

117010-1

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(), 비공개()발간등록번호(○)

11-1543000-002299-01

구기자 함유 복합한약추출물의 지표성분 연구 최종보고서

갱년기 열성홍조 개선 건강기능성식품 개발을 위한

2018

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

갱년기 열성홍조 개선 건강기능성식품
개발을 위한 구기자 함유 복합한약추출물의
지표성분 연구 최종보고서

2018. 04. 20.

주관연구기관 / 경희대학교

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

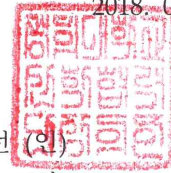
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “갱년기 열성홍조 개선 건강기능식품 개발을 위한 구기자 함유 복합한약 추출물의 지표성분 연구”(개발기간 : 2017. 04. 21 ~ 2018. 04. 20)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 07. 26.

주관연구기관명 :	경희대학교	(대표자) 홍충선	(인)
협동연구기관명 :		(대표자)	(인)
참여기관명 :		(대표자)	(인)



주관연구책임자 : 장대식

협동연구책임자 :

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117010-1	해당단계 연구기간	2017. 04. 21 - 2018. 04. 20	단계구분	(1차년도)/ (1차년도)
연구사업명	단위사업	농생명산업기술개발			
	사업명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업(개발착수형)			
연구과제명	대과제명	갱년기 열성홍조 개선 건강기능식품 개발을 위한 구기자 함유 복합한약추출물의 지표성분 연구			
	세부과제명				
연구책임자	장대식	해당단계 참여연구원 수	총: 5 명 내부: 5 명 외부: - 명	해당단계 연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 16,700천원 계: 66,700천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 5 명 내부: 5 명 외부: - 명	총연구개발비	정부: 50,000천원 민간: 16,700천원 계: 66,700천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교			참여기업명 올만식품(유)	
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명: (해당 없음)	
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호							2018-0 004				

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

본 과제는 구기자 함유 복합한약추출물(천문동, 상삼자, 구기자)을 이용한 갱년기 열성홍조 개선 건강기능식품개발을 위한 기초적인 연구로서 건강기능식품개발을 위한 지표성분연구를 진행하였음. 복합한약추출물 구성약재인 천문동과 구기자의 열수 추출물로부터 반복적인 크로마토그래피를 통해 총 10종의 주요 성분(protodioscin, methyl protodioscin, aspachioside A, 15-hydroxy-pseudoprotodioscin, aspachioside C, protocatechuic acid, pinellic acid, rutin, isoquercitrin, 및 quercetin)을 분리하였으며, NMR 분석을 실시하여 그 화학적 구조를 규명하였음. 이 중 6종의 주요성분은 100 mg 이상 대량으로 분리하였음. 본 연구를 통해 얻어진 주요 성분을 이용하여 각 구성생약의 열수추출물 중 함량을 HPLC로 분석하였음. 또한 본 연구를 통해 분리된 3종의 화합물(protodioscin, methyl protodioscin, rutin)은 한국화학물은행에 기탁하였음. (기탁번호 : 2018-0004)

보고서 면수 44

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구 목적 <ul style="list-style-type: none"> - 갱년기 열성홍조 개선 건강기능식품 개발을 위한 구기자 함유 복합한약추출물 (천문동, 상심자, 구기자)의 지표성분 발굴 ○ 연구 내용 <ul style="list-style-type: none"> - 구기자 함유 복합한약추출물의 주요 구성성분 8종 이상(10 mg 이상) 분리 및 화학구조동정 - 분리된 성분을 이용한 HPLC 프로파일링 및 주요성분 함량 분석 - 약효실험을 위해 주요성분 2종 이상 추가분리(100 mg 이상) - 약효/함량/특이성 등을 종합적으로 고려하여 지표물질 선정 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 구기자 함유 복합 한약추출물의 구성약재 중 천문동과 상심자 열수 추출물로부터 10종(protodioscin, methyl protodioscin, aspacochioside A, 15-hydroxy-pseudoprotodioscin, aspacochioside C, protocatechuic acid, pinelllic acid, rutin, isoquercitrin, 및 quercetin)의 주요 화합물을 10 mg 이상 분리하여 화학구조를 동정하였음 - 이 중 6종 화합물(protodioscin, methyl protodioscin, aspacochioside A, 15-hydroxy-pseudoprotodioscin, protocatechuic acid, rutin)은 100 mg 이상 대량으로 분리하였음 - 천문동, 상심자, 구기자의 주요물질(protodioscin, protocatechuic acid, betaine)의 함량을 HPLC로 분석하였음 - 천문동, 상심자, 구기자의 지표물질로 protodioscin, protocatechuic acid, betaine을 제시하였음 - 본 연구를 통해 분리된 3종의 화합물(protodioscin, methyl protodioscin, rutin)은 한국화합물은행에 기탁하였음. (기탁번호: 2018-0004) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제에서 구기자 함유 복합 한약추출물의 구성성분, 특히 500 mg 이상 대량 확보된 천문동의 주요 성분인 protodioscin (2.5 g), methyl protodioscin (1.56 g), aspacochioside A (612.3 mg)는 갱년기 열성홍조 관련 동물실험을 통해 유효물질로서의 활용가능성을 확인할 계획임 - 또한 본 연구과제에서 확보된 화합물들은 원료 안전성 연구, 제조공정 및 완제품 표준화에 직접적으로 활용 가능하며, 효능기전연구나 PK연구에 활용할 수 있음 - 구기자 함유 복합 한약추출물이나 개별 구성한약재를 이용한 다른 용도의 건강기능식품 연구의 지표/유효물질로 활용 가능함 - 또한 천연물의 지표/유효성분 발굴에 전문성을 가지는 연구 전문 인력의 양성에 기여할 수 있음 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>갱년기 열성홍조</p>	<p>건강기능성식품</p>	<p>구기자</p>	<p>복합한약추출물</p>	<p>지표성분</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>menopausal hot flushes</p>	<p>functional food</p>	<p>Lycii Fructus</p>	<p>multi-herbal extract</p>	<p>marker compound</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	8
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	32
4. 연구결과의 활용 계획 등	33
붙임. 참고 문헌	35

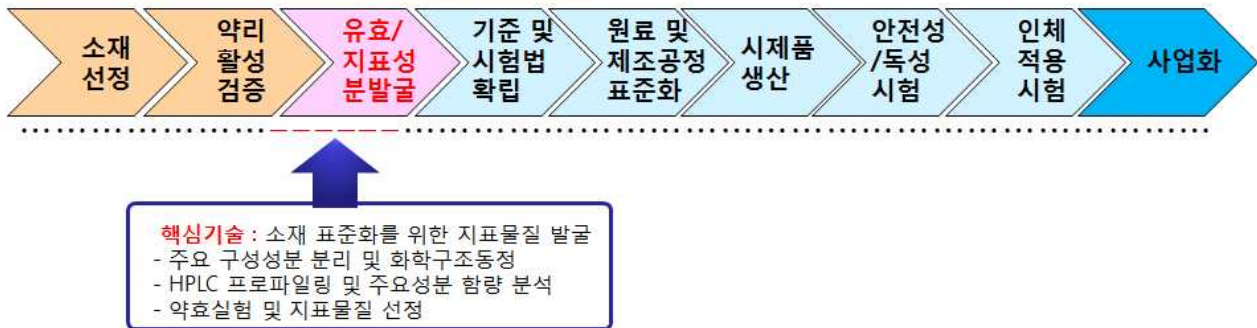
<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 연구개발 개요 : 갱년기 열성홍조 개선 건강기능성식품 개발을 위해 필수적인 원료표준화 선행연구로서 구기자 함유 복합한약추출물의 지표성분 발굴에 관한 연구
- 핵심기술 : 구기자 함유 복합한약추출물의 지표물질 발굴
 - 구기자 함유 복합한약추출물의 주요 구성성분 분리 및 화학구조동정
 - HPLC 프로파일링 및 주요성분 함량 분석
 - 약효실험을 위해 주요성분 2종 이상 추가분리
 - 약효/함량/특이성 등을 종합적으로 고려하여 지표물질 선정

갱년기 열성홍조 개선 건강기능성식품 개발



1-2. 연구개발의 필요성

- 지표/유효물질 연구의 중요성
 - 미국 FDA는 DSHEA의 후속조치로 “Botanical Drugs Guidance for Industry”를 만들어 전통약물을 포함하는 생약원료를 이용한 천연물신약에 대한 새로운 등록허가 요건규정을 만들어 시행함으로써 향후 세계전통약물의 현대화와 산업화의 주도권을 장악할 수 있는 토대를 마련하였으며, 이후 2000년 “Botanical Drugs Guidance”를 제정하였는데 이는 전통약물이건 생약요법이건 항상 안전성과 유효성이 확보되어야 하며 이를 과학적으로 실증하는 자료를 제출하여야 천연물 신약으로 등록 및 허가할 수 있음을 명기함.
 - Combinatorial chemistry를 포함한 다양한 화학 합성법과 초고속 스크리닝법(HTS)의 발전에도 불구하고 신약개발에 있어서 천연물에서 분리한 성분들은 그 자체로 혹은 lead compound로서 여전히 중요한 비중을 차지하고 있음.
 - 향후 천연물유래 신 기능성소재, 천연물신약, 한방 및 신 기능성식품 산업발전 및 이들의

제품 개발, 품질 향상, 공정개발 등을 위해서는 그 명확한 활성 원인 성분이 미처 밝혀지지 않은 상태에서 대중에게 복용되는 문제점이 해결되어야 세계적 상품성을 갖출 수 있으며, 이를 위해 천연물 성분 분리 및 구조 분석 기술이 반드시 필요함.

- 따라서 21세기 글로벌시대를 대비하는 의미에서 천연물의 약리 활성 또는 생물활성 유효성분 연구에서부터 시작하는 정석적인 신약개발 연구가 요구되고 있으며, 현재 다양한 신약개발연구 사업에서 천연물에서 유래한 물질들을 대상으로 하고 있어 천연물 지표/유효성분 발굴 기술은 건강기능성식품이나 신약개발사업의 핵심기반기술의 하나임.

2장 연구수행 내용 및 결과

제 1절. 함유 성분 분리

1. 천문동(*Asparagus cochinchinensis*)의 주요성분 분리

가. 실험목적

갱년기 열성홍조 개선 건강기능식품 개발을 위한 구기자 함유 복합한약추출물(천문동, 상삼자, 구기자)의 구성 약재 중 천문동 괴경 열수추출물의 표준화를 위한 기초연구로서 주요 성분들을 분리하고 이들의 화학구조를 규명함

나. 실험방법

(1) 천문동 열수 추출물의 조제

천문동(구입처: 나눔제약, 원산지: 중국)에 10배의 물을 넣은 뒤, 2시간 동안 열수 추출(95°C~100°C)을 실시함. 열수 추출액을 29브릭스로 농축하여 천문동 열수 추출물을 조제하였음.

(2) Protodioscin의 분리

천문동 열수 추출물 1.15 kg을 이용하여 MeOH-H₂O 혼합용매 (0:1, 2:8, 4:6, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 1:0 각각 6.5 L, 3 L, 3 L, 9 L, 7 L, 3 L, 3 L), acetone (3L)을 이동상으로 하여 Diaion HP-20 칼럼크로마토그래피(∅ 9.6 × 56.0 cm)를 실시 후 12개의 소분획물(1-12)로 나누었음. 이 중 소분획물 6 (12.0 g)을 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매(14:6:1, 0:1:0 각각 3.8 L, 1.5 L)를 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 5.6 × 35.0 cm, 70-230 mesh)를 실시하여 7개의 분획물로 나누었음. 소분획물 6-4(1.75 g)를 EtOAc-acetone-H₂O 혼합용매 [4:5:1, 0:8:2 각각 3 L, 0.5 L]를 이동상으로 사용하여 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 5.2 × 25.5 cm, 230-400 mesh) 실시를 통해 **protodioscin** (217.8 mg)을 분리하였음. 또한 소분획물 6-6 (2.18 g)을 EtOAc-Acetone-H₂O 혼합용매 [4:5:1, 3.5:5:1.5 각각 2.7 L, 1.97 L]를 이동상으로 사용하여 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 4.4 × 30.0 cm, 230-400 mesh)를 통해 **protodioscin** (228.5 mg)를 추가적으로 분리하였음. Diaion HP-20 CC를 통해 나누어진 12개의 소분획물 중 7번 분획물 (16.3 g)을 EtOAc-acetone-H₂O 혼합용매(4:5:1, 13 L)를 이동상으로 사용하여 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 5.8 × 40.0 cm, 230-400 mesh)를 통해 10개의 소분획물로 나누었음. 이 중 소분획물 7-8(6.3 g)과 소분획물 7-9(3.4 g)을 각각 MPLC(C18, 130 g, acetonitrile-H₂O = 15:85 → 45:55)를 실시하여 **protodioscin** 1.23 g과 847.0 mg을 확보하였음. 분리된 화합물의 구조는 NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고 문헌의

분광학적 데이터와 비교 분석을 통하여 동정하였음.¹⁾

(3) **Methyl protodioscin**의 분리

상기의 방법으로 얻어진 소분획물 6-5 (7.16 g)중 일부 2.0 g을 취하여 MeOH 용액에 72시간 동안 담아 methylation을 시행하였음. 이를 가지고 EtOAc-Acetone-H₂O 혼합용매 (4:5:1, 1.4 L)를 이동상으로 하여, Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 5.2 × 32.0 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 **methyl protodioscin** (1.56 g)을 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고 문헌의 분광학적 데이터와 비교 분석을 통하여 동정하였음.²⁾

(4) **Aspachioside A**의 분리

상기의 방법으로 얻어진 소분획물 6-2(392.0 mg)를 EtOAc-Acetone-H₂O 혼합용매 (5:4:1, 1.5 L)를 이동상으로 하여, Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 3.6 × 26.0 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 **aspachioside A** (118.7 mg)를 분리하였음. 또한 EtOAc-acetone-H₂O 혼합용매(4:5:1, 13 L)를 이동상으로 사용하여 Silica gel 칼럼크로마토그래피 (∅ 5.8 × 40.0 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 소분획물 7번 (16.3 g)을 10개의 소분획물로 나누었음. 이 중 소분획물 7-5(1.15 g)를 EtOAc-acetone-H₂O 혼합용매 [4.5:4.5:1, 0.9:1 각각 2.1 L, 0.5 L]를 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 3.6 × 25.0 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 **aspachioside A**를 493.6 mg을 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고 문헌의 분광학적 데이터와 비교 분석을 통하여 동정하였음.³⁾

(5) **15-Hydroxy-pseudoprotodioscin**의 분리

상기의 방법으로 얻어진 소분획물 7 (16.3 g)을 EtOAc-Acetone-H₂O 혼합용매 (4:5:1, 13 L)를 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피 (∅ 5.8 × 40.0 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 10개의 소분획물로 나누었음. 이 중 소분획물 7-6(1.6 g)로부터 MPLC (C18, 130 g, acetonitrile-H₂O = 15:85 → 40:60)를 이용하여 15-hydroxy-pseudoprotodioscin (211.0 mg)을 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고 문헌의 분광학적 데이터와 비교 분석을 통하여 동정하였음.⁴⁾

(6) **Aspachioside C**의 분리

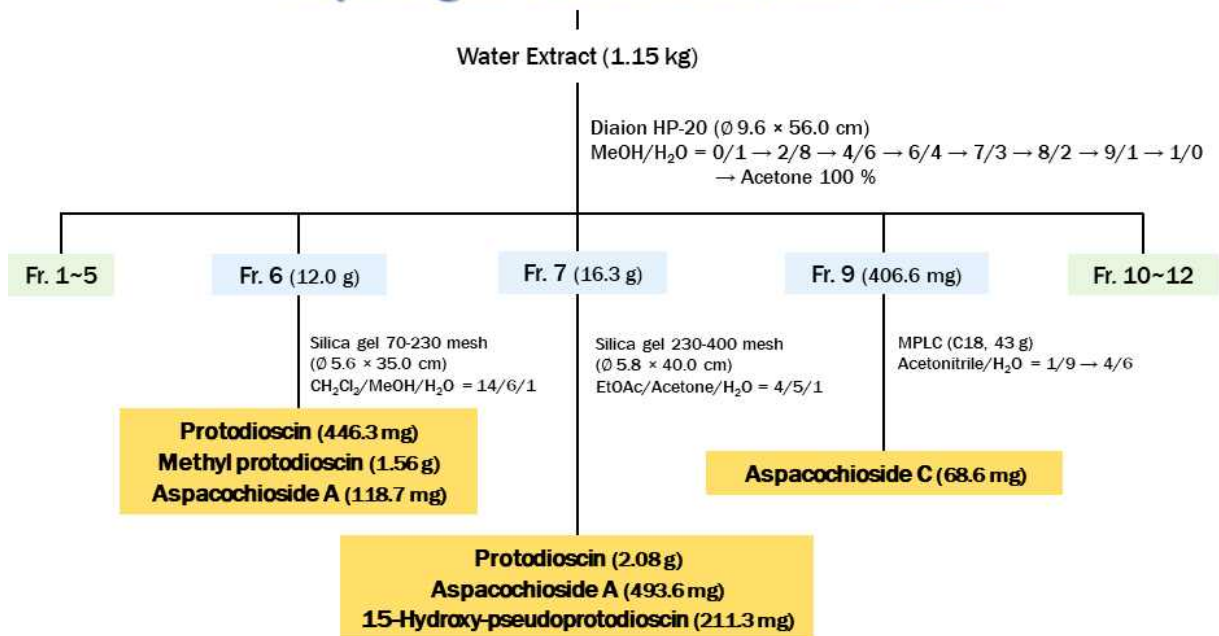
천문동 열수 추출물 1.15 kg을 Diaion HP-20 칼럼크로마토그래피(∅ 9.6 × 56.0 cm)를 실시 후 12개의 소분획물로 나누었음. 이 중 소분획물 9(406.6 mg)로부터 EtOAc-Acetone-H₂O 혼합용매(5:4:1, 4:5:1 각각 0.2 L, 0.5 L), MeOH(0.5 L)을 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 2.5 × 31.5 cm, 230-400 mesh)를 통해 **aspachioside C** (68.6 mg)를 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고 문헌의 분광학적

데이터와 비교 분석을 통하여 동정하였음.⁵⁾

다. 결과 및 고찰

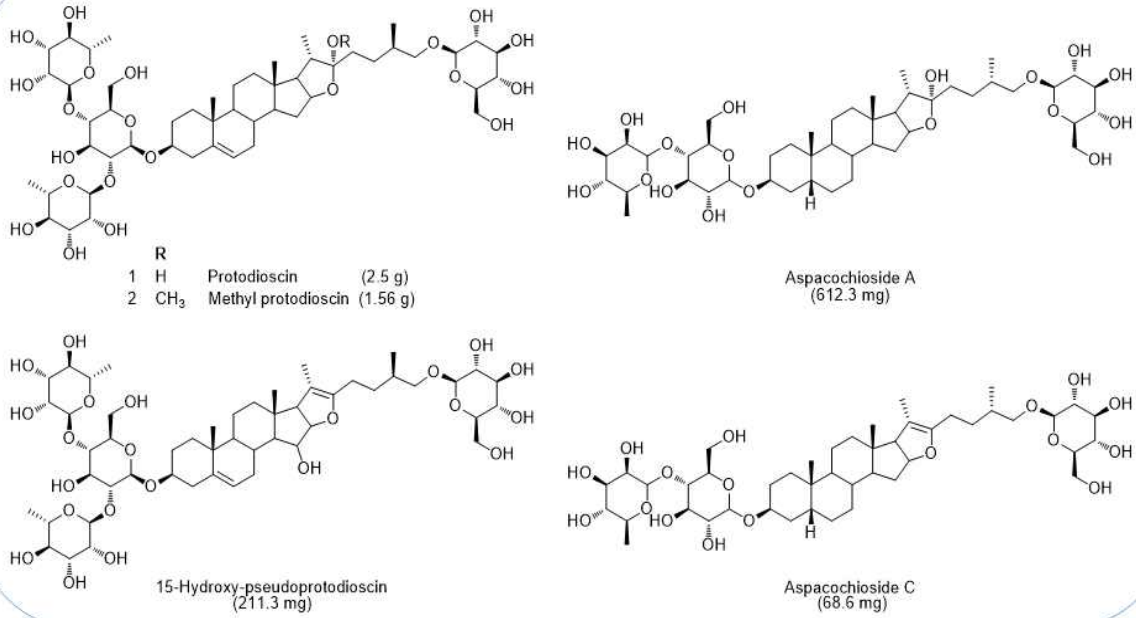
- (1) 천문동 열수 추출물 1.15 kg으로부터 반복적인 칼럼크로마토그래피를 이용하여 5종의 steroidal saponin, protodioscin(2.5 g), methyl protodioscin(1.56 g), aspachioside A(612.3 mg), 15-hydroxy-pseudoprotodioscin(211.3 mg), aspachioside C(68.6 mg)를 분리하였으며, NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고문헌의 분광학적 데이터와 비교 분석을 통하여 화학구조를 동정하였음.
- (2) 분리된 물질 중 protodioscin과 methyl protodioscin은 한국화학물은행에 기탁하였음. (기탁번호 : 2018-0004)

Asparagus cochinchinensis (3.0 kg)

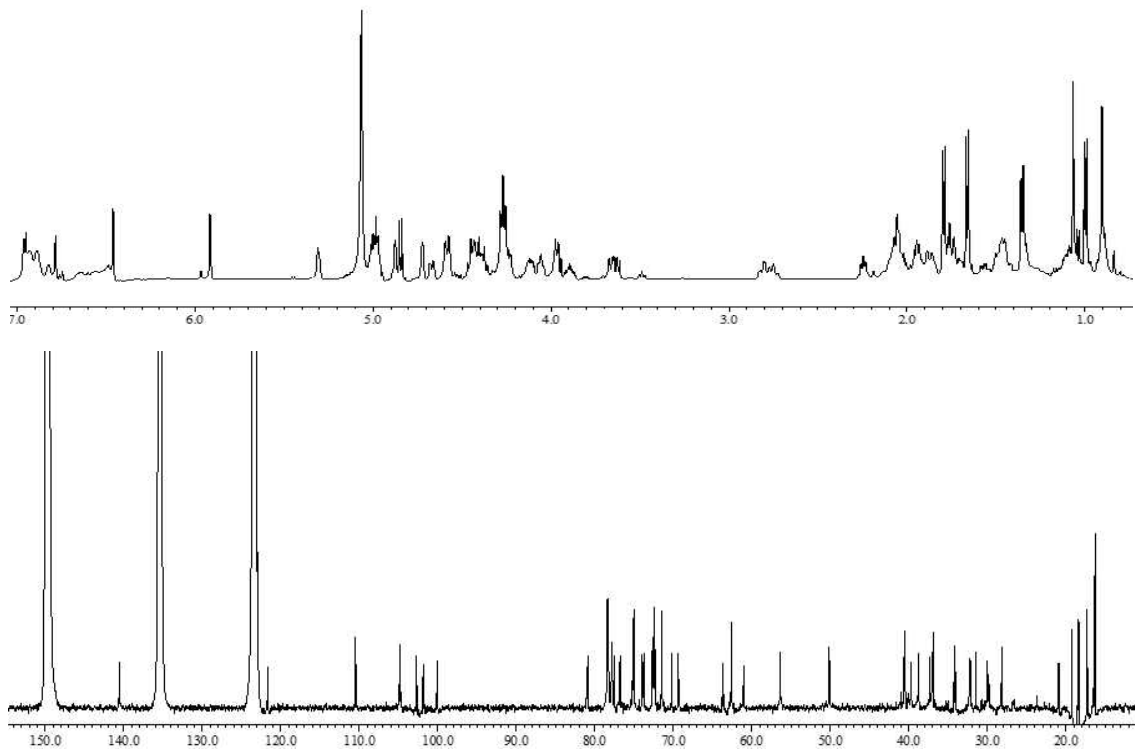


<천문동 추출물에서의 분리과정>

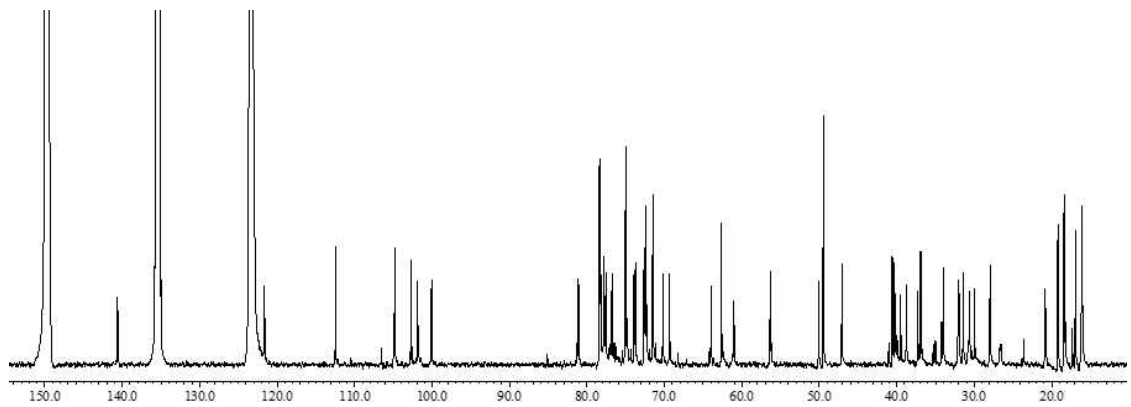
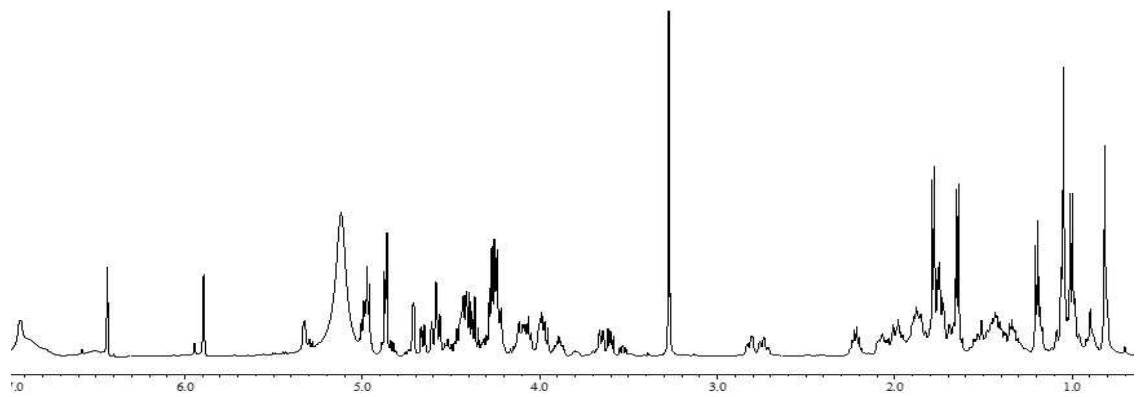
Steroidal saponin



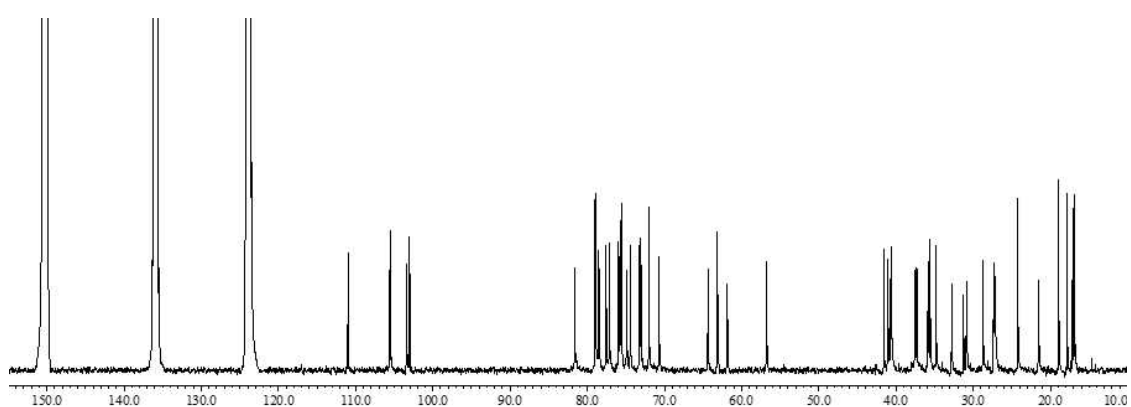
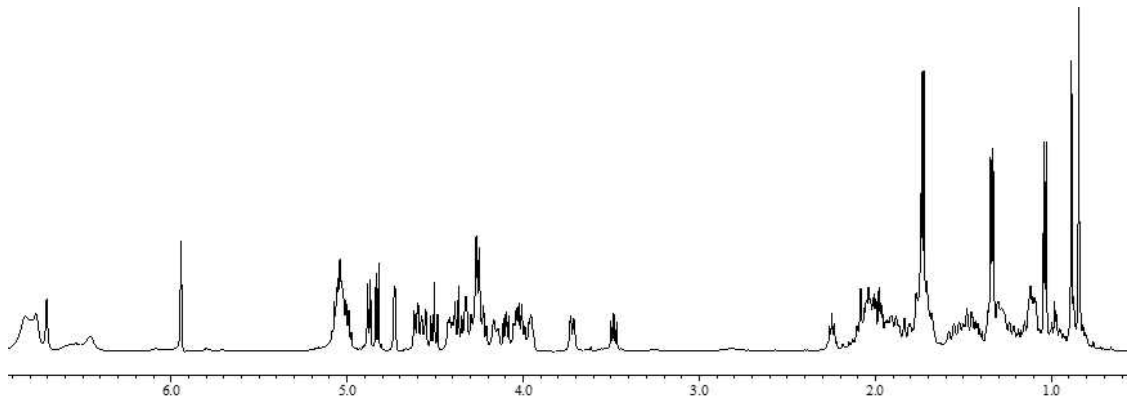
<천문동에서 분리한 물질들의 화학구조>



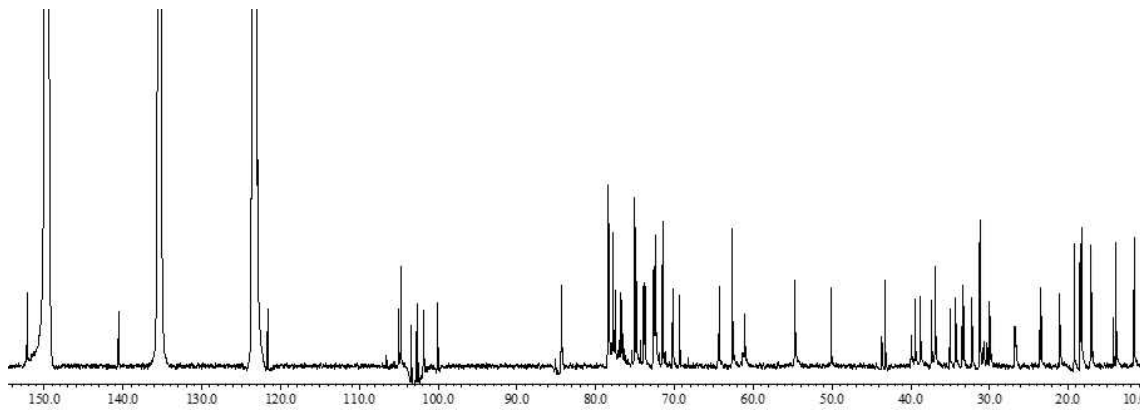
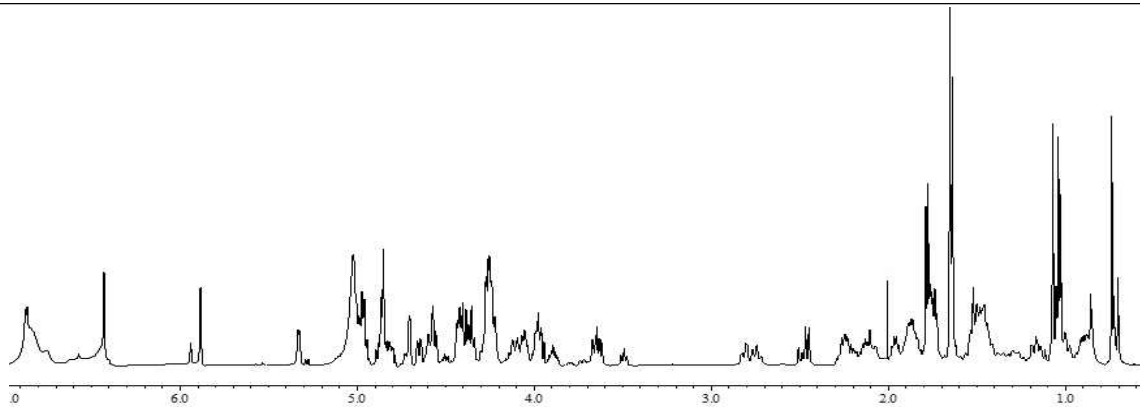
<천문동에서 분리한 Protodioscin의 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 스펙트럼>



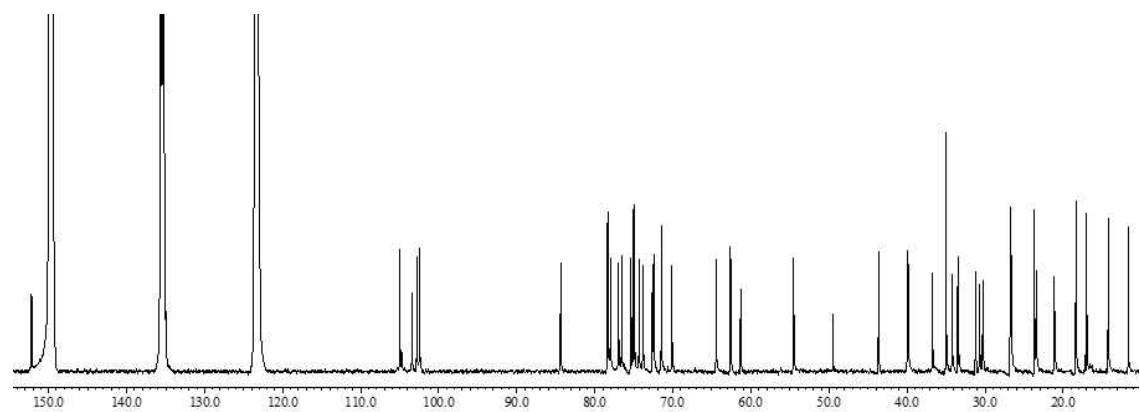
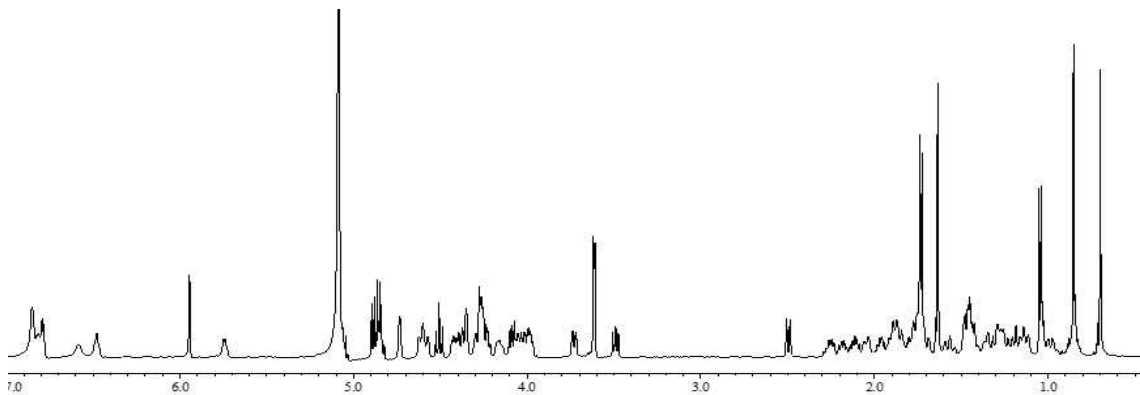
<천문동에서 분리한 Methyl protodioscin의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼>



<천문동에서 분리한 Aspachioside A의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼>



<천문동에서 분리한 15-Hydroxy-pseudoprotodioscin의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼>



<천문동에서 분리한 Aspacochioside C의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼>

<천문동에서 분리된 5종의 steroidal saponin의 ¹³C-NMR 데이터 - aglycon 부분>

Number	Protodioscin		Methyl protodioscin		Aspachioside A		15-Hydroxy-pseudoprotodioscin		Aspachioside C	
	¹³ C	Ref. ¹⁾	¹³ C	Ref. ²⁾	¹³ C	Ref. ³⁾	¹³ C	Ref. ⁴⁾	¹³ C	Ref. ⁵⁾
1	36.8	37.1	37.8	37.8	30.9	30.5	37.4	37.5	30.6	30.5
2	29.8	30.1	30.5	30.5	27.3	27.0	30.0	30.2	26.6	26.6
3	78.5	78.6	78.1	78.3	74.9	74.6	77.8	78.0	74.9	74.8
4	38.8	38.9	40.1	39.3	31.3	30.9	38.8	39.0	31.0	31.0
5	140.6	140.7	141.2	141.1	37.3	37.0	140.6	140.8	36.6	36.6
6	121.7	121.7	122.2	122.2	27.4	27.0	121.6	121.8	26.6	26.6
7	32.2	32.1	32.6	32.6	27.1	26.8	32.2	32.4	26.5	26.6
8	31.5	31.6	32.0	32.0	35.9	35.5	31.2	31.4	34.8	34.8
9	50.1	50.3	50.7	50.7	40.6	40.3	50.1	50.3	39.7	39.7
10	37.1	37.5	37.5	37.5	35.6	35.2	36.9	37.1	34.8	34.8
11	20.9	21.0	21.4	21.4	21.5	21.2	21.1	21.2	21.0	21.0
12	39.7	39.7	39.3	39.2	40.7	40.4	39.4	39.7	39.8	39.7
13	40.6	40.7	41.1	41.1	41.6	41.2	43.2	43.4	43.5	43.4
14	56.4	56.5	56.9	56.9	56.8	56.4	54.7	54.9	54.4	54.3
15	32.3	32.3	32.5	32.6	32.8	32.4	74.8	75.2	34.1	34.0
16	81.1	81.3	81.6	81.6	81.6	81.2	84.3	84.6	84.2	84.2
17	63.7	64.1	64.4	64.2	64.4	64.2	64.3	64.8	64.3	64.2
18	16.6	16.3	16.7	16.7	17.1	16.7	19.2	19.4	14.1	14.1
19	19.2	19.4	19.7	19.7	24.2	23.9	13.9	14.1	23.5	23.5
20	40.5	40.4	40.8	41.1	41.0	40.7	103.4	104.9	103.2	103.2
21	16.3	16.2	16.6	16.6	16.9	16.5	11.6	11.7	11.5	11.5
22	110.5	112.6	113.0	113.0	111.0	110.6	152.2	154.4	152.0	151.9
23	30.0	30.8	31.1	30.8	37.5	37.1	34.3	34.5	23.3	23.3
24	28.2	28.1	28.5	28.5	28.7	28.3	23.5	23.6	30.1	30.1
25	34.1	34.2	34.6	34.6	34.8	34.4	35.0	34.5	33.3	33.3
26	80.9	79.0	74.5	75.6	75.8	75.4	75.0	75.6	74.9	74.8
27	17.3	17.1	17.5	17.4	17.8	17.5	17.2	17.8	16.8	16.8
OMe			47.6	47.2						

<천문동에서 분리된 5종의 steroidal saponin의 ¹³C-NMR 데이터 - sugar 부분>

Number	Protodioscin		Methyl protodioscin		Aspacochioside A		15-Hydroxy-pseudoprotodioscin		Aspacochioside C	
	¹³ C	Ref. ¹⁾	¹³ C	Ref. ²⁾	¹³ C	Ref. ³⁾	¹³ C	Ref. ⁴⁾	¹³ C	Ref. ⁵⁾
3-O-										
Glc-1'	100.1	100.2	100.6	100.6	103.4	103.0	100.1	100.2	102.6	102.6
2'	77.9	78.0	78.3	78.8	75.9	75.6	77.5	77.7	75.2	75.2
3'	76.8	76.9	75.6	77.3	77.1	76.8	78.3	78.0	76.4	76.4
4'	78.3	78.5	79.0	79.0	78.6	78.2	78.4	78.6	78.2	78.2
5'	77.5	77.8	77.3	78.1	77.5	77.2	76.8	77.0	76.8	76.8
6'	61.1	61.2	61.6	61.6	61.9	61.5	61.1	61.3	61.2	61.1
Rha-1''	101.9	102.0	102.4	102.4	105.5	105.2	101.9	102.0	102.3	102.2
2''	72.4	72.5	72.9	72.9	75.6	75.2	72.4	72.6	72.3	72.2
3''	72.6	72.7	73.1	73.1	78.9	78.6	72.7	72.8	72.5	72.4
4''	73.8	73.9	74.5	74.5	72.0	71.7	73.9	74.1	73.7	73.6
5''	69.4	69.5	70.8	70.8	79.0	78.5	69.4	69.5	70.0	69.9
6''	18.5	18.6	18.9	18.9	63.2	62.8	18.9	18.7	18.2	18.2
Rha-1'''	102.7	102.8	103.3	103.2			102.7	103.0		
2'''	72.4	72.5	73.2	73.2			72.4	72.6		
3'''	72.7	72.8	72.9	72.6			72.6	72.7		
4'''	74.0	74.1	74.3	74.3			73.8	73.9		
5'''	70.2	70.4	69.9	69.9			70.2	70.4		
6'''	18.4	18.5	19.0	19.0			18.3	18.5		
26-O-										
Glc-1''''	104.8	104.9	105.4	105.3	103.0	102.7	104.8	105.1	104.8	104.8
2''''	75.0	75.1	74.3	75.6	73.0	72.7	75.0	75.2	74.2	74.8
3''''	77.8	77.9	78.9	78.9	73.2	72.8	78.5	78.7	78.2	78.2
4''''	71.5	71.7	72.1	72.1	74.4	74.0	71.5	71.7	71.3	71.3
5''''	78.4	78.5	78.4	78.9	70.7	70.3	78.4	78.6	77.8	78.2
6''''	62.6	62.8	63.2	63.2	18.9	18.6	62.7	62.9	62.5	62.4

2. 상심자(*Morus alba*) 열수 추출물의 주요 성분 분리

가. 실험목적

- (1) 갱년기 열성홍조 개선 건강기능식품 개발을 위한 구기자 함유 복합한약추출물(천문동, 상심자, 구기자)의 구성 약재 중 뽕나무 열매(오디, 상심자) 열수추출물의 표준화를 위한 기초연구로서 주요 성분들을 분리하고 이들의 화학구조를 규명함

나. 실험방법

(1) 상심자 열수 추출물의 조제

상심자(구입처: 매일 오디 농원(과상 2호), 원산지: 국산)에 10배의 물을 넣은 뒤, 2시간 동안 열수 추출(95°C~100°C)을 실시함. 열수 추출액을 24브릭스로 농축하여 상심자 열수 추출물을 조제하였음.

(2) **Protocatechuic acid**의 분리

상심자 열수 추출물 1.0 kg을 acetone-H₂O 혼합 용매 (0:1, 2:8, 4:6, 6:4, 8:2, 1:0 각각 4 L, 8 L, 6 L, 4 L, 4 L, 4 L)를 이동상으로 하여 Diaion HP-20 칼럼크로마토그래피 (∅ 9.0 × 43.0 cm)를 실시 후 20개의 분획물로 나누었음(분획물 1-20). 이 중 분획물 5(10.75 g)를 acetone-H₂O 혼합 용매(4:6, 2:8 각각 0.1 L, 2.5 L)를 이동상으로 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피(∅ 4.8 × 48.5 cm)를 실시하여 6개의 소분획물로 나누었음(소분획물 5-1-5-6). 또한 소분획물 6 (5.69 g)을 acetone-H₂O 혼합 용매(3:7, 2.2 L)를 이동상으로 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피(∅ 4.8 × 43.5 cm)를 실시하여 6개의 소분획물로 나누었음(소분획물 6-1-6-6). 이 중 소분획물 5-6과 6-6을 합하여(363.7 mg) EtOAc-MeOH-H₂O 혼합용매(9:0.5:0.5, 7:2.5:0.5 각각 700 mL, 400 mL)를 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 2.8 × 26.8 cm, 230-400 mesh)를 실시하여 **protocatechuic acid** (181.5 mg)를 분리하였음. 또한 분획물 11(8.64 g)에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매 (6:3.6:0.4, 4.6 L)를 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 4.8 × 37.5 cm, 230-400 mesh)를 진행하여 총 7개의 소분획물로 나누었음(11-1-11-7). 이 중 소분획물 11-3을 MPLC (C18, 43g, MeOH-H₂O = 0:10 → 3:7)를 이용하여 추가적으로 **protocatechuic acid** (24.7 mg)를 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 참고 문헌의 분광학적 데이터 (¹H-NMR, ¹³C-NMR)와 비교 분석을 통하여 동정하였음.⁶⁾

(3) **Pinellic acid**의 분리

상기의 방법으로 얻은 분획물 16(1.38 g)에 대해 acetone-H₂O 혼합 용매(6:4, 1.1 L)를 이동상으로 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피(∅ 3.4 × 57.7 cm)를 실시하여 다시 13개의 소분획물로 나누었음(분획물 16-1-16-13). 이 중 소분획물 16-3(100.3 mg)에서

MPLC(C18, 26 g, MeOH-H₂O = 5:5 → 8:2)를 진행하여 **pinellic acid** (10.1 mg)를 분리하였음. 또한 소분획물 16-4(78.3 mg)에서 MPLC(C18, 26 g, MeOH-H₂O= 5:5 → 8:2)를 진행하여 **pinellic acid** (5.2 mg)를 추가적으로 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 참고 문헌의 분광학적 데이터 (¹H-NMR, ¹³C-NMR)와 비교 분석을 통하여 동정하였음.⁷⁾

(4) **Rutin**의 분리

상기의 방법으로 얻은 소분획물 11-3(318.1 mg)에서 MPLC (C18, 43 g, MeOH-H₂O = 3:7 → 6:4)를 진행하여 10개의 소분획물로 나눈 후, 소분획물 11-3-5 (105.9 mg)를 100% MeOH을 이동상으로 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피(∅ 3.6 × 60.5 cm)를 실시하여 **rutin** (61.5 mg)을 분리하였음. 또한 소분획물 11-4 (955.0 mg)에 대해 MPLC (C18, 130 g, MeOH-H₂O = 3:7 → 6:4)를 진행하여 3개의 소분획물로 나누었음(11-4-1-11-4-3). 이 중 소분획물 11-4-1(321.0 mg)을 100% MeOH을 이동상으로 하는 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피 (∅ 3.6 × 60.5 cm)를 실시하여 **rutin**(219.4 mg)을 추가적으로 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 참고 문헌의 분광학적 데이터 (¹H-NMR, ¹³C-NMR)와 비교 분석을 통하여 동정하였음.⁸⁾

(5) **Isoquercitrin**의 분리

상기의 방법으로 얻은 소분획물 11-3(318.1 mg)에 대해 MPLC(C18, 43 g, MeOH-H₂O = 3:7 → 6:4)를 진행하여 10개의 소분획물로 나눈 후, 소분획물 11-3-5 (105.9 mg)를 100% MeOH을 이동상으로 하는 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피(∅ 3.6 × 60.5 cm)를 실시하여 **isoquercitrin**(13.4 mg)을 분리하였음. 또한 소분획물 11-4-1(321.0 mg)을 100% MeOH을 이동상으로 하는 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피(∅ 3.6 × 60.5 cm)를 실시하여 **isoquercitrin**(16.0 mg)을 추가로 확보하였음. 분리된 화합물의 구조는 참고 문헌의 분광학적 데이터 (¹H-NMR, ¹³C-NMR)와 비교 분석을 통하여 동정하였음.⁹⁾

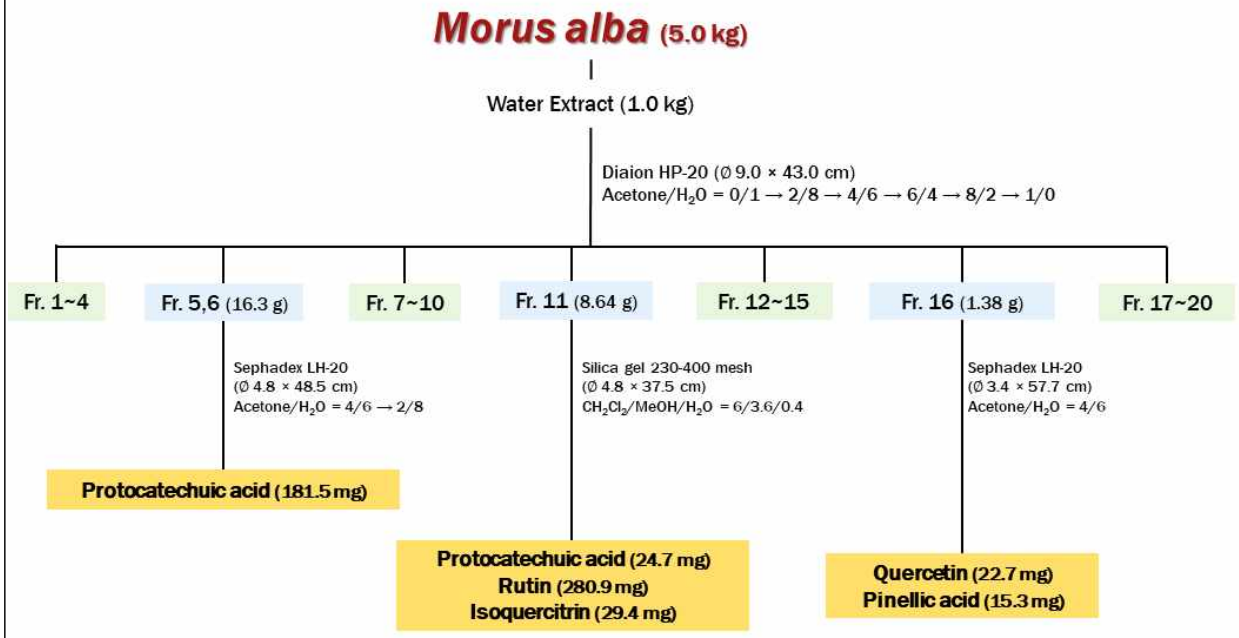
(6) **Quercetin**의 분리

상기의 방법으로 얻은 소분획물 16-12(58.2 mg)에 대하여 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 혼합용매 [9:0.95:0.05, 0.5 L]를 이동상으로 Silica gel 칼럼크로마토그래피(∅ 2.5 × 34.8 cm, 230-400 mesh)를 진행하여 **quercetin**(22.7 mg)을 분리하였음. 분리된 화합물의 구조는 참고문헌의 분광학적 데이터(¹H-NMR, ¹³C-NMR)와 비교 분석을 통하여 동정하였음.¹⁰⁾

다. 결과 및 고찰

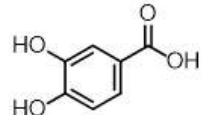
- (1) 상심자 열수 추출물 1.0 kg으로부터 반복적인 칼럼크로마토그래피를 이용하여 1종의 페놀화합물 protocatechuic acid(206.2 mg), 1종의 지방산 pinellic acid(15.3 mg), 그리고 3종의 플라보노이드 rutin(280.9 mg), isoquercitrin(29.4 mg), quercetin(22.7 mg)을

- 분리하였으며, NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) 데이터 분석과 참고문헌의 분광학적 데이터와 비교 분석을 통하여 화학구조를 동정하였음.
- (2) 이 들 성분 중에서 polyhydroxylated fatty acid인 pinellic acid는 본 연구를 통해 상심자에서는 처음으로 분리 보고되는 물질임.
- (3) 분리된 물질 중 rutin은 한국화학물은행에 기탁하였음. (기탁번호 : 2018-0004)



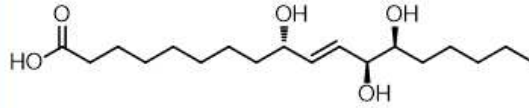
<상심자 열수추출물에서 주요성분의 분리 과정>

Phenolic acid



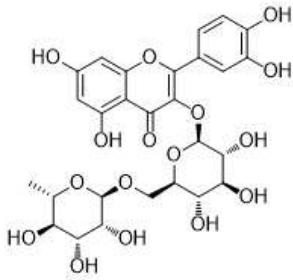
Protocatechuic acid
(206.2 mg)

Fatty acid

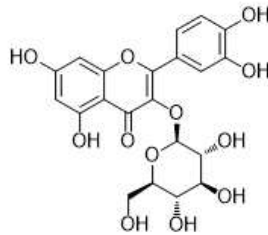


Pinellic acid
(15.3 mg)

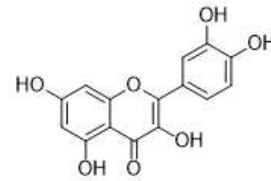
Flavonoid



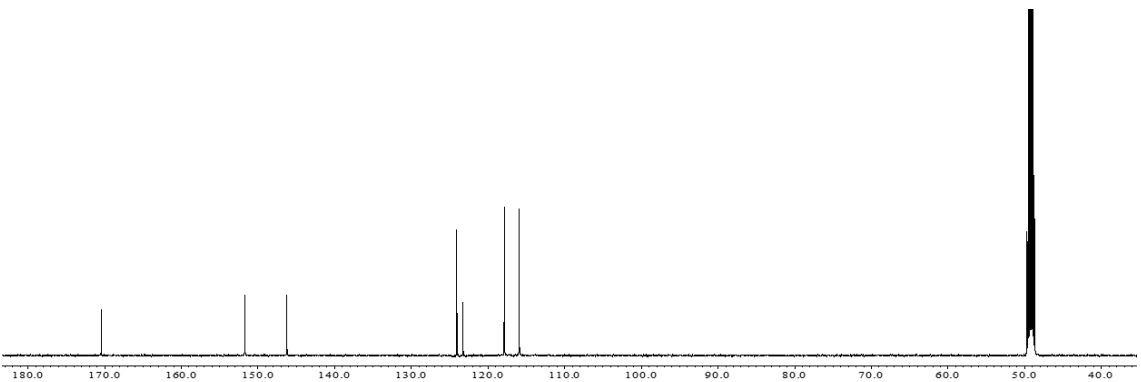
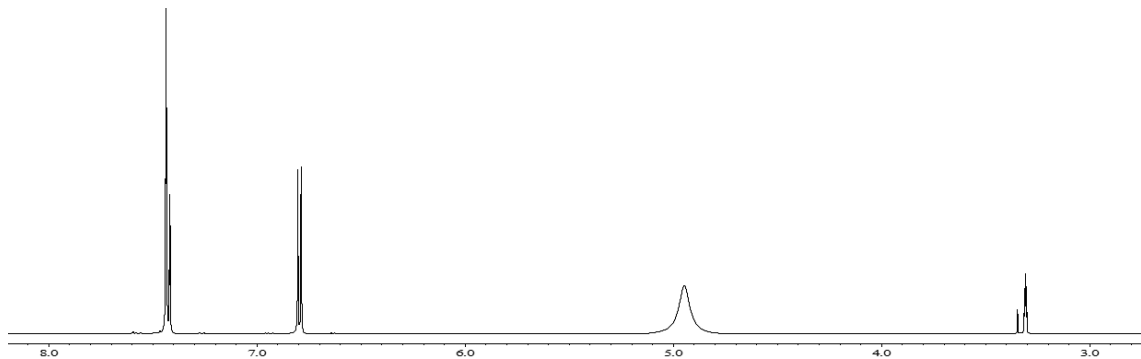
Rutin
(280.9 mg)



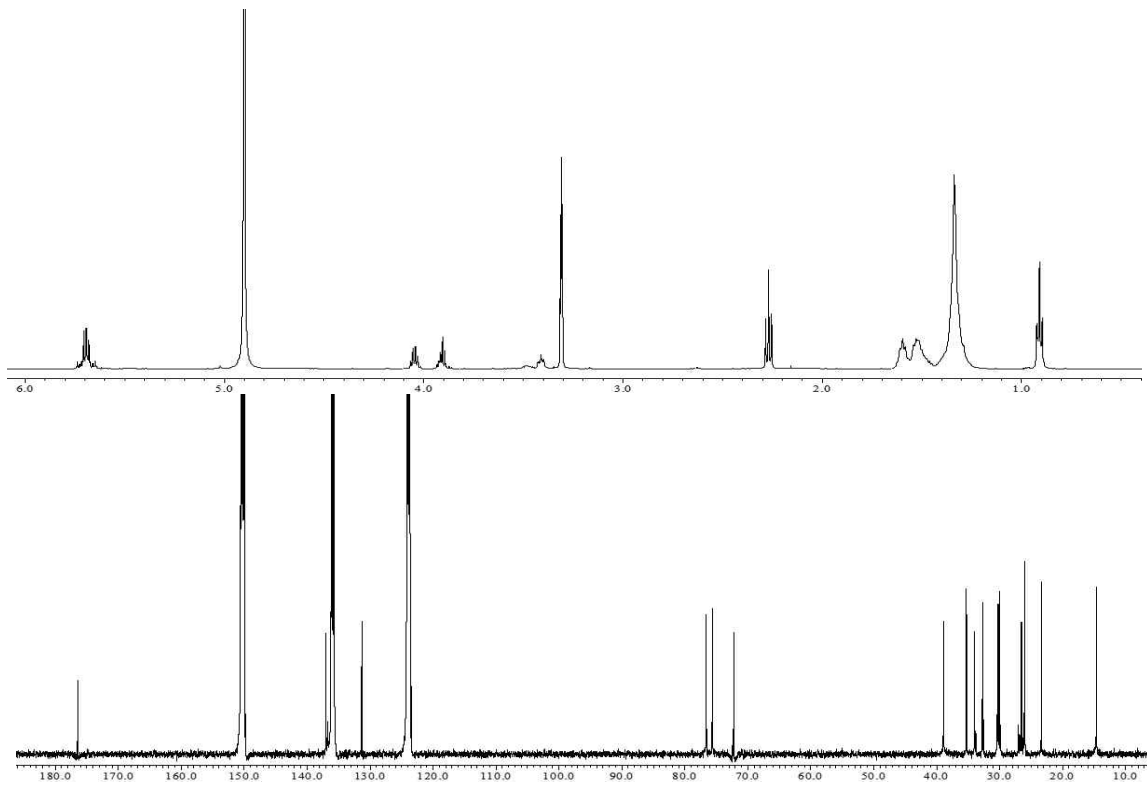
Isoquercitrin
(29.4 mg)



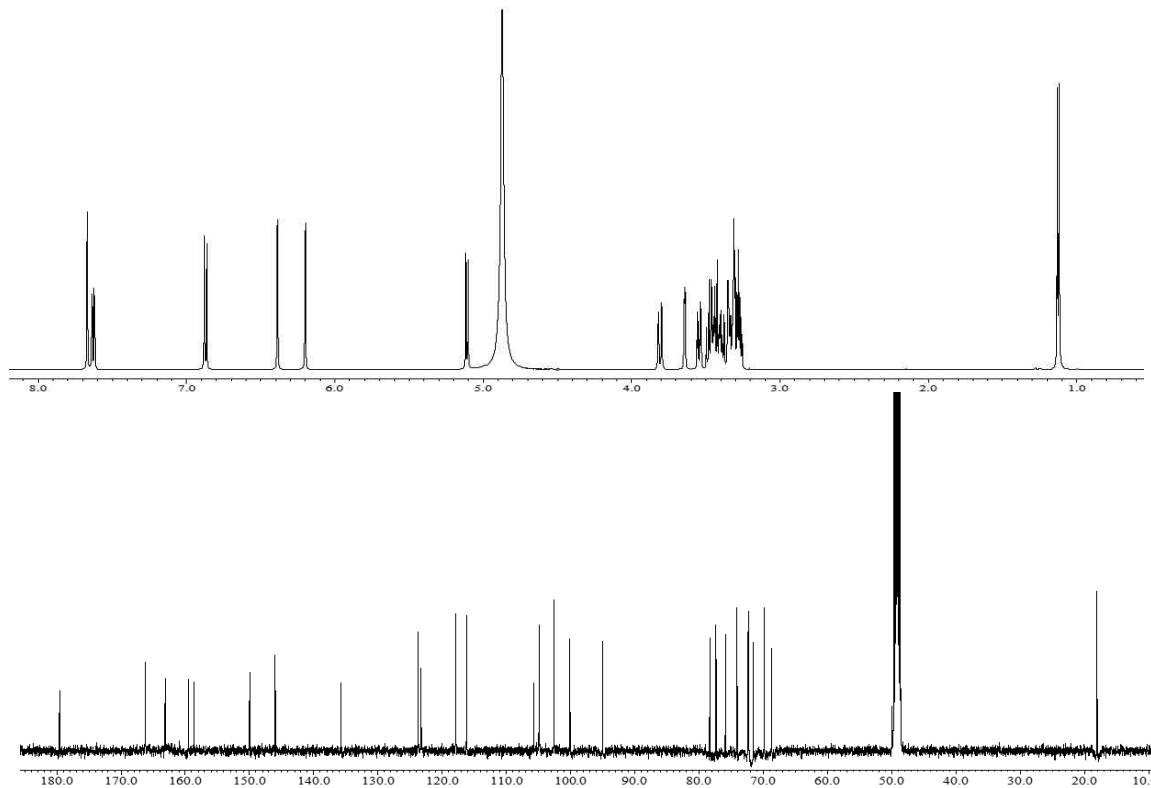
Quercetin
(22.7 mg)



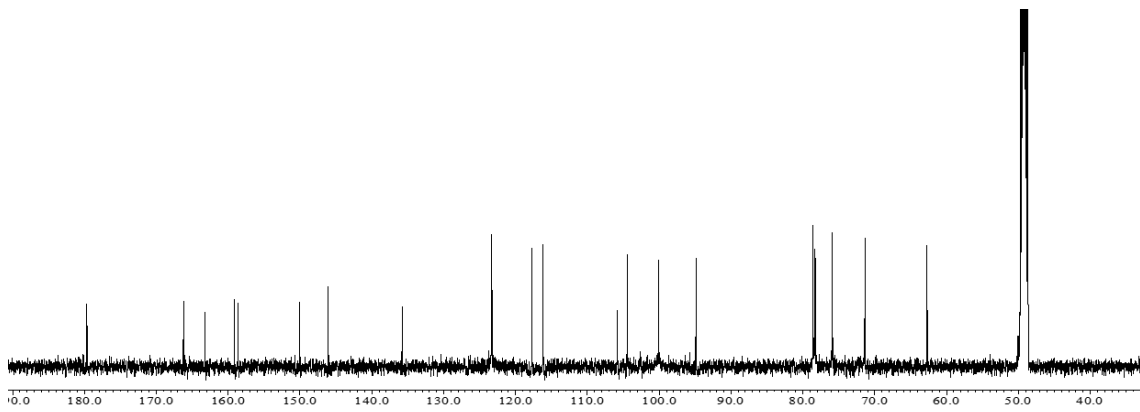
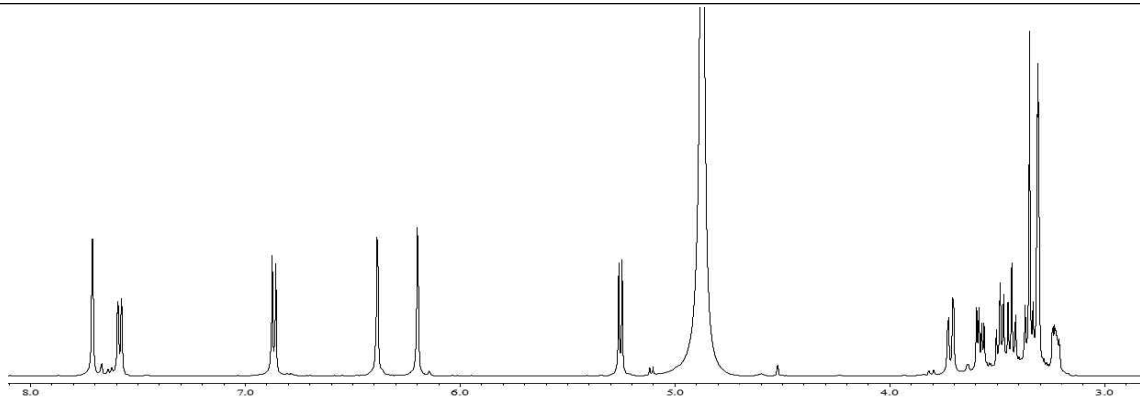
<상심자에서 분리한 Protocatechuic acid의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼>



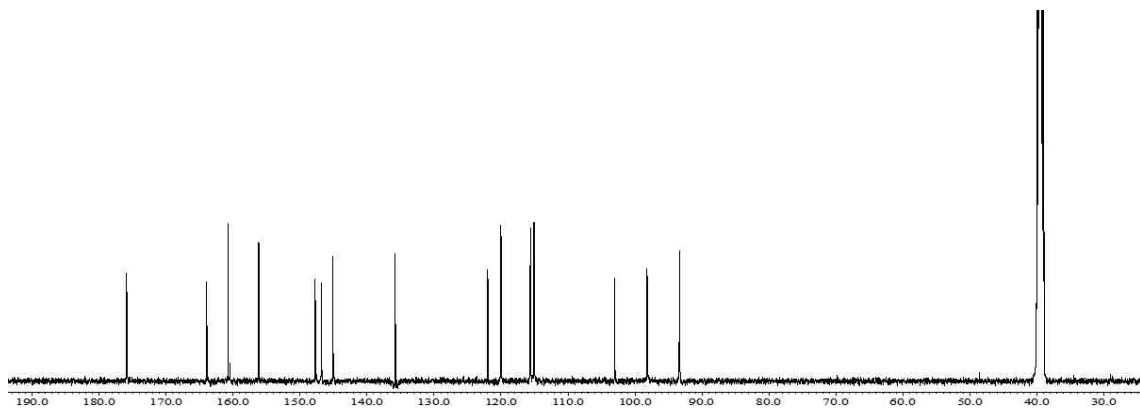
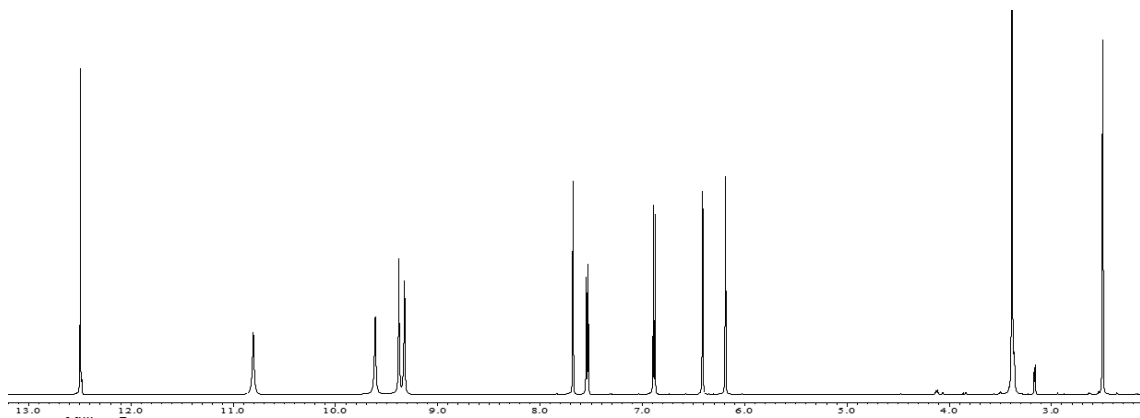
<상심자에서 분리한 Pinellic acid의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



<상심자에서 분리한 Rutin의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



<상심자에서 분리한 Isoquercitrin의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>



<상심자에서 분리한 Quercetin의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼>

Protocatechuic Acid (1)

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.44 (d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.80 (d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.42 (d, $J = 1.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 123.3 (C-1), 117.8 (C-2), 146.2 (C-3), 151.7 (C-4), 116.0 (C-5), 124.0 (C-6), 170.5 (C-7)

Pinellic Acid (2)

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 5.69 (2H, dd, $J = 7.5, 5.5$ Hz, H-10, H-11), 4.06 (1H, dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, H-9), 3.90 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, H-12), 3.41 (1H, m, H-13), 2.27 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.61 (2H, m, H-3, H-14b), 1.53 (2H, m, H-8b), 1.34 (16H, brs, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8b, H-14a, H-15, H-16, H-17), 0.91 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, pyridine- d_5) δ 176.4 (C-1), 35.3 (C-2), 26.5 (C-15), 26.0 (C-3), 30.0 (C-4), 30.3 (C-5), 30.2 (C-6), 26.6 (C-7), 38.9 (C-8), 72.2 (C-9), 131.3 (C-10), 137.0 (C-11) 76.7 (C-12), 75.6 (C-13), 34.0 (C-14), 32.7 (C-16), 23.4 (C-17), 14.6 (C-18)

<상삼자에서 분리한 3종의 flavonoid에 대한 ¹H-NMR 데이터>

Number	Rutin ³⁾	Isoquercitrin ⁴⁾	Quercetin ⁵⁾
6	6.20 (1H, d, <i>J</i> = 2.5 Hz)	6.20 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	6.19 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)
8	6.39 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.39 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	6.41 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)
2'	7.67 (1H, d, <i>J</i> = 2.5 Hz)	7.71 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	7.68 (1H, d, <i>J</i> = 2.5 Hz)
5'	6.87 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.87 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	6.88 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)
6'	7.63 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.5 Hz)	7.59 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.0 Hz)	7.54 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.0 Hz)
Glc-1''	5.11 (1H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz)	5.25 (1H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz)	
2''			
3''			
4''	3.26-3.48 (4H, m)		
5''		3.21-3.73 (6H, m)	
	3.38 (1H, m)		
6''	3.81 (1H, d, <i>J</i> = 10.5 Hz)		
Rha-1'''	4.52 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)		
2'''	3.64 (1H, dd, <i>J</i> = 3.0, 1.5 Hz)		
3'''	3.55 (1H, dd, <i>J</i> = 9.0, 3.5 Hz)		
4'''	3.28 (1H, m)		
5'''	3.44 (1H, m)		
6'''	1.13 (3H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz)		

<상삼자에서 분리한 3종의 flavonoid에 대한 ¹³C-NMR 데이터>

Number	Rutin ³⁾	Isoquercitrin ⁴⁾	Quercetin ⁵⁾
2	158.7	157.6	146.8
3	135.9	134.3	135.8
4	179.6	178.1	175.9
5	163.1	161.7	156.1
6	100.1	98.5	98.2
7	166.2	164.7	163.1
8	95.0	93.3	93.4
9	159.5	157.1	160.7
10	105.8	102.9	103.0
1'	123.3	121.7	122.0
2'	117.9	116.2	115.1
3'	146.0	144.6	145.1
4'	150.0	148.5	147.7
5'	116.2	114.6	115.6
6'	123.8	121.8	120.0
Glc-1''	105.0	104.3	
2''	76.0	74.4	
3''	77.4	77.1	
4''	71.6	69.8	
5''	78.4	76.8	
6''	68.7	61.2	
Rha-1'''	102.6		
2'''	72.3		
3'''	72.4		
4'''	74.1		
5'''	69.9		
6'''	18.1		

제 2절. 지표성분의 함량 분석

1. 천문동 열수 추출물의 protodioscin 함량 분석

가. 실험 목적

천문동 열수추출물의 표준화를 위한 기초연구의 일환으로 본 연구에서 5종의 steroidal saponin, protodioscin(2.5 g), methyl protodioscin(1.56 g), aspacochioside A(612.3 mg), 15-hydroxy-pseudoprotodioscin(211.3 mg), aspacochioside C(68.6 mg)를 분리하였음. 이 중 가장 함유량이 많은 protodioscin을 천문동의 지표물질로 우선 선정하였으며, HPLC 분석을 통해 천문동 열수추출물내의 함량분석을 실시하고자 하였음

나. 실험 방법

(1) 조작

Mobile Phase	Time (min)	A% (water)	B% (Acetonitrile)
	0	76	24
	35	71	29
Detector	UV-200 nm		
Flow rate	0.8 mL/min		
Column temp.	25°C		
Injection volume	10 µL		
Column	J'Sphere C18 (4.6 * 250 mm, 4 µm)		
Analytical instrument	Gilson HPLC system (321 pump, UV/VIS-159 detector)		

(2) 표준 용액의 조제

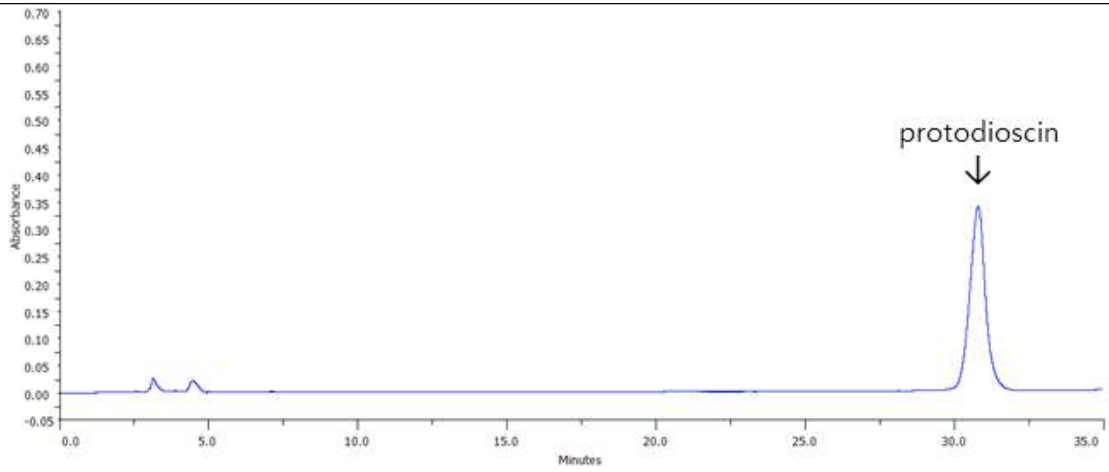
Protodioscin을 2.0 mg을 취해 50 % MeOH 0.5 mL에 완전히 녹인다. 이 용액을 여과한 뒤, 적정 농도로 희석하여 표준 용액으로 사용한다(protodioscin 4000, 2000, 1000, 500 µg/mL).

(3) 시험 용액의 조제

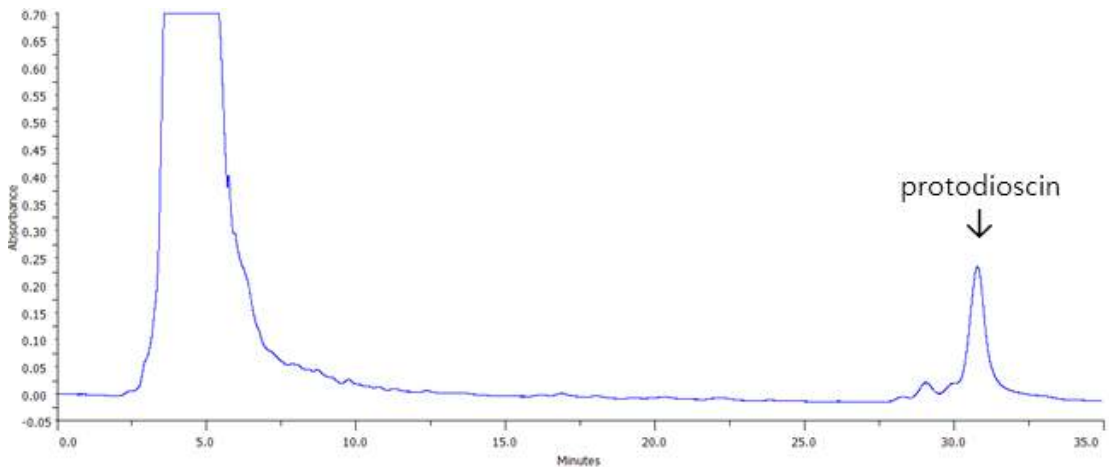
천문동 열수추출물 120.0 mg을 취해 50 % MeOH 0.4 mL에 완전히 녹인다. 이 용액을 여과한 뒤, 시험 용액으로 사용한다.

다. 실험 결과

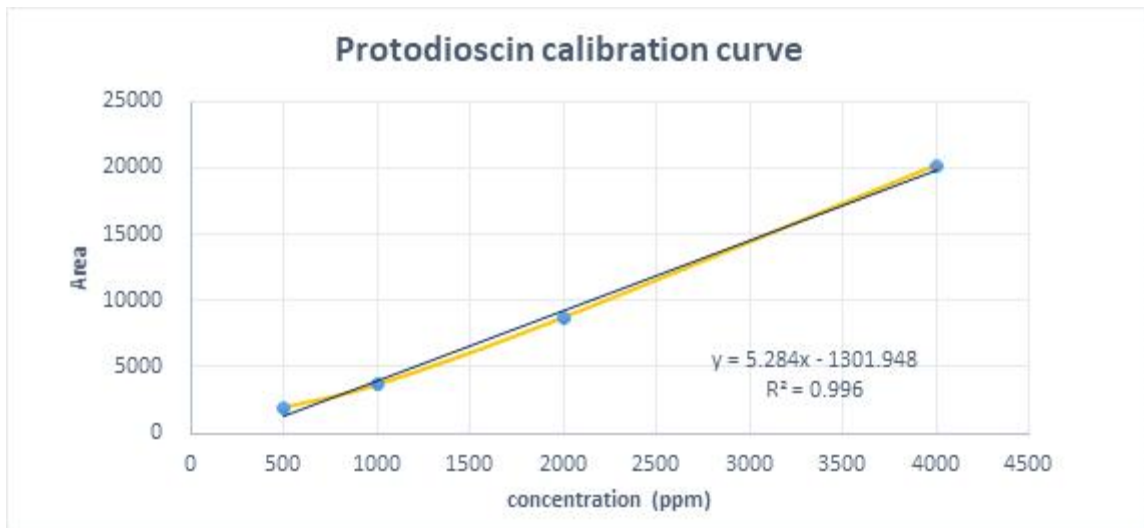
Protodioscin을 200 nm에서 분석한 결과 30분 내외에 peak가 검출되었다. 주어진 조건으로 분석하였을 때에 표준품 및 샘플 중 protodioscin의 peak를 구별할 수 있었다. 농도 별로 제조한 표준 용액을 HPLC로 농도별 peak area 분석을 실시하여 정량곡선을 작성하였고($r^2 = 0.996$), 이에 기반하여 시험 용액에서의 protodioscin의 함량은 0.77 %로 나타났다. 표준 용액과 시험 용액의 크로마토그램과 calibration curve는 다음과 같다.



<Protodioscin 표준 용액의 HPLC 크로마토그램>



<시험 용액의 HPLC 크로마토그램>



<Protodioscin의 calibration curve>

2. 상심자 열수 추출물의 protocatechuic acid 함량 분석

가. 실험 목적

상심자 열수추출물의 표준화를 위한 기초연구의 일환으로 본 연구에서 1종의 페놀화합물 protocatechuic acid(206.2 mg), 1종의 지방산 pinellic acid(15.3 mg), 그리고 3종의 플라보노이드 rutin(280.9 mg), isoquercitrin(29.4 mg), quercetin(22.7 mg)을 분리하였음. 이 중 분리된 양과 TLC/HPLC 분석을 통해 함유량이 가장 많을 것으로 예상되는 protocatechuic acid를 상심자의 예비지표물질로 선정하였으며, HPLC 분석을 통해 상심자 열수추출물 내의 함량분석을 실시하고자 하였음

나. 실험 방법

(1) 조작

Mobile Phase	Time (min)	A% (water with 0.5% formic acid)	B% (Acetonitrile with 0.5% formic acid)
	0	95	5
	15	95	5
	40	85	15
Detector	UV-280 nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Column temp.	25°C		
Injection volume	10 µL		
Column	YMC Triart C18(4.6 * 250 mm, 5 µm)		
Analytical instrument	Gilson HPLC system (321 pump, UV/VIS-155 detector)		

(2) 표준 용액의 조제

Protocatechuic acid를 1.0 mg 취해 MeOH 1.0 mL에 완전히 녹인다. 이 용액을 여과한 뒤, 적정 농도로 희석하여 표준 용액으로 사용한다. (protocatechuic acid 1000, 500, 250, 125, 62.5 µg/mL)

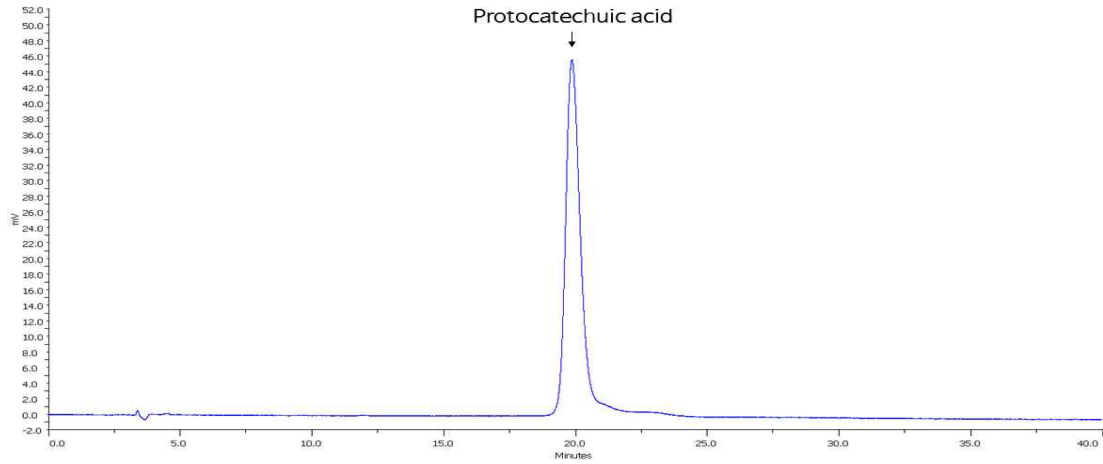
(3) 시험 용액의 조제

상심자 추출물 300.0 mg을 취해 H₂O 0.5 mL에 완전히 녹인다. 이 용액을 여과한 뒤, 시험 용액으로 사용한다.

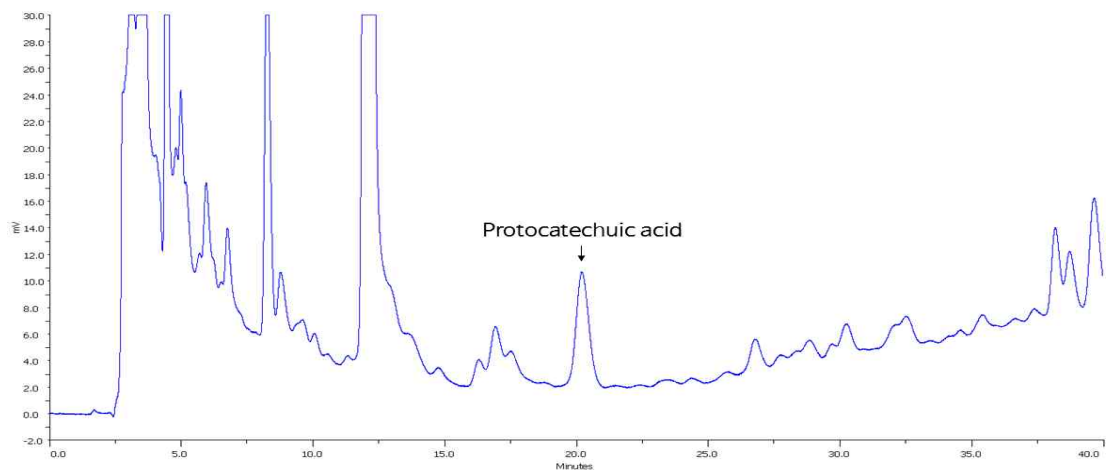
다. 실험 결과

Protocatechuic acid를 280 nm에서 분석한 결과 20분 내외에 peak가 검출되었다. 주어진 조건으로 분석하였을 때에 표준품 및 샘플 중 protocatechuic acid의 분리도는 문제점이 없는 것으로 확인되었다. 농도 별로 제조한 표준 용액을 HPLC로 농도별 peak

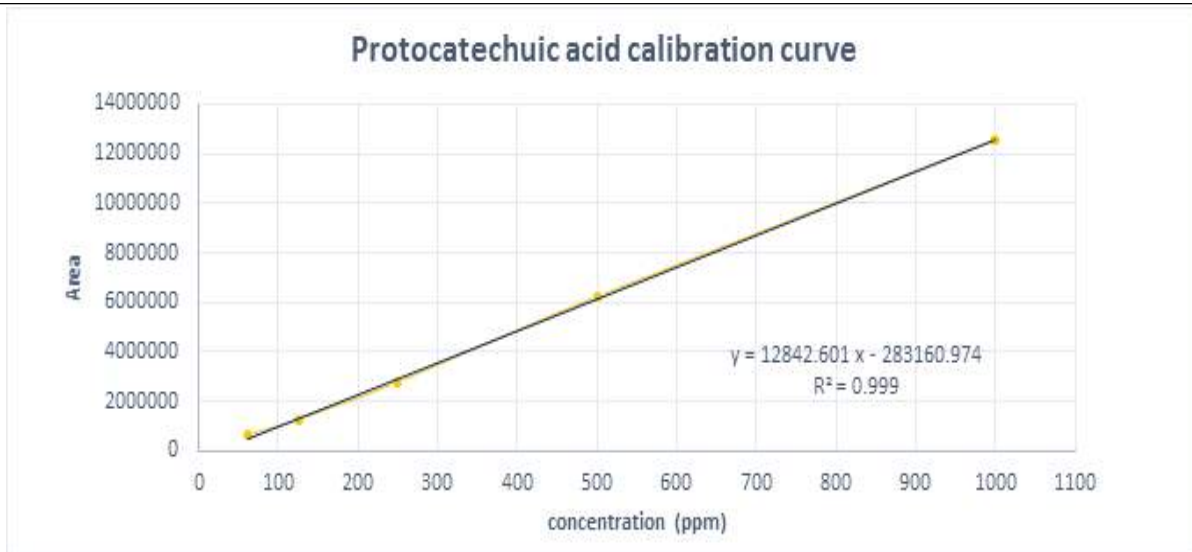
area 분석을 실시하여 정량곡선을 작성하였고, ($r^2 = 0.999$) 이에 기반하여 시험 용액에서의 protocatechuic acid의 함량은 0.05%로 나타났다. 표준 용액과 시험 용액의 크로마토그램과 calibration curve는 다음과 같다.



<Protocatechuic acid 표준 용액의 HPLC 크로마토그램>



<시험 용액의 HPLC 크로마토그램>



<Protocatechuic acid의 calibration curve>

3. 구기자 열수추출물의 betaine 함량 분석

가. 실험 목적

구기자 열수추출물의 표준화를 위한 기초연구의 일환으로 본 연구에서 이미 구기자의 지표물질로 잘 알려져 있는 betaine을 지표물질로 선정하였으며, HPLC 분석을 통해 구기자 열수추출물 내의 함량분석을 실시하고자 하였음

나. 실험 방법

(1) 구기자 열수 추출물의 조제

구기자(구입처: 청양구기자농협, 원산지: 국산)에 10배의 물을 넣은 뒤, 2시간 동안 열수 추출(95℃~100℃)을 실시함. 열수 추출액을 22브릭스로 농축하여 구기자 열수 추출물을 조제하였음.

(2) 조작

Mobile Phase	Time (min)	A% (30 mM Ammonium formate)	B% (Acetonitrile)
	0	80	20
	50	20	80
Detector	ELSD		
Flow rate	1.0 mL/min		
Column temp.	25℃		
Injection volume	10 μL		

Column	Phenomedex Luna HILIC 200Å(4.6 * 150 mm, 5 µm)
Analytical instrument	Sedex 80 LT-ELSD detector

(3) 분석법의 선택

구기자 추출물에서의 지표물질인 betaine은 UV에서 detecting이 되지 않아 ELSD detector를 사용하여 함량 분석을 진행하였다. ELSD를 이용하여 함량 분석을 진행하는 경우, detector의 sensitivity가 높아서 peak area의 변동사항이 크기 때문에 내부표준물질 첨가법으로 함량 분석을 진행하였고, 내부표준물질(Internal Standard, IS)로는 L-alanine이 사용되었다.

(4) 표준품의 구입

실험에 사용된 betaine(B2629-50G, >98%)과 L-alanine(A2627-1G, >98%)은 Sigma-aldrich에서 구매하였다.

(5) 표준 용액의 조제

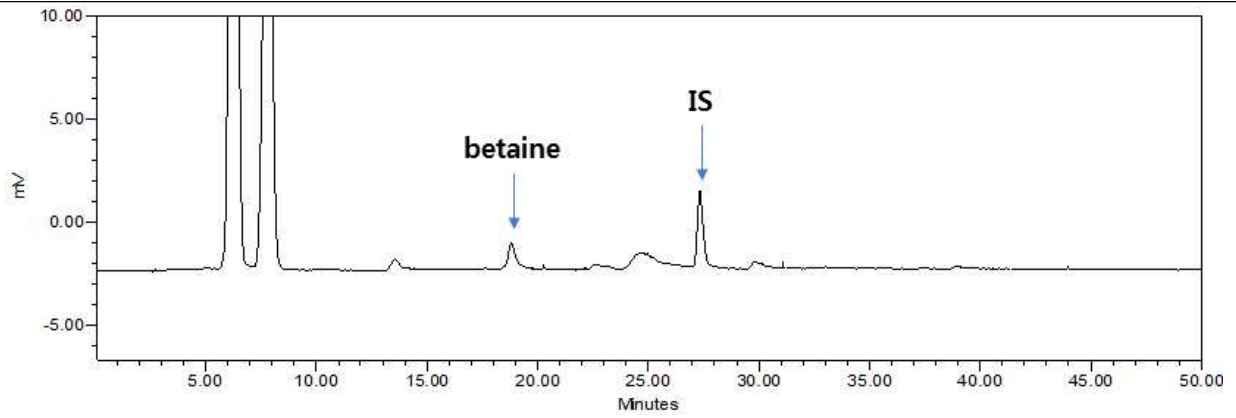
Betaine 5.0 mg을 취해 H₂O 1.0 mL에 완전히 녹인다. 이 용액을 여과하여 적정 농도로 희석한 후에 (5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.125 µg/mL) 내부표준물질인 L-alanine 0.5mg을 H₂O 1.0mL에 완전히 녹여 여과한 용액과 동량을 혼합(v:v=1:1)하여 표준 용액으로 사용한다. (betaine 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.0625 µg/mL, L-alanine 250.0 µg/mL)

(6) 시험 용액의 조제

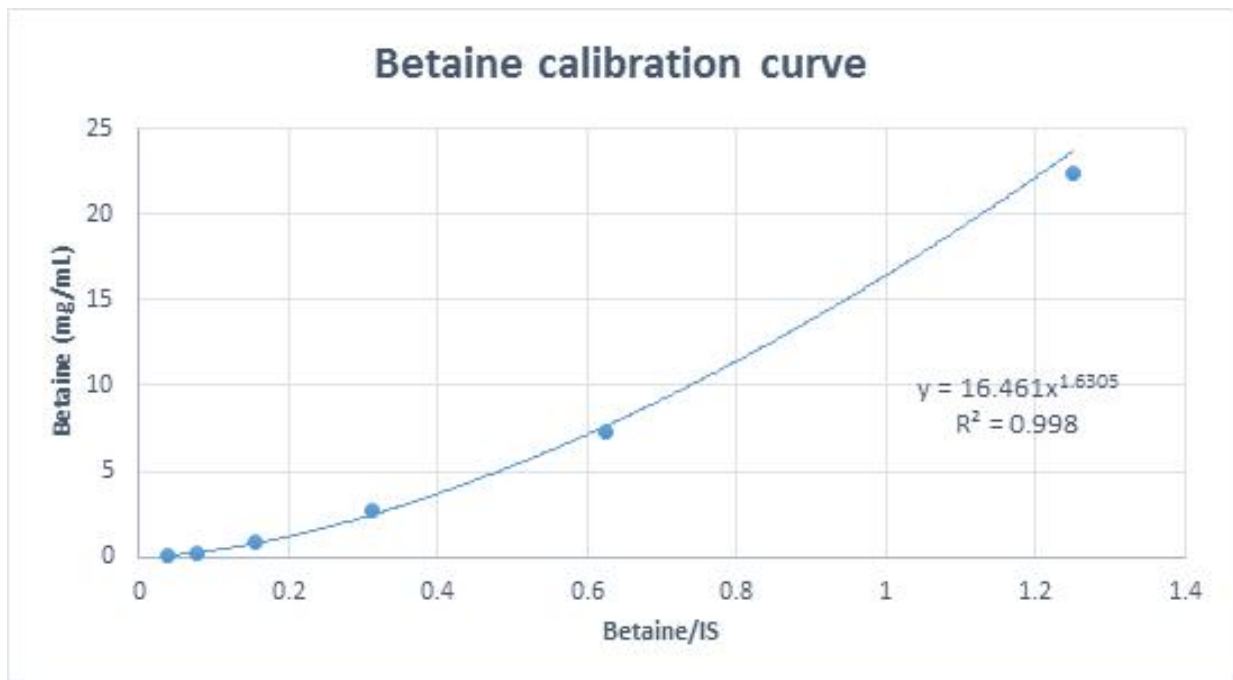
구기자 추출물 20.0 mg을 취해 H₂O 1.0 mL에 완전히 녹이고, 내부표준물질인 L-alanine 0.5 mg을 취해 H₂O 1.0mL에 완전히 녹인다. 두 용액을 각각 600.0 µL씩 혼합한 뒤 여과하여 시험 용액으로 사용한다.

다. 실험 결과

Betaine과 L-alanine을 ELSD에서 분석한 결과 19분 내외에 betaine, 27분 내외에 L-alanine의 peak가 검출되었다. 주어진 조건으로 분석하였을 때에 표준품 및 샘플 중 betaine과 L-alanine의 분리도는 문제점이 없는 것으로 확인되었다. 농도 별로 제조한 표준 용액을 HPLC로 농도별 peak area 분석을 실시하여 정량곡선을 작성하였고, ($r^2 = 0.998$) 이에 기반하여 구기자 추출물에서의 betaine의 함량은 0.90%로 나타났다. 시험 용액의 크로마토그램과 calibration curve는 다음과 같다.



<시험용액의 HPLC 크로마토그램>



<Betaine과 내부표준물질의 calibration curve>

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분	내용
최종목표	○ 구기자 함유 복합한약추출물의 지표성분 발굴
세부목표	○ 구기자 함유 복합한약추출물의 지표성분의 분리/분석 - 주요 구성성분 8종 이상(10 mg 이상) 분리 및 화학구조 동정 - 주요성분 2종 이상 추가분리(100 mg 이상) - HPLC 프로파일링 및 주요물질 함량 분석

3-2. 목표 달성여부

구분	목표	연구 내용	달성도
세부목표	- 주요 구성성분 8종 이상(10 mg 이상) 분리 및 화학구조 동정	- 구기자 함유 복합 한약추출물의 구성약재 중 천문동과 상심자 열수 추출물로부터 10종 (protodioscin, methyl protodioscin, aspacochioside A, 15-hydroxy-pseudoprotodioscin, aspacochioside C, protocatechuic acid, pinellic acid, rutin, isoquercitrin, 및 quercetin)의 주요 화합물을 10 mg 이상 분리하여 화학구조를 동정하였음	100%
	- 주요성분 2종 이상 추가분리(100 mg 이상)	- 분리된 물질들 중, 주요 구성성분 6종 (protodioscin, methyl protodioscin, aspacochioside A, 15-hydroxy-pseudoprotodioscin, protocatechuic acid, rutin)은 100 mg 이상 대량으로 확보하였음	100%
	- HPLC 프로파일링 및 주요물질 함량 분석	- 구기자 함유 복합한약추출물의 개별 구성 약재인 천문동, 상심자, 구기자 열수추출물의 protodioscin, protocatechuic acid, betaine의 함량을 HPLC로 분석하였음	100%

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

<p>○ 후속연구의 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 기존 목표였던 HPLC 프로파일링 및 주요물질의 함량 분석은 개별 구성 약재 각각의 주요물질의 함량 분석을 함으로서 목표를 달성하였으나, 구기자 함유 복합한약추출물에서 3종 소재를 동시에 분석하는 과정에서는 어려움이 존재하였음 - 개별 구성 약재의 지표 물질로 제시한 protodioscin, protocatechuic acid, betaine 각각의 화학적 특성의 차이로 인해, 각 물질의 함량 분석에 사용된 HPLC system, detector, 전개 용매 및 분석용 컬럼 등이 상이하였기에 이들을 동시 분석하기 위해서는 새로운 분석 조건 및 새로운 지표물질 발굴에 대한 추가적인 후속연구가 필요할 것으로 판단됨

4장. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 구기자 함유 복합 한약추출물의 표준화 및 과학화에 활용
 - 본 과제를 통해 분리된 구기자 함유 복합 한약추출물의 구성성분, 특히 500 mg 이상 대량 확보된 천문동의 주요 성분인 protodioscin(2.5 g), methyl protodioscin(1.56 g), aspachioside A(612.3 mg)는 갱년기 열성홍조 관련 동물실험을 통해 유효성분으로서의 활용가능성을 확인할 계획임
 - 동물 실험에서 좋은 활성을 보여서 유효성분으로서의 활용 가능성이 높게 나오는 성분이나 구성 생약으로부터 새롭게 분리되는 신규 물질의 경우에는 관련 분야 저널의 논문 게재 및 특허 출원을 통해 지적재산권을 확보할 예정임
 - 구기자 함유 복합 한약추출물이나 개별 구성한약재를 이용한 다른 용도의 건강기능식품 연구의 지표/유효물질로 활용 가능함

- 갱년기 열성홍조 개선 건강기능성식품 개발을 위한 본 과제관련 후속연구
 - 본 과제에서 발굴된 구기자 함유 복합 한약추출물의 구성성분 및 시험법은 향후 원료 규격화, 기준 및 시험법 개발에 직접적으로 활용할 수 있음
 - 구기자 함유 복합 한약추출물의 유효성분 규명
 - 전임상연구 중 CMC(Chemistry, Manufacturing, Control) 자료 확보
 - 원료와 완제의약품을 만드는 ‘Process Development(공정개발)’과 ‘Quality Control(품질관리)’

- 구기자 함유 복합 한약추출물의 사업화에 활용(올만식품(유))
 - 본 과제를 통해 발굴된 구기자 함유 복합 한약추출물의 시험법은 개별인정형 건강기능식품 원료의 개발 과정 중, 원료의 표준화 공정에 활용할 계획
 - 표준화 공정과 아울러 기능성 원료의 효능 및 독성 실험에 사용하는 시료의 조제물 분석에 활용할 계획임

4-2. 기대성과 및 파급효과

- 기술적 측면
 - 본 연구결과로 얻어지는 유효/지표물질의 화학성분, 유효성분에 대한 연구결과는 국제전문학술지의 논문을 양산할 것으로 기대되며 천연물 및 한약자원 활용연구분야의 학문적 발전에 기여할 수 있음.

- 한약의 성분과 관련된 지식을 증대시키고, 천연물 유래 생리활성물질 분리 및 화학구조 규명 연구에 전문성을 가지는 전문연구인력의 양성에 기여할 수 있음.

○ 경제적·산업적 측면

- 본 연구를 통하여 유효/지표성분이 발굴되고 구기자 함유 복합한약추출물의 효능을 과학적으로 입증한다면, 천연물신약, 건강기능식품 개발을 위한 근간을 마련할 것으로 예상되며, 유효 생약추출물 및 활성성분에 대한 지적소유권을 확보함으로써 국내 제약산업 및 식품산업의 발전에 기여할 수 있음.

- 천연물신약, 건강기능식품 개발을 통해, 치료에 소비되는 막대한 비용뿐만 아니라 질환으로 인한 생산액 손실 등을 감소시켜 경제적 손실을 막을 수 있음.

- 고령화 시대 뇌질환 관련 제약시장의 방대함과 건강기능성 식품 시장의 성장성을 고려해 볼 때 효능과 안전성이 뛰어난 새로운 선도물질을 개발한다면 국민건강증진 뿐만 아니라 국가경제에 공헌할 수 있음.

- 생리활성 물질과 그 약리효과에 대한 연구내용은 그 자체가 훌륭한 자산으로서 수입대체효과는 물론이고 수출도 가능한 신약개발의 database로서 무한한 활용가치를 지닐 것으로 기대됨.

붙임. 참고문헌

1. Oyama, M.; Tokiwano, T.; Kawaii, S.; Yoshida, Y.; Mizuno, K.; Oh, K.; Collected in NYoshizawa, Y. Protodioscin, Isolated from the Rhizome of *Dioscorea tokoro* orthern Japan is the Major Antiproliferative Compound to HL-60 Leukemic Cells. *Current bioactive compounds*, **2017**. *13(2)*, 170-174.
2. Ju, Y.; Jia, Z. J. Steroidal saponins from the rhizomes of *Smilax menispermoides*. *Phytochemistry*, **1992**, *31.4*, 1349-1351.
3. Shi, J. G.; Li, G. Q.; Huang, S. Y.; Mo, S. Y.; Wang, Y.; Yang, Y. C.; Hu, W. Y. Furostanol oligoglycosides from *Asparagus cochinchinensis*. *Journal of Asian natural products research*, **2004**. *6(2)*, 99-105.
4. Huang, H. L.; Liu, R. H.; Shao, F. Structural determination of two new steroidal saponins from *Smilax china*. *Magn. Reson in Chem*. **2009**. *47(9)*, 741-745.
5. Shi, J. G.; Li, G. Q.; Huang, S. Y.; Mo, S. Y.; Wang, Y.; Yang, Y. C.; Hu, W. Y. Furostanol oligoglycosides from *Asparagus cochinchinensis*. *Journal of Asian natural products research*, **2004**. *6(2)*, 99-105.
6. Gutzeit, D.; Wray, V.; Winterhalter, P.; Jerz, G. Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography. *Chromatographia*, **2007**. *65(1-2)*, 1-7.
7. Hong, S. S.; Oh, J. S. Inhibitors of antigen-induced degranulation of RBL-2H3 cells isolated from wheat bran. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. **2012**. *55(1)*, 69-74.
8. Güvenalp, Z.; Kilic, N.; Kazaz, C.; Kaya, Y.; Demirezer, L. Ö. Chemical constituents of *Galium tortumense*. *Turk J Chem*, **2006**. *30(4)*, 515-523.
9. Yun, J.; Lee, H.; Ko, H. J.; Woo, E. R.; Lee, D. G. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **2015**. *1848(2)*, 695-701.
10. Bukhari, S. B.; Memon, S.; Tahir, M. M.; Bhanger, M. I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt - quercetin complex. *Journal of Molecular Structure*, **2008**. *892(1-3)*, 39-46.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업(개발착수형)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업(개발착수형)의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.