

발간등록번호

11-1543000-000826-01

질려자 (*Tribulus terrestris*) 추출물을 통한 관절건강  
개선용 건강기능식품 개발

Development of functional food improving joint health  
from *Tribulus terrestris* extract

단국대학교

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “질려자 (*Tribulus terrestris*) 추출물을 통한 관절건강 개선용 건강기능식품 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2015년 3월 11일

주관연구기관명 : 단국대학교

주관연구책임자 : 오 좌 섭

연 구 원 : 이지혜, 김미선, 김선영

협동연구기관명 : (재)경기과학기술진흥원

협동연구책임자 : 홍성수

연 구 원 : 권진관, 최춘환, 정원식  
최윤희

참 여 기 업 : (주)넥스팜코리아

연 구 원 : 김용환, 박상민, 송기완  
이지연

# 요 약 문

## I. 제 목

질려자 (*Tribulus terrestris*) 추출물을 통한 관절건강 개선용 건강기능식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발 목적

본 연구에서는 질려자 추출물을 이용하여 지표물질 설정에 따른 원료표준화 연구를 진행하고 관절건강과 관련한 기능성 평가연구를 수행하여, 안전성이 확보되고 부작용이 적은 관절 건강 개선용 천연소재의 개별인정형 건강기능식품의 개발을 그 목적으로 함.

### 2. 연구개발 필요성

퇴행성관절염은 일반적으로 노화에 불가피한 질환이며 주요 원인은 노화, 과도한 관절의 사용, 비만 유전 등이 있고 그 원인은 아직 명확하게 규명되어 있지 않음. 또한 50세 이상 연령층의 65%에서 골관절염 증상이 나타나는 것으로 보고되어 있다. 또한 류마티스 관절염 인구는 67만 명으로 전세계 인구의 1.4%를 차지하는데 대개 20~40대에 발생하며 남성보다 여성에서 3배정도 많이 발생하고 있다. 아직까지는 완치를 가능케 하는 의약품이 개발되지 않고 있으며 이에 대한 안정성이 확보된 관절염 치료제 개발이 시급하다. 또한, 관절 건강 개선용 건강기능식품으로서의 천연소재의 개발은 전 세계적으로 큰 시장을 형성하고 있기 때문에 치료제 개발 뿐 만 아니라 보조제의 개발도 앞으로 계속 진행 되어야 할 숙제로 남아있다. 현재 시판중인 대표적인 류마티스 관절염치료제로는 와이어스의 엔브렐라로 염증을 유발하는 종양괴인자(TNF- $\alpha$ )를 억제, 중증 류마티스 관절염 환자의 치료제로 쓰이며, 레미케이드와 애보트사의 휴미라 등이 있고 현재 BMS 제약에서 '오렌시아'를 내놓았다. 기존에는 COX-2 억제제인 바이옥스와 벡스트라가 있었으나 심혈관계 부작용을 이유로 2004년과 2005년 판매 중지가 되었으며, 현재 NSAIDs와 히알론산 주사제를 성분으로 하는 치료제가 각광받고 있는 추세이다. 앞으로도 부작용이 적고 염증완화 작용이 있는 천연 유래의 제품이 꾸준히 연구 개발 되어야 한다고 생각함. 이와 같은 문제점을 보완 할 수 있는 천연 소재인 질려자 추출물 유래의 관절건강 개선용 건강기능식품 개발에 대한 연구의 필요성이 요구됨.

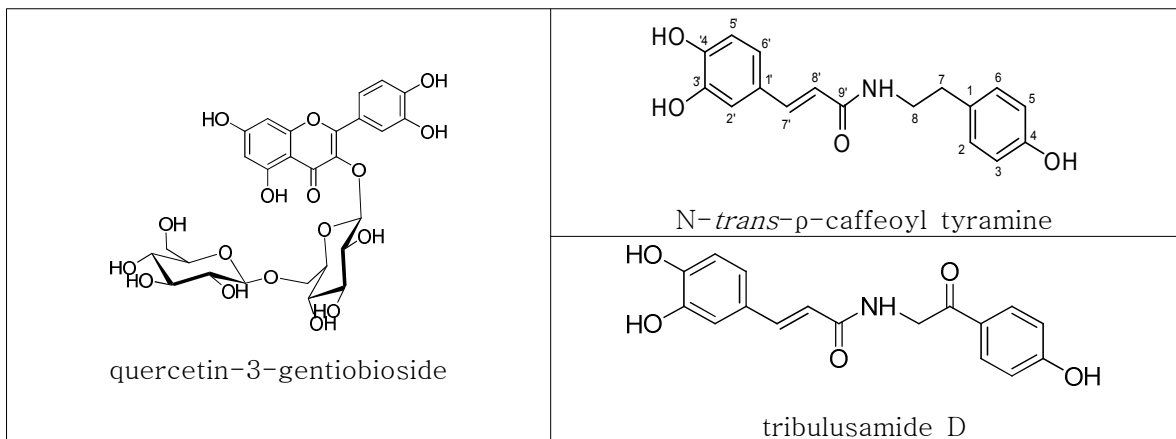
## III. 연구개발 내용 및 범위

- 질려자 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리
- 대식세포에서 염증억제 활성 평가
- 급성 염증동물모델에서의 염증 억제 평가
- 표준화된 최적 공정 확립

- 대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보
- 최적추출물과 유효물질의 염증 관련 유전자 및 단백질 발현수준 분석
- 동물모델을 통한 간이독성 평가 I
- 골관절염 동물모델에서의 염증 억제 평가
- 인체적용 시험용 시제품 제작을 위한 제형 연구
- 인체적용 시험 진행 I
- 최적 추출물속 유효성분 분리 및 분석 완료
- 원료 규격 표준화 및 원료 validation
- 동물모델을 통한 안전성 평가
- 인체적용 시험 진행 기획 및 IRB 승인
- 개별인정 자료 최종 정리 및 제품화 지원
- 인체적용시험용 시제품 제작을 위한 제형설계 및 연구진행 (참여기업과의 공동연구)
- 제형의 안정성 평가

#### IV. 연구개발결과

- 질려자 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리  
 질려자 추출물로부터 지표성분을 quercetin-3-gentiobioside로 설정하고 N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine, tribulusamide D 등의 유효성분을 포함하여 총 23종의 화합물을 분리정제 하였음



- 표준화된 최적 공정 확립  
 질려자 용매별 추출을 실시하고, 각 추출물별 효능을 검증하여 최적 수율 및 효능을 검토하고 질려자 추출물 제조의 최적 공정을 확립하였음.
- 대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보  
 표준화된 최적 공정법을 이용하여 질려자의 대량생산 공정을 실시하였고 pilot 추출물을 확보하였음.
- 최적 추출물속 유효성분 분리 및 분석 완료  
 최적 추출물로부터 지표 및 유효성분을 포함하여 총 23종의 화합물을 분리정제 하였으며

HPLC를 이용하여 최적 분석 조건을 확립 하였다. 유효성분 및 지표물질들의 HPLC 등 분석기기를 이용한 최적 분리 및 분석 조건을 확립함.

◦ 원료 규격 표준화 및 원료 validation

HPLC를 이용하여 지표성분의 최적 분석 조건을 확립하고 원료 및 지표성분에 대한 분석법 validation을 통해서 원료 규격 표준화를 실시하였음.

◦ 안정성 평가

시제품에 사용될 제형의 물리 화학적 장기보존 평가 진행

◦ 원료표준화 자료 지속적인 보완

원료 표준화에 필요한 추가 자료 보완 및 자료에 대한 수정을 실시하였음.

◦ 질려자 추출물 및 유효물질의 항염증 활성

질려자 추출물 및 유효물질인 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine, tribulusamide D를 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 RAW 264.7 세포주에 처리하여 NO 분비 억제 효과를 관찰하였으며, MTT 결과로부터 뚜렷한 세포독성은 나타나지 않음.

◦ 질려자 추출물 및 유효물질의 염증관련 인자 발현수준 분석

질려자 추출물 및 유효물질인 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine, tribulusamide D를 처리하여 염증관련 유전자인 IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것이 관찰되었음.

◦ COX-2 발현수준 분석

질려자 추출물 및 유효물질인 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine, tribulusamide D를 처리하여 COX-2 유전자 발현 수준을 RT-PCR을 통해, 단백질 발현수준을 western blot을 통해 확인한 결과, 농도 의존적으로 그 발현양이 감소하는 것을 관찰함.

◦ PGE<sub>2</sub> 발현수준 분석

질려자 추출물 및 유효물질인 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine, tribulusamide D를 처리하여 PGE<sub>2</sub> 단백질 발현수준을 ELISA로 확인한 결과, 농도 의존적으로 그 발현양이 감소하는 것을 관찰함.

◦ 관절염 동물모델에서의 골소주 분석

골소주 분석결과 초과 추출물이 골관절염의 보호 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었음. 초과 추출물 투여군에서 bone이 차지하는 비율을 의미하는 BV/TV 항목과, 해면골의 두께를 의미하는 'Tb/Th' 항목에서 높은 수치를 보였음. 또한 골의 표면적을 의미하는 'Tb.Sp' 항목에서 낮은 수치를 보였음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

1-1. 논문

구분	연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	구분
			주저자	교신저자	공동저자			
1	2013	Two new furostanol glycosides from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Hong Seong Su	Oh Joa Sub	Choi Yun-Hyeok, Jeong Wonsik, Kwon Jin Gwan, Kim Jin Kyu, Seo Changon, Ahn Eun-Kyung, Lee Hyun Hwa, Ko Han-Jik, Seo Dong-Wan	Tetrahedron Letters	54 (30)	SCI
2	2013	Phenolic amides from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i> and their inhibitory effects on the production of nitric oxide	Hong Seong Su	Oh Joa Sub	Jeong Wonsik, Kwon Jin Gwan, Choi Yun-Hyeok, Ahn Eun-Kyung, Ko Han-Jik, Seo Dong-Wan	Bull. Korean Chem. Soc.	34 (10)	SCI
3	2015	N-trans-p-caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> exerts anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide	Ko Han-Jik	Oh Joa Sub	Ahn Eun-Kyung	IJMM	submission	SCI

계재 연도	논문명	저자			학술 지명	Vol. (No.)	구분	
		주저자	교신저자	공동저자				
		-stimulated RAW 264.7 cells						
4	2015	Composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising dehydrodiconiferyl alcohol compound isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	Lee Hyun Hwa,	Oh Joa Sub	Lee Jung A Jeong Wonsik Hong Seong Su Ahn un-Kyung	JKSA BC	submission 예정	SCIE
5	2015	Anti-osteoarthritis effects of <i>Tribulus terrestris</i> on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rat	Park Young Jin	Oh Joa Sub	Cho Young-Rak ,Hong Sung Soo ,Ko Hye-Jin, Ahn Eun-Kyung	Arthritis research & therapy	submission 예정	SCI
6	2015	Phytochemical constituents from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Jeong Wonsik	Oh Joa Sub	Hong Sung Soo, Choi Yun-Hyeo	Kor. J. Pharmacogn.	submission 예정	-
7	2015	질려자 에틸아세테이트 분획에서의 항염증 효과	Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub		생약학회	submission 예정	
8	2015	Evaluation of anti-inflammatory property of Tribulusamide D isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	Lee Hyun Hwa, Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub		IJMM	submission 예정	SCI

### 1-2. 특허

	특허명	특허출원번호	실적
1	질려자로부터 분리한 엔-트랜스-로우-카페오일 티라민 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	10-2013-0064204	1건
2	질려자로부터 분리한 디하이드로디코니페릴 알코올 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	10-2013-0064205	1건
3	질려자 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	10-2012-0047751	1건

### 1-3. 학술대회

	발표일	제목	학술대회명	구분
1	20120504	Anti-inflammatory activity of <i>Tribulus terrestris</i> in RAW264.7 cells	IMMUNOLOGY 2012	미국 (Boston)
2	20121023	Studies on chemical constituents of <i>Tribulus terrestris</i>	2012 Proceedings of Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	대한민국 (서울)
3	20121109	Chemical constituents isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	2012 한국응용생명화학회	대한민국 (광주)
4	20130627	Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract of <i>Tribulus terrestris</i> in RAW 264.7 Cells	2013 한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
5	20130627	N- <i>trans</i> -p-caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> inhibits the inflammatory activity through the down regulation of cyclooxygenase-2(COX-2) in RAW 264.7 cell line	2013 한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
6	20131205	Steroidal saponins and flavonoid glycosides from <i>Tribulus terrestris</i>	2013 한국생약학회	대한민국 (서울)
7	20140619	Effects of ethanol extract of <i>Tribulus terrestris</i> on anti-osteoarthritic activities <i>in vivo</i> .	2014 한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
8	20140822	Inhibitors of LPS-induced Nitric	EMBO Conference	독일



		Oxide Production in Macrophage RAW264.7 Cells from <i>Tribulus terrestris</i>		(하이델베르크)
9	20141023	Isolation and identification of phytochemical constituents from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	대한약학회 2014 추계학술대회	대한민국 (경주)

#### 1-4. 신규화합물 및 화합물 등록성과

	화합물명	주요내용	등록현황	등록기관	등록번호
1	Terrestrinone A1	Furostanol glycoside UV $\lambda_{\max}$ = 242nm Molecular formular = $C_{33}H_{50}O_{10}$ Molecular weight = 605	등록완료	Americal Chemical Society (ACS)	1445952-09-9
2	Terrestrinone A2	Furostanol glycoside UV $\lambda_{\max}$ = 242nm Molecular formular = $C_{33}H_{50}O_{10}$ Molecular weight = 605	등록완료	Americal Chemical Society (ACS)	1445952-10-2
3	Tribulusamide D	Phenolic amide UV $\lambda_{\max}$ = 219, 242, 290, 319nm Molecular formular = $C_{17}H_{15}NO_5$ Molecular weight = 313	등록완료	Americal Chemical Society (ACS)	1634625-41-4

#### 1-5. 인력양성

지원인원	인력양성명	인력양성내용
1	석사 인력양성	- 질려자의 에탄올 추출물과 질려자로 부터 분리한 N- <i>trans</i> -p-caffeoyl tyramine의 NO억제 활성 및 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포주에서 PGE2와 염증반응을 촉진하는 사이토카인의 발현을 억제
1	석사 인력양성	질려자 에탄올 추출물과 질려자로부터 분리된 화합물 Tribulusamide D의 항염증 효과에 대한 생체의 평가

#### 2. 성과활용계획

질려자 추출물은 원료표준화(지표 및 유효성분 규명)연구를 진행하였고, *in vitro* 실험을 통해 염증억제 활성 효과에 대해서 입증했으며, *in vivo* 실험으로 파괴된 관절의 회복 효과를 확인함으로써 안전성이 확보되고 부작용이 적은 관절건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발 가능성을 입증하였음. 이에 관절건강 개선에 도움을 줄 수 있는 제품개발에 활용할 계획임.

# SUMMARY

## I. Title

Development of functional food improving joint health from *Tribulus terrestris* extract

## II. The goal and the significance of the research

### 1. The goal

In this study on the development of individual approval type of health functional food to alleviate joint health using natural source with safer material and fewer side effects. For this purpose, this study has been conducted raw material standardization according to determination of marker compounds and investigation of the functionality for joint health with *T. terrestris* extract.

### 2. The significance of the research

Osteoarthritis is mostly related to aging, repetitive use of the joints, obesity, heredity, and so on. Development of full recovery antiarthritic agent is not yet completed. Therefore, we are in need of the development of individual approval type of health functional food to alleviate joint health using natural source with safer material and fewer side effects.

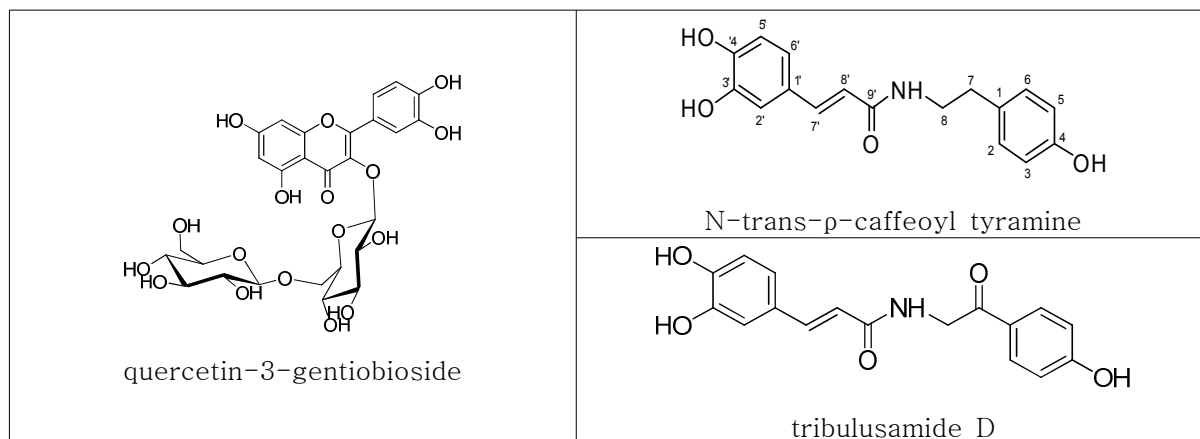
## III. The contents of the study

- Determination of marker compounds and isolation of bioactive components from *T. terrestris* extract
- Anti-inflammatory effect of macrophages
- Anti-inflammatory effect in animal model of acute inflammation
- Establishment of standardized optimal extraction process
- Pilot scale extraction with mass-up process
- Expression of inflammatory gene and protein on extracts and compound
- General toxicity test on animal model
- Anti-inflammatory effect in animal model of osteoarthritis
- Development of health functional food form
- Progress of human trial
- Isolation and analysis of bioactive components from optimal extracts
- Standardizing of specifications for raw materials and validation of raw materials
- Safety test on animal model
- Design of human trial and approval of IRB

- Stability assessment of formulations

#### IV. The results of Research and Development

- Determination of marker compounds and isolation of bioactive components from *T. terrestris* extract.
- Determination of marker compounds (quercetin-3-gentiobioside) and isolation of 23 compounds including bioactive components (N-trans- $\rho$ -caffeoyl tyramine, Tribulusamide D)



- Establishment of standardized optimal extraction process  
Establishment of standardized optimal extraction process with biological activity of various solvent extracts.
- Pilot scale extraction with mass-up process  
Pilot scale extraction with mass-up process using standardized optimal extraction process.
- Isolation and analysis of bioactive components from optimal extracts  
Isolation of 23 compounds including marker and bioactive components. Establishment of optimization analytical condition using HPLC for marker and bioactive components.
- Standardizing of specifications for raw materials and validation of raw materials  
Establishment of optimization analytical condition using HPLC and standardizing of specifications for raw materials according to HPLC method validation for raw materials and marker compounds.
- Stability assessment of formulations  
Physicochemical long-term storage test of food forms and raw materials
- Data supplementation of standardizing of raw materials  
Data supplementation and revision of standardizing of raw materials
- The anti-inflammatory activities of ETT (Ethanol extract of *T. terrestris*) and

compounds

ETT and N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine and Tribulusamide D prohibited NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells without affecting its cell viability.

- The effects of ETT and compounds on the expression of inflammatory cytokines  
ETT and N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine and Tribulusamide D suppressed the expression of LPS-induced inflammatory cytokines such as interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.
- The effects of ETT and compounds on inhibition of COX-2 expression  
ETT and compounds treatment resulted in the dose-dependent suppression COX-2 mRNA expression by RT-PCR and COX-2 protein expression by Western blot.
- The effects of ETT and compounds on inhibition of PGE<sub>2</sub> expression  
ETT treatment resulted in the dose-dependent suppression PGE<sub>2</sub> protein expression by ELISA assay.
- Morphometric parameters of subcondral bone in the MIA-induced model  
Morphometric parameters analysis showed protective effects of ETT on trabecular bone  
ETT tended to increase in trabecular thickness(Tb.Th) and trabecular bone volume fraction(BV/TV). Treatment with EAA significantly decreased the level of trabecular spacing(Tb.Sp).

## V. Achievements of Research and Development and the applicable planning

### 1. Achievements of Research and Development

#### 1-1. Publications

	Year	Title	Author			Journal	Vol. (No.)	Classification
			First author	corresponding author	co-author			
1	2013	Two new furostanol glycosides from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Hong Seong Su	Oh Joa Sub	Choi Yun-Hyeok, Jeong Wonsik, Kwon Jin Gwan, Kim Jin Kyu, Seo Changan, Ahn un-Kyung, Lee Hyun Hwa,	Tetrahedron Letters	54 (30)	SCI

	Year	Title	Author			Journal	Vol. (No.)	Classification
			First author	corresponding author	co-author			
					Ko Han-Jik, Seo Dong-Wan			
2	2013	Phenolic Amides from the Fruits of <i>Tribulus terrestris</i> and Their Inhibitory Effects on the Production of Nitric Oxide	Hong Seong Su	Oh Joa Sub	Jeong Wonsik, Kwon Jin Gwan, Choi Yun-Hyeok, Ahn un-Kyung, Ko Han-Jik, Seo Dong-Wan	Bull. Korean Chem. Soc.	34 (10)	SCI
3	2015	N-trans-p-caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> exerts anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells	Ko Han-Jik	Oh Joa Sub	Ahn un-Kyung	IJMM	submission	SCI
4	2015	Composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising dehydrodiconiferyl alcohol compound isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	Lee Hyun Hwa,	Oh Joa Sub	Lee Jung A, Jeong Wonsik, Hong Seong Su, Ahn un-Kyung	JKSA BC	submission	SCIE
5	2015	Anti-osteoarthritis effects of <i>Tribulus terrestris</i> on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rat	Park Young Jin	Oh Joa Sub	Cho Young-Rak, Hong Sung Soo, Ko Hye-Jin, Ahn Eun-Kyung	Arthritis research & therapy	submission	SCI

	Year	Title	Author			Journal	Vol. (No.)	Classification
			First author	corresponding author	co-author			
6	2015	Phytochemical constituents from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Jeong Wonsik	Oh Joa Sub	Hong Sung Soo, Choi Yun-Hyeo	Kor. J. Pharm. acogn.	submission 예정	-
7	2015	질러자 에틸아세테이트 분획에서의 항염증 효과	Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub		생약학회	submission 예정	
8	2015	Evaluation of anti-inflammatory property of Tribulusamide D isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	Lee Hyun Hwa, Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub		IJMM	submission 예정	SCI

### 1-2. Patents

No.	Title	Apply No.	Amounts
1	Composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising N- <i>trans</i> -p-caffeoyl tyramine compound isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	10-2013-0064204	1
2	Composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising dehydrodiconiferyl alcohol compound isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	10-2013-0064205	1
3	Composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising extracts from <i>Tribulus terrestris</i>	10-2012-0047751	1

### 1-3. Posters

No.	Date	Title	Conference reports	Location
1	20120504	Anti-inflammatory activity of <i>Tribulus terrestris</i> in RAW264.7 cells	IMMUNOLOGY 2012	USA (Boston)
2	20121023	Studies on chemical constituents of <i>Tribulus terrestris</i>	2012 Proceedings of Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Korea (Seoul)

3	20121109	Chemical constituents isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	2012 JKSABC	Korea (Gwangju)
4	20130627	Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract of <i>Tribulus terrestris</i> in RAW 264.7 Cells	2013 JKSABC	Korea (Busan)
5	20130627	N- <i>trans</i> -p-caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> inhibits the inflammatory activity through the down regulation of cyclooxygenase-2(COX-2) in RAW 264.7 cell line	2013 JKSABC	Korea (Busan)
6	20131205	Steroidal saponins and flavonoid glycosides from <i>Tribulus terrestris</i>	2013 KSP	Korea (Seoul)
7	20140619	Effects of ethanol extract of <i>Tribulus terrestris</i> on anti-osteoarthritic activities <i>in vivo</i> .	2014 JKSABC	Korea (Busan)
8	20140822	Inhibitors of LPS-induced Nitric Oxide Production in Macrophage RAW264.7 Cells from <i>Tribulus terrestris</i>	EMBO Conference	Germany (Heidelberg)
9	20141023	Isolation and identification of phytochemical constituents from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Proceedings of the Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Korea (Gyeongju)

#### 1-4. Registration of new compounds

No.	Chemical name	Contents	Registration	Registration agency	Registration number
1	Terrestrinone A1	Furostanol glycoside UV $\lambda_{\max}$ = 242nm Molecular formular = $C_{33}H_{50}O_{10}$ Molecula weight = 605	accept	Americal Chemical Society (ACS)	1445952-09-9
2	Terrestrinone A2	Furostanol glycoside UV $\lambda_{\max}$ = 242nm Molecular formular = $C_{33}H_{50}O_{10}$	accept	Americal Chemical Society (ACS)	1445952-10-2

		Molecular weight = 605			
3	Tribulusamide D	Phenolic amide UV $\lambda_{max}$ = 219, 242, 290, 319nm Molecular formular = $C_{17}H_{15}NO_5$ Molecular weight = 313	accept	Americal Chemical Society (ACS)	1634625-4 1-4

#### 1-4. Human resource development

Amount	Grade	Contents
2	Master	<i>N-trans-p</i> -caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> inhibits inflammatory activity through down regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells
		Evaluation of anti-inflammatory property of tribulusamide D isolated from <i>Tribulus terrestris</i> and ethanol extract of <i>Tribulus terrestris in vitro</i>

#### 2. Future plans

In this study has been conducted raw material standardization according to determination of marker compounds and investigation of the functionality for joint health with *T. terrestris* extract. We are planning to the development of individual approval type of health functional food to alleviate joint health using natural source with safer material and fewer side effects.



# CONTENTS

<b>Chapter 1. Overview of the Research and Development projects</b> .....	18
Section 1. The research goal.....	18
Section 2. The significance of the research.....	18
Section 3. The research scope.....	19
<b>Chapter 2. The current Research status</b> .....	21
Section 1. Current Technical Developments and problem in domestic and global...	21
<b>Chapter 3. Results and Contents of Research and Development</b> .....	24
Section 1. Compounds isolation from <i>T. terrestris</i> extracts.....	24
Section 2. Standardizing of specifications for raw materials and pilot scale process...	49
Section 3. Stability assessment of formulations.....	74
Section 4. Anti-inflammatory effects of <i>T. terrestris</i> extracts on macrophages.....	104
Section 5. Anti-inflammatory effects in animal models.....	123
Section 6. Safety evaluation of <i>T. terrestris</i> extracts.....	131
Section 7. Analysis of nutritional components of <i>T. terrestris</i> extracts.....	136
Section 8. Design of human trial and approval of IRB.....	137
<b>Chapter 4. Contribution to the Achievements in the related Fields</b> .....	145
Section 1. Purpose.....	145
Section 2. Contributions.....	146
<b>Chapter 5. Achievements of Research and Development and the applicable planning</b> ..	147
Section 1. Annual aims and outcomes.....	147
Section 2. The plan for utilizing the outcomes.....	152
<b>Chapter 6. References</b> .....	154

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	18
제 1 절	연구개발의 목적	18
제 2 절	연구개발의 필요성	18
제 3 절	연구개발의 범위	19
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 1 절	국내외 관련 기술의 현황과 문제점	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절	질려자 추출물의 성분연구	24
제 2 절	질려자 추출물의 원료표준화 및 pilot scale 추출공정 연구	49
제 3 절	질려자 추출물의 안정성 시험	74
제 4 절	대식세포에서 질려자 추출물의 항염증 활성 평가	104
제 5 절	염증동물모델에서의 질려자 추출물의 염증 억제 평가	123
제 6 절	질려자 추출물의 동물내 안전성 평가	131
제 7 절	질려자 추출물 영양성분검사	136
제 8 절	인체적용시험 및 IRB 승인	137
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	145
제 1 절	목표달성도	145
제 2 절	관련분야에의 기여도	146
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	147
제 1 절	연차별 연구성과 목표 및 성과	147
제 2 절	성과 활용 계획	152
제 6 장	참고문헌	154

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

본 연구에서는 질려자 추출물의 원료 표준화 작업을 위하여 표준 제조법 연구, 품질 관리기준 설정 및 최적 공정시스템개발을 통한 표준화된 추출물 엑스를 확보하고, 관절조직 개선과 밀접한 염증 억제 활성 및 해당 조직세포의 증식 유도등을 개별인정 획득에 필요한 항목에 맞게 세포 및 질환 동물모델을 통해 기능성 평가시험을 진행하여 관절건강 기능 개선 및 완화·예방 기능과 안전성을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발하여 건강기능성식품의 제조 노하우를 축적하고, 향후 이를 타 천연물 신약 및 식품 개발에 확대시켜 국내 천연물 기반 기능성 식품산업의 기술력 강화 및 국제 경쟁력을 높이는 것을 그 목적으로 함.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 관절염이란 노화, 기계적 손상, 면역 이상 등 어떤 원인에 의해 관절 내에 염증성 변화가 생긴 것을 말하며 크게 퇴행성관절염(Osteoarthritis)과 류마티스성 관절염(Rheumatoid Arthritis)으로 나눌 수 있음. 퇴행성관절염은 골관절염 또는 마모 관절염이라고 불리 우며 일반적으로 노화에 불가피한 질환임. 또한 나이가 들어가면서 모든 사람에게 올 수 있는 흔한 질병으로 주요 원인은 노화, 과도한 관절의 사용, 비만, 유전 등이 있고 정확한 원인은 아직 규명되어 있지 않음. 통계청 자료에 따르면 우리나라 50세 이상 연령층의 65%에서 골관절염 증상이 나타나는 것으로 보고되고 있음.
- 이와 달리 류마티스성 관절염은 자가면역질환의 일종으로 전신성 만성 염증 질환이며 류마티스성 관절염 또한 발병 원인이나 발병 기전이 아직 명확히 밝혀져 있지 않으나 유전적인 요인과, 감염, 호르몬 이상 등에 의한 것으로 추정됨. 또한 자가면역반응이 이 질환의 만성화와 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 이것은 염증성 매개체들과 사이토카인들의 국소적인 방출과 함께 T cell이 중요한 역할을 하여 결과적으로 관절을 파괴하는 자가면역반응으로써 주요증상은 피로, 무기력증, 동통 등이 있으며, 관절염이 만성화되면서 발열이나 체력쇠약 등이 나타남. 우리나라 류마티스 관절염 인구는 67만 명으로 전체 인구의 1.4%를 차지하는데(대한류마티스학회 자료) 대개 20~40대에 발생하며 남성보다 여성에서 3배 정도 많이 발생함.
- 아직까지 완치를 가능케 하는 의약품이 개발되지 않은 관절염 치료제 시장에서 현재 시판중인 대표적인 류마티스 관절염치료제로는 와이어스의 엔브렐라로 염증을 유발하는 종양괴사인자(TNF- $\alpha$ )를 억제, 중증 류마티스 관절염 환자의 치료제로 쓰이고 레미케이드와 애보트사의 휴미라 등이 있으며, 현재 BMS제약에서 '오렌시아'를 내놓았음. 기존에는 COX-2 억제제인 바이옥스와 백스트라가 있었으나 심혈관계 부작용을 이유로 2004년과 2005년 판매 중지가 되었으며, 현재 NSAIDs와 히알론산 주사제를 성분으로 하는 치료제가 각광받고 있는 추세임.
- 따라서 국내 기술로 안전성이 확보된 천연자원을 이용하여 관절건강 및 염증완화 작용을 하

면서 부작용이 적은 관절염 치료제 개발이 시급하나, 이 결과는 짧은 시간에 이루어지는 것이 아니므로 그에 앞서 관절건강에 도움이 되는 보조 역할을 가지며 질병발생 감소기능을 지닌 천연물 유래 건강 기능성 식품 개발이 우선적으로 이루어져야함. 기능성 식품이란 영양학적 유의성 외에 생리학적으로 유익하고 만성질환의 위해를 감소 또는 만성질환의 위해로부터 보호할 목적으로 제조된 식품으로 이러한 기능성 식품을 포함한 식품시장은 제약시장의 5배에 해당하는 거대규모이고 이 규모는 앞으로도 다양한 기능성 식품들의 등장으로 더 확대될 것으로 사료됨. 대부분의 기능성 식품의 재료 등은 천연물을 원료로 사용하여 개발되고 있으며 그 중에서도 한방재료를 소재로 개발되는 기능성 식품은 계속 증가하고 있음 (식약청 고시 기능성 원료 인정현황 ('04-08')).

- 그러나 현재 우리나라의 기능성 식품 시장은 기업들의 과대 허위광고로 제품들의 효능이 불신되고 있는 상태이므로, 이러한 불신을 해소하며 대외적으로도 인정받을 수 있는 기능성식품 시장을 형성하기 위해서는 그 제품의 안전성이 생물학적인 실험을 통해 입증되어야하며, 이렇게 입증된 천연물 또는 농수산물을 사용하여 만든 제품 생산이 빠르게 진행되어야 함.
- 따라서 본 연구에서는 천연물질인 질려자 추출물을 통하여 RAW 264.7 세포의 Nitric Oxide (NO) 측정을 통해 염증 억제에 관여하는 성분을 분리해 내고 관절 조직 개선에 효과가 있는 성분을 최적의 표준화된 추출공정을 통해 확보하려고 함. 표준화 된 질려자 추출물을 이용하여 부작용이 없으며, 안정성 및 안전성이 입증된 관절 건강에 도움이 되는 건강기능식품의 개발을 이루고, 이것을 제품화하여 올바른 기능성 식품 시장 형성을 유도함. 더불어 질려자를 원료로 제공하는 농업 종사자들의 소득을 증대시키고 제품화 된 건강기능성식품의 판매를 국내뿐만 아니라 해외로 확대시켜 국내 생산 기능성 식품의 국가 경쟁력을 확보하고자 함.

### 제 3 절 연구개발의 범위

구분 (연도)	연구개발 내용	연구개발 범위
1차년도 (2011 ~2012)	질려자 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리	- 자료조사를 통한 최적의 지표물질 설정 - 선정된 지표물질의 구조 동정 - 추출물로부터 항염활성을 가지는 물질탐색 - 항염작용을 갖는 기능성 성분의 구조 규명
	대식세포에서 염증억제 활성 평가	- 농도별로 LPS가 처리된 대식세포에 유효물질을 처리하여, NO assay를 수행하여 항염 작용 평가 - 농도별로 LPS가 처리된 대식세포에 유효추출물질을 처리하여, PGE <sub>2</sub> assay를 수행하여 항염 작용 평가
	급성 염증동물모델에서의 염증 억제 평가	- 급성 염증 동물모델 구축 완료 - 급성 염증 동물모델을 대상으로 유효 추출물을 처리시 염증억제 유효성을 CT장비를 활용하여 평가함
	표준화된 최적 공정 확립	- 최적의 유효성분 추출조건 확립 - 이를 통해 얻어진 유효성분 및 지표물질의 함량 분석

구분 (연도)	연구개발 내용	연구개발 범위
		- 추출 효율이 극대화 된 제조공정의 표준화 및 validation
	대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보	- 최적 추출 조건에 따른 pilot scale 추출법 확립
2차년도 (2012 ~2013)	최적추출물과 유효물질의 염증 관련 유전자 및 단백질 발현수준 분석	- 최적 추출물과 유효물질 설정에 따른 세포에서의 항염증 유효성 평가 및 관련 유전자의 작용기전 관련 COX-2와 iNOS의 발현 여부 확인 - 최적 추출물과 유효물질의 해당 세포 배양액에서 Cytokine (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ )의 분비정도 평가
	동물모델을 통한 간이독성 평가 I	- 소동물을 대상으로 MTD(maximum tolerated dose) 평가
	골관절염 동물모델에서의 염증 억제 평가	- 골관절염 동물모델 구축 - 염증에 대한 효력실험으로 골관절염 모델에 유효 추출물을 처리하여 CT 측정을 통해 bone volume 변화량 측정
	인체적용 시험용 시제품 제작	- 유효성분의 물리화학적 특징에 맞은 다양한 제형 설계 - 최적의 관절조직 개선 효과를 보이는 제형 선별
	인체적용 시험 진행 I	- 인체에 대한 질려자 추출물의 안전성과 유효성 평가를 위한 시험방법 설계
	최적 추출물속 유효성분 분리 및 분석 완료	- 활성 추적법(Bio-assay Guided methods)에 따른 유효성분리 다량 분리 및 구조결정완료
	원료 규격 표준화 및 원료 validation	- 단위공정의 수율 및 지표성분의 함량변화 확인 - 원료의 영양성분 및 배합비율 확인
3차년도 (2013 ~2014)	동물모델을 통한 안전성 평가	- 질려자 추출물의 간이 독성 평가 결과를 토대로 GLP 기관 단회독성 평가 실시
	최적 추출물의 항염증 작용메커니즘 보완 연구 진행	- 1, 2차년도 연구결과 정리하여 최적 추출물의 다양한 항염증 작용메커니즘을 추가 탐색 - 향후 식약처 개별인정 허가를 위한 전임상 평가자료 작성 완료
	인체적용 시험 진행 기획 및 IRB 승인	- 원료표준화자료와 전임상 평가자료에 대한 식약처 개별인정형 기능식품 개발 컨설팅 자문 의뢰 및 IRB 승인 신청 - IRB 승인 (관련 내용 별첨자료에 제시)에 따른 인체적용시험 진행 여부를 참여기업과 논의하여 진행 및 기술이전 논의
	개별인정 자료 최종 정리 및 제품화 지원	- 기술이전에 따른 원료의 기능성 인정관련 자료 지원 - 대량 생산에 따른 품질관리 - 제품관리 시스템 향후 계획 진행
	인체적용시험용 시제품 제작을 위한 제형설계 및 연구진행 (참여기업과의 공동연구)	- 대량 생산을 통해 현재 확보된 20kg의 80% 질려자 주정 추출물을 이용 시제품 제작 기획
	제형의 안정성 평가	- 시제품에 사용될 제형의 물리 화학적 장기보존 평가 ↳ initial, 2, 4, 6개월 원료의 안정성 평가진행
	원료표준화 자료의 지속적인 보완	- 원료의 개별인정 획득을 위한 원료표준화 결과 보완 및 추가적인 연구 지원

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련 기술의 현황과 문제점

#### 1. 관절건강 도움 및 관절염 완화 보조제로서의 기능 식품들의 현황

대표 물질	제 품 명	제조원/연구개발	인정 여부	제조국가	특 징
글루코사민	nutra 글루코사민플러스	씨제이	개별인정형	대한민국	- 글루코사민은 연골구성성분으로 아미노당이며, 연골형성의 천연영양소임. - 관절연골의 손상회복, 연골세포의 성장촉진의 효능 있음.
글루코사민	생생 글루코사민	헬스원	개별인정형	대한민국	- 글루코사민(75%), 상어연골추출물, 녹색홍합추출물, 해조칼슘 등을 다량 함유해 연골 및 관절관리가 필요한 중년층이 상에게 효과적임. 특히 글루코사민뿐만 아니라 상어연골추출물 등의 물질이 적절하게 혼합돼있어 글루코사민 100%제품보다 관절염 개선효과가 더 뛰어남.
글루코사민 MX	이룸 글루코사민 플러스	이룸	개별인정형	대한민국	- 글루코사민 플러스는 복합적인 관절건강관리를 위한 제품으로, 글루코사민의 연골생성을 빠르게 촉진하는 효과가 있는 상어연골 성분과 관절에 영양을 공급하는 비타민과 미네랄을 배합, 글루코사민 MX가 낡고 닳은 관절과 연골의 생성에 가장 효과적으로 작용할 수 있게 도와줌.
글루코사민 BDX-1	글루코사민 트리플정	대웅 제약	개별인정형	대한민국	- 글루코사민 트리플정은 특허가 등록된 신물질인 BDX-1을 사용해 진통·소염작용 및 연골재생능력이 우수함.
글루코사민 콘드로이친 MSM	트리플렉스	GNC		미국	- 관절건강을 위한 글루코사민과 콘드로이친 그리고 MSM이 함유되어 있음.
글루코사민 MSM	슈프 글루코사민	Schiff		미국	- 관절의 조직 연결을 도와주는 MSM과 관절을 튼튼하고 유연하게 도와주는 Glucosamine MSM.
글루코사민 콘드로이친	Glucosamine Chondroitin	Kirkland		미국	- 관절건강을 위한 글루코사민과 콘드로이친이 함유되어 있음.

대표 물질	제 품 명	제조원/ 연구개발	인정 여부	제조국가	특 징
글루코사민 콘드로이친 MSM 비타민C	Glucosa mine MIX	Solgar		미국	- 관절 보조제로서 유명한 소염작용의 글루코사민과 연골재생에 도움을 주는 콘드로이친, MSM, 비타민 C (Ester-C)가 함유되어 있음.
글루코사민 콘드로이친 비타민C 히알루론산 MSM	트로피칼 오아시스 액체형 관절보조 식품	Tropi cal Oasis		미국	- 건강한 관절 건강을 위해 글루코사민, 콘드로이친, 비타민C, 히알루론산, msm이 특별 혼합된 제품으로 액체형은 타블렛 제품에 비해 체내에 빠르게 흡수됨.
MSM	MSM 1500	GNC	개별인정형	미국	- 섬유조직의 접착제, 항산화제, 소화제, 면역강화, 류마티스성 관절염 완화.

## 2. 천연물 유래 관절염 치료제 및 관절건강에 관한 건강기능식품의 현황

대표 물질	제 품 명	제조원/ 연구개발	인정 여부	제조국가	특 징
MSM	관절백세 조인스틱	롯데제 약 신도바 이오	개별인정형	대한민국	-SM, 망간, 식물혼합추출물분말, 상어연골추출물분말, 초록잎혼합추출물분말, 버드나무가지껍질추출물분말, 달팽이추출물분말, 콜라겐 등 함유.
초록잎혼합 추출오일	리프리놀	파마링 크	개별인정형	대한민국	-천연 항염물질로서, 다가불포화지방산이며, 염증물질인 류코트리엔 생합성을 억제하는 작용. -SPECIFIC, COX-2 INHIBITOR로서의 역할도 함.
초록잎혼합 추출오일	정관장 루마큐 골드	라이프 앤진	개별인정형	대한민국	-정관장 6년근 홍삼과 초록잎 혼합추출오일을 배합한 기존 건강기능식품인 루마큐를 리뉴얼한 제품으로 관절부위의 염증을 완화해 관절기능 개선에 도움.
프로폴리스	프로 폴리스 캡슐	천호식 품		대한민국	-천연 항생물질 프로폴리스는 관절염, 피부병, 기관지염등 염증성 질환에 효과가 있음.
MSM	MSM 1500	GNC	개별인정형	미국	-섬유조직의 접착제, 항산화제, 소화제, 면역강화, 류마티스성 관절염 완화.
초록잎혼합 추출오일	관절팔팔	Syspha rm	개별인정형	뉴질랜드	-천연 항염물질로서, 다가불포화 지방산이며, 염증물질인 류코트리엔 생합성을 억제하는 작용.

보라지씨오 일	컨츄리 라이프 셀라드린 콤플렉스	Celadri n		미국	-연골건강에 도움을 주는 보라지씨 오일 (borage seed oil)이 함유되어 있는 건강보조식품.
------------	----------------------------	--------------	--	----	--

### 3. 질려자로부터 관절건강 관련 건강기능 식품의 개발 가능성

- 모든 토양에서 적응력이 좋아 밭에서 뿐만 아니라 해안 등 건조지에서도 재배가 가능해 원료 수급이 원활하고 질려자를 원료로 사용함으로써 농업 종사자들에게 원료 공급이라는 새로운 일거리를 제공함과 동시에 농가 소득을 증대시킬 수 있으며, 이미 황금 등의 천연 복합물이 관절 건강에 도움을 주는 건강기능식품으로 생산되고 있어, 이와 관련된 관절건강에 도움을 주는 건강기능식품 제품을 빠르게 출시하여 기능성 식품 시장에 활력을 넣을 것으로 예상함.

### 4. 원료 사용량 및 농가수익에 대한 예측, 분석을 구체화하여 제시

- 질려자
  - 질려자 원료 소요량 : 450톤
  - 1인당 섭취량 약 1.6g/day (총90일)
  - 원료구입비 kg당(건중량) 8,000원
  - 새로운 농가 수익모델창출 (재배가능)
    - 국내 시장 진출 : 신규농가 소득 (40억원/년, 500톤 예상)
    - 산지 : 제주도, 거제도, 남부해안
    - 예상계약재배단지 조성 추진중 : 제주도



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 질려자 추출물의 성분연구

#### 1. 질려자의 산지별 추출 용매에 따른 수율(%) 평가

- 본 추출물 제조에 사용된 질려자는 제주도 해안가에 자생하고 있는 남가새 열매를 8월에 채취하여 건조 후 사용하였으며, 또한 국내에서 유통되고 있는 중국산 질려자를 구입하여 사용함.
- 질려자 추출물 제조법을 최적화하는 연구를 위하여 용매별 (물, 발효에탄올), 온도 및 시간에 따른 추출물을 제조하여 수율 및 활성 평가를 진행하였음.
- 추출물 제조시 효능평가 결과가 우수하고 대량 제조시 경제성이 탁월한 방법으로 진행함.

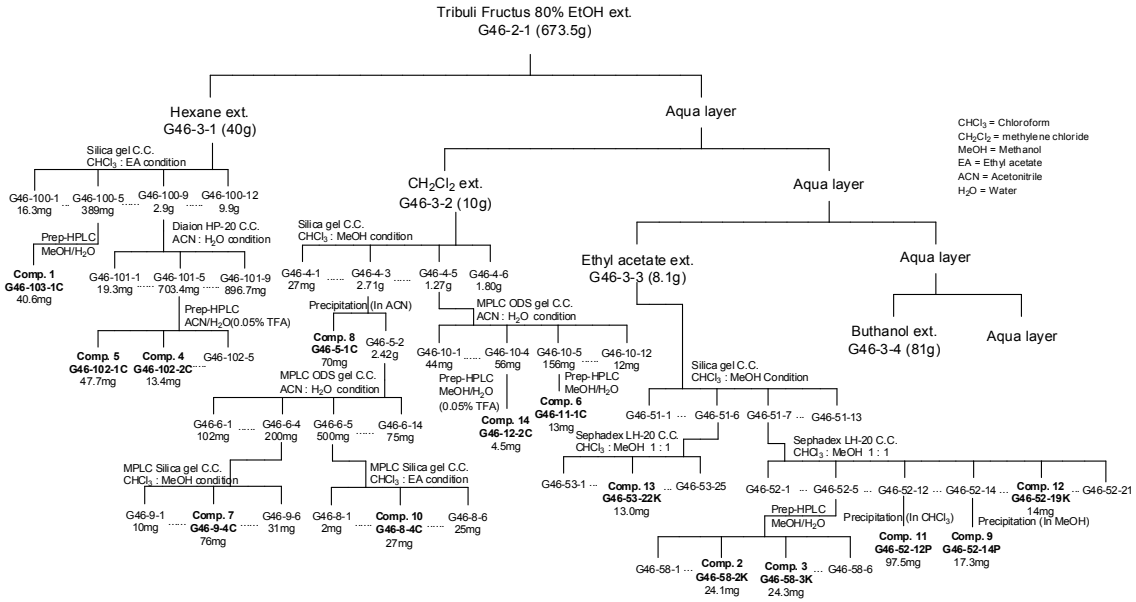
표 1. 추출 용매에 따른 국내산과 중국산의 추출 수율(%)

Methods	Solvents	Yields (%)	
		국내산	중국산
Extraction	20% (발효에탄올/증류수)	6.9	10.4
	40% (발효에탄올/증류수)	6.8	10.3
	60% (발효에탄올/증류수)	5.8	8.8
	80% (발효에탄올/증류수)	3.9	6.6
	90% (발효에탄올/증류수)	2.4	4.5

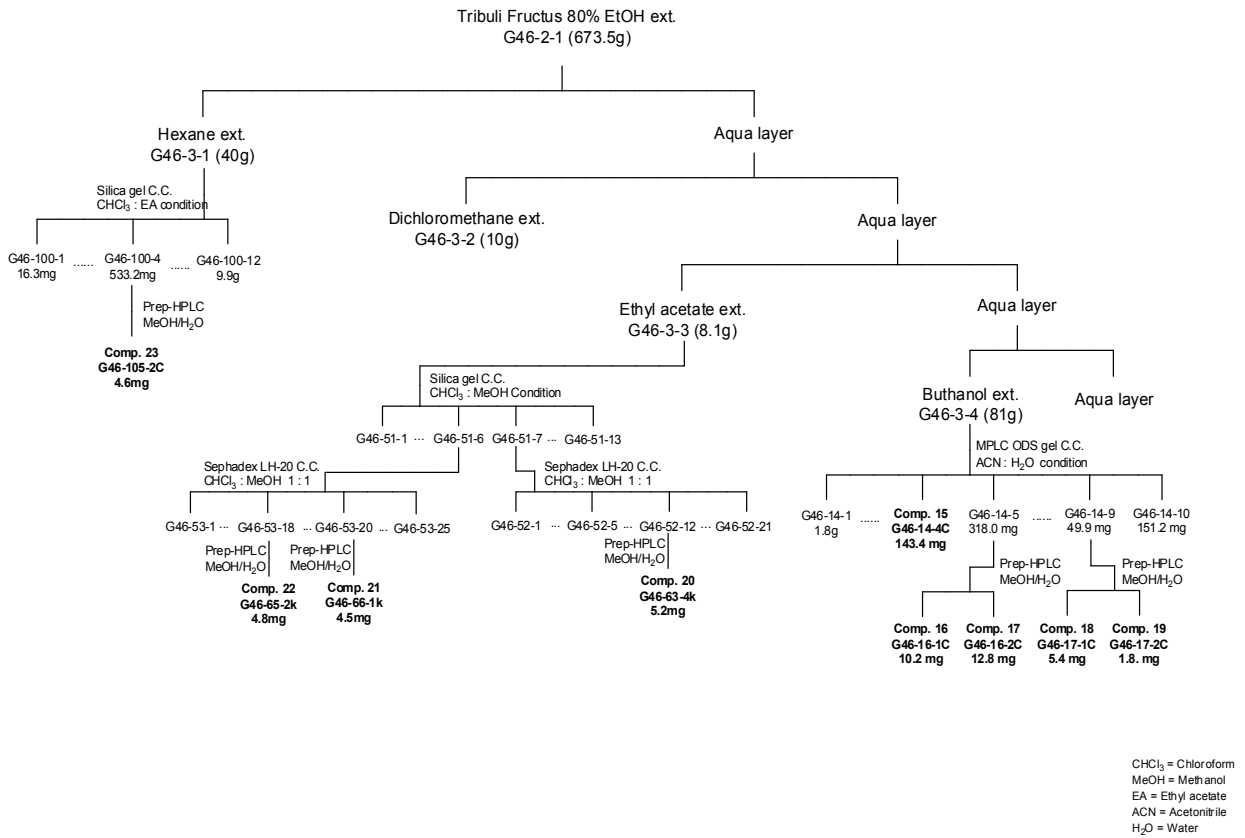
#### 2. 질려자 추출물로부터 항염활성 물질의 분리 및 구조규명

##### 가. 질려자 에탄올 추출물, 용매 분획물 제조 및 유효성분의 분리·정제

- 질려자 10 kg에 80% 에탄올을 가하고 24시간 2회 실온에서 추출하였다. 추출액을 감압상태에서 농축시켜 673 g의 에탄올 추출물을 얻었음. 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매 분획하였음.
- 각각의 분획층을 감압상태에서 증발시켜 용매별 추출물을 얻었고, 헥산 (G46-3-1), 디클로로메탄 (G46-3-2), 에틸아세테이트 (G46-3-3) 추출물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래프를 실시하였음.
- 각각의 소분획물에 대하여 실리카겔, Sephadex LH-20, RP-18 칼럼 크로마토그래프, MPLC 및 prep. HPLC를 실행하여 14 종의 순수 화합물을 얻었음 (도식 1,2).



도식 1. 활성물질 isolation scheme



도식 2. 활성물질 isolation scheme

## 나. 분광학적 분석 data를 통한 분리정제 단일화합물의 구조규명

- 본 연구소에 구축된 700 MHz NMR (cryo probe)을 이용하여 분석한 NMR data ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, HMBC)를 통한 proton과 carbon의 connectivity에 대한 정보 및 Mass data를 이용한 molecular formula의 확인
- 결정된 구조에 대한 data를 기존 문헌과 비교 확인

### (1) Identification of compound 1 (*trans*-phytol)

- Light yellow oil,  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 700 MHz):  $\delta$  0.86 (6H, d,  $J = 6.7$  Hz, Me-18, Me-19), 0.89 (6H, d,  $J = 6.7$  Hz, Me-16, Me-17), 1.54 (1H, septet,  $J = 7.0$  Hz, H-15), 1.69 (3H, s, Me-20), 2.00 (2H, m, H2-4), 4.18 (2H, d,  $J = 7.0$  Hz, H2-1) and 5.43 (1H, t,  $J = 6.7$  Hz, H-2);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 175 MHz):  $\delta$  16.2 (C-20), 19.7 (C-18), 19.8 (C-19), 22.6 (C-17), 22.7 (C-16), 24.5 (C-9), 24.8 (C-13), 25.1 (C-5), 28.0 (C-15), 32.7 (C-11), 32.8 (C-7), 36.7 (C-6), 37.3 (C-8), 37.4 (C-12), 37.4 (C-10), 39.4 (C-14), 39.9 (C-4), 59.4 (C-1), 123.1 (C-2) and 140.4 (C-3). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the *trans*-phytol was consistent with those reported in the literature.<sup>1)</sup>

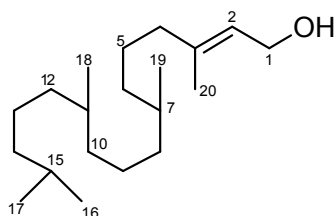


그림 1. Compound 1의 구조

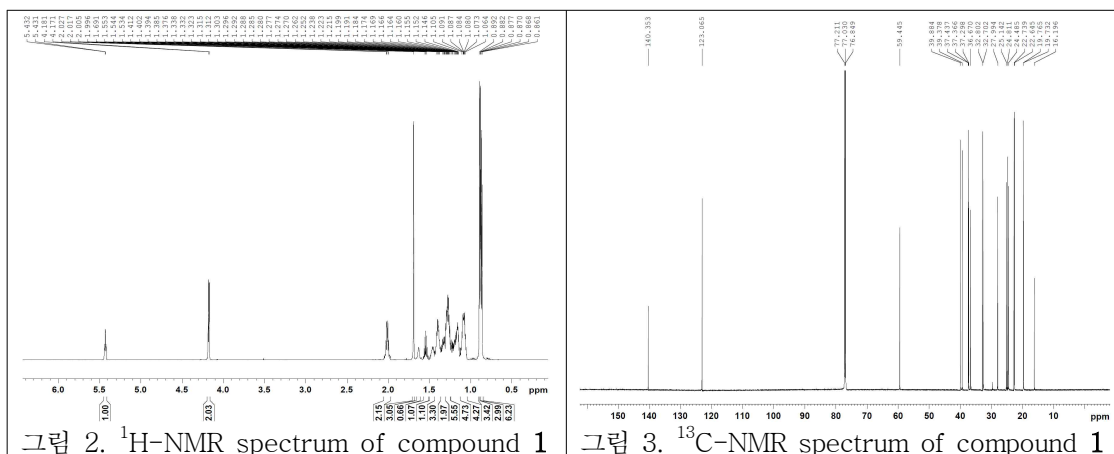


그림 2.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 1

그림 3.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 1

### (2) Identification of compound 2 (9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid)

- White amorphous powder,  $[\alpha]_D^{22} = -30.4^\circ$  ( $c = 0.1$ , MeOH), IR  $\nu_{\text{max}}$  (KBr) 3544, 3355 (OH), 2926, 2849 (CH), 1696 (acid), 1462 ( $\text{CH}_2$ ), 1311 ( $\text{CH}_3$ ), 1071 (C-O), 974 (trans  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 860, 725  $\text{cm}^{-1}$ ,  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 700 MHz)  $\delta$ : 0.99 (3H, t,  $J = 7.5$  Hz, Me-18), 1.36 ( $\text{CH}_2$ ), 1.55 (1H, m, H-8), 1.62 (2H, m, H-3), 2.01 - 2.15 (3H, m, H-17, 14b), 2.29 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-2), 2.36 (1H, m, H-14a), 3.47 (1H, m, H-13), 3.98 (1H, t,  $J = 5.6$

Hz, H-12), 4.07 (1H, m, H-9), 5.48 (2H, m, H-15, 16), 5.74 (1H, dd,  $J = 2.6, 15.6$  Hz, H-11), 5.74 (1H, dd,  $J = 2.4, 15.6$  Hz, H-10).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175 MHz)  $\delta$ : 13.2 (C-18), 20.3 (C-17), 24.7 (C-3), 25.1 (C-7), 28.8, 29.0, 29.2 (C-4, 5, 6), 30.1 (C-14), 33.6 (C-2), 36.9 (C-8), 71.6 (C-9), 74.4 (C-13), 74.5 (C-12), 125.0 (C-15), 129.7 (C-10), 132.9 (C-16), 135.1 (C-11), 176.3 (C-1). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the 9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(*E*),15(*Z*)-dienoic acid was consistent with those reported in the literature.<sup>2)</sup>

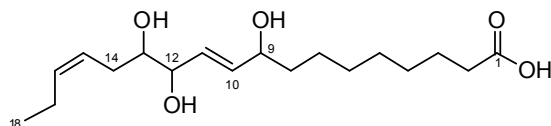


그림 4. Compound 2의 구조

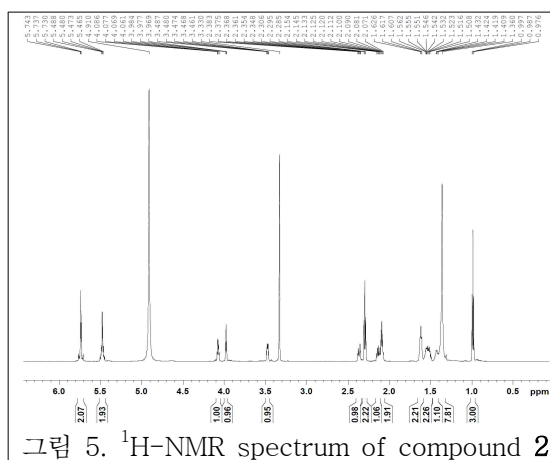


그림 5.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 2

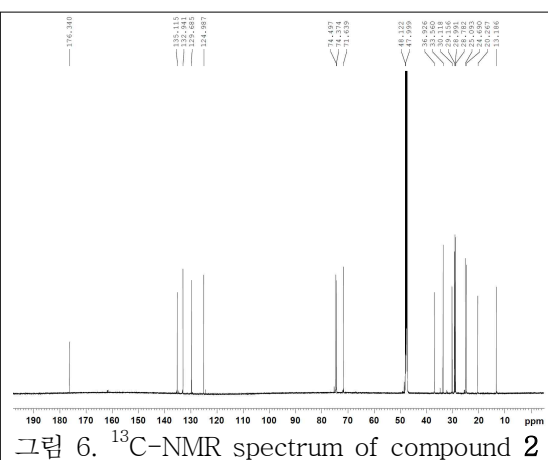


그림 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 2

### (3). Identification of compound 3 (9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid)

- White amorphous powder,  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 700 MHz)  $\delta$  0.93 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, Me-18), 1.36 ( $\text{CH}_2$ ), 2.30 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-2), 3.42 (1H, m, H-13), 3.93 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, H-12), 4.07 (1H, dd,  $J = 6.3, 12.6$  Hz, H-9), 5.69 (1H, dd,  $J = 5.6, 15.4$  Hz, H-11), 5.73 (1H, dd,  $J = 5.6, 15.4$  Hz, H-10).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175 MHz)  $\delta$ : 13.0 (C-18), 22.3 (C-17), 24.7 (C-3), 25.1 (C-7), 25.2 (C-15), 28.8, 29.0, 29.2 (C-4, 5, 6), 32.1 (C-16), 33.6 (C-14), 36.9 (C-2), 38.3 (C-8), 71.6 (C-9), 74.4 (C-13), 75.1 (C-12), 129.7 (C-10), 135.1 (C-11), 176.3 (C-1). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the 9,12,13-trihydroxy-10(*E*)-octadecenoic acid was consistent with those reported in the literature.<sup>2)</sup>

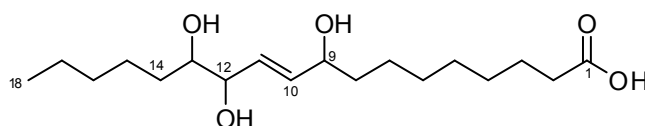


그림 7. Compound 3의 구조

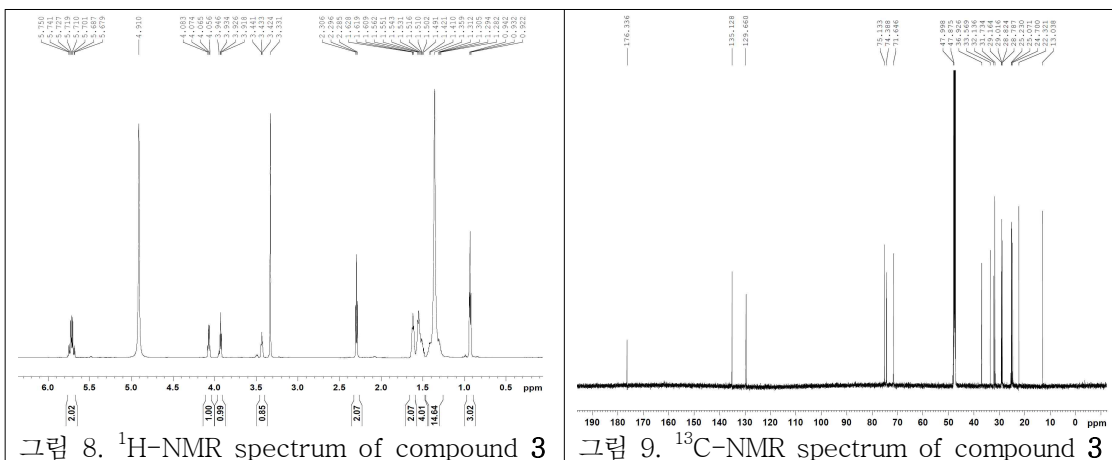


그림 8. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 3

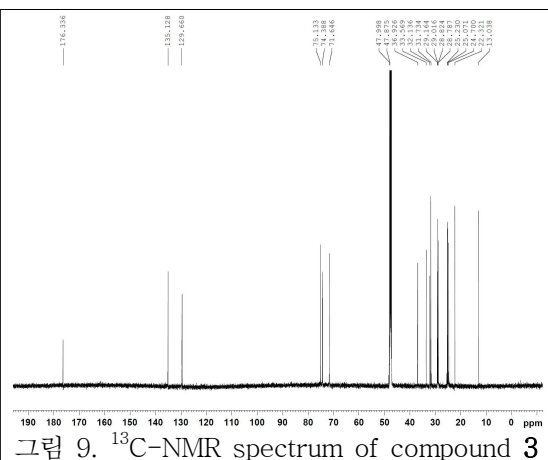


그림 9. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 3

#### (4) Identification of compound 4 (hecogenin)

- White amorphous powder;  $[\alpha]_D^{23} = -10.7^\circ$  (c 0.36, CHCl<sub>3</sub>); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3500, 2930, 2865, 1705, 1455, 1376, 1242, 1157, 1075, 1056, 980, 918, 897 and 862 cm<sup>-1</sup>; ESI-MS  $m/z$  431 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  4.37 (1H, m, H-16), 3.60 (1H, dd,  $J = 3.7, 10.8$  Hz), 3.49 (1H, m, H-3), 3.37 (1H, t,  $J = 10.8$  Hz), 1.08 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-21), 1.07 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-27); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) data see Table 2. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the hecogenin was consistent with those reported in the literature.<sup>3)</sup>

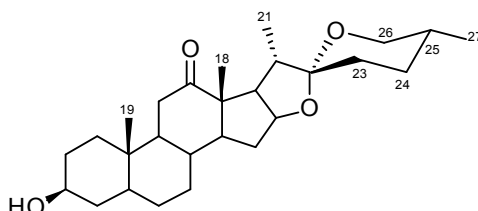


그림 10. Compound 3의 구조

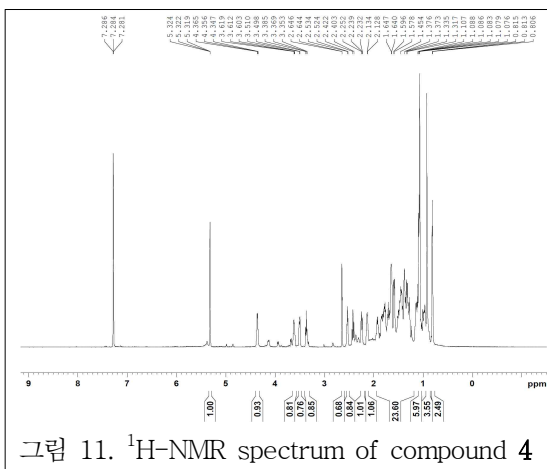


그림 11. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 4

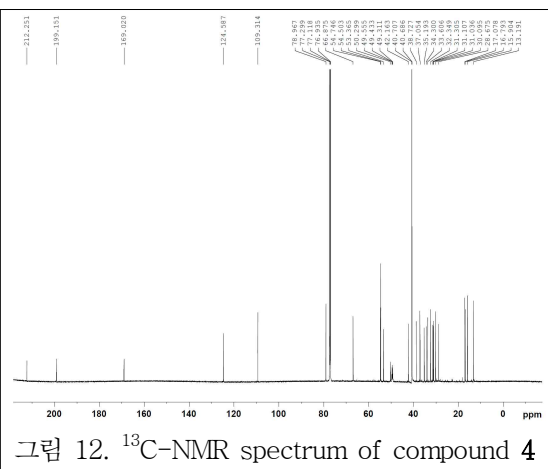


그림 12. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 4

### (5) Identification of compound 5 (25R-spirostan-4-ene-3,12-dione)

- White amorphous powder;  $[\alpha]_D^{23} = -10.7^\circ$  (c 0.36, CHCl<sub>3</sub>). ESI-MS  $m/z$  427 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 700 MHz): δ 5.74 (1H, s, H-4), 4.33 (1H, m, H-16), 3.45 (1H, m, H-26a), 3.31 (1H, m, H-26b), 1.24 (3H, s, Me-19), 1.07 (3H, s, Me-18), 1.03 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, Me-21), 0.76 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, Me-27); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz) data see Table 2. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the 25R-spirostan-4-ene-3,12-dione was consistent with those reported in the literature.<sup>4)</sup>

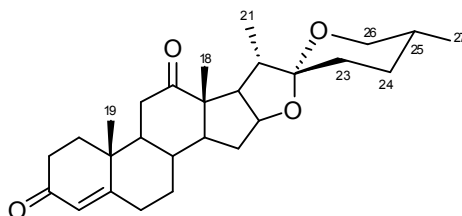


그림 13. Compound 5의 구조

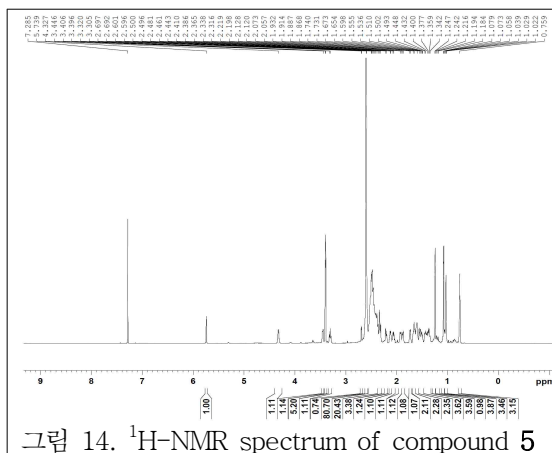


그림 14. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 5

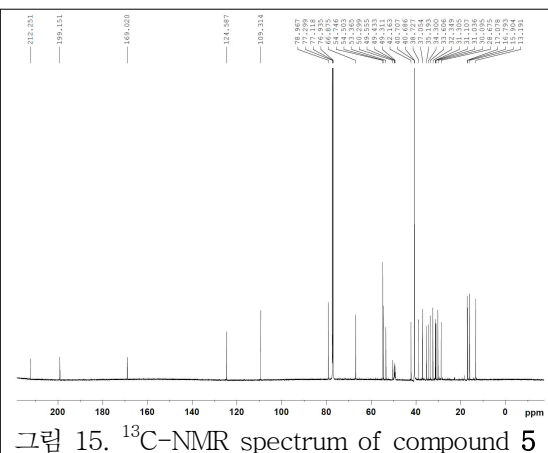


그림 15. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 5

### (6) Identification of compound 6 ((25R)-26-O-β-D-glucopyranosyl-furostan-4-ene-3,12-dione)

- White amorphous powder; ESI-MS  $m/z$  629 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 700 MHz): δ 5.78 (1H, s, H-4), 4.53 (1H, m, H-16), 4.26 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, Glc-1), 3.89 (1H, d,  $J = 11.9$  Hz, Glc-6a), 3.76 (1H, dd,  $J = 9.8, 7.0$  Hz, H-26a), 3.69 (1H, dd,  $J = 11.9, 5.6$  Hz, Glc-6b), 3.40 (1H, dd,  $J = 9.8, 7.0$  Hz, H-26b), 3.20 (1H, t,  $J = 8.4$  Hz, Glc-2), 2.67 (1H, t,  $J = 14.0$  Hz, H-11a), 2.62 (1H, m, H-6a), 2.40 (1H, m, H-6b), 1.36 (3H, s, Me-19), 1.18 (3H, s, Me-18), 1.10 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, Me-21), 0.96 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, Me-27); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz) data see Table 2.

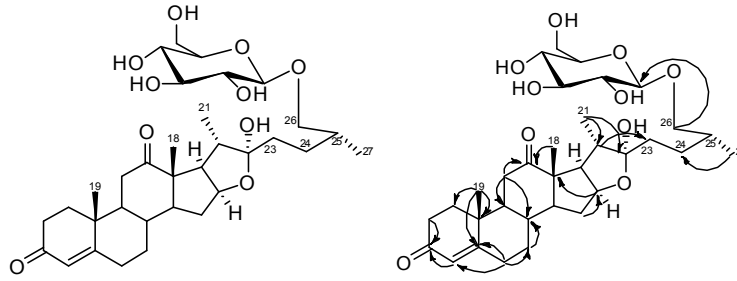


그림 16. Compound 6의 구조와 HMBC correlation

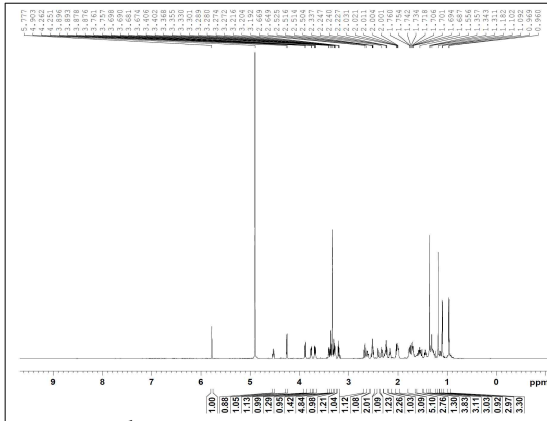


그림 17.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 6

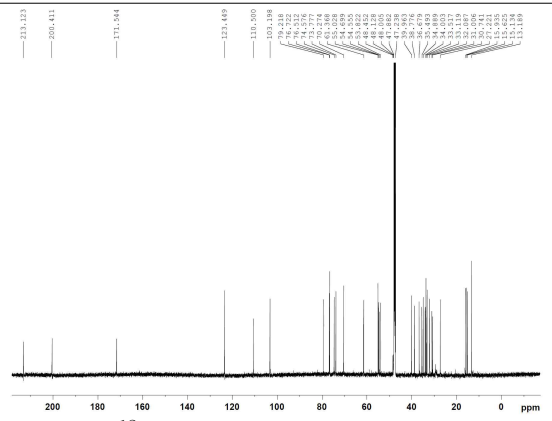


그림 18.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 6

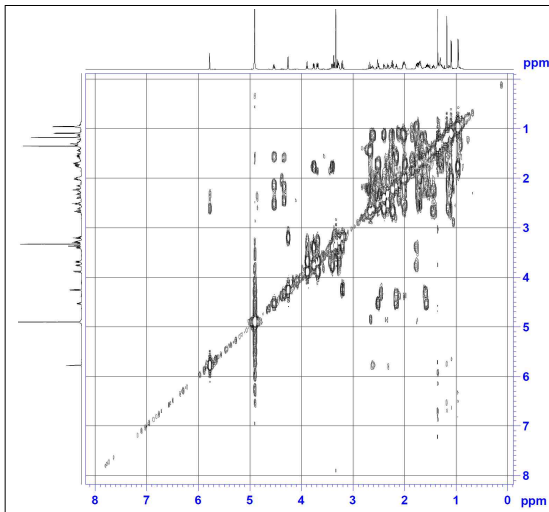


그림 19. COSY spectrum of compound 6

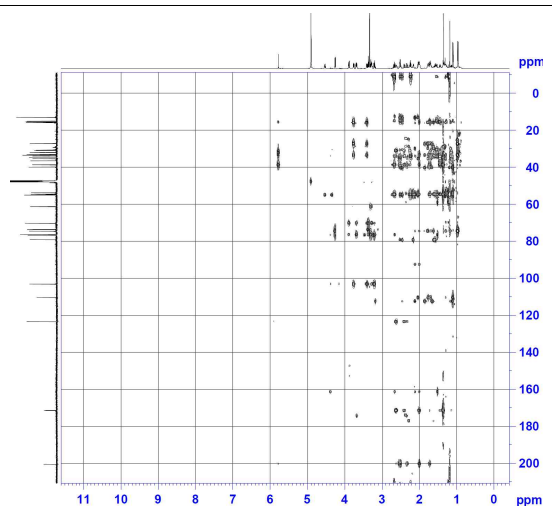


그림 20. HMBC spectrum of compound 6

표 2.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compounds 4 - 6 (175 MHz)

position	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	position	4	5	6
1	36.5	35.2	34.9	Glc-1			103.2
2	31.2	32.3	33.1	2			73.8
3	70.9	199.2	200.4	3			76.7
4	37.8	124.6	123.4	4			70.3
5	44.6	169.0	171.5	5			76.5
6	28.3	33.6	32.1	6			61.4
7	31.2	31.0	31.0				
8	34.4	34.3	34.0				
9	55.5	54.5	54.7				
10	36.1	38.7	38.8				
11	37.9	37.1	36.7				
12	213.7	212.3	213.1				
13	55.1	54.7	55.0				
14	55.8	54.7	54.6				
15	31.4	31.3	30.7				
16	79.2	78.9	79.2				
17	53.5	53.4	53.8				
18	16.0	15.9	15.1				
19	12.0	16.8	15.6				
20	42.2	42.2	40.0				
21	13.3	13.2	13.2				
22	109.3	109.3	110.5				
23	31.1	31.1	35.5				
24	28.8	28.7	27.2				
25	30.2	30.1	33.5				
26	66.9	66.9	74.6				
27	17.1	17.1	15.9				

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>CD<sub>3</sub>OD

(7) Identification of compound 7 ((-)-dehydrodiconiferyl alcohol)

○ Colorless oil; ESI-MS  $m/z$  403 [M + COOH]<sup>-</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz)  $\delta$  6.97–6.99 (3H, H-2,2',6'), 6.84 (1H, dd,  $J$ =8.4, 2.1 Hz, H-5), 6.79 (1H, d,  $J$ =8.4 Hz, H-6), 6.56 (1H, d,  $J$ =16.1 Hz, H-7'), 6.25 (1H, dt,  $J$ =16.1, 5.6 Hz, H-8'), 5.54 (1H, d,  $J$ =5.6, H-7), 4.22 (1H, dd,  $J$ =5.6, 1.4 Hz, H-9'), 3.88 (3H, s, OMe), 3.83 (3H, s, OMe), 3.86 (1H, dd,  $J$ =11.2, 5.6 Hz, H-9a), 3.80 (1H, dd,  $J$ =11.2, 7.0 Hz, H-9b), 3.51 (1H,  $J$  = 6.3 Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz)  $\delta$  147.8 (C-3), 147.7 (C-4'), 146.2 (C-4), 144.1 (C-3'), 133.1 (C-1'), 131.2 (C-1'), 130.6 (C-5'), 128.9 (C-7'), 126.1 (C-8'), 118.3 (C-6), 115.1 (C-6'), 114.7 (C-5), 110.6 (C-2'), 109.1 (C-2), 63.4 (C-9), 62.5 (C-9'), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 54.9 (OCH<sub>3</sub>), 53.8 (OCH<sub>3</sub>). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the (-)-dehydrodiconiferyl alcohol was consistent with those reported in the literature.<sup>5,6)</sup>



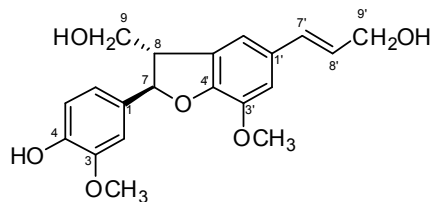


그림 21. Compound 7의 구조

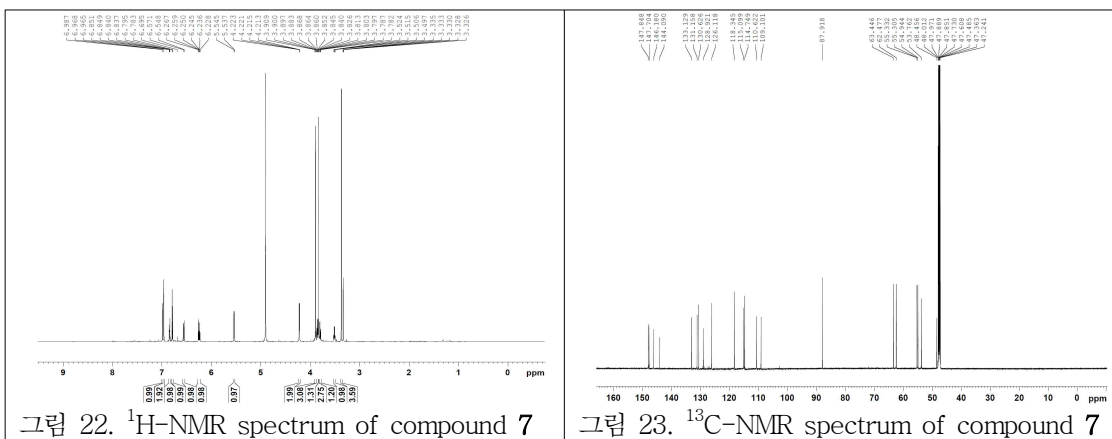


그림 22.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 7

그림 23.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 7

### (8) Identification of compound 8 (terrestriamide)

- White amorphous powder; ESI-MS  $m/z$  326  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 653  $[2\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 700 MHz)  $\delta$  8.22 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, NH), 7.90 (2H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-2' and H-6'), 7.35 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-7), 7.18 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2), 7.03 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6), 6.88 (2H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-3' and H-5'), 6.81 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.66 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-8), 4.66 (2H, s, H-8'), 3.82 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 175 MHz) data see Table 3. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the terrestriamide was consistent with those reported in the literature.<sup>7)</sup>

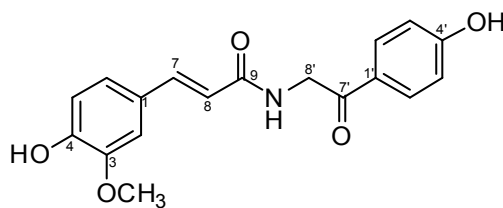
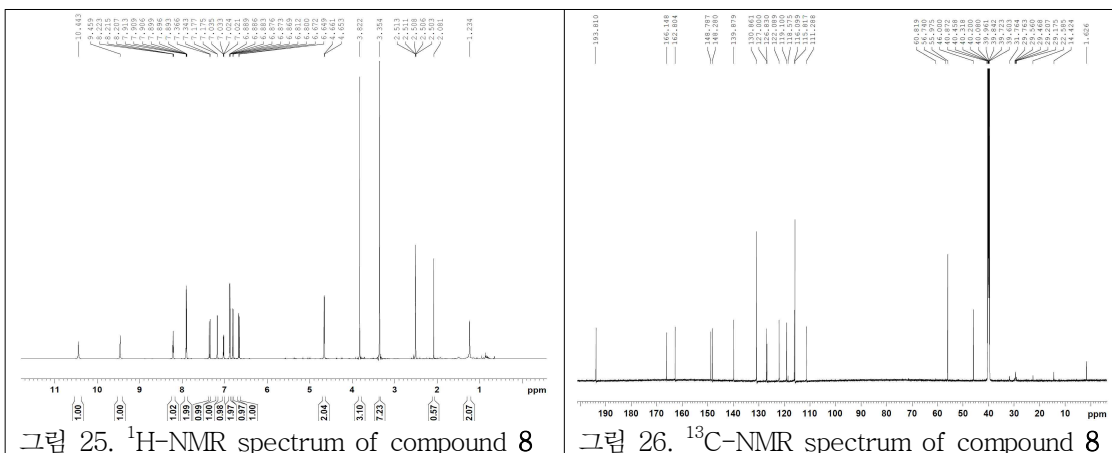


그림 24. Compound 8의 구조



### (9) Identification of compound 9

- White amorphous powder; ESI-MS  $m/z$  312  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 700 MHz)  $\delta$  10.4 (1H, s, OH), 9.39 (1H, s, OH), 9.16 (1H, s, OH), 8.29 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, NH), 7.90 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2' and H-6'), 7.27 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-7), 6.99 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2), 6.88 (2H, d,  $J = 9.1$  Hz, H-3' and H-5'), 6.87 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6), 6.75 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-5), 6.52 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H-8), 4.65 (2H, s, H-8');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 175 MHz) data see Table 3.

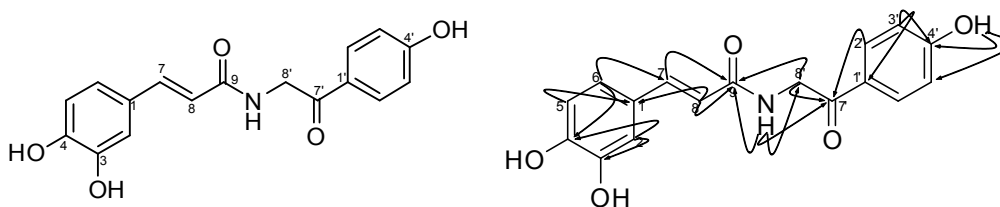
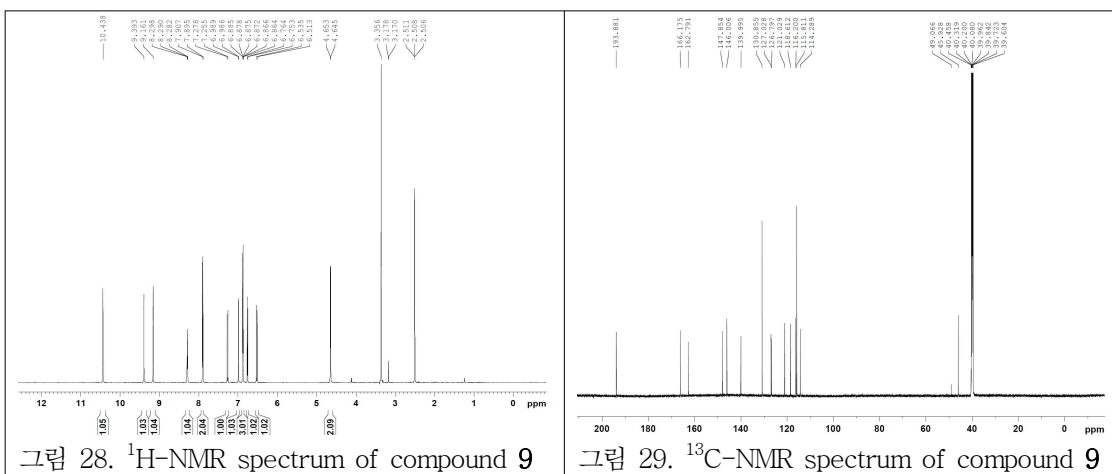
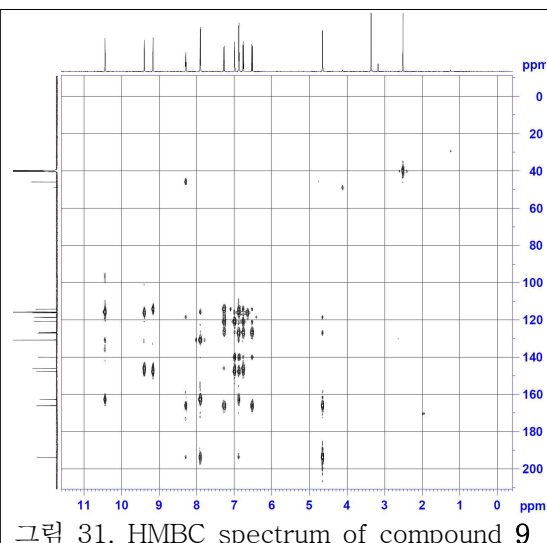
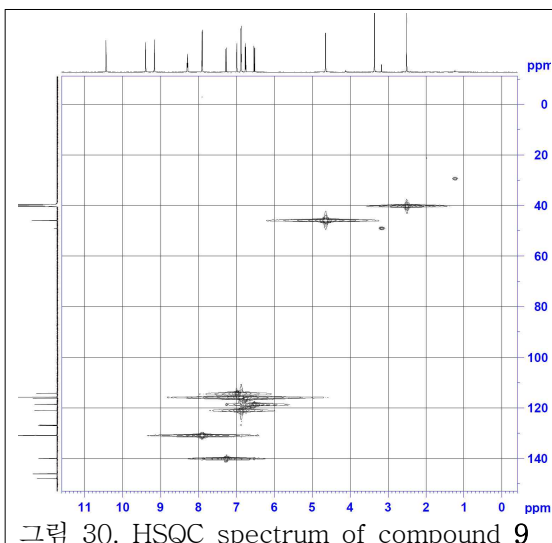


그림 27. Compound 9의 구조와 HMBC correlation





### (10) Identification of compound 10 (*N-trans*-Feruloyl tyramine)

- Pale yellow powder; ESIMS:  $m/z$  312 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz) δ 7.42 (1H, d,  $J$  = 15.4 Hz, H-7), 7.10 (1H, brs, H-2), 7.04 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-2', H-6'), 7.01 (1H, d,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, H-6), 6.78 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5), 6.71 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3', H-5'), 6.39 (1H, d,  $J$  = 15.4 Hz, H-8), 3.86 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.45 (2H, t,  $J$  = 7.0 Hz, H-8'), 2.74 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-7'); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz) data see Table 3. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the *N-trans*-feruloyl tyramine was consistent with those reported in the literature.<sup>8)</sup>

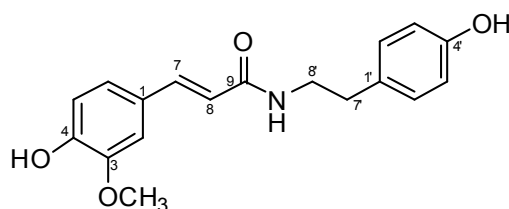
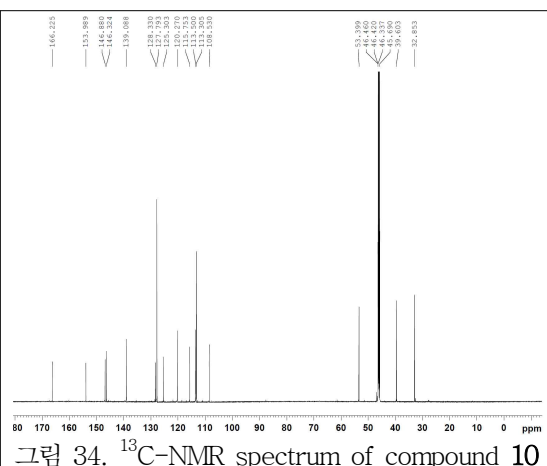
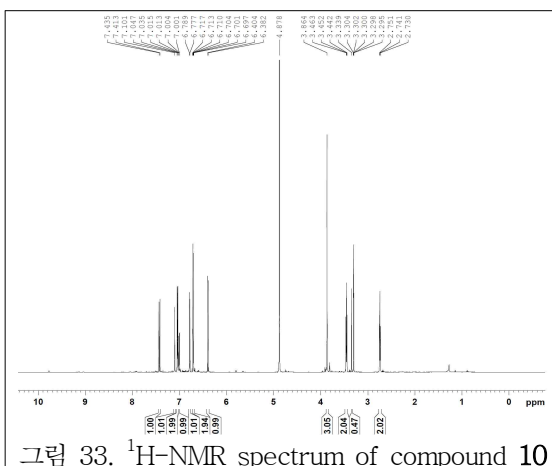


그림 32. Compound 10의 구조



### (11) Identification of compound 11 (*N-trans-p*-Caffeoyl tyramine)

- Pale yellow powder; ESIMS:  $m/z$  298  $[M - H]^-$ ;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 700 MHz)  $\delta$  9.36 (1H, s, OH), 9.18 (1H, s, OH), 9.13 (1H, s, OH), 8.03 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, NH), 7.22 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-7), 7.01 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.94 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2), 6.83 (1H, d,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6), 6.74 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.68 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.32 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-8), 3.32 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz, H-8'), 2.64 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-7');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 175 MHz) data see Table 3. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the *N-trans-p*-caffeoyl tyramine was consistent with those reported in the literature.<sup>8)</sup>

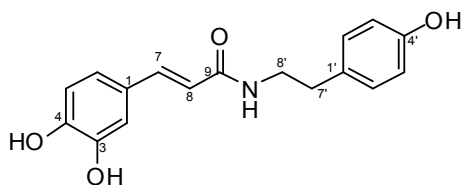


그림 35. Compound 11의 구조

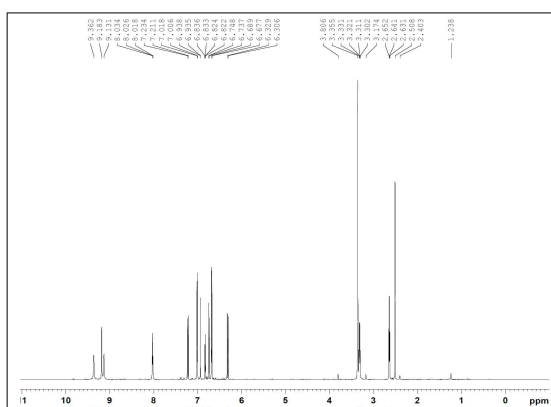


그림 36.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 11

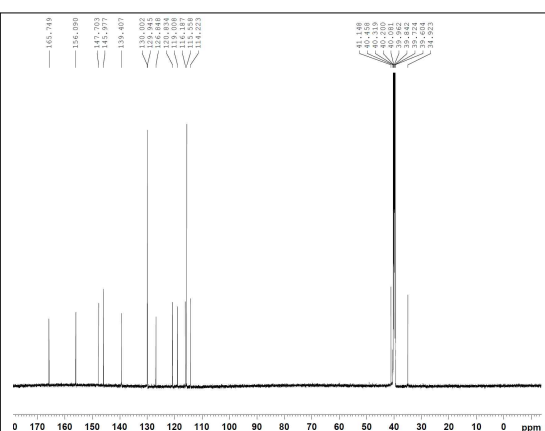


그림 37.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound 11

표 3.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compounds **8** - **11** (175 MHz)

position	<b>8</b> <sup>a</sup>	<b>9</b> <sup>a</sup>	<b>10</b> <sup>b</sup>	<b>11</b> <sup>a</sup>
1	127.0	126.8	125.3	126.8
2	111.3	114.3	108.5	114.2
3	148.3	146.0	146.3	146.0
4	148.8	147.9	154.0	156.1
5	116.1	116.2	113.5	116.2
6	122.1	121.0	120.3	120.8
7	139.9	140.0	115.8	139.4
8	119.1	118.6	139.1	119.0
9	166.1	166.2	166.2	165.7
1'	126.8	127.0	128.3	130.0
2'	130.9	130.9	127.8	129.9
3'	115.8	115.8	113.3	115.6
4'	162.8	162.8	146.9	147.7
5'	115.8	115.8	113.3	115.6
6'	130.9	130.9	127.8	129.9
7'	193.8	193.9	32.9	34.9
8'	46.0	45.9	39.6	41.1
OCH <sub>3</sub>	56.0		53.4	

<sup>a</sup>DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>b</sup>CD<sub>3</sub>OD

(12) Identification of compound **12** (Quercetin)

- Yellow powder, mp 314 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 205, 256, 372 nm; ESIMS:  $m/z$  301 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz)  $\delta$  7.75 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-2'), 7.65 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-8), 6.20 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz) data see Table 4. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the quercetin was consistent with those reported in the literature.<sup>9)</sup>

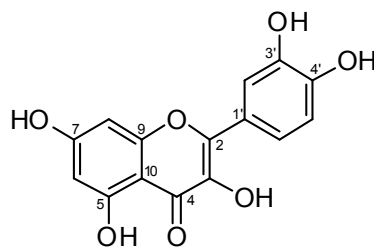
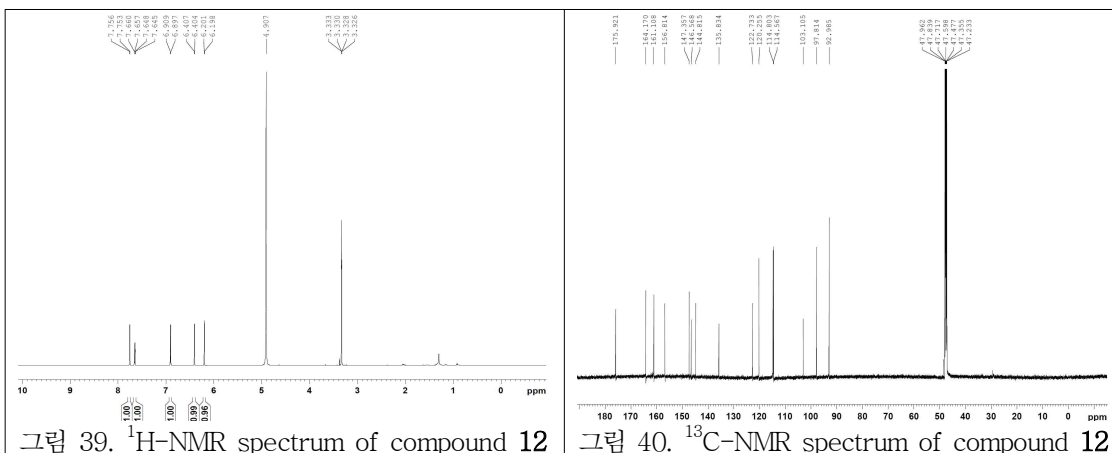


그림 38. Compound **12**의 구조



### (13) Identification of compound **13** (Kaempferol)

- Bright yellow powder, mp 276–278 °C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 205, 256, 372 nm; ESIMS:  $m/z$  285  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 700 MHz)  $\delta$  8.05 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-1', 6'), 6.94 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', 5'), 6.46 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.21 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 175 MHz) data see Table 4. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the kaempferol was consistent with those reported in the literature.<sup>10)</sup>

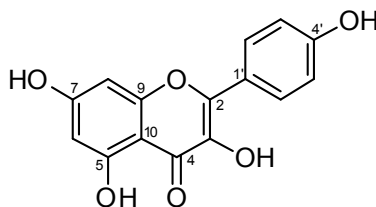


그림 41. Compound **13**의 구조

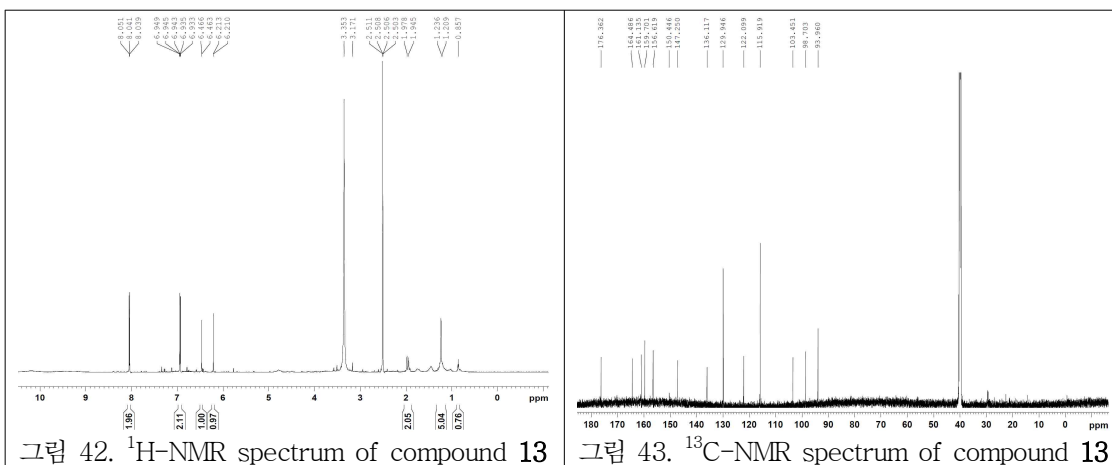


표 4.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of compounds **12** and **13**

position	<b>12</b> <sup>a</sup>	<b>13</b> <sup>b</sup>
2	148.2	147.3
3	137.4	136.1
4	177.5	176.4
5	158.4	161.1
6	99.4	98.7
7	165.8	164.5
8	94.6	94.0
9	162.7	156.6
10	104.7	103.5
1'	124.3	122.1
2'	116.2	129.9
3'	146.4	115.9
4'	149.0	159.7
5'	116.4	115.9
6'	121.9	129.9

<sup>a</sup>CD<sub>3</sub>OD, <sup>b</sup>DMSO-*d*<sub>6</sub>

(14) Identification of compound **14** (Abscisic acid)

- Yellow viscous mass; ESIMS:  $m/z$  287 [M + Na]<sup>+</sup>, 263 [M - H]<sup>-</sup>;  $^1\text{H}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 700 MHz)  $\delta$  7.84 (1H, d,  $J$  = 16.1 Hz, H-4), 6.19 (1H, d,  $J$  = 16.1 Hz, H-5), 5.99 (1H, s, H-3'), 5.80 (1H, s, H-2), 2.51 (1H, d,  $J$  = 17.5 Hz, H-5' a), 2.32 (1H, d,  $J$  = 17.5 Hz, H-5' b), 2.07 (3H, s, Me-6), 1.95 (3H, s, Me-7'), 1.14 (3H, s, Me-8'), 1.05 (3H, s, Me-9');  $^1\text{H}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz)  $\delta$  7.80 (1H, d,  $J$  = 16.1 Hz, H-4), 6.26 (1H, d,  $J$  = 16.1 Hz, H-5), 5.95 (1H, s, H-3'), 5.77 (1H, s, H-2), 2.56 (1H, d,  $J$  = 16.8 Hz, H-5' a), 2.20 (1H, d,  $J$  = 16.8 Hz, H-5' b), 2.06 (3H, s, Me-6), 1.95 (3H, s, Me-7'), 1.09 (3H, s, Me-8'), 1.05 (3H, s, Me-9');  $^{13}\text{C}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz)  $\delta$  198.0 (C-4'), 170.3 (C-1), 162.6 (C-2'), 151.6 (C-3), 136.9 (C-5), 128.1 (C-4), 127.1 (C-3'), 117.8 (C-2), 79.8 (C-1'), 49.7 (C-5'), 41.6 (C-6'), 24.3 (Me-9'), 23.8 (Me-8') 21.4 (Me-6), 19.0 (Me-7');  $^{13}\text{C}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz)  $\delta$  199.7 (C-4'), 168.3 (C-1), 165.2 (C-2'), 149.4 (C-3), 136.4 (C-5), 128.0 (C-4), 126.1 (C-3'), 118.4 (C-2), 79.2 (C-1'), 49.2 (C-5'), 41.4 (C-6'), 23.2 (Me-9'), 22.1 (Me-8') 19.8 (Me-6), 18.2 (Me-7'). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the abscisic acid was consistent with those reported in the literature.<sup>11)</sup>

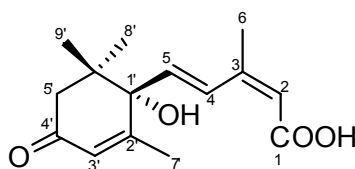


그림 44. Compound **14**의 구조





### (16) Identification of compound 16 (kaempferol 3-gentiobioside)

- $^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.02 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.16 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.36 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1''), 4.06 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1'''), 3.86 (1H, brd,  $J = 11.2$  Hz, H-6''), 3.52 (1H, brd,  $J = 11.9, 2.1$  Hz, H-6'''), 3.45 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.6$  Hz, H-6'');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 175 MHz) data see table 5. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the kaempferol 3-gentiobioside was consistent with those reported in the literature.<sup>13)</sup>

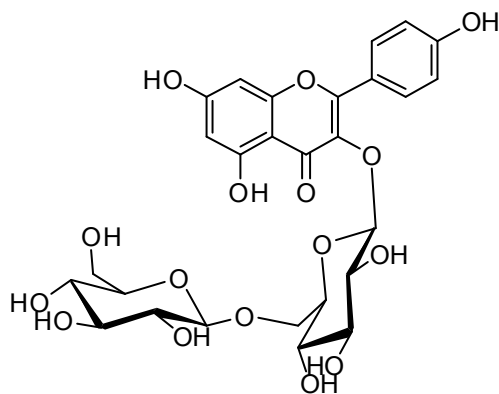


그림 50. Compound 16 구조

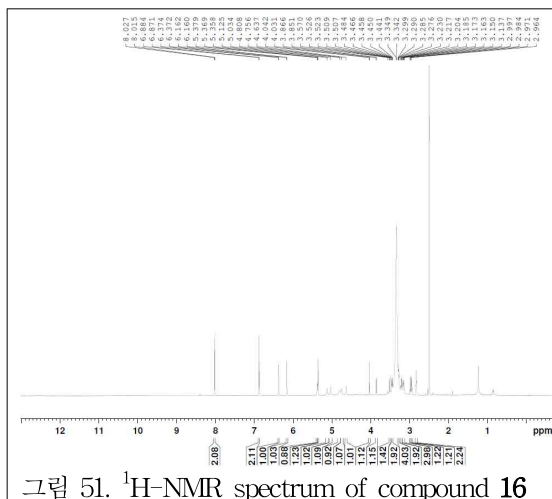


그림 51.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 16

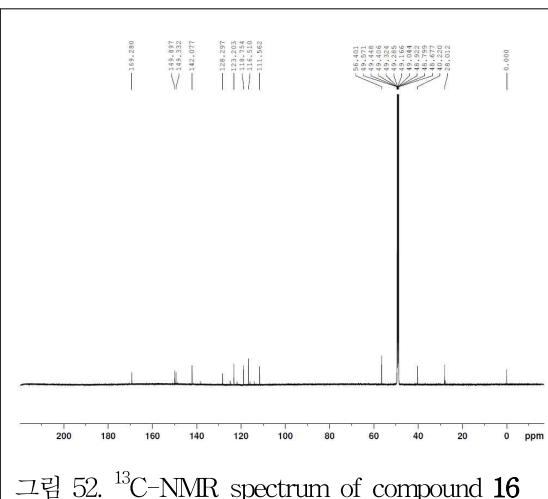


그림 52.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of compound 16

### (17) Identification of compound 17 (astragaloside)

- $^1\text{H-NMR}$  (700 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.93 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2'), 7.50 (1H, dd,  $J = 8.1, 2.1$  Hz, H-6'), 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.40 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 6.17 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.51 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1''), 4.08 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1'''), 3.89 (1H, brd,  $J = 11.2$  Hz, H-6''), 3.84 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.51 (1H, dd,  $J = 11.9, 5.6$  Hz, H-6''), 3.48 (1H, dd,  $J = 11.9, 2.1$  Hz, H-6'''), 3.31 (1H, overlap, H-6''');  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 175 MHz) data see table 5. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the astragaloside was consistent with those reported in the literature.<sup>14)</sup>

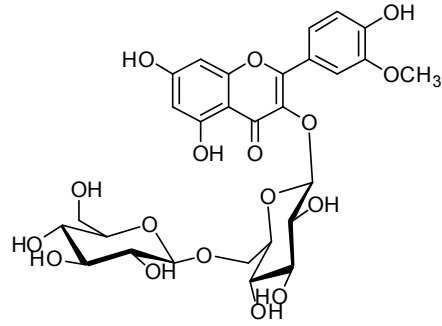


그림 53. Compound 17 구조

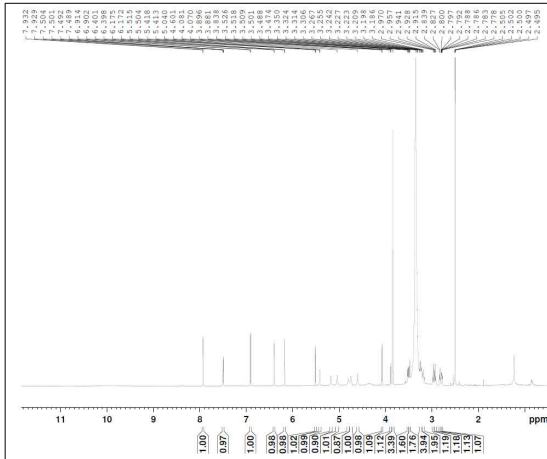


그림 54.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 17

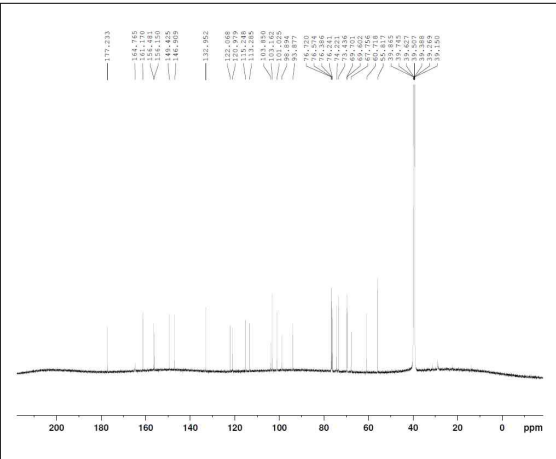


그림 55.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 20

표 5.  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data for compounds 15 ~ 17<sup>a</sup>

position	15	16	17	position	15	16	17
2	156.8 s <sup>b</sup>	156.4 s	156.2 s	Glc-1			
3	133.8 s	133.2 s	133.0 s	1''	101.3 d	101.1 d	101.0 d
4	177.8 s	177.3 s	177.2 s	2''	74.4 d	74.1 d	74.2 d
5	161.7 s	161.2 s	161.2 s	3''	77.0 d	76.6 d	76.6 d
6	99.1 d	98.9 d	98.9 d	4''	70.2 d	69.7 d	69.6 d
7	164.6 s	165.0 s	164.8 s	5''	76.9 d	76.3 d	76.4 d
8	94.0 d	93.9 d	93.9 d	6''	68.5 t	68.0 t	67.8 t
9	156.8 s	156.5 s	156.5 s	Glc-2			
10	104.5 s	103.8 s	103.9 s	1'''	103.6 d	103.2 d	103.2 d
1'	121.6 s	120.9 s	121.0 s	2'''	73.8 d	73.4 d	73.4 d
2'	116.7 d	131.0 d	113.2 d	3'''	77.0 d	76.6 d	76.7 d
3'	145.2 s	115.1 d	146.9 s	4'''	70.1 d	69.7 d	69.7 d
4'	148.9 s	160.0 s	149.4 s	5'''	76.8 d	76.3 d	76.2 d
5'	115.7 d	115.1 d	115.2 d	6'''	61.1 t	60.8 t	60.7 t
6'	122.1 d	131.0 d	122.1 d	OCH <sub>3</sub>			55.8 q

<sup>a</sup> Measured at 700 and 175 MHz ( $\delta$  in ppm); obtained in DMSO-*d*<sub>6</sub> with TMS as an internal standard. The assignments were based on  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, and HMBC experiments. <sup>b</sup>Carbon multiplicity.

**(18) Identification of compound 18 (26-O-β-D-glucopyranosyl-(25R)-furostan-4(5), 20(22)-diene-3,12-dione)**

- <sup>1</sup>H-NMR (Pyridine-*d*<sub>5</sub>, 700 MHz) δ 4.88 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, Glc-1), 4.61 (1H, dd, *J* = 11.9, 2.1 Hz, Glc-6a), 4.43 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.6 Hz, Glc-6b), 3.98 (1H, dd, *J* = 9.8, 7.0 Hz, H-26a), 3.64 (1H, dd, *J* = 9.8, 5.6 Hz, H-26a), 3.43 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-17), 2.52 (1H, t, *J* = 14.0 Hz, H-11), 1.78 (3H, s, CH<sub>3</sub>-21), 1.10 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 1.05 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-27), 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18); <sup>13</sup>C-NMR (Pyridine-*d*<sub>5</sub>, 175 MHz) data see table 6. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the 26-O-β-D-glucopyranosyl-(25R)-furostan-4(5),20(22)-diene-3,12-dione was consistent with those reported in the literature.<sup>15)</sup>

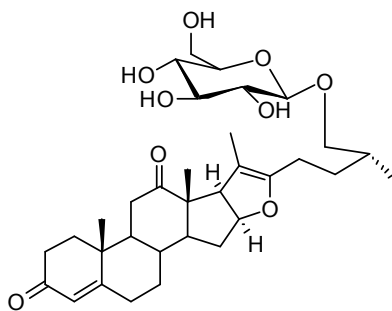


그림 56. Compound 18 구조

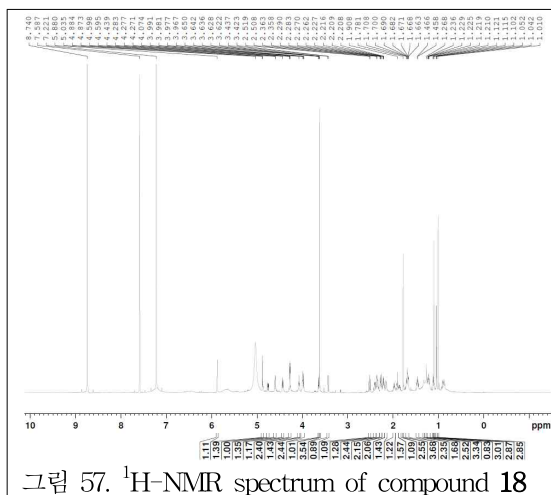


그림 57. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 18

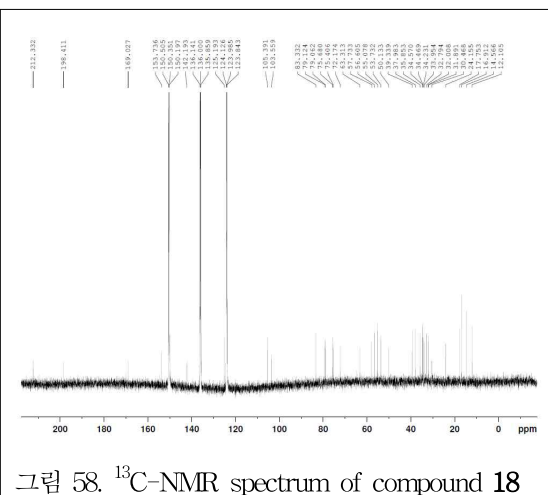


그림 58. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 18

**(19) Identification of compound 19 ((25R)-5α-furost-20(22)-en-12-one-3β,26-diol-26-O-β-D-glucopyranoside)**

- <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz) δ 4.22 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, Glc-1), 3.93 (1H, dd, *J* = 9.1, 6.3 Hz, H-26a), 3.86 (1H, d, *J* = 11.9 Hz, Glc-6a), 3.71 (1H, dd, *J* = 9.1, 7.0 Hz, H-26a), 3.66 (1H, dd, *J* = 11.9, 5.6 Hz, Glc-6b), 3.52 (1H, m, H-3), 3.34 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, Glc-3), 3.28 (1H, t, *J* = 9.1 Hz, Glc-4), 3.25 (1H, m, Glc-5), 3.21 (1H, d, *J* = 10.5 Hz, H-17), 3.18 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, Glc-2), 2.53 (1H, t, *J* = 14.0 Hz, H-11a), 2.19 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.9 Hz, H-11b), 1.57 (3H, s, CH<sub>3</sub>-21), 0.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0.95 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-27), 0.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz) data see table 6. The <sup>1</sup>H

and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the (25*R*)-5 $\alpha$ -furost-20(22)-en-12-one-3 $\beta$ ,26-diol-26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside was consistent with those reported in the literature.<sup>16)</sup>

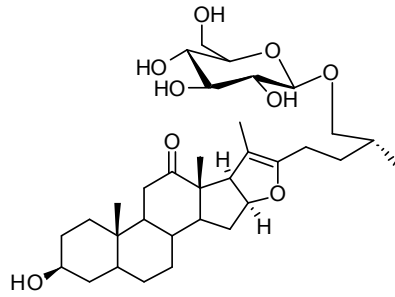


그림 59. Compound 19 구조

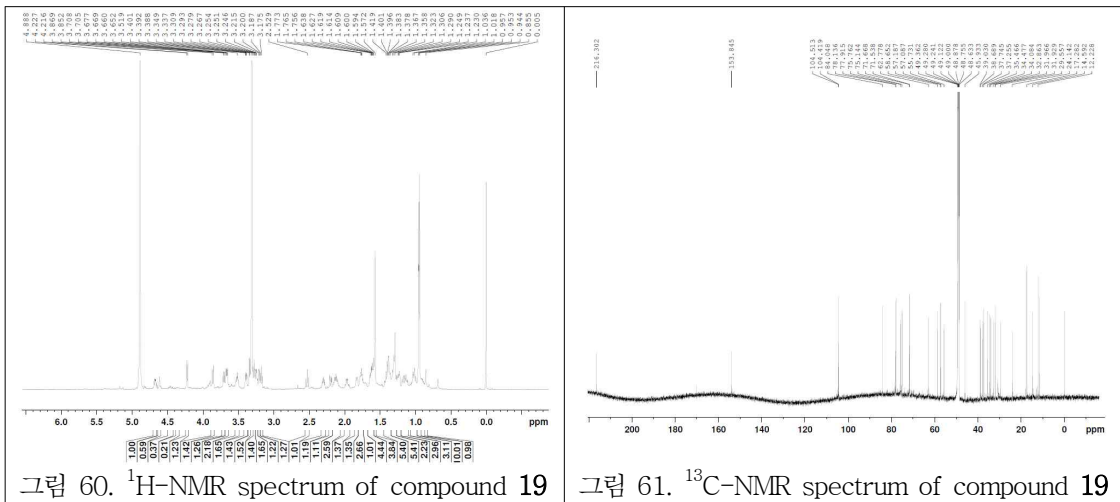
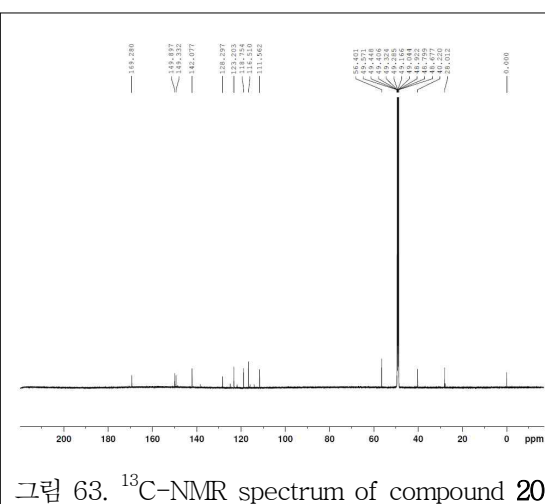
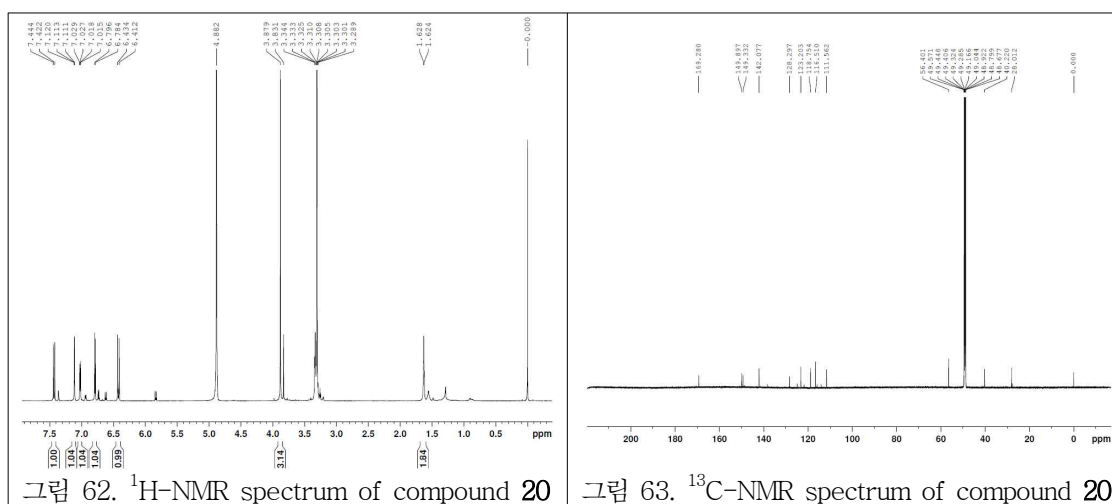


표 6.  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data for compounds **18** and **19**<sup>a</sup>

position	18	19	position	18	19
1	36.3 t <sup>b</sup>	37.7 t	18	14.5 q	14.6 q
2	34.5 t	31.9 t	19	17.0 q	12.2 q
3	201.8 s	71.5 d	20	104.5 s	104.4 s
4	124.9 d	38.7 t	21	11.6 q	11.6 q
5	173.0 s	45.9 d	22	154.0 s	153.8 s
6	33.5 t	29.6 t	23	24.2 t	24.1 t
7	32.5 t	32.9 t	24	32.0 t	32.0 t
8	35.3 d	35.5 d	25	34.1 d	34.1 d
9	56.2 d	57.2 d	26	75.8 t	75.8 t
10	40.2 s	37.3 s	27	17.3 q	17.3 q
11	38.3 t	39.0 t	Glc-1	104.5 d	104.5 d
12	214.8 s	216.3 s	Glc-2	75.1 d	75.1 d
13	58.3 s	58.7 s	Glc-3	78.1 d	78.1 d
14	54.6 d	55.7 d	Glc-4	71.7 d	71.7 d
15	34.5 t	34.5 t	Glc-5	77.9 d	77.9 d
16	84.0 d	84.1 d	Glc-6	62.8 t	62.5 t
17	57.1 d	57.1 d			

<sup>a</sup>Measured at 700 and 175 MHz ( $\delta$  in ppm); obtained in CD<sub>3</sub>OD with TMS as an internal standard. The assignments were based on  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC, and HMBC experiments. <sup>b</sup>Carbon multiplicity.



(20) Identification of compound **20** (terrestribisamide)

- Pale yellow powder;  $^1\text{H}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz)  $\delta$  7.43 (2H, d,  $J$  = 15.4 Hz, H-7', 7''), 7.11 (2H,  $J$  = 2.1 Hz, H-2', 2''), 6.79 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5', 5''), 7.02 (2H, dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, H-6', 6''), 6.42 (2H, d,  $J$  = 15.4 Hz, H-8', 8''), 3.88 (6H, s, 2  $\times$  OCH<sub>3</sub>), 3.33 (4H, m, H-1, 4), 1.63 (4H, m, H-2, 3);  $^{13}\text{C}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz)  $\delta$  169.3 (C-9', 9), 149.9 (C-3', 3), 149.3 (C-4', 4''), 142.1 (C-7', 7''), 128.6 (C-1', 1''), 123.2 (C-6', 6''), 118.8 (C-8', 8''), 116.5 (C-5', 5''), 111.6 (C-2', 2''), 56.4 (OCH<sub>3</sub>), 40.2 (C-1, 4), 28.0 (C-2, 3); ESIMS (positive mode)  $m/z$  441 [M + H]<sup>+</sup>, 463 [M

+ Na)<sup>+</sup>, (negative mode)  $m/z$  439 [M - H]<sup>-</sup>. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the terretribisamide was consistent with those reported in the literature.<sup>17)</sup>

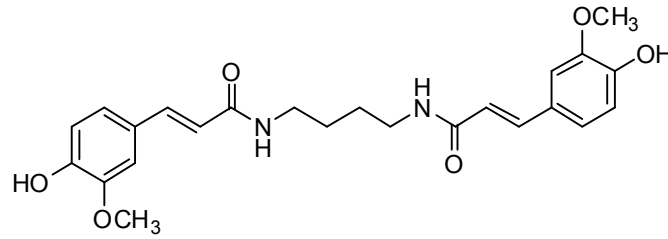


그림 64. Compound 20 구조

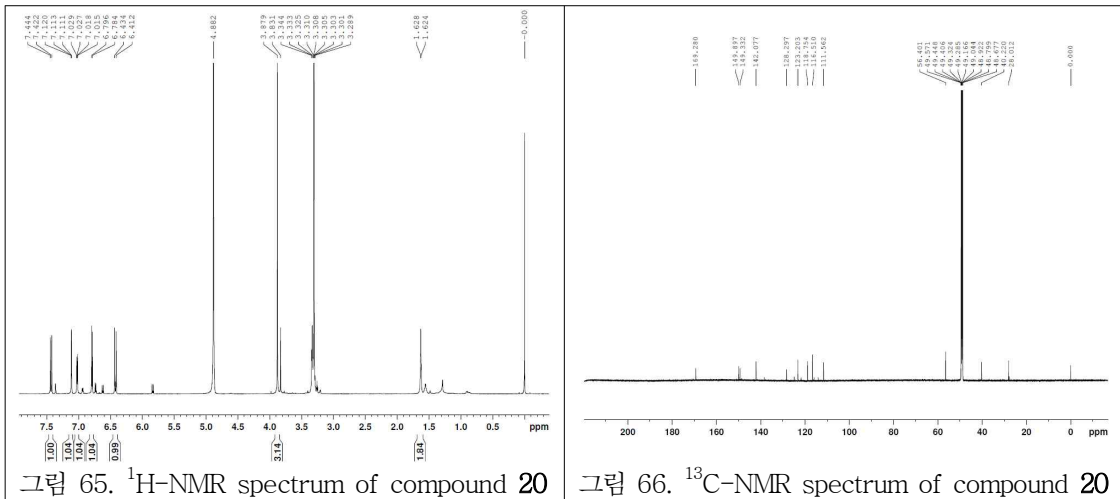


그림 65. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 20

그림 66. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 20

### (21) Identification of compound 21 (dihydrobenzoic acid)

- <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 700 MHz) δ 7.43 (1H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-2), 7.42 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 2.1 Hz, H-6), 7.11 (2H, d,  $J$  = 2.1 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 175 MHz) δ 170.3 (C-9), 151.6 (C-4), 146.1 (C-3), 123.9 (C-6), 123.1 (C-1), 117.7 (C-5), 115.8 (C-2). The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and MS of the dihydrobenzoic acid was consistent with those reported in the literature.<sup>18)</sup>

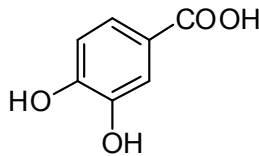
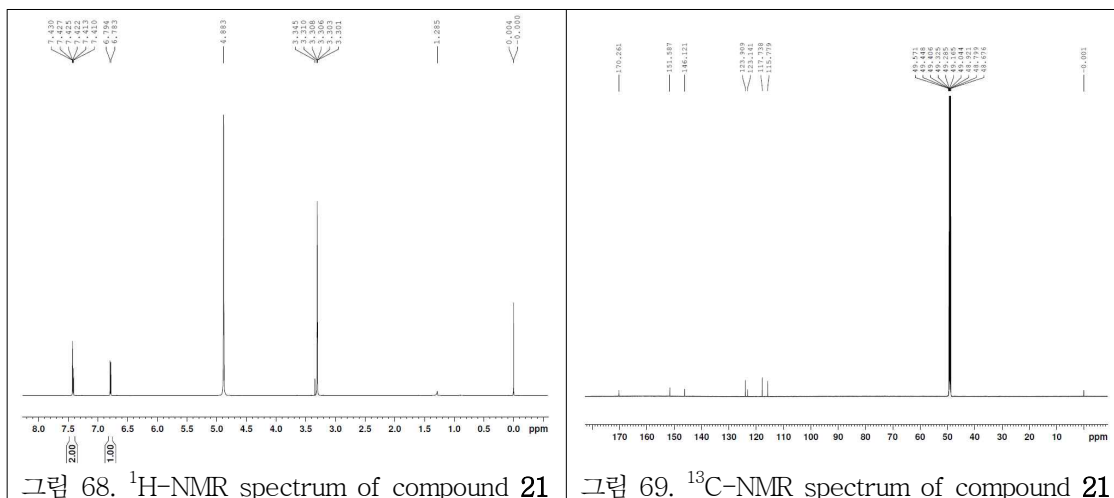


그림 67. Compound 21 구조



## (22) Identification of compound **22** (caffeic acid)

- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 700 MHz)  $\delta$  7.53 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-7), 7.03 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-2), 6.93 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6), 6.77 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.21 (1H, d,  $J = 16.1$  Hz, H-8);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 175 MHz)  $\delta$  171.1 (C-9), 149.5 (C-4), 147.1 (C-7), 146.9 (C-3), 127.8 (C-1), 122.9 (C-6), 116.5 (C-5), 115.5 (C-8), 115.1 (C-2). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the caffeic acid was consistent with those reported in the literature.<sup>19,20)</sup>

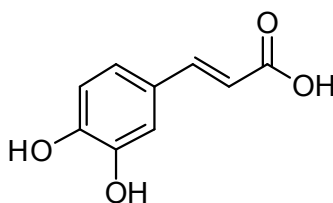
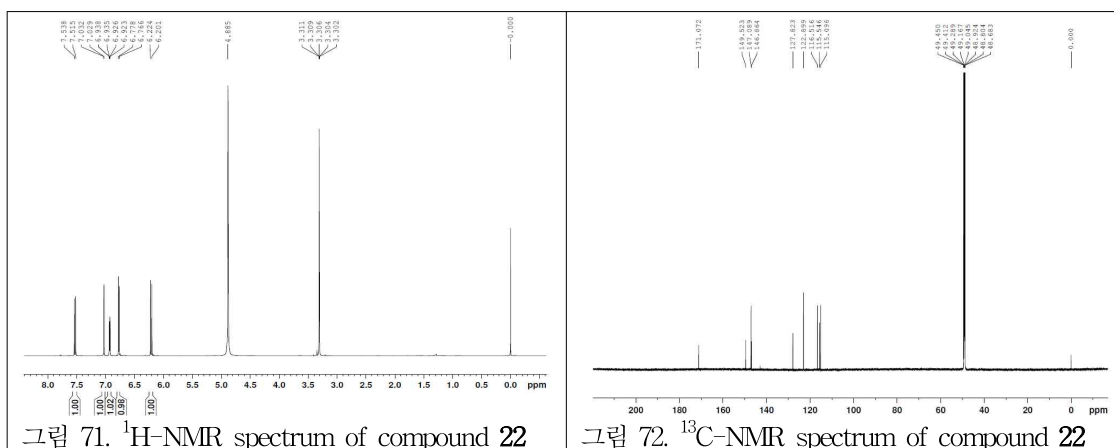


그림 70. Compound **22** 구조



## (23) Identification of compound **23** ( $\gamma$ -tocopherol)

- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 700 MHz)  $\delta$  6.35 (1H, s, H-5), 2.65 (2H, dd,  $J = 14.7, 7.0$  Hz, H-4),

2.11 (3H, s, H-7a), 2.09 (3H, s, H-8a), 1.23 (3H, s, H-2a), 0.84 (6H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-4' a, 8' a), 0.83 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-13' ), 0.82 (3H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-12' a);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 175 MHz)  $\delta$  146.4 (C-6), 145.9 (C-9), 126.0 (C-8), 121.8 (C-7), 112.3 (C-5), 118.5 (C-10), 75.7 (C-2), 40.2 (C-1' ), 39.6 (C-11'), 37.7 (C-7' ), 37.6 (C-3' , 5' ), 37.5 (C-9' ), 33.0 (C-4' ), 32.9 (C-8' ), 31.6 (C-3), 28.2 (C-12' ), 25.0 (C-6' ), 24.7 (C-10' ), 24.3 (C-2a), 23.0 (C-12' a), 22.9 (C-13' ), 22.5 (C-4), 21.2 (C-2' ), 20.0 (C-4' a), 19.9 (C-8' a), 12.1 (C-7a), 12.0 (C-8a). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, and MS of the  $\gamma$ -tocopherol was consistent with those reported in the literature.<sup>21)</sup>

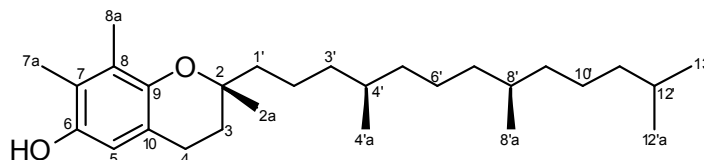


그림 73. Compound 23 구조

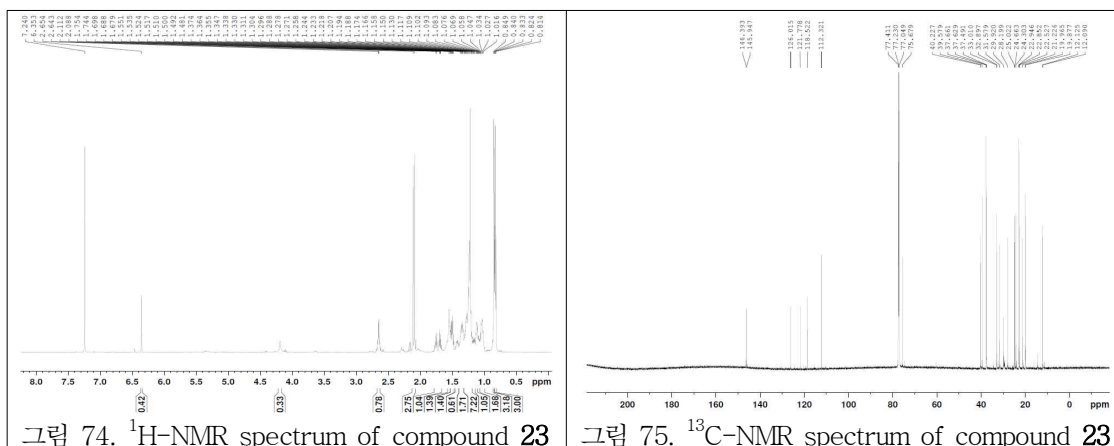


그림 74.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound 23

그림 75.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound 23



(24) 질려자로부터 분리 정제된 화합물 구조

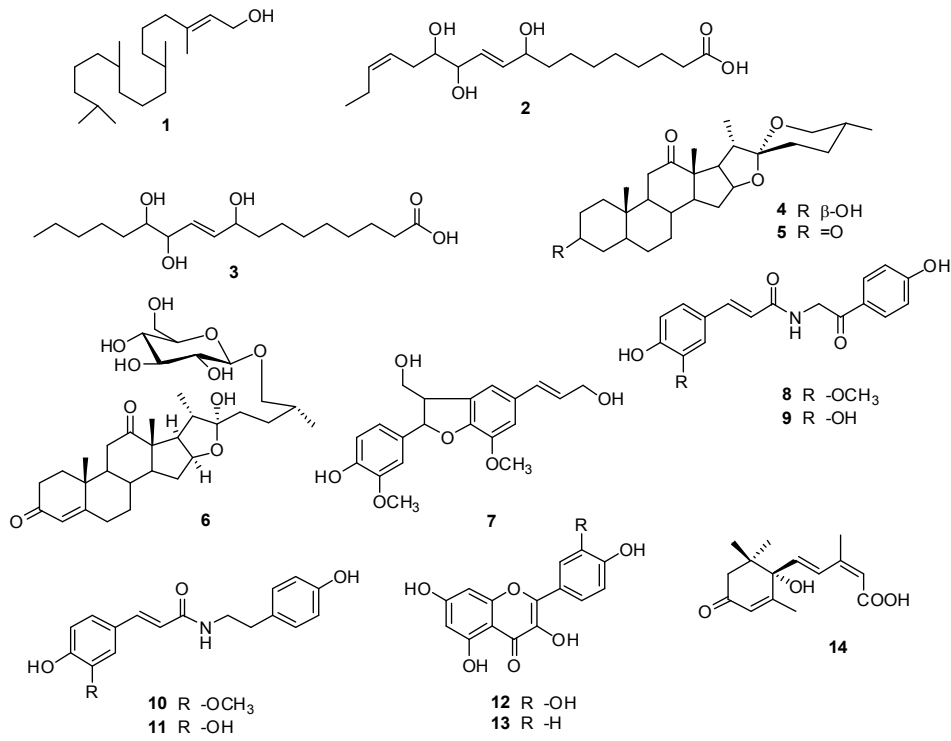


그림 76. 화합물 1-14의 구조

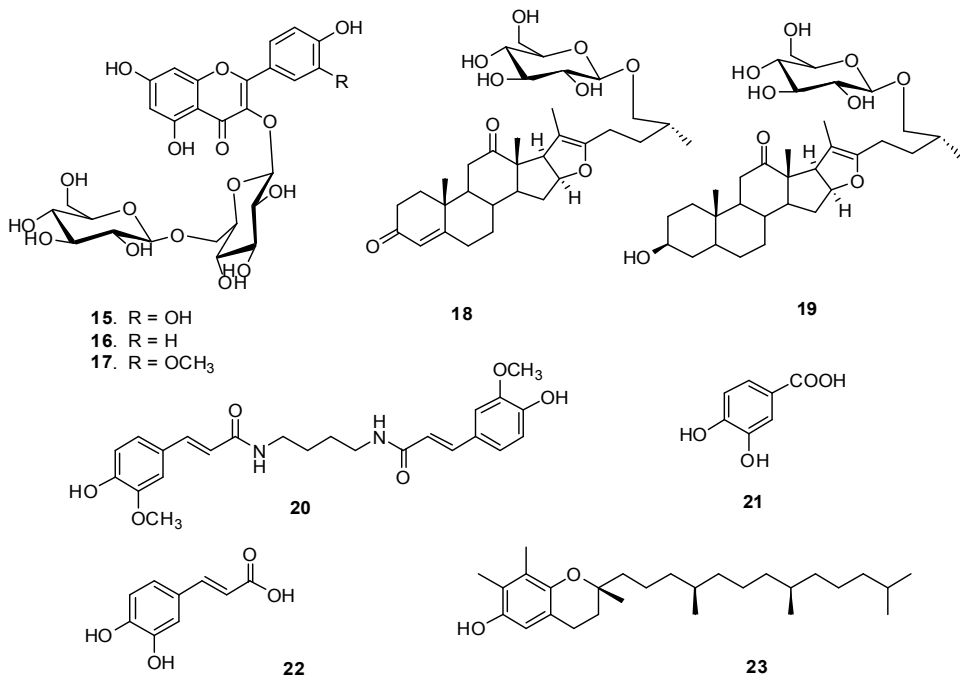


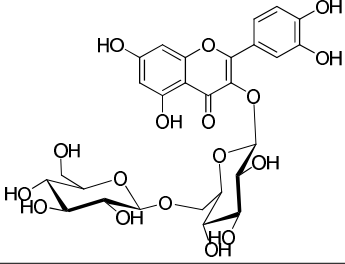
그림 77. 화합물 15-23의 구조

## 제 2 절 질러자 추출물의 원료표준화 및 pilot scale 추출공정 연구

### 1. 지표물질 설정

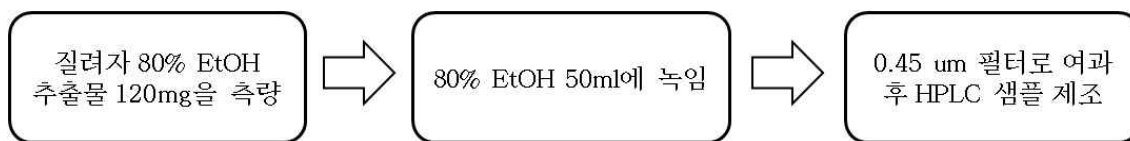
- 표준품 확보를 위하여 질러자의 항염증 활성을 나타내는 유효성분 및 지표물질들의 HPLC 등 분석기기를 이용한 최적 분리 및 분석 조건을 확립함.
- 1차로 설정한 지표성분인 alkaloid계열 terrestriamide는 특이성이 좋으나 함량이 너무 적어 추출물에서는 검출하기가 어려우며 지표성분 구매의 용이성이 다소 부족하여 2차로 질러자 추출물에서도 검출이 용이하고 HPLC 분리능이 양호한 quercetin-3-gentiobioside로 지표물질을 변경하여 진행함.

### 가. 표준품(지표성분) 정보

시판되는 표준품	표준품명	Quercetin-3-gentiobioside
	제조·판매회사명	Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.
	구조식	
	분자식	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>
	CAS No.	7431-83-6

### 나. HPLC 분석법 확립

#### (1) 시료 전처리 방법



#### (2) HPLC 분석조건

- HPLC system: Agilent 1100-DAD
- Column: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 250 mm, 5µm)
- Mobile phase: (A) Distilled water (0.05% TFA), (B) Acetonitrile
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

표 7. Solvent gradient system 설정

- Flow rate: 1 mL/min
- Injection volume : 10 $\mu$ L
- Detection : 254 nm
- Column oven : 40 $^{\circ}$ C

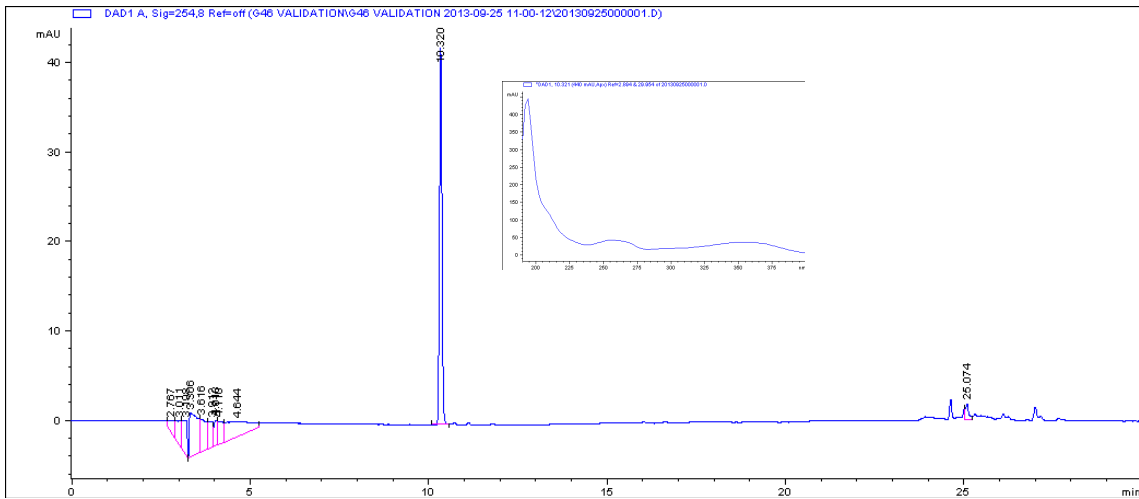


그림 78. 지표성분 (quercetin-3-gentiobioside, 10.3분)의 HPLC chromatogram과 UV spectrum

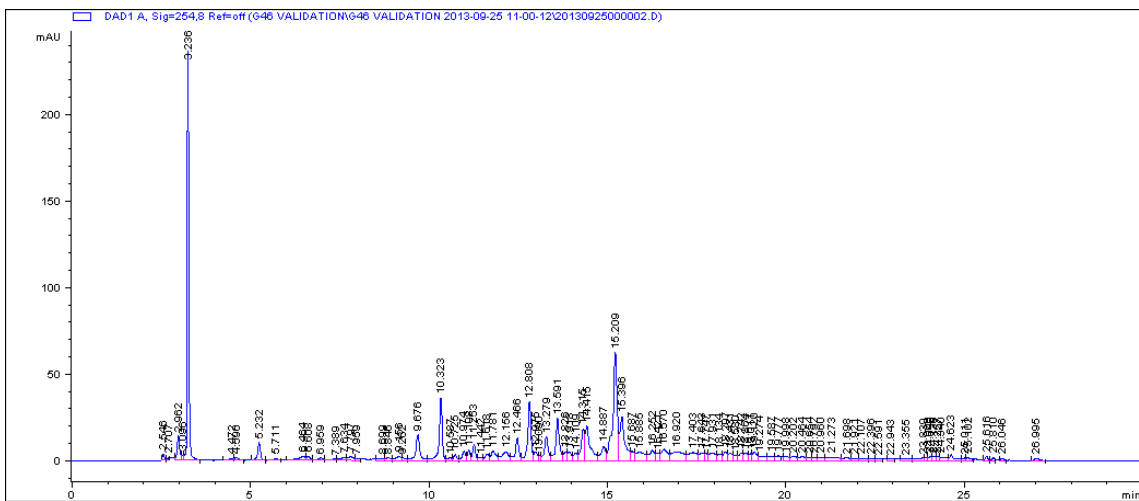


그림 79. 질려자 추출물의 HPLC chromatogram

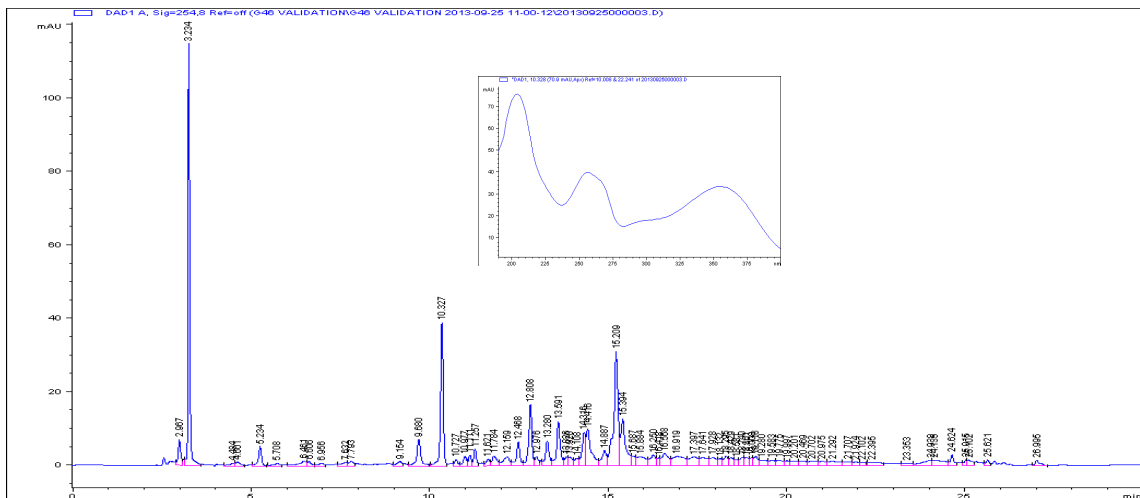


그림 80. 지표성분 (quercetin-3-gentiobioside, 10.3분) & 질려자 추출물의 HPLC chromatogram  
과 UV spectrum

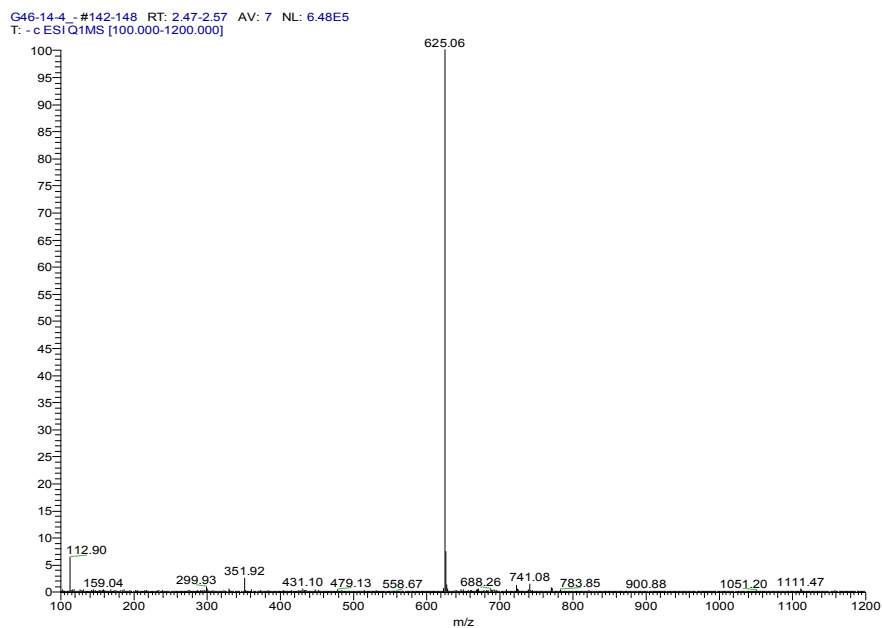


그림 81. 지표성분 화합물 8의 ESI-MS spectrum

## 2. 원료 규격 표준화 및 원료 validation

- 질려자 추출물의 기준 및 시험방법에 대한 벨리데이션 Test 시험결과

### 가. 목적

- 질려자 추출물의 기준 및 시험방법을 자사에서 확립하고 이에 대한 시험법을 검증하고자 본 벨리데이션 시험을 실시하였음.

### 나. 재료

- 질려자 추출물, quercetin-3-gentiobioside 표준품

표 8. Quercetin-3-gentiobioside 표준품 정보

	성분명	회사	순도 (%)
주성분 표준품	Quercetin-3-gentiobioside	Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.	98.75

**다. 밸리데이션 시험방법 및 시험결과**

**(1). 밸리데이션 시험항목대상물질**

- 질려자 추출물의 주성분인 quercetin-3-gentiobioside 함량

**(2) 밸리데이션 시험항목**

- 기준 및 시험항목에 기재된 시험법 중 함량시험에 대한 직선성, 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성에 대한 시험을 시험하였음.

**(3) 시험방법**

(가) 시험방법 및 분석기기조건

- 함량시험에 대한 시료전처리조건 및 분석기기 조건은 자사에서 설정한 기준 및 시험방법에 기술한 조건으로 시험하였음.

표 9. 시료전처리조건 및 분석기기조건

컬럼	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 250mm, 5 $\mu$ m)
이동상	A : 0.05% TFA in H <sub>2</sub> O B : 아세토니트릴
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 : 254nm)
유속	1.0 mL/min
주입량	10 $\mu$ l
사용한 HPLC System	Agilent 1100-DAD

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

**라. 밸리데이션 시험방법 및 결과**

**(1) 특이성 시험**

(가) 시험 방법

① Blank의 확인

- 80% EtOH이 본 함량시험법에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위하여 함량시험법의

기기조건에 따라 시험하여 얻어진 피크의 유지시간이 Quercetin-3-gentiobioside의 피크와 겹치지 않음을 확인함.

② Quercetin-3-gentiobioside 표준액의 조제

- Quercetin-3-gentiobioside 표준품 5mg를 정밀히 달아 80% EtOH로 녹여 정확히 50mL로 한다. 이 액을 quercetin-3-gentiobioside 표준원액(100 $\mu$ g/ml)이라 한다. 표준원액 5mL을 80% EtOH로 50mL로 한다. 이 액을 quercetin-3-gentiobioside 표준액 (10 $\mu$ g/ml)이라 함.

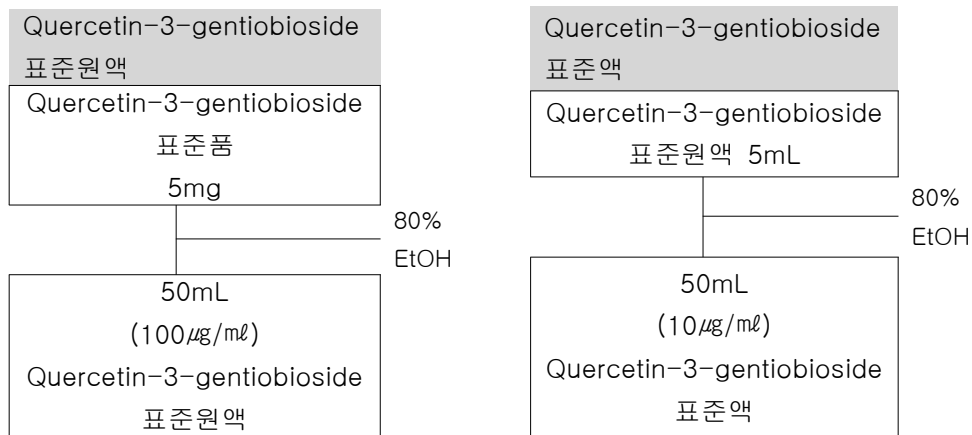


그림 82. Quercetin-3-gentiobioside 표준액의 조제 방법

③ 질려자 추출물 : 검액의 조제

- 질려자 추출물 약 120mg을 정밀하게 취하여 물 10mL를 넣고 EtOH로 정확히 50mL로 한다. 이 액을 가지고 함량기시험의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.

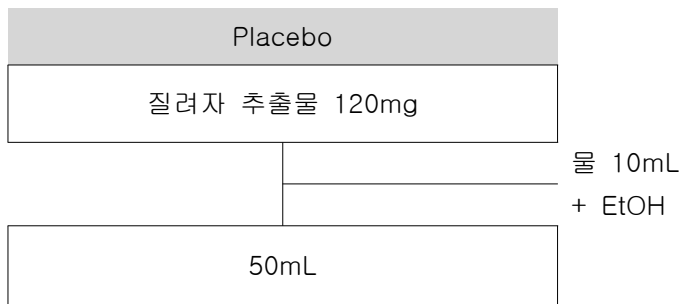


그림 83. 질려자 추출물 검액 조제 방법

④ Quercetin-3-gentiobioside 표준액과 질려자 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

- 위에서 제조한 quercetin-3-gentiobioside 표준원액 5mL과 질려자 추출물 120mg을 취하여 물 20mL를 넣고 EtOH로 정확히 100mL로 한다. 이 액을 가지고 함량시험법의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.

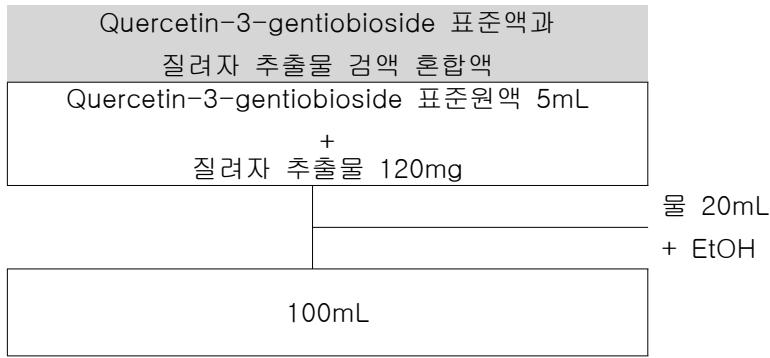


그림 84. Quercetin-3-gentiobioside 표준액과 질려자 추출물 검액 혼합물 조제 방법

(나) 시험 결과

표 10. Quercetin-3-gentiobioside 표준액과 질려자 추출물 검액 혼합물에서의 회수율

특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (80% EtOH)	-	-	-
Quercetin-3-gentiobioside 표준액	10.320	199.92036	-
질려자 추출물	10.323	191.67444	0.42
Quercetin-3-gentiobioside 표준액 + 질려자 추출물	10.327	194.25453	99.78

표 11. Quercetin-3-gentiobioside 피크유지시간

원료명	피크유지시간 (분)
Quercetin-3-gentiobioside	10.320

- 위의 결과표에서 보듯이 (a) quercetin-3-gentiobioside은 완전히 분리되며 (b) Blank 에서는 quercetin-3-gentiobioside과 겹치는 피크가 없었으며 (c) quercetin-3-gentiobioside 표준액 + 질려자 추출물 시험결과 그의 회수율은 99.78%로서 양호한 결과를 얻었다. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 제품에서 quercetin-3-gentiobioside을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있음.

(2) 직선성 시험(STD)

(가) 질려자 추출물 중 Quercetin-3-gentiobioside 함량시험

㉠ Quercetin-3-gentiobioside 표준품을 가지고 함량시험농도(10 $\mu$ g/mL)의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.

㉡ 직선성 시험용액의 조제

- Quercetin-3-gentiobioside 표준품 약 5mg을 정확히 취하여 80% EtOH을 넣어 50mL로 하고 (100 $\mu$ g/mL), 이를 각각 2.0mL, 3.5mL, 5.0mL, 6.5mL, 8.0mL를 정확히 취한 다음 여기에 80% EtOH을 넣어 정확히 50mL로 한다. 이는 각각 함량시험에서 기준농도의 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 농도임.

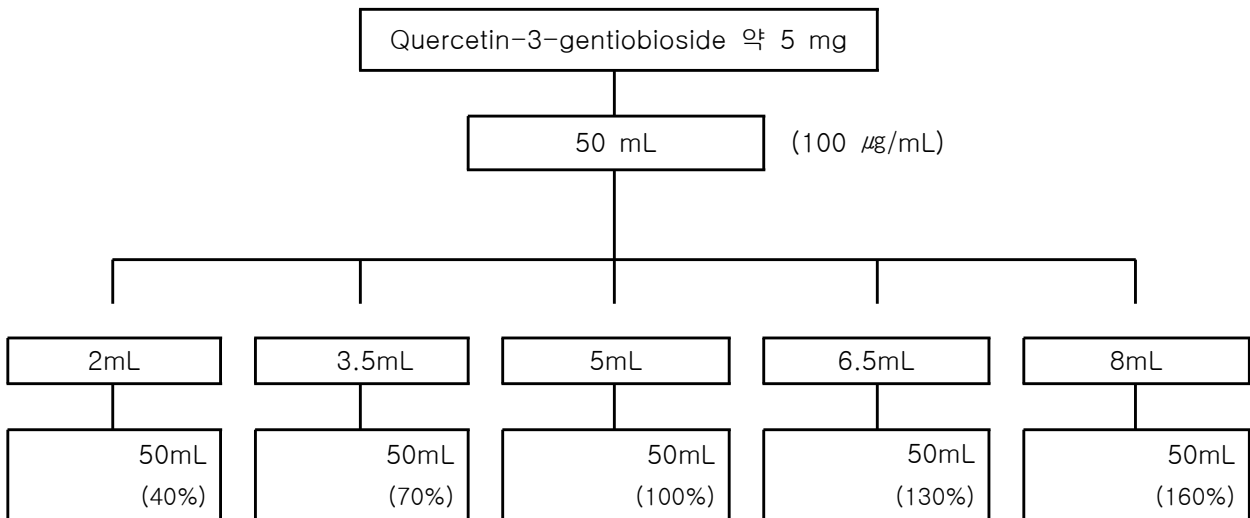


그림 85. 직선성 시험용액의 조제방법

☞ 각 표준품의 실제 취한 양 (표준품의 순도 : 98.75%)

Group 1

Quercetin-3-gentiobioside : 5.3 mg × 순도 98.75 % = 5.23375 mg

Group 2

Quercetin-3-gentiobioside : 5.1 mg × 순도 98.75% = 5.03625 mg

Group 3

Quercetin-3-gentiobioside : 5.0 mg × 순도 98.75 % = 4.9375 mg



㉔ 직선성시험 결과

① Group 1의 직선성시험결과

(a) 피크면적 및 검량선식

표 12. Group 1 피크면적

Group 1	Quercetin-3-gentiobioside		
	mL	농도( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	4.19	78.88810
Cal 1 - 2	3.5	7.33	139.62445
Cal 1 - 3	5.0	10.47	198.95329
Cal 1 - 4	6.5	13.61	258.87326
Cal 1 - 5	8.0	16.75	320.50574
기울기	19.18586		
y 절편	-1.45906		
$R^2$	0.99996		

검량선식

Group 1  $y = 19.18586 x - 1.45906$  ( $R^2 = 0.99996$ )

(b) 검량선 그래프

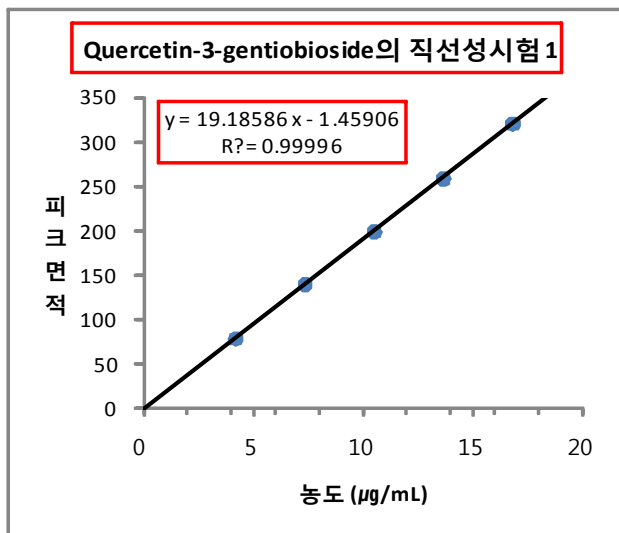


그림 86. Group 1 검량선 그래프

(c) Quercetin-3-gentiobioside을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

② Group 2의 직선성시험결과

(a) 피크면적 및 검량선식

표 13. Group 2 피크면적

Group 2	Quercetin-3-gentiobioside		
	mL	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	4.03	80.72450
Cal 1 - 2	3.5	7.05	141.71280
Cal 1 - 3	5.0	10.07	202.58253
Cal 1 - 4	6.5	13.09	262.31268
Cal 1 - 5	8.0	16.12	320.85303
기울기	19.88440		
y 절편	1.35146		
$R^2$	0.99992		

검량선식

$$\text{Group 2 } y = 19.88440 x + 1.35146 \quad (R^2 = 0.99992)$$

(b) 검량선 그래프

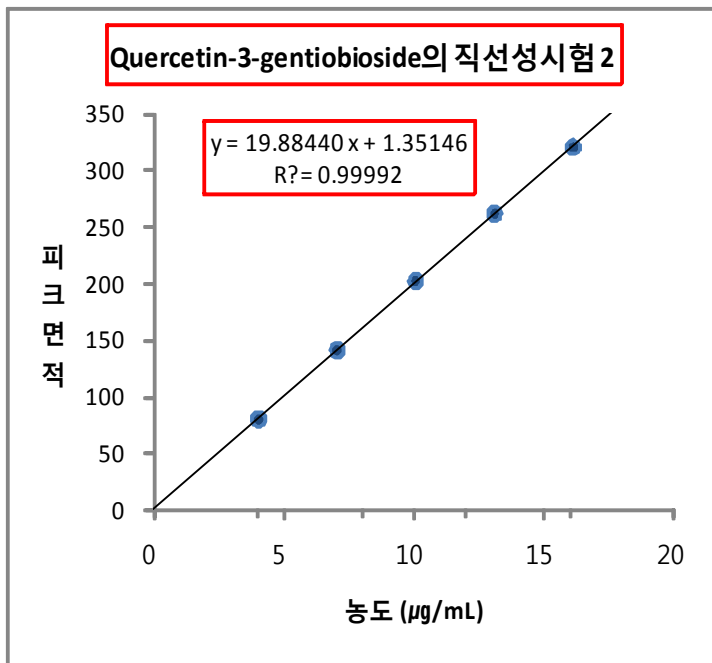


그림 87. Group 2 검량선 그래프

(c) Quercetin-3-gentiobioside을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

③ Group 3의 직선성시험결과

(a) 피크면적 및 검량선식

표 14. Group 3 피크면적

Group 3	Quercetin-3-gentiobioside		
	mL	농도 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	3.95	78.74083
Cal 1 - 2	3.5	6.91	139.79024
Cal 1 - 3	5.0	9.88	197.82932
Cal 1 - 4	6.5	12.84	261.25562
Cal 1 - 5	8.0	15.80	318.82785
기울기	20.30850		
y 절편	-1.25770		
$R^2$	0.99982		

검량선식

Group 3  $y = 20.30850 x - 1.25770$  ( $R^2 = 0.99982$ )

(b) 검량선 그래프

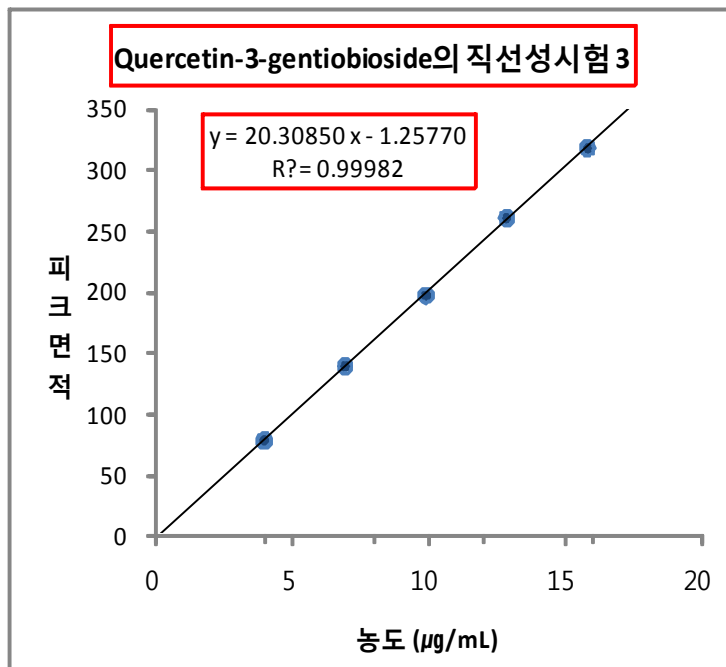


그림 88. Group 3 검량선 그래프

(c) Quercetin-3-gentiobioside을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

(나) Quercetin-3-gentiobioside의 직선성시험 종합결과

표 15. Quercetin-3-gentiobioside의 직선성시험 종합결과

직선성시험 종합결과	Quercetin-3-gentiobioside		
	기울기	y 절편	R <sup>2</sup>
직선성시험 1	19.18586	-1.45906	0.99996
직선성시험 2	19.88440	1.35146	0.99992
직선성시험 3	20.30850	-1.25770	0.99982
평균	19.79292	-0.45510	0.99990
표준편차	0.566883	1.56776	0.00007
종합 검량선	$y = 19.79292 x - 0.45510$ (R <sup>2</sup> = 0.99990)		

(3) 직선성 시험(SA)

(가) 질려자 추출물 중 Quercetin-3-gentiobioside 함량시험

㉠ 질려자 추출물을 가지고 함량시험농도의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.

㉡ 직선성 시험용액의 조제

- 질려자 추출물을 각각 약 45.2mg, 79.1mg, 113mg, 146.9mg, 180.8mg를 정확히 취한 다음 메탄올에 녹여 50mL로 한다. 이는 각각 함량시험에서 기준농도의 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 농도임.

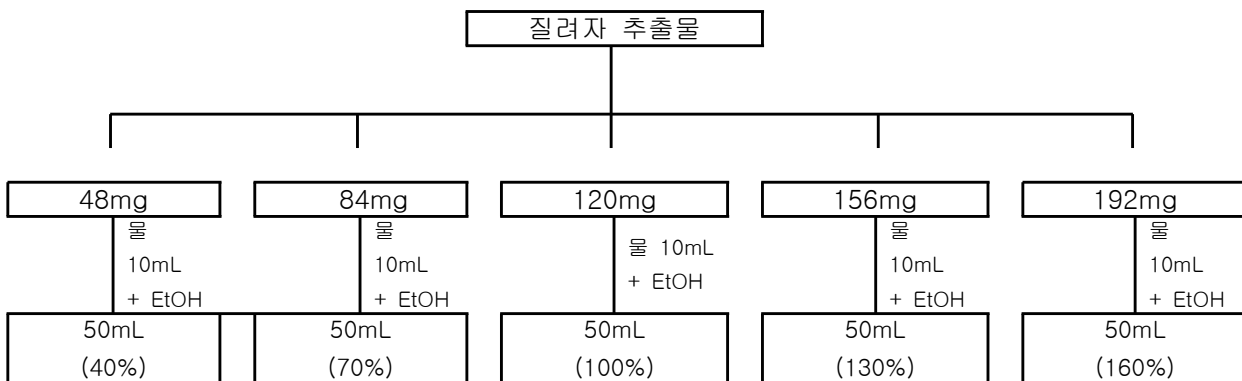


그림 89. 직선성 시험용액의 조제 방법

☞ 각 질려자 추출물의 실제 취한 양

Group 1

질려자 추출물 : 48.4mg, 89.7mg, 120.5mg, 155.8mg, 191.6mg

Group 2

질려자 추출물 : 47.7mg, 83.7mg, 123.3mg, 156.1mg, 191.9mg

Group 3

질려자 추출물 : 48.7mg, 84.0mg, 120.0mg, 155.7mg, 191.6mg

© 직선성시험 결과

① Group 1의 직선성시험결과

(a) 피크면적 및 검량선식

표 16. Group 1 피크면적

Group 1	질려자 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	48.4	76.83575
Cal 1 - 2	89.7	144.56123
Cal 1 - 3	120.5	192.56790
Cal 1 - 4	155.8	251.76334
Cal 1 - 5	191.6	312.88757
기울기	1.64361	
y 절편	-3.48210	
R <sup>2</sup>	0.99977	

검량선식

Group 1  $y = 1.64361 x - 3.48210$  ( $R^2 = 0.99977$ )

(b) 검량선 그래프

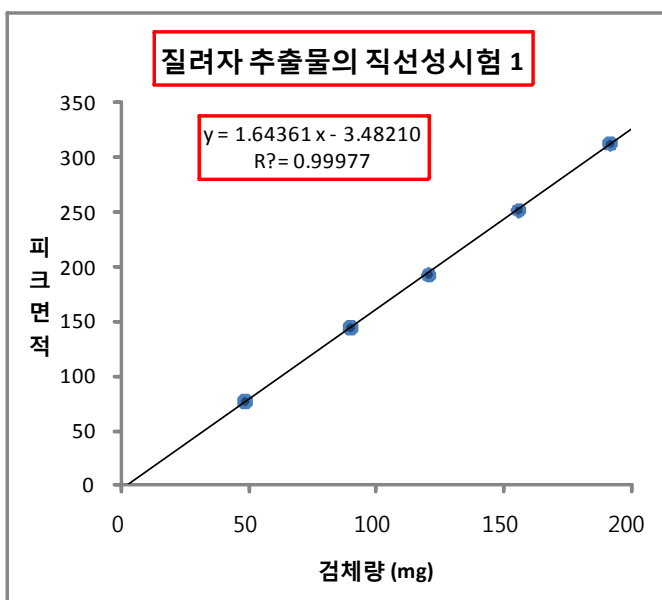


그림 90. Group 1 검량선 그래프

(c) 질려자 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

② Group 2의 직선성시험결과

(a) 피크면적 및 검량선식

표 17. Group 2 피크면적

Group 2	질려자 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	47.7	74.00692
Cal 1 - 2	83.7	135.83594
Cal 1 - 3	123.3	200.34517
Cal 1 - 4	156.1	253.21970
Cal 1 - 5	191.9	307.87186
기울기	1.62217	
y 절편	-1.27986	
$R^2$	0.99956	

검량선식

Group 2  $y = 1.62217 x - 1.27986$  ( $R^2 = 0.99956$ )

(b) 검량선 그래프

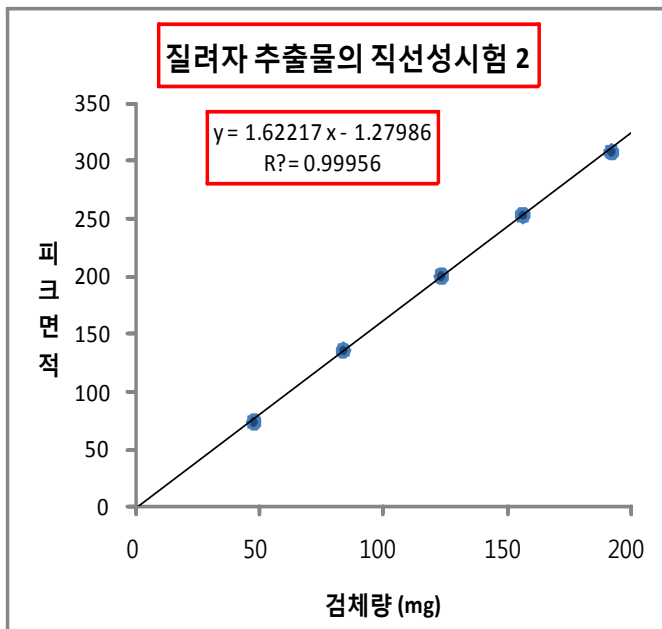


그림 91. Group 2 검량선 그래

(c) 질려자 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

③ Group 3의 직선성시험결과

(a) 피크면적 및 검량선식

표 18. Group 3 피크면적

Group 3	질려자 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	48.7	76.68736
Cal 1 - 2	84.0	133.86974
Cal 1 - 3	120.0	193.40959
Cal 1 - 4	155.7	250.50827
Cal 1 - 5	191.6	311.04849
기울기	1.63739	
y 절편	-3.38250	
R <sup>2</sup>	0.99994	

검량선식

Group 3  $y = 1.63739 x - 3.38250$  ( $R^2 = 0.99994$ )

(b) 검량선 그래프

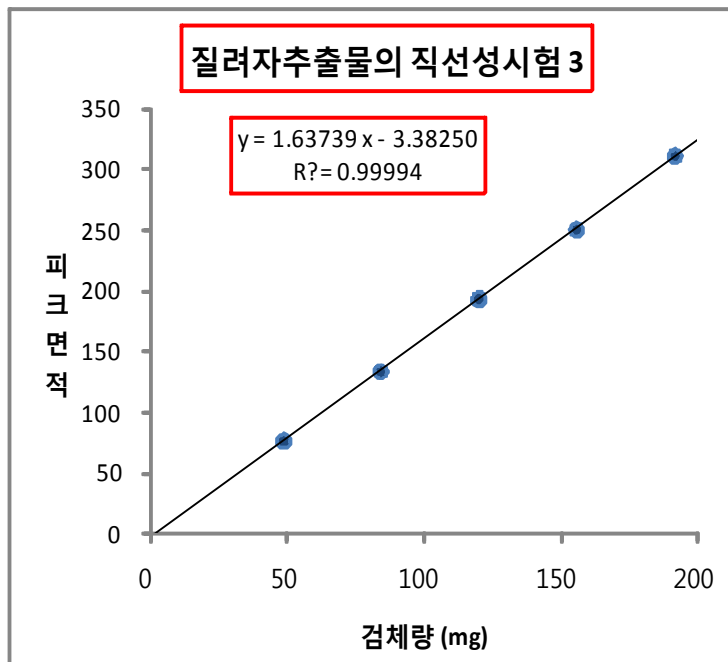


그림 92. Group 3 검량선 그래프

(c) 질려자 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱( $R^2$ )은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

(나) 질려자 추출물의 직선성시험 종합결과

표 19. 질려자 추출물의 직선성시험 종합결과

직선성시험 종합결과	질려자 추출물		
	기울기	y 절편	R <sup>2</sup>
직선성시험 1	1.64361	-3.48210	0.99977
직선성시험 2	1.62217	-1.27986	0.99956
직선성시험 3	1.63739	-3.38250	0.99994
평균	1.63439	-2.71482	0.99976
표준편차	0.011033	1.24371	0.00019
종합 검량선	$y = 1.63439 x - 2.71482 (R^2 = 0.99976)$		

(4) 정확성 및 정밀성 시험

(가) 질려자 추출물 중 quercetin-3-gentiobioside

㉠ Quercetin-3-gentiobioside 표준품을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인하였다. 또한 이 시험에서 얻은 피크면적을 위의 직선성시험 결과에서 얻은 회귀방정식에 대입하여 실제의 농도를 계산하였으며 이를 이론농도에 대한 회수율을 구하여 위에서 얻은 회귀방정식의 정확성을 확인하였음.

㉡ 정확성 및 정밀성 시험용액 조제

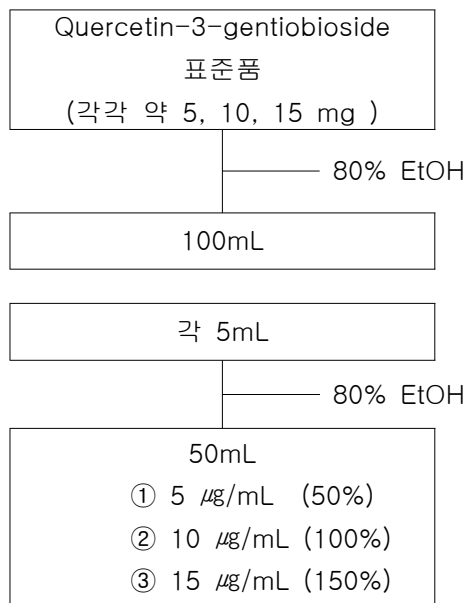


그림 93. 정확성 및 정밀성 시험용액 조제 방법



㉔ 시험결과에 대한 평가방법

- 위의 시험방법의 “2) 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액”을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

㉕ 정확, 정밀성시험 결과

- (a) 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 quercetin-3-gentiobioside의 정확성과 회수율 (%)

표 20. Quercetin-3-gentiobioside의 정확성(50%) 과 회수율 (%)

	Quercetin-3-gentiobioside				
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)
정확성 - 1 (50%)	5.0	4.94	98.33305	4.9911	101.09
			97.45768	4.9469	100.19
			97.75002	4.9616	100.49
			96.77678	4.9125	99.49
			97.34544	4.9412	100.07
			97.67086	4.9576	100.41
					평균
				표준편차	0.52
				RSD (%)	0.52

표 21. Quercetin-3-gentiobioside의 정확성(100%) 과 회수율 (%)

	Quercetin-3-gentiobioside				
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)
정확성 - 2 (100%)	10.0	9.88	198.32445	10.0430	101.70
			198.98734	10.0765	102.04
			198.95872	10.0750	102.03
			196.04138	9.9276	100.53
			196.20509	9.9359	100.62
			196.83618	9.9678	100.94
					평균
				표준편차	0.70
				RSD (%)	0.69

표 22. Quercetin-3-gentiobioside의 정확성(150%) 과 회수율 (%)

	Quercetin-3-gentiobioside				
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)
정확성 - 3 (150%)	15.0	14.81	298.91342	15.1250	102.11
			297.91849	15.0748	101.77
			297.06818	15.0318	101.48
			297.13324	15.0351	101.50
			295.63928	14.9596	100.99
			293.78702	14.8660	100.36
					평균
				표준편차	0.62
				RSD (%)	0.61

- 위의 결과를 종합해 보면 quercetin-3-gentiobioside의 회수율이 95.0 ~ 105.0 % 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

(b) Quercetin-3-gentiobioside의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

표 23. Quercetin-3-gentiobioside의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

시험액의 농도	Quercetin-3-gentiobioside					
	50%		100%		150%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	10.317	98.33305	10.312	198.32445	10.313	298.91342
2회	10.315	97.45768	10.317	198.98734	10.287	297.91849
3회	10.321	97.75002	10.314	198.95872	10.305	297.06818
4회	10.312	96.77678	10.318	196.04138	10.303	297.13324
5회	10.314	97.34544	10.311	196.20509	10.297	295.63928
6회	10.324	97.67086	10.313	196.83618	10.312	293.78702
평균	10.317	97.55564	10.314	197.55886	10.303	296.74327
표준편차	0.005	0.51	0.003	1.36	0.010	1.81
RSD (%)	0.04	0.53	0.03	0.69	0.09	0.61
시험기준 RSD (%)	2.0 % 이하					

- 위의 결과를 종합해 보면 quercetin-3-gentiobioside 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

(나) 질려자 추출물 중 Quercetin-3-gentiobioside

① 질려자 추출물을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC 조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인하였음.

㉞ 정확성 및 정밀성 시험용액 조제

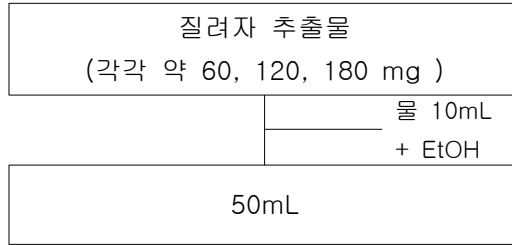


그림 94. 정확성 및 정밀성 시험용액 조제 방법

㉟ 시험결과에 대한 평가방법

- 위의 시험방법의 “2) 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액”을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

㊱ 정확, 정밀성시험 결과

- (a) 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 질려자 추출물의 정확성과 회수율 (%)

표 24. 질려자 추출물의 정확성(50%)과 회수율 (%)

	질려자 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정확성 - 1 (50%)	59.8	95.52084	60.1054	100.51
		95.25680	59.9439	100.24
		94.71763	59.6140	99.69
		94.95378	59.7585	99.93
		94.91718	59.7361	99.89
		94.17417	59.2815	99.13
			평균	99.90
			표준편차	0.47
			RSD (%)	0.47

표 25. 질려자 추출물의 정확성(100%)과 회수율 (%)

	질려자 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정확성 - 2 (100%)	119.8	193.78836	120.2304	100.36
		193.14999	119.8398	100.03
		192.80849	119.6309	99.86
		193.26971	119.9130	100.09
		193.66386	120.1542	100.30
		193.08679	119.8011	100.00
			평균	100.11
		표준편차	0.19	
		RSD (%)	0.19	

표 26. 질려자 추출물의 정확성(150%)과 회수율 (%)

	질려자 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정확성 - 3 (150%)	179.7	291.75751	180.1728	100.26
		291.49088	180.0096	100.17
		289.28738	178.6614	99.42
		291.52502	180.0305	100.18
		288.95200	178.4562	99.31
		287.44360	177.5333	98.79
			평균	99.69
		표준편차	0.60	
		RSD (%)	0.61	

- 위의 결과를 종합해 보면 질려자 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0 % 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

(b) 질려자 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

표 27. 질려자 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

시험액의 농도	질려자 추출물					
	50%		100%		150%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	10.324	95.52084	10.320	193.78836	10.317	291.75751
2회	10.324	95.25680	10.319	193.14999	10.327	291.49088
3회	10.325	94.71763	10.323	192.80849	10.307	289.28738
4회	10.329	94.95378	10.326	193.26971	10.296	291.52502
5회	10.320	94.91718	10.329	193.66386	10.304	288.95200
6회	10.321	94.17417	10.330	193.08679	10.310	287.44360
평균	10.324	94.92340	10.325	193.29453	10.310	290.07607
표준편차	0.003	0.46	0.005	0.37	0.011	1.77
RSD (%)	0.03	0.49	0.04	0.19	0.10	0.61
시험기준 RSD (%)	2.0 % 이하					

- 위의 결과를 종합해 보면 질려자 추출물 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

(5) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- Quercetin-3-gentiobioside의 직선성 시험용액 3개의 Group을 가지고 각 Group에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다. 이들 각각 3개의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 ICH에서 규정한대로 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다.

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times y \text{ 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times y \text{ 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

(가) Quercetin-3-gentiobioside

㉠ Quercetin-3-gentiobioside의 검량선

표 28. Quercetin-3-gentiobioside의 검량선

① Group 1	$y = 19.18586 x - 1.45906 \quad (R^2=0.99996)$
② Group 2	$y = 19.88440 x + 1.35146 \quad (R^2=0.99992)$
③ Group 3	$y = 20.30850 x - 1.25770 \quad (R^2=0.99982)$
종합 검량선	$y = 19.79292 x - 0.45510 \quad (R^2=0.99990)$
검량선 기울기의 평균값	19.79292
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	1.56776

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 1.56776}{19.79292} = 0.79 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 1.56776}{19.79292} = 0.26 \mu\text{g/mL}$$

(나) 질려자 추출물

㉠ 질려자 추출물의 검량선

표 29. 질려자 추출물의 검량선

① Group 1	$y = 1.64361 x - 3.48210 \quad (R^2=0.99977)$
② Group 2	$y = 1.62217 x - 1.27986 \quad (R^2=0.99956)$
③ Group 3	$y = 1.63739 x - 3.38250 \quad (R^2=0.99994)$
종합 검량선	$y = 1.63439 x - 2.71482 \quad (R^2=0.99976)$
검량선 기울기의 평균값	1.63439
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	1.24371

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 1.24371}{1.63439} = 7.61 \text{ mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 1.24371}{1.63439} = 2.51 \text{ mg/50mL}$$

- <범위> 질려자 추출물 중 quercetin-3-gentiobioside 함량시험에 대한 밸리데이션 시험결과 quercetin-3-gentiobioside(4.0 ~ 16.0 $\mu$ g/mL)의 범위에서 직선성 및 재현성이 양호한 결과를 얻었으며 정량한계의 결과를 고려해 보았을 때 quercetin-3-gentiobioside의 정량한계는 0.79 $\mu$ g/mL로서 이는 quercetin-3-gentiobioside 함량시험 기준 농도인 10 $\mu$ g/mL의 7.9 %에 해당하는 농도로서, 이 농도의 범위까지 정량성이 있음을 알 수 있었음.

#### 마. 밸리데이션시험 결론

- 질려자 추출물 중의 quercetin-3-gentiobioside 함량 밸리데이션 시험방법에 대하여 자사에서 선정한 분석방법을 검토한 결과 다음과 같이 요약 할 수 있으며, 질려자 함량 밸리데이션 시험법은 적합하다고 판단됨.

##### (1) 특이성시험

- 질려자 추출물 중의 quercetin-3-gentiobioside 시험용액을 만들 때 사용하는 80% EtOH에서 quercetin-3-gentiobioside의 피크와 겹침을 확인 한 결과 이들 분석하고자 하는 quercetin-3-gentiobioside 피크가 겹치지 않는다는 것을 확인하였고, 또한 quercetin-3-gentiobioside 표준액, 질려자 추출물에서의 회수율은 95.0 - 105.0% 로서 본 시험법은 특이성이 있음을 확인하였음.

##### (2) 직선성시험

- 직선성시험에서는 quercetin-3-gentiobioside의 별도 3 group의 직선성 시험용액을 만들고 이들을 가지고 시험한 결과 3 group 모두 양호한 직선성을 나타내어 본 시험법의 직선성 기준에 적합한 것으로 나타났음.

☞ Quercetin-3-gentiobioside의 상관계수 ( $R^2$ ) = 0.99990

☞ 질려자 추출물의 상관계수 ( $R^2$ ) = 0.99976

##### (3) 정확성시험

- 정확성시험에서는 직선성 시험에서 얻은 검량선을 가지고, 정확성 시험용액에서 얻은 피크 면적을 대입하여 검량선법에 의해 얻어진 결과 값과, 실제로 취한 양을 가지고 계산한 결

과 값을 비교해 보았을 때 그의 회수율은 95.0 ~ 105.0% 의 범위 안에 있으며, 회수율의 상대표준편차가 2.0% 이하로서 본 시험법의 정확성을 확인 할 수 있었음.

#### (4) 피크유지시간 및 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

- 정확성 및 정밀성의 3가지 시험농도용액(50%, 100%, 150%용액)을 HPLC에 각각 6회 반복 주입하여 얻어진 총 18개의 크로마토그램 중 피크의 유지시간 및 피크면적에 대한 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 정밀성을 확인할 수가 있었음.

#### (5) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- 위의 직선성시험에서 얻은 검량선을 이용하여 ICH (International Conference on Harmonization)에서 규정하는 방법으로 검출한계(DL) 및 정량한계(QL)을 구하였다. 그의 결과는 다음과 같음.

① Quercetin-3-gentiobioside

정량한계 : 0.79  $\mu\text{g}/\text{mL}$

검출한계 : 0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$

② 질려자 추출물

정량한계 : 7.61 mg/50mL

검출한계 : 2.51 mg/50mL

#### (6) 범위

- Quercetin-3-gentiobioside(4.0 ~ 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 범위에서 직선성 및 재현성이 양호한 결과를 얻었으며 정량한계의 결과를 고려해 보았을 때 quercetin-3-gentiobioside의 정량한계는 0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로서 이는 quercetin-3-gentiobioside 함량시험 기준 농도인 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 7.9 %에 해당하는 농도로서, 이 농도의 범위까지 정량성이 있음을 알 수 있었음.

### 3. 질려자 pilot 추출 공정개발 및 추출물 제조와 관련 질려자 추출물 연구용 제공품 제조기록서

#### 가. 질려자 Pilot추출 제조공정

- 질려자 원재료 94.9 kg을 80% 주정(원물대비 5.5배 이상) 약 550 L로 배합하여 60~65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 정치 및 순환 추출을 실시함. 질려자 80% 주정 추출물을 75  $\mu\text{m}$  cartridge filter를 이용하여 여과하고 여과액을 45~60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 농축물이 약 14 brix 정도가 될 때까지 감압 농축 실시. 농축된 농축물은 동결건조를 통해서 건조하여 최종 건조된 건조물 10.1 kg을 얻음. 이런 과정을 3회 반복하여 실시함.



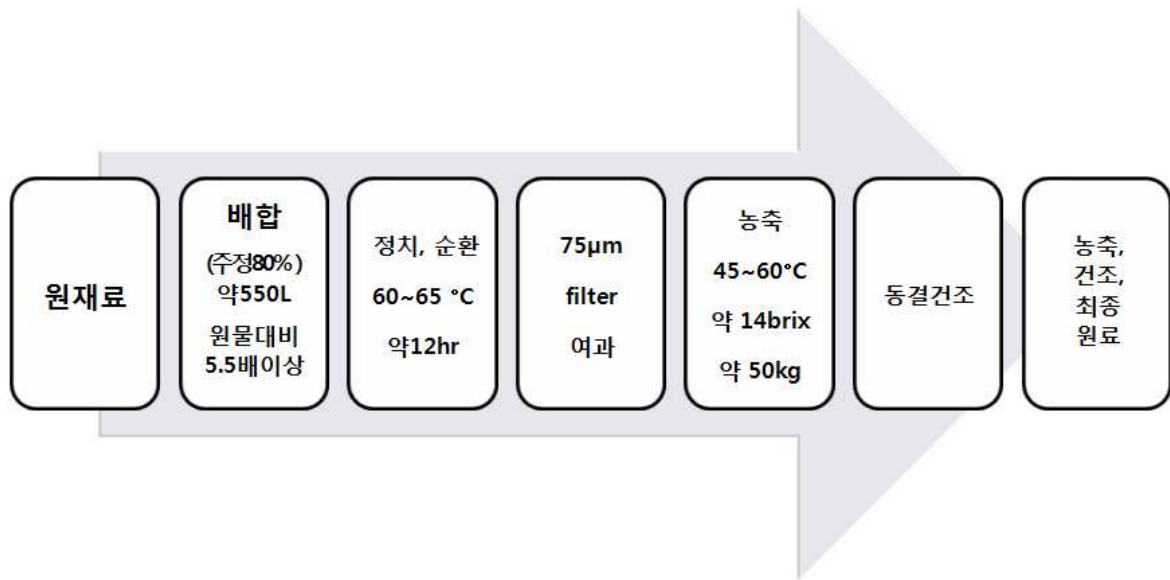


그림 95. 질러자 Pilot 추출 제조공정

나. 질러자 추출물 연구용 재공품 제조기록서

13 Jul 22 01:56p

P.1

제 조 기 록 서

제 품 명	질러자추출물 연구용 재공품
-------	----------------

유 형	연구용 시료
제 조 번 호	
제 조 단 위	원물 2847 kg
제 조 일 자	2013. 06. 21 ~ 07. 04
유 통 기 한	
포장완료일자	2013. 07. 04

### 제 3 절 질려자 추출물의 안정성 시험

1. 가속시험, 장기보존시험 실시 : initial, 2, 4, 6개월간 실시

## 시험 성적서(Initial)

검 체 명	G46	제조번호	003	
시험규격	별규	검 체 량	10g	
시험기간	2013.09.25 ~ 2013.10.16		발행일자	2013.10.17

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상	동일 Rf 및 색상	2013.09.25
		2) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2013.09.27
2	건조감량	8.0% 이하	6.62%	2013.09.25
3	중금속시험	1) 총중금속 : 30mg/kg 이하	적 합	2013.09.26
		2) 납 : 5mg/kg 이하	불검출	2013.09.26
		3) 비소 : 3mg/kg 이하	0.519mg/kg	2013.09.26
4	잔류농약	1) 총비에치씨(BHC) : 0.2mg/kg 이하	불검출	2013.10.16
		2) 총디디티(DDT) : 0.1mg/kg 이하	불검출	2013.10.16
		3) 알드린(Aldrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2013.10.16
		4) 디엘드린(Dieldrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2013.10.16
		5) 엔드린(Endrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2013.10.16
5	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.36%	2013.09.27

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 6
시험일자	2013.09.25 ~ 10.16	시험규격	별첨	작성일자	2013.10.17

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 확인시험

(1) 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상

☞ 시험결과 : 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상

(2) 아래의 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

☞ 시험결과 : 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

### 2. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 1.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{33.0015 - 32.9332}{33.0015 - 31.9854} \times 100 = 6.62\%$$

☞ 시험결과 : 6.62%

### 3. 중금속 : 이 약을 가지고 대한약전, 생약시험법, 중금속에 따라 시험한다.

1) 총중금속 : 총중금속 30 ppm 이하

☞ 시험결과 : 적합

2) 납, 비소 : 납 5 mg/kg 이하, 비소 3 mg/kg 이하

☞ 시험결과 : 납 (불검출), 비소 (0.519mg/kg)

### 4. 잔류농약 : 이 약을 가지고 대한약전, 생약시험법, 잔류농약에 따라 시험한다.

☞ 시험결과 : 불검출

### 5. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

- ① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

# 시 험 기 록 서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 6
시험일자	2013.09.25 ~ 10.16	시험규격	별첨	작성일자	2013.10.17

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

- ㉤ 유 속 : 1.0mL/min
- ㉥ 주입량 : 10uL

④ 결과

☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	5.0	166.57219
표준액 2		5.0	166.86827
평 균		5.0	166.72023

☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 166.72023

Sample	Area
SA 1	148.49297
SA 2	146.20944
SA 3	147.49358

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	4 / 6
시험일자	2013.09.25 ~ 10.16	시험규격	별첨	작성일자	2013.10.17

☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 148.49297}{120.8/50 \times 166.72023} \times 98.75 = 0.364\%$$

$$\text{SA2} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 146.20944}{120.1/50 \times 166.72023} \times 98.75 = 0.361\%$$

$$\text{SA3} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 147.49358}{120.5/50 \times 166.72023} \times 98.75 = 0.362\%$$

**Average = 0.362%**

# 시험기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	5 / 6
시험일자	2013.09.25 ~ 10.16	시험규격	별첨	작성일자	2013.10.17

## G46의 확인시험중

### TLC Chromatogram



ST SA

검액 : 이 약 200mg을 달아 70% 메탄올 10ml에 녹인 액

표준액 : Quercetin-3-O-β-D-gentiobioside 0.5mg을 달아 메탄올 10ml에 녹인액

흡착제 : 순상 실리카겔 F<sub>254</sub>

전개용매 : (에틸아세테이트 : 메탄올 : 물 : 포름산 = 5 : 1 : 1 : 0.5)

발색시약 : 알루미늄 트리클로라이드 용액(aluminium trichloride 2g을 에탄올 100ml에 녹인액)

UV : 365nm

실리카겔 TLC에 표준액(ST)와 검액(SA)을 각각 3ul씩을 점적하여 전개용매를 이용하여 전개한다.

전개된 TLC에 발색시약을 뿌리고 80도에서 5분간 기다린다.

발색시약이 묻은 TLC를 UV(365nm)를 이용하여 관찰한다.

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	6 / 6
시험일자	2013.09.25 ~ 10.16	시험규격	별첨	작성일자	2013.10.17

## G46의 중금속시험 중 1) 총중금속 시험결과



비교액

검액



## 시 험 성 적 서(가속 2개월)

검 체 명	G46	제조번호	003
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2013.12.23 ~ 2013.12.26	발행일자	2013.12.27

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	건조감량	10.0% 이하	6.86%	2013.12.26
2	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.34%	2013.12.23

--	--	--	--	--

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 3
시험일자	2013.12.23 ~ 12.26	시험규격	별첨	작성일자	2013.12.27

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 2.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{33.3783 - 33.2292}{33.3783 - 31.2036} \times 100 = 6.86\%$$

☞ 시험결과 : 6.86%

### 2. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

#### ③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세트니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

㉤ 유 속 : 1.0mL/min

㉥ 주입량 : 10uL

# 시험기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 3
시험일자	2013.12.23 ~ 12.26	시험규격	별첨	작성일자	2013.12.27

## ④ 결과

### ☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	5.0	172.89250
표준액 2		5.0	173.39571
평    균		5.0	173.144105

### ☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 173.144105

Sample	Area
SA 1	144.30981
SA 2	150.35654
SA 3	146.79370

### ☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 144.30981}{119.5/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.344\%$$

$$\text{SA2} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 150.35654}{125.0/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.343\%$$

$$\text{SA3} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 146.79370}{121.1/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.346\%$$

Average = 0.344%

## 시 험 성 적 서(가속 4개월)

검 체 명	G46	제 조 번 호	003
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.02.24 ~ 2014.02.26	발행일자	2014.02.27

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	건조감량	10.0% 이하	6.95%	2014.02.26
2	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.335%	2014.02.24

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 3
시험일자	2014.02.24 ~ 02.26	시험규격	별첨	작성일자	2014.02.27

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 2.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{42.8556 - 42.7164}{42.8556 - 40.8515} \times 100 = 6.95\%$$

☞ 시험결과 : 6.95%

### 2. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

#### ③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

㉤ 유 속 : 1.0mL/min

㉥ 주입량 : 10uL

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 3
시험일자	2014.02.24 ~ 02.26	시험규격	별첨	작성일자	2014.02.27

## ④ 결과

### ☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	5.0	172.89250
표준액 2		5.0	173.39571
평    균		5.0	173.144105

### ☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 173.144105

Sample	Area
SA 1	143.41479
SA 2	140.72931
SA 3	141.95769

### ☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 143.41479}{120.2/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.340\%$$

$$\text{SA2} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 140.72931}{121.0/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.332\%$$

$$\text{SA3} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 141.95769}{121.3/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.334\%$$

Average = 0.335%

## 시 험 성 적 서(가속 6개월)

검 체 명	G46	제조번호	003
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.04.21 ~ 2014.04.24	발행일자	2014.04.25

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상	동일 Rf 및 색상	2014.04.21
		2) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2014.04.23
2	건조감량	10.0% 이하	8.00%	2014.04.22
3	중금속시험	1) 총중금속 : 30mg/kg 이하	적 합	2014.04.24
		2) 납 : 5mg/kg 이하	0.003mg/kg	2014.04.23
		3) 비소 : 3mg/kg 이하	0.563mg/kg	2014.04.23
4	잔류농약	1) 총비에치씨(BHC) : 0.2mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		2) 총디디티(DDT) : 0.1mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		3) 알드린(Aldrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		4) 디엘드린(Dieldrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		5) 엔드린(Endrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
5	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.323%	2014.04.23

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 확인시험

(1) 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상

☞ 시험결과 : 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상

(2) 아래의 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

☞ 시험결과 : 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

### 2. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 1.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{39.4660 - 39.3860}{39.4660 - 38.4655} \times 100 = 8.00\%$$

☞ 시험결과 : 8.00%

### 3. 중금속 : 이 약을 가지고 대한약전, 생약시험법, 중금속에 따라 시험한다.

1) 총중금속 : 총중금속 30 ppm 이하

☞ 시험결과 : 적합

2) 납, 비소 : 납 5 mg/kg 이하, 비소 3 mg/kg 이하

☞ 시험결과 : 납 (0.003mg/kg), 비소 (0.563mg/kg)

### 4. 잔류농약 : 이 약을 가지고 대한약전, 생약시험법, 잔류농약에 따라 시험한다.

☞ 시험결과 : 불검출

### 5. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

- ① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.



# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

- ㉤ 유 속 : 1.0mL/min
- ㉥ 주입량 : 10uL

④ 결과

☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	4.9	170.21663
표준액 2		4.8	170.11037
평 균		4.85	170.16350

☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 170.16350

Sample	Area
SA 1	136.60269
SA 2	139.43463
SA 3	139.37907

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	4 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{4.85/50 \times 5/50 \times 136.60269}{120.7/50 \times 170.16350} \times 98.75 = 0.319\%$$

$$\text{SA2} = \frac{4.85/50 \times 5/50 \times 139.43463}{120.5/50 \times 170.16350} \times 98.75 = 0.326\%$$

$$\text{SA3} = \frac{4.85/50 \times 5/50 \times 139.37907}{121.2/50 \times 170.16350} \times 98.75 = 0.324\%$$

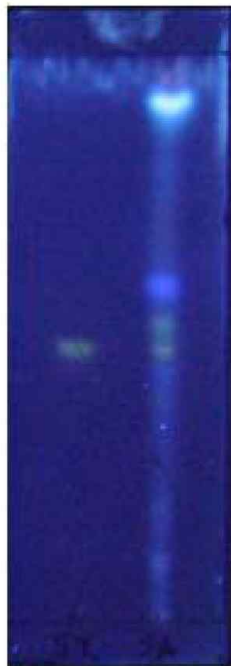
**Average = 0.323%**

# 시험기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	5 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

G46의 확인시험중

TLC Chromatogram



ST SA

# 시 험 기 록 서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	6 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

## G46의 중금속시험 중 1) 총중금속 시험결과



비교액

검액

## 시 험 성 적 서(장기 2개월)

검 체 명	G46	제 조 번 호	003
시 험 규 격	별 규	검 체 량	10g
시 험 기 간	2013.12.23 ~ 2013.12.26	발 행 일 자	2013.12.27

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	건조감량	10.0% 이하	6.60%	2013.12.26
2	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.34%	2013.12.23

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 3
시험일자	2013.12.23 ~ 12.26	시험규격	별첨	작성일자	2013.12.27

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 2.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{39.1503 - 39.0101}{39.1503 - 37.0269} \times 100 = 6.60\%$$

☞ 시험결과 : 6.60%

### 2. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

#### ③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세트니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

㉤ 유 속 : 1.0mL/min

㉥ 주입량 : 10uL

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 3
시험일자	2013.12.23 ~ 12.26	시험규격	별첨	작성일자	2013.12.27

## ④ 결과

### ☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	5.0	172.89250
표준액 2		5.0	173.39571
평    균		5.0	173.144105

### ☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 173.144105

Sample	Area
SA 1	146.73407
SA 2	146.23976
SA 3	145.28268

### ☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 146.73407}{121.3/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.345\%$$

$$\text{SA2} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 146.23976}{123.1/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.339\%$$

$$\text{SA3} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 145.28268}{119.9/50 \times 173.144105} \times 98.75 = 0.346\%$$

**Average = 0.343%**

## 시 험 성 적 서(장기 4개월)

검 체 명	G46	제 조 번 호	003
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.02.24 ~ 2014.02.26	발행일자	2014.02.27

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	건조감량	10.0% 이하	6.91%	2014.02.26
2	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.34%	2014.02.24



# 시험기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 3
시험일자	2014.02.24 ~ 02.26	시험규격	별첨	작성일자	2014.02.27

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 2.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{39.0358 - 38.8969}{39.0358 - 37.0245} \times 100 = 6.91\%$$

☞ 시험결과 : 6.91%

### 2. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

#### ③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세트니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

㉤ 유 속 : 1.0mL/min

㉥ 주입량 : 10uL

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 3
시험일자	2014.02.24 ~ 02.26	시험규격	별첨	작성일자	2014.02.27

## ④ 결과

### ☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	5.0	177.63982
표준액 2		5.0	178.00323
평    균		5.0	177.821525

### ☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 177.821525

Sample	Area
SA 1	150.67038
SA 2	147.58188
SA 3	148.68358

### ☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 150.67038}{123.0/50 \times 177.821525} \times 98.75 = 0.340\%$$

$$\text{SA2} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 147.58188}{121.0/50 \times 177.821525} \times 98.75 = 0.339\%$$

$$\text{SA3} = \frac{5.0/50 \times 5/50 \times 148.68358}{122.4/50 \times 177.821525} \times 98.75 = 0.337\%$$

Average = 0.339%

## 시 험 성 적 서(장기 6개월)

검 체 명	G46	제조번호	003
시험규격	별규	검 체 량	10g
시험기간	2014.04.21 ~ 2014.04.24	발행일자	2014.04.25

순서	시험항목	시험기준	시험결과	시험일자
1	확인시험	1) 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상	동일 Rf 및 색상	2014.04.21
		2) 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.	2014.04.23
2	건조감량	10.0% 이하	8.37%	2014.04.22
3	중금속시험	1) 총중금속 : 30mg/kg 이하	적 합	2014.04.24
		2) 납 : 5mg/kg 이하	0.043mg/kg	2014.04.23
		3) 비소 : 3mg/kg 이하	0.548mg/kg	2014.04.23
4	잔류농약	1) 총비에치씨(BHC) : 0.2mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		2) 총디디티(DDT) : 0.1mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		3) 알드린(Aldrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		4) 디엘드린(Dieldrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
		5) 엔드린(Endrin) : 0.01mg/kg 이하	불검출	2014.04.24
5	함량시험	퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상	0.349%	2014.04.23

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	2 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

## I. 시험방법 및 시험결과

### 1. 확인시험

(1) 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상

☞ 시험결과 : 표준액과 검액은 동일 Rf 및 색상

(2) 아래의 함량시험법에 따라 시험할 때 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

☞ 시험결과 : 검액은 표준액과 같은 유지시간에서 피크를 나타낸다.

### 2. 건조감량 : 10.0% 이하

이 약 약 1.0g을 정밀히 달아 대한약전, 일반시험법, 건조감량시험법에 따라 시험한다.

$$\frac{31.9547 - 31.8708}{31.9547 - 30.9521} \times 100 = 8.37\%$$

☞ 시험결과 : 8.37%

### 3. 중금속 : 이 약을 가지고 대한약전, 생약시험법, 중금속에 따라 시험한다.

1) 총중금속 : 총중금속 30 ppm 이하

☞ 시험결과 : 적합

2) 납, 비소 : 납 5 mg/kg 이하, 비소 3 mg/kg 이하

☞ 시험결과 : 납 (0.043mg/kg), 비소 (0.548mg/kg)

### 4. 잔류농약 : 이 약을 가지고 대한약전, 생약시험법, 잔류농약에 따라 시험한다.

☞ 시험결과 : 불검출

### 5. 함량시험 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드(C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>17</sub> : 626.52)으로서 0.30% 이상

① 표준액조제 : 퀘르세틴-3-겐티오바이오사이드표준품 약 5mg을 정밀하게 달아 80% 에탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 한다. 이 액 5mL를 취하여 80% 에탄올을 넣어 50mL로 한 액을 표준액으로 한다.

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	3 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

② 검액조제 : 이 약 약 120mg을 정밀하게 달아 물 10mL를 넣고 에탄올을 넣어 녹여 정확히 50mL로 한 액을 검액으로 한다.

③ 분석조건

- ㉠ 검출기 : 254nm
- ㉡ 칼 럼 : C18 (4.6 x 250mm, 5um)
- ㉢ 이동상 A : 0.05% TFA in H<sub>2</sub>O
- ㉣ 이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
20	50	50
21	0	100
30	0	100

- ㉤ 유 속 : 1.0mL/min
- ㉥ 주입량 : 10uL

④ 결과

☞ 표준액에 대한 결과

	순도(%)	취한량 (mg)	피크면적
표준액 1	98.75	4.9	170.21663
표준액 2		4.8	170.11037
평 균		4.85	170.16350

☞ 검액에 대한 결과

- 표준품 취한량 평균값 : 5.0mg
- 표준품 순도 및 제조처 : 98.75%(Chengdu Biopurify Phytochemicals)
- 표준액 면적값 평균 : 170.16350

Sample	Area
SA 1	148.34492
SA 2	149.63570
SA 3	149.61818

# 시험 기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	4 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

☞ 계산식

$$\frac{\text{표준품 취한량의 평균(mg)/50} \times 5/50 \times \text{SA 면적}}{\text{검체 취한량(mg)/50} \times \text{표준액의 피크면적의 평균}} \times \text{표준품 순도(\%)}$$

$$\text{SA1} = \frac{4.85/50 \times 5/50 \times 148.34492}{120.4/50 \times 170.16350} \times 98.75 = 0.347\%$$

$$\text{SA2} = \frac{4.85/50 \times 5/50 \times 149.63570}{120.8/50 \times 170.16350} \times 98.75 = 0.349\%$$

$$\text{SA3} = \frac{4.85/50 \times 5/50 \times 149.61818}{120.1/50 \times 170.16350} \times 98.75 = 0.351\%$$

**Average = 0.349%**

# 시험기록서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	5 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

G46의 확인시험중

TLC Chromatogram



ST SA

# 시 험 기 록 서

검체명	G46(003)	시험지시번호	-	페이지수	6 / 6
시험일자	2014.04.21 ~ 04.24	시험규격	별첨	작성일자	2014.04.25

## G46의 중금속시험 중 1) 총중금속 시험결과



비교액

검액



## 제 4 절 대식세포에서 질려자 추출물의 항염증 활성

### 1. 대식세포에서 염증 억제 활성 평가 방법

#### 가. 마우스 대식세포주 RAW 264.7에서 NO assay를 통한 항염증 효능 평가

- 실험에 사용한 RAW 264.7 마우스 대식세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였고 세포는 10% FBS DMEM 배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. RAW 264.7 마우스 대식세포를 96 well plate에 4×10<sup>4</sup>/well의 세포수로 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 배양시켰음. 이후 NO synthesis mitogen으로 쓰이는 lipopolysaccharide (LPS)를 비유도군 (none mitogenic group)을 제외한 나머지 well에 0.5 ug/ml농도로 1시간 30분 동안 처리하여 NO synthesis를 유도하였음. 질려자 추출물, 분획물, 화합물은 각각 주어진 농도로 처리하였고, 24시간 배양시킨 후 NO 분비 억제 정도를 확인하였음. NO은 배양 상층액과 정량시약(Griess reagent)을 1:1로 혼합한 후 10분간 상온에 보관한 후 540 nm에서 흡광도를 이용하여 NO분비 억제효능을 측정하였음.

#### 나. 마우스 대식세포주 RAW 264.7에서 MTT assay를 통한 세포독성 확인

- NO 억제능 측정실험에 사용한 RAW 264.7 마우스 대식세포는 곧바로 상층액을 제거한 후 MTT 시약(5mg/ml)을 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 1시간 보관시켰음. 다시 상층액을 제거하고 100% DMSO시약을 100 ul/well씩 처리하고 plate rotator에 10분간 보관한 후 540 nm 흡광도를 측정하여 질려자 화합물의 세포 독성을 확인하였음.

#### 다. 마우스 비장세포(splenocytes)에서 MTS assay를 통한 세포증식 확인

- 질려자 추출물의 면역증강 활성을 확인하기 위해 BALB/c 마우스의 spleen에서 추출한 splenocytes를 10% FBS RPMI 1640를 이용하여 2.5×10<sup>5</sup>/well로 96well plate에 분주하였음. 그리고 mitogen으로 쓰이는 concanavalin A (10 ug/ml)와 질려자 80% 주정 추출물을 0-500 µg/ml로 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 배양하였음. MTS 시약을 각 well에 20 ul씩 넣어 4시간 배양시킨 후 490 nm 흡광도를 측정하여 질려자 80% 주정 추출물의 세포 증식을 확인하였음.

### 2. 대식세포에서 염증 관련 유전자 및 단백질 발현수준 분석 방법

#### 가. 염증관련 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR

- RAW 264.7 마우스 대식세포를 10% FBS, 100 unit/ml의 페니실린과 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지와 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 6 well plate에 5×10<sup>5</sup>/well로 분주한 후 24시간 배양시켰음. 이 후 NO synthesis mitogen으로 쓰이는 LPS를 비유도군(Non mitogenic group)을 제외한 나머지 well에 0.5 µg/ml농도로 1시간 30분 동안 처리하여 NO synthesis를 유도하였음. 질려자 80% 주정 추출물은 50, 100, 250, 500 µg/ml, 화합물 G46-52-12P (N-trans-p-caffeoyl tyramine)은 5, 25, 50 µM, 화합물 G46-52-14P

(tribulusamide D) 25, 50, 100  $\mu$ M의 농도로 처리하고 24시간 배양함. 세포를 PBS로 2번 세척 후 trizol과 chloroform를 넣어 RNA를 분리하고 추출한 RNA를 이용하여 정량 후 역전사 효소인 SuperscriptIII (Invitrogen)를 사용하여 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 합성함. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) 조건은 95 $^{\circ}$ C 1분, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분 30초를 30 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시킨 후 정량 분석을 위하여 cytokine과 대조군 유전자인 GAPDH primer를 이용하여 유전자의 발현 억제 효과를 agarose gel 상에서 비교함.

**나. 염증관련 Cytokine 및 염증반응 관여인자의 생성 억제 활성 분석을 위한 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA assay)**

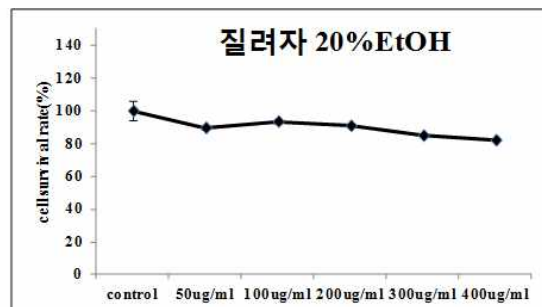
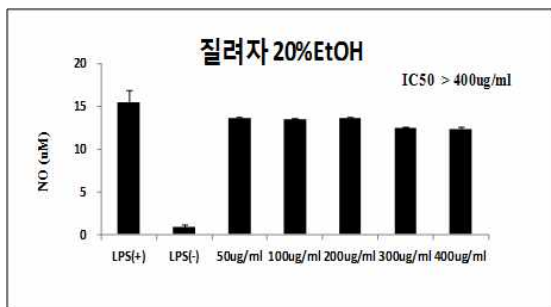
- 선행 연구 방법에 의해 시료가 처리된 RAW 264.7 마우스 대식세포주에서 얻은 상등액에서 염증관련 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10과 염증반응 관여인자인 PGE<sub>2</sub>를 ELISA assay kit (각각 ebioscience, R&D systems)를 이용하여 그 효과를 측정함.

**다. 염증반응 관련 단백질의 생성 억제 활성 분석을 위한 western blotting**

- 유전자 발현 분석과 같은 방법으로 시료를 처리한 RAW 264.7 마우스 대식세포주를 PBS로 세척 후 lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0 with 150mM sodium chloride, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate)에 용해시킨 후 13,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 단백질을 추출하여 정량함. 정량된 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동 후 polyvinylidene difluoride membrane으로 이동시킴. membrane은 5% skim milk를 포함하는 TBST로 blocking 한 후 1차 항체와 2차 항체에 반응시켜 ECL western detection 시약으로 원하는 단백질을 규명함.

**3. 질려자 추출물의 세포내 항염증 활성 결과**

**가. 질려자 추출물 선정을 위한 에탄올 농도별 항염증 활성 평가**



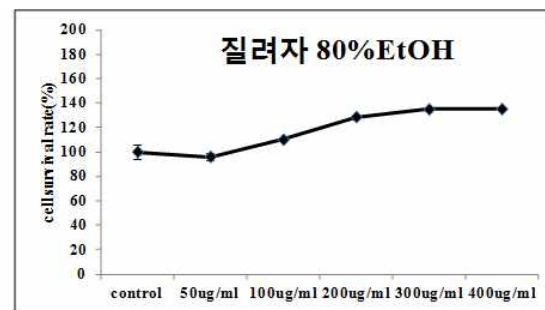
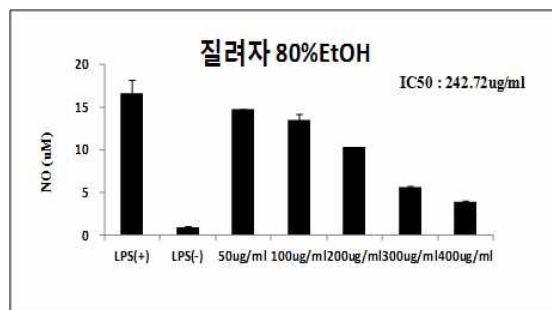
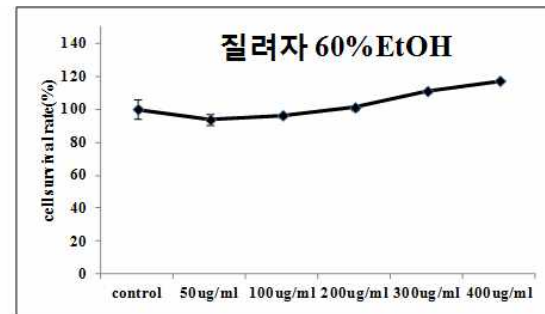
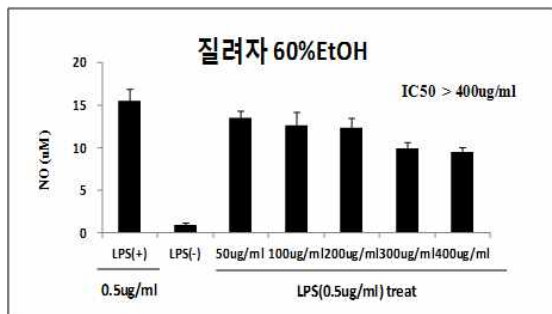
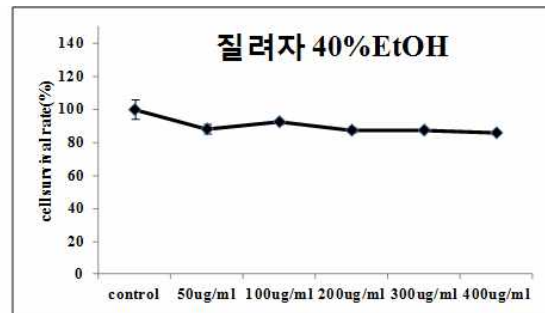
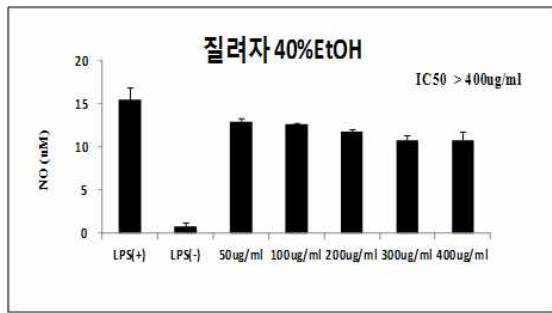
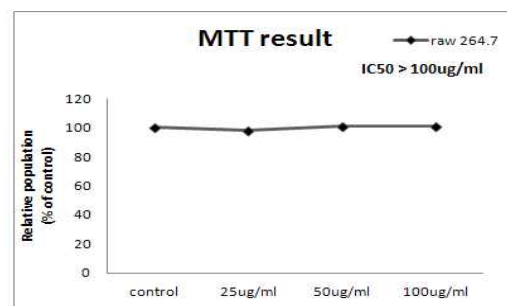
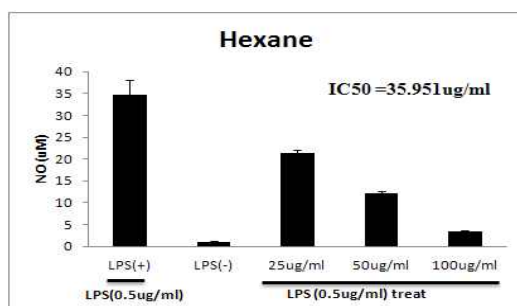


그림 96. The inhibition of No production by RAW 264.7 cells by *T. terrestris* Ethanol extract.

- RAW 264.7 세포에 질려자 에탄올 농도별 추출물을 처리하여 항염(NO)활성을 확인해 본 결과, 질려자 20, 40, 60% 에탄올 추출물의 경우 LPS를 처리한 양성대조군에 비해 항염 활성이 나타나지 않은 반면 질려자 80% 에탄올 추출물은 IC<sub>50</sub> 값이 242.72ug/ml로 염증억제 효과가 우수한 것으로 관찰되었음.

나. 질려자 추출물 1차 분획별 항염증 활성 평가



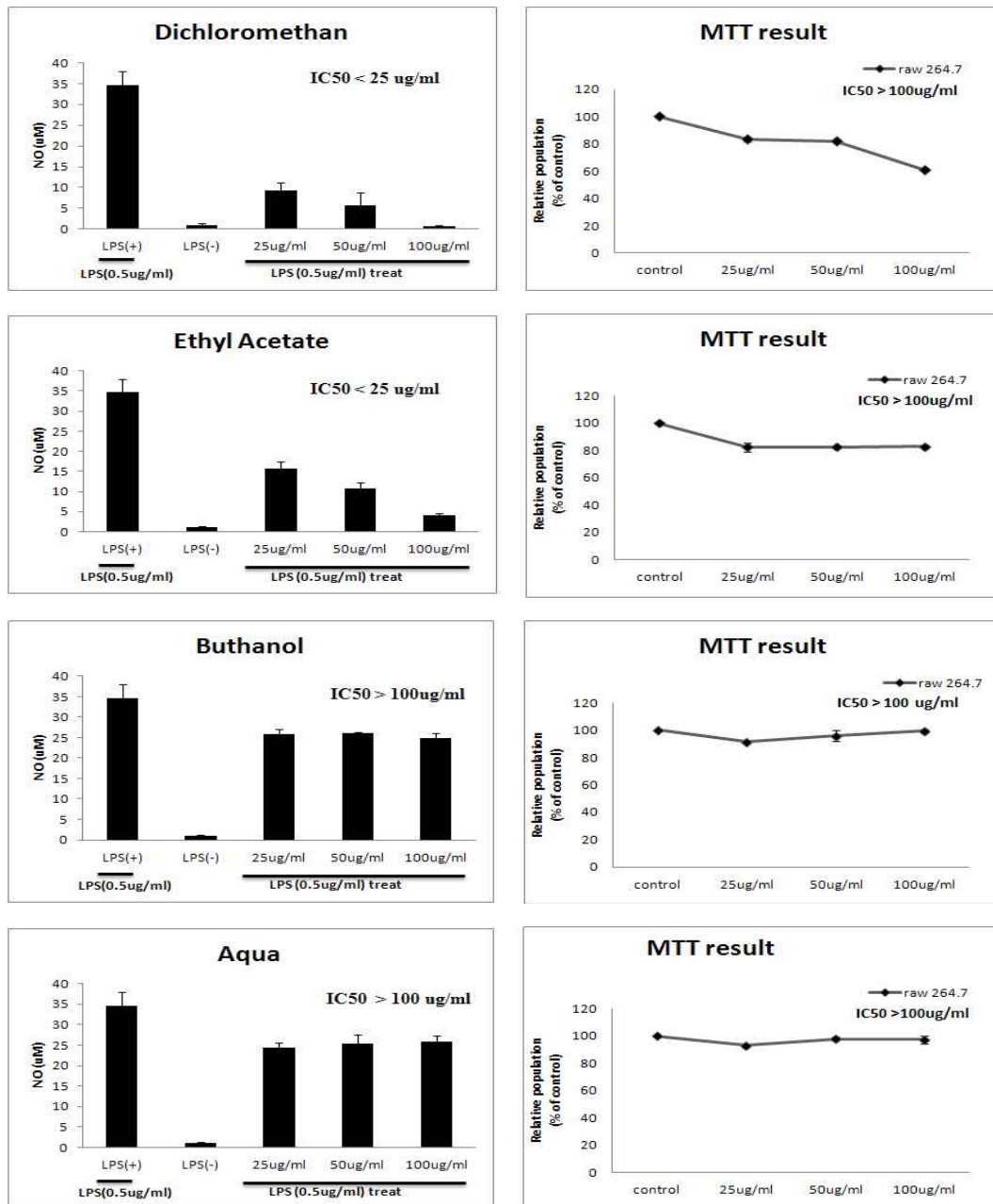
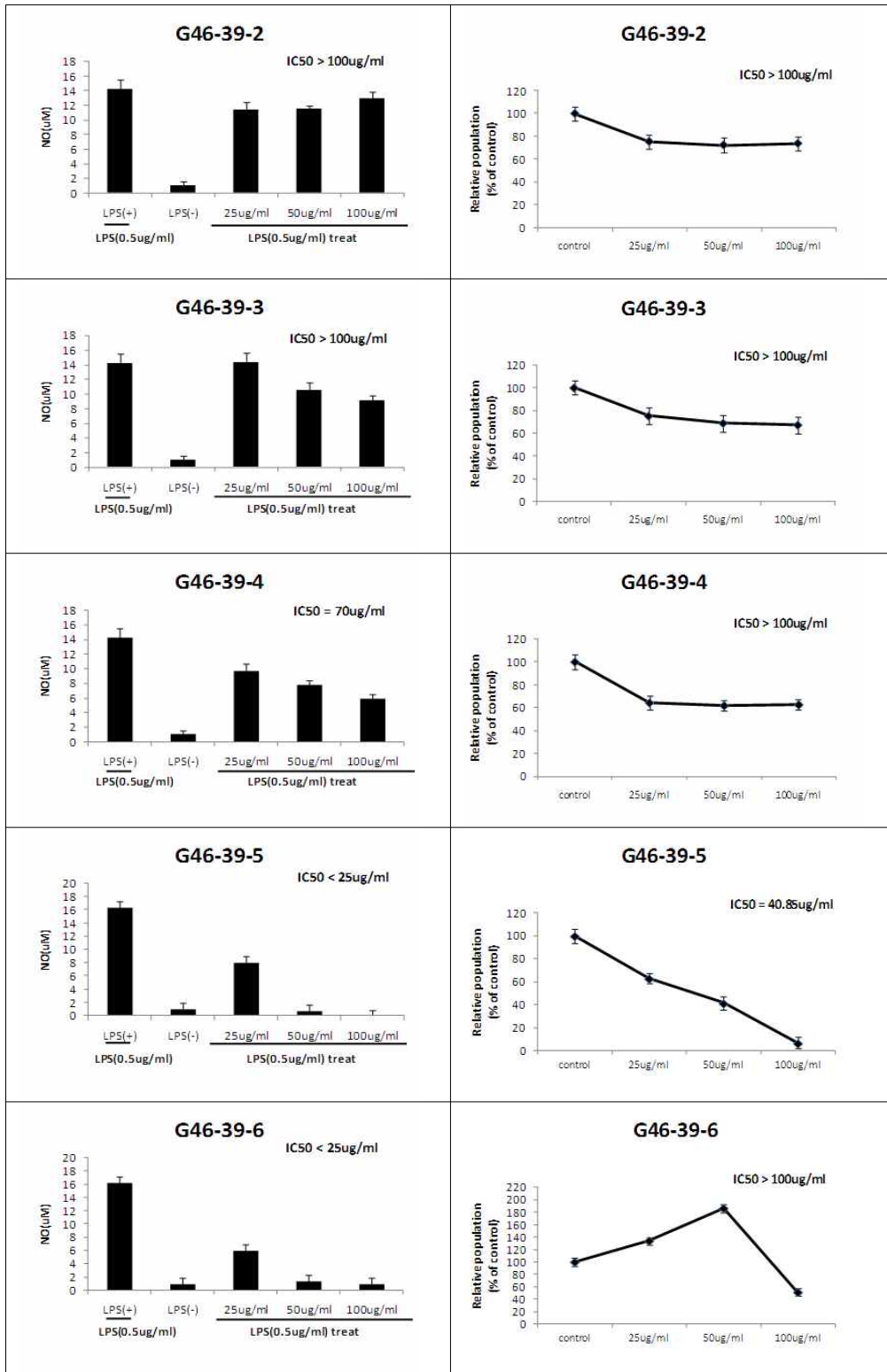
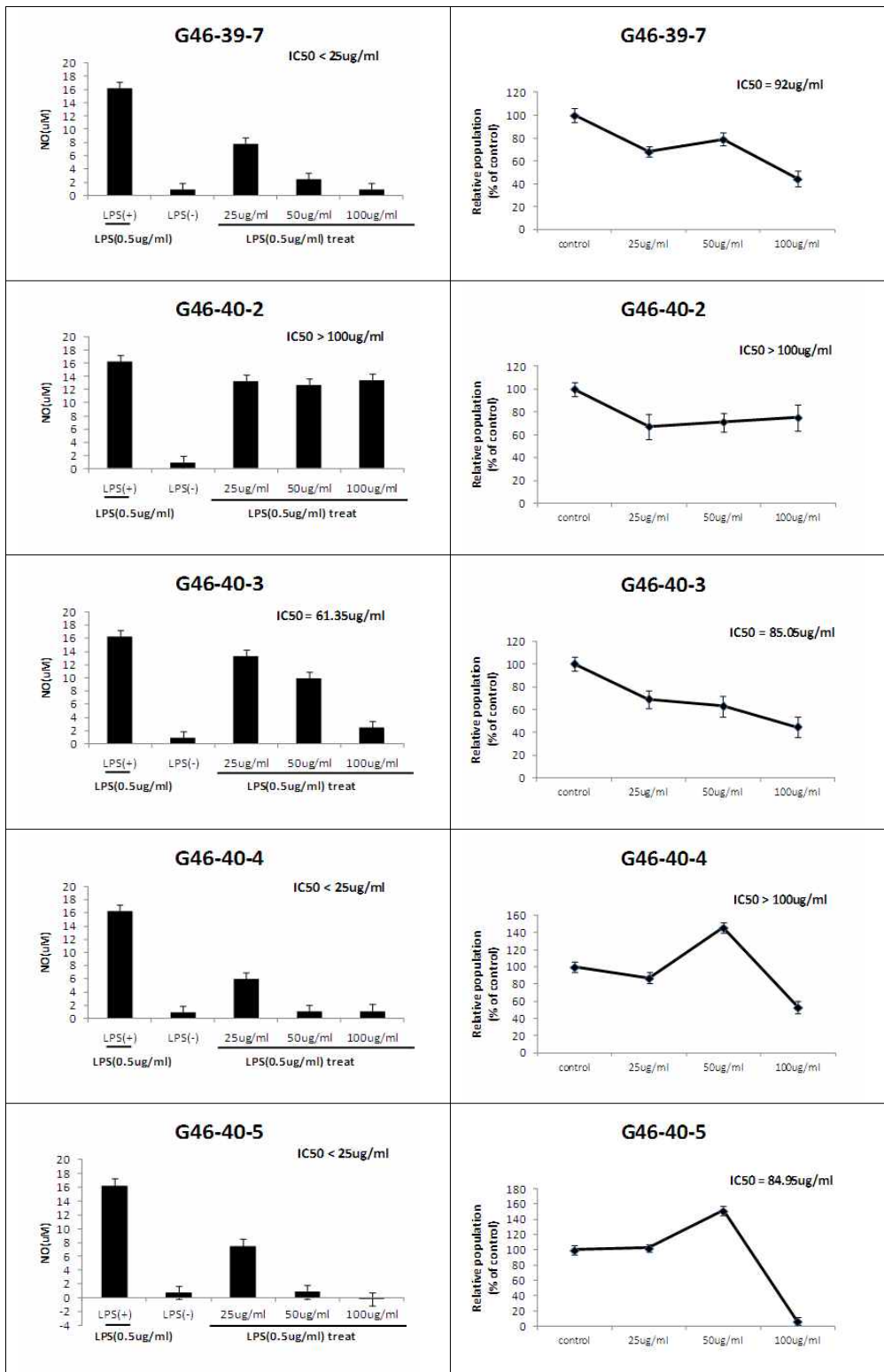


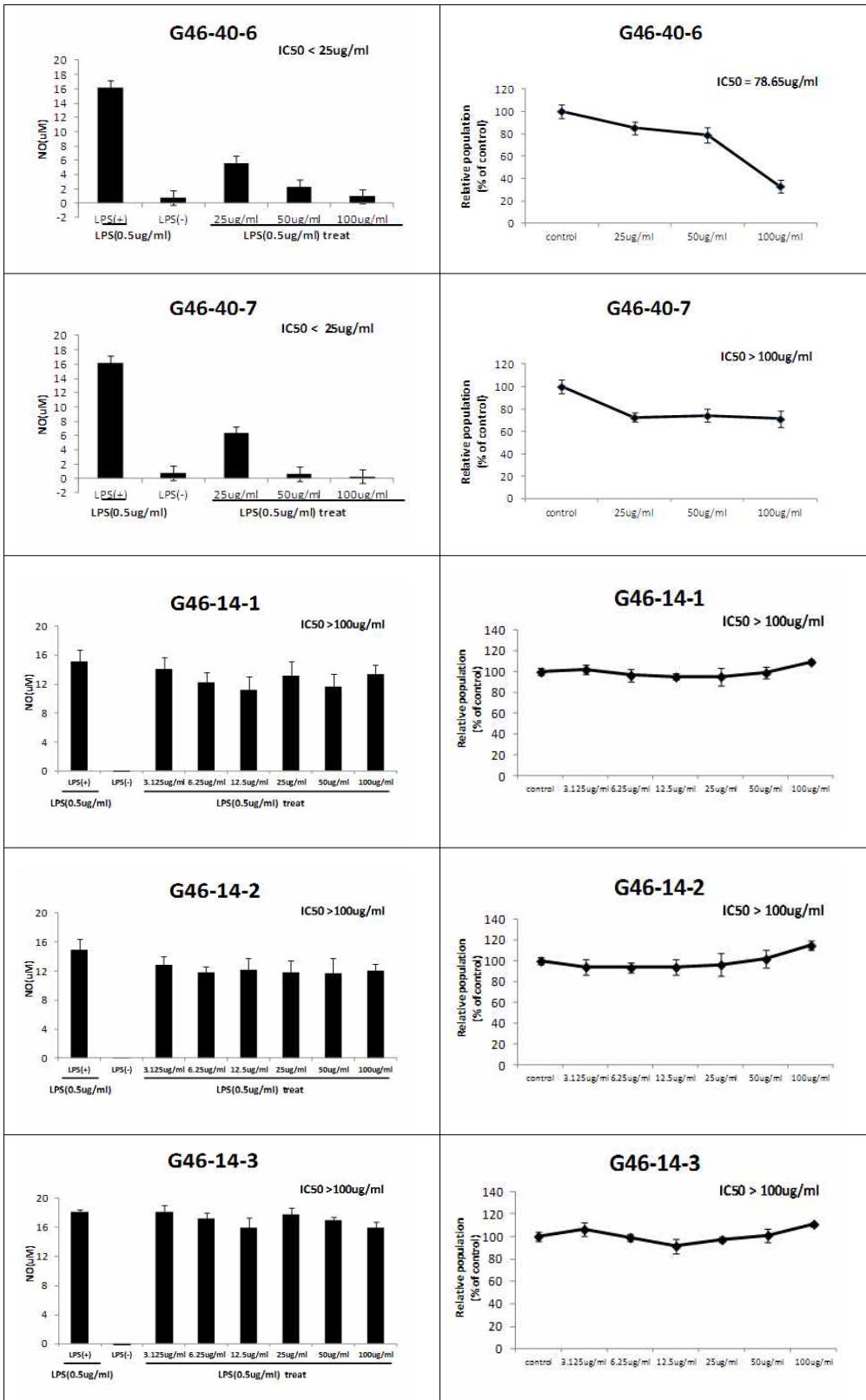
그림 97. The inhibition of NO production by RAW 264.7 cells by *T. terrestris* fraction.

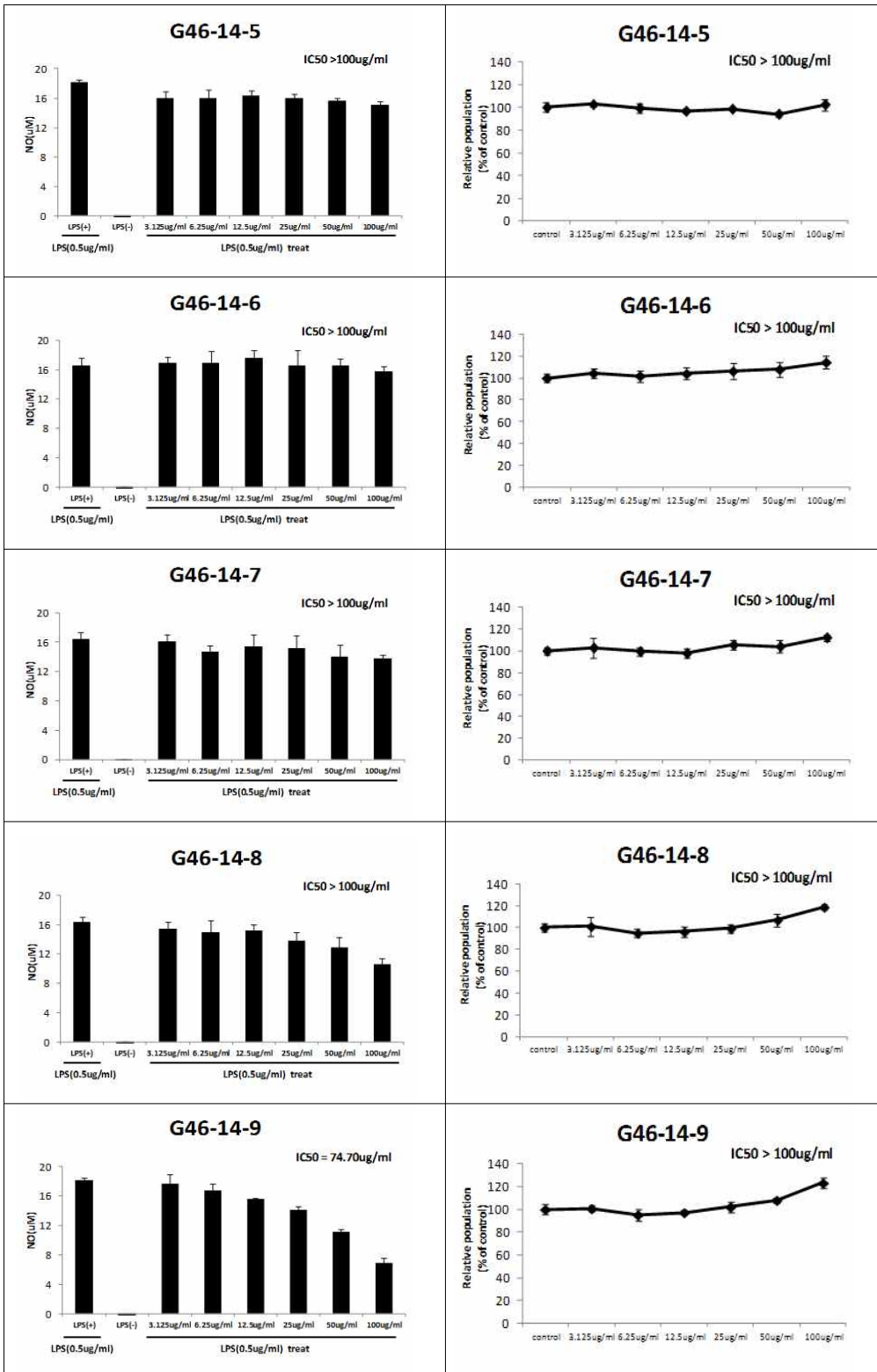
- 질려자 추출물속 기능성분을 분리하기 위한 bioassay-guided isolation을 진행하기 위해 극성에 따라 용매 분획을 진행한 후 5종의 fraction을 이용하여 대식세포인 RAW 264.7 세포의 항염(NO)활성을 확인해 본 결과, *n*-hexane, dichloromethan, ethyl acetate에서 염증억제효능이 우수하게 나타났음.

다. 질러자 추출물 2차 분획별 항염증 활성 평가

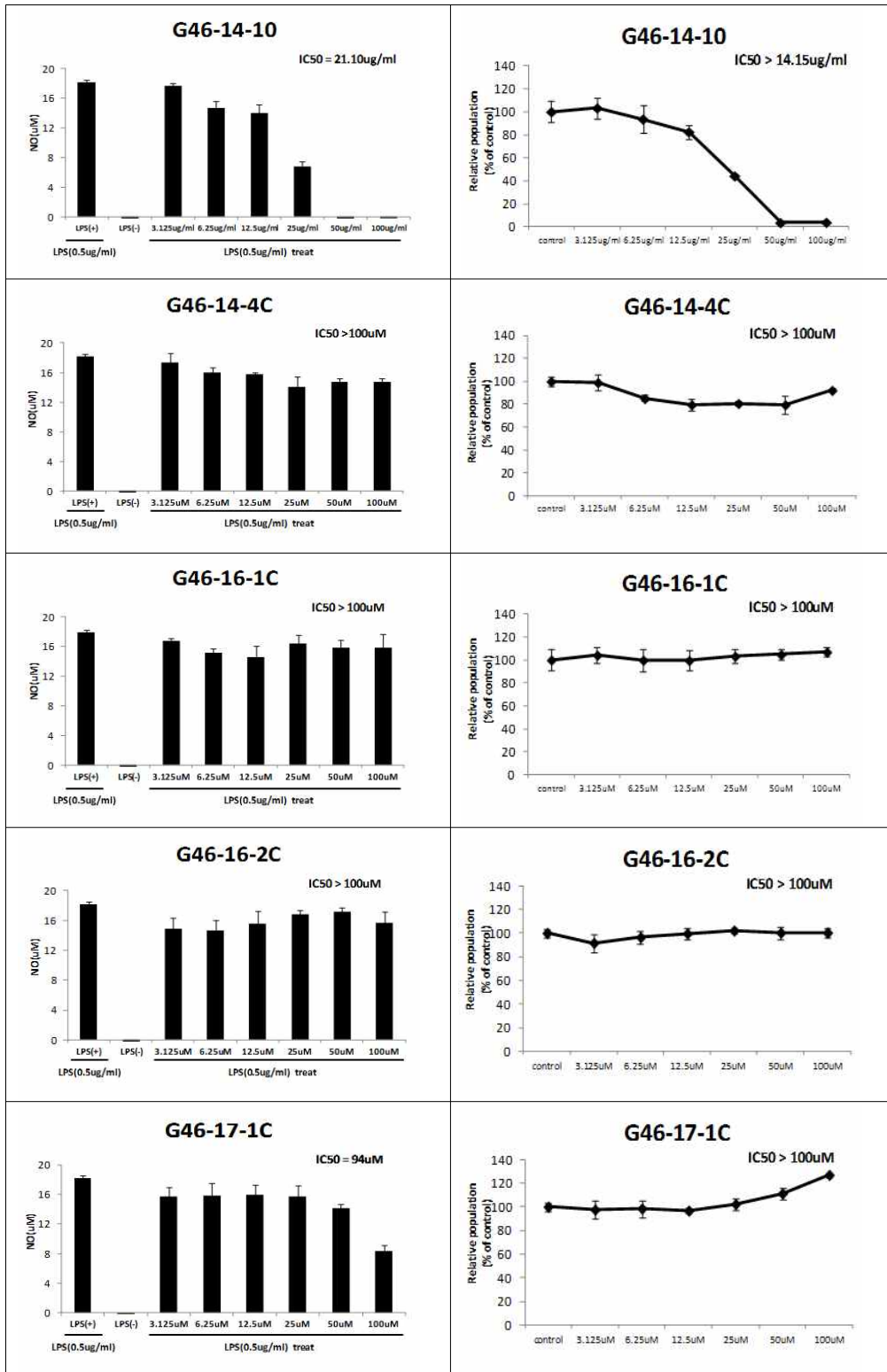












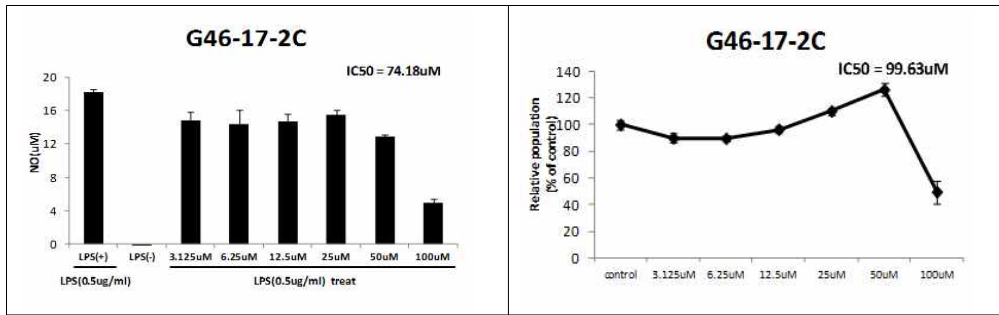
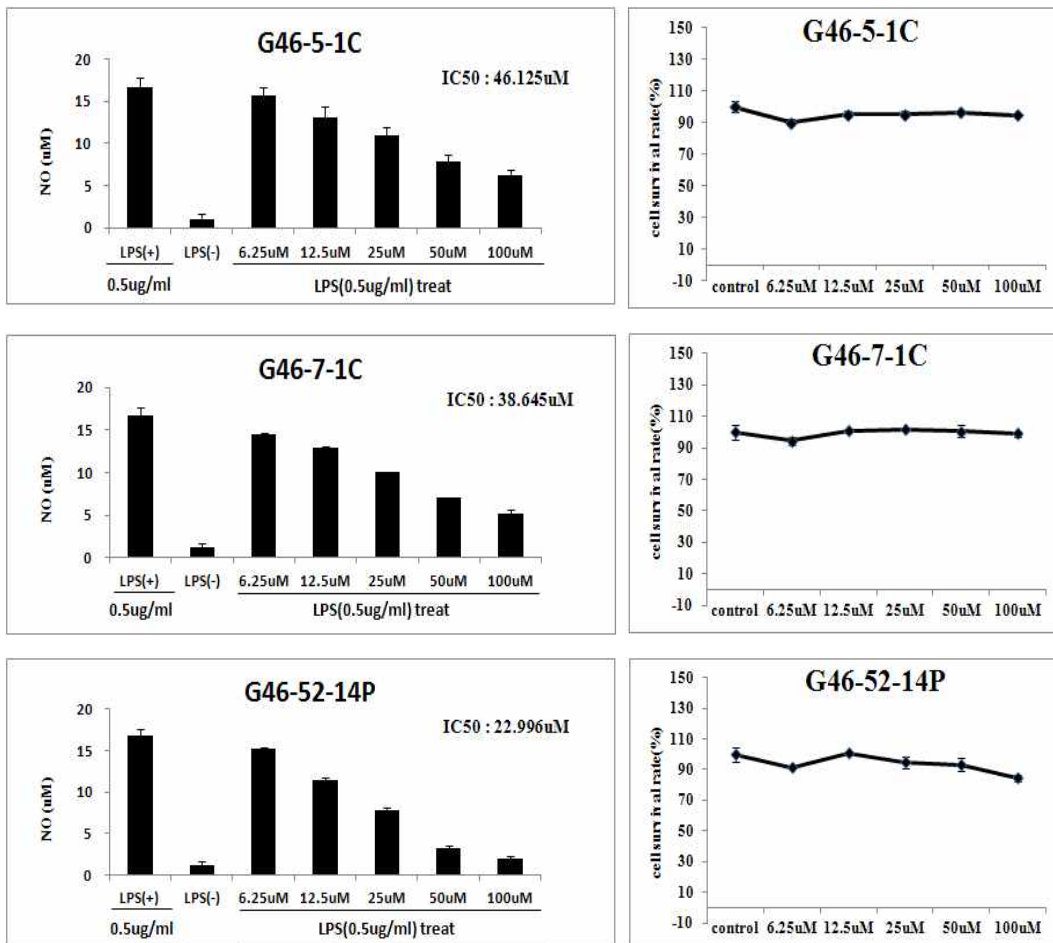
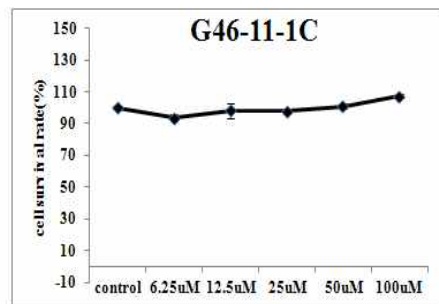
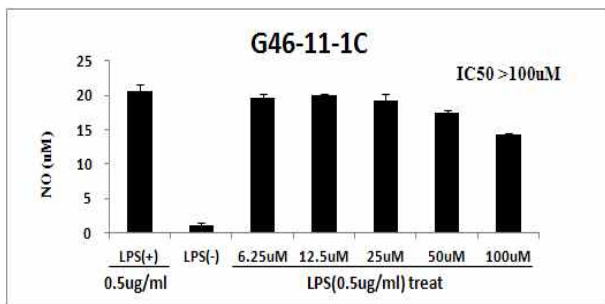
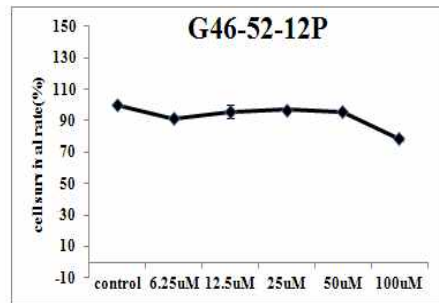
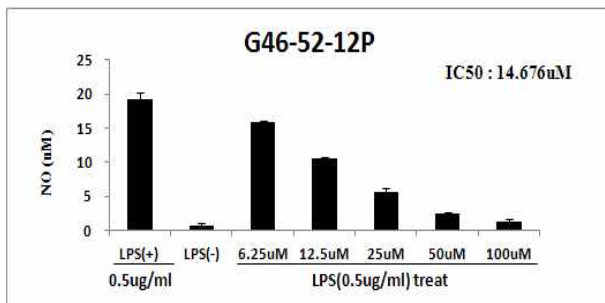
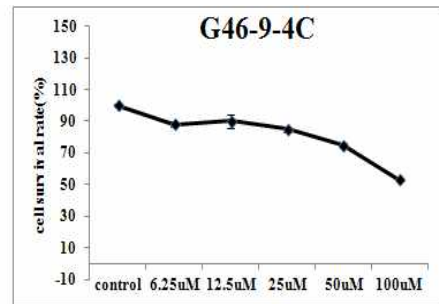
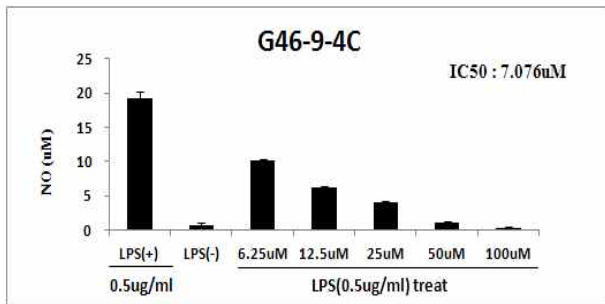
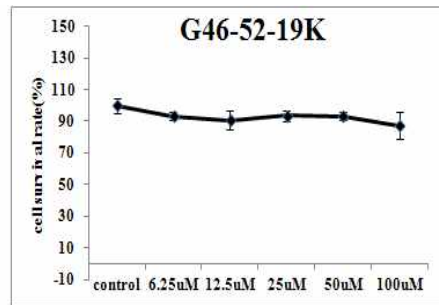
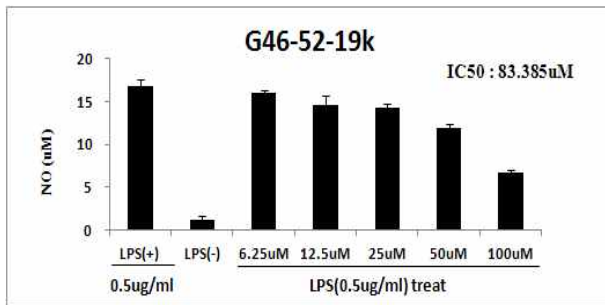
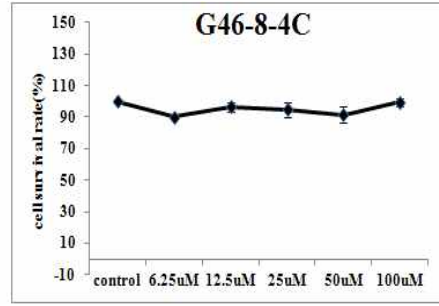
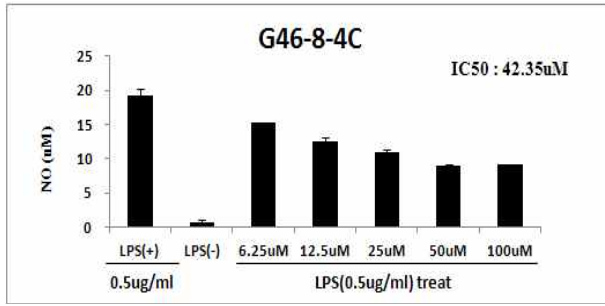


그림 98. The inhibition of NO production by extracts, fractions and compounds form *T. terrestris* on RAW 264.7 cells

- 질려자 추출물속 유효성분 찾고자 bioassay-guided isolation에 따라 분획물 21종과 화합물 5종의 항염증 활성을 확인한 결과, 분획물 중 G46-39-4, G46-40-7, G46-14-9의 3종이 세포독성이 없는 범위내에서 항염증 활성이 우수하였음. 또한 5종의 화합물중 G46-17-1C의 100 µM에서 항염증 억제 활성을 보였으며 나머지 화합물 4종에서는 세포독성이 없는 범위 안에서 항염증 효능이 관찰되지 않았음.

라. 질려자 추출물에서 분리된 유효물질들의 항염증 활성





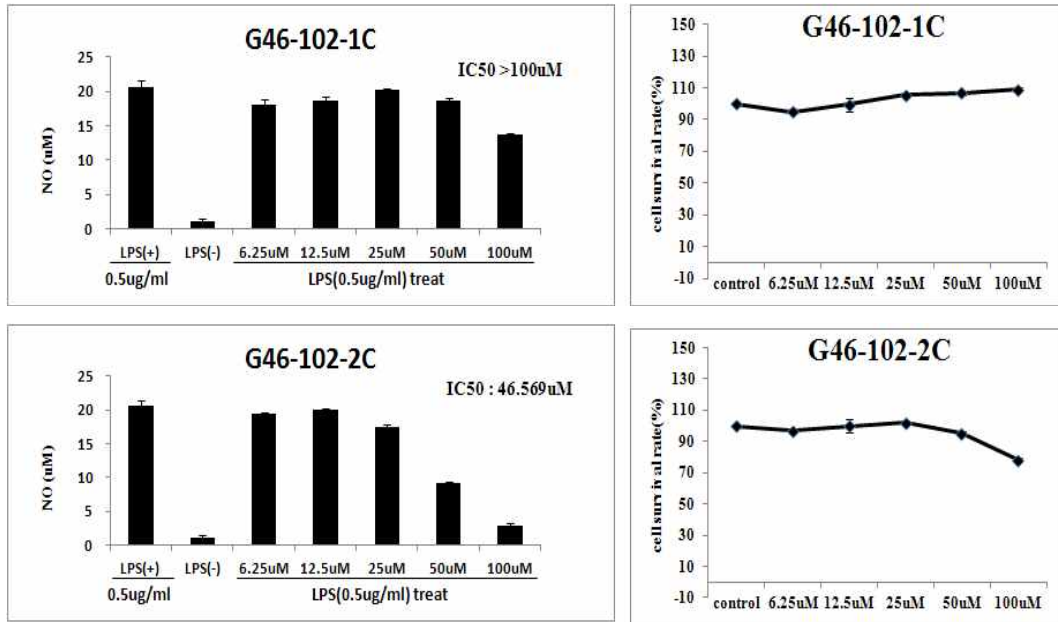


그림 99. The inhibition of NO production by *T. terrestris* isolated compounds on RAW 264.7 cells

- 질려자 추출물에서 분리한 화합물 10종을 이용하여 대식세포인 RAW 264.7 세포의 항염증 (NO) 활성을 확인해 본 결과, G46-5-1C, G46-7-1C, G46-52-1, G46-8-4C, G46-9-4C, G46-52-12P, G46-102-2C가 염증억제 효능이 나타났고, 이중 G46-9-4C, G46-52-12P에서 항염증 효과가 우수한 것으로 나타났음.

### 3. 질려자 80% 주정 추출물과 질려자에서 분리된 유효물질의 항염증 활성

#### 가. 질려자에서 유효성분의 분리·정제

- 질려자 10 kg에 80% 에탄올을 가하고 24시간 2회 실온에서 추출하였음. 추출액을 감압상태에서 농축시켜 673 g의 에탄올 추출물을 얻었음. 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매 분획하였음.
- 각각의 분획층을 감압상태에서 증발시켜 용매별 추출물을 얻었고, 헥산 (G46-3-1), 디클로로메탄 (G46-3-2), 에틸아세테이트 (G46-3-3) 추출물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래프를 실시하였음.
- 각각의 소분획물에 대하여 실리카겔, Sephadex LH-20, RP-18 칼럼 크로마토그래프, MPLC 및 prep. HPLC를 실행하여 14 종의 순수 화합물을 얻었음. 순수화합물 14종 중 효능이 우수한 유효화합물 2종을 설정하여 compound 1 (*N-trans-p*-caffeoyl tyramine), compound 2 (tribulusamide D)로 나타냄 (그림 100).

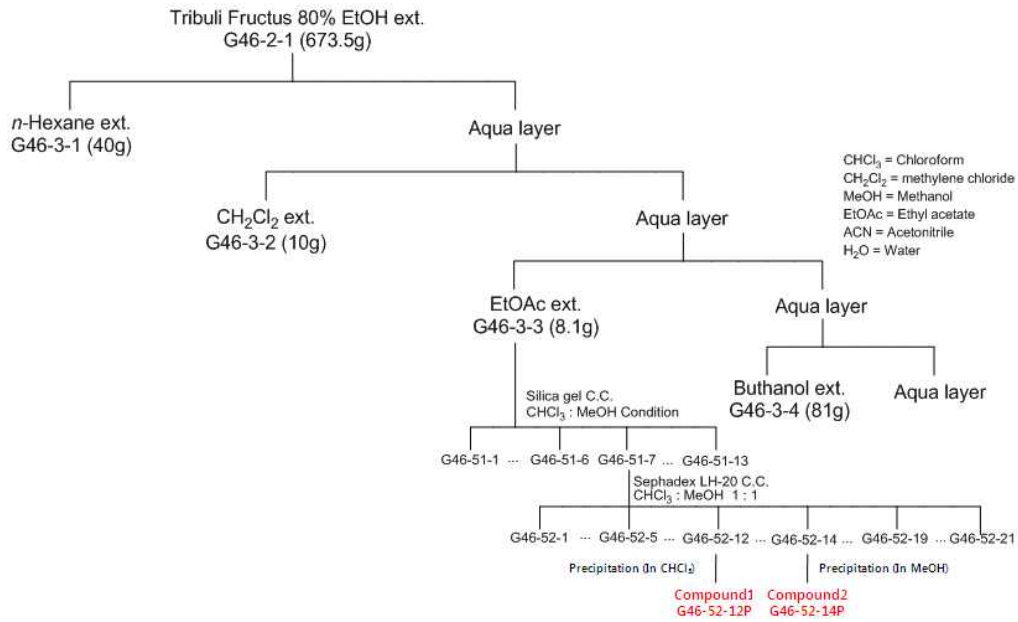


그림 100. 질려자 추출물로부터 compound 1과 2의 추출, 용매 분획 및 화합물의 분리.

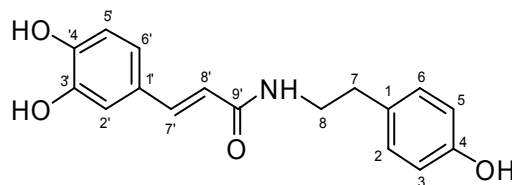


그림 101. Compound 1, G46-52-12P (*N-trans-p*-caffeoyl tyramine)의 구조

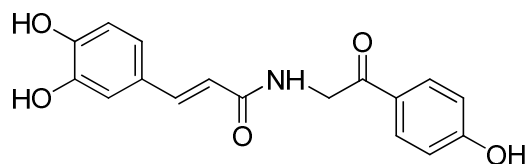


그림 102. Compound 2, G46-52-14P (tribulusamide D)의 구조

- ☞ 위의 두 가지 단일화합물 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine 과 tribulusamide D는 bioassay-guided isolation에 따라 유효물질들로 단리 되었으며, 항염증 활성이 검증되어 항염증 활성 작용기전에 대한 연구를 진행함.

#### 4. 질려자 80% 주정 추출물과 유효물질의 *in vitro* 항염증 활성 실험 결과

##### 가. 질려자 80% 주정 추출물과 유효물질 2종의 NO synthesis 억제 효과

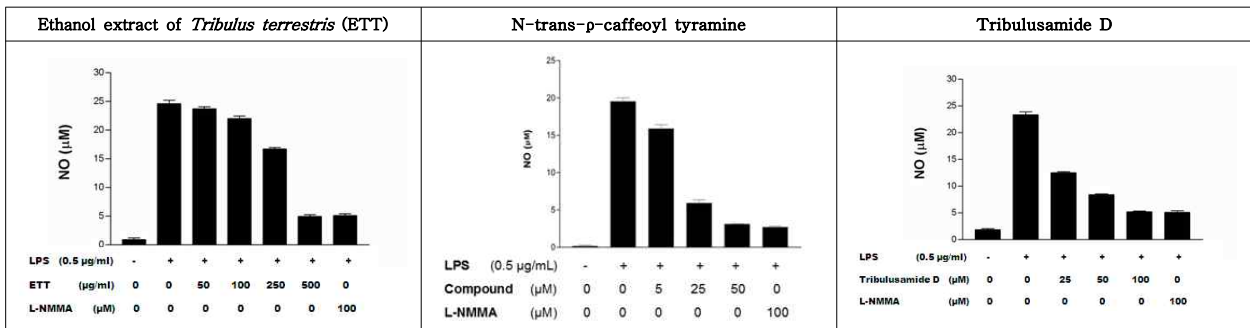


그림 103. Effect of the Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT) and its compounds N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine and tribulusamide D on NO production in RAW 264.7 cells. After stimulation, RAW 264.7 cells were treated with 50, 100, 250 and 500  $\mu$ g/ml of ETT, 5, 25 and 50  $\mu$ M of N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine and 25, 50 and 100 $\mu$ M of tribulusamide D in the absence or presence for 24 h. NO assay was performed by Griess reagent. L-NMMA: NG-Monomethyl-L-Arginine is known to an inhibitor of nitric oxide synthase.

- RAW 264.7 세포에 질려자 80% 주정 추출물(ETT)과 질려자 화합물인 N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine과 tribulusamide D를 처리하여 항염증 활성을 NO assay로 확인해 본 결과, 농도의존적으로 LPS를 처리한 양성대조군에 비해 뚜렷한 NO 생성 분리량이 감소되는 것으로 나타났으며, 각 실험의 최고농도인 500  $\mu$ g/ml (ETT), 50  $\mu$ M (N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine), 100  $\mu$ M (tribulusamide D)은 NO 합성 억제제인 양성대조군인 L-NMMA의 유효농도에서의 비슷한 효과를 나타냄으로써 염증억제 효과가 우수한 것으로 관찰됨.

##### 나. 질려자 80% 주정 추출물과 유효물질 2종의 세포독성 평가

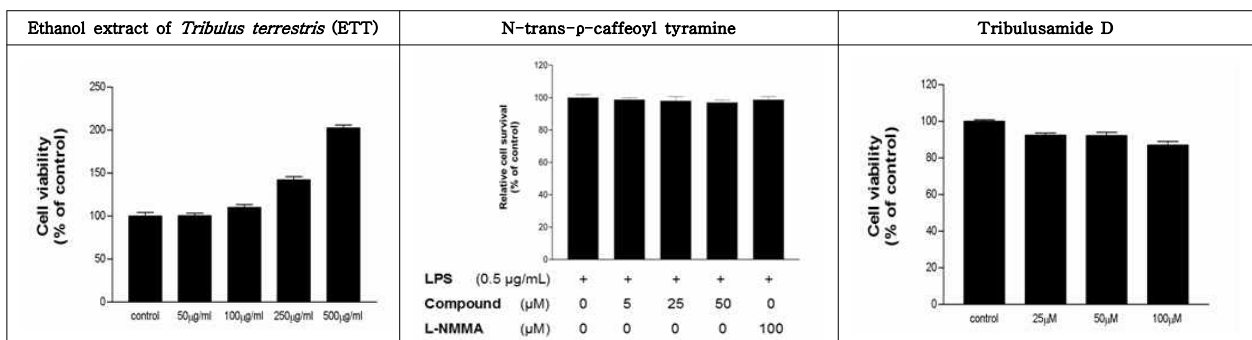


그림 104. Cell viability was determined by the MTT assay. Cell proliferation of RAW 264.7 cell treated ETT increases in dose dependent manner. The proliferation of RAW 264.7 cell treated N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine is stable but tribulusamide D slightly decreased. Results of the experiments

were the mean values of three independent experiments and are shown as percentage cell viability compared with the viability of untreated control cells.

- RAW 264.7 세포에 질려자 80% 주정 추출물 (ETT)과 질려자 화합물인 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine과 tribulusamide D를 처리하여 세포독성 (MTT)을 확인해 본 결과, 화합물의 경우에는 뚜렷한 세포독성이 나타나지 않은 반면, 질려자 80% 주정 추출물의 경우 농도 의존적으로 세포증식 효능이 있는 것을 확인하였음.

**다. 질려자 80% 주정 추출물의 비장세포에서의 세포 증식 효과**

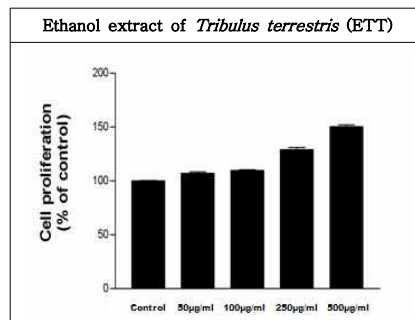


그림 105. Effects of Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT) on cell proliferation of primary splenocytes. Splenocytes were treated with ETT at various concentrations. Cell proliferation of splenocytes was determined using the MTS assay. The proliferation increased in dose dependent manner. The bars represent the mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments.

- RAW 264.7 세포에서 질려자 80% 주정 추출물을 이용하여 MTT assay를 수행한 결과 농도 의존적으로 세포증식이 관찰되었음. 대식세포의 증식과 면역증강과의 상관관계를 확인해 보기 위해 질려자 주정 추출물을 마우스 비장에서 추출한 splenocytes를 통해 세포 증식 효능을 확인해 본 결과 비장세포에서도 농도 의존적으로 세포증식이 일어남을 확인할 수 있었음. 이로써 일차적으로 질려자 주정 추출물이 면역작용을 하는 비장세포를 증가시킴으로써 면역증강 효능도 가지고 있음을 확인하였음.

**라. 작용기전 연구 I : 염증관련 Cytokine의 유전자 발현 분석**

Ethanol extract of <i>Tribulus terrestris</i> (ETT)						<i>N-trans-p</i> -caffeoyl tyramine						Tribulusamide D						
IL-6	[Gel bands]					TNF- $\alpha$	[Gel bands]					IL-6	[Gel bands]					
IL-10	[Gel bands]					IL-6	[Gel bands]					IL-10	[Gel bands]					
TNF- $\alpha$	[Gel bands]					IL-10	[Gel bands]					TNF- $\alpha$	[Gel bands]					
GAPDH	[Gel bands]					GAPDH	[Gel bands]					GAPDH	[Gel bands]					
LPS (0.5 µg/ml)	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ETT (µg/ml)	0	0	50	100	250	500	0	0	5	25	50	0	0	0	25	50	100	0
Dexa (µM)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	25

그림 106. Effects of Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT), *N-trans-p*-caffeoyl tyramine

and tribulusamide D on the expression of inflammatory cytokines mRNA in RAW 264.7 cells. (A) The representative gels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  were assessed by RT-PCR analysis.

- 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 염증관련 유전자를 대상으로 유전자 발현 억제능을 살펴보기 위해 RT-PCR 실험을 실시한 결과, 질려자 80% 주정 추출물 (ETT)과 질려자 유효물질인 *N-trans-p*-caffeoyl tyramine과 tribulusamide D 시료를 처리한 군에서 IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것이 관찰되었음.

마. 작용기전 연구 II : 염증관련 Cytokine의 단백질 발현 분석 (ELISA assay)

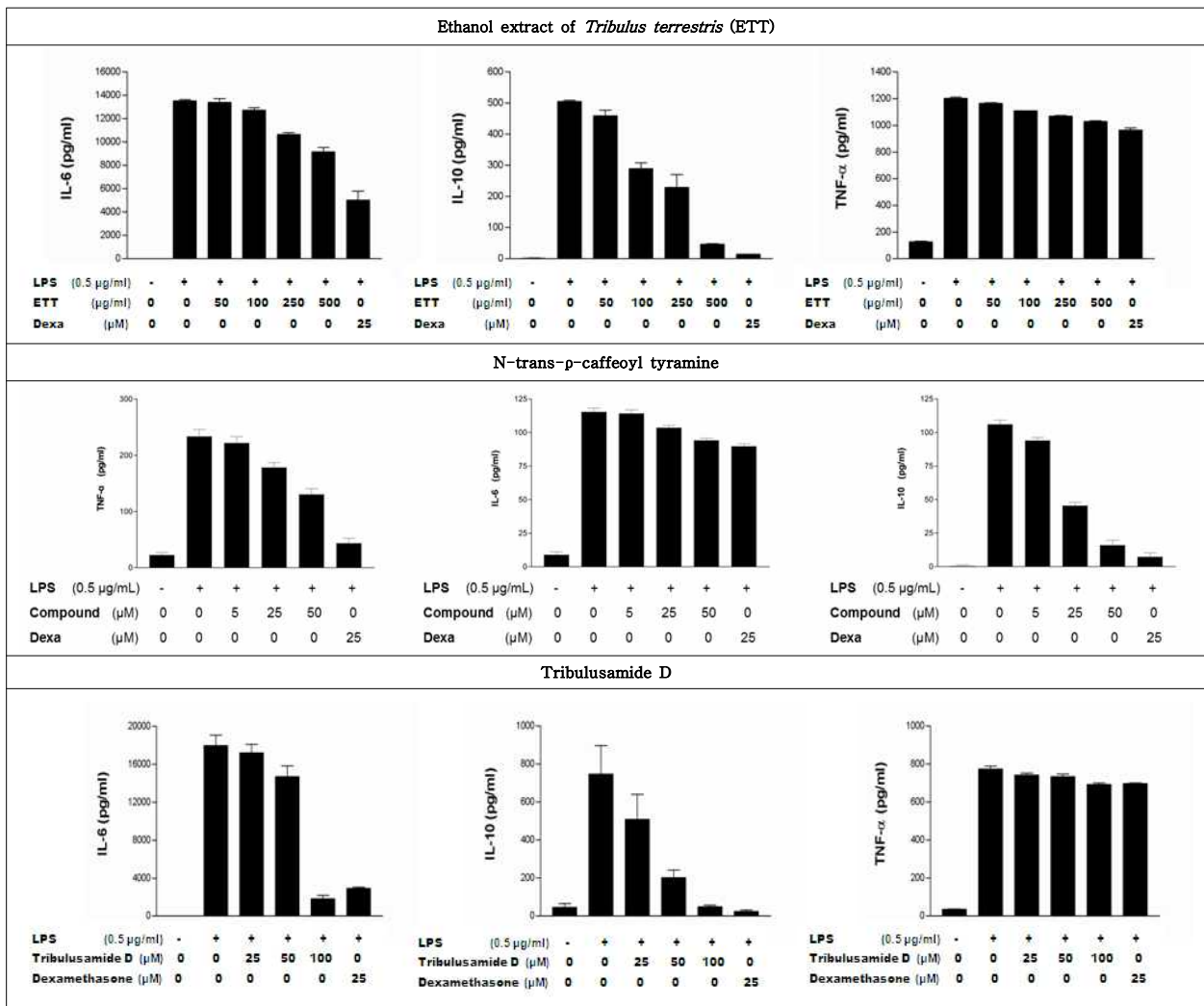


그림 107. Inhibitory effects of Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT), *N-trans-p*-caffeoyl tyramine, and tribulusamide D on the production of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in medium of LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Results of the experiments were the mean values of three independent experiments. Compound: *N-trans-p*-caffeoyl tyramine, Dexa: dexamethasone.

- 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용하여 염증관련 단백질의 발현 억제능을 살



펴보기 위해 ELISA assay를 실시한 결과, 질려자 80% 주정 추출물(ETT), N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine과 tribulusamide D 시료를 처리한 군에서 IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 경향이 관찰됨.

바. 작용기전 연구 III : COX-2 유전자 발현 분석

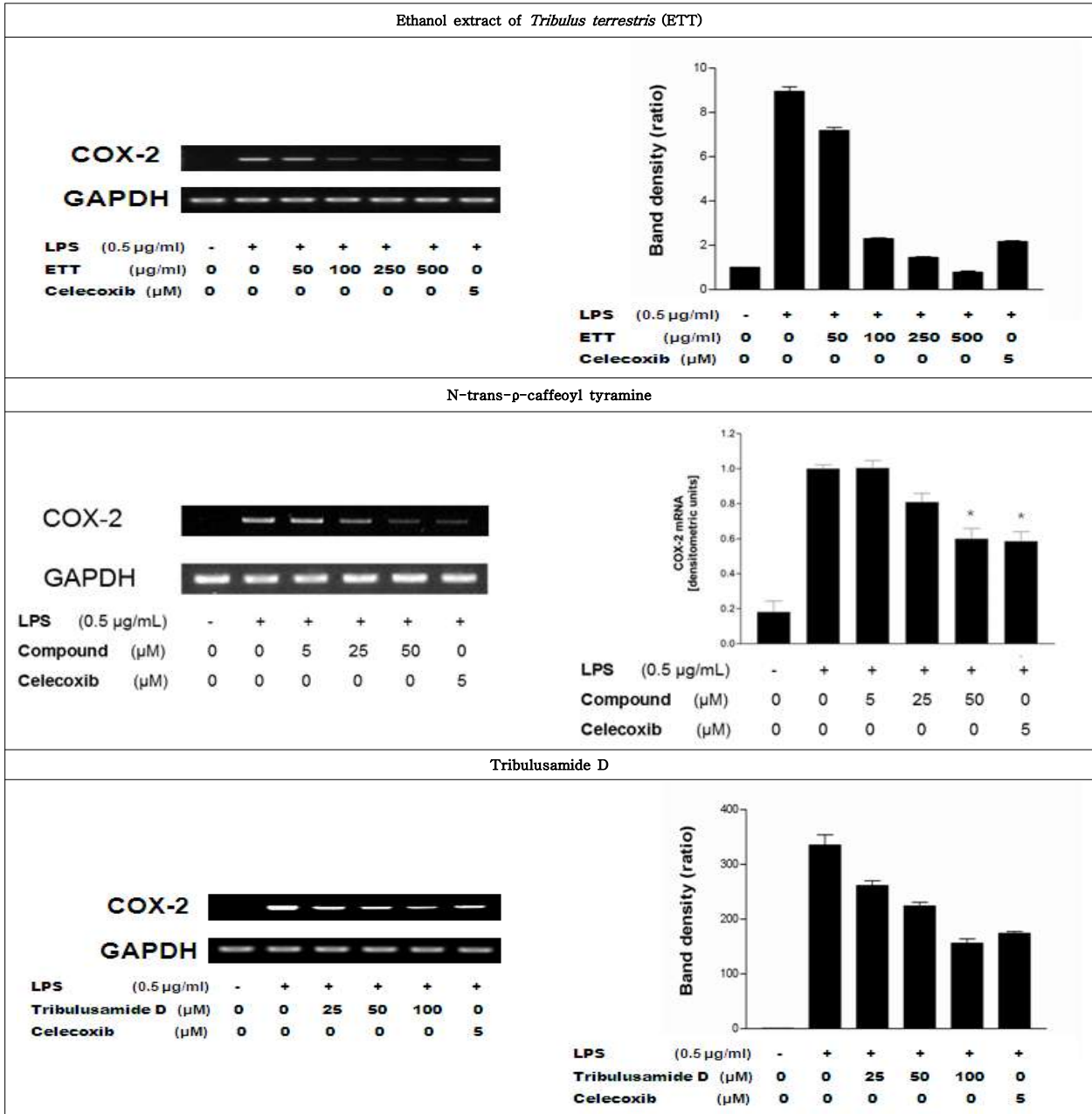


그림 108. Effects of Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT), N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine, and tribulusamide D on inhibition of COX-2 expression in RAW 264.7 cells. The RT-PCR and quantitative densitometric analysis of COX-2 mRNA expression. Data are expressed as the means $\pm$ S.D. where P<0.05 was considered statistically significant.

- RAW 264.7 세포에 질려자 80% 주정 추출물(ETT), 질려자 화합물인 N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl

tyramine과 tribulusamide D를 처리하여 COX-2를 RT-PCR을 통해 유전자의 발현수준을 확인해 본 결과, control인 GAPDH와 비교하였을 때 농도 의존적으로 mRNA 양이 감소하는 것이 관찰됨.

#### 사. 작용기전 연구 IV : COX-2 단백질 발현 분석 (western blot analysis)

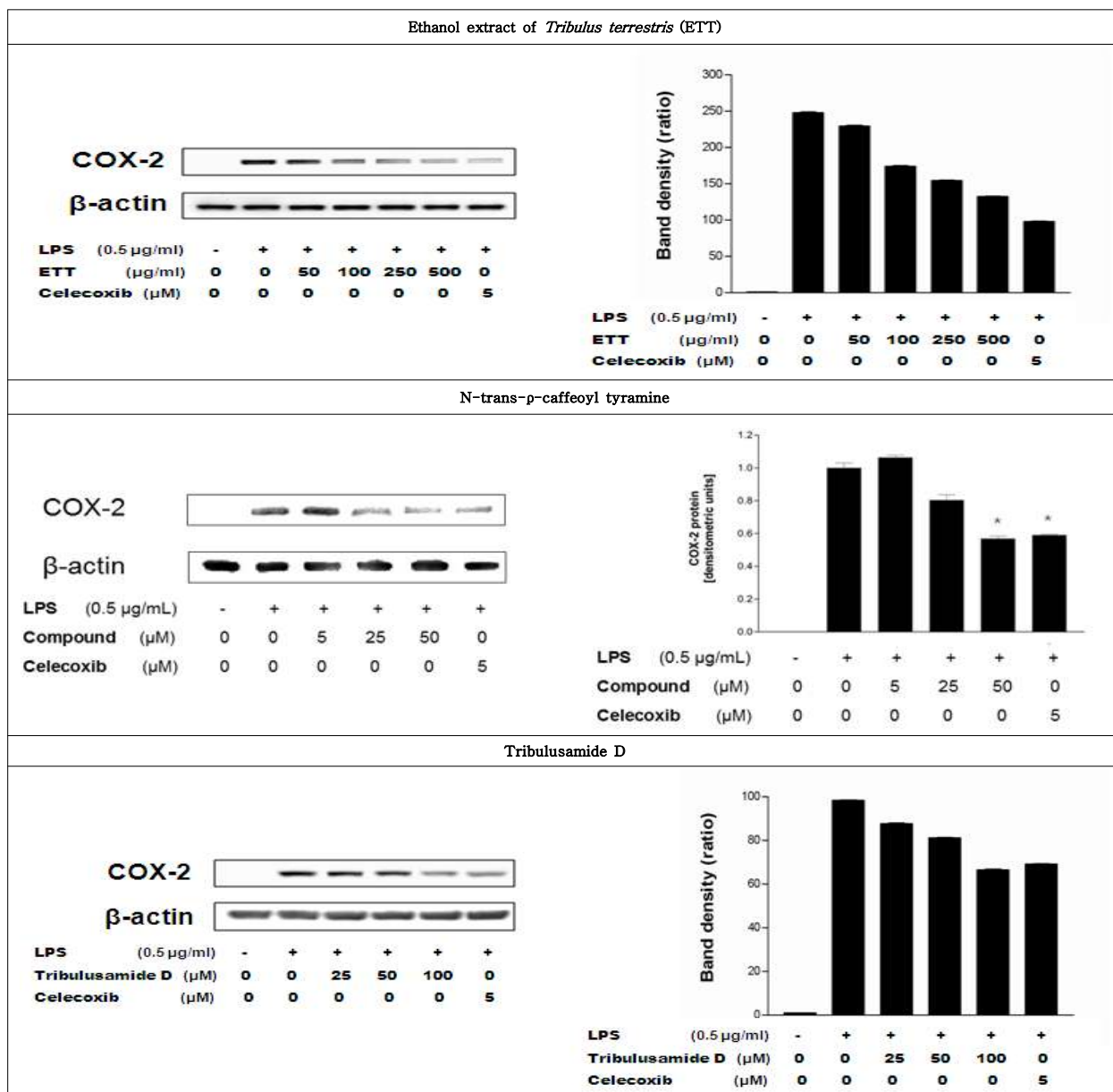


그림 109. Effects of Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT), N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine, and tribulusamide D on inhibition of COX-2 expression in RAW 264.7 cells. The western blotting for COX-2 and quantitative densitometric analysis of COX-2 protein expression. Data are expressed as the means $\pm$ S.D. where P<0.05 was considered statistically significant. celecoxib: COX-2 specific inhibitor.

- RAW 264.7 세포에 질려자 80% 주정 추출물(ETT), 질려자 화합물인 N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine과 tribulusamide D를 처리하여 COX-2의 단백질 발현수준을 western blot analysis 방법으로 확인해 본 결과, control인  $\beta$ -actin에 비해 COX-2의 발현양이 농도 의존적으로 감소하는 것이 관찰됨.

아. 작용기전 연구 V : PGE<sub>2</sub>의 단백질 발현수준 분석 (ELISA assay)

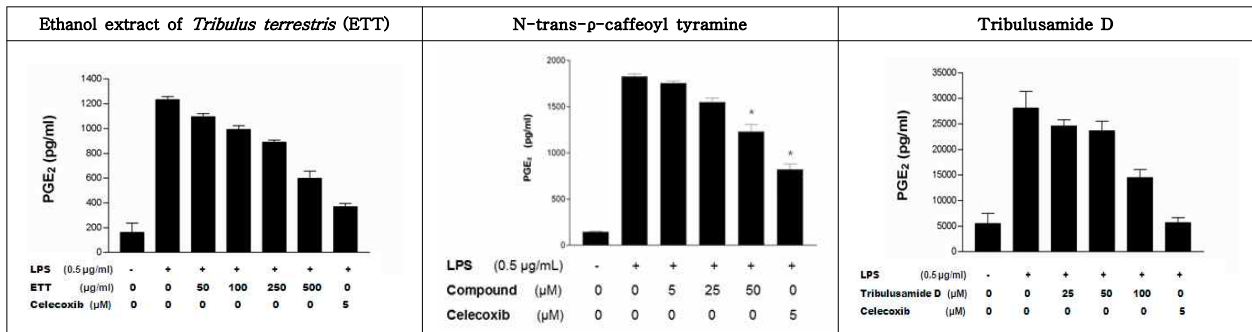


그림 110. Effects of Ethanol extract of *T. terrestris* (ETT), N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine, and tribulusamide D on production of PGE<sub>2</sub> in RAW 264.7 cells. Results of the experiments were the mean values of three independent experiments. Data are expressed as the means $\pm$ S.D. where P<0.05 was considered statistically significant. celecoxib: COX-2 specific inhibitor.

- RAW 264.7 세포에 질려자 80% 주정 추출물(ETT), N-*trans*- $\rho$ -caffeoyl tyramine과 tribulusamide D를 처리하여 COX-2의 downstream에 있는 PGE<sub>2</sub>의 단백질 발현수준을 ELISA assay로 확인한 결과, 농도 의존적으로 그 발현양이 감소하는 것을 관찰함.

## 제 5 절 염증동물모델에서의 질려자 추출물의 염증 억제 평가

### 1. 급성 염증 동물모델 구축

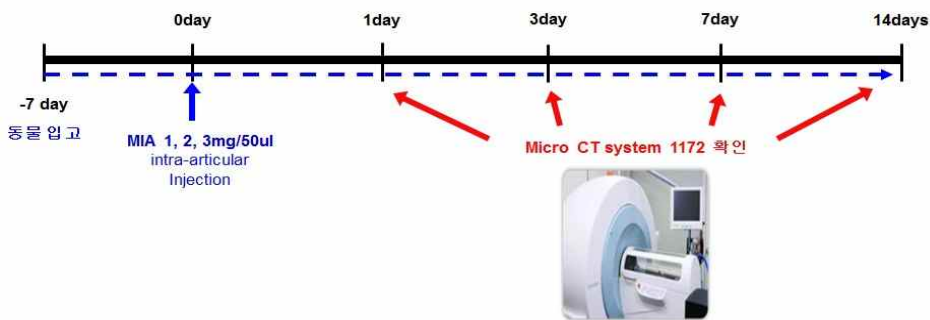
- 사람과 유사한 퇴행성 골관절염 유발 모델을 제작하기 위해 MIA(monosodium iodoacetate, Sigma)로 관절염을 유발하였음.

실험동물은 6주령 된 수컷 SD rat과 Lewis rat 수컷 130~150g (오리엔트바이오, 한국), 사료는 10 kcal% fat (TD 06416, Harlan Teklad사)를 사용하였고, 사육실 온도는 22±2℃, 습도는 50±15%의 환경을 유지 오전 8시 오후 8시 기준으로 하여 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주고 고형사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였음.

렘폰과 조레틸을 3:7로 혼합한 마취액을 i.m(intra-muscle)으로 50ul 주사하여 동물을 마취시킨 다음 MIA를 오른쪽 슬관절의 슬개골 인대를 통해 관절 내 주사 (intra-articular injection) 함.

MIA는 멸균수에 각 1, 2, 3 mg의 농도가 되게 용해하여 한 관절 당 50ul씩 26gauge를 사용하여 주사하고 유발하지 않는 왼쪽 관절은 50ul씩 멸균증류수를 주사하여 관절염 유발에 적절한 농도를 찾기 위한 실험과 1mg 농도의 MIA로 주사하여 샘플투여의 적정시기를 결정하기 위하여 유발 후 각 1, 3, 7, 10일에 골관절염의 Positive 약물인 celecoxib를 투여하여 실험을 진행하였음 (그림 111).

< MIA 농도 결정 실험 >



< 약물투여 결정 실험 >

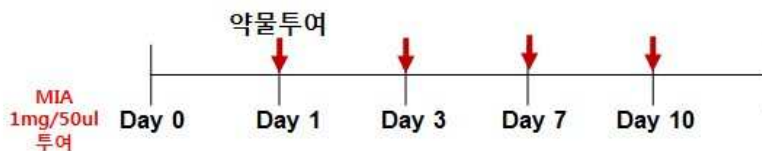


그림 111. 실험일정표

- MIA 주사 후 14일 동안 관절 직경의 길이를 재 부종을 측정 한 결과, 3일차에 부종이 가장 커지고 농도에 따라 부종이 증가하였으며 (표 30, 그림 112) 3일, 7일, 14일 체중은 MIA농도가 증가함에 따라 대조군대비 유의하게 체중이 감소했음 (표 31, 그림 112).

표 30. MIA 농도에 따른 0, 3, 7, 14일의 부종 크기 변화 (오른쪽 - 왼쪽 직경길이)

단위 (mm)	0일	3일	7일	14일
대조군	-0.03±0.03	0.04±0.03	-0.01±0.03	0.03±0.01
1mg/50ul	0.01±0.03	0.64±0.1	0.1±0.04	0.05±0.03
2mg/50ul	0.04±0.05	0.76±0.17	0.23±0.06	0.11±0.03
3mg/50ul	0.05±0.01	1.13±0.14	0.32±0.12	0.09±0.03

표 31. MIA 농도에 따른 0, 3, 7, 14일의 체중 변화

단위 (g)	0일	3일	7일	14일
대조군	145.5±3.2	153.0±4.0	178.0±4.7	206.7±7.0
1mg/50ul	145.3±1.7	151.2±2.6	171.3±3.4	205.3±3.7
2mg/50ul	145.5±2.2	150.8±3.4	167.5±4.2	197.3±4.9
3mg/50ul	145.5±5.3	147.8±5.5	163.3±7.3	194.5±8.2

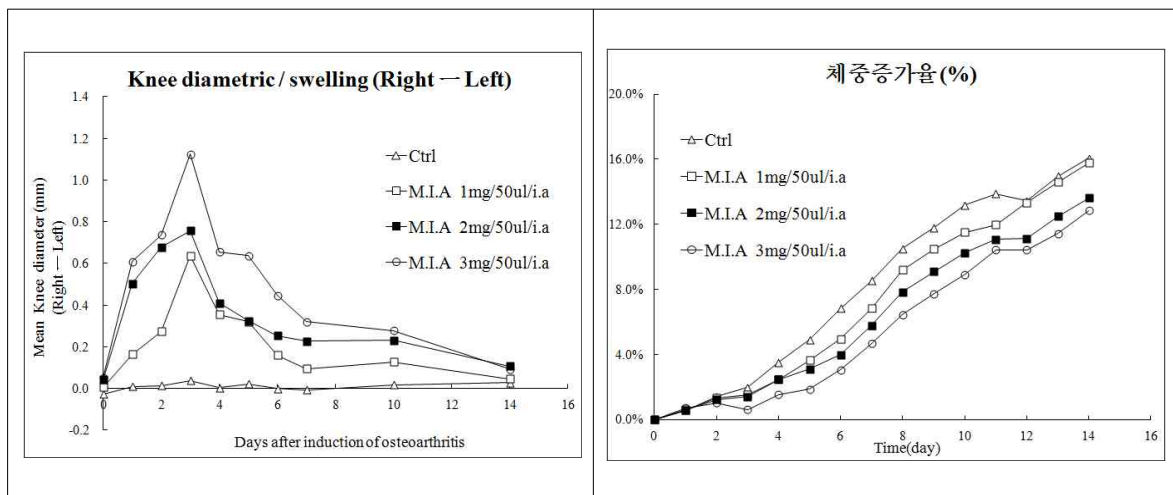


그림 112. MIA 주사 2주 후 부종발생과 체중증가율 결과 그래프

- MIA를 1, 2, 3mg/50ul로 주사한 후 Micro CT (Micro CT system 1172)를 이용하여 1일, 3일, 7일, 14일에 관찰한 결과 대조군에 비해 슬관절 안쪽부위의 파괴가 MIA 농도가 높을수록, 시간이 지날수록 더 진행되었음을 관찰할 수 있음 (그림 113).

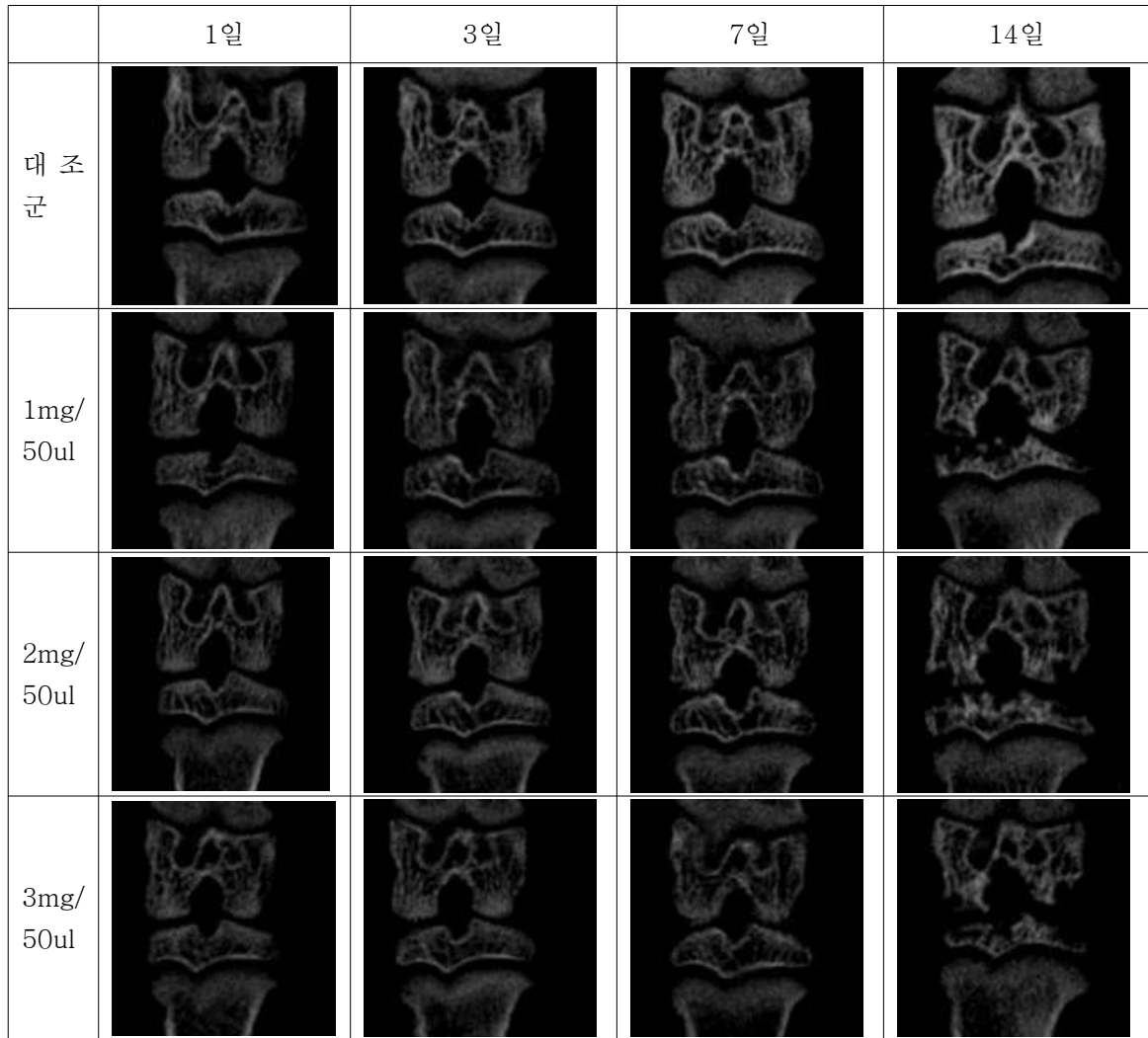


그림 113. MIA 주사 2주 후 Micro CT Image 결과

- MIA 1mg 농도로 주사하여 유발 후 각 1, 3, 7, 10일부터 골관절염의 Positive 약물인 celecoxib를 투여하여 직경의 길이를 재 약물투여결정 실험을 진행한 결과, 부종은 celecoxib를 빨리 투여할수록 감소하였고 (표 32, 그림 114), 유도군 대비 유의한 체중변화는 나타나지 않았음 (표 33, 그림 114).

표 32. MIA 농도에 따른 0, 3, 7, 14일의 부종 크기 변화 (오른쪽 - 왼쪽 직경길이)

단위 (mm)	0일	3일	7일	14일
유도군	0.01±0.02	1.24±0.30	0.56±0.15	0.02±0.01
1일째부터 투여	0.00±0.03	1.60±0.21	0.22±0.04	0.08±0.02
3일째부터 투여	0.05±0.01	1.64±0.09	0.30±0.11	0.04±0.02
7일째부터 투여	-0.01±0.02	1.75±0.12	0.49±0.15	0.10±0.01
10일째부터 투여	-0.01±0.02	1.25±0.03	0.57±0.03	0.07±0.02

표 33. MIA 농도에 따른 0, 3, 7, 14일의 체중 변화

단위 (g)	0일	3일	7일	14일
유도군	141.0±7.5	142.7±7.9	166.0±8.1	206.0±8.1
1일째부터 투여	144.3±1.3	149.1±2.2	171.7±2.7	211.3±4.5
3일째부터 투여	143.0±1.5	147.1±1.8	171.0±1.9	213.7±2.7
7일째부터 투여	142.7±1.3	144.8±2.0	169.0±2.2	211.7±1.9
10일째부터 투여	142.7±3.9	147.8±3.8	169.0±3.9	209.0±5.1

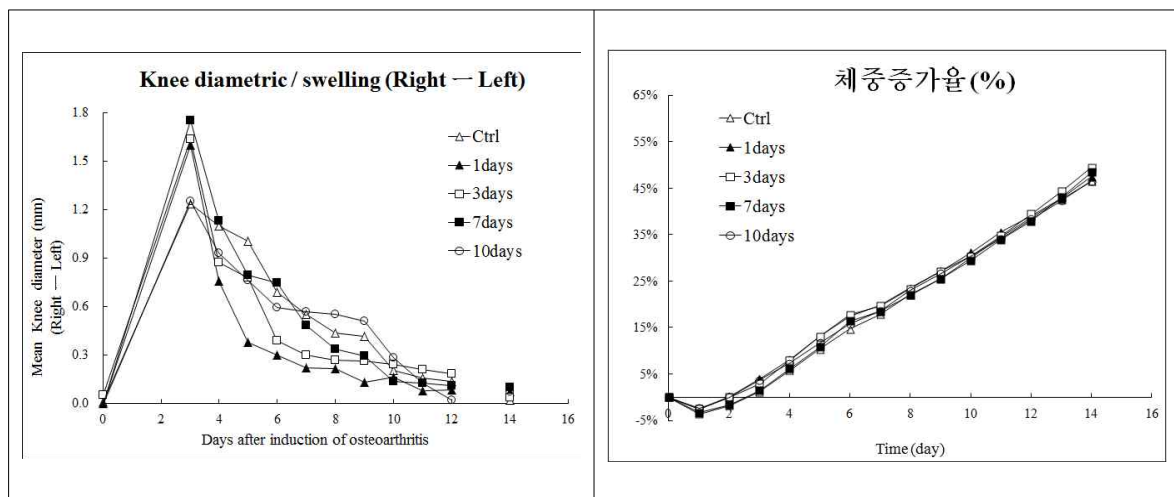
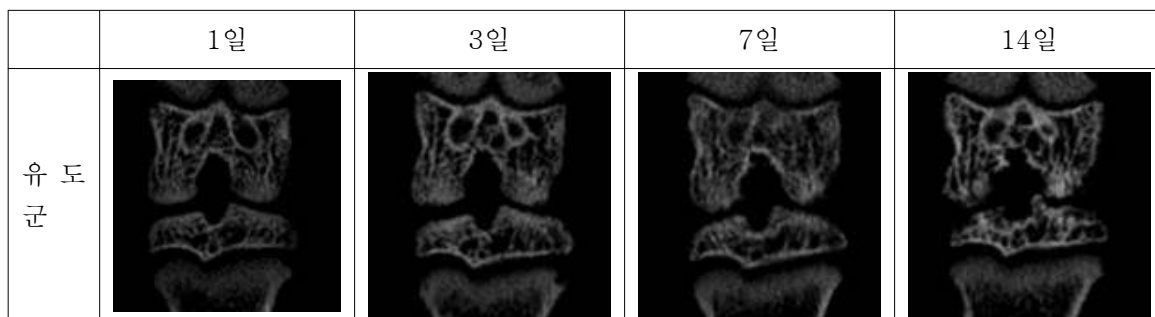


그림 114. MIA 주사 14일 후 부종발생과 체중증가율 결과 그래프

- MIA 1mg 농도로 주사하여 유발 후 각 1, 3, 7, 10일부터 골관절염의 Positive 약물인 celecoxib를 투여한 후 Micro CT (Micro CT system 1172)를 이용하여 1일, 3일, 7일, 14일에 관찰한 결과 유도군에 비해 슬관절 안쪽부위의 파괴가 1, 3일째부터 투여한 것은 억제된 것으로 보이며 7, 10일째부터 투여한 것은 유도군 대비 차이가 없는 것으로 보여짐 (그림 115).



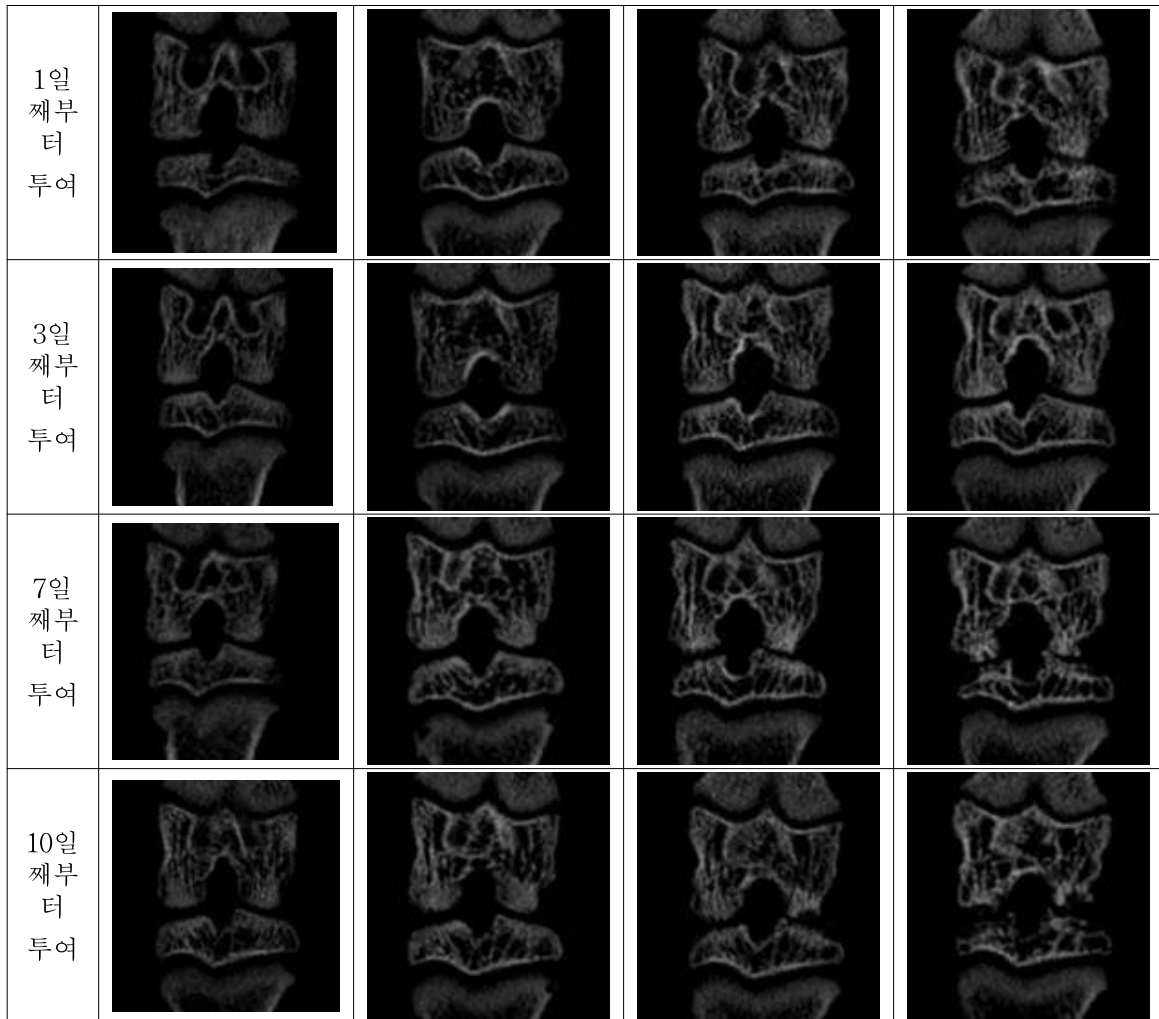


그림 115. MIA 주사 1일, 3일, 7일, 14일 후 Micro CT Image 결과

## 2. MIA 동물모델을 이용한 관절개선 *in vivo* 평가

- 6주령의 Lewis Rat을 체중이 높은 순으로 배열하고 분리하여 군 간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 함. 림폰과 졸레틸을 3:7로 혼합한 마취액을 i.m(intra-muscle)으로 50ul 주사하여 동물을 마취시킨 다음 MIA를 1mg 농도로 오른쪽 슬관절의 슬개골 인대를 통해 관절 내 50ul 주사 (intra-articular injection)함. 유발 후 다음 날부터 질려자 추출물 200mg/kg, 400mg/kg, 800mg/kg와 양성대조군으로 celecoxib 경구투여 하였으며, 매주 micro Computed Tomograph scan 하여 얻은 이미지를 bone morphometry 분석을 통하여 관절염의 완화 정도를 평가함.



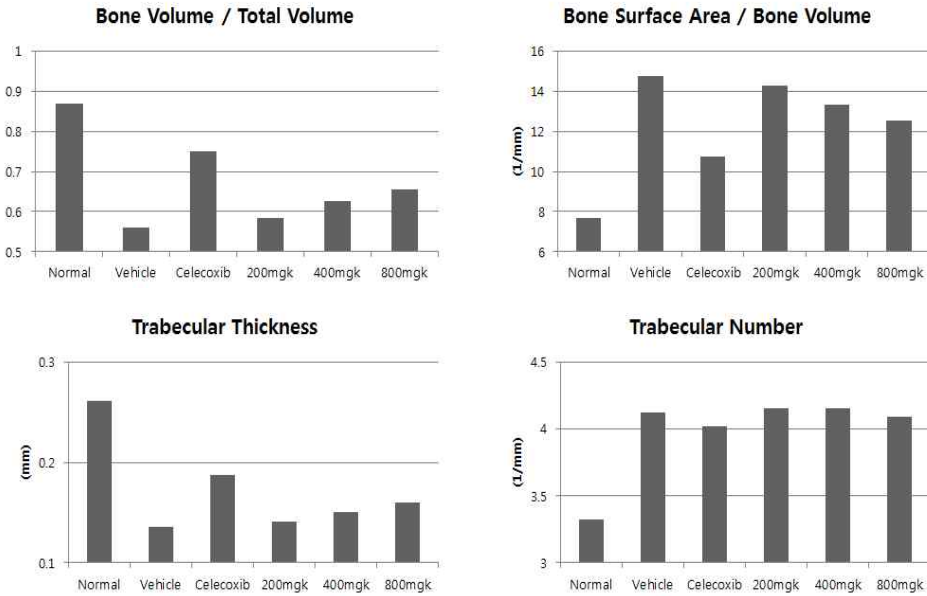


그림 116. 2주 Bone Morphometry 분석 결과

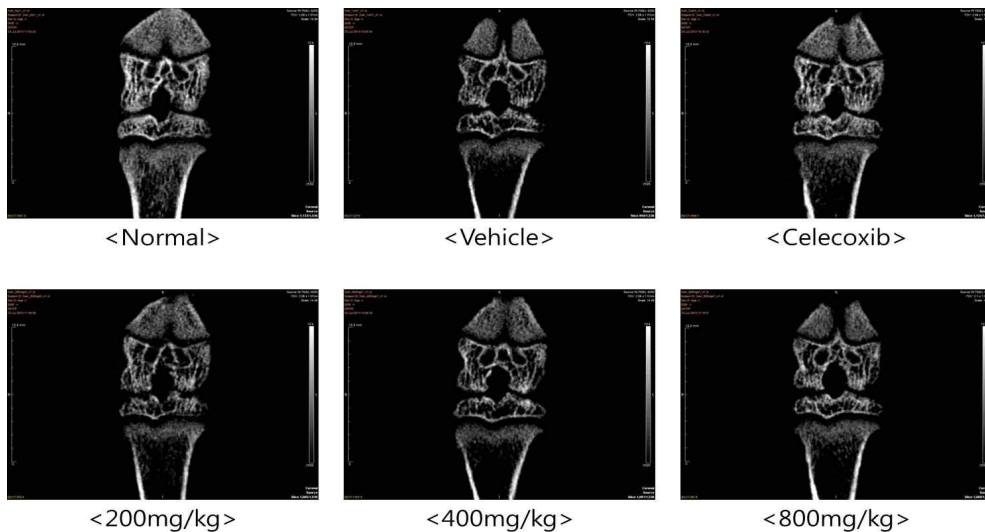


그림 117. 실험동물의 2주 micro-CT 관절 영상

- 투여 2주째의 bone morphometry 분석결과 전체 ROI(관심영역)으로 지정한 부위에서 bone 이 차지하는 비율을 의미하는 'Bone Volume / Total Volume' 항목은 양성대조군을 기준으로 다른 군을 비교하였는데 800mg/kg 농도로 투여한 군에서 다른 군에 비해 bone이 차지하는 비율이 높게 나타났음. 이는 관절 부위의 파괴 진행이 감소되면서 연골 마모가 감소됨에 따라 관절염이 완화되는 것을 의미함. 그에 따라 해면골의 두께를 의미하는 'Trabecular Thickness' 항목에서도 800mg/kg 농도로 투여한 고농도 군에서 다른 군에 비해 높은 수치를 나타냈음. 이는 관절부위의 파괴가 억제되면서 해면골 두께의 증가로 인한 관절염의 완화를 의미하고, 또한 ROI(관심영역)의 bone 부위에서 bone의 표면적 비율을 의미하는 'Bone Surface Area / Bone Volume' 항목 또한 800mg/kg 농도로 투여한 고농도 군에서 다른 군에 비해 낮은 수치를 보여 관절염이 완화되고 있음을 알 수 있었음.

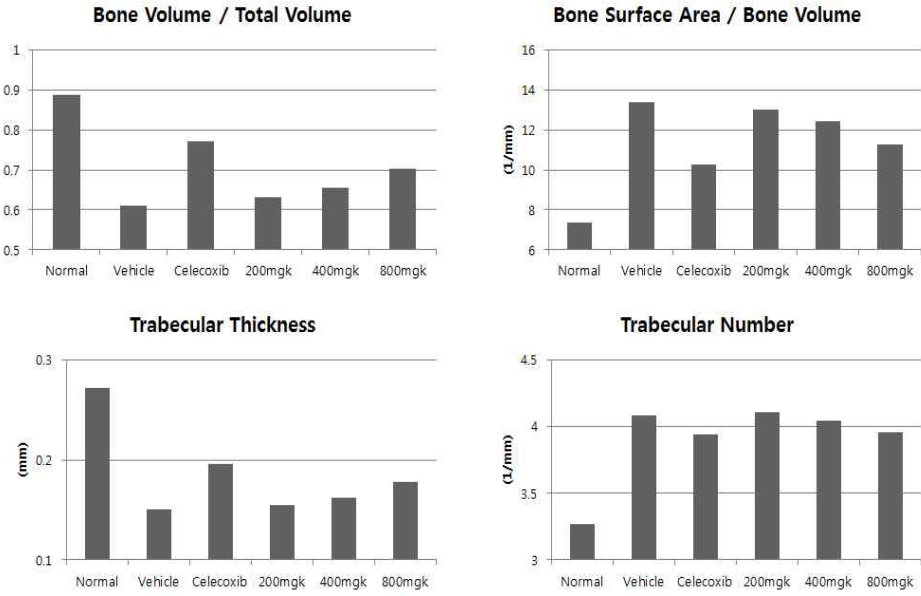


그림 118. 4주 Bone Morphometry 분석 결과

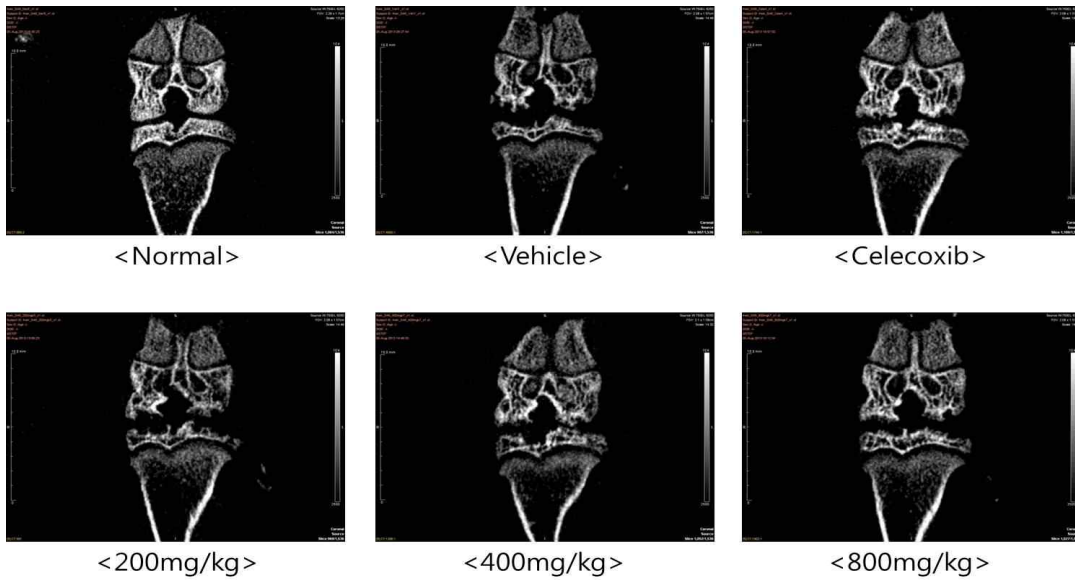
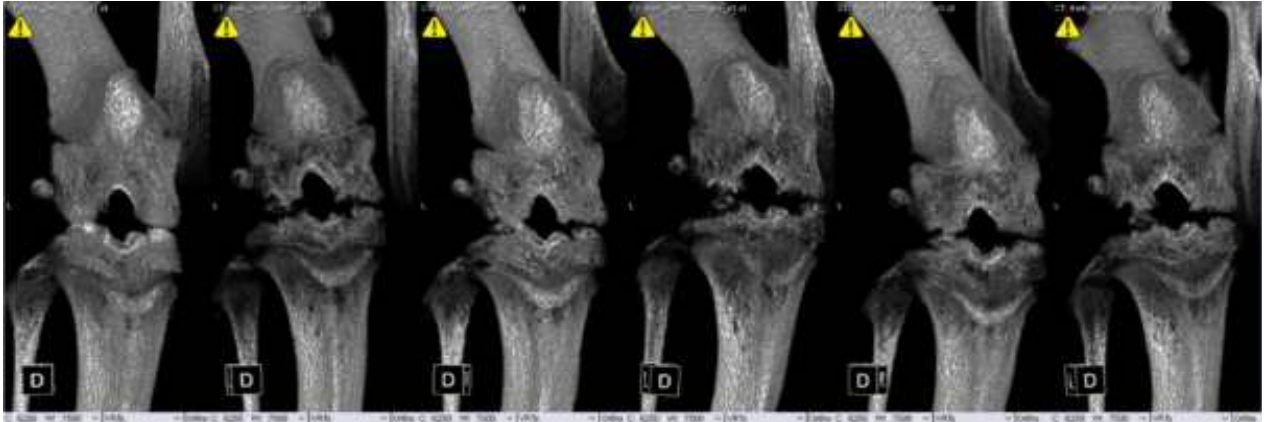


그림 119. 실험동물의 4주 micro-CT 관절 영상



<정상군>      <음성대조군>      <양성대조군>      <200mg/kg>      <400mg/kg>  
 <800mg/kg>

그림 120. 실험동물의 4주 3D 관절 영상

- 투여 4주째의 bone morphometry 분석결과 전체 ROI(관심영역)으로 지정한 부위에서 bone 이 차지하는 비율을 의미하는 'Bone Volume / Total Volume' 항목은 2주째의 결과와 동일한 경향으로 800mg/kg 농도로 투여한 군에서 다른 군에 비해 bone이 차지하는 비율이 높게 나타났음. 그에 따라 해면골의 두께를 의미하는 'Trabecular Thickness' 항목에서도 양성대조군과 800mg/kg 농도로 투여한 고농도 군에서 다른 군에 비해 높은 수치를 나타냈음. ROI(관심영역)의 bone 부위에서 bone의 표면적 비율을 의미하는 'Bone Surface Area / Bone Volume' 항목 또한 고농도 투여 군에서 낮은 수치를 유지하고 있어 관절염의 완화를 확인할 수 있었음.

## 제 6 절 질려자 추출물의 동물내 안전성 평가

### 1. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

- 바이오톡스텍에 안전성평가를 의뢰하여 질려자 추출물의 단회 경구투여 독성시험을 실시하였음 (시험번호 : B14251).
- 동물실험윤리규정에 준수하여 승인을 거쳐 수행되었음.



최종보고서

G46-43-1 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한  
단회 경구투여 독성시험

시험번호: B14251

㈜바이오톡스텍

우 363-883 충청북도 청원군 오창읍 연구단지로 53

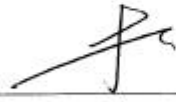
## GLP 적합진술서

시험제목 : G46-43-1 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험  
시험번호 : B14251

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice Regulations 를 준수하였다.

- "비임상시험관리기준"  
식품의약품안전처 고시 제 2014-67 호 (2014 년 2 월 12 일)
- "OECD Principles of Good Laboratory Practice"  
Organisation for Economic Co-operation and Development, ENV/MC/CHEM(98)17  
(as revised in 1997)

㈜바이오텍스텍  
시험책임자 박찬성



---

2014년 8월 4일

㈜바이오텍스텍  
운영책임자 박철범



---

2014년 8월 4일

## 신뢰성보증서

시험제목 : G46-43-1 의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

시험번호 : B14251

㈜바이오텍스텍 신뢰성보증업무담당자는 본 최종보고서에 기술된 시험에 대해 아래와 같이 점검하였다. 점검은 GLP, 시험계획서, ㈜바이오텍스텍의 표준작업수순서와 기초자료에 따라서 실시하였으며, 각각의 점검결과는 시험책임자 및 운영책임자에게 보고하였다.

점검수행단계 및 시험책임자와 운영책임자에게 보고한 일자는 아래와 같다.

점검단계	점검일자	시험책임자 및 운영책임자 보고일자
시험계획서	2014년 6월 12일	2014년 6월 13일
동물의 입수*	2014년 6월 5일	2014년 6월 5일
시험물질의 보관	2014년 6월 18일	2014년 6월 18일
시험물질의 조제	2014년 6월 19일	2014년 6월 19일
투여	2014년 6월 19일	2014년 6월 19일
일반증상관찰	2014년 6월 19일	2014년 6월 19일
부검	2014년 7월 3일	2014년 7월 3일
시험기초자료의 기록	2014년 7월 22일	2014년 7월 22일
최종보고서 (안)	2014년 7월 22일	2014년 7월 22일
최종보고서	2014년 8월 4일	2014년 8월 4일

\* 수행절차의 점검: 반복적으로 실시되는 정형적인 절차는 시험마다 점검을 실시하지 않고, 특정의 시험을 점검하여 본 시험의 해당단계를 보증한다.

본 최종보고서에 기술된 방법들이 적절하고, 결과의 기술이 시험수행에서 얻은 시험기초자료를 정확하게 반영하고 있음을 보증한다.

㈜바이오텍스텍  
신뢰성보증책임자 김윤정

  
2014년 8월 4일

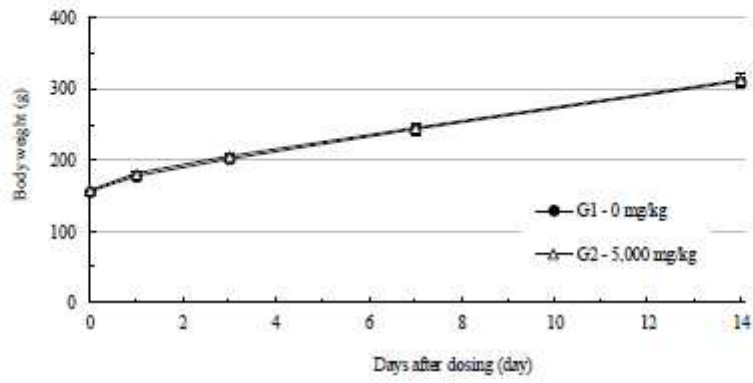


Figure 1. Body Weights in Male SD Rats

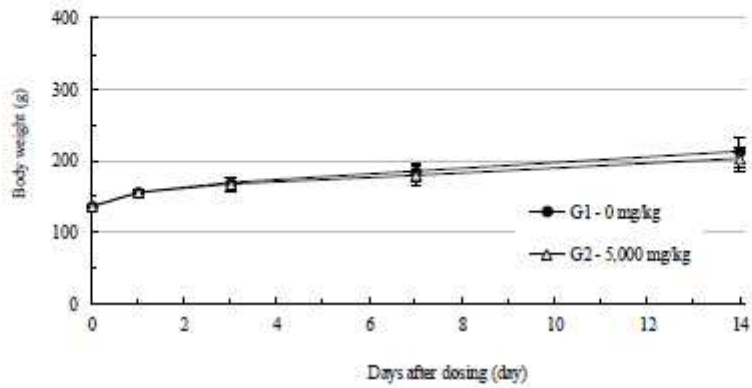


Figure 2. Body Weights in Female SD Rats

Appendix IV. Results of the Preliminary Study

1. 시험번호: B14251P

2. 시험목적

본시험에서의 투여용량을 결정하기 위하여 non-GLP 시험으로 수행하였다.

3. 시험내용

3.1 동물종, 계통, 성별, 주령 및 마리수

랫드, Sprague-Dawley (Cr:CD(SD)), 암수, 6 주령, 각 1 마리

3.2 투여용량

5,000 mg/10 mL/kg

3.3 투여방법

투여용량은 10 mL/kg 으로 하였고, 개체별 투여용량은 결식 후 (투여 당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 용량을 무제한 일회용 주사기를 이용하여 쥐내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16 시간 이상 음식은 자유섭취 시키면서 결식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

4. 시험결과

4.1 사망례: 사망례는 관찰되지 않았다.

4.2 일반증상: 투여 후 1 일에 시험동물색변이 암수 모두, 점역변이 없었어서 관찰되었다.

4.3 체중변화

Dose (mg/kg)	Sex	Animal ID	Days after dosing		
			0	1	3
5,000	Male	1001	145.9	164.1	184.8
	Female	2001	140.1	163.8	178.9

(g)

5. 결론

5,000 mg/kg 을 투여한 결과, 시험동물 투여에 기인한 사망례가 관찰되지 않아, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg 으로 설정하였다.



# 제 7 절 질려자 추출물 영양성분검사

## 1. 영양성분 검사가 가능한 공인기관에 의뢰하여 실시

- 한국기능식품연구원

제 D2014071285 호		검사성적서																																								
검체명	천연물추출물	제조일자 (유통기한)	2013-12-24																																							
의뢰인	업체명	단국대학교천안캠퍼스산학협력단	성명																																							
	주소	충청남도 천안시 동남구 단대로 119 (안성동, 단국대학교천안캠퍼스내)																																								
제조번호		접수년월일	2014-07-23																																							
검사의뢰목적	제출품	검사접수번호	D2014071285																																							
<p>귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.      검사기관 총 책임자: 김 원 희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험항목</th> <th>결과</th> <th>검사담당자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>열량(Kcal/100g)</td> <td>341.83Kcal/100g</td> <td>한아름</td> </tr> <tr> <td>탄수화물(%)</td> <td>35.98%</td> <td>한아름</td> </tr> <tr> <td>포도당(%)</td> <td>39.87%</td> <td>이경민</td> </tr> <tr> <td>조지방(%)</td> <td>4.27%</td> <td>주은선</td> </tr> <tr> <td>수분(%)</td> <td>7.12%</td> <td>김혜순</td> </tr> <tr> <td>회분(%)</td> <td>12.76%</td> <td>김혜순</td> </tr> <tr> <td>나트륨(mg/100g)</td> <td>135.16mg/100g</td> <td>남은권</td> </tr> <tr> <td>칼(mg/kg)</td> <td>0.029mg/kg</td> <td>류미진</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(mg/kg)</td> <td>0.0504mg/kg</td> <td>류미진</td> </tr> <tr> <td>중수은(mg/kg)</td> <td>0.001mg/kg</td> <td>박재용이</td> </tr> <tr> <td>중비소(mg/kg)</td> <td>0.1510mg/kg</td> <td>류미진</td> </tr> <tr> <td>대장균</td> <td>음성</td> <td>영희숙</td> </tr> </tbody> </table>				시험항목	결과	검사담당자	열량(Kcal/100g)	341.83Kcal/100g	한아름	탄수화물(%)	35.98%	한아름	포도당(%)	39.87%	이경민	조지방(%)	4.27%	주은선	수분(%)	7.12%	김혜순	회분(%)	12.76%	김혜순	나트륨(mg/100g)	135.16mg/100g	남은권	칼(mg/kg)	0.029mg/kg	류미진	카드뮴(mg/kg)	0.0504mg/kg	류미진	중수은(mg/kg)	0.001mg/kg	박재용이	중비소(mg/kg)	0.1510mg/kg	류미진	대장균	음성	영희숙
시험항목	결과	검사담당자																																								
열량(Kcal/100g)	341.83Kcal/100g	한아름																																								
탄수화물(%)	35.98%	한아름																																								
포도당(%)	39.87%	이경민																																								
조지방(%)	4.27%	주은선																																								
수분(%)	7.12%	김혜순																																								
회분(%)	12.76%	김혜순																																								
나트륨(mg/100g)	135.16mg/100g	남은권																																								
칼(mg/kg)	0.029mg/kg	류미진																																								
카드뮴(mg/kg)	0.0504mg/kg	류미진																																								
중수은(mg/kg)	0.001mg/kg	박재용이																																								
중비소(mg/kg)	0.1510mg/kg	류미진																																								
대장균	음성	영희숙																																								
<p>2014년 7월 30일</p> <p>한국기능식품연구원</p>  <p>(사)한국건강기능식품협회, 부원 한국기능식품연구원 <a href="http://www.khfr.co.kr">http://www.khfr.co.kr</a> 전화 031-831-628-0400-1</p>																																										

## 제 8 절 인체적용시험 및 IRB 승인

### 1. 제형 연구 및 시제품 제작

#### 가. 시제품 제형 개발

- 캡슐제형 : 원활한 인체적용시험을 위한 시제품으로 질려자 원료가 포함된 캡슐형태의 제형 개발
- 포 제형 : 추가 제형으로 먹기 용이한 포 형태의 제형 개발



그림 121. 시제품 사진

## 2. 인체적용시험 계획서

# 인 체 적 용 시 험 계 획 서

퇴행성 관절염 대상자에서 질러자추출물의 퇴행성 관절염 개선 효과 관련 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험

A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Intervention Study of the Efficacy and Safety of “질러자추출물” in Osteoarthritis Patients

시 험 계 획 서 번 호 질러자추출물

버 전 ( 작 성 일 ) 1.0 (2014.11.03)

인 체 적 용 시 험 의 회 자 단국대학교천안캠퍼스산학협력단

인체적용시험수탁기관 ㈜파마크로 (PharmaCRO)

### 기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용 식품을 투여 받는 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 단국대학교천안캠퍼스산학협력단 및 ㈜파마크로(PharmaCRO)의 사전서면동의 없이 제 3자에게 공개될 수 없습니다.

## ❖ 본 인체적용시험계획서에 사용된 약어 및 용어 정의

약어 및 용어	정 의
시험군	질려자추출물(GSTEP-01)
대조군	Placebo, 대조식품
AE	Adverse Events
ALT (SGPT)	Alanine Aminotransferase: GPT
ALP	Alkaline Phosphatase
AST (SGOT)	Aspartate Aminotransferase: GOT
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRA	Clinical Research Associate (임상시험 모니터 요원)
CRF	Case Report Form
CRO	Contract Research Organization
FAS	Full Analysis set
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HDL	High density Lipoprotein
IRB	Institutional Review Board (임상시험심사위원회)
ITT	Intention To Treat
KGCP	Korean good clinical practice
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
LDL	Low density Lipoprotein
PGART	Physician's Global Assessment of Response to Therapy
PP	Per protocol
RBC	Red Blood Cell
r-GT	Gamma-glutamyltransferase
TG	Triglyceride
VAS	Visual analogue scale
Wash-out period	약물투여 중지기간
WBC	White Blood Cell
WOMAC Scale	Western Ontario McMaster Questionnaire Scale
활력징후	혈압, 맥박수 등
실험실적 검사	혈액학적 검사, 혈액화학적 검사, 소변검사

❖인체적용시험계획서 개요

인 체 적 용 시 험 명	퇴행성 관절염 대상자에서 질려자추출물의 퇴행성 관절염 개선 효과 관련 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
인 체 적 용 시 험 책 임 자	
인 체 적 용 시 험 실 시 기 관	
의 례 자	단국대학교천안캠퍼스산학협력단
인 체 적 용 시 험 의 목 적	퇴행성 관절염 대상자에게 질려자추출물을 경구 투여한 후 퇴행성 관절염 개선 효과 관련 기능성 및 안전성을 평가하고자 한다.
시 험 설 계	단일기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험
대 상 자 수	최종 평가가능 예수 42 예 (시험군: 21 명, 대조군: 21 명), 30%의 탈락을 고려시 군당 30 예 총 60 예
연 구 대 상	만 40 세 이상, 만 75 세 이하의 성인 남녀로 경증 및 중등증 퇴행성 관절염 대상자
선 정 기 준	<p><b>선정기준</b> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 만 40 세 이상, 만 75세 이하의 성인 남녀</li> <li>2) ACR 진단기준에 의해 슬관절 골관절염으로 진단 받은 대상자로 방사선 촬영상 Kellgren-Lawrence grade I~III 에 해당하는 자</li> <li>3) WOMAC Scale 설문지를 읽고 이해할 수 있는 자 또는 시험자의 도움을 받아 평가를 진행할 수 있는 자</li> <li>4) 본 인체적용시험에 참여할 것을 자발적으로 서면 동의한 자</li> </ol>
제 외 기 준	<p><b>제외기준</b> (다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 천연물에 알레르기 등 이상반응을 경험한 자</li> <li>2) 유효성 판정에 영향을 줄 수 있는 류마티스 관절염, 활액낭염 등의 질환으로 진통소염제를 복용하고 있거나 복용을 필요로 하는 자</li> <li>3) 스크리닝 이전 6개월 이내에 외과적 수술을 받았거나 사고 등의 외상 후 2차적으로 유발된 골관절염 대상자</li> <li>4) 양쪽 슬관절에 모두 인공치환술을 받은 대상자 또는 연구기간 중에 퇴행성 관절염이 있는 슬부에 수술 또는 수술에 준하는 치료를 받기로 예정된 대상자</li> <li>5) 스크리닝 이전 6개월 이내에 활동성 소화성 궤양 또는 위장관 출혈이 있거나 의심되는 염증성 장질환(크론병 또는 궤양성 장염)을 가진 대상자거나 식도 및 위장관 궤양 진단을 받거나 치료 받은 자 또는 위장관</li> </ol>

	<p>수술을 받은 자</p> <p>6) 스크리닝 이전 5년 이내에 악성종양의 병력이 있는 자</p> <p>7) 뇌졸중, 임상적으로 의미있는 허혈성 심장질환, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 말초성 동맥질환이 있는 대상자</p> <p>8) 심한 신 기능 장애(serum creatinine이 2.0mg/dl 이상인 경우)가 있는 대상자 또는 울혈성 심부전 대상자</p> <p>9) 심한 간 기능 장애(ALT, AST, total bilirubin 중 하나의 항목이라도 정상 상한치의 2.5배 이상인 경우)가 있는 대상자</p> <p>10) 조절되지 않는 고혈압(혈압강하제의 지속적인 복용에도 불구하고 진료실 혈압이 수축기 혈압이 140 mmHg 이상이고 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 경우) 및 폐질환(폐렴, 폐결핵 등)으로 약물 복용중인 자</p> <p>11) 스크리닝 이전 12 주 이내에 코르티코스테로이드를 1 주 이상 지속적으로 경구투여 또는 관절강 내 투여했거나 스크리닝 이전 8 주 이내에 관절 구조 및 기능을 개선하기 위한 스테로이드나 약제를 투여 받은 대상자</p> <p>12) 스크리닝 이전 4 주 이내에 항정신성 의약품, 마약성 진통제를 1주 이상 지속적으로 투여했거나 인체적용시험기간 동안 항응고제 또는 만성적인 진통제 또는 NSAIDs(허용용량은 제외) 또는 다른 질환으로 부신 피질제제를 필요로 하는 자</p> <p>13) 치매, 정신질환 등을 진단 받고 연구참여를 위하여 필요한 정도의 의사 전달이 불가능하거나 약물을 복용하고 있는 자</p> <p>14) 스크리닝 이전 4 주 이내에 다른 임상(인체적용)시험에 참여한 자</p> <p>15) 퇴행성관절염에 영향을 줄 수 있는 건강기능식품을 복용중이거나 침, 한의학적인 치료를 받고 있는 자</p> <p>16) 임부 또는 수유부인 여성이거나 인체적용시험 기간 중 피임약 복용 외의 효과적인 피임방법 사용에 동의하지 않은 가임 여성(효과적인 피임방법: 불임수술, 자궁내장치, 콘돔, 살정제를 이용한 barrier methods)</p> <p>17) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 시험자가 부적합하다고 판단한 자</p>
시 험 식 품 명	질려자추출물(GSTEP-01)
대 조 식 품 명	대조식품
투 여 방 법 및 투 여 기 간	<p>시험군: 아침, 저녁 식후 30 분에 1 포씩 1 일 2 회 질려자추출물(GSTEP-01) 2g 경구 투여</p> <p>대조군: 아침, 저녁 식후 30 분에 1 포씩 1 일 2 회 위약 2g 경구 투여</p>
시 험 기 간	각 대상자 별로 총 14 주(스크리닝 2 주, 약제투여기간 12 주)가 소요되며 전체 60 명의 대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 10 주 이상

	<p>예상되며, 총 인체적용시험 실시기간은 최초 모집시점으로부터 약 24 주 이상 소요될 것으로 예상된다.</p>
<p>평 가 방 법</p>	<p><b>기능성(efficacy)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1차 기능성 평가 변수(Primary endpoint):             <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 100mm Pain VAS on walking 의 변화치</li> </ol> </li> <li>• 2차 기능성 평가 변수 (Secondary endpoint):             <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 100mm Pain VAS on walking 의 수치 변화율</li> <li>2) WOMAC Scale 의 총점 변화치</li> <li>3) WOMAC Scale 의 총점 변화율</li> <li>4) Cytokines(TNF-alpha, Interleukin-6) 변화치</li> <li>5) CRP(C-reactive protein)의 변화치</li> <li>6) PGART 단계 변화율</li> </ol> </li> </ul> <p><b>안전성(safety)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 시험약제 투여 전과 투여 중, 투여 12주 후에 실험실적 검사, 활력 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.</li> </ul>

▣ 인체적용시험 흐름도

시험항목	Screening	Treatment			Follow-up 방문 9)
	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Visit 4 8)	
	-2주~ 0일	0주(0일)	6주(±5일)	12주(±5일)	필요 시
대상자 동의서 취득	○				
기초 조사 1)	○				
신체 검사 2)	○			○	
활력징후 3)	○	○	○	○	○
병력 및 동반질환	○				
생활습관 조사		○		○	
실험실적 검사 4)	○	○	○	○	○
임신 검사5)	○	○	○	○	○
X-ray (knee AP) 6)	○				
대상자 적합성 평가	○				
무작위 배정		○			
Cytokines 및 CRP 측정7)		○		○	
100mm Pain VAS on walking		○	○	○	
WOMAC scale		○	○	○	
PGART 단계			○	○	
선행/병용 약물 조사	○	○	○	○	○
시험식품 / 대조식품 처방		○	○		
이상반응			○	○	○
복용 순응도 평가			○	○	

1) 기초조사: 성년월일, 성별 등을 조사한다.  
 2) 신체검사: 체중은 시험기간 중 동일한 체중계를 사용해야 하며, 신장은 신을 벗고 cm 단위로 측정한다. 방문 4에서는 체중만 측정한다.  
 3) 활력징후: 혈압, 맥박수, 체온: 혈압과 맥박수는 5분간 앉은 자세로 안정을 취한 후 동일한 혈압계를 사용하여 측정한다.  
 4) 실험실적 검사: 방문1 이전 2주 내에 본원에서 실시한 실험실적 검사결과가 있는 경우 검사를 별도로 시행하지 않아도 되며, 방문1 에서 시행해야 할 검사 항목 중 누락된 항목이 있는 경우나 임상적으로 문제가 있는 경우에는 해당 항목에 대해서만 추가적으로 검사를 할 수 있다.  
 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets  
 혈액화학적 검사: AST, ALT, r-GT, ALP, Total bilirubin, Albumin, Triglyceride, Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, BUN, Creatinine, Uric acid, Glucose  
 소변검사: pH, WBC, RBC, Protein, Glucose  
 5) 임신 검사: 불임수술을 받지 않고, 효과적인 피임법을 실시하지 않은 가임기 여성에 한하여 urine β HCG pregnancy test 로 실시한다. 단, 방문 1 이후 3일 이내 방문 2를 실시할 경우 방문 1의 임신검사 결과를 방문 2에 기재할 수 있다.  
 6) X-ray (knee AP): 스크리닝 기준으로 4주 이내에 실시한 결과를 사용할 수 있다.  
 7) Cytokines 및 CRP 측정: TNF-alpha, IL-6, CRP 측정을 실시한다.  
 8) 초기 종료 시 종료방문과 동일한 검사 및 평가를 수행한다  
 9) Follow up 방문: 이상반응이 있거나 실험실적 검사 이상으로 follow up이 필요한 경우 실시한다.



## 2. IRB 승인



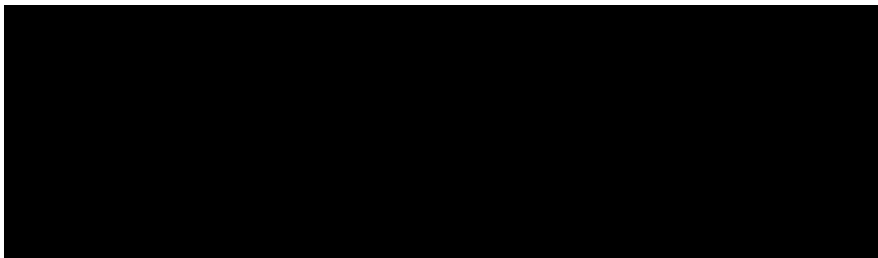
### 심사결과 통보서

과제번호	C14015			
수신	시험책임자	강승현	직위	부장
	의뢰기관	단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단		
연구과제명	퇴행성 관절염 환자에서 질러자추출물의 퇴행성 관절염 개선 효과 관련 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 비교 인체적용시험			
	Protocol NO.	GSTEP-01	Version NO.	1.0
심의종류	<input checked="" type="checkbox"/> 정규심의 <input type="checkbox"/> 신속심의			
회의소집요청일	2014년 11월 17일			
연구정보	평가대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 기타		
		성분명	질러자에탄올추출물	
		상품명	미정	
	연구단계	<input type="checkbox"/> 제1상 생물학적동등성시험 <input type="checkbox"/> 제1상 임상시험 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input checked="" type="checkbox"/> 기타 (건강기능식품인체적용시험)		
	연구주도	<input checked="" type="checkbox"/> 의뢰자 주도임상 (SIT) <input type="checkbox"/> 연구자 주도 임상 (ITT)		
용도	<input checked="" type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 국내허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외허가용			
심의일자	2014년 11월 21일			
제출서류목록	1. 신청서 2. 시험계획서 3. 연구자자료집			
심의결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지 또는 보류			
승인일자	2014년 11월 24일			
참석위원	양정선(의장), 김은순(부의장), 이해리(위원), 홍순재(위원), 손경은(위원), 김은희(위원)			
심의의견	건강기능식품으로 이상반응에 대한 큰 우려는 없으나 모든 사항에 대한 준비를 철저히 하여 시험진행 바랍니다.			

\*귀하가 신청하신 심의안에 대하여 본 심사위원회의 심의결과를 위와 같이 알려드립니다. 시험 책임자는 IRB 심의 결과에 이의가 있는 경우 IRB 통보일로부터 2주 이내에 서면으로 이의 사유를 기록하여 이의를 제기할 수 있습니다. 단, 동일 사항에 대하여 2회 연속으로 이의신청을 할 수 없습니다

2014년 11월 24일

임 상 시 험 심 사 위 원 회



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

구분 (연도)	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
1차년도 (2011 ~2012)	질려자 추출물의 지표물질 설정 및 유효성분 분리	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자료조사를 통한 최적의 지표물질 설정 여부</li> <li>- 선정된 지표물질의 구조 동정여부</li> <li>- 추출물로부터 항염활성을 가지는 물질탐색 여부</li> <li>- 항염작용을 갖는 기능성 성분의 구조 규명 여부</li> </ul>	100%
	대식세포에서 염증억제 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 농도별로 LPS가 처리된 대식세포에 유효추출물질을 처리하여, NO assay를 수행하여 항염 작용 평가 여부</li> <li>- 농도별로 LPS가 처리된 대식세포에 유효추출물질을 처리하여, PGE<sub>2</sub> assay를 수행하여 항염 작용 평가 여부</li> </ul>	100%
	급성 염증동물모델에서의 염증 억제 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 급성 염증 동물모델 구축 완료 여부</li> <li>- 급성 염증 동물모델을 대상으로 유효 추출물을 처리시 염증억제 유효성을 CT장비를 활용한 평가 진행 여부</li> </ul>	100%
	표준화된 최적 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 이를 통해 얻어진 유효성분 및 지표물질의 함량 분석 여부</li> <li>- 추출 효율이 극대화 된 제조공정의 표준화 및 validation 진행 여부</li> </ul>	100%
	대량생산 공정을 통한 Pilot 추출물 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적 추출 조건에 따른 pilot scale 추출법 확립 여부</li> </ul>	100%
2차년도 (2012 ~2013)	최적추출물과 유효물질의 염증 관련 유전자 및 단백질 발현수준 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적 추출물과 유효물질 설정에 따른 세포에서의 항염 증 유효성 평가 및 관련 유전자의 작용기전 관련 COX-2와 iNOS의 발현 확인 여부</li> <li>- 최적 추출물과 유효물질의 해당 세포 배양액에서 Cytokines (IL-6, IL-10, TNF-<math>\alpha</math>)의 분비정도 평가 여부</li> </ul>	100%
	동물모델을 통한 간이독성 평가 I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 소동물을 대상으로 MTD(maximum tolerated dose) 평가 여부</li> </ul>	100%
	골관절염 동물모델에서의 염증 억제 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 골관절염 동물모델 구축 여부</li> <li>- 염증에 대한 효력실험으로 골관절염 모델에 유효 추출물을 처리하여 CT 측정을 통해 bone volume 변화량 측정 여부</li> </ul>	100%
	인체적용 시험용 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유효성분의 물리화학적 특징에 맞는 다양한 제형 설계 및 최적의 관절조직 개선 효과를 보이는 제형 선별 여부</li> </ul>	100%
	인체적용 시험 진행 I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 인체에 대한 질려자 추출물의 안전성과 유효성 평가를 위한 시험방법 설계 여부</li> </ul>	100%
	최적 추출물속 유효성분 분리 및 분석 완료	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성 추적법(Bio-assay Guided methods)에 따른 유효성분 리 다량 분리 및 구조결정 완료 여부</li> </ul>	100%
	원료 규격 표준화 및 원료 validation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 단위공정의 수율 및 지표성분의 함량변화 확인 여부</li> <li>- 원료의 영양성분 및 배합비율 확인 여부</li> </ul>	100%

3차년도 (2013 ~2014)	동물모델을 통한 안전성 평가	- 질려자 추출물의 간이 독성 평가 결과를 토대로 GLP 기관 단회독성 평가 실시 여부	100%
	최적 추출물의 항염증 작용메커니즘 보완 연구 진행	- 1, 2차 년도 연구결과 정리하여 최적 추출물의 다양한 항염증 작용메커니즘의 추가 탐색 여부 - 향후 식약처 개별인정 허가를 위한 전임상 평가자료 작성 여부	100%
	인체적용 시험 진행 기획 및 IRB승인	- 원료표준화자료와 전임상 평가자료에 대한 식약처 개별인정형 기능식품 개발 컨설팅 자문 의뢰 및 IRB 승인 신청 여부 - IRB 승인 (관련 내용 별첨자료에 제시)에 따른 인체적용시험 진행 여부를 참여기업과 논의하여 진행 및 기술이전 논의 여부	100%
	개별인정 자료 최종 정리 및 제품화 지원	- 기술이전에 따른 원료의 기능성 인정관련 자료 지원 여부 - 대량 생산에 따른 품질관리 여부 - 제품관리 시스템 향후 계획 진행 여부	100%
	인체적용시험용 시제품 제작을 위한 제형설계 및 연구진행	- 질려자 80%의 대량생산 원물을 이용 시제품 제작 기획 여부	100%
	제형의 안정성 평가	- 시제품에 사용될 제형의 물리 화학적 장기보존 평가 여부	100%
	원료표준화 자료 지속적인 보완	- 원료의 개별인정 획득을 위한 원료표준화 결과 보완 및 추가적인 연구 지원 여부	100%

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 천연소재인 질려자로부터 관절건강 개선용 건강기능식품 개발에 필요한 최적 추출조건을 확립하여 농업 종사자들에게 원료공급이라는 새로운 일자리 창출과 동시에 농가 소득을 증대시킬 수 있게 되었음.
2. 질려자 추출물로부터 지표 및 유용물질 프로파일링 기술과 후보물질의 구조를 규명하여 신규화합물 3종을 밝혀냈음.
3. 질려자 추출물로부터 염증억제 효과 및 파괴된 관절의 회복 효과를 확인하여 관절건강 개선에 도움이 되는 개별인정형 건강기능식품 개발에 기여할 것임.
4. 관절건강 기능 개선 및 완화·예방 기능과 안전성을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발하여, 건강기능성식품의 제조 노하우를 축적하고, 향후 이를 타 천연물 신약 및 식품 개발에 확대시켜서 국내 천연물 기반 기능성 식품산업의 기술력 강화 및 국제 경쟁력을 높이는데 기여할 것임.
5. 또한 질려자를 원료로 제품화 된 건강기능성식품의 판매를 국내뿐만 아니라 해외로 확대시켜 국내 생산 기능성 식품의 국가 경쟁력을 확보에 기여할 것임.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연차별 연구성과 목표 및 성과

#### 1. 연구성과

##### 가. 논문

	게재 연도	논문명	저자			학술 지명	Vol. (No.)	구분
			주저자	교신저자	공동저자			
1	2013	Two new furostanol glycosides from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Hong Seong Su	Oh Joa Sub	Choi Yun-Hyeok, Jeong Wonsik, Kwon Jin Gwan, Kim Jin Kyu, Seo Changon, Ahn Eun-Kyung, Lee Hyun Hwa, Ko Han-Jik, Seo Dong-Wan	Tetrahedron Letters	54 (30)	SCI
2	2013	Phenolic amides from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i> and their inhibitory effects on the production of nitric oxide	Hong Seong Su	Oh Joa Sub	Jeong Wonsik, Kwon Jin Gwan, Choi Yun-Hyeok, Ahn Eun-Kyung, Ko Han-Jik, Seo Dong-Wan	Bull. Korean Chem. Soc.	34 (10)	SCI

계재 연도	논문명	저자			학술 지명	Vol. (No.)	구분	
		주저자	교신저자	공동저자				
3	2015	N-trans-p-caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> exerts anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells	Ko Han-Jik, Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub	Ahn Eun-Kyung	IJMM	submission	SCI
4	2015	Composition for prevention and treatment of inflammatory diseases comprising dehydrodiconiferyl alcohol compound isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	Lee Hyun Hwa	Oh Joa Sub	Lee Jung A, Jeong Wonsik, Hong Seong Su, Ahn Eun-Kyung	JKSA BC	submission 예정	SCIE
5	2015	Anti-osteoarthritis effects of <i>Tribulus terrestris</i> on monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis pain in rat	Park Young Jin	Oh Joa Sub	Cho Young-Rak, Hong Sung Soo, Ko Hye-Jin, Ahn Eun-Kyung	Arthritis research & therapy	submission 예정	SCI
6	2015	Phytochemical constituents from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	Jeong Wonsik	Oh Joa Sub	Hong Sung Soo, Choi Yun-Hyeo	Kor. J. Pharmacogn.	submission 예정	-
7	2015	질려자 에틸아세테이트 분획에서의 항염증 효과	Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub		생약학회	submission 예정	
8	2015	Evaluation of anti-inflammatory property of Tribulusamide D isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	Lee Hyun Hwa, Ahn Eun-Kyung	Oh Joa Sub		IJMM	submission 예정	SCI

## Phenolic Amides from the Fruits of *Tribulus terrestris* and Their Inhibitory Effects on the Production of Nitric Oxide

Seong Su Hong,<sup>†,a</sup> Wonsik Jeong,<sup>†,a</sup> Jin Gwan Kwon,<sup>†</sup> Yun-Hyeok Choi,<sup>†</sup> Eun-Kyung Ahn,<sup>†</sup>  
Han-Jik Ko,<sup>†,‡</sup> Dong-Wan Seo,<sup>‡</sup> and Joa Sub Oh<sup>†,‡,\*</sup>

<sup>†</sup>Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion Suwon 443-270, Korea

<sup>‡</sup>College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. \*E-mail: jsoh@dankook.ac.kr

Received June 8, 2013, Accepted July 1, 2013

**Key Words :** *Tribulus terrestris*, Phenolic amide, Tribulusamide D, Nitric oxide inhibitor

Tetrahedron Letters 54 (2013) 3967–3970



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tetlet](http://www.elsevier.com/locate/tetlet)



## Two new furostanol glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*



Seong Su Hong<sup>a,†</sup>, Yun-Hyeok Choi<sup>a,†</sup>, Wonsik Jeong<sup>a</sup>, Jin Gwan Kwon<sup>a</sup>, Jin Kyu Kim<sup>a</sup>, Changon Seo<sup>a</sup>,  
Eun-Kyung Ahn<sup>a</sup>, Hyun Hwa Lee<sup>a,b</sup>, Han-Jik Ko<sup>a,b</sup>, Dong-Wan Seo<sup>b</sup>, Joa Sub Oh<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion, Suwon 443-766, Republic of Korea

<sup>b</sup> College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 March 2013

Revised 14 May 2013

Accepted 17 May 2013

Available online 23 May 2013

#### Keywords:

*Tribulus terrestris*

Furostanol glycoside

Terrestrinone A1

Nitric oxide inhibitor

### ABSTRACT

Two new furostanol glycosides, named terrestrinones A1/A2 (**1a**/**1b**), were isolated from the fruits of *Tribulus terrestris* L. together with four known compounds, and their structures were determined by spectroscopic methods, including 2D NMR experiments. All of the isolates (**1–5**) were evaluated for their potential to inhibit the LPS-induced production of nitric oxide in murine macrophage RAW264.7 cells. Of these, compounds **2** and **3** inhibited nitric oxide production with IC<sub>50</sub> values of 7.1 and 46.6 μM.

Crown Copyright © 2013 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

나. 특허

	특허명	특허출원번호	실적
1	질려자로부터 분리한 엔-트랜스-로우-카페오일 티라민 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	10-2013-0064204	1건
2	질려자로부터 분리한 디하이드로디코니페릴 알코올 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	10-2013-0064205	1건
3	질려자 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물	10-2012-0047751	1건

공개특허 10-2014-0142680

---

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(61) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/128 (2006.01) A61K 31/048 (2006.01)  
A61K 31/18 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0064204  
(22) 출원일자 2013년06월04일  
실사청구일자 2014년11월28일

(11) 공개번호 10-2014-0142680  
(43) 공개일자 2014년12월12일

(71) 출원인  
단국대학교 산학협력단

(72) 발명자  
오하성

(74) 대리인  
순민

전체 청구항 수 : 총 9 항

(64) 발명의 명칭 질려자로부터 분리한 엔-트랜스-로우-카페오일 티라민 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

**(67) 요약**

본 발명은 질려자로부터 분리한 우수한 염증성 질환 치료 효과가 있는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 상기 화합물을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 상기 약학적 조성물을 염증성 질환 의심개체에 부여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 염증성 질환 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용으로 유용하게 사용할 수 있으며, 본 발명의 유효성분인 엔-트랜스-로우-카페오일 티라민 (N-trans- $\beta$ -cafeoyl tyramine) 화합물은 질려자 추출물의 분획물로부터 분리한 천연물 유래의 화합물로서, 합성 의약품에 비하여 부작용의 염려가 없는 안전한 치료제를 제공할 수 있다.

공개특허 10-2014-0142681

---

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(61) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/048 (2006.01) A61K 31/34 (2006.01)  
A61K 31/045 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0064205  
(22) 출원일자 2013년06월04일  
실사청구일자 2014년11월28일

(11) 공개번호 10-2014-0142681  
(43) 공개일자 2014년12월12일

(71) 출원인  
단국대학교 산학협력단

(72) 발명자  
오하성

(74) 대리인  
순민

전체 청구항 수 : 총 9 항

(64) 발명의 명칭 질려자로부터 분리한 디하이드로디코니페릴 알코올 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

**(67) 요약**

본 발명은 질려자로부터 분리한 우수한 염증성 질환 치료 효과가 있는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 상기 화합물을 포함하는 염증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 상기 약학적 조성물을 염증성 질환 의심개체에 부여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 염증성 질환 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선용으로 유용하게 사용할 수 있으며, 본 발명의 유효성분인 디하이드로디코니페릴 알코올 (Dehydrodiconiferyl alcohol) 화합물은 질려자 추출물의 분획물로부터 분리한 천연물 유래의 화합물로서, 합성 의약품에 비하여 부작용의 염려가 없는 안전한 치료제를 제공할 수 있다.

공개특허 10-2013-0124107

---

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(61) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/186 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0047751  
(22) 출원일자 2012년06월04일  
실사청구일자 없음

(11) 공개번호 10-2013-0124107  
(43) 공개일자 2013년11월13일

(71) 출원인  
단국대학교 산학협력단

(72) 발명자  
오하성

(74) 대리인  
순민

전체 청구항 수 : 총 4 항

(64) 발명의 명칭 질려자 추출물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

**(67) 요약**

본 발명은 염증성 질환의 치료제 및 이를 이용한 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것으로서, 질려자 추출물이 염증성 질환의 발병의 기표인 10종의 생상을 억제하고, 세포 독성이 없어, 염증성 질환의 예방 또는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

다. 학술대회

	발표일	제목	학술대회명	구분
1	20120504	Anti-inflammatory activity of <i>Tribulus terrestris</i> in RAW264.7 cells	IMMUNOLOGY 2012	미국 (Boston)
2	20121023	Studies on chemical constituents of <i>Tribulus terrestris</i>	2012 Proceedings of Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	대한민국 (서울)
3	20121109	Chemical constituents isolated from <i>Tribulus terrestris</i>	2012 한국응용생명화학회	대한민국 (광주)
4	20130627	Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extract of <i>Tribulus terrestris</i> in RAW 264.7 Cells	2013 한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
5	20130627	N- <i>trans</i> -p-caffeoyl tyramine isolated from <i>Tribulus terrestris</i> inhibits the inflammatory activity through the down regulation of cyclooxygenase-2(COX-2) in RAW 264.7 cell line	2013 한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
6	20131205	Steroidal saponins and flavonoid glycosides from <i>Tribulus terrestris</i>	2013 한국생약학회	대한민국 (서울)
7	20140619	Effects of ethanol extract of <i>Tribulus terrestris</i> on anti-osteoarthritic activities <i>in vivo</i> .	2014 한국응용생명화학회	대한민국 (부산)
8	20140822	Inhibitors of LPS-induced Nitric Oxide Production in Macrophage RAW264.7 Cells from <i>Tribulus terrestris</i>	EMBO Conference	독일 (하이델베르크)
9	20141023	Isolation and identification of phytochemical constituents from the fruits of <i>Tribulus terrestris</i>	대한약학회 2014 추계학술대회	대한민국 (경주)



라. 신규화합물 및 화합물 등록성과

	화합물명	주요내용	등록현황	등록기관	등록번호
1	Terrestrinone A1	Furostanol glycoside UV $\lambda_{\max}$ = 242nm Molecular formular = C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>10</sub> Molecular weight = 605	등록완료	Americal Chemical Society (ACS)	1445952 -09-9
2	Terrestrinone A2	Furostanol glycoside UV $\lambda_{\max}$ = 242nm Molecular formular = C <sub>33</sub> H <sub>50</sub> O <sub>10</sub> Molecular weight = 605	등록완료	Americal Chemical Society (ACS)	1445952 -10-2
3	Tribulusamide D	Phenolic amide UV $\lambda_{\max}$ = 219, 242, 290, 319nm Molecular formular = C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> Molecular weight = 313	등록완료	Americal Chemical Society (ACS)	1634625 -41-4

마. 인력양성

지원인원	인력양성명	인력양성내용
2명	석사 인력양성	- 질려자의 에탄올 추출물과 질려자로 부터 분리한 N-trans-p-caffeoyl tyramine의 NO억제 활성 및 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포주에서 PGE2와 염증반응을 촉진하는 싸이토카인의 발현을 억제 질려자 에탄올 추출물과 질려자로부터 분리된 화합물 Tribulusamide D의 항염증 효과에 대한 생체의 평가

바. 기술 확보

1. 질려자 추출물 제조공정방법 최적화
2. 질려자 추출물에서의 지표 및 유용물질 프로파일링기술과 후보물질 구조규명기술
3. 질려자 추출물 유래 신규 물질 발굴과 관련기술 확보
4. 원료 규격 표준화 및 원료 validation
5. 질려자 추출물 및 유효물질의 항염 활성 및 염증관련 인자 발현수준 분석
6. 골관절염 동물모델에서의 염증 억제 평가 및 골소주 분석

제 2 절 성과 활용 계획

1. 성과활용계획

질려자 추출물은 원료표준화(지표 및 유효성분 규명)연구 진행하였고 *in vitro* 실험을 통해 염증억제 활성 효과에 대해서 입증했으며, *in vivo* 실험을 통해 파괴된 관절의 회복 효과를 확인함으로써 안전성이 확보되고 부작용이 적은 관절건강 개선용 개별인정형 건강기능식품 개발 가능성을 입증하였다. 이에 관절건강 개선에 도움을 줄 수 있는 제품개발에 활용할 계획임.

## 2. 사업화 계획

### 가. 제품개발 추진전략

구분	구체적인내용
인체적용시험진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 내용 : IRB 승인을 통한 인체적용시험 진행</li> <li>- 참여기업 : (주)넥스팜코리아</li> </ul>
기술이전	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구성과 : 특허</li> <li>- 핵심기술명 : 질려자로부터 분리한 디하이드로디코니페릴 알코올 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물</li> <li>- 이전형태 : 유상 (1천만원)</li> <li>- 이전방식 : 통상실시권</li> </ul>
개별인정형 건강기능식품 제품출시	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 내용 : 개별인정형 건강기능식품 제품 출시</li> <li>- 참여기업 : (주)넥스팜코리아</li> </ul>
의약품 개발 진행	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 내용 : 퇴행성골관절염 치료제 개발 진행</li> <li>- 참여기업 : (주)넥스팜코리아, (주)제일약품</li> </ul>

### 나. 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 상용화 형태 : 제품생산 및 대기업 공동 마케팅(제일, SK 등)</li> <li>- 유통망 : 약국 체인망 및 홈쇼핑 활용 계획</li> <li>- 예상 단가 : 25,000~30,000원 (30일분)</li> <li>- 개발 투입인력 및 기간 : 5명(영업부분 포함) 3년</li> </ul>

## 제 6 장 참고문헌

1. Kashiwagi, T.; Mikagi, E.; Mekuria, D. B.; Boru, A. D.; Tebayashi, S.; Kim, C. S. *Z. Naturforsch.* **2005**, 60c, 739-742.
2. Kim, J. S.; Yean, M. Y.; Seo, H. K.; Lee, J. H.; Kang, S. S. *Kor. J. Pharmacogn.* **2009**, 40(4), 326-333.
3. Jin, J. M.; Liu, X. K.; Yang, C. R. *Journal of Asian Natural Products Research* **2003**, 5(2), 95-103.
4. Xu, Y. X.; Chen, H. S.; Liu, W. Y.; Gu, Z. B.; Liang, H. Q. *Phytochemistry.* **1998**, 49, 199-201.
5. Yeo, H.; Chin, Y. W.; Park, S. Y.; Kim, J. *Arch. Pharm. Bull.* **2004**, 27(3), 287-290.
6. Hong, S. S.; Han, X. H.; Hwang, J. S.; Lee, K. S.; Lee, M. K.; Ro, J. S.; Hwang, B. Y. *Natural Product Sciences* **2006**, 12(4), 201-204.
7. Byun, E.; Jeong, G. S.; An, R. B.; Min, T. S.; Kim, Y. C. *Arch. Pharm. Res.* **2010**, 33(1), 67-70.
8. Fukuda, N.; Yonemitsu, M.; Kimura, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31, 156-161.
9. Li, H.; Ma, Q.; Liu, Y.; Qian, J.; Zhou, J.; Zhou, Y. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* **2009**, 15, 615-620.
10. Gohar, A. A. *Journal of Biological Sciences* **2001**, 1, 843-845.
11. Wilairat, R.; Kijjoa, A.; Pinto, M.; Nascimento, M. S. J.; Silva, A. M. S. *Pharmaceutical Biology*, **2006**, 44(6), 411-415.
12. Nawwar, M. A. M.; EL-Mousallamy, A. M. D.; Barakat, H. H. *Phytochemistry* **1989**, 28(6), 1755-1757.
13. Iwashina, T.; Lopez-Saez, J. A.; Herrero, A.; Kitajima, J.; Matsumoto S. *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, 28(7), 665-671.
14. Junei, K.; Tuyoshi, I.; Kazutaka, W.; Toshihiro, N. *Phytochemistry* **1994**, 37(6), 1685-1687.
15. Huang, J. W.; Tan, C. H.; Jiang, S. H.; Zhu, D. Y. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2003**, 5(4), 285-290.
16. Xu, T. H.; Xu, Y. J.; Xie, S. X.; Zhao, H. F.; Han, D.; Li, Y.; Niu, J. Z.; Xu, D. M. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, 10(5), 419-423.
17. Hong, S. S.; Jeong, W.; Kwon, J. G.; Choi, Y. H.; Ahn, E. K.; Ko, H. J.; Seo, D. W.; Oh, J. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2013**, 34(10), 3105-3108.
18. Bchir, S.; Hammami, S.; Bergaoui, A.; Mighri, Z. *J. Soc. Alger. Chim.* **2011**, 21(1), 59-64.
19. Bhatt, B. *J. Chem. Pharm. Res.* **2011**, 3(3), 176-1881.
20. Chang, S. W.; Kim, K. H.; Lee, I. K.; Choi, S. U.; Ryu, S. Y.; Lee, K. R. *Nat. Prod. Sci.* **2009**, 15(4), 234-240.
21. Baker, J. K.; Myers, C. W. *Pharmaceutical Research.* **1991**, 8(6), 763-770.