

주 의

1. 이 보고서는 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발과제의 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발과제의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.
4. 이 보고서 내용을 신문, 방송, 참고문헌, 세미나 등에 인용 시에는 해당 주관부서 또는 연구책임자와 사전에 상의하여 주시기 바랍니다.

제 출 문

식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(현삼, 치자)(동국대학교/이동웅)” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009. 2. 27

주관연구기관명 : 동국대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 이 동 웅

제 1 세부과제명 : 현삼 및 치자의 생리활성 성분 분리 및 구조확인
(동국대학교 경주캠퍼스/이동웅)

제 2 세부과제명 : 현삼 및 치자의 표준물질 분석법 개발
(경북대학교/송경식)

목 차

I. 연구개발결과 요약문

(한글) -----	1
(영문) -----	3

II. 총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표 -----	5
제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법 -----	11
제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과 -----	13
제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 -----	23
제5장 총괄연구개발과제의 연구성과 -----	28
제6장 기타 주요변경사항 -----	30
제7장 참고문헌 -----	30
제8장 첨부서류 -----	32

III. 제1 세부연구개발과제 연구결과

제1장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표 -----	38
제2장 제2 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법 -----	39
제3장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과 -----	40
제4장 제1 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 -----	96
제5장 제1 세부연구개발과제의 연구성과 -----	97
제6장 기타 주요변경사항 -----	99
제7장 참고문헌 -----	99
제8장 첨부서류 -----	101

IV. 제2 세부연구개발과제 연구결과

제1장 제2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표 -----	107
-----------------------------------	-----

제2장 제2 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법 -----	115
제3장 제2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과 -----	117
제4장 제2 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론 -----	144
제5장 제2 세부연구개발과제의 연구성과 -----	149
제6장 기타 주요변경사항 -----	150
제7장 참고문헌 -----	150
제8장 첨부서류 -----	150
총괄 연구과제 요약 -----	151
제1 세부과제 요약 -----	154
제2 세부과제 요약 -----	156

최종보고서 요약문

과 제 명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(현삼, 치자)		
중심단어	생리활성성분, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 표준품		
주관연구기관	동국대학교 산학협력단	주관연구책임자	이 동 응
연구기간	2007년 2월 28일 ~ 2008년 11월 30일 (1년 4.9개월)		
◆ 최종연구목표			
<ol style="list-style-type: none"> 1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 활성물질 대량 분리 방법을 확립 2. 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 제공 3. 현삼 또는 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명 4. 각종 기기분석 장비를 활용한 활성지표물질의 동시 정량법 개발 5. HPLC, LC-MS fingerprint 작성 및 패턴분석, chemometrics에 의한 기원별, 산지별 확인법 확립 			
◆ 연구내용 및 방법			
<ol style="list-style-type: none"> 1. 제1세부과제 <ol style="list-style-type: none"> 1) 국내외에서 수집한 현삼 6종 및 치자 7종의 70% 에탄올 엑스제조 및 시료 제공(효능팀, 분석팀) 2) 현삼과 치자 기본생약의 메탄올 추출물에서 성분분획(CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH 분획) 제조 3) 각 성분분획에서 각종 chromatography(순상 및 역상 column, prep. HPLC, prep. TLC 등)를 이용하여 성분을 분리, 정제하였으며 분리한 성분의 구조를 확인하기 위하여 기기분석(¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS/ESI-MS/FAB-MS, FT-IR, UV 등) 및 물리특성을 측정하여 문헌치와 대조하거나 화학적 수식 등을 이용하여 구조를 동정하였음. 4) 현삼에서 16종, 치자에서 20종의 성분을 분리하였으며 이들 성분의 순도를 측정하였고 시료를 분석팀, 효능팀에 제공하였음. 5) 현삼의 분획에서 지금까지 보고된 바 없는 신규물질 6종을 분리하여 구조를 규명하였음. 2. 제2세부과제 <ol style="list-style-type: none"> 1) 최적분석조건: 현삼의 경우 Eclipse SDB C-18를 고정상으로 각각 1%의 초산을 함유하는 물과 acetonitrile을 gradient로 UV 296 nm에서 검출하는 조건과 치자의 경우는 Zorbax XDB-C18를 고정상으로 UV 254 nm에서 각각 1%의 초산을 함유하는 물과 acetonitrile을 gradient로 용출하는 HPLC 조건을 확립하였음. 2) 치자의 경우 <i>geniposidic acid</i>, <i>chlorogenic acid</i>, <i>geniposide</i>와 <i>genipin</i> 4종이 치자의 지표성분으로 가장 적당한 것으로 판단되었으며 현삼의 경우는 (<i>E</i>)-<i>harpagoside</i>, <i>p-methocycinnamic acid</i> 그리고 <i>p-methoxycinnamic acid methyl ester</i> 3종이 지표성분으로 가장 적합하였음. 3) 선정된 지표성분의 경우 모두 90% 이상의 순도를 나타냈으며 상온에서 DMSO에 녹여 60일간 보관 시에도 안정하였다. 현삼 지표성분은 표준품의 범위 0.1~10.00 ug/ml, 직선성 0.9967~0.9976, 검출한계 0.322~2.738, 정량한계 1.172~7.124로 나타났으며, 치자 지표성분의 경우 각각 0.1~50 ug/ml, 0.9939~0.9999, 0.500~2.636, 2.194~7.409로 관측되었음. 재현성, 정밀성, 정확성의 경우 현삼 지표성분은 면적비에 대한 RSD는 재현성 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 RSD는 재현성 0.10-1.26%, CV(%)는 0.26%-6.3%의 정밀성을 보였으며 accuracy(%)는 정확성 92.0%-108.6%로 나타났음. 치자 지표성분의 경우 면적비에 대한 RSD는 재현성 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 RSD는 재현성 0.5-1.1%, CV(%)는 0.22%-5.72%의 정밀성을 보였으며 accuracy(%)는 86.8%-105.3%로 관측되었음. 컬럼, 온도, 이동상 변화 등을 통한 완전성 테스트에서도 모두 94-108%이내였음. 4) 상기 표준품에 대한 최적 추출 조건은 치자와 현삼 공히 1 g의 시료에 95% 에탄올 200 ml를 이용하여 70℃에서 1시간 환류추출하는 것이 가장 좋았음. 5) Fingerprint analysis의 결과 치자의 경우는 수집품간 차이를 거의 나타내지 않았으나, 현삼의 경우 국내산과 중국산이 비교적 뚜렷하게 구별되었으며, 특히 현삼은 DNA 감별결과와 비교적 잘 일치하였음. 			
◆ 기대성과 및 활용방안			
<p>현삼과 치자의 표준화 및 규격화 확립, 유효성분 표준품 확보 및 천연물 라이브러리 구축, 한약재기반 기초연구 촉진, 지역산업 생산기반의 생물산업화 추진과 지역 한방바이오산업의 활성화, 관련 학문분야의 발전에 기여, 우수 연구인력 양성, 한약재 생산을 통한 지역농업의 활성화, 건강기능식품 및 천연물 의약품의 지표성분으로 활용, 수입대체 효과 및 세계시장 진출에 의한 정부의 창출 및 지역경제의 활성화에 기여, 지역의 생물학적 다양성 보존 및 개발에 활용</p>			

주관연구책임자 의견

연구의 범위	<ol style="list-style-type: none"> 1. 성분의 분리 및 구조 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 추출물의 성분분획 제조 및 각종 chromatography 통한 성분분리, 정제 - 각종 기기분석을 통한 구조 동정 또는 구조 규명 2. 생약시료의 검정 3. 활성물질의 동시 정량법 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC-PDA/ELSD, LC-MS/MS, NMR, TLC 등을 이용한 정량 분석 - LC/MS fingerprints를 이용한 정성분석 (기원 및 산지 구별) - Chemometrics를 이용한 기원구별 4. 분석법 validation <ul style="list-style-type: none"> - 식약청 가이드라인에 따른 평가 5. 연구용 시료제공 <ul style="list-style-type: none"> - 대량 분리된 추출물, 분획물 및 정제물 제공
연구의 한계점	<ol style="list-style-type: none"> 1. 연구 대상 생약은 잘 알려진 약재로서 함유성분에 관한 많은 연구가 보고 되어 특히 치자에서는 새로운 성분의 분리에 한계가 있었음. 2. 성분마다 특성이 다르기 때문에 동시 성분분석에는 한계가 있었음.
인용시 주의사항	<p>본 연구결과는 공개가 가능하므로 결과의 인용시 특별한 주의가 필요하지는 않음.</p>
주관부서 연락처	<p>식품의약품안전청 인체노출평가과 (☎ 380 ~ 1825)</p>

Summary

Title of Project	Isolation and Quantitative Analysis of Bioactive Components from Scrophulariae Radix and Gardeniae Fructus		
Key Words	bioactive component, quantitative analysis, pattern recognition analysis, chemical fingerprint, reference standard		
Institute	Dongguk University	Project Leader	Dong-Ung Lee
Project Period	2007. 02. 28 ~ 2008. 11. 30		
<p>◆ Objectives</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Development of protocol for purifying useful components contained in herbal drugs 2. Large scale purification of standard compounds useful for standardization of oriental drugs 3. Investigation of un-identified compounds from Gardenia and Scrophularia 4. Development of simultaneous quantitative analysis of active components in Gardenia and Scrophularia 5. Fingerprint analysis/chemometrics of Gardenia and Scrophularia <p>◆ Results</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 1st Research Team <ol style="list-style-type: none"> 1) Six kinds of Scrophularia and 7 kinds of Gardenia collected from Korea or China were extracted with 70% ethanol and provided for bioassay and analysis 2) Fractions of each main medicinal drug were prepared for isolation of the constituent 3) Isolation was performed using various chromatographic techniques (normal/reverse phase column, prep. HPLC, prep. TLC etc.) and structure identification was achieved by instrumental analyses with ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS/ESI-MS/ FAB-MS, FT-IR, UV etc. 4) 16 Components from Scrophularia and 20 constituents from Gardenia were isolated and provided for bioassay and analysis 5) Isolation of six new components from Scrophularia 2. 2nd Research Team <ol style="list-style-type: none"> 1) Optimal HPLC condition: Scrophularia (Eclipse SDB C-18, 1% HOAc in water and MeCN, gradient elution, UV 296 nm). Gardenia (Zorbax XDB-C18, 1% HOAc in water and MeCN, gradient elution, UV 254 nm). 2) Selected standards: Gardenia (<i>geniposidic acid</i>, <i>chlorogenic acid</i>, <i>geniposide</i>, and <i>genipin</i>). Scrophularia (<i>(E)-harpagoside</i>, <i>p-methocycinnamic acid</i>, and <i>p-methocycinnamic acid methyl ester</i>). Purity of every standard is more than 90%. They are stable at rt for 60 days. Their range, linearity, LOD and LOQ were 0.1~10.00 ug/ml, 0.9967~0.9976, 0.322~2.738, and 1.172~7.124, respectively, for Scrophularia and 0.1~50 ug/ml, 0.9939~0.9999, 0.500~2.636, 2.194~7.409, respectively, for Gardenia. The reproducibility, were 0.78-2.7% (RSD for peak area) and 0.10-1.26% (RSD for retention time) and precision and accuracy were 0.26%-6.3% [CV(%)] and 92.0%-108.6%, respectively, for Scrophularia. The reproducibility, precision, accuracy of gardenia were 0.3-1.8% (RSD for peak area) and 0.5-1.1% (RSD for retention time), 0.22%-5.72% [CV(%)], and 86.8%-105.3%, respectively, for Gardenia. Robustness test showed that the accuracy was 94-108% according to column, temp., and mobile phase change. 4) The optimal extraction condition was as follows: 1 g sample/200 ml 95% EtOH, 1 hr of reflux at 70°C. 5) The cultivated site of Gardenia was not discriminated by fingerprint analysis while that of Scrophularia was differentiated into Korean one and Chinese one by PCA and HClustering analysis. The PCA result of Scrophularia showed good correspondence with that of DNA analysis. 			

Opinion of Project Manager	
Scope	<ol style="list-style-type: none"> 1. Isolation and structure identification of the constituents <ul style="list-style-type: none"> - Fractionation of the extracts and separation by chromatography - Structure determination by instrumental analyses 2. Identification of the herbal drugs <ul style="list-style-type: none"> - Collection of herbs as a reference 3. Simultaneous quantification of the active compound <ul style="list-style-type: none"> - Quantitative analysis by HPLC-PDA/ELSD, LC-MS/MS, NMR, TLC - Qualitative analysis by LC/MS fingerprints for origin distinction - Chemometrics for origin distinction 4. Validation <ul style="list-style-type: none"> - Valuation according to KFDA guide line 5. Provide of samples for assays and analyses <ul style="list-style-type: none"> - Supply of extracts, fractions and pure compounds
Limitation	<ol style="list-style-type: none"> 1. A few new components could be isolated from plants used in this study, because these plants, especially Gardenia, were well-known. 2. Simultaneous analysis was limited owing to the different properties of the index compounds
Direction For Citation	No special attention would be needed for citation of the results.
Supervisory Office	KFDA Human Exposure Assessment Division(☎ 380~1825)

총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 총괄연구개발과제의 목표

구 분	최종 연구개발 목표
총괄연구과제	1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 현삼 및 치자로 부터 활성물질 대량 분리 방법을 확립 2. 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 활성시험용 시료 제공 3. 현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명 4. 각종 기기분석 장비를 활용한 활성지표물질의 동시정량법 개발 5. HPLC 또는 LC-MS fingerprint의 작성 및 기원별, 산지별 확인법 확립
제1 세부과제	1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 현삼 및 치자로 부터 활성물질 대량 분리 방법을 확립 2. 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 효능검색용 시료 제공 3. 현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명
제2 세부과제	1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화 과학화를 위하여 치자 및 현삼으 로부터 활성물질의 분석방법을 확립 2. 패턴인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보 구축

◦ 연구배경, 목적 및 필요성

- 한약재의 오용 및 저질 한약재 유통에 따른 부작용 발생 근절을 위하여 유효성분 중심의 한약재 기준규격 설정으로 품질 및 안전성, 유효성 확보 필요
- 한약재는 기원별, 산지별로 다양한 성분을 함유하고 있어 현행 1종의 지표성분으로 평가하는데 한계가 있으므로 다성분 다변량 분석 등으로 전환 필요
- 한약재 생리활성성분의 동시분석 및 효능확인연구를 위한 생리활성성분 제공 및 정량용 표준품 대량확보 필요
- 2002년 식약청이 의약품 안전성, 유효성 심사규정 개정을 통해서 화학성 분야 위주로 되어 있던 심사 규정을 천연물 신약에 적합하도록 완화하였으며 이런 제도적 장치 아래서 의약품 개발에 있어서 우리나라 보다 훨씬 뒤떨어졌던 중국이 다양한 한약 제품으로 미국시장에서 막대한 매출을 올리고 있음을 교훈삼아 한약재의 국제화, 표준화를 통하여 세계 시장을 상대로 의약품 개발에 나설 필요가 있음

1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

연구개발목표	연구목표의 달성도	기여도
<ul style="list-style-type: none"> 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 현삼 및 치자로부터 활성물질 분리 방법을 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 분리방법을 사용하여 현삼에서 16종, 치자에서 20종의 성분을 분리, 정제하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> 성분분획으로부터 다양한 구조의 성분을 분리, 정제는 방법을 확립.
<ul style="list-style-type: none"> 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 활성시험용 시료 제공 	<ul style="list-style-type: none"> 현삼 지표성분 3종과 치자 지표성분 4종을 다량 분리하였으며 표준품으로 식약청에 제공할 예정임 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> 다량의 표준품을 제공함으로써 향후 생약의 규격화에 활용
<ul style="list-style-type: none"> 현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 현삼에서 신규성분 6종을 분리하고 구조를 규명하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> 신규성분의 분리 및 구조규명으로 국제저널에 논문 발표 가능
<ul style="list-style-type: none"> 치자와 현삼 중 활성성분의 동시분석법 확립 및 validation 완성 LC-MS/MS에 의한 분석 및 식약청 분석법 밸리데이션 가이드라인에 의한 분석법 타당성 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 최적 HPLC 조건을 확립하였음 (100%) 식약청 가이드라인에 의하여 현삼 및 치자의 표준품을 설정하고 분석법의 validation을 수행하여 분석법의 적합성을 입증하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 방법을 이용하여 생약 규격집, 또는 약전의 시험방법으로 이용할 수 있음 생약을 이용하여 건강기능식품, 천연물신약 등을 개발 시 기준으로 이용할 수 있음
<ul style="list-style-type: none"> 최적 추출방법 확립 및 산지별, 기원별 분석 직교배열법을 이용한 최적 추출조건 확립 및 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 직교배열법에 의하여 용매, 추출온도, 추출시간, 용매의 양 등의 최적 추출조건을 확립하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> 동 생약의 산업화 시 QC 방법 등으로 이용될 수 있으며, 유효성분의 최적 추출방법으로 이용할 수 있음
<ul style="list-style-type: none"> 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 치자 및 현삼의 chemical fingerprint 또는 chemomatrix에 의한 기원별, 산지별 분석 	<ul style="list-style-type: none"> PCA 및 HClustering에 의하여 치자 및 현삼 중의 성분 peak들을 이용하여 산지를 구별할 수 있는가 검토하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> 수출입관리, 원산지 관리 등에 이용할 수 있음

1.3 국내·외 기술개발 현황

1. 외국의 기술개발 현황

- 최근 유전체 연구가 활성화됨에 따라 생체기능 조절물질로서 천연물의 효능 및 기능성은 그 활용 범위가 점차 확대될 전망이다. 이에 부응하여 미국은 국립암연구소(NCI), Schering-Plough 등 국립연구기관과 제약회사에서는 새로운 천연물 확보, library화 및 약리활성 평가 등에 지속적인 투자를 하고 있으며 특히, 최근에는 포스트게놈 시대의 기반이 되는 주요기술인 유전체학(Genomics), 단백질체학(Proteomics), 화학유전체학(Chemical genomics), 생물정보학(Bioinformatics) 및 Nano-biotech의 접목과 신약개발기술로서 조합화학(Combinational chemistry), 고효율탐색(High

Throughput Screening, HTS), 선도물질 최적화, 후보물질도출기술 등과 연계하여 천연물로부터 신규 의약품 및 기능성 제품의 개발에 역점을 두고 있음

- 천연물 중, 식물 추출 의약품은 테르펜, 배당체, 알칼로이드 및 기타 성분군 등 4가지 계열로 대별되어지며, 이들 가운데 taxol이 속해 있는 테르펜계(terpens)가 향후 가장 큰 성장률을 보일 것으로 기대되는 화합물군임. 배당체 역시 큰 시장으로 형성하고 있으며 테르펜계의 뒤를 잇고 있음. 식물추출물 유래 의약품 중 현재 단일처방 의약으로서 판매효과를 보고 있는 것은 taxoids와 camptothecins 계열이 대부분이며 이외에도 해양천연물 유래의 천연물 의약품과 화장품에 대한 연구개발이 활발하게 진행되고 있고, 해양에서 7,000여종 이상의 생리활성물질들이 발견된 바 있고 이들을 이용한 제품 개발이 이루어지고 있음

2. 국내의 기술개발 현황

- 천연물 의약산업 분야에서 선발주자인 상기 국가들에 비해 뒤늦은 감은 있으나 우리나라도 천연물을 이용한 신약연구와 개발결과의 산업화 촉진을 위하여 2000년 ‘천연물신약연구개발촉진법’을 제정하고, 이 제정에 발맞추어 2002년 8월 천연물 신약의 신속허가 및 시판 후 임상제도의 도입, 한약서 처방의 응용기준 마련 등의 내용을 담고 있는 ‘의약품 등의 안전성 유효성 심사에 관한 규정’을 마련하여 천연물 의약의 산업화 촉진을 위한 제도적 기반 조성을 마련하였음
- 또한 2003년 3월 생약제제 전문 제약기업과 바이오벤처로 구성된 ‘천연물신약/한약제제 개발센터’가 설립되는 등 천연물 의약 개발을 지향하기 위한 여건이 지속적으로 확충되고 있음.
- 이에 부응하여 한국 특허청에서도 국내 및 해외에서 급증하고 있는 천연물 의약분야에 대한 발명에 대하여, 천연물 의약에 대한 기존 관례에 근거한 구체적인 의약분야 심사기준을 개정하였을 뿐만 아니라 특허청 내에 전통의약과 관련된 「유전자원 및 전통지식에 관한 협의체」를 구성하여 심도 있게 해당 분야의 국제동향에 귀 기울이고 있으며('02. 3), 「전통 의약 관련 전통지식 현황조사 및 지적권 관련 연구」와 같은 책자를 발행하여 ('02. 11), 해당 분야에 대한 관심과 홍보를 확대해 나아가고 있음
- 우리나라는 전통의약 지식분야에서 외국에 비해 상대적 우위를 확보함에도 불구하고 다양한 생약, 한약이 복합적으로 작용하는 천연물 신약을 단일성분 위주로 된 화학성분 의약의 허가 기준으로 묶어왔던 과거 제도 때문에 독일이나 미국, 중국에 상대적으로 밀리기도 하고 훨씬 다양한 제품들이 개발되어 국내로 역수입되곤 하였음. 그러나 앞에서 언급한 바와 같이 2002년 식약청이 의약품 안전성, 유효성 심사규정 개정을 통해서 화학성 분야 위주로 되어 있던 심사 규정을 천연물 신약에 적합하도록 완화하였으며 이런 제도적 장치 아래서 의약품 개발에 있어서 우리나라 보다 훨씬 뒤떨어졌던 중국이 다양한 한약 제품으로 미국시장에서 수천억 원의 매출을 올리고 있음을 교훈 삼아 한약재의 국제화, 표준화를 통하여 세계 시장을 상대로 의약품 개발에 나설 필요가 있음

3. 산지 혹은 환경에 따른 생약 중 유효함량 변이와 관련된 연구

- 생약 및 생약의 조합으로부터 이루어지는 한방약은 금후 점점 중요한 의약품이 될 것으로 생각되 어지나 생약은 달인 후의 대량의 추출액을 보면 알 수 있듯이 대부분은 약효와 관계없는 식물의 조직 등이어서 유효성분은 생약의 극히 일부에 지나지 않음
- 그러나 천연물이기 때문에 유효성분의 양이 여러 가지 조건에 의해 변한다는 데 문제점이 있음. 이 점에 주의를 기울여 항상 일정한 품질의 생약을 원료에 이용하지 않으면 치료의 정도에 차기 생기게 되며 생약의 신용이 없어지게 되므로 생약의 기원은 물론 그 안에 함유된 화합물의 조성 및 함량도 일정하게 유지될 것이 요구됨
- 생약의 품질 (성분의 종류와 양)에 영향을 미치는 요인으로서 동일명의 생약에 기원이 다른 식물 (종)을 사용한다든지, 종 내의 성분변이 (개체차, 생육지), 채집시기 등에 의해 다름. 그 외에도 식물의 부위

- 에 의한 차이, 식물의 연령에 의한 차이, 가공법 (수치)에 의한 차이, 보존 중의 변화가 생각될 수 있음
- 동일명 생약으로 기원이 다른 종을 사용하는 예
 - 갈근 (한) *Pueraria lobata* / (일) *Pueraria lobata* / (중) *Pueraria. thomsonii*
 - 당귀 (한) *Angelica gigas* / (일) *Angelica actiloba* / (중) *Angelica sinensis*
 - 백출 (한, 일) *Atractylodes japonica* / (중) *Atractilodes macrocephala*
- 동일종 내의 성분변이 (개체차, 생육지)
 - 식물은 같은 종 중에서도 형태학적인 변이가 있을 뿐 아니라 성분에도 변화가 있음
 - 유럽의 동북부에 생산되는 것은 청산배당체의 양이 적고 서남쪽으로 갈수록 증가하는 경향 보임
- 채집시기에 의한 차이
 - 감귤 과피중의 flavonoid heperidin과 naringin의 함량을 조사한 결과 계절변화의 경향은 매우 큰 것을 알 수 있음
- 식물의 연령에 의한 차이
 - 식물성분은 연령에 따라 변화하며 일례로 인삼은 5-6년에 수확하는 것이 과종 후 2-3년의 인삼보다 사포닌 함량은 매우 낮은 것으로 알려져 있음. 일반적으로 약용식물의 유효성분으로 되어 있는 소위 2차대사산물의 축적에는 식물의 성숙과 일정기간이 필요하나 해를 경과하면 좋다고 할 수는 없고 모두 채집 적기가 있음
- 가공 (수치)에 의한 변화
 - 생약에 특수한 가공을 하는 것을 수치라고 하는데 이는 생약의 품질을 높이거나 부작용을 감하기도 하며 경우에 따라서는 약효를 변화시키는 등의 중요한 처리임. 수치는 성분의 변화를 동반하는 것으로 생약의 품질, 약효를 생각할 때 매우 중요하며 예를 들어 감초의 경우는 온풍건조가 천일건조보다 사포닌함량은 높으나 이것은 신속한 건조에 의해 사포닌의 가수분해가 진행되지 않았기 때문으로 생각됨. 이와 같은 결과는 배당체를 함유하는 생약을 건조할 때는 신속하게 처리하는 것이 좋다는 것을 나타내고 있음. 다음 그림은 대황의 건조법에 따른 유리 안트라퀴논의 함량 변화를 나타내고 있는데 음건상태로 자연건조한 것은 함량이 낮으나 동결후 건조한 것은 매우 높은 것을 볼 수 있으며 이와 같이 가공법에 따라 생약의 성분함량이 변화하므로 가공에 대한 철저한 관리가 필요할 것임
- 보존 중의 변화
 - 생약중에는 六陳으로 불리워 오래된 것이 좋다고 하는 낭독, 반하, 오수유, 진피, 지실, 마황이 있으며 대황도 오래된 것이 좋다고 하기는 하나 일반적으로 생약은 신선한 것이 좋음. 특히 정유를 함유하는 것은 정유가 오래되면 휘산이 되기 때문에 가능한 신선한 것을 사용하는 것이 좋으며 보존기간에 대한 고려는 국산품 뿐 아니라 수입품에 대하여도 철저한 관리가 필요한 부분임
- 생약이 약효를 나타내는 것은 그 중에 함유된 유효성분 때문으로 그 양을 재는 것에 의해 품질평가가 가능함. 그러나 여기에 문제가 있어 약효를 단일 성분, 또는 성분 그룹으로 설명 가능한 생약은 거의 없으며 한방제제의 경우가 되면 더욱 불가능해 짐. 마황의 ephedrine과 pseudoephedrine, 황련, 황백의 berberine, 진피, 청피, 지실, 지각의 synephrine, 감초의 glycyrrhizin, 원지, 길경의 사포닌류, 대황의 anthrone 유도체와 anthraquinone 유도체, 목단피의 paeonol 등은 거의 그 생약의 서양의학에 의한 약효를 대표하고 있으나 한방적인 약효를 설명할 수 있는 것은 거의 없어 앞으로 한방의 과학화와 성분함량과의 상관관계 설정에는 많은 노력을 기울일 필요가 있음.
- 천연물 중, 식물 추출 의약품은 테르펜, 배당체, 알카로이드 및 기타 성분군, 4가지 계열로 대별되어지며, 이들 가운데 Taxol이 속해 있는 테르펜계(Terpens)가 향후 가장 큰 성장률을 보일 것으로 기대되는 화합물군임. 배당체 역시 큰 시장으로 형성하고 있으며 테르펜계의 뒤를 잇고 있음. 식물 추출물 유래 의약품 중 현재 단일처방 의약으로서 판매효과를 보고 있는 것은 Taxoids와

Camptothecins 계열이 대부분이며 이외에도 해양천연물 유래의 천연물 의약품과 화장품에 대한 연구개발이 활발하게 진행되고 있고, 해양에서 7,000여종 이상의 생리활성물질들이 발견된 바 있고 이들을 이용한 제품 개발이 이루어지고 있음

4 . Chemometrics의 중요성과 관련연구

- Chemometrics 란?

Chemometrics 기술은 분석화학의 한 분야로 1970년대에 태동된 것으로, 화학실험에서 얻은 데이터로부터 통계학적, 수학적 모형을 통하여 중요한 화학적 정보를 추출하는 기술이며 그 응용 범위가 제약, 의약, 식품, 환경, 정유산업, 고분자, 생명과학 등으로 다양해짐에 따라 독자적인 분야로 부상하고 있음. 특정한 물질, 원료, 제품의 성분을 분석하는데 직접적으로 고가의 분석장비(chromatograph 등)를 사용하는 대신에 비교적 간단한 장비인 FTIR (Fourier transform infra-red), NIR(near infra-red), NMR (nuclear magnetic resonance)등의 데이터를 Chemometrics 기술을 이용하여 분석함으로써 빠른 시간 내에 비파괴분석이 가능함. 따라서 이 기술의 핵심은 정확한 성분예측을 위한 모델의 개발이라 할 수 있음. 또한 Chemometrics 기술은 신속하고 정확한 소재성분의 예측을 가능하게 하므로 품질향상과 생산성 향상의 효과를 제공하는 환경 친화적 분석 기술임. (출처: 스펙트론 테크)

- Chemometrics 의 중요성

Chemometrics 와 같은 계측소프트웨어기술은 산업체의 생산품질 모니터링, 농축산물의 품질평가, 식품가공산업, 재료산업, 정유산업, 생명과학, 의학, 제약분야 등 화학적 물성분석이 필요한 전 분야에 걸쳐 응용되는 기술임. 특히 생약과 같이 다양한 종류의 화합물을 함유하고 있는 경우 Chemometrics 기술을 응용 시, 품질관리 및 평가에 유용하게 이용될 수 있음. (출처: 스펙트론 테크)

- Chemometrics 기술개발의 중요성

분광법의 최대 약점은 그 결과로 도출되는 스펙트럼의 해석이 어렵다는 점임. 특히 물성이 복잡하거나 측정하고자 하는 물성이외의 불순물(noise)이 들어있는 경우 더욱 해석을 어려움. 보통의 경우 단순한 모델로는 성분 해석 및 예측이 곤란하며 복잡한 모델의 개발이 요구됨. 따라서 예측력이 우수한 Chemometrics의 개발이 계측산업 또는 Chemometrics 기술의 핵심이라 할 수 있음. (출처: 스펙트론테크)

5 . Fingerprint technique의 중요성

- 전통생약을 포함하는 대체약물의 사용 급증에 따라 이들의 일관성, identity 및 진위여부를 가리기 위해 혼합약제의 품질을 평가하는 것이 매우 중요한 과제로 대두되었음. 최근 chromatographic fingerprint technique은 생약의 품질관리를 위한 좀 더 의미있는 방법으로서 많은 사람들의 관심을 끌고 있는데, 그 이유는 fingerprint technique이 시료의 체계적인 특성에 강조를 둔 방법일 뿐 아니라, 식물의 안전성을 확보하고, 식물의 동정까지 행할 수 있는 방법이기 때문임. 특히 생약은 매우 복잡한 화합물로 이루어진 혼합물로 구성되어 있으며 그들의 치료효과나 독성은 이러한 많은 구성성분의 synergic effect에 의한 것이 많아 생약 중 포함되어 있는 한두 가지의 화합물이 생약의 질을 대표하기에는 어려운 측면이 있기 때문이기도 함.
- Fingerprint analysis는 생약의 품질평가를 위한 전략으로서 WHO에서 도입하였으며, 인정되고 있는 방법임. 그 뿐 아니라 WHO (2000), EMA (2001) 등을 비롯하여 중국에서는 전통의약으로부터 만들어진 주사제를 표준화하기 위한 방법으로 이 technique을 요구하고 있는 실정임.
- Fingerprint를 포함하는 chromatographic method로서는 TLC, HPLC, X-ray, CE 등이 있으며 그 중에서도 HPLC가 그 장점과 보편성으로 인하여 최선의 방법으로 여겨지고 있음.

Chromatographic fingerprint 후에는 identity, 진위여부, 일관성이 chemometrics를 이용한 시료의 fingerprint를 비교함으로써 결정될 수 있음.

- 한편 LC-ESI-MSⁿ은 현재 가능한 방법 중 가장 강력한 분석방법으로 대두되고 있으며, 그 장점들 중에서도 LC-ESI-MSⁿ는 높은 감도와 선택성을 제공한다는 것임. 따라서 이 방법은 복잡한 혼합물을 분석하는 데 널리 사용되고 있음.

제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1 연구개발 내용

1. 제1세부과제

치자 및 현삼으로부터 활성지표성분의 분리, 구조동정 또는 구조규명

- 추출물의 제조
- 활성 성분의 분리
- 화합물의 순도검정
- 화합물의 구조동정

2. 제2세부과제

- 활성성분 분석을 위한 산지별 치자, 현삼의 수집
 - 현삼/치자의 대조생약 및 산지별 생약재의 확보 (각 20 시료 이상)
- 최적 분석 방법의 검토 및 validation
 - HPLC를 이용한 최적 분석방법의 검토
 - 확립된 분석법의 validation
- 최적 분석 전처리 조건의 확립
 - 분석 전처리를 위한 최적 조건 및 분석 최적조건 확립 (직교배열법 이용)
- Fingerprint의 작성
 - HPLC chromatogram에 의한 fingerprint standardization
- Chemometrics에 의한 원산지 판별
 - PCA 등에 의한 원산지 판별 가능 검토

2.2 연구 방법

1. 제1세부과제

■ 추출물의 제조

- 현삼 및 치자의 추출물 제조는 기존 연구에서 얻은 경험을 바탕으로 70% 에탄올을 이용하여 수 욕상에서 환류추출한 다음, 잔사를 여과하고 여액을 회전 농축기를 이용하여 감압농축
- 대량추출 및 농축을 위하여 필요시에는 산업용 추출 농축기를 이용할 예정

■ 활성 성분의 분리

- 활성성분의 분리 역시, 기존 선행연구에서 얻은 결과를 바탕으로 하여 n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol 등의 유기용매를 이용하여 극성에 따라 순차적 분배 크로마토그래피를 행함
- 각 분획에 대하여 최적 분리조건을 TLC 등을 이용하여 결정하고 이 조건에 따라 실리카젤, 알루미나, Sephadex, Diaion HP, XAD-II 등을 이용하여 부분 정제함
- 상기 방법에 의하여 순수물질로 분리되지 않는 경우 RP-, Phenyl-, Diol-, Amide, Amine-HPLC 등 최적의 방법을 이용하여 정제

■ 화합물의 순도검정

- 분리된 화합물에 대하여는 PDA 및 ELSD를 이용한 동시 검출을 행하여 순도를 검정

■ 화합물의 구조동정

- 구조 동정에는 UV, FT-IR, EI- 및 FAB-MS, NMR, 2-D NMR 등의 기기분석을 이용하여 이들의 분석치를 문헌치와 비교하여 동정하거나 필요시 화학적 수식, CD/ORD, X-RAY 등의 기법을 병행
- 분리한 성분이 신규화합물일 경우, 추가적인 최신 기기분석법을 이용하여 구조를 규명

2. 제2세부과제

- 활성성분 분석을 위한 산지별 치자, 현삼의 수집
 - 식약청 제공 대조 생약 외 약 20여 종 이상씩의 현삼을 인터넷, 산지, 약령시 등을 통해 수집
- 최적 분석 방법의 검토
 - C18, 순상 등의 각종 고정상과 물 MeCN, HOAC, MeOH 등의 이동상 및 PDA, ELSD 등의 검출기를 조합한 최적 추출방법의 확립
- 최적 분석 전처리 조건의 확립
 - 분석 전처리를 위한 최적 추출용매, 용매/용질의 비, 추출시간 및 기타 전처리 조건을 확립
 - 최적이동상, 최적검출기, 최적 고정상 등 최적 분석조건을 확립
- Chemical fingerprint의 확립
 - HPLC fingerprint 구축: 산지별 시료에 대한 D/B 구축. HPLC용 software를 통한 library 구축
 - LC-MS/MS library 구축: 기존 library에 분리하여 얻은 화합물의 library를 구축
 - LC-MS/MS fingerprint DB의 구축
 - Fingerprint의 작성: LS-MS의 MS condition은 천연물에 주로 많이 이용되는 negative mode를 위주로 하며, positive mode와 비교하여 최선의 방법을 선택. Fragmentor voltage에 따라 각 성분 peak의 강도가 달라질 수 있으므로 최적의 조건을 검토하기 위하여 50, 150, 250 V 등으로 다양하게 측정. 기본적으로는 scan mode에서 MS fingerprint를 작성하며, 또한 높은 감도를 이용하기 위하여 SIM mode로도 fingerprint를 작성.
 - Fingerprint의 standardization: fingerprint analysis의 validation은 relative retention time (the ratio of peak rt of sample constituents to the reference standard)와 relative peak area (the ratio of peak area of sample constituents to the reference standard)로 함. Reference substance는 화합물 중 가장 안정하고 다른 화합물과 잘 분리되며, 쉽게 알아볼 수 있는 major compound로 함. 분석은 각 시료에 대하여 5반복을 실시하며 relative rt 및 area가 RSD가 3% 이내에 들도록 함. 또한 재현성 실험을 위하여 한 batch의 식물 추출물 5개를 준비하여 역시 각각의 RSD가 3% 이내에 들도록 함. 마지막으로 stability test를 위하여 각 시료를 24시간 후에 재분석하여 RSD가 3% 이내에 들도록 함. 이러한 오차 범위 내에 분석치가 들어갔을 때 이 실험방법은 유효한 것으로 인정하고 다른 시료에 적용. 상기에서 확립된 분석법을 이용하여 10-20 개의 동일 식물의 산지별 추출물중 공통적으로 나타나는 common peak를 이 식물의 fingerprint peak로 설정.
- Chemometrics에 의한 원산지 판별
 - LC fingerprint를 이용한 산지(기원) 구별: 산지별 생약의 구별은 표준화된 fingerprint를 이용하여 실시하며 principal component analysis (PCA)를 이용하여 처음 두 PC를 이용하여 score plot을 작성하여 산지(기원)을 판별 (RG Brereton, Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant, John Wiley & Sons, Chichester, 2003).

제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 제1세부과제

1. 추출물 및 분획의 제조

현삼 및 치자의 추출물 제조는 각 약재의 건조된 분말을 70% 에탄올로 수욕상에서 3시간, 2회 추출한 다음, 여과하고 여액을 감압농축하여 분석 및 효능검색용 시료로 함.

산지별로는 국내 또는 중국등지에서 시판되고 있는 현삼과 치자를 5종 이상 확보한 다음, DNA 감별 및 Biochip연구 등을 위하여 원생약을 각각 제공하였으며 분석과 효능검색을 위해서는 위와 동일한 방법으로 추출하여 추출물을 시료로 제공하였음.

활성성분을 분리하기 위한 전 단계로 분획을 실시하였는데 표준분획제조법에 따라서 각 약재의 methanol 추출물을 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH의 순으로 순차 분획화하였음.

2. 활성성분의 분리, 정제 및 구조

각종 chromatography(순상 및 역상 column, prep. HPLC, prep. TLC 등)를 이용하여 성분을 분리, 정제하였음. 분리한 성분의 구조를 확인하기 위하여 기기분석(¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-/ESI-/FAB-MS, FT-IR, UV 등)을 실시하였으며 물리특성을 측정하여 문헌치[1-17]와 대조하거나 화학적 수식 등을 이용하여 치자에서 총 20개, 현삼에서 총 16개의 성분을 분리하고 구조를 확인하였음.

이 가운데 현삼에서 신규성분 6개 (aucubin, sinuatomol, angoroside C, acteoside, β-sitosterol, daucosterol)를 처음으로 분리하고 구조를 동정하였음.

화합물 종류	현삼	치자
iridoid and its glycosides	5	8
steroid, triterpenoid	2	3
flavonoids	-	3
carotenoid and its glycosides	-	2
phenolics	1	3
cinnamic acid and its derivatives	8	-
기타	-	1
합계	16	20

가. 현삼의 산지별 약재의 70% 에탄올엑스 수율 및 제공량

시료번호	산지		수집처	형태	수율(%)	제공량
<i>Scrophularia buergeriana</i> (기본 생약)	국산	경북 안동	2006년산	전형	40.4	사업단과 분석팀 각 10g 제공
<i>Scrophularia buergeriana</i>	국산	경북 안동	서울시장	음편	44.0	사업단에 각 3g 제공
<i>Scrophularia buergeriana</i>	국산	경북 안동	영천시장	음편	37.1	
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	중국	-	서녕시장	음편	39.6	
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	중국	하북성	안국시장	음편	38.6	
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	중국	하남성	서울시장H	음편	33.2	

나. 치자의 산지별 약재의 70% 에탄올엑스 수율 및 제공량

시료번호	산지		수집처	형태	수율(%)	제공량
<i>Gardenia jasminoides</i> (기본생약)	중국	운남성	-	전형	18.5	사업단과 분석팀 각 10g 제공
<i>Gardenia jasminoides</i> or <i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	국산	전남 완도	영천시장	음편	15.4	사업단에 각 3g 제공
<i>Gardenia jasminoides</i> or <i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	국산	전남 순천	서울시장	음편	15.8	
<i>Gardenia jasminoides</i>	중국	강서성	안국시장	전형	20.8	
<i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	중국	-	상해시장	전형	17.4	
<i>Gardenia jasminoides</i>	중국	-	울산시장	전형	15.0	
<i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	국산	-	울산시장	음편	13.2	

다. 현삼의 성분 분리량, 순도, 사업단 제공량 및 식약청 제공량

No	성분명	순도		분리량 (mg)	제공량(mg)	
		UV	ELSD		사업단	식약청
1	<i>E</i> -harpagoside*	99.9		2,150	43.4	2,100
2	harpagide		99	37	8.7	20
3	8- <i>O-E-p</i> -methoxycinnamoylharpagide		99	25	8.1	10
4	aucubin		99	25	9.1	5
5	sinuatol		99.4	11	0	5
6	cinnamic acid	96		230	61.4	150
7	<i>p</i> -coumaric acid		98	350	245.4	100
8	<i>p</i> -methoxycinnamic acid methyl ester*	99		3,320	8.9	3,300
9	caffeic acid	96		260	39.3	210
10	ferulic acid	98		355	33.7	310
11	<i>p</i> -methoxycinnamic acid*	96		3,470	59.6	3,400
12	buergeriside C ₁		81	6.7	0	3
13	angoroside C		92.5	12	0	5
14	acteoside	92.9		32	0	21
15	β -sitosterol		92	15	5	5
16	daucoesterol		99(RI)	15	0	7

*: 지표성분

라. 치자의 성분 분리량, 순도, 사업단 제공량 및 식약청 제공량

No	성분명	순도		분리량 (mg)	제공량(mg)	
		UV	ELSD		사업단	식약청
1	geniposide*	97		2,650	34.2	2,600
2	geniposidic acid*	91		550	45.2	480
3	gardenoside		97	52	5	25
4	shanzhiside		99	31	5	17
5	gardoside	92.3		17	0	5
6	genipin gentiobioside		92.6	15	0	5
7	6β-hydroxygeniposide		99.9	11	0	0
8	genipin*	99		5,500	2,450	3,000
9	crocin		90	2,500	2,102	500
10	crocetin	99		50	20	25
11	rutin	98		600	475	100
12	quercetin		85	450	50	300
13	isoquercitrin		91	20	5.0	10
14	ursolic acid		98	700	552	100
15	stigmasterol	93		260	158.5	60
16	β-sitosterol		92	20	5.0	10
17	protocatechuic acid	98		250	100	100
18	caffeic acid		83	260	100	100
19	chlorogenic acid*	91		3,500	192	3,000
20	picrocrocinic acid		99	15	5	5

*: 지표성분

3.2 제2세부과제

1. 치자

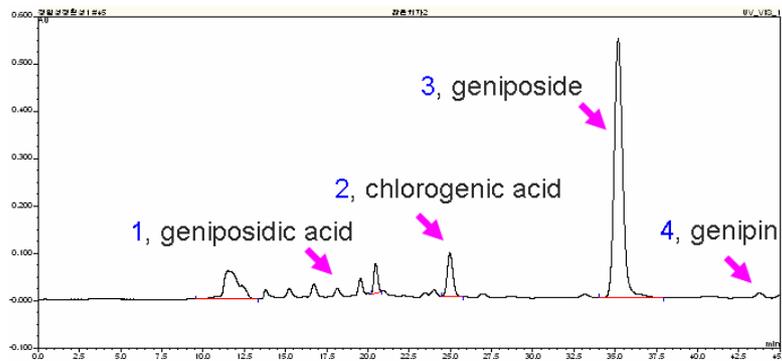
가. 시료의 산지별 수집

- 생약감별팀에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 13 종, 총 27종의 시료를 확보하였음.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Agilent Eclipse XDB- C18(4.6 × 250 mm, 5 μm) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리 조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 254 nm에서 검출하는 것이 치자 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음.
- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 치자의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 치자의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide 및 genipin의 4종을 선정하였음.



2) 치자 표준품의 validation

가) Sample 및 표준액의 조제

- Geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide 그리고 genipin 각각 1.0 mg을 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 1 mL에 녹이고 이것을 stock solution으로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였음. 각각의 표준용액 10 μL를 HPLC로 분석하여 Chromatogram의 면적을 구하고 농도와 면적에 따른 검량선을 작성하여 함량계산을 실시하였음.
- 26종의 치자를 최적 추출조건으로 추출한 후 농축한 추출물을 각각 20.0 mg으로 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 용액 1 ml로 녹인 다음 0.45 syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였음. 각각의 검액을 10 μL씩 3회 반복하여 HPLC로 분석하여 함량을 계산하였음.

나) 표준품의 순도 검정

- 각 표준품의 순도는 geniposidic acid가 91.20±0.16%, chlorogenic acid가 99.86±0.07%, geniposide가 97.52±0.13%, genipin이 92.06±0.10%이었음.

다) 표준품의 안정성

- 표준품 4종을 1일, 7일, 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99-101% 수준으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수가 있었음.

라) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 위의 네 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 0.1 µg - 50 µg으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음.

마) Repeatability

- 각 성분의 면적값을 내부표준물질의 면적값으로 나눈 면적값 비율과 머무름시간(retention time)에 대하여 재현성을 수행하였음. 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.5-1.1%내의 양호한 값으로 나타났음.

바) Precision and Accuracy

- 각 지표성분 분석에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복실험을 하였음. 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였음.
- 그 결과 CV(%)는 0.22%-5.72%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 86.8%-105.3%사이에 나타나 양호한 정밀성과 정확성을 나타내었음

사) Robustness

- 이동상 용매 2종 중에 acetic acid가 1%씩 첨가되어 있으므로 acetic acid의 농도 변화에 따른 retention time의 변화를 확인 하였음. 그 결과 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않았음.
- Column별, column 온도별과의 완건성을 비교해본 결과 Accuracy가 97%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있음.

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- Soxhlet, 환류 및 초음파추출을 행한 결과, geniposide의 경우 Soxhlet추출이 가장 높은 추출효과를 나타내었으나 그 이외의 다른 지표물질 즉, geniposidic acid, chlorogenic acid, genipin의 경우는 거의 추출되지 않았음. 따라서 geniposide만을 지표성분으로 할 경우는 Soxhlet 추출을, 기타 다른 지표성분을 함께 정량하기 위해서는 환류추출 (reflux)이 가장 좋은 방법인 것으로 판단 되었음.

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 각종 조건들에 의하여 추출된 치자 중의 지표성분 함량을 계산한 결과 지표성분의 추출은 치자 1 g을 200 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 70°C에서 추출하는 것이 최적인 것으로 판단 하였음.

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 치자 지표성분의 TLC pattern 분석

- 치자 지표성분 및 추출물에 대한 TLC 조건을 검토하였으나 순상 TLC에서는 화합물의 분리가 거의 일어나지 않았음.
- 시도한 방법 중 3종의 지표성분 및 치자 추출물에 대한 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이 때의 TLC chromatogram과 용매 조건은 ACN : MeOH : H₂O : Formic acid = 15:20:64:1. A= Chlorogenic acid, B= Geniposide, C= Geniposidic acid, S= 치자 추출물. Merck RP-18 precoated TLC plate. Visualization: UV254 nm & 10% Sulfuric acid와 같음.
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 치자의 TLC pattern을 비교하여 보았으나 TLC pattern으로는 지역간의 차이를 인정하기 어려웠음.

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 생약감별팀으로부터 받은 6종의 대조 생약이 나타내는 HPLC에서의 각 peak들의 평균을 기준으로 잡은 후 본 연구에서 선정된 표준품을 포함하여 총 10개의 peak area를 통계프로그램의 변수로 사용하였음. 또한 이 peak 10개를 사용하여 H-cluster 및 주성분분석인 PCA를 통해 군집을 나누고자 하였음.

나) H-cluster (군집분석)

- 확보된 생약시료를 H-cluster를 통해 분석한 결과 몇 개의 군집을 나눌 수 있었음. 이 경우 전남지역의 치자는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있었으나 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았음.

다) PCA 분석

- PAC 분석을 수행한 결과 H-cluster와 비슷한 패턴을 나타내었는데, 전남지역의 치자는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있었음. 하지만 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았음. 또한 치자 및 꽃치자에 대한 DNA 감별 결과와 PCA 및 H-clustering의 결과를 연결할 수 있는 개연성은 보이지 않았음.

바. 치자 중 지표성분의 함량

- 26개의 치자시료 중의 지표성분의 함량의 평균은 geniposide의 전체 평균은 0.106±0.046 mg/g, chlorogenic acid는 2.201±1.269, geniposide는 10.956±2.020, genipin은 0.133±0.144이었음.
- 따라서 치자의 품질 평가는 각 성분의 함유량이 전체평균±10-20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

2. 현삼

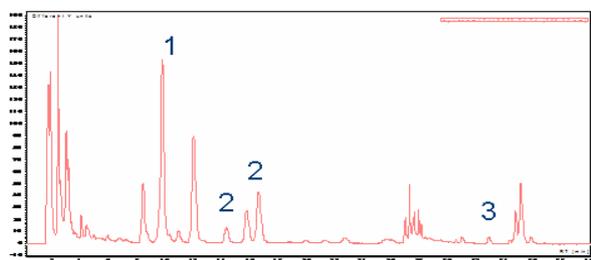
가. 시료의 산지별 수집

- 생약감별팀에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 12종, 총 26종의 시료를 확보하였음.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Agilent Eclipse XCB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세토니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 296 nm에서 검출하는 것이 현삼 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음.
- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 현삼의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 현삼의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 (*E*)-Harpagoside, (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid 및 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester의 3종을 선정하였음. 한편 trans 형태로 제공받은 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid의 경우는 두 개의 피크로 나타나는데 이것은 분리후 수 분 내에 cis 형태로 일부가 전환되기 때문인 것으로 추측됨. 따라서 잠정적으로 cis와 trans의 합을 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid의 함량으로 하였음.



1. (*E*)-Harpagoside
2. (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid
3. (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester

Peak No. 2 [(*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid] might rapidly inter-convert into cis and trans forms, therefore the sum of two peaks were considered as (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid content.

2) 현삼 표준품의 validation

가) Sample 및 표준액의 조제

- (*E*)-Harpagoside, (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid 및 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester 각각 1.0 mg을 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 1 mL에 녹이고 이것을 stock solution으로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였음. 각각의 표준용액 10 μL를 HPLC로 분석하여 Chromatogram에서의 peak의 면적을 구하고 농도와 면적을 함수로 하는 검량선을 작성하여 함량계산을 실시하였음.
- 26종의 현삼을 최적 추출조건으로 추출한 후 농축한 추출물을 각각 20.0 mg으로 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 용액 1 mL로 녹인 다음 0.45 syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용

하였음. 각각의 검액을 10 μ L씩 3회 반복하여 HPLC로 분석하여 함량을 계산하였음.

나) 표준품의 순도 검정

- 3종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였음. 표준품의 순도는 각각 (*E*)-harpagoside : 순도 96.77%, (*E*)-*p*-methoxy cinnamic acid : 순도 99.53%, *p*-methoxycinnamic acid methyl ester : 순도 99.96%로 양호하게 나타났음.

다) 표준품의 안정성

- 표준품 3종을 1일, 7일 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99% 이상으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는 것을 알 수가 있었음.

라) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 세 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 10 μ g - 1000 μ g으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었음. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음.

마) Repeatability

- 각 성분의 면적값을 내부표준물질의 면적값으로 나눈 면적값 비율과 머무름시간(retention time)에 대하여 재현성 test를 수행하였음. 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.10-1.26%내의 값으로 나타났으며, 이들은 모두 인정할 수 있는 범위에 있는 것으로 판단하였음.

바) Precision and Accuracy

- 선정된 3종의 지표성분에 대하여 확립한 분석법에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3회 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위해서는 3일간 반복실험을 수행하였음. 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 peak 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 peak 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였음. 이 때 각 지표성분의 CV(%)는 0.26%-6.3%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 92.0%-108.6%사이로 비교적 양호한 값을 나타내었음.

사) Robustness

- 이동상 용매 2종 중에 acetic acid가 1%씩 첨가되어 있으므로 acetic acid의 농도 변화에 따른 retention time의 변화를 확인하였음. 그 결과 아래의 표와 같이 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않게 나타났음.
- Column별, column 온도별과의 완전성을 비교해본 결과 상온에서 50 $^{\circ}$ C까지는 accuracy가 94%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있었음.

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- 현삼의 최적 추출조건을 확립하기 위하여 Soxhlet, reflux 및 초음파 등 3가지 추출법으로 추출 한 결과, 지표성분 3 (*p*-methoxycinnamic methyl ester)의 경우는 큰 차이가 없었으나 지표성분 1 [(*E*)-harpagoside], 2 ((*E*)-*p*-methoxycinnamic acid)의 경우 soxhlet 추출법이 sonication 추출법 보다 1.5배 가까이 높은 수율을 내는 것을 확인하였음. 따라서 Soxhlet 추출법이 가장 적합한 것으로 판단되었으나 경제성이나 장비의 복잡함 등을 고려하여 환류추출을 선택하였음.

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 현삼의 최적 추출용매와 시간, 용매와 용질 양을 찾기위해 직교배열표를 이용하여 함량을 분석해 본 결과, 현삼 3 g을 50 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하였음.

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 현삼 지표성분의 TLC pattern 분석

- 시도한 방법 중 3종의 지표성분 및 현삼 추출물에 대한 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이 때의 용매 조건은 MeCN:MeOH: H₂O:Formic acid = 45:20:35:1 비율로 하였을 때 화합물의 분리가 가장 양호하게 나타났음
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 현삼의 TLC pattern을 비교하여 보았을 때 TLC pattern 상에서도 (*E*)-harpagoside의 함량이 지역간 눈에 띄게 다른 것을 알 수 있었음.

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 생약감별팀에서 제공한 현삼 6종의 평균을 기준 잡은 후 표준품 peak 3개와 미지의 peak 7개를 합한 10개의 peak를 선택하여 각종 통계프로그램의 변수로 사용하였음.

나) H-cluster (군집분석)

- H-cluster을 통해 두개의 군집을 나눌 수 있었다. 중국산과 국산의 경계가 확연히 나타나는 것을 알 수가 있음. 하지만 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있음.

다) PCA

- PAC(주성분분석)을 통해 두 개의 군집을 나눌 수 있었으며 그 결과 H-cluster와 비슷하게 나뉜 것을 알 수가 있다. 하지만 H-cluster결과와 같이 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있음.

라) Princomp 분석

- PrinComp 분석 결과, PCA에서 두 개의 군집이 형성되는 주된 이유는 현삼의 주 성분인 (*E*)-harpagoside 와 (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid에 의해 나뉘는 것으로 생각되어짐.

마. 현삼 중 지표성분의 함량

- 각 지역에서 수집한 현삼 중 함유된 표준품 3종의 함량을 구한 결과 국산 현삼의 경우 중국산 현삼에 비해 표준품의 함량이 모두 높게 나타났음. (*E*)-harpagoside의 경우 국산 현삼이 중국산 현삼보다 평균 3배가량 높게 나타나 국산현삼의 대표적인 기준물질로써 사용할 수 있을 것으로 판단됨.

(Table 1. Average contents standard compounds in *S. Radix*.)

	Contents (mg/g)		
	(<i>E</i>)-Harpagoside	(<i>E</i>)- <i>p</i> -Methoxycinnamic acid	<i>p</i> -Methoxycinnamic acid methyl ester
Korea	3.349 ± 1.947	1.482 ± 0.851	0.038 ± 0.014
China	1.254 ± 0.900	0.482 ± 0.245	-
Average	2.302 ± 1.481	0.982 ± 0.706	-

- 상기 결과를 토대로 하여 현삼의 품질 평가시 각 성분의 함유량이 전체평균±10-20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1 제1세부과제

1. 추출물의 제조

- 현삼은 국산 생약 3종과 중국산 생약 3종에 대하여 70% 에탄올 추출물을 제조하였음.
치자의 경우에는 국산 3종과 중국산 4종에 대하여 70% 에탄올 추출물을 제조하였음.
- 성분분리를 위해서 methanol로 추출하여 다량의 추출물을 얻는 방법을 사용하였음.

2. 분획의 제조

- 현삼과 치자의 기본생약에 대하여 염화메틸렌 분획, 에틸아세테이트 분획, 부탄올 분획을 제조하였으며 각 분획으로부터 성분을 분리하였음.

3. 활성 성분의 분리

- 각종 chromatography 법을 시행하였으며 각 분획에 대하여 최적 분리조건을 TLC 등을 이용하여 결정하고 이 조건에 따라 실리카젤, 알루미나, Sephadex, Diaion HP, XAD-II 등을 이용하여 정제하였음.
- 상기 방법에 의하여 순수물질로 분리되지 않는 경우 RP-, Phenyl-, Diol-, Amide, Amine-HPLC 등 최적의 방법을 이용하여 정제하였음.
- 이상의 방법으로 현삼 16종, 치자 20종을 순수하게 분리하여 표준품으로 제공하였음.
이 가운데 현삼에서 신규성분 6개 (aucubin, sinuatol, angoroside C, acteoside, β -sitosterol, daucosterol)를 처음으로 분리하고 구조를 동정하였음.

4. 화합물의 순도검정

- 분리된 화합물에 대하여는 UV 및 ELSD를 이용한 동시 검출을 행하여 순도를 검정하였음.

5. 화합물의 구조동정

- 구조 동정에는 UV, FT-IR, EI- 및 FAB-MS, NMR, 2-D NMR 등의 기기분석을 이용하여 이들의 분석치를 문헌치와 비교하여 동정하거나 필요시 화학적 수식, CD/ORD, X-RAY 등의 기법을 병행하였음.
- 분리한 성분이 신규화합물일 경우, 추가적인 최신 기기분석법을 이용하여 구조를 규명하였음.

4.2 제2 세부과제

1. 치자

가. 시료의 산지별 수집

- 식약청에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 13종 및 중국산 13종, 총 26종의 시료를 확보하였음.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Aglient Eclipse XDB- C18(4.6 × 250 mm, 5 μ m) 컬럼을 고정상

으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리 조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 254 nm에서 검출하는 것이 치자 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음.

- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 치자의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 치자의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide 및 genipin의 4종을 선정하였음.

2) 치자 표준품의 validation

가) 표준품의 순도 검정

- 4종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 각 표준품의 순도는 91.2%-99.8%였음.

나) 표준품의 안정성

- 표준품 4종을 1일, 7일, 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99-101% 수준으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수가 있음.

다) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 네 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 0.1 µg - 50 µg으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었음. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음.

라) Repeatability

- 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.5-1.1%내의 양호한 값으로 나타났음.

마) Precision and Accuracy

- 각 지표성분 분석에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복실험을 하였음. 그 결과 CV(%)는 0.22%-5.72%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 86.8%-105.3% 사이에 나타나 양호한 정밀성과 정확성을 나타내었음.

바) Robustness

- 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않았으며, column별, column 온도별 완건성을 비교해본 결과 Accuracy가 97%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있음.

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- Geniposide만을 지표성분으로 할 경우는 Soxhlet 추출을, 기타 다른 지표성분을 함께 정량하기 위해서는 환류추출 (reflux)이 가장 좋은 방법인 것으로 판단되었음.

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 지표성분의 추출은 치자 1 g을 200 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 70°C에서 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하였음.

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 치자 지표성분의 TLC pattern 분석

- 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이동상은 ACN : MeOH : H₂O : Formic acid = 15:20:64:1이 가장 좋았음
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 치자의 TLC pattern을 비교하여 보았으나 TLC pattern으로는 지역간의 차이를 인정하기 어려웠음.

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 총 10개의 peak area를 통계프로그램의 변수로 사용하여 H-cluster 및 주성분분석인 PCA를 통해 군집을 나누고자 하였음.

나) H-cluster (군집분석)

- H-cluster을 통해 몇 개의 군집을 나눌 수 있었음. 즉 전남지역의 치자 (sample N. 1, 2, 3, 8, 10, 11)는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있었으나 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았음. 또한 DNA 감별 결과와 H-clustering의 결과를 연결할 수 있는 개연성은 보이지 않았음.

다) PCA (주성분 분석)

- PAC(주성분분석)을 통해 몇 개의 군집을 나눌 수 있었음. PCA에 의한 결과 역시 전남지역의 치자는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있었으나 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았음. 또한 DNA 감별 결과와 PCA의 결과를 연결할 수 있는 개연성은 보이지 않았음.

마. 지표성분의 LC-MS/MS pattern 검토

- 치자의 지표성분에 대하여 LC-MS pattern을 분석하였음.

바. 치자 중 지표성분의 함량

- 각지에서 수집한 치자 중의 지표성분의 함량을 확립된 분석방법으로 정량하였음. geniposide의 전체 평균은 0.106±0.046 mg/g, chlorogenic acid는 2.201±1.269, geniposide는 10.956±2.020, genipin은 0.133±0.144였음.
- 따라서 치자의 품질 평가는 각 성분의 함유량이 전체평균±10-20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

2. 현삼

가. 시료의 산지별 수집

- 식약청에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 12 종, 총 26종의 시료를 확보하였음.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Agilent Eclipse XCB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리 조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 296 nm에서 검출하는 것이 현삼 중 함유된 여러 성분들에 대

하여 가장 검출감도가 좋았음.

- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 현삼의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 현삼의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 (*E*)-Harpagoside, (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid 및 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester의 3종을 선정하였음.

2) 현삼 표준품의 validation

가) 표준품의 순도 검정

- 3종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 표준품의 순도는 각각 (*E*)-harpagoside : 순도 96.77%, (*E*)-*p*-methoxy cinnamic acid : 순도 99.53%, *p*-methoxycinnamic acid methyl ester : 순도 99.96%로 양호하게 나타났음.

나) 표준품의 안정성

- 표준품 3종을 1일, 7일 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99% 이상으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수 있음.

다) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 세 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 10 µg - 1000 µg으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었음. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음.

라) Repeatability

- 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.10-1.26%내의 값으로 나타났으며, 이들은 모두 인정할 수 있는 범위에 있는 것으로 판단하였음.

마) Precision and Accuracy

- 각 지표성분 분석에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복실험을 하였음. 그 결과 CV(%)는 0.26%-6.3%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 92.0%-108.6%사이로 비교적 양호한 값을 나타내었음.

바) Robustness

- 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않았으며, column별, column 온도별 완건성을 비교해본 결과 상온에서 50°C까지는 accuracy가 94%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있음.

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- Soxhlet, reflux 및 초음파 등 3가지 추출법으로 추출 한 결과, *p*-methoxycinnamic methyl ester의 경우는 큰 차이가 없었으나 (*E*)-harpagoside, (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid의 경우 Soxhlet 추출법이 sonication 추출법 보다 1.5배 가까이 높은 수율을 내는 것을 확인하였음. 따라서 Soxhlet 추출법이 가장 적합한 것으로 판단되었으나 경제성이나 장비의 복잡함 등을 고려하여 환류추출을 선택하였음.

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 현삼 3 g을 50 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하

였음.

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 현삼 지표성분의 TLC pattern 분석

- 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이동상은 ACN : MeCN:MeOH:H₂O:Formic acid = 45:20:35:1이 가장 좋았음
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 현삼의 TLC pattern을 비교하여 보았을 때 TLC pattern 상에서도 (E)-harpagoside의 함량이 지역간 눈에 띄게 다른 것을 알 수 있었음

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 총 10개의 peak area를 통계프로그램의 변수로 사용하여 H-cluster 및 주성분분석인 PCA를 통해 군집을 나누고자 하였음.

나) H-cluster (군집분석)

- H-cluster을 통해 두 개의 군집을 나눌 수 있었음. 즉 중국산과 국산의 경계가 확연히 나타나는 것을 알 수가 있음. 하지만 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있음.
- 유전자감별 연구팀의 결과, 현삼마커를 이용한 증폭 결과를 볼때, C4, C5는 현삼(*S. buergeriana*)이었으며, C10은 국산현삼으로 구매하였다고 하였으나, 증폭 결과 중국현삼(*S. ningpoensis*)이었으며, D3는 중국현삼으로 구입하였다고 되어있으나 국산 현삼(*S. buergeriana*)으로 확인되었음

다) PCA

- PAC분석을 통해 두 개의 군집을 나눌 수 있었음. PCA에 의한 결과 역시 중국산으로 나눌 수 있음. 하지만 H-cluster결과와 같이 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있음.
- 유전자감별 연구팀의 결과, 현삼마커를 이용한 증폭 결과를 볼때, C4, C5는 현삼(*S. buergeriana*)이었으며, C10은 국산현삼으로 구매하였다고 하였으나, 증폭 결과 중국현삼(*S. ningpoensis*)이었으며, D3는 중국현삼으로 구입하였다고 되어있으나 국산 현삼(*S. buergeriana*)으로 확인되었음

라) Princomp 분석

- PrinComp 분석 결과, PCA에서 두 개의 군집이 형성되는 주된 이유는 현삼의 주 성분인 (E)-harpagoside 와 (E)-*p*-methoxycinnamic acid에 의해 나뉘는 것으로 생각되어짐

마. 지표성분의 LC-MS/MS pattern 검토

- 현삼의 지표성분에 대하여 LC-MS fragmentation pattern을 분석하였음.

바. 현삼 중 지표성분의 함량

- 각지에서 수집한 현삼 중의 지표성분의 함량을 확립된 분석방법으로 정량하였음. rm 결과 국산 현삼의 경우 중국산 현삼에 비해 표준품의 함량이 모두 높게 나타났음. (E)-harpagoside의 전체 평균은 2.302±1.481, (E)-*p*-methoxycinnamic acid는 0.982±0.706이었으며, *p*-methoxycinnamic acid methyl ester는 한국산에서만 검출되었음.
- 따라서 현삼의 품질 평가는 각 성분의 함유량이 전체평균±10-20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(현삼, 치자)
총괄과제책임자	이동웅

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	Protective effect of ferulic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice	임현, 박광록, 이동웅, 김영식, 김현표	Biomolecules & Therapeutics	16	82-86		국내	SCIE
2	The Genome-wide Expression Profile of <i>Scrophularia ningpoensis</i> -treated thapsigargin-stimulated U-87MG Cells	Sung-Hwa Sohn, Eunjung Ko, Sung-Bae Jeon, Beom-Joon Lee, Sung-Hoon Kim, Mi-Sook, Dong, Dong-Ung Lee, Jong-Hwan Kwak, Yangseok Kim, Minkyu Shin, Moochang Hong, Hyunsu Bae	Neurotoxicology		인쇄중	3.009	국외	SCI

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/ 국제
1	Simultaneous quantification of four major compounds in Gardeniae Fructus by high-performance liquid chromatography	포스터	김호진, 박효준, 양은주, 이동웅, 곽종환, 송경식	생약학회 제38회 정기총회 및 학술대회	2007. 12. 11	서울	국내
2	Simultaneous HPLC quantification of (E)-harpagoside, p-methoxycinnamic acid, and p-methoxycinnamic acid methyl ester in Scrophulariae Radix	포스터	박효준, 김호진, 양은주, 이동웅, 곽종환, 송경식	생약학회 제38회 정기총회 및 학술대회	2007. 12. 11	서울	국내
3	Inhibitory activity on acetylcholinesterase in vitro and memory enhancing effect in vivo of the constituents from Gardeniae Fructus	포스터	이동웅, 곽종환, 송경식	7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF	2008. 8.3-8	아테네 (그리스)	국제
4	Protective effect of ferulic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice	포스터	Kim JK, Yun NR, Kim SH, Lee DU, Kim YS, Kang SS, Lee SM	7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF	2008. 8.3-8	아테네 (그리스)	국제
5	Cognition Improving Effects of the Components from Gardenia jasminoides	포스터	박광록, 강주억, 신석철, 이동웅	한국생약학 회	2008. 12. 3	서울대학교	국내

다. 지식재산권

번호	출원/ 등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

- 본 연구에서 얻어진 화합물은 당 연구실에 구축되어 있는 치매관련 활성검정을 통해 새로운 효능을 도출할 계획임
- 본 연구에서 얻어진 분석방법은 약전이나 규격집 등에 고시자료로 활용되도록 함
- 현재 본 연구에서 얻은 결과를 두편의 SCI급 논문에 투고하고자 원고를 준비하고 있으므로 논문발표에 활용하고자 함

제6장 기타 중요변경사항

없음

제7장 참고문헌

- 1) Preparative isolation and purification of harpagoside from *Scrophularia ningpoensis* Hemsley by high-speed counter-current chromatography. Tong, S.; Yan, J.; Lou, J. *Phytochemical Analysis* (2006), 17(6), 406-408.
- 2) A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*. Nguyen, A.-T.; Fontaine, J.; Malonne, H.; Claeys, M.; Luhmer, M.; Duez, P. *Phytochemistry (Elsevier)* (2005), 66(10), 1186-1191.
- 3) Studies on the physicochemical properties, structure and antitumor activity of an oligosaccharide homologue SnS-2 from the root of *Scrophularia ningpoensis* hemsl. Deng, J.-E.; Zhang, J.; Chen, X.-M.; Ke, W.; Tian, G.-Y. *Chinese Journal of Chemistry* (2004), 22(5), 492-497.
- 4) Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Li, Y.-M.; Jiang, S.-H.; Gao,

- W.-Y.; Zhu, D.-Y. *Phytochemistry* (2000), 54(8), 923-925.
- 5) A new iridoid glucoside from ningpo figwort (*Scrophularia ningpoensis*) root. Zou, C. ; Yang, X. *Zhongcaoyao* (2000), 31(4), 241-243.
- 6) Liposoluble constituents from roots of *Scrophularia ningpoensis*. Li, Yiming; Jiang, Shan hao; Gao, Wenyun; Zhu, Dayuan. *Yaoxue Xuebao* (1999), 34(6), 448-450.
- 7) Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Li, Yi-Ming; Jiang, Shan-Hao; Gao, Wen-Yun; Zhu, Da-Yuan. *Phytochemistry* (1998), Volume Date 1999, 50(1), 101-104.
- 8) Crocetin Esters, Picrocrocic acid and Its Related Compounds Present in *Crocus sativus* Stigmas and *Gardenia jasminoides* Fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS. Carmona, M.; Zalacain, A.; Sanchez, A. M.; Novella, J. Luis; A. Gonzalo L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54(3), 973-979
- 9) Determination of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis by High Performance Liquid Chromatography. Ren, Zhijun; He, Kaize; Zhang, Liming; Tan, Jian; Pu, Qiang. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* (2005), 17(4), 465-467.
- 10) Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. Lee, In-Ah; Lee, Jin Hee; Baek, Nam-In; Kim, Dong-Hyun. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2005), 28(11), 2106-2110.
- 11) Extraction of ursolic acid from gardenia and its quantification. Liao, Xiaofeng; Chen, Zhengxing; Li, Yongzhong; Liang, Ping. *Shipin Gongye Keji* (2005), 26(2), 76-77, 79.
- 12) Immunosuppressive Iridoids from the Fruits of *Gardenia jasminoides*. Chang, Wen-Liang; Wang, Hua-Ying; Shi, Li-Shian; Lai, Jenn-Haung; Lin, Hang-Ching. *Journal of Natural Products* (2005), 68(11), 1683-1685.
- 13) Studies on the constituents of *Gardenia* species. III. New iridoid glycosides from the leaves of *Gardenia jasminoides* cv. *Fortuneana* Hara. Machida, K.; Takehara, E.; Kobayashi, H.; Kikuchi, M. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (2003), 51(12), 1417-1419.
- 14) Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of *Gardenia jasminoides*. Lee, D. U.; Park, C. H.; Kang, S. I.; Min, E. G.; Han, Y. H.; Lee, C. K.. *Saengyak Hakhoechi* (1998), 29(3), 204-208.
- 15) Studies of the constituents of *Gardenia* species. I. Monoterpenoids from *Gardeniae Fructus*. Machida, Koichi; Onodera, Rie; Furuta, Kyoko; Kikuchi, Masao. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (1998), 46(8), 1295-1300.
- 16) Isolation and Structure Elucidation of Carotenoid-Glycosyl Esters in *Gardenia* Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne). Pfister, S.; Meyer, P.; Steck, A.; Pfander, H. J. *Agricultural and Food Chemistry* (1996), 44(9), 2612-2615.
- 17) Two monoterpenes from fruits of *Gardenia jasminoides*. Zhao, Wei-Min; Xu, Jun-Ping; Qin, Guo-Wei; Xu, Ren-Sheng. *Phytochemistry* (1994), 37(4), 1079-81.
- 18) HPLC determination of the contents of four iridoids in *Scrophularia ningpoensis*. Hemsl. Li, J.; Lai, D.; Sun, W. *Yaowu Fenxi Zazhi* (2005), 25(12), 1531-1533.
- 19) Determination of harpagoside and cinnamic acid in radix *Scrophularia* by HPLC. Cai, S.; Xie, L.; Wang, J.; Liu, H.; Wang, X.; Xu, B.. *Yaowu Fenxi Zazhi*(2000), 20(3), 191-194.

Effects of the Constituents of *Gardenia Fructus* on Prostaglandin and NO Production

Hyun LIM¹, Kwang-Rock PARK², Dong-Ung LEE², Yeong Shik KIM³, and Hyun Pyo KIM^{1*}

¹College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Dept. Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

³Natural Products Research Institute and College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received February 11, 2008; Accepted April 3, 2008)

Abstract – The fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis have been previously reported to possess anti-inflammatory activity. In this study, the constituents including geniposide, geniposidic acid, genipin and crocin were evaluated for their effects on prostaglandin and NO production in an attempt to establish anti-inflammatory cellular mechanisms. Among the constituents tested, only genipin significantly inhibited cyclooxygenase-2-mediated PGE₂ and inducible nitric oxide synthase-mediated NO production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells at 10–100 μM. Genipin also inhibited nuclear transcription factor-κB activation. Moreover, genipin showed *in vivo* anti-inflammatory activity on λ-carrageenan-induced paw edema in mice (10.4–29.9% inhibition at 20–100 mg/kg, i.p.). All of these results suggest that genipin may contribute to anti-inflammatory activity of the fruits of *G. jasminoides* and an inhibitory action on prostaglandin and NO production is, at least, the part of anti-inflammatory mechanism of genipin.

Keywords: *Gardenia jasminoides* Ellis, genipin, cyclooxygenase, nitric oxide synthase, anti-inflammation

INTRODUCTION

Among various proinflammatory chemical mediators, prostaglandins (PG) synthesized from arachidonic acid (AA) play an important role in many inflammatory disorders. Cyclooxygenases (COX) are the enzymes responsible for synthesizing PGs. Especially, COX-2 (an inducible isoform of COX) produces high amounts of PGs in inflammatory lesions. In addition, nitric oxide (NO) synthesized from arginine by nitric oxide synthase (NOS) is also involved in some inflammatory disorders. In particular, inducible NOS (iNOS) produces massive amount of NO in certain cell types including macrophages (Gallin and Snyderman, 1999). Thus, it is worthy to evaluate the effects of potential anti-inflammatory agents on prostaglandin and NO production.

In Chinese medicine, the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae) have been used on inflammatory conditions, jaundice, diarrhea, etc (Bae, 2000). Previously, the alcoholic extract of *Gardenia* fruits and geniposide

showed favorable effects on soft tissue injury (Yao *et al.*, 1991). Hydrophobic pigment in *Gardenia* inhibited IgE production from rat spleen lymphocytes (Kuramoto *et al.*, 1996). In addition, the fruits of *Gardenia* protected from pancreatitis by reducing blood circulation in rats (Jia *et al.*, 1993). Recently, genipin was found to inhibit iNOS expression leading to reduced production of NO by inhibiting nuclear transcription factor-κB (NF-κB) pathway (Koo *et al.*, 2004), and it was also reported that genipin and geniposide including the alcoholic extract showed *in vivo* anti-inflammatory activity on several animal models of acute inflammation (Koo *et al.*, 2006). Although these previous reports may explain some anti-inflammatory property of the fruits of *G. jasminoides*, anti-inflammatory active constituents from the same plant material have not been fully understood. Therefore, in the present study, anti-inflammatory activity of geniposide, geniposidic acid, genipin and crocin successfully isolated from the fruits of *G. jasminoides* was investigated using *in vitro* and *in vivo* models to define anti-inflammatory activity further.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]methane sulfonamide (NS-398) was obtained from Biomol (Plymouth Meeting, PA). 2-Amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazine hydrochloride (AMT) was purchased from Tocris Cookson Ltd. (UK). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and LPS (*Escherichia coli* 0127:B8) were purchased from Sigma Chem. (St. Louis, MO). LipofecAMINE PLUS, DMEM and other cell culture reagents including FBS were products of Gibco BRL (Grand Island, NY). Protein assay kit was purchased from Bio-Rad Lab. (Hercules, CA). Geniposide, geniposidic acid, genipin and crocin (Fig. 1) were isolated from the butanol fraction of the fruits of *G. jasminoides* and their chemical structures were identified according to the previously described (Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Test compounds dissolved in DMSO were diluted with serum-free DMEM into appropriate concentrations. Final concentration of DMSO in the culture medium was adjusted to 0.1% (v/v).

RAW 264.7 cell culture and measurement of NO and PGE₂ concentrations

RAW 264.7 cells obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics under 5% CO₂ at 37°C based on the previously described procedures (Chi *et al.*, 2001). Briefly, cells were plated in 96-well plates (2×10⁵ cells/well). After pre-incubation for 2 h, the test compounds and LPS (1 µg/ml)

were added and incubated for 24 h. From the media, NO and PGE₂ concentrations were measured. For determination of NO concentration, the stable conversion product of NO, nitrite (NO₂⁻), was measured using Griess reagent and optical density was checked at 550 nm. PGE₂ concentration in the medium was measured using ELISA kit for PGE₂ (Cayman Chem. Co.) according to the manufacturer's recommendation. Cell viability was assessed with MTT assay as described previously (Mossmann, 1983).

Western blot analysis of iNOS

For measuring the protein level of iNOS, Western blotting technique was used (Chi *et al.*, 2001). RAW cells were cultured in 6-well plates (5×10⁶ cells/well) in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) with/without genipin for 16-20 h. After preparing cell homogenate, the supernatant was obtained by centrifugation at 15,000 g for 30 min. Using Tris-glycine gel (8%), electrophoresis was carried out and bands were blotted to PVDF membranes. iNOS antibody (N32030, Transduction Lab.) was incubated and bands were visualized with HRP-linked secondary antibody (Cell signaling, Denver, MA) and chemiluminescent reagent (Amersham, UK).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

RAW cells were treated with/without LPS and genipin for 3 h. To prepare nuclear fractions, the cells were washed with PBS, harvested and resuspended in 400 µl of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9) for 15 min on ice. After 10% NP-40 (25 µl) was added, the tubes were vortexed vigorously for 10 sec. The nuclei were collected by centrifugation at 5,000 rpm for 3 min and the supernatant was saved as the cytosolic fraction. The nuclei were lysed in buffer B (20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7.9). NF-κB consensus oligonucleotide (Promega) was phosphorylated by T4 polynucleotide kinase (10 units) with 10 µCi of [γ-³²P] ATP (3,000 Ci/mmol) at 37°C for 10 min. Unincorporated oligonucleotides were removed by Microspin G-25 column (Amersham, UK). Nuclear extract containing 5 µg protein was incubated with ³²P-labeled NF-κB consensus oligonucleotide in gel shift binding buffer at room temperature for 20 min. The incubation mixture was subjected to electrophoresis on a 4% polyacrylamide gel in TBE buffer (0.5X) at 350V. The gel was dried and exposed to X-ray film overnight at -70°C.

λ-Carrageenan (CGN)-induced paw edema in mice

In order to examine *in vivo* anti-inflammatory activity,

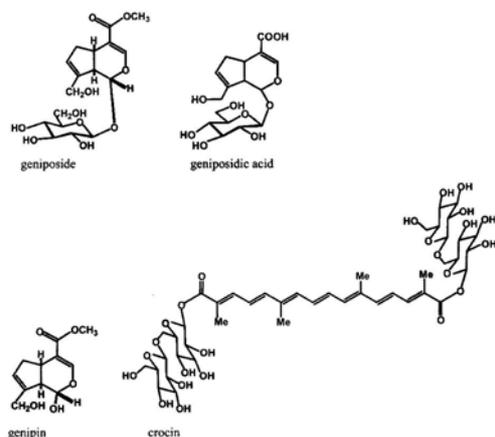


Fig. 1. The chemical structures of the constituents studied.

mouse CGN-induced paw edema assay was used according to the slightly modified procedures of Lichtman *et al.* (2004) based on the original methods of Winter *et al.* (1962). Specific-pathogen free male ICR mice were purchased from Orient-Bio (Seoul, Korea) and acclimated in animal facility with standard lab. chow and water *ad libitum* at least for 7 days prior to experiment. Test compounds dissolved in DMSO were administered intraperitoneally to mice (0.05 ml/mouse). One hour later, 1% CGN (*w/v*) dissolved in pyrogen-free sterile saline solution (0.05 ml/paw) was injected to right hind paw. Five hours later, paw volume was measured using plethysmometer (Ugo Basil, Italy). The paw volume increased from the initial non-treated paw volume was regarded as edema.

Statistical analysis

Experimental values were represented as arithmetic mean \pm SD. Unpaired Student's t-test was used to determine the statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

It is well known that RAW 264.7 cells, a mouse macrophage-like cell line, induce COX-2/iNOS which produce high amounts of PGs and NO by LPS treatment (Chi *et al.*, 2001). When LPS (1 μ g/ml) was added and the cells were incubated for 24 h, PGE₂ and NO production from the culture media increased to 89.3 \pm 4.4 nM and 38.1 \pm 0.2 μ M from the basal levels of 2.4 \pm 0.0 nM and 0.6 \pm 0.0 μ M, respectively (n = 3). When the compounds were simultaneously added with LPS and the inhibitory activities were examined, only genipin significantly inhibited COX-2-mediated PGE₂ and iNOS-mediated NO production from LPS-treated RAW 264.7 cells at 10-100 μ M (Fig. 2). Especially, genipin strongly inhibited NO production (IC₅₀ for PGE₂ production=58.0 μ M), being less active on PGE₂ production. Genipin showed 40.7% inhibition against PGE₂ production at 100 μ M, while other compounds tested did not show a significant inhibition at the concentrations up to 100 μ M. Under the same experimental conditions, the reference compounds, NS-398 (selective COX-2 inhibitor) and AMT (iNOS inhibitor) showed 99.4% and 95.6% inhibition at 0.1 and 1.0 μ M, respectively, against COX-2- and iNOS-mediated PGE₂ and NO production as expected (Fig. 2). At the concentrations examined, all of the test compounds did not show cytotoxic effects on RAW cells revealed by MTT assay (data not shown). The control experiment without LPS treatment revealed that geniposide, geniposidic acid, genipin

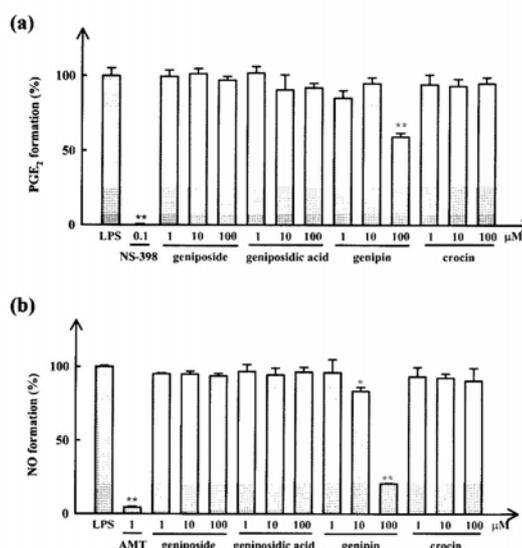


Fig. 2. Effect of the constituents from *G. jasminoides* on COX-2-mediated PGE₂ and iNOS-mediated NO production from LPS-treated RAW 264.7 cells. (a) Effect on COX-2-mediated PGE₂ production. (b) Effect on iNOS-mediated NO production. Data points and bars represent arithmetic mean \pm SD (n = 3). *: P<0.05, **: P<0.01, Significantly different from the LPS-treated control group.

and crocin did not significantly affect PGE₂ and NO concentration in RAW 264.7 cells at 100 μ M (data not shown).

In order to elucidate the cellular mechanism of NO inhibition, iNOS expression level was examined using Western blotting analysis. But genipin did not down-regulate iNOS (Fig. 3a). On the other hand, genipin was demonstrated to inhibit NF- κ B activation revealed by EMSA (Fig. 3b). It was previously reported that genipin inhibited iNOS expression from macrophages at 300 μ M (Koo *et al.*, 2004). In the present investigation, the maximum concentration examined was 100 μ M, since the concentrations higher than 100 μ M are not likely attained in the body by oral genipin ingestion. Thus, iNOS down-regulating capacity of genipin could not be observed in the present study. Our results clearly demonstrated that genipin inhibited NF- κ B activation, without iNOS down-regulation at 100 μ M. The precise reason for this inconsistency is not known at present, but it is speculated that the sensitivity of EMSA using radioactivity is higher than that of Western blotting analysis using antigen-antibody reaction. Therefore, it is suggested that genipin may inhibit NO production at least in part by iNOS down-regulation

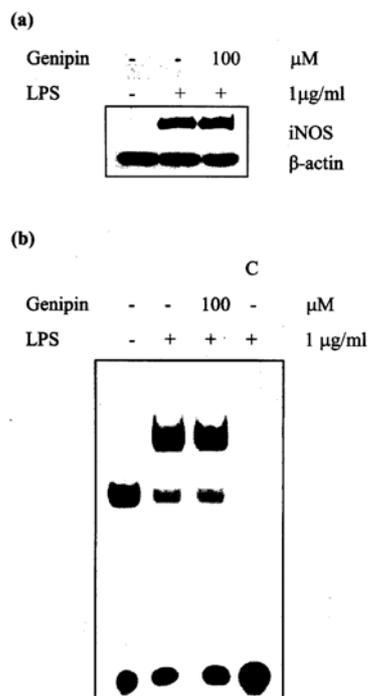


Fig. 3. Western blotting analysis and EMSA. (a) iNOS expression (Western blot), (b) EMSA of NF-κB. Note: Genipin clearly inhibited NF-κB activation, while no effect was observed on iNOS expression at 100 μM.

via NF-κB inhibition.

In addition, genipin inhibited CGN-induced paw edema in mice by intraperitoneal injection. As shown in Fig. 4, genipin showed 10.4% and 29.9% inhibition of paw edema at 20 and 100 mg/kg, respectively. Some of anti-inflammatory activities of genipin were previously described (Koo *et al.*, 2004 and 2006) and NO inhibitory action was repeatedly found in this study. But, the finding of COX-2 inhibitory activity of genipin is new and is important since prostanooids play a critical role in some inflammatory disorders. It is significant to note that genipin derivatives such as geniposide and geniposidic acid did not show anti-inflammatory activity *in vitro* probably due to inaccessibility to cell inside. The similar results were previously demonstrated that some flavonoid glycosides did not inhibit iNOS-mediated NO production from RAW cells in contrast to the inhibitory action of the respective flavonoid aglycones (Kim *et al.*, 1999).

In conclusion, the present investigation has shown that

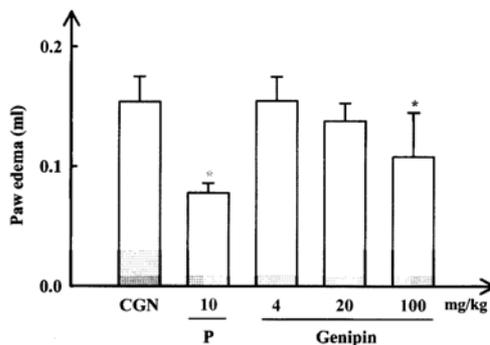


Fig. 4. *In vivo* anti-inflammatory activity of genipin (CGN-induced mouse paw edema). All compounds were intraperitoneally administered 1 h prior to CGN injection. P (prednisolone). Data points and bars represent arithmetic mean \pm SD (n = 5). *: P < 0.05, Significantly different from the CGN-treated control group.

genipin has anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* among the constituents tested. Genipin inhibited COX-2-mediated PGE₂ production and iNOS-mediated NO production. Genipin may reduce prostaglandin and NO concentration in inflammatory lesions, leading to anti-inflammatory effect. It is suggested that genipin, among the constituents, may contribute to anti-inflammatory activity of the fruits of *G. jasminoides*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the research fund of Studies on the Identification of the Efficacy of Biologically Active Components from Oriental Herbal Medicines from Korean Food and Drug Administration (2007) and post-BK21 project from Ministry of Education, Korea.

REFERENCES

- Bae K. 2000. Medicinal plants of Korea, Kyo-Hak Pub. Seoul, pp. 417.
- Chi, Y. S., Cheon, B. S. and Kim, H. P. (2001). Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 1195-1203.
- Gallin, J. I. and Snyderman, R. (1999). Overview. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* 3rd ed. (Gallin, J. I. and Snyderman, R., Eds.), pp. 1-4. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Jia, Y. J., Jiang, M. N., Pei, D. K., Ji, X. P. and Wang, J. M. (1993). Effect of *Gardenia jasminoides* Ellis (GJE) on the

- blood flow of internal organs at the early stage of acute necrotizing hemorrhagic pancreatitis in rats. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **18**, 431-433.
- Kim, H. J., Kim, E. J., Seo, S. H., Shin, C. G., Jin, C. and Lee, Y. S. (2006). Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gardeniae Fructus*. *J. Nat. Prod.* **69**, 600-603.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 759-765.
- Koo, H. J., Lim, K. H., Jung, H. J. and Park, E. H. (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J. Ethnopharmacol.* **103**, 496-500.
- Koo, H. J., Song, Y. S., Kim, H. J., Lee, Y. H., Hong, S. M., Kim, S. J., Kim, B. C., Jin, C., Lim, C. J. and Park, E. H. (2004). Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur. J. Pharmacol.* **495**, 201-208.
- Kumamoto, Y., Yamada, K., Tsuruta, O. and Suganon, M. (1996). Effect of natural food colorings on immunoglobulin production in vitro by rat spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1712-1713.
- Lee, I. A., Lee, J. H., Baek, N. I. and Kim, D. H. (2005). Antihyperlipidemic effects of crocin isolated from the frutus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2106-2110.
- Lichtman, A. H., Shelton, C. C., Advani, T. and Cravatt, B. F. (2004). Mice lacking fatty amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* **109**, 319-327.
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1962). Carrageenan-induced edema in the hindpaw on the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 544-547.
- Yao, O., Zhou, G., Zhu, Y., Pan, Y., Hu, J., Xue, H. and Zhang, Q. (1991). Screening studies on anti-inflammatory function of traditional Chinese herb *Gardenia jasminoides* Ellis and its possibility in treating soft tissue injuries in animals. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **16**, 489-493 (1991).

제 1 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 현삼과 치자의 생리활성성분 분리 및 구조확인

세부과제책임자 : 이동웅 / 동국대학교

제1장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 연구개발 목표

구 분	최종 연구개발 목표
제1 세부과제	<ol style="list-style-type: none"> 1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 현삼 및 치자로 부터 활성물질 대량 분리 방법을 확립 2. 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 효능검색용 시료 제공 3. 현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명

1.2 연구개발과제의 목표달성도

연구개발목표	연구목표의 달성도	기여도
◦유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 현삼 및 치자로부터 활성물질 분리 방법을 확립	- 다양한 분리방법을 사용하여 현삼에서 16종, 치자에서 20종의 성분을 분리, 정제하였음 (100%)	- 성분분획으로부터 다양한 구조의 성분을 분리, 정제는 방법을 확립.
◦확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 활성시험용 시료 제공	- 현삼 지표성분 3종과 치자 지표성분 4종을 다량 분리하였으며 표준품으로 식약청에 제공할 예정임 (100%)	- 다량의 표준품을 제공함으로써 향후 생약의 규격화에 활용
◦현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명	- 현삼에서 신규성분 4종을 분리하고 구조를 규명하였음 (100%)	- 신규성분의 분리 및 구조규명으로 국제저널에 논문 발표 가능

제2장 제1 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법

1. 연구대상 한약재

가. 치자

- 치자(梔子): 치자나무 (*Gardenia jasminoides* Ellis, Rubiaceae)의 열매 (Fig. 1)
- 한방약효: 淸熱, 瀉火, 涼血, 熱病, 虛煩, 不眠, 황달, 淋病, 消渴, 結막염, 吐血, 鼻出血, 血痢, 血尿, 熱毒, 瘡瘍, 挫傷痛등에 효능
- 문헌약효: 간보호효과, hypolipidemic effect, 뇌세포 보호효과, 항염증작용, 항산화작용, 면역억제효과 등이 보고
- 함유성분: genipin, geniposide, gentiobioside, crocin, gardenin, rutin, crocetin, chlorogenic acid, quinic acid, stigmasterol, pectin, choline, gardenoside, d-mannitol, nonacosane, β -sitosterol, shanzhiside, genipin-1- β -d-gentiobioside, scandoside methyl ester, ursolic acid 등
- 연구현황: 1701건의 치자 관련 문헌이 STN data base에 수록되어 있으며, 이 중에서 성분과 관련된 문헌 178건, 활성과 관련된 논문 200건 [1-17]



Fig. 1 The whole plant (left) and its fruit (right) of *Gardenia jasminoides*

나. 현삼

- 현삼(玄蔘)(*Scrophularia buergeriana*): 현삼/큰개현삼/토현삼/섬현삼의 뿌리 (Fig. 2)
- 한방약효: 滋陰, 降火, 祛煩, 解毒, 煩渴發斑, 骨蒸勞熱, 夜寢不寧, 自汗盜汗, 津傷便秘, 血吐, 鼻出血, 咽喉腫痛, 癰腫등에 효능
- 문헌약효: 항암활성, 항노화효과, 항고혈압효과, glutamate-유도 독성에 대한 세포보호효과, CCl₄-유도 간독성 보호효과
- 함유성분: aucubin, harpagide, *O*-methyl-catalpol, harpagoside, scrophuloside B4, acteoside, 8-(*O*-methyl-*p*-coumaroyl)-harpagide, 3-*O*-acetyl-2-*O*-*p*-methoxy-cinnamoyl- α (β)-L-rhamnopyranose, oleanonic acid, ursolonic acid, cinnamic acid, 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid 등
- 연구현황: STN data base 검색결과 현삼과 관련된 문헌은 모두 33건 (대부분 2000년 이후 보고)



Fig. 2 The whole plant (left) and its fruit (right) of *Scrophularia buergeriana*

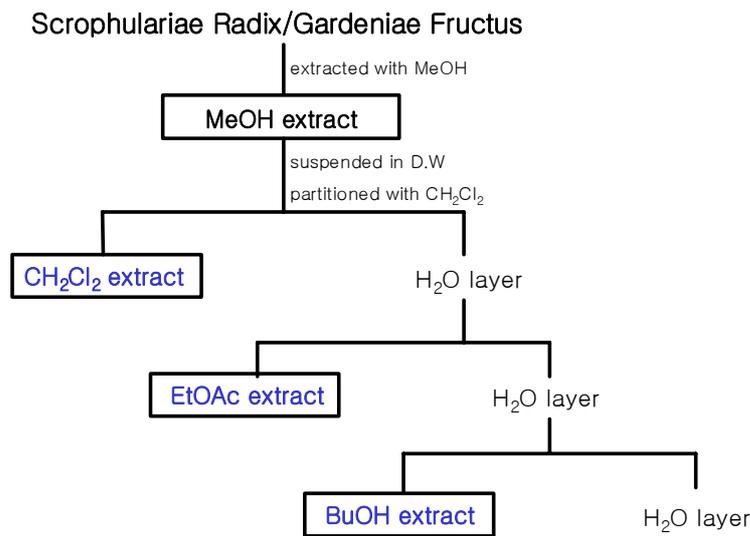
제3장 제1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

1. 추출물 및 분획의 제조

현삼 및 치자의 추출물 제조는 각 약재의 건조된 분말을 70% 에탄올로 수욕상에서 3시간, 2회 추출한 다음, 여과하고 여액을 감압농축하여 분석 및 효능검색용 시료로 함.

산지별로는 국내 또는 중국등지에서 시판되고 있는 현삼과 치자를 5종 이상 확보한 다음, DNA 감별 및 Biochip연구 등을 위하여 원생약을 각각 제공하였으며 분석과 효능검색을 위해서는 위와 동일한 방법으로 추출하여 추출물을 시료로 제공하였음.

활성성분을 분리하기 위한 전 단계로 분획을 실시하였음. 표준분획제조법에 따라서 각 약재의 methanol 추출물을 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH의 순으로 scheme 1과 같은 방법으로 순차 분획화하였음.



(Scheme 1. Extraction and fractionation of Scrophulariae Radix and Gardeniae Fructus)

2. 활성성분의 분리, 정제 및 구조

각종 chromatography(순상 및 역상 column, prep. HPLC, prep. TLC 등)를 이용하여 성분을 분리, 정제하였음. 분리한 성분의 구조를 확인하기 위하여 기기분석(¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-/ESI-/FAB-MS, FT-IR, UV 등)을 실시하였으며 물리특성을 측정하여 문헌치[1-17]와 대조하거나 화학적 수식 등을 이용하여 치자에서 총 20개, 현삼에서 총 16개의 성분을 분리하고 구조를 확인하였음.

이 가운데 현삼에서 신규성분 6개 (aucubin, sinuatol, angoroside C, acteoside, β-sitosterol, daucosterol)를 처음으로 분리하고 구조를 동정하였음.

화합물 종류	현삼	치자
iridoid and its glycosides	5	8
steroid, triterpenoid	2	3
flavonoids	-	3
carotenoid and its glycosides	-	2
phenolics	1	3
cinnamic acid and its derivatives	8	-
기타	-	1
합계	16	20

가. 현삼의 산지별 약재의 70% 에탄올엑스 수율 및 제공량

시료번호	산지		수집처	형태	수율(%)	제공량
<i>Scrophularia buergeriana</i> (기본생약)	국산	경북 안동	2006년산	전형	40.4	사업단과 분석팀 각 10g 제공
<i>Scrophularia buergeriana</i>	국산	경북 안동	서울시장	음편	44.0	사업단에 각 3g 제공
<i>Scrophularia buergeriana</i>	국산	경북 안동	영천시장	음편	37.1	
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	중국	-	서녕시장	음편	39.6	
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	중국	하북성	안국시장	음편	38.6	
<i>Scrophularia ningpoensis</i>	중국	하남성	서울시장H	음편	33.2	

나. 치자의 산지별 약재의 70% 에탄올엑스 수율 및 제공량

시료번호	산지		수집처	형태	수율(%)	제공량
<i>Gardenia jasminoides</i> (기본생약)	중국	운남성	-	전형	18.5	사업단과 분석팀 각 10g 제공
<i>G. jasminoides</i> or <i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	국산	전남 완도	영천시장	음편	15.4	사업단에 각 3g 제공
<i>G. jasminoides</i> or <i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	국산	전남 순천	서울시장	음편	15.8	
<i>G. jasminoides</i>	중국	강서성	안국시장	전형	20.8	
<i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	중국	-	상해시장	전형	17.4	
<i>G. jasminoides</i>	중국	-	울산시장	전형	15.0	
<i>G. jasminoides</i> var. <i>grandiflora</i>	국산	-	울산시장	음편	13.2	

다. 현삼의 성분 분리량, 순도, 사업단 제공량 및 식약청 제공량

No	성분명	순도		분리량 (mg)	제공량(mg)	
		UV	ELSD		사업단	식약청
1	<i>E</i> -harpagoside*	99.9		2,150	43.4	2,100
2	harpagide		99	37	8.7	20
3	8- <i>O-E-p</i> -methoxycinnamoylharpagide		99	25	8.1	10
4	aucubin		99	25	9.1	5
5	sinuatol		99.4	11	0	5
6	cinnamic acid	96		230	61.4	150
7	<i>p</i> -coumaric acid		98	350	245.4	100
8	<i>p</i> -methoxycinnamic acid methyl ester*	99		3,320	8.9	3,300
9	caffeic acid	96		260	39.3	210
10	ferulic acid	98		355	33.7	310
11	<i>p</i> -methoxycinnamic acid*	96		3,470	59.6	3,400
12	buergeriside C ₁		81	6.7	0	3
13	angoroside C		92.5	12	0	5
14	acteoside	92.9		32	0	21
15	β -sitosterol		92	15	5	5
16	daucosterol		99(RI)	15	0	7

*: 지표성분

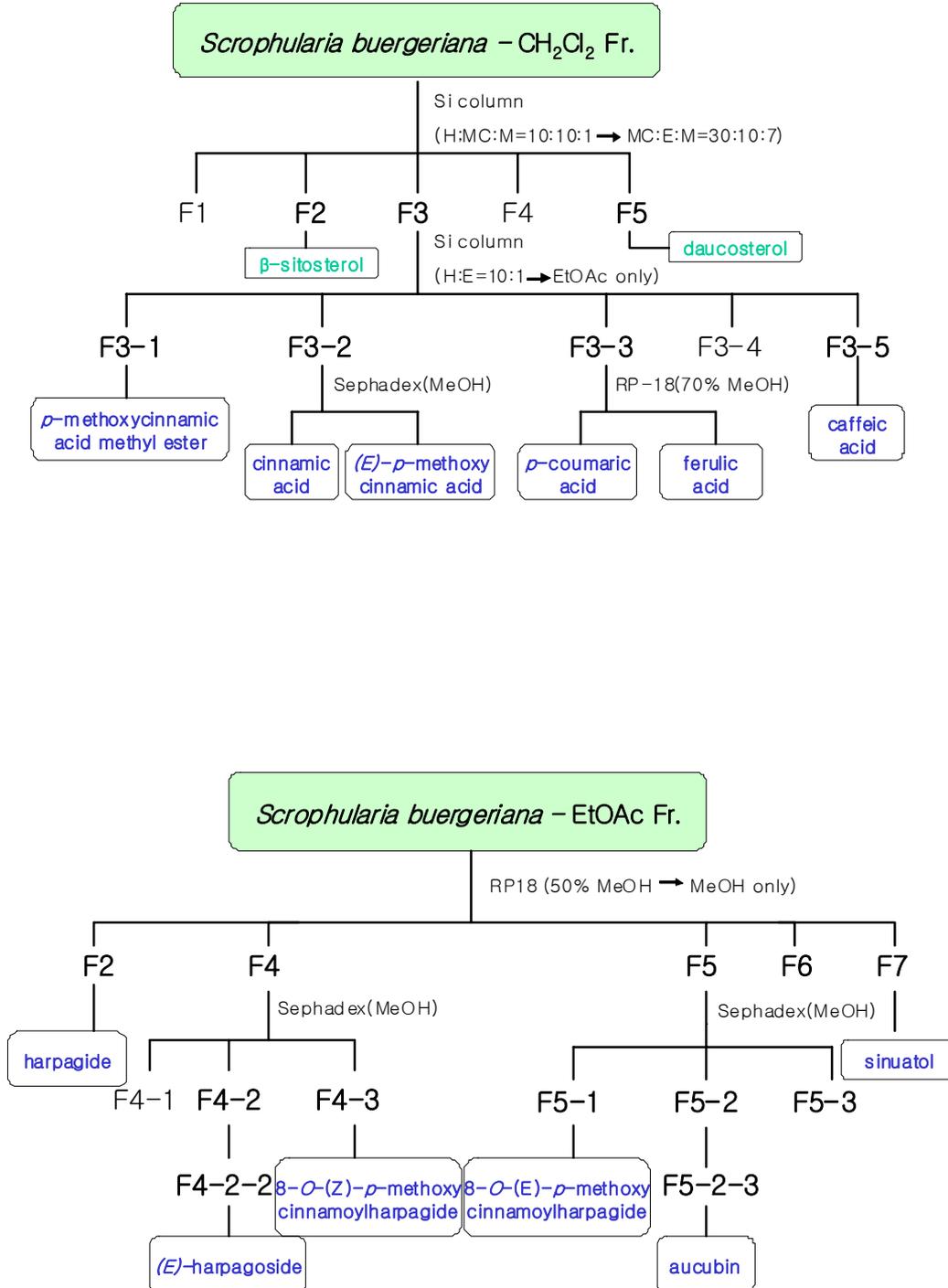
라. 치자의 성분 분리량, 순도, 사업단 제공량 및 식약청 제공량

No	성분명	순도		분리량 (mg)	제공량(mg)	
		UV	ELSD		사업단	식약청
1	geniposide*	97		2,650	34.2	2,600
2	geniposidic acid*	91		550	45.2	480
3	gardenoside		97	52	5	25
4	shanzhiside		99	31	5	17
5	gardoside	92.3		17	0	5
6	genipin gentiobioside		92.6	15	0	5
7	6 β -hydroxygeniposide		99.9	11	0	0
8	genipin*	99		5,500	2,450	3,000
9	crocin		90	2,500	2,102	500
10	crocetin	99		50	20	25
11	rutin	98		600	475	100
12	quercetin		85	450	50	300
13	isoquercitrin		91	20	5.0	10
14	ursolic acid		98	700	552	100
15	stigmasterol	93		260	158.5	60
16	β -sitosterol		92	20	5.0	10
17	protocatechuic acid	98		250	100	100
18	caffeic acid		83	260	100	100
19	chlorogenic acid*	91		3,500	192	3,000
20	picrocrocinic acid		99	15	5	5

*: 지표성분

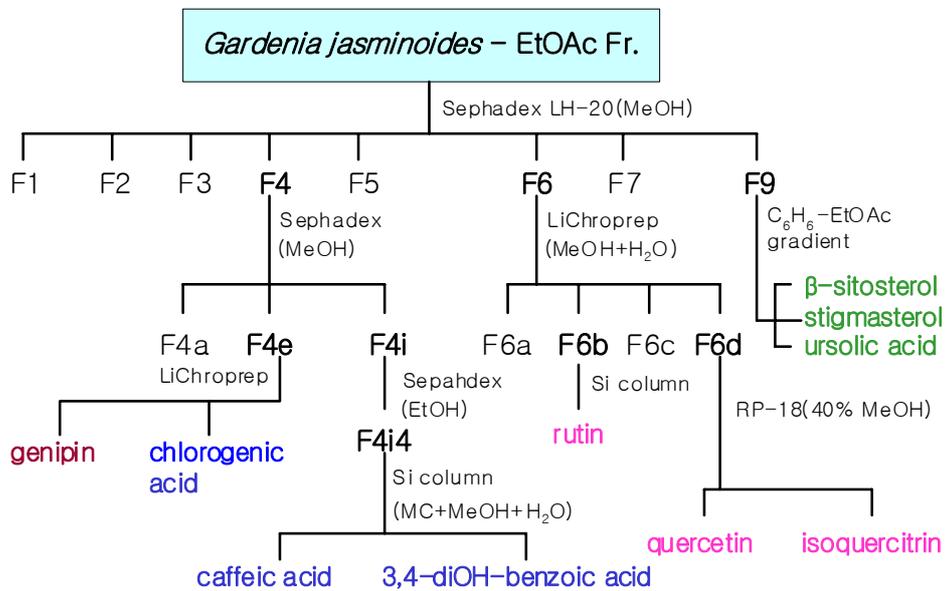
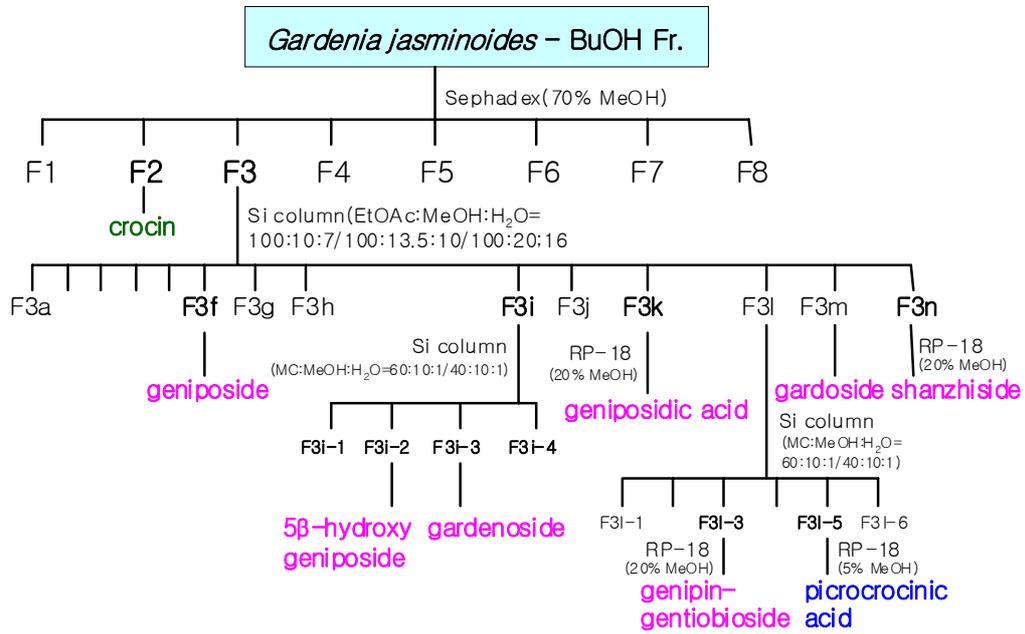
마. 현삼의 성분분리 과정

현삼과 치자의 성분분리 과정을 scheme 2과 3에 각각 나타내었음.



(Scheme 2. Isolation of the components from methylene chloride fraction (above) and ethyl ethylacetate fraction (below) of *Scrophularia buergeriana*)

바. 치자의 성분분리 과정

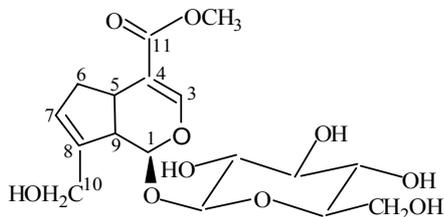


(Scheme 3. Isolation of the components from butanol fraction (above) and ethylacetate fraction (below) of *Gardenia jasminoides*)

3. 치자성분의 구조 및 분광분석 데이터

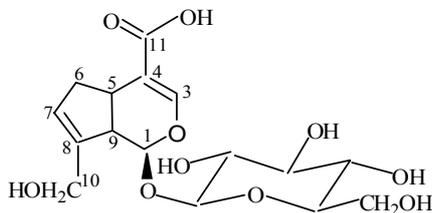
◦Iridoids 화합물

•Geniposide



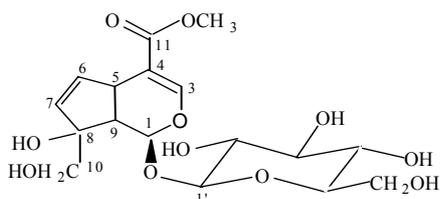
mp 159-161 °C; UV λ_{\max} (MeOH) 200, 237 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.12–2.14 (1H, br dddd, H-6a), 2.73–2.76 (1H, br dd, H-9), 2.81–2.86 (1H, br dd, H-6b), 3.32 (1H, br s, H-5), 3.73 (3H, s, OMe), 4.20 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10b), 4.33 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10a), 4.82 (1H, s, H-1), 5.81 (1H, s, H-7), 7.52 (1H, s, H-3), 4.72 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glc 1), 3.18-3.89 (6H, m, glc 2-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 97.1 (C-1), 152.2 (C-3), 111.4 (C-4), 35.4 (C-5), 38.5 (C-6), 127.2 (C-7), 143.6 (C-8), 45.9 (C-9), 60.3 (C-10), 168.4 (C=O), 50.5 (OMe), 99.2 (C-1'), 73.7 (C-2'), 76.7 (C-3'), 70.4 (C-4'), 77.2 (C-5'), 61.5 (C-6'); Positive ESIMS m/z 411 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Geniposidic acid



mp 56-57°C; UV λ_{\max} (MeOH) 201, 235 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, D_2O) δ : 2.08–2.12 (1H, br dddd, H-6a), 2.72–2.77 (1H, br dd, H-9), 2.80–2.83 (1H, br dd, H-6b), 3.12–3.17 (1H, m, H-5), 4.18 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10b), 4.24 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-10a), 5.24 (1H, d, $J=6.5$ Hz, H-1), 5.80 (1H, s, H-7), 7.54 (1H, s, H-3), 4.74 (1H, d, $J=8.0$ Hz, glc 1), 3.12-3.84 (6H, m, glc 2-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, D_2O) δ : 99.1 (C-1), 153.1 (C-3), 111.8 (C-4), 34.3 (C-5), 38.2 (C-6), 129.4 (C-7), 141.5 (C-8), 46.1 (C-9), 60.0 (C-10), 171.6 (C-11), 97.2 (glc 1), 73.0 (glc 2), 75.9 (glc 3), 69.7 (glc 4), 76.5 ((glc 5), 60.9 (glc 6); Positive ESIMS m/z 397 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

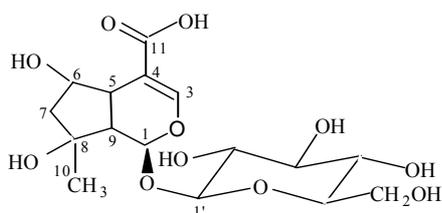
•Gardenoside



mp 118-120 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.64 (1H, dd, $J=2.5, 8.5$ Hz, H-9), 3.18-3.92 (glucose,

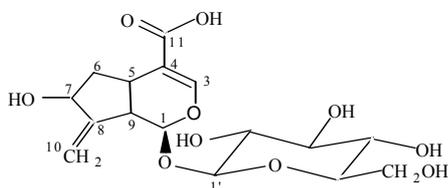
H-10, H-5), 4.67 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 5.76 (1H, dd, $J=2.0, 5.0$ Hz, H-7), 5.80 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-1), 6.17 (1H, dd, $J=2.5, 5.5$ Hz, H-6), 7.40 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 93.2 (C-1), 150.8 (C-3), 110.4 (C-4), 37.7 (C-5), 134.5 (C-6), 134.7 (C-7), 85.1 (C-8), 51.2 (C-9), 66.0 (C-10), 167.8 (C=O), 50.6 (OMe), 98.7 (C-1'), 73.5 (C-2'), 77.2 (C-3'), 70.4 (C-4'), 76.8 (C-5'), 61.6 (C-6'); Positive ESIMS m/z 427 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Shanzhiside



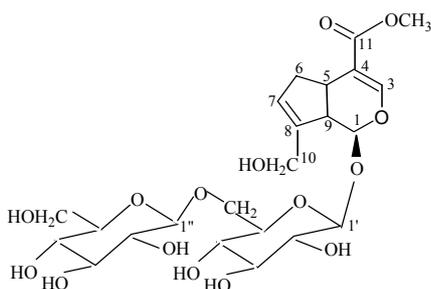
mp 82-90 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.28 (3H, s, Me), 1.85 (2H, dd, $J=6.5, 13.0$ Hz, H-7b), 2.05 (2H, dd, $J=6.5, 13.0$ Hz, H-7a), 2.59 (1H, dd, $J=3.0, 10.5$ Hz, H-9), 2.98 (1H, dd, $J=4.0, 10.5$ Hz, H-5), 3.18-3.92 (glucose), 4.02 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-6), 4.66 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 5.51 (1H, d, $J=3.0$, H-1), 7.35 (1H, s, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 93.6 (C-1), 150.3 (C-3), 110.4 (C-4), 40.6 (C-5), 76.7 (C-6), 48.4 (C-7), 77.8 (C-8), 50.7 (C-9), 23.7 (C-10), 171.3 (C=O), 98.7 (C-1'), 73.5 (C-2'), 76.8 (C-3'), 70.5 (C-4'), 77.1 (C-5'), 61.7 (C-6'); Positive ESIMS m/z 415 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Gardoside



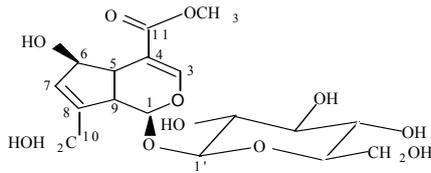
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.86-1.91 (2H, m, H-6b), 2.12-2.17 (2H, m, H-6a), 3.00-3.01 (1H, br s, H-9), 3.16-3.17 (1H, m, H-5), 3.18-3.92 (glucose), 4.42-4.45 (2H, br t, H-7), 4.66 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 5.29 and 5.33 (2H, H-10), 5.44 (1H, d, $J=4.0$, H-1), 7.16 (1H, s, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ : 95.0 (C-1), 152.4 (C-3), 110.7 (C-4), 30.8 (C-5), 39.4 (C-6), 72.9 (C-7), 148.2 (C-8), 44.3 (C-9), 113.0 (C-10), 167.8 (C=O), 98.6 (C-1'), 73.6 (C-2'), 77.2 (C-3'), 70.5 (C-4'), 76.7 (C-5'), 61.7 (C-6'); Positive ESIMS m/z 397 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Genipin- β -D-gentiobioside



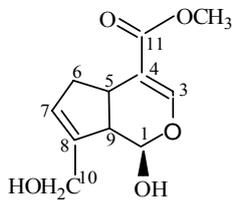
mp 227–229 °C; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 2.11 (1H, br dd, H-6b), 2.72 (1H, br dd, H-9), 2.83 (1H, br dd, H-6a), 3.19 (1H, m, H-5), 3.24–3.89 (12H, 2xglucose), 3.72 (3H, s, OMe), 4.18 (1H, br dd, H-10b), 4.32 (1H, br d, H-10a), 4.38 (1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1''), 4.73 (1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1'), 5.16 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1), 5.87 (1H, s, H-7), 7.53 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 97.6 (C-1), 152.2 (C-3), 111.2 (C-4), 35.6 (C-5), 38.6 (C-6), 127.8 (C-7), 143.7 (C-8), 168.4 (C=O), 50.5 (OMe), 99.4 (C-1'), 73.6 (C-2'), 76.6 (C-3'), 70.5 (C-4'), 76.7 (C-5'), 68.6 (C-6'), 103.7 (C-1''), 74.0 (C-2''), 76.7 (C-3''), 70.5 (C-4''), 76.8 (C-5''), 61.6 (C-6''); Negative ESIMS *m/z* 549 [M - H]⁻

•6β-Hydroxygeniposide



¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 3.01–3.05 (1H, br dd, H-9), 3.21–3.89 (glucose+H-5), 4.19 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-10b), 4.34 (1H, d, *J*=15.5 Hz, H-10a), 3.73 (3H, s, OMe), 4.20 (1H, d, *J*=15.0 Hz, H-10b), 4.33 (1H, d, *J*=15.0 Hz, H-10a), 4.56 (1H, d, *J*=4.5 Hz, H-6), 5.20 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-1), 5.82 (1H, d, *J*=3.0 Hz, H-7), 7.52 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 97.1 (C-1), 152.7 (C-3), 109.7 (C-4), 44.4 (C-5), 81.1 (C-6), 128.9 (C-7), 146.4 (C-8), 169.1 (C=O), 50.9 (OMe), 99.1 (C-1'), 73.6 (C-2'), 76.7 (C-3'), 70.4 (C-4'), 77.3 (C-5'), 59.9 (C-6'); Positive ESIMS *m/z* 427 [M + Na]⁺

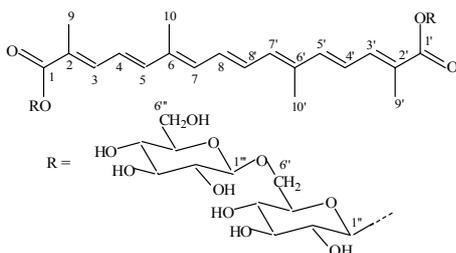
•Genipin



mp 120–121°C; UV λ_{max} (MeOH) 202, 240 nm; ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ: 2.05 (1H, br dddd, H-6a), 2.51 (1H, br dd, H-9), 2.81–2.86 (1H, br dd, H-6b), 3.33 (1H, br s, H-5), 3.72 (1H, s, OMe), 4.22 (1H, d, *J*=15.0 Hz, H-10b), 4.31 (1H, d, *J*=15.0 Hz, H-10a), 4.81 (1H, s, H-1), 5.84 (1H, s, H-7), 7.53 (1H, s, H-3); ¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD)) δ: 97.7 (C-1), 154.3 (C-3), 111.8 (C-4), 37.6 (C-5), 34.0 (C-6), 128.3 (C-7), 145.6 (C-8), 48.5 (C-9), 61.7 (C-10), 169.9 (C-11), 51.7 (OMe); Positive ESIMS *m/z* 249 [M + Na]⁺

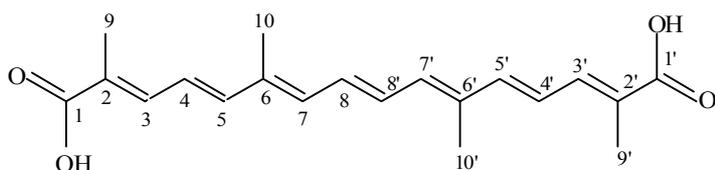
◦Iridoids 화합물

•Crocin



mp 127–128°C; UV λ_{\max} (MeOH) 209, 233, 324, 432, 458 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6) δ : 1.97 (6H, s, H-9, 9'), 2.00 (6H, s, H-10, 10'), 6.28 (m, H-7, H-7'), 6.47 (2H, dd, $J = 14.9, 11.6$ Hz, H-4, H-4'), 6.54 (2H, d, $J = 14.9$ Hz, H-5, H-5'), 6.63 (2H, m, H-8, H-8'), 7.46 (2H, br s, H-3, H-3'), 4.52 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 1''), 3.30-4.27 (12H, m, glc 2''-6'', 2'''-6'''), 5.12 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, 1'''), 3.12-3.84 (6H, m, glc 2''-6'', 2'''-6'''), $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO- d_6) δ : 167.6 (C-1, 1'), 97.5 (C-2, 2'), 144.8 (C-3, 3'), 96.4 (C-4, 4'), 152.3 (C-5, 5'), 126.2 (C-6, 6'), 111.6 (C-7, 7'), 99.3 (C-8, 8'), 38.7 (C-9, 9'), 35.1 (C-10, 10'), 96.4 (C-1''), 64.5 (C-2''), 72.0 (C-3''), 60.0 (C-4''), 77.4 (C-5''), 51.7 (C-6''), 102.3 (C-1'''), 70.7 (C-2'''), 74.0 (C-3'''), 61.7 (C-4'''), 77.9 (C-5'''), 46.6 (C-6''')

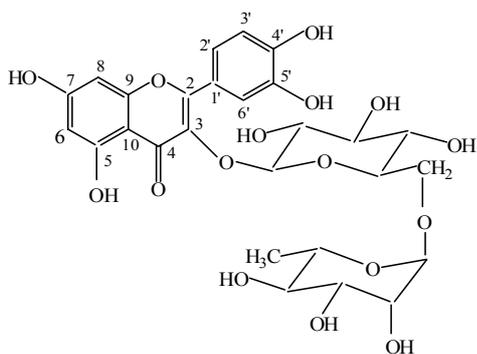
•Crocetin



mp 283-285°C; UV λ_{\max} (MeOH) 203, 288, 320, 398 sh, 424, 449 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6) δ : 1.92 (6H, s, H-9, 9'), 1.97 (6H, s, H-10, 10'), 6.49 (2H, d, $J=10.0$ Hz, H-7, H-7'), 6.59-6.64 (2H, m, H-4, H-4'), 6.75 (2H, d, $J=10.0$ Hz, H-5, H-5'), 6.83 (2H, d, $J=10.0$ Hz, H-8, H-8'), 7.21 (2H, d, $J=10.0$ Hz, H-3, H-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO- d_6) δ : 168.6 (C-1, 1'), 127.5 (C-2, 2'), 138.7 (C-3, 3'), 124.6 (C-4, 4'), 144.0 (C-5, 5'), 136.0 (C-6, 6'), 135.6 (C-7, 7'), 132.3 (C-8, 8'), 13.5 (C-9, 9'), 13.2 (C-10, 10'); Positive ESIMS m/z 351 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

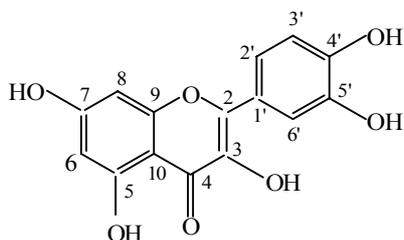
◦Flavonoids

•Rutin



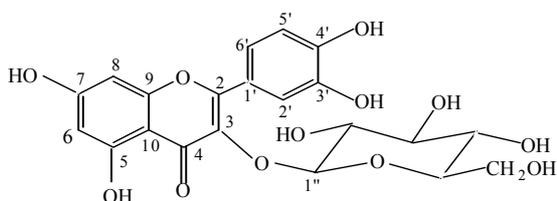
mp 186-188°C(dec.); UV λ_{\max} (MeOH) 207, 257, 300 sh, 357 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6) δ : 6.20 (1H, s, H-6), 6.39 (1H, s, H-8), 7.53–7.55 (1H, br dd, H-2'), 6.84 (1H, dd, $J=10.0, 1.5$ Hz, H-3'), 7.53 (1H, br dd, H-6'), 5.34 (1H, d, $J=7.5$ Hz, glc 1), 3.04-3.72 (12H, m, glc 2-6, rha 2-5), 4.39 (1H, s, rha 1), 1.00 (3H, s, rha CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO- d_6) δ : 157.1 (C-2), 134.0 (C-3), 178.1 (C-4), 161.9 (C-5), 99.4 (C-6), 161.9 (C-7), 94.3 (C-8), 157.3 (C-9), 104.7 (C-10), 122.3 (C-1'), 115.9 (C-2'), 134.0 (C-3'), 149.1 (C-4'), 117.0 (C-5'), 121.9 (C-6'), 101.9 (glc 1), 74.8 (glc 2), 77.2 (glc 3), 71.3 (glc 4), 76.6 (glc 5), 67.7 (glc 6), 101.4 (rha 1), 71.1 (rha 2), 70.7 (rha 3), 72.6 (rha 4), 68.9 (rha 5), 18.4 (rha CH₃); Positive ESIMS m/z 633 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Quercetin



mp 314 °C (dec.); UV λ_{\max} (MeOH) 205, 256, 372 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6) δ : 6.20 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 6.42 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 7.69 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.55 (1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO-d_6) δ : 147.5 (C-2), 138.4 (C-3), 176.5 (C-4), 161.4 (C-5), 98.9 (C-6), 164.6 (C-7), 94.0 (C-8), 156.8 (C-9), 103.7 (C-10), 122.7 (C-1'), 115.8 (C-2'), 148.4 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.3 (C-5'), 120.7 (C-6'); Positive ESIMS m/z 487 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

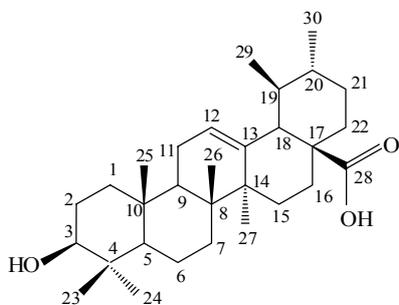
•Isoquercitrin



mp 244-246 °C; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6) δ : 3.10-3.66 (5H, glucose), 5.47 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1''), 6.20 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.85 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.58 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-6') 7.59 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2''); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO-d_6) δ : 156.9 (C-2), 134.1 (C-3), 178.2 (C-4), 161.9 (C-5), 99.4 (C-6), 164.9 (C-7), 94.2 (C-8), 157.0 (C-9), 104.7 (C-10), 121.9 (C-1'), 115.9 (C-2'), 145.5 (C-3'), 149.2 (C-4'), 116.9 (C-5'), 122.3 (C-6'), 101.7 (C-1''), 74.8 (C-2''), 77.2 (C-3''), 70.7 (C-4''), 78.2 (C-5''), 122.3 (C-6''); Positive ESIMS m/z 487 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

◦Steroid and Triterpenoid

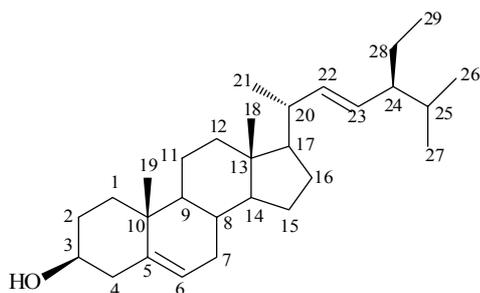
•Ursolic acid



mp 264-268°C(dec.); UV λ_{\max} (MeOH) 204 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, pyridine- d_5) δ : 0.87 (6H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-25), 0.96 (3H, d, $J=5.0$ Hz, H-29), 1.20 (3H, s, H-26), 1.21 (3H, s, H-27), 0.99

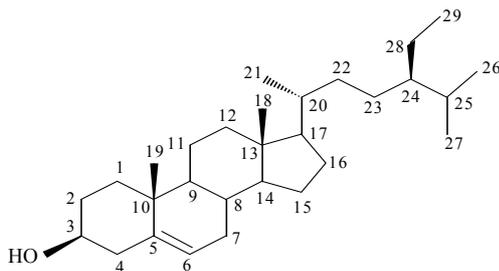
(3H, d, $J=5.0$ Hz, H-30), 1.20–2.60 (20H, m, methine and methylene protons), 2.60 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-18), 3.41 (1H, br dd, H-3), 5.46 (1H, t, $J=5.0$ Hz, H-12); ^{13}C -NMR (125MHz, pyridine- d_5) δ : 39.4 (C-1), 23.9 (C-2), 78.1 (C-3), 39.1 (C-4), 55.8 (C-5), 21.1 (C-6), 33.6 (C-7), 40.0 (C-8), 48.0 (C-9), 37.3 (C-10), 23.6 (C-11, 27), 125.6 (C-12), 139.3 (C-13), 42.5 (C-14), 28.7 (C-15), 24.9 (C-16), 48.1 (C-17), 53.6 (C-18), 39.4 (C-19), 39.5 (C-20), 28.8 (C-21), 36.4 (C-22), 28.1 (C-23), 18.8 (C-24), 15.7 (C-25), 16.6 (C-27), 179.8 (C-28), 17.5 (C-29), 21.4 (C-30); Positive ESIMS m/z 479 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Stigmasterol



mp 167-168°C(dec.); UV λ_{max} (MeOH) 201 nm; ^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 0.70 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, $J=7.5$ Hz, H-27), 0.83 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-26), 0.85 (3H, t, $J=7.8$ Hz, H-29), 0.92 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-21), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92–2.40 (24H, m, methane and methylene protons), 3.51–3.53 (1H, m, H-3), 5.02 (1H, dd, $J=15.5, 8.5$ Hz, H-22), 5.15 (1H, dd, $J=15.0, 8.5$ Hz, H-23), 5.34–5.35 (1H, m, H-6); ^{13}C -NMR (125MHz, CDCl_3) δ : 39.9 (C-1), 32.1 (C-2), 72.0 (C-3), 42.5 (C-4), 141.0 (C-5), 121.9 (C-6), 32.1 (C-7), 32.2 (C-8), 51.5 (C-9), 37.5 (C-10), 21.4 (C-11), 40.7 (C-12), 42.5 (C-13), 57.1 (C-14), 25.6 (C-15), 31.9 (C-16), 56.2 (C-17), 12.5 (C-18), 21.3 (C-19), 36.8 (C-20), 19.2 (C-21), 32.2 (C-22), 29.1 (C-23), 50.4 (C-24), 32.1 (C-25), 21.3 (C-26), 19.6 (C-27), 24.6 (C-28), 12.3 (C-29)); Positive ESIMS m/z 435 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

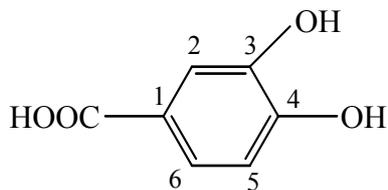
• β -Sitosterol



mp 137-140 °C; ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26), 0.82 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-27), 0.83 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-29), (0.91 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 3.51 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, br d, $J=5.5$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 11.9 (C-18), 12.0 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-26), 19.4 (C-19), 19.8 (C-27), 21.1 (C-11), 23.1 (C-28), 24.3 (C-15), 26.1 (C-23), 28.3 (C-16), 29.2 (C-25), 31.7 (C-2), 31.9 (C-7, 8), 34.0 (C-22), 36.2 (C-20), 36.5 (C-10), 37.3 (C-1), 39.8 (C-12), 42.3 (C-4), 42.3 (C-13), 45.9 (C-24), 50.1 (C-9), 56.1 (C-17), 56.8 (C-14), 71.8 (C-3), 121.7 (C-6), 140.8 (C-5); EIMS m/z 414 $[\text{M}]^+$

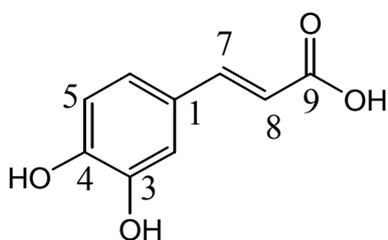
◦페놀류

•Protocatechuic acid



mp 195-196 °C; ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ: 6.80 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 7.44 (1H, dd, *J*=2.0, 9.5 Hz, H-6), 7.45 (1H, d, *J*=3.0 Hz, H-2), ¹³C-NMR(125MHz, CD₃OD) δ: 169.2 (C=O), 150.3 (C-4), 144.9 (C-3), 122.7 (C-6), 122.2 (C-1), 116.6 (C-2), 114.6 (C-5); Positive ESIMS *m/z* 177 [M + Na]⁺

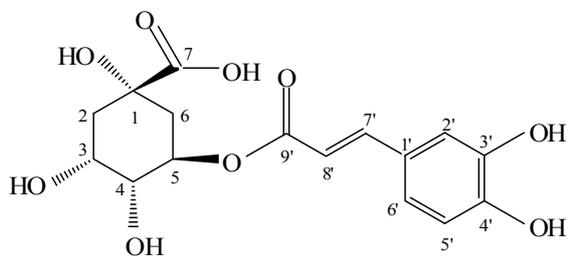
•Caffeic acid



mp 215-217°C; UV λ_{max} (MeOH) 203, 217, 233 sh, 244 sh, 298, 324nm; ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ: 6.23 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8), 6.79 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5), 6.95 (1H, dd, *J*=8.5 Hz, 2.0Hz, H-6), 7.05 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-2), 7.55 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-7); ¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ: 126.7 (C-1), 114.4 (C-2), 148.3 (C-3), 145.6 (C-4), 115.4 (C-5), 121.7 (C-6), 145.9 (C-7), 114.0 (C-8) 169.9 (C-9); Positive ESIMS *m/z* 203 [M + Na]⁺

◦ 기타

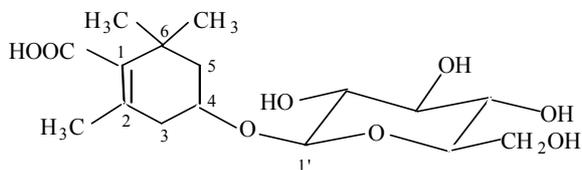
•Chlorogenic acid



mp 210°C (dec); UV λ_{max} (MeOH) 201, 217, 245 sh, 298 sh, 328 nm; ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ: 2.00–2.11 (1H, br ddd, H-2α), 2.17–2.26 (3H, br dd, H-2β, 6α, 6β), 4.16–4.19 (1H, br ddd, H-3), 3.73 (1H, dd, *J*=8.5, 3.0 Hz, H-4), 5.33–5.37 (1H, br ddd, H-5), 7.06 (1H, s, H-2'), 6.79 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5'), 6.97 (1H, dd, *J*=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 7.58 (1H, d, *J*=15.5 Hz, H-7'), 6.28 (1H, d, *J*=16.0 Hz, H-8'); ¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ: 75.1 (C-1), 37.1 (C-2), 70.9 (C-3), 72.5 (C-4), 70.3 (C-5), 37.8 (C-6), 176.1 (C-7),

126.7 (C-1'), 114.2 (C-2'), 145.6 (C-3'), 148.4 (C-4'), 116.5 (C-5'), 121.8 (C-6'), 145.9 (C-7'), 115.3 (C-8'), 167.5 (C-9')); Positive ESIMS m/z 377 [M + Na]⁺

•Picrocrocin acid

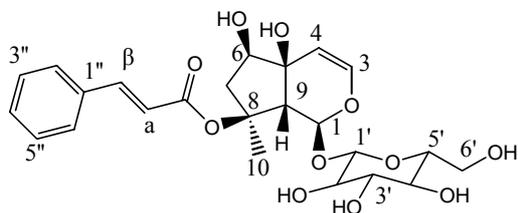


¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 1.13 and 1.23 (each 3H, 2 x Me-C6), 1.50–1.55 (2H, m, H-5a), 1.71 (3H, s, Me-C2), 1.85 (2H, dd, J =2.5, 12.0 Hz, H-5b), 2.04 (2H, dd, J =9.0, 16.5 Hz, H-3a), 2.41 (2H, dd, J =5.5, 17.0 Hz, H-3b), 3.16-3.88 (glucose); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 139.8 (C-1), 124.2 (C-2), 37.0 (C-3), 76.9 (C-4), 45.3 (C-5), 35.0 (C-6), 20.3 (Me-C2), 28.4 and 29.1 (2Me-C6), 176.7 (C=O), 101.4 (C-1'), 72.2 (C-2'), 76.7 (C-3'), 70.5 (C-4'), 74.0 (C-5'), 61.5 (C-6'); Positive ESIMS m/z 369 [M + Na]⁺

4. 현삼성분의 구조 및 분광데이터

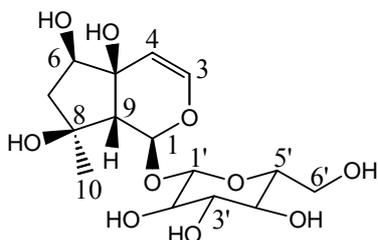
◦ Iridoid

•*E*-Harpagoside



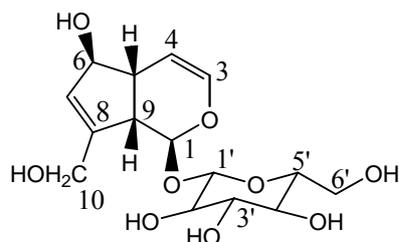
mp 212-214°C; UV λ_{max} (MeOH) 205, 217, 222 sh, 280 nm; IR ν_{max} 3200, 3050, 2900, 1695, 1610, 1580, 1075 cm⁻¹; ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ : 1.37 (3H, s, H-10), 1.86 (1H, dd, J =14.7, 4.0Hz, H-7a), 2.10 (1H, d, J =14.7Hz, H-7b), 2.78 (1H, s, H-9), 3.10–4.05 (sugar H), 3.60(1H, d, J =4.0Hz, H-6), 4.46 (H, d, J =7.8Hz, H-1'), 4.78 (1H, dd, J =6.4, 1.4Hz, H-4), 6.02 (1H, s, H-1), 6.24 (1H, d, J =6.5Hz, H-3), 6.34 (1H, d, J =16.0Hz, H- α), 7.24 (3H, m, H-3'', 4'', 5''), 7.41 (2H, m, H-2'', 6''), 7.49 (1H, d, J =16.0Hz, H- β); ¹³C-NMR (125MHz, CD₃OD) δ : 23.0 (C-10), 46.5 (C-7), 56.0 (C-9), 63.2 (C-6'), 71.9 (C-4'), 73.7 (C-5), 75.0 (C-2'), 78.0 (C-5'), 78.1 (C-6), 78.4 (C-3'), 89.1 (C-8), 95.0 (C-1), 100.3 (C-1'), 106.9 (C-4), 120.5 (C- α), 129.5 (C-3'', 5''), 130.5 (C-2'', 6''), 132.0 (C-4''), 136.1 (C-1''), 144.3 (C-3), 146.5 (C- β), 169.2 C=O); Positive ESIMS m/z 516 [M + Na]⁺

•Harpagide



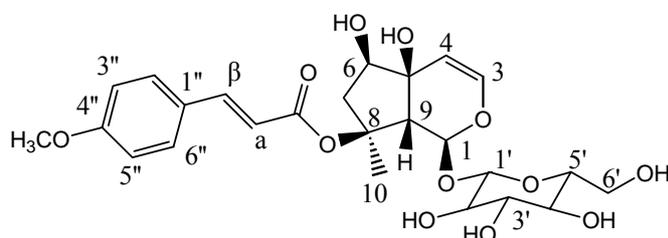
mp 186-188°C; UV $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$ 204 nm; IR ν_{\max} 3380, 2950, 2830, 1660, 1550, 1450, 1030 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 1.08 (3H, s, H-10), 1.62 (1H, dd, $J=14.0, 5.0$ Hz, H-7a), 1.72 (1H, d, $J=14.3$ Hz, H-7b), 2.77 (1H, s, H-9), 3.10-3.85 (sugar H), 3.61 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-6), 4.47 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 4.78 (1H, dd, $J=6.4, 1.5$ Hz, H-4), 6.02 (1H, s, H-1), 6.25 (1H, d, $J=6.4$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 93.8 (C-1), 142.8 (C-3), 108.7 (C-4), 72.9 (C-5), 77.9 (C-6), 47.5 (C-7), 78.6 (C-8), 60.0 (C-9), 25.1 (C-10), 99.9 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.7 (C-3'), 72.1 (C-4'), 78.5 (C-5'), 63.2 (C-6'); Positive ESIMS m/z 387 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Aucubin



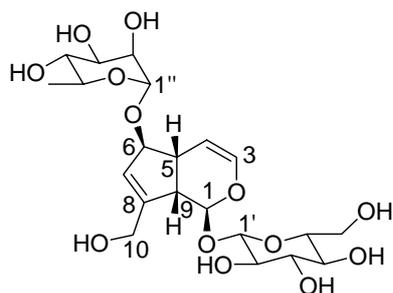
mp 126-128°C; UV $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$ 202nm; IR ν_{\max} 3380, 2970, 1640, 1540, 1050 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 2.66 (1H, m, H-5), 2.91 (1H, br t, H-9), 3.20-3.90 (sugar H), 4.18 (1H, dd, $J=15.5, 0.8$ Hz, H-10a), 4.36 (1H, br d, H-10b), 4.45 (1H, m, H-6), 4.69 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.96 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-7), 5.10 (1H, dd, $J=6.0, 4.0$ Hz, H-4), 5.78 (1H, br s, H-1), 6.32 (1H, dd, $J=6.0, 2.0$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 96.6 (C-1), 140.4 (C-3), 104.6 (C-4), 45.1 (C-5), 81.7 (C-6), 129.1 (C-7), 146.9 (C-8), 46.8 (C-9), 60.3 (C-10), 98.8 (C-1'), 73.8 (C-2'), 76.8 (C-3'), 70.4 (C-4'), 77.1 (C-5'), 61.5 (C-6'); Positive ESIMS m/z 369 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•8-*O-E-p*-Methoxycinnamoylharpagide



$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -38.0°; UV $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$ 204, 224, 309 nm; IR ν_{\max} 3420, 2970, 1680, 1620, 1520, 1050 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 1.48 (3H, s, H-10), 2.01 (1H, dd, $J=15.2, 4.5$ Hz, H-7a), 2.21 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H-7b), 2.89 (1H, s, H-9), 3.15-3.50 (sugar H), 3.72 (3H, s, OMe), 3.77 (1H, dd, $J=11.0, 5.8$ Hz, H-6a'), 3.99 (1H, dd, $J=11.0, 2.1$ Hz, H-6b'), 4.59 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.86 (1H, dd, $J=6.2, 1.3$ Hz, H-4), 6.15 (1H, br s, H-1), 6.30 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H- α), 6.35 (1H, d, $J=6.4$ Hz, H-3), 6.90 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3'', 5''), 7.48 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2'', 6''), 7.54 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H- β); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 94.7 (C-1), 144.1 (C-3), 106.6 (C-4), 73.6 (C-5), 77.7 (C-6), 46.5 (C-7), 88.0 (C-8), 55.8 (C-9), 23.0 (C-10), 100.1 (C-1'), 74.5 (C-2'), 77.8 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 63.0 (C-6'), 128.5 (C-1''), 131.2 (C-2'', 6''), 115.3 (C-3'', 5''), 163.0 (C-4''), 117.5 (C- α), 146.1 (C- β), 169.2 (C=O), 55.9 (OMe); Positive ESIMS m/z 547 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

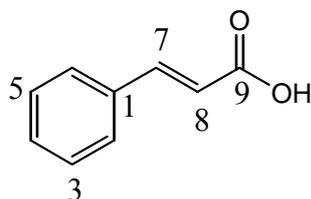
•Sinuatol



$[\alpha]_D^{20} = -147^\circ$ (C 0.3, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 1.29 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-6''), 2.81 (1H, m, H-5), 2.90 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-9), 3.20–3.90 (10H, m, sugar-H), 4.19 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-10b), 4.38 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-10a), 4.47 (1H, m, H-6), 4.70 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1'), 4.83 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1''), 4.91 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1), 5.16 (1H, dd, $J=6.0, 4.0$ Hz, H-4), 5.88 (1H, t, $J=1.5$ Hz, H-7), 6.35 (1H, dd, $J=6.0, 2.0$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 18.2 (C-6''), 44.5 (C-5), 48.3 (C-9), 61.5 (C-10), 62.8 (C-6'), 70.3 (C-5''), 71.7 (C-4'), 72.4 (C-3''), 72.7 (C-2''), 74.2 (C-4''), 75.1 (C-2'), 78.0 (C-5'), 78.4 (C-3'), 89.1 (C-6), 98.3 (C-1), 100.2 (C-1'), 101.3 (C-1''), 105.8 (C-4), 127.4 (C-7), 142.1 (C-3), 149.6 (C-8); Positive ESIMS m/z 515 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

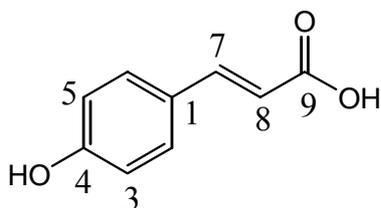
◦ Cinnamic acid derivatives

•Cinnamic acid



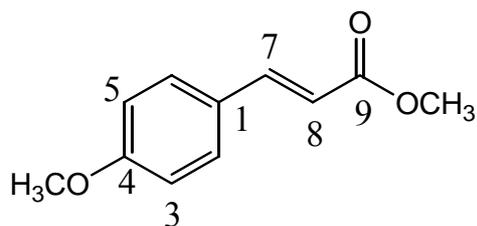
mp 132-135°C; UV λ_{max} (MeOH) 202, 215, 220, 272 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 6.49 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-8), 7.40, 7.60 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, 6), 7.69 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 134.7 (C-1), 128.0 (C-2, 6), 128.8 (C-3, 5), 130.2 (C-4), 145.2 (C-7), 118.2 (C-8), 169.2 (C-9); Negative ESIMS m/z 147 $[\text{M} - \text{H}]^-$

•*p*-Coumaric acid



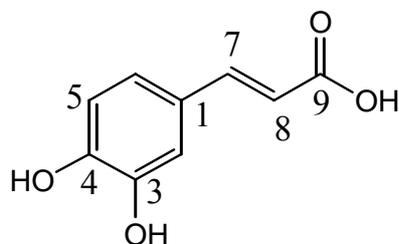
mp 212-214°C; UV λ_{max} (MeOH) 202, 210, 226, 300, 309 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 6.29 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-8), 6.82 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2, 6), 7.46 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3, 5), 7.62 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 126.1 (C-1), 115.7 (C-2,6), 129.9 (C-3,5), 160.0 (C-4), 145.5 (C-7), 114.5 (C-8), 169.9 (C-9); Positive ESIMS m/z 187 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester



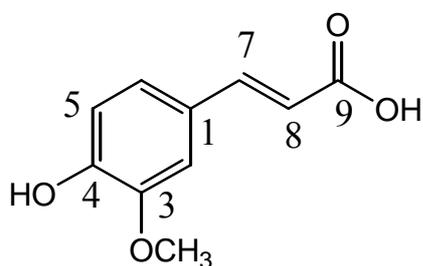
mp 130-133°C; UV λ_{\max} (MeOH) 201, 226, 298 sh, 309 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 3.78 (3H, s, OMe), 3.84 (3H, s, OMe), 6.38 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8), 6.96 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2,6), 7.55 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3,5), 7.65 (1H, d, $J=15.5$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 127.1 (C-1), 114.3 (C-2,6), 129.8 (C-3,5), 162.0 (C-4), 145.0 (C-7), 114.7 (C-8), 168.4 (C-9), 50.9 (COOMe), 54.7 (OMe); Positive ESIMS m/z 215 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Caffeic acid



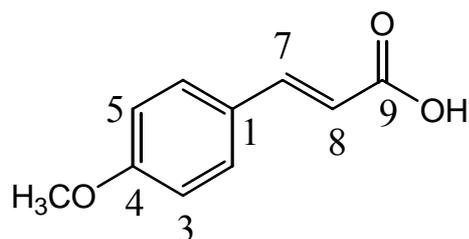
mp 215-217°C; UV λ_{\max} (MeOH) 203, 217, 233 sh, 244 sh, 298, 324 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 6.23 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8), 6.79 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5), 6.95 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, 2.0Hz, H-6), 7.05 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 7.55 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 126.7 (C-1), 114.4 (C-2), 148.3 (C-3), 145.6 (C-4), 115.4 (C-5), 121.7 (C-6), 145.9 (C-7), 114.0 (C-8), 169.9 (C-9); Positive ESIMS m/z 203 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•Ferulic acid



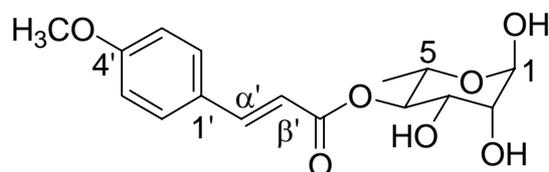
mp 167-170°C; UV λ_{\max} (MeOH) 202, 231 sh, 292, 320 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 3.90 (3H, s, OMe), 6.32 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8), 6.82 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 7.07 (1H, dd, $J= 8.5, 2.0$ Hz, H-6), 7.17 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2), 7.61 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 127.8 (C-1), 111.8 (C-2), 149.4 (C-3), 150.5 (C-4), 116.0 (C-5), 124.0 (C-6), 146.9 (C-7), 116.5 (C-8), 171.0 (C-9), 56.5 (OMe); Positive ESIMS m/z 217 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

•(*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid



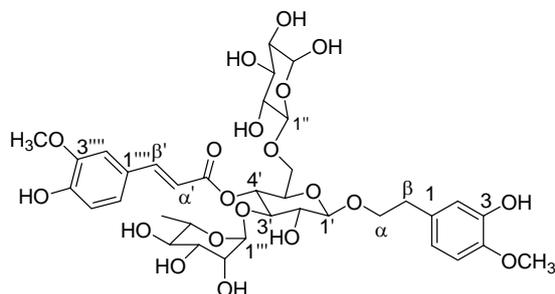
mp 170-172°C; UV λ_{max} (MeOH) 213, 225, 298, 307 nm; $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 3.85 (3H, s, OMe), 6.34 (1H, d, $J=16.0\text{Hz}$, H-8), 6.97 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-2,6), 7.56 (2H, d, $J=9.0\text{ Hz}$, H-3,5), 7.64 (1H, d, $J=16.0\text{Hz}$, H-7); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 127.3 (C-1), 114.3 (C-2,6), 129.7 (C-3,5), 161.9 (C-4), 145.0 (C-7), 115.5 (C-8), 169.7 (C-9), 54.7 (OMe); Positive ESIMS m/z 201 [M + Na] $^+$

•Buergeriside C₁



Pale yellow amorphous powder; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ : 1.31 (3H, d, $J=6.0\text{ Hz}$, H-6), 3.67 (1H, t, $J=9.7\text{ Hz}$, rha.-H), 3.85 (3H, s, OMe), 3.97 (1H, dd, $J=9.5, 5.5\text{ Hz}$, rha.-H), 4.02 (1H, dd, $J=3.0, 2.0\text{ Hz}$, rha.-H), 5.03 (1H, d, $J=1.5\text{ Hz}$, H-1), 5.17 (1H, dd, $J=9.5, 3.5\text{ Hz}$, H-4), 6.48 (1H, d, $J=16.0\text{ Hz}$, H- α'), 6.97 (2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$, H-3',5'), 7.58 (2H, d, $J=8.5\text{ Hz}$, H-2',6'), 7.74 (1H, d, $J=16.0\text{ Hz}$, H- β'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 18.3 (C-6), 56.0 (OMe), 69.6 (C-5), 71.2 (C-3), 71.8 (C-2), 75.7 (C-4), 96.0 (C-1), 115.6 (C-3',5'), 116.7 (C- α'), 128.6 (C-1'), 131.1 (C-2', 6'), 146.3 (C- β'), 163.3 (C-4'), 168.9 (C=O); Positive ESIMS m/z 347 [M + Na] $^+$

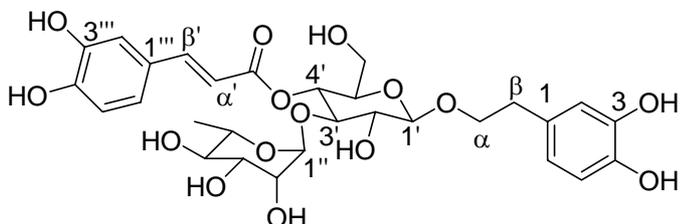
•Angoroside C



$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -63.5^\circ$ (C 0.32, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ : 1.12 (3H, d, $J=6.0\text{ Hz}$, H-6'''), 2.84 (2H, t, $J=7.5\text{ Hz}$, H- β), 3.29-3.95 (14H, m, sugar-H), 3.72-3.80 (1H, m, H- α), 3.82 (3H, s, 4''''-OMe), 3.90 (3H, s, 3-OMe), 4.06 (1H, m, H- α), 4.25 (1H, d, $J=6.5\text{ Hz}$, H-1''), 4.40 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$, H-1'), 4.99 (1H, t, $J=9.5\text{ Hz}$, H-4'), 5.22 (1H, d, $J=1.0\text{ Hz}$, H-1'''), 6.39 (1H, d, $J=16.0\text{ Hz}$, H- α'), 6.71 (1H, dd, $J=8.0, 2.0\text{ Hz}$, H-6), 6.77 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$, H-2), 6.83 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$, H-5''''), 6.84 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$, H-5), 7.10 (1H, dd, $J=8.0, 2.0\text{ Hz}$, H-6''''), 7.21 (1H, d, $J=2.0\text{ Hz}$, H-2''''), 7.68 (1H, d, $J=16.0\text{ Hz}$, H- β'); $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) δ : 18.6 (C-6'''), 36.7(C- β), 56.7 (4''''-OMe), 56.7 (3-OMe), 66.9 (C-5'''), 69.2 (C-6'), 69.7 (C-4''),

70.6 (C-4'), 70.7 (C-5'''), 72.2 (C-3'''), 72.3 (C- α), 72.5 (C-2'''), 72.6 (C-2''), 73.9 (C-3''), 74.2 (C-4'''), 75.1 (C-5'), 76.3 (C-2'), 81.7 (C-3'), 103.2 (C-1'''), 104.3 (C-1''), 105.2 (C-1'), 112.1 (C-2'''''), 113.1 (C-2), 115.3 (C- α'), 116.7 (C-5'''''), 117.3 (C-5), 121.4 (C-6), 124.7 (C-6'''''), 127.8 (C-1'''''), 133.2 (C-1), 147.5 (C-4), 147.7 (C-3), 148.2 (C- β'), 149.5 (C-3'''''), 151.0 (C-4'''''), 168.5 (C=O); Negative ESIMS m/z 783 [M - H]⁻

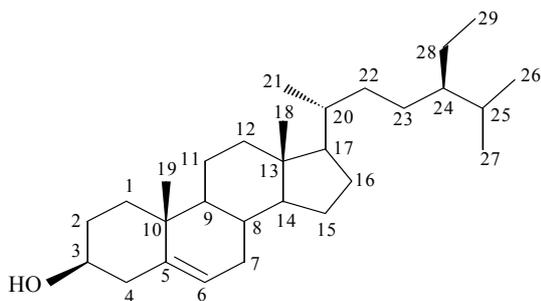
• Acteoside



mp 148-151 °C; $[\alpha]_D^{20} = -77^\circ$ (C 0.3, MeOH); ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 0.97 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-6''), 2.71 (2H, m, H-7), 3.08 - 3.95 (9H, m, sugar-H), 3.57 - 3.95 (2H, m, H-8), 4.36 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1'), 4.72 (1H, t, $J=9.8$ Hz, H-4'), 5.04 (1H, brd, $J=1.5$ Hz, H-1''), 6.19 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'''), 6.50 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.63 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2), 6.64 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.77 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'''), 6.97 (1H, dd, $J=8.5, 2.0$ Hz, H-6'''), 7.03 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'''), 7.46 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7'''); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ : 18.8 (C-6''), 35.7 (C-7), 61.4 (C-6'), 69.4 (C-5''), 69.9 (C-4'), 70.9 (C-3''), 71.1 (C-2''), 71.2 (C-8), 72.4 (C-4''), 75.2 (C-2'), 75.2 (C-5'), 79.8 (C-3'), 101.9 (C-1''), 103.0 (C-1'), 114.3 (C-8'''), 115.4 (C-2'''), 116.2 (C-5), 116.5 (C-5'''), 117.0 (C-2), 120.2 (C-6), 122.1 (C-6'''), 126.2 (C-1''), 129.8 (C-1), 144.3 (C-4), 145.7 (C-3), 145.7 (C-3'''), 146.3 (C-7'''), 149.2 (C-4'''), 166.4 (C-9'''); Negative ESIMS m/z 623 [M - H]⁻

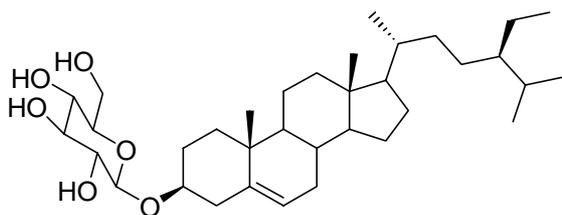
◦ 기타

• β -Sitosterol



mp 137-140 °C; ¹H-NMR (500MHz, CD₃OD) δ : 0.66 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26), 0.82 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-27), 0.83 (3H, t, $J=7.5$ Hz, H-29), (0.91 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 3.51 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, br d, $J=5.5$ Hz, H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 11.9 (C-18), 12.0 (C-29), 18.8 (C-21), 19.0 (C-26), 19.4 (C-19), 19.8 (C-27), 21.1 (C-11), 23.1 (C-28), 24.3 (C-15), 26.1 (C-23), 28.3 (C-16), 29.2 (C-25), 31.7 (C-2), 31.9 (C-7, 8), 34.0 (C-22), 36.2 (C-20), 36.5 (C-10), 37.3 (C-1), 39.8 (C-12), 42.3 (C-4), 42.3 (C-13), 45.9 (C-24), 50.1 (C-9), 56.1 (C-17), 56.8 (C-14), 71.8 (C-3), 121.7 (C-6), 140.8 (C-5); EIMS m/z 414 [M⁺]

•Daucosterol

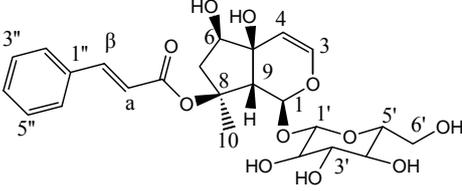
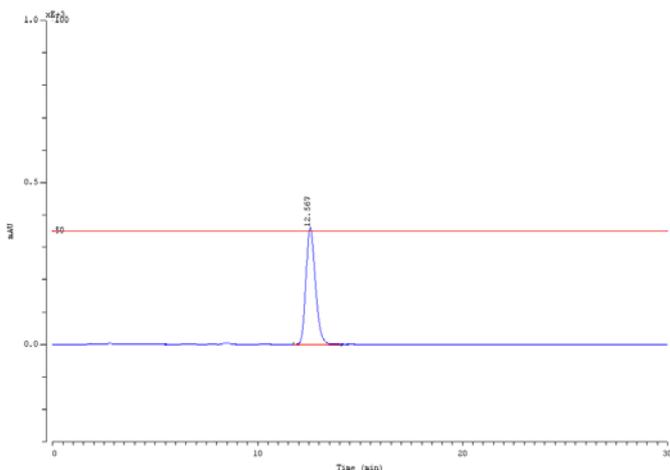


mp 275-278 °C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300MHz, δppm): 0.63(3H, s, H-18), 0.83(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$, H-26), 0.85(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$, H-27), 0.86(3H, t, $J=7.5\text{Hz}$, H-29), 0.96(3H, d, $J=6.5\text{Hz}$, H-21), 0.91(3H, s, H-19), 3.96(1H, m, H-3), 5.03(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-1'), 5.32(1H, brs, H-6), 6.54(1H, brs); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75.5MHz δppm): 37.5(C-1), 30.3(C-2), 78.6(C-3), 39.5(C-4), 140.9(C-5), 121.9(C-6), 32.3(C-7), 32.2(C-8), 50.3(C-9), 37.0(C-10), 21.4(C-11), 40.0(C-12), 42.6(C-13), 6.8(C-14), 24.6(C-15), 28.6(C-16), 56.2(C-17), 12.0(C-18), 19.2(C-19), 36.4(C-20), 19.0(C-21), 34.3(C-22), 26.6(C-23), 46.0(C-24), 29.6(C-25), 19.4(C-26), 20.0(C-27), 23.4(C-28), 12.2(C-29), 102.6(C-1'), 75.4(C-2'), 78.6(C-3'), 71.7(C-4'), 78.0(C-5'), 62.8(C-6'); Positive ESIMS m/z 599 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

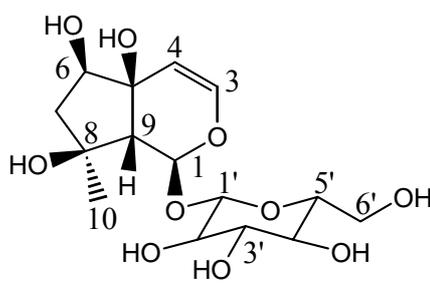
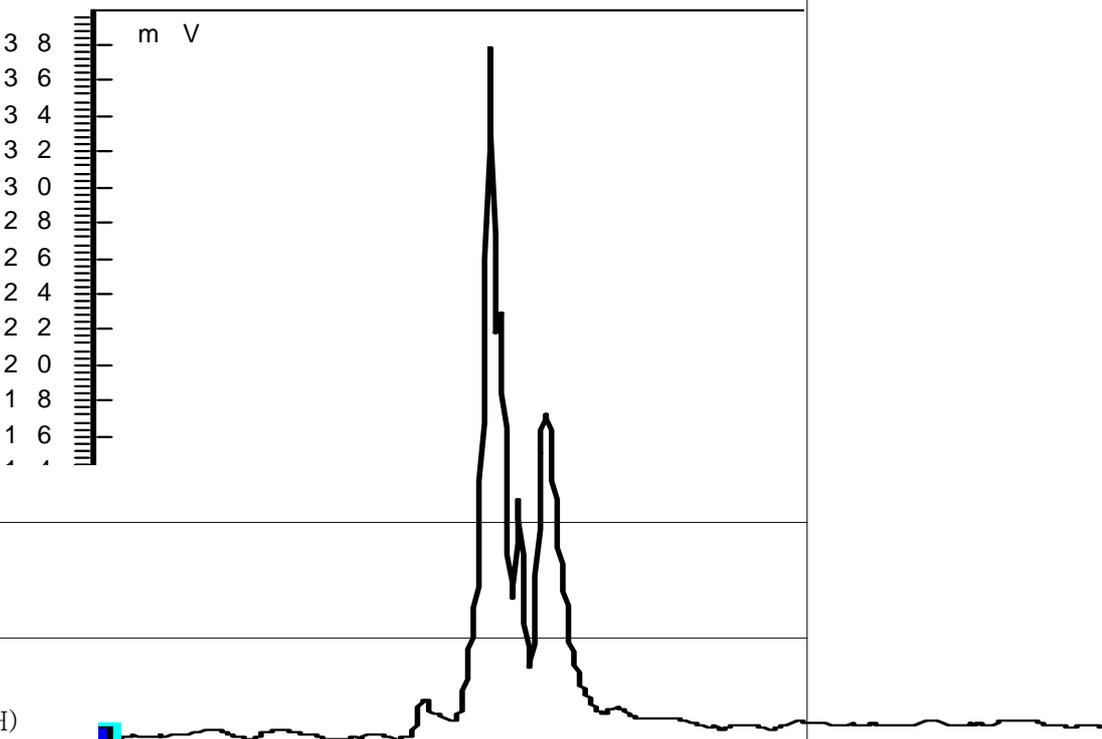
4. 함유성분의 순도분석 결과

◦현삼성분의 순도성적서

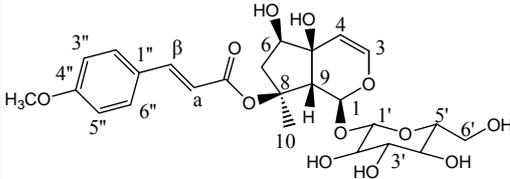
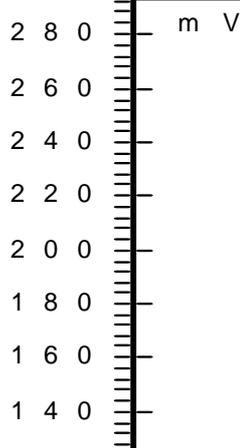
순도성적서

화합물명	<i>E</i> -harpagoside		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	분자량	494
순도	99.9%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	<ul style="list-style-type: none"> ·Column: Gemini 5μ C18 110A (4.6\times150 mm), phenomenex ·Mobile phase: 53% MeOH ·Flow rate: 1.0 ml/min ·Detector: UV 254nm 	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 농도 : 0.3 mg/ml (MeOH)						

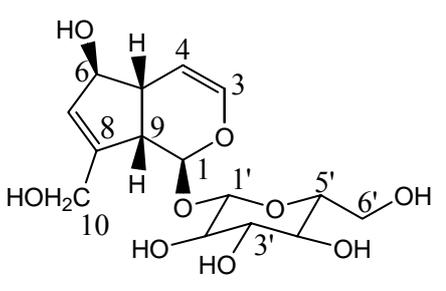
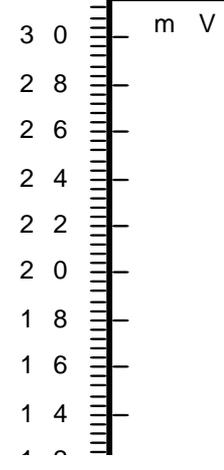
순도성적서

화합물명	Harpagide		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	분자량	364
순도	99%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (15:85 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	농도 : 0.1 mg/ml (MeOH)					

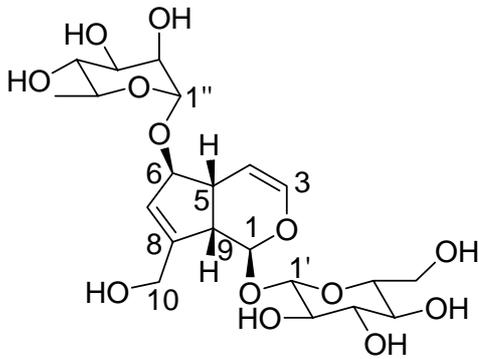
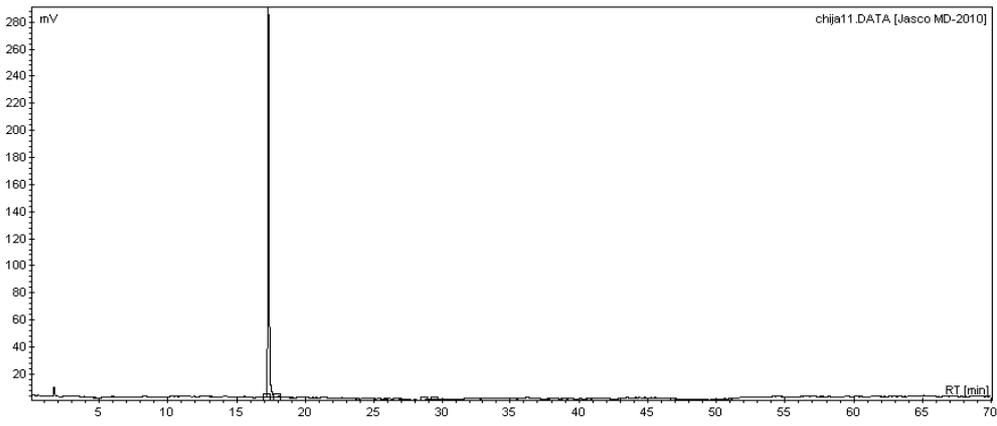
순도성적서

화합물명	8- <i>O-E-p</i> -methoxycinnamoyl-harpagide		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	분자량	524
순도	99%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (13:87 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector : ELSD	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	농도 : 1 mg/ml (MeOH) 두 개의 peak는 각각 cis-, trans- <i>p</i> -methoxycinnamoylharpagide					

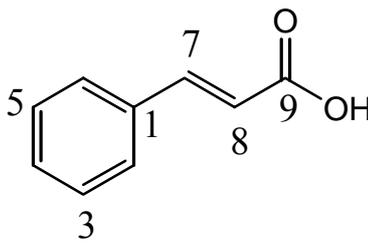
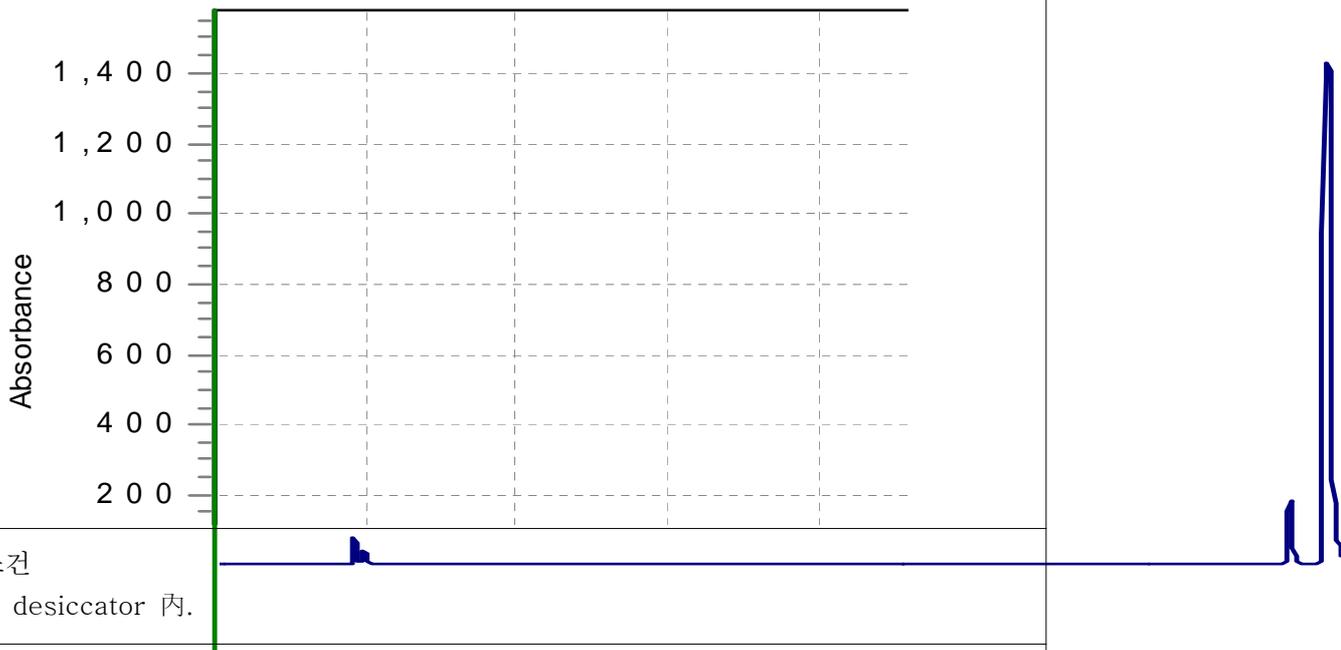
순도성적서

화합물명	Aucubin		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	분자량	346
순도	99%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (15:85 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
농도 : 0.1 mg/ml (MeOH)						

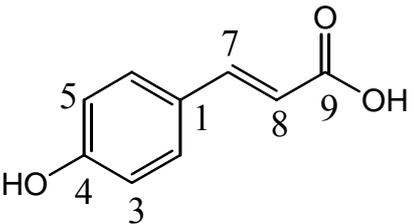
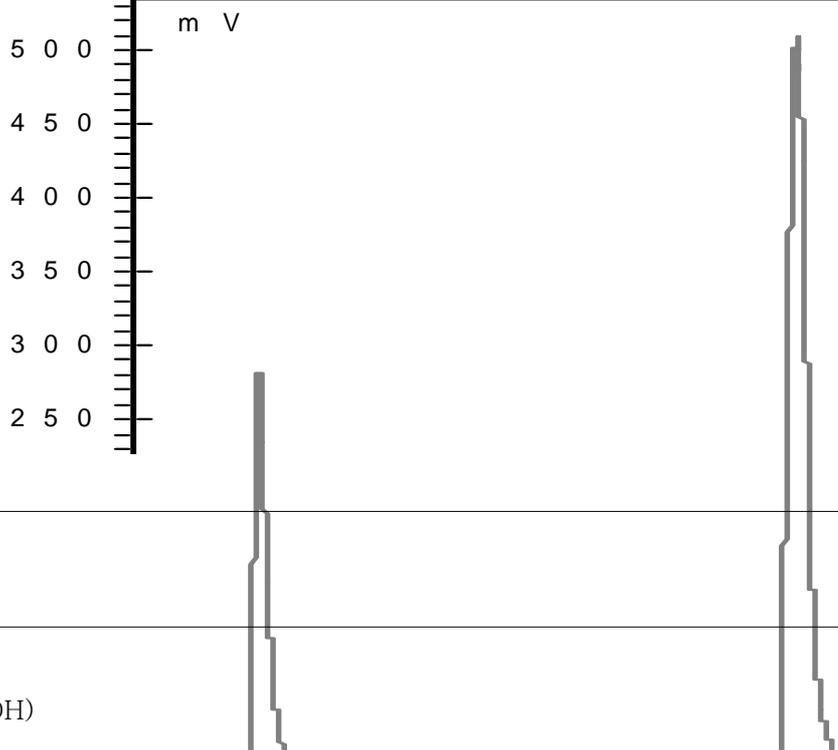
순도성적서

화합물명	Sinuatol		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₃	분자량	492
순도	99.4%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Sunfire C ₁₈ , 5μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:1% H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 농도 : 0.5 mg/ml (MeOH)						

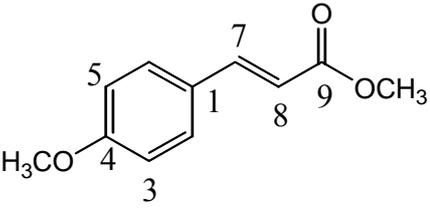
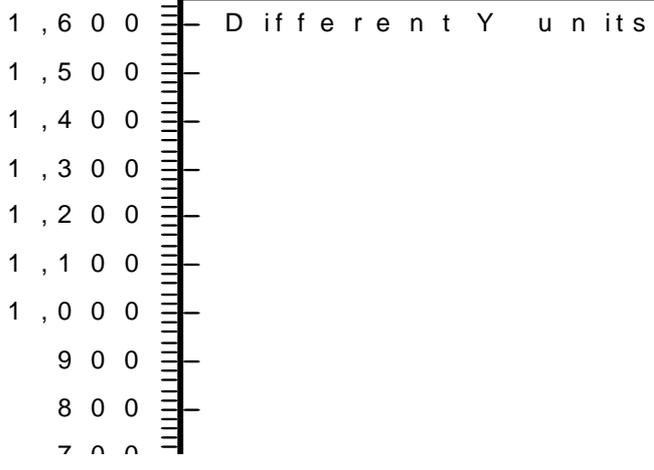
순도성적서

화합물명	Cinnamic acid		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₉ H ₈ O ₂	분자량	148
순도	96%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (15:85 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: UV 296nm	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	농도 : 1 mg/ml (MeOH)					

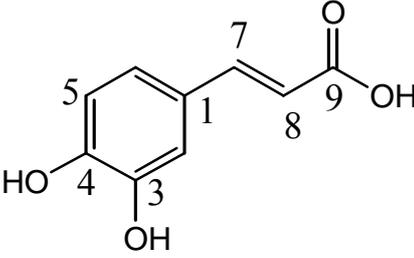
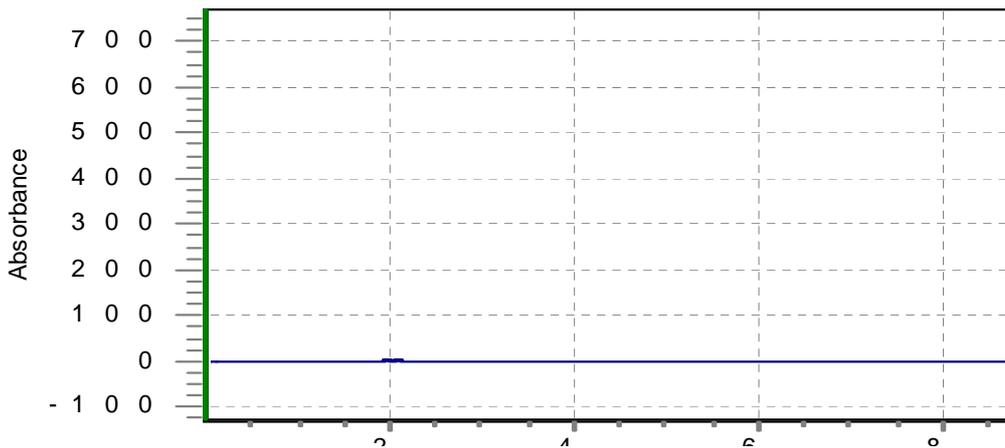
순도성적서

화합물명	<i>p</i> -Coumaric acid		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₉ H ₆ O ₃	분자량	164
순도	98%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (13:87 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	농도 : 1 mg/ml (MeOH)					

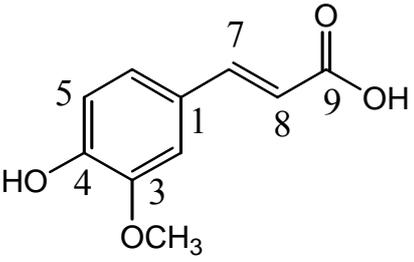
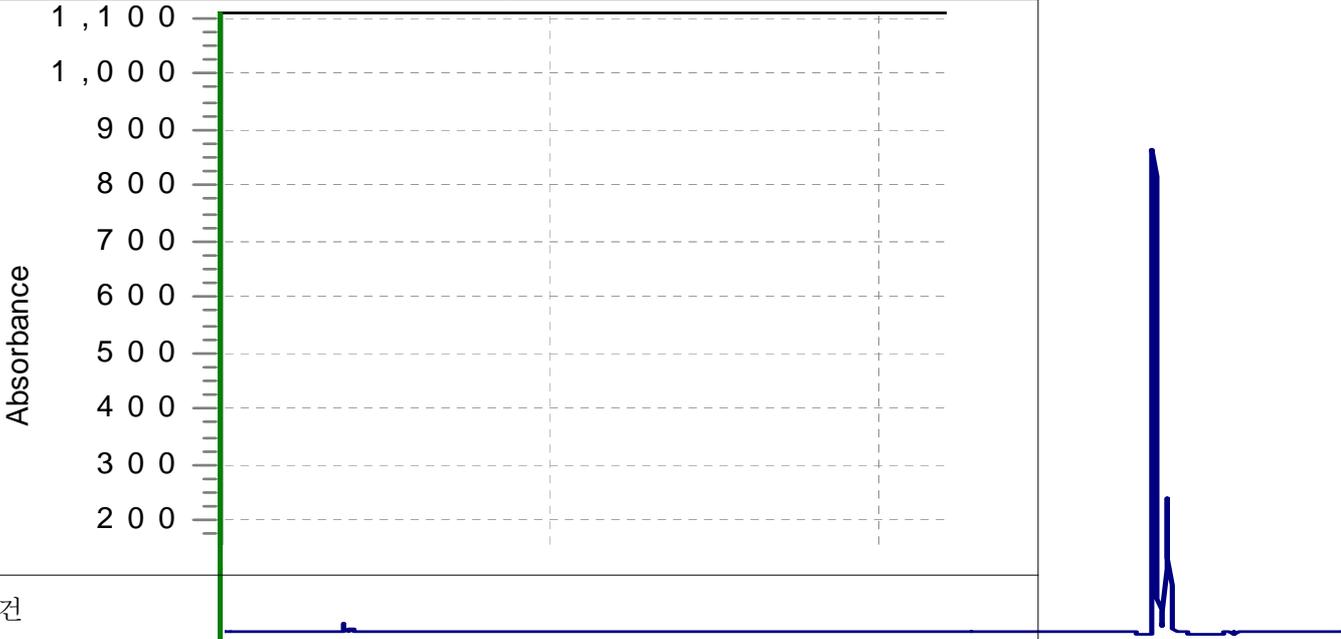
순도성적서

화합물명	<i>p</i> -Methoxycinnamic acid methyl ester		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	분자량	192
순도	99%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (10:90 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector : UV 296nm	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
농도 : 1 mg/ml (MeOH)						

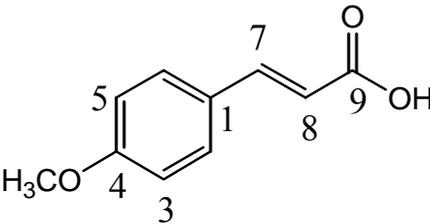
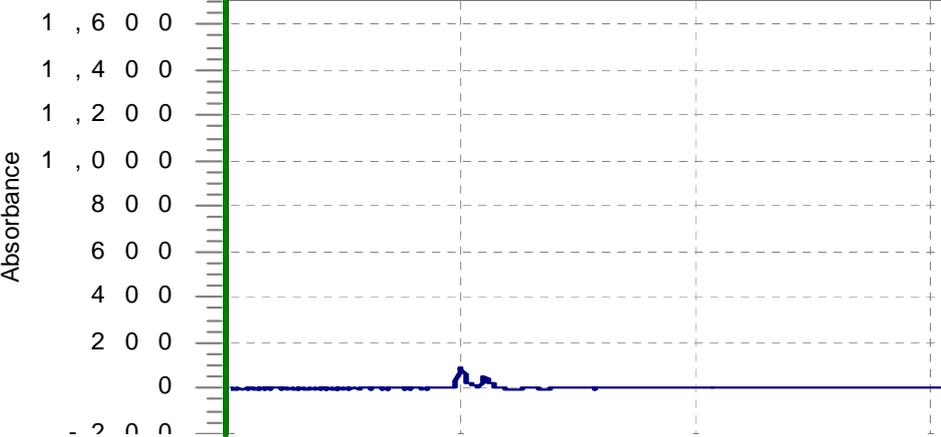
순도성적서

화합물명	Caffeic acid		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₉ H ₈ O ₄	분자량	180
순도	96%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: UV 296nm	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 농도 : 1 mg/ml (MeOH)						

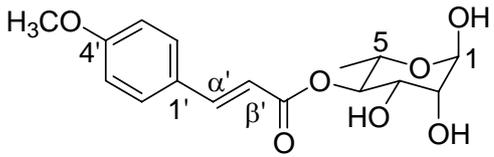
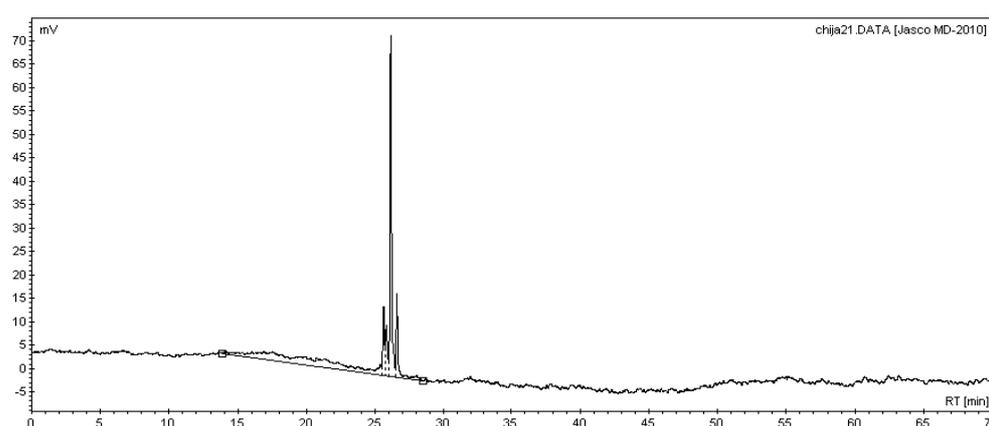
순도성적서

화합물명	Ferulic acid		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	분자량	194
순도	98%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: UV 296nm	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	농도 : 1 mg/ml (MeOH) 두 개의 peak는 각각 cis-, trans-ferulic acid					

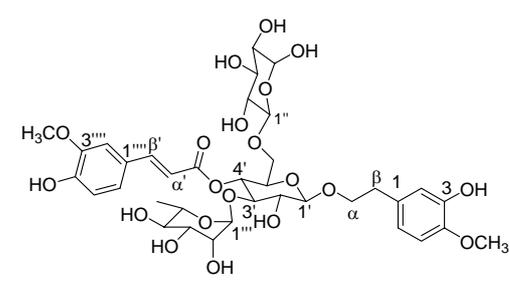
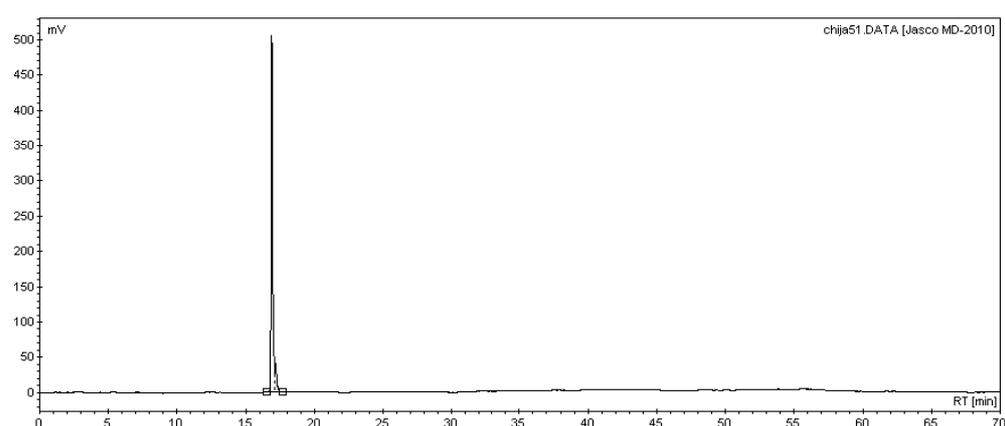
순도성적서

화합물명	(E)-p-Methoxycinnamic acid		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	분자량	178
순도	96%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (15:85 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: UV 326nm	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
농도 : 1 mg/ml (MeOH)						
두 개의 peak는 각각 cis-, trans--p-Methoxycinnamic acid						

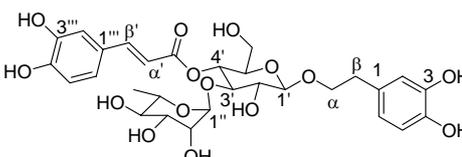
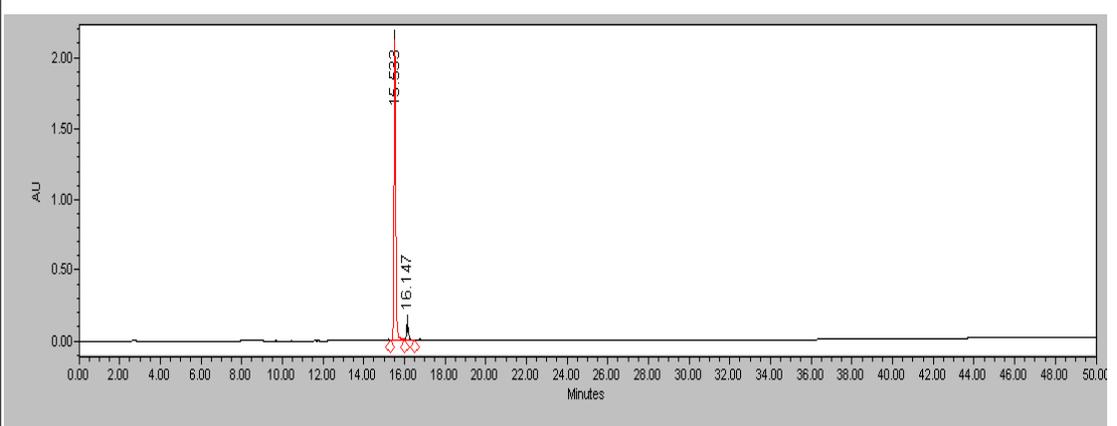
순도성적서

화합물명	Buergeriside C ₁		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₁₆ H ₂₀ O ₇	분자량	324
순도	81%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Sunfire C ₁₈ , 5μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. ·Mobile phase: 1% HOAc-MeCN:1% H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 농도 : 0.5 mg/ml (MeOH)						

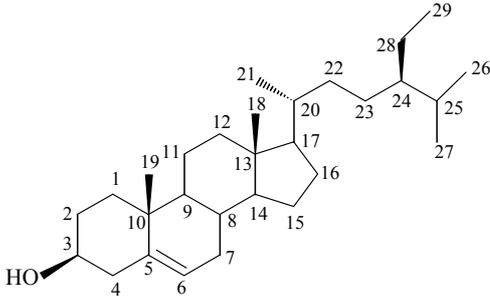
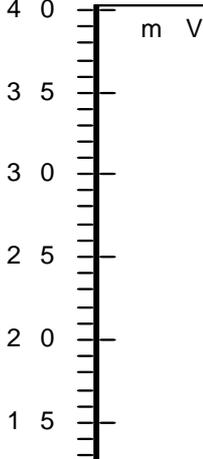
순도성적서

화합물명	Angoroside C		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	분자량	784
순도	92.5%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Sunfire C ₁₈ , 5μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. ·Mobile phase: 1% HOAc-MeCN:1% H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 농도 : 1 mg/ml (MeOH)						

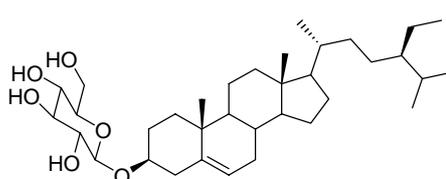
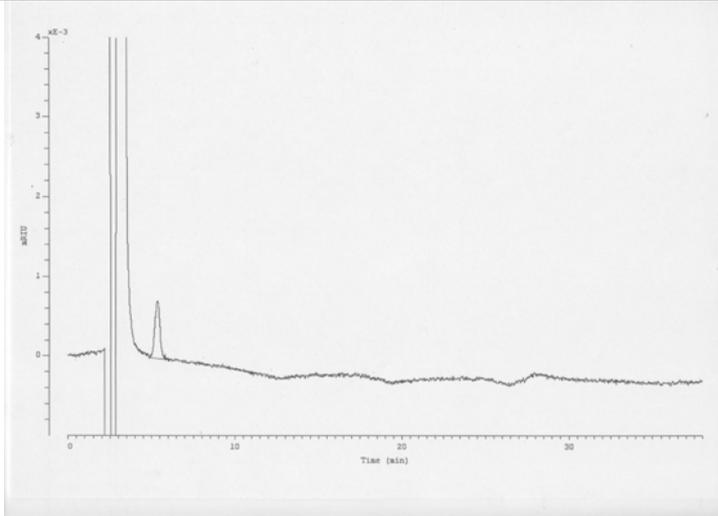
순도성적서

화합물명	Acteoside		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	분자량	624
순도	92.9%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	<ul style="list-style-type: none"> · Column: Sunfire C₁₈, 5 μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. · Mobile phase: 1% HOAc-MeCN:1% H₂O (0:100 → 100:0) · Flow rate: 0.8 ml/min · Detector: UV 254 nm 	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 농도 : 1.2 mg/ml (MeOH)						

순도성적서

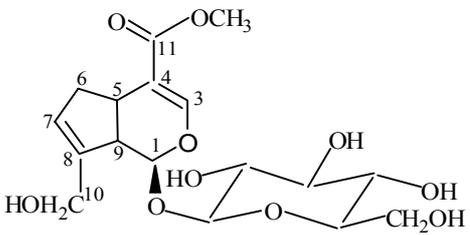
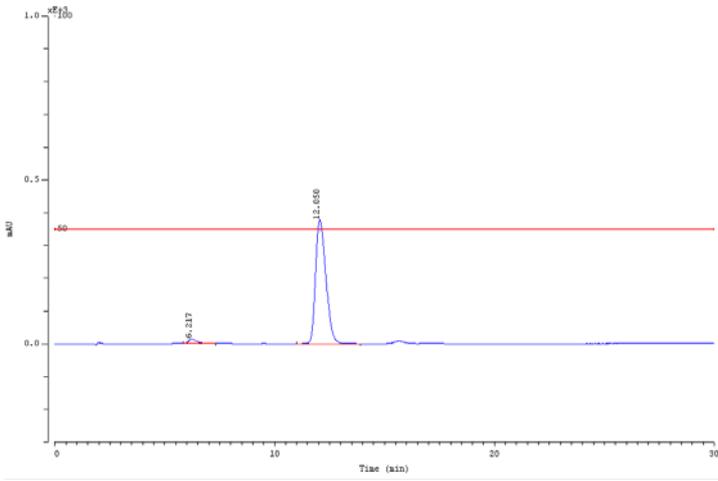
화합물명	β -Sitosterol		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₂₉ H ₅₀ O	분자량	414
순도	92%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건	-20℃, 냉장고 內.					
참고사항	농도 : 1.0 mg/ml (DMSO)					

순도성적서

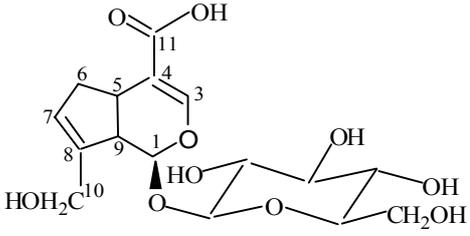
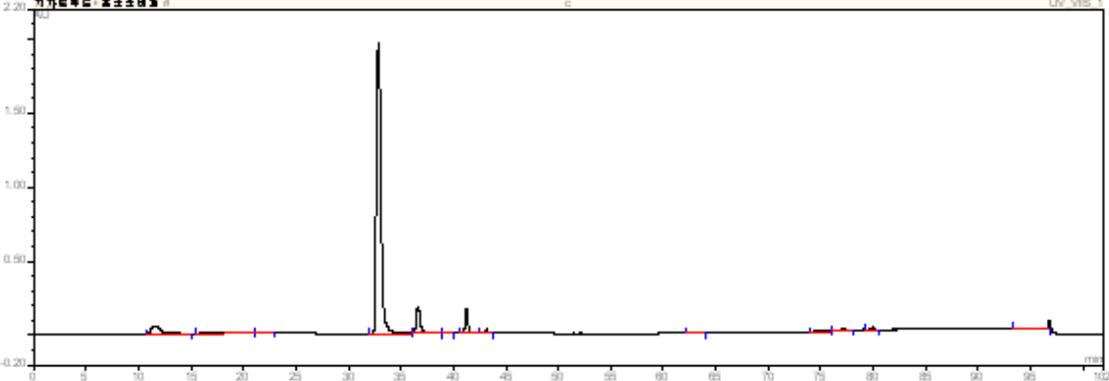
화합물명	Daucosterol		한약재명	현삼(<i>Scrophularia buergeriana</i>)		
			화학식	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	분자량	576
순도	98%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Luna Silica (2) 100A, 5μ, 4.6×150 mm, phenomenex, U.S.A. ·Mobile phase: CH ₂ Cl ₂ -MeOH (10:1) · Flow rate: 1.0 ml/min · Detector: RI	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
농도 : 3.0 mg/ml (pyridine)						

·치자성분의 순도성적서

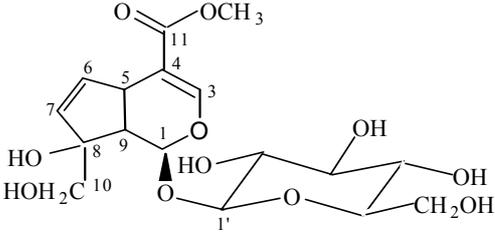
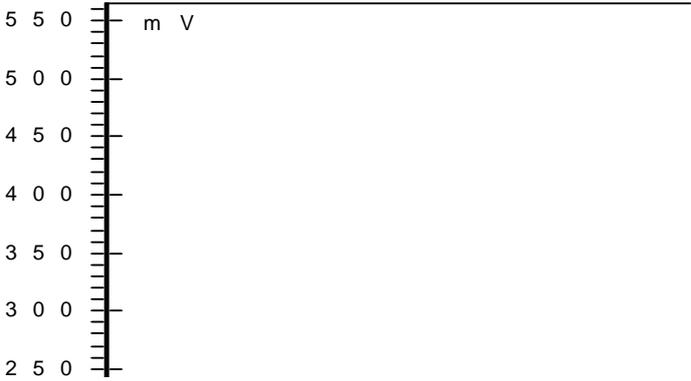
순도성적서

화합물명	Geniposide		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	분자량	388
순도	97	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Gemini 5 μ C18 110A (4.6 \times 150 mm), phenomenex ·Mobile phase: 25% MeOH ·Flow rate: 1.0 ml/min ·Detector: UV 254nm	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 内.						
참고사항						
농도 : 1.0mg/ 1ml (MeOH)						

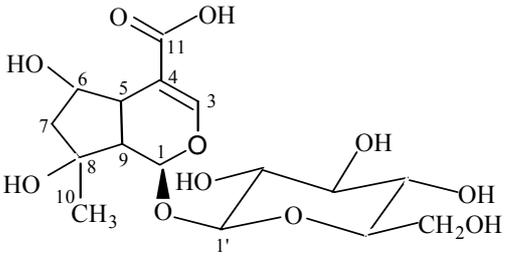
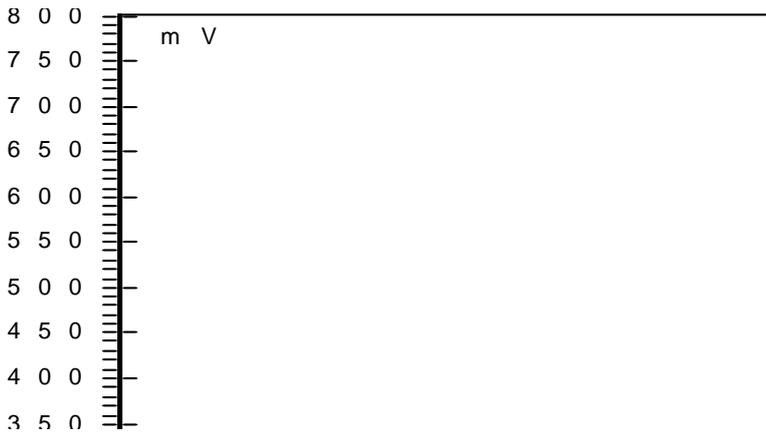
순도성적서

화합물명	Geniposidic acid		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	분자량	374
순도	91%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×250 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 254nm	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 内 (특히 흡습성 있음).						
참고사항 ※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

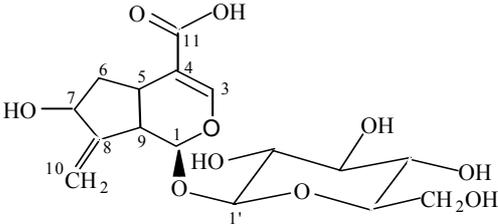
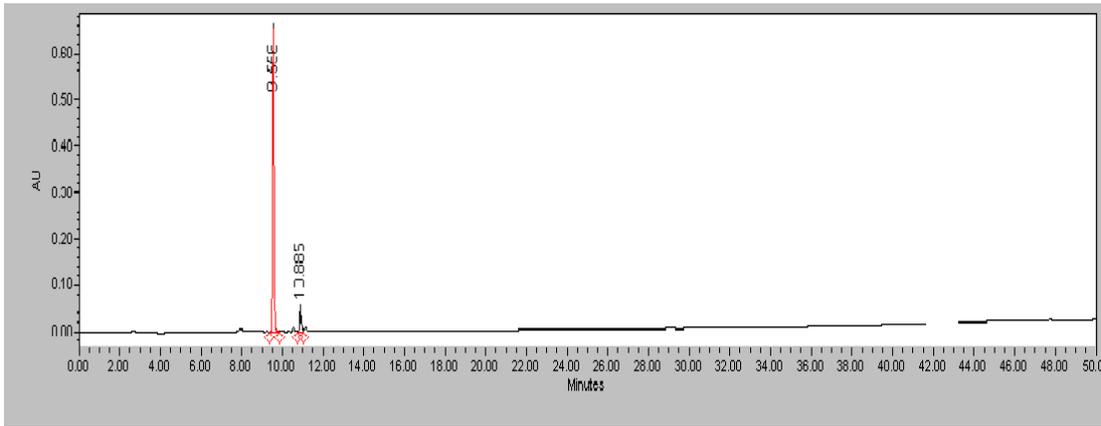
순도성적서

화합물명	Gardenoside		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	분자량	404
순도	97%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 ※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (MeOH)						

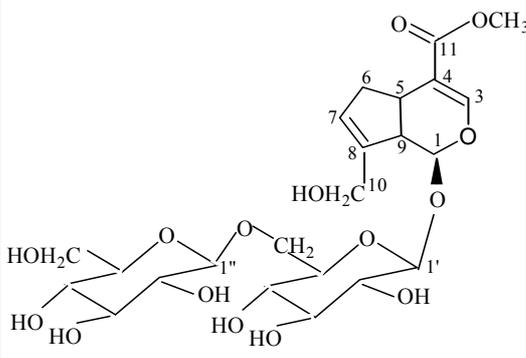
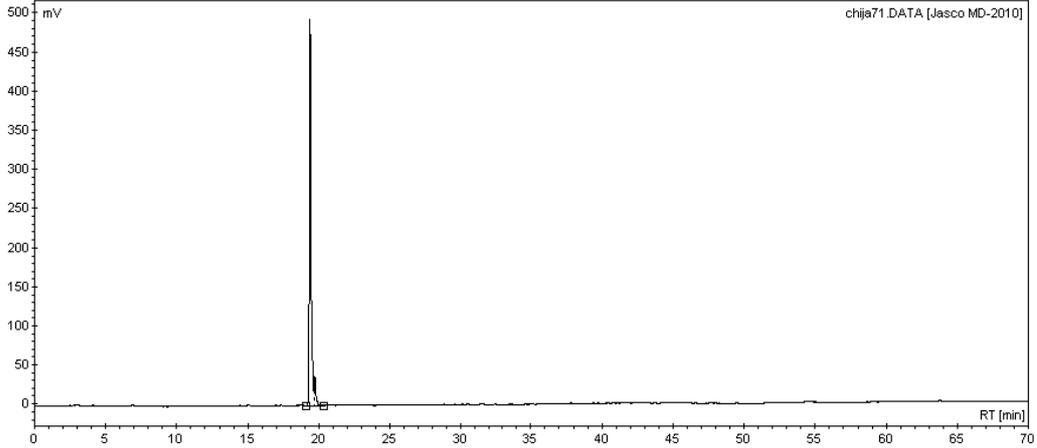
순도성적서

화합물명	Shanzhiside		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	분자량	392
순도	99%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (MeOH)						

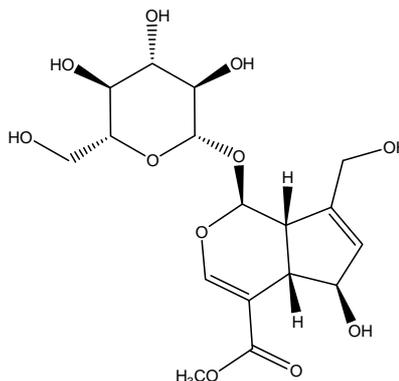
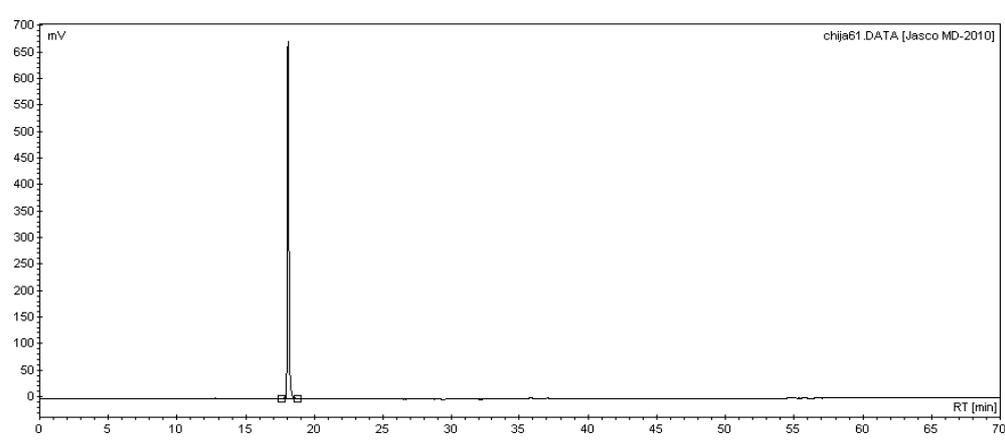
순도성적서

화합물명	Gardoside		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	분자량	374
순도	92.3%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Sunfire C ₁₈ , 5μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. ·Mobile phase: 1% HOAc-MeCN:1% H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 254nm	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
Injection concentration : 1 mg/ml (MeOH)						

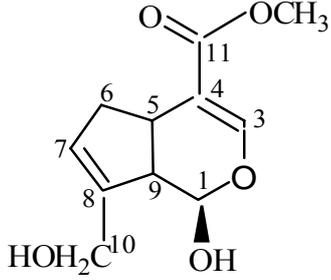
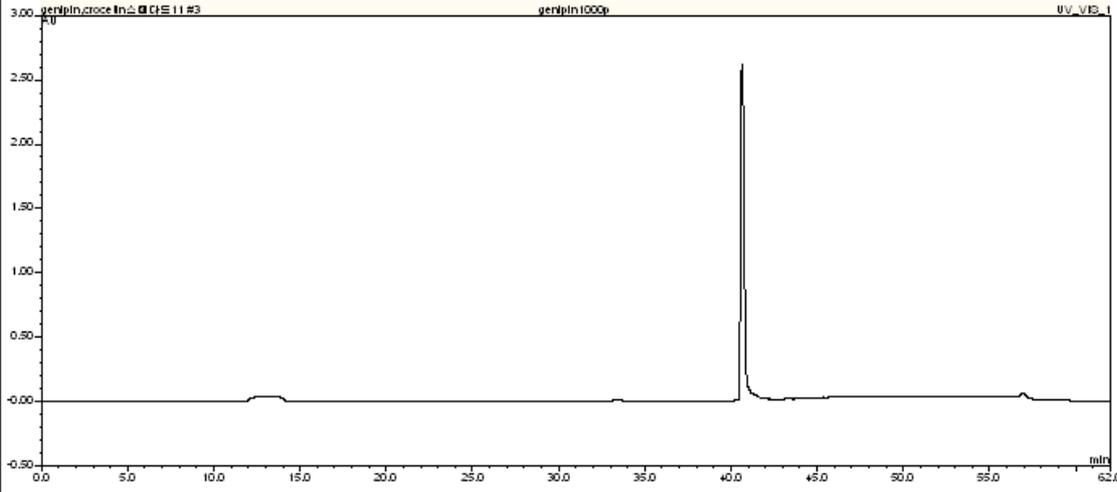
순도성적서

화합물명	Genipin-β-D-gentiobioside		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	분자량	550
순도	92.6%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Sunfire C ₁₈ , 5 μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. ·Mobile phase: 1% HOAc-MeCN : 1% H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
Injection concentration : 1 mg/ml (MeOH)						

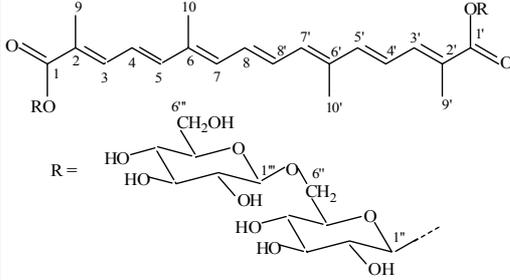
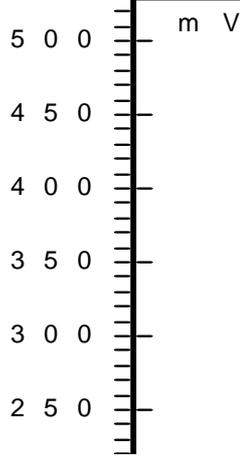
순도성적서

화합물명	6β-hydroxygeniposide		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	분자량	404
순도	99.9	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Sunfire C ₁₈ , 5 μm, 4.6×150 mm, Waters, U.S.A. ·Mobile phase: 1% HOAc-MeCN : 1% H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 内.						
참고사항						
Injection concentration : 1 mg/ml (MeOH)						

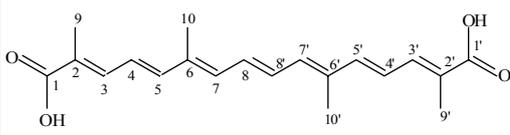
순도성적서

화합물명	Genipin		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	분자량	226
순도	99%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×250 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 254nm	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 ※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

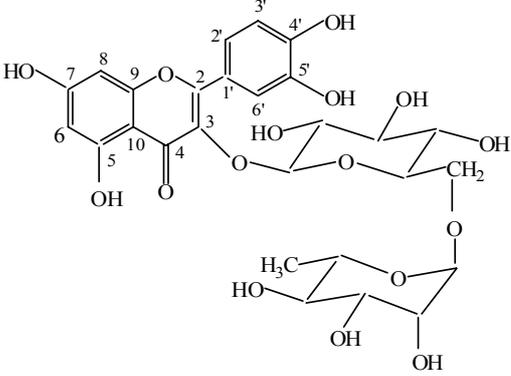
순도성적서

화합물명	Crocin		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	분자량	977
순도	90%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건	4℃, 냉장고 內.					
참고사항	※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)					

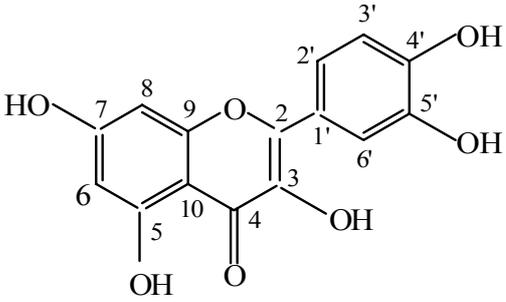
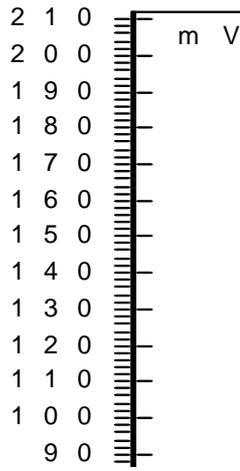
순도성적서

화합물명	Crocetin		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	분자량	328
순도	99%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×250 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 440nm	구조식				
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

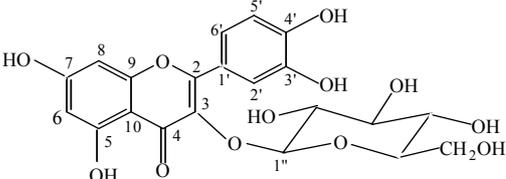
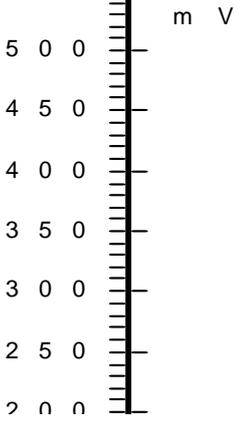
순 도 성 적 서

화합물명	Rutin		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	$C_{27}H_{30}O_{16}$	분자량	610
순 도	98%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 254nm	구조식				
보관조건 실온, desiccator 内.						
참고사항 ※ 농도 : 0.1 mg/ 1ml (DMSO)						

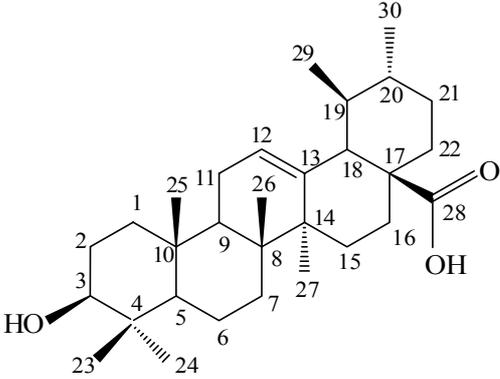
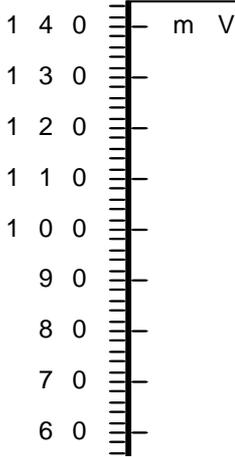
순도성적서

화합물명	Quercetin		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	분자량	464
순도	85%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 ※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

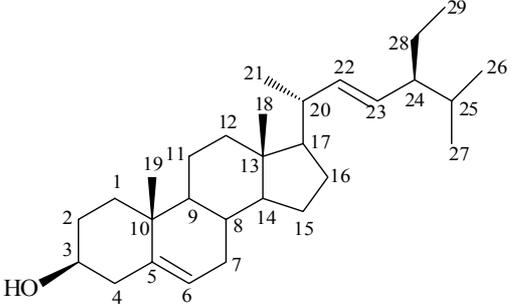
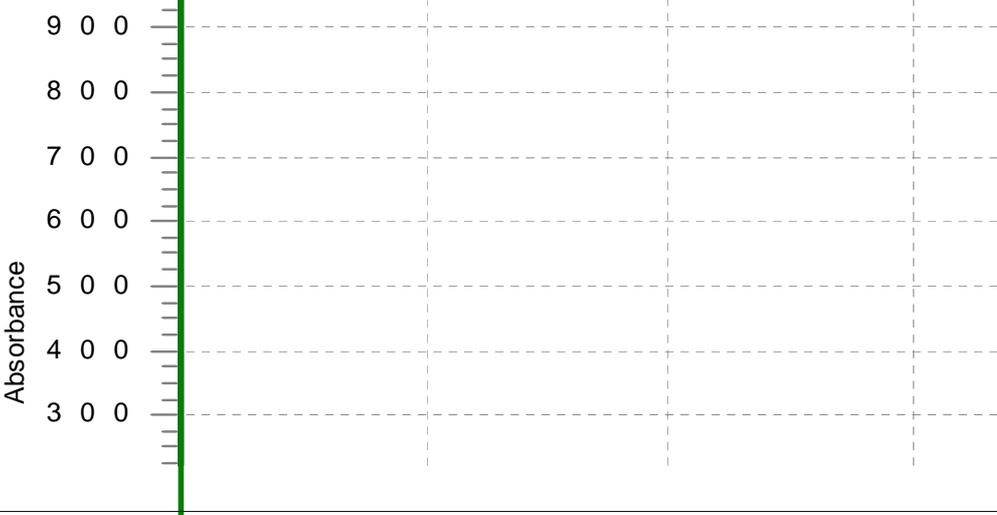
순도성적서

화합물명	Isoquercitrin		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	분자량	464
순도	91%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD		구조식			
						
보관조건 -18℃, 냉장고 內.						
참고사항 ※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

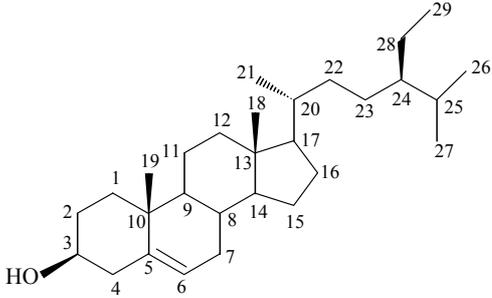
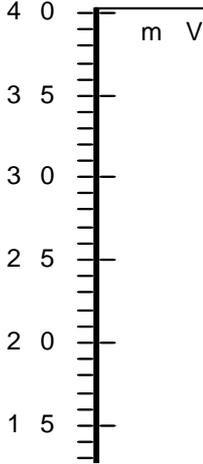
순 도 성 적 서

화합물명	Ursolic acid		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	$C_{30}H_{48}O_3$	분자량	456
순 도	98%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건 실온, desiccator 內.						
참고사항 ※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

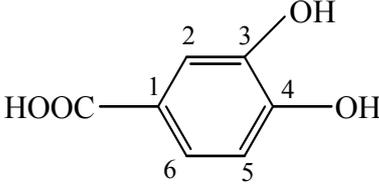
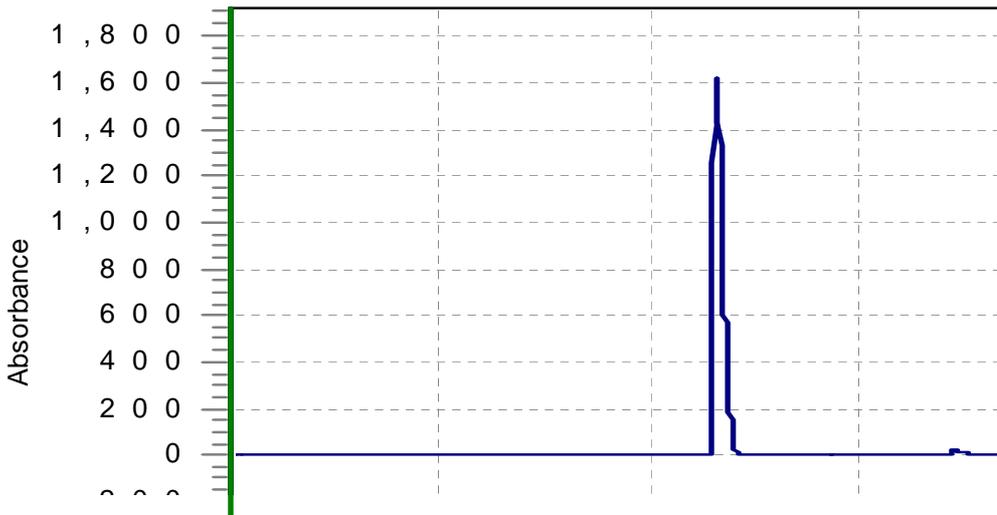
순도성적서

화합물명	Stigmasterol		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₂₉ H ₄₈ O	분자량	412
순도	93%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 446nm	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)					

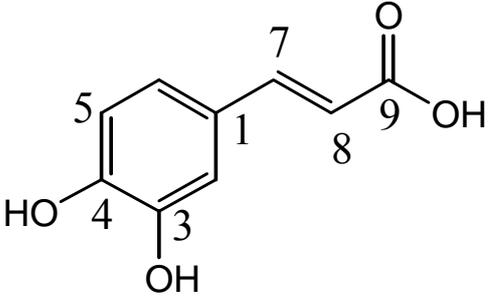
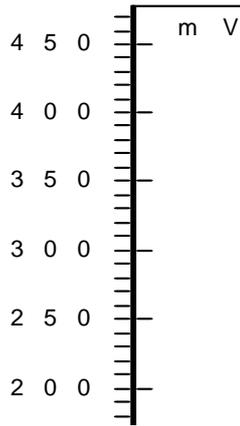
순도성적서

화합물명	β-Sitosterol		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₂₉ H ₅₀ O	분자량	414
순도	92%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
-20℃, 냉장고 內.						
참고사항						
※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

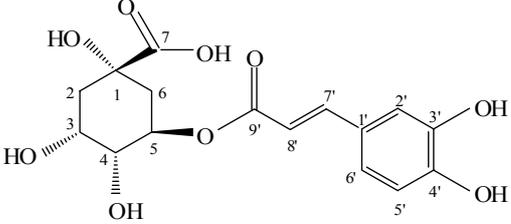
순도성적서

화합물명	Protocatechuic acid		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₇ H ₆ O ₄	분자량	154
순도	98%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 362nm	구조식				
						
보관조건	실온, desiccator 內.					
참고사항	※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)					

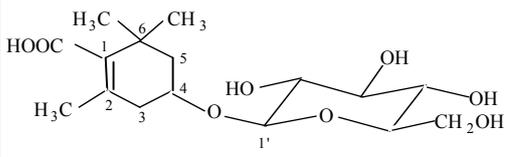
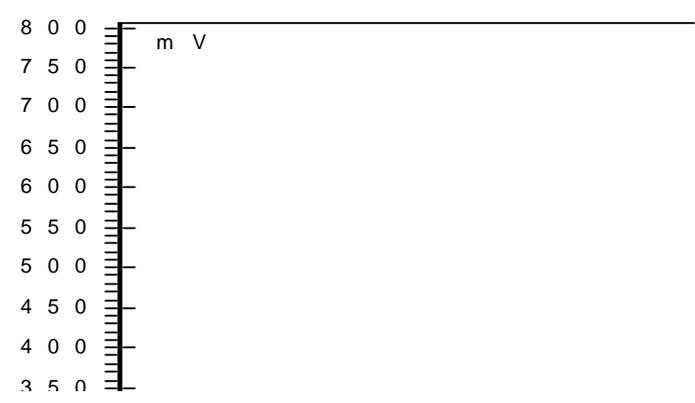
순도성적서

화합물명	Caffeic acid		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₉ H ₈ O ₄	분자량	180
순도	83%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (DMSO)						

순도성적서

화합물명	Chlorogenic acid		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	분자량	354
순도	91%	제조년월일	2007. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×250 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: UV 254nm	구조식				
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
※ 농도 : 0.4 mg/ 1ml (DMSO)						

순도성적서

화합물명	Picrocrocinic acid		한약재명	치자(<i>Gardenia jasminoides</i>)		
			화학식	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	분자량	346
순도	99%	제조년월일	2008. 10.			
분석조건	·Column: Eclipse XDB -C ₁₈ (4.6×150 mm) ·Mobile phase: 0.1% HOAc-MeCN:H ₂ O (0:100 → 100:0) ·Flow rate: 0.8 ml/min ·Detector: ELSD	구조식				
						
보관조건						
실온, desiccator 內.						
참고사항						
※ 농도 : 1.0 mg/ 1ml (MeOH)						

제4장 제1 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

1. 추출물의 제조

- 현삼은 국산 생약 3종과 중국산 생약 3종에 대하여 70% 에탄올 추출물을 제조하였음.
치자의 경우에는 국산 3종과 중국산 4종에 대하여 70% 에탄올 추출물을 제조하였음.
- 성분분리를 위해서 methanol로 추출하여 다량의 추출물을 얻는 방법을 사용하였음.

2. 분획의 제조

- 현삼과 치자의 기본생약에 대하여 염화메틸렌 분획, 에틸아세테이트 분획, 부탄올 분획을 제조하였으며 각 분획으로부터 성분을 분리하였음.

3. 활성 성분의 분리

- 각종 chromatography 법을 시행하였으며 각 분획에 대하여 최적 분리조건을 TLC 등을 이용하여 결정하고 이 조건에 따라 silicagel, alumina, sephadex, diaion HP, XAD-II 등을 이용하여 정제하였음.
- 상기 방법에 의하여 순수물질로 분리되지 않는 경우 RP-, phenyl-, diol-, amide, amine-HPLC 등 최적의 방법을 이용하여 정제하였음.
- 이상의 방법으로 현삼 16종, 치자 20종을 순수하게 분리하여 표준품으로 제공하였음.
이 가운데 현삼에서 신규성분 6개 (aucubin, sinuatol, angoroside C, acteoside, β -sitosterol, daucosterol)를 처음으로 분리하고 구조를 동정하였음.
분리한 화합물의 종류는 다음과 같음.

화합물 종류	현삼	치자
iridoid and its glycosides	5	8
steroid, triterpenoid	2	3
flavonoids	-	3
carotenoid and its glycosides	-	2
phenolics	1	3
cinnamic acid and its derivatives	8	-
기타	-	1
합계	16	20

4. 화합물의 순도검정

- 분리된 화합물에 대하여는 UV 및 ELSD를 이용한 동시 검출을 행하여 순도를 검정하였음.

5. 화합물의 구조동정

- 구조 동정에는 UV, FT-IR, EI-/ESI-/FAB-MS, NMR ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) 등의 기기분석을 이용하여 이들의 분석치를 문헌치[1-17]와 비교하여 동정하거나 필요시 화학적 수식, CD/ORD, X-RAY 등의 기법을 병행하였음.
- 분리한 성분이 신규화합물일 경우, 추가적인 최신 기기분석법을 이용하여 구조를 규명하였음.

제5장 제1 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(현삼, 치자)
총괄과제책임자	이동웅

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	Protective effect of ferulic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice	임현, 박광록, 이동웅, 김영식, 김현표	Biomolecules & Therapeutics	16	82-86		국내	SCIE
2	The Genome-wide Expression Profile of <i>Scrophularianingpoensis</i> -treatedthapsigargin-stimulated U-87MG Cells	S.H. Sohn, E.J. Ko, S.B. Jeon, B.J. Lee, S.H. Kim, M.S. Dong, D.U. Lee, J.H. Kwak, Y.S. Kim, M.K. Shin, M.C. Hong, H.S. Bae	Neurotoxicology	인쇄중			국외	SCI

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/ 국제
1	Simultaneous quantification of four major compounds in Gardeniae Fructus by high-performance liquid chromatography	포스터	김호진, 박효준, 양은주, 이동웅, 곽종환, 송경식	생약학회 제38회 정기총회 및 학술대회	2007. 12. 11	서울	국내
2	Simultaneous HPLC quantification of (E)-harpagoside, p-methoxycinnamic acid, and p-methoxycinnamic acid methyl ester in Scrophulariae Radix	포스터	박효준, 김호진, 양은주, 이동웅, 곽종환, 송경식	생약학회 제38회 정기총회 및 학술대회	2007. 12. 11	서울	국내
3	Inhibitory activity on acetylcholinesterase in vitro and memory enhancing effect in vivo of the constituents from Gardeniae Fructus	포스터	이동웅, 곽종환, 송경식	7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF	2008. 8.3-8	아테네 (그리스)	국제
4	Protective effect of ferulic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice	포스터	Kim JK, Yun NR, Kim SH, Lee DU, Kim YS, Kang SS, Lee SM	7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF	2008. 8.3-8	아테네 (그리스)	국제
5	Cognition Improving Effects of the Components from Gardenia jasminoides	포스터	박광록, 강주억, 신석철, 이동웅	한국생약학 회	2008. 12. 3	서울대학교	국내

다. 지식재산권

번호	출원/ 등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크숍 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

- 본 연구에서 얻어진 화합물은 당 연구실에 구축되어 있는 활성검정시스템(신경안정, 기억증진 등)을 통하여 새로운 효능을 검정하는데 활용할 계획임
- 본 연구에서 얻어진 분리방법은 향후 다른 생약의 성분분리에 이용할 수 있음.
- 현재 본 연구에서 얻은 결과를 두편의 SCI급 논문에 투고하고자 원고를 준비하고 있으므로 논문발표에 활용하고자 함

제6장 기타 중요변경사항

없음

제7장 참고문헌

- 1) Preparative isolation and purification of harpagoside from *Scrophularia ningpoensis* Hemsley by high-speed counter-current chromatography. Tong, S.; Yan, J.; Lou, J. *Phytochemical Analysis* (2006), 17(6), 406-408.
- 2) A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*. Nguyen, A.-T.; Fontaine, J.; Malonne, H.; Claeys, M.; Luhmer, M.; Duez, P. *Phytochemistry* (Elsevier) (2005), 66(10), 1186-1191.
- 3) Studies on the physicochemical properties, structure and antitumor activity of an oligosaccharide homologue SnS-2 from the root of *Scrophularia ningpoensis* hemsl. Deng, J.-E.; Zhang, J.; Chen, X.-M.; Ke, W.; Tian, G.-Y. *Chinese Journal of Chemistry* (2004), 22(5), 492-497.
- 4) Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Li, Y.-M.; Jiang, S.-H.; Gao, W.-Y.; Zhu, D.-Y. *Phytochemistry* (2000), 54(8), 923-925.
- 5) A new iridoid glucoside from ningpo figwort (*Scrophularia ningpoensis*) root. Zou, C. ; Yang, X. *Zhongcaoyao* (2000), 31(4), 241-243.
- 6) Liposoluble constituents from roots of *Scrophularia ningpoensis*. Li, Yiming; Jiang, Shanbao; Gao, Wenyun; Zhu, Dayuan. *Yaoxue Xuebao* (1999), 34(6), 448-450.

- 7) Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Li, Yi-Ming; Jiang, Shan-Hao; Gao, Wen-Yun; Zhu, Da-Yuan. *Phytochemistry* (1998), Volume Date 1999, 50(1), 101-104.
- 8) Crocetin Esters, Picrocrocin and Its Related Compounds Present in *Crocus sativus* Stigmas and *Gardenia jasminoides* Fruits. Tentative Identification of Seven New Compounds by LC-ESI-MS. Carmona, M.; Zalacain, A.; Sanchez, A. M.; Novella, J. Luis; A. Gonzalo L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54(3), 973-979
- 9) Determination of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis by High Performance Liquid Chromatography. Ren, Zhijun; He, Kaize; Zhang, Liming; Tan, Jian; Pu, Qiang. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* (2005), 17(4), 465-467.
- 10) Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. Lee, In-Ah; Lee, Jin Hee; Baek, Nam-In; Kim, Dong-Hyun. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2005), 28(11), 2106-2110.
- 11) Extraction of ursolic acid from gardenia and its quantification. Liao, Xiaofeng; Chen, Zhengxing; Li, Yongzhong; Liang, Ping. *Shipin Gongye Keji* (2005), 26(2), 76-77, 79.
- 12) Immunosuppressive Iridoids from the Fruits of *Gardenia jasminoides*. Chang, Wen-Liang; Wang, Hua-Ying; Shi, Li-Shian; Lai, Jenn-Haung; Lin, Hang-Ching. *Journal of Natural Products* (2005), 68(11), 1683-1685.
- 13) Studies on the constituents of *Gardenia* species. III. New iridoid glycosides from the leaves of *Gardenia jasminoides* cv. *Fortuneana* Hara. Machida, K.; Takehara, E.; Kobayashi, H.; Kikuchi, M.. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (2003), 51(12), 1417-1419.
- 14) Isolation of the component transformed into blue pigments by aerobic bacteria in the fruits of *Gardenia jasminoides*. Lee, D. U.; Park, C. H.; Kang, S. I.; Min, E. G.; Han, Y. H.; Lee, C. K.. *Saengyak Hakhoechi* (1998), 29(3), 204-208.
- 15) Studies of the constituents of *Gardenia* species. I. Monoterpenoids from *Gardeniae Fructus*. Machida, Koichi; Onodera, Rie; Furuta, Kyoko; Kikuchi, Masao. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* (1998), 46(8), 1295-1300.
- 16) Isolation and Structure Elucidation of Carotenoid-Glycosyl Esters in *Gardenia* Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne). Pfister, S.; Meyer, P.; Steck, A.; Pfander, H. J. *Agricultural and Food Chemistry* (1996), 44(9), 2612-2615.
- 17) Two monoterpenes from fruits of *Gardenia jasminoides*. Zhao, Wei-Min; Xu, Jun-Ping; Qin, Guo-Wei; Xu, Ren-Sheng. *Phytochemistry* (1994), 37(4), 1079-81.

Effects of the Constituents of Gardenia Fructus on Prostaglandin and NO Production

Hyun LIM¹, Kwang-Rock PARK², Dong-Ung LEE², Yeong Shik KIM³, and Hyun Pyo KIM^{1*}

¹College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Dept. Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

³Natural Products Research Institute and College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received February 11, 2008; Accepted April 3, 2008)

Abstract – The fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis have been previously reported to possess anti-inflammatory activity. In this study, the constituents including geniposide, geniposidic acid, genipin and crocin were evaluated for their effects on prostaglandin and NO production in an attempt to establish anti-inflammatory cellular mechanisms. Among the constituents tested, only genipin significantly inhibited cyclooxygenase-2-mediated PGE₂ and inducible nitric oxide synthase-mediated NO production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells at 10–100 μM. Genipin also inhibited nuclear transcription factor-κB activation. Moreover, genipin showed *in vivo* anti-inflammatory activity on λ-carrageenan-induced paw edema in mice (10.4–29.9% inhibition at 20–100 mg/kg, i.p.). All of these results suggest that genipin may contribute to anti-inflammatory activity of the fruits of *G. jasminoides* and an inhibitory action on prostaglandin and NO production is, at least, the part of anti-inflammatory mechanism of genipin.

Keywords: *Gardenia jasminoides* Ellis, genipin, cyclooxygenase, nitric oxide synthase, anti-inflammation

INTRODUCTION

Among various proinflammatory chemical mediators, prostaglandins (PG) synthesized from arachidonic acid (AA) play an important role in many inflammatory disorders. Cyclooxygenases (COX) are the enzymes responsible for synthesizing PGs. Especially, COX-2 (an inducible isoform of COX) produces high amounts of PGs in inflammatory lesions. In addition, nitric oxide (NO) synthesized from arginine by nitric oxide synthase (NOS) is also involved in some inflammatory disorders. In particular, inducible NOS (iNOS) produces massive amount of NO in certain cell types including macrophages (Gallin and Snyderman, 1999). Thus, it is worthy to evaluate the effects of potential anti-inflammatory agents on prostaglandin and NO production.

In Chinese medicine, the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae) have been used on inflammatory conditions, jaundice, diarrhea, etc (Bae, 2000). Previously, the alcoholic extract of Gardenia fruits and geniposide

showed favorable effects on soft tissue injury (Yao *et al.*, 1991). Hydrophobic pigment in Gardenia inhibited IgE production from rat spleen lymphocytes (Kuramoto *et al.*, 1996). In addition, the fruits of Gardenia protected from pancreatitis by reducing blood circulation in rats (Jia *et al.*, 1993). Recently, genipin was found to inhibit iNOS expression leading to reduced production of NO by inhibiting nuclear transcription factor-κB (NF-κB) pathway (Koo *et al.*, 2004), and it was also reported that genipin and geniposide including the alcoholic extract showed *in vivo* anti-inflammatory activity on several animal models of acute inflammation (Koo *et al.*, 2006). Although these previous reports may explain some anti-inflammatory property of the fruits of *G. jasminoides*, anti-inflammatory active constituents from the same plant material have not been fully understood. Therefore, in the present study, anti-inflammatory activity of geniposide, geniposidic acid, genipin and crocin successfully isolated from the fruits of *G. jasminoides* was investigated using *in vitro* and *in vivo* models to define anti-inflammatory activity further.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

N-[2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl]methane sulfonamide (NS-398) was obtained from Biomol (Plymouth Meeting, PA). 2-Amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazine hydrochloride (AMT) was purchased from Tocris Cookson Ltd. (UK). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and LPS (*Escherichia coli* 0127:B8) were purchased from Sigma Chem. (St. Louis, MO). LipofecAMINE PLUS, DMEM and other cell culture reagents including FBS were products of Gibco BRL (Grand Island, NY). Protein assay kit was purchased from Bio-Rad Lab. (Hercules, CA). Geniposide, geniposidic acid, genipin and crocin (Fig. 1) were isolated from the butanol fraction of the fruits of *G. jasminoides* and their chemical structures were identified according to the previously described (Lee *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Test compounds dissolved in DMSO were diluted with serum-free DMEM into appropriate concentrations. Final concentration of DMSO in the culture medium was adjusted to 0.1% (v/v).

RAW 264.7 cell culture and measurement of NO and PGE₂ concentrations

RAW 264.7 cells obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics under 5% CO₂ at 37°C based on the previously described procedures (Chi *et al.*, 2001). Briefly, cells were plated in 96-well plates (2×10⁵ cells/well). After pre-incubation for 2 h, the test compounds and LPS (1 µg/ml)

were added and incubated for 24 h. From the media, NO and PGE₂ concentrations were measured. For determination of NO concentration, the stable conversion product of NO, nitrite (NO₂⁻), was measured using Griess reagent and optical density was checked at 550 nm. PGE₂ concentration in the medium was measured using ELISA kit for PGE₂ (Cayman Chem. Co.) according to the manufacturer's recommendation. Cell viability was assessed with MTT assay as described previously (Mossmann, 1983).

Western blot analysis of iNOS

For measuring the protein level of iNOS, Western blotting technique was used (Chi *et al.*, 2001). RAW cells were cultured in 6-well plates (5×10⁶ cells/well) in the presence or absence of LPS (1 µg/ml) with/without genipin for 16-20 h. After preparing cell homogenate, the supernatant was obtained by centrifugation at 15,000 g for 30 min. Using Tris-glycine gel (8%), electrophoresis was carried out and bands were blotted to PVDF membranes. iNOS antibody (N32030, Transduction Lab.) was incubated and bands were visualized with HRP-linked secondary antibody (Cell signaling, Denver, MA) and chemiluminescent reagent (Amersham, UK).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

RAW cells were treated with/without LPS and genipin for 3 h. To prepare nuclear fractions, the cells were washed with PBS, harvested and resuspended in 400 µl of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9) for 15 min on ice. After 10% NP-40 (25 µl) was added, the tubes were vortexed vigorously for 10 sec. The nuclei were collected by centrifugation at 5,000 rpm for 3 min and the supernatant was saved as the cytosolic fraction. The nuclei were lysed in buffer B (20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7.9). NF-κB consensus oligonucleotide (Promega) was phosphorylated by T4 polynucleotide kinase (10 units) with 10 µCi of [γ-³²P] ATP (3,000 Ci/mmol) at 37°C for 10 min. Unincorporated oligonucleotides were removed by Microspin G-25 column (Amersham, UK). Nuclear extract containing 5 µg protein was incubated with ³²P-labeled NF-κB consensus oligonucleotide in gel shift binding buffer at room temperature for 20 min. The incubation mixture was subjected to electrophoresis on a 4% polyacrylamide gel in TBE buffer (0.5X) at 350V. The gel was dried and exposed to X-ray film overnight at -70°C.

λ-Carrageenan (CGN)-induced paw edema in mice

In order to examine *in vivo* anti-inflammatory activity,

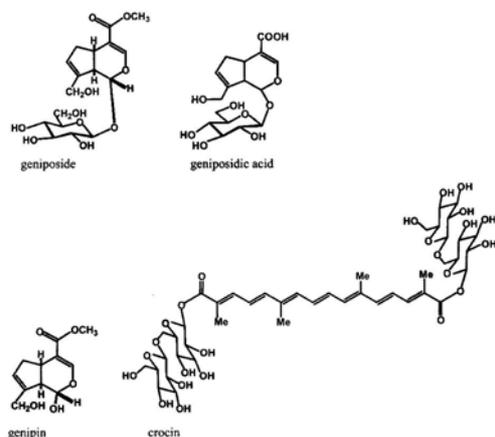


Fig. 1. The chemical structures of the constituents studied.

mouse CGN-induced paw edema assay was used according to the slightly modified procedures of Lichtman *et al.* (2004) based on the original methods of Winter *et al.* (1962). Specific-pathogen free male ICR mice were purchased from Orient-Bio (Seoul, Korea) and acclimated in animal facility with standard lab. chow and water *ad libitum* at least for 7 days prior to experiment. Test compounds dissolved in DMSO were administered intraperitoneally to mice (0.05 ml/mouse). One hour later, 1% CGN (*w/v*) dissolved in pyrogen-free sterile saline solution (0.05 ml/paw) was injected to right hind paw. Five hours later, paw volume was measured using plethysmometer (Ugo Basil, Italy). The paw volume increased from the initial non-treated paw volume was regarded as edema.

Statistical analysis

Experimental values were represented as arithmetic mean \pm SD. Unpaired Student's t-test was used to determine the statistical significance.

RESULTS AND DISCUSSION

It is well known that RAW 264.7 cells, a mouse macrophage-like cell line, induce COX-2/iNOS which produce high amounts of PGs and NO by LPS treatment (Chi *et al.*, 2001). When LPS (1 μ g/ml) was added and the cells were incubated for 24 h, PGE₂ and NO production from the culture media increased to 89.3 \pm 4.4 nM and 38.1 \pm 0.2 μ M from the basal levels of 2.4 \pm 0.0 nM and 0.6 \pm 0.0 μ M, respectively (n = 3). When the compounds were simultaneously added with LPS and the inhibitory activities were examined, only genipin significantly inhibited COX-2-mediated PGE₂ and iNOS-mediated NO production from LPS-treated RAW 264.7 cells at 10-100 μ M (Fig. 2). Especially, genipin strongly inhibited NO production (IC₅₀ for PGE₂ production=58.0 μ M), being less active on PGE₂ production. Genipin showed 40.7% inhibition against PGE₂ production at 100 μ M, while other compounds tested did not show a significant inhibition at the concentrations up to 100 μ M. Under the same experimental conditions, the reference compounds, NS-398 (selective COX-2 inhibitor) and AMT (iNOS inhibitor) showed 99.4% and 95.6% inhibition at 0.1 and 1.0 μ M, respectively, against COX-2- and iNOS-mediated PGE₂ and NO production as expected (Fig. 2). At the concentrations examined, all of the test compounds did not show cytotoxic effects on RAW cells revealed by MTT assay (data not shown). The control experiment without LPS treatment revealed that geniposide, geniposidic acid, genipin

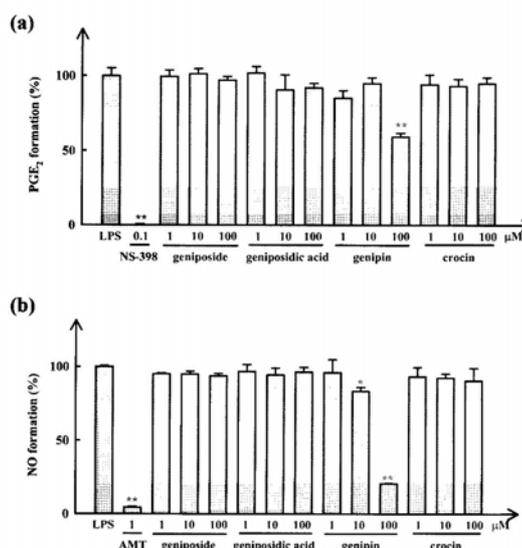


Fig. 2. Effect of the constituents from *G. jasminoides* on COX-2-mediated PGE₂ and iNOS-mediated NO production from LPS-treated RAW 264.7 cells. (a) Effect on COX-2-mediated PGE₂ production. (b) Effect on iNOS-mediated NO production. Data points and bars represent arithmetic mean \pm SD (n = 3). *: P<0.05, **: P<0.01, Significantly different from the LPS-treated control group.

and crocin did not significantly affect PGE₂ and NO concentration in RAW 264.7 cells at 100 μ M (data not shown).

In order to elucidate the cellular mechanism of NO inhibition, iNOS expression level was examined using Western blotting analysis. But genipin did not down-regulate iNOS (Fig. 3a). On the other hand, genipin was demonstrated to inhibit NF- κ B activation revealed by EMSA (Fig. 3b). It was previously reported that genipin inhibited iNOS expression from macrophages at 300 μ M (Koo *et al.*, 2004). In the present investigation, the maximum concentration examined was 100 μ M, since the concentrations higher than 100 μ M are not likely attained in the body by oral genipin ingestion. Thus, iNOS down-regulating capacity of genipin could not be observed in the present study. Our results clearly demonstrated that genipin inhibited NF- κ B activation, without iNOS down-regulation at 100 μ M. The precise reason for this inconsistency is not known at present, but it is speculated that the sensitivity of EMSA using radioactivity is higher than that of Western blotting analysis using antigen-antibody reaction. Therefore, it is suggested that genipin may inhibit NO production at least in part by iNOS down-regulation

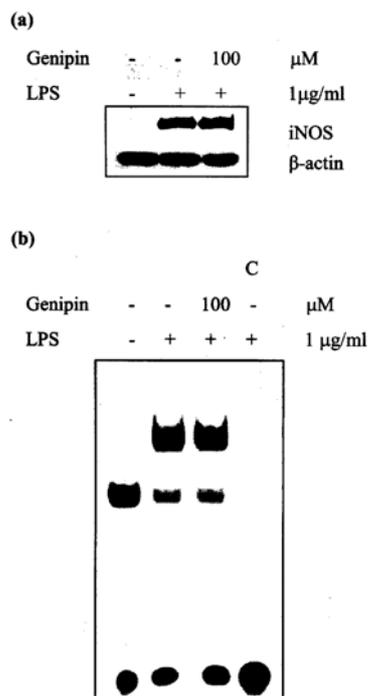


Fig. 3. Western blotting analysis and EMSA. (a) iNOS expression (Western blot), (b) EMSA of NF- κ B. Note: Genipin clearly inhibited NF- κ B activation, while no effect was observed on iNOS expression at 100 μ M.

via NF- κ B inhibition.

In addition, genipin inhibited CGN-induced paw edema in mice by intraperitoneal injection. As shown in Fig. 4, genipin showed 10.4% and 29.9% inhibition of paw edema at 20 and 100 mg/kg, respectively. Some of anti-inflammatory activities of genipin were previously described (Koo *et al.*, 2004 and 2006) and NO inhibitory action was repeatedly found in this study. But, the finding of COX-2 inhibitory activity of genipin is new and is important since prostanooids play a critical role in some inflammatory disorders. It is significant to note that genipin derivatives such as geniposide and geniposidic acid did not show anti-inflammatory activity *in vitro* probably due to inaccessibility to cell inside. The similar results were previously demonstrated that some flavonoid glycosides did not inhibit iNOS-mediated NO production from RAW cells in contrast to the inhibitory action of the respective flavonoid aglycones (Kim *et al.*, 1999).

In conclusion, the present investigation has shown that

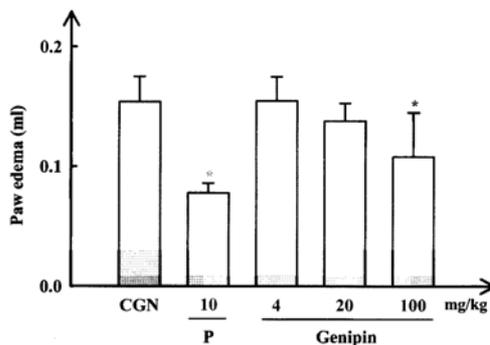


Fig. 4. *In vivo* anti-inflammatory activity of genipin (CGN-induced mouse paw edema). All compounds were intraperitoneally administered 1 h prior to CGN injection. P (prednisolone). Data points and bars represent arithmetic mean \pm SD (n =5). *: P<0.05, Significantly different from the CGN-treated control group.

genipin has anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* among the constituents tested. Genipin inhibited COX-2-mediated PGE₂ production and iNOS-mediated NO production. Genipin may reduce prostaglandin and NO concentration in inflammatory lesions, leading to anti-inflammatory effect. It is suggested that genipin, among the constituents, may contribute to anti-inflammatory activity of the fruits of *G. jasminoides*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the research fund of Studies on the Identification of the Efficacy of Biologically Active Components from Oriental Herbal Medicines from Korean Food and Drug Administration (2007) and post-BK21 project from Ministry of Education, Korea.

REFERENCES

- Bae K. 2000. Medicinal plants of Korea, Kyo-Hak Pub. Seoul, pp. 417.
- Chi, Y. S., Cheon, B. S. and Kim, H. P. (2001). Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 1195-1203.
- Gallin, J. I. and Snyderman, R. (1999). Overview. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* 3rd ed. (Gallin, J. I. and Snyderman, R., Eds.), pp. 1-4. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Jia, Y. J., Jiang, M. N., Pei, D. K., Ji, X. P. and Wang, J. M. (1993). Effect of *Gardenia jasminoides* Ellis (GJE) on the

- blood flow of internal organs at the early stage of acute necrotizing hemorrhagic pancreatitis in rats. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **18**, 431-433.
- Kim, H. J., Kim, E. J., Seo, S. H., Shin, C. G., Jin, C. and Lee, Y. S. (2006). Vanillic acid glycoside and quinic acid derivatives from *Gardeniae Fructus*. *J. Nat. Prod.* **69**, 600-603.
- Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 759-765.
- Koo, H. J., Lim, K. H., Jung, H. J. and Park, E. H. (2006). Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *J. Ethnopharmacol.* **103**, 496-500.
- Koo, H. J., Song, Y. S., Kim, H. J., Lee, Y. H., Hong, S. M., Kim, S. J., Kim, B. C., Jin, C., Lim, C. J. and Park, E. H. (2004). Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur. J. Pharmacol.* **495**, 201-208.
- Kumamoto, Y., Yamada, K., Tsuruta, O. and Suganon, M. (1996). Effect of natural food colorings on immunoglobulin production in vitro by rat spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1712-1713.
- Lee, I. A., Lee, J. H., Baek, N. I. and Kim, D. H. (2005). Antihyperlipidemic effects of crocin isolated from the frutus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2106-2110.
- Lichtman, A. H., Shelton, C. C., Advani, T. and Cravatt, B. F. (2004). Mice lacking fatty amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain* **109**, 319-327.
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1962). Carrageenan-induced edema in the hindpaw on the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 544-547.
- Yao, O., Zhou, G., Zhu, Y., Pan, Y., Hu, J., Xue, H. and Zhang, Q. (1991). Screening studies on anti-inflammatory function of traditional Chinese herb *Gardenia jasminoides* Ellis and its possibility in treating soft tissue injuries in animals. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* **16**, 489-493 (1991).

제 2 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 현삼 및 치자의 표준물질 분석법 개발

세부과제책임자 : 송경식 / 경북대학교

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

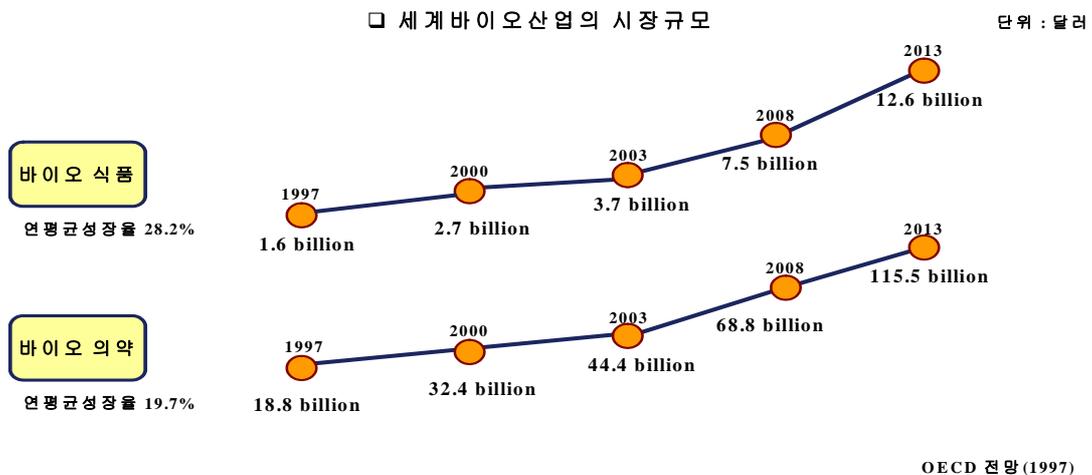
가. 경제적 측면

- 웰빙에 관한 욕구증대와 더불어 소비자는 건강에 대한 다양, 세분, 고급화된 수요를 요구하고 있어 건강과 관련된 바이오소재산업, 그 중에서도 특히 천연물을 소재로한 바이오소재는 21세기를 향한 주요 미래산업으로 인식되고 있으며, 국가적으로도 2012년 선진복지국가 수준으로의 진입을 위한 목표로, 새로운 의약의 개발 및 산업화, 질병 예방, 진단, 치료의 혁신을 과제로 설정 (생물산업을 21세기를 이끌어갈 산업 성장동력으로 인식하여, “21세기 바이오사회 구현을 위한 생물산업 발전 종합대책”을 발표, 2000년 2월 산업자원부)
- 국외 생물산업시장의 규모는 2000년 540억불에서 2003년에는 740억불로 급증하였으며 2008년에는 1,250억불에 이를 것으로 전망

(Table 1-1. Market Scale of world bio-industry (억불, %))

분야별	2000	2003	2008	2013	연평균증가율 ('00~'13년)
생물의약	324	444	688	1,155	19.7
생물화학	38	52	100	168	26.3
생물환경	32	44	87	147	27.6
바이오식품	27	37	75	126	28.2
바이오에너지·자원	11	15	37	63	36.4
생물농업·해양	27	37	75	126	28.2
생물공정·측정시스템	81	111	188	315	22.2
계	540	740	1,250	2,100	26.9

※ 자료 : OECD, Biotechnology & Trade, 1997 등



(Fig. 1-1 Increasing market share of world bio-industry)

- 세계 한약 시장에서 우리나라의 점유율은 1993년 2% 수준에 지나지 않으며, 미국 건강식품 시장의 40억 달러 약초시장의 점유율도 1997년 4%에 불과하여 세계시장에서의 점유율이 아주 저조한 상태에 있고, 또한 국내 한약제제 생산업체의 생산규모도 320억원(1999년)에 불과하며, 생산되는 전체 의약품 중 한약제제는 4.3%(2000년)에 지나지 않으므로 이에 대한 대책마련이 시급함
- 국내 천연물 유래의 의약품 시장은 3,500억원(식약청 '01년 자료) 규모로 약 70여개의 제약업체에서 1,000여 품목을 생산하고 있으며, 천연물 의약품 관련 특허 출원도 최근 몇 년간 급격한 성장세를 보이고 있어 앞으로 천연물 의약 연구개발이 활발히 전개될 전망이다. 대상 질환으로 간염, 당뇨병, 관절염, 치매 등 난치성 질환 치료제 및 천연물성분을 사용한 성기능 개선제가 주요 개발대상으로 파악되고 있음
- 국내 약 3,500억원 규모로 추정되고 있는 천연물 의약품 시장이 향후 국내 제약 및 바이오산업체의 경쟁력 확보에 도움을 줄 수 있는 유망한 산업으로 각광받고 있으며 천연물 의약품관련 특허 출원도 최근 몇 년간 급격한 성장세를 보이고 있어 앞으로 천연물 의약 연구개발이 활발히 전개될 전망이므로 이를 대비한 생약의 품질 및 약효표준화가 이루어져야 할 것임

나. 기술적 측면

1) 산지 혹은 환경에 따른 생약 중 유효함량 변이의 중요성

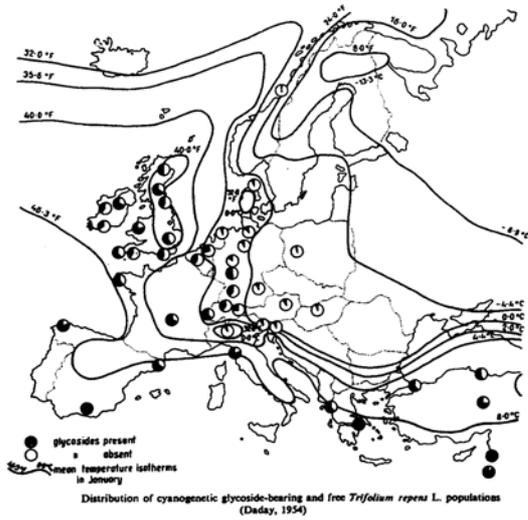
- 생약 및 생약의 조합으로부터 이루어지는 한방약은 금후 점점 중요한 의약품이 될 것으로 생각되 어지나 생약은 달인 후의 대량의 추출액을 보면 알 수 있듯이 대부분은 약효와 관계없는 식물의 조직 등이어서 유효성분은 생약의 극히 일부에 지나지 않음
- 그러나 천연물이기 때문에 유효성분의 양이 여러 가지 조건에 의해 변한다는 데 문제점이 있음. 이 점에 주의를 기울여 항상 일정한 품질의 생약을 원료에 이용하지 않으면 치료의 정도에 차기 생기게 되며 생약의 신용이 없어지게 되므로 생약의 기원은 물론 그 안에 함유된 화합물의 조성 및 함량도 일정하게 유지될 것이 요구됨
- 생약의 품질 (성분의 종류와 양)에 영향을 미치는 요인으로서 동일명의 생약에 기원이 다른 식물 (종) 을 사용한다면, 종 내의 성분변이 (개체차, 생육지), 채집시기 등에 의해 다름. 그 외에도 식물의 부위 에 의한 차이, 식물의 연령에 의한 차이, 가공법 (수치)에 의한 차이, 보존 중의 변화가 생각될 수 있음
- 동일명 생약으로 기원이 다른 종을 사용하는 예
 - 갈근 (한) *Pueraria lobata* / (일) *Pueraria lobata* / (중) *Pueraria. thomsonii*
 - 당귀 (한) *Angelica gigas* / (일) *Angelica actiloba* / (중) *Angelica sinensis*
 - 백출 (한, 일) *Atractylodes japonica* / (중) *Atractilodes macrocephala*

(Table 1-2. Different contents according to the origin of *Coptis Rhizoma*)

	BRS	PAL	BER	EPI	COP	COL	GRO	JAT
<i>C. trifolia</i>	±	+	+	+	++	±	+++	+
<i>C. chinensis</i>	+	+	+++	+	++	+	+	+
<i>C. dertoides</i>	+	+	+++	+	++	+	+	+
<i>C. quinquefolia</i>	+	+	+	-	+++	+	-	+
<i>C. ramosa</i>	+	+	+++	-	++	+	-	+
<i>C. japonica</i>	±	+	+++	-	++	+	-	+
<i>C. teetoides</i>	±	+	+++	-	++	+	-	+
<i>C. teeta</i>	+	+	+++	-	++	+	-	+
<i>C. asplenifolia</i>	-	+	+	-	++	+	-	+++

BRS: berberastine, PAL: palmatine, BER: berberine, EPI: epiberberine, COP: coptisine, COL: columbamine, GRO: groenlandicine, JAT: jateorrhizine

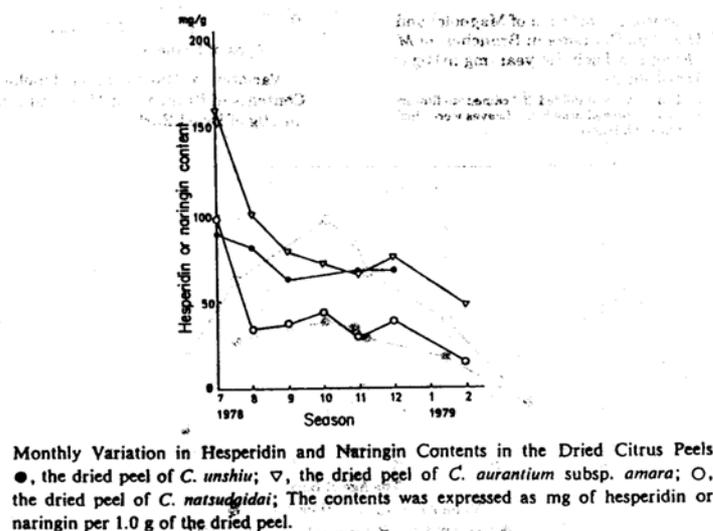
- 동일종 내의 성분변이 (개체차, 생육지)
 - 식물은 같은 종 중에서도 형태학적인 변이가 있을 뿐 아니라 성분에도 변화가 있음



(Fig. 1-3 Distribution of cyanoglycosides in *Trifolium repens*)

유럽의 동북부에 생산되는 것은 청산배당체의 양이 적고 서남쪽으로 갈수록 증가하는 경향이 보임

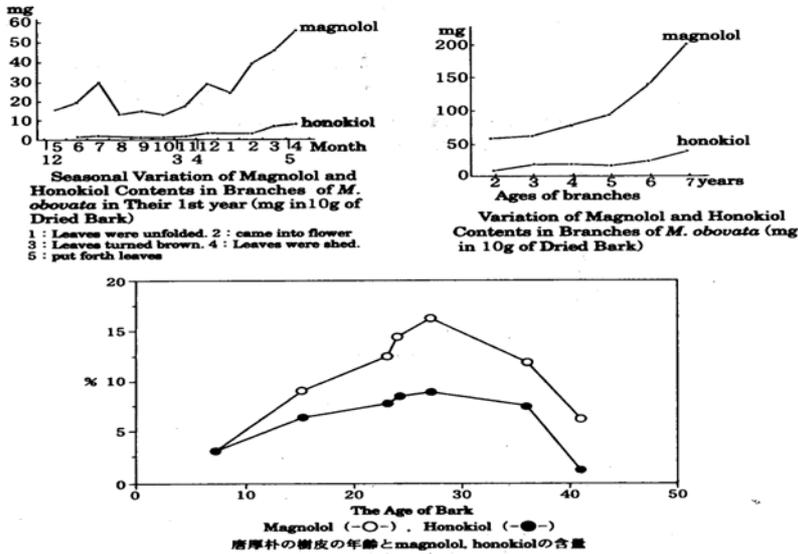
- 채집시기에 의한 차이



(Fig. 1-4. Seasonal variation of chemical contents in Citrus Peels)

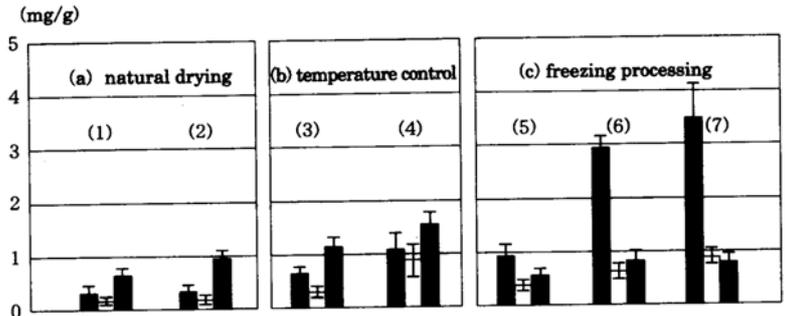
감귤 과피중의 flavonoid hesperidin과 naringin의 함량을 조사한 결과 계절변화의 경향은 매우 큰 것을 알 수 있음

◦ 식물의 연령에 의한 차이



(Fig. 1-5. Variation of magnolol and honokiol contents in branches of *M. obovata* according to age)

- 식물성분은 연령에 따라 변화하며 일례로 인삼은 5-6년에 수확하는 것이 파종 후 2-3년의 인삼보다 사포닌 함량은 매우 낮은 것으로 알려져 있음. 일반적으로 약용식물의 유효성분으로 되어 있는 소위 2차대사산물의 축적에는 식물의 성숙과 일정기간이 필요하나 해를 경과하면 좋다고 할 수는 없고 모두 채집 적기가 있음
- 그림은 후박의 원식물의 가지의 햇수와 유효성분인 magnolol, honokiol의 함량을 나타내는데 이것은 가지의 연령 뿐 아니라 한 개의 나무의 각각의 장소의 연령과 성분의 관계를 나타내고 있으며 이에 의하면 20-30년을 경과한 가지가 품질적으로 매우 우수한 것을 알 수 있음
- 가공 (수치)에 의한 변화
 - 생약에 특수한 가공을 하는 것을 수치라고 하는데 이는 생약의 품질을 높이거나 부작용을 감하기도 하며 경우에 따라서는 약효를 변화시키는 등의 중요한 처리임. 수치는 성분의 변화를 동반하는 것으로 생약의 품질, 약효를 생각할 때 매우 중요하며 예를 들어 감초의 경우는 온풍건조가 천일 건조보다 사포닌함량은 높으나 이것은 신속한 건조에 의해 사포닌의 가수분해가 진행되지 않았기 때문으로 생각됨. 이와 같은 결과는 배당체를 함유하는 생약을 건조할 때는 신속하게 처리하는 것이 좋다는 것을 나타내고 있음. 다음 그림은 대황의 건조법에 따른 유리 안트라퀴논의 함량 변화를 나타내고 있는데 음건상태로 자연건조한 것은 함량이 낮으나 동결후 건조한 것은 매우 높은 것을 볼 수 있으며 이와 같이 가공법에 따라 생약의 성분함량이 변화하므로 가공에 대한 철저한 관리가 필요할 것임



Contents of Free-Anthraquinones in Rhubarb (Rhizome of *R. palmatum*) after Drying with Various Conditions

■: Rhein, □: Emodin, ▒: Chrysophanol.

Mean ± S.D. (n=4).

Conditions

(a) natural drying: (1) drying in the shade, (2) drying in the sun.

(b) temperature control: (3) drying at 60°, (4) drying at 90°.

(c) freezing processing: (5) drying at 60° quickly after freezing (-80°), (6)

drying at 60° after freezing (-80°) and melting in the shade (2 days), (7)

drying in the shade after freezing (-80°).

(Fig. 1-6. Variation of anthraquinone contents in Rhizome of *R. palmatum* according to drying duration)

◦ 보존 중의 변화

- 생약중에는 六陳으로 불리워 오래된 것이 좋다고 하는 낭독, 반하, 오수유, 진피, 지실, 마황이 있으며 대황도 오래된 것이 좋다고 하기는 하나 일반적으로 생약은 신선한 것이 좋음. 특히 정유를 함유하는 것은 정유가 오래되면 휘산이 되기 때문에 가능한 신선한 것을 사용하는 것이 좋으며 보존기간에 대한 고려는 국산품 뿐 아니라 수입품에 대하여도 철저한 관리가 필요한 부분임

◦ 생약이 약효를 나타내는 것은 그 중에 함유된 유효성분 때문으로 그 양을 재는 것에 의해 품질평가가 가능함. 그러나 여기에 문제가 있어 약효를 단일 성분, 또는 성분 그룹으로 설명 가능한 생약은 거의 없으며 한방제제의 경우가 되면 더욱 불가능해 짐. 마황의 ephedrine과 pseudoephedrine, 황련, 황백의 berberine, 진피, 청피, 지실, 지각의 synephrine, 감초의 glycyrrhizin, 원지, 길경의 사포닌류, 대황의 anthrone 유도체와 anthraquinone 유도체, 목단피의 paeonol 등은 거의 그 생약의 서양의학에 의한 약효를 대표하고 있으나 한방적인 약효를 설명할 수 있는 것은 거의 없어 앞으로 한방의 과학화와 성분함량과의 상관관계 설정에는 많은 노력을 기울일 필요가 있음.

◦ 천연물 중, 식물 추출 의약품은 테르펜, 배당체, 알카로이드 및 기타 성분군, 4가지 계열로 대별되어지며, 이들 가운데 Taxol이 속해 있는 테르펜계(Terpens)가 향후 가장 큰 성장률을 보일 것으로 기대되는 화합물군임. 배당체 역시 큰 시장으로 형성하고 있으며 테르펜계의 뒤를 잇고 있음. 식물 추출물 유래 의약품 중 현재 단일처방 의약으로서 판매효과를 보고 있는 것은 Taxoids와 Camptothecins 계열이 대부분이며 이외에도 해양천연물 유래의 천연물 의약품과 화장품에 대한 연구개발이 활발하게 진행되고 있고, 해양에서 7,000여종 이상의 생리활성물질들이 발견된 바 있고 이들을 이용한 제품 개발이 이루어지고 있음

2) Chemometrics의 중요성

◦ Chemometrics 란?

Chemometrics 기술은 분석화학의 한 분야로 1970년대에 태동된 것으로, 화학실험에서 얻은 데이터로부터 통계학적, 수학적 모형을 통하여 중요한 화학적 정보를 추출하는 기술이며 그 응용 범위가 제약, 의약, 식품, 환경, 정유산업, 고분자, 생명과학 등으로 다양해짐에 따라 독자적인 분야로 부상하고 있음. 특정한 물질, 원료, 제품의 성분을 분석하는데 직접적으로 고가의 분석장비(chromatograph 등)를 사용하는 대신에 비교적 간단한 장비인 FTIR (Fourier transform infra-red), NIR(near infra-red), NMR (nuclear magnetic resonance)등의 데이터를 Chemometrics 기술을 이용하여 분석함으로써 빠른 시간 내에 비파괴분석이 가능함. 따라서 이 기술의 핵심은 정확한 성분예측을 위한 모델의 개발이라 할 수 있음. 또한 Chemometrics 기술은 신속하고 정확한 소재성분의 예측을 가능하게 하므로 품질향상과 생산성 향상의 효과를 제공하는 환경 친화적 분석기술임. (출처: 스펙트론테크)

◦ Chemometrics 의 중요성

Chemometrics 와 같은 계측소프트웨어기술은 산업체의 생산품질 모니터링, 농축산물의 품질평가, 식품가공산업, 재료산업, 정유산업, 생명과학, 의학, 제약분야 등 화학적 물성분석이 필요한 전 분야에 걸쳐 응용되는 기술임. 특히 생약과 같이 다양한 종류의 화합물을 함유하고 있는 경우 Chemometrics 기술을 응용 시, 품질관리 및 평가에 유용하게 이용될 수 있음. (출처: 스펙트론 테크)

◦ Chemometrics 기술개발의 중요성

분광법의 최대 약점은 그 결과로 도출되는 스펙트럼의 해석이 어렵다는 점임. 특히 물성이 복잡하거나 측정하고자 하는 물성이외의 불순물(noise)이 들어있는 경우 더욱 해석을 어려움. 보통의 경우 단순한 모델로는 성분 해석 및 예측이 곤란하며 복잡한 모델의 개발이 요구됨. 따라서 예측력이 우수한 Chemometrics의 개발이 계측산업 또는 Chemometrics 기술의 핵심이라 할 수 있음. (출처: 스펙트론테크)

3) Fingerprint technique의 중요성

- 전통생약을 포함하는 대체약물의 사용 급증에 따라 이들의 일관성, identity 및 진위여부를 가리기 위해 혼합약제의 품질을 평가하는 것이 매우 중요한 과제로 대두되었음. 최근 chromatographic fingerprint technique은 생약의 품질관리를 위한 좀 더 의미있는 방법으로서 많은 사람들의 관심을 끌고 있는데, 그 이유는 fingerprint technique이 시료의 체계적인 특성에 강조를 둔 방법일 뿐 아니라, 식물의 안전성을 확보하고, 식물의 동정까지 행할 수 있는 방법이기 때문임. 특히 생약은 매우 복잡한 화합물로 이루어진 혼합물로 구성되어 있으며 그들의 치료효과나 독성은 이러한 많은 구성성분의 synergic effect에 의한 것이 많아 생약 중 포함되어 있는 한두 가지의 화합물이 생약의 질을 대표하기에는 어려운 측면이 있기 때문이기도 함.
- Fingerprint analysis는 생약의 품질평가를 위한 전략으로서 WHO에서 도입하였으며, 인정되고 있는 방법임. 그 뿐 아니라 WHO (2000), EMA (2001) 등을 비롯하여 중국에서는 전통의약으로부터 만들어진 주사제를 표준화하기 위한 방법으로 이 technique을 요구하고 있는 실정임.
- Fingerprint를 포함하는 chromatographic method로서는 TLC, HPLC, X-ray, CE 등이 있으며 그 중에서도 HPLC가 그 장점과 보편성으로 인하여 최선의 방법으로 여겨지고 있음. Chromatographic fingerprint 후에는 identity, 진위여부, 일관성이 chemometrics를 이용한 시료의 fingerprint를 비교함으로써 결정될 수 있음.

- 한편 LC-ESI-MSⁿ은 현재 가능한 방법 중 가장 강력한 분석방법으로 대두되고 있으며, 그 장점들 중에서도 LC-ESI-MSⁿ는 높은 감도와 선택성을 제공한다는 것임. 따라서 이 방법은 복잡한 혼합물을 분석하는 데 널리 사용되고 있음.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

연구개발목표	연구목표의 달성도	기여도
<ul style="list-style-type: none"> ○ 치자와 현삼 중 활성성분의 동시분석법 확립 및 validation 완성 - LC-MS/MS에 의한 분석 및 식약청 분석법 밸리데이션 가이드라인에 의한 분석법타당성 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 최적 HPLC 조건을 확립하였음 (100%) - 식약청 가이드라인에 의하여 현삼 및 치자의 표준품을 설정하고 분석법의 validation을 수행하여 분석법의 적합성을 입증하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 방법을 이용하여 생약 규격집, 또는 약전의 시험방법으로 이용할 수 있음 - 생약을 이용하여 건강기능식품, 천연물신약 등을 개발 시 기준으로 이용할 수 있음
<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 추출방법 확립 및 산지별, 기원별 분석 - 직교배열법을 이용한 최적 추출조건 확립 및 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 직교배열법에 의하여 용매, 추출온도, 추출시간, 용매의 양 등의 최적 추출조건을 확립하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> - 동 생약의 산업화 시 QC 방법 등으로 이용될 수 있으며, 유효성분의 최적 추출방법으로 이용할 수 있음
<ul style="list-style-type: none"> ○ 패턴인식/지문인식법에 의한 한약재 평가 - 치자 및 현삼의 chemical fingerprint 또는 chemomatrix에 의한 기원별, 산지별 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - PCA 및 HClustering에 의하여 치자 및 현삼 중의 성분 peak들을 이용하여 산지를 구별할 수 있는가 검토하였음 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> - 수출입관리, 원산지 관리 등에 이용할 수 있음

1.3 국내·외 기술개발 현황

가. 국내 현황 및 문제점, 전망

- 2001년 정부포럼에서 한국·중국·일본 등 9개국은 전통의학의 발전을 위한 권고안을 결정하였고, 동년 10월 국제동양의학회에서 전통의학 국제교류 강화를 위한 공동선언문(2001 서울선언)을 채택하였으며, 동양의학 관련 제도와 법령의 교류 활성화, 동양의학 공동연구, 용어통일 및 규격기준의 국제표준화, 학술·의료정보 및 인력교류의 협력 및 동양의학 관련 약제 및 의료기기의 개발과 민간교류에 협력하기로 하였음.
- 우리나라는 한의학의 교육, 면허, 시술이 법제도로 규정되어 있으며, 세계에서 질적으로 가장 우수한 인적자원과 축적된 임상기술, 양질의 한약자원을 보유하고 있어 전통의학 분야에서 중국과 중주국의 지위를 다투고 있는 실정이나, 아직 중국보다 국제시장을 개척할 수 있는 인프라구축이 미흡하고 제도적 뒷받침도 부족하여 주도적인 시장 개척을 기대하기 힘든 상태에 있음. 그러나 한약의 효능을 응용한 신 치료물질 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 1990년대 이후 우리나라 특허

청에 출원된 한의약품 분야의 특허가 급격히 증가되고 있음.

- 특히 한의약품 분야의 국제특허를 살펴보면 한국출원인과 외국출원인의 비율은 62 : 38로서 일반 의약품분야의 29 : 71과 비교해 볼 때 우리나라가 기술경쟁력을 지고 있는 것으로 확인되어지며 따라서 생약의 품질규격화를 통하여 우수한 생약재를 생산할 수 있는 기반을 구축한다면 우수한 인적 자원과 양질의 물적 자원을 활용하여, 고부가가치의 창출을 통해 국가경제에 기여할 수 있을 것으로 생각됨.

나. 외국 현황 및 문제점, 전망

- 미국 FDA의 Guidance for Industry - Botanical Drug Products의 초안마련 (2000. 8) 등 식물성 생약제제의 산업화 지원을 위한 제도적 기반구축의 초안을 마련.
- 또한 1994년 Dietary Supplements and Human Education Act 법을 제정하여 약초를 활용하여 각종기능성 건강보조식품, 화장품 등이 개발 판매되고 있으며 그 성장속도는 1997년 39억불에서 2001년도 약 363억불로 엄청난 시장성의 확대를 보이고 있음. 기능성식품 연구논문도 1994년 200여 편이었으나, 1998년에는 약 3000편으로 5년간 15배 정도 크게 신장하였음.
- 국립보건원(NIH) 산하기관으로 대체의학국립센터(NCCAM-National Center for Complementary & Alternative Medicine)를 두어 2001년에는 1억 달러의 연구비를 지원한 바 있음.
- 최근 유럽 미국 등지에서는 대체의학 분야에 대한 사회적 제도적 수용에 대하여 조사 연구가 활발하며 적극적인 투자를 하고 있는 실정으로 한약에 대한 연구·개발에 대한 투자가 급증하고 있으며 독일의 경우 정부주도하에 Natural Product Pool 시행으로 은행엽엑스, 카드두스마리아누스엑스 등을 개발하여 전세계 천연물제제시장을 독점하고 있음.
- 유럽공동체에서는 1993년부터 1998년까지 권역내의 국가별 대체의학에 대한 연구 보고서를 작성하여 대체의학에 대한 배경, 사회적 가치, 안전성·유효성, 법률적인 검토, 향후 과제 등에 관해 총체적인 접근을 시도한 바 있음.
- 일본의 경우 100년전부터 한약재 규격 및 관리 현대화 연구를 추진해 왔으며, 현재 세계시장 점유율의 80%를 차지하고 있고, 1984년도부터 문부성과 농림수산성 주관하에 신식품소재 기능발현기구 제어기술 개발 등 다양한 프로젝트를 기획하여 계획적으로 지원한 결과 식품소재의 신속 평가법 개발, 기능성의 증명, 발현기구의 해명, 기능성향상을 위한 생산유통기술의 개발, 제품의 다양화 등 상당한 기술수준에 이르고 있음.
- 중국은 한방바이오산업의 학문적 메카로서 위치를 확보하고 있는 상태에서 미국, 유럽의 관심 속에 확산해 나가면서 세계화되어 가고 있으며, 한약 GAP, GMP, GSP제도를 도입하여 품질관리 및 안전관리를 국제 수준으로 격상하였음.

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구대상 및 방법

2.1 연구내용

- 활성성분 분석을 위한 산지별 치자, 현삼의 수집
 - 현삼/치자의 대조생약 및 산지별 생약재의 확보 (각 20 시료 이상)
- 최적 분석 방법의 검토 및 validation
 - HPLC를 이용한 최적 분석방법의 검토
 - 확립된 분석법의 validation
- 최적 분석 전처리 조건의 확립
 - 분석 전처리를 위한 최적 조건 및 분석 최적조건 확립 (직교배열법 이용)
- Fingerprint의 작성
 - HPLC chromatogram에 의한 fingerprint standardization
- Chemometrics에 의한 원산지 판별
 - PCA 등에 의한 원산지 판별 가능 검토

2.2 연구방법

- 활성성분 분석을 위한 산지별 치자, 현삼의 수집
 - 식약청 제공 대조 생약 외 약 20여 종 이상씩의 현삼을 인터넷, 산지, 약령시 등을 통해 수집
- 최적 분석 방법의 검토
 - C18, 순상 등의 각종 고정상과 물 MeCN, HOAC, MeOH 등의 이동상 및 PDA, ELSD 등의 검출기를 조합한 최적 추출방법의 확립
- 최적 분석 전처리 조건의 확립
 - 분석 전처리를 위한 최적 추출용매, 용매/용질의 비, 추출시간 및 기타 전처리 조건을 확립
 - 최적이동상, 최적검출기, 최적 고정상 등 최적 분석조건을 확립
- Chemical fingerprint의 확립
 - HPLC fingerprint 구축: 산지별 시료에 대한 D/B 구축. HPLC용 software를 통한 library 구축
 - LC-MS/MS library 구축: 기존 library에 분리하여 얻은 화합물의 library를 구축
 - LC-MS/MS fingerprint DB의 구축
 - Fingerprint의 작성: LS-MS의 MS condition은 천연물에 주로 많이 이용되는 negative mode를 위주로 하며, positive mode와 비교하여 최선의 방법을 선택. Fragmentor voltage에 따라 각 성분 peak의 강도가 달라질 수 있으므로 최적의 조건을 검토하기 위하여 50, 150, 250 V 등으로 다양하게 측정. 기본적으로는 scan mode에서 MS fingerprint를 작성하며, 또한 높은 감도를 이용하기 위하여 SIM mode로도 fingerprint를 작성.
 - Fingerprint의 standardization: fingerprint analysis의 validation은 relative retention time (the ratio of peak rt of sample constituents to the reference standard)와 relative peak area (the ratio of peak area of sample constituents to the reference standard)로 함. Reference substance는 화합물 중 가장 안정하고 다른 화합물과 잘 분리되며, 쉽게 알아볼 수 있는 major compound로 함. 분석은 각 시료에 대하여 5반복을 실시하며 relative rt 및 area가 RSD가 3% 이내에 들도록 함. 또한 재현성 실험을 위하여 한 batch의 식물 추출물 5개를 준비하여 역시 각각의 RSD가 3% 이내에 들도록 함. 마지막으로 stability test를 위하여 각 시료를 24시간 후에 재분석하여 RSD가 3% 이내에 들도록 함. 이러한 오차 범위 내에 분석치가 들어갔을 때 이 실험방법은 유효

한 것으로 인정하고 다른 시료에 적용. 상기에서 확립된 분석법을 이용하여 10-20 개의 동일 식물의 산지별 추출물중 공통적으로 나타나는 common peak를 이 식물의 fingerprint peak로 설정.

◦ Chemometrics에 의한 원산지 판별

- LC fingerprint를 이용한 산지(기원) 구별: 산지별 생약의 구별은 표준화된 fingerprint를 이용하여 실시하며 principal component analysis (PCA)를 이용하여 처음 두 PC를 이용하여 score plot을 작성하여 산지(기원)을 판별 (RG Brereton, Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant, John Wiley & Sons, Chichester, 2003).

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 치자

가. 시료의 산지별 수집

- 생약감별팀에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 13 종, 총 27종의 시료를 확보하였음.

(Table 3-1. Collected Gardenia samples)

국산			중국산		
No.	구입처	산지	No.	구입처	산지
S1	(10-6) 서울시장	순천	S3	(10-9) 울산시장	중국
S2	(10-5) 영천시장	완도	S4	울산시장	중국
X1	(10-17) 대구시장	전남 화순	S5	(10-10) 한국	중국산성
X2	(10-19) 대구시장	전남 화순	S6	상해시장	중국
X3	(10-30) 대구시장	전남 화순	X7	(10-36) 대구시장	중국
X4	(10-21) internet	경북 영천	X9	(10-24) 서울시장	중국
X5	(10-27) internet	경북 영천	X13	(10-35) 서울시장	중국
X6	(10-32) internet	경북 영천	X14	(10-33) 서울시장	중국
X8	(10-34) internet	전북 장수	X15	(10-28) 대구시장	중국
X10	(10-22) internet	전남 진도	X17	(10-23) 대구시장	중국
X11	(10-25) internet	전남 진도	X18	(10-20) 서울시장	중국
X12	(10-29) internet	경남거제	X20	(10-18) 대구시장	중국
X16	(10-27) 대구시장	국산	X21	서울시장	중국
X19	(10-31) internet	제주도			
총계	국산	14종	총계	중국산	13종

S: 생약감별팀 제공시료. X : 구입한 치자

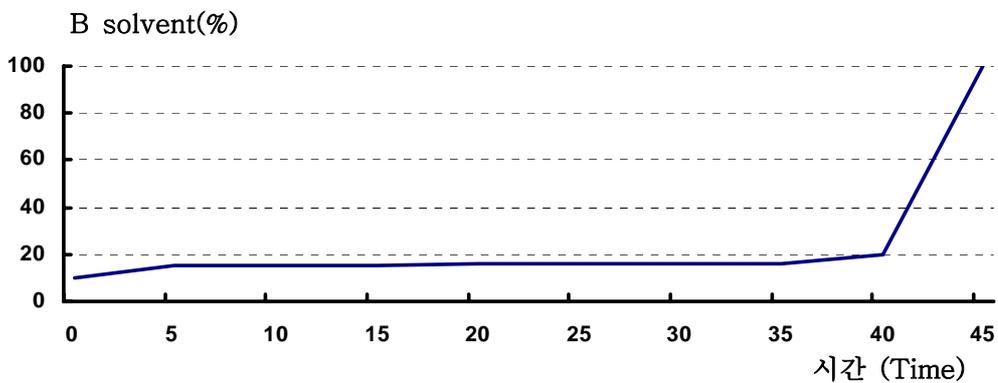
No.의 오른쪽은 유전자 감별팀의 시료번호임/X1-20은 PCA 분석에 사용한 시료임.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

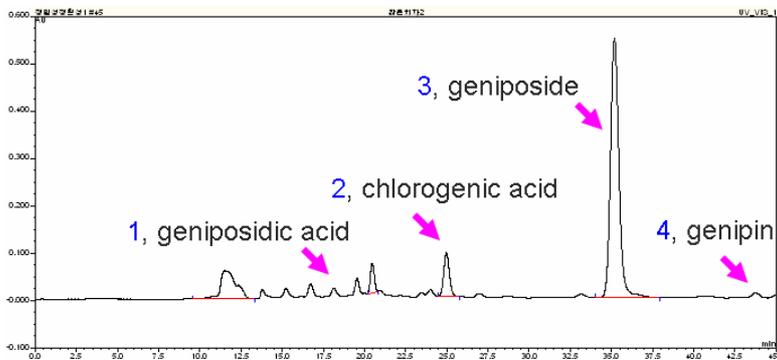
1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Agilent Eclipse XDB- C18(4.6 × 250 mm, 5 μm) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리 조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 254 nm에서 검출하는 것이 치자 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음. 아래 표에 이상의 조건을 정리, 요약하여 나타내었으며 이 조건에서의 HPLC profile을 Fig. 3-1에 나타내었음. 그림에서 보는 바와 같이 주요 성분들이 모두 base line separation이 되었음
- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 치자의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 치자의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide 및 genipin의 4종을 선정하였음.

Column	Agilent Eclipse XCB C18 (4.6×250mm, 5μm)			
Wavelength	UV 254 nm			
Temp.	25 °C			
Injection volume	20 μL			
Flow rate	0.8 mL/min			
Mobile phase	Time	Flow	H ₂ O+1% HOAc	ACN+1% HOAc
	0	0.8	90	10
	5		85	15
	15		85	15
	20		84	16
	35		84	16
	40		80	20
	45		0	100



(Fig. 3-1. Condition of mobile phase)



(Fig. 3-2. Retention time of standard samples and HPLC profile of Gardeniae Fructus extract (1, geniposidic acid. 2, chlorogenic acid. 3, geniposide. 4, genipin))

2) 치자 표준품의 validation

가) Sample 및 표준액의 조제

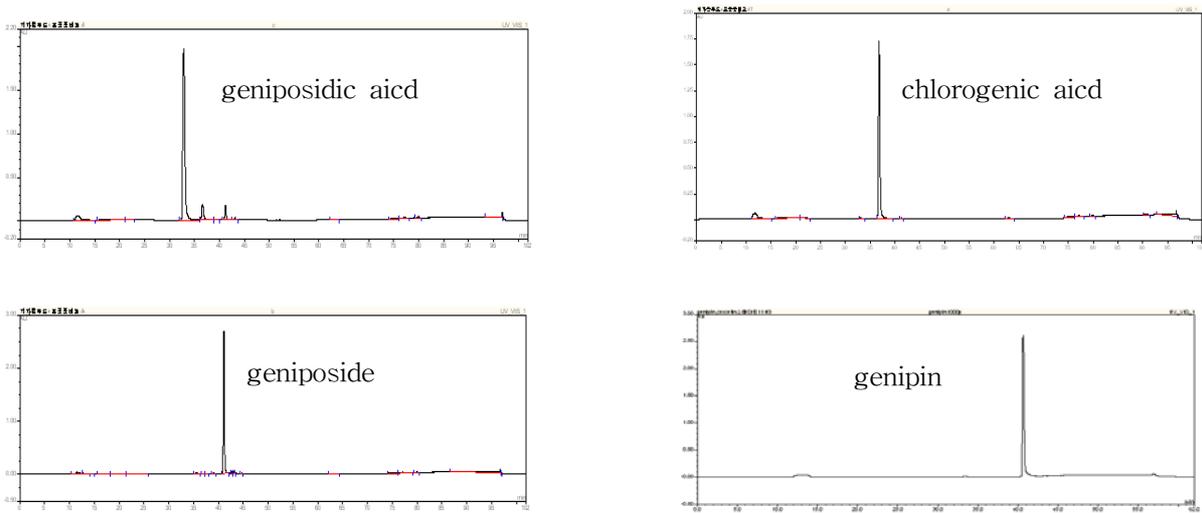
- Geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide 그리고 genipin 각각 1.0 mg을 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 1 mL에 녹이고 이것을 stock solution으로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액 10 μL를 HPLC로 분석하여 Chromatogram의

면적을 구하고 농도와 면적에 따른 검량선을 작성하여 함량계산을 실시하였다.

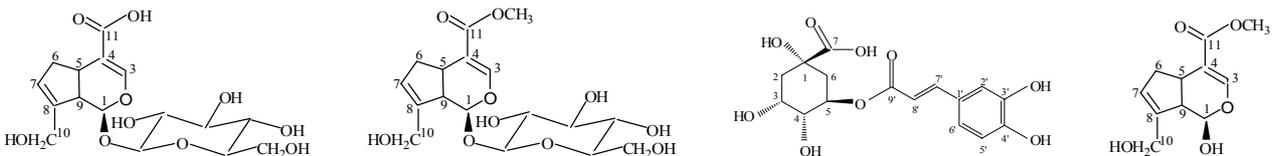
- 26종의 치자를 최적 추출조건으로 추출한 후 농축한 추출물을 각각 20.0 mg으로 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 용액 1 ml로 녹인 다음 0.45 syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 각각의 검액을 10 µL씩 3회 반복하여 HPLC로 분석하여 함량을 계산하였다.

나) 표준품의 순도 검정

- 4종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 각 표준품의 순도는 91.2%-99.8%였다. 이들의 크로마토그램은 Fig. 3-2에 나타내었으며 화합물의 구조는 Fig. 3-2와 같다.



(Fig. 3-2. HPLC profiles of standards)



(Fig. 3-3. Structures of geniposidic acid, geniposide, chlorogenic acid and genipin (from the left to right))

- 각 표준품의 순도는 geniposidic acid가 91.20±0.16%, chlorogenic acid가 99.86±0.07%, geniposide가 97.52±0.13%, genipin이 92.06±0.10%이었다.

다) 표준품의 안정성

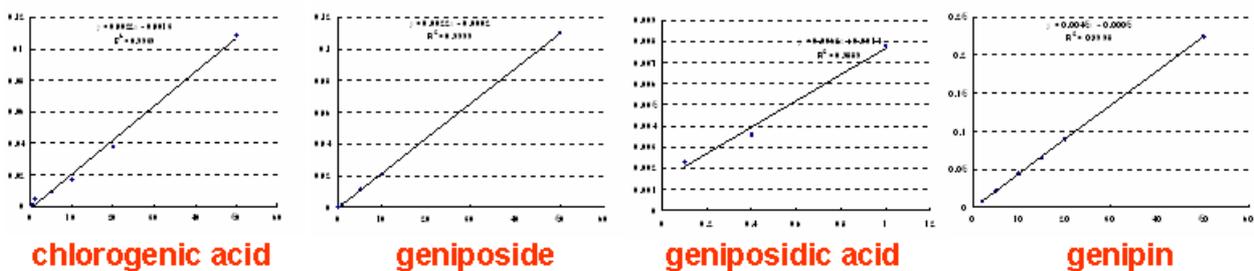
- 표준품 4종을 1일, 7일 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99-101% 수준으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수가 있다. (Table 3-2)

(Table 3-2. Stability of standard samples (geniposidic acid, geniposide, chlorogenic acid and genipin) by storage days and temperature)

Compound	Temp.	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Observed conc.				Average	SD	Accuracy(%)
			1 day	7 day	30 day	60 day			
Chlorogenic acid	-20 $^{\circ}\text{C}$	50	50.67	49.87	50.21	51.12	50.47	0.54	100.94
	RT		51.72	50.43	49.36	49.74	50.31	1.04	100.63
Geniposide	-20 $^{\circ}\text{C}$		50.28	49.54	51.42	50.87	50.53	0.81	101.06
	RT		49.11	50.62	48.99	51.23	49.99	1.11	99.98
Geniposidic acid	-20 $^{\circ}\text{C}$		50.98	48.37	50.69	51.47	50.38	1.38	100.76
	RT		49.98	51.13	50.72	49.12	50.24	0.88	100.48
Genipin	-20 $^{\circ}\text{C}$		50.55	48.72	51.22	50.64	50.28	1.08	100.57
	RT		50.92	48.41	51.52	49.69	50.14	1.38	100.27

라) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

◦ 위의 네 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 0.1 μg - 50 μg 으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었음. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음. Standard curve는 Fig. 3-4에 나타내었으며 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계는 Table 3-3에 나타내었음.



(Fig. 3-4. Genipin, chlorogenic acid, geniposide and geniposidic acid standard curve)

(Table 3-3. Range, linearity, LOD and LOQ)

Compound	Linear range ($\mu\text{g/ml}$)	Slope	Intercept	Correlation coefficient	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
chlorogenic acid	5-100	0.0010	-0.0133	0.9999	2.636	7.409
geniposide	1-100	0.0007	-0.0175	0.9987	2.136	6.909
geniposidic acid	1-100	0.0004	0.0005	0.9986	0.500	2.194
genipin	10-100	0.0008	0.0050	0.9990	1.111	3.444

LOD : 3 = S/N; LOQ : 10 = S/N (S : signal N : noise)

마) Repeatability

- 각 성분의 면적값을 내부표준물질의 면적값으로 나눈 면적값 비율과 머무름시간(retention time)에 대하여 재현성을 수행하였음. 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.5-1.1%내의 양호한 값으로 Table 3-4에 나타내었음.

(Table 3-4. Repeatability (Genipin, chlorogenic acid, geniposide and geniposidic acid))

Compound	Peak area			Retention time(min)		
	Mean	SD	RSD(%)	Mean	SD	RSD(%)
Genipin	0.021	0.00017	0.8172	25.67	0.2619	1.0201
Chlorogenic acid	0.042	0.00060	1.4184	22.08	0.11442	0.5181
Geniposide	0.071	0.00135	1.8764	24.27	0.28689	1.1820
Geniposidic acid	0.046	0.00191	0.3369	17.14	0.18801	1.0972

바) Precision and Accuracy

- 각 지표성분 분석에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복실험을 하였음. 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였음.
- 그 결과 CV(%)는 0.22%-5.72%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 86.8%-105.3%사이에 나타나 양호한 정밀성과 정확성을 나타내었음 (Table 3-5, 3-6)

(Table 3-5. Intra-day precision and accuracy)

Compound	Fortified (µg/ml)	Intra-day(n=3)				
		Observed conc.	SD	Bias	CV(%)	Accuracy(%)
Chlorogenic acid	20	21.3	0.000458	1.3	5.72	93.9
	50	50.03	0.000503	0.03	2.32	99.9
	100	102.35	0.000252	2.35	0.61	97.7
Geniposide	20	20.58	0.000208	0.58	1.23	97.2
	50	51.90	0.000681	1.9	2.01	96.3
	100	100.20	0.000351	0.2	0.48	99.8
Geniposidic acid	20	20.98	0.000220	0.98	1.7	95.3
	50	52.36	0.000200	2.36	0.64	95.5
	100	98.65	0.000451	-1.35	0.96	101.4
Genipin	20	23.03	0.000153	3.03	0.63	86.8
	50	50.33	0.002329	0.33	5.14	99.3
	100	104	0.000200	4	0.22	96.2

(Table 3-6. Inter-day precision and accuracy)

Compound	Fortified ($\mu\text{g/ml}$)	Inter-day(n=3)				
		Observed conc.	SD	Bias	CV(%)	Accuracy(%)
Chlorogenic acid	20	19.98	0.000348	-0.02	4.35	100.1
	50	50.87	0.000145	0.87	0.66	98.3
	100	103	0.000149	3	0.35	97.1
Geniposide	20	21	0.000689	1	4.08	95.2
	50	50.98	0.000115	0.96	0.34	98.1
	100	101.56	0.000478	1.56	0.66	98.5
Geniposidic acid	20	19	0.001978	-1	4.17	105.3
	50	50.98	0.000897	0.98	2.9	98.1
	100	104.3	0.000247	4.3	0.53	95.9
Genipin	20	20.48	0.000699	0.48	2.9	97.7
	50	50.55	0.000478	0.55	1.05	98.97
	100	99.54	0.000214	-0.06	0.24	100.5

사) Robustness

- 이동상 용매 2종 중에 acetic acid가 1%씩 첨가되어 있으므로 acetic acid의 농도 변화에 따른 retention time의 변화를 확인하였음. 그 결과는 아래의 표와 같으며 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않았음. (Table 3-7)
- Column별 (사이지 및 제조사별), column 온도별과의 완전성을 비교해본 결과 Accuracy가 97%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있음. (Table 3-8, 3-9)

(Table 3-7. Robustness of acetic acid concentration)

Acetic acid (mM)	Retention time (min)		
	Rutin	Chlorogenic acid	Geniposide
50	27.617	21.427	23.903
100	27.91	21.617	24.163
166	27.61	22.113	24.073
333	26.297	21.486	25.620
RSD(%)	2.63	1.43	3.24

(Table 3-8. Robustness of types of columns)

Compound	Column	Conc. (ug/ml)	Observed conc.	Accuracy(%)
Chlorogenic acid	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)	50	48.8	97.6
	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mm, 3.5 μm)		49.2	98.4
	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		50.2	100.4
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.2	98.4
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		50.3	100.6
Geniposide	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)	50	52.3	104.6
	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mm, 3.5 μm)		50.6	101.2
	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		51.3	102.6
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		50.6	101.2
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.8	99.6
Geniposidic acid	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)	50	52.3	104.6
	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mm, 3.5 μm)		52.4	104.8
	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		51.5	103.0
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		50.2	100.4
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		50.1	100.2
Genipin	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)	50	52.3	104.6
	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mdm, 3.5 μm)		49.3	98.6
	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		51.9	103.8
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.8	99.6
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		47.9	95.8

(Table 3-9. Robustness of temperature of column)

Compound	Temperature of column (°C)	Conc. (ug/ml)	Observed conc.	Accuracy(%)
Chlorogenic acid	RT	50	50.3	100.6
	30		52.3	104.6
	50		49.6	99.2
Geniposide	RT		51.2	102.4
	30		48.6	97.2
	50		50.3	100.6
Geniposidic acid	RT		48.6	97.2
	30		49.6	99.2
	50		53.3	106.6
Genipin	RT	50.3	100.6	
	30	54.3	108.6	
	50	48.6	97.2	

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- 치자 1 g당 95% 에탄올 10 ml를 이용하여 Soxhlet, 환류 및 초음파추출을 행한 결과, geniposide의 경우 Soxhlet추출이 가장 높은 추출효과를 나타내었으나 그 이외의 다른 지표물질 즉, geniposidic acid, chlorogenic acid, genipin의 경우는 거의 추출되지 않았음. 따라서 geniposide만을 지표성분으로 할 경우는 Soxhlet 추출을, 기타 다른 지표성분을 함께 정량하기 위해서는 환류추출 (reflux)이 가장 좋은 방법인 것으로 판단 되었음. (Table 3-10.)

(Table 3-10. Comparison of Soxhlet, reflux, and sonication extract methods)

Extract method	Compound	Contents (mg/g)
Soxhlet	Geniposide	7.08
	Geniposidic acid	ND
	Chlorogenic acid	ND
	Genipin	ND
Sonication	Geniposide	2.90
	Geniposidic acid	ND
	Chlorogenic acid	ND
	Genipin	ND

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 직교배열법의 경우 직교배열표는 각 열이 직교가 되게 미리 만들어 놓은 표임. 즉, 어떤 수준에 대해서나 다른 열의 전체 수준이 같은 횡수씩 나타나도록 구성되어 있으며 인자가 많을 시에는 일반 요인 배치법으로는 모든 실험을 할 수가 없기 때문에 적은 수의 실험으로 많은 효과를 찾으려는 목적으로 만들어 놓은 표임. 직교배열법의 장점으로서는 첫째, 기계적인 조작으로 이론을 잘 모르기도 직교배열법의 실험을 실시 할 수 있고 둘째, 실험 데이터로부터 요인변동의 계산이 용이하고 분산분석표 작성과 분석이 수월하며 셋째, 실험의 크기를 확대시키지 않고도 실험에 많은 인자를 짜 넣을 수 있음 (Table 3-11).

(Table 3-11. Orthogonal design)

추출번호	ethanol(%)	시간(h)	무게(g)	용매량(ml)	온도
1	70	5	1	50	60
2	70	5	3	100	70
3	70	5	5	200	80
4	50	3	1	100	80
5	50	3	3	200	60
6	50	3	5	50	70
7	95	1	1	200	70
8	95	1	3	50	80
9	95	1	5	100	60

- Table 3-11과 같은 조건들에 의하여 추출된 치자 중의 지표성분 함량을 계산한 결과 Table 3-12와 같이 chlorogenic acid는 6번 조건에서 가장 높았으나 합계를 비교했을 때는 7번의 경우가 가장 좋았으므로 지표성분의 추출은 치자 1 g을 200 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 70℃에서 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하였음.

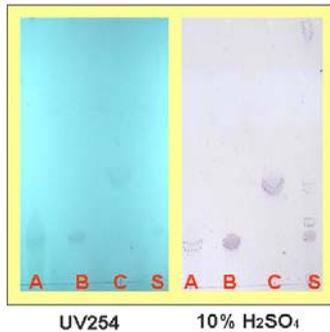
(Table 3-12. Contents of 4 standard samples(geniposidic acid, geniposide, chlorogenic acid and genipin) according to different extraction methods)

Number	Contents (µg/mg)				Total
	Geniposidic acid	Chlorogenic acid	Geniposide	Genipin	
1	0.38	1.82	10.10	Trace	12.30
2	0.50	1.92	10.68	Trace	13.10
3	0.49	1.88	9.89	Trace	12.26
4	0.26	1.42	9.10	Trace	10.78
5	0.10	1.17	7.04	Trace	8.31
6	0.14	1.99	14.24	Trace	16.37
7	0.56	1.87	15.18	Trace	17.61
8	0.54	1.87	13.68	Trace	16.09
9	0.33	1.67	12.54	Trace	14.54

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 치자 지표성분의 TLC pattern 분석

- 치자 지표성분 및 추출물에 대한 TLC 조건을 검토하였으나 순상 TLC에서는 화합물의 분리가 거의 일어나지 않았음.
- 시도한 방법 중 3종의 지표성분 및 치자 추출물에 대한 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이 때의 TLC chromatogram과 용매 조건은 아래 그림과 같음. (Fig. 3-5)



ACN : MeOH : H₂O : Formic acid = 15:20:64:1

A= Chlorogenic acid

B= Geniposide

C= Geniposidic acid

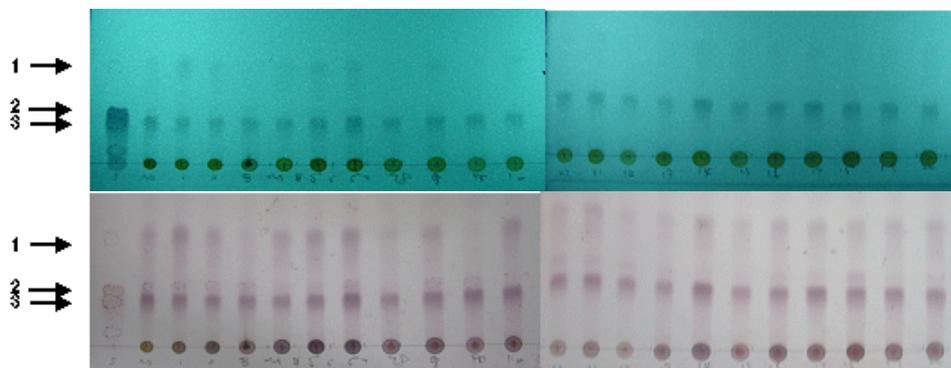
S= 치자 추출물

Merck RP-18 precoated TLC plate

Visualization: UV254 nm & 10% Sulfuric acid

(Fig. 3-5. TLC chromatogram and developing conditions)

- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 치자의 TLC pattern을 비교하여 보았으나 TLC pattern으로는 지역간의 차이를 인정하기 어려웠음 (Fig. 3-6).



(Fig. 3-6. Upper : UV 254nm, Lower : 10% H₂SO₄)

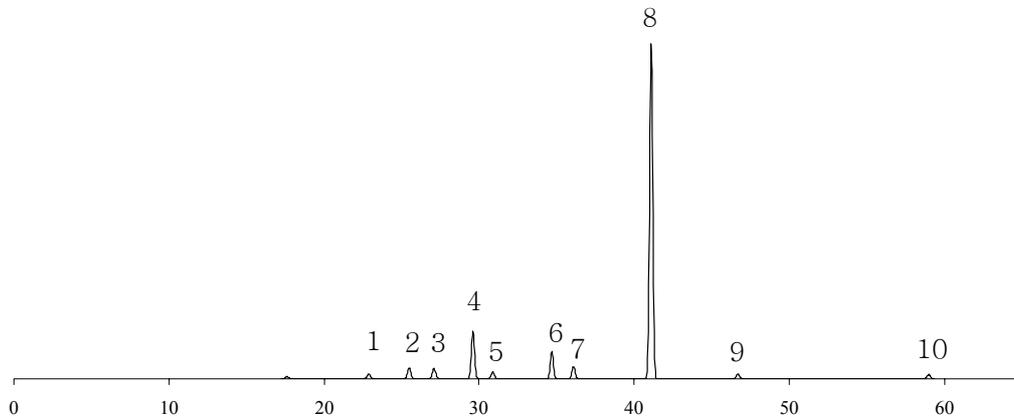
Merck RP-18 TLC plate / MeCN:MeOH:H₂O:Formic acid = 15:20:64:1 (1= geniposide. 2= geniposidic acid. 3= chlorogenic acid) ST - standard. HS - Mean of Gardeniae Fructus from KFDA / 1-20 Different places Gardeniae Fructus (20 places)

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 생약 감별팀으로부터 받은 6종의 대조 생약이 나타내는 HPLC에서의 각 peak들의 평균을 기준으로 잡은 후 본 연구에서 선정된 표준품을 포함하여 총 10개의 peak area를 통계프로그램의 변수로

사용하였다 (Fig. 3-7). 또한 이 peak 10개를 사용하여 H-cluster 및 주성분분석인 PCA를 통해 군집을 나누고자 하였다.

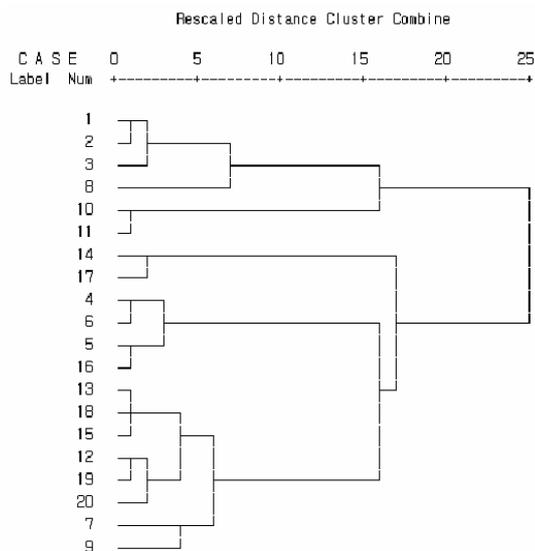


(Fig. 3-7. Peak standardization)

2: Geniposidic acid, 4: Chlorogenic acid, 8: Geniposide, 9: Genipin. The other peaks are arbitrary ones from standard Gardenia samples from pharmacognosy team

나) H-cluster (군집분석)

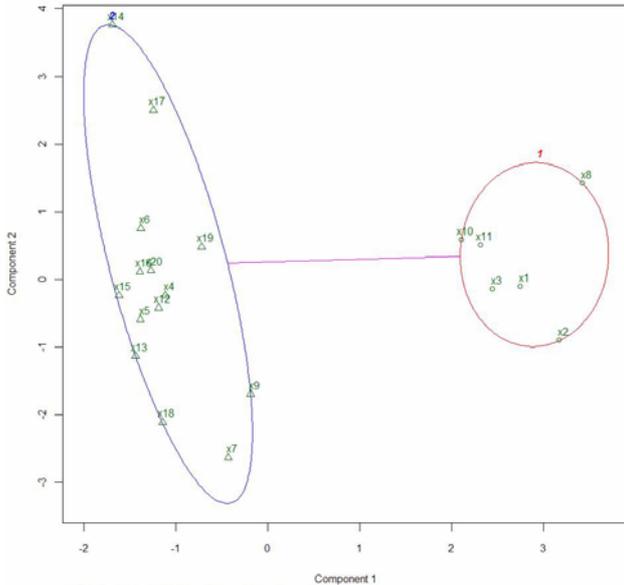
◦ Table 3-1에 나타난 생약시료는 H-cluster을 통해 몇 개의 군집을 나눌 수 있었다 (Fig. 3-8). 이 경우 전남지역의 치자(sample N. 1, 2, 3, 8, 10, 11)는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있었으나 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았다 (번호1-20은 100쪽의 X1-X20과 동일). 한편 DNA 감별 결과, X2, X5, X15는 꽃치자로 판명되었으나 H-cluster와의 개연성은 보이지 않았다.



(Fig. 3-8. H-cluster analysis for 20 samples)

다) PCA (주성분 분석)

- PCA 분석을 통해서도 두 개의 군집으로 나눌 수 있었다 (Fig. 3-9). PCA에 의한 결과 역시 H-cluster와 비슷한 패턴을 나타내었는데, 아래 그림에서 보듯이 전남지역의 치자 (sample No. X1, X2, X3, X8, X10, X11)는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있다. 하지만 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않음을 알 수가 있다 (시료번호는 Table 1 참조). 한편 DNA 감별 결과, X2, X5, X15는 꽃치자로 판명되었으나 PCA 분석결과와의 개연성은 보이지 않았다.



(Fig. 3-9. PCA for 20 samples)

이 PCA로는 한국산과 중국산의 명확한 구별을 할 수는 없었으나 전남산 (오른쪽)과 기타 산지와와의 구별은 할 수 있었음. 또한 DNA 감별 결과, X2, X5, X15는 꽃치자로, 기타는 치자로 판명되었으나 PCA 분석결과와의 개연성은 보이지 않았음. 아래에 DNA 종감별 분석결과를 정리하였음.

(Table 3-13. Comparison of PCA result and DNA analysis of Gardenia samples)

No.	산지	PCA	DNA	No.	산지	PCA	DNA
S1 (10-6)	순천	-	치자	S3 (10-9)	중국	-	꽃치자
S2 (10-5)	완도	-	치자	S4	중국	-	
X1 (10-17)	전남 화순	-	치자	S5 (10-10)	중국산성	-	치자
X2 (10-19)	전남 화순	-	꽃치자	S6	중국	-	
X3 (10-30)	전남 화순	-	치자	X7 (10-36)	중국	-	치자
X4 (10-21)	경북 영천	-	치자	X9 (10-24)	중국	-	치자
X5 (10-27)	경북 영천	-	꽃치자	X13 (10-35)	중국	-	치자
X6 (10-32)	경북 영천	-	치자	X14 (10-33)	중국	-	치자
X8 (10-34)	전북 장수	-	치자	X15 (10-28)	중국	-	꽃치자
X10 (10-22)	전남 진도	-	치자	X17 (10-23)	중국	-	치자
X11 (10-25)	전남 진도	-	치자	X18 (10-20)	중국	-	치자
X12 (10-29)	경남거제	-	치자	X20 (10-18)	중국	-	치자
X16 (10-27)	국산	-	치자	X21	중국		
X19 (10-31)	제주도	-	치자				

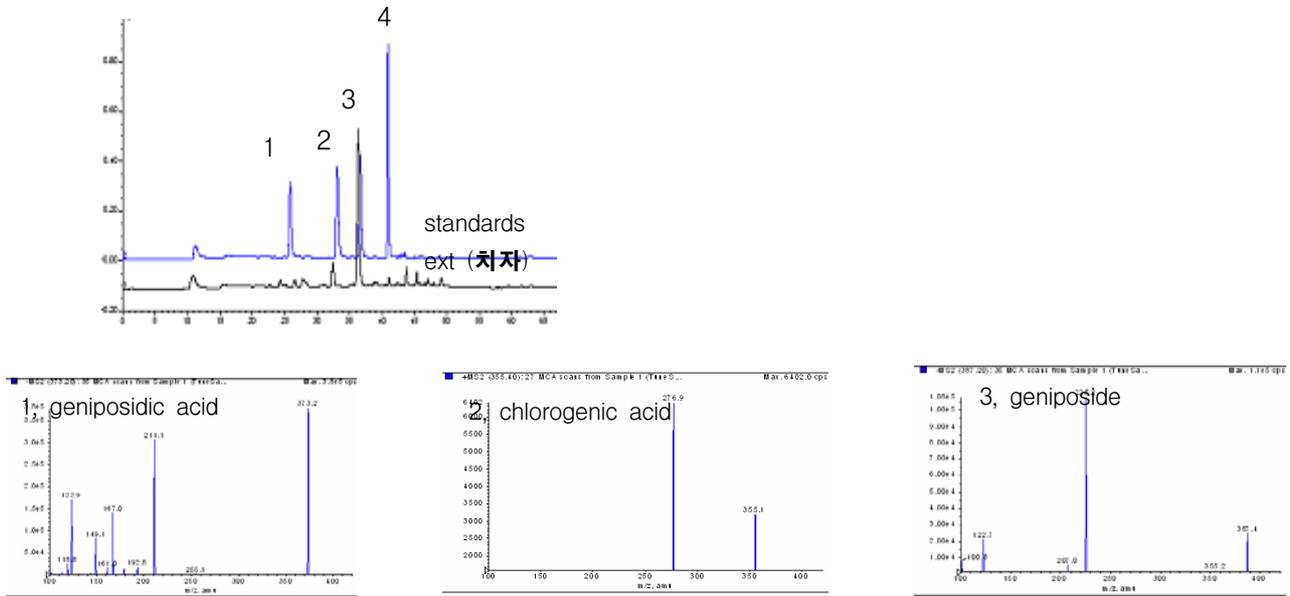
S: 생약감별팀 제공시료. X : 구입한 치자

No.의 오른쪽은 유전자 감별팀의 시료번호임/X1-20은 PCA 분석에 사용한 시료임.

PCA에 의해서는 치자와 꽃치자의 구분은 불가능하였음

마. 지표성분의 LC-MS/MS pattern 검토

- 치자의 지표성분에 대하여 LC-MS pattern을 분석한 결과는 Fig. 3-10과 같다. Genipin의 경우에는 MS pattern이 잘 검출되지 않았다.



(Fig. 3-10. LC-MS/MS pattern)

바. 치자 중 지표성분의 함량

- 각지에서 수집한 치자 중의 지표성분의 함량은 Table 3-13과 같다.

(Table 3-13. Contents of four standard samples in various Gardenia samples)

Sample No.	Contents (mg/g)				
	geniposidic acid	chlorogenic acid	geniposide	genipin	
식약청 제공	1	0.074 ± 0.085	0.685 ± 0.693	13.476 ± 0.089	0.101 ± 0.070
	2	0.129 ± 0.054	1.500 ± 0.093	12.791 ± 1.018	0.047 ± 0.032
	3	0.183 ± 0.012	2.034 ± 0.107	13.703 ± 0.650	0.003 ± 0.000
	5	0.148 ± 0.016	2.038 ± 0.135	10.411 ± 0.794	0.199 ± 0.019
	6	0.156 ± 0.007	1.613 ± 0.044	10.608 ± 0.282	0.090 ± 0.003
	수집품	1	0.012 ± 0.030	4.992 ± 0.990	8.230 ± 0.803
2		0.076 ± 0.027	4.000 ± 0.377	8.707 ± 0.850	0.236 ± 0.087
3		0.084 ± 0.062	0.276 ± 0.056	11.120 ± 1.073	0.088 ± 0.014
4		0.063 ± 0.056	3.144 ± 0.305	10.059 ± 0.808	0.256 ± 0.093
5		0.045 ± 0.041	3.587 ± 0.360	8.192 ± 0.837	0.351 ± 0.039
6		0.097 ± 0.030	2.966 ± 0.046	10.150 ± 0.176	0.108 ± 0.012
7		0.105 ± 0.038	0.708 ± 0.450	8.404 ± 0.579	0.086 ± 0.008
8		0.058 ± 0.010	4.700 ± 0.351	12.536 ± 0.829	0.340 ± 0.069

Sample No.	Contents (mg/g)				
	geniposidic acid	chlorogenic acid	geniposide	genipin	
수집품	9	0.049 ± 0.005	0.272 ± 0.014	12.271 ± 0.600	0.095 ± 0.016
	10	0.068 ± 0.008	3.378 ± 0.259	11.154 ± 0.763	0.205 ± 0.027
	11	0.148 ± 0.009	2.776 ± 0.196	11.904 ± 0.725	0.338 ± 0.057
	12	0.134 ± 0.013	0.795 ± 0.074	9.828 ± 0.863	0.003 ± 0.000
	13	0.051 ± 0.003	1.795 ± 0.282	9.105 ± 0.389	0.038 ± 0.050
	14	0.142 ± 0.012	3.102 ± 0.200	15.593 ± 0.739	0.232 ± 0.166
	15	0.064 ± 0.063	2.015 ± 0.056	9.961 ± 0.176	0.003 ± 0.000
	16	0.127 ± 0.007	2.784 ± 0.172	9.108 ± 0.495	0.334 ± 0.019
	17	0.157 ± 0.013	2.197 ± 0.217	14.021 ± 1.129	0.003 ± 0.000
	18	0.058 ± 0.051	1.060 ± 0.033	8.908 ± 0.739	0.021 ± 0.026
	19	0.066 ± 0.004	2.958 ± 0.082	13.048 ± 0.328	0.144 ± 0.007
	20	0.164 ± 0.014	2.597 ± 0.223	9.389 ± 0.768	0.101 ± 0.014

◦ 치자 중의 지표성분의 함량의 평균은 Table 3-14와 같다.

(Table 3-14. Average contents of four standards in Gardenia samples)

	Contents (mg/g)			
	geniposidic acid	chlorogenic acid	geniposide	genipin
중국산평균	0.114±0.039	2.669±1.109	11.204±1.741	0.145±0.101
한국산평균	0.097±0.053	1.734±1.177	10.889±2.366	0.122±0.118
전체 평균	0.106±0.046	2.201±1.269	10.956±2.020	0.133±0.114

◦ 따라서 치자의 품질 평가는 각 성분의 함유량이 전체평균±10~20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

3.2 현삼

가. 시료의 산지별 수집

- 생약감별팀에서 받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 12 종, 총 26종의 시료를 확보하였음.

Sample	Cultivation area	Sample	Cultivation area
A1 12-3	Andong	B1 12-10	China
A2 12-8	Andong	B2 12-11	Hebei, China
A3 12-9	Andong	B3 12-12	Henan, China
C1 12-14	Yeongcheon	D1 12-17	China
C2 12-15	Andong	D2 12-18	China
C3 12-16	Yeongcheon	D3 12-21	China
C4 12-19	Yeongcheon	D4 12-23	China
C5 12-20	Yeongju	D5 12-24	China
C6 12-22	Yeongcheon	D6 12-25	China
C7 12-27	Andong	D7 12-26	China
C8 12-28	Andong	D8 12-29	China
C9 12-30	Youngju	D9 12-33	China
C10 12-31	Suncheon		
C11 12-32	Uiseoung		

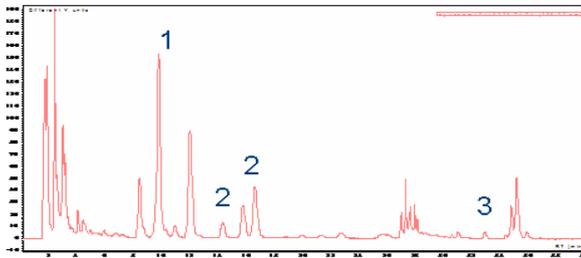
시료 번호의 우측은 유전자 감별시의 시료 번호임

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Agilent Eclipse XCB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 μm) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 296 nm에서 검출하는 것이 현삼 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음. 아래 표에 이상의 조건을 정리, 요약하여 나타내었으며 이 조건에서의 HPLC profile을 Fig. 3-13에 나타내었음. 그림에서 보는 바와 같이 주요 성분들이 모두 base line separation이 되었음
- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 현삼의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 현삼의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 (*E*)-Harpagoside, (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid 및 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester의 3종을 선정하였음. 한편 trans 형태로 제공받은 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid의 경우는 두 개의 피크로 나타나는데 이것은 분리후 수 분 내에 cis 형태로 일부가 전환되기 때문인 것으로 추측됨. 따라서 잠정적으로 cis와 trans의 합을 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid의 함량으로 하였음.

Column	Agilent Eclipse XCB C18 (4.6×150mm, 3.5μm)		
Wavelength	UV 296 nm		
Temperature	25 °C		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	0.8 mL/min		
Mobile phase	A: H ₂ O+1% HOAc B: MeCN+1% HOAc		
Time	Flow	A	B
0		75.7	24.3
18		74.5	25.5
20	0.8	50.5	49.5
35		48	52
40		0	100



1. (*E*)-Harpagoside
2. (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid
3. (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester

(Fig 3-13. Retention time of standard samples and HPLC profile of *Scrophularia Radix* extract)

Peak No. 2 [(*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid] might rapidly inter-convert into cis and trans forms, therefore the sum of two peaks were considered as (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid content.

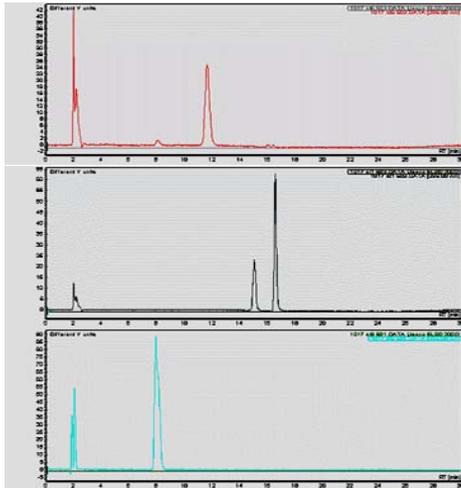
2) 현삼 표준품의 validation

가) Sample 및 표준액의 조제

- (*E*)-Harpagoside, (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid 및 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester 각각 1.0 mg을 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 1 mL에 녹이고 이것을 stock solution으로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액 10 μL를 HPLC로 분석하여 Chromatogram에서의 peak의 면적을 구하고 농도와 면적을 함수로하는 검량선을 작성하여 함량계산을 실시하였다.
- 26종의 현삼을 최적 추출조건으로 추출한 후 농축한 추출물을 각각 20.0 mg으로 정확히 측정하여 HPLC용 DMSO 용액 1 ml로 녹인 다음 0.45 syringe filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 각각의 검액을 10 μL씩 3회 반복하여 HPLC로 분석하여 함량을 계산하였다.

나) 표준품의 순도 검증

- 3종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 표준품의 순도는 각각 (*E*)-harpagoside : 순도 96.77%, (*E*)-*p*-methoxy cinnamic acid : 순도 99.53%, *p*-methoxycinnamic acid methyl ester : 순도 99.96%로 양호하게 나타났다 (Fig. 3-14).



1. (*E*)-Harpagoside
2. (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid
3. (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester

(Fig. 3-14. HPLC chromatogram of standard (*E*)-harpagoside, (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid, and (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid methyl ester)

다) 표준품의 안정성

- 표준품 3종을 1일, 7일 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99% 이상으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수가 있다 (Table 3-16)

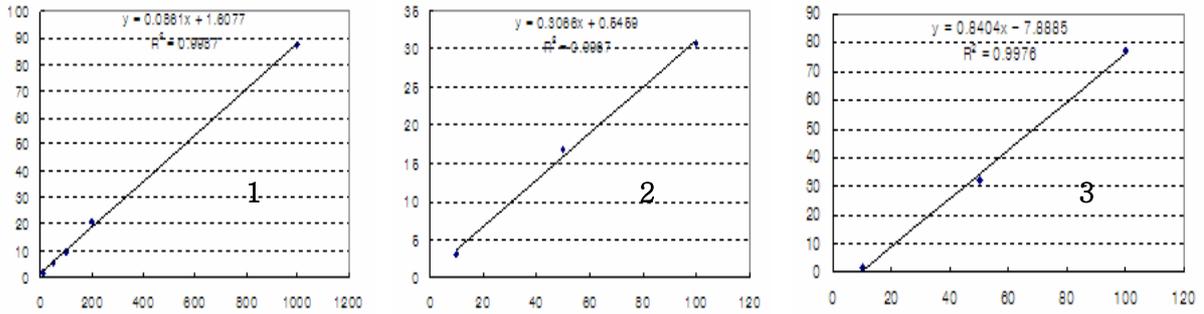
(Table 3-16. Stability of standard samples ((*E*)-harpagoside, (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid, (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid methyl ester) by storage days and temperature)

Compound	Temp.	Conc. (ug/ml)	Observed conc.				Average	SD	Accuracy(%)
			1 day	7 day	30 day	60 day			
(<i>E</i>)-Harpagoside	-20°C	50	50.86	50.58	50.11	49.27	50.21	0.70	100.41
	RT		52.91	50.54	52.08	50.57	51.53	1.17	103.05
(<i>E</i>)- <i>p</i> -Methoxy cinnamic acid	-20°C	50	48.83	49.21	50.98	49.10	49.53	0.98	99.06
	RT		51.48	50.32	48.00	49.56	49.84	1.46	99.68
(<i>E</i>)- <i>p</i> -Methoxy cinnamic methyl ester	-20°C	50	50.63	48.25	50.47	50.49	49.96	1.14	99.92
	RT		50.32	51.16	51.39	50.74	50.92	0.47	101.81

라) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 세 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인

10 µg - 1000 µg으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었다. Standard curve는 Fig. 3-15에 나타내었다. 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계는 Table 3-17에 나타내었다.



(Fig 3-15. Standard curves of standard samples (1.(*E*)-harpagoside 2. *p*-methoxy-cinnamic acid 3. *p*-methoxycinnamic acid Me ester)

(Table 3-17. Range, linearity, LOD and LOQ)

Compound	Linear range (µg/ml)	Slope	Intercept	Correlation coefficient	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
(<i>E</i>)-Harpagoside	50~1000	0.0861	1.6077	0.9987	2.738	7.124
<i>p</i> -Methoxycinnamic acid	10~100	0.3066	0.5459	0.9967	1.088	2.926
<i>p</i> -Methoxycinnamic methyl ester	10~100	0.8404	-7.8886	0.9976	0.322	1.172

마) Repeatability

◦ 각 성분의 면적값을 내부표준물질의 면적값으로 나눈 면적값 비율과 머무름시간(retention time)에 대하여 재현성 test를 수행하였다. 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.10-1.26%내의 값으로 나타났으며, 이들은 모두 인정할 수 있는 범위에 있는 것으로 판단하였다 (Table 3-18).

(Table 3-18. Repeatability)

Compound	Peak area			Retention time(min)		
	Average	SD	RSD(%)	Average	SD	RSD(%)
(<i>E</i>)-Harpagoside	52.7	0.9899	1.8785	9.0195	0.0092	0.1019
<i>p</i> -Methoxycinnamic acid*	9.15	0.071	0.7770	13.6988	0.1724	1.2587
	22.5	0.2824	1.2684	16.092	0.0184	0.1143
<i>p</i> -Methoxycinnamic methyl ester	1.9	0.0578	2.665	21.4845	0.0474	0.1458

* Calculated as the sum of trans- and cis-isomer

바) Precision and Accuracy

- 선정된 3종의 지표성분에 대하여 확립한 분석법에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 가지 농도에 대하여 하루에 3회 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위해서는 3일간 반복실험을 수행하였다. 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 peak 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 peak 면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 이 때 각 지표성분의 CV(%)는 0.26%–6.3%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 92.0%–108.6%사이로 비교적 양호한 값을 나타내었다 (Table 3-19, Table 3-20)

(Table 3-19. Intra-day accuracy and precision)

Compound	Spiked conc. (ug)	Intra-day(n=3)				
		Observed conc.	SD	Bias	CV(%)	Accuracy (%)
(E)-Harpagoside	0.5	0.477	0.017	-0.023	3.472	95.4
	1	0.944	0.040	-0.056	4.187	94.4
	2	2.171	0.121	0.171	5.589	108.6
	5	4.871	0.091	-0.129	1.871	97.42
	10	10.037	0.026	0.037	0.261	100.37
<i>p</i> -Methocycinnamic acid	0.1	0.092	0.006	-0.008	6.307	92.0
	0.5	0.515	0.010	0.015	2.026	103.0
	1	0.993	0.005	-0.007	0.465	99.3
<i>p</i> -Methoxycinnaminc methyl ester	0.1	0.108	0.006	0.008	5.214	108.0
	0.5	0.486	0.010	-0.014	2.086	97.2
	1	1.006	0.005	0.006	0.448	100.6

(Table 3-20. Inter-day accuracy and precision)

Compound	Spiked conc. (ug)	Inter-day				
		Observed conc.	SD	Bias	CV(%)	Accuracy (%)
(E)-harpagoside	0.5	0.465	0.025	-0.035	5.337	93.0
	1	0.967	0.023	-0.033	2.377	96.7
	2	2.113	0.080	0.133	3.777	105.7
	5	4.801	0.141	-0.199	2.931	96.0
	10	10.119	0.084	0.119	0.830	101.2
<i>p</i> -Methocycinnamic acid	0.1	0.101	0.001	0.001	0.774	101
	0.5	0.482	0.013	-0.018	2.608	96.4
	1	0.938	0.044	-0.062	4.699	93.8
<i>p</i> -Methoxycinnaminc methyl ester	0.1	0.108	0.006	0.008	5.214	108
	0.5	0.469	0.022	-0.031	4.675	93.8
	1	0.994	0.004	-0.006	0.394	99.4

사) Robustness

- 이동상 용매 2중 중에 acetic acid가 1%씩 첨가되어 있으므로 acetic acid의 농도 변화에 따른 retention time의 변화를 확인하였다. 그 결과 아래의 표와 같이 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않게 나타났다. (Table 3-21)
- Column별 (사이즈 및 제조사별), column 온도별과의 완전성을 비교해본 결과 상온에서 50℃까지는 accuracy가 94%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있었다. (Table 3-22, 3-23)

(Table 3-21. Robustness of acetic acid concentration)

Acetic acid conc. (mM)	Retention time(min)		
	(E)-Harpagoside	(E)- <i>p</i> -Methoxy Cinnamic acid	<i>p</i> -Methoxy cinnamic acid Me ester
50 mM	9.13	15.17/17.72	30.70
100 mM	9.47	15.32/17.84	30.74
166 mM	9.65	15.47/18.25	30.69
333 mM	9.82	15.10/17.61	30.05

(Table 3-22. Robustness of types of columns)

Compound	Column	Conc. (mg/ml)	Observed conc.	Accuracy(%)
(E)-Harpagoside	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)	50	52.3	104.6
	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mm, 3.5 μm)		47.3	94.6
	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.6	99.2
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		47.6	95.2
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		50.2	100.4
	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)		50.5	101.0
(E)- <i>p</i> -Methoxy cinnamic acid	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mm, 3.5 μm)	50	51.6	103.2
	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.6	99.2
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.8	99.6
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.7	99.4
	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)		49.8	99.6
	Zorbax XDB-C18 (4.6×250mm, 3.5 μm)		52.1	104.2
<i>p</i> -Methoxy cinnamic acid Me ester	Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 5 μm)	50	50.6	101.2
	Supelco Ascentis C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		51.1	102.2
	Waters Sunfire C18 (4.6×150 mm, 5 μm)		49.8	99.6
	Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 μm)		49.8	99.6

(Table 3-23. Robustness of temperature of column)

Compound	Temperature (°C)	Conc. (ug/ml)	Observed conc.	Accuracy(%)
<i>(E)</i> -Harpagoside	RT		51.3	102.6
	30		54.3	108.6
	50		48.2	96.4
<i>(E)</i> - <i>p</i> -Methoxy cinnamic acid	RT		50.2	100.4
	30	50	52.3	104.6
	50		51.2	102.4
<i>p</i> -Methoxy cinnamic acid Me ester	RT		52.3	104.6
	30		51.9	103.8
	50		48.7	97.4

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- 현삼의 최적 추출조건을 확립하기 위하여 흔히 사용되는 추출법에 따른 현삼 중 지표성분의 함량 변화를 검토하여 보았다. 현삼 1 g당 95% 에탄올 10 ml로 아래 표와 같이 soxhlet, reflux 및 초음파 등 3가지 추출법으로 추출 한 결과, 지표성분 3 (*p*-methoxycinnamic methyl ester)의 경우는 큰 차이가 없었으나 지표성분 1 [*(E)*-harpagoside], 2 (*(E)*-*p*-methoxycinnamic acid)의 경우 soxhlet 추출법이 sonication 추출법 보다 1.5배 가까이 높은 수율을 내는 것을 확인하였다. 따라서 Soxhlet 추출법이 가장 적합한 것으로 판단되었으나 경제성이나 장비의 복잡함 등을 고려하여 환류추출을 선택하였다 (Table 3-24)

(Table 3-24. Comparison of soxhlet, reflux, and sonication extract methods)

Standard	Soxhlet			Reflux			Sonication		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
mg/g	12.07	2.91	0.065	8.16	2.44	0.060	8.24	1.74	0.062

1, *(E)*-harpagoside 2, *(E)*-*p*-methoxycinnamic acid 3, *p*-methoxycinnamic acid Me ester

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 현삼의 최적 추출용매와 시간, 용매와 용질 양을 찾기위해 직교배열표(Table 3-25)를 이용하여 함량을 분석해 본 결과 (Table 3-26), 8번 조건인 현삼 3 g을 50 ml의 95% ethanol을 이용하여 1

시간 동안 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하였다

(Table 3-25. Orthogonal design for optimal extraction condition)

No.	Ethanol(%)	Time (h)	Sample (g)	Solvent (ml)
1	70	5	1	50
2	70	5	3	100
3	70	5	5	200
4	50	3	1	100
5	50	3	3	200
6	50	3	5	50
7	95	1	1	200
8	95	1	3	50
9	95	1	5	100

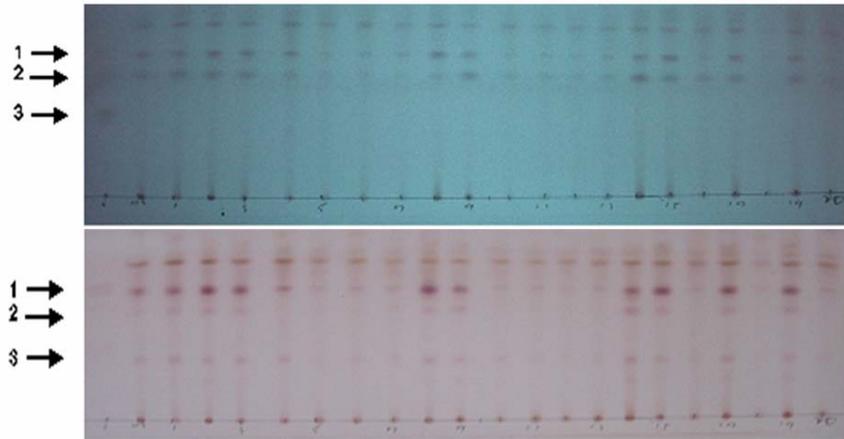
(Table 3-26. Contents of 2 standard samples ((*E*)-harpagoside, *p*-methoxy cinnamic acid methyl ester) in each extracts methods)

No.	Contents		
	(<i>E</i>)-Harpagoside (mg)	(<i>E</i>)- <i>p</i> -Methoxycinnamic acid methyl ester (mg)	Total (mg)
1	8.49	0.029	8.519
2	9.32	0.040	9.360
3	8.91	0.036	8.946
4	7.21	0.029	7.239
5	6.85	0.032	6.882
6	6.72	0.047	6.767
7	9.94	0.045	9.985
8	10.95	0.056	11.006
9	10.84	0.051	10.891

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 현삼 지표성분의 TLC pattern 분석

- 현삼 지표성분 및 추출물에 대한 TLC 조건을 검토하였으나 순상 TLC에서는 화합물의 분리가 거의 일어나지 않았음.
- 시도한 방법 중 3종의 지표성분 및 현삼 추출물에 대한 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이 때의 용매 조건은 MeCN:MeOH: H₂O:Formic acid = 45:20:35:1 비율로 하였을 때 화합물의 분리가 가장 양호하게 나타났음
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 현삼의 TLC pattern을 비교하여 보았을 때 TLC pattern 상에서도 (*E*)-harpagoside의 함량이 지역간 눈에 띄게 다른 것을 알 수 있었음 (Fig. 3-16).

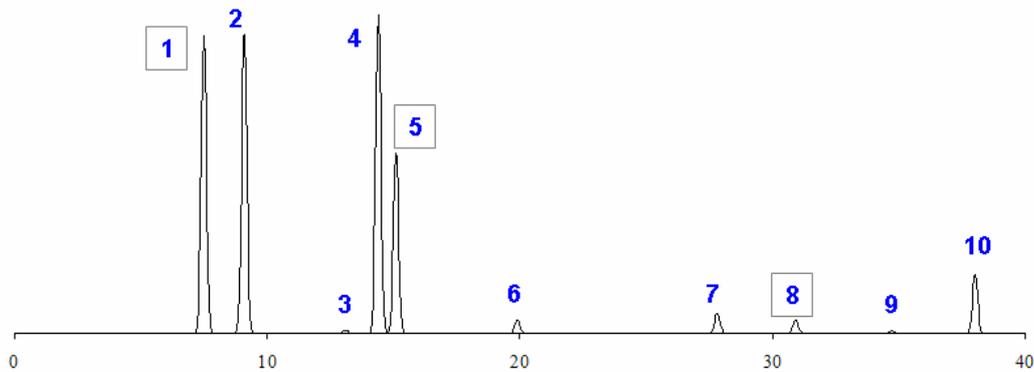


(Fig 3-16. TLC chromatogram of various Scrophulariae Radix. Upper : UV 254nm, Lower : 10% H₂SO₄, Merck RP-18 TLC plate / MeCN:MeOH:H₂O:Formic acid = 45:20:35:1 (1=(*E*)-harpagoside, 2=(*E*)-*p*-methoxycinnamic acid, 3= *p*-methoxy- cinnamic acid Me ester) 1-20 Different places *Scrophularia* Radix (20 places)

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 식약청에서 DNA감별이 끝난 현삼 6종의 평균을 기준 잡은 후 표준품 peak 3개와 미지의 peak 7개를 합한 10개의 peak를 선택하여 각종 통계프로그램의 변수로 사용하였다 (Fig. 3-17)



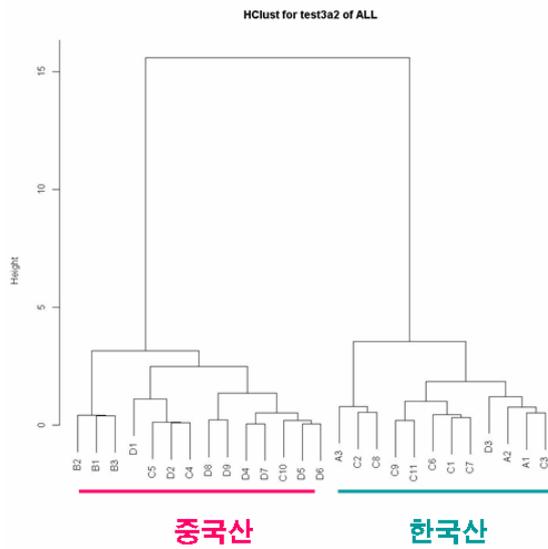
(Fig. 3-17. Peak standardization)

1: (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester. 5: (*E*)-Harpagoside. 8: (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester. The other peaks are arbitrary ones appeared from standard *Scrophularia* provided by pharmacognosy team

나) H-cluster (군집분석)

- H-cluster을 통해 두개의 군집을 나눌 수 있었다 (Fig. 3-18). 아래 그림에서 보듯이 중국산과 국산의 경계가 확연히 나타나는 것을 알 수가 있다. 하지만 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으

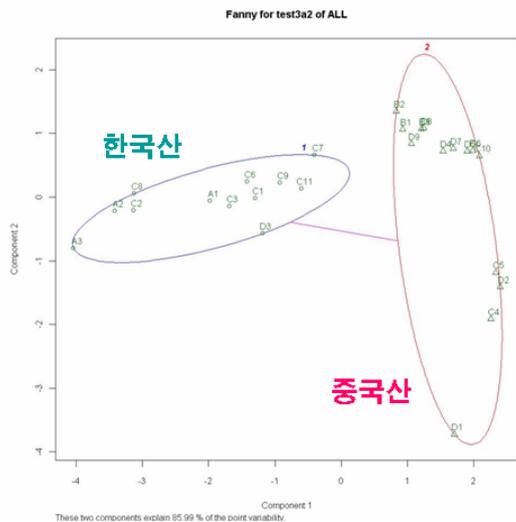
나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있다.



(Fig 3-18. H-Cluster for *Scrophularia Radix* (20 places))
(각 시료의 기호에 대하여는 131쪽을 참조)

다) PCA

- 그림에서 보듯이 PAC(주성분분석)을 통해 두 개의 군집을 나눌 수 있었으며(Fig. 3-19) 그 결과 H-cluster와 비슷하게 나뉜 것을 알 수가 있다. 하지만 H-cluster결과와 같이 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있다 (각 시료의 기호에 대하여는 114쪽을 참조).
- 유전자감별 연구팀의 결과, 현삼마커를 이용한 증폭 결과를 볼때, C4, C5는 현삼(*S. buergeriana*)이었으며, C10는 국산현삼으로 구매하였다고 하였으나, 증폭 결과 중국현삼(*S. ningpoensis*)이었으며, D3는 중국현삼으로 구입하였다고 되어있으나 국산 현삼(*S. buergeriana*)으로 확인되었음



(Fig. 3-19. PCA for *Scrophularia Radix* (20 places))

◦ 아래에 DNA 종감별 분석결과를 정리하였음.

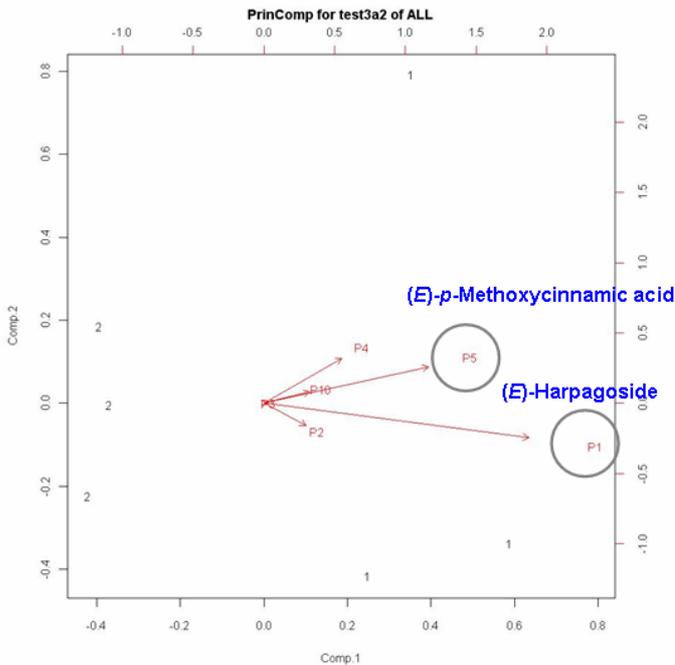
(Table 3-27. Comparison of PCA result and DNA analysis of *Scrophularia* samples)

No.	판매처	PCA	DNA*	Sample	판매처	PCA	DNA
A1	12-3	한국산	한국산	B1	12-10	중국산	중국산
A2	12-8	한국산	한국산	B2	12-11	중국산	중국산
A3	12-9	한국산	한국산	B3	12-12	중국산	중국산
C1	12-14	한국산	한국산	D1	12-17	중국산	중국산
C2	12-15	한국산	한국산	D2	12-18	중국산	중국산
C3	12-16	한국산	한국산	D3	12-21	중국산	한국산
C4	12-19	한국산	중국산	D4	12-23	중국산	중국산
C5	12-20	한국산	중국산	D5	12-24	중국산	중국산
C6	12-22	한국산	한국산	D6	12-25	중국산	중국산
C7	12-27	한국산	한국산	D7	12-26	중국산	중국산
C8	12-28	한국산	한국산	D8	12-29	중국산	중국산
C9	12-30	한국산	한국산	D9	12-33	중국산	중국산
C10	12-31	한국산	중국산				
C11	12-32	국산					

*한국산과 중국산은 각각 *S. buergeriana*와 *S. ningpoensis*를 의미함

라) Princomp 분석

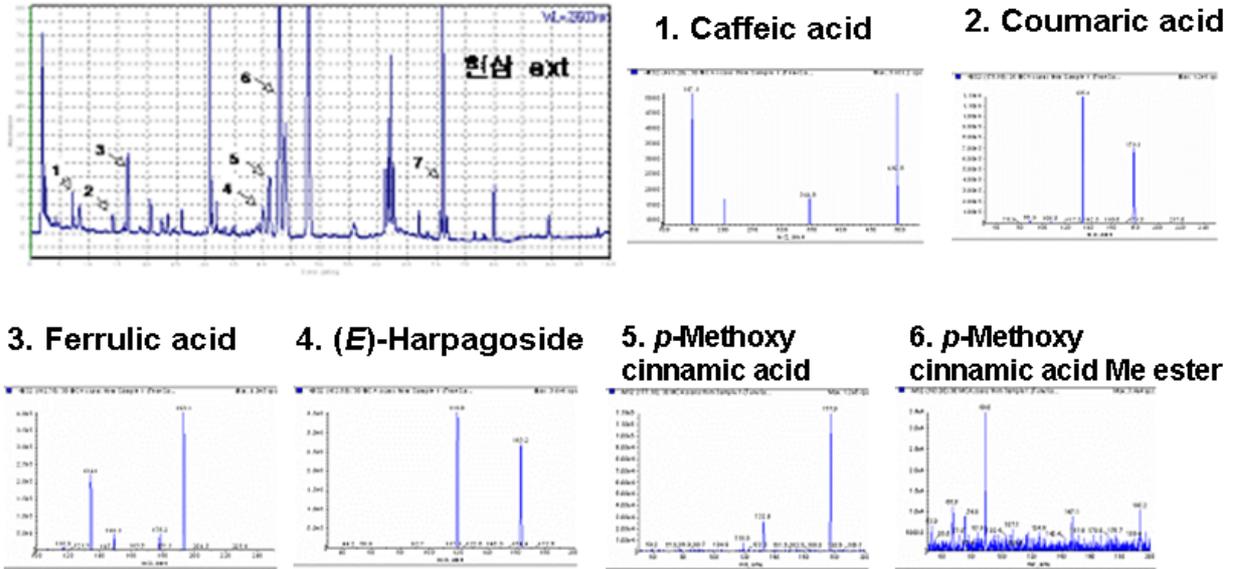
◦ PrinComp 분석 결과, PCA에서 두 개의 군집이 형성되는 주된 이유는 현삼의 주 성분인 (*E*)-harpagoside 와 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid에 의해 나뉘는 것으로 생각됨 (Fig. 3-20)



(Fig. 3-20. PrinComp for *Scrophularia* Radix (20 places))

마. 지표성분의 LC-MS/MS pattern 검토

- 현삼에 대하여 LC-MS pattern을 분석한 결과는 Fig. 3-21과 같음.



(Fig. 3-21. LC-MS/MS pattern of major constituents in Scrophulariae Radix)

바. 현삼 중 지표성분의 함량

- 각 지역에서 수집한 현삼 중 함유된 표준품 3종의 함량을 구한 결과 국산 현삼의 경우 중국산 현삼에 비해 표준품의 함량이 모두 높게 나타났다 (Table 3-27, 3-28). (*E*)-Harpagoside의 경우 국산 현삼이 중국산 현삼보다 평균 3배가량 높게 나타나 국산현삼의 대표적인 기준물질로써 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

(Table 3-27. Contents of standard compounds in various S. Radix)

Sample No.	Contents (mg/g)			
	(E)-Harpagoside	(E)- <i>p</i> -Methoxycinnamic acid	<i>p</i> -Methoxycinnamic acid methyl ester	
식약청 제공	A1	7.413 ± 0.013	2.318 ± 0.001	0.070 ± 0.001
	A2	5.550 ± 0.026	3.039 ± 0.001	0.061 ± 0.002
	A3	6.072 ± 0.089	1.836 ± 0.002	0.046 ± 0.001
	B1	1.839 ± 0.009	0.739 ± 0.003	-
	B2	3.623 ± 0.007	0.896 ± 0.005	-
	B3	1.835 ± 0.002	0.329 ± 0.002	-
수집품	C1	1.997 ± 0.039	1.811 ± 0.011	0.033 ± 0.001
	C2	4.647 ± 0.119	1.716 ± 0.036	0.038 ± 0.001
	C3	2.496 ± 0.064	1.236 ± 0.023	0.022 ± 0.001
	C4	2.021 ± 0.050	0.328 ± 0.008	-
	D1	0.724 ± 0.030	0.209 ± 0.007	-
	C5	0.971 ± 0.028	0.284 ± 0.007	-
	D2	1.131 ± 0.036	0.209 ± 0.006	-
	D3	3.414 ± 0.130	0.573 ± 0.012	0.023 ± 0.001
	C6	2.484 ± 0.071	1.743 ± 0.028	0.028 ± 0.001
	D4	0.788 ± 0.022	0.425 ± 0.008	-
	D5	0.841 ± 0.031	0.376 ± 0.008	-
	D6	0.530 ± 0.016	0.266 ± 0.007	-
	D7	1.033 ± 0.034	0.493 ± 0.010	-
	C7	2.518 ± 0.057	2.072 ± 0.015	0.038 ± 0.001
C8	4.574 ± 0.083	2.335 ± 0.017	0.034 ± 0.001	
D8	0.663 ± 0.002	0.842 ± 0.013	-	
C9	3.209 ± 0.011	1.485 ± 0.007	0.037 ± 0.001	
C10	0.352 ± 0.001	0.098 ± 0.001	-	
C11	2.526 ± 0.017	1.356 ± 0.014	0.029 ± 0.001	
D9	0.796 ± 0.011	0.526 ± 0.005	-	

(Table 3-28. Average contents standard compounds in S. Radix.)

	Contents (mg/g)		
	(E)-Harpagoside	(E)- <i>p</i> -Methoxycinnamic acid	<i>p</i> -Methoxycinnamic acid methyl ester
Korea	3.349 ± 1.947	1.482 ± 0.851	0.038 ± 0.014
China	1.254 ± 0.900	0.482 ± 0.245	-
Average	2.302 ± 1.481	0.982 ± 0.706	-

- 상기 결과를 토대로 하여 현삼의 품질 평가시 각 성분의 함유량이 전체평균±10-20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1 치자

가. 시료의 산지별 수집

- 생약감별팀에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 13 종, 총 27종의 시료를 확보하였음.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Aglient Eclipse XDB- C18(4.6 × 250 mm, 5 μm) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리 조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 254 nm에서 검출하는 것이 치자 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음.
- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 치자의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 치자의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide 및 genipin의 4종을 선정하였음.

2) 치자 표준품의 validation

가) 표준품의 순도 검정

- 4종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 각 표준품의 순도는 91.2%-99.8%였음.

나) 표준품의 안정성

- 표준품 4종을 1일, 7일 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99-101% 수준으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수가 있음.

라) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 네 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 0.1 μg - 50 μg으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었음. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음.

마) Repeatability

- 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.5-1.1%내의 양호한 값으로 나타났음.

바) Precision and Accuracy

- 각 지표성분 분석에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복실험을 하였음. 그 결과 CV(%)는 0.22%-5.72%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 86.8%-105.3%사이에 나타나 양호한 정밀성과 정확성을 나타내었음.

사) Robustness

- 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않았으며, column별, column 온도별 완전성을 비교해본 결과 Accuracy가 97%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있음.

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- Geniposide만을 지표성분으로 할 경우는 Soxhlet 추출을, 기타 다른 지표성분을 함께 정량하기 위해서는 환류추출 (reflux)이 가장 좋은 방법인 것으로 판단 되었음.

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 지표성분의 추출은 치자 1 g을 200 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 70°C에서 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하였음.

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 치자 지표성분의 TLC pattern 분석

- 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이동상은 ACN : MeOH : H₂O : Formic acid = 15:20:64:1이 가장 좋았음
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 치자의 TLC pattern을 비교하여 보았으나 TLC pattern으로는 지역간의 차이를 인정하기 어려웠음.

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 총 10개의 peak area를 통계프로그램의 변수로 사용하여 H-cluster 및 주성분분석인 PCA를 통해 군집을 나누고자 하였음.

나) H-cluster (군집분석)

- 생약시료 중 식약청에서 제공한 시료를 포함한 몇몇 시료를 분석대상에서 제외한 경우는 H-cluster을 통해 몇 개의 군집을 나눌 수 있었음. 이 경우 전남지역의 치자는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있었으나 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았음.

다) PCA (주성분 분석)

- PCA에 의한 결과 역시 H-cluster와 비슷한 패턴을 나타내었는데, 전남지역의 치자는 특이적으로 같은 그룹에 있음을 확인 할 수 있음. 하지만 중국산과 국산의 경계는 확연히 나타나지 않았음. 또한 DNA 감별 결과와 PCA 및 H-clustering의 결과를 연결할 수 있는 개연성은 보이지 않았음.

마. 지표성분의 LC-MS/MS pattern 검토

- 치자의 지표성분에 대하여 LC-MS pattern을 분석하였음.

바. 치자 중 지표성분의 함량

- 각지에서 수집한 치자 중의 지표성분의 함량을 확립된 분석방법으로 정량하였음. geniposide의 전체 평균은 0.106±0.046 mg/g, chlorogenic acid는 2.201±1.269, geniposide는 10.956±2.020, genipin은 0.133±0.144였음.

- 따라서 치자의 품질 평가는 각 성분의 함유량이 전체평균 \pm 10-20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

4.2 현삼

가. 시료의 산지별 수집

- 식약청에서 제공받은 대조생약 6종을 포함하여 국산 14종 및 중국산 12종, 총 26종의 시료를 확보하였음.

나. 최적 HPLC 분석법 확립 및 validation

1) 최적 HPLC 분석조건 확립

- 수종의 고정상을 비교검토한 결과 Agilent Eclipse XCB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 μ m) 컬럼을 고정상으로 하고, 각각 초산이 함유된 물과 아세트니트릴을 이동상으로 사용한 경우가 가장 좋은 분리조건을 나타내었으며 PDA 분석 결과 296 nm에서 검출하는 것이 현삼 중 함유된 여러 성분들에 대하여 가장 검출감도가 좋았음.
- 한편 제1 세부과제로부터 공급받은 표준품 중 순도가 90% 이상이며, 현삼의 성분을 대표할 수 있고, 비교적 함량이 많으면서 다른 peak와 중첩이 일어나지 않는 화합물을 현삼의 대표적인 지표성분으로 설정하고자 하였으며, 이러한 조건을 만족시키는 화합물로 (*E*)-Harpagoside, (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid 및 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid methyl ester의 3종을 선정하였음.

2) 현삼 표준품의 validation

가) 표준품의 순도 검정

- 3종의 표준물질에 대하여 앞서 확립된 최적 조건으로 HPLC를 이용하여 순도를 측정하였다. 표준품의 순도는 각각 (*E*)-harpagoside : 순도 96.77%, (*E*)-*p*-methoxy cinnamic acid : 순도 99.53%, *p*-methoxycinnamic acid methyl ester : 순도 99.96%로 양호하게 나타났음.

나) 표준품의 안정성

- 표준품 3종을 1일, 7일 30일, 60일 간격으로 실온과 냉장보관 시에 나타나는 안정성 실험 결과 정확도는 99% 이상으로 60일 이내에서는 실온 및 냉장보관시에도 그 함량이 변화하지 않는다는 것을 알 수 있음.

다) 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

- 세 가지 지표성분에 대하여 정량범위를 검토한 결과, 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도인 10 μ g - 1000 μ g으로 나타났으며 내부표준물질과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.99$ 로 양호한 직선성을 나타내었음. LOD와 LOQ의 비율은 2.6배에서 4.3배로써 양호한 값을 나타내었음.

라) Repeatability

- 면적비에 대한 재현성 RSD는 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 재현성 RSD는 0.10-1.26%내의 값으로 나타났으며, 이들은 모두 인정할 수 있는 범위에 있는 것으로 판단하였음.

마) Precision and Accuracy

- 각 지표성분 분석에 대한 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험을 하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복실험을 하였음.

그 결과 CV(%)는 0.26%-6.3%정도를 보였으며 Accuracy(%)는 92.0%-108.6%사이로 비교적 양호한 값을 나타내었음.

마) Robustness

- 서로 다른 acetic acid의 농도에서도 retention time 차이는 크지 않았으며, column별, column 온도별 완전성을 비교해본 결과 상온에서 50℃까지는 accuracy가 94%-108%로 큰 차이를 볼 수가 없음을 알 수 있음.

다. 최적 분석 전처리 방법의 확립

1) 추출방법에 따른 효율

- Soxhlet, reflux 및 초음파 등 3가지 추출법으로 추출 한 결과, *p*-methoxycinnamic methyl ester의 경우는 큰 차이가 없었으나 (*E*)-harpagoside, (*E*)-*p*-methoxycinnamic acid의 경우 Soxhlet 추출법이 sonication 추출법 보다 1.5배 가까이 높은 수율을 내는 것을 확인하였음. 따라서 Soxhlet 추출법이 가장 적합한 것으로 판단되었으나 경제성이나 장비의 복잡함 등을 고려하여 환류추출을 선택하였음.

2) 직교배열법에 의한 최적 추출조건 검토

- 현삼 3 g을 50 ml의 95% ethanol을 이용하여 1시간 동안 추출하는 것이 최적인 것으로 판단하였음.

라. Fingerprint analysis에 의한 Pattern 분석법의 확립

1) 현삼 지표성분의 TLC pattern 분석

- 최적 TLC 조건은 RP-TLC를 사용하였을 때 가장 좋았으며, 이동상은 ACN : MeCN:MeOH:H₂O:Formic acid = 45:20:35:1이 가장 좋았음
- 상기 최적 TLC 조건을 이용하여 각 지역별 현삼의 TLC pattern을 비교하여 보았을 때 TLC pattern 상에서도 (*E*)-harpagoside의 함량이 지역간 눈에 띄게 다른 것을 알 수 있었음

2) Chemometrics에 의한 원산지 판별법 검토

가) Peak standardization

- 총 10개의 peak area를 통계프로그램의 변수로 사용하여 H-cluster 및 주성분분석인 PCA를 통해 군집을 나누고자 하였음.

나) H-cluster (군집분석)

- H-cluster을 통해 두 개의 군집을 나눌 수 있었음. 즉 중국산과 국산의 경계가 확연히 나타나는 것을 알 수가 있음. 하지만 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있음.
- 유전자감별 연구팀의 결과, 현삼마커를 이용한 증폭 결과를 볼때, C4, C5는 현삼(*S. buergeriana*)이었으며, C10은 국산현삼으로 구매하였다고 하였으나, 증폭 결과 중국현삼(*S. ningpoensis*)이었으며, D3는 중국현삼으로 구입하였다고 되어있으나 국산 현삼(*S. buergeriana*)으로 확인되었음

다) PCA

- PAC분석을 통해 두 개의 군집을 나눌 수 있었음. PCA에 의한 결과 역시 중국산으로 나눌 수 있음. 하지만 H-cluster결과와 같이 C4, C5, C10는 국산이라고 구매 하였으나 분석결과 중국산일 가능성이 많으며, D3의 경우는 중국산이라고 구매하였으나 국산일 가능성이 있음.

- 유전자감별 연구팀의 결과, 현삼마커를 이용한 증폭 결과를 볼때, C4, C5는 현삼(*S. buergeriana*)이었으며, C10은 국산현삼으로 구매하였다고 하였으나, 증폭 결과 중국현삼(*S. ningpoensis*)이었으며, D3는 중국현삼으로 구입하였다고 되어있으나 국산 현삼(*S. buergeriana*)으로 확인되었음

라) Princomp 분석

- PrinComp 분석 결과, PCA에서 두 개의 군집이 형성되는 주된 이유는 현삼의 주성분인 (*E*)-harpagoside 와 (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid에 의해 나뉘는 것으로 생각되어짐

마. 지표성분의 LC-MS/MS pattern 검토

- 현삼의 지표성분에 대하여 LC-MS fragmentation pattern을 분석하였음.

바. 현삼 중 지표성분의 함량

- 각지에서 수집한 현삼 중의 지표성분의 함량을 확립된 분석방법으로 정량하였음. rm 결과 국산 현삼의 경우 중국산 현삼에 비해 표준품의 함량이 모두 높게 나타났음. (*E*)-harpagoside의 전체 평균은 2.302 ± 1.481 , (*E*)-*p*-Methoxycinnamic acid는 0.982 ± 0.706 이었으며, *p*-Methoxycinnamic acid Me ester는 한국산에서만 검출되었음.
- 따라서 현삼의 품질 평가는 각 성분의 함유량이 전체평균 ± 10 -20% 내외에 해당하는 함량을 갖는 것으로 설정하는 것이 바람직할 것으로 생각됨.

제5장 제2 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(현삼, 치자)
총괄과제책임자	이 동 응

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1								
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Simultaneous quantification of four major compounds in Gardeniae Fructus by high-performance liquid chromatography	포스터	김호진, 박효준, 양은주, 이동응, 곽종환, 송경식	한국생약학회	2007. 12. 11	생약학회 제38회 정기총회 및 학술대회 초록집	국내
2	Simultaneous HPLC quantification of (E)-harpagoside, p-methoxycinnamic acid, and p-methoxycinnamic acid methyl ester in Scrophulariae Radix	포스터	박효준, 김호진, 양은주, 이동응, 곽종환, 송경식	한국생약학회	2007. 12. 11	생약학회 제38회 정기총회 및 학술대회 초록집	국내
3	Inhibitory activity on acetylcholinesterase in vitro and memory enhancing effect in vivo of the constituents from Gardeniae Fructus	포스터	이동응, 곽종환, 송경식	7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF	2008.	아테네 (그리스)	국제

다. 지식재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험 , 관련 DB구축, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

- 본 연구에서 얻어진 화합물은 당 연구실에 구축되어 있는 치매관련 활성검정을 통해 새로운 효능을 도출할 계획임
- 본 연구에서 얻어진 분석방법은 약전이나 규격집 등에 고시자료로 활용되도록 함
- 현재 본 연구에서 얻은 결과를 두편의 SCI급 논문에 투고하고자 원고를 준비하고 있으므로 논문 발표에 활용하고자 함

제6장 기타 중요변경사항

◦없음

제7장 참고문헌

- 1) HPLC determination of the contents of four iridiods in *Scrophularia ningpoensis*. Hemsl. Li, J.; Lai, D.; Sun, W. *Yaowu Fenxi Zazhi* (2005), 25(12), 1531-1533.
- 2) Determination of harpagoside and cinnamic acid in radix *Scrophularia* by HPLC. Cai, S.; Xie, L.; Wang, J.; Liu, H.; Wang, X.; Xu, B. *Yaowu Fenxi Zazhi*(2000), 20(3), 191-194.

제8장 첨부서류

◦ 없음

총괄 연구과제 요약

과제번호	08182한약재256		
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구		
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(현삼, 치자)		
연구책임자	성명	이동웅	주민등록번호 (앞번호만 기재)
	소속기관명	동국대학교	

○ 연구목표 (400~600자)

1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 활성물질 대량 분리 방법을 확립
2. 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 제공
3. 현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명
4. 각종 기기분석 장비를 활용한 활성지표물질의 동시정량법 개발
5. HPLC, LC-MS fingerprint 작성 및 패턴분석, chemometrics에 의한 기원별, 산지별 확인법 확립

○ 연구내용 (1000~1200자)

1. 제1세부과제

- 1) 국내외에서 수집한 현삼 6종 및 치자 7종의 70% 에탄올 엑스제조 및 시료 제공(효능팀, 분석팀)
- 2) 현삼과 치자 기본생약의 메탄올 추출물에서 성분분획(CH_2Cl_2 , EtOAc, BuOH 분획) 제조
- 3) 각 성분분획에서 각종 chromatography(순상 및 역상 column, prep. HPLC, prep. TLC 등)를 이용하여 성분을 분리, 정제하였으며 분리한 성분의 구조를 확인하기 위하여 기기분석($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, EI-MS/ESI-MS/ FAB-MS, FT-IR, UV 등) 및 물리특성을 측정하여 문헌치와 대조하거나 화학적 수식 등을 이용하여 구조를 동정하였음.
- 4) 현삼에서 16종, 치자에서 20종의 성분을 분리하였으며 이들 성분의 순도를 측정하였고 시료를 분석팀, 효능팀에 제공하였음.
- 5) 현삼에서 지금까지 보고된 바 없는 신규물질 6종을 분리하여 구조를 규명하였음.

2. 제2세부과제

- 1) 최적분석조건: 현삼의 경우 Eclipse SDB C-18를 고정상으로 하고 치자의 경우는 Zorbax XDB-C18를 고정상으로 하여 각각 UV로 검출하는 HPLC 조건을 확립하였음.
- 2) 치자의 경우 *geniposidic acid*, *chlorogenic acid*, *geniposide*와 *genipin* 4종이, 현삼의 경우는 (*E*)-*harpagoside*, *p-methocycinnamic acid* 그리고 *p-methoxycinnamic acid methyl ester* 3종이 지표성분으로 가장 적합하였음.
- 3) 선정된 지표성분의 경우 모두 90% 이상의 순도를 나타냈으며 상온에서 DMSO에 녹여 60일간 보관 시에도 안정하였음. 표준품의 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계의 경우 현삼 지표성분은 각각 0.1~10.00 ug/ml, 0.9967~0.9976, 0.322~2.738, 1.172~7.124로 나타났으며, 치자 지표성분의 경우 각각 0.1~50 ug/ml, 0.9939~0.9999, 0.500~2.636, 2.194~7.409로 관측되었음. 재현성, 정밀성, 정확성의 경우 현삼 지표성분은 면적비에 대한 RSD는 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 RSD는 0.10-1.26%, CV(%)는 0.26%-6.3% 정도를 보였으며 accuracy(%)는 92.0%-108.6%로 나타났음. 치자 지표성분의 경우 면적비에 대한 RSD는 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 RSD는 0.5-1.1%, CV(%)는 0.22%-5.72% 정도를 보였으며 accuracy(%)는 93.896%-105.263%로 관측되었음. 컬럼, 온도, 이동상 변화 등을 통한 완전성 테스트에서도 모두 94-108%이내였음.
- 4) 상기 표준품에 대한 최적 추출 조건은 치자와 현삼 모두 1 g의 시료에 95% 에탄올 200 ml를 이용하여 70°C에서 1시간 환류추출하는 것이 가장 좋았음.
- 5) Fingerprint analysis의 결과 치자의 경우는 수집품간 차이를 거의 나타내지 않았고 PCA결과 역시 DNA 감별결과와 개연성이 없었으나, 현삼의 경우 국내산과 중국산이 비교적 뚜렷하게 구별되었음.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

1. 연구성과

가) 논문발표

- 1) SCI 및 SCIE 학술지 각 1건 (총 2건)

가) 학회발표

- 1) 국내학회 3건, 국제학회 2건 (총 5건)

2. 활용범위

현삼와 치자의 표준화 및 규격화 확립, 유효성분 표준품 확보 및 천연물 라이브러리 구축, 한약재기반 기초연구 축적, 지역산업 생산기반의 생물산업화 추진과 지역 한방바이오산업의 활성화, 관련 학문분야의 발전에 기여, 우수 연구인력 양성, 한약재 생산을 통한 지역농업의 활성화, 건강기능식품 및 천연물 의약품의 지표성분으로 활용, 수입대체 효과 및 세계시장 진출에 의한 국부의 창출 및 지역경제의 활성화에 기여, 지역의 생물학적 다양성 보존 및 개발에 활용

○ 총괄 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
이동웅		구현영	
송경식		양은주	
곽종환		박효준	
강주억		김호진	
박광록			
유승래			
최형진			
이종욱			
신석철			
박진규			
차진욱			
김일환			
강경우			
정지영			

Keywords (5개 내외)	한글	생리활성성분, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 표준품
	영문	bioactive component, quantitative analysis, pattern recognition analysis, chemical fingerprint, reference standard

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “비공개”로 표시
 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술

제1 세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재256			
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구			
제1 세부과제명	현삼과 치자의 생리활성성분 분리 및 구조확인			
연구책임자	성 명	이 동 용	주민등록번호 (앞번호만 기재)	
	소속 기관명	동국대학교		

○ 연구목표 (400~600자)

1. 유효성분을 중심으로 한 한약재의 표준화, 과학화를 위하여 현삼 및 치자로부터 활성물질 대량 분리 방법을 확립
2. 확립된 방법을 이용하여 한약재활성 표준화사업에 제공할 수 있는 다량의 시료 분리 및 효능검색 용 시료 제공
3. 현삼 및 치자에서 아직 보고되지 않은 미지성분 분리 및 구조 규명

○ 연구내용 (1000~1200자)

- 1) 국내외에서 수집한 현삼 6종 및 치자 7종의 70% 에탄올 엑스제조 및 시료 제공(효능팀, 분석팀)
- 2) 현삼과 치자 기본생약의 메탄올 추출물에서 성분분획(CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH 분획) 제조
- 3) 각 성분분획에서 각종 chromatography(순상 및 역상 column, prep. HPLC, prep. TLC 등)를 이용하여 성분을 분리, 정제하였으며 분리한 성분의 구조를 확인하기 위하여 기기분석(¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS/ESI-MS/ FAB-MS, FT-IR, UV 등) 및 물리특성을 측정하여 문헌치와 대조하거나 화학적 수식 등을 이용하여 구조를 동정하였음.
- 4) 현삼에서 16종, 치자에서 20종의 성분을 분리하였으며 이들 성분의 순도를 측정하였고 시료를 분석팀, 효능팀에 제공하였음.
- 5) 현삼의 분획에서 지금까지 보고된 바 없는 신규물질 6종을 분리하여 구조를 규명하였음. 이들의 구조는 aucubin, sinuatol, angoroside C, acteoside, β-sitosterol, daucosterol으로 확인되었음.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

1. 연구성과

□ 논문 (SCI, SCIE 각 1편)

- 1) Protective effect of ferulic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice
임현, 박광록, 이동웅, 김영식, 김현표. *Biomolecules & Therapeutics* 16(2), 82-86 (3008).
- 2) The Genome-wide Expression Profile of *Scrophularia ningpoensis*-treated thapsigargin-stimulated U-87MG Cells. Sung-Hwa Sohn , Eunjung Ko, Sung-Bae Jeon, Beom-Joon Lee, Sung-Hoon Kim, Mi-Sook Dong, Dong-Ung Lee, Jong-Hwan Kwak, Yangseok Kim, Minkyu Shin, Moochang Hong, Hyunsu Bae. *Neurotoxicology*. 2009(인쇄중)

□ 학회발표 (국제 2편, 국내 3편)

- 1) Inhibitory activity on acetylcholineesterase in vitro and memory enhancing effect in vivo of the constituents from Gardeniae Fructus, 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008. 8.3-8(아테네)
- 2) Protective effect of ferulic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice
상동
- 3) Simultaneous quantification of four major compounds in Gardeniae Fructus by high-performance liquid chromatography, 한국생약학회, 2007. 12. 11 (서울)
- 4) Simultaneous HPLC quantification of (E)-harpagoside, p-methoxycinnamic acid, and p-methoxycinnamic acid methyl ester in Scrophulariae Radix, 한국생약학회, 2007. 12. 11 (서울)
- 5) Cognition Improving Effects of the Components from Gardenia jasminoides, 한국생약학회, 2008. 12. 3(서울)

2. 응용분야 및 활용범위

- 1) 본 연구에서 얻어진 화합물은 각종 활성검정을 통해 새로운 효능을 도출하는 데 이용
- 2) 본 연구에서 얻어진 화합물은 당 연구실에 구축되어 있는 활성검정시스템(신경안정, 기억증진 등)을 통하여 새로운 효능을 검정하는데 활용할 계획임
- 3) 현재 본 연구에서 얻은 결과를 두편의 SCI급 논문에 투고하고자 원고를 준비하고 있으므로 논문발표에 활용하고자 함

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
이동웅		김일환	
강주익		강경우	
박광록		정지영	
유승래			
최형진			
이종욱			
신석철			
박진규			
차진욱			

Keywords (5개 내외)	한글	현삼, 치자, 성분분리, 구조규명, 순도측정
	영문	<i>Gardenia jasminoides</i> , <i>Scrophularia buergeriana</i> , isolation, structure determination, purity analysis

제2 세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재256			
단위과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 분석 연구			
제2 세부과제명	현삼 및 치자의 표준물질 분석법 개발			
연구책임자	성 명	송 경 식	주민등록번호 (앞번호만 기재)	
	소속 기관명	경북대학교		

○ 연구목표 (400~600자)

<ol style="list-style-type: none"> 1. 유효성분을 중심으로한 한약재의 표준화 과학화를 위하여 현삼 및 치자 중 활성물질 분석법 확립 및 이의 적용 <ul style="list-style-type: none"> - 활성 성분 분석을 위한 산지별 치자, 현삼의 수집 - 주요 표준품에 대한 최적 추출방법 정립 - 최적 분석방법 검토 (HPLC, LC-MS, NMR 등) - 최적 분석방법에 준한 시료 분석 2. 패턴 인식법에 의한 기원별, 산지별 한약재 정보 구축 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC chromatogram에 의한 fingerprint standardization - PCA, HClustering 등에 의한 pattern 분석
--

○ 연구내용 (1000~1200자)

<ol style="list-style-type: none"> 1) 최적분석조건: 현삼의 경우 Eclipse SDB C-18를 고정상으로 하고 치자의 경우는 Zorbax XDB-C18를 고정상으로 하여 각각 UV로 검출하는 HPLC 조건을 확립하였음. 2) 치자의 경우 <i>geniposidic acid</i>, <i>chlorogenic acid</i>, <i>geniposide</i>와 <i>genipin</i> 4종이, 현삼의 경우는 (<i>E</i>)-<i>harpagoside</i>, <i>p-methocycinnamic acid</i> 그리고 <i>p-methoxycinnamic acid methyl ester</i> 3종이 지표성분으로 가장 적합하였음. 3) 선정된 지표성분의 경우 모두 90% 이상의 순도를 나타냈으며 상온에서 DMSO에 녹여 60일간 보관 시에도 안정하였음. 표준품의 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계의 경우 현삼 지표성분은 각각 0.1~10.00 ug/ml, 0.9967~0.9976, 0.322~2.738, 1.172~7.124로 나타났으며, 치자 지표성분의 경우 각각 0.1~50 ug/ml, 0.9939~0.9999, 0.500~2.636, 2.194~7.409로 관측되었음. 재현성, 정밀성, 정확성의 경우 현삼 지표성분은 면적비에 대한 RSD는 0.78-2.7%, 머무름 시간에 대한 RSD는 0.10-1.26%, CV(%)는 0.26%-6.3%정도를 보였으며 accuracy(%)는 92.0%-108.6%로 나타났음. 치자 지표성분의 경우 면적비에 대한 RSD는 0.3-1.8%, 머무름 시간에 대한 RSD는 0.5-1.1%, CV(%)는 0.22%-5.72%정도를 보였으며 accuracy(%)는 86.8%-105.3%로 관측되었음. 컬럼, 온도, 이동상 변화 등을 통한 완전성 테스트에서도 모두 94-108%이내 었음. 4) 상기 표준품에 대한 최적 추출 조건은 치자와 현삼 모두 1 g의 시료에 95% 에탄올 200 ml를 이용하여 70℃에서 1시간 환류추출하는 것이 가장 좋았음. 5) Fingerprint analysis의 결과 치자의 경우는 수집품간 차이를 거의 나타내지 않았고 PCA결과 역시 DNA 감별결과와 개연성이 없었으나, 현삼의 경우 국내산과 중국산이 비교적 뚜렷하게 구별되었으며 DNA 결과와도 잘 일치하였음.
--

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

1. 연구성과

□ 학회발표

- 1) 김호진, 박효준, 양은주, 이동웅, 곽중환, 송경식, Simultaneous quantification of four major compounds in Gardeniae Fructus by high-performance liquid chromatography, 포스터발표, 한국생약학회, 2007. 12. 11 (서울)
- 2) 박효준, 김호진, 양은주, 이동웅, 곽중환, 송경식, Simultaneous HPLC quantification of (*E*)-harpagoside, *p*-methoxycinnamic acid, and *p*-methoxycinnamic acid methyl ester in Scrophulariae Radix, 포스터발표, 한국생약학회, 2007. 12. 11 (서울)
- 3) 이동웅, 곽중환, 송경식, Inhibitory activity on acetylcholinesterase in vitro and memory enhancing effect in vivo of the constituents from Gardeniae Fructus, 포스터발표, 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008. 8.3-8(아테네)

2. 응용분야 및 활용범위

- 1) 본 연구에서 얻어진 화합물은 각종 활성검정을 통해 새로운 효능을 도출하는 데 이용
- 2) 본 연구에서 얻어진 분석방법은 약전이나 규격집 등에 고시자료로 활용
- 3) 현재 본 연구에서 얻은 결과를 두편의 SCI급 논문에 투고하고자 원고를 준비하고 있으므로 논문 발표에 활용하고자 함

○ 참여연구원

성명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성명	주민등록번호(앞번호만 기재)
송경식			
구현영			
양은주			
박효준			
김호진			

Keywords (5개 내외)	한글	HPLC, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 동시분석
	영문	HPLC, quantitative analysis, pattern recognition analysis, chemical fingerprint, simultaneous analysis

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “비공개”로 표시
- 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
- 4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)