생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
47(3) : 246 ~ 250 (2016)

적송제제(PineXol®)로 부터 Taxifolin과 (+)-Catechin, Procyanidin B1의 함량분석

황윤정[1] · Yin Jun[1] · Le Thi Tam[1] · 윤성혜[1] · 안혜신[1] · 권석형[2] · 민복기[2] · 윤성호[2] · 안영은[2] · 이민원[1]*
[1]중앙대학교 약학대학, [2]노바렉스

Quantitative Analysis of Taxifolin, (+)-Catechin and Procyanidin B1 from the Preparation of *Pinus densiflora* (PineXol®)

Yoon Jeong Hwang[1], Jun Yin[1], Le Thi Tam[1], Sung Hye Youn[1], Hye Shin Ahn[1], Suk Hyung Kwon[2], Bok Kee Min[2], Seong Ho Yun[2], Yeoung Eun An[2], and Min Won Lee[1]*
[1]Laboratory of Pharmacognosy and Natural Product Derived Medicine, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
[2]Novarex, 94, Gangni 1-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 363-885, Korea

Abstract – *Pinus densiflora* contained diverse phenol compounds like flavonoid, phenylpropanoid and tannin. PineXol® is nutraceutical preparation which was treated from bark of *Pinus densiflora*. Validation and contents determination of taxifolin, (+)-catechin and procyanidion B1 for the preparation of *Pinus densiflora* (PineXol®) were confirmed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). As a result, content of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1 were, respectively 4.90%, 2.35% and 8.19%. These analysis method and results could be used as important basic data for the preparation of *Pinus densiflora*.

Key words – *Pinus densiflora* (PineXol®), Taxifolin; (+)–Catechin, Pprocyanidin B1, HPLC, Validation, Content

소나무(*Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini, 赤松)는 소나무과(Pinaceae)에 속하는 상록침엽 교목으로, 줄기는 높이 35m, 지름 1.8m 정도이며 수피는 붉은빛을 띤 갈색이나 밑부분은 검은 갈색이다. 소나무의 근연식물로는 백송(*Pinus dungeana*), 금송(*Pinus densiflora* for. *aurescens*), 잣나무(*Pinus koraiensis*) 및 해송(*Pinus thunbergii*) 등이 있으며 북아프리카, 서인도, 및 말레이시아 이북, 북반구 지방에 250여종이 분포하며 우리나라에 약 25종이 분포한다.[1-2)]

소나무 수피는 새살을 돋고 지혈시키며 어혈을 풀어준다 하여 한방 및 민간에서는 관절염, 타박상, 화상에 응용되었으며,[3-6)] flavonoid인 (+)-catechin, taxifolin을 비롯한 condensed tannin인 procyanidins 등이 함유되어 있다.[7-10)]

프랑스 해송 수피 추출물인 피크노제놀(pycnogenol®)은 약 85%가 procyanidins으로 이루어져 있으며 그 밖에 gallic acids, caffeic acids, ferulic acids 등과 같은 다양한 페놀산이 포함되어 있고,[11)] 항산화, 항염, 항비만, 상처 치유 효과뿐만 아니라 혈관 이완 등 심혈관계 효과가 보고되었다.[12-18)] 국내에서도 적송 껍질을 가공한 기능성 소재(파인엑솔, PineXol®)를 개발하였으며 본 연구에서는 파인엑솔에 함유되어 있는 taxifolin과 (+)catechin, procyanidin B1에 대한 밸리데이션과 함량평가를 시행하였다.

*교신저자(E-mail) : mwlee@cau.ac.kr
(Tel) : +82-2-820-5602

재료 및 방법

시약 및 기기 – High–Performance Liquid Chromatography (HPLC) 기기는 Waters 600E Multisolvent Delivery System (Waters, America)을 사용하였다. 컬럼은 Kromasil 100-5-C18 column(5 μm, 250×4.6 mm) (AkzoNobel, Bohus, Sweden)을 사용하였다. 분석에 사용된 용매는 Whatman® Membrane filters(0.45 μm, diam. 47 mm)를 이용하여 여과된 용매를 사용하였다. 지표물질 분리에 사용된 역상 컬럼은 고정상으로 Sephadex LH-20(10-25 μm, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden), MCI-gel CHP 20P (75-150 μm, Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan) 및 ODS-B gel(40-60 μm, Daiso, Osaka, Japan)이었다. TLC는 pre-coated

silica gel 60 F254 plate(Merck, Darmastadt, Germany)를 사용하였다.

재료 – 본 실험에 사용된 파인엑솔(적송 수피 추출물)은 NutraPharm(주)으로부터 공급 받아 사용하였다.

지표성분 분리 및 정제 – 파인엑솔(130 g)을 물에 현탁해 celite로 여과한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 H2O/MeOH(gradient)로 용출시켜 세부 분획으로 나누고 fraction 14를 MCI-gel CHP20P(0% MeOH→100% MeOH, gradient)를 통하여 taxifolin(2.9 g)을 분리하였으며 ODS-B gel(0% MeOH→100% MeOH, gradient)을 통하여 (+)-catechin(72 mg)을 분리하였다.

표준용액의 조제 – 파인엑솔로부터 분리, 정제한 taxifolin과 (+)catechin 및 procyanidin B1을 각각 1 mg씩 정확히 취해 혼합한 후 MeOH를 3 mL 가하여 stock solution(1000 μg/mL)을 조제했다. 이 stock solution을 희석하여 1000, 500, 250, 125 μg/mL 농도의 표준용액을 조제하였다.

검액의 조제 – 파인엑솔 5 mg을 50% methanol 1 mL에 녹여서 HPLC 검액으로 사용하였다.

HPLC 조건 – 표준품인 taxifolin과 (+)-catechin, procyanidin B1의 분석조건을 Table I과 같이 설정한 다음, 이 분석조건에 따라 각각의 시료의 validation과 정량분석 실시하였다.

분석 방법의 검증(Validation) – HPLC 분석방법의 정확성 및 재현성을 검증하기 위하여 KFDA(식품의약품안전처)의 「의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인」에 따라서 특이성, 직선성, 정량한계, 정확성 및 정밀성 평가를 시행하였다.

특이성(Specificity) – 지표성분이 파인엑솔 내의 다른 물질과 분리가 되는지 UV detector를 이용하여 피크의 retention time(RT)을 검토하여 확인하였다.

검량선, 직선성(Linearity) – 직선성 평가를 위한 검량선을 얻기 위해 taxifolin과 (+)-catechin, procyanidin B1을 혼합한 표준용액을 methanol로 희석하여 4개의 농도(1000, 500, 250, 125 μg/mL)가 되도록 용액을 만들어 실험 실시하였다. Linear regression equation(y=ax+b y: peak 면적, x: 시료 농도 a: 직선의 기울기, b: y절편)을 구하였으며 R^2의 값을 통하여 직선성을 확인하였다. R^2의 값이 0.99이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

Table I. HPLC condition of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1

HPLC condition			
Column	Kromasil 100-5-C18		
Flow rate	1 ml/min		
UV length	280 nm		
Injection volume	10 μl		
Mobile solvent	A: 0.2% Acetic acid; B: Acetonitrile		
Mobile Phase	Time(min)	A	B
	0	90	10
	40	70	30
	42	0	100
	52	0	100

정량한계(LOQ) – 분석물질의 정량이 가능한 최저농도를 확인하기 위하여 정량한계(LOQ)를 측정하였다. 정량한계(LOQ)는 QL=10×σ/S(σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)를 통하여 계산하였다. 기울기 S는 분석물질의 검량선으로부터 구하여 회귀직선에서 y절편의 표준편차를 표준편차 σ로서 이용하였다.

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) – 동일 시료에 대하여 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 확인하기 위하여 정밀성 및 정확성 평가를 하였다. Taxifolin과 (+)-catechin, procyanidin B1의 혼합 표준용액을 4개 농도(1000, 500, 250, 125 μg/mL)의 범위에서, 각 시료 농도당 3일간 반복성 시험, 일내 3회 반복 반복성 시험을 하였다. 정확성은 표준값과 측정값 간의 일치되는 정도로 확인하였으며, 정밀성은 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 측정값들 사이의 근접성으로 측정하였다.

함량분석(Content) – Validation 과정을 통하여 확립한 HPLC 분석법으로 파인엑솔 내의 지표성분의 정량에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 등을 갖고 있음을 확인하고, 검증된 분석법으로 파인엑솔의 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

지표물질 분리 – Column chromatography이용하여 지표물질을 분리하였으며 ^{1}H 300 MHz 및 ^{13}C 150 MHz핵자기 공명 분광기를 이용하여 taxifolin과 (+)-catechin의 구조를 동정하였다.[19,20] Procyanidin B1은 중앙대학교 약학대학 생약학/천연물 의약품 연구실에 보유하고 있는 표준 화합물을 이용하였다.[19]

분석조건 확립 – 지표성분인 taxifolin과 (+)-catechin, procyanidin B1의 분석법을 확립하기 위한 최적의 분석법이 확립되었다. 이동상 용매로 A: 0.2% acetic acid, B: acetonitrile를 선정하여 각각 gradient elution을 적용함으로써 검체의 피크를 이상적으로 분리할 수 있었다. Taxifolin은 31.29분, (+)-catechin은 14.70분, procyanidin B1은 8.83분에 검출되었다. 두 지표성분의 UV 흡수 파장은 280 nm로 설정하여 피크의 면적을 측정하였다.

특이성(Specificity) – HPLC를 이용해 파인엑솔의 chromatography를 비교하여 taxifolin, (+)-catechin의 retention

time을 확인한 결과, 다른 물질과 간섭 없이 성분의 peak를 확인하였다. 표준용액의 RT는 taxifolin 31.29분, (+)-catechin 14.70분, procyanidin B1은 8.83분으로 확인되었으며, 파인엑솔 내의 taxifolin과 (+)-catechin, procyanidin B1의 RT는 각각 31.23분, 14.59분, 8.67분으로 표준용액의 피크 유지시간과 파인엑솔의 피크 유지시간이 거의 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증하였다(Fig. 1).

검량선, 직선성(Linearity) – Taxifolin의 HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은 Y= 5818.6X+21982이며(Fig. 2), 검량선의 상관계수(R^2)는 1로

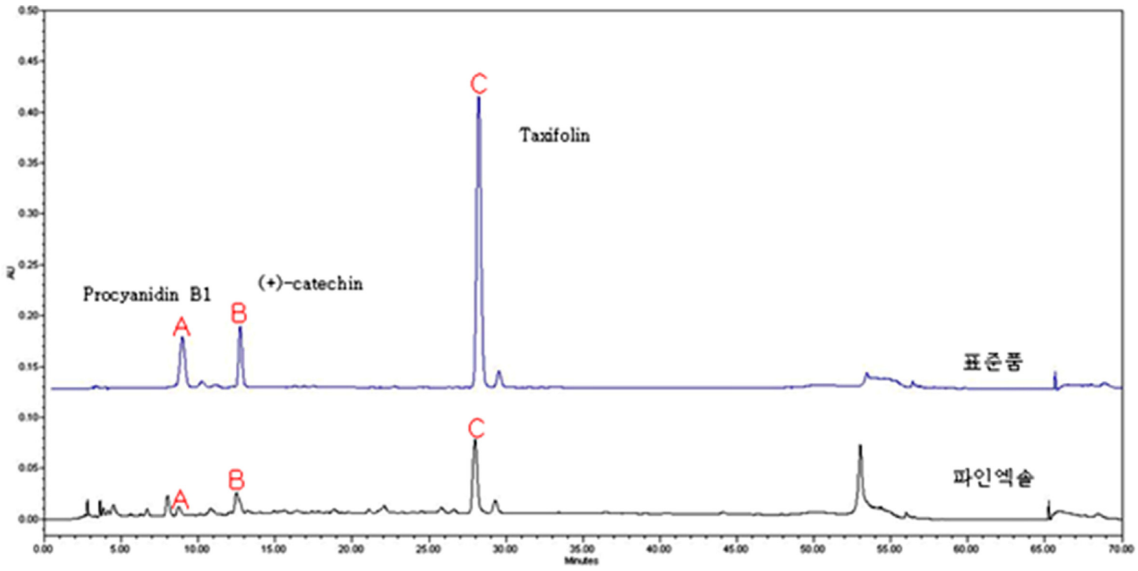

Fig. 1. Specificity of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1 in PineXol®.

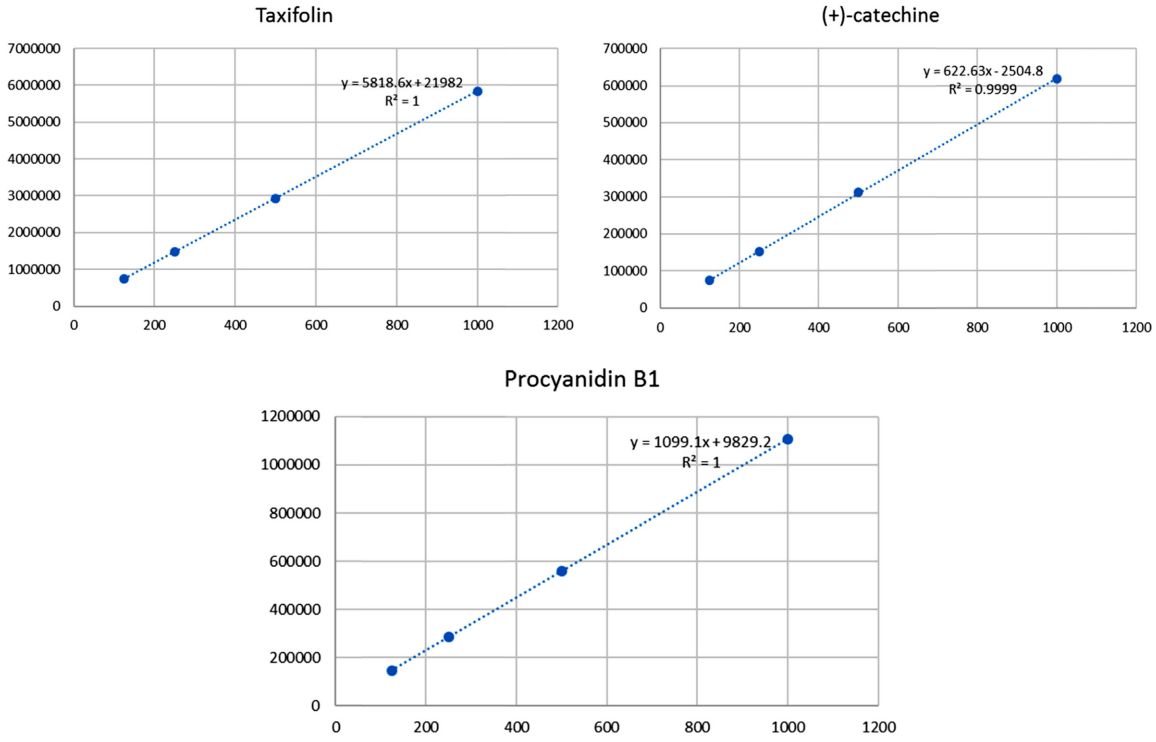

Fig. 2. Linearity of standards of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1 (*y: peak area, x: concentration, R: Correlation coefficient).

Table II. Linear ranges and LOQ of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1

Compounds	Linear range (μg/mL)	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient(R^2)	LOQ (μg/mL)
Taxifolin	125~1000	5818.6	21982	1	48.92
(+)-Catechin	125~1000	622.63	-2504.8	0.9999	0.43
Procyanidin B1	125~1000	1099.1	9829.2	1	62.14

Table III. Precision and accuracy of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1

Compounds	Conc. (μg/mL)	Accuracy (%)		Precision (c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Taxifolin	1000	99.97	99.99	0.36	0.15
	500	100.03	100.18	1.58	0.82
	250	99.68	99.00	1.21	0.68
	125	100.49	101.29	1.89	0.80
(+)-Catechin	1000	100.13	100.02	0.26	0.17
	500	99.44	100.05	1.32	0.90
	250	99.80	99.22	0.76	0.76
	125	101.62	101.21	1.89	1.22
Procyanidin B1	1000	100.03	100.01	0.12	0.09
	500	99.96	99.57	0.75	0.53
	250	99.54	100.33	1.08	0.96
	125	100.89	100.39	0.45	0.97

*Intra-day: three times per day, Inter-day: one time analysis of standards per day for three days, c.v.: Coefficient of variation.

높은 직선성을 보였다. (+)-Catechin을 HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은 Y= 622.63X–2504.8이며(Fig. 2), 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9999로 높은 직선성을 보였다. Procyanidin B1을 HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은 Y=1099.1X+9829.2이며(Fig. 2), 검량선의 상관계수(R^2)는 1로 높은 직선성을 보였다.

정량한계(LOQ) – 정량한계(LOQ)공식을 이용하여 정량한계를 구하였다. Taxifolin은 48.92 μg/mL, (+)-catechin은 0.43 μg/mL, procyanidin B1은 62.14 μg/mL으로 확인하였으며 소량인 성분도 정량이 가능함을 확인하였다(Table II).

정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision) – Taxifolin의 정확성은 99.00~101.29% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.15~1.89%로 양호한 값을 나타내었다(Table III). (+)-Catechin의 정확성은 99.44~101.62% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.26~1.89%로 양호한 값을 나타내었다(Table III). Procyanidin B1의 정확성은 99.54~100.89% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.09~1.08%로 양호한 값을 나타내었다(Table III).

Table IV. Contents of taxifolin, (+)-catechin and procyanidin B1 in PineXol®

	Taxifolin	(+)-catechin	Procyanidin B1
PineXol®	4.90%	8.19%	2.35%

함량분석(Content) – 확립된 분석법을 이용하여 지표물질의 함량을 측정한 결과 파인엑솔 내 taxifolin의 함량은 4.90%로 확인하였으며, (+)-catechin의 함량은 8.19%, Procyanidin B1의 함량은 2.35%로 확인하였다(Table IV).

결 론

NutraPharm(주)으로부터 공급받은 파인엑솔을 column chromatography 방법으로 분리, 정제하여 얻은 taxifolin과 (+)-catechin과 본 연구실에서 보유하고 있는 procyanidin B1 표준품을 지표성분으로 설정하여 분석법을 확립하였다.

특이성, 직선성, 정량한계, 정확성 및 정밀성을 통하여 충분히 유의성이 있음을 확인하였으며 이상의 분석법을 이용하여 지표물질에 대한 함량분석을 시행한 결과 파인엑솔에는 4.90%의 taxifolin, 8.19%의 (+)-catechin, 2.35%의 procyanidin B1이 함유되어 있음을 확인하였다. 본 연구의

결과로 확립된 분석법은 추후 적송제제의 함량분석에 있어서 중요한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(과제번호: 115015-3-1-SB010).

인용문헌

1. 정태현 (1965) 한국동식물 도감 식물편 (목·초본류), 1475, 문교부, 서울.
2. 이창복 (1979) 대한 식물 도감, 285, 향문사, 서울.
3. 강소신의학원 (1985) 중약 대사전 (제2권), 2383, 소학관, 서울.
4. 문화방송 (1987) 한국 민간요법대전, 31, 금박출판사, 서울.
5. 堀田滿 (1989) 世界有用植物事典 (植物編), 341, 平凡社, 일본.
6. 이경순 외 (1999) 중약대사전, 3219, 정담출판사, 서울.
7. Kim, H., Song, H. K. and Chung, D. K. (1991) Chemical analyses of coniferous flavonoids in Korea. The flavonoids of red pine bark (*Pinus densiflora*). *Mokchae Konghak* **19**: 73-79.
8. Sato, M., Islam, S. Q., Awata, S. and Yamasaki, T. (1999) Flavanonol glucoside and proanthocyanidins: oviposition stimulants for the cerambycid beetle. *Monochamus alternatus. J. Pesticide Sci.* **24**: 123-129.
9. Song, H. K. and Oh, S. J. (1996) Isolation and structure elucidation of proanthocyanidin in bark of *Pinus densiflora*. *Mokchae Konghak* **24**: 81-93.
10. Kwon, J. H., Kwon, Y. M., Choi, S. E., Park, K. H. and Lee, M. W. (2010) Anti oxidative activities of phenolic compounds from barks of *Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini. *Nat. Pro. Sci*. **16**: 10-14.
11. Liu, F. J., Zhang, Y. X. and Lau, B. H. S. (1998) Pycnogenol enhances immune and haemopoietic functions in senescence-accelerated mice. *Cell. Mol. Life Sci*. **54**: 1168-1172.
12. Maffei, F. R., Carini, M., Aldini, G., Calloni, M. T., Bombardelli, E. and Morazzoni, P. (1998) Sparing effect of procyanidins from *Vitis vinifera* on vitamin E: *In vitro* studies. *Planta Med.* **64**: 343-347.
13. Pietta, P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**: 1035-1042.
14. Blazso, G., Gabor, M. and Rohdewald, P. (1997) Antiinflammatoryactivities of procyanidin-containing extracts from *Pinus pinaster* Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie* **52**: 380-382.
15. Hasegawa, N. (2000) Inhibition of lipogenesis by pycnogenol. *Phytother. Res.* **14**: 472-473.
16. Blazsó, G., Gábor, M., Schönlau, F. and Rohdewald, P. (2004) Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother. Res.* **18**: 579-581.
17. Blazso, G., Hilbert, M. and Gabor, M. (1996) Double protective effect oftopically applied dimethidindene maleate against ultravio-let light. *Pharmazie* **51**: 516-517.
18. Fitzpatrick, D. F., Bing, B. and Rohdewald, P. (1998) Endothelium-dependent vascular effects of pycnogenol. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**: 509-515.
19. Kwon, Y. M. (2002), Phenolic compounds from barks of *Ulmus macrocarpa* and its antioxidative activities. *Kor. J. Pharmacogn*. **33**: 404-410.
20. Kim, J. E., Kim, S. S., Hyun, C. G. and Lee, N. H. (2012) Antioxidative chemical constituents from the stems of *Cleyera japonica* Thunberg. *International Journal of Pharmacology* **8**: 410-415.

(2016. 8. 24 접수; 2016. 9. 5 심사; 2016. 9. 7 게재확정)