	45	0	100
	50	0	100

[1)]0.1% formic acid in water. [2)]0.1% formic acid in acetonitrile.

검출한계(LOD, limit of detection) 및 정량한계(LOQ, limit of quantitation) 측정, 반복실험을 통한 정밀성(precision) 평가, 회수율(recovery) 시험을 통한 정확성(accuracy) 평가를 실시하였다.

갈대이삭의 추출용매별 Tricin 함량분석 – 건조된 갈대이삭을 균질하게 분쇄하여 50호 체로 친 후 정확히 1.00 g 칭량하여 추출용매(Water, 50% MeOH, MeOH, EtOH, Acetonitrile) 20 ml을 가하여 상온에서 24시간 교반추출 하였다. 이 추출액은 0.45 μm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 각 시료는 세 번씩 반복 분석하였다. 표준용액의 chromatogram의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 갈대이삭 추출물 시료 중 tricin의 함량을 산출하였다.

결과 및 고찰

화합물의 구조동정 – 화합물 1은 노란색 분말이며 TLC에서 10% H_2SO_4를 분무하고 가열시 노란색으로 나타났으며 flavonoid계 화합물로 추정되었다. 이 화합물의 EIMS spectrum에서는 *m/z* 330에서 $[M]^+$에 molecular ion peak를 확인하였고, HREIMS spectrum에서 *m/z* 330.0740의 $[M]^+$는 분자식 $C_{17}H_{14}O_7$의 $[M^+]$ 계산값 330.0740과 일치했다. ^{1}H-NMR spectrum에서 δ 6.21과 δ 6.56에서 meta-coupled doublet인 H-6과 H-8 signal이 나타났고, δ 6.97에서 singlet peak는 H-3으로 C-ring에 치환기가 존재하지 않는 flavone으로 확인되었다. 또한 δ 12.97에서 5번의 OH peak가 나타났으며 δ 7.32에서 flavonoid B-ring의 H-2′,6′에 위치한 2개의 proton peak가 관찰되었으며, δ 3.89에서 H-3′,5′에서 2개의 methoxy기에서 기인한 proton peak가 관찰되었다.

^{13}C-NMR spectrum에서 flavone 화합물의 C-4 위치의 ketone에 기인한 carbon peak δ 182.1이 관찰되었으며 그 외 δ 164.8 (C-7), 164.0 (C-2), 161.8 (C-5), 157.8 (C-8a), 148.6 (C-3′, 5′), 140.2 (C-4′)에서 oxygen과 인접한 carbon peak가, δ 120.8 (C-1′), 104.7 (C-2′, 6′), 104.0 (C-4a and 3), 99.3 (C-6), 94.6 (C-8)에서 A, B, C ring의 carbon peak가, δ 56.8에서 2개의 methoxy기의 carbon peak가 검출되었다. 이를 기존 문헌과 비교하여 tricin으로 구조 동정한 후 이를 정량분석을 위한 지표물질로 이용하였다(Fig. 1).[14]

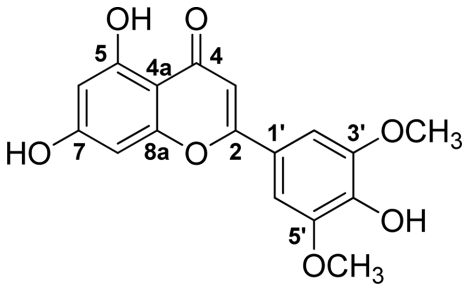

Fig. 1. Structure of tricin isolated from *P. communis*.

특이성 확인 – 특이성은 불순물, 분해물, 추출물 등이 혼합된 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 의미하며 다른 물질의 간섭 없이 분리될 수 있는 것으로 특이성을 확인하게 된다. 표준용액과 갈대이삭 추출한 용액의 chromatogram을 비교하여 tricin peak를 확인한 결과 Fig. 2와 같이 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며 표준용액의 retention time(t_R)과 추출물의 RT 값이 일치하였으며 표준용액과 갈대이삭 추출물의 DAD spectrum 결과에서도 동일한 spectrum을 나타내어 본 시험법의 특이성을 확인하였다(Fig. 2).

검량선 및 검출한계, 정량한계 조사 – Tricin 표준용액 3.12, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 100, 200 μl/ml로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 Fig. 3과 같은 검량선을 나타내었다. 검량선의 상관계수(R^2)는 1로 높은 직선성을 보였으며, 검출한계는 0.84 μg/ml, 정량한계는 2.53 μg/ml 수준으로 나타났다(Table II).

회수율 측정 – 회수율은 tricin이 함유되어 있지 않은 공시료에 표준용액 50.0, 66.6, 100 μg/ml의 세 가지 농도를 첨

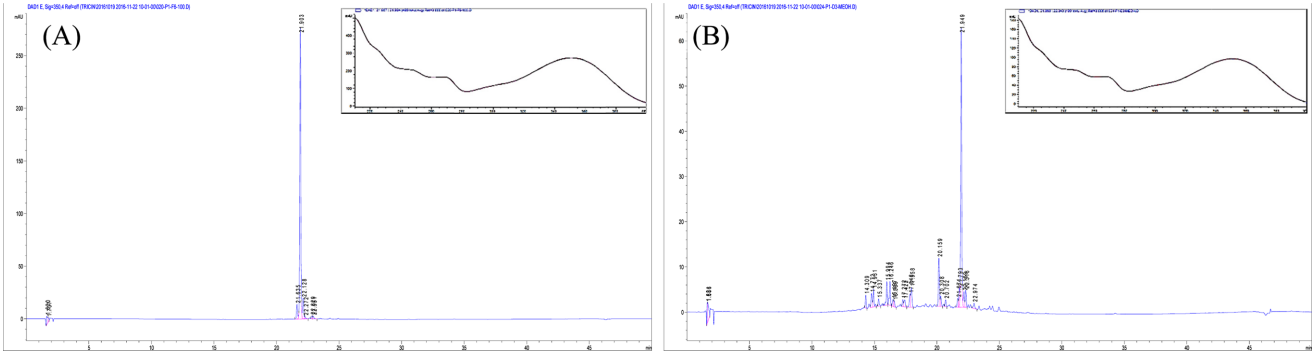

Fig. 2. The chromatograms and absorption spectra (insert) of tricin (t_R – 21.9 min), in standard solution (100 μg/ml) and *P. communis* ear extracts obtained by HPLC-PDA system. (A) Standard, (B) *Phragmites communis* ear extracts.

Table II. Calibration curve, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of tricin by HPLC-DAD

Compound	Linear range (μg/ml)	Regression equation	R^2	LOD (μg/ml)	LOQ (μg/ml)
Tricin	3.12~200.00	y = 16.29x – 4.57	1.0000	0.84	2.53

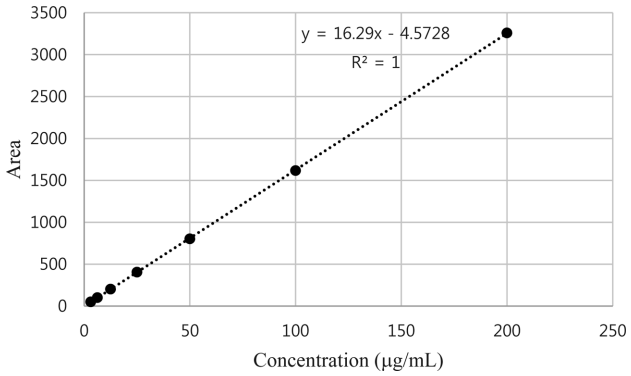

Fig. 3. Calibration curve of tricin standard solution.

Table III. Recovery of tricin

Concentration (μg/ml)	Recovery (%)	RSD (%)
50.00	100.48±0.45	0.90
66.67	108.22±0.77	1.06
100	98.80±0.93	0.94

가하고 앞의 전처리법에 의해 처리한 뒤 HPLC로 분석하여 검출되는 농도를 측정하였다. Table III에 나타나 바와 같이 tricin의 회수율은 50.0 μg/ml에서는 99.67~101.45%, 66.6 μg/ml는 106.94~109.17%, 그리고 100 μg/ml의 농도에서는 97.76~99.56%의 범위의 회수율을 보였으며, 분석오차 10% 이내를 만족하였다.

정밀성 검토 – 정밀성은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에서 분석하였을 때 측정 결과 값 사이의 근접성을 확인하는 것으로 정밀성을 분석하였다. Intra-day, inter-day의 정밀도(RSD)를 측정한 결과 Table IV와 같으면 intra-day에서의 정밀도는 0.60~1.35%를 나타내었고, inter-day에서는 0.77~1.51%의 정밀도를 나타내었다.

추출용매별 함량분석(Content) – 확립된 분석법을 이용하여 갈대이삭 추출용매별(Water, 50% MeOH, MeOH, EtOH, acetonitrile) tricin 함량을 분석하였다. 추출용매에 따른 지표성분 함량 지표는 Table V와 같이 100% MeOH 추출에서 가장 높은 효율을 확인하였고, water에서는 tricin이 추출되지 않는 것으로 확인하였다.

결 론

갈대이삭의 MeOH 추출물로부터 각종 컬럼 chromatography법을 이용하여 지표성분을 분리, 분광학적 방법을 통해 tricin으로 구조 동정하였다. 분석법 검증 결과는 HPLC를 이용한 분석방법에서 표준용액의 retention time과 갈대이삭 추출물의 retention time이 일치하였으며 동일한 spectrum을 나타내는 것으로 특이성을 확인하였다. Tricin의 검량성은 상관계수 값이 1로 나타나 높은 직선성을 보여주어 분석에 적합함을 알 수 있었다. Tricin의 검출한계는 0.84 μg/ml였고, 정량한계는 2.53 μg/ml로 나타났다. 정밀도 측정 결과 tricin은 intra-day에서 99.96~100.96%의 정밀도를 보여주었으며 inter-day에서는 99.01~100.96%로 높은 정밀성을 나타내었다. 또한 tricin은 98.80~108.22% 범위의 회수율을 보여주어 실험방법에 대한 정확성을 검증하였다. 추출용매별 tricin의 함량을 확인한 결과 MeOH, EtOH, 50% MeOH, acetonitrile 순으로 관찰되었다. 본 연구 결과 갈대이삭의 주요성분 tricin의 HPLC를 이용한 분석방법이 적합한 분석방법임을 검증되었다.

Table IV. Intra- and inter-day accuracy and precision of tricin

Nominal concentration (μg/ml)		Mean measured concentration (μg/ml)	Accuracy (%)	RSD[1)] (%)
Intra-Day	25	25.24±0.26	100.96	1.03
	50	49.98±0.67	99.96	1.35
	100	100.50±0.60	100.50	0.60
Inter-Day	25	25.10±0.19	100.40	0.77
	50	49.51±0.73	99.01	1.48
	100	99.53±1.51	99.53	1.51

[1)]Relative standard deviation.

Table V. Content of tricin extracted by different solvents

Extract solvent	Mean (μg/g)	RSD (%)	Contents (%)
Water	ND	ND	ND
50% MeOH	242.24±27.56	11.38	0.36
MeOH	468.84±9.69	2.07	0.98
EtOH	193.01±4.30	2.23	0.48
Acetonitrile	106.25±0.84	0.79	0.33

사 사

본 연구는 2017년 국립낙동강생물자원관의 담수생물활용 기반구축사업의 일환으로 수행 하였음.

인용문헌

1. Baxter, H. and Harborne, J. B. (1999) The Handbook of Natural Flavonoids. John wiley & Sons, New York.
2. Martens, S. and Mithöfer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**: 2399-2407.
3. Lu, B., Wu, X., Tie, X. and Zhang, Y. (2005) Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food Chem. Toxicol.* **43**: 783-792.
4. Verschoyle, R. D., Greaves, P., Cai, H., Borkhardt, A., Broggini, M., D'lncalci, M., Riccio, E., Doppalapudi, R., Kapetanovic, I. M., Steward, W. P. and Gescher, A. J. (2006) Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricin, a naturally occurring flavone. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **57**: 1-6.
5. Chang, C. L., Zhang, L. J., Wu, C. C., Huang, H. C., Roy, M. C., Huang, J. P., Wu, Y. C. and Kuo, Y. H. (2010) Quiquelignan A-H, eight new lignoids from the rattan palm *Calamus quiquesetinervius* and their antiradical, anti-inflammatory and antiplatelet aggregation activities. *Bioorg. Med. Chem.* **18**: 518-525.
6. Ju, Y., Sacalis, J. N. and Still, C. C. (1998) Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3785-3788.
7. Harborne, J. B. and Hall, E. (1964) Plant polyphenols—XII. : The occurrence of tricin and of glycoflavones in grasses. *Phytochemistry* **3**: 421-428.
8. Li, M., Pu, Y., Yoo, C. G. and Ragauskas, A. J. (2016) The occurrence of tricin and its derivatives in plants. *Green Chem.* **18**: 1439-1454.
9. Jung, G. E. and Lee, J. S. (2011) Dyeability and functionality of bamboo extracts (Part I)-Characteristics of bamboo extracts and dyeing properties of cotton. *J. Korean Soc. Cloth. Text.* **35**: 206-217.
10. Lee, D., Park, H. Y., Kim, S., Park, Y., Bang, M. H. and Imm, J. Y. (2015) Anti-adipogenic effect of oat hull extract containing tricin on 3T3-L1 adipocytes. *Process Biochem.* **50**: 2314-2321.
11. Kim, C. M., Shin, M. K., Ahn, D. K. and Lee, K. S. (1998) A compete translation dictionary of China medicine. Jeongdam Publisher. Seoul Korea.
12. Shin, K. Y., Lee, G. H., Park, C. H., Kim, H. J., Park, S. H., Kim, S., Kim, H. S., Lee, K. S., Won, B. Y., Lee, H. G., Choi, J. H. and Suh, Y. H. (2007) A novel compound, maltolyl p-coumarate, attenuates cognitive deficits and shows neuroprotective effects in vitro and in vivo dementia models. *J. Neurosci. Res.* **85**: 2500-2511.
13. Choi, S. E., Yoon, J. H., Park, K. H., Kim, K. Y., Song, Y. J., Jin, H. Y. and Lee, M. W. (2014) Whitening activity of phenolic compounds from rhizome of *Phragmites communis*. *Nat. Prod. Sci.* **20**: 269-273.
14. Bhattacharyya, J., Stagg, D., Mody, N. V. and Miles, D. H. (1978) Constituents of *Spartina cynosuroides*: isolation and ^{13}C-NMR analysis of tricin. *J. pharm. sci.* **67**: 1325-1326.

(2016. 12. 22 접수; 2017. 3. 16 심사; 2017. 3. 20 게재확정)