

고비로부터 Cinnamtannin B-1의 분리 및 함량 분석

김민석^{1,2#} · 우경완^{1#} · 이기호¹ · 이현주¹ · 이선유¹ · 강병만¹ · 전병훈² · 조정희¹ · 조현우^{1*}
¹한약진흥재단 한약자원본부, ²원광대학교 한의학과 병리학교실

Isolation and Quantitative Analysis of Cinnamtannin B-1 from *Osmunda japonica* Thunb

Min Suk Kim^{1,2#}, Kyeong Wan Woo^{1#}, Ki Ho Lee¹, Hyun Joo Lee¹, Seon Yu Lee¹, Byoung Man Kang¹,
Byung Hun Jeon², Jung Hee Cho¹, and Hyun Woo Cho^{1*}

¹Division of Traditional Korean Medicine Resource, National Development Institute of Korea Medicine,
288, Woodlandgil, Anyangmyeon, Jangheunggun, Jeollanamdo 59338, Korea

²Department of Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

Abstract – In traditional Korean medicine, *Osmunda japonica* Thunb has been used as hemostasis and antipyretic treatment. The main compound “cinnamtannin B-1” was obtained by column chromatographic separation, and its structure was determined by spectroscopic methods, including ¹H, ¹³C NMR, and IT-TOF-ESI MS. Ash, moisture and extract content and acid-insoluble ash were monitored as identification test to establish the analytical methods. The optimum reflux extraction condition was 100% methanol extracted 30 min for 2 times. A quantitative analysis using HPLC method exhibited that the main compound at 24.7 min and its content was 0.96% in methanol extraction.

Key words – Osmundaceae, *Osmunda japonica*, Cinnamtannin B-1, Quantitative analysis

고비(*Osmunda japonica*)는 고비과(Osmundaceae)의 속하는 여러해살이풀로 우리나라에는 고비, 꿩고비(*Osmunda cinnamomea*), 가는고비(*Osmunda japonica* var. *sublancea*), 음양고비(*Osmunda claytoniana*) 4종이 자생한다.¹⁾ 주로 숲 속이나 물가의 습하고 그늘진 곳에 자라고, 뿌리에서 여러 대가 올라와 높이는 60~100 cm 정도이며, 잎은 2회 우상복엽이고 어린 잎은 얇고 흰털로 덮여있으나, 성숙하면 털이 없고 주맥과 측맥이 50°각도로 교차한다.^{2,3)} 어린잎은 나물로 식용하며, 한방에서는 고비의 뿌리줄기를 자기(紫箕)라 하여 해열(解熱), 지혈(止血), 구충(驅蟲)작용으로 사용하였다.⁴⁾ 고비의 약리작용 연구로 지상부는 tyrosinase inhibitory 활성이,⁵⁾ 뿌리는 anti-oxidant,⁶⁾ anti-bacterial 및 antifungal 활성이 보고되었다.⁷⁾ 또한 식물 화학적 성분연구로는 sterol,⁸⁾ phenolic compound,⁹⁾ flavonoid,⁷⁾ antifeeding active 화합물^{10,11)} 등의 미량성분들이 분리, 보고되었다.

본 연구는 고비의 지표성분 분석법이 제대로 되어 있지

않는 실정으로 품질관리 기준을 설정하기 위해 고비로부터 각종 column chromatography법을 이용하여 대량 분리된 지표성분을 spectroscopic data를 통해 cinnamtannin B-1으로 구조 동정하였다. 또한 고비의 확인시험 뿐만 아니라 지표 성분 cinnamtannin B-1의 함량 방법을 HPLC 방법으로 확립하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 고비는 2015년 6월 24일 전남 완도 에서 채취하였으며, 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수에게 의뢰하여 동정하여 사용하였다. 표본은 한약진흥재단 한약재연구팀에 보관하였다.

기기 및 시약 – 추출 및 분획용 시약, TLC 및 column용 시약 등은 특급시약을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F_{254S}plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm. Art. 5423, Merck)를 사용하였으며, UV의 검색은 254와 365 nm

#These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): johw7@nikom.or.kr

(Tel): +82-61-860-2801

에 측정하였다. Column chromatography의 충전제는 YMC gel ODS-A(50 μ m)를 사용하였다. 단일 화합물의 구조를 규명하기 위해 이용한 NMR(Nuclear magnetic resonance) spectrum은 Varian 600 spectrometer(^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)를 사용하여 측정하였고, NMR 용매는 Sigma. Inc(USA)의 CD_3OD 를 사용하였다. 일반성분 분석을 위한 건조기(VS-1202D3, Jeitech, Korea), 회화로(MF-21G, Daehan, Korea), 초음파추출기(UC-20, Branson, USA)이며, 확인시험에는 반자동박층크로마토그래프(ATS4&ADC2, Camag, Swiss)를 사용하였다. 함량 분석은 X-bridge C_{18} column(5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm, Waters, USA)을 사용하여 Shimadzu HPLC system(20-AD, Shimadzu, Japan)으로 측정하였다.

추출 및 분획 - 고비 뿌리줄기(2 kg)를 환류냉각장치를 이용하여 1 kg 씩 MeOH 20 L에 담가 3시간, 총 3회 온침 추출을 진행 후 감압 농축하여 메탄올 추출물(137 g)을 얻었다. 이를 10% MeOH에 현탁시킨 후 *n*-hexane으로 분획하여 *n*-hexane층 20 g, H_2O 층 100 g을 얻었다.

지표물질 분리 - H_2O 분획물(80 g)을 glass column(16 cm \times 60 cm)에 ODS gel(50 μ m, 0.8 kg, YMC, Japan)을 충전하여 H_2O -MeOH 혼합용매(100:1, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100)를 사용하여 open column chromatography를 실시하여, LC-MS 및 TLC를 이용해 스크리닝 후 6개의 소분획물을 얻었다(GBW 1-6). 그리고 이 중 GBW 2(13 g)를 ODS gel(20 μ m, 0.4 kg, YMC, Japan)을 사용하여 H_2O -ACN의 혼합용매(9:1, 8:2)를 사용해 column chromatography 진행하여 15개의 소분획물(GBW 2-1~15)을 얻었다. 지표성분 분획으로 확인된 GBW 2-7(1 g)를 MeOH 10 mL에 녹여 ODS column(30 mm \times 250 mm, 5 μ m, phenomenex, USA)가 장착된 preparative LC(Agilent, infinity 1260, USA)를 사용하여 14% ACN, 25 mL/min의 조건으로 277 nm에서 화합물 **1**(675 mg)를 분리하였다.

Cinnamtannin B-1 (1) - Brown powder; ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD) δ 7.31 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-12'), 7.19 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-16'), 7.03 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-12), 6.85 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-15''), 6.83 (3H, m, H-16, 15', 12''), 6.75 (2H, m, H-15, 16''), 6.10 (1H, s, H-6''), 6.01 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6), 5.97 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-8), 5.80 (1H, s, H-6'), 5.70 (1H, s, H-2'), 4.56 (1H, t, $J=1.5$ Hz, H-4'), 4.39 (1H, s, H-2''), 4.15 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-4), 4.12 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-3'), 3.86 (1H, dd, $J=4.0, 3.0$ Hz, H-3''), 3.29 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3), 2.83 (2H, t, $J=4.0$ Hz, H-4''); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ 156.4 (C-7), 155.4 (C-9), 154.6 (C-7''), 154.4 (C-5', 5''), 154.2 (C-9''), 152.7 (C-5), 150.4 (C-9'), 149.7 (C-7'), 145.3 (C-14), 144.9 (C-14'), 144.5 (C-13'), 144.3 (C-13''), 144.1 (C-

13), 143.9 (C-14''), 131.8 (C-11''), 131.1 (C-11), 130.4 (C-11'), 119.9 (C-16'), 118.5 (C-16), 118.0 (C-16''), 115.3 (C-15), 114.7 (C-12'), 114.6 (C-12), 114.3 (C-15', 15''), 114.1 (C-12''), 107.4 (C-8''), 105.3 (C-10'), 105.0 (C-8'), 103.5 (C-10), 98.6 (C-10''), 98.5 (C-2), 96.9 (C-8), 95.1 (C-6''), 95.0 (C-6), 94.6 (C-6'), 78.9 (C-2''), 77.5 (C-2'), 71.2 (C-3'), 66.1 (C-3''), 65.8 (C-3), 36.9 (C-4'), 28.5 (C-4''), 27.5 (C-4); LC ESI IT-TOF MS: m/z 863 $[\text{M-H}]^-$.

확인시험 - 분리한 cinnamtannin B-1을 이용하여 박층크로마토그래프법을 설정하였으며 시료를 가루로 하여 약 1.0 g을 취하여 메탄올, 에탄올, 물 10 mL를 각각 첨가하여 30분 초음파 추출한 다음 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 검액 및 표준용액 5 μL 를 박층크로마토그래프용실리카겔(형광제 첨가)을 써서 만든 박층판에 점적하였다. Ethyl acetate·Acetic acid·Formic acid·Water(100:11:11:27)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개한 후 분무용 황산시액을 고르게 뿌리고 105°C에서 10분간 가열한 뒤 백색광에서 관찰하였다.

일반성분 - 대한민국약전(참고문헌처리, 제2014-194호) 일반시험법 중 생약시험법에 준하여 각각의 건조감량, 엑스함량(뚝은에탄올엑스), 회분, 산불용성회분 시험법에 따라 실시하였다.

표준용액 조제 - 지표성분 cinnamtannin B-1을 2.30 mg를 MeOH 10 mL에 용해하여 stock solution으로 하였다. 이 stock solution을 희석하여 230, 115, 57.5, 28.75, 14.38 ppm 농도의 표준용액을 조제하였다.

검액 조제 - 시료를 가루로 하여 약 1.0 g을 칭량하여 용매에 따른 추출효율 분석과 추출조건에 따른 함량 분석을 실시하였다. 용매별(MeOH, 50% MeOH, EtOH)로 각각 10 mL씩 첨가하여 30분간 초음파 추출 후 검액으로 사용하였다. 추출효율이 가장 좋았던 MeOH을 첨가하여 조건(초음파 30분, 30분 2회, 60분과 환류 30분, 30분 2회, 60분 추출)에 따라 추출, 여과 후 정확하게 50 mL가 되게 하여

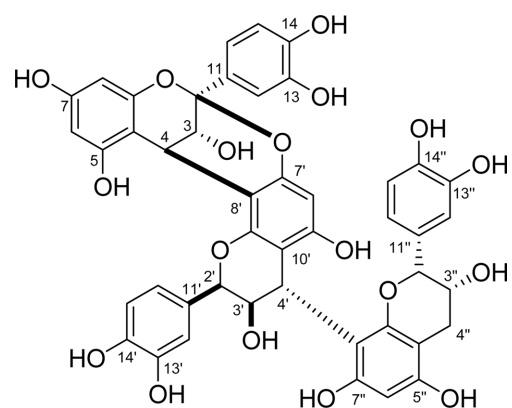


Fig. 1. Chemical structure of compound 1.

Table I. HPLC condition of cinnamtannin B-1

| Instrument | HPLC (Shimadzu 20 AD) | | |
|------------------|--------------------------------------------------------------|-------|-------|
| Flow rate | 1.0 mL/min | | |
| Injection volumn | 10 μ L | | |
| UV length | 280 nm | | |
| Mobile solvent | A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in ACN | | |
| Mobile phase | Time | A (%) | B (%) |
| | 0 | 95 | 5 |
| | 10 | 95 | 5 |
| | 15 | 92 | 8 |
| | 17 | 89 | 11 |
| | 30 | 85 | 15 |
| | 45 | 85 | 15 |

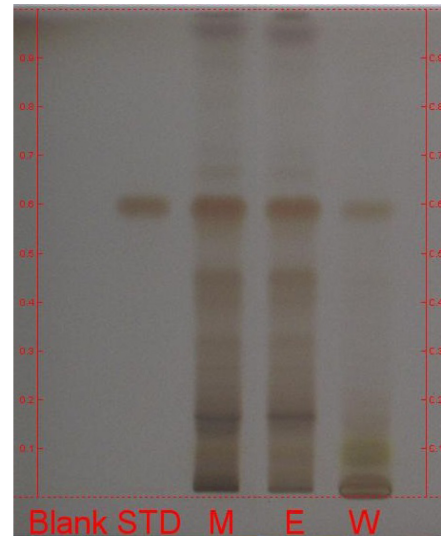
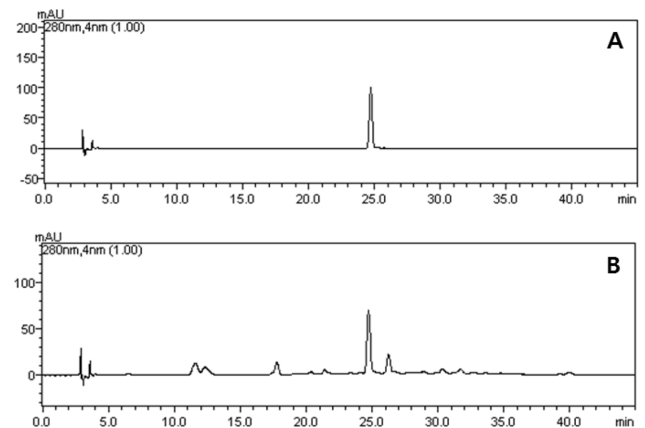
검액으로 사용하였다.

HPLC 분석 조건 - Cinnamtannin B-1의 분석 조건을 Table I과 같이 설정한 다음, 이 조건에 따라 함량분석을 실시하였다.

검량선 및 직선성(Linearity) - 고비로부터 순수 분리된 cinnamtannin B-1의 표준용액을 MeOH로 희석하여 230, 115, 57.5, 28.75, 14.38 μ g/mL의 농도가 되도록 만들어 실험하였다. 검량선은 $y=ax+b$ (y: peak 면적, x: 시료농도, a: 직선의 기울기, b: y절편)의 형태로 작성하였다.

결과 및 고찰

화합물의 구조 - 갈색 가루로 분리되었으며, LC ESI-IT TOF MS 분석에서 m/z 863.1305 [M-H]⁻으로 확인하였고, formular predictor(Shimadzu, Japan)를 이용한 결과 $C_{45}H_{36}O_{18}$ 의 분자식을 얻었다. ¹H-NMR spectrum에서 3 set의 1,3,4-치환된 benzene ring proton δ 7.31(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-12'), 7.19(1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-16'), 7.03(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-12), 6.85(1H, d, $J=1.5$ Hz, H-15''), 6.83(3H, overlap, H-16), 그리고 6.75(2H, overlap, H-15)과 meta couple하는 proton δ 6.01(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6) 그리고 5.97(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-8)과 2개의 benzene ring proton δ 6.10(1H, s, H-6'') 그리고 5.80(1H, s, H-6')과 5개의 oxygenated proton δ 3.29(1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3), 5.70(1H, brs, H-2'), 4.12(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-3'), 4.39(1H, s, H-2''), 그리고 3.86(1H, dd, $J=4.0, 3.0$ Hz, H-3'')과 2개의 methine proton δ 4.15(1H, d, $J=3.5$ Hz, H-4) 그리고 4.56(1H, t, $J=1.5$ Hz, H-4')와 하나의 methylene proton δ 2.83(2H, t, $J=4.0$ Hz, H-4'')이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 45개의 carbon 개수를 통해 전형적인 축합형 tannin으로 예상하였고,¹²⁾ benzene ring carbon 36개와 5개의 oxygenated carbon δ

**Fig. 2.** TLC chromatogram of *Osmunda japonica* and cinnamtannin B-1.**Fig. 3.** HPLC chromatogram of cinnamtannin B-1 (A) and *Osmunda japonica* (B).**Table II.** The contents of cinnamtannin B-1 by extract solvents

| Solvents | Content (%) | | |
|----------|-------------|----------|------|
| | MeOH | 50% MeOH | EtOH |
| | 0.68 | 0.67 | 0.22 |

78.9(C-2''), 77.5(C-2'), 71.2(C-3'), 66.1(C-3''), 그리고 65.8(C-3), 2개의 methine carbon δ 36.9(C-4') 그리고 27.5(C-4), 하나의 methylene carbon δ 28.5(C-4'')과 하나의 quaternary carbon δ 98.5(C-2)을 확인하였다. 이를 기존 문헌과 비교하여 cinnamtannin B-1으로 구조 동정하였다.¹³⁾

확인시험 - 분리한 cinnamtannin B-1과 추출한 검액을 이용하여 박층크로마토그래프 실험 결과 $R_f=0.8$ 에서 갈색의 반점을 확인하였다(Fig. 2).¹⁴⁾

Table III. The contents of cinnamtannin B-1 by extraction time and methods

| Extraction method | Sonication | | | Reflux | | | |
|-------------------|------------|------|------|--------|------|------|------|
| | Time (min) | 30 | 30*2 | 60 | 30 | 30*2 | 60 |
| Content (%) | 0.84 | 0.83 | 0.84 | 0.84 | 0.92 | 0.95 | 0.94 |
| | 0.83 | 0.84 | 0.83 | 0.83 | 0.93 | 0.97 | 0.95 |
| | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.83 | 0.93 | 0.97 | 0.96 |
| SD | 0.83 | 0.83 | 0.84 | 0.84 | 0.93 | 0.96 | 0.95 |
| Average | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 |

Table IV. Calibration data for analysis of cinnamtannin B-1

| Compound | Regression equation y=ax+b | | Contents (mg/g) | r ² | LOD (µg/mL) | LOQ (µg/mL) |
|------------------|-------------------------------|--------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Slope(a) | Intercept(b) | | | | |
| Cinnamtannin B-1 | 6178.54 | -6041.88 | 9.61±0.13 | 0.9998 | 0.28 | 0.86 |

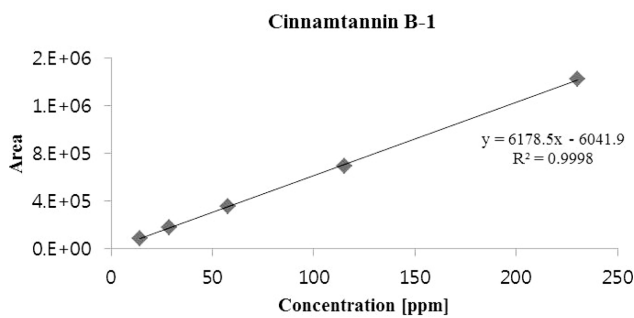


Fig. 4. Calibration curve of cinnamtannin B-1.

일반성분 - 고비는 대한약전에 수재되어 있지 않는 민간 생약으로 설정된 기준규격이 없으며, 실험결과 건조감량은 11.3%, 회분은 4.1%, 산불용성회분은 1.0%, 묽은에탄올엑스함량은 14.7%의 결과로 나타났다.

함량분석(Content) - 고비의 지표성분 cinnamtannin B-1의 분석법 확립을 위해 Table I의 HPLC 조건으로 진행하여 peak의 retention time은 24.7 min에 관찰하였다(Fig. 3). 50% MeOH, 100% MeOH, EtOH의 추출용매에 따른 지표 성분 함량 비교는 Table II와 같이 100% MeOH 추출에서 가장 높은 효율을 확인하였고, MeOH을 추출용매로 하여 추출조건별 실험 결과 Table III과 같이 환류 추출 30분 2반복에서 가장 높은 효율을 확인하였다. 지표물질의 검량선 결과 Fig. 4과 같고, 상관계수(R²)은 0.9998로 높은 직선성을 보였으며, 고비의 지표성분 cinnamtannin B-1의 MeOH 추출물에서의 함량은 0.96%으로 확인되었다(Table IV).¹⁵⁾

결 론

분석법 확립을 위해 고비를 100% MeOH로 추출하여 얻은 추출물로부터 각종 column chromatography법을 이용하

여 지표성분을 분리, 분광학적 방법을 통해 cinnamtannin B-1으로 구조 동정하였다. 고비의 함량분석을 위해 HPLC 조건을 확립하였고, 메탄올 용매에 환류 추출 30분 2회 반복에서 가장 높은 효율을 나타냈으며, 지표성분 함량은 0.96%로 확인하였다. 또한 고비의 품질규격은 설정되어 있지 않아 우리의 실험 결과로 볼 때 건조감량은 11.3%, 회분은 4.1%, 산불용성회분은 1.0%, 묽은에탄올엑스함량은 14.7%으로 설정하였으며, 향후 고비의 식물화학적 성분 및 생리 활성 실험을 진행할 예정이다.

사 사

이 연구는 2015년도 보건복지부 한의약 산업 육성을 위한 기반구축(한국 토종자원의 한약재 기반구축사업) 결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

인용문헌

- 안완식 (2009) 한국토종작물자원도감, 341, 도서출판 이유헌, 서울.
- 이창복 (2003) 원색 대한식물도감(상), 33, 향문사, 서울.
- 이영노 (2007) 한국식물도감(상), 37, 교학사, 서울.
- 정진해 (2012) 한국토종약용식물도감, 150, 학연문화사, 서울.
- Kim, S. J., Heo, M. Y., Bae, K. H., Kang, S. S. and Kim, H. P. (2003) Tyrosinase inhibitory activity of plant extracts (III): Fifty Korean indigenous plants. *J. Appl. Pharmacol.* **11**: 245-249.
- Heo, C., Chung, J. H., Jo, B. K., Kim, H. P. and Heo, M. Y. (2003) Antioxidative activities of 60 plant extract. *J. Appl. Pharmacol.* **11**: 196-199.
- Li, F. and Hu, Y. (2012) Antibacterial and antifungal properties of flavonoid compounds from *Osmunda japonica*

- Thumb. *Chem. Asian. J.* **24**: 4964-4966.
8. Hollenbeak, K. H. and Kuehne, M. E. (1974) Isolation and structure determination of the fern glycoside osmundalin and the synthesis of its aglycon osmundalactone. *Tetrahedron* **30**: 2307-2316.
 9. Zhu, X. X., Li, Y. J., Yang, L., Zhang, D., Chen, Y., Kmonickova, E., Weng, X. G., Yang, Q. and Zidek, Z. (2011) Divergent immunomodulatory effects of extracts and phenolic compounds from the fern *Osmunda japonica* Thunb. *Chin. J. Integr. Med.* **19**: 761-770.
 10. Numata, A., Hokimoto, K., Takemura, T., Katsuno, T. and Yamamoto, K. (2004) Plant constituents biologically active to insects. V. Antifeedants for the larvae of the yellow butterfly, *Eurema hecabe mandarina*, in *Osmunda japonica* (1). *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 2815-2820.
 11. Numata, A., Takahashi, C., Fujiki, R., Kitano, E., Kitajima, A. and Takemura, T. (1990) Plant constituents biologically active to insects. VI. Antifeedants for larvae of the yellow butterfly, *Eurema hecabe mandarina*, in *Osmunda japonica* (2). *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 2862-2865.
 12. Hoer, M., Heinrich, M. and Rimpler, H. (1996) Proanthocyanidin polymers with antisecretory activity and proanthocyanidin oligomers from *Guazuma ulmifolia* bark. *Phytochemistry* **42**: 109-119.
 13. Killday, K. B., Davey, M. H., Glinski, J. A., Duan, P., Veluri, R., Proni, G., Daugherty, F. J. and Tempesta, M. S. (2011) Bioactive A-type proanthocyanidins from *Cinnamomum cassia*. *J. Nat. Prod.* **74**: 1833-1841.
 14. Kim, H. J., Suh, Y. T., Lee, J. P., Cho, J. H. and Jang, Y. P. (2009) Studies on the identification test of herbal medicines and its preparations. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 155-160.
 15. Nugroho, A., Park, M. G., Jin, S. E., Choi, J. S. and Park, H. J. (2009) Quantitative analysis of flavanone glycosides and peroxynitrite scavenging effect of the five oriental medicinal drugs (*Aurantii nobilis pericarpium*, *Citrii unshiu pericarpium*, *Citrii unshiu semen*, *Aurantii fructus*, *Poncirii fructus*). *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 370-375.
- (2016. 6. 13 접수; 2016. 8. 16 심사; 2016. 8. 30 게재확정)