

발간등록번호

11-1543000-002613-01

**약용작물 유효성분의 생체내 분포도 작성을 통한  
신규 유용성 발굴 및 상용화  
최종보고서**

2019. 3. 25.

주관연구기관명 : 건국대학교

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구기관명 : (주)이룸바이오테크놀러지

협동연구기관명 : 농업회사법인문경미소(주)

**농 립 축 산 식 품 부  
농림식품기술기획평가원**

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “약용작물 유효성분의 생체내 분포도 작성을 통한 신규 유용성 발굴 및 상용화”(개발기간 : 2016. 5. ~ 2018. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 12. 31.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단장



협동연구기관명 : 한림대학교 산학협력단장 (인)

협동연구기관명 : (주)이룸바이오테크놀러지 대표



협동연구기관명 : 농업회사법인문경미소(주) 대표



주관연구책임자 : 임응호

세부연구책임자 : 여운석

협동연구책임자 : 이근욱

협동연구책임자 : 유상구

협동연구책임자 : 도준호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

# 제 출 문

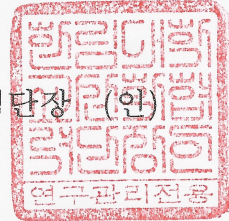
농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “약용작물 유효성분의 생체내 분포도 작성을 통한 신규 유용성 발굴 및 상용화”(개발기간 : 2016. 5. ~ 2018. 12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 12. 31.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단장 (인)

협동연구기관명 : 한림대학교 산학협력단장 (인)



협동연구기관명 : (주)이룸바이오테크놀로지 대표 (인)

협동연구기관명 : 농업회사법인문경미소(주) 대표 (인)

주관연구책임자 : 임용호

세부연구책임자 : 여운석

협동연구책임자 : 이근욱

협동연구책임자 : 유상구

협동연구책임자 : 도준호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	316028-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.5 - 2018.12	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	약용작물 유효성분의 생체내 분포도 작성을 통한 신규 유용성 발굴 및 상용화			
연구책임자	임용호	해당단계 참여연구원 수	총: 56명 내부: 39명 외부: 17명	해당단계 연구개발비	정부:1,330,000천원 민간: 443,334천원 계: 1,773,334천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 56명 내부: 39명 외부: 17명	총 연구개발비	정부:1,330,000천원 민간: 443,334천원 계: 1,773,334천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 융합생명공학과			참여기업명 (주)이룸바이오테크놀러지 농업회사법인문경미소(주)	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

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											

국가과학기술중합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 약용작물이 함유한 성분의 HPLC, NMR, 물리화학적 성질 database화
- 오미자, 당귀 효능성분이 강화된 분획 확보
- 오미자 추출방법에 따른 효능 비교 분석 및 성분 분석
- 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 성분들의 조직/장기내 존재유무를 형광이미징 방법과 질량분석 방법으로 분석함으로써 생체내 분포도 제작
- 약용작물 성분의 퇴행성 뇌질환 관련 효능에 대한 과학적 근거 제시를 위한 실험으로 acetylcholinesterase 저해효과, tau 단백질의 aggregation 저해효과, monoamine oxidase 저해효과 실험을 수행하여 수종의 물질이 퇴행성 뇌질환 관련 효능을 보임
- 암세포의 성장을 억제하는 약용작물 함유 성분들의 in vitro 기전 분석 및 in vivo 효능 검증을 수행함
- 오미자 추출물은 비알콜성 간섬유화에 탁월한 효능을 보임이 본 연구를 통해서 확인이 되어 “간기능개선”을 위한 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 자료를 확보함
- 오미자 액상차 제품으로 병제품, 파우치, 스틱 제품을 상용화하여 판매 중임

보고서 면수  
371

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구에서는 생체이미징 기술을 적용하여 약용작물 유효성분/대사물질의 생체내 분포도를 작성하며, 작성된 생체내 분포도를 기반으로 약용작물의 효능을 과학적으로 검증하고, 약용작물의 노인성질환 관련 효능을 발굴하며, 검증된 유용성 및 발굴된 유용성에 근거하여 고부가가치 건강기능식품 제품을 개발함으로써, 국내 약용작물 재배농가의 소득증대에 기여하고자 하는 목적과 내용을 가진다.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 약용작물이 함유한 성분의 HPLC, NMR, 물리화학적 성질 database화</li> <li>- 오미자, 당귀 효능성분이 강화된 분획 확보</li> <li>- 오미자 추출방법에 따른 효능 비교 분석 및 성분 분석</li> <li>- 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 성분들의 조직/장기내 존재유무를 형광이미징 방법과 질량분석 방법으로 분석함으로써 생체내 분포도 제작</li> <li>- 약용작물 성분의 퇴행성 뇌질환 관련 효능에 대한 과학적 근거 제시를 위한 실험으로 acetylcholinesterase 저해효과, tau 단백질의 aggregation 저해효과, monoamine oxidase 저해효과 실험을 수행하여 수종의 물질이 퇴행성 뇌질환 관련 효능을 보임</li> <li>- 암세포의 성장을 억제하는 약용작물 함유 성분들의 in vitro 기전 분석 및 in vivo 효능 검증을 수행함</li> <li>- 오미자 추출물은 비알콜성 간섭유화에 탁월한 효능을 보임이 본 연구를 통해서 확인이 되어 “간기능개선”을 위한 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 자료를 확보함</li> <li>- 오미자 액상차 제품으로 병제품, 파우치, 스틱 제품을 상용화하여 판매 중임</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 약용작물의 유효성분 및 생체내 대사물질에 대하여 구축한 데이터베이스는 건강기능식품 상업화를 위한 근거 자료 및 건기식을 개발할 때 자료로 활용</li> <li>- 약용작물에 대하여 작성한 생체내 분포도는 기존에 알려진 효능을 입증하기 위한 과학적 근거 자료, 약용작물의 건기식 개발을 위한 과학적 근거에 활용하고, 소비자에게 약용작물의 효능에 관한 과학적 신뢰 구축을 위한 자료로 제공</li> <li>- 약용작물의 유효성분 및 그 대사물질의 노인성질환 관련 유용성 발굴 결과는 고령사회로 진입한 우리나라의 건강수명 연장을 위한 노인성질환 예방 및 치료제 개발에 활용하고 기존에 노인성질환 효과가 있는 것으로 알려진 약용작물에 대한 과학적 근거로 제시</li> <li>- 약용작물 유효성분의 건강기능식품 원료 개별 인정 자료는 향후 개별인정 신청 자료로 활용</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>약용작물</p>	<p>대사물질</p>	<p>생체내 분포도</p>	<p>노인성질환</p>	<p>생체이미징</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>medicinal plant</p>	<p>metabolite</p>	<p>bio-distribution</p>	<p>aged disease</p>	<p>bio-imaging</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	6
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	10
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	362
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	369
붙임. 참고 문헌 .....	370

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 건강기능식품(건기식)은 인구고령화에 따라서 수요가 크게 증가하는 추세이다. 건기식의 세계시장은 매년 5% 내외의 성장을 보이는 반면 우리나라는 3% 정도에 머물러 있다. 이와 같은 이유 중 하나는 효능에 대한 불확신 때문이다 [국내외건강기능식품산업현황및전망, 김정연교수 (2014)]. 이를 극복하기 위해서는 효능에 대한 과학적 근거 제시가 필요하다.
- 우리나라 건기식 시장의 절반 정도가 인삼 관련 제품이다. 인삼은 2009년을 정점으로 생산량, 재배면적, 재배농가, 생산액, 농산물 수출에서 차지하는 비중 등 모두 감소하는 추세이다 [인삼통계자료집, 농식품부 (2015)]. 뿌리삼 비중이 큰 인삼 관련 제품을 고부가가치 가공제품으로 변화하는 것이 돌파구가 될 것이다. 이를 위해서는 효능에 대한 과학적 근거 제시뿐만 아니라 신규 유용성 발굴이 필요하다.
- 우리나라 건기식 시장에서 인삼 다음으로 큰 비중을 차지하는 제품은 개별인정형 제품이다. 개별인정형 제품의 성장률은 29%에 이르고 있다 (타 제품들은 3% 수준) [보건산업기술이전센터 시장정보 report 37 (2014)]. 인삼의 뒤를 이을 경제약용작물의 개별인정형 제품 개발이 필요하다.
- 2017년에 고령사회로 진입한 우리나라는 건기식 중 노인성질환에 대한 관심이 아주 높다 [통계청, 2017]. 65세 이상의 인구가 14.2% 이상이 되면 고령사회로 구분하는데 고령화사회에서 고령사회로의 진입에 걸린 기간이 우리나라는 17년으로 24년 걸린 일본에 비해서 아주 빠른 속도로 진입하였다. 65세 이상의 인구가 20% 이상이 되면 초고령사회로 구분하는데 우리나라는 2026년에 초고령사회로 진입할 것으로 예측되고 있다. 미국이나 영국 등은 고령화사회에서 초고령사회로 진입하는 기간이 100년 내외였던 것과는 달리 우리나라는 26년 밖에 걸리지 않아서 이로 인한 노인성질환에 대한 관심과 대비가 필요하다. 노인성질환은 인지기능저하, 암, 퇴행성질환 등을 포함하고 있어서 이와 관련한 개별인정형 제품 개발이 우선되어야 할 필요가 있다.
- 우리나라 건기식 제품은 약용작물 원료 그대로를 사용하거나 조추출물 형태의 제품이 주류를 이루고 있다. 해외 고부가가치 제품들은 부분정제분획 또는 유효성분을 주성분으로 생산/판매되고 있다. 따라서 약용작물의 효능성분이 강화된 고부가가치 제품 개발이 필요하다.
- 따라서, 본 연구에서는 생체이미징 기술을 적용하여 약용작물 유효성분/대사물질의 생체내 분포도를 작성하며, 작성된 생체내 분포도를 기반으로 약용작물의 효능을 과학적으로 검증하고, 약용작물의 노인성질환 관련 효능을 발굴하며, 검증된 유용성



및 발굴된 유용성에 근거하여 고부가가치 건강기능식품 제품을 개발함으로써, 국내 약용작물 재배농가의 소득증대에 기여하고자 하는 목적을 가진다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 약용작물 유래 건기식 제품의 경우, 과학적 근거를 기초로 한 제품개발이 요구되고 있다. 생체를 대상으로 한 유효성 입증자료 이외에 작용기전, 효능성분의 규명과 함께 해당 성분이 생체 내 관련 조직/장기로 이행됨을 입증하는 자료도 동시에 요구되고 있다. 전통적 임상 사용경험이 축적된 약용작물의 해당 효능에 대해 동물실험 등을 통해 유효성은 확인되었으나 효능성분을 규명하지 못한 경우가 있다. 이 경우, 효능성분 대신 지표성분을 임의로 설정하여 표준화 추출물의 제조 및 품질 관리를 하고 있으나, 생산 제품의 효능 관리에는 문제가 발생한다. 효능성분의 함량 부족 제품의 경우, 효능이 나타나지 않기 때문에 지표성분 보다는 효능성분이 항상 일정한 수준으로 유지되는 것이 중요하다. 따라서 품질 규격 설정은 지표성분 대신 효능성분으로 설정해야 한다. 따라서 약용작물 중의 특정 성분이 생체에 흡수된 후 표적 장기로 이행됨을 입증하고 이 성분이 효능을 나타낸다는 과학적 근거의 확보가 필수적이다. 결과적으로, 약용작물의 전통적 사용경험에 대한 과학적 근거 제시를 통하여 그 유효성을 입증하고, 약용작물 시장을 확대함으로써, 약용작물 유래 건기식 제품의 과학화 및 세계화를 달성해야 할 필요성이 강력히 대두된다.
- 건강에 대한 사회적 관심이 증가하면서 약용작물에 관련 시장도 성장하고 있다. 고령화의 진행으로 노인성질환에 대한 관심 증가하고 있다. 의료비 부담 증가로 국민 자신의 건강에 대한 돌봄 관심 역시 증가하고 있다 [건강보험심사평가원통계]. 생활습관에 의한 질병의 증가로 인한 국민 자신의 건강에 대한 관심과 대체의학에 대한 사회적 관심이 증가하고 있으며, 소비자의 건강기능식품에 대한 인식도 변화하고 있다 [국내외건강기능식품산업 현황 및 전망 (2012)]. 국내의 경우, 약용작물의 신규 효능 발굴 연구가 필요하며 약용작물의 고부가가치화를 위한 제품 개발이 필요하다. 대표적인 전통 경제약용작물인 인삼의 경우에도 캐나다, 미국 등의 인삼 수출액은 이미 우리나라의 수출액을 추월한 상태이며, 중국삼, 화기삼에 비해 고려인삼은 가격 경쟁력을 상실하는 실정이다. 우리나라 건기식 시장은 자체개발된 제품보다는 수입관제품 비중이 증가하는 추세이다. 인삼을 대표로 하는 국내 약용작물 산업의 경쟁력 제고를 위해 고부가가치 제품 개발을 위한 연구개발이 절실히 요구되고 있다. 해외에서는 고부가가치 인삼 가공 제품 개발에 주력하는 반면, 국내 인삼 산업은 부가가치가 낮은 뿌리삼 제품 위주이다 (전체

생산의 80% 수준). 따라서 기존 약용작물의 신규 효능 발굴 및 인삼대체 신규 경제약용작물 발굴에 의한 제품 개발을 통해 국제경쟁력을 제고할 필요성이 강하게 대두되고 있다.

- 인구 노령화로 인한 건강수명 연장을 위한 약용작물 제품에 대한 국민적 관심이 높아지고 있으나, 효능에 대한 과학적 근거 제시보다는 단편적인 효능 정보의 제공에 그치는 경우가 많아, 일반 소비자들에게 효능에 대한 불신을 초래함으로써 약용작물 소비 증가가 해외 시장에 비해서 상대적으로 낮은 수준이다. 노인성질환은 만성질환이 대부분으로 일반질병의 치료와는 달리 예방 차원에서의 접근이 필요하나 이에 대한 효능 검증이 어렵다는 문제를 가지고 있다. 노인성질환은 생활습관으로 인한 질병이 많으나 건강기능식품이 생활습관병 치료 및 예방에 효능이 있다는 점을 과학적으로 입증해야할 필요가 있다 [바이오인웹진 (2011)].
- 약용작물이 효능을 나타내기 위해서는 유효성분의 장기/조직내 분포가 필수적이므로, 유효성분의 생체내 분포도는 약용작물 효능에 대한 직접적 근거를 제시한다. 본 과제에서는, 약용작물 중의 특정 성분이 생체에 흡수된 후 표적 장기로 이행됨을 입증하고 이 성분이 효능을 나타낸다는 과학적 근거를 확보하기 위해 융합 생체이미징 기술을 적용하고자 한다. 결과적으로, 생체이미징 기술을 적용한 생체내 분포도 확보를 통해 약용작물의 전통적 사용경험에 대한 다양한 과학적 근거를 제시하여 그 유효성을 입증함으로써 약용작물 시장을 확대시키고, 약용작물 유래 건기식 제품의 과학화 및 세계화를 달성하고자 한다.

### 1-3. 연구개발 범위

- 2016농생명산업기술개발사업 제안요구서(RFP)에서 제시한 약용작물의 유효성분 및 대사물질의 생체내 분포도를 생체이미징 기술로 작성하고자 한다.
- 작성된 생체내 분포도에 근거하여 약용작물의 효능에 대한 과학적 근거를 제시하고자 한다.
- 작성된 생체내 분포도에 근거하여 약용작물의 새로운 유용성을 발굴하고자 한다.
- 노인성질환 관련 약용작물 원료의 기능성 개별인정을 받기 위한 자료를 확보하고자 한다.
- 이를 위해서 2016농생명산업기술개발사업 제안요구서(RFP)에서 제시한 연구내용을 모두 포함하여,
  - ✓ 약용작물 유효성분 DB 구축하고,
  - ✓ 약용작물 추출물 생체투여 및 장기별 유효성분/대사물질 분석하며,
  - ✓ 유효성분/대사물질 생체 내 분포도 작성하고,

- ✓ 유효성분/대사물질 성분표준물질의 유효성 검증하고,
- ✓ 유효성분/대사물질에 의한 노인성질환 관련 활성 검증하며,
- ✓ 약용작물 효능성분 강화된 부분정제 방법 개발하며,
- ✓ 약용작물 원료 개별인정형 자료를 확보하며,
- ✓ 약용작물 상용화를 달성하고자 한다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 1장. 약용작물의 유효성분/대사물질 데이터베이스 구축

약용작물이 함유한 성분의 HPLC, NMR, 물리화학적 성질 database화

- 오미자 에탄올 추출물 분석
- 오미자 에탄올 추출물에 함유된 gomisin 유도체들의 NMR 실험
- 오미자 에탄올 추출물에 함유된 gomisin 유도체들의 물리화학적 성질
- 오미자에 포함된 lignan 분석
- 오미자 함유 성분들(gomisin 유도체 이외)의 물리화학적성질
- 당귀 함유 성분들의 HPLC data 및 NMR data
- 당귀 함유 성분들 중 decursin, decursinol, decursinol angelate, chlorogenic acid의 안정성 시험 및 물리화학적성질
- 당귀 함유 성분들(위의 성분 이외)의 물리화학적성질
- 인삼에 함유된 ginsenoside NMR 실험
- 백수오 함유 성분들의 물리화학적성질
- 강황 함유 성분들의 물리화학적성질

오미자, 당귀 효능성분이 강화된 분획 확보

- 당귀 효능성분이 강화된 분획
- 오미자 효능성분이 강화된 분획
- 오미자 제품 내 성분 분석

오미자 추출방법에 따른 효능 비교 분석 및 성분 분석

- 오미자 추출방법에 따른 효능
- 오미자 추출방법에 따른 성분 분석
- 오미자 함유 성분의 식품의약품안전처 방법과 본 연구자의 분석 방법의 비교
- 약용작물 함유 성분의 대사물질

## 1절. 오미자가 함유하고 있는 유효성분

오미자는 동의보감에서 다섯가지 맛을 내는 성질이 우리 몸에 각기 다르게 작용하는 것으로 표시하고 있는데, 신맛은 간, 단맛은 비장과 위장, 매운맛은 폐, 쓴맛은 심장, 짠맛은 신장과 방광에 좋은 것으로 평가하고 있다. 우리나라와 중국이 원산지로서, 중국은 북오미자와 남오미자로 구분하고, 우리나라는 이 두 가지 외에 흑오미자가 추가된다. 북오미자가 일반적으로 오미자라고 부르는 품종이고, 흑오미자는 열매가 까만 것으로 우리나라 제주도에서만 생산된다. 우리나라에서 오미자는 주로 북오미자로 경북 문경이 주재배지이나 현재는 기후 온난화로 북쪽으로 재배지가 확산되어 평창까지 이르고 있다. 전국에서의 오미자 재배지는 2000년에 비해서 10년이 지난 후에는 500% 증가하였고, 생산량 역시 10년 동안 2300% 증가하였고, 수입량도 50% 이상 증가하였다. 그러나 근래에는 오미자의 공급과잉과 수입증가로 인해서 오미자 단가가 하락하고 있으며 이와 같은 추세는 지속될 것으로 예측되고 있기 때문에 오미자 제배 농가의 소득 감소로 이어질 것이 우려되는 실정으로 오미자의 새로운 수요 창출이 필요하다. 이를 위해서 현재 오미자 소비가 주로 생과, 건과, 당절임 세가지로 집중되어 있는 것을 확대할 필요가 있으며 새로운 효능의 발굴이 필요하다.

### 1. 오미자 에탄올 추출물 분석

#### 가. 연구내용

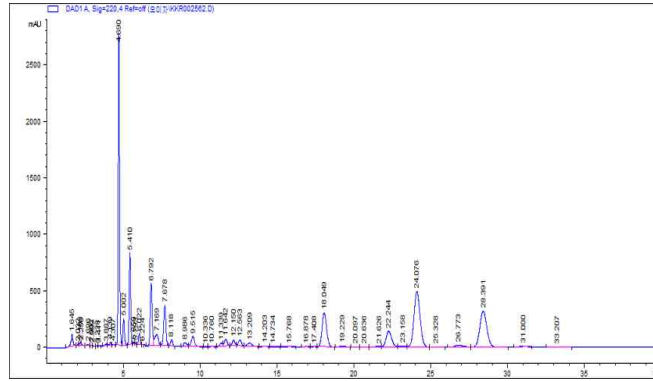
본 연구에서는 오미자의 유효성분에 대한 데이터베이스를 구축하고자 한다.

#### 나. 연구방법

- (1) 오미자를 음지에서 건조시킨 후 건조량 1Kg을 취하여 에탄올에 침지시켰다.
- (2) 3일간 3회 반복하여 에탄올로 추출하였다.
- (3) 추출액을 감압증류장치로 농축하였다.
- (4) 농축한 건조물을 동결건조기로 건조시켰다.
- (5) n-hexane과 water로 층분리하였다.
- (6) n-hexane 층을 감압증류한 후 동결건조하였다.
- (7) 건조된 n-hexane층을 10g/L의 농도로 메탄올에 녹여서 HPLC 분석에 사용하였다.
- (8) HPLC는 Agilent 1260 Infinity 기기를 사용하였고, Symmetry column (4.6 x 250mm, 5 $\mu$ m)을 장착하여 분석하였다. 실험한 온도는 30°C였고, 이동상은 65% acetonitrile로 1.2 mL/min의 유속으로 분석하였다. injection volume은 10  $\mu$ L, UV/VIS detector로 220nm에서 분석하였다.
- (9) 자세한 연구방법은 기존에 발표한 논문에 기재된 방법을 따름 [Bioorg. Med. Chem. Lett 19:4367(2009)]

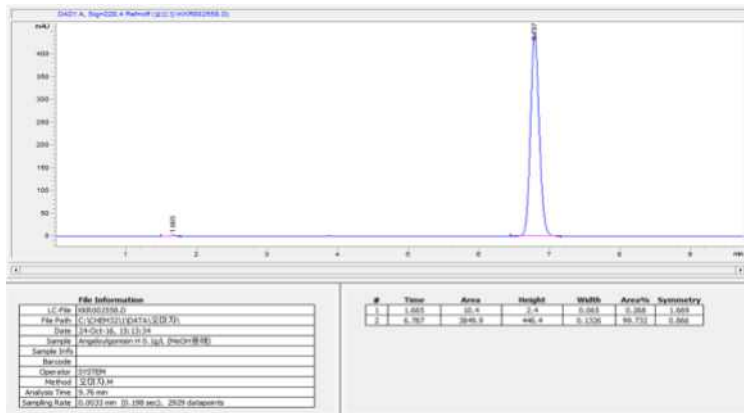
#### 다. 연구결과

- (1) HPLC 분석 결과 얻은 chromatogram은 아래와 같다.

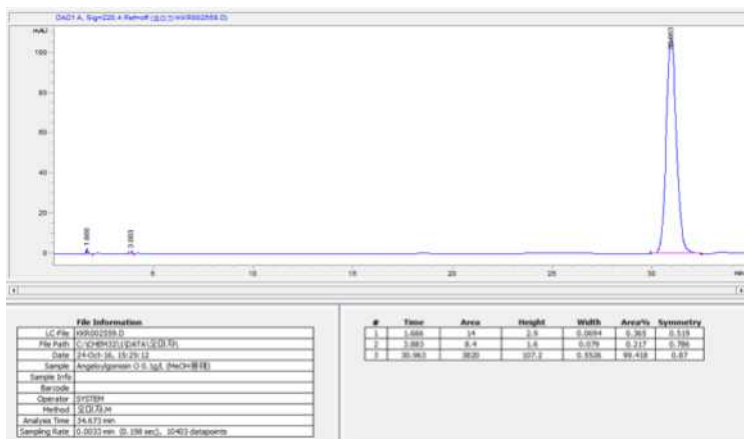


(2) 이 chromatogram에서 관찰된 peak들을 확인하기 위하여 오미자에 함유된 것으로 알려진 9종의 gomisin 유도체들의 standard 시료를 n-hexane 층의 HPLC 분석 방법과 동일한 조건으로 HPLC 실험을 수행하였다. 사용한 standard 시료들은 gomisin D, G, H, J, N, O, angeloylgomisin H, O, benzoylgomisin O 였다. 각각의 gomisin 유도체들의 HPLC chromatogram은 아래와 같다.

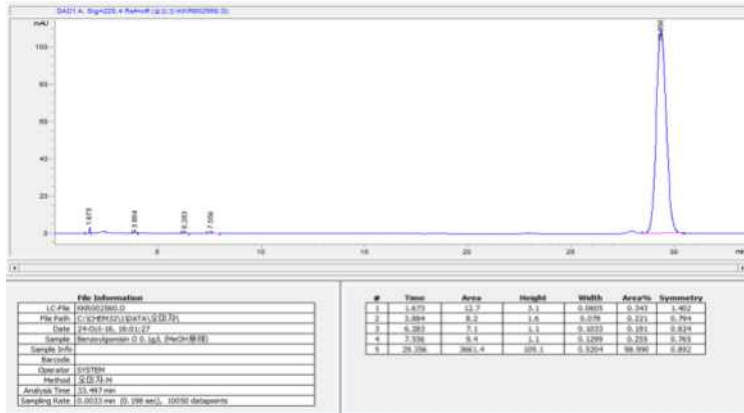
angeloylgomisin H의 chromatogram



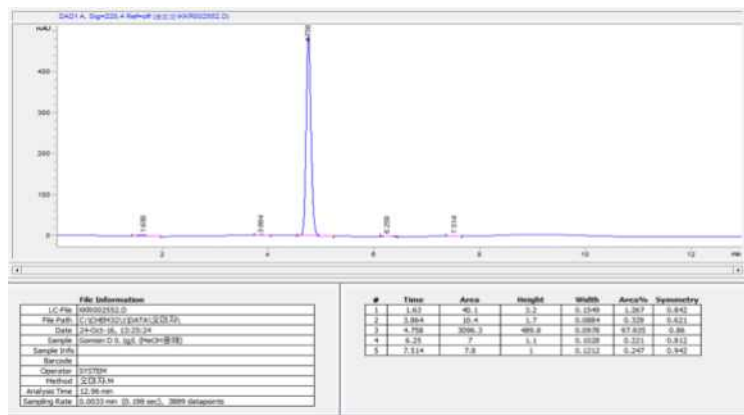
angeloylgomisin O의 chromatogram



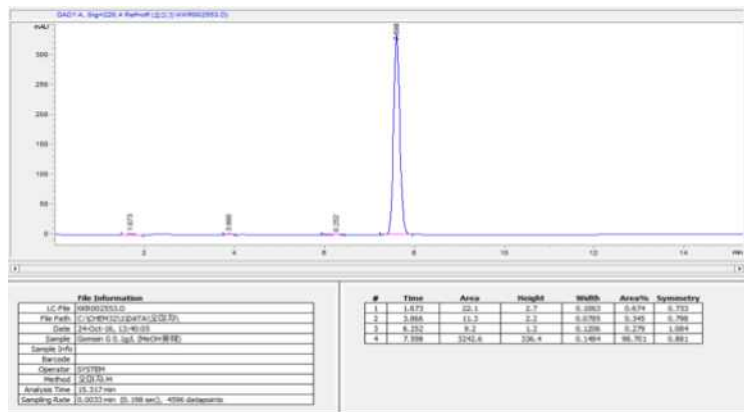
benzoylgomisin O의 chromatogram



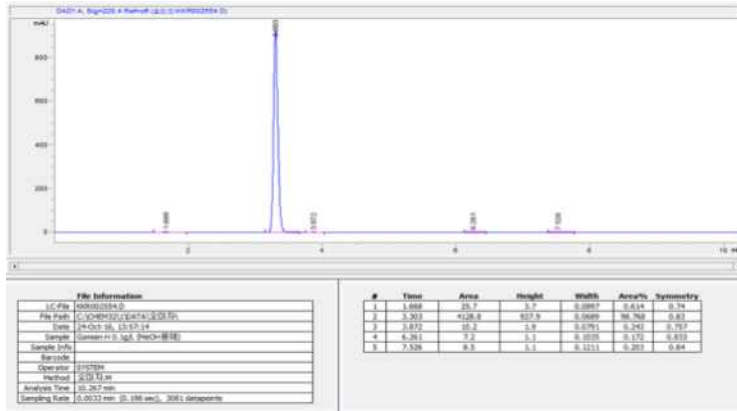
gomisin D<sup>2</sup> chromatogram



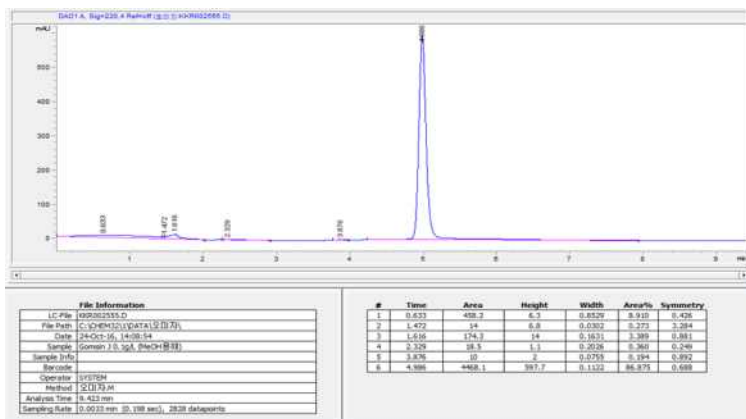
gomisin G<sup>2</sup> chromatogram



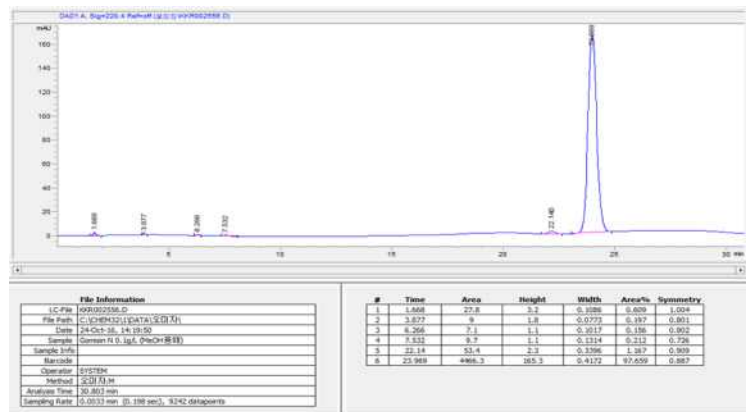
gomisin H<sup>2</sup> chromatogram



gomisin J의 chromatogram

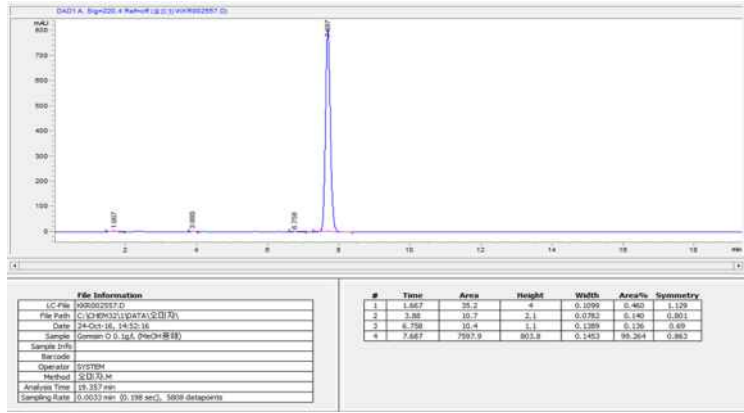


gomisin N의 chromatogram

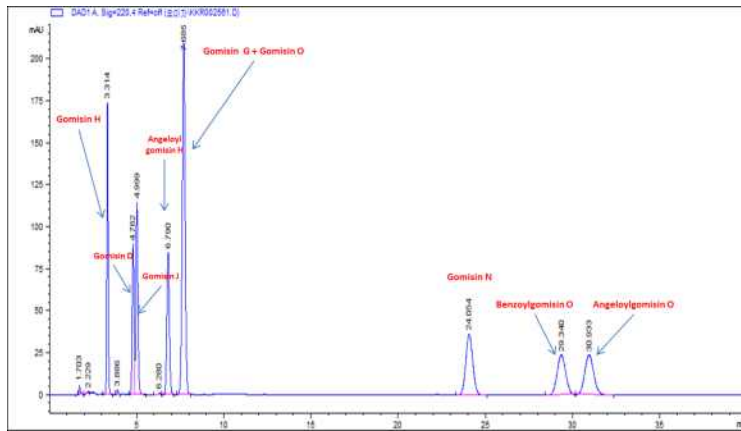


gomisin O의 chromatogram

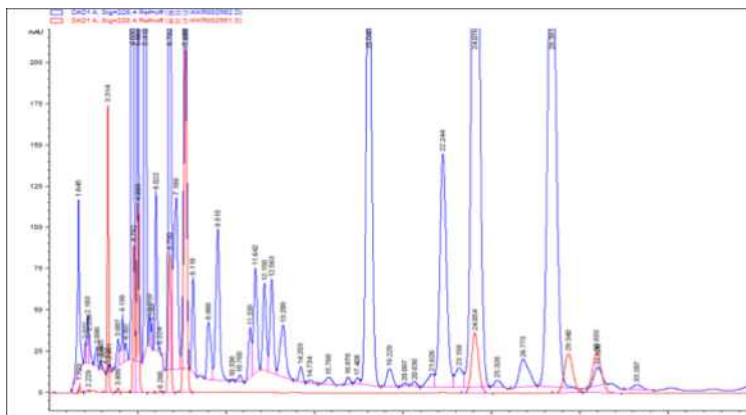




(3) 이들 9종의 gomisin 유도체들을 1g/L의 농도로 녹여서 동일한 양을 섞었다. 섞은 시료의 HPLC 분석 결과 얻은 chromatogram은 아래와 같다.



(4) n-hexane 층의 HPLC chromatogram (파란색)과 9종의 gomisin 유도체들의 HPLC chromatogram (빨간색)을 겹쳐서 비교한 결과는 아래와 같다.



(5) n-hexane 층에 가장 많이 함유된 gomisin 유도체는 gomisin N으로 확인되었다.

## 2. 오미자 에탄올 추출물에 함유된 gomisin 유도체들의 NMR 실험

### 가. 연구내용

(1) 오미자에 함유된 것으로 밝혀진 9종의 gomisin 유도체들의 NMR spectroscopy data를 확보하기 위하여 NMR 실험을 수행하였다.

### 나. 연구방법

(1) NMR 실험에 사용한 기기는 Bruker Avance 400 NMR spectrometer였고, 각 시료들은 DMSO-d6에 녹여서 2.5 mm NMR tube에 넣어서 실험하였다.

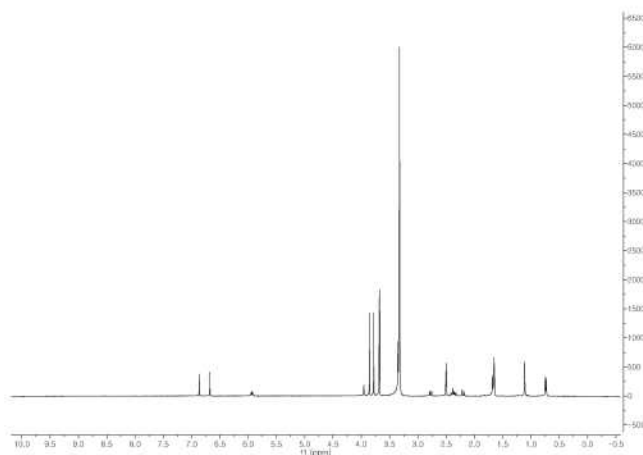
(2) 1D-NMR로 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 실험을 수행하였고, 2D-NMR로 correlated spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple bonded connectivities (HMBC) 실험을 수행하였다.

(3) 자세한 실험방법은 기존에 발표한 논문에 기재된 방법을 따랐다 [Magn. Reson. Chem. 50:62(2012)]

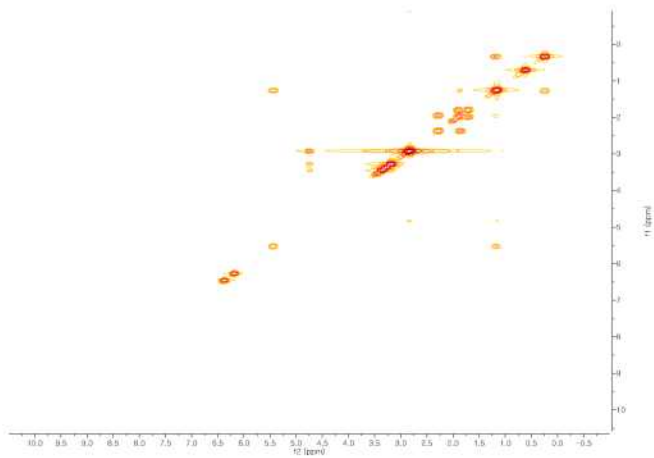
### 다. 연구결과

(1) 오미자에 함유된 것으로 밝혀진 9종의 gomisin 유도체들의 NMR 실험 결과는 아래와 같다.

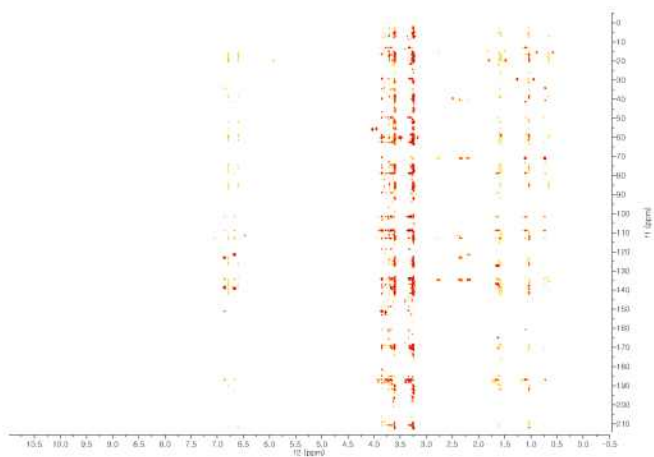
Angeloylgomisin H의 <sup>1</sup>H-NMR



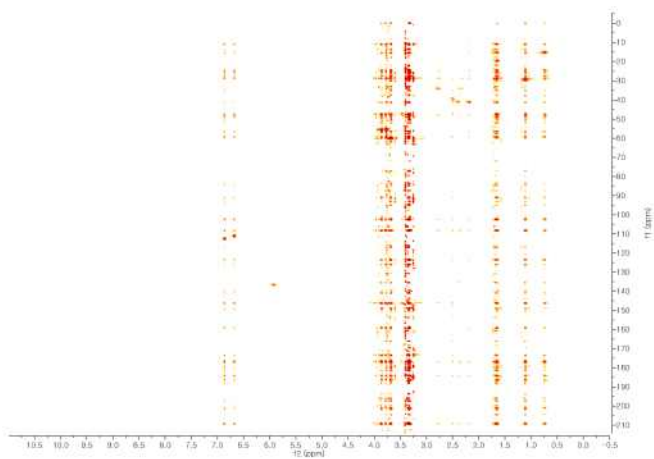
Angeloylgomisin H의 COSY



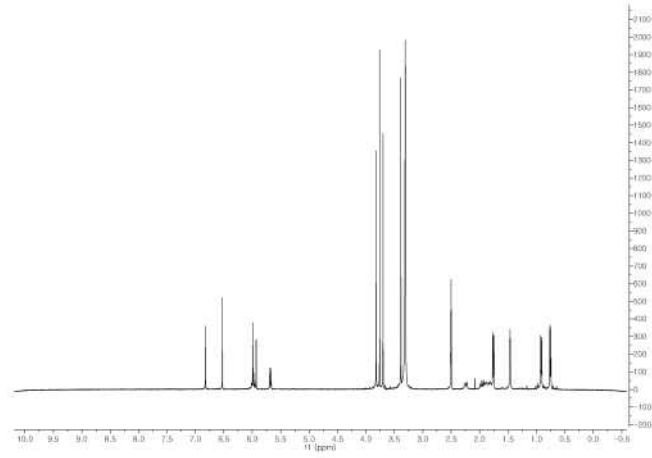
Angeloylgomisin H의 HMBC



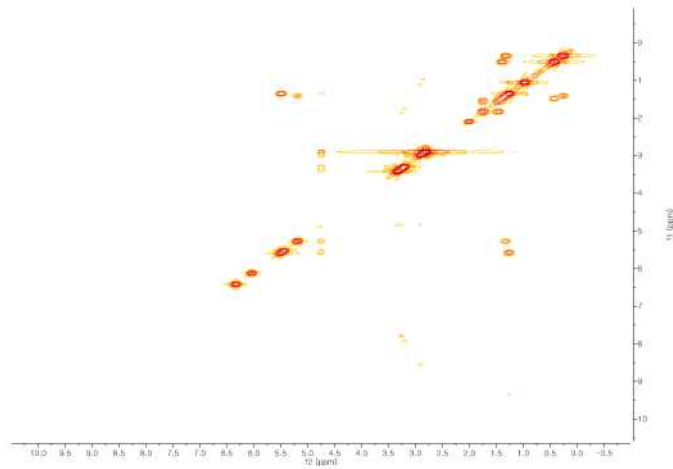
Angeloylgomisin H의 HMQC



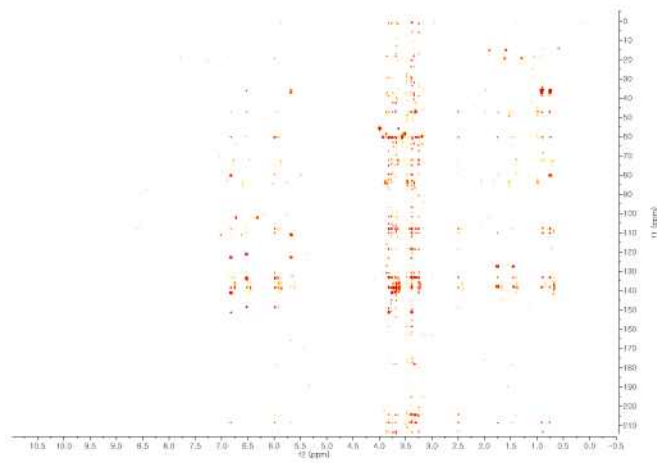
Angeloylgomisin O의 1H-NMR



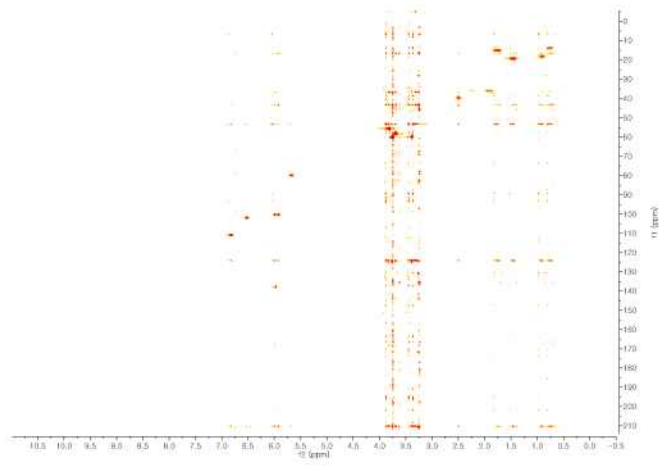
Angeloylgomisin O의 COSY



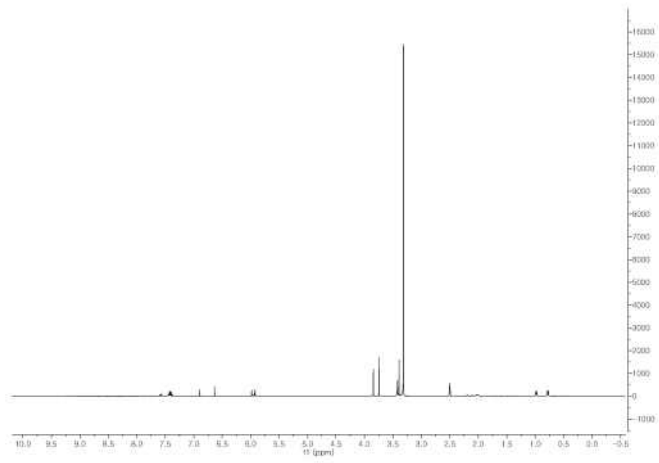
Angeloylgomisin O의 HMBC



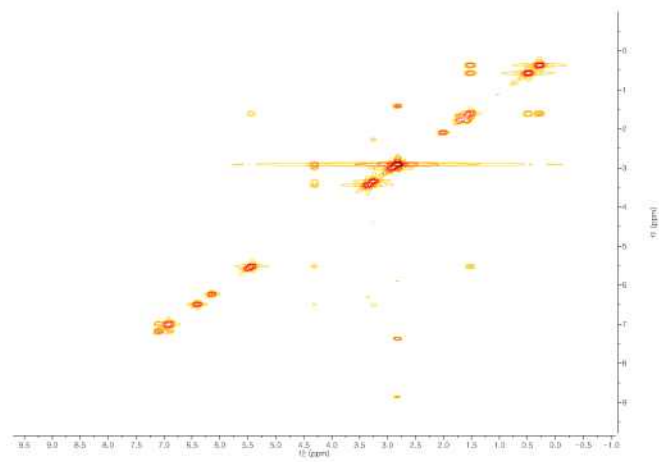
Angeloylgomisin O의 HMQC



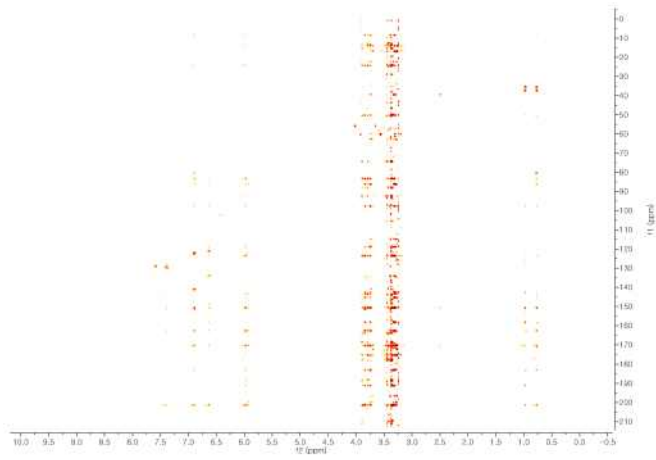
Benzoylgomisin O의  $^1\text{H-NMR}$



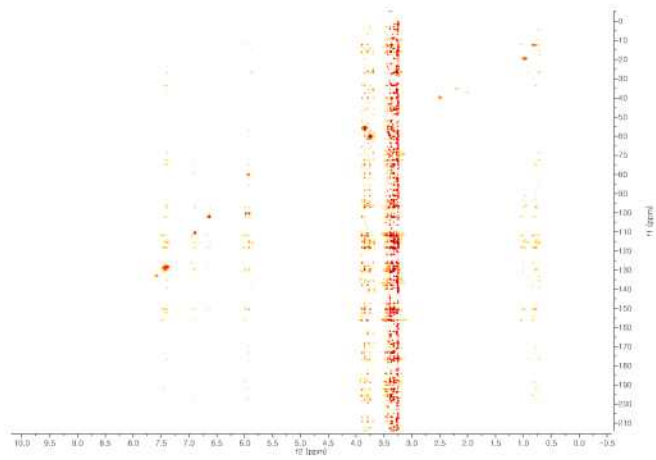
Benzoylgomisin O의 COSY



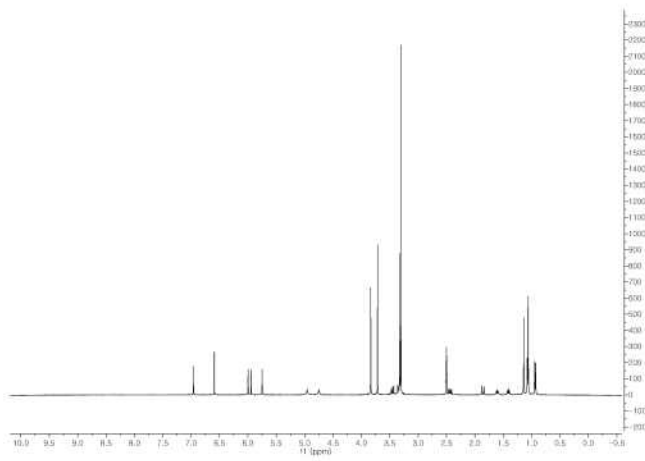
Benzoylgomisin O의 HMBC



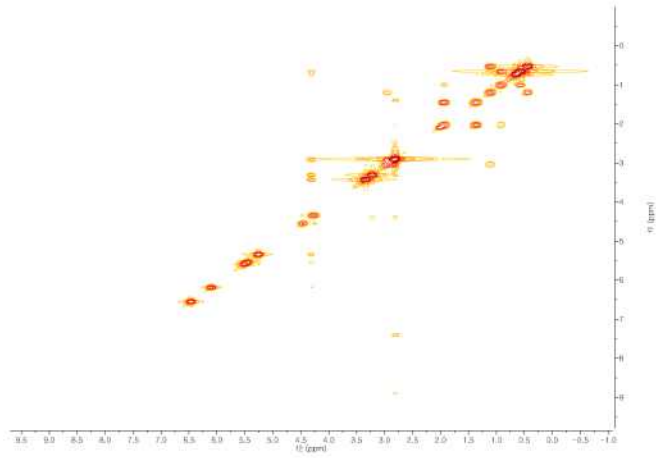
Benzoylgomisin O의 HMQC



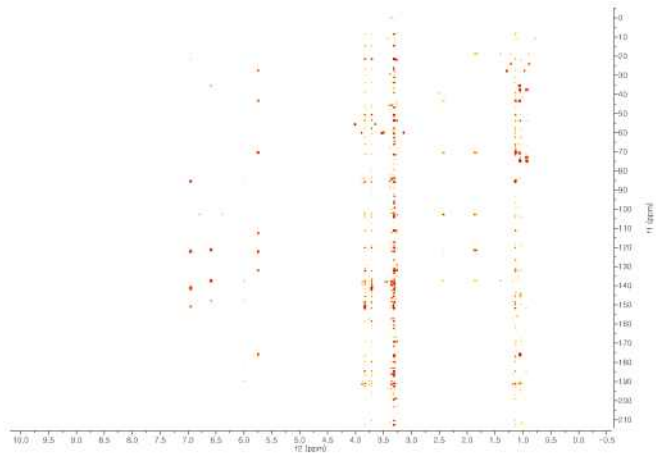
Gomisin D의 1H-NMR



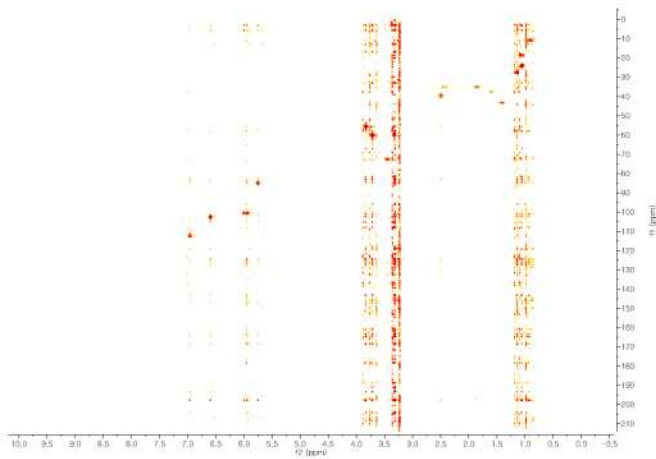
Gomisin D의 COSY



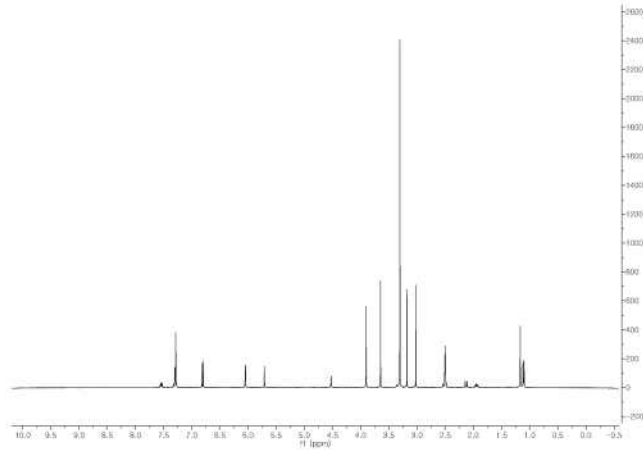
Gomisin D의 HMBC



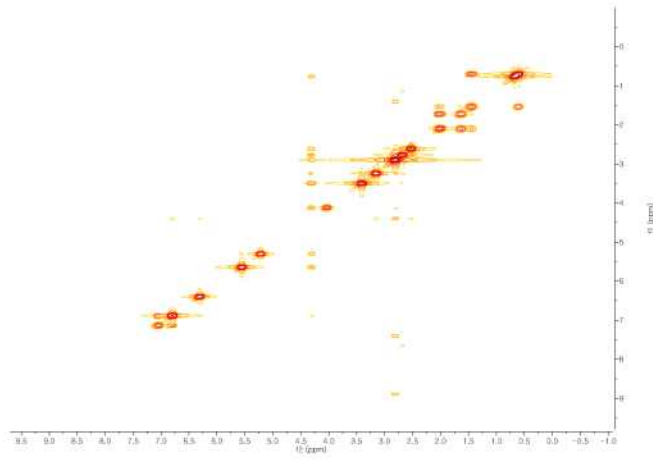
Gomisin D의 HMQC



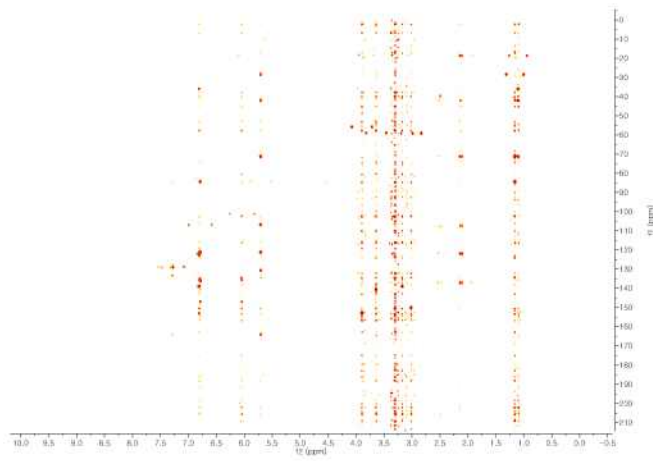
Gomisin G의 1H-NMR



Gomisin G의 COSY

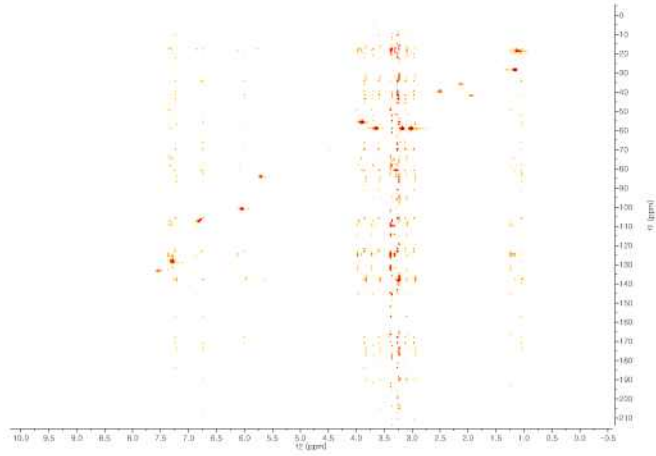


Gomisin G의 HMBC

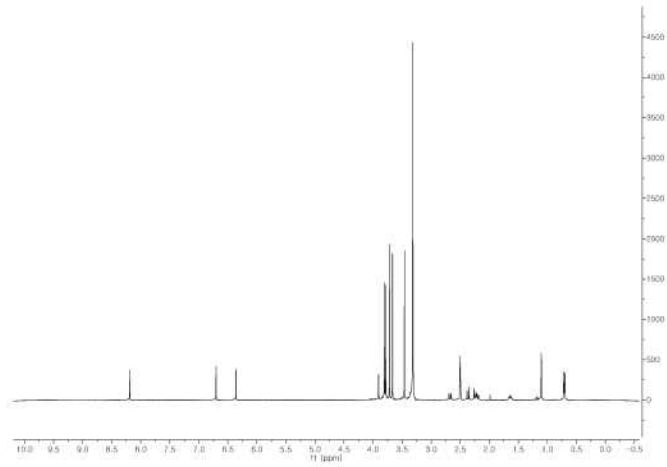


Gomisin G의 HMQC

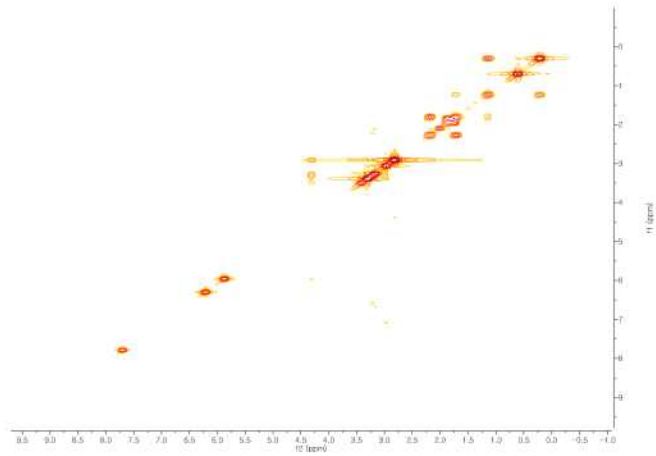




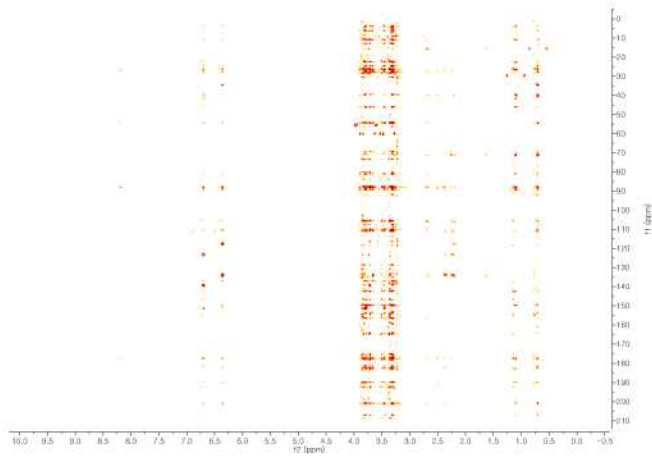
Gomisin H의  $^1\text{H-NMR}$



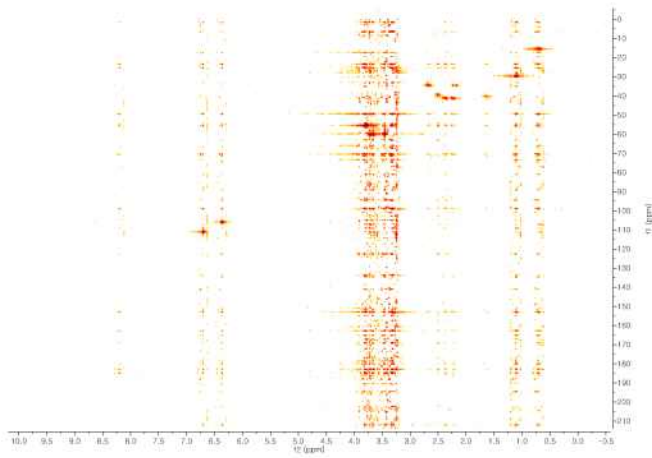
Gomisin H의 COSY



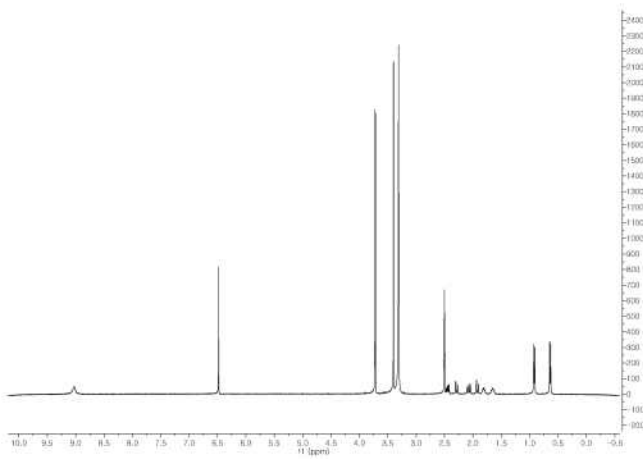
Gomisin H의 HMBC



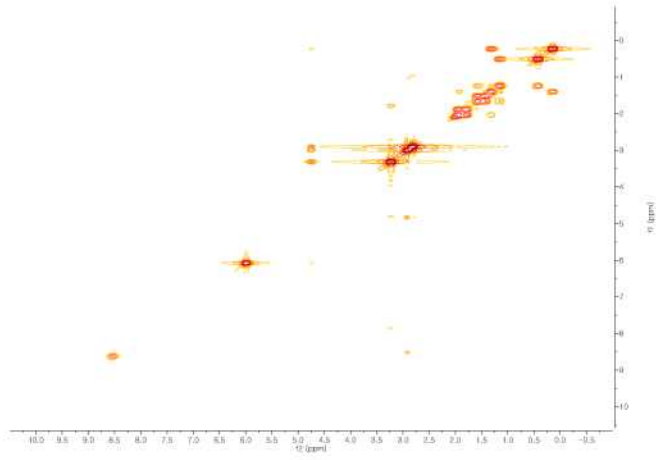
Gomisin H의 HMQC



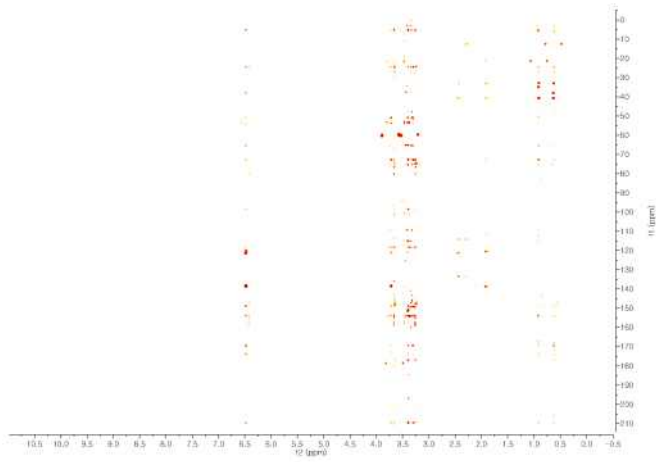
Gomisin J의 1H-NMR



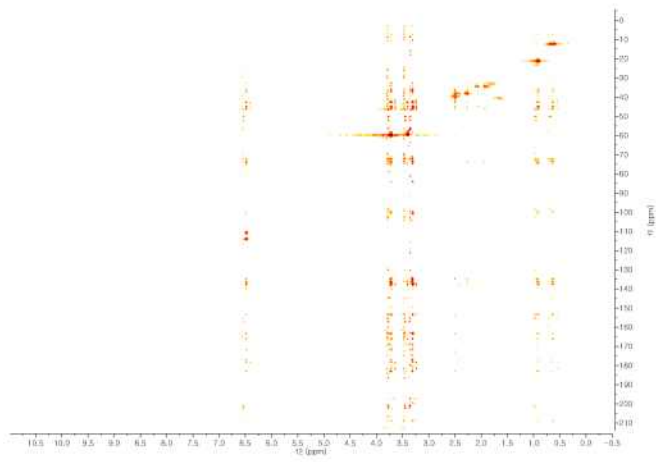
Gomisin J의 COSY



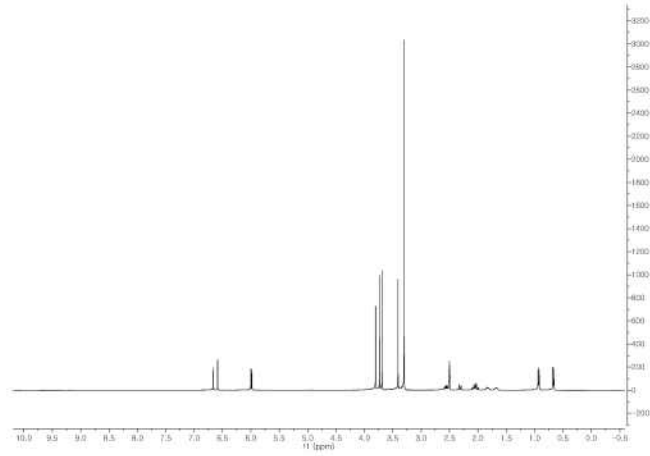
Gomisin J의 HMBC



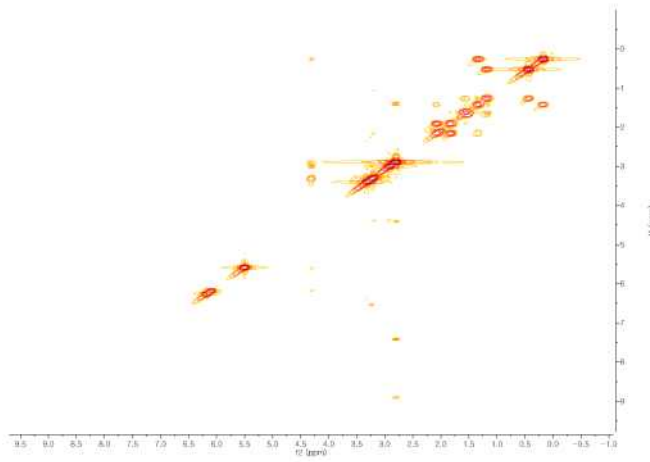
Gomisin J의 HMQC



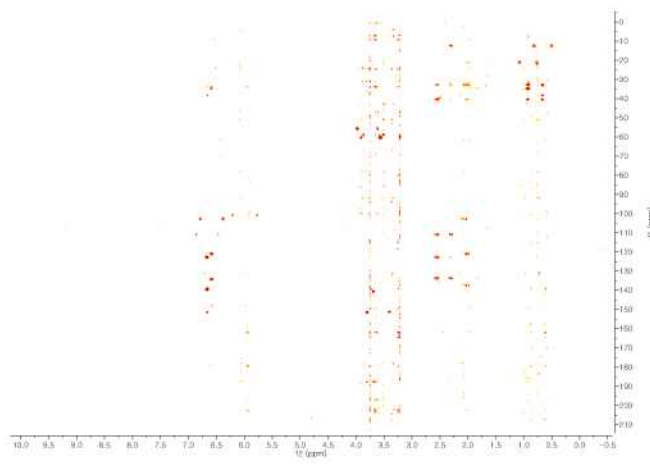
Gomisin N의 1H-NMR



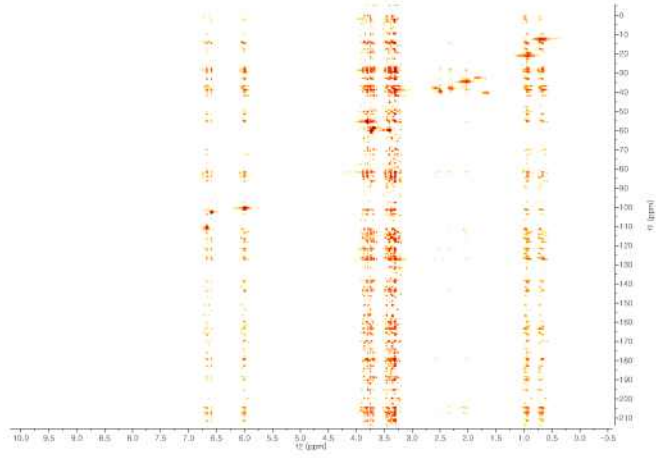
Gomisin N의 COSY



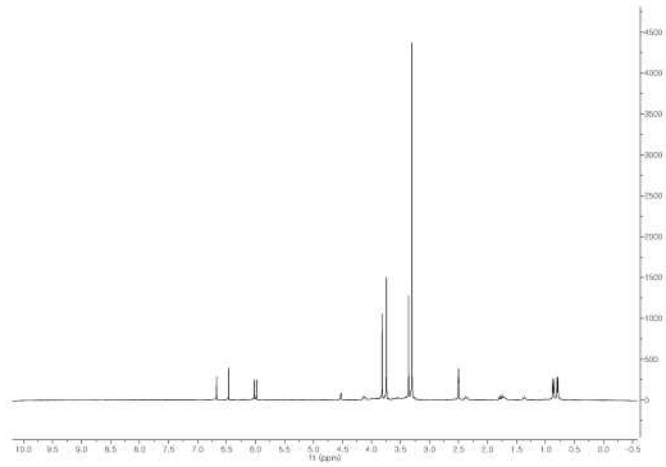
Gomisin N의 HMBC



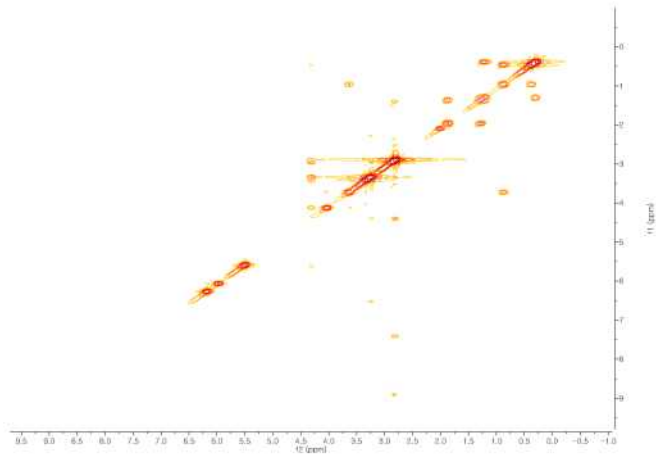
Gomisin N의 HMQC



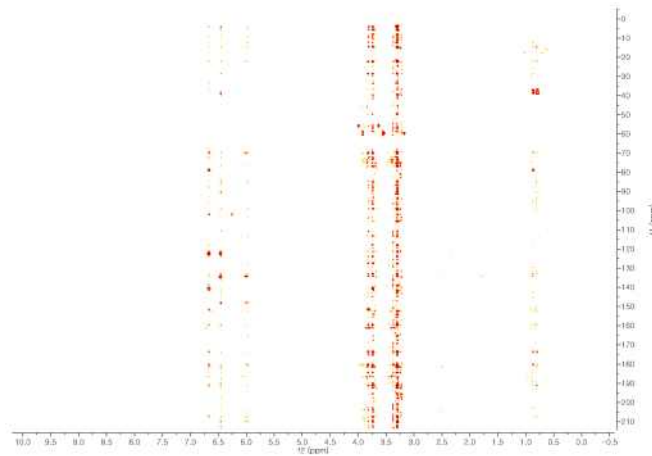
Gomisin O의  $^1\text{H-NMR}$



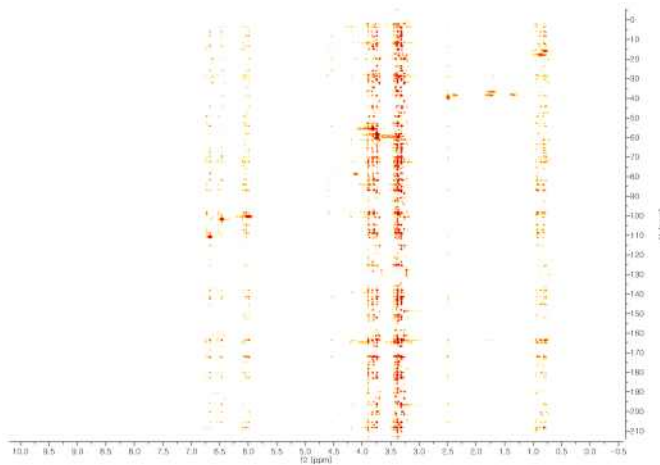
Gomisin O의 COSY



Gomisin O의 HMBC



Gomisin O의 HMQC



### 3. 오미자 에탄올 추출물에 함유된 gomisin 유도체들의 물리화학적 성질

#### 가. 연구내용

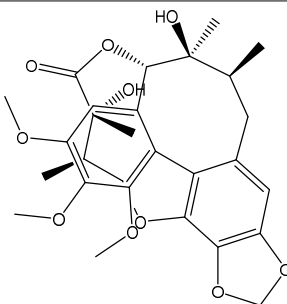
오미자 에탄올 추출물에 함유된 gomisin 유도체들의 데이터베이스 구축을 위해서 이들 화합물의 물리화학적 성질을 규명하고자 하였다.

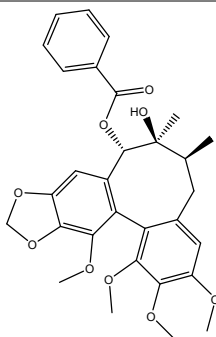
#### 나. 연구방법

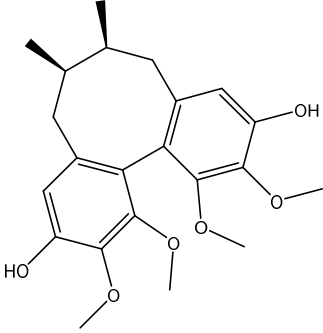
- (1) 분자구조는 PubChem에 등록된 구조를 사용하였다.
- (2) 분자식, 질량, 원소분석, 끓는점, 녹는점, LogP, 굴절률 값들은 ChemDraw program을 이용하여 확보하였다.

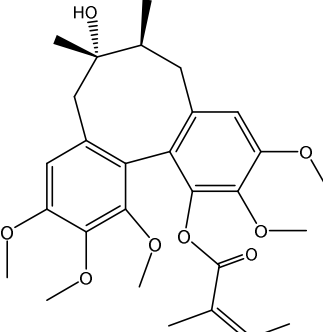
#### 다. 연구결과

- (1) 9종의 gomisin 유도체들의 물리화학적 성질은 아래 표와 같이 요약할 수 있다.

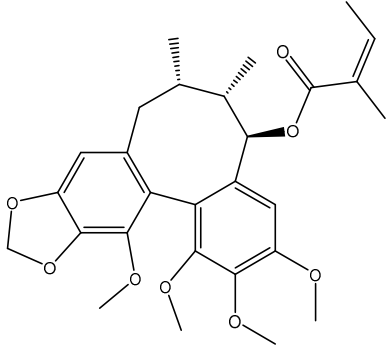
물리화학적 성질	결과
이름	Gomisin D
분자식	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>
분자구조	
질량	530.5636 g/mol
원소분석	C, 63.39%; H, 6.46%; O, 30.16%
끓는점	1344.03 K
녹는점	954.29 K
Log P	3.29
굴절률	142.07 cm <sup>3</sup> /mol

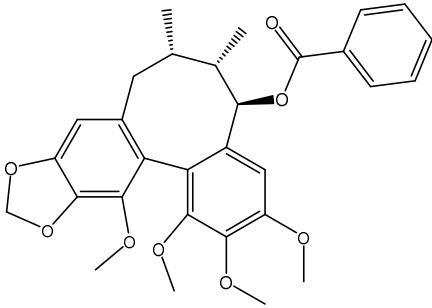
물리화학적 성질	결과
이름	Gomisin G
분자식	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>
분자구조	
질량	536.5697 g/mol
원소분석	C, 67.15%; H, 6.01%; O, 26.84%
끓는점	1313.18 K
녹는점	904.01 K
Log P	4.99
굴절률	148.47 cm <sup>3</sup> /mol

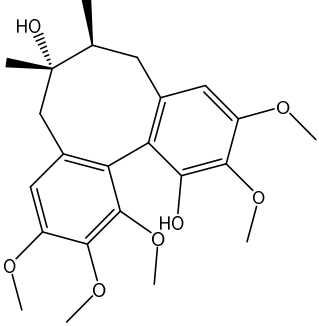
물리화학적 성질	결과
이름	Gomisin J
분자식	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	388.4541 g/mol
원소분석	C, 68.02%; H, 7.27%; O, 24.71%
끓는점	1043.46 K
녹는점	787.70 K
Log P	4.39
굴절률	111.77 cm <sup>3</sup> /mol

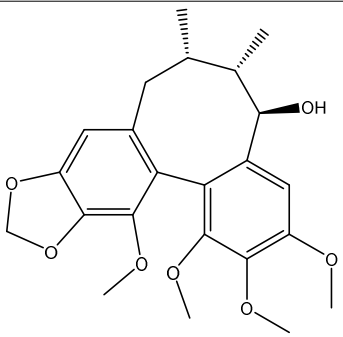
물리화학적 성질	결과
이름	Angeloylgomisin H
분자식	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>
분자구조	
질량	500.5806 g/mol
원소분석	C, 67.18%; H, 7.25%; O, 25.57%
끓는점	1206.56 K
녹는점	787.16 K
Log P	4.76
굴절률	143.04 cm <sup>3</sup> /mol



물리화학적 성질	결과
이름	<b>Angeloylgomisin O</b>
분자식	$C_{28}H_{34}O_8$
분자구조	
질량	498.5648 g/mol
원소분석	C, 67.45%; H, 6.87%; O, 25.67%
끓는점	1152.36 K
녹는점	751.29 K
Log P	5.56
굴절률	142.36 $cm^3/mol$

물리화학적 성질	결과
이름	<b>Benzoylgomisin O</b>
분자식	$C_{30}H_{32}O_8$
분자구조	
질량	520.5703 g/mol
원소분석	C, 69.22%; H, 6.20%; O, 24.59%
끓는점	1220.76 K
녹는점	819.29 K
Log P	6.06
굴절률	147.26 $cm^3/mol$

물리화학적 성질	결과
이름	<b>Gomisin H</b>
분자식	$C_{23}H_{30}O_7$
분자구조	
질량	418.4801 g/mol
원소분석	C, 66.01%; H, 7.23%; O, 26.76%
끓는점	1105.54 K
녹는점	806.72 K
Log P	3.39
굴절률	118.42 $cm^3/mol$

물리화학적 성질	결과
이름	<b>Gomisin O</b>
분자식	$C_{23}H_{28}O_7$
분자구조	
질량	416.4642 g/mol
원소분석	C, 66.33%; H, 6.78%; O, 26.89%
끓는점	1067.88 K
녹는점	732.47 K
Log P	3.93
굴절률	117.78 $cm^3/mol$

#### 4. 오미자 성분의 분석

##### 가. 연구내용

(1) 오미자에는 다양한 종류의 lignan이 포함되어 있다. 본 연구에서는 오미자에 포함된 lignan을 분취하였다.

##### 나. 연구방법

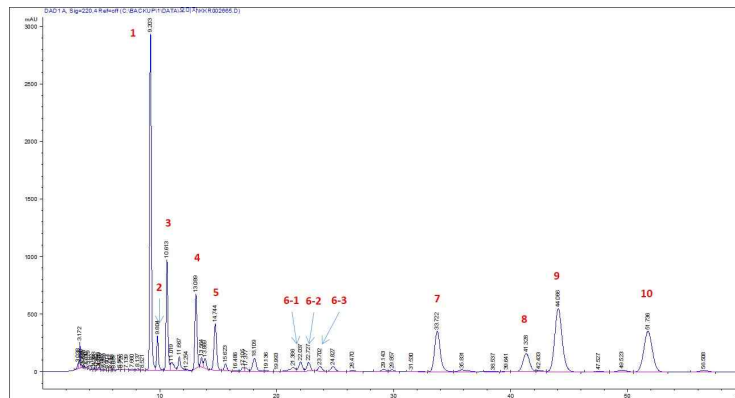
(1) 분석장비는 Agilent 1260 infinity를 사용하였고 Symmetry 4.6x250mm (5um) column으로 분석하였다.

(2) 이동상은 65% aqueous acetonitrile을 사용하여 220nm에서 분석하였다.

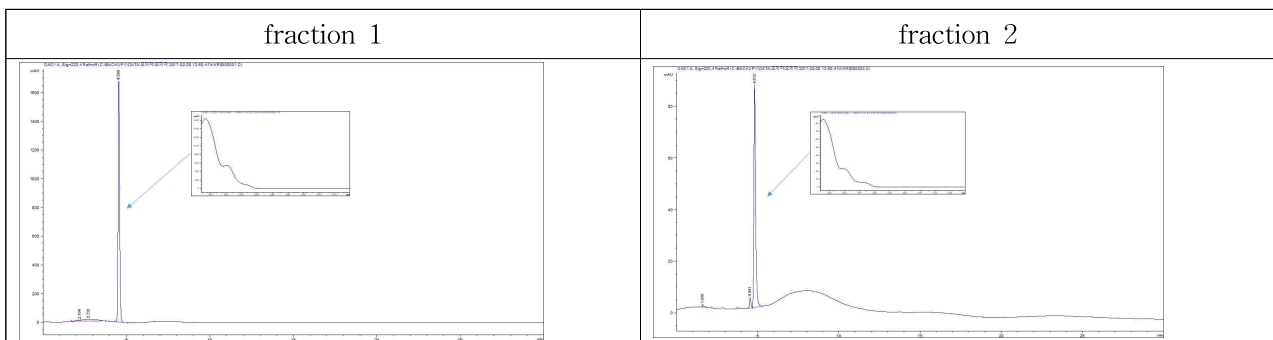
(3) 자세한 분석방법은 기존에 발표한 논문에서 기재된 방법을 따랐다 [J. Microbiol. Biotechnol. 20:1359 (2010)]

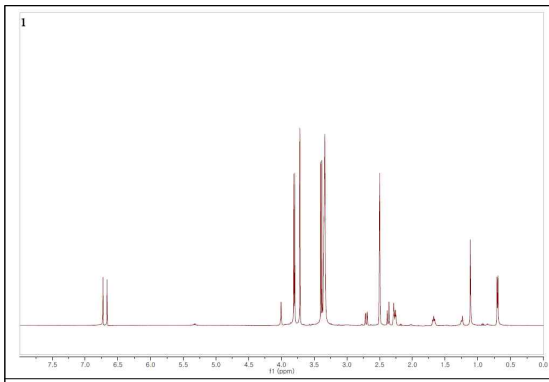
##### 다. 연구결과

(1) 총 12개 분획을 분취하였고 chromatogram은 아래와 같다.

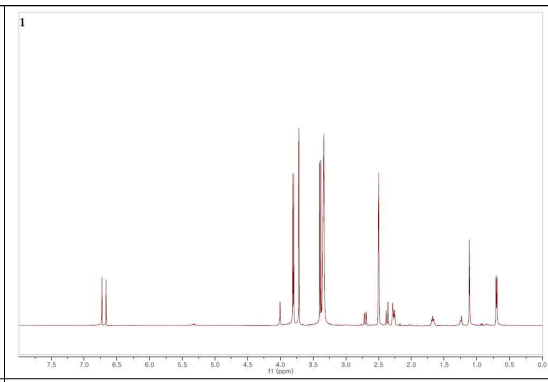


(2) 위의 chromatogram에 표시된 12개 분획의 HPLC chromatogram과 NMR spectrum은 아래와 같다.

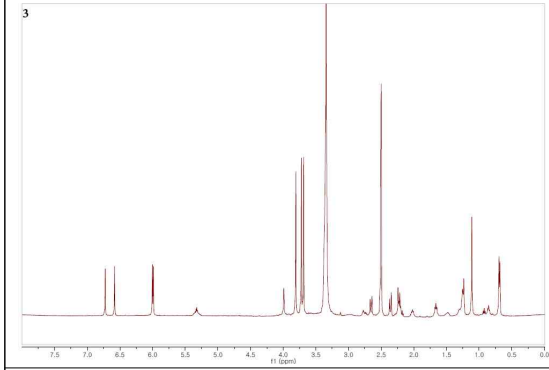
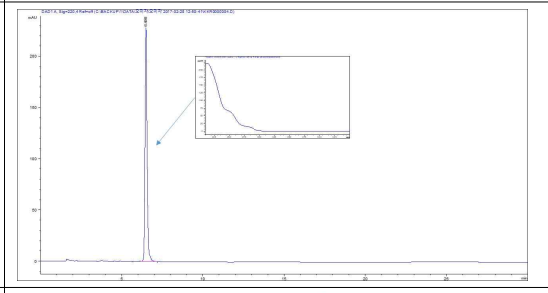
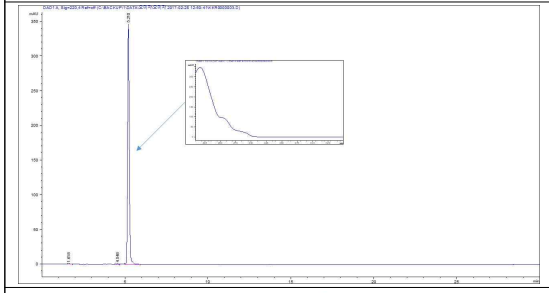




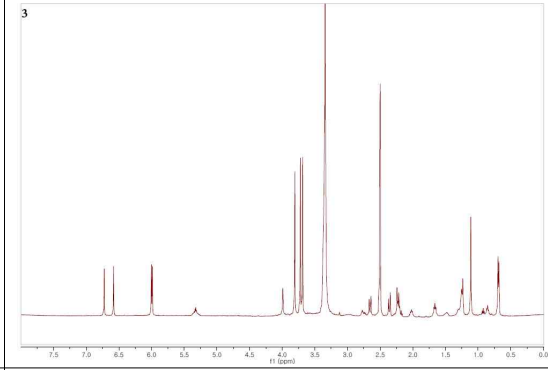
fraction 3



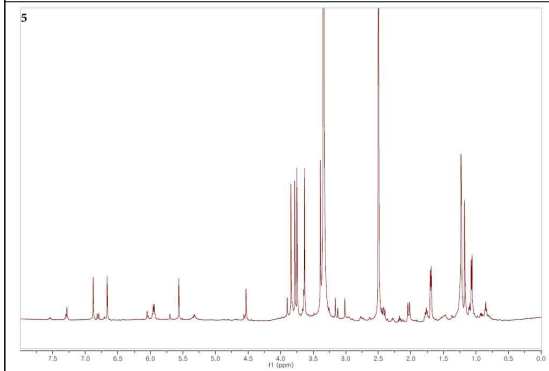
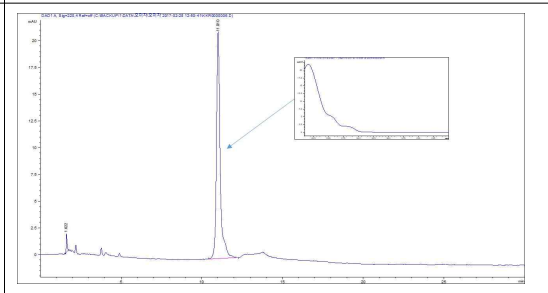
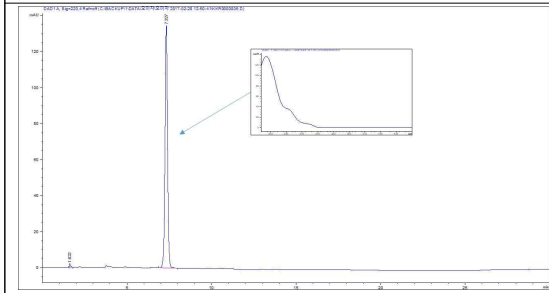
fraction 4



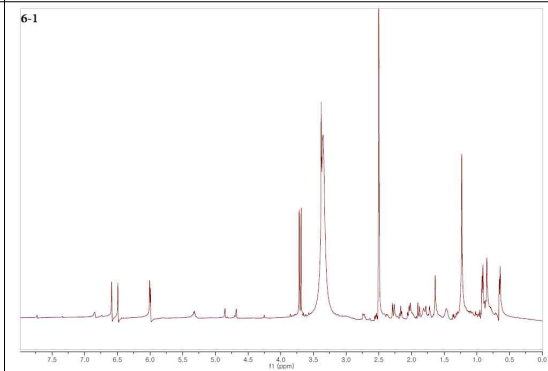
fraction 5



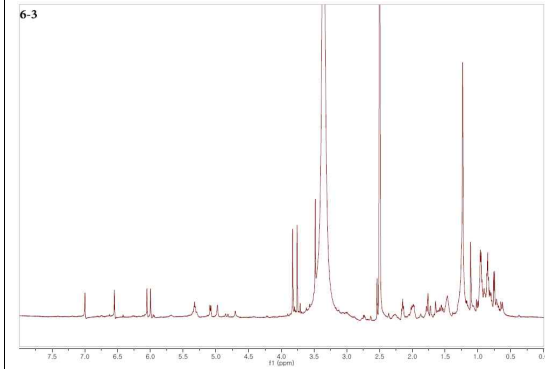
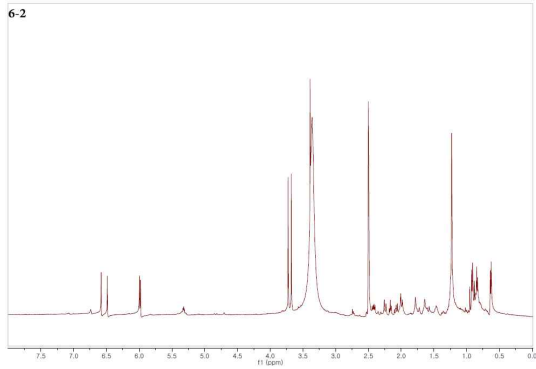
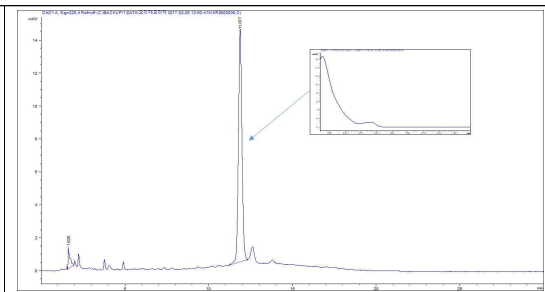
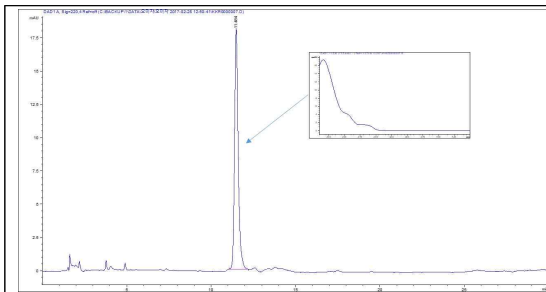
fraction 6-1



fraction 6-2

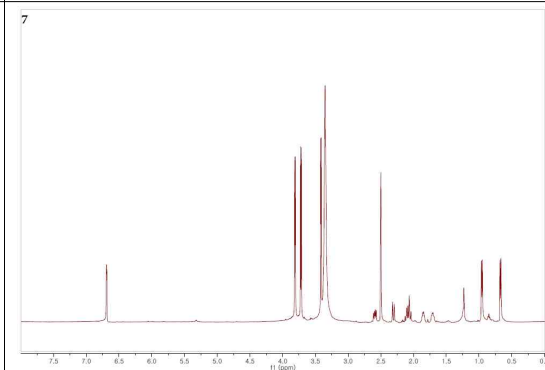
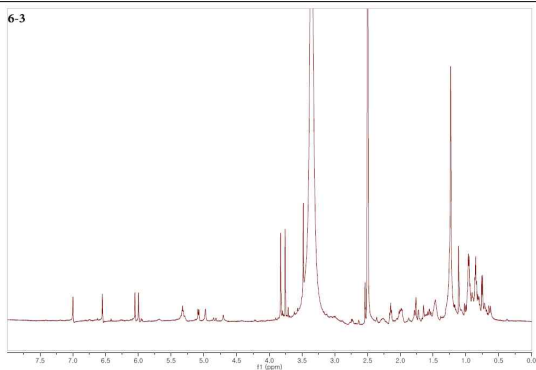
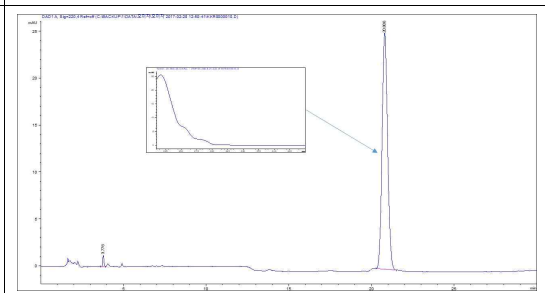
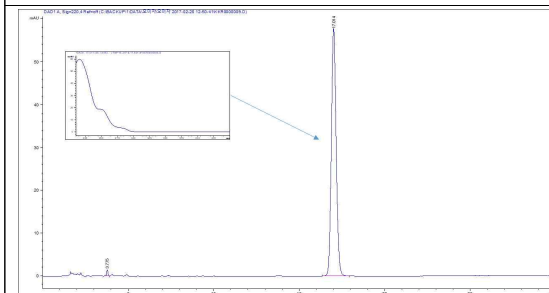


fraction 6-3



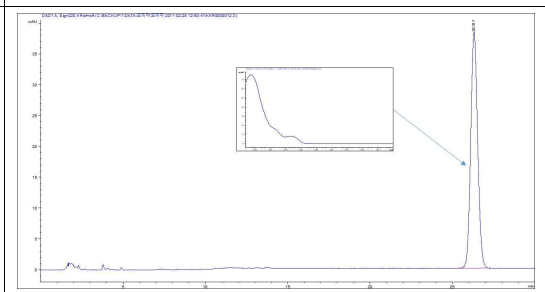
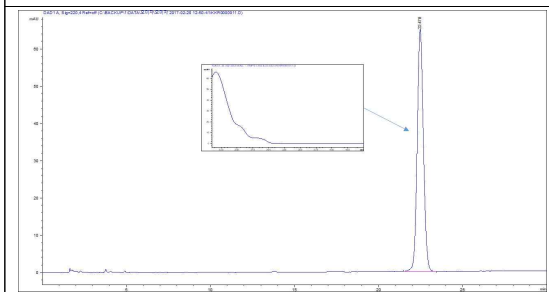
fraction 7

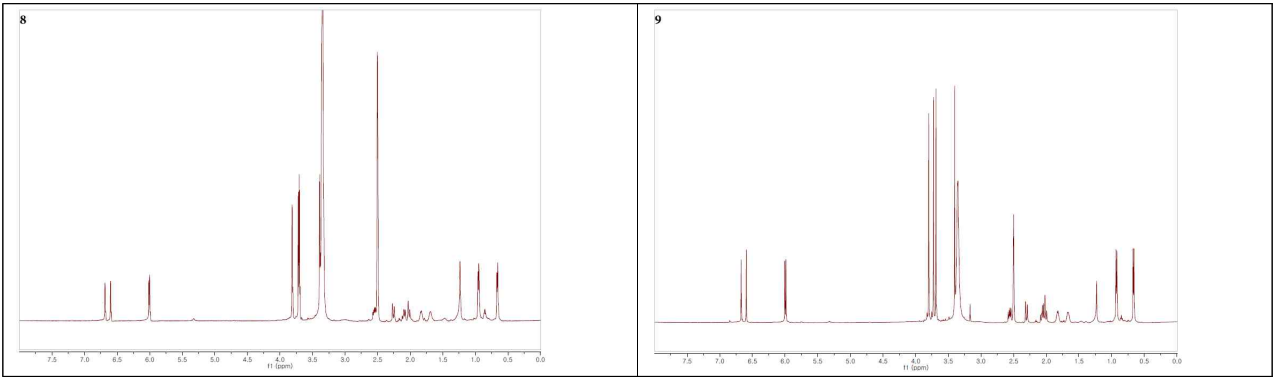
fraction 8



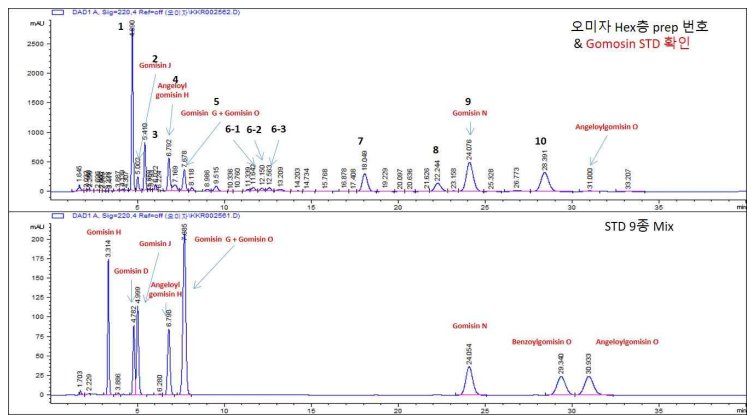
fraction 9

fraction 10





(3) 오미자에 함유된 것으로 알려진 성분들의 authentic samples의 chromatogram과 위에서 언급한 오미자 추출물의 분획chromatogram을 아래와 같이 비교한 결과 fraction 1, 2, 4, 9는 각각 gomisin D, gomisin J, angeloyl gomisin H, gomisin N으로 확인이 되었고 fraction 5는 gomisin G와 gomisin O의 mixture인 것으로 확인되었다.



## 2절. 당귀가 함유하고 있는 유효성분

당귀는 우리나라에서 대표적인 약용작물의 하나로 진정, 진통, 진경, 항암, 뇌세포보호, 항염증, 면역증강, 혈소판응집, 항균작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 생산량은 1995년에 7천톤으로 정점에 이른 후 계속 감소하여 현재는 3천톤 내외이다. 당귀는 토당귀와 일당귀가 주종인데 약제로 수입된 경우는 없고 식품으로 분류되어 수입이 되어 왔는데 2001년 960톤이 수입된 이후 계속 감소하여 현재는 100톤 정도에 이르고 있는바, 이는 국산 당귀와 수입 당귀의 가격이 유사해졌기 때문이다. 생산량의 70%는 의약용을 사용되고 30%는 음료 등의 식품용으로 소비된다. 수익성은 46% 정도로 구기자의 31%, 천궁의 42%보다는 높으나 백수오의 65%보다는 낮은 실정이다 (국립산림과학원 ‘산지약용자원의 생산 및 유통실태(III)’ 2012년).

### 1. 당귀 함유 성분들의 HPLC data 및 NMR data

#### 가. 연구내용

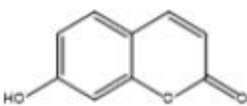
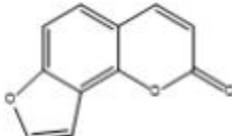
- (1) 당귀가 함유한 17종의 성분들에 대한 HPLC 및 NMR data를 확보하였다.
- (2) 7-hydroxycoumarin, angelicin, byakangelicin, byakangelicol, isoimperatorin, isopimpinellin, osthol, phellopterin, xanthotoxol, oxypeucedanin, decursin, decrusinol angelate, asarone, nodakenin, decrusinol, ferulic acid

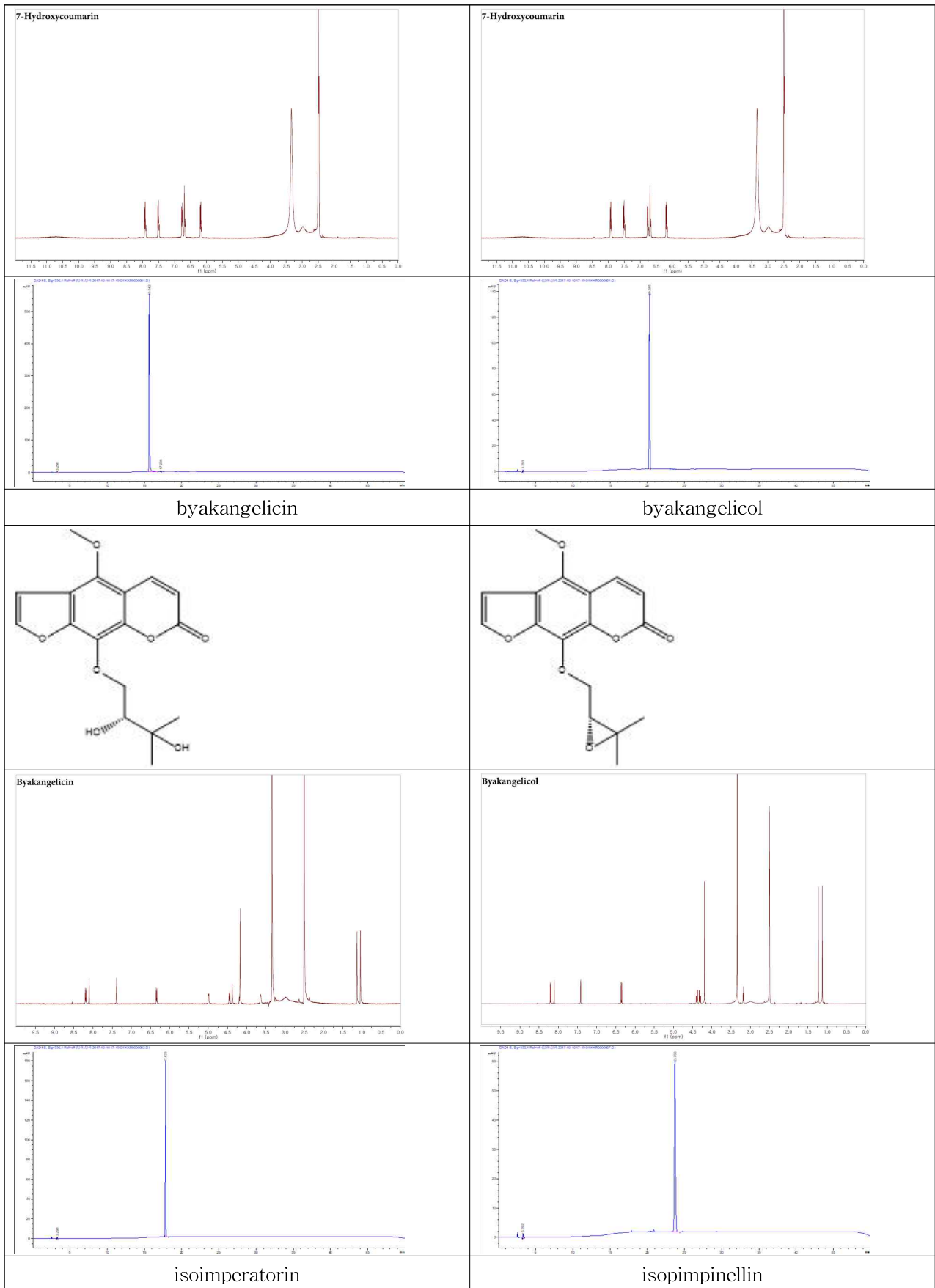
#### 나. 연구방법

- (1) 당귀의 유효성분의 NMR data를 확보하기 위하여 Bruker Avance 400 NMR spectrometer로 NMR 실험을 수행하였다. 각 시료들은 DMSO-d<sub>6</sub>에 녹여서 2.5 mm NMR tube에 넣어서 실험하였다.
- (2) 당귀의 유효성분의 chromatogram을 확보하기 위하여 HPLC는 Agilent 1260 Infinity 기기를 사용하였고, Symmetry column (4.6 x 250mm, 5um)을 장착하여 분석하였다. 실험한 온도는 30°C였고, 이동상은 65% acetonitrile로 1.2 mL/min의 유속으로 분석하였다. injection volume은 10 uL, UV/VIS detector로 220nm에서 분석하였다.

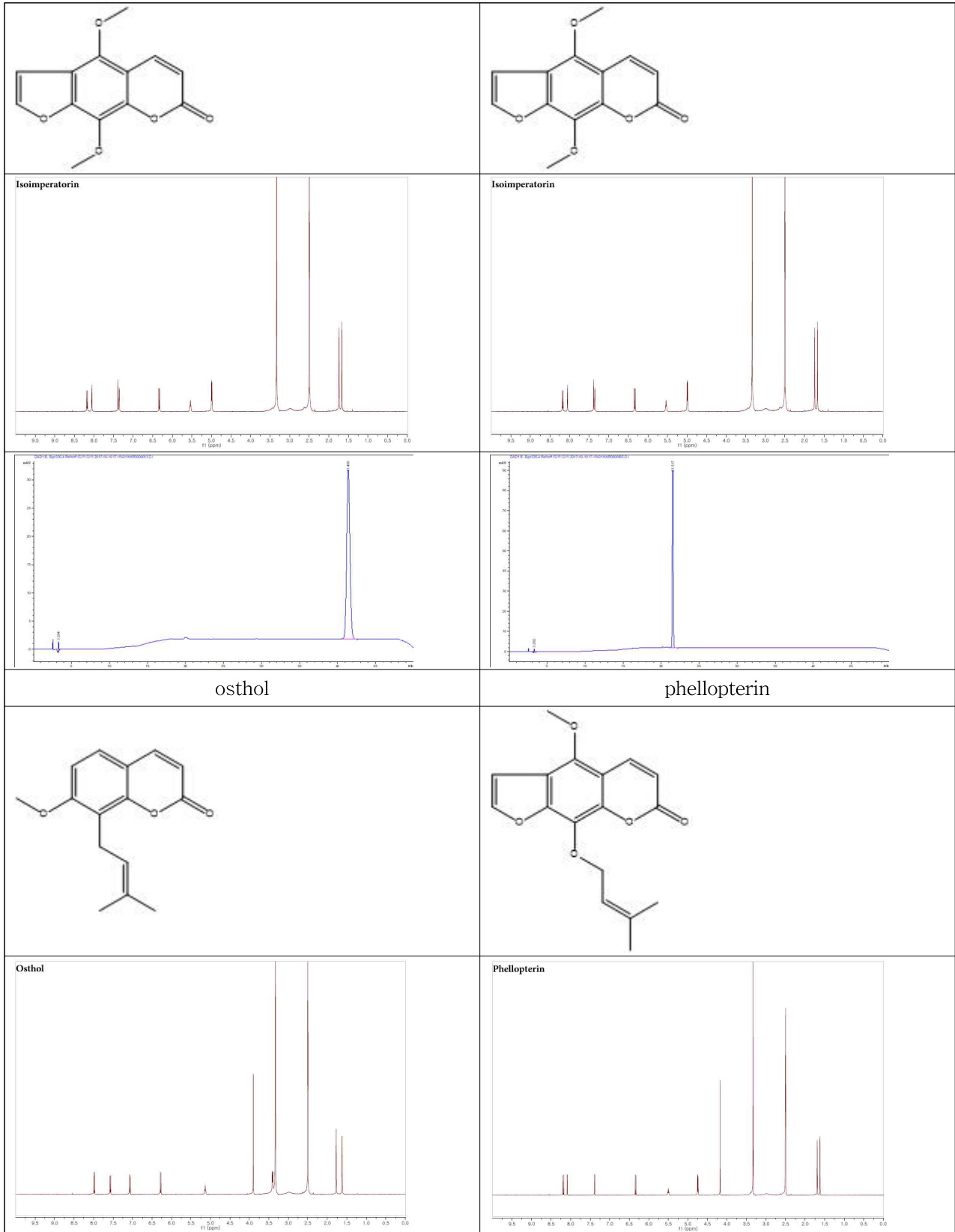
#### 다. 연구결과

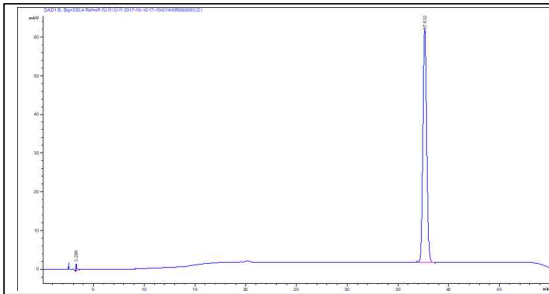
- (1) 17종 성분의 구조, HPLC 및 NMR data는 아래와 같다.

7-hydroxycoumarin	angelicin
	

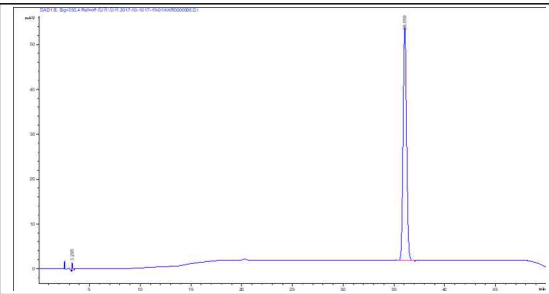
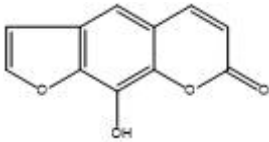




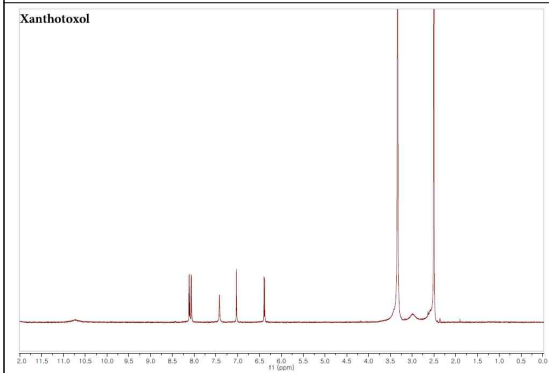
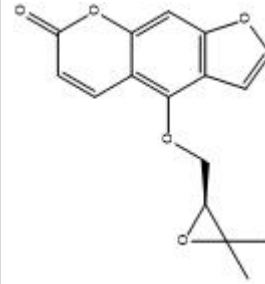




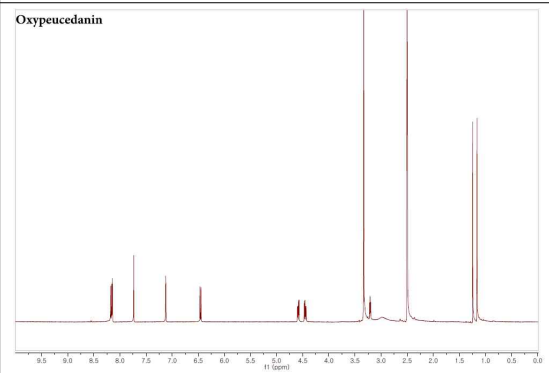
xanthotoxol



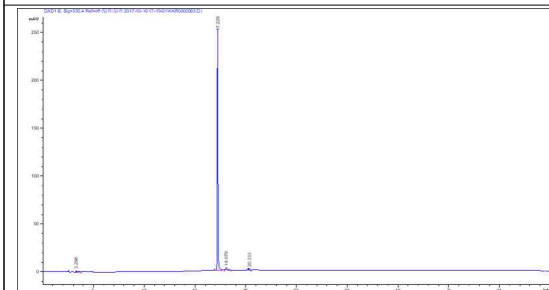
oxypeucedanin



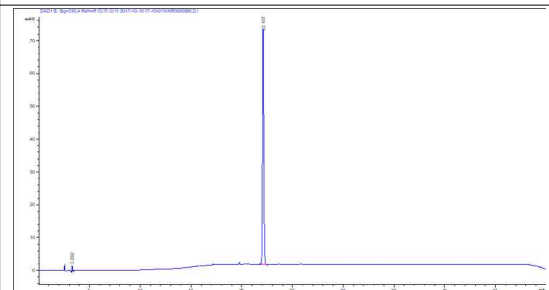
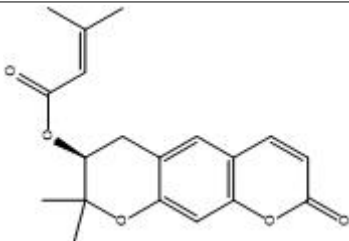
Xanthotoxol



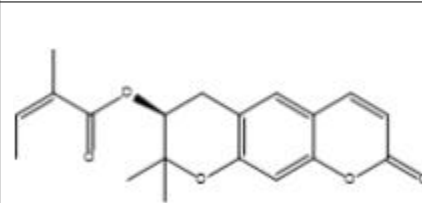
Oxypeucedanin

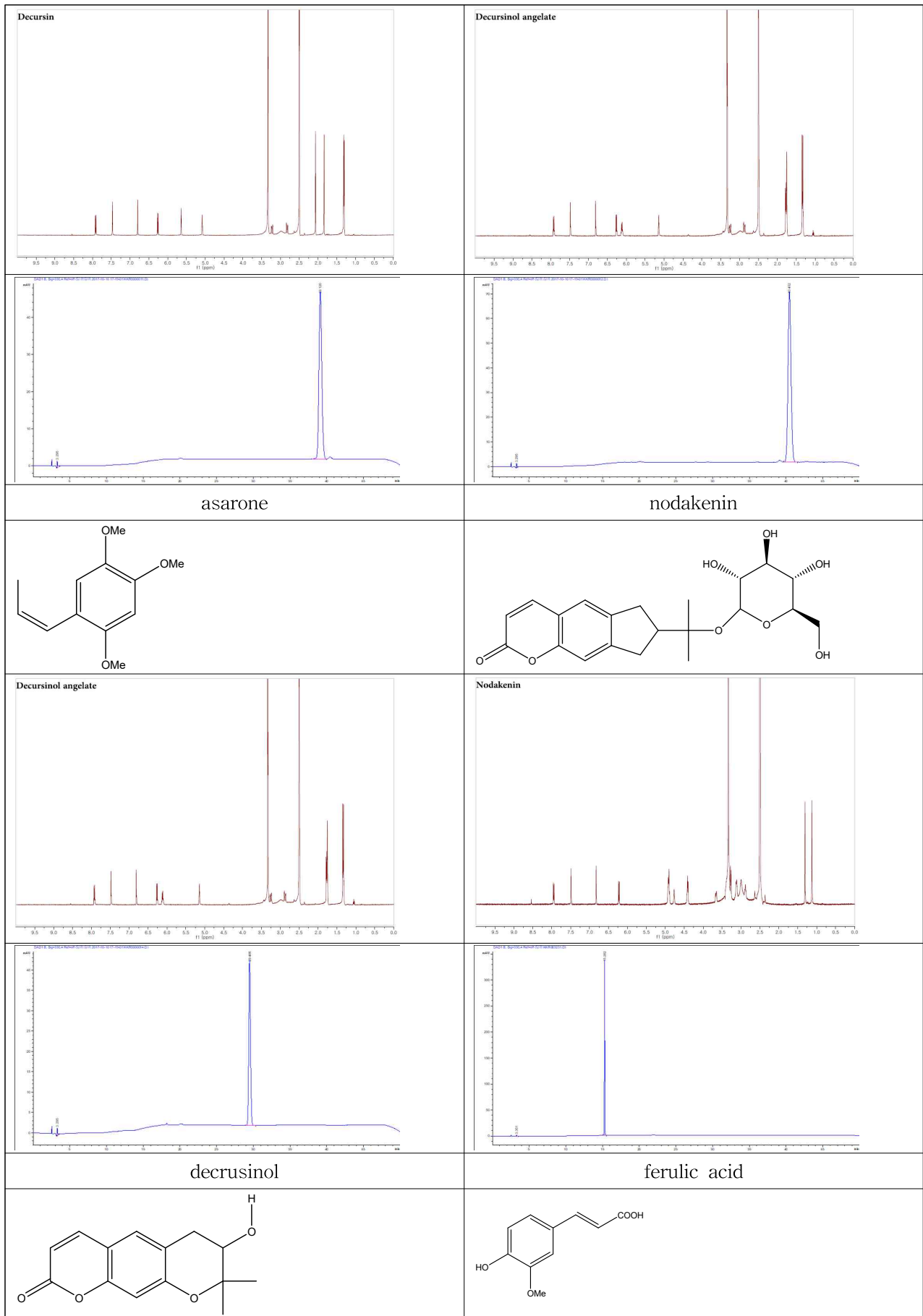


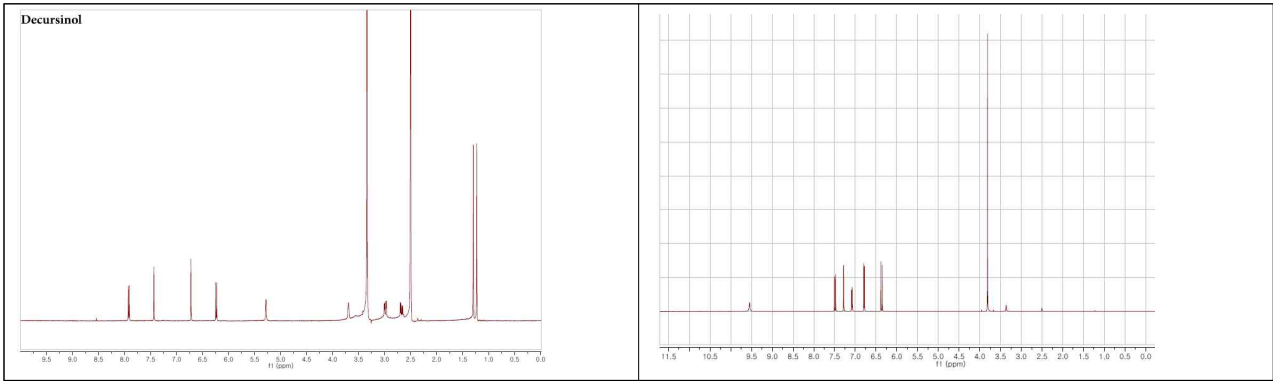
decursin



decrusinol angelate







## 2. 당귀 함유 성분들 중 decursin, decursinol, decursinol angelate, chlorogenic acid의 안정성 시험

### 가. 연구내용

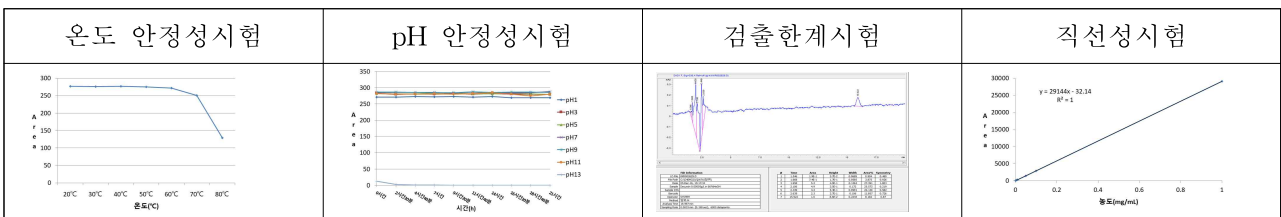
- (1) 당귀의 지표성분으로는 decursin, decursinol이 알려져 있는데 이 2종에 더하여 decursinol angelate, chlorogenic acid의 온도 및 pH에 대한 안정성 시험을 수행하였다.
- (2) 4종의 성분에 대한 검출한계 시험과 직선성 시험을 수행하였다.

### 나. 연구방법

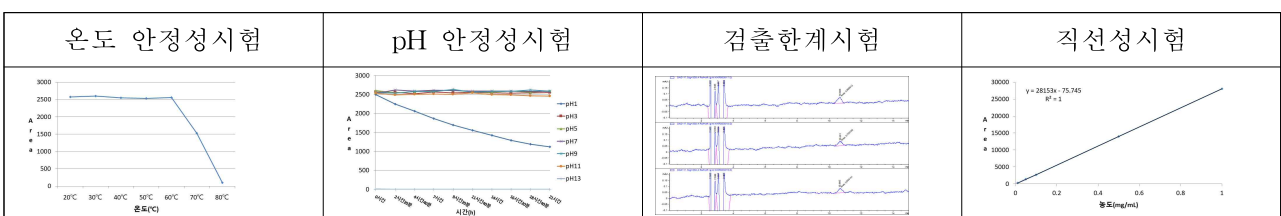
- (1) 안정성 실험은 HPLC 방법을 적용하였는데 앞서 성분 분석한 조건과 모두 동일하고 단지 이동상만 70% acetonitrile을 사용한 것만 다르다.
- (2) 검출한계 (detection limit) 실험조건은 온도 및 pH에 대한 안정성 시험 분석 조건과 동일하게 수행하였다.

### 다. 연구결과

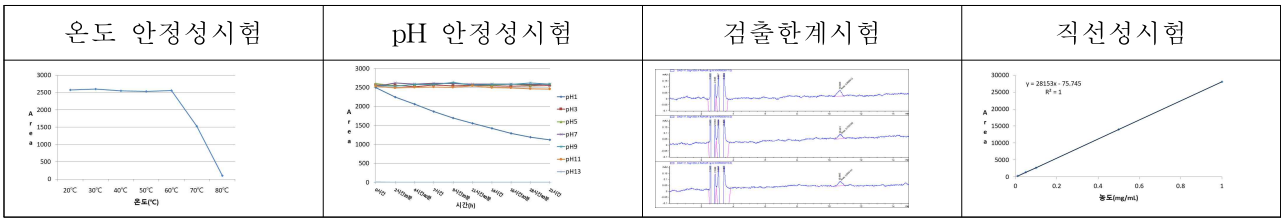
- (1) decursin의 온도, pH에 대한 안정성시험, 검출한계시험, 직선성시험 결과 (60도, pH13까지는 안정함)



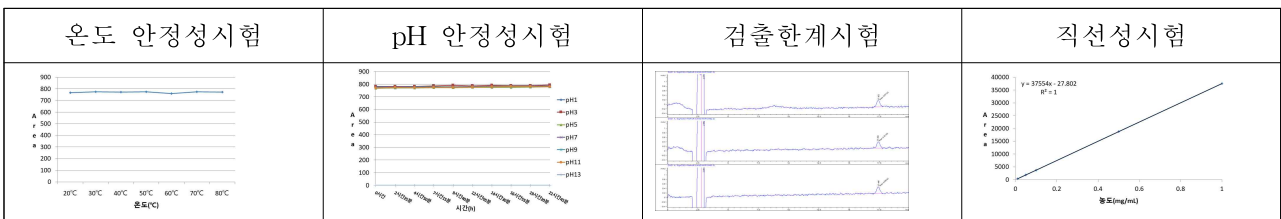
- (2) decursinol angelate의 온도, pH에 대한 안정성 시험, 검출한계 시험, 직선성 시험 결과 (75도, pH13까지는 안정함)



(3) chlorogenic acid의 온도, pH에 대한 안정성 시험, 검출한계 시험, 직선성 시험 결과 (65도, pH11까지는 안정)



(4) decrusinol의 온도, pH에 대한 안정성 시험, 검출한계 시험, 직선성 시험 결과 (80도, pH13까지는 안정함)



### 3. 당귀 함유 성분들 중 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusino의 물리화학적성질

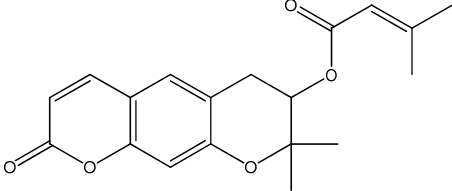
#### 가. 연구내용

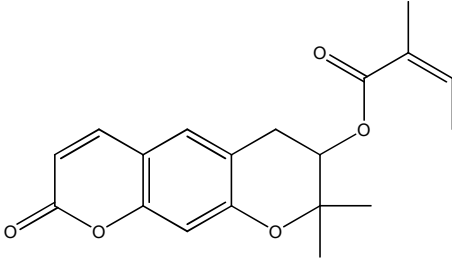
(1) 당귀 함유 성분 중 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol에 대한 물리화학적 성질을 규명하였다.

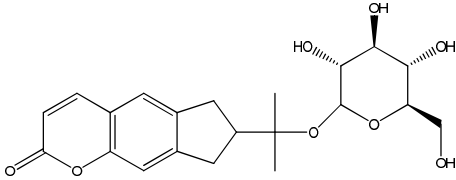
#### 나. 연구방법

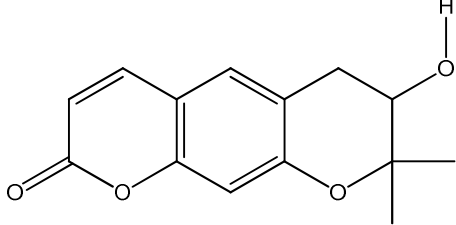
- (1) 분자구조는 PubChem에 등록된 구조를 사용하였다.
- (2) 분자식, 질량, 원소분석, 끓는점, 녹는점, LogP, 굴절률 값들은 ChemDraw program을 이용하여 확보하였다.

#### 다. 연구결과

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	decrusin
IUPAC name	2,2-dimethyl-8-oxo-2,3,4,8-tetrahydropyrano[3,2-g]chromen-3-yl 3-methylbut-2-enoate
분자식	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>
분자구조	
질량	328.1311g/mol
원소분석	C, 69.50%; H, 6.14%; O, 24.36%
끓는점	836.25 K
녹는점	520.10 K
Log P	3.13
굴절률	93.23 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	decrusinol angelate
IUPAC name	(Z)-2,2-dimethyl-8-oxo-2,3,4,8-tetrahydropyrano[3,2-g]chromen-3-yl 2-methylbut-2-enoate
분자식	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>
분자구조	
질량	328.1311 g/mol
원소분석	C, 69.50%; H, 6.14%; O, 24.36%
끓는점	836.25 K
녹는점	520.10 K
Log P	3.31
굴절률	93.03 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	nodakenin
IUPAC name	7-(2-(((3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)propan-2-yl)-7,8-dihydrocyclopenta[g]chromen-2(6H)-one
분자식	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>
분자구조	
질량	406.1628 g/mol
원소분석	C, 62.06%; H, 6.45%; O, 31.49%
끓는점	1208.69 K
녹는점	761.56K
Log P	0.71
굴절률	104.86 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	decrusinol
IUPAC name	7-hydroxy-8,8-dimethyl-7,8-dihydropyrano[3,2-g]chromen-2(6H)-one
분자식	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	246.0892 g/mol
원소분석	C, 68.28%; H, 5.73%; O, 25.99%
끓는점	751.77 K
녹는점	501.28 K
Log P	1.68
굴절률	68.45 cm <sup>3</sup> /mol

### 3절. 인삼 함유하고 있는 유효성분

#### 1. 인삼에 함유된 ginsenoside 분석

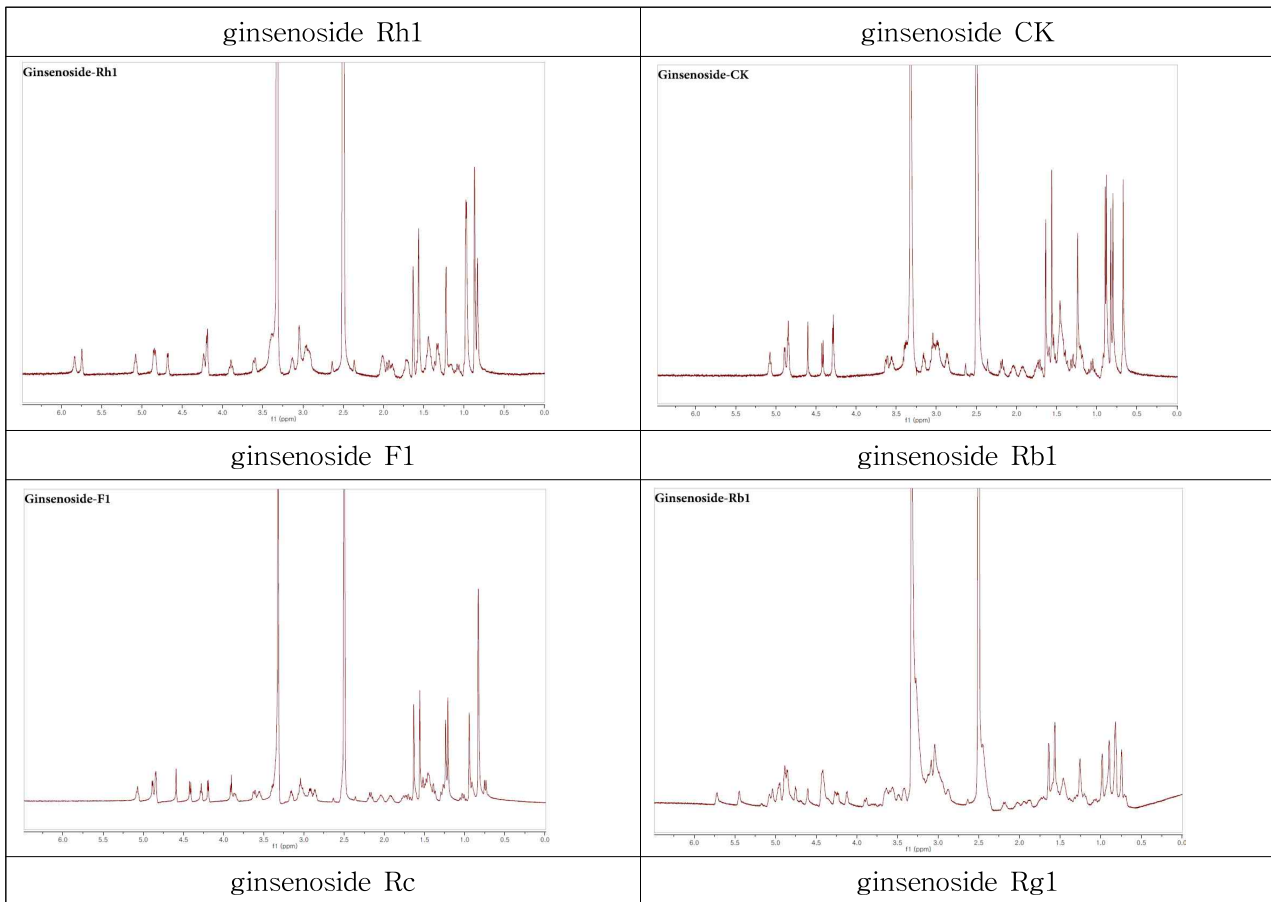
##### 가. 연구내용

인삼에는 다양한 종류의 ginsenoside가 포함되어 있다. 본 연구에서는 이들의 <sup>1</sup>H-NMR 실험을 수행하였다.

##### 나. 연구방법

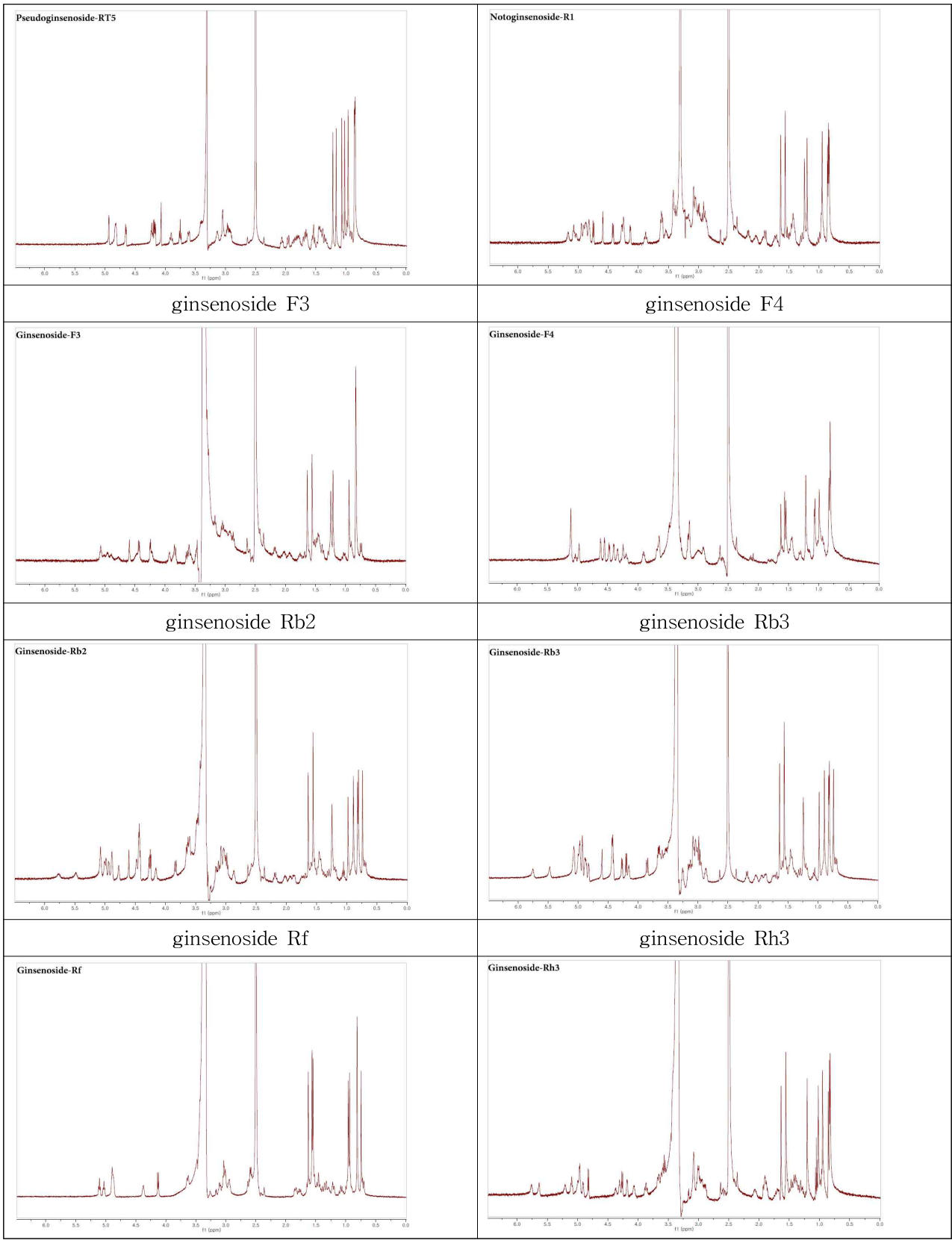
NMR 실험에 사용한 기기는 Bruker Avance 400 NMR spectrometer였고, 각 시료들은 DMSO-d<sub>6</sub>에 녹여서 2.5 mm NMR tube에 넣어서 실험하였다.

##### 다. 연구결과









#### 4절. 당귀 함유 성분들의 물리화학적성질

##### 가. 연구내용

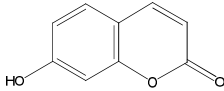
(1) 당귀 함유 성분 중 소량으로 함유된 성분들에 대한 물리화학적 성질을 규명하였다.

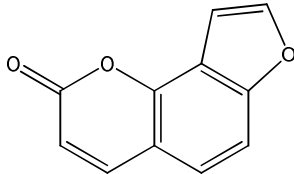
##### 나. 연구방법

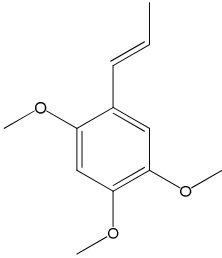
(1) 분자구조는 PubChem에 등록된 구조를 사용하였다.

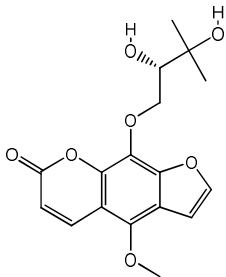
(2) 분자식, 질량, 원소분석, 끓는점, 녹는점, LogP, 굴절률 값들은 ChemDraw program을 이용하여 확보하였다.

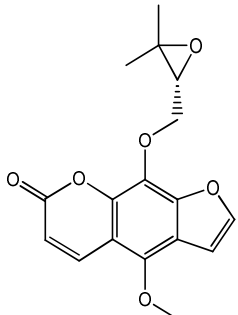
##### 다. 연구결과

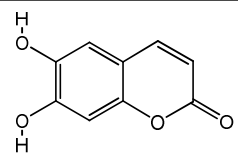
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	7-Hydroxycoumarin
IUPAC name	7-hydroxy-2H-chromen-2-one
분자식	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
분자구조	
질량	162.0317g/mol
원소분석	C, 66.67%; H, 3.73%; O, 29.60%
끓는점	582.32 K
녹는점	410.14 K
Log P	1.44
굴절률	43.91 cm <sup>3</sup> /mol

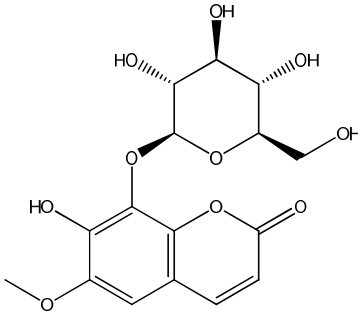
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Angelicin
IUPAC name	2H-furo[2,3-h]chromen-2-one
분자식	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
분자구조	
질량	186.0317g/mol
원소분석	C, 70.97%; H, 3.25%; O, 25.78%
끓는점	594.94 K
녹는점	395.51 K
Log P	1.44
굴절률	51.78 cm <sup>3</sup> /mol

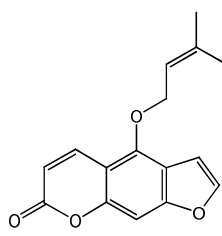
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Asarone
IUPAC name	(E)-1,2,4-trimethoxy-5-(prop-1-en-1-yl)benzene
분자식	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>
분자구조	
질량	208.1099g/mol
원소분석	C, 69.21%; H, 7.74%; O, 23.05%
끓는점	587.20 K
녹는점	350.09 K
Log P	2.66
굴절률	63.49 cm <sup>3</sup> /mol

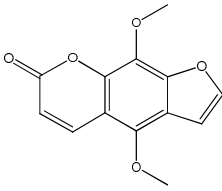
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Byakangelicin
IUPAC name	(S)-9-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-4-methoxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>
분자구조	
질량	334.1053g/mol
원소분석	C, 61.07%; H, 5.43%; O, 33.50%
끓는점	967.71 K
녹는점	641.69 K
Log P	0.67
굴절률	87.74 cm <sup>3</sup> /mol

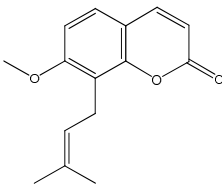
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Byakangelicol
IUPAC name	(R)-9-((3,3-dimethyloxiran-2-yl)methoxy)-4-methoxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	316.0947g/mol
원소분석	C, 64.55%; H, 5.10%; O, 30.35%
끓는점	816.28 K
녹는점	596.80 K
Log P	1.30
굴절률	84.45 cm <sup>3</sup> /mol

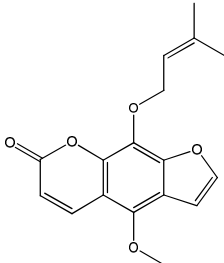
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Esculetin
IUPAC name	6,7-dihydroxy-2H-chromen-2-one
분자식	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	178.0266g/mol
원소분석	C, 60.68%; H, 3.39%; O, 35.93%
끓는점	662.94 K
녹는점	521.86 K
Log P	1.05
굴절률	45.72 cm <sup>3</sup> /mol

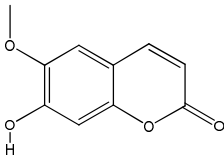
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Fraxin
IUPAC name	7-hydroxy-6-methoxy-8-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2H-chromen-2-one
분자식	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>
분자구조	
질량	370.0900g/mol
원소분석	C, 51.89%; H, 4.90%; O, 43.21%
끓는점	1193.82 K
녹는점	818.80 K
Log P	-0.92
굴절률	86.92 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Isoimperatorin
IUPAC name	4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	270.0892g/mol
원소분석	C, 71.10%; H, 5.22%; O, 23.68%
끓는점	740.78 K
녹는점	467.57 K
Log P	2.55
굴절률	78.63 cm <sup>3</sup> /mol

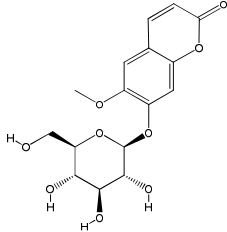
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Isopimpinellin
IUPAC name	4,9-dimethoxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
분자구조	
질량	246.0528g/mol
원소분석	C, 63.42%; H, 4.09%; O, 32.49%
끓는점	695.50 K
녹는점	487.55 K
Log P	1.18
굴절률	66.28 cm <sup>3</sup> /mol

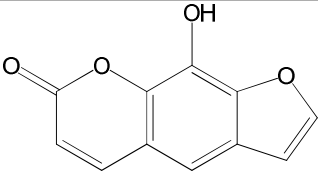
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Osthol
IUPAC name	7-methoxy-8-(3-methylbut-2-en-1-yl)-2H-chromen-2-one
분자식	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>
분자구조	
질량	244.1099g/mol
원소분석	C, 73.75%; H, 6.60%; O, 19.65%
끓는점	675.40 K
녹는점	394.27 K
Log P	3.29
굴절률	74.64 cm <sup>3</sup> /mol

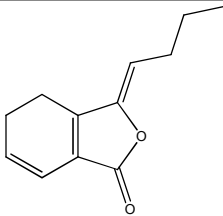
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Phellopterin
IUPAC name	4-methoxy-9-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
분자구조	
질량	300.0998g/mol
원소분석	C, 67.99%; H, 5.37%; O, 26.64%
끓는점	791.06 K
녹는점	513.59 K
Log P	2.42
굴절률	85.88 cm <sup>3</sup> /mol

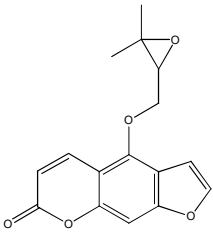
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Scopoletin
IUPAC name	7-hydroxy-6-methoxy-2H-chromen-2-one
분자식	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	192.0423g/mol
원소분석	C, 62.50%; H, 4.20%; O, 33.30%
끓는점	632.60 K
녹는점	456.16 K
Log P	1.31
굴절률	51.16 cm <sup>3</sup> /mol



물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Scopolin
IUPAC name	6-methoxy-7-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2H-chromen-2-one
분자식	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
분자구조	
질량	354.0951g/mol
원소분석	C, 54.24%; H, 5.12%; O, 40.64%
끓는점	1113.20 K
녹는점	707.08 K
Log P	-0.53
굴절률	85.11 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Xanthotoxol
IUPAC name	9-hydroxy-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	202.0266g/mol
원소분석	C, 65.35%; H, 2.99%; O, 31.66%
끓는점	675.56 K
녹는점	507.23 K
Log P	1.05
굴절률	53.60 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Z-Ligustilide
IUPAC name	(Z)-3-butylidene-4,5-dihydroisobenzofuran-1(3H)-one
분자식	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
분자구조	
질량	190.0994g/mol
원소분석	C, 75.76%; H, 7.42%; O, 16.82%
끓는점	574.39 K
녹는점	344.59 K
Log P	1.84
굴절률	58.25 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Oxypeucedanin
IUPAC name	4-((3,3-dimethyloxiran-2-yl)methoxy)-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one
분자식	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>
분자구조	
질량	286.0841g/mol
원소분석	C, 67.13%; H, 4.93%; O, 27.94%
끓는점	766.00 K
녹는점	550.78 K
Log P	1.43
굴절률	77.20 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Angelol A
IUPAC name	(Z)-(1R,2S)-1,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-6-yl)-3-methylbutan-2-yl 2-methylbut-2-enoate
분자식	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>
분자구조	
질량	376.1522g/mol
원소분석	C, 63.82%; H, 6.43%; O, 29.75%
끓는점	1028.27 K
녹는점	587.01 K
Log P	2.22
굴절률	102.53 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside
IUPAC name	(3R,4R)-4-(3,4-dimethoxybenzyl)-3-(3-methoxy-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)benzyl)dihydrofuran-2(3H)-one
분자식	C <sub>33</sub> H <sub>44</sub> O <sub>16</sub>
분자구조	
질량	696.2629g/mol
원소분석	C, 56.89%; H, 6.37%; O, 36.74%
끓는점	1907.21 K
녹는점	1190.99 K
Log P	-0.07
굴절률	169.14 cm <sup>3</sup> /mol

## 5절. 오미자 함유 성분들의 물리화학적성질

### 가. 연구내용

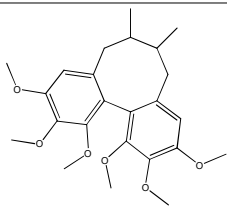
(1) 오미자 함유 성분 중 소량으로 함유된 성분들에 대한 물리화학적 성질을 규명하였다.

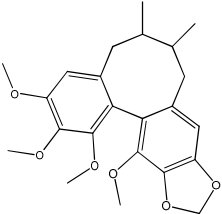
### 나. 연구방법

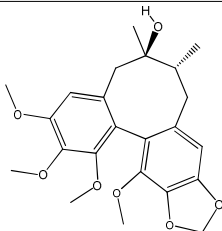
(1) 분자구조는 PubChem에 등록된 구조를 사용하였다.

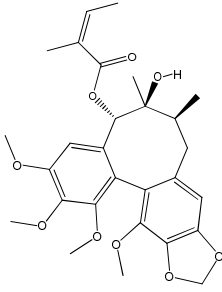
(2) 분자식, 질량, 원소분석, 끓는점, 녹는점, LogP, 굴절률 값들은 ChemDraw program을 이용하여 확보하였다.

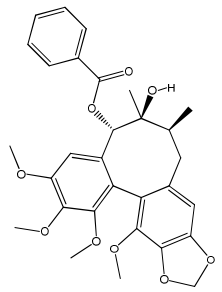
### 다. 연구결과

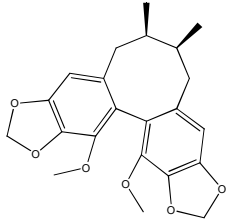
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Doxyschizandrin
IUPAC name	1,2,3,10,11,12-hexamethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrodibenz[ a,c][8]annulene
분자식	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	416.2199g/mol
원소분석	C, 69.21%; H, 7.74%; O, 23.05%
끓는점	982.78 K
녹는점	656.30 K
Log P	4.92
굴절률	122.64 cm <sup>3</sup> /mol

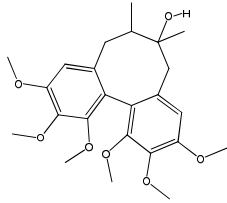
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Schisandrin B
IUPAC name	1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxole
분자식	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	400.1886g/mol
원소분석	C, 68.98%; H, 7.05%; O, 23.97%
끓는점	980.37 K
녹는점	675.89 K
Log P	4.95
굴절률	116.32 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Schizandrol B (Gomisin A)
IUPAC name	(6R,7R)-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-ol
분자식	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>
분자구조	
질량	416.1835g/mol
원소분석	C, 66.33%; H, 6.78%; O, 26.89%
끓는점	1072.79 K
녹는점	760.61 K
Log P	3.68
굴절률	117.54 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Schisantherin B (Gomisin B)
IUPAC name	(Z)-(5S,6S,7S)-6-hydroxy-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-5-yl 2-methylbut-2-enoate
분자식	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>
분자구조	
질량	514.2203g/mol
원소분석	C, 65.36%; H, 6.66%; O, 27.98%
끓는점	1244.78 K
녹는점	836.01 K
Log P	4.49
굴절률	143.57 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Schisantherin A (Gomisin C)
IUPAC name	(5S,6S,7S)-6-hydroxy-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-5-yl benzoate
분자식	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>
분자구조	
질량	536.2046g/mol
원소분석	C, 67.15%; H, 6.01%; O, 26.84%
끓는점	1313.18 K
녹는점	904.01 K
Log P	4.99
굴절률	148.47 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Schisandrin C
IUPAC name	(6R,7S,13aS)-5,6,7,8-Tetrahydro-13,14-dimethoxy-6,7-dimethylcycloocta[1,2-f:3,4-f']bis[1,3]benzodioxole
분자식	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	384.1573g/mol
원소분석	C, 68.74%; H, 6.29%; O, 24.97%
끓는점	977.96 K
녹는점	695.48 K
Log P	4.99
굴절률	110.00 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Schizandrol A
IUPAC name	1,2,3,10,11,12-hexamethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrodibenzof[a,c][8]annulen-6-ol
분자식	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>
분자구조	
질량	432.2148g/mol
원소분석	C, 66.65%; H, 7.46%; O, 25.89%
끓는점	1075.20 K
녹는점	741.02 K
Log P	3.65
굴절률	123.86 cm <sup>3</sup> /mol

## 6절. 백수오 함유 성분들의 물리화학적성질

### 가. 연구내용

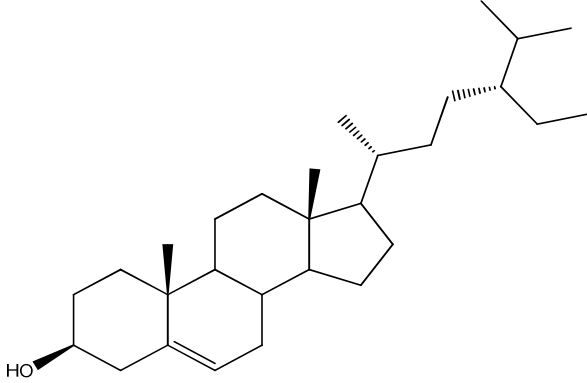
(1) 백수오 함유 성분 중 소량으로 함유된 성분들에 대한 물리화학적 성질을 규명하였다.

### 나. 연구방법

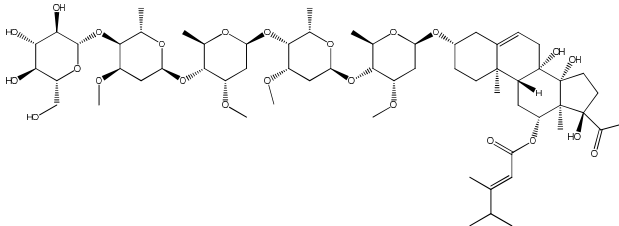
(1) 분자구조는 PubChem에 등록된 구조를 사용하였다.

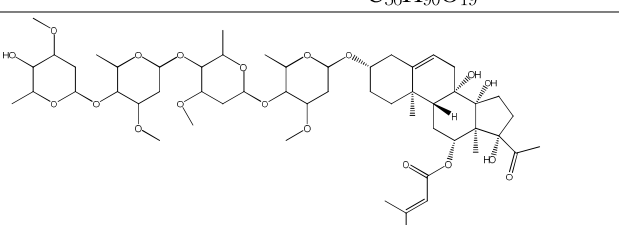
(2) 분자식, 질량, 원소분석, 끓는점, 녹는점, LogP, 굴절률 값들은 ChemDraw program을 이용하여 확보하였다.

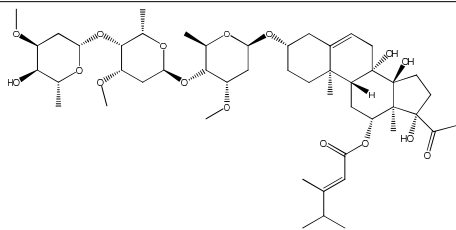
### 다. 연구결과

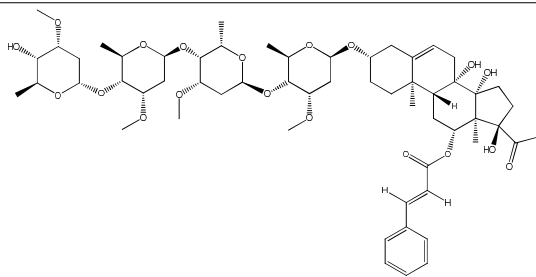
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	$\beta$ -sitosterol
IUPAC name	(3S,10R,13R)-17-((2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol
분자식	$C_{29}H_{50}O$
분자구조	
질량	414.3862g/mol
원소분석	C, 83.99%; H, 12.15%; O, 3.86%
끓는점	992.90 K
녹는점	534.43 K
Log P	8.14
굴절률	130.21 $cm^3/mol$

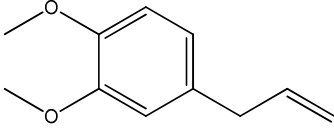


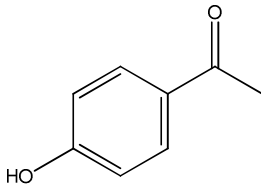
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Wilfoside C1G
IUPAC name	(E)-(3S,8S,9R,10R,12R,13S,14R,17R)-17-acetyl-8,14,17-trihydroxy-3-(((2R,4S,5R,6R)-4-methoxy-5-(((2S,4S,5R,6S)-4-methoxy-5-(((2S,4S,5R,6R)-4-methoxy-5-(((2S,4R,5S,6S)-4-methoxy-6-methyl-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-12-yl 3,4-dimethylpent-2-enoate
분자식	C <sub>62</sub> H <sub>100</sub> O <sub>24</sub>
분자구조	
질량	1228.6605g/mol
원소분석	C, 60.57%; H, 8.20%; O, 31.23%

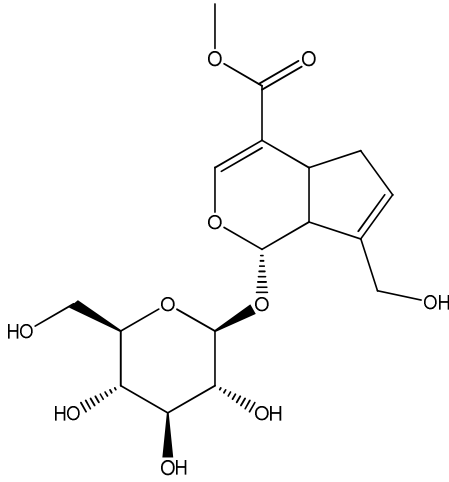
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Wilfoside C1N
IUPAC name	(E)-(3S,8S,9R,10R,12R,13S,14R,17S)-17-acetyl-8,14,17-trihydroxy-3-((5-((5-((5-((5-hydroxy-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-12-yl 3,4-dimethylpent-2-enoate
분자식	C <sub>56</sub> H <sub>90</sub> O <sub>19</sub>
분자구조	
질량	1066.6076g/mol
원소분석	C, 63.02%; H, 8.50%; O, 28.48%

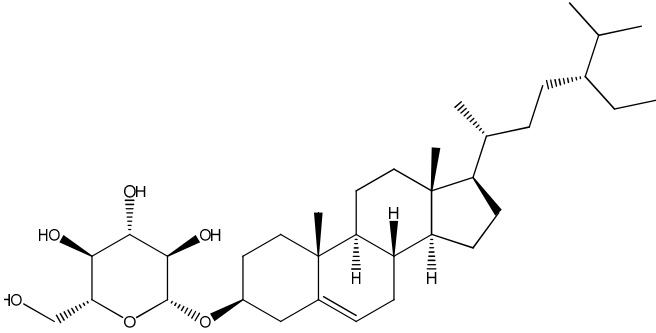
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Wilfoside C3N
IUPAC name	(E)-(3S,8S,9R,10R,12R,13S,14S,17S)-17-acetyl-8,14,17-trihydroxy-3-(((2R,4S,5R,6R)-5-(((2S,4S,5R,6S)-5-(((2S,4S,5R,6R)-5-hydroxy-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4-methoxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-12-yl 3,4-dimethylpent-2-enoate
분자식	C <sub>49</sub> H <sub>78</sub> O <sub>16</sub>
분자구조	
질량	922.5290g/mol
원소분석	C, 63.75%; H, 8.52%; O, 27.73%

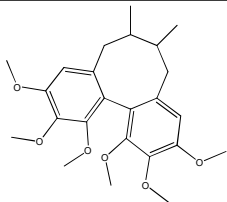
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Wilfoside K1N
IUPAC name	[(3S,8S,9R,10R,12R,13S,14R,17R)-17-acetyl-8,14,17-trihydroxy-3-[(2R,4S,5R,6R)-5-[(2S,4S,5R,6S)-5-[(2S,4S,5R,6R)-5-[(2S,4R,5S,6S)-5-hydroxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-12-yl] (E)-3-phenylprop-2-enoate
분자식	C <sub>58</sub> H <sub>86</sub> O <sub>19</sub>
분자구조	
질량	1086.5763g/mol
원소분석	C, 64.07%; H, 7.97%; O, 27.96%

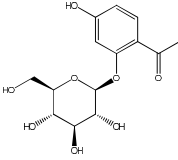
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Methyleugenol
IUPAC name	1,2-Dimethoxy-4-(prop-2-en-1-yl)benzene
분자식	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
분자구조	
질량	178.0994g/mol
원소분석	C, 74.13%; H, 7.92%; O, 17.95%
끓는점	529.44 K
녹는점	307.39 K
Log P	2.83
굴절률	54.92 cm <sup>3</sup> /mol

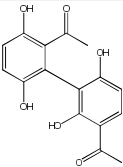
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	p-Hydroxyacetophenone
IUPAC name	1-(4-Hydroxyphenyl)ethan-1-one
분자식	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
분자구조	
질량	136.0524g/mol
원소분석	C, 70.57%; H, 5.92%; O, 23.50%
끓는점	543.81 K
녹는점	367.49 K
Log P	1.40
굴절률	38.34 cm <sup>3</sup> /mol

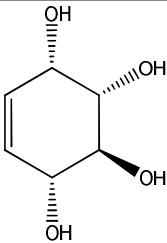
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Geniposide
IUPAC name	(1S)-methyl 7-(hydroxymethyl)-1-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-1,4a,5,7a-tetrahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylate
분자식	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>
분자구조	
질량	388.1369g/mol
원소분석	C, 52.57%; H, 6.23%; O, 41.20%
끓는점	1214.77 K
녹는점	740.71 K
Log P	-2.00
굴절률	89.07 cm <sup>3</sup> /mol

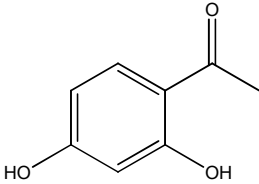
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Daucosterol
IUPAC name	(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[[[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(2R,5R)-5-ethyl-6-methylheptan-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl]oxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol
분자식	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	576.4390g/mol
원소분석	C, 72.87%; H, 10.48%; O, 16.64%

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Cynauculoside A
IUPAC name	
분자식	
분자구조	

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Cyanoneside B
IUPAC name	1-(4-hydroxy-2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)phenyl)ethanone
분자식	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
분자구조	
질량	314.1002g/mol
원소분석	C, 53.50%; H, 5.77%; O, 40.73%
끓는점	1105.03 K
녹는점	730.13 K
Log P	-1.27
굴절률	74.10 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Cynandione A
IUPAC name	1-[3-(2-acetyl-3,6-dihydroxyphenyl)-2,4-dihydroxyphenyl]ethanone
분자식	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	302.0790g/mol
원소분석	C, 63.57%; H, 4.67%; O, 31.76%
끓는점	1059.22 K
녹는점	894.20 K
Log P	0.78
굴절률	80.62 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Conduritol F
IUPAC name	(1R,2S,3S,4S)-cyclohex-5-ene-1,2,3,4-tetraol
분자식	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	146.0579g/mol
원소분석	C, 49.31%; H, 6.90%; O, 43.79%
끓는점	710.30 K
녹는점	395.58 K
Log P	-1.63
굴절률	34.79 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	2,4-Dihydroxyacetophenone
IUPAC name	1-(2,4-dihydroxyphenyl)ethanone
분자식	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
분자구조	
질량	152.0473g/mol
원소분석	C, 63.15%; H, 5.30%; O, 31.55%
끓는점	624.43 K
녹는점	479.21 K
Log P	0.57
굴절률	40.15 cm <sup>3</sup> /mol

## 7절. 강황 함유 성분들의 물리화학적성질

### 가. 연구내용

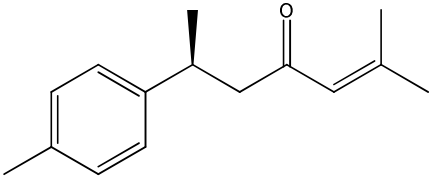
(1) 강황 함유 성분 중 소량으로 함유된 성분들에 대한 물리화학적 성질을 규명하였다.

### 나. 연구방법

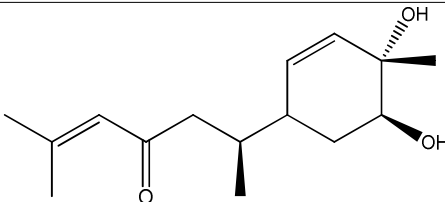
(1) 분자구조는 PubChem에 등록된 구조를 사용하였다.

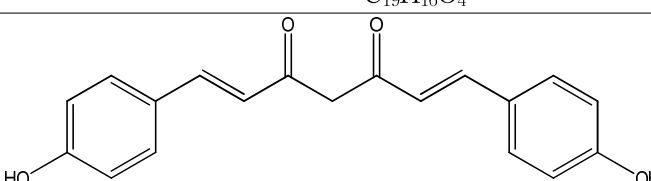
(2) 분자식, 질량, 원소분석, 끓는점, 녹는점, LogP, 굴절률 값들은 ChemDraw program을 이용하여 확보하였다.

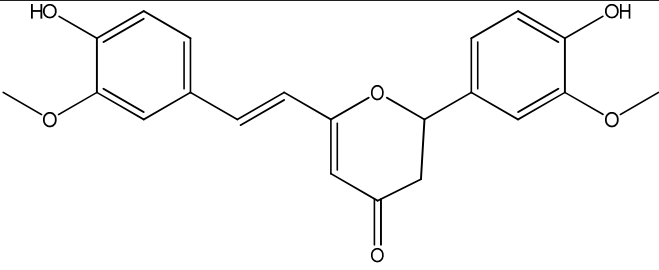
### 다. 연구결과

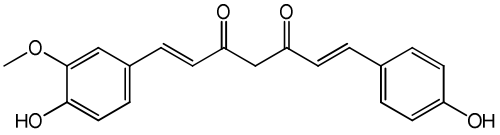
물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Arturmerone
IUPAC name	(6S)-2-methyl-6-(4-methylphenyl)hept-2-en-4-one
분자식	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O
분자구조	
질량	216.1514g/mol
원소분석	C, 83.28%; H, 9.32%; O, 7.40%
끓는점	631.93 K
녹는점	313.14 K
Log P	3.85
굴절률	71.24 cm <sup>3</sup> /mol



물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Bisacurone
IUPAC name	(6S)-6-[(1R,4S,5S)-4,5-dihydroxy-4-methylcyclohex-2-en-1-yl]-2-methylhept-2-en-4-one
분자식	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>
분자구조	
질량	252.1725g/mol
원소분석	C, 71.39%; H, 9.59%; O, 19.02%
끓는점	794.24 K
녹는점	419.40 K
Log P	1.52
굴절률	75.36 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Bisdemethoxycurcumin
IUPAC name	(1E,6E)-1,7-Bis(4-hydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione
분자식	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
분자구조	
질량	308.1049g/mol
원소분석	C, 74.01%; H, 5.23%; O, 20.76%
끓는점	964.98 K
녹는점	669.37 K
Log P	2.81
굴절률	91.30 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Cyclocurcumin
IUPAC name	2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-6-[(E)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl]-2,3-dihydropyran-4-one
분자식	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
분자구조	
질량	368.1260g/mol
원소분석	C, 68.47%; H, 5.47%; O, 26.06%
끓는점	1072.10 K
녹는점	782.08 K
Log P	1.87
굴절률	104.28 cm <sup>3</sup> /mol

물리화학적 성질	결과
이름(common name)	Demethoxycurcumin
IUPAC name	(1E,6E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione
분자식	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>
분자구조	
질량	338.1154g/mol
원소분석	C, 70.99%; H, 5.36%; O, 23.64%
끓는점	1015.26 K
녹는점	715.39 K
Log P	2.69
굴절률	98.55 cm <sup>3</sup> /mol

## 8절. 효능성분이 강화된 분획

약용작물의 추출물보다는 효능성분이 강화된 추출물의 효능이 증가할 것은 자명한 사실이므로 다국적 제약사에서는 이미 약용작물의 단순 추출물보다는 효능성분이 강화된 추출물을 제품화하여 고부가가치를 상승시키려는 노력이 증가하고 있다. 인삼은 가공하지 않은 상태 100그램에 약 3000원인데 반하여 효능성분이 강화된 제품은 100그램에 90,000원으로 약 30배의 부가가치가 상승한다. 따라서 효능성분이 강화된 건기식의 개발은 부가가치 상승을 위해서 반드시 필요한 과정의 하나이다. 따라서 본 연구에서는 1 ~ 2 단계의 추출 과정을 추가함으로써 효능성분이 강화된 추출물 분획을 확보하고자 실험하였다.

### 1. 당귀 효능성분이 강화된 분획

당귀의 지표물질은 decrusin과 decrusinol로 알려져 있기는 하나 함유되어 있는 함량 순으로 보면 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol 순이므로 이와 같은 4종의 함유물이 주된 성분이라고 할 수 있다. 또한 이들 모두 당귀의 효능을 나타내는 대표적인 효능성분이므로 본 연구에서는 이들 4종의 함유성분이 간단한 추출 방법을 통해서 농축될 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 당귀를 그대로 사용하는 것보다는 효능성분이 강화된 분획을 사용하는 것이 효능을 강화시키는데 유리하고 당귀의 고부가가치화에도 일조할 것이므로 본 연구는 이에 초점을 맞추어 진행하였다 [J. Korean Oriental Med. 32(4):1 (2011)]

#### 가. 연구내용

(1) 한국당귀의 ethanol 추출물을 대상으로 하였다.

#### 나. 연구방법

(1) 한국당귀를 ethanol로 추출하여 감압농축한 후의 회수율은 14.08%였다.

(2) 감압농축한 추출물 속에 포함된 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol의 함유량은 각각 5.06, 1.59, 0.57, 0.01%였다.

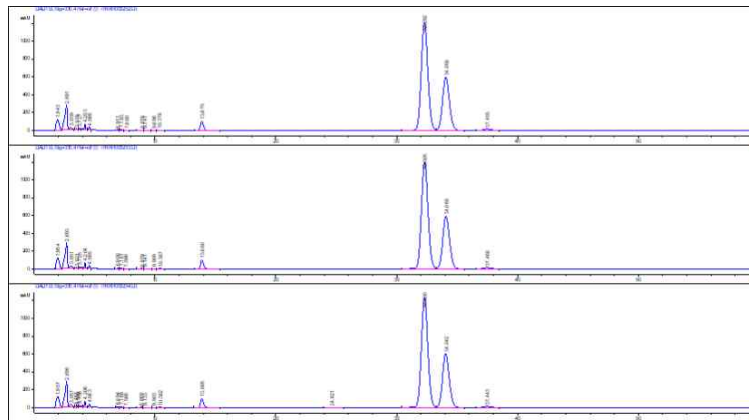
(3) 7.23%가 효능성분인 추출물을 확보하였기 때문에 1% 내외의 효능성분을 가진 당귀보다 효능성분이 강화된 추출물을 확보하였다.

(4) methanol로 추출하게 되면 회수율이 조금 더 높아지기는 하나 감압농축 후에 잔류하는 용매 문제를 해결하기 위해서는 methanol보다 ethanol이 유리하기 때문에 ethanol 추출을 사용하였다.

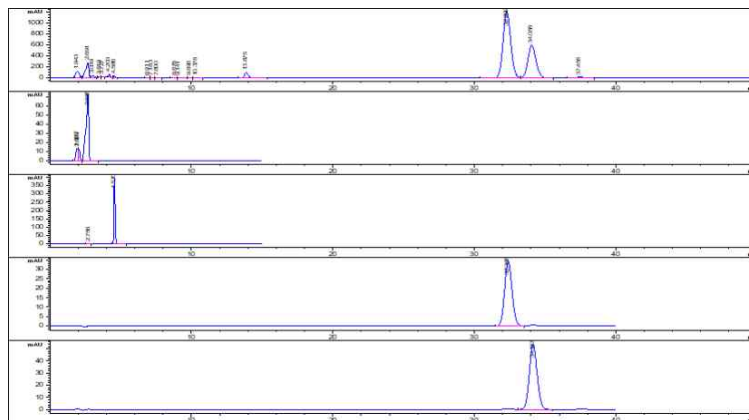
(5) 효능성분 분석은 HPLC로 수행하였는데, 장비는 Agilent 1260 Infinity를 사용하였고 Symmetry 4.6 X 250mm 5um column을 사용하고 검출은 UV/VIS 330nm에서 수행하였다. 온도는 30도에서 이동상으로 47% aqueous acetonitrile을 사용하였고 유속은 1.0mL/min로 하였다.

#### 다. 연구결과

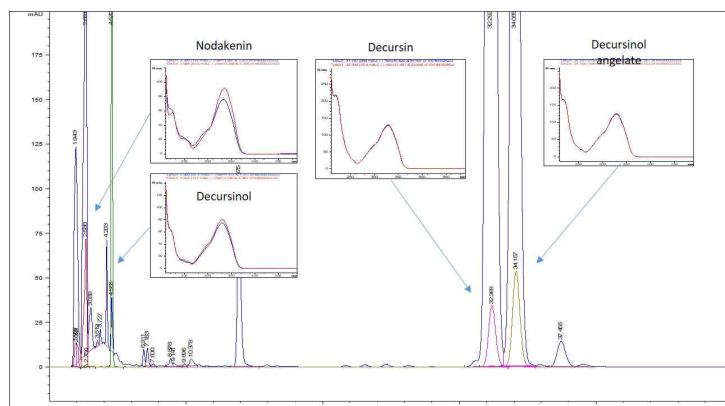
(1) 당귀 ethanol 추출물의 HPLC chromatogram은 아래 그림과 같다.



(2) decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol 표준 시료와 당귀의 ethanol 추출물의 HPLC chromatogram을 비교하면 아래 그림과 같다. (decrusin(32.3min), decrusinol angelate(34.2min), nodakenin(2.1min), decrusinol(4.5min) 표준 시료와 당귀의 ethanol 추출물의 HPLC chromatogram)



(3) 표준시료와 추출물의 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol 성분이 동일한지 여부를 확인하기 위하여 이들의 UV/VIS spectrum을 비교하였고 그 결과는 아래 그림과 같다. (decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol의 UV/VIS spectrum과 당귀 ethanol추출물의 spectrum비교)

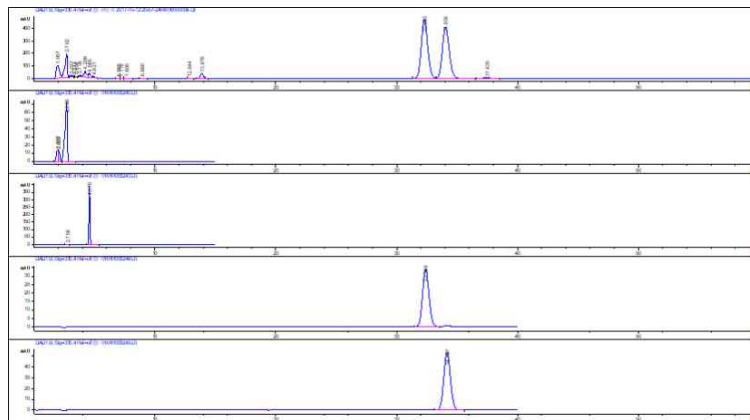


라. 당귀는 우리나라뿐만 아니라 일본과 중국에서도 생산되기 때문에 각각에 포함된 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol의 함유량도 분석하여 비교하였다.

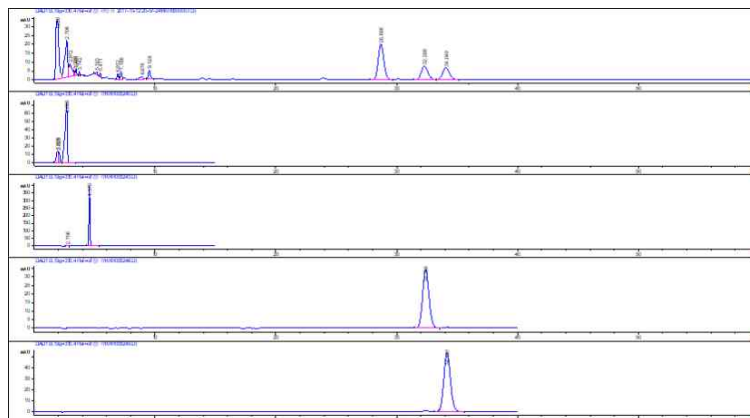
(1) 한국, 중국, 일본 당귀에 함유된 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol의 함유량

	Nodakenin	Decursinol	Decursin	Decursinolangelate
한국 당귀	0.5681%	0.0111%	5.0581%	1.5900%
중국 당귀	0.6472%	0.0409%	3.3552%	1.9276%
일본 당귀	ND	ND	0.0389%	0.0216%

(2) decrusin(32.3min), decrusinol angelate(34.2min), nodakenin(2.1min), decrusinol(4.5min) 표준 시료와 중국당귀의 methanol 추출물의 HPLC chromatogram



(3) decrusin(32.3min), decrusinol angelate(34.2min), nodakenin(2.1min), decrusinol(4.5min) 표준 시료와 일본당귀의 methanol 추출물의 HPLC chromatogram



(4) 결론적으로, 당귀를 ethanol로 추출하고 감압증류하면 효능성분인 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol이 약 7배 강화된 분획을 확보할 수 있다.

## 2. 오미자 효능성분이 강화된 분획

대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4] 의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”에 기재된 지표성분 중 하나는 gomisin N이다. 따라서 오미자 ethanol추출물에 함유된 gomisin N의 함량과 1단계 추출을 더 진행한 n-hexane 추출 분획에 함유된 gomisin N의 함량을 비교함으로써 효능성분이 강화되었는지 여부를 판단하고자 하였다 [대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4] 의약품각조\_2부].

### 가. 연구내용

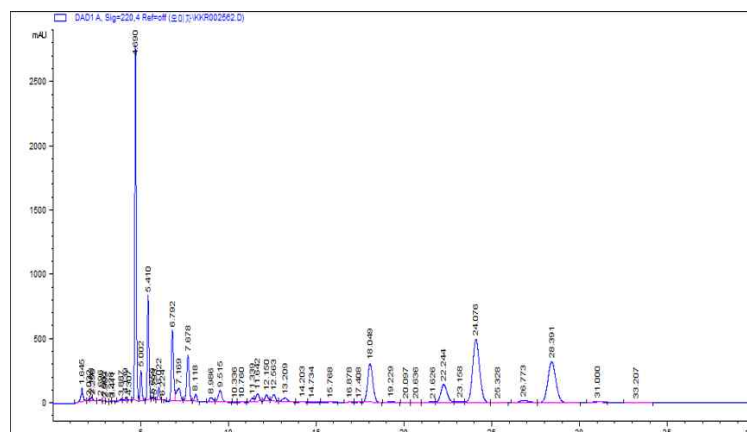
- (1) 오미자 ethanol 추출물에 함유된 9종의 gomisin을 대상으로 HPLC 분석을 수행하여 hexane 분획에서 검출되는 gomisin을 확인하였다.
- (2) 9종 중 6종이 hexane 분획에서 검출되었는데 이들 중 gomisin N을 대상으로 ethanol 추출물과 1단계 추가로 추출을 시행한 hexane 분획의 함량을 비교하여 유효성분의 강화된 정도를 판정하였다.

### 나. 연구방법

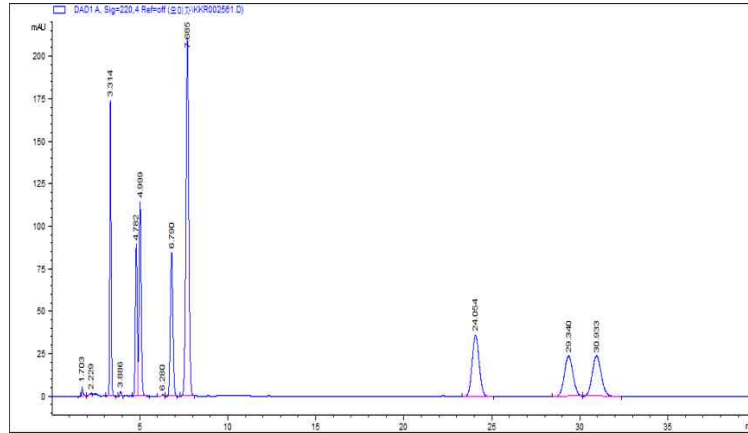
- (1) 분석장비는 Agilent 1260 Infinity를 사용하였고, Column은 Symmetry 4.6 X 250mm 5um를 사용하였으며, 온도는 30도에서 수행하였다. Mobile phase, Flow rate, Inj. Volume, Detector는 각각 65% ACN, , 1.2mL/min, 10uL, 220nm이었다.
- (2) 분석을 위한 시료는 methanol에 녹여서 10 g/L의 농도로 준비하여 실험하였다.
- (3) gomisin 9종의 표준품은 각각 1g/L 농도로 만든 후 700uL 씩 mixing 하여 사용하였다.

### 다. 연구결과

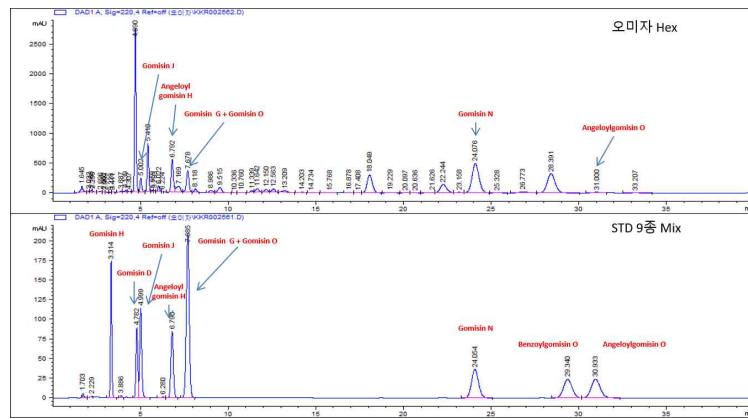
- (1) 오미자 ethanol 추출물의 hexane 분획 chromatogram (methanol에 10g/L의 농도로 준비한 시료)



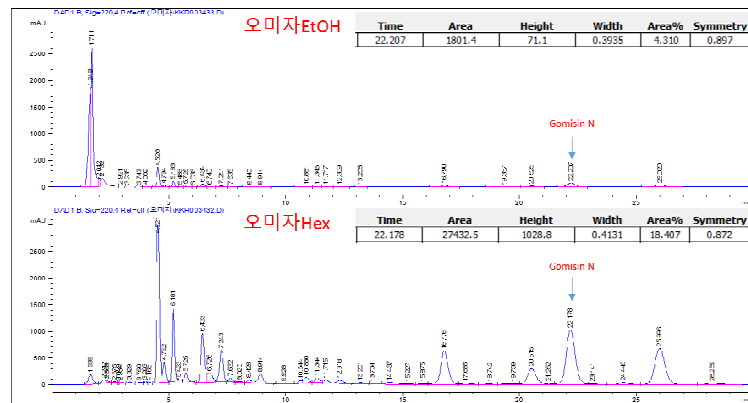
- (2) Gomisin 표준품 9종 chromatogram



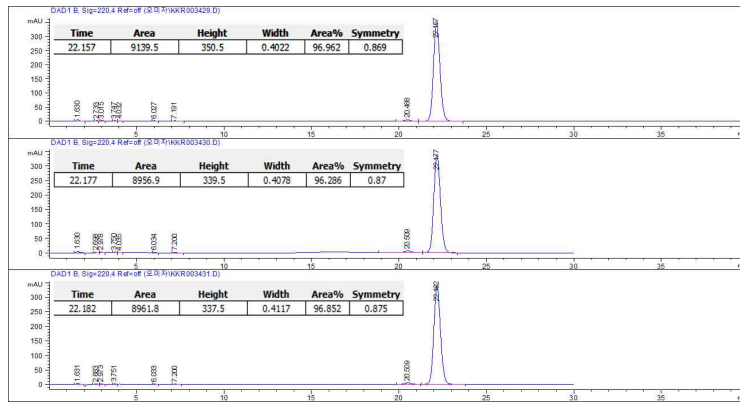
(3) 오미자 hexane 분획과 표준품 9종의 섞은 시료의 chromatogram의 비교



(4) 오미자 ethanol 추출물과 hexane 분획의 chromatogram에서 확인된 gomisin N



(5) gomisin N (0.1mg/mL 농도)의 chromatogram



(6) 오미자 ethanol 추출물을 추가로 hexane 분획까지 진행한 결과 gomisins N은 0.195% 함량에서 2.984%로 증가됨으로써 약 15배 강화된 분획이 확보되었다. 즉, 오미자의 일반적인 ethanol 추출 방법에 hexane 분획 확보 방법을 추가할 경우, 유효성분이 15배 강화된 분획을 얻을 수 있다는 결론을 얻었다.

### 3. 오미자 제품 내 성분 분석

기존의 오미자 제품은 오미자 열매를 착즙한 방법인데 본 연구에서는 효능성분을 강화한 제품을 상용화하기 위하여 ethanol 추출물로 제품을 제작하여 기존 제품 내의 성분과 비교 분석하였다.

#### 가. 연구내용

(1) 오미자 열매를 착즙하여 생산한 오미자 제품 (과우치)과 ethanol 추출물로 제작한 제품 (과우치)를 대상으로 하였다.

#### 나. 연구방법

(1) 효능성분 분석은 HPLC로 수행하였는데, 장비는 Agilent 1260 Infinity를 사용하였고 Symmetry 4.6 X 250mm 5um column을 사용하고 검출은 UV/VIS 220nm와 254nm에서 수행하였다. 온도는 30도에서 이동상으로 65% aqueous acetonitrile을 사용하였고 유속은 1.2 mL/min로 하였다.

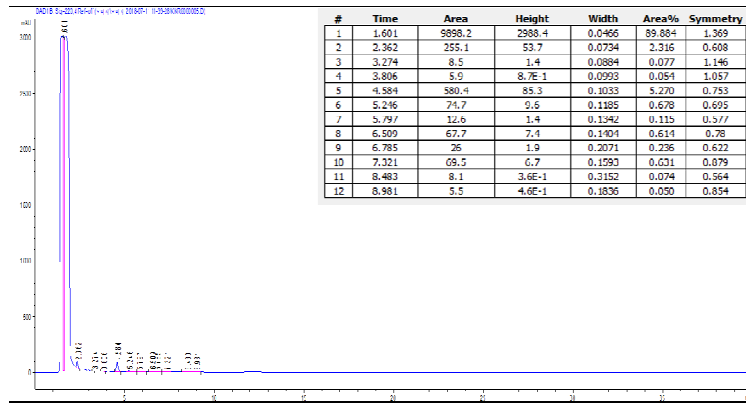
(2) 오미자 함유 성분 20종의 표준품은 0.1 mg/ml 또는 1.0 mg/ml 농도로 methanol에 녹인 후 0.45 um membrane filter에 여과하여 준비하였다.

(3) 기존 제품은 2배 희석하여 분석하였다.

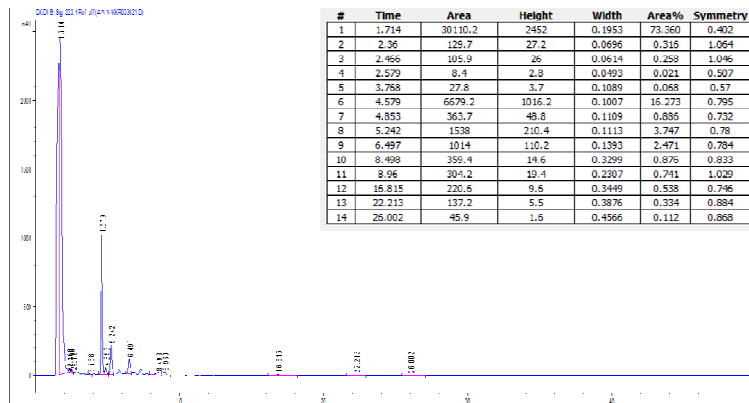
#### 다. 연구결과

(1) 기존 제품의 chromatogram





(2) ethanol 추출물로 제작한 제품의 chromatogram



(3) EtOH 추출물을 원료로 제작한 파우치 제품의 오미자 함유 성분의 함량 분석 결과

	Gomisin O	Magnolol	Schisanther in A	Schisanther in B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgomisin O	Angeloylgomisin O
함량 220nm	-	-	-	0.0083%	0.0293%	-	0.0730%	-	-	-
함량 254nm	-	-	-	0.0096%	0.0297%	-	0.0729%	0.0241%	-	-

(4) ethanol 추출물로 제작한 제품이 기존의 오미자 열매를 착즙한 제품에 비해서 효능 성분이 적어도 12배 이상 함유된 결과를 얻었기 때문에 효능성분이 강화된 새로운 제품의 상용화에 대한 가능성을 확인하였다.

## 9절. 오미자 성분 분석

### 1. 오미자 추출방법에 따른 효능

본 연구에서는 오미자가 함유하고 있는 간섬유화 억제효능 성분으로 gomicin G, gomicin O, gomicin N, gomisin J, angeloylgomisin O, and benzoylgomisin O의 6종의 리그난 성분을 규명하였다. 이들은 모두 오미자 ethanolic extract에 함유되어 있는 성분들이다. 오미자의 간섬유화 억제효능 실험은 in vitro 및 in vivo 실험을 수행하였는데 이 때 사용한 시료는 오미자 열매를 100% ethanol로 추출하여 확보한 추출물로서 in vitro 및 in vivo 실험 결과 모두 간섬유화 억제효능이 유의성 있게 관찰되었다. 2016년 12월에 오미자가 보이는 갱년기증상 완화 관련 개별인정형 원료가 식약처로부터 인정을 받게 되었다. 여기에 포함된 오미자 원료 확보 방법은 30% 주정으로 추출한 방법과 10% 주정으로 추출한 방법이 각각 신청내용 및 관련 특허에 발표되어 있기 때문에, 본 연구에서는 기존에 본 연구자들이 사용한 방법과 동일하게 100% ethanol 추출물, 30% 추출물, 10% 추출물을 사용하였고 이에 더하여 전통 한의약에서 사용하는 방법의 하나인 물중탕 추출방법도 사용하여 총 4종의 추출물로 실험을 수행하였다 [Appl. Biol. Chem. 61(6):607 (2018)].

#### 가. 연구내용

(1) 오미자 열매를 추출 대상으로 하였다.

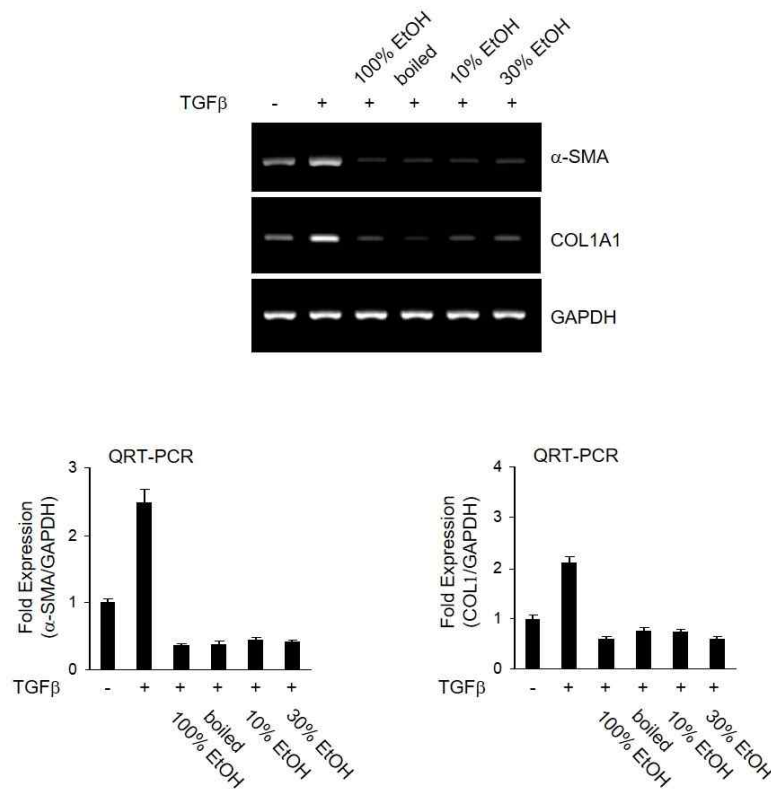
#### 나. 연구방법

(1) TGF $\beta$ 로 자극을 준 간 정상세포(HSC)를 추출물이 저해하는지로 간섬유화 억제실험을 수행하였다. 즉, 간 정상세포(HSC)에 10 ng/mL 농도의 TGF $\beta$ 로 자극을 주면, 6시간 이후부터  $\alpha$ -SMA와 제1형A1 콜라겐(COL1A1) 유전자 mRNA의 발현이 증가된다 [Semin Liver Dis 21:311 (2001)].

(2) 오미자 추출물을 30분 동안 전처리하고, 10 ng/mL 농도의 TGF $\beta$ 를 처리한 후, 12 시간 후에 세포를 수확하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 실험을 수행하였다.

#### 다. 연구결과

(1) 네 종류 추출물 (100% ethanol 추출물, 30% 추출물, 10% 추출물, 물중탕 추출물)은 아래 그림과 같이 TGF $\beta$ 에 의해 증가되는  $\alpha$ -SMA 와 제1형A1 콜라겐 유전자 (COL1A1) mRNA의 발현을 감소시켰다. 오미자의 추출방법은 간 정상세포(HSC) 억제효능에 거의 영향을 미치지 않음이 확인되었다.



## 2. 오미자 추출방법에 따른 성분 분석

본 연구에서 오미자의 간섬유화 억제효능 *in vitro* 및 *in vivo* 실험은 오미자 열매의 100% ethanol 추출물로 수행하였다. 식약처로부터 2016년 12월에 오미자가 보이는 갱년기증상 완화 관련 개별인정형 원료 인정은 30% 주정으로 추출한 방법으로 수행하였고 이와 관련한 특허는 10% 주정으로 추출한 방법으로 발표되었다. 따라서, 오미자의 100% ethanol 추출물, 30% 추출물, 10% 추출물과 물중탕 추출방법으로 확보한 4종의 시료에 함유된 성분을 분석하였다.

### 가. 연구내용

(1) 오미자 열매를 추출 대상으로 하였다.

### 나. 연구방법

(1) 효능성분 분석은 HPLC로 수행하였는데, 장비는 Agilent 1260 Infinity를 사용하였고 Symmetry 4.6 X 250mm 5um column을 사용하고 검출은 UV/VIS 220nm와 254nm에서 수행하였다. 온도는 30도에서 이동상으로 65% aqueous acetonitrile을 사용하였고 유속은 1.2 mL/min로 하였다.

(2) 오미자 함유 성분 20종의 표준품은 0.1 mg/ml 또는 1.0 mg/ml농도로 methanol에 녹인 후 0.45 um membrane filter에 여과하여 준비하였다.

(3) 4가지 추출방법으로 확보한 시료들은 10 mg/ml 농도로 methanol에 녹여서 준비하였다.

(4) 100% ethanol 추출물 (추출방법 1) : 오미자 200g을 EtOH에 넣고 추출한 다음 추출

용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 47.04g을 얻음(회수율 : 23.52%)

(5) 물중탕 추출물 (추출방법 2) : 오미자 200g을 물에 넣고 증탕('오쿠'에 있는 한약중탕법 사용)하여 그 추출 용액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 오미자 추출물 82.42g을 얻음(회수율 : 41.21%)

(6) 30% ethanol 추출물 (추출방법 3) : 오미자 200g을 30% EtOH에 넣고 가열 추출(100℃, 3시간)한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 58.97g을 얻음(회수율 : 29.49%)

(7) 10% ethanol 추출물 (추출방법 4) : 오미자 200g을 10% EtOH에 넣고 가열 추출(100℃, 3시간)한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 76.04g을 얻음(회수율 : 38.02%)

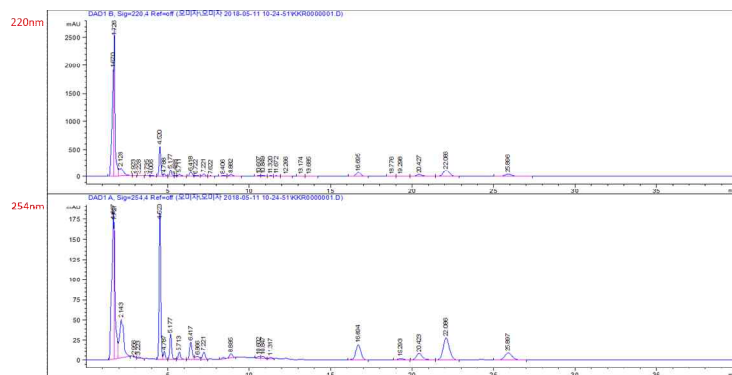
다. 연구결과

(1) 20종의 표준품 중 검출된 8종에 대한 결과는 아래 표와 같다. 100% ethanol에서는 8종의 성분이 모두 검출되나 다른 3가지 방법에서는 일부만 검출되었다. 따라서 본 연구에서 수행한 추출방법에 따라 다른 실험들을 진행하였다.

추출방법	nm	Schizandrol A (Schisandrin)	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H
EtOH 100%	220nm (MeOH)	0.1040%	0.0082%	0.0227%	0.0231%
	254nm (MeOH)	0.0873%	0.0081%	0.0208%	0.0230%
Water 100%	220nm (MeOH)	0.0556%	0.0029%	0.0079%	0.0075%
	254nm (MeOH)	0.0466%	0.0028%	0.0069%	0.0062%
	220nm (water)	0.0512%	0.0026%	0.0062%	0.0068%
	254nm (water)	0.0429%	0.0025%	0.0059%	0.0066%
EtOH 30%	220nm (MeOH)	0.2166%	0.0059%	0.0187%	0.0215%
	254nm (MeOH)	0.1820%	0.0059%	0.0178%	0.0195%
	220nm (water)	0.1897%	0.0041%	0.0149%	0.0144%
	254nm (water)	0.1592%	0.0042%	0.0134%	0.0132%
EtOH 10%	220nm (MeOH)	0.1523%	0.0027%	0.0124%	0.0135%
	254nm (MeOH)	0.1277%	0.0027%	0.0112%	0.0118%
	220nm (water)	0.1433%	0.0025%	0.0112%	0.0118%
	254nm (water)	0.1201%	0.0025%	0.0101%	0.0106%

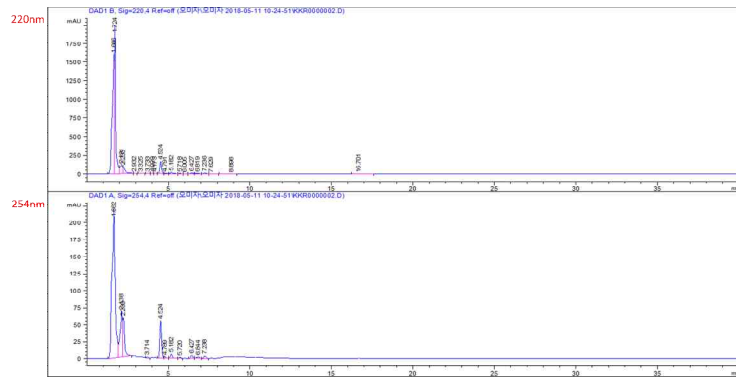
추출방법	nm	Schisantherin B (Gomisin B)	Schisandrin A (Doxyschizandrin)	Gomisin N	Schisandrin C
EtOH 100%	220nm (MeOH)	0.0083%	0.0293%	0.0730%	0.0239%
	254nm (MeOH)	0.0096%	0.0297%	0.0729%	0.0241%
Water 100%	220nm (MeOH)	-	0.0017%	-	-
	254nm (MeOH)	-	-	-	-
	220nm (water)	-	0.0011%	-	-
	254nm (water)	-	-	-	-
EtOH 30%	220nm (MeOH)	-	0.0049%	0.0023%	-
	254nm (MeOH)	-	0.0049%	-	-
	220nm (water)	-	0.0011%	-	-
	254nm (water)	-	-	-	-
EtOH 10%	220nm (MeOH)	-	0.0018%	-	-
	254nm (MeOH)	-	-	-	-
	220nm (water)	-	-	-	-
	254nm (water)	-	-	-	-

(2) 100% ethanol 추출방법으로 얻은 추출물의 chromatogram은 아래 그림과 같다. 검출과장을 220nm와 254nm에서 수행하였다.

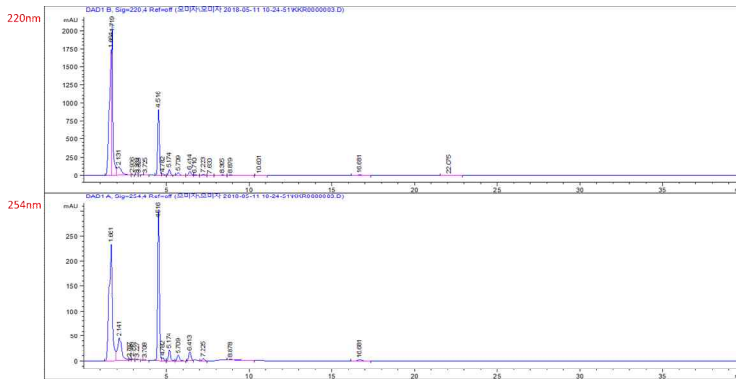


(3) 물증탕 추출방법으로 얻은 추출물의 chromatogram은 아래 그림과 같다. 검출과장을

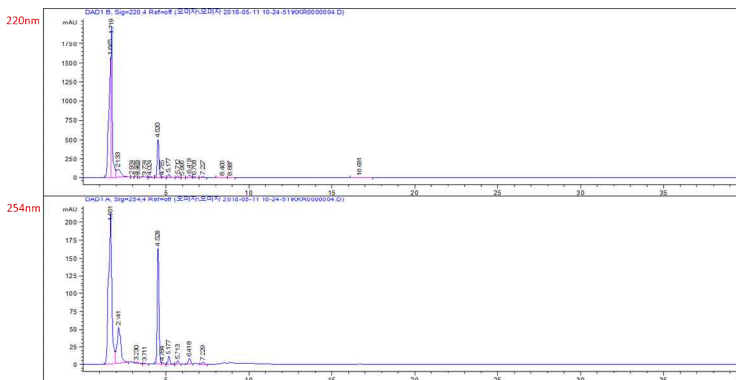
220nm와 254nm에서 수행하였다.



(4) 30% ethanol 추출방법으로 얻은 추출물의 chromatogram은 아래 그림과 같다. 검출과장을 220nm와 254nm에서 수행하였다.



(5) 10% ethanol 추출방법으로 얻은 추출물의 chromatogram은 아래 그림과 같다. 검출과장을 220nm와 254nm에서 수행하였다.



# 10절. 오미자 함유 성분의 식품의약품안전처 방법과 본 연구자의 분석 방법의 비교

## 1. 오미자 함유 성분의 식품의약품안전처 방법

본 연구에서는 의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”에 기재된 지표성분과 시험법을 사용하여 오미자 함유 성분을 분석하고자 하였다.

### 가. 연구내용

(1) 오미자 열매를 추출 대상으로 하였고 성분은 총 20종을 대상으로 하였다.

### 나. 연구방법

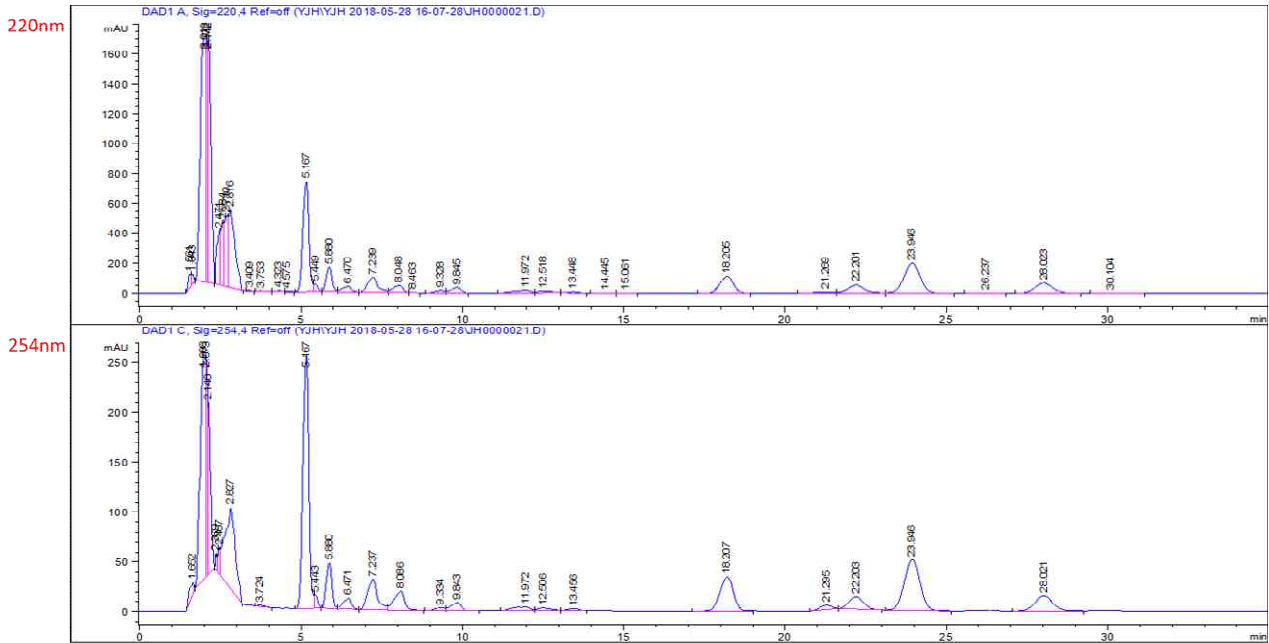
- (1) 표준품 20종을 각각 0.1mg/mL 또는 1mg/mL의 농도(MeOH 용해)로 만든 후 0.45um membrane filter로 여과 후 사용하였다.
- (2) 시료는 아래 열거한 4가지 추출방법으로 확보한 추출물을 대상으로 시료를 10mg/mL의 농도로 만든 후 0.45um membrane filter로 여과 후 사용하였다.
- (3) 1번 방법으로 추출한 시료는 MeOH으로만 용해하였고, 2~4번 방법으로 추출한 시료들은 MeOH, EtOH 으로 각각 용해하였고, 2~4번의 방법으로 추출한 시료들은 MeOH으로는 완전히 용해되지 않아 상등액을 사용하였다.
- (4) 1번 방법은 오미자 200g을 EtOH에 넣고 추출한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 47.04g을 얻음(회수율 : 23.52%)
- (5) 2번 방법은 오미자 200g을 물에 넣고 중탕('오쿠'에 있는 한약중탕법 사용)하여 그 추출 용액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 오미자 추출물 82.42g을 얻음(회수율 : 41.21%)
- (6) 3번 방법은 오미자 200g을 30% EtOH에 넣고 가열 추출(100℃, 3시간)한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 58.97g을 얻음(회수율 : 29.49%)
- (7) 4번 방법은 오미자 200g을 10% EtOH에 넣고 가열 추출(100℃, 3시간)한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 76.04g을 얻음(회수율 : 38.02%)
- (8) 분석 장비는 Agilent 1100 series를 사용하고 column은 Symmetry 4.6x250mm (5 um), 이동상은 65% acetonitrile 수용액에 0.1% formic acid를 첨가하여 사용하고, 유속은 1.0 ml/min, 주입부피는 2 - 20 uL, 검출과장은 254nm 및 220nm에서 30도 온도로 수행하였다.

### 다. 연구결과

(1) 추출방법 1로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolol	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.2772%	-	0.0095%	0.0557%	0.0523%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.1810%	-	0.0084%	0.0396%	0.0529%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisanther in A	Schisanther in B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgo misin O	Angeloylgo misin O
합량 220nm	-	-	-	0.0175%	0.0614%	-	0.1418%	0.0472%	-	0.0030%
합량 254nm	-	-	-	0.0188%	0.0597%	-	0.1417%	0.0466%	-	-

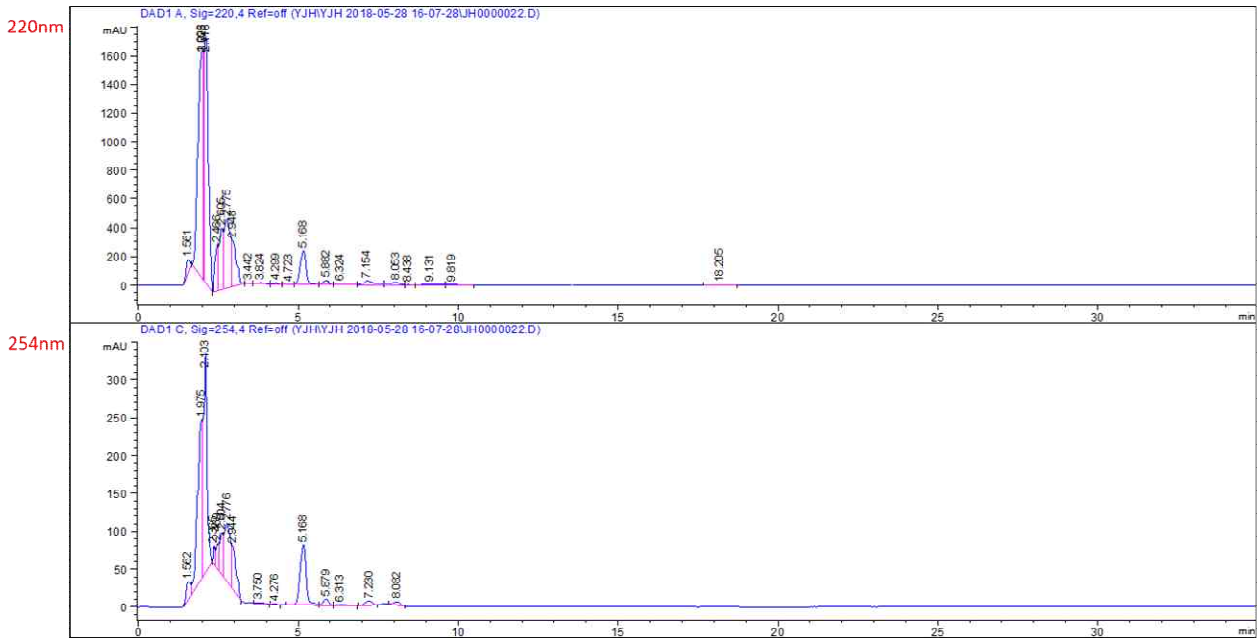


(2) 추출방법 2로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-ge ntiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolol	Schizandrol A (schizandri n)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgo misin H	Gomisin G
합량 220nm	-	-	-	-	0.1550%	-	-	0.0184%	0.0272%	-
합량 254nm	-	-	-	-	0.1026%	-	-	0.0121%	0.0132%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisanther in A	Schisanther in B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgo misin O	Angeloylgo misin O
합량 220nm	-	-	-	-	0.0040%	-	-	-	-	-
합량 254nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



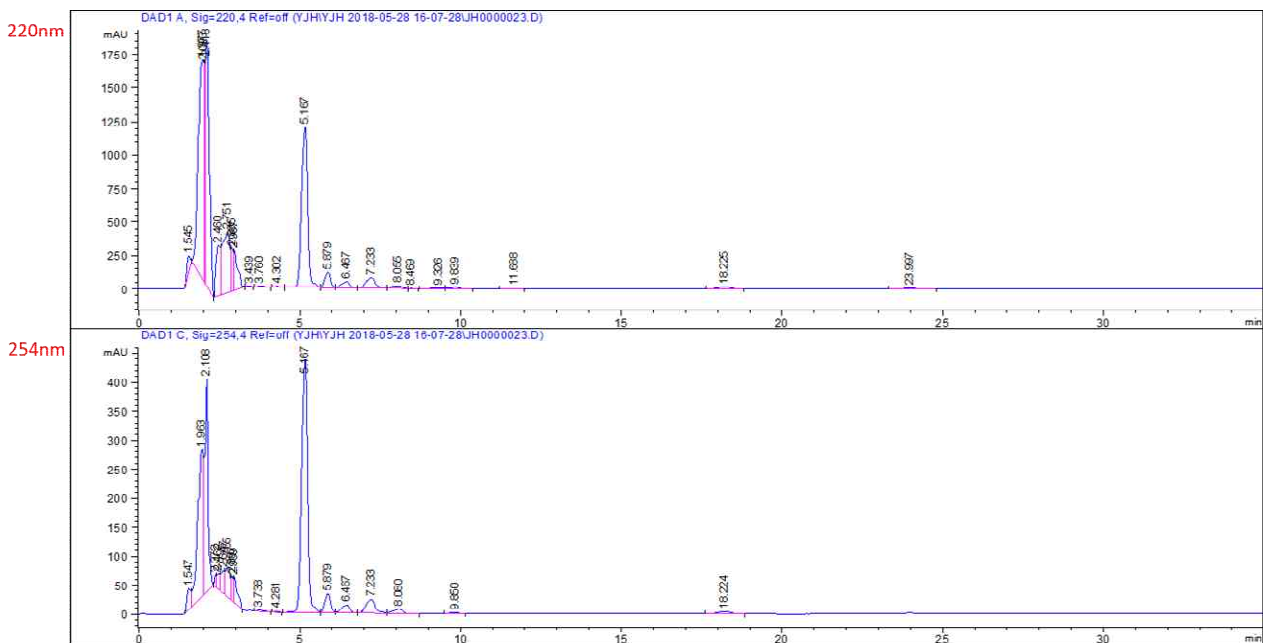


(3) 추출방법 3으로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolol	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.5843%	-	-	0.0483%	0.0501%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.3965%	-	-	0.0359%	0.0482%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisantherin in A	Schisantherin in B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgomisin O	Angeloylgomisin O
함량 220nm	-	-	-	0.0068%	0.0102%	-	0.0050%	-	-	-
함량 254nm	-	-	-	0.0046%	0.0098%	-	-	-	-	-

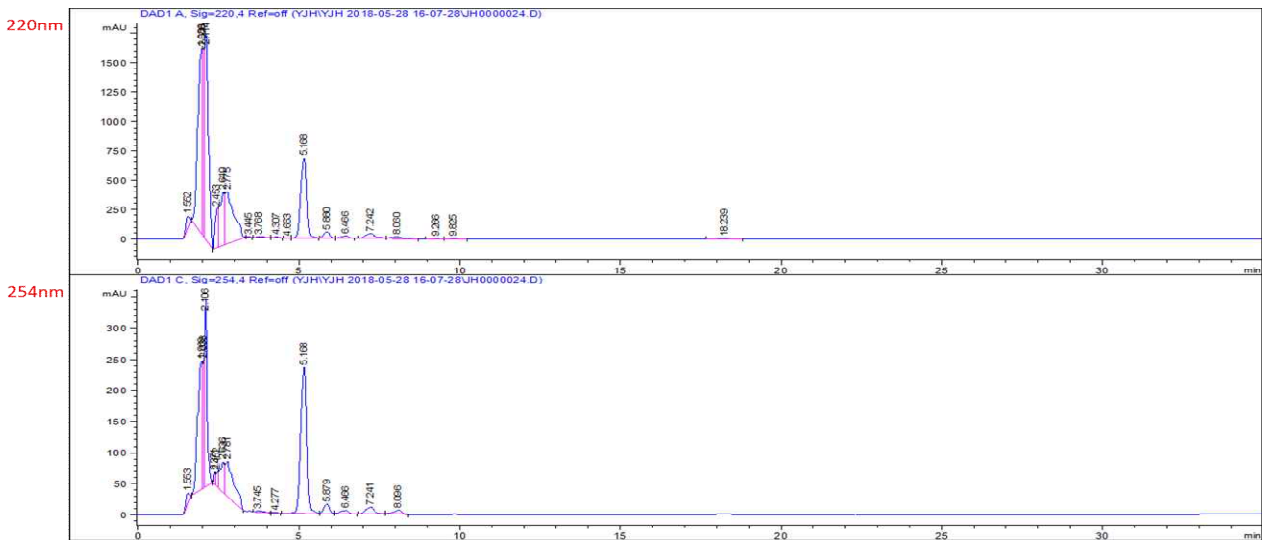


(4) 추출방법 4로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolol	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.4151%	-	-	0.0303%	0.0357%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.2755%	-	-	0.0227%	0.0268%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisantherin A	Schisantherin B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgomisin O	Angeloylgomisin O
함량 220nm	-	-	-	0.0027%	0.0038%	-	-	-	-	-
함량 254nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



2. 오미자 함유 성분의 본 연구자 분석 방법

본 연구자가 개발한 오미자 함유 성분 분석 방법을 사용하여 오미자 함유 성분을 분석하고자 하였다.

가. 연구내용

(1) 오미자 열매를 추출 대상으로 하였고 성분은 총 20종을 대상으로 하였다.

나. 연구방법

- (1) 표준품 20종을 각각 0.1mg/mL 또는 1mg/mL의 농도(MeOH 용해)로 만든 후 0.45um membrane filter로 여과 후 사용하였다.
- (2) 시료는 아래 열거한 4가지 추출방법으로 확보한 추출물을 대상으로 시료를 10mg/mL의 농도로 만든 후 0.45um membrane filter로 여과 후 사용하였다.
- (3) 1번 방법으로 추출한 시료는 MeOH으로만 용해하였고, 2~4번 방법으로 추출한 시료들은 MeOH, EtOH 으로 각각 용해하였고, 2~4번의 방법으로 추출한 시료들은 MeOH으로는 완전히

용해되지 않아 상등액을 사용하였다.

(4) 1번 방법은 오미자 200g을 EtOH에 넣고 추출한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 47.04g을 얻음(회수율 : 23.52%)

(5) 2번 방법은 오미자 200g을 물에 넣고 중탕('오쿠'에 있는 한약중탕법 사용)하여 그 추출 용액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 오미자 추출물 82.42g을 얻음(회수율 : 41.21%)

(6) 3번 방법은 오미자 200g을 30% EtOH에 넣고 가열 추출(100℃, 3시간)한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 58.97g을 얻음(회수율 : 29.49%)

(7) 4번 방법은 오미자 200g을 10% EtOH에 넣고 가열 추출(100℃, 3시간)한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조하여 오미자 추출물 76.04g을 얻음(회수율 : 38.02%)

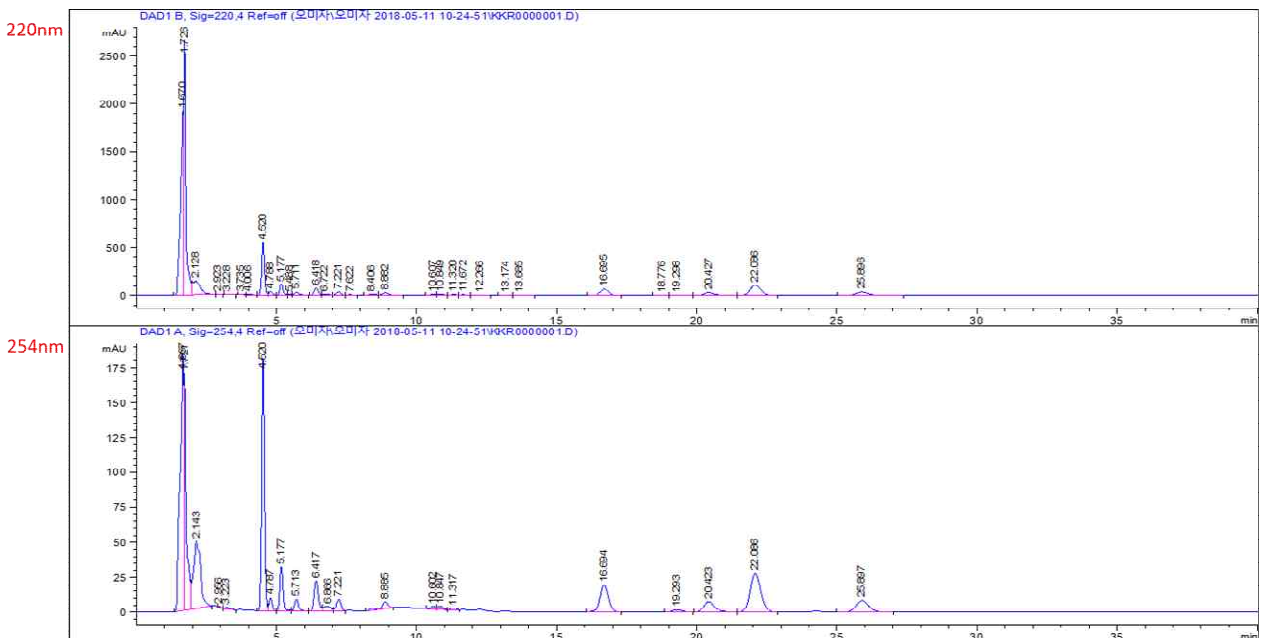
(8) 분석 장비는 Agilent 1260 Infinity를 사용하고 column은 Symmetry 4.6x250mm (5 μm), 이동상은 65% acetonitrile 수용액을 사용하고, 유속은 1.2 ml/min, 주입부피는 2 - 20 μL, 검출과장은 254nm 및 220nm에서 30도 온도로 수행하였다.

## 다. 연구결과

### (1) 추출방법 1로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolol	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.1040%	-	0.0082%	0.0227%	0.0231%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.0873%	-	0.0081%	0.0208%	0.0230%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisantherin A	Schisantherin B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgomisin O	Angeloylgomisin O
함량 220nm	-	-	-	0.0083%	0.0293%	-	0.0730%	0.0239%	-	-
함량 254nm	-	-	-	0.0096%	0.0297%	-	0.0729%	0.0241%	-	-

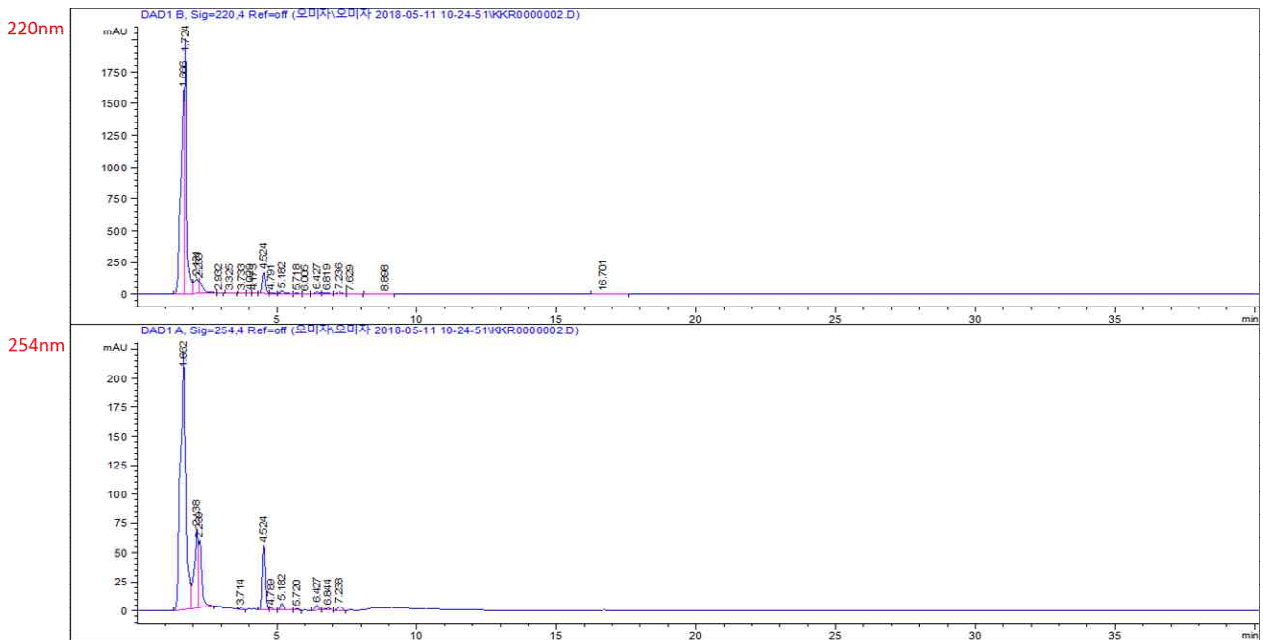


(2) 추출방법 2로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolin	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.0556%	-	0.0029%	0.0079%	0.0075%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.0466%	-	0.0028%	0.0069%	0.0062%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisantherin A	Schisantherin B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgomisin O	Angeloylgomisin O
함량 220nm	-	-	-	-	0.0017%	-	-	-	-	-
함량 254nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

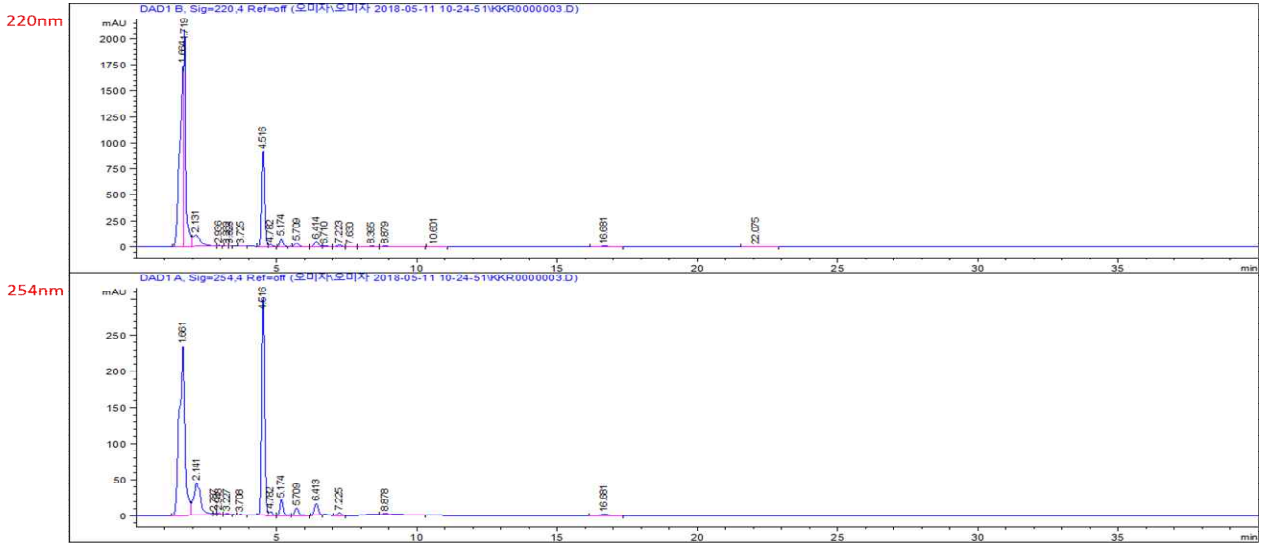


(3) 추출방법 3으로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolin	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgomisin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.2166%	-	0.0059%	0.0187%	0.0215%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.1820%	-	0.0059%	0.0178%	0.0195%	-

	Gomisin O	Magnolol	Schisantherin A	Schisantherin B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgomisin O	Angeloylgomisin O
함량 220nm	-	-	-	-	0.0049%	-	0.0023%	-	-	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.0049%	-	-	-	-	-

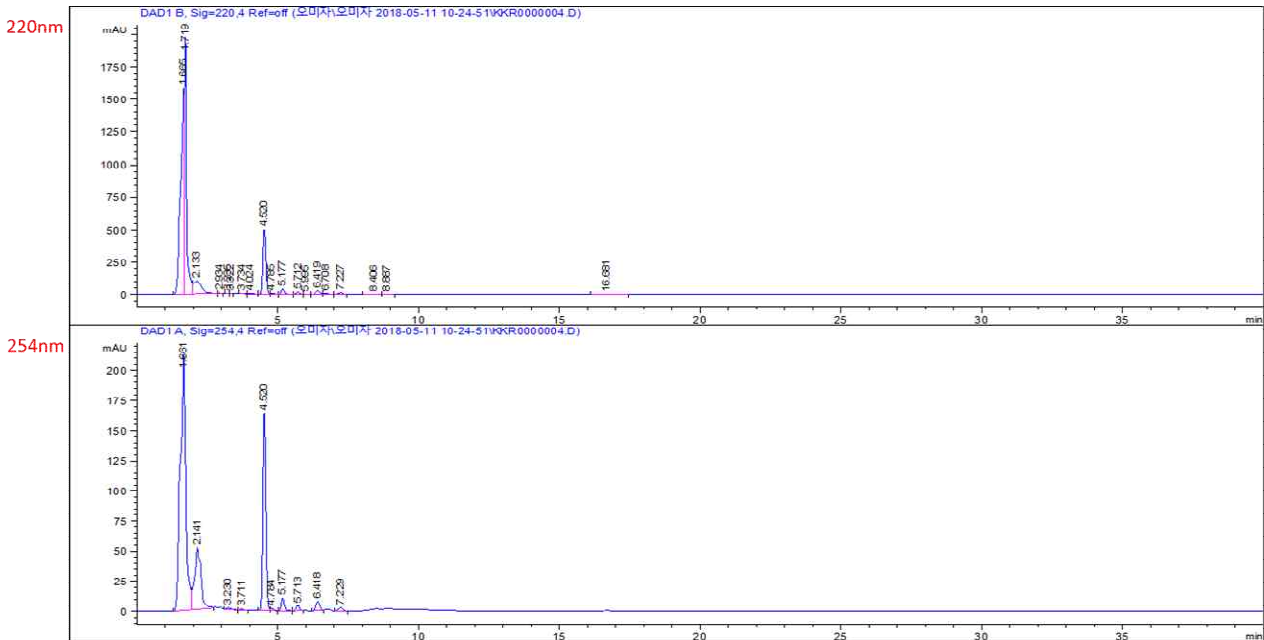


(4) 추출방법 4로부터 얻은 시료를 분석한 결과

	Arctigenin 4'-O-β- gentiobioside	Etoposide	Gomisin H	Magnolol	Schizandrol A (schizandrin)	Gomisin D	Gomisin J	Schizandrol B (Gomisin A)	Angeloylgo misin H	Gomisin G
함량 220nm	-	-	-	-	0.1523%	-	0.0027%	0.0124%	0.0135%	-
함량 254nm	-	-	-	-	0.1277%	-	0.0027%	0.0112%	0.0118%	-

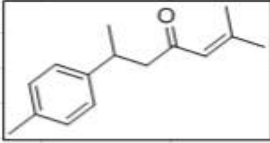
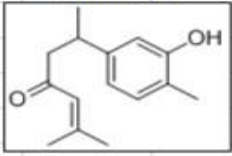
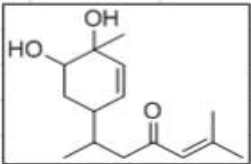
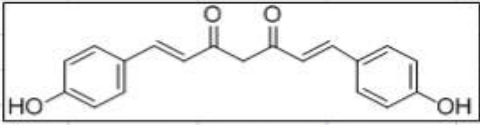
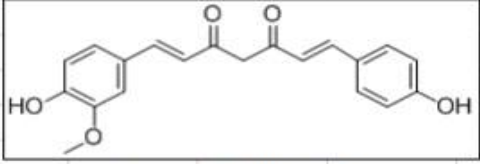
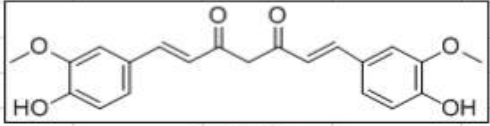
	Gomisin O	Magnolol	Schisanther in A	Schisanther in B	Schisandrin A	Schisandrin B	Gomisin N	Schisandrin C	Benzoylgo misin O	Angeloylgo misin O
함량 220nm	-	-	-	-	0.0018%	-	-	-	-	-
함량 254nm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



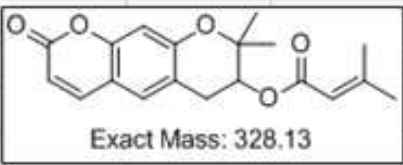
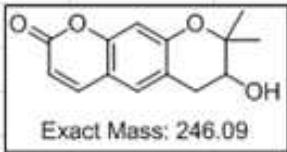
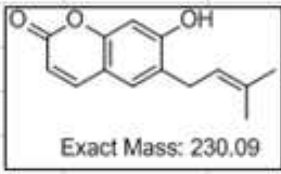
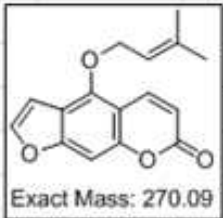
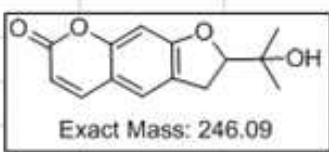
## 11절. 약용작물 함유 성분의 대사물질

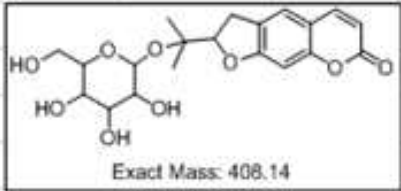
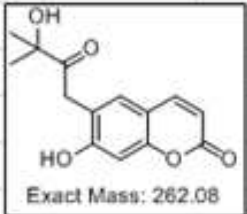
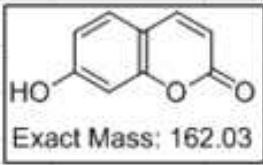
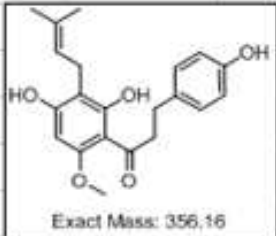
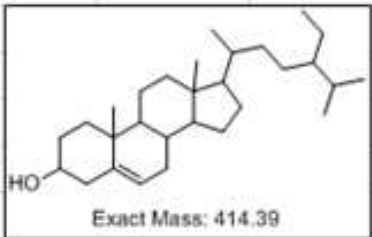
강황, 당귀, 오미자, 인삼이 함유한 성분들의 대사물질의 질량분석 자료를 데이터베이스화 하였다.

### 1. 강황

	Exact mass	216.15
	H	217.15
	Na	239.15
	K	255.15
<b>Ar-turmerone</b>		
	Exact mass	232.15
	H	233.15
	Na	255.15
	K	271.15
<b>2-hydroxy-1,3,5,10-bisabolatetraen-9-one</b>		
	Exact mass	252.17
	H	253.17
	Na	275.17
	K	291.17
<b>Bisacurone</b>		
	Exact mass	308.1
	H	309.1
	Na	331.1
	K	347.1
<b>Bisdemethoxycurcumin</b>		
	Exact mass	338.12
	H	339.12
	Na	361.12
	K	377.12
<b>Demethoxycurcumin</b>		
	Exact mass	368.13
	H	369.13
	Na	391.13
	K	407.13
<b>Curcumin</b>		

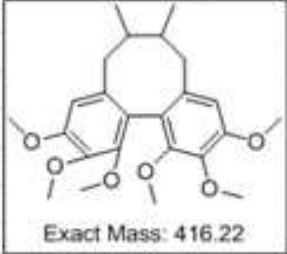
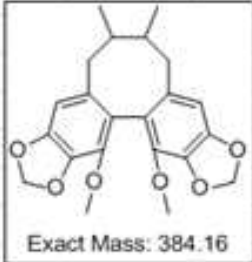
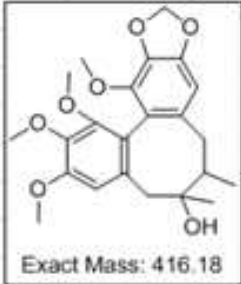
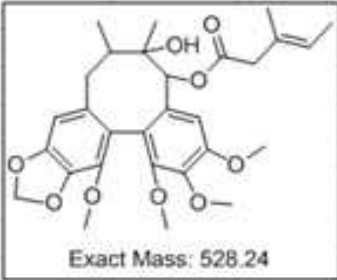
2. 당귀

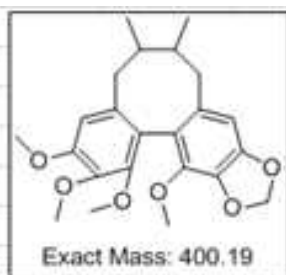
 <p>Exact Mass: 328.13</p>	<p>Exact Mass: 328.13 H 329.13 Na 351.13 K 367.13</p>
<p>Decursin</p>	
 <p>Exact Mass: 246.09</p>	<p>Exact Mass: 246.09 H 247.09 Na 269.09 K 285.09</p>
<p>Decursinol</p>	
 <p>Exact Mass: 230.09</p>	<p>Exact Mass: 230.09 H 231.09 Na 253.09 K 269.09</p>
<p>Demethylsuberosine</p>	
 <p>Exact Mass: 270.09</p>	<p>Exact Mass: 270.09 H 271.09 Na 293.09 K 309.09</p>
<p>Isoimperatorin</p>	
 <p>Exact Mass: 246.09</p>	<p>Exact Mass: 246.09 H 247.09 Na 269.09 K 285.09</p>
<p>Marmesin</p>	

 <p>Exact Mass: 408.14</p>	<p>Exact Mass: 408.14</p> <p>H 409.14</p> <p>Na 431.14</p> <p>K 447.14</p>
<p>Nodakenin</p>	
 <p>Exact Mass: 262.08</p>	<p>Exact Mass: 262.08</p> <p>H 263.08</p> <p>Na 285.08</p> <p>K 301.08</p>
<p>Peucedanone</p>	
 <p>Exact Mass: 162.03</p>	<p>Exact Mass: 162.03</p> <p>H 163.03</p> <p>Na 185.03</p> <p>K 201.03</p>
<p>Umbelliferon</p>	
 <p>Exact Mass: 356.16</p>	<p>Exact Mass: 356.16</p> <p>H 357.16</p> <p>Na 379.16</p> <p>K 395.16</p>
<p>Xanthoarnol</p>	
 <p>Exact Mass: 414.39</p>	<p>Exact Mass: 414.39</p> <p>H 415.39</p> <p>Na 437.39</p> <p>K 453.39</p>
<p>B-sitosterol</p>	



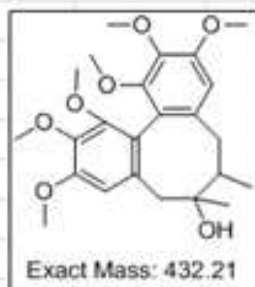
### 3. 오미자

 <p>Exact Mass: 416.22</p>	<p>Exact Mass: 416.22 H 417.22 Na 439.22 K 455.22</p>
<p>schisandrin A</p>	
 <p>Exact Mass: 384.16</p>	<p>Exact Mass: 384.16 H 385.16 Na 407.16 K 423.16</p>
<p>schisandrin C</p>	
 <p>Exact Mass: 416.18</p>	<p>Exact Mass: 416.18 H 417.18 Na 439.18 K 455.18</p>
<p>schisandrol A (Gomisin A)</p>	
 <p>Exact Mass: 528.24</p>	<p>Exact Mass: 528.24 H 529.24 Na 551.24 K 567.24</p>
<p>Gomisin B</p>	



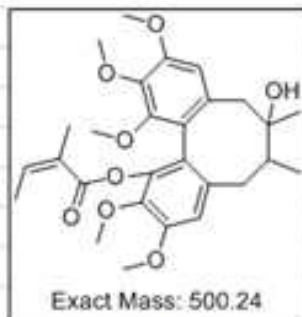
schisandrin B

Exact Mas	400.19
H	401.19
Na	423.19
K	439.19



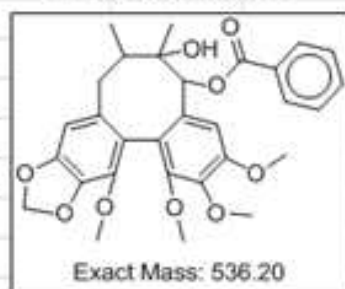
schisandrol A

Exact Mas	432.21
H	433.21
Na	455.21
K	471.21



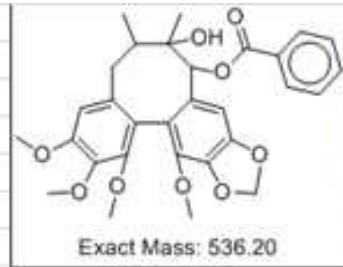
Angeloylgomisin H

Exact Mas	500.24
H	501.24
Na	523.24
K	539.24



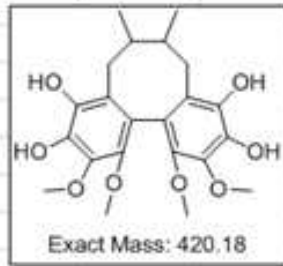
schisantherin A (Gomisin C)

Exact Mas	536.2
H	537.2
Na	559.2
K	575.2



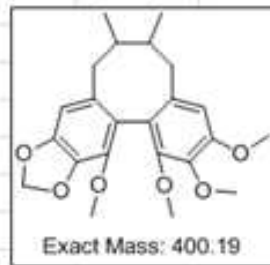
Exact Mas	536.2
H	537.2
Na	559.2
K	575.2

Gomisin G



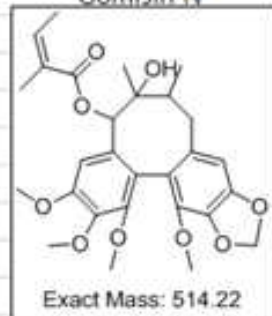
Exact Mas	420.18
H	421.18
Na	443.18
K	459.18

Gomisin J



Exact Mas	400.19
H	401.19
Na	423.19
K	439.19

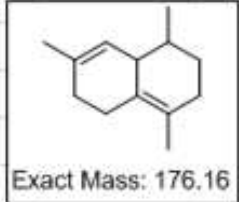
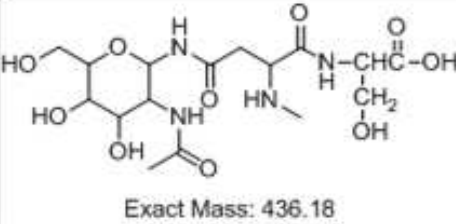
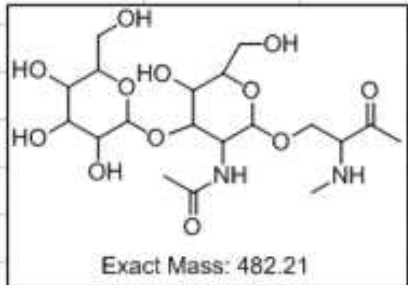
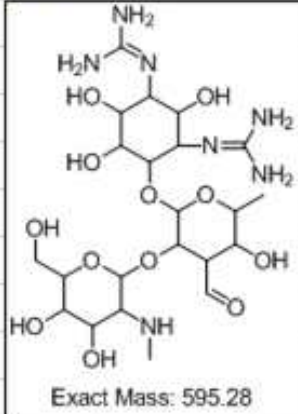
Gomisin N

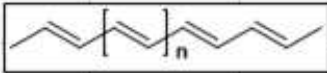
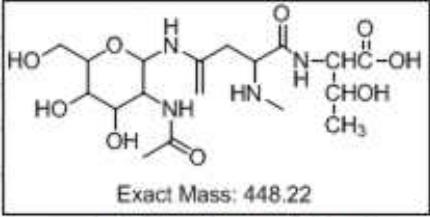
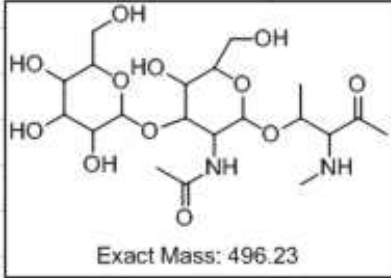
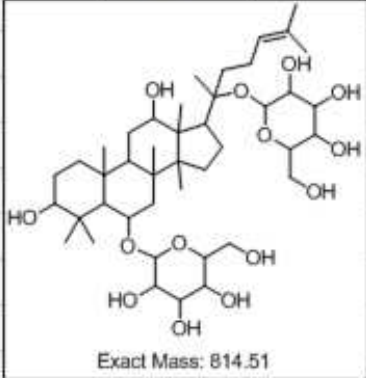


Exact Mas	514.22
H	515.22
Na	537.22
K	553.22

Tigloylgomisin P

4. 인삼

 <p>Exact Mass: 176.16</p>	<p>Exact Mass: 176.16</p> <p>H 177.16</p> <p>Na 199.16</p> <p>K 215.16</p>	
delta-Cadinene		
 <p>Exact Mass: 436.18</p>	<p>Exact Mass: 436.18</p> <p>H 437.18</p> <p>Na 459.18</p> <p>K 475.18</p>	
N-linked oligosaccharide		
 <p>Exact Mass: 482.21</p>	<p>Exact Mass: 482.21</p> <p>H 483.21</p> <p>Na 505.21</p> <p>K 521.21</p>	
O-linked oligosaccharide		
 <p>Exact Mass: 595.28</p>	<p>Exact Mass: 596.28</p> <p>H 597.28</p> <p>Na 619.28</p> <p>K 635.28</p>	
Aminoglycoside		

					Exact Mass:
				H	
				Na	
				K	
			polyacetylenes		
				Exact Mas	448.22
				H	449.22
				Na	471.22
				K	487.22
			Exact Mass: 448.22		
			<i>N</i> -linked oligosaccharide		
				Exact Mas	496.23
				H	497.23
				Na	519.23
				K	535.23
			Exact Mass: 496.23		
			<i>O</i> -linked oligosaccharide		
				Exact Mas	814.51
				H	815.51
				Na	837.51
				K	853.51
			Exact Mass: 814.51		
			Aminoglycoside		

## 2장. 약용작물(오미자)의 개별인정형 신청을 위한 자료 확보

오미자 추출물은 비알콜성 간섭유화에 탁월한 효능을 보임이 본 연구를 통해서 확인이 되어 “간기능개선”을 위한 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 자료를 아래와 같이 확보하였다.

**기능성원료 인정 신청을 위한  
제 출 자 료**

# 1. 제출자료의 총괄 요약본

## □ 신청원료 개요

(■최초, □변경\*)

업 체 명(기관명)		건국대학교				
영업의 종류		교육기관	허가/신고/등록번호			
주소 및 연락처		* 서울 광진구 능동로 120				
		담당자	(이름) 임응호			
신청 원료명		오미자 추출물				
심사 대상 분류	개별 인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	간기능개선		
			신청 섭취량	783mg/일		
	고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)			
		·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)			
·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>						
·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>						
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>					
	·기타 변경 <input type="checkbox"/>					
	·기능성 추가 <input type="checkbox"/>	(변경 전)				
	·섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 후)				
	·제조방법 변경 <input type="checkbox"/>					
	·기준규격 변경 <input type="checkbox"/>					
	·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>					
	·기타 변경 <input type="checkbox"/>					
국내제조 <input type="checkbox"/>	수입인 경우	수리번호		수출국		
수입 <input type="checkbox"/>		제조회사				
		소재지				
모듬토의 <input type="checkbox"/>	실시 날짜 :					

## □ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분 호	비고
<b>1. 제출자료 전체의 총괄 요약본</b>		■예 □ 아니오		
<b>2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료</b>				
2.1	기원	■국내 □국외		
2.2	개발경위	■국내 □국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	■국내 □국외		
2.4	국내·외 사용 현황	■국내 □국외		
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료</b>				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □ 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □ 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □ 아니오		
<b>4. 원료의 특성에 관한 자료</b>				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □ 아니오 □기능성분 ■지표성분		
4.3	영양성분정보자료	□예 ■ 아니오		
<b>5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □ 아니오		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■예 □ 아니오 ■ 시판 표준품 ■ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □ 아니오 ■ 공인 시험방법 □ 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)			



연번	제출자료	제출여부	첨부번호
<b>6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	■예 □ 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	■예 □ 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	■예 □ 아니오	
<b>7. 안전성에 관한 자료 [의사결정도 : ]</b>			
7.1	섭취근거 정보	■예 □ 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	□예 ■ 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보	■예 □ 아니오	
7.4	인체적용시험 정보	■예 □ 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	□예 ■ 아니오
		3개월 반복투여독성시험	□예 ■ 아니오
		유전독성시험	□예 ■ 아니오
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성 )	□예 ■ 아니오
<b>8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료</b>			
8.1	시험관시험	■ 신청원료 (논문 1편) * 시험기관 : 건국대학교	
		□ 유사원료 (논문 편)	
8.2	동물시험	■ 신청원료 (논문 1 편) * 시험기관 : 건국대학교	
		□ 유사원료 (논문 편)	
8.3	인체적용시험	■ 신청원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 1편) * 인체적용시험기관 : Chung Shan Medical University Hospital, Taichung, Taiwan	
		□ 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)	
<b>9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</b>			
9.1	섭취량 및 근거	■예 □ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	■예 □ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	■예 □ 아니오	
<b>10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료</b>			
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	■예 □ 아니오	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	■예 □ 아니오	

## □ 전체 내용 요약

항 목	주요 내용	
1. 원료명	오미자 추출물	
2. 원재료	오미자 (학명: Schisandra chinensis, 사용부위 : 열매)	
3.기능 (지표)성분	Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N	
4. 제조 공정	오미자 건조열매 → 95%에탄올 추출 → 감압농축 → 동결건조 → 신청 원료	
5. 규격 및 시험방법	1) 성상 : 갈색고체 2) Schizandrin(0.2%), Gomisin A(0.02%), Gomisin N(0.1%) 3) 납(mg/kg) : 5 ppm 이하 4) 총비소(mg/kg) : 3 ppm 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.3 ppm 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.2 ppm 이하 7) 대장균군 : 불검출	
	기능(지표) 성분 시험법	대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표_4]_의약품각조_2부_중_생약부분 “오미자”에 기재된 지표성분과 시험법을 그대로 따름
	규격 외 (잔류농약)	한국식품과학연구원, 동명생명과학원의 시험성적서 첨부
6. 안전성	의사결정도	
	섭취 근거	오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)
	안전성 정보	오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 인정받음 (2016-21호)
	섭취량 평가	
	인체적용시험	Improvement of Liver Function in Humans Using a Mixture of Schisandra Fruit Extract and Sesamin. Phytotherapy Research 27:368-373(2013)
	독성 시험	오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 인정받음 (2016-21호)
	기타 사항	

	섭취 시 주의사항	오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 인정받음 (2016-21호)
7. 기능성	신청 기능성	간기능 개선
	신청 일일섭취량	오미자 열매 에탄올 추출물로서 783mg/일
	시험관시험	Appl. Biol. Chem. 61:607-616 (2018)
	동물시험	Appl. Biol. Chem. 61:607-616 (2018)
	인체적용시험	Phytotherapy Research 27:368-373(2013)
	기타 사항	

## 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

### 2.1. 기원

<원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	오미자	비고(참고)
학명	Schisandra chinensis	
원산지	대한민국	
사용부위	열매	

### 2.2. 개발경위

- 신청원료를 언제, 어떤 경위로 개발하였고, 기반연구·인체적용시험 등을 언제부터 어떻게 실시하게 되었는지 등을 간략하게 기술
  - 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업의 하나로 2016년 5월부터 오미자의 새로운 기능성을 개발하였다.
  - 건강에 대한 사회적 관심이 증가하면서 약용 작물 관련 시장도 성장하고 있다. 미국의 경우 건강식품 시장의 약 20%를 약용작물이 차지하고, 중국에선 약초를 기초로 한 처방이 전체 의약품의 전반을 이루고 있다. 국내의 경우, 신규 약용작물의 개발 혹은 기존 약용작물의 신규 효능 발굴 연구가 부진하며, 대표적인 전통 약용작물인 인삼의 경우에도 국제경쟁력이 약화된 상태이다. 캐나다, 미국 등의 인삼 수출액은 이미 우리나라의 수출액을 추월한 상태이며, 중국삼, 화기삼에 비해 고려인삼은 가격 경쟁력을 상실한 실정이다. 인삼을 대표로 하는 국내 경제약용작물 산업의 경쟁력 제고를 위해 고부가가치 상품 개발을 위한 연구개발이 절실히 요구된다. 해외에서는 고부가가치 인삼 가공품 개발에 주력하는 반면, 국내 인삼 산업은 부가가치가 낮은 뿌리삼의 생산 수준에 머무르고 있다. 따라서 인삼대체 신규 경제약용작물 발굴 및 기존 약용작물의 신규 효능 발굴에 의한 상품화를 통해 국제경쟁력을 제고할 필요성이 강하게 대두되고 있다.
  - 오미자는 동의보감에서 다섯가지 맛을 내는 성질이 우리 몸에 각기 다르게 작용하는 것으로 표시하고 있는데, 신맛은 간, 단맛은 비장과 위장, 매운맛은 폐, 쓴맛은 심장, 짠맛은 신장과 방광에 좋은 것으로 평가한다. 우리나라와 중국이 원산지로써, 중국은 북오미자와 남오미자로 구분하고, 우리나라는 이 두 가지 외에 흑오미자가 추가된다. 북오미자가 일반적으로 오미자라고 부르는 품종이다. 흑오미자는 열매가 까만 것으로 우리나라 제주도에서만 생산된다. 우리나라에서 오미자는 주로 북오미자로 경북 문경

이 주재배지이나 현재는 기후 온난화로 북쪽으로 재배지가 확산되어 평창까지 이르고 있는 실정이다. 1990년대 말까지는 강원도 인제군이 전국 오미자 생산의 약 절반을 차지하였으나 군부대에 편입되면서 문경이 주재배지가 되고 있다. 문경에서는 약 700 농가 550ha로 전국 오미자 재배의 약 절반을 차지하고 있다. 전국에서의 오미자 재배지는 2000년에 비해서 10년이 지난 후에는 500% 증가하였고, 생산량 역시 10년 동안 2300% 증가하였고 수입량도 50% 이상 증가하였다. 그러나 근래에는 오미자의 공급과잉과 수입증가로 인해서 오미자 단가가 하락하고 있으며 이와 같은 추세는 지속될 것으로 예측되고 있기 때문에 오미자 재배 농가의 소득 감소로 이어질 것이 우려되는 실정이다. 오미자는 묘목 식재 후 3년생부터 생산이 가능하고 5년째가 가장 생산성이 높다 (국립산림과학원 ‘산지약용자원의 생산 및 유통실태(II)’ 2011년). 연도별 가격은 600g 당 26,200원(2002년)에서 17,000원(2009년)까지 점차 하락하는 추세이다. 생산 농가의 오미자 출하가격 역시 계속 하락하고 있다. 출하가격이 5,000원일 때 소득률은 5.6%, 6,000원일 때 21.3%로 근래 출하가격인 5-6천원인 점을 감안하면 소득률이 거의 0에 가까운 점을 제고해야 한다 (국립산림과학원 ‘산지약용자원의 생산 및 유통실태(II)’ 2011년). 중국의 오미자 생산량은 13,000톤(2010년) 정도로 우리나라(3,800톤)보다는 많다 (2011, 3.7 상하이 aT센터 자료). 중국에서 생산되는 오미자의 절반은 재고로 남기 때문에 가격하락으로 이어질 전망이다. 재고는 매년 축적되어 현재는 약 2만톤에 이르고 있는 것으로 추정된다. 이와 같은 재고 오미자는 우리나라 오미자 가격보다 아주 싼 가격에 우리나라로 수입되면서 가격 하락을 유도하고 있다.

- 따라서, 오미자의 새로운 수요 창출이 필요하고, 이를 위해서 현재 오미자 소비가 주로 생과, 건과, 당절임 세가지로 집중되어 있는 것을 확대할 필요가 있으며 새로운 효능의 발굴이 필요하다.
- 본 연구자가 개발한 오미자 관련 기술은 오미자 추출물이 보이는 생물학적 효능 중간기능 개선과 관련된 것으로 오미자의 새로운 수요 창출에 일조할 수 있는 기술이다.
- 간은 우리 몸에서 가장 큰 기관 중의 하나로, 단백질, 당, 비타민, 지방 등을 합성하고 지방과 지용성 비타민의 흡수를 도와주는 담즙을 생산하며, 알코올, 암모니아, 각종 약물 뿐 아니라 소화하면서 생긴 몸에 해로운 독성 물질을 해독시키는 작용을 한다. 간 섬유증(Liver fibrosis)은 간염에서 간경화/간경변(Liver cirrhosis)으로 진행되는 초기 과정으로서, 간에서 교원섬유 (collagen) 등이 과다하게 축적되어 발생된다 (J. Biol. Chem. 275:2247-2250 (2000)). 간 섬유화가 만성적으로 지속되면 간경화/간경변증으로 발전되어 간 기능이 손상되면서, 간의 구조적 구조가 파괴되고, 결국에는 간암으로 진행될 수 있다. 만성 간질환은 식욕감퇴와 만성 피로 증상을 나타내는 국내에서 중요한 성인병이며, 2013년 통계 기준으로 폐암에 이어 우리나라 암사망률 2위인 간암의 80% 이상에서 간경화 상태를 보이고 있다.
- 간섬유증은 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 알콜중독 또는 독성약물 등의 만성 자극에

대한 상처 치유 작용으로 나타난다. 다양한 원인에 의해 간염이 생겨 간세포가 손상을 받으면, 탐식세포의 일종인 쿠퍼 (Kupffer) 세포가 형질전환성장인자- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), 혈소판유래성장인자(PDGF), 종양괴사인자- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등과 같은 여러가지 세포 활성 물질을 분비하여, 염증을 유도함으로써 손상된 간 조직을 재생시켜 준다 (Alcoholism. Clin. Exp. Res. 23:911-6 (1999)). 이때, 간세포(hepatocyte)와 동모양 혈관내피세포 (sinusoidal endothelial cell) 사이에 위치하고 있는 간성상 세포(Hepatic stellate cell; HSC)는 쿠퍼 세포와 손상된 간세포에서 분비되는 활성 물질에 의해 휴지기 상태에서 근섬유아세포 유사세포 (myofibroblast-like cells)로 분화되고 활성화되면서 (J. Gastroenterol. Hepatol. 14:618-633 (1999)), 콜라겐섬유 (collagen fiber)를 포함하여 프로테오글리칸(proteoglycan) 등과 같은 세포외간질 물질(ECM)을 다량 방출하여, 손상된 간 조직 주변에 새로운 세포외간질 물질을 침착 시켜 조직 재생을 촉진시켜준다 (J. Gastroenterol. 35:665-672 (2000)).

- 그러나, 간세포 파괴와 재생 과정이 반복적으로 일어나면, 모든 원인의 간 손상에서 세포외간질의 콜라겐 단백질은 가는 미세섬유(fibril) 상태에서 굵은 섬유(fiber) 상태로 변형되어 과다 축적되면서, 간 섬유화(liver fibrosis) 과정이 진행되게 된다 (Semin. Liver Dis. 10:30-46 (1990)). 간 섬유화 과정에서 가장 일반적으로 관찰되는 특징은 제1형 콜라겐섬유가 극적으로 증가하고, 3형 콜라겐섬유는 작지만 유의하게 증가되는 것이다. 특히, 제1형 콜라겐섬유는 정상 간 조직의 경우 총 단백질 중 2% 정도를 차지하지만, 간 섬유화가 진행되고 있는 간 조직에서는 총 단백질의 10~30%까지 증가되는 것으로 알려져 있다 (Conn. Tis. Res. 23:19-31 (1989)). 이와 같이, 콜라겐 섬유가 다량 축적되어 간 섬유화가 지속되면, 간의 구조가 변형되고 간 기능이 감소되면서, 간이 딱딱하게 되는 간경변(liver cirrhosis)으로 진행된다.
- 간경화/간경변은 비가역적이지만, 간 섬유화는 가역적으로 일어나는 반응이므로, 예방 및 조기 치료가 가능하다고 알려져 있다. 따라서, 간경화/간경변증을 효과적으로 예방 및 치료하기 위해서는 간 성상세포(HSC)의 활성을 억제시켜 콜라겐섬유 등의 합성을 차단시켜 간 섬유화의 진행 과정을 차단시켜주는 것이 절대적으로 중요하다 (J. Gastroenterol. 35:665-672 (2000)).
- 본 연구에서는 오미자 추출물이 마우스 동물모델에서 간 섬유증 예방에 효능이 있다는 실험 결과를 얻었다. 또한 오미자 추출물은 간 섬유화 과정에서 가장 중요한 역할을 하는 간 성상세포(HSC)에 작용하여 콜라겐섬유 합성을 차단한다는 사실을 확인하였다.

## 2.3. 국내·외 인정·허가 현황

### 2.3.1. 국내

○ 국내 인정·허가 현황을 요약하여 기술

- 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년

개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

- 오미자의 사용용도 : 식약처 식품공전 ‘식품의 기준 및 규격’에 ‘식품에 사용할 수 있는 원료’의 목록에 열매 부위가 등재되어 있음
- 오미자의 유통량 : 국내생산량 9565톤, 수입량 231톤 (관세청, 2013년 기준)
- 오미자의 섭취실태 : 더운 물에 우려낸 물 또는 착즙으로 가공 사용

○ 유사원료(오미자추출물)가 건강기능식품 기능성 원료로 인정:

인정번호	원료명	제조방법	지표성분	기능성내용	일일섭취량
2016-21호	오미자	에탄올 추출물	Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N	갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음	783mg/일

- 본 원료와 기능성 내용이 다름

### 2.3.2. 국외

○ 국외 정부기관의 인정근거를 기재 (예: GRAS, Novel food, FOSHU 등)

- 오미자 추출물에 대한 인체적용시험은 Phytotherapy Research 27:368-373(2013) 논문에 발표됨
  - ✓ alanine aminotransferase (ALT) 또는 aspartate aminotransferase (AST) 수치가 높은 (40-60 U/L) 20명의 환자와 20명의 placebo 사람에 대해 오미자 추출물을 제공하여 시험
  - ✓ 60Kg 체중의 사람은 2064mg/day의 용량으로 효능을 나타냄
  - ✓ 오미자 추출물 투여에 따른 aspartate aminotransferase (AST) 수치의 감소효과
  - ✓ 오미자 추출물 투여에 따른 alanine aminotransferase (ALT) 수치의 감소효과
  - ✓ 사람의 복부 초음파 사진에서 오미자 추출물 투여 결과로 간이 정상으로 회복되었음이 확인됨

## 2.4. 국내·외 사용 현황

### 2.4.1. 국내

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
	오미자 열매					식품	3800톤	생과, 당절임, 액상 등 의 형태로 제조, 유통, 판매되고, 본 신청원료 와는 다름(본 신청원료 는 오미자 에탄올 추출 물)

#### 2.4.2. 국외

<유통 판매 현황 표>

유통국	제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
미국		오미자 열매					식품	13000 톤	



### 3. 제조방법 및 그에 관한 자료

#### 3.1. 원재료

- 제조공정 상의 출발물질을 기재
  - 오미자 열매

##### 3.1.1. 원재료 성분

- 원재료에 포함되어 있는 주요 성분(5개 이상) 및 함량 기재
  - 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”의 지표성분은 schisandrin, gomisin A, gomisin N으로 정의됨
  - 따라서 schisandrin, gomisin A, gomisin N을 포함하는 리그난 성분들로 schsandrin A, Angeloylgomisin H를 함유하고 있음

##### 3.1.2. 원재료 구별법

- 유사원재료가 있는 경우 신청원료의 원재료와의 구별방법(형태학적인 감별법, 유전자 분석 등) 기재
  - 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”의 지표성분은 schisandrin, gomisin A, gomisin N으로 정의되어 있으므로 이를 충족 시켜야 함
  - 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”에 지표성분 분석법이 기술되어 있고 이에 준하는 방법으로 구별함

##### 3.1.3. 원재료 조성비

#### 3.2. 개요

- 제조과정을 기술한 제조공정으로 원재료에서 최종 신청원료까지 제조공정을 요약(3줄 이내)
  - 오미자 열매를 채취하여 음건
  - 건조한 오미자 열매를 95% 이상의 에탄올 수용성 용매로 추출
  - 추출물을 감압농축, 건조한 추출물을 원료로 사용

#### 3.3. 제조공정표

(1) 제조과정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(kg)
원재료	건조한 오미자 열매		
↓			
추출	95% 이상의 에탄올로 추출		
↓			
여과	거름종이로 여과		
↓			
농축	감압농축, 40도		20%
↓			
건조	동결건조		
↓			
원료			

## 4. 원료의 특성에 관한 자료

### 4.1. 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등

- 성상, 물성 : 갈색고체 (예시로 사진 첨부)

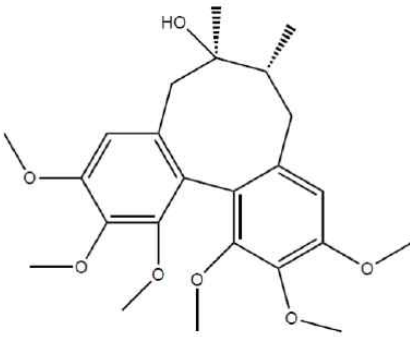


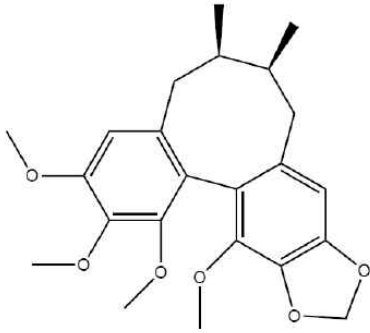
### 4.2. 지표성분(또는 기능성분) 및 근거

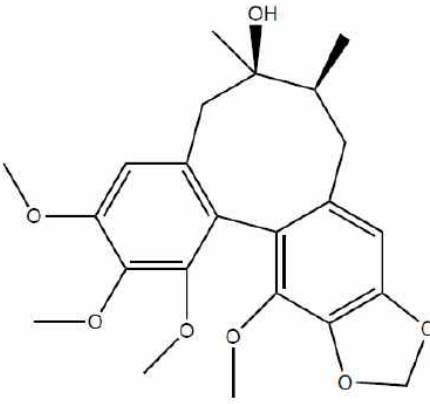
- 지표성분(또는 기능성분)

- 지표성분(또는 기능성분)을 정하고 설정 근거를 서술

- 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”의 지표성분은 schisandrin, gomisin A, gomisin N으로 정의되어 있으므로 이를 본 원료의 지표성분으로 함

지표성분	schisandrin
구조	
일반명	(6R,7R)-1,2,3,10,11,12-hexamethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrodibenzo[a,c][8]annulen-6-ol
분자식	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>
분자량	432.51
CAS No	7432-28-2

지표성분	gomisin N
구조	
일반명	(6R,7S)-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxole
분자식	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>
분자량	400.47
CAS No	69176-52-9

지표성분	gomisin A
구조	
일반명	(6R,7S)-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-ol
분자식	<del>C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub></del>
분자량	416.47
CAS No	58546-54-6

#### 4.3. 영양성분정보자료

○ 해당사항 없음

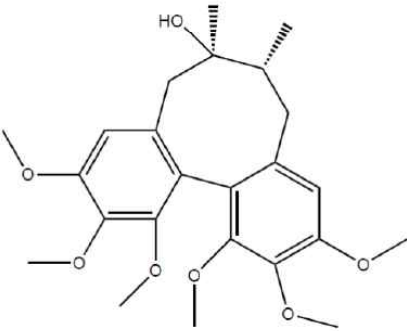
## 5. 지표성분(또는 기능성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

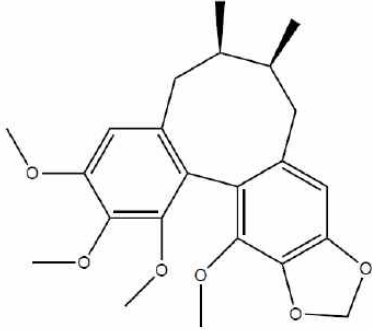
### 5.1. 지표성분(또는 기능성분)의 규격 및 근거

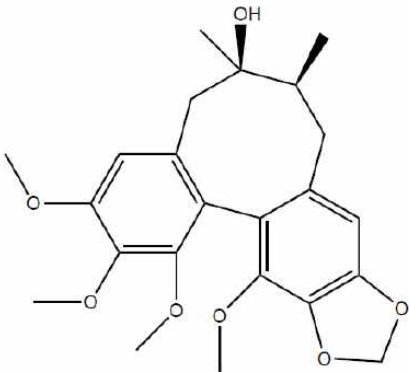
○ 지표성분(또는 기능성분)의 규격 및 설정 근거에 대하여 요약하여 기재

- 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”의 지표성분은 schisandrin, gomisin A, gomisin N으로 정의되어 있으므로 이를 본 원료의 지표성분으로 함

#### 5.1.1. 지표성분(또는 기능성분)의 규격

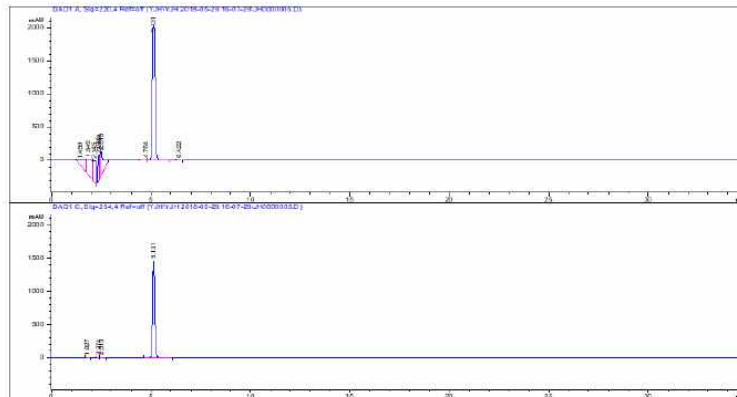
지표성분	schisandrin
구조	
일반명	(6R,7R)-1,2,3,10,11,12-hexamethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrodibenzo[a,c][8]annulen-6-ol
분자식	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>
분자량	432.51
CAS No	7432-28-2

지표성분	gomisin N
구조	
일반명	(6R,7S)-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxole
분자식	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>
분자량	400.47
CAS No	69176-52-9

지표성분	gomisin A
구조	
일반명	(6R,7S)-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-ol
분자식	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>
분자량	416.47
CAS No	58546-54-6

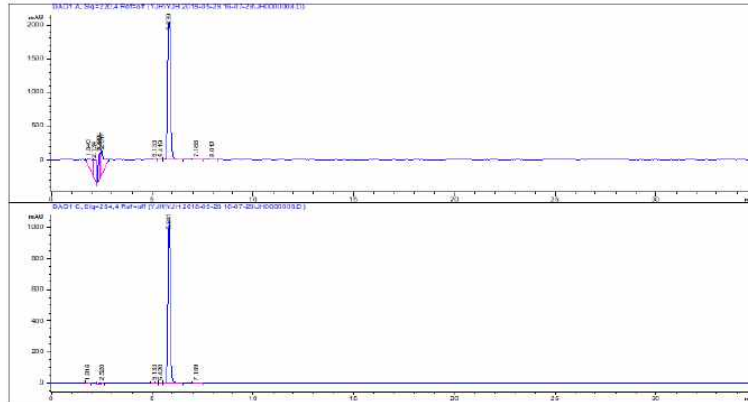
### 5.1.2. 설정근거

- 건국대학교 분자구조연구실 실험 결과
- 오미자 200g을 95% EtOH에 넣고 추출한 다음 추출 용액을 감압 농축 후 동결 건조 하여 오미자 추출물 47.04g을 얻음 (회수율 : 23.52%)
- 식약처 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”에서 제시한 HPLC 분석방법을 사용함 : HPLC로 분석하기 위하여 사용한 기기는 Agilent 1100 Series이고, 컬럼은 Symmetry 4.6 X 250mm 5um을 사용하고, 30도에서 실험을 수행함. injection volume은 5~20uL, flow rate는 1.0 mL/min으로 하였고 220nm와 254nm에서 검출함. 이동상은 0.1% Formic acid를 첨가한 65% acetonitrile 수용액을 사용함
- 오미자의 지표성분 Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N의 표준품은 AlfaBiotech에서 구입하여 사용하였고 이들의 순도는 98% 이상이므로 추가 정제없이 사용함
- Schizandrin 1mg/ml (methanol)을 HPLC로 분석한 chromatogram은 아래와 같은데 위의 chromatogram은 220nm에서, 아래 chromatogram은 254nm에서 검출한 결과임 (5.13min의 retention time에서 관찰됨)

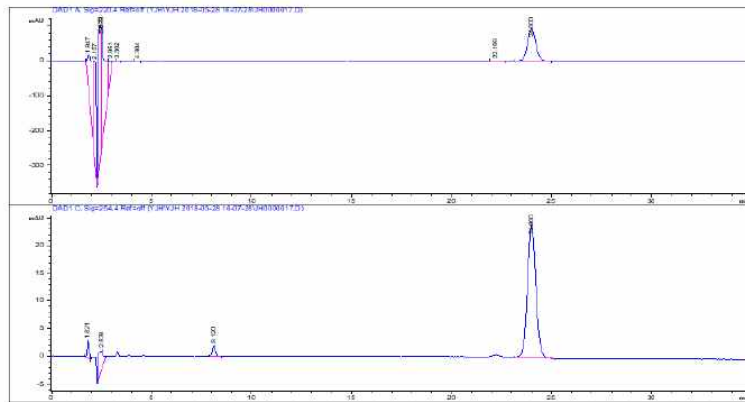


- Gomisin A 1mg/ml (methanol)을 HPLC로 분석한 chromatogram은 아래와 같은데 위의 chromatogram은 220nm에서, 아래 chromatogram은 254nm에서 검출한 결과임 (5.84min의 retention time에서 관찰됨)

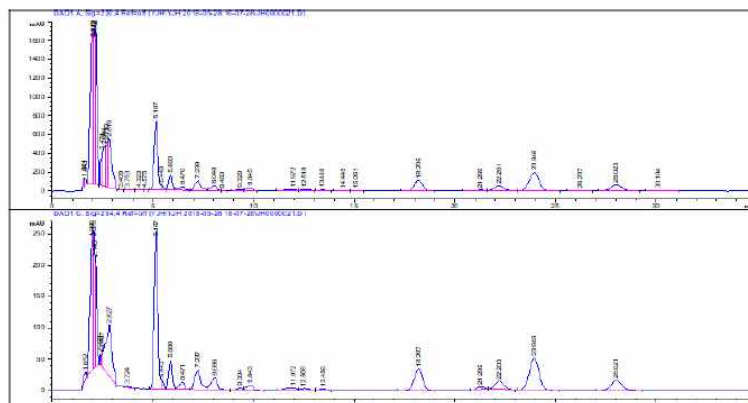




- Gomisin N 1mg/ml (methanol)을 HPLC로 분석한 chromatogram은 아래와 같은데 위의 chromatogram은 220nm에서, 아래 chromatogram은 254nm에서 검출한 결과임 (24.00min의 retention time에서 관찰됨)



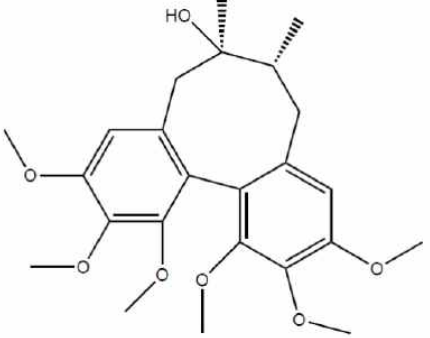
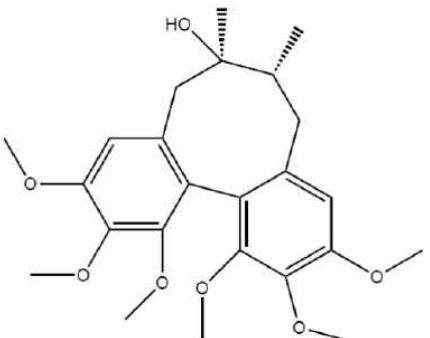
- 오미자 EtOH ex 10mg/ml (methanol)을 HPLC로 분석한 chromatogram은 아래와 같은데 위의 chromatogram은 220nm에서, 아래 chromatogram은 254nm에서 검출한 결과임



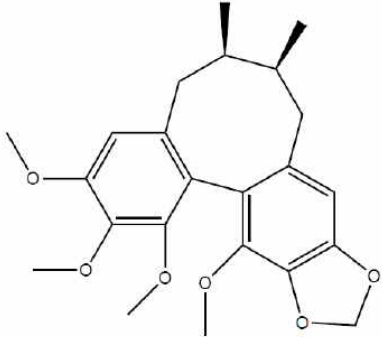
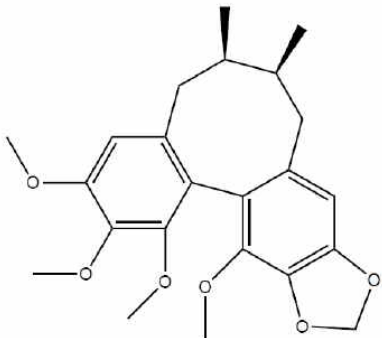
- 오미자 EtOH ex에 포함된 Schizandrin, Gomisin A, Gomisin N의 함량은 220nm에서 0.28%, 0.06%, 0.14%이고, 254nm에서 0.18%, 0.04%, 0.14%였음

5.2. 지표성분(또는 기능성분) 표준품 정보

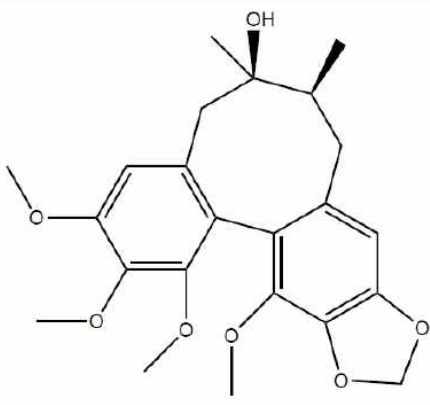
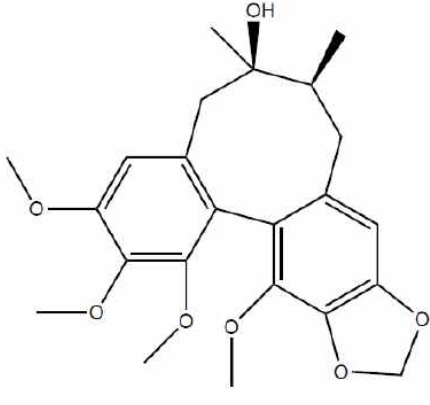
○ schsandrín

<p>■ 시판되는 표준품</p>	표준품명	schsandrín
	제조·판매회사명	AlfaBiotech
	구조식	
	CAS No.	7432-28-2
<p>■ 자사 표준품</p>	표준품명	schsandrín
	구조식	
	CAS No.	7432-28-2
	순도	98%
	유통기한	-
	제공여부 확인서 제출여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오

○ gomisin N

<p>■ 시판되는 표준품</p>	표준품명	gomisin N
	제조·판매회사명	AlfaBiotech
	구조식	
	CAS No.	69176-52-9
<p>■ 자사 표준품</p>	표준품명	gomisin N
	구조식	
	CAS No.	69176-52-9
	순도	98%
	유통기한	-
	제공여부 확인서 제출여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오

○ gomisin A

<p>■ 시판되는 표준품</p>	표준품명	gomisin A
	제조·판매회사명	AlfaBiotech
	구조식	
	CAS No.	58546-54-6
<p>■ 자사 표준품</p>	표준품명	gomisin A
	구조식	
	CAS No.	58546-54-6
	순도	98%
	유통기한	-
	제공여부 확인서 제출여부	<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오

### 5.3. 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

<input checked="" type="checkbox"/> 공인시험방법	출처: 식약처 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표_4]_의약품각조_2부_중_생약부분 “오미자”에서 제시한 시험방법을 사용
<input type="checkbox"/> 자사시험방법	<input type="checkbox"/> 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료 제출 여부

## 6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

### 6.1. 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

- 실측치를 고려하여 가능한 낮은 규격으로 설정하고, 일일 최대섭취량을 제안한 기준 규격에 대비했을 때 그에 따른 제안규격에 의한 일일최대섭취량이 규정에서 정해진 일일 규정규격 이내로 설정되었는지 확인
- 식약처 대한민국의약품(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”에서 제시한 규격항목을 따름
  - 가) 납 5 ppm 이하
  - 나) 비소 3 ppm 이하
  - 다) 수은 0.2 ppm 이하
  - 라) 카드뮴 0.3 ppm 이하
- 시험성적서 자료 첨부 [한국식품과학연구원의 시험성적서 첨부]
  - 가) 납 : 불검출
  - 나) 비소 : 0.01 ppm
  - 다) 수은 : 불검출
  - 라) 카드뮴 : 불검출



일반 제 8451 호

## 시 험 성 적 서

검 체 명	오미자 추출물					
회 사 명	건국대학교 산학협력단	대 표 자	임응호			
주 소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교					
시험항목	이미녹타닌 외 29항목	의뢰목적	제출용			
제조번호	제조일자	유통기한	접수일자	2018.06.07		

귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

외관	적색의 페이스트임
이미녹타닌(ppm)	불검출
디페노코나졸(ppm)	불검출
뉴프로페진(ppm)	불검출
아이트라즈(ppm)	불검출
트리포린(ppm)	불검출
페나리올(ppm)	0.01
디티아논(ppm)	불검출
아세타미프리드(ppm)	불검출
아족시스트로빈(ppm)	불검출
플루디옥소닐(ppm)	불검출
트리플록시스트로빈(ppm)	0.25
피라클로스트로빈(ppm)	0.19
메톡시페노자이드(ppm)	불검출
디티오카바메이트(ppm)	불검출
펜피라자민(ppm)	불검출
트리플루미졸(ppm)	0.01
클로르페나피르(ppm)	불검출
에마멕틴 벤조에이트(ppm)	불검출
아이소피라잠(ppm)	불검출
피리오페논(ppm)	불검출
페니트로티온(ppm)	불검출
스피네토람(ppm)	불검출
납(mg/kg)	불검출
카드뮴(mg/kg)	불검출
비소(mg/kg)	0.01
수은(mg/kg)	불검출
세균수	0/g
대장균	음성
대장균군	음성
살모넬라	음성 끝.

2018년 06월 21일

**한 국 식 품 과 학 연 구 원 장**



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

## 6.2. 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

- 「식품의 기준 및 규격」에 농약의 잔류허용기준이 없는 경우 : 5가지 농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)에 대하여 시험결과와 분석자료
  - 식약처 대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부\_중\_생약부분 “오미자”에서 제시한 규격항목을 따름
  - 시험성적서 자료 첨부
  - 한국식품과학연구원의 시험성적서 첨부
  - 동명생명과학원의 시험성적서 첨부





일반 제 8451 호

## 시 험 성 적 서

검 체 명	오미자 추출물					
회 사 명	건국대학교 산학협력단	대 표 자	임용호			
주 소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교					
시험항목	이미녹타닌 외 29항목	의뢰목적	제출용			
제조번호		제조일자		유통기한		접수일자 2018.06.07

귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

외관.....	적색의 페이스트임
이미녹타닌(ppm).....	불검출
디페노코나졸(ppm).....	불검출
뉴프로페진(ppm).....	불검출
아미트라즈(ppm).....	불검출
트리포린(ppm).....	불검출
페나리올(ppm).....	0.01
디티아논(ppm).....	불검출
아세타미프리드(ppm).....	불검출
아족시스트로빈(ppm).....	불검출
플루디옥소닐(ppm).....	불검출
트리플록시스트로빈(ppm).....	0.25
피라클로스트로빈(ppm).....	0.19
메톡시페노자이드(ppm).....	불검출
디티오카바메이트(ppm).....	불검출
펜피라자민(ppm).....	불검출
트리플루미졸(ppm).....	0.01
클로르페나피르(ppm).....	불검출
에마엑틴 벤조에이트(ppm).....	불검출
아이소피라잠(ppm).....	불검출
피리오페논(ppm).....	불검출
페니트로티온(ppm).....	불검출
스피네토람(ppm).....	불검출
납(mg/kg).....	불검출
카드뮴(mg/kg).....	불검출
비소(mg/kg).....	0.01
수은(mg/kg).....	불검출
세균수.....	0/g
대장균.....	음성
대장균군.....	음성
살모넬라.....	음성 끝.

2018년 06월 21일

한 국 식 품 과 학 연 구 원 장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.



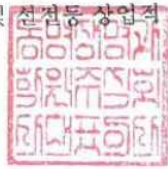
제CTAPC8518호

## 검사 성적서 (Certificate of Analysis)

신청인 (Applicant)	성명 : 건국대학교산학협력단_서정향		생년월일 : -		
	주소(Address) : 서울특별시 광진구 능동로 120(화양동, 건국대학교 내)		전화번호 : -		
접수번호	CP18-00051	접수일자	2018-06-05		
검사 품목 (Name of Product)	오미자EtOH추출물				
시료 접수 및 중량 (Quantity of Samples)	1점				
검사 항목 (Analytical Items)	잔류농약검사320성분				
검사 목적 (Analytical Purpose)	참고용				
검사 결과 (Analytical Results)	아래 검출항목의 나머지 성분은 불검출 (검출 6항목)				
	순번	검출항목	단 위	잔류허용기준	검출결과
	1	Buprofezin	mg/kg	핵과류 최저 0.5	0.1481
	2	Etofenprox	mg/kg	핵과류 최저 2.0	0.0265
	3	Flubendiamide	mg/kg	핵과류 최저 1.0	0.1494
	4	Iprodione	mg/kg	핵과류 최저 2.0	3.8898
	5	Pyraclostrobin	mg/kg	핵과류 최저 1.0	0.1144
	6	Trifloxystrobin	mg/kg	오미자 3.0	0.0749

비고 : 건조 등의 과정으로 인하여 수분 함량이 변화된 경우는 수분 함량을 고려하여 적용한다.

귀하께서 의뢰한 검체의 검사결과는 위와 같습니다.  
 검사에 사용된 검체는 의뢰인이 제공하였으며, 검체명 또한 의뢰인이 제시한 것입니다.  
 본 성적서는 검사목적 이외의 법적인 해결의 용도나 광고 및 **전접촉 상업적** 용도로 사용할 수 없습니다.



2018년 6월 13일

### 동명생명과학원(주)

61611 광주광역시 남구 대남대로 385(월산동) T.062) 351-1005 F.062) 351-1006

### 6.3. 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

#### 6.3.1. 납

- 식품공전의 유해물질시험법 중 적합한 것을 선정한다.

#### 6.3.2. 총비소

- 식품공전의 유해물질시험법 중 적합한 것을 선정한다.

#### 6.3.3. 카드뮴

- 식품공전의 유해물질시험법 중 적합한 것을 선정한다.

#### 6.3.4. 총수은

- 식품공전의 유해물질시험법 중 적합한 것을 선정한다.

#### 6.3.5. 대장균군

- 식품공전의 미생물시험법 중 대장균군 정량시험을 선정한다.

##### ※ 시험성적서 및 분석 자료 첨부

- 한국식품과학연구원의 시험성적서 첨부
- 대장균 : 불검출
- 대장균군 : 불검출
- 살모넬라 : 불검출



일반 제 8451 호

## 시 험 성 적 서

검 체 명	오미자 추출물					
회 사 명	건국대학교 산학협력단	대 표 자	임용호			
주 소	서울특별시 광진구 능동로 120 건국대학교					
시험항목	이미녹타딘 외 29항목			의뢰목적	제출용	
제조번호		제조일자		유통기한	접수일자	2018.06.07

귀하가 우리 연구원에 검사 의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

외관.....	적색의 페이스트임
이미녹타딘(ppm).....	불검출
디페노코나졸(ppm).....	불검출
뉴프로페진(ppm).....	불검출
아미트라즈(ppm).....	불검출
트리포린(ppm).....	불검출
페나리몰(ppm).....	0.01
디티아논(ppm).....	불검출
아세타미프리드(ppm).....	불검출
아족시스트로빈(ppm).....	불검출
플루디옥소닐(ppm).....	불검출
트리플록시스트로빈(ppm).....	0.25
피라클로스트로빈(ppm).....	0.19
메톡시페노자이드(ppm).....	불검출
디티오카바메이트(ppm).....	불검출
펜피라자민(ppm).....	불검출
트리플루미졸(ppm).....	0.01
클로르페나피르(ppm).....	불검출
에마멕틴 벤조에이트(ppm).....	불검출
아이소피라잠(ppm).....	불검출
피리오페논(ppm).....	불검출
페니트로티온(ppm).....	불검출
스피네토람(ppm).....	불검출
납(mg/kg).....	불검출
카드뮴(mg/kg).....	불검출
비소(mg/kg).....	0.01
수은(mg/kg).....	불검출
세균수.....	0/g
대장균.....	음성
대장균군.....	음성
살모넬라.....	음성 끝.

2018년 06월 21일

한 국 식 품 과 학 연 구 원 장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선전 등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

#### 6.4. 필요시 추가항목의 규격 및 근거

- 해당사항 없음

## 7. 안전성에 관한 자료

### 7.1. 섭취근거 정보

- 2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황으로 같음
  - 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음“의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

### 7.2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보

- 오미자는 이미 우리나라에서 식품으로 허가받은 식물임
- 2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황으로 같음
  - 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음“의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 인정받음 (2016-21호)

### 7.3. 섭취량 평가 정보

- 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음“의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

### 7.4. 인체적용시험 정보

- 인체적용시험 정보
  - 오미자 추출물에 대한 인체적용시험은 Chiu 등이 보고한 Phytotherapy Research 27:368-373(2013) 논문의 결과로 대체하고자 함
  - alanine aminotransferase (ALT) 또는 aspartate aminotransferase (AST) 수치가 높은 (40-60 U/L) 20명의 환자와 20명의 placebo 사람에게 대해 오미자 추출물을 제공하여 시험

**Table 2. Characteristics of enrolled subjects**

		Placebo group (n = 20)	Test group (n = 20)
Male		10	10
Female		10	10
Age (years)	20-40	7	5
	41-60	9	10
	61-74	4	5
	Mean ± SD	46.2 ± 14.6	51.8 ± 14.8

- 60Kg 체중의 사람은 2064mg/day의 용량으로 효능을 나타냄

- 오미자 추출물 투여에 따른 aspartate aminotransferase (AST) 수치의 감소효과

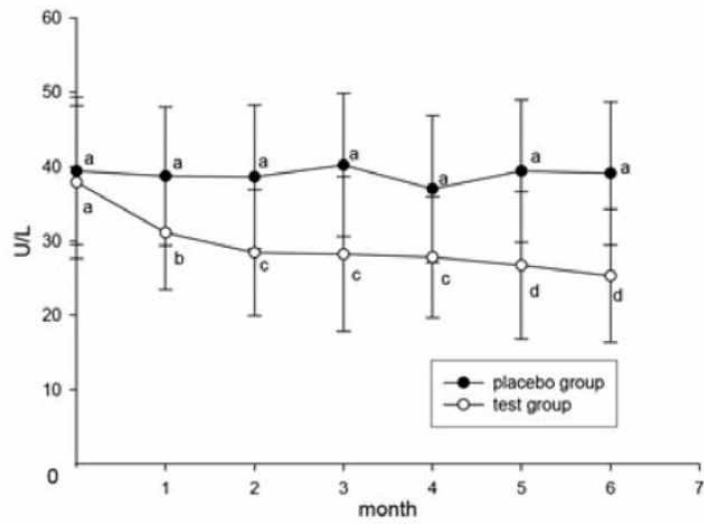


Figure 1. Levels of aspartate aminotransferase in blood.

- 오미자 추출물 투여에 따른 alanine aminotransferase (ALT) 수치의 감소효과

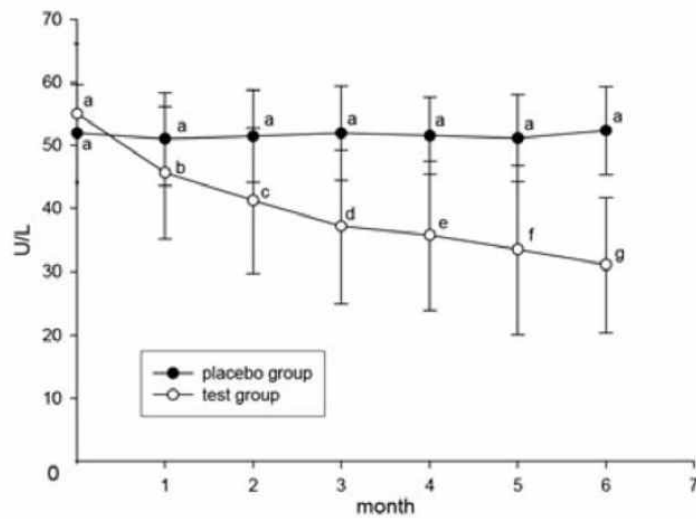


Figure 2. Levels of alanine aminotransferase in blood.

- 복부 초음파 사진에서 오미자 추출물 투여 결과로 간이 정상으로 회복되었음이 확인됨

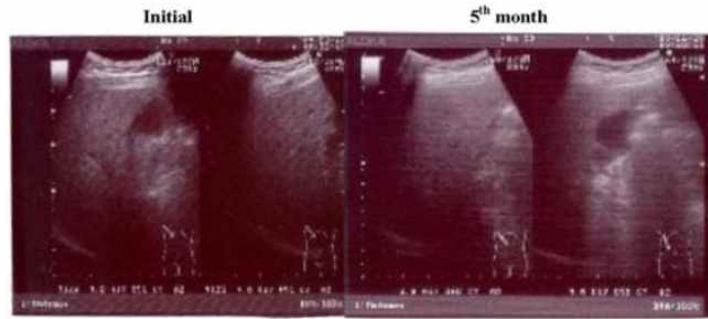


Figure 4. Abdominal ultrasonic examination.

## 7.5. 독성시험

- 오미자는 이미 우리나라에서 식품으로 허가받은 식물임
- 2.3. 국내·외 인정·허가 현황 및 2.4. 국내·외 사용 현황으로 같음
  - 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 인정받음 (2016-21호)



## 8. 기능성에 관한 자료

### ■ 제안된 기능성내용 및 섭취량

- 기능성 내용 : 간기능 개선
- 일일 섭취량 : 제안한 일일 섭취량을 기재
  - 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능성을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

### ■ 기능성 제출자료

시험물질	총 제출자료(건)	시험관시험(건)	동물시험(건)	인체적용시험(건)
신청원료	3	1	1	1
참고자료	3	1	1	1

### ■ 추측 가능한 작용기전

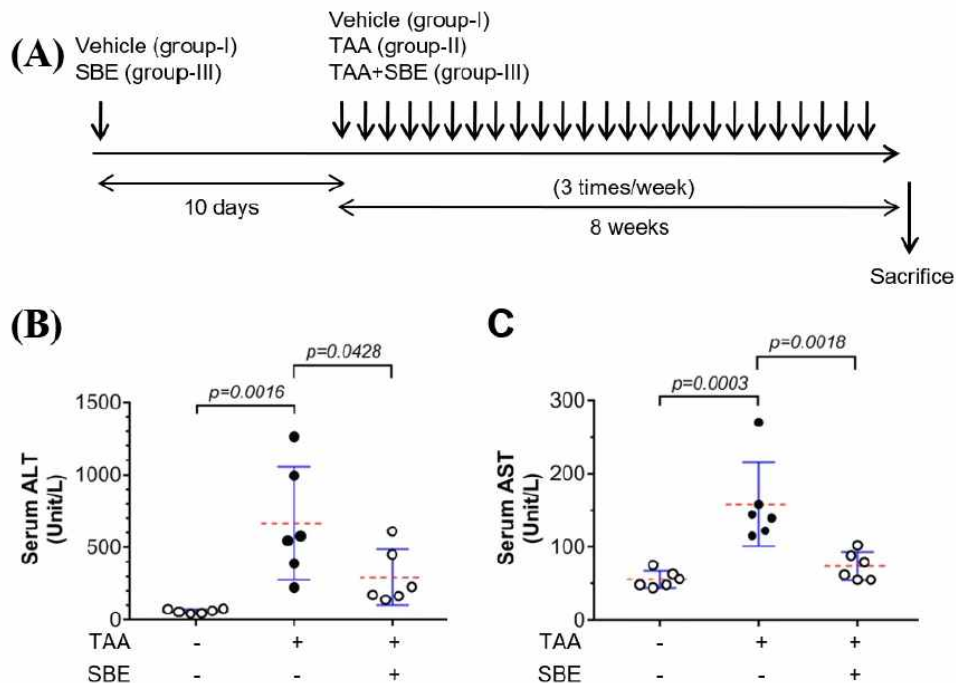
- 간섬유증은 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 알콜중독 또는 독성약물 등의 만성 자극에 대한 상처 치유 작용으로 나타난다. 다양한 원인에 의해 간염이 생겨 간세포가 손상을 받으면, 탐식세포의 일종인 쿠퍼 (Kupffer) 세포가 형질전환성장인자-β(TGF-β), 혈소판유래성장인자(PDGF), 종양괴사인자-α (TNF-α) 등과 같은 여러가지 세포 활성 물질을 분비하여, 염증을 유도함으로써 손상된 간 조직을 재생시켜 준다 (Alcoholism, Clin. Exp. Res. 23:911-6 (1999)). 이때, 간세포(hepatocyte)와 동모양 혈관내피세포 (sinusoidal endothelial cell) 사이에 위치하고 있는 간성상 세포(Hepatic stellate cell; HSC)는 쿠퍼 세포와 손상된 간세포에서 분비되는 활성 물질에 의해 휴지기 상태에서 근섬유아세포 유사세포 (myofibroblast-like cells)로 분화되고 활성화되면서 (J. Gastroenterol. Hepatol. 14:618-633 (1999)), 콜라겐섬유 (collagen fiber)를 포함하여 프로테오글리칸(proteoglycan) 등과 같은 세포외간질 물질(ECM)을 다량 방출하여, 손상된 간 조직 주변에 새로운 세포외간질 물질을 침착 시켜 조직 재생을 촉진시켜준다 (J. Gastroenterol. 35:665-672 (2000)).
- 그러나, 간세포 파괴와 재생 과정이 반복적으로 일어나면, 모든 원인의 간 손상에서 세포외간질의 콜라겐 단백질은 가는 미세섬유(fibril) 상태에서 굵은 섬유(fiber) 상태로 변형되어 과다 축적되면서, 간 섬유화(liver fibrosis) 과정이 진행되게 된다 (Semin. Liver Dis. 10:30-46 (1990)). 간섬유화 과정에서 가장 일반적으로 관찰되는 특징은 제1형 콜라겐섬유가 극적으로 증가하고, 3형 콜라겐섬유는 작지만 유의하게 증가되는 것이다. 특히, 제1형 콜라겐섬유는 정상 간 조직의 경우 총 단백질 중 2% 정도를 차

지하지만, 간 섬유화가 진행되고 있는 간 조직에서는 총 단백질의 10~30%까지 증가 되는 것으로 알려져 있다 (Conn. Tis. Res. 23:19-31 (1989). 이와 같이, 콜라겐 섬유화가 다량 축적되어 간 섬유화가 지속되면, 간의 구조가 변형되고 간 기능이 감소되면서, 간이 딱딱하게 되는 간경변(liver cirrhosis)으로 진행된다.

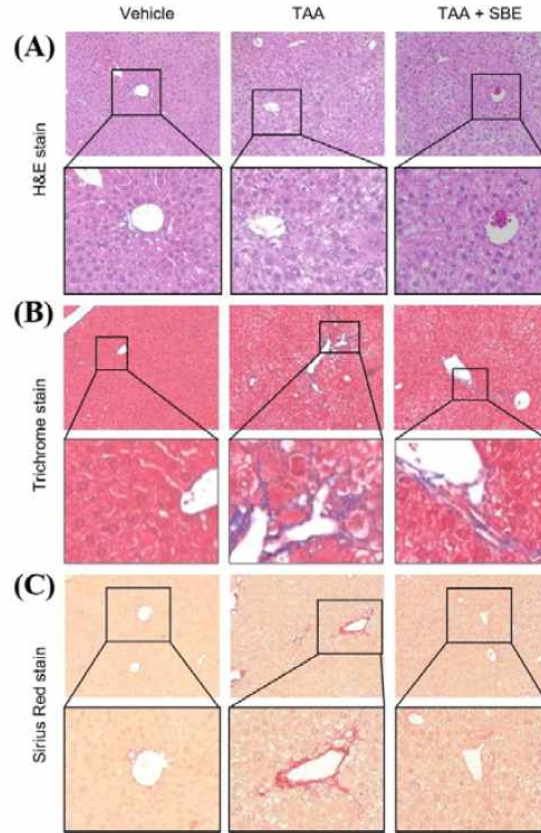
- 간경화/간경변은 비가역적이지만, 간 섬유화는 가역적으로 일어나는 반응이므로, 예방 및 조기 치료가 가능하다고 알려져 있다. 따라서, 간경화/간경변증을 효과적으로 예방 및 치료하기 위해서는 간 정상세포(HSC)의 활성을 억제시켜 콜라겐섬유 등의 합성을 차단시켜 간 섬유화의 진행 과정을 차단시켜주는 것이 절대적으로 중요하다 (J. Gastroenterol. 35:665-672 (2000).
- 본 연구에서는 오미자 추출물이 마우스 동물모델에서 간 섬유증 예방에 효능이 있다는 실험 결과를 얻었다. 또한 오미자 추출물은 간 섬유화 과정에서 가장 중요한 역할을 하는 간 정상세포(HSC)에 작용하여 콜라겐섬유 합성을 차단한다는 사실을 확인하였다.
- Appl. Biol. Chem. 61:607-616 (2018)

### 8.1. 시험관시험

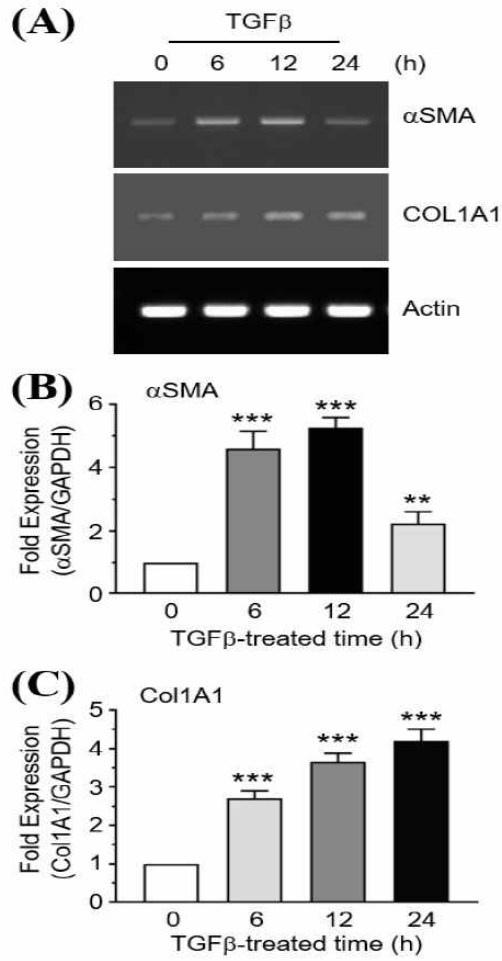
- TAA(Thioacetamide)-induced liver damagedp 대한 오미자 추출물의 저해효과 (A) 실험 디자인: Phosphate buffered saline aks 처리한 마우스, 100mg/Kg TAA를 처리한 마우스, 150mg/Kg 오미자 추출물과 TAA를 동시에 처리한 마우스 (B) alanine aminotransferase (ALT) serum에서의 효과 (C) aspartate aminotransferase (AST) serum level에서의 효과



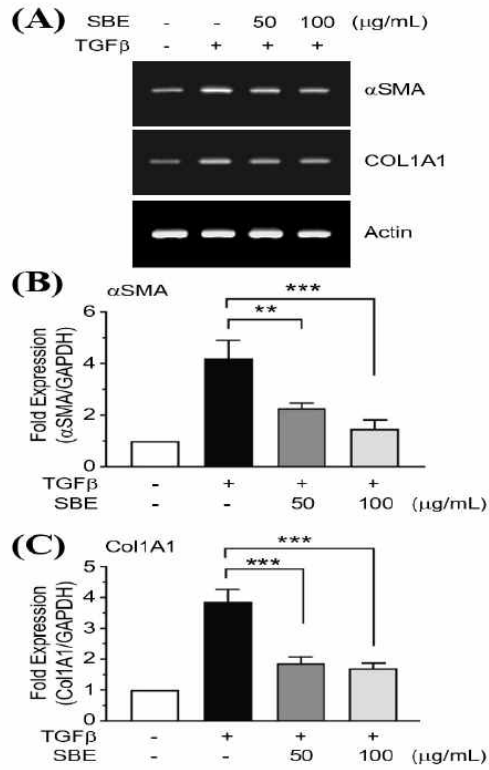
- 마우스 간에서의 TAA-induced collagen deposition에 대한 오미자 추출물의 효과 :  
 (A) 간을 해부하여 10% formalin 으로 고정시키고 Hematoxylin와 eosin (H&E) staining을 함 (cytoplasm, pink; nucleus, purple) (B) modified Masson's trichrome (collagen, blue) (C) Picro Sirius Red (collagen fibers, red)



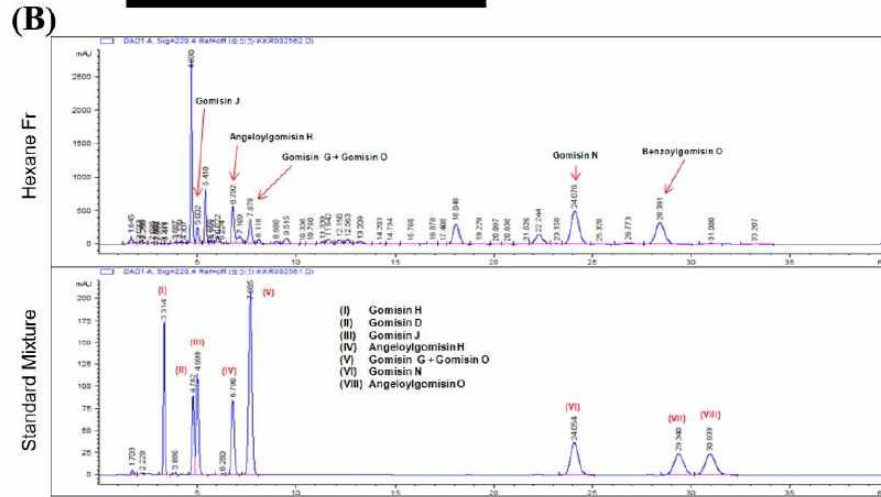
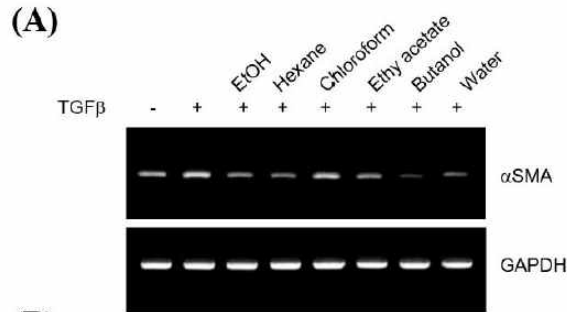
- $\alpha$ SMA 및 COL1A1 mRNA의 발현에 대한 TGF $\beta$ 의 효과: hepatic stellate cells (HSCs)는 10ng/ml로 처리함. (A)  $\alpha$ SMA 및 COL1A1 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정함. (B)  $\alpha$ SMA에 대한 결과 (C) COL1A1에 대한 결과



- $\alpha$ SMA and COL1A1 mRNAs 의 TGF $\beta$ -induced expression 에 대한 오미자 추출물의 저해 효과: (A) HSC를 오미자 추출물 50mg/ml 또는 100mg/ml로 처리하거나 안한 결과 (B)  $\alpha$ SMA에 대한 Q-PCR 결과 (C) COL1A1에 대한 Q-PCR 결과



- $\alpha\text{SMA}$  mRNA 발현에 대한 오미자 추출물의 효과 : 에탄올, 헥산, 부탄올, 수용액 분획이 효과를 보임



- 이상의 동물실험 및 시험관시험에서 오미자 추출물이 간섬유화에 효능을 보임이 확인 됨
- Schisandra chinensis inhibiting TGFβ-induced activation of hepatic stellate cells. Appl. Biol. Chem. 61:607-616 (2018)

## 8.2. 동물시험

- 위의 8.1 시험관시험에 함께 기술하였음
- 동물실험 관련 IRB승인신청서는 아래 첨부함



2. 실험동물				
	1	2	3	4
종	Mouse			
계통	Balb/c			
성별/수량	♂: 144 ♀:	♂: ♀:	♂: ♀:	♂: ♀:
체중/주령	15~20gram / 7주령	gram / 주령	gram / 주령	gram / 주령
품질	<input checked="" type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> CL (Clean) <input type="checkbox"/> Conventional <input type="checkbox"/> 무 확인	<input type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> CL (Clean) <input type="checkbox"/> Conventional <input type="checkbox"/> 무 확인	<input type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> CL (Clean) <input type="checkbox"/> Conventional <input type="checkbox"/> 무 확인	<input type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> CL (Clean) <input type="checkbox"/> Conventional <input type="checkbox"/> 무 확인
구입처	오리엔트바이오			
사육장소	실험동물연구센터 SPF사육실			

**3. 연구(실습) 목적 및 필요성** (비전문가도 이해할 수 있도록 평이하게 기술)

Thioacetamide(TAA)-induced liver fibrosis mouse model에서 증상 완화 효과를 보이는 천연물 screening 및 분석.

**4. 동물실험을 대체할 수 있는 방법의 유무**

검토하였으나, 동물실험을 대체할 수 있는 방법이 없었다.

검토하였으나, 대체수단으로는 연구목적에 충분히 달성하기가 어려웠다.

검색사이트  PubMed  Current Contents Connect  한국학술정보  기타 ( )

Key words liver fibrosis, hepatic stellate cell activation

검색일 2018.03.24

**5. 해당 종과 계통(strain)을 선택한 합리적 이유** (연구의 생물학적 연관성 제시)

Mouse는 Human과 유사한 척추동물로써, TAA-induced liver fibrosis 모델을 만든 후 약물의 증상 완화 효과를 보기 위한 연구이므로 BALB/c mouse를 선택하였음. 발표된 논문으로는 Arch Pharm Res. 2013 Apr;36(4):485-94. doi: 10.1007/s12272-013-0039-0. Epub 2013 Feb 24. 등이 있음.



**6. 사용동물 수에 대한 합리적 근거 (동물의 수를 산출한 통계학적 근거제시)**

연구에 사용되는 총 마릿수 : 총 144마리

[실험1]

- Control : 6마리
    - 1. - TAA 100mg/kg : 6마리
  - TAA 100mg/kg + AG(간경화 억제 후보 물질1) : 서로 다른 2가지 AG 농도조건으로 각 6마리
- \*1회 24마리, 총 2회 실시함. (통계적인 수치를 얻어내기 위해 수행)

[실험2]

- Control : 6마리
    - 2. - TAA 100mg/kg : 6마리
  - TAA 100mg/kg + Omi(간경화 억제 후보 물질2) : 서로 다른 2가지 Omi 농도조건으로 각 6마리
- \*1회 24마리, 총 2회 실시함. (통계적인 수치를 얻어내기 위해 수행)

[실험3]

- Control : 6마리
    - 3. - TAA 100mg/kg : 6마리
  - TAA 100mg/kg + XXX(간경화 억제 후보 물질3) : 서로 다른 2가지 XXX 농도조건으로 각 6마리
- \*1회 24마리, 총 2회 실시함. (통계적인 수치를 얻어내기 위해 수행)
- >약물 3종X 24마리X 2회=144마리

\* 3가지 약물에 대한 실험을 동시에 진행할 경우, 개체수가 많아 실험 수행 중 오류가 발생할 수 있기 때문에 [실험1,2,3]을 각각 독립적으로 수행함. 이에 따라 각 실험별 양성, 음성 대조군이 요구되므로 위와 같이 산출하였음.

**7. 위해 물질 실험 [방사선, 위험화학물 등]**

해당사항 없음

**8. 특별한 주거(Housing) 및 사육조건 필요 유무 (예, Restraining devices)**

해당사항 없음

**9. 사육장소 이외의 장소로 동물의 반출 혹은 외부 연구시설에서 동물을 반입할 경우, 그 필요사유**

해당사항 없음

10. 실험방법 (프로토콜) 개요 (필요시 별지를 사용하여 구체적으로 기술할 것)

- 간경화 억제 후보약물을 주 3회, 1주간 복강주사로 투여함.
  - 이후 TAA 100mg/kg씩 주 3회, 9주간 복강주사로 투여함. 실험이 종료되면 안락사 시켜 liver를 채취하고, 간경화 정도를 관찰.
  - 약품명 : Thioacetamide(TAA), 복강주사, 100mg/kg  
AG, Omi, 간경화 억제 후보물질XXX, 복강주사, 10, 25mg/kg
  - 실험 조건 : ① Control  
② TAA 100mg/kg, 복강주사  
③ AG 10mg/kg + TAA, 복강주사  
④ AG 20mg/kg + TAA, 복강주사
  - 순차 기간 : 1주일
  - 안락사 시기 : 실험 시작 10주 후
  - 간경화 억제효과 측정 방법  
① 마우스의 간 적출 후 조직염색 (Hematoxylin & Eosin stain, Trichrome masson staining, sirius red staining)을 통해 간경화 정도를 비교 분석  
② 간 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 간경화 지표를 비교 분석  
③ 간 조직에서 단백질을 추출 후 western blot을 통해 간경화 지표를 비교 분석
- \* 나머지 간경화 억제후보 물질은 in vitro 결과를 기반으로 농도를 잡은 후 같은 방식으로 진행 할 예정이다.

※ 복수의 대규모 수술 실험 (Multile Major Operative Procedures)을 시행하는 경우, 그 필요 사유 (단, 원칙적으로 불허함)

11. 동물이 경험하는 통증 및 스트레스 정도 (해당사항에 V표)

- 고통등급 A : 생물개체를 이용하지 아니하거나 세균, 원충 및 무척추동물을 사용한 실험, 교육, 연구, 수술 또는 시험
  - 고통등급 B : 실험, 교육, 연구, 수술 또는 시험을 목적으로 사육, 적응 또는 유지되는 척추동물
  - 고통등급 C : 척추동물을 대상으로 고통이나 억압이 없고, 고통을 줄여주는 약물을 사용하지 아니하는 실험, 교육, 연구, 수술 또는 시험
  - 고통등급 D : 척추동물을 대상으로 고통이나 억압을 동반하는 실험, 교육, 연구, 수술 또는 시험으로서 적절한 마취제나 진통제 등이 사용되는 경우
  - 고통등급 E : 척추동물을 대상으로 고통이나 억압을 동반하는 실험, 교육, 연구, 수술 또는 시험으로서 마취제나 진통제 등이 사용되지 아니하는 경우
- < 등급 E는 원칙적으로 불허하며 사용하지 않은 이유에 대하여 별첨자료로 설명하여야 함 >

**12. 고통등급 D에 해당되는 동물실험에서 동물의 통증 혹은 스트레스 경감을 위한 방법 (진정제, 진통제, 마취제, 항생제 등의 종류, 용량, 투여방법, 횟수 및 실시자)**

- TAA 주사 후 2주 차부터 진통제를 투여함.
- 약물 종류 : Meloxicam
- 용량 : 5mg/kg
- 투여방법 및 횟수 : 교육받은 실험자가 1주에 1번, SC로 주사함.

**13. 고통등급 E에 해당하는 동물실험을 수행하는 사유 (필요시, 별지로 상세사유 첨부)**

<input type="checkbox"/>	인도적 종료시점은 채택하지만, 연구목적 상 진정·진통제를 투여할 수 없거나, 고통경감을 위한 방법 없음 (상세 사유 기재) 예) 통증실험 수행으로 진통제를 사용하면 연구결과에 영향을 미침
<input type="checkbox"/>	연구목적 상 인도적 종료시점을 채택하지 않고 동물의 죽음을 종료시점으로 설정해야 함. (상세 사유 기재) 예) LD50 측정을 위한 독성실험

**14. 동물에 극도의 통증 또는 스트레스를 가하는 결과가 예상될 경우, 적절한 중재, 인도적인 실험종료 (Humane endpoints) 또는 안락사를 취하기 위한 기준**

실험 전 체중 대비 20% 감소하였을 때, 호흡을 잘 못하고 경련을 일으킬 때, 체모가 빠질 때

**15. 안락사 및 사체처리방법**

- 약제 (사용약물명, 용량 및 투여경로 : )     CO<sub>2</sub> 가스     경추탈골  
 기타 (분당 10-20% 속도로 안락사 챔버를 서서히 채우는 속도로 주입함.)  
 ※ 사체처리방법 (보관 장소 및 사체 처리업체명) : 실험동물연구센터 계약업체 한국위생에 위탁처리

**16. 실험자를 위한 작업환경의 안전성 확보 여부**

- 실험동물에 의한 상해를 방지하기 위한 사전 안전교육 충분히 실시
- 연구 진행 전 과정 동안 Latex glove, 마스크, 실험복 착용

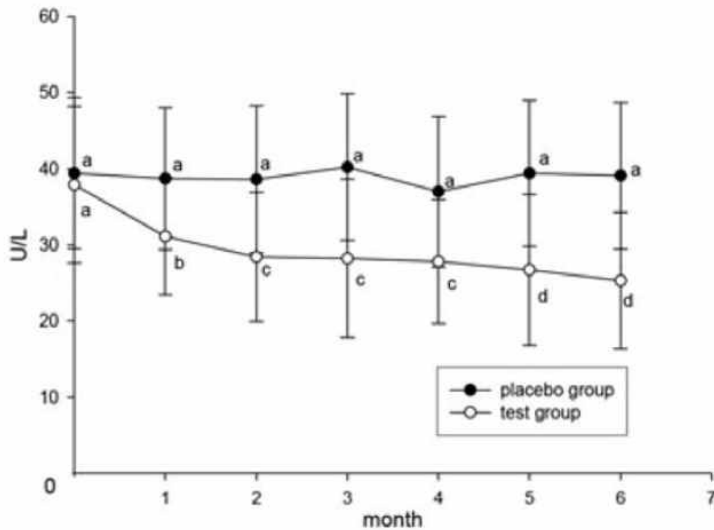
### 8.3. 인체적용시험

- alanine aminotransferase (ALT) 또는 aspartate aminotransferase (AST) 수치가 높은 (40–60 U/L) 20명의 환자와 20명의 placebo 사람에 대해 오미자 추출물을 제공하여 시험

**Table 2. Characteristics of enrolled subjects**

	Placebo group (n = 20)	Test group n = 20)
Male	10	10
Female	10	10
Age (years)		
20–40	7	5
41–60	9	10
61–74	4	5
Mean ± SD	46.2 ± 14.6	51.8 ± 14.8

- 60Kg 체중의 사람은 2064mg/day의 용량으로 효능을 나타냄
- 오미자 추출물 투여에 따른 aspartate aminotransferase (AST) 수치의 감소효과



**Figure 1.** Levels of aspartate aminotransferase in blood.

- 오미자 추출물 투여에 따른 alanine aminotransferase (ALT) 수치의 감소효과

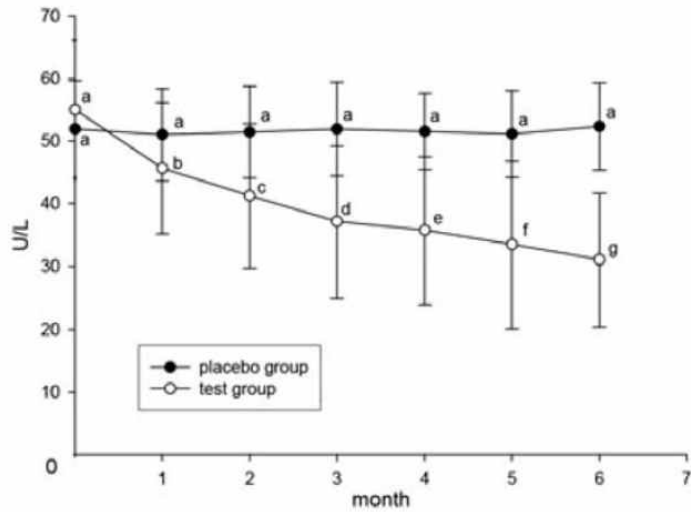


Figure 2. Levels of alanine aminotransferase in blood.

- 복부 초음파 사진에서 오미자 추출물 투여 결과로 간이 정상으로 회복되었음이 확인됨

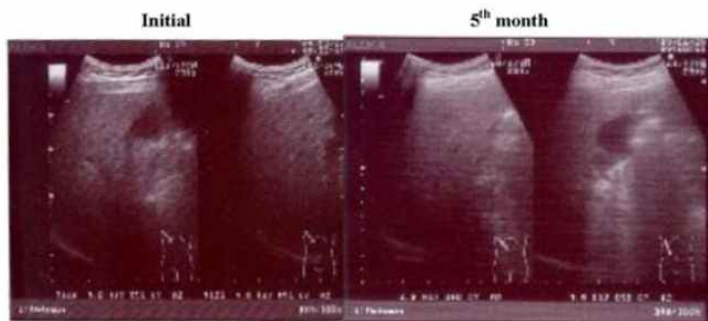


Figure 4. Abdominal ultrasonic examination.

- Improvement of Liver Function in Humans Using a Mixture of Schisandra Fruit Extract and Sesamin. *Phytotherapy Research* 27:368–373(2013)

## 9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

### 9.1. 섭취량 및 근거

- 섭취량 : 783mg/일
- 근거내용 : 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

### 9.2. 섭취방법 및 근거

- 섭취방법 : 복용
- 근거내용 : 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

### 9.3. 섭취 시 주의사항 및 근거

- 섭취 시 주의사항 : 783mg/일의 일일섭취량
- 근거내용 : 오미자 에탄올 추출물은 ‘갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있음’의 기능을 2016년 개별인정원료 생리활성기능2등급으로 개별인정원료로 원료성분을 인정받았고, 783mg/일의 일일섭취량으로 인정받음 (2016-21호)

## 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

### 10.1. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2016-63호, '16.6.30)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료'에 해당하지 않음

### 10.2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2016-63호, '16.6.30)」 제 2. 1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않음
- 식약처 식품공전 '식품의 기준 및 규격'에 '식품에 사용할 수 있는 원료'의 목록에 오미자 열매 부위가 등재되어 있음

### 3장. 질량분석방법 기반 유효성분/대사물질의 생체분포도 작성

- 질량분석을 이용한 당귀, 오미자, 백수오 함유성분의 마우스 장기분포
- 질량분석을 이용한 오미자 함유성분의 정량적 생체내 분포

#### 1절. 약용작물 추출물 및 단일약용물질의 MALDI-TOF MS 분석을 위한 최적의 matrix 확인

##### 1. 질량분석방법을 위한 사전 조사

###### 가. 연구내용

약용물질 중 오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황의 추출물을 통하여 질량분석을 위하여 다양한 추출방법으로 추출물을 얻음. 특히 당귀의 경우 2가지 방법을 사용하여 추출을 진행. 이때 추출물 - 오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황에 함유되어 있는 단일물질을 우선 데이터베이스를 이용하여 확인함. 다양한 방법(정맥주사, 복강주사, 근육주사, 구강투여 등)으로 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 주입된 성분들을 실시간 위치 추적 및 생체 내 분포를 정성적/정량적 평가를 통해 각 물질들이 장기의 어느 부분에 분포하는 가를 알아봄으로써 각 장기 내의 효능과 매커니즘에 관한 연구가 가능함.

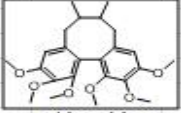

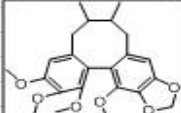
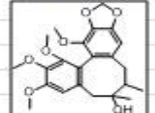
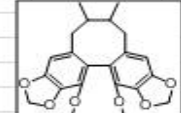
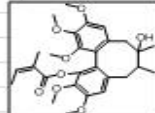
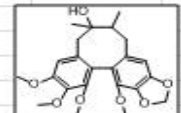
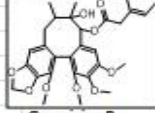
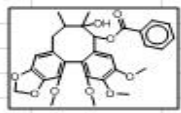
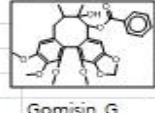
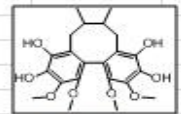
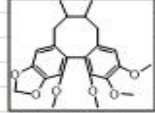
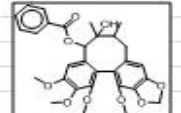
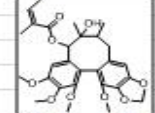
###### 나. 연구방법

(1) 추출한 물질을 데이터베이스를 통해 물질의 구조와 질량값을 분석하여 각 구조에 대한 이해 시도

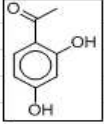
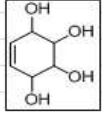
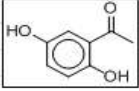
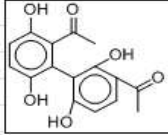
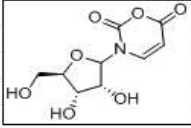
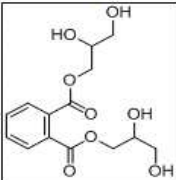
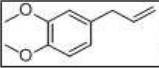
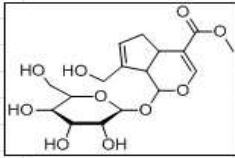
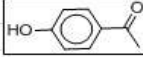
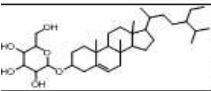
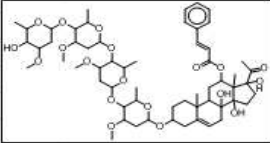
###### 다. 연구결과

(1) 오미자를 분석한 결과 오미자의 경우 Gomisin계열이 단일물질의 주를 구성하고 있으며, 14개의 단일물질이 대표적으로 포함되어 있음을 확인 할 수 있었음. 각 단일물질의 mass spectrometry (MS) 분석을 위하여 분자량을 확인 하였으며, MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. 오미자 내의 단일추출물 리스트는 아래와 같다.

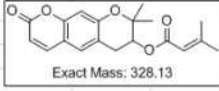
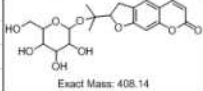
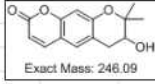
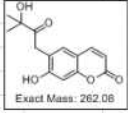
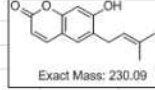
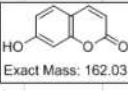
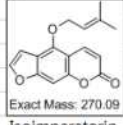
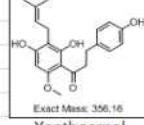
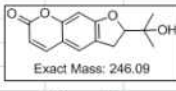
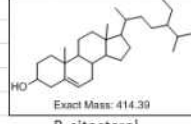


	Exact Mass: 416.22 H: 417.22 Na: 439.22 K: 455.22		Exact Mass: 432.21 H: 433.21 Na: 455.21 K: 471.21
Schizandrin A		Schizandrol A	
	Exact Mass: 400.19 H: 401.19 Na: 423.19 K: 439.19		Exact Mass: 416.18 H: 417.18 Na: 439.18 K: 455.18
Schizandrin B		Schizandrol B	
	Exact Mass: 384.16 H: 385.16 Na: 407.16 K: 423.16		Exact Mass: 500.24 H: 501.24 Na: 523.24 K: 539.24
Schizandrin C		Angeloylgomisin H	
	Exact Mass: 416.18 H: 417.18 Na: 439.18 K: 455.18		Exact Mass: 528.24 H: 529.24 Na: 551.24 K: 567.24
Gomisin A		Gomisin B	
	Exact Mass: 536.2 H: 537.2 Na: 559.2 K: 575.2		Exact Mass: 536.2 H: 537.2 Na: 559.2 K: 575.2
Gomisin C		Gomisin G	
	Exact Mass: 420.18 H: 421.18 Na: 443.18 K: 459.18		Exact Mass: 400.19 H: 401.19 Na: 423.19 K: 439.19
Gomisin J		Gomisin N	
	Exact Mass: 536.2 H: 537.2 Na: 559.2 K: 575.2		Exact Mass: 514.22 H: 515.22 Na: 537.22 K: 553.22
schisantherin		Tigloylgomisin P	

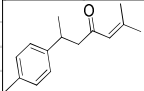
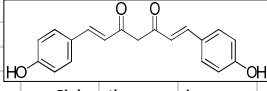
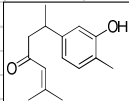
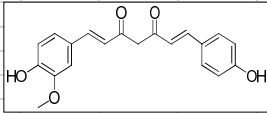
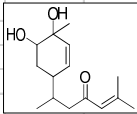
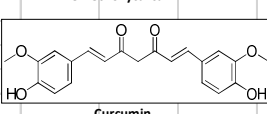
(2) 백수오를 분석한 결과 백수오의 경우 다양한 단일물질들로 구성되어 있음을 확인하였으며, 총 11개의 대표적인 단일물질을 확인 할 수 있었음. 각 단일물질의 MS 분석을 위하여 분자량을 확인 하였으며, MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. 백수오 내의 단일추출물 리스트는 아래와 같다.

	Exact Mass: 152.05 H 153.05 Na 175.05 K 191.05			Exact Mass: 146.06 H 147.06 Na 169.06 K 185.06
2,4-dihydroxyacetophenone			Conduritol F	
	Exact Mass: 152.05 H 153.05 Na 175.05 K 191.05			Exact Mass: 302.08 H 303.08 Na 325.08 K 341.08
2,5-dihydroxyacetophenone			Cynandione A	
	Exact Mass: 245.05 H 246.05 Na 268.05 K 284.05			Exact Mass: 314.1 H 315.1 Na 337.1 K 353.1
3-(D-ribofuranosyl)-2,3-dihydro-6H-1,3-oxazine-2,6-dione			Cynanoneside B	
	Exact Mass: 178.1 H 179.1 Na 201.1 K 217.1			Exact Mass: 388.14 H 389.14 Na 411.14 K 427.14
methyleugenol			geniposide	
	Exact Mass: 136.05 H 137.05 Na 159.05 K 175.05			
p-hydroxyacetophenone				
	Exact Mass: 590.45 H 591.45 Na 613.45 K 629.45			Exact Mass: 1086.58 H 1087.58 Na 1109.58 K 1125.58
daucoesterol			Wilfoside	

(3) 당귀를 분석한 결과 Coumarin계열이 대표적 단일물질들로 구성이 되어있으며, 총 10개의 대표적 단일물질을 확인함. 각 단일물질의 MS 분석을 위하여 분자량을 확인하였으며, MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. 당귀 단일추출물 리스트는 아래와 같다.

 Exact Mass: 328.13	Exact Mass: 328.13 H 329.13 Na 351.13 K 367.13	 Exact Mass: 408.14	Exact Mass: 408.14 H 409.14 Na 431.14 K 447.14
<b>Decursin</b>		<b>Nodakenin</b>	
 Exact Mass: 246.09	Exact Mass: 246.09 H 247.09 Na 269.09 K 285.09	 Exact Mass: 262.08	Exact Mass: 262.08 H 263.08 Na 285.08 K 301.08
<b>Decursinol</b>		<b>Peucedanone</b>	
 Exact Mass: 230.09	Exact Mass: 230.09 H 231.09 Na 253.09 K 269.09	 Exact Mass: 162.03	Exact Mass: 162.03 H 163.03 Na 185.03 K 201.03
<b>Demethylsuberosine</b>		<b>Umbelliferon</b>	
 Exact Mass: 270.09	Exact Mass: 270.09 H 271.09 Na 293.09 K 309.09	 Exact Mass: 356.16	Exact Mass: 356.16 H 357.16 Na 379.16 K 395.16
<b>Isoimperatorin</b>		<b>Xanthoanol</b>	
 Exact Mass: 246.09	Exact Mass: 246.09 H 247.09 Na 269.09 K 285.09	 Exact Mass: 414.39	Exact Mass: 414.39 H 415.39 Na 437.39 K 453.39
<b>Marmesin</b>		<b>B-sitosterol</b>	

(4) 강황을 분석한 결과 대표적 물질로 Curcumin이 들어있으며, 그 외에 다양한 단일물질로 구성이 되어있음을 확인함. 일반적으로 작은 양의 분자량을 가지는 물질을 분석할 때 사용하는 방법을 이용하여 각 약용작물에서 얻은 추출물을 MS를 통하여 분석할 수 있었음. 각 단일물질의 MS 분석을 위하여 분자량을 확인하였으며, MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. 당귀 단일추출물 리스트는 아래와 같다.

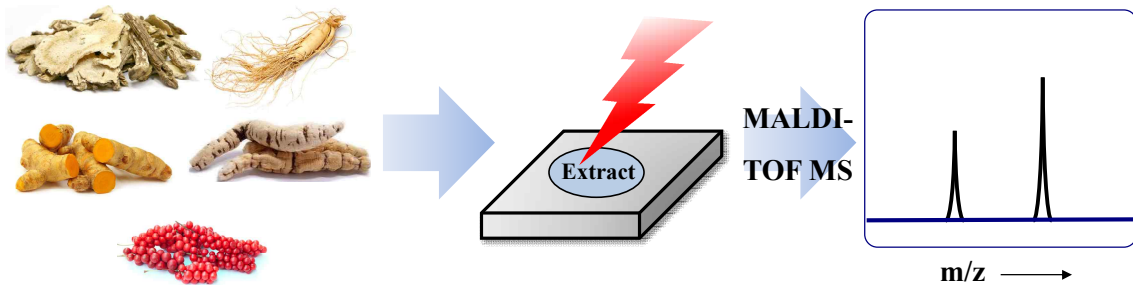
 Ar-turmerone	Exact mass 216.15 H 217.15 Na 239.15 K 255.15	 Bisdemethoxycurcumin	Exact mass 308.1 H 309.1 Na 331.1 K 347.1
 2-hydroxy-1,3,5,10-bisabolatetraen-9-one	Exact mass 232.15 H 233.15 Na 255.15 K 271.15	 Demethoxycurcumin	Exact mass 338.12 H 339.12 Na 361.12 K 377.12
 Bisacurone	Exact mass 252.17 H 253.17 Na 275.17 K 291.17	 Curcumin	Exact mass 368.13 H 369.13 Na 391.13 K 407.13

## 2. 약용작물 분석을 위한 MALDI-TOF MS의 matrix 최적화

### 가. 연구내용

약용물질 중 오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황의 추출물을 통하여 질량분석을 위하여 다양한 추출방법으로 추출물을 얻음. 이를 사용하여 실제로 MALDI TOF MS를 사용하여 분석을 진

행함. 이 때 최적의 조건을 찾기 위해 다양한 종류의 matrix를 사용하여 분석함. 이에 대한 대략적인 모식도는 아래와 같다.

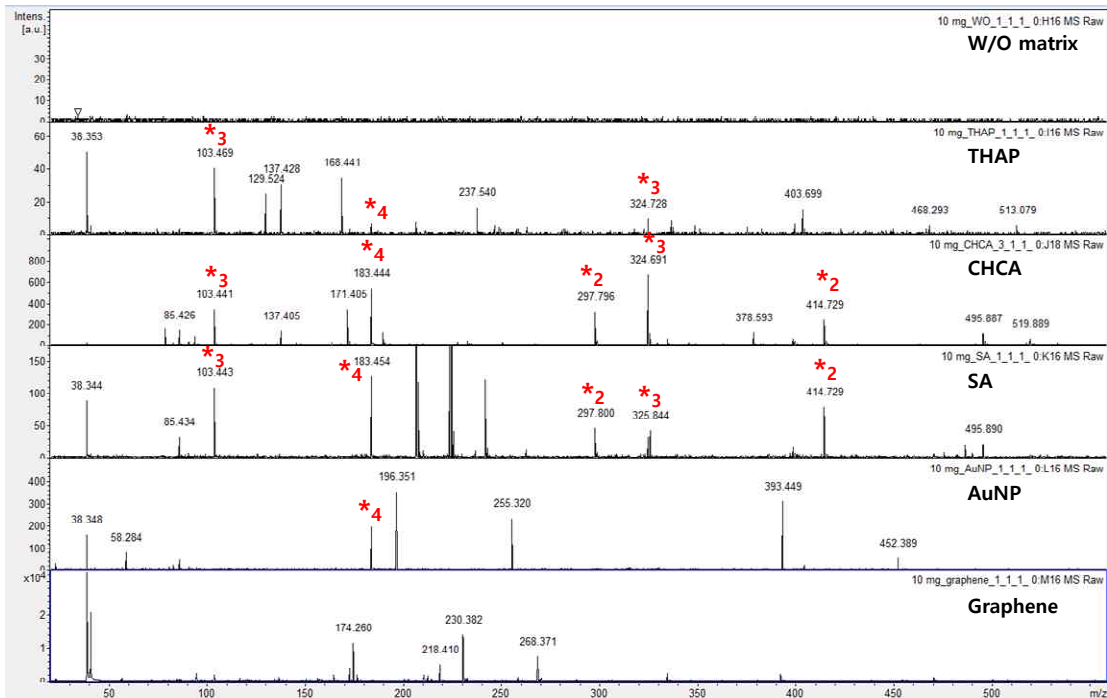


나. 연구방법

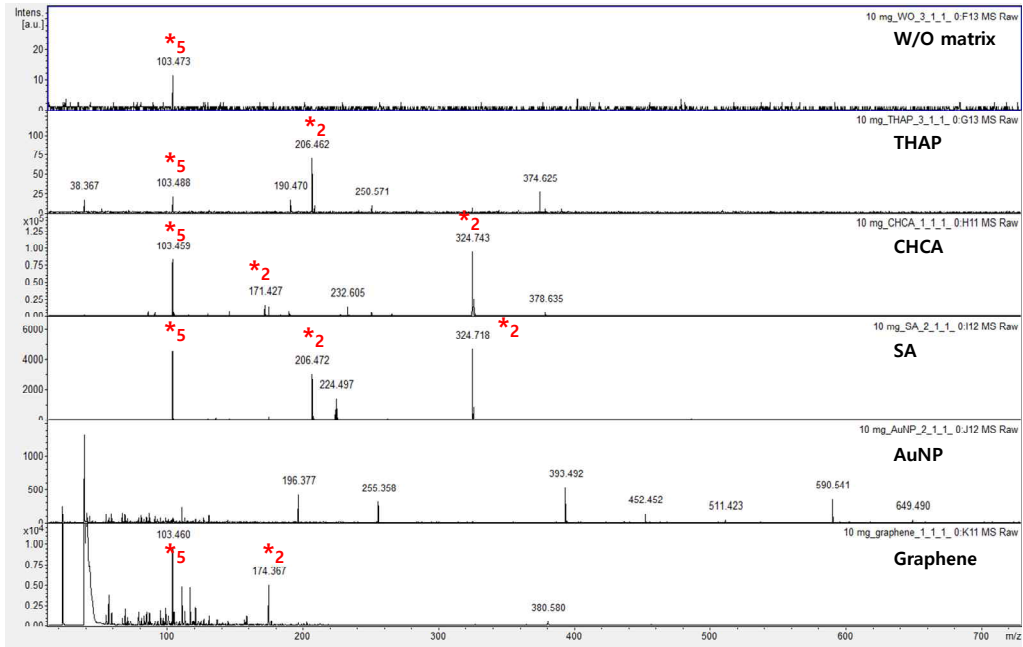
- (1) 추출한 물질을 각 10mg을 사용하여 분석을 진행
- (2) 다양한 종류의 matrix를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행 [Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47(49):9518 (2008)]

다. 연구결과

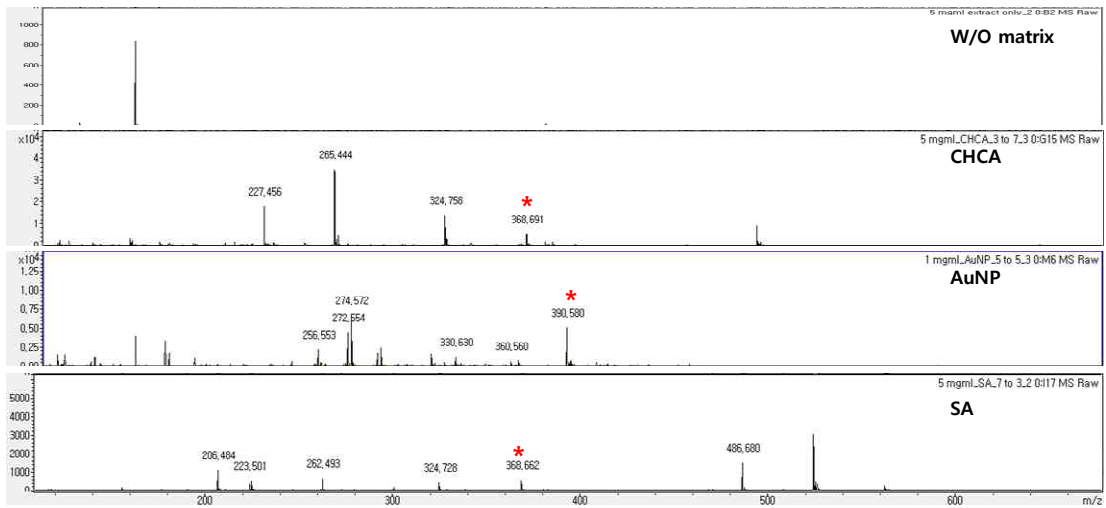
- (1) 오미자를 분석하기 위하여 다양한 매트릭스를 사용하여 분석을 수행하였다. MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. MS 데이터는 아래와 같다.



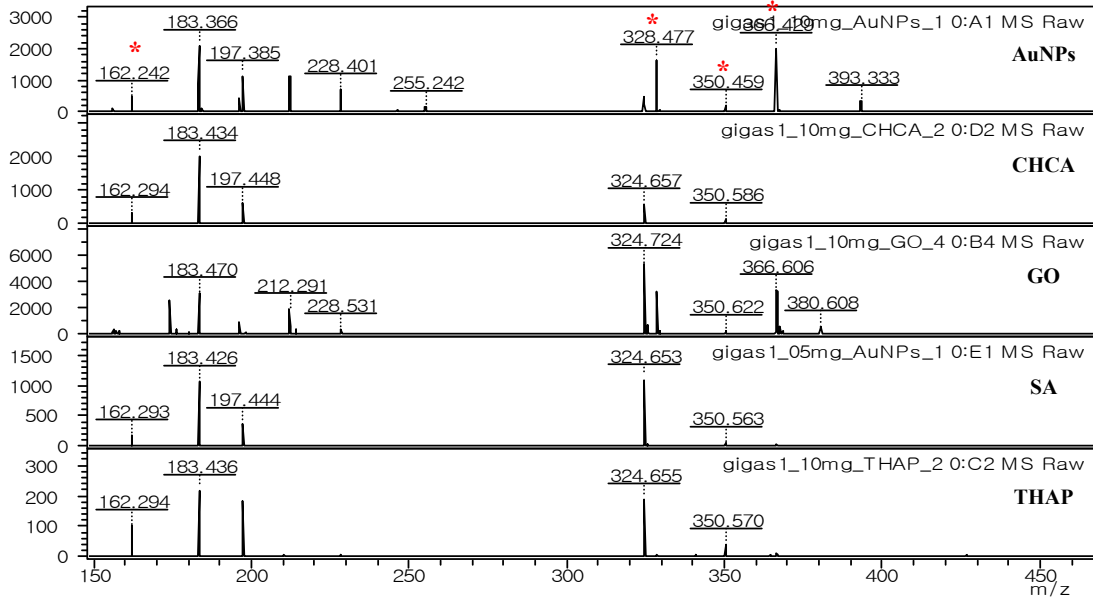
- (2) 백수오를 분석하기 위하여 다양한 매트릭스를 사용하여 분석을 수행하였다. MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. MS 데이터는 아래와 같다.



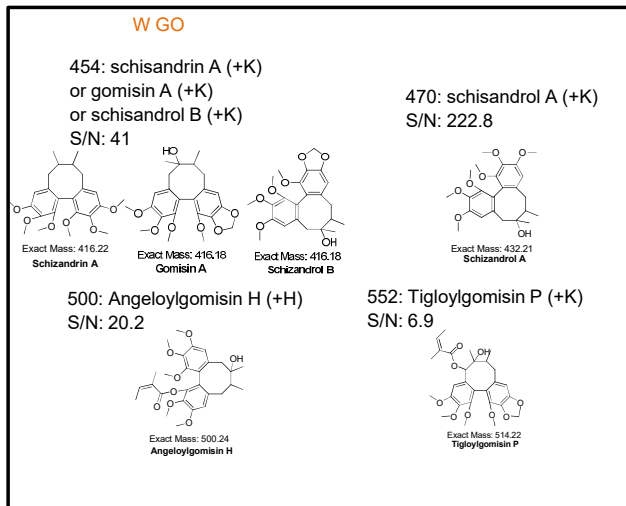
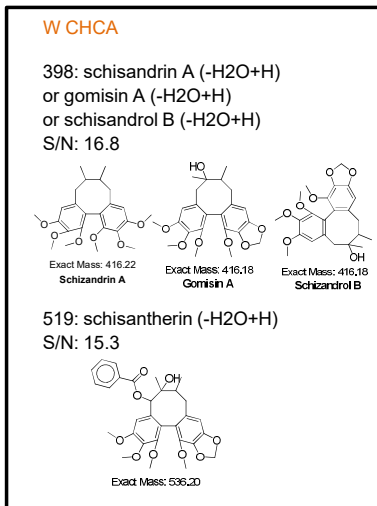
(3) 강황을 분석하기 위하여 다양한 매트릭스를 사용하여 분석을 수행하였다. MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. MS 데이터는 아래와 같다.



(4) 당귀를 분석하기 위하여 다양한 매트릭스를 사용하여 분석을 수행하였다. MS를 통하여 확인할 수 있는 분자량을 각 단일물질마다 확인함. MS 데이터는 아래와 같다.



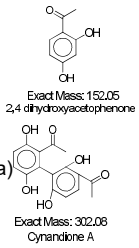
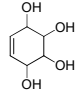
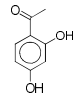
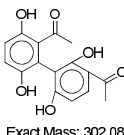
(5) MS 분석을 통하여 각각 추출물의 양에 서로 있었으며, 서로 다른 MS 추출물의 MS 데이터를 대 있었음. 데이터는 아래와

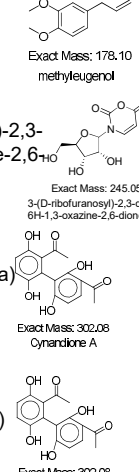
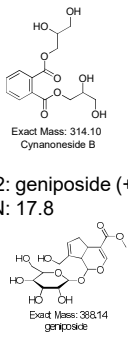
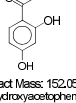


W THAP  
없음

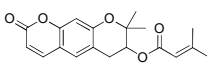
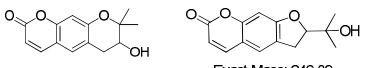
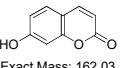
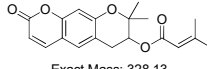
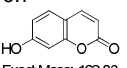
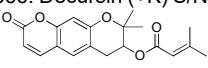
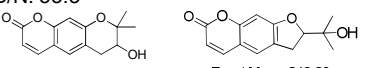
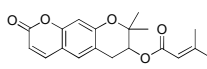
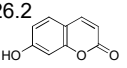
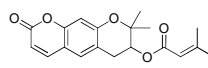
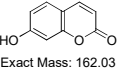
W SA  
없음

W AuNP  
없음

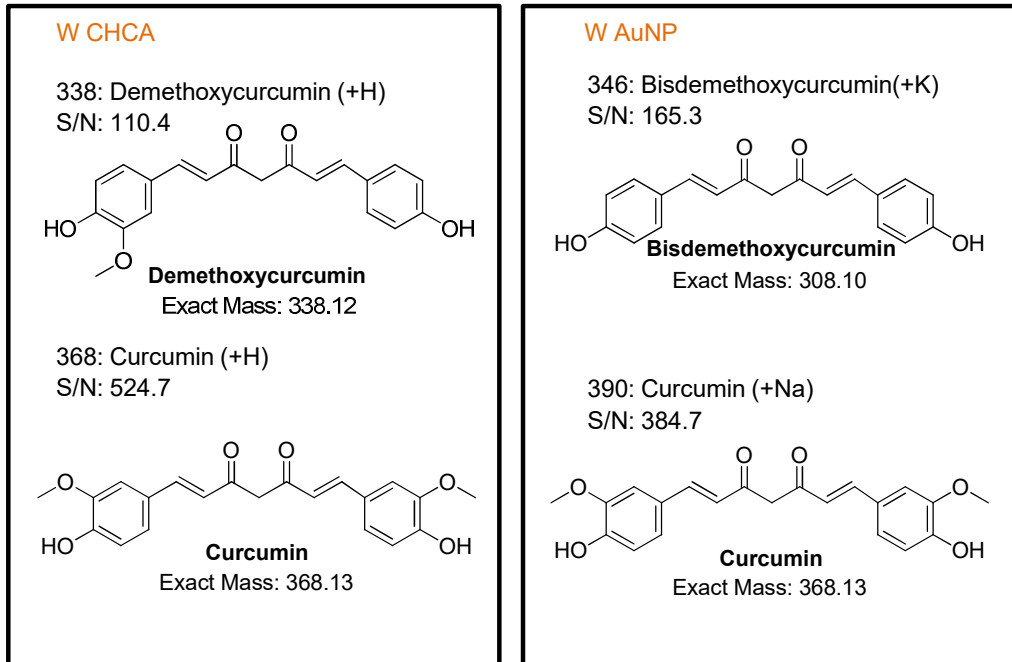
<p><b>W THAP</b></p> <p>174: 2,4 (or 2,5)-dihydroxyacetophenone (+Na) S/N: 6.7</p> <p>324: Cynadione A (+ Na) S/N: 5.3</p>  <p>Exact Mass: 152.05 2,4 dihydroxyacetophenone</p> <p>Exact Mass: 302.08 Cynadione A</p>	<p><b>W SA</b></p> <p>129: Conduritol F (-H<sub>2</sub>O+H) S/N: 8.2</p>  <p>Exact Mass: 146.06 Conduritol F</p>	<p>135: 2,4 (or 2,5)-dihydroxyacetophenone (-H<sub>2</sub>O+H) S/N: 24.3</p>  <p>Exact Mass: 152.05 2,4 dihydroxyacetophenone</p>	<p>324: Cynadione A (+ Na) S/N: 1249.9</p>  <p>Exact Mass: 302.08 Cynadione A</p>
--	---	---	--

<p><b>W CHCA</b></p> <p>216: methyleugenol (+Na) S/N: 28.8</p> <p>250: 3-(D-ribofuranosyl)-2,3-dihydro-6H-1,3-oxazine-2,6-dione (+Na-H<sub>2</sub>O) S/N: 374.2</p> <p>324: Cynadione A (+ Na) S/N: 5862</p> <p>340: Cynadione A (+ K) S/N: 111</p>  <p>Exact Mass: 178.10 methyleugenol</p> <p>Exact Mass: 245.05 3-(D-ribofuranosyl)-2,3-dihydro-6H-1,3-oxazine-2,6-dione</p> <p>Exact Mass: 302.08 Cynadione A</p> <p>Exact Mass: 302.08 Cynadione A</p>	<p>354: Cynanoneside B (+ K) S/N: 25</p> <p>412: geniposide (+ Na) S/N: 17.8</p>  <p>Exact Mass: 314.10 Cynanoneside B</p> <p>Exact Mass: 388.14 geniposide</p>	<p><b>W GO</b></p> <p>156: 2,4 (or 2,5)-dihydroxyacetophenone (-H<sub>2</sub>O+Na) S/N: 10.4</p> <p>174: 2,4 (or 2,5)-dihydroxyacetophenone (+Na) S/N: 61.8</p>  <p>Exact Mass: 152.05 2,4 dihydroxyacetophenone</p> <p>Exact Mass: 152.05 2,4 dihydroxyacetophenone</p> <p><b>W AuNP</b> 없음</p>
--	--	--

서로 다른 matrix를 사용하여 백수오 추출물 내 존재하는 단일물질 확인

<p><b>W AuNPs</b></p> <p>328: Decursin (+H) S/N: 437.9 350: Decursin (+Na) S/N: 47.0 366: Decursin (+K) S/N: 531.1</p>  <p>Exact Mass: 328.13</p> <p>246: Decursinol or Marmesin (+H) S/N: 7.7 228: Decursinol or Marmesin (-H<sub>2</sub>O+H) S/N: 138.9</p>  <p>Exact Mass: 246.09</p> <p>Exact Mass: 246.09</p> <p>162: Umbelliferon (+H) S/N: 58.6</p>  <p>Exact Mass: 162.03</p>	<p><b>W CHCA</b></p> <p>350: Decursin (+Na) S/N: 40.9</p>  <p>Exact Mass: 328.13</p> <p>162: Umbelliferon (+H) S/N: 73.7</p>  <p>Exact Mass: 162.03</p>	<p><b>W GO</b></p> <p>328: Decursin (+H) S/N: 457.4 350: Decursin (+Na) S/N: 38.8 366: Decursin (+K) S/N: 422.7</p>  <p>Exact Mass: 328.13</p> <p>228: Decursinol or Marmesin (-H<sub>2</sub>O+H) S/N: 55.3</p>  <p>Exact Mass: 246.09</p> <p>Exact Mass: 246.09</p>
<p><b>W SA</b></p> <p>350: Decursin (+Na) S/N: 9.8</p>  <p>Exact Mass: 328.13</p> <p>162: Umbelliferon (+H) S/N: 26.2</p>  <p>Exact Mass: 162.03</p>	<p><b>W THAP</b></p> <p>350: Decursin (+Na) S/N: 12.3</p>  <p>Exact Mass: 328.13</p> <p>162: Umbelliferon (+H) S/N: 21.8</p>  <p>Exact Mass: 162.03</p>	

서로 다른 matrix를 사용하여 당귀 추출물 내 존재하는 단일물질 확인



W THAP  
없음

W SA  
없음

W GO  
없음

서로 다른 matrix를 사용하여 강황 추출물 내 존재하는 단일물질 확인

(6) 추출물 MS 분석의 경우 CHCA matrix를 사용했을 때 대체적으로 단일 물질 확인이 잘 되었음. 또한, 각 추출물 마다 다른 matrix 조건에서 MS 분석을 통하여 얻은 단일 물질 데이터가 달라짐을 확인할 수 있었음. Matrix의 이러한 효과가 각 추출물의 서로 다른 농도를 사용하였을 때 동일한 결과를 나타내는지 확인하기 위하여, 각 추출물의 다양한 양을 사용하여 다양한 추출물의 농도를 만들어 matrix의 영향에 대하여 확인할 필요성을 제시함. 각 추출물의 MS분석 시 뚜렷이 확인이 되는 단일 물질을 이미징 실험에 사용할 표준물질로 선택함. 또한, 추출물 내 단일물질의 구조에 따른 분류를 통하여 Coumarin계열, Gomisins계열, 그리고 기타 계열로 분류함.

3. 약용작물 내 단일물질의 다양한 농도 및 matrices에 따른 데이터분석을 통하여 검출최적(최저)농도 확인 및 데이터 확립

가. 연구내용

오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황의 추출물에 대하여 질량분석을 진행함. 이때 분석을 위한 최적의 농도 및 조건을 찾기 위해 각 물질들의 대표 물질을 조금 더 구체적으로 하나씩 분석을 진행함.

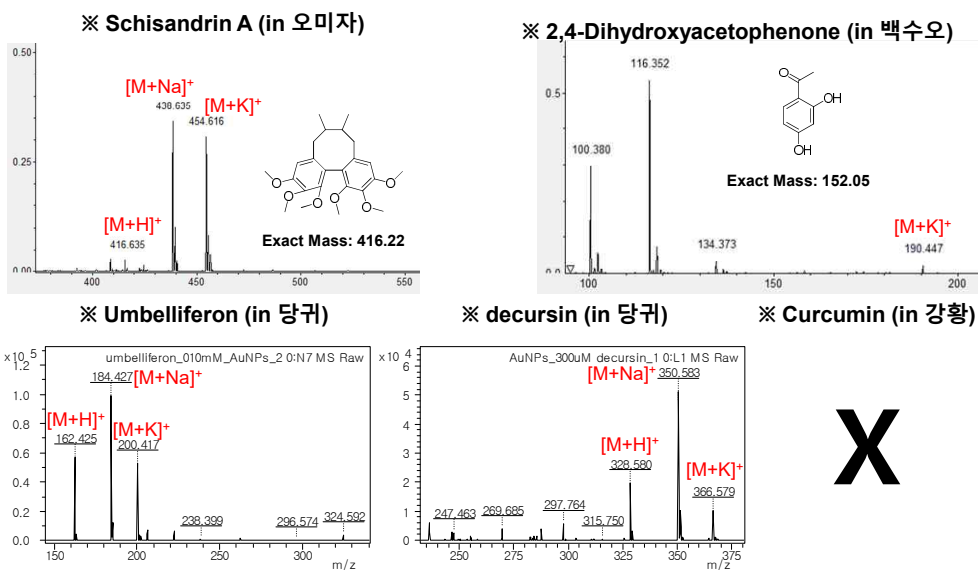


나. 연구방법

- (1) 추출한 물질 중 가장 대표적인 물질들을 선정
- (2) 선정된 물질을 다양한 농도와 다양한 종류의 matrix를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행

다. 연구결과

- (1) 각 약용작물에 들어있는 단일 물질들을 분석하기 위하여 다양한 농도 및 matrices를 사용하여 MS 분석함. 각 약용작물 내 단일물질을 MS분석 및 데이터를 기반으로 Coumarin계열과 Gomisin계열, 그리고 기타 계열로 분류를 하였으며, 각 추출물에서 뚜렷하게 확인이 된 단일물질을 사용하여 다양한 농도 및 matrices를 사용하여 최적 조건을 확인함.



- (2) 각 추출물의 대표 단일물질 선택하였으며, 다양한 농도조건과 다양한 MS 분석하였음. 서로 다른 농도 및 matrix를 사용하여 분석한 MS 데이터가 낮아질수록 graphene oxide (GO)를 제외한 다른 matrix에서는 해당하는 peak이 나타나지 않았음.
- (3) 또한, 확인 가능한 peak의 경우 또한 signal to noise (S/N)가 너무 낮아 해당하는 분자량이라 할 수 없었음.
- (4) 각 단일물질마다 분석 가능한 최저농도의 경우 matrix에 따라 데이터를 통하여 확인 할 수 있었음.
- (5) 확인한 최저농도는 평균적으로 100  $\mu$ M이었으며, matrix는 GO 단일물질에 해당하는 분자량이 높은 S/N값을 보여주며 peak 또한 뚜렷이 관

### 가. 연구내용

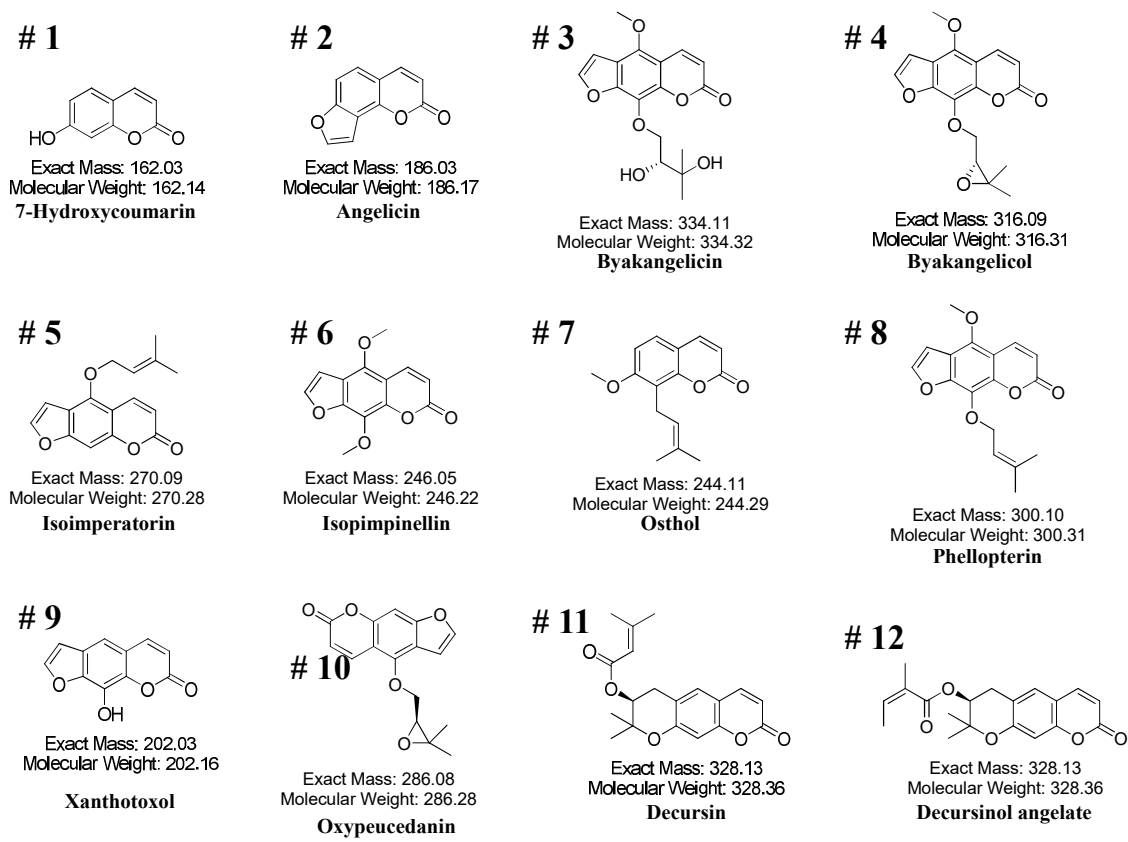
생체 이미징을 위하여 조직 내 존재하는 약용작물 추출물 및 단일물질을 MS를 사용하여 분석하는 최적의 조건을 확립. 약용작물 추출물 (오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황)에서 정확히 확인이 되는 MS값 확보 및 MS 값에 해당하는 물질의 확인. Coumarin, Gomisin, 그리고 기타 계열의 단일물질 29개를 선별하였음.

### 나. 연구방법

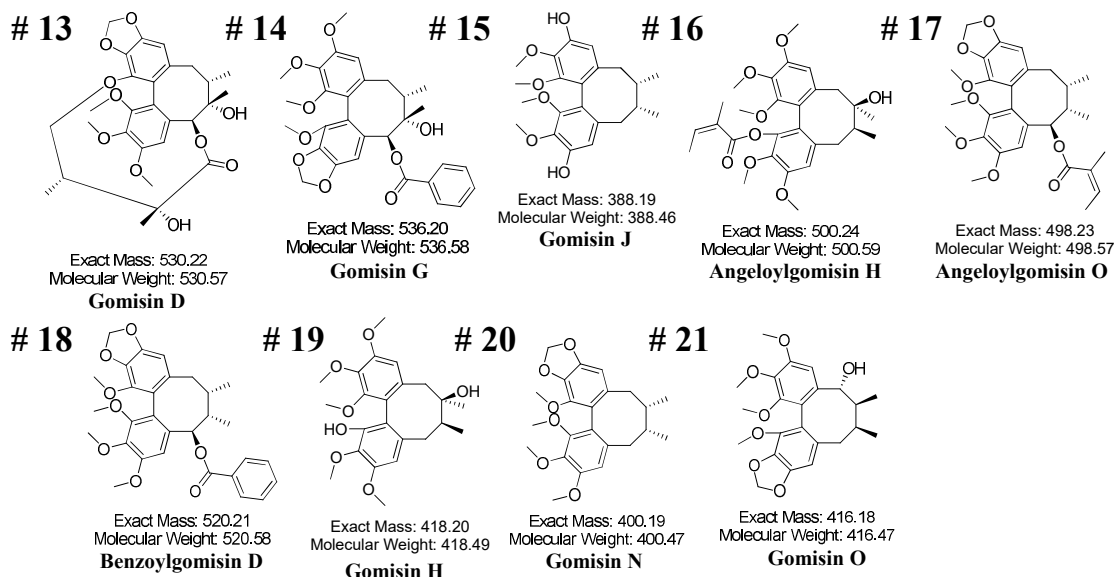
- (1) 추출한 물질을 데이터베이스를 통해 분석을 통해 함유하는 약용물질을 선정
- (2) 산정된 물질을 각 최적의 농도와 matrix를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행

### 다. 연구결과

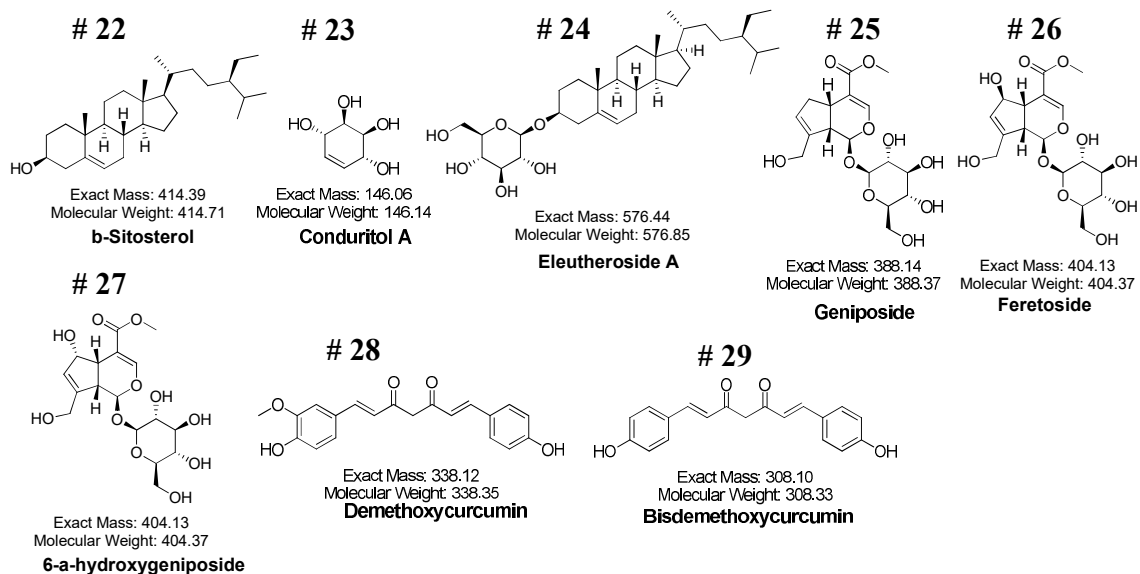
(1) Coumarin계열 단일물질을 선별하였으며, 당귀추출물에 존재하는 단일물질이 주를 이루고 있음. Gomisin계열의 단일물질의 경우 오미자추출물에 존재하는 물질이 다수 존재함. 기타계열의 경우 백수오와 강황 추출물에 존재하는 물질이 포함되어 있음. 특정 기본구조를 가지는 물질이 부족하여 기타계열에 모두 포함시킴. 선별물질들은 아래와 같음.



Coumarin계열 단일물질 후보군



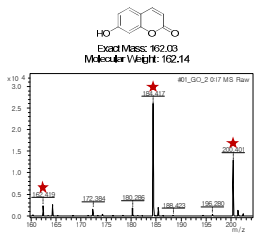
Gomisin계열 단일물질 후보군



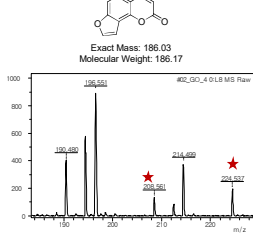
기타계열 단일물질 후보군

(2) 각 계열의 단일물질의 구조에 따른 분자량을 확인 하였으며, MS 분석시 나올 수 있는 분자량을 확인함. 각 계열의 단일물질을 동일한 농도를 사용하여 서로 다른 matrix조건에서 MS분석을 하였음. 사용한 matrix의 경우 graphene oxide (GO), gold nanoparticles (AuNPs), DHB, 그리고 CHCA를 사용하였음. 각 MS 데이터는 아래와 같음.

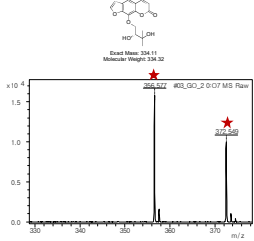
1. 7-Hydroxycoumarin (GO)



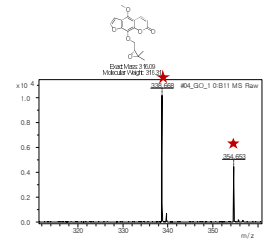
2. Angelicin (GO)



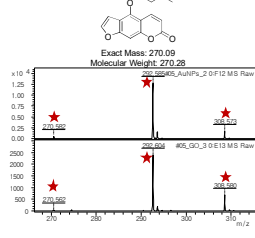
3. Byakangelicin (GO)



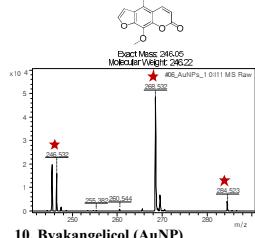
4. Byakangelicol (GO)



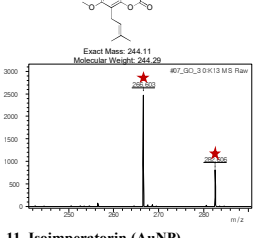
5. Isoimperatorin (AuNP and GO)



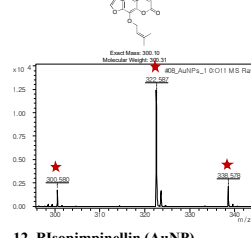
6. Blisopimpinellin (GO)



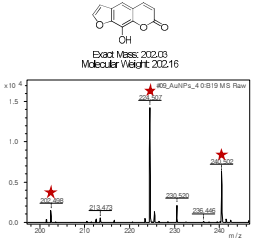
7. 7-Hydroxycoumarin (AuNP)



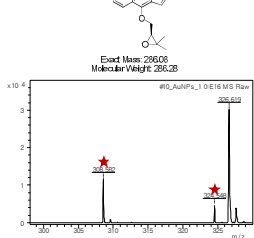
8. Angelicin (AuNP)



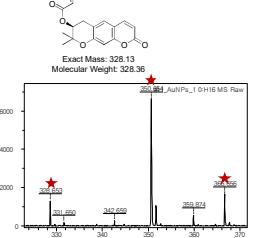
9. Byakangelicin (AuNP)



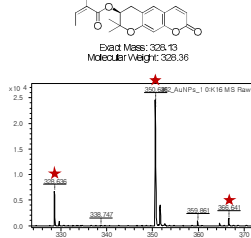
10. Byakangelicol (AuNP)



11. Isoimperatorin (AuNP)

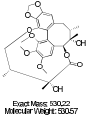
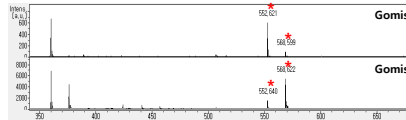


12. Blisopimpinellin (AuNP)

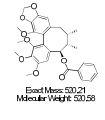
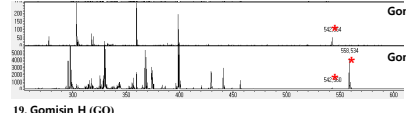


서로 다른 matrix를 사용하여 coumarin계열 단일물질 분석

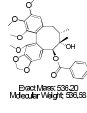
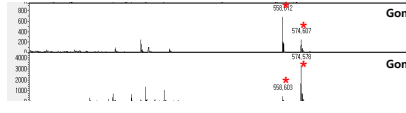
13. Gomisin D (GO)



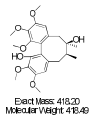
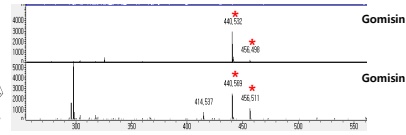
18. Benzoylgomisin O (GO)



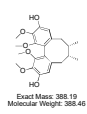
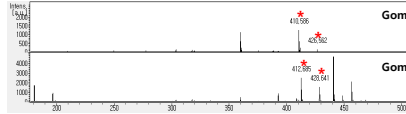
14. Gomisin G (GO)



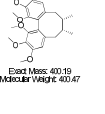
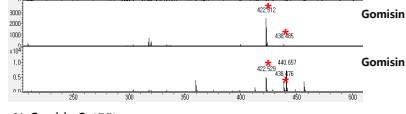
19. Gomisin H (GO)



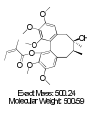
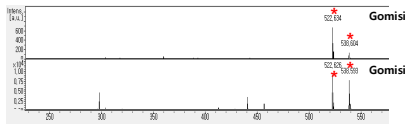
15. Gomisin J (GO)



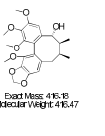
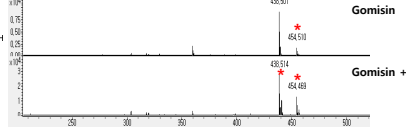
20. Gomisin N (GO)



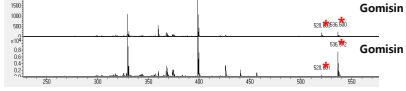
16. Angeloylgomisin H (GO)



21. Gomisin O (GO)

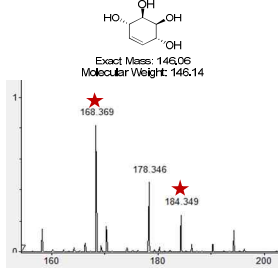


17. Angeloylgomisin O (GO)

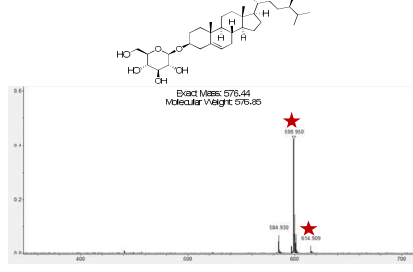


서로 다른 matrix를 사용하여 gomisin계열 단일물질 분석

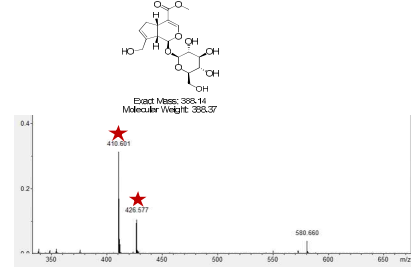
**23. Angelicin (GO)**



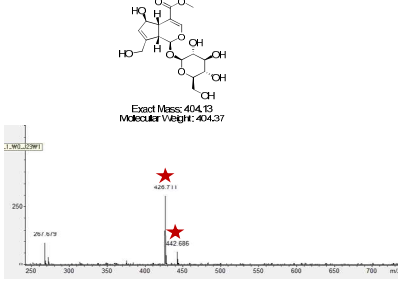
**24. Eleutheroside A (GO)**



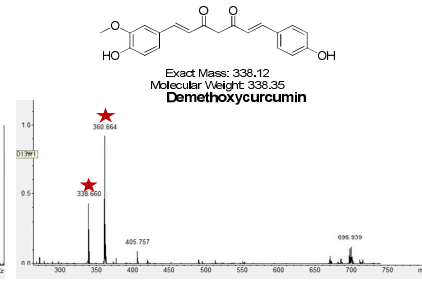
**25. Geniposide (DHB in iPrOH)**



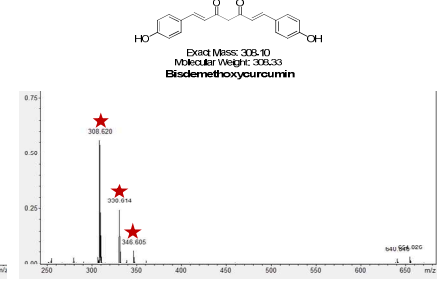
**26. Feretoside (DHB in MeOH)**



**28. Demethoxycurcumin (DHB in iPrOH)**



**29. Bisdemethoxycurcumin (DHB in iPrOH)**



서로 다른 matrix를 사용하여 기타계열 단일물질 분석

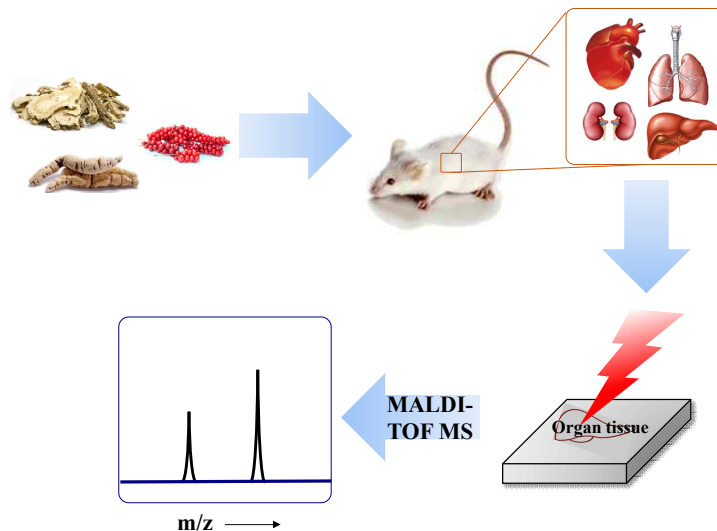
(3) 각 계열의 단일물질 29가지를 서로 다른 matrix조건에서 분석을 진행하였음. Coumarin계열의 경우 matrices중에 GO를 사용하였을 때 가장 뚜렷하게 단일물질에 해당하는 분자량을 확인 할 수 있었음. Gomisin계열의 경우 matrix 없이도 확인이 뚜렷이 되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 GO를 사용하였을 때 분자량 확인이 더 개선되는 것을 확인 할 수 있었음. 기타계열의 경우 GO를 사용했을 때 23 그리고 24번 단일물질 확인이 잘 되었으며, 25, 26, 28, 그리고 29번의 경우 DHB를 사용했을 때 단일물질에 해당하는 분자량을 뚜렷이 확인 할 수 있었음. 특히, 기타계열 중 22 그리고 27번의 경우 모든 matrix조건에서 단일물질에 해당하는 분자량을 확인 할 수 없었음. 이 결과를 바탕으로, 각 계열의 단일물질을 MS분석을 통하여 확인 시 단일물질의 분자량을 뚜렷이 확인할 수 있는 matrix를 확인 및 조건을 확립 할 수 있었음.

## 2절. 다양한 약용작물 추출물의 질량분석방법(MS)를 이용한 mouse 내 약용물질의 분석

### 1. mouse 내 다양한 약용작물의 MS 분석

#### 가. 연구내용

약용물질 중 오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황의 추출물을 mouse에 주입하여 분석을 하여 실제로 물질을 mouse에 주입한 이후에 주 함유 약용물질의 분석이 가능한 가를 알아보기 위한 실험을 수행함. 다양한 방법(정맥주사, 복강주사, 근육주사, 구강투여 등)으로 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 주입된 성분들을 실시간 위치 추적 및 생체 내 분포를 정성적/정량적 평가를 통해 각 물질들이 장기의 어느 부분에 분포하는 가를 알아봄으로써 각 장기 내의 효능과 매커니즘에 관한 연구가 가능함. 이에 대한 모식도는 아래와 같음.



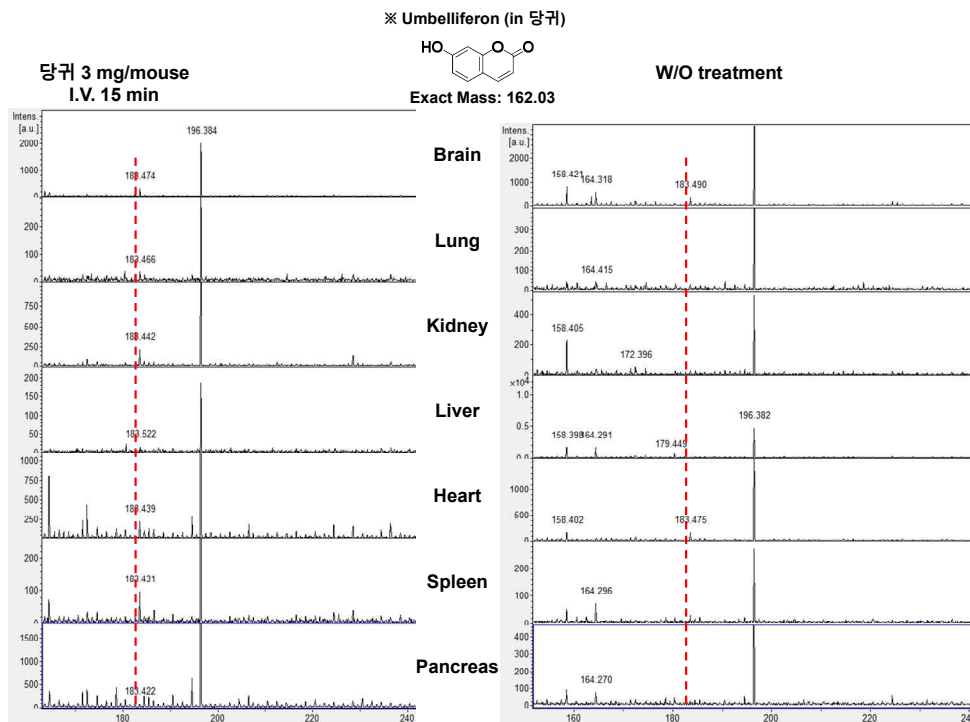
#### 나. 연구방법

- (1) 다양한 방법을 사용하여 다양한 약용작물로부터 약용물질 추출
- (2) 추출된 물질을 유기용매에 녹임
- (3) mouse에 intravenous 방법을 통해 추출물들을 각 다양한 양만큼 주입
- (4) 이후 15분이 지나고 mouse로부터 장기를 적출
- (5) 장기를 저울을 통해 무게를 재고 튜브에 장기와 장기의 무게의 3배 되는 Phosphate-buffered saline (PBS)를 넣고 장기를 기계를 통해 갈아줌
- (6) 이후 ethyl acetate를 넣어준 후 sonication을 10분정도 진행한 후 유기 용매층을 따로 얻어냄
- (7) 위 과정을 3번 반복
- (8) 유기 용매층을 말리고 이후 DMSO를 넣어줌
- (9) 장기 추출물을 matrix로 다양한 물질을 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행

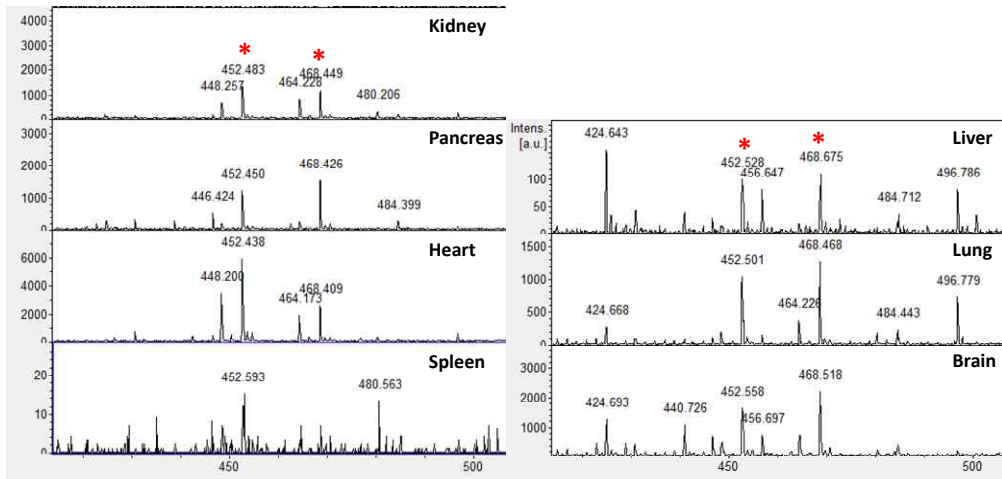
다. 연구결과

(1) 각 추출물에서 확연히 확인 할 수 있었던 단일물질 기준을 생체 내 약용작물의 분포도 확인. 서로 다른 추출물을 투여한 mouse에서 얻은 생체분포도를 조사함으로써 각 약용작물의 주요 분포 및 기작을 예측 할 수 있을 것임. 각 추출물을 투여한 mouse에서 앞서 확인한 각 추출물의 MS 데이터를 토대로, 단일물질이 가장 뚜렷이 나오는 matrix 조건을 사용하여 분석을 진행함.

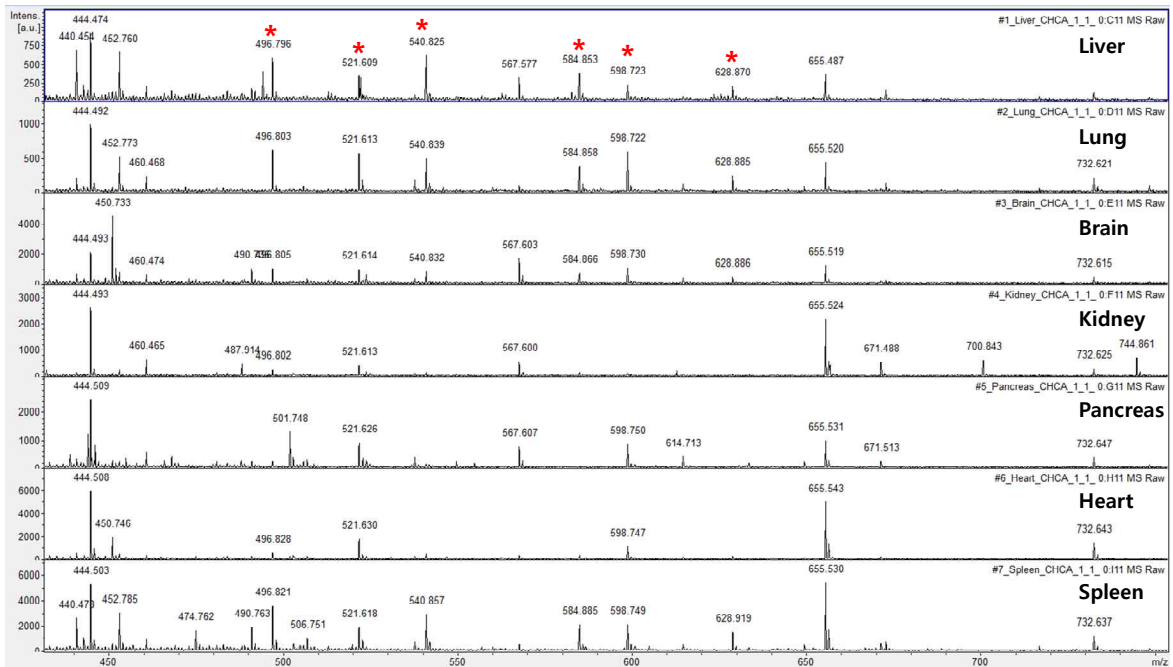
(2) 당귀의 경우 Umbelliferon이 뚜렷이 구분이 되는 matrix조건을 사용하여 각 장기에서 얻은 샘플을 MS를 사용하여 분석함. 당귀추출물을 투여한 그룹과 투여하지 않은 그룹의 각 장기 샘플의 MS 데이터가 동일하게 확인됨. 이에 대한 자료는 아래와 같음.



(2) 오미자 추출물을 투여한 mouse의 경우 오미자 추출물 분석 시 가장 뚜렷이 확인되는 단일물질 및 matrix를 사용하여 동일하게 각 장기에서 얻은 샘플을 MS를 통하여 분석함. MS 분석 결과 대부분의 장기에서 오미자 추출물에서 확인된 단일물질이 확인되었으며, 각 장기에 고르게 분포하되, spleen에 비교적 적게 존재하는 것으로 확인할 수 있었음. 이에 대한 자료는 아래와 같음.



(3) 백수오 추출물을 투여한 mouse의 각 장기 샘플을 분석하여 결과를 얻을 수 있었음. MS 분석의 경우 각 장기에서 얻은 샘플을 사용하여 백수오추출물 분석 시 단일물질이 가장 뚜렷이 확인되는 동일한 조건하에 MS 분석을 진행함. 적출한 각 장기에서 얻은 샘플 중 liver, spleen, 그리고 lung에서 단일물질로 생각되는 MS값을 확인 할 수 있었음. 이에 대한 자료는 아래와 같음.



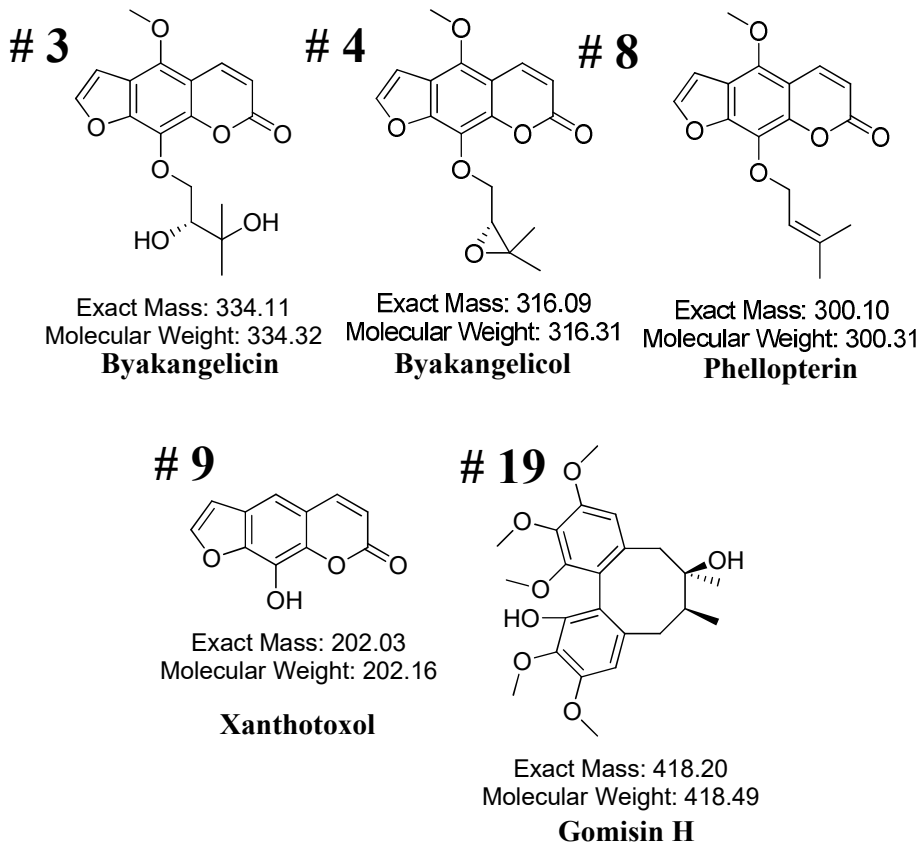
(4) 그러나, 3 가지의 약용작물 추출물을 투여한 mouse의 장기에서 얻은 샘플분석 결과 단점이 몇 가지 존재함. 약용작물 추출물의 경우 각 약용작물 내 존재하는 모든 단일물질의 갯수를 모두 파악하기 힘들며, MS 분석 시 파악이 되지 않은 단일물질의 경우 예상한 MS 데이터와 전혀 다른 방향으로 확인 될 것으로 생각됨.

(5) 각 약용작물 내 존재하는 대표적 단일물질을 확인하여 MS분석 방법을 개발함. 그러나



약용작물 추출물 내 존재하는 대표적 단일물질들의 농도 및 양을 정확히 확인이 불가능하며, 약용작물의 추출 시 약용작물의 상태 및 주변 환경에 따라 추출물 내 존재하는 다양한 단일물질들의 함유량이 달라질 것으로 생각됨. 이러한 이유들로 인하여 약용작물 내 대표적으로 존재하는 물질들을 단독으로 mouse에 투여하여 생체분포도를 확인하는 것이 보다 많은 정보를 얻을 수 있을 것임

(6) 이를 위하여 coumarin계열, gomisin계열, 그리고 기타계열의 단독물질을 기반으로 형광 이미징 및 MS분석이미징을 동시에 가능한 물질을 선별함. 형광 및 MS 분석을 통한 생체 내 분포도 확인을 위하여 총 5가지 단일물질을 선별함. 각 단일물질은 coumarin계열 4가지, gomisin계열 한 가지로 총 5가지 단일물질을 선별하였으며, 각 단일물질은 형광분석을 사용하여 뚜렷한 형광을 나타내는 것을 확인하였으며, MS를 이용한 분석에서도 각 단일물질의 분자량이 뚜렷하게 분석됨을 확인함. 선별된 물질은 아래와 같음.



## 2. 다양한 약용단일물질을 mouse에 투여 후 MS를 이용하여 투여한 단일물질의 조직 분포도 분석 및 확립

### 가. 연구내용

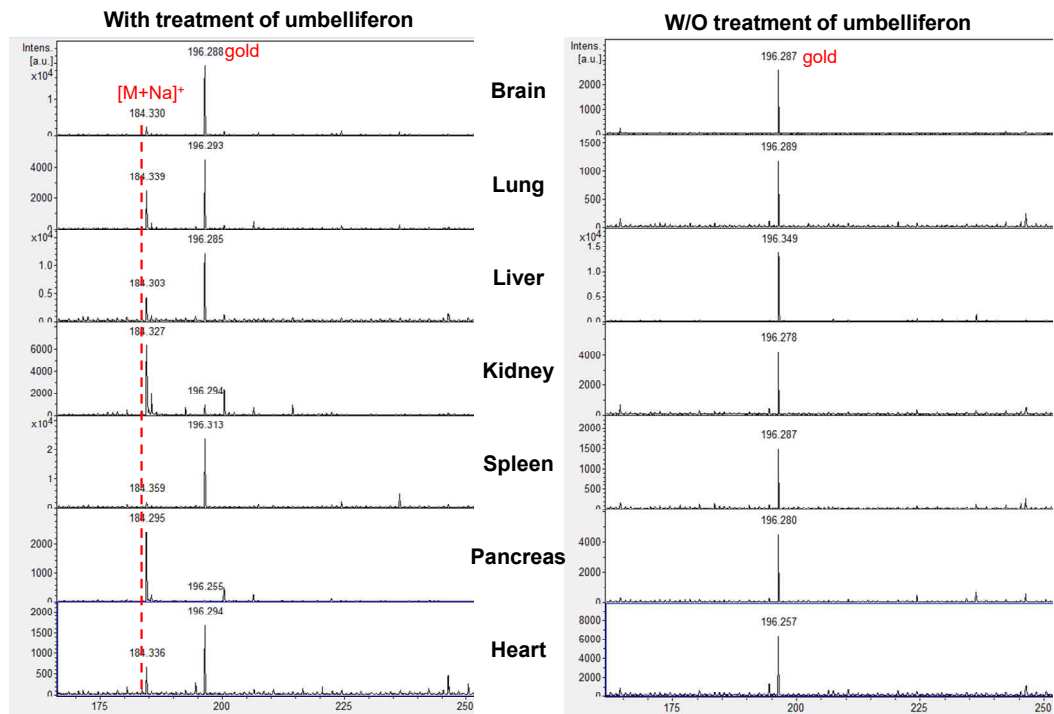
약용물질 중 오미자, 백수오, 당귀, 그리고 강황의 주요 약용물질의 mouse 생체 내 분석이 가능한가를 알아보기 위한 실험을 수행함. 다양한 약용단일물질을 투여한 mouse의 여러 장기 내 분포도를 확인하기 위하여 약용작물 추출물을 분석한 결과를 바탕으로 첫 번째 후보군을 선정함. 약용작물 중 당귀 추출물 분석 시 뚜렷한 분자량을 확인할 수 있었던 Umberiferon을 단일 물질로 선정하였음. 선정된 약용단일물질을 mouse에게 투여 후 MS 분석을 통하여 실험의 가능성 및 coumarin계열 단일물질의 검출을 검증함.

### 나. 연구방법

- (1) 다양한 방법을 사용하여 약용작물로부터 약용물질 추출
- (2) 추출된 물질을 유기용매에 녹임
- (3) mouse에 intravenous 방법을 통해 추출물들을 각 다양한 양만큼 주입
- (4) 이후 15분이 지나고 mouse로부터 장기를 적출
- (5) 장기를 저울을 통해 무게를 재고 튜브에 장기와 장기의 무게의 3배 되는 PBS를 넣고 장기를 기계를 통해 갈아줌
- (6) 이후 ethyl acetate를 넣어준 후 sonication을 10분정도 진행한 후 유기 용매층을 따로 얻어냄
- (7) 위 과정을 3번 반복
- (8) 유기 용매층을 말리고 이후 DMSO를 넣어줌
- (9) 장기 추출물을 matrix 로 다양한 물질을 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행.

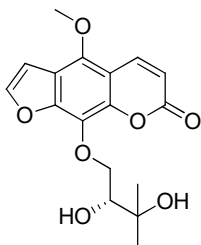
### 다. 연구결과

- (1) 약용단일물질로 선정한 Umberiferon을 투여한 mouse의 장기 샘플을 MS를 사용하여 분석을 진행하였음. 각 장기에서 얻은 샘플을 MS를 통하여 분석한 결과 Umberiferon에 해당하는 분자량을 확인하였으며, 각 장기 내 분포도를 얻을 수 있었음. 이를 통하여 mouse에게 약용단일물질을 투여하였을 때 장기 내 단일물질의 분포도를 조사하는 방법을 확립 할 수 있었으며, 다른 약용단일물질을 사용하여 생체 내 분포도를 확인함.



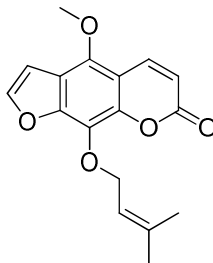
(2) 위의 실험을 통해 분석이 가능하다는 것을 확인. 이후 여러 가지 물질 중 MS 분석이 잘 이뤄졌던 3가지 물질을 선정함. 선정된 물질은 아래와 같음.

**#3: Byakangelicin**  
**15 mg/mouse**  
**I.V. 15 min**



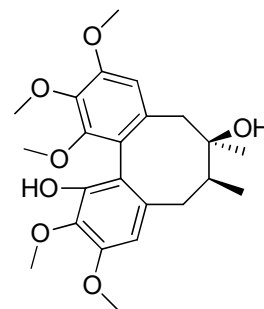
Exact Mass: 334.11  
Molecular Weight: 334.32

**#8: Phellopterin**  
**15 mg/mouse**  
**I.V. 15 min**



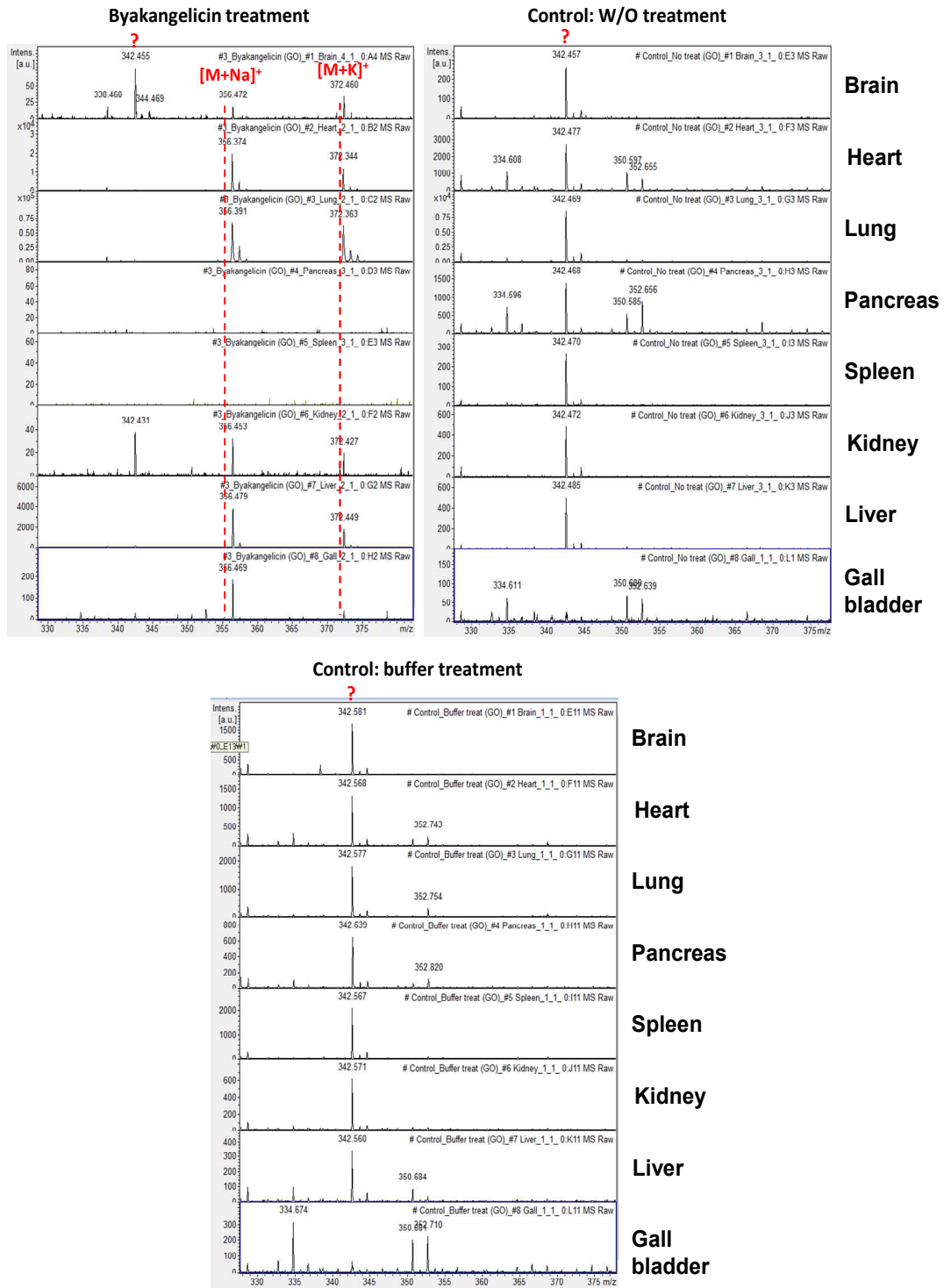
Exact Mass: 300.10  
Molecular Weight: 300.31

**#19: gomisin H**  
**15 mg/mouse**  
**I.V. 15 min**

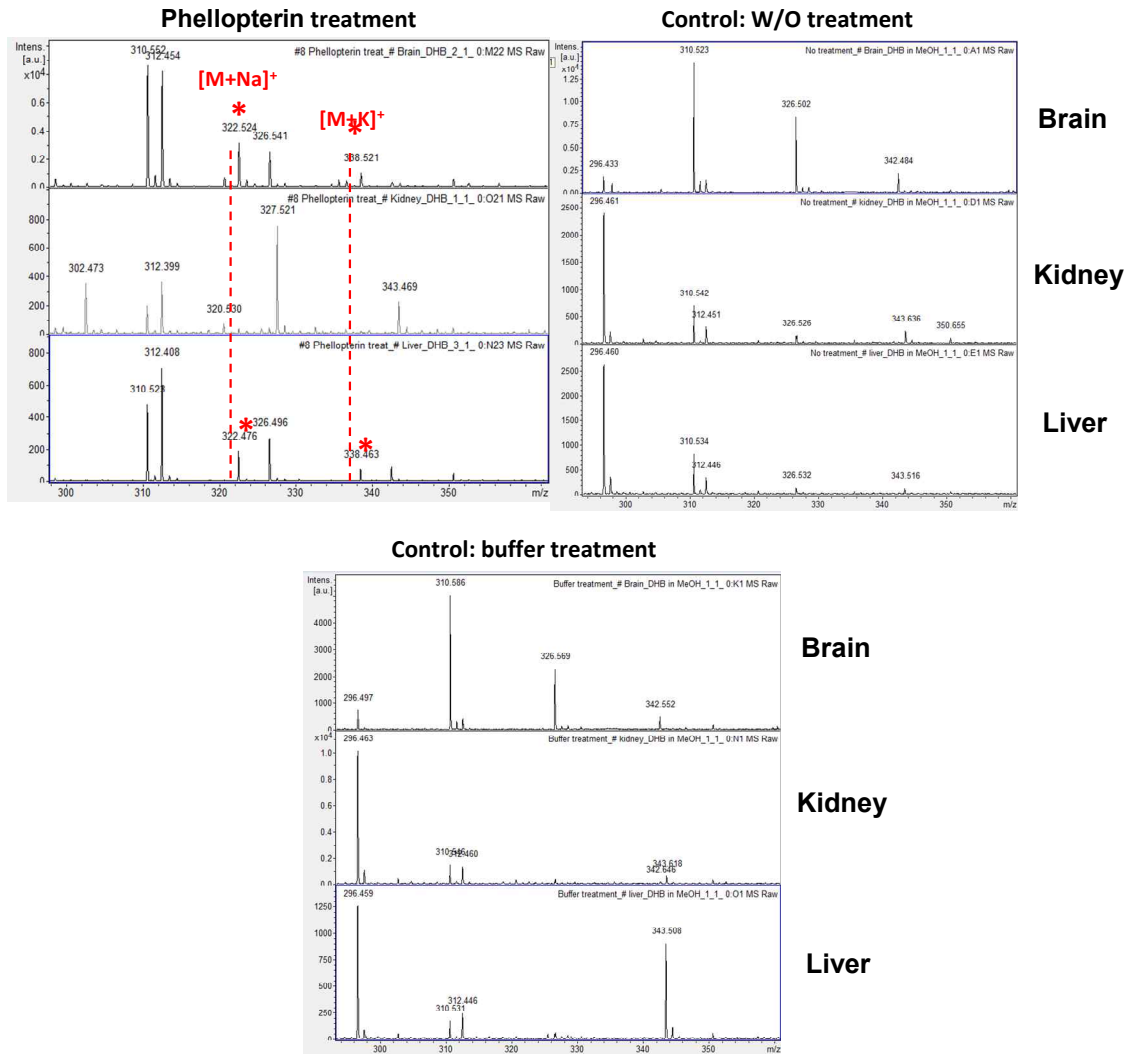


Exact Mass: 418.20  
Molecular Weight: 418.49

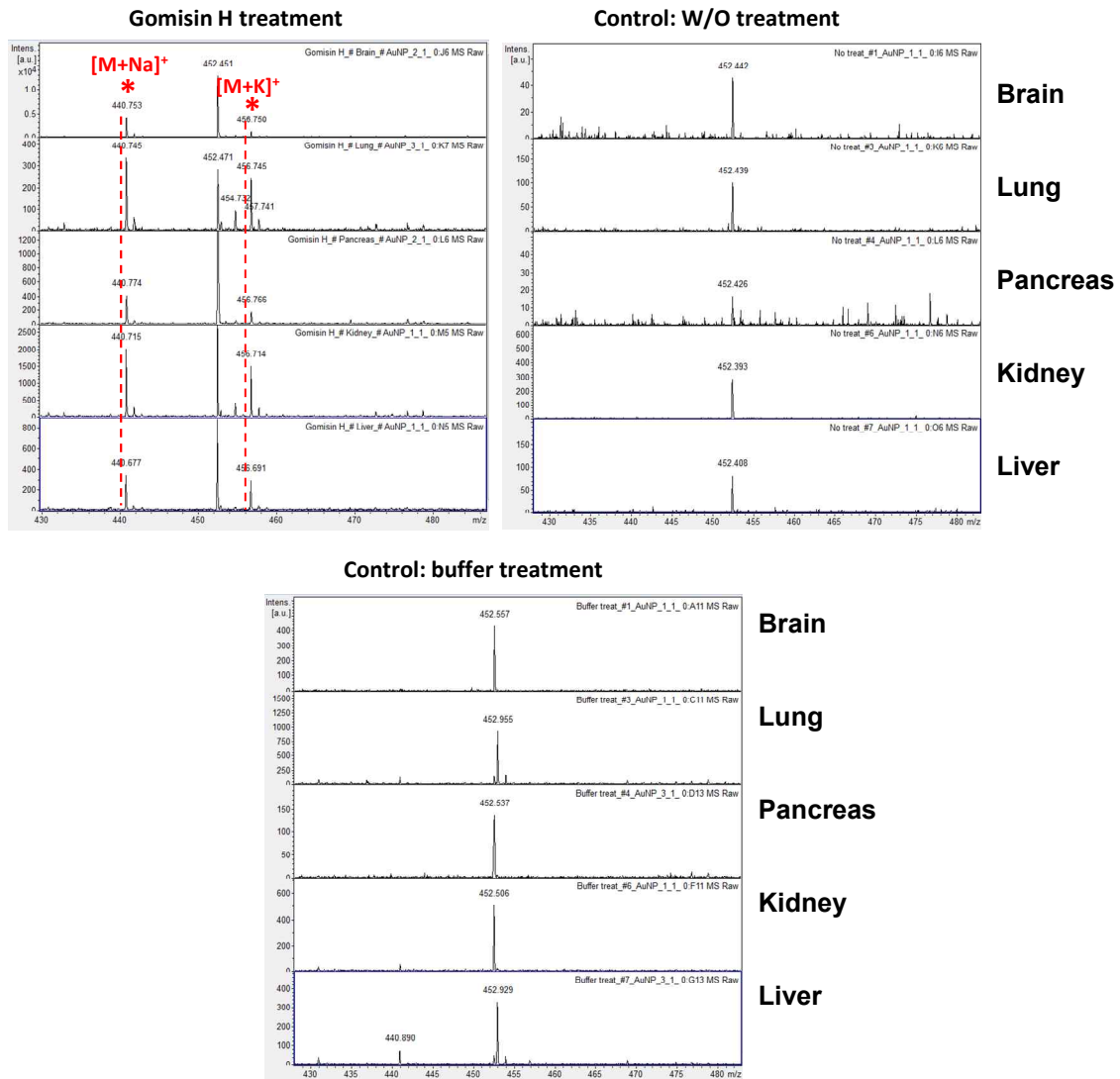
아래와 같음.



(3) 약용단일물질 중 coumarin계열에 해당하는 phellopterin을 투여한 mouse의 경우 brain, kidney, 그리고 liver에서 투여한 단일물질에 해당하는 분자량이 확인되었으며, 다른 장기에서는 확인되지 않음. 또한, control 실험(약용단일물질을 투여하지 않은 것, buffer만 투여한 것)에서는 투여한 약용단일물질에 해당하는 분자량이 확인되지 않음을 통하여 phellopterin의 생체 내 분포도를 확인할 수 있었음. 이에 대한 MS 자료는 아래와 같음.



(4) 약용단일물질 중 gomisin 계열에 해당하는 gomisin H을 투여한 mouse의 경우 brain, lung, pancreas, kidney, 그리고 liver에서 투여한 단일물질에 해당하는 분자량이 확인 되었으며, 다른 장기에서는 확인되지 않음. 또한, control실험(약용단일물질을 투여하지 않은 것, buffer만 투여한 것)에서는 약용단일물질의 분자량이 확인되지 않음. 이를 통하여, gomisin H의 생체 내 분포도를 확인 할 수 있었음. 이에 대한 MS 자료는 아래와 같음.



(5) 3가지의 서로 다른 약용단일물질을 우선적으로 MS를 이용한 생체내 분포도를 확인한 결과 투여한 약용단일물질은 다른 내·외부영향 없이 각 장기 내 분포도를 확인 할 수 있었음.

(6) 이를 통해 약용물질의 생체내 분포도가 가능하다는 확신을 얻고 위의 추출한 물질을 사용하여 각 장기별 분포도를 작성하기 위한 구체적인 실험을 진행시킴.

### 3절. MS 기법을 이용한 약용단일물질의 정량적 생체내 분포도 작성

#### 1. 약용단일물질을 mouse에 투여 후 MS를 이용하여 투여한 단일물질의 조직분포도 작성을 위한 물질 선정

##### 가. 연구내용

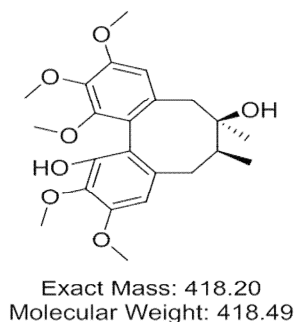
페놀기 화합물은 다양한 생물학, 화학적 효과를 가지고 있다. 이러한 효과를 증진시키기 위해서는 각 물질이 체내에 주입된 이후 어느 장기로 이동하는지에 대한 생체분포도를 작성하는 것이 필요하다. 그러나 대부분의 물질들은 용해도가 좋지 않고 체내에서 빠른 대사과정으로 사라지게 되기 때문에 빠르고 정확한 분석법이 필수적이다. 이를 위한 여러 선행연구로 형광을 통해 분석을 하나 이 방법은 형광을 띄지 않는 경우 분석이 불가능하다는 단점이 있으며 이뿐만 아니라 여러 배경신호 등에 의해 검출한계가 있다. 이를 보완하는 장비로는 질량분석기가 존재한다. 이 때 가장 많이 사용하는 것으로는 high pressure liquid chromatography/mass spectrometry가 있다. 이 방법은 정확도의 측면에서 좋지만 시간이 오래 걸리고 복잡하다는 단점이 존재한다. 그로 인해 이를 보완하기 위한 방법으로 matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI TOF MS)를 사용하여 분석을 시도하였다. 이를 위한 실험을 수행하기 위한 약용작물을 선정하기 위해 오미자를 선택적으로 선정하고 분석하기 위한 물질을 선정함 [Anal. Chim. Acta. 843:38 (2014)].

##### 나. 연구방법

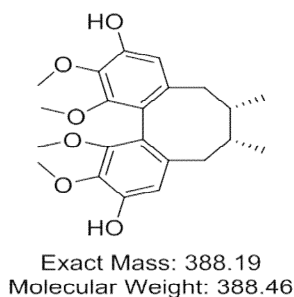
- (1) 물질을 선정하기 위하여 다양한 물질을 문헌을 위해 분석
- (2) 선정된 물질들을 MS로 분석을 하여 적합한 물질 선정

##### 다. 연구결과

(1) 분포도 작성을 위한 생체 내에서 약용물질의 정량값을 얻기 위해 기준이 되는 물질을 선정하여 기준물질을 바탕으로 정량실험을 진행하였다. 이를 위한 기준이 되는 물질로 gomisin J를 사용하여 진행을 하였음. 물질의 구조들은 아래와 같음.



**# 19 Gomisin H**



**# 15 Gomisin J**

## 2. 약용단일물질을 mouse에 투여 후 MS를 이용하여 투여한 단일물질의 조직분포도 작성을 위한 calibration curve 작성

### 가. 연구내용

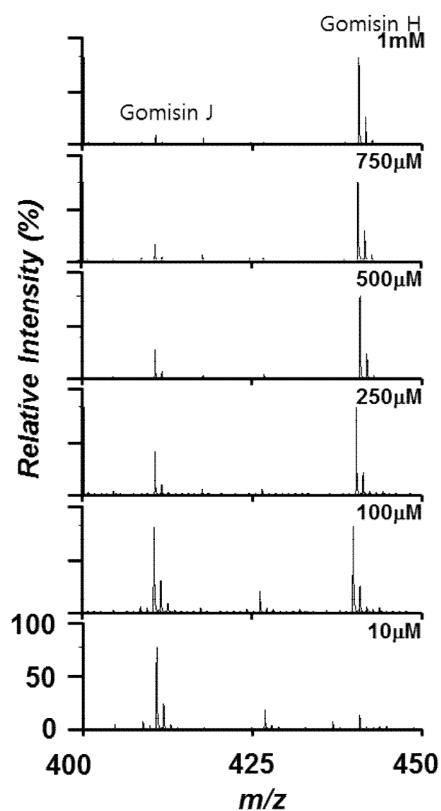
정량값을 구하기 위해 calibration curve를 구하여 이후 생체 내 약용단일 물질의 상대적인 양을 측정하였다. Target 물질의 정량을 위해 internal standard를 사용하여 calibration curve를 작성

### 나. 연구방법

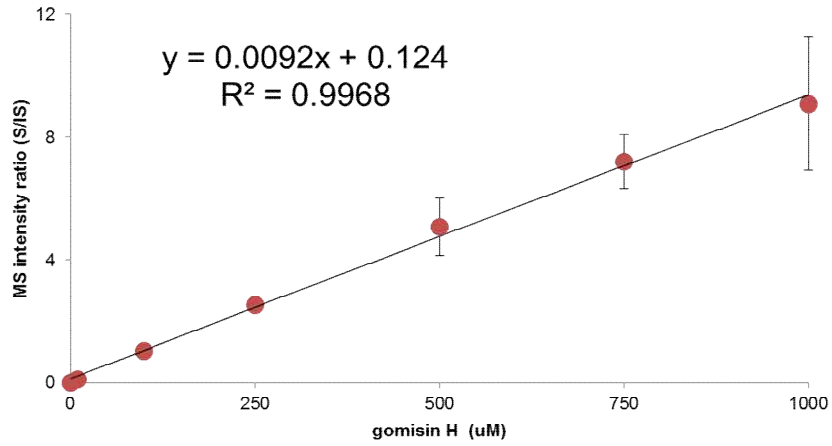
- (1) gomisin H 이 1 mM 부터 10 uM 까지 다양한 물질을 DMSO을 통해 준비한다.
- (2) Internal standard 인 gomisin J 250 uM와 섞어 MALDI-TOF MS로 분석하였고, target peak/internal standard peak(Q/IS) 의 비율을 구할 수 있었다.
- (3) 각 실험을 모두 세 번 이상 수행하여 평균값으로 표를 작성하였다.

### 다. 연구결과

(1) gomisin H와 gomisin J를 동량으로 섞고 이를 MALDI TOF MS를 통해 분석하여 얻은 MS 자료와 이를 활용하여 gomisin H와 gomisin J (IS) 간의 MS의 intensity 차이를 이용한 calibration curve는 아래와 같음.

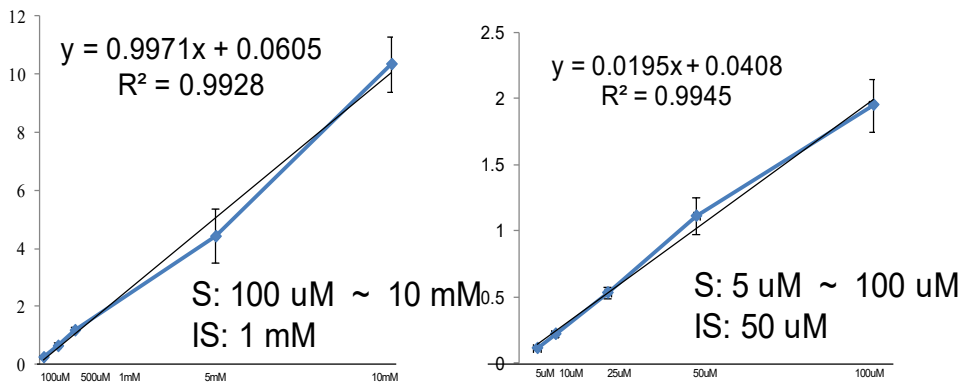
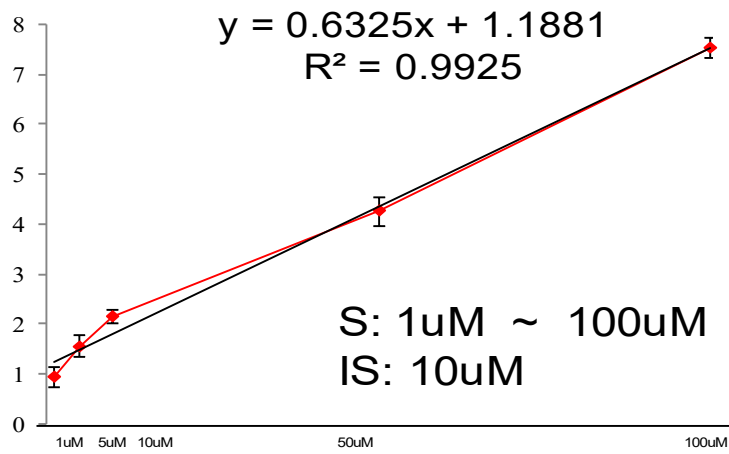






calibration curve

(2) 장기별 gomisin H의 정량을 확인하기 위하여 다양한 조건에서의 calibration curve도 작성함. 이에 대한 그래프는 다음과 같다.



calibration curve

### 3. 약용단일물질을 mouse에 투여 후 MS를 이용하여 투여한 단일물질의 조직분포도 작성을 위한 spiking 실험

#### 가. 연구내용

장기로부터 얻은 추출물과 질량분석기를 통한 정량분석의 신뢰성을 확인하기 위하여 PBS 용액을 사용하여 실험을 진행함

#### 나. 연구방법

- (1) PBS 용액에 gomisin H를 정해진 200, 400 uM를 준비하였다.
- (2) Internal standard 인 gomisin J 250 uM와 섞어 MALDI-TOF MS로 분석하였고, target peak/internal standard peak(Q/IS) 의 비율을 구할 수 있었다.
- (3) 실험을 모두 세 번 이상 수행하여 평균값으로 표를 작성하였다.
- (4) 위를 통해 얻은 값을 calibraion curve에 대입하여 정확도, 정밀도를 확인한다.

#### 다. 연구결과

- (1) 이 때 얻은 자료는 위의 calibration curve와의 정확도면에서 적은 오차를 통해 높은 정확도의 확인이 가능하였으며 이를 통해 실질적으로 장기로부터 얻은 추출물을 통한 정량의 가능함을 확인하였다. 정확한 데이터 표는 아래와 같음.

Sample conc.	Expected(S/IS)	Observed(S/IS)	Precision(CV,%)	Accuracy(%)
200 $\mu$ M	1.97	1.94 $\pm$ 0.15	7.7	98
400 $\mu$ M	3.81	3.69 $\pm$ 0.51	13.8	96

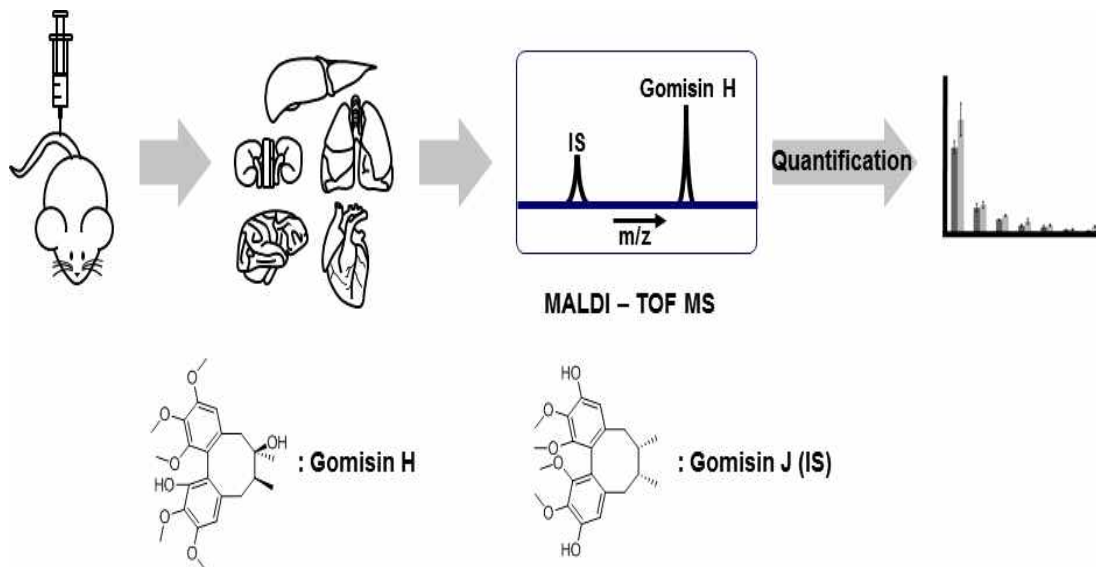
precision과 accuracy 자료

### 4. 약용단일물질을 mouse에 투여 후 MS를 이용하여 투여한 단일물질의 조직분포도 작성 실험

#### 가. 연구내용

장기로부터 얻은 추출물을 통한 질량분석기를 통한 분석을 통해 생체분포도를 작성하기 위한 실험을 수행함. 이를 위하여 mouse의 장기를 perfusion을 수행한 방기와 아닌 장기를 비교하여 다양한 활용연구가 활용가능함을 증명하려고 함. 또한 이전에 작성한 calibration curve에 이를 통해 얻은 값을 대입하여 정확한 정량을 하고 이를 통해 생체분포도를 작성함. 이를 통해 정량분석의 신뢰성을 확인하기 위하여 PBS 용액을 사용하여 실험을 진행함. 그 중 약용작물 중 오미자 추출물의 단일물질을 mouse에게 투여한 후 MS분석을 통하여 조직분포도 작성을 진행하였다. 각 장기에서 얻은 샘플을 분석하여 오미자 추출물의 하나인 gomisin H에 해당하는 분자량을 확인하고 이를 통해 장기 내 분포도 작성을 진행을 하였다. 4.5 mg을 mouse에게

I.V.로 투여 후 15분후 mouse에서 장기를 적출한 후 이를 MS로 분석을 진행하였음. 장기로부터 약용단일물질을 추출 후 이후 기준물질과 함께 분석하여 상대적인 양을 구하고자 하였음. 물질의 전반적인 과정은 아래와 같음.

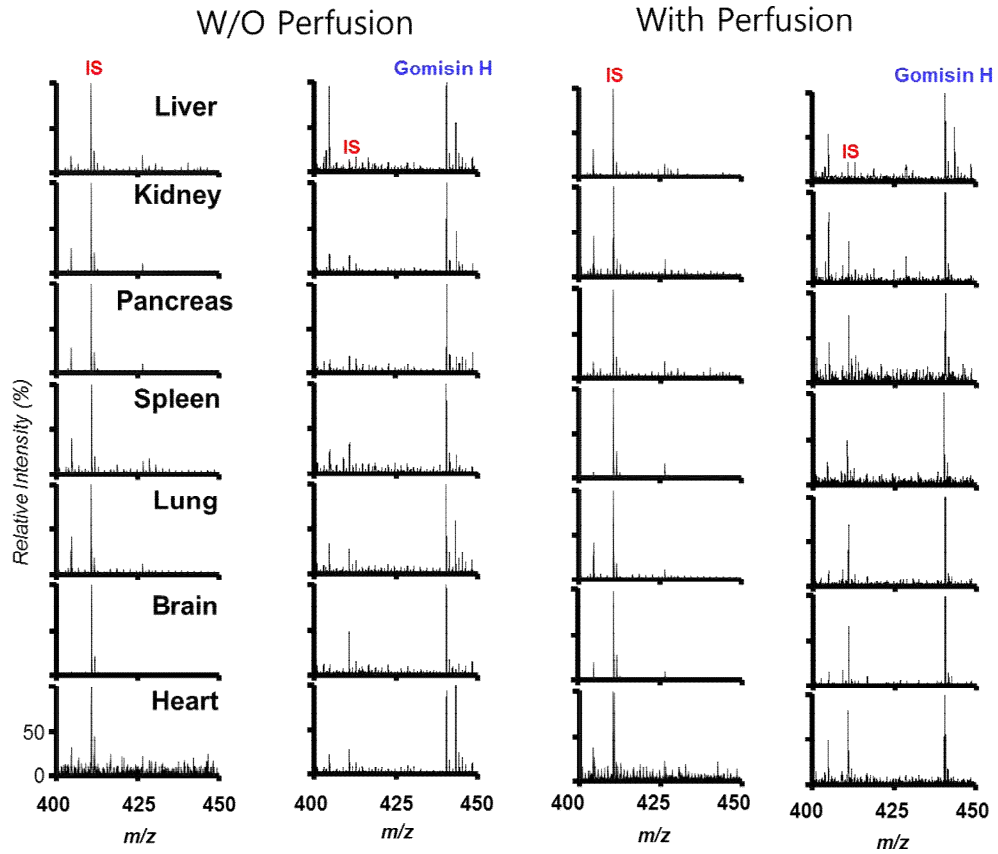


#### 나. 연구방법

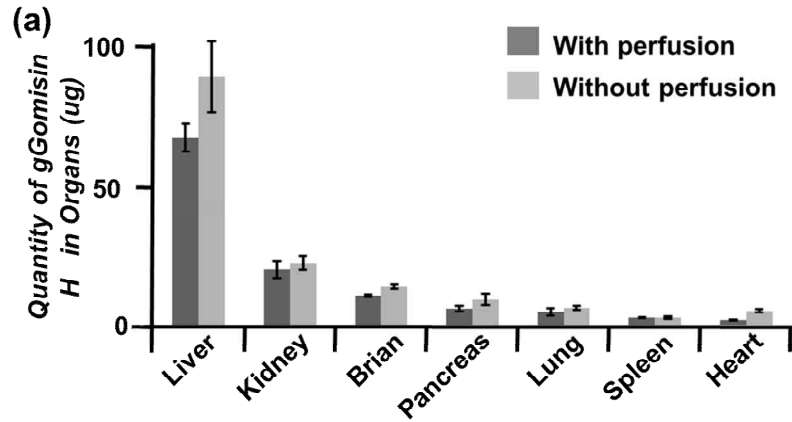
- (1) mouse에 intravenous 방법을 통해 gomisin H를 4.8 mg 주입
- (2) 이후 15분이 지나고 mouse로부터 장기를 적출한다. 한 종류의 장기는 gomisin H를 찌르지 않은 mouse의 장기이며 또 다른 장기들은 gomisin H를 주입한 mouse의 장기이다.
- (3) 장기로부터 perfusion 과정을 통해 피를 제거
- (4) 장기를 저울을 통해 무게를 재고 튜브에 장기와 장기의무게의 3배 되는 PBS를 넣고 장기를 기계를 통해 갈아준다.
- (5) 이후 ethyl acetate를 넣어준 후 sonication을 10분정도 진행한 후 유기용매층을 따로 얻어낸다.
- (6) 위 과정을 3번 반복
- (7) 유기용매층을 말리고 이루 DMSO를 넣어준다. 이후 gomisin J 250 uM과 함께 1:1로 섞어준다.
- (8) 혼합물을 matrix 로 금나노입자를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행.

#### 다. 연구결과

- (1) 아래의 자료는 MALDI TOF MS를 사용한 mouse의 장기로부터 얻은 장기의 추출물을 분석한 자료임.



(2) 위에서 얻은 자료인 MS를 통한 분석을 통해 이전에 구한 calibration curve에 대입하여 실제적인 정량이 가능하였다. 이를 통해 피를 제거한 장기에서 전반적으로 gomisin H의 양이 적은 것을 알 수 있었다. 간에서 제일 많은 양이 검출되는 것을 알 수 있었으며 2번째로 많이 존재하는 kidney와 비교 하였을 때 최소 2-3배 이상의 양이 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 아래는 gomisin H의 mouse 내의 정량분석표와 생체분포도 작성그래프임.



(b)

Tissues	W/O perfusion (µg)	With perfusion (µg)
Liver	68.05±5.08	90.25±2.82
Kidney	20.30±3.07	22.55±2.53
Brain	10.79±0.39	13.94±0.76
Pancreas	6.00±1.01	9.27±2.11
Lung	4.64±1.33	6.26±0.67
Spleen	2.63±0.11	2.70±0.56
Heart	1.80±0.14	5.12±0.59

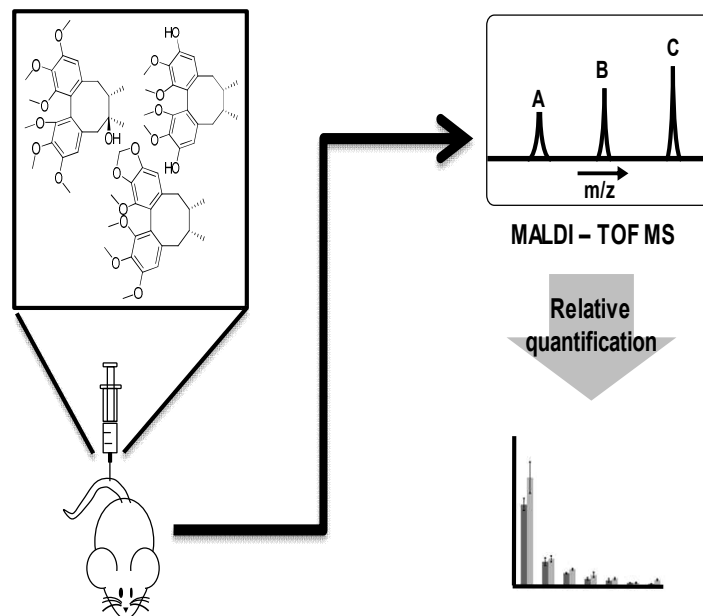
(3) 위의 데이터들을 바탕으로 다음과 같은 방법은 생체 내 약용물질의 생체분포도 작성이 가능한 방법임을 증명 가능하였음.

## 4절. MS 기법을 이용한 다양한 약용단일물질의 각 물질의 생체내 분포도 작성

### 1. 두 가지 이상의 약용물질을 mouse에 투여하여 MS 분석을 이용하여 각 물질의 분포도 분석 가능성 확인

#### 가. 연구내용

단순히 한 가지 물질만의 생체분포도를 작성하는 것이 아니라 다양한 약용물질의 MS 분석을 통해 체내에서 각 물질들의 서로 간의 상호작용과 이를 통한 유의미한 자료를 통해 더 나은 연구를 수행하는 하나의 토대가 되기 위해 실험을 진행하였다. 우선 오미자 추출물들을 사용하여 다중검지를 시도하여 다음과 같은 방법의 실효성을 확인함. 이후 정확한 분석이 가능함과 유의미한 자료를 위하여 새로운 물질을 통해 새로 다중검지를 진행하였다. 이때 오미자 추출물 가운데 오미자내의 함유량이 많으며 많은 효과에 대한 연구가 활발히 진행되는 물질들인 schizandrol A, gomisin N, gomisin J를 사용하여 분석을 진행하였다. 위의 방법과 동일하게 MALDI TOF MS를 사용하여 분석을 시도하였다. 그중 약용작물 중 오미자 추출물의 단일물질을 mouse에게 투여한 후 MS분석을 통하여 조직분포도 작성을 진행하였다. 아래의 간단한 그림을 통해 방법에 대해 설명함.



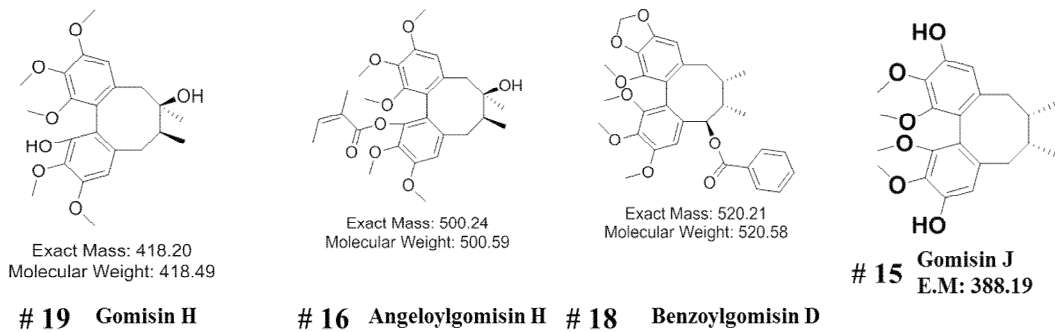
#### 나. 연구방법

- (1) 물질을 선정하기 위하여 다양한 물질을 문헌을 위해 분석
- (2) 선정한 물질들을 MS로 분석을 하여 적합한 물질 선정
- (3) mouse에 intravenous 방법을 통해 각 추출물 gomisin J와 Angeloylgomisin H 그리고 Benzoylgomisin D를 1.2 mg 주입
- (4) 이후 15분이 지나고 mouse로부터 장기를 적출

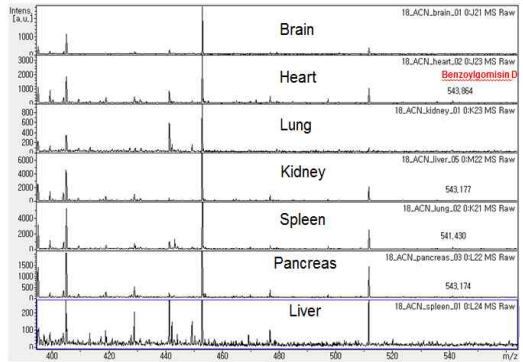
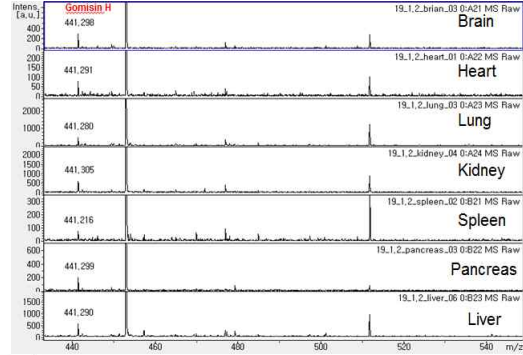
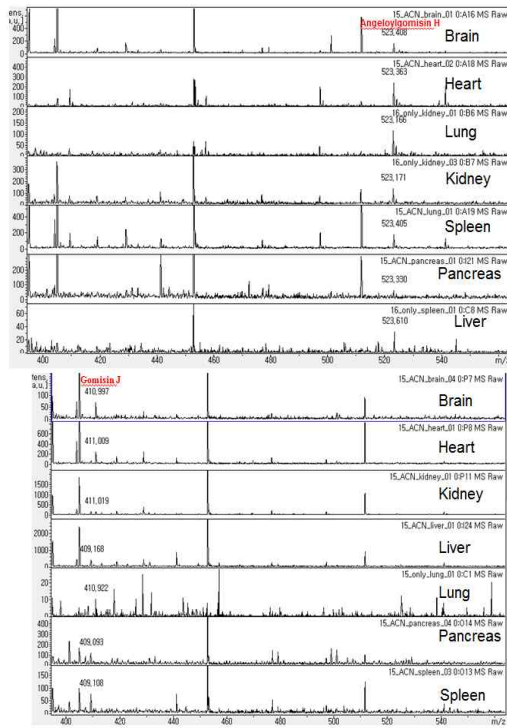
- (5) 장기를 저울을 통해 무게를 재고 튜브에 장기와 장기의 무게의 3배 되는 PBS를 넣고 장기를 기계를 통해 갈아줌
- (6) 이후 ethyl acetate를 넣어준 후 sonication을 10분정도 진행한 후 유기 용매층을 따로 얻어냄
- (7) 위 과정을 3번 반복
- (8) 유기 용매층을 말리고 이ru DMSO를 넣어준다. 이후 상대정량물질 20 uM과 함께 1:1로 섞어줌
- (9) 혼합물을 matrix 로 금나노입자를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행

다. 연구결과

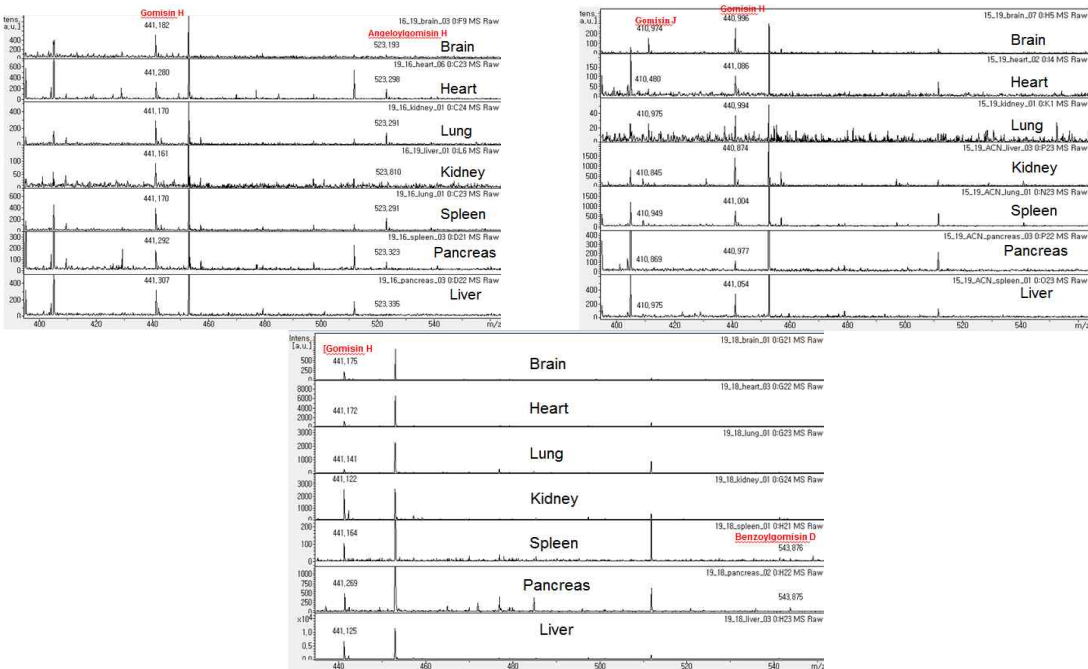
- (1) 선정된 약용물질 이외 오미자에 존재하는 다른 여러 물질 가운데 선정된 물질과 분석 시 문제가 없는 물질을 선정하고자 하였으며 이를 통해 앞서 기준물질로 사용한 gomisin J와 Angeloylgomisin H 그리고 Benzoylgomisin D를 선정함. 각 물질의 구조는 아래와 같음.



- (2) 선정된 물질을 여러 가지 조합으로 mouse에게 투여한 후 장기별로 분석을 진행하여 multiplexing이 가능한지 여부를 확인하고자 함. mouse에 각 1 mg을 I.V.를 사용하여 투여한 후 이를 MS를 사용하여 분석을 진행함. 이를 통해 MS 데이터를 얻음. MS자료는 아래와 같음.



(3) 약용단일물질을 분석 시 Benzoylgomisin D를 제외한 3가지 물질을 장기에서 이에 해당되는 분자량을 분석하는 것이 가능하였음. 이후 2가지 물질을 앞선 실험과 동일한 양으로 mouse에게 투여하여 한번에 2가지 이상의 물질을 분석하는 것이 가능한지 MS를 통해 실험을 진행함. 아래의 데이터를 통해 2가지 물질의 분석을 보여줌.



(4) 단일물질을 투여한 mouse에서의 분석 시와 동일하게 Benzoylgomisin D의 MS 데이터에서 분자량을 찾는 것이 힘들었지만 이외 다른 물질들은 2가지 물질을 한 번에 분석하는 것이 가능함



## 2. umberiferone 약용물질을 mouse에 투여하여 MS 분석을 이용하여 각 물질의 분포도 분석

### 가. 연구내용

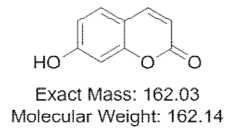
이와 같은 결과를 통해 이후 여러 가지조합을 통하여 서로간의 상대적인 양의 분석을 통해 여러 물질을 mouse에게 투여 시 단일물질을 투여할 때에 비해 어떠한 정량적인 변화가 있는지를 통하여 체내에서 다음과 같은 약용물질의 효과를 알아보고자 하는 실험을 진행. gomisin H이외의 당귀의 약용물질인 umberiferone을 선정하여 MS를 기반으로 생체 내 분포도 및 서로간의 시너지 효과를 분석하고자 하였다. 이를 위해 umberiferone, angelicin, byknangelicin을 사용하였으며 기준이 되는 물질로는 coumarin을 사용하여 실험을 진행하였다. 위의 3가지 물질을 여러 조합을 사용하여 단일물질을 mouse에게 투여했을 때와 2가지 물질을 투여했을 시의 umberiferone의 상대적인 양을 비교하여 시너지 효과가 있는지를 알아보고자 하였다. 1 mg을 mouse에게 I.V.방법을 사용하여 투여한 후 MS를 사용하여 분석을 진행하였다.

### 나. 연구방법

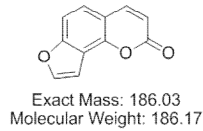
- (1) 물질을 선정하기 위하여 다양한 물질을 문헌을 위해 분석
- (2) 선정한 물질들을 MS로 분석을 하여 적합한 물질 선정
- (3) mouse에 intravenous 방법을 통해 각 추출물 umberiferone, angelicin, byknangelicin를 1 mg 주입
- (4) 이후 15분이 지나고 mouse로부터 장기를 적출
- (5) 장기를 저울을 통해 무게를 재고 튜브에 장기와 장기의 무게의 3배 되는 PBS를 넣고 장기를 기계를 통해 갈아줌
- (6) 이후 ethyl acetate를 넣어준 후 sonication을 10분정도 진행한 후 유기 용매층을 따로 얻어냄
- (7) 위 과정을 3번 반복
- (8) 유기 용매층을 말리고 이후 DMSO를 넣어준다. 이후 상대정량물질 20 uM과 함께 1:1로 섞어줌
- (9) 혼합물을 matrix 로 금나노입자를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행

### 다. 연구결과

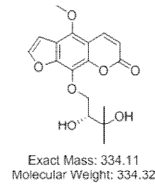
- (1) 사용한 물질들의 구조는 아래와 같음.



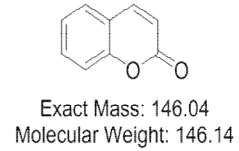
**umbelliferone**



**# 2 Angelicin**

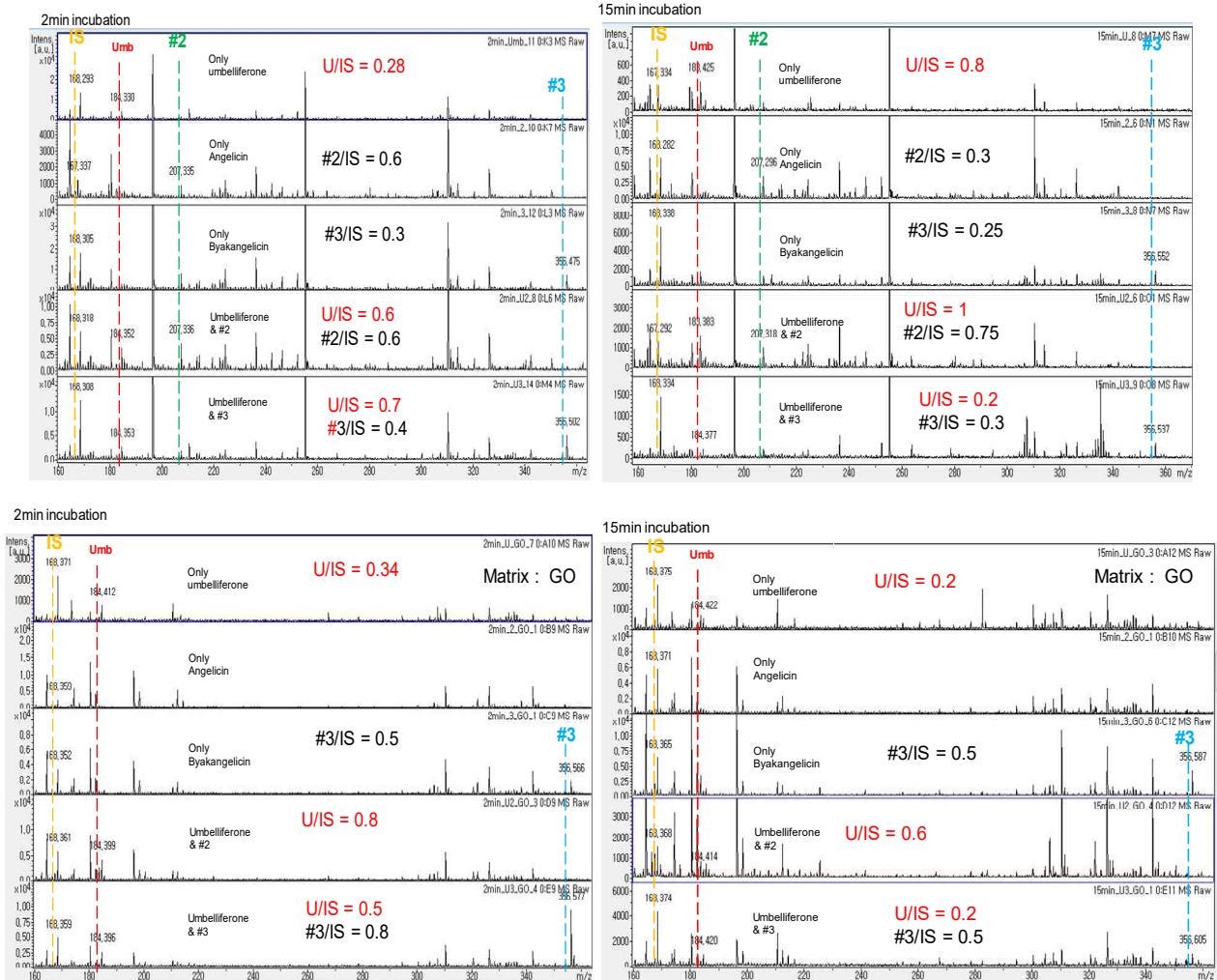


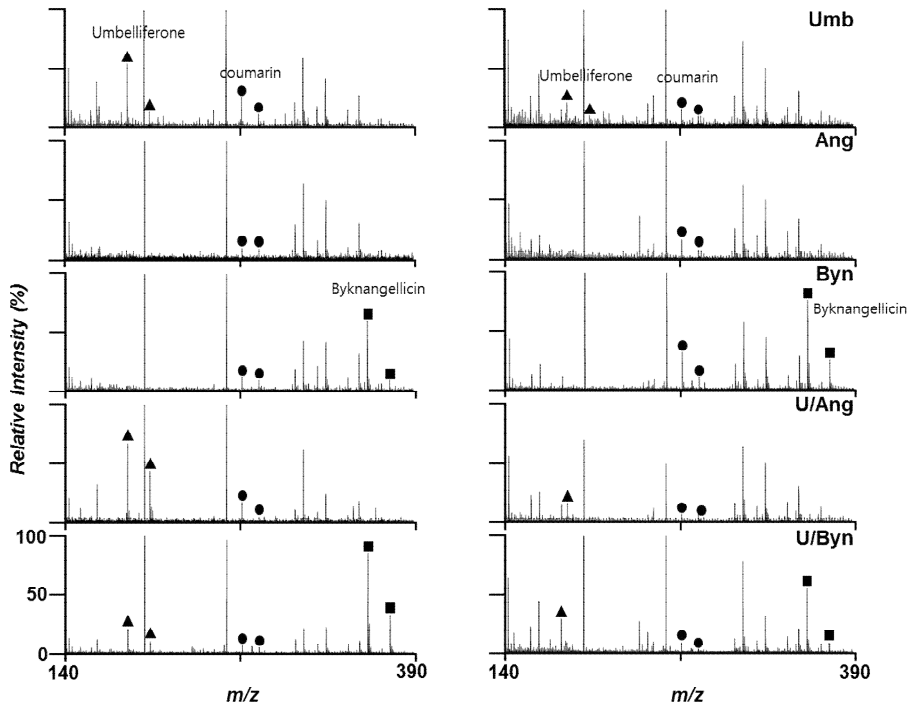
**# 3 Byakangelicin**



**Coumarin (IS)**

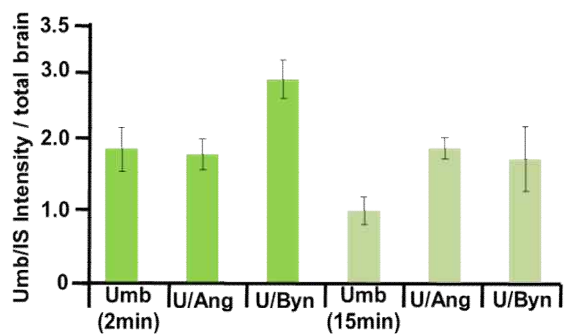
(2) 이때 mouse의 장기 중에 brain에서만 약용물질을 추출한 후 이후 기준물질인 coumarin을 사용하여 분석을 진행하였으며 mouse에게 약용물질을 투여한 후 2분과 15분 후 각각 brain을 적출하여 비교하여 어떠한 시너지 효과가 있는지를 분석하고자 하였다. 약용물질을 투여한 후 기준물질과의 상대적인 차이를 분석하여 단일물질만 투여를 하였을 경우와 비교하여 어떠한 양적인 변화를 야기하는지 알아보하고자 하였다. MS 데이터 분석결과는 아래와 같음.





(3) MS 분석 결과 시 각 물질에 해당하는 분자량을 확인하여 상대적인 정량이 가능하였으며 이를 통해 단일 물질을 찌를 경우와 비교하여 약용물질을 mouse에게 투여 후 2분 동안 두는 것에 비해 15분을 두어올 경우 angelicin과 같이 투여 시 umberiferone의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 byankangelicin과 같이 투여한 경우 2분과 15분 모두에서 umberiferone의 양이 증가하는 것을 볼 수 가 있었으며 byankangelicin의 양 또한 단일물질로 찌른 경우에 비해 양이 증가하는 것을 통해 시너지 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었지만 angelicin의 경우에는 MS로 분석 시 이에 해당되는 분자량을 확인할 수 가 없었다. 이를 통해 MS를 사용하여 약용물질들의 상대적인 양을 분석하여 이를 통해 시너지 효과를 확인 가능하였다. 위의 결과를 수치화 하여 이를 표와 그래프로 변환시킨 데이터 자료는 아래와 같음.

		250uM	
2min	umb	1.85	
	3	4.03	
	umb+2(u)	1.78	0.96 감소
	umb+3(u)	2.81	1.52 증가
	umb+3(3)	8.89	2.2 증가
15min	umb	0.99	
	3	3.47	
	umb+2(u)	1.86	1.88 증가
	umb+3(u)	1.71	1.72 증가
	umb+3(3)	5.66	1.63 증가



### 3. 오미자 약용물질을 mouse에 투여하여 MS 분석을 이용하여 각 물질의 분포도 분석

#### 가. 연구내용

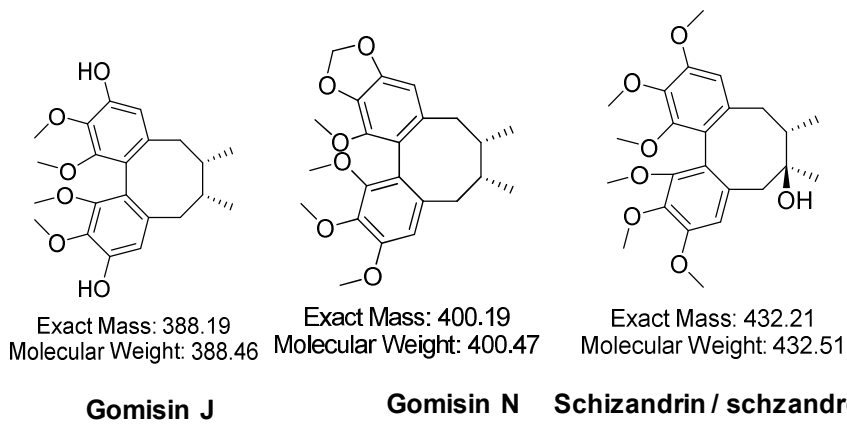
여러 가지 조합을 통하여 서로간의 상대적인 양의 분석을 통해 여러 물질을 mouse에게 투여 시 단일물질을 투여할 때에 비해 어떠한 정량적인 변화가 있는지를 통하여 체내에서 다음과 같은 약용물질의 효과를 알아보고자 하는 실험을 진행. gomisin H 이외의 오미자의 약용물질인 schizandrol A, gomisin N, gomisin J를 선정하여 MS를 기반으로 생체 내 분포도 및 서로 간의 시너지 효과를 분석하고자 하였다. 이를 위해 기준이 되는 물질로는 Angeloylgomisin H를 사용하여 실험을 진행하였다. 위의 3가지 물질을 여러 조합을 사용하여 단일물질을 mouse에게 투여했을 때와 2가지 물질을 투여했을 시의 schizandrol A, gomisin N, gomisin J의 상대적인 양을 비교하여 시너지 효과가 있는지를 알아보고자 하였다. 1 or 1.2 mg을 mouse에게 I.V.방법을 사용하여 투여한 후 MS를 사용하여 분석을 진행하였다.

#### 나. 연구방법

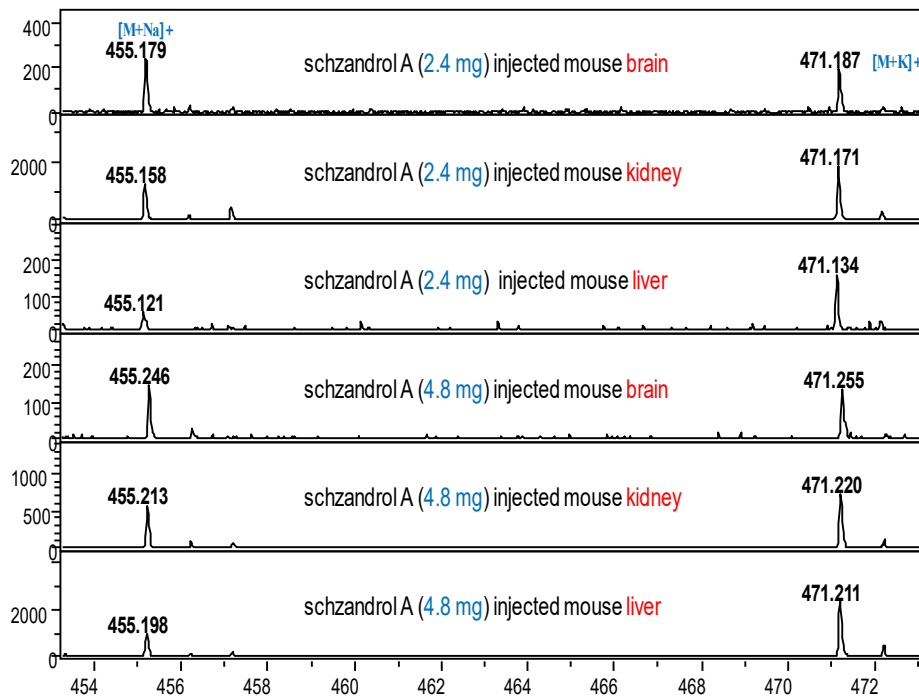
- (1) 물질을 선정하기 위하여 다양한 물질을 문헌을 위해 분석
- (2) 선정한 물질들을 MS로 분석을 하여 적합한 물질 선정
- (3) mouse에 intravenous 방법을 통해 각 추출물 schizandrol A, gomisin N, gomisin J를 1 또는 1.2 mg 주입한다.
- (4) 이후 15분이 지나고 mouse로부터 장기를 적출한다.
- (5) 장기를 저울을 통해 무게를 재고 튜브에 장기와 장기의 무게의 3배 되는 PBS를 넣고 장기를 기계를 통해 갈아준다.
- (6) 이후 ethyl acetate를 넣어준 후 sonication을 10분정도 진행한 후 유기 용매층을 따로 얻어낸다.
- (7) 위 과정을 3번 반복한다.
- (8) 유기 용매층을 말리고 이류 DMSO를 넣어준다. 이후 상대정량물질 20 uM과 함께 1:1로 섞어준다.
- (9) 혼합물을 matrix 로 금나노입자를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 분석을 진행.

#### 다. 연구결과

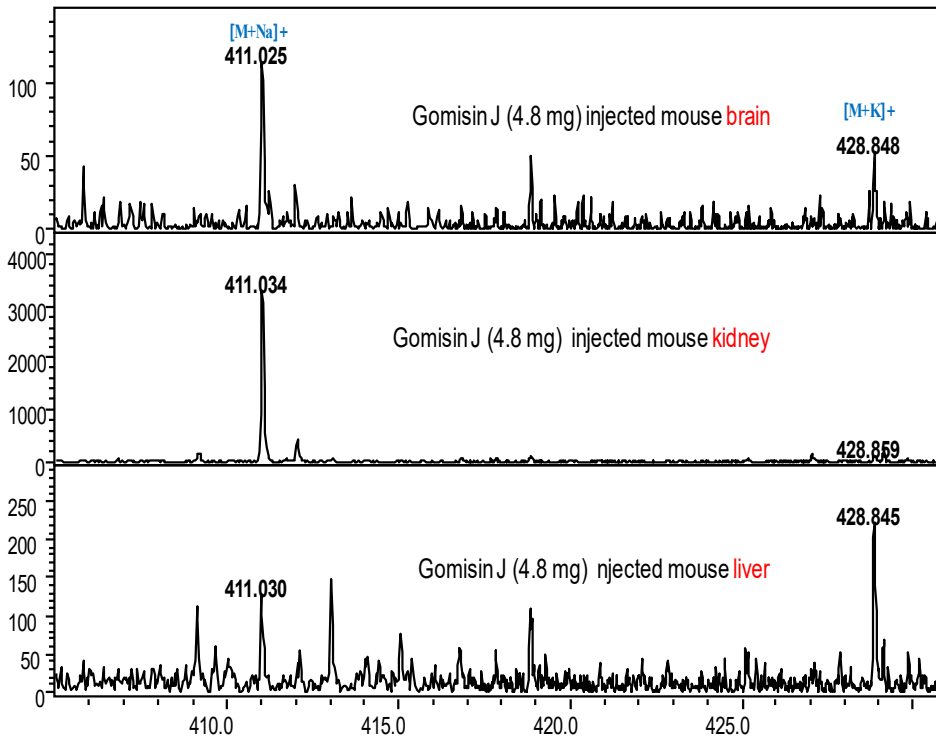
- (1) 사용한 물질들의 구조는 아래와 같음.



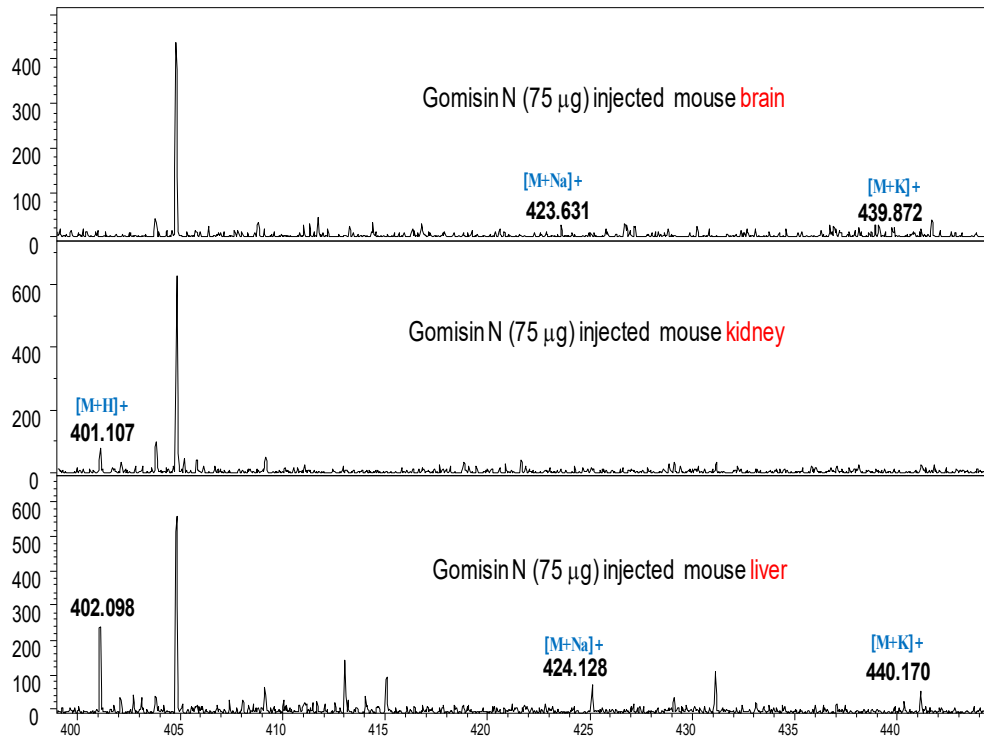
(2) 실험을 진행하기에 알맞은 물질인지 확인하기 위하여 각 물질을 mouse에 최대 2.4 mg을 찌르고 각 장기로부터 3가지 물질을 추출하여 이를 MALDI TOF MS를 통해 분석을 진행함. 각 물질에 대한 MS 자료를 아래에 첨부함.



schizandrol A 분석 자료

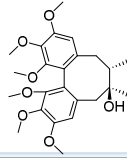


gomisin J 분석 자료



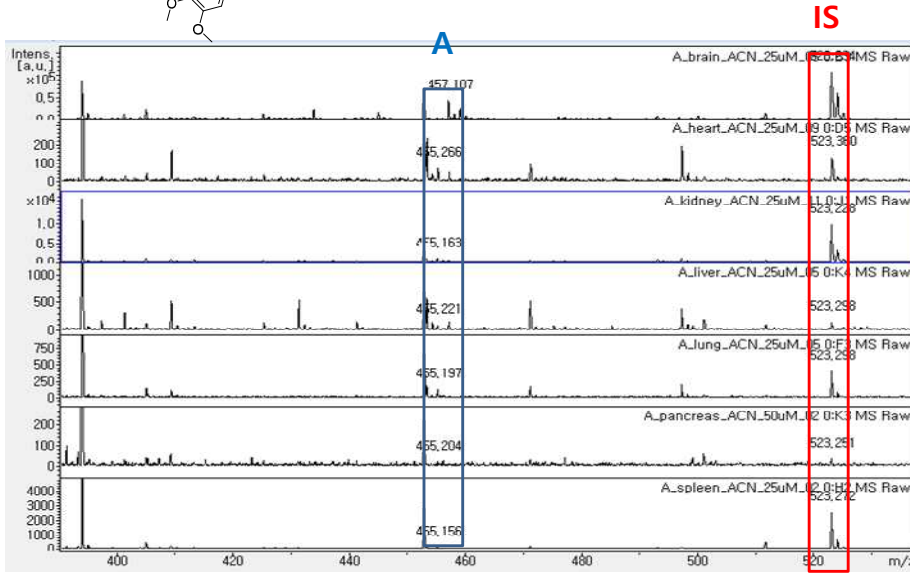
gomisin N 분석 자료

(3) 실제로 확인을 하여 분석 가능한 물질임을 증명하고 이후 각 물질을 한 개씩 각 1.2 mg을 찌른 후 장기를 MS를 통해 분석을 하였다. 아래에 MS 자료를 첨부함.

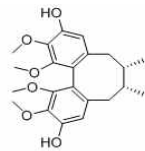


Schizandrin / schizandrol A  
E.M: 432.21

schizandrol A (1.2 mg) injected mouse

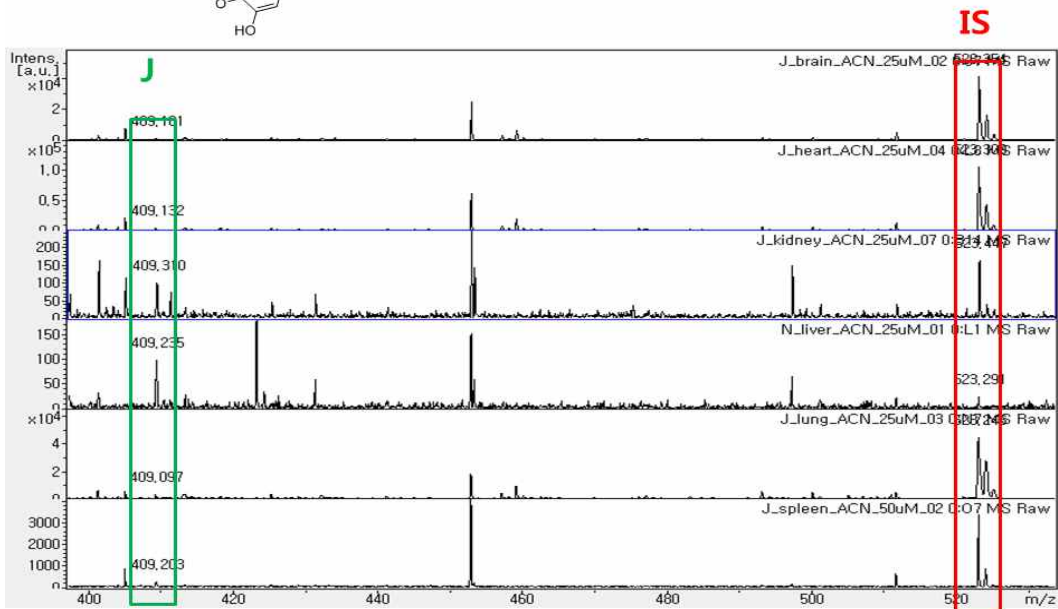


Schizandrol A 분석 자료

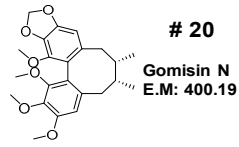


# 15  
Gomisin J  
E.M: 389.19

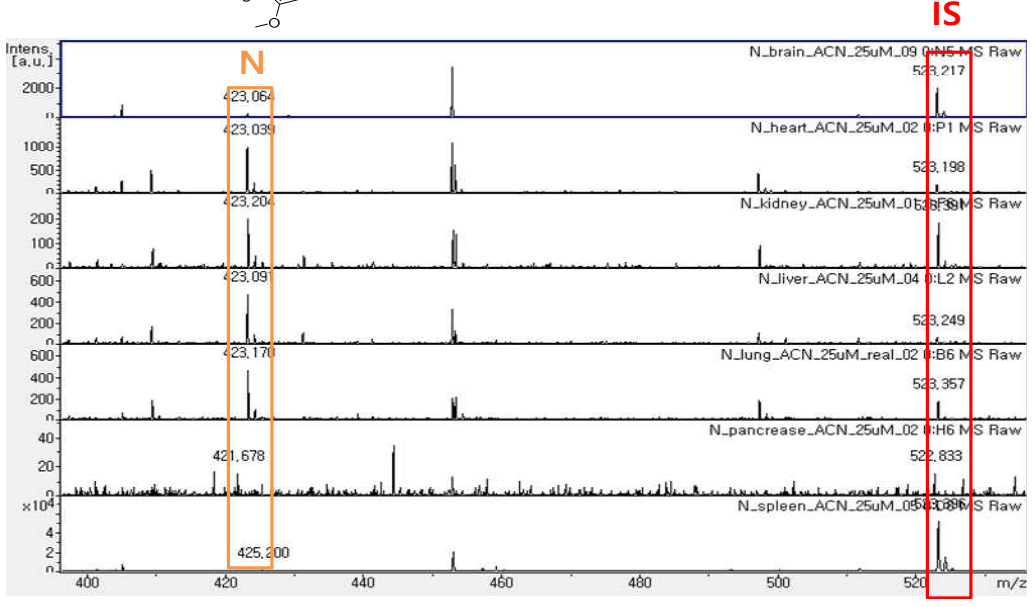
Gomisin J (1.2 mg) injected mouse



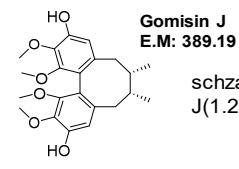
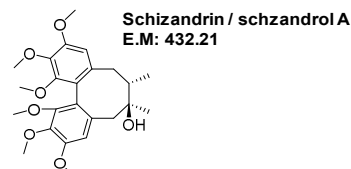
Gomisin J 분석 자료



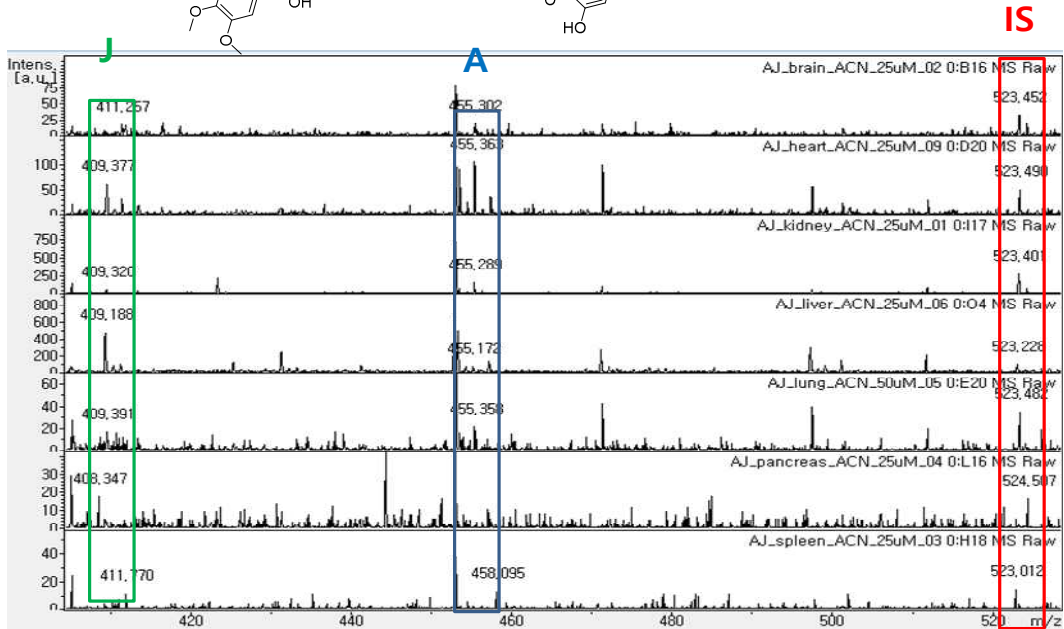
Gomisin N (1 mg) injected mouse



gomisin N 분석 자료

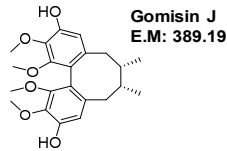
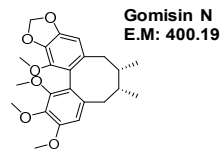
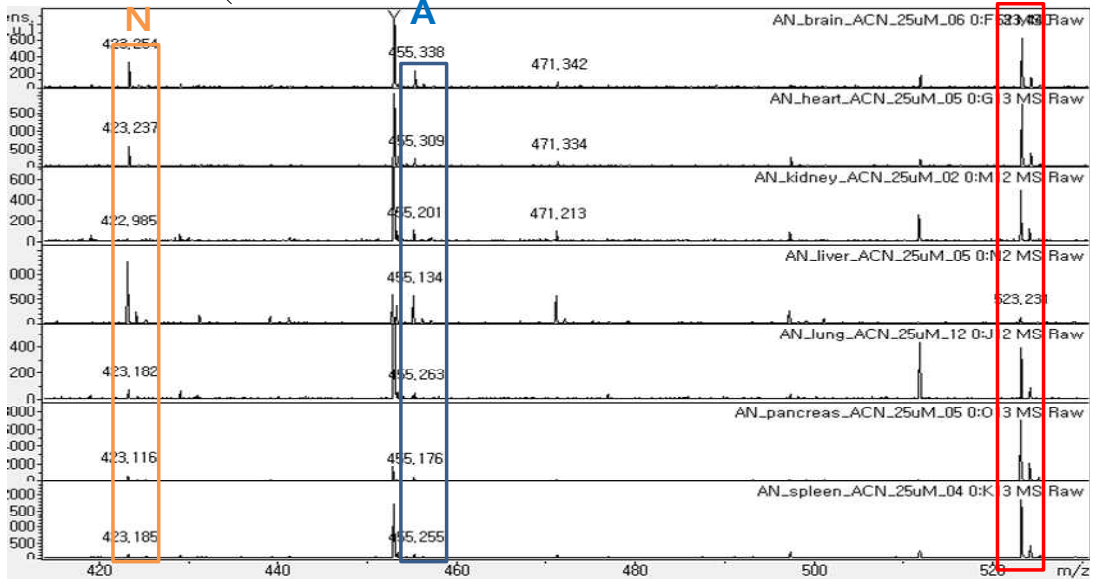
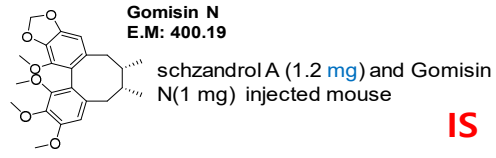
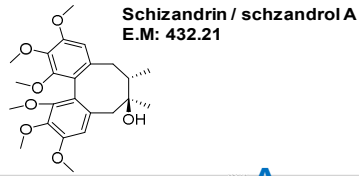


schzandrol A (1.2 mg) and Gomisin J(1.2 mg) injected mouse

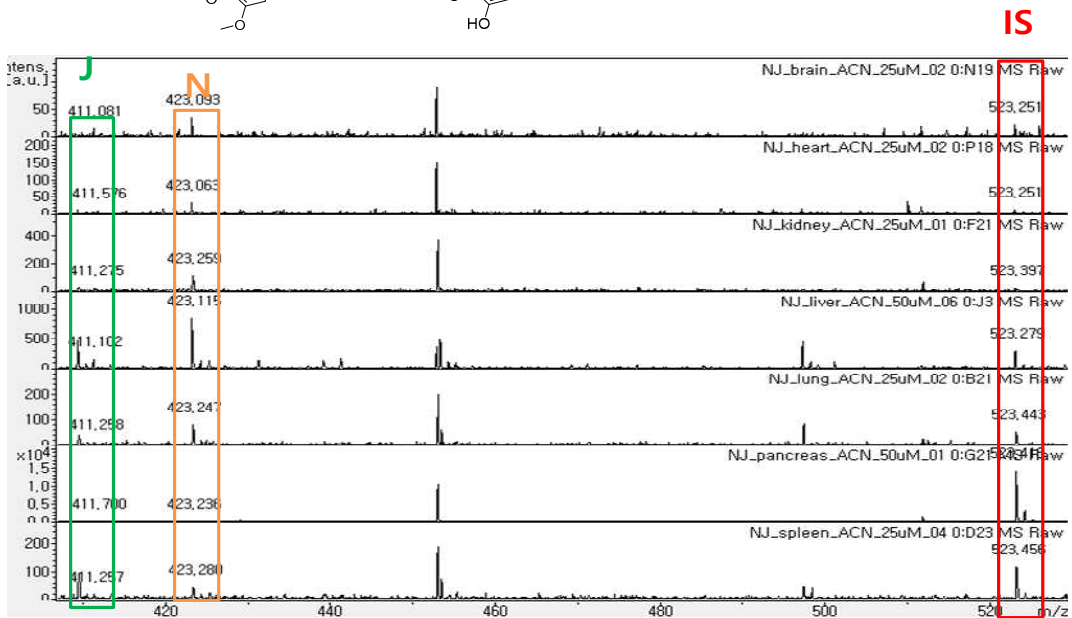


Schizandrol A, gomisin J 분석 자료

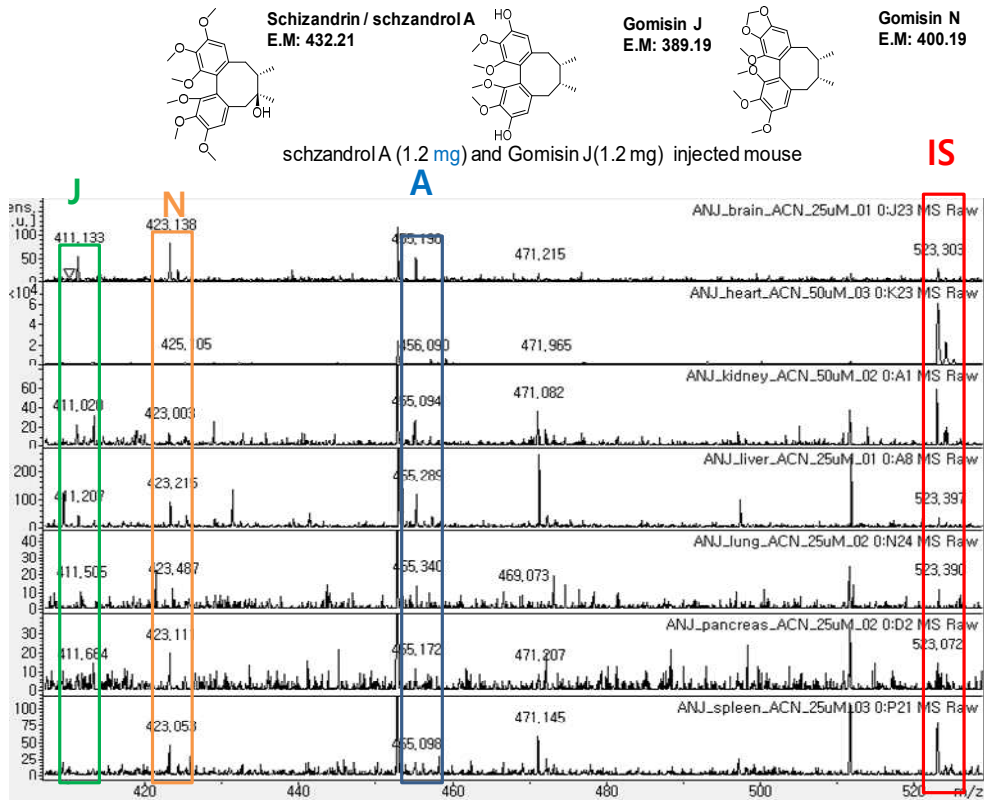




Gomisin N(1 mg) and Gomisins J(1.2 mg) injected mouse

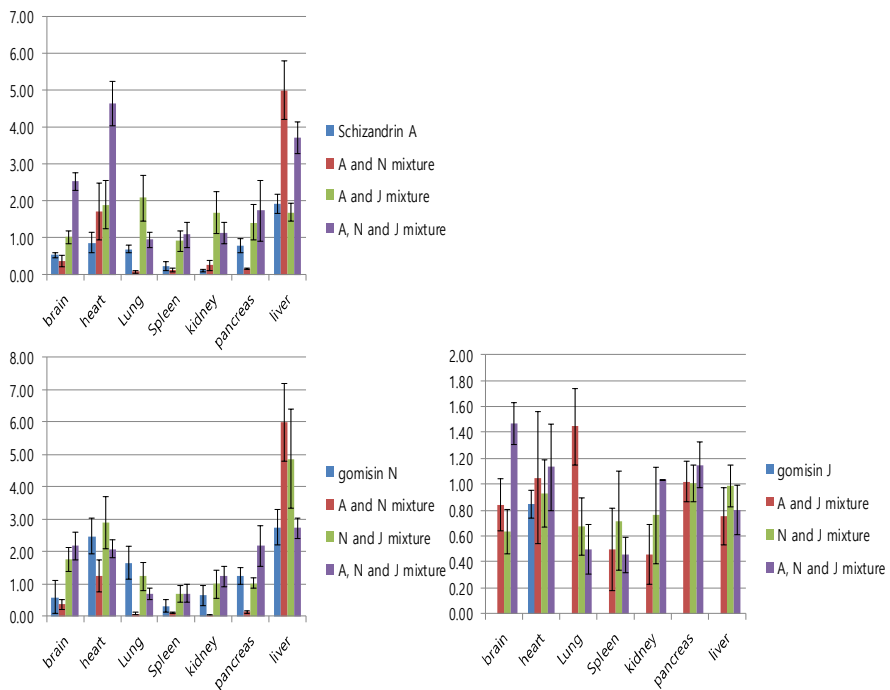


gomisin J, gomisin N 분석 자료

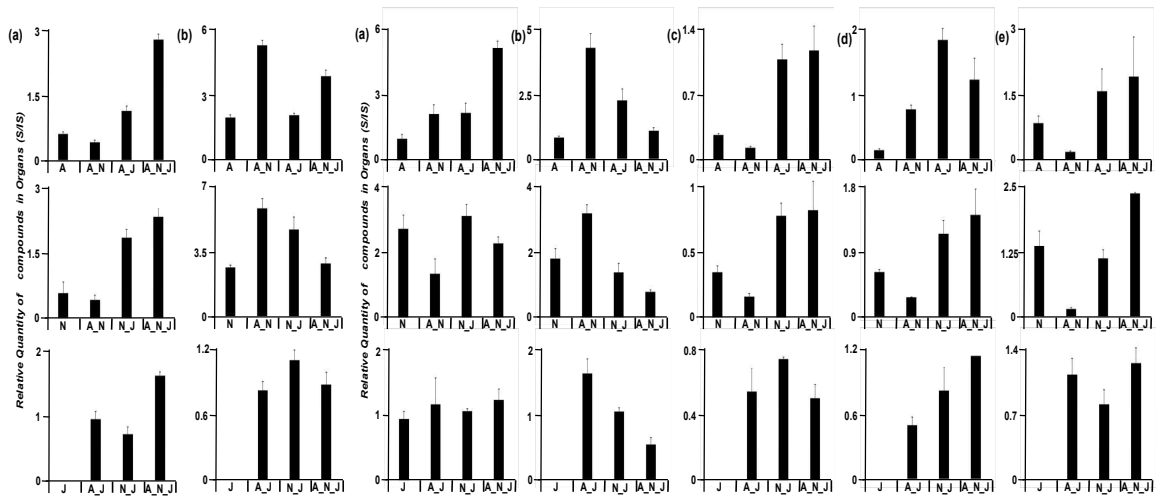


Schizandrol A, gomisin J, gomisin N 분석 자료

(4) 위의 MS자료를 토대로 각 물질을 IS와 MS의 intensity의 비교를 통해 상대적인 정량을 진행함. 이를 통해 각 schizandrol A, gomisin N, gomisin J을 한 개만 mouse에 주입한 후의 정량값과 두가지 혹은 3가지 물질을 함께 찌른 후 물질들의 정량을 통해 상호작용들에 대한 분석을 시도함.



schizandrol A, gomisin N, gomisin J의 비교 값 그래프 (물질 별)



schizandrol A, gomisin N, gomisin J의 비교 값 그래프 (장기 별)

Tissues			Brain (S/S)	Liver (S/S)	Tissues			Heart (S/S)	Lung (S/S)	Spleen (S/S)	Kidney (S/S)	Pancreas (S/S)
Schizandrol A	A	0.53±0.05	1.87±0.13	Schizandrol A	A	0.86±0.18	0.71±0.03	0.24±0.01	0.12±0.02	0.75±0.15		
	A_N	0.36±0.05	5.19±0.21		A_N	1.92±0.38	3.85±0.53	0.11±0.01	0.22±0.05	0.16±0.01		
	A_J	1.02±0.11	1.68±0.09		A_J	1.96±0.42	2.01±0.39	0.98±0.15	1.67±0.15	1.41±0.49		
	A_N_J	2.52±0.12	3.75±0.27		A_N_J	4.72±0.29	0.94±0.10	1.07±0.24	1.11±0.29	1.74±0.83		
Gomisin N	N	0.52±0.26	2.71±0.14	Gomisin N	N	2.46±0.37	1.60±0.28	0.31±0.05	0.55±0.03	1.25±0.26		
	A_N	0.38±0.10	6.04±0.59		A_N	1.21±0.40	2.86±0.24	0.10±0.02	0.03±0.00	0.13±0.02		
	N_J	1.74±0.17	4.88±0.68		N_J	2.81±0.35	1.24±0.23	0.71±0.09	1.01±0.16	1.03±0.15		
	A_N_J	2.18±0.16	2.73±0.32		A_N_J	3.06±0.18	0.68±0.06	0.74±0.21	1.23±0.32	2.17±0.02		
Gomisin J	J			Gomisin J	J	0.84±0.11						
	A_J	0.86±0.11	0.75±0.07		A_J	1.06±0.36	1.49±0.21	0.49±0.13	0.45±0.07	1.02±0.16		
	N_J	0.65±0.10	0.99±0.08		N_J	0.95±0.03	0.68±0.06	0.74±0.01	0.74±0.19	1.00±0.14		
	A_N_J	1.47±0.05	0.80±0.10		A_N_J	1.12±0.16	0.50±0.10	0.46±0.08	1.03±0.00	1.14±0.15		

schizandrol A, gomisin N, gomisin J의 비교 값 표 (장기 별)

(5) 이를 통해 오미자 내의 주요 함유 물질들을 다중검지로 생체분포도 작성이 가능하다는 것을 확인하였으며 다음의 자료를 통해 대부분 2, 3가지 물질을 동시에 증비하면 이전에 배해 증강하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

(6) 이를 통해 약용물질들을 같이 찌르면 증가하는 현상을 통해 메커니즘 등의 다양한 연구에 활용가능 한 분석 방법이라는 것을 증명가능 하였다.

## 5절. MS 이미징 기법을 이용한 약용작물 유효성분 분석

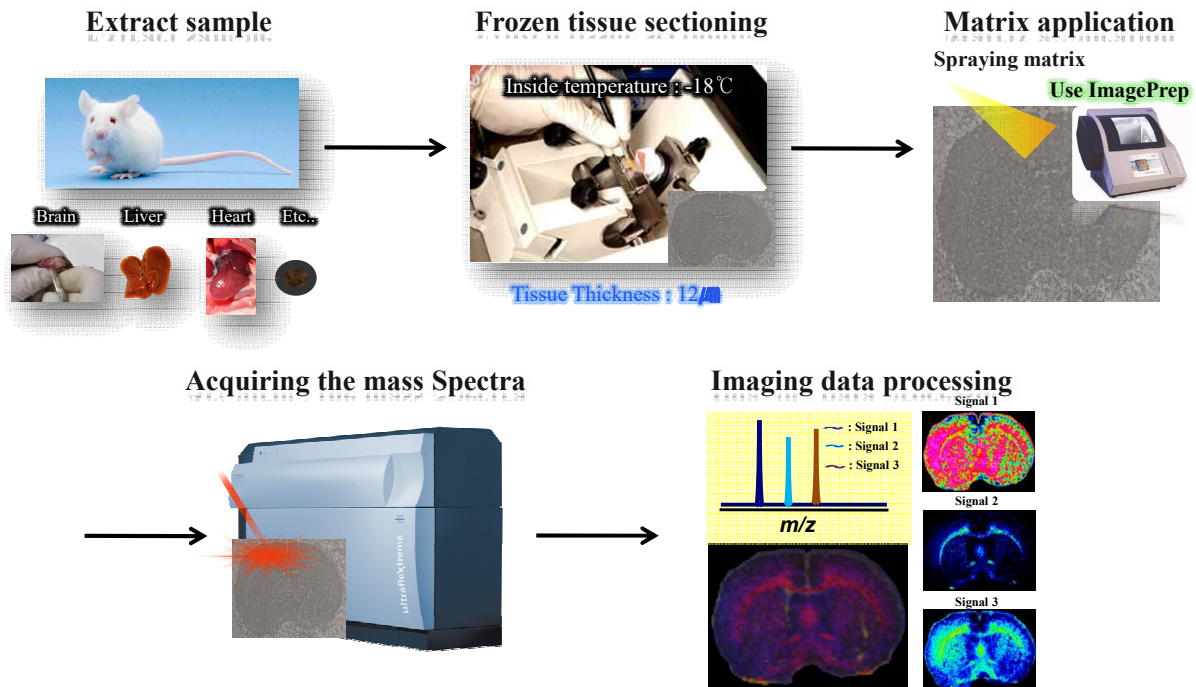
### 1. MALDI-TOF 질량분석기를 이용한 이미징

#### 가. 연구내용

다양한 방법(정맥주사, 복강주사, 근육주사, 구강투여 등)으로 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 주입된 성분들을 실시간 위치 추적 및 생체 내 분포를 정성적/정량적 평가를 통해 각 물질들이 장기의 어느 부분에 분포하는가를 알아봄으로써 각 장기내의 효능과 매커니즘에 관한 연구가 가능함.

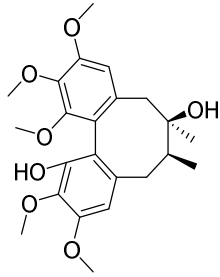
#### 나. 연구방법

- (1) 유효성분 추출물/표준품으로 처리한 mouse에서 원하는 장기 부위를 적출
- (2) 적출된 장기를  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 넣어 냉동한 후 cryocut microtome 장비를 이용해 약 10  $\mu\text{m}$ 의 두께로 sectioning
- (3) Sectioning 된 조직 절편에 MS 분석을 위한 저분자 유기 matrix를 균일하게 분포
- (4) matrix 로 금나노입자를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 조직에 존재하는 분석물질 분석
- (5) MS spectrum 에 분석된 분자의 peak을 software를 통해 이미지로 전환.



#### 다. 연구결과

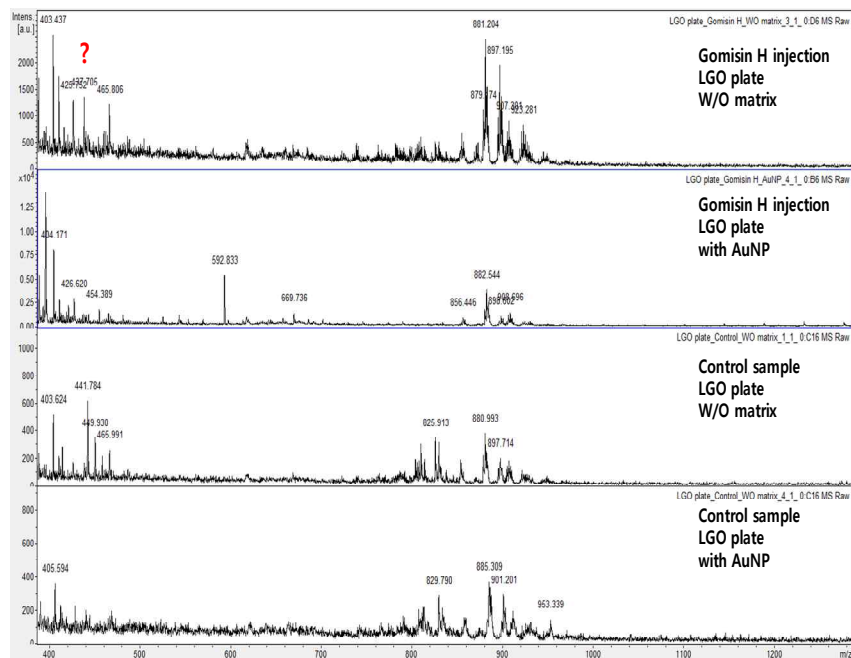
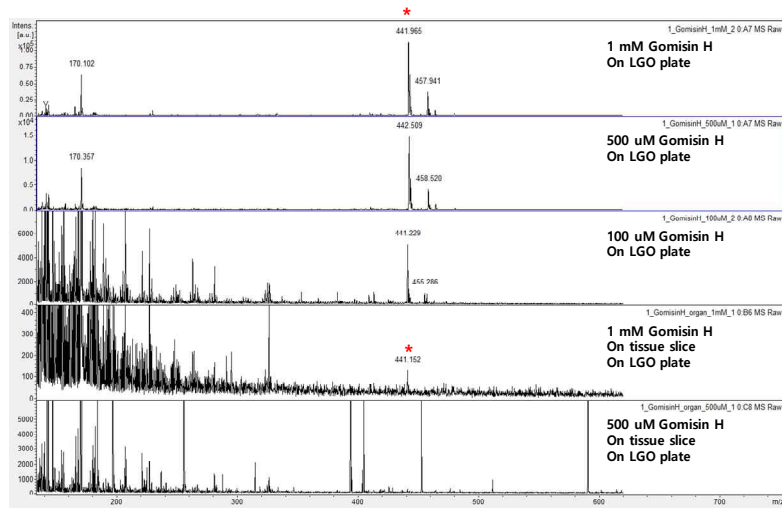
- (1) 이미징을 위해 사용한 물질은 아래와 같다.



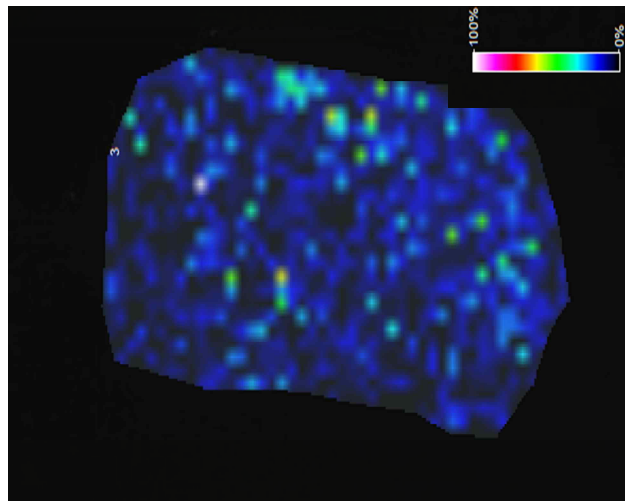
Gomisin H  
E.M: 418.20

Exact Mass: 418.20  
Molecular Weight: 418.49

(2) 이미징을 위해 얻은 MS데이터는 다음과 같다.



(3) 이미징을 통한 데이터는 다음과 같다.



(3) 이미징의 결과를 통해 mouse의 brain 중 cortex인 외피질에 많이 존재한다는 것을 알 수 있었다.

## 6절. 보론산 기능화 입자를 사용한 vicinal diol을 갖는 플라보노이드의 효율적인 농축과 MALDI-TOF MS 분석

### 1. Vicinal diol을 갖는 플라보노이드의 농축을 위해 사용한 보론산 기능화 입자의 사이즈 측정

#### 가. 연구내용

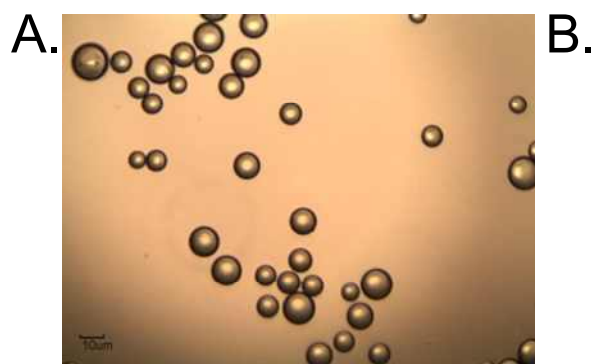
플라보노이드는 체내에서 제거되는 빠른 대사 과정을 겪기 때문에 다른 소분자 분석물질에 비해 검출이나 정량이 비교적 어렵다. 따라서 Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS)를 사용하여 vicinal diol을 갖는 플라보노이드 분자들의 효율적인 농축 방법을 제시하고자 하였다. 보론산이 염기 pH 에서 vicinal diol과 결합하여 boronate 모노에스테르를 형성하는 것을 이용하기 위해 보론산 기능화 입자를 사용하였다. 농축 과정 동안 보론산과 vicinal diol을 갖는 플라보노이드 분자의 복합체는 계속 유지되고, 산성 조건에서 vicinal diol을 갖는 플라보노이드는 쉽게 분리될 수 있다. 이 방법을 증명하기 위해 먼저 vicinal diol을 갖는 플라보노이드의 농축을 위해 사용된 보론산 기능화 입자의 사이즈를 측정하였다.

#### 나. 연구방법

- (1) 0.2 M ammonium acetate buffer(pH 8.65)를 사용하여 보론산 기능화 입자를 wash 하였다.
- (2) 보론산 기능화 입자를 TDW에 용해시킨 후 inverted microscope를 사용하여 사이즈를 측정하였다.
- (3) 보론산 기능화 입자를 다시 Drying oven에서 완전히 건조 시키고 난 후 inverted microscope를 사용하여 사이즈를 측정하였다.

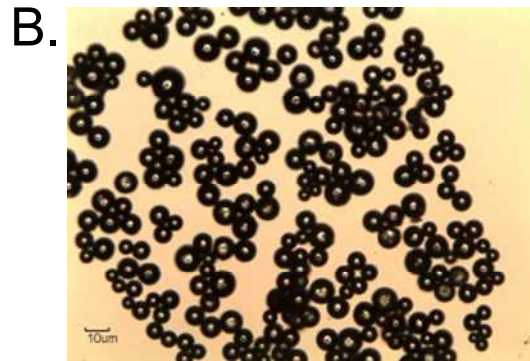
#### 다. 연구결과

- (1) TDW에 용해시킨 후 분산되어 존재하는 보론산 기능화 입자의 모양은 다음과 같고 사이즈는 약 10  $\mu\text{m}$ 로 측정 되었다.



- (2) 완전히 건조 시키고 난 후 보론산 기능화 입자의 모양은 다음과 같고 사이즈가 줄어드는

것이 관찰 되었다.



## 2. MALDI-TOF MS를 기반으로 분석 데이터 구축

### 가. 연구내용

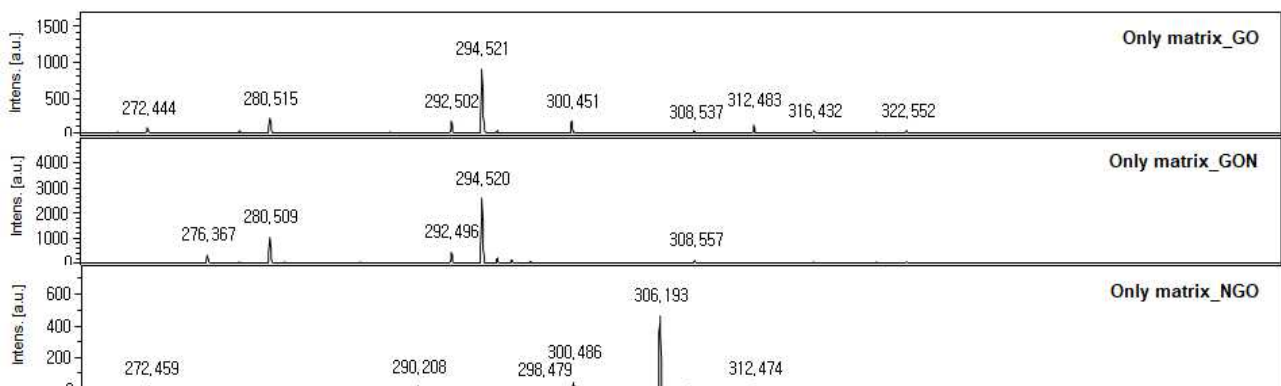
- (1) Pure flavonoid의 MALDI-TOF MS 분석을 위한 최적의 matrix 확인
- (2) Pure flavonoid의 MALDI-TOF MS 분석을 위한 최적의 matrix 농도 확인

### 나. 연구방법

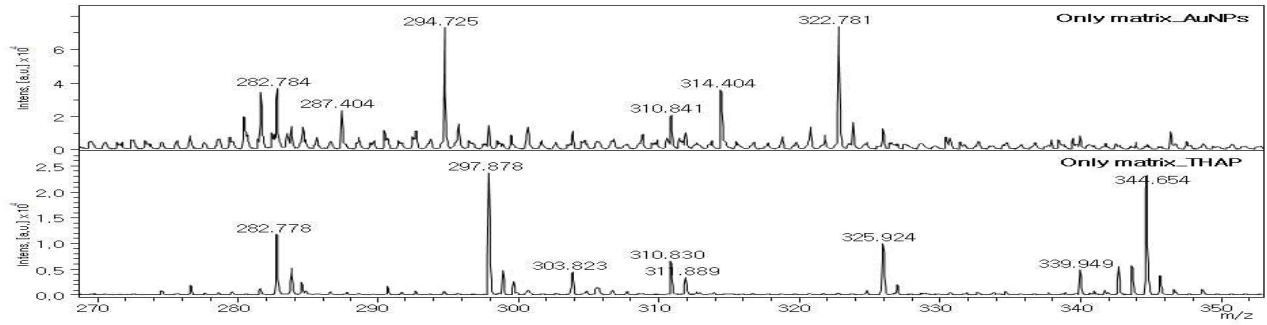
- (1) Target 물질인 quercetin을 MALDI-TOF MS로 분석하기 위해 5가지 matrix를 선정 (GO, GON, NGO, THAP, AuNPs)
- (2) Target 물질인 quercetin 샘플을 matrix와 각각 serial dilution 한 후 2 ul 씩 spotting 하여 관찰
- (3) 0.11 nM, 0.275 nM, 1.1 nM, 4.4 nM, 11 nM 의 AuNPs를 사용하였을 때, quercetin 의 peak을 관찰

### 다. 연구결과

- (1) 5가지의 matrix의 background peak 은 다음과 같다.

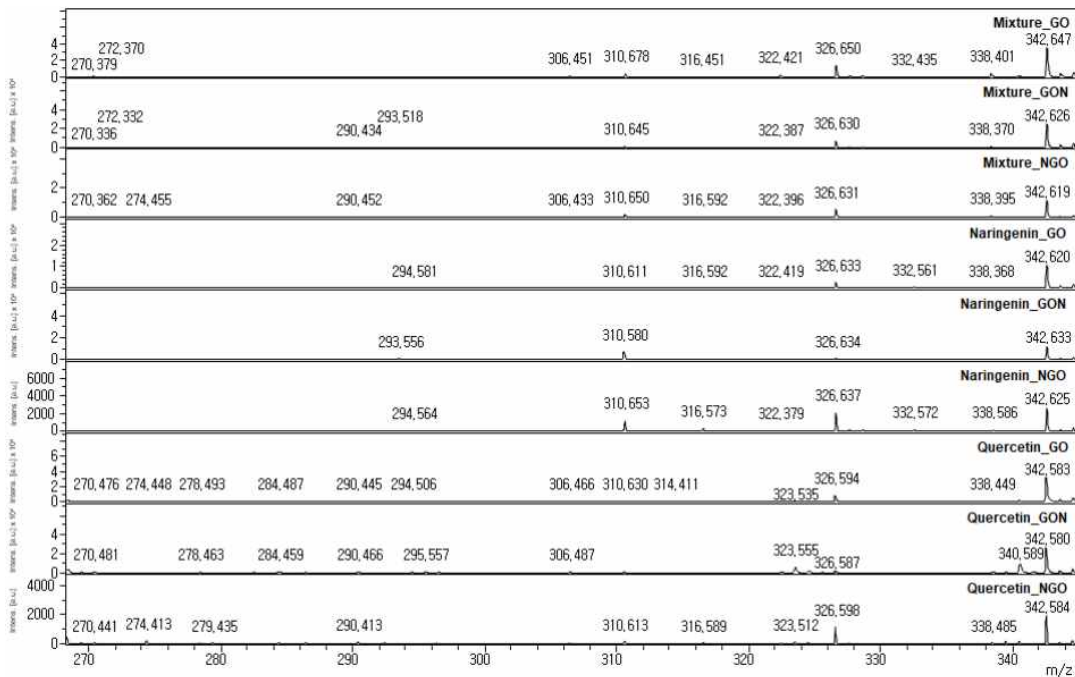


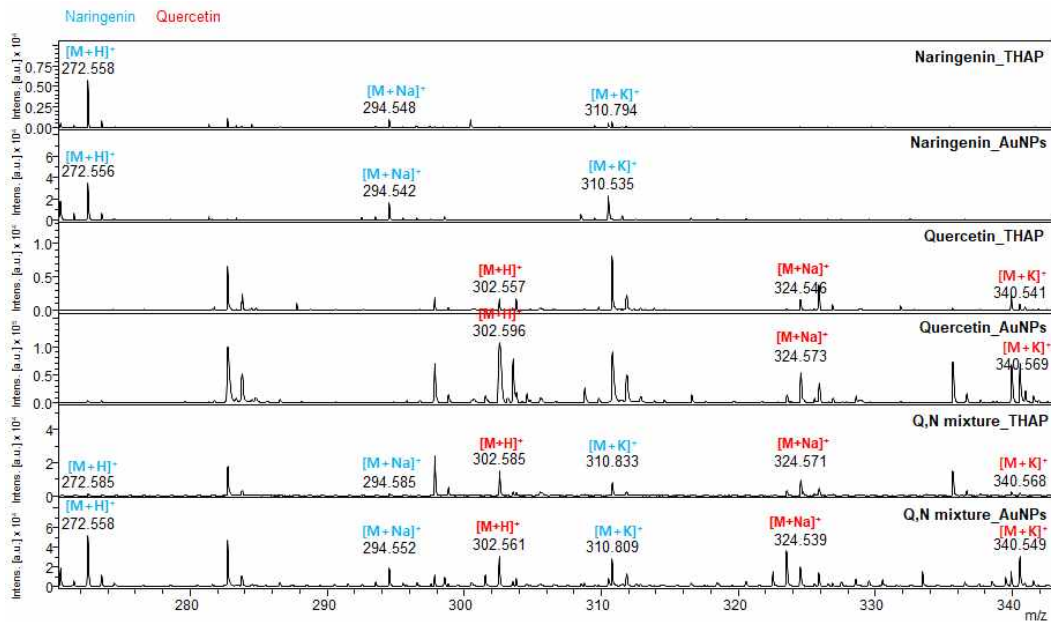




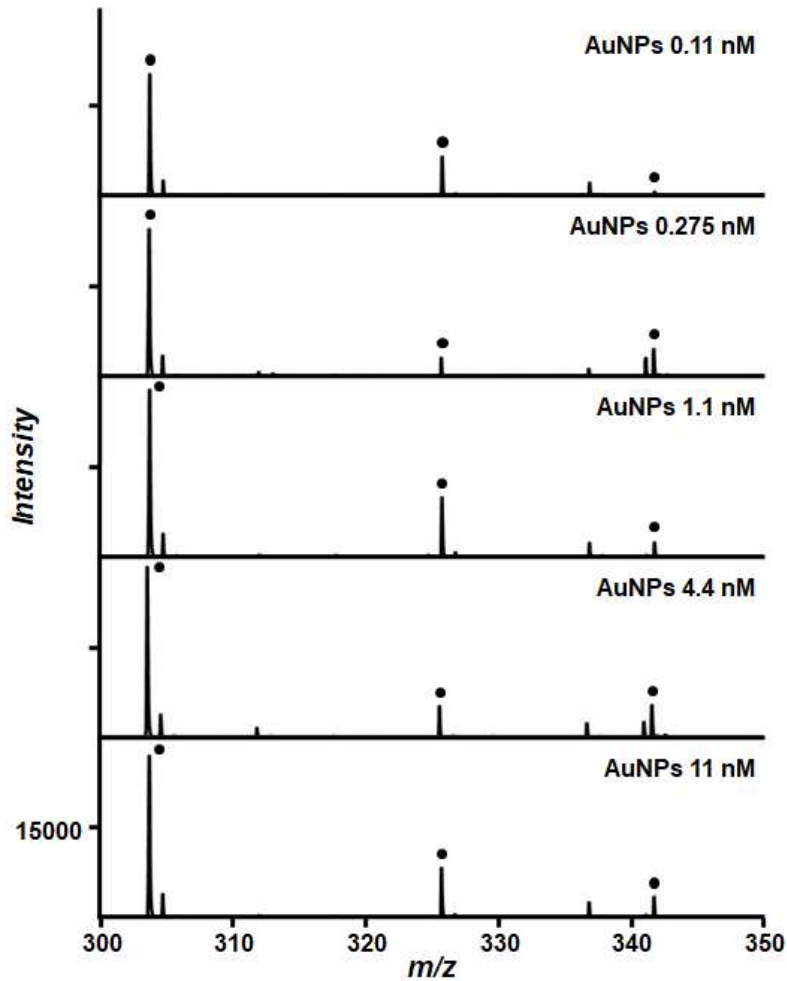
(2) Matrix 만을 분석하였을 때, 실험에 사용할 플라보노이드의 peak와 겹치는 peak이 전혀 없기 때문에 NGO가 가장 적합할 것이라고 예상되었다.

(3) 5가지 matrix를 사용하여 quercetin 과 naringenin 의 mixture를 분석한 결과는 다음과 같다.





- (4) GO, GON, NGO에서는 플라보노이드 물질의 어떤 peak도 관찰할 수 없었다.
- (5) THAP와 AuNPs를 사용하였을 때, 두 경우 모두 peak이 잘 관찰 되었지만, THAP는 matrix 자체의 peak이 target 물질인 quercetin의 peak과 겹치기 때문에 추후 실험은 AuNPs를 사용하여 진행하였다.
- (6) 0.11 nM, 0.275 nM, 1.1 nM, 4.4 nM, 11 nM의 AuNPs를 사용하여 quercetin의 peak을 관찰한 결과는 다음과 같다.



- (7) 1.1 nM과 11 nM에서 target 물질의 peak이 가장 잘 보이며, 같은 양상을 띠는 것을 확인하였다.
- (8) 굳이 높은 농도의 matrix를 사용할 필요가 없기 때문에 1.1 nM이 적합하다고 판단하여 추후 실험에 모두 1.1 nM의 AuNPs를 적용하였다.

### 3. Enrichment의 condition 확립

#### 가. 연구내용

- (1) Target 물질의 enrichment 후 보론산 기능화 입자에 결합하지 못한 나머지 물질들을 제거하기 위한 wash 횟수의 확립
- (2) Target 물질의 release를 위한 시간 확립

#### 나. 연구방법

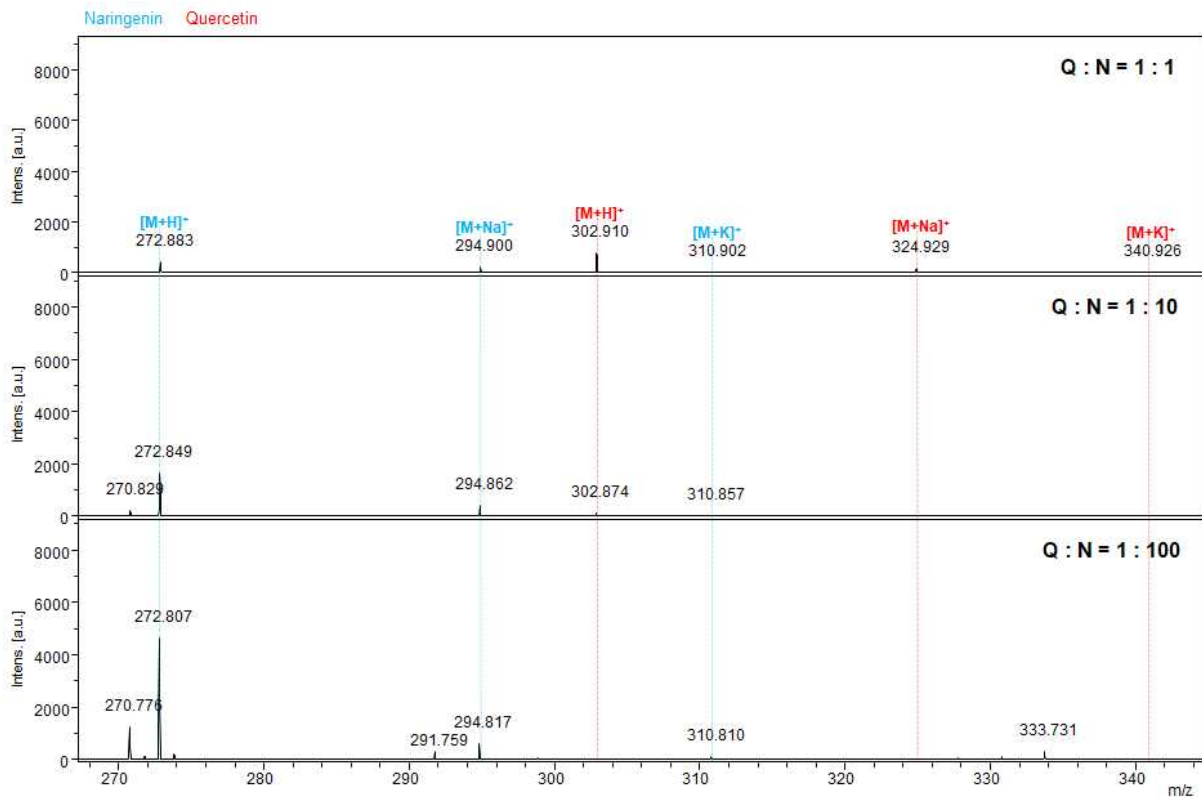
- (1) 보론산 기능화 입자를 target 물질인 quercetin 과 non-target 물질인 naringenin의 mixture solution과 상온에서 2시간 동안 반응시켰다.
- (2) Non-target 물질인 naringenin을 모두 제거하기 위해 Binding buffer(DMSO:ammonium

acetate=6:4)를 사용하여 wash 과정을 각각 3번, 5번, 7번 수행하였다.

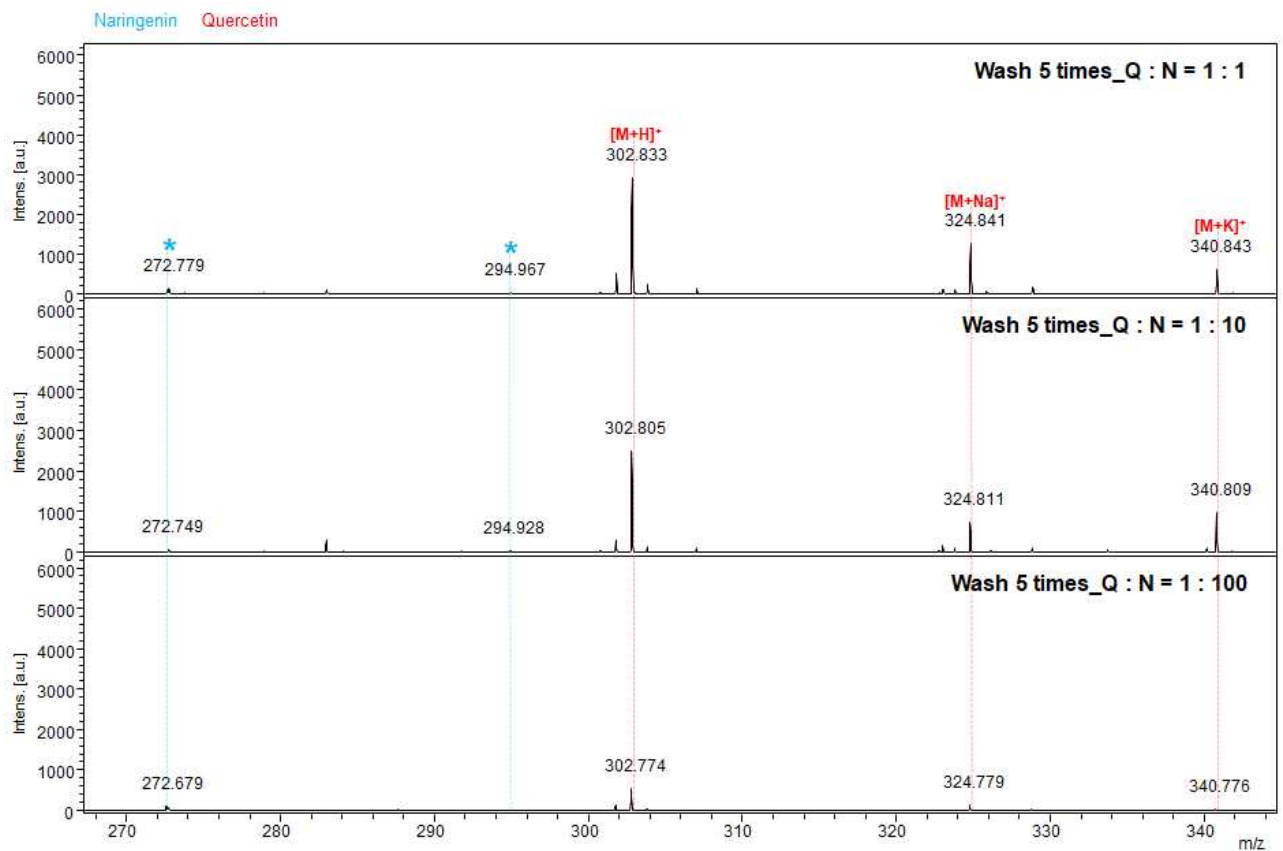
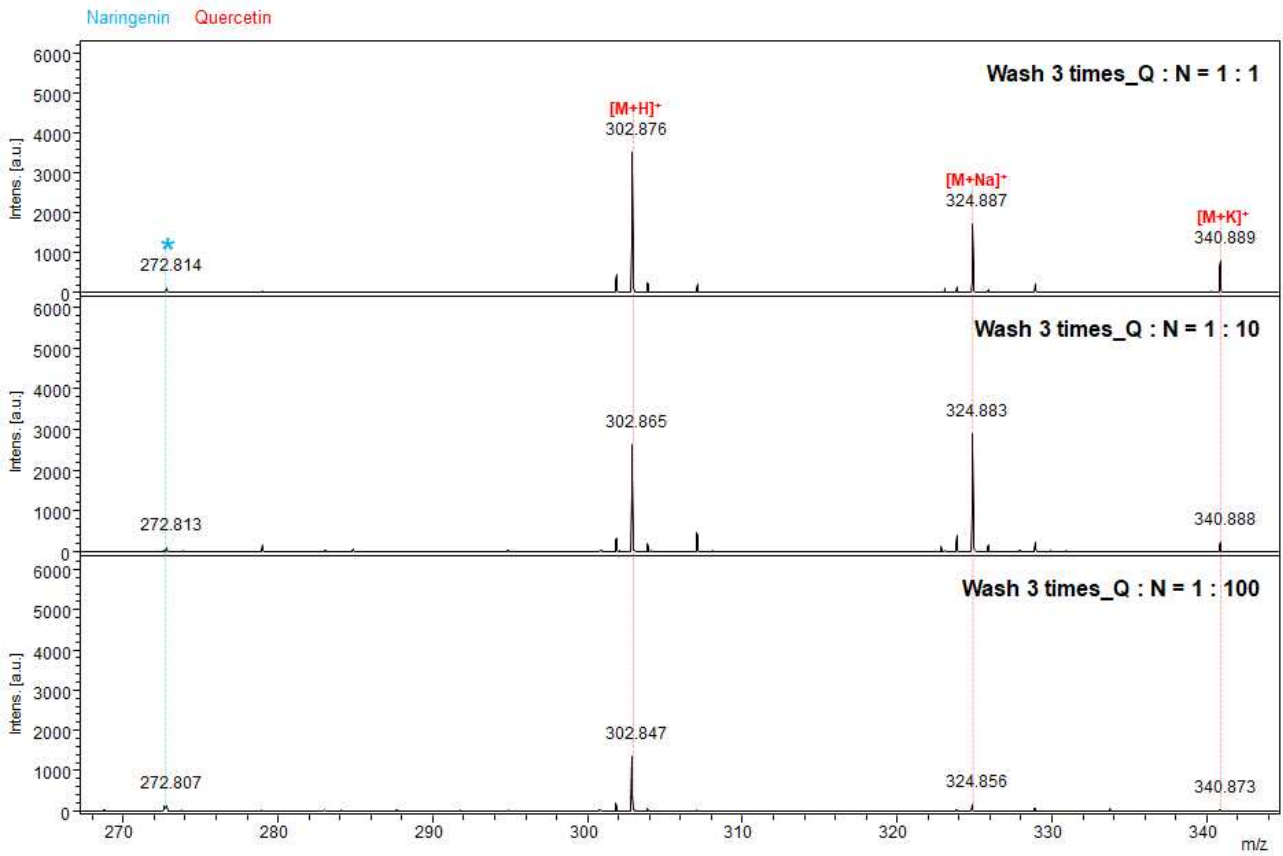
- (3) Wash 후 quercetin이 보론산 기능화 입자에서 release 되기 위해 충분한 시간을 찾기 위해 release solution(TFA:ACN:TDW=1:50:49)을 사용하여 1분, 10분, 30분, 1시간, 2시간 동안 상온에서 반응을 진행하였다.
- (4) 또한, release solution의 양에 따라 변화가 생기는지 확인하기 위해 release solution을 100 uL와 200 uL를 사용하여 같은 실험을 진행하였고, internal standard로써 apigenin을 사용하여 quercetin peak을 비교하였다.

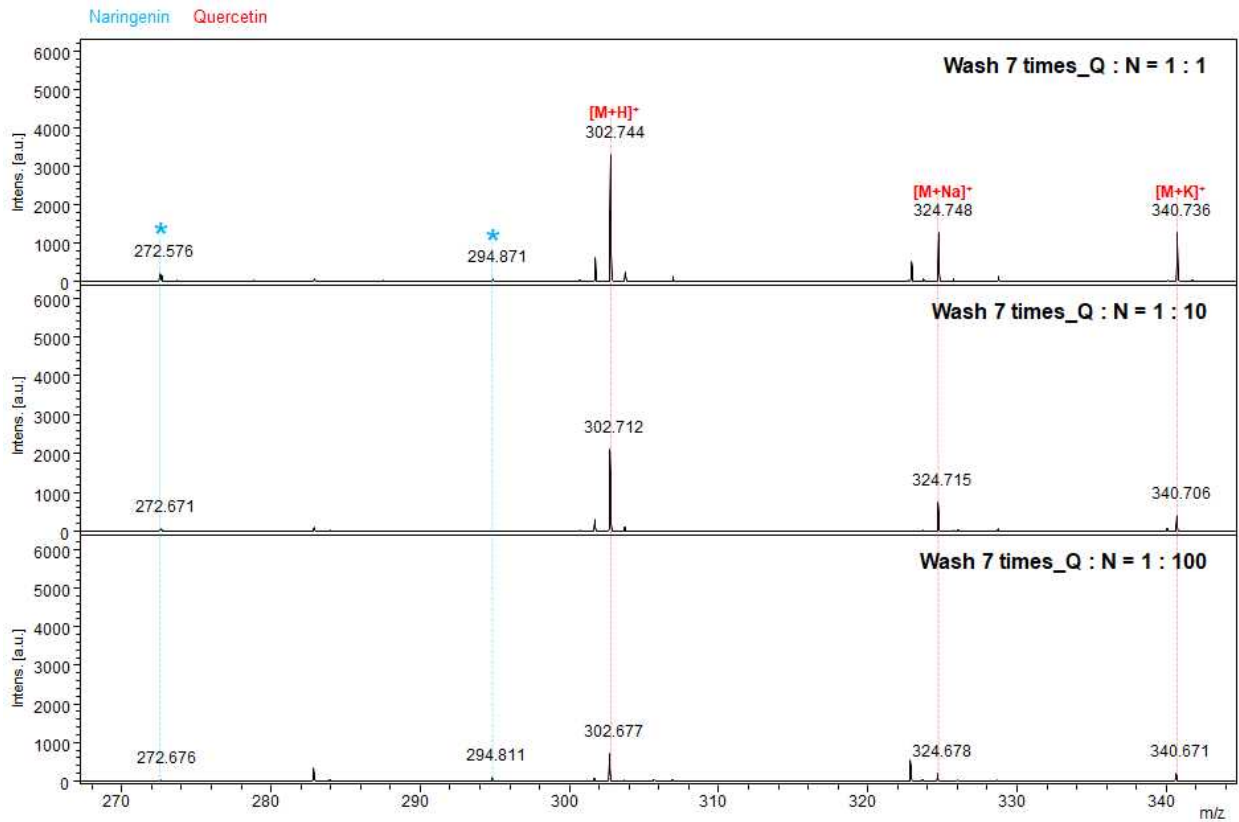
#### 다. 연구결과

- (1) Quercetin과 naringenin이 1:1, 1:10, 1:100의 비율로 존재하는 mixture를 관찰했을 때, 두 물질의 peak은 아래와 같다.

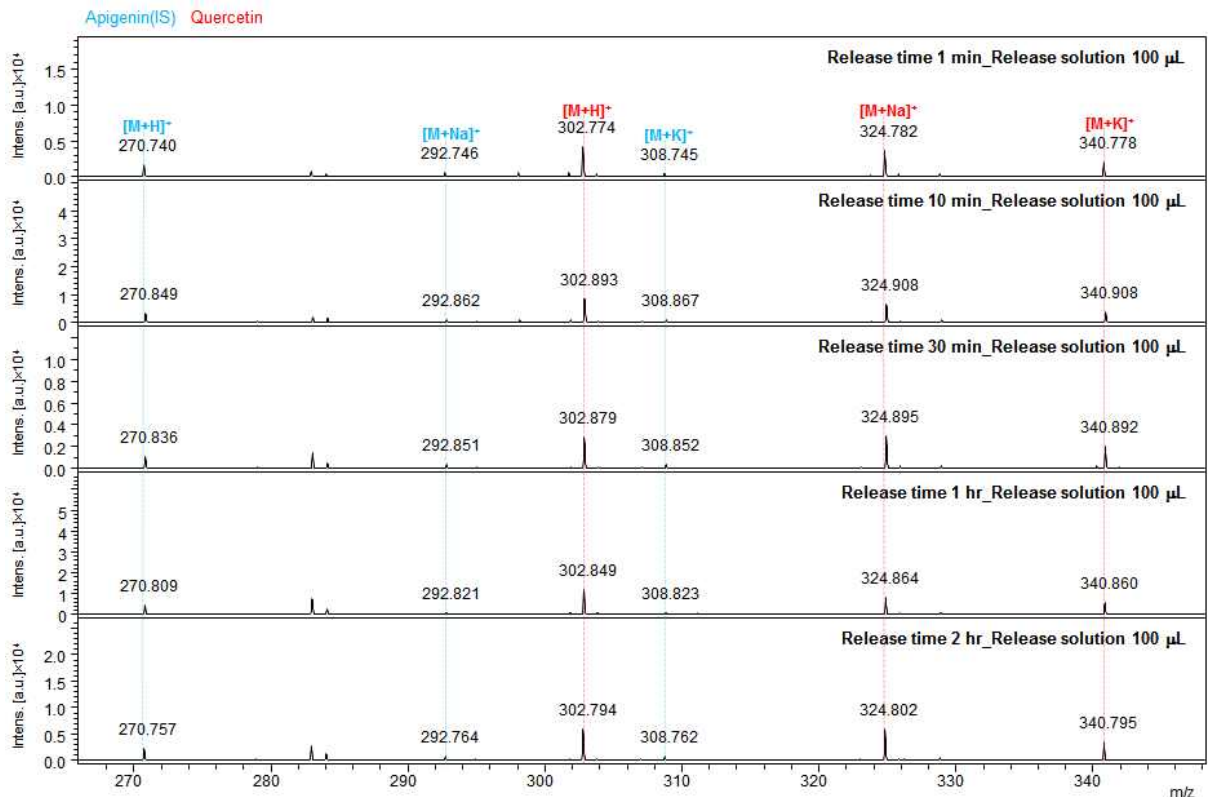


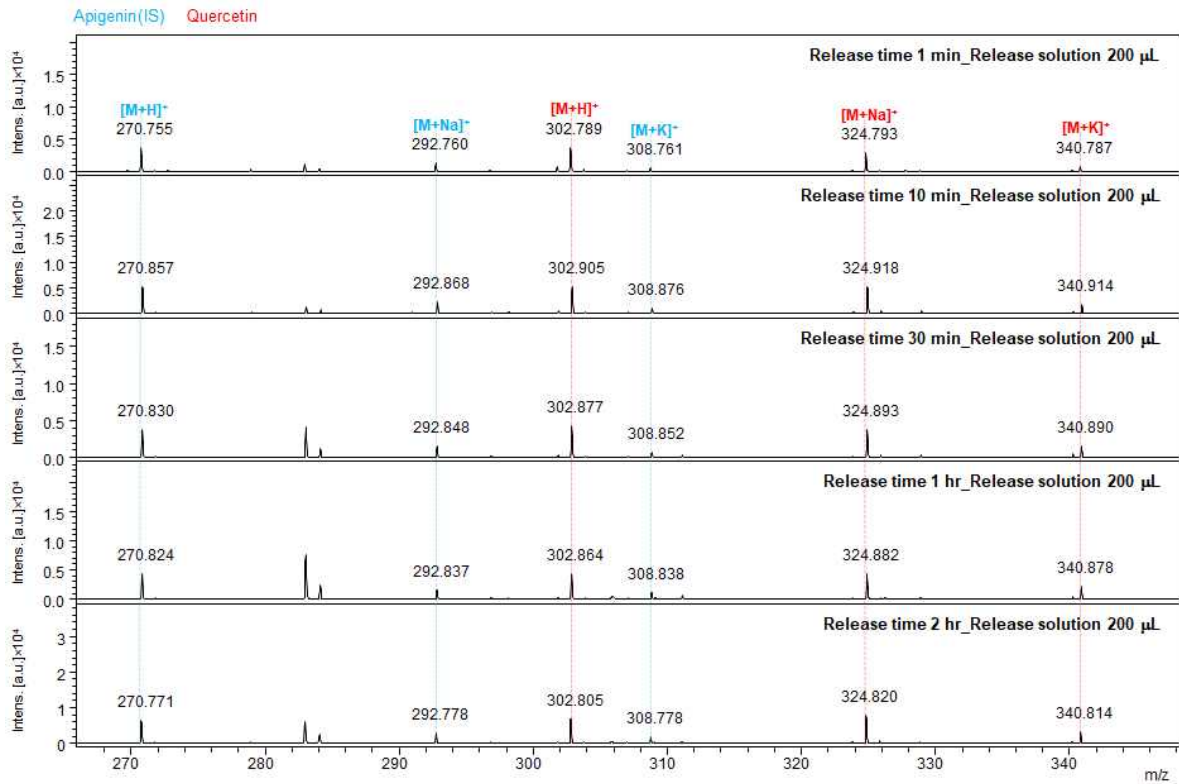
- (2) Naringenin의 비율이 높아질수록 quercetin의 peak이 관찰되지 않음을 확인하였다.
- (3) 각 비율로 존재하는 quercetin과 naringenin의 mixture solution을 보론산 기능화 입자와 상온에서 2시간 동안 반응 시킨 후 wash를 각각 3번, 5번, 7번 진행한 결과를 아래에 나타내었다.





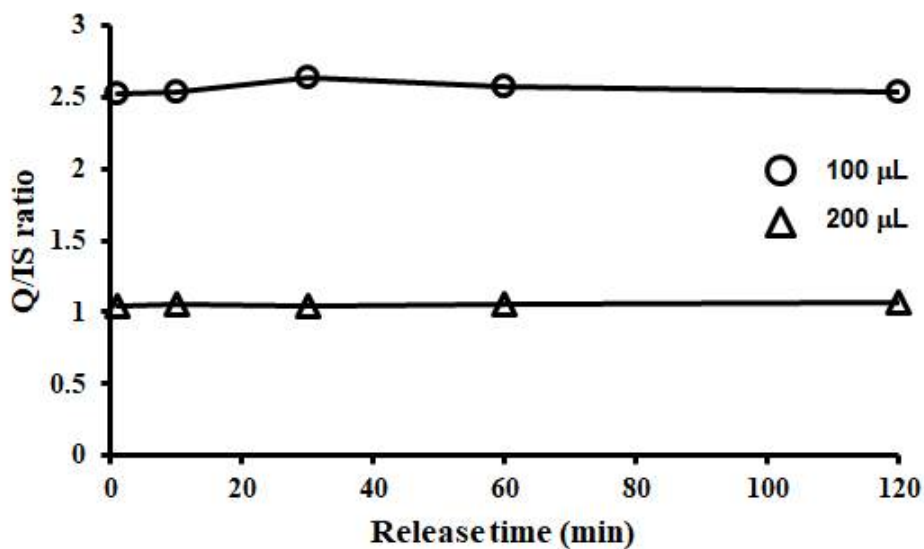
- (4) Wash를 3번만 진행해도 naringenin peak의 방해 없이 quercetin peak을 깔끔하게 관찰할 수 있다는 것을 확인하였다.
- (5) Wash 후 release solution을 각각 100 uL, 200 uL 사용하여 target 물질이 모두 release 되는 시간을 조사한 결과는 아래와 같다.





- (6) 100 uL와 200 uL의 release solution을 사용한 경우 모두 1분 내로 quercetin이 release 되는 것을 확인하였다.
- (7) 이것을 Quercetin/Internal Standarad ratio를 사용하여 그래프를 작성하였고, 1분부터 2시간까지 일정한 값을 나타내는 것을 확인하였다.

Release solution (µL)	Release time (min)					
	1	10	30	60	120	
100	2.525	2.532	2.632	2.574	2.534	
200	1.044	1.053	1.043	1.053	1.073	



#### 4. 보론산 기능화 입자의 recognition site 확인

##### 가. 연구내용

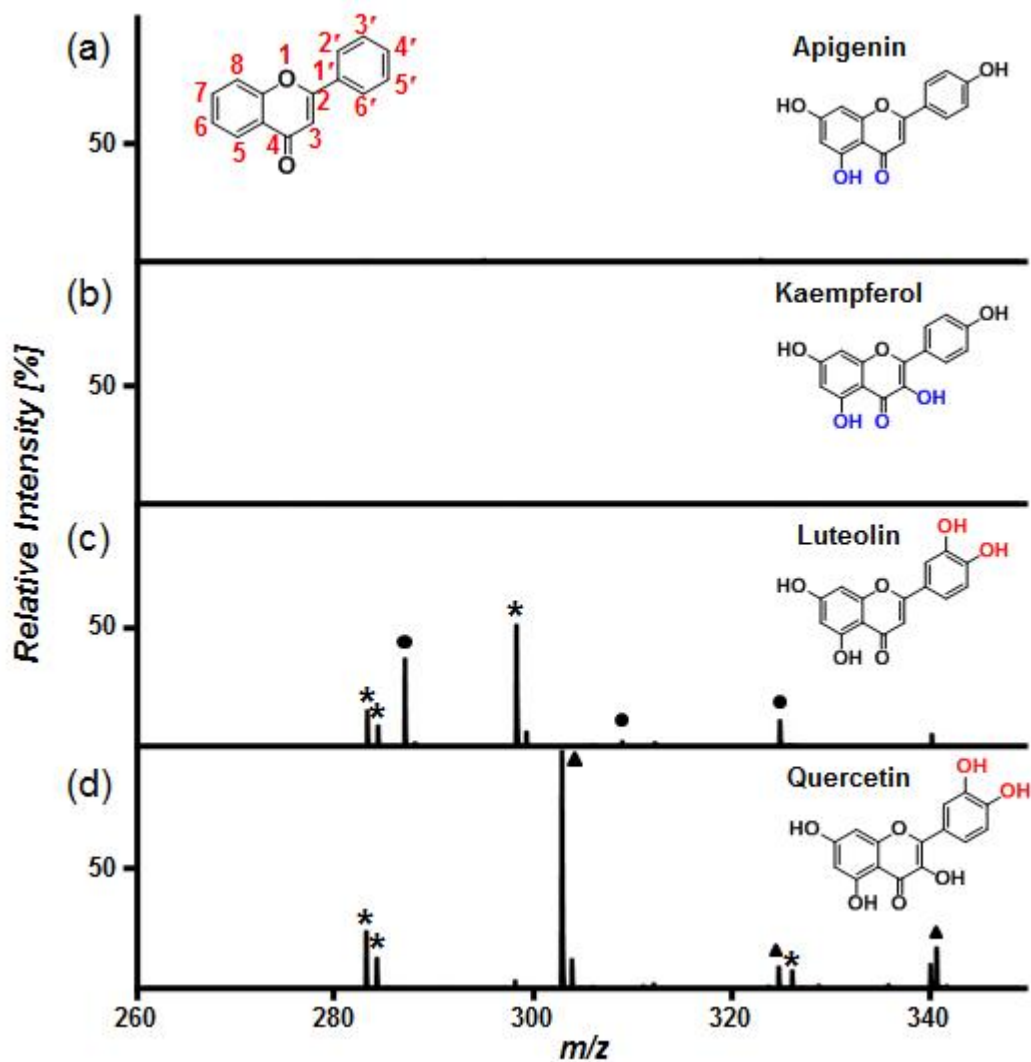
(1) 보론산 기능화 입자가 정말 vicinal diol 만을 선택적으로 인지하는지 확인하기 위해 잠재적인 binding site를 갖는 물질을 사용하여 확인하였다.

##### 나. 연구방법

(1) vicinal diol을 갖는 target 물질로 quercetin과 luteolin을 사용하였고, minor recognition site만을 갖는 물질로 apigenin과 kaempferol을 사용하여 실험을 진행하였다.  
 (2) 각 물질들을 보론산 기능화 입자와 반응시킨 후 release를 수행하여 MS peak을 관찰하였다.

##### 다. 연구결과

(1) 각 물질들을 사용하여 enrichment 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.



(2) Minor recognition site만을 갖는 apigenin과 kaempferol은 peak이 관찰되지 않는 것으로



보아 보론산 기능화 입자에 결합하지 않는다는 것을 알 수 있었고, vicinal diol(major recognition site)을 갖는 quercetin과 luteolin만이 보론산 기능화 입자에 결합한다는 것을 알 수 있었다.

(3) 이것으로 보론산 기능화 입자는 vicinal diol만을 선택적으로 인지한다는 것을 확인하였다.

## 5. 보론산 기능화 입자의 선택성 확인

### 가. 연구내용

(1) Target 물질과 non-target 물질이 1:1의 비율로 존재할 때, mixture에서 target 물질에 대한 보론산 기능화 입자의 선택성 확인

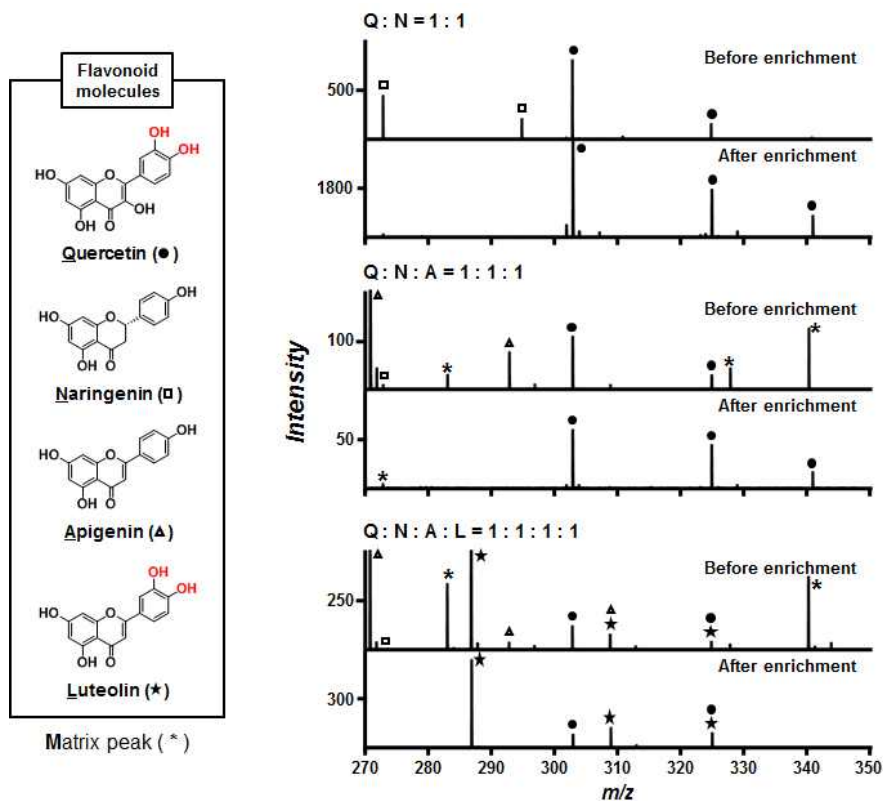
### 나. 연구방법

(1) Vicinal diol을 갖는 target 물질로 quercetin과 luteolin을 사용하였고, non-target 물질로 naringenin과 apigenin을 사용하였다.

(2) Quercetin : Naringenin = 1 : 1, Quercetin : Naringenin : Apigenin = 1 : 1 : 1, Quercetin : Naringenin : Apigenin : Luteolin = 1 : 1 : 1 : 1 의 비율로 섞은 mixture solution을 보론산 기능화 입자와 반응시킨 후 release를 수행하여 MS peak를 관찰하였다.

### 다. 연구결과

(1) 각 mixture를 사용하여 enrichment 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.



(2) Enrichment를 수행하기 전에는 mixture에 존재하는 물질들의 모든 peak이 관찰되어

quercetin의 peak만을 크게 얻을 수 없었지만, enrichment를 수행한 후에는 quercetin의 peak만을 깔끔하고 크게 얻을 수 있었다.

- (3) Non-target 물질이 2개 이상 존재하더라도 보론산 기능화 입자가 target 물질을 효과적으로 enrichment 한다는 것을 확인하였다.
- (4) 이를 통해 enrichment 된 target 물질을 MALDI-TOF MS로 확실하게 관찰할 수 있다는 것을 증명하였다.

## 6. 보론산 기능화 입자의 효율성 확인

### 가. 연구내용

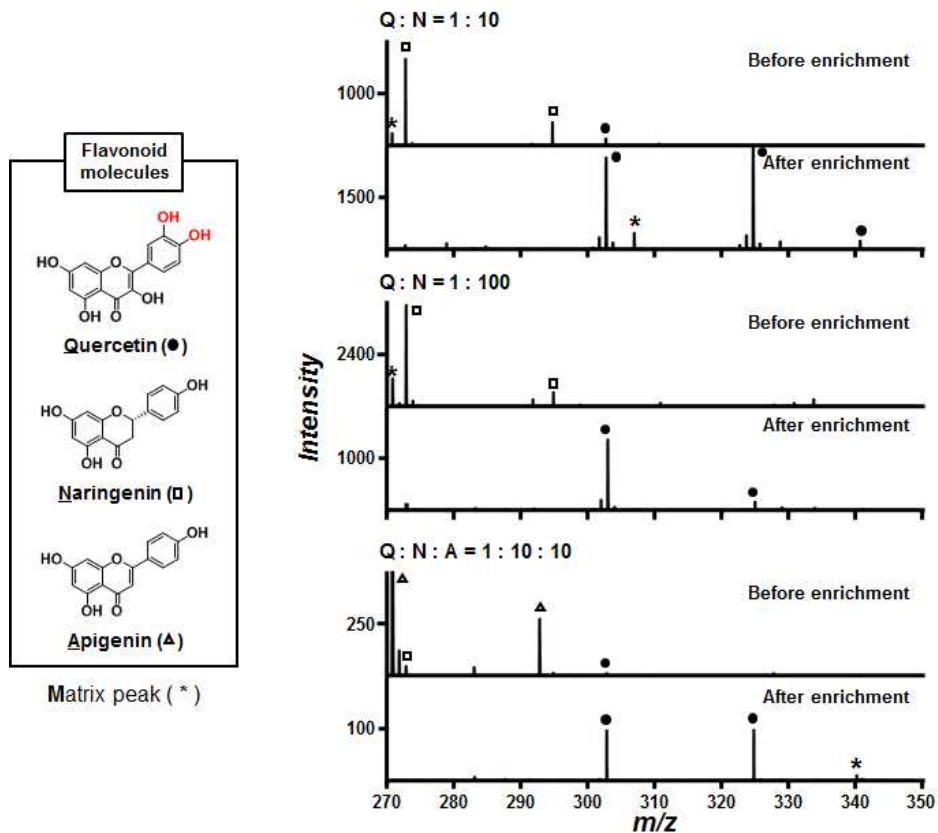
- (1) Target 물질에 비해 non-target 물질이 훨씬 과량으로 존재할 때, target 물질에 대한 보론산 기능화 입자의 enrichment 효율성 확인

### 나. 연구방법

- (1) Vicinal diol을 갖는 target 물질로 quercetin을 사용하였고, non-target 물질로 naringenin과 apigenin을 사용하였다.
- (2) Quercetin : Naringenin = 1 : 10, Quercetin : Naringenin = 1 : 100, Quercetin : Naringenin : Apigenin = 1 : 10 : 10 의 비율로 섞은 mixture solution을 보론산 기능화 입자와 반응시킨 후 release를 수행하여 MS peak를 관찰하였다.

### 다. 연구결과

- (1) 각 mixture를 사용하여 enrichment 실험을 수행한 결과는 다음과 같다.



- (2) Enrichment을 수행하기 전에는 훨씬 과량으로 존재하는 non-target 물질 때문에 target 물질인 quercetin의 peak이 매우 작거나 관찰이 되지 않았지만, enrichment를 수행한 후에는 quercetin의 peak만이 깔끔하게 관찰되는 것을 확인하였다.
- (3) Target 물질이 non-target 물질과 1:100 이상의 비율로 존재하더라도 효과적인 enrichment 과정에 의해 MALDI-TOF MS에서 관찰이 가능하다는 것을 증명하였다.

## 7. 정량을 위한 calibration curve 작성

### 가. 연구내용

- (1) Target 물질의 정량을 위해 internal standard를 사용하여 calibration curve를 작성

### 나. 연구방법

- (4) Quercetin이 0.75 nmol, 1.5 nmol, 3 nmol, 6 nmol, 9 nmol, 12 nmol, 30 nmol, 60 nmol 존재하는 sample solution을 사용하여 보론산 기능화 입자와 상온에서 2시간 동안 반응시켰다.
- (5) Binding buffer를 사용하여 3번의 wash를 진행한 후, 100 uL의 release solution을 사용하여 10분 동안 release 과정을 수행하였다.
- (6) 이 때, 0.125 umol, 0.25 umol, 0.5 umol의 boronate가 존재하는 보론산 기능화 입자를 각각 사용하였다.
- (7) Internal standard 와 섞어 MALDI-TOF MS로 분석하였고, target peak/internal standard

peak(Q/IS)의 비율을 구할 수 있었다.

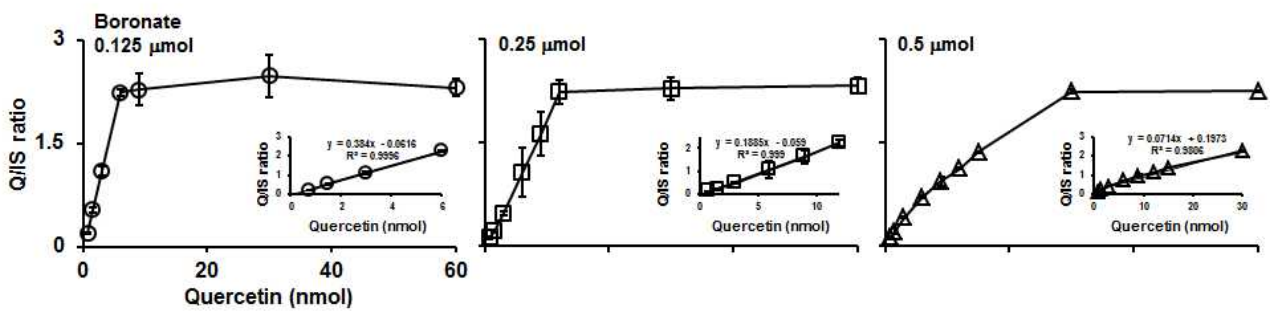
(8) 각 실험을 모두 세 번 이상 수행하여 평균값으로 표를 작성하였다.

다. 연구결과

(1) Q/IS ratio를 얻은 표와 그래프는 다음과 같다.

< Q/IS ratios at various boronate amounts >

Boronate (μmol)	Quercetin (nmol)							
	0.75	1.5	3	6	9	12	30	60
0.125	0.204(±0.008)	0.533(±0.044)	1.102(±0.071)	2.235(±0.047)	2.281(±0.235)	2.187(±0.081)	2.474(±0.306)	2.304(±0.122)
0.25	0.122(±0.020)	0.215(±0.019)	0.479(±0.030)	1.064(±0.362)	1.619(±0.311)	2.227(±0.166)	2.277(±0.160)	2.321(±0.115)
0.5	0.120(±0.009)	0.213(±0.037)	0.409(±0.012)	0.708(±0.017)	0.939(±0.068)	1.117(±0.010)	2.232(±0.033)	2.237(±0.015)



- (2) 0.125 umol의 boronate가 존재하는 보론산 기능화 입자를 사용하여 실험을 진행한 경우, 6 nmol의 quercetin이 존재할 때 보론산 기능화 입자가 saturation 되었다.
- (3) 0.25 umol의 boronate가 존재하는 보론산 기능화 입자를 사용하여 실험을 진행한 경우, 12 nmol의 quercetin이 존재할 때 보론산 기능화 입자가 saturation 되었다.
- (4) 0.5 umol의 boronate가 존재하는 보론산 기능화 입자를 사용하여 실험을 진행한 경우, 30 nmol의 quercetin이 존재할 때 보론산 기능화 입자가 saturation 되었다. 그러나 진행 양상을 보았을 때, 24 nmol의 quercetin이 존재할 때부터 saturation이 되었다고 판단할 수 있었다.
- (5) Quercetin의 농도가 증가할 때, Q/IS ratio가 linear하게 증가하는 calibration curve를 얻을 수 있었고, quercetin의 LOD(Limit of Detection)는 75 pmol로 관찰되었다.
- (6) 세 가지 경우에서 모두 같은 양상을 보이므로, 어떤 보론산 기능화 입자를 사용하더라도 적용이 가능하다는 것을 증명하였다.

## 8. FBS spiking 실험 수행

가. 연구내용

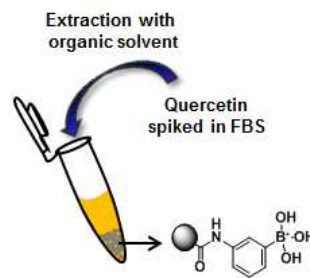
(1) Complex mixture인 FBS를 사용하여 spiking 실험을 수행

나. 연구방법

- (1) FBS의 농도는 2%, 5%, 10%를 사용하였고, quercetin의 농도는 두 가지를 사용하였다.
- (2) 각 농도의 FBS solution에 알고 있는 농도의 quercetin을 spiking 한 후 유기용매로 추출하였다.
- (3) 추출한 solution을 보론산 기능화 입자와 상온에서 2시간 동안 반응 시킨 후 release를 수행하였다.
- (4) Internal standard 와 섞어 MALDI-TOF MS로 분석하였고, target peak/internal standard peak(Q/IS) 의 비율을 구할 수 있었다.

다. 연구결과

- (1) Q/IS ratio를 얻은 표는 다음과 같다.



FBS Conc., %	Expected (Q/IS)	Observed (Q/IS)	Precision (CV, %)	Accuracy (observed/expected, %)
2	0.70	0.68(±0.011)	1.62	97
2	1.07	1.09(±0.055)	5.05	102
5	0.70	0.66(±0.011)	1.67	94
5	1.07	1.02(±0.006)	0.59	95
10	0.70	0.70(±0.015)	2.14	100
10	1.07	1.07(±0.037)	3.46	100

- (2) 앞서 작성한 calibration curve에서 나타낸 Q/IS ratio 와 비교했을 때 spiking 실험 후 얻어진 Q/IS ratio 값이 매우 유사하고, 정밀성과 정확성이 매우 높게 나타났다.
- (3) 이를 통해 complex mixture에 존재하는 flavonoid의 추출이 매우 잘 되었음을 알 수 있었고, 후의 enrichment 과정도 효과적임을 확인하였다.
- (4) 따라서 complex sample 에도 적용 가능하다는 것을 증명하였다.

## 9. Animal tissue에 존재하는 target 물질의 정량

가. 연구내용

- (1) Animal tissue에 존재하는 target 물질의 정량을 위해 enrichment를 수행

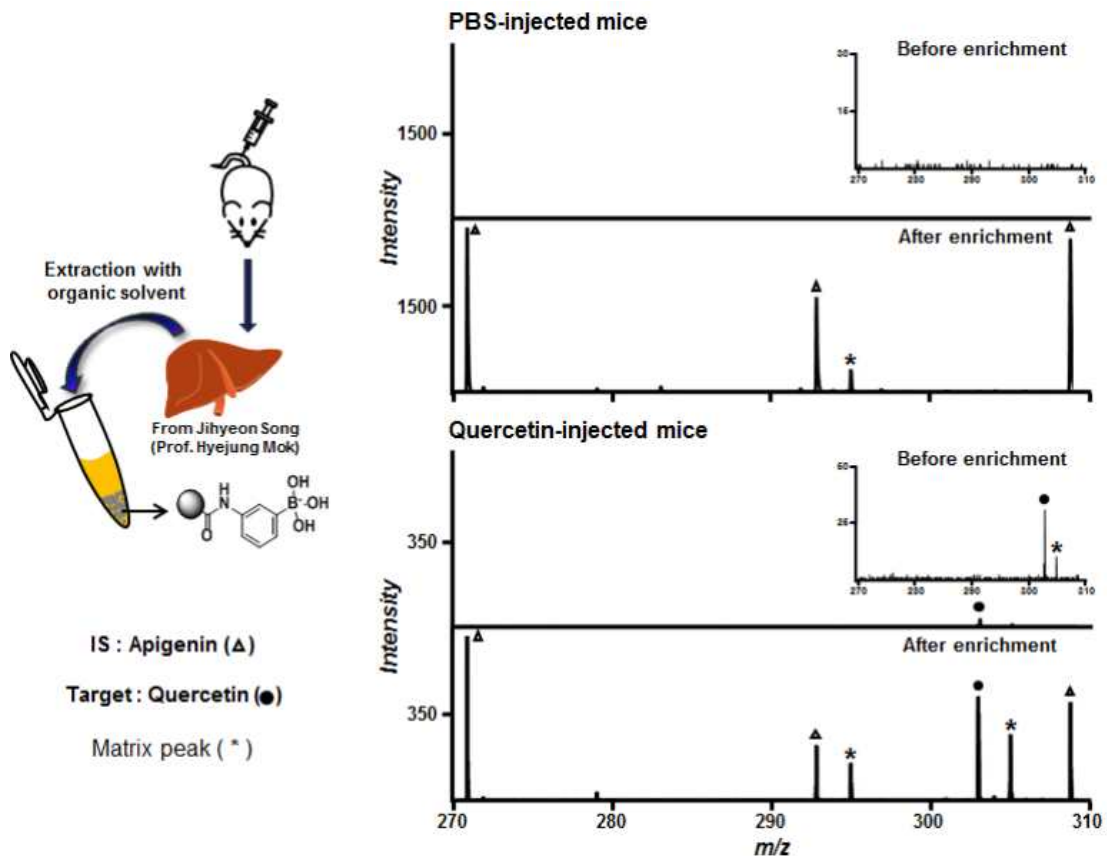
나. 연구방법

- (1) mouse에 quercetin을 주입한 후, 장기를 얻었다.
- (2) 장기를 갈아준 뒤 유기용매로 추출하였다.

- (3) 추출한 solution을 보론산 기능화 입자와 상온에서 2시간 동안 반응 시킨 후 release를 수행하였다.
- (4) Internal standard 와 섞어 MALDI-TOF MS로 분석하였고, target peak/internal standard peak(Q/IS) 의 비율을 구할 수 있었다.

다. 연구결과

- (1) Enrichment를 수행한 결과는 다음과 같다.



- (2) PBS를 주입한 mouse에서는 quercetin의 peak을 관찰할 수 없었지만, quercetin을 주입한 mouse에서는 quercetin의 peak이 관찰되었다.
- (3) 그러나 enrichment 전에는 quercetin의 peak이 매우 작고 internal standard와의 peak intensity 비교가 매우 어려웠다.
- (4) Enrichment 후에는 quercetin의 peak이 매우 크고 명확하며 internal standard와의 peak intensity 비교가 수월하였다.
- (5) 이 결과를 통해 얻어진 Q/IS ratio를 calibration curve에 대입한 결과 quercetin을 주입한 mouse의 간에는 0.475 mg/g of organ 이 존재한다는 결과를 얻을 수 있었다.
- (6) 따라서 장기에 매우 적은 양으로 존재하는 target 물질도 보론산 기능화 입자를 사용하여 효과적으로 enrichment를 수행할 수 있고, 그것을 MALDI-TOF MS로 관찰하여 정량까지 가능하다는 것을 증명하였다.

## 10. 보론산 기능화 입자의 recyclability 확인

### 가. 연구내용

(1) 보론산 기능화 입자를 여러 번 재사용하여 recyclability를 확인

### 나. 연구방법

(1) 보론산 기능화 입자를 사용하여 target 물질의 enrichment와 release를 수행하였다.

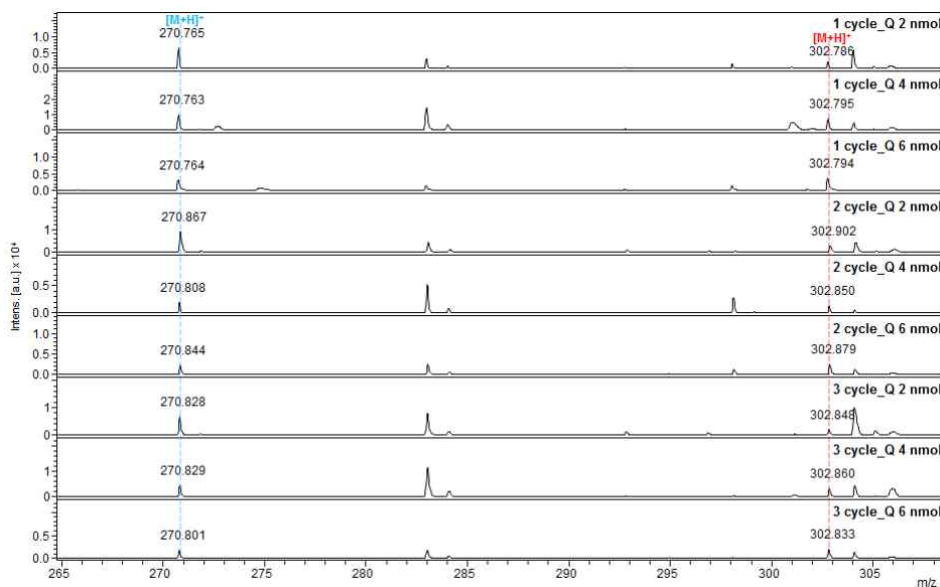
(2) Release buffer와 binding buffer를 사용하여 보론산 기능화 입자의 wash를 세 번 수행하였다.

(3) Wash가 끝난 보론산 기능화 입자를 다시 사용하여 target 물질의 enrichment와 release를 수행하였다.

(4) 세 번의 cycle을 수행하였고, 각 cycle마다 release 후에 얻어진 sample을 Internal standard 와 섞어 MALDI-TOF MS로 분석하여 target peak/internal standard peak(Q/IS) 의 비율을 구할 수 있었다.

### 다. 연구결과

(1) 각 cycle에 대한 MALDI-TOF MS 결과는 다음과 같다.

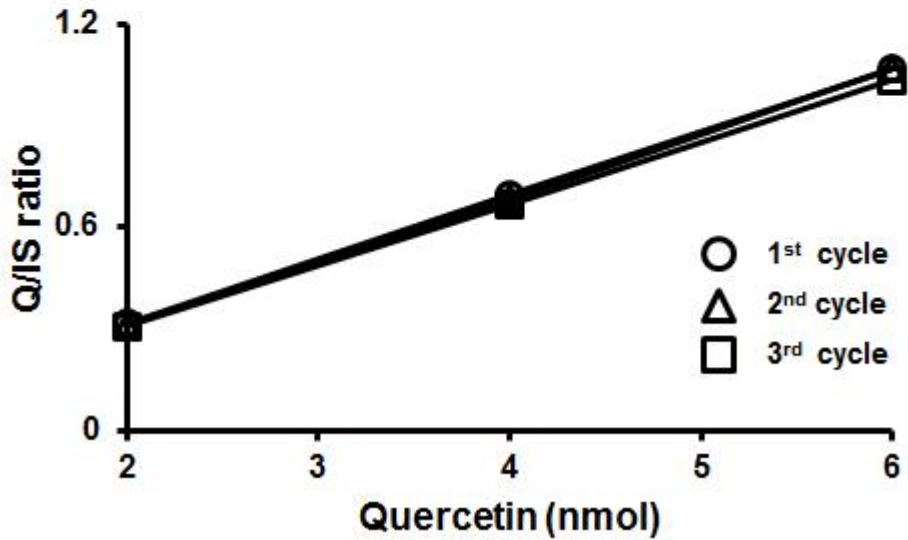


(2) Cycle을 반복하여도 quercetin의 농도가 증가할수록 나타나는 Q/IS ratio가 비슷한 경향을 보이는 것이 확인되었다.

(3) MALDI-TOF MS 분석을 통해 얻어진 Q/IS ratio를 사용하여 작성한 표와 그래프는 다음과 같다.

0.25  $\mu$ mol boronate

	Quercetin (nmol)	2	4	6
Q/IS ratio				
1 <sup>st</sup> cycle		0.32	0.70	1.07
2 <sup>nd</sup> cycle		0.32	0.68	1.07
3 <sup>rd</sup> cycle		0.31	0.67	1.04



- (4) 반복된 cycle을 거쳐도 일정한 값을 나타내는 것을 확인하였다.
- (5) 따라서 보론산 기능화 입자는 3번 이상 재사용이 가능하다는 것을 증명하였다.
- (6) 위의 모든 결과를 통해 보론산 기능화 입자를 사용하면 vicinal diol을 갖는 플라보노이드의 효율적인 enrichment가 가능하며 그것을 MALDI-TOF MS로 분석할 수 있고, target 물질의 정량까지 가능하다는 것을 증명하였다.
- (7) 따라서 이 방법은 비용 절감의 효과와 더불어 여러 application에 적용 가능할 것으로 예상된다.

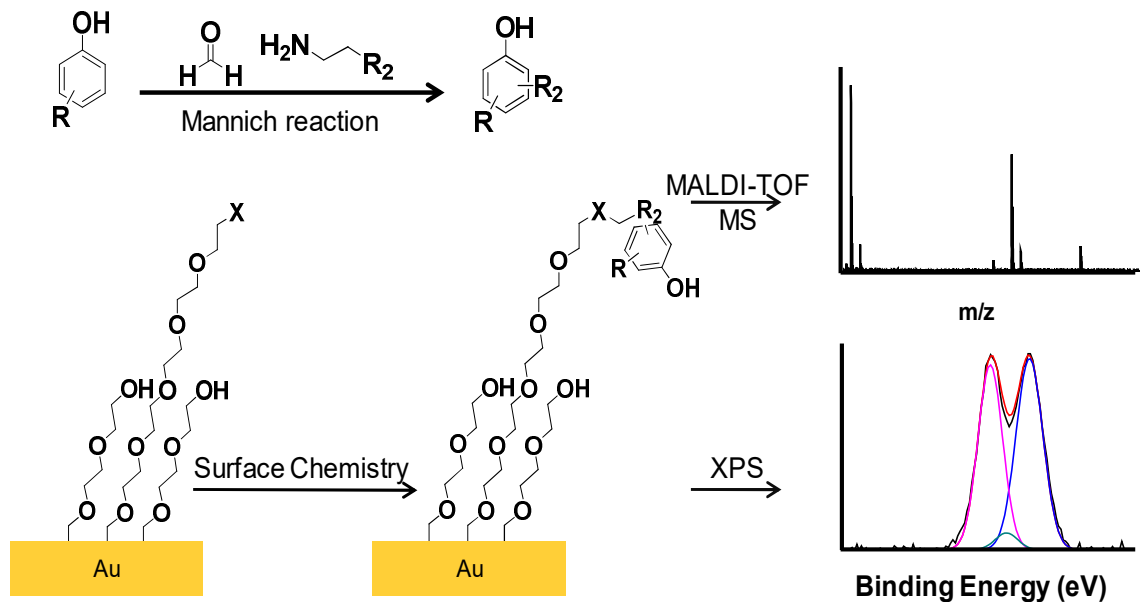


## 7절. 표면위의 약용물질의 bioconjugation을 사용한 고정화 작업

### 1. 페놀 화합물에 작용기 도입을 위한 물질 합성

#### 가. 연구내용

식물로부터 유래한 여러 약용물질의 효능을 확인하기 위한 연구로 많이 활용되는 방법이 고체 표면에 약용물질의 고정화작업을 통하여 약용물질의 대사분석이나 제약 관련한 여러 분야에 응용 가능하다. 이를 활용한 연구로 타겟 단백질, 앵타머 검지 및 형광 센서로의 활용 등 다양한 응용연구를 하고 있다. 이를 통해 고정화 작업 시에 여러 가지 작용기를 가진 물질을 합성하여 기존에 사용되는 여러 가지 물질과의 결합도 가능하며 그 외의 많은 용도로 응용이 가능할 것이라고 기대하고 있다. 이때 대부분의 방식이 수산화물 바로 활용하여 고정화를 진행하는데 이러한 방법은 이후 여러 응용연구를 수행하는 가운데 한계를 야기할 수 있다. 그러므로 - 고정화 작업을 위하여 mannich 반응을 사용하였는데 수많은 약용물질에서 수산화기는 필수불가결하게 중요한 작용기로 항암효과나 항수산화기 작용등 많은 의학적인 역할을 하는 부분으로 이미 많은 연구들에서 밝혀져 있기 때문에 수산화기를 사용하여 고정화를 시키지 않고 다른 부분을 사용하여 고정화시키기 위해 다음과 같은 반응을 사용하여 고정화작업을 진행하였다. 대략적인 모식도는 아래와 같다.



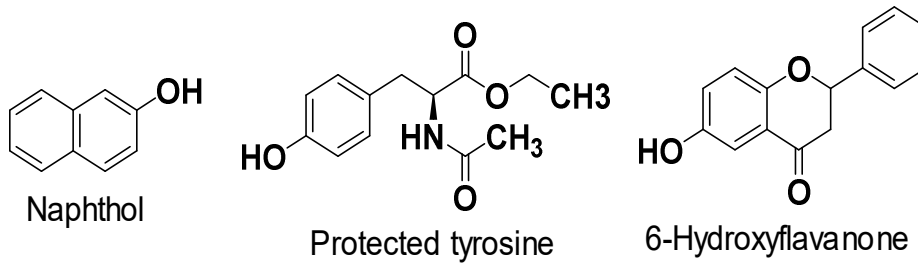
다양한 표면화학을 사용한 페놀 화합물의 표면 고정화방법 모식도

#### 나. 연구방법

(1) 페놀기 물질을 Mannich reaction을 사용하여 카복실기, 티올기, 아자이드 기를 도입시킨다.

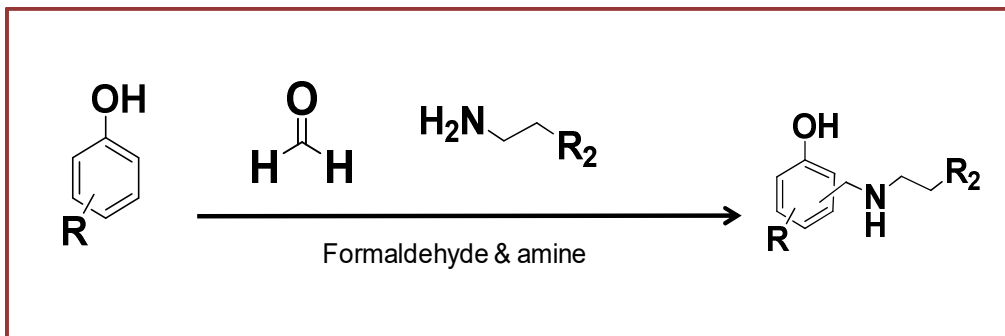
#### 다. 연구결과

(1) 표면고정화를 위해 사용한 페놀기 함유 물질은 아래와 같다.

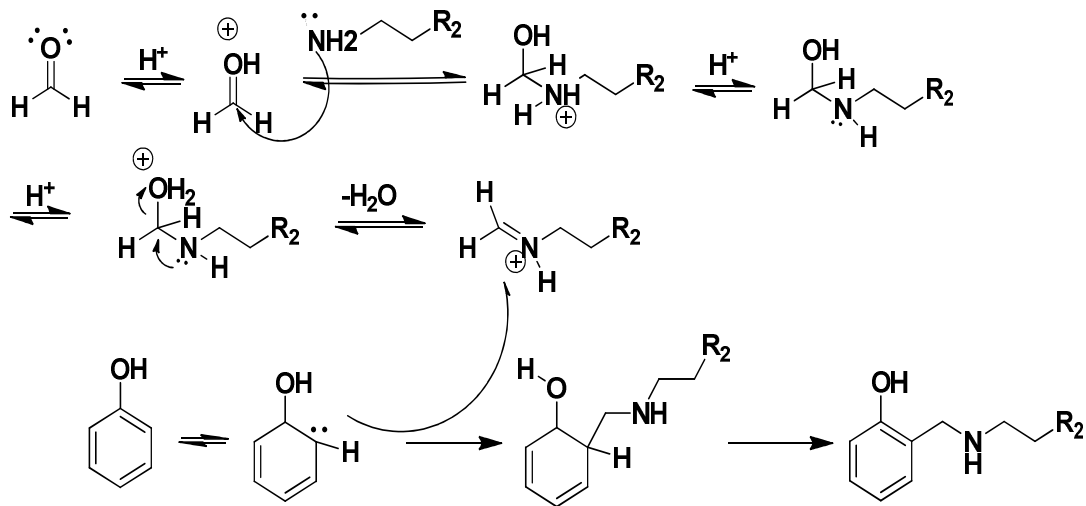


페놀기 함유 물질들의 화학적 구조

(2) 새로운 작용기를 도입하기 위해 사용한 화학반응인 Mannich reaction은 아래와 같다.



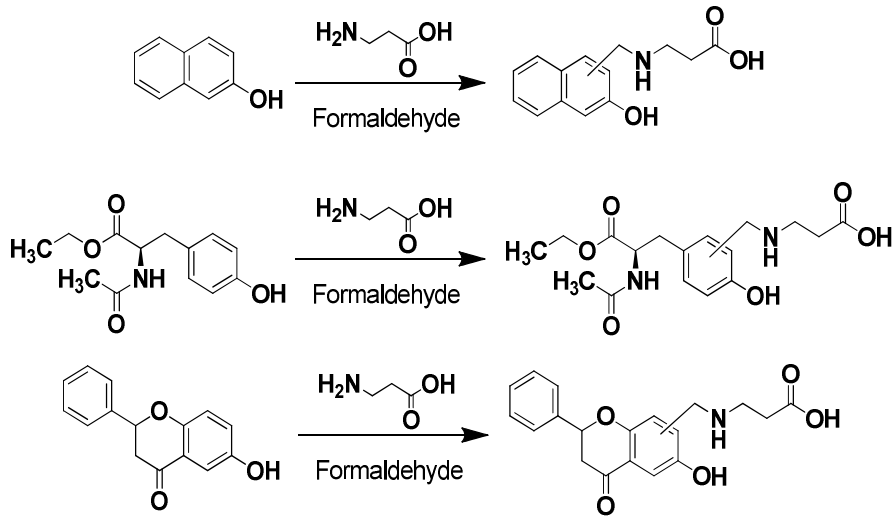
Mannich reaction



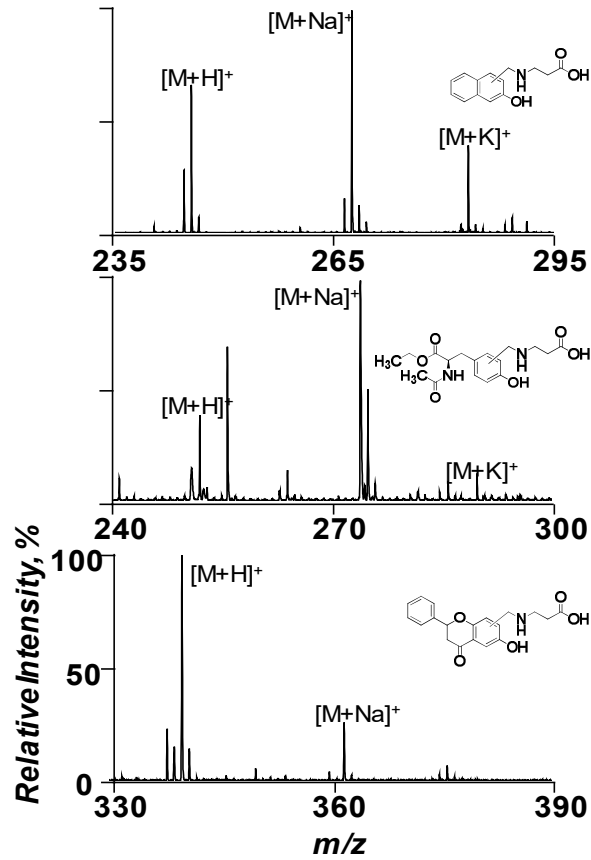
Mannich reaction의 매커니즘

(3) 수많은 약용물질의 수산화기가 중요한 역할을 하기 때문에 많은 물질이 페놀기를 가지고 있으며 이를 이용하여 다음과 같은 반응을 통해 여러 가지 물질의 합성을 진행하였다. 이때 조금 더 많은 활용도를 위하여 여러 가지 물질을 사용하여 합성을 진행하였으며 이때 여러 가지 작용기를 가진 물질을 위해 바깥부분에 카복실기, 아자이드, 티올기를 가진 물질을 가지도록 합성을 진행함. 합성을 진행한 후에 실질적으로 합성이 되었는지를 확인하기 위하여 MS를 용하여 분석을 진행하였으며 또한 TLC를 사용하여 확인을 하였다. 확인한 이후 column을 통하여 합성된 물질을 분리하였으며 이는 NMR을 통하여 분석을 진행함. Mannich

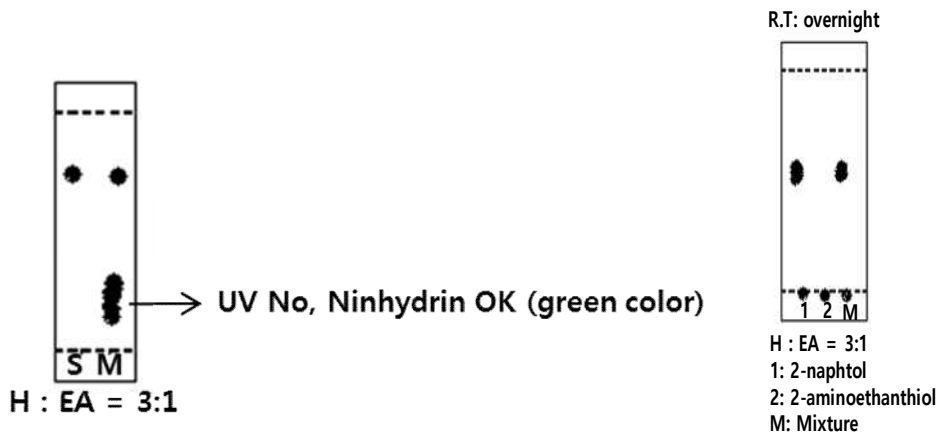
reaction을 통해 새로운 작용기를 도입 시킨 방법들은 다음과 같다.



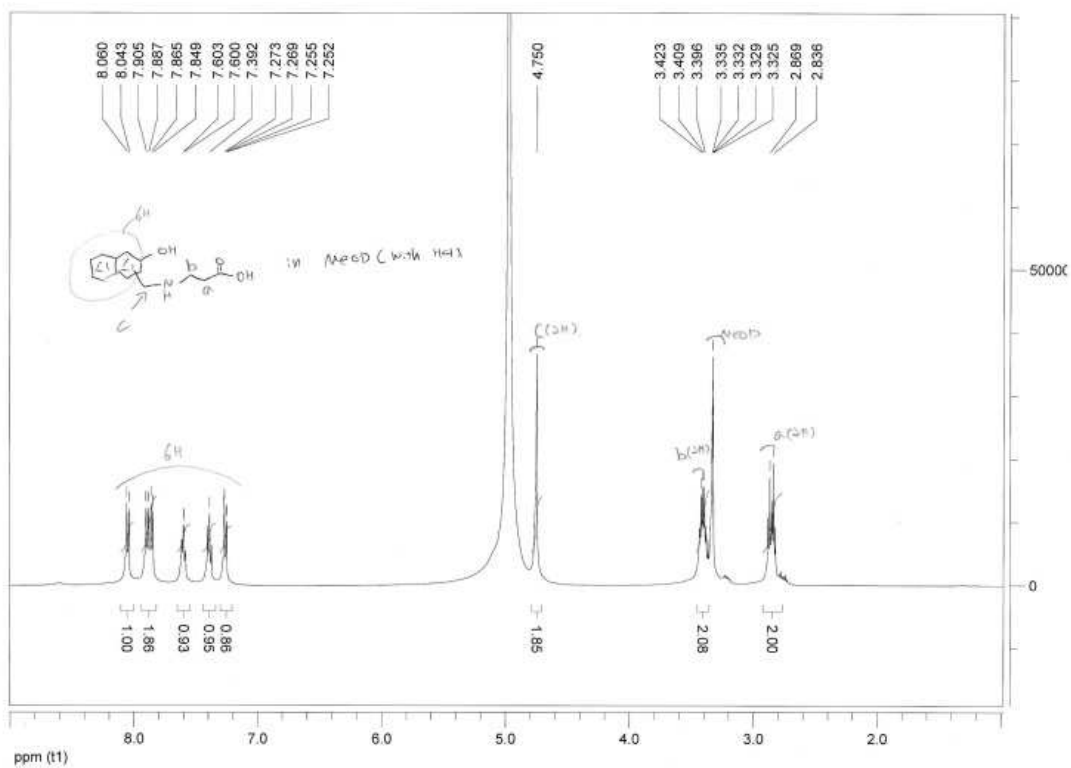
카복실기 도입 매커니즘



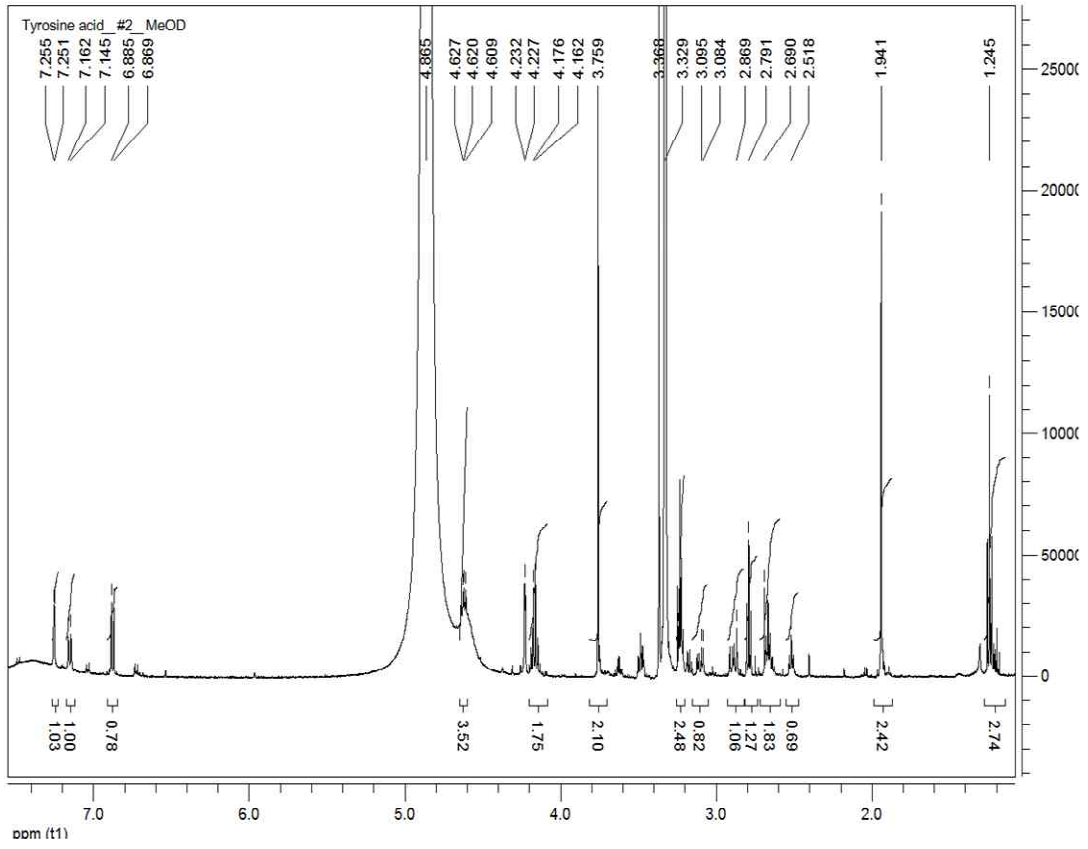
카복실기 도입 페놀기 물질 MS 분석 자료



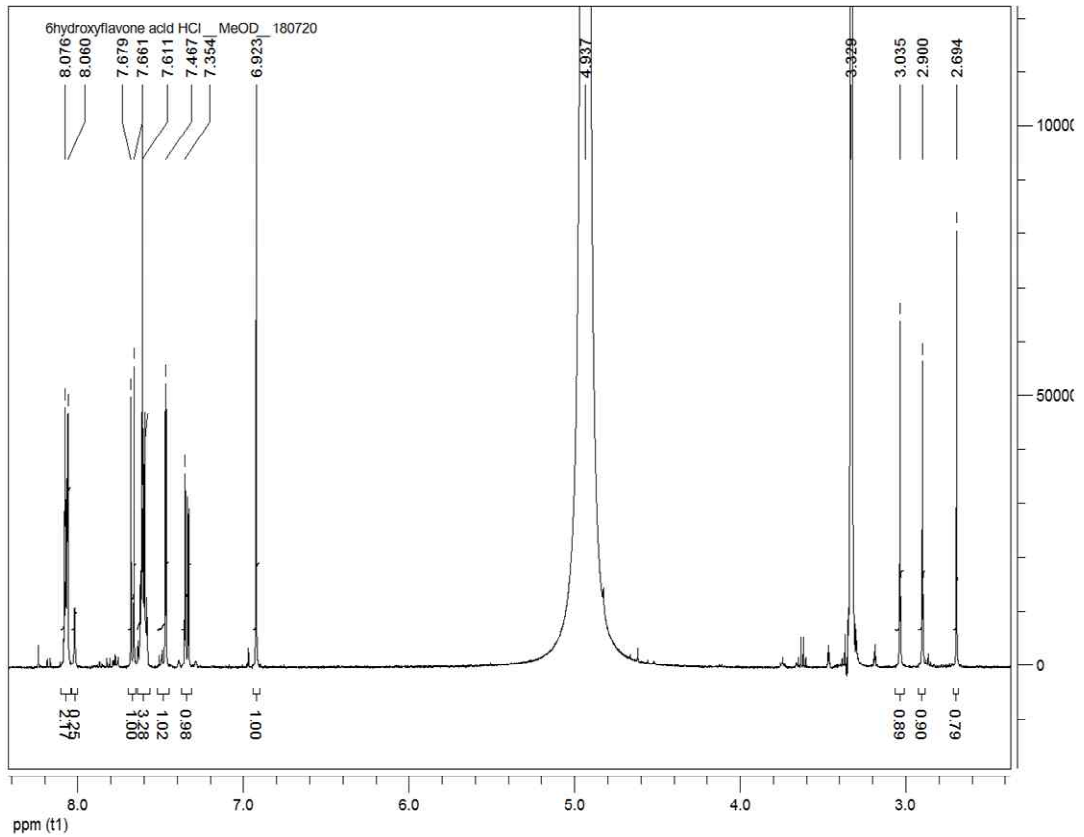
naphthol 도입 TLC



naphthol acid 의 NMR 자료

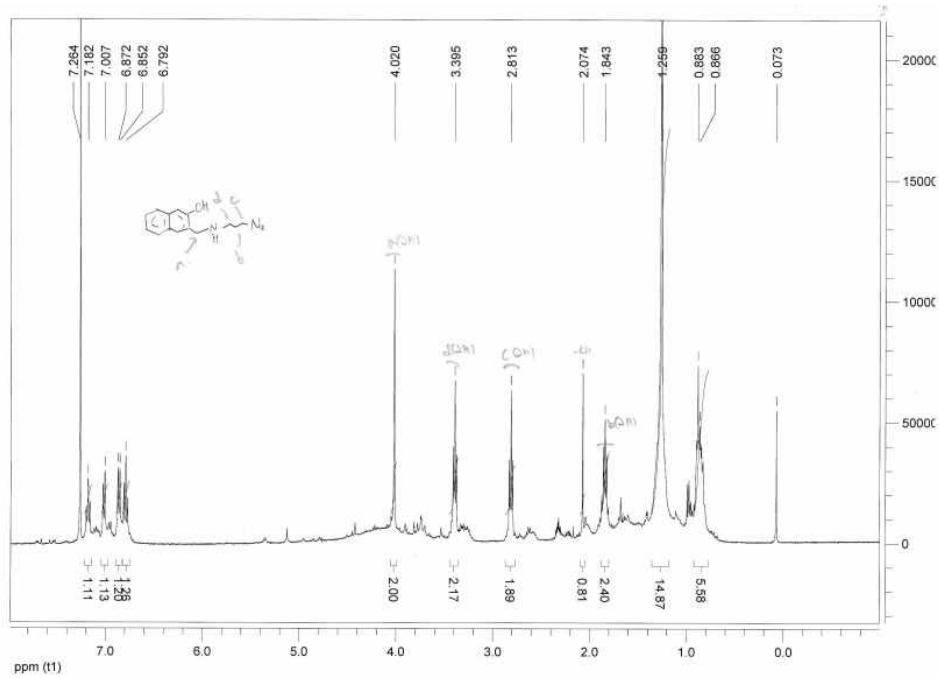


tyrosine acid 의 NMR 자료



6-hydroxyflavone acid 의 NMR 자료



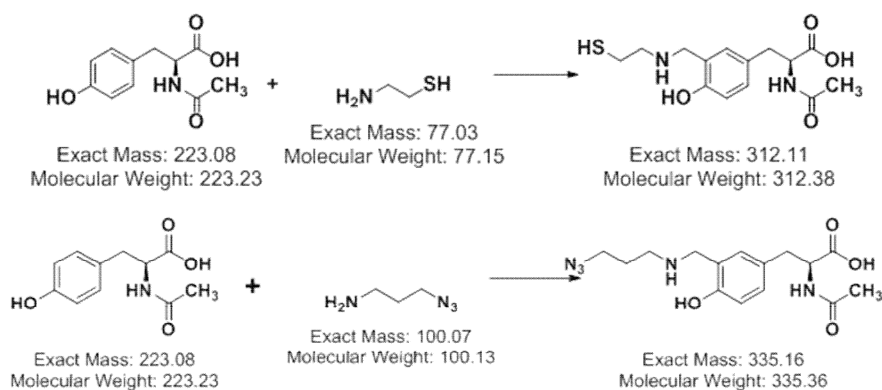


naphthol azide 의 NMR 분석 자료

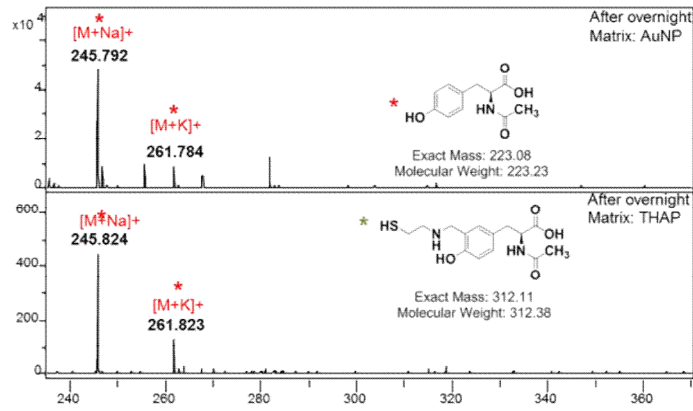
Name	Exact mass	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
Carboxylated 2-naphthol	245.11	√	√	√
Carboxylated protected tyrosine	352.17	√	√	
Carboxylated 6-hydroxyflavone	339.11	√	√	√
Thiolated 2-naphthol	233.09	√	√	√
Azidated 2-naphthol	256.13	√	√	√

Mannich reaction을 통한 MS 분석 데이터 표

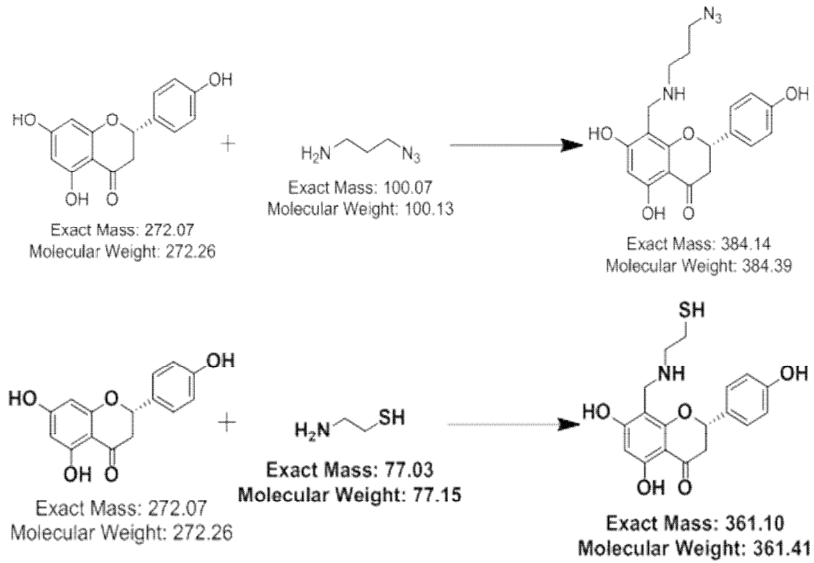
(4) 그 외의 다양한 물질에 작용기를 도입하기 위한 다양한 시도를 하였음. Mannich reaction을 통해 새로운 작용기를 도입 시킨 방법들은 다음과 같다.



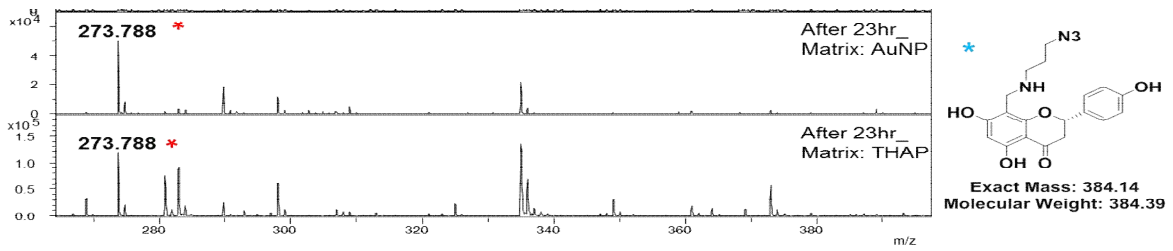
tyrosine을 이용한 다양한 매커니즘



tyrosine thiol 합성 MS 분석 결과



naringenin을 이용한 다양한 매커니즘



naringenin azide 합성 MS 분석 결과



## 2. 다양한 표면화학을 사용한 페놀 화합물의 표면 고정화

### 가. 연구내용

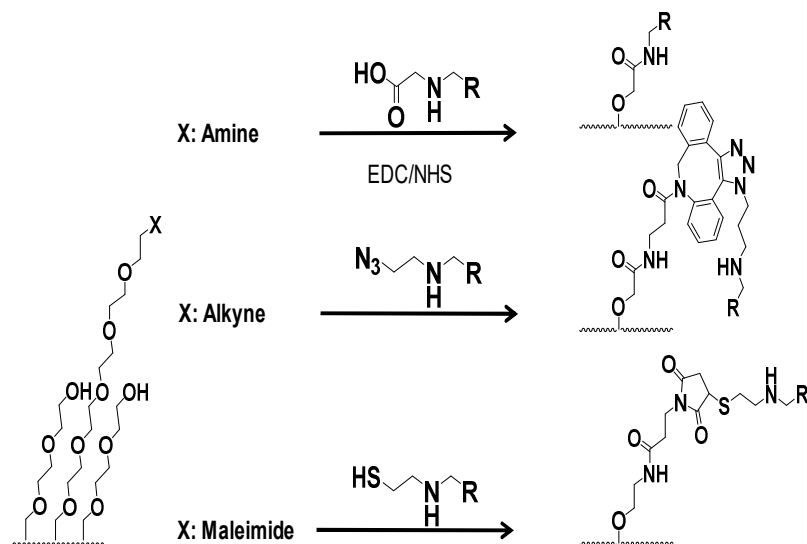
고정화 작업을 위하여 mannich 반응을 사용하여 다양한 작용기로를 도입시킨 물질을 다양한 표면화학반응을 사용하여 표면의 고정화작업을 진행하였다.

### 나. 연구방법

- (2) 고정화를 위한 금 기판을 황산과 과산화수소로 닦아준다.
- (3) 금 기판에 자가조립단부자층이 있는 용액을 사용하여 표면에 다양한 작용기를 도입시킨다.
- (4) 이후 다양한 표면화학을 사용하여 표면에 새로운 작용기를 도입시킨 페놀기 물질과 금 기판을 고정화 시킨다.
- (5) matrix 로 금나노입자를 사용하여 Bruker Autoflex III MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 금기판의 표면과 합성된 물질을 분석
- (5) Thermo Scientific K-alpha X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)를 사용하여 그 기판을 분석
- (6) 효소반응을 위해 phosphate buffer (50 mM, pH 6.2)를 만들고 SULT1A1과 PAPS를 준비한다.
- (7) 나프톨이 고정화 된 금 기판위에 반응시킨 SULT1A1과 PAPS를 phosphate buffer에 섞어준 후 이를 기판위에 뿌려주어 충분히 반응시킴
- (8) 기판은 XPS를 통해 확인

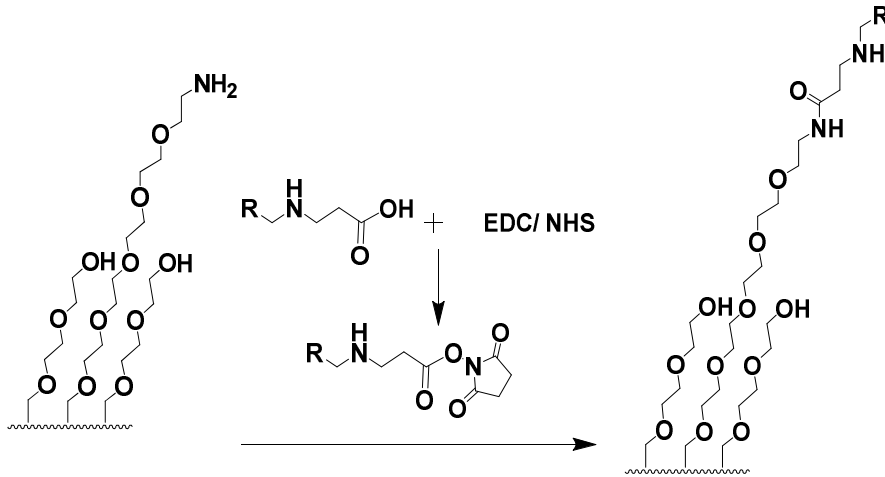
### 다. 연구결과

(1) 합성이 된 물질을 가지고 실제적으로 표면위에 부착하는 실험을 진행함. 티올기를 가진 물질을 합성하기 위해 아민기를 표면에 가지는 칩을 만든후 티올과의 결합이 가능하도록 maleimide를 아민과 결합을 진행함. 이후 표면에 부착이 되도록 실험을 진행함. 아자이드기는 표면에 고정된 알카인 기와 결합을 진행함. 매커니즘을 아래와 같다.

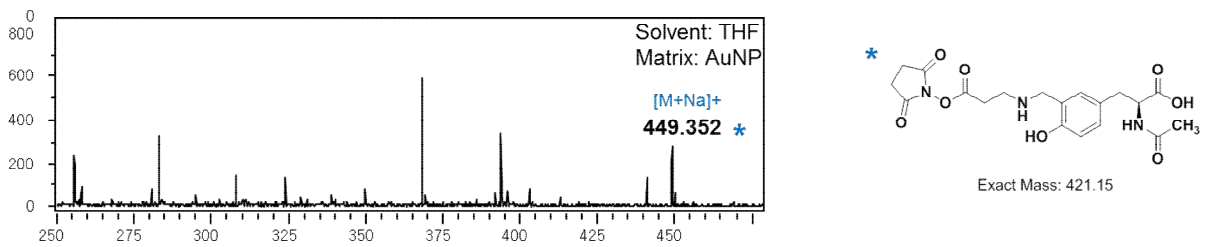
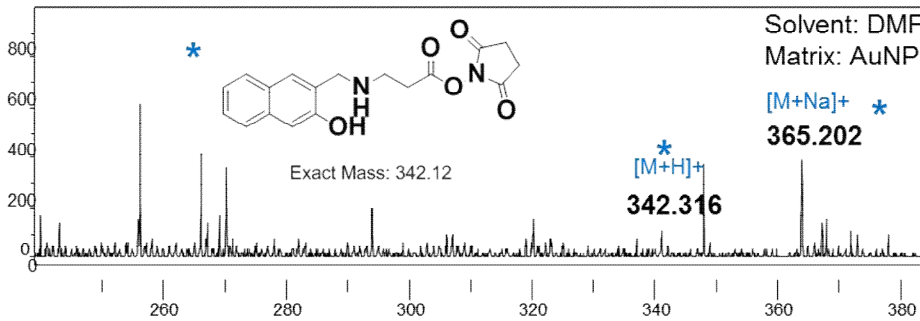


전반적인 표면 고정화 매커니즘

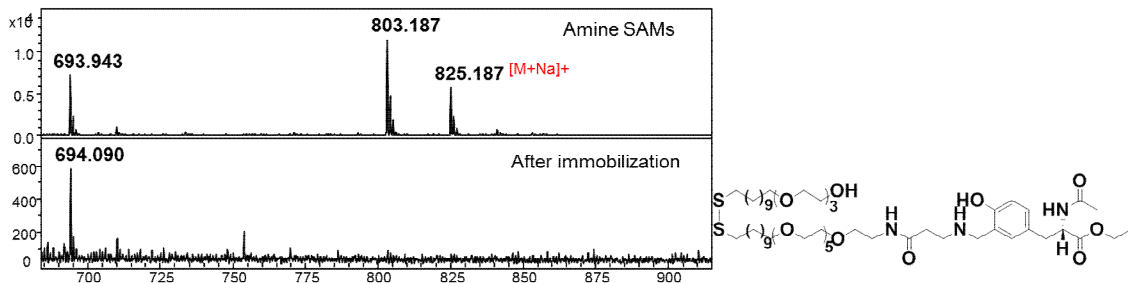
(2) 카복실기를 고정화 하기 위하여 표면에 아민기를 세운 후 EDC, NHS를 통한 carbodiimide 결합을 통하여 반응을 유도. 이를 위해 우선 카복실기 도입 폐놀기 물질에 NHS기를 도입시킴. 이를 위해 용액에서 2시간 동안 실온에서 반응을 유도 이후 아민기를 도입한 표면에 용액을 뿌려주어 반응을 유도함. 이에 대한 자료는 아래와 같다.

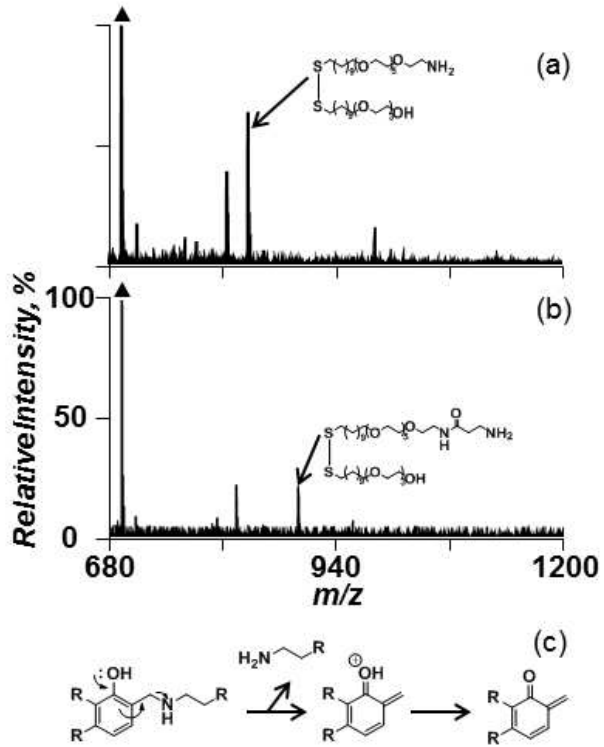
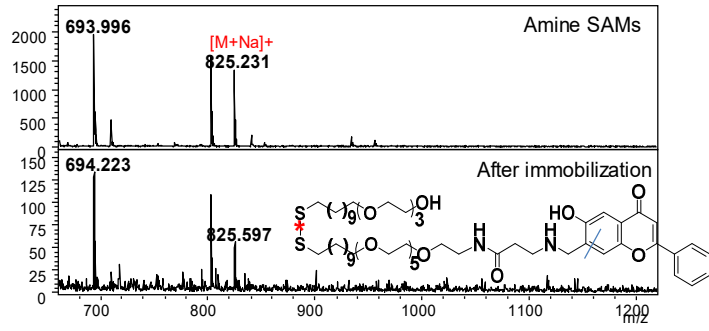
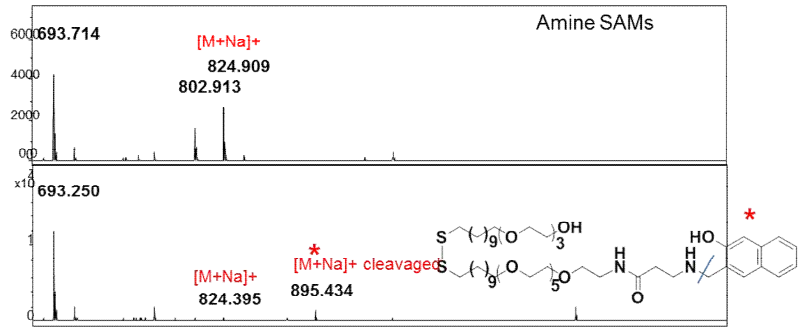


카복실기 작용기의 표면 결합 매커니즘

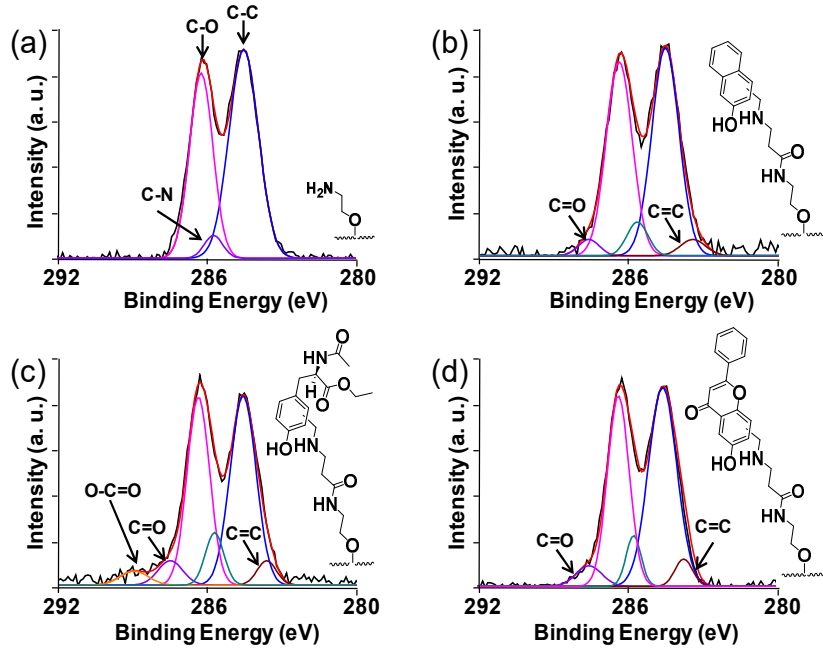


카복실기의 NHS결합 MS 분석 자료



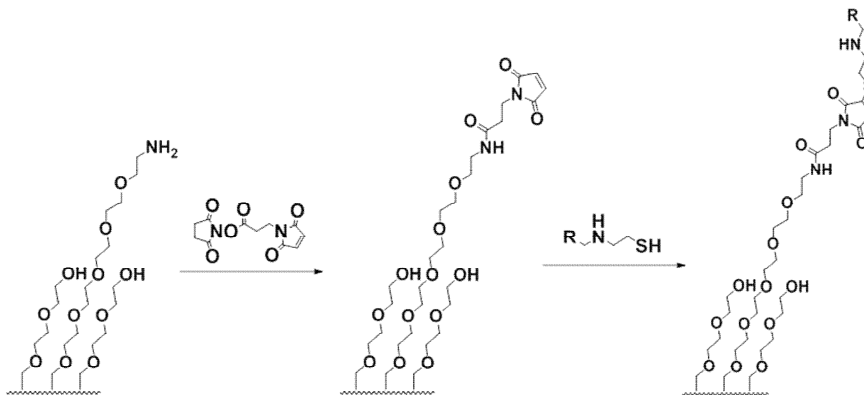


카복실기의 표면결합 MS 분석 자료와 cleavage 매커니즘

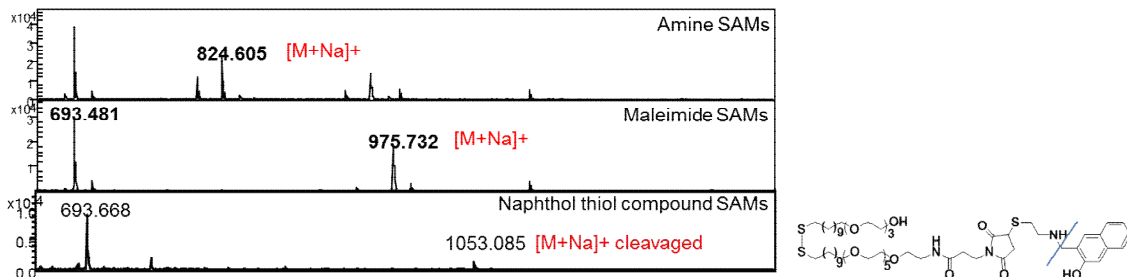


카복실기의 표면결합 XPS 분석 자료

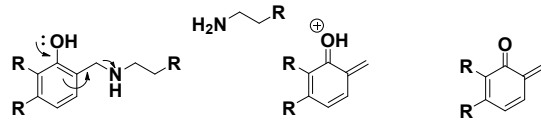
(3) 티올기를 고정화 하기 위하여 표면에 아민기를 세운 후 maleimide-NHS를 통go 표면에 maleimide기를 도입시킴. 이후 티올기를 가진 물질을 뿌려주어 michael addition 결합을 통하여 반응을 유도. 이에 대한 자료는 아래와 같다.



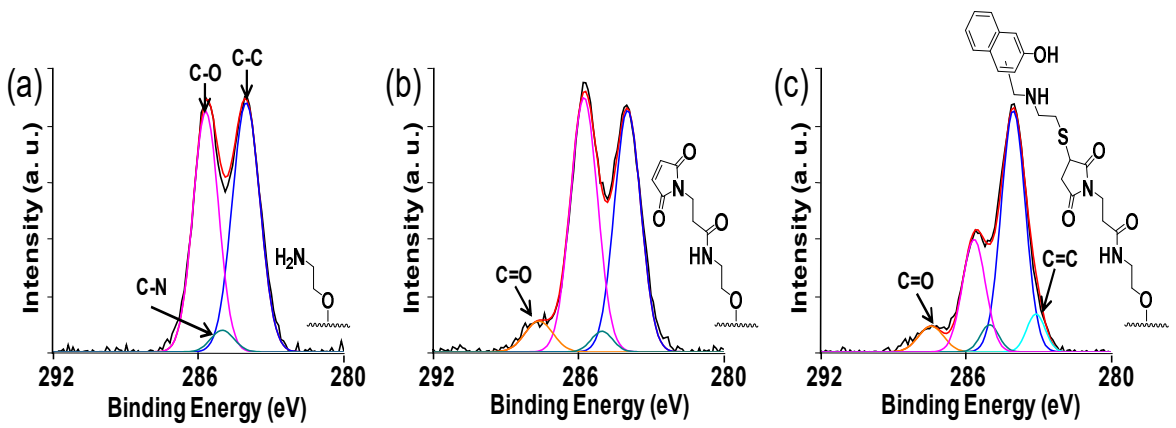
티올기 작용기의 표면 결합 매커니즘



티올기의 표면결합 MS 분석 자료

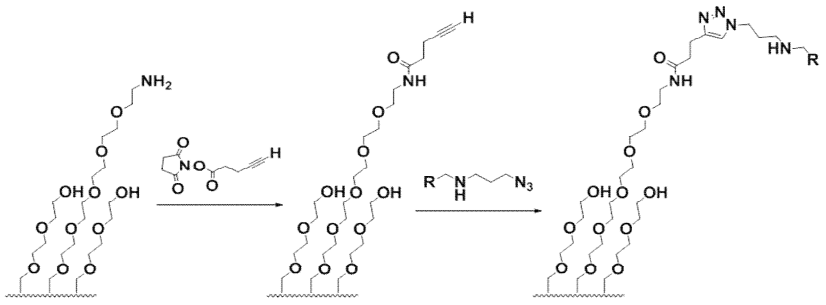


티올기의 표면결합 cleavage 매커니즘

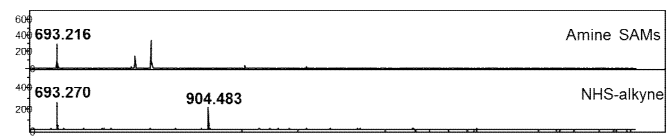


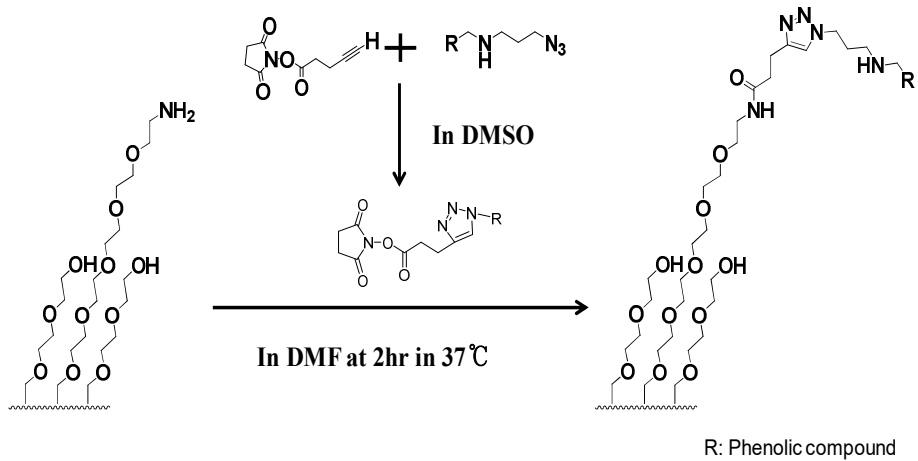
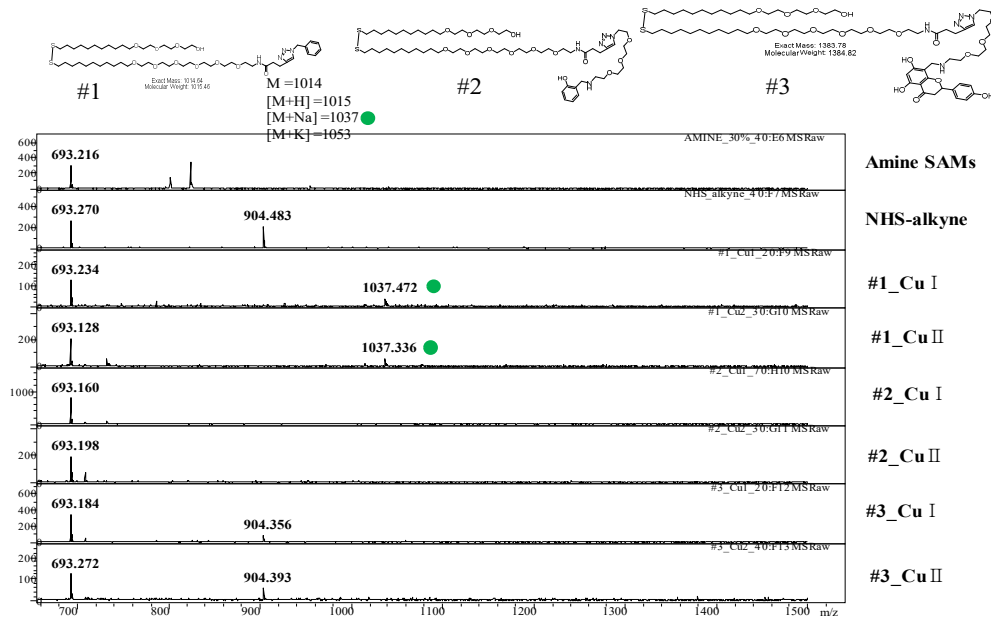
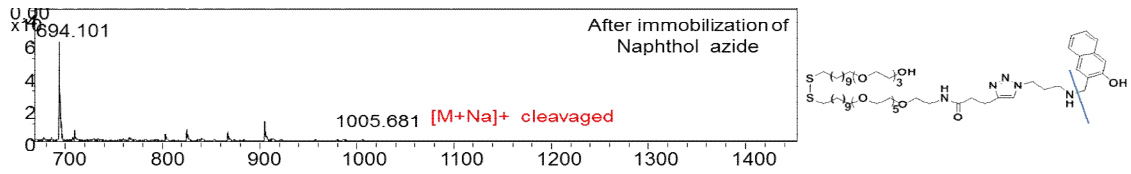
티올기의 표면결합 XPS 분석 자료

(4) 아자이드기를 고정화 하기 위하여 우선 아자이드기를 가진 물질의 합성을 위해 표면에 아민기를 가지도록 한 후 이후 표면에 알킬기를 가지도록 함. 이후 아자이드 기를 가진 합성물을 구리이온을 가진 물질과 함께 넣어 촉매로 사용하는 click반응을 통해 합성을 진행함 MS를 사용한 합성 확인을 시도하였으나 오류가 발생하여 (구리이온에 의해 합성물의 활성을 잃어버릴 것으로 생각됨) 매커니즘을 변화시킴. 변화시킨 반응은 다음과 같다. 표면에 카복실기를 세운 후 amine-DBCO(dibenzylcyclooctene)를 통해 표면에 EDC/NHS반응을 통해 표면에 알카인기를 도입한다. 이후 아자이드기를 가진 물질을 뿌려주어 click reaction 결합을 통하여 반응을 유도. 이에 대한 자료는 아래와 같다.

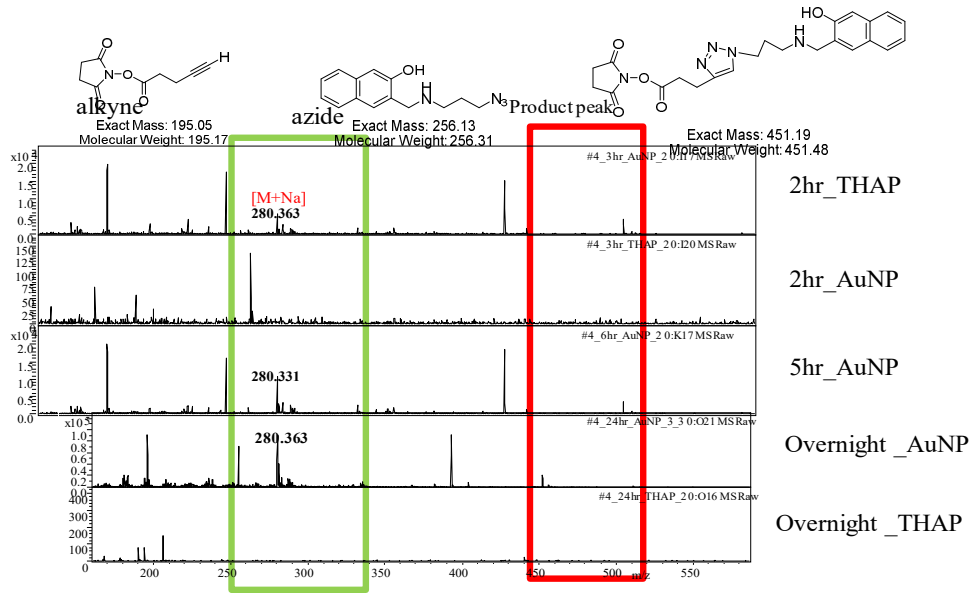


첫 번째 아자이드기 작용기의 표면 결합 매커니즘

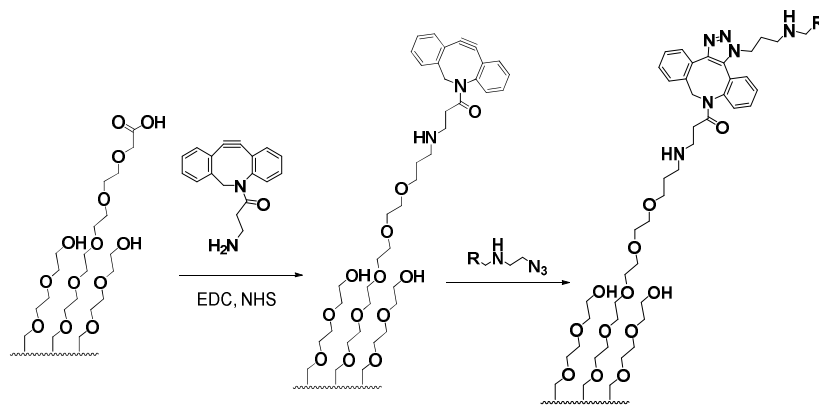




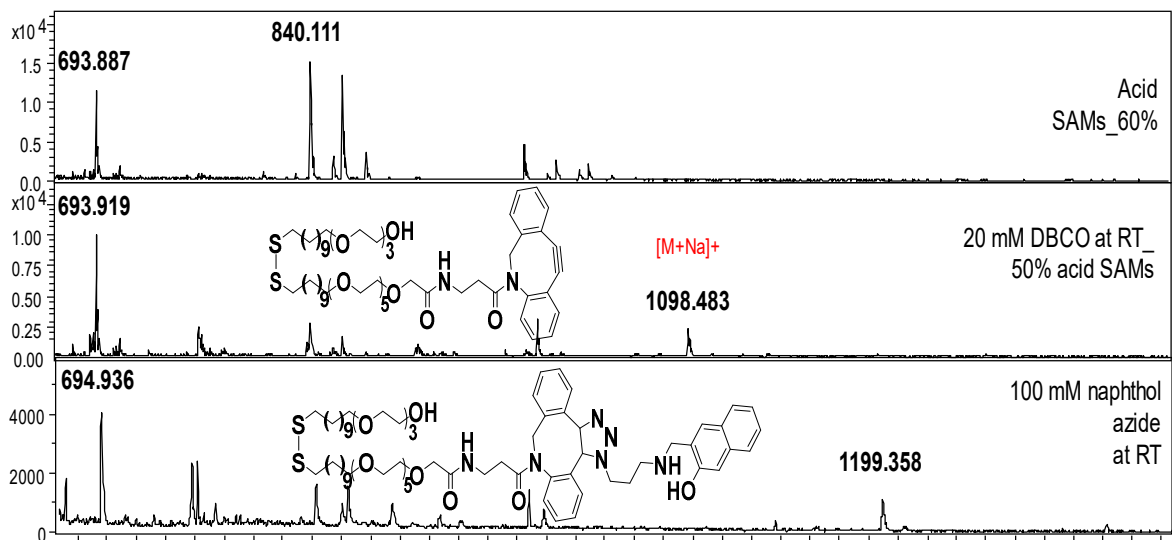
첫 번째 방법의 새로운 표면 고정화 매커니즘



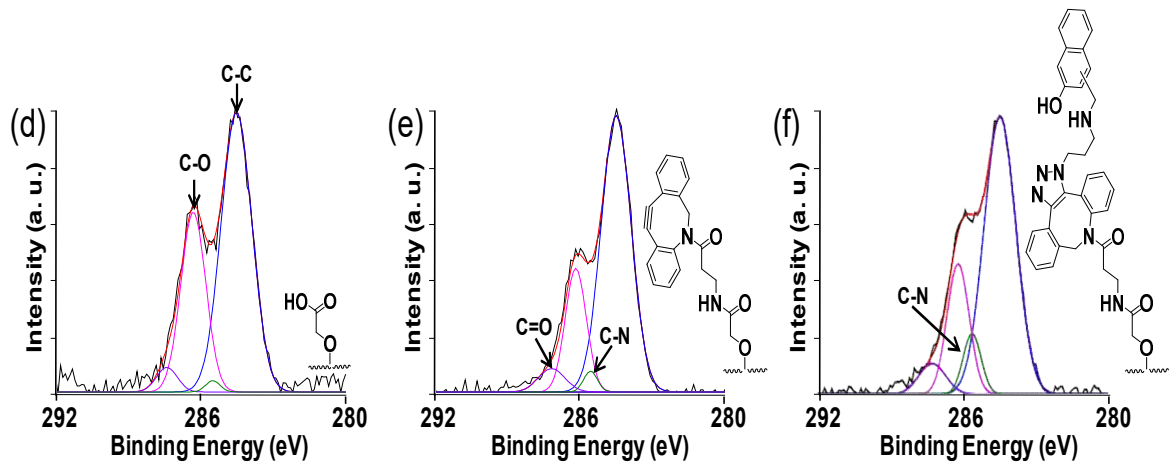
위의 방법을 사용하기 위해 용액내 결합화학 반응 MS 데이터



두 번째 아자이드기 작용기의 표면 결합 매커니즘



두 번째 아자이드기의 표면결합 MS 분석 자료



티올기의 표면결합 XPS 분석 자료

(5) 고정화가 되었는지 확인을 하기 위해 MS를 사용하여 확인한 결과 잘려진 형태로 관찰이 되거나 혹은 반응이 진행된 것으로 보지만 그에 해당되는 분자량을 확인하지 못한 경우가 많아 다시 한 번 XPS를 통해 고정화가 되었는지 확인하였다.

### 3. 표면 고정화된 약용물질의 응용연구

#### 가. 연구내용

표면의 고정화된 약용물질의 다양한 응용연구를 수행하기 위해서는 표면의 생활성을 유지하는 것이 매우 중요하기 때문에 이를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이를 위해 표면에 고정시킨 나프톨이 SULT1A1을 넣어주면 효소반응이 일어나는 사실을 활용하여 실험을 수행하였으며 이는 XPS를 통해 확인을 진행하였다.

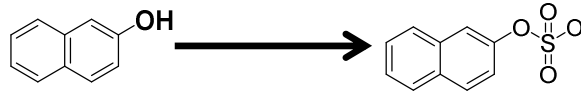
#### 나. 연구방법

- (1) 고정화를 위한 금 기판을 황산과 과산화수소로 닦아준다.
- (2) 금 기판에 자가조립단부자층이 있는 용액을 사용하여 표면에 다양한 작용기를 도입시킨다.
- (3) 이후 다양한 표면화학을 사용하여 표면에 naphthol을 띠도록 한다.  
새로운 작용기를 도입시킨 폐놀기 물질과 금 기판을 고정화 시킨다.
- (4) 효소반응에 사용하기 위한 용액을 만든다. phosphate buffer (50 mM, pH 6.2)
- (5) 나프톨이 고정화 된 금 기판위에 반응시킨 SULT1A1과 PAPS를 phosphate buffer에 섞어준 후 이를 기판위에 뿌려주어 충분히 반응시킴
- (6) Thermo Scientific K-alpha X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)를 사용하여 그 기판을 분석

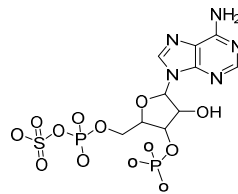
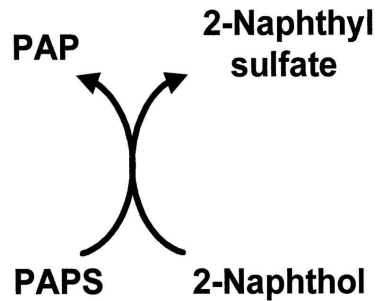
#### 다. 연구결과

- (1) 효소반응을 진행하기 위해 선정된 물질의 효소반응에 대해 문헌을 통해 확인하였다. 이에 대한 자료는 아래와 같다.





human phenol sulfotransferase (SULT1A1)



Exact Mass: 454.97  
Molecular Weight: 455.23

**PAPS**

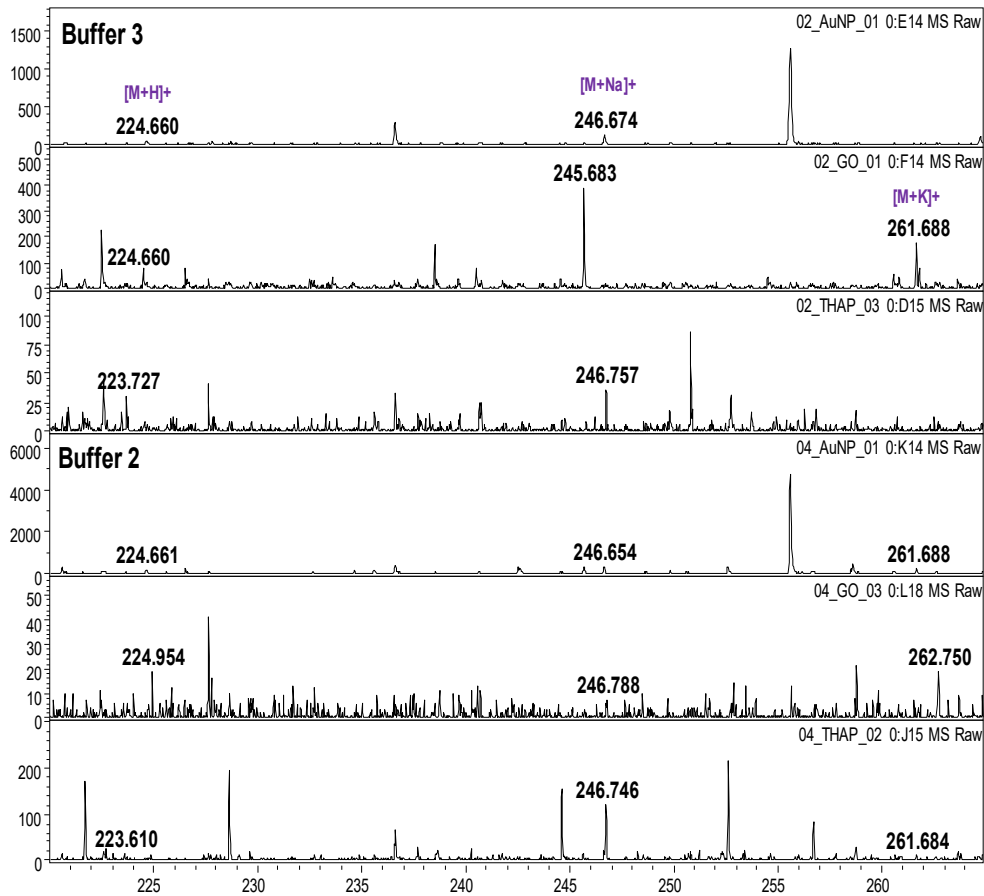
PAPS의 화학적 구조

(2) 효소반응이 가장 잘 일어나는 buffer 조건을 찾기위하여 표면반응이전에 용액에서 반응을 유도함. 이에 대한 결과는 아래와 같다.

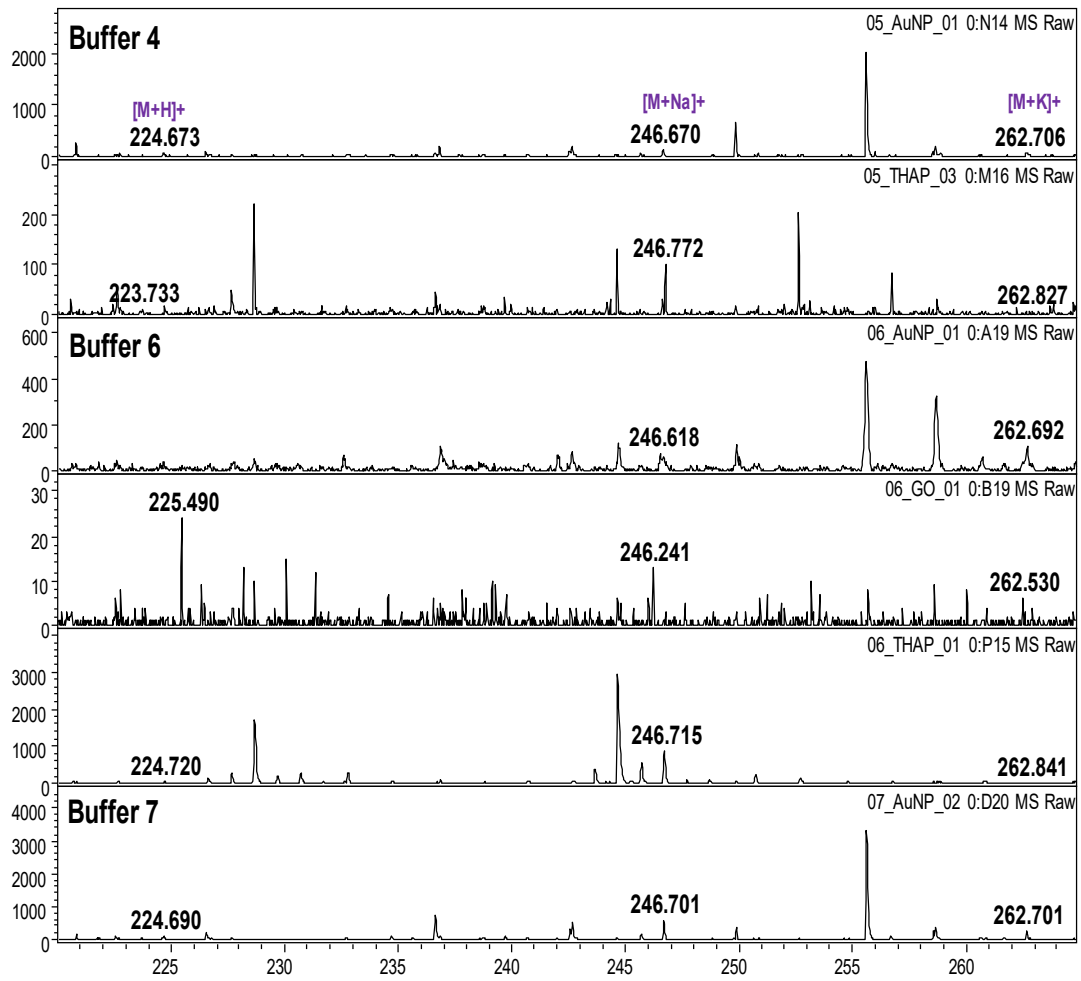
### Buffer condition

1. 50 mM Tris & 15 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS buffer (pH 7.5)
2. 50 mM Tris buffer (pH 6.2)
3. 20 mM MgCl<sub>2</sub> & 25 mM Tris buffer (pH 7.5)
4. 10 mM MgCl<sub>2</sub> & 50 mM Tris buffer (pH 7.4)
5. PBS buffer (pH 6.2)
6. 50 mM PB buffer (pH 6.2)
7. 50 mM Tris & 15 mM MgCl<sub>2</sub> in PB buffer (pH 7.5)

buffer 조건

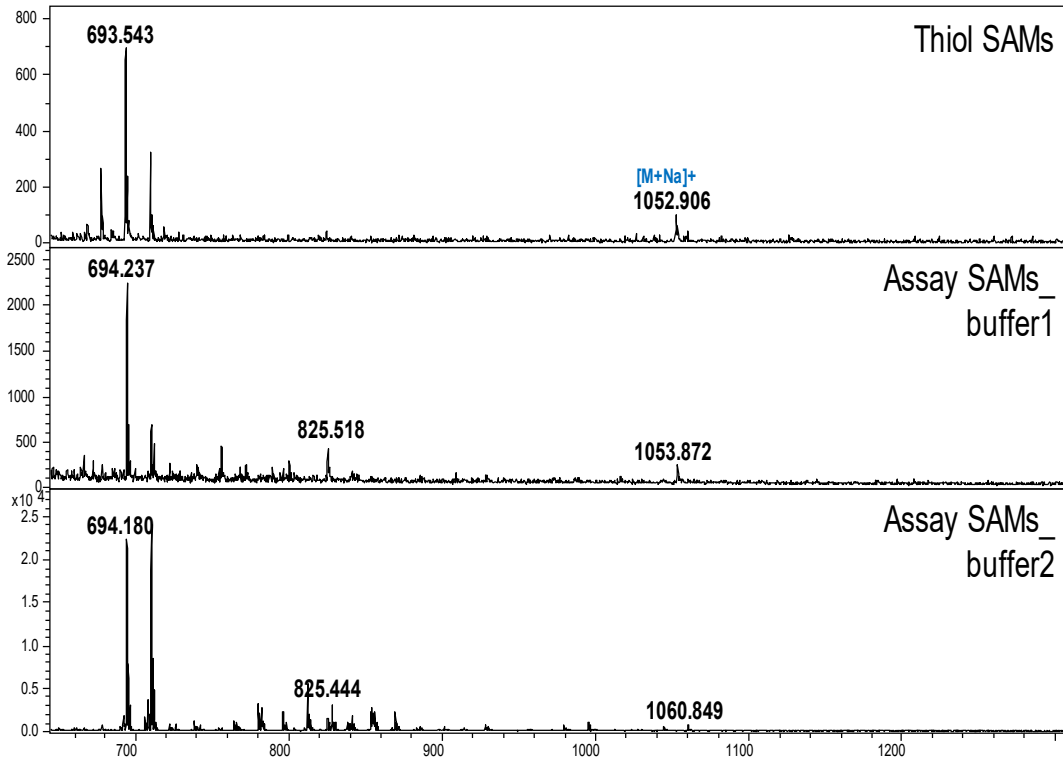


buffer 2,3을 사용한 효소반응 결과



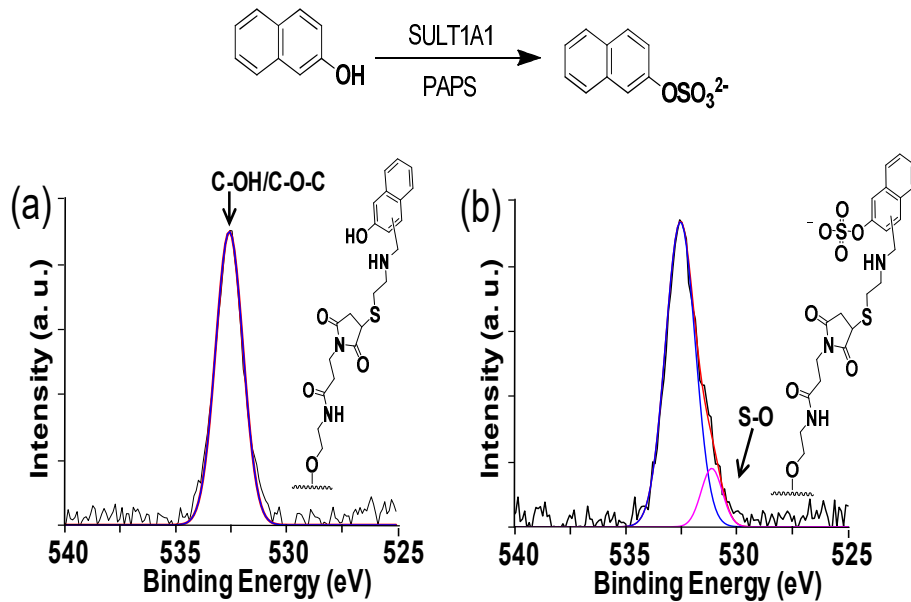
buffer 4,6,7을 사용한 효소반응 결과

(2) 효소반응을 보내고 이를 MS를 통해 분석을 진행하여 표면이 손상되지않고 유지되어있는지를 확인함. 결과는 아래와 같다.



효소반응보낸 표면의 MS 분석 자료

(3) 효소반응을 보내고 이를 XPS를 통해 분석을 진행하여 반응이 진행되었는 지를 확인함. 결과는 아래와 같다.



효소반응보낸 표면의 XPS 분석 자료

(4) 효소반응이 진행이 되며 이를 통해 표면의 생활성이 유지되는 것을 확인가능하였으며 다양한 용도로 활용가능한 표면을 구축하였다는 것을 증명가능.

## 4장. 형광이미징 기반 유효성분/대사물질의 생체분포도 작성

- 강황 함유성분 curcumin의 뇌로 전달된 형광이미지 확인
- 당귀 함유성분 umberiferone, angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin의 생체내 장기로 전달된 형광이미지 확인

### 1절. 강황의 활성물질인 curcumin의 체내 안정성 강화

#### 1. curcumin과 붕소 기반 배위 화합물 준비

##### 가. 연구내용

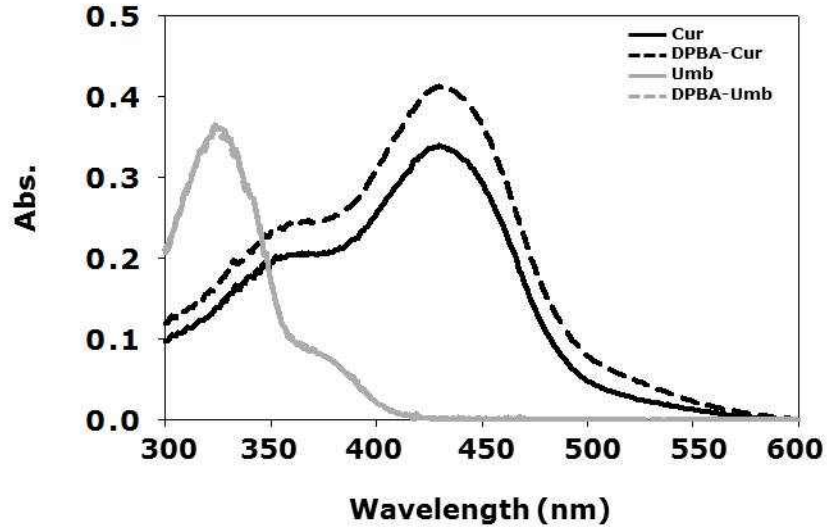
curcumin은 강황에 풍부하게 존재하는 폴리페놀로, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증 그리고 신경염증에 예방 및 치료효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 하지만 수용액 상에서 5 분만에 60%가 분해되고, 정맥 투여 시 빠르게 분해 및 대사되는 물질로 그 반감기가 약 8분 밖에 되지 않는다. 따라서 curcumin의 케토-엔올기에 붕소기반 화합물중 하나인 2-aminoethyl diphenyl borate (DPBA)이 결합하여 배위화합물을 형성하는지 검증하고자 하였다.

##### 나. 연구방법

- (1) curcumin과 umberiferone 각각을 유기용매인 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (2) DPBA를 유기용매인 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (3) curcumin과 DPBA를 중량비율 1:0, 1:0.04, 1:0.08, 1:0.2, 1:1이 되도록 혼합하여 상온에서 5 분간 반응시켰다
- (4) PBS buffer (pH 7.4)와 MES buffer (pH 6.0)을 이용하여 희석하였다. 이때 curcumin과 umberiferone 농도는 50 µg/ml로 준비하였다.
- (5) 파장 300-600 nm에서의 흡광을 측정하였다.
- (6) UV-vis spectrophotometer는 Molecular Device의 Beckman-Coulter DU 730을 사용하였다 [Int. J. Pharm. 515:669 (2016)].

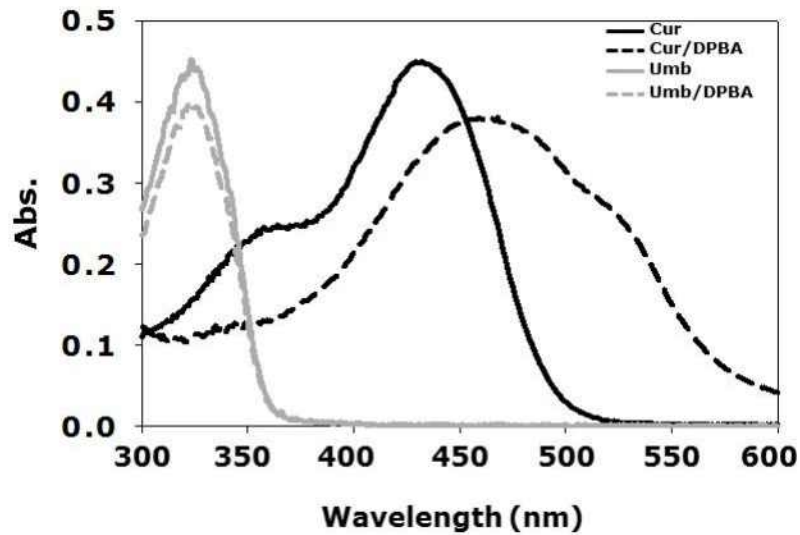
##### 다. 연구결과

- (1) pH 7.4인 PBS buffer에서 curcumin이 DPBA와 배위화합물을 만들어 흡광이 증가함을 확인하였고, 음성 대조군으로 사용한 엄베리페론은 수산기가 하나이므로 DPBA와 배위화합물을 형성하지 못해 흡광에 차이가 없음을 확인하였다.



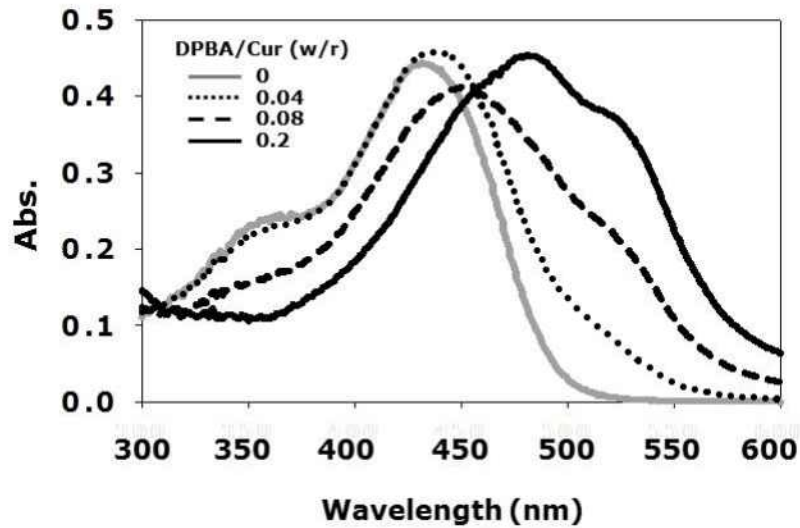
pH 7.4에서 흡광 비교 분석

(2) pH 6.0인 MES buffer에서 curcumin이 DPBA와 배위화합물을 만들어 적색 편이가 일어남을 확인하였고, 음성 대조군으로 사용한 엄베리페론은 수산기가 하나이므로 DPBA와 배위화합물을 형성하지 못해 차이가 없음을 확인하였다.



pH 6.0에서 흡광 비교 분석

(3) DPBA의 중량비율이 증가함에 따라, DPBA-curcumin 배위화합물의 적색 편이가 많이 일어남을 확인하였다.



pH 6.0에서 흡광 비교 분석

## 2. 붕소기반 화합물-curcumin 배위 결합물의 안정성 평가

### 가. 연구내용

DPBA-curcumin이 일반적인 curcumin에 비해 안정한지 평가하고자 시간에 따른 curcumin의 형광을 분석하였다.

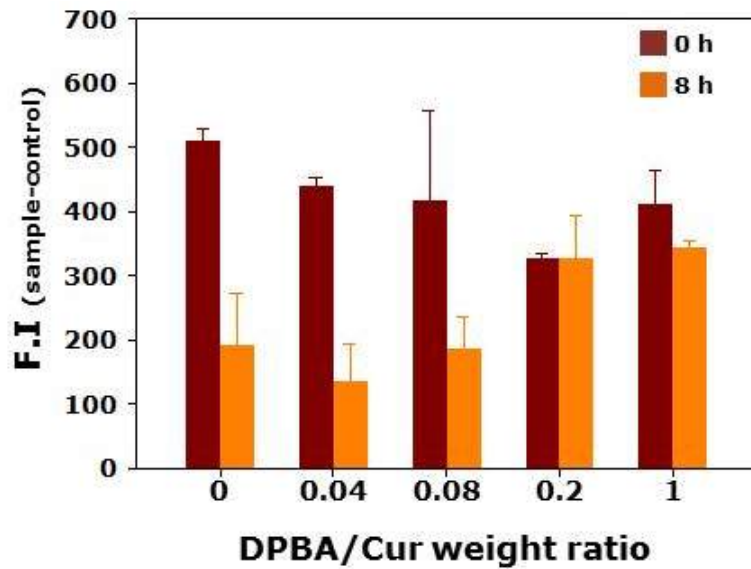
### 나. 연구방법

- (1) curcumin을 유기용매인 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (2) DPBA를 유기용매인 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (3) curcumin과 DPBA를 중량비율 1:0, 1:0.04, 1:0.08, 1:0.2, 1:1이 되도록 혼합하여 상온에서 5분간 반응시켰다
- (4) MES buffer (pH 6.0)를 이용하여 희석한 뒤, 상온에서 8시간 동안 인큐베이션 하였다. 이때 빛을 차단하였다.
- (5) 중량비율이 시간에 따른 형광변화에 미치는 영향을 확인하고자 0 시간과 8 시간에 각 샘플의 형광을 측정하였다. 이때 curcumin 기준 농도는 5 µg/ml로 준비하였다.
- (6) Fluorometer는 Molecular Device의 Gemini EM microplate reader를 이용하였고, excitation 파장 430 nm, emission 파장 520 nm에서 형광을 측정하였다 [Macromol. Biosci. 14(6):881 (2014)].

### 다. 연구결과

(1) curcumin의 형광을 이용해 분석한 안정성 평가 결과는 아래 그래프와 같다. DPBA의 양이 증가 할수록 시간이 지난 뒤에도 curcumin의 형광이 유지되는 것을 통해 curcumin의 안정성이 증대되었음을 확인하였다. DPBA가 없을 때에는 8시간 후에 curcumin의 형광이 급속히 감소하였으나, DPBA가 질량비 0.2와 1로 들어간 샘플에서는 8시간이후에도

curcumin의 형광이 감소되는 것이 관찰되지 않았고, 이는 curcumin-DPBA 배위화합물이 curcumin의 수용액상에서의 안정성을 높였기 때문으로 생각된다.



curcumin과 curcumin-DPBA의 시간에 따른 형광비교

### 3. 붕소기반 화합물의 생체 적합성 평가

#### 가. 연구내용

붕소기반 화합물중 하나인 2-aminoethyl diphenyl borate (DPBA)의 생체 사용이 적합한지 확인하고자 실험용 mouse 유래 대식세포인 RAW264.7 세포와 섬유아세포인 NIH/3T3 세포를 사용하여 세포 생존율을 평가하였다.

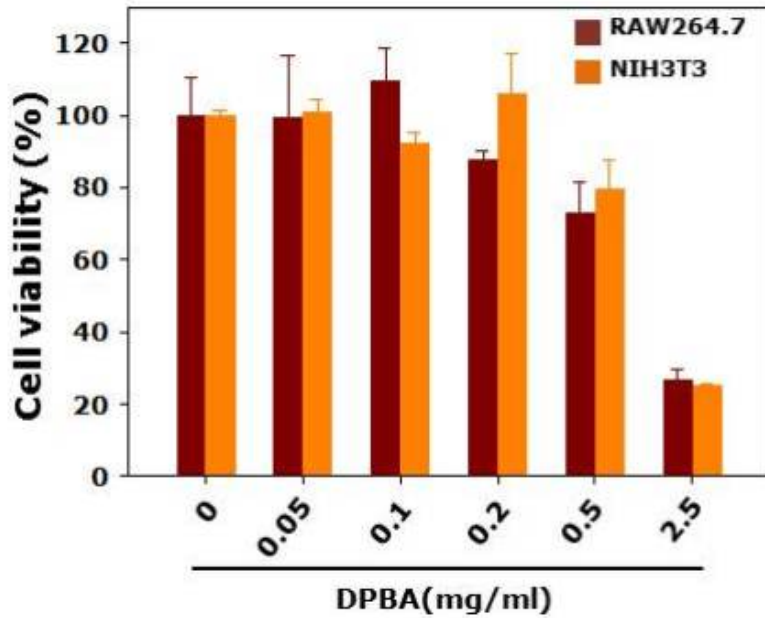
#### 나. 연구방법

- (1) DPBA를 유기용매인 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (2) RAW264.7 세포 와 NIH/3T3 세포에 DPBA를 농도별로 처리하였다. 이때 10%의 FBS가 함유된 세포 배양용 배지를 사용하였다.
- (3) 37 °C에서 1 시간 인큐베이션하였다.
- (4) CCK-8 분석을 실시하여 세포 생존율을 평가하였다 [Biomaterials. 162:71 (2018)].

#### 다. 연구결과

- (1) 붕소 기반 화합물인 DPBA의 생체 적합성을 확인한 결과는 아래와 같다. 대식세포와 섬유아세포 모두 0.2 mg/ml 이하의 농도에서 세포 생존율에 큰 변화를 확인 할 수 없었다.





DPBA 농도에 따른 세포독성 비교

#### 4. DPBA-curcumin 화합물의 체내 안정성 평가

##### 가. 연구내용

DPBA-curcumin 화합물의 체내 안정성 증대를 평가하였다.

##### 나. 연구방법

가. 이미징 방식을 통한 curcumin과 DPBA-curcumin 복합체의 시간에 따른 체내분포 비교

- (1) curcumin과 DPBA를 유기용매인 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 중량비율은 DPBA/curcumin이 0 또는 0.08 이 되도록 하였다.
- (2) curcumin과 DPBA가 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.
- (3) ICR (6 주령, 암컷)에 curcumin 기준 20 mg/kg이 되도록 정맥투여하였다.
- (4) 15 분, 1 시간 그리고 3 시간 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 curcumin의 형광을 측정하였다.
- (5) 형광 분석은 Caliper Life Sciences의 In Vivo Imaging System (IVIS) Lumina II를 사용하였다. excitation 430 nm, emission 509 nm에서 측정하였다.

나. 추출 방식을 통한 curcumin 과 DPBA-curcumin의 시간에 따른 체내분포 비교

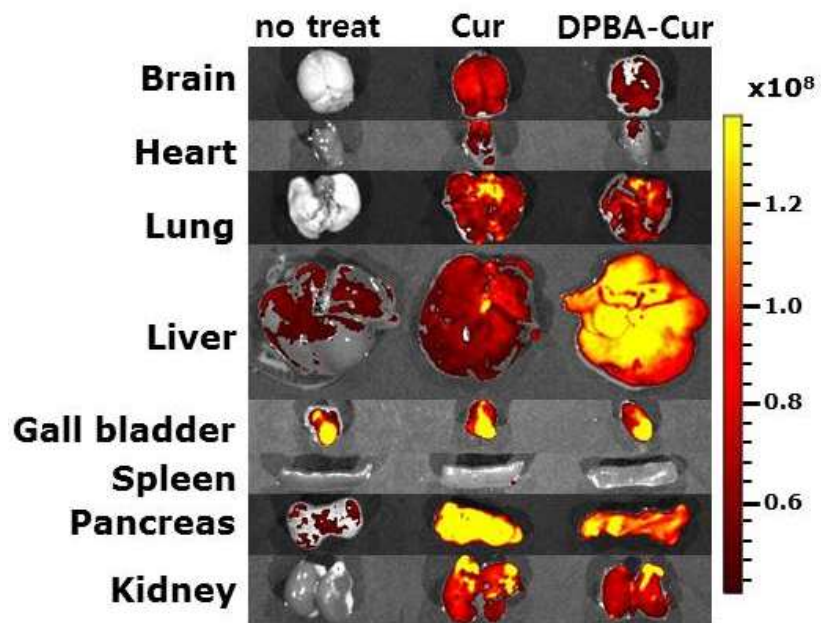
- (1) 각 장기의 무게를 측정 후, 해당 무게의 3배의 PBS를 넣고 장기를 균질화하였다.
- (2) 장기 균질액, 10% SDS, ethyl acetate를 부피 비 1 : 0.5 : 5가 되도록 혼합하였다.
- (3) 원심분리하여 상층액을 분리한 뒤, 상온에서 건조시킨다.
- (4) DMSO를 이용하여 추출된 curcumin을 다시 녹였다.
- (5) 추출된 curcumin의 형광 측정을 통해 각 장기로 전달된 curcumin 양을 분석하였다. 이때

curcumin 과 DPBA-curcumin 각각의 standard를 따로 준비해 정량하였다. fluorometer를 이용하여 excitation 430 nm, emission 520 nm에서 측정하였다.

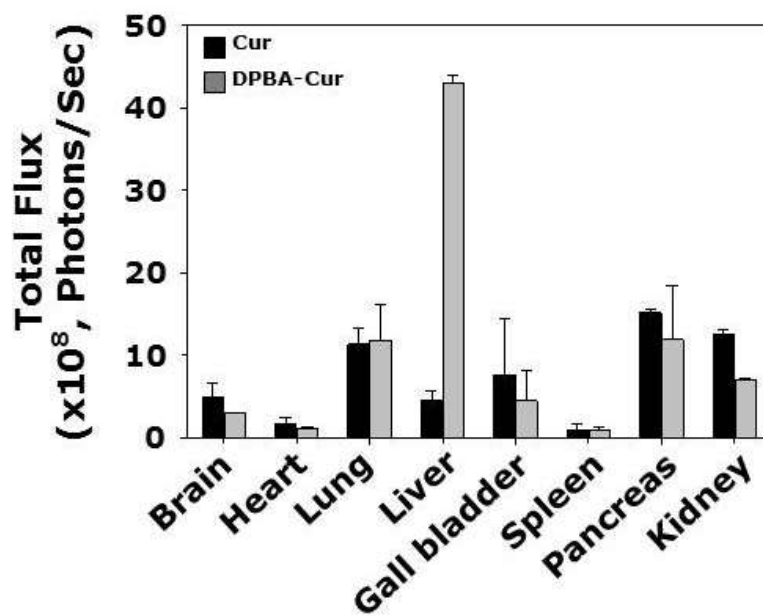
다. 연구결과

가) 이미징 방식을 통한 curcumin 과 DPBA-curcumin의 시간에 따른 체내분포 비교

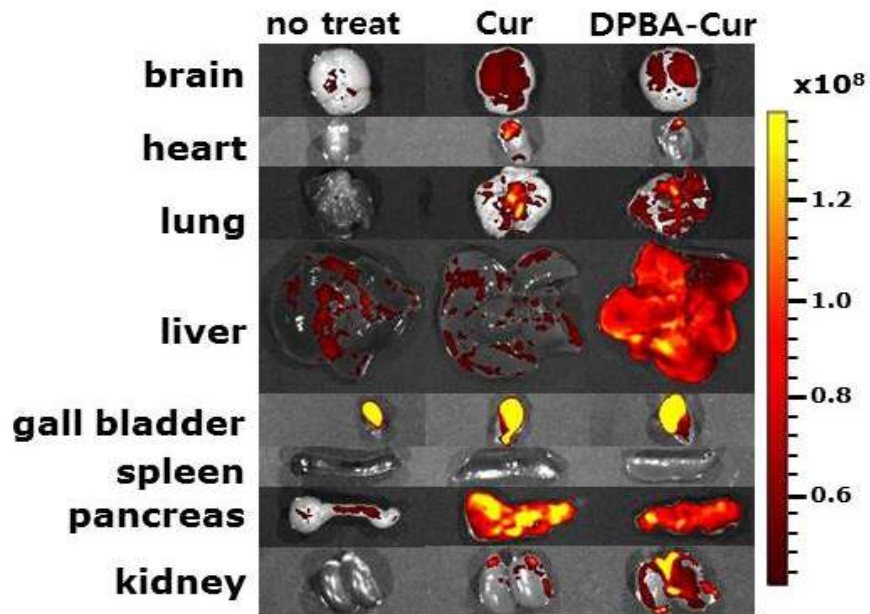
(1) 시간에 따른 curcumin과 DPBA-curcumin의 체내 분포 분석 결과는 아래와 같다. 15분에는 curcumin에 비해 DPBA-curcumin이 뇌로 전달된 양은 적었으나, 간으로 전달된 양이 월등히 증가하였다.



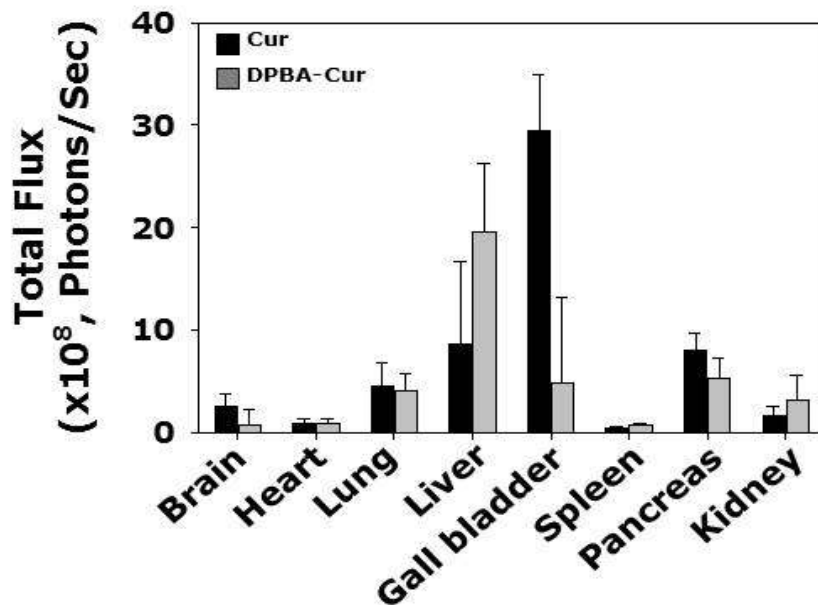
curcumin과 curcumin-DPBA 정맥 투여 15분 후 각 장기의 형광 이미지



curcumin과 curcumin-DPBA 정맥 투여 15분 후 각 장기의 형광을 정량적으로 나타낸 그래프  
 (2) 투여 후 1시간이 지났을때 뇌로 전달된 curcumin과 DPBA-curcumin의 양은 유사하였고,  
 간으로 전달된 양은 DPBA-curcumin이 월등히 증가해하였다.



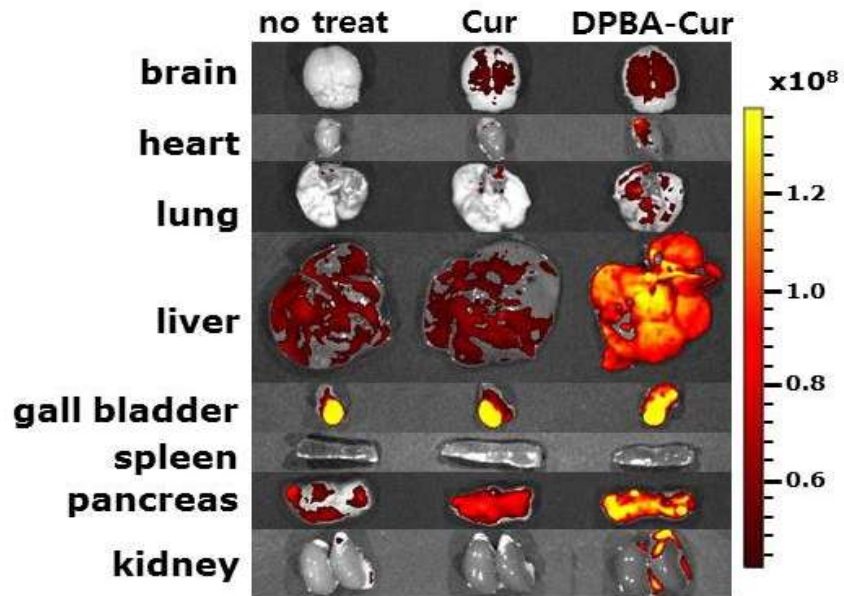
curcumin과 curcumin-DPBA 정맥 투여 1 시간 후 각 장기의 형광 이미지



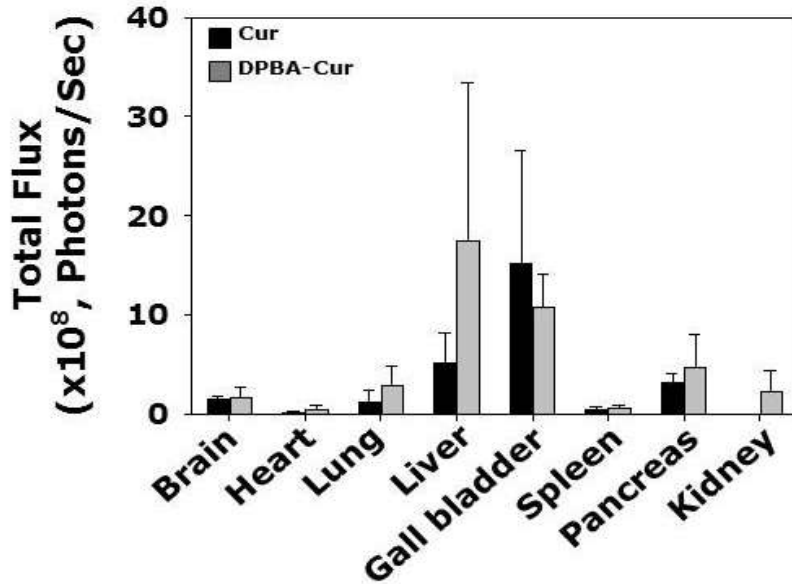
curcumin과 curcumin-DPBA 정맥 투여 1 시간 후 각 장기의 형광을 정량적으로 나타낸 그래프

(3) 투여 후 3 시간이 지나면서 curcumin은 체내에서 분해 및 대사되어 거의 남아있지 않았다. 뇌와 간 그리고 이자에 소량 남아있었다. 그러나 뇌, 간, 그리고 이자에 남아있는 DPBA-curcumin은 일반 curcumin에 비해 그 양이 월등히 높았다. 이는 DPBA와 결합하여

안정성이 증가한 curcumin이 체내에서 분해 및 대사되는 속도가 늦춰져 뇌로 전달되는 양이 지속적으로 유지되고 있는 것이라 판단된다.



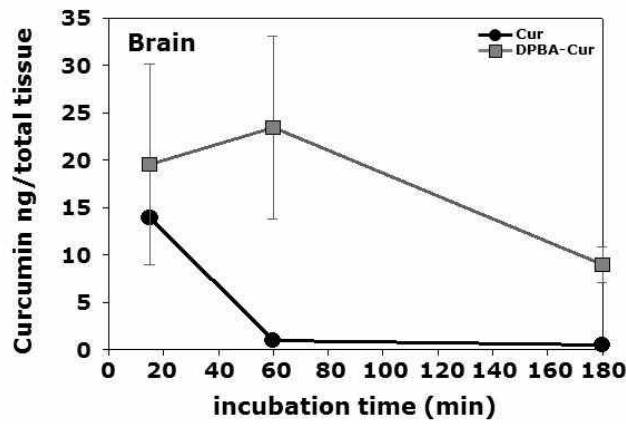
curcumin과 curcumin-DPBA 정맥 투여 3 시간 후 각 장기의 형광 이미지



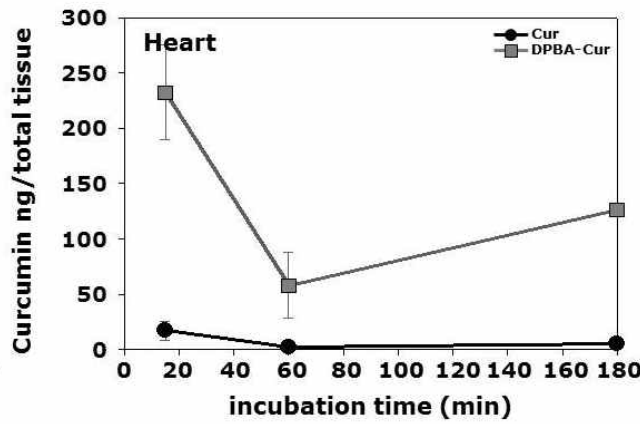
curcumin과 curcumin-DPBA 정맥 투여 3 시간 후 각 장기의 형광을 정량적으로 나타낸 그래프

나) 추출 방식을 통한 curcumin 과 DPBA-curcumin의 시간에 따른 체내분포 비교  
 (1) curcumin과 DPBA-curcumin을 투여한 각 장기 (뇌, 심장, 폐, 비장, 이자, 그리고 신장)에서 curcumin을 추출하여 체내 분포를 분석 결과는 아래와 같다. 모든 장기에서 시간이 지남에 따라 curcumin은 빠르게 그 양이 줄어든 반면, DPBA-curcumin은 모든 장기 모든

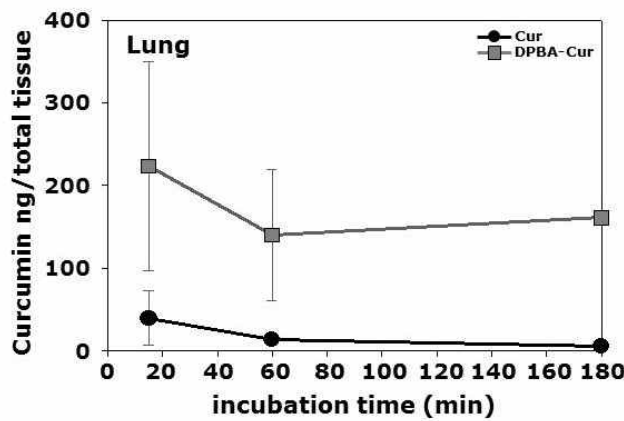
시간대에서 더 많은 양의 curcumin이 측정되었다.



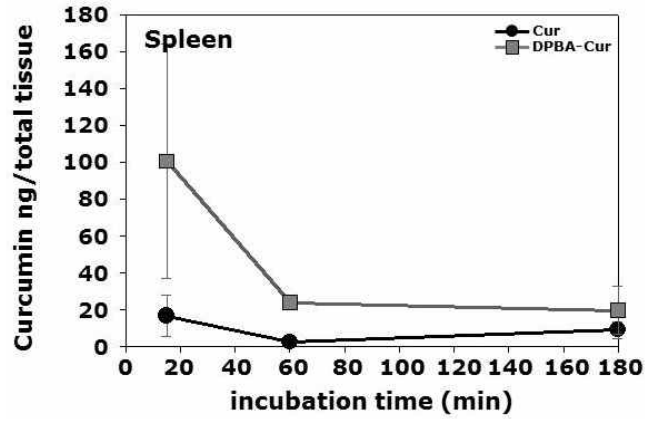
추출방식을 통한 뇌에 남아있는 curcumin의 양 비교



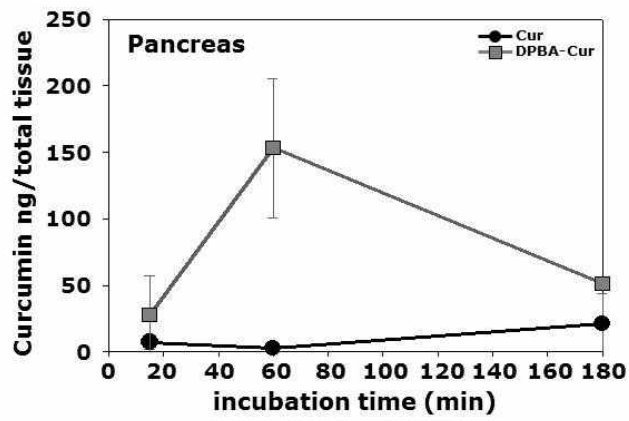
추출방식을 통한 심장에 남아있는 curcumin의 양 비교



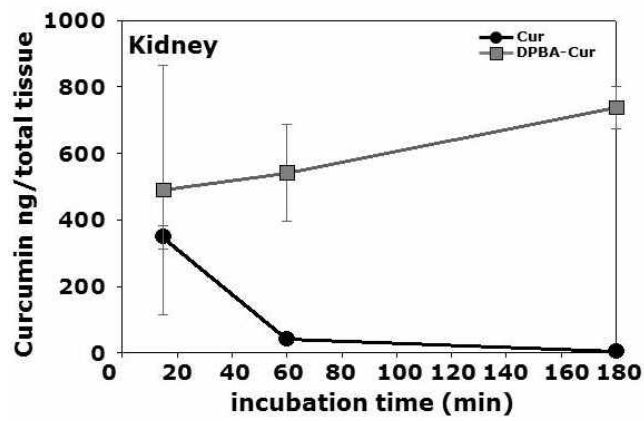
추출방식을 통한 폐에 남아있는 curcumin의 양 비교



추출방식을 통한 비장에 남아있는 curcumin의 양 비교



추출방식을 통한 이자에 남아있는 curcumin의 양 비교



추출방식을 통한 신장에 남아있는 curcumin의 양 비교

## 5. DPBA-curcumin의 활성 평가

### 가. 연구내용

DPBA와 결합을 이루며 안정해진 curcumin의 활성을 평가하고자 curcumin의 대표적인 효능인 항산화 효과와 항암 효과를 검증하였다. 항산화 효과 검증을 위해 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였고, 항암 효과를 검증하기 위해 인간에서 유래한 유방암 세포인 MCF-7 세포와 인간 유래 폐암 상피 세포인 A549 세포의 증식 억제를 확인하였다.

### 나. 연구방법

#### 가) HPLC를 통한 DPBA-curcumin 결합 확인

- (1) DMSO에 녹인 curcumin과 DPBA를 혼합하여 상온에서 5분간 반응시켰다. 이때 DPBA/curcumin의 질량비는 0, 1, 10으로 준비하였다
- (2) curcumin 기준 농도 100 µg/ml을 HPLC를 이용하여 분석하였다.

#### 나) DPBA-curcumin의 항산화 효과 검증

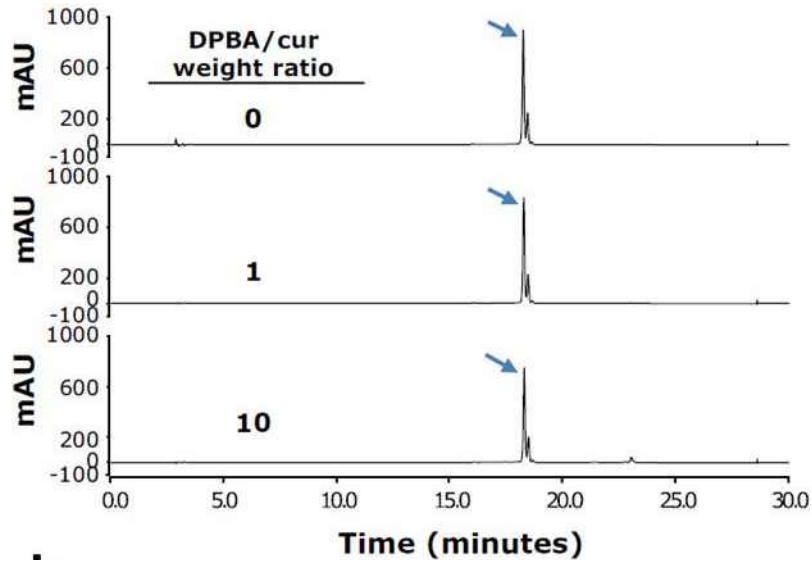
- (1) DMSO에 녹인 curcumin과 DPBA-curcumin (DPBA/curcumin 질량비 0.08)을 준비하였다. 이때 curcumin 기준 농도가 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 그리고 2.0 mg/ml 이 되도록 희석하여 준비하였다. 또한 양성 대조군으로 아스코르브산을 농도별로 준비하였다.
- (2) 각각의 물질을 DPPH와 혼합하여 반응시켰다.
- (3) 517 nm에서 흡광을 측정하여 DPPH 라디칼이 소거된 정도를 측정하였다.

#### 다) DPBA-curcumin의 항암 효과 검증

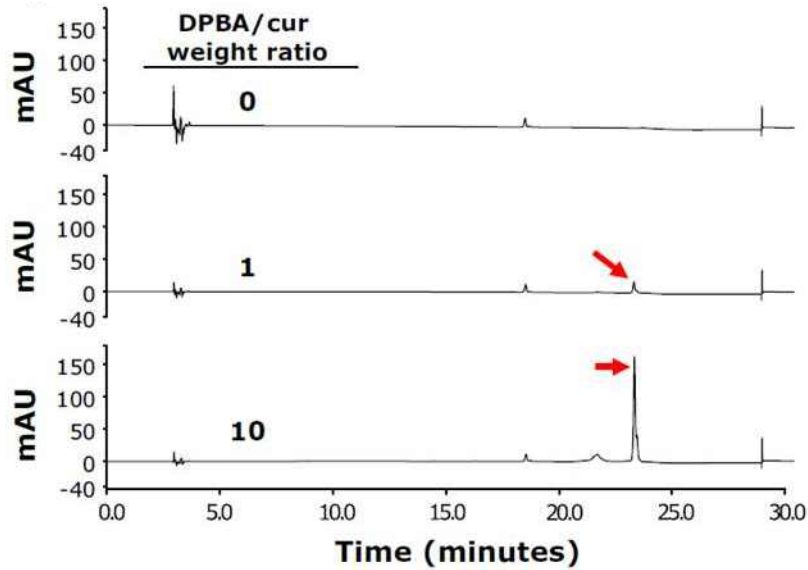
- (1) curcumin과 DPBA-curcumin 처리 24시간 전에 MCF-7 세포와 A549 세포를 well당  $1 \times 10^4$ 개씩 배양하였다.
- (2) curcumin과 DPBA-curcumin (DPBA/curcumin 질량비 0.08)를 세포에 curcumin 기준 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 µM이 되도록 처리하여 24시간동안 추가 배양하였다. 이때 세포 배양액은 10%의 FBS가 함유되어있는 RPMI-1640을 사용하였고, DMSO의 최종 농도는 1%로 동일하게 맞춰주었다.
- (3) 24 시간 뒤, 세포 생존력을 측정하기 위해 CCK-8 분석법을 실시하였다.

### 다. 연구결과

가) HPLC를 통한 DPBA-curcumin 결합 확인한 결과는 아래와 같다. DPBA의 양이 증가할수록 a에 해당하는 curcumin의 픽은 줄어들고, b에 해당하는 DPBA-curcumin의 픽은 증가하였다.



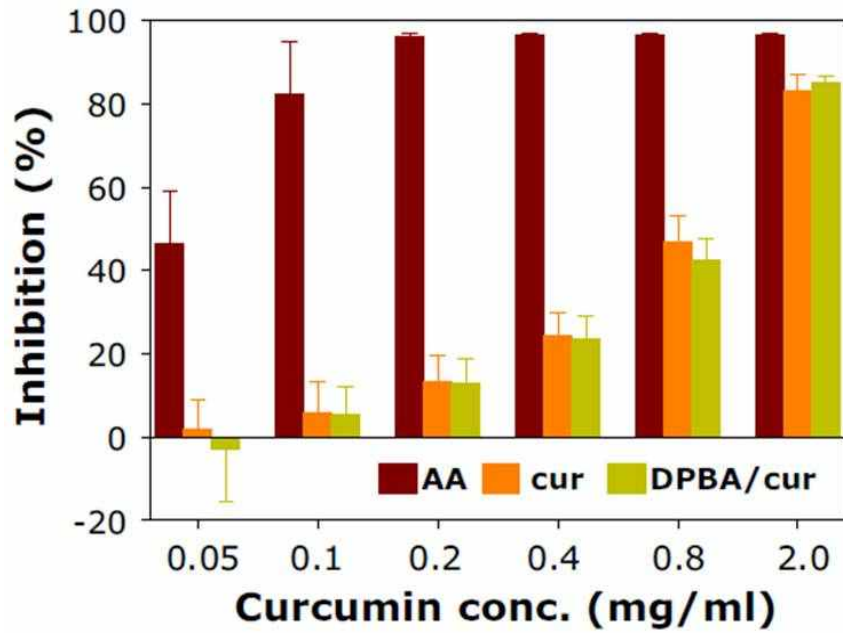
HPLC를 통한 DPBA-curcumin 반응시 curcumin 분석



HPLC를 통한 DPBA-curcumin 결합체 분석

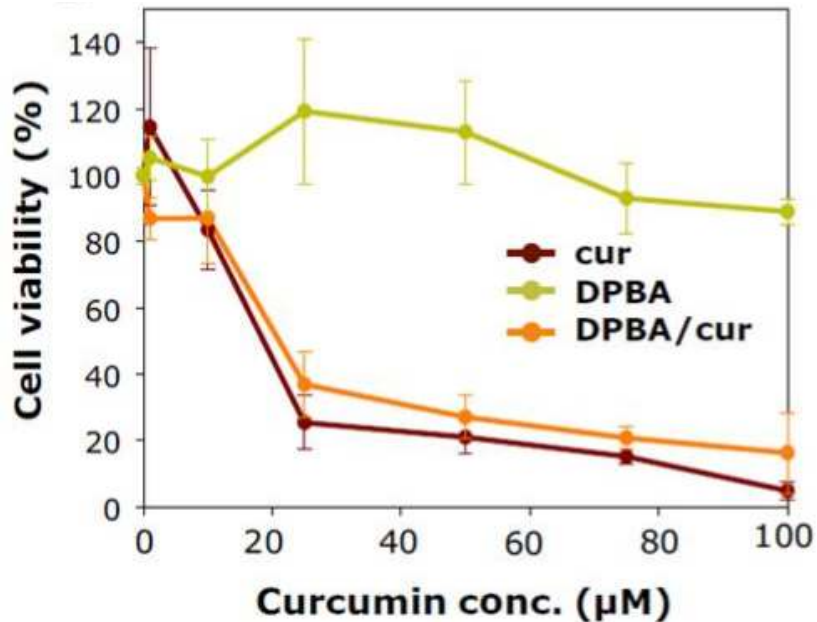
나) DPBA-curcumin의 항산화 효과 검증하기 위해 DPPH 라디칼 소거율을 확인한 결과는 아래와 같다. curcumin 기준 농도가 같을 때 curcumin과 DPBA-curcumin의 DPPH 라디칼 소거율에 차이가 없음을 통해 DPBA과 결합하여 안정해진 DPBA-curcumin의 항산화 효과가 유지되고 있음을 확인하였다.



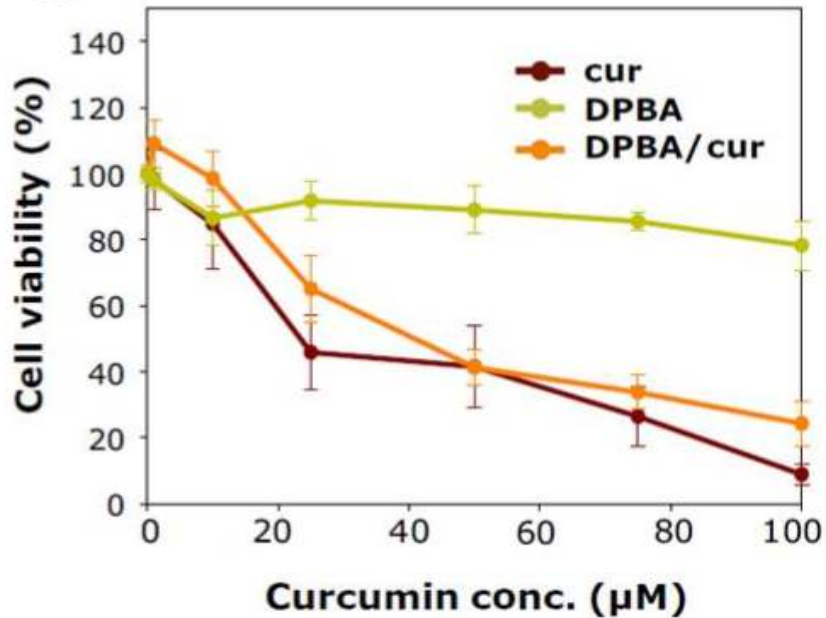


curcumin과 DPBA-curcumin의 DPPH 라디칼 소거율 비교

다) DPBA-curcumin의 항암 효과 검증한 결과는 다음과 같다. 인간 유래 유방암 세포주인 MCF-7와 인간 유래 폐암 세포주인 A549 모두 DPBA는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았지만, curcumin과 DPBA-curcumin은 curcumin 기준 농도에 따른 암세포의 생존율이 유사하게 감소하는 것을 통해 DPBA-curcumin의 항암효과가 유지되고 있음을 확인하였다.



curcumin과 DPBA-curcumin에 의한 MCF-7 세포의 생존률 감소 비교



curcumin과 DPBA-curcumin에 의한 A549 세포의 생존률 감소 비교

## 6. scaffold를 이용한 curcumin의 생체 안정성 증대

### 가. 연구내용

curcumin은 염증을 완화하고 상처 회복을 돕는 것으로 알려져 있다. 하지만 curcumin은 빠르게 분해 및 대사되므로 상처부위에 지속적으로 curcumin을 공급하기 위해 scaffold를 이용하고자 하였다.

### 나. 연구방법

#### 가) scaffold 선정

- (1) 0.5x0.5 cm의 PLGA/PLA scaffold (질량비 8:2)와 키토산 scaffold (음성 대조군)에 증류수에 녹인 curcumin (0.5 mg)을 18 시간 동안 인큐베이션 하였다.
- (2) 인큐베이션이 끝난 scaffold는 증류수를 이용하여 3회 세척하였다.
- (3) 세포 배양액에 3일간 인큐베이션하며 시간별로 scaffold에 남아있는 curcumin의 형광을 IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하여 측정하였다.

#### 나) curcumin의 항산화 효과 검증

- (1) curcumin (3.7 μg)과 DPPH를 메탄올에 녹여 준비하였다. 이때 DPPH/curcumin의 몰 비는 5.07로 하였다.
- (2) curcumin과 DPPH 혼합 후 시간 간격 (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 그리고 4 시간)을 두고 250~600 nm에서 흡광 스펙트럼을 측정하여 curcumin과 curcumin 대사체를 확인하였다.

#### 다) 재 추출한 curcumin의 항산화 효과 검증

- (1) DMSO에 curcumin이 담긴 PLGA/PLA scaffold를 넣고 원심분리(10,000 rpm, 10분) 4회

실시하였다.

(2) curcumin (0.48 µg)과 scaffold에서 재 추출한 curcumin을 DPPH와 혼합하였다.

이때 DPPH/curcumin의 물 비는 58.5, 585로 하였다.

(3) curcumin의 형광을 통해 curcumin의 잔량을 확인 하였다. IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하여 확인하였다.

라) curcumin이 담긴 PLGA/PLA scaffold의 항산화 효과 검증

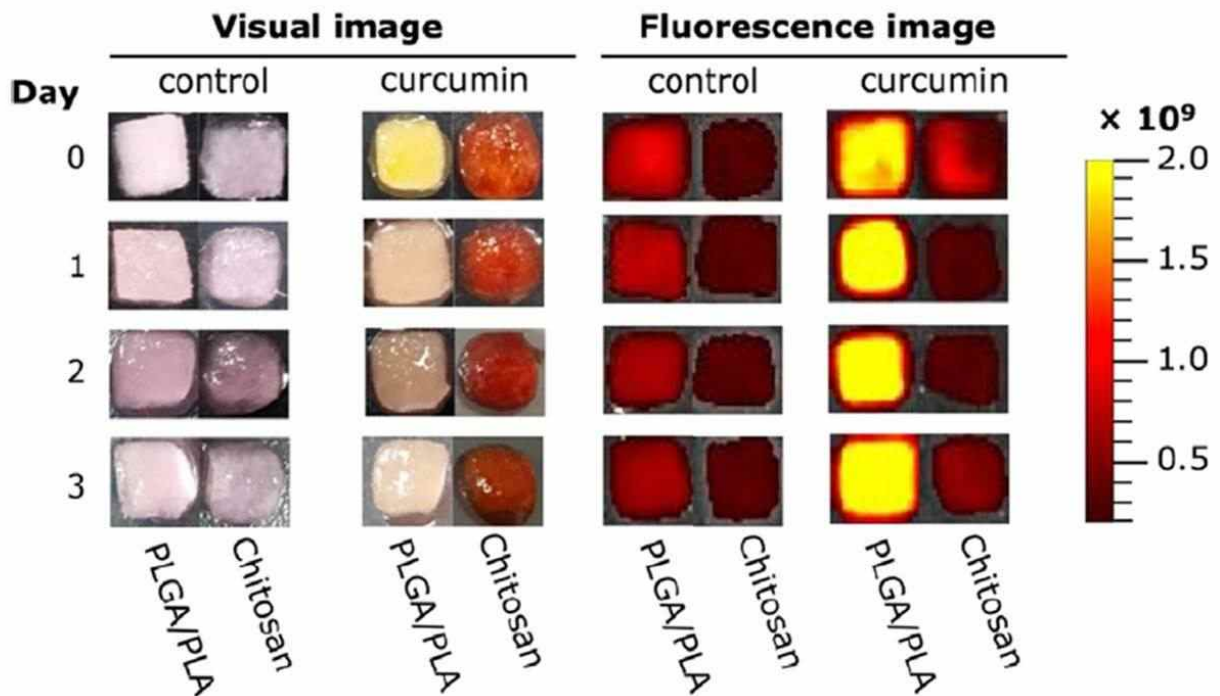
(1) curcumin이 담긴 PLGA/PLA scaffold를 DPPH와 혼합하였다.

이때 DPPH/curcumin의 물 비는 0.75, 7.5로 하였다.

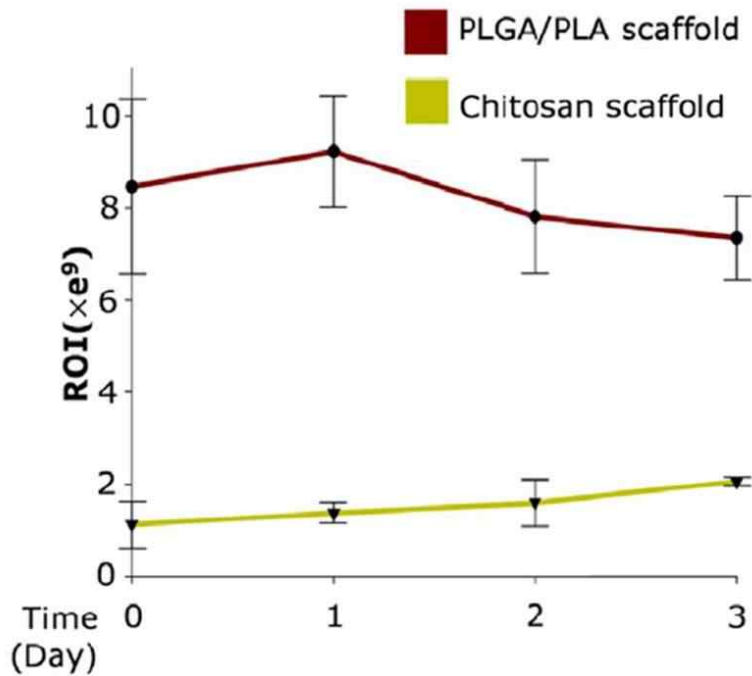
(2) curcumin의 형광을 통해 curcumin의 잔량을 확인 하였다. IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하여 확인하였다.

다. 연구결과

가) scaffold를 선정하기 위해 PLGA/PLA와 키토산으로 만들어진 두 가지 scaffold 각각에 curcumin을 로딩되는 정도를 비교하였다. PLGA/PLA scaffold에 더 많은 curcumin이 로딩되므로 이후 실험에서는 PLGA/PLA scaffold를 사용하였다.

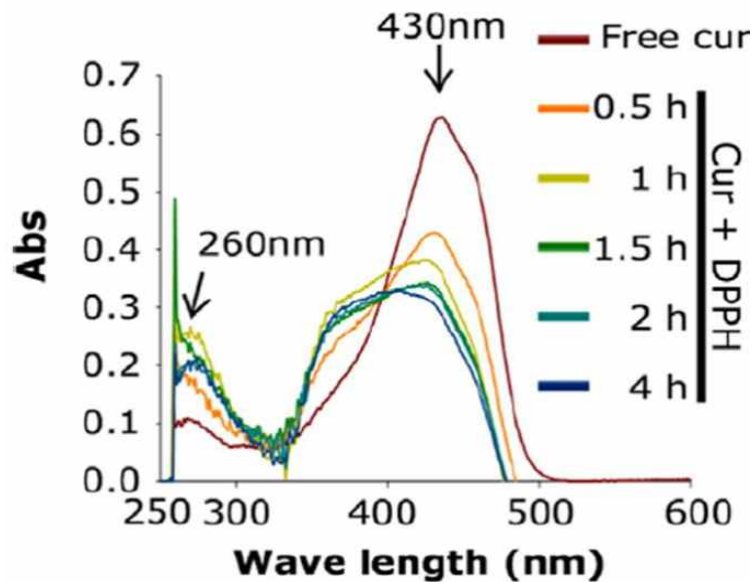


curcumin이 담긴 두가지 scaffold의 이미지



curcumin이 담긴 두가지 scaffold의 형광을 정량화한 그래프

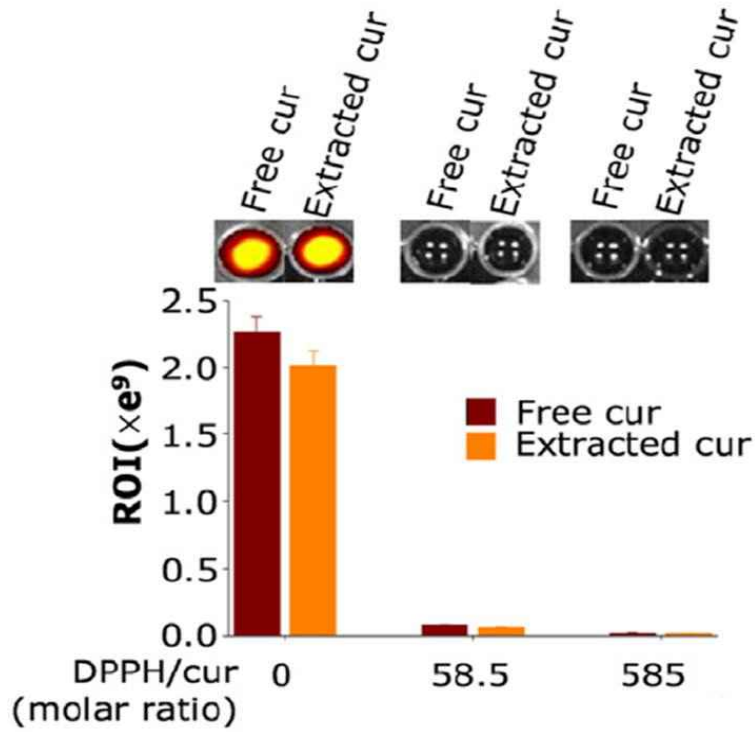
나) curcumin의 항산화 효과 검증한 결과는 아래와 같다. curcumin이 DPPH 라디칼에 의해 산화되면 바이사이클로펜타다이온 (bicyclopentadione)이 되고, 그 흡광은 260 nm에서 가장 높은 것으로 알려져있다. 따라서 반응 시간에 따른 바이사이클로펜타다이온 형성을 통해 curcumin의 항산화효과를 검증하였다.



흡광을 통해 분석한 시간에 따른 바이사이클로펜타다이온 형성 검증

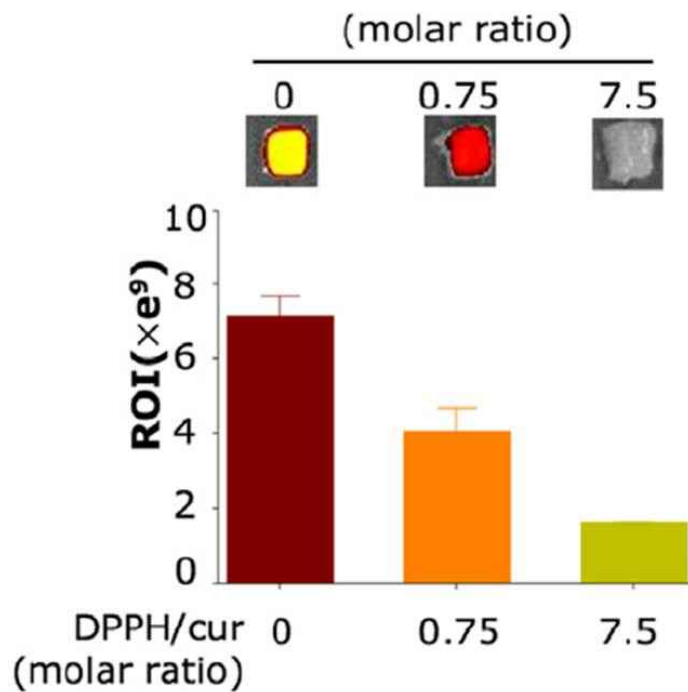
다) 재 추출한 curcumin의 항산화 효과 검증하기 위해 유리 curcumin의 효과와 비교하였다. 이때 두 curcumin간의 큰 차이가 없음을 통해 scaffold에서 나온 curcumin의 활성이 유지되고

있음을 확인하였다.



DPPH 라디칼에 의한 curcumin과 scaffold에서 추출한 curcumin의 형광 감소

라) curcumin이 담긴 PLGA/PLA scaffold의 항산화 효과 검증한 결과는 아래와 같다. DPPH 라디칼의 농도가 증가할수록 scaffold의 형광이 줄어드는 것을 확인하였다. 이는 curcumin이 라디칼에 의해 산화되어 바이사이클로펜타다이온을 형성하며 그 형광을 잃은 것이라 생각된다.



DPPH 라디칼에 의한 scaffold에서 curcumin의 형광 감소

## 7. curcumin의 항산화 효과 모니터링

### 가. 연구내용

curcumin은 항산화와 항염증 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 또한 형광을 띠던 curcumin이 생체 활성을 보이면서 대사체가 되면 그 형광을 잃는다는 특징을 갖고 있으므로, 우리는 질병 모델에서 curcumin의 형광을 통해 활성산소 여부를 측정할 수 있는지 확인하고자 하였다.

### 나. 연구방법

#### 가) In vitro에서 curcumin의 항산화 효과 모니터링

- (1) curcumin과 curcumin/아스코르브산을 메탄올에 녹여 준비하였다. 이때 아스코르브산/curcumin 질량비는 7.8로 하였고, curcumin 기준 농도 0.13, 0.27, 0.55, 1.08, 2.17, 5.43 mM로 준비하였다.
- (2) 메탄올에 녹여 준비한 0.004% DPPH 1 ml에 앞서 준비한 curcumin과 curcumin/아스코르브산 10  $\mu$ l를 넣는다.
- (3) 상온에서 30분간 반응시킨다.
- (4) 라디칼 소거 효과를 검증하기 위해 517 nm에서 흡광을 측정하고, 남아있는 curcumin을 확인하기 위해 IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 통해 관찰하였다.

#### 나) 세포에서 curcumin의 항산화/항염증 효과 모니터링

- (1) 6-well plate의 well마다 mouse 유래 대식세포인 RAW264.7 세포를  $6 \times 10^5$  개씩 배양하였다.
- (2) curcumin과 curcumin/아스코르브산 (아스코르브산/curcumin 질량 비 7.8) 를 curcumin 기준 7.36  $\mu$ g/ml 과 LPS 1  $\mu$ g/ml 처리하여 8시간 동안 인큐베이션 하였다.
- (3) 세포 배양 배지를 제거한 후 PBS를 이용하여 3회 세척하였다.
- (4) 세포를 모두 떼어내 IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)으로 측정하거나 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.

#### 다) 콜라겐 유도 류마티스 관절염 모델에서 curcumin의 항산화/항염증 효과 모니터링

- (1) DBA/1 (6주령, 암컷) mouse의 꼬리 피하에 콜라겐과 CFA를 3주 간격으로 총 2회 주사하여 류마티스 관절염을 유도하였다. 이때 콜라겐과 CFA는 동량으로 준비하였고, 콜라겐은 5 mg/kg으로 주사하였다.
- (2) 한쪽 뒷발의 두께 3.5 mm 이상으로 두꺼워지고, 반대쪽은 정상으로 1.5~1.8 mm인 mouse만 선정하였다.
- (3) mouse의 꼬리 정맥을 통해 curcumin과 curcumin/아스코르브산 (아스코르브산/curcumin 질량 비 7.8)을 투여하였다. curcumin 기준 25 mg/kg으로 주사하였다.
- (4) mouse를 마취한 뒤, 양쪽 발에 보이는 curcumin의 형광을 IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)으로 통해 관찰하였다.
- (5) 1% 이반스 블루 투여를 통해서 혈관 이상여부를 확인하고자 하였고, 이 또한 IVIS

(excitation 535 nm, emission 705 nm)를 이용하여 관찰하였다.

라) curcumin 대사체 중 하나인 페룰산 (Ferullic acid)의 형광 및 흡광 측정

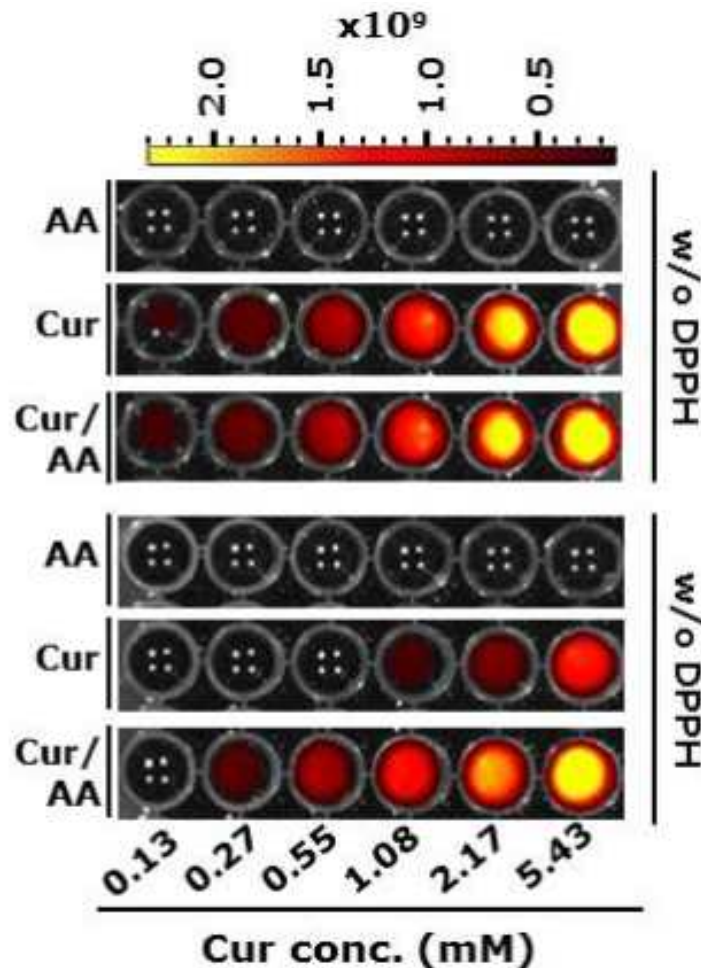
(1) 메탄올에 녹인 페룰산을 농도별로 (0, 0.13, 0.27, 0.55, 1.08, 2.17, 5.43 mM)로 준비하여 IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)으로 측정하거나 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.

(2) 메탄올에 녹인 4.24  $\mu$ M의 페룰산을 파장 200~700 nm에서 흡광 스펙트럼을 측정하였다.

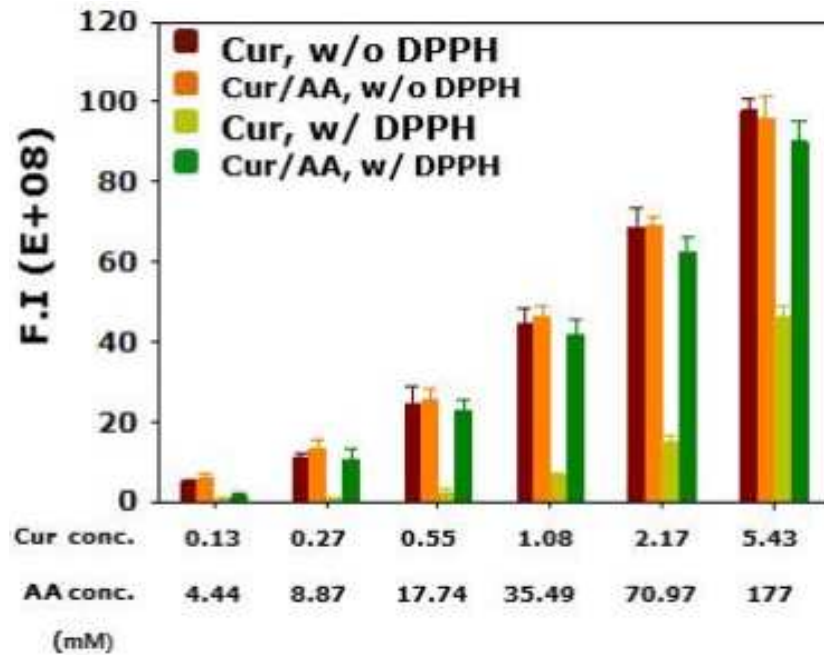
(3) 파장 319 nm에서 페룰산의 농도 (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu$ M)에 따른 흡광을 측정하였다.

다. 연구결과

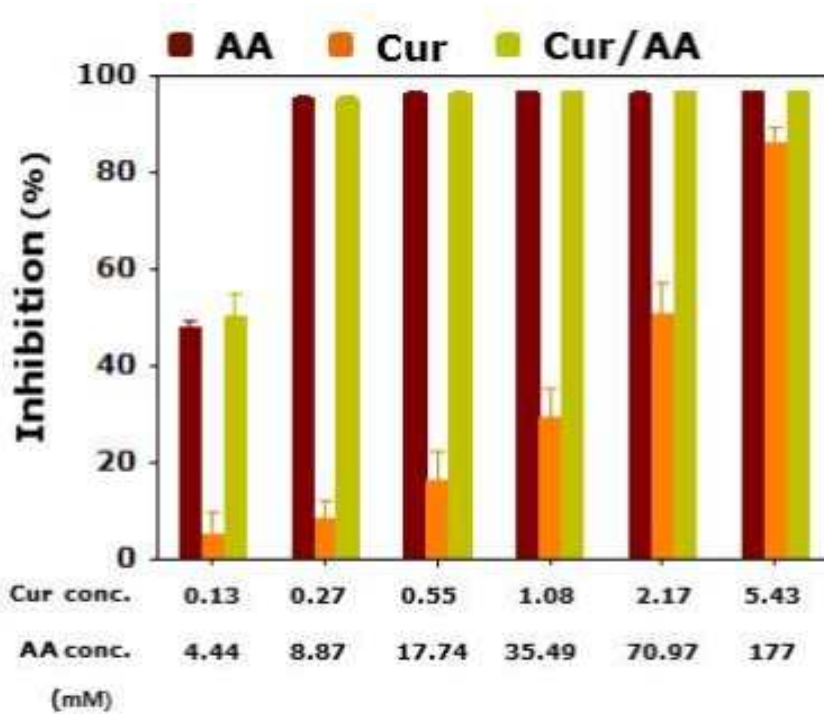
가) In vitro에서 curcumin의 항산화 효과 모니터링한 결과는 아래와 같다. 대조군으로 사용한 아스코르브산 (AA) 은 뛰어난 항산화 효과를 갖고 있으나 형광이 없다. 또한 DPPH 라디칼 부재 시 curcumin과 curcumin/AA의 형광은 같았다. 그러나 DPPH 라디칼이 존재하는 경우 curcumin/AA의 형광이 curcumin에 비해 높게 나타났다. DPPH 라디칼 소거율 그래프에서 보여주듯 아스코르브산이 높은 라디칼 소거율을 보이기 때문에 curcumin이 DPPH 라디칼에 의해 산화되면서 형광을 잃었다는 것을 확인 할 수 있었고, 이것이 활성산소의 유무를 판단할 수 있는 요소라는 것을 확인하였다.



DPPH 라디칼 소거 후 curcumin과 curcumin/AA의 형광 감소 분석 이미지



DPPH 라디칼 소거 후 curcumin과 curcumin/AA의 형광 감소 분석 이미지

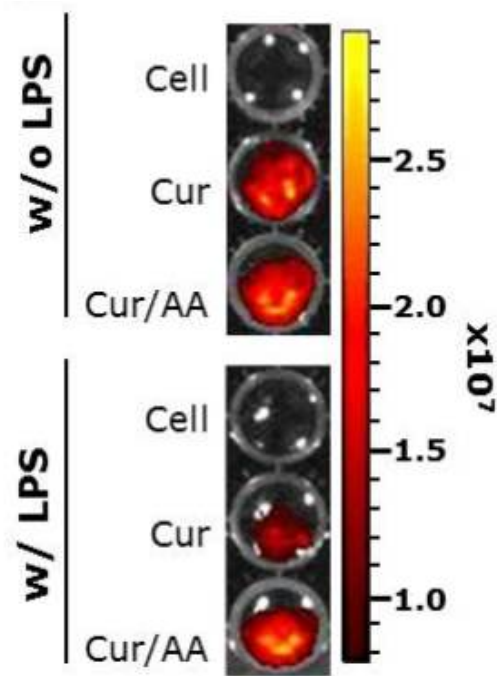


curcumin과 curcumin/AA의 DPPH 라디칼 소거율

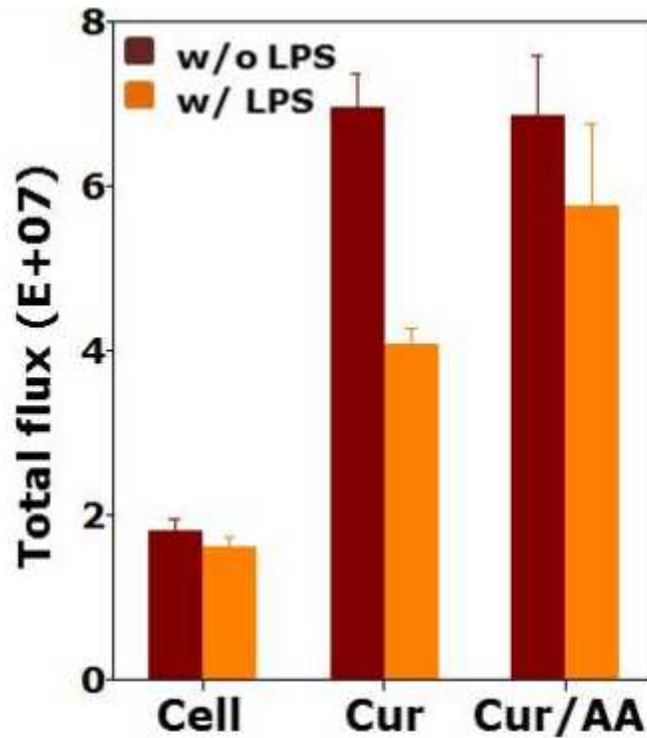
나) 세포에서 curcumin의 항산화/항염증 효과 모니터링한 결과는 아래와 같다. IVIS를 통해 관찰한 LPS 부재 시 curcumin과 curcumin/AA의 형광은 같았다. 그러나 LPS가 있을 때는 curcumin/AA의 형광이 더 높게 나타났다. 공초점 현미경을 통해 관찰한 결과 역시



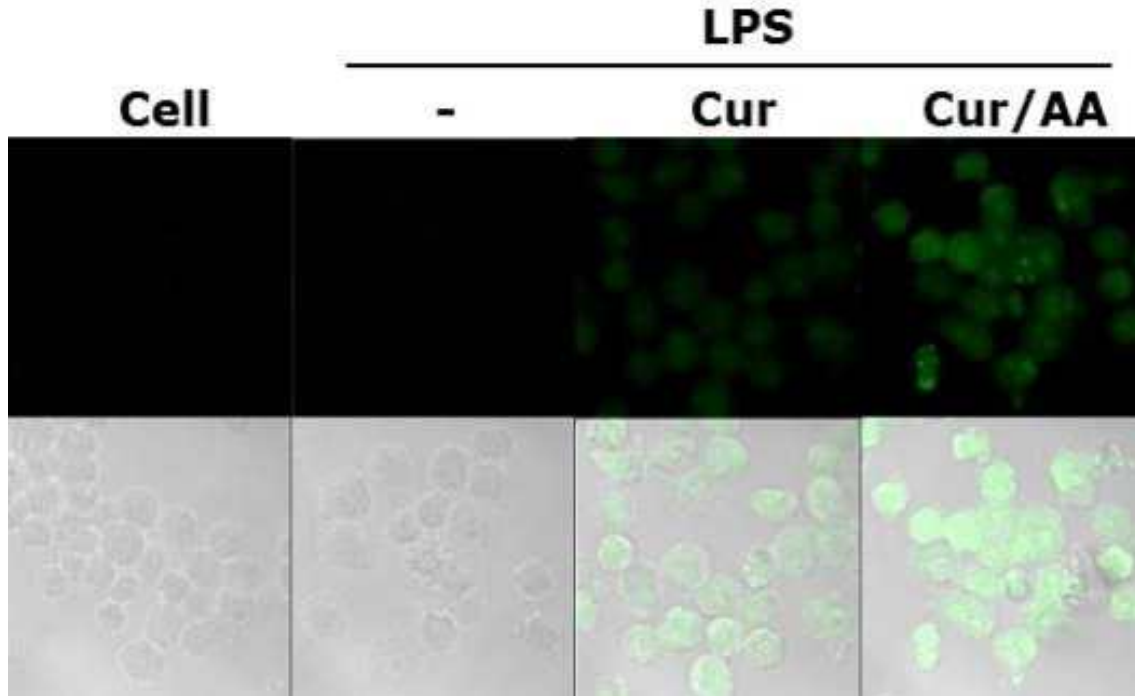
curcumin/AA의 형광이 curcumin을 처리한 그룹보다 높았다. 이는 아스코르브산이 항산화/항염증효과를 갖기 때문에 curcumin이 덜 사용된 결과로 curcumin의 형광 감소를 통해 산화 스트레스 또는 염증 상황인지 모니터링이 가능하다는 것을 알 수 있다.



IVIS를 통해 분석한 LPS로 염증을 유도한 세포에 남아있는 curcumin의 형광

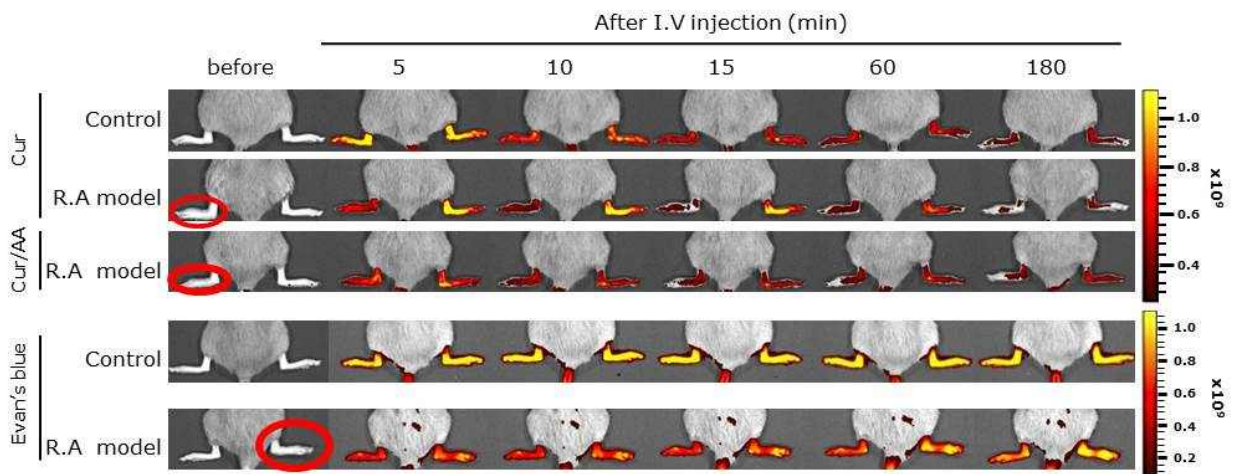


IVIS를 통해 분석한 LPS로 염증을 유도한 세포에 남아있는 curcumin의 형광을 정량화한 그래프



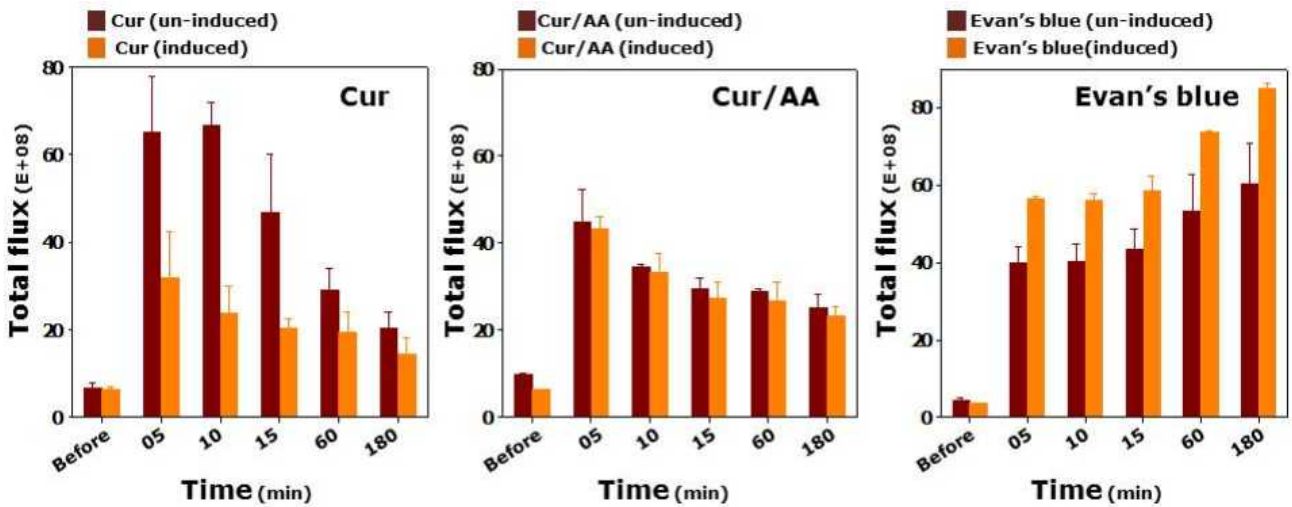
공초점 현미경을 통해 분석한 LPS로 염증을 유도한 세포에 남아있는 curcumin

다) 콜라겐 유도 류마티스 관절염 모델에서 curcumin의 항산화/항염증 효과 모니터링한 결과는 아래와 같다. 대조군에 curcumin을 투여하였을 때는 양쪽 발의 형광이 유사하게 나타났고, 시간이 지남에 따라 유사하게 감소했다. 그러나 류마티스 관절염 모델의 경우는 발병 부위의 형광이 더 적게 나타났고, curcumin/AA를 투여했을 때는 양발의 형광이 같게 나타났다. 이러한 차이가 혈관 이상으로 인한 문제인지 확인하고자 이반스 블루를 투여한 결과 관절염 발병 유무와 상관없이 형광의 세기가 같았다. 이로써 정맥투여로 전달된 형광이 양발에 같은 양으로 전달되고, 발병부위에서는 빠르게 소모되어 형광이 적게 나타나는 것으로 판단하였다.



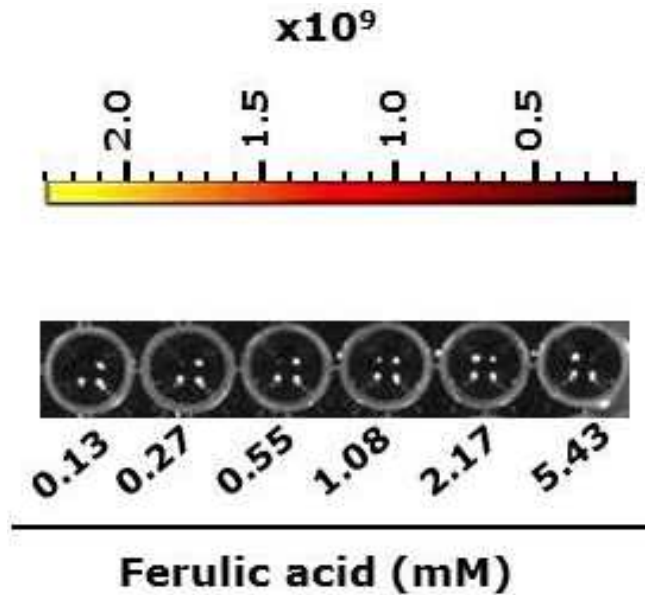
류마티스 관절염 모델에 curcumin, curcumin/AA, 이반스 블루 투여 후 시간에 따른 형광 이미지

빨간색 동그라미는 환부이다.

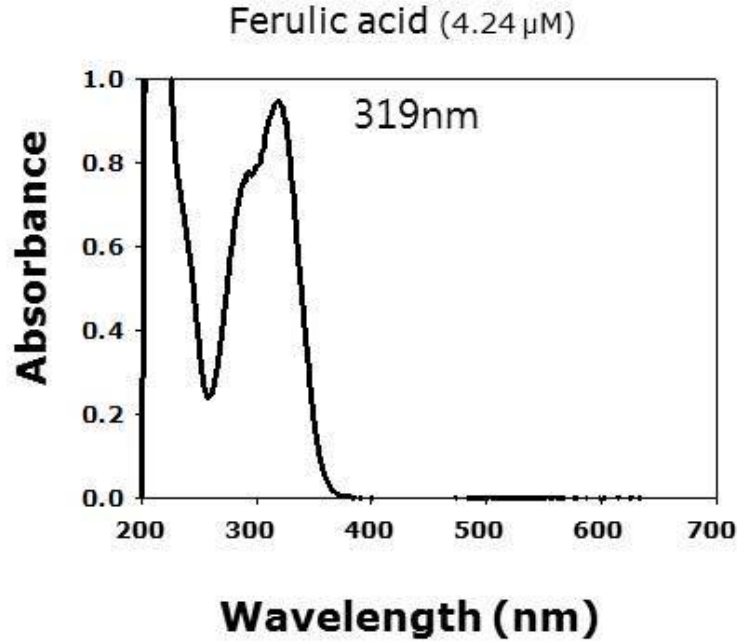


curcumin, curcumin/AA, 이반스 블루 투여 후 시간에 따른 형광을 정량화한 그래프

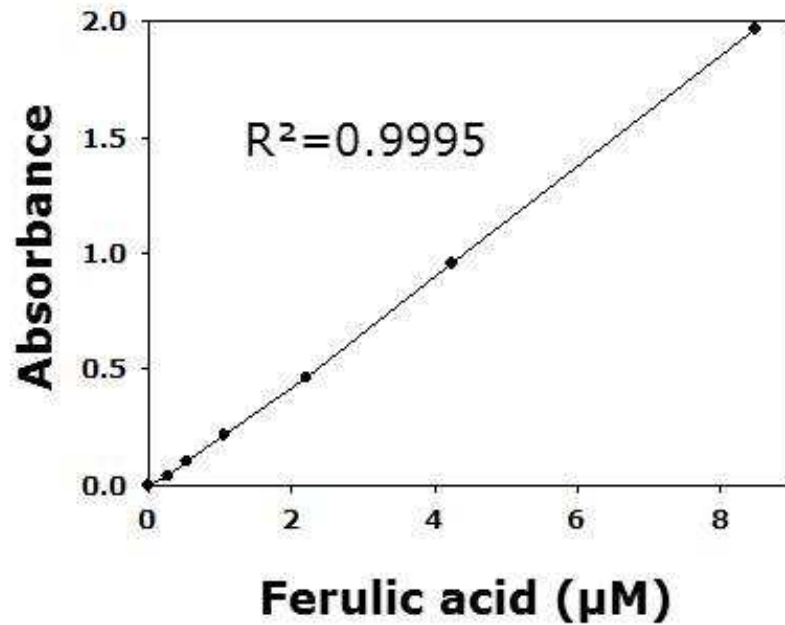
라) curcumin 대사체 중 하나인 페룰산 (Ferullic acid)의 형광 및 흡광 측정과 형광이 나타나지 않았다. 이 것은 페룰산이 319 nm에서 흡광이 가장 높고 해당 파장대에서는 흡광이 농도에 따라 차이가 남을 확인하였다. 이로써 앞서 형광 이미징을 통해 분석한 결과가 curcumin의 형광을 측정 한 것임을 확인 할 수 있었다.



IVIS를 이용하여 Ex\_430 nm, Em\_509 nm에서 페룰산의 형광을 측정 한 이미지



페룰산의 흡광 스펙트럼을 측정한 결과



319 nm에서 측정한 페룰산 농도에 따른 흡광

## 8. exosome을 이용한 curcumin의 생체 안정성 증대

### 가. 연구내용

curcumin의 항산화, 항염증, 항암 등 다양한 생체 활성을 갖고 있지만, 빠르게 대사되고 분해

된다는 단점을 갖고 있다. 따라서 생체 유래 물질인 exosome을 이용하여, curcumin의 체내 안정성을 증대 시키고자 하였다.

#### 나. 연구방법

##### 가) curcumin이 담긴 exosome 준비

- (1) Exoquick-TC를 이용하여 소태아 혈청 (FBS)에서 exosome을 분리하였다.
- (2) DMSO에 curcumin을 1 mg/ml로 녹인다.
- (3) exosome과 curcumin을 혼합하여 37°C에서 2시간 반응 시켰다. 이때 빛은 차단하였으며, exosome 단백질: curcumin의 질량비를 20:1로 반응시켰다.
- (4) exosome에 담기지 않은 curcumin을 제거하기 위해 Nanosep을 실시하였다. 이로써 curcumin/엑소를 준비하였다 [Macromol. Biosci. 18(12):e1800301 (2018)].

##### 나) 수용액에서 안정성 평가

- (1) curcumin과 curcumin/엑소를 PBS에 희석하여 37°C에서 인큐베이션하였다.
- (2) 인큐베이션 시간에 따라 (0, 30, 60, 90, 120, 150 분) 430 nm에서 측정되는 흡광을 통해 curcumin의 안정성을 평가하였다.
- (3) 또한 같은 인큐베이션 시간에 측정되는 형광을 통해 curcumin의 안정성을 평가하였다. IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하여 측정하였다.

##### 다) curcumin/엑소의 항산화 효과 검증

- (1) curcumin과 curcumin/엑소를 에탄올에 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 µg/ml이 되도록 희석하였다.
- (2) 준비한 curcumin과 curcumin/엑소를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM)과 혼합하여 반응시켰다. 이때 샘플: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 부피 비는 1:2로 하였다.
- (3) 10 분간 반응 시킨 뒤, 230 nm에서 흡광을 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 소거된 정도를 파악하였다.
- (4) curcumin과 curcumin/엑소를 1% Triton X-100에 녹인 뒤 DPPH와 희석하였다. 이때 curcumin의 농도는 8 µg/ml로 하였고 DPPH/curcumin의 질량비는 0, 0.1, 1, 2, 5, 그리고 10로 준비하였다.
- (5) 샘플:DPPH를 부피비 1:1로 혼합 한 뒤 30분간 인큐베이션 하였다.
- (6) curcumin의 형광을 측정 하므로써 남아있는 curcumin을 측정하였다. IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하여 측정하였다.

##### 라) 세포 생존률 측정

- (1) 96-well plate의 well마다 mouse 유래 대식세포인 RAW264.7 세포를 3x10<sup>4</sup> 개씩 배양하였다.
- (2) curcumin과 curcumin/엑소를 curcumin 기준 0, 25, 50, 100, 그리고 200 µM 처리하였다.
- (3) 2시간 뒤, CCK-8 분석법을 통해 세포 생존률을 평가하였다.

##### 마) 활성산소 탐지

- (1) 6-well plate의 well마다 mouse 유래 대식세포인 RAW264.7 세포를 6x10<sup>5</sup> 개씩 배양하였다.

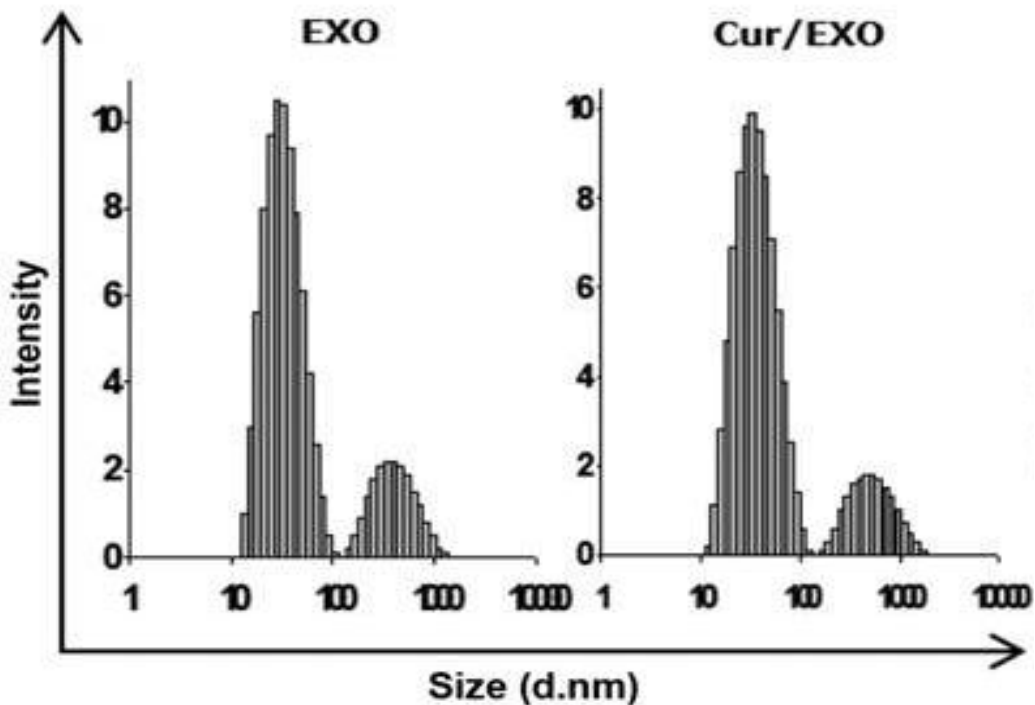
- (2) curcumin과 curcumin/엑소를 curcumin 기준 0, 25, 50, 100, 그리고 200  $\mu\text{M}$  처리하여 2시간 동안 인큐베이션 하였다.
- (3) 100  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 추가하여 30분간 더 인큐베이션 하였다.
- (4) 세포를 떼어내어 세포에 남아있는 curcumin을 측정하였다. IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하였다.

바) In vivo에서 curcumin과 curcumin/엑소의 형광 비교 관찰

- (1) 실험용 mouse의 발등에 curcumin과 curcumin/엑소를 curcumin 기준 0.12 mg/kg subcutaneous로 주사하였다.
- (2) 1분 뒤 IVIS (excitation 430 nm, emission 509 nm)를 이용하여 발등의 형광을 관찰하였다.

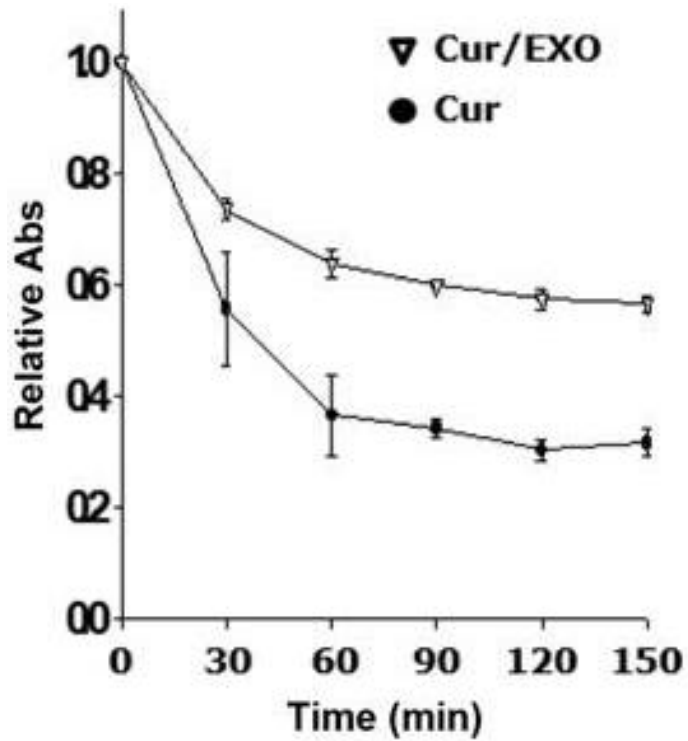
다. 연구결과

가) curcumin이 담긴 exosome을 준비한 결과 크기에 큰 변화 없이 exosome이 형성됨을 확인하였다.

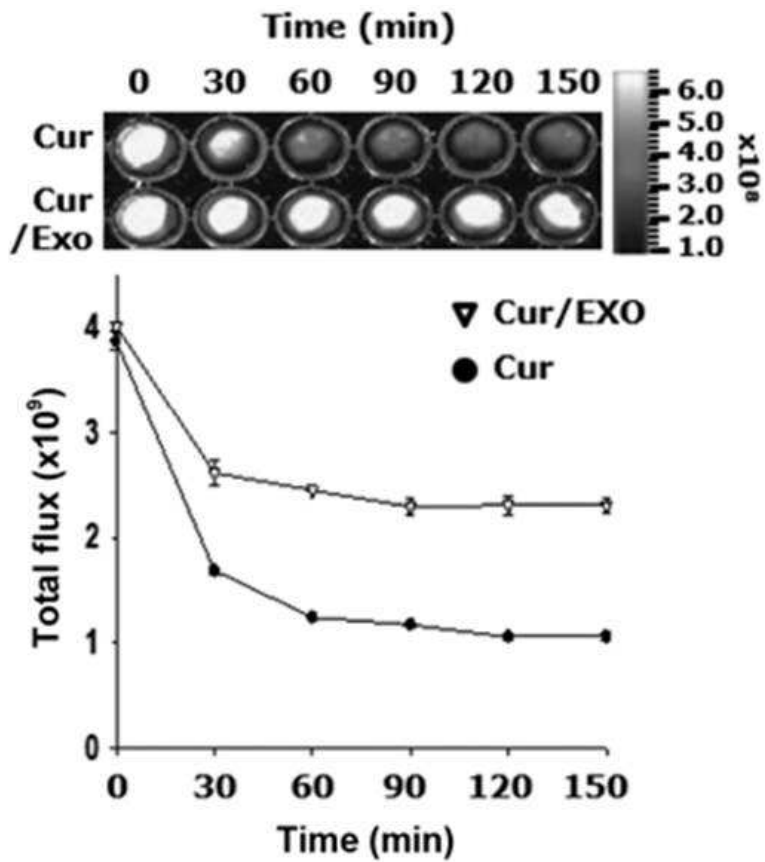


DLS를 이용한 exosome과 curcumin/엑소의 사이즈 측정

나) 수용액에서 안정성 평가한 결과는 아래와 같다. 시간에 따른 curcumin과 curcumin/엑소의 흡광과 형광을 비교분석한 결과 curcumin이 흡광과 형광이 빠르게 감소한 반면 curcumin/엑소는 유지되는 것을 확인 할 수 있었다.



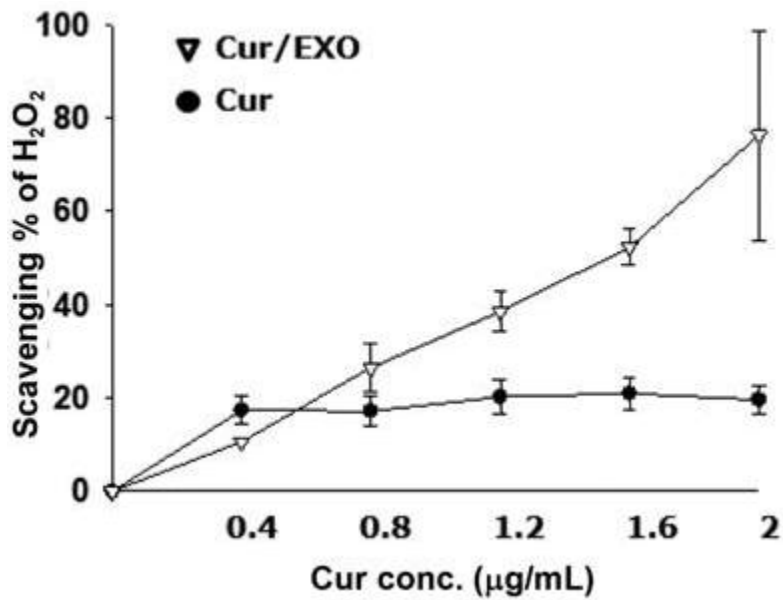
curcumin과 curcumin/엑소의 시간에 따른 흡광 분석



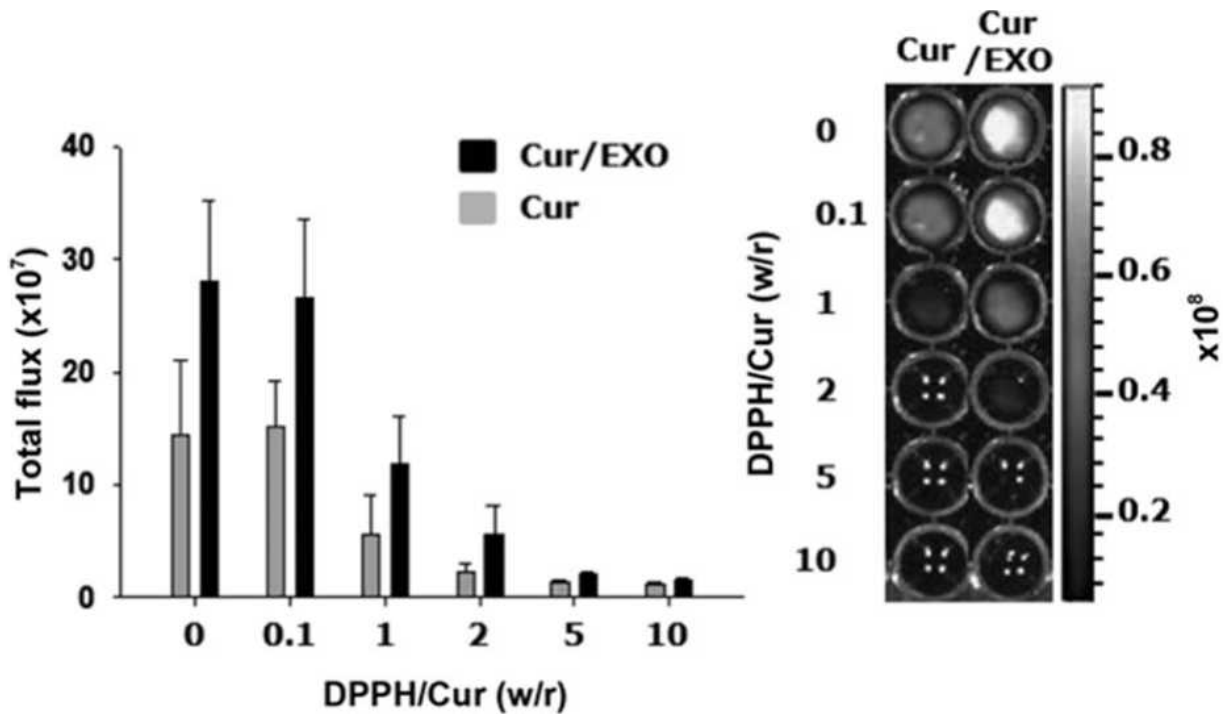
curcumin과 curcumin/엑소의 시간에 따른 형광 이미지와 형광을 정량적으로 나타낸 그래프

다) curcumin/엑소의 항산화 효과 검증한 결과는 아래와 같다. curcumin 기준 농도가 같을 때

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거율이 curcumin/엑소가 더 뛰어남을 확인하였다. 또한 DPPH 라디칼 소거에 사용되고 남은 curcumin을 형광으로 비교하였을때 curcumin/엑소가 더 많이 남아있음을 확인하였다.



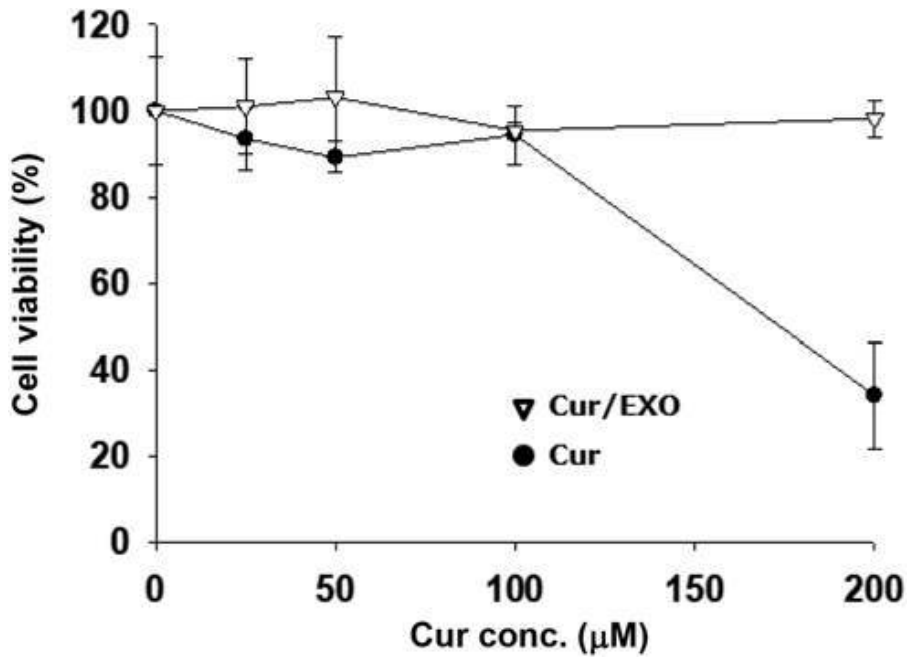
curcumin과 curcumin 엑소의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거율 그래프



DPPH 라디칼 소거 후 curcumin과 curcumin 엑소의 형광을 정량적으로 나타낸 그래프와 이미지

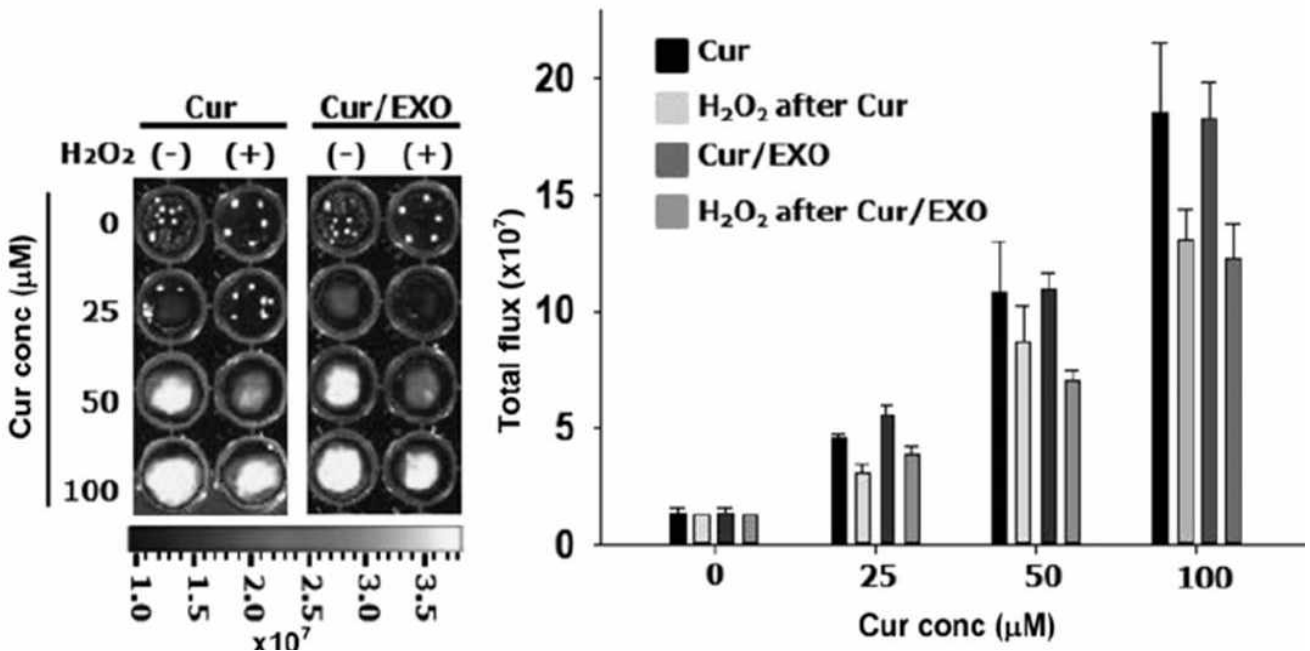
라) 세포 생존률 측정한 결과는 아래와 같다. mouse 유래 대식세포인 RAW264.7 세포에 curcumin과 curcumin/엑소를 처리한 결과 curcumin은 고농도에서 세포의 생존율을 떨어트리는 반면 curcumin/엑소는 유지되고 있음을 확인하였다.





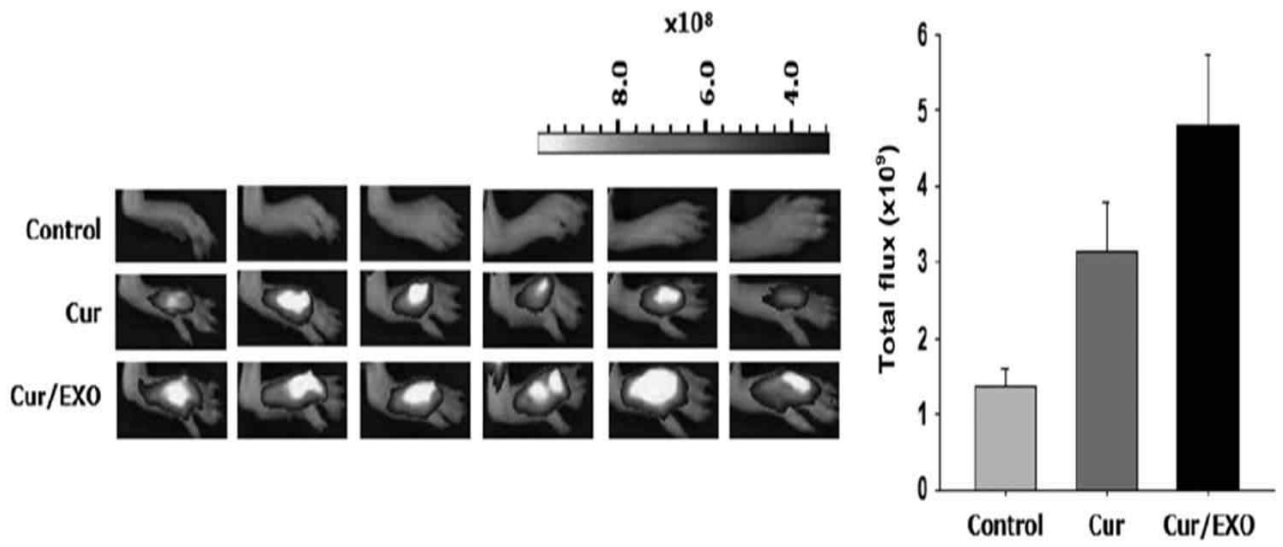
측정한 curcumin과 curcumin/엑소 처리 후 RAW264.7 세포의 생존을 분석

마) 활성산소 탐지한 결과는 아래와 같다. curcumin과 curcumin/엑소 모두에서 활성산소 존재 시 형광이 줄어드는 것을 통해 활성산소 유무를 확인할 수 있다.



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거 후 curcumin과 curcumin 엑소의 형광 이미지와 형광을 정량적으로 나타낸 그래프

바) In vivo에서 curcumin과 curcumin/엑소의 형광 비교 관찰한 결과는 아래와 같다. curcumin 투여 시 대조군에 비하여 형광이 나타난 것을 확인하였고, 시간이 지남에 따라 그 형광이 빠르게 줄어들었으나, curcumin/엑소의 경우 시간이 지나도 높은 형광이 유지되고 있었다.



curcumin과 curcumin 엑소를 투여한 발등의 형광 이미지와 그 형광을 정량적으로 나타낸 그래프

## 2절. 약용작물(당귀) 유래 coumarin의 항산화 효과 검증

### 1. 당귀 유래 coumarin의 항산화 효과 검증

#### 가. 연구내용

약용작물인 당귀는 한방에서 빈혈에 의한 두통 완화에 좋은 당귀보혈탕과 총명탕에 사용되고 있는 약재이며, 인지기능저하 예방을 위한 건강기능 식품에도 함유되어있다. 따라서 당귀에 함유된 coumarin의 항산화 효과를 분석하고, 이 coumarin 간의 시너지 효과가 있는지 확인하고자 하였다. 해당 연구에서는 umberiferone, angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin을 선정하여 연구를 수행하였다.

#### 나. 연구방법

##### 가) DPPH 라디칼 소거율 검증

(1) 당귀 유래 coumarin들을 DMSO에 녹인 뒤 에탄올로 희석하여 준비하였다.

(2) 에탄올에 녹인 DPPH를 준비하였다.

(3) coumarin (1.6 그리고 8.1 mg/ml)과 DPPH (26.3  $\mu\text{g}$ )을 반응시켰다.

이때 반응은 에탄올과 0.1 M 아세트산 (pH 5.5)이 부피비 1:2로 혼합된 용매를 사용하였고, 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 반응 시켰다.

(4) 517 nm에서 흡광을 측정하여 DPPH 라디칼 소거율을 분석하였다.

##### 나) 과산화수소를 통한 항산화 효과 검증

(1) 당귀 유래 coumarin들을 20 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 혼합하여 반응시켰다.

이때 coumarin의 농도는 4.1과 8.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였다.

(2) 상온에서 10분간 반응 시킨 뒤, 230 nm에서 흡광을 측정하였다.

##### 다) 대식 세포에서 확인한 당귀유래 coumarin의 항산화 효과 검증

(1) mouse 유래 대식 세포인 RAW264.7 세포에 각 coumarin을 처리 후 2시간 인큐베이션 하였다.

(2) 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 추가하였다.

(3) 세포를 세척한 후 20  $\mu\text{M}$ 의 DCFH-DA를 처리하여 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 인큐베이션 하였다.

(4) 세포를 PBS를 이용하여 3회 세척하였다.

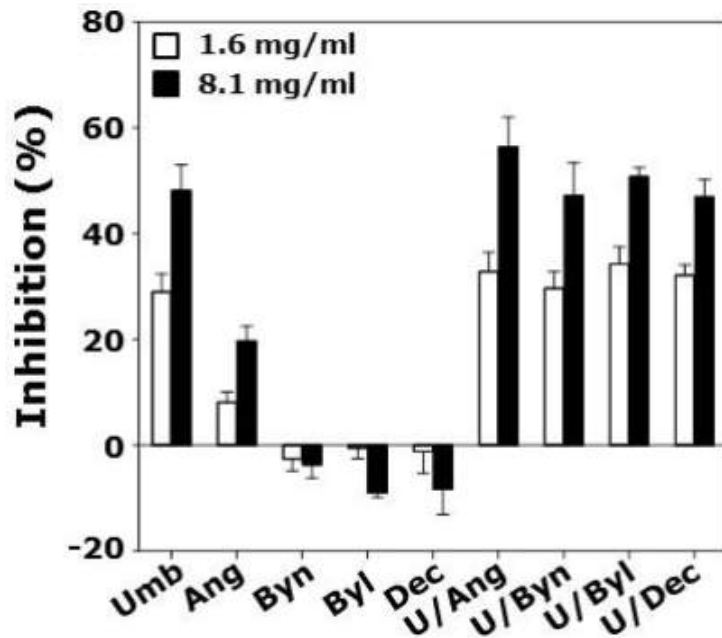
(5) triton X-100을 이용하여 세포를 용해시킨 뒤, fluorometer (excitation 495 nm, emission 530 nm)에서 형광을 측정하였다.

#### 다. 연구결과

(1) 당귀 유래 coumarin이 단독 그리고 혼합물일때 각각의 항산화 효과는 다음과 같다.

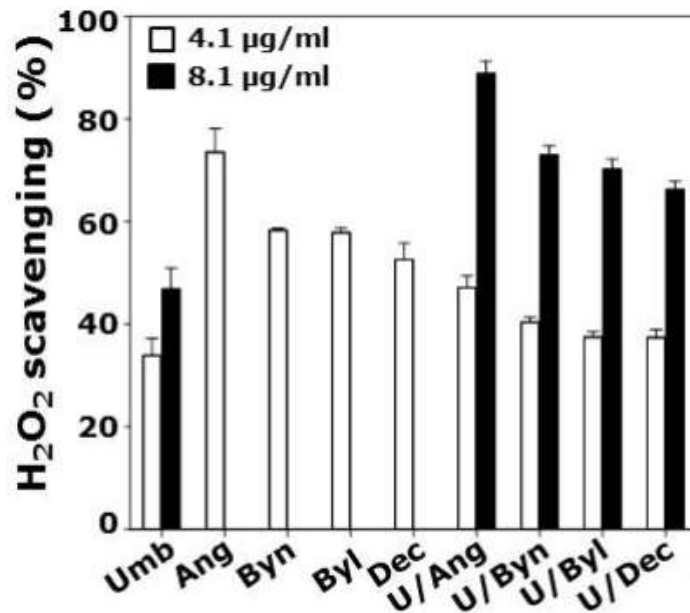
가) DPPH 라디칼 소거율 검증한 결과 아래와 같았다. umberiferone이 가장 뛰어난 소거율을 나타내었고, 그 다음으로 angelicin이 높게 나타났다. 그러나 byakangelicin, byakangelicol,

decursin의 소거율은 측정할 수 없었다. 또한 umberiferone과 다른 coumarin들을 혼합하였을 때의 DPPH 라디칼 소거율은 umberiferone 단독일 때와 차이가 없었으므로, 시너지 효과는 없는 것으로 보인다.



당귀 유래 coumarin이 단독 또는 혼합물인 경우 DPPH 라디칼 소거율

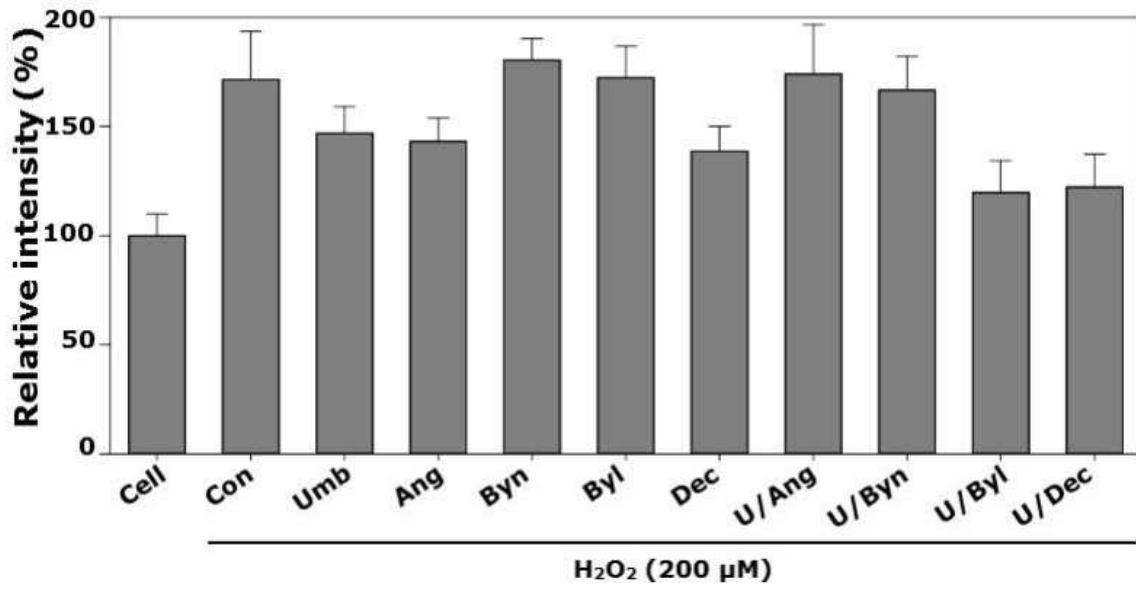
나) 과산화수소를 통한 항산화 효과 검증한 결과 아래 그래프와 같이 나타났다. DPPH 라디칼 소거율의 결과와 달리 umberiferone이 가장 낮은 항산화 효과를 보이는 것으로 나타났다. 혼합물의 항산화효과 역시 각 coumarin 단독일 때에 비해 시너지효과를 발견할 수는 없었다.



당귀 유래 coumarin이 단독 또는 혼합물인 경우 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거율

다) 대식 세포에서 확인한 당귀유래 coumarin의 항산화 효과 검증한 결과는 아래와 같다. 과산화수소에 의해 세포내 활성산소가 170%가량 증가하였고, coumarin을 처리한 결과 세포내

활성 산소 발생율이 감소하였으나, 이 역시 혼합물에 의한 시너지 효과는 확인 할 수 없었다.



당귀 유래 coumarin이 단독 또는 혼합물인 경우 세포내 활성산소 억제 효과

### 3절. 약용 작물(당귀) 유래 coumarin에 의한 활성물질의 뇌로의 전달 강화

#### 1. 당귀 유래 coumarin인 umberiferone의 체내 분포

##### 가. 연구내용

약용작물인 당귀는 한방에서 빈혈에 의한 두통 완화에 좋은 당귀보혈탕과 총명탕에 사용되고 있는 약재이며, 인지기능저하 예방을 위한 건강기능 식품에도 함유되어있다. 따라서 당귀의 성분 중 활성물질의 뇌로의 전달을 강화하는 성분을 찾고자 하였다. 당귀 유래 coumarin 중 형광을 띄어 이미징을 통한 분포 분석이 가능한 umberiferone을 표적물질로 선정하였다.

##### 나. 연구방법

###### 가) 이미징을 통한 umberiferone의 분포 확인

- (1) umberiferone을 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (2) umberiferone 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.
- (3) ICR (6 주령, 암컷)에 umberiferone 기준 160, 320 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.
- (4) 15 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 umberiferone의 형광을 측정하였다.
- (5) 형광 분석은 Spectral Instruments Imaging의 Lago-X (excitation 360 nm, emission 490 nm)를 사용하였다.

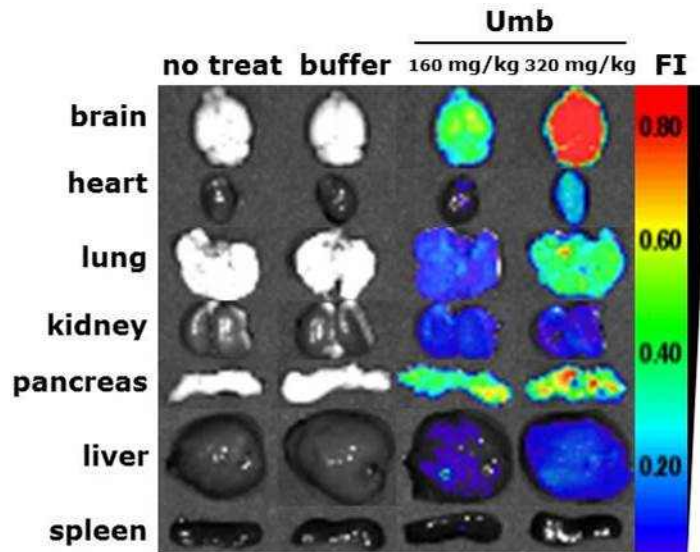
###### 나) 추출 방식을 통한 umberiferone의 체내분포 비교

- (1) 각 장기의 무게를 측정한 뒤, 해당 무게의 3배의 PBS를 넣고 장기를 균질화하였다.
- (2) 장기 균질액, 10% SDS, ethyl acetate를 부피 비 1 : 0.5 : 5가 되도록 혼합하였다.
- (3) 원심분리하여 상층액을 분리한 뒤, 상온에서 건조시켰다.
- (4) DMSO를 이용하여 추출된 umberiferone을 다시 녹였다.
- (5) 추출된 umberiferone의 형광 측정을 통해 각 장기로 전달된 umberiferone 양을 분석하였다. fluorometer (excitation 325 nm, emission 495 nm)를 사용하였다.

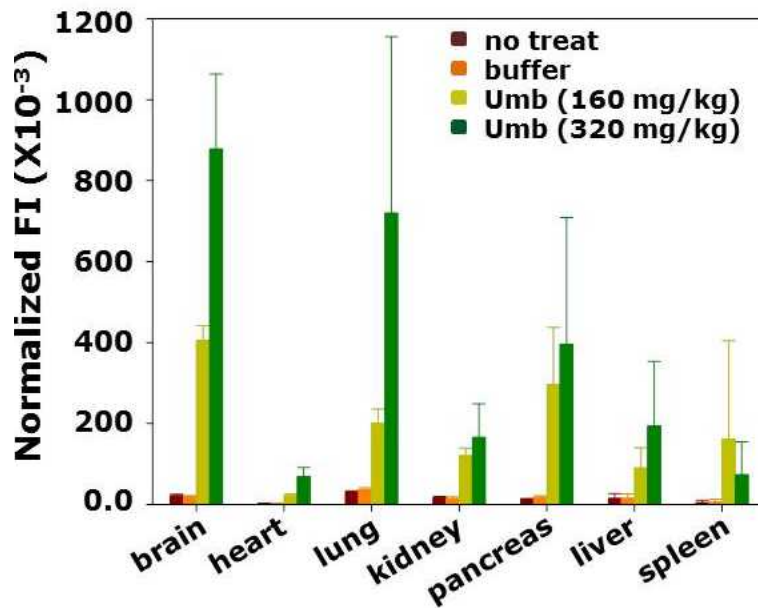
##### 다. 연구결과

- (1) 이미징을 통한 umberiferone의 정맥 투여 15분 후 체내 분포는 다음과 같다. umberiferone이 뇌, 이자, 그리고 폐로 많이 전달됨을 확인하였다. 약물의 체내분포를 확인하는 기존의 방식인 추출방식과 이미징 방식의 상관관계를 파악하고자, 해당 장기들에서 umberiferone을 추출하여 그 분포를 분석해 보았다. 이때 이미징 방식과 유사함을 확인하므로써 이미징을 통한 umberiferone의 체내 분포 확인이 가능함을 확인 할 수 있었다.

가) 이미징을 통한 umberiferone의 분포 확인한 결과 뇌, 폐, 이자로 많은 양의 umberiferone이 전달되었음을 확인하였다.

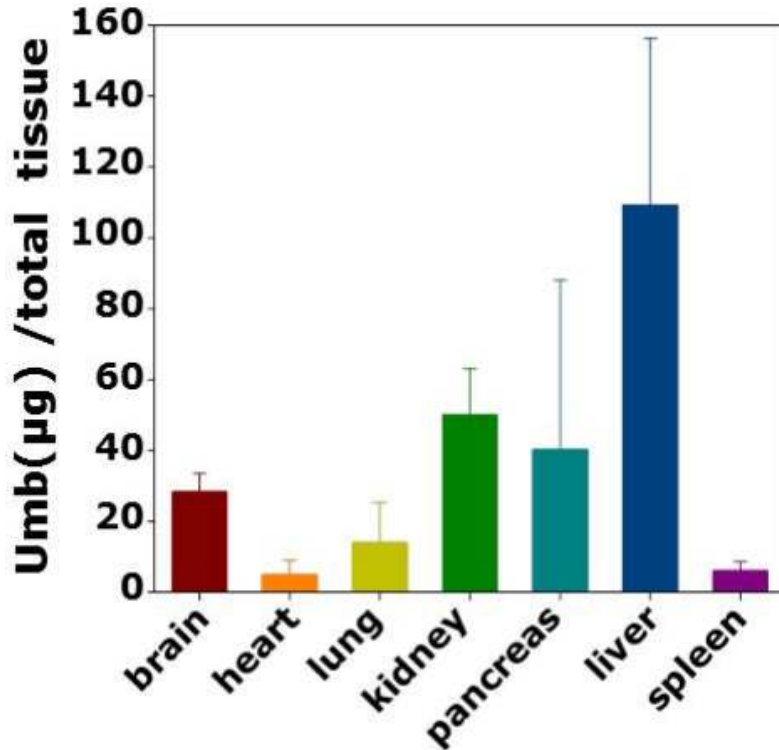


umberiferone 투여 15분 뒤 각 장기에서 측정된 umberiferone의 형광



umberiferone 투여 15분 뒤 각 장기에서 측정된 umberiferone의 형광을 정량적으로 나타낸 그래프

나) 추출 방식을 통한 umberiferone의 체내분포 비교한 결과는 아래와 같다. 가장 큰 장기인 간에 많은 양이 추출되었으나, 그 밖의 장기들은 뇌, 폐, 신장, 이자에서 많은 umberiferone이 전달된 것으로 확인되었다.



추출방식을 통해 확인한 각 장기로 전달된 umbiferone의 양

## 2. 당귀유래 coumarin에 의한 umbiferone의 체내 분포 변화

### 가. 연구내용

다른 coumarin에 의하여 뇌로 umbiferone의 전달량이 증가하는지 확인하고자 하였다.

### 나. 연구방법

가) 이미징 방식과 추출 방식을 통해 분석한 혼합물 정맥 투여 2 분 뒤 umbiferone의 체내 분포

(1) umbiferone과 다른 당귀 유래 coumarin (angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)을 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 umbiferone과 다른 coumarin은 질량비 1:1이 되도록하였다.

(2) umbiferone과 다른 당귀 유래 coumarin이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.

(3) ICR (6 주령, 암컷)에 umbiferone 기준 80 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.

(4) 2 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 umbiferone의 형광을 측정하였다.

(5) 형광 분석은 Spectral Instruments Imaging의 Lago-X (excitation 360 nm, emission 490 nm)를 사용하였다.

(6) 각 실험군 별 뇌에서 umbiferone을 추출하여 그 양을 비교하였다. 이때 umbiferone을 추출한 방식은 앞서 사용한 방식과 동일했다.



나) 이미징 방식과 추출 방식을 통해 분석한 혼합물 정맥 투여 15 분 뒤 umberiferone의 체내 분포

(1) umberiferone과 다른 당귀 유래 coumarin (angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)을 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 umberiferone과 다른 coumarin은 질량비 1:1이 되도록하였다.

(2) umberiferone과 다른 당귀 유래 coumarin이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.

(3) ICR (6 주령, 암컷)에 umberiferone 기준 40 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.

(4) 15 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 umberiferone의 형광을 측정하였다.

(5) 형광 분석은 Spectral Instruments Imaging의 Lago-X (excitation 360 nm, emission 490 nm)를 사용하였다.

(6) 각 실험군 별 뇌에서 umberiferone을 추출하여 그 양을 비교하였다. 이때 umberiferone을 추출한 방식은 앞서 사용한 방식과 동일했다.

다) umberiferone외 coumarin의 형광 측정

(1) 당귀 유래 coumarin (angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)과 당귀 추출물을 DMSO에 녹여 준비하였다.

(2) 당귀 유래 coumarin (angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)과 당귀 추출물이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.

(3) ICR (6 주령, 암컷)에 당귀 유래 coumarin 40 mg/kg 과 당귀 추출물 120 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.

(4) 15 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 umberiferone의 형광을 측정하였다.

(5) 형광 분석은 Spectral Instruments Imaging의 Lago-X (excitation 360 nm, emission 490 nm)를 사용하였다.

라) 뇌혈관장벽 검증

(1) umberiferone과 다른 당귀 유래 coumarin(angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)을 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 umberiferone과 다른 coumarin은 중량 비 1:1이 되도록 하였다.

(2) umberiferone과 다른 당귀 유래 coumarin이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.

(3) ICR (6 주령, 암컷)에 umberiferone 기준 40 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.

(4) 15 분 뒤 PBS에 녹인 1% 이반스 블루를 정맥 투여하였다.

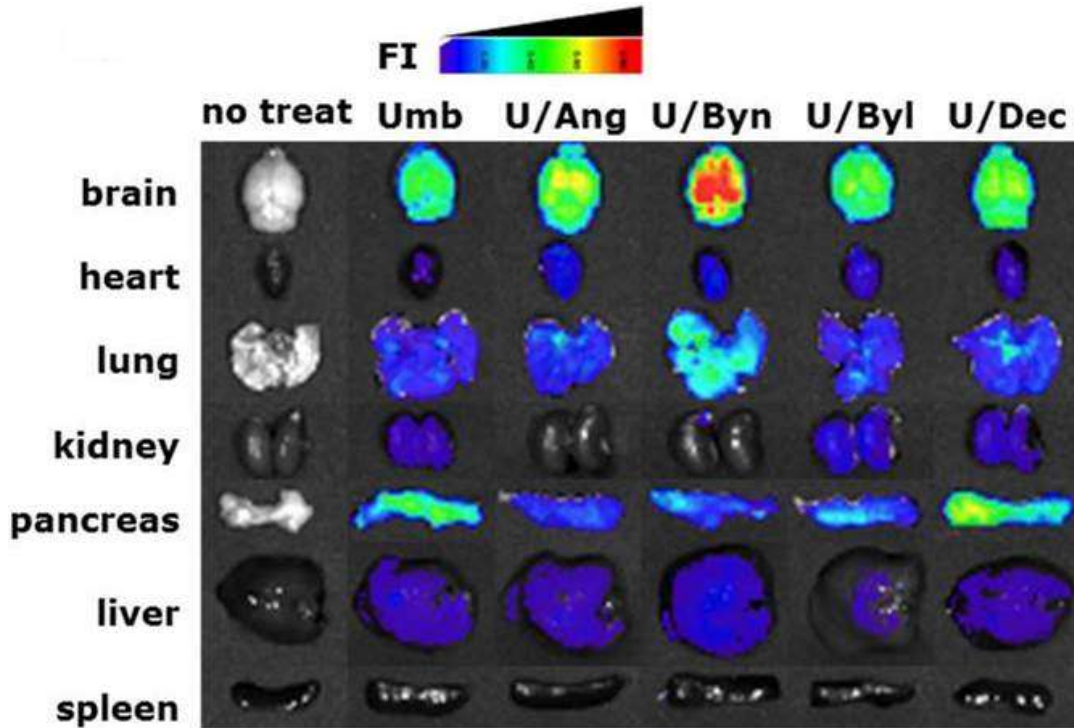
(5) 15 분 뒤, 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 이반스 블루의 형광을 측정하였다.

(5) 형광 분석은 Caliper Life Sciences의 In Vivo Imaging System (IVIS) Lumina II를 사용하였다. 이때 excitation 535 nm, emission 705 nm로 측정하였다.

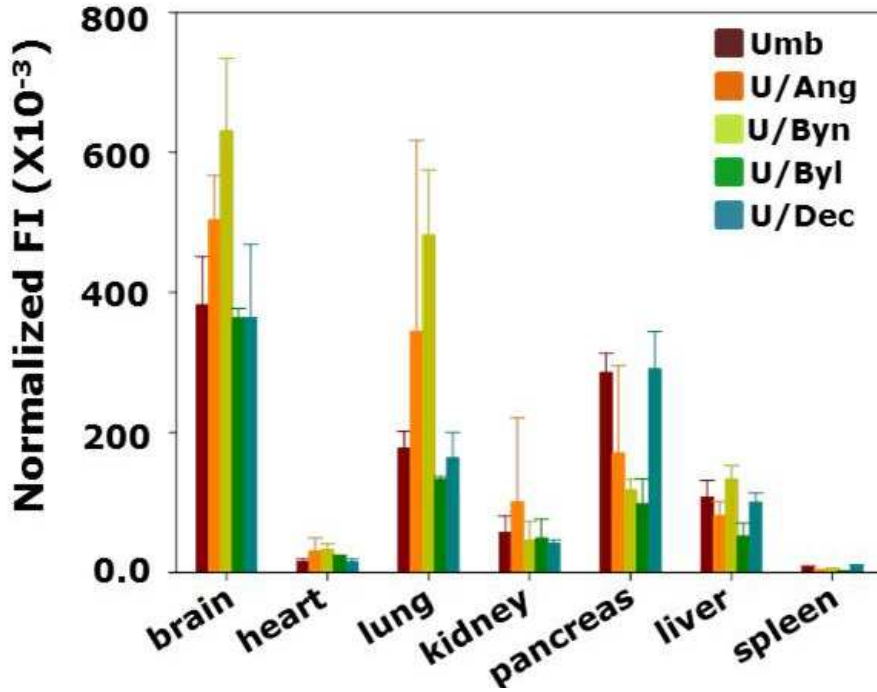
다. 연구결과

가) 이미징 방식과 추출 방식을 통해 분석한 혼합물 정맥 투여 2 분 뒤 umberiferone의 체내 분포

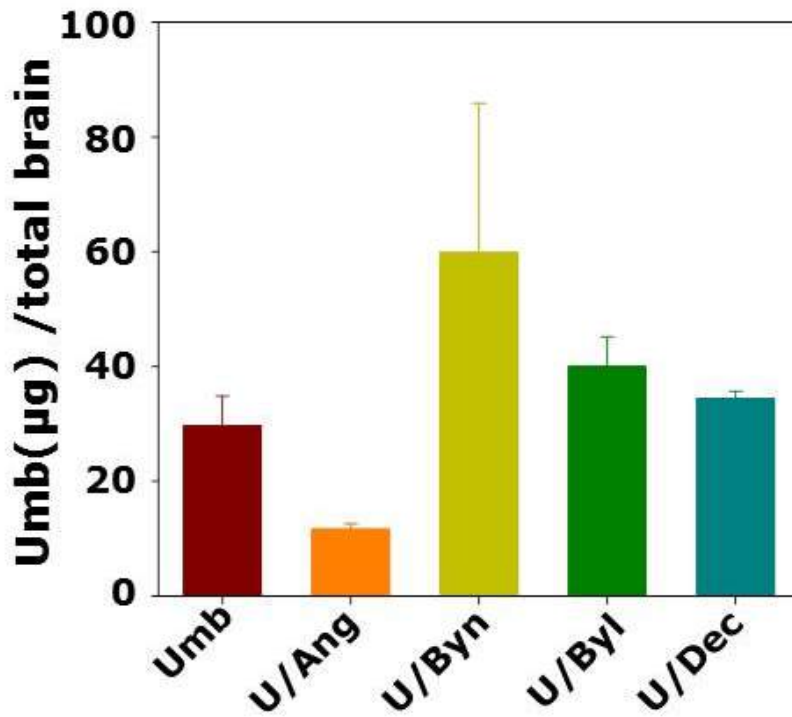
(1) 혼합물 정맥 투여 2분 후 umberiferone의 체내 분포는 다음과 같다. byakangelicin과 함께 투여 하였을때 가장 많은 umberiferone이 뇌로 전달됨을 확인하였다. 그 양은 umberiferone 단독에 비하여 약 1.7배 증가한 것이다. 또한 폐로 umberiferone이 전달되는 양 또한 증가하는 것으로 나타났으며, 이자로 전달되는 양은 반대로 줄어드는 것으로 나타났다. 각 실험군 별 뇌에서 umberiferone을 추출하여 분석한 결과 이미징을 통한 분석 결과와 마찬가지로 byakangelicin과 함께 투여하였을 때 가장 많은 umberiferone이 뇌로 전달되었음을 확인할 수 있었다.



umberiferone 혼합물 정맥 투여 2분 후 umberiferone의 형광을 분석한 이미지



umberiferone 혼합물 정맥 투여 2분 후 umberiferone의 형광을 정량화한 그래프

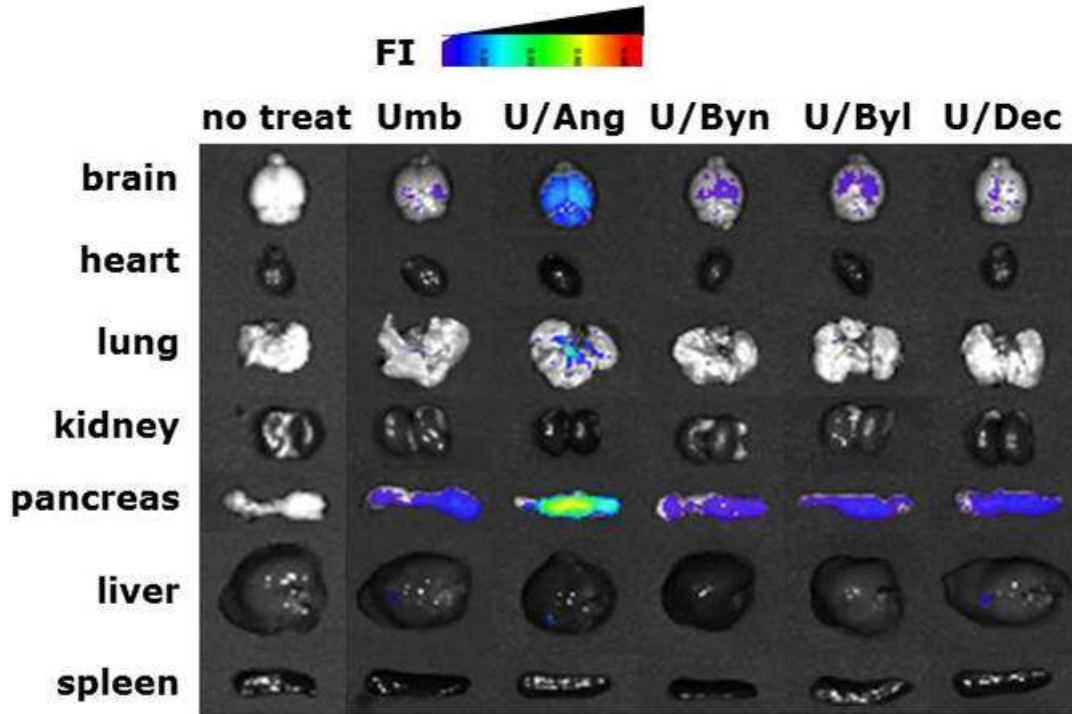


추출방식을 통해 확인한 투여 2분 뒤 뇌로 전달된 umberiferone의 양

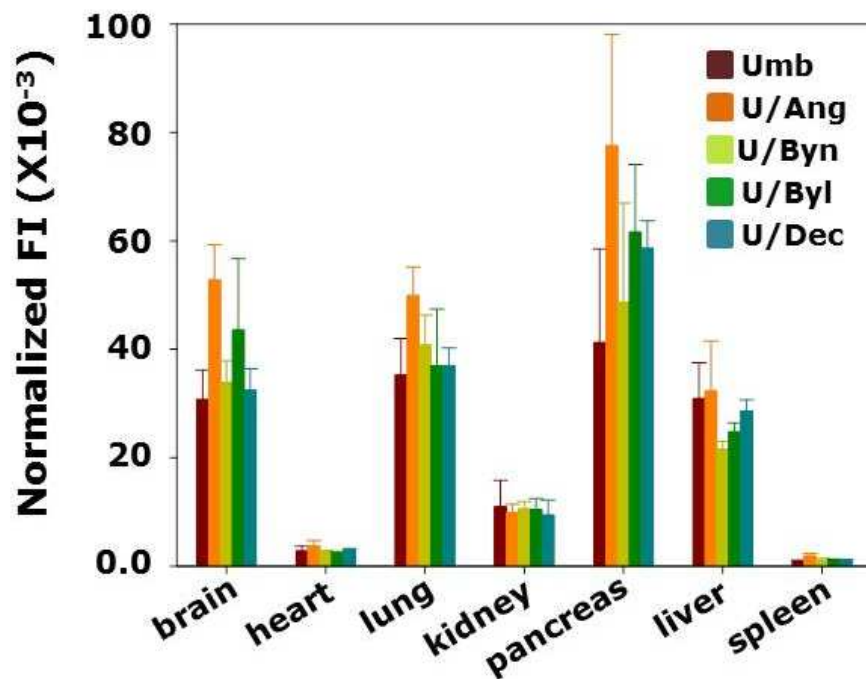
나) 이미징 방식과 추출 방식을 통해 분석한 혼합물 정맥 투여 15분 뒤 umberiferone의 체내 분포

(1) 혼합물 정맥 투여 15분 후 umberiferone의 체내 분포는 다음과 같다. angelicin과 함께 투여 하였을때 가장 많은 umberiferone이 뇌로 전달됨을 확인하였다. byakangelicin이 보여준 결과와 달리 폐로의 전달량은 증가하지 않았으며, 이자로 전달된 양이 다른 혼합물보다 월등히

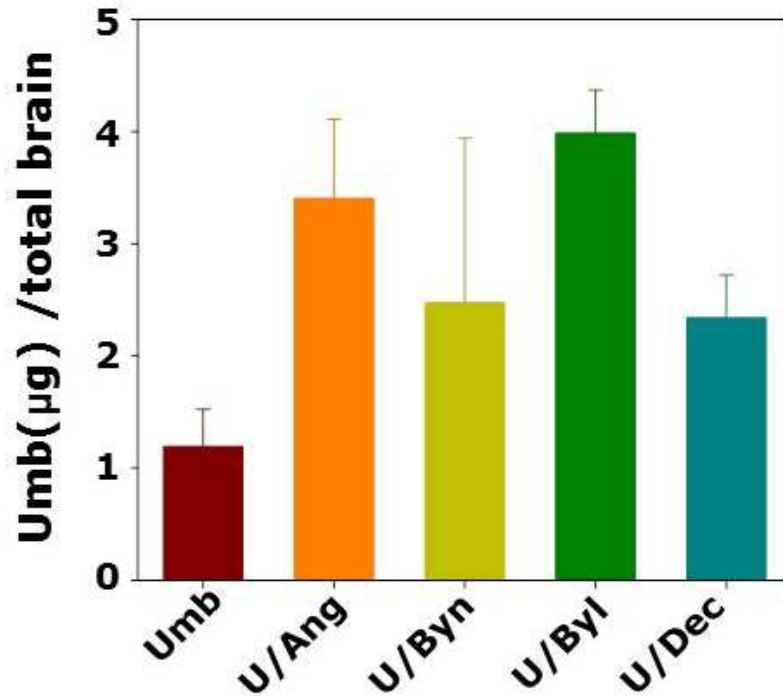
높은 것으로 나타났다. 각 실험군 별 뇌에서 umberiferone을 추출하여 분석한 결과 이미지를 통한 분석 결과와 마찬가지로 angelicin과 함께 투여하였을때 가장 많은 umberiferone이 뇌로 전달되었음을 확인할 수 있었다.



umberiferone 혼합물 정맥 투여 15분 후 umberiferone의 형광을 분석한 이미지



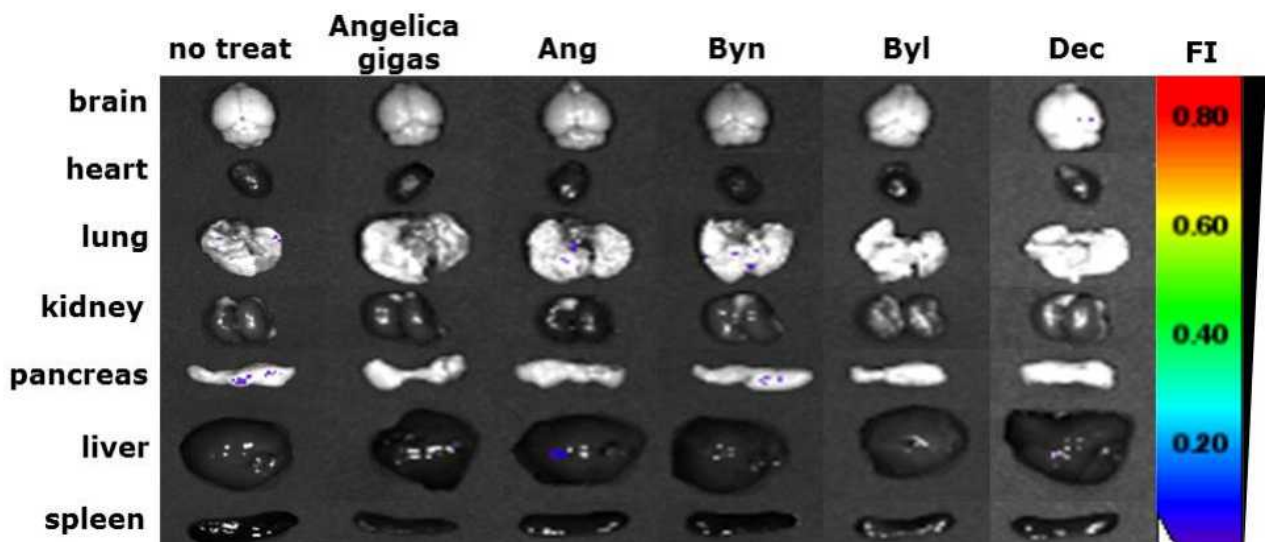
umberiferone 혼합물 정맥 투여 15분 후 umberiferone의 형광을 정량화한 그래프



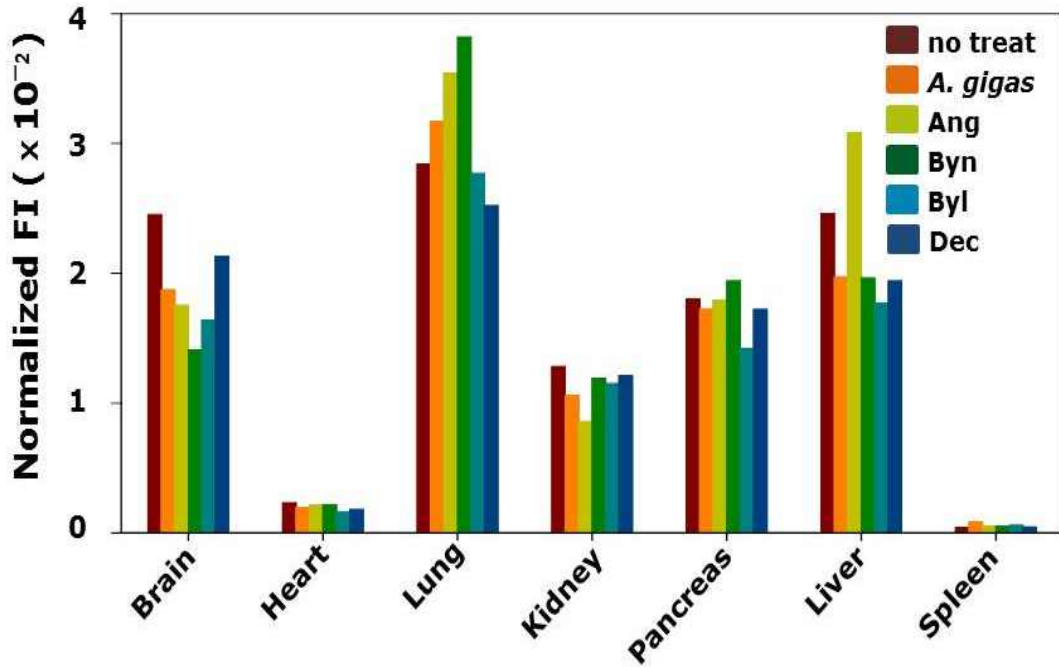
추출방식을 통해 확인한 투여 15분 뒤 뇌로 전달된 umbiferone의 양

다) umbiferone의 coumarin의 형광 측정

(1) umbiferone의 coumarin의 체내 분포는 다음과 같다. 모든 장기에서 형광이 측정되지 않은 것을 통해, umbiferone의 제외한 coumarin들은 형광이 측정되지 않는 것으로 판단된다. 따라서 앞서 확인한 결과들이 모두 umbiferone의 분포 변화임을 확신할 수 있다.



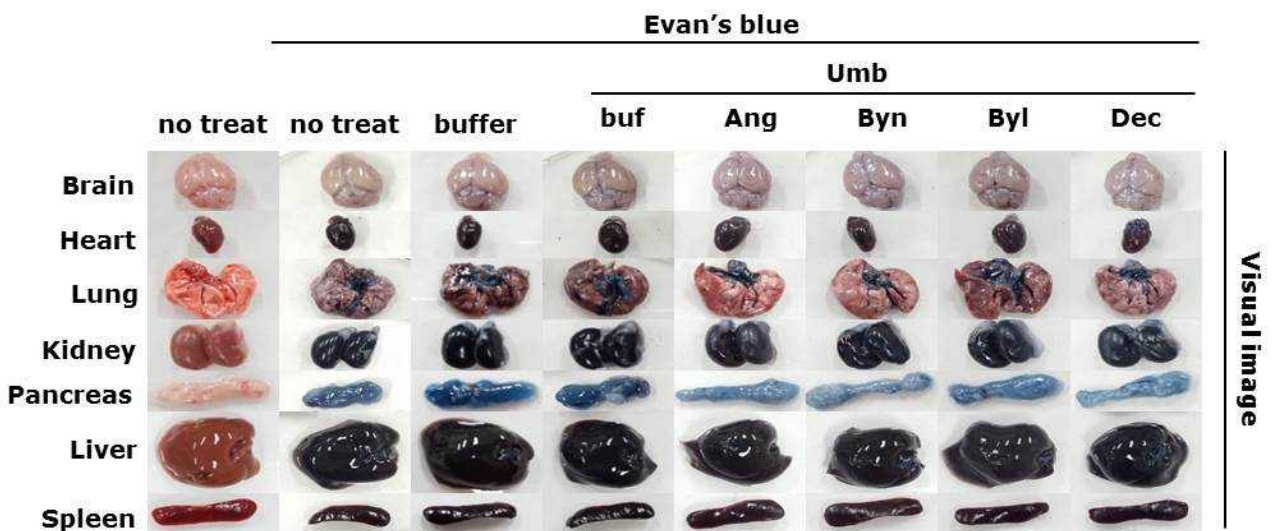
umbiferone의 coumarin과 당귀추출물 투여 15분 후 각 장기의 형광 이미지



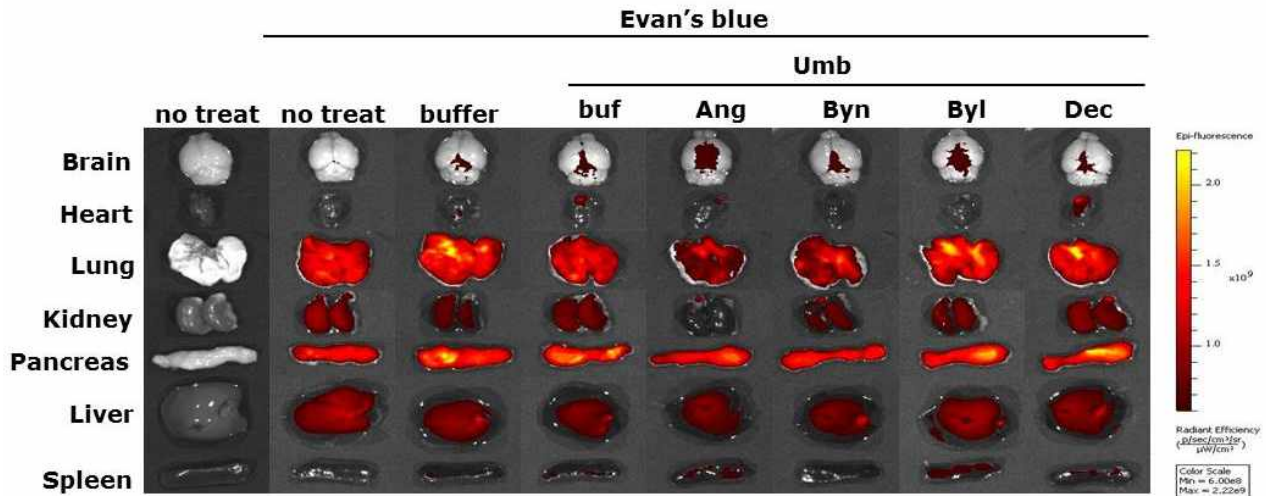
umberiferone의 coumarin과 당귀추출물 투여 15 분 후 각 장기의 형광을 정량화한 그래프

라) 뇌혈관장벽 검증

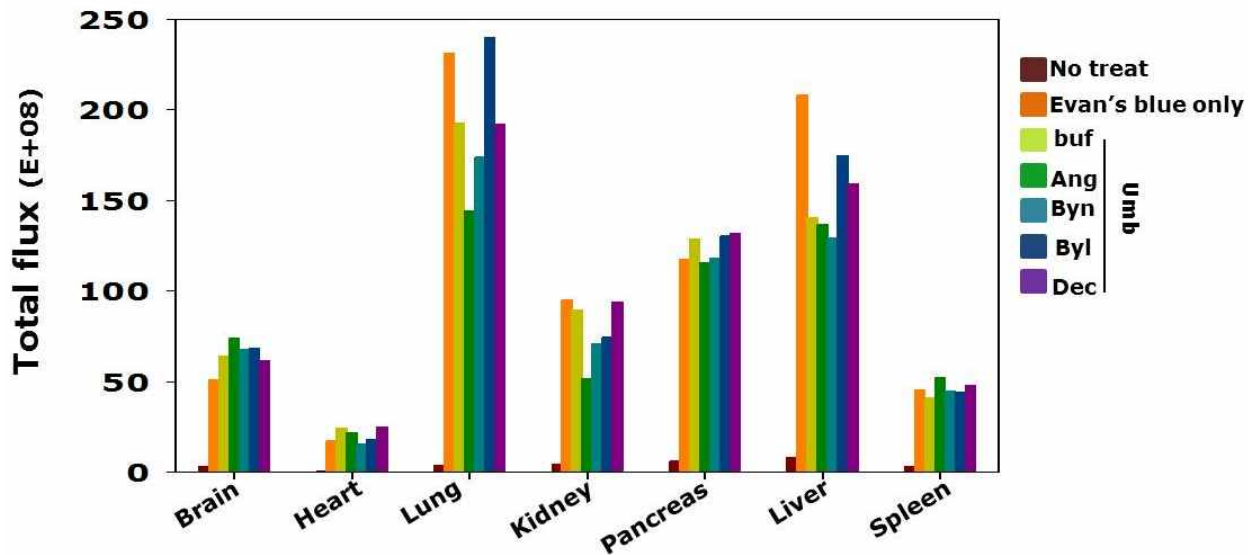
(1) 다른 coumarin에 의한 umberiferone의 뇌로의 전달량 증가가 뇌혈관장벽이 손상되어 발생한 결과인지 확인하기 위해 이반스 블루를 투여하였다. 정맥주사에 사용된 용매, umberiferone 단독 투여 와 각종 혼합물을 투여한 모든 실험 군에서 뇌로 이반스 블루 전달량이 증가하지 않은 것을 통해 뇌혈관장벽에 손상 없이 umberiferone이 많이 전달되었음을 확인할 수 있었다. a는 광학이미지이고, b는 이반스 블루의 형광을 측정 한 이미지이다.



umberiferone과 각 혼합물 투여 후 이반스 블루를 투여한 장기의 광학이미지



umberiferone과 각 혼합물 투여 후 이반스 블루를 투여한 장기의 형광 이미지



umberiferone과 각 혼합물 투여 후 이반스 블루를 투여한 장기의 형광을 정량화한 그래프

### 3. 혼합비율 증가에 따른 활성 물질의 뇌로의 전달량 증가

#### 가. 연구내용

byakangelicin에 의한 활성 물질의 뇌로의 전달량 증가가 혼합 비율에 의존적인지, 또한 umberiferone에 한정된 전달량 증가인지 확인하고자 폴리페놀의 curcumin과 독소루비신을 선정하였다. curcumin은 신경 염증과 알츠하이머병 같은 뇌에서 발생하는 질환에 치료효과를 보이는 형광을 띤 폴리페놀이며, 독소루비신은 형광을 갖고 있는 항암제로 뇌종양 치료에 사용된다.

나. 연구방법

가) 혼합비율 증가에 따른 umberiferone의 뇌로의 전달량 증가

- (1) umberiferone과 다른 당귀 유래 coumarin(angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)을 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 umberiferone과 다른 coumarin은 질량 비 1:0, 1:1, 1:20이 되도록 하였다.
- (2) umberiferone과 다른 당귀 유래 coumarin이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.
- (3) ICR (6 주령, 암컷)에 umberiferone 기준 4 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.
- (4) 2 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 umberiferone의 형광을 측정하였다.
- (5) 형광 분석은 Spectral Instruments Imaging의 Lago-X를 사용하였다.
- (6) umberiferone과 byakangelicin 혼합물 (질량비, umberiferone : byakangelicin=1:20)의 형광을 excitation 325 nm, emission 495 nm에서 측정하였다.

나) byakangelicin에 의한 curcumin의 뇌로의 전달량 증가

- (1) curcumin과 다른 당귀 유래 coumarin(angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)을 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 curcumin과 다른 coumarin은 질량 비 1:0, 1:20, 1:50이 되도록 하였다.
- (2) curcumin과 다른 당귀 유래 coumarin이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.
- (3) ICR (6 주령, 암컷)에 curcumin 기준 1.6 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.
- (4) 2 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 curcumin의 형광을 측정하였다.
- (5) 형광 분석은 Caliper Life Sciences의 In Vivo Imaging System (IVIS) Lumina II를 사용하였다.
- (6) curcumin과 byakangelicin 혼합물 (질량비, curcumin : byakangelicin=1:50)의 형광을 excitation 420 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

다) byakangelicin에 의한 doxorubicin의 뇌로의 전달량 증가

- (1) doxorubicin과 다른 당귀 유래 coumarin (angelicin, byakangelicin, byakangelicol, decursin)을 DMSO에 녹여 준비하였다. 이때 doxorubicin과 다른 coumarin은 질량 비 1:0, 1:5, 1:10이 되도록 하였다.
- (2) doxorubicin과 다른 당귀 유래 coumarin이 함유된 DMSO: Cremophor: PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다.
- (3) ICR (6 주령, 암컷)에 doxorubicin 기준 5 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.
- (4) 2 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 doxorubicin의 형광을 측정하였다.
- (5) 형광 분석은 Caliper Life Sciences의 In Vivo Imaging System (IVIS) Lumina II를 사용하였다
- (6) doxorubicin과 byakangelicin 혼합물 (질량비, doxorubicin : byakangelicin=1:10)의 형광을 excitation 465 nm, emission 583 nm에서 측정하였다.

라) byakangelicin 존재시 이반스블루의 체내분포 확인

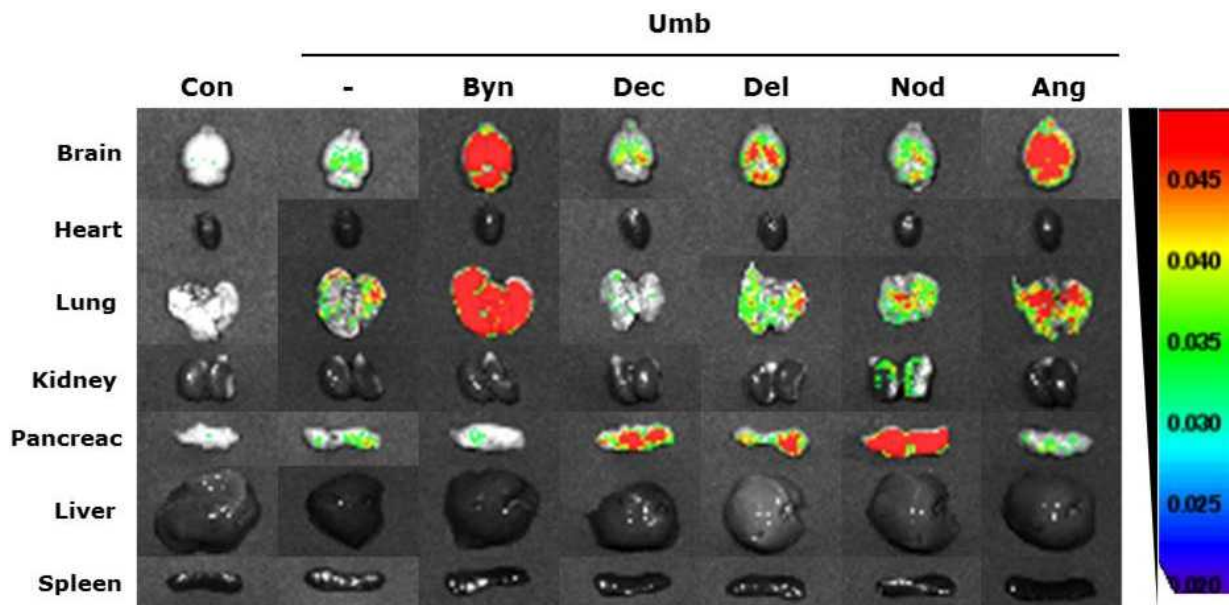


- (1) byakangelicin을 DMSO에 녹여 준비하였다.
- (2) byakangelicin이 함유된 DMSO: Cremophor: 이반스 블루가 함유된 PBS를 부피 비 1.5:1.5:7이 되도록 혼합하였다. 이때 비아칸젤리 : 이반스 블루의 중량 비율은 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:20 그리고 1:50이 되도록 하였다.
- (3) ICR (6 주령, 암컷)에 이반스블루 기준 1.6 mg/kg이 되도록 정맥 투여하였다.
- (4) 2 분 뒤 각 장기를 적출하여 각 장기에 분포되어있는 이반스블루의 형광을 측정하였다.
- (5) 형광 분석은 IVIS를 이용하여 excitation 535 nm, emission 705 nm에서 측정하였다.

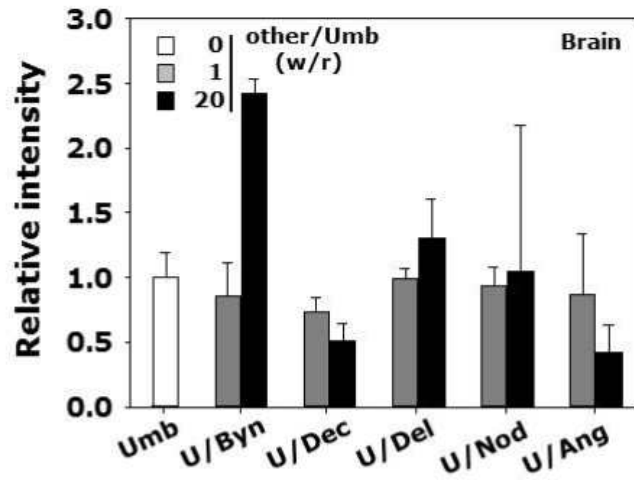
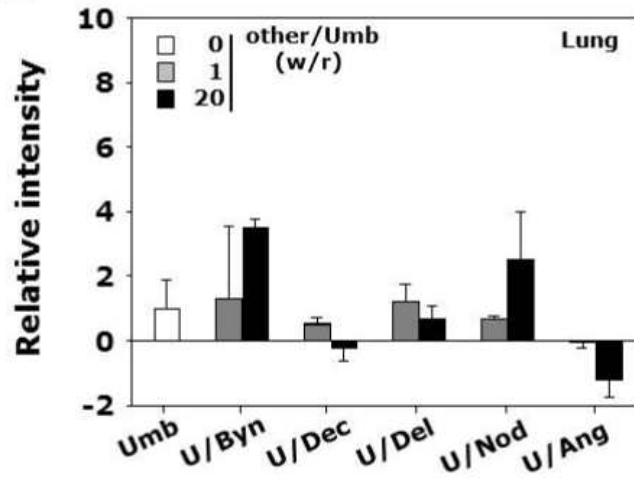
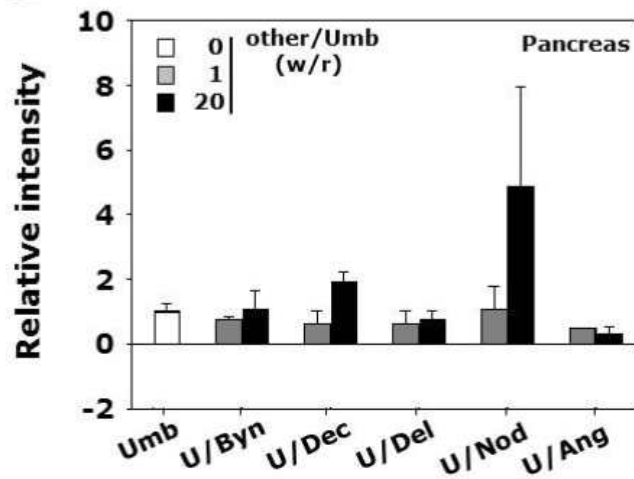
다. 연구결과

가) 혼합비율 증가에 따른 umberiferone의 뇌로의 전달량 증가

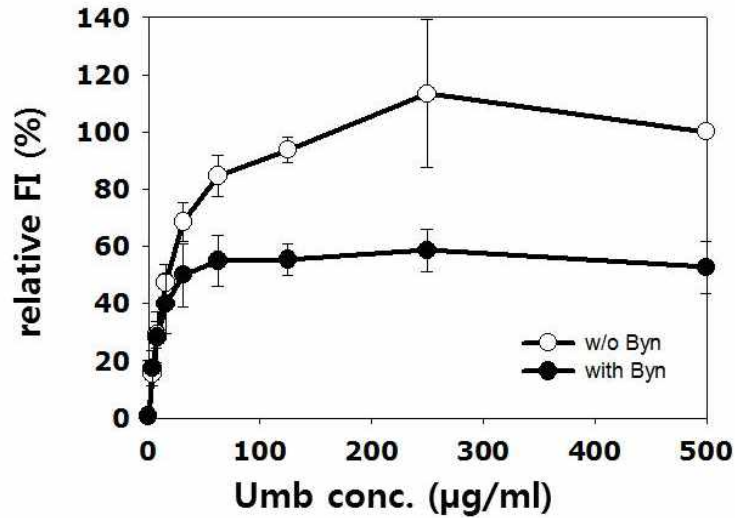
(1) 혼합 비율 1:50의 혼합물 정맥 투여 2분 후 umberiferone의 체내 분포는 다음과 같다. byakangelicin과 함께 투여하였을 때 가장 많은 umberiferone이 뇌로 전달됨을 확인하였다. 그 양은 umberiferone 단독에 비하여 약 1.7배 증가한 것이다. 또한 폐로 umberiferone이 전달되는 양 또한 증가하는 것으로 나타났으며, 이자로 전달되는 양은 반대로 줄어드는 것으로 나타났다. 1:1 비율에서 효과를 보이지 않았던 angelicin의 경우 혼합비율을 증가시키자 뇌와 폐로 전달되는 umberiferone의 양이 증가하였다. byakangelicin 유무에 따른 umberiferone의 형광을 확인 하였을 때 byakangelicin의 umberiferone의 형광을 증폭시키지 않으므로 이미지를 통해 분석한 umberiferone의 체내분포 결과가 umberiferone만의 형광임을 확신 할 수 있었다.



혼합물에 따른 umberiferone의 체내 분포 이미지

**a)****b)****c)**

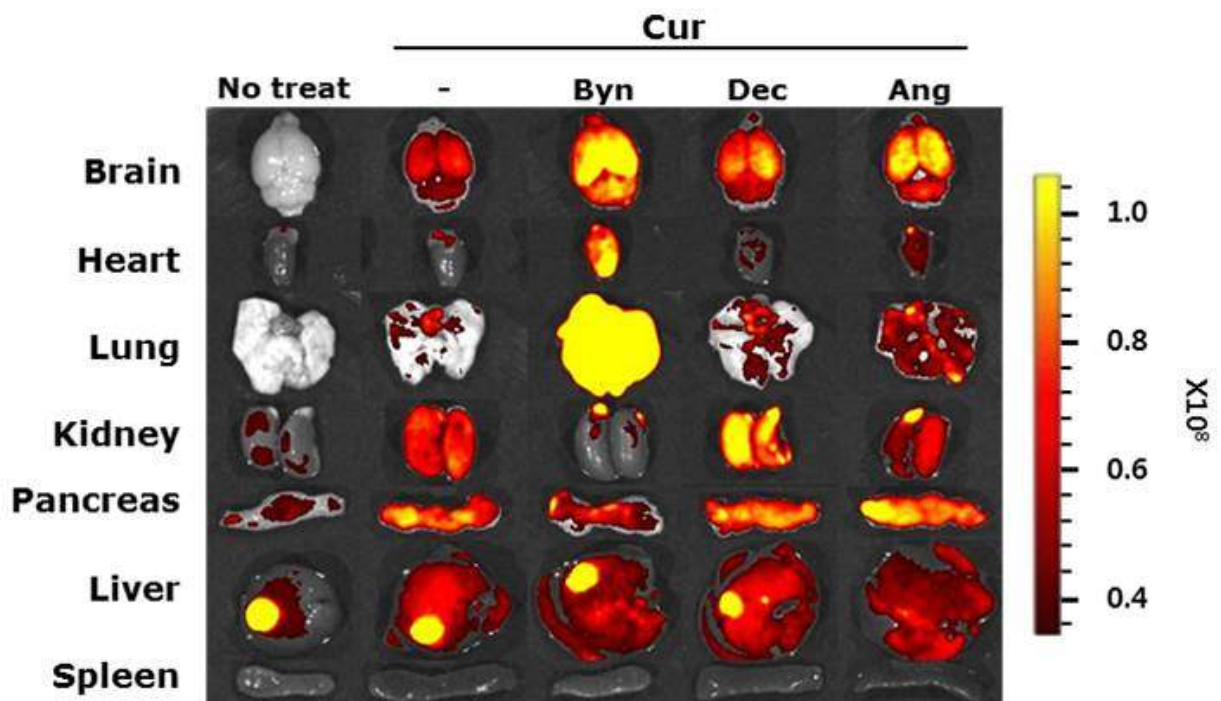
형광을 정량하여 나타낸 혼합물에 따른 umberiferone의 체내 분포



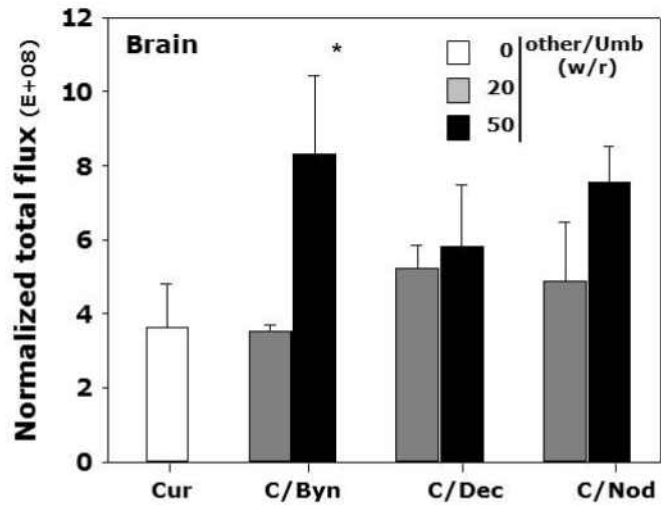
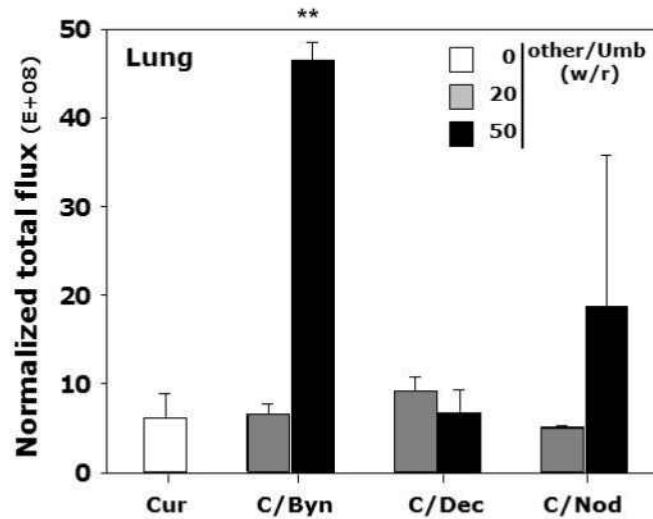
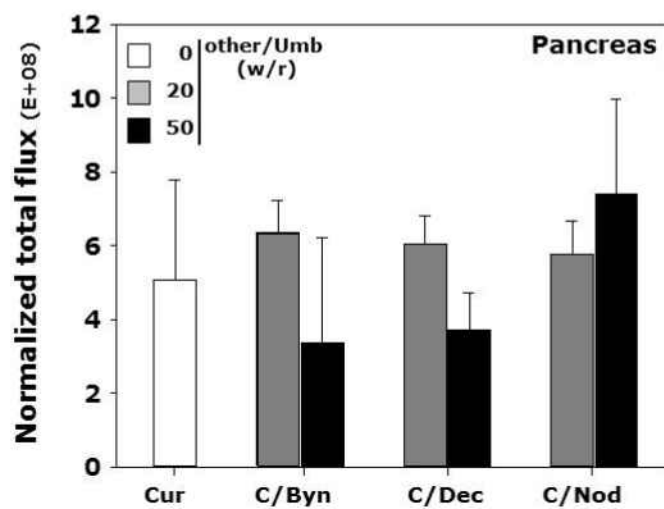
byakangelicin 유무에 따른 umberiferone의 형광

나) byakangelicin에 의한 curcumin의 뇌로의 전달량 증가

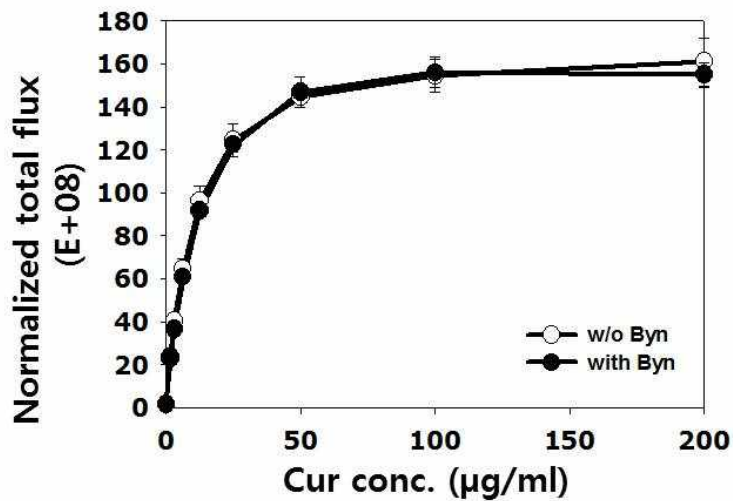
(1) 형광을 띄고있는 폴리페놀인 curcumin을 다른 coumarin들과 혼합하여 전달하였다. byakangelicin과 혼합하였을때 가장 많은 curcumin이 뇌로 전달되는 것을 확인하였고, angelicin과 decursin도 curcumin 단독에 비하여 전달량이 증가하였다. byakangelicin 유무에 따른 curcumin의 형광을 확인하였을때 byakangelicin이 curcumin의 형광을 증폭시키지 않으므로 이미지를 통해 분석한 curcumin의 체내분포 결과가 curcumin만의 형광임을 확신 할 수 있었다.



혼합물에 따른 curcumin의 체내 분포 이미지

**a****b****c**

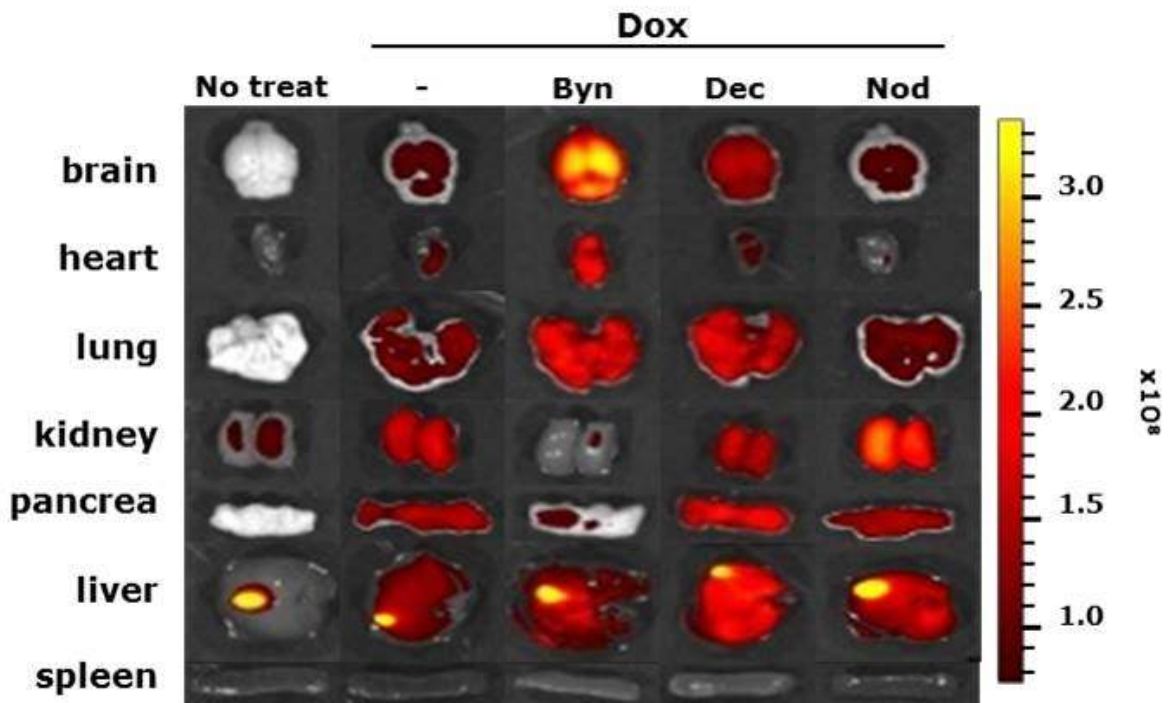
형광을 정량하여 나타낸 혼합물에 따른 curcumin의 체내 분포



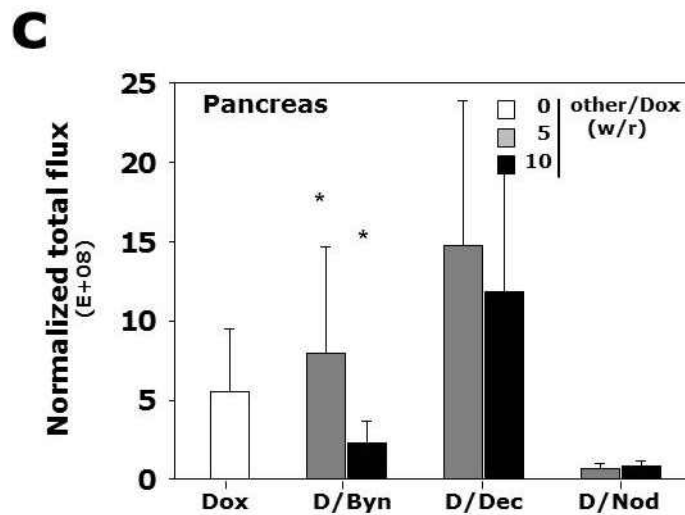
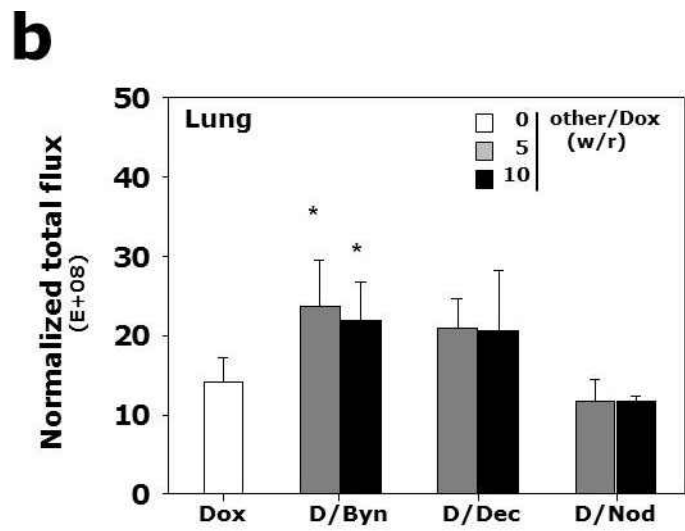
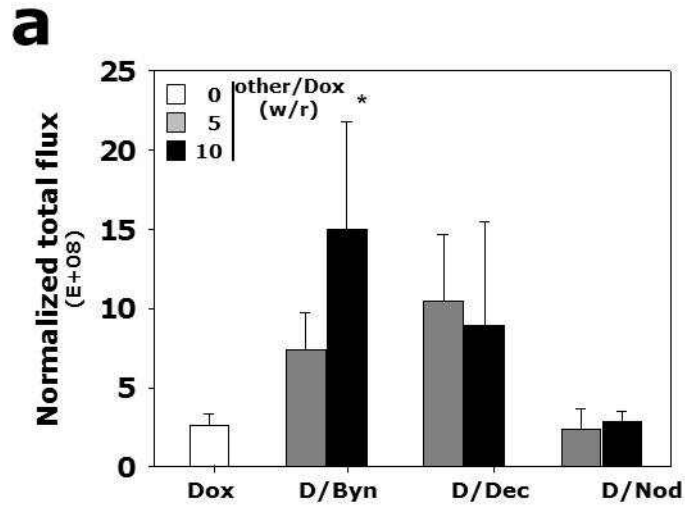
byakangelicin 유무에 따른 curcumin의 형광

다) byakangelicin에 의한 doxorubicin의 뇌로의 전달량 증가

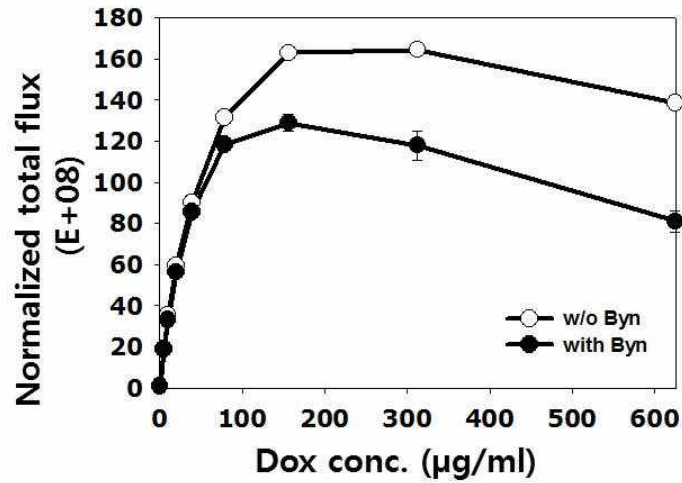
(1) 형광을 띄고 있는 항암제인 doxorubicin과 각각의 coumarin을 혼합하여 실험용 mouse에 정맥 투여하였다. 이때 byakangelicin과 함께 혼합하였을때 가장 많은 doxorubicin이 뇌로 전달되는 것을 확인하였다. byakangelicin 유무에 따른 doxorubicin의 형광을 확인하였을때 byakangelicin이 doxorubicin의 형광을 증폭시키지 않으므로 이미지를 통해 분석한 doxorubicin의 체내분포 결과가 doxorubicin만의 형광임을 확신 할 수 있었다.



혼합물에 따른 doxorubicin의 체내 분포 이미지



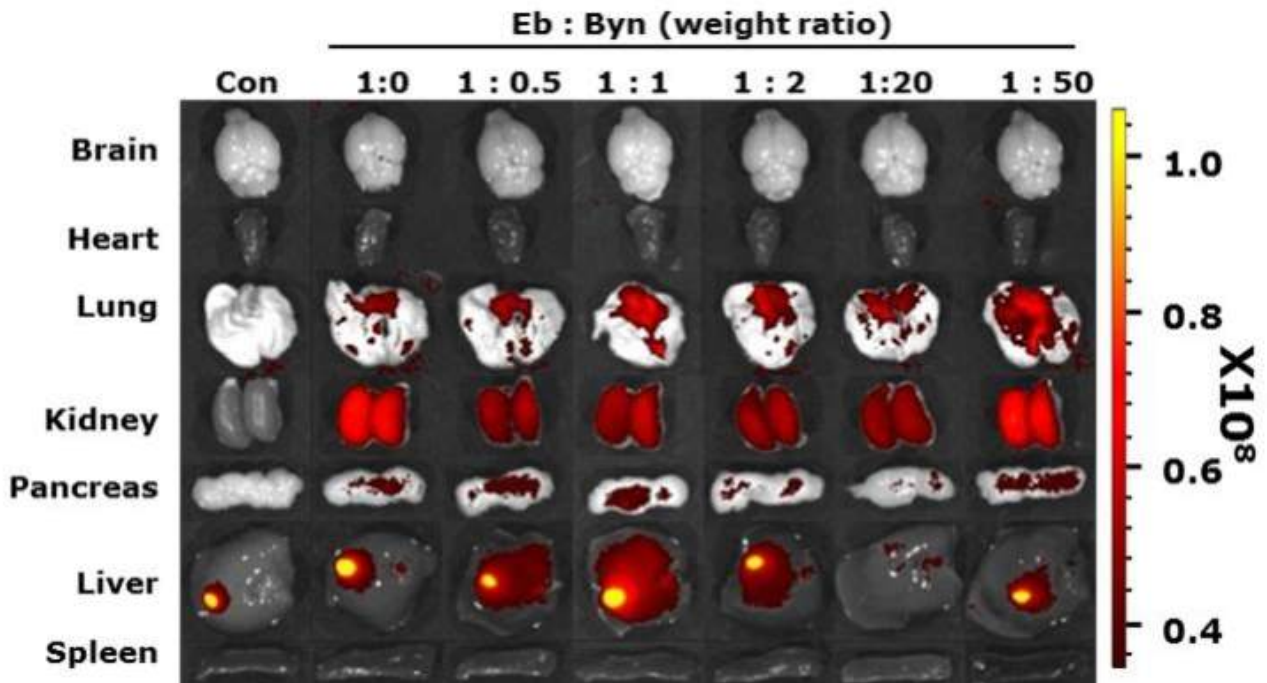
형광을 정량하여 나타낸 혼합물에 따른 doxorubicin의 체내 분포



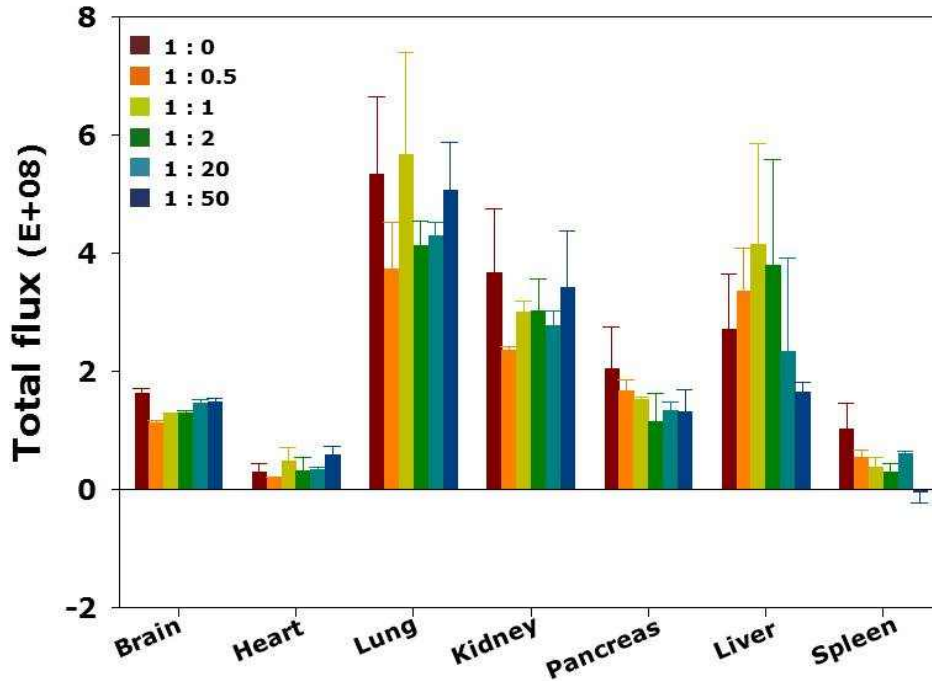
byakangelicin 유무에 따른 doxorubicin의 형광

라) byakangelicin 존재시 이반스 블루의 체내분포 확인

(1) 다양한 비율의 혼합물을 준비한 뒤 실험용 mouse에 투여하였다. 그러나 byakangelicin의 양이 증가할지라도 뇌로 전달되는 이반스 블루의 양이 증가하지 않는 것을 통해 byakangelicin이 뇌혈관장벽에 손상을 일으키지 않는 것을 확신하였다.



byakangelicin 혼합비율에 따른 이반스 블루의 형광



byakangelicin 혼합비율에 따른 이반스 블루의 형광을 정량화한 그래프

#### 4. curcumin/byakangelicin의 신경염증 억제 효과 강화

##### 가. 연구내용

앞선 연구에서 당귀 유래 coumarin 중 byakangelicin에 의하여 활성물질이 뇌로 많이 전달됨을 확인하였다. 따라서 우리는 byakangelicin의 의한 활성 물질의 축적이 뇌에서 발생하는 질병을 예방 및 치료하는데 더욱 효과적인지 확인하고자 신경염증 모델을 선정하였다.

##### 나. 연구방법

###### 가) 신경 염증 모델

(1) curcumin 또는 curcumin/byakangelicin (curcumin : byakangelicin = 1 : 2, 질량비의 혼합물)을 매일 1회 실험용 mouse (C57BL/6, 6주령, 암컷)에 정맥 투여하였다. curcumin 기준 12 mg/kg으로 주사하였다.

(2) 5일째 되는 날 마지막 투여 30분 뒤에, LPS (0.83 mg/kg)을 복강 투여하여 신경염증을 유도하였다.

(3) curcumin과 curcumin/byakangelicin (curcumin : byakangelicin = 1:2, 질량비)을 인젝션 용매에 curcumin 기준 농도 1 µg/ml이 되도록 준비한 뒤, IVIS (Ex\_430 nm, Em\_509 nm)로 분석하였다.

###### 나) 뇌에 축적된 curcumin 비교



- (1) curcumin과 curcumin/byakangelicin을 curcumin 기준 12 mg/kg으로 5회 정맥 투여 후 LPS (0.83 mg/kg)투여 24 시간 뒤에 perfusion을 수행한 뒤, mouse의 뇌를 적출하였다.
- (2) 동결 절편을 준비하여 형광 현미경과 공초점 현미경을 이용하여 분석하였다.

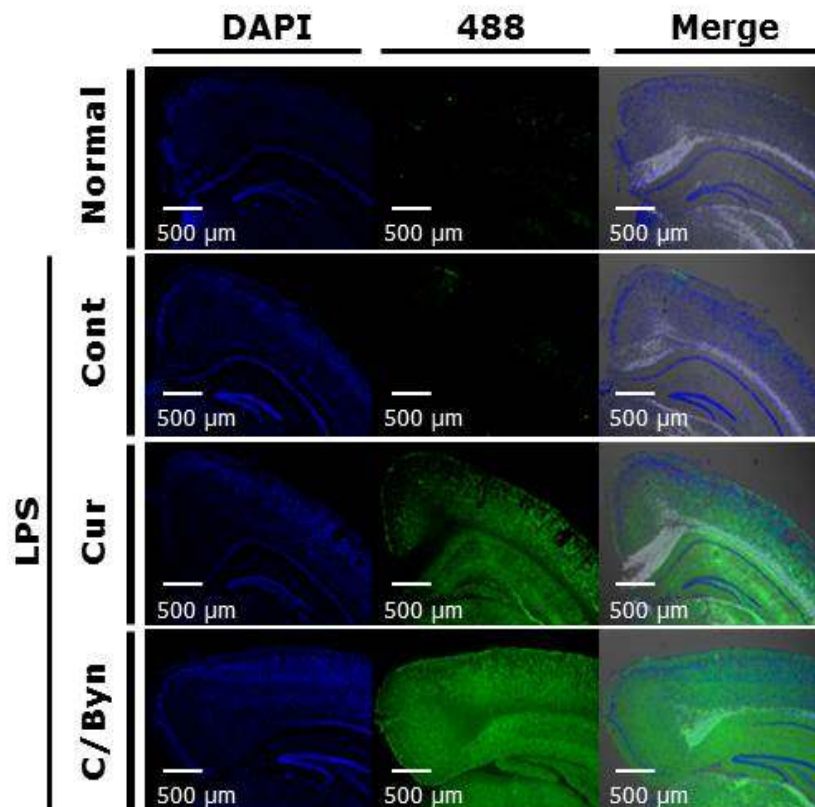
다) 뇌에 축적된 curcumin의 항염증 효과 비교

- (1) 실험용 mouse를 마취한 뒤 심장 채혈을 통해 모은 혈액을 원심 분리 (2,000 g, 15 분)하여 serum을 수득하였다.
- (2) 뇌를 균질화 한 뒤, 원심분리 (13,000 rpm, 10 분, 4°C)하여 상층액만 준비하였다.
- (3) 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 그리고 IL-6의 양을 측정하기 위해 ELISA를 수행하였다.

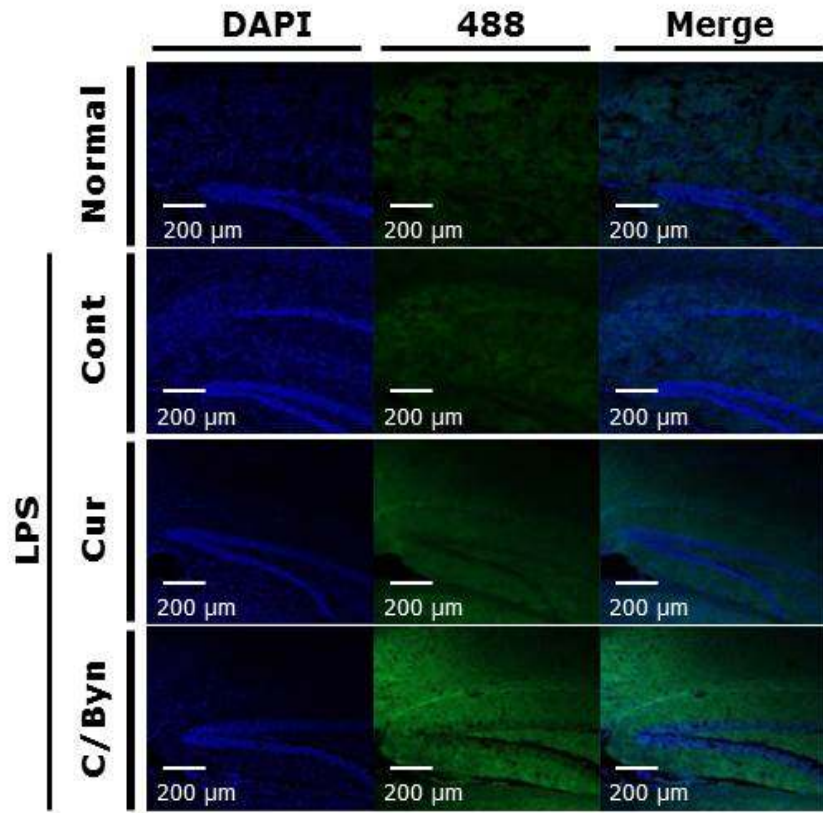
다. 연구결과

가) 혼합비율 증가에 따른 뇌에 축적된 curcumin 비교

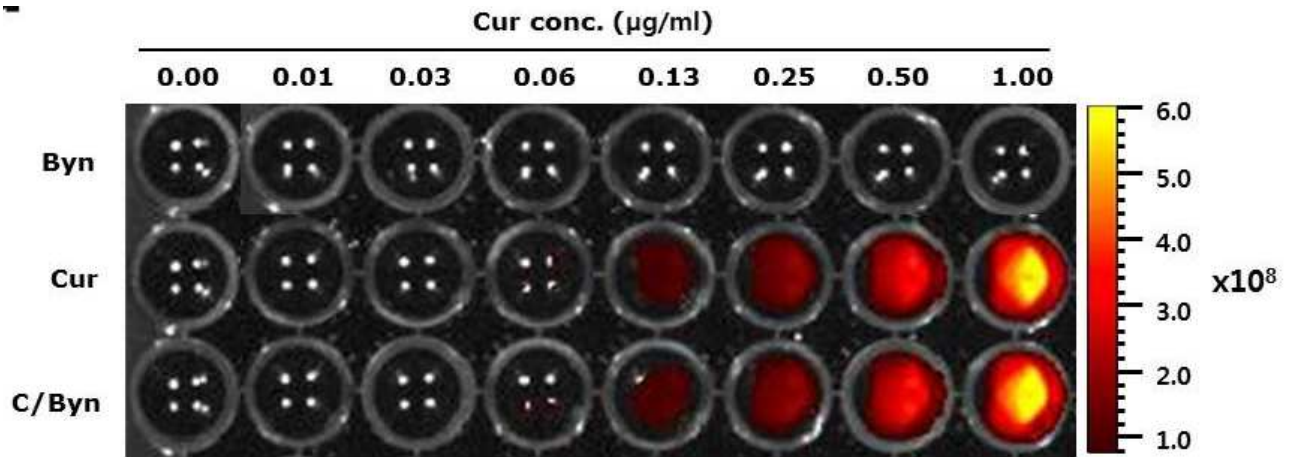
- (1) 위의 이미지는 형광현미경을 통해 관찰한 대뇌 피질부위이고, 아래 이미지는 공초점 현미경을 통해 관찰한 해마이다. byakangelicin과 함께 전달한 curcumin이 더 많이 전달된 것을 확인 할 수 있다. 또한 curcumin과 curcumin/byakangelicin (curcumin : byakangelicin = 1:2, 질량비)의 형광에 차이가 없음을 통하여 이미지에서 확인한 형광이 curcumin만의 형광임이고, curcumin/byakangelicin을 투여하였을때 더 많은 양의 curcumin이 뇌로 전달됨을 확신할 수 있었다.



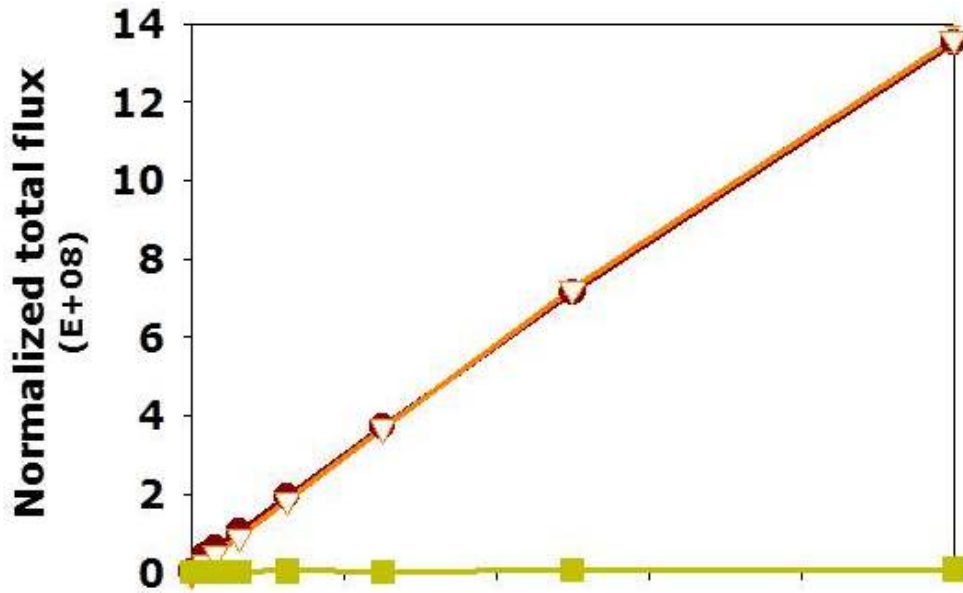
형광 현미경을 통해 관찰한 대뇌 피질에 축적된 curcumin 분석



공초점 현미경을 통해 관찰한 해마에 축적된 curcumin 분석



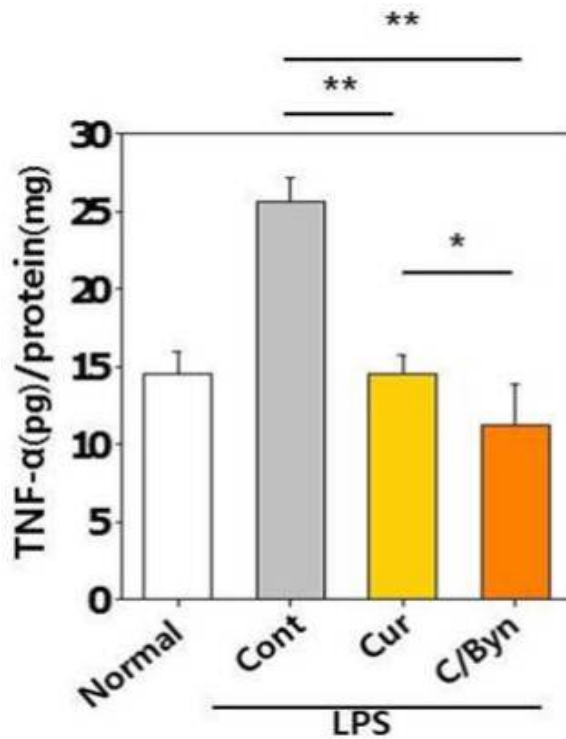
curcumin과 curcumin/byakangelicin (curcumin : byakangelicin = 1:2, 질량비)의 형광 이미지



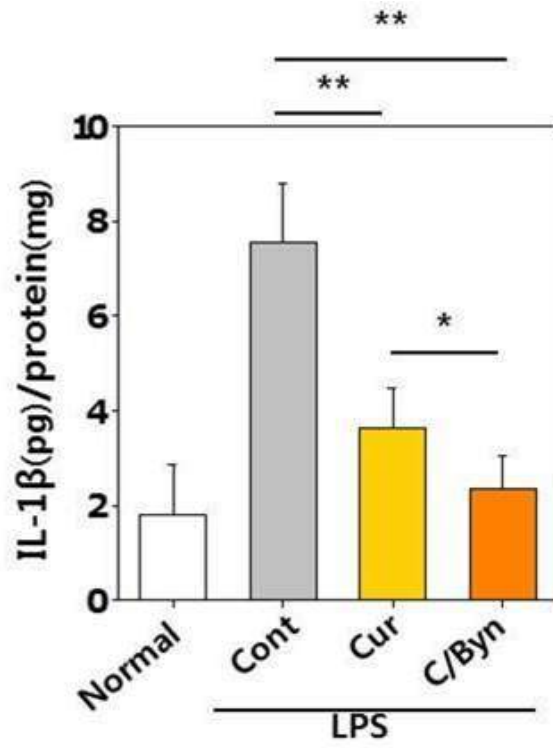
curcumin과 curcumin/byakangelicin (curcumin : byakangelicin = 1:2, 질량비)의 형광을 정량화한 그래프

나) 뇌에 축적된 curcumin의 항염증 효과 비교

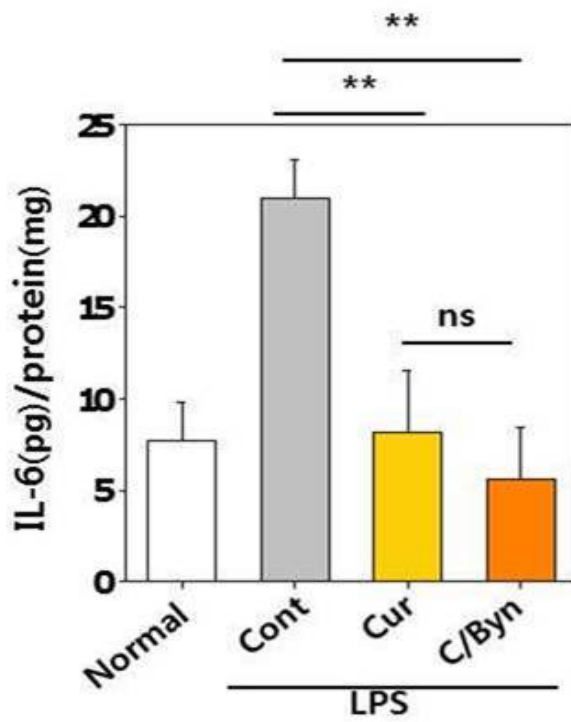
(1) byakangelicin에 의해 더 많은 양의 curcumin이 축적된 뇌에서 더 큰 항염증효과를 보였으며, 그 결과는 혈액 존재하는 염증성 사이토카인의 발현양도 크게 낮춰 전신에 걸쳐 작용하는 것으로 확인되었다.



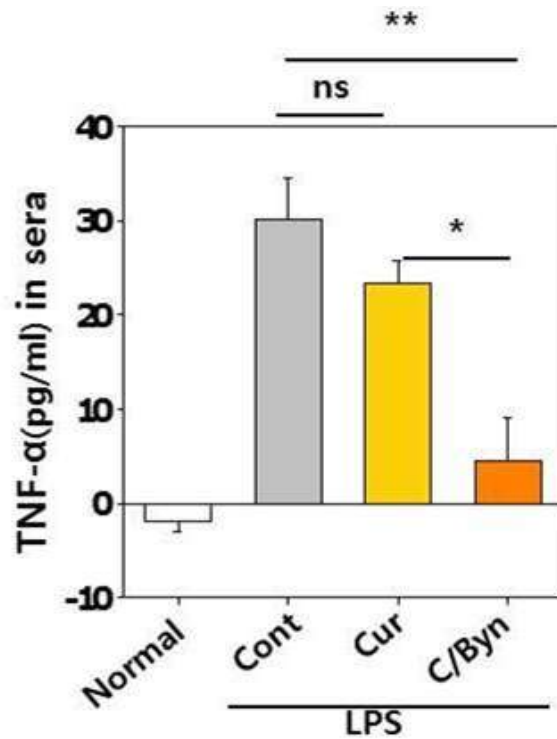
뇌에서 발현된 TNF-α의 양



뇌에서 발현된 IL-1β의 양



뇌에서 발현된 IL-6의 양



혈청에서 측정된 TNF- $\alpha$  발현양

## 5. 다른 coumarin에 의한 umberiferone의 세포내 전달 증가

### 가. 연구내용

다른 coumarin에 의하여 활성물질의 체내 분포가 달라지는 기작을 파악하고자 하였다. 먼저 세포내 전달량을 증가시키는지 확인해 보았다.

### 나. 연구방법

가) 시간에 따른 umberiferone과 혼합물의 세포내 전달량 비교

- (1) 12well plate의 well당 MCF-7  $2.5 \times 10^5$  세포를 준비하였다.
- (2) umberiferone과 혼합물 (다른 coumarin:umberiferone = 1:1, 질량비)를 umberiferone 기준  $16.2 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하였다.
- (3) 2, 4, 24 시간동안 인큐베이션 한 뒤, 세포를 용해시켰다.
- (4) 세포내로 전달된 umberiferone은 excitation 325 nm, emission 495 nm에서 측정하였다.

나) MCF-7 세포와 MCF-7/MDR세포내의 umberiferone 전달량 비교

- (1) 12well plate의 well당 MCF-7 과 MCF-7/MDR 각각  $2.5 \times 10^5$  세포를 준비하였다.
- (2) umberiferone과 혼합물 (다른 coumarin:umberiferone = 1:1, 질량비)를 umberiferone 기준  $100 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하였다.
- (3) 8 시간동안 인큐베이션 한 뒤, 새로운 배지로 바꿔주어 세포내로 전달된 umberiferone이 세포 밖으로 배출될 수 있도록 하였다.

- (4) 세포를 세척한 뒤 용해시켰다.
- (5) 세포내로 전달된 umberiferone은 excitation 325 nm, emission 495 nm에서 측정하였다.

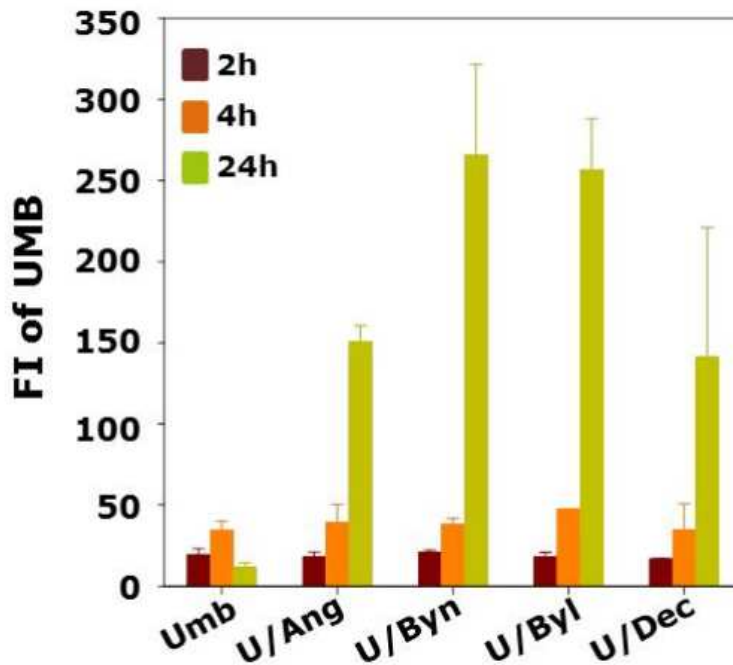
다) 혼합물의 질량 비율에 따른 umberiferone의 세포내 전달량 비교

- (1) 12well plate의 well당 MCF-7/MDR 각각  $2.5 \times 10^5$  세포를 준비하였다.
- (2) umberiferone과 혼합물 (다른 coumarin:umberiferone = 1:0, 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:20, 1:50, 질량비)를 umberiferone 기준 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였다.
- (3) 8 시간동안 인큐베이션 한 뒤, 새로운 배지로 바꿔주어 세포내로 전달된 umberiferone이 세포 밖으로 배출될 수 있도록 하였다.
- (4) 세포를 세척한 뒤 용해시켰다.
- (5) 세포내로 전달된 umberiferone은 excitation 325 nm, emission 495 nm에서 측정하였다.

다. 연구결과

가) 시간에 따른 umberiferone과 혼합물의 세포내 전달량 비교

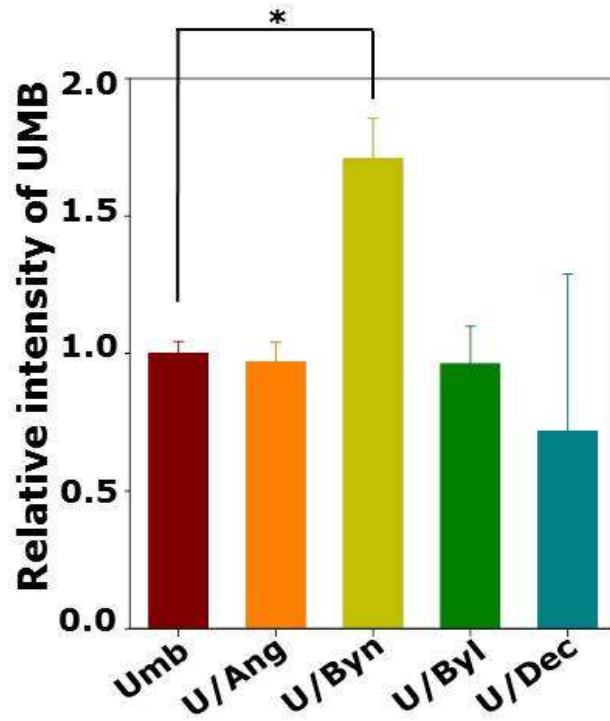
- (1) 초기 2, 4 시간은 세포내로 전달된 umberiferone의 양에 차이가 없었으나, 24시간 인큐베이션 하였을때 모든 혼합물이 umberiferone 단독일 때에 비하여 많은 양의 umberiferone을 세포내로 전달하였음을 확인 할 수 있었다.



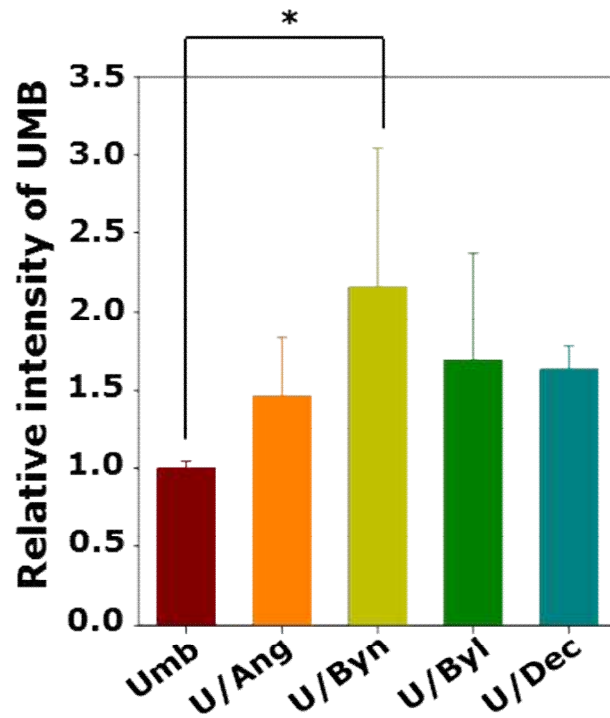
umberiferone과 혼합물 (혼합비 1:1) 처리 후 시간에 따른 umberiferone의 세포내 전달 비교

나) MCF-7 세포와 MCF-7/MDR세포내의 umberiferone 전달량 비교

- (1) MCF-7세포의 경우 byakangelicin과 함께 있을때 가장 많은 umberiferone이 세포내로 전달됨을 확인하였다.



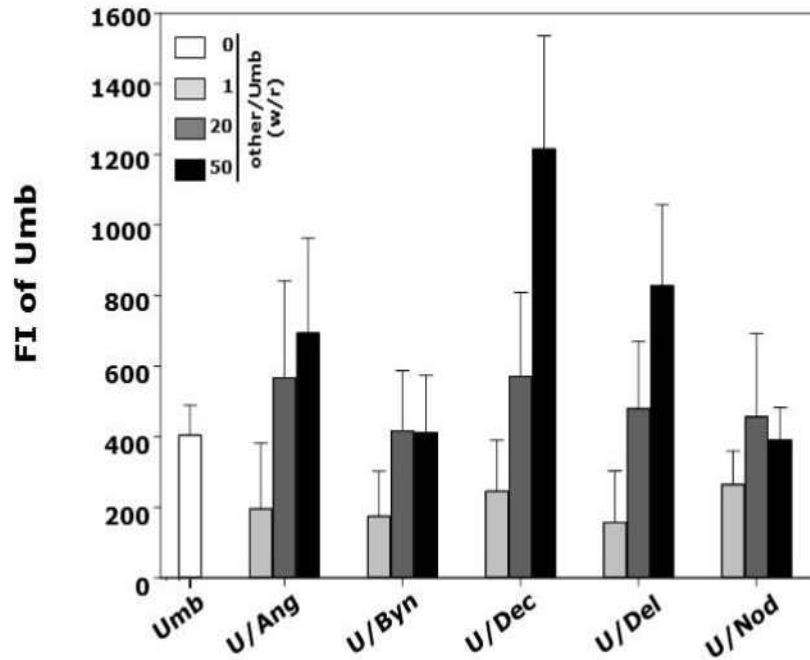
umberiferone과 혼합물 (혼합비 1:1) 처리 후 MCF-7 세포내 umberiferone 잔량 비교  
 (2) MCF-7/MDR세포의 경우 byakangelicin과 함께 있을때 가장 많은 umberiferone이 세포내로 전달됨을 확인하였다. 다른 coumarin 혼합물 역시, umberiferone 단독에 비하여 많은 umberiferone을 세포내로 전달하였다.



umberiferone과 혼합물 (혼합비 1:1) 처리 후 MCF-7/MDR 세포내 umberiferone 잔량 비교

다) MCF-7/MDR에서 혼합물의 질량 비율에 따른 umberiferone의 세포내 전달량 비교결과는

아래와 같다.



혼합물 비율에 따른 MCF-7/MDR 세포내 umberiferone 잔량 비교

## 6. P-glycoprotein 억제

### 가. 연구내용

다른 coumarin에 의해 umberiferone의 세포내 전달량이 증가한 이유가 efflux pump이 P-glycoprotein을 억제하여 발생한 일인지 확인하고자 하였다.

### 나. 연구방법

가) MCF-7과 MCF-7/MDR 세포의 P-gp 발현량 비교

- (1) MCF-7과 MCF-7/MDR 세포의 RNA를 추출하였다.
- (2) 각 세포의 RNA를 이용하여 cDNA를 만들었다.
- (3) P-gp와 GAPDH primer를 이용하여 PCR을 수행하였다.
- (4) 전기영동을 통해 PCR 생산물의 양을 비교하였다. (2% 아가로스 겔을 이용)

나) MCF-7 세포에서 각 coumarin의 P-gp 억제 확인 실험

- (1) MCF-7 세포에 각 coumarin을 64.8  $\mu\text{g/ml}$  처리하여 4시간동안 인큐베이션하였다. 이때 양성대조군으로 베라파밀 (verapamil, Vera) 100  $\mu\text{M}$ 을 사용하였다.
- (2) 배양액 제거 후 PBS를 이용하여 세포를 세척하였다.
- (3) Rhodamine 123 (10  $\mu\text{M}$ )를 세포에 처리하여 1시간동안 인큐베이션하였다.
- (3) 배양액 제거 후 PBS를 이용하여 3회 세척하였다.
- (4) 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포를 용해시켰다.



(5) 세포내 Rhodamine 123을 비교하기 위하여 excitation 495 nm, emission 538 nm에서 형광을 측정하였다.

다) MCF-7/MDR 세포에서 각 coumarin의 P-gp 억제 확인 실험

(1) MCF-7 세포에 각 coumarin을 64.8 µg/ml 처리하여 4시간동안 인큐베이션하였다. 이때 양성대조군으로 베라파밀 (verapamil, Vera) 100 µM을 사용하였다.

(2) 배양액 제거 후 PBS를 이용하여 세포를 세척하였다.

(3) Rhodamine 123 (10 µM)를 세포에 처리하여 1시간동안 인큐베이션하였다.

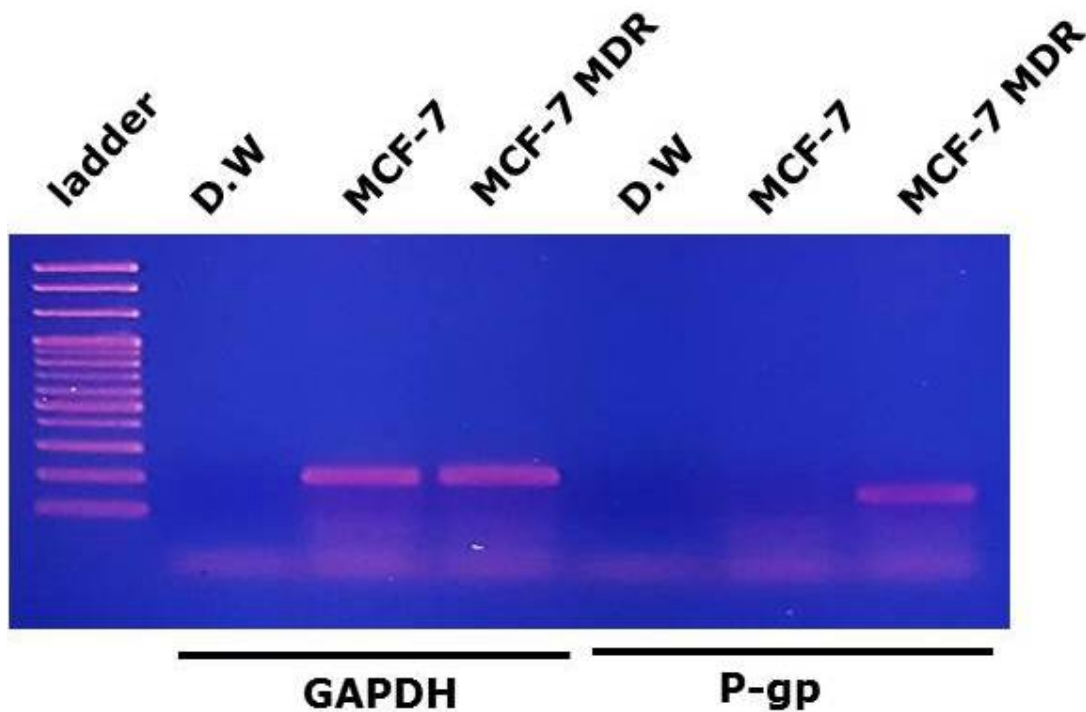
(3) 배양액 제거 후 PBS를 이용하여 3회 세척하였다.

(4) 0.1% Triton X-100을 이용하여 세포를 용해시켰다.

(5) 세포내 Rhodamine 123을 비교하기 위하여 excitation 495 nm, emission 538 nm에서 형광을 측정하였다.

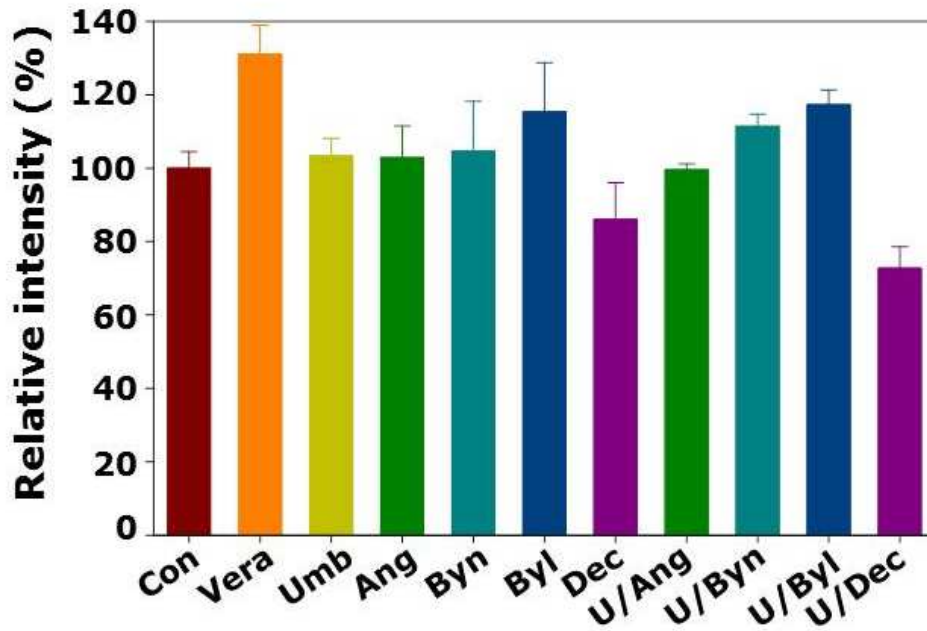
다. 연구결과

가) P-gp 발현량 비교결과는 아래처럼 MCF-7/MDR 세포에서 월등히 높게 나타났다.



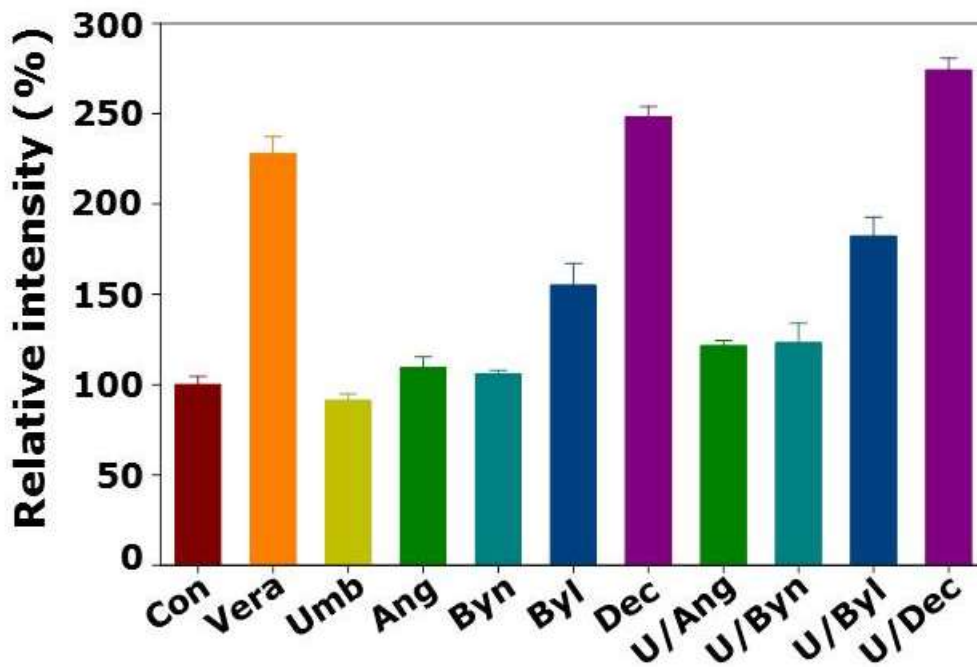
MCF-7과 MCF-7/MDR에서 RT-PCR 이후에 전기영동 실험을 통해 P-gp 발현량 비교

나) MCF-7 세포에서 각 coumarin의 P-gp 억제 확인 실험 결과는 아래와 같다. P-gp 발현량이 적은 MCF-7 세포는 각각의 coumarin의 영향을 크게 관찰하지 못했다.



MCF-7에서 각 coumarin과 그 혼합물의 P-gp 억제 효과 검증

다) MCF-7/MDR 세포에서 각 coumarin의 P-gp 억제 확인 실험결과는 아래와 같다. decursin과 byakangelicol이 P-gp의 억제자로 작용하는 것으로 보인다. 그러나 byakangelicin의 억제효과가 없는 것으로 나타나 5절의 세포내 전달량 증가는 P-gp 억제에 의한 것은 아닌 것으로 판단된다.



MCF-7/MDR에서 각 coumarin과 그 혼합물의 P-gp 억제 효과 검증

## 7. 다른 coumarin에 의한 umberiferone의 대사 작용 억제

### 가. 연구내용

다른 coumarin에 의해 umberiferone의 대사 작용이 억제되어 체내 분포에 영향을 미친것인지 확인하고자 하였다. umberiferone은 형광을 띄고 있으나 대사되어 대사체가 되면 그 형광을 잃는다는 특성을 이용하였으며, 체내에서 대사되는 것과 같은 환경을 만들기 위하여 umberiferone이 많이 전달된 장기인 뇌와 이자, 그리고 효소가 풍부한 장기인 간의 균질액을 이용하였다.

### 나. 연구방법

가) 뇌와 이자 균질액에서 umberiferone 혼합물의 대사 정도 비교

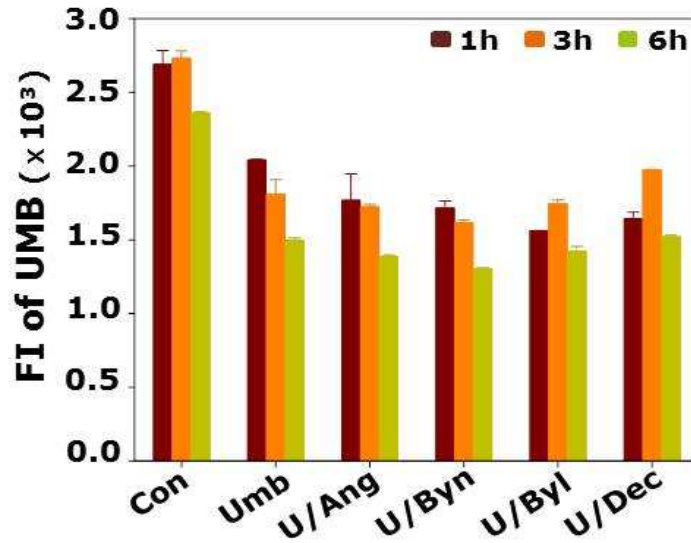
- (1) Phosphate buffer를 이용하여 1 g/ml이 되도록 뇌와 이자를 균질화 하였다.
- (2) 균질액을 1,300g에서 5분간 원심 분리하여 상층액만 분리하였다. (이때 온도는 4°C로 유지하였다.)
- (3) umberiferone과 혼합물 (1:1 질량 비율)을 앞서 준비한 상층액과, UDPGA (5 mM), 그리고 MgCl<sub>2</sub> (10 mM)을 넣고 37°C에서 인큐베이션하였다. 이때 umberiferone의 농도는 1.62 µg/ml로 고정하였다.
- (4) 시간별로 (1, 3, 6 시간) excitation 325 nm, emission 495 nm에서 형광을 측정하여 남아있는 umberiferone을 분석하였다.

나) 간 균질액에서 umberiferone 혼합물의 대사 정도 비교

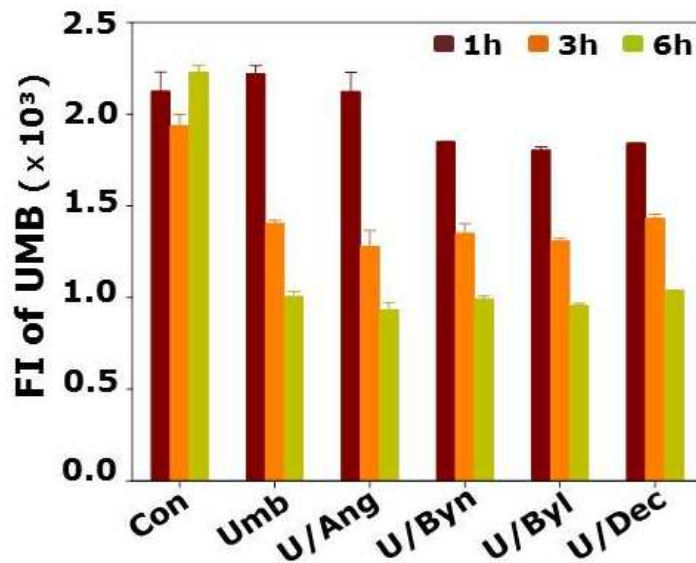
- (1) Phosphate buffer를 이용하여 1 g/ml이 되도록 간을 균질화 하였다.
- (2) 균질액을 1,300g에서 5분간 원심 분리하여 상층액만 분리하였다. (이때 온도는 4°C로 유지하였다.)
- (3) umberiferone과 혼합물 (1:1, 1:10 질량 비율)을 앞서 준비한 상층액과, UDPGA (5 mM), 그리고 MgCl<sub>2</sub> (10 mM)을 넣고 37°C에서 인큐베이션하였다. 이때 umberiferone의 농도는 1.62, 16.2 µg/ml으로 고정하였다.
- (4) 시간별로 (1 시간) excitation 325 nm, emission 495 nm에서 형광을 측정하여 남아있는 umberiferone을 분석하였다.

### 다. 연구결과

가) 뇌와 이자 균질액에서 umberiferone 혼합물의 대사 정도 비교한 결과는 아래처럼 umberiferone과 혼합물에 있어서 차이를 발견할 수 없었다.

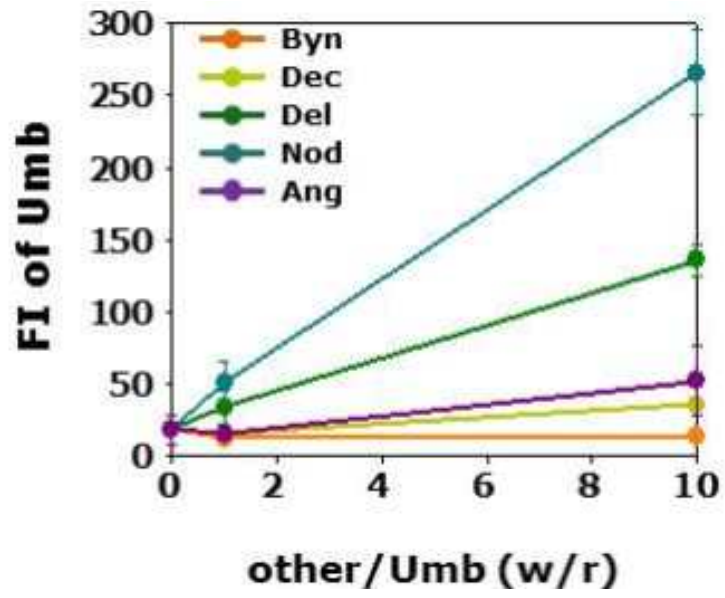


뇌 균질액에 처리한 umberiferone과 혼합물의 umberiferone 대사 정도 비교



이차 균질액에 처리한 umberiferone과 혼합물의 umberiferone 대사 정도 비교

나) 간 균질액에서 umberiferone 혼합물의 대사 정도 비교결과는 아래와 같다. umberiferone 단독일 때에 비하여 angelicin과 혼합하였을때 2.7배, decursin과 혼합시 2.1배, byakangelicol과 혼합시 1.6배 많은 umberiferone이 남아있는 것을 확인하였으나, byakangelicin은 umberiferone의 대사에 영향을 주지 않는 것으로 보인다.



간 균질액에 처리한 혼합물 비율에 따른 umberiferone 대사 정도 비교

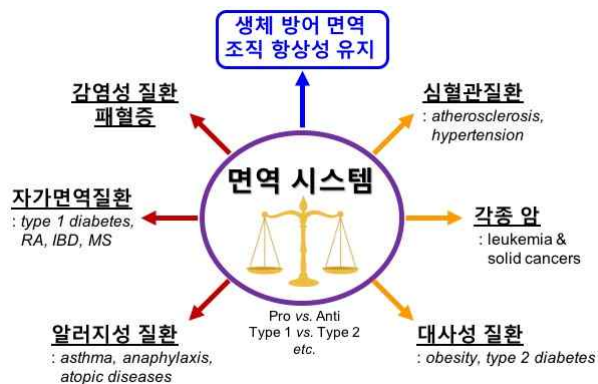
## 제5장 노인성질환 관련 *in vivo* 및 *in vitro* 활성 검증

- 약용작물 함유성분의 염증성 장질환에 대한 효능 평가
- 약용작물 함유성분의 다발성 경화증에 대한 효능 평가
- 약용작물 함유성분의 항생제내성 황색포도알균 감염에 의해 유발되는 패혈증에 대한 효능 평가

### 제1절 약용작물 유효 성분의 염증성 질환 효능 검증

#### 1. 연구내용

- 최근 의료 기술과 진단 기법의 발전은 인간 수명 연장이라는 밝은 미래와 동시에 노인 문제의 양면성을 부각시키며, 특히 노인성 질환에 대한 관심이 급격히 증가하고 있다. 최근 다양한 노인성 질환의 원인으로 면역 세포에 의해 매개되는 염증 반응의 이상은 감염성 질환과 같은 면역성 질환 이외에도 다양한 대사성 질환, 퇴행성 질환 및 각종 암의 발병과 악화를 유발하는 원인으로 규명되고 있다.



- 본 연구팀은 4종의 약용식물 (당위, 오미자, 백수오, 강황)에서 유래한 29종의 화합물을 대상으로, 염증 반응의 조절 활성을 갖는 신규 유효물질들을 선별하기 위하여 *in vitro* 효능 검증 연구를 수행하였다. 성공적인 연구 수행 결과 마우스 effector T 세포의 분화와 활성을 조절하는 유효물질과, 마우스 대식세포의 염증 반응을 제어하는 유효 물질을 선별하였고, 자가면역 및 감염 동물 모델을 이용한 *in vivo* 실험을 통해 염증성 장염, 경화성 다발증, 항생제내성 황색포도알균 감염에 의한 패혈증 및 리스테리아증에 대한 치료 효능을 분석하였다.

## Natural products from 4 medicinal plants 29 natural compounds used in screening

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Angelica gigas</i> (당귀) </li> <li>2. <i>Schisandra chinensis</i> (오미자) </li> <li>3. <i>Cynachum</i> (백수오) </li> <li>4. <i>Curcuma longa</i> (강황) </li> </ol>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;"><i>Angelica gigas</i> (당귀)</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;"><i>Schisandra</i> (오미자)</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;"><i>Cynachum</i> (백수오)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="padding: 2px;">1. 7-Hydroxycoumarin</td><td style="padding: 2px;">13. Gomisin D</td><td style="padding: 2px;">22. Beta-Sitosterol</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">2. Angelicin</td><td style="padding: 2px;">14. Gomisin G</td><td style="padding: 2px;">23. Conduritol</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">3. Byakangelicin</td><td style="padding: 2px;">15. Gomisin J</td><td style="padding: 2px;">24. Eleutheroside</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">4. Byakangelicol</td><td style="padding: 2px;">16. Angeloylgomisin H</td><td style="padding: 2px;">25. Geniposide</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">5. Isoimperatorin</td><td style="padding: 2px;">17. Angeloylgomisin O</td><td style="padding: 2px;">26. Feretoside</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">6. Isopimpinellin</td><td style="padding: 2px;">18. Benzoylgomisin O</td><td style="padding: 2px;">27. 6-alpha-Hydroxygeniposide</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">7. Osthol</td><td style="padding: 2px;">19. Gomisin H</td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">8. Phellopterin</td><td style="padding: 2px;">20. Gomisin N</td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">9. Xanthotoxol</td><td style="padding: 2px;">21. Gomisin O</td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">10. Oxypeucedanin</td><td></td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">11. Decursin</td><td></td><td></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">12. Decursinon angelate</td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	<i>Angelica gigas</i> (당귀)	<i>Schisandra</i> (오미자)	<i>Cynachum</i> (백수오)	1. 7-Hydroxycoumarin	13. Gomisin D	22. Beta-Sitosterol	2. Angelicin	14. Gomisin G	23. Conduritol	3. Byakangelicin	15. Gomisin J	24. Eleutheroside	4. Byakangelicol	16. Angeloylgomisin H	25. Geniposide	5. Isoimperatorin	17. Angeloylgomisin O	26. Feretoside	6. Isopimpinellin	18. Benzoylgomisin O	27. 6-alpha-Hydroxygeniposide	7. Osthol	19. Gomisin H		8. Phellopterin	20. Gomisin N		9. Xanthotoxol	21. Gomisin O		10. Oxypeucedanin			11. Decursin			12. Decursinon angelate		
<i>Angelica gigas</i> (당귀)	<i>Schisandra</i> (오미자)	<i>Cynachum</i> (백수오)																																						
1. 7-Hydroxycoumarin	13. Gomisin D	22. Beta-Sitosterol																																						
2. Angelicin	14. Gomisin G	23. Conduritol																																						
3. Byakangelicin	15. Gomisin J	24. Eleutheroside																																						
4. Byakangelicol	16. Angeloylgomisin H	25. Geniposide																																						
5. Isoimperatorin	17. Angeloylgomisin O	26. Feretoside																																						
6. Isopimpinellin	18. Benzoylgomisin O	27. 6-alpha-Hydroxygeniposide																																						
7. Osthol	19. Gomisin H																																							
8. Phellopterin	20. Gomisin N																																							
9. Xanthotoxol	21. Gomisin O																																							
10. Oxypeucedanin																																								
11. Decursin																																								
12. Decursinon angelate																																								

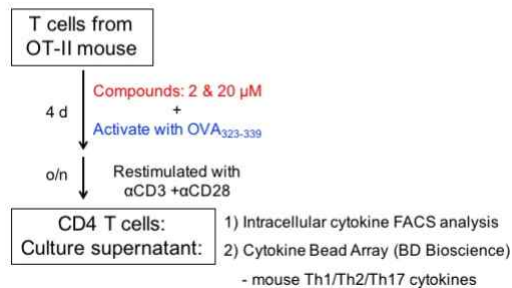
<i>Curcuma</i> (강황)
28. Demethoxycurcumin
29. Bisdemethoxycurcumin

### 2. 연구방법

#### (1) T 세포 염증 반응 분석

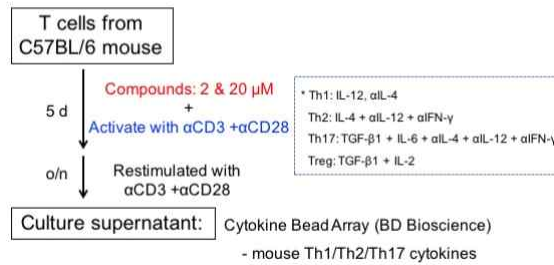
- OT-II transgenic 마우스로부터 CD4 T 세포를 분리하고 0.5 µg/ml OVA<sub>323-339</sub> peptide를 처리하고 4일간 배양하여 effector T 세포로 활성화시킨다. 이 때 29종의 약용식물 유래 화합물들을 30분간 전처리하고 활성화된 effector T 세포의 배양액을 Th1/Th2/Th17 Cytokine Beads Array kit를 사용하여 분리된 염증성 사이토카인의 양을 정량하였다.

#### Screening: effector T cell activation



- C57BL/6 마우스로부터 CD4 T 세포를 분리하고 2.5 µg/ml anti-CD3 항체와 2.5 µg/ml anti-CD28 항체를 처리하고 IL-2 존재 하에 5일간 배양하여 helper T 세포로 분화시킨다. 이 때 10 ng/ml IL-12, 10 µg/ml anti-IL-4 항체를 첨가하여 Th1 세포로, 10 ng/ml IL-4, 10 µg/ml anti-IL-12 항체, 10 µg/ml anti-IFN-γ 항체를 첨가하여 Th2 세포로, 5 ng/ml TGF-β1, 10 ng/ml IL-6, 10 µg/ml anti-IL-4 항체, 10 µg/ml anti-IL-12 항체, 10 µg/ml anti-IFN-γ 항체를 첨가하여 Th17 세포로, 5 ng/ml TGF-β1 만을 처리하여 Treg 세포로의 분화를 유도하였다. 이 때 29종의 약용식물 유래 화합물들을 30분간 전처리하고 활성화된 effector T 세포를 intracellular cytokine staining 기법과 Th1/Th2/Th17 Cytokine Beads Array kit를 사용하여 helper T 세포의 분화와 기능을 분석하였다.

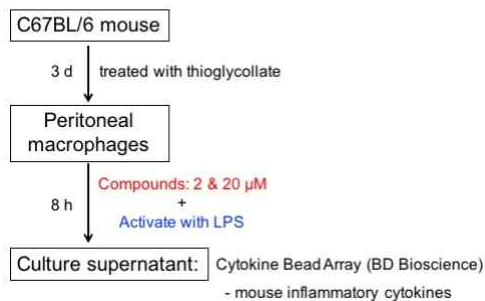
## Helper T cell differentiation



### (2) 대식세포 염증 반응 분석

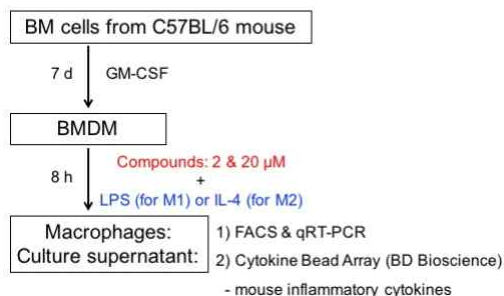
- 3% Thioglycollate를 C57BL/6 마우스 복강에 투여하고 3일 후 복강 대식세포를 분리하고 48-well plate에 부착시킨다. 부착된 대식세포에 29종의 약용식물 유래 화합물들을 30분간 전처리하고 200 ng/ml LPS를 처리하여 8 시간 동안 활성화하였다. 활성화된 복강 대식세포로부터 분리된 염증성 사이토카인들을 Mouse Inflammatory Cytokine Beads Array kit를 사용하여 정량하였다.

## Screening: macrophage activation



- C57BL/6 마우스의 골수 세포를 분리하여 5 ng/ml GM-CSF 존재하에 7일간 배양시킨다. 7일 후 29종의 약용식물 유래 화합물들을 30분간 전처리하고 200 ng/ml LPS를 처리하여 M1 대식세포로, 10 ng/ml IL-4를 처리하여 M2 대식세포로 활성화시킨다. LPS 및 IL-4 처리 8시간 후 flow cytometry 기법 및 Mouse Inflammatory Cytokine Beads Array kit를 이용하여 대식세포의 분화와 기능을 분석하였다.

## M1 & M2 macrophage polarization

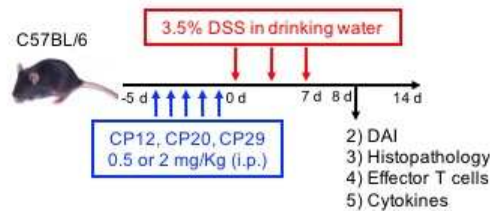




(3) 염증성 장질환 동물 모델

- 수컷 C57BL/6 마우스에 3% dextran sodium sulfate (DSS)가 함유된 음용수를 7일간 공급하여 염증성 대장염을 유발하였다. 이때 T 세포 염증반응 억제 유효물질로 선별된 화합물을 복강으로 4회 투여하고 DSS에 의해 유발되는 염증성 대장염 증상의 완화 여부를 분석하였다. 체중, Disease Activity Index (DAI), H&E 염색을 이용한 조직병리 분석, flow cytometry 기법을 이용한 염증세포 분석, 혈액내 염증성 사이토카인 분석을 수행하였다.

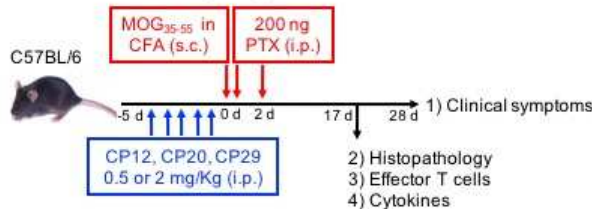
**염증성 장염 모델 (IBD)**



(4) 다발성 경화증 동물 모델

- 수컷 C57BL/6 마우스에 100 µg의 MOG<sub>35-33</sub> peptide와 Complete Freud's Adjuvant (CFA)를 혼합하여 피하 투여하고, 200 ng/ml pertussis toxin을 2회 복강 투여하여 다발성 경화증을 유발하였다. 이때 T 세포 염증반응 억제 유효물질로 선별된 화합물을 복강으로 4회 투여하고 다발성 경화증 증상의 완화 여부를 분석하였다. 28일간의 병증, 신경조직의 병리분석, 염증세포 분석, 사이토카인 분석을 수행하였다.

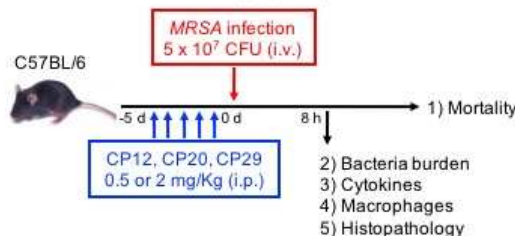
**다발성 경화증 모델 (EAE)**



(5) 항생제내성 황색포도알균 감염 패혈증 모델

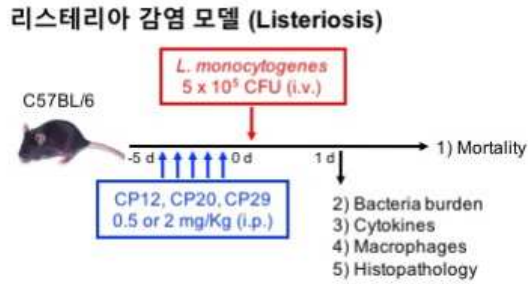
- 8주령의 C57BL/6 마우스 꼬리 정맥으로 5 x 10<sup>7</sup> CFU의 항생제내성 황색포도알균 (*Methicillin-resistant S. Aureus*, MRSA)를 감염시킨다. 이때 대식세포 염증반응 억제 유효물질로 선별된 화합물을 복강으로 4회 투여하고 MRSA 감염에 의한 패혈증 증상의 완화 여부를 분석하였다. 마우스의 사망률, 혈액 및 조직내 감염균의 역가, 염증성 사이토카인, 대식세포, 조직병리 분석을 수행하였다.

**항생제 내성균 감염 모델 (sepsis)**



(6) 리스테리아 감염 동물 모델

- 8주령의 C57BL/6 마우스 꼬리 정맥으로  $5 \times 10^5$  CFU의 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*)를 감염시킨다. 이때 대식세포 염증반응 억제 유효물질로 선별된 화합물을 복강으로 4회 투여하고 리스테리아 감염에 의한 리스테리아증 증상의 완화 여부를 분석하였다. 마우스의 사망률, 혈액 및 조직내 감염균의 역가, 염증성 사이토카인, 대식세포, 조직병리 분석을 수행하였다.

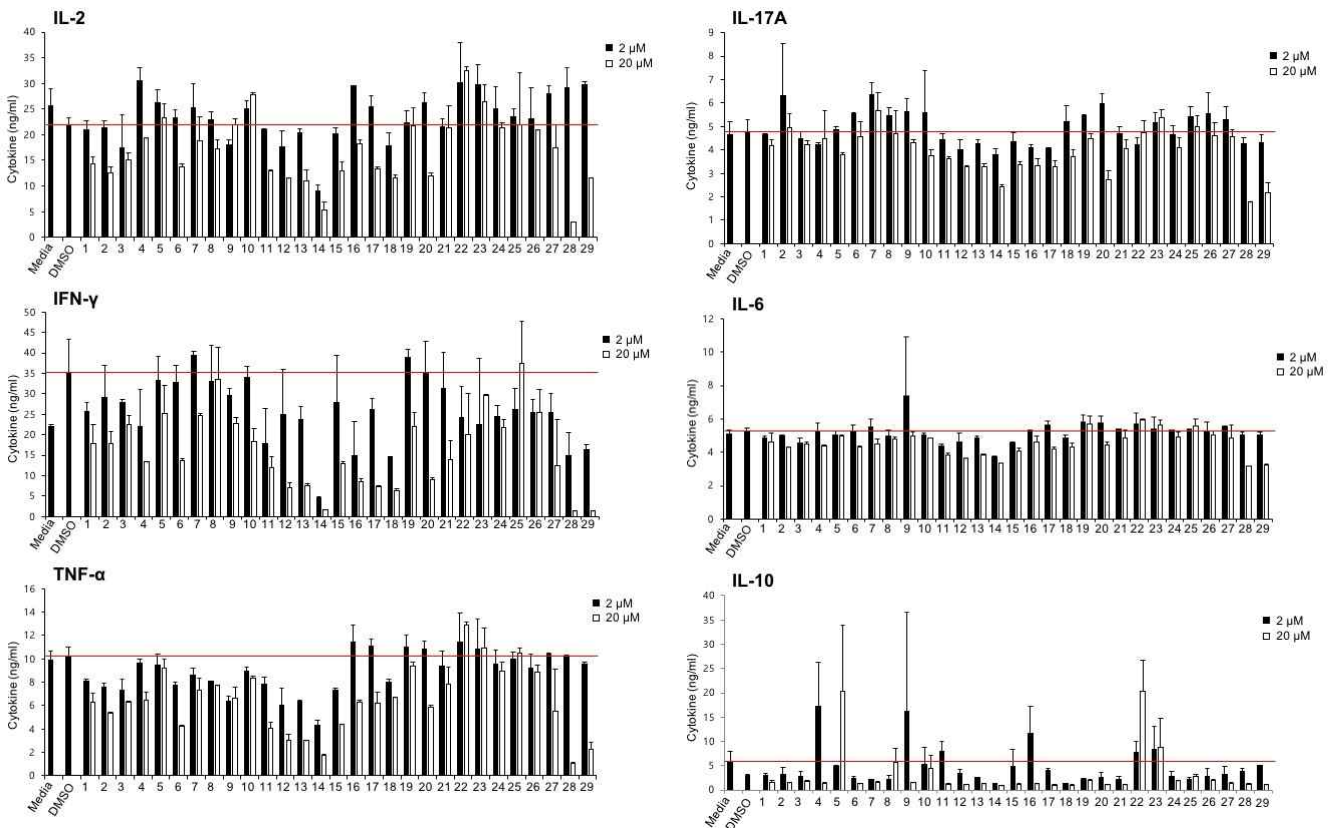


3. 연구결과

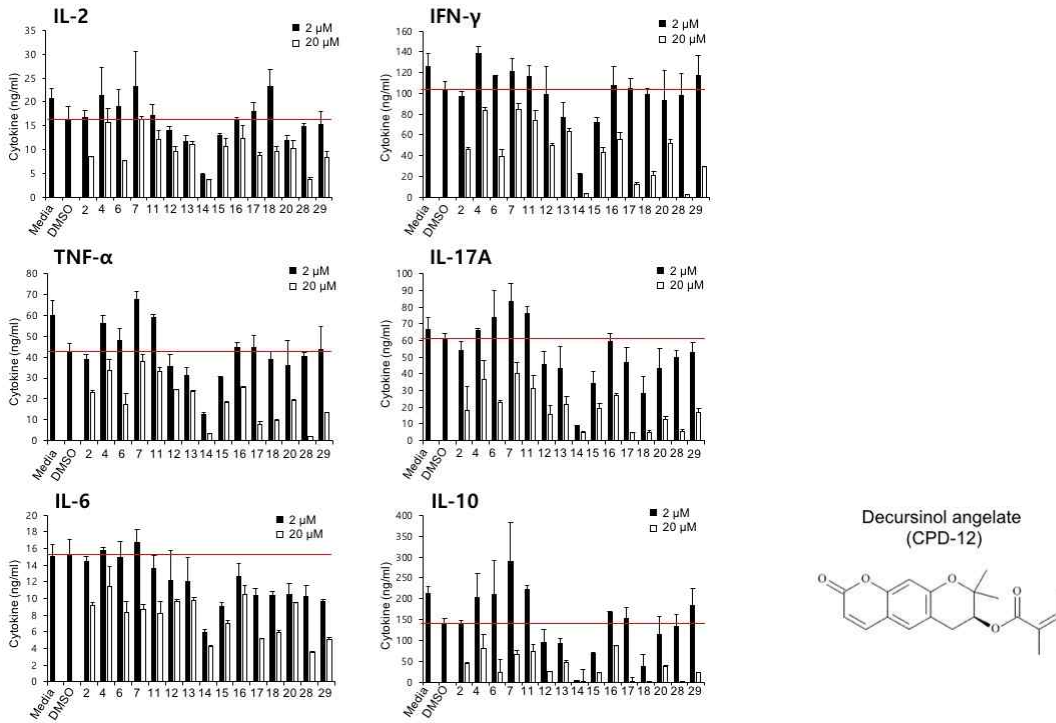
(1) In vitro T 세포 염증반응 억제 유효물질 선별

① OT-II T 세포 활성화 억제 유효성분 스크리닝

- T 세포의 염증반응을 억제하는 유효성분을 선별하기 위하여 4종의 약용작물 유래 29종의 화합물을 전처리 하였을 때 OVA 항원에 의해 활성화된 OT-II T 세포의 염증성 사이토카인 분비를 유의하게 제어하는 유효 성분 15종을 1차 선별하였다 (#2, #4, #6, #7, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #20, #28, #29).

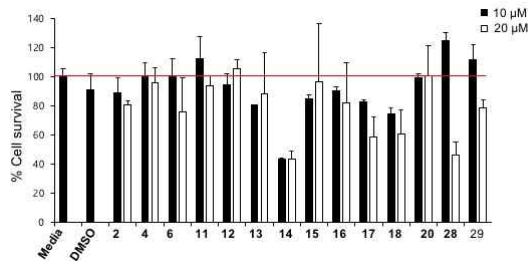


- 1차 선별된 약용작물 유래 15종의 화합물을 2차 스크리닝 과정을 통해 OT-II T 세포 염증성 사이토카인을 농도 의존적으로 유의하게 억제하는 6종 (#12, #13, #14, #15, #28, #29)의 유효 물질은 2차 선별하였다. 이중, ②항의 세포 독성 및 세포 분열 조절 평가를 통해 T 세포의 정상적 활성화에 영향을 미치지 않는 유효 성분 중 특히 IL-17 사이토카인 분비를 효율적으로 억제하는 당귀 유래 decursinol angelate (#13)을 후보 물질로 최종 선별하였다.

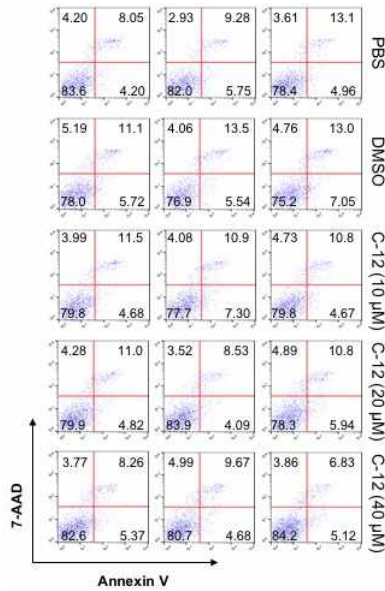


② T 세포에 대한 세포 독성 및 세포분열 조절 영향 분석

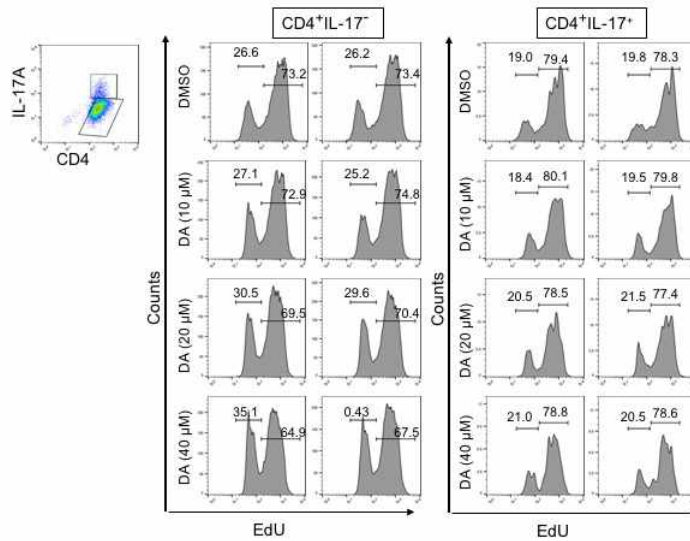
- T 세포의 염증반응 억제 효능이 탁월하다고 할지라도 정상 T 세포의 성장과 분열에 독성을 미치는 물질을 배제하기 위하여 MTT assay를 통해 1차 스크리닝된 약용작물 유래 15종의 화합물에 대한 세포 생존율을 평가하였다. #14, #17, #18, #28 화합물의 T 세포의 염증반응 억제 효능은 T 세포에 대한 독성에서 일부 기인한 것임을 확인하였다.



- 최종 선별된 유효 화합물 decursinol angelate의 정상 T 세포 성장에 미치는 영향을 재확인하기 위하여 Annexin-V 염색을 통한 apoptosis를 분석하였다. decursinol angelate를 농도별로 2일간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 T 세포의 apoptosis를 유발하지 않는 것으로 관찰되었다.



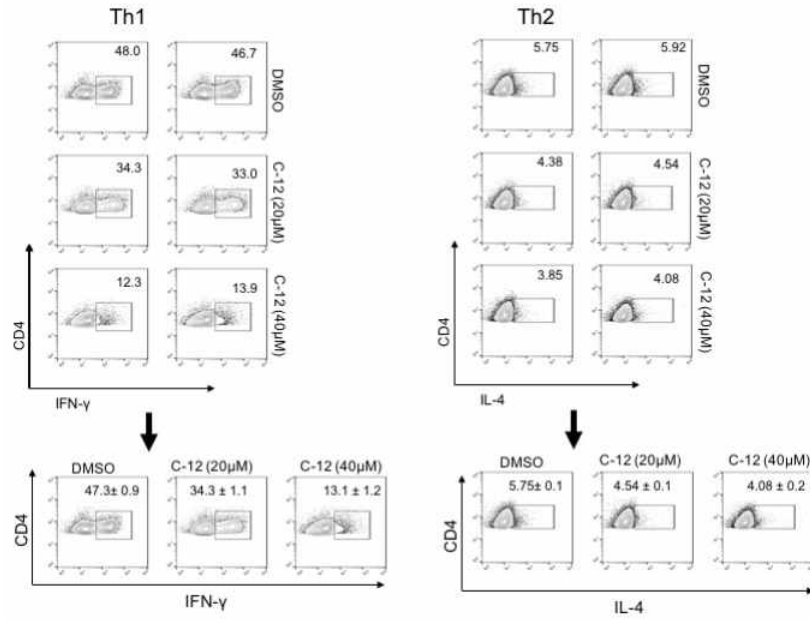
- Edu Uptake assay를 통해 항원 자극에 의한 T 세포의 세포 분열 조절 기능을 평가한 결과 유효 후보 화합물 decursinol angelate는 정상 T 세포의 세포 분열에는 영향을 미치지 않음을 입증하였다.



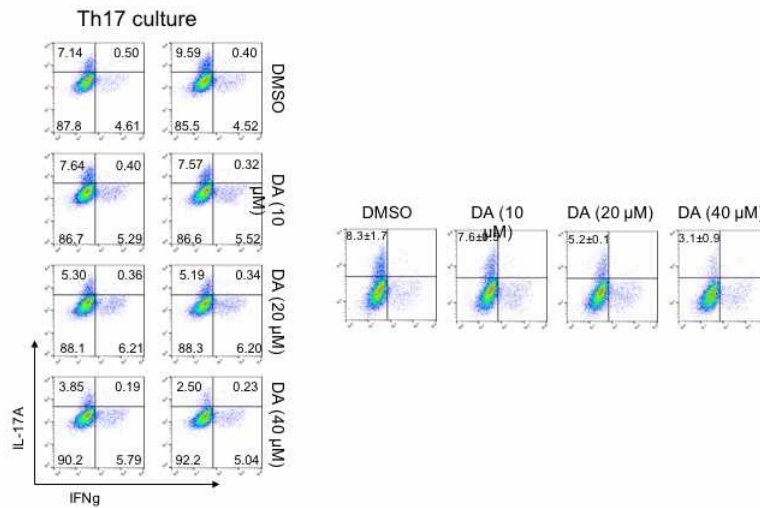
③ CD4 helper T 세포 분화 및 염증반응에 미치는 영향 평가

- 약용작물 유래 화합물의 T 세포 염증반응 억제 유효 성분 decursinol angelate의 helper T 세포의 분화와 염증반응에 미치는 영향을 평가하기 위해 CD4 T 세포에 decursinol angelate를 농도별로 처리하고 Th1, Th2, Th17 및 Treg 분화 조건에서 배양하였다.

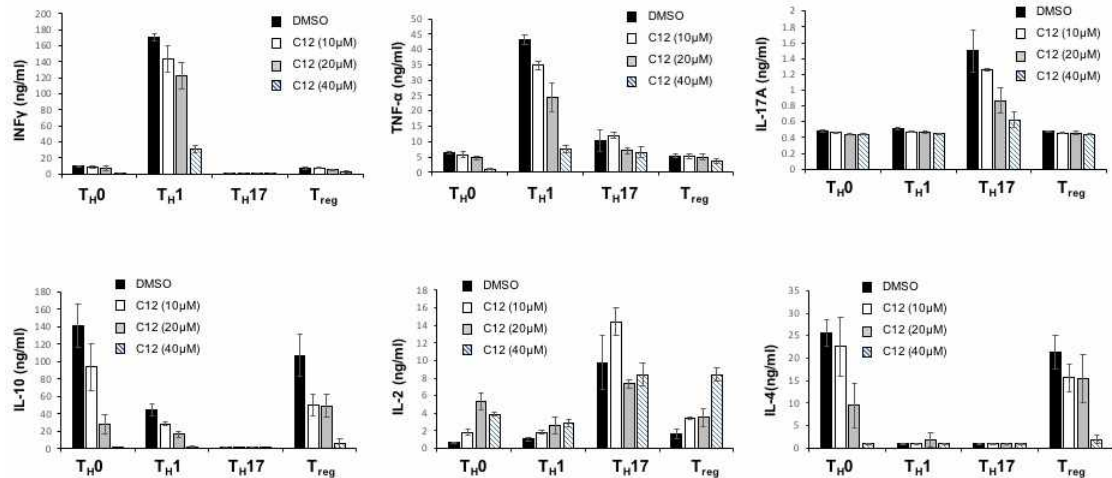
- Decursinol angelate 처리시 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 Th1 및 IL-4를 생산하는 Th2 세포로의 분화에는 영향을 미치지 못함을 intracellular cytokine staining을 통해 확인하였다. 단 고농도의 decursinol angelate 처리시 Th1 세포 분화 조건에서 IFN- $\gamma$  합성이 유의하게 저해되는 것이 관찰되었다.



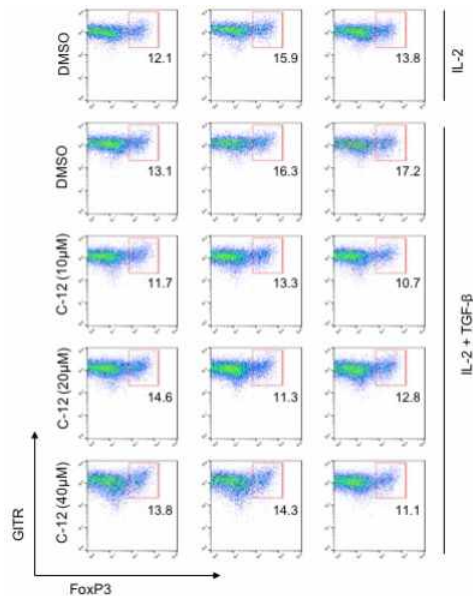
- 염증성 사이토카인 IL-17를 생산하는 Th17 세포 분화 조건에서 decursinol angelate를 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포내 IL-17 합성을 억제하는 현상을 확인하였다. 이러한 결과는 IL-17과 Th17 세포 관련 염증성 질환 및 자가면역질환에 대한 치료제로서의 decursinol angelate 가능성을 제시하였다.



- Decursinol angelate의 Th17-특이적 T 세포 염증반응 억제 효능은 helper T 세포의 배양액에 대한 Cytokine Beads Array 분석을 통해 재확인되었다.



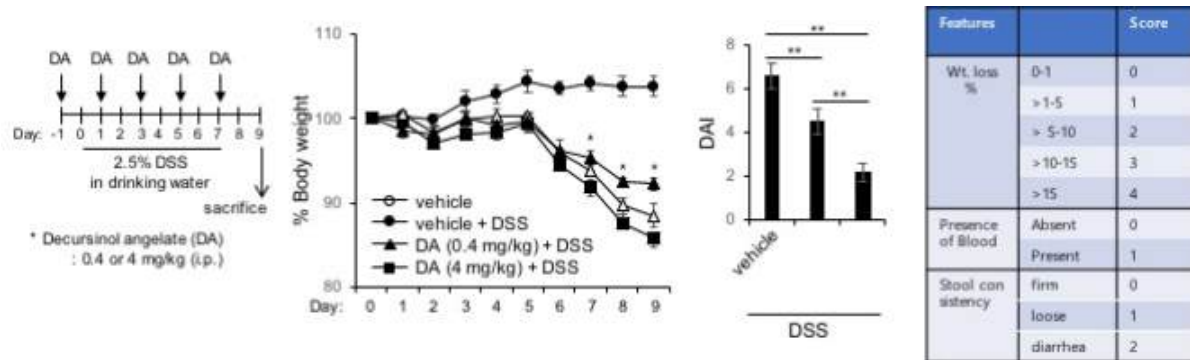
- Decursinol angelate의 Th17-특이적 T 세포 염증반응 억제 효능이 항염증성 Treg 세포의 분화 및 기능을 증진시킴으로써 발생하는 이차적인 효과인지 여부를 판단하기 위하여 Treg 세포 특이적 전사인자 FoxP3 염색 결과 Decursinol angelate Treg 세포의 분화에 영향을 미치지 못함을 입증하였다.



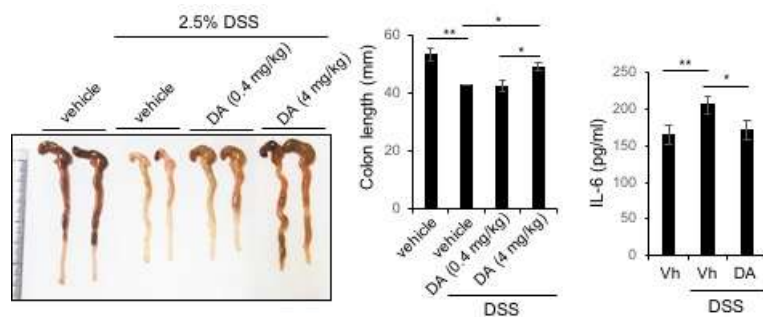
## (2) In vivo 염증질환 동물모델을 이용한 유효물질 효능 평가

### ① 염증성 장질환에 대한 효능 평가

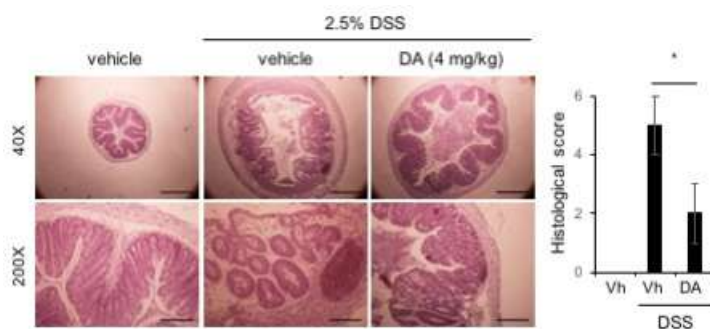
- 약용작물 유래 T 세포 염증반응 억제 유효물질로 선별된 decursinol angelate는 IL-17 사이토카인을 생산하는 Th17 세포의 분화와 기능을 억제한다는 in vitro 효능 평가 결과에 기초하여 관련 in vivo 염증질환에 대한 효능 평가를 수행하였다. 염증성 장질환은 크게 크론병과 궤양성 대장염으로 구별되며, Th17 세포의 비정상적인 염증반응이 염증성 장질환을 매개하는 것으로 보고된 바 있다. DSS를 처리하여 궤양성 대장염을 유발한 마우스에 decursinol angelate를 처리하였을 때 유의하게 체중 감소와 증상 (DAI)이 개선되는 것을 확인할 수 있었다.



- DSS에 의해 궤양성 대장염 유발된 마우스는 대장 길이와 맹장 크기의 현저한 감소가 관찰되며, 이때 decursinol angelate를 처리한 마우스들은 농도 의존적으로 대장 길이와 맹장 크기의 감소가 억제되는 효능을 나타내었다. 특히, 혈액 내 염증 반응의 지표인 IL-6 사이토카인의 유의한 감소가 관찰됨으로써 decursinol angelate의 항염증 효능을 제시하였다.

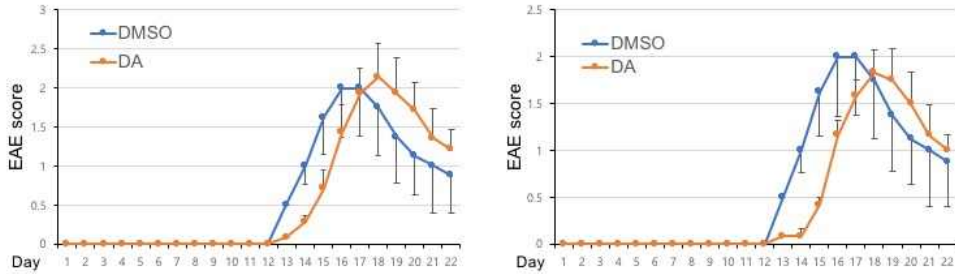
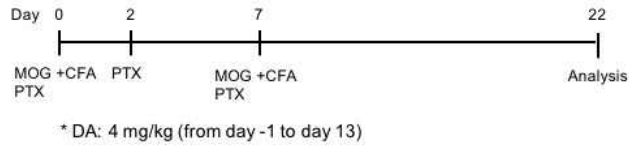


- 대장의 조직병리학적 분석 결과 DSS에 의해 유발되는 장 구조 이상, 간질층 증가, 염증 세포 유입 등의 현상이 decursinol angelate 처리에 의해 완화되는 것을 확인할 수 있었다.

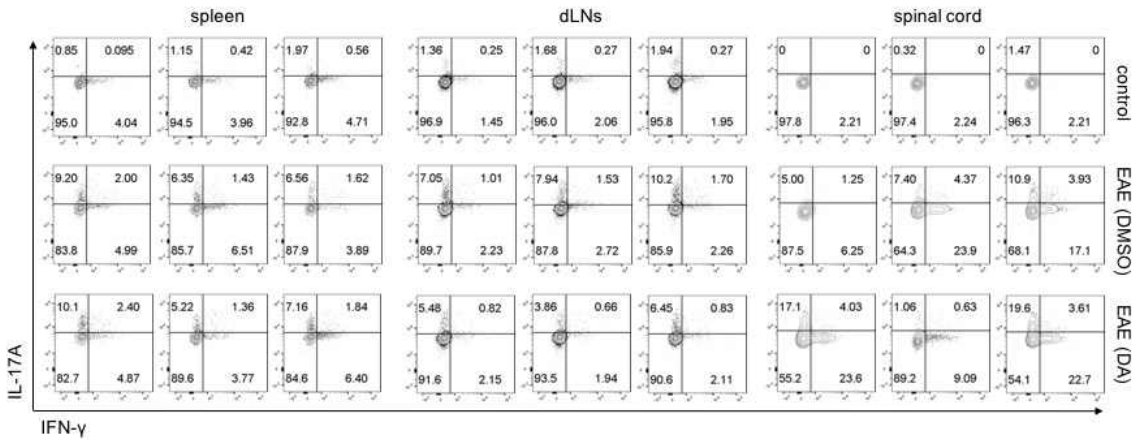


## ② 다발성 경화증에 대한 효능 평가

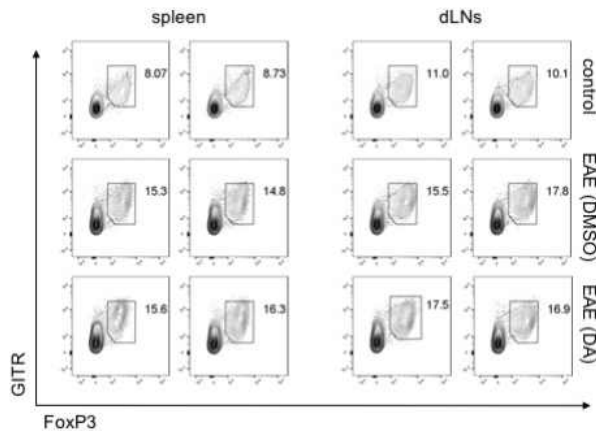
- 다발성 경화증 (multiple sclerosis)은 IL-17을 생산하는 Th17 세포가 비정상적으로 중추신경계에 침투하여 신경세포를 파괴하는 자가면역질환의 일종이다. In vitro 효능 평가에서 Th17 세포의 분화와 기능을 억제하는 것으로 입증된 decursinol angelate의 다발성 경화증에 대한 개선 효능을 평가하기 위하여 EAE (experimental autoimmune encephalitis) 마우스 모델에 적용하였다. 앞선 궤양성 장질환에 대한 효능 평가와 달리 2차례의 반복 실험을 통해 decursinol angelate는 다발성 경화증의 발병을 지연시키는 효과는 관찰되었으나 증상 개선 효능은 나타나지 않았다.



- EAE 유발 마우스의 비장, 림프절 및 척추 신경조직의 면역 세포들의 염증 반응 분석 결과에서도 decursinol angelate는 EAE 유발에 의해 증가된 IL-17 및 IFN- $\gamma$  등의 염증성 사이토카인을 분비하는 T 세포의 염증반응을 억제하지 못하였다.



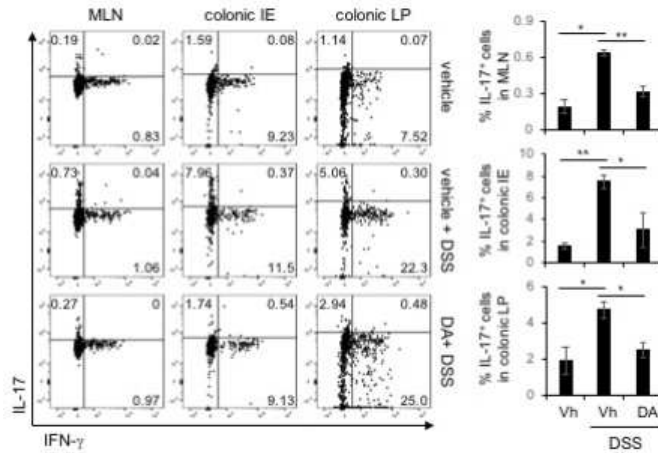
- 염증성 장질환 모델에서와 마찬가지로 decursinol angelate 처리는 EAE 유발 마우스에서 항 염증성 Treg 세포의 증가를 유도하지 못하였다. 결과적으로 유사한 Th17 세포 관련 염증성 질환이라 할지라도 decursinol angelate는 궤양성 장질환 치료에는 유효 화합물로서 입증된 반면, 다발성 경화증 개선에는 유효성이 없음이 확인되었다. 이에, decursinol angelate의 투여 경로에 따른 효능 평가에 관한 추가 연구가 필요한 것으로 판단된다.



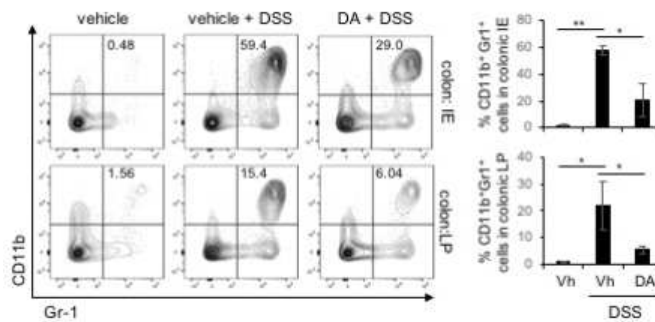


(3) 약용작물 유효 성분의 T 세포 염증 억제 기전 연구

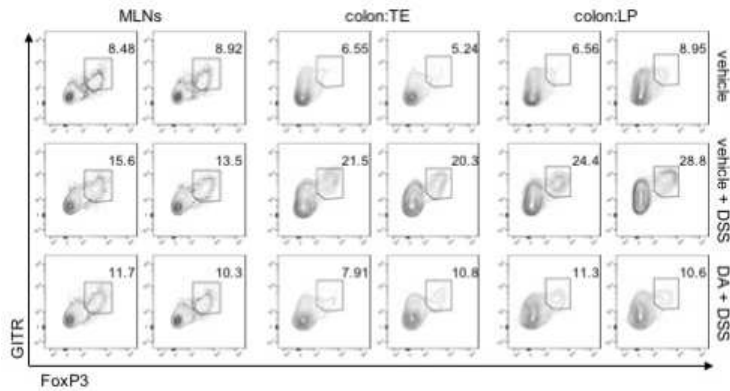
- 림프절과 장점막 조직에 분포하는 면역세포의 표현형 분석 결과 DSS에 의한 대장염 유발 마우스에서 IL-17과 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 CD4<sup>+</sup>T 세포의 분율이 급격하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 대장염 유발 마우스 decursinol angelate 처리시 유의하게 IL-17을 생산하는 helper T 세포가 감소하였고, 반면 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 helper T 세포는 영향을 받지 않았다. 즉, in vitro 결과와 동일하게 decursinol angelate는 Th17 세포의 활성화를 선별적으로 억제한다는 것을 in vivo 동물실험에서도 입증하였다.



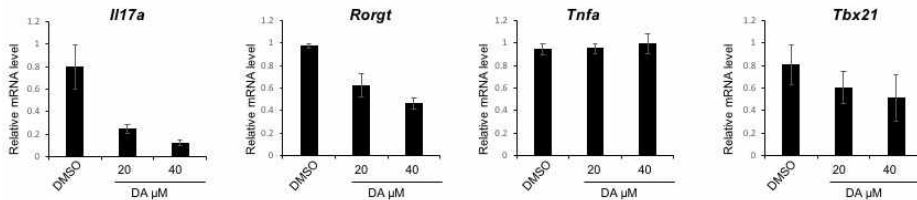
- 염증성 사이토카인 IL-17은 호중구 등의 과립세포의 염증 부위로 유입을 유도하는 기능을 한다. DSS 유발 대장염 마우스의 림프절과 장점막 조직에 CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 과립세포의 급격한 증가가 관찰되었고, decursinol angelate 처리에 의해 Th17 세포의 활성화 억제화 동시에 CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> 세포의 유입이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.



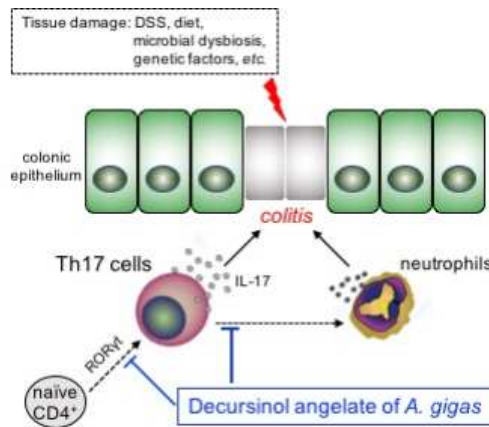
- 반면 in vitro 결과와 마찬가지로 decursinol angelate는 in vivo 대장염 동물 모델에서도 항 염증성 Treg 세포에 영향을 미치지 않았다.



- 앞선 decursinol angelate의 Th17 세포 특이적 활성화 조절 결과를 검증하기 위하여 궤양성 대장염 마우스에서 분리한 T 세포에 대한 qRT-PCR 분석 결과, IL-17 유전자 발현뿐만 아니라 Th17 세포 분화를 매개하는 전사인자 ROR $\gamma$ T 유전자의 발현이 decursinol angelate 처리에 의해 감소하는 반면, Th1 세포 관련 유전자 발현에는 영향을 미치지 않았다.



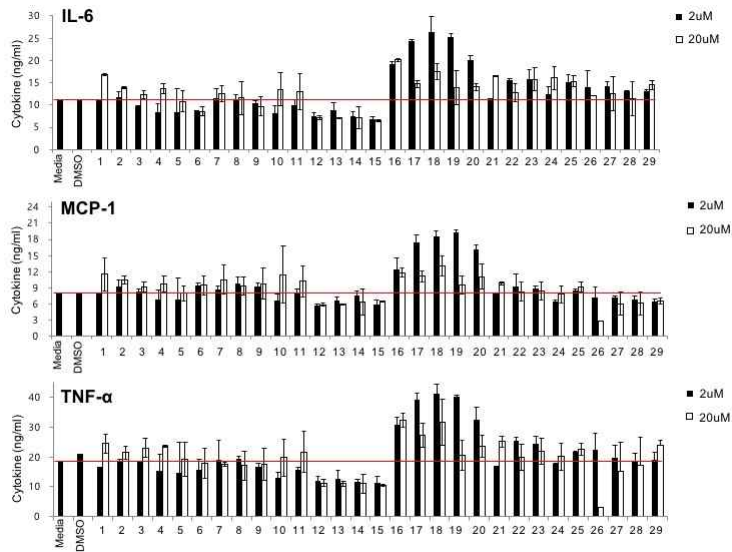
- 결론적으로 아래와 같은 decursinol angelate의 궤양성 대장염 억제 효능에 대한 작용 기전을 제시하였다.



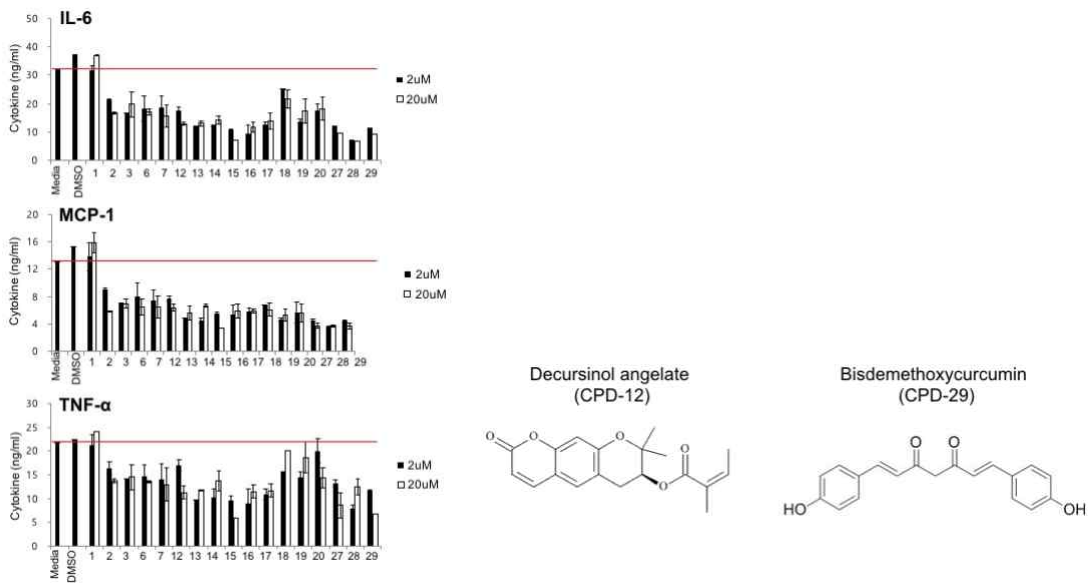
(4) In vitro 대식세포 염증반응 억제 유효물질 선별

① 복강 대식세포 활성화 억제 유효성분 스크리닝

- 대식세포의 염증반응을 억제하는 유효성분을 선별하기 위하여 4종의 약용작물 유래 29종의 화합물을 전처리 하였을 때 LPS에 의해 활성화된 복강 대식세포의 염증성 사이토카인 분비를 유의하게 제어하는 유효 성분 17종을 1차 선별하였다 (#1, #2, #3, #6, #7, #12, #13, #14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #27, #28, #29).

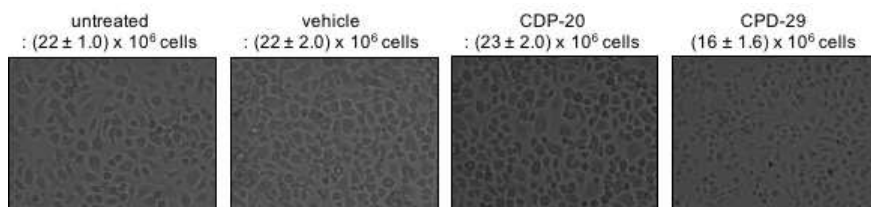


- 1차 선별된 약용작물 유래 17종의 화합물을 2차 스크리닝 과정을 통해 대식세포 염증성 사이토카인을 농도 의존적으로 유의하게 억제하는 동시에 대식세포에 대한 세포 독성이 없는 2종 (#12, #29)의 유효 물질을 2차 선별하였다.



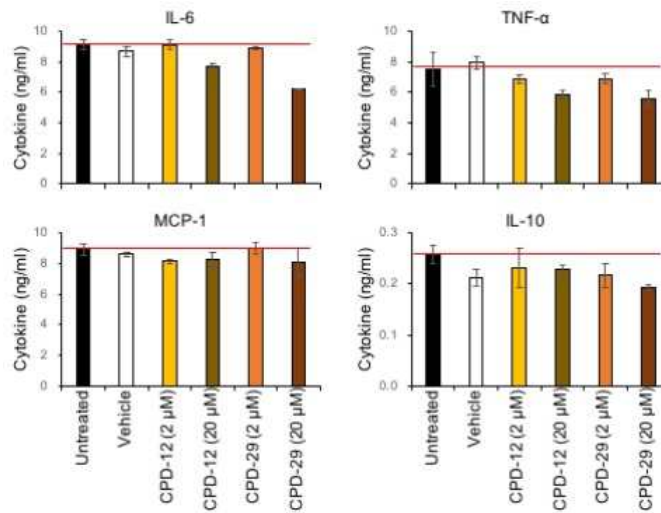
## ② 대식세포에 대한 세포 독성 및 세포성장 조절 영향 분석

- 세포생물학적 분석 결과 decursinol angelate (CPD-12) 처리 경우와 달리 bisdemethoxycurcumin (CPD-29)의 경우 약용작물 유래 후보물질에 대한 염증성 대식세포 활성화 억제 효능은 대식세포 자체의 성장 억제 효능에 기인할 수 있음이 관찰되었다.

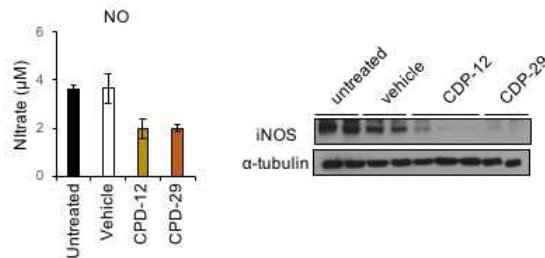


③ 골수유래 대식세포 분화 및 염증반응에 미치는 영향 평가

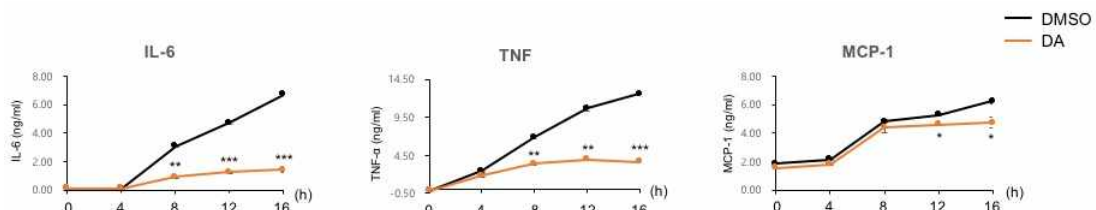
- 골수 세포를 GM-CSF 존재하에 배양하여 BMDM으로 분화시킨 후 LPS 자극에 의해 활성화된 염증성 대식세포에 의한 분비되는 사이토카인 및 키모카인들을 CBA 기법으로 측정된 결과, 20  $\mu$ M 농도의 decursinol angelate (CPD-12)와 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29) 전처리시 염증성 사이토카인 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비를 억제하였다. 반면 항염증성 사이토카인 IL-10의 분비를 증가시키지는 못하는 것을 관찰하였다.



- 염증성 대식세포로부터 생산되는 면역조절물질 NO (Nitric oxide) 및 NO 합성효소 (iNOS)의 단백질 발현이 decursinol angelate (CPD-12)와 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29) 처리에 의해 감소함을 입증하였다.

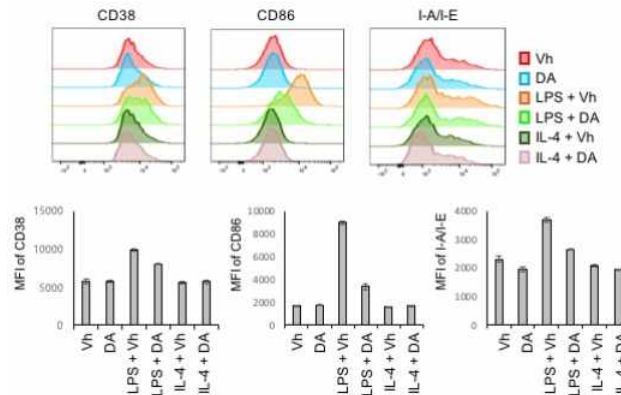


- LPS 처리후 시간별 분석을 통해 20  $\mu$ M 농도의 decursinol angelate (DA) 처리에 의해 유의하게 BMDM의 IL-6, TNF, MCP-1의 분비를 감소시킴을 확인하였다.



- 염증성 M1 대식세포의 활성화 지표로서 표면 항원 CD38, CD86, class II MHC (I-A/I-E)의 발현 정도를 flow cytometry 기법에 의해 분석한 결과, decursinol angelate (DA)는 LPS 자극

에 의해 증가되는 CD38, CD86, class II MHC의 세포 표면 발현을 모두 유의하게 억제함을 확인하였다.

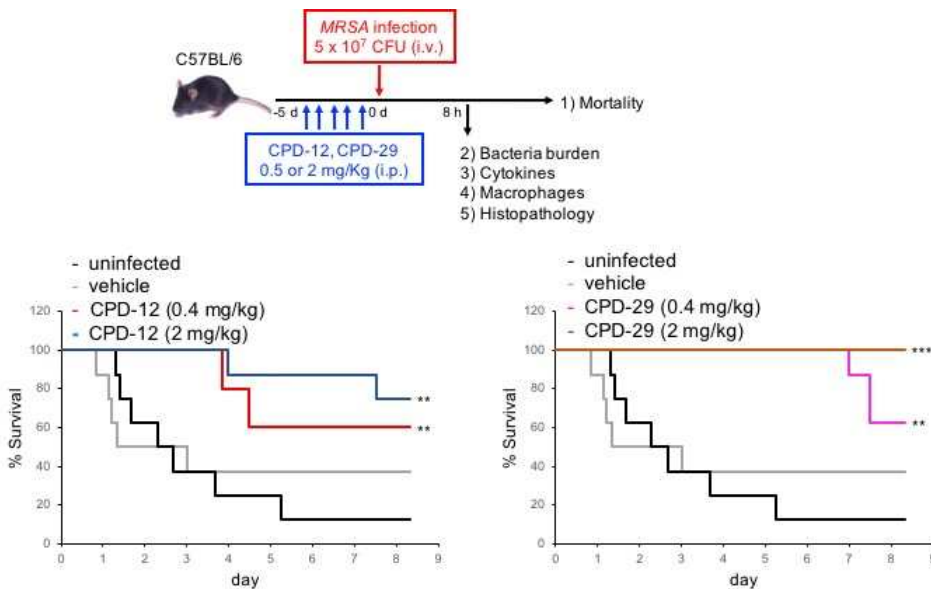


(5) In vivo 감염질환 동물모델을 이용한 유효물질 효능 평가

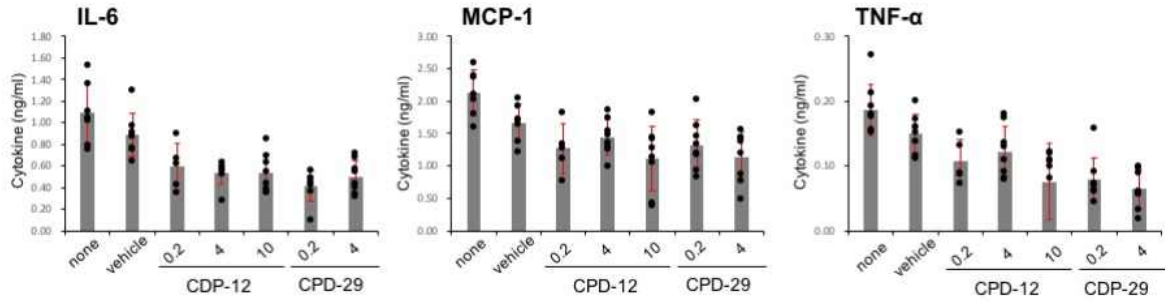
① 항생제내성 황색포도알균 감염에 의해 유발되는 패혈증에 대한 효능 평가

- 병원균 감염시 염증성 대식세포의 비정상적 활성화에 의한 염증성 사이토카인의 과도한 증가는 패혈증을 유발하며 사망에 이를 수 있다. 본 연구에서는 최근 병원내 심각한 문제를 야기하는 항생제내성 황색포도알균 (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)를 이용한 패혈증 동물 모델을 통해 약용작물 유래 유효물질의 in vivo 염증 억제 효능을 평가하였다.

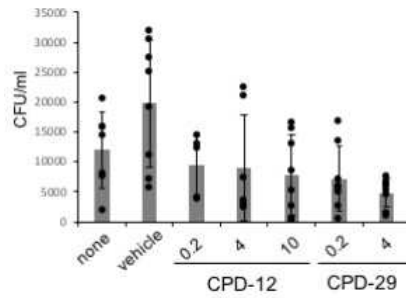
- MRSA 감염에 의한 마우스의 패혈증 사망률을 Kaplan-Meier plot 기법으로 분석한 결과 각각 농도 의존적으로 decursinol angelate (CPD-12)와 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29) 처리에 의해 마우스의 생존을 유의하게 증가시키는 효능이 있음을 입증하였다.



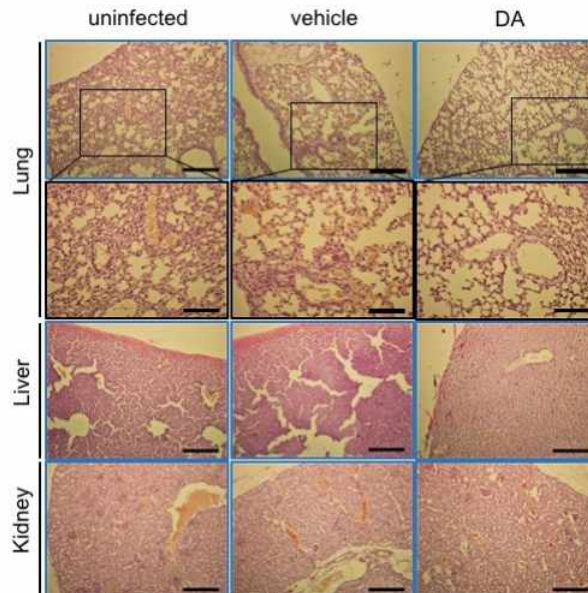
- decursinol angelate (CPD-12), 특히 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29) 처리시 패혈증으로 인한 마우스 생존 증가는 혈액내 염증성 사이토카인 IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ 의 감소와 상관관계를 나타내었으며, 반면 in vitro 실험 결과와 유사하게 항염증성 사이토카인 IL-10의 증가는 관찰되지 않았다.



- 혈액내 감염균의 역가 분석 결과 MRSA를 제거하는 기능에는 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다.



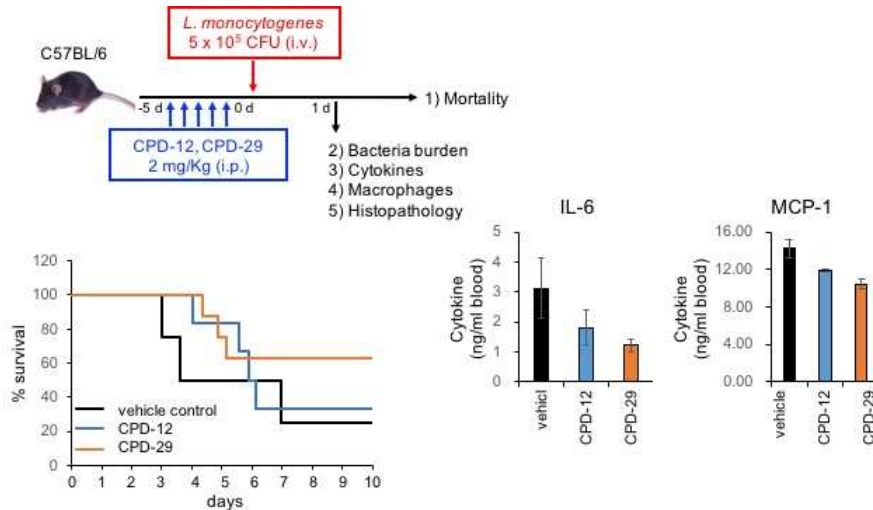
- 조직병리학적 분석에 의해 MRSA 감염으로 인한 폐, 간, 신장 조직의 염증이 decursinol angelate (DA) 처리에 의해 완화되는 것을 확인할 수 있었다.



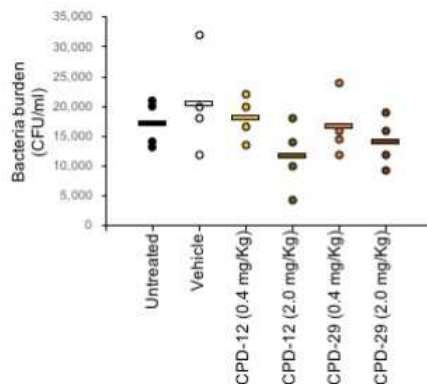
## ② 리스테리아 감염증에 대한 효능 평가

- 리스테리아증을 유발하는 *Listeria monocytogenes* 감염 동물모델을 이용하여 decursinol angelate (CPD-12)와 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29)의 in vivo 효능 평가를 수행하였다. 리스테리아 감염에 의한 생존율 개선 효능은 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29)가 decursinol angelate (CPD-12) 보다 높은 효율성을 나타내었으며, 이는 혈액내 IL-6, MCP-1과 같은 염증

성 사이토카인/키모카인의 감소 효능과 상관관계를 확인할 수 있었다.



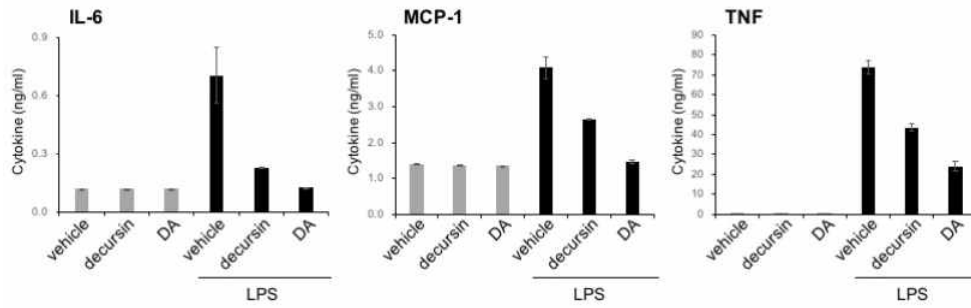
- MRSA 감염 동물 실험 결과와 유사하게 리스테리아 감염균에 대한 역가는 decursinol angelate (CPD-12)와 Bisdemethoxcurcumin (CPD-29) 처리에 의해 주목할 변화를 발견할 수 없었으나, 단 2 mg/ml의 decursinol angelate (CPD-12) 처리시 감염균 제거 기능이 향상되는 것을 관찰할 수 있었다.



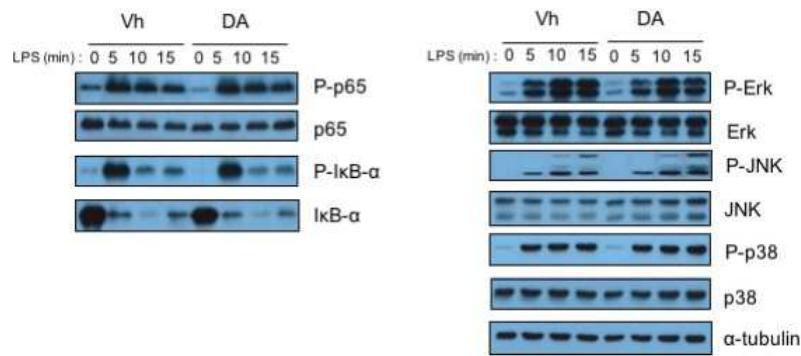
(6) 약용작물 유효 성분의 대식세포 염증 억제 기전 연구

① RAW264.7 대식세포주를 이용한 기전 연구

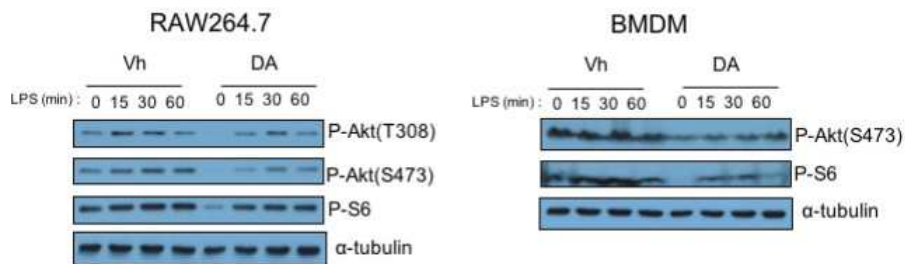
- 앞선 마우스 primary 대식세포를 이용한 연구 결과가 세포주에서 동일하게 재현되는 지 검증하기 위하여 RAW264.7 세포에 decursin 및 decursinol angelate (DA)를 전처리하고 LPS 자극에 의한 염증성 사이토카인 분비를 측정하였다. decursin과 decursinol angelate 모두 활성화된 RAW264.7 세포의 IL-6, MCP-1, TNF의 분비를 억제하였으며, 특히 MCP-1과 TNF 측면에서 decursinol angelate가 decursin에 비해 우수한 억제 효능을 나타내었다.



- 위의 결과를 토대로 Western blotting 기법을 통해 염증성 대식세포 활성화를 매개하는 신호전달 경로를 분석한 결과, LPS에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B 신호전달경로와 MAPK 신호전달 경로에 관련된 단백질의 인산화에는 decursinol angelate가 영향을 미치지 못함을 확인하였다.



- PI3K 신호전달 경로의 핵심 단백질 Akt의 인산화는 Akt의 활성을 조절한다. LPS에 의해 유도되는 Akt 인산화를 분석한 결과 decursinol angelate는 Akt T308과 S473 잔기의 인산화를 모두 지연/억제하며, Akt의 하부 단백질 ribosomal protein S6의 인산화도 감소시킴을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 마우스 primary 대식세포에서도 확인할 수 있었다.



- 결론적으로 참당귀 유래 decursinol angelate는 PI3K/Akt 신호전달 경로의 제어를 통해 대식세포의 활성화를 억제하며, in vivo 동물 실험 평가의 결과를 종합할 때 패혈증 및 감염성 질환의 예방 및 치료에 활용할 수 있는 유용한 유효성분임을 입증하였다.



## 제2절 약용작물 유효 성분의 노인성질환(항암) 효능 검증

### 1. 연구내용

최근의 고령화 사회는 인간 수명 연장이라는 밝은 미래의 이면에 암 발병으로 인한 사망률 증가라는 어두운 면을 드러내고 있다. 본 연구 과제에서는 당귀, 오미자, 백수오, 강황 4종의 약용작물 성분인 29종의 화합물 중에서 종양 세포주의 세포성장 및 세포 이동성에 미치는 영향을 평가하여 항암 효능 유효성분을 선별하고, 선별된 후보물질에 의한 유방암 및 대장암 세포주 성장 억제 효능과 항암 기전 연구를 통해 유용한 약용작물 성분의 의약학적 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

### Natural products from 4 medicinal plants 29 natural compounds used in screening

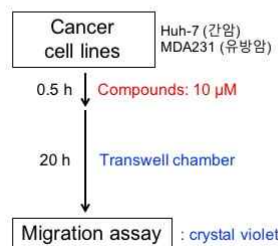
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Angelica gigas</i> (당귀) </li> <li>2. <i>Schisandra chinensis</i> (오미자) </li> <li>3. <i>Cynachum</i> (백수오) </li> <li>4. <i>Curcuma longa</i> (강황) </li> </ol>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;"><i>Angelica gigas</i> (당귀)</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;"><i>Schisandra</i> (오미자)</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;"><i>Cynachum</i> (백수오)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1. 7-Hydroxycoumarin</td><td>13. Gomisin D</td><td>22. Beta-Sitosterol</td></tr> <tr><td>2. Angelicin</td><td>14. Gomisin G</td><td>23. Conduritol</td></tr> <tr><td>3. Byakangelicin</td><td>15. Gomisin J</td><td>24. Eleutheroside</td></tr> <tr><td>4. Byakangelicol</td><td>16. Angeloylgomisin H</td><td>25. Geniposide</td></tr> <tr><td>5. Isoimperatorin</td><td>17. Angeloylgomisin O</td><td>26. Feretoside</td></tr> <tr><td>6. Isopimpinellin</td><td>18. Benzoylgomisin O</td><td>27. 6-alpha-Hydroxygeniposide</td></tr> <tr><td>7. Osthol</td><td>19. Gomisin H</td><td></td></tr> <tr><td>8. Phellopterin</td><td>20. Gomisin N</td><td></td></tr> <tr><td>9. Xanthotoxol</td><td>21. Gomisin O</td><td></td></tr> <tr><td>10. Oxypeucedanin</td><td></td><td style="text-align: center;"><b>Curcuma (강황)</b></td></tr> <tr><td>11. Decursin</td><td></td><td>28. Demethoxycurcumin</td></tr> <tr><td>12. Decursinon angelate</td><td></td><td>29. Bisdemethoxycurcumin</td></tr> </tbody> </table>	<i>Angelica gigas</i> (당귀)	<i>Schisandra</i> (오미자)	<i>Cynachum</i> (백수오)	1. 7-Hydroxycoumarin	13. Gomisin D	22. Beta-Sitosterol	2. Angelicin	14. Gomisin G	23. Conduritol	3. Byakangelicin	15. Gomisin J	24. Eleutheroside	4. Byakangelicol	16. Angeloylgomisin H	25. Geniposide	5. Isoimperatorin	17. Angeloylgomisin O	26. Feretoside	6. Isopimpinellin	18. Benzoylgomisin O	27. 6-alpha-Hydroxygeniposide	7. Osthol	19. Gomisin H		8. Phellopterin	20. Gomisin N		9. Xanthotoxol	21. Gomisin O		10. Oxypeucedanin		<b>Curcuma (강황)</b>	11. Decursin		28. Demethoxycurcumin	12. Decursinon angelate		29. Bisdemethoxycurcumin
<i>Angelica gigas</i> (당귀)	<i>Schisandra</i> (오미자)	<i>Cynachum</i> (백수오)																																						
1. 7-Hydroxycoumarin	13. Gomisin D	22. Beta-Sitosterol																																						
2. Angelicin	14. Gomisin G	23. Conduritol																																						
3. Byakangelicin	15. Gomisin J	24. Eleutheroside																																						
4. Byakangelicol	16. Angeloylgomisin H	25. Geniposide																																						
5. Isoimperatorin	17. Angeloylgomisin O	26. Feretoside																																						
6. Isopimpinellin	18. Benzoylgomisin O	27. 6-alpha-Hydroxygeniposide																																						
7. Osthol	19. Gomisin H																																							
8. Phellopterin	20. Gomisin N																																							
9. Xanthotoxol	21. Gomisin O																																							
10. Oxypeucedanin		<b>Curcuma (강황)</b>																																						
11. Decursin		28. Demethoxycurcumin																																						
12. Decursinon angelate		29. Bisdemethoxycurcumin																																						

### 2. 연구방법

#### (1) 세포 이동성 평가 (Migration assay)

간암 세포주 Huh-7 세포와 유방암 세포주 MDA-MB231 세포 등을 transwell에서 배양시키고 아래쪽 챔버에 성장인자가 포함된 배양액을 넣고, 세포가 자라는 위쪽 챔버에 성장인자가 없는 배양액과 함께 29종의 화합물을 처리하여 transwell 아래쪽으로 이동한 세포를 crystal violet으로 염색하여 정량하였다.

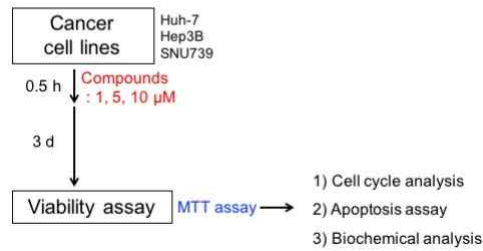
#### Screening: Cancer cell migration



#### (2) 세포 성장 평가 (Viability assay)

간암 세포주 Huh-7, Hep3B, SNU739 세포 등을 각각 96-well plate에 배양시키고, 29종의 화합물을 처리하고 시간대별로 MTT assay를 통해 세포의 성장률을 측정하고 대조군과 비교하였다.

## Screening: Cancer cell growth



### (3) 세포 주기 평가 (Cell cycle analysis)

유방암 세포주 MDA-MB231 세포와 T47D 세포 등을 성장인자가 없는 배양액에서 12시간 동안 synchronize 한 후, 선별된 후보 유효물질과 성장인자를 추가하여 배양하고 propidium iodide 로 염색하여 flow cytometry 기법으로 G0/G1, S, G2/M 상의 세포주기 분포를 분석하였다.

### (4) 세포 사멸 평가 (Apoptosis assay)

유방암 세포주 MDA-MB231 세포와 T47D 세포 등을 선별된 화합물과 배양하고 Annexin-V 로 염색하여 flow cytometry 기법으로 apoptotic 세포들을 정량함. Western Blotting 기법을 통해 PARP-1 (poly(ADP)ribose polymerase 1), Caspase-3 단백질의 분해 정도를 측정함으로써 후보 유효물질에 의한 apoptosis 유발 유무를 검증하였다,

### (5) 작용 기전 연구

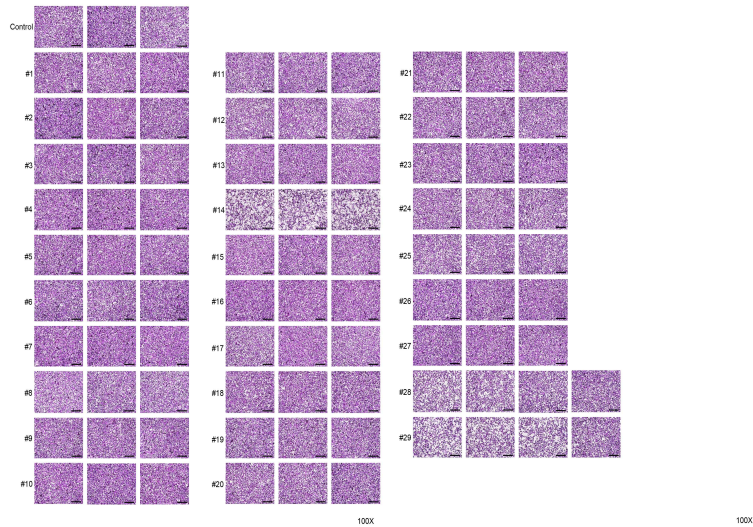
Western blotting 기법을 통해 PI3K, MAPK, Rb 신호전달 등을 매개하는 핵심 단백질들 발현과 인산화 정도를 비교함으로써 약용작물 유해 후보 유효물질의 항암 효능에 대한 작용 메커니즘을 규명하였다.

## 3. 연구결과

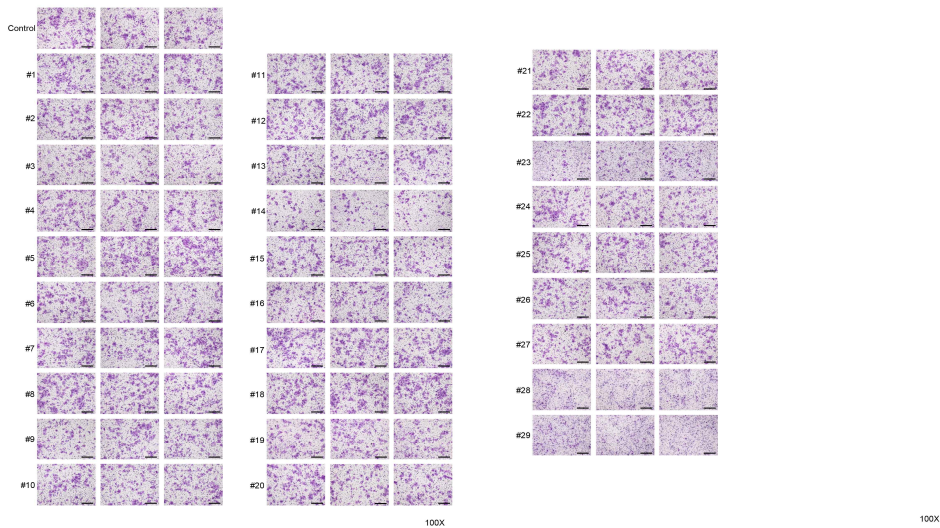
### (1) 항암 효능 후보 유효물질 스크리닝

#### ① 암세포 이동성 억제 효능을 갖는 후보 유효물질 선별

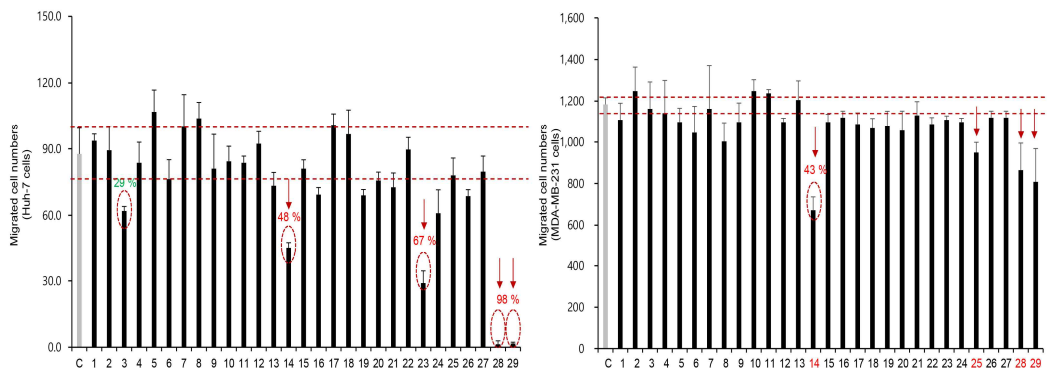
- 4종의 약용작물 유래 29종의 화합물 중 암세포의 이동성 저해능이 있는 유효 물질을 선별하였다. 간암 세포주 Huh-7 세포를 이용한 실험 결과 #14, #28, #29 화합물이 암세포의 이동을 효과적으로 억제함이 관찰되었다.



- 이와 같은 현상은 간암 세포주 Hur-7 세포에서도 유사하게 관찰되었으며, #14, #28, #29 화합물 이외에도 #3과 #23 화합물이 추가적으로 Hur-7 세포의 이동성을 억제하는 효능이 있음을 확인하였다.

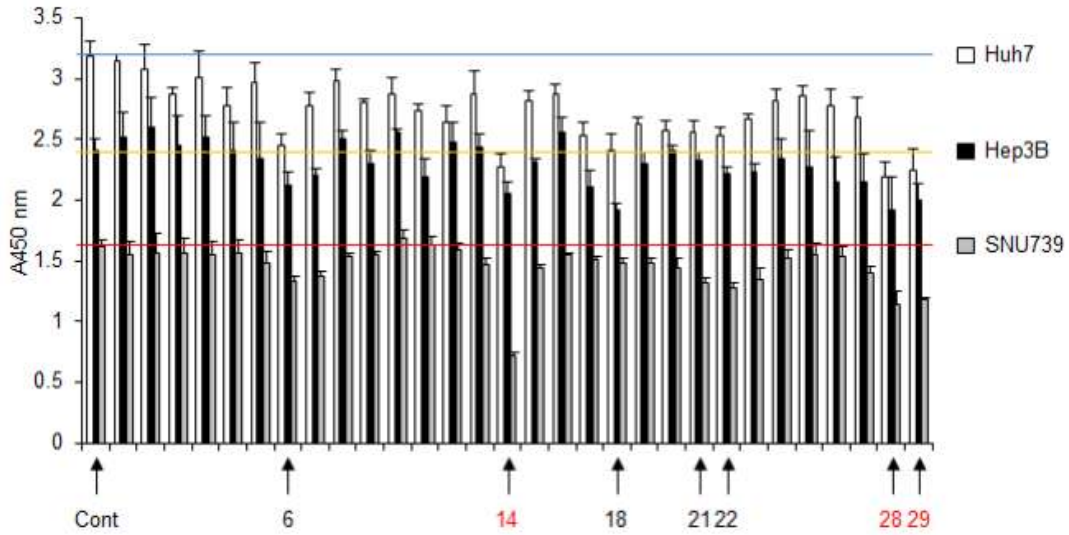


- 이러한 결과를 그래프로 정리하면 아래와 같고, #28, 29 화합물이 Hur-7 세포의 이동성을 99% 이상 억제하는 현상은 후속 연구를 통해 이동성 억제보다는 주로 세포 독성에 기인한 것임을 확인하였다.



② 암세포 성장 효능을 갖는 후보 유효물질 선별

- 4종의 약용작물 유래 29종의 화합물 중 암세포의 성장 억제 효능이 있는 유효 물질을 선별 하였다. 간암 세포주 Huh-7, Hep3B, SNU739 세포주를 이용한 성장 평가 결과 #6, #14, #18, #21, #22, #28, #29 화합물 처리시 대조군에 비해 유의하게 세포 성장이 감소하는 것을 확인하였고, 특히 #14, #28, #29 화합물이 가장 효과적으로 암세포주들의 성장을 억제함을 관찰하였다.

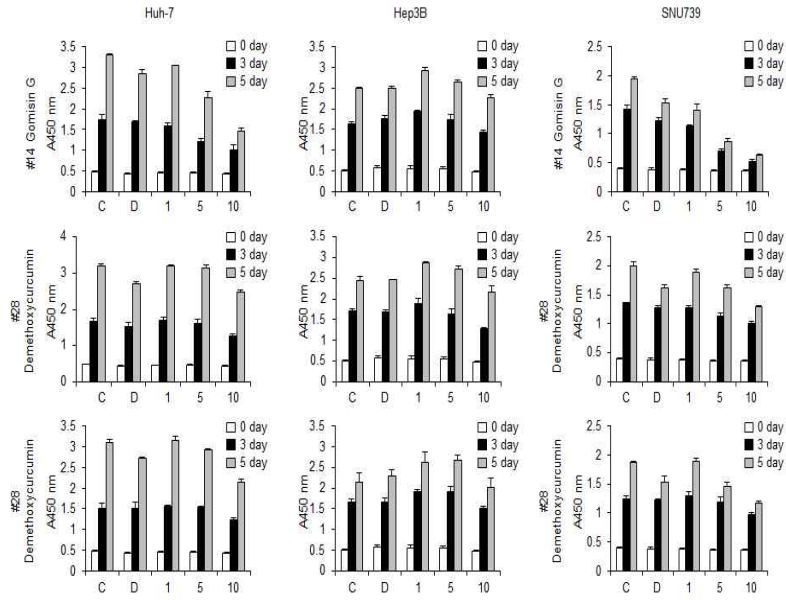


Compound name	Huh-7	Hep3B	SNU-739
Control	100%	100%	100%
7-Hydroxycoumarine (1)	96.6	107.6	96.7
Angelicin (2)	90	101.2	96.7
Byakangelicin (3)	94.1	104.2	95.6
Byakangelicol (4)	87	99.8	96.3
Isomperatorin (5)	93.2	97.2	91.5
Isopimpinellin (6)	76.8	88	82.2
Osthol (7)	87.2	91.1	85
Phellopterin (8)	93.2	103.5	95.2
Xanthotoxol (9)	87.7	95.4	95.5
Oxypeucedanin (10)	89.9	105.9	103.9
Decursin (11)	85.6	91	101.2
Decursinol angelate (12)	82.9	102.3	98.7
Gomisin D (13)	90.1	100.8	90.5
Gomisin G (14)	71.1	85.2	44.4
Gomisin J (15)	88.2	95.8	89.5
Angeloylgomisin H (16)	90.1	105.7	95.6
Angeloylgomisin O (17)	79.4	87.5	92.9
Benzoylgomisin O (18)	75.6	79.3	92
Gomisin H (19)	82.2	95.1	91.3
Gomisin N (20)	80.7	100	89.3
Gomisin O (21)	80.1	96.4	81.8
Beta-Sitosterol (22)	79.5	92.1	79
Conduritol A (23)	83.6	92.6	83.2
Eleutheroside A (24)	88.5	97.1	93.8
Geniposide (25)	89.7	94.1	96.2
Feretoside (26)	87	88.8	94.8
6-alpha-Hydroxygeniposide (27)	84	89	86.6
Demethoxycurcumin (28)	68.8	79.6	70.9
Bisdemethoxycurcumin (29)	70.2	83.1	72.8

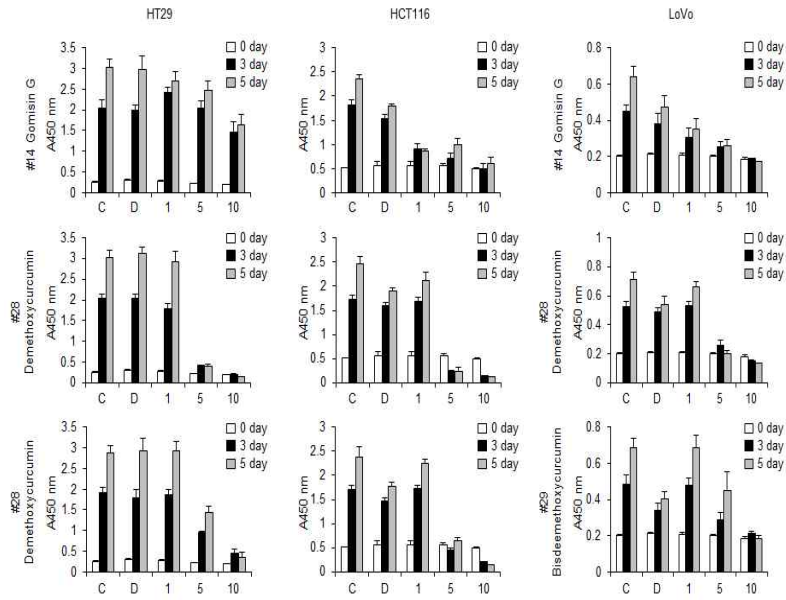
③ 후보 유효물질의 암세포 성장 억제 효능 검증

- 스크리닝 결과를 종합하여 #14 화합물 오미자 유래 Gomisin G, #28 화합물 강황 유래 Demethoxycurcumin, #29 강황 유래 Bisdemethoxycurcumin 3종을 1차 선별하고, 다양한 암 세포주의 세포 성장에 미치는 영향을 검증하였다.

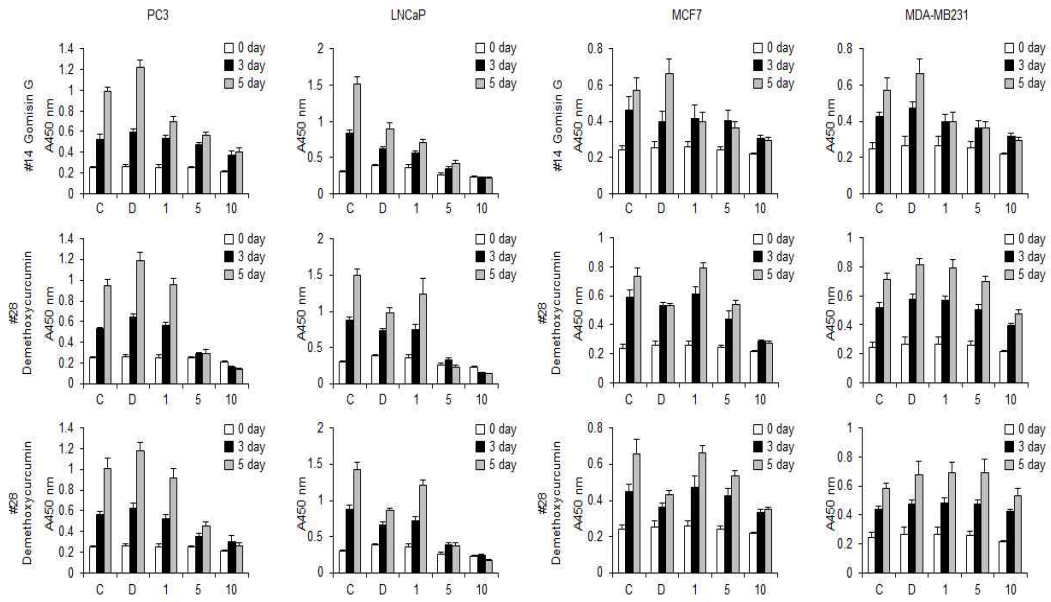
- 간암 세포주 Huh-7과 SNU739 세포에 선별된 3종의 화합물 처리하였을 때 시간에 따른 세포 성장이 억제되는 것을 재확인하였고, 특히 SNU739 세포에 대한 Gomisin G의 성장 억제 효능이 우수함을 입증하였다.



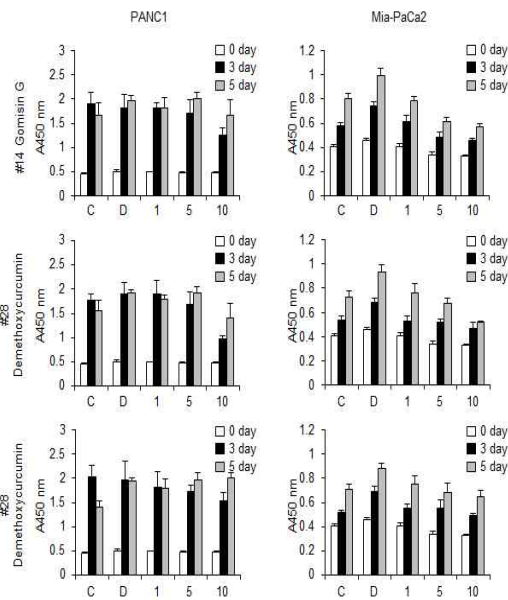
- 대장암 세포주 HT29, HCT116, LoVo 세포에 선별된 3종의 화합물을 처리하였을 때 간암 세포주의 결과와 유사하게 세포 성장이 억제됨을 관찰하였고, 특히 Demethoxycurcumin이 모든 대장암 세포주들의 성장을 현저하게 억제하는 것을 확인하였다.



- 전립선암 세포주 PC3 세포와 LNCaP 세포에 대한 3종의 후보 화합물의 세포 성장 억제효능 분석 결과, 간암 및 대장암 세포주에 대한 효능에 비해 보다 강력한 세포 성장 억제 효능을 나타내었고, 반면 유방암 세포주 MCF7 세포와 MDA-MB231에 대한 효능은 다소 다른 종의 암세포주에 비해 다소 낮은 성장 억제 효능을 나타냄을 관찰하였다.

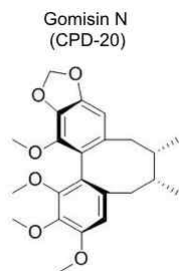


- 췌장암 세포주 PANC1 세포와 Mia-PaCa2 세포에 대한 3종의 후보 화합물의 세포 성장 억제 분석 결과, 다른 암세포주에 비해 췌장암 세포주들에 대해서는 낮은 암성장 억제 효능을 나타냄을 관찰하였다.



- 다양한 암세포주들에 대한 성장 억제 효능 결과를 정리한 표는 아래와 같다. 결과적으로 다양한 암종에서 공통적으로 암세포의 성장을 억제하는 동시에 세포 이동성을 저해하는 후보물질로서 Gomisin G를 최종 선별하였고, 유방암 세포주와 대장암 세포주를 이용한 항암 효능 검증 및 작용 기전 연구를 수행하였다.

		#14				#28				#29			
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
Huh-7	3D	100	91.7	69.9	57.9	100	102.7	97.4	76.5	100	101.9	100.7	81.6
	5D	100	91.8	68.2	44.2	100	99.4	97.7	77	100	101.7	94.4	68.9
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
Hep3B	3D	100	118.3	107.2	88	100	110.4	96.1	74.8	100	115.1	115.3	91.2
	5D	100	117	105.5	90.1	100	116.8	110.9	88	100	122.9	124.7	94.7
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
SNU 739	3D	100	80	48.7	37	100	93.7	82.6	73.8	100	104.8	95.6	78.4
	5D	100	71.9	43.9	32.5	100	94.9	81.4	64.6	100	100.2	77.1	61.9
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
HT29	3D	100	118.7	100.6	71.6	100	87.1	20.5	9.1	100	97.3	50	23.6
	5D	100	88.8	81.5	54.1	100	96.9	13.6	4.5	100	101.7	50.1	12.2
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
HCT 116	3D	100	49.8	39	26.8	100	98.2	13.7	8.3	100	101.4	26.2	12.1
	5D	100	36.5	42	25.8	100	85.7	9.1	5.3	100	94.4	26.7	6.1
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
LoVo	3D	100	68.2	57	42.1	100	100.9	48.7	28.5	100	98.6	60	43.9
	5D	100	54.6	40.6	26.7	100	92.9	28.1	18.9	100	100	65.6	26.5
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
PC3	3D	100	100.5	90.7	70	100	106.7	55.3	30.9	100	92.7	62.4	53
	5D	100	70.8	57.1	40.6	100	100.6	30.3	14.9	100	90.8	45.2	26.1
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
LNCaP	3D	100	67.1	41.2	26.8	100	85.6	37.9	17.5	100	82.1	44.3	26.9
	5D	100	46.8	27.2	14	100	82.5	15.1	9	100	84.6	26.2	12
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
MCF-7	3D	100	90.5	88	66.3	100	103.4	73.7	48.1	100	104.7	94.5	74.1
	5D	100	70.2	63.5	51.8	100	108.1	73.4	37.4	100	100.8	81.3	53.6
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
MDA-MB231	3D	100	93.1	85.2	74.4	100	109.6	97.3	76.5	100	109.3	107.6	96.8
	5D	100	70.2	63.5	51.8	100	111.1	97.3	66.4	100	119.1	119.1	91.6
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
PANC 1	3D	100	94.8	90	66	100	107.9	95.2	54.7	100	89.2	85.6	75.2
	5D	100	109.4	120.6	100.7	100	114.5	122.9	89.2	100	127.3	140.4	142.2
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10
Mia-PaCa2	3D	100	105.6	83.2	79.6	100	99	97.1	88.2	100	107.2	107.4	94.5
	5D	100	97.9	77.1	71.4	100	104.5	92.5	71.5	100	106.2	97.3	91.8
		cont	1	5	10	cont	1	5	10	cont	1	5	10



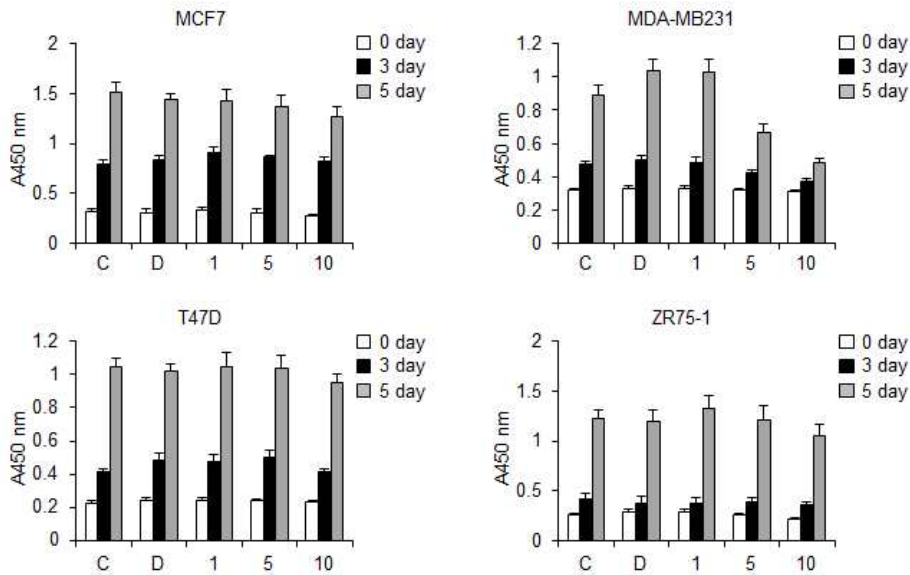
(2) 오미자 유래 Gomisin G의 유방암 성장 억제 연구

① Gomisin G의 유방암 세포주 성장 억제 평가

- 유방암 세포주 MCF7, MDA-MB231, T47D, ZR75-1 4종의 세포를 이용한 MTT assay

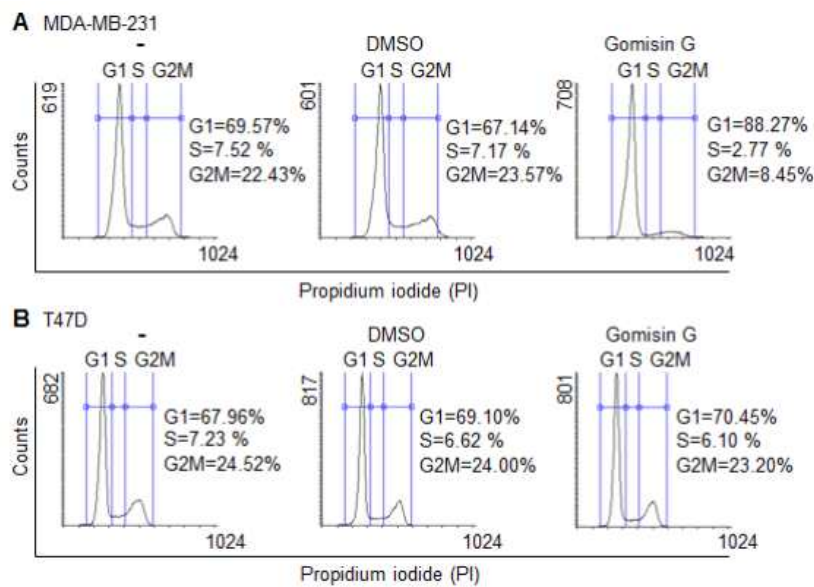
결과, triple-negative 유방암 세포주인 MDA-MB231의 성장을 Gomisin G가 농도-의존적으로 암세포 성장을 억제함을 확인하였다.





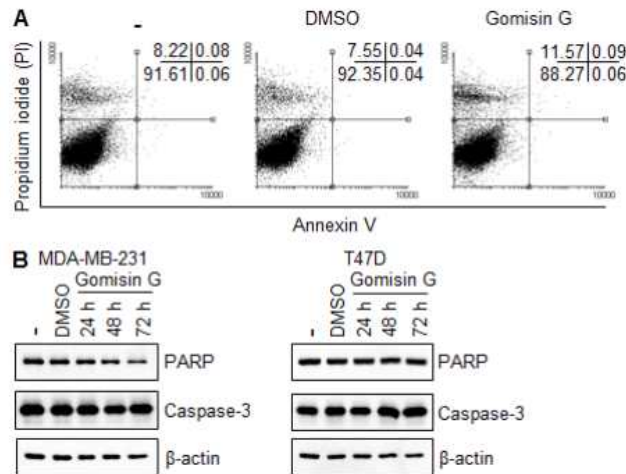
② Gomisin G의 유방암 세포주 세포주기 조절 효능 평가

- Flow cytometry 기법으로 세포 주기를 분석한 결과, MDA-MB231 세포주에 Gomisin G를 처리하였을 때 G1 상의 세포 분율이 증가하고 S 및 G2/M 단계의 분열상의 세포 분율이 감소함을 입증하였다. 그러나 T47D 세포주의 경우 Gomisin G 처리에 의해 유의한 세포주기 변화가 없음을 확인하였다.



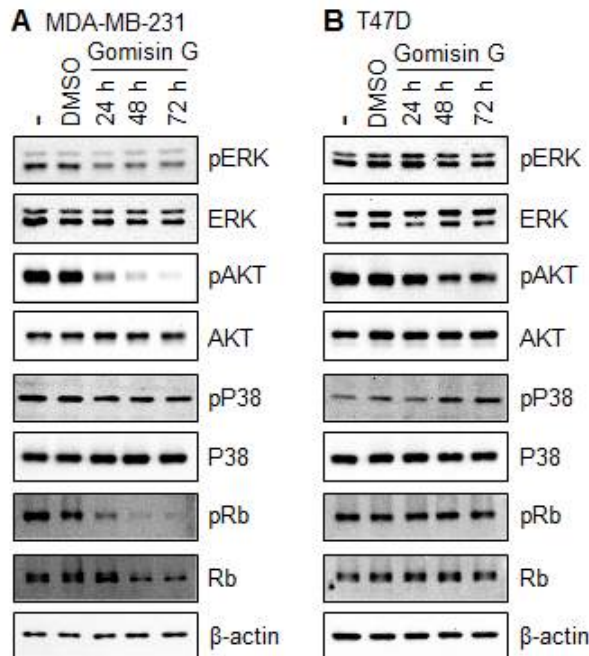
③ Gomisin G의 유방암 세포주 세포사멸 유도 효능

- Gomisin G에 의한 MDA-MB231 세포주의 성장 억제 효능이 세포사멸에서 기인한 것인지를 판단하기 위하여 Annexin-V 염색을 통한 세포의 apoptosis를 분석한 결과, Gomisin G 처리시 Annexin-V+ 세포 분율의 유의한 증가를 관찰할 수 없었다. 또한, Apoptosis 관련 단백질 PARP1과 Caspase-3의 활성화 (절단) 측정을 통해 Gomisin G는 MDA-MB231 세포주의 세포사멸과 무관하게 세포 분열을 억제한다는 것을 입증하였다.



④ Gomsin G의 유방암 세포주 신호전달 억제 효능 연구

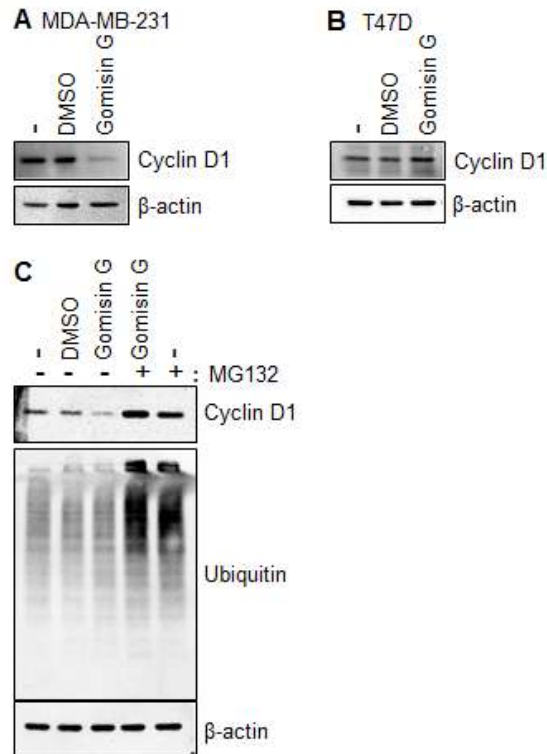
- 유방암 세포주 성장 억제 효능 평가 및 세포주기 조절 평가의 결과와 유사하게, MDA-MB231 세포에 Gomsin G 처리시 세포의 증식을 조절하는 PI3K 신호전달 경로의 단백질 AKT의 인산화가 억제되는 것을 확인하였다. 또한 MDA-MB231 세포에서 MAPK 신호전달 경로의 단백질 ERK의 인산화는 Gomsin G 처리에 의해 억제되는 반면 p38 단백질의 인산화는 영향을 받지 않았다. Gomsin G에 영향을 받지 않는 T47D 세포주의 경우 모든 신호전달 단백질의 인산화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.



- 위의 Western blotting 결과에서 세포주기 조절 단백질 Rb의 인산화와 Rb 단백질 양이 Gomsin G 처리에 의해 MDA-MB231 세포에서 현저하게 감소함을 관찰하였다.

- 유방암 세포에서 AKT의 인산화는 cyclin D1의 활성을 조절하는 것으로 보고되었다. Gomsin G 처리시 cyclin D1의 단백질 양을 확인한 결과 MDA-MB231 세포에서 유의하게 감

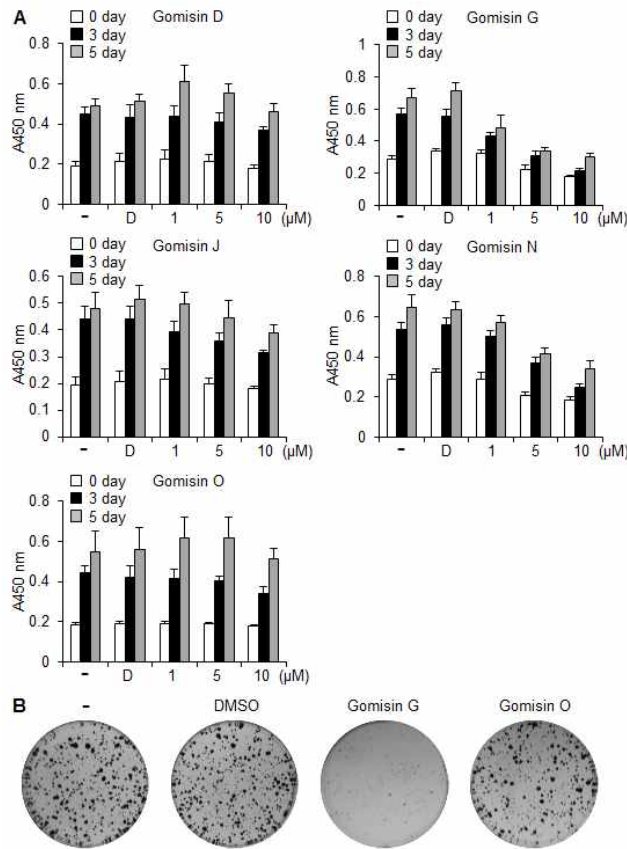
소한 반면 T47D 세포주에서는 변화가 없음을 확인하였다. Gomisin G 처리에 의한 cyclin D1의 감소가 유비퀴틴화에 의한 proteosome 분해 기전에 의한 현상인지 검증하기 위하여 MG132를 전처리하고 Gomisin G를 처리한 MDA-MB231 세포에서는 cyclin D1의 감소가 억제됨을 확인하였다. 즉 Gomisin G의 유방암 세포주 세포주기 조절 효능은 cyclin D1의 유비퀴틴화에 의한 분해 현상에 기인한 것임을 규명하였다.



### (3) 오미자 유래 Gomisin G의 대장암 성장 억제 연구

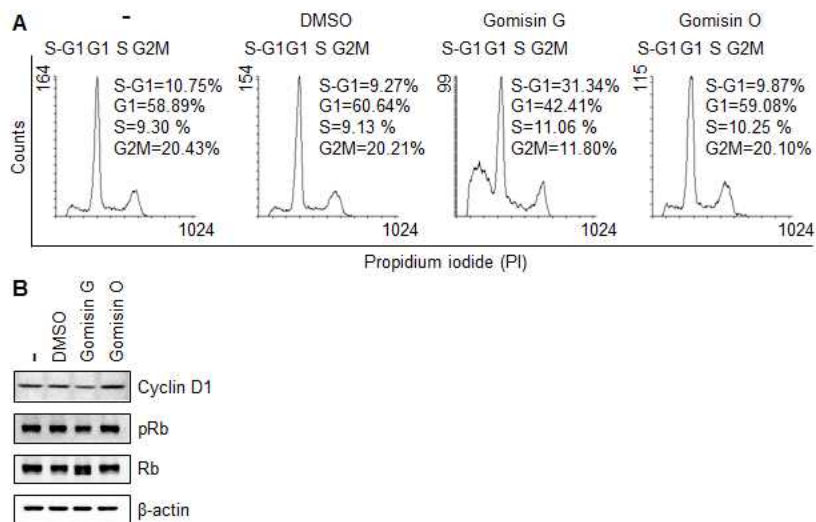
#### ① Gomisin G의 대장암 세포주 성장 억제 평가

- 대장암 세포주 LoVo 세포를 이용한 MTT assay 및 crystal violet 염색 결과, 5종의 Gomisin 중 Gomisin G가 농도-의존적으로 암세포 성장을 억제함을 확인하였다.



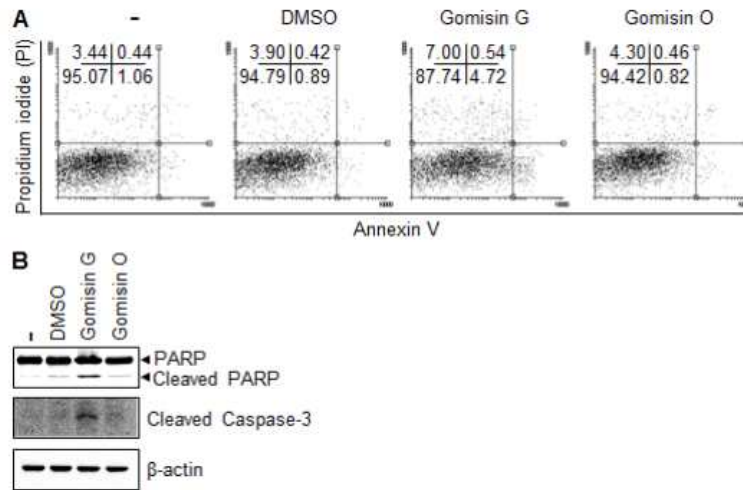
② Gomisin G의 대장암 세포주 세포주기 조절 효능 평가

- LoVo 세포주에 Gomisin G를 처리하였을 때, Sub-G1 상의 세포 비율이 증가하고 G1 및 G2/M 상의 세포 비율이 전반적으로 감소함이 관찰되었다. 반면 Gomisin O 처리는 세포주기에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 또한 세포주기 조절과 관련된 단백질 Rb의 인산화와 단백질 양, 그리고 cyclin D1의 단백질 양에는 영향을 미치지 못한 결과를 통해 Gomisin G의 대장암 세포 성장 억제 효능은 세포주기의 분열상 조절에 기인한 현상이 아님을 확인함.



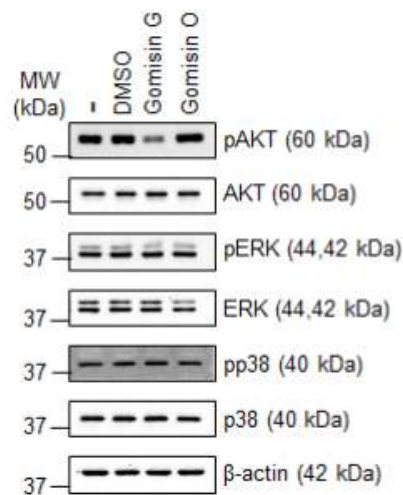
③ Gomisin G의 대장암 세포주 세포사멸 유도 효능 평가

- Gomisin G의 대장암 세포 성장 억제 효능이 세포 사멸에 기인한 것인지 여부를 검증하기 위하여 Annexin-V 염색을 이용한 apoptosis 분석 결과, Gomisin G 처리에 의해 Annexin-V+ apoptotic 세포 분율이 증가함이 관찰되었다. 또한 Western blotting을 통해 Gomisin G 처리에 의한 Apoptosis 관련 단백질 PARP와 Caspase-3의 활성화 (절단)를 확인함으로써 Gomisin G의 대장암 세포주 성장 억제 효능은 세포주기 조절보다는 세포사멸 유도에 의한 결과임을 규명하였다.



④ Gomisin G의 대장암 세포주 신호전달 억제 효능 연구

- Gomisin G 처리에 의한 LoVo 세포에서의 신호전달 경로 단백질들의 인산화를 Western blotting 기법을 통해 분석한 결과, PI3K 신호전달 경로의 단백질 AKT의 인산화가 억제된 반면, MAPK 신호전달 경로의 단백질 ERK 및 p38의 인산화에는 영향을 주지 않았다. 즉, Gomisin G는 세포 사멸을 억제하는 신호전달 단백질 AKT의 활성 억제를 통해 LoVo 대장암 세포주의 성장을 억제하는 효능을 나타낸다는 점을 규명하였다.



## 6장. 오미자, 당귀 성분의 퇴행성 뇌질환에 대한 효능

- acetylcholinesterase 저해효과 시험
- tau protein 분해효과
- monoamine oxidase-B 저해효과

당귀는 우리나라 대표적인 약용식물의 하나로 이미 기억력개선 및 인지능력 관련하여 식약처로부터 개별인정형 원료로 허가를 받았다. 또한 오미자는 중추신경흥분작용이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 당귀 및 오미자 성분의 퇴행성 뇌질환 관련 효능에 대한 과학적 근거 제시를 실험을 수행하였다.

### 1절. 아세틸콜린에스라제(acetylcholinesterase) 저해효과 시험

Alzheimer's disease (AD)은 1907년 Alois Alzheimer가 발견한 질병으로 뇌에서 발생하는 신경퇴행성 질환의 하나로 65세의 나이에는 약 10%가, 85세의 나이에는 약 50%가 발병하는 것으로 알려져 있다. acetylcholinesterase (AChE) 효소는 neurotransmitter의 일종인 acetylcholine (ACh)을 choline과 acetic acid로 분해하는데 moto neuron에서 많이 발견된다. ACh는 motor nerve와 skeletal nerve사이를 연결시켜주는 역할을 하는데 이 neurotransmitter가 분해되어 감소하면 알츠하이머병이 발병하는 것과 관련이 있다고 알려져 있다. 따라서 ACh를 분해하는 효소인 AChE를 저해하게 되면 결과적으로는 알츠하이머병과 같은 퇴행성뇌신경질환 치료효능을 기대할 수 있기 때문에 AChE의 저해효능을 보이는 저분자 화합물에 대한 연구가 활발하게 이루어져 왔고 이미 donepezil로 알려진 물질이 알츠하이머병 치료제로 개발되어 사용되고 있다 (Cur. Neuropharmacol. 11:315-335 (2013)). 따라서, 본 연구에서는 오미자 및 당귀 함유 성분이 AChE 저해효과를 보이는지에 대한 실험을 수행하였다.

#### 1. 당귀 및 오미자 성분의 AChE 저해효과

##### 가. 연구내용

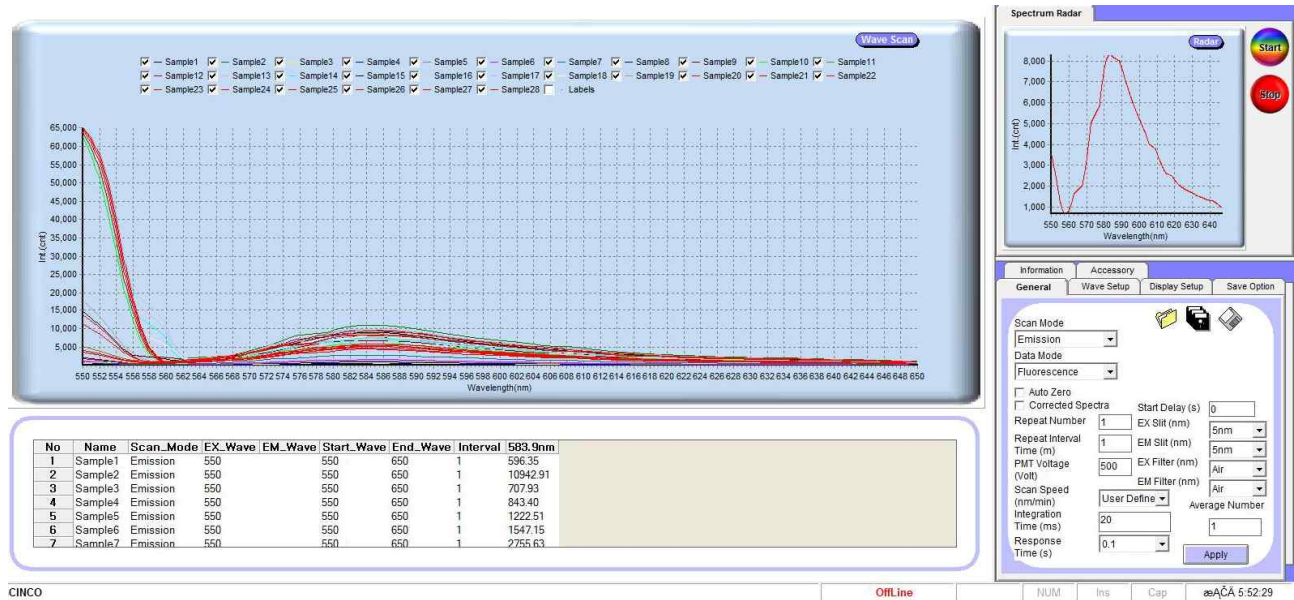
(1) 당귀 및 오미자 함유 성분 45종을 대상으로 AChE 저해효과를 실험하였다..

##### 나. 연구방법

(1) acetylcholinesterase (AChE) 저해효과를 측정하기 위하여 Acetylcholinesterase Fluorescent Activity Kit (Invitrogen)를 사용하였다. 이 kit는 AChE와 substrate 사이의 반응 산물인 thiol기에 non-fluorescence molecule이 결합하도록 해준다. 이 때 excitation wavelength는 390nm, emission wavelength는 510nm를 사용한다. 이 실험 결과는 AChE에 대한 저해효과를 알려준다. 자세한 실험 방법은 제조사의 실험 protocol을 따랐다 [Biochem. Biophys. Res.

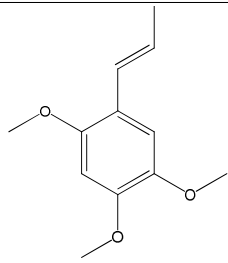
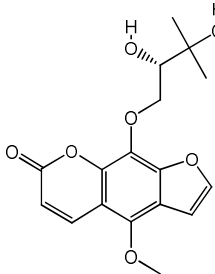
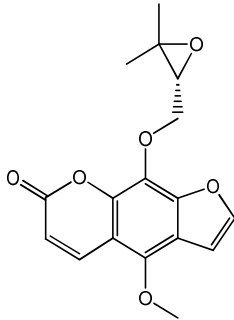
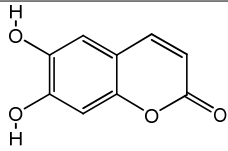
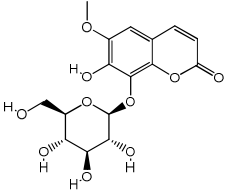
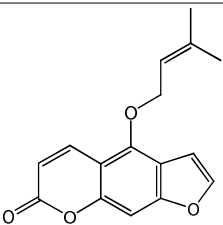
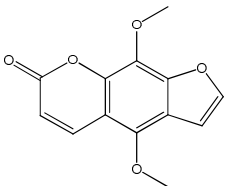
다. 연구결과

(1) Acetylcholinesterase Fluorescent Activity Kit로 실험한 결과의 예는 아래 그림과 같다.

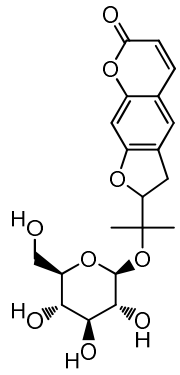
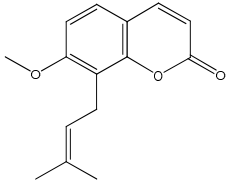
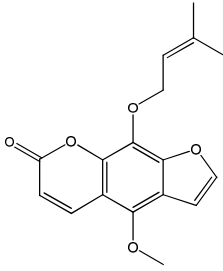
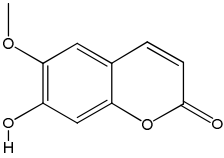
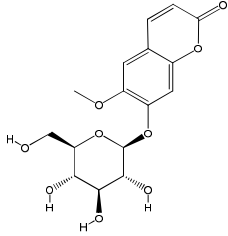
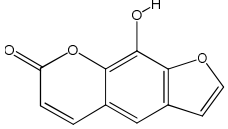
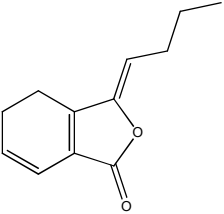


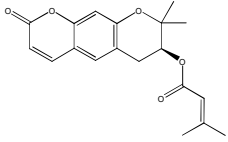
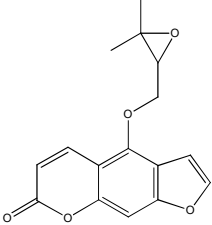
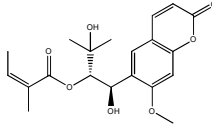
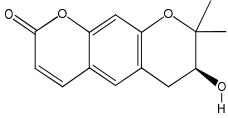
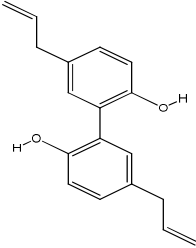
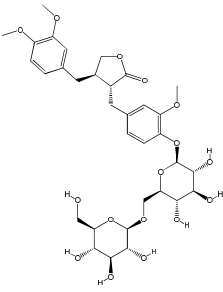
(2) 당귀 및 오미자 함유 성분 45종의 이름, 구조, 분자식, 그리고 AChE 저해효과 (half-maximal inhibition concentration, IC50)는 아래 표와 같다.

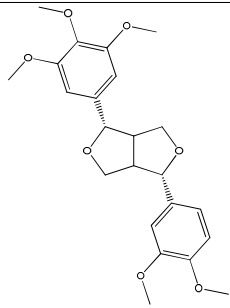
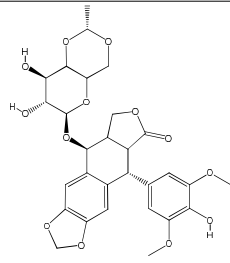
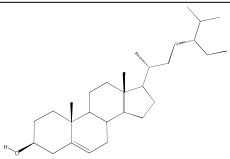
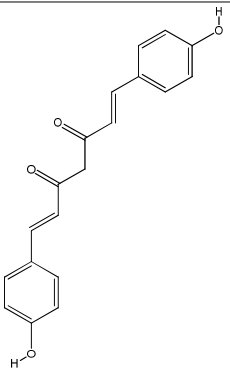
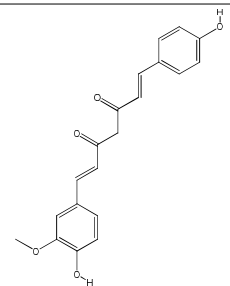
name	structure	molecular weight	formulae	IC50
Decursinol angelate		328.3591	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	303.96
7-Hydroxycoumarin		162.1421	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	171.12
Angelicin		186.1635	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	141.90
Asarone		208.2536	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	143.53

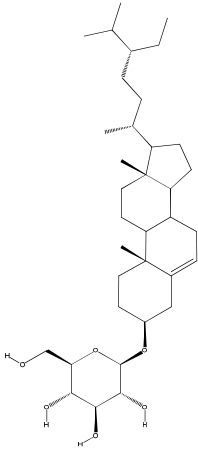
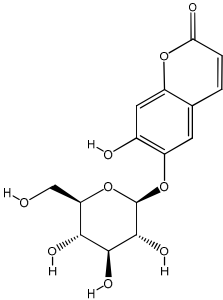
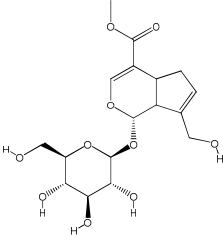
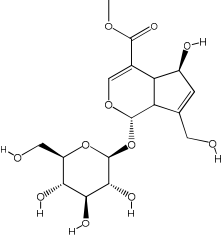
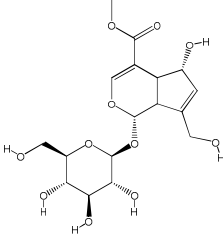
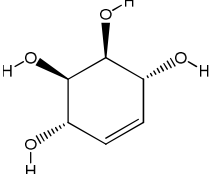
				
Byakangelicin		334.3206	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	150.50
Byakangelicol		316.3053	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	157.20
Esculetin		178.1415	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	29.88
Fraxin		370.3081	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	232.00
Isoimperatorin		270.2800	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	173.74
Isopimpinellin		246.2155	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	218.27

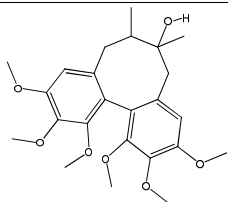
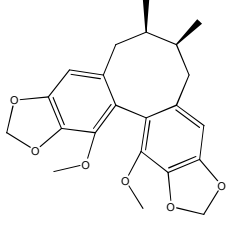
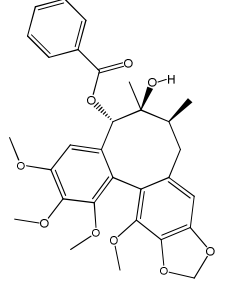
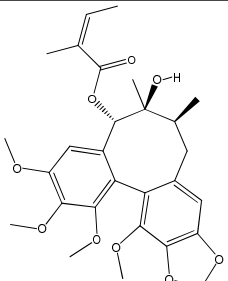
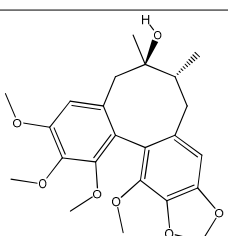
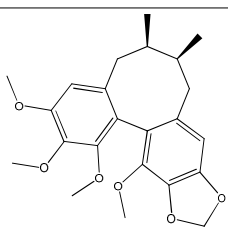
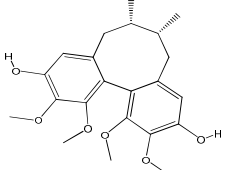


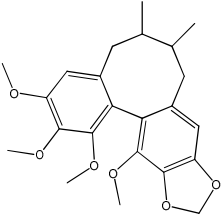
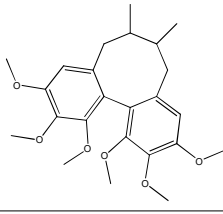
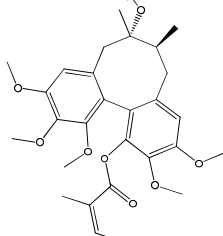
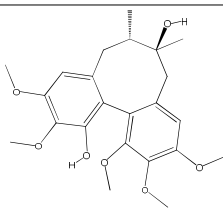
Nodakenin		408.3992	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	217.79
Osthol		244.2857	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	138.13
Phellopterin		300.3059	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	426.77
Scopoletin		192.1681	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	463.86
Scopolin		354.3087	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1000.00
Xanthotoxol		202.1629	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	219.74
Z-Ligustilide		190.2384	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	300.27

Decursin		328.3591	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	229.27
Oxypeucedanin		286.2794	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	277.08
Angelol A		376.4004	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	322.35
Decursinol		246.2586	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	156.52
Magnolol		266.3343	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	351.48
Arctigenin 4'-O-β-gentiobioside		696.6929	C <sub>33</sub> H <sub>44</sub> O <sub>16</sub>	619.90
Magnolin		416.4642	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	228.70

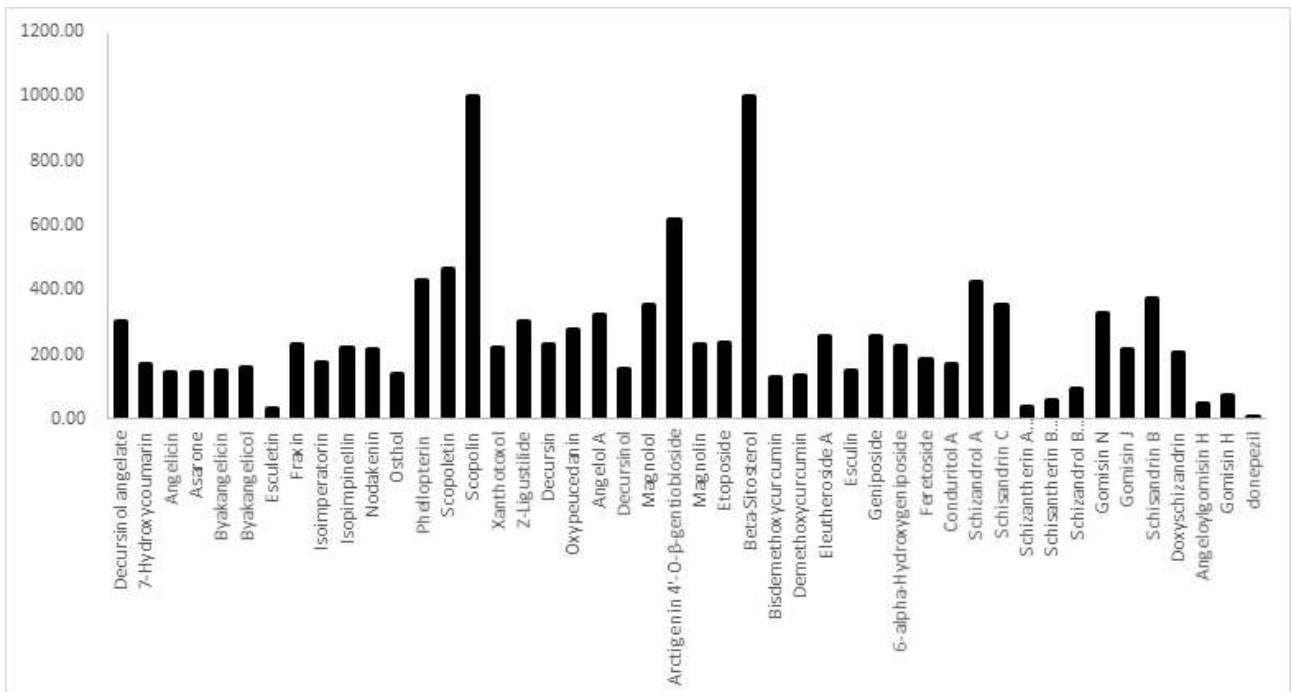
				
Etoposide		588.5566	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>	234.27
Beta-Sitosterol		414.7067	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	1000.00
Bisdemethoxycurcumin		308.3279	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	130.97
Demethoxycurcumin		338.3539	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	134.17
Eleutheroside A		576.8473	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub>	257.39

				
Esculin		340.2821	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	147.20
Geniposide		388.3665	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	256.48
6-alpha-Hydroxygeniposide		404.3659	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	227.82
Feretoside		404.3659	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	183.78
Conduritol A		146.1412	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	171.58
Schizandrol A		432.5067	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	422.93

				
Schisandrin C		384.4224	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	350.57
SchisantherinA (GomisinC)		536.5697	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	37.93
SchisantherinB (GomisinB)		514.5642	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	57.42
SchizandrolB (GomisinA)		416.4642	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	94.53
Gomisin N		400.4648	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	325.42
Gomisin J		388.4541	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	215.15
Schisandrin B		400.4648	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	372.33

				
Doxyschizandrin		416.5073	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	206.70
Angeloylgomisin H		500.5806	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	49.23
Gomisin H		418.4801	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	74.99

(3) AChE 저해효과를 도표로 나타내면 아래 그림과 같다.



(4) 이들 중 esculetin, Schizanthrin A, Schisantherin B, Schizandrol B, Angeloylgomisin H,

Gomisin H 등 6종은 수십 micromolar concentration의 IC50값을 보였다. control로 사용한 denepezil은 동일한 실험 조건에서 3.15 uM의 IC50값을 보였다. 당귀에 함유된 esculetin을 제외한 다른 5종은 모두 오미자에 함유된 성분들로 당귀보다는 상대적으로 오미자 함유 성분들이 AChE 저해효과에 효능을 나타내는 것으로 판단되었다.

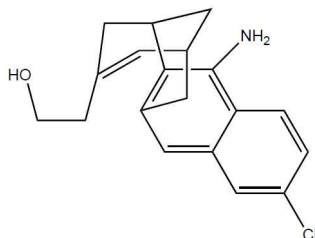
## 2. AChE 저해효과를 보이는 당귀, 오미자 성분들의 AChE 결합 상태 규명

esculetin, Schizanthrin A, Schisantherin B, Schizandrol B, Angeloylgomisin H, Gomisin H 등 6종의 성분들은 AChE 저해효과가 상대적으로 우수하여 이들이 AChE에 결합하는지 여불르 분자 수준에서 확인하고자 in silico docking 실험을 수행하였다.

### 가. 연구내용

(1) AChE의 3차 구조는 X-ray crystallography를 이용하여 규명이 되어 protein data bank에 250종의 구조가 등록되어 있다. 이들 중 가장 많은 residue를 포함하고 있는 3차 구조인 4bdt.pdb를 선택하였다.

(2) AChE는 583개 amino acids로 구성되어 있는데 4bdt.pdb는 Asp5 - Trp566로 이루어져 있다. 25개의 helix와 26개의 beta sheet로 이루어져 있고 huprine으로 명명한 2-((6R,10R)-5-amino-2-chloro-6,7,10,11-tetrahydro-6,10-methanocycloocta[b]naphthalen-8-yl) ethanol을 substrate로 포함하고 있다.



### 나. 연구방법

(1) esculetin, Schizanthrin A, Schisantherin B, Schizandrol B, Angeloylgomisin H, Gomisin H 등 6종의 3차구조는 PubChem에서 확보하였다.

(2) in silico docking은 AutoDock program을 사용하여 수행하였다.

(3) substrate의 bindin site를 포함하는 grid box는 center x, y, z를 -2.397, -35.843, -50.727로 하고, size는 x, y, z를 14, 10, 16으로 하였다.

(4) active site는 LigPlot program을 사용하여 결정하였는데, hydrophobic interaction을 보이는 Trp86, Gly121, Glu202, Tyr337, Trp439, Tyr449와 H-bond를 형성하는 Gly122, Ser203, His447가 포함되어 있다.

### 다. 연구결과

(1) 4bdt.pdb에 포함되어 있는 substrate인 huprine의 binding energy는 -12.3 kcal/mol 이었다.

(2) esculetin, Schizanthrin A, Schisantherin B, Schizandrol B, Angeloylgomisin H, Gomisin H 등 6종의 binding energy, hydrophobic interaction을 하는 residues, H-bond를 형성하는 residues는 아래 표와 같다.

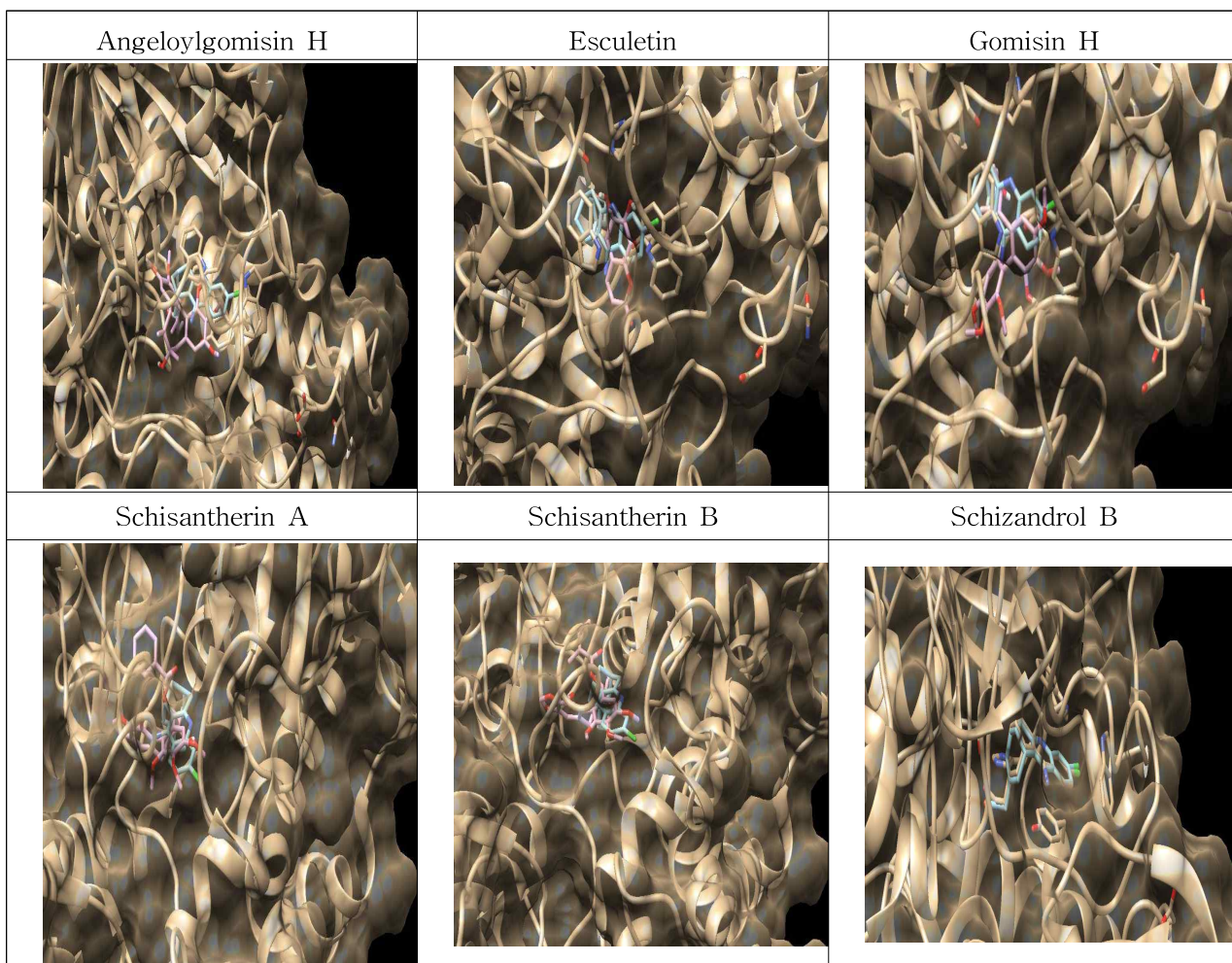
name	binding energy kcal/mol	hydrophobic interaction을 하는 residues	H-bond를 형성하는 residues
Angeloylgomisin H	-4.1	: Asp74, Gly82, Thr83, Trp86, Asn87, Pro88, Gly120, Gly121, Gly122, Tyr124, Ser125, Gly126, Leu130, Tyr133, Glu202, Ser203, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341, Trp439, His447	-
Esculetin	-7.8	Asp74, Thr83, Trp86, Tyr337, Tyr341, His447, Tyr449	-
Gomisin H	-4.7	Tyr72, Asp74, Thr83, Trp86, Asn87, Gly121, Tyr124, Ser125, Tyr337, Tyr341, Trp439, His447, Tyr449	-
Schisantherin A	-3.1	Asp74, Thr83, Trp86, Asn87, Gly120, Gly121, Tyr124, Ser125, Gly126, Ala127, Leu130, Tyr133, Ser203, Tyr337, Tyr341, Trp439, His447, Tyr449	-
Schisantherin B	-5.9	Asp74, Thr83, Trp86, Asn87, Gly120, Gly121, Gly122, Tyr124, Ser125, Gly126, Leu130, Tyr133, Ser203, Tyr337, Tyr341, Trp439, His447, Tyr449	-
Schizandrol B	-3.5	Asp74, Gly82, Thr83, Trp86, Asn87, Gly121, Gly122, Tyr124,	-



		Ser125, Ser203, Tyr337, Trp439, His447, Tyr449	
--	--	--	--

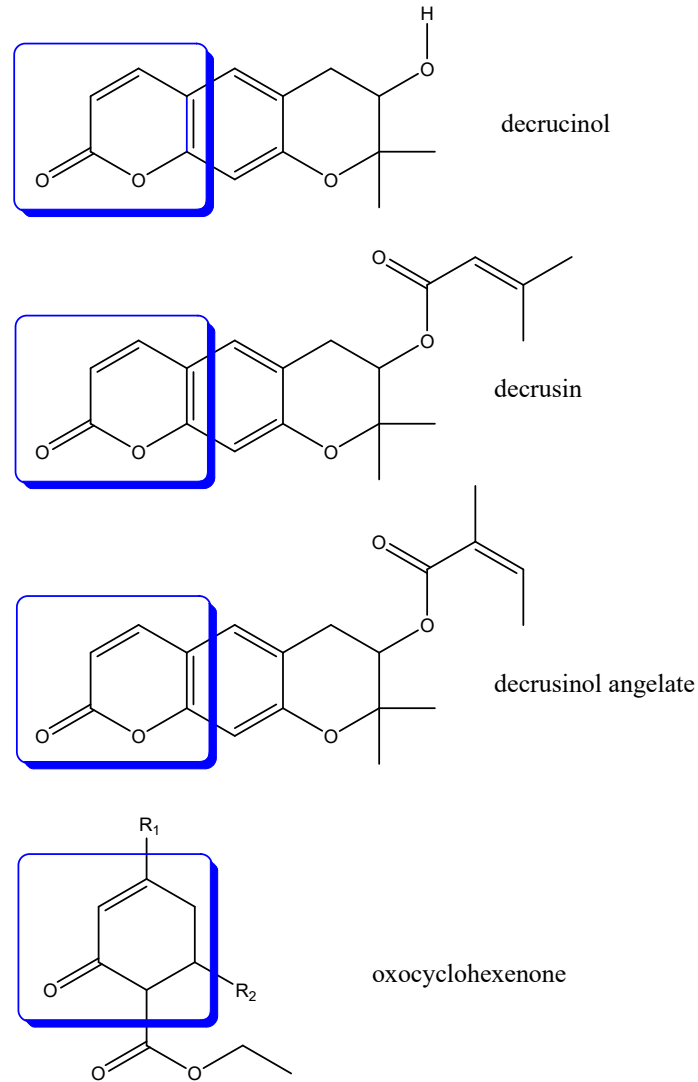
(3) 4bdt.pdb에 포함되어 있는 huprine의 binding energy보다 모두 높은 enrgy값을 보였고, H-bond를 형성하는데 참여한 residues가 한 개도 없어서 이들 6종의 성분들은 huprine보다 AChE에 대한 결합 정도가 약하다는 결론을 얻었다.

(4) 6종의 성분들이 AChE에 결합한 pose는 아래 그림과 같다.



### 3. 당귀 성분 유도체의 AChE 저해효과

본 연구에서는 당귀 성분들 중 decrucin, decrucinol, decrucinol angelate에 관심을 갖고 이들이 공통적으로 가지고 있는 모핵을 포함하는 새로운 유도체를 디자인하고자 하였다. decrucin, decrucinol, decrucinol angelate의 구조는 아래 그림에 나타낸 바와 같다.



이들 구조가 가지는 공통 모핵의 하나인 dihydropyranone골격 (위의 그림에서 파란 박스)을 흉내낸 oxocyclohexenone을 포함하는 네 번째 그림과 같은 골격을 포함하는 유도체들을 디자인하였다.

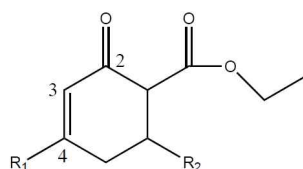
#### 가. 연구내용

(1) 총 22종의 oxocyclohexenone 골격을 포함하는 유도체를 합성하여 이들에 대한 AChE 저해효능을 시험하였다.

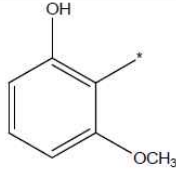
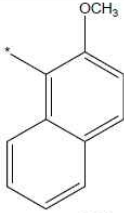
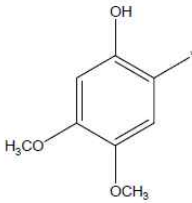
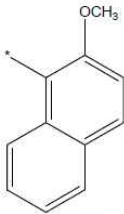
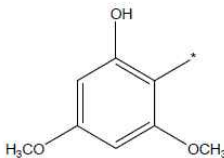
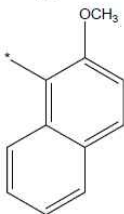
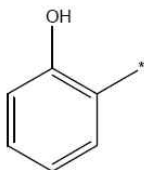
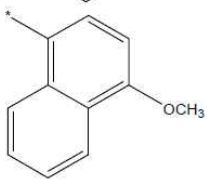
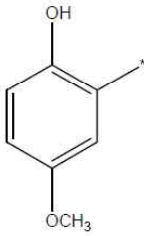
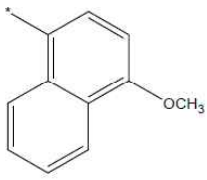
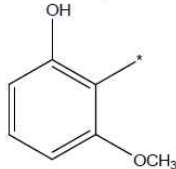
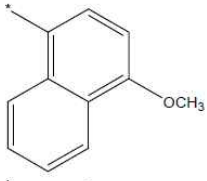
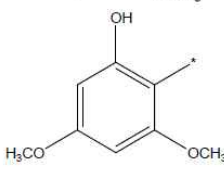
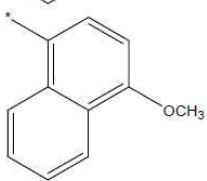
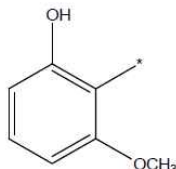
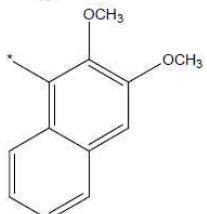
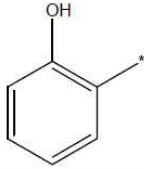
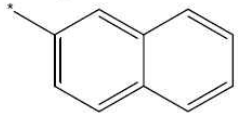
#### 나. 연구방법

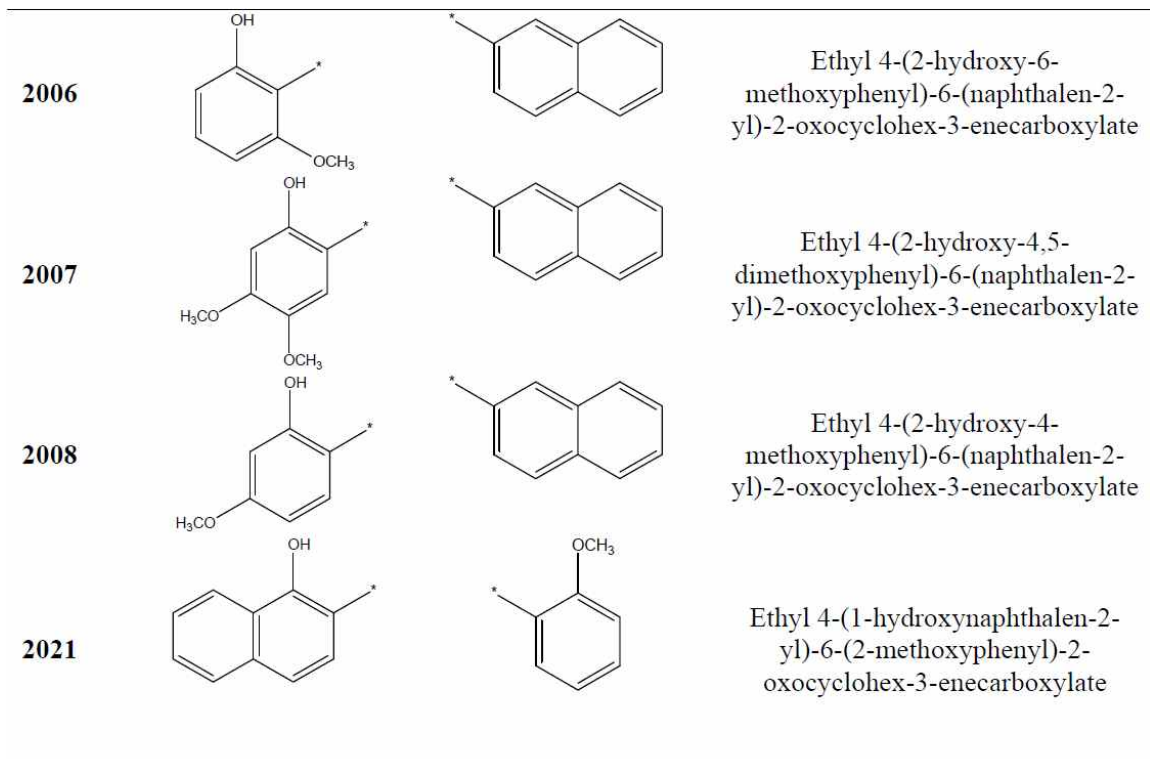
(1) acetylcholinesterase (AChE) 저해효과를 측정하기 위하여 Acetylcholinesterase Fluorescent Activity Kit (Invitrogen)를 사용하였다. 이 kit는 AChE와 substrate 사이의 반응 산물인 thiol기에 non-fluorescence molecule이 결합하도록 해준다. 이 때 excitation wavelength는 390nm, emission wavelength는 510nm를 사용한다. 이 실험 결과는 AChE에 대한 저해효과를 알려준다. 자세한 실험 방법은 제조사의 실험 protocol을 따랐다.

(2) 22종의 유도체들의 이름과 구조는 아래와 같다.



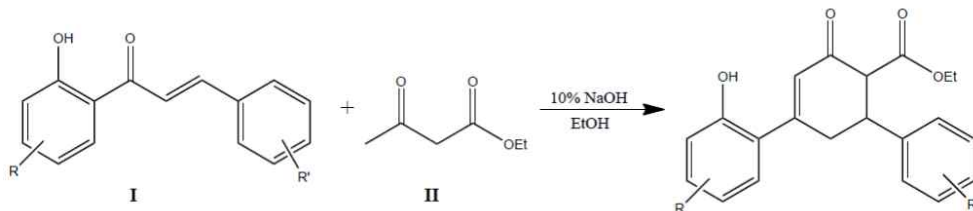
Derivative	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Name
2019			Ethyl 6-(2,4-dimethoxyphenyl)-4-(2-hydroxyphenyl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2022			Ethyl 6-(4-bromophenyl)-4-(2-hydroxyphenyl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2023			Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-2-oxo-6-p-tolylcyclohex-3-enecarboxylate
2000			Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-(naphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2001			Ethyl 4-(2-hydroxy-6-methoxyphenyl)-6-(naphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2002			Ethyl 4-(2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-6-(naphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2004			Ethyl 4-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-6-(naphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2009			Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2010			Ethyl 4-(2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-6-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate

2011			Ethyl 4-(2-hydroxy-6-methoxyphenyl)-6-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2012			Ethyl 4-(2-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl)-6-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2013			Ethyl 4-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-6-(2-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2014			Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-(4-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2015			Ethyl 4-(2-hydroxy-5-methoxyphenyl)-6-(4-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2016			Ethyl 4-(2-hydroxy-6-methoxyphenyl)-6-(4-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2017			Ethyl 4-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-6-(4-methoxynaphthalen-1-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2018			Ethyl 6-(2,3-dimethoxynaphthalen-1-yl)-4-(2-hydroxy-6-methoxyphenyl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate
2005			Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-(naphthalen-2-yl)-2-oxocyclohex-3-enecarboxylate



#### 다. 연구결과

(1) 22종의 유도체들의 합성 방법은 아래와 같다.

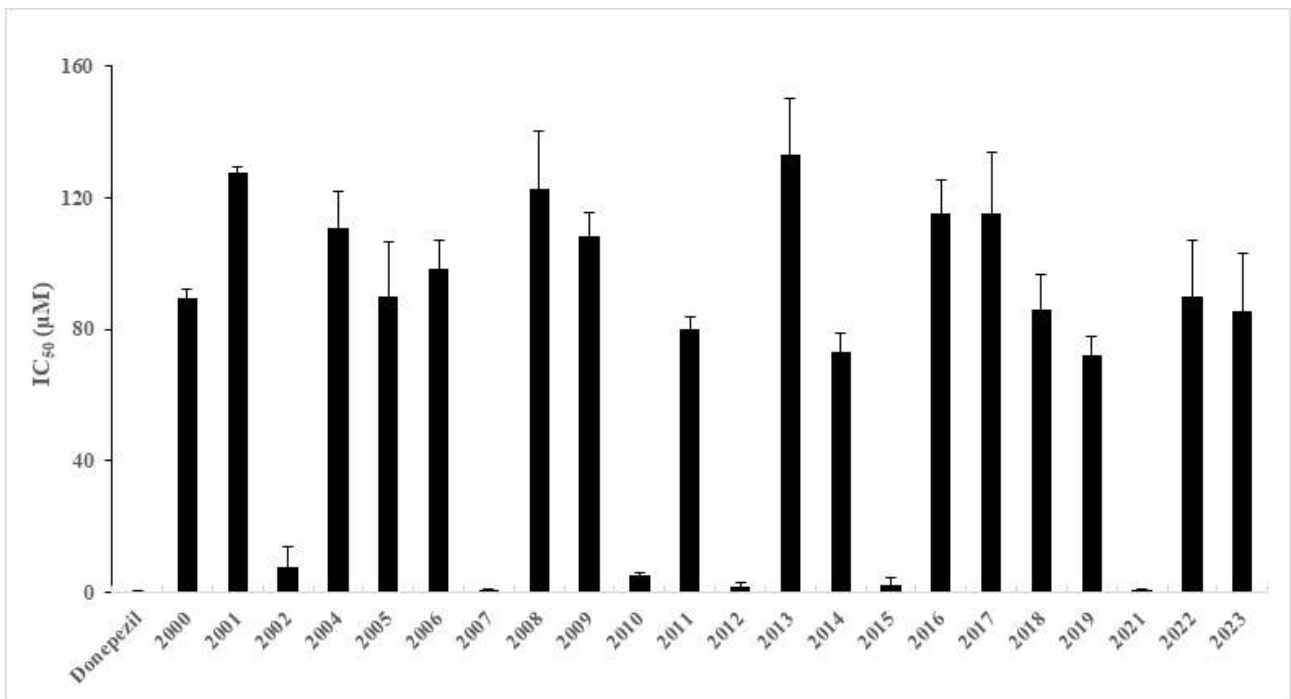


(2) 22종의 유도체들의 IC<sub>50</sub>값은 아래 표와 같다. control로 사용한 donepezil은 동일한 실험 조건에서 0.32 uM 이었고 유도체들 중 가장 AChE 저해효과가 좋은 2021의 IC<sub>50</sub>값은 0.93 uM로 donepezil에 근접한 저해효과를 보였다. 즉, 당귀 및 오미자가 함유한 성분들 자체의 AChE 저해값은 donepezil에 많이 못 미치나 이들 성분이 가지는 공통된 골격을 중심으로 새로 디자인 하여 합성한 유도체들은 향상된 AChE 저해효과를 보임이 확인되었다.

Donepezil	0.32
2000	89.39
2001	127.35
2002	7.83
2004	110.81
2005	90.00
2006	98.37
2007	1.03
2008	122.81

2009	108.18
2010	5.34
2011	80.07
2012	1.74
2013	133.12
2014	72.87
2015	2.27
2016	115.37
2017	115.09
2018	85.88
2019	72.18
2021	0.93
2022	89.85
2023	85.65

(3) 이 유도체들의 AChE에 대한 IC50값을 도표로 나타내면 아래와 같다.



## 2절. tau 단백질 분해효과 시험

알츠하이머병과 같은 퇴행성신경질환의 원인은 아직도 명확하게 규명되지 않았지만 tau 단백질이 기여한다는 사실이 밝혀졌다. Tau 단백질의 aggregation이 퇴행성뇌신경질환을 일으키는 사실이 점차 사실로 밝혀지고 있다. 따라서 tau 단백질의 aggregation을 저해하는 방법에 대한 연구가 근래에 집중적으로 이루어지고 있다. 이를 달성하기 위한 방법들 중 가장 보편적인 방법은 tau 단백질의 aggregation을 저해하는 저분자 화합물을 찾아서 퇴행성신경질환 치료제로 개발하는 것이다.

### 1. 인삼에 함유된 ginsenoside의 tau 단백질 분해효과

인삼에 함유된 다양한 ginsenoside를 대상으로 이들이 tau 단백질을 저해하는지를 확인하기 위하여 섬유화된 tau 단백질 분해능을 평가하고자 하였다 [ACS Chem. Neurosci. 7(11):1474 (2016)].

#### 가. 연구내용

(1) 총 21종의 ginsenoside를 대상으로 실험하였다.

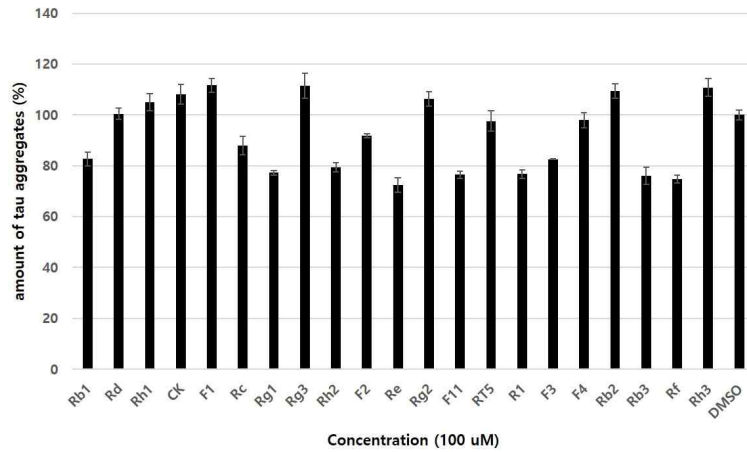
#### 나. 연구방법

(1) tau 단백질 단량체를 만들기 위해 LoBind tube (Eppendorf, Germany)를 이용하여 정제된 tau 단백질 (50 uM)을 25 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT에 녹인 후 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. tau 단백질 단량체에 Heparin (5 μM)을 첨가한 후 37 °C에서 48시간 동안 교반 배양하였다.

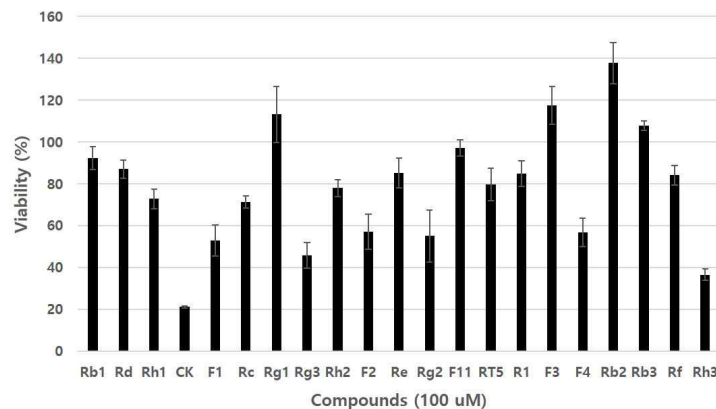
(2) 섬유화된 tau를 확인하기 위해 티오프라빈에스 (thioflavin S) 처리하고 최대 여기 (excitation): 440 nm, 최대 발광 (emission): 530 nm 값에서 증가하는 형광값을 SpectraMax M2e sepctrophotometer (Molecular device, USA)로 측정하였다. thioflavin S 결합 실험을 통해 생성 여부를 확인 한 뒤 생성된 섬유화된 tau 단백질에 다양한 약용작물 유효성분을 100 μM 농도로 처리하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양 후 thioflavin S 결합 실험을 통해 남아 있는 섬유화된 tau 단백질의 양을 확인하여 분해능 정도를 평가하였다. 이 실험은 이미 발표된 방법을 따라서 수행하였다 [Neuropharmacology 59:276 (2010)].

#### 다. 연구결과

(1) 섬유화된 tau 단백질 분해능을 평가한 결과는 아래 그림과 같다. Ginsenoside Re를 비롯한 수종의 성분들이 tau 단백질의 응집을 효과적으로 저해하는 결과를 얻었다.

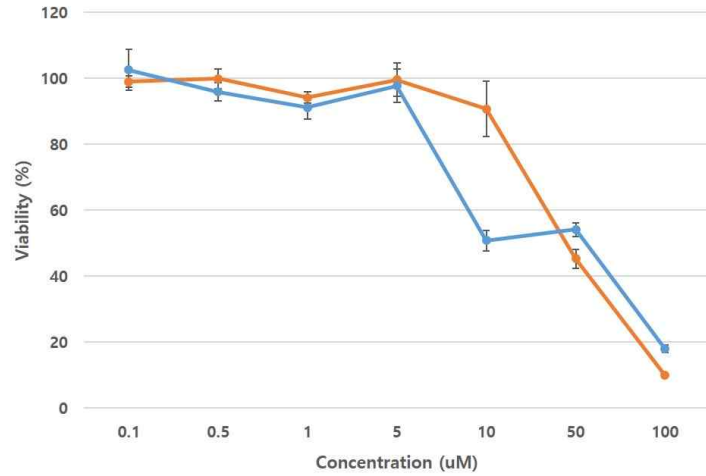


(2) 실험에 사용한 ginsenoside들의 세포 독성을 평가하기 위하여 Huh-7과 MDA-MB-231 세포주를 한국세포주은행에서 분양받아 96-well plate에  $5 \times 10^3$  개 분주하고 DMEM에 10% FBS를 포함한 미디어를 이용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 키웠다. 세포가 70% 정도 자랐을 때, 다양한 ginsenoside를 100 μM 농도로 처리하였다. 48 시간 배양 후, 배지를 새롭게 갈아준 뒤 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)를 처리하고 4 시간동안 배양하였다. 생성된 formazan을 DMSO로 용해시켜 Spectramax M2e sepectrophotometer (Molecular device, USA)를 이용하여 590 nm에서 흡광을 조사하였다. 세 번 반복 실험을 통해 조사된 흡광을 이용하여 결과를 분석하였다. 그 중 효과가 좋았던 물질들을 따로 선별하여 농도별 (100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 μM)로 각각의 세포주에 처리한 뒤, 48 시간 동안 배양하였다. 그 뒤 위와 동일한 방법으로 MTT 시약을 처리하고 흡광을 측정하여 세포 독성을 관찰하였다. Huh-7 세포주에 21종의 ginsenoside를 처리하여 확보한 세포독성 시험 결과는 아래 그림과 같다.

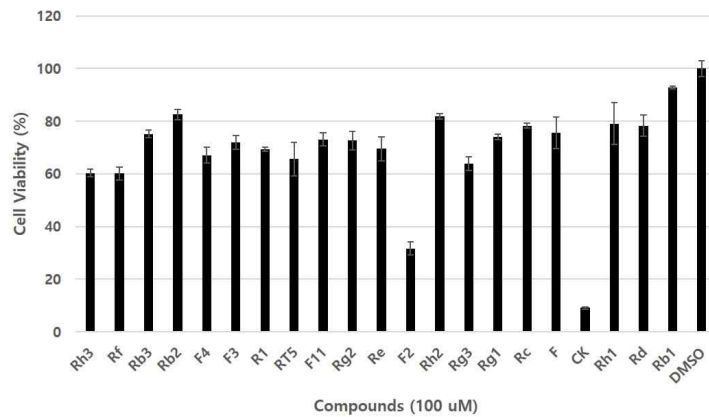


(3) 세포독성이 강하게 나타난 CK(주황색)와 Rh3(하늘색)에 대하여 다양한 농도 (100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 μM)로 처리할 때 확보한 세포독성 시험 결과는 아래 그림과 같다. (CK(주황색)와 Rh3(하늘색)에 대하여 다양한 농도 (100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 μM)로 처리할 때 확보한 세포독성 시험 결과)

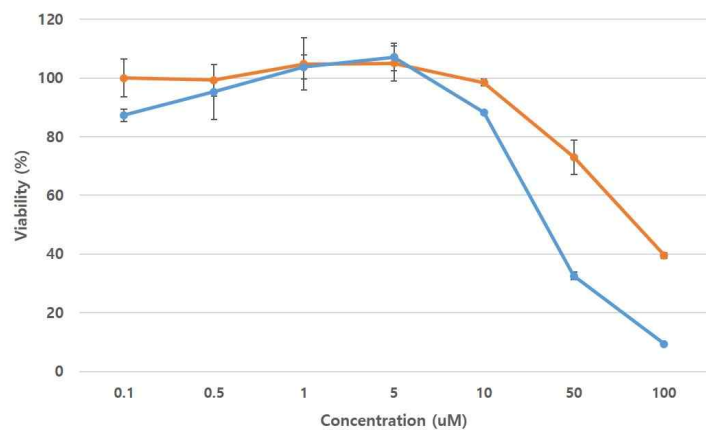




(4) MDA-MB-231 세포주에 21종의 ginsenoside를 처리하여 확보한 세포독성 시험 결과는 아래 그림과 같다. (MDA-MB-231 세포주에 21종의 ginsenoside를 처리하여 확보한 세포독성 시험 결과)



(5) F2(주황색)와 CK(하늘색)에 대하여 다양한 농도 (100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1  $\mu$ M)로 처리할 때 확보한 세포독성 시험 결과는 아래 그림과 같다.



## 2. 오미자, 당귀, 백수오, 강황에 함유된 성분들의 tau 단백질 분해효과

오미자, 당귀, 백수오, 강황에 함유된 다양한 성분들을 대상으로 tau 단백질을 저해하는지를 확인하기 위하여 섬유화된 tau 단백질 분해능을 평가하고자 하였다.

### 가. 연구내용

(1) 총 47종의 효능성분을 대상으로 실험하였다.

### 나. 연구방법

(1) tau 단백질 단량체를 만들기 위해 LoBind tube (Eppendorf, Germany)를 이용하여 정제된 tau 단백질 (50 uM)을 25 mM Tris-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT에 녹인 후 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. tau 단백질 단량체에 Heparin (5 µM)을 첨가한 후 37 °C에서 48시간 동안 교반 배양하였다.

(2) 섬유화된 tau를 확인하기 위해 티오플라빈에스 (thioflavin S) 처리하고 최대 여기 (excitation): 440 nm, 최대 발광 (emission): 530 nm 값에서 증가하는 형광값을 SpectraMax M2e sepctrophotometer (Molecular device, USA)로 측정하였다. thioflavin S 결합 실험을 통해 생성 여부를 확인 한 뒤 생성된 섬유화된 tau 단백질에 다양한 약용작물 유효성분을 100 µM 농도로 처리하였다. 37°C에서 2시간 동안 배양 후 thioflavin S 결합 실험을 통해 남아 있는 섬유화된 tau 단백질의 양을 확인하여 분해능 정도를 평가하였다. 이 실험은 이미 발표된 방법을 따라서 수행하였다 (Neuropharmacology 59:276-289 (2010)).

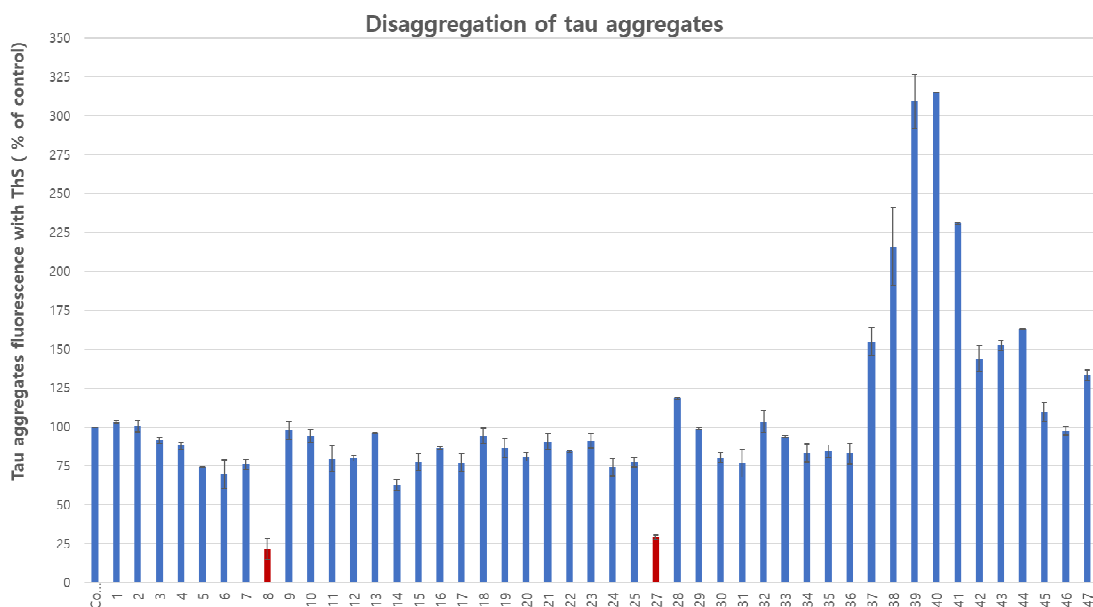
### 다. 연구결과

(1) 47종의 성분들은 아래 표와 같다.

- 1 Decursinol angelate
- 2 7-Hydroxycoumarin
- 3 Angelicin
- 4 Asarone
- 5 Byakangelicin
- 6 Byakangelicol
- 7 Esculetin
- 8 Fraxin
- 9 Isoimperatorin
- 10 Isopimpinellin
- 11 Nodakenin
- 12 Osthol
- 13 Phellopterin
- 14 Scopoletin
- 15 Scopolin
- 16 Xanthotoxol
- 17 Z-Ligustilide
- 18 Decursin
- 19 Oxypeucedanin

- 20 Angelol A
- 21 Decursinol
- 22 Magnolol
- 23 Arctigenin4'-O-β-gentiobioside
- 24 Magnolin
- 25 Etoposide
- 27 Bisdemethoxycurcumin
- 28 Demethoxycurcumin
- 29 Eleutheroside A
- 30 Esculin
- 31 Geniposide
- 32 6-alpha-Hydroxygeniposide
- 33 Feretoside
- 34 Conduritol A
- 35 Schizandrol A
- 36 Schizandrol C
- 37 Schizantharin A (Gomisin C)
- 38 Schizantharin B (Gomisin B)
- 39 Schizandrol B (Gomisin A)
- 40 Gomisin N
- 41 Gomisin J
- 42 Schisandrin B
- 43 Doxyschizandrin
- 44 Schisandrin A
- 45 Schisandrin B
- 46 Angeloylgomisin H
- 47 Gomisin H

(2) 섭취화된 tau 단백질을 분해하는 능력은 아래 그림과 같은데 fraxin, Bisdemethoxycurcumin이 가장 우수한 결과를 보였다. 즉, 이들 성분은 노인성 질환의 하나인 치매를 유발하는 원인의 하나로 알려진 tau단백질의 aggregation을 저해하는 효과를 지니는 것으로 평가되었다.



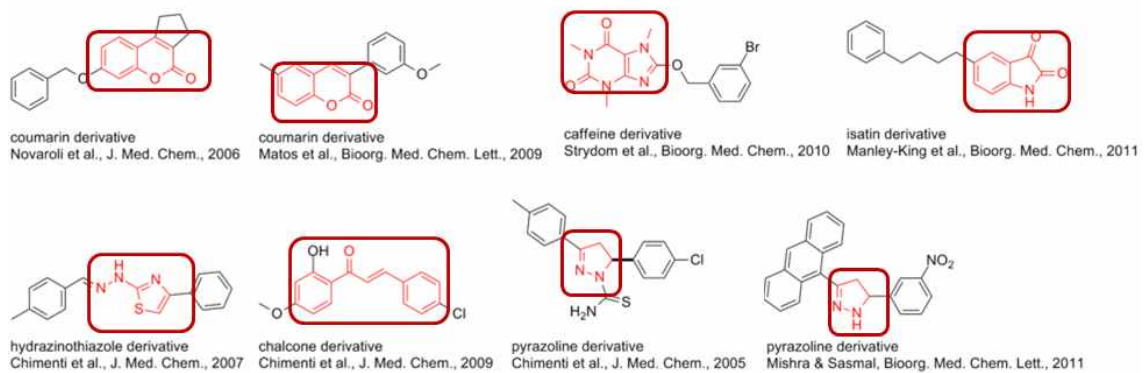
### 3절. monoamine oxidase-B 저해효과 시험

monoamine oxidase(MAO)는 dopamine, serotonin, adrenaline 등과 같은 신경전달물질의 대사에 관련하는 효소로서 A와 B의 두 종류가 발견되었다. 이 중 MAO-B는 주로 뇌에서 발견되며 도파민의 분해에 관여하고 그 결과로 퇴행성뇌질환의 일종인 파킨슨병과 밀접한 연관을 보인다. 따라서 MAO-B 저해물질은 퇴행성뇌질환의 예방, 억제, 치료에 효과를 보일 것으로 기대하여 많이 개발되어 왔다.

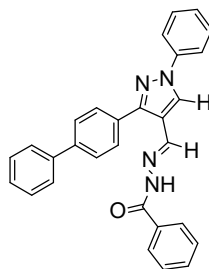
#### 1. 오미자 및 당귀에 포함된 성분들 중 이들과 구조적인 유사성이 있는 저해제

##### 가. 연구내용

(1) 본 연구에서는 오미자 및 당귀에 포함된 성분들 중 이들과 구조적인 유사성이 있는 저해제를 디자인하였다.

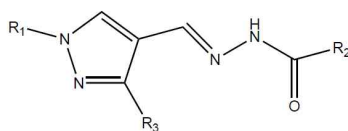


당귀에는 coumarin 계열 이차대사물들이 다수 발견되고 있고 오미자에서는 리그난 계열 이차대사물들이 발견된다. 위의 상자에 처리한 골격을 보면 coumarin 골격을 갖거나 폴리페놀 구조를 갖는 MAO-B 저해제들이 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 이를 근거로 pyrazoloacylhydrazone 유도체들을 아래와 같이 디자인하였다.



##### 나. 연구방법

(1) 총 29종의 pyrazoloacylhydrazone 유도체들을 합성하였고 이들의 이름과 구조는 아래 표와 같다.



Derivative	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Name
2900	Phenyl	3-Methoxyphenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-methoxybenzohydrazide
2901	Phenyl	4-Methoxyphenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-methoxybenzohydrazide
2902	Phenyl	3-Fluorophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-fluorobenzohydrazide
2903	Phenyl	4-Fluorophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-fluorobenzohydrazide
2904	Phenyl	2-Chlorophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-2-chlorobenzohydrazide
2905	Phenyl	3-Bromophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-bromobenzohydrazide
2906	Phenyl	4-Bromophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-bromobenzohydrazide
2907	Phenyl	3-Pyridinyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)nicotinohydrazide
2908	Phenyl	4-Pyridinyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)isonicotinohydrazide
2909	Phenyl	Phenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)benzohydrazide
2910	Phenyl	3-Hydroxyphenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-hydroxybenzohydrazide
2911	4-Methoxyphenyl	3-Methoxyphenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-methoxybenzohydrazide
2912	4-Methoxyphenyl	4-Methoxyphenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-methoxybenzohydrazide
2913	4-Methoxyphenyl	3-Fluorophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-fluorobenzohydrazide
2914	4-Methoxyphenyl	4-Fluorophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-fluorobenzohydrazide
2915	4-Methoxyphenyl	2-Chlorophenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-2-chlorobenzohydrazide
2917	Phenyl	3-Pyridinyl	Naphthalene	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-(naphthalen-2-yl)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)nicotinohydrazide
2919	4-Methoxyphenyl	Phenyl	1,1'-biphenyl-1	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-

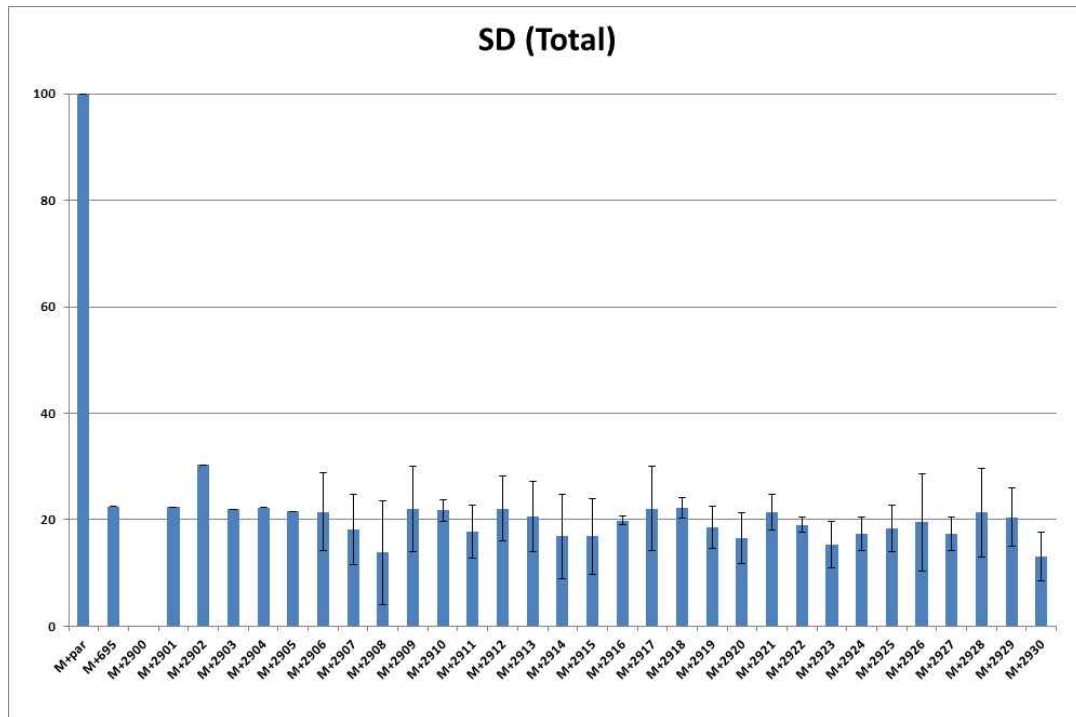
	henyl		1	methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)benzohydrazide
2920	4-Methoxyphenyl	3-Hydroxyphenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-hydroxybenzohydrazide
2921	4-Fluorophenyl	3-Methoxyphenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-methoxybenzohydrazide
2922	4-Fluorophenyl	4-Methoxyphenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-methoxybenzohydrazide
2923	4-Fluorophenyl	3-Fluorophenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-fluorobenzohydrazide
2924	4-Fluorophenyl	2-Chlorophenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-2-chlorobenzohydrazide
2925	4-Fluorophenyl	3-Bromophenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-bromobenzohydrazide
2926	4-Fluorophenyl	3-Pyridinyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)nicotinohydrazide
2927	4-Fluorophenyl	4-Pyridinyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)isonicotinohydrazide
2928	4-Fluorophenyl	Phenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)benzohydrazide
2929	4-Fluorophenyl	3-Hydroxyphenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-fluorophenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-3-hydroxybenzohydrazide
2930	4-Methoxyphenyl	4-Bromophenyl	1,1'-biphenyl	( <i>E</i> )- <i>N'</i> -((3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-(4-methoxyphenyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-yl)methylene)-4-bromobenzohydrazide

(2) MAO-B 저해효과를 실험하기 위하여 human MAO-B를 과발현하였다.

(3) Amplex Red Monoamine Oxidase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen)를 사용하여 저해효과를 측정하였다. 10 uM의 Aplex Red를 10uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1U/ml HRP와 함께 pH7.4 buffer 용액에서 incubate하였다. 571 nm에서 excitation, 585 nm에서 emission하도록 fluorescence reader를 사용하여 형광을 측정하였다. 자세한 실험 방법은 제조사가 제시한 방법을 따랐다. horse radish peroxidase-coupled reaction에서 Amplex Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)를 사용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 검지하는 방식을 사용하였다. (4) control로 MAO-B 저해제로 잘 알려진 pargyline을 사용하여 이 값을 100으로 하고 상대적인 저해값을 얻었다 [Bioorg. Med. Chem. 21:7890 (2013)].

#### 다. 연구결과

(1) 유도체들이 보이는 MAO-B 저해값은 아래 그림과 같이 나타낼 수 있는데 3회 반복실험에 따른 error bar를 함께 표시하였다.



(2) control로 MAO-B 저해제로 잘 알려진 pargyline에는 못 미치나 합성한 유도체들 중 가장 우수한 저해효과를 나타낸 화합물은 2902로 pargyline에 비하여 30.3%에 해당하는 저해값을 나타냈다. 따라서 당귀에 함유된 coumarine 골격과 오미자에 함유된 리그난 골격을 동시에 가지는 유도체들은 MAO-B에 저해효과를 보이는 것으로 확인되었다.

## 7장. 오미자의 건강기능식품 제품의 상용화

건강에 대한 사회적 관심이 증가하면서 약용 작물에 관련 시장도 성장하고 있다. 미국의 경우 건강식품 시장의 약 20%를 약용작물이 차지하고, 중국에선 약초를 기초로 한 처방이 전체 의약품의 절반을 이루고 있다. 국내의 경우, 신규 약용작물의 개발 혹은 기존 약용작물의 신규 효능 발굴 연구가 부진하며, 대표적인 전통 약용작물인 인삼의 경우에도 국제경쟁력이 약화된 상태이다. 캐나다, 미국 등의 인삼 수출액은 이미 우리나라의 수출액을 추월한 상태이며, 중국 삼, 화기삼에 비해 고려인삼은 가격 경쟁력을 상실한 실정이다. 인삼을 대표로 하는 국내 경제 약용작물 산업의 경쟁력 제고를 위해 고부가가치 상품 개발을 위한 연구개발이 절실히 요구된다. 해외에서는 고부가가치 인삼 가공품 개발에 주력하는 반면, 국내 인삼 산'업은 부가가치가 낮은 뿌리삼의 생산 수준에 머무르고 있다. 따라서 인삼대체 신규 경제약용작물 발굴 및 기존 약용작물의 신규 효능 발굴에 의한 상품화를 통해 국제경쟁력을 제고할 필요성이 강하게 대두되고 있다.

오미자는 동의보감에서 다섯가지 맛을 내는 성질이 우리 몸에 각기 다르게 작용하는 것으로 표시하고 있는데, 신맛은 간, 단맛은 비장과 위장, 매운맛은 폐, 쓴맛은 심장, 짠맛은 신장과 방광에 좋은 것으로 평가한다. 우리나라와 중국이 원산지로서, 중국은 북오미자와 남오미자로 구분하고, 우리나라는 이 두 가지 외에 흑오미자가 추가된다. 북오미자가 일반적으로 오미자라고 부르는 품종이다. 흑오미자는 열매가 까만 것으로 우리나라 제주도에서만 생산된다. 우리나라에서 오미자는 주로 북오미자로 경북 문경이 주재배지이나 현재는 기후 온난화로 북쪽으로 재배지가 확산되어 평창까지 이르고 있는 실정이다. 1990년대 말까지는 강원도 인제군이 전국 오미자 생산의 약 절반을 차지하였으나 군부대에 편입되면서 문경이 주재배지가 되고 있다. 문경에서는 약 700농가 550ha로 전국 오미자 재배의 약 절반을 차지하고 있다. 전국에서의 오미자 재배지는 2000년에 비해서 10년이 지난 후에는 500% 증가하였고, 생산량 역시 10년 동안 2300% 증가하였고 수입량도 50% 이상 증가하였다. 그러나 근래에는 오미자의 공급과잉과 수입증가로 인해서 오미자 단가가 하락하고 있으며 이와 같은 추세는 지속될 것으로 예측되고 있기 때문에 오미자 재배 농가의 소득 감소로 이어질 것이 우려되는 실정이다. 오미자는 묘목 식재 후 3년생부터 생산이 가능하고 5년째가 가장 생산성이 높다 [국립산림과학원 '산지 약용자원의 생산 및 유통실태(II)' (2011)]. 연도별 가격은 600g 당 26,200원(2002년)에서 17,000원(2009년)까지 점차 하락하는 추세이다. 생산 농가의 오미자 출하가격 역시 계속 하락하고 있다. 출하가격이 5,000원일 때 소득률은 5.6%, 6,000원일 때 21.3%로 근래 출하가격인 5-6천원인 점을 감안하면 소득률이 거의 0에 가까운 점을 제고해야 한다 [국립산림과학원 '산지약용자원의 생산 및 유통실태(II)' (2011)]. 중국의 오미자 생산량은 13,000톤(2010년) 정도로 우리나라(3,800톤)보다는 많다 [상하이 aT센터 자료 2011. 3. 7]. 중국에서 생산되는 오미자의 절반은 재고로 남기 때문에 가격하락으로 이어질 전망이다. 재고는 매년 축적되어 현재는 약 2만톤에 이르고 있는 것으로 추정된다. 이와 같은 재고 오미자는 우리나라 오미자 가격보다 아주 싼 가격에 우리나라로 수입되면서 가격 하락을 유도하고 있다.

따라서, 오미자의 새로운 수요 창출이 필요하고, 이를 위해서 현재 오미자 소비가 주로 생과, 건과, 당절임 세가지로 집중되어 있는 것을 확대할 필요가 있으며 새로운 효능의 발굴이 필요하다. 궁극적으로는 오미자가 인삼의 뒤를 잇는 우리나라 경제약용작물의 지위를 차지하기



위한 연구가 필요하다.

## 1절. 오미자 건강기능식품의 상용화

오미자 액상 제품의 생산을 위해서 액상차 생산 공장을 참여기업인 (주)문경미소에서 준공하였다.

## 2절. 오미자 액상차 생산공장

가. 오미자 액상차 생산공장의 외부 전경



나. 오미자 액상차 생산공장의 생산라인



다. 오미자 엑상차 제품

(1) 병에 담은 제품



(2) 파우치 제품



(3) 스틱 제품



### 3절. 오미자 효능성분이 강화된 제품

오미자의 기존 제품은 액상 추출인데 본 연구에서 확보한 결과는 100% ethanol 추출물에 효능성분이 더 많이 포함되기 때문에 ethanol 추출물을 이용한 제품을 개발하고자 하였다. 제품 생산방법은 위의 액상차 생산방법과 동일하나 재료를 ethanol 추출물로 대체하여 생산하였다. 그 결과, “8절 3”에 제품 내 오미자 효능 성분을 분석한 결과를 기술한 바와 같이 ethanol 추출물로 제작한 제품이 기존의 오미자 열매를 착즙한 제품에 비해서 효능 성분이 적어도 12배 이상 함유된 결과를 얻었다.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

가. 최종목표 (농생명산업기술개발사업RFP에서 제시한 최종목표를 그대로 따름)

- 약용작물의 유효성분 및 생체내 대사물질 데이터베이스 1건 구축
- 약용작물의 유효성분 및 그 대사물질의 생체내 분포도 1건 작성
- 약용작물 및 생체내 대사물질의 노인성질환 관련 신규유효성 발굴 1건 이상
- 약용작물의 건강기능식품 원료 개별인정형 자료 확보 1건 이상

나. 정성적 목표 (농생명산업기술개발사업RFP에서 제시한 세부목표를 그대로 따름)

- 약용작물의 유효성분/대사물질 동정 및 표준품 제작
  - 약용작물 유효성분 동정
  - In vitro metabolite profiling을 통한 유효성분의 대사물질 동정
  - 합성생물학/유기화학 방법으로 유효성분/대사물질 제작
- 약용작물의 생체내 분포도 작성으로 알려진 유효성의 검증
  - 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 유효성분/대사물질들의 조직/장기내 존재유무를 분석함으로써 생체내 분포도 제작
- 약용작물 유효성분 및 생체내 대사물질의 신규 유효성 발굴 및 상용화
  - 제작된 생체내 분포도에 기반하여, 유효성분 및 그 대사물질에 의한 노인성질환 치료/예방 효능을 세포 및 동물실험을 통하여 발굴
  - 유효성분의 건강기능식품 원료 개별인정형 자료 확보
  - 유효성분의 상용화

다. 정량적 목표

(단위 : 백만원, 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
최종목표	7	7		3	20	5	16,600		29			9	10	9	37	14			
1차년도	2								2			1	2	2	10	2			
2차년도	3			1	10	1			3			2	3	2	12	5			
3차년도	2	5		2	10	2			4			2	5	2	15	7			
소 계	7	5		3	20	3			9			5	10	6	37	14			
종료 1차년도		1				1	100		4			2		1					
종료 2차년도		1				1	500		4			1		1					
종료 3차년도							1,000		4			1		1					
종료 4차년도							5,000		4										
종료 5차년도							10,000		4										
소 계		2				2	16,600		20			4	0	3					
합 계	7	7		3	20	5	16,600		29			9	10	9	37	14			

## 3-2. 목표 달성여부

### 가. 정성적 목표

- 약용작물의 유효성분/대사물질 동정 및 표준품 제작
  - ✓ 오미자가 함유하고 있는 유효성분 중 오미자 에탄올 추출물에 포함된 9종의 gomisin 유도체에 대하여 HPLC, NMR data 확보
  - ✓ 오미자가 함유한 미량 성분 12종을 분석함
  - ✓ 당귀가 함유하고 있는 유효성분들 17종의 HPLC 및 NMR data 확보
  - ✓ 당귀 함유 성분들 중 decursin, decursinol, decursinol angelate, chlorogenic acid의 안정성(stability) 시험 수행
  - ✓ 인삼에 함유된 ginsenoside 20종의 NMR data 확보
  - ✓ 당귀, 오미자, 강황 함유성분들의 물리화학적 성질 database화
  - ✓ 당귀 효능성분인 decrusin, decrusinol angelate, nodakenin, decrusinol이 약 7배 강화된 분획을 확보
  - ✓ 오미자 효능성분이 약 15배 강화된 분획을 확보
  - ✓ 오미자 추출방법(4가지 다른 추출방법)에 따른 효능 비교 분석 및 성분 분석
  - ✓ 오미자 함유 성분의 식품의약품안전처 방법과 본 연구자의 분석 방법의 비교
  - ✓ 강황, 당귀, 오미자, 인삼이 함유한 성분들의 대사물질의 질량분석 자료를 database화
  
- 약용작물의 생체내 분포도 작성으로 알려진 유효성의 검증
  - 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 유효성분/대사물질들의 조직/장기내 존재유무를 분석함으로써 생체내 분포도 제작 (형광이미징 방법 적용)
    - ✓ 강황 함유 유효성분(curcumin)의 생체내 안정성 향상을 위한 복합체 형성 조건 확보
    - ✓ 강황 및 당귀 유래 단일물질들의 생체내 분포 이미징 data 확보
    - ✓ 강황 함유 단일유효성분과 유효성분 혼합의 뇌질환모델에서의 항염증 효능 비교 분석
    - ✓ 천연물 성분 및 저분자 화합물들의 뇌 분포 증대를 위한 천연물 후보 5종을 분석함
    - ✓ 당귀 함유 단일유효성분과 유효성분 혼합(umbelliferone, Byakangelicin, decursin, decursinol, nodakenin, angelicin)의 세포내 도입효율 data 확보
    - ✓ 당귀 함유 유효성분들의 세포내 도입효율 증대를 위한 유효성분들의 혼합비율 조절 조건 확보
    - ✓ 당귀 함유 유효성분들의 간유래 효소 안정성 data 확보
    - ✓ 당귀 함유 유효성분들의 혼합비율 조절에 따른 활성 물질의 뇌로의 전달량 증가 조건 확보
    - ✓ 당귀 함유 유효성분의 세포 활성 분석 조건 확보
    - ✓ 고분자 소재 및 지지 소재를 이용한 강황 함유 활성성분의 생체 안정성 증대 조건 확보

- 약용작물 추출물을 생체에 적용한 뒤, 유효성분/대사물질들의 조직/장기내 존재유무를 분석함으로써 생체내 분포도 제작 (질량분석 방법 적용)
  - ✓ 약용작물 추출물 및 단일물질의 MALDI-TOF 질량분석을 위한 최적의 매트릭스 조건 확인 (오미자 14종, 백수오 11종, 당귀 10종, 강황 6종의 대표적 단일물질 질량값 확인)
  - ✓ 약용작물 추출물을 쥐에 주입하고 장기에 분포하는 성분들을 질량분석 (coumarin 계열 4종, gomisin 계열 5종 등 질량분석이 가능한 단일물질 선별)
  - ✓ 첫 번째 후보로 당귀의 umbelliferon을 단일물질로 쥐에 투여하여 질량분석을 통해 장기내 분포여부를 확인 후 각 장기 내 분포도를 얻음
  - ✓ 이 후에 byakangelicin, phellopterin, gomisin H 등에 대한 장기 분포를 확인
  - ✓ 내위표준물질을 활용하여 정량커브를 구축한 후 gomisin H에 대한 정량적 생체내 분포도 작성
  - ✓ umbelliferon, angellicin, byknangellicind의 생체내 분포를 확인하여 다중검지(multiplexing)능력을 검증
  - ✓ 두가지 이상의 유효성분(schizandrol A, gomisin N, gomisin J)을 쥐에 주입한 후 각 성분에 대해 생체내 분포도 작성하여 유효성분간 시너지 효과를 확인
  - ✓ 질량분석 이미징 기법을 이용한 뇌에서의 gomisin H 분포 확인
  - ✓ 장기추출물에서의 유효성분 분석을 효과적으로 수행하기 위해 효율적이고 선택적인 농축법 및 질량분석법 개발
  - ✓ 추가로 폐놀기 함유분자의 선택적 고정화 방법을 개발
- 약용작물 유효성분 및 생체내 대사물질의 신규 유용성 발굴 및 상용화
  - 제작된 생체내 분포도에 기반하여, 유효성분 및 그 대사물질에 의한 노인성질환 치료/예방 효능을 세포 및 동물실험을 통하여 발굴 (퇴행성 뇌질환 관련 연구)
    - ✓ 당귀 및 오미자 성분의 퇴행성 뇌질환 관련 효능에 대한 과학적 근거 제시를 위한 실험 3종을 수행함
    - ✓ 당귀 및 오미자 성분 45종의 acetylcholinesterase(AChE) 저해효과 실험: Schizantharin A, Schisantherin B, Schizandrol B, Angeloylgomisin H, Gomisin H 등 오미자 함유 성분 5종은 수십 micromolar concentration의 IC50값을 나타냄
    - ✓ 당귀 성분 유도체의 AChE 저해효과 실험: 당귀 함유 성분들이 가지는 공통 모핵의 하나인 dihydropyranone 골격을 흉내낸 oxocyclohexenone을 포함하는 골격을 포함하는 유도체들을 디자인, 합성하고, 이들이 보이는 AChE 저해효과를 시험하였고 수백 nanomole 수준의 IC50값을 나타냄
    - ✓ 알츠하이머병과 같은 퇴행성신경질환의 원인 중 하나인 tau 단백질의 aggregation 저해효과를 수행함
    - ✓ 인삼에 함유된 ginsenoside의 tau 단백질 분해효과: 21종의 ginsenoside를 대상으로 실험하여 Ginsenoside Re를 비롯한 수종의 성분들이 tau 단백질의 응집을 효과적으로 저해하는 결과를 확보함
    - ✓ 오미자, 당귀, 백수오, 강황에 함유된 47종의 성분을 대상으로 실험하여 강황 함유

성분 중 하나인 Bisdemethoxycurcumin이 tau단백질의 aggregation을 저해하는 효과를 지니는 것으로 확인함

- ✓ monoamine oxidase(MAO)는 퇴행성뇌질환의 일종인 파킨슨병과 밀접한 연관을 보이기 때문에 MAO-B 저해물질을 찾고자 실험을 수행함
  - ✓ 당귀에는 coumarin 계열, 오미자에서는 리그난 계열 이차대사물들이 발견되므로 이들 골격을 공통적으로 갖는 화합물을 디자인, 합성하여 MAO-B 저해효과를 실험하였고, 기존에 알려진 pargyline에 비하여 30.3%에 해당하는 저해값을 보이는 저해제를 도출함
- 제작된 생체내 분포도에 기반하여, 유효성분 및 그 대사물질에 의한 노인성질환 치료/예방 효능을 세포 및 동물실험을 통하여 발굴 (항암 관련 연구)
- ✓ 4종의 약용식물 (당귀, 오미자, 백수오, 강황)에서 유래한 29종의 화합물에 대한 유효성분 평가 스크리닝을 완료함
  - ✓ T 세포 염증반응 억제 효능을 갖는 유효성분 6종을 선별하였고, 이 중 Th17 세포 특이적 활성억제 기능을 갖는 당귀 유래 decursinol angelate를 최종 선별하여 in vitro 기전 분석과 2종류 (퀘양성 장질환 및 다발성 경화증)의 in vivo 효능 검증을 수행함
  - ✓ 퀘양성 장질환 마우스 모델에서 decursinol angelate의 예방 및 치료 효능과 세포 수준의 기전을 규명함
  - ✓ 다발성 경화증 동물 모델에서 decursinol angelate의 효능을 분석함
  - ✓ 대식세포 염증반응 억제 효능을 갖는 유효성분을 스크리닝하여 당귀 유래 decursinol angelate와 강황 유래 bisdemethoxycurcumin 2종을 최종 선별하여, 골수유래 대식세포의 활성화와 기능에 미치는 in vitro 효능을 검증하고 기전을 분석함
  - ✓ 항생제내성 황색포도알균에 의한 패혈증 모델과 리스테리아에 의한 리스테리아증 2종류의 감염 동물 모델을 이용하여 decursinol angelate와 bisdemethoxycurcumin in vivo 효능 분석을 완료함
  - ✓ 암세포주에 대한 이동성 평가 및 성장 평가를 통해 오미자 유래 Gomisins G, 강황 유래 demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin 3종을 선별하였고, 이 중 다양한 암종에서 가장 효율적으로 암세포의 성장을 억제하는 Gomisins G를 최종 선별함
  - ✓ 유방암 세포주와 대장암 세포주에 대한 Gomisins G 성장 억제 효능을 검증하고 작용 기전을 분석함
- 유효성분의 건강기능식품 원료 개별인정형 자료 확보
- ✓ 오미자 추출물은 비알콜성 간섭유화에 탁월한 효능을 보임이 본 연구를 통해서 확인이 되어 “간기능개선”을 위한 개별인정형 기능성 원료 신청을 위한 자료를 확보
  - ✓ 기원, 개발경위, 국내외 인정/허가 현황, 사용 현황, 제조방법에 관한 자료, 원료의 특성에 관한 자료, 기능성분 규격 및 시험방법에 관한 자료, 유해물질의 규격 및 시험방법에 관한 자료, 안전성에 관한 자료, 기능성 관련 자료, 섭취량 및 설정에



관한 자료 등을 확보하였음

- 유효성분의 상용화

- ✓ 오미자 액상차 제품으로 병에 담은 제품, 파우치, 스틱 제품을 상용화하여 판매 중임
- ✓ 오미자 액상 제품의 생산을 위해서 본 연구과제 기간 중에 액상차 생산 공장을 참여기업인 (주)문경미소에서 준공하여 현재 제품 생산 중임
- ✓ 오미자 제품 내 오미자 함유 성분 20종에 대한 분석
- ✓ 오미자 열매를 착즙하여 생산한 제품과 효능성분이 강화된 제품의 성분의 비교 분석

나. 정량적 목표

(단위 : 백만원, 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
최종목표	7	7		3	20	5	16,600		29			9	10	9	37	14			
연구기간 중 목표	7	5		3	20	3			9			5	10	6	37	14			
연구기간 내 달성	7	0		3	20	3			9			19	1	8	37	27			
종료 1차년도		1				1	100		4			2		1					
종료 2차년도		1				1	500		4			1		1					
종료 3차년도							1,000		4			1		1					
종료 4차년도							5,000		4										
종료 5차년도							10,000		4										
소 계		2				2	16,600		20			4	0	3					
종료 후 목표	0	7		0	0	2	16,600		20			0	0	1	0	0			
합 계	7	7		3	20	5	16,600		29			9	10	9	37	14			

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

- 특허등록을 제외한 모든 정성적, 정량적 목표를 달성하였음
- 특허등록 5건은 종료시점까지 달성하지 못하였는데, 연구과제 신청 시점과는 달리 근래에는 특허출원부터 등록까지 소요되는 시간이 길어져서 현재까지 출원한 7건의 특허가 등록되는 데에는 시간 더 필요할 것으로 판단되고, 과제 종료후의 결과물로 제출할 예정임

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

- 약용작물의 유효성분 및 생체내 대사물질에 대하여 구축한 데이터베이스
  - 건강기능식품 상업화를 위한 근거 자료로 제공
  - 건기식을 개발할 때 자료로 활용
- 약용작물의 유효성분 및 그 대사물질의 생체내 분포도
  - 약용작물에 대하여 작성한 생체내 분포도는 기존에 알려진 효능을 입증하기 위한 과학적 근거 자료로 활용
  - 약용작물의 건기식 개발을 위한 과학적 근거에 활용
  - 소비자에게 약용작물의 효능에 관한 과학적 신뢰 제공
- 약용작물의 유효성분 및 그 대사물질의 노인성질환 관련 유용성 발굴
  - 고령사회로 진입한 우리나라의 건강수명 연장을 위한 노인성질환 예방 및 치료제 개발에 활용
  - 기존에 노인성질환 효과가 있는 것으로 알려진 약용작물에 대한 과학적 근거 제시로 소비자 신뢰 제공
- 약용작물 유효성분의 건강기능식품 원료 개별 인정
  - 효능 관련 결과들은 건기식 원료 개별인정 신청 자료로 활용

## 붙임. 참고문헌

- ACS Appl. Mater. Interfaces 10:4324 (2018)
- ACS Chem. Neurosci. 7(11):1474 (2016)
- Anal. Chim. Acta. 843:38 (2014)
- Anal. Sci. 32:1117 (2016)
- Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47(49):9518 (2008)
- Appl. Biol. Chem. 59:689 (2016)
- Appl. Biol. Chem. 61(6):607 (2018)
- Appl. Biol. Chem. 61:251 (2018)
- Appl. Biol. Chem. 61:403 (2018)
- Appl. Biol. Chem. 61:607 (2018)
- Biochem. Biophys. Res. Commun. 315:502 (2004)
- Biomaterials. 162:71 (2018)
- Biomol. Ther 26:322 (2018)
- Biomol. Ther. doi.org/10.4062/biomolther.2018.054 (2018)
- Bioorg. Med. Chem. 21:7890 (2013)
- Bioorg. Med. Chem. 25:397 (2017)
- Bioorg. Med. Chem. Lett. 19:4367 (2009)
- Biotechnol. Biopro. Eng. 23:150 (2018)
- Bull. Korean Chem. Soc. 38:964 (2017)
- Chem. Asian J. 12:1895 (2017)
- Geerts A (2001) History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis 21:311 - 335
- Int. J. Pharm. 515:669 (2016)
- Int. J. Pharm. 515:669 (2016)
- J. Korean Oriental Med. 32(4):1 (2011)
- J. Microbiol. Biotech. 27:975 (2017)
- J. Microbiol. Biotechnol. 20:1359 (2010)
- J. Pharm. Inves. 47:11 (2017)
- Macromol. Biosci. 14(6):881 (2014)
- Macromol. Biosci. 18(12):e1800301 (2018)
- Macromol. Res., 26:145 (2018)
- Magn. Reson. Chem. 50:62(2012)
- MolImmuno. 87:47 (2017)
- Neuropharmacology 59:276 (2010)
- talanta168-240
- 국내외건강기능식품산업 현황 및 전망 (2012)
- 국내외건강기능식품산업현황및전망, 김정연교수 (2014)

국립산림과학원 ‘산지약용자원의 생산 및 유통실태(II)’ (2011)  
대한민국약전외한약(생약)규격집 [별표\_4]\_의약품각조\_2부  
바이오인웹진 (2011)  
보건산업기술이전센터 시장정보 report 37 (2014)  
상하이 aT센터 자료 (2011,3.7)  
인삼통계자료집, 농식품부 (2015)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.