

HPLC 를 이용한 가는장구채 추출물의 Isoscoparin 분석법 개발

권진관*·서찬곤*·정연우*·최용문*·신현탁**·정수영**·최정준***·김진규*†

*(재)경기도경제과학진흥원

**국립수목원

***대전대학교 한의예학과, 교수

(2020년 12월 18일 접수, 2021년 3월 10일 수정, 2021년 3월 12일 채택)

Analytical Method Development of Isoscoparin in *Silene seoulensis* Extract Using HPLC

Jin Gwan Kwon*, Changon Seo*, Yeon Woo Jung*, Yongmun Choi*,
Hyun Tak Shin**, Su Young Jung**, Jeong June Choi***, and Jin Kyu Kim*†

*Gyeonggido Business and Science Accelerator, Gyeonggi-do, Suwon, Yeongtong-gu, Gwanggyo-ro 147, 16229, Korea

**DMZ Botanic Garden, Korea National Arboretum

***College of Korean Medicine, Daejeon University

(Received December 18, 2020; Revised March 10, 2021; Accepted March 12, 2021)

요약: 본 연구는 가는장구채(*Silene seoulensis*) 추출물을 기능성 화장품소재로 개발하기 위해 isoscoparin을 지표 성분으로 선정하고, 품질관리를 위해 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석법을 개발하였다. 분석용 칼럼은 Unison US-C₁₈을, 이동상은 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA)와 메탄올을 사용하여 컬럼 온도는 35 °C 에서 유속 1.0 mL/min 로 검출파장은 330 nm에서 검출하였다. International conference on harmonization (ICH) 가이드라인(version 4, 2005)을 근거로 하여 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계를 분석하여 분석방법을 검증하였다. 분석결과, 검출한계 및 정량한계는 0.02 및 0.07 mg/mL로 나타났으며, 검량곡선은 상관계수 값이 0.99988로 양호한 직선성을 보였고 정밀성 분석결과도 0.46% 이하로 확인되었다. 또한, 회수율은 99.10 ~ 101.61% 범위로 정확성이 있음을 확인하였다. 따라서, 본 분석법은 가는장구채 추출물 지표성분의 분석법으로 적합한 시험법임이 검증되었다.

Abstract: In this study, isoscoparin was selected as an indicator component to develop *Silene seoulensis* extract as a functional cosmetic material, and we developed an analysis method using high performance liquid chromatography (HPLC) for quality control. HPLC was performed on a Unison US-C₁₈ with a gradient elution of 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and methanol at a flow rate of 1.0 mL/min at 35 °C, and the detection wavelength was 330 nm. The HPLC method was performed in accordance with the international conference on harmonization (ICH) guideline (version 4, 2005) of analytical procedures with respect to specificity, precision, accuracy, and linearity. The limits of detection and quantitation were 0.02 and 0.07 mg/mL respectively. Calibration curves showed good linearity ($R^2 > 0.99988$), and the precision of analysis was satisfied (less than 0.46%). In addition, the recovery rate was in the range of 99.10 to 101.61%, it was shown to be accurate. This result indicated that the established HPLC method is very useful for the determination of marker compounds in *Silene seoulensis* extracts.

Keywords: *silene seoulensis*, isoscoparin, functional cosmetic, HPLC, validation

1. 서 론

화장품을 포함한 뷰티산업의 호황 속에 새로운 기술개발을 통한 화장품 출시가 활성화 되고 있는 반면에 기존 출시된 화학물질 소재의 화장품에 대한 부작용으로 안구 건조증, 피부트러블, 소화 장애, 호흡기 장애 심지어 호르몬의 교란 등 수 많은 문제점들이 노출되고 있는 실정이다 [1,2]. 특히, 환경오염에 따른 피부질환 등의 문제가 최근에 지속적으로 대두되면서 인체에 무해한 친환경화장품에 대한 수요가 크게 증가하고 있다. 영국의 경우 대부분의 소비자들 이 친환경 성분의 화장품을 선호하고 있으며 이러한 트렌드는 전 유럽을 거쳐 나타나고 있는 상황이다[3]. 따라서 국내 화장품 시장도 천연소재를 활용한 기능성 화장품이 주목 받고 있으며 기능성의 범위가 미백, 주름개선, 자외선 차단, 탈모, 여드름 완화 및 아토피성 피부의 보습 등으로 세분화되고 확대되었다.

이에 화장품 소재에 대한 안전성 규제 강화, 동물실험 금지 등 연구 환경의 변화로 인해 합성 화장품 소재에서 생물학적 활성을 갖는 천연물 기반 소재에 대한 연구 사례가 증가하고 있다[4].

장구채는 한방과 민간에서 전초와 종자를 지혈, 소담, 어혈, 고지혈증 개선 등에 사용하였으나 가는장구채의 효능에 대한 보고는 알려진 바가 없다[5].

가는장구채(*Silene seoulensis*, *S. seoulensis*)는 석죽과(Caryophyllaceae) 끈끈이장구채속(*Silene*)의 한국특산식물로 습하고 그늘진 곳에 흩어져 자라는 한해살이 초본류로 뿌리는 줄기가 땅에 닿는 마디에서 자란다. 국내에 자생하고 있는 장구채속 식물들에 비해서 잎은 난형이며 잎자루가 있고, 줄기 밑부분이 누워서 자라는 특징을 갖고 있다[6,7].

국내 천연자원의 화장품 원료 이용에 대한 연구를 수행하던 중 한국특산식물인 가는장구채의 피부재생 효과를 확인하고 2차대사산물에 대한 연구를 진행하여 플라보노이드, 지방산, 페놀성 화합물 및 알칼로이드 성분들을 분리하여 성분을 보고 한 바 있다[8].

본 연구진은 국내 자생식물에 대한 화장품 원료로 사용 가능한 소재를 발굴하기 위한 효능에 대한 스크리닝을 수행 하던 중 가는장구채가 다양한 기능성을 가진 화장품 원료로 가치가 높다고 판단하였으며, 특히 피부재생에 효과가 높음을 확인하였다. 따라서 본 연구진은 가는장구채의 화장품 원료로 개발할 목적으로 이 식물의 지표성분으로

isoscoparin을 선정하였으며, 추출수율 및 효능이 높았던 50% 에탄올 추출물에 함유되어 있는 함량을 분석하기 위해 HPLC를 이용하여 분석법을 개발하였고, 그 방법을 검증하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 가는장구채는 강원도 양구지역(Korea)에서 채취한 후, 음건한 시료를 국립 DMZ 자생식물원으로부터 제공받았다. 건조된 시료를 분쇄하여 50% 에탄올(Samchun Pure Chemical, Korea)을 이용하여 상온에서 24 h 동안 침지하여 2 회 추출하였다. 추출물은 여과 및 감압 농축한 후 동결 건조하여 분말(수율: 13.7%)로 제조한 것을 사용하였다. 추출물은 50% 메탄올(Burdick & Jackson, Korea)에 녹여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다.

2.2. 표준용액 조제

HPLC 분석에 사용한 표준품 isoscoparin (98.0%)는 Wuhan ChemFaces Biochemical (China)에서 구입하여 사용하였다(Figure 1). 표준용액은 isoscoparin 6.0 mg을 50% 메탄올에 녹여 50 mL의 표준원액을 조제하였다. 이를 50% 메탄올에 희석한 표준용액을 이용하여 isoscoparin 함량을 구하였다.

2.3. HPLC 분석

HPLC 1100 (Agilent Technologies, USA) 시스템을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Unison US-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μ m, USA)을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 isoscoparin 성분이 분리되도록 흘려주었으며 검출파장은 330 nm에서 검출하였다.

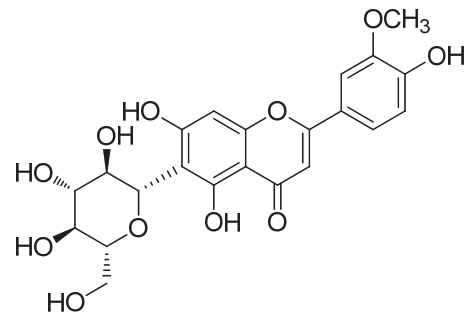


Figure 1. Chemical structure of isoscoparin.

Table 1. HPLC Conditions for The Quantitative Analysis of Isoscoparin

Items	Conditions		
Instrument	HPLC 1100 series (Agilent Technologies)		
	A: Water (0.05% TFA)		
	B: Methanol		
	Time (min)	% A	% B
Mobile phase	0	70	30
	70	70	30
	71	0	100
	85	0	100
	post time: 10 min		
Column	Unision US-C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm)		
Column temperature	35 °C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 μL		
Detection	UV 330 nm		

2.4. 분석법 검증(Method Validation)

기능성 화장품 원료로 등록하기 위한 지표성분으로서 ICH 가이드라인을 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.

2.4.1. 특이성(Specificity)

불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼합 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말하는 것으로 확립된 분석법을 통하여 분리된 각각의 피크가 추출물 내의 다른 화합물과 분리가 되었는지 피크를 검토하여 확인하였으며 photo diode array (PDA) spectrum을 측정하여 동일한 spectrum을 나타내는 지도 확인하였다.

2.4.2. 직선성(Linearity)

분석대상물질의 농도에 대해 직선적인 측정값을 얻을 수 있는 능력을 말하는 것으로 가는장구채 추출물을 0.96, 1.68, 2.4, 3.12, 3.84 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 3 회 반복 측정하였고 또한 표준품로 직선성을 확인하기 위해 isoscoparin을 2.4, 6.0, 12, 18, 24 μg/mL의 농도로 측정하였으며 피크면적과 시료 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R²)값을 이용하여 직선성을 확인하였다.

2.4.3. 정밀성(Precision)

정밀성이란 균질한 검체를 여러 번 채취하여 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 의미하는 것으로 본 연구에서는 동일 실험자가 동일한 장치와 기구, 시료, 및 조작 조건하에서 균일한 검체로부터 얻은 복수의 검체를 반복 분석 실험하는 반복성과 동일 실험실내에서 다른 실험일자을 이용하여 얻은 측정값을 분석하는 실험실내 정밀성을 분석하였다. 일내분석(intra-day)는 1 일 3 구간 진행하였고 일간분석(inter-day)는 1 일 1 구간으로 3 일간으로 나누어 진행하여 변이성을 측정하였다.

2.4.4. 정확성(Accuracy)

시료를 3 가지 농도(1.2, 2.4, 3.6 mg/mL)로 조제하고 동일한 분석조건으로 6 회 반복 주입하여 얻은 결과를 회수율(recovery)로 나타내어 정확성을 확인하였다.

2.4.5. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

시료의 직선성 시험용액 3 개의 그룹에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다.

$$\cdot \text{정량한계 (LOQ)} =$$

$$10 \times y \text{ 절편의 표준편차/검량선 기울기의 평균값}$$

$$\cdot \text{검출한계 (LOD)} =$$

$$3.3 \times y \text{ 절편의 표준편차/검량선 기울기의 평균값}$$

2.5. 피부재생활성화 평가(Wound Healing Assay)

사람의 각질형성세포인 HaCaT 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 분양 받았으며, 100 units/mL penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (WLGENE, Korea) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. HaCaT 세포를 5 × 10⁵ cells/mL로 24 well에 500 μL 씩 분주하고 24 h 배양하였다. 이후 배지를 FBS를 포함하지 않는 배지로 교체한 후 각 well에 200 μL tip을 이용하여 스크래치를 내고 시료를 농도별로 처리하였다. 양성 대조군으로는 ascorbic acid (50 μg/mL, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다. 시료를 농도별로 처리하고 48 h 동안 CO₂ 배양기에 배양하였다. 시료처리 후 0 h과 48 h에 현미경을 이용하여 세포 사진을 찍고 Image J 프로그램을 이용

하여 0 h 대비 48 h에 wound healing 된 면적을 계산하여 closure rate (%)를 구하였다.

2.6. 통계처리

결과값은 mean ± SD로 나타내었다. 결과값에 대한 통계 처리는 GraphPad Prism 4 software (Version 4.03, GraphPad software Inc., USA)를 사용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하고 Post hoc Tukey test로 검증하였다. p < 0.05 일 때 통계적으로 유의적인 차이가 있다고 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 특이성 검증

불순물, 분해물, 배합성분 등의 공존하는 상태에서 다른 성분의 영향을 받지 않고 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 표준용액과 가는장구채 추출물의 HPLC 크로마토그램을 비교하여 피크가 분리됨을 확인한 결과, 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며 표준용액의 피크 유지시간(retention time, RT)과 추출물의 피크 RT가 일치하였다. 또한 blank에서는 표준용액과 겹치는

피크가 없었으며 가는장구채 추출물에 표준용액을 스파이킹하여 시험한 결과 회수율은 100.54%로서 양호한 결과를 얻었다(Figure 2). 또한 표준용액과 가는장구채 추출물의 PDA spectrum 측정에서도 동일한 spectrum을 확인하였다(Figure 3). 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 특이

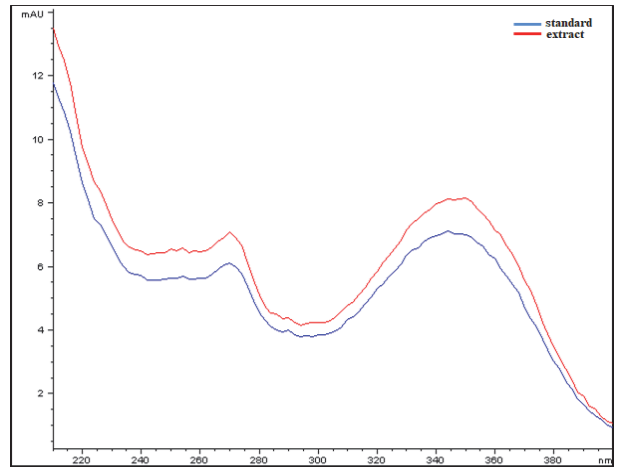


Figure 3. PDA (Photo diode array) spectrum of isoscoparin. (standard solution and *S. seoulensis* extract)

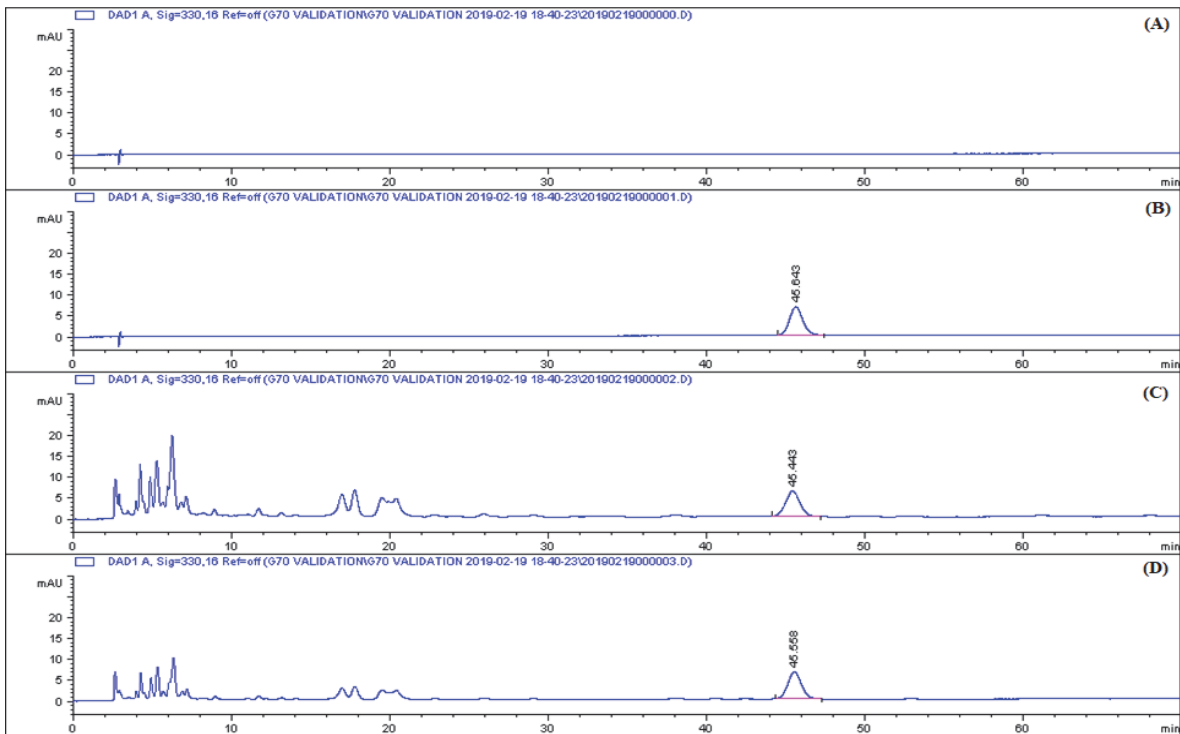


Figure 2. HPLC chromatograms of isoscoparin. (A) blank (50% MeOH), (B) standard solution of isoscoparin, (C) *S. seoulensis* extract, and (D) recovery test.

성이 있음을 확인 할 수 있다.

3.2. 직선성 확인

실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 크로마토그램에 대한 면적과 가는장구채 추출물의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2)값을 이용하여 직선성을 확인하였다. 가는장구채 추출물을 0.96, 1.68, 2.4, 3.12, 3.84 mg/mL의 농도로 각각 조제하여 HPLC로 분석한 값으로 검량선을 작성하였다(Figure 4). 또한 표준품 isoscoparin을 2.4, 6.0, 12, 18, 24 μ g/mL의 농도로 조제하여 분석한 값을 이용하여 각각의 검량선을 작성하였다(Figure 5). 가는장구채 추출물에서 isoscoparin의 상관계수(R^2) 값은 0.99988로 양호한 직선성을 나타내었고, isoscoparin 표준품의 상관계수(R^2) 값은 각각 0.99993로 양호한 직선성을 나타내었다.

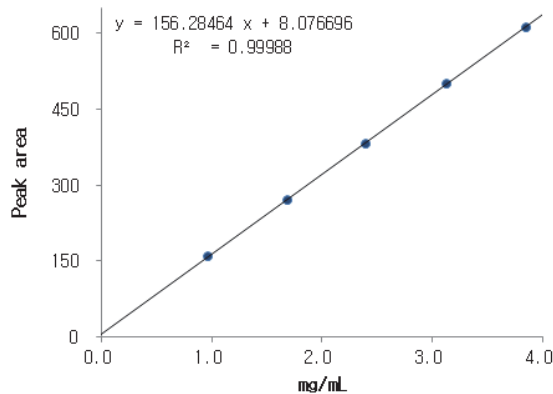


Figure 4. Calibration curves of isoscoparin in *S. seoulensis* extract.

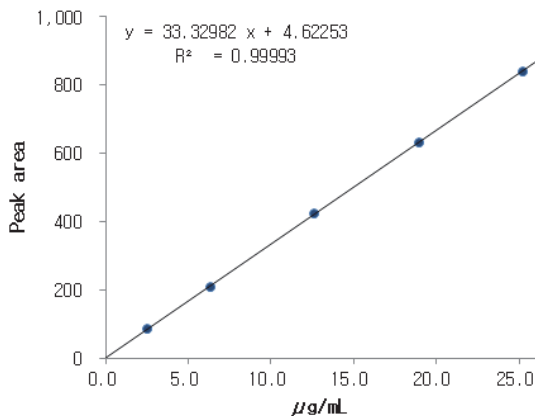


Figure 5. Calibration curves of isoscoparin by standard solution.

3.3. 정밀성 확인

3.3.1. 반복성(Repeatability)

균질한 검체로부터 다수의 시료를 취해 반복적으로 시험을 실시할 때 각 시험결과와 일치정도를 나타내는 것으로 가는장구채 추출물 1.2, 2.4 및 3.6 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6 회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분별 3 가지 농도의 피크의 RT 및 피크면적의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 0.09 ~ 0.46%로 나타나 RSD 2% 이하로서 반복성이 있음을 확인하였다(Table 2).

3.3.2. 실험실내 정밀성(Intermediate Precision)

동일 실험실내에서 다른 실험일을 이용하여 얻은 측정값들 사이의 근접성을 나타내는 것으로 3 가지 농도의 intra-day, inter-day의 정밀도를 측정된 결과는 Table 3과 같으며 intra-day에서의 정밀도는 0.29 ~ 0.40%를 나타내었고, inter-day에서는 0.08 ~ 0.18%의 정밀도를 나타내었다.

Table 2. Repeatability of Isoscoparin Analysis

Parameters	Precision		
	Mean \pm SD	RSD ¹⁾ (%)	
Concentration (1.2 mg/mL)	RT (min)	45.358 \pm 0.04	0.09
	Area	198.139 \pm 0.68	0.34
Concentration (2.4 mg/mL)	RT (min)	45.347 \pm 0.21	0.46
	Area	381.985 \pm 1.49	0.39
Concentration (3.6 mg/mL)	RT (min)	45.548 \pm 0.10	0.21
	Area	567.810 \pm 1.60	0.28

¹⁾ Relative standard deviation

Table 3. Precision of Isoscoparin in *S. seoulensis* Extract for Validation

Concentration (mg/mL)	Precision		
	Mean \pm SD	RSD ¹⁾ (%)	
Intra-day	1.2	60.81 \pm 0.22	0.36
	2.4	119.62 \pm 0.48	0.40
	3.6	179.08 \pm 0.51	0.29
Inter-day	1.2	60.72 \pm 0.11	0.18
	2.4	120.12 \pm 0.19	0.15
	3.6	179.13 \pm 0.14	0.08

¹⁾ Relative standard deviation

3.4. 회수율을 이용한 정확성 확인

측정값을 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 나타내는 정확성을 검증하기 위해 가는장구채 추출물을 가지고 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6 회 반복 주입하고 시험하여 회수율은 98.0 ~ 102.0%, RSD는 모두 2.0% 이하로서 정확성을 확인하게 된다.

가는장구채 추출물을 1.2, 2.4 및 3.6 mg/mL의 세 농도로 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6 회 반복 주입하고 시험하여 얻은 결과 각 성분 3 가지 농도의 회수율은 99.10 ~ 101.61%였으며 RSD는 0.29 ~ 0.40%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다(Table 4).

3.5. 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. 가는장구채 추출물의 직선성 시험용액 3 개의 그룹에 대한 각각의 검량선을 작성하여

Table 4. Accuracy of HPLC Analysis for Isoscoparin

Concentration (mg/mL)	Recovery (%)	
	Mean \pm SD	RSD ¹⁾ (%)
1.2	101.01 \pm 0.36	0.36
2.4	99.77 \pm 0.40	0.40
3.6	99.54 \pm 0.28	0.29

¹⁾ Relative standard deviation

검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 각각의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 반응의 표준편차와 검정곡선의 기울기에 근거하는 방법 (standard deviation of the response and the slope)으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다(Table 5). 직선상의 검출한계 (LOD)는 0.02 mg/mL이었으며 정량한계(LOQ)는 0.07 mg/mL로 나타났다.

3.6. 피부재생 활성화 평가

가는장구채의 피부에 대한 생리활성을 측정하기 위하여 사람의 각질형성세포인 HaCaT세포주를 세포배양접시에 분주한 뒤 스크래치를 내고 가는장구채 추출물을 48 h 동안 처리하여 스크래치된 영역을 회복하는 피부재생 효능을 평가하였다. 그 결과 대조군의 closure rate는 64.8 \pm 1.2%인 반면 가는장구채 추출물을 5 μ g/mL 처리한 세포는 79.6 \pm 6.9%, 10 μ g/mL 처리한 세포는 90.4 \pm 7.3%의 closure rate를 나타내었다(Figure 6). 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid를 50 μ g/mL 처리한 실험군은 74.7 \pm 2.3%의 closure rate를 나타내었다. 따라서 가는장구채는 피부재생에 효능이 있음을 확인하였다.

Table 5. Limit of Detection and Limit of Quantitation of Isoscoparin

Instrument	Limit of detection (mg/mL)	Limit of quantitation (mg/mL)
HPLC 1100 series (Agilent Technologies)	0.02	0.07

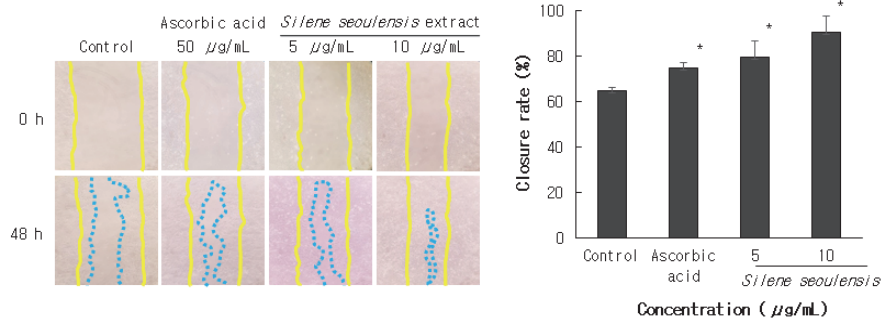


Figure 6. The effects of extract from *S. seoulensis* on wound healing in HaCat cell line. HaCat cells cultured in 24 well were treated with extract from *S. seoulensis* as indicated concentrations for 48 h. The cells were observed with microscope with bright field and the closed area was measured by a software, Image J. The closure rate was calculated by comparing with 0 h and 48 h from 3 independent experiments. The data are expressed as mean \pm SD. * p < 0.05 vs. Control. Yellow line; the border line of empty area by scratch at time 0 h, blue line; the border line of empty area at 48 h after scratch.

4. 결 론

본 연구는 HPLC를 이용하여 가는장구채 추출물을 기능성 화장품 원료로 개발하기 위하여 지표성분인 isoscoparin의 분석법 설정과 분석법에 대한 검증을 실시하고자 하였다. 표준용액과 가는장구채 추출물은 다른 물질의 간섭 없이 분리되었으며, 표준용액과 추출물의 피크 유지시간이 일치한 spectrum을 나타내었다. 또한 blank에서 표준용액과 겹치는 피크가 없는 것으로 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수(R^2)는 0.99988로 양호한 직선성을 보였으며, 표준품을 이용한 검량선 상관계수(R^2) 또한 0.99993의 직선성을 확인하였다. 직선상의 검출한계(LOD)는 0.02 mg/mL이었으며 정량한계(LOQ)는 0.07 mg/mL로 나타났다. 가는장구채 추출물을 1.2, 2.4 및 3.6 mg/mL의 세 농도의 회수율은 99.10 ~ 101.61%였으며 RSD는 0.29 ~ 0.40%로 나타나 RSD 2.0% 이하로서 정확성이 있음을 알 수 있었다. 정밀성은 0.09 ~ 0.46%의 정밀도(RSD)를, intra-day에서의 정밀도(RSD)는 0.29 ~ 0.40%, inter-day에서는 0.08 ~ 0.18%의 정밀도를 나타내어 가는장구채 추출물의 지표성분 isoscoparin의 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다. 본 분석법은 가는장구채 추출물의 기능성 화장품 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. J. S. Park, Application of pine needle extract as cosmetic material, *Journal of Digital Convergence*, **17**(7), 395 (2019).
2. J. Y. Kim, S. H. Han, I. S. Chang, and H. H. Kang, High functional cosmetics industry and nanotechnology recent research, *Food Science and Industry*, **35**(4), 25 (2002).
3. H. Y. Paek, A Study on how to activate eco-friendly cosmetics in the Korean cosmetics market, *J. Korean Soc. Cosmet. Cosmetol.*, **10**(1), 123 (2020).
4. H. S. Hwang, Prospects for development of cosmetic industry using natural products in Chungbuk, *International Symposium on Natural Resources Industry & 2018 International Conference of Korean J. Plant Res.* Jecheon-si, **26** (2018).
5. M. H. Lee, H. S. Han, and Y. J. Lee, Comparative studies on the hyperlipidemia of melandrii herba and vaccariae semen, *Kor. J. Herbology*, **25**(3), 81 (2010).
6. G. J. Bak, Ph. D. Dissertation, Daegu Haany Univ., Daegu, Korea (2012).
7. D. K. Chung, T. H. Kim, and Y. R. Lee, The chemical screening of Caryophyllaceae plants, *Kor. J. Pharmacogn.*, **9**(2), 83 (1978).
8. C. G. Seo, H. S. Shin, J. E. Lee, Y. W. Jung, J. K. Kim, J. G. Kwon, W. S. Jeong, C. W. Choi, J. S. Oh, and S. S. Hong, Isolation and structure elucidation of siliendines A-D, new β -carboline alkaloids from *Silene seoulensis*, *Phytochemistry Letters*, **36**, 58 (2020).