

## 싸리나무 추출물의 Xanthoangelol 분리 및 HPLC-DAD 밸리데이션

우현심<sup>1</sup> · 김영수<sup>1</sup> · 오유진<sup>1</sup> · 조해진<sup>1</sup> · 송세규<sup>1</sup> · 김대욱<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>국립백두대간수목원, 산림식물산업부

### Isolation and HPLC-DAD validation of xanthoangelol in *Lespedeza bicolor* extract

Hyun Sim Woo<sup>1</sup>, Yeong-Su Kim<sup>1</sup>, Yu Jin Oh<sup>1</sup>, Hae Jin Cho<sup>1</sup>, Se-Kyu Song<sup>1</sup>, and Dae Wook Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Plant Industry, Baekdudaegan National Arboretum

**Abstract** This study was undertaken to determine the characteristics of xanthoangelol, the major chalcone constituent derived from the extracts of different parts of *Lespedeza bicolor*. Xanthoangelol was isolated from the root extract using column chromatography and used as a standard for quantitative analysis. The structure of the isolated compound was established based on spectroscopic evidence. The HPLC-DAD method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, and limit of quantitation. The calibration curve of xanthoangelol had significant linearity ( $R^2 > 0.9999$ ). Limit of detection and limit of quantitation 0.018 and 0.059  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The relative standard deviation values of precision test, and intra- and inter-day tests were less than 0.22 and 0.40%, respectively. In the recovery test, the accuracy ranged from 98.98-102.78% with RSD values less than 0.13%. The method validation parameters indicate the applicability of the HPLC method for quality control of food or drug formulations containing *L. bicolor*.

**Keywords:** *Lespedeza bicolor*, chalcone, xanthoangelol, HPLC-DAD, validation

## 서 론

싸리나무(*Lespedeza bicolor*)는 전국 산야에서 2-3 m 높이로 흔히 자라고 7-8월에 꽃이 피고 하나의 잎자루에 3개씩의 잎이 달리고 작은 잎이 타원형이며 엽맥의 연장인 짧은 침상의 돌기가 있는 콩과의 낙엽관목으로 우리나라와 일본, 대만에 주로 분포한다. 싸리나무는 특유의 약리효과가 뛰어나 진해, 거담, 만성 기관지염, 지혈, 해열 등의 치료 및 이뇨제와 건비제 등으로 사용되고 있으며 민간요법으로 피부질환 치료제로 이용해 왔다(Korea National Arboretum, 2012; Lee, 1972). 싸리나무에 관한 연구는 꾸준히 발표되고 있으며, 부위별(잎, 줄기, 뿌리) 추출물의 자유라디칼 소거 활성, 산화적 스트레스, 멜라닌 생합성에 관여하는 tyrosinase 억제 활성 및 면역 활성 등이 보고된 바 있다(Lee 등, 2005a; Lee 등, 2005b; Lee 등, 2011; Lee과 Jhoo 2012; Lee 등, 2016; Ryu 등, 2007).

최근 연구 결과에 따르면 추출물로부터 주성분/미량성분 분리·정제 및 구조 확인과 동시에 그 약리적 기능에 관한 연구도 활발히 진행 중이다. Woo 등(2011)에 따르면 뿌리에서 3종의 신규

화합물 포함한 6개의 단일 화합물은 bacterial neuraminidas를 저해함으로써 항박테리아성을 가지고, Do 등(2017)은 줄기에 존재하는 17개의 metabolite가 methylglyoxal (MGO)에 의해 유도된 advanced glycation end products (AGE)를 저해함으로써 endothelial dysfunction의 예방 또는 치료제로의 이용 가능성을 연구하였다. Ullah(2017)는 싸리나무 지상부와 지하부 추출물의 phytochemical을 분석하였고 Human lung carcinoma cell (LU-1)과 human prostate carcinoma (LnCaP) cell line에 가능성 있는 천연의 항암 후보 물질이 될 수 있을 것이라 제시하였다.

싸리나무의 대표적인 2차 대사산물로는 caffeic acid, protocatechuic acid, botulin acid, b-sitosterol, quercetin, kaempferol, trifolin, prenylated/geranylated flavonoids 등의 성분이 보고되었다(Maximov 등, 2004; Samiullah 등, 2012). Prenylated/geranylated flavonoids의 경우 flavonoids의 생합성 경로에서 chalcone synthase (CHS)에 의해 1분자의 coumaroyl-CoA와 3분자의 malonyl-CoA가 축합 반응하여 노란색의 chalcone을 형성한다. 싸리나무 추출물의 기능성물질인 xanthoangelol은 테르펜 합성 경로에서 생성되는 isopren과 flavonoids 생합성 경로에서 생성되는 chalcone이 결합하여 geranyl group이 결합된 chalcone 유도체이다(Sun 등, 2015). Xanthoangelol은 신경 암세포와 백혈병 세포주에서 항암효과, 중앙 프로토모 활성화와 전이에 대한 억제 효능 및 항염작용으로 인한 비만 억제 효능과 다양한 범위에서 항산화 작용이 있다고 알려져 있다(Akihisa 등, 2003; Kimura와 Baba, 2003; Li 등, 2016; Sumiyoshi 등, 2015; Tabata K, 2005). 본 연구에서는 생리학적 기능성과 이용 가능성이 있는 싸리나무 유효성분 xanthoangelol를 부위별 최적의 추출 조건 탐색, HPLC-DAD 분석법을 확립하여 기능성 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

\*Corresponding author: Dae Wook Kim, Department of Forest Plant Industry, Baekdudaegan National Arboretum, Bonghwa-gun, 36209, Korea

Tel: +82-54-679-2738

Fax: +82-54-679-0636

E-mail: dwking@bdna.or.kr

Received November 12, 2019; revised December 4, 2019;

accepted December 9, 2019

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 싸리나무는 경북 봉화군 문수산 일대에서 2018년에 채집하여 음건하여 사용하였으며, 국립백두대간수목원 송세규박사가 동정하였다. 그 표본(BDNA-2018-302)은 국립백두대간수목원 표본실에 보관하였다. TLC (Thin layer chromatography)는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, 발색 시약은 10% aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 분리 및 정제를 위해 Open column chromatography 용 silica gel은 Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany), Recycling preparative HPLC column은 JAIGEL-ODS AP (20×500 mm, 15 μm, Jai, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 정량분석에 사용된 기기는 Agilent 1290 Infinity II LC Systems (Agilent, CA, USA)으로 column은 ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, 5 μm, Agilent, CA, USA), 용매는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입한 HPLC급 용매를 사용하였다. NMR spectrum은 800 MHz NMR (Bruker, MA, USA)를 사용하여 측정하였고 NMR용 용매는 Actone-d<sub>6</sub> (BK Instruments Inc., Daejeon, Korea)를 사용하였다.

### 지표물질의 분리 및 동정

건조한 싸리나무뿌리 수피 1.4 kg을 95% methanol로 상온에서 5일간 3회 추출하였다. Filter paper (NO. 4 Whatman international, UK)를 이용하여 여과 후 이를 감압 농축하여 methanol 농축액(224 g)을 증류수에 용해하여, 극성에 따라 *n*-Hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 물을 순차적으로 가하여 분획하였다. 이때 용출된 EtOAc 층은 다시 감압 농축하여 얻은 농축액(15 g)을 silica gel (250 g)이 충전된 column (8×300 mm)에 주입하였다. Column에 *n*-Hexane/ethyl acetate (50:1, 30:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1)로 순차적으로 전개시켜 6개의 분획(Fr.1-6)으로 나누었다. 이 중에서 Fr.4 (2.1 g)은 sephadex LH-20을 사용하고 methanol을 전개 용매로 column chromatography를 실시하여 7개의 소분획 (Fr.4.1-7)으로 나누었다. 소분획 Fr.4.2 (161 mg)는 Recycling preparative HPLC system (JAIGEL-ODS AP; 20×500 mm, 15 μm)를 이용하여, gradient (H<sub>2</sub>O/ACN; 80:20, 60:40, 20:80, 0:100)를 사용하여, 화합물 1 (34.1 mg)을 순수하게 분리하였다(Fig. 1).

화합물 (1): <sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ 1.54 (3H, s, H-9<sup>''</sup>), 1.60 (3H, s, H-8<sup>''</sup>), 1.82 (3H, s, H-10<sup>''</sup>), 1.98 (2H, t, *J*=8.0 Hz, H-4<sup>''</sup>), 2.07 (2H, m, H-5<sup>''</sup>), 3.44 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-1<sup>''</sup>), 5.07 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H-6<sup>''</sup>), 5.54 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5<sup>'</sup>), 6.95 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3,5), 7.71 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2,6), 7.73 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-α), 7.85 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-β), 7.95 (1H, d, *J*=7.95 Hz, H-6). <sup>13</sup>C-NMR (200 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ 15.5 (C-10<sup>''</sup>), 16.9 (C-9<sup>''</sup>), 21.4 (C-1<sup>''</sup>), 25.0 (C-8<sup>''</sup>), 26.5 (C-5<sup>''</sup>), 39.6 (C-4<sup>''</sup>), 107.2 (C-5<sup>'</sup>), 113.6 (C-1<sup>'</sup>), 115.3 (C-3<sup>'</sup>), 115.9 (C-3,5), 117.5 (C-6), 122.3 (C-2<sup>''</sup>), 124.3 (C-6<sup>'</sup>), 126.7 (C-1), 129.3 (C-β), 130.7 (C-7<sup>''</sup>), 130.8 (C-2,6), 134.4 (C-3<sup>''</sup>), 144.0 (C-α), 160.0 (C-4), 161.8 (C-2<sup>'</sup>), 164.3 (C-4<sup>'</sup>), 192.1 (C=O).

### 표준액 조제

분리한 지표 성분 xanthoangelol을 5 mg을 칭량하여 HPLC용 MeOH에 5 mL 녹여서 1000 mg/L의 standard solution을 조제하였다. 이를 분석 조건 확립 및 검증을 위해 0.06-500 mg/L로 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

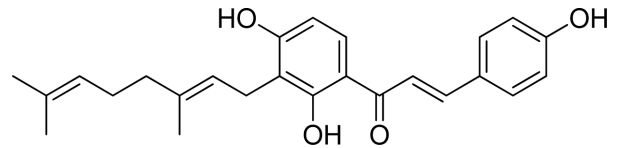


Fig. 1. Structure of xanthoangelol isolated from *Lespedeza bicolor*.

Table 1. Optimized process parameters for chromatographic condition

Parameter	Conditions			
Instrument	Agilent 1290 Infinity II LC Systems (Agilent Technologies)			
Column	ZORBAX Eclipse plus C <sub>18</sub> (4.6×150 mm, 5 μm)			
	Time (min)	A (%) <sup>1)</sup>	B (%) <sup>2)</sup>	
Mobile phase	Gradient	7	95	5
		27	20	80
		33	0	100
		38	0	100
		45	95	5
Injection volume	10 μL			
Flow rate	1.0 mL/min			
Wavelength	370 nm			

<sup>1)</sup>A: Water with 0.1% (v/v) formic acid

<sup>2)</sup>B: Acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid

### HPLC-DAD 분석

HPLC-DAD 시스템을 사용하여 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 이 장비는 펌프, DAD 검출기 및 자동 샘플러로 구성되었다. DAD 검출기에서 xanthoangelol 최적의 검출 파장은 370 nm에서 확인되었고, 스펙트럼 스캔은 200-400 nm에 이루어졌다. ZORBAX C<sub>18</sub> 칼럼(150×4.6 mm, 5 μm, Agilent, CA, USA)을 사용하여 분리를 수행하였다. 이동상으로는 0.1% formic acid를 함유하는 water (A)과 acetonitrile (B)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 시료 10 μL를 주입하여 gradient condition으로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. 분석 시료는 370 nm에서 크로마토그램을 추출하여 xanthoangelol을 검출한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성하고 화합물의 함유량을 계산하였다.

### 분석조건 검증(Validation)

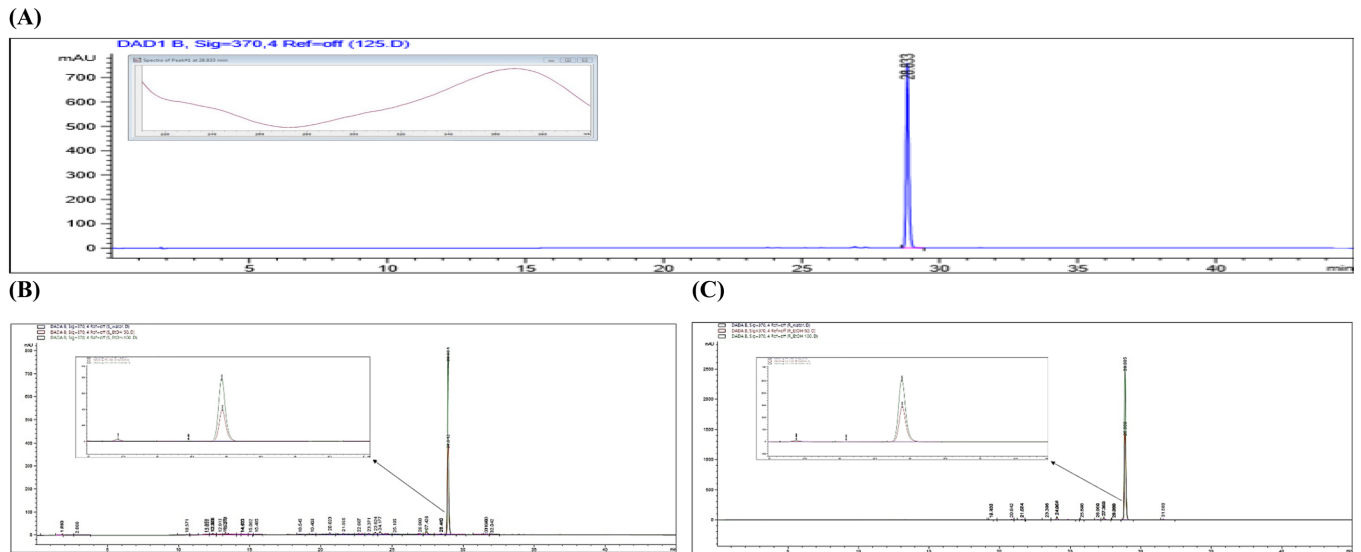
HPLC-DAD 분석법의 재현성 및 정확도를 검증하기 위해 ICH Guideline에 기초하여 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection) 및 정량한계(LOQ, limit of quantitation) 측정, 반복 실험을 통한 정밀성(precision) 평가, 회수율(recovery) 시험을 통한 정확성(accuracy) 평가를 실시하였다(ICH harmonized tripartite guideline, 2005).

### 직선성(Linearity)

분석하고자 하는 xanthoangelol의 농도 범위를 포함하는 농도에 비례하여 HPLC로 분석한 피크 면적 값을 관계로 검량선을 측정하였고 상관계수(R<sup>2</sup>) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다.

### 검출한계와 정량한계(Limit of Detection and Limit of Quantitation)

검출한계(LOD; limit of detection)와 정량한계(LOQ; limit of quantitation)는 분석 대상 물질을 신뢰성 있게 검출될 수 있는 최



**Fig. 2.** Comparisons of the HPLC chromatogram of xanthoangelol in 125 µg/mL standard solution (A) and influence of ethanol distribution ratios on xanthoangelol profiles; Stems (B) and Roots (C). Insert show the absorbance spectra of xanthoangelol and an enlargement of the HPLC trace between 27 and 31 min. Blue: water, Red: 50% EtOH, Green: 95% EtOH.

소 농도, 분석 대상 물질을 신뢰성 있게 정량 할 수 있는 최소 농도이다. 표준용액을 농도별로 주입하여 분석한 결과를 토대로 signal/noise 비가 3.3에 해당하는 농도를 LOD로, signal/noise 비가 10에 해당하는 농도를 LOQ로 하였다.

#### 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy) 평가

정밀성은 균일한 검체로부터 여러 번 채취 한 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 측정값들 사이의 근접성(분산 정도)을 나타내는 것으로 intra-day는 하루 동안 3회 반복측정해서 나온 표준편차를 평균치를 나눈 상대표준편차로 나타내었으며, inter-day는 2일간 3회 반복 측정 한 후 얻은 표준편차를 평균치로 나눈 상대표준편차로 나타내었다. 정확성은 시험방법에 따른 측정값이 표준값에 근접한 정도를 말하는 것으로 반복 측정 한 시료의 회수율과 상대표준편차 값(RSD)으로 정확성을 평가하였다.

#### 싸리나무 부위별 시험용액의 추출조건

싸리나무 부위별(줄기/뿌리) 수피를 균질하여 분쇄하여 50 mesh의 체를 통과한 미세입자를 선별하여 건조로 5 g에 50 mL의 water, 30, 50, 70, 95% EtOH을 사용하여 25±5°C로 2 h씩 초음파 추출한 후 상층액을 취하고 0.45 µm PTFE syringe filter(Advantech, CA, USA)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다.

#### 통계분석

모든 분석은 3회 이상 반복 수행하였고, 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 기술하였다. 각 실험 결과는 SAS program (Statistical Analysis System, version 8.1, SAS Institute Inc., NC, USA)을 이용하여 one-way ANOVA와 Duncan's multiple-range test ( $p < 0.05$ )로 비교하였다.

## 결과 및 고찰

#### 지표물질 분리 및 구조동정

n-Hexane, ethyl acetate를 사용하여 column chromatography를 통해 분리한 화합물 xanthoangelol은 노란색 분말이며 HPLC chro-

matogram 확인 결과 retention time 28.833 min에서 single peak로 단일물질임을 확인하였다. 구조 동정을 위해 NMR 분석과 HREIMS 측정을 실시하였으며 이들 결과를 토대로 구조를 결정하였다. UV spectrum 측정 결과 210, 370 nm 파장의 peak를 확인했으며(Fig. 2A (Insert)), HREIMS spectrum에서  $m/z$  392.1986 [M]<sup>+</sup>는 분자식 C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>  $m/z$  392.1988 [M]<sup>+</sup> 계산 값과 일치했다(Supporting information). <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 δ 7.85 (H, d,  $J=16.0$  Hz)과 δ 7.73 (H, d,  $J=16.0$  Hz)의 peaks는 chalcone 화합물의 특징적인 H-α,β signal들이 doublet으로 서로 coupling하고 있으며, coupling constant 값이  $J=16.0$  Hz인 것으로 전형적인 α,β-unsaturated carbonyl 화합물임을 알 수 있었다. 또한 aromatic region에서 δ 6.56 (H, d,  $J=8.0$  Hz, H-5'), δ 7.95 (H, d,  $J=8.0$  Hz, H-6')의 doublet peaks는 A ring에서 기인하는 peak로 서로 ortho coupling을 하고 있음을 알 수 있었으며, δ 6.95 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-3,5)과 δ 7.71 (2H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2,6)에서의 doublet peaks는 B ring에서 기인하는 peak로 para 치환체임을 알 수 있었다.

Geranyl group은 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum에서 H-1'와 짝짓는 H-2'', 5'와 짝짓는 H-6''를 확인하였고 HMBC spectrum를 통해 δ 192.1의 carbonyl carbon이 H-β, H-α, H-6'와 correlation을 확인함으로써 위치를 확정 지을 수 있었다. 이상의 연구결과로부터, 싸리나무 메탄올 추출물로부터 xanthoangelol으로 동정하였으며, 기타 1D/2D NMR spectral data가 보고된 문헌치와 일치함을 확인하였다.

#### 싸리나무 추출물의 분석법 확립 및 특이성 확인

싸리나무 유효성분인 xanthoangelol를 지표성분으로 제안하고 이의 분석법을 개발하였다. 특이성 시험을 통해 분석 대상 물질을 다른 물질의 간섭 없이 분리될 수 있도록 370 nm의 검출 파장으로 ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, 5 µm)을 사용하여 Table 1의 용매 조건을 확립하였다. 확립된 분석 조건으로 싸리 나무줄기(Fig. 2B)와 뿌리(Fig. 2C) 추출물을 분석한 결과 추출물이 혼합된 상태에서도 간섭없이 분석가능하고 표준용액과 싸리나무 추출물의 UV 스펙트럼에서 동일한 스펙트럼을 나타내었다. 위 분석법에 대한 검증은 다음과 같이 수행하였다.

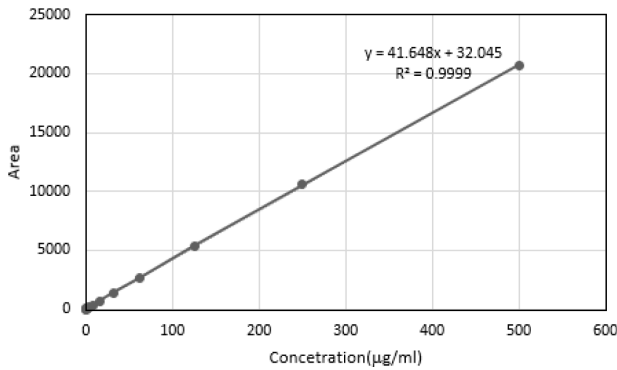


Fig. 3. Calibration curve of standard.

**직선성 및 검출한계, 정량한계 확인**

Xanthoangelol 표준용액을 0.06-500 µg/mL 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC 측정값을 검량선으로 작성하였다(Fig. 3). 검량선의 방정식은  $y=41.648x+32.045$ , 상관계수( $R^2$ )값은 0.9999로 높은 직선성을 보였다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 검량선의 직선 방정식의 기울기와 y 절편 값을 이용하여 계산한 결과,

xanthoangelol의 검출한계 0.018 µg/mL, 정량한계 0.059 µg/mL로 나타내었다(Table 2).

**정확성, 정밀성 및 회수율 측정**

정밀성, 정확성을 평가하기 위해 함량분석과 동일한 추출조건에서 세 가지 농도(15.63, 31.25, 62.50 µg/mL)를 제조 및 추출하여 RSD 값을 분석하였으며 Intra-, Inter-day의 RSD 값은 Table 3 과 같이 0.06-0.22, 0.13-0.40% 범위로 나타났다. Xanthoangelol의 정확성 평가를 위해 15.63, 31.25, 62.50 µg/mL 농도에서 3반복한 결과 xanthoangelol은 98.98-103.04% 범위의 회수율을 보였으며 RSD 값은 0.03-0.13%로 나타났다. Precision 및 accuracy는 모두 2% 이내의 높은 재현성을 나타내었으며 이와 같은 결과를 토대로 본 분석법의 표준화가 가능함을 확인하였다(Table 3).

**추출 용매에 따른 싸리나무의 부위별 함량분석**

본 시험법의 검증 과정을 통하여 xanthoangelol에 대한 상기 HPLC-DAD 분석법이 싸리나무 부위별 추출물의 정량 분석에 이용하기에 충분한 것을 알 수 있었다. 잎, 줄기 및 뿌리 95% 에탄올 추출물에 대한 크로마토그램과 UV 스펙트럼을 비교 분석한 결과 줄기와 뿌리 껍질추출물에서만 xanthoangelol 화합물을

Table 2. Calibration curve, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of xanthoangelol by HPLC

Compound	Linear range (µg/mL)	Regression equation <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>	LOD <sup>2)</sup> (µg/mL)	LOQ <sup>3)</sup> (µg/mL)
Xanthoangelol	0.06-500	$y=41.648x+32.045$	0.9999	0.018	0.059

<sup>1)</sup>y: peak area, x: concentration.

<sup>2)</sup>Limit of detection.

<sup>3)</sup>Limit of quantitation

Table 3. Precision and accuracy results of xanthoangelol

Compound	Conc. (µg/mL)	Precision				Accuracy		
		Intra-day <sup>1)</sup>		Inter-day <sup>1)</sup>		Mean±SD	Recovery (%)	RSD (%)
		Mean±SD <sup>2)</sup>	RSD (%) <sup>3)</sup>	Mean±SD	RSD (%)			
Xanthoangelol	15.63	15.42±0.03	0.19	15.44±0.03	0.19	15.47±0.02	98.98	0.13
	31.25	32.05±0.07	0.22	32.18±0.13	0.40	32.20±0.02	103.04	0.06
	62.50	63.87±0.04	0.06	63.95±0.08	0.13	64.02±0.02	102.43	0.03

<sup>1)</sup>Inter-day: three times analysis of xanthoangelol per day for 2 days, Intra-day: three times per day.

<sup>2)</sup>Relative standard deviation

<sup>3)</sup>Each data was obtained by three times analysis (n=3).

Table 4. Content of xanthoangelol from stems and roots extracted by different solvents

Plant part	Extract solvent	Mean±SD (µg/mL) <sup>1)</sup>	RSD (%) <sup>2)</sup>	Contents (%)	Extraction Yield (%)
Stems	Water	ND <sup>3)</sup>	ND	ND	11.0
	30% EtOH	0.35±0.04	0.20	0.26	17.4
	50% EtOH	62.96±0.15	0.14	4.81	17.4
	70% EtOH	90.14±1.22	0.12	7.57	20.0
	95% EtOH	127.41±3.01	1.40	11.08	29.2
Roots	Water	ND	ND	ND	8.0
	30% EtOH	1.02±0.07	42.16	0.079	15.0
	50% EtOH	237.79±1.46	0.14	18.29	15.4
	70% EtOH	277.15±2.09	0.06	21.32	16.4
	95% EtOH	437.42±5.77	0.07	33.65	30.8

<sup>1)</sup>Each values were the mean±SD.

<sup>2)</sup>Relative standard deviation.

<sup>3)</sup>ND=Not detected.

확인할 수 있었다. Xanthoangelol은 다양한 생리활성이 보고된 만큼 기능성 식품 소재로 활용하기에 적합한 물과 에탄올로 추출하여 정량분석을 실시하였다. 추출용매에 따른 싸리나무 줄기와 뿌리의 xanthoangelol 정량분석 결과는 Table 4와 같다. 싸리나무 줄기와 뿌리 모두 95% EtOH에서 xanthoangelol의 함량이 127.41, 437.42 µg/mL로 가장 높은 것으로 나타났고 두 용매의 조성에서 EtOH 비율이 높아질수록 xanthoangelol 함량 또한 증가하는 것을 확인하였다. Water에서는 xanthoangelol이 추출되지 않아 크로마토그램에서 확인할 수 없었다. 이상의 결과는 싸리나무의 대표적인 기능성 물질인 xanthoangelol에 대한 추출 및 분리, 분석에 관한 기초자료로서 다양한 식의약 소재로의 개발 시에 활용 가능할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구는 싸리나무의 기능성 식의약품 개발을 위해 부위별 최적의 에탄올 추출조건을 탐색하고 HPLC-DAD 분석방법에 대한 밸리데이션을 실시하였다. 싸리나무뿌리 추출물로부터 반복적인 크로마토그래피 기법으로 주요성분을 분리하여 NMR, MS와 같은 기기분석 data를 해석하여 xanthoangelol 화합물임을 확인하였다. Xanthoangelol를 표준물질로 선정하여 HPLC-DAD 분석법이 타당한지를 검토하기 위하여 직선성, 일간 일내 정확성, 정밀성 검출한계 및 정량한계를 확인하는 분석법 밸리데이션을 수행하였다. Xanthoangelol 분석은 ZORBAX Eclipse plus C<sub>18</sub> (4.6×150 mm, 5 µm) 칼럼과 기울기 용출(gradient elution) 방법으로, 370 nm 파장에서 다른 물질의 간섭 없이 안정되게 분석되는 것을 확인하였다. 기능성 소재로 적용하기에 적합한 물과 에탄올을 이용해 농도별(water, 30, 50, 70, 95% EtOH)로 추출하고 xanthoangelol의 함량을 분석하였으며, 에탄올 비율에 따라 대상 성분의 추출율을 조절함으로써 기능성 바이오 식의약품 원료 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

## 감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 산림식물자원 유래 뇌기능 향상 소재개발 (No.2019061270) 연구지원과 한국기초과학기술지원연구원 2020년도 선도장비 이용자프로그램 지원을 받아 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

## References

Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Iizuka M, Schneider S, Ogasawara K, Mukainaka T, Iwatsuki K, Suzuki T, Nishino H. Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Cancer Lett.* 201; 133-137 (2003)

Do MH, Lee JH, Wahedi HM, Pak CH, Lee CH, Yeo EJ, Lim YS, Ha SK, Choi IW, Kim SY. *Lespedeza bicolor* ameliorates endothelial dysfunction induced by methylglyoxal glucotoxicity, *Phytomedicine* 36: 26-36 (2017)

ICH harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), ICH Harmonized Tripartite Guidelines, November 2005. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.

Kimura Y, Baba K. Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: isolation of an active substance, xanthoangelol. *Int. J. Cancer.* 106: 429-437 (2003)

Korea National Arboretum. Available from: <http://www.kna.go.kr>. Accessed Jun. 1, 2012.

Lee SJ. Report on Korean folk-medicine. Seoul Natl Univ, Korea. pp. 75-101 (1972)

Lee YS, Chang, Park SC, Rim NR, Kim NW. Antioxidative and irritation response of *Lespedeza bicolor*. *J. Toxicol. Public Health* 21: 115-119 (2005a)

Lee SJ, Hossaine M.D.A., Park SC. A potential anti-inflammation activity and depigmentation effect of *Lespedeza bicolor* extract and its fractions. *Saudi J. Biol. Sci.* 22: 9-14 (2016)

Lee JH, Jhoo JW. Antioxidant Activity of Different Parts of *Lespedeza bicolor* and Isolation of Antioxidant Compound. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 763-771 (2012)

Lee YS, Joo EU, Kim NW. Antioxidant activity of extracts from the *Lespedeza bicolor*. *Korean J. Food Preserv.* 12: 75-79 (2005b)

Lee KI, Yang SA, Kim SM. Antioxidative and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Lespedeza bicolor* Stem Extracts Depending on Solvents. *Korean J. Med. Crop Sci.* 19: 368-372 (2011)

Li Y, Goto T, Ikutani R, Lin S, Takahashi N, Takahashi H, Jheng HF, Yu R, Taniguchi, Baba K, Murakami S, Kawada T. Xanthoangelol and 4-Hydroxyderricin Suppress Obesity-Induced Inflammatory Responses. *Obesity.* 24: 2351-2360 (2016)

Maximov OB, Kulesh NI, Stepanenko LS, Dmitrenok PS. New prenylated isoflavanones and other constituents of *Lespedeza bicolor*. *Fitoterapia.* 75: 96-98. (2004)

Ryu IS, Lee SJ, Lee SW, Mun YJ, Woo WH, Kim YM, Lee JC, Lim KS. Dermal Bioactive Properties of the Ethanol Extract from Flowers of *Lespedeza bicolor*. *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* 20: 1-9 (2007)

Samiullah, Bano A, Girmay S, Tan G. Total Phenolic Content, Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of *Lespedeza bicolor* Turcz (Papilionaceae). *The International Society for Applied Life Sciences (ISALS).* 10-12 (2012)

Sun W, Meng X, Lianq L, Jiang W, Huang Y, He J, Hu H, Almqvist J, Gao X, Wnag L. Molecular and Biochemical Analysis of Chalcone Synthase from *Freesia hybrid* in Flavonoid Biosynthetic Pathway. *PLoS One* 10(3): e0119054 (2015)

Sumiyoshi M, Taniguchib M, Babab K, Kimura Y. Antitumor and antimetastatic actions of xanthoangelol and 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots through the inhibited activation and differentiation of M2 macrophage. *Phytomedicine* 22: 759-767 (2015)

Tabata K, Motani N, Takayanagi N, Nishimura R, Asami S, Kimura Y, Ukiya M, Hasegawa D, Akihisa T, Suzuk T. Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces Apoptosis in Neuroblastoma and Leukemia Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28:1404-0407 (2005)

Ullah S. Methanolic extract from *Lespedeza bicolor*: potential candidates for natural antioxidant and anticancer agent, *J. Tradit. Chin. Med.* 37: 444-451 (2017)

Woo HS, Kim DW, Curis-Long MJ, Lee BW, Lee JH, Kim JY, Kang JE, Park KH. Potent inhibition of bacterial neuraminidase activity by pterocarpan isolated from the roots of *Lespedeza bicolor*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21: 6100-6103 (2011)