

과제번호  
114145  
-3

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

발간등록번호  
11-1543000-002260-01

뇌  
질  
환  
성  
운  
동  
장  
애  
예  
방  
및  
개  
선  
을  
위  
한  
건  
강  
기  
능  
식  
품  
소  
재  
개  
발  
최  
종  
보  
고  
서

# 뇌질환성 운동장애 예방 및 개선을 위한 건강기능식품 소재 개발 최종보고서

2018. 3. .

주관연구기관 / 한국생명공학연구원

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

2018

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

“뇌질환성 운동장애 예방 및 개선을 위한 건강기능식품 소재 개발”(개발기간 : 2014. 12. ~ 2017. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 3. .

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 김원곤 (인)  
협동연구기관명 : (대표자) (인)  
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 김 원 곤  
협동연구책임자 :  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

## 보고서 요약서

과제 고유 번호	114145-3	해당 단계 연구 기간	2014. 12. 19 - 2017. 12 18	단계구분	1/1
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	뇌질환성 운동장애 예방 및 개선을 위한 건강기능식품 소재 개발			
연구책임자	김원곤	해당단계 참여연구원 수	총: 26 명 내부: 26 명 외부:    명	해당단계 연구개발비	정부: 750,000 천원 민간:       천원 계: 750,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 26 명 내부: 26 명 외부:    명	총 연구개발비	정부: 750,000천원 민간:       천원 계: 750,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	한국생명공학연구원 감염병연구센터			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

### 9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	6	5	1								

### 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<p>요약</p> <p>새로운 작용기전 Nurr-1 단백질 활성화 활성을 가지며 파킨슨 질환 동물 모델에서 운동장애 개선 효능이 확인된 팔꽃나무와 병아리꽃나무 2종의 원예작물을 대상으로 파킨슨병으로 인한 노인성 운동장애 예방 및 개선용 건강기능식품 기능성원료로 인정받기 위한 연구를 실시한 결과, 팔꽃나무 꽃 추출물은 파킨슨 동물모델에서 10mg/kg에서도 치료효과가 우수하였고 도파민 신경세포사멸을 강력히 억제하였으며, 건강기능식품 원료로 인정받는데 필요한 모든 비임상시험 (단회투여독성, 유전독성, 13주 반복투여독성)에서 안전성이 입증되어 건강기능식품 기능성원료로 개발될 수 있는 것으로 판명되었음. 또한 팔꽃나무 꽃 추출물에서 2개의 신규화합물을 포함하여 16개의 유효성분을 분리하였고, Nurr1 활성화 활성을 검증하였음. 본 연구는 팔꽃나무 꽃 추출물이 “운동능력개선” 신기능성 건강기능성 식품원료의 개발이 유망할 뿐만 아니라, 파킨슨질환 치료 천연물 신약으로서의 가능성을 제시하고 있음.</p>	<p>보고서 면수</p> <p>80</p>
---	-------------------------

# 요 약 문

연구의 목적 및 내용	<p>새로운 작용기전 Nurr-1 단백질 활성화 활성을 가지며 파킨슨질환 동물모델에서 운동장애 개선 효능이 확인된 팔꽃나무와 병아리꽃나무 2종의 원예작물을 대상으로 파킨슨병으로 인한 노인성 운동장애 예방 및 개선용 건강기능식품 기능성원료로 인정받기 위하여, 지표성분 분석방법 확립, 시생산을 통한 공정 표준화, 기준규격 설정, 안정성 평가, 및 건강기능성추출물의 동물시험에서 기능성 평가 및 안전성 평가를 실시하여 임상시험에 진입함.</p>				
연구개발성과	<p>1. 주요 정성적 성과</p> <p>1) 팔꽃나무의 지표성분이면서 유효성분인 DGH-2 화합물 (yuanhuacin)의 분석 방법을 확립하였고, 효율적인 추출방법을 표준화하였음. 또한, 줄기와 뿌리 추출물에서 6개의 유효성분을 추가로 분리하여 동정하였으며, 꽃 추출물에서는 2개의 신규 화합물을 포함하여 총 16개의 유효성분을 분리하여 화학구조를 규명하였고 활성을 비교 조사하였음.</p> <p>2) Nurr-1 활성화 in vitro 시험과 파킨슨 동물모델에서 활성을 확인한 다음, 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)의 안전성시험을 GLP기관에서 실시한 결과, 복귀돌연변이와 염색체 이상시험에서 유전독성이 발견되어, 아쉽게도 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물은 건강기능식품 원료로 개발될 수 없음을 알 수 있었음.</p> <p>3) 그러나, <b>팔꽃나무 꽃은 “원화”로 불리며 한약제로 직접적으로 사용되는 부위로 알려져 있기 때문에, 꽃 추출물에 대한 유전독성, 유효성분, 파킨슨 효능을 조사한 결과, 꽃 추출물 (DGF-EX)는 복귀돌연변이과 염색체 이상 시험에서 유전독성이 없었고, 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)보다 Nurr-1 활성화 활성이 우수하였으며, 파킨슨 동물모델에서도 10mg/kg에서도 도파민 신경세포 사멸을 강력히 억제하면서 파킨슨 치료 효과가 우수한 것을 발견하였음.</b></p> <p>4) 특히, 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)은 GLP기관에서 건강기능식품 원료로 인정받는데 필요한 모든 비임상시험 (단회투여독성, 유전독성, 13주 반복투여독성)을 실시한 결과, 안전성이 입증되어 건강기능식품 기능성원료로 개발될 수 있는 것으로 판명되었음.</p> <p>5) 병아리 꽃나무 추출물의 경우, 복귀돌연변이시험에서는 독성이 없었으나, 염색체 이상시험에서 의양성으로 판정되었고, 채집에 따른 in vitro 및 in vivo 파킨슨 치료 활성의 재현성이 낮았기 때문에, 기능성 식품원료 개발로 적합하지 않은 것으로 판명되었음.</p> <p>2. 주요 정량적 성과</p> <p>1) 논문-교신저자로 SCI 저널 3편          ① J. Nat. Prod. 79 (6), 1604-1609, 2016 (IF 3.6), ② Biol. Pharm. Bull. 40 (12), 2205-2211, 2016 (IF 1.8), ③ Nat. Res. Prod. 2017, Nov 20:1-9. [Epub ahead of print] (IF 1.8)</p> <p>2) 특허-연구책임자로 국내 3편/PCT 1편 출원</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>○ 동물모델에서의 탁월한 효능을 가지며 GLP 비임상 시험에서 안전성이 확보된 팔꽃나무 꽃 추출물을 대상으로 향후 임상시험후 “운동능력개선” 신기능성 건강기능성 식품원료로 개발.</p> <p>○ 팔꽃나무 꽃 추출물을 파킨슨 치료 천연물 신약으로 개발. 향후 전임상 보완 및 임상 시험후 기존 치료제의 부작용(이상 운동증, 환각등)이 없는 안전한 파킨슨 치료제 개발</p> <p>○ 팔꽃나무 꽃 추출물이 뇌신경세포 사멸저해 활성이 우수하므로 “인지능력 개선” 건강기능식품 원료 또는 치매 치료 천연물 신약으로의 개발 가능성 연구</p> <p>○ 고부가가치 작물 발굴을 통한 농가수익 증대</p> <p>○ 운동장애 예방 및 개선 건강기능식품 개발을 통한 파킨슨병으로 고통 받는 노인 인구의 절감을 통한 의료비 감소 및 삶의 질 향상</p>				
중심어 (5개 이내)	건강기능성 식품 소재	뇌질환	운동장애	동물시험	

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	5
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	9
3. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	76
4. 연구결과의 활용계획 등 .....	78
5. 참고문헌 .....	79

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

### ○ 연구개발 목표:

새로운 작용기전 Nurr-1 단백질 활성화 활성을 가지며 파킨슨질환 동물모델에서 운동장애 개선 효능이 확인된 팔꽃나무와 병아리꽃나무 2종의 원예작물을 대상으로 파킨슨병으로 인한 노인성 운동장애 예방 및 개선용 건강기능식품 기능성원료로 인정받기 위하여, 지표성분 분석방법 확립, 시생산을 통한 공정 표준화, 기준규격 설정, 안정성 평가, 및 건강기능성 추출물의 동물시험에서 기능성 평가 및 안전성 평가를 실시하여 임상시험에 진입함.

### 최종목표

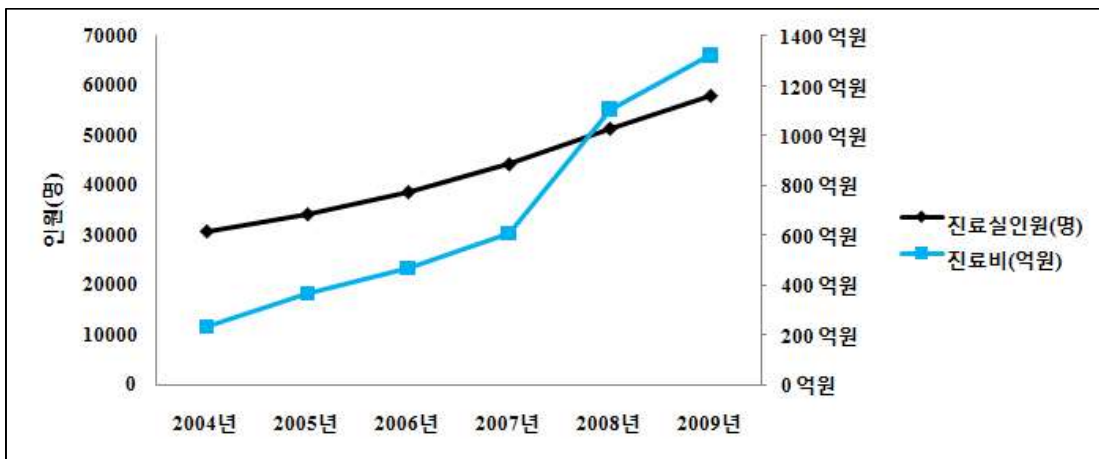
- “운동장애 예방 및 개선용” 건강기능식품 기능성원료 임상시험 진입 1종
- “운동장애 예방 및 개선용” 건강기능식품 기능성원료 2종 관련 SCI 논문 3편 이상 발표
- “운동장애 예방 및 개선용” 건강기능식품 기능성원료 2종 관련 국내외 특허 4건 이상

## 1-2. 연구개발의 필요성

### ○ 파킨슨병 (Parkinson’s Disease, PD)이란?

뇌의 흑질 (substantia nigra) 부위의 도파민 신경세포가 서서히 선택적으로 소실되어 이곳에서 만들어지는 도파민이라 불리는 신경전달 물질이 결핍되어 발생하는 질병으로, 병리학적으로 운동기능장애를 수반하며 시간이 갈수록 증세가 악화되는 운동장애 질환이며, 이와 더불어 우울증 및 언어장애등을 수반하는 대표적인 퇴행성 만성 뇌 질환임.<sup>1, 2</sup>

### ○ 국내 파킨슨병 환자 발병률

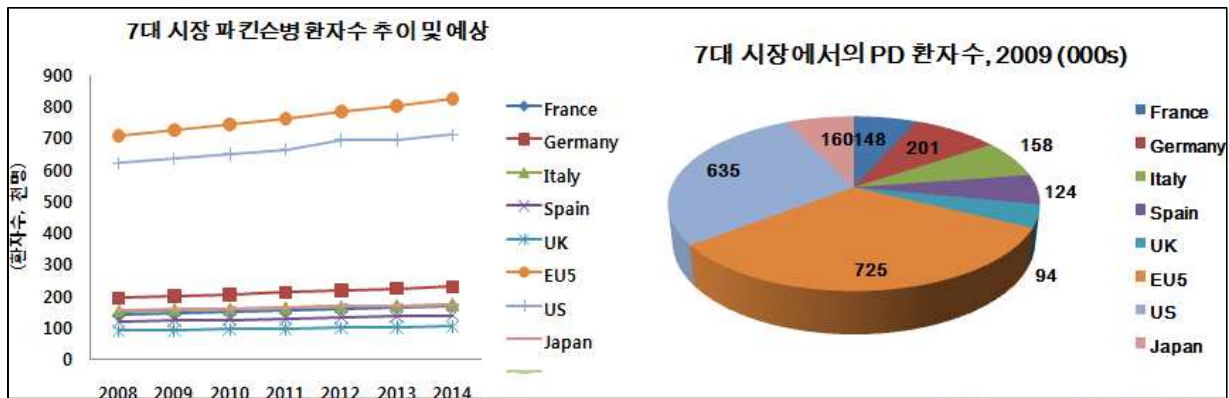


국내 파킨슨 병 환자수 및 진료비

2009년 건강보험심사평가원 자료에 의하면 국내 파킨슨병 환자는 2004년 3만 명이었으나, 2009년 5만 8천여 명으로 약 2배 증가하였고, 진료비는 2004년 200억 원에서 2009년 1370억 원으로 약 7배 증가하였음. 60세 이상에서 파킨슨병 환자는 1.47%로 나타나 미국과 비교해 거의 유사한 발병률을 보임. 그런데, 파킨슨병 노인 가운데 약 70%가 치매나 노화로 오인돼 제대로 된 치료를 받지 못하고 있는 것으로 조사되어, 국내 노인 인구 10만 명당 파킨슨병 실제 환자수는 2천명~3천명에 이르는 것으로 추정 됨 (대한신경과학회, 제26차 추계 학술대회, 2007). 따라서 현재의 추세로 고령화가 진행될 경우 2020년에는 65세 이상의 노인 인구가 770만 명으로 예상되기 때문에 (통계청, 장래인구추계, 2010), 2020년에는 국내에서 15 - 23만 명의 파킨슨 환자가 발생할 것으로 추산되어 사회·경제적으로 심각한 문제로 대두될 것으로 예상됨.

○ 국외 파킨슨병 발병률

전 세계적으로는 60세 이상 인구의 약 1%, 65세 이상 인구의 2%내외, 85세 이상의 4-5%가 파킨슨병 환자로 추정됨. 하지만 전체 환자의 약 10-15%는 40대 이전에 발병하며 30대에 발병하는 경우도 있음. 2009년 미국에서 64만명, 일본에서 16만명, 유럽등 선진 7개국에서 최소 230만명의 파킨슨 환자가 발병하였음 (2010년 Business Insights). 더욱이 더욱 신속하고 정밀해진 파킨슨병 진단기술로 인해 발병빈도가 더욱 늘어나는 실정임. 선진국에서는 발병 후 평균 6년 정도가 지나고 나서야 파킨슨병으로 진단되며, 그 후 환자의 지속수명은 약 18년으로 조사되고 있음.





○ 파킨슨병의 현재의 치료방법과 문제점

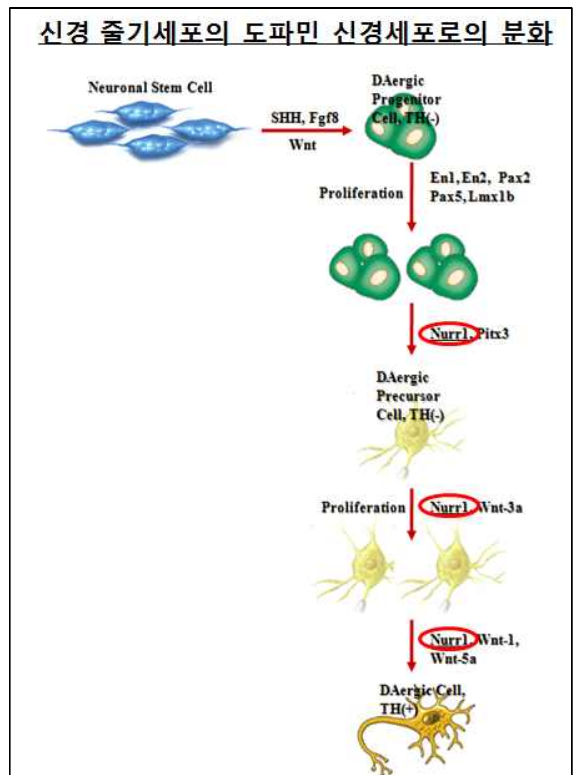
파킨슨병의 가장 이상적인 치료방법으로서는 발병원인과 병의 진전을 근본적으로 차단하는 신경보호기술(neuroprotection)과 손상된 신경계를 근원적으로 복구, 재생시키는 신경재생기술 (neuroregeneration)이 필요하지만 현재 이들 분야에서는 치료기술의 진척이 원활하지 않은 것이 현실임. 따라서 파킨슨병에 대한 근원적 치료법이 존재하지 않는 현실에서 가장 이상적인 파킨슨병 치료법이라 하면 환자로 하여금 삶의 질을 최대한 안정화시키고 수명을 지속시키는 방법뿐이라고 할 수 있음.

지금까지 개발된 파킨슨병 치료제로는 L-DOPA, dopamine receptor agonist, Monoamine oxidase(MAO)-B inhibitor, Catechol O-methyltransferase(COMT) inhibitor, Anticholinergic drugs, Antiglutamate drugs 등이 있음 (CNS Drugs. 2010, 24, 941; Int Rev Neurobiol. 2010,95,163).<sup>3, 4</sup>

이들 약물치료제는 모두 L-DOPA가 갖는 문제점 즉, 시간이 지남에 따라 복용량이 증가하며, 일부 복용환자에게서 이상 운동증 (dyskinesia), 환각 및 환상 (hallucination, illusion) 등 심각한 부작용을 초래하며, 무엇보다도 파킨슨병의 원천적 원인인 도파민 신경세포의 죽음을 차단할 수 없다는 한계를 지니고 있기 때문에 새로운 작용기전의 파킨슨 치료방법 개발이 절실히 필요함.<sup>5</sup>

○ 파킨슨병 개선및치료의새로운타겟으로서Nurr1

뇌에서 도파민 신경세포의 발생 및 분화는 여러 성장인자 (growth factors)와 전사인자 (transcription factors)에 의해 결정됨. Sonic hedgehog (Shh)과 fibroblast growth factor-8 (Fgf8)이라 불리는 성장인자는 초기 도파민 전구세포를 만드는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, Engrailed (En1 and En2), Pax, Pitx3, Nurr1 등의 전사인자는 도파민 전구세포로부터 도파민 신경세포로의 분화를 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, Nurr1, Wnt 등의 전사인자들은 도파민 신경세포의 특징인 tyrosine hydroxylase (TH) 양성세포를 만듦으로써 도파민 신경세포로의 분화 및 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 그리고, Nurr1은 Pitx3와 함께 도파민 신경세포의 특징을 결정하는 핵심 전사인자로 많은 주목을 받아왔음(Proc Natl Acad Sci U S A. 2006, 103, 2874).<sup>6-8</sup>



또한 파킨슨병 환자에게서 Nurr1 유전자의 돌연변이가 자주 발견 되고 있으며,<sup>9</sup> 특히 Nurr1 유전자를 결핍시킨 쥐의 흑질부위 (substantia nigra)에서 도파민 신경세포가 생성되지 않는 것으로 밝혀져 Nurr1이 도파민 신경세포 생성에 필수적인 유전자로 검증되어서 Nurr1은 새로운 파킨슨 치료제 타겟으로 유망함 (Progress in Neurobiology, 2005, 77,128).<sup>10, 11</sup>

#### ○ 본 연구의 필요성:

팔꽃나무와 병아리꽃나무는 국내에서 관상용으로 재배되고 있는 원예 작물로서, 팔꽃나무는 전통적으로 향암, 향염, 진통제로 이용되어 왔고, 병아리 꽃나무는 보신 보혈에 이용되어 왔음 (동의보감 및 운곡본초학). 두 작물은 뇌질환 치료에 관한 연구가 전혀 되어 있지 않은 재료이며, 특히 식약청의 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 등에 관한 규정 제 2조 1항에 있는 “건강기능 식품으로 사용할 수 없는 식물성 원료”에 포함되지 않은 원료로써 전임상/임상 시험후 건강기능식품으로 개별인정이 가능함. 특히, 예비 연구에서 팔꽃나무와 병아리꽃나무 추출물의 파킨슨 동물모델에서의 운동장애 치료효과가 확인되었을 뿐 만 아니라, 팔꽃나무의 경우 유효성분이 규명되었고 유효성분에 대한 동물실험에서도 그 기능성이 검증되었음. 특히, 그 작용기전이 Nurr1 단백질 활성화를 통한 것이기 때문에, 본 연구과제를 수행하면 산업적으로 매우 유용한 기능성 원료를 개발할 가능성이 높을 뿐만 아니라, 학술적으로도 매우 impact있는 결과를 도출할 수 있을 것이다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

		코드번호	D-05
가. 연구방법 및 연구내용			
연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용	
원료 표준화 및 지표성분 규격화	유효 성분 분석 방법 확립 및 유효성분 추출 방법 확립.	유효성분 분석방법을 확립한다. 컬럼, 이동상, 검출과장, 온도 등 다양한 조건을 확정하고 HPLC 조건을 확립한다. 팔꽃나무 작물의 부위별 및 추출 조건별 (온도, 추출방법, 용매 조성등)로 추출물을 제조하여 유효성분의 최적의 추출 방법의 확립. 또한 추출물의 지표성분의 분석법을 검증한다.	
병아리꽃나무의 유효성분 결정	유효성분 분리정제 및 구조결정	<p>○ 병아리꽃나무 유효성분 분리</p> <p>본 연구팀은 소량의 화합물이라도 신속하게 추출 정제할 수 있는 기술을 확보하고 있음. 즉 silica gel, MCI gel, Sephadex LH-20, ODS column chromatography, TLC, MPLC, HPLC 등 다양한 컬럼크로마토그래피 방법을 통하여 활성물질을 activity-guided fractionation하여 단일성분으로 추출 정제할 수 있는 기술을 확보하고 있으며, 특히 분자량 2,000 이하의 저분자 물질이라면 lipophilic, amphiphilic, acidic, basic 등 각종 활성물질의 추출정제를 용이하게 정제할 수 있는 기술을 확보하고 있음.</p> <p>○ 병아리꽃나무 유효 물질 구조분석</p> <p>순수하게 추출 정제된 화합물은 화학구조를 결정하게 되는데 특히 미량성분이라도 화학구조를 분석 결정할 수 있는 기술이 요구됨. 본 연구팀은 NMR, MS 등을 이용하여 화학구조를 규명할 수 있는 기술을 확보하고 있음. 즉 NMR은 500, 600 MHz의 NMR을 이용하여 <math>^1\text{H-NMR}</math>, <math>^{13}\text{C-NMR}</math>, COSY, DEPT, HMQC, HMBC, NOESY 등의 분석기법을 활용할 것이며 MS는 EI-MS, FAB-MS, ESI-MS 등을 측정하여 분자량을 결정하고 high-resolution mass를 측정하여 화합물의 분자식 및 분자구성원소를 규명함. 활성물질의 입체구조는 vicinal coupling constant (<math>^3J_{\text{H-H}}</math>), <math>^{13}\text{C-}^1\text{H}</math> coupling constant (<math>^2J_{\text{C-H}}</math>, <math>^3J_{\text{C-H}}</math>), NOESY NMR 등을 측정하여 활성물질의 입체구조를 밝힘.</p>	
팔꽃나무 추출물의 안전성평가 (GLP 기관)	단회독성 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)	<p>○ 단회투여독성시험 : GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시한다. 5,000mg/kg 과 2,000mg/kg 2개 용량에서 예비실험을 실시하여 용량을 결정하고, 본 시험을 군당 랫드 암수 각 5수에 대하여 실시한다. 일반증상관찰, 사망률, 체중측정 등 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 결정.</p> <p>○ 복귀돌연변이시험 : GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시한다. 5개 균주에 대하여 예비실험 1회 실시하여 최대 용량을 결정하고, 본 실험에서 5개 용량에 대하여 각 용량 별 3개 plate에서 실시한다.</p> <p>○ 염색체이상실험 : GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시한다. 포유류 배양세포주 (CHL/IU cell) 사용에 대하여 1차 시험(단시간) 과 2차 시험 (연속처리)에서 최대 용량을 결정하고 본 실험에서 3개 용량에 대하여 각 용량 별 2개 plate에서 실시하여 염색체의 구조적 이상 유발성의 유무를 평가한다.</p>	

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
팥꽃나무 추출물의 안전성평가 (GLP 기관)	단회독성 유전독성시험(복귀돌연 변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)	○ 소핵 실험 GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시한다. 마우스의 골수세포를 이용하여 예비실험 및 소핵 유발 빈도시험을 실시한 후, 본 실험을 실시하여 소핵유무를 평가한다.
	4주 반복 용량 결정 (DRF) 시험 (설치류)	○ 4주 반복 용량 결정 (DRF) 시험 GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시한다. 암수 랫드를 이용하여 시험물질을 4주간 반복 경구투여시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시한다.
in vitro Nurr1 활성화 물질 활성 평가	GAL4 유전자가 결합할 수 있는 염기서열이 포함된 유전자를 리포터 유전자인 luciferase에 결합시킨 plasmid, Nurr1-LBD를 함유한 plasmid와 beta-Galactocidase를 갖고 있는 plasmid 등 3종의 plasmid DNA와 BE(2)C 세포를 이용한 측정 방법이용	GAL4 유전자가 결합할 수 있는 염기서열이 포함된 유전자를 리포터 유전자인 luciferase에 결합시킨 plasmid, Nurr1-LBD를 함유한 plasmid와 beta-Galactocidase를 갖고 있는 plasmid 등 3종의 plasmid DNA를 BE(2)C 세포에 트랜스펙션한 뒤 6시간 후, 활성성분이나 작물 추출물은 DMSO에 녹여 처리하고 대조군으로 1% DMSO를 처리함. 처리한 세포를 20시간 동안 5% CO <sub>2</sub> incubator에서 키운 후 luciferase assay를 함 Luciferase assay를 통해 얻은 OD값으로부터 blank 대비 fold값(시료 처리군/1% DMSO)을 계산하여 Nurr1 활성화 정도를 측정함.
파킨슨 병 동물 모델 구축	○ 6-OHDA를 뇌의 흑질부위에 직접주입법을 이용한 파킨슨병동물모델 구축	파킨슨병 동물모델은 6-OHDA를 뇌의 흑질부위에 직접주입법을 이용하여 도파민성 신경세포 특이적인 세포사를 유발하는 기술을 확보하고 있음 : 6주령의 SD rat을 코아텍 사로부터 구입하여 동물실 환경에 적응시킨 다음, 중뇌의 흑질 부위에 6-OHDA 4ug을 stereotaxic tool을 이용하여 AP(-4.3) , MI(-1.8) , DV (-8.2)와 AP(-5.0), ML (-1.8) , DV (-8.2) 부위에 1ug/ul의 농도를 1ul/min 속도로 직접 주입함. 이때 desipramine 25mg/kg를 6-OHDA 투여 30분 전에 투여하여 도파민성 신경세포 이외의 세포사를 억제시킴. 천연추출물은 랫트의 사료에 섞어 하루에 해당 농도에 대해 2주일간 먹이며 이때, 대조군은 천연추출물을 함유하지 않은 먹이를 공급하고 다른 외과적 수술 등의 처치는 동일하게 진행함.

연구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
동물의 운동장애 행동실험	① Stepping test, ② Rotation test, ③ Cylinder test를 이용한 동물 운동 장애 행동 실험 및 뇌조직 적출후 면역 염색 실험	<p>① Stepping test : 약물학적 시험의 오차를 보강하기 위한 비 약물학적 검사 방법이며 다리의 운동 상실을 테스트 하는 실험으로 길이 90 cm의 탁자위에서 손으로는 쥐의 세다리를 제어한 상태에서 탁자면 위를 15초 동안 이동시키며 제어되지 않은 쪽의 다리가 탁자표면을 딛는 수를 측정함. 4다리를 각각 3회 반복 측정함. 이 실험은 6-OHDA를 주입하기 전 3일 전에 2일간 4회 연습을 시키고 pre test를 시행하며 6-OHDA 주입 후 2주, 4주, 6주 차에 각각 테스트를 시행함.</p> <p>② Rotation test : 6-OHDA 투여 후 도파민성 신경세포사멸에 의한 운동조절 능력을 약물학적 시험으로 확인하는 방법으로 6-OHDA 병변의 반대쪽으로 회전하게 하는 DA receptor agonist인 apomorphine을 투여하여 circling 행동을 측정함. 플라스틱 볼에 랫트를 먼저 적응시킨 다음 apomorphine 을 0.5mg/kg 로 투여한 후 플라스틱 볼에 놓고 60min간 rotation을 측정함..6-OHDA 투여 후 2주, 4주, 6주에 각각 측정함.</p> <p>③ Cylinder test : 6-OHDA 투여 후 앞발의 사용횟수를 비교하기 위한 실험으로 랫트를 지름 30cm, 높이 30cm 의 cylinder 에 놓고 5분간 비디오로 촬영하여 6-OHDA 병변의 동측과 대측의 앞발로 벽면을 짚은 횟수를 측정함.. 6-OHDA 투여 전과 투여 후 2주, 4주, 6주 에 각각 시행함.</p> <p>○ 뇌조직 면역 염색            뇌에서의 도파민성 신경세포사의 정도를 알아보기 위해 6-OHDA 투여 6주 후에 2.5%의 avertin을 복강 주사하여 마취한 후 4% paraformaldehyde로 고정시킴. 적출한 brain은 vibratome (Leica) 으로 40μm 두께의 뇌 절편을 취함. 뇌의 흑질 부위에서의 도파민성 신경세포사를 확인하기 위해 5% HS에서 상온에서 blocking 한 다음, 도파민성 신경세포 특이적인 rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (Millipore AB152) 1차 항체를 4℃에서 overnight 반응시킴. 2차 항체 (Biotinylated Rbt IgG)와 ABC kit를 반응 후, DAB 발색을 하여 현미경 하에서 관찰하며 면역 염색 진행함. 면역 염색된 조직은 슬라이드에 올린 후 연속된 3개의 뇌 절편에 대해 현미경하에서 좌우 뇌에서 염색된 도파민성 신경세포의 수를 세고 density를 측정하여 약물 투여 그룹의 효과를 비교 분석함.</p>

나. 연구결과

1). 팔꽃나무 원료 표준화 및 유효성분 규격화

가) 팔꽃나무 식물

경기도 용인에 위치하는 한택식물원으로부터 2011년 구입하여 기확보한 5년생 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)를 사용하였음. 그늘에서 건조한 다음 5 - 10cm 크기로 잘랐음.

나) 유효성분 분석방법

유효물질 DGH-2 와 DGE은 분석에 사용한 HPLC와 용매는 다음과 같다.

- HPLC model :HITACHI, Pump : L-2130, Detector : Diode Array L-2455, Column Oven : L-2300, Autosampler : L-2200
- HPLC Solvent: Acetonitrile (ACN, HPLC grade). Distilled water (DW).

(1) DGH-2 정량분석 방법 확립

DGH-2 성분의 HPLC 분석 조건 및 chromatogram그림 1과 같고, 이를 이용하여 DGH-2의 정량분석을 위하여 구한 standard curve는 그림 2와 같음.

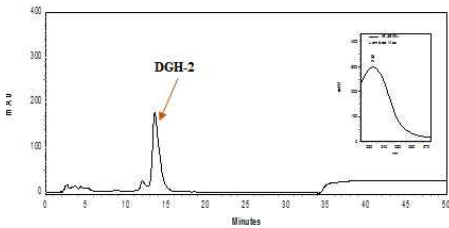


그림 1. HPLC profile of DGH-2.

Column : J'sphere ODS-H80, 150×4.6mm I.D  
 Eluent: 75% ACN + 0.025% TFA (30min)  
 Flow rate : 0.8 ml/min  
 Detection: UV at 230nm  
 Temperature : 25°C  
 Injection : 10ul sample dissolved in MeOH

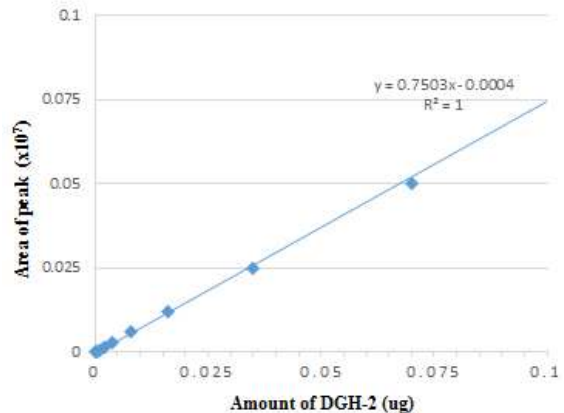


그림 2. Standard curve of DGH-2

(2) DGE 정량분석 방법 확립

DGE 성분의 HPLC 분석 조건 및 chromatogram 그림 3과 같고, 이를 이용하여 DGE의 정량분석을 위하여 구한 standard curve는 그림 4와 같음.

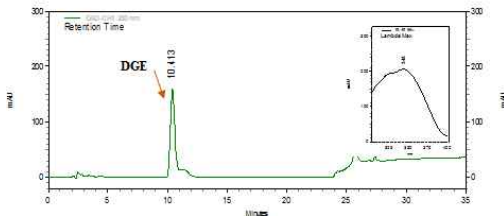


그림 3. HPLC profile of DGE.

Column : J'sphere ODS-H80, 150×4.6mm I.D  
 Eluent: 35% ACN + 0.025% TFA (30min)  
 Flow rate : 0.8 ml/min  
 Detection: UV at 230nm  
 Temperature : 25 °C  
 Injection : 10ul sample dissolved in MeOH

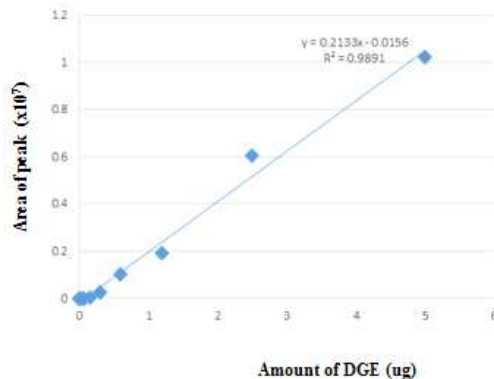


그림 4. Standard curve of DGE.

다) 팔꽃나무의 줄기와 뿌리 최적 추출조건 확립

팔꽃나무의 줄기와 뿌리 두 부위에 대하여 다양한 추출용매로 추출한 다음, DGH-2 와 DGE 함량을 분석하여 가장 유효성분을 많이 추출하는 조건을 찾기 위하여 조사하였다. 모든 실험은 2반복으로 실시하였다. 사용한 유기용매는 기능성식품원료 제조에 허용된 에탄올을 사용하였음.

(1) 추출 방법

팔꽃나무의 건조된 줄기와 뿌리를 각각 3g씩 준비하여 100ml의 물, 20% 에탄올, 40% 에탄올, 60% 에탄올, 80% 에탄올, 100% 에탄올, 100% 메탄올로 각각 추출하였다. 물은 100℃에서 2시간 추출하고, 에탄올과 메탄올은 120rpm으로 24시간 추출하였다. 추출후 감압농축하여 용매를 제거한 다음, crude ext.를 30ml 물로 혼탁시키고, 30ml의 n-hexane, ethyl acetate로 3회씩 순차적으로 partition 추출하였다 (표 1).

표 1. Effect of ethanol concentration on the ethanol, n-hexane and ethyl acetate extracts from root and stem of *D. genkwa*.

Sample wt	Extraction method	Extract wt. (mg)	Hex. ext. wt. (mg)	EA. ext. wt. (mg)
3g	Root 0% EtOH	348.5 ± 1.6	32.5 ± 1.4	27.6 ± 2.9
3g	Root 20% EtOH	489.6 ± 17.0	9.7 ± 1.1	29.1 ± 1.4
3g	Root 40% EtOH	453.8 ± 1.2	5.8 ± 0.8	68.6 ± 4.1
3g	Root 60% EtOH	347.1 ± 5.4	29.2 ± 0.7	98.4 ± 5.5
3g	Root 80% EtOH	363.9 ± 5.6	39.8 ± 1.4	56.9 ± 5.8
3g	Root 100% EtOH	180.35 ± 11.8	45.1 ± 3.8	62.5 ± 8.1
3g	Root 100% MeOH	336.3 ± 0.07	37.5 ± 2.1	90.4 ± 7.2
3g	Stem 0% EtOH	284.5 ± 22.4	8.7 ± 1.0	27.1 ± 2.8
3g	Stem 20% EtOH	312.6 ± 22.6	5.8 ± 0.5	48.1 ± 3.1
3g	Stem 40% EtOH	287.6 ± 10.9	18.5 ± 2.7	45.1 ± 1.6
3g	Stem 60% EtOH	332.0 ± 5.8	33.0 ± 1.5	52.6 ± 1.6
3g	Stem 80% EtOH	237.75 ± 12.3	21.7 ± 0.6	61.8 ± 2.1
3g	Stem 100% EtOH	97.85 ± 9.6	27.9 ± 0.9	19.9 ± 0.4
3g	Stem 100% MeOH	215.1 ± 7.1	17.7 ± 0.6	35.2 ± 2.4

(2) 추출물의 유효성분 정량분석

HPLC 시료준비 : 각 추출물에 있는 DGH-2 및 DGE 를 분석하기 위하여 각각 1mg/100ul, 1mg/ml 농도로 MeOH로 녹인 다음 10ul를 HPLC한 다음, standard curve를 이용하여 정량분석하였다.

뿌리 와 줄기 각 부위의 에탄올 농도에 따른 추출물과 헥산 과 에틸아세테이트 추출물에서 DGH-2 및 DGE를 함량을 조사하였다. 그림 5 은 뿌리 80% 에탄올 추출물과 헥산추출물에서 DGH-2가 존재하는 것을 나타내는 HPLC profile 이다. 80% 에탄올 추출물에서 12.27분, 헥산 추출물에서는 12.28분에 DGH-2가 검출되었다. 에틸아세테이트 추출물에서는 DGH-2가 검출되지 않았다. DGH-2의 standard curve를 이용하여 뿌리 80% 에탄올 추출물과 헥산추출물에 존재하는 DGH-2의 함량을 계산하였다 (표 2). 마찬가지로 DGE standard curve를 이용하여 뿌리 80% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 추출물에 존재하는 DGE의 함량을 계산하였다 (표 2). 헥산 추출물에서는 DGE가 검출되지 않았다. 같은 방식으로 여러 에탄올 농도에서의 추출한 에탄올 추출물과 헥산, 에틸아세테이트 추출물에서 DGH-2 및 DGE 함량을 조사하였다 (표 2).





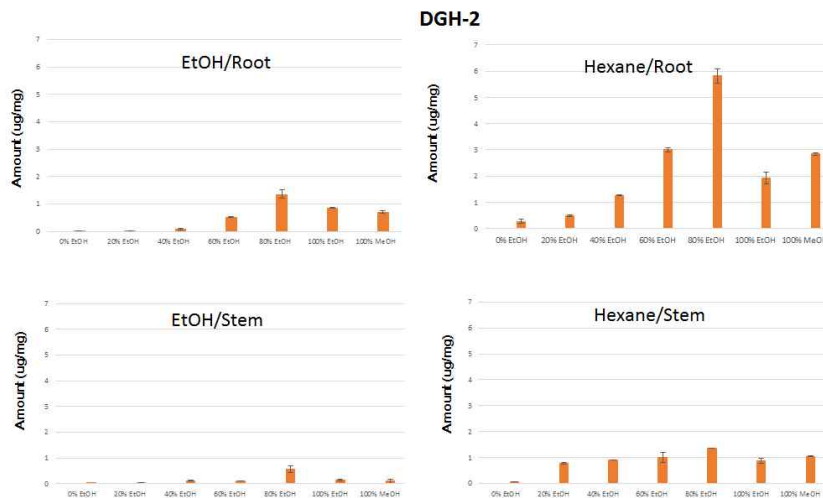


그림 5. DGH-2 amount in EtOH and Hex ext. of roots and stems of *D. genkwa*.

뿌리의 에탄올 추출물에서는 DGH-2 함량은 80% 에탄올에서 1.37 ug/mg 성분이 존재하여 0.13%로 가장 높았다. 헥산 추출물에서는 80% 에탄올 추출물에서 추출한 것에서 5.82 ug/mg 성분이 존재하여 0.58%로 가장 높았다 (표 2, 그림 6). 80% 에탄올 추출물보다 헥산 추출물에서 DGH-2 성분이 4.24 배 높았다. 에칠아세테이트 추출물에서는 DGH-2가 검출되지 않았다.

뿌리의 에탄올 추출물에서 DGE 함량도 80% 에탄올에서 48.9 ug/mg 성분이 존재하여 4.8%로 가장 높았다. 에칠아세테이트 추출물에서는 80% 에탄올 추출물에서 추출한 것에서 158.8 ug/mg 성분이 존재하여 13.1%로 가장 높았다 (표 2). 80% 에탄올 추출물보다 에칠아세테이트 추출물에서 DGE 성분이 3.24배 높았다. 헥산 추출물에서는 DGE 성분은 검출되지 않았다.

줄기 추출물에서 DGH-2 함량은 뿌리 추출물과 추출 경향이 비슷하였는데, 함량이 낮았다. 즉, DGH-2 함량은 80% 에탄올에서 0.05%로 가장 높았고, 헥산 추출물에서는 80% 에탄올 추출물에서 추출한 것에서 0.13%로 가장 높았다 (그림 6). 뿌리 추출물보다 약 3배 낮은 함량을 보였다.

줄기 추출물에서 DGE 함량도은 뿌리 추출물과 추출 경향이 비슷하였고, 함량도 비슷했다. 즉, DGE 함량은 80% 에탄올에서 4.5%로 가장 높았고, 헥산 추출물에서는 80% 에탄올 추출물에서 추출한 것에서 15.4%로 가장 높았다.

이러한 추출결과로부터 동물실험 및 비임상시험을 위한 시료는 팔꽃나무 뿌리 줄기 모두 80% 에탄올을 이용하여 추출하고, DGH-2 성분만 있는 헥산 추출물과 DGE 성분이 있는 에칠아세테이트 추출물도 제조하고, 양을 고려하면서 동물실험 및 비임상시험에서 활성 및 안전성을 서로 비교하기로 하였다.



표 4. Amount of DGH-2 and DGE in each solvent extracts from root and stem of *D. Genkwa* dry sample(20kg).

Sample Extract	Extract wt. (g)	Amount (µg/mg)		Total amount ((µg)			
		DGH-2	DGE	DGH-2	%	DGE	%
EtOH Ex. (DG-EX)	1140.9	1.6	28.0	1871.4	0.16	32008.2	2.80
Hex. Ex. (DG-HX)	70.5	15.4	0	1092.2	1.54	0	0
EA Ex. (DG-EAX)	231.0	0	81.8	0	0	18907.9	8.19

DG-HX에는 DGH-2가 1.54% 존재하고, DG-EAX에는 DGE가 8.19% 함유되었다.

효능 검증을 위한 동물실험은 DG-EX, DG-HX, DG-EAX 모두 실시하고, 비임상 안전성평가는 비용 및 양을 고려하여 초기 비임상 시험 (단회투여독성, 복귀돌연변이시험)에는 DG-EX, DG-EAX를 모두 실시하고, 그 결과로부터 안전성이 확보된 것에 대하여 비임상시험을 계속하기로 하였음.

나). 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물의 안전성평가 (GLP 기관)

(1). 단회투여독성시험 (랫드)

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 랫드에서 실시하였다. 5,000mg/kg 과 2,000mg/kg 2개 용량에서 예비실험을 실시하여 용량을 결정하고, 본 시험을 군당 랫드 암수 각 5수에 대하여 실시하였다. 일반증상관찰, 사망률, 체중측정 등 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 결정하였다.

시험결과: 팔꽃나무 줄기 뿌리의 에탄올 추출물 (DG-EX)의 단회경구투여 독성시험 결과, 5,000 mg/kg 투여한 랫드 경구독성시험에서 DG-EX 투여군에서 일부 점액변이 관찰되었지만, 사망한 랫드가 없고, 정상쥐와 비슷하게 체중이 증가하였음. 따라서, DG-EX시료의 개략의 치사량은 5,000 mg/kg이상임. DG-EAX 투여군에서도 일부 점액변이 관찰되었고, 사망한 랫드가 없었지만, 정상쥐와 다르게 체중 감소가 발견되었음. DG-EAX는 개략의 치사량이 수컷은 5,000mg/kg, 암컷은 5,000mg/kg을 상회하는 것으로 판정되었다.

(2). 유전독성 시험

(가) 복귀돌연변이시험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하였다. 시험물질 DG-EX 와 DG-EAX의 유전자돌연변이 유발성을 히스티민 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*) 과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 조사하였다.

A.예비실험 : 생육저해 농도를 결정한다.

1. 생육저해

- *S. typhimurium* TA98 (S9-) : 5,000 ug/plate
- *S. typhimurium* TA98 (S9+) : 생육저해 없음
- *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 (S9-) : 313 ug/plate 이상
- *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 (S9+) : 5,000 ug/plate
- *E. coli* WP2uvrA(pKM101) (S9-/+) : 생육저해 없음
- 2.본시험 적용 최고용량
- *S. typhimurium* TA98 (S9-) : 5,000 ug/plate (이하 공비 2로 5용량)
- *S. typhimurium* TA98 (S9+) : 5,000 ug/plate (이하 공비 2로 4용량)
- *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 (S9-) : 313 ug/plate (이하 공비 2로 5용량)
- *S. typhimurium* TA100, TA1535, TA1537 (S9+) : 5,000 ug/plate (이하 공비 2로 5용량)
- *E. coli* WP2uvrA(pKM101) (S9-/+) : 5,000 ug/plate (이하 공비 2로 4용량)

B. 본 실험

대사활성화비존재하의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2*uvrA*(pKM101) 균주, 존재하의 TA98, TA100, TA1535 및 WP2*uvrA*(pKM101) 균주에서는 시험물질군에서 대사활성화유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

그러나, 대사활성화존재하의 TA1537 균주의 1,250 µg/plate에서 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 재현성있게 증가하였다 (표 5, 그림 8). 2,500 µg/plate 이상에서는 시험물질에 의한 생육저해가 관찰되어 복귀변이콜로니수가 감소하는 경향이 관찰되었다.

이상의 결과로, 본 시험조건하에서 시험물질 DG-EX는 대사활성화존재하의 TA1537 균주에서 유전자돌연변이 유발성이 있는 것으로 판단되었다.

표 5. 팻꽃나무 줄기뿌리 추출물(DG-EX)의 대사활성화 존재하 복귀돌연변이.

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	27 , 26 , 24	26	2
		313	28 , 25 , 30	28	3
	DG-EX	625	30 , 31 , 35	32	3
		1,250	36 , 43 , 42	40	4
		2,500	52 , 45 , 43	47	5
		5,000	36 , 30 , 36	34	3
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	358 , 366 , 362	362	4	
TA100	Dimethyl sulfoxide	0	118 , 117 , 115	117	2
		156	110 , 117 , 103	110	7
	DG-EX	313	116 , 116 , 123	118	4
		625	123 , 127 , 133	128	5
		1,250	192 , 181 , 205	193	12
		2,500	171 , 176 , 184	177	7
5,000	117* , 110* , 119*	115	5		
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	596 , 608 , 572	592	18	
TA1535	Dimethyl sulfoxide	0	9 , 11 , 7	9	2
		156	7 , 10 , 9	9	2
	DG-EX	313	6 , 8 , 8	7	1
		625	9 , 9 , 5	8	2
		1,250	10 , 8 , 10	9	1
		2,500	12 , 15 , 13	13	2
5,000	15* , 15* , 11*	14	2		
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	98 , 112 , 94	101	9	
TA1537	Dimethyl sulfoxide	0	14 , 13 , 16	14	2
		156	20 , 18 , 17	18	2
	DG-EX	313	20 , 18 , 21	20	2
		625	16 , 17 , 19	17	2
		1,250	32 , 30 , 37	33	4
		2,500	25* , 27* , 29*	27	2
5,000	14* , 16* , 17*	16	2		
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	128 , 136 , 122	129	7	
WP2 <i>uvrA</i> (pKM101)	Dimethyl sulfoxide	0	163 , 150 , 151	155	7
		313	170 , 152 , 169	164	10
	DG-EX	625	170 , 176 , 166	171	5
		1,250	180 , 163 , 162	168	10
		2,500	176 , 159 , 169	168	9
		5,000	168 , 167 , 153	163	8
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	445 , 462 , 480	462	18	

S.D.: Standard Deviation

\*: Indicated growth inhibition

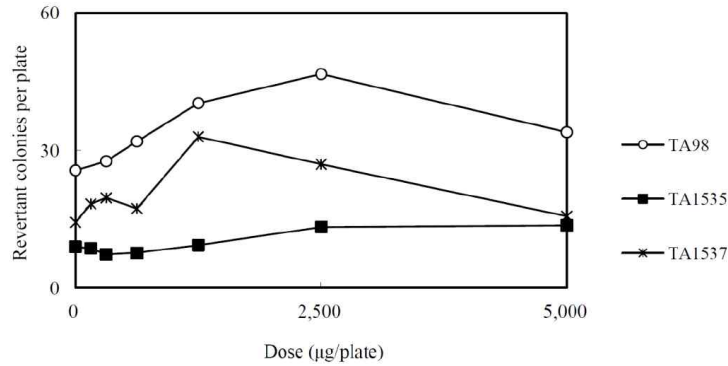


그림 8. 팔꽃나무 줄기뿌리 추출물(DG-EX)의 TA1537균주의 복귀돌연변이 유발.

(나) 염색체이상실험

GLP 기관인 (주)바이오독스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하고 있다. 포유류 배양 세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell) 사용하여 염색체의 구조적 이상 유발성의 유무를 평가한다.

시험 결과:

단시간처리법의 대사활성화존재하의 900, 1,000, 1,100 및 1,200 µg/mL에서 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 12.5, 11.5, 10.0 및 8.5%로 확인되었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (표 6). 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 7.5, 7.0, 8.5 및 4.5%로 확인되었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 DG-EX는 단시간처리법의 대사활성화존재하의 계열에서 수적이상을 가진 세포의 출현빈도가 10% 이상, 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 5% 이상 10% 미만으로 확인되어, 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물은 염색체이상 유발성이 있는 것으로 판단된다.

표 6. 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)의 염색체 이상 시험

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	S9 max	Trt-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations										Number of cells with numerical aberrations			Others <sup>a)</sup>	
						ctb	csb	cte	cse	fig	gap		total (%)		end	pol	total (%)			
											ctg	csg	gap-	gap+						
Dimethyl sulfoxide	0	100	+	6-18	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0	0	0 (0.0)	0
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DG-EX	900	66.5	+	6-18	100	1	0	6	0	0	0	0	0	15 <sup>**</sup> (7.5)	15 (7.5)	0	12	25 <sup>**</sup> (12.5)	0	
					100	2	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0
	1,000	72.6	+	6-18	100	0	0	7	0	0	0	0	0	14 <sup>**</sup> (7.0)	15 (7.5)	0	12	23 <sup>**</sup> (11.5)	0	
					100	1	0	5	1	0	1	0	0	0	0	0	11	0	0	0
	1,100	60.0	+	6-18	100	2	0	7	0	0	2	0	0	17 <sup>**</sup> (8.5)	18 (9.0)	0	10	20 <sup>**</sup> (10.0)	0	
					100	3	0	6	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	
1,200	53.2	+	6-18	100	2	0	2	1	0	0	0	0	9 <sup>#</sup> (4.5)	9 (4.5)	0	9	17 <sup>**</sup> (8.5)	0		
				100	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	
B[a]P	20	41.3	+	6-18	100	8	0	15	0	0	0	0	0	40* (20.0)	40 (20.0)	0	1	2 (1.0)	0	
					100	3	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Aberation: ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, fig: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

B[a]P: Benzo[a]pyrene

RPD: Relative Population Doubling, Trt-Rec time: Treatment-Recovery times

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by fisher's exact test: \* p<0.01

Significant difference from negative control by Cochran-Armitage trend test: # p<0.05, \*\* p<0.01

(다) 소핵 실험 :

GLP 기관인 ㈜바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하고 있다. 마우스의 골수세포를 이용하여 예비실험 및 소핵유발 빈도시험을 실시한 후, 본 실험을 실시하여 소핵유무를 평가한다.

시험 결과:

A. 일반증상 및 사망동물의 관찰 : 시험물질군의 모든 용량에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 투여후 2시간에 2,500 mg/kg에서 연변 (Soft stool), 투여후 1일에 2,500 및 5,000 mg/kg에서 시험물질색변 (Compound-colored stool)이 관찰되었다.

B. 체중변화 : 시험기간 동안 모든 용량에서 음성대조군과 비교시 유의성 있는 체중변화가 관찰되지 않았다.

C. 소핵유발 출현빈도 : 시험물질군에서는 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte) 중 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated polychromatic erythrocyte)의 비율이 모든 용량에서 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (표 7). 또한, 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.01$ , Kastenbaum & Bowman). 총 적혈구 중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군과 비교시 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ , Dunnett's t-test)

표 7. 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)의 소핵 시험

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	Animal ID	PCE (PCE/NCE)	MNPCE/PCE				
Negative control Water for injection	0	P.O.	24	1101	164 / 500	0 / 2000				
				1102	150 / 500	0 / 2000				
				1103	157 / 500	2 / 2000				
				1104	180 / 500	2 / 2000				
				1105	176 / 500	0 / 2000				
				Total	827 / 2500	4 / 10000				
				% (Mean=S.D.)		33.1 ± 2.52	0.040 ± 0.055			
				Test Substance	1,250	P.O.	24	1201	168 / 500	1 / 2000
								1202	146 / 500	1 / 2000
								1203	146 / 500	1 / 2000
1204	163 / 500	3 / 2000								
1205	153 / 500	0 / 2000								
Total	776 / 2500	6 / 10000								
% (Mean=S.D.)		31.0 ± 2.00	0.060 ± 0.055							
Test Substance	2,500	P.O.	24		1301	126 / 500	0 / 2000			
					1302	178 / 500	0 / 2000			
					1303	156 / 500	1 / 2000			
				1304	155 / 500	1 / 2000				
				1305	146 / 500	1 / 2000				
	Total	761 / 2500	3 / 10000							
	% (Mean=S.D.)		30.4 ± 3.76	0.030 ± 0.027						
	Test Substance	5,000	P.O.	24	1401	132 / 500	0 / 2000			
					1402	169 / 500	2 / 2000			
					1403	156 / 500	0 / 2000			
1404					143 / 500	0 / 2000				
1405					155 / 500	1 / 2000				
Total		755 / 2500	3 / 10000							
% (Mean=S.D.)		30.2 ± 2.81	0.030 ± 0.045							
Positive control		MMC	IP.	24	1501	117 / 500	105 / 2000			
					1502	123 / 500	94 / 2000			
					1503	114 / 500	123 / 2000			
	1504				133 / 500	135 / 2000				
	1505				118 / 500	90 / 2000				
	Total				605 / 2500	547 / 10000				
% (Mean=S.D.)		24.2* ± 1.49	5.470 ± 0.960							

P.O.: Per Os  
 I.P.: Intraperitoneal  
 MMC: Mifomycin C  
 S.D.: Standard Deviation  
 PCE: Polychromatic erythrocyte  
 NCE: Normochromatic erythrocyte  
 MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocyte  
 Significant difference from negative control by Kastenbaum & Bowman: \*  $p < 0.01$   
 Significant difference from negative control by Dunnett's t-test: \*  $p < 0.01$

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)의 마우스 골수세포의 소핵유발성은 없는 것으로 판단된다.

이상과 같이, 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)은 소핵 유발성은 없었으나, 복귀돌연변이 및 염색체 이상시험에서 유전독성이 관찰되었음.

### 3). 팔꽃나무 꽃 추출물의 안전성평가

#### 가). 팔꽃나무 부위별 성분 및 활성 비교

팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)이 복귀돌연변이 및 염색체 이상시험에서 유전독성이 관찰되었기 때문에 (P23-26 안전성평가 결과 부분 참조), 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물은 아쉽게도 건강기능식품 원료로 개발될 수 없음을 알 수 있었다.

그러나, 팔꽃나무 꽃은 “원화”로 불리우며 한약제로 직접적으로 사용되는 부위로서, 꽃 추출물에 대한 복귀돌연변이 시험한 결과 유전독성이 없는 것으로 판명되어 (P31-35 안전성 평가 부분 참조), Nurr-1 활성화 활성 (P71, 그림49 참조), in vivo 파킨슨 효능 조사 (P74, 그림56-58 참조), 유효성분 분석을 실시하였다.

꽃 추출물과 줄기뿌리 추출물에 대한 유효성분 DGH-1 과 DGH-2 함량을 비교분석하였다.

#### (1) 팔꽃나무 식물

- 줄기 뿌리: 경기도 용인에 위치하는 한택식물원으로부터 2015년 구입하여 기확보한 5년생 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)를 사용하였음. 그늘에서 건조한 다음 5 - 10cm 크기로 잘랐음.
- 꽃: 서울 경동시장 해성당에서 2016년 원화 (팔꽃나무 꽃) 구입하여 사용하였음.

#### (2) 유효성분 분석방법 확립

팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물은 DGH-1과 DGH-2의 두 개의 유효성분이 있는데, 이중 DGH-1은 UV extinction coefficient가 매우 낮아, HPLC UV방법으로 추출물에 있는 DGH-1를 분석하기가 매우 어려워, 추출물에서 유효물질 DGH-1 과 DGH-2 모두를 효과적으로 정량분석하기 위하여 LC-MS/MS의 MRM방법으로 분석하였다 (그림 9, 10). MRM (multiple reaction monitoring) 방법은 특정 product ion를 갖는 parent ion를 detect하는 방법으로 복잡한 시료에서 특정 물질을 정성 및 정량분석하는 방법이다. HPLC와 LC 조건은 다음과 같다.

- HPLC model :Agilent 1200 series (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany)  
 Column : Luna C18(2) reversed-phase column (100 × 2.0 mm, 3 mm; guard cartridge system, security guard #KJ 0-4282; Phenomenex, Torrance, CA, USA)  
 Eluent: 0~7min : 70% ~ 100% acetonitrile (+0.1% formic acid)  
 Flow rate : 0.4 ml/min, Temperature : 25 °C  
 Injection : 10 ul sample in 10 ug/mL dissolved in MeOH
- LC: QTrap 3200 with a Turbolon Spray source (AB SCIEX, Singapore).

#### (1) DGH-1 분석

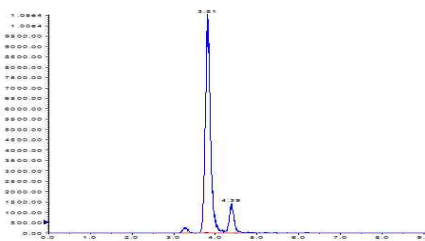


그림 9. MRM (105.2>591.2) analysis of compound DGH-1.

#### (2) DGH-2 분석

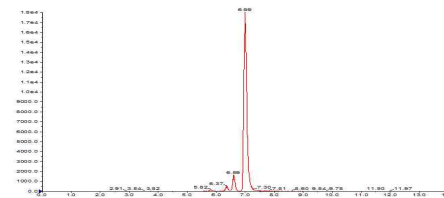


그림 10. MRM (105.1>639.2) analysis of compound DGH-2.

그 결과, DGH-1 와 DGH-2 화합물은 각각 3.81분, 6.99분에 검출되었고, 0.1 ug injection 시 각각  $1.05 \times 10^4$ ,  $1.8 \times 10^4$  intensity를 보여 비슷한 민감도로 MRM방법으로 검출되었음.

(3) 성분 분석

1 차년도에서 유효성분 DGH-2를 가장 많이 함유하는 추출조건을 조사하여, 80% 에탄올을 최적의 추출조건으로 선정하 바 있다. 이에따라 꽃 부위와 줄기뿌리 부위를 80% 에탄올로 추출하여 각각 꽃 추출물(DGF-EX) 과 줄기뿌리 추출물 (DG-EX)를 제조하여 유효성분 DGH-1, DGH-2 함량을 비교분석하였다.

LC-MS/MS 시료준비 : 꽃 추출물(DGF-EX LN021) 과 줄기뿌리 추출물 (DG-EX LN011)에 있는 유효성분을 분석하기 위하여 추출물을 10 ug/mL 농도로 MeOH로 녹인 다음 10ul를 injection 하여 MRM mode로 정량분석하였다 (그림 11, 12).

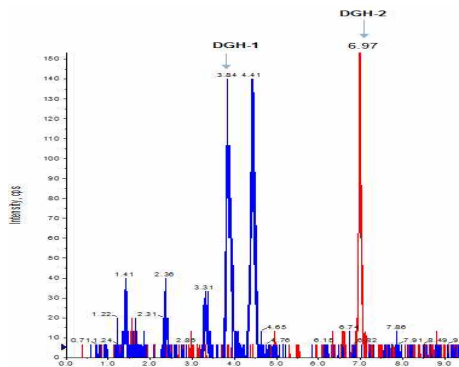


그림 11. MRM analysis of DGF-EX

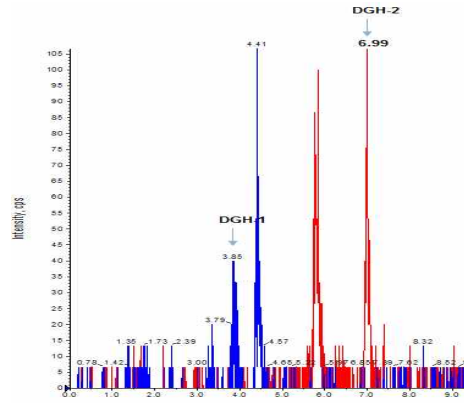


그림 12. MRM analysis of DG-EX

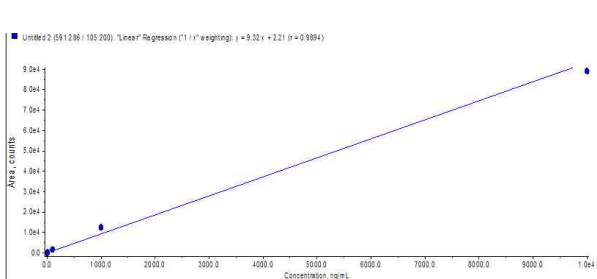


그림 13. Standard curve of DGH-1

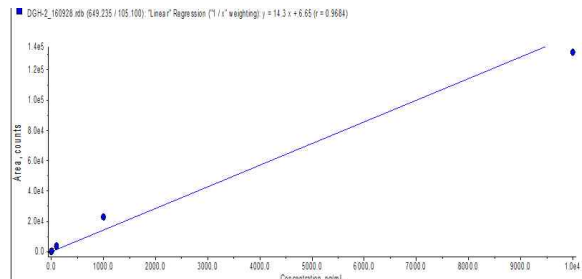


그림 14 Standard curve of DGH-2

꽃 추출물(DGF-EX) 과 줄기뿌리 추출물 (DG-EX) 모두에서 유효성분 DGH-1 과 DGH-2 가 검출되었으며, standard curve로부터 유효성분 DGH-1 과 DGH-2를 정량하였다. 그 결과, 꽃 추출물이 줄기 뿌리 추출물보다 DGH-1은 7.32배, DGH-2는 1.23배 많았다 (표 8).

표 8. Quantitative analysis of DGH-1 and DGH-2 in flower extract and stem/root extract of *Daphne genkwa*.

	Amount (g/kg)	
	DGH-1 (Genkwanine N)	DGH-2 (Yuanhuacin)
Flower (DGF-EX)	0.835	0.381
Stem & Root (DG-EX)	0.114	0.311



나). 팔꽃나무 꽃 추출물의 시료 대량 제조 및 분석법 검증

(1) 꽃 추출물 batch 별 유효성분 분석

1월에 구입한 건조된 팔꽃나무 꽃 (3 kg)을 1.5 kg씩 두 번 나누어 추출하였다. 80% 에탄올로 상온에서 각각 48시간, 24시간 두 번 추출하여 각각 391g (DGF-EX LN.011)과 246g (DGF-EX-LN 012)을 얻었다. 7월에 구입한 건조된 팔꽃나무 꽃 (2 kg)을 같은 방식을 추출하여 469g (DGF-EX LN 021)을 얻었다. 구입일, 추출 batch가 다른 3종류의 팔꽃나무 꽃의 추출물에서 DGH-2 함량을 HPLC로 정량분석하여 줄기뿌리 추출물의 것 (DG-EX)과 비교하였다 (그림 15).

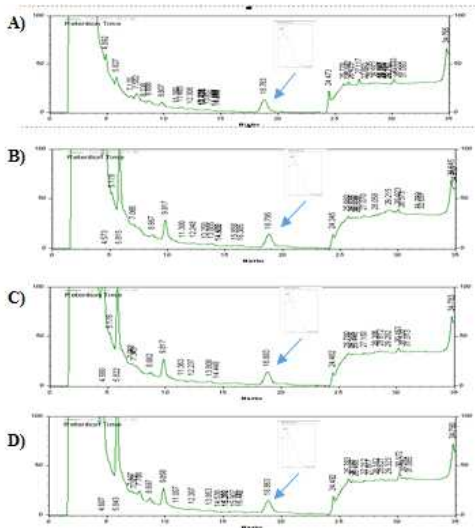


표 9. Comparative analysis of DGH-2 in ethanol extracts from flower and root/stem of *D. Genkwa* dry sample.

Sample	Dried flower wt. (kg)	Extract wt. (g)	Amount of DGH-2	
			mg/g	%
DGF-E X LN011	1.5	391	0.46	0.046
DGF-E X LN012	1.5	246	0.38	0.038
DGF-E X LN021	2	469	0.39	0.039
DG-EX LN011	-	-	0.47	0.047

그림 15. HPLC analysis of DGH-2.

A) DG-EX, B)DGF-EX LN011, C)DGF-EX LN012, D)DGF-EX LN021.

HPLC로 비교 조사한 결과, 꽃 추출물의 DGH-2 함량은 구입일, 추출 batch에 따라 0.04%로 같았고, 줄기뿌리 추출물에서의 DGH-2 함량과 비슷하였다(표 9).

LC-MS/MS에 의한 비교 분석(P 28)에서는 꽃 추출물이 DGH-2 함량이 23% 높았으나, HPLC에 의한 방법에서는 같은 것으로 나타났는데, 이는 두 분석방법의 정밀도 차이에 의한 것으로 보인다. 에탄올 추출물이라는 매우 복잡한 혼합물을 분석하는 데는 HPLC로 분리된 물질을 다시 MS/MS로 분리하는 LC-MS/MS 분석방법이 HPLC 방법보다 정밀하기 때문에, 최종적으로 꽃 추출물이 줄기뿌리 추출물보다 DGH-2 함량이 많은 것으로 판단된다. 향후 지역별, 종별, 종판별을 위한 자세한 연구가 필요함.

(2) 꽃 추출물 유효성분의 안정성 조사

구입일, 추출 batch가 다른 3종류의 팔꽃나무 꽃의 추출물에 대하여 6개월 냉동 보관후 유효성분의 함량을 조사하였음. 그 결과, DGF-EX LN011, DGF-EX LN012, DGF-EX LN021의 초기 DGH-2 함량이 각각 0.043, 0.042, 0.042% 이었고, 6개월 후에는 각각 0.046, 0.038, 0.039%로서 조사되었음. 이는 초기함량의 변동율이 -9.6 ~ + 6.99%로서 유효성분이 안정함을 나타내었음. 향후 가혹한 조건에서 더 자세한 조사가 필요함.

(3) HPLC를 이용한 DGF-EX의 조제물 분석법 검증 (GLP기관인 바이오톡스텍(주)에서 실시)

본 시험은 식약처 “비임상시험관리기준”에 의거 GLP기관인 바이오톡스텍(주)에서 실시하였음.

(가). 시험 재료 및 방법

- 시험물질 : DGF-EX LN032, 함량: Apigenin 1.921%
- 표준물질 : Apigenin (Sigma LN E445301/1V, CAS No. 520-36-5)
- 분석기기 및 조건

HPLC : Agilent 1100 Series, Agilent Technologies Ltd., U.S.A.

분석 조건 :

Column : Luna 5u C18(2) 100A (250 x 4.6 mm), Serial No. : 752826-28, Phenomenex, U.S.A.  
 Column temperature 25°C  
 Mobile phase : Water : Acetonitrile = 55:45 (v/v)  
 Flow rate : 1.0 mL/min  
 Run time : 20 min  
 Wavelength : 340 nm  
 Injection volume : 20 µL  
 Autosampler temperature : Ambient temperature

(나) 시험 결과

**A. 시스템 적합성:** QC 시료 5 µg/mL 의 농도를 6 회 반복 측정 한 결과, 피크면적과 retention time 의 정밀성은 각각 0.19 및 0.00%로 확인되었다.

Table 1. System Suitability

Concentration of standard solution (µg/mL)	Classification	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	Mean	SD	Precision (%)
5	Peak area	187.48	187.14	186.87	186.52	187.27	187.36	187.11	0.36	0.19
	Retention time	6.10	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	6.09	0.00	0.00

**B. 직선성 :** 표준용액 1 ~ 20 µg/mL 의 농도 범위에서 측정 한 검량선의 상관계수 r 은 0.9999 이상으로 나타났으며, 각 범위에서의 정확성은 0 일째 측정 시 98.35 ~ 105.20%로, 7 일째 측정 시 98.16 ~ 102.40%로 확인되었다.

Figure 1. Linearity of Standard Solutions

(A) Day 0

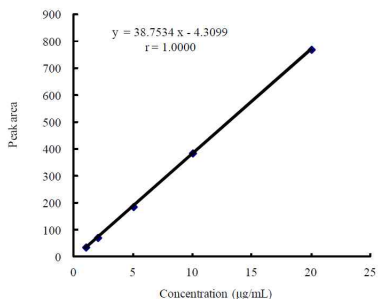


Table 2. Accuracy of Calibration Curves

(A) Day 0

Concentration of standard solution (µg/mL)	Peak area	Measured concentration (µg/mL)	Accuracy (%)
1	36.47	1.052	105.20
2	71.93	1.967	98.35
5	186.76	4.930	98.60
10	385.70	10.06	100.60
20	770.22	19.99	99.95

$y = 38.7534x - 4.3099, r = 1.0000$

C. 특이성 : 표준물질은 분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 이동상, 희석용매 및 부형제가 표준물질의 피크에 영향을 주는 성분은 검출되지 않았다.

D. 일내재현성 : 조제물 5 및 250 mg/mL 의 농도에서 시험물질의 정밀성은 0.32 및 2.05%로, 정확성은 103.47 및 96.39%로 확인되었다.

Table 3. Accuracy and Precision of Intra-day Variation

Concentration of dosing formulation (mg/mL)	<sup>1)</sup> Actual concentrations of Apigenin (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
		No.1	No.2	No.3				
5	0.09605	0.09966	0.09903	0.09944	0.09938	0.00032	0.32	103.47
250	4.803	4.692	4.675	4.519	4.629	0.095	2.05	96.39

<sup>1)</sup> Actual concentrations of Apigenin = Concentration of dosing formulation × Content of Apigenin (1.921%)

E. 표준원액 안정성 : 표준원액을 실온 4 시간 및 냉장 (4.1 ~ 4.8 °C)에서 7 일간 보관 후, QC 농도로조제하여 안정성을 확인한 결과, 정밀성은 0.26 및 0.08%로, 정확성은 100.78 및 105.60%로 확인되었다.

Table 4. Stability of Stock Solution

(A) 4 Hours at Room Temperature

Time (hr)	Concentration of standard solution (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)			Mean (µg/mL)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
		No.1	No.2	No.3				
4	5	5.041	5.025	5.051	5.039	0.013	0.26	100.78

(B) 7 Days under Refrigeration

Time (day)	Concentration of standard solution (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)			Mean (µg/mL)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)
		No.1	No.2	No.3				
7	5	5.276	5.283	5.280	5.280	0.004	0.08	105.60

F. Autosampler 내에서의 안정성 : 조제물 5 및 250 mg/mL 의 농도를 autosampler 내에서 9 시간 방치 후 안정성을 확인한 결과, 정밀성은 0.38 및 2.03%로, 초기농도에 대한 변동률은 0.24 및 0.26%로 확인되었다.

G. 균질성 : 조제물 5 및 250 mg/mL 의 농도에서 상층, 중층 및 하층의 균질성을 확인한 결과, 정밀성은 0.37 및 3.16%로, 정확성은 103.57 및 98.22%로 확인되었다.

Table 6. Homogeneity of the Dosing Formulations

Concentration of dosing formulation (mg/mL)	<sup>1)</sup> Actual concentrations of Apigenin (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)	
		No.1	No.2	No.3					
		5	0.09605	0.09994					0.09958
		Upper	0.09994	0.09958	0.09887				
		Middle	0.09966	0.09903	0.09944	0.09948	0.00037	0.37	103.57
		Lower	0.09994	0.09958	0.09931				
250	4.803	4.959	4.700	4.496	4.717	0.149	3.16	98.22	
		Middle	4.692	4.675	4.519	4.717	0.149	3.16	98.22
		Lower	4.749	4.856	4.808				

<sup>1)</sup> Actual concentrations of Apigenin = Concentration of dosing formulation × Content of Apigenin (1.921%)

H. 안정성

H-1. 실온 4 시간 안정성 : 조제물 5 및 250 mg/mL 의 농도를 실온에서 4 시간 동안 방치 후 안정성을 확인한 결과, 정밀성은 0.22 및 0.22%로, 조제 직후 초기농도에 대한 변동률은 -2.02 및 6.83%로 확인되었다.

H-2. 냉장 7 일간 안정성 : 조제물 5 및 250 mg/mL 의 농도를 7 일간 냉장 조건 (4.1 ~ 4.8°C) 하에 보관 후 안정성을 확인한 결과, 정밀성은 0.40 및 3.58%로, 조제 직후 초기농도에 대한 변동률은 1.13 및 -5.23%로 확인되었다.

Table 8. Stability of 7 Days under Refrigeration

Time (day)	Concentration of dosing formulation (mg/mL)	<sup>1)</sup> Actual concentrations of Apigenin (mg/mL)	Measured concentration (mg/mL)			Mean (mg/mL)	SD	Precision (%)	Accuracy (%)	Variation (%)
			No.1	No.2	No.3					
			0	5	0.09605					
	250	4.803	4.692	4.675	4.519	4.629	0.095	2.05	96.39	-
7	5	0.09605	0.1009	0.1005	0.1001	0.1005	0.0004	0.40	104.63	1.13
	250	4.803	4.220	4.409	4.532	4.387	0.157	3.58	91.35	-5.23

<sup>1)</sup> Actual concentrations of Apigenin = Concentration of dosing formulation × Content of Apigenin (1.921%)

H-3. Quality Control : QC 시료 5 µg/mL 의 농도를 분석 종료 시에 3 회 측정된 결과, 정밀성 및 정확성은 0 일째 측정 시 0.16 및 100.70%로, 7 일째 측정 시 0.26 및 98.26%로 확인되었다.

(다) 결론

이상의 결과로부터 DGF-EX 의 조제물 농도 분석을 위한 본 분석법은 적합한 것으로 확인되었다. 또한, 부형제 (주사용수) 내에서 5 및 250 mg/mL 농도의 조제물은 균질하였으며, 실온 4 시간 및 냉장 7 일간 안정한 것으로 확인되었다.

### 다. 팔꽃나무 꽃 추출물의 안전성평가 (GLP 기관)

팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)은 복귀돌연변이 및 염색체 이상시험에서 유전독성이 관찰되었기 때문에, 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물은 아쉽게도 건강기능식품 원료로 개발될 수 없음을 알 수 있었다.

그러나, 팔꽃나무 꽃은 “원화”로 불리며 한약제로 직접적으로 사용되는 부위로 알려 져 있기 때문에, 꽃 추출물에 대한 복귀돌연변이 예비실험, Nurr-1 활성화 활성, 유효성분 분석, in vivo 파킨슨 효능 조사를 실시한 결과,

놀랍게도, 꽃 추출물 (DGF-EX)는 예비 복귀돌연변이 및 염색체 이상시험에서 유전독성이 없었고, 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)보다 Nurr-1 활성화 활성이 우수하였고, 유효성분도 많았으며, 특히 in vivo 파킨슨 치료 효과도 우수한 것으로 조사되어, 꽃 부위에 대한 본격적인 안전성 평가 시험을 실시하였음.

#### (1). 단회투여독성시험 (랫드)

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 랫드에서 실시하였다. 5,000mg/kg 과 2,000mg/kg 2개 용량에서 예비실험을 실시하여 용량을 결정하고, 본 시험을 군당 랫드 암수 각 5수에 대하여 실시하였다. 일반증상관찰, 사망률, 체중측정 등 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 결정하였다.

투여요량 설정: 본시험의 예비시험 (Biototech Study No.: B16283P1)으로 2,000 및 5,000 mg/10 mL/kg을 암수 랫드 각 1마리에 단회 경구투여한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험의 투여용량은 5,000 mg/kg의 단일 시험물질 투여군을 설정하였다. 대조군에는 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제를 투여하였다.

#### 시험결과:

A. 사망유무 : 관찰기간 동안, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 없었다.

B. 일반증상 :

5,000 mg/kg 투여군에서 점액변 (mucous stool)이 투여 후 2시간에 수컷 1례, 투여 후 6시간에 수컷 3례, 암컷 1례, 투여 후 1일에 암수 전례에서 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된다.

C. 체중변화 :

암수 5,000 mg/kg 투여군을 대조군과 비교시 수컷에서는 투여 후 1일에 통계학적으로 유의성 있는 체중감소가 관찰되었고, 암컷에서는 관찰기간 동안 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다. 이러한 수컷의 체중변화는 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단된다.

D. 육안적 부검소견

부검시, 암수 대조군 및 5,000 mg/kg 투여군에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

E. 결론 : 본 시험의 조건 하에서 꽃 추출물 (DGF-EX)를 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

(2). 유전독성 시험

(가) 복귀돌연변이시험

GLP 기관인 ㈜바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하였다. 시험물질 DGF-EX 의 유전자돌연변이 유발성을 히스티민 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 조사하였다.

시험 결과 :

A. 용량설정시험

본시험의 최고용량을 설정하기 위해, 시험방법에 따라 용량설정시험을 실시한 결과, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA1535	-	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
TA100	-	313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77
	+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
TA1537	-	78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44
	+	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

B. 본시험

(2.1) 복귀변이콜로니수의 계측 (표 6)

시험물질군에서는 대사활성화 유무에 관계없이 각 균주의 모든 용량에 대해서 귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고 (표 10), 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다.

양성대조군에서는 각 균주의 복귀변이콜로니수가 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

(2.2) 시험물질에 의한 생육저해 및 침전

시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA98 및 TA1535 균주의 625 µg/plate 이상, TA100 균주의 156 µg/plate 이상, TA1537 균주의 78.1 µg/plate, 존재하의 TA98 및 TA1535 균주의 2,500 µg/plate 이상, TA100 균주의 1,250 µg/plate, TA1537 균주의 625 µg/plate 이상에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하 및 존재하의 WP2uvrA(pKM101) 균주에서는 생육저해가 관찰되지 않았다.

시험물질의 침전은 대사활성화비존재하 및 존재하의 모든 용량에서 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 시험물질 꽃 추출물 (DGF-EX)의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

표 10. 팔꽃나무 꽃 추출물 (DGF-EX)의 복귀돌연변이 시험.

Table 4. The Number of Revertant Colonies per Plate in the Presence of Metabolic Activation (Main Study)

Strain	Test substance	Dose level (µg/plate)	Individual revertant colony counts	Mean	S.D.
TA98	Dimethyl sulfoxide	0	24 , 24 , 27	25	2
		156	25 , 27 , 25	26	1
	DGF-EX	313	35 , 24 , 27	29	6
		625	35 , 30 , 29	31	3
		1,250	29 , 22 , 26	26	4
		2,500	35* , 22* , 27*	28	7
		5,000	22* , 25* , 22*	23	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	1.0	436 , 432 , 452	440	11	
TA100	Dimethyl sulfoxide	0	75 , 87 , 85	82	6
		39.1	80 , 87 , 91	86	6
	DGF-EX	78.1	73 , 87 , 92	84	10
		156	72 , 83 , 95	83	12
		313	91 , 87 , 79	86	6
		625	81 , 84 , 83	83	2
		1,250	73* , 67* , 81*	74	7
2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	811 , 853 , 849	838	23	
TA1535	Dimethyl sulfoxide	0	9 , 8 , 10	9	1
		156	9 , 9 , 9	9	0
	DGF-EX	313	10 , 8 , 11	10	2
		625	11 , 11 , 10	11	1
		1,250	10 , 8 , 7	8	2
		2,500	8* , 8* , 6*	7	1
		5,000	4* , 7* , 5*	5	2
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	172 , 170 , 151	164	12	
TA1537	Dimethyl sulfoxide	0	16 , 11 , 14	14	3
		39.1	15 , 14 , 19	16	3
	DGF-EX	78.1	14 , 18 , 14	15	2
		156	18 , 19 , 15	17	2
		313	20 , 23 , 19	21	2
		625	10* , 13* , 12*	12	2
		1,250	11* , 8* , 4*	8	4
2-Aminoanthracene (2-AA)	3.0	235 , 210 , 214	220	13	
WP2uvrA (pKM101)	Dimethyl sulfoxide	0	161 , 168 , 177	169	8
		313	166 , 172 , 164	167	4
	DGF-EX	625	165 , 149 , 154	156	8
		1,250	151 , 160 , 176	162	13
		2,500	150 , 163 , 178	164	14
		5,000	179 , 153 , 162	165	13
		2-Aminoanthracene (2-AA)	2.0	549 , 543 , 543	545

S.D.: Standard Deviation

\*: Indicated growth inhibition

(나) 염색체이상실험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하고 있다. 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell) 사용하여 염색체의 구조적 이상 유발성의 유무를 평가한다.

시험결과 :

A. RPD (relative population doubling) 측정

RPD는 단시간처리법의 대사활성화비존재하의 0, 53.8, 108, 215 및 430 µg/mL에서 각각 100, 102, 102, 97.6 및 75.0%, 존재하의 0, 91.3, 183, 365 및 730 µg/mL에서 100, 104, 98.4, 77.4 및 53.4%, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 0, 17.5, 35.0, 70.0 및 140 µg/mL에서 각각 100, 97.0, 94.4, 93.5 및 57.1%이었다.

B. 시험물질의 침전

시험물질의 침전은 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하의 모든 용량에서는 관찰되지 않았다.

C. 염색체이상 관찰대상 용량

단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 최고용량에서 200개의 분열중

계열	S9 mix	염색체이상 관찰대상 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	430, 215, 108
	+	730, 365, 183
연속처리법	-	140, 70.0, 35.0

기상이 관찰 가능하여 최고용량을 포함한 3용량을 염색체이상 관찰대상 용량으로 설정하였다.

D. 염색체이상출현빈도 (표 11)

본시험의 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 확인되지 않았으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다.

각 처리계열에 대한 양성대조군에서는 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 10% 이상으로, 음성대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게 증가하였다 (Fisher's exact test, p<0.01).

이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 꽃 추출물 (DGF-EX)의 염색체이상 유발성은 음성으로 판정되었다.



표 11. 팔꽃나무 꽃 추출물 (DGF-EX)의 염색체 이상 시험결과.

Test substance	Dose (µg/mL)	RPD (%)	S9 mix	Trit-Rec Time (hr)	No. of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations								Number of cells with numerical aberrations			Others <sup>a)</sup>		
						ctb	csb	cte	cse	frg	gap		total (%)		end	pol		total (%)	
											ctg	csg	gap-	gap+					
Dimethyl sulfoxide	0	100	-	6-18	100	1	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0	0	0 (0.0)	0
					100	1	0	0	0	0	0	0			0	0			
DGF-EX	53.8	102	-	6-18	100	not observed													
					100														
	108	102	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	0
					100	0	0	0	0	0	0	0			0	0			
	215	97.6	-	6-18	100	0	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0	1	1 (0.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0			0	0				
	430	75.0	-	6-18	100	0	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0	3	5 (2.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0			0	2				
MMC	0.1	80.4	-	6-18	100	5	0	18	0	0	0	0	38* (19.0)	38 (19.0)	0	2	2 (1.0)	0	
					100	4	0	14	0	0	0			0	0				
Dimethyl sulfoxide	0	100	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0	1	1 (0.5)	0	
					100	1	0	0	0	0	0			0	0				
DGF-EX	91.3	104	+	6-18	100	not observed													
					100														
	183	98.4	+	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0 (0.0)	0	
					100	0	0	0	0	0	0			0	0				
	365	77.4	+	6-18	100	1	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1	1	2 (1.0)	0	
					100	1	0	0	0	0	0			0	0				
	730	53.4	+	6-18	100	0	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0	3	5 (2.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0			0	2				
B[a]P	20	57.4	+	6-18	100	5	0	15	0	0	0	0	31* (15.5)	32 (16.0)	0	0	0 (0.0)	0	
					100	2	0	13	0	0	1			0	0				
Dimethyl sulfoxide	0	100	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0	1	1 (0.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0			0	0				
DGF-EX	17.5	97.0	-	24-0	100	not observed													
					100														
	35.0	94.4	-	24-0	100	2	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0	1	1 (0.5)	0	
					100	0	0	0	0	0	0			0	0				
	70.0	93.5	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0	1	1 (0.5)	0	
					100	0	1	0	0	0	0			0	0				
	140	57.1	-	24-0	100	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	2 (1.0)	0	1	1 (0.5)	0	
					100	0	1	0	0	0	1			0	0				
MMC	0.1	66.0	-	24-0	100	6	0	25	0	0	0	0	52* (26.0)	52 (26.0)	0	0	0 (0.0)	0	
					100	6	1	20	1	0	0			0	0				

Aberation : ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, frg: fragmentation, end: endoreduplication, pol: polyploidy

MMC: Mitomycin C, B[a]P: Benzo[a]pyrene

RPD: Relative Population Doubling, Trit-Rec time: Treatment-Recovery times

gap-: Total number of cells with structural aberrations excluding gap, gap+: Total number of cells with structural aberrations including gap

a): Others were excluded from the number of cells with chromosomal aberrations.

Significant difference from negative control by fisher's exact test : \* p<0.01

## (3) 소핵실험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하고 있다. 마우스의 골수세포를 이용하여 예비실험 및 소핵유발 빈도시험을 실시한 후, 본 실험을 실시하여 소핵유무를 평가한다.

시험결과 :

- A. 용량 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg
- B. 일반증상 및 사망동물 : 없음
- C. 수컷 본시험 결과 : 시험물질군의 모든 용량에서 소핵다염성적혈구의 출현변도는 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의차이는 없는 것으로 확인되었음.

## (4) 4주 반복 용량결정 (DRF) 시험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하였다. 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 DGF-EX 를 4 주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응을 평가하고, 반복투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용하기 위하여 실시하였다

시험방법:

군구성은 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 의 투여군과 대조군 (주사용수)의 4 군으로 각 군당 암수 각각 5 마리로 구성하였다. 관찰기간 동안, 일반증상관찰, 체중과 사료섭취량 측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정 및 부검시 육안적 검사를 수행하였다.

시험결과:

투여기간 동안, 5,000 mg/kg/day 투여군의 암컷 2 마리가 사망하였다. 사망전의 일반증상으로 거식, 유연, 시험물질색변, 하복부오염, 사료섭취량의 감소 및 불규칙호흡이 관찰되었고, 부검 결과, 공장의 충혈, 간의 변색 및 위의 병소가 관찰되었다. 일반증상 관찰 결과, 암수 1,250 mg/kg/day 투여군에서 유연이 투여 후에 관찰되었다. 암수 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 전후 유연 및 시험물질색변이 관찰되었고, 수컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 점액변 또는 연변이 일시적으로 관찰되었다. 체중측정 결과, 수컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군과 암컷 1,250 및 2,500 mg/kg/day 투여군에서 투여기간 동안 체중감소 또는 체중증가 억제경향이 관찰되었고, 암수 5,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 1 주에 이와 연관된 사료섭취량의 감소가 관찰되었다. 혈액학적 검사 및 부검 결과, 시험물질 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다. 혈액생화학적 검사 결과, 암수 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 혈액요소질소 (BUN)의 증가, 암컷 5,000 mg/kg/day 투여군에서 총콜레스테롤 (T-Chol)의 증가가 관찰되었다. 장기중량 측정 결과, 수컷 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 신장의 상대중량 증가, 암컷 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg/day 투여군에서 간의 상대중량 증가가 관찰되었다.

이상으로 DGF-EX 를 랫드에 4 주 반복 경구투여 한 결과, 반복투여 독성시험의 고용량은 수컷은 2,500 mg/kg/day 이하로, 암컷은 1,250 mg/kg/day 이하로 설정해야 될 것으로 판단되었다.

(5) 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

(가) 꽃 추출물 대량 제조

건조된 팔꽃나무 꽃을 서울 경동 한약 시장의 해성당에서 2016년 7월에 구입한 8 kg 와 11월에 구입한 37 kg을 사용하였음. 상기에서 기술한 동일한 방법으로 24시간 씩 80% 에탄올로 두 번 추출하여 8kg의 추출물을 얻었음.

대량 추출한 꽃 추출물 (DGF-EX lot 032)에 대하여 HPLC로 유효성분 DGH-2 함량을 조사한 결과, 0.64 mg/g 즉, 0.064%의 DGH-2가 함유된 것으로 조사되어 이전에 소량 추출물과 비슷하게 DGH-2를 함유하였음.

(나) 13주 반복 경구투여 독성시험 및 4주 회복시험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하였다. 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 DGF-EX를 13주간 반복 경구투여 시 나타나는 독성반응과 그 안전성을 평가하고, 4주간의 회복군을 설정하여 독성변화의 가역성 여부를 확인하기 위하여 실시하였다. 그 결과를 요약하면 아래와 같음.

시험방법:

시험물질은 240, 600 및 1,500 mg/kg/day의 3개의 용량으로 암수 군당 각각 10, 10 및 15마리에 13주간 경구 투여하였다. 또한, 대조군 (주사용수)을 설정하여 15마리에 13주간 경구 투여하였다. 대조군 및 1,500 mg/kg/day 투여군에는 암수 각 5마리에 대하여 독성 변화의 가역성을 평가하기 위해 4주간의 회복기간을 두었다. 관찰기간 동안, 일반증상 관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안과학적 검사 및 뇨검사를 실시하였고, 관찰기간 종료 후 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기의 중량측정, 부검시 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

군	투여용량 (mg/kg/day)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	10 (1101 ~ 1110) +5* (1111 ~ 1115)	10 (2101 ~ 2110) +5* (2111 ~ 2115)
G2 저용량군	240	10	10 (1201 ~ 1210)	10 (2201 ~ 2210)
G3 중용량군	600	10	10 (1301 ~ 1310)	10 (2301 ~ 2310)
G4 고용량군	1,500	10	10 (1401 ~ 1410) +5* (1411 ~ 1415)	10 (2401 ~ 2410) +5* (2411 ~ 2415)

\*: 회복군

결과 요약

1. 일반증상

투여기간 동안 암수 대조군 과 모든 투여군 및 회복군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

2. 체중변화

투여기간 동안 암수 대조군 과 모든 투여군 및 회복군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 체중 변화는 관찰되지 않았다.

3. 사료섭취량

투여기간 동안 암수 대조군 과 모든 투여군 및 회복군에서 대조군과 비교시 유의성 있는 사료 섭취량 변화는 관찰되지 않았다.

## 4. 안과학적 검사

암수 대조군 과 모든 투여군 및 회복군에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

## 5. 뇨검사

암수 대조군 과 모든 투여군 및 회복군에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

## 6. 혈액학적 검사

암수 대조군 과 모든 투여군 및 회복군에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음.

## 7. 혈액 생화학적 검사

주시험군의 암수 240, 600 및 1,500 mg/kg/day 투여군에서 대조군과 비교시 모든검사 항목에서 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다. 회복군의 암수 1,500 mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

## 8. 장기 중량

주시험군의 암수 240, 600 및 1,500 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 1,500mg/kg/day 투여군에서 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

## 9. 부검

주시험군의 암수 240, 600 및 1,500 mg/kg/day 투여군과 회복군의 암수 1,500mg/kg/day 투여군에서 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되는 결과는 없었다.

## 10. 조직병리학적 검사

주시험군의 암수 240, 600 및 1,500 mg/kg/day 투여군에서 위의 경계능의 과다각화증을 동반한 편평세포 과다 형성 (squamous cell hyperplasia)이 미미한 정도(minimal)에서 중등도(moderate)로 용량상관성 있게 관찰되었다.

해당 소견은 수컷 대조군에서도 관찰되었으나, 시험물질 투여군에서 발생 빈도 및 정도가 증가하였기에 시험물질에 의한 영향으로 판단하였다. 다만, 위의 경계능은 사람에서는 존재하지 않는 종특이적인 구조로 사람에 외삽하는 관점에서 볼 때 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단된다. 회복군의 암수 1,500 mg/kg/day 투여군에서도 해당 소견이 미미한 정도에서 경도(slight)로 여전히 관찰되었으나, 발생 빈도 및 정도가 주시험군 보다 감소하였고 일부 회복하였기에, 회복과정 중에 있는 것으로 판단하였다

결론 :

본 시험 조건하에서, DGF-EX에 대한 암수 랫드를 이용한 13주 반복 경구투여 독성시험을 실시한 결과, 암수 모든 시험물질 투여군에서 위의 변화가 관찰되어 무독성량 (NOAEL)은 산출할 수 없었다. 다만, 위의 경계능은 사람에서는 존재하지 않는 종특이적인 구조로 사람에 외삽하는 관점에서 볼 때 독성학적 의미는 미약한 것으로 판단된다. 위의 변화를 제외한 NOAEL은 1,500 mg/kg/day을 상회하는 것으로 판단된다.

이러한, GLP기관에서의 13주 반복 경구투여 독성시험결과, 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)는 시험에 사용한 모든 투여군에서 무독성으로 나왔기 때문에, 무독성량 (NOAEL)은 1,500 mg/kg/day 이상인 것으로 판단되었음.

4). 팔꽃나무 추출물의 유효성분 분리 및 구조분석

추가적인 유효성분을 발견하여 특허권을 확보함으로써 본 원래특허의 특허권을 확장하고, 이를 통하여 다른 식물에서 발견될 수 있는 유효성분을 미리 차단함으로써 본 추출물의 특허권을 방어하기 위하여 추가적인 유효성분을 분리하고 화학 구조를 규명하였음.

가). 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물로부터 유효성분 분리

팔꽃나무 줄기뿌리 추출물의 유효성분 DGH-1 와 DGH-2 화합물은 daphnane type의 diterpene 화합물이기 때문에, DGH-1 와 DGH-2 성분이외에 다수의 daphnane-type의 minor 성분이 존재하고 있을 가능성이 많다. 이러한 minor 성분이 DGH-1 와 DGH-2 보다 specific 활성이 높을 가능성도 있기 때문에 특허권 확보를 위하여 minor 성분을 분리 규명하고자 하였다. 또한 이는 팔꽃나무 꽃 부위의 성분을 신속하게 분석하는 데 이용할 수 있다.

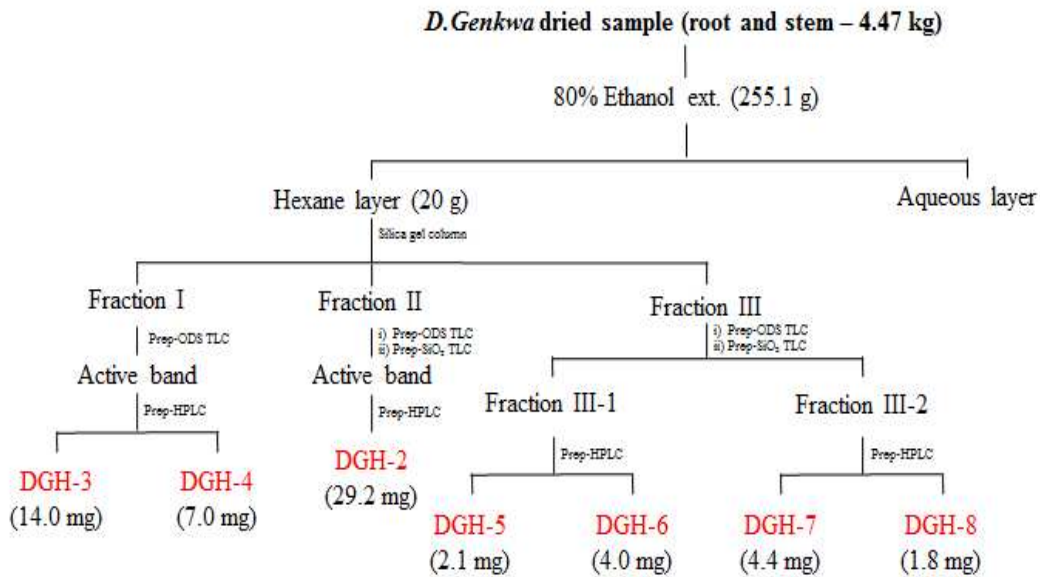


그림 16. Purification of minor daphnane-type diterpene compounds from root and stem portions of *Daphne genkwa*.

(1) 추가 유효성분 분리

이미 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물을 다량 확보하고 있기 때문에, 줄기 뿌리 추출물에서 daphnane-type diterpene 화합물을 분리하였다 (그림 16, 17). 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)의 줄기 과 뿌리 4.47 kg을 세절한 다음, 12 L 80% 에탄올에 4시간 동안 침지하고, 여과하여 고형분과 1차 액상 성분을 분리하였다. 상기 분리된 고형분을 다시 12 L 80% 에탄올에 4시간 동안 침지하고, 여과하여 2차 액상성분을 수득하였다. 상기 수득한 1차 액상성분과 2차 액상성분을 혼합하고, 상기 혼합물을 감압하에서 농축시킨 다음, 잔사를 동결건조하여 255.1 g의 팔꽃나무 추출물을 얻었다.

수득한 팔꽃나무 추출물을 200 mL의 증류수와 헥산의 1:1 혼합용매에 녹여 분획하여 헥산층을 얻었다. 같은 방법으로 2번 더 실시하여 얻은 헥산층을 감압농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 이렇게 얻은 헥산 분획물 (20 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 헥산과 에틸 아세테이트의 구배(gradient) 혼합용매(10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2)로 용리시켜 총 3개의 분획 (Fr. I, II, III)을 얻었다. 이 중 Fr. I (577 mg)을 75% 아세토니트릴 조건으로 역상 실리카겔 프랩 TLC(reverse phase silica gel prep TLC)를 실시하여 활성밴드를 얻었다. 이 활성밴드를 83% 아세토니트릴을 용출액을 유속 3 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 retention time 15.2 분과 18.5분에서 각각 DGH-3 (acutilonine F) (14.0 mg) 와 DGH-4 (wikstroemia factor M<sub>1</sub>) (7.0 mg)을 얻었다. Fr. II (320 mg)을 75% 아세토니트릴 조건으로 역상 실리카겔 프랩 TLC(reverse phase silica gel prep TLC)를 실시하여 활성밴드를 얻었다. 이 활성밴드를 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(50:1) 조건으로 순상 실리카겔 프랩 TLC(silica gel prep TLC)를 실시하고 최종적으로 79% 아세토니트릴을 용출액을 유속 3 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 retention time 16분에서 DGH-2 (yuanhuacin) (29.2 mg)을 얻었다. Fr. III (400 mg)을 Fr.II와 같은 방법으로 실시하여 Rf 0.4 과 0.25 에서 두 개의 sub-fraction 각각 Fr.III-1 과 Fr.III-2 를 얻었다. Fr.III-1를 65% 아세토니트릴을 용출액을 유속 3 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 retention time 17.2 분과 23.4 분에서 각각 DGH-5 (prostratin Q) (2.1 mg) 와 DGH-6 (yuanhuadine) (4.0 mg)을 얻었다. Fr.III-2 Fr.III-1와 같은 방법으로 ODS HPLC를 수행하여 retention time 19.0 분과 21.4 분에서 각각 DGH-7 (yuanhuatine) (4.4 mg) 와 DGH-8 (12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate) (1.8 mg)을 얻었다.

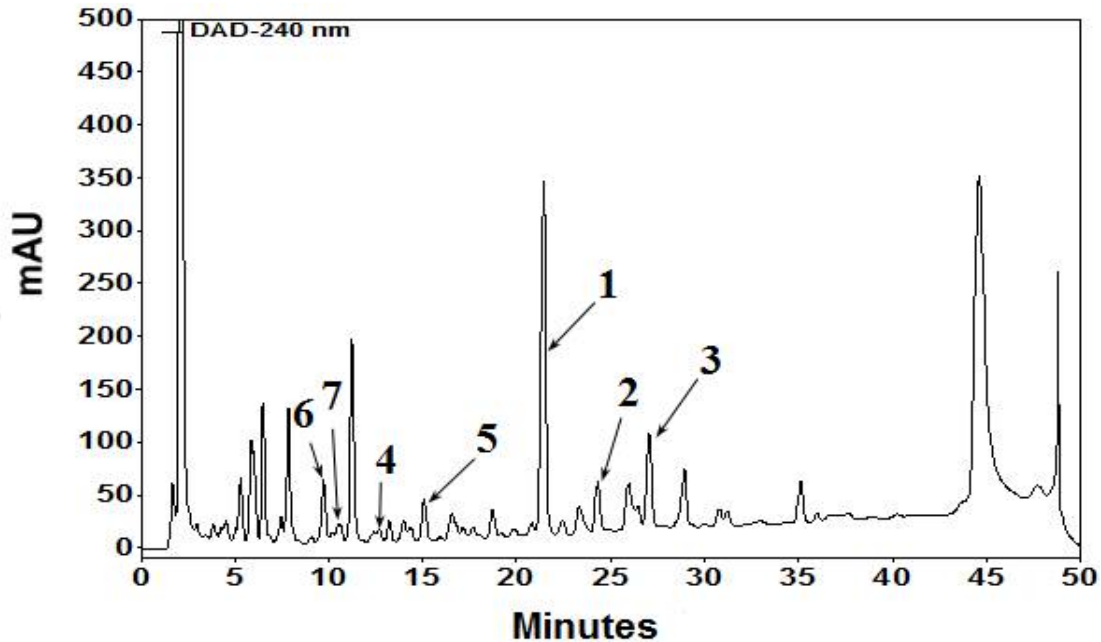


그림 17. HPLC chromatogram of the hexane extract of root and stem parts of *D. genkwa* and identification of DGH 2 ~ 8. The hexane extract was subjected to a reverse-phase HPLC column (4.6 x 150 mm, J'sphere ODS-H80) chromatography measured at 240 nm. The column was eluted with an aqueous acetonitrile gradient from 50% to 100% containing 0.025% trifluoroacetic acid (TFA) for 50 min at a flow rate of 0.8 mL/min. DGH-2 (1), DGH-3 (2), DGH-4 (3), DGH-5 (4), DGH-6 (5), DGH-7 (6), and DGH-8 (7).

## (2) 화학구조 규명.

DGH-3의 화학구조를 규명하기 위하여  $\text{CD}_3\text{OD}$ 를 용매로하여  $^1\text{H}$  과  $^{13}\text{C}$ -NMR를 측정하였다 (그림 18, 19). HMQC 과 함께 1개의 singlet methyl기와 2개의 doublet methyl, 1개의 triplet methyl, 1개의 exomethylene, 4개의 oxygenated methine, 3개의 oxygenated  $sp^3$  carbon, 1개의 oxygenated methylene, 4개의 methylene, 4개의 methine, 5개의 aromatic methine, 6개의 olefinic methine, 118.7ppm의 1개의 quaternary orthoester carbon, 1개의  $sp^2$  quaternary carbon, 1개의 carbonyl carbon이 관측되어 daphnane-type diterpene ester 물질임을 알수 있었다.

HMBC에서 one-substituted benzene ring이 orthoester carbon에 결합하고, 2,4,6-decatrienoic acid가 82.3 ppm의 oxygenated carbon (C-3)에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과 NMR 결과는 Acutilonine F 물질과 유사하였다. 2D-NMR data를 이용하여 DGH-3의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR data를 assign한 결과 (표 12), 문헌의 Acutilonine F의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR data와 일치하였다. 또한 ESI-MS에서도  $m/z$  633 ( $\text{M}-\text{H}^-$ ),  $m/z$  635 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )이 확인되어, DGH-3 화합물은 분자식  $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{O}_9$  분자량 634의 Acutilonine F 로 동정하였음 (그림 20).

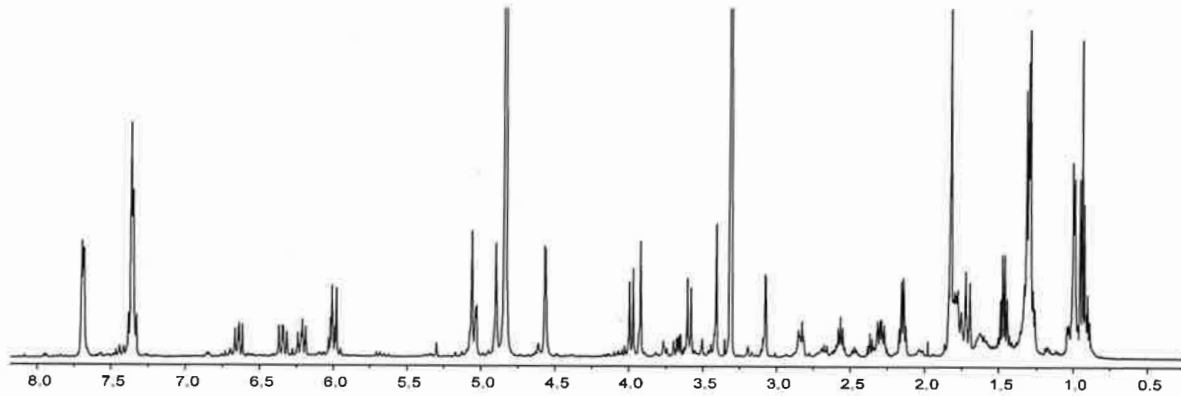


그림 18.  $^1\text{H}$  -NMR spectrum of compound DGH-3 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

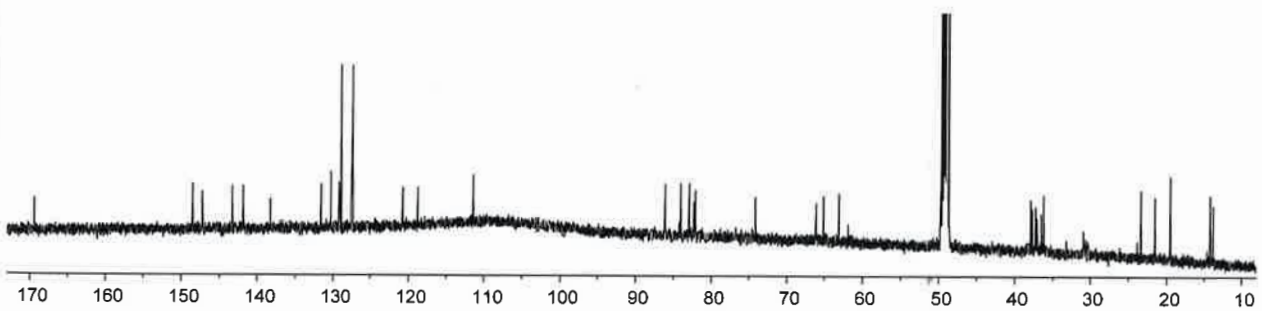


그림 19.  $^{13}\text{C}$  -NMR spectrum of compound DGH-3 (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

DGH-4와 DGH-7의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 DGH-3과 같이 orthoester aromatic ring을 함유하고 있는 daphnane-type diterpene인 DGH-1 (genkanine N)과 유사하였다.

DGH-4는 HMBC에서 d 7.75 (2H, m, H-3' and H-7')의 aromatic protons 이 d 117.6의 orthoester carbon (C-1')과 long-rang coupling 하였고, Acyl chain의 d 5.90의 H-2"와 d 7.33의 H-3"가 d 169.6의 ester carbonyl C-1"과 HMBC correlation이 관측되어 C-1"에 acyl chain이 연결되어 있음을 알수 있었다. 또한 acyl chain에서 C-2"과 C-4"의 double bond는 H-2", H-4", H-6"의 larger coupling constants로부터 *Z* geometry임을 알수 있었다. 이러한 결과로부터 DGH-4는 wikstroemia factor  $\text{M}_1$ 로 동정되었다. wikstroemia factor  $\text{M}_1$ 의  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터와 acyl chain의 geometry는 본 연구에서 처음으로 규명되었다.

DGH-7의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 DGH-1 (genkanine N)처럼 2개의 aromatic ring를 가지고 있음을 시사하였다. HMBC spectrum에서 two aromatic ring가 C-1'과 C-1"에 결합하고 있음을 알 수 있었다. 따라서, DGH-7는 yuanhuatine로 동정되었다. Yuanhuatine의  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 본 연구에서 처음으로 규명되었다.

DGH-6의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 aromatic ring에 해당하는 signal 없는 것만 제외하고 DGH-2 (yuanhuacine)와 유사하였다. 이에 따라,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS,  $[\alpha]_D$  데이터를 기반으로 DGH-6은 yuanhuadine로 동정되었다.

DGH-5와 DGH8의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 long chain aliphatic ester을 함유하고 있는 phorbol-type diterpene의 특성을 나타내었다.

DGH-5와 DGH8의 차이는 DGH-8은 acyl chain에서 한 개 많은 double bond를 가졌다. DGH-8의 HMBC spectrum에서 acyl chain의 d 5.84의 H-2"와 d 7.28의 H-3"가 d 167.2의 ester carbonyl C-1"과 HMBC correlation이 관측되어 C-1"에 acyl chain이 연결되어 있음을 알 수 있었다. 또한 acyl chain에서 C-2", C-4", C-6"의 double bond는 H-2", H-4", H-6"의 larger coupling constants로부터 *Z* geometry임을 알 수 있었다. 그리고 H-12의  $J = 10.3$  Hz의 larger coupling constant로부터 acyl chain이 b-configuration임을 알 수 있었다. 따라서 DGH-5와 DGH8은 각각 prostratin Q과 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate로 동정되었다. 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate의  $^{13}\text{C}$ -NMR 데이터는 본 연구에서 처음으로 규명되었다.

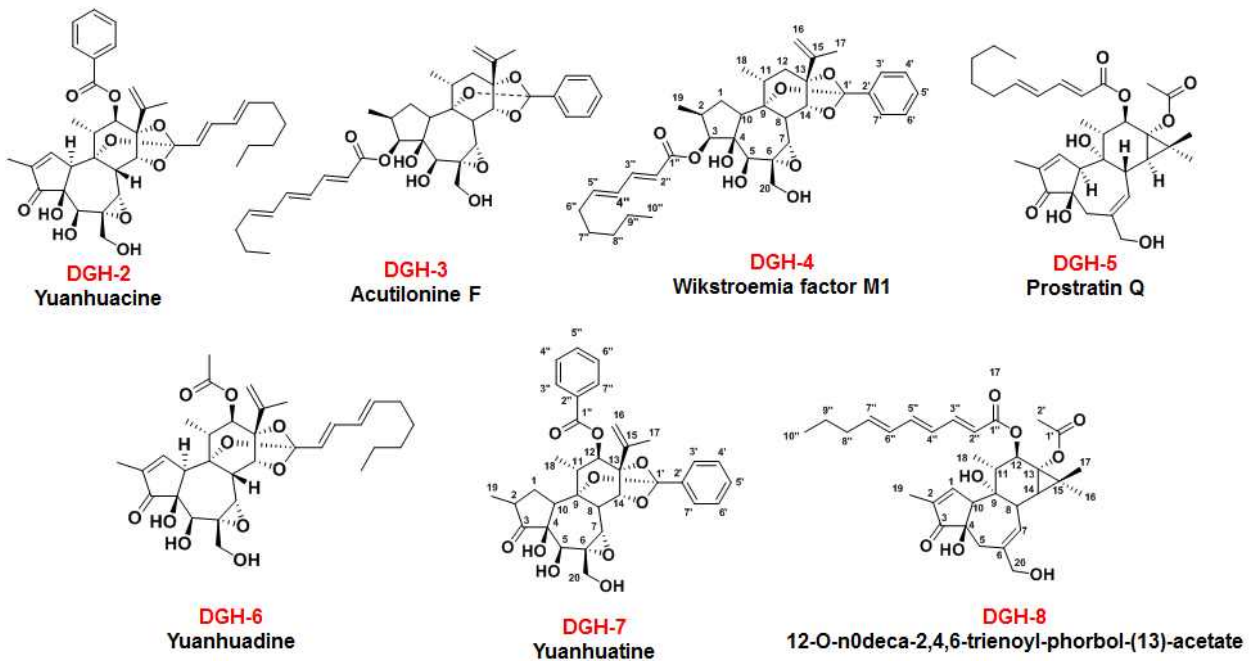


그림 20. Structure of compounds DGH-2-8.



DGH-3 ~ 8 화합물의  $[\alpha]_D^{20}$ , MS, NMR 데이터는 다음과 같다.

DGH-3 (Acutilonine F); White powder;  $[\alpha]_D^{20}$  -32.1 (*c* 1.3, MeOH); ESI-MS,  $m/z$  635.6  $[M+H]^+$ , 657.7  $[M+Na]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.70(2H, dd, *J*=7.35, 2.22Hz, H-3', H-7'), 7.37(1H, m, H-5'), 7.36(2H, m, H-4', H-6'), 7.35(1H, m, H-3''), 6.64(1H, dd, *J*=14.82, 10.75Hz, H-5''), 6.34(1H, dd, *J*=14.79, 11.40Hz, H-4''), 6.22(1H, dd, *J*=15.16, 10.69Hz, H-6''), 6.01(1H, m, H-7''), 6.00(1H, m, H-2''), 5.06(1H, brs, H-16a), 5.03(1H, d, *J*=4.52Hz, H-3), 4.90(1H, brs, H-16b), 4.56(1H, d, *J*=2.66Hz, H-14), 3.98(1H, d, *J*=12.19Hz, H-20a), 3.92(1H, s, H-5), 3.59(1H, d, *J*=12.20Hz, H-20b), 3.41(1H, brs, H-7), 3.07(1H, d, *J*=2.69Hz, H-8), 2.83(1H, dd, *J*=13.03, 5.32Hz, H-10), 2.59(1H, m, H-11), 2.29(2H, m, H-12), 2.15(2H, m, H-8''), 1.82(3H, s, H-17), 1.78(1H, m, H-2), 1.71(2H, m, H-1), 1.47(2H, m, H-9''), 1.31(3H, d, *J*=6.89Hz, H-18), 0.99(3H, d, *J*=5.77Hz, H-19), 0.94(3H, t, *J*=7.39Hz, H-10'');

DGH-4 (wikstroemia factor  $M_1$ ); White powder;  $[\alpha]_D^{20}$  +18.9 (*c* 1.0, MeOH); ESI-MS,  $m/z$  637.6  $[M+H]^+$ , 659.4  $[M+Na]^+$ , 635.2  $[M-H]^-$ ;  $^1\text{H NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.75(2H, m, H-3', H-7'), 7.36(3H, m, H-4', H-5', H-6'), 7.34(1H, dd, *J*=15.4 and 10.2, H-3''), 6.21(1H, dd, *J*=14.8 and 10.4, H-4''), 5.90(1H, d, *J*=15.2, H-2''), 5.05(1H, brs, H-16a), 4.92(1H, brs, H-16b), 4.69(1H, d, *J*=5.19, H-3), 4.51(1H, d, *J*=2.76, H-14), 4.06(1H, s, H-5), 3.88(1H, d, *J*=12.2, H-20a), 3.77(1H, d, *J*=12.2, H-20b), 3.44(1H, s, H-7), 2.96(1H, d, *J*=2.8, H-8), 2.82(1H, dd, *J*=13.2, 5.5, H-10), 2.48(1H, m, H-11), 2.20(2H, overlapped, H-6''), 2.20(1H, overlapped, H-12a), 1.93(1H, m, H-1a), 1.83(3H, s, H-17), 1.78(1H, m, H-12b), 1.73(1H, m, H-1b), 1.71(1H, m, H-2), 1.45(2H, m, H-7''), 1.33(3H, d, *J*=6.9, H-18), 1.32(2H, overlapped, H-9''), 1.31(2H, overlapped, H-8''), 1.06(3H, d, *J*=6.5, H-19), 0.91(3H, t, *J*=6.9, H-10'')

DGH-5 (prostratin Q) : White powder;  $[\alpha]_D^{20}$  +14.1 (*c* 0.03, MeOH); ESI-MS,  $m/z$  579.5  $[M+Na]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.60(1H, s, H-1), 7.24(1H, m, H-3''), 6.19(1H, m, H-4''), 6.15(1H, m, H-5''), 5.79(1H, d, *J*=15.41Hz, H-2''), 5.70(1H, d, *J*=4.71Hz, H-7), 5.47(1H, d, *J*=10.27Hz, H-12), 4.03(2H, q, *J*=13.04Hz, H-20), 3.26(2H, overlapped, H-8, H-10), 2.53(2H, m, H-5), 2.17(2H, overlapped, H-6''), 2.17(1H, overlapped, H-11), 2.11(3H, s, H-2'), 1.78(3H, s, H-19), 1.44(2H, m, H-7''), 1.32(2H, m, H-9''), 1.31(2H, m, H-8''), 1.27(3H, s, H-16), 1.22(3H, s, H-17), 1.10(1H, d, *J*=5.20Hz, H-14), 0.91(3H, d, *J*=6.93Hz, H-18), 0.90(3H, t, *J*=7.06Hz, H-10'').

DGH-6 (yuanhuadine); White powder;  $[\alpha]_D^{20}$  +7.5 (*c* 1.3,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); ESI-MS,  $m/z$  587.6  $[M+H]^+$  and 609.5  $[M+Na]^+$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.58(1H, s, H-1), 6.67(1H, dd, *J*=15.45, 10.66Hz, H-3'), 6.05(1H, dd, *J*=15.14, 10.71Hz, H-4'), 5.86(1H, m, H-5'), 5.65(1H, d, *J*=15.46Hz, H-2'), 5.02(1H, brs, H-16a), 4.99(1H, brs, H-12), 4.96(1H, brs, H-16b), 4.76(1H, d, *J*=2.47Hz, H-14), 4.26(1H, brs, H-7), 3.94(1H, dd, *J*=12.34, 5.86Hz, H-20a), 3.82(1H, m, H-10), 3.80(1H, m, H-20b), 3.56(1H, s, H-5), 3.52(1H, d, *J*=2.45Hz, H-8), 2.38(1H, q, *J*=7.22Hz, H-11), 2.10(2H, q, *J*=7.20Hz, H-6'), 2.00(3H, s, H-2''), 1.84(3H, s, H-17), 1.80(3H, d, *J*=1.31Hz, H-19), 1.39(2H, dt, *J*=14.26, 7.28Hz, H-7'), 1.30(2H, m, H-9'), 1.27(2H, m, H-8'), 0.89(3H, t, *J*=6.93Hz, H-10').

DGH-7 (yuanhuatine) ; White powder;  $[\alpha]_D^{20}$  +52.8 (*c* 0.5, MeOH); ESI-MS,  $m/z$  605.5  $[M+H]^+$ , 627.4  $[M+Na]^+$ , 603.3  $[M-H]^-$ ;  $^1\text{H NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):  $\delta_{\text{H}}$  7.94(2H, m, H-3'', H-7''), 7.75(2H, m, H-3', H-7'), 7.60(1H, t, *J*=7.4, H-5''), 7.48(2H, m, H-4'', H-6''), 7.40(3H, m, H-4', H-5', H-6'), 5.42(1H, brs, H-12), 5.07(1H, brs, H-16a), 5.03(1H, brs, H-16b), 4.99(1H, d, *J*=2.8, H-14), 4.10(1H, s, H-5), 3.90(1H, d, *J*=12.4, H-20a), 3.85(1H, d, *J*=12.3, H-20b), 3.69(1H, d, *J*=2.8, H-8), 3.67(1H, brs, H-7), 3.06(1H, dd, *J*=13.3 and 5.9, H-10), 2.59(1H, q, *J*=6.9, H-11), 2.40(1H, m, H-1a), 2.28(1H, m, H-2), 1.92(3H, s, H-17), 1.63(1H, m, H-1b), 1.51(3H, d, *J*=6.9, H-18), 1.12(3H, d, *J*=6.6, H-19).

DGH-8 (12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate): white powder;  $[\alpha]_D^{20}$  -15.1 (*c* 0.2, CHCl<sub>3</sub>); ESI-MS, *m/z* 577.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 553.4 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>HNMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): δ<sub>H</sub>7.61(1H, s, H-1), 7.28(1H, dd, J=15.3 and 11.22, H-3''), 6.54(1H, dd, J=14.9 and 10.7, H-5''), 6.23(1H, dd, J=14.8 and 11.4, H-4''), 6.15(1H, dd, J=15.1 and 10.8, H-6''), 5.95(1H, m, H-7''), 5.84(1H, d, J=15.3, H-2''), 5.70(1H, d, J=4.8, H-7), 5.47(1H, d, J=10.3, H-12), 4.05(1H, d, J=12.9, H-20a), 4.00(1H, d, J=12.9, H-20b), 3.26(1H, overlapped, H-10), 3.26(1H, overlapped, H-8), 2.52(2H, m, H-5), 2.17(1H, m, H-11), 2.13(2H, overlapped, H-8''), 2.11(3H, s, H-2'), 1.78(3H, d, J=1.5, H-19), 1.45(2H, dq, J=14.6 and 7.3, H-9''), 1.27(3H, s, H-16), 1.22(3H, s, H-17), 1.10(1H, d, J=5.1, H-14), 0.93(3H, t, J=7.3, H-10''), 0.91(3H, d, J=6.4, H-18).

표 12. <sup>13</sup>C-NMR data of compounds DGH-2 ~ 8.

No.	DGH-2 (Yuanhuacine)	DGH-3 (Acutilonine F)	DGH-4 (Wikstroemia factor M1)	DGH-5 (Prostratin Q)	DGH-6 (Yuanhuadine)	DGH-7 (Yuanhuatine)	DGH-8 (12-O-n-deca- 2,4,6-trienoyl- phorbol-(13)-a cetate)
1	160.5	37.3	36.0	161.0	160.6	33.6	161.0
2	137.1	37.7	36.4	133.1	137.1	43.1	133.1
3	209.6	82.3	82.2	209.1	209.7	220.4	209.2
4	72.3	82.9	81.7	74.0	60.7	75.2	74.0
5	72.0	74.1	75.0	38.9	64.5	71.5	38.8
6	60.8	63	60.6	140.7	72.5	61.0	140.7
7	64.2	65.1	64.2	129.5	72.2	64.5	129.5
8	35.9	37.9	36.6	39.3	35.6	36.3	39.3
9	78.4	82.1	80.5	78.4	78.3	79.3	78.5
10	47.6	49.8	48.9	56.4	47.7	44.2	56.4
11	44.3	36.5	35.5	43.4	44.3	44.3	43.4
12	79.1	37.1	36.3	76.8	78.5	78.7	76.9
13	84.0	86.1	84.5	65.9	83.9	83.9	65.9
14	80.6	84	82.7	36.6	80.7	81.4	36.6
15	143.1	148.5	146.7	25.9	143.3	143.2	26.0
16	113.8	111.4	111.4	17.0	113.5	113.8	17.0
17	18.9	19.6	19.3	24.0	18.9	19.0	24.0
18	18.5	21.6	21.1	14.6	18.5	19.0	14.6
19	10.0	13.8	13.3	10.3	10.1	12.6	10.3
20	64.9	66.1	66.3	68.2	65.3	65.3	68.2
1'	117.2	118.7	117.6	174.1	117.2	118.4	174.1
2'	122.4	138.2	136.4	21.3	122.5	135.7	21.3
3'	135.3	127.4	126.3	-	135.3	126.2	-
4'	128.7	128.9	128.2	-	128.8	128.3	-
5'	139.6	130.3	129.4	-	139.6	130.0	-
6'	32.8	128.9	128.2	-	32.9	128.3	-
7'	28.9	127.4	126.3	-	28.9	126.2	-
8'	31.4	-	-	-	31.5	-	-
9'	22.6	-	-	-	22.7	-	-
10'	14.2	-	-	-	14.2	-	-
1''	165.6	169.4	169.6	167.3	169.9	165.8	167.2
2''	129.8	120.7	118.0	119.1	21.4	129.8	119.9
3''	129.6	147.2	147.4	145.8	-	129.7	145.6
4''	128.8	129.2	128.4	128.5	-	128.9	127.9
5''	133.5	143.3	146.8	145.5	-	133.5	141.8
6''	128.8	131.6	33.3	33.2	-	128.9	130.2
7''	129.6	141.9	28.5	28.6	-	129.7	141.0
8''	-	36.2	31.6	31.6	-	-	35.5
9''	-	23.4	22.7	22.7	-	-	22.4
10''	-	14.1	14.2	14.2	-	-	13.9

나). 팔꽃나무 꽃 추출물로부터 유효성분 분리

팔꽃나무(*Daphne genkwa*)의 건조된 꽃 2 kg을 40 L 80% 에탄올에 72시간 동안 침지하고, 여과하여 액상성분을 수득하였다. 상기 수득한 액상성분을 감압하에서 농축시킨 다음, 435g의 팔꽃나무 꽃 추출물을 제조하였다.

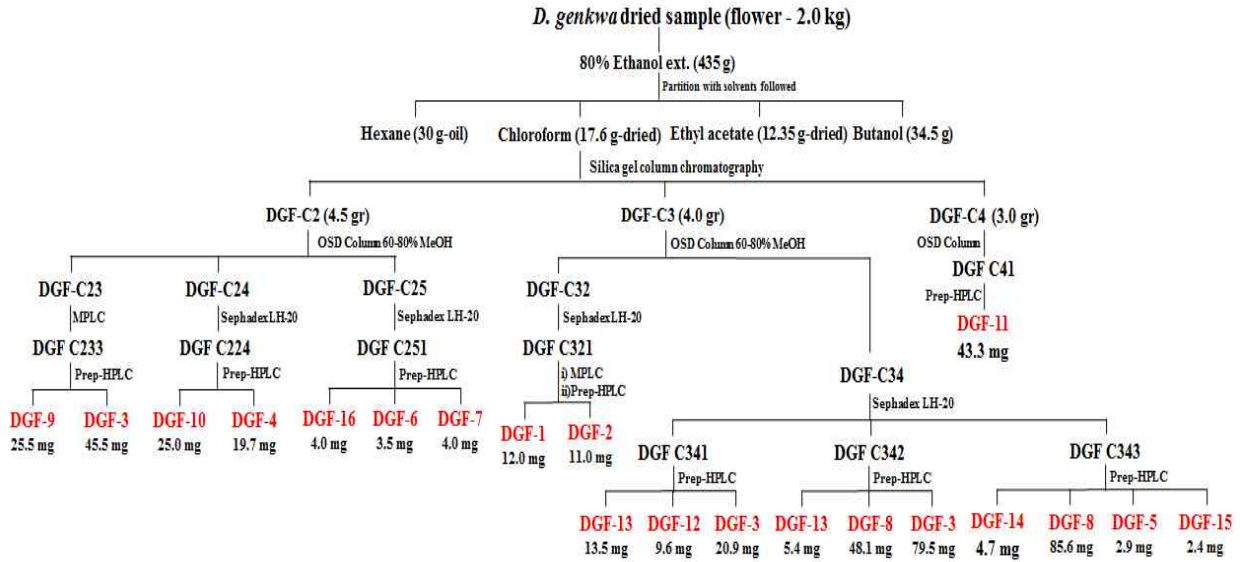


그림 21. Purification of daphnane-type diterpene compounds from the chloroform extract of the flowers of *Daphne genkwa*.

(1) 유효성분 분리

팔꽃나무 꽃 추출물을 2 L의 증류수와 2 L의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올로 각각 순차적으로 용매 분획한 다음, 이 중 클로로포름층으로부터 16개의 diterpene 화합물을 분리하였다 (그림 21). 클로로포름 분획물 (17.6 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 클로로포름과 메탄올 구배(gradient) 혼합용매(100:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1)로 용리시켜 총 4개의 분획 (Fr. C1, C2, C3, C4)을 얻었다. 이 중 Fr. C2 (4.5 g)을 메탄올과 물 구배(gradient) 혼합용매(60:40, 80:20, 100:0)조건으로 역상 컬럼 크로마토그래피를 (ODS silica gel chromatography)를 실시하여 4개의 sub-fraction (Fr. C21, C22, C23, C24)를 얻었다. Fr. C23 (300 mg)을 다시 클로로포름과 아세톤의 gradient 혼합용매(99:1 - 95:5)조건으로 실리카겔(40-63 μm; 4 g flash column) MPLC를 실시하여 3개의 sub-fraction (Fr. C231-C233)를 얻었다. Fr. C233 (140 mg) 최종적으로 55% 아세토니트릴을 용출액으로 유속 5 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 DGF-9 (25.5 mg) 와 DGF-3 (45.5 mg)을 얻었다. Fr. C24 (210 mg)을 다시 클로로포름과 메탄올 (1:1) 혼합용매으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고, 최종적으로 65% 아세토니트릴을 용출액으로 유속 5 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 DGF-10 (25.0 mg) 과 DGF-4 (19.7 mg) 을 얻었다. Fr. C25 (130 mg)을 다시 클로로포름과 메탄올 (1:1) 혼합용매으로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고, 최종적으로 70% 아세토니트릴을 용출액으로 유속 5 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 DGF-16 (4.0mg), DGF-6 (3.5 mg) 과 DGF-7 (4.0 mg) 을 얻었다.

코드번호	D-05
------	------

Fr. C3 (4.0 g)을 메탄올과 물 구배(gradient) 혼합용매(60:40, 80:20, 100:0)조건으로 역상 컬럼 크로마토그래피를 (ODS silica gel chromatography)를 실시하여 4개의 sub-fraction (Fr. C31, C32, C33, C34)를 얻었다. Fr. C32 (350 mg)을 메탄올을 용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고, 다시 클로로포름과 메탄올의 gradient 혼합용매(100:0 - 90:10)조건으로 실리카겔(40-63 μm; 4 g flash column) MPLC를 실시한 다음, 최종적으로 30% 아세토니트릴을 용출액으로 유속 4.5 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여 DGF-1 (12.0 mg) 과 DGF-2 (11.0 mg)를 얻었다. Fr. C34 (1.06 g)을 메탄올을 용출용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 3개의 sub-fraction (Fr. C341-C343)를 얻었다. Fr. C341 (120 mg), C342 (180 mg), C343 (119 mg) 최종적으로 50% 아세토니트릴을 용출액으로 유속 4.5 mL/min으로 ODS HPLC를 각각 수행하여, Fr. C341으로부터 DGF-13 (13.5 mg), DGF-12 (9.6 mg), DGF-3 (20.9 mg)을 얻었고, Fr. C342으로부터 DGF-13 (5.4 mg), DGF-8 (48.1 mg), DGF-3 (79.5 mg) 을 얻었고, Fr. C343으로부터 DGF-14 (4.7 m), DGF-8 (85.6 mg), DGF-5 (2.9 mg), DGF-15 (2.4 mg)을 얻었다.

Fr. C4 (3.0 g)을 메탄올과 물 구배 (gradient) 혼합용매(40:60, 60:40, 80:20, 100:0)조건으로 역상 컬럼 크로마토그래피를 (ODS silica gel chromatography)를 실시하여 sub-fraction C41 (233.7 mg)를 얻었고, 최종적으로 40% 아세토니트릴을 용출액으로 유속 4.0 mL/min으로 ODS HPLC를 수행하여, DGF-11 (43.3 mg) 을 얻었다.

이상과 같이 팔꽃나무 꽃의 클로로포름 추출물에서 DGF 1~ 16 까지의 16개의 diterpene 화합물을 분리하였다. 팔꽃나무 꽃의 클로로포름 추출물을 ODS HPLC 분석한 다음 16개 diterpene 화합물을 identification 한 결과는 그림 22A와 같다. 17.6분의 major peak는 이미 팔꽃나무 꽃에서 보고된 genkwanin이라는 flavonoid 성분이였다. 팔꽃나무 꽃의 헥산 추출물을 동일 조건에서 HPLC 분석 비교한 결과 (그림 22B), major 유효성분 DGH-2 물질은 팔꽃나무 꽃의 헥산 추출물에서 major 화합물로 존재하였다. 또한 클로로포름 층에서 분리되었던 DGF-3, 4, 6, 7, 14 화합물도 헥산 추출물에도 존재하였고, 줄기 뿌리 추출물에서 분리되었던 DGH-2 이외에 DGH-3,5,6 화합물도 꽃 추출물에도 존재하였다.

팔꽃나무 꽃 추출물과 줄기 및 뿌리 추출물의 성분을 비교하기 위하여 팔꽃나무 줄기 및 뿌리의 클로로포름 추출물 과 헥산 추출물을 동일 조건에서 HPLC 분석하였다 (그림 23 A, B). 그 결과, 그림 23A에서 보는 바와 같이 팔꽃나무 줄기 및 뿌리의 클로로포름 추출물에서는 Genkwanin flavonoid가 검출되지 않았고, DGH-2 와 소량의 DGF-5, 7, 8등 4개의 diperpene 화합물이 존재하였으며, 헥산 추출물에서는 DGH 2 ~ 8 화합물이외에 소량의 DGF-6 화합물이 함유되었다.

이러한 결과로부터 팔꽃나무 꽃 추출물에는 줄기 뿌리의 일부 성분도 존재하지만, 더 다양한 diterpene 화합물이 존재함을 알 수 있었다.

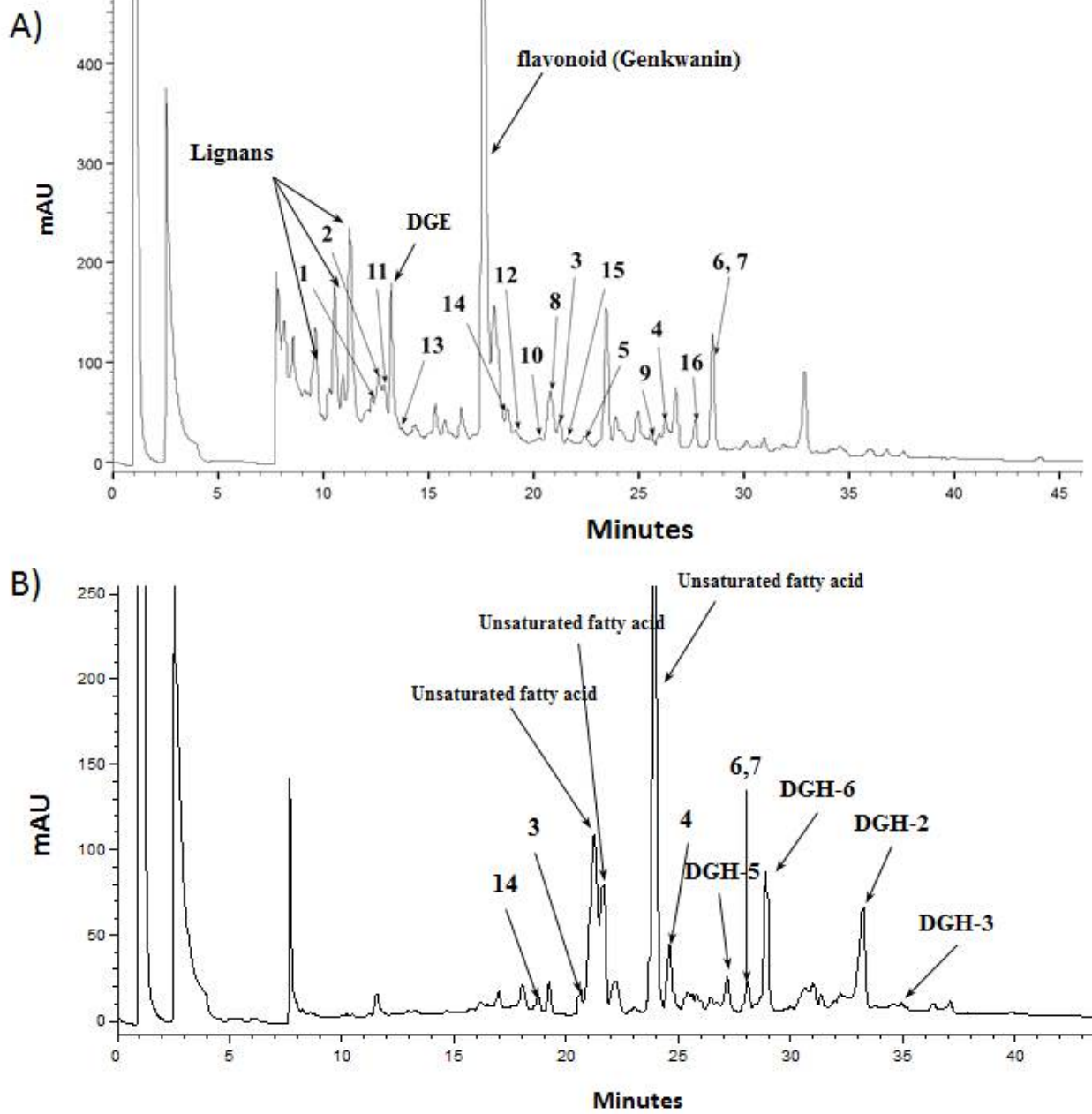


그림 22. HPLC chromatograms of the chloroform extract (A) and hexane extract (B) from **the flowers** of *D. genkwa* and identification of DGF 1-16 (1 ~ 16) and DGH compounds. The extract was subjected to a reverse-phase HPLC column (4.6 x 150 mm, J'sphere ODS-H80) chromatography measured at 240 nm. The column was eluted with an aqueous acetonitrile gradient from 0% to 100% for 60 min at a flow rate of 0.8 mL/min.

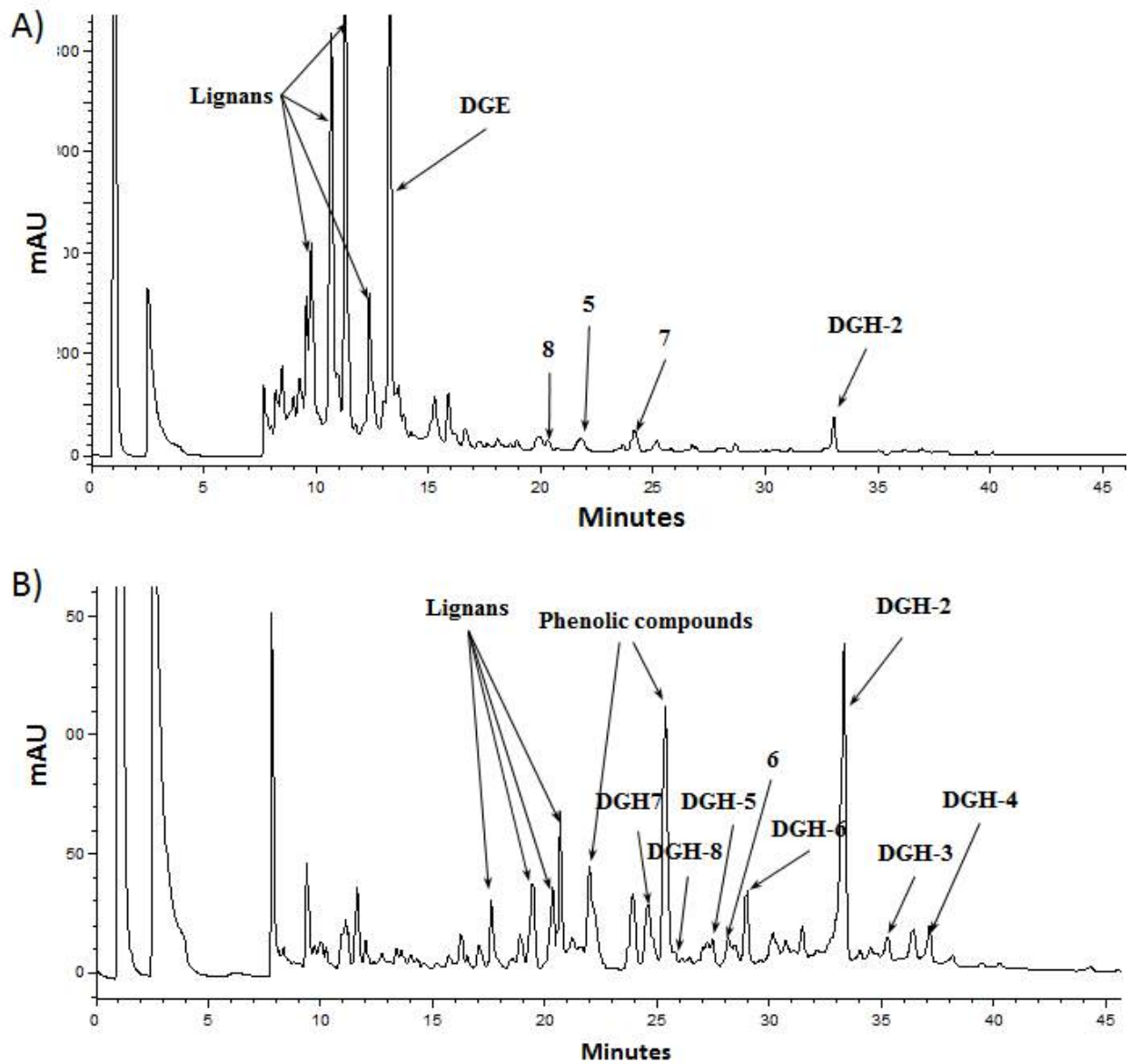
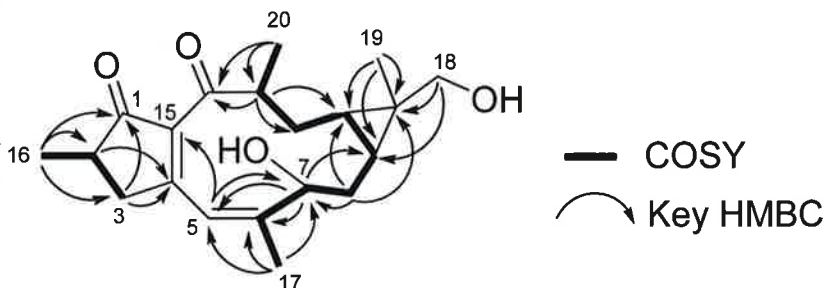


그림 23. HPLC chromatograms of the chloroform extract (A) and hexane extract (B) from **root and stem parts** of *D. genkwa* and identification of DGH and DGF compounds. The extract was subjected to a reverse-phase HPLC column (4.6 x 150 mm, J'sphere ODS-H80) chromatography measured at 240 nm. The column was eluted with an aqueous acetonitrile gradient from 0% to 100% for 60 min at a flow rate of 0.8 mL/min.

(2) 구조분석

DGF-1 화합물은 흰색의 무정형 바늘모양이었으며, IR 스펙트럼에서 3413 과 1617cm<sup>-1</sup>에서 흡수대를 보여 hydroxyl 기와 carbonyl 기를 가지고 있음을 시사하였다.

DGF-1의 화학구조를 규명하기 위하여 CD<sub>3</sub>OD를 용매로하여 <sup>1</sup>H 과 <sup>13</sup>C-NMR를 측정하였다 (그림 24, 25, 표 13). HMQC data와 함께 <sup>1</sup>H 과 <sup>13</sup>C-NMR data는 4개의 methyls, 3개의 sp<sup>3</sup>methylenes, 하나의 oxygenated methylene (δ<sub>H</sub>3.28, 1H, d, J = 11.0 Hz; δ<sub>H</sub> 3.24, 1H,



< Key COSY and HMBC data of DGF-1>

d, J = 11.0 Hz, H-18), 4개의 sp<sup>3</sup> methines, 하나의 oxygenated methine (δ<sub>H</sub>4.47, 1H, t, J = 3.0 Hz, H-7), 하나의 olefinic methine, 하나의 sp<sup>3</sup>quaternary carbon, 3개의 sp<sup>2</sup> quaternary carbons, 두 개의 ketone carbons (δ<sub>C</sub>211.9, 213.4)를 가지고 있음을 알 수 있었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 스펙트럼에서 ring A의 H-16/H-2/H-3의 부분구조, ring B의 H-20 - H-7 부분구조가 있음을 알 수 있었다. 이러한 부분구조와 δ 0.91(1H, brt, J = 10.4 Hz, H-9) 과 δ 0.66 (1H, br t, J = 9.3 and 4.7 Hz, H-11)의 <sup>1</sup>H-NMR signal은 lathyrane-type diterpenes의 특징인 cyclopropane ring이 존재함을 시사하였다. 이러한 cyclopropane ring은 0.94 ppm의 isolated methyl로부터 24.5 ppm의 sp<sup>3</sup>quaternary carbon, 194 ppm 과 21.4 ppm의 sp<sup>3</sup> methine 탄소로의 HMBC data로 증명되었다. HMBC data 과 HR\_ESIMS 결과 (m/z 333.2064 [M+H]<sup>+</sup>, calcd. 333.2066 for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>)로부터, 최종적으로 DGF-1 화합물은 laurifolioside 화합물의 C-7에 hydroxylated 되고 deglycosylated 된 신규 화합물로 규명되었다 (그림 27). laurifolioside 화합물은 *Euphorbia laurifolia*에서 분리된 바가 있다.

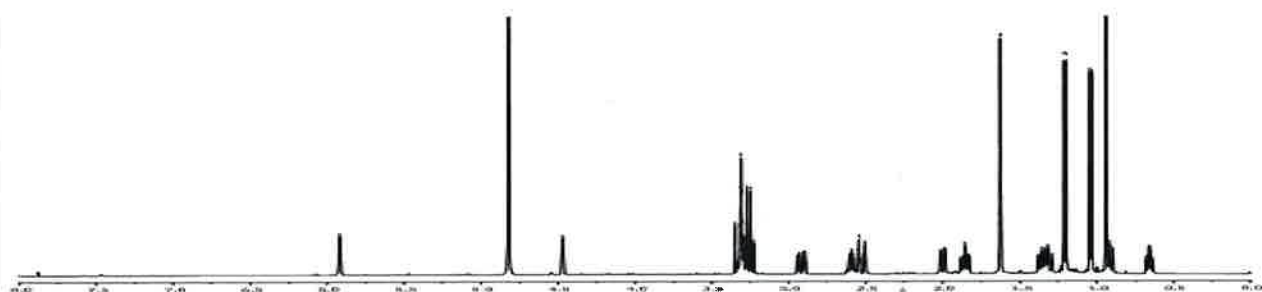


그림 24. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of DGF-1 in CD<sub>3</sub>OD (500MHz).

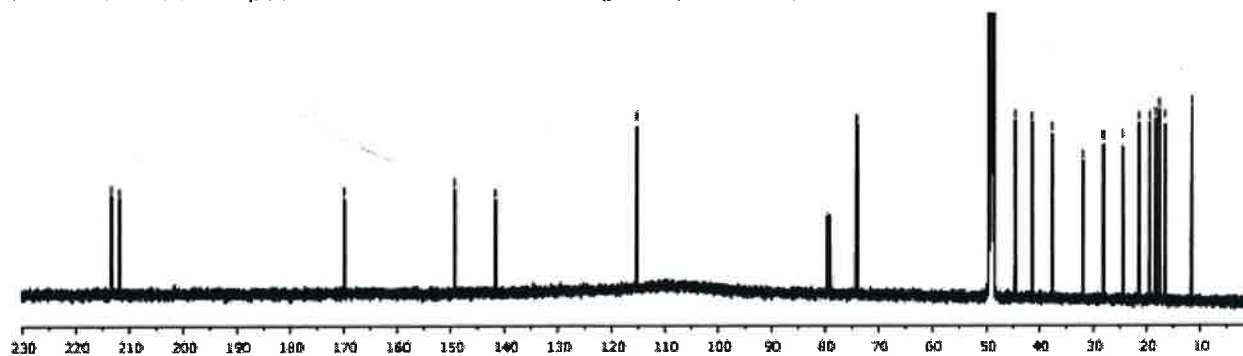


그림 25. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of DGF-1 in CD<sub>3</sub>OD (125MHz).

DGF-1의 C-7의 절대구조는 Mosher 방법으로 규명되었다. DGF-1의 S-MTPA ester 와 R-MTPA ester의 1H-NMR spectra를 비교한 결과 H-5와 H-17에서 chemical shift의 차이가 positive 이고 H-8a 와 H-8b에서는 negative로 나와서 C-7의 absolute configuration은 S로 규명되었다 (그림 26). C-2, C-9, C-10, C-11, C-13의 stereochemistry 는 NOESY spectrum으로부터 H-9, H-11, H-18이 공간적으로 같은 side에 위치하여  $\alpha$ -orientation을 나타내었고, C-2의 methyl (C-16) 과 Hb-3은  $\beta$ -configuration으로 같은 side에 위치함을 나타내었다. 따라서, DGF-1은 신규 화합물로서 (2R,7S,9S,10R,11R,13R)-7,18-dihydroxy-9aH,11aH-lathyra-4(15),5(6)-diene-1,14-dione으로 규명되었고 "genkwalathin A"으로 명명하였다.

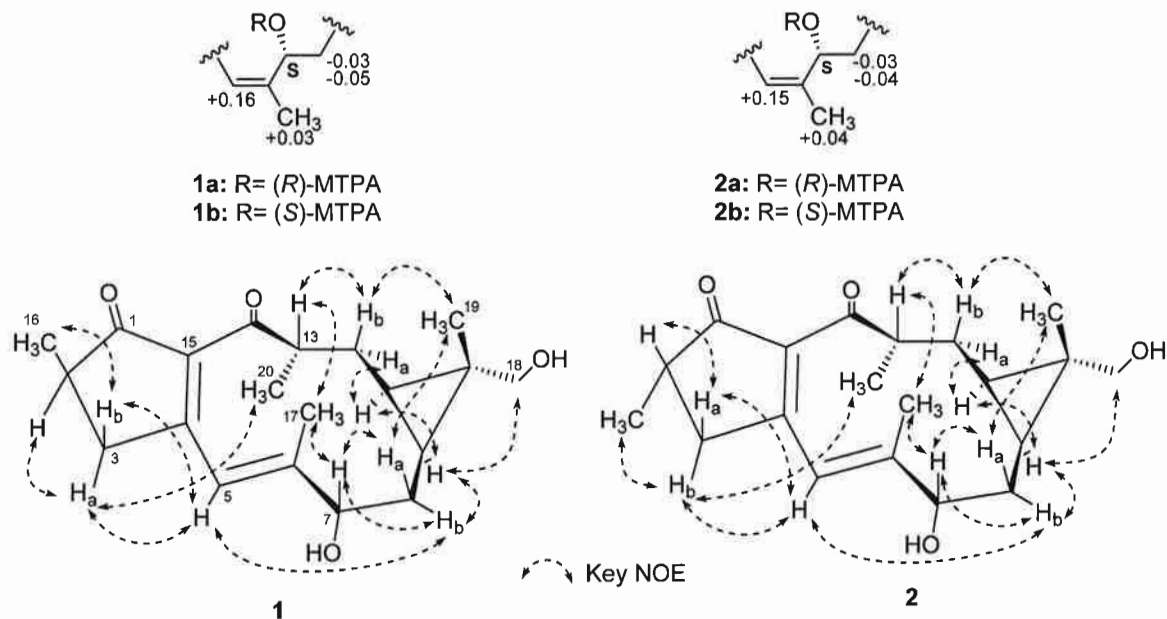


그림 26. Mosher's analysis of C-7 in DGF-1 (1) and DGF-2 (2) and key NOE correlations.

DGF-2 화합물도 흰색의 무정형의 바늘모양이고 IR이 DGF-1 과 매우 유사하였고, HR\_ESI MS 에서 분자식이 DGF-1과 일치하였으며,  $^1\text{H}$  과  $^{13}\text{C}$ -NMR 도 거의 DGF-1 과 일치하였다 (표 13). NMR에서 다른점은 C-3의 methylene proton의 chemical shift가 DGF-1은  $\delta_{\text{H}}$ 2.92 과 2.52, DGF-2는  $\delta_{\text{H}}$  3.20 과 2.28으로 차이가 있었음. HMQC 과 HMBC data로부터 DGF-2의 planar structure가 DGF-1과 일치하였기 때문에, DGF-2는 DGF-1의 C-2의 stereoisomer 임을 시사하였음. DGF-2의 절대구조를 Mosher 방법으로 규명하였음 (그림 26). C-7의 절대구조는 DGF-1과 같았고, NOESY 실험에서는 DGF-1 과 다르게, H-20이 Ha-3f보다 Hb-3과 NOE를 보였기 때문에 C-2의 absolute configuration 이 S로 규명되었다. 따라서, DGF-2 화합물은 신규 화합물인 2-*epi*-genkwalathin으로 규명되어 "genkwalathin B"로 명명하였다 (그림 27).



DGF-3 ~ 16 화합물은 기존의 문헌에 알려진 spectroscopic data와 비교하여, 각각 yuanhuapine (3), yuanhuatine (4), 1, 2 $\alpha$ -dihydrodaphnetoxin (5), genkwanine N (6), genkwanine M (7), orthobenzoate 2 (8), yuanhuafine (9), genkwadaphnine (10), genkwanine I (11), genkwainin K (12), genkwainin O (13), genkwainin A (14), genkwainin I (15), genkwanine H (16) 으로 동정되었다 (그림 27).

이상과 같이, 팔꽃나무 꽃 추출물에서 2개의 신규 lathyrane-type diterpene 계 화합물을 분리하여 genkwalathin A 과 B라 명명하였으며, 14개의 기존에 알려진 daphnane-type diterpene 계 화합물을 분리하였음 (그림 27).

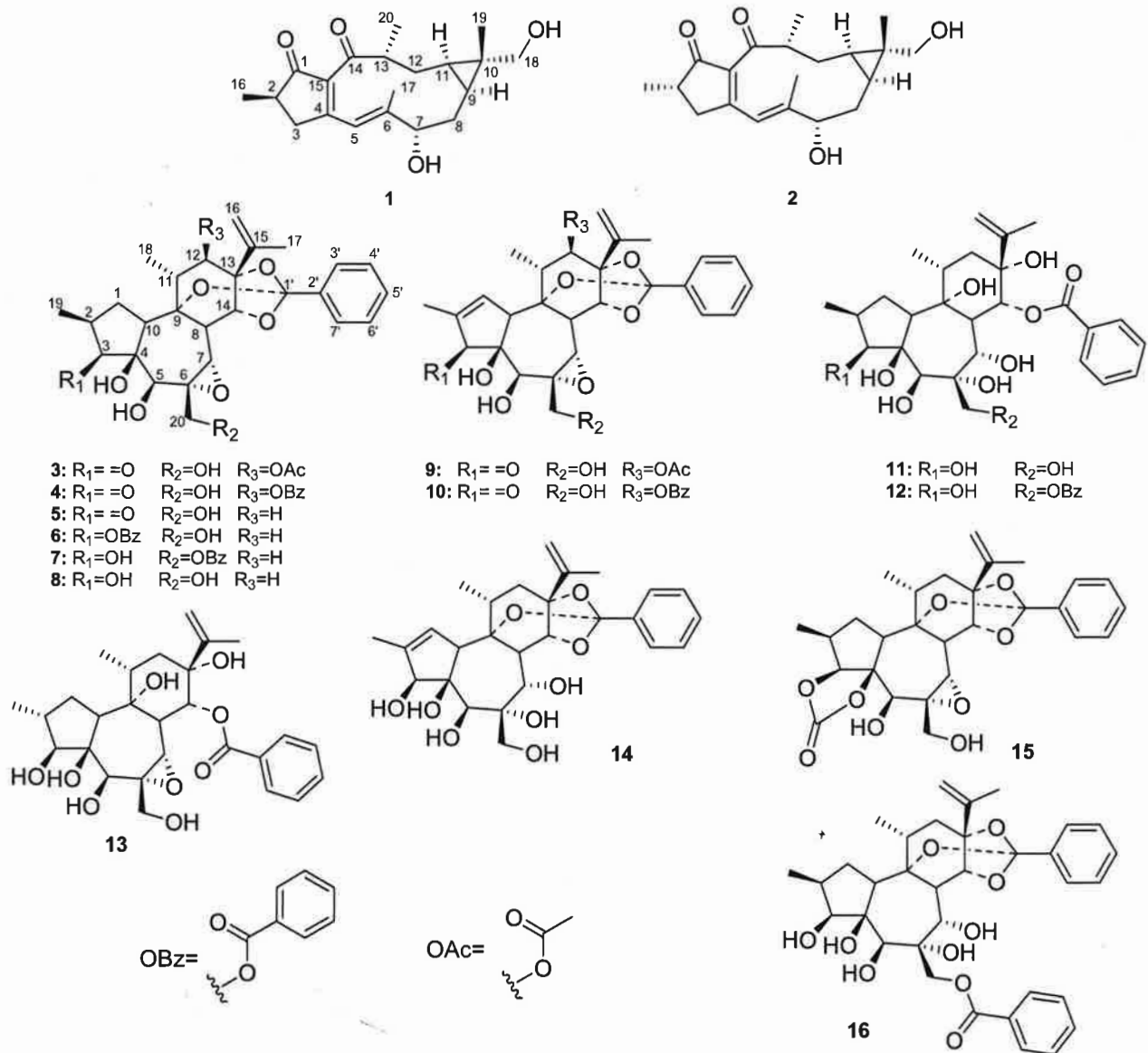


그림 27. Chemical structures of two new compounds, genkwalathin A (1) 과 B (2), and the known daphnane-type diterpene compounds (3 - 16) isolated from the dried flower of *D. genkwa*

표 13.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR data for DGF-1 (1) and DGF-2 (2) measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .<sup>a</sup>

Position	1		2	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	213.4	-	213.4	-
2	41.4	2.59 (m)	41.7	2.59 (m)
3	37.6	Ha 2.92 (ddd, 18.6, 6.6, 2.7) Hb 2.52 (dt, 18.6, 2.7)	37.8	Ha 3.20 (ddd, 18.7, 6.7, 2.6) Hb 2.28 (dt, 18.8, 2.6)
4	169.9	-	169.9	-
5	115.3	5.92 (m)	115.3	5.91 (m)
6	149.2	-	149.2	-
7	74.2	4.47 (t, 3.0)	74.3	4.47 (t, 3.0)
8	32.0	Ha 2.00 (dd, 14.5, 4.1) Hb 1.32 (ddd, 14.3, 11.2, 2.9)	32.1	Ha 2.00 (dd, 14.4, 4.0) Hb 1.33 (ddd, 14.3, 11.2, 2.9)
9	19.4	0.91 (br t, 10.4)	19.5	0.91 (br t, 10.4)
10	24.5	-	24.5	-
11	21.4	0.66 (td, 9.3, 4.7)	21.4	0.66 (td, 9.2, 4.7)
12	28.1	Ha 1.85 (ddd, 14.6, 9.8, 4.7) Hb 1.36 (ddd, 14.4, 9.6, 4.5)	28.1	Ha 1.85 (ddd, 9.8, 8.0, 4.7) Hb 1.37 (ddd, 14.6, 9.3, 4.6)
13	44.6	3.31 (overlapped)	44.7	3.29 (m)
14	211.9	-	211.9	-
15	141.6	-	141.6	-
16	16.6	1.21 (d, 7.4)	16.8	1.23 (d, 7.5)
17	17.7	1.63 (d, 1.2)	17.6	1.63 (d, 1.2)
18	74.0	Ha 3.28 (d, 11.0) Hb 3.24 (d, 11.0)	74.0	Ha 3.28 (d, 11.0) Hb 3.24 (d, 11.0)
19	11.5	0.94 (s)	11.5	0.94 (s)
20	18.4	1.04 (d, 7.0)	18.3	1.04 (d, 7.0)

<sup>a</sup> 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ .

5). 분리된 화합물의 in vitro 활성

가) Nurr1 활성화 활성

(1) 팔꽃나무 줄기 뿌리에서 분리한 성분

팔꽃나무 줄기 뿌리에서 분리한 다프난 및 포블 다이테펜 화합물의 농도에 따른 Nurr1 단백질 활성도를 루시퍼라제 분석을 통하여 positive control로 amodiaquine (AQ)를 사용하여 조사하였다.<sup>15</sup>

분석 결과, 하기 표 14과 같이, prostratin Q, yuanhuadine, 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate은 0.03 μM의 저농도에서도 Nurr1을 유의적으로 활성화시켰으며, M에서 유의적으로 Nurr1를 활성화시킴을 확인하였다. 또한, acutilonine F, wikstroemia factor M1 및 yuanhuatine은 각각 1, 0.2 및 0.3 μ에서 유의적으로 Nurr1를 활성화시켰다. 이를 통해, 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물에서 분리된 화합물들이 Nurr1을 활성화시킴과 동시에, 화합물의 구조에 따라 활성이 상이할 수 있음을 알 수 있었다. 특히, prostratin Q, yuanhuadine, 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate 화합물은 amodiaquine (AQ) 보다 300배 강한 Nurr1 단백질 활성화 활성을 보였다.

표 14. 팔꽃나무 줄기 뿌리에서 분리한 다프난 및 포블 다이테펜 화합물의 Nurr1 활성화 활성

농도 (μM)	AQ (양성 대조군)	Acutilonine F	Wikstroemia factor M1	Prostratin Q	Yuanhuadine	Yuanhuatine	12-O-n-Deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate
0.003	-	-	-	1.23±0.09	1.03±0.15	-	-
0.01	-	-	-	1.35±0.28	0.94±0.04	-	-
0.03	-	1.28±0.18	1.4±0.18	*1.47±0.17	*1.63±0.18	1.17±0.22	*1.42±0.15
0.1	-	1.16±0.16	**1.29±0.04	*1.42±0.14	**1.68±0.11	1.28±0.35	*1.68±0.43
0.3	-	1.32±0.13	*1.33±0.06	*1.65±0.2	**1.62±0.11	**1.59±0.08	*1.82±0.51
1	0.8±0.03	*1.76±0.08	*1.62±0.21	**1.47±0.02	*1.67±0.32	*2.12±0.37	**1.53±0.07
5	1.1±0.15	-	-	-	-	-	-
10	**1.6±0.03	-	-	-	-	-	-
20	**2.7±0.37	-	-	-	-	-	-

2) 팔꽃나무 꽃에서 분리한 성분

팔꽃나무 꽃에서 분리한 다프난 다이터펜 화합물의 농도에 따른 Nurr1 단백질 활성도를 루시퍼라제 분석을 통하여 positive control로 amodiaquine (AQ)를 사용하여 조사하였다.

분석 결과, 하기 15 표과 같이, yuanhuafine 화합물은 0.01 $\mu$ M의 저농도에서도 2배 Nurr1을 활성화시켜, DGH-2 화합물보다 10배 낮은 농도에서도 Nurr1를 활성화시켰다. yuanhuapine, 1, 2 $\alpha$ -dihydrodaphnetoxin, genkwadaphnine 이 DGH-2 처럼 0.1  $\mu$ M농도에서 약 2 배의 Nurr1을 활성화시켰음. 그러나, genkwanine I, genkwanin O 은 10  $\mu$ M농도에서도 Nurr1을 활성화를 효과적으로 활성화 시키지 못하여, 팔꽃나무 꽃 추출물에서 분리된 화합물들이 Nurr1을 활성화시킴과 동시에, 화합물의 구조에 따라 활성이 상이할 수 있음을 알 수 있었다.

표 15. 팔꽃나무 꽃에서 분리한 다프난 다이터펜 화합물의 Nurr1 활성화 활성

농도 ( $\mu$ M)	AQ	1*	2	3	5	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	DGH-2
0.01	-	-	-	1.0	-	-	1.0	2.1	-	-	-	-	-	-	-	1.1
0.1	-	-	-	1.8	1.7	1.0	1.5	2.2	1.7	-	0.9	-	1.2	-	1.2	2.6
1	-	0.7	0.7	2.4	2.4	1.4	1.7	1.9	2.0	1.3	1.2	1.0	2.6	1.8	1.4	2.2
5	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	0.7	0.7	-	1.5	1.7	-	-	1.6	1.1	1.9	1.3	2.0	1.9	1.4	-
20	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	0.5	0.6	-	-	-	-	-	-	0.9	-	1.4	-	1.1	-	-

\*Genkwalathin A (1), Genkwalathin B (2), yuanhuapine (3), 1, 2 $\alpha$ -dihydrodaphnetoxin (5), genkwanine M (7), orthobenzoate 2 (8), yuanhuafine (9), genkwadaphnine (10), genkwanine I (11), genkwanin K (12), genkwanin O (13), genkwanin A (14), genkwanin I (15), genkwanine H (16), DGH-2 (yuanhuacin).

나). 마이크로글리아 BV-2 세포에서 염증 억제 활성

(1) 팔꽃나무 줄기 뿌리에서 분리한 성분

Nurr-1은 도파민 신경세포의 분화, 기능에도 중요한 역할을 하지만, 항염증활성도 가져서 염증에 의한 신경세포 사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. 마이크로글리아 세포 (microglia cell)에서 염증반응에 의한 뇌신경세포의 사멸은 치매, 파킨슨 병과 같은 퇴행성 뇌질환의 주요한 원인중의 하나로 보고되어 있다 (Sarkar S et al., Neurotoxicology, 44, 250-262 (2014); Bower JH et al., Neurology, 67, 494-496 (2006)). 이에 따라, 마이크로글리아에서의 대표적인 염증인자인 IL-1b, IL-6 및 TNF $\alpha$ 에 대한 화합물의 생성억제활성을 조사하였다. 마이크로글리아 BV-2 세포를 96 웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  세포/웰로 넣고, LPS (1 mg/mL)를 화합물과 함께 5시간 배양하였다. 각 웰에서 세포를 회수하여 웨스턴 블롯팅과 real-time PCR 을 실시하였다.

구체적으로, IL-1b 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯팅으로 조사하였다. 1차 항체로 rabbit anti-IL-1b [Cell Signaling (Danvers, MA, USA); 1:1000]를 사용하였고, control로 mouse anti-actin (Sigma 1:5000)을 사용하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 또는 anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody (Amersham, Piscataway, NY, USA)를 사용하였고, enhanced-chemiluminescent substrate (Amersham)로 발색하여 관찰하였다.

또한, IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$  의 mRNA 발현량을 Real-time quantitative PCR 로 분석하였다. 모든 쥐의 사이토카인과 GAPDH의 프라이머는 Invitrogen에서 구입하였고, 사이토카인 mRNA 발현량을 GAPDH mRNA 발현량으로 정규화(normalized)하여 구하였다.

웨스턴 블롯팅 및 PCR 수행 결과, 그림 28A 및 B와 같이, 모든 화합물의 투여군에서 IL-1b의 발현량이 감소함을 확인하였다. 또한, PCR 수행 결과, 그림 28C 및 D와 같이, 모든 화합물의 투여군에서 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 발현량 역시 감소함을 확인하였다.

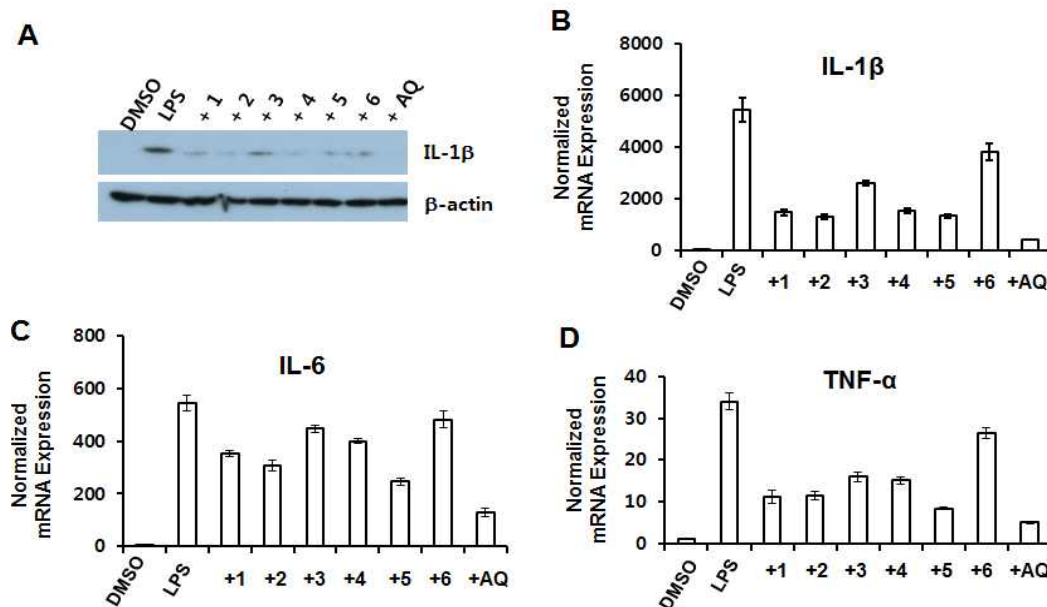


그림 28. Effect of compounds 1 - 7 on the LPS-induced expression of pro-inflammatory cytokines in microglial BV-2 cells. Western blotting analysis (A) of IL-1 $\beta$  and real time-PCR analysis (B, C, and D) of IL-1b, IL-6, and TNF- $\alpha$  mRNA in LPS-induced BV-2 cells with or without compounds 1 - 7 at 3 uM and AQ (amodiaquine) at 20 uM. Yuanhuacin (1), acutilonine F (2), wikstroemia factor M<sub>1</sub>(3), prostratin Q (4), yuanhuadine (5), and yuanhuatine (6), 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate (7).

마이크로글리아에서 대표적인 염증인자인 산화 질소(nitric oxide, NO)의 생성억제 활성을 조사하였다. 마이크로글리아 BV-2 세포를 96 웰 플레이트에  $5 \times 10^4$  세포/웰로 넣고, 2일 배양한 다음, LPS (1 mg/mL)를 상기 실시예 2에서 분리한 화합물과 함께 24시간 배양하였다. 배양 상등액을 Griess 시약을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 아질산염(nitrite)를 정량함으로써 산화질소의 생성량을 조사하였다. 양성대조군으로는 Minocycline을 사용하였다.

조사 결과, 하기 표16 과 같이, 모든 화합물들이 1.03 - 3.73  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub>의 가지며 낮은 농도에서 산화질소의 생성을 저해하였고, minocycline 보다 10 - 30 배 강한 저해활성을 보였다. 특히, Yuanhuacin (1), prostratin Q (4), yuanhuadine (5), 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate (7)이 가장 강한 저해활성을 보였는데, 이는 Nurr1 활성화 활성과 일치하였다.

표 16. Effect of 1 - 7 on NO production by LPS-activated microglial BV2 cells.

	1	2	3	4	5	6	7	AQ <sup>a</sup>	MC <sup>b</sup>
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	1.24	3.49	2.3	1.8	1.03	3.73	1.78	> 10	29.9

Yuanhuacin (1), acutilonine F (2), wikstroemia factor M<sub>1</sub>(3), prostratin Q (4), yuanhuadine (5), and yuanhuatine (6), 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate (7).

<sup>a</sup> Amodiaquine showed cytotoxicity at 10 mM.

<sup>b</sup> Minocycline as a positive anti-neuroinflammatory agent.

## (2) 팔꽃나무 꽃 추출물에서 분리한 성분

마이크로글리아에서 대표적인 염증인자인 산화 질소(nitric oxide, NO)의 생성 억제 활성을 상기와 같은 방법으로 조사하였다.

조사 결과, 하기 표 17 과 같이, 모든 화합물들이 산화질소의 생성을 저해함을 확인하였다. 특히, genkwadaphnine 과 genkwanine N 은 각각 0.06, 0.09  $\mu$ M의 매우 낮은 농도에서 산화질소 생성의 저해 활성을 나타냄을 확인하였다. 홍미류계도 다프난 다이터펜 화합물중에서 genkwanine I, genkwanin O의 산화질소 생성 저해활성이 가장 낮는데 이는 Nurr1 활성 활성화 활성결과와 일치하여 Nurr1 활성화 활성과 산화질소 생성억제 활성이 상관관계가 있음을 보여 주었다.

표 17. Effects of diterpenes isolated from *D. Genkwa* on LPS-induced NO production in microglial BV-2 cells (Mean  $\pm$  SEM).

Compounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Compounds	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Minocycline <sup>a</sup>	21.28 $\pm$ 0.48	9	0.37 $\pm$ 0.15
1 <sup>b</sup>	43.08 $\pm$ 3.39	10	0.06 $\pm$ 0.02
2	46.77 $\pm$ 2.00	11	73.79 $\pm$ 4.58
3	0.25 $\pm$ 0.06	12	4.67 $\pm$ 3.10
4	0.44 $\pm$ 0.08	13	27.61 $\pm$ 1.39
5	1.60 $\pm$ 0.37	14	3.41 $\pm$ 0.99
6	0.09 $\pm$ 0.01	15	7.79 $\pm$ 0.91
7	0.18 $\pm$ 0.04	16	1.06 $\pm$ 0.12
8	1.22 $\pm$ 0.13		

<sup>a</sup> Positive control. <sup>b</sup>Genkwalathin A (1), Genkwalathin B (2), yuanhuapine (3), yuanhuatine (4), 1, 2 $\alpha$ -dihydrodaphnetoxin (5), genkwanine N (6), genkwanine M (7), orthobenzoate 2 (8), yuanhuafine (9), genkwadaphnine (10), genkwanine I (11), genkwanin K (12), genkwanin O (13), genkwanin A (14), genkwanin I (15), genkwanine H (16), DGH-2 (yuanhuacin).

## 6) 병아리꽃나무의 유효성분 분석

### 가) 병아리꽃나무 식물 대량 확보

경기도 용인에 위치하는 한택식물원으로부터 20년생 병아리꽃나무 (*Rhodotypes scandens*) 가지를 구입하였음. 줄기만 그늘에서 건조한 다음 5 - 10cm 크기로 잘랐음 (그림 29).



그림 29. Cutted stems of *Rhodotypes scandens*.

### ***R. scandens* stem (13.1 kg)**

**MeOH ext (440.8 g)**

**EtOAc ext (29.6 g)**

SiO<sub>2</sub> C.C., CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 50:1 - 1:2

**Active Fr. (fr. 5)**

SiO<sub>2</sub> C.C., CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:1 - 1:1

**Active Fr. (fr. 16 - 18)**

SiO<sub>2</sub> TLC, CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 30:1

**Active Band (Band-(5+6)) (40 mg)**

ODS TLC, MeOH:H<sub>2</sub>O = 10:1

<b>RSE-1</b> (6.1 mg)	<b>RSE-2</b> (7.0 mg)	<b>RSE-3</b> (8.5 mg)	<b>RSE-4</b> (5.3 mg)
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

그림 31. Isolation of active compounds from stem portion of *Rhodotypes scandens*.

### 나) 유효성분의 분리 정제

병아리꽃나무의 건조된 줄기 13 kg를 메탄올로 48시간, 24시간 씩 두 번 추출한 다음, 감압 농축하여 메탄올을 제거하여 440.8 g의 crude extract를 얻었음. 이렇게 얻은 crude extract를 1.5L 물에 혼탁한 뒤 n-Hexane, ethyl acetate로 순차적으로 추출하여 EtOAc ext. 29.6g을 얻었음. 유효성분이 EtOAc ext.에 있는 것으로 확인되었기 때문에, EtOAc ext.에 대한 silica gel column chromatography를 수행하였음 (그림 31). CHCl<sub>3</sub>:MeOH 혼합 용매를 50:1에서 1:2로 순차적으로 용출하여 68개의 fraction 를 얻었음. 이중 활성이 있는 fr. 5를 다시 silica gel column를 CHCl<sub>3</sub>:MeOH 혼합 용매를 100:1에서 1:1로 순차적으로 용출하여 42개의 fraction 를 얻었음. 이중 활성이 있는 fr 16, 17, 18을 silica gel TLC로 분리 정제하였음. CHCl<sub>3</sub>:MeOH= 30:1를 전개 용매로 하여 11 band를 얻었으며, 이중 band 5 와 6에서 활성이 확인 되었음. 활성 band (band-(5+6))를 최종적으로 MeOH:water = 10:1를 용매로 하여 ODS TLC를 수행한 결과,  $R_f = 0.81, 0.74, 0.62, 0.37$ 에서 각각 4개의 화합물 RSE-1, RSE-2, RSE-3, RSE-4 화합물을 분리하였음.

다) 화학구조 규명.

RSE-1의 화학구조를 규명하기 위하여

CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub>를 용매로하여 <sup>1</sup>H 과 <sup>13</sup>C-NMR를 측정하였다 (그림 31, 32). <sup>1</sup>H-NMR에서 6개의 singlet methyl기와 1개의 doublet methyl, 1.5 - 2.5 사이의 8개의 methylene의 signal이 관측되어 triterpenoid계열임을 시사하였음. <sup>13</sup>C-NMR과 HMQC 에서는 174.4, 181.9, 183.1 ppm에서 3개의 carbonyl carbon, 128.7ppm의 olefinic carbon, 72.6 ppm의 oxygenated sp<sup>3</sup> quaternary carbon, 7개의 methyl carbon, 8개의 methylene carbon등이 관찰되어 triterpenoid 화합물중 cecropiacic acid 물질과 매우 유사하였다. HMBC에서 2.45 와 2.29ppm 의

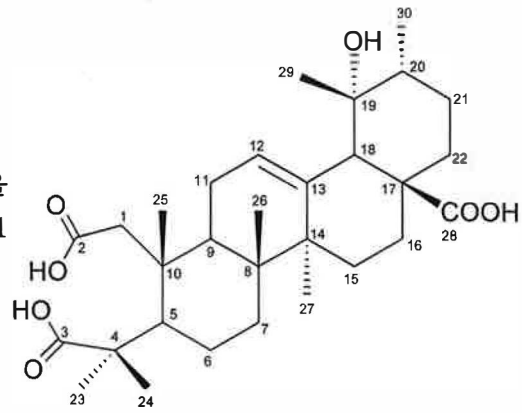


그림 30. Structure of compound RSE-1

methylene proton(H2-2)에서 174.4ppm의 carbonyl carbon (Cecropiacic acid). (C-1), 1.14ppm (H3-24)과 1.22ppm (H3-23) 의 methyl protons에서 183.1ppm의 carbonyl carbon (C-3)로의 long range coupling이 관측되었고, 1.09ppm (H3-29)과 0.84ppm (H3-30) 의 methyl protons에서 72.6ppm의 sp<sup>3</sup> quaternary carbon (C-19)로의 long range coupling이 관측되어 cecropiacic acid 물질과 유사하였다. RSE-1의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR data (표 8)는 문헌에 보고된 cecropiacic acid의 NMR data (J. Nat. Prod. 52 (1):52-56, 1989)와 일치하였다. 또한 ESI-MS에서도 m/z 517 (M-H)<sup>-</sup>, m/z 541 (M+Na)<sup>+</sup>이 관측되어, RSE-1 화합물은 분자식 C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub> 분자량 518의 cecropiacic acid 로 동정하였음 (그림 30). 본 연구에서 cecropiacic acid 는 병아리꽃나무에서 처음으로 분리되었다.

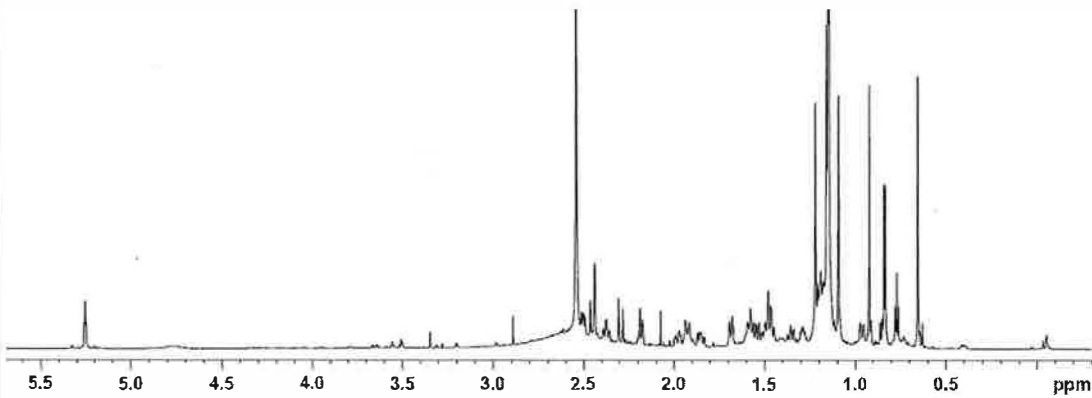


그림 31. <sup>1</sup>H -NMR spectrum of compound RSE-1 (800 MHz, CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub>).

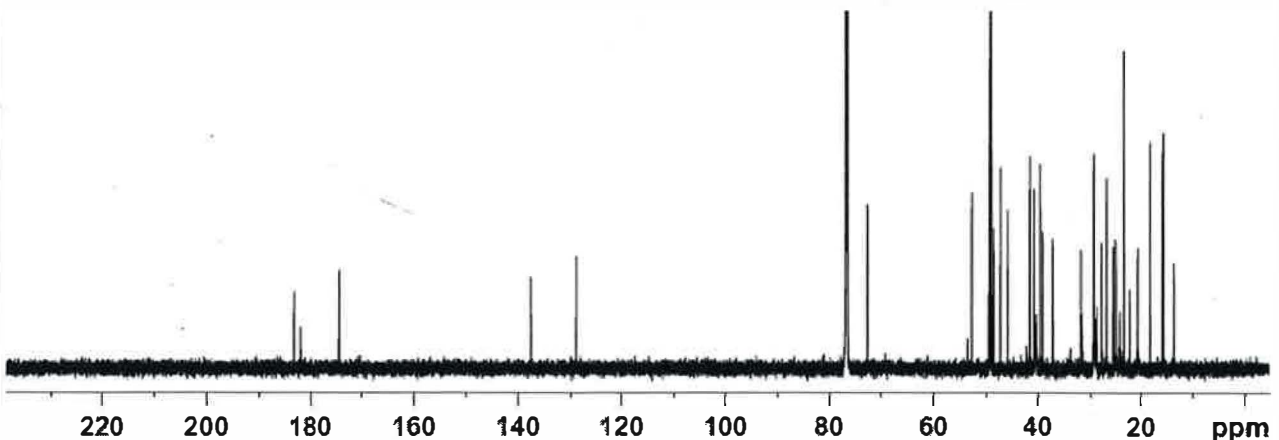


그림 32. <sup>13</sup>C -NMR spectrum of compound RSE-1 (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub>).



RSE-2의 화학구조를 규명하기 위하여  $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ 를 용매로하여  $^1\text{H}$  과  $^{13}\text{C}$ -NMR를 측정하였다 (그림 33, 34).  $^1\text{H}$ -NMR 와  $^{13}\text{C}$ -NMR 에서 RSE-1 과 비슷하였다. 차이점은 3.59 ppm의 O-methyl (3-OMe)이 더 관측되었다. O-methyl의 위치를 확인하기 위하여 HMBC를 측정한 결과, 3.59 ppm의 O-methyl 의 proton이 180.9 ppm의 carbonyl carbon (C-3)과 long range coupling이 관측되었고, 1.19ppm (H3-24)과 1.21ppm (H3-23) 의 methyl protons에서 C-3로의 long range coupling이 관측되었고, 나머지 부분은 RSE-1과 일치하여, RSE-1 화합물은 C-3의 carboxylic 그룹이 methylation 된 물질 즉, cecropiatic acid 3-methyl ester 임을 알수 있었다.

RSE-2의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR data (표 18)는 문헌에 보고된 cecropiatic acid 3-methyl ester의 NMR data (Chemistry & Biodiversity 4: 17-24, 2007)와 잘 일치하였다. 또한 ESI-MS에서도  $m/z$  531 ( $\text{M}-\text{H}^-$ ),  $m/z$  555 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ )이 관측되어, RSE-2 화합물은 분자식  $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_7$  분자량 532의 cecropiatic acid 3-methyl ester로 동정하였음. 본 연구에서 cecropiatic acid 3-methyl ester 는 병아리꽃나무에서 처음으로 분리되었다.

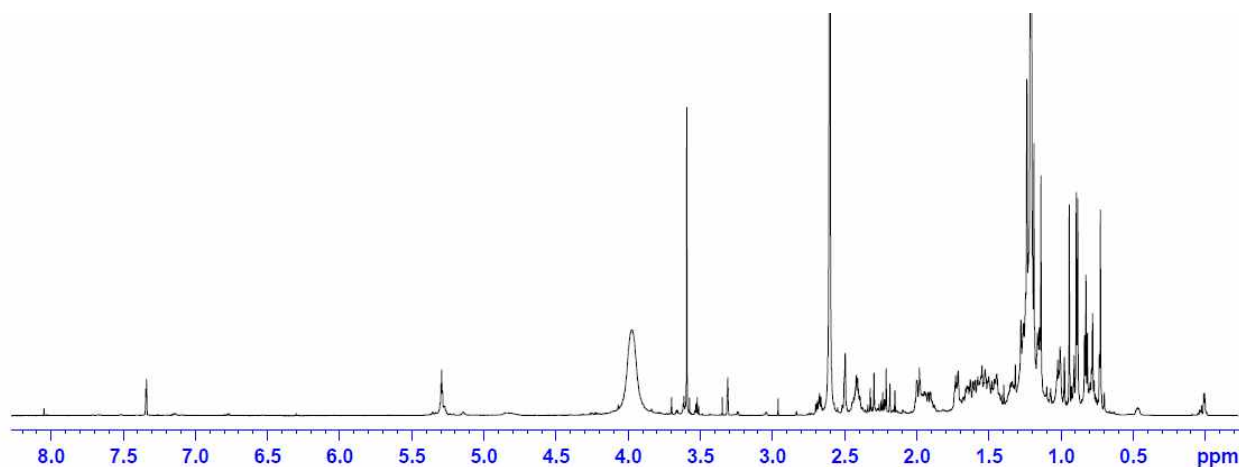


그림 33.  $^1\text{H}$  -NMR spectrum of compound RSE-2 (700 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ).

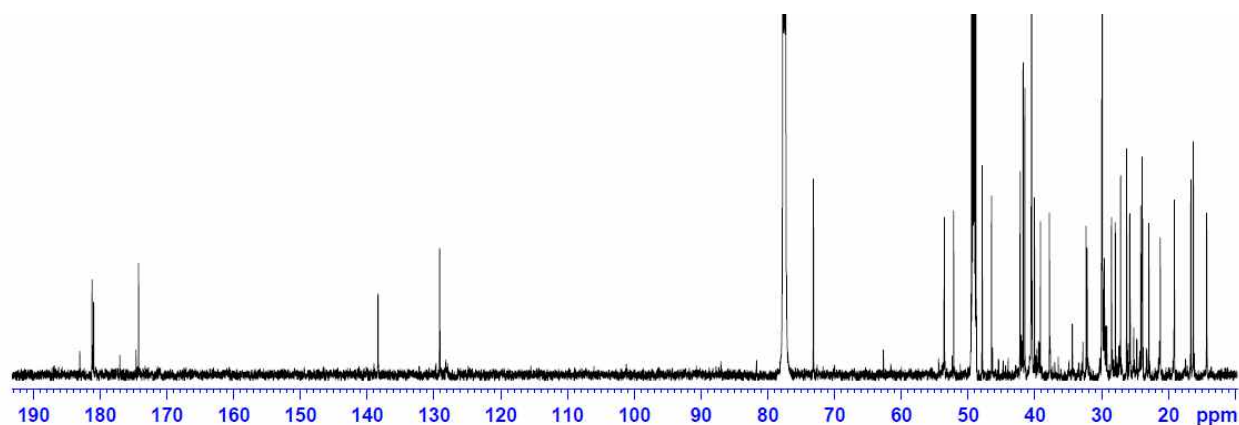


그림 34.  $^{13}\text{C}$  -NMR spectrum of compound RSE-2 (175 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ).

표 18. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds RSE-1 and RSE-2.

Position	RSE-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ )		RSE-2 ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (H, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}$ (H, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	2.29 (1H, d, 17.6), 2.45 (1H, d, 17.6)	41.6	2.20 (1H, d, 18.2), 2.31 (1H, d, 18.2)	42.1
2		174.4		174.2
3		183.1		180.9
3-OMe			3.59 (3H, s)	52.1
4		45.9		46.5
5	2.18 (1H, m)	48.5	2.40 (1H, m)	48.9
6	1.34 (1H, m), 1.48 (1H, m)	20.7	1.45 (2H, m)	21.2
7	1.19 (1H, m) 1.46 (1H, m)	31.6	1.55 (2H, m)	32.3
8		39.4		40.1
9	2.51 (1H, dd, 11.2, 6.4)	38.9	2.64 (1H, m)	39.2
10		41.5		41.7
11	1.85 (1H, m) 1.98 (1H, m)	23.4	1.93 (1H, m)	24.2
12	5.23 (1H, t, 3.2)	128.7	5.29 (1H, m)	129.1
13		137.4		138.3
14		41.6		42.2
15	0.96 (1H, m), 1.58 (1H, m)	27.8	1.01 (1H, m), 1.67 (1H, m)	28.6
16	1.47 (1H, m), 2.38 (1H, m)	25.1	2.42 (2H, m)	25.8
17		47.2		47.9
18	2.44 (1H, s)	52.6	2.50 (1H, s)	53.6
19		72.6		73.1
20	1.29 (H, m)	40.7	1.35 (H, m)	41.5
21	1.18 (1H, m), 1.59 (1H, m)	25.5	1.21 (1H, m), 1.62 (1H, m)	26.2
22	1.53 (1H, m), 1.68 (1H, m)	37.0	1.49 (1H, m), 1.70 (1H, m)	37.8
23	1.22 (3H, s)	26.8	1.21 (3H, s)	27.9
24	1.14 (3H, s)	24.2	1.19 (3H, s)	23.9
25	0.92 (3H, s)	18.3	0.95 (3H, s)	19.1
26	0.66 (3H, s)	15.9	0.73 (3H, s)	16.6
27	1.16 (3H, s)	23.5	1.23 (3H, s)	23.8
28		181.9		181.2
29	1.09 (3H, s)	26.7	1.14 (3H, s)	26.2
30	0.84 (3H, d, 6.4)	15.7	0.89 (3H, d, 6.3)	16.2

Assignments were done by  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, and HMBC experiments.

RSE-3의 화학구조를 규명하기 위하여  $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ 를 용매로하여  $^1\text{H}$  과  $^{13}\text{C}$ -NMR를 측정하였다 (그림 35, 36).  $^1\text{H}$ -NMR 와  $^{13}\text{C}$ -NMR 에서 RSE-1과 비슷하였다. 차이점은 2개의 carboxyl carbon과 1개의 methylene이 사라진 대신에 6.31ppm의 olefin methine, 144.6ppm의  $sp^2$  quaternary carbon, 202.4 ppm의 ketone carbonyl carbon이 새로이 관측되었다. 6.31ppm의 olefin methine의 위치를 확인하기 위하여 HMBC를 측정한 결과, 6.31ppm의 olefin methine proton (H-1)이 144.6ppm의  $sp^2$  quaternary carbon (C-2), 202.4 ppm의 ketone carbonyl carbon (C-3)과 long range coupling이 관측되었고, 1.08ppm (H3-24)과 1.17ppm (H3-23) 의 methyl protons에서 C-3로의 long range coupling이 관측되었고, 나머지 부분은 RSE-1과 일치하여, RSE-3 화합물은 fupenzic acid임을 알수 있었다. 문헌에 보고된 fupenzic acid (Phytochemistry 27: 3975-3976, 1988)의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR data과 RSE-3의 NMR data (표 19)와 일치하였다. 또한 ESI-MS에서도  $m/z$  483 ( $\text{M}-\text{H}^-$ ),  $m/z$  507 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ )이 관측되어, RSE-3 화합물은 분자식  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$  분자량 532의 fupenzic acid로 동정하였음. 본 연구에서 fupenzic acid 는 병아리꽃나무에서 처음으로 분리되었다.

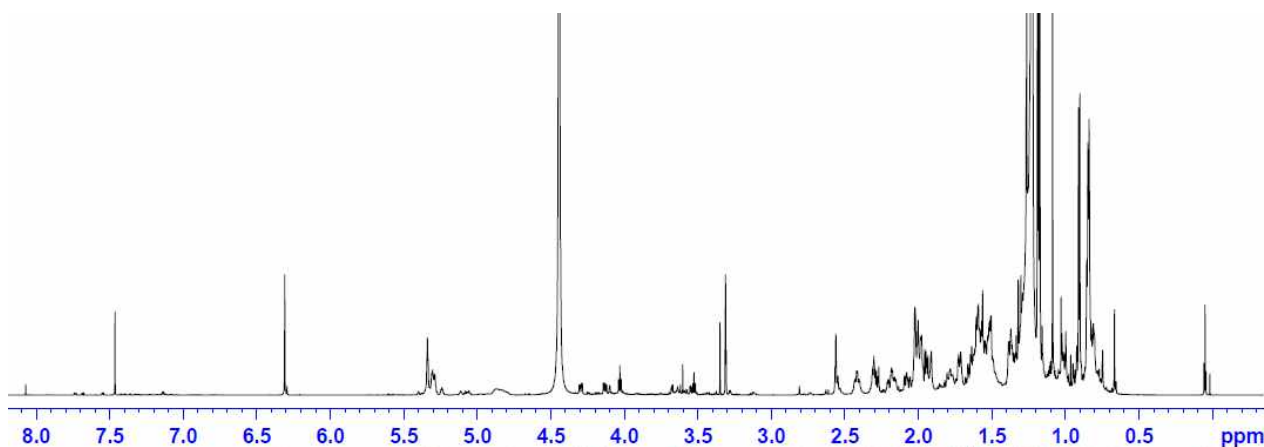


그림 35.  $^1\text{H}$  -NMR spectrum of compound RSE-3 (800 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ).

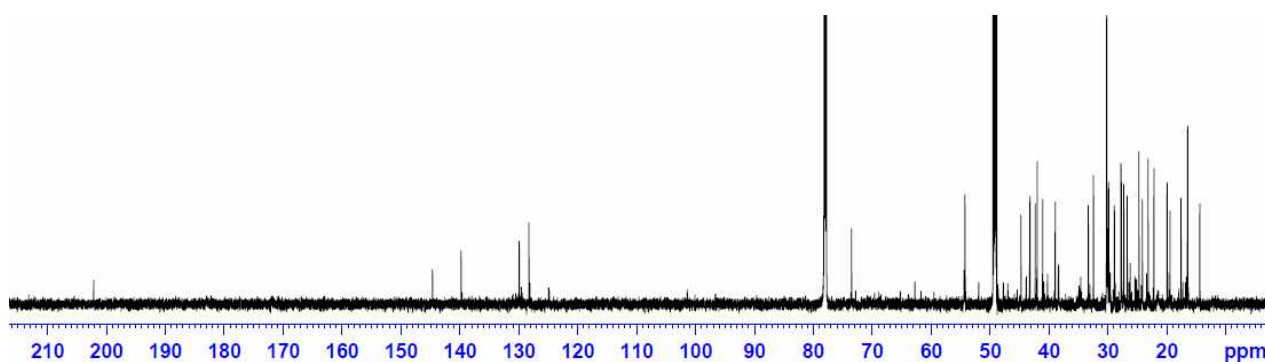


그림 36.  $^{13}\text{C}$  -NMR spectrum of compound RSE-3 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ).

RSE-4의 화학구조를 규명하기 위하여 DMSO-*d*<sub>6</sub>를 용매로하여 <sup>1</sup>H 과 <sup>13</sup>C-NMR를 측정하였다 (그림 37, 38). <sup>1</sup>H-NMR에서 5개의 singlet methyl기와 2개의 doublet methyl, 3.03ppm의 double doublet (*J*= 10.3, 4.9 Hz)의 broad한 signal이 관측에서 triterpenoid계열임을 시사하였음. <sup>13</sup>C-NMR과 HMQC 에서는 178.7ppm에서 carbonyl carbon, 125.0ppm의 olefinic carbon, 77.3ppm의 oxygenated methine carbon, 7개의 methyl carbon, 8개의 methylene carbon등이 관찰되어 triterpenoid 화합물중 ursolic acid물질과 매우 유사하였다. 문헌에 보고된 ursolic acid (Molecules 13:2482-2487, 2008)의 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR data과 RSE 4-3-4의 NMR data (표19)와 비교한 결과 잘 일치하였다. 또한 ESI-MS에서도 *m/z* 455.4 (M-H)<sup>-</sup>, *m/z* 457.5 (M+H)<sup>+</sup>이 관측되었고, MS/MS 실험에서 *m/z* 411 [456-COOH]<sup>+</sup>, *m/z* 439 [456-OH]<sup>+</sup>이 관측되어, RSE 4-3-4 화합물은 분자식 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> 분자량 456.7의 ursolic acid로 동정하였음. 본 연구에서 ursolic acid는 병아리꽃나무에서 처음으로 분리되었다.

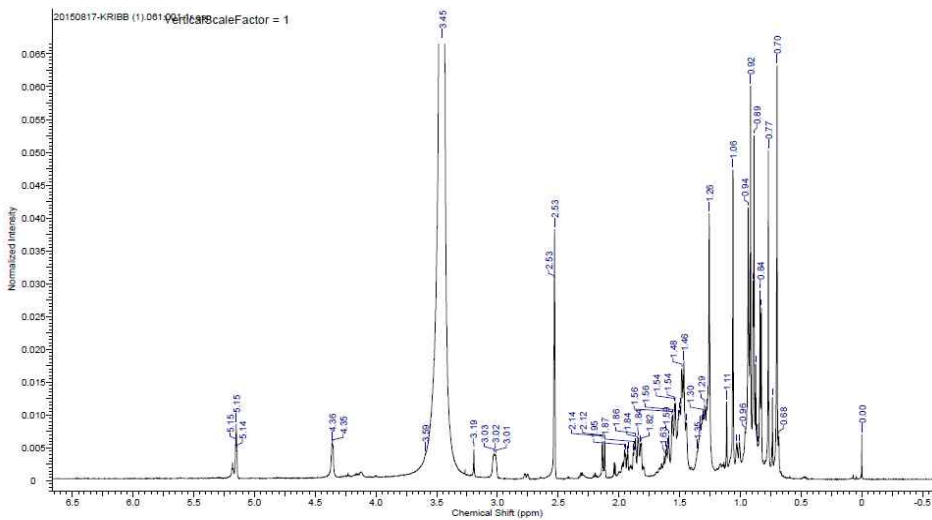


그림 37. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound RSE-4 (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

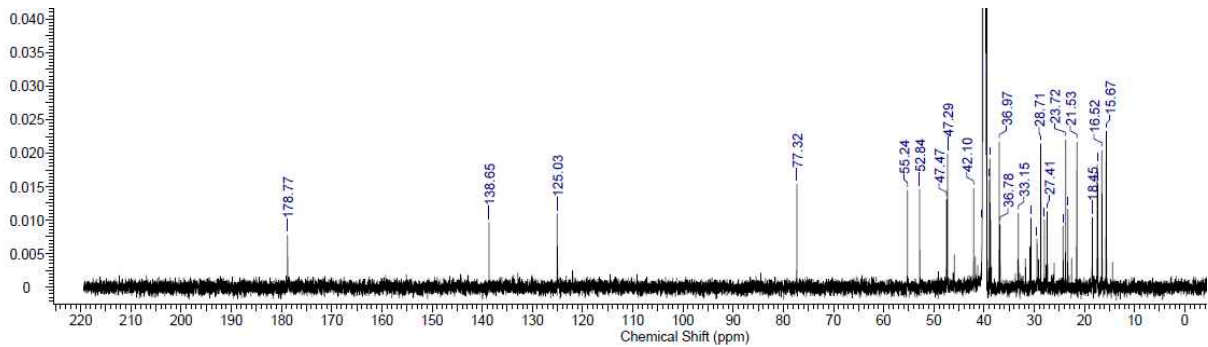


그림 38. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound RSE-4 (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

㉔ 19. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds RSE-3 and RSE-4.

Position	RSE-3 ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ )		RSE-4 ( $\text{DMSO}-d_6$ )	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (H, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}$ (H, mult, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	6.31 (1H, s)	129.9	1.60 (2H, m)	38.69
2		144.6	1.44 (2H, m)	27.41
3		202.4	3.03 (1H, dd, 10.3, 4.9)	77.32
4		44.7		38.83
5	1.60 (1H, m)	54.2	0.68 (1H, s)	55.24
6	1.51 (1H, m)	19.4	1.46 (1H, m, H-6a) 1.29 (1H, m, H-6b)	18.45
7	1.38 (1H, m) 1.58 (1H, m)	33.3	1.27 (2H, m)	33.15
8		40.9		39.54
9	1.92 (1H, m)	43.2	1.58 (1H, s)	47.46
10		38.9		36.97
11	2.09 (1H, m) 2.17 (1H, m)	24.2	1.92 (2H, dd, 4.14, 13.3)	24.25
12	5.33 (1H, m)	128.3	5.15 (1H, t, 3.1)	125.03
13		139.7		138.65
14		42.3		42.10
15	1.01 (1H, m), 1.78 (1H, m)	28.9	1.01 (2H, m)	27.98
16	1.54 (1H, m), 2.41 (1H, m)	26.2	1.53 (2H, m)	23.29
17		48.5		47.29
18	2.56 (1H, s)	54.4	2.13 (1H, d, 11.2)	52.84
19		73.5	1.31 (1H, m)	38.89
20	1.37 (H, m)	42.0	1.49 (H, m)	38.95
21	1.66 (1H, m)	26.7	1.29 (2H, m)	30.63
22	1.61 (1H, m), 1.72 (1H, m)	38.3	1.55 (2H, m)	36.78
23	1.17 (3H, s)	27.7	0.91 (3H, s)	28.71
24	1.08 (3H, s)	22.1	0.76 (3H, s)	17.37
25	1.19 (3H, s)	19.9	0.69 (3H, s)	16.52
26	0.84 (3H, s)	17.6	0.88 (3H, s)	15.67
27	1.26 (3H, s)	24.7	1.06 (3H, s)	23.72
28		183.0		178.77
29	1.18 (3H, s)	27.2	0.83 (3H d, 6.4)	17.46
30	0.90 (3H, d, 6.4)	16.5	0.93 (3H, d, 11.7)	21.53

Assignments were done by  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, and HMBC experiments.

라) Nurr-1 활성화

활성 band (Band-(5+6))로 부터 분리된 4 개 화합물 RSE-1, RSE-2, RSE-3, RSE-4의 Nurr-1 활성화 활성을 Band-(5+6)와 비교하여 조사하였다(제 2세부 과제 수행). 매우 흥미롭게도, 활성 band (Band-(5+6))는 2 µg/mL에서도 DMSO만 처리한 control에 비해 1.5배의 Nurr-1 활성화 활성을 보인 반면, 4개 화합물 모두 50 µg/mL에서도 Nurr-1 활성화 활성을 나타내지 않았다 (그림 39). 즉, 분리전의 mixture 상태에서는 활성을 보였으나, 단일 물질로 분리된 상태에서는 활성을 나타내지 않았다. 그러한 현상은 천연물에서 종종 보이는 현상으로서, 본 추출물도 여러 물질의 synergy 효과로 활성을 보이는 것으로 추정되며, 이에 대한 자세한 기전을 조사중에 있다.

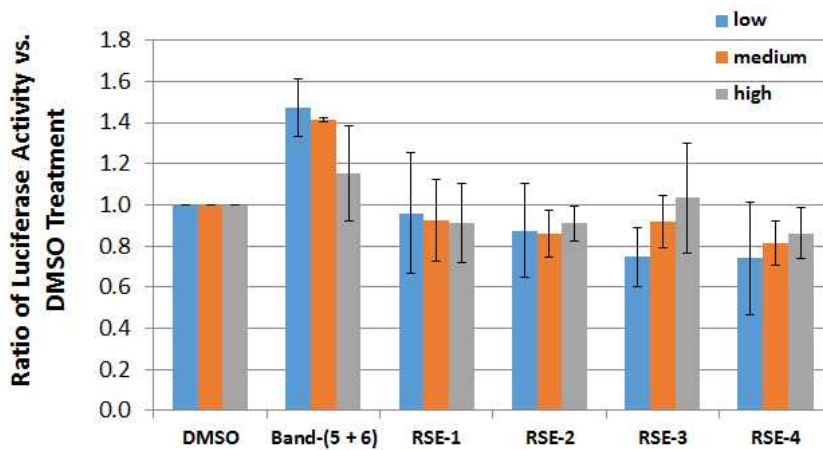


그림 39. Nurr-1-activating activity. Band-(5+6) was treated at 2, 10, 50 µg/mL. Compounds RSE-1,2,3,and4 were treated at 0.5, 5, 50 µg/mL.

7). 병아리 꽃나무 추출물의 안전성평가

1차년도에 경기도 용인에 위치하는 한택식물원으로부터 봄 (5월22일) 과 가을 (11월 24일)에 각각 5-10년생, 5년생 병아리꽃나무 줄기를 구입하였음. 줄기그늘에서 건조한 다음 1차년도 기술한 방법으로 추출물을 제조하여 Nurr-1 활성을 조사하였으나, 모두 활성이 없었음.

Screening 초기 in vitro 와 in vivo 활성이 있는 병아리꽃나무는 20년생이고 가을에 채집한 것 이었으므로, 2차년도는 2016년 가을 (9월 26일)에 경기도 용인 한택식물원으로부터 20년생 병아리 꽃나무 줄기를 구입하여, 1주일간 건조한 다음 5 - 10 cm 크기로 자른 후 1주일간 건조한 다음 추출하였다 (그림 40).



그림 40. Cutted stems of 20 years-old *Rhodotypos scandens*.

가) 추출조건 확립

20년생 병아리 꽃나무 줄기를 각각 3g씩 준비하여 100ml의 40% 에탄올, 60% 에탄올, 8% 에탄올, 100% 에탄올, 100% 메탄올로 각각 추출하였다 (표 20). 에탄올과 메탄올은 180 rpm으로 24시간 씩 두 번 추출하였다. 추출후 감압농축하여 건조한 다음, 각 추출물을 DMSO에 녹인 후 100, 200 µg/mL에서 Nurr-1 활성화 활성을 조사하였다 (그림 41). 그 결과, 40% 에탄올 추출물에서만 활성이 나타났음. 따라서 40% 에탄올 추출물에 대한 활성물질 분리정제가 향후 필요함.

표 20. Solvent extraction of cutted stems of 20 years-old *Rhodotypos scandens*.

Sample name	Stem weight (gram)	Extraction method	Extract weight (mg)
IV-RS-40E	3	40% EtOH	150
IV-RS-60E	3	60% EtOH	121.3
IV-RS-80E	3	80% EtOH	86.3
IV-RS-100E	3	100% EtOH	39.1
IV-RS-100M	3	100% MeOH	84.1

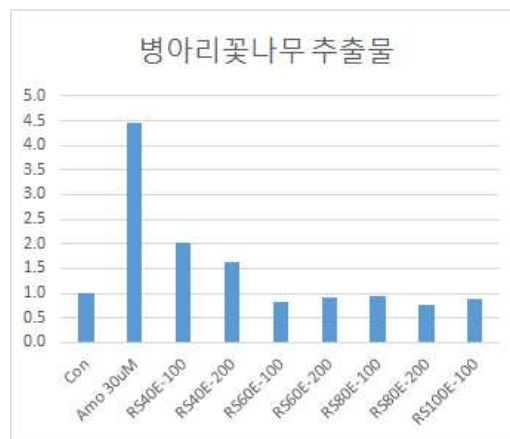


그림 41. 병아리꽃나무 추출물의 Nurr1 활성 확인.

나) 병아리 꽃나무 추출물의 안전성평가를 위한 시료 대량 제조

20년생 병아리 꽃나무 줄기의 40% 에탄올 추출물에서 활성이 있기 때문에, 1.5 kg의 건조된 줄기를 10 liter 40% 에탄올로 상온에서 24시간 씩 두 번 추출하였다. 감압농축으로 건조한 다음 42g의 추출물(IV-RS-EX LN011)을 얻은 뒤 25 kGy로 gamma irradiation하여 멸균한 뒤 안전성 평가에 사용하였음.

다). 병아리 꽃나무 추출물의 안전성평가

병아리 꽃나무 추출물 (IV-RS-EX)에 대한 단회 독성 및 유전독성 (복귀돌연변이, 염색체 이상시험)등 안전성 평가를 진행중에 있음.

(1). 단회투여독성시험 (랫드)

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 랫드에서 실시중임. 5,000mg/kg 과 2,000mg/kg 2개 용량에서 예비실험을 실시하여 용량을 결정하고, 본 시험을 군당 랫드 암수 각 5수에 대하여 실시함. 일반증상관찰, 사망률, 체중측정 등 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 결정함.

시험 방법: 군구성은 시험물질 5,000 mg/kg의 용량 및 대조군 (주사용수)의 2군으로 하고, 암수 각각 5마리씩 단회 경구투여 하였다. 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사시켜 부검하였다. .

시험결과:

암수 5,000 mg/kg 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다. 일반증상에서는 암수 5,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 1일에 점액변이 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다

결론 : 본 시험의 조건 하에서 IV-RS-EX를 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

(2). 유전독성 시험

(가) 복귀돌연변이시험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시함. 시험물질 DG-EX 와 DG-EAX의 유전자돌연변이 유발성을 히스티민 요구성인 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*)과 트립토판 요구성인 대장균 (*Escherichia coli*)을 이용하여 조사함.

시험 방법: 본시험의 용량을 설정하기 위해, 5,000 µg/plate를 최고용량으로 하고, 이하 용량은 공비 4를 적용하여, 1,250, 313, 78.1 및 19.5 µg/plate로 용량설정시험을 실시한 결과, 시험물질에 의한 생육저해가 대사활성화비존재하의 TA100 및 TA1537 균주의 5,000 µg/plate에서 관찰되었다. 대사활성화비존재하의 TA98, TA1535 및 WP2uvrA(pKM101), 대사활성화 존재하의 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA(pKM101) 균주의 모든 용량에서 생육저해는 관찰되지 않았다.

따라서, 본시험의 용량은 아래와 같이 설정하였다. 또한, 음성대조군 및 양성대조군을 설정하였다.

균주명	S9 mix	본시험의 용량 (µg/plate)
TA98, TA1535, WP2uvrA(pKM101)	-/+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100, TA1537	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313, 156
	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313



시험 결과: 본시험의 결과, 시험물질군에서 대사활성화 유무에 관계없이 각 군주의 모든 용량에서 복귀변이콜로니수는 음성대조군의 2배를 초과하지 않았고, 용량의존적인 증가도 관찰되지 않았다. 각 군주에 대한 양성대조군의 복귀변이콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 확실하게 증가하였다.

결론 : 이상의 결과로부터, 본 시험조건하에서 시험물질 IV-RS-EX의 유전자돌연변이 유발성은 없는 것으로 판단된다.

(나) 염색체이상실험

GLP 기관인 (주)바이오톡스텍에서 식약처 가이드라인에 근거하여 실시하고 있다. 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung (CHL/IU) cell) 사용하여 염색체의 구조적 이상 유발성의 유무를 평가한다.

시험 방법: 본시험의 용량을 설정하기 위하여, 5,000 µg/mL을 최고용량으로 하고, 이하 용량은 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 및 19.5 µg/mL로 용량설정시험을 실시한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 세포독성이 관찰되었다. 따라서, 약 55% 세포증식을 억제하는 용량을 산출한 결과, 단시간처리법의 대사활성화비존재하는 1,635.4 µg/mL, 존재하는 4,797.3 µg/mL 및 연속처리법의 대사활성화비존재하는 1,110.9 µg/mL이었다. 따라서, 본시험의 용량은 약 55% 세포증식을 억제할 것으로 예상되는 용량으로 하여, 아래와같이설정하였다. 또한, 음성대조군및양성대조군을설정하였다.

계열	S9 mix	본시험의 용량 (µg/mL)
단시간처리법	-	1,700, 850, 425, 213
	+	5,000, 2,500, 1,250, 625
연속처리법	-	1,200, 600, 300, 150

시험결과: 본시험의결과,단시간처리법의 대사활성화비존재하의1,700µg/mL에서 수적이상을 가진 세포의 출현빈도가 8.5%로, 음성대조군 (0.5%)과 비교하여 통계학적으로 유의한 증가가 확인되었다. 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 모든 용량에서 5% 미만이었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 확인되지 않았다. 단시간처리법의 대사활성화존재하에서는 5,000 µg/mL에서 구조이상을 가진 세포의 출현빈도가 4.5%로, 5% 미만이었으나, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성이 확인되었다. 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만이었으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 확인되지 않았다. 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 염색체이상을가진 세포의 출현빈도는5% 미만이었으며, 음성대조군과비교하여통계학적인유의성은확인되지않았다.

본시험의 단시간처리법의 대사활성화비존재하의1,700µg/mL에서 수적이상을 가진 세포의 출현빈도가 5% 이상 10% 미만의 의양성으로 확인되었기 때문에, 의양성의 결과를 명확하게 확인하기 위하여, 본시험과 동일한 방법으로 확인시험을 실시한 결과 동일한 결과를 얻었다.

결론 : 이상의 결과로부터 본시험 조건하에서 IV-RS-EX는 단시간처리법의 대사활성화 비존재하에서 5% 이상 10% 미만으로 수적이상을 유발하는 것으로 확인되어, Toshio Sofuni등의 판정기준에 따라 의양성으로 판단된다.

8). *in vitro* Nurr1 활성화 물질 활성 평가 (제 2 세부)

생체 내 및 생체 외 실험에서 Nurr1 전사인자가 도파민 신경세포에서 도파민 생성 유전자인 TH의 발생 및 유지에 매우 중요한 역할을 하므로 Nurr1 전사인자를 활성화 시키는 화합물은 파킨슨병의 원인인 도파민 신경세포의 손실을 최소화 할 뿐 아니라, 새로운 도파민 신경세포의 발생에 따른 도파민 신경전달 물질의 복구로 인하여 직접적인 치료 방법을 제공 할 수 있을 것으로 사료됨에 따라 Nurr1을 활성화 시킬 수 있는 화합물을 발굴하고자 여러 가지 세포기반분석시스템을 개발함 (U.S. Provisional Patent Application filed on 2/16/2006).

Nurr1 유전자는 598개의 아미노산으로 구성된 핵수용체 전사인자로 DNA 결합부위 (DNA binding domain; DBD)를 해독하는 아미노말단과 리간드 결합부위(ligand binding domain; LBD)를 해독하는 카복시 말단으로 구성되어있음. Nurr1은 NR4A family에 속하는 것으로 이 family에는 Nur77과 Nor1이 함께 속해있으며, 이들은 DNA 결합부위에서 약 95%의 아미노산 유사성을 보이며, 리간드 결합부위에서는 약 60%의 유사성을 보이는 것으로 보고되었음. 따라서 Nurr1 특이 활성 화합물을 분리 동정하기 위하여, NR4A family 간의 유사성이 높은 DNA 결합부위를 효모 특이 DNA 결합부위로 치환한 분석 시스템을 사용하였음. GAL4 유전자가 결합할 수 있는 염기서열 (CTCGGAGGACAGTACTCCG)이 8번 반복된 유전자를 리포터 유전자인 luciferase에 결합시킨 벡터를 합성하였음. 이 두개의 유전자를 섬유아세포에 트랜스펙션한 뒤 팔꽃나무 추출물을 처리하여 luciferase의 활성을 측정하여 Nurr1 유전자를 활성화 시키는지 확인했음 (그림 42).

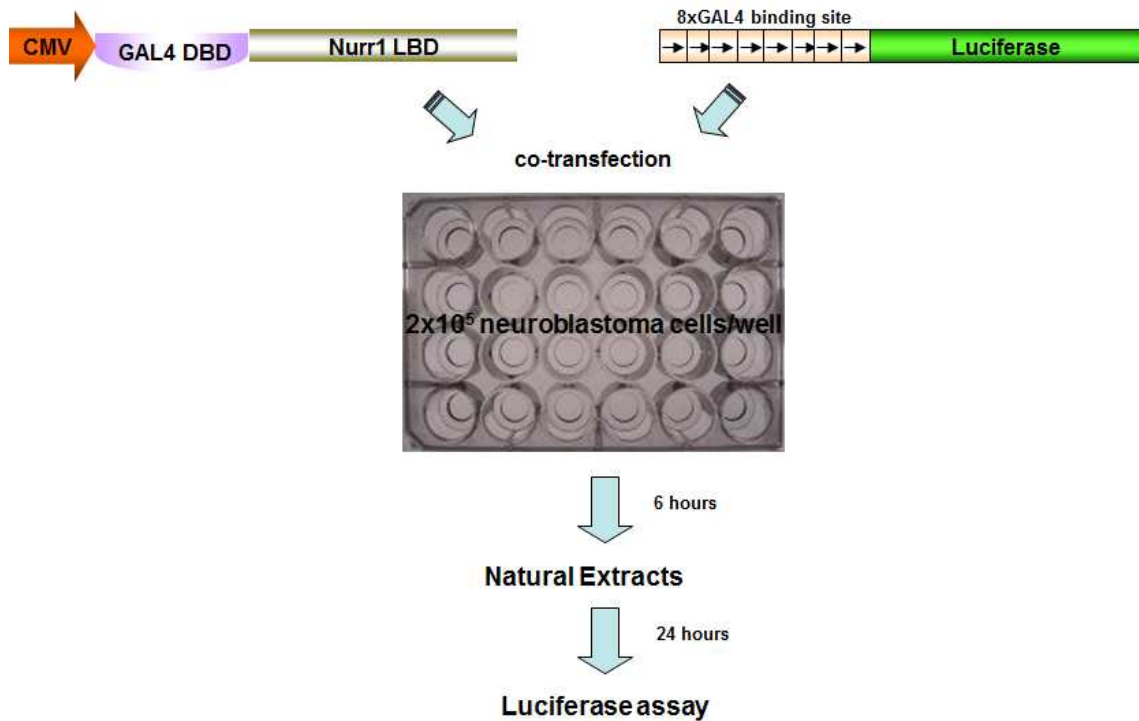


그림 42. Nurr1 활성화 물질 발굴 시스템

가) 팔꽃나무의 줄기 뿌리 부위에 따른 추출용매에 따른 추출물의 in vitro Nurr1 활성 효과

위에서 기술한 Nurr1 활성 측정 방법을 이용해 팔꽃나무의 줄기 뿌리 부위에 따른 추출용매에 따른 in vitro Nurr1 활성도를 측정함. 팔꽃나무의 뿌리와 줄기로부터 각기 다른 용매에 의해 추출한 후 세가지 농도로 세포에 처리함. 처리 24시간 후에 luciferase assay를 진행함. 그 결과 에탄올에 의해 추출된 경우 뿌리와 줄기에서의 차이는 존재하지 않았으며, 처리 농도의 증가에 따라 활성이 증가함을 확인 할 수 있었음. Hexane 추출물의 경우는 농도에 따른 활성 증가 양상은 보이지 않았으며, 다른 용매에 비해 활성이 높게 나타났음. Ethyl acetate의 경우에는 뿌리에서 추출한 경우가 줄기 추출시보다 높게 나왔음 (그림 43).

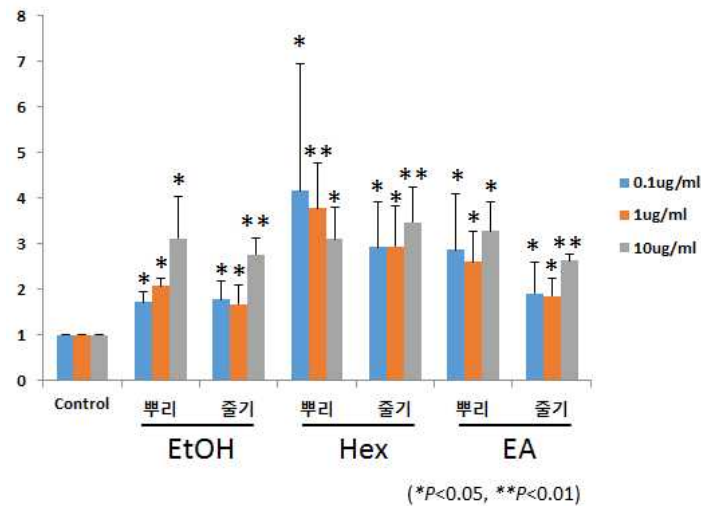


그림 43. 팔꽃나무의 줄기 뿌리 부위에 따른 추출용매에 따른 추출물의 Nurr1 활성정도 측정

나) 팔꽃나무의 줄기 뿌리 부위에 따른 추출용매에 따른 추출물의 세포 독성 확인

팔꽃나무의 줄기 뿌리 부위에 따른 추출용매에 따른 추출물의 Nurr1 활성화 농도에서 세포 독성을 확인하기 위해 24시간 동안 BE(2)C 세포에 처리 후, MTT assay를 진행함. 위에서 사용한 농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았음 (그림 44).

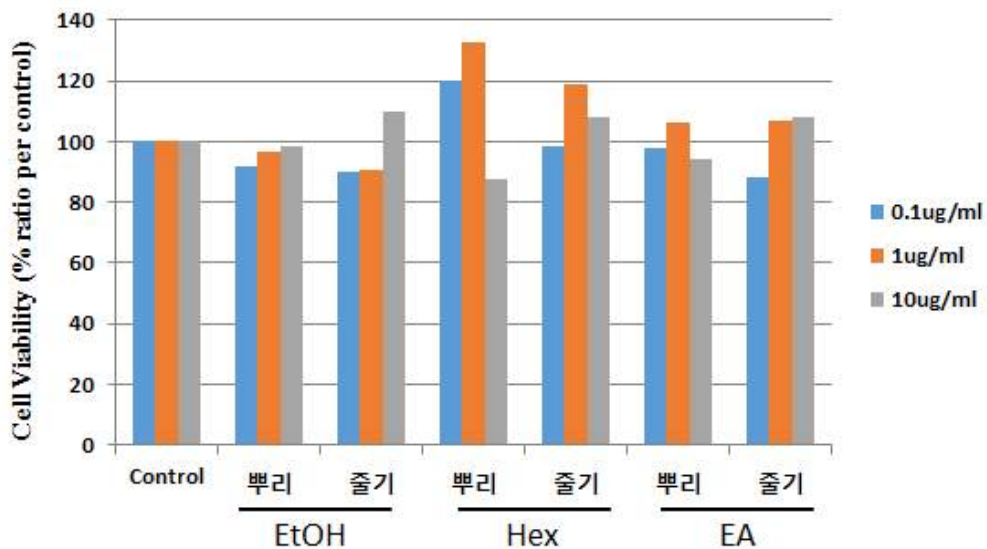


그림 44. 팔꽃나무의 줄기 뿌리 부위에 따른 추출용매에 따른 추출물의 세포 독성 측정.

다) DGE

(1) in vitro Nurr1 활성 효과

팔꽃나무 추출물의 분리 정제 과정에서 확인된 Nurr1 활성 물질중 하나로 추측되는 DGE에 대해 in vitro에서 Nurr1 활성 정도를 측정했음. 그 결과 DGE의 경우 세가지 농도 (0.1ug/ml, 1ug/ml, 10ug/ml)에서의 활성이 확인되었음 (그림 45).

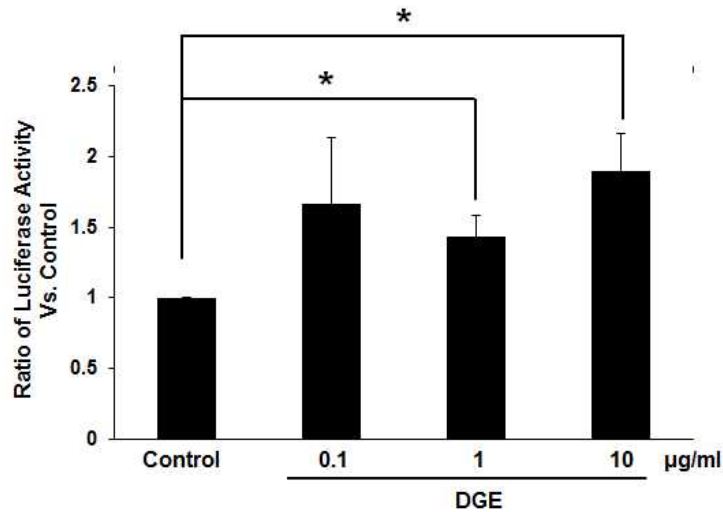
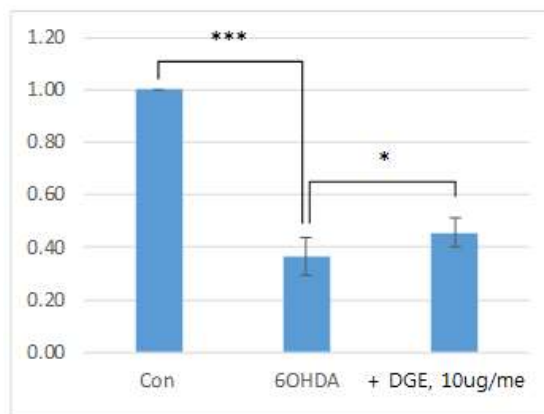


그림 45. DGE의 Nurr1 활성 효과

(2) DGE의 세포 사멸 억제 효과

MTT assay를 이용하여 Nurr1을 활성화 시킬 수 있는 팔꽃나무 추출물 중, DGE의 6-OHDA의 독성을 억제 효과 여부를 확인하였다. SH-SY5Y에 6-OHDA 100uM을 16시간 처리하여 세포독성을 유도했음. 이때, 6-OHDA와 DGE 10ug/ml를 함께 처리하여 도파민성 신경세포 사멸 억제 효과를 확인하였음. 대조군에는 1% DMSO를 처리하였음. 실험결과, DGE, 10ug/ml은 6-OHDA의 독성을 억제하는 효과를 보여주었음 (그림 46).



\* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001

그림 46. DGE의 세포 사멸 억제 효과 (1)

SH-SY5Y에 6-OHDA 100uM, 또는 6-OHDA와 DGE 10ug/ml을 함께 8시간 처리하여 세포독성을 유도한 후, 현미경 상으로 세포의 상태를 확인하였음. 대조군에는 1% DMSO를 처리하였음. 실험결과, 6-OHDA를 단독으로 처리한 실험군에서는 대부분의 세포들의 죽어 없어졌고, 붙어있는 세포도 죽어가는 양상을 보였음. 그러나 6-OHDA와 DGE 10ug/ml을 함께 처리한 실험군에서는 죽은 세포의 양이 확실히 줄어 있는 것을 확인할 수 있었음 (그림 47A).

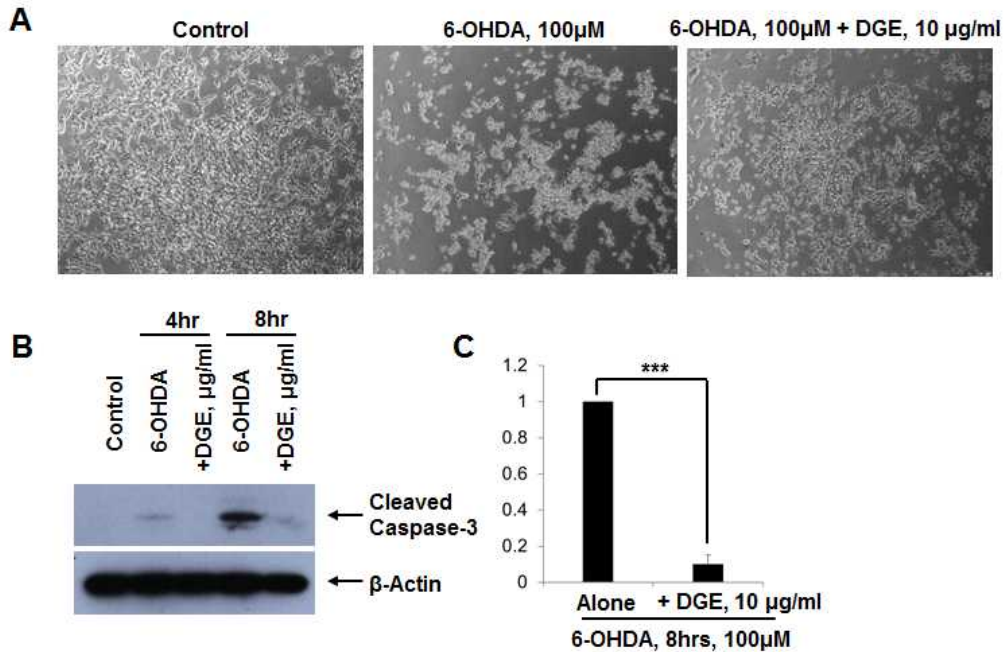


그림 47. DGE의 세포 사멸 억제 효과 (2)

6-OHDA가 세포독성을 일으킬 때, cleaved caspase-3를 생성하는데 DGE가 이를 억제하는지 확인하기 위하여 western blot을 수행하였음. SH-SY5Y에 6-OHDA 100uM, 또는 6-OHDA와 DGE 10ug/ml을 4시간, 8시간 각각 처리하여 세포독성을 유도한 후, 세포를 lysis 하여 western blot을 수행하였음. 실험결과, 뿌리-EtOH 추출물이 cleaved caspase-3 생성을 억제하는 것을 확인하였고, 이는 8시간 실험군에서 효과가 극명하게 나타났다. cleaved caspase-3 단백질은 beta-actin으로 평균화 하여 band intensity를 정량 하였음 (그림 47B).

### (3) DGE의 항염증 기능 확인

Nurr1의 활성화 증가는 뇌에서 염증기능을 담당하고 있는 microglia의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있음. Nurr1을 활성화 시키는 것으로 확인된 DGE가 항염증 효과를 일으키는 지 확인하기 위해 brain-microglial 세포주인 BV-2 세포에 염증을 유도시키는 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하였으며, 이때 DGE를 함께 처리해준 후, 염증에 관여하는 것으로 알려진 사이토카인들의 발현량을 조사하였음. 그 결과 DGE 3ug/ml 또는 10ug/ml을 처리한 경우, LPS에 의해 유도된 염증반응시 나타나는 IL-1b, IL-6, TNF-alpha의 발현 증가를 효과적으로 억제하는 것으로 확인함 (그림 48).

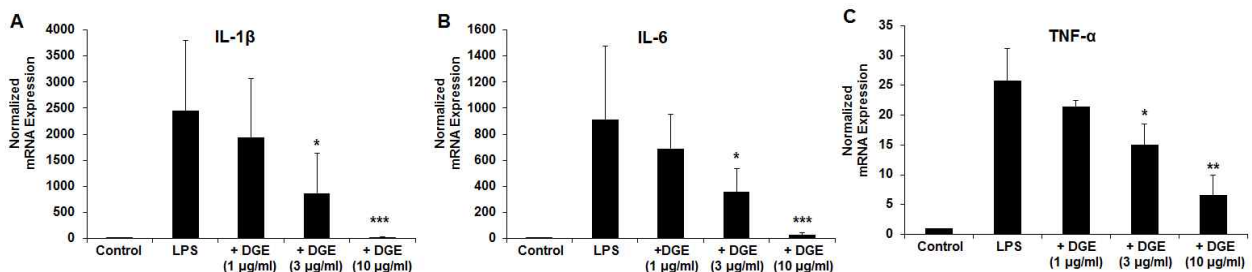


그림 48. DGE에 의한 항염증 효과

라) 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF)의 Nurr1 활성화 확인

GAL4 assay system을 이용하여 팔꽃나무 꽃 추출물 DGF-EX (Ethanol 추출물)가 Nurr1을 활성화 시킬 수 있는지 확인하였음. GAL4-LBD plasmid, GAL4가 결합할 수 있는 Luciferase plasmid, beta-Galactosidase plasmid를 BE(2)C cell에 transfection 시킨 후, 각각의 추출물을 16시간 동안 처리하였음. 추출물은 DMSO에 녹여 처리하고 대조군에는 1% DMSO를 처리하였음. Luciferase 형광을 정량한 결과, 팔꽃나무 꽃 추출물 DGF-EX는 1PPM, 25PPM 농도에서 의미 있게 Nurr1을 활성화 시키고, 특히 25PPM 농도에서 대조군 대비, 2배이상의 활성을 보여주었음 (그림 49).

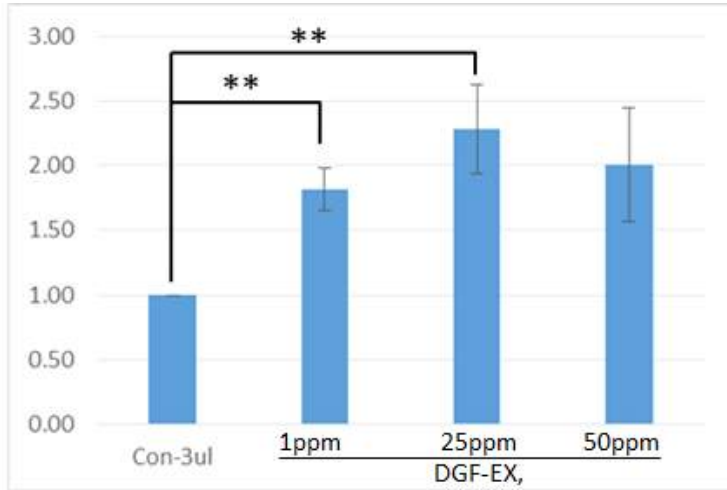


그림 49. DGF-EX의 Nurr1 활성화 효과

GAL4 assay system을 이용하여 팔꽃나무 꽃 추출물 DGF-WX (Water 추출물)가 Nurr1을 활성화 시킬 수 있는지 확인하였음. GAL4-LBD plasmid, GAL4가 결합할 수 있는 Luciferase plasmid, beta-Galactosidase plasmid를 BE(2)C cell에 transfection 시킨 후, 각각의 추출물을 16시간 동안 처리하였음. 추출물은 DMSO에 녹여 처리하고 대조군에는 1% DMSO를 처리하였음. Luciferase 형광을 정량한 결과, 팔꽃나무 꽃 추출물 DGF-WX는 200PPM 농도에서 의미 있게 Nurr1을 활성화 시켰음 (그림 50).

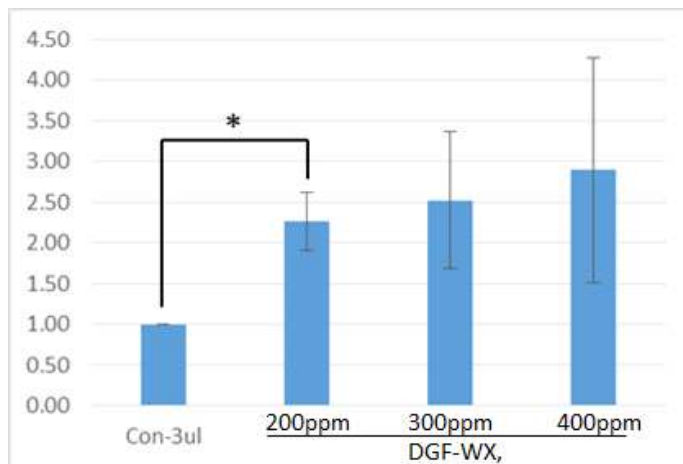


그림 50. DGF-WX의 Nurr1 활성화 효과

마) 병아리꽃나무 추출물의 Nurr1 활성화 효과 확인

이전 실험에서 Nurr1 활성화 효과가 1차적으로 확인된 물질인 병아리꽃 추출물에 대해 Nurr1 활성화를 추가적으로 조사함. 병아리꽃나무를 다양한 용매로 추출을 진행했으며, 40% 에탄올을 이용한 추출시 100ppm에서 활성이 있음을 확인함 (그림 51). 그러나, 이후 재현성있는 활성을 나타내지 않았음.

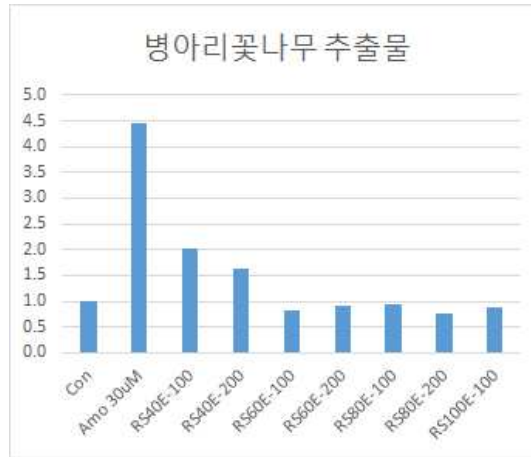
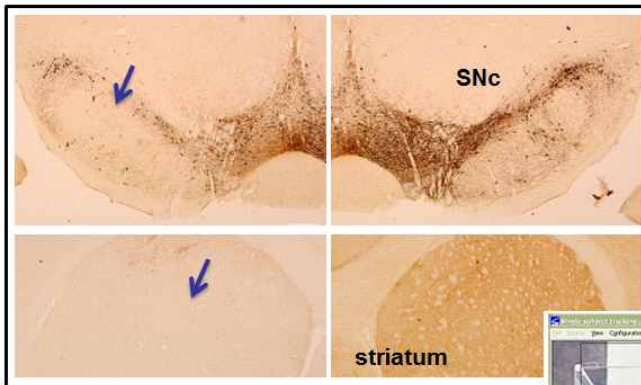


그림 51. 병아리꽃나무 추출물의 Nurr1 활성화 확인

9). 파킨슨병동물모델 구축 (제 2 세부)

● 6-OHDA rat model

TH positive dopaminergic cell death



Stereotaxic surgery

Apomorphine-induced rotation behavior

1. Dose of 6-OHDA : 8 ug
2. Site of injection : SN (-4.9, 1.8, 8.2)
3. Time point: 2w, 4w, 6w
4. Analysis : TH-positive neuron staining / apomorphine-induced rotation foot printing test

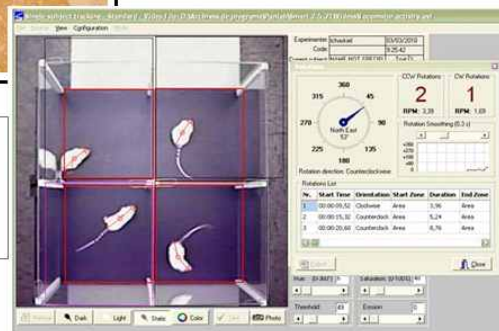


그림 52. 6-OHDA를 이용한 파킨슨씨병 동물 모델 구축

6-OHDA를 이용한 rat 동물모델은 6-OHDA 투여 농도 결정을 위한 실험을 진행하였음. 약물투여 후 시점을 기준으로 도파민성 신경세포사가 20% 이내이며 apomorphine 투여에 의한 rotation 행동이 관찰되고 stepping test에서도 차이를 보이는 가장 낮은 농도의 6-OHDA 투여를 목표로 하였음 (그림 52).

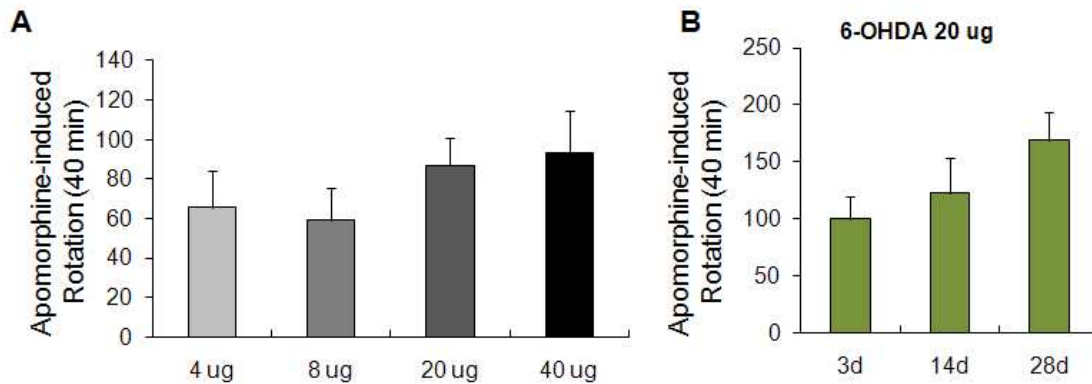


그림 53. 6-OHDA를 이용한 동물모델에서 apomorphine-induced behavioral rotation 확인

6-OHDA 4, 8, 20, 40  $\mu$ g을 각각 rat의 뇌 부위인 Substantia nigra(SN) 지역에 투여하고 3일 후에 apomorphine(0.5 mg/kg, I.P.)에 의한 rotation 행동을 관찰한 결과, contralateral rotation 수가 모든 그룹에서 현저히 증가하는 것이 확인 되었음 (그림 53A). 그리고 농도 증가에 따라 rotation 수도 증가하는 경향이 있었지만 4  $\mu$ g과 8  $\mu$ g은 거의 차이가 없는 것이 확인되었음. 20  $\mu$ g의 고농도의 6-OHDA를 투여하고 3일, 14일, 28일 후의 rotation행동을 관찰하면 시간이 경과함에 따라 rotation 수도 증가하는 것이 확인 되었음 (그림 53B). Tyrosine hydroxylase (TH) 의 염색을 통하여 뇌흑질 및 중뇌지역의 도파민성 신경세포 생존율의 감소가 고농도의 6-OHDA에서 확인되었 (그림 54)..

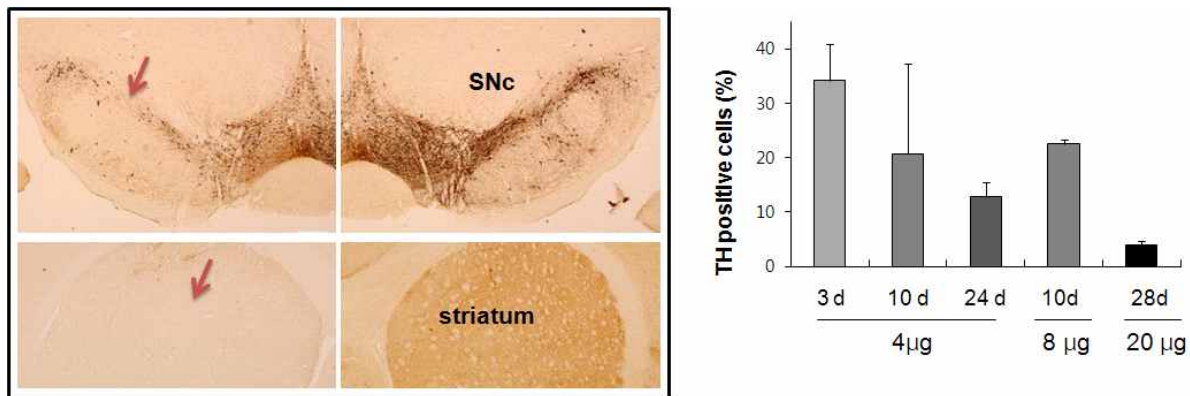


그림 54. 도파민성 신경세포 특이적인 단백질인 tyrosine hydroxylase 의 염색을 통한 중뇌지역의 도파민성 신경세포 생존율 확인

가) 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)의 파킨슨병 동물모델에서 운동 능력 증진 확인

팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물의 뇌질환 예방 및 운동 능력 회복의 가능성을 확인하기 위해 위에서 구축한 동물모델 시스템을 이용해 in vivo 실험을 진행함. 6-OHDA를 뇌에 주입한 후 하루 동안 실험 cage 에 정상적인 사료를 먹임. 줄기 뿌리의 추출물 (DG-EX)의 경우 250mg/kg, 100mg/kg 의 섭취량이 되도록 사료와 혼합한 후, rat이 섭취토록 함. 6-OHDA주입 후, 4주, 6주, 8주 후에 rotation test를 진행했음. 그 결과 100mg/kg/day 와 250mg/kg/day 두가지 농도 모두에서 6-OHDA에서 나타나는 behavior를 감소시키는 것으로 나타남(그림 55).



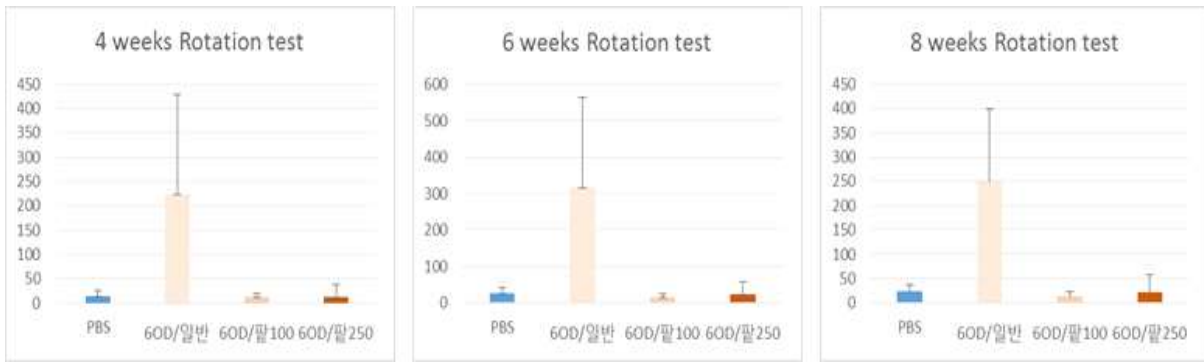


그림 55 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물 (DG-EX)에 의한 파킨슨씨병 동물 모델에서의 질환 호전 효과

나) 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)에 의한 파킨슨씨병 동물모델에서 질환 억제 효과 확인

팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)이 파킨슨 동물모델에 미치는 영향을 확인하기 위하여 총 24마리의 Rat을 Stereotaxic surgery를 통해 파킨슨 동물모델을 만들었음. 총 24마리 중에서 실험군으로 18마리에게 6-OHDA (0.2mg/ml, final volume 5ul) 를 주입하였고 대조군 6마리는 6-OHDA 대신 PBS를 주입하였음. 6-OHDA를 주입한 18마리 중 6마리에게는 일반 사료를 주었고 6마리에게는 10 mg/kg이 되도록, 나머지 6마리에게는 50 mg/kg 이 되도록 팔꽃나무 꽃 추출물 배합 사료를 만들어 먹였음. 수술후 22주차, 4주차에 rotation test를 진행함. 그 결과 2주, 4주후의 apomorphine에 의한 회전수가 10 mg/kg DGF-EX가 포함된 사료를 먹인 쥐에서도 확연히 감소하는 것을 확인함(그림 56). 또한, immunostaining 방법으로 뇌 흑질의 TH-positive 신경세포를 조사한 결과, 6-OHDA를 주입한 쥐에서 TH-positive 신경세포가 90%이상 감소한 반면, 10 mg/kg DGF-EX가 포함된 사료를 먹인 쥐에서는 TH-positive 신경세포가 50%이상 생존하였음 (그림 57, 58).

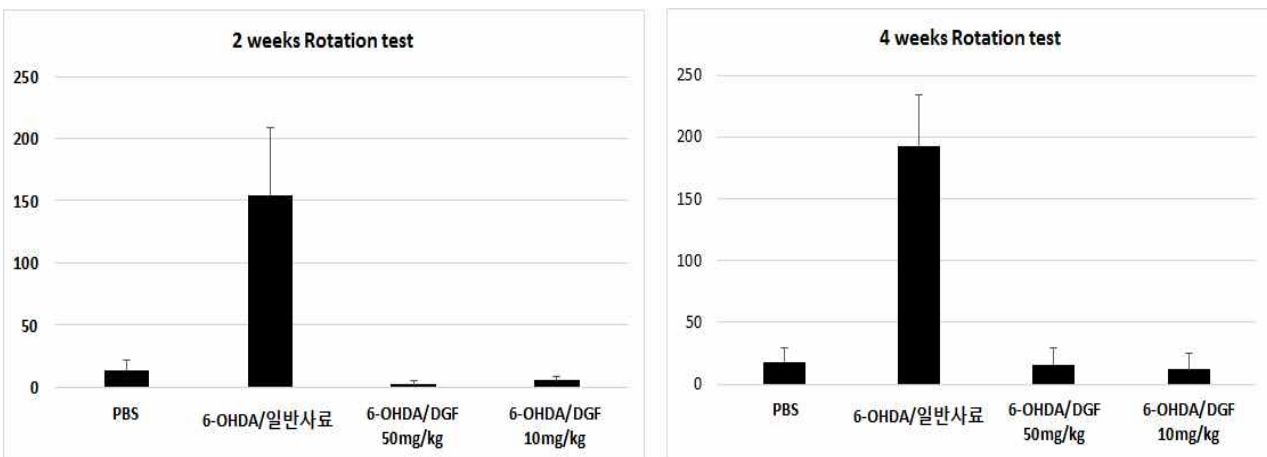


그림 56 파킨슨씨병 동물모델에서 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX) 포함 사료의 섭취에 의한 효과. Apomorphine-induced behavioral rotation 방법으로 회전운동 관찰하였음.

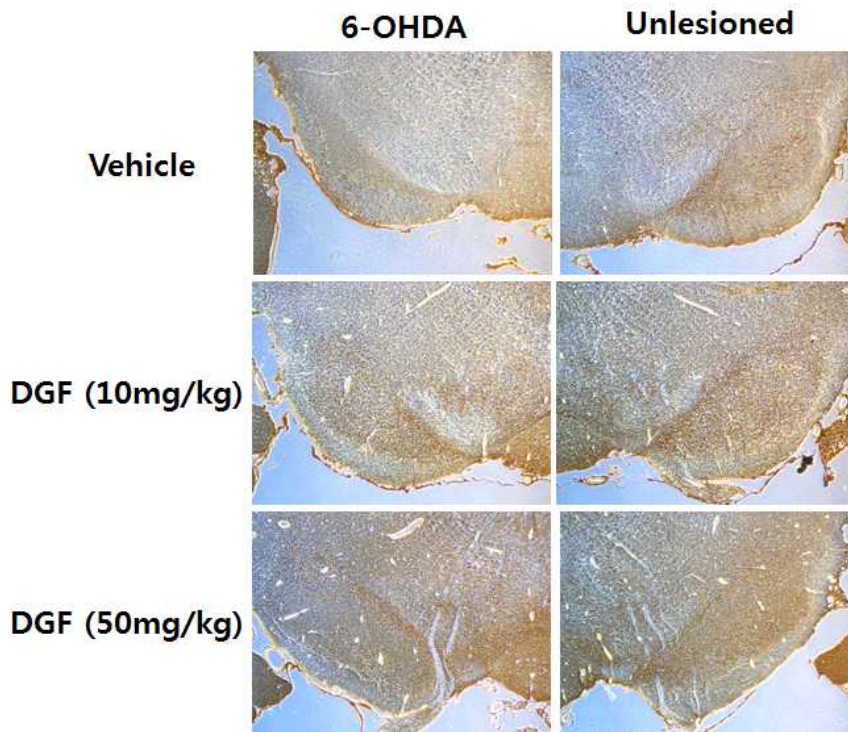


그림 57 파킨슨씨병 동물모델에서 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)에 의한 뇌 흑질 도파민 신경세포 사멸 보호효과. Immunostaining 방법으로 뇌 흑질에서의 TH-positive 신경세포를 관찰하였음.

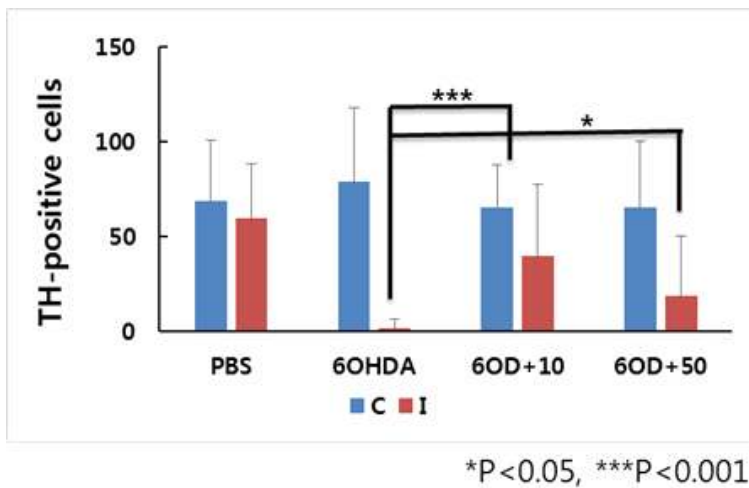


그림 58 파킨슨씨병 동물모델에서 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)에 의한 뇌 흑질 도파민 신경세포 사멸 보호효과. TH-positive 세포 수를 조사하였음. C: control (unlesioned side), I: 6-OHDA-injected side

다) 병아리 꽃나무 추출물에 의한 파킨슨씨병 동물 모델 효과 확인

팔꽃나무 추출물에서 진행했던 것과 같은 방식으로 병아리꽃나무 추출물을 이용한 동물 실험을 진행함. 6-OHDA를 주입한 쥐에서 일반사료를 섭취시킨 쥐와 병아리꽃나무 추출물이 혼합된 사료를 먹인 쥐에서의 rotation test를 수술 2 및 4 주후에 조사한 결과, 유의적인 효과가 나타나지 않았음.

다. 주요 연구개발성과

1). 논문

No	논문명	학술지명	주저자명	Vol (NO)	국내외 구분	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재연도	등록번호
1	Daphnane diterpenes from <i>Daphne genkwa</i> activate Nurr1 and have a neuroprotective effect in an animal model of Parkinson's disease	Journal of Natural Products	Won Gon Kim	79	국외	SCI	2016	
2	Daphnane and Phorbol Diterpenes, Anti-Neuroinflammatory Compounds with Nurr1 Activation from the Roots and Stems of <i>Daphne genkwa</i> .	Biological and Pharmaceutical Bulletin	Won Gon Kim	40 (12)	국외	SCI	2017	
3	Genkwalathins A and B, new lathyrane-type diterpenes from <i>Daphne genkwa</i>	Natural Product Research	Won Gon Kim	doi: 10.1080/14786419 [Epub ahead of print]	국외	SCI	2017. 11. 20	

2). 특허

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	팔꽃나무 꽃 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.	대한민국/PCT	한국생명공학연구원	2016.1.14. (국내)/ 2017.1.13. (PCT)	10-2016-015098 3 (국내) PCT/KR2017/012790 (PCT)				60%
2	다프난 또는 포볼 다이테펜계 화합물을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	한국생명공학연구원	2017.1.15	10-2017-015248 7.				60%
3	다이테펜계 화합물을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물.	대한민국	한국생명공학연구원	2017.1.17	10-2017-015386 1.				60%

## 3). 기술요약정보

가) 기술명: 파킨슨 뇌질환 예방/개선/치료용 천연식물 소재

나) 요약내용:

## (1) 기술개요

- 팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 기술
- 도파민 신경세포 분화, 작용, 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Nurr-1 transcription factor 활성화시키는 기전임. in vitro 도파민 신경세포 사멸을 억제하고, 항염증활성을 확립함.
- 실제로, 파킨슨 동물모델에서 DGF-EX가 파킨슨병 유도에 의한 회전운동을 감소시키고, 뇌의 흑질에서 도파민성 신경세포에 대한 보호 효과가 있음을 실험적으로 확인.

## (2) 기술특징

- 기존의 파킨슨 약은 질환 치료가 아닌 증상 완화기능이나, 본 추출물은 새로운 타겟으로 알려진 Nurr-1를 활성화하여 도파민 신경세포의 사멸을 억제하는 기능을 함.
- 본 추출물은 전통적으로 한방에서 사용한 한약재 "팔꽃나무 꽃"로부터 제조함.
- 본 추출물(DGF)은 GLP 비임상시험에서 아래의 안전성 자료 확보.
  - 랫드 단회경구: 치사량 5g/kg 이상 (장기에 이상 없음).
  - 유전독성 (복귀 돌연변이, 염색체 이상, 소핵시험): 음성
  - 랫드 4주 반복 용량결정(DRF) 시험:
    - 수컷 2.5g/kg/day, 암컷 1.25g/kg/day로 용량결정.
  - 13주 반복투여 : 1,500mg/kg/day에서도 유의미한 독성이 발견되지 않아, 무독성량 (NOAEL)은 1,500mg/kg/day을 상회함.
- 천연식물 추출물(DGF-EX) 10mg/kg/d oral 투여시에 파킨슨병 유도에 의한 회전운동을 감소시키고, 뇌의 흑질에서 도파민성 신경세포에 대한 보호 효과.
- 유효성분(DGH-2)을 규명하였으며, 유효성분도 0.5 mg/kg/d 투여시에서도 파킨슨병 유도에 의한 회전운동 감소, 뇌의 흑질에서 도파민성 신경세포에 대한 보호 효과를 입증.

다) 기술완성도: 기술개발 진행중 (전임상 완료)

라) 지적재산권 현황

국내 특허등록 제 10-1631589호 (2016.6.13.) 외 3건 출원

미국특허등록 14/009,526 (2015.1.20.) 외 PCT 출원 1건

국내 특허출원 3건의 PCT 출원 1건

## 라. 연구결과

### 1). 기술적 성과

- 본 과제에서 도출된 팔꽃나무 꽃 추출물은 파킨슨 동물 모델에서의 운동장애 개선에 탁월한 효능을 가지고 있을 뿐만 아니라, GLP 비임상 시험에서 건강기능식품 원료로 개발하는데 필요한 안전성이 확보되었기 때문에, 향후 임상시험을 통해서 본 추출물을 세계 최초로 “운동능력개선” 신기능성 건강기능성 식품원료로 개발가능성이 있음.

- 또한, 천연물 신약에 필요한 전임상 시험을 보완하고, 임상 시험을 통하여 본 추출물을 파킨슨 치료 천연물 신약으로 개발 가능성이 있음. 이는 기존 파킨슨 치료약 와 달리 근본적으로 파킨슨 병을 치료할 수 있고, 부작용(이상 운동증, 환각등)이 없는 안전한 파킨슨 치료제 개발 가능성이 있음.

### 2) 경제적성과

- 건강기능성 식품원료로서 향후 개별인정 획득으로 국내에서 제품 출시/특허권 기술실시.

- 미FDA의 New Dietary Ingredient(NDI) approval 확보에 따른 세계시장진출 확보. 전 세계 4조 치료제 시장의 10%인 4000억원을 차지하는 것을 최종 목표로 함.

- 고부가가치 작물 발굴을 통한 농가수익 증대

- 운동장애 예방 및 개선 건강기능식품 개발을 통한 파킨슨병으로 고통 받는 노인인구의 절감을 통한 의료비 감소 및 삶의 질 향상

### 3. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
가. 최종 성과 목표 및 달성도				
최종 성과 목표 및 평가 방법	실적	가중치 (%)	달성도 (%)	
“운동장애 예방 및 개선용” 건강기능식품 기능성원료 임상시험 진입 1종	팔꽃나무 꽃 추출물(DGF-EX)의 전임상 성공적 완료로 임상 가능	50	100	
“운동장애 예방 및 개선용” 건강기능식품 기능성원료 2종 관련 SCI 논문 3편 이상 발표	교신저자로 SCI 논문 3편	20	100	
“운동장애 예방 및 개선용” 건강기능식품 기능성원료 2종 관련 국내외 특허 4건 이상	PCT특허 1건 국내 특허 3건 출원	30	100	
나. 년차별 성과 목표 및 달성도				
구분 (연도)	세부연구목표	연구개발수행내용	가중치 (%)	달성도 (%)
1차 년도 (2015)	팔꽃나무 원료 표준화 및 지표성분 규격화	-유효성분 DGH-2의 분석방법 확립 및 validation 및 원재료 표준화 - 추출물 제조 공정 표준화 - 지표성분의 분석법 확립 및 검증 - 기준규격 설정 및 유통기한 설정을 위한 안정성 평가	20	100
	병아리꽃나무의 유효성분 결정	- 유효성분 분리 및 구조결정 - 유효성분의 Nurr-1 활성화 활성 평가 및 검증	30	100
	팔꽃나무 추출물의 안전성평가(GLP 기관)	- 단회투여독성시험 (설치류) - 유전독성시험 (복귀돌연변이, 염색체이상시험, 소핵시험)	30	100
	팔꽃나무 추출물의 동물시험에서 기능성 평가를 통한 섭취량 결정	- 파킨슨병 동물모델에서 운동장애 개선 효과 조사 - 파킨슨병 동물모델에서 도파민성 신경세포사에 대한 보호 효과 조사내용	20	100

				코드번호	D-06
구분 (연도)	세부연구목표	연구개발수행내용	가중 치 (%)	달성 도 (%)	
2 차 년도 (2016)	추출물 제조	- 팔꽃나무 꽃 과 병아리 줄기 추출물 제조	10	100	
	추출물의 다양한 성분규명	- 팔꽃나무 줄기 뿌리: DGH-3 분리 구조 규명 - 병아리꽃나무: 4개 화합물 분리 및 구조 규명	20	100	
	병아리꽃나무 원료 표준화 및 지표성분 규격화	- 팔꽃나무 성분의 LC-MS 조건 확립 - 병아리 꽃나무 4개 화합물에 대한 LC-MS 분석 조건 확립.	20	100	
	팔꽃나무 추출물의 안전성평가 (GLP 기관에서 수행)	- 팔꽃나무 뿌리 줄기 추출물은 유전독성이 있었으나, 꽃 추출물에서 유전독성이 발견되지 않아 부위를 꽃으로 변경. 13주 독성은 3차년도 실시.	20	100	
	병아리꽃나무 추출물의 안전성평가 (GLP 기관)	- 유전독성 실시한 경과 복귀돌연 변이는 이상없음.	10	100	
	병아리꽃나무 추출물의 동물시험에서 기능성 평가를 통한 섭취량 결정	- 팔꽃나무의 부위가 줄기에서 꽃으로 변동되어, 꽃 추출물에 대한 동물시험 실시. 그 결과 10 mg/kg에서도 파킨슨 효과 확인	20	100	
3 차 년도 (2017)	추출물 제조	- 안전성평가를 위한 대량 팔꽃나무 꽃 추출물 제조	20	100	
	추출물의 다양한 성분규명	- 팔꽃나무 꽃 추출물: 신규 화합물 2개물질 포함 16개 성분 분리 및 구조 규명. - 팔꽃나무 줄기 뿌리 추출물: 6개 유효성분 추가 분리 및 구조규명 - 유효성분의 Nurrl 활성화 활성 확인하였음.	20	100	
	추출물의 안전성평가 (GLP 기관에서 수행)	- 팔꽃나무 꽃 추출물의 13주 반복투여 독성시험 (설치류)에서 1,500mg/kg/day에서도 유의미한 독성이 발견되지 않아, 무독성량 (NOAEL)은 1,500mg/kg/day을 상회함. - 병아리꽃나무 추출물의 유전독성 시험중에서 염색체 이상시험에서 의양성으로 판정	40	100	
	병아리꽃나무 줄기 추출물의 동물시험에서 기능성 평가를 통한 섭취량 결정	- 병아리 꽃나무의 채집에 따른 in vitro 및 in vivo 파킨슨 치료 활성의 재현성이 낮음.	20	100	

**다. 관련분야 기여도**

**1). 건강기능식품 개발 측면**

향후 인구노령화 및 건강보험료에 대한 부담등으로 질병예방에 대한 관심이 높아지고 있어 향후 건강기능식품 시장이 지속적으로 성장할 것으로 예상되는데, 2010년 기능성 원료인정 현황에서 ‘기억력 개선“ 과 ‘간 건강‘이 12건으로 가장 많이 차지하는 등, 치매, 파킨슨병 환자를 위한 기억력 개선용 건강기능식품이 개발되고 있음. 또한 파킨슨병으로 인한 운동장애 예방 및 개선용 기능성 식품 개발 연구도 활발하여, 2014년 5월 22일 현재 미국에서 Coenzyme Q 와 creatine등이 파킨슨병 환자를 대상으로 임상 3상중에 있으나 (<https://clinicaltrials.gov>), 아직 시판되어 나온 것은 없음.

따라서, 본 과제에서 도출된 팔꽃나무 꽃 추출물은 운동장애 개선에 탁월한 효능을 가지고 있고, 안전성이 확보되었기 때문에, 향후 임상시험을 통해서 본 추출물을 세계 최초로 “운동능력개선” 신기능성 건강기능성 식품원료로 개발가능성이 있음.

또한, 천연물 신약에 필요한 전임상 시험을 보완하고, 임상 시험을 통하여 본 추출물을 파킨슨 치료 천연물 신약으로 개발 가능성이 있음. 이는 기존 파킨슨 치료약 와 달리 근본적으로 파킨슨 병을 치료할 수 있고, 부작용(이상 운동증, 환각등)이 없는 안전한 파킨슨 치료제 개발 가능성이 있음.

**2). 파킨슨 치료 타겟 관련 기술적 측면**

Nurr1은 새로운 파킨슨 치료 타겟으로 최근에 활발히 연구되고 있으나, 전임상에서 효과적인 선도 물질은 많이 연구되어 있지 않은 실정임. 본 연구과제에서 발굴된 Nurr1 활성화 유효성분 DGH-2 (Yuanhuacin) 화합물은 기존 Nurr1 agonist로 알려진 amodiaquine, chloroquine 보다 in vitro 및 in vivo 에서도 활성이 강하기 때문에, 향후 새로운 Nurr1 타겟 관련 파킨슨 치료제 개발 연구에 기여할 것으로 판단됨.<sup>15</sup> 특히, 본 연구에서는 DGH-2 (Yuanhuacin) 뿐 만 아니라, 22개의 DGH-2 유도체성 화합물이 분리되었고, 이러한 다양한 화합물의 구조-활성 연구결과는 향후 Nurr1 활성화 화합물의 최적화 연구 개발에 기여할 것임.

**5. 연구결과의 활용계획**

- 동물 모델에서의 탁월한 효능을 가지며 과 GLP 비임상 시험에서 안전성이 확보된 팔꽃 나무 꽃 추출물을 대상으로, 기술이전후 기업과 공동으로 임상연구를 통한 “운동능력개선” 신기능성 건강기능성 식품원료로 개발할 계획임.
- 파킨슨 치료 천연물 신약으로 개발 계획. 기술이전후 기업과 공동으로 전임상 보완 및 임상 시험을 통한 기존 치료제의 부작용(이상 운동증, 환각등)이 없는 안전한 파킨슨 천연물 신약으로 개발할 계획임.
- 팔꽃 나무 꽃 추출물이 뇌신경세포 사멸저해 활성이 우수하므로 “인지능력 개선” 건강기능식품 원료 또는 치매 치료 천연물 신약으로의 개발 가능성을 연구할 계획임.



#### 4. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. Meissner WG, et al. Priorities in Parkinson's disease research. <i>Nat Rev Drug Discov.</i> 10(5):377-393 (2011)		
2. Obeso JA, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. <i>Nat Med.</i> 16(6):653-661 (2010)		
3. Perez-Lloret S, Rascol O. Dopamine Receptor Agonists for the Treatment of Early or Advanced Parkinson's Disease. <i>CNS Drugs.</i> 24(11):941-968 (2010)		
4. Haasio K. Toxicology and Safety of Comt Inhibitors. In <i>International Review of Neurobiology.</i> (eds. Nissinen E) 163-189 (Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2010).		
5. Poewe W, Antonini A, Zijlmans JC, Burkhard PR, Vingerhoets F. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. <i>Clinical interventions in aging.</i> 5:229 (2010)		
6. Martinat C, et al. Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 103(8):2874-2879 (2006)		
7. Kadkhodaei B, et al. Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. <i>J. Neurosci.</i> 29(50):15923-15932 (2009)		
8. Saucedo-Cardenas O, et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> 95(7):4013-4018 (1998)		
9. Chu Y, Le W, Kompoliti K, Jankovic J, Mufson EJ, Kordower JH. Nurr1 in Parkinson's disease and related disorders. <i>J Comp Neurol.</i> 494(3):495-514 (2006)		
10. Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. <i>Science.</i> 276(5310):248-250 (1997)		
11. Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. <i>Progress in Neurobiology.</i> 77(1):128-138 (2005)		
12. Park B-Y, et al. Daphnane diterpene esters isolated from flower buds of <i>Daphne genkwa</i> induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model. <i>Journal of Ethnopharmacology.</i> 111(3):496-503 (2007)		
13. Zhang S, Li X, Zhang F, Yang P, Gao X, Song Q. Preparation of yuanhuacine and relative daphne diterpene esters from <i>Daphne genkwa</i> and structure - activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I. <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry.</i> 14(11):3888-3895 (2006)		
14. Liou YF, Hall IH, Lee KH. Antitumor agents LVI: The protein synthesis inhibition by genkwadaphnin and yuanhuacine of P-388 lymphocytic leukemia cells. <i>Journal of Pharmaceutical Sciences.</i> 71(12):1340-1344 (1982)		
15. Kim CH, et al. Nuclear receptor Nurr1 agonists enhance its dual functions and improve behavioral deficits in an animal model of Parkinson's disease. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> 112(28):8756-8761 (2015)		

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.