

발간등록번호

11-1543000-001838-01

기술사업화 지원사업 R&D Report

GINST(발효인삼)를 이용한 남성 난임 개선
개별 인정형 기능식품 개발

최종보고서

2017. 10. 31.

주관연구기관 / 건국대학교글로벌산학협력단

협동연구기관 / (주)일화

연세대학교 산학협력단

헬스케어크레임스앤드멘네지먼트

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “GINST(발효인삼)를 이용한 남성 난임 개선 개별 인정형 기능식품 개발”
연구사업 (사업기간 2013년 12월 04일 - 2017년 06월 03일) 의 완료보고서로 제출합니다.

2017년 10월 31일

연구기관명 : 건국대학교글로벌산학협력단
(주)일화
연세대학교 산학협력단
헬스케어크레임스앤드메네지먼트

총괄 연구책임자 : 건국대학교글로벌산학협력단 김 시 관
1협동 연구책임자 : (주)일화 성 종 환
2협동 연구책임자 : 연세대학교 산학협력단 최 영 식

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	113040-3	해당 단계 연구 기간	2015.12.04.~ 2016.12.03	단계 구분	3년/ 3년
연구사업명	중사업명	기술사업화지원사업			
	세부사업명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대과제명	GINST(발효인삼)를 이용한 남성 난임 개선 개별 인정형 기능식품 개발			
	세부과제명				
연구책임자	김시관	해당단계 참여 연구원 수	총: 18 명 내부: 6 명 외부: 12 명	해당단계 연구개발비	정부: 240,000 천원 민간: 160,000 천원 계: 400,000 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 47 명 내부: 18 명 외부: 29 명	총연구개발비	정부: 700,000천원 민간: 470,000천원 계: 1,170,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교글로벌산학협력단 연세대학교산학협력단			참여기업명	(주) 일화
위탁연구	연구기관명: 헬스케어크레임스텐네지먼트			연구책임자: 하 기 찬	
1. 남성 난임 활용 GINST의 표준생산 시스템 및 공정별 품질관리 기준 구축				54 ~ 58 page	
2. 해외 수출을 위한 홍삼의 지표물질 확보 및 표준품 서류 구축				58 ~ 76 page	
3. 카놀라유를 이용함으로써 잔류농약을 검출한계 미만으로 제거할 수 있는 방법 확립. Cost- & labor-effective함과 동시에 건강 및 환경 친화적				79 ~ 83 page	
4. GINST는 혈중 성호르몬 불균형을 개선하는 것으로 밝혀짐				27 page	
5. 남성 난임 활용 발효인삼 제품 개발 및 대량 생산을 위한 착수				54~ 58 page	
6. 정신적, 고온 및 노화로 인한 스트레스는 혈중 남성호르몬(testosterone)의 저하는 물론 고환세포의 남성호르몬 수용체 단				27 ~ 44 page	

백질 저하를 초래하여 심각한 정자생성능 억제를 유발하는 것으로 규명됨.

7. GINST는 각종 스트레스로 야기되는 항산화, 정자생성에 관여하는 전사인자 및 성호르몬 수용체 감소를 현저하게 억제하므로 정자의 수와 질을 향상시키는 것으로 밝혀짐.

8. 정자생성 증대 및 운동성 개선을 통한 남성난임에 대한 GINST의 효능 입증

20 ~ 44 page

27, 33, 40 page

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효인삼을 이용한 남성 난임 개선용 기능식품 개발 ○ 국제기준에 부합하는 제조공정(cGMP) 및 품질규격기준(WHO 혹은 ICH 기준) 확립 ○ 발효인삼 및 compound K의 정자 생성 촉진 기전 연구 ○ 정자 결핍 및 약정자증으로 인한 난임 남성용 제품 개발 ○ 국제적으로 공인 받은 고려인삼의 효능 발굴 ○ 연간 200억 이상 매출 가능한 기능식품/생약제 의약품 개발 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 남성 난임 활용 GINST의 표준생산 시스템 및 공정별 품질관리 기준 구축 ○ 해외 수출을 위한 홍삼의 지표물질 확보 및 표준품 서류 구축 ○ 카놀라유를 이용함으로써 잔류농약을 검출한계 미만으로 제거할 수 있는 방법 확립. Cost- & labor-effective함과 동시에 건강 및 환경 친화적 ○ GINST는 혈중 성호르몬 불균형을 개선하는 것으로 밝혀짐 ○ 남성 난임 활용 발효인삼 제품 개발 및 대량 생산을 위한 착수 ○ 정신적, 고온 및 노화로 인한 스트레스는 혈중 남성호르몬(testosterone)의 저하는 물론 고환세포의 남성호르몬 수용체 단백질 저하를 초래하여 심각한 정자생성능 억제를 유발하는 것으로 규명됨. ○ GINST는 각종 스트레스로 야기되는 항산화, 정자생성에 관여하는 전사인자 및 성호르몬 수용체 감소를 현저하기 억제하므로 정자의 수와 질을 향상시키는 것으로 밝혀짐. ○ 정자생성 증대 및 운동성 개선을 통한 남성난임에 대한 GINST의 효능 입증 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>[활용방안]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 남성 성기능 개선제로도 활용 ○ 국제적으로 공인받을 수 있는 남성 난임 치료제로 활용 ○ 여성 난임 치료제로의 활용 범위 확대 <p>[기대성과]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 세계 최초 남성 난임 치료제 제품 탄생 ○ 기능식품으로서 고려인삼의 신수요 창출 ○ 간절한 장복 소비자 그룹 확보→지속적 매출 증대 기대 ○ 침체된 인삼산업의 활력소 역할 ○ 년매출 200억 이상 제품 탄생 가능 ○ 출산율 증대로 국가시책에 이바지 					
중심어 (5개 이내)	발효인삼	표준화 인삼제품	남성 난임	정자 생성	기능식품	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of fermented ginseng functional food with biological activity against male subfertility derived from oligospermia and asthenospermia ○ Establishment of manufacturing process conforming with cGMP and quality specification qualifying for ICH specification guideline for herbal medicine ○ Elucidation of stimulatory mode of action for fermented ginseng and compound K on spermatogenesis ○ Development of globally accredited ginseng product ○ Development of ginseng product with annual sale of 20 billion won 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Build-up of standardized manufacturing process and quality control system for GINST with biological activity against male subfertility ○ Acquirement of standard reference materia (SRM) and dossier establishment for the SRM ○ Establishment of cost- and labor-effective method for pesticide residue elimination to non-detection level with health- and environmentally friendly canola oil ○ GINST improves blood sex hormone imbalance ○ Development of large scale production of fermented ginseng product ○ GINST was found to protect decrease in testicular sex hormone receptor expression levels induced by psychological and physical (heat and ageing) stress ○ Elucidated stimulatory effect of GINST on the testicular expression of antioxidant enzymes, spermatogenesis-related transgenic marker molecules and sex hormone receptors, thus increasing sperm number and quality ○ GINST was found to be effective against male subfertility by improving sperm number and activity 				
Expected Contribution	<p>[Application]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Can be used as a male sexuality improving agent ○ Can be applied as globally approved herbal medicine effective against male subfertility ○ Can be applied also against female subfertility <p>[Expectation]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ The 1st globally accredited medicine for male subfertility ○ Creation of new ginseng market as a functional food ○ Secure eager and loyal consumer group, thus promoting sales continually ○ Plays as an activator role in depressed ginseng enterprise ○ Birth of popular ginseng product with new and original claim (indication) ○ Contribute to national birth rate increase 				
Keywords	Fermented ginseng	Standardized ginseng product	Male subfertility	Spermatogenesis	Functional food

6. 영문 목차

1. Introduction	1
1.1. Purpose of the study	1
1.2. Background of the study	1
1.3. Scope of the study	6
2. Global R&D status	8
3. Experimental contents and results	10
3.1. Materials and methods	10
3.1.1. Study I (PI)	10
3.1.2. Study II (Collaboration study 1)	15
3.1.3. Study III (Collaboration study 2)	16
3.2. Time schedule of the experiment	19
3.3. Experimental results	20
3.3.1. Study I (PI)	20
3.3.2. Study II (Collaboration study 1)	54
3.3.3. Study III (Collaboration study 2)	86
4. Achievement rate and contribution to the related industry	93
4.1. Achievement rate	93
4.1.1. Final goal achievement and evaluation method	93
4.1.2. Goal of annual achievement	93
4.2. Contribution rate to related industry	96
5. Plan of experimental results	96
6. Foreign scientific and technological information collected during the process of study	96
7. Confidential rate of the research results	97
8. Facility and equipment registered to national science & technology general information system	97
9. Safety measures applied to the laboratory	97
10. Representative research results	98
11. Others	99
12. References	99
Appendix	101

7. 국문 목차

1. 연구개발과제의 개요	1
1.1. 연구개발 목적	1
1.2. 연구개발의 필요성	1
1.3. 연구개발 범위	6
2. 국내외 기술개발 현황	8
3. 연구수행 내용 및 결과	10
3.1. 실험방법	10
3.1.1. 제1세부 실험방법	10
3.1.2. 제1협동 실험방법	15
3.1.3. 제2협동 실험방법	16
3.2. 추진일정	19
3.3. 연구수행결과	20
3.3.1. 제1세부 연구수행결과	20
3.3.2. 제1협동 연구수행결과	54
3.3.3. 제2협동 연구수행결과	86
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	93
4.1. 목표달성도	93
4.1.1. 최종 성과목표 및 평가 방법	93
4.1.2. 연차별 성과목표	93
4.2. 관련분야 기여도	96
5. 연구결과의 활용계획	96
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	96
7. 연구개발결과의 보안등급	97
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설, 장비 현황 ...	97
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ...	97
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	98
11. 기타사항	99
12. 참고문헌	99
Appendix	101

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 발효인삼을 이용한 남성 난임 개선용 기능식품 개발
- 국제기준에 부합하는 제조공정(cGMP) 및 품질규격기준(WHO 혹은 ICH 기준) 확립
- 발효인삼 및 compound K의 정자 생성 촉진 기전 연구
- 정자 결핍 및 약정자증으로 인한 난임 남성용 제품 개발
- 국제적으로 공인 받은 고려인삼의 효능 발굴
- 연간 200억 이상 매출 가능한 기능식품/생약제 의약품 개발

1-2. 연구개발의 필요성

○ 불임/난임의 정의: 건강보험심사평가원의 보도자료[www.hira.or.kr, 2012. 10. 17]에 의하면 “불임(infertility)/난임(subfertility)”이란 1년간 별다른 피임을 하지 않은 부부가 정상적인 부부관계에도 불구하고 임신이 되지 않는 경우를 말한다. 정자와 난자의 수정, 수정된 배아의 발달, 배아의 자궁내 착상까지 전과정 중 한 단계에서라도 이상이 있으면 불임/난임이 될 수 있다. 발표에 의하면 대부분의 불임/난임 부부는 절대적 불임/난임 상태가 아니며 수태능력이 저하된 상태가 많다고 한다. 불임 부부의 경우 가임력이 저하된 상태이므로 자연적 임신을 기다리기 보다는 수태력을 증대시켜 주는 적극적인 방법을 이용하는 것도 좋다고 본다. 그 가운데에서도 자연식품의 섭취로 아기를 가질 수 있다면 가장 이상적이라 하겠다.

○ 남성 불임/난임의 원인: 1) 기질적 원인(정삭정맥류, 감염, 사출 이상, 불강하고환, 호르몬 불균형, 정관 결함, 염색체 이상, 성관계 불능 등), 2) 환경적 요인(고열, 독성물질 장기노출), 3) 생활습관(비합법적인 의약품 사용, 음주 과다, 직업적 요인, 흡연, 과도한 정신적 스트레스, 과체중, 장시간 자전거 타기 등)이 있다.

○ 의료비 증가, 생산성 저하: 최근 5년간 건강보험심사평가원의 심사 결정 자료 [아이는 낳고 싶은데...‘불임 부부 증가’, 2011. 10. 18]를 기준으로 분석한 결과 진료인원은 2006년 148,000명에서 2010년 184,000명으로 5년간 24.4% 증가하였고 연평균으로는 5.8%씩 매우 빠르게 증가하고 있다. 이에 따른 진료비 증가 역시 2010년 203억원으로 지난 5년간 연평균 9.4%씩 가파르게 증가하고 있는 추세이다. 불임을 연령별고 구분하여 분석해 보면 2010년 기준으로 남성(73%)은 물론 여성(66.7%) 역시 30대가 가장 많다. 현대의학의 기술적 발달로 인공 수정, 시험관, 미세수정 등을 통해 남성 불임의 치료방법으로 사용되고 있지만, 이 또한 실패 가능성이 존재하고 있으며, 정자 자체의 질 개선은 전혀 이루어지지 않는다. 또한 국가에서 체외수정 (1회 180만원), 인공수정 (1회 50만원)을 지원해주고 있지만, 임신을 위한 시술 각각 1회당 평균 400만원, 80만원의 비용으로 상당한 부담으로 느껴진다. 불임은 자식을 갖지 못하는 무자녀 가정에만 국한된 문제가 아니라 국가적으로는 출산율 저하로 이어지며 당사자 개인적으로는 자신감 결여, 우울증 등으로 이어져 생산성 저하로 이어지기도 한다.

○ 불임/난임 남녀 비율: 불임 진료인원을 성별로 분석한 결과 2010년 기준으로 남성이 34,811명, 여성이 149,765명으로 여성이 남성의 4.3배에 달하는 것으로 나타났으나 여성의 연평균 증가율은 4.8%인 반면 남성의 연평균 증가율은 11.3%로 여성 증가율의 2배를 상회한다. 특히 남성의 경우 불임 소인을 가지고 있다고 하더라도 타인의 시선 때문에 병원을 찾지 못하는 경우

가 많다는 사실을 감안한다면 실제 불임/난임 남성의 수는 수배에 달할 것으로 본다.

○ 남성 불임/난임의 국내외 현황: 국내에서는 결혼한 부부의 15%가 불임이며 이중 절반은 남성에 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 남성의 15%는 불임 혹은 난임의 소인을 가지고 있다고 보아야 할 것이다. 미국의 통계[Current Reproductive Endocrinology 27(3): 487-516 (2000)]에 따르면 미국에는 600만명의 남성불임 환자가 있다고 한다. 그러나 보다 심각한 것은 남성 불임이 빠른 속도로 증가하고 있다는 점이다. 가장 큰 원인으로서는 장시간 컴퓨터 사용(고환 온도 상승), 비만(여성 호르몬 증가), 환경오염, 스트레스 등이 있다. 국내의 경우 2013년 7월 13일 SBS 20시 뉴스에 의하면 최근 5년간 국내 난임 남성 환자 비율이 75.7% 증가하였다고 한다. 이는 매년 15%씩 급속도로 증가하고 있는 셈이다.

○ 남성 갱년기 증상 심각: 최근 데일리팜[www.dailypharm.com, 2013. 07. 12]에 보도된 기사에 의하면 우리나라 40대 이상 중년 남성 3명 가운데 1명은 평상시 각종 남성 갱년기 증상을 느끼고 있으며 10명중 1명꼴은 치료가 시급한 상태라고 한다(서울 아산병원 건강증진센터 경윤수 교수팀). 이들 대부분은 혈중 남성 호르몬인 테스토스테론 함량이 3.0 ng/ml로서 호르몬 보충 요법이 필요하다고 하니 보통 심각한 상태가 아닌 것으로 사료된다.

○ 난임 남성을 대상으로 하는 기능식품/치료제: 특허를 검색한 결과 정자의 수나 질을 개선함으로써 수정력을 높이는 특허는 2건이 검색되었다. 하나는 무청(radish leaves)을 이용하는 방법 [US patent 05736144]이고 또 하나는 retinoid agonist (예: tarzarotene)이다 [US patient 20070060620]. 무 잎의 경우 끓여서 차로 마시는 방법이며 retinoid agonist는 임상 증례에 대한 언급이 없는 것으로 보아 채취한 정액에 사용함으로써 정자의 운동성을 증진시키는 것으로 보인다. 이외에도 대체의약으로 추천하는 식품은 Vit. C, zinc, selenium, Vit. E, Vit. B12, L-carnithine, b-carotene 정도이다 [www.edition.cnn.com, 2012. 09. 15]. 그러나 이런 식품을 얼마나 섭취해야 정자생성이 좋아지고 나아가 불임을 치료할 수 있는지에 대해서는 보고된 바 없고 공인된 기능식품/치료제가 아니다.

○ 인삼산업의 위기: 인건비 증대에 따른 생산비 증가(경쟁국 대비 2~7배), 경기 불황으로 인한 매출 격감(2011년 대비 25% 정도 감소), 재고 누적(1조원 이상), FTA 체결로 인한 경쟁력 약화, 식재 면적 급감(2009년 대비 2011년 90%)으로 인한 인삼산업의 위기가 현재 대한민국 인삼산업 현황이다. 따라서 고려인삼의 새로운 쓰임새 발굴로 국내외 소비를 증진시키는 길만이 우리가 할 수 있는 최선의 선택일 것이다.

○ 위기 극복 경험: 1990년도 후반 대한민국은 IMF라는 경제위기에 봉착하였다. 이런 경제위기로 인해 인삼 매출은 극도로 위축되었으며 회사마다 엄청난 재고를 안고 있었다. 한국인삼공사 역시 1년분의 재고를 고스란히 창고에 쌓아 놓고 있는 매우 어려운 상황이었다. 이러한 악조건에서 위기를 극복하는데 결정적으로 기여한 한편의 논문은 본 주관책임자가 영국비뇨기과학회지[KIM, SLK et al. Panax ginseng protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced testicular damage in guinea pigs, BJU International, 83: 842-849 (1999).]에 발표한 “고려인삼의 다이옥신-유발 고환독성 방어 효과”였다.

○ 충성도 높은 소비자 확보: 현재는 다이옥신 때문에 인삼을 복용하는 소비자는 없다. 즉, 다이옥신에 대한 고려인삼의 효과는 일과성 소비 증진에 그쳤다. 금후 인삼산업은 단타성 홍보, 막연히 건강 증진, 성기능 증진 등에 의존해서는 아니 된다고 본다. 이 경우 경제 상황에 따라 매출이 급변할 수 있기 때문이다. 따라서 1) 현재 경쟁 상품이 없으며, 2) 간절히 그리고 절박

하게 원하는 소비자층을 대상으로 하는 제품을, 3) 세계 최초로 **launching**하여 시장을 선점해야만 성공 가능성이 높다고 생각한다. 이러한 점에서 남성 난임 소비자를 대상으로 하는 “세계 최초 발효 인삼 기능 식품” 출시하는 회사 차원에서는 충성도 높은 소비자를 확보한다는 점이고 공익적 차원에서는 출산율을 높일 수 있는 계기가 되리라 판단한다.

○ 중동시장을 겨냥한 제품 개발: 중동의 이슬람 국가들은 일부다처제이다. 젊을 때 여러 부인을 거느리는 것은 체력적으로 문제 되지 않겠으나 중년 이후 남성의 경우 체력적으로 많이 부담되는 것이 사실이다. 따라서 이들을 겨냥한 정자생성 촉진/성기능 개선 제품 개발은 구매력이 있는 산유국에서 인기 있는 상품이 될 것이다.

○ 국제 공인 효능 발굴 필요: 현재까지 고려인삼 제품을 가지고 식약처에서 인증 받은 기능은: 1) 피로회복, 2) 면역기능 증진, 3) 혈소판 응집 억제를 통한 혈액순환 개선, 4) 기억력 개선에 도움을 줌, 5) 항산화 효과, 6) 혈당강하에 도움을 줌(일화의 발효인삼 제품에만 국한)이 있다. 그러나 이들 기능 모두 국내용으로 WHO를 비롯하여 국제적으로는 “**tonic** (강장효과)”이 전부이다. 본 주관연구책임자는 한국인삼공사 생산 홍삼분말 캡슐의 독일 의약품 등록 서류 작성 프로젝트를 수행한 적이 있어 생약재 의약품의 국제적 등록에 대해 잘 알고 있다. 의약품 등록 경험에 비추어 볼 때 6가지 기능 모두 국내용이지 국제적으로 공인받을 수 있을 정도로 효과가 강한 것은 아니라고 판단한다.

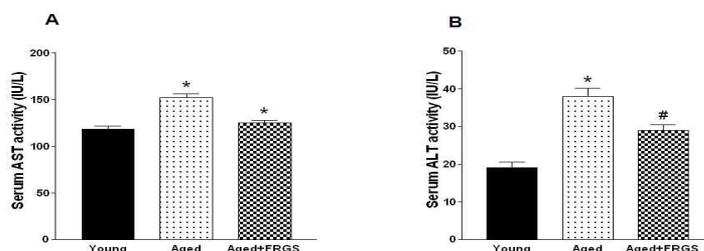
○ 성기능 개선 iPET 과제: 금년도 iPET에서 공모한 고려인삼을 이용한 성기능 개선 효과는 유교에 근간을 두고 있는 우리나라로서는 식약처의 기능식품으로 등재해 줄 수 없다고 본다. 이에 대한 협의는 본 과제 제안자가 식약처 담당관과 수차례 협의를 하여도 불가능한 것으로 결론지었다. 그리고 성기능 개선 효과는 남성 삶의 질을 개선한다는 측면도 있겠으나 한편으로는 쾌락주의자를 위한 것으로 대한민국의 자존심인 고려인삼을 비아그라처럼 폄하될 수도 있으므로 종주국으로서 자존심이 용납할 수 없다.

○ 수세에서 공세로: 동남아 시장에서 고려인삼은 증열작용이 있다는 오인으로 인해 판촉에 큰 어려움을 겪고 있다. 이를 위해서는 고환을 따뜻하게 하여 정자 생성 기능을 감퇴시키고 이에 대한 고려인삼의 효과를 규명함으로써 더운 나라 소비자 판촉을 위한 귀중한 홍보 자료를 확보하고자 한다.

○ 선행 연구 결과: 일부는 2011년 *Experimental Gerontology*에 게재.

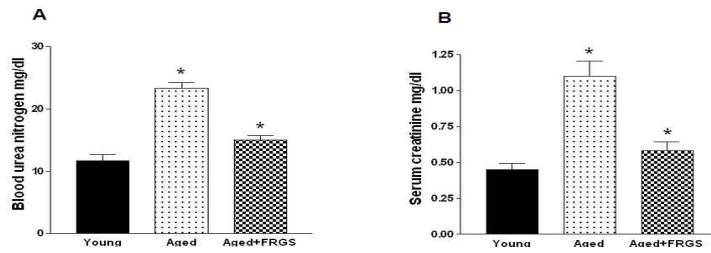
- GINST는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 노화로 인한 간 염증 관련 효소활성 증가를 현저히 회복시킴.

Figure 1



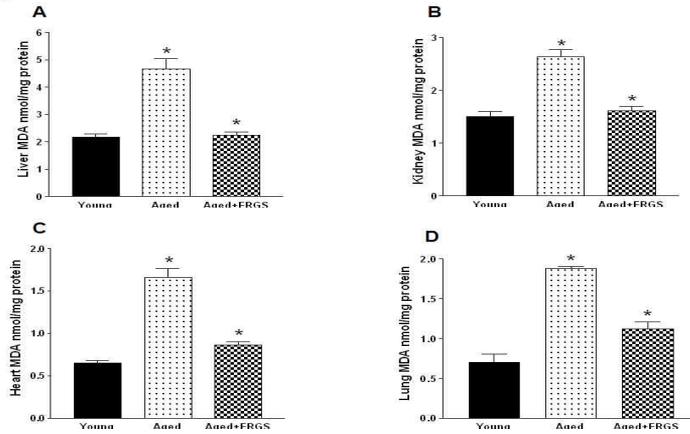
- GINST는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 노화로 인한 신장 관련 생화학 지수를 유의하게 개선함.

Figure 2



- GINST는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 노화로 인한 MDA 생성 증가를 현저히 억제함.

Figure 3



- GINST는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 노화로 인해 감퇴하는 정자생성 지수를 현저히 개선함.

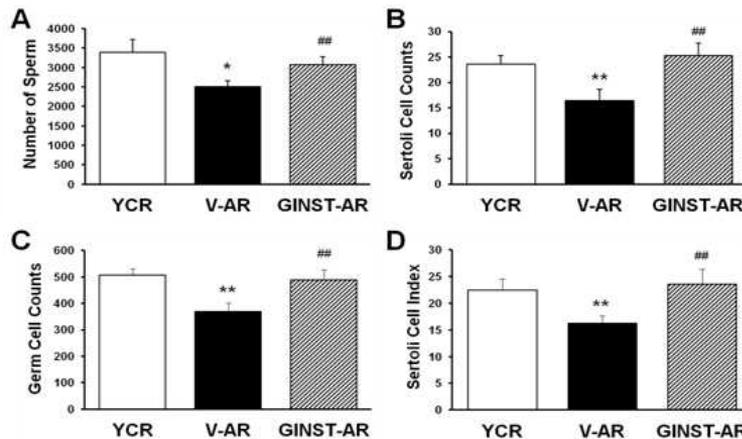


Figure 4. Effects of GINST on testis parameters related to spermatogenesis in aged rats. (A) Sperm number per tubule, (B) Sertoli cells per tubule, (C) Germ cells per tubule, and (D) Sertoli cell index. Statistical comparisons: YCR vs V-AR, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; V-AR vs. GINST-AR, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. Values are mean \pm SD (n=6).

- 노화로 인해 저하하는 고환 조직의 항산화효소활성을 현저히 개선함.

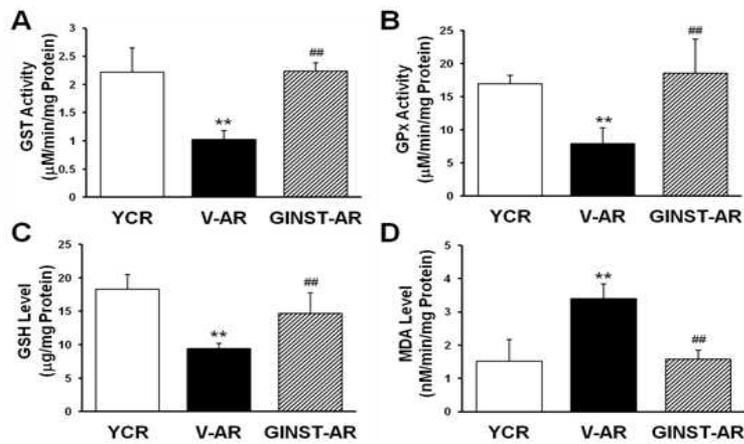


Figure 5. Effects of GINST on testicular antioxidant enzymes in aged rats. (A) GST activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein). (B) GPx activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein). (C) GSH level, expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein. (D) MDA level, expressed as $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. Statistical comparisons: YCR vs. V-AR, $**p < 0.01$; V-AR vs. GINST-AR, $##p < 0.01$. $n=6$.

- 노화로 인해 저하하는 정세관내 정자생성능을 현저히 개선함.

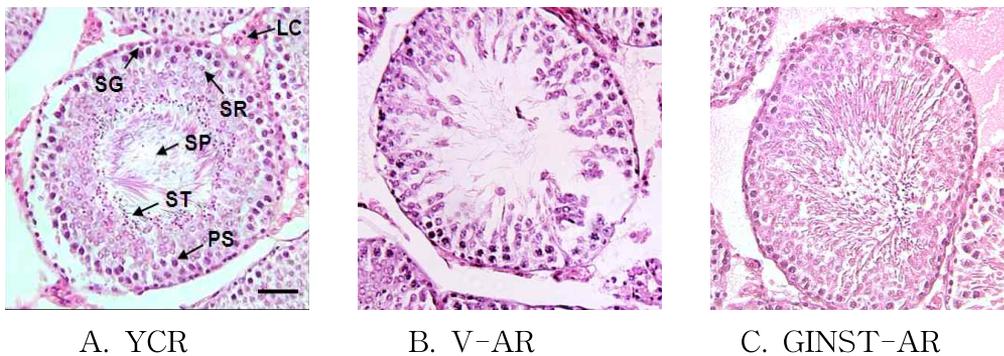


Figure 6. Histological analysis of seminiferous tubules in the rat testis. Representative images of tubular cross-sections of testis from young control rats (YCR, A), vehicle-treated aged rats (V-AR, B), and GINST-treated aged rats (GINST-AR, C). Sections were stained with H&E. The images are typical of those obtained in five independent experiments. Scale bar = $45 \mu\text{m}$. LC, Leydig cell; PS, primary spermatocyte; SG, spermatogonium; SP, spermatozoa; SR, Sertoli cell; ST, spermatid.

- 고환 proteome 분석 결과 노화에 의해 감소하는 항산화 효소 발현을 현저히 개선함.

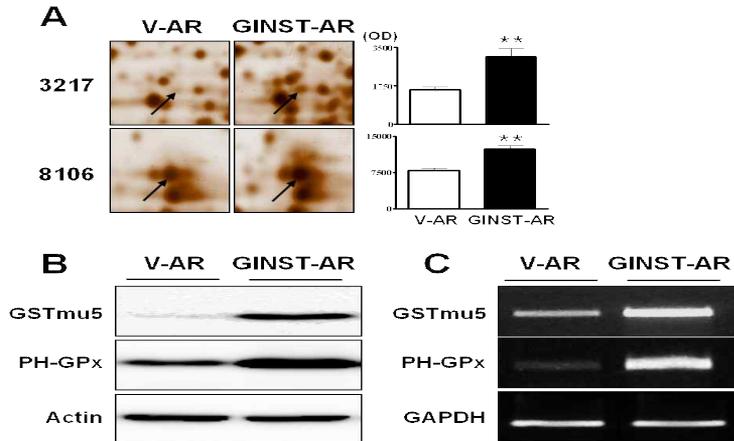


Figure 7. Protein expression and confirmation of changes in expression in AR and GINST-AR. (A) Arrows indicate proteins that were differentially expressed in V-AR relative to GINST-AR. Protein levels were quantified from four independent experiments ($p < 0.05$). The numbers indicated in the gels correspond to the numbers in Table 1. (B) Protein expression of GSTmu5 and PH-GPx in testis tissues. Tissue lysates from V-AR and GINST-AR testis were immunoblotted with anti-GSTmu5 and -PH-GPx antibodies. The images are typical of those obtained in blots from three independent experiments. (C) GSTmu5 and PH-GPx mRNA levels in testis from V-AR and GINST-AR. GAPDH served as a loading control. The images are representative of three independent experiments.

○ 선행 연구를 통한 확신: 본 과제 제안자는 지난 20년간 각종 원인(독성물질, 노화 등)에 의한 정자생성 감퇴에 미치는 고려인삼의 효과에 대하여 연구하여 왔다. 고려인삼 특히 발효인삼의 정자생성 촉진 및 정자의 운동성 향상은 매우 민감하여 ppm 이하 농도에서도 발현된다. 또한, 주변의 불임 가정에 관한 결과 여러 가정이 아기를 출산하였기 때문에 임상효과 역시 확신을 가지고 있다. 고려인삼은 성호르몬의 균형유지, 효소적/비효소적 항산화 기능 증진, 정자생성 관련 단백질 발현 증가, 성호르몬 수용체 발현 증대 등을 통하여 매우 재현성(repeatable) 있고, 매우 민감(sensitive)하게 정자생성을 촉진한다는 사실을 확인하였다. 이러한 경험을 바탕으로 “GINST를 이용하여 정자결핍증(oligospermia)/약정자증(asthenospermia)으로 인한 남성 난임 개선 기능식품/생약재 의약품”을 개발하고자 한다.

1-3. 연구개발 범위

○ 고환세포 독성에 대한 GINST의 방어능 조사

(1) 과산화수소-노출 고환세포 독성에 따른 GINST의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR)의 mRNA 및 단백질 발현량 확인

(2) 항암제-노출 고환세포 독성에 따른 GINST의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR)의 mRNA 및 단백질 발현량 확인

(3) 고온-노출 고환세포 독성에 따른 GINST의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정

자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR)의 mRNA 및 단백질 발현량 확인

○ 생식기능 저하에 대한 GINST의 방어능 조사

- (1) 노령쥐의 생식기능 저하에 대한 GINST의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR), 간/신장 기능 관련 혈액화학지수, 혈중 성호르몬(testosterone, LH, FSH)함량, 정세관 현미경 관찰
- (2) Heat stress로 인한 GINST의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR), 간/신장 기능 관련 혈액화학지수, 혈중 성호르몬(testosterone, LH, FSH)함량, 정세관 현미경 관찰
- (3) Immobilization stress로 인한 GINST의 항산화관련 효소(Prx, Gpx, SOD, CAT 등), 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2), 성호르몬 수용체(FSHR, AR, LHR), 간/신장 기능 관련 혈액화학지수, 혈중 성호르몬(testosterone, LH, FSH)함량, 정세관 현미경 관찰

○ 품질규격 기준 부합여부 조사

- (1) 지표성분 기준 규격
- (2) 잔류농약 기준 설정
- (3) 미생물의 기준 규격 설정
- (4) 중금속의 기준 규격 설정을 공인기관의 분석과 법적 기준 등을 기본으로 설정

○ 지표물질의 validated 정량 분석법 확립

- (1) ICH guideline 준수
- (2) Compound K의 validated 정량 분석법(선택성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 범위, 정확성, 정밀성, 강건성, 시스템 적정성) 확립

○ 제품 등록을 위한 규격기준(specification) 분석

- (1) 제품 등록을 위한 3 batch QC data(물리·화학 및 미생물 검사, 위해물질 허용기준 초과여부, 국내·외 규격기준 부합여부) 확보
- (2) 제품의 저장기간 확립을 위한 real time & accelerated stability 자료 확보

○ 임상연구를 통한 난임 개선 효능 입증

- (1) CASA(computer aided sperm analyzer) 및 microscope를 이용한 sperm morphology 평가
- (2) 정낭액의 MDA analysis와 정자의 Halo-sperm study 진행
- (3) serum OT/PT (AST/ALT), serum FSH, LH, Testosterone, SHBG 검사를 통해 임상약 투여 전과 후 상태 비교 평가
- (4) 생활습관, 성생활 만족도(brief sexual function inventory), 피로도(fatigue severity scale), 삶의 질(SF-36 health survey score) 평가를 통해 임상약 투여 전과 후의 상태 비교 평가

2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
<p>○ 특허를 검색한 결과 미국 특허 10,306건, 유럽 2,403건, 일본 85건, 국내 89건의 특허가 검색되었고, 그 중 정자의 수나 질을 개선함으로써 수정력을 높이는 특허는 2건이 검색되었다. 하나는 무청(radish leaves)을 이용하는 방법[US patent 05736144]이고 또 하나는 retinoid agonist (예: tarzartene)이다[US patient 20070060620]. 무 잎의 경우 끓여서 차로 마시는 방법이며 retinoid agonist는 임상 증례에 대한 언급이 없는 것으로 보아 채취한 정액에 사용함으로써 정자의 운동성을 증진시키는 것으로 보인다.</p> <p>○ 이외에도 특허는 아니지만 대체의약으로 추천하는 식품은 Vit. C, zinc, selenium, Vit. E, Vit. B12, L-carnithine, b-carotene 정도이다 [www.edition.cnn.com, 2012. 09. 15]. 그러나 이런 식품을 얼마나 섭취해야 정자생성이 좋아지고 나아가 불임을 치료할 수 있는지에 대해서는 보고된 바 없고 공인된 기능식품/치료제 의약품이 아니다.</p> <p>○ 본 과제에서는 동물실험을 통하여 고려인삼을 발효함으로써 compound K를 주 활성성분으로 하는 GINST의 정자생성 촉진 효과와 기전을 규명하고 나아가 임상 연구를 통하여 남성 난임 개선 및 치료 효과를 증명한다. 또한, 이미 시장에 나와 있는 인삼/홍삼 제품들과는 “차별화된 제품으로 시장을 선점”하고 본 제품에 대해서는 “용도 특허”를 확보하고자 한다.</p> <p>○ 제조공정에서 품질관리에 이르기까지 전공정이 “국제기준”인 ICH (국제조화위원회)와 WHO guideline에 부합되도록 함으로써 국제 시장 진입을 목표로 모든 전임상 연구 (pharmacodynamics), 임상연구(clinical study), 제조공정(GMP), 품질관리 자료를 확보한다.</p> <p>○ 국내 불임 시장이 350억원(medisobizaneews, ‘국내 불임치료제 시장 외자사 아성 깨졌다’, 2013-04-11)으로 추정되고 있는 가운데 현재 국내에서 시판되고 있는 불임 치료제는 여성 불임에 관련된 배란유도제가 대부분임. 남성 불임에 관련된 치료제는 없고 다만 수술에 의해 치료하고 있는 상황임.</p> <p>○ 남성 불임환자에 대한 정확한 시장조사 자료는 국내외를 막론하고 보고된 것이 없음. 다만 결혼한 부부의 15%가 불임이며, 남성의 70%가 결혼을 한다고 가정하면 결혼적령기 남성의 10%는 불임일 것으로 판단됨.</p> <p>○ 현재 국외에서 시판되고 있는 불임 치료제는 여성 불임에 관련된 치료제가 대부분임. 최근 독일에서 남성 불임 관련 생식세포로 정자 배양에 성공한 사례(포커스 신문사, 2012-01-04)가 있으나, 현재 해외에서 남성 불임에 관련되어 시판되고 있는 불임 치료제는 전무한 상황임.</p> <p>○ 한국보건산업진흥원에서 발표한 자료(2013. 5. 24. vol.57)와 Dailymedi에 보도된 기사(2012. 1. 4. ‘대한민국 의료관광 효자 부상 ‘불임치료’)에 따르면 한국의 의료 관광객의 비율이 점점 더 높아짐에 따라 현재 국내에서 시판되고 있는 남성불임 치료제로 사용될 인삼의 판매 비율이 커질 것으로 예상된다고 한다. 또한 CMH Health International의 통계에 의하면 2003부터 2007년까지의 중국 불임 치료제 시장규모는 각각 20억1500만 위안(4,000억원), 23</p>		

억6500만 위안(4,700억원), 27억3800만 위안(5,476억원), 29억1300만 위안(5,829억원), 30억 2100만 위안(6,042억원)으로 5년 사이에 50% 성장함으로써 중국의 불임 시장에서 큰 판매 효과를 볼 것이라 예상된다. 또한 미국의 경우 남성 불임 환자가 600만명에 이른다고 하니 세계시장 규모는 수조원에 달할 것으로 예측한다. 또한, 남성 난임 환자의 비율은 생활 습관의 변화와 더불어 급속도로 증가하고 있는 것이 특징이다. 따라서 대한민국이 종주국인 고려인삼을 이용하여 남성 난임 개선/치료제를 출시하여 세계시장을 선점한다면 경제적 측면에서는 물론 국격 제고에도 기여하리라 생각된다.

- 기존에 시장에 나와 있는 수삼, 백삼, 홍삼 가공제품이 아니라 발효인삼을 이용하여 남성 난임 치료/개선제 기능식품 개별인증을 획득함으로써 차별화된 제품, 동분야의 “세계 최초 제품”을 출시하는 것을 목표로 한다.
- 인삼은 재배과정에서 병충해에 매우 취약하므로 농약을 여러 차례 살포한다(10~15회/년). 따라서 매년 2~3%의 원료삼은 잔류농약 허용치를 상회하는 농약이 함유되어 있어 농가는 물론 정부도 곤란한 처지에 있다. 더욱 심각한 사실은 지금까지 한국에서는 한 번도 사용한 적이 없는 농약과 DDT와 같이 이미 1970년도 중반부터 생산, 판매가 중지된 농약까지 검출되는 상황이다. 이처럼 한국에 유입된 적이 없는 농약이 검출되는 이유는 분석장비의 감도 개선과 중국으로부터의 대기 공해물질 유입이 원인으로 생각되어 진다. 현재 국내에서 생산되는 인삼 제품의 경우 잔류농약 허용기준 관련 유럽이나 미국, 일본의 zero tolerance 혹은 positive system을 충족시키는 것이 매우 어렵다. 이러한 현실을 감안하여 볼 때 제품제조과정에서 잔류농약 제거 공정은 필수적이라 하겠다.
- 제 1세부과제 연구책임자는 생약재로부터 잔류농약을 제거하는 방법에 관한 특허를 보유하고 있다. 이 방법은 생약재 추출물을 식용유와 혼합한 다음 정치, 하층의 원심분리라는 극히 간단한 과정을 거쳐 농약을 식용유층으로 전이, 제거하는 방법이다. 본 방법은 기존의 상용화되어 있는 CO₂ 임계추출장치에 비해 cost-, labor-, efficiency-effective하다.
- 본 제품은 정자 결핍 혹은 정자의 운동성 부족으로 인하여 불임인 남성을 대상으로 하는 “건강기능식품” 혹은 “생약재 의약품”을 목표로 한다.
- 본 제품은 기존의 인삼, 홍삼제품과는 “차별화된 제품”이다. 즉, GINST는 고려인삼을 발효시킴으로써 protopanaxadiol계 사포닌이 선택적으로 compound K로 변환된 사포닌을 주성분으로 하는 제품이다. 일반적으로 물리적(열처리, 홍삼제조), 화학적 방법(산처리, 초산 등)으로 수삼을 가공하면 C20위에 결합되어 있는 당이 탈락되어 ginsenoside Rd를 거쳐 Rg3로 변환되는 것이 특징이다. 따라서 홍삼에는 수삼에는 존재하지 않는 artifact인 ginsenoside Rg3가 다량 함유되어 있는 것이 특징이다. 그러나 compound K는 미생물 혹은 효소 처리에 의해 생성되는 화합물로 C3위의 당이 모두 탈락하고 C20위에 포도당 한 분자만 결합되어 있는 화합물로서 compound K는 정자생성 촉진, 항산화, 항암, 항염증 등과 같이 다양한 효과가 밝혀지고 있다. 특히 흥미로운 사실은 사람의 체질에 따라 보다 정확하게는 장내 세균 분포에 따라 compound K가 생성되는 사람과 그렇지 않은 사람이 있어 인삼을 복용하더라도 나타나는 효과에 차이가 있다는 것이 유력한 사실로 받아들여지고 있다.

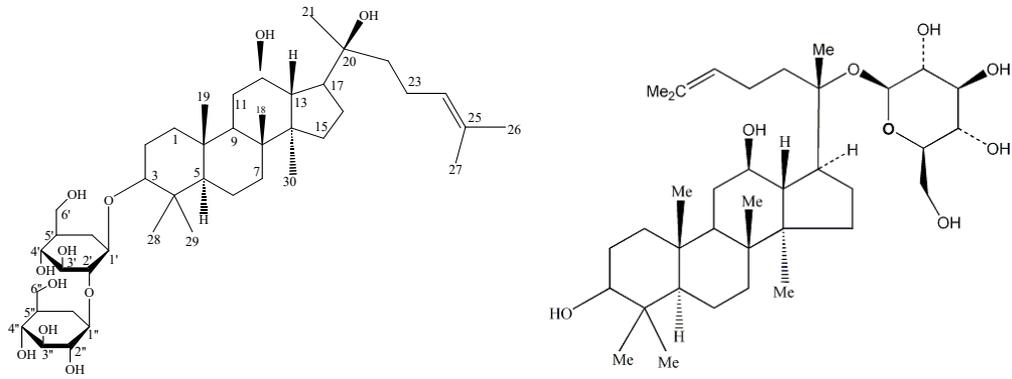


Fig. 8. Ginsenoside Rg3(좌)와 compound K(우)의 구조식

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

가. 실험방법

[제1세부 : 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명]

(1) *In vitro* 실험

(가) 세포 배양

미국 세포주은행(ATCC) 지침에 따라 No. CRL-2196 Spermatoocyte GC-2spd, No. CRL-1714 Leydig TM3, No. CRL-1715 sertoli TM4 cell (ATCC, USA)은 배양액에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. GC-2spd는 10% fetal bovine serum (Gibco), 100 units/mL penicillin (Gibco), 100 ng/mL streptomycin (Gibco)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, USA) 배지에서 배양한다. TM3와 TM4는 DMEM과 Ham's F12 (1:1, v/v) 배지에 5% horse serum (Gibco), 2.5% fetal bovine serum, 100-units/mL penicillin, 100 ng/mL streptomycin을 첨가하여 배양한다.

(나) 각종 자극에 의한 고환 세포의 홍삼 추출물 방어효과 연구

① RNA추출

Total RNA는 Invitrogen사의 TRIZOL시약을 이용하여 추출하였다. 먼저 배양한 세포를 홍삼 물 추출물 (KRG-WE) 100 µg/ml, 조사포닌 (CS) 10 µg/ml, 비사포닌 (NS) 90 µg/ml를 각각 2시간 전 처리 후 Hydrogen peroxide 600 µM로 1시간 자극을 준다. 다음으로 배양 세포를 PBS로 2회 씻은 다음 TRIZOL 용액 0.4 ml 첨가, 세포를 용해시킨 후 100 µl chloroform 용액을 가하고 2~3회 잘 섞어준 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 맨 위의 상층액을 취했다. 그 후 2-propanol과 1:1로 혼합 후 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 남은 침전물을 75% ethanol로 씻고 침전물을 건조시켰다. 다시 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 20 µl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

② 중합효소(PCR) 반응

TRIZOL로 추출한 RNA는 M-MLV reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 g)에 0.1 g의 oligo-(dT), 10 mM dNTPs 을 넣고 65°C에서 10분간 변성시킴으로써 single strand를 얻었다. 그 후에 1X single strand

buffer, 0.5 mM DTT, 200 Unit M-MLV reverse transcriptase을 첨가하고 25°C에서 10분, 37°C에서 50분, 70°C에서 15분 반응시킨 후 PCR은 각각의 tube에 250 ng cDNA, 1xPCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30초, 60°C에서 45초, 그 후에 72°C에서 30초, 30 cycling하였다. PCR 반응이 끝난 다음 1.5 % agarose gel에 6 µl씩을 넣고 전기영동 한 후 형광사진을 이용하여 반응을 확인하였다.

③ 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

고환에서 특이적으로 발현하는 글루타티온 S-전달효소 (Glutathion S-transferase, GST) 종류의 하나인 GSTm5, 글루타티온 과산화효소 (Glutathion peroxidase, GPX) 종류의 하나인 GPX4와 고환의 미토콘드리아에서 특이적으로 발현되는 PRX (Peroxiredoxin) 류의 하나인 PRX3의 발현을 mRNA 수준에서 조사하였다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

GSTm5: TCA AGC TAG ATC TGG ACT TTC CTA A (Forward)

GSTm5: ATC ATA GGT GAG AAA ATC CAC AAA G (Reverse)

GPX4: AGG CAA AAC TGA CGT AAA CTA CAC T (Forward)

GPX4: CGT TCT TAT CAA TGA GAA ACT TGG T (Reverse)

PRX3: ATG AGT TTC ATG ACG TAA AC (Forward)

PRX3: AAA GTA CTC TTT TGA AGC TG (Reverse)

④ 호르몬 pathway에서 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사

정자생성 효능을 알아보기 위해 산화적 스트레스로 인해 저하되는 분자들 중 정세관세포의 접합과 정자생성에 중요한 역할을 하는 nectin-2, 여포자극호르몬 항상성을 음성적으로 유지시켜 주는 inhibin-α의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

Nectin-2: AGT GAC CTG GCT CAG AGT CA (Forward)

Nectin-2: TAG GTA CCA GTT GTC ATC AT (Reverse)

Inhibin-α: TTG ACT CTA CAG GAT GTG GA (Forward)

Inhibin-α: ACA TAA GTG AAG AGA CCT TC (Reverse)

⑤ 성 호르몬 receptor 관련 mRNA 발현량 조사

산화적 스트레스로 인한 고환 세포 내의 성 호르몬 receptor의 발현량의 차이를 보기 위하여 Androgen receptor (AR), Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), Luteinizing hormone receptor (LHR) 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

AR : CTG GAC TAC CTG GAT CTC TAC CTT A (Forward)

AR : CCT GGG CTG TAG TTT TAT TGT ACT T (Reverse)

FSHR : ATG CTG CTG GCT TTT TCA CT (Forward)

FSHR : TCT TGG TGT CGC TTG ATG AG (Reverse)

LHR : GCA TTC AAT GGG ACG ACT CT (Forward)

LHR : CCT CAA AGA TGG CGG AAT AA (Reverse)

(2) *In vivo* 실험

(가) 실험 동물

랫 사육 조건은 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명암주기 12시간으로 유지되는 향온, 향습의 SPF (Specific Pathogen Free) 조건에서 사육하였다.

- ① 12개월령의 노령 쥐(male, Sprague Dawley)를 구입 이후 4개월 동안 AIN-76A 사료를 급여하여 실험을 진행하였다. 실험군 설정은 젊은 쥐 대조군(YC, Young control, 7주령), 고령쥐 대조군(OC, Old control), GINST 200mg/kg b.w. 투여군 (GINST-AR, 200 mg/kg b.w.)으로 하였으며 각 군은 9마리씩으로 구성하였다.
- ② 4주령의 쥐(male, Sprague Dawley)를 구입 이후 6개월 동안 AIN-76A 사료를 급여하여 실험을 진행하였다. 실험군 설정은 대조군(NC, Normal control), 고온 스트레스 대조군(HC, Heating control), 고온 스트레스 처리 GINST 100mg/kg b.w. 투여군 (HG100, 100mg/kg b.w.), 고온 스트레스 처리 GINST 200mg/kg b.w. 투여군(HG200, 200mg/kg b.w.)으로 하였으며 각 군은 10마리씩으로 구성하였다.
- ③ 4주령의 쥐(male, Sprague Dawley)를 구입 이후 6개월 동안 AIN-76A 사료를 급여하여 실험을 진행하였다. 실험군 설정은 대조군(NC, Normal control), 구속 스트레스 대조군(IC, Immobilization control), 구속 스트레스 처리 GINST 100mg/kg b.w. 투여군 (IG100, 100mg/kg b.w.), 구속 스트레스 처리 GINST 200mg/kg b.w. 투여군(IG200, 200mg/kg b.w.)으로 하였으며 각 군은 10마리씩으로 구성하였다.

(나) GINST 투여

GINST는 rat용 분말사료에 첨가, 펠렛으로 제조하여 분획별 함유 비율을 감안하여 각각 ① 200mg/kg b.w. ② 100, 200mg/kg b.w. ③ 100, 200mg/kg b.w. 가 되도록 사료에 첨가하여 급이하였다. 총 6개월간의 투여 기간 동안 주당 2회 체중과 일일 사료 섭취량을 측정하여 증가한 체중을 보상하여 줌으로써 체중 대비 1일 섭취량을 계산한 다음 매 2주 간격으로 새로운 사료를 제조하였다.

(다) 혈액화학지수 (Blood Chemistry Panel) 조사

혈액시료를 이용, 노화로 인하여 저하되는 혈구상 변화, 당 및 지질대사 기능(Glu: glucose, T-cho: total cholesterol, LDL: LDL-cholesterol, HDL: HDL-cholesterol, TG: triacylglycerol), 성호르몬 분비량(testosterone, LH, FSH) 등을 조사하였다. 혈액화학지수는 생화학자동분석기(Hitachi Medical Co., Ltd., Model 747, Tokyo, Japan)를 이용하여 통상의 임상검사 방법에 준하여 측정하였다.

(라) 조직병리학적 관찰

적출한 간, 신장, 비장 및 고환 조직을 육안 관찰하고 최종적으로 1×1cm 크기로 절편 제작 후 10% buffered 중성 formalin 용액에 48시간 고정, automatic tissue processor(Citable 2000)를 이용하여 처리, Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색한 것을 현미경으로 관찰하였다. 기타 방법에 대하여는 통상적인 병리학적 실험 방법에 준하였다. Johnsen's score는 아래의 기준에 의하여 seminiferous tubule을 각 개체 당 10개를 관찰하여 계량화 하였다 (Table 1)[4].

Table 1. Parameter for testicular biopsy score counting system by Johnson's method

Score	Description of scoring system
10	Complete spermatogenesis with many spermatozoa (determined by head form) Germinal epithelium organized in regular thickness leaving an open lumen
9	Many spermatozoa present but germinal epithelium disorganized with marked sloughing or obliteration of lumen
8	Only a few spermatozoa present (<5 to 10)
7	No spermatozoa but many spermatids present
6	No spermatozoa and only a few spermatids present (<5 to 10)
5	No spermatozoa and no spermatids but several or many spermatocytes present
4	Only a few spermatocytes (<5) but no spermatids or spermatozoa present
3	Spermatogonia are the only germ cells present
2	No germ cells, but Sertoli cells are present
1	No cells in tubular section

Data from Johnson's SC: Hormones 1:2, 1970.

(마) 고환 조직에서의 RT-PCR

① RNA추출

Total RNA는 Invitrogen사의 TRIZOL시약을 이용하여 추출하였다. 적출한 고환 조직 50 μ g에 TRIZOL 용액 0.5 ml 첨가, 조직을 용해시킨 후 150 μ l의 chloroform 용액을 가하고 2~3회 잘 섞어준 다음 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 취했다. 다시 TRIZOL 0.5 ml과 chloroform 150 μ l을 첨가 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 역시 상층액을 취한 후 2-propanol과 상층액을 1:1로 혼합 후 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물에 대해서는 75% ethanol로 씻고, 건조시켰다. 다시 침전물에 DEPC로 처리한 증류수를 60 μ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다.

② 중합효소(PCR) 반응

TRIZOL로 추출한 RNA는 M-MLV reverse transcriptase의 protocol을 사용하여 cDNA로 합성하였다. 역전사 반응을 위하여 total RNA (1 μ g)에 0.1 μ g의 oligo-(dT), 10 mM dNTPs 을 넣고 65°C에서 10분간 변성시킴으로써 single strand를 얻었다. 그 후에 1X single strand buffer, 0.5 mM DTT, 200 Unit M-MLV reverse transcriptase을 첨가하고 25°C에서 10분, 37°C에서 50분, 70°C에서 15분 반응시킨 후 PCR은 각각의 tube에 250 ng cDNA, 1xPCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.2 mM의 primer를 넣고 PCR 조건인 92°C에서 30 초, 60°C에서 45초, 72°C에서 30초, 30 cycling하였다. 사용할 primer는 다음과 같으며 PCR 반응이 끝난 다음 2% agarose gel에 5 μ l씩을 loading하고 전기영동 한 후 형광사진을 이용하여 반응을 확인하였다.

③ 고환 조직에서의 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

고환에서 특이적으로 발현하는 글루타티온 S-전달효소 (Glutathion S-transferase, GST) 종류의 하나인 GSTm5, 글루타티온 과산화효소 (Glutathion peroxidase, GPX) 종류의 하나인 GPX4와 고환의 미토콘드리아에서 특이적으로 발현되는 PRX (Peroxiredoxin) 류의 하나인 PRX3의 발현을 mRNA 수준에서 조사하였다.

GSTm5: TCA AGC TAG ATC TGG ACT TTC CTA A (Forward)

GSTm5: ATC ATA GGT GAG AAA ATC CAC AAA G (Reverse)

GPX4: AGG CAA AAC TGA CGT AAA CTA CAC T (Forward)

GPX4: CGT TCT TAT CAA TGA GAA ACT TGG T (Reverse)

PRX3: ATG AGT TTC ATG ACG TAA AC (Forward)

PRX3: AAA GTA CTC TTT TGA AGC TG (Reverse)

④ 성 호르몬 pathway에서 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사

정자생성 효능을 알아보기 위해 산화적 스트레스로 인해 저하되는 분자들 중 정세관 세포의 접합과 정자생성에 중요한 역할을 하는 nectin-2, 여포자극호르몬 항상성을 음성적으로 유지시켜 주는 inhibin- α 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

Nectin-2: AGT GAC CTG GCT CAG AGT CA (Forward)

Nectin-2: TAG GTA CCA GTT GTC ATC AT (Reverse)

Inhibin- α : TTG ACT CTA CAG GAT GTG GA (Forward)

Inhibin- α : ACA TAA GTG AAG AGA CCT TC (Reverse)

⑤ 성 호르몬 receptor mRNA 발현량 조사

산화적 스트레스로 인한 고환 세포 내 성 호르몬 receptor의 발현량 차이를 보기 위하여 androgen receptor (AR), follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) 의 mRNA 발현량을 조사하였다. mRNA 발현량 조사는 항산화 효소 mRNA 발현량 조사와 동일한 방법으로 수행하였다.

AR : CTG GAC TAC CTG GAT CTC TAC CTT A (Forward)

AR : CCT GGG CTG TAG TTT TAT TGT ACT T (Reverse)

FSHR : ATG CTG CTG GCT TTT TCA CT (Forward)

FSHR : TCT TGG TGT CGC TTG ATG AG (Reverse)

LHR : GCA TTC AAT GGG ACG ACT CT (Forward)

LHR : CCT CAA AGA TGG CGG AAT AA (Reverse)

(바) 항산화 및 정자생성 관련 단백질 발현량

특이적 단백질 검출을 위해 Western blot 방법을 이용하였다. 즉, 고환 조직을 추출한 다음 standard buffer (RIPA buffer 980 ml + protease inhibitor 10 ml + phosphatase inhibitor 10 ml)를 넣고 단백질을 lysis시킨 다음 원심분리 (14,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 상층액을 취

하여 단백질을 정량하였다. 일정량의 단백질과 loading buffer (5X)를 혼합한 다음 10% SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane에 transfer하였다. 5% skim milk로 1시간 blocking 후 GSTm5, PRX2, nectin-2, inhibin- α , actin 1차 항체와 overnight 반응시킨 후, ECL detection 용액 (Thermo) 으로 확인하였다.

(사) 통계 처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS 통계 package를 사용하여 실시하고, 분석수치는 평균과 표준편차 (standard deviation, SD)로 표시하였다. 실험군 간의 차이는 one way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 검증하며, $p < 0.05$ 수준에서 유의성이 관찰된 경우 각 실험군 간의 평균값의 차이에 대한 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 평가하였다.

[제1협동 : 국제기준(ICH 혹은 WHO 기준) 부합 제조공정 확립 및 품질규격 표준화 제품 개발]

(1) 지표물질 표준품 분석

(가) 표준품 제조 : 일화(사)에서 제조 공급한 IH901 RM (100% method HPLC peak purity 94%)을 순도를 높이기 위하여 분취용 HPLC (ODS, 20 x 250 mm YMC-Pack, 203 nm, 55% CH₃CN)를 이용, IH901에 상응하는 peak를 분취하였다. 분취물을 농축한 다음 최종적으로 초순수 증류수를 용매로 한 용매계에서 재결정함으로써 흰색의 무정형 결정 분말 IH901 RM을 얻었다.

(나) 표준품 동정 : ¹H NMR spectroscopy, ¹³C NMR spectroscopy, ¹H-¹H COSY spectroscopy, HMQC spectroscopy, HMBC spectroscopy, NOESY spectroscopy, FT-IR spectroscopy, Mass spectrometry, UV Spectrophotometry 조사한다.

(다) 표준품 순도 : Melting point, Elemental analysis, 각각 다른 3가지의 HPLC Method, Water content, Residual solvent content, Optical rotation, Thin-layer chromatographic purity test를 실시한다.

(라) 함량 조사 : 각각 다른 3가지의 HPLC Method로 함량 분석 실시한다.

(2) Validation 정량분석법 확립

(가) ICH guideline에 제시된 것과 같이 해당 분석법에 대해 분석을 실시하였다.

- ① 검출한계 및 정량한계(LOD & LOQ)
- ② 특이성
- ③ 직선성
- ④ 정밀성
- ⑤ 재현성
- ⑥ 정확성

(3) 잔류농약 불검출 제품 생산을 위한 연구

32종의 농약을 6종의 식용유(대두유, 카놀라유, 옥수수유, 포도씨유, 올리브유, 해바라기씨

유)으로 2상간 분배를 이용해 농약제거에 관련된 연구를 진행하였다. Gas chromatography, HPLC를 이용해서 잔류농약의 함량을 확인하였다.

[제2협동 : 발효 인삼이 정액과 임신에 미치는 효과]

(1) 발효 인삼이 사람의 정액에 미치는 효과

(가) 내용: 임상적으로 정액의 질 개선에 효과가 있을 용량을 결정하기 위해 저용량과 고용량의 발효 인삼 제제를 복용하도록 하여 복용 전 후의 정액의 지표를 비교함.

(나) 연구대상군

① 선정기준: 불임을 주소로 세브란스 병원 불임클리닉에 내원한 여성환자의 배우자, 정액 검사상 total motile sperm count 0.5×10^6 이상

② 제외기준:

㉠ 심각한, 만성적인 전신적 질환이나 내분비계 질환을 앓고 있는 환자

㉡ 고혈압 (수축기 혈압 140mmHg 이상, 그리고 이완기 혈압 90mmHg 이상)을 진단받고 치료 중인 자

㉢ 악성 종양으로 항암 치료를 시행 받은 과거력이 있는 환자

㉣ 1개월 이내 테스토스테론 또는 항안드로젠 제제를 복용한 과거력이 있는 환자

㉤ 수술적 방법으로 정자를 채취한 자

㉥ BMI > 30 또는 BMI < 18 인 자

㉦ 문맹이거나 동의를 구할 수 없는 외국인

③ 스크리닝 검사:

㉠ 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 : CASA (computer aided sperm analyzer, 정자자동분석기)

㉡ Ejaculated volume, sperm count, total motile sperm count, motility, morphology, total leukocyte count

㉢ 혈압 측정: 수축기 및 이완기 혈압

㉣ 신체 측정 : 키, 체중, 허리둘레

(다) 연구수행방법

① 발효인삼을 open label, 무작위 배정으로 1일 3회, 회당 2캡슐씩 1000mg/캡슐(발효인삼 용량 1.92g/일), 또는 500mg/캡슐(발효인삼용량 0.96g/일)으로 매일, 3개월 간 투여한다.

② 발효인삼의 용량에 따른 대상자 군 배정은 block randomization 방법을 사용한다.

③ 정액검사와 혈액 검사, 설문지 조사는 모집 당시와 발효인삼 투여 후 3개월에 시행한다.

④ 정액검사 - 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 : CASA (computer aided sperm analyzer, 정자자동분석기)& microscopic examination

㉠ Ejaculated volume, sperm count, total motile sperm count, motility, morphology, total leukocyte count

⑤ 정자의 질 분석

- ㉞ Sperm chromatin assessment (Halo sperm assay)
- ⑥ 정낭액 (Seminal fluid, 정액 중 정자를 제외한 부분) 내 oxidative stress 표지자 분석
 - ㉞ Malondialdehyde(MDA) analysis
- ⑦ 혈액
 - ㉞ Total testosterone & free testosterone index, FSH, LH, Inhibin B, OT (ALT), PT(AST)
- ⑧ 설문지 조사: 삶의 질 평가(SF-36), 남성 성기능 설문지(Brief sexual function inventory), 피로도 측정 설문 (fatigue severity scale)
- ⑨ 문진 : 흡연력, 음주력, 일주일 간 운동량, 일주일 간 앉아서 생활하는 시간.

(2) 발효 인삼이 약정자증 남성의 정액에 미치는 효과: 단일군 선행 연구 (IRB No. 4-2015-0912)

(가) 내용: 앞선 연구의 결과를 바탕으로, 저용량의 발효인삼 섭취가 약정자증 대상군에서 정자의 운동성을 개선시키는 효과가 있는지 확인하고자 하였음.

(나) 연구대상군

- ① 선정기준: 정액 검사상 정자의 운동성 < 32%
- ② 제외기준:
 - ㉞ 심각한, 만성적인 전신적 질환이나 내분비계 질환을 앓고 있는 환자
 - ㉞ 고혈압 (수축기 혈압 140mmHg 이상, 그리고 이완기 혈압 90mmHg 이상)을 진단받고 치료 중인 자
 - ㉞ 악성 종양으로 항암 치료를 시행 받은 과거력이 있는 환자
 - ㉞ 1개월 이내 테스토스테론 또는 항안드로젠 제제를 복용한 과거력이 있는 환자
 - ㉞ 수술적 방법으로 정자를 채취한 자
 - ㉞ BMI > 30 또는 BMI < 18 인 자
 - ㉞ 문맹이거나 동의를 구할 수 없는 외국인
- ③ 스크리닝 검사:
 - ㉞ 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 : CASA (computer aided sperm analyzer, 정자자동분석기)
 - ㉞ Ejaculated volume, sperm count, total motile sperm count, motility, morphology, total leukocyte count
 - ㉞ 혈압 측정: 수축기 및 이완기 혈압
 - ㉞ 신체 계측 : 키, 체중, 허리둘레

(다) 연구수행방법

- ① 발효인삼을 500mg/캡슐(하루 2캡슐씩 3회, 3000mg/일, 발효인삼용량 0.96g/일)으로 매일, 3개월 간 투여한다.
- ② 정액검사와 혈액 검사, 설문지 조사는 모집 당시와 발효인삼 투여 후 3개월에 시행한다.
- ③ 정액검사 - 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 : CASA (computer aided sperm

analyzer, 정자자동분석기) & microscopic examination

㉗ Ejaculated volume, sperm count, total motile sperm count, motility, morphology, total leukocyte count

④ 혈액

㉗ Total testosterone & free testosterone index, FSH, LH, Inhibin B, OT (ALT), PT(AST)

⑤ 설문지 조사: 삶의 질 평가(SF-36), 남성 성기능 설문지(Brief sexual function inventory), 피로도 측정 설문 (fatigue severity scale)

⑥ 문진 : 흡연력, 음주력, 일주일 간 운동량, 일주일 간 앉아서 생활하는 시간.

(3) 발효인삼 섭취에 의한 정자 운동성 개선 효과 평가를 위한 12주. 대기관. 무작위 배정. 이중 눈가림. 위약 대조 임상 시험 (IRB No. 4-2016-0288)

(가) 내용: 발효 인삼 섭취에 의한 정액의 질 향상 및 개선 효과가 플라세보 (대조군) 섭취와 비교하여 우위에 있음을 증명하고자 한다.

(나) 연구대상군

① 선정기준: 정액 검사상 정자의 운동성 < 32%

② 제외기준:

㉗ 심각한, 만성적인 전신적 질환이나 내분비계 질환을 앓고 있는 환자

㉘ 고혈압 (수축기 혈압 140mmHg 이상, 그리고 이완기 혈압 90mmHg 이상)을 진단받고 치료 중인 자

㉙ 악성 종양으로 항암 치료를 시행 받은 과거력이 있는 환자

㉚ 1개월 이내 테스토스테론 또는 항안드로젠 제제를 복용한 과거력이 있는 환자

㉛ 수술적 방법으로 정자를 채취한 자

㉜ BMI > 30 또는 BMI < 18 인 자

㉝ 문맹이거나 동의를 구할 수 없는 외국인

③ 스크리닝 검사:

㉗ 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 : CASA (computer aided sperm analyzer, 정자자동분석기)

㉘ Ejaculated volume, sperm count, total motile sperm count, motility, morphology, total leukocyte count

㉙ 혈압 측정: 수축기 및 이완기 혈압

㉚ 신체 계측 : 키, 체중, 허리둘레

(다) 연구수행방법:

① 발효인삼을 double blinded, 무작위 배정으로 1일 3회, 회당 2캡슐씩 500mg/캡슐(발효인삼용량 0.96g/일) 혹은 placebo (위약)으로 매일, 12주 간 투여한다.

② 연구 참여 대상자의 원활한 모집을 위해 대기관(연세대학교 의과대학 세브란스 병원, 연세대학교 원주의과대학 세브란스 기독병원, 가천대 길병원)으로 임상연구를 진행한다.

③ 정액검사와 혈액 검사, 설문지 조사는 모집 당시와 발효인삼 투여 후 3개월에 시행한

다.

- ④ 정액검사 - 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 : CASA (computer aided sperm analyzer, 정자자동분석기) & microscopic examination
 - ㉠ Ejaculated volume, sperm count, total motile sperm count, motility, morphology, total leukocyte count
- ⑤ 정자의 질 분석
 - ㉠ Sperm chromatin assessment (Halo sperm assay)
- ⑥ 정낭액 (Seminal fluid, 정액 중 정자를 제외한 부분) 내 oxidative stress 표지자 분석
 - ㉠ Malondialdehyde (MDA) analysis
- ⑦ 혈액
 - ㉠ Total testosterone & free testosterone index, FSH, LH, Inhibin B, OT (ALT), PT(AST)
- ⑧ 설문지 조사: 삶의 질 평가(SF-36), 남성 성기능 설문지(Brief sexual function inventory), 피로도 측정 설문 (fatigue severity scale)
- ⑨ 문진 : 흡연력, 음주력, 일주일 간 운동량, 일주일 간 앉아서 생활하는 시간.

나. 추진일정

세부과제명	세부연구내용	연차별 월 단위 추진계획											
		12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
[제1세부] GINST (발효인삼)를 이용한 남성 난임 개선 개별 인 정형 기능식품 개발	대상 제품/화합물분리/제조 GINST(혼합물) 및 Compound K(발효인삼)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>in vitro</i> 모델	과산화수소 노출	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		항암제(doxorubicin) 노출	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		고온스트레스 노출	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	<i>in vivo</i> 모델	노령쥐(16개월령)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		고온스트레스 노출	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
		만성구속스트레스 노출	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
CRO 전문기관 위탁과제 의뢰 및 점검 식약처 기능식품 등재를 위한 서류 작성	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
[제1협동] 국제기준 부합 제조공정 확립 및 품질 규격 표준화 제품 개발	지표물질 분리 및 국제 규격서류 작성	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	지표물질 validation 정량분석법 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	공정 최적화 및 cGMP 부합 공정 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	품질규격: 미생물, 위해물질 (잔류농약, 중금속, 아플라톡신 등)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	잔류농약 불검출 제품 생산을 위한 연구	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	제품의 안정성 : real time 및 학대조건	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	Batch analysis data 확보	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
[제2협동] 임상 연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증	연구대상자 선정(WHO 표준 기준 미만의 정자결핍증, 약정자증을 가진 남성)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	임상화학지수 (serum AST/ALT, serum FSH, LH, testosterone, SHBG, Inhibin β)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	정자의 질 및 수 조사: CASA(computer aided sperm analyzer), 현미경 하 정자 모양 평가, 정자의 질 및 정낭액의 oxidative stress 평가.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	설문지 조사 (삶의 질 지표, 피로도 평가, 성생활 만족도)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	임상 연구 자료 결과 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

다. 연구수행결과

[제1세부 : 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명]

(1) *in vitro* 실험

(가) 과산화수소-유발 고환세포 독성에 대한 GINST의 방어능 조사

① 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

과산화수소-유발 고환세포 독성에 대한 GINST 및 compound K (CK) 의 방어 효과 연구를 위해 항산화 작용에 관여하는 주요 효소의 mRNA 발현량을 조사하였다. Mouse의 정모 세포인 GC-2spd 세포주에 과산화수소 600 μ M을 1 시간 처리한 결과 PRx3, PRx4, GPx4 및 GSTm5의 mRNA 발현량이 유의하게 감소한 것을 볼 수 있었다($p < 0.01 \sim 0.05$). 이러한 mRNA 발현량 감소에 대한 GINST와 CK의 효능을 확인하기 위하여 GINST는 50 mg/ml와 100 mg/ml, CK는 10 μ M, 20 μ M을 각각 2시간 전처리하여 효과를 확인하였다. PRx3, PRx4 그리고 GPx4의 경우 GINST 처리군에서 과산화수소 독성으로 인한 mRNA 발현량 감소가 유의하게 회복되었다($p < 0.01 \sim 0.05$). GSTm5의 경우 GINST 처리군보다 CK 처리군에서 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

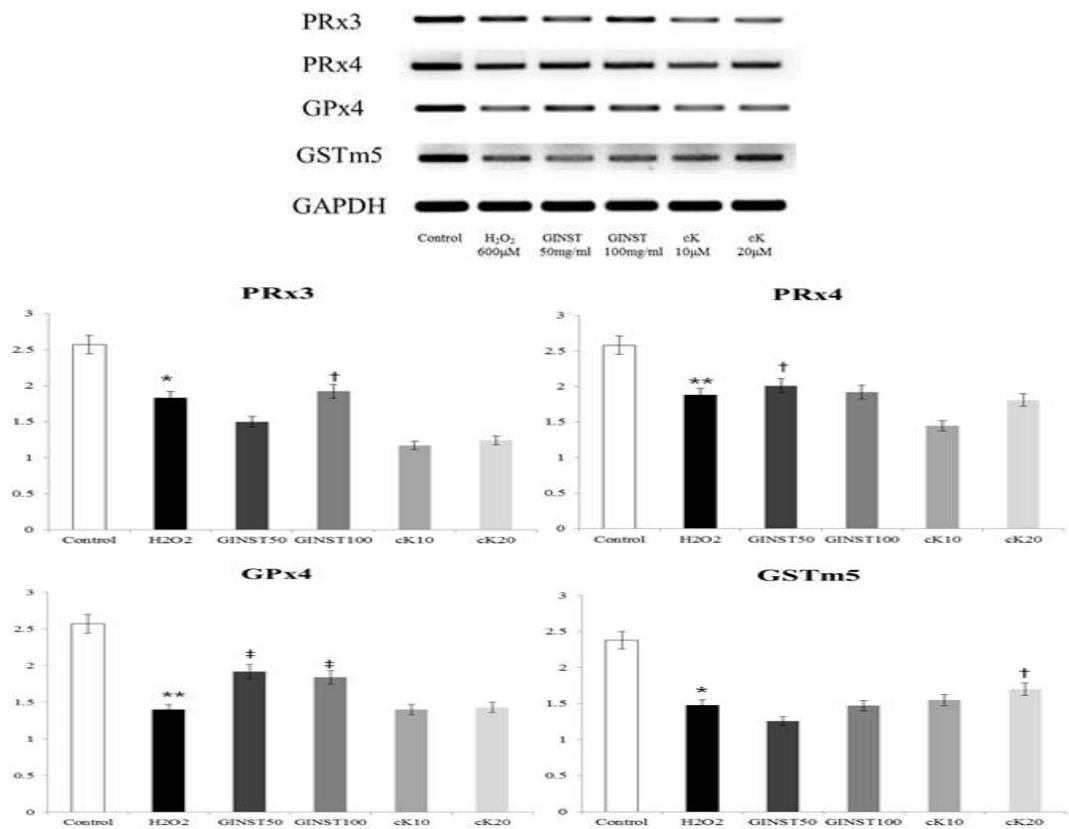


Fig 9. 과산화수소에 노출된 GC-2spd cells에 있어 항산화효소 mRNA 발현에 미치는 GINST 및 compound K의 농도별 효과. *, ** Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. †, ‡ Significantly different from H₂O₂ at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

한편, Leydig cell인 TM3 세포주의 경우 과산화수소 300 μ M에서 항산화 관련 효소의

mRNA 발현량의 유의적인 감소가 나타났으며($p<0.01\sim0.05$), 대부분의 조사 항목에서 GINST 처리군에서의 농도 의존적인 발현량 증가를 보이는 것이 관찰되었으며($p<0.01\sim0.05$), CK 처리군에서는 유의한 증가는 나타나지 않았다.

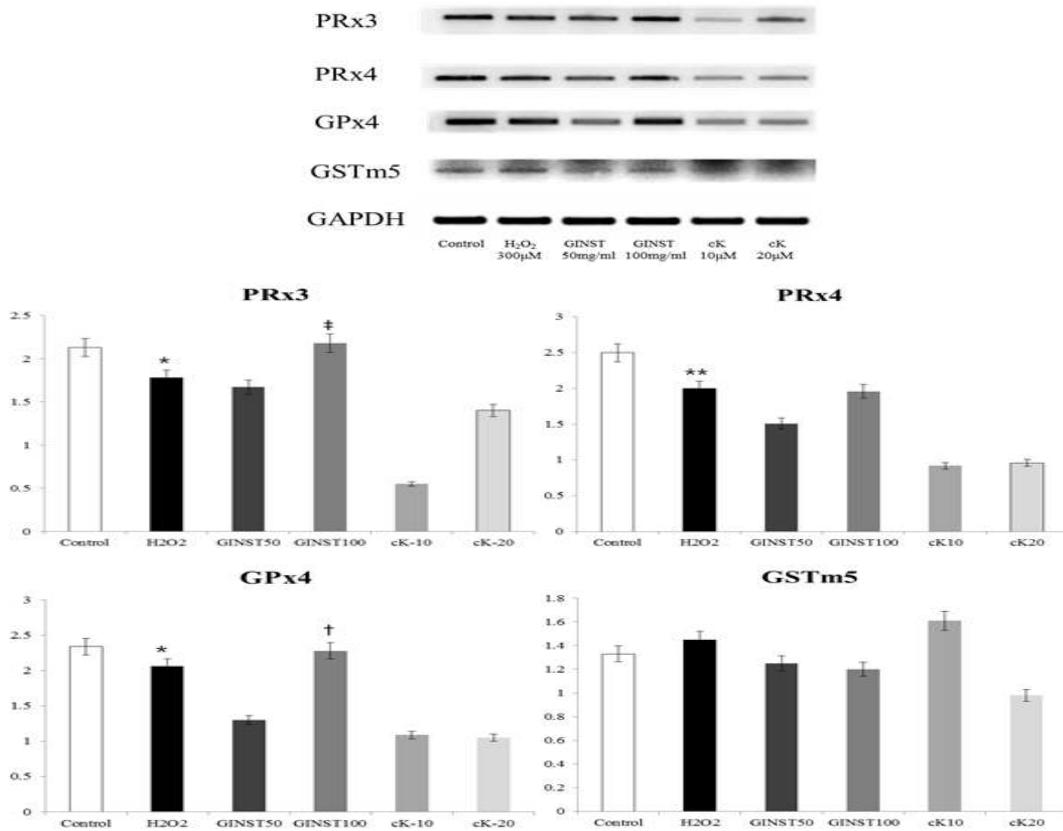


Fig 10. 과산화수소에 노출된 TM3 cells에 있어 항산화효소 mRNA 발현에 미치는 GINST 및 compound K의 농도별 효과. *, ** Significantly different from control at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively. [‡] Significantly different from H₂O₂ at $p<0.01$, respectively.

② 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사

GC-2spd 세포에 있어 호르몬 pathway의 정자생성 관련 단백질 mRNA 발현량은 fig. 11에서 보는 바와 같이 과산화수소 600 µM에 의한 inhibin-α의 mRNA 발현량이 유의하게 감소하는 것으로 나타났으며($p<0.01$), 이에 반해 GINST 및 CK 처리군에서는 발현량이 유의하게 회복되었다($p<0.01$). fig. 12는 TM3 세포주의 과산화수소 유도 독성에 대한 inhibin-α의 mRNA 발현량 감소를 조사한 것으로, 과산화수소 노출에도 불구하고 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

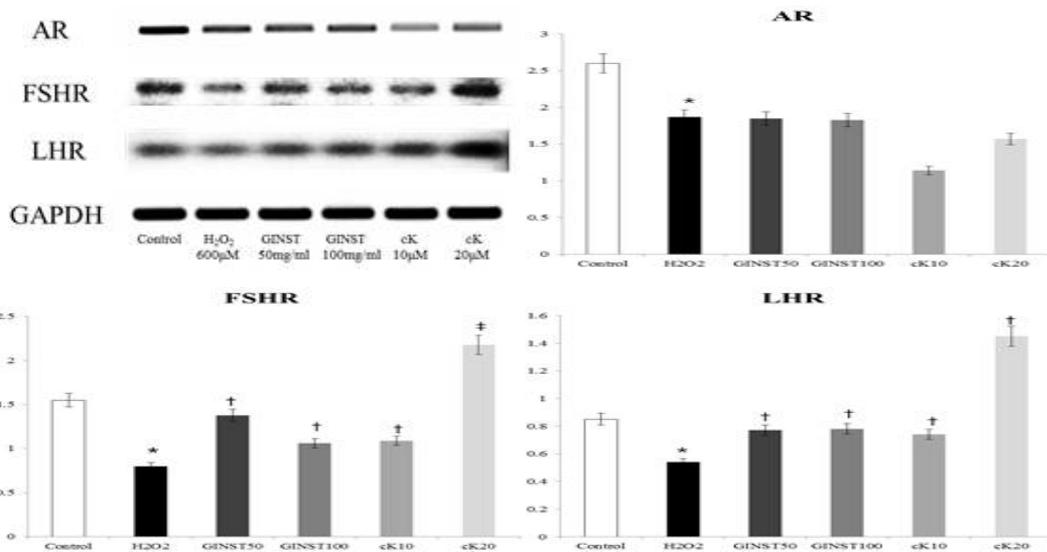


Fig. 11. 과산화수소에 노출된 GC-2spd cells에 있어 성 호르몬 receptor의 mRNA 발현에 미치는 GINST 및 compound K의 농도별 효과. * Significantly different from control at $p < 0.05$, respectively. †, ‡ Significantly different from H₂O₂ at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

TM3 세포의 경우 300 µM의 과산화수소 처리시 성 호르몬 receptor의 유의적 감소가 나타났다($p < 0.01 \sim 0.05$). 이에 반해 GINST 처리군의 경우 농도의존적으로 발현량 회복이 관찰되었다($p < 0.01 \sim 0.05$). 또한 CK 처리군은 FSHR과 LHR의 발현량을 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다($p < 0.01 \sim 0.05$).

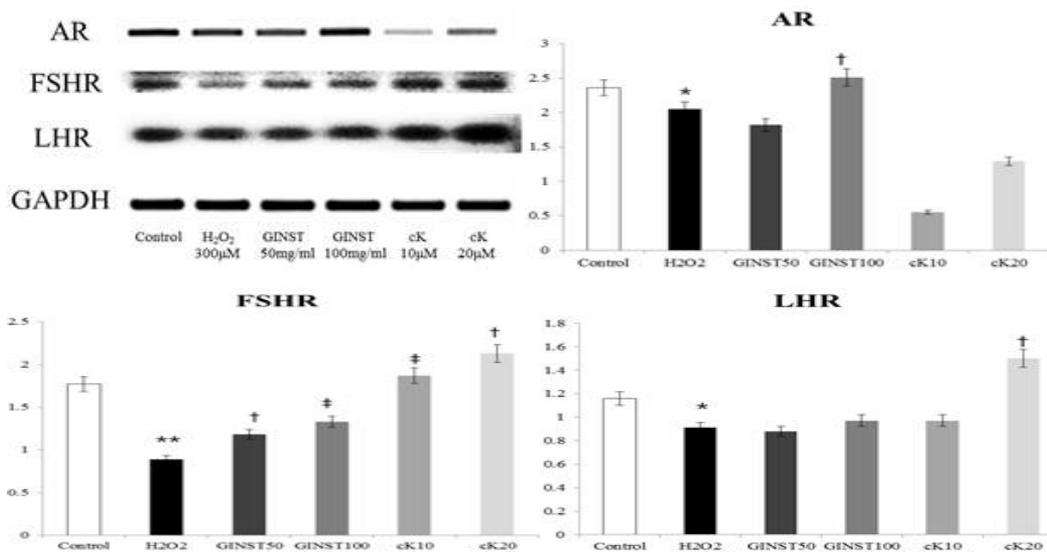


Fig. 12. 과산화수소에 노출된 TM3 cells에 있어 성 호르몬 receptor의 mRNA 발현에 미치는 GINST 및 compound K의 농도별 효과. *, ** Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. †, ‡ Significantly different from H₂O₂ at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

(나) 항암제(doxorubicin)-유발 고환세포 독성에 대한 GINST의 방어능 조사

① 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

항암제-유발 고환세포(정자, Sertoli, Leydig) 독성에 대한 GINST 및 compound K (CK) 의 방어 효과 연구를 위해 항산화에 관여하는 주요 효소의 mRNA 발현량을 조사하였다. 정모 세포인 GC-2spd cell line의 경우 doxorubicin 500 μ M 농도에서 유의한 감소가 관찰되지 않아 항암제 독성유발 정자 세포 독성에 대한 홍삼 추출물의 방어 효과는 조사할 수 없었다. GC-2spd cell line에 있어 항산화 효소의 mRNA 발현량을 감소시킬 수 있는 농도를 찾고자 doxorubicin의 처리 용량을 500 μ M 이상으로 투여해 보았으나, 역시 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 DMSO에 용해시킨 doxorubicin을 DMEM 배지에 첨가할 경우 일정 이상의 농도로는 용해되지 않기 때문으로 생각된다. 실제로 doxorubicin을 500 μ M 이상 처리할 경우 용해되지 않고 배지 표면에 doxorubicin 입자가 부유하는 것을 확인하였다.

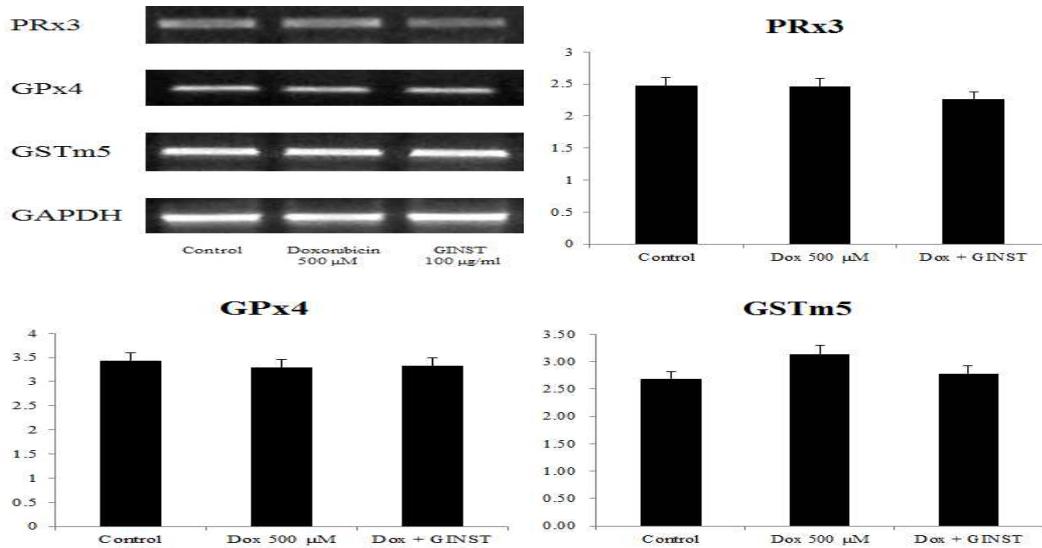


Fig. 13. Effect of GINST on the mRNA expression level of antioxidant enzymes in doxorubicin-exposed GC-2spd cells. GC-2spd (sperm) cells were treated with GINST (100 mg/ml) for 3 hr before exposing the cells to doxorubicin (500 μ M, in DMSO). The band intensities of PRx3, GPx4 and GSTm5 were analyzed by using an NIH ImageJ 1.410 package and normalized to GAPDH value.

② 정자생성관련 단백질의 mRNA 발현량 조사

Doxorubicin에 노출된 정모세포(GC-2spd cells)에 있어 정자생성 pathway에서 중요한 역할을 하는 biomarker 단백질(inhibin- α , nectin-2)의 mRNA 발현량 역시 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과 역시 위에서 언급한 바와 같이 doxorubicin의 용해도와 관련이 있다고 사료된다.

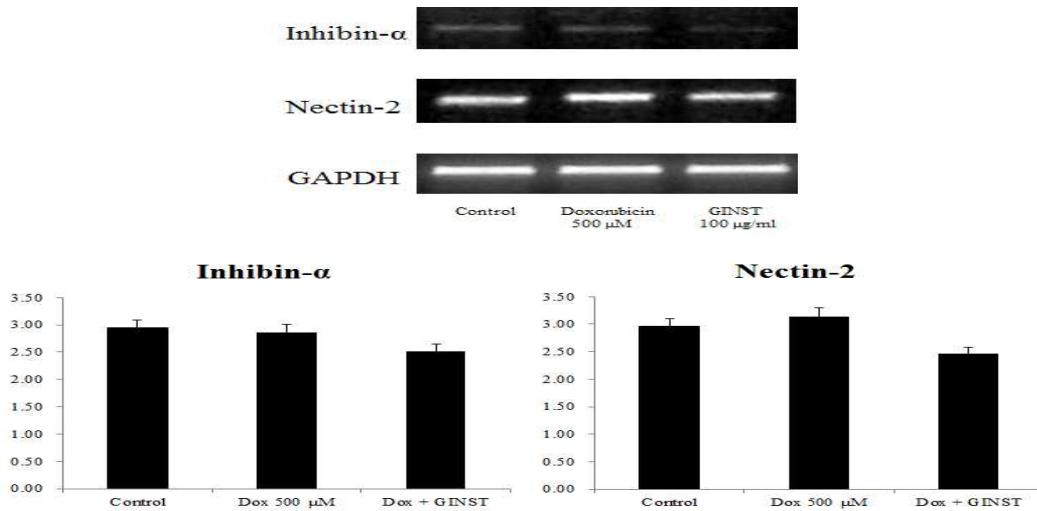


Fig. 14. Effect of GINST on the mRNA expression level of spermatogenesis related molecules in doxorubicin-exposed GC-2spd cells. GC-2spd (sperm) cells were treated with GINST (100 mg/ml) for 3 hr before the exposure to doxorubicin 500 μM. The band intensities of inhibin-α and nectin-2 were analyzed by using an NIH ImageJ 1.410 package and normalized to GAPDH value.

③ TM3, TM4 cells의 세포 독성에 미치는 효과

TM3, TM4 cells에 대한 doxorubicin의 세포 독성을 MTT assay로 측정한 결과, Fig. 15과 같이 500 μg/mL에서 세포독성이 전혀 나타나지 않아 정자 생성에 관련된 각종 bio-markers, 항산화 효소, 성호르몬 수용체의 발현량에 미치는 효과를 확인할 수 없었다. 그이상의 농도로 doxorubicin을 첨가하는데 있어서는 용해도의 문제가 있어 더 이상의 실험을 진행할 수 없었다.

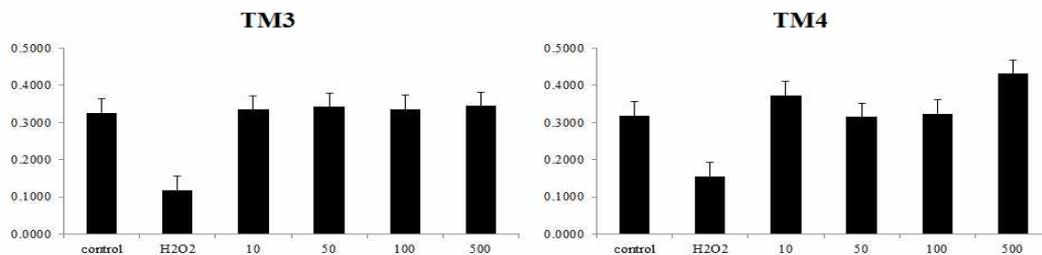


Fig. 15. doxorubicin의 세포 독성의 MTT assay

(다) 고온스트레스-유발 고환세포 독성에 대한 GINST의 방어능 조사

① 고온스트레스가 고환세포에 미치는 효과

GC-2spd, TM3, TM4 cells에 대한 고온스트레스의 세포 독성을 MTT assay로 확인한 결과, Fig. 16과 같이 기존 배양 세포와 고온스트레스 처리군 간의 세포의 cell viability의 차이가 거의 없음을 확인하였다.

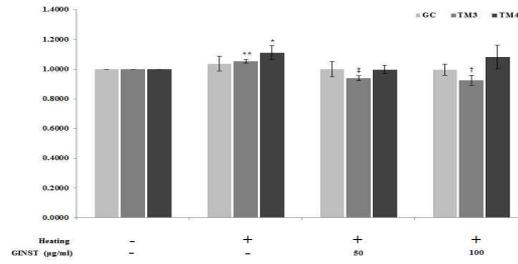


Fig. 16. Dose-dependent effect of GINST on viability of GC-2spd, TM3 and TM4 cells.

② 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

고온스트레스-유발 고환세포 독성에 대한 GINST의 방어 효과 연구를 위해 항산화 작용에 관여하는 주요 효소의 mRNA 발현량을 조사하였다. GC-2spd, TM3, TM4 cell line에 열처리를 한 결과 GSTm5, GPx4의 경우, 대부분의 cell line이 고온 스트레스에 의한 발현량 감소가 일어나지 않았지만, TM4의 cell line에서 발현량이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). PRx4의 경우는 모든 cell line에서 발현량의 변화를 확인할 수 없었다.

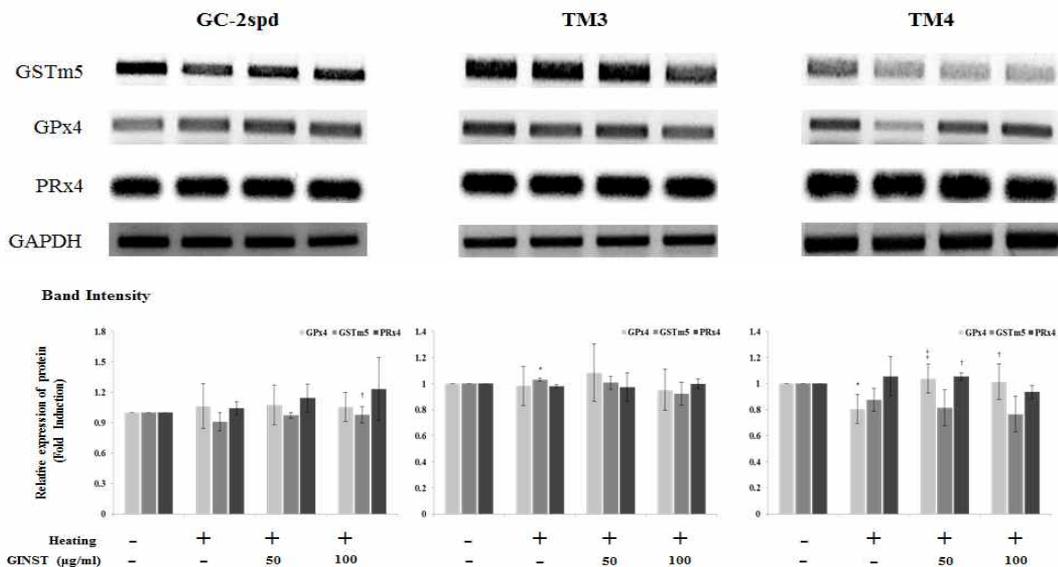


Fig. 17. Dose-dependent effect of GINST on mRNA expression levels for antioxidant enzymes in GC-2spd, TM3 and TM4 cells.

③ 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사

GC-2spd, TM3, TM4 세포에 있어 호르몬 pathway의 정자생성 관련 단백질 mRNA 발현량은 보는 바와 같이 정상군에 비해 mRNA의 양의 큰 차이를 나타내고 있지 않으며, 대부분의 발현량이 동일하게 나타남을 알 수 있다.

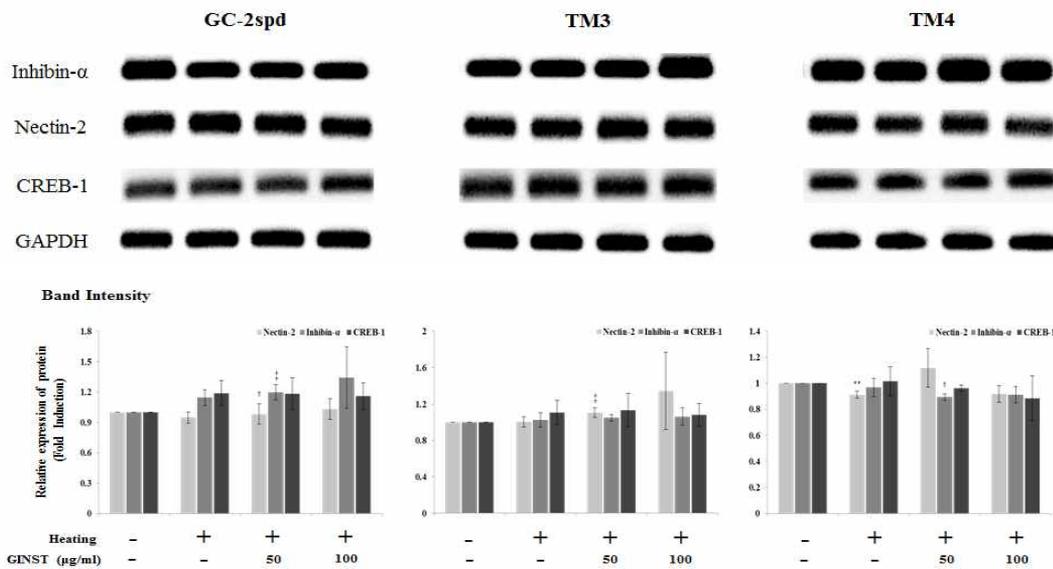


Fig. 18. Dose-dependent effect of GINST on mRNA expression levels for spermatogenesis related molecules in GC-2spd, TM3 and TM4 cells.

④ 성호르몬 수용체의 mRNA 발현량 조사

성호르몬 receptor 중 AR의 mRNA 발현량의 경우는 GC-2spd cell의 발현량이 고온스트레스를 가했을 경우 감소되는 경향을 보이고, GINST 투여 회복되는 사실을 확인하였다. 반면, LHR과 FSHR의 경우 고온스트레스로 인한 mRNA 발현량 감소가 일어나지 않음을 확인하였다.

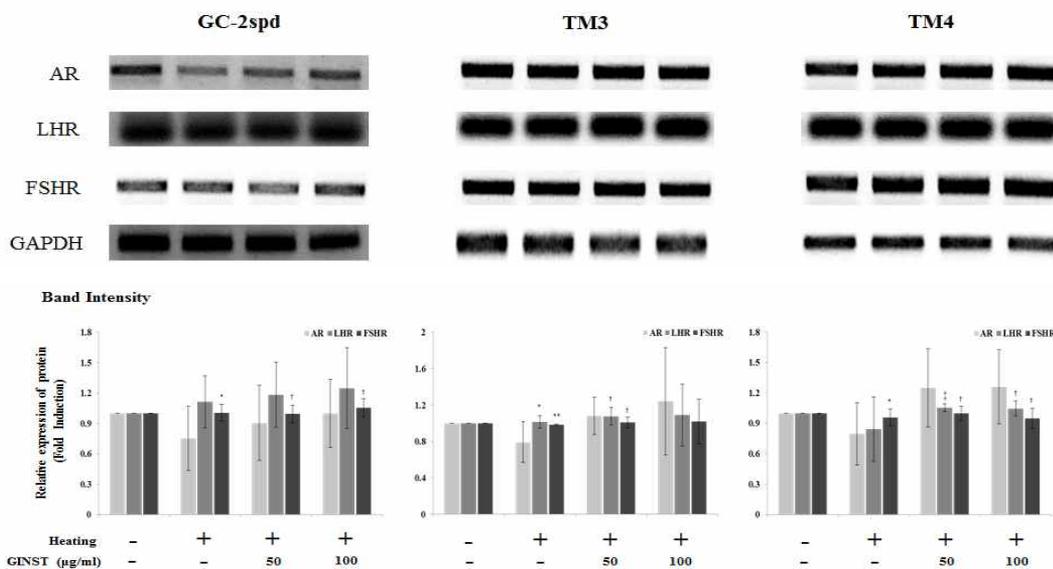


Fig. 19. Dose-dependent effect of GINST on mRNA expression levels for sex hormone receptors in GC-2spd, TM3 and TM4 cells.

(2) *in vivo* 실험

(가) 노령쥐의 생식기능 저하에 대한 GINST의 방어효과

① 혈액화학지수에 미치는 GINST의 효능

Fig. 20은 혈중 성호르몬 함량을 나타낸 것으로서 노령쥐(aged rat, V-AR) 대조군의 testosterone 함량은 YCR군과 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이에 반하여 GINST 투여군의 testosterone 함량은 AR군에 비해 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 한편, FSH와 LH의 함량은 젊은 쥐 대조군(YCR)에 비해 AR군에서 현저히 증가하였으나($p<0.05$), 이는 노화로 인해 정자 생성 관련 기능이 감퇴됨으로 인해 남성 호르몬 분비를 촉진시키기 위한 내분비계의 보상적 생리활동 결과라 판단된다. 이에 반해 GINST 투여군(GINST-AR)에서는 AR대비 FSH와 LH의 함량 감소가 관찰되었으며($p<0.05\sim 0.01$), 이는 고환의 정자 생성 기능을 개선하기 때문에 성선자극호르몬의 과잉 분비가 요구되지 않기 때문이라 사료된다.

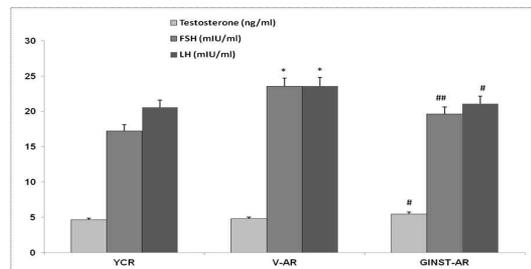


Fig. 20. GINST 투여 노령 쥐의 혈중 성 호르몬 분비량. * Significantly different from YCR at $p<0.01$, respectively. #, ## Significantly different from V-AR at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

② 조직병리학적 관찰

㉠ 고환 조직에 미치는 영향

Fig. 21과 같이, YCR군의 정세관은 활발하게 증식하는 정조세포, 정모세포, 정자세포가 치밀하게 분포되어 있었다. 반면 V-AR군에서는 대부분의 정세관 상피세포의 치밀도가 유의하게 감소되어 있으며, 정세관 상피세포 사이의 연결성 또한 상실되어 세포 간의 간격이 넓어져 다소 떨어져 있는 모양이 관찰되기도 하였다. 정조세포 및 정자세포의 수는 유의하게 감소되어 있었으며 지지세포 (Sertoli cell)가 주된 정세관 상피세포로 관찰되었다. 또한 일부 부위에서 정세관의 상피세포가 괴사되어 정세관 내강에 저류되어 있는 소견도 관찰되었으며, 공포 또한 관찰되었다. 반면, GINST-AR에서는 정세관 상피세포층의 두께뿐만 아니라 V-AR군에 비해 세포 사이의 연결성이 대부분에서 유지되어 있었고, 정자세포의 활발한 증식이 대부분의 정세관에서 관찰되어 V-AR군 대비 현저하게 개선되는 것으로 나타났다.

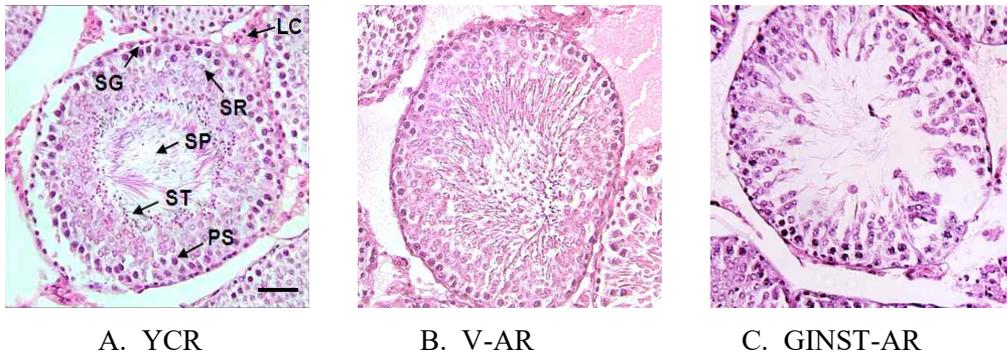


Fig. 21. GINST 투여 노령 쥐의 고환 조직 단면 광학 현미경 사진. LC, Leydig cell; PS, primary spermatocyte; SG, spermatogonium; SP, spermatozoa; SR, Sertoli cell; ST, spermatid.

Fig. 22-A는 정세관 내 정자 수를 나타내는 것으로서 YCR군 대비 V-AR군에서의 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타냈으며 이에 반해 GINST 처리군에서 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). Fig. 22-B, C 그리고 D는 각각 Sertoli cell과 germ cell의 개체 수 및 SCI 지표로서 모든 지표들이 V-AR군에서의 유의적 감소를 나타내다($p < 0.01$). 반면, GINST-AR이 V-AR군에서 감소했던 지표들을 회복시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$).

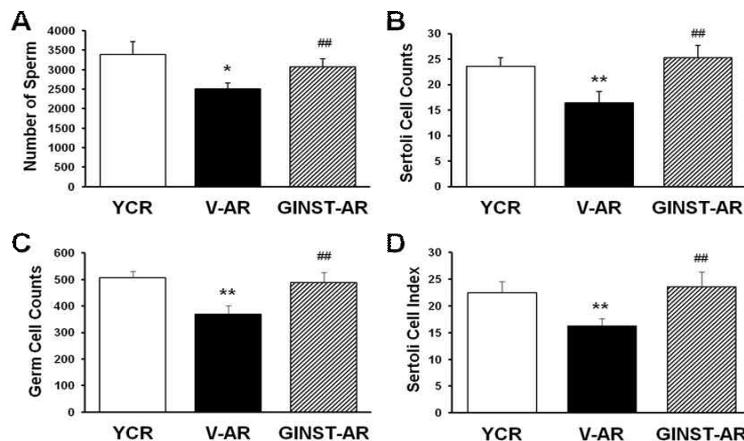


Fig. 22. 노령 쥐에서의 정자 생성 관련 지표에 대한 GINST의 효능. *, ** Significantly different from YCR at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. ## Significantly different from V-AR at $p < 0.01$, respectively.

㉞ 신장 조직에 미치는 영향

Fig. 23과 24은 노령쥐의 신장에서의 항산화 기능에 대한 GINST의 효능을 보기 위해 측정한 결과로 신장 내의 MDA와 GSH level과 항산화 효소인 SOD, GPx, GR 그리고 GST의 활성을 조사하였다. MDA는 지질과산화물로서 산화 스트레스의 생체 지표인자로 잘 알려져 있는 물질로서 YCR군에 비해 V-AR군에서 MDA 생성량이 급격하게 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.01$). 그에 반해 GINST-AR에서는 MDA의 유의적 감소($p < 0.01$)를 보임으로써 산화적 스트레스로 인한 지질산화를 감소시키는 것으로 생각할 수 있다. 또한

V-AR군에서 노화로 인한 GSH의 활성 감소($p<0.01$)를 GINST-AR에서 유의하게 개선시키는 것이 관찰되었다($p<0.01$).

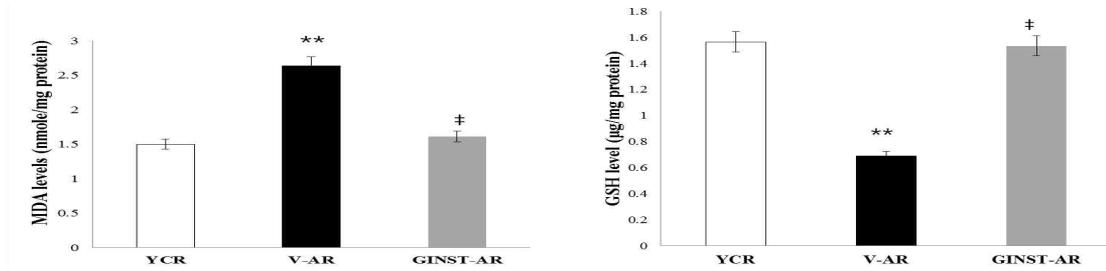


Fig. 23. 노령 쥐에서의 신장 내 MDA와 GSH level에 대한 GINST의 효능. ** Significantly different from YCR at $p<0.01$. † Significantly different from V-AR at $p<0.01$.

또한 YCR군에서의 활발한 항산화 효소의 활성에 비해 V-AR군은 유의하게 감소한 활성을 보였으나($p<0.01$), 이러한 감소를 GINST-AR에서는 유의한 활성의 개선을 나타냈다($p<0.01$). 특히나 SOD의 활성의 경우 YCR군의 활성보다도 증가된 수치를 나타냈다. 노화로 인해 증가한 지질산화와 현저히 감소한 항산화 효소의 활성에 대한 GINST-AR에서의 개선 효과는 활성 산소에 대한 체내 방어 기작을 증진시킴으로써 신장의 기능 보호 및 유지에 도움이 되는 것으로 생각할 수 있다.

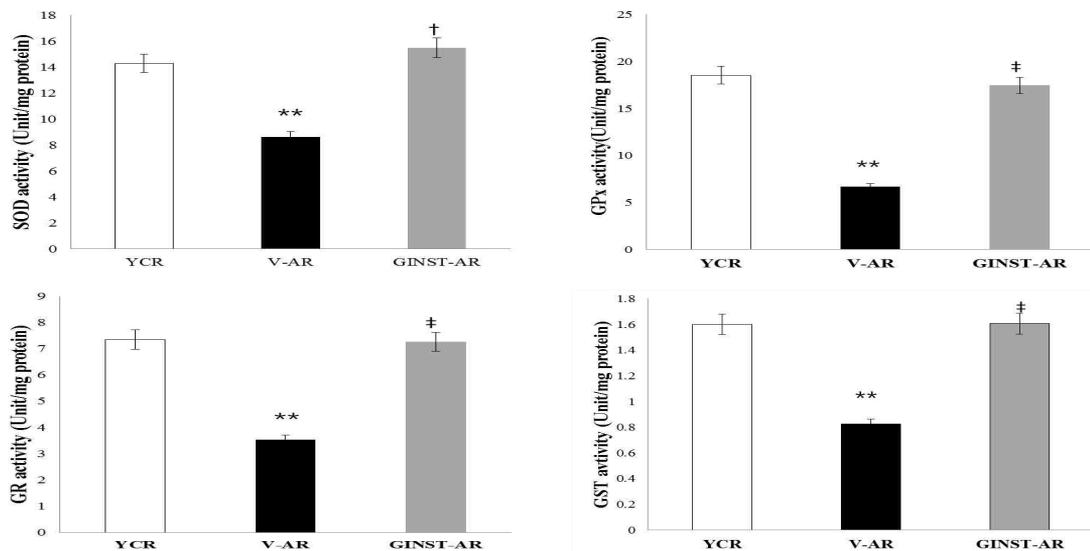


Fig. 24. 노령 쥐에서의 신장 내 항산화 효소의 활성에 대한 GINST의 효능. ** Significantly different from YCR at $p<0.01$. †, ‡ Significantly different from V-AR at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

㊦ 노령쥐의 간에 미치는 영향

Fig. 25는 노령쥐의 간에 대한 GINST의 항산화 활성을 조사한 결과로서 V-AR의 MDA level은 V-AR군에서 YCR군 대비 유의하게 증가하였으며, GSH의 활성의 경우는 유의

($p < 0.01$)하게 감소한 반면, GINST에서는 두가지 지수 모두 유의하게 개선된 것으로 나타났다($p < 0.01$).

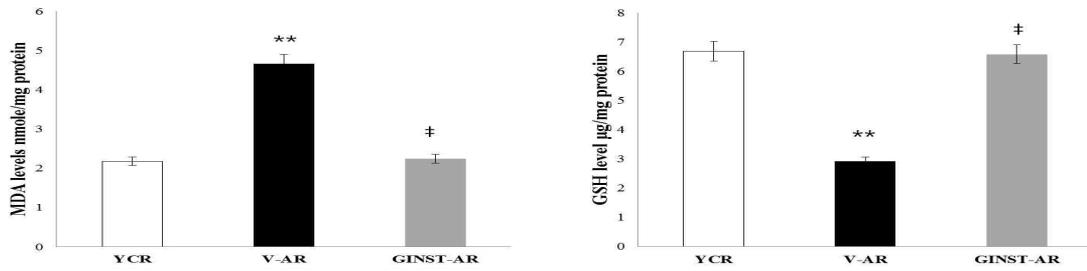


Fig. 25. 노령 쥐 간에서 MDA와 GSH level에 미치는 GINST의 효능. ** Significantly different from YCR at $p < 0.01$. ‡ Significantly different from V-AR at $p < 0.01$.

Fig. 26은 노령 쥐 간에서의 항산화 효소 활성을 측정한 결과로서 GR, GPx, SOD, GST 효소의 활성 모두 노화에 의해 유의하게 감소하는 것으로 나타났으며, 이러한 감소는 GINST 투여에 의해 유의하게 개선되었다($p < 0.01$).

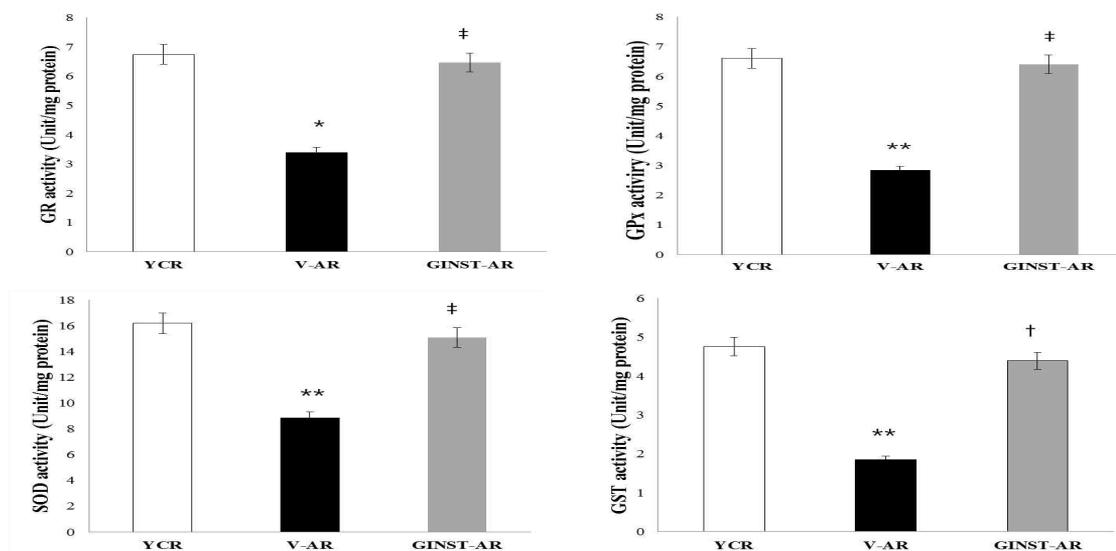


Fig. 26. 노령 쥐 간에서의 항산화 효소 활성에 미치는 GINST의 효과. *, ** Significantly different from YCR at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. †, ‡ Significantly different from V-AR at $p < 0.01$, respectively.

(나) 고온스트레스 노출 쥐의 생식기능 저하에 대한 GINST의 방어효과

① 장기 무게 변화에 미치는 영향

Table 2에서 보는 바와 같이 spleen과 heart를 제외한 모든 장기의 무게가 heat stress로 인해 감소하였으며 이러한 장기의 무게 감소는 GINST 투여로 억제되었다. 특히 신장 무게는 고온 스트레스 부하로 인해 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.01$) GINST 투여군에서는 NC 군 수준으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). 한편, 고환과 부고환의 무게는 heat stress로 유의하게 감소하지는 않았으나 GINST 투여군에서는 NC는 물론 HC 대비 유의한 무게 증가

가 관찰되었다($p<0.05$). 이로부터 GINST의 고환 무게 감소 억제 효과는 매우 선택적이라는 사실을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of GINST in rat organ weight of heat-induced stress.

Organ Group	Liver	Spleen	Kidney	Testis	Heart	Epidydimis	Adrenal gland
NC	14.2809 ± 1.9714	0.7513 ± 0.1275	3.2484 ± 0.1243	3.4137 ± 0.1225	1.6855 ± 0.1956	0.6969 ± 0.0405	0.0782 ± 0.0068
HC	13.7319 ± 2.1094	0.7790 ± 0.0673	3.0959 ± 0.1005**	3.3555 ± 0.0290	1.7007 ± 0.1905	0.6636 ± 0.0260*	0.0762 ± 0.0074
HG100	13.8946 ± 1.4594	0.7992 ± 0.1082	3.0674 ± 0.1189	3.4874 ± 0.1096‡	1.7314 ± 0.1407	0.6773 ± 0.0552‡	0.0759 ± 0.0075
HG200	14.7348 ± 1.8886	0.7871 ± 0.0768	3.2177 ± 0.0857‡	3.5177 ± 0.0861†	1.7769 ± 0.0983	0.6824 ± 0.0853	0.0803 ± 0.0035

Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * $p<0.01$ compared with NC group. ** $p<0.05$ compared with NC group. † $p<0.01$ compared with HC group. ‡ $p<0.05$ compared with HC group.

② 혈액화학지수(blood chemistry panel)

㉠ 간 기능 관련 혈액화학지수

간 기능 관련 혈액화학지수에서 GOT의 경우 heat stress로 인해 현저히 증가하였으며 ($p<0.05$), HG200군에서는 유의한 감소를 나타냈다($p<0.05$). γ -GPT 지수는 heat stress 그룹, GINST 투여 그룹간의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았으며, ALB 지수 역시 GINST 투여와 관계없이 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 3).

Table 3. Effect of GINST on liver-related blood chemistry panels.

Group	GOT	γ -GPT	ALB
NC	77.3 ± 14.6	26.5 ± 5.8	2.7 ± 0.1
HC	105.5 ± 23.5**	22.5 ± 2.6	2.7 ± 0.2
HG100	96.3 ± 35.8	23.0 ± 3.9	2.7 ± 0.1
HG200	78.4 ± 10.2‡	21.7 ± 2.4	2.8 ± 0.2

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * $p<0.01$ compared with NC group. ** $p<0.05$ compared with NC group. † $p<0.01$ compared with HC group. ‡ $p<0.05$ compared with HC group.

㉔ 당 및 지질대사 기능 관련 혈액화학지수

전반적으로 고온스트레스 부하로 인하여 지질대사물이 감소하였으며 GINST는 이러한 감소를 억제하는 것으로 나타났으나 유의차는 관찰되지 않았다. 한편, 고온스트레스 부하로 NC 대비 HC군의 혈당량은 유의하게 감소하였고 GINST 투여군에서는 정상으로 회복되는 경향을 보였다($p<0.05$).

Table 4. Effect of GINST on glucose and lipid metabolism-related blood chemistry panels.

Group	T-CHO	TG	LDL-C	GLU
NC	89.3 ± 20.5	70.5 ± 29.7	6.0 ± 2.2	161.5 ± 10.5
HC	66.3 ± 8.2	39.8 ± 9.9	4.5 ± 1.2	140.9 ± 15.5**
HG100	74.1 ± 10.1	43.9 ± 20.1	3.8 ± 1.8	134.6 ± 16.1
HG200	66.4 ± 8.8	33.5 ± 15.5	5.2 ± 2.5	164.8 ± 27.4‡

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * $p<0.01$ compared with NC group. ** $p<0.05$ compared with NC group. † $p<0.01$ compared with HC group. ‡ $p<0.05$ compared with HC group. T-Cho: total cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, HDL: high density lipoprotein-cholesterol TG: triacylglycerol.

③ 정자의 질에 미치는 영향

㉕ 정자의 운동성에 미치는 효과

NC 대비 HC군 정자의 운동성(motility)과 직진운동성(progressive)은 유의하게 감소한 것으로 나타났다($p<0.01$). 이에 반하여 HG200군에 있어서는 정자의 운동성이 유의하게 개선되는 것을 알 수 있었다($p<0.05$). 한편, average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), straitness (STR), linearity (LIN) 및 elongation에 있어서는 고온스트레스 유발 대조군 대비 정상대조군 사이에 유의한 변화가 관찰되지 않아 GINST의 효과를 판별할 수 없었다.

Table 5. Effect of GINST on sperm kinematic values of heat-induced stress.

Average Group	Motile	Progressive	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	Elongation
NC	91.67 ± 6.29	31.93 ± 13.81	32.87 ± 6.39	23.08 ± 3.74	76.00 ± 14.41	69.47 ± 5.41	39.33 ± 5.61	95.47 ± 3.62
HC	58.33 ± 20.68*	18.89 ± 8.27*	30.11 ± 6.43	21.78 ± 8.78	74.38 ± 12.01	73.33 ± 7.48	40.89 ± 5.16	97.89 ± 2.52

HG100	90.40 ± 9.73 [†]	35.90 ± 9.40 [†]	35.04 ± 5.21 [‡]	24.64 ± 3.90	80.50 ± 7.93	69.70 ± 2.71	38.90 ± 3.03	92.70 ± 3.53 [†]
	81.14 ± 15.94 [‡]	30.29 ± 16.02	34.94 ± 8.19	23.94 ± 7.17	81.54 ± 16.81	68.86 ± 5.98	39.43 ± 7.55	96.00 ± 4.36
HG200								

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. [†]*p*<0.01 compared with HC group. [‡]*p*<0.05 compared with HC group. VAP; average path velocity, VSL; straight line velocity, VCL; curvilinear velocity, LIN; linearity = VSL/VCL×100, STR; straightness = VSL/VAP×100.

④ 고환의 정자생성능 조사

㉞ 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

항산화 관련 효소 중 고환 조직 내 글루타치온 *S*-전이효소 (glutathion *S*-transferase, GST) 류의 하나인 GSTm5와 고환의 미토콘드리아에서 발현되는 PRx (Peroxioredoxin) 류의 하나인 PRx4의 발현량을 RT-PCR을 통해 확인한 결과, GPx4, GSTm5 그리고 PRx4의 경우 heat stress에 의해 발현량이 유의하게 감소하였으며(*p*<0.01), GINST 투여는 용량-의존적으로 발현량을 회복시키는 것으로 나타났다(*p*<0.05).

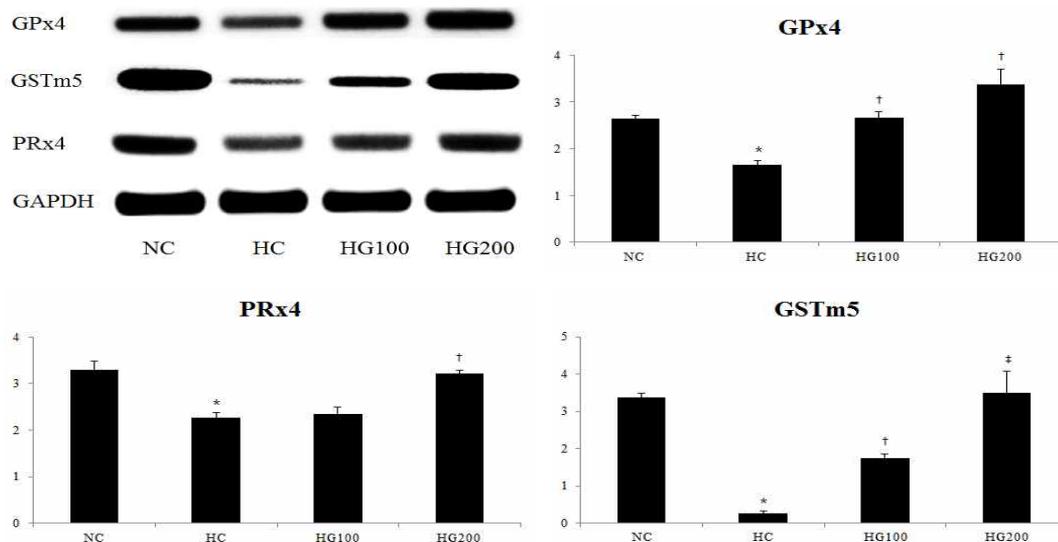


Fig. 27. Effect of GINST on mRNA expression of antioxidant enzymes in rat testis. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. [†]

$p < 0.01$ compared with HC group. $^{\ddagger}p < 0.05$ compared with HC group.

㉔ 정자생성관련 단백질의 mRNA 발현량 조사

성호르몬 pathway에서 정자생성에 관여하는 CREB-1과 Nectin-2의 mRNA 발현량은 heat stress 부하로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.01$). 한편, GINST는 heat stress로 인해 감소하는 CREB-1과 Nectin-2의 mRNA 발현량을 유의하게 회복시키는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

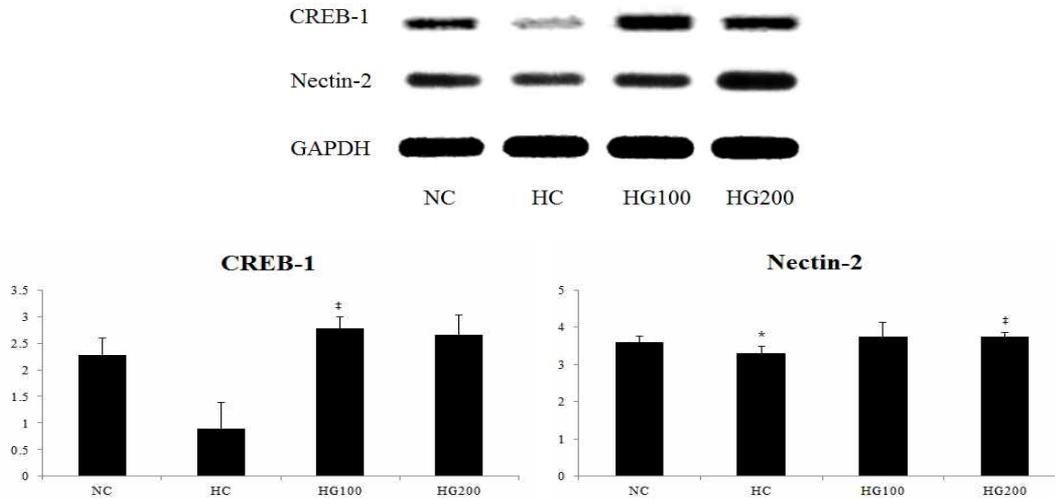


Fig. 28. Effect of GINST on mRNA expression levels of spermatogenesis-related molecules in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * $p < 0.01$ compared with NC group. ** $p < 0.05$ compared with NC group. $^{\dagger}p < 0.01$ compared with HC group. $^{\ddagger}p < 0.05$ compared with HC group.

㉕ 성호르몬 수용체의 mRNA 발현량 조사

Fig. 29에서 보는 바와 같이 heat stress 부하는 황체호르몬 수용체(luteonizing hormone receptor, LHR), 여포자극호르몬 수용체(follicle stimulating hormone receptor, FSHR) 및 남성호르몬 수용체(androgen receptor, AR) 발현을 현저히 억제하는 것으로 나타났다($p < 0.01$). 이에 반해 GINST는 heat stress로 야기되는 성호르몬 수용체 발현 감소를 유의하게 방어하는 것으로 나타났다.

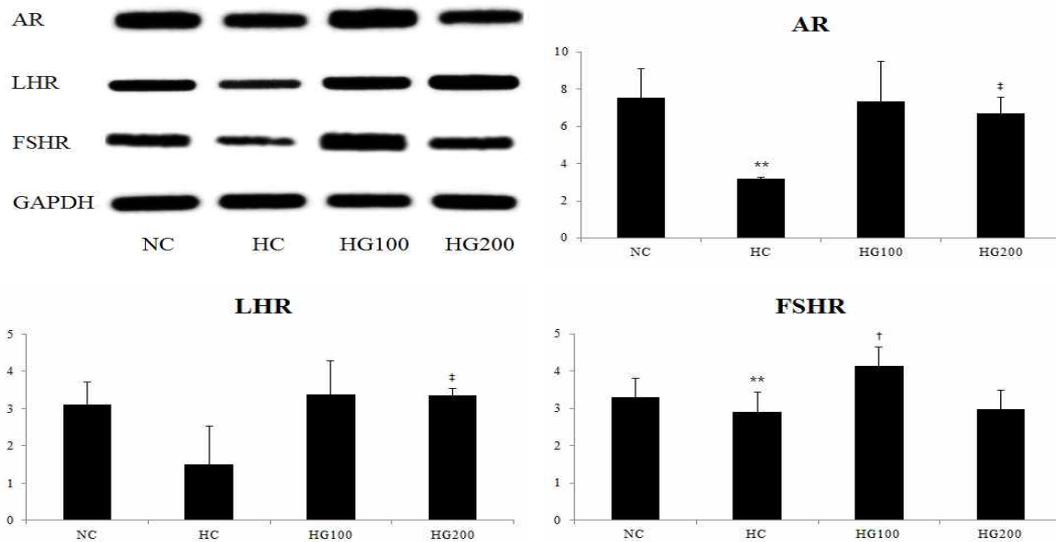
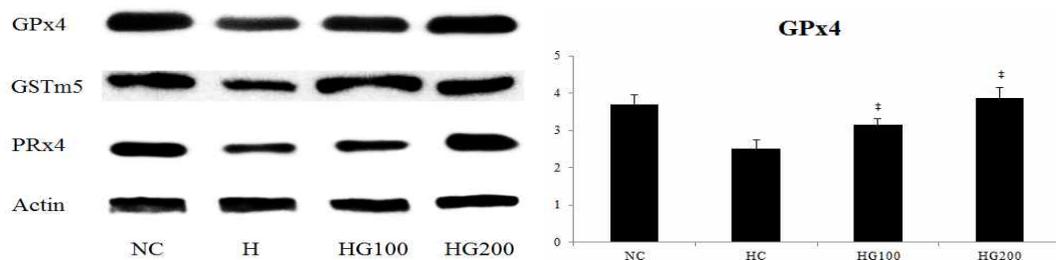


Fig. 29. Effect of GINST on mRNA expression of sex hormone receptors in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * p <0.01 compared with NC group. ** p <0.05 compared with NC group. † p <0.01 compared with HC group. ‡ p <0.05 compared with HC group.

⑤ 고환 조직 내 Western blot

㉞ 항산화 관련 효소(단백질)의 발현량 조사

Fig. 30에 나타난 바와 같이 항산화 관련 효소의 발현량 역시 mRNA 발현량과 동일한 결과를 나타냈다. 즉, GPx4, GSTm5 및 PRx4의 경우 heat stress에 의해 발현량이 유의하게 감소하였으며(p <0.01), GINST 투여군에서는 용량-의존적으로 발현량이 회복하는 것으로 나타났다(p <0.05). 이는 GINST가 heat stress로 인해 감소하는 항산화효소의 발현을 회복시킨다는 사실을 의미한다.



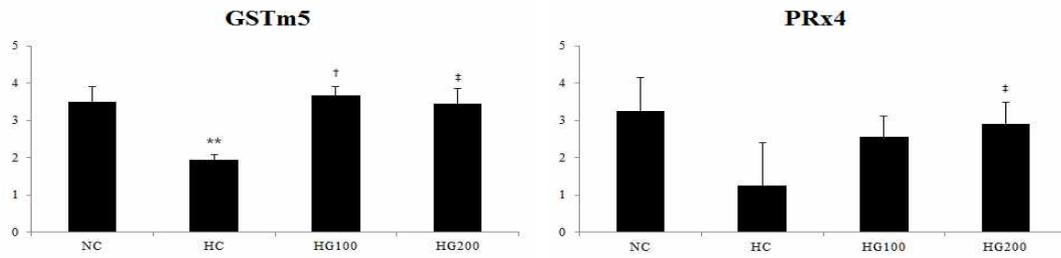


Fig. 30. Effect of GINST on protein expression of antioxidant enzymes in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * p <0.01 compared with NC group. ** p <0.05 compared with NC group. † p <0.01 compared with HC group. ‡ p <0.05 compared with HC group.

㉔ 정자생성-관련 biomarker 단백질 발현량 조사

성호르몬 pathway에서 정자생성에 관여하는 CREB-1과 Nectin-2 protein 발현량을 조사한 결과 mRNA 발현량에서와 마찬가지로 두 분자 모두 heat stress를 가했을 때 발현량이 감소하는 것을 알 수 있었다(p <0.05~0.01). 이에 반하여, GINST 투여는 heat stress로 인해 감소하는 Nectin-2와 CREB의 발현량을 증가시킨다는 사실을 확인하였다.

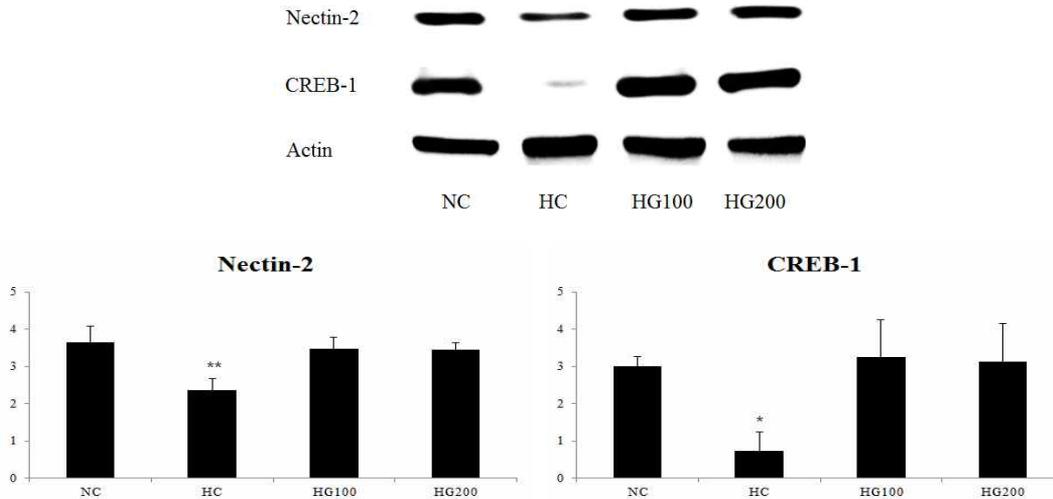


Fig. 31. Effect of GINST on protein expression level of spermatogenesis-related biomarker molecules in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * p <0.01 compared with NC group. ** p <0.05 compared with NC group. † p <0.01 compared with HC group. ‡ p <0.05 compared with HC group.

㉔ 성호르몬 수용체(단백질) 발현량 조사

Fig. 32에서 보는 바와 같이 LHR, FSHR, AR의 발현량은 heat stress로 인해 현저하게 억제되었으며($p<0.05\sim0.01$) GINST 투여는 heat stress에 의해 야기되는 이들 성호르몬 수용체의 발현량 감소를 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다($p<0.05\sim0.01$). 특히, 고온 스트레스를 부하하면 androgen receptor (남성호르몬 수용체)의 발현량은 정상의 1/8 수준으로 감소한다는 사실과 GINST 투여는 정상대조군의 80% 수준까지 회복시킨다는 사실은 새로운 발견으로 매우 고무적이라 하겠다. 이는 고환의 온도가 올라가면 혈중 성호르몬 함량 감소도 문제가 되겠으나, 호르몬 수용체의 감소로 이들 호르몬에 대한 생식세포의 sensitivity가 감소함으로 인해 생식력에 악영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

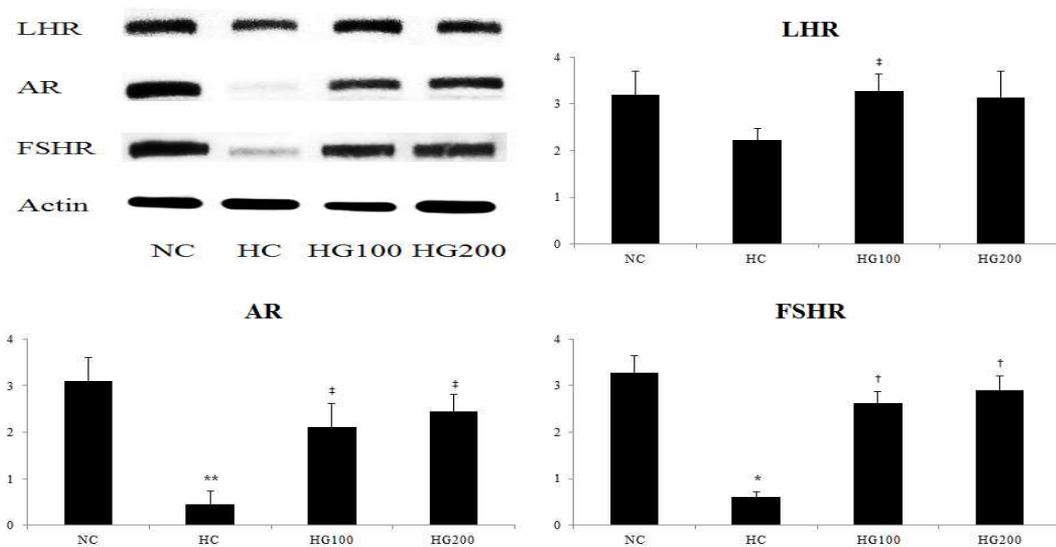


Fig. 32. Effect of GINST on protein expression of sex hormone receptors in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * $p<0.01$ compared with NC group. ** $p<0.05$ compared with NC group. † $p<0.01$ compared with HC group. ‡ $p<0.05$ compared with HC group.

이상의 결과로부터 GINST는 heat stress로 야기되는 성호르몬 pathway biomarker molecules의 발현 감소를 억제함으로써 정자생성 기능 감퇴를 방어하는 것으로 사료된다. 이러한 사실은 홍콩, 대만, 동남아, 중동 지역과 같이 더운 나라에 거주하는 사람들이 GINST를 복용하여야 유리하다는 사실을 증명하는 매우 귀중한 연구결과라 하겠다.

(다) 만성구속스트레스 노출 쥐의 생식기능 저하에 대한 GINST의 방어효과

① 장기 무게 변화에 미치는 영향

Table 6에서 보는 바와 같이 모든 장기의 무게가 immobilization stress로 인해 감소하였으

며 이러한 장기의 무게 감소는 GINST 투여로 대부분 억제되는 경향을 보였다. 특히 고환과 부고환의 무게는 구속 스트레스 부하로 인해 유의하게 감소하였으며 GINST 투여군에서는 IC군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 이로부터 GINST의 고환 무게 감소 억제 효과는 선택적이라는 사실을 알 수 있다.

Table 6. Effect of GINST in rat organ weight of immobilization-induced stress.

Organ Group	Liver	Spleen	Kidney	Testis	Heart	Epidydimis	Adrenal gland
NC	15.277 ± 2.196	0.900 ± 0.147	3.251 ± 0.362	3.672 ± 0.241	1.634 ± 0.185	1.392 ± 0.110	0.067 ± 0.011
IC	10.163 ± 1.541	0.658 ± 0.137	2.586 ± 0.234	3.335 ± 0.433	1.348 ± 0.108	1.193 ± 0.166	0.057 ± 0.006
IG100	10.119 ± 1.564	0.679 ± 0.132	2.668 ± 0.380	3.467 ± 0.267	1.377 ± 0.158	1.269 ± 0.082	0.051 ± 0.010
IG200	10.167 ± 1.025	0.671 ± 0.101	2.723 ± 0.260	3.538 ± 0.175	1.489 ± 0.214	1.289 ± 0.068	0.050 ± 0.010

Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Duncan's *t*-test using the SAS ver. 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA). NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. †*p*<0.01 compared with HC group. ‡*p*<0.05 compared with HC group.

② 혈액화학지수(blood chemistry panel)

㉠ 간 기능 관련 혈액화학지수

간 기능 관련 혈액화학지수에서 ALT의 경우 immobilization stress로 인해 현저히 감소하였으며(*p*<0.05), IG군에서는 증가하는 경향을 나타냈다. ALP 지수는 immobilization stress로 인해 증가하였으며, IG100그룹에서 감소하는 경향을 보였다. ALB 지수는 GINST 투여와 관계없이 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 7).

Table 7. Effect of GINST on liver-related blood chemistry panels.

Group	ALT	ALP	ALB
NC	31.0 ± 9.4	395.9 ± 53.9	2.76 ± 0.08
IC	24.6 ± 4.2*	425.7 ± 83.2	2.70 ± 0.12
IG100	26.7 ± 7.3	407.6 ± 407.6	2.76 ± 0.11
IG200	33.6 ± 8.4	493.7 ± 134.1	2.69 ± 0.12

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. †*p*<0.01

compared with HC group. ‡*p*<0.05 compared with HC group.

㉔ 당 및 지질대사 기능 관련 혈액화학지수

전반적으로 구속스트레스 부하로 인하여 지질대사물이 감소하였으며 GINST는 이러한 감소를 억제하는 것으로 나타났으나 유의차는 관찰되지 않았다. 한편, 구속스트레스 부하로 NC 대비 HC군의 콜레스테롤 수치는 유의하게 감소하였고 GINST 투여군에서는 정상으로 회복되는 경향을 보였다(*p*<0.05).

Table 8. Effect of GINST on glucose and lipid metabolism-related blood chemistry panels.

Group	T-CHO	TG	LDL-C	GLU
NC	95.14 ± 10.19	67.86 ± 19.66	10.86 ± 1.07	171.0 ± 27.2
IC	77.71 ± 16.85	49.00 ± 25.48	8.71 ± 2.43	164.7 ± 16.9
IG100	75.85 ± 18.57	61.86 ± 27.41	8.71 ± 2.14	171.6 ± 13.3
IG200	91.29 ± 16.50	63.14 ± 19.67	10.71 ± 2.56	170.6 ± 9.9

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; NC: normal control; HC: heat-stressed control; HG100: heat-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; HG200: heat-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. †*p*<0.01 compared with HC group. ‡*p*<0.05 compared with HC group. T-Cho: total cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, HDL: high density lipoprotein-cholesterol TG: triacylglycerol.

③ 정자의 질에 미치는 영향

㉕ 정자의 운동성에 미치는 효과

NC 대비 IC군 정자의 운동성(motility)과 직진운동성(progressive)은 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(*p*<0.05). 이에 반하여 IG그룹군에 있어서는 정자의 운동성이 유의하게 개선되는 것을 알 수 있었다(*p*<0.01~0.05). 한편 average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), straitness (STR), linearity (LIN) 및 elongation에 있어서는 구속스트레스 유발 대조군 대비 정상대조군 사이에 유의한 변화가 관찰되지 않아 GINST의 효과를 판별할 수 없었다.

Table 9. Effect of GINST on sperm kinematic values of immobilization-induced stress.

Average Group	Motile	Progressive	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	Elongation
NC	75.71 ± 17.15	6.00 ± 3.16	72.74 ± 14.84	65.40 ± 14.64	112.26 ± 36.54	90.43 ± 5.44	65.29 ± 16.29	99.29 ± 1.25
IC	51.50 ± 17.15	3.63 ± 3.16	68.54 ± 14.84	66.57 ± 14.64	123.09 ± 36.54	96.43 ± 5.44	57.00 ± 16.29	100.00 ± 1.25

	11.17*	1.36*	35.22	34.30	42.21	3.15	20.44	0.00
IG100	84.50 ±	5.88 ±	76.51 ±	68.44 ±	131.11 ±	89.50 ±	55.50 ±	99.75 ±
	12.68†	2.36	18.43	15.63	27.50	6.52	2.83	0.71
IG200	86.88 ±	7.13 ±	71.44 ±	66.34 ±	110.15 ±	90.88 ±	61.75 ±	100.00 ±
	10.58‡	4.52	16.83	18.66	16.98	7.57	13.26	0.00

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. †*p*<0.01 compared with HC group. ‡*p*<0.05 compared with HC group. VAP; average path velocity, VSL; straight line velocity, VCL; curvilinear velocity, LIN; linearity = VSL/VCL×100, STR; straightness = VSL/VAP×100.

④ 고환의 정자생성능 조사

㉞ 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량 조사

항산화 관련 효소 중 고환 조직 내 글루타치온 *S*-전이효소 (glutathion *S*-transferase, GST) 류의 하나인 GSTm5와 고환의 미토콘드리아에서 발현되는 PRx (Peroxiredoxin) 류의 하나인 PRx4의 발현량을 RT-PCR을 통해 확인한 결과, GSTm5의 경우 immobilization stress에 의해 발현량이 유의하게 감소하였으며(*p*<0.05), GINST 투여는 모든 항산화 관련 효소의 지표에서 큰 차이를 보이지 않았다(*p*<0.05).

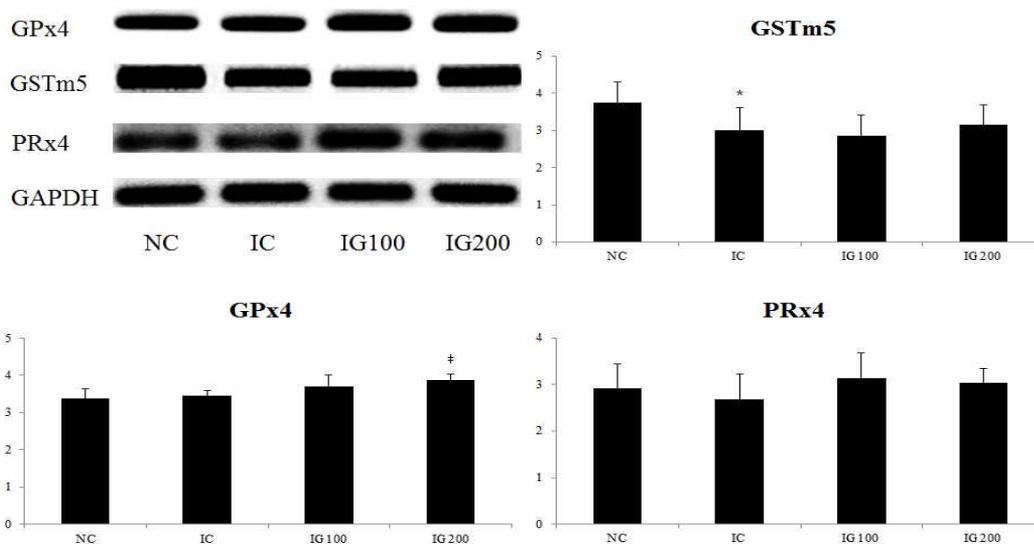


Fig. 33. Effect of GINST on mRNA expression of antioxidant enzymes in rat testis. Data are expressed as mean ± S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC

group. † $p < 0.01$ compared with IC group. ‡ $p < 0.05$ compared with IC group.

㉔ 정자생성관련 단백질의 mRNA 발현량 조사

정자생성에 관여하는 단백질 중 CREB-1과 Inhibin- α 의 경우 immobilization stress 부하로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 한편 GINST의 투여로 해당 단백질의 발현량이 유의하게 회복하는 것으로 나타났다($p < 0.01 \sim 0.05$).

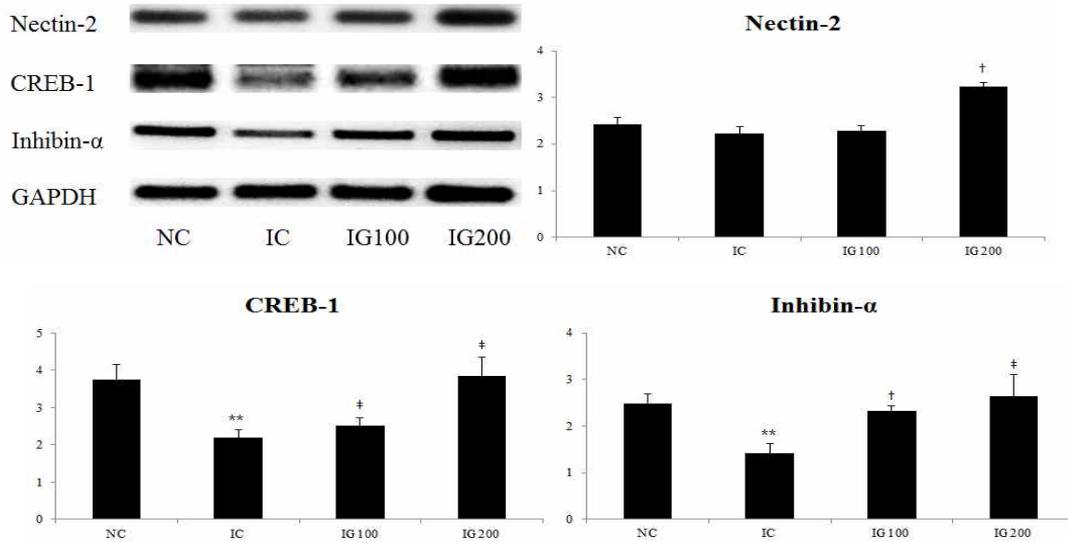


Fig. 34. Effect of GINST on mRNA expression levels of spermatogenesis-related molecules in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * $p < 0.01$ compared with NC group. ** $p < 0.05$ compared with NC group. † $p < 0.01$ compared with IC group. ‡ $p < 0.05$ compared with IC group.

㉕ 성호르몬 수용체의 mRNA 발현량 조사

Immobilization stress 부하는 황체호르몬 수용체(luteonizing hormone receptor, LHR), 여포 자극호르몬 수용체(follicle stimulating hormone receptor, FSHR) 및 남성호르몬 수용체(androgen receptor, AR) 발현을 현저히 억제하는 것으로 나타났다($p < 0.01 \sim 0.05$). 이에 반해 GINST는 성호르몬 수용체 발현 감소를 유의하게 방어하는 것으로 나타났다.

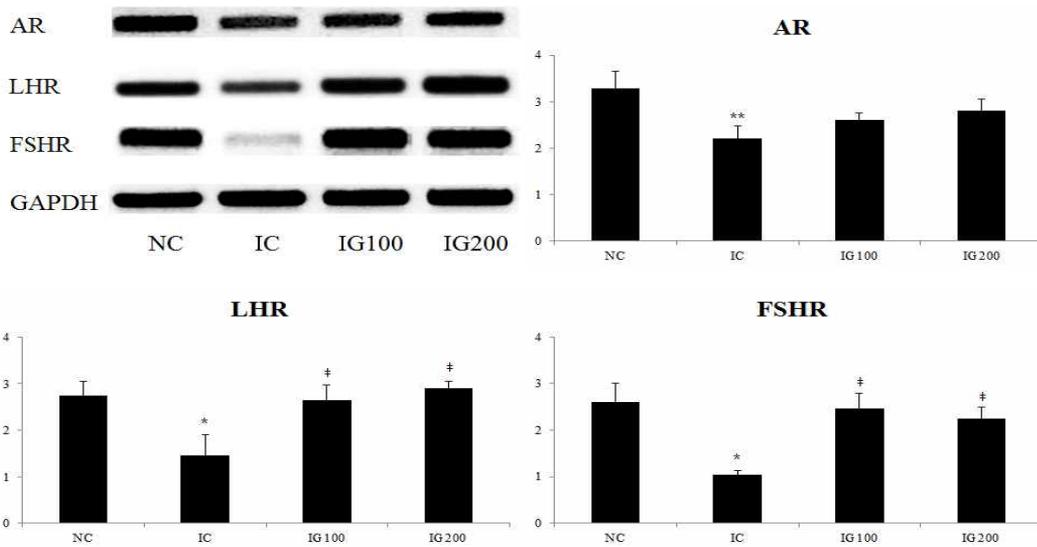


Fig. 35. Effect of GINST on mRNA expression of sex hormone receptors in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * p <0.01 compared with NC group. ** p <0.05 compared with NC group. † p <0.01 compared with IC group. ‡ p <0.05 compared with IC group.

⑤ 고환 조직 내 Western blot

㉞ 항산화 관련 효소(단백질)의 발현량 조사

항산화 관련 효소 발현량은 GPx4, GSTm5 및 PRx4의 경우 immobilization stress 에 의해 발현량이 유의하게 감소하였으며, GINST 투여군에서는 해당 효소들의 발현량이 회복하는 경향을 보였다.

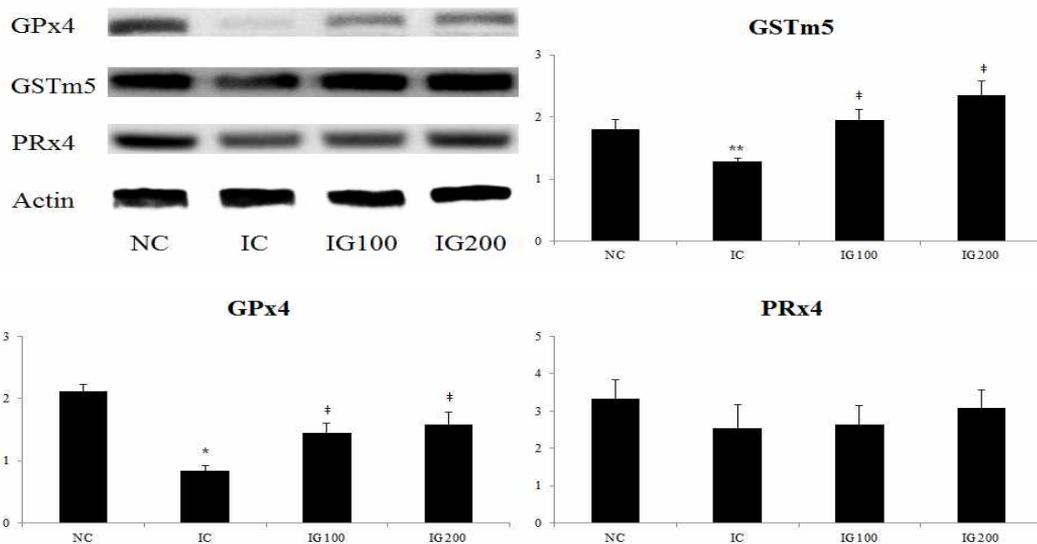


Fig. 36. Effect of GINST on protein expression of antioxidant enzymes in rat testis.

Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. †*p*<0.01 compared with IC group. ‡*p*<0.05 compared with IC group.

㉔ 정자생성-관련 biomarker 단백질 발현량 조사

Inhibin- α 의 발현량은 Immobilization stress 부하로 인해 mRNA 발현량과 동일하게 감소하는 것으로 나타났다. mRNA 발현과 동일하게 GINST 투여군은 발현량이 증가하였으나, 다른 지표들의 발현량은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

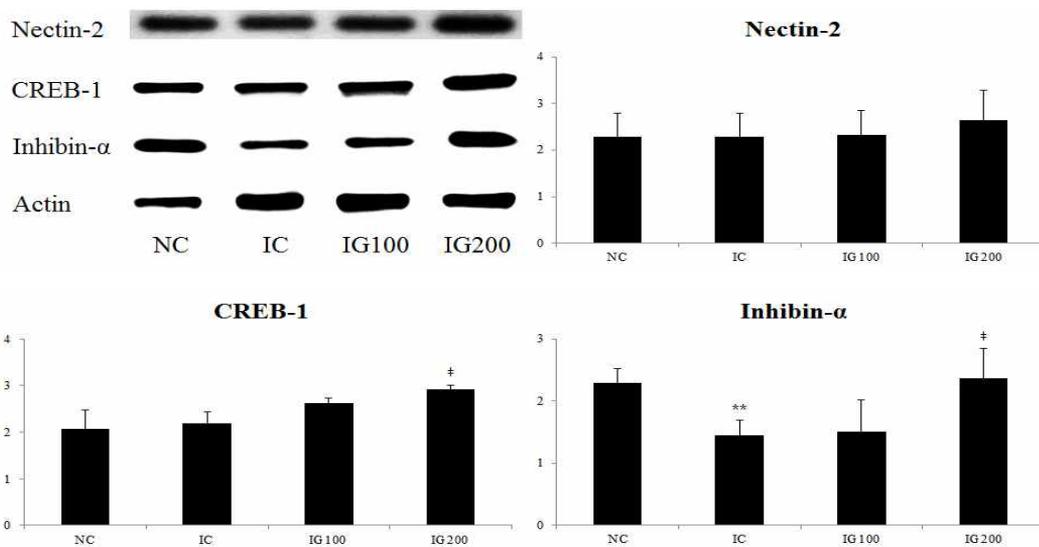


Fig. 37. Effect of GINST on protein expression level of spermatogenesis-related biomarker molecules in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. **p*<0.01 compared with NC group. ***p*<0.05 compared with NC group. †*p*<0.01 compared with IC group. ‡*p*<0.05 compared with IC group.

㉕ 성호르몬 수용체(단백질) 발현량 조사

AR, LHR, FSHR의 발현량은 mRNA 발현량과 동일하게 immobilization stress로 인해 현저하게 억제되었으며(*p*<0.05~0.01) GINST 투여는 heat stress에 의해 야기되는 이들 성호르몬 수용체의 발현량 감소를 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다(*p*<0.05~0.01).

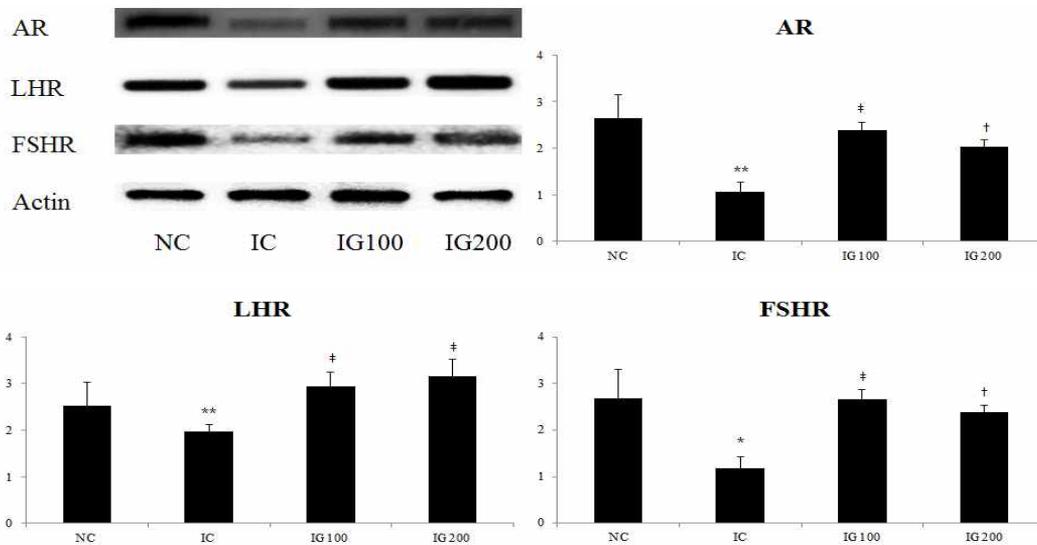


Fig. 38. Effect of GINST on protein expression of sex hormone receptors in rat testis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (n=10). Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test and one way ANOVA using GraphPad Prism version 4.0. NC: normal control; IC: immobilization-stressed control; IG100: immobilization-stressed and received GINST 100 mg/kg b.w.; IG200: immobilization-stressed and received GINST 200 mg/kg b.w. * p <0.01 compared with NC group. ** p <0.05 compared with NC group. † p <0.01 compared with IC group. ‡ p <0.05 compared with IC group.

[위탁 : 기능 등재를 위한 연구: 식약처 기능식품 등재를 위한 서류 작성]

(가) 건강기능식품 개발 기술컨설팅 및 선행연구 자료 검색

- 연구자 협의 등을 통해 진행 현황 파악 및 진행시 문제점 파악, 대책 방안 논의
- 기능성 소재에 대한 연구결과 활용도를 높이고, 개발품목에 대한 성공 가능성을 높이기 위해 기술컨설팅 진행함, 컨설팅 결과 반영하여 연구 계획에 대한 의견 제시
- 개별인정 업무를 효율적으로 진행하기 위한 전반적인 내용에 대한 식약처 사전 검토
- 담당주무관: 오재명 주무관 (영양기능연구팀)
- 식약처 민원상담 진행: 2016년 1월 13일 (아래 회의록 참고)
- 식약처 기능성 원료 및 기준 규격 인정에 관한 규정 안내

회의록		기	번	비	항
회의 목적	식품안전관리공단 원료상담 (정자운동성/인삼)				
일시	2016. 01. 18 (수) 오후 2:00 ~ 3:00				
장소	식품안전관리공단 고객지원센터 (충북 오송)				
참석자	- 원료기능연구팀: 오경원, 최민지 - 품질관리팀: 김기영, 박용남				
회의 내용					
1. 기능성 - 개별인정 현황					
구분	제품명	기능성분명	식품안전성	인정종류	현황
개별인정	대마 젤라틴화 분말	정자운동성	기능성분명: 정자운동성	인정종류: 개별인정	2017.12.29 승인
- 해당 원료: 분말형 정자운동성 추출물 추가됨 - 다만: 산출물 품질평가 결과에 따라 인증서 개편으로 진행 필요					
2. 인삼특성시험 신청기준 - 일반: 0.01% (최대) 이상인성분: 10~50%일 지 - 다만: 원료가 단일성 확인되는 근거 자료 있음. 분말, 분쇄					
3. 인삼특성시험 비인정요인 - 정자 운동성 증가 수, 활동성 증가 반응, 항산화 및 정자 행동, 효모산, 셀라지(HEF, PSS, 인산염) 등 증가 - 다만: 인산염 증가 설명에 대한 근거 자료 있음은 분말, 분쇄, HEF 설명자는 개별인정 시 주입이 꼭 일어나야 주무 검토 시 표시 분할					

Fig. 39. 민원상담 회의록

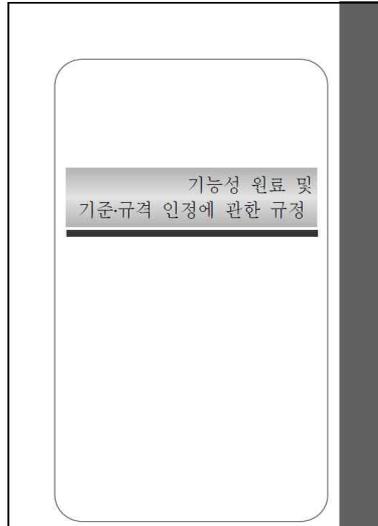


Fig. 40. 건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정

개별인정원료	
2016년 12월 건강기능식품심사결과	
2016년 12월 건강기능식품심사결과	15/30
<ul style="list-style-type: none"> ○ 통과: 대마 젤라틴화 분말 ○ 인정번호: 제2017호 (2017.11.16) ○ 품명: (주)이스타비엔트 ○ 기능성분명: <ul style="list-style-type: none"> - 운동수용성: 정자운동성 도출물 추출물 (정자운동성) 3등급 - 정자운동성 개선에 도움될 수 있음 (정자운동성) 2등급 - 정자운동성 개선에 도움될 수 있으나 관련 인체실험이 필요함 (정자운동성) 3등급 ○ 신청주회사명: <ul style="list-style-type: none"> - 이스타비엔트 - 운동수용성: 대마 젤라틴화 분말(15 - 30g/일) - 정자운동성 개선 및 정자운동성: 대마 젤라틴화 분말(50g/일) ○ 최종 결정을 위한 보완요건: 정자운동성 등 관련 인체실험을 할 수 있습니다. 	

Fig. 41. 유사원료 개별인정 현황

- GINST(인삼가수분해농축액) 관련 논문자료 및 섭취근거 자료 수집

Table 10. 원재료 기원에 관한 정보

원재료명	인삼	비고(참고)
학명	<i>Panax ginseng</i> C.A Meyer <i>Panaxschinseng</i> Nees(이명)	http://www.foodsafetykorea.go.kr/
이명	Ginseng, 백삼, 홍삼, 야산삼, 별직삼, 귀개, 토청, 신초, 혈삼, 장뇌삼, 산양삼 등	
생약명	인삼(人參, Ginseng Radix Alba)	
원재료분류	식물	
식품원료 사용가능부위	잎/뿌리/조식배양삼/열매/씨	

- 원료의 정자운동성 개선 관련 논문 현황

<국내 연구 현황>

자료출처: KISS, DBpia

주요 검색어: (인삼 or 홍삼 or 진세노사이드) and (정자운동성 or 성기능)

	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	인체적용시험	총설 / 메타분석	Total
인삼		1		1	2
홍삼		1	2		3
ginsenoside					
Total		2	2	1	5

<국의 연구 현황>

자료출처: Pubmed

주요 검색어: (ginseng or red ginseng or ginsenoside) and (sperm motility or sexual function)

	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	인체적용시험	총설 /메타분석	Total
인삼	2	13	4	1	20
홍삼		3	5		8
ginsenoside	1	3	1		5
Total	3	19	10	1	33

Table 11. 정자운동성 개선관련 인정 및 허가 현황

구분	개별인정형
원료명	마카 젤라틴화 분말
기능성내용	-정자운동성 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능2등급) -갱년기남성건강에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함(생리활성기능3등급) - 운동수행능력 향상에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험 이 미흡함(생리활성기능 3등급)
일일섭취량	-정자운동성 개선 및 갱년기 남성 건강: 마카 젤라틴화 분말로서 5.0g/일 - 운동수행능력 : 마카 젤라틴화 분말로서 1.5 ~ 3.0 g/일
인정번호	제2011-7호(2011.1.16)
업체명	(주)이스터비엔에프

Table 12. 유사원료관련 인정 및 허가 현황

구분	원료명	기능성내용	일일섭취량	기능(지표)성분	인정번호	업체명
인삼	고시형 인삼	면역력 증진·피로개선에 도움을 줄 수 있음	진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합계로서 3~80 mg	진세노사이드 Rg1과 Rb1을 합하여 0.8~34 mg/g	-	-
	개별인정형 가수분해농축액	혈당 조절에 도움을 줄 수 있음 (기타기능 II)	인삼가수분해농축액으로서 960 mg/일	Ginsenoside Rg1	제2011-27호("11.10.11)	(주)일화
	개별인정형 다당체추출물	면역기능 증진에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능 2등급)	인삼다당체추출물로서 6 g/일	-	제2015-11호(2015.4.6)	(주)헬스바이오메드
	개별인정형 가시오갈피 등 혼합추출물	기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체시험을 통한 확인이 필요함 (기타기능 III)	인삼가시오갈피 등 혼합추출물로서 5.2g/day	① Ligustilide ② Eleutheroside E ③ Ginsenoside Rg1과 Rb1의 합 ④ Baicalin	제2009-79호("09.10.15)	(주)뉴메드

홍삼	고시 형	홍삼	면역력 증진.피로개선. 혈소관 응집억제를 통 한 혈액 흐름.기억력 개선.항산화에 도움을 줄 수 있음	면역력 증진.피로개선 에 도움을 줄 수 있 음 : 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계로서 3~80 mg (나) 혈소관 응집억 제를 통한 혈액흐름. 기억력 개선.항산화에 도움을 줄 수 있음 : 진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계 로서 2.4~80 mg	진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합	-	-
	개별 인정 형	홍삼	갱년기여성의 건강에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능 2등급)	진세노사이드 Rg1, Rb1 및 Rg3의 합계 로 25 ~ 80mg/일	-	제2014-15 호 (2014.4.23)	(주)한국 인삼공 사
	개별 인정 형	홍삼,사 상자,산 수유 복합추출 물	햇볕 또는 자외선에 의한 피부손상으로부터 피부건강을 유지하 는데 도움을 줄 수 있 음 (생리활성기능 2등 급)	복합추출물로서 3 g/ 일	-	제2008-67 호(2008.11 .04)	(주)한국 인삼공 사

(나) 임상시험 모니터링

- 연구의 질과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 연구 수탁기관(CRO; Contact Research Organization)에서 연구 전반 과정에 대해 모니터링을 실시함
- 모니터링 계획
 - 모니터 요원은 계획서 및 증례기록서, 연구대상자 동의서, 연구자에게 제공되는 서면 정보, 사용되는 시험용제품, 연구 관리기준 및 관련 규정 및 본 연구를 위하여 수립된 모니터링 계획에 따라 모니터링 실시
 - 모니터링 항목
 - ▶ 시험자 및 관련 연구 인력들에 대한 교육
 - ▶ 근거 문서 확인(Source Data Verification: SDV)
 - ▶ 자료 처리에 관한 절차
 - ▶ 시험제품 관리에 대한 절차
 - ▶ 임상병리 자료 및 샘플 처리 절차
 - ▶ 기타: 임상시험에서 사용될 여러 문서 template이나 임상시험팀 연락처 등을 확인.
- 모니터링 방문 및 follow-up
 - 사전에 수립된 모니터링 계획서에 따라 담당 수행기관에 대한 개별 monitoring visit 계획을 세우고, 현장 방문 시 확인해야 할 내용 및 만나야 할 대상을 정하여 미리 일정을 짜고 연구자와 방문 약속을 조정함. 현장 모니터링 시에 연구 관리요원이 확인해야 하는 항목들을 현장 방문 때 빠짐없이 check되어 자세히 기록되도록 확인함.
- Source Data Verification (SDV)

○ 모니터 요원의 **routine monitoring** 시에 자료의 질적인 측면을 보장하기 위한 활동으로서 가장 중요한 것이 증례기록서에 적힌 정보의 **source data**를 **source document**를 통하여 대조 확인하는 작업임.



Fig. 42. 모니터링 방문 사진

- 모니터링 보고서

○ 모니터링 방문 활동 또는 다른 연구와 관련된 교신은 모니터링 보고서로 작성함. 개별 모니터링 방문에 대한 보고서는 방문 요약 및 서술적 기술, **issues**, **checklist results** 등의 부분으로 구성되며 연구대상자 등재 현황 및 방문의 진행, **data monitoring**과 **SDV** 등 활동 영역이 포함됨.

Table 13. 모니터링 방문

과제 구분	1 과제_저/고용량군	2 과제_ 단일군			3 과제_ 이중눈가림		
회차/기관	연세대학교 의과대학 세브란스병원	연세대학교 의과대학 세브란스병원	연세대학교 원주 세브란스기독병원	가천대학교 길병원	연세대학교 의과대학 세브란스병원	연세대학교 원주 세브란스기독병원	가천대학교 길병원
1	2015/03/10	2016/03/23	2016/03/15	2016/06/09	2016/11/16	2017/01/17	2016/11/04
2	2015/05/11	2016/08/12	2016/05/26	2016/08/29	2017/02/06	2017/04/19	등록 전
3	2015/07/23	2016/11/16	2016/08/10	2016/11/04	2017/04/10	2017/07/11	-
4	2015/07/27	-	2016/11/08	-	2017/04/11	2017/07/12	-
5	2015/09/22	-	2016/11/09	-	2017/06/22	-	-
6	2015/11/26	-	2017/01/17	-	-	-	-
7	2016/01/26	-	2017/07/12	-	-	-	-
8	2016/03/23	-	-	-	-	-	-
9	2016/05/31	-	-	-	-	-	-
10	2016/08/12	-	-	-	-	-	-
11	2016/11/16	-	-	-	-	-	-
12	2017/04/10	-	-	-	-	-	-

○ 모니터링 보고서 별첨함. [별첨1]

개시 모니터링 보고서			
공표 번호	제품명	제조사	제출 일자
2014-0108	건강기능식품	한국건강기능식품협회	2014.01.08
제출자	제출자	제출자	제출자
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자

모니터링 보고서 (Monitoring Report)			
공표 번호	제품명	제조사	제출 일자
2014-0108	건강기능식품	한국건강기능식품협회	2014.01.08
제출자	제출자	제출자	제출자
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자

모니터링 보고서 (Monitoring Report)			
공표 번호	제품명	제조사	제출 일자
2014-0108	건강기능식품	한국건강기능식품협회	2014.01.08
제출자	제출자	제출자	제출자
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자

모니터링 보고서 (Monitoring Report)			
공표 번호	제품명	제조사	제출 일자
2014-0108	건강기능식품	한국건강기능식품협회	2014.01.08
제출자	제출자	제출자	제출자
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자

모니터링 보고서 (Monitoring Report)			
공표 번호	제품명	제조사	제출 일자
2014-0108	건강기능식품	한국건강기능식품협회	2014.01.08
제출자	제출자	제출자	제출자
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자

모니터링 보고서 (Monitoring Report)			
공표 번호	제품명	제조사	제출 일자
2014-0108	건강기능식품	한국건강기능식품협회	2014.01.08
제출자	제출자	제출자	제출자
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자
제출 번호	제출 번호	제출 번호	제출 번호
제출 일자	제출 일자	제출 일자	제출 일자

Fig. 43. 모니터링 보고서 예시

(다) 기능성원료 개별인정 신청

- 선행 연구 자료와 인체적용시험 결과를 바탕으로 건강기능식품 원료 개별인정을 받을 수 있도록 신청 제출자료 준비
- 건강기능식품에 관한 법률에 따라 건강기능식품 기능성 원료 및 기준 규격의 인정에 필요한 제출자료 준비하였으며, 인체적용시험 결과 확보 되는대로 제출할 예정임. 제출자료 별첨함 [별첨2]

Table 14. 제출 자료의 범위

1.	제출자료 전체의 총괄 요약본
2.	기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
2.1	기원
2.2	개발경위
2.3	국내·외 인정·허가 현황
2.4	국내·외 사용 현황
3.	제조방법 및 그에 관한 자료
3.1	제조공정표
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화
3.5	주요공정별 수율 변화
4.	원료의 특성에 관한 자료

4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거
4.3	영양성분정보자료
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료	
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도,구조동정,유효기간 등 정보 추가)
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료	
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 :)	
7.1	섭취근거 정보
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보
7.3	섭취량 평가 정보
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보
7.5	독성시험
	* GLP기관
	확인 여부
	단회투여독성시험 3개월 반복투여독성시험 유전독성시험 특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료	
8.1	시험관시험
	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 : <input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)
8.2	동물시험
	<input type="checkbox"/> 신청원료 (논문 편) * 시험기관 : <input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편)
8.3	인체적용시험
	<input type="checkbox"/> 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편) *인체적용시험기관 : <input type="checkbox"/> 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료	
9.1	섭취량 및 근거
9.2	섭취방법 및 근거
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료	
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

Table 15. 제출자료의 총괄 요약본

항 목	1. 주요 내용
1. 원료명	인삼가수분해농축액
2. 원재료	인삼 (학명: <i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer, 이명 : 수삼(水蔘), 백삼(白蔘), 홍삼(紅蔘), 흑삼, 야산삼(野山蔘), 별직삼(別直蔘), Ginseng, Korean ginseng, 사용부위 : 뿌리)
3.기능 (지표)성분	지표성분: Compound K
4. 제조 공정	원재료 → 추출 → 여과 → 농축 → 가수분해 → 농축 → 신청 원료
5. 규격 및 시험방법	1) 성상 : 고유의 향미를 가지며 이미 · 이취가 없는 암갈색의 액상 2) 지표성분 : Compound K 5 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1.0 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1.0 이하

	<p>5) 카드뮴(mg/kg) : 0.5 이하</p> <p>6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하</p> <p>7) 대장균군 : 음성</p> <p>8) 세균수: 100 cfu/ml 이하</p>
	<p>기능(지표)성분 ◦ Compound K 분석법</p> <p>시험법 ◦ 자사시험방법 (HPLC, 203 nm)</p>
	<p>규격외 ◦ 「식품의 기준 및 규격」에 따라 58종의 잔류농약에 대하여 국내 식품 위생검사기관인 한국기능식품연구원에서 시험결과 ‘불검출’ 임을 확인함</p>
	<p>의사결정도 ◦ 섭취경험이 있는 인삼을 물리적인 추출 또는 물이나 주정을 이용한 단순추출에 의해 얻어진 것이 아니므로 의사결정도 ‘라’에 해당</p>
6. 안전성	<p>섭취 근거</p> <p><인정현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 국내: 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재(뿌리, 잎, 열매, 씨앗), 식품원재료 DB검색결과 ‘인삼’으로 식용 가능한 것으로 등재, 유사원료 건강기능식품 기능성원료 인정 ◦ 국외 : 식품 원료로 널리 사용됨 <p><사용현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 국내: 함유 식품 유통 ◦ 국외: 함유 식품 유통
	<p>안전성 정보</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 안전성 정보 DB : 독성에 관한 정보 없음 ◦ 섭취시 주의사항: 인삼의 섭취로 두통, 불면, 가슴 두근거림, 혈압상승의 부작용이 나타날 수 있으며 땀이 나지 않고 배변이 불편하고 열이 많은 사람이나, 염증 등으로 인한 고열이 있을 때에는 일반적으로 인삼을 기피하도록 하고 있습니다. 또한, 수축기 혈압 180 mmHg 이상의 고혈압이 있는 경우 인삼의 섭취를 금하는 것을 권장
	<p>섭취량 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 신청원료의 섭취량: 신청원료로서 960 mg/일 ◦ 인삼은 예로부터 한방에서 널리 사용되어온 식물로 약용, 식용 등으로 널리 이용되고 있으며, 식품 공전의 원재료로 등재되어 있고, 심각한 독성은 보고되지 않았다. 또한 면역력 증진·피로개선 등의 기능성이 인정되어 있다(Rg1과 Rb1 합계로서 3~80 mg). 또한 해당원료인 인삼가수분해농축액 등 다양한 형태로 제품이 유통·판매되고 있으며, 특징적인 부작용이 발생하지 않을 것으로 생각되어 진다. ◦ ‘대한약전’에는 정확한 복용량 기준이 명기되어 있지 않지만 생약규격집 해설에 따르면 하루 인삼 1.5~10 g, 많을 경우 30 g까지 복용한다고 되어 있음 ◦ ‘동의보감’, ‘방약합편’, ‘의문보감’, ‘제중신론’ 등 조선시대 한방의서에 수록된 인삼 함유 처방 가운데 인삼의 평균 배합량 분포는 1첩 기준 9~11 분(푼, 分)으로 3~4g이므로 하루에 두 첩을 복용할 경우 인삼 복용량은 6~8g, 또한 ‘동의보감’에서는 원기가 약해 기력이 없는 경우 인삼 달인 물을 하루에 5~6순가락씩 복용한다고 되어 있는데, 한 순가락을 4g으로 하면 하루 양은 20~24g에 해당 ◦ 인삼은 식약처의 기능성 원료 고시형으로 등재되어 있으며(일일섭취량: 진세노사이드 Rg1 과 Rb1의 합계로서 3~80 mg, 지표성분: 진세노사이드 Rg1과 Rb1을 합하여 0.8~34 mg, 기능성내용: 면역력증진·피로개선에 도움을 줄 수 있음), 개별인정형 제품은 인삼가수분해농축액 섭취량 960 mg/day(혈당 조절에 도움을 줄 수 있음, 생리활성기능 2등급), 인삼다당체 추출물 섭취량 6 g/day(면역기능 증진에 도움을 줄 수 있음, 생리활성기능 2등급), 인삼, 가시오갈피 등 혼합추출물 섭취량 5.2 g/day(기억력 개선에 도움을 줄 수 있으나 인체적용시험을 통한 확인이 필요함, 생리활성기능

		<p>3등급)으로 인정</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 당해원료로 수행한 비임상시험에서, 노령쥐와 고온 스트레스 부하 쥐에서 인삼가수분해농축액 100mg/kg 투여시, 정자운동성, 정세관 모양 및 항산화 효소, 정자생성, 성호르몬 receptor 관련 인자 발현이 개선됨을 확인(인체환산 시 960-970mg/d) ◦ 또한 유사원료로 수행한 임상시험에서, 인삼 또는 홍삼 0.96-4g/d 섭취시 정자운동성 및 성기능 관련 지표들이 유의적 개선 <p>⇒ 인삼은 오래전부터 한방 및 민간에서 이용되어 왔으며 인삼은 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재(뿌리, 잎, 열매, 씨앗)되어 있음. 현재 다양한 제품이 유통, 판매되고 있으며, 이에 관한 부작용은 보고되지 않아 특징적인 부작용이 발생하지 않을 것으로 예측됨. 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배 이내이고), 최대 안전섭취량, 일일허용 섭취량 이내임</p>
	인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 특징적 부작용 확인되지 않음 (960 mg/일 섭취 기준)
	독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 시험물질에 의한 사망례가 관찰되지 않아, 계약의 치사량은 암·수 각 2000 mg/kg 이상으로 판단 ◦ 비글견을 이용한 단회 경구투여 용량 증가 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 250 mg/kg 용량에서는 어떠한 증상도 없었으나, 500 mg/kg 이상의 용량에서는 설사증상이 관찰되었으며, 계약의 치사량은 암·수 모두 1000 mg/kg 이상으로 판단 ◦ 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 <ul style="list-style-type: none"> - Chinese Hamster Lung(CHL/IU) 배양세포에 대해 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단 ◦ 마우스를 이용한 소핵시험 <ul style="list-style-type: none"> - 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향을 주지 않으므로 음성으로 판단 ◦ 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 <ul style="list-style-type: none"> - 복귀돌연변이 유발성은 음성으로 판정 ◦ 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험 <ul style="list-style-type: none"> - 수컷 500 mg/kg 투여군에서 시험물질에 의한 체중감소 경향 및 사료섭취량 감소가 인정되었으나, 그 외 검사항목에서는 독성 변화가 인정되지 않음. - 최대내성용량(MTD)은 수컷이 500 mg/kg으로 사료되며, 무독성량(NOAEL)은 암·수 500 mg/kg으로 사료됨
	기타 사항	-
	섭취시주의사항	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 인삼의 섭취로 두통, 불면, 가슴 두근거림, 혈압상승의 부작용이 나타날 수 있으며 땀이 나지 않고 배변이 불편하고 열이 많은 사람이나, 염증 등으로 인한 고열이 있을 때에는 일반적으로 인삼을 기피하도록 하고 있습니다. 또한, 수축기 혈압 180 mmHg 이상의 고혈압이 있는 경우 인삼의 섭취를 금하는 것을 권장
7. 기능성	신청 기능성	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 정자운동성 개선
	신청 일일섭취량	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 인삼가수분해농축액으로서 960 mg/일
	시험관시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ Mouse의 정모 세포인 GC-2spd 세포-과산화수소에 노출 <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량: 과산화수소 독성으로 인해 PRx3, PRx4, GPx4, GSTm5의 mRNA 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 - 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사: 과산화수소 독성으로 인

	<p>한 inhibin-α의 mRNA 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복</p> <ul style="list-style-type: none"> - 성 호르몬 receptor의 mRNA 발현량 조사: 과산화수소 독성으로 인해 AR, FSHR, LHR의 mRNA 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 <p>※ 시험물질: 인삼가수분해농축액(GINST)</p> <p>[J Ginseng Res. 2016 Apr;40(2):185-95.]</p>
동물시험	<p>◦ 노령쥐(aged rat, V-AR, 12-mo-old), 200mg/kg, 4개월</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항산화 관련 효소의 protein 발현량: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 PRx3, GPx4, GSTm5의 protein 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 - 항산화 관련 효소의 mRNA 발현량: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 PRx3, PRx4, GPx4, GSTm5의 mRNA 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 - 정자생성 관련 분자들의 protein 발현량 조사: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 Nectin-2, CREB-1의 protein 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 - 정자생성 관련 분자들의 mRNA 발현량 조사: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 Nectin-2의 mRNA 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 - 성 호르몬 receptor의 protein, mRNA 발현량 조사: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 AR, LHR, FSHR의 protein 및 mRNA 발현량 감소했으나, 시험군에서 유의하게 회복 <p>※ 시험물질: 인삼가수분해농축액(GINST)</p> <p>[J Ginseng Res. 2016 Apr;40(2):185-95.]</p> <p>◦ 노령쥐(aged rat, V-AR, 12-mo-old), 200mg/kg, 4개월</p> <ul style="list-style-type: none"> - 정세관의 현미경 관찰 (정자생성능): 정세관 상피세포층의 두께뿐만 아니라 V-AR군에 비해 세포 사이의 연결성이 대부분에서 유지되어 있었고, 정자세포의 활발한 증식이 대부분의 정세관에서 관찰되어 V-AR군 대비 현저하게 개선 - 정액검사: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 정자운동성, 정자운동, VAP, VCL, LIN 감소했으나, 시험군에서 유의하게 증가 - 혈중 성호르몬 : testosterone은 시험군에서 유의적으로 증가되었으며, 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 LH, FSH가 증가했으나 시험군에서 유의적으로 감소 (정자 생성 기능이 개선되어 성선자극호르몬의 과잉 분비가 요구되지 않음) - 정자 생성 관련 마커: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 정세관 내 정자 수, Sertoli cell, germ cell, SCI 지표가 감소했으나, 시험군에서 유의하게 증가 - 항산화 지표: 젊은쥐에 비해 노령쥐에서 GST, GPx, GSH가 감소했으나, 시험군에서 유의하게 증가하였으며, MDA는 시험군에서 유의하게 감소 <p>※ 시험물질: 인삼가수분해농축액(GINST)</p> <p>[Exp Gerontol. 2014 May;53:57-66.]</p> <p>◦ 고온스트레스 부하 쥐(heat stress in rat), 100, 200mg/kg, 9주</p> <ul style="list-style-type: none"> - 장기 무게: 대조군에 비해 고온스트레스군에서 신장, 부고환 무게가 감소했으나, 시험군에서 유의하게 증가 - 정액검사: 대조군에 비해 고온스트레스군에서 정자운동성이 감소했으나, 시험군에서 유의하게 개선 - 항산화(GSTm5, GPx4), 정자생성(CREB-1, inhibin-α), 성 호르몬 receptor(AR, LHR, FSHR) 관련 효소의 protein, mRNA 발현량: 대조군에 비해 고온스트레스군에서 정자운동성이 감소했으나, 시험군에서 농도의존적으로 회복

	<p>※ 시험물질: 인삼가수분해농축액(GINST) [자체 수행 결과, 논문 투고 준비 중]</p> <p>◦ 고온스트레스 부하 쥐(heat stress in rat), 100, 200mg/kg, 6개월</p> <ul style="list-style-type: none"> - 장기 무게: 시험군에서 유의하게 개선 - 정액검사: 시험군에서 유의하게 개선 - 항산화, 정자생성, 성 호르몬 receptor 관련 효소의 protein, mRNA 발현량: 시험군에서 유의하게 개선 <p>※ 시험물질: 인삼가수분해농축액(GINST) [자체 수행 결과, 논문 투고 준비 중]</p>
인체적용시험	<p>◦ 반건강인, 건강인(n= 60), 960 mg/일, 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 비교 인체적용시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 정액검사: 정액의 양, 정자의 모양, 운동성 및 수 분석 - 정자의 질 분석 - 정낭액 내 oxidative stress 표지자 분석 : MDA - 혈액 검사: Total testosterone, Sex Hormone binding globulin, Free androgen index (FAI), free testosterone, FSH, LH, Inhibin B, OT (ALT), PT(AST) - 설문지 조사: 삶의 질 평가, 남성 성기능 설문지, 피로도 측정 설문 <p>※ 시험물질: 인삼가수분해농축액(GINST) 960mg/g ※인체적용시험기관 : 연세대학교 의과대학 세브란스병원 [인체적용시험 수행 중]</p>
기타 사항	-

[제1협동 : 국제기준(ICH 혹은 WHO 기준) 부합 제조공정 확립 및 품질규격 표준화 제품 개발]

(1) 품질규격 확인

▷ 국제 기준에 맞는 품질규격 확인을 위해 주요 원료인 GINST를 EU의 인증 시험기관인 Eurofins의 독일소재 시험소인 Dr. Specht Laboratorien에 의뢰하여 중금속, 곰팡이독소, 잔류농약, 미생물등을 시험하였다. 시험 방법은 EU의 기준에 의해 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

Table 16. 중금속, 잔류농약, 미생물 시험방법

Analysis of pesticides		
Lead (Pb)	## J8306	EN 15763:2009
Cadmium (Cd)	## J8308	EN 15763:2009
Arsenic (As)	## J8312	EN 15763:2009
Mercury (Hg)	## JCHG2	EN 15763:2009
Aflatoxin B1, B2, G1, G2 (spices, oleoresins)	## JJ0EW	internal method based on EN
Organochlorine Pesticides, Pyrethroides (OC-02-01-GHT)	SP201	PSP25 ASU L00.00-34
Organophosphorus Pesticides (OP-02-01-GHT)	SP203	PSP25 ASU L00.00-34
Organonitrogen Pesticides (OX-02-02-GHT)	SP205	PSP25 ASU L00.00-34
Pesticides NCI-GHT (NCI-02-01-GHT)	SP206	PSP25 ASU L00.00-34
Quechers LC-XL-GHT (QuLC-02-01-GHT)	SP914	PSP25 EN 15662:2008
Aerobic Plate Count 30°C <10 >3000000 ISO 4833	## UM275	ISO 4833
E.coli -1/g	## UMULP	ISO 16649-2-M

▷ 시험결과는 아래의 표에 요약하였으며 Dr. Specht Laboratorien의 성적서를 그림으로 표시하였다. 시험 결과를 보면 수많은 항목은 모두 불검출되었으나 일부 성분이 검출되었다. 하지만 그 양은 극히 미량으로서 우려할 만한 수준이 아니었으며 모두가 국제규격에 적합

한 수준임을 알 수 있었다. 상세히 보면 Pb, Cd가 일부 검출되었으나 검출한계에 근접하는 극히 미량수준이며 EU기준에도 크게 미달하는 수준이었고 As, Hg등 다른 중금속 성분은 검출되지 않았다. AflatoxinB1등 곰팡이 독소는 전혀 검출되지 않았으며 잔류농약성분 593개 항목을 시험한 결과 일부 항목에서 잔류농약성분이 검출되었지만 대부분 검출한계에 근접하는 극미량 수준이며 이 역시도 EU 기준에 크게 미달하는 수준에 불과 하였다. 한편 미생물은 전 항목에서 불검출 되었다.

Table 17. 중금속, 곰팡이독소, 잔류농약, 미생물 시험결과

구분	Parameter	Measurement	Dimension	Result	RL*	MRL*	비고
중금속	Lead(Pb)##	ICP-MS	mg/kg	0.06	0.05	-	
	Cadmium(Cd)##	ICP-MS	mg/kg	0.02	0.01	0.1	
	Arsenic(As)##	ICP-MS	mg/kg	n.n.	0.1	-	
	Mercury(Hg)##	ICP-MS	mg/kg	n.n.	0.005	0.1	
곰팡이 독소	AflatoxinB1##	IAC,HPLC-FLD	µg/kg	n.n.	1	-	
	AflatoxinB2##	IAC,HPLC-FLD	µg/kg	n.n.	1	-	
	AflatoxinG1##	IAC,HPLC-FLD	µg/kg	n.n.	1	-	
	AflatoxinG2##	IAC,HPLC-FLD	µg/kg	n.n.	1	-	
잔류 농약	Quintozene(sum)	GC-ECD	mg/kg	0.008		0.1	
	Pentachloroaniline	GC-ECD	mg/kg	0.007	0.005	-	
	Tebuconazole	LC-MS/MS	mg/kg	0.08	0.01	50	
	Trifloxystrobin	LC-MS/MS	mg/kg	0.01	0.01	0.05	
	Propamocarb	LC-MS/MS	mg/kg	0.01	0.01	0.2	
	Pyraclostrobin	LC-MS/MS	mg/kg	0.03	0.01	0.05	
	Pyrimethanil	LC-MS/MS	mg/kg	0.02	0.01	0.1	
	Metalaxyl	LC-MS/MS	mg/kg	0.01	0.01	0.1	
	Azoxystrobin	LC-MS/MS	mg/kg	0.06	0.01	50	
	Fenhexamid	LC-MS/MS	mg/kg	0.02	0.01	0.1	
	Fludioxonil	LC-MS/MS	mg/kg	0.14	0.01	1	
	Cyprodinil	LC-MS/MS	mg/kg	0.02	0.01	1	
	Difenoconazole	LC-MS/MS	mg/kg	0.04	0.01	20	
Dimethomorph	LC-MS/MS	mg/kg	0.05	0.01	0.05		
미생물	AerobicPlateCount30°C	Microbiological	cfu/g	<10		-	
	Escherichiacoli##	Microbiological	cfu/g	<10		100	

No further pesticides/parameters of above mentioned scope of analysis are detectable.

*RL=Reporting Limit (검출한계)

*MRL=Maximum Residue Level according to Regulation (EC) NO396/2005
(EU 잔류농약기준)



Fig 44. Eurofins / Dr.SpechtLaboratorien의 성적서

(2) 임상시험용 제품의 clinical formulae 구축

▷ 임상 시험용 제품 및 Placebo의 formulae 구축을 위해 여러 가지 부형제 및 제형에 관하여 검토하였다. 본 시험에서 정한 GINST의 하루 섭취량은 960 mg으로 1회 2정 1일 3회로 하였다. 따라서 1정에 160 mg의 GINST성분이 함유되도록 제형을 만드는 것이 관건이 된다. 또 임상시험의 안정적 data확보를 위해 실제 임상에서는 960 mg과 1920 mg의 두 가지 섭취를 동시에 진행하기로 함에 따라 역시 1회 2정 1일 3회 섭취가 가능한 제형을 만들어야 했다. 처음에는 Tablet 제형을 검토하였으나 GINST 성분의 특성상 500 mg정도의 Tablet 중 32% 해당하는 160 mg을 함유하여 제형을 하는데 어려움이 많았으며 또한 강한 흡습력으로 인하여 안정성에도 문제가 노출되었다. 이에 여러 시험 과정을 거쳐 비교적 안정적으로 생산 가능하고 제형도 안정한 soft capsule을 검토하여 수차에 걸쳐 시험한 결과 아래와 같은 부형제를 사용하여 규격을 설정하였다.

Table 18. 임상용 샘플 500 (960 mg/day 섭취기준)의 배합 규격표

제품명	크기/모양	성분	규격(%)	함량(mg)	비고
임상샘플 500	120	GINST	32.00	160.0	
		대두유	47.50	237.5	
		정제팜유	9.00	45.0	
		자당지방산에스테르	1.50	7.5	
		쌀겨왁스	10.00	50.0	
내용량 합계				500	

Table 19. 임상용 샘플 1000 (1920 mg/day 섭취기준)의 배합 규격표

제품명	크기/모양	성분	규격(%)	함량(mg)	비고
임상샘플 1000	240	GINST	32.00	320.0	
		대두유	47.50	475.0	
		정제팜유	9.00	90.0	
		자당지방산에스테르	1.50	15.0	
		쌀겨왁스	10.00	100	

내용량 합계	1000	
--------	------	--

Table 20. 임상용 Placebo 샘플의 배합 규격표

제품명	크기/모양	성분	규격(%)	합량(mg)	비고
Placebo 500	120	말토덱스트린	32.0	160.0	
		대두유	48.10	240.5	
		정제팜유	6.00	30.0	
		쌀겨왁스	9.60	48.0	
		레시틴	2.30	11.5	
		카카오색소	1.40	7.0	
		안나토색소	0.60	3.0	
내용량 합계				1000	

▷ 이 같은 배합 규격에 의거하여 주) RP corp.에 각각의 시험 샘플 생산을 의뢰하여 생산 중이며 생산된 제품은 임상시험에 사용하고자 한다.

(3) 등록용 batch analysis data (3 batches) 확보

▷ 3 batch 생산을 위하여 공장과 연계하여 batch별로 80 kg씩 3 batch를 생산하였다. 생산 공정은 다음과 같다.

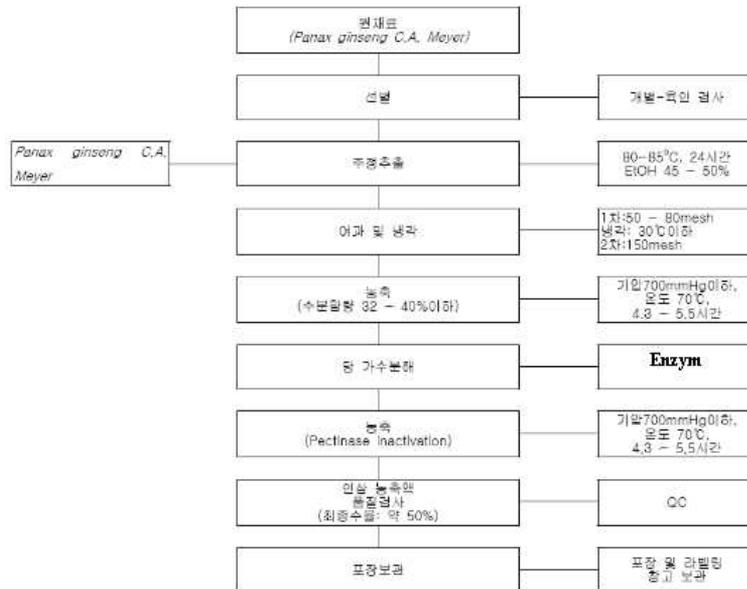


Fig. 45. 제조 공정도

▷ 생산된 원료의 성분확인 및 품질의 적합성 확인을 위해 건강기능식품 공전에 의거하여 시험을 실시하였다. 3 batch의 시험결과는 아래 그림에 표시하였다. 그림에서 보듯 각각의 시험항목에 대하여 모두 적합하였으며 안정적인 생산이 가능하고 분석 data로서도 적합함을 알 수 있었다. 향후 본 생산품으로 임상용 샘플 제공은 물론 모든 시험에 사용할 계획이다.

▷ 일화(사)에 의하여 제조된 IH901 RM의 진위 여부는 각각 독립적으로 수행된 여러 분석법을 통하여 입증하였으며 표준물질에 관한 문서 작성은 F. Gaedeke *et. al.* (Appendix 2)의 방법에 충실하였으나 문서의 질을 보다 높이기 위하여 다소 상세하게 조사, 기술하였다. 물질 동정은 상기 방법으로 얻은 데이터를 데이터베이스 (Appendix 3)와 문헌에 기록된 값과 비교함으로써 달성할 수 있었다. UV, FT-IR, HR-FAB/MS와 NMR 분석 역시 IH901 RM의 동정을 위해 사용되었으며 화학 구조 역시 상기 방법에 의하여 증명되었다. IH901 RM의 순도 분석은 용점, 선광도, HPLC, 원소분석, 수분함량, 잔류 용매, TLC fingerprint 분석을 통하여 수행되었다. 순수 함량은 3가지 다른 HPLC 100% 분석법을 이용하여 결정하였으며 최종적으로 순함량(mass balance)은 HPLC 순도 (피크의 적분치), 수분 함량, 잔류 용매 함량을 고려하여 산출하였다.

(나) IH901의 동정

① ¹H NMR spectroscopy

▷ ¹H NMR spectroscopy (20 mg/ml pyridine-*d*₅, 500 MHz, TMS as the external reference) 역시 IH901 RM의 동정을 위하여 활용되었다. ¹H(Appendix4), ¹³C(Appendix5), ¹H-¹H COSY(Appendix6), HMQC(Appendix7), HMBC(Appendix8) 및 NOESY (Appendix 9) spectra를 해석함으로써 모든 ¹H signals 을 assign할 수 있었다 (Table 15). 각 proton signal의 chemical shift (ppm), multiplicity 및 coupling constant는 상기 NMR spectra의 해석으로 가능하였다. ¹H NMR data와 문헌치와의 비교를 통하여 (주)일화 (대한민국 경기도 구리시 소재)에 의하여 제조된 IH901 RM은 문헌에 보고된 ginsenoside K와 동일하다는 사실을 입증할 수 있었다.

▷ Table 21, 22은 수산기를 포함한 모든 proton의 chemical shifts를 assign한 결과이다. ¹H NMR 분석결과 IH901 RM의 구조를 확인하였으며 문헌치와 비교 하였을 때 미세한 chemical shift 값의 차이를 제외하고는 거의 일치하였다. 따라서 본 연구에 제조한 표준품 IH901 RM의 proton 개수와 chemical shifts가 문헌치와 동일한 것으로 판단된다.

▷ IH901 RM의 ¹H NMR spectrum은 우리로 하여금 문헌상에 보고된 ginsenoside K의 구조와 상관성 분석을 가능토록 하였다. 즉, IH901 RM은 문헌치와 동일하다는 사실을 확인할 수 있었다 [*L. N. Atopkina *et. al.*, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42 (4), (2006), 452-458 Appendix 10]. Triterpen aglycon과 한개의 glucose moiety의 resonances가 ¹H NMR spectrum 상에 선명하게 나타나 있었다.

② ¹³C NMR spectroscopy

▷ ¹³C NMR spectrum 역시 시료를 deuterated pyridine-*d*₅에 동일 농도로 용해한 다음 125 MHz NMR spectrometer (JEOL, Japan)로 측정하였다. Calibration을 위해서는 TMS signal의 chemical shift를 0.00 ppm으로 하였다. ¹³C NMR spectrum상에서 개별 signal간의 상세한 상관성을 Table 23, 24에 나타냈다.

▷ IH901 RM에 있어 carbon resonances data는 문헌상 (Appendix 10)에 수록된 값과 일치 하였으므로 IH901 RM은 ginsenoside K이라는 사실을 입증한다. 또한 ginsenoside analogs의 혼재는 관측되지 않았다. ¹H 및 ¹³C NMR spectra의 해석과 NMR spectra를 통하여 얻

은 정보와 문헌상의 값을 비교한 결과 Fig. 47와 같은 IH901 RM의 구조를 입증할 수 있었다.

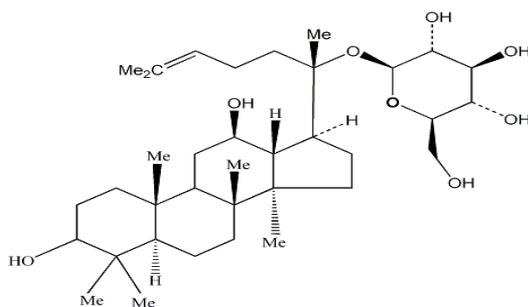


Fig. 47. Chemical structure of IH901

Table 21. ¹H NMR data for the IH901

No.	IH901		Ref. literature*
	Chemical shift (ppm)	Chemical shift (ppm)	Chemical shift (ppm)
1	1.70	m ; 1H	
	0.92	m ; 1H	
2	1.87	m ; 1H	
	1.84	m ; 1H	
3	3.43	m ; 1H	3.43
3-OH	5.76	d (J=4.5 Hz) ; 1H	
4			
5	0.82	d (J=11.0 Hz) ; 1H	
6	1.60	m ; 1H	
	1.46	m ; 1H	
7	1.54	m ; 1H	
	1.26	m ; 1H	
8			
9	1.47	m ; 1H	
10			
11	2.06	m ; 1H	
	1.54	m ; 1H	
12	4.17	m ; 1H	
12-OH	5.61	s ; 1H	
13	2.01	t (J=11.0 Hz) ; 1H	
14			
15	1.59	m ; 1H	
	1.01	m ; 1H	
16	1.87	m ; 1H	
	1.37	m ; 1H	
17	2.59	m ; 1H	
18	1.00	s ; 3H	1.01
19	0.90	s ; 3H	0.93
20			
21	1.64	s ; 3H	1.60
22	2.42	m ; 1H	
	1.84	m ; 1H	
23	2.52	m ; 1H	

	2.26	m ; 1H	
24	5.26	t (J=6.5 Hz) ; 1H	5.29
25			
26	1.61	s ; 3H	1.64
27	1.61	s ; 3H	1.66
28	1.24	s ; 3H	1.25
29	1.05	s ; 3H	1.08
30	0.95	s ; 3H	

Table 22. ¹H NMR data for the IH901

Glucose 1 at C20			
1	5.21	d (J=7.5 Hz) ; 1H.	
2	4.02	t (J=8.0 Hz) ; 1H	3.99
3	4.26	t (J=8.5 Hz) ; 1H	4.24
4	4.19	t (J=8.5 Hz) ; 1H	4.20
5	3.95	m ; 1H	3.92
6	4.51	br d (J=11.5 Hz) ; 1H	4.53
	4.35	br d (J=11.5 Hz) ; 1H	4.35
6-OH	6.14	s ; 1H	

Abbreviation: s singlet, d doublet, t triplet, dd doublet of doublets, m multiplet, brs broad singlet. Chemical shifts are expressed in ppm and referenced to the tetramethylsilane (TMS) signal at 0.00 ppm. *L. N. Atopkina and V. A. Denisenko : Synthesis of 20*S*-protopanaxadiol 20-*O*-β-D-glucopyranoside, a metabolite of *Panax ginseng* glycosides, and compounds related to it. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42 (4), (2006), 452-458 (Appendix 10).

Table 23. ¹³C NMR data for the IH901 RM

C atom	Chemical shift (ppm)	
	IH901	Ref. literature
1	39.4	39.19
2	28.3	28.05
3	78.1	77.83
4	39.6	39.34
5	56.4	56.14
6	18.8	18.55
7	35.2	34.95
8	40.1	39.86
9	50.3	50.09
10	37.4	37.14
11	31.0	30.56
12	70.2	69.96
13	49.5	49.30
14	51.4	51.21
15	30.8	30.74
16	26.7	26.42
17	51.6	51.39
18	16.0	15.81
19	16.4	16.14
20	83.2	83.08

21	22.4	22.13
22	36.2	35.96
23	23.2	22.98
24	126.0	125.75
25	130.9	130.69
26	25.8	25.54
27	17.8	17.54
28	28.7	28.47
29	16.4	16.14
30	17.4	17.18

Table 24. ^{13}C NMR data for the IH901 RM

Glucose 1 at C3		
1	98.3	98.05
2	75.2	74.92
3	79.3	79.10
4	71.7	71.45
5	78.3	78.07
6	62.9	62.68

Chemical shifts are expressed in ppm and referenced to TMS signal at 0.00 ppm. *L. N. Atopkina and V. A. Denisenko : Synthesis of 20*S*-protopanaxadiol 20-*O*- β -*D*-glucopyranoside, a metabolite of *Panax ginseng* glycosides, and compounds related to it. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42 (4), (2006), 452-458 (Appendix 10).

▷ 화학구조식 상에 표시된 모든 탄소 원자는 IUPAC nomenclature system에 따라 numbering하였으며 이 번호들은 개별 NMR signals 의 상관성 분석에 이용하였다.

③ ^1H - ^1H COSY spectroscopy

▷ Proton-proton connectivity ($^3J_{\text{HH}}$)는 ^1H - ^1H COSY spectrum (Appendix 6)을 해석함으로써 가능하였다. ^1H - ^1H COSY spectrum 상에서 cross-peaks 는 다소 중첩되어 나타나기는 하였으나 분리되어 출현한 피크들로부터 얻은 부분 구조는 IH901 (ginsenoside K)와 일치하였다.

④ HMQC spectroscopy

▷ Direct ^1H - ^{13}C connectivity ($^1J_{\text{CH}}$)는 HMQC (heteronuclear multiple-quantum coherence) spectrum (Appendix 7) 해석에 의하여 결정되었다. 수소와 결합되어 있는 탄소는 모두 Table 23, 24에서와 같이 HMQC spectrum 에 의하여 정확하게 assign할 수 있었다. IH901 RM에 있어 수소와 결합되어 있는 탄소의 chemical shifts는 문헌 [*L. N. Atopkina et. al., Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42 (4), (2006), 452-458 Appendix 10] 에 보고된 ginsenoside K 의 carbon chemical shifts와 일치하였다.

⑤ HMBC spectroscopy

▷ Two or three-bonded ^1H - ^{13}C connectivity ($^{2,3}J_{\text{CH}}$)는 HMBC spectrum (Appendix 8) 해석에 의

하여 완성할 수 있었다. HMBC spectrum 해석은 IH901 RM이 문헌 [*L. N. Atopkina et al., Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42 (4), (2006), 452-458; Appendix 10]에 보고된 ginsenoside K와 동일하다는 사실을 입증하여 주었으며 proton과 carbon resonances assignment 역시 완성할 수 있게 하였다.

⑥ NOESY spectroscopy

▷ NOE data로부터 얻은 공간적 거리에 대한 정보는 본 화합물이 용액 중에서 어떤 입체 구조를 하고 있는지를 추론할 수 있도록 하였다. IH901 RM로부터 얻은 NOE data와 문헌상 (Appendix 10)에 수록된 NOE data와의 비교는 우리로 하여금 문헌의 ginsenoside K와 동일하다는 결론을 내릴 수 있도록 해 주었다.

⑦ FT-IR spectroscopy

▷ IH901 RM은 Ge-coated KBr pellet (3.0 mg/g)으로 만들어 IR spectroscopy (Mattson IR spectroscopy, model Galaxy 7020A)를 조사하였다. IR spectrum 상에서의 specific band와 관능기와의 상관성을 Table 25에 나타냈다. 기타 band들은 구조와 상관성이 적기 때문에 명기하지 않았다. IR spectrum 분석 결과 특별히 다른 유기물이 오염되어 있다는 증거는 찾을 수 없었다. IH901 RM의 FT-IR spectrum은 Appendix 11에 첨부되어 있다. IR spectrum은 IH901 RM의 구조 (L. N. Atopkina and V.A. Denisenko, 2006)와 일치하며 문헌상에 보고된 IR spectrum과도 일치한다 (Appendix 12).

Table 25. FT-IR spectral data for IH901 RM

Chemical moiety	Sample (Wavenumber: cm ⁻¹)	Ref*
v (O-H): O-H stretching vibration	3413	3400
v (C-H): C-H stretching vibration	2947	2930
v (C=C) : C=C stretching vibration	1636	1635
δ (C-H): C-H bending vibration	1385	1390
v (O-H): O-H stretching vibration	1076	1080

v: stretching vibration, δ: bending vibration. FT-IR spectrometer: Mattson Instruments, Inc., Galaxy 7020A, Spectral range: 4000 to 400cm⁻¹, Beam splitter: Ge coated on KBr, detector: DTGS, resolution: 0.25cm⁻¹(step selectable); *L. N. Atopkina and V. A. Denisenko : Synthesis of 20S-protopanaxadiol 20-O-β-D-glucopyranoside, a metabolite of *Panax ginseng* glycosides, and compounds related to it. Chemistry of Natural Compounds, Vol. 42 (4), (2006), 452-458 (Appendix 10).

⑧ Mass spectrometry

▷ IH901 RM에 대해서는 positive 및 negative mode의 HPLC/ESI 질량분석 (LC/MS; LCQ DECA XP, Thermo Finnigan)을 수행하였다. 시료 10 mg을 10 ml의 MeOH에 용해하였으며 5 ml의 시료 용액을 LC/MS에 도입하였다. 또한, positive 및 negative mode의 FAB/MS [JMS-700 Mstation FAB/MS spectrometer, JEOL Ltd.]도 측정하였으며 HR-FAB/MS 분석을 통하여 분자식을 확인하였다.

▷ Conditions for HPLC/MS analysis:

Mass spectrometer

Equipment : LCQ DECA XP, Thermo Finnigan
 Ionization source : Electrospray ionization (ESI)
 Polarity : positive & negative
 Analyzing type : ion trap analyzer
 Mass range : 100~2000 m/z
 Scan mode : mass
 HPLC: Waters
 Pump: Alliance 2690 (Waters)
 Injector: Alliance 2690 auto sampler (Waters)
 Column oven: Alliance 2690 (Waters)
 Column: Steel column, 4.9 x 250 mm, C18, 5 μm (Supelco)
 Detector: W 996 photodiode array (Waters)
 Quattro Ultima tandem mass spectrometer (Micromass)
 Integrator: Workstation with MassLynx software (Micromass)
 Mobile phase: A; acetonitrile
 B; water
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Injection volume: 5 μl
 Detection: UV 203 nm
 Temperature: 40°C
 Pump program:

Flow rate [ml/min]	Time [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1.0	0	45	65
1.0	32	45	65
1.0	70	72.5	27.5
1.0	74	12.5	87.5
1.0	79	100	0
1.0	90	100	0

㉔ Electro spray ionization mass spectrometry

▷ LC/MS 분석 결과 IH901 RM의 평균 분자량은 622.44로 나타났으며 (Appendix 13), 이는 데이터베이스에 수록된 IH901 RM의 분자량 (Appendix 3)과도 일치하였다. Positive mode에서 m/z 645.6의 peak는 $[M+Na]^+$ 분자 이온에 해당되는 것으로 추측된다 (Appendix 13). IH901 RM의 파편화는 sugars moiety의 cleavage로 가름할 수 있었다. Positive 및 negative modes에서의 주된 fragment ions 의 가능한 상관성은 Table 26에 나타나 있다. Negative mode에서 m/z 621.6 peak는 $[M-H]^-$ 에 해당되는 것으로 판단되며, m/z 621.6, 465.25, and 161.3는 각각 $[M-H]^-$, $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 및 $[C_6H_{10}O_5-H]^-$ 에 상당하는 fragment ions 로 사료된다 (Appendix 14).

Table 26. Possible correlation of the main product ions of IH901 determined by ESI-MS.

Correlation	IH901	Ref.
	Fragment	<i>m/z</i>
Positive mode		
[M+Na] ⁺	645.6	645.5
Negative mode		
[M-H] ⁻	621.6	621.0
[621.6-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	465.25	465.6
[C ₆ H ₁₀ O ₅ -H] ⁻	161.3	-

Meng C., Fengrui S., Zhiqiang L. and Shuying L. Metal ion adducts in the structural analysis of ginsenosides by electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 586-595. (Appendix 15)

㉞ Fast atomic bombardment mass spectrometry (FAB/MS)

▷ FAB/MS에서 IH901 RM main product ions의 가능성 있는 상관성은 Table 27에 나타난 바와 같다. 질량 spectra 및 의미 있는 product ion spectra는 모두 ginsenoside K의 구조와 일치하였으므로, IH901 RM은 ginsenoside K의 구조와 동일하다는 사실을 입증한다 하겠다 (Appendix 16, 17). 또한, HR-FAB-MS 분석을 통하여 분자식을 확인한 결과 C₃₆H₆₂O₈로서 ginsenoside K와 일치함을 알았다 (Appendix 18).

▷ Conditions for FAB/MS analysis:

Equipment : HR-FAB, JMS-700 Mstation, JEOL Ltd
 Analyzing type : ion trap analyzer
 Mass range : 100~1500 *m/z*
 FAB mode : mass

Table 27. Possible correlation of the main product ions of IH901 RM in FAB/MS

Correlation	IH901	Ref.
	Fragment	<i>m/z</i>
Positive mode		
[M+Na] ⁺	645.4	645.5
Negative mode		
[M-H] ⁻	622.2	621
[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	465.25	465.6

㉟ UV Spectrophotometry

▷ IH901 RM의 UV spectrum은 UV/VIS spectrophotometer (JASCO, V-530)를 이용, 시료 농도를 0.5 mg/ml (MeOH)로 하여 200 ~ 500 nm 범위 내에서 측정하였다 (Appendix 19). IH901 RM는 특이한 UV 흡수 패턴을 보이지는 않았다. 즉, 203 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내는 말단 흡수 특징을 보였다. IH901 RM의 UV spectrum이 비록 direct maximum은 보이지 않았으나 흡수 곡선은 230 nm 부근에서부터 높아지기 시작하였다. UV spectrum에 의한 IH901 RM의 동정은 HPLC 분석 (Hewlett Packard, photodiode array detector, 203 nm)에서 IH901 RM에 해당되는 피크의 UV 스캐닝을 통해서도 수행되었다 (Appendix 20).

(다) IH901 RM의 순도

① Melting point (융점)

▷ IH901 RM의 순도를 조사하는 수단 중 하나로 융점 분석을 수행되었다. 융점 측정은 대한약전 방법 39, 제 1법에 따라 수행하였다. 본 실험에 사용한 융점 측정기는 Manstead/Electrothermal melting point analyzer, IA9100였다. IH901 RM의 융점은 160.02°C로 나타났으며 (Appendix 20), 이 값은 참고문헌 (Appendix 12)에 수록된 융점 159-161°C과 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 융점 분석 결과는 IH901 RM의 순도를 보증한다 하겠다.

② Elemental analysis (원소분석)

▷ 총 2 mg의 IH901 RM을 원소분석기 (Flash EA 1112 series/CE Instrument) 에 도입하였으며 분석은 1,100°C에서 행하였다. 원소분석은 3회에 걸쳐 수행하였으며 결과는 평균값으로 나타냈다 (Table 28). 원소 분석 결과는 약간의 오차를 제외하고는 시성식을 가지고 계산한 이론치과 거의 일치하였다.

Table 28. Elemental composition of IH901 RM reference material.

Element	Measured value (%)				Theoretical value (%)*
	1 차	2 차	3 차	mean	
Carbon	69.48	69.46	69.50	69.48	69.42
Hydrogen	10.03	10.05	10.04	10.04	10.03
Oxygen	20.49	20.48	20.47	20.48	20.55

IH-901 (ginsenoside K): $C_{36}H_{62}O_8$; $36 \times 12.011(69.42\%) + 62 \times 1.0079(10.03\%) + 13 \times 15.999(20.55\%)$

③ 100% Method 1 (HPLC)

▷ 100% HPLC Method 1의 HPLC fingerprint 에 의하여 IH901 RM의 순도를 조사한 결과 다른 유기화합물에 기인된 피크는 관찰되지 않았다 (Appendix 21). Appendix 30에 첨부된 바와 같이 HPLC method 1은 IH901 RM를 분석 할 수 있는 해상력이 뛰어난 방법이다. 이러한 HPLC 조건은 본 방법의 선택성(specificity)이 뛰어나다는 사실을 반영한다 하겠다. HPLC peak purity 역시 비색법 (흡광도 분석)을 통하여 수행하였다. 산출한 peak purity value (purity angle = 10.070; 0.400)는 역치인 16.412; 0.457 보다 낮았으며 이러한 결과는 IH901 RM에 해당되는 peak가 spectrally homogeneous하다는 사실을 암시한다 (Appendix 22).

④ 100% Method 2 (HPLC)

▷ 100% HPLC Method 2의 HPLC fingerprint 에 의하여 IH901 RM의 순도를 조사한 결과 다른 유기화합물에 기인된 피크는 관찰되지 않았다 (Appendix 23). Appendix 23에 첨부된 바와 같이 HPLC method 2는 IH901 RM을 분석 할 수 있는 해상력이 뛰어난 방법이다. 이러한 HPLC 조건은 본 방법의 선택성이 뛰어나다는 사실을 대변한다 하겠다. HPLC peak purity 역시 비색법 (흡광도 분석)을 통하여 수행하였다. 산출한 peak purity value (purity angle = 10.070; 0.400)는 역치인 16.412; 0.457) 보다 낮았으며 이러한 결과

는 IH901 RM에 해당되는 peak가 spectrally homogenous하다는 사실을 암시한다 하겠다 (Appendix 24).

⑤ 100% Method 3 (HPLC)

▷ 100% HPLC Method 3의 HPLC fingerprint 에 의하여 IH901 RM의 순도를 조사한 결과 다른 유기화합물에 기인된 피크는 관찰되지 않았다 (Appendix 25). 그러나 evaporative light scattering detector (ELSD, Sedex model 55, SEDERE, Alfortville, France)를 이용한 분석법은 ginsenosides와 같이 UV검출기에서 민감도가 낮은 유기화합물 특히 배당체 정량 분석에 유리하다 하겠다.

▷ Kwon 등(Appendix 26)은 비교적 극성이 낮은 ginsenoside의 정량분석법으로 역상 칼럼을 이용한 ELSD 분석법을 제시하였으나 본 실험에서는 이미 HPLC방법 1과 2가 역상 칼럼을 이용하는 방법이었으므로 3번째 HPLC방법으로는 ginsenosides의 정량분석에 흔히 사용되는 순상의 carbohydrate column을 사용하였다. 그 결과 IH901 RM은 Rt 7.01분에 출현하였으며 다른 인삼사포닌 유래 피크는 관찰되지 않았다. 이로써 IH901 RM은 HPLC 방법 3에서도 역시 순수하다는 사실을 확인할 수 있었다.

⑥ Water content (수분 함량)

▷ IH901 RM의 수분 함량은 대한약전 26의 칼 피셔 수분 측정법에 따라 micro-scale로 조사하였다. IH901 RM의 수분 함량은 0.583% 인 것으로 나타났다 (Appendix 28).

⑦ Residual solvent content (잔류 용매 함량)

▷ IH901 RM은 최종적으로 재결정하는데 초순수 증류수를 사용하였으므로 잔류용매 함량을 별도로 조사하지 않았다.

⑧ Optical rotation (선광도)

▷ IH901 RM의 $[a]_D$ 값을 측정하기 위하여 JASCO P-1020 polarimeter (Tokyo, Japan; filter 589 mm, cylindrical glass cell: 10 x 100 mm)를 사용하였다. IH901 RM의 선광도를 MeOH에서 조사한 결과 (Table 29) 데이터베이스에 수록된 ginsenoside K의 $[a]_D$ 값과 유사하게 나타났다. 따라서 IH901 RM의 $[a]_D$ 값은 +39.01 (c, 1.0 in MeOH)가 정확한 것으로 사료된다.

Table 29. Optical rotation of IH901 RM

Sample No.	IH901 RM
1	+39.08
2	+38.97
3	+39.01
4	+39.07
5	+38.94
Average	+39.01

IH901 (c, 1.0 in MeOH); Analytical Equipment: JASCO P-1020 Polarimeter (Tokyo, Japan); Filter589mm, Cylindrical glass cell: 10x100mm

⑨ Thin-layer chromatographic purity test (TLC 순도 조사)

▷ IH901 RM의 또 다른 순도 확인의 수단으로 TLC fingerprint를 이용하였다 (Appendix 28). IH901 RM 5 mg을 10 ml methanol (0.5 mg/ml)에 용해하여 TLC를 수행하였으며 이때 TLC fingerprint 조사 조건은 다음과 같다.

Stationary phase: HPTLC plate with silica gel 60 F₂₅₄(20×20cm)
Mobile phase: CHCl₃-MeOH-D/W(9:3:1,v/v/v, lower phase)
Applied volume: 10 µl, 20 µl
Developing distance: 10 cm
Impregation: spray with 20% sulfuric acid,
heated at 115°C/15 min
Detection: pinkish band appears at R_f value approximately 0.42

▷ 상기 조건에서의 IH901 RM의 R_f value는 0.42이었다. TLC fingerprint에서는 다른 ginsenosides의 오염에 기인되는 밴드는 관측되지 않았다.

(라) 함량 조사

① 서론

▷ IH901 RM의 함량 분석은 100% HPLC method에 의거 3가지 다른 HPLC systems을 이용하여 수행하였다. 방법 3은 방법 1과 2와는 전개용매, 칼럼 수지의 종류 및 검출기가 전혀 다른 방법이다. 3가지 방법 모두 ICH 가이드라인인 “Validation of analytical procedure: methodology (Appendix 29)”에서 요구하는 선택성, 정밀도, 직선성 및 정확성 면에서 적합성(validation)이 검증되었다.

② HPLC 100% 분석법 1 (용매 구매법1)에 의한 함량 분석

㉠ IH901 RM의 표준 물질 용액 조제

▷ 총 10 mg의 IH901 RM을 10 ml (1,000 mg /ml)의 HPLC 급 methanol에 용해한 다음 2배씩 희석하여 최종 농도가 62.5 mg/ml가 될 때까지 5단계 희석하였다.

㉡ HPLC 100% 분석법1의 분석 조건

Equipment : Hewlett Packard 1100
Column : C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm, Waters symmetry®
Detector : UV/VIS detector 203 nm
Integrator : Chemstation for LC 3D
Temperature : room temperature
Injection volume : 20 µl
Mobile phase A: acetonitrile
B: water

Flow rate : 1.6 ml/min
 Pump program : gradient system

Flow rate [ml/min]	Time [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1.6	10	20	80
1.6	40	32	68
1.6	50	42	58
1.6	60	45	55
1.6	78	75	25
1.6	80	100	0

㉔ HPLC 100% 분석법 1의 결과

▷ IH901 RM의 함량 분석을 위하여 100% HPLC method를 이용하였다. 본 방법에 있어서 함량 값은 “100%”와 “협잡물의 합”과의 차를 결정하는 것이다. 상기 HPLC 조건하에서 IH901 RM에 상당하는 피크는 71.09분에 출현하였다 [Appendix 30]. 또한 오염된 유기물에 기인된 피크는 관측되지 않았다. 본 실험 방법으로 6회 반복 분석을 통하여 IH901 RM의 함량을 분석한 결과 함량은 100%인 것으로 나타났다. 6회 반복 분석에서 나타난 각각의 적분치 값은 정밀도 (Table 30)에 나타나 있다. HPLC 100% method 1에서는 IH901 RM이 해상력이 우수하게 검출되므로 본 방법은 선택성이 뛰어나다고 할 수 있다.

㉕ HPLC 100% 분석법1의 적합성

▷ 본 분석 방법의 선택성을 확인하기 위하여 이동상에 대한 blank와 용매 도입에 이용된 운반체에 대한 HPLC fingerprint를 조사하였다 (Appendix 31). 크로마토그램에서 IH901 RM에 상당하는 피크는 전적으로 IH901 RM에서만 기인되었음을 알 수 있었다. Peak purity를 조사한 결과 피크는 spectrally homogenous 하다는 사실을 알 수 있었다 (Appendix 22).

▷ 0.5 mg/ml 농도의 시료를 가지고 6 반복 실험을 통하여 얻은 함량 값으로 정밀도 (precision; repeatability, Table 30)를 조사한 결과 피크의 평균 적분치는 2998.23 ± 45.364 였으며 함량은 100%였다.

Table 30. Precision of HPLC 100% method 1 for IH901 RM reference material

Measurement	Peak areas	Content (%)
1	3012.0	100
2	2958.1	100
3	2974.1	100
4	3074.6	100
5	2955.8	100
6	3014.8	100
Peak area mean	2998.23 ± 45.364	

Mean value: 100%

Standard deviation: ---

Variation coefficient: ---
 Confidence interval of the mean value (n=6, P=95%): ---
 Found IH-901 (ginsenoside K)content: 100%

▷ 상기 HPLC 조건하에서 IH901 RM을 1 mg/ml ~ 0.0625 mg/ml (two-fold dilution) 농도 범위에서 5개 농도의 피크 적분치에 대한 직선성을 조사한 결과는 (Appendix 32)와 같다 (Table 31).

Table 31. Linearity of gradient method 1 for IH901 reference material

Concentration IH901 RM [mg/ml]	Peak areas
0.0625	395.911
0.1250	783.149
0.2500	1617.896
0.5000	3086.799
1.0000	5877.022

▷ 본 방법의 경우 조사한 농도 범위 즉, 0.0625 mg/ml ~ 1.000 mg/ml에서 직선성이 양호하다는 사실을 재확인 할 수 있었다. 검량선의 방정식은 $Y = 5874.7157A + 63.08576$ 로서 상관계수 $R^2=0.99951$ 였으며 Y는 피크 면적, A는 IH901 RM의 농도[ppm]를 의미한다. 상기 농도 범위에서 본 방법으로 함량을 분석할 경우 높은 상관계수가 말해 주듯이 직선성이 양호하다 하겠다.

▷ “Validation of analytical procedures: methodology (Appendix 29)”에서 규정한 국제조화위원회 (ICH)의 가이드라인 (Section 4.1.1 c)에 의하면 함량분석법의 정확성은 정밀도, 직선성 및 선택성이 충족되어야 한다고 되어 있다. HPLC method 1은 이와 같은 요구사항을 충족시킨다고 할 수 있다. 따라서 본 방법은 IH901 RM의 정량법으로 적합하다는 사실을 입증한다.

③ HPLC 100% 분석법2 (용매 구매법 2)에 의한 함량 분석

㉠ IH901 RM의 표준 용액 조제

▷ 총 10 mg의 IH901 RM을 10 ml (1,000 mg /ml)의 HPLC 급 methanol에 용해한 다음 2배씩 희석하여 최종 농도가 62.5 mg/ml가 될 때까지 5단계 희석하였다.

㉡ HPLC 100% 분석법2의 분석 조건

Equipment : Hewlett Packard 1100
 Column : C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm, Waters symmetry®
 Detector : UV/VIS detector 203 nm
 Integrator : Chemstation for LC 3D
 Temperature : room temperature
 Injection volume : 20 μl
 Mobile phase : A: acetonitrile containing 0.1% HCOOH

B: water containing 0.1% HCOOH

Flow rate : 1.6 ml/min

Pump program : gradient system

Flow rate [ml/min]	Time [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1.6	10	20	80
1.6	40	32	68
1.6	50	42	58
1.6	60	45	55
1.6	78	75	25
1.6	80	100	0

㉔ HPLC 100% 분석법 2의 결과

▷ IH901 RM의 함량 분석을 위하여 100% HPLC method를 이용하였다. 본 방법에 있어서는 함량의 값은 “100%”와 “협잡물의 합”과의 차를 결정하는 것이다. 상기 HPLC 조건하에서 IH901 RM에 상당하는 피크는 70.61분에 출현하였다 [Appendix 33]. 또한 오염된 유기물에 기인된 피크는 관측되지 않았다. 본 실험 방법으로 6회 반복 분석을 통하여 IH901 RM의 함량을 분석한 결과 함량은 100%인 것으로 나타났다. 6회 반복 분석에서 나타난 각각의 적분치 값은 정밀도 Table 32에 나타났다. HPLC 100% method 2에서는 IH901 RM이 해상력 뛰어나게 검출되므로 본 방법은 선택성이 뛰어나다고 할 수 있다.

㉕ HPLC 100% 분석법 2의 적합성

▷ 본 분석 방법의 선택성을 확인하기 위하여 이동상에 대한 blank와 용매 도입에 이용된 운반체에 대한 HPLC fingerprint를 조사하였다 (Appendix 33). 크로마토그램에서 IH901 RM에 상당하는 피크는 전적으로 IH901 RM에서만 기인되었음을 알 수 있었다. Peak purity를 조사한 결과 피크는 spectrally homogeneous 하다는 사실을 알 수 있었다 (Appendix 24).

▷ 0.5 mg/ml 농도의 시료를 가지고 6 반복 실험을 통하여 얻은 함량 값으로 정밀도 (precision; repeatability)를 조사한 결과 피크의 평균 적분치는 2977.237 ± 41.776 였으며 함량은 100%였다 (Table 32).

Table 32. Precision of HPLC 100% method 2 for IH901 reference material

Measurement	Peak areas	Content (%)
1	3018.10	100
2	2965.90	100
3	3018.20	100
4	2912.43	100
5	2951.66	100
6	2997.13	100
Peak area mean	2977.237 ± 41.776	

Mean value: 100%

Standard deviation: ---

Variation coefficient: ---
 Confidence interval of the mean value (n=6, P=95%): ---
 Found IH-901 (ginsenoside K)content: 100%

▷ 상기 HPLC 조건하에서 IH901 RM을 1 mg/ml ~ 0.0625 mg/ml (two-fold dilution) 농도 범위에서 5개 농도의 피크 적분치에 대한 직선성을 조사한 결과는 (Appendix 35)와 같다 (Table 33).

Table 33. Linearity of gradient method 2 for IH901 reference material

Concentration IH901 RM [mg/ml]	Peak areas
0.0625	374.476
0.1250	790.136
0.2500	1632.060
0.5000	3122.034
1.0000	5933.327

▷ 본 방법의 경우 조사한 농도 범위 즉, 0.0625 mg/ml ~ 1.000 mg/ml에서 직선성이 양호하다는 사실을 확인시켜 주었다. 검량선의 방정식은 $Y = 5933.590A + 64.228$ 로서 상관계수 $R^2=0.99945$ 였으며 Y는 피크 면적, A는 IH901 RM의 농도 [ppm]를 나타낸다. 상기 농도 범위에서 본 방법으로 함량을 분석할 경우 높은 상관계수가 말해 주듯이 직선성이 양호하다 하겠다.

▷ “Validation of analytical procedures: methodology (Appendix 29)”에서 규정한 국제조화위원회 (ICH)의 가이드라인 (Section 4.1.1 c)에 의하면 함량분석법의 정확성은 정밀도, 직선성 및 선택성이 충족되어야 한다고 되어 있다. HPLC method 2는 이와 같은 요구사항을 충족시킨다고 할 수 있다. 따라서 본 방법은 IH901 RM의 정량법으로 적합하다는 사실을 입증한다.

④ HPLC 100% method 3 (용매 구배법 3)에 의한 함량 분석

㉠ IH901 RM의 표준 용액 조제

▷ 총 10 mg의 IH901 RM을 10 ml (1,000 mg/ml)의 HPLC 급 methanol에 용해한 다음 2배씩 희석하여 최종 농도가 62.5 mg/ml가 될 때까지 5단계 희석하였다.

㉡ HPLC 100% 분석법3의 분석 조건

Equipment: Waters Alltech Model ELSD 2000
 Integrater: Breeze
 Column: Alltech Prevail Carbohydrate ES column (p/n 35101)
 Mobile phase A: acetonitrile/H₂O/isopropyl alcohol=80/5/15
 B: acetonitrile/H₂O/isopropyl alcohol=80/15/15
 Flow rate: 1.0 ml/min
 Temperature: room temperature

Injection volume: 10 μ l
 Detector: Alltech ELSD 2000 (gain 8)
 Gas flow rate: 2.0 SLPM
 Drift Tube Temp: 90°C
 Pump program: gradient system

Flow rate [ml/min]	Time [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
1.0	0	75	25
1.0	28	15	85
1.0	35	20	80
1.0	45	25	75
1.0	50	10	90
1.0	51	0	100

㉔ HPLC 100% 분석법3의 결과

▷ IH901 RM의 또 다른 함량 분석법으로 HPLC 100% method 3을 이용하였으며 본 방법에 있어서도 함량의 값은 “100%”와 “협잡물의 합”과의 차를 결정하는 것이다. 상기 HPLC 조건하에서 IH901 RM에 해당하는 피크는 7.03분에 출현하였다 [Appendix 36]. 또한 오염된 유기물에 기인된 피크는 관측되지 않았다. 본 실험 방법으로 6회 반복 분석을 통하여 IH901 RM의 함량을 분석한 결과 함량은 100%인 것으로 나타났다. IH901 RM에 해당하는 피크는 좌우 대칭으로 불순물에 기인한 어깨 (클립 현상)가 관측되지 않았다. 6회 반복 분석에서 나타난 각각의 적분치 값은 정밀도 (Table 34)에 나타났다.

㉕ HPLC 100% 분석법 3의 적합성

▷ 본 분석 방법의 선택성을 확인하기 위하여 이동상에 대한 blank와 용매 도입에 이용된 운반체에 대한 HPLC fingerprint를 조사하였다 (Appendix 36, 37). 크로마토그램에서 IH901 RM에 해당하는 피크는 전적으로 IH901 RM에서만 기인되었음을 알 수 있었다 (Appendix 36). 0.5 mg/ml 농도의 시료를 가지고 6 반복 실험을 통하여 얻은 함량 값으로 정밀도 (precision; repeatability)를 조사한 결과 피크의 평균 적분치는 1352232 ± 138208.4 였으며 함량은 100%였다 (Table 34).

Table 34. Precision of 100% method 3 of IH901 reference material

Measurement	Peak areas	Content (%)
1	1384977	100
2	1321075	100
3	1526536	100
4	1229368	100
5	1478331	100
6	1173105	100
Peak area mean	1352232 ± 138208.4	

Mean value: 100%
 Standard deviation: ---
 Variation coefficient: ---

▷ 순합량 계산을 위한 공식: $[100.00\% - \text{수분 함량}(\%) - \text{잔류 용매 함량}(\%)] \times \text{HPLC 순도}(\%) / 100$

▷ 결론적으로 (주)일화가 제조한 IH901표준물질의 순합량 (mass balance)은 99.417%임을 증명한다.

※ Appendix 1~38 (첨부자료 참고)

1. Picture of *Panax ginseng* C.A. Meyer
2. Literature cited for the documentation of reference material
3. Physico-chemical information for IH-901 obtained from D/B
4. ^1H NMR spectrum of IH-901 reference material
5. ^{13}C NMR spectrum of IH-901 reference material
6. ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of IH-901 reference material
7. $^1\text{HMQC}$ NMR spectrum of IH-901 reference material
8. HMBC spectrum of IH-901 reference material
9. NOESY spectrum of IH-901 reference material
10. Reference literature for NMR assignment of IH-901
11. FT-IR spectrum for IH-901 reference material
12. Reference literature for IR spectrum of IH-901RM
13. HPLC/MS spectrum for IH-901RM (positive mode)
14. HPLC/MS spectrum for IH-901RM (negative mode)
15. Reference literature for LC/Mass spectrum of IH-901RM
16. HR-FAB/MS spectrum for IH-901RM (positive mode)
17. HR-FAB/MS spectrum for IH-901RM (negative mode)
18. Elemental composition determined by HR-FAB/MS
19. UV spectrum for IH-901RM
20. UV spectrum of the peak corresponding to IH-901RM in HPLC photodiode array system
21. HPLC fingerprint 1 for IH-901 reference material
22. Peak purity analysis for IH-901 reference material in HPLC system 1
23. HPLC fingerprint 2 for IH-901 reference material
24. Peak purity analysis for IH-901 reference material in HPLC system 2
25. HPLC fingerprint 3 for IH-901 reference material
26. Reference literature for the LC separation of less polar ginsenosides
27. Reference literature for optical rotation of IH-901RM
28. TLC fingerprint for IH-901RM
29. ICH guideline for validation of analytical procedure: methodology
30. HPLC fingerprint 1 for IH-901RM
31. HPLC fingerprint of test material solvent for IH-901RM
32. Standard curve for IH-901RM in HPLC method 1

- 33. Chromatogram of HPLC 100% method 2 for IH-901RM
- 34. HPLC fingerprint 2 of test material solvent for IH-901RM
- 35. Standard curve for IH-901RM in HPLC 100% method 2
- 36. Chromatogram of HPLC 100% method 3 for IH-901RM
- 37. HPLC fingerprint 3 of test material solvent for IH-901RM
- 38. Standard curve for IH-901RM in HPLC 100% method 3

(5) Validation 정량분석법 확립

(가) 전처리 및 기기 분석

① 시료 추출 방법

▷ GINST 시료 1.00 g을 정확히 취하여 10 mL 3차 증류수에 녹인 다음, 8 mL 부탄올로 3회 partition chromatography를 실시한다. 부탄올 층은 pooling, 농축, HPLC용 메탄올에 용해한 다음 0.45 µm millipore filter로 여과하여 시험액으로 사용한다.

② HPLC/DAD 기기 분석

▷ 분석을 위해 사용한 HPLC column은 C18 (Supelco 4.6 mm × 250 mm, 5 µm)이다. 이 동상으로는 water (A) 와 acetonitrile (B)을 사용하였으며 1.6 mL/min의 유속으로 시료 20 µL를 주입하여 구배 (gradient) 조건으로 분석하였고, 정성 및 정량을 위해 사용한 HPLC/DAD 분석 조건은 Table 36과 같다.

Table 36. HPLC gradient condition

Column	Supelco C18 (4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 µm), 또는 동등한 칼럼		
Mobile Phase	A: water		
	B: acetonitrile		
Gradient condition	time (min)	Mobile phase (%)	
		A	B
	0	80	20
	10	80	20
	40	68	32
	48	58	42
	60	55	45
	78	25	75
	80	0	100
Flow rate	1.6 mL/min		
column temperature	room temperature		
Injection volume	20 µL		
Detector	203 nm (DAD 190~ 400 nm)		

(나) 분석법 검증

① 검출한계 및 정량한계 (LOD & LOQ)

▷ Compound K의 검출 및 정량 한계를 측정하는 것은 분석에 대한 정확도를 크게 향상 시키기 위함이며, 해당 분석법을 위해 검출 및 정량 한계를 측정하였다. Compound K의 LOD (Limit of detection)는 13.03 mg/mL, LOQ (Limit of Quantification)는 39.48 mg/mL로

나타났다.

② 특이성

▷ C18 컬럼을 이용하여 compound K의 분리능을 확인하였으며 상기 조건에서 $R \geq 2.0$ 으로 신뢰도는 매우 양호하였다. Rt는 66.735분이었으며, 해당 물질 피크 정점에서의 DAD 스펙트럼을 조사한 결과 최대흡광도 파장은 203 nm였고 이러한 특성은 표준물질과 동일하다는 사실을 알 수 있었다.

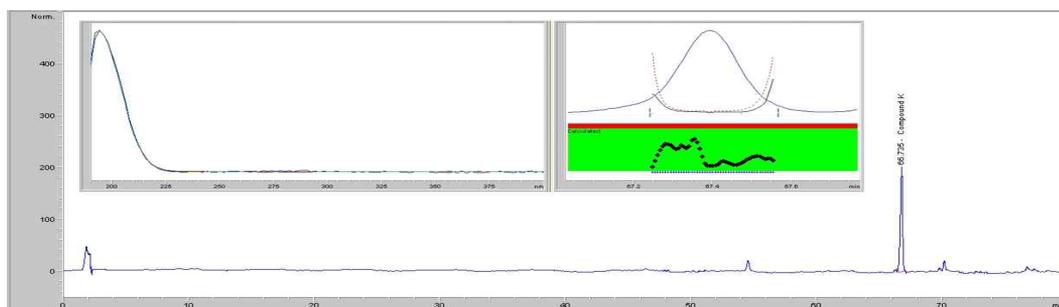


Fig. 49. HPLC chromatogram of compound K.

③ 직선성(Linearity)

▷ Linearity를 조사하기 위하여 CK 함량 2.0~0.125 mg/mL 범위내에서 2-fold dilution법을 이용하여 표준곡선(standard curve)을 작성하였다(Fig. 50). 시험 결과 검량선의 R^2 값은 0.99966으로 매우 높은 수준의 유의성을 보였다. 따라서, 이 농도 범위를 정량분석 가능 범위로 설정하였다.

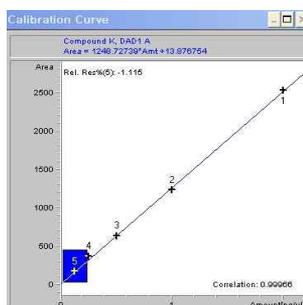


Fig. 50. Linearity of compound.

④ 정밀성

▷ 정밀성을 확인하기 위하여 반복시험의 재현성(repeatability)과 분석일자별 정밀성(intermediate precision)을 측정하였다.

㉠ 재현성(repeatability)

▷ 반복시험의 재현성은 시험농도의 100%에 해당하는 농도 3개 (0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL)를 분석법의 전조작을 3회 반복 측정하였으며 RSD는 각각 1.40, 0.66, 0.31%로 나타났다.

Table 37. Repeatability data of compound K

Treatment	0.5 mg/mL	1.0 mg/mL	2.0 mg/mL
1	104.1	198.1	412
2	103.9	199.1	412.1
3	101.5	196.5	415.3
Mean (peak area)	103.17	197.9	412.8
S.D.	1.45	1.31	1.3
RSD (%)	1.40	0.66	0.31

㉔ 분석일자별 정밀성(intermediate precision)

▷ 분석일자를 달리하였을 때의 정밀성(intermediate precision)을 확인하기 위하여 시험농도의 100% HPLC peak area에 해당하는 농도 (1.0 mg/mL)를 제조하여 4°C 냉장고에서 보관하면서 0, 24, 48 시간 지난 다음 3회 반복 조작하여 측정된 %RSD의 결과는 0.66, 0.28, 2.37%로 나타났다.

Table 38. Intermediate precision data of compound K

Treatment	0 Hour	24 Hour	48 Hour
1	198.1	196.3	199.2
2	199.1	195.2	190.1
3	196.5	195.7	196.1
Mean	197.9	195.73	195.13
Inter-day SD	1.31	0.55	4.62
Inter-day RSD(%)	0.66	0.28	2.37

㉕ 정확성(Accuracy)

▷ Spiking/recovery 방법으로 compound K 분석법의 정확성을 평가하였다. 표준용액의 검량선 범위 이내의 compound K를 각각 0.5, 1.0, 2.0 mg/g 씩 가하고 동일한 전처리 과정을 거쳐 검량함으로써 회수율을 측정하였다. 표준물질을 가한 질량에 따른 회수율을 비교한 결과 95.59, 100.37, 101.88%의 회수율을 보였으며, %RSD는 각각 1.36, 1.10, 0.79%로 나타났다.

Table 39. Accuracy data of compound K

Treatment	Recovery (%)		
	0.5 mg/g	1.0 mg/g	2.0 mg/g
1	95.7	101.3	101.9
2	96.8	100.7	101.0
3	94.2	99.1	102.6
Mean	95.59	100.37	101.88
S.D.	1.30	1.11	0.80
RSD (%)	1.36	1.10	0.79

(6) 잔류농약 불검출 제품 생산을 위한 연구

▷ 시중에서 쉽게 구할 수 있는 식용유 6종(대두유, 카놀라유, 옥수수유, 포도씨유, 올리브유, 해바라기씨유)를 이용하여 「Si-Kwan Kim et al., Two-phase partition chromatography using soybean oil eliminates pesticide residues in aqueous ginseng extract, *J. Chromatography A*. 1042: 163-168 (2004)」에 발표하였던 방법으로 기존 대두유의 단점(맛과 냄새 변화) 보완을 시도하였다.

(가) 6종 식용유의 잔류농약 제거 효율

▷ 32종의 농약을 분석기기의 종류, GC와 HPLC에서의 Rt 값, 검출기 종류 등을 감안하여 4개 그룹으로 나누고 각각의 농약을 고품분 함량 10%인 인삼추출물(10 mL)에 최종농도가 2.0 ppm 정도가 되도록 spiking하였다. 농약이 첨가된 인삼추출물에 6종의 식용유를 각각 7 mL씩 첨가한 다음 vortexing, spinning하여 식용유층과 인삼추출물 층을 분리하였다. 각각의 층에 대해서는 잔류농약 분석을 위한 전처리 과정을 거친 다음 다중분석법에 따라 GC (ECD/NPD) 혹은 HPLC로 정량분석함으로써 회수율을 조사하였다. 회수율은 대두유 100.40 ± 11.47 %, 카놀라유 96.45 ± 11.57 %, 옥수수유 88.89 ± 15.75 %, 포도씨유 95.67 ± 15.27 %, 올리브유 84.26 ± 11.79 %, 해바라기씨유 93.36 ± 13.67 % 로 대두유가 가장 높은 제거율을 보였으며, 다음으로 카놀라유, 포도씨유, 해바라기씨유, 옥수수유, 올리브유 순으로 나타났다(Table 40).

Table 40. Recovery of pesticide residues in the oil phase by 6 different vegetable oils.

Pesticides Group	Recovery		Soybean	Canola	Corn	Grape	Olive	Sunflower
	Retention Time							
Organophosphorus	Chlorothalonil	7.875	82.01	77.10	65.69	94.30	75.68	89.58
	Dieldrin	10.99	94.39	109.29	86.97	98.30	96.82	94.81
	Tolclofos-methyl	8.97	90.14	91.38	95.23	87.07	79.35	108.54
	Average		88.85	92.59	82.63	93.22	83.95	97.64
	SD		6.29	16.13	15.24	5.69	11.30	9.79
Organochlorides	PCNB	7.342	100.40	95.62	73.01	96.48	79.23	94.14
	PCTA	7.397	82.30	77.39	77.54	74.24	68.59	71.64
	PCA	7.511	99.68	88.64	80.80	100.93	84.15	81.90
	DDE	10.807	112.93	95.68	105.97	109.73	100.25	102.63
	Endrin	11.315	96.64	90.11	103.94	106.34	67.43	112.83
	DDD	11.533	112.50	107.66	94.95	125.78	78.78	103.35
	DDT	13.270	102.99	103.1	99.48	77.3	70.47	82.33
	a-BHC	6.836	96.16	108.12	94.54	96.85	100.27	102.52
	b-BHC	7.242	97.75	101.74	71.80	97.71	75.68	92.62
	r-BHC	7.367	108.06	106.88	89.40	96.22	90.12	93.04
	d-BHC	7.735	86.86	93.83	77.66	84.56	82.95	81.35
	Aldrin	9.175	86.98	65.29	62.90	79.01	78.51	70.62
	Average		98.60	94.51	86.00	95.43	81.37	90.75

	SD		9.82	12.94	13.95	14.92	10.99	13.33
Carbamates	Diethofencarb	9.495	104.11	106.38	98.29	70.92	87.70	105.45
	Carbosulfan	13.893	109.87	109.21	92.68	87.99	103.01	106.62
	Carbofuran	12.732	104.42	100.42	85.05	119.75	75.97	101.22
	Average		106.13	105.34	92.01	92.89	88.89	104.43
	SD		3.24	4.49	6.65	24.78	13.56	2.84
Pyrethroids	Tefluthrin	7.696	100.95	97.76	101.99	106.04	73.80	100.92
	Cyfluthrin	15.924	119.82	90.36	69.73	114.87	82.90	81.32
	Bifenthrin	13.082	103.05	97.89	85.83	86.61	98.96	106.32
	Average		107.94	95.34	85.85	102.51	85.22	96.19
	SD		10.34	4.31	16.13	14.46	12.74	13.15
Triazoles	Hexaconazole	11.125	96.12	90.81	85.42	86.22	84.45	89.69
	Flusilazole	11.442	79.07	77.76	76.27	72.93	74.49	75.51
	Fluquinconazole	15.925	102.38	104.58	94.64	100.73	80.00	109.53
	Average		92.52	91.05	85.44	86.63	79.65	91.58
	SD		12.06	13.41	9.19	13.90	4.99	17.09
Pyrimidines	Cyprodinil	10.106	106.30	97.99	60.07	87.98	66.24	76.48
	Pyrimethanil	15.263	129.89	112.77	84.09	117.14	95.77	110.93
	Average		118.10	105.38	72.08	102.56	81.01	93.71
	SD		16.68	10.45	16.98	20.62	20.88	24.36
Strobilurins	Kresoxim-methyl	11.472	106.94	98.31	101.63	84.92	112.03	84.89
	Pyraclostrobin	17.723	88.94	84.70	80.07	79.80	81.59	76.14
	Average		97.94	91.51	90.85	82.36	96.81	80.52
	SD		12.73	9.62	15.25	3.62	21.52	6.19
Morpholines	Dimethomorph	14.448	119.03	109.06	116.88	113.55	98.79	77.24
	Average		119.03	109.06	116.88	113.55	98.79	77.24
	SD		27.92	25.41	28.68	10.60	17.08	20.80
Cyclohexenoxims	Sethoxydim	19.756	91.59	109.01	116.11	84.78	73.77	79.02
	Average		91.59	109.01	116.11	84.78	73.77	79.02
	SD		26.97	13.26	25.32	21.94	22.56	27.12
Amides	Cyazofamid	17.015	102.75	103.57	125.98	126.16	80.72	115.64
	Methalaxyl	10.487	97.72	84.09	90.00	96.17	97.77	108.70
	Average		100.24	93.83	107.99	111.17	89.25	112.17
	SD		3.56	13.77	25.44	21.21	12.06	4.91
Total average			100.40	96.45	88.89	95.67	84.26	93.36
Total SD			11.47	11.57	15.75	15.27	11.79	13.67

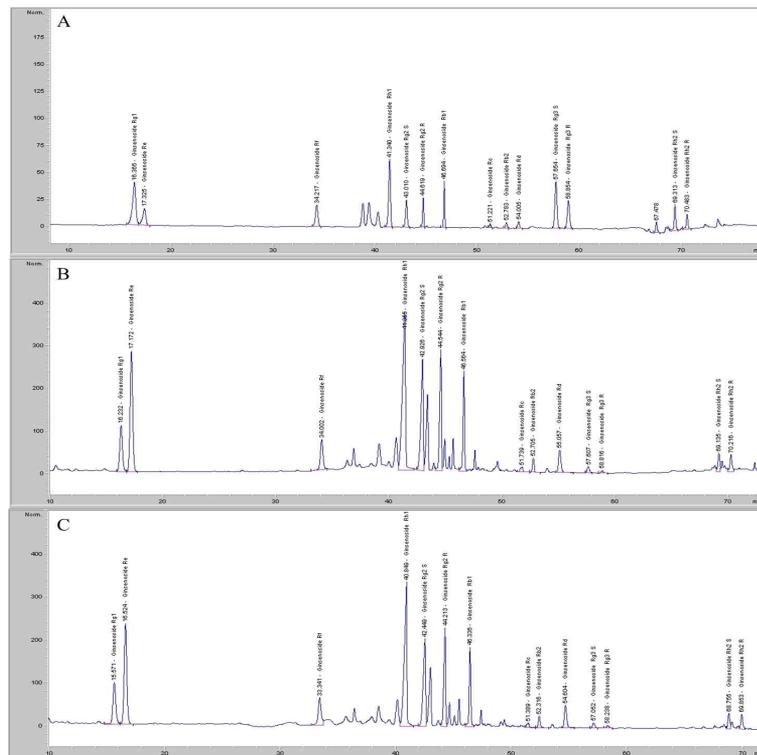


Fig. 53. HPLC ginsenoside profiles in aqueous ginseng extract layer before and after canola oil treatment. A: 14 standard ginsenosides, B: ginsenosides profile in ginseng extract layer before oil treatment, C: ginsenosides profile in ginseng extract layer after oil treatment.

(다) 관능검사

▷ 잔류농약 제거를 위한 가장 적합한 식용유를 선택하기 위해 관능검사(맛과 향), 사포닌 유실을 및 가격을 항목으로 하여 상대평가를 실시하였다. 평가는 최고점 6점, 최하점 1점을 부여하였다. 6종의 식용유별 평가 점수는 Table 41에 정리하였다. 제거 효율 면에서는 대두유가 최고점을 받았으나, 맛과 향의 변화로 인해 비교적 낮은 19점을 획득하였다. 모든 항목의 점수를 집계한 결과, 카놀라유(29점), 해바라기씨유, 포도씨유, 대두유, 옥수수유, 올리브유 순으로 나타났다.

Table 41. Value evaluation of the oil as a pesticide residue elimination vehicle

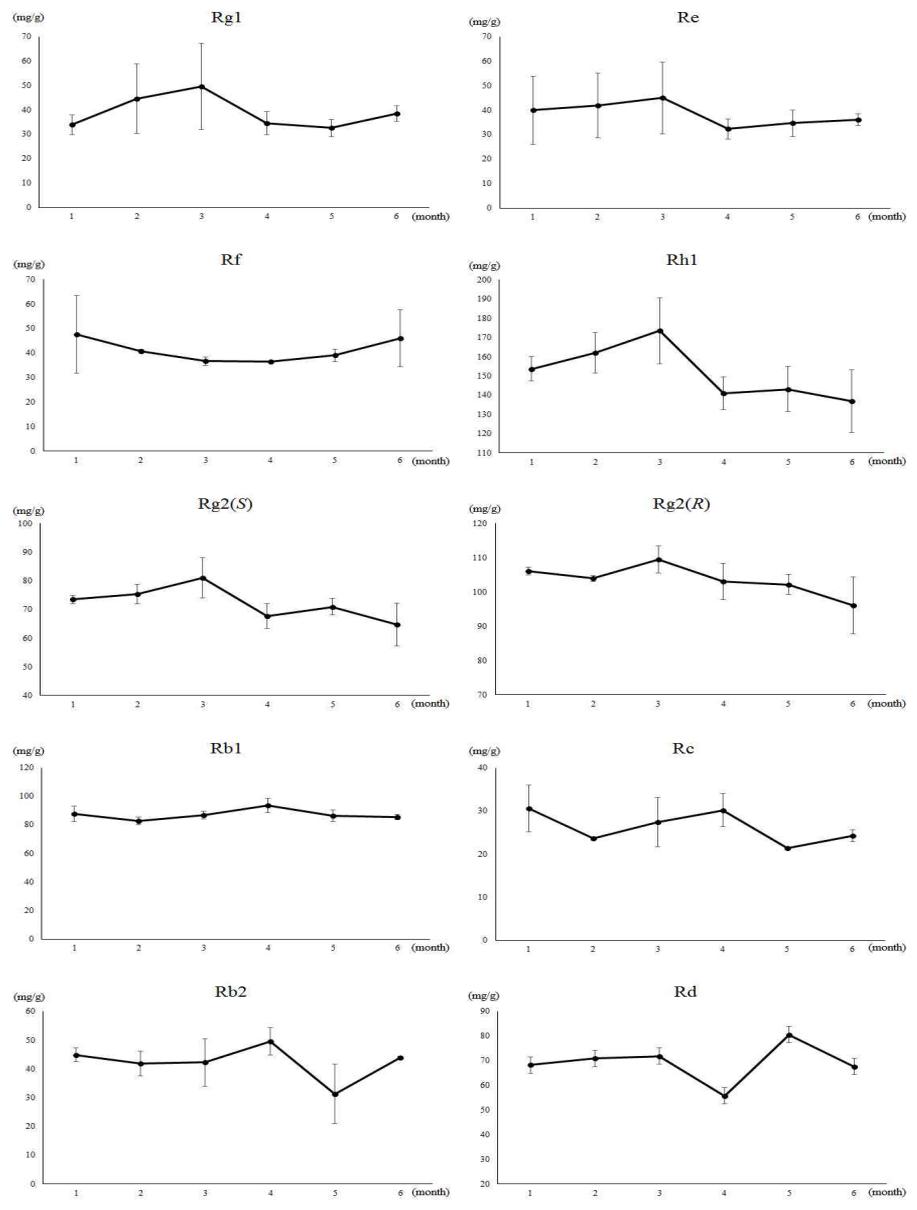
Parameter	Oil					
	Soybean	Canola	Sunflower	Grape	Corn	Olive
<i>Elimination efficiency</i>	6	5	3	4	2	1
<i>Organoleptic factor</i>						
-smell	1	6	4	5	2	3
-taste	1	6	5	4	3	2
<i>Loss of ginsenosides</i>	6	6	6	6	6	6
<i>Price</i>	5	6	3	2	4	1
Total score	19	29	21	21	17	13

Score was given by evaluating the relative rank of the six oils. An oil with best results obtained a score of “6,” but the lowest grade received score “1”. Score “6” was given to all of the oils employed because none of the oils influenced the loss of ginsenosides profiles by oil treatment.

(7) 안정성 시험

(가) Accelerated (학대) 조건하에서의 개별 ginsenosides 함량 분석

▷ 제품의 저장 기간(shelf-life, expiry date) 설정을 위해 accelerated 조건에서 저장하면서 월 1회, 6개월간 12종의 ginsenosides의 함량을 분석하였다(Fig. 54).



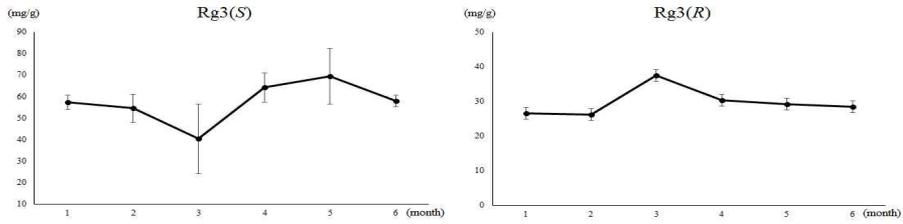
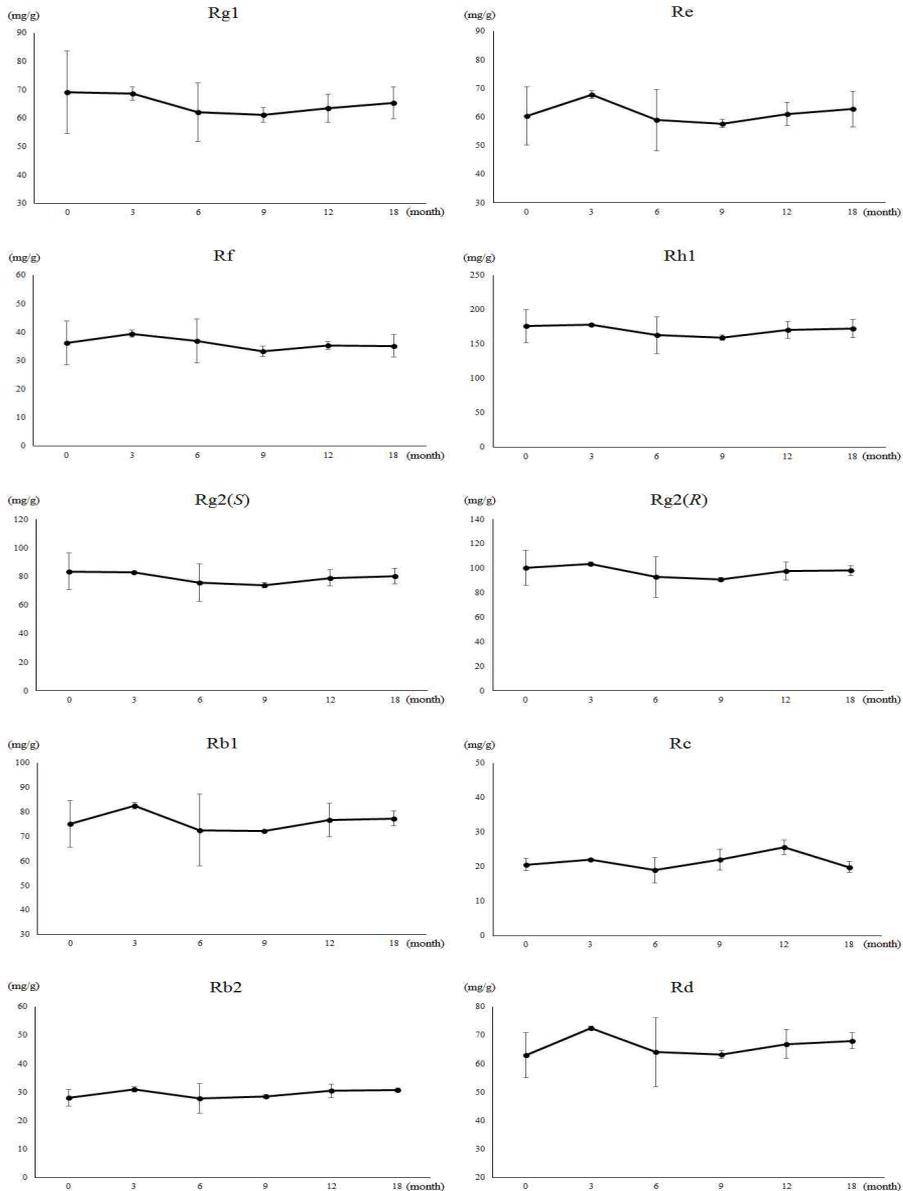


Fig. 54. Change of ginsenosides contents in the accelerated storage conditions.

(나) Real-time 조건에서의 ginsenosides 함량 분석

▷ 제품의 저장 기간(shelf-life, expiry date) 설정을 위해 상온(25°C)에서 저장하면서 첫해는 3개월 단위로, 2년차에는 6개월간 단위로, 3년차에는 1년 단위로 12종의 ginsenosides의 함량을 분석하였다(Fig. 55).



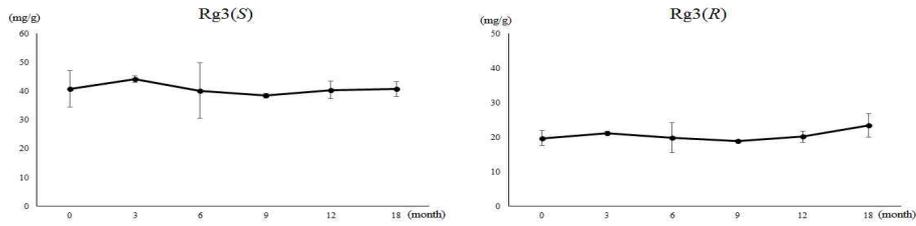


Fig. 55. Real time change of ginsenosides content in room temperature storage conditions.

(다) 지표물질의 조건별 함량 비교

▷ 두 조건 모두에서 compound K는 유의한 함량 변화가 없는 것으로 보아 3년이라는 저장기간을 설정하는 것은 문제가 되지 않을 것으로 사료된다.

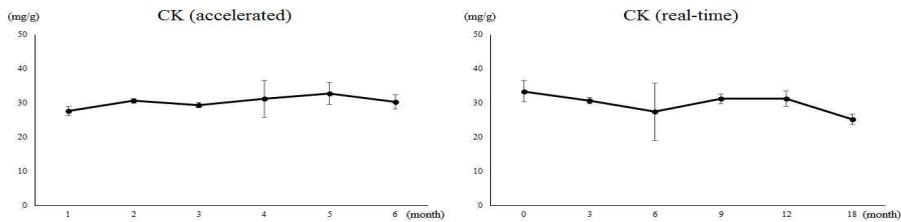


Fig. 56. Contents of compound K in the accelerated and real-time conditions.

(라) 수분함량 비교

▷ 두 조건 모두에서 수분 함량은 30% 내외로서 저장기간 내내 변화가 없는 것으로 나타남에 따라 3년이란 저장기간 설정에는 문제가 없을 것으로 사료됨.

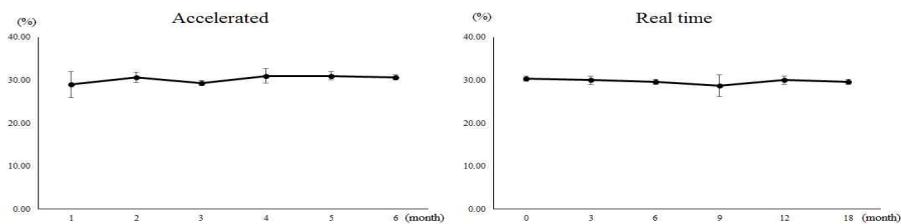


Fig. 57. Contents of moisture in the accelerated and real-time storage conditions.

(8) 사업화성과 및 매출실적

(가) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	5억원
	시장	관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	5억원
	개발제품	개발후 현재까지	국내 : %	

	점유율			국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

(나) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	개별인정 등록까지 3년 제품개발 및 판매 5년			
	소요예산(백만원)	300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

[제2협동 : 발효 인삼이 정액과 임신에 미치는 효과]

(1) 발효 인삼이 사람의 정액에 미치는 효과 (IRB No. 4-2014-0708)

▷ 본 연구는 GINST 제제가 남성의 가임력을 향상시키는 효과가 있는지 확인하기 위한 연구였으며, 특히 임상약의 적정 농도를 결정하기 위한 무작위 대조연구로 계획하였다.

본 연구는 2015년 2월부터 2016년 9월까지 진행되었고, 총 18명의 대상자를 screening 하여 최종 17명의 대상자가 연구에 등록되었고, 17명이 연구를 완료하였다. Clinical pregnancy rate은 47.06% (8/17) 이었으며 모두 자연임신이였다. 임신한 8명 중 저용량군 (3000mg/day)에서 3명 (3/8, 37.5%), 고용량군 (6000mg/day)에서 5명 (5/9, 55.5%)이었으며, 두 군 간 차이에 대하여 통계적 유의성은 관찰되지 않았다 ($p=0.457$).

연구 시작 당시와 12주 이후의 결과를 비교했을 때, 전체 대상자에서 serum sex hormone binding globulin의 감소 ($p=0.026$)와 삶의 질 지표 중 Brief sexual inventory가 증가 ($p=0.05$)

하였으며, 통계적 유의성은 보이지 않았으나 정액 검사의 지표 중 질 지표인 산화 스트레스 (MDA)의 감소와 sperm DNA fragmentation (Halo sperm) 의 감소, sperm morphology 개선 효과를 보였다 (Table 43).

고용량군 (6000mg/day)와 저용량군 (3000mg/day)의 GINST 투여 전 후를 비교했을 때, 저용량군에서는 삶의 질 지표(Brief sexual inventory, Fatigue severity scale)가 유의하게 개선되는 것을 볼 수 있었고, 통계적 유의성은 보이지 않았으나 혈액 검사 상 Testosterone과 free index의 증가, sex hormone binding globulin의 감소 경향을 볼 수 있었다. 정액 검사 상 정자의 운동성 및 정상 모양 비율의 증가, 질 지표인 산화 스트레스 (MDA)의 감소와 sperm DNA fragmentation (Halo sperm) 의 감소를 보였으나 역시 통계적 유의성은 보이지 않았다 (Table 44). 고용량군에서는 정액 검사의 지표 중 정자의 운동성이 유의하게 감소하였고 ($p=0.014$), 이외의 지표들은 통계적 유의성은 보이지 않았으나 질 지표인 산화 스트레스 (MDA)의 감소와 sperm DNA fragmentation (Halo sperm) 의 감소 효과를 보였다 (Table 45).

또한 정상인과 약정자증 군에서 동일한 효과를 보일지에 대하여 추가 분석을 시행하였는데 (Table 46 & 47), 약정자증 군에서 정액 검사의 지표가 대부분 개선되는 효과를 보이는 데 반해, 정상인군에서는 정자의 운동성 감소를 보였다. 그러나 이는 고용량군 대상자 중 정상인의 비율이 더 높았고, 저용량군 대상자 중 약정자증의 비율이 더 높았음을 감안해야 할 것이다.

임상약의 입고 관련으로 실제 임상 연구는 2015년 2월부터 시작하였고, 임신을 원하는 난임부부들의 참여율이 기대보다 저조하여 낮은 등록율을 보였다. 적은 n수로 인하여 통계적인 유의성을 관찰하는데 제한점이 있었으나, 고용량군에서 유의미한 정도의 정자 운동성의 감소를 보이는 점과, 저용량군에서 대부분의 정액검사 지표가 개선되는 것을 볼 때, 추후의 임상연구에서는 3000mg/day로 용량을 결정하여 진행할 것을 고려하기로 하였다. 또한 정상 부부에서 자연임신율을 10~15%/개월로 볼 때, 3개월 간 약 48%의 임신율을 보여, 임신율을 primary outcome으로 정하는 것 보다 정자의 질 지표의 개선을 primary outcome으로 변경하는 것이 나올 것으로 사료되었다.

Table 42. Baseline characteristics of participants.

	3000mg/day (n=8)	6000mg/day (n=9)	P value
Height (cm)	176±6.50	177.11±5.28	0.703
Weight (kg)	80.25±14.87	77.0±5.39	0.548
Waist Circumference (cm)	85.4±7.0	82.1±3.4	0.231
Age of partner (years)	33.5 (29-38)	32 (28-43)	0.673
Duration (months)	12 (6-60)	12 (6-24)	0.481
하루에 앉아서 일하는 시간 (Hours)	8.5±2.73	6.67±2.96	0.206
일주일에 격렬한 운동 일수 (Days)	1.5±1.85	2.44±1.81	0.305
일주일에 중등도의 운동 일수 (Days)	1.38±2.07	2.56±2.19	0.272
Smoking Hx	Never smoker	5 (62.5%)	5 (55.6%)
	Past smoker	1 (12.5%)	4 (44/4%)
	Current smoker	2 (25%)	0

Quality of life			
Brief sexual inventory	29.37±8.12	33.56±4.59	0.204
Fatigue severity scale	36.38±10.64	23.33±11.06	0.026
SF-36, Physical health (PCS)	52.03±4.551	55.70±2.48	0.051
SF-36, Mental health (MCS)	45.21±8.31	52.37±4.36	0.039
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	362.39±132.42	503.31±189.35	0.1
Sex hormone binding globulin (nmol/mL)	28.23±10.6	38.86±9.45	0.045
Free Testosterone Index (%)	45.42±8.84	44.64±8.66	0.78
Serum FSH (mIU/mL)	7.7±6.30	5.2±3.08	0.306
Serum LH (mIU/mL)	3.95±1.42	4.64±2.07	0.442
Serum AST (IU/L)	30.5±20.42	19.67±5.09	0.143
Serum ALT (IU/L)	53±59.44	24.89±9.2	0.181
Semen analysis			
Volume (mL)	2.54±0.86	2.92±1.38	0.505
Count (x10 ⁶ cells/mL)	25.56±17.68	30.47±14.83	0.543
Motility (%)	30.75±9.18	51.22±23.62	0.071
Morphology (%)	3.62±1.5	4.37±0.47	0.178
WBC count (x10 ⁶ cells/mL)	1.06±2.01	0.67±1.66	0.663
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	28.86±36.48	47.49±41.44	0.344
MDA (μM)	11.35±11.26	9.8±4.02	0.702
Halo sperm assay	30.89±9.65	29.01±11.33	0.72

Table 43. 발효 인삼 제제 투여 전과 후의 비교 (대상자 전체)

	투여 전 (n=17)	투여 후 (n=17)	P value
Quality of life			
Brief sexual inventory	31.59±6.63	33.35±5.02	0.05
Fatigue severity scale	29.47±12.48	27.35±10.45	0.37
SF-36, Physical health (PCS)	53.97±3.94	53.85±4.79	0.919
SF-36, Mental health (MCS)	49±7.3	51.82±4.43	0.322
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	436.99±175.66	451.94±152.26	0.542
Sex hormone binding globulin (nmol/mL)	33.86±11.12	31.87±10.68	0.026
Free Testosterone Index (%)	45.01±8.48	47.89±10.32	0.331
Serum FSH (mIU/mL)	6.38±4.88	6.49±4.36	0.732
Serum LH (mIU/mL)	4.32±1.77	4.56±1.42	0.647
Serum AST (IU/L)	24.76±15.05	24.88±16.04	0.971
Serum ALT (IU/L)	38.12±42.47	42.71±47.07	0.574
Semen analysis			
Volume (mL)	2.74±1.14	2.45±1.22	0.354
Count (x10 ⁶ cells/mL)	28.16±16.91	26.64±8.21	0.718

Motility (%)	41.59±23.47	36.59±21.59	0.343
Morphology (%)	4.02±1.11	4.22±0.34	0.434
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	37.82±39.15	31.16±45.82	0.589
MDA (μM)	10.53±8.01	8.76±3.85	0.465
Halo sperm assay	29.89±10.29	25.97±10.29	0.203

Table 44. 발효 인삼제제 저용량군 (3000mg/day) 투여 전과 후의 비교

	투여 전 (n=8)	투여 후 (n=8)	P value
Quality of life			
Brief sexual inventory	29.38±8.12	32.13±5.54	0.092
Fatigue severity scale	36.38±10.64	28.75±11.9	0.059
SF-36, Physical health (PCS)	52.03±4.51	52.68±5.82	0.76
SF-36, Mental health (MCS)	45.21±8.31	49.26±4.52	0.278
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	503.31±189.35	520.10±129.01	0.686
Sex hormone binding globulin (nmol/mL)	28.23±10.6	26.61±9.76	0.295
Free Testosterone Index (%)	42.43±8.84	48.95±6.13	0.257
Serum FSH (mIU/mL)	7.7±6.3	7.84±5.61	0.779
Serum LH (mIU/mL)	3.95±1.42	5.27±1.69	0.133
Serum AST (IU/L)	30.50±20.42	31.5±21.64	0.885
Serum ALT (IU/L)	53±59.44	60.38±64.10	0.682
Semen analysis			
Volume (mL)	2.54±0.83	2.49±1.09	0.935
Count (x10 ⁶ cells/mL)	25.56±17.68	25.46±18.66	0.989
Motility (%)	30.75±19.18	36.25±20.87	0.533
Morphology (%)	3.63±1.5	4.18±0.47	0.311
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	28.86±36.47	38.28±63.97	0.73
MDA (μM)	11.36±11.26	9.41±2.91	0.575
Halo sperm assay	30.89±9.64	25.24±9.50	0.277

Table 45. 발효 인삼제제 고용량군 (6000mg/day) 투여 전과 후의 비교

	투여 전 (n=9)	투여 후 (n=9)	P value
Quality of life			
Brief sexual inventory	33.56±4.59	34.44±4.56	0.396
Fatigue severity scale	23.33±11.06	26.11±9.52	0.23
SF-36, Physical health (PCS)	55.7±2.48	54.9±3.68	0.532
SF-36, Mental health (MCS)	52.67±4.36	52.2±4.09	0.9
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	503.31±31	520.10±129.01	0.686
Sex hormone binding globulin (nmol/mL)	38.86±9.45	36.54±9.61	0.039
Free Testosterone Index (%)	44.64±8.66	46.96±3.34	0.655

Serum FSH (mIU/mL)	5.2±3.08	5.29±2.64	0.852
Serum LH (mIU/mL)	4.64±2.07	3.93±0.74	0.265
Serum AST (IU/L)	19.67±5.1	19±4.72	0.681
Serum ALT (IU/L)	24.89±9.92	27±15.72	0.483
Semenanalysis			
Volume (mL)	2.92±1.38	2.41±1.39	0.1
Count (x10 ⁶ cells/mL)	30.47±4.83	27.69±18.86	0.593
Motility (%)	51.22±23.62	36.89±23.48	0.014
Morphology (%)	4.37±0.47	4.26±0.19	0.336
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	47.49±41.44	24.83±22.85	0.068
MDA (μM)	9.8±4.01	8.17±4.64	0.441
Halo sperm assay	29.01±11.34	26.62±11.48	0.548

Table 46. 정액 검사상 정자의 운동성 $\geq 32\%$ 인 대상자(정상군)의 발효 인삼제제 투여 전과 후의 비교

	투여 전 (n=8)	투여 후 (n=8)	P value
GINST Dose		Lower group, n=2 Higher group, n=6	
Quality of life			
Brief sexual inventory	35.25±3.73	36.25±3.28	0.275
Fatigue severity scale	23.75±11.30	26.62±12.57	0.346
SF-36, Physical health (PCS)	55.09±3.05	56.31±2.06	0.285
SF-36, Mental health (MCS)			
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	398.55±42.83	405.33±108.75	0.873
Free Testosterone Index (%)	46±9.58	45.15±1.66	0.884
Serum FSH (mIU/mL)	5.41±3.02	5.58±2.32	0.756
Serum LH (mIU/mL)	3.87±1.3	3.89±0.78	0.971
Serum AST (IU/L)	23.75±9.60	19.37±5.05	0.168
Serum ALT (IU/L)	31.88±21.03	29±13.44	0.628
Semen analysis			
Volume (mL)	3.16±1.01	2.06±0.87	0.001
Count (x10 ⁶ cells/mL)	34.56±16.05	29.88±20.87	0.442
Motility (%)	64.13±10.74	47.13±10.74	0.018
Morphology (%)	4.14±0.43	4.19±0.19	0.638
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	67.50±8.11	31.29±24.98	0.014
MDA (μM)	9.41±4.25	6.46±2.72	0.208
Halo sperm assay	29.96±8.88	26.79±11.16	0.545

Table 47. 정액 검사상 정자의 운동성 $< 32\%$ 인 대상자(약정자증)의 발효 인삼제제 투여 전과 후의 비교

	투여 전 (n=9)	투여 후 (n=9)	P value
--	------------	------------	---------

GINST dose	Lower group,n=6 Higher group,n=3		
Quality of life			
Brief sexual inventory	28.33±7.11	30.78±5.02	0.127
Fatigue severity scale	34.56±11.74	28±8.89	0.053
SF-36, Physical health (PCS)	52.98±4.54	51.67±5.54	0.511
SF-36, Mental health (MCS)	44.97±7.81	51.27±3.90	0.025
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	471.17±202.65	493.38±178.65	0.473
Sex hormone binding globulin (nmol/mL)			
Free Testosterone Index (%)	44.13±7.85	50.33±8.93	0.015
Serum FSH (mIU/mL)	7.23±6.15	7.3±5.63	0.882
Serum LH (mIU/mL)	4.71±2.11	5.16±1.62	0.634
Serum AST (IU/L)	25.67±19.25	29.78±20.86	0.451
Serum ALT (IU/L)	43.67±56.1	54.89±62.61	0.455
Semen analysis			
Volume (mL)	2.37±1.17	2.79±1.42	0.366
Count (x10 ⁶ cells/mL)	22.47±14.26	23.77±16.19	0.835
Motility (%)	21.56±6.42	27.22±9.09	0.421
Morphology (%)	3.91±1.51	4.24±0.45	0.499
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	13.13±15.14	31.04±60.43	0.42
MDA (μM)	11.53±10.5	10.8±3.65	0.515
Halo sperm assay	29.83±11.95	25.24±10.08	0.247

(2) 발효 인삼이 약정자증 남성의 정액에 미치는 효과: 단일군 선행 연구 (IRB No. 4-2015-0912)

▷ 본 연구는 GINST 제제가 3000mg/day의 용량으로 투여되었을 때, 약정자증 남성에서 정자의 운동성을 개선시키는 효과가 있는지 확인하기 위한 다기관 단일군 연구로 계획되었다.

본 연구는 2016년 6월부터 2016년 10월까지 진행되었고, 총 3개 기관에서 17명의 대상자가 연구에 등록되었고, 13명이 연구를 완료하였다. IRB No. 4-2014-0708 연구에서 약정자증에 해당하는 9명을 포함(중도탈락 및 결측값 제외)하여 총 22명에서 분석을 시행하였다.

분석 결과, 약정자증 남성에서 GINST 3000mg/day의 12주 투여는 삶의 질 지표 중 sexual performance의 개선 (Brief sexual inventory, $p=0.009$)을 보였고, 정액 검사 상 정자 운동성의 유의한 개선을 보였다 ($p<0.001$) (Table 49).

Table 48. Basal characteristics

Height (cm)	172.5 (162-186)
Weight (kg)	73.55 (51-115)

Waist Circumference (cm)	32 (27-40)	
하루에 앉아서 일하는 시간 (Hours)	5 (0-12)	
일주일에 격렬한 운동 일수 (Days)	2 (0-6)	
일주일에 중등도의 운동 일수 (Days)	1 (0-7)	
Smoking Hx	Never smoker	8 (30.8%)
	Past smoker	8 (30.8%)
	Current smoker	8 (30.8%)
Quality of life		
Brief sexual inventory	31 (11-38)	
Fatigue severity scale	34.5 (11-38)	
SF-36, Physical health (PCS)	53.2 (43.7-59.6)	
SF-36, Mental health (MCS)	45.7 (23.3-59.1)	
Blood test		
Serum total Testosterone(ng/dL)	345.55(133-621.4)	
Free Testosterone Index (%)	42.59 (21.98-65.35)	
Serum FSH (mIU/mL)	5.82 (3.64-23.1)	
Serum LH (mIU/mL)	3.57(2.41-6.22)	
Serum AST (IU/L)	21 (15-76)	
Serum ALT (IU/L)	25 (10-191)	
Semen analysis		
Volume (mL)	2.1 (0.2-3.7)	
Count (x10 ⁶ cells/mL)	24.85 (4-90)	
Motility (%)	22.85 (9-31)	
Morphology (%)	4.5 (4-80)	
WBC count (x10 ⁶ cells/mL)	0.2 (0-7)	
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	7.95 (0.78-63)	

Table 49. 투여 전과 후의 비교

	투여 전 (n=24)	투여 후 (n=20)	Pvalue
Quality of life			
Brief sexual inventory	31 (11-38)	31.5 (11-40)	0.009
Fatigue severity scale	34.5 (11-38)	31 (12-50)	0.191
SF-36, Physical health (PCS)	53.2 (43.7-59.6)	53.3 (40.6-60)	0.156
SF-36, Mental health (MCS)	45.7 (23.3-59.1)	49.5 (17-57.7)	0.455
Blood test			
Serum total Testosterone (ng/dL)	345.55 (133-621.4)	373.55 (196-612)	0.601
Serum FSH (mIU/mL)	5.82 (3.64-23.1)	6.13 (3.26-25.27)	0.573
Serum LH (mIU/mL)	3.57 (2.41-6.22)	4.18 (2.03-8.45)	0.147
Serum AST (IU/L)	21 (15-76)	23 (13-69)	0.917
Serum ALT (IU/L)	25 (10-191)	26 (13-178)	0.92
Semen analysis			
Volume (mL)	2.1 (0.2-3.7)	2.05 (1.0-4.8)	0.467

Count (x10 ⁶ cells/mL)	24.85 (4-90)	32.5 (1-100)	0.184
Motility (%)	22.85 (9-31)	41 (3-67)	<0.001
Morphology (%)	4.5 (4-80)	4.3 (3.8-70)	0.7
WBC count (x10 ⁶ cells/mL)	0.2 (0-7)	0.02 (0-4)	0.132
Total motile sperm count (x10 ⁶ cells)	7.95 (0.78-63)	24.79 (0.06-190.71)	0.033

(3) 발효인삼 섭취에 의한 정자 운동성 개선 효과 평가를 위한 12주. 대기관. 무작위 배정. 이중 눈가림. 위약 대조 임상 시험 (IRB No. 4-2016-0288)

▷ 앞선 두 연구를 통해 발효 인삼의 용량과 효과가 기대되는 대상군을 선정하였고 (약정 자증 남성, 발효 인삼성분 0.96g/일=발효인삼 제제 3000mg/일), 현재 이를 바탕으로 개별 인정형 기능 식품 인증을 위하여 필수 조건인 환자 대조군 이중 맹검 임상 시험을 진행 중에 있다. 2016년 6월부터 시작하여 현재 스크리닝 25명, 등록 18명으로 진행 중임.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

가. 최종 성과목표 및 평가 방법

- (1) 개발 제품의 국제기준 부합 여부(30%): cGMP 준수 여부(제조공정의 flow chart, routine QC, in-process control, red alertness 대비 방법 등), 국제수준(WHO 혹은 ICH)의 품질규격 확립, 지표물질 표준품 서류 구비 여부, 지표물질의 정성/정량 분석법 유효화 여부, ICH-conformed real time & accelerated 조건하 안정성 자료 확보 여부, 잔류농약 불검출 제품 생산 여부, 표준화 제품 생산 여부
- (2) 정자 수 증가 및 질 개선에 미치는 효능 및 기전 규명(30%): 노화, 고온 스트레스 노출, 만성 구속 스트레스 노출에 따른 고환 기능 감퇴에 대한 방어 효과 및 기전 규명, 병리 조직 검사, 정자운동성 조사, 항산화 관련 효소의 mRNA 및 단백질 발현량, 정자생성 관련 단백질 발현량, 성호르몬 수용체 mRNA 및 단백질 발현량
- (3) 임상 효능 입증 여부(30%): 간, 신장 기능 관련 임상화학 지수, 혈중 성호르몬 함량, 정자 수 및 운동성, 부부관계 및 삶의 질, 임신여부
- (4) 제품의 식약처 개별 인증 신청/획득 여부(10%): 개별인증 서류 작성 및 신청서 제출

나. 연차별 성과목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	[제1세부] 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명	○ 생쥐 유래 GC-2spd (정모세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용 -독성 유도: 과산화수소 노출	100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량
			100	▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량
			100	▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량
		100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	

			100	▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	
			100	▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량	
			100	▪ 간/신장 기능 관련 혈액화학지수(동물실험)	
			100	▪ 혈중 성호르몬 (testosterone, LH, FSH) 함량	
			100	▪ 정세관의 현미경 관찰(정자생성능)	
	[제1협동] 국제기준(ICH 혹은 WHO 기 준) 부합 제조 공정 확립 및 품질규격 표준 화 제품 개발	○ 제조공정 확립	100	▪ 공정 최적화 및 cGMP 부합 공정 흐름도 확립 ▪ routine quality control 및 in-process control (IPC)을 위한 공정단계/조사항목/규격기준 작성, red alertness, SOP 확립	
		○ 지표물질 표준품	100	▪ 초고순도 표준품 분리(2 g 이상) ▪ 지표물질 표준품 국제 규격서류 작성 (순도 및 구조 관련)	
		○ 임상시험용 제품의 clinical formula 구축	100	▪ 임상시험용 제품의 clinical formula 완성 ▪ 임상시험용 sample 및 placebo 제작	
		○ 등록용 batch analysis data (3 batches) 확보	100	▪ 등록용 3 batches 생산 ▪ 분석시험 완성	
		○ 제품의 안정성 자료 확보	100	▪ real time 및 학대조건 (ICH guideline 준수, 6개월 이상)	
		○ 기능 등재를 위한 연구: 식약처 기능식품 등재를 위한 서류 작성	100	▪ 등록을 위한 기초자료 확보	
	[제2협동] 임상연구를 통 한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재	○ 연구대상자 선정	100	▪ 기관 내 연구윤리심의위원회에서 연구계획서 심의를 완료함.	
	2차 년도 (2014)	[제1세부] 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명	○ 생쥐 유래 GC-2spd (정자세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용 -독성유도: 항암제 (doxorubicin) 노출	100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량
				100	▪ 정자생성관련 단백질 (inhibin- α , nectin-2 등)의 mRNA 발현량
			100	▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 발현량	
			100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	
			100	▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	
			100	▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량	
			80	▪ 간/신장 기능 관련 혈액화학지수 (동물실험)	
			100	▪ 혈중 성호르몬 (testosterone, LH, FSH) 함량	
			80	▪ 정세관의 현미경 관찰 (정자생성능)	

3차 년도 (2015)	[제1협동] 국제기준 제조공정 및 품질 표준화 개발	부합 규격 제품	○ 지표물질 validation 정량분석법 확립	90	▪ ICH guideline 준수 ▪ 선택성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 범위, 정확성, 정밀성, 강건성, 시스템 적정성 조사
			○ 잔류농약 불검출 제품 생산을 위한 연구	100	▪ 6종의 식용유 농약 제거 효율 조사 ▪ 화학 및 관능검사를 통한 최적 식용유 선발
			○ Real time stability 자료 확보	100	▪ 1.5 yr ▪ 지표물질 및 수분 함량, 미생물수 변화 등
			○ Batch analysis data 확보	100	▪ 3 batches 조사 ▪ 식약처 기능식품 등재를 위한 data 조사
	[제2협동] 임상연구를 통한 남성 개선 효능 증 및 기능 식품 등재		○ 연구대상자 선정	100	▪ WHO 표준 기준 미만의 정자결핍증, 약정자증을 가진 기혼 남성
			○ 임상화학지수 관련 조사	100	▪ 혈중 간, 신장 기능/성호르몬, 스트레스 호르몬 함량 중심
			○ 정자의 질 및 수 조사	100	▪ CASA(computer aided sperm analyzer), 정자 운동성 자동분석기 활용
			○ 문진을 통한 연구대상자 조사	100	▪ 삶의 질(피로감, 의욕 등), 부부관계의 질, 부작용 유무 ▪ 임신 여부, 임신한 자녀의 성별 등
	[제1세부] 정자 생성과 질 개선 효능 및 기전 규명	○ 만성 구속 스트레스(Immobilization stress) 노출 모델	○ 생쥐 유래 GC-2spd (정모세포), TM3 (Leydig), TM4 (Sertoli) cell line 이용 -독성 유도: 고온 노출	100	▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량
			100	▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량	
100			▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량		
100			▪ 항산화관련 효소(Prix, Gpx, SOD, CAT 등)의 mRNA 및 단백질 발현량		
100			▪ 정자생성관련 단백질(inhibin- α , nectin-2 등)의 mRNA 및 단백질 발현량		
100			▪ 성호르몬 수용체의 mRNA 및 단백질 발현량		
80			▪ 간/신장 기능 관련 혈액화학지수(동물실험)		
80			▪ 혈중 성호르몬 (testosterone, LH, FSH) 함량		
80			▪ 정세관의 현미경 관찰(정자생성능)		
[제1협동] 국제기준 제조공정 및 품질 표준화 개발			부합 규격 제품	○ 잔류농약 불검출 제품 생산	80
	○ 등록용 batch analysis data (3 batches) 확보	100		▪ 3 batches 조사 ▪ 식약처 기능식품 등재를 위한 data 조사	
	○ 제품의 안정성 자료 확보	100		▪ Real time stability 조사(국제기준	

[제2협동] 임상연구를 통한 남성 난임 개선 효능 입증 및 기능식품 등재	○ 기능 등재를 위한 연구: 식약처 기능식품 등재를 위한 서류 작성	80	준수) ▪ 수분 및 지표물질 함량, 미생물 조사 ▪ 등록을 위한 기초자료 확보 및 기본 서류 작성
	○ 연구대상자 선정	80	▪ WHO 표준 기준 미만의 정자결핍증, 약정자증을 가진 기혼 남성
	○ 임상화학지수 관련 조사	60	▪ 혈중 간, 신장 기능/성호르몬, 스트레스 호르몬 함량 중심
	○ 정자의 질 및 수 조사	60	▪ CASA(computer aided sperm analyzer), 정자 운동성 자동분석기 활용
	○ 문진을 통한 연구대상자 조사	60	▪ 삶의 질(피로감, 의욕 등), 부부관계의 질, 부작용 유무
	○ 기능 등재를 위한 연구 결과 및 기본 자료 작성	60	▪ 임신 여부, 임신한 자녀의 성별 등 ▪ 등록을 위한 임상 연구 기초자료 확보 및 기본 서류 작성

4-2. 관련분야 기여도

- 화합물/생약재를 다양한 동물 모델을 이용하여 정자생성능과 기전을 규명한 논문은 극히 드물다. 게다가 임상연구를 거쳐 기능 식품 혹은 치료제로 등록된 제품은 하나도 없다. 즉, 모두 논문에서 그치고 산업화로까지 이어지지 못했다는 이야기이다. 그러므로 본 연구 과제가 성공하면 우리가 개발한 제품은 “남성 난임 개선/치료제 1호”가 되는 것이다.
- 기존에 시장에 나와 있는 수삼, 백삼, 홍삼 가공제품이 아니라 발효인삼을 이용하여 남성 난임 치료/개선제 기능식품 개별인증을 획득함으로써 차별화된 제품, 동분야의 “세계 최초 제품”을 출시

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> ○ 자사의 보유 바이어와 글로벌 천연물 유통업체 협의회인 NHFS를 활용하여 제품이 우수성을 홍보하고 신제품을 출시할 계획 ○ 자사의 해외법인이 있는 일본, 대만, 미국을 중심으로 전략을 수립하여 관리하고 있는 바이어들에게 원료 및 제품을 우선 공급하는 전략을 수립하여 실행할 계획 ○ 국내외 박람회 참가 및 일본 판매 조직의 마케팅 교육을 강화할 예정 		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ 지표물질 표준품 분석, validation 정량분석법, 잔류농약 관련 정보 수집 <ul style="list-style-type: none"> - ICH guideline, Ph.Eur.(유럽약전), J.Ph(일본약전) 참고 ○ 관련 자료 예시 		

<p style="text-align: center;">3AQ13a ■</p> <p>VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY *)</p> <p>Guideline Title: Validation of Analytical Procedures: Methodology Legislative basis: Directive 7318/EEC as amended Date of first adoption: December 1998 Date of entry into force: For studies commencing after June 1997 Status: Last revised 2005 Previous titles/other references: ICH Q2(R)CPMP/ICH/281/95 Additional Notes: This note for guidance concerns test procedures used in documentation submitted in accordance with Part 2, sections A17 of the Annex to Directive 7318/EEC, as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a medicinal product. This guideline is complementary to, and should be read in conjunction with, the guidelines on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology.</p> <p>CONTENTS</p> <p>INTRODUCTION 1. SPECIFICITY 2. LINEARITY 3. RANGE 4. ACCURACY 5. PRECISION 6. DETECTION LIMIT 7. QUANTIFICATION LIMIT 8. ROBUSTNESS 9. SYSTEM SUITABILITY TESTING</p>	<p style="text-align: center;">3AQ15a ■</p> <p>STABILITY TESTING OF NEW ACTIVE SUBSTANCES AND MEDICINAL PRODUCTS *)</p> <p>Guideline Title: Stability Testing of New Active Substances and Medicinal Products Legislative basis: Directive 7318/EEC as amended Date of first adoption: October 1989 Date of entry into force: Compulsory for applications submitted after 1/1/1998 Status: Last revised 1993 Previous titles/other references: ICH Q1A: Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH3S2.92, CPMP/ICH/380/93 Additional Notes: This note for guidance concerns the application of Part 2, sections C and F of the Annex to Directive 7318/EEC, as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a new medicinal product. This guideline replaces those sections of the CPMP guidelines entitled <i>Stability tests on Active Ingredients and Finished Products which refer to new active substances and medicinal products containing new active substances.</i></p> <p>CONTENTS</p> <p>PREAMBLE OBJECTIVE SCOPE ACTIVE SUBSTANCE PRODUCT ANNEX 1</p>	<p>C. CONTROL OF STARTING MATERIALS</p> <p>C.1 ACTIVE SUBSTANCES</p> <p>C.1.1 Specifications and routine tests for starting material of Korean net growing powder capsule.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Test parameters</th> <th>Test method</th> <th>Specifications/limits</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Identification</td> <td>Ph. Eur. 01/2002:1523 (Ginseng) -Identification C</td> <td>As described in Ph. Eur. 01/2002:1523 -Identification C</td> </tr> <tr> <td>Loss on drying</td> <td>Ph. Eur. 2.2.32</td> <td>≤8.0%</td> </tr> <tr> <td>Total ash</td> <td>Ph. Eur. 2.4.16</td> <td>≤5.0%</td> </tr> <tr> <td>HCl-soluble ash</td> <td>Ph. Eur. 2.8.1</td> <td>≤1.0%</td> </tr> <tr> <td>Foreign matter</td> <td>Ph. Eur. 2.8.2</td> <td>≤2.0% (100 g sample need)</td> </tr> <tr> <td>Content of 50% EtOH extractable material</td> <td>2 Ph. C.1.1.2.7</td> <td>≥18.0%</td> </tr> <tr> <td>Assay</td> <td>Ph. Eur. 01/2002:1523</td> <td>90.0%, combined ginsenosides Rb₁ and Rg₃, calculated with reference to the dried drug</td> </tr> <tr> <td>Microbiological quality</td> <td>Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 5.1.1</td> <td>Category 3B</td> </tr> <tr> <td>Alfentanil*</td> <td>HP/LC/fluorescence method C.1.1.2.5</td> <td>M1: 0.05 µg/g, B1: 2.0 µg/g, Total of Alfentanil: 4.0 µg/g</td> </tr> <tr> <td>Pesticides</td> <td>Test method according to EP/AMRL 00019/34 & C.1.1.2.4</td> <td>Ph. Eur. 2.8.13</td> </tr> <tr> <td>Heavy metals</td> <td>Ph. Eur. 4.2.4.27 (method) C.1.1.2.5</td> <td>Ph. Eur. 5 mg/g Cd: 0.2 mg/g Hg: 0.1 mg/g, Calculated to the dried powder</td> </tr> <tr> <td>Radioactivity*</td> <td>Determination of the activity concentration of gamma ray emitting radionuclides HALL-300 (G-01-R:1997) C.1.1.2.6</td> <td>≤500 Bq/g</td> </tr> </tbody> </table> <p><small>*Ph: Jap. Pharmacopoeia; Ph. Eur.: The Pharmacopoeia *Analyzed every ten bags.</small></p>	Test parameters	Test method	Specifications/limits	Identification	Ph. Eur. 01/2002:1523 (Ginseng) -Identification C	As described in Ph. Eur. 01/2002:1523 -Identification C	Loss on drying	Ph. Eur. 2.2.32	≤8.0%	Total ash	Ph. Eur. 2.4.16	≤5.0%	HCl-soluble ash	Ph. Eur. 2.8.1	≤1.0%	Foreign matter	Ph. Eur. 2.8.2	≤2.0% (100 g sample need)	Content of 50% EtOH extractable material	2 Ph. C.1.1.2.7	≥18.0%	Assay	Ph. Eur. 01/2002:1523	90.0%, combined ginsenosides Rb ₁ and Rg ₃ , calculated with reference to the dried drug	Microbiological quality	Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 5.1.1	Category 3B	Alfentanil*	HP/LC/fluorescence method C.1.1.2.5	M1: 0.05 µg/g, B1: 2.0 µg/g, Total of Alfentanil: 4.0 µg/g	Pesticides	Test method according to EP/AMRL 00019/34 & C.1.1.2.4	Ph. Eur. 2.8.13	Heavy metals	Ph. Eur. 4.2.4.27 (method) C.1.1.2.5	Ph. Eur. 5 mg/g Cd: 0.2 mg/g Hg: 0.1 mg/g, Calculated to the dried powder	Radioactivity*	Determination of the activity concentration of gamma ray emitting radionuclides HALL-300 (G-01-R:1997) C.1.1.2.6	≤500 Bq/g
Test parameters	Test method	Specifications/limits																																							
Identification	Ph. Eur. 01/2002:1523 (Ginseng) -Identification C	As described in Ph. Eur. 01/2002:1523 -Identification C																																							
Loss on drying	Ph. Eur. 2.2.32	≤8.0%																																							
Total ash	Ph. Eur. 2.4.16	≤5.0%																																							
HCl-soluble ash	Ph. Eur. 2.8.1	≤1.0%																																							
Foreign matter	Ph. Eur. 2.8.2	≤2.0% (100 g sample need)																																							
Content of 50% EtOH extractable material	2 Ph. C.1.1.2.7	≥18.0%																																							
Assay	Ph. Eur. 01/2002:1523	90.0%, combined ginsenosides Rb ₁ and Rg ₃ , calculated with reference to the dried drug																																							
Microbiological quality	Ph. Eur. 2.6.12 & 13 Ph. Eur. 5.1.1	Category 3B																																							
Alfentanil*	HP/LC/fluorescence method C.1.1.2.5	M1: 0.05 µg/g, B1: 2.0 µg/g, Total of Alfentanil: 4.0 µg/g																																							
Pesticides	Test method according to EP/AMRL 00019/34 & C.1.1.2.4	Ph. Eur. 2.8.13																																							
Heavy metals	Ph. Eur. 4.2.4.27 (method) C.1.1.2.5	Ph. Eur. 5 mg/g Cd: 0.2 mg/g Hg: 0.1 mg/g, Calculated to the dried powder																																							
Radioactivity*	Determination of the activity concentration of gamma ray emitting radionuclides HALL-300 (G-01-R:1997) C.1.1.2.6	≤500 Bq/g																																							

7. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<p>○ 일반 등급</p> <p>- 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음.</p>	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 : 해당사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11												
<p>가. 실험실 안전 점검</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>위험등급</th> <th>점검주기</th> <th>분류 기준</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A등급</td> <td>분기 1회</td> <td>가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실</td> </tr> <tr> <td>B등급</td> <td>반기 1회</td> <td>일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실</td> </tr> <tr> <td>C등급</td> <td>연 1회</td> <td>이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실</td> </tr> </tbody> </table> <p>(1) 실험실 정밀안전진단 실시</p> <p>실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.</p> <p>나. 교육 훈련</p> <p>(1) 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행 규칙 제 9조 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전</p>		위험등급	점검주기	분류 기준	A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실	B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실	C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실
위험등급	점검주기	분류 기준											
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실											
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실											
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실											

교육의 관리)

(2) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속 연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

(3) 안전교육 시간 및 수료인정기간

- 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수
- 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)

(4) 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물·방사선 취급
- B코스 : 화학·가스 취급
- C코스 : 전기·기계 취급

다. 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

라. 안전 교육, 훈련 이행 실적

- 월 1회 연구책임자 안전 교육
- 분기별 전체 실험실 이용자 교육

안전교육·훈련 결과 기록부			
소속기관	의료생명대학	안전관리책임자	소속기관장
	의생명화학과 응용생화학전공		
교육·훈련 일시	2019년 4월 15일 / 15:00 ~ 15:00 (2시간)		
교육·훈련 인원	11 명	교육·훈련 실시자	김서안
교육·훈련 장소	상지 600		
교육·훈련 구분	<input type="checkbox"/> 정기 교육·훈련 <input checked="" type="checkbox"/> 신규채용 등에 따른 교육·훈련 <input type="checkbox"/> 특별 안전 교육·훈련		
교육·훈련 실시자 자 적 조 건	<input checked="" type="checkbox"/> 소소수 이상으로 안전에 관한 경험과 학식이 풍부한 자 <input type="checkbox"/> 연구실 안전책임자 <input type="checkbox"/> 특별한 자격을 만족하는 자 ()		
○ 교육·훈련 실시 내용 - 연구실 안전행동 요령 방법에 관한 사항 - 연구실내 화재·위험요인에 관한 사항 - 안전한 연구개발활동에 관한 사항 - 물질안전보건자료(MSDS)에 관한 사항 - 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 - 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 - 안전표지에 관한 사항 - 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항			

안전교육·훈련 결과 기록부			
소속기관	의료생명대학	안전관리책임자	소속기관장
	의생명화학과 응용생화학전공		
교육·훈련 일시	2019년 2월 18일 / 15:00 ~ 17:00 (2시간)		
교육·훈련 인원	8 명	교육·훈련 실시자	김서안
교육·훈련 장소	상지 600		
교육·훈련 구분	<input checked="" type="checkbox"/> 정기 교육·훈련 <input type="checkbox"/> 신규채용 등에 따른 교육·훈련 <input type="checkbox"/> 특별 안전 교육·훈련		
교육·훈련 실시자 자 적 조 건	<input checked="" type="checkbox"/> 소소수 이상으로 안전에 관한 경험과 학식이 풍부한 자 <input type="checkbox"/> 연구실 안전책임자 <input type="checkbox"/> 특별한 자격을 만족하는 자 ()		
○ 교육·훈련 실시 내용 - 연구실 안전행동 요령 방법에 관한 사항 - 연구실내 화재·위험요인에 관한 사항 - 안전한 연구개발활동에 관한 사항 - 물질안전보건자료(MSDS)에 관한 사항 - 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 - 연구실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 - 안전표지에 관한 사항 - 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항			

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	코드번호			D-12	
					논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)

1	논문	Korean red ginseng protects against doxorubicin-induced testicular damage: An experimental study in rats	건국대	교신 저자	Journal of Functional Foods	4.48	2015.10.15	단독사사	
2	논문	Korean red ginseng extract rejuvenates testicular ineffectiveness and sperm maturation process in aged rats by regulating redox proteins	건국대	교신 저자	Experimental Gerontology	3.529	2015.03.11	단독사사	
3	논문	Pectinase-treated Panax ginseng extract (GINST) rescues testicular dysfunction in aged rats via redox-modulating proteins	건국대	교신 저자	Experimental Gerontology	3.529	2014.02.20	단독사사	
4	논문	Panax ginseng improves senile testicular function in rats	건국대	교신 저자	Journal of Ginseng Research	3.898	2010.11.29	단독사사	
5	논문	Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	건국대	교신 저자	BJU International	2.635	2004.08.25	단독사사	중앙 TV방송 방영

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
<p>○ ‘아이는 낳고 싶은데 ‘불임부부’증가’, 2010. 10. 17 건강보험심사평가 보도자료</p> <p>○ Current Reproductive Endocrinology 27(3): 487-516 (2000)</p> <p>○ ‘40대 이상 남성 3명 중 1명 ‘남성 갱년기’’, 2013. 7. 2 데일리팜 뉴스기사</p> <p>○ ‘대한민국 의료관광 효자 부상 ‘불임치료’’, 데일리메디, 2012년 1월 4일 게재</p> <p>○ Aaron S, Kim ED, and Lipshultz LI. Contemporary approach to the male infertility evaluation. Current Reproductive Endocrinology 27: 487-516 (2000).</p> <p>○ Kobayashi H, Urashima M, Hoshi Y, Uchiyama H, Fujisawa K, Akatsuka J, Maekawa K and Hurusato M, Testicular morphological changes in children with acute lymphoblastic leukemia following chemotherapy. Acta Paediatrica Japonica 38: 640-643 (1996).</p> <p>○ Kim W, Hwang S, Lee H, Song H and Kim S. Panax ginseng protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced testicular damage in guinea pigs, <i>BJU Int'l</i>, 83,</p>		

842-849 (1999).

○ Hwang SY, Kim WJ, Wee JJ, Choi CS and Kim SK. Panax ginseng improves survival and sperm quality in guinea pigs exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *BJU Int'l*, 94: 663 - 668 (2004).

○ Hwang SY, Sohn SH, Wee JJ, Yang JB, Kyung JS, Kwak YS, Kim SW and Kim SK. *Panax ginseng* improves senile testicular function in rats. *J Ginseng Research* 34: 327-335 (2010).

○ Gene Review: Androgen Insensitivity Syndrome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1429/>)

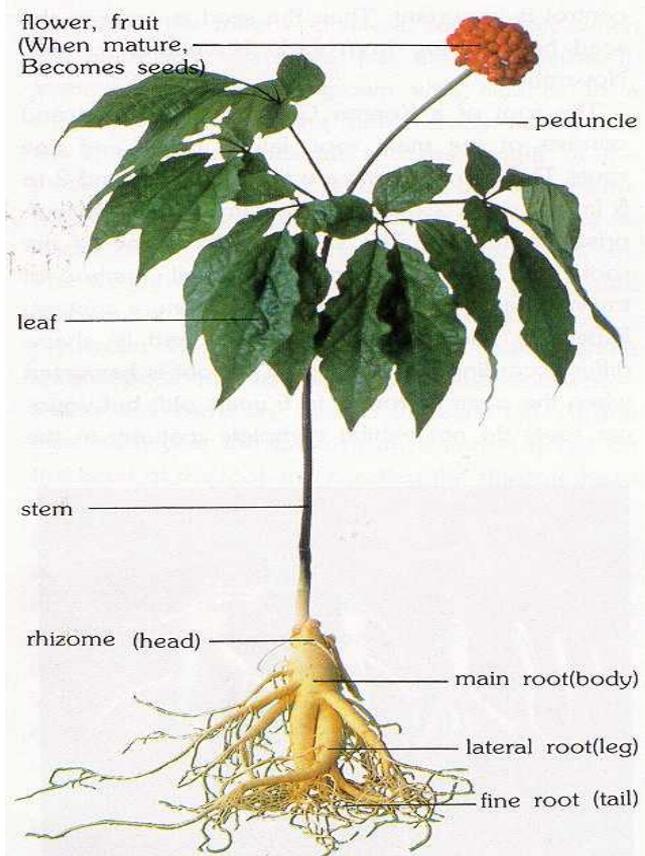
○ Ishigami, J. Department Urology, School of Medicine, Kobe University, Japan. *Japanese Journal of infertility* 16: 45-49 (1971).

○ Kim EH, Park JD, Pyo SN, Rhee DK, Effects of non-saponin red ginseng components on multi-drug resistance, *J. Ginseng Research*. v.31: 74-78 (2007).

○ Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1:2-25 (1970).

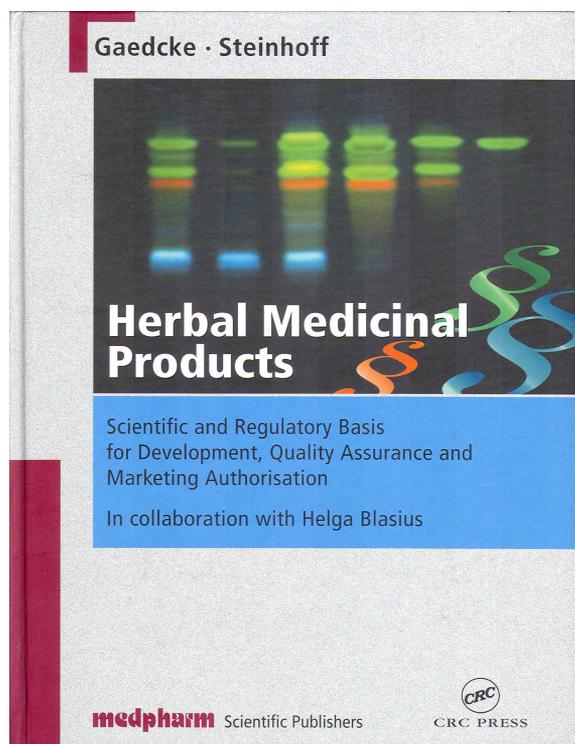
※ Appendix 1~32

1. *Picture of Panax ginseng C.A. Meyer*



Part employed for the manufacture of steamed and dried Panax ginseng

2. Literature cited for the documentation of reference material



Quality assurance of the herbal extract

1. General data:		
1.1	Product name	Reference substance valerenic acid HF-V01
1.2	Origin	Valerenic acid Co. Analyticon Batch-No.: 95-006-002 Archive-No.: 8008
2. Tests:		Results:
2.1 Characteristics:		
2.1.1	Appearance	White crystals
2.1.2	Solubility	Conforms
2.2 Identity:		
2.2.1	IR spectroscopy	Reference spectrum in Ref. ²⁾
2.2.2	¹ H NMR spectroscopy	Chemical shift and multiplicity of signals must be characteristic for the valerenic acid molecule
2.2.3	¹³ C NMR spectroscopy	Chemical shift of the signals must conform with the data of Ref. ¹⁾
2.2.4	Mass spectroscopy	The mol peak must be present
2.2.5	UV Spectroscopy	The measure value for the UV maximum must conform approximately with the calculated value
2.3 Purity:		
2.3.1	Elementary analysis	Theoretical values: C = 76.85 %, H = 9.46 %, O = 13.65 % C = 76.78 % (99.87 % d. T.) H = 9.55 % (100.42 % d. T.) O = 13.44 % (98.46 % d. T.)
2.3.2	100% method 1 (HPLC)	Total of accompanying peaks ≤ 5.00 %
2.3.3	100% method 2 (HPLC)	1.34 %
2.3.4	100% method 3 (HPLC)	1.03 %
2.3.5	Water content	Total of accompanying peaks ≤ 5.00 %
2.3.6	Melting point	0.55 %
2.3.7	Thin layer chromatography	≤ 1.000 % 136° C acc. to Ref. ³⁾ 0.036 % 138° C
2.3.7	Thin layer chromatography	Besides a violet main zone with an RF value of ca. 0.22 no further zones
2.3.7	Thin layer chromatography	No further zones (see p. 13)
2.4 Content		
2.4.1	HPLC 100 % method 1	2.95.00 %, calculated with respect to the dried substance
2.4.2	HPLC 100 % method 2	98.66 %
2.4.3	HPLC 100 % method 3	3.95.00 %, calculated with respect to the dried substance
2.4.3	HPLC 100 % method 3	98.97 %
2.4.3	HPLC 100 % method 3	3.95.00 %, calculated with respect to the dried substance
2.4.3	HPLC 100 % method 3	99.45 %
2.5 Result		
As within HPLC method 1 one peak is separated which coincides with the peak of the valerenic acids within methods 2 and 3, the content of valerenic acid HF-V 01 is 98.66 % (result of method 1).		
Andemach, 01.06.1995		
Head of Quality Control Dpt.		Head of Science Dpt.
Dr. Volker Friess		Dr. Frauke Gaedcke

Figure 3.3: Analytical certificate for the reference substance valerenic acid

47

3. Physico-chemical information for IH-901 obtained from D/B

Derivative: 20-O-β-D-Glucopyranoside

Synonym(s): Compound K

Chapman & Hall Number: MON06-M

CAS Registry Number: 39262-14-1

Type of Compound Code(s): VS7950

Molecular Formula: C₃₆H₆₂O₈

Molecular Weight: 622.881

Accurate Mass: 622.44447

Percentage Composition: C 69.42%; H 10.03%; O 20.55%

Biological Source: Prod. from saponins of *Gynostemma pentaphyllum* by endogenous glycosidases

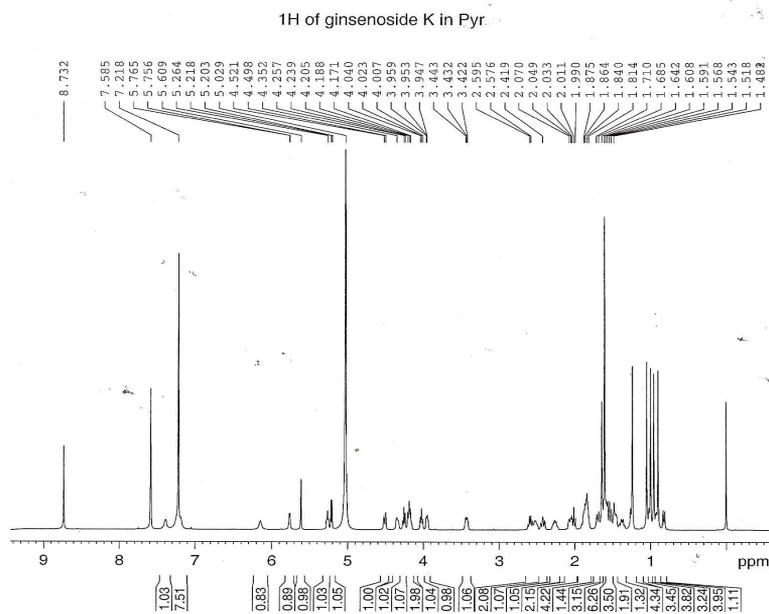
Metabolism: Main metab. of ginsenosides in human and rat

Physical Description: Cryst. + ½H₂O (MeOH aq.)

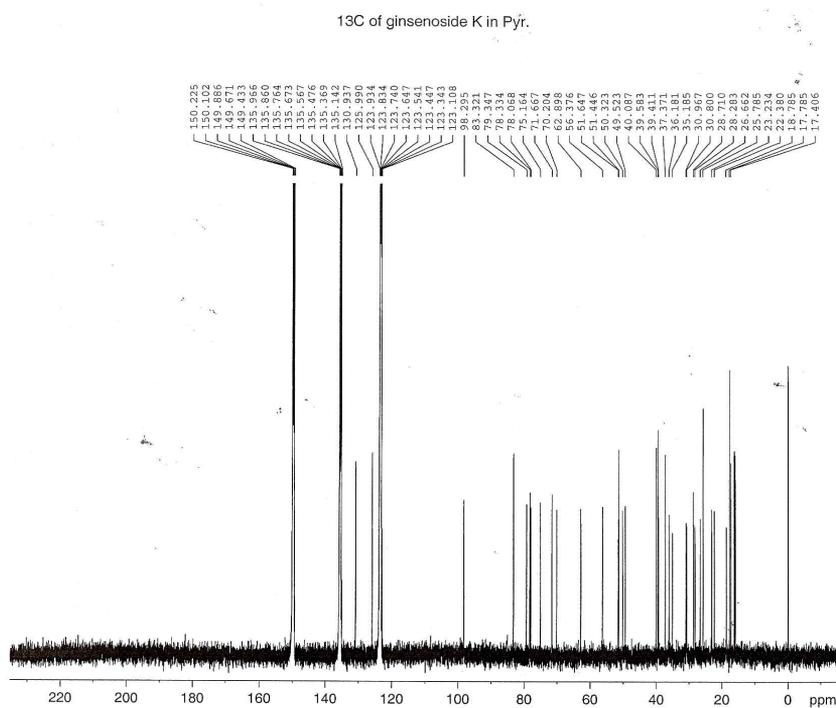
Melting Point: Mp 159-161° (hemihydrate)

Optical Rotation: [α]_D +39 (c, 1 in MeOH)

4. ¹H NMR spectrum of IH-901 reference material

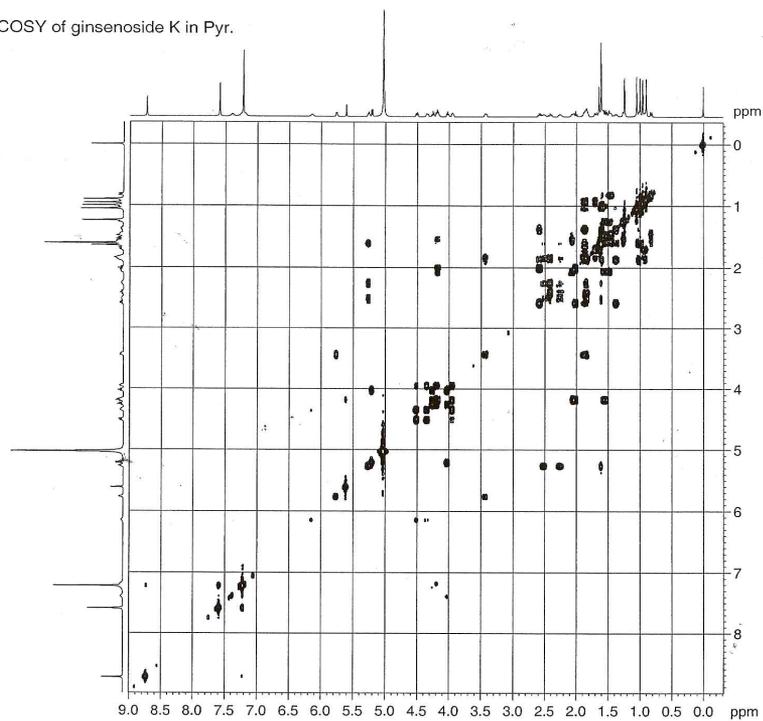


5. ¹³C NMR spectrum of IH-901 reference material



6. ^1H - ^1H COSY NMR spectrum of IH-901 reference material

COSY of ginsenoside K in Pyr.



```

Current Data Parameters
NAME      1025kku-ksk
EXNO     14
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20061026
Time     17.55
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm CPTXI 2-G
PULPROG  cosyppqf
TD       2048
SOLVENT  cdcl3
NS       4
DS       16
SWH      5000.000 Hz
FIDRES   2.441406 Hz
AQ       0.2049500 sec
RG       32
DW       100.000 usec
DE       6.00 usec
TE       298.0 K
AQ       0.0000300 sec
D1       1.5000000 sec
d13      0.00000400 sec
D15      0.00000000 sec
IN0      0.0002000 sec
MCREST   0.00000400 sec
MCWRK    1.50000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P0       10.03 usec
P1       10.03 usec
PL1     -0.60 dB
SF01    500.1322006 MHz

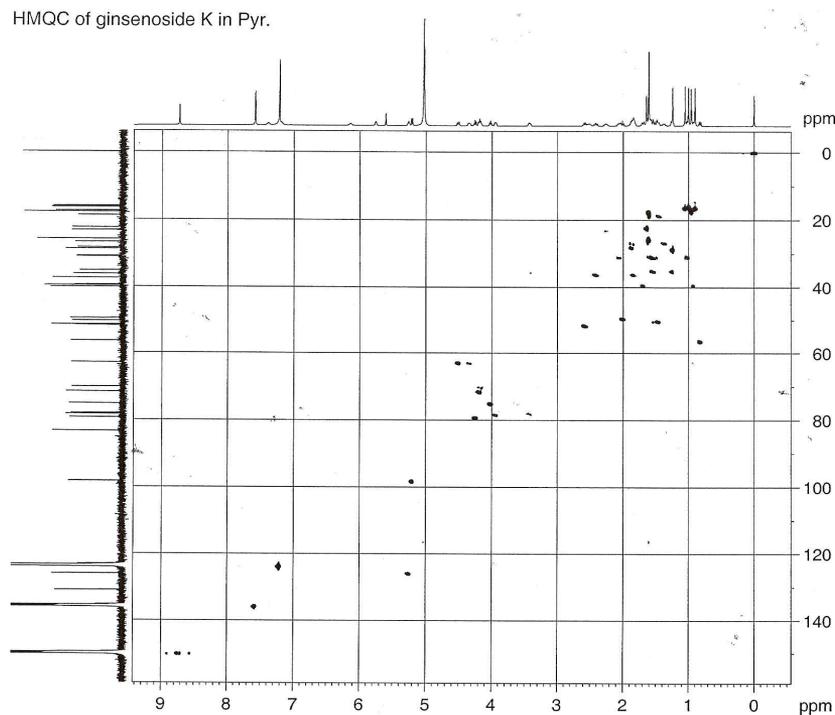
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1   SINE.100
GPNAM2   SINE.100
GPX1     0.00 %
GPX2     0.00 %
GPY1     0.00 %
GPY2     0.00 %
GPZ1     10.00 %
GPZ2     10.00 %
P16     1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
ND0      1
TD       320
SF01    500.1322 MHz
FIDRES   15.6250000 Hz
SW       9.997 ppm
FnMODE   QF

F2 - Processing parameters
SI       2048
SF       500.1299847 MHz
WDW      QSINE
SSB      1
LB       0.00 Hz
GB       0
    
```

7. ^1H MQC NMR spectrum of IH-901 reference material

HMOC of ginsenoside K in Pyr.



```

Current Data Parameters
NAME      1025kku-ksk
EXNO     12
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20061026
Time     15.49
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm CPTXI 2-G
PULPROG  hmqcgpqf
TD       2048
SOLVENT  DMSO
NS       4
DS       16
SWH      5000.000 Hz
FIDRES   2.441406 Hz
AQ       0.2049500 sec
RG       10240
DW       100.000 usec
DE       6.00 usec
TE       298.0 K
CNST2    145.0000000
d3       0.00000000 sec
D1       1.5000000 sec
d2       0.00344628 sec
d12      0.00000000 sec
d13      0.00000400 sec
D16      0.00020000 sec
DELTA1   0.00022428 sec
IN0      0.0002400 sec
MCREST   0.00000000 sec
MCWRK    1.50000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       10.03 usec
P2       20.06 usec
PL1     -0.60 dB
SF01    500.1322006 MHz

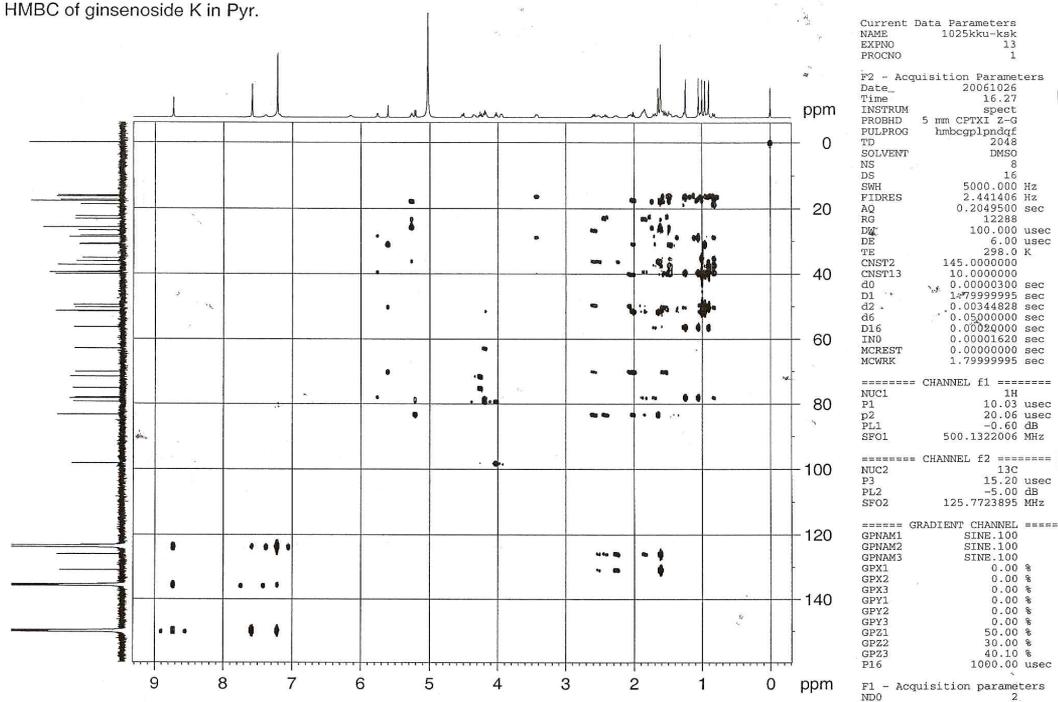
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  garp
NUC2     13C
P3       15.20 usec
PCPD2    70.00 usec
PL2     -5.00 dB
PL12     7.60 dB
SF02    125.7673592 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM1   SINE.100
GPNAM2   SINE.100
GPNAM3   SINE.100
GPX1     0.00 %
GPX2     0.00 %
GPX3     0.00 %
GPY1     0.00 %
GPY2     0.00 %
GPY3     0.00 %
GPZ1     50.00 %
GPZ2     30.00 %
GPZ3     40.10 %
P16     1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
    
```

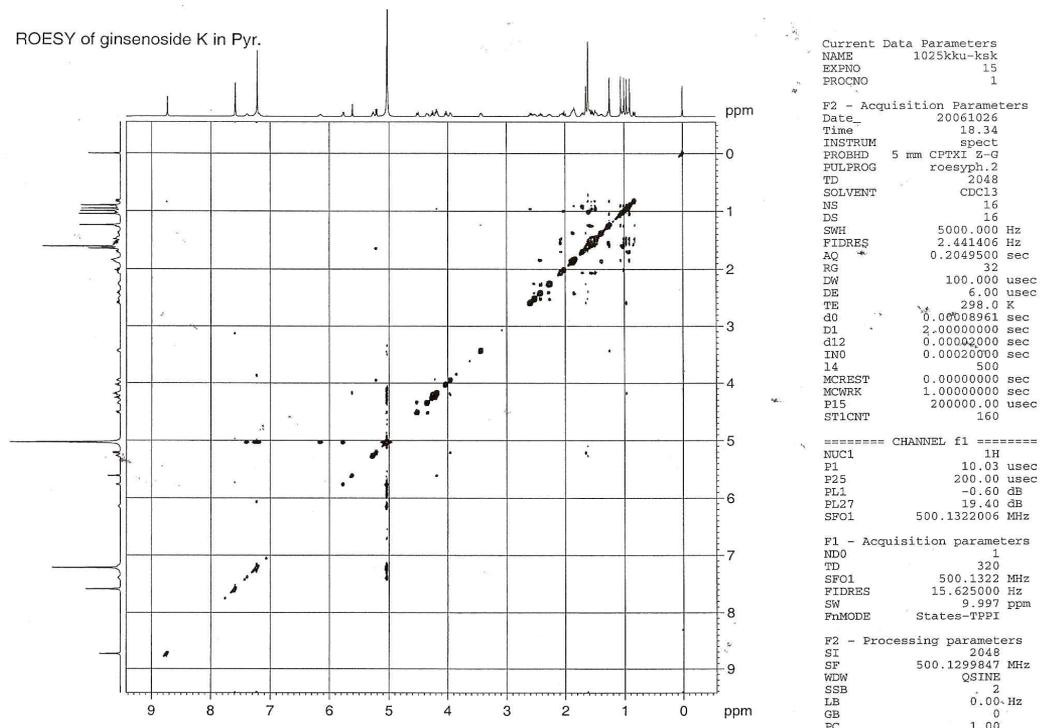
8. HMBC spectrum of IH-901 reference material

HMBC of ginsenoside K in Pyr.



9. NOESY spectrum of IH-901 reference material

ROESY of ginsenoside K in Pyr.



10. Reference literature for NMR assignment of IH-901

Chemistry of Natural Compounds, Vol. 4, No. 4, 2006

SYNTHESIS OF 20S-PROTOPANAXADIOL 20-O-β-D-GLUCOPYRANOSIDE, A METABOLITE OF *Panax ginseng* GLYCOSIDES, AND COMPOUNDS RELATED TO IT

L. N. Atopkina and V. A. Denisenko

UDC 547.917:547.918+547.597

A preparative semi-synthetic method was developed to prepare 20S-protopanaxadiol 20-O-β-D-glucopyranoside (I), a metabolite of *Panax ginseng* glycosides. The 20-O-β-D-glucopyranosides of 20S-hydroxydammar-24-en-3,12-dione, 3β,20S-dihydroxydammar-24-en-12-one, and 3β,12α,20S-trihydroxydammar-24-ene were synthesized for the first time.

Key words: dammarane triterpenoids; glycosylation; *Betula*; *Panax ginseng* C. A. Meyer; 20S-protopanaxadiol 20-O-β-D-glucopyranoside; 20S-hydroxydammar-24-en-3,12-dione 20-O-β-D-glucopyranoside; 3β,20S-dihydroxydammar-24-en-12-one 20-O-β-D-glucopyranoside; 3β,12α,20S-trihydroxydammar-24-ene 20-O-β-D-glucopyranoside.

Extract of *Panax ginseng* C. A. Meyer root, which is constantly attracting attention to itself owing to the breadth and variety of its biological activity, contains triterpene glycosides, which have been the subject of numerous investigations. Ginseng glycosides are transformed by intestinal microflora in the gastro-intestinal tract into compounds with new biological properties. In the last few years, the properties and mechanism of action of one of the main metabolites of ginseng glycosides, 20S-protopanaxadiol 20-O-β-D-glucopyranoside (I) (compound K), have been studied more frequently [1-13]. Glucoside I inhibits the growth of tumor cells and induces their apoptosis [3, 9, 10], decreases the toxicity of antitumor preparations [4], possesses antineoplastic and immunomodulating activity [2, 11], and exhibits anti-allergic [12] and anti-inflammatory [13] properties. In most of these investigations, I was prepared by treating ginseng extract or the enriched glycoside fraction with enzymes, bacteria, or intestinal microflora followed by chromatographic separation of the products of enzymatic hydrolysis.

We previously prepared 1 isomer of the condensation products of 20S-protopanaxadiol (dammar-24-en-3β,12,20S-triol) (2) with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide (3) under Koenig-Knoer reaction conditions [14, 15]. Because all three hydroxyls of 3 were glycosylated, the main drawback was the lack of regioselectivity, which led to the formation of a complicated and difficultly separated mixture of mono- and diglycosides. Regioselective glycosylation of the 3,12-diacetate of 20S-protopanaxadiol (4) with one free hydroxyl on C-20 was unsuccessful [14], apparently because the 20-OH was sterically shielded by the 12β-OAc group.

The present article is a continuation of investigations on the synthesis of glycosides based on tetracyclic dammarane triterpenoids. The goal was to develop a preparative regio- and stereoselective method for preparing 20S-protopanaxadiol 20-O-β-D-glucopyranoside (I).

An attempt to synthesize I through regio- and stereoselective glycosylation of the tertiary hydroxyl on C-20 of 20S-hydroxydammar-24-en-3,12-dione (5) with subsequent reduction of both ketones on C-3 and C-12 into the glycosylation product (6) did not give the desired result. Reaction of 5 with 3 in the presence of Ag₂O and 4Å molecular sieves in dichloroethane gave the tetraacetate of the diketone 20-O-β-D-glucopyranoside (6) (47% yield), reduction of which with NaBH₄ in isopropanol selectively reduced only one ketone on C-3 and formed the tetraacetate of 3β,20S-dihydroxydammar-24-en-12-one 20-O-β-D-glucopyranoside (7).

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Division, Russian Academy of Sciences, 690022, Vladivostok, pr. 100 Let Vladivostoku, 159, fax 7-(42323) 31 40 50, e-mail: atopkina@mail.ru. Translated from *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, No. 4, pp. 364-369, July-August, 2006. Original article submitted June 9, 2006.

452

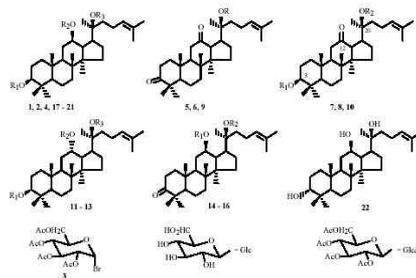
0009-3130/06/4204-0452 © 2006 Springer Science+Business Media, Inc.

TABLE 1. ¹³C NMR Chemical Shifts of 1, 5-7, 9-12, and 21 (δ, ppm, TMS = 0)

C atom	1	5	6	7	9	10	11	12	21
1	39.19	39.03	39.26	38.60	39.16	38.82	39.26	38.51	38.83
2	28.05	33.77	33.79	27.16	33.97	27.89	28.08	24.05	28.02
3	77.83	216.75	216.91	78.61	215.97	77.53	77.86	80.87	77.79
4	39.34	47.37	47.36	38.93	47.26	39.51	39.40	37.91	39.32
5	56.14	55.13	55.17	55.76	54.79	55.94	56.40	55.96	56.13
6	18.55	19.66	19.77	18.36	19.86	18.64	18.62	18.17	18.47
7	34.95	33.27	33.76	34.40	33.83	34.61	35.80	35.21	34.77
8	39.86	40.12	40.45	40.50	40.55	40.70	40.71	40.40	39.76
9	50.09	52.74	53.88	54.57	53.94	54.73	45.98	45.28	50.06
10	37.14	37.13	37.30	37.63	37.26	37.67	37.00	36.72	37.25
11	30.56	39.27	39.87	39.76	39.16	39.93	30.33	29.25	27.71
12	69.96	213.22	211.19	211.88	210.76	211.06	67.51	68.22	77.38
13	49.30	56.27	55.62	55.53	56.41	56.24	45.80	45.25	46.54
14	51.21	51.79	56.25	56.25	56.16	56.05	49.21	48.07	52.01
15	30.74	30.86	31.69	31.67	32.23	32.12	31.77	31.52	31.10
16	26.42	24.61	23.77	23.73	24.46	24.59	25.02	23.70	26.96
17	51.39	45.90	41.07	40.99	42.48	42.38	46.60	45.48	53.91
18	15.81	15.57	15.24	15.56	15.41	15.77	15.40	15.08	15.50
19	16.14	15.53	15.83	16.13	15.78	16.14	16.45	16.25	16.14
20	83.08	73.17	82.17	82.18	81.25	81.15	82.87	83.44	72.82
21	22.13	26.38	23.45	23.33	22.44	22.26	21.58	22.59	26.68
22	35.96	37.86	38.77	38.80	40.07	40.38	37.00	37.08	36.29
23	22.98	22.46	23.53	23.52	23.90	23.76	22.77	23.33	22.76
24	125.75	124.80	124.26	124.28	125.67	125.56	126.07	124.55	126.37
25	130.69	131.57	131.68	131.63	130.80	130.63	130.58	131.55	130.39
26	25.54	25.73	25.65	25.67	25.71	25.57	25.57	25.71	25.36
27	17.54	17.68	17.67	17.67	17.70	17.56	17.60	17.79	17.50
28	28.47	26.57	26.70	27.98	26.63	28.58	28.48	28.01	28.49
29	16.14	21.05	20.99	15.27	21.00	15.08	16.17	16.61	16.06
30	17.18	17.34	16.73	16.77	16.80	16.79	19.84	19.18	17.14
CH ₂ O	170.58	170.63	170.63	170.63	170.63	170.63	170.63	170.63	170.63
	170.17	170.22	170.22	170.22	170.22	170.22	170.22	170.22	170.22
	169.55	169.55	169.55	169.55	169.55	169.55	169.55	169.55	169.55
	169.06	169.04	169.04	169.04	169.04	169.04	169.04	169.04	169.04
CH ₃ O	20.84	20.82	20.82	20.82	20.82	20.82	20.82	20.82	20.82
	20.60	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61
	20.58	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61	20.61

The structures of all prepared compounds were proved by IR, PMR, and ¹³C NMR spectroscopy. Doublets for anomeric protons of the sugars of acetylated glycosides (6-8, 12, 19, and 20) appeared in PMR spectra in CDCl₃ at δ 4.60-4.73 ppm (J_{1,2} = 7.8-8.0 Hz). Doublets for anomeric glucose protons in PMR spectra in C₂D₂N of free glycosides (1, 9-11, and 21) were observed at δ 5.09-5.27 ppm (J_{1,2} = 7.6-7.8 Hz). Chemical shifts and spin-spin coupling constants for anomeric glucose protons were consistent with the *trans*-configuration of the glycoside bond in all glycosides. The site of attachment of the glucose was confirmed by comparing ¹³C NMR spectra of 1, 5-7, 9-12, and 21 (Tables 1 and 2).

454



1: R₁ = R₂ = H, R₃ = Glc, 2: R₁ = R₂ = R₃ = H, 4: R₁ = R₂ = Ac, R₃ = H
 5: R₁ = H, R₂ = R₃ = GlcAc, 7: R₁ = H, R₂ = R₃ = GlcAc, 9: R₁ = GlcAc, 9: R₁ = Glc
 10: R₁ = H, R₂ = Glc, 11: R₁ = R₂ = H, R₃ = Glc, 12: R₁ = Ac, R₂ = H, R₃ = GlcAc
 13: R₁ = R₂ = Ac, R₃ = GlcAc, 14: R₁ = R₂ = H, 15: R₁ = GlcAc, R₂ = H
 16: R₁ = H, R₂ = GlcAc, 17: R₁ = R₂ = H, R₃ = GlcAc, 18: R₁ = R₂ = H, R₃ = GlcAc
 19: R₁ = R₂ = Ac, R₃ = Glc, 20: R₁ = Ac, R₂ = GlcAc, R₃ = H, 21: R₁ = R₂ = H, R₃ = Glc

The IR spectrum of 7 contained absorption bands for carbonyl at 1700 cm⁻¹ and free hydroxyl at 3612 cm⁻¹. The PMR spectrum of 7 exhibited a signal for the axial proton on C-3 at δ 3.19 ppm, which underwent a low-field shift and appeared at δ 4.47 ppm in the PMR spectrum of 8, which was obtained by acetylation of 7. Compared with the ¹³C NMR spectrum of 6, that of 7 had one of the two signals for carbonyl C atoms at δ 211.9 ppm, belonging to C-12, whereas the signal for the C-3 carbonyl at δ 216.9 ppm disappeared. Deacetylation of 7 by MeONa (0.1 N) in MeOH gave free 3β,20S-dihydroxydammar-24-en-12-one 20-O-β-D-glucopyranoside (10), the spectroscopy, elemental analysis, and physicochemical properties of which were identical to the general propanogen of natural dammarane glycosides with a 12-ketone in the aglycon [16].

Reduction of free 20S-hydroxydammar-24-en-3,12-dione 20-O-β-D-glucopyranoside (9), obtained after removing the protecting groups of 6, formed 3β,12α,20S-trihydroxydammar-24-ene (the 12-epimer of 20S-protopanaxadiol) (11) instead of the desired monoglycoside (1). Acetylation of 11 by Ac₂O in pyridine at room temperature gave the pentaacetate of 3β,12α,20S-trihydroxydammar-24-ene 20-O-β-D-glucopyranoside (12); at 90°C, it hexaacetate (13).

Therefore, the optimal version of the preparative synthesis of 1 was, in our opinion, glycosylation of 12β,20S-dihydroxydammar-24-en-3-one (14) by 3 with subsequent reduction by NaBH₄ in isopropanol of the reaction products (15 and 16) to form a mixture of the two tetraacetates 20S-protopanaxadiol 20- and 12-O-β-D-glucopyranosides (17 and 18). In order to simplify the chromatographic separation of 17 and 18, the resulting mixture of 17 and 18 was treated with Ac₂O in pyridine at 90°C for 2-3 h. Because the tertiary OH on C-20 in 18 was not acetylated, the treatment produced a mixture of the hexaacetate of 20S-protopanaxadiol 20-O-β-D-glucopyranoside (19) and the pentaacetate of 20S-protopanaxadiol 12-O-β-D-glucopyranoside (20), the chromatographic separation of which was facile. Deacetylation of 19 and 20 was effected using KOH solutions (10%) in MeOH and produced free 1 and 21, respectively, in quantitative yields.

455

TABLE 2. ¹³C NMR Chemical Shifts of Sugars in 1, 6, 7, 9-12, and 21 (δ, ppm, TMS = 0)

Compound	C atom					
	1'	2'	3'	4'	5'	6'
1	98.05	74.92	79.10	71.45	78.07	62.68
6	94.61	72.01	73.22	69.00	71.59	62.66
7	94.57	71.93	73.21	68.94	71.53	62.64
9	98.42	75.67	79.20	71.83	77.98	62.88
10	98.31	75.53	79.06	71.72	77.83	62.78
11	98.19	75.11	78.77	71.78	77.47	62.96
12	95.15	71.90	72.59	68.83	71.65	62.47
21	100.23	75.08	78.23	70.99	78.18	62.40

EXPERIMENTAL

PMR and ¹³C NMR spectra of 1, 9-11, and 21 were recorded on a Bruker Avance-500 spectrometer at working frequency 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C at 30°C in C₂D₂N₂ for 5-8, 12, 13, 19, and 20, in CDCl₃. Chemical shifts are given on the δ scale relative to TMS. The multiplicity of the ¹³C signals was established using DEPT-135 experiments by the standard method. Homonuclear 2D proton-proton correlation COSY-45 spectra and 2D heteronuclear HSQC and HMBSC correlation spectra were also recorded using standard methods. HMBSC experiments were optimized for J_{HC} = 19 Hz. IR spectra were recorded on a Bruker Vector 22 spectrophotometer in CHCl₃ solution. Optical rotation was determined on a Perkin-Elmer 141 instrument in 10-cm cuvettes at 20°C. Melting points were measured on a Beckman stage. Column chromatography was performed over KSK silica gel (120-150 mesh) using solvent systems hexane:acetone (15:1, 15:1-6:1, 10:1). The purity of compounds was monitored using TLC on Sefling plates (Russia) and hexane:acetone (3:2) and C₆H₆:CHCl₃:CH₂OH (6:4:1, 3:2:1, 2:1:1). Development used H₂SO₄ (10%) in ethanol with heating at 100-200°C. Elemental analyses of all newly prepared compounds agreed with those calculated.

Betalulofenolol (3α,12β,20S-trihydroxydammar-24-ene, 22) was isolated from an extract of *Betula pendula* leaves according to the literature method [14, 15], mp 195-196°C (acetone).

12β,20S-Dihydroxydammar-24-ene-3-one (14) was prepared on [14, 15], mp 196-198°C (acetone).

Oxidation of Betalulofenolol (22) into Diketone 5. Cooled absolute pyridine (25 mL) was stirred and treated with CrO₃ (3.4 g). After the yellowish-orange complex formed, a solution of 22 (1.67 g) in pyridine (12 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 20 h. The course of the reaction was monitored by TLC. The reaction mixture was diluted with CHCl₃ and passed through a layer of silica gel. Solvent was evaporated at reduced pressure. The solid was dried and chromatographed over a column of silica gel with elution by hexane:acetone (15:1) to afford diketone 5 (1.17 g, 70.3%) and monoketone 14 (0.35 g, 19.7%).

20S-Hydroxydammar-24-en-3,12-dione (5), mp 151-152°C (MeOH), [α]_D²⁰ +63.3° (c 0.9, CHCl₃), lit. mp 152-153.5°C [17]. PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J(Hz)): 0.812 (CH₃, s, Me-19), 1.039 (3H, s, Me-19), 1.072 (CH₃, s, Me-29), 1.106 (3H, s, Me-28), 1.119 (3H, s, Me-21), 1.228 (3H, s, Me-18), 1.621 (3H, s, Me-27), 1.088 (3H, s, Me-26), 2.29 (2H, d, J = 8.6, 2H-11), 2.49 (3H, m, 2H-2, H-17), 2.90 (1H, d, J = 10.2, H-13), 5.11 (1H, t, J = 7.1, 7.1, H-24).

Condensation of 5 with 3 in the Presence of Silver Oxide and 4Å Molecular Sieves. A mixture of 5 (2.4 g, 5 mmol), 3 (4.11 g, 10 mmol), Ag₂O (2.34 g, 10 mmol), and 4Å molecular sieves (2 g) in dichloroethane (30 mL) was stirred at room temperature for 1 h, treated twice at 1-h intervals with additional portions of 3 (2.06 g, 5 mmol), Ag₂O (1.17 g, 5 mmol), and 4Å molecular sieves (1 g); stirred for 3 h until 3 disappeared in the reaction mixture (TLC monitoring) and filtered to remove insoluble silver compounds and molecular sieves. Solvent was removed at reduced pressure. The solid was dried, washed three times with hot water, dried, and chromatographed over a silica-gel column with elution by hexane:acetone (15:1-6:1) to isolate diketone 5 (0.97 g, 40.4%) and glycoside 6 (1.86 g, 47.2%).

20S-(2',3',4',6'-Tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-3,12-dione (6), C₄₄H₆₄O₁₂, mp 200-202°C (EtOH), [α]_D²⁰ +32.6° (c 0.7, CHCl₃). IR spectrum (ν, cm⁻¹): 1704 (C=O), 1753 (CH₃-O). PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J(Hz)): 0.741 (3H, s, Me-30), 1.034 (3H, s, Me-21), 1.038 (3H, s, Me-19), 1.067 (3H, s, Me-29), 1.096 (3H, s,

455

10. Reference literature for NMR assignment of IH-901

Me-28), 1.251 (3H, s, Me-18), 1.612 (3H, s, Me-27), 1.657 (3H, s, Me-26), 1.988 (6H, s, 20Ac), 2.028 (3H, s, OAc), 2.056 (3H, s, OAc), 2.15 (1H, dd, J = 12.6, 4.1, H-10), 2.25 (1H, t, J = 12.9, 12.9, H-11), 2.47 (3H, m, 2H-2, H-17), 3.06 (1H, d, J = 9.7, H-13), 3.66 (1H, dd, J = 10.6, 6.8, 2.4, H-5), 4.09 (1H, dd, J = 12.1, 2.5, H-6), 4.16 (1H, dd, J = 12.1, 6.8, H-6), 4.61 (1H, d, J₁₋₂ = 7.8, H-1), 4.94 (1H, dd, J = 9.5, 7.8, H-2), 4.98 (1H, t, J = 9.6, 9.6, H-4), 5.05 (1H, t, J = 7.1, 7.1, H-24), 5.19 (1H, t, J = 9.5, 9.5, H-3).

Reduction of 6. A suspension of NaBH₄ (180 mg) in isopropanol (10 mL) was treated at room temperature with a solution of 6 (680 mg) in isopropanol (3 mL), stirred for 30 min until the starting 5 disappeared in the reaction mixture (TLC monitoring), treated dropwise with dilute (1:1) acetic acid, and poured onto ice. The resulting solid was filtered off and dried to afford 7 (570 mg, 83.6%).

3β-Hydroxy-20S-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-12-one (11). C₄₂H₇₀O₁₂, mp 199–200.5°C (MeOH), [α]_D²⁰ +21.3° (c 0.7, CHCl₃). IR spectrum (ν, cm⁻¹): 1701 (C=O), 1752 (CH₂-C=O), 3612 (OH). PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J/Hz): 0.724 (3H, s, Me-30), 0.796 (3H, s, Me-29), 0.935 (3H, s, Me-19), 0.981 (3H, s, Me-28), 1.028 (3H, s, Me-21), 1.197 (3H, s, Me-18), 1.604 (3H, s, Me-27), 1.651 (3H, s, Me-26), 1.977 (3H, s, OAc), 1.981 (3H, s, OAc), 2.020 (3H, s, OAc), 2.049 (3H, s, OAc), 2.15 (1H, dd, J = 8.6, 2H-11), 2.45 (1H, dd, J = 10.4, 10.4, 5.4, H-17), 3.01 (1H, d, J = 9.6, H-13), 3.19 (1H, dd, J = 11.1, 4.7, H-3), 3.66 (1H, dd, J = 10.1, 6.9, 2.5, H-5), 4.07 (1H, dd, J = 12.1, 2.5, H-6), 4.15 (1H, dd, J = 12.1, 6.9, H-6), 4.60 (1H, d, J₁₋₂ = 7.9, H-1), 4.93 (1H, dd, J = 9.4, 7.9, H-2), 4.98 (1H, t, J = 9.4, 9.4, H-4), 5.04 (1H, t, J = 7.0, 7.0, H-24), 5.18 (1H, t, J = 9.4, 9.4, H-3).

Acetylation of 7. Glucoside 7 (200 mg) in absolute pyridine (2 mL) was treated with absolute acetic anhydride (1 mL) and left at room temperature for 1 d. The reaction mixture was poured into a cylinder with ground ice. The resulting precipitate was filtered off, washed with ice water, and dried to afford 8.

3β-Acetoxy-20S-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-12-one (8). C₄₂H₇₀O₁₂, mp 241–243°C (EtOH), lit. mp [15] 242–244°C, [α]_D²⁰ +25.4° (c 0.6, CHCl₃). IR spectrum (ν, cm⁻¹): 1708 (C=O), 1730 (CH₂-C=O), 1753 (CH₂-C=O). PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J/Hz): 0.727 (3H, s), 0.876 (3H, s), 0.876 (3H, s), 0.966 (3H, s), 1.033 (3H, s), 1.204 (3H, s), 1.609 (3H, s), 1.657 (3H, s), 1.974 (3H, s, OAc), 1.980 (3H, s, OAc), 2.019 (3H, s, OAc), 2.038 (3H, s, OAc), 2.048 (3H, s, OAc), 2.15 (1H, dd, J = 10.2, 10.2, 5.5, H-17), 3.01 (1H, d, J = 9.6, H-13), 3.66 (1H, dd, J = 10.1, 6.6, 2.5, H-5), 4.08 (1H, dd, J = 12.1, 2.5, H-6), 4.15 (1H, dd, J = 12.1, 6.6, H-6), 4.47 (1H, dd, J = 11.2, 4.9, H-3), 4.60 (1H, d, J₁₋₂ = 7.7, H-1), 4.93 (1H, dd, J = 9.6, 8.0, H-2), 4.98 (1H, t, J = 9.6, 9.6, H-4), 5.04 (1H, t, J = 7.1, 7.1, H-24), 5.18 (1H, t, J = 9.3, H-3).

Glucoside 8 and 7 were deacetylated using MeONa (0.1 N) in MeOH at room temperature for 1–2 h.

20-O-β-D-Glucopyranosyl-3β,12β,20S-trihydroxydammar-24-en-11-one (9). C₃₈H₆₂O₈, amorph., [α]_D²⁰ +30.5° (c 0.9, C₆H₆N). PMR spectrum (500 MHz, C₆D₆N₆, δ, ppm, J/Hz): 0.877 (3H, s, Me-30), 0.889 (3H, s, Me-19), 1.044 (3H, s, Me-29), 1.133 (3H, s, Me-28), 1.333 (3H, s, Me-18), 1.592 (3H, s, Me-21), 1.624 (3H, s, Me-26), 1.640 (3H, s, Me-27), 3.67 (1H, d, J = 9.3, H-13), 3.92 (1H, m, H-5), 4.03 (1H, t, J = 8.2, 8.2, H-2), 4.24 (1H, m, H-3), H-4), 4.36 (1H, dd, J = 11.5, 5.3, H-6), 4.51 (1H, dd, J = 11.8, 2.8, H-6), 5.12 (1H, d, J₁₋₂ = 7.6, H-1), 5.22 (1H, t, J = 7.1, 7.1, H-24).

20-O-β-D-Glucopyranosyl-3β,12β,20S-trihydroxydammar-24-en-12-one (10). C₃₈H₆₂O₈, amorph., [α]_D²⁰ +27.3° (c 1.2, C₆H₆N). PMR spectrum (500 MHz, C₆D₆N₆, δ, ppm, J/Hz): 0.891 (3H, s, Me-30), 0.910 (3H, s, Me-19), 1.041 (3H, s, Me-29), 1.225 (3H, s, Me-28), 1.340 (3H, s, Me-18), 1.594 (3H, s, Me-21), 1.621 (3H, s, Me-26), 1.640 (3H, s, Me-27), 2.96 (1H, dd, J = 9.4, 9.4, 4.6, H-17), 3.41 (1H, dd, J = 10.7, 5.4, H-3), 3.65 (1H, dd, J = 9.5, H-13), 3.92 (1H, m, H-5), 4.03 (1H, t, J = 8.1, 8.1, H-2), 4.23 (1H, t, J = 8.8, 8.8, H-4), 4.26 (1H, t, J = 8.8, 8.8, H-4), 4.36 (1H, dd, J = 11.5, 5.1, H-6), 4.51 (1H, dd, J = 11.5, 2.7, H-6), 5.12 (1H, d, J₁₋₂ = 7.7, H-1), 5.22 (1H, t, J = 7.1, 7.1, H-24).

Reduction of 9. A suspension of NaBH₄ (70 mg) in isopropanol (10 mL) at room temperature was treated dropwise with a solution of 9 (35 mg) in isopropanol (7 mL) and stirred for 20 h. The excess of NaBH₄ was destroyed by adding dropwise dilute (1:1) acetic acid. The reaction mixture was poured onto ice and extracted with CHCl₃. The solvent was distilled off. The solid was dried to afford 11 (30 mg, 85.2%).

20-O-β-D-Glucopyranosyl-3β,12β,20S-trihydroxydammar-24-en-11-one (11). C₃₈H₆₂O₈, amorph., [α]_D²⁰ +24° (c 1.5, C₆H₆N). PMR spectrum (500 MHz, C₆D₆N₆, δ, ppm, J/Hz): 0.934 (3H, s, Me-30), 0.907 (3H, s, Me-19), 1.078 (3H, s, Me-29), 1.252 (3H, s, Me-28), 1.432 (3H, s, Me-18), 1.604 (3H, s, Me-21), 1.643 (3H, s, Me-26), 1.655 (3H, s, Me-27), 3.43 (1H, dd, J = 11.4, 4.7, H-3), 3.92 (1H, dd, J = 9.4, 5.2, 2.7, H-5), 3.99 (1H, t, J = 8.0, 8.0, H-2), 4.20 (1H, t, J = 8.9, 8.9, H-4), 4.24 (1H, t, J = 8.9, 8.9, H-4), 4.35 (1H, dd, J = 11.4, 5.5, H-6), 4.53 (1H, dd, J = 11.4, 2.7, H-6), 4.88 (1H, dd, J = 5.7, 2.9, H-12), 5.09 (1H, d, J₁₋₂ = 7.7, H-1), 5.20 (1H, t, J = 7.1, 7.1, H-24).

12-O-β-D-Glucopyranosyl-3β,12β,20S-trihydroxydammar-24-en-11-one (12). C₄₂H₇₀O₁₂, amorph., [α]_D²⁰ +43° (c 0.75, C₆H₆N). PMR spectrum (500 MHz, C₆D₆N₆, δ, ppm, J/Hz): 0.770 (3H, s, Me-30), 0.827 (3H, s, Me-18), 0.842 (3H, s, Me-30), 1.019 (3H, s, Me-29), 1.223 (3H, s, Me-28), 1.343 (3H, s, Me-21), 1.643 (3H, s, Me-26), 1.649 (3H, s, Me-27), 3.42 (1H, dd, J = 10.7, 5.6, H-3), 4.00 (1H, dd, J = 9.6, 5.0, 2.6, H-5), 4.09 (1H, dd, J = 9.0, 7.8, H-2), 4.21 (1H, t, J = 9.2, 9.2, H-4), 4.29 (1H, t, J = 8.8, 8.8, H-3), 4.30 (1H, m, H-12), 4.32 (1H, dd, J = 11.6, 5.0, H-6), 4.47 (1H, dd, J = 11.6, 2.6, H-6), 5.27 (1H, d, J₁₋₂ = 7.6, H-1), 5.34 (1H, m, H-24).

Acetylation of 11. a) Glucoside 11 (30 mg) in absolute pyridine (1 mL) was treated with absolute acetic anhydride (0.7 mL) and left at room temperature for 1 d. The reaction mixture was poured into a cylinder with ground ice and extracted with CHCl₃. The solvent was distilled off. The solid was dried to afford 12.

b) A solution of 11 (30 mg) in absolute pyridine (1 mL) was treated with absolute acetic anhydride (0.7 mL) and left at 80–90°C for 5 h. The reaction mixture was poured into a cylinder with ground ice. The resulting precipitate was filtered off, washed with ice water, and crystallized from EtOH to afford 13.

3β-Acetoxy-12β-hydroxy-20S-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-12-one (12). C₄₂H₇₀O₁₂, mp 193–195°C (EtOH), [α]_D²⁰ +48.5° (c 0.4, CHCl₃). IR spectrum (ν, cm⁻¹): 1726 (CH₂-C=O), 1753 (CH₂-C=O), 3469 (OH). PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J/Hz): 0.852 (3H, s, Me-29), 0.856 (3H, s, Me-28), 0.895 (3H, s, Me-19), 0.939 (3H, s, Me-18), 1.077 (3H, s, Me-30), 1.198 (3H, s, Me-21), 1.598 (3H, s, Me-27), 1.663 (3H, s, Me-26), 1.990 (3H, s, OAc), 2.017 (3H, s, OAc), 2.043 (3H, s, OAc), 2.046 (3H, s, OAc), 2.064 (3H, s, OAc), 3.65 (1H, dd, J = 10.1, 5.7, 2.4, H-5), 4.08 (1H, dd, J = 12.2, 2.4, H-6), 4.14 (1H, dd, J = 12.1, 5.7, H-6), 4.28 (1H, m, H-12), 4.49 (1H, dd, J = 11.1, 5.3, H-3), 4.69 (1H, d, J₁₋₂ = 7.9, H-1), 4.92 (1H, dd, J = 9.8, 7.9, H-2), 5.00 (1H, t, J = 9.8, 9.8, H-4), 5.04 (1H, t, J = 6.9, 6.9, H-24), 5.23 (1H, t, J = 9.6, 9.6, H-3).

3β,12β-Diacetoxy-20S-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-12-one (13). C₄₂H₇₀O₁₂, mp 174–176°C (EtOH), [α]_D²⁰ +49.9° (c 0.4, CHCl₃). IR spectrum (ν, cm⁻¹): 1726 (CH₂-C=O), 1753 (CH₂-C=O). PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J/Hz): 0.854 (3H, s, Me-29), 0.862 (3H, s, Me-28), 0.886 (3H, s, Me-19), 0.974 (3H, s, Me-18), 1.036 (3H, s, Me-30), 1.170 (3H, s, Me-21), 1.599 (3H, s, Me-27), 1.653 (3H, s, Me-26), 1.980 (3H, s, OAc), 2.014 (3H, s, OAc), 2.038 (3H, s, OAc), 2.041 (3H, s, OAc), 2.046 (3H, s, OAc), 2.074 (3H, s, OAc), 3.65 (1H, dd, J = 10.1, 6.6, 2.5, H-5), 4.08 (1H, dd, J = 12.1, 2.5, H-6), 4.15 (1H, dd, J = 12.1, 6.6, H-6), 4.47 (1H, dd, J = 10.4, 5.8, H-3), 4.63 (1H, d, J₁₋₂ = 8.1, H-1), 4.95 (1H, dd, J = 9.6, 8.0, H-2), 4.98 (1H, t, J = 9.6, 9.6, H-4), 5.05 (1H, t, J = 6.9, 6.9, H-24), 5.16 (1H, dd, J = 6.0, 3.0, H-12), 5.19 (1H, t, J = 9.6, 9.6, H-3).

Synthesis of 20S-Protopanaxadiol 20- and 12-O-β-D-Glucopyranosides (1 and 2). A mixture of 14 (11.5 g, 25 mmol), 3 (2.06 g, 5 mmol), Ag₂O (1.17 g, 5 mmol), and 4Å molecular sieves (1 g) in dichloroethane (30 mL) was stirred at room temperature for 1 h; treated twice at 1-h intervals with additional portions of 3 (2.06 g, 5 mmol), Ag₂O (1.17 g, 5 mmol), and 4Å molecular sieves (1 g); stirred for 3 h until 5 disappeared in the reaction mixture (TLC monitoring); and filtered to remove insoluble silver compounds and molecular sieves. Solvent was removed at reduced pressure. The solid was dried, washed three times with hot water to remove the excess of glucose derivatives, and dried to afford the crude product (19 g). A suspension of NaBH₄ (200 mg) in isopropanol (15 mL) was treated dropwise with a solution of the crude product (19 g) in isopropanol (10 mL) and stirred at room temperature for 3 h until the reaction was complete (TLC monitoring). The excess of NaBH₄ was decomposed by adding dropwise dilute (1:1) acetic acid. The reaction mixture was poured into a cylinder with ground ice and extracted with CHCl₃. The extracts were evaporated and dried. The solid was dissolved in absolute pyridine (10 mL), treated with acetic anhydride (7 mL), held at 90°C for 3 h (TLC monitoring), and poured onto ice. The resulting precipitate was filtered off, washed with cold water, and dried. The solid (1.48 g) was chromatographed over a silica-gel column with elution by hexane:acetone (10:1) to afford 19 (0.32 g, 14.5%) and 20 (0.98 g, 45.7%).

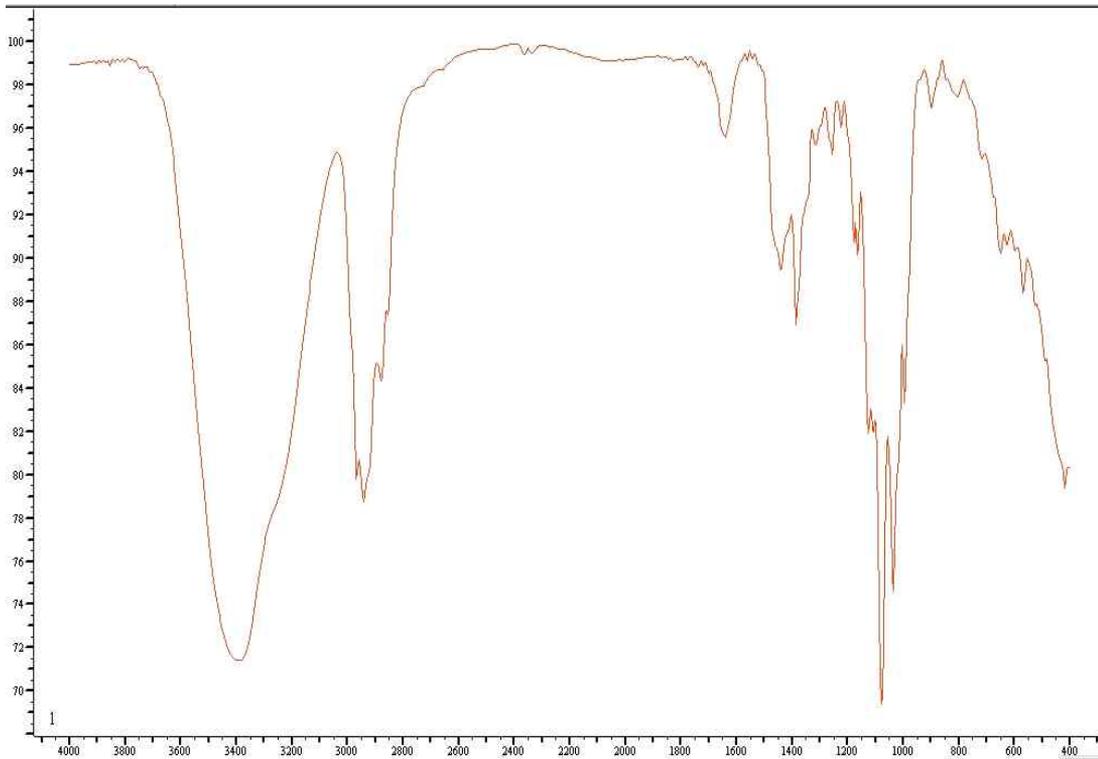
3β,12β-Diacetoxy-20S-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-12-one (19). mp 176–177°C (EtOH), lit. mp [15] 177–178°C. PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J/Hz): 0.849 (3H, s), 0.878 (3H, s), 0.927 (3H, s), 0.968 (3H, s), 1.177 (3H, s), 1.595 (3H, s), 1.655 (3H, s), 1.977 (3H, s, OAc), 1.991 (3H, s, OAc), 2.023 (3H, s, OAc), 2.055 (3H, s, OAc), 2.049 (3H, s, OAc), 2.056 (3H, s, OAc), 3.65 (1H, dd, J = 10.2, 5.3, 2.4, H-5), 4.10 (1H, dd, J = 12.0, 3.2, H-6), 4.13 (1H, dd, J = 12.2, 5.5, H-6), 4.48 (1H, dd, J = 11.0, 5.0, H-3), 4.67 (1H, d, J₁₋₂ = 7.7, H-1), 4.83 (1H, dd, J = 10.7, 10.7, 5.2, H-12), 4.92 (1H, dd, J = 9.7, 8.0, H-2), 4.99 (1H, t, J = 9.7, 9.7, H-4), 5.01 (1H, m, H-24), 5.19 (1H, t, J = 9.5, 9.5, H-3).

3β-Acetoxy-20S-hydroxy-12β-(2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl)dammar-24-en-12-one (20). mp 137–140°C (EtOH), lit. mp [15] 137–140°C. PMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm, J/Hz): 0.867 (3H, s), 0.886 (3H, s), 0.898 (3H, s), 0.970 (3H, s), 1.110 (3H, s), 1.643 (3H, s), 1.706 (3H, s), 1.989 (3H, s, OAc), 2.014 (3H, s, OAc), 2.034 (3H, s, OAc), 2.061 (3H, s, OAc), 2.093 (3H, s, OAc), 3.67 (1H, dd, J = 10.0, 3.7, 3.7, H-5), 3.81 (1H, dd, J = 10.7, 10.7, 5.0, H-12), 3.95 (1H, s, OH), 4.21 (2H, d, J = 4.00, 2H-6), 4.49 (1H, dd, J = 11.5, 4.7, H-3), 4.73 (1H, d, J₁₋₂ = 8.0, H-1), 4.91 (1H, dd, J = 9.7, 8.0, H-2), 5.09 (1H, t, J = 9.7, 9.7, H-4), 5.17 (1H, m, H-24), 5.21 (1H, t, J = 9.5, 9.5, H-3).

Compounds 19 and 20 were deacetylated by KOH (10%) in methanol at room temperature.

1. I. Yosioka, T. Sugawara, K. Inai, and I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 2418 (1972).
2. H. Hasegawa, J. H. Sung, and J. D. Huh, *Arch. Pharm. Res.*, **20**, 539 (1997).
3. C. Wakabayashi, K. Murakami, H. Hasegawa, J. Murata, and I. Saiki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 725 (1998).
4. I. K. Kang, Y. J. Lee, K. O. No, E. Y. Jung, J. H. Sung, Y. B. Kim, and S. Y. Nam, *Reprod. Toxicol.*, **16**, 291 (2002).
5. D. H. Kim, J. S. Jung, Y. S. Moon, J. H. Sung, H. W. Suh, Y. H. Kim, and D. K. Song, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1035 (2005).
6. S. Kim, B. Y. Kang, S. Y. Cho, D. S. Sung, H. K. Chang, M. H. Yeon, D. H. Kim, Y. C. Sim, and Y. S. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 548 (2004).
7. S. J. Lee, J. H. Sung, S. J. Lee, C. K. Moon, and B. H. Lee, *Cancer Lett.*, **144**, 39 (1999).
8. L. N. Atopkina, G. V. Malinotskaya, G. B. Elyakov, N. I. Uvarova, H. J. Woerdenburg, A. Koulinan, N. Pras, and P. Pater, *Planta Med.*, **65**, 30 (1999).
9. S. J. Lee, W. G. Ko, J. H. Kim, J. H. Sung, S. J. Lee, C. K. Moon, and B. H. Lee, *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 677 (2000).
10. S. H. Oh and B. H. Lee, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **194**, 221 (2004).
11. A. M. Popov, L. N. Atopkina, N. I. Uvarova, and G. B. Elyakov, *Dokl. Akad. Nauk*, **380**, 1 (2001).
12. M.-K. Cho, E.-K. Park, M.-J. Han, and D.-H. Kim, *Planta Med.*, **69**, 518 (2003).
13. E.-K. Park, Y.-W. Shin, H.-U. Lee, S.-S. Kim, Y.-C. Lee, B.-Y. Lee, and D.-H. Kim, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 652 (2005).
14. L. N. Atopkina, V. A. Denisenko, V. L. Novikov, and N. I. Uvarova, *Khim. Prir. Soedin.*, **301** (1986).
15. L. N. Atopkina, V. A. Denisenko, N. I. Uvarova, and G. B. Elyakov, *Carbohydr. Res.*, **177**, 101 (1988).
16. S. Yahara, O. Tamaka, and I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3010 (1978).
17. O. Tamaka, M. Nagai, T. Ohtsura, N. Tamaka, K. Kawai, and S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1204 (1972).

11. FT-IR spectrum for IH-901 reference material



12. Reference literature for IR spectrum of IH-901RM

From Central Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo (Japan)

Isolation and Characterization of Ginsenoside-Rg₂, 20R-Prosopogenin, 20S-Prosopogenin and Δ²⁰-Prosopogenin

Chemical studies on saponins of *Panax ginseng* C. A. Meyer, Thiriel report

By T. Kaku and Y. Kawashima

Summary: In the course of a chemical study on pure ginsenosides, a ginsenoside-Rg₂ was isolated as colorless needles, from the lateral root of *Panax ginseng* C. A. Meyer. For the characterization of Rg₂, a chikastaninaponin-I (ginsenoside-Rg₁) was isolated as colorless needles from rhizome of *Panax japonicus* C. A. Meyer. The optical rotation value of both saponins were opposite to the published data. On the large scale isolation of ginsenosides, trace amount of ginsenoside-Rg₂ was isolated as crystals. Three compounds, A, B and C, were isolated from the reaction mixture on hydrolysis of ginsenoside-Rb₁, Rb₂, and Rg₁ with 50% aq. acetic acid. A was 20R-prosopogenin and was identical with Rg₂. On the other hand, B was found to be 20S-prosopogenin and C was estimated to be prosopogenin dehydrated at C-20-OH and named as Δ²⁰-prosopogenin. It was found that an equilibrium is present among A, B and C at the earlier stage on acid hydrolysis.

Zusammenfassung: Isolierung und Charakterisierung von Ginsenosid-Rg₂, 20R-Prosopogenin, 20S-Prosopogenin und Δ²⁰-Prosopogenin. Im Verlauf der chemischen Studien über reine Ginsenoside wurde aus Wurzel von *Panax ginseng* C. A. Meyer, Ginsenosid-Rg₂ als farblose Nadeln isoliert. Für die Charakterisierung des Rg₂ wurde Chikastaninaponin-I (Ginsenosid-Rg₁) aus Rhizom von *Panax japonicus* C. A. Meyer als farblose Nadeln isoliert. Die optischen Rotationswerte von beiden Saponinen waren den veröffentlichten Daten entgegengesetzt. Bei der Isolierung von Ginsenosiden in größerem Maßstab wurde eine Spurenmenge Ginsenosid-Rg₂ als Kristalle isoliert. Drei Verbindungen A, B und C wurden aus der Reaktionslösung durch Hydrolyse von Ginsenosid-Rb₁, Rb₂ und Rg₁ mit 50% wässriger Essigsäure isoliert. A war 20R-Prosopogenin, identisch mit Rg₂. Gleichzeitig wurde B als 20S-Prosopogenin gefunden. C wurde als dehydriertes Prosopogenin, ein C₂₀-OH, Δ²⁰-Prosopogenin genannt. Es wurde festgestellt, daß ein Gleichgewicht zwischen A, B und C auf der frühen Stufe der Säurehydrolyse stattfindet.

Key words: Ginsenosides - *Panax ginseng* C. A. Meyer - Prosopogenins - Saponins

1. Introduction

The root of *Panax ginseng* C. A. Meyer is one of the most familiar oriental medicines. Studies on the isolation of saponins, such as ginsenoside-Ro, Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rg, Rd, Re, 20-glyco-Rf, Rg₁, and Rg₂ from the root, and on the determination of their structures have been done by Shibata et al. [1, 2], Kaku et al. [3], and Sanada et al. [4]. A chemical and pharmacological study of seven pure saponins, ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rg, Rd, Re, Rf and Rg₂, was also reported [4].

2. Chemistry

It is known that the structures of ginsenoside-Rb₁, Rb₂, Rg and Rd are different only in the sugar moieties attached to C-20 position of the aglycone, 20S-protopanaxadiol (Scheme 1). Mild hydrolysis of these ginsenosides with acid gave prosopogenin [5, 6, 7, 8, 9, 10]. The prosopogenin was converted into the 20R-protopanaxadiol by periodic desaturation of the D-glucose moiety at C-3 position [9]. It was previously pointed out that epimerization occurs at C-20 position in the acidic hydrolysis, however, 20S-prosopogenin has never been isolated from the hydro-

In the course of our chemical study on pure ginsenosides, we found that the optical rotational value of Rg₂ is being misreported, that Rg₂ which was only detected on thin-layer chromatogram by Shibata et al. [11, 12] is identical with 20R-prosopogenin (A), that 20S-prosopogenin (B) and Δ²⁰-prosopogenin (C) are also present in the acetic acid hydrolyzate of the above ginsenosides. The ginsenoside-Rg₂ was obtained from lateral root of the ginseng cultivated in Nagano prefecture, Japan, as colorless needles in very low yield by a silica gel column chromatography (eluent: CH₂Cl₂/MeOH=85/15), while the Rg₂ was not isolated as crystal from the main root cultivated 5-6 years. On a thin-layer chromatogram (Fig. 1) the Rg₂ showed a slightly larger R_F value than that of an authentic sample of Rg₂. The melting point and analytical values of Rg₂ and products (Diglucoside, L-rhamnose and ramosaric acid) liberated on acid hydrolysis agreed well with those reported in the literature [5] but the sign of optical rotation of our sample was opposite to the published data [5]. It was recently reported [13] that chikastaninaponin-I isolated from rhizome of *Panax japonicus* C. A. Meyer was identical with ginsenoside-Rg₁. So we isolated it from the

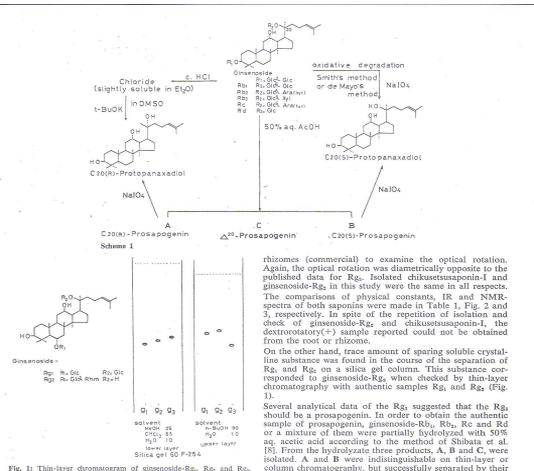


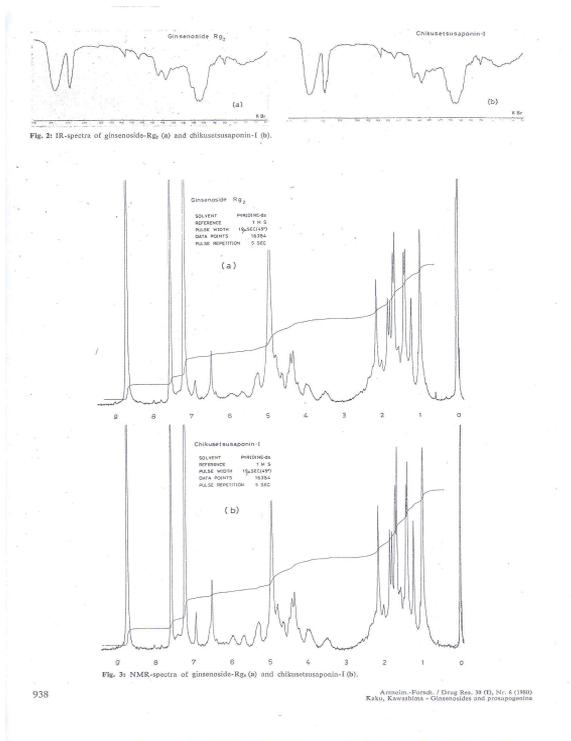
Fig. 1 Thin-layer chromatogram of ginsenoside-Rg₂, Rg₁, and Rg.

Table 1: Properties of ginsenoside-Rg₂ and chikastaninaponin-I.

Product	mp. (°C)	[α] _D ²⁰	Formula	Sugar	Aglycone	Method
Ginsenoside Rg ₂	185 - 186 (EHOH) colorless needles	-14.9° C ₂₀ H ₃₈ O ₁₀ MeOH, 20°	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂ · H ₂ O	Glucose Rhamnose	Panaxatriol	IR 3400 (OH), 1635 (C=C) NMR δ = 1.82, 1.68 δ-C ₁₃ gem. CH ₃ τ = 1.78 (CH ₃ of Rham.) τ ₂ = 0.85
Ginsenoside Rg ₁	3-0	+3.90 - 4.00 C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ MeOH, 20°	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ · 2H ₂ O	Glucose Rhamnose	Panaxatriol	IR 3400 (OH) 1630 (C=C)
Chikastaninaponin-I	185 - 186 (EHOH) colorless needles	-14.9° C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ MeOH, 20°	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ · H ₂ O	Glucose Rhamnose	Panaxatriol	IR 3400 (OH), 1635 (C=C) NMR δ = 1.62, 1.68 δ-C ₁₃ gem. CH ₃ τ = 1.78 (CH ₃ of Rham.) τ ₂ = 0.85
Chikastaninaponin-I	13	+4.90° C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ MeOH, 20°	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₀ · 2H ₂ O	Glucose Rhamnose	Panaxatriol	IR 3400 (OH) 1630 (C=C)

Arzmitz, Festsch. / Dong Rat. 30 (3), Nr. 6 (1989)
Kaku, Kawashima - Ginsenoside und prosopogenin

12. Reference literature for IR spectrum of IH-901RM



938

Arimura, Fureki / Drug Res. 30 (1), No. 4 (1980)
Kubo, Kawashima - Ginsenosides and protoposgenin

Table 2: Properties of 20R-, 20S- and 20^{AB}-protoposgenin.

Product	mp. (°C)	Color	[α] _D ²⁰	Formula	Sugar	Component
A	298 ~ 303 dec.	Dioxane colorless needles	-14.09	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
20R-Protoposgenin	248 ~ 250	iso-PyOH colorless needles	+16.5 ^a	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
B	298 ~ 303	Dioxane colorless needles	-14.09	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
20S-Protoposgenin	248 ~ 250	iso-PyOH colorless needles	+16.5 ^a	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
Rg ₂	298 ~ 303	Dioxane colorless needles	-14.09	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
Protoposgenin	368 ~ 382	MeOH colorless crystals	-20.09	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
C	187 ~ 195	white powder	+5.5 ^a	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₁	Glucose 2	Panaxadiol
20 ^{AB} -Protoposgenin						

large difference of solubility in methanol. A sparingly soluble in methanol was purified by crystallization from acetic acid (60%) as colorless needles of mp. 298~303°C, (α)_D²⁰ -14.09 (C 0.26, pyridine), and B soluble in methanol was crystallized from ac. isopropanol (90%) as colorless needles of mp. 248~250°C, (α)_D²⁰ +16.5 (C 1.00, methanol). The physical constants (Table 2) and spectral data (Fig. 4 and 5) strongly supported that A (20R-protoposgenin) is identical with Rg₂.

In order to confirm the structures of A and B, they were respectively converted into 20R- or 20S-protopanaxadiol by periodate oxidation. Comparison of these samples with authentic samples prepared by the methods reported [14] proved the structure of A and B to be 20R- and 20S-protoposgenin, respectively (Scheme 1). C and B were se-

parated from methanol soluble hydrolyzate described above by a silica gel column chromatography (effluent: CHCl₃/MeOH/H₂O=75~70/25~30/10, lower layer). Analytically pure C was prepared by the saponification of the corresponding acetate which was purified on a silica gel column (effluent: benzene/MeOH=98/2). A, B and C gave the same hydrolyzate, panaxadiol and D-glucose, by hydrochloric acid hydrolysis. The UV absorption of C (λ_{max}²⁵ 206 nm, ε 3055) suggests the presence of two double bonds in the structure in comparison with B (λ_{max}²⁵ 203 nm, ε 3770).

Moreover, the NMR spectrum of the acetate showed a new methyl proton signal at δ 1.84 ppm as a doublet (J = 2.5 Hz) in CDCl₃. These evidences indicate that C is 20^{AB}-protoposgenin produced by the elimination of C-20-hydroxy group. Examination of acid hydrolyzates of the ginsenosides with thin-layer chromatography showed the formation of C at the earlier stage of the hydrolysis (Fig. 6). In addition, it was confirmed by check of thin-layer chromatography that C and B-A formed from B and C, respectively, in ac. acetic acid (Fig. 6). A treatment of B with 3% hydrochloric acid at room temperature gave a mixture of 20R- and 20S-protopanaxadiol as reported on the mixture of ginsenoside-Rb₁, Rb₂ and Rg₁ [14].

Therefore, it can be concluded that A and B are in equilibrium state in the hydrolyzate via C by dehydration-hydration reaction (Scheme 2). Thus, 20S-configuration in the native ginsenosides changes to 20R-, and 20R-protoposgenin becomes the main product in the hydrolyzates.

3. Experimental

3.1. Crude drugs

The dried lateral root of Panax ginseng C. A. Meyer cultivated in Nagano prefecture (Japan) and the commercial dried rhizomes of Panax japonicus C. A. Meyer were used. The combination with roots of young plant in the former were checked. Methanol extract of the rhizomes and that of the collection in Tochigi prefecture (Japan) gave the same pattern on thin-layer chromatogram (CHCl₃/MeOH/H₂O = 65/35/10 lower layer).

3.2. Chromatography

Silica gel (Wakogel 100 or 200) column was used for separation of crude substances. For thin-layer chromatography, pre-coated TLC plate, silica gel 60F-25 (Merck Art. 5713), was used. As spray reagent, 10% sulfuric acid was used for saponins and benzene-trichloroacetic acid (10 ml 5% benzoic acid in ac. and 10 ml 40% ac. trichloroacetic acid/100 ml ethanol) for sugar. After spraying the plate was heated to above 100°C.

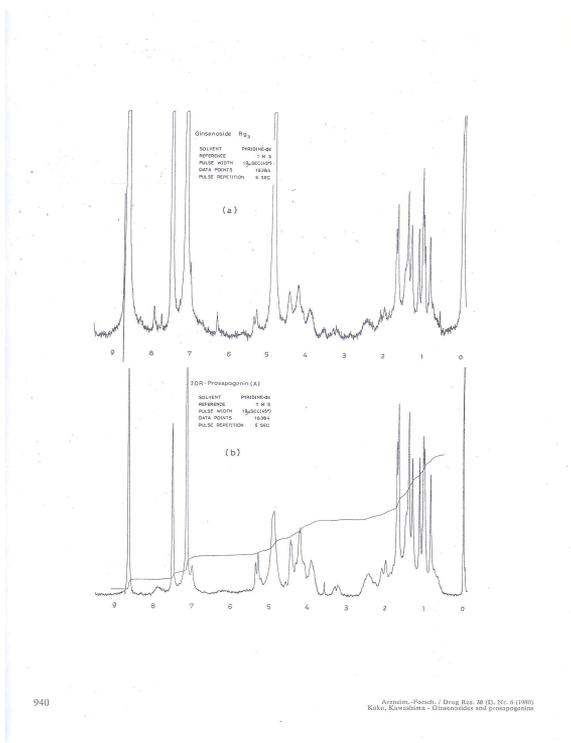
3.3. Physical measurements

Melting points were determined on a Yanagimoto micro melting point apparatus and uncorrected. Optical rotation was measured with Perkin-Elmer Model 241 polarimeter. IR spectra were

Fig. 4: IR-spectra of ginsenoside-Rg₂ (a), 20R-protoposgenin (b) and 20S-protoposgenin (c).

Arimura, Fureki / Drug Res. 30 (1), No. 4 (1980)
Kubo, Kawashima - Ginsenosides and protoposgenin

939



940

Arimura, Fureki / Drug Res. 30 (1), No. 4 (1980)
Kubo, Kawashima - Ginsenosides and protoposgenin

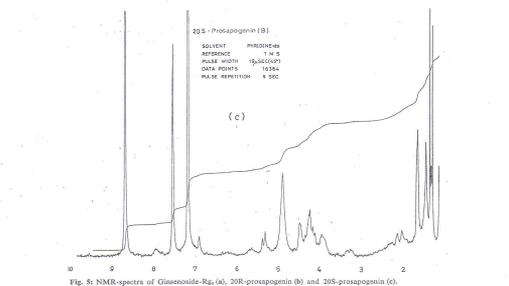


Fig. 5: NMR-spectra of Ginsenoside-Rg₂ (a), 20R-protoposgenin (b) and 20S-protoposgenin (c).

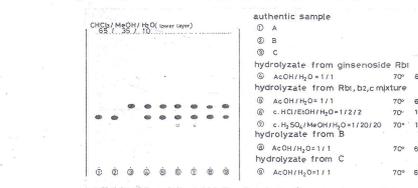
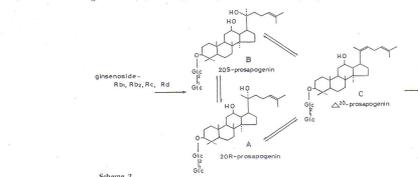


Fig. 6: Thin-layer chromatogram of hydrolyzate in the mild hydrolysis reaction.



Arimura, Fureki / Drug Res. 30 (1), No. 4 (1980)
Kubo, Kawashima - Ginsenosides and protoposgenin

941

12. Reference literature for IR spectrum of IH-901RM

recorded on a Hitachi Model EPI-G2 spectrometer. UV spectra were recorded on a Shimadzu UV-210A double-beam spectrophotometer. NMR spectra were obtained with a JEOL FX-100 FT-NMR spectrometer. Mass spectra were obtained with a Hitachi RMU-6MG mass spectrometer.

3.4. Isolation of ginsenoside-Rg₂

1 kg of powdered lateral roots of Panax ginseng, C. A. Meyer was well-extracted three times with 1 l of dichloromethane at room temperature to remove fats and oils, and the residue was extracted three times with 5, 4 and 3 l of methanol to isolate saponins similarly. All methanol extracts were combined and concentrated in vacuo. To a solution of the residue in methanol (600 ml) was added dichloromethane (350 ml) with stirring, and viscous precipitates formed were removed from the solution by decantation. Then again, 400 ml dichloromethane was added into the solution and the supernatant liquid separated by decantation similarly. The residue evaporated in vacuo was washed with small amount of dichloromethane and the remaining solvent was removed in a reduced pressure. The resulting product (15–14 g) contains ginsenoside-Rg₂, Rg₁ and Rg₃. The Rg₂ was isolated from the above mixture by column chromatography on silica gel (eluent: CH₂Cl₂/MeOH=8/2) twice and then it was crystallized from ethanol, as colorless needles, mp. 185–186°C (lit. [2] 184–185°C (lit. 1.00 MeOH)).

Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: H₂O: C 62.81; H 9.28. Found: C 62.49; H 9.38.

IR (KBr disc) 3400 (OH), 1635 cm⁻¹ (C = C).

NMR (pyridine-d₅) δ = 1.62, 1.68 (s, C₂₀ gem. CH₃), δ 1.78 (d, CH of Rham); TLC R_f = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O = 65/35/10 lower layer).

3.5. Isolation of dihydrostemonosaponin-1
Chiknostenosaponin-1 was isolated from powdered rhizomes of Panax japonicus C. A. Meyer (1 kg) according to the procedure similar to that described above. The saponin was crystallized from ethanol, colorless needles (0.2 g), mp. 185–186°C (lit. [14] 184–185°C (lit. 1.00 MeOH)).

Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: H₂O: C 62.81; H 9.28. Found: C 62.65; H 9.24.

IR (KBr disc) 3400 (OH), 1635 cm⁻¹ (C = C).

NMR (pyridine-d₅) δ = 1.62, 1.68 (s, C₂₀ gem. CH₃), δ 1.78 (d, CH of Rham); TLC R_f = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O = 65/35/10 lower layer).

3.6. Isolation of ginsenoside-Rg₃
According to the procedure similar to described above, ginsenoside-Rg₃ was separated with Rg₂ from lateral roots of Panax ginseng C. A. Meyer (10 kg). The crystalline mixture of Rg₂ and Rg₃ was washed with a small amount of methanol and filtered. The sparingly soluble crystalline powder in methanol was purified by recrystallization from 60% ac. diacetate as colorless needles (0.03 g), mp. 208–209°C, [α]_D²⁵ = -14.0° (C 0.26, pyridine).

Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: C 64.25; H 9.24. Found: C 63.93; H 9.25.

3.7. Preparation of 20R-protopanaxadiol
The 20R-protopanaxadiol was prepared according to the method described in the literature [12]. A mixture of saponins (3 g), ginsenoside-Rb₁, Rb₂, and Rg₂, was used for the preparation. The product was yielded as colorless needles (0.4 g), mp. 236–238°C (from benzene) (lit. [23] 238–239°C), [α]_D²⁵ = -17.8° (C 1.00 CHCl₃) (lit. +20.5° (C 1.03)).

3.8. Preparation of 20S-protopanaxadiol
A mixture of saponins (3 g), ginsenoside-Rb₁, Rb₂, and Rg₂, was used for preparation of the saponin by published method [14]. The product was yielded as colorless needles (0.2 g), mp. 199–200°C (from benzene) (lit. 197–200°C), [α]_D²⁵ = -26.3° (C 1.00 CHCl₃) (lit. +26.7°).

3.9. Preparation and isolation of 20R-, 20S- and 20β-protopanaxins
A mixture of saponins (10 g), ginsenoside-Rb₁, Rb₂, and Rg₂, was warmed at 70°C with 30% ac. acetic acid (20 ml) for 2 h. The crystalline precipitate in the reaction mixture was filtered off and washed with a small amount of methanol. The filtrate was diluted with water (20 ml) and extracted three times with

n-butanol (70 ml). The extract was evaporated in vacuo and the residue dissolved in methanol (30 ml). After standing overnight the precipitate in the methanol solution was filtered off and washed with methanol. The filtrate was concentrated and the residue purified by column chromatography on silica gel (eluent: CH₂Cl₂/MeOH/H₂O = 70/20/10 lower layer).

At the results of above treatment, compound A (2.37 g), which was sparingly soluble in methanol, compound B (1.76 g) which was soluble in methanol and compound C (1.45 g), which had different R_f value from A and B were separated. A (diβ-protopanaxin) was recrystallized from 60% ac. diacetate as colorless needles, mp. 298–300°C (dec.), [α]_D²⁵ = -14.0° (C 0.26 pyridine). Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: C 64.26; H 9.24. Found: C 64.03; H 9.33.

B (20S-protopanaxin) was purified by recrystallization from 90% ac. isopropanol as colorless needles, mp. 248–250°C, [α]_D²⁵ = +16.9° (C 1.00 MeOH). Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: H₂O: C 61.45; H 9.33. Found: C 61.37; H 9.34.

C (1.45 g) was acetylated with acetic anhydride (6.5 g) and pyridine (9 ml) at room temperature for 6 h. The reaction mixture was poured into ice water (100 g) and the precipitate was extracted with CHCl₃ (30 ml). The extract was washed with water and concentrated to dryness. The residue (2.2 g) was purified by silica gel column chromatography (eluent: benzene/MeOH 9/1) and gave white powder.

Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: H₂O: C 62.06; H 8.01. Found: C 61.79; H 7.84. Mass spectrum: m/z (M⁺ - CH₃COOH).

The obtained acetate (0.5 g) was refluxed with 9% KOH/MeOH (30 ml) for 30 min, and the reaction mixture was concentrated in vacuo. The residue was neutralized in the ice water with 2 N HCl and was extracted with n-butanol. A purification of the liberated C on silica gel column (eluent: CHCl₃/MeOH/H₂O = 30/30/10 lower layer) gave white powder.

mp. 187–189°C, [α]_D²⁵ = +1.0° (C 1.00 MeOH). Anal. Calcd. for C₄₂H₆₄O₁₁: H₂O: C 61.49; H 9.35. Found: C 61.69; H 9.39.

3.10. Preparation of 20R- and 20S-protopanaxadiol from A and B by peracetic acid degradation
Sodium metaperiodate (1.0 g) was added into a suspension of A (0.3 g) in the mixture solution (MeOH/EtOH/H₂O = 100/60/ 60 ml) during 30 min under ice cooling and stirring for 3 days. The filtrate concentrated in vacuo. The concentrated water solution was extracted with n-butanol and the n-butanol extract was washed with water. The n-butanol solution was evaporated in vacuo and the residue was dissolved with a solution of potassium hydroxide (2.5 g), ethanol (15 ml) and water (35 ml). The solution was kept overnight at room temperature under the nitrogen gas atmosphere. The reaction mixture was warmed at 80°C for 1 h and after cooling it was neutralized (pH 6.5) with 2 N sulfuric acid. The precipitate in the reaction mixture was filtered off and the filtrate was extracted with ether. The etheral solution was washed with water and evaporated in vacuo to dryness. The residue was purified by column chromatography on a silica gel (eluent: CHCl₃/MeOH = 96/4) and crystallized from benzene as colorless needles, mp. 236–238°C. The product was identical with the authentic sample, 20R-protopanaxadiol. According to the procedure similar to that described above, B (0.3 g) was dissolved into the solvent of oxidation reaction. The reaction product was purified on a silica gel column (eluent: n-hexane/acetone 2/1) and crystallized from benzene as colorless needles, mp. 197–200°C. The obtained compound was identical with the authentic sample, 20S-protopanaxadiol.

3.11. Micro analysis for sugars and saponins (secondary) of saponins and protosaponins
Saponin or protosaponin (1 mg) was heated with 0.1 ml of the acetic solution (0.75 ml 4 N HCl/3.5 ml n-BuOH) in the micro sealed tube on a water bath at 90°C for 4 h. After cooling, water (0.5 ml) was added into the reaction tube and the reaction mixture was extracted with ether (1 ml) twice. The etheral extract was evaporated in vacuo to dryness. The residue was dissolved in methanol and spotted on the thin-layer plate. The water extract was treated similarly. As developing solvent for saponins, benzene/acetone = 3/1 and for sugars ethyl-acetic/acetic acid/methanol/water = 65/15/15/0 was used.

The authentic samples of panaxadiol and panaxatriol were prepared from ginsenoside-Rb₁ and Rg₂, respectively by the acidic hydrolysis described in the literature [8, 11]. Two commercial reagents, D-glucose and L-rhamnose, were used for authentic samples.

4. References

- Kaku, T., Kawashima, Y., Rep. Yamaguchi Coll. Res. Lab. No. 3, pp. 45 (1977) — [2] Kawashima, Y., Kaku, T., Chemical Soc. Japan 37th Congr. Tokyo (1978) — [3] Nagai, Y., Tanaka, O., Shibata, S., Tetrahedron 27, 881 (1971); 8) Saito, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O., Shibata, S., Chem. Pharm. Bull. 22, 421 (1975); 9) Saito, S., Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O., Shibata, S., Chem. Pharm. Bull. 23, 2407 (1976); 10) Saito, S., Shoji, J., Chem. Pharm. Bull. 26, 1694 (1978) — [4] Kaku, T., Miyata, T., Urano, T., Sako, L., Kinoshita, A., Arizumi-Forens-Drug Res. 25, 343, 539 (1975) — [5] Ashiba, Y., Taguchi, D., Yakugakuzasshi 25, 549 (1966) — [6] Kottake, M., Nippon Kagaku Kaishi 21, 357 (1950) — [7] Palla, M., Itatsawa-Ichome, I., Shibata, S., Yakugakuzasshi 82, 1634 (1963) — [8]

Shibata, S., Ando, T., Tanaka, O., Chem. Pharm. Bull. 14, 1157 (1966) — [9] Tanaka, O., Nagai, M., Ohnawa, T., Tanaka, N., Shibata, S., Tetrahedron Letters 20 (1967) — [10] Kondo, N., Shoji, J., Tanaka, O., Chem. Pharm. Bull. 21, 2765 (1973) — [11] Shibata, S., Tanaka, O., Soma, K., Iida, Y., Ando, T., Nakamura, H., Tetrahedron Letters 20 (1967) — [12] Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Soma, K., Iida, Y., Ohnawa, T., Chem. Pharm. Bull. 14, 395 (1966) — [13] Liu, T. D., Kondo, N., Shoji, J., Chem. Pharm. Bull. 24, 253 (1976) — [14] Nagai, M., Ando, T., Tanaka, O., Tanaka, O., Shibata, S., Chem. Pharm. Bull. 20, 1212 (1972)

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. J. Yoshimura, Tokyo Institute of Technology, for the useful suggestion and wish to thank Messrs. T. Ishimura and Kan'wa for the NMR-spectra and Mr. H. Makimoto for mass spectra.

For the authors: Prof. Dr. T. Kaku, Central Research Laboratories, Yamamoto Pharmaceutical Co., Ltd., no. 1–8, Anzawa-1-chome, Itahashi-ku, Tokyo (Japan)

From the Departments of Pharmacology and Cardiovascular Surgery, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, and Department of Statistics, Stanford University, Stanford, California (USA)

A Two-Compartment Model for Digoxin Disposition in Dogs

By S. M. Kalman, H.-G. Güllner, Th. A. Gibson, S. Kahn, E. B. Stinson, R. Miller, and J. Halpern

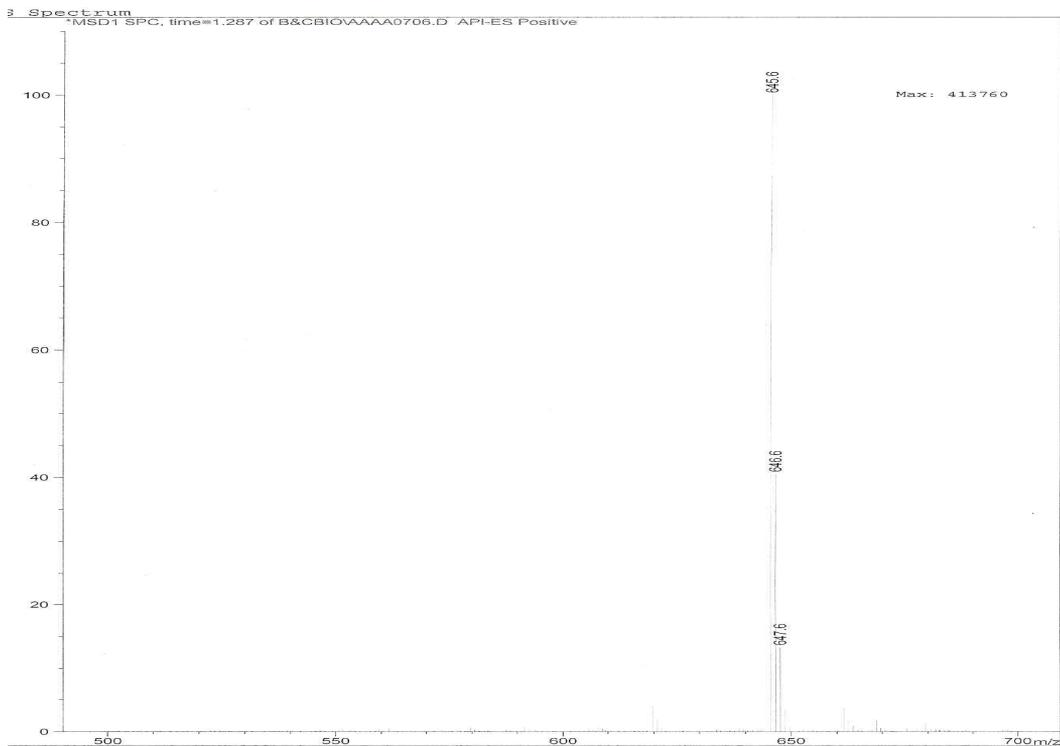
Summary: The disappearance of digoxin from heart and skeletal muscle was studied in dogs using a sequential biopsy technique. The animals were injected with digoxin for five days and subsequently with ³H-digoxin for an additional three days. 12, 24, and 48 h after discontinuation of digoxin, tissue samples of left ventricle, left atrial appendage, and skeletal muscle were taken. In addition, digoxin serum levels were measured. With the help of a computer program, a mathematical model was developed for the description of the disposition and elimination of digoxin from tissue. Disappearance from plasma and tissue was consistent with a two-compartment open model.

Zusammenfassung: Ein Zwei-Kompartiment-Modell zur Errechnung der Disposition von Digoxin beim Hund

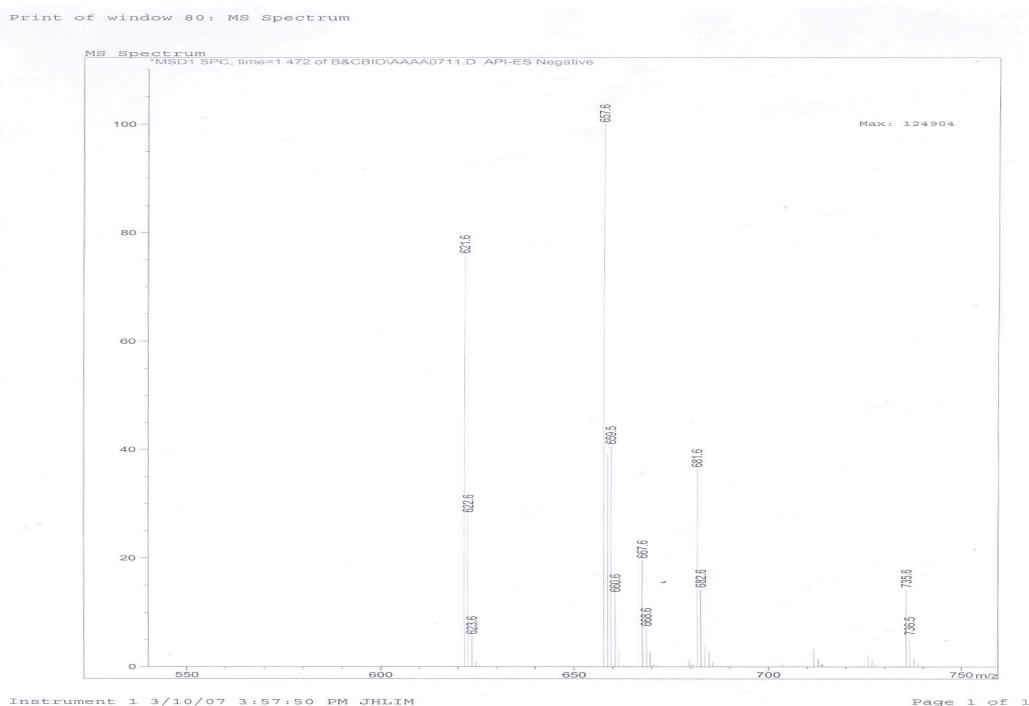
Das Verschwinden von Digoxin aus Herz und Muskel wurde an Hunden studiert durch eine sequentielle Biopsie-Technik. Während fünf Tagen wurden den Tieren Injektionen mit Digoxin gegeben und dann mit ³H-Digoxin für drei weitere Tage. 12, 24 und 48 h nach Absetzen von Digoxin wurden Gewebeproben des linken Ventrikels, des linken Atriummuskel und der Muskel entnommen, durch Serum-Konzentrationen von Digoxin wurden gemessen. Mit Hilfe eines Computer-Programms wurden die pharmakokinetischen Parameter für Disposition und Elimination von Digoxin aus dem Gewebe errechnet. Das Verschwinden aus Plasma und Gewebe entsprach einem offenen Zwei-Kompartiment-Modell.

Key words: Digoxin · Disposition, elimination, pharmacokinetics
Arztw.-Forsch. / Drug Res. 38 (1984), Nr. 4 (1984)
Klin. w. / Clin. 38 (1984), Nr. 4 (1984)

13. HPLC/MS spectrum for IH-901RM(positive mode)



14. HPLC/MS spectrum for IH-901RM(negative mode)



15. Reference literature for LC/Mass spectrum of IH-901RM

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15, 586-592

Metal ion adducts in the structural analysis of ginsenosides by electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry

Meng Cui, Fengrui Song, Zhiqiang Liu and Shuying Liu*

Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, P. R. China

Received 5 January 2001; Revised 13 February 2001; Accepted 13 February 2001

The effect of metal (Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+) cationization on collision-induced dissociation of ginsenosides was investigated by electrospray ionization mass spectrometry combined with multi-stage mass spectrometry (ESI-MSⁿ). The fragments of sodiated and lithiated molecules give valuable structural information regarding the nature of the aglycone and the sequence and linkage information of sugar moieties. However, the number and relative abundances of fragment ions from lithiated ginsenosides are significantly greater than for the sodiated species. The K^+ adducts undergo glycosidic cleavages and very limited cross-ring reactions. The silver ion adducts fragment mainly through glycosidic cleavages. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliaceae)) is one of the best-known Chinese crude drugs and has been used widely for over 2000 years. Research studies have shown ginseng can stimulate the non-specific resistance of an organism and build up general vitality (adaptogen),¹ and affect various biological processes, such as tumor metastasis,² the central nervous system,³ and prevention of the aging process.⁴ Ginseng products are popular around the world and have a large consumption. Ginsenosides have been demonstrated to give rise to the pharmacological properties of ginseng. Ginsenosides are mainly diacetylene terpenes with (20S)-protopanaxadiol or (20R)-protopanaxatriol aglycone moieties, oleanolic acid type saponins.⁵ Also, in each kind of ginseng, the species and content of glycosides are clearly different. Structural analysis of these compounds are still usually performed by chemical and biochemical degradation methods that are both time- and material-consuming because of the instability and high polarity of ginsenosides. Therefore, it is desirable to establish a rapid and convenient method for structural analysis of ginsenosides in medicinal herbs.

Many methods have been applied to the characterization of ginsenosides. Mass spectrometry has played an important role due to its advantages of rapidly and sensitivity in structural analysis. However, electron impact (EI) and chemical ionization (CI) mass spectrometry⁶ show no or very low abundance molecular ions, even after derivatization of the ginsenosides. Field desorption ionization (FD) mass spectrometry⁷ can provide mass spectra of ginsenosides without derivatization, but limited structural-specific fragment ions are provided. Fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry⁸ combined with collisional activation

(CA) mass spectrometry can be used for structural analysis of underivatized ginsenosides, and yields more structural information than FD spectra. However, because of the perturbation due to the matrix background, the sensitivity for FAB is lower than that for electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. ESI-MS is a softer ionization technique that is suitable for analysis of biomolecules and thermally labile compounds. In recent studies, ESI-MS has been employed to characterize various natural products.⁹⁻¹⁰ Especially when combined with tandem mass spectrometry, structural information can be obtained for compounds, including ginsenosides.¹¹⁻¹⁶

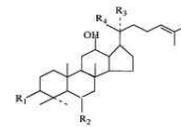
With the development of soft ionization mass spectrometry, the study of adducts of metal cations with various chemical species has been an area of significant interest.¹⁷ Metal ion adducts of organic molecules are observed when using ionization techniques, such as electrospray ionization,¹⁸⁻¹⁹ field desorption,²⁰ fast atom bombardment,^{21,22} fission fragment-induced desorption,²³ matrix-assisted laser desorption,^{24,25} and secondary ion mass spectrometry.²⁶ These complexes have useful applications in analytical chemistry, especially for polar organic compounds. Besides providing molecular weight information, the cationization method can also, in some cases, provide considerably higher sensitivity than protonation, for example. In particular, in ESI mass spectrometry metal cationization is often an important ionization mechanism that can enhance the characterization of molecules²⁷ as a pre-NMR study. Such analysis is fast, requires only a small amount of sample, and provides different ways to activate the molecule leading to dissociation pathways different from those observed for protonated molecules.

In the present work we studied the effect of the metal ion (Li^+ , Na^+ , K^+ , Ag^+) on fragmentation pathways in ESI-MSⁿ of ginsenosides. We find that by varying the metal ion concentration it is possible to suppress all other molecular

RCM

RCM

ESI-MSⁿ analysis of ginsenosides as metal ion adducts 587



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	MW ^a	aglycone
Compound 1	glc ²⁻¹ -glc	H	CH ₃	glc ⁶⁻¹ -glc	1108	panaxadiol
Compound 2	glc ²⁻¹ -glc	H	CH ₃	glc ⁶⁻¹ -ara(py)	1078	panaxadiol
Compound 3	glc ²⁻¹ -glc	H	CH ₃	glc	946	panaxadiol
Compound 4	glc ²⁻¹ -glc	H	OH	CH ₃	784	panaxadiol
Compound 5	H	glc ²⁻¹ -rha	CH ₃	glc	946	panaxatriol

^a These MW data are integral values obtained by truncation of calculated values.

Figure 1. Structures of compounds 1-5.

adduct ions in favor of those with the metal ion from the deprotonated salt. The fragmentation pathways of the cationized molecules depend on the nature of the adducted metal ion.

EXPERIMENTAL

Compound 1 was kindly provided by Prof. X. G. Li of the Chinese Agriculture University. Compounds 2-5 were isolated from the stems of Chinese Echinacea ginseng (see text) and shown in Fig. 1. The chemicals used were commercially available and of analytical grade. HPLC-grade methanol was used to dissolve the samples. Metal salts (LiCl, NaCl, KCl, AgNO₃) were commercially available.

A Finnigan-MAT LCQ ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ion source was used. The mass spectrometer was mass-calibrated with a solution containing caffeine, the tetrapeptide MRFa, and Ultramarck 1621, dissolved in a solvent of approximately 25% water, 25% methanol, 50% acetonitrile, acidified with 1% glacial acetic acid. The samples were dissolved in MeOH at concentration of 10⁻⁶ M. Sample solutions were introduced via a syringe pump at a flow rate of 3 μL/min. The transfer capillary voltage was set at 4.5 kV and its temperature to 200°C. The ion gauge pressure was 2.4 × 10⁻⁸ Torr. Nitrogen was used as sheath gas at a pressure of 100 psi. For MSⁿ experiments the window for parent ion selection was 3.0 Th. Helium was used as the buffer gas, and the collision energy was adjusted

until the intensity ratio of the base peak to the parent was between 2 and 20.

RESULTS

To investigate the role of metal ions in the production of fragment ions from electrosprayed ginsenosides, a systematic investigation was performed by drying each compound separately with each of the metal salts (LiCl, NaCl, KCl, AgNO₃). In order to elucidate the fragment pathways of ginsenosides, fragment ions were labeled according to the nomenclature proposed by Costello and collaborators.²⁸ The ions retaining the charge on the part containing the aglycone are termed X, Y and Z (glycosidic cleavages), whereas those ions retaining the charge on the sugar moieties are termed B, C (glycosidic cleavages) and A (cross-ring cleavages). Cross-ring cleavage ions are also designated by superscript numbers indicating the two bonds cleaved. The saccharide chain at C-3 of the aglycone is termed the α-chain, and that at C-21 of the aglycone is termed the β-chain. In this study we selected the monoisotopic ¹²C peak in each case for MS/MS studies.

In our experiments we found the respective metal-coordinated species of the ginsenoside to be the base peak in the mass spectrum, provided the appropriate amount of deprotonated salt was added. The appropriate concentration of the

*Correspondence to: S. Liu, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, P. R. China.
 E-mail: msdsh@ccit.ac.cn

15. Reference literature for LC/Mass spectrum of IH-901RM

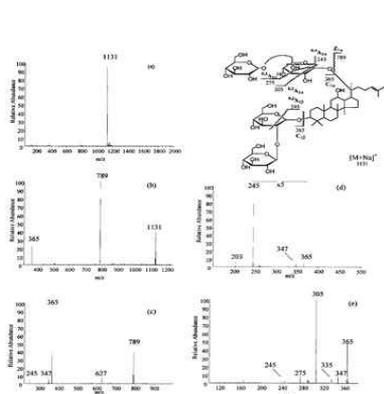


Figure 2. (a) ESI-MS spectrum of a methanolic solution of compound 1; (b) MS² spectrum of [M + Na]⁺ (m/z 1131) of compound 1; (c) MS² spectrum of m/z 789 of compound 1; (d) MS² spectrum of m/z 365 from m/z 789 of compound 1; (e) MS² spectrum of m/z 365 formed directly from m/z 1131 of compound 1.

metal salts for producing molecular adduct ions had to be determined by internal error in each case.

[M + Na]⁺
Under the experimental conditions, all ginsenoside ESI-MS spectra contained the sodiated molecules as the most abundant molecular ions when the sample was not doped with metal salts. The sodium ion is probably derived from glass containers and as an impurity picked up during the preparation of the sample.

Figure 2(a) shows the ESI mass spectrum of a methanolic solution of compound 1 without any other additive. The sodiated molecule [M + Na]⁺ ion is observed and there are no other molecular ions in this spectrum, nor are there any significant fragment ions reflecting the soft ionization character of ESI. This phenomenon was also observed for the other saponins studied here. Thus the [M + Na]⁺ ions can be unambiguously identified in the high-mass region, yielding molecular weight information. For example, the molecular weight of compound 1 is 1108 Da (all MS mass data are quoted using truncated integral values for convenience in this paper), deduced from the [M + Na]⁺ ion at m/z 1131.

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

Figure 2(b) shows the ESI-MS² spectrum of the [M + Na]⁺ ion of compound 1 (m/z 1131), which yielded the most abundant fragment ion at m/z 789 by the loss of 342 Da which fits with the molecular mass of a disaccharide [hexose-hexose]. There is also a less abundant ion at m/z 365 in this spectrum that corresponds to the sodiated [hexose-hexose]. Obviously, these are a pair of complementary ions. According to the known structure of compound 1 (Fig. 1), there are three possibilities to yield the fragment ions at m/z 789 and 365, i.e. by the loss of the disaccharide chain at C-21 or at C-3, or by losses of the terminal glucose residues at both these positions.

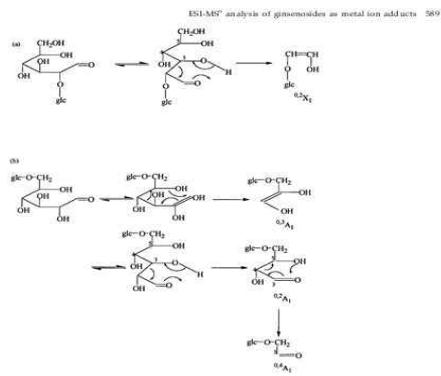
In order to investigate these fragmentation possibilities of the [M + Na]⁺ ion, MS² experiments were employed. Figure 2(c) shows the ESI-MS² spectrum of the m/z 789 ion from compound 1. It is interesting that the m/z 789 ion yields another m/z 365 ion, corresponding to the second sodiated disaccharide.

The two different m/z 365 ions formed (see Figs 2(b) and 2(c)) were investigated by multi-stage mass spectrometry. Figure 2(d) shows the MS² spectrum of m/z 365 ion formed from the first-generation fragment ion at m/z 789 (Fig. 2(c)). This m/z 365 ion produces a fragment at m/z 203 by the loss of 162 Da, a hexose unit, and the m/z 203 ion itself corresponds

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15, 586-595

RCM

RCM



Scheme 1. Structures of compounds 1-5.

to an intact sodiated hexose, which confirms further that there are two hexose residues in a sugar chain in this m/z 365 ion. It is worth noting that this m/z 365 ion also yields an abundant cross-ring ion ¹²C₆ at m/z 243, a sodiated hexose (162 Da) unit plus a C₂H₄O₂ group (60 Da), by the loss of a C₄H₆O₂ group (120 Da). The fragmentation mechanism is proposed in Scheme 1(a). During the cross-ring cleavage reaction, the first step is the opening of the reducing ring to form the cyclic hydroxyl aldehyde species. Then a hydrogen rearrangement and retro-Diels-Alder (RDA) reaction occur, in which the hydrogen on the hydroxyl group is transferred to the carbonyl group. In this way the ¹²C₆ m/z 243 ion is formed, suggesting that the two hexose residues may be related by a 1-2 linkage.

Figure 2(e) shows the MS² spectrum of the other ion at m/z 365 formed directly from m/z 1131 (Fig. 2(b)). There are obvious differences between Figs 2(d) and 2(e). The m/z 365 ion formed directly from m/z 1131 (Fig. 2(b)) yields a series of cross-ring ions at m/z 335, 305 (¹²C₅A₁), 245 (¹²C₄A₁), by the loss of 30, 60, 90, and 120 Da, respectively. The fragmentation pathways are described in Scheme 1(b). These cross-ring ions are also formed by the RDA reaction and H-arrangement, and suggest that in this case the two hexoses are related by a 1-6 linkage.

According to the above results, one sugar chain in compound 1 involves a 1-6 linkage and the other a 1-2

linkage. Comparing these results with the known structure of compound 1 (Fig. 1), the [M + Na]⁺ ion yields the m/z 789 ion (Z₁) and m/z 365 ion (Z₂) by the preferential loss of the saccharide chain at C-21, then another ion at m/z 365 (Z₃) by loss of the saccharide chain at C-3 from the primary fragment ion at m/z 789. The different reactivities may result from the fact that the saccharide chain at C-3 is linked to a secondary carbon atom, and that at C-21 is connected to a tertiary carbon atom. The molecular mass of the saccharide chain at C-21 is obtained by the mass difference between the [M + Na]⁺ precursor and the Z₁ fragment ion, or from only the C₁₂ ion in Fig. 2. These characteristics in the gas phase are in qualitative agreement with the property of ginsenosides in solution, where the rate of hydrolysis at C-21 is far faster than that at C-3.

In addition, in Fig. 2(e), the glycoside cleavage of the m/z 789 ion (Z₃) leads to loss of a group of mass 424 Da to yield the m/z 365 ion (Z₄). The mass of the lost neutral group is in agreement with that of the aglycone (panaxadiol, Fig. 1) of compound 1 with the loss of two water molecules. This type of cleavage provides some information on the type of aglycone of the ginsenoside.

We also investigated compounds 2-5 by the same method. The MS² data for these compounds are listed in Table 1. The sodiated compounds 2-5 show the same general fragmentation pathways as compound 1. It is worth noting that for

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15, 586-595

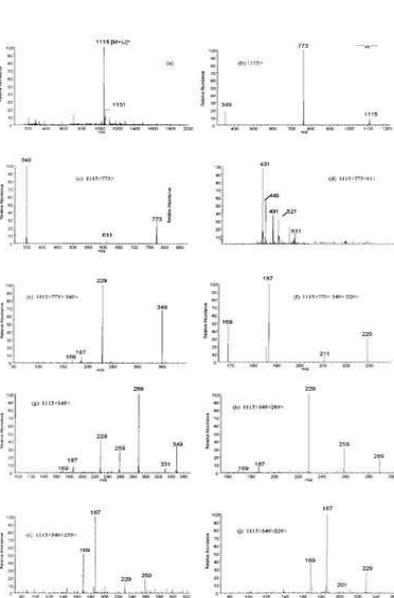


Figure 3. (a) ESI-MS spectrum of compound 1 with LiClO₄ solution; (b) MS² spectrum of [M + Li]⁺ ion (m/z 1115); (c) MS² spectrum of the m/z 773 ion; (d) MS² spectrum of the m/z 611 ion from m/z 773 ion; (e) MS² spectrum of the m/z 249 ion from m/z 349 ion from m/z 773 ion; (f) MS² spectrum of the m/z 229 ion from m/z 289 ion from m/z 349 ion from m/z 773 ion; (g) MS² spectrum of the m/z 209 ion from m/z 269 ion from m/z 349 ion from m/z 773 ion; (h) MS² spectrum of the m/z 289 ion from m/z 249 ion from m/z 1115 ion; (i) MS² spectrum of the m/z 269 ion from m/z 249 ion from m/z 1115 ion; (j) MS² spectrum of the m/z 229 ion from m/z 249 ion from m/z 1115 ion.

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15, 586-595

RCM

RCM

Table 1. Major ESI-MS² data for sodiated compounds 1-5 (m/z values^a)

Ginsenoside	[M + Na] ⁺	MS ² data
1	1131	m/z 789 (Z ₁), m/z 365 (Z ₂), m/z 243 (¹² C ₆ A ₁), m/z 203 (m/z 365 - 162), m/z 67 (Z ₃), m/z 365 (m/z 365 - 0), m/z 305 (m/z 365 - 60), m/z 245 (¹² C ₄ A ₁)
2	1301	m/z 989 (Z ₁), m/z 365 (Z ₂), m/z 243 (¹² C ₆ A ₁), m/z 203 (m/z 365 - 162), m/z 67 (Z ₃), m/z 365 (m/z 365 - 0), m/z 305 (m/z 365 - 60), m/z 245 (¹² C ₄ A ₁)
3	906	m/z 789 (Z ₁), m/z 365 (Z ₂), m/z 243 (¹² C ₆ A ₁), m/z 203 (m/z 365 - 162), m/z 67 (Z ₃), m/z 365 (m/z 365 - 0), m/z 305 (m/z 365 - 60), m/z 245 (¹² C ₄ A ₁)
4	807	m/z 645 (Z ₁), m/z 407 (Z ₂), m/z 365 (m/z 365 - 0), m/z 243 (m/z 365 - 120)
5	908	m/z 789 (Z ₁), m/z 349 (Z ₂), m/z 229 (m/z 349 - 120), m/z 43 (Z ₃)

^aAll the mass data correspond to the sodiated species and are integral values obtained by truncation of measured values.

compound 5 similar fragmentation pathways are obtained, even though the sugar chain is linked at C-6, not at C-3, and that the mass difference between Z₁ and Z₂ is 440 Da, which indicates that the aglycone of compound 5 is panaxatriol (Fig. 1).

[M + Li]⁺

With addition of the appropriate amounts of LiClO₄ the lithiated ginsenosides become the major molecular ions in the ESI-MS spectrum. Figure 3(a) shows the ESI-MS spectrum of compound 1 obtained on adding LiClO₄ solution. The lithiated molecule (m/z 1115) is observed as the base peak, suppressing the sodiated ion (m/z 1131) to a minor peak. When the [M + Li]⁺ ion was subjected to CID, much more abundant fragment ions were observed than for the [M + Na]⁺ or [M + Na]⁺ precursors. In Fig. 3(b), the masses of the major fragment ions from the lithiated molecule are shifted down by 16 Da from those observed for the sodiated species, which suggests similar fragmentation pathways. However, the intensity of the ion current of [M + Li]⁺ is higher, so that more fragment ions could be observed. In Fig. 3(d), the Z₃ ion (m/z 611) yields further the fragment ions corresponding to the lithiated aglycone (Y₁, m/z 449; Z₁, m/z 431) remaining after subsequent glycoside bond cleavages. Also the m/z 611 ion produces a series of cross-ring ions (m/z

521 and 491). In the MS² spectrum of lithiated compound 1 (Fig. 3(g)), the C₁₂ ion yields ¹²C₅A₁ (m/z 289), ¹²C₄A₁ (m/z 239) and ¹²C₃A₁ (m/z 229). The intensities of the cross-ring ions are high enough to permit observation of their further cleavages. The ¹²C₅A₁ and ¹²C₄A₁ ions are formed from ¹²C₆A₁ in its MS² spectrum (Fig. 3(b)), and the ¹²C₃A₁ ion is formed from the ¹²C₄A₁ ion in the MS² spectrum (Fig. 3(i)), which confirms further that the sugar chain at C-21 involves a 1-6 linkage and the other at C-3 a 1-2 linkage in compound 1. Analogous fragments are observed for the C₁₂ ion (Figs 3(e) and 3(j)). Clearly, because of the increase in intensity, the observable cleavages of the [M + Li]⁺ ion will provide more detailed structural information than those of the [M + Na]⁺ ion.

The major ESI-MS² data of lithiated compounds 2-5 are listed in Table 2. The major fragmentation pathways of [M + Li]⁺ are similar to those of the corresponding [M + Na]⁺ precursors, although the ions from glycoside bond cleavages are markedly enhanced. In addition, the fragment ions for cross-ring cleavages of the disaccharide moieties are readily observed, and more fragment ions are produced in general.

It is worth noting that, for compound 5 with a panaxatriol aglycone, the MS² spectrum (Fig. 4) for Z₁ (m/z 773) contains the lithiated aglycone (m/z 447; Z₁) and an additional m/z 351 ion besides C₁₂ and Y₁₀, which was not found in the other compounds all of which have panaxadiol as the

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15, 586-595

15. Reference literature for LC/Mass spectrum of IH-901RM

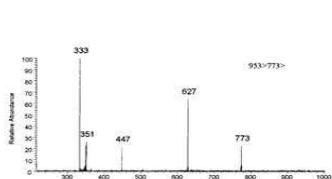


Figure 4. MS² spectrum of m/z 773 from [M + Li]⁺ ion of compound 5.

glycone. This results probably from the fact that the sugar chain in compound 5 is linked to C-6 of the aglycone, and the oxygen at C-6 is more active than that at C-3 that also corresponds to the properties of ginsenosides in solution.

[M + K]⁺
When ginsenosides are doped with KCl solution, the number and abundances of fragment ions decrease significantly relative to both lithium and sodiated molecules. The

Table 2. Major ESI-MSⁿ data for lithiated compounds 1–5 (m/z values^a)

Ginsenoside	[M + Li] ⁺	MS ⁿ data
1	1115	MS ² : 273 _{Li} , 349 _{Li} , 387 _{Li} , 447 _{Li} , 485 _{Li} , 523 _{Li} , 561 _{Li} , 599 _{Li} , 637 _{Li} , 675 _{Li} , 713 _{Li} , 751 _{Li} , 789 _{Li} , 827 _{Li} , 865 _{Li} , 903 _{Li} , 941 _{Li} , 979 _{Li} , 1017 _{Li} , 1055 _{Li} , 1093 _{Li} , 1131 _{Li} , 1169 _{Li} , 1207 _{Li} , 1245 _{Li} , 1283 _{Li} , 1321 _{Li} , 1359 _{Li} , 1397 _{Li} , 1435 _{Li} , 1473 _{Li} , 1511 _{Li} , 1549 _{Li} , 1587 _{Li} , 1625 _{Li} , 1663 _{Li} , 1701 _{Li} , 1739 _{Li} , 1777 _{Li} , 1815 _{Li} , 1853 _{Li} , 1891 _{Li} , 1929 _{Li} , 1967 _{Li} , 2005 _{Li} , 2043 _{Li} , 2081 _{Li} , 2119 _{Li} , 2157 _{Li} , 2195 _{Li} , 2233 _{Li} , 2271 _{Li} , 2309 _{Li} , 2347 _{Li} , 2385 _{Li} , 2423 _{Li} , 2461 _{Li} , 2499 _{Li} , 2537 _{Li} , 2575 _{Li} , 2613 _{Li} , 2651 _{Li} , 2689 _{Li} , 2727 _{Li} , 2765 _{Li} , 2803 _{Li} , 2841 _{Li} , 2879 _{Li} , 2917 _{Li} , 2955 _{Li} , 2993 _{Li} , 3031 _{Li} , 3069 _{Li} , 3107 _{Li} , 3145 _{Li} , 3183 _{Li} , 3221 _{Li} , 3259 _{Li} , 3297 _{Li} , 3335 _{Li} , 3373 _{Li} , 3411 _{Li} , 3449 _{Li} , 3487 _{Li} , 3525 _{Li} , 3563 _{Li} , 3601 _{Li} , 3639 _{Li} , 3677 _{Li} , 3715 _{Li} , 3753 _{Li} , 3791 _{Li} , 3829 _{Li} , 3867 _{Li} , 3905 _{Li} , 3943 _{Li} , 3981 _{Li} , 4019 _{Li} , 4057 _{Li} , 4095 _{Li} , 4133 _{Li} , 4171 _{Li} , 4209 _{Li} , 4247 _{Li} , 4285 _{Li} , 4323 _{Li} , 4361 _{Li} , 4399 _{Li} , 4437 _{Li} , 4475 _{Li} , 4513 _{Li} , 4551 _{Li} , 4589 _{Li} , 4627 _{Li} , 4665 _{Li} , 4703 _{Li} , 4741 _{Li} , 4779 _{Li} , 4817 _{Li} , 4855 _{Li} , 4893 _{Li} , 4931 _{Li} , 4969 _{Li} , 5007 _{Li} , 5045 _{Li} , 5083 _{Li} , 5121 _{Li} , 5159 _{Li} , 5197 _{Li} , 5235 _{Li} , 5273 _{Li} , 5311 _{Li} , 5349 _{Li} , 5387 _{Li} , 5425 _{Li} , 5463 _{Li} , 5501 _{Li} , 5539 _{Li} , 5577 _{Li} , 5615 _{Li} , 5653 _{Li} , 5691 _{Li} , 5729 _{Li} , 5767 _{Li} , 5805 _{Li} , 5843 _{Li} , 5881 _{Li} , 5919 _{Li} , 5957 _{Li} , 5995 _{Li} , 6033 _{Li} , 6071 _{Li} , 6109 _{Li} , 6147 _{Li} , 6185 _{Li} , 6223 _{Li} , 6261 _{Li} , 6299 _{Li} , 6337 _{Li} , 6375 _{Li} , 6413 _{Li} , 6451 _{Li} , 6489 _{Li} , 6527 _{Li} , 6565 _{Li} , 6603 _{Li} , 6641 _{Li} , 6679 _{Li} , 6717 _{Li} , 6755 _{Li} , 6793 _{Li} , 6831 _{Li} , 6869 _{Li} , 6907 _{Li} , 6945 _{Li} , 6983 _{Li} , 7021 _{Li} , 7059 _{Li} , 7097 _{Li} , 7135 _{Li} , 7173 _{Li} , 7211 _{Li} , 7249 _{Li} , 7287 _{Li} , 7325 _{Li} , 7363 _{Li} , 7401 _{Li} , 7439 _{Li} , 7477 _{Li} , 7515 _{Li} , 7553 _{Li} , 7591 _{Li} , 7629 _{Li} , 7667 _{Li} , 7705 _{Li} , 7743 _{Li} , 7781 _{Li} , 7819 _{Li} , 7857 _{Li} , 7895 _{Li} , 7933 _{Li} , 7971 _{Li} , 8009 _{Li} , 8047 _{Li} , 8085 _{Li} , 8123 _{Li} , 8161 _{Li} , 8199 _{Li} , 8237 _{Li} , 8275 _{Li} , 8313 _{Li} , 8351 _{Li} , 8389 _{Li} , 8427 _{Li} , 8465 _{Li} , 8503 _{Li} , 8541 _{Li} , 8579 _{Li} , 8617 _{Li} , 8655 _{Li} , 8693 _{Li} , 8731 _{Li} , 8769 _{Li} , 8807 _{Li} , 8845 _{Li} , 8883 _{Li} , 8921 _{Li} , 8959 _{Li} , 8997 _{Li} , 9035 _{Li} , 9073 _{Li} , 9111 _{Li} , 9149 _{Li} , 9187 _{Li} , 9225 _{Li} , 9263 _{Li} , 9301 _{Li} , 9339 _{Li} , 9377 _{Li} , 9415 _{Li} , 9453 _{Li} , 9491 _{Li} , 9529 _{Li} , 9567 _{Li} , 9605 _{Li} , 9643 _{Li} , 9681 _{Li} , 9719 _{Li} , 9757 _{Li} , 9795 _{Li} , 9833 _{Li} , 9871 _{Li} , 9909 _{Li} , 9947 _{Li} , 9985 _{Li} , 10023 _{Li} , 10061 _{Li} , 10099 _{Li} , 10137 _{Li} , 10175 _{Li} , 10213 _{Li} , 10251 _{Li} , 10289 _{Li} , 10327 _{Li} , 10365 _{Li} , 10403 _{Li} , 10441 _{Li} , 10479 _{Li} , 10517 _{Li} , 10555 _{Li} , 10593 _{Li} , 10631 _{Li} , 10669 _{Li} , 10707 _{Li} , 10745 _{Li} , 10783 _{Li} , 10821 _{Li} , 10859 _{Li} , 10897 _{Li} , 10935 _{Li} , 10973 _{Li} , 11011 _{Li} , 11049 _{Li} , 11087 _{Li} , 11125 _{Li} , 11163 _{Li} , 11201 _{Li} , 11239 _{Li} , 11277 _{Li} , 11315 _{Li} , 11353 _{Li} , 11391 _{Li} , 11429 _{Li} , 11467 _{Li} , 11505 _{Li} , 11543 _{Li} , 11581 _{Li} , 11619 _{Li} , 11657 _{Li} , 11695 _{Li} , 11733 _{Li} , 11771 _{Li} , 11809 _{Li} , 11847 _{Li} , 11885 _{Li} , 11923 _{Li} , 11961 _{Li} , 12000 _{Li} , 12038 _{Li} , 12076 _{Li} , 12114 _{Li} , 12152 _{Li} , 12190 _{Li} , 12228 _{Li} , 12266 _{Li} , 12304 _{Li} , 12342 _{Li} , 12380 _{Li} , 12418 _{Li} , 12456 _{Li} , 12494 _{Li} , 12532 _{Li} , 12570 _{Li} , 12608 _{Li} , 12646 _{Li} , 12684 _{Li} , 12722 _{Li} , 12760 _{Li} , 12798 _{Li} , 12836 _{Li} , 12874 _{Li} , 12912 _{Li} , 12950 _{Li} , 12988 _{Li} , 13026 _{Li} , 13064 _{Li} , 13102 _{Li} , 13140 _{Li} , 13178 _{Li} , 13216 _{Li} , 13254 _{Li} , 13292 _{Li} , 13330 _{Li} , 13368 _{Li} , 13406 _{Li} , 13444 _{Li} , 13482 _{Li} , 13520 _{Li} , 13558 _{Li} , 13596 _{Li} , 13634 _{Li} , 13672 _{Li} , 13710 _{Li} , 13748 _{Li} , 13786 _{Li} , 13824 _{Li} , 13862 _{Li} , 13900 _{Li} , 13938 _{Li} , 13976 _{Li} , 14014 _{Li} , 14052 _{Li} , 14090 _{Li} , 14128 _{Li} , 14166 _{Li} , 14204 _{Li} , 14242 _{Li} , 14280 _{Li} , 14318 _{Li} , 14356 _{Li} , 14394 _{Li} , 14432 _{Li} , 14470 _{Li} , 14508 _{Li} , 14546 _{Li} , 14584 _{Li} , 14622 _{Li} , 14660 _{Li} , 14698 _{Li} , 14736 _{Li} , 14774 _{Li} , 14812 _{Li} , 14850 _{Li} , 14888 _{Li} , 14926 _{Li} , 14964 _{Li} , 15002 _{Li} , 15040 _{Li} , 15078 _{Li} , 15116 _{Li} , 15154 _{Li} , 15192 _{Li} , 15230 _{Li} , 15268 _{Li} , 15306 _{Li} , 15344 _{Li} , 15382 _{Li} , 15420 _{Li} , 15458 _{Li} , 15496 _{Li} , 15534 _{Li} , 15572 _{Li} , 15610 _{Li} , 15648 _{Li} , 15686 _{Li} , 15724 _{Li} , 15762 _{Li} , 15800 _{Li} , 15838 _{Li} , 15876 _{Li} , 15914 _{Li} , 15952 _{Li} , 15990 _{Li} , 16028 _{Li} , 16066 _{Li} , 16104 _{Li} , 16142 _{Li} , 16180 _{Li} , 16218 _{Li} , 16256 _{Li} , 16294 _{Li} , 16332 _{Li} , 16370 _{Li} , 16408 _{Li} , 16446 _{Li} , 16484 _{Li} , 16522 _{Li} , 16560 _{Li} , 16598 _{Li} , 16636 _{Li} , 16674 _{Li} , 16712 _{Li} , 16750 _{Li} , 16788 _{Li} , 16826 _{Li} , 16864 _{Li} , 16902 _{Li} , 16940 _{Li} , 16978 _{Li} , 17016 _{Li} , 17054 _{Li} , 17092 _{Li} , 17130 _{Li} , 17168 _{Li} , 17206 _{Li} , 17244 _{Li} , 17282 _{Li} , 17320 _{Li} , 17358 _{Li} , 17396 _{Li} , 17434 _{Li} , 17472 _{Li} , 17510 _{Li} , 17548 _{Li} , 17586 _{Li} , 17624 _{Li} , 17662 _{Li} , 17700 _{Li} , 17738 _{Li} , 17776 _{Li} , 17814 _{Li} , 17852 _{Li} , 17890 _{Li} , 17928 _{Li} , 17966 _{Li} , 18004 _{Li} , 18042 _{Li} , 18080 _{Li} , 18118 _{Li} , 18156 _{Li} , 18194 _{Li} , 18232 _{Li} , 18270 _{Li} , 18308 _{Li} , 18346 _{Li} , 18384 _{Li} , 18422 _{Li} , 18460 _{Li} , 18498 _{Li} , 18536 _{Li} , 18574 _{Li} , 18612 _{Li} , 18650 _{Li} , 18688 _{Li} , 18726 _{Li} , 18764 _{Li} , 18802 _{Li} , 18840 _{Li} , 18878 _{Li} , 18916 _{Li} , 18954 _{Li} , 18992 _{Li} , 19030 _{Li} , 19068 _{Li} , 19106 _{Li} , 19144 _{Li} , 19182 _{Li} , 19220 _{Li} , 19258 _{Li} , 19296 _{Li} , 19334 _{Li} , 19372 _{Li} , 19410 _{Li} , 19448 _{Li} , 19486 _{Li} , 19524 _{Li} , 19562 _{Li} , 19600 _{Li} , 19638 _{Li} , 19676 _{Li} , 19714 _{Li} , 19752 _{Li} , 19790 _{Li} , 19828 _{Li} , 19866 _{Li} , 19904 _{Li} , 19942 _{Li} , 19980 _{Li} , 20018 _{Li} , 20056 _{Li} , 20094 _{Li} , 20132 _{Li} , 20170 _{Li} , 20208 _{Li} , 20246 _{Li} , 20284 _{Li} , 20322 _{Li} , 20360 _{Li} , 20398 _{Li} , 20436 _{Li} , 20474 _{Li} , 20512 _{Li} , 20550 _{Li} , 20588 _{Li} , 20626 _{Li} , 20664 _{Li} , 20702 _{Li} , 20740 _{Li} , 20778 _{Li} , 20816 _{Li} , 20854 _{Li} , 20892 _{Li} , 20930 _{Li} , 20968 _{Li} , 21006 _{Li} , 21044 _{Li} , 21082 _{Li} , 21120 _{Li} , 21158 _{Li} , 21196 _{Li} , 21234 _{Li} , 21272 _{Li} , 21310 _{Li} , 21348 _{Li} , 21386 _{Li} , 21424 _{Li} , 21462 _{Li} , 21500 _{Li} , 21538 _{Li} , 21576 _{Li} , 21614 _{Li} , 21652 _{Li} , 21690 _{Li} , 21728 _{Li} , 21766 _{Li} , 21804 _{Li} , 21842 _{Li} , 21880 _{Li} , 21918 _{Li} , 21956 _{Li} , 21994 _{Li} , 22032 _{Li} , 22070 _{Li} , 22108 _{Li} , 22146 _{Li} , 22184 _{Li} , 22222 _{Li} , 22260 _{Li} , 22298 _{Li} , 22336 _{Li} , 22374 _{Li} , 22412 _{Li} , 22450 _{Li} , 22488 _{Li} , 22526 _{Li} , 22564 _{Li} , 22602 _{Li} , 22640 _{Li} , 22678 _{Li} , 22716 _{Li} , 22754 _{Li} , 22792 _{Li} , 22830 _{Li} , 22868 _{Li} , 22906 _{Li} , 22944 _{Li} , 22982 _{Li} , 23020 _{Li} , 23058 _{Li} , 23096 _{Li} , 23134 _{Li} , 23172 _{Li} , 23210 _{Li} , 23248 _{Li} , 23286 _{Li} , 23324 _{Li} , 23362 _{Li} , 23400 _{Li} , 23438 _{Li} , 23476 _{Li} , 23514 _{Li} , 23552 _{Li} , 23590 _{Li} , 23628 _{Li} , 23666 _{Li} , 23704 _{Li} , 23742 _{Li} , 23780 _{Li} , 23818 _{Li} , 23856 _{Li} , 23894 _{Li} , 23932 _{Li} , 23970 _{Li} , 24008 _{Li} , 24046 _{Li} , 24084 _{Li} , 24122 _{Li} , 24160 _{Li} , 24198 _{Li} , 24236 _{Li} , 24274 _{Li} , 24312 _{Li} , 24350 _{Li} , 24388 _{Li} , 24426 _{Li} , 24464 _{Li} , 24502 _{Li} , 24540 _{Li} , 24578 _{Li} , 24616 _{Li} , 24654 _{Li} , 24692 _{Li} , 24730 _{Li} , 24768 _{Li} , 24806 _{Li} , 24844 _{Li} , 24882 _{Li} , 24920 _{Li} , 24958 _{Li} , 25000 _{Li} , 25040 _{Li} , 25080 _{Li} , 25120 _{Li} , 25160 _{Li} , 25200 _{Li} , 25240 _{Li} , 25280 _{Li} , 25320 _{Li} , 25360 _{Li} , 25400 _{Li} , 25440 _{Li} , 25480 _{Li} , 25520 _{Li} , 25560 _{Li} , 25600 _{Li} , 25640 _{Li} , 25680 _{Li} , 25720 _{Li} , 25760 _{Li} , 25800 _{Li} , 25840 _{Li} , 25880 _{Li} , 25920 _{Li} , 25960 _{Li} , 26000 _{Li} , 26040 _{Li} , 26080 _{Li} , 26120 _{Li} , 26160 _{Li} , 26200 _{Li} , 26240 _{Li} , 26280 _{Li} , 26320 _{Li} , 26360 _{Li} , 26400 _{Li} , 26440 _{Li} , 26480 _{Li} , 26520 _{Li} , 26560 _{Li} , 26600 _{Li} , 26640 _{Li} , 26680 _{Li} , 26720 _{Li} , 26760 _{Li} , 26800 _{Li} , 26840 _{Li} , 26880 _{Li} , 26920 _{Li} , 26960 _{Li} , 27000 _{Li} , 27040 _{Li} , 27080 _{Li} , 27120 _{Li} , 27160 _{Li} , 27200 _{Li} , 27240 _{Li} , 27280 _{Li} , 27320 _{Li} , 27360 _{Li} , 27400 _{Li} , 27440 _{Li} , 27480 _{Li} , 27520 _{Li} , 27560 _{Li} , 27600 _{Li} , 27640 _{Li} , 27680 _{Li} , 27720 _{Li} , 27760 _{Li} , 27800 _{Li} , 27840 _{Li} , 27880 _{Li} , 27920 _{Li} , 27960 _{Li} , 28000 _{Li} , 28040 _{Li} , 28080 _{Li} , 28120 _{Li} , 28160 _{Li} , 28200 _{Li} , 28240 _{Li} , 28280 _{Li} , 28320 _{Li} , 28360 _{Li} , 28400 _{Li} , 28440 _{Li} , 28480 _{Li} , 28520 _{Li} , 28560 _{Li} , 28600 _{Li} , 28640 _{Li} , 28680 _{Li} , 28720 _{Li} , 28760 _{Li} , 28800 _{Li} , 28840 _{Li} , 28880 _{Li} , 28920 _{Li} , 28960 _{Li} , 29000 _{Li} , 29040 _{Li} , 29080 _{Li} , 29120 _{Li} , 29160 _{Li} , 29200 _{Li} , 29240 _{Li} , 29280 _{Li} , 29320 _{Li} , 29360 _{Li} , 29400 _{Li} , 29440 _{Li} , 29480 _{Li} , 29520 _{Li} , 29560 _{Li} , 29600 _{Li} , 29640 _{Li} , 29680 _{Li} , 29720 _{Li} , 29760 _{Li} , 29800 _{Li} , 29840 _{Li} , 29880 _{Li} , 29920 _{Li} , 29960 _{Li} , 30000 _{Li} .

^aAll the mass data correspond to the lithiated species and are integral values obtained by truncation of measured values.

RCM

RCM

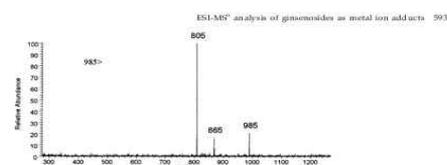


Figure 5. MS² spectrum of [M + K]⁺ ion of compound 5.

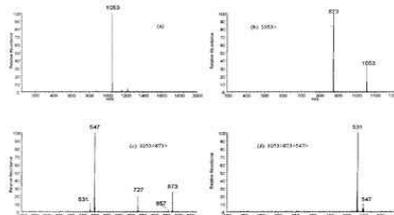


Figure 6. (a) ESI-MS spectrum of compound 5 with AgCl solution; (b) MS/MS spectrum of [M + Ag]⁺ ion (m/z 1053); (c) MS² spectrum of the m/z 873 ion; (d) MS² spectrum of the m/z 547 ion.

ions from glycosidic cleavage at C-21 of the aglycone remain the major fragments. However, the intensity of the K⁺ adduct of the sugar chain is so weak that their CID data could not be obtained. The only fragment ions arising from cross-ring cleavages correspond to cleavage at the terminal sugar unit of the [M + K]⁺ ions. Figure 5(a) shows the ESI-MSⁿ spectrum of the [M + K]⁺ ions of compound 5. In this spectrum the [M + K]⁺ (m/z 985) ion yields fragment ions formed by glycosidic bond cleavage (m/z 803) and by cross-ring reactions, e.g. m/z 865 ([M + K – 20]). However, the intensities of these fragment ions are too low to permit observation of their CID spectra. Similarly, K⁺ adducts of the other compounds display the same phenomena (Table 3).

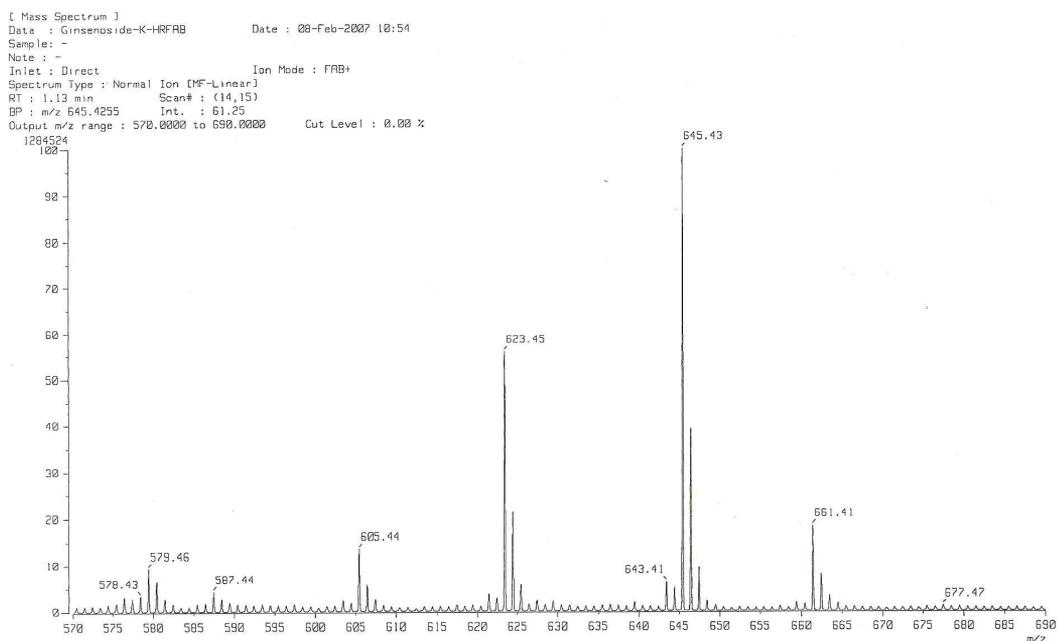
Table 3. Major ESI-MSⁿ data for potassiumated compounds 1–5 (m/z values^a)

Ginsenoside	[M + K] ⁺	MS ⁿ data
1	1147	→ 985 _K , 803 _K , 865 _K , 985 _K , 304 _K
2	1117	→ 985 _K , 803 _K , 865 _K , 985 _K , 304 _K
3	985	→ 803 _K , 865 _K , 985 _K , 304 _K
4	873	→ 803 _K , 865 _K , 985 _K , 304 _K
5	985	→ 803 _K , 865 _K , 985 _K , 304 _K

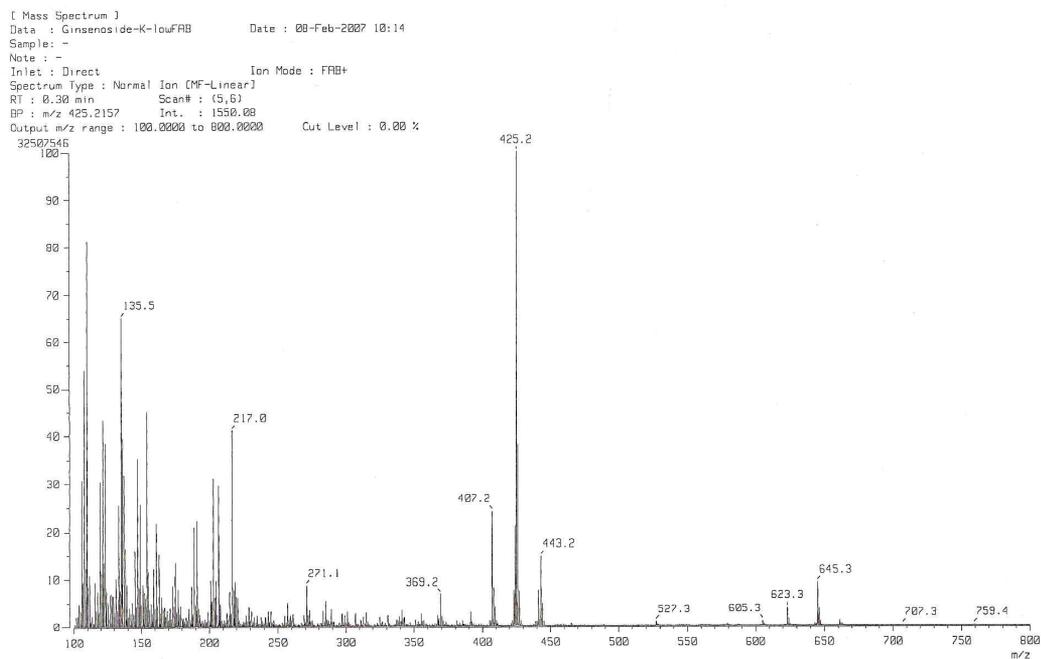
^aAll the mass data correspond to the potassiumated species and are integral values obtained by truncation of measured values.

[M + Ag]⁺
When Ag⁺ solution is added, an abundant [M + Ag]⁺ ion is observed, such that the intensity of the molecular ion

16. HR-FAB/MS spectrum for IH-901RM(positive mode)



17. HR-FAB/MS spectrum for IH-901RM(negative mode)



18. Elemental composition determined by HR-FAB/MS

[Elemental Composition] Page: 1

Data : Ginsenoside-K-HRFAB Date : 08-Feb-2007 10:54
 Sample: -
 Note: -
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 RT : 1.13 min Scan#: (14,15)
 Elements : C 36/0, H 63/1, O 8/0, Na 1/0
 Mass Tolerance : 1000ppm, 3mmu if m/z < 3, 9mmu if m/z > 9
 Unsaturation (U.S.) : -0.5 - 100.0

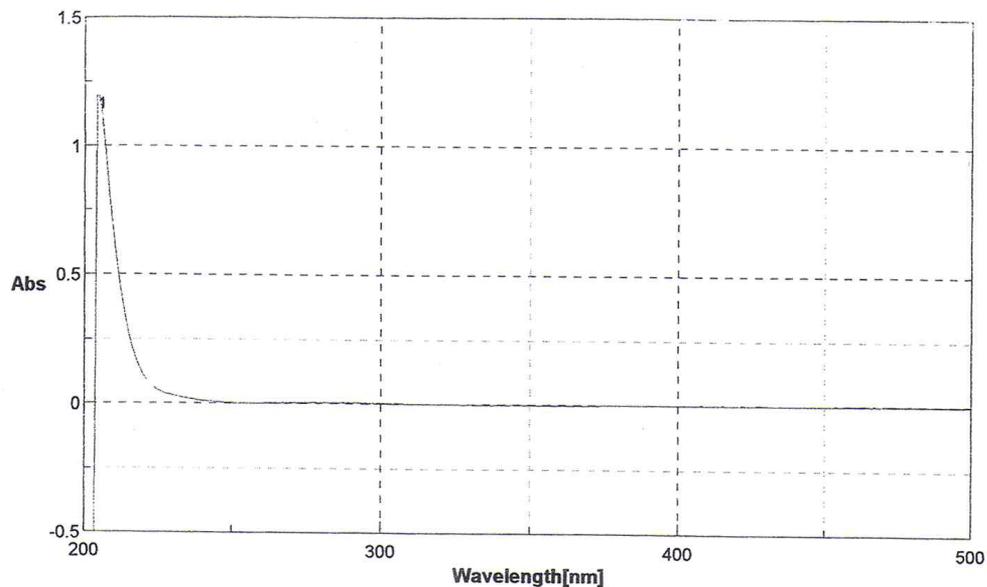
Observed m/z	Int%	Err [ppm / mmu]	U.S.	Composition
605.4419	13.5	+0.3 / +0.2 +4.2 / +2.6	6.5 3.5	C 36 H 61 O 7 C 34 H 62 O 7 Na
623.4524	56.0	+0.2 / +0.1	5.5	C 36 H 63 O 8 [M+H]
624.4503	21.3			
645.4255	100.0	-13.5 / -8.7	5.5	C 36 H 62 O 8 Na
646.4328	39.2			
661.4113	18.3			

[Theoretical Ion Distribution] Page: 1

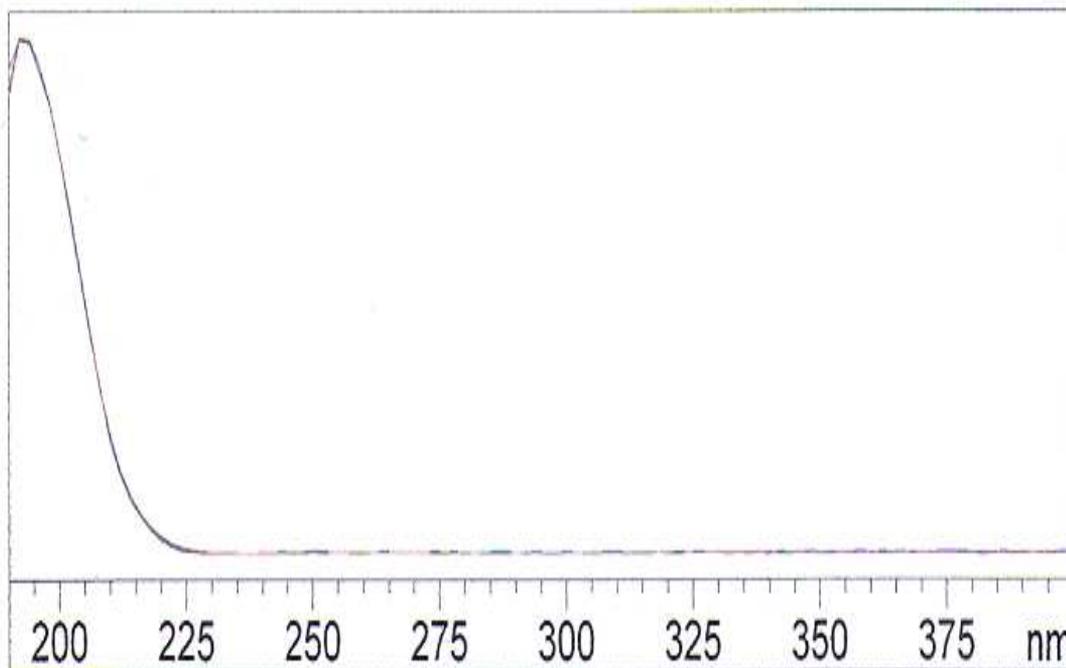
Molecular Formula : C₃₆H₆₃O₈
 (m/z 623.4523, MW 623.8914, U.S. 5.5)
 Base Peak : 623.4523, Averaged MW : 623.8943 (a), 623.8950 (w)

m/z	INT.
623.4523	100.0000 *****
624.4557	41.2903 *****
625.4587	9.9055 *****
626.4616	1.7445 *
627.4644	0.2472
628.4671	0.0296
629.4698	0.0031
630.4725	0.0003

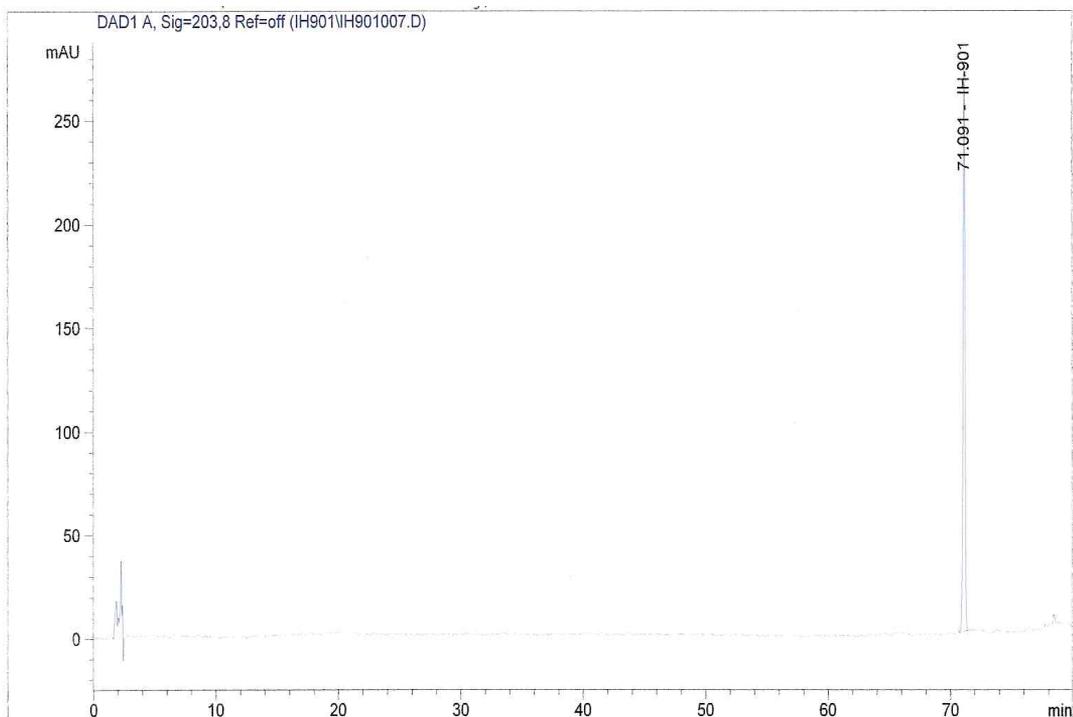
19. UV spectrum for IH-901RM



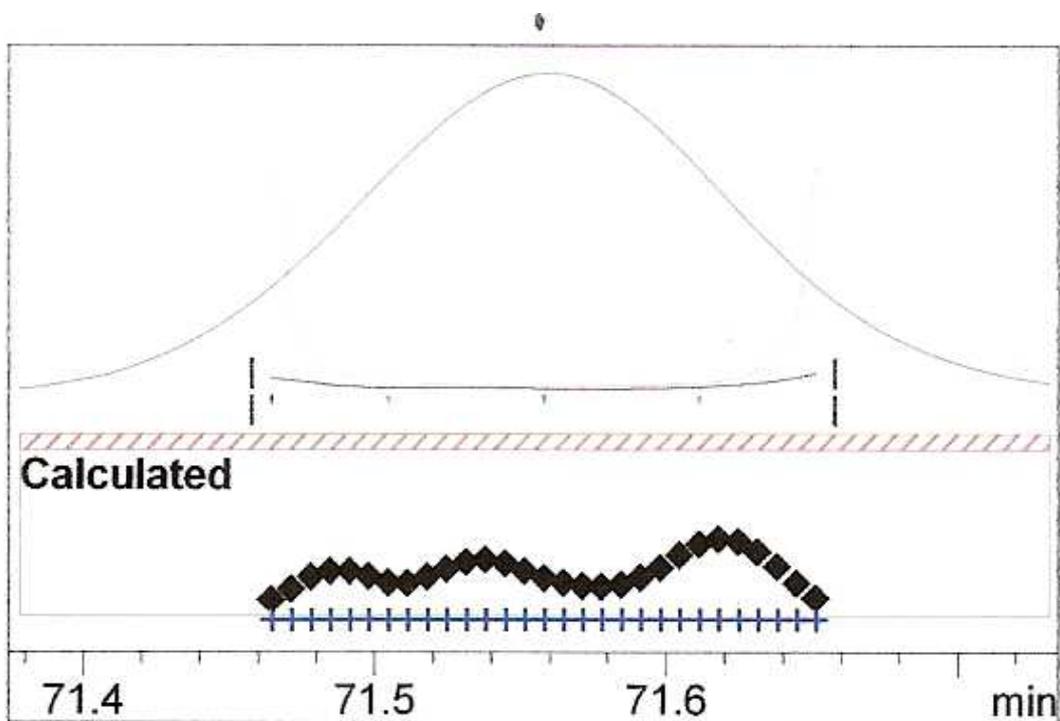
20. UV spectrum of the peak corresponding to IH-901RM in HPLC photodiode array system



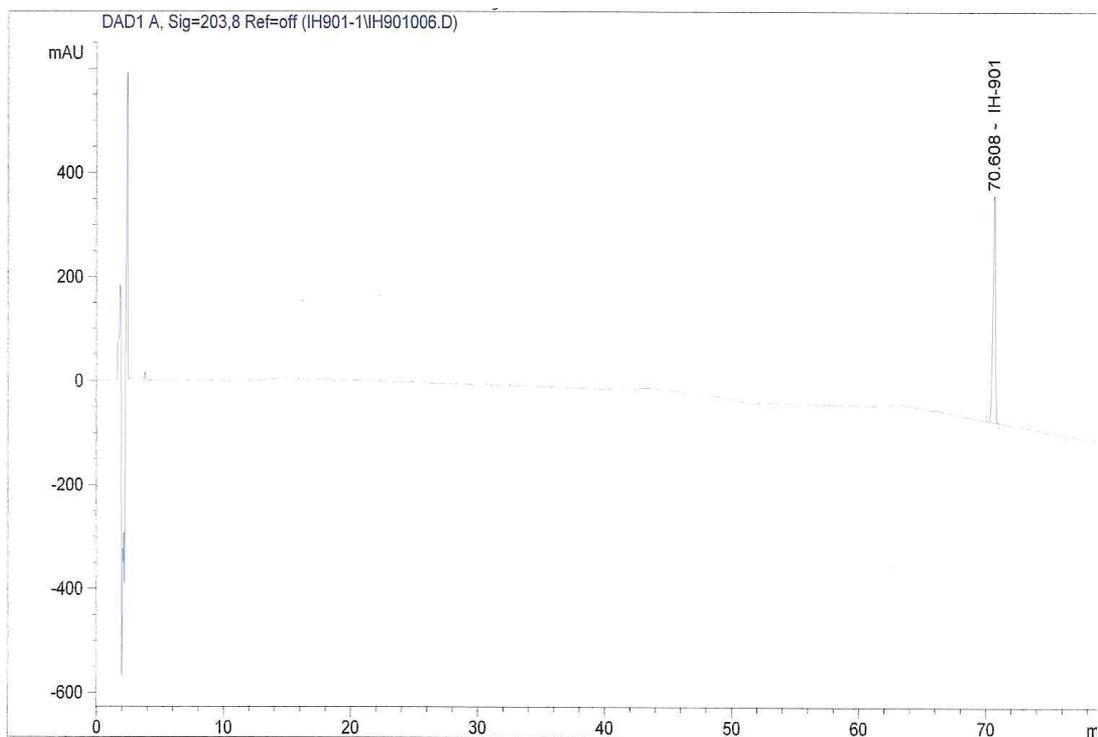
21. HPLC fingerprint 1 for IH-901 reference material



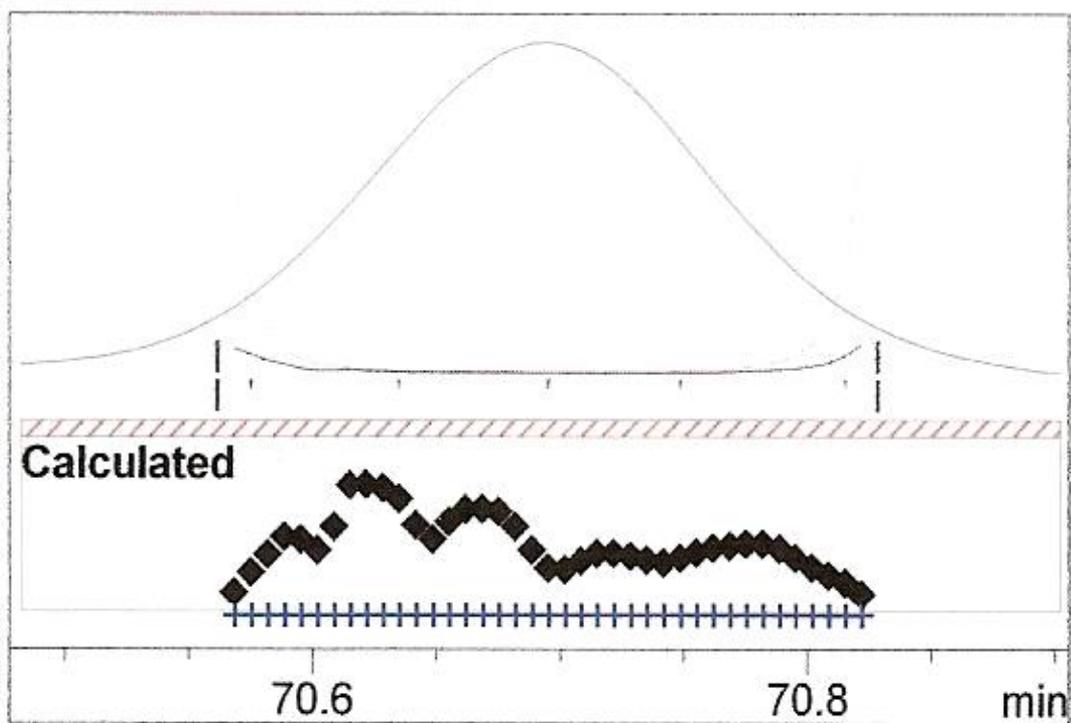
22. Peak purity analysis for IH-901 reference material in HPLC system 1



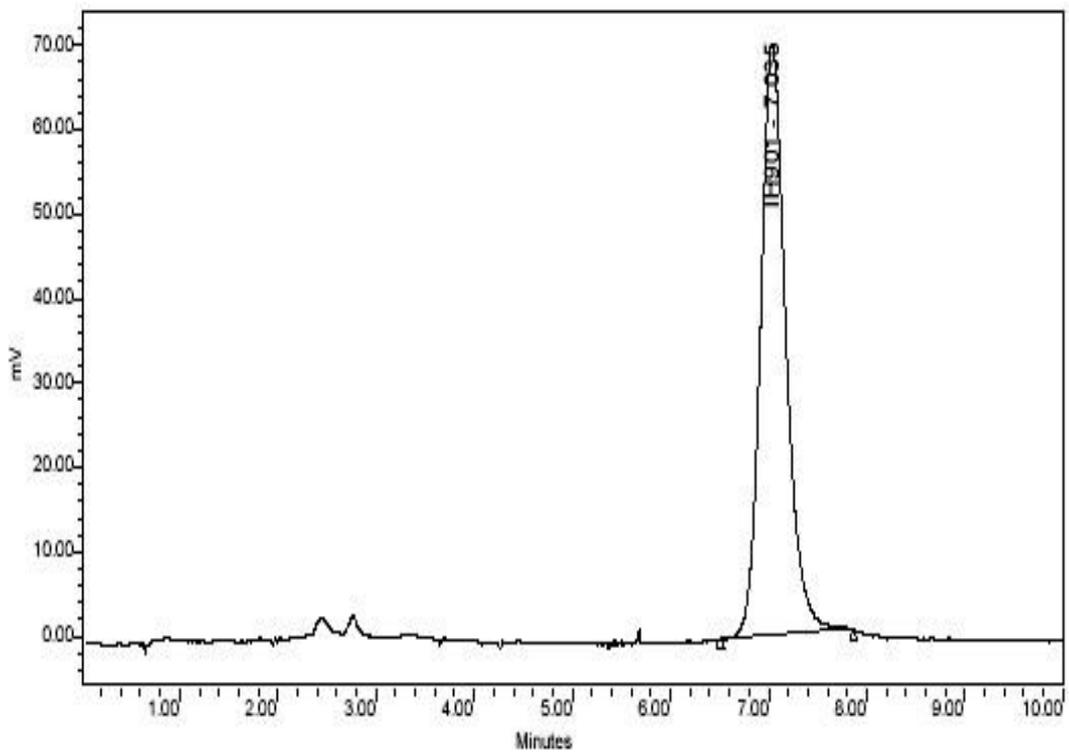
23. HPLC fingerprint 2 for IH-901 reference material



24. Peak purity analysis for IH-901 reference material in HPLC system 2



25. HPLC fingerprint 3 for IH-901 reference material



26. Reference literature for the LC separation of less polar ginsenosides



Short communication

Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng

Sung Won Kwon^a, Sang Beom Han^b, Il Ho Park^a, Jong Moon Kim^c, Man Ki Park^a, Jeong Hill Park^{a,*}

^aResearch Institute of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

^bSeoul Clinical Laboratories, Daehingdo dong, Tongsan gu, Seoul 140-230, South Korea

^cKorean Institute of Oriental Medicine, Changdam dong, Kangnam gu, Seoul 135-100, South Korea

Received 12 March 2001; received in revised form 12 April 2001; accepted 12 April 2001

Abstract

Reversed-phase LC with an evaporative light scattering detector (ELSD) is used for the determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. These ginsenosides include ginsenosides F₁, R_g, R_g, R_g, R_k, R_k, R_s, R_s, and R_s. The method used a C₁₈-bonded silica column with a CH₃CN/H₂O/CH₃COOH gradient elution. (20R) and (20S) epimers and geometric isomers at the C-20 position of ginsenosides, which are not generally separated by amino columns, were now clearly separated. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Panax ginseng*; Ginsenosides

1. Introduction

Ginseng, the radix of *Panax ginseng* C. A. Meyer, known as Korean ginseng, is one of the most widely used herbal medicines in the Orient. Recently, we reported that steaming the ginseng at high temperature greatly enhances its biological activity [1,2]. We also isolated several new ginsenosides from the steamed ginseng that are not present in white ginseng [3]. These were ginsenosides F₁, R_g, R_g, R_k, R_k, R_s, R_s, and R_s (Fig. 1). Ginsenoside R_g showed strong vasorelaxation activity [4] and anti-platelet aggregation activity [5]. Ginsenoside R_g, R_s, and R_s also showed anti-cancer

activity through the induction of apoptosis [6–8]. Therefore there is a need to analyze these ginsenosides which demonstrate important pharmacological activities.

However, the reported methods are not appropriate for the determination of new ginsenosides in processed ginseng since they show less polarity than the previously known ginsenosides. This paper describes the successful determination of these less polar compounds by RP-ELSD.

2. Experimental

2.1. Preparation of samples

Four-year-old fresh ginseng was purchased from the local ginseng market in Seoul. Ginsenosides R_b,

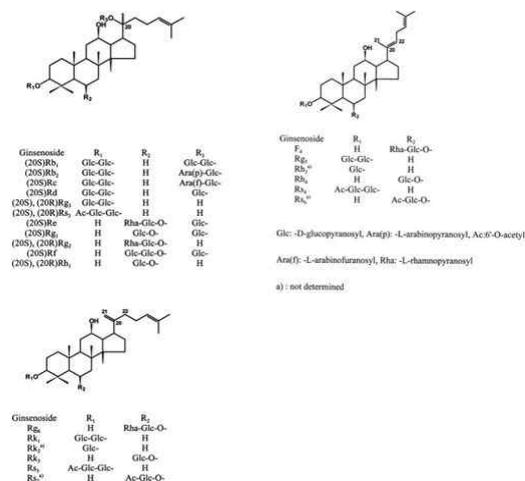


Fig. 1. Structure of ginseng saponins.

R_b, R_c and R_d were generous gifts from Korea Ginseng and Tobacco Research Institute (Daejeon, Korea). Ginsenosides R_g, R_g, R_g, R_k, R_k, R_s, R_s, and R_s were isolated and identified in our laboratory [3]. Two hundred g each of fresh ginseng, ginseng steamed at 100°C for 3 h, and ginseng steamed at 120°C for 3 h were refluxed with methanol for 6 h. The organic solvent was removed

and the residue was dissolved in 1000 ml of water and extracted with 300 ml of dichloromethane. The aqueous layer was further extracted three times with 300 ml of water-saturated *n*-butanol. The *n*-butanol fraction was evaporated and the residue was dissolved in 40 ml of methanol, which was subjected to LC determination. The samples were filtered before injection.

*Corresponding author. Tel.: +82-2-880-7857; fax: +82-2-874-8928.
E-mail address: hlpark@su.ac.kr (J.H. Park).

2.2. Chromatographic conditions

The LC system consisted of two Hitachi (Tokyo,

Japan) model L-7100 pumps coupled with a Rheodyne (Cotati, CA, USA) model 7125 injector, Sedex model 55 ELSD (SEDERE, Alfortville, France) and

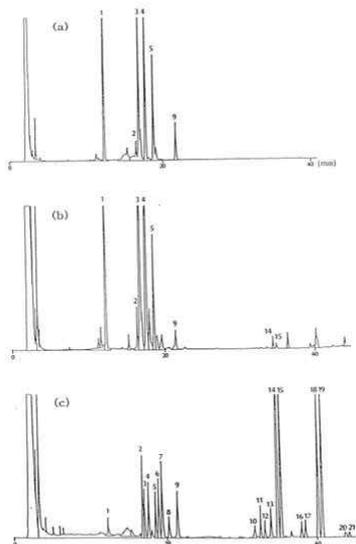


Fig. 2. Chromatogram of fresh ginseng (a), steamed ginseng at 100°C/3 h (b) and steamed ginseng at 120°C/3 h (c) (Peak identity: see Table 1).

Table 1

Peak no. in Fig. 2	Ginsenoside	LOD(ng) ^a	Contents ^b % (w/w)	RSD(%) of Intra-day (n=3)	RSD(%) of Inter-day (n=3)
1	Re+Rg	30 (Re), 45 (Rg)	c	3.2	2.3
2	Rf	c	1.6	2.5	2.5
3	Rb	50	0.32	3.7	2.8
4	Rc	50	0.19	2.7	3.6
5	Rb ₁	120	0.16	5.2	6.2
6	(20S)R _g	c	c	4.2	1.2
7	(20R)R _g + (20S)R _b	75 (R _g)	c	0.59	0.65
8	(20R)R _k	c	c	5.8	2.7
9	Rd	100	0.30	1.1	4.1
10	Rg ₁	75	0.16	0.53	5.1
11	F ₁	170	0.20	0.54	4.0
12	Rk ₁	c	c	2.2	2.2
13	Rb ₂	c	c	0.71	3.6
14	(20S)R _g	70	3.6	0.11	2.6
15	(20R)R _g	35	2.5	4.6	8.5
16	(20S)R _k	65	0.05	0.32	2.5
17	(20R)R _k	100	0.03	1.8	2.6
18	Rk ₂	75	2.9	0.04	2.8
19	Rg ₂	130	3.3	4.0	1.0
20	R _s	65	0.02	4.2	6.5
21	R _s	130	0.03	1.5	2.7

^a Limit of detection (S/N=3).

^b w/w in the extract of steamed ginseng at 120°C/3 h.

^c Not determined in this authors wish to acknowledge the financial support of the Korea Research Foundation granted in 1997.

Chromatopac model C-R7Ae integrator (Shimadzu, Kyoto, Japan). ELSD conditions were optimized in order to achieve maximum sensitivity: temperature of the nebulizer was set for 40°C, and N₂ was used as the nebulizing gas at a pressure of 1.8 bar. Separation was performed on a Mightysil RP-18 (5 μm, 250×4.6 mm I.D., Kanto Chemical, Tokyo, Japan) column. A gradient elution system of A (CH₃CN:H₂O:5%CH₃COOH=15:80:5) and B (CH₃CN:H₂O=80:20) was used [0% B (0 min); 30% B (10 min); 50% B (25 min); 100% B (40 min); 100% B (50 min)]. The solvent flow-rate was 1.0 ml/min and the injection volume was 10 μl. A Finnigan LCQ (San Jose, CA, USA) ion-trap mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) mode was used in the LC-MS method. ESI condition was as follows: source voltage 4.5 kV, sheath gas flow-rate 6 bar, auxiliary gas flow 2 bar, capillary voltage -9.3 V, capillary temperature 250°C, collision energy 10 V.

3. Results and discussion

We previously reported an LC determination of ginsenosides in processed ginseng using an amino column [2]. However, we discovered that epimers and geometric isomers do not separate on an amino column. (20S) ginsenoside R_g did not separate from its (20R) epimer, (20S)R_g from (20R)R_g, (20S)R_k from (20R)R_k, and (20S)R_s from (20R)R_s; geometric isomers of ginsenosides R_k and R_s, R_k and F₁, R_s and R_s, and R_k and R_b were not separated either. Our efforts to separate these isomers by modifying the solvent system, column temperature and flow-rate were unsuccessful. As an alternative, the use of a reversed-phase separation was attempted.

An experiment with a C₁₈-bonded silica column with a CH₃CN:H₂O:CH₃COOH solvent system was successful in separating (20S) and (20R) epimers of ginsenosides R_g, R_k, R_s, and R_s.

26. Reference literature for the LC separation of less polar ginsenosides

S.W. Kwon et al. / J. Chromatogr. A 921 (2001) 335–339

339

Geometric isomers at the C-20 position i.e. ginsenosides R_g, F₁, R_k, and R_b, R_k, and R_g, and R_s, and R₄ were also clearly separated through this system. It was found that the (20S) epimer of ginsenoside R_g, R_h, R_g, and R_s were eluted earlier than its relevant (20R) epimer, and Δ20(21)-geometric isomers were eluted earlier than its relevant Δ20(22)-isomers.

RPLC traces of three kinds of ginseng extract are presented in Fig. 2. Peaks were identified by comparing retention times and LC-MS spectra with those of reference compounds.

Fig. 2 demonstrates that steaming the ginseng at 120°C increases the contents of less polar ginsenosides (peaks 10–21) and decreases polar ginsenosides (peaks 1–9). Through this method less polar ginsenosides which have been difficult to determine by usual methods were clearly detected. The calibration curves, plotted by double logarithmic coordinates [9], showed good linearity ($R = 0.995$ – 0.999). The slope was in the range of 1.36–1.90 [10]. Precision of the assay, represented by the relative standard deviation (RSD), was the range of 0.04–5.8% for intra-day variation and 0.65–8.5% for inter-day variation (Table 1).

In conclusion, the RPLC-ELSD method is a successful technique to determine less polar ginsenosides in processed ginseng.

References

- [1] Y.S. Keam, K.K. Park, J.M. Lee, K.S. Chun, J.H. Park, S.K. Lee, H.J. Kwon, Y.J. Suh, *Cancer Lett.* 150 (2000) 41.
- [2] W.Y. Kim, J.M. Kim, S.B. Han, S.K. Lee, N.D. Kim, M.K. Park, C.K. Kim, J.H. Park, *J. Nat. Prod.* 53 (2000) 1702.
- [3] J.H. Park, N.Y. Kim, S.B. Han, J.M. Kim, S.W. Kwon, H.J. Kim, M.K. Park, and J.H. Park, *Arch. Pharm. Res.* (2000), submitted for publication.
- [4] N.D. Kim, S.Y. Kang, J.H. Park, V.B. Schini-Kerth, *Eur. J. Pharmacol.* 367 (1999) 41.
- [5] S.K. Lee, J.H. Park, K.J. Choi, N.D. Kim, *Korean J. Ginseng Sci.* 21 (1997) 132.
- [6] K.Y. Lee, Y.H. Lee, S.I. Kim, J.H. Park, S.K. Lee, *Anticancer Res.* 17 (1997) 1067.
- [7] S.E. Kim, Y.H. Lee, J.H. Park, S.K. Lee, *Eur. J. Cancer* 98 (1999) 507.
- [8] S.E. Kim, Y.H. Lee, J.H. Park, S.K. Lee, *Anticancer Res.* 19 (1999) 487.
- [9] M. Riberza, G. Garcia, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 1967.
- [10] G. Garcia, A. Moysa, C. Holley, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 2547.

27. Reference literature for optical rotation of IH-901RM



Carbohydrate Research 304 (1997) 179–182

CARBOHYDRATE RESEARCH

Note

Synthesis of ginsenoside R_g, a minor constituent of Ginseng Radix

Victor Ph. Anufriev ^{a,*}, Galina V. Malinovskaya ^a, Vladimir A. Denisenko ^a, Nina I. Uvarova ^a, Georgi B. Elyakov ^a, Shin-Il Kim ^b, Nam-In Baek ^b

^a Laboratory of Organic Synthesis of Natural Products, Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

^b Division of Biochemical Pharmacology, Korea Ginseng & Tobacco Institute, Science Town, Yusong P.O. Box 7, Taedjeon, Korea

Received 13 May 1997; accepted in revised form 18 July 1997

Abstract

Glycosylation of 12β-acetoxy-dammar-24-en-3β,20(S)-diol (4), with hepta-O-acetyl-α-sophorosyl bromide (5) under catalysis by Ag₂CO₃ or Ag₂O afforded a chromatographically unseparated mixture of the α- and β-linked octaacetates 6 and 7 in an approximately 2.5:1 ratio. After deprotection and chromatographic purification, the free α- (8) and β-glycosides (9) were obtained. Sophorose 9 was identical in all respects with ginsenoside R_g, the minor component of Ginseng Radix rubra. All compounds were fully characterized by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. © 1997 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: α-Acetobromosophorose; Ginsenoside R_g; Ginseng Radix rubra

Ginseng, the famous plant drug, has been used as an expensive traditional medicine in oriental countries for more than five thousand years. Ginseng and its crude extracts have a tranquilizing action on the central nervous system, elevate blood pressure, protect against physical and chemical stress, and have other actions [1]. After many twists and turns, it was determined that the major active components of ginseng are glycosides of terpenes of the dammarane type. To date, about thirty glycosides have been isolated from roots of *Panax ginseng*. The isolation

of the individual compounds in a pure state from crude extracts, especially minor components, is often tedious. Due to the biological activity and low content of some of the dammarane glycosides in ginseng, this preparation is of interest. In particular, this includes the 20(S)-ginsenoside R_g, a minor component isolated from Ginseng Radix rubra [2]. One route to ginsenoside R_g is the mild acidic hydrolysis of ginsenosides R_b, R_d, R_c, and R_d, but a mixture of 20(R,S) epimers is formed [3]. We now describe the first synthesis of 20(S)-ginsenoside R_g. For the synthesis of ginsenoside R_g, 12β-acetoxy-dammar-24-en-3β,20(S)-diol (12-acetoxy-protopanaxadiol, 4) was chosen as glycosyl acceptor and hepta-O-acetyl-α-sophorosyl bromide (α-

180

V.P.h. Anufriev et al. / Carbohydrate Research 304 (1997) 179–182

acetobromosophorose, 5) as glycosyl donor (Scheme 1). The 12-O-acetyl derivative of 20(S)-protopanaxadiol 4 is the most convenient aglycon for the regioselective introduction of a carbohydrate residue onto the C-3 position, because the tertiary C-20 hydroxyl group is sterically hindered by 12β-acetoxy group [4]. 12-Acetoxy-protopanaxadiol (4) was synthesized from 20(S)-dammar-24-en-3α,12β,20-triol (betulafolienetriol, 1) in three steps. Betulafolienetriol, isolated from the leaves of birch [5], was oxidized with Sarett reagent to give the 3-ketone 2. The acetyl derivative 3, prepared from 2, was reduced with NaBH₄ to give 12-acetoxy-protopanaxadiol (4) [4].

12-Acetoxy-protopanaxadiol (4) was condensed with α-acetobromosophorose (5) [6] in dichloromethane in the presence of silver carbonate at room temperature (Koenigs-Knorr conditions). Chromatography on silica gel, and elution with light petroleum–acetone gave a chromatographically homogeneous product (57% overall yield). The use of silver oxide as an acceptor of hydrogen bromide gave a comparable result to that of silver carbonate (49.5%

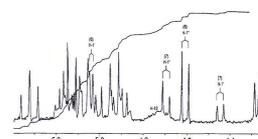
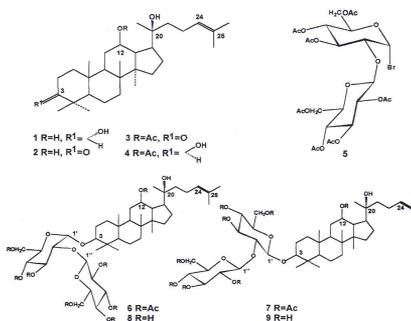


Fig. 1. Part of the ¹H NMR (250 MHz, in CDCl₃) of the mixture of α- and β-linked octaacetates 6 and 7 (a region of anomeric protons).

overall yield). Inspection of the ¹H NMR spectrum of product suggested that the latter was a mixture of the α- and β-linked octaacetates 6 and 7 (Scheme 1). Indeed, in the region of β-anomeric protons, there are three characteristic doublets at δ 4.44, 4.69, and 4.60 (Fig. 1). The coupling constants ($J = 7$ Hz) for these doublets, agreed with a β-configuration for the corresponding residues. The intensities of the first



Scheme 1.

* Corresponding author. Tel.: +7(4232)-314-050; fax: +7(4232)-314-050; e-mail: anufriev@piboc.marine.su
0008-6215/97/\$17.00 © 1997 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII S0008-6215(97)00217-6

27. Reference literature for optical rotation of IH-901RM

two signals are equal, indicating that the corresponding protons arise from β -sophoroside octaacetate (7). The signal at δ 4.60 arises from the β -anomeric proton H-1' of the α -sophoroside's residue in glucoside (6). In the ^1H NMR spectra of α -glycosides, the anomeric proton signals are usually observed at $\delta > 5.0$ with spin coupling values $J_{1,2}$ in the range 3.7–5.0 Hz [4,6,8]. As it is shown in Fig. 1, the α -anomeric proton signal is overlapped by other carbohydrate resonances from compounds 6 and 7. Thus the exact H-1' signal position was measured by selective decoupling experiments on individual compounds.

The ratio of intensities of the anomeric proton signals at δ 4.60 and 4.44 (or 4.69) is equal to the ratio ($\approx 2.5:1$) of 6 and 7 in this mixture. In addition, in the region of methyl and acetyl group resonances, there are only three low intensity peaks from methyl groups and only three of the same intensity from acetyl groups. The intensity of each of these small signals was approximately one third of an ordinary CH_3 peak.

Deacetylation and chromatographic purification afforded the free α - (8) and β -sophorosides (9). The assignment of the ^{13}C NMR spectra of 8 and 9 was done by comparison of their spectra with those of related disaccharides and glycosides of protopanaxadiol, taking into account the effects of the change in configuration at C-1' in 8 [4,7,8]. The spectral characteristics of 9 were identical to those of native 20(S)-ginsenoside Rg_3 [2].

Treatment of the free α - (8) and β -sophorosides (9) with acetic anhydride in pyridine resulted in the corresponding α - and β -octaacetates 6 and 7. ^1H NMR analysis of pure octaacetates of α - (6) and β -sophorosides (7) confirmed our assumption about the ^1H NMR spectrum of the mixture.

1. Experimental

General procedures.—All melting points were determined with a Boethius apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured at 20 °C with a Perkin-Elmer 141 polarimeter for MeOH or CHCl_3 solutions. Column chromatography was performed on Silica Gel L (Chemapol, Czechoslovakia) 40/100 (μ). Precoated Silica Gel 60F-254 E. Merck® plates were used for TLC, and detection was performed by spraying with a 10% solution of coned sulfuric acid in methanol followed by heating. All NMR experiments were run on a Bruker WM-250 instrument operating at 250 MHz for ^1H , and at 62.9 MHz for ^{13}C , using

CDCl_3 or pyridine- d_5 as solvent and Me_4Si as an internal reference (δ 0). Elemental analysis was performed with a Perkin-Elmer 240.

12 β -Acetoxy-dammar-24-en-3 β -20(S)-diol (4).—(i) **Oxidation of betulafolienetriol (1):** Sarett reagent was prepared from dry pyridine (17.5 mL, 220 mmol) and CrO_3 (10.56 g, 106 mmol) in accordance with procedures described by Rattif and Rodehorst [9]. Betulafolienetriol (1) (18.89 g, 41 mmol) in CH_2Cl_2 (300 mL) was added to a stirred CH_2Cl_2 solution (200 mL) of pyridine- CrO_3 complex. The reaction mixture was stirred at room temperature for about 5 h and monitored by TLC (3:2 hexane-acetone) every 30 min. A small volume of MeOH was added to decompose an excess of CrO_3 and the reaction mixture was purified by percolation through a short column of alumina (100 g). The volatiles were removed under vacuum. Methanol (30 mL) was added and evaporated from the residue thrice. The semisolid was triturated with hot MeOH (80 mL). After cooling, the precipitate was separated by filtration. The product (12.2 g, 65%) proved to be identical with the authentic dammar-24-en-12 β ,20(S)-diol-3-one (2) by comparisons of their IR-spectra and by TLC [10]. ^1H NMR (CDCl_3): δ 0.90 (s, 3 H), 0.98 (s, 3 H), 1.03 (s, 3 H), 1.05 (s, 3 H), 1.08 (s, 3 H), 1.21 (s, 3 H), 1.65 (br s, 3 H), 1.70 (br s, 3 H), 3.61 (ddd, 1 H, $J_{1,2,11}$, 10.0, $J_{12,13}$, 9.7, $J_{12,11}$, 5.0 Hz, H₁₂), 5.18 (m, 1 H, H-24); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 217.8 (3), 70.5 (12), 73.8 (20), 125.1 (24), 131.3 (25).

From the ^1H NMR spectrum, the resulting solid (2) appeared to contain a small amount of impurity (less than 5%) and therefore was used in the second stage without purification.

(ii) **Acetylation of 12,20-dihydroxy-3-ketone 2:** Compound 2 (1.20 g) was acetylated with Ac_2O (36 mL) in pyridine (60 mL) at room temperature for 15 h. After the usual work up, 12 β -acetoxy-dammar-24-en-20(S)-ol-3-one (3) (11.8 g) was obtained. NMR data [4] showed the product 3 was slightly impure and was used in the third stage without purification.

(iii) **Reduction of 12-acetoxy-20-hydroxy-3-ketone 3:** Crude product 3 (11.5 g) was reduced with NaBH_4 (1.3 g) in t -PrOH (200 mL). After working up in the usual way, the residue was eluted from a column of silica gel with light petroleum-acetone (15:1 \rightarrow 9:1). The fractionation, which was monitored by TLC (3:2 hexane-acetone), gave the amorphous product (9.7 g, 84%), $[\alpha]_D^{25} -6.1^\circ$ (c 1.07, CHCl_3), which proved to be identical with the authentic 12-acetoxy-protopanaxadiol (4) by comparisons of IR- and ^1H NMR spectra, and by TLC [4].

Glycosylation of 12-acetoxy-protopanaxadiol with α -acetobromosophorose.—(i) **Condensation in the presence of silver carbonate:** A solution of 12-acetoxy-protopanaxadiol 4 (0.502 g, 1 mmol) and α -acetobromosophorose 5 (1.75 g, 2.50 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) was stirred at room temperature for 15 h in the presence of freshly prepared Ag_2CO_3 (0.746 g, 2.70 mmol) in the dark. The mixture was filtered and concd under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel using 6:1 \rightarrow 2:1 petroleum-acetone as eluent, to yield a product with R_f 0.46 (2:1 hexane-acetone) (0.638 g, 57%). A solution of the product (0.638 g) in MeOH (3 mL) was kept at room temperature in the presence of MeONa (three drops of 1 N solution in MeOH) for 15–20 h and reaction monitored by TLC (3:1 CHCl_3 -MeOH, satd with H_2O). The reaction mixture was neutralized with Amberlite IR 120 (H^+) and filtered. The filtrate and methanol washings were taken to dryness. The residue (0.439 g) was chromatographed using 15:3 CHCl_3 -MeOH, satd with H_2O , as eluent to yield pure 8 and 9.

(ii) **12 β ,20(S)-Dihydroxy-dammar-24-en-3-O-yl)- α -sophoroside (8)** (280 mg, 35.7%): mp 196–198 °C (MeOH-H₂O); $[\alpha]_D^{25} +73.5^\circ$ (c 1.0, MeOH); ^1H NMR ($\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$): δ 5.25 (d, 1 H, $J_{1,2}$, 7.6 Hz, H-1'), 5.67 (d, 1 H, $J_{2,3}$, 3.7 Hz, H-1'), ^{13}C NMR ($\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$): δ 97.5 (1'), 106.2 (1'), 85.4 (3), 70.9 (12), 72.9 (20), 126.1 (24), 130.3 (25); Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_{13}$: C, 64.26; H, 9.25. Found: C, 64.46; H, 9.30.

(iii) **12 β ,20(S)-Dihydroxy-dammar-24-en-3-O-yl)- β -sophoroside (ginsenoside Rg_3 , 9)** (109 mg, 13.9%): mp 192–194 °C (MeOH-H₂O); $[\alpha]_D^{25} +8.5^\circ$ (c 1.0, MeOH); ^1H NMR ($\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$): δ 4.95 (d, 1 H, $J_{1,2}$, 7.3 Hz, H-1'), 5.39 (d, 1 H, $J_{2,3}$, 7.3 Hz, H-1'); ^{13}C NMR ($\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$): δ 104.7 (1'), 105.6 (1'), 88.9 (3), 70.9 (12), 72.9 (20), 126.1 (24), 130.4 (25); Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_{13}$: C, 64.26; H, 9.25. Found: C, 64.43; H, 9.31.

(iv) **Condensation in the presence of silver oxide:** Glycosylation of 12-acetoxy-protopanaxadiol (0.502 g, 1 mmol) with α -acetobromosophorose (1.75 g, 2.50 mmol), in the presence of freshly prepared silver oxide (0.626 g, 2.70 mmol), was carried out as described above to give a mixture of two octaacetates 6 and 7 (0.554 g, 49.5%). After deacetylation in the usual way, the residue (0.374 g) was chromatographed as already described above to yield pure 8 (239 mg, 30.5%) and 9 (100 mg, 12.8%).

Acetylation of sophorosides 8 and 9.—Compounds 8 and 9 (100 mg) were acetylated with Ac_2O (1 mL) in pyridine (2 mL) at room temperature for 15

h. After the usual work up, the corresponding octaacetates 6 and 7 were obtained.

(12 β -Acetoxy-20(S)-hydroxy-dammar-24-en-3-O-yl)-3',4',6',2'',3'',4'',6''-hepta-O-acetyl- α -sophoroside (6): mp 113–116 °C (petroleum-ether); $[\alpha]_D^{25} +32.8^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3): δ 4.60 (d, 1 H, $J_{1,2}$, 8.1 Hz, H-1'), 5.04 (d, 1 H, $J_{2,3}$, 3.7 Hz, H-1'); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 96.8 (1'), 101.2 (1'), 87.5 (3), 76.7 (12), 73.7 (20), 125.3 (24), 131.0 (25); Anal. Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{O}_{21}$: C, 62.12; H, 7.91. Found: C, 62.24; H, 7.98.

(12 β -Acetoxy-20(S)-hydroxy-dammar-24-en-3-O-yl)-3',4',6',2'',3'',4'',6''-hepta-O-acetyl- β -sophoroside (7): mp 110–113 °C (petroleum-ether); $[\alpha]_D^{25} -7.45^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3): δ 4.44 (d, 1 H, $J_{1,2}$, 7.8 Hz, H-1'), 4.69 (d, 1 H, $J_{2,3}$, 8.0 Hz, H-1'); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 100.7 (1'), 103.5 (1'), 91.0 (3), 76.6 (12), 73.8 (20), 125.4 (24), 131.2 (25); Anal. Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{O}_{21}$: C, 62.12; H, 7.91. Found: C, 62.29; H, 7.96.

Acknowledgements

We are greatly indebted to Dr. Lyubov N. Atopkina, of the Pacific Institute of Biorganic Chemistry, for the interesting discussion.

References

- [1] A. Tanaka and R. Kasai, *Saponins of Ginseng and Related Plants*, in W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby, and Ch. Tamm (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 46, Springer, Wien, New York, 1984, pp 1–76.
- [2] H. Kitagawa, M. Yoshikawa, M. Yoshihara, T. Hayashi, and T. Taniyama, *Yakugaku Zasshi*, 103 (1983) 612–622.
- [3] S. Sanada, N. Komdo, J. Shoji, O. Tanaka, and S. Shihata, *Chem. Pharm. Bull.*, 22 (1974) 421–428.
- [4] L.N. Atopkina, N.F. Samoshina, and N.I. Uvarova, *Khim. Prir. Soedin.*, 6 (1989) 813–816.
- [5] N.D. Pokhilo and N.I. Uvarova, *Khim. Prir. Soedin.*, 3 (1988) 325–341.
- [6] H.P. Wessel and G. Englert, *J. Carbohydr. Chem.*, 13 (1994) 1145–1158.
- [7] K. Boeck, C. Pedersen, and H. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 42 (1984) 193–225.
- [8] N.I. Uvarova, L.N. Atopkina, and G.B. Elyakov, *Carbohydr. Res.*, 83 (1980) 33–42.
- [9] M. Fieser and L. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 3, Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto, 1972, pp 55–56.
- [10] M. Nagai, N. Tanaka, O. Tanaka, and S. Ichikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 21 (1973) 2061–2065.

28. TLC fingerprint for IH-901RM



29. ICH guideline for validation of analytical procedure: methodology

3AQ13a s

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY *)

Guideline Title	Validation of Analytical Procedures: Methodology
Legislative basis	Directive 75/318/EEC as amended
Date of first adoption	December 1996
Date of entry into force	For studies commencing after June 1997
Status	Last revised 1996
Previous titles/other references	ICH Q2B/CPMP/ICH/281/95
Additional Notes	This note for guidance concerns test procedures used in documentation submitted in accordance with Part 2, sections A-F of the Annex to Directive 75/318/EEC as amended, with a view to the granting of a marketing authorisation for a medicinal product. This guideline is complementary to, and should be read in conjunction with, the guideline on <i>Validation of Analytical procedures: Definitions and Terminology</i> .

CONTENTS

INTRODUCTION

1. SPECIFICITY
2. LINEARITY
3. RANGE
4. ACCURACY
5. PRECISION
6. DETECTION LIMIT
7. QUANTITATION LIMIT
8. ROBUSTNESS
9. SYSTEM SUITABILITY TESTING

107

s 3AQ13a

1.1 Identification

Suitable identification tests should be able to discriminate between compounds of closely related structures which are likely to be present. The discrimination of a procedure may be confirmed by obtaining positive results (perhaps by comparison with a known reference material) from samples containing the analyte, coupled with negative results from samples which do not contain the analyte. In addition, the identification test may be applied to materials structurally similar to or closely related to the analyte to confirm that a positive response is not obtained. The choice of such potentially interfering materials should be based on sound scientific judgement with a consideration of the interferences that could occur.

1.2 Assay and Impurity Test(s)

For chromatographic procedures, representative chromatograms should be used to demonstrate specificity and individual components should be appropriately labelled. Similar considerations should be given to other separation techniques.

Critical separations in chromatography should be investigated at an appropriate level. For critical separations, specificity can be demonstrated by the resolution of the two components which elute closest to each other.

In cases where a non-specific assay is used, other supporting analytical procedures should be used to demonstrate overall specificity. For example, where a titration is adopted to assay the active substance for release, the combination of the assay and a suitable test for impurities can be used.

The approach is similar for both assay and impurity tests:

1.2.1 Discrimination of analytes where impurities are available

For the assay, this should involve demonstration of the discrimination of the analyte in the presence of impurities and/or excipients; practically, this can be done by spiking pure substances (active substance or product) with appropriate levels of impurities and/or excipients and demonstrating that the assay result is unaffected by the presence of these materials (by comparison with the assay result obtained on unspiked samples).

For the impurity test, the discrimination may be established by spiking active substance or product with appropriate levels of impurities and demonstrating the separation of these impurities individually and/or from other components in the sample matrix.

1.2.2 Discrimination of the analyte where impurities are not available

If impurity or degradation product standards are unavailable, specificity may be demonstrated by comparing the test results of samples containing impurities or degradation products to a second well-characterised procedure (e.g. pharmacopoeial method or other validated analytical procedure (independent procedure)). As appropriate, this should include samples stored under relevant stress conditions: light, heat, humidity, acid/base hydrolysis and oxidation.

- for the assay, the two results should be compared.
- for the impurity tests, the impurity profiles should be compared.

110

3AQ13a s

VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY *)

INTRODUCTION

This guideline is complementary to the parent guideline* which presents a discussion of the characteristics that should be considered during the validation of analytical procedures. Its purpose is to provide some guidance and recommendations on how to consider the various validation characteristics for each analytical procedure. In some cases (for example, demonstration of specificity), the overall capabilities of a number of analytical procedures in combination may be investigated in order to ensure the quality of the active substance or medicinal product. In addition, the document provides an indication of the data which should be presented in an application for marketing authorisation.

All relevant data collected during validation and formulae used for calculating validation characteristics should be submitted and discussed as appropriate.

Approaches other than those set forth in this guideline may be applicable and acceptable. It is the responsibility of the applicant to choose the validation procedure and protocol most suitable for the product. However it is important to remember that the main objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that the procedure is suitable for its intended purpose. Due to their complex nature, analytical procedures for biological and biotechnological products in some cases may be approached differently than in this document.

Well-characterised reference materials, with documented purity, should be used throughout the validation study. The degree of purity necessary depends on the intended use.

In accordance with the parent guideline*, and for the sake of clarity, this document considers the various validation characteristics in distinct sections. The arrangement of these sections reflects the process by which an analytical procedure may be developed and evaluated.

In practice, it is usually possible to design the experimental work so that the appropriate validation characteristics can be considered simultaneously to provide a sound, overall knowledge of the capabilities of the analytical procedure, for instance: specificity, linearity, range, accuracy and precision.

1. SPECIFICITY

An investigation of specificity should be conducted during the validation of identification tests, the determination of impurities and the assay. The procedures used to demonstrate specificity will depend on the intended objective of the analytical procedure. It is not always possible to demonstrate that an analytical procedure is specific for a particular analyte (complete discrimination). In this case a combination of two or more analytical procedures is recommended to achieve the necessary level of discrimination.

* Note for guidance on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology

109

Peak purity tests may be useful to show that the analyte chromatographic peak is not attributable to more than one component (e.g., diode array, mass spectrometry).

2. LINEARITY

A linear relationship should be evaluated across the range (see section 3) of the analytical procedure. It may be demonstrated directly on the active substance (by dilution of a standard stock solution) and/or on separate weighings of synthetic mixtures of the product components, using the proposed procedure. The latter aspect can be studied during investigation of the range.

Linearity should be evaluated by visual inspection of a plot of signals as a function of analyte concentration or content. If there is a linear relationship, test results should be evaluated by appropriate statistical methods, for example, by calculation of a regression line by the method of least squares. In some cases, to obtain linearity between assays and sample concentrations, the test data may need to be subjected to a mathematical transformation prior to the regression analysis. Data from the regression line itself may be helpful to provide mathematical estimates of the degree of linearity.

The correlation coefficient, y-intercept, slope of the regression line and residual sum of squares should be submitted. A plot of the data should be included. In addition, an analysis of the deviation of the actual data points from the regression line may also be helpful for evaluating linearity.

Some analytical procedures, such as immunoassays, do not demonstrate linearity after any transformation. In this case, the analytical response should be described by an appropriate function of the concentration (amount) of an analyte in a sample.

For the establishment of linearity, a minimum of 5 concentrations is recommended. Other approaches should be justified.

3. RANGE

The specified range is normally derived from linearity studies and depends on the intended application of the procedure. It is established by confirming that the analytical procedure provides an acceptable degree of linearity, accuracy and precision when applied to samples containing amounts of analyte within or at the extremes of the specified range of the analytical procedure.

The following minimum specified ranges should be considered:

- for the assay of an active substance or a finished product: normally from 80 to 120 percent of the test concentration;
- for content uniformity, covering a minimum of 70 to 130 percent of the test concentration, unless a wider more appropriate range, based on the nature of the dosage form (e.g., metered dose inhalers), is justified;
- for dissolution testing: $\pm 20\%$ over the specified range; e.g. if the specifications for a controlled released product cover a region from 20%, after 1 hour, up to 90%, after 24 hours, the validated range would be 0-110% of the label claim.

111

29. ICH guideline for validation of analytical procedure: methodology

s 3AQ13a

- for the determination of an impurity: from the reporting level of an 'impurity' to 120% of the specification; for impurities known to be unusually potent or to produce toxic or unexpected pharmacological effects, the detection/quantitation limit should be commensurate with the level at which the impurities must be controlled. Note: for validation of impurity test procedures carried out during development, it may be necessary to consider the range around a suggested (probable) limit;
- if assay and purity are performed together as one test and only a 100% standard is used, linearity should cover the range from the reporting level of the impurities' to 120% of the assay specification.

4. ACCURACY

Accuracy should be established across the specified range of the analytical procedure.

4.1 Assay

4.1.1 Active Substance

Several methods of determining accuracy are available:

- a) application of an analytical procedure to an analyte of known purity (e.g. reference material);
- b) comparison of the results of the proposed analytical procedure with those of a second well-characterised procedure, the accuracy of which is stated and/or defined (independent procedure, see 1.2.2);
- c) accuracy may be inferred once precision, linearity and specificity have been established.

4.1.2 Medicinal Product

Several methods for determining accuracy are available:

- a) application of the analytical procedure to synthetic mixtures of the product components to which known quantities of the substance to be analysed have been added;
- b) in cases where it is impossible to obtain samples of all product components, it may be acceptable either to add known quantities of the analyte to the product or to compare the results obtained from a second, well characterised procedure, the accuracy of which is stated and/or defined (independent procedure, see 1.2.2);
- c) accuracy may be inferred once precision, linearity and specificity have been established.

4.2 Impurities (Quantitation)

Accuracy should be assessed on samples (substance/ product) spiked with known amounts of impurities.

* see chapters 'Reporting Impurity Content of Batches' of the corresponding Guidelines: 'Impurities in New Active Substances' and 'Impurities in New Medicinal Products'.

112

s 3AQ13a

5.4 Recommended Data

The standard deviation, relative standard deviation (coefficient of variation) and confidence interval should be reported for each type of precision investigated.

6. DETECTION LIMIT

Several approaches for determining the detection limit are possible, depending on whether the procedure is a non-instrumental or instrumental. Approaches other than those listed below may be acceptable.

6.1 Based on Visual Evaluation

Visual evaluation may be used for non-instrumental methods but may also be used with instrumental methods.

The detection limit is determined by the analysis of samples with known concentrations of analyte and by establishing the minimum level at which the analyte can be reliably detected.

6.2 Based on Signal-to-Noise

This approach can only be applied to analytical procedures which exhibit baseline noise.

Determination of the signal-to-noise ratio is performed by comparing measured signals from samples with known low concentrations of analyte with those of blank samples and establishing the minimum concentration at which the analyte can be reliably detected. A signal-to-noise ratio between 3 or 2:1 is generally considered acceptable for estimating the detection limit.

6.3 Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope

The detection limit (DL) may be expressed as:

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

where σ = the standard deviation of the response
 S = the slope of the calibration curve

The slope S may be estimated from the calibration curve of the analyte. The estimate of σ may be carried out in a variety of ways, for example:

6.3.1 Based on the Standard Deviation of the Blank

Measurement of the magnitude of analytical background response is performed by analysing an appropriate number of blank samples and calculating the standard deviation of these responses.

114

3AQ13a s

In cases where it is impossible to obtain samples of certain impurities and/or degradation products, it is considered acceptable to compare results obtained by an independent procedure (see 1.2.2). The response factor of the drug substance can be used.

It should be clear how the individual or total impurities are to be determined (e.g., weight/weight or area percent, in all cases with respect to the major analyte).

4.3 Recommended Data

Accuracy should be assessed using a minimum of 9 determinations over a minimum of 3 concentration levels covering the specified range (e.g. 3 concentrations/ 3 replicates each of the total analytical procedure).

Accuracy should be reported as percent recovery by the assay of known added amount of analyte in the sample or as the difference between the mean and the accepted true value together with the confidence intervals.

5. PRECISION

Validation of tests for assay and for quantitative determination of impurities includes an investigation of precision.

5.1 Repeatability

Repeatability should be assessed using:

- a) a minimum of 9 determinations covering the specified range for the procedure (e.g. 3 concentrations/3 replicates each)
or
- b) a minimum of 6 determinations at 100% of the test concentration.

5.2 Intermediate Precision

The extent to which intermediate precision should be established depends on the circumstances under which the procedure is intended to be used. The applicant should establish the effects of random events on the precision of the analytical procedure. Typical variations to be studied include days, analysts, equipment, etc. It is not considered necessary to study these effects individually. The use of an experimental design (matrix) is encouraged.

5.3 Reproducibility

Reproducibility is assessed by means of an inter-laboratory trial. Reproducibility should be considered in case of the standardisation of an analytical procedure, for instance, for inclusion of procedures in pharmacopoeias. This data is not part of the marketing authorisation dossier.

113

3AQ13a s

6.3.2 Based on the Calibration Curve

A specific calibration curve should be studied using samples containing an analyte in the range of DL. The residual standard deviation of a regression line or the standard deviation of y-intercepts of regression lines may be used as the standard deviation.

6.4 Recommended Data

The detection limit and the method used for determining the detection limit should be presented. If DL is determined based on visual evaluation or based on signal to noise ratio, the presentation of the relevant chromatograms is considered acceptable for justification.

In cases where an estimated value for the detection limit is obtained by calculation or extrapolation, this estimate may subsequently be validated by the independent analysis of a suitable number of samples known to be near or prepared at the detection limit.

7. QUANTITATION LIMIT

Several approaches for determining the quantitation limit are possible, depending on whether the procedure is a non-instrumental or instrumental. Approaches other than those listed below may be acceptable.

7.1 Based on Visual Evaluation

Visual evaluation may be used for non-instrumental methods but may also be used with instrumental methods.

The quantitation limit is generally determined by the analysis of samples with known concentrations of analyte and by establishing the minimum level at which the analyte can be quantified with acceptable accuracy and precision.

7.2 Based on Signal-to-Noise Approach

This approach can only be applied to analytical procedures that exhibit baseline noise. Determination of the signal-to-noise ratio is performed by comparing measured signals from samples with known low concentrations of analyte with those of blank samples and by establishing the minimum concentration at which the analyte can be reliably quantified. A typical signal-to-noise ratio is 10:1.

7.3 Based on the Standard Deviation of the Response and the Slope

The quantitation limit (QL) may be expressed as:

$$QL = \frac{10 \sigma}{S}$$

where σ = the standard deviation of the response
 S = the slope of the calibration curve

The slope S may be estimated from the calibration curve of the analyte. The estimate of σ may be carried out in a variety of ways including:

115

29. ICH guideline for validation of analytical procedure: methodology

s 3AQ13a

7.3.1 Based on Standard Deviation of the Blank

Measurement of the magnitude of analytical background response is performed by analysing an appropriate number of blank samples and calculating the standard deviation of these responses.

7.3.2 Based on the Calibration Curve

A specific calibration curve should be studied using samples, containing an analyte in the range of QL. The residual standard deviation of a regression line or the standard deviation of y-intercepts of regression lines may be used as the standard deviation.

7.4 Recommended Data

The quantitation limit and the method used for determining the quantitation limit should be presented.

The limit should be subsequently validated by the analysis of a suitable number of samples known to be near or prepared at the quantitation limit.

8. ROBUSTNESS

The evaluation of robustness should be considered during the development phase and depends on the type of procedure under study. It should show the reliability of an analysis with respect to deliberate variations in method parameters.

If measurements are susceptible to variations in analytical conditions, the analytical conditions should be suitably controlled or a precautionary statement should be included in the procedure. One consequence of the evaluation of robustness should be that a series of system suitability parameters (e.g., resolution test) is established to ensure that the validity of the analytical procedure is maintained whenever used.

Examples of typical variations are:

- stability of analytical solutions,
- extraction time

In the case of liquid chromatography, examples of typical variations are

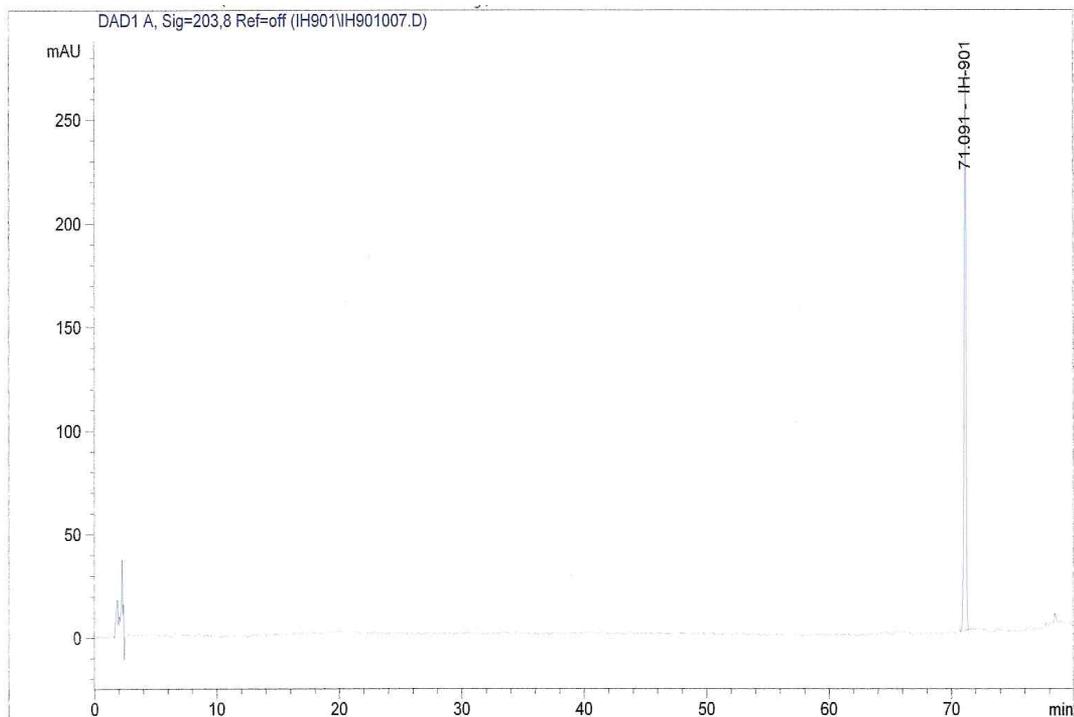
- influence of variations of pH in a mobile phase,
- influence of variations in mobile phase composition,
- different columns (different lots and/or suppliers),
- temperature,
- flow rate.

In the case of gas-chromatography, examples of typical variations are

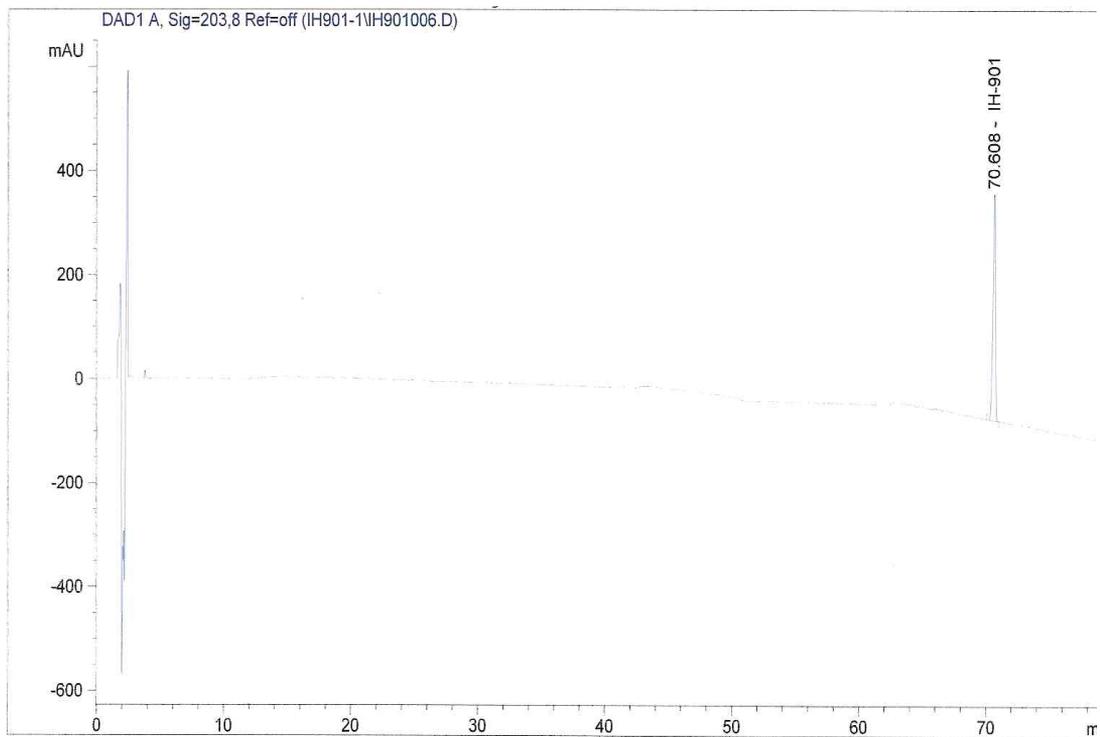
- different columns (different lots and/or suppliers),
- temperature,
- flow rate.

116

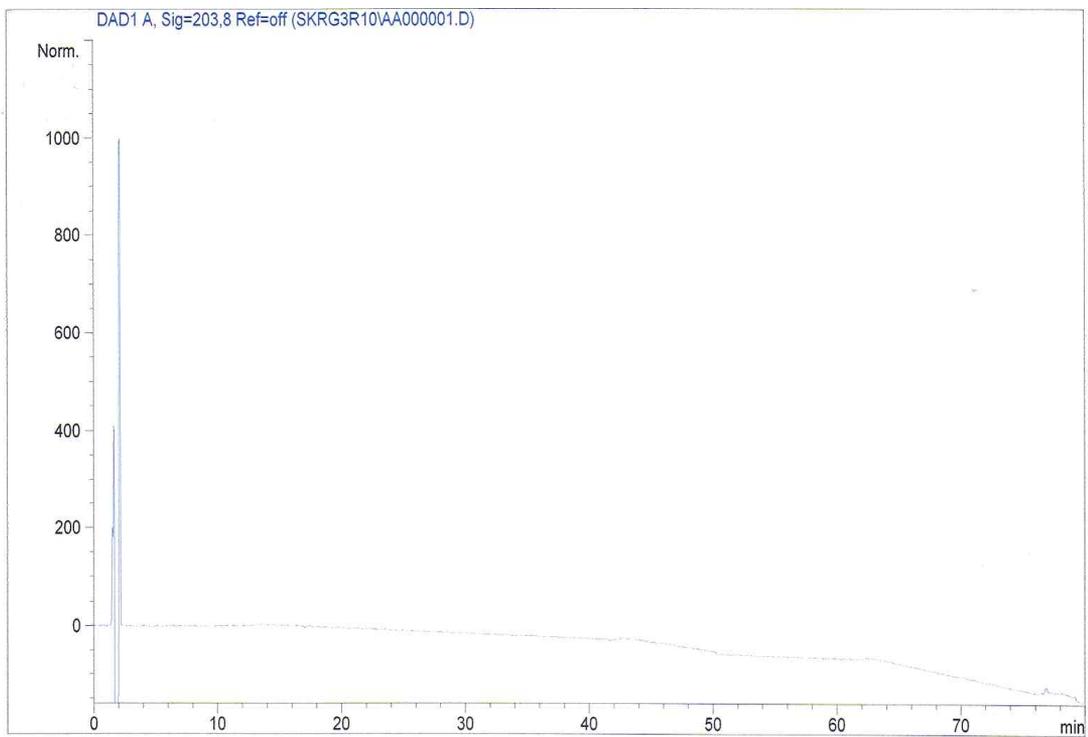
30. HPLC fingerprint 1 for IH-901RM



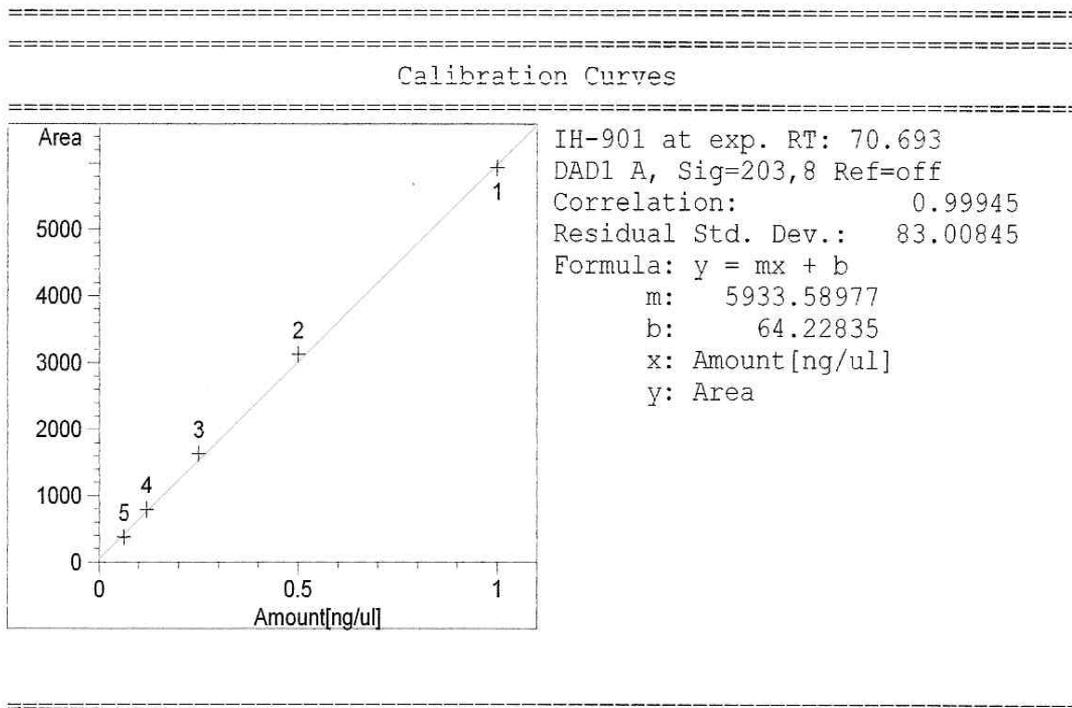
33. Chromatogram of HPLC 100% method 2 for IH-901RM



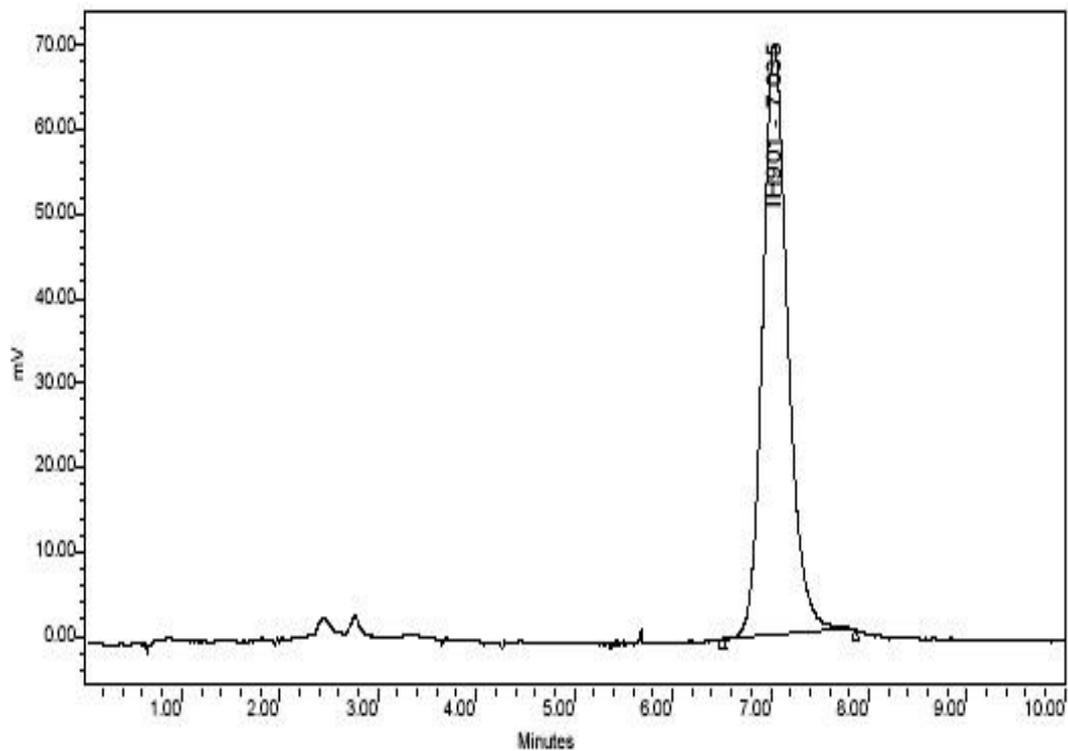
34. HPLC fingerprint 2 of test material solvent for IH-901RM



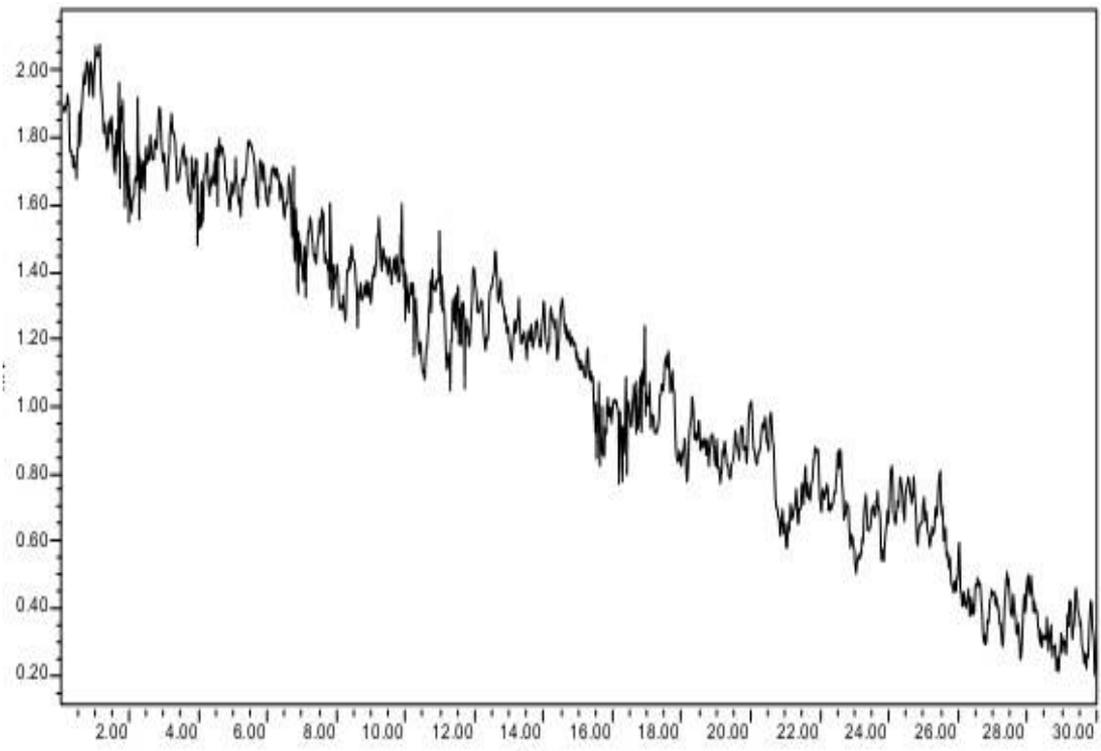
35. Standard curve for IH-901RM in HPLC 100% method 2



36. Chromatogram of HPLC 100% method 3 for IH-901RM



37. HPLC fingerprint 3 of test material solvent for IH-901RM



38. Standard curve for IH-901RM in HPLC 100% method 3

