

## 흰말채 나무에 함유된 Cornusiin B에 대한 Validation 및 함량 분석

박동희 · YIN JUN · 왕혜수 · 김 민 · 김민지 · 이은경 · 이민원\*

중앙대학교 약학대학

### Validation and Content Analysis of Cornusiin B Isolated from *Cornus alba*

Dong Hui Park, JUN YIN, Hye Soo Wang, Min Kim, Min Ji Kim,  
Eun kyeng Lee, and Min Won Lee\*

Laboratory of Pharmacognosy and Natural Product Derived Medicine, College of Pharmacy,  
Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea

**Abstract** – *Cornus alba* (CA) geographically distributes in Korea, Japan, Northeast China and Russia. The cornus species have been used traditionally as anti-inflammatory, hemostatic and diuretic in Korea. Previously, it was reported CA and its separated components have excellent antioxidant, anti-inflammatory and anti-prostate cancer efficacy. Present work, the validation and content determination was tried on the ellagitannin, cornusiin B which were isolated from the CA by using high-performance liquid chromatography (HPLC). As a result, the content of cornusiin B were 3.07% in ethanolic extract of CA.

**Keywords** – Validation, Content, *Cornus alba*, Cornusiin B, HPLC.

층층나무과 *Cornus* 속 식물 중 국내 자생식물인 흰말채 나무(*Cornus alba*, CA)는 우리나라 중부 이북지방의 산기슭 및 산골짜기에서 자라며, 세계적으로는 중국, 몽골, 시베리아, 그리고 유럽 등지에서 자생하며, 나무껍질과 잎에 소염, 지혈제 등으로 사용 된다.<sup>1)</sup> CA에는 cornusiin B 포함하여 cornusiin A, cornusiin H, camptothin B가 존재하며,<sup>2)</sup> 이들의 항산화, 항염 활성을 검토해본 결과 우수한 DPPH radical 소거능과 NO생성 억제능이 관찰되었다.<sup>2)</sup> 그 중에 ellagitannin인 cornusiin B는 연한 노란색 가루이며, <sup>4</sup>C<sub>1</sub> glucose 핵의 4, 6번에 HHDP, 3번에 galloyl 및 2번에 락톤화된 valoneoyl기가 있다(Fig. 1).<sup>2,3)</sup>

이런 활성이 높은 치환기가 존재하는 성분이 있기 때문에, CA는 전립선 비대증과 전립선 암의 치료보조제, 전립선 질환 예방을 위한 기능성식품 또는 천연 의약품 등으로 개발될 수 있다. 특히 cornusiin B 분석법과 표준화 및 정량 분석을 통해 cornusiin B가 정확한 함량이 높은 지역의 흰말채 나무를 이용함으로써 관련 기초자료를 마련하고자 한다.

본 연구에서는 CA로부터 분리한 cornusiin B 대해 HPLC

를 사용하여 밸리데이션 및 함량평가를 실시하였다.

### 재료 및 방법

**기기 및 시약** – 밸리데이션과 함량분석에 사용된 high-performance liquid chromatography(HPLC) 기기는 Waters 600E Multi-solvent Delivery System(Waters, USA) 모델을 이용하였으며, 컬럼은 Hecor C18 column(5 µm, 250×4.6 mm)을 이용하였다. HPLC 분석 용매는 아세트나이트릴, 초산, 물(Honey well, USA)를 이용하였으며, 모든 표준용액과 검액의 조제는 Whatman<sup>®</sup> Membrane filters(0.45 µm, diam. 47 mm) 로 여과하여 사용하였다.

**재료** – 본 실험에 사용된 CA의 소재는 경북 포항시 경상북도 수목원(2018.08.25)에서 채집 하였으며, 김진우 연구관(경상북도 수목원)의 검증을 받았다. 확장표본 CA 2018-0825-1이며, 중앙대학교 약학대학 표본실에 보관되어 있다. 신선한 전초 31.24 g을 실내에서 건조 후, CA을 분쇄하여, Reflux로 80% ethanol 용매로 3회 반복 추출하여 CA 추출물 경북 흰말채 나무(GBCA)을 확보하였다. 이전 연구를 통해 분리된 cornusiin B를 확보하여 이를 함량분석의 표준품으로 이용하였다(Fig. 1).<sup>2)</sup>

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

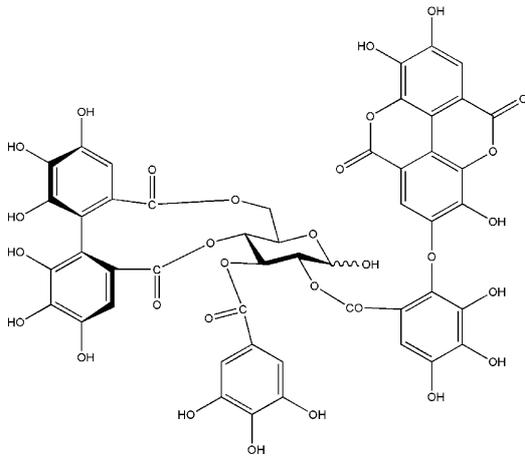


Fig. 1. The structures of isolated from cornusiiin B.

**표준용액과 검액의 조제** – Cornusiiin B를 증류수에 녹여 stock solution을 조제하였다. cornusiiin B 표준용액의 농도는 1000, 500, 250  $\mu\text{g/mL}$ 로 조제하였다.

검액은 GBCA 추출물 20 mg을 취해 100% MeOH 1 mL에 녹여 sample로 이용하였다.

**HPLC 조건** – 화합물의 정량은 HPLC를 이용하였다. 분석조건은 유속 1 mL/min, 이동상으로 A line; 0.2% 초산-물, B line; 아세트나이트릴을 이용하였으며, UV 파장은 256 nm로 설정하여 함량분석을 하였고, injection volume은 10  $\mu\text{L}$ 로 하였으며, Table I과 같은 조건으로 각 시료에 대한 함량분석을 실시하였다(Table I).

**특이성(Specificity)** – Cornusiiin B는, 흰말채 나무 추출물 내 다른 물질과 간섭 없이 분리가 되는 것에 의해 특이성을 확인한다.

**직선성(Linearity)** – 직선성 평가를 위한 검량선을 얻기 위해 화합물을 증류수에 희석하여 각 3 개의 농도가 되도록 용액을 만들어 실험을 진행하였다. Linear regression

Table I. HPLC analysis condition

		HPLC condition	
		1 mL/min	
		256 nm	
		75min	
	Time (min)	A (%)	B (%)
		0.2% 초산-물	아세트나이트릴
Gradient	0 min	95	5
	5 min	90	10
	15 min	90	10
	40 min	82	18
	50 min	0	100
	60 min	0	100
	65 min	95	5
	75 min	95	5

equation( $y=ax+b$  y: peak 면적, x: 시료 농도 a: 직선의 기울기, b: y절편)을 구하였으며 상관계수( $R^2$ )의 값을 통해 직선성을 확인하였다.  $R^2$ 의 값이 0.999 이상인 경우 지표성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

**정량한계(LOQ)** – 분석물질의 정량 가능한 최저농도 확인을 위하여, 정량한계(LOQ)를 측정하였다. 정량한계(LOQ)는  $QL=10\times\sigma/S$ ( $\sigma$ : 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)의 식을 이용해 계산하였다. 기울기 S는 분석물질의 검량선으로부터 구하였으며, 회귀직선에서 y절편의 표준편차를 표준편차  $\sigma$ 로서 활용하였다.

**정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)** – 동일 농도의 시료에 대하여 일간 및 일내 변동을 알아보기 위해 정밀성 및 정확성 평가를 실시하였다. 화합물의 표준용액을 시료 농도당 3일간 반복성 시험, 일내 3회 반복성 시험을 하였다. 각 농도의 범위는 1000, 500, 250  $\mu\text{g/mL}$  농도로 진행하였다. 정확성은 표준값과 측정값 간의 일치되는 정도로 확인하였으며, 정밀성은 반복 분석하였을 때 분석물질에 대한 측정값들 사이의 근접성으로 측정하였다.

**함량분석** – 화합물의 함량은 linear regression equation을 이용해 계산하였다.

## 결과 및 고찰

**HPLC 분석조건 확립** – 지표성분의 최적 분석법을 확립하였다. 유속 1 mL/min, 이동상 용매 A: 0.2% 초산-물, B: 아세트나이트릴을 선정하여 각각 gradient elution을 확립한 HPLC 분석조건은 식약처 validation guide line에 따라 특이성, 직선성, 정량한계, 정밀성 및 정확성을 확인하였다(Fig. 2).<sup>5,6)</sup>

Cornusiiin B는 glucose 핵이 있어서  $\alpha$ -anomer 및  $\beta$ -anomer이 존재한다. 자연계에  $\beta$ 가  $\alpha$ 에 비해 상대적으로 많이 함유되어 있어 cornusiiin B피크가 2개로 나타나며 강도에도 차이가 있는 것을 알 수 있다. FAB-MS 결과를 통하여 cornusiiin B를 확인하였다.<sup>7)</sup>

**특이성(Specificity)** – HPLC를 이용해 CA 추출물의 chromatogram을 비교해 화합물의 retention time(RT)을 확인한 결과, cornusiiin B의 피크는 35.85분, 36.60분 GBCA 흰말채 나무 추출물의 cornusiiin B의 피크는 35.90분, 36.50분 다른 물질의 간섭 없이 성분의 피크가 분리된 것을 확인하였으며, 흰말채 나무 추출물내의 피크 유지시간이 거의 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증 하였다(Fig. 2).

**직선성(Linearity)** – 검량선의 linear regression equation은 다음과 같았다.  $Y=14.127X-1,662,557$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9992이다. 화합물의 검량선은  $R^2$ 가 0.9990 이상으로 나타나 높은 직선성을 보이고 있음을 확인하였다(Fig. 3, Table III).

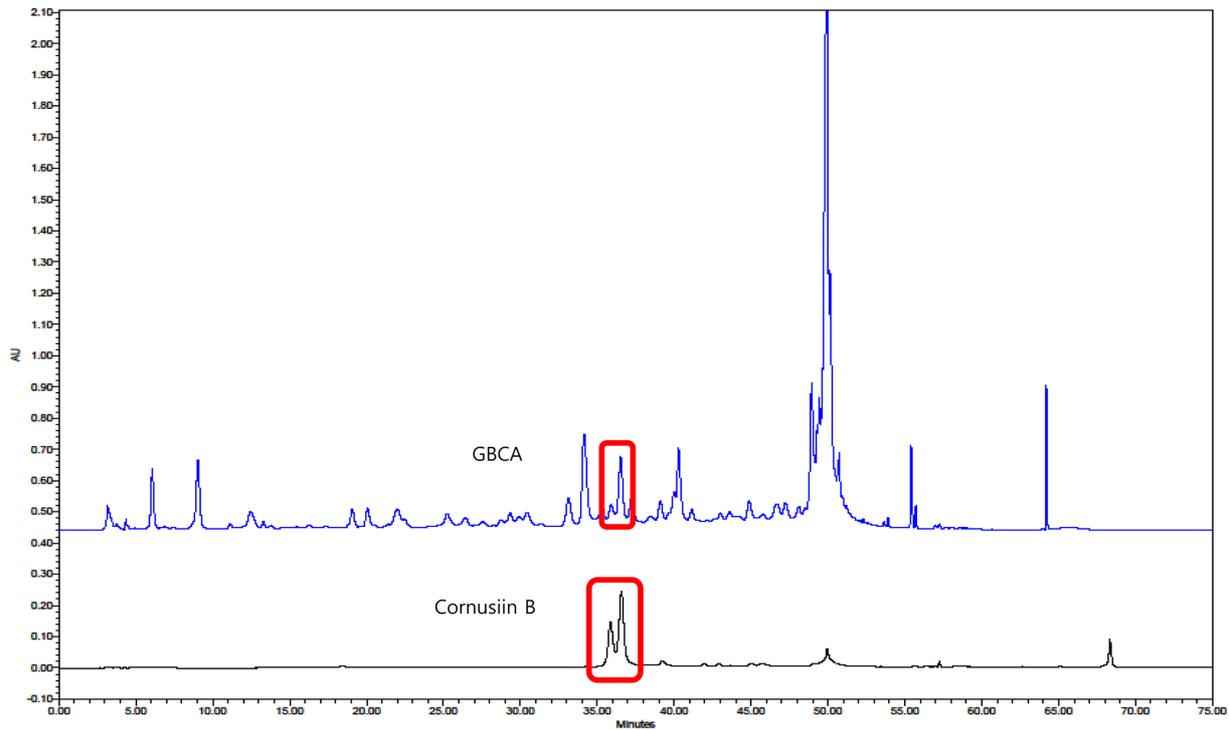


Fig. 2. The HPLC chromatograms of GBCA and Cornusiiin B at 256 nm.

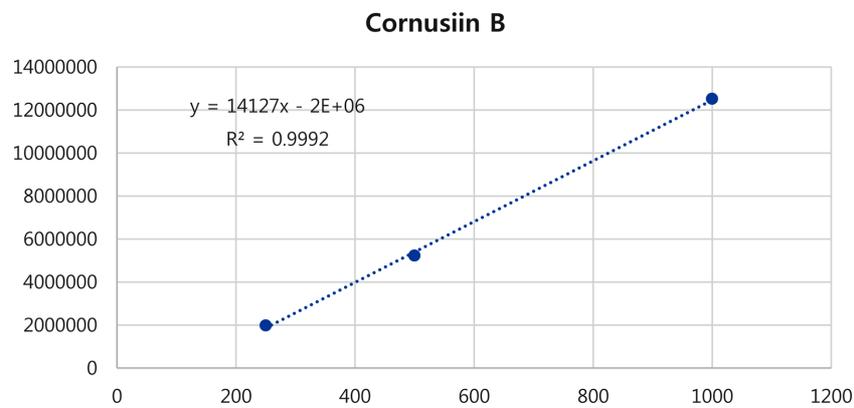


Fig. 3. Calibration curve and linear regression equation of cornusiiin B.

Table II. Linear ranges, linear regression equation and LOQ of cornusiiin B

Compound	Linear range (µg/mL)	Response Slope (a)	Response Factor (b)	Correlation Coefficient (R <sup>2</sup> )	LOQ (µg/mL)
Cornusiiin B	250~1000	14127	-1662557	0.9992	190.31

Table III. Precision and accuracy for the determination of cornusiiin B

Compound	Conc. (µg/mL)	Accuracy (%)		Precision (c.v.%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Cornusiiin B	1000	0.38	1.20	99.64	99.60
	500	1.21	1.01	102.11	102.36
	250	1.36	1.15	97.17	96.85

**Table IV.** Contents of Gyeong Buk *Cornus alba*

Contents (%)		
GB	Extract	3.06
	Original plant	1.07

GB: Gyeong Buk Arboretum

**정량한계(LOQ)** – 정량한계(LOQ)는 공식을 이용하여 그 값을 구하였다. cornusiin B의 190.31 µg/mL으로 측정되었다. 이를 통해 정량 가능함을 확인하였다(Table III).

**정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)** – Cornusiin B의 정확성은 96.85%~102.36% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로써 0.43%~1.64%로 양호한 값을 나타내었다(Table IV).

**함량분석** – Cornusiin B의 함량은 GBCA의 ethanol 추출물 대비 3.07%가 함유되어 있음을 확인하였다. 또한, 원소재의 건조 중량 대비 화합물의 함량은 1.07%로 확인되었다(Table II).

## 결 론

Cornusiin B를 지표성분으로 이용한 밸리데이션 실험에 의해 분석법의 특이성, 직선성, 정량한계, 정밀성, 정확성을 검토하여 분석법을 검증하였다.

확립한 분석을 이용하여 함량분석을 시행한 결과, 경상북도 수목원 CA추출물에는 cornusiin B가 3.07%가 함유되어 있으며, 원소재의 건조 중량 대비 화합물의 함량은 1.07%로 확인되었다. 연구의 결과로 CA추출물에 존재하는 cornusiin B 화합물의 함량분석에 있어서 중요한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 결과물은 한국연구재단의 재원으로 한국 연구재단의 기초연구 사업의 지원을 받아 연구되었음(NRF-2016R1D1A1B03930307).

## 인용문헌

1. 김태정 (2008) 한국의 야생화와 자원식물, P505. 서울대학교출판부, 서울.
2. Park, K. H., Yin, J., Yoon, K. H., Hwang, Y. J. and Lee, M. W. (2016) Anti-proliferative effects of hydrolysable tannins from *Cornus alba* in prostate cancer cells. *Molecules* **21**: 137-148.
3. Bjorøy, Ø., Fossen, T. and Andersen, Ø. M. (2007) Anthocyanin 3-galactosides from *Cornus alba* “Sibirica” with glucosidation of the B-ring. *Phytochemistry* **68**: 640-645.
4. Salminen, J., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K. and Pulkkinen, P. (2004) Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J. Chem. Ecol.* **30**: 1693-1711.
5. Barry, K., Davies, N. and Mohammed, C. (2001) Identification of hydrolysable tannins in the reaction zone of *Eucalyptus nitens* wood by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **12**: 120-127.
6. Fecka, I. (2009) Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem. Anal.* **20**: 177-190.
7. 박관희 (2013) 흰말채나무 hydrolysable tannin 의 전립선 암세포 증식 억제 활성, 석사학위논문, 중앙대학교.

(2019. 5. 11 접수; 2019. 5. 23 심사; 2019. 7. 16 게재확정)