

[별지 제15호서식]

용역연구사업 연구결과보고서			
관리 번호	06082한약분218		
사업 명	한약재 과학화		
과 제 명	국문	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인연구-황금, 단삼	
	영문	Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines (Project 2 : Scutellaria Roots, Salvia Miltiorrhiza Roots)	
주관연구기관	기 관 명	소재지	대 표
	안동대학교	안동시 송천동 388번지	권영건
주관연구 책임자	성 명	소속 및 부서	전 공
	손건호	생활과학대학 식품영양학과	천연물화학
총연구기간	2005 년 4 월 27 일 - 2006 년 11 월 10 일(1년 5.1개월)		
총 연구비	570,000천원		
연구년차	연구기간	연구비	
1차년도	2005.04.27- 2005.12.31	280,000천원	
2차년도	2006.02.10- 2006.11.10	290,000천원	
총참여연구원	21명 (책임연구원: 3명, 연구원: 6명, 연구보조원: 10명 보조원: 2명)		
<p>2006년도 용역연구개발사업에 의하여 수행중인 연구과제의 연구결과보고서를 붙임과 같이 제출합니다.</p> <p>붙임 : 1. 연구결과보고서 35부.</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;">2006 년 12 월 일</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;">주관연구책임자 손 건 호 (인 또는 서명)</p> <p style="text-align: right; margin-right: 100px;">주관연구기관장 권 영 건 (직인)</p> <p style="margin-top: 20px;">식품의약품안전청장 귀하</p>			

연구과제제안서(RFP)					
사업명	한약재 과학화 연구			과제번호	06082한약 분218
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구-황금, 단삼				
연구기간	단년도()		2년 계속과제(○) (2)년차		
소요예산	총액	570백만원	수행방법	자체() 용역() 지정(○)	
	1차년도	280백만원			
	2차년도	290백만원			
연구형태	조사연구() 시험연구(○)				
연구목표	<p>[1차년도][2차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> 유효성분 중심의 한약재 관리에 필요한 한약재별 생리활성 성분의 분리, 확인 및 (동시)분석법을 개발하고 유전자 칩을 활용한 생리활성성분의 효능유전자를 확인하고자 함 				
주요연구내용	<p>[1차년도][2차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> 한약재의 생리활성 성분 분리 및 분석법개발 <ul style="list-style-type: none"> 연구대상 한약재의 기원, 종 선별 등 연구전략 수립 한약재의 성분 분리 및 구조 동정 한약재의 유효성분 동시분석법 및 패턴분석법 개발 한약재의 유효성분 표준품 확보 및 함량분석 기초실험 한약재의 효능 유전자 확인 <ul style="list-style-type: none"> DNA microarray를 활용한 약리효능 유전자 검색, 기능 확인 (biomarker 제시) 약리유전자 DB 구축 및 유전정보처리시스템 구축(구체적인 내용은 별첨자료 참고) 				
기대성과 및 활용분야	<p>[1차년도][2차년도]</p> <ul style="list-style-type: none"> 한약재 유효성분 분석법 개발 및 유효성분 표준품 확보 유효성분 중심의 한약재 관리로 한약 및 한약제제의 품질수준 향상 및 안전성 제고 한약 및 한약제제 품질관리 기반기술 구축 				
색인어	국문	생리활성성분, 약리유전자, 함량분석			
	영문	bioactive components, biomarker gene, assay			
활용도	기준규격(○) 시험법(○) 대국민홍보() 제도개선() 기타()				

연구결과보고서

한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인연구-황금, 단삼

Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of
Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines
(Project 2 : Scutellaria Roots, Salvia Miltiorrhiza Roots)

주관연구기관 : 안동대학교

식품의약품안전청

주 의

1. 이 보고서는 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 식품의약품안전청에서 시행한 용역연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

제 출 문

식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인연구-황금, 단삼(안동대학교/손건호)”과제의 연구결과보고서로 제출합니다.

2006. 12 .

주관연구기관명 : 안동대학교

주관연구책임자 : 손 건 호

제 1세부과제명 : 황금, 단삼의 생리활성물질 분리
(제1세부연구기관/세부과제책임자):안동대학교/손건호

제 2세부과제명 :황금과 단삼의 생리활성물질분석 및 동시정량법개발
(제2세부연구기관/세부과제책임자):대구가톨릭대학교/우미희

제 3세부과제명 :유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성성분의 효능 유전자 검증
(제3세부연구기관/세부과제책임자):한국한의학연구원/하혜경

목 차

I. 연구개발결과 요약문	4
(한글)	4
(영문)	5
II. 총괄연구개발과제 연구결과	6
제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표	6
제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	15
제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과	26
제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	42
제5장 총괄연구개발과제의 연구성과	47
제6장 기타 주요변경사항	51
제7장 참고문헌	52
제8장 첨부서류	56
III. 제1세부연구개발과제 연구결과	57
제1장 제1세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표	58
제2장 제1세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	65
제3장 제1세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과	69
제4장 제1세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	77
제5장 제1세부연구개발과제의 연구성과	87
제6장 기타 주요변경사항	90
제7장 참고문헌	91
제8장 첨부서류	93

IV. 제2세부연구개발과제 연구결과	94
제1장 제2세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표	95
제2장 제2세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	98
제3장 제2세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과	109
제4장 제2세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	146
제5장 제2세부연구개발과제의 연구성과	148
제6장 기타 주요변경사항	150
제7장 참고문헌	150
제8장 첨부서류	152

V. 제3세부연구개발과제 연구결과	153
제1장 제3세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표	154
제2장 제3세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	156
제3장 제3세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과	161
제4장 제3세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	224
제5장 제3세부연구개발과제의 연구성과	226
제6장 기타 주요변경사항	228
제7장 참고문헌	229
제8장 첨부서류	230

연구결과보고서 요약문

연구과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인연구-황금, 단삼		
중심단어	활성 성분분리, 분석법, 효능유전자, 황금, 단삼		
주관연구기관	안동대학교	주관연구책임자	손 건 호
연구기간	2005. 4. 27 - 2006. 11. 10		
<p>제1세부과제에서는 황금과 단삼으로부터 생리활성성분을 분리하고자 하였다. 황금과 단삼을 추출 및 분획하고 이들을 각각 크로마토그래피를 실시하여 다음의 물질들을 분리하였다. 각각을 분광학적 수단을 사용하여 구조결정한 결과 황금은 17종의 flavonoids 화합물과 phenolic 화합물인 guaiacol과 paeonol 2종임을 확인하였고 단삼은 diterpenoid 5종과 lignin 6종임을 확인하였다. Flavonoid 화합물은 oroxylin A, chrysin, tanaxin I, skullcapflavone II, rivularin, wogonin, baicalein, 2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone, 2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, 6''-ethyl-wogonoside, viscidulinIII-2'-O-glucoside, wogonoside, rutin, baicalin임을 확인하였다. diterpenoid화합물은 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydrotanshinone I 과 dansenspiroketallacton임을 알았고 lignin은 salvianolic acid B, rosmarinic acid, 9'-methyl lithospermate, methyl lithospermate B, dimethyl lithospermate B와 methyl salvianolic acid C임을 확인하였다.</p> <p>제 2세부과제에서는 황금과 단삼에 함유된 생리활성물질들 (황금의 경우 HPLC법은 6종, LC-MS/MS법은 7종, 단삼의 경우 HPLC법과 LC-MS/MS법 모두 6종)의 동시정량법을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 새로이 개발하였다. 동시정량법에 대한 validation을 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다. 황금과 단삼의 시중 유통품 (황금은 8종, 단삼은 16종)에 대해 활성성분의 함량을 측정하였다.</p> <p>제 3세부에서는 한약재 및 각 약재별 유효 성분을 제시하고 각각의 효능을 제시하고자 DNA microarray를 이용하였다. 한약재추출물 또는 성분을 처리 후 약 3만개의 유전자 중 발현 변화를 나타내는 효능 유전자를 발굴하고자 청열약으로 분류되는 황금과 활혈거어약으로 분류되는 단삼 및 그 성분들을 LPS 처리한 대식세포에 처리하여 항염 효과 및 항산화 효능을 검색하였다. 황금의 항염 효능 성분으로는 baicalein, wogonin, chrysin을 제시하였고, 단삼의 항산화 효능 성분으로 tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B을 제시하였다. DNA microarray 분석결과 inflammation, apoptosis, anti-oxidant 등과 관련된 pathway 관련 유전자들의 발현 변화가 가장 크게 나타났으며 선정된 효능 유전자들에 대해서 RT-PCR을 이용한 검증결과 IL-11 R α1, IL-6 ST, Tgfb1 등의 유전자를 효능 유전자로 제시하였다.</p>			

Summary

Title of Project	Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines (Project 2 : Scutellaria Roots, Salvia Miltiorrhiza Roots)		
Key Words	Isolation of bioactive components, method of analysis, bio-marker genes, Scutellaria Root, Salvia Miltiorrhiza Root		
Institute	Andong university	Project Leader	Kun Ho Son
Project Period	2005. 4. 27 - 2006. 11. 10		

In the first sub-project, we have isolated bioactive compounds from *Scutellariae Radix* (*Scutellaria baicalensis*) and *Salvia miltiorrhizae Radix* (*Salvia miltiorrhiza*). In our studies on *Scutellaria Radix*, we isolated seventeen flavonoids and two phenolic compounds, guaiacol and paeonol. Also we isolated five diterpenoids and six lignins from *Salvia miltiorrhizae Radix*. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic analyses and chemical evidence.

In the second sub-project, we have developed both a HPLC and a LC-MS/MS analytical methods to determine six or seven marker compounds from herbal drugs, *Scutellariae Radix* (*Scutellaria baicalensis*) and *Salvia miltiorrhizae Radix* (*Salvia miltiorrhiza*). Calibration graph showed good linearity across wide concentration ranges of the marker compounds. The simple analytical procedure has shown good accuracy and precision, and therefore is proposed as an efficient method for fingerprinting analysis as well as quality control of the herbal drug. Quantities of marker compounds from collected samples of *Scutellariae Radix* and *Salvia miltiorrhizae Radix* were assayed.

In the third sub-project, gene expression patterns associated with sensitivities to each agent were analyzed with oligonucleotide arrays that comprised approximately 30,000 genes. This study used DNA microarray data for mouse whole genes to examine the change of effective gene activity of 70% EtOH extracted from *Scutellariae Radix*, *Salviae Miltiorrhizae Radix* and their ingredients such as baicalein, wogonin, chrysin, tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B on LPS treated macrophage cell line. Based on analysis, 20 genes were selected for further analysis from 33,000 whole genes in microarray. The genes were validated by RT-PCR. The broad spectrum of the differentially expressed genes, including those associated with inflammation, apoptosis, anti-oxidants, as well as others, IL-11 R α 1, IL-6 ST and Tgfb1, indicate overall cellular response to *Scutellariae Radix*, *Salviae miltiorrhizae Radix* and compounds treatment.

총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 총괄연구개발과제의 목표

황금, 단삼에 함유되어 있는 유효성분중심의 한약재규격관리에 요구되는 생리활성성분 분리, 동시분석법 개발 및 biochip을 활용한 생리활성성분의 효능유전자 확인

1.2 연구내용

황금으로부터 baicalin, wogonin등의 flavonoid 8종과 benzenoid, phenylpropanoid 2종 화합물과 단삼으로부터 tanshinone I, II A 등의 diterpenoid 8종과 dimethyl lithospermate등의 lignin 2종 화합물들을 크로마토그래피 방법으로 분리하여 생리활성검색 시료로 제공한다. 분리된 화합물들을 지표물질로 한 동시분석법을 개발하고 finger-print analysis를 실시한다. 분리된 유효성분을 중심으로 유전자 칩을 활용한 생리활성성분의 효능유전자 확인 연구를 진행하며, 대량분리를 통하여 유효성분 3종이상을 확보 제출한다.

1.3 연구배경 및 목적

○ 한약은 의약품임에도 불구하고 천연물이므로 안전성과 유효성이 확보되어 있다는 인식은 잘못된 것임이 최근에 국내외에서 발생된 불량 한약재, 위변조 기원불명 한약재, 천연물 독성성분사고 등의 예에서 찾아볼 수 있다. 따라서 심각한 유통 한약재의 품질·안전성 문제를 해결하기 위해서는 과학적 근거에 의한 선진기술수준에 적합한 기준을 제정하여 관리할 필요가 있으며 그 필요성을 충족시키기 위해서는 한약의 과학화에 대한 선행연구가 심도 있게 진행되어야만 한다.

○ 국제적인 환경변화에 적절히 대응하기 위하여서도 본 과제의 연구 필요성이 절실히 요구되고 있다. 즉 미국은 1999년 NCCAM을 설립하여 대체의약 분야에 집중적인 투자 (2004년도: 117.7백만불)를 하고 있으며, 일본도 이미 1986년도부터 한방 GMP를 적용하고 있고, 중국은 2002년 GACP를 공표하여 한약재 품질관리를 강화하고 있으며, WHO/DDA 협상에서 한약재 시장의 개방을 적극적으로 요구하고 있는 추세이다. 또한 WHO에서도 전통약물의 품질, 안전성 및 유효성에 관련된 guideline제정을 권고하고 있다.

○ 국내에서도 한약재 생산과 제조분야의 개방에 맞춰 경쟁력을 키우기 위한 방안을 강구하고 있다. 최근 보건복지부에 따르면 2002년 3월 ‘한약-생약 규격 국제화 포럼(FHH)’을 결성한 한국, 중국, 일본 3국은 서울에서 FHH 분과위원회를 열고 우수한약재재배관리규정(GAP)과 우수한약제조기준(GMP)을 논의하였다. 이러한 논의에 따라서 향후부터는 일정한 기준에 따라 재배되지 않은 한약재는 국내 유통이나 수출이 어렵게 된다. 보건복지부는 앞으로 한약재 재배농가에게 국제기준에 맞는 재배를 권장하고 한약재상과 한의원에서도 재배기준에 따라 생산된 한약재만 공급, 처방하도록 의무화할 계획이다. 우수한약재재배관리규정(GAP)에는 한약재 재배과정에서 토양오염과 중금속, 농약, 방사성동위원소 오염방지 기준 등이 포함되고, 우수한약제조기준(GMP)에는 한약재의 가공 및

규격품 생산 기준, 한약제품 및 한약제제 생산 기준 등이 정해지게 된다.

○ 한약재에 대한 정보제공으로 소비자를 보호하고, 한약재에 대한 수급의 안정 및 품질향상과 유통체계의 확립, 한방의료 서비스 개선을 제도적으로 뒷받침하며, 한약재의 품질관리 및 안전성확보로 국민건강을 보호하기 위한 목적으로 한약재의 수급조절, 규격품 대상 한약재의 범위·규격 및 표시기재 요령 등 한약재의 유통관리에 관한 사항을 정함으로써 한약재의 수급 안정과 유통질서 확립에 기여하고자 한약재 규격화 사업을 진행하여 왔다.

○ 국내외적인 추세에 능동적으로 대처하기 위해서 한약재의 생리활성성분 분리와 그 분석법을 개발하고 biochip을 활용한 한약 효능 유전자 탐색 연구는 기반 기술로서 매우 중요한 사업으로 인식된다. 그중 본 과제에 포함된 황금과 단삼의 과학화 연구는 매우 중요한 비중을 차지하고 있다.

Table 1. 최근 3년간 황금, 단삼의 생산량, 수입량(생약협회, 의약품 수출입협회 자료)

품목	2001년			2002년			2003년		
	생산량 (ton)	수입량(ton)		생산량 (ton)	수입량(ton)		생산량 (ton)	수입량(ton)	
		식품	한약재		식품	한약재		식품	한약재
황금	181	253	-	232	73	-	309	213	-
단삼	-	91		-	58		-	53	

○ 표1에서 보는바와 같이 황금은 국내에서 재배, 생산될 뿐 아니라 외국에서 수입되고 있는 주요 수급조절 품목 한약재이며 국내 생산량이 매년 증가추세에 있다. 단삼의 경우 국내 생산량은 미비하여 통계화 되고 있지 않으나 매년 일정량이 수입되어 유통되고 있음을 알 수 있다.

○ 황금과 단삼은 대한약전 8개정에 수재되어 있는 주요 생약재이다.

○ 황금과 단삼의 성분 및 생리활성에 대해서는 비교적 많은 연구가 수행되어 그에 관련된 다수의 연구결과가 발표되었지만 대부분 부분적 연구수준에 머무르고 있는 실정이므로 2003년 8월에 제정된 한의약육성법과 2000년 1월에 제정된 천연물신약연구개발 촉진법등의 제도적 뒷받침과 한약재 과학화 사업과 같은 본 과제를 통하여 심도 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

1.2.1 황금과 단삼의 생리활성성분 분리

<당초목표>

황금의 주요성분인 flavonoid 8종 및 기타화합물 2종을 포함하여 10종 이상의 물질을 분리하고 단삼은 주요성분인 diterpenoid 8종 및 lignin화합물 2종을 포함하여 10종 이상의 물질을 분리한다.

<목표달성도>

황금으로부터 flavonoid 17종 및 penolic compound 2종을 포함하여 19종의 화합물을 분리하였고 단삼으로부터 diterpenoid 5종 및 lignin 화합물 6종을 포함하여 11종의 화합물을 분리하였다. 단삼의 당초목표는 diterpenoid 8종 및 lignin화합물 2종을 분리하는 것이었으나 단삼의 추출용매를 70% EtOH을 사용하여 비극성물질인 diterpenoid보다 lignin 화합물의 함량이 많아 당초목표보다 lignin화합물이 많이 분리되었고 반면 diterpenoid화합물 수는 당초목표에 부족한 결과를 얻었다.

1.2.2 황금과 단삼의 생리활성물질분석 및 동시정량법개발

가. 황금과 단삼의 활성물질들 (6종 혹은 7종)의 동시분석법 개발

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질들 (황금의 경우 HPLC법은 6종, LC-MS/MS법은 7종, 단삼의 경우 HPLC법과 LC-MS/MS법 모두 6종)의 동시정량조건을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 설정함으로써 황금과 단삼의 유효성분 정량법을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로

각각 새로이 개발하였다.

나. 황금과 단삼의 활성물질들 (6종 혹은 7종)의 동시분석법 검증 (validation)

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질들 (황금의 경우 HPLC법은 6종, LC-MS/MS법은 7종, 단삼의 경우 HPLC법과 LC-MS/MS법 모두 6종)의 동시정량법에 대한 validation을 다음 항목에 대해 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다.

다. 황금과 단삼의 시중 유통품의 활성성분 (6종) 함량 측정

황금과 단삼의 시중 유통품 (황금은 8종, 단삼은 16종)의 활성성분 (6종)의 함량을 측정하였다. 산지별 성분 분석결과를 활용하여 산지별 패턴 분석을 할 수 있다.

1.2.3 유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성성분의 효능 유전자 검증

구분	연구 목표	연구 범위	목표 달성도
1차 년도 (황금)	- 황금 추출물 및 성분 확보	70% EtOH 추출물 및 성분 8개 확보	100
	- <i>In vitro</i> assay : 처리 농도 및 시간별	Cytotoxicity assay, PGE ₂ assay를 실행하여 각 시료의 처리농도와 시간결정	100
	- 약물처리 후 RNA 분리	- Cell Line : Raw 264.7 cell + LPS 처리 (100 ng/ml) - Time : 2, 4, 8, 18hr - Sample : 70E, Baicalein, Wogonin, Chrysin	100
	- DNA microarray	- Applied Biosystems chemiluminescent RT Labeling kit - Scanner : Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Analyzer	100
	- 효능 유전자 확인 : RT-PCR 등	- Program : Avadis [®] , R, Panther 등 - 2 fold 이상의 유효 gene을 선정 - 항염증과 관련된 gene 22개 선정	100
	- 독성유전자의 발현 여부 확인	- 황금 및 성분의 처리농도에 대한 독성이 없었기 때문에 유전자는 발견하지 못함	100
	- DB 제공	- DB 구축 자료 제공	100
2차 년도 (단삼)	- 단삼 추출물 및 성분 확보	70% EtOH 추출물 및 성분 6개 확보	100
	- <i>In vitro</i> assay : 처리 농도 및 시간별	Cytotoxicity assay, NO, SOD, GSH assay를 실행하여 각 시료의 처리농도와 시간결정	100
	- 약물처리 후 RNA 분리	-Cell Line : Raw 264.7 cell + LPS 처리 (1 mg/ml) -Time : 2, 4, 8, 24hr -Sample:70E, tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B	100
	- DNA microarray	- Applied Biosystems chemiluminescent RT IVT Labeling kit -Scanner : Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Analyzer	100
	- 효능 유전자 확인 : RT-PCR 등	- Program : Avadis [®] , GenPlex, R, Panther - 2 fold 이상의 유효 gene을 선정 - 항산화 관련 gene들을 선정	100
	- 독성유전자의 발현 여부 확인	- 독성 관련 유전자 검색	100
- DB 제공	- DB 구축 자료 완성	100	

1.3 국내외 기술개발 현황

1.3.1 국외연구동향

Table 2. 국외에서 진행된 황금의 성분 연구(Flavonoid)

Compound type	Compound name	Reference
Flavonoid	6-C- α -L-Arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranosylchrysin	S. Takagi et al., Phytochemistry, 20, 2443, 1981 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Apigenin	H. Itokawa, Chem. Pharm. Bull., 29, 254, 1981
	Apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989
	Baicalein (Noroxylin)	K. Sagara et al., Shoyakugaku Zasshi, 40, 1, 84, 1986
	Baicalein-7-methyl ether	TP. Popova et al., Chem. Nat. Comp., 9, 6, 699, 1973
	Baicalein-7-O- β -D-glucopyranoside	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 524, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Baicalin	SS. Subramanian et al., Phytochemistry, 11, 439, 1972
	Carthamidin	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 1792, 1982
	Chrysin	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 1792, 1982
	Chrysin-6-C- β -D-glucopyranoside-8-C- α -L-arabinopyranoside	S. Takagi et al., Phytochemistry, 20, 2443, 1981 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Cichlorooxylin A	H. Yamamoto et al., Shoyakugaku Zasshi, 41, 2, 97, 1987
	Dihydrobaicalin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Dihydrooxylin A	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	5,8-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 4, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	5-Hydroxy-7,8-dimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	4'-Hydroxywogonin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 4, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Isocarthamidin	M. Takido et al., Yakugaku Zasshi, 96, 381, 1976 (uv, ir, pmr, ms)
	Isoscutellarein	Y. Miyachi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989
	Isoscutellarein-8-O-glucuronopyranoside	Y. Miyachi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989
	Maltol	A. Ohnishi et al., Agr. Biol. Chem., 51, 5, 1449, 1987
Neobaicalein	Anon, Natl. Med. J. China, 53, 417, 1973	
Norwogonin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
Oroxylin A	M. Goudard, Phytochemistry, 17, 145, 1978(ms)	
Oroxylin A-7-O-glucuronidemethyl ether	TP. Popova et al., Chem. Nat. Comp., 9, 6, 699, 1973	
2(R), 3(R)-2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 5, 1792, 1982 (uv, ir, pmr, ms)	
Salvigenin	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 101, 899, 1981	
Scutellarein	E. Wollenweber et al., Phytochemistry, 24, 9, 2129, 1985 (uv, pmr, cmr) ; B. Voirin, 22, 2107, 1983	
	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989	

Compound type	Compound name	Reference
Flavonoid	Scutellarin	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Scutevulin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Skullcapflavone II-2'-methyl ether	M.Takido et al., Yakugaku Zasshi, 95, 108, 1975
	Tectorigenin	SO. Lee et al., Korean J. Pharmacogn., 20, 4, 219, 1989
	Tenaxin I	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	(2S)-2',6',7-Trihydroxy-5-methoxy-flavanone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	(2S)-4',5,6,7-Tetrahydroxyflavanone-7-O- β -D-glucuronopyranoside	Y. Miyaichi et al., Shoyakugaku Zasshi, 42, 3, 216, 1988
	(2S)-4',5,7,8-Tetrahydroxyflavanone-7-O- β -D-glucuronopyranoside	Y. Miyaichi et al., Shoyakugaku Zasshi, 42, 3, 216, 1988
	2(S)-2',5,6',7-Tetrahydroxyflavanone	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 5, 1792, 1982 (uv, ir, pmr, ms)
	2,2',4',6-Tetrahydroxy-6'-methoxychalcone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',3',5,7-Tetrahydroxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jpn.), 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,5',7-Tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavone	Y. Kimura et al., Planta Med., 50, 4, 290, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,5'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,6,7-Tetrahydroxyflavanone	J. Geigert et al., Tetrahedron, 29, 2703, 1973
	2',5,6',7-Tetrahydroxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 5, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 35, 9, 3720, 1987
	2',5,7-Trihydroxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,8-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavone	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 12, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,7-Trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,8-Trihydroxy-7-methoxyflavone	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 12, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavanone	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 12, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
Viscidulin I	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
Wogonin	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 219, 1982	
Wogonoside	T. Tomimori et al., Chem. Pharm. Bull., 33, 4457, 1985	
Wogonin-7-O- β -D-glucuronopyranosyl methyl ester	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
Wogonin-5-O- β -D-glucopyranoside	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 1220, 1980	

Table3. 국외에서 진행된 단삼의 성분 연구 (Diterpenoid, Lignin)

Compound type	Compound name	Reference
Diterpenoid	1,2,5,6-Tetrahydrotanshinone I	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	1,2-Dihydrotanshinquinone	N. Okamura et al., J. Chromatogr., 542, 317, 1991
	12-Methoxysalvinone	N. Wang et al., Planta Med., 55, 4, 390, 1989
	3- α -Hydroxytanshinone II a	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	1-Dehydromiltirone	HW. Luo et al., Yao Hsueh Pao, 23, 830, 1988
	1-Dehydrotanshinone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	4-Methylenemiltirone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	6,7,8,9-Tetrahydro-1,6,6-trimethylfuro(3,2-c)naphth(2,1-E)oxepine	HM. Chang et al., J. Chem. res.(S), 4, 1990
	-10, 12-dione	
	7- β -Hydroxy-abieta-8,13-diene-11, 12-dione	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	7-Oxo-sandaracopimaric acid	B. Esquivel et al., J. Nat. Prod., 50, 4, 738, 1987
	Arucadiol	LZ. Lin et al., Planta Med., 54, 5, 443, 1988
	Cryptoacetalide	F. Asari et al., Chem. Lett., 10, 1885, 1990
	Cryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Cyptanshinone	S. Luo et al., Yaowu Fenxi Zazhi, 8, 154, 1988
	Dan shen spiroketallactone	HW. Luo et al., Phytochemistry, 27, 270, 1988
	Danshenol A	Y. Tezuka et al., Chem. Pharm. Bull., 45, 1306, 1997
	Danshenol B	Y. Tezuka et al., Chem. Pharm. Bull., 45, 1306, 1997
	Danshexinkun A	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Danshexinkun B	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Danshexinkun C	CN. Fang et al., Hua Hsueh Pao, 34, 197, 1976
	Danshexinkun D	HW. Luo et al., Yao Hsueh Pao, 20, 542, 1985
	Deoxyneocryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Dihydroisotanshinone I	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Dihydromethylenetanshinquinone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	Dihydrotanshinone I	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Epi dan shen	HW. Luo et al., Phytochemistry, 27, 270, 1988
	spirospiroketallactone	
	Epicryptoacetalide	F. Asari et al., Chem. Lett., 10, 1885, 1990
	Euphracal	A. Ulubelen, J. Nat. Prod., 52, 6, 1313, 1989
	Formyltanshinone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	Hydroxytanshinone II	HW. Luo et al., Phytochemistry, 24, 815, 1985
Isocryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989	
Isotanshinone II b	AR. Lee et al., J. Nat. Prod., 50, 157, 1987	
Methyl dihydrotanshinone	HC. Lin et al., Chin. Pharm. J., 43, 11, 1991	
Methyl tanshinate	MK. Chien et al., Hua Hsueh Hsueh Pao, 36, 199, 1978	
Methyl tanshinonate	MK. Chien et al., Hua Hsueh Hsueh Pao, 36, 199, 1978	
Methylenetanshinone	HW. Luo et al., Yao Hsueh Pao, 24, 341, 1989	

Compound type	Compound name	Reference
Diterpenoid	Methylenetanshinquinone	XL. Huang et al., Shin Wu Hsueh Pao, 22, 98, 1980
	Miltionone I	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	Miltionone II	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	Miltipolone	G. Haro et al., Chem. Lett., 9, 1599, 1990
	Miltirone	N. Wang et al., Planta Med., 55, 390, 1989
	Neocryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Nordihydrotanshinone	HC. Lin et al., Chin. Pharm. J., 43, 11, 1991
	Norsalvioidide	H. Ginda et al., Tetrahedron Lett., 29, 36, 4603, 1988
	Nortanshinone	HW. Luo et al., Phytochemistry, 24, 815, 1985
	Przewaquinone A	B. Li et al., Phytochemistry, 30, 3815, 1991
	Przewaquinone B	B. Yang et al., Yaoxue Xuebao, 16, 837, 1981; CA, 96, 177900
	Salvia diterpene lactone V	HM. Chang et al., J. Chem. Res. (S), 4, 1990
	Salvia diterpene lactone VI	HM. Chang et al., J. Chem. Res. (S), 4, 1990
	Salvia tanshinone 31	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvia tanshinone 32	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvia tanshinone 33	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvilenone	LZ Lin et al., Planta Med., 54, 5, 443, 1988
	Salvinone	N. Wang et al., Planta Med., 55, 390, 1989
	Salviol	E. Wenkert et al., Phytochemistry, 13, 2545, 1974
	Salviolone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvonitin	M. Noguchi et al., J. Nat. Prod., 48, 342, 1985
	Tanshindiol A	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991
	Tanshindiol B	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991
	Tanshindiol C	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991
	Tanshinketolactone	HC. Lin et al., J. Chin. Chem. Soc. (Taipei), 43, 199, 1996
	Tanshinol 1	HW. Luo et al., Chem. Pharm. Bull., 34, 3166, 1986
	Tanshinonal	N. Okamura et al., Planta Med., 58, 571, 1992
Tanshinone EE-B	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991	
Tanshinone I	G. Honda et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 1, 408, 1988	
Tanshinone IIb	CN. Fang et al., Hua Hsueh Hsueh Pao, 34, 197, 1976	
Tanshinone II A	G. Honda et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 1, 408, 1988	
Tanshinone V	A. Yagi et al., Planta Med., 55, 51, 1989	
Tanshinone VI	A. Yagi et al., Planta Med., 55, 51, 1989	
Lignin	Ammonium-potassium lithospermic acid B	T. Tanaka et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 2, 340, 1989
	Catecholaldehyde	W. Chen et al., Chung Ts'ao Yao, 11, 442, 1980
	Danshensuan B	Z. Chen et al., Yao Hsueh T'ung Pao, 16, 24, 1981
	Dihydrocaffeic acid(tetramer)	T. Yokozawa et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 1, 316, 1988
	Ethyl lithospermate	CB. AI et al., Planta Med., 58, 2, 197, 1992
	Magnesium lithospermic acid B	T. Tanaka et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 2, 340, 1989
	Salvianolic acid A	LM. Li et al., Planta Med., 50, 227, 1984
	Salvianolic acid C	CB. Ai et al., J. Nat. Prod., 51, 1, 145, 1988
	Salvianolic acid D	CB. AI et al., Planta Med., 58, 197, 1992
	Salvianolic acid E	CB. AI et al., Planta Med., 58, 197, 1992
	Salvianolic acid G	CA. AI et al., Chin. Chem. Lett., 2, 1, 17, 1991

황금 및 단삼의 성분이나 그 활성에 관하여서는 이미 매우 많은 연구가 수행되어 왔으며 그 결과들도 보고되었다. 황금의 경우 flavonoid가 주성분으로 Table 2에서와 같이 보고되어 있으며 이외에도

alpha-pyrone type의 butylphthalide 외 5종¹⁾, benzenoid 화합물인 benzoic acid²⁾, phenylacetaldehyde³⁾ 등 21종, diterpenoid 계열인 Ferruginol⁴⁾ 1종이 보고되어 있으며 이외에도 Lipid성분 3종, Monoterpenoid 성분 3종, phenylpropanoid 화합물인 Elemicin⁵⁾을 비롯하여 3종, protein 10종, sesquiterpenoid 4종, steroid 2종의 화합물들이 분리 보고되었다. 활성연구로는 flavonoid계열의 화합물인 baicalein, baicalin, wogonin과 oroxylin A에 관한 연구가 많은 비중을 차지하고 있으며 그 외에도 3종의 기타성분에 관한 연구가 진행되어 왔다. 그중 baicalin은 가장 많이 함유되어 있는 성분으로 주된 생리활성으로는 다음과 같은 결과들이 보고되었다. 즉 1) 항알러지 및 항염증 작용 (antiinflammatory and antiallegic)⁶⁻⁷⁾ 2) anti-HIV⁸⁻⁹⁾ 3) 항암효과(anticancer activity)¹⁰⁻¹²⁾ 4) 항산화효과 (antioxidative activity)¹³⁻¹⁴⁾ 5) anti-SARs 코로나바이러스효과¹⁵⁾ 등 많은 연구결과가 보고 되어있고 baicalein은 anti-HIV⁸⁻⁹⁾, anticancer activity¹⁰⁻¹²⁾, antioxidative activity 효과¹³⁻¹⁴⁾를 가지며 wogonin은 anti-respiratory syncytial virus 효과¹⁶⁾, anti-hepatitis B virus 효과¹⁷⁾, 항암¹²⁾, 항산화효과¹⁴⁾를 나타내며 oroxylin A anti-respiratory syncytial virus활성¹⁶⁾을 나타낸다. 그 외에도 acetoside(항산화작용)¹⁸⁾, 2',3',5,7-tetrahydroxyflavone 외 4종의 항암효과¹⁹⁾, 2-Ph flavone(insect antifeedant activity)²⁰⁾과 같은 화합물들의 경우에도 활성연구가 보고된 바 있다.

단삼의 경우에도 많은 연구결과가 보고 되어 있으며 주성분으로는 Table 3와 같이 많은 종류의 diterpenoid와 lignin등이 보고 되었다. 이외에도 Boucheny등이 benzenoid 화합물인 protocatechuic acid와 rancinamycin IV 2종을 분리 보고²¹⁾하였고 flavonoid 화합물 2종²²⁻²³⁾, phenylpropanoid 화합물인 danshensu²⁴⁾, Chen등이 danshensuan A, danshensuan C²⁵⁾, rosmarinic acid²⁶⁾, salvianolic acid F²⁷⁾외 2종의 화합물들이 보고 되었으며 그 외 quinoid 2종²⁸⁻²⁹⁾, saponin 2종³⁰⁻³¹⁾, sesquiterpenoid 2종³²⁻³³⁾, triterpenoid 5종³⁴⁻³⁷⁾, tannin 1종의 화합물³⁸⁾들이 각각 분리 보고 되었다. 그 외 정량연구는 Zhang등이 HPLC-UV와 HPLC-MS기술을 이용하여 단삼의 finger print를 분석³⁹⁾하였고 Gu등이 high-speed counter-current chromatography를 이용해서 주요활성성분의 finger print를 구명⁴⁰⁾하였으며 Mosaddik등은 HPLC를 이용하여 단삼으로부터 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinone I을 분리⁴¹⁾하였다. 또한 Gu등이 HPLC-ESI-MS를 이용하여 단삼의 주요활성물질의 finger print를 분석⁴²⁾하였고 Xue등은 reversed-phase liquid chromatography를 이용하여 cryptotanshinone을 분석⁴³⁾하였다.

단삼의 활성연구는 주요성분인 diterpenoid와 lignin화합물들에 대해 주로 연구가 진행되어 왔다. 먼저 diterpenoid성분에 대해 살펴보면 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydrotanshinone이 acetylcholinesterase 활성⁴⁴⁾과 cytotoxicity활성효과⁴⁵⁾를 나타낸다고 보고하였고 okuno등은 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone이 SOS inducing 활성을 저해한다고 보고⁴⁶⁾하였으며, Lam등은 tanshinone II A, tanshinone II B가 neuroprotective 효과를 가진다고 보고⁴⁷⁾하였다. 또한 Ueng등은 tanshinone II A의 cytochrome p4051A₂에 대한 선택적 저해효과⁴⁸⁾와 Niu등이 antioxidant 활성을 보고⁴⁹⁾하였으며 Wang등은 neotanshinon이 anti-breast cancer 효과를 나타낸다고 보고⁵⁰⁾하였고 Mostallino등은 miltrone이 신경손상에 대한 저해효과를 나타낸다고 보고⁵¹⁾하였다. lignin화합물의 활성연구는 salvianolic acid A의 cytotoxicity⁵²⁾, antitumor 효과⁵³⁾, anti-fibrosis 효과⁵⁴⁾가 보고되었고 salvianolic acid B의 항혈전효과⁵⁵⁾와 enhance angiogenic process⁵⁶⁾를 보고하였으며 lithospermic acid와 lithospermic acid B는 anti-HIV효과를 가진다는 활성연구가 보고⁵⁷⁾되었다. 그 외 활성연구로는 danshinone 합성유도물인 S-3-1이 강력한 항암활성효과⁵³⁾를 나타냈고, caffeic acid 유도물에서 항암, 항바이러스등 biological 활성이 보고⁵⁸⁻⁵⁹⁾되었다.

1.3.2 국내연구동향

국내에서 연구된 황금 및 단삼의 성분이나 그 활성에 관한 연구결과에 대해 살펴보면 먼저 황금에 대한 국내 연구결과를 보면 baicalein이 LPS로 유도된 IL-12의 생산을 농도 의존적으로 저해했다는 보고⁶⁰⁾와 NO-dependent apoptotic pathway를 선택적으로 억제했다는 보고⁶¹⁾가 있고 wogonin의 항염증효과와 항종양효과⁶²⁾, neuroprotective 활성이 각각 보고⁶³⁾ 되었으며 baicalein과 baicalin의 경우 항산화효과⁶⁴⁾와 항박테리아효과가 보고⁶⁵⁾ 되었다. 이외에도 유효성분이 밝혀지지 않았지만 황금엑스를 이용하여 활성검색을 실시한 결과들도 발표되었는데 황금엑스의 항산화효과⁶⁶⁾와 황금추출물이 CYP효소중 CYP1A1/2에 억제작용이 보고⁶⁷⁾ 되었으며 황련해독탕이 rat의 국소빈혈로 인한 뇌손상과 neutrophil infiltration을 감소시키는 효과⁶⁸⁾와 rat의 담관결석, CCl₄에 의해 생성되는 간 섬유증을 억제하는 작용이 있다고 보고⁶⁹⁾ 하였다.

단삼의 국내성분연구결과를 보면 Kang등이 redical 소거능을 가지는 1-hydroxypinoresinol-O-β-D-glucoside를 분리 보고⁷⁰⁾ 하였고 Choi등이 salviamiltamide를⁷¹⁾, Ryu등이 cytotoxicity 활성을 가지는 tanshinol A, tanshinol B를 분리 보고⁷²⁾ 하였다. 활성연구에 대해 살펴보면 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydrotanshinone I의 항산화효과가 보고⁷³⁾ 되었고 tanshinone I에서는 항염증효과가 보고⁷⁴⁾ 되었으며 cryptotanshinone과 15, 16-dihydrotanshinone에서는 diacylglycerol acyltransferase의 활성을 저해⁷⁵⁾ 하고 항박테리아효과⁷⁶⁾, 항염증효과⁷⁷⁾, 항산화효과⁷⁸⁾ 등을 보고하였으며 15, 16-dihydrotanshinone I에서는 항알러지효과⁷⁹⁾와 DNA clavege를 저해하는 효과⁸⁰⁾도 보고되었다. 또한 tanshinone II A가 osteoclast differentiation과 bone resorption을 저해⁸¹⁾ 하는 효과가 보고되었고 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 유도⁸²⁾ 하고 그 외 항암효과도 가진다고 보고⁸³⁾ 하였다. 기타성분으로 lithospermate B의 항산화효과⁸⁴⁾와 emodin의 neuroamidase 효소의 저해효과⁸⁵⁾가 각각 보고 되었다.

제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1 황금과 단삼의 생리활성성분 분리

가. 실험재료 - 전남 순천에서 재배한 황금(Scutellaria Roots, 구입일 : 2005년 7월)과 원산지가 중국의 산동성인 단삼(Salvia Miltiorrhiza Roots, 구입: 2005년 10월) 3~4년근을 구입하여 각각 경희대학교 이재현교수의 확인을 거친 후 사용하였다. 단삼은 성림무역을 통해 구입하였다.

나. 기기 및 시약 - ^1H , ^{13}C -NMR spectrum은 Varian의 Gemini 2000 (300 MHz)과 Bruker의 AMX 500 (500 MHz)을 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. 용점은 fisher사의 melting point를 사용해 측정하였으며 Column chromatography용 고정상은 Merck사의 Kieselgel 60 (No. 7734, 0.063-0.200 mm) 또는 Kieselgel 60 (No. 7729, 0.063 mm 이하), Kieselgel 60 (No. 9385, 0.040-0.063mm)과 Lichroprep RP-18 (NO. 13900, 0.040-0.063 mm)을 사용하였다 또한 Mitsubishi kasei사의 MCI-gel(75-150 μ), sephadex LH-20을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ 과 RP-18 F_{254S} (Merck)를 사용하였다. 발색시약은 10% H₂SO₄를 사용하였으며, UV 254 nm, 365 nm detection을 병행하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 1급 시약을 정제 없이 사용하였고 나머지 시약은 1급 시약을 정제해서 사용하거나 특급 시약을 사용하였다. glucuronic acid 와 sugar standard는 Sigma Chemical Company, LTD에서 구입 사용하였다.

다. 황금의 추출 및 분리-황금 20 Kg을 80 °C에서 70 % 에탄올 (30 l)로 12시간씩 3회추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% EtOH extract 약 6 Kg을 얻었다. 이중 5.9 Kg을 물 20 l 에 녹여 여기에 CH₂Cl₂(15 l)를 가하여 분획할대기로 CH₂Cl₂ 와 수층으로 분획한 다음 CH₂Cl₂층을 감압농축하여 CH₂Cl₂ extract(300g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 EtOAc (15 l), n-BuOH (15 l)순으로 추출하여 EtOAc extract 120g, n-BuOH extract 2.2kg 과 H₂O extract 1.6kg을 얻었다. 이들 중 CH₂Cl₂ extract 일부(30.5g)을 silica gel column으로 분리한 결과 compound 1~7을 얻었다. EtOAc extract 또한 일부(120g)를 silica gel(0.063-0.200 mm)를 이용해 column chromatography하여 compound 8~16을 분리하였고 BuOH extract 중 50g을 silica gel column으로 분리한 결과 compound 17, 18, 19를 얻었다.

라. 단삼의 추출 및 분리-경희대 이재현교수의 확인을 거친 중국산 단삼(3-4년근) 17.45kg을 70% EtOH 로 상온에서 일주일간 3회 추출 후 농축하여 70% EtOH extract 2.37kg을 만들었다. 70% EtOH extract 를 물에 녹여 여기에 n-Hexane을 가하여 분획하여 n-Hexane extract(48.8g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 CH₂Cl₂ , EtOAc , n-BuOH순으로 추출하여 CH₂Cl₂ extract 27.89g, EtOAc extract 212.23g, n-BuOH extract 149.11g 과 H₂O extract 1.79kg을 얻었다. 이중 Hexane, CH₂Cl₂ 분획을 합쳐 column chromatography를 실시한 결과 compound 1, compound 2, compound 3, compound 4와 5를 분리하였다. EtOAc분획 또한 silica gel column chromatography와 MCI-gel, RP-18 column, sephadex LH-20 column을 이용하여 compound 6~11을 분리하였다.

2.2 황금과 단삼의 생리활성물질분석 및 동시정량법개발

2.2.1 HPLC/UV 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 기기 및 시약

가. 황금:

황금의 성분 중 본 실험에 사용한 표준물질 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester (1), wogonin (2), baicalein (3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone (4) baicalin (8), chrysin (9), oroxylin A (10)의 표준품은 안동대학교에서 분리 정제한 표준품을 제공받아 별도의 정제 없이 사용하였다. 내부표준물로 사용한 Propylparaben은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 메탄올과 아세토니트릴은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 탈이온수는 Millipore와 Milli-RO4, Milli-Q 증류장치(Bedford, USA)를 통과한 탈이온수를 사용하였다. 이동상은 0.2 μ m membrane filter (Phenomenex, CA, USA)를 통과시킨 다음 ultrasonication하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 사용하였다. HPLC system은 1525 binary pump와 autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Waters 2796 (Waters, America) system에 photodiode array detector (Waters 2996)가 장착된 기기를 사용하였다. HPLC 컬럼은 같은 고정상의 guard 컬럼 (4.0 mm x 3.0 ID mm)이 달린 Luna C18 analytical column (4.6 x 250 mm, I.D. 5 μ m, Phenomenex Torrance, CA, USA)을 사용하였고 컬럼온도를 40°C로 유지하여 사용하였다.

나. 단삼:

단삼의 성분 중 본 실험에 사용한 표준물질 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)는 안동대학교에서 분리 정제한 표준품을 제공받아 별도의 정제 없이 사용하였다. (Fig.2) 내부표준물로 사용한 4-hydroxycinnamic acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 메탄올과 아세토니트릴은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 초순수는 3차 증류수를 구입하여 Milli-Q 초순수제조 장치를 통과하여 사용하였다. 이동상은 0.2 μ m membrane filter (Phenomenex, CA, USA)를 통과시킨 다음 ultrasonication하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 사용하였다. 단삼의 생리활성성분에 대한 정량법을 개발하기 위해 사용된 표준물질의 구조는 Fig. 2와 같다. 표준품 보존용액(stock solution)은 각 물질 즉, rosmarinic acid (500 μ g/mL), salvianolic acid B (1,000 μ g/mL), 15,16-dihydrotanshinone I (500 μ g/mL), cryptotanshinone (500 μ g/mL), tanshinone I (500 μ g/mL), tanshinone IIA (500 μ g/mL)의 농도로 메탄올에 녹여 조제한 후 4 °C로 냉장보관 하였다. 사용한 기기로는 GILSON 321 PUMP, UV/VIS 151 detector, 231XL sampling injector, 및 Waters 600 PUMP, 486 Tunable Absorbance detector, 717 Plus Autosampler를 사용하였다.

2. 황금과 단삼 시료의 추출조건 설정

가. 황금

황금 시료를 0.1 g을 사용하여 70 % 에탄올 50 mL를 추가하여 60 분간 sonication한 다음 여과하여 HPLC를 사용하여 황금 각 성분이 가장 잘 분리 되는 조건을 분석조건으로 설정하였다.

나. 단삼

단삼 시료를 분말로 한 후 0.3 g을 사용하여 75 % methanol 50 mL를 추가하여 30 분간 reflux 하여 추출한 후 여과하여 HPLC를 사용하여 peak가 가장 잘 분리되는 조건을 분석조건으로 설정하였다.

3. 분석법 검증을 위한 validation 실시

가. 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 내부 표준물과의 면적비를 이용한 검량선으로 상관관계수 r^2 를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인 하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

(1) 황금 :

각 standard 의 직선성 농도범위를 wogonin, 0.2~20 $\mu\text{g/mL}$, baicalein, 0.2~50 $\mu\text{g/mL}$, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon, 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$, baicalin, 1.0~336 $\mu\text{g/mL}$, chrysin, 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$, oroxylin A, 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 로 하였다.

(2) 단삼 :

각 standard의 직선성 농도범위를 salviolic acid B, 0.2~800 $\mu\text{g/mL}$; rosmarinic acid, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA, 0.2~40 $\mu\text{g/mL}$ 로 하였다.

나. 회수율 (recovery)

최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구하였다. 회수율은 maker compound들의 양을 세 농도씩 첨가하여 측정하였다. Sample에 첨가된 표준품의 양은 황금 sample에 존재하는 각 분석물질의 양에 저, 중, 고 농도가 더해지도록 하여 5회 측정하였다. Marker compound 들의 회수율은 표준품의 양을 첨가한 sample(C_{obs})과 첨가하지 않은 sample(C_{basal})을 분석하여 분석물질의 면적과 내부표준물의 면적비를 각자의 검량선식에 대입하여 농도를 측정한 후 첨가된 농도(C_{add})와 비교하여 계산하였다. 이용된 회수율의 식은 다음과 같다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{[(\text{observed concentration} - \text{basal analyte concentration})]}{\text{added analyte concentration}} \times 100 \%$$

(1) 단삼 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액 농도는 rosmarinic acid : 5.0, 10.0, 15.0 $\mu\text{g/mL}$; salviolic acid B 60.0, 150.0, 300 $\mu\text{g/mL}$, 15,16-dihydrotanshinone I : 1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{g/mL}$; cryptotanshinone: 2.0, 4.0, 6.0 $\mu\text{g/mL}$; tanshinone I: 1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{g/mL}$; tanshinone IIA: 2.0, 4.0, 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 이다.

(2) 황금 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액 농도는 LC-MS/MS에서 wogonin-7-O-glucuronide methyl ether, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy flavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, baicalin, chrysin, 전부 10 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL로 하였고, HPLC-UV에서는 wogonin, 0.40, 1.00, 2.00 $\mu\text{g/mL}$, baicalein, 0.80, 2.00, 4.00 $\mu\text{g/mL}$, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'- dimethoxy flavon, 0.13, 0.26, 0.66 $\mu\text{g/mL}$, chrysin, 0.02, 0.05, 0.10 $\mu\text{g/mL}$, oroxylin A, 0.10, 0.20, 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 로 하였다.

다. 피크면적의 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성 (repeatability)은 standard mixture를 가지고 분석기기가 시간의 변화에 따라 변

화되는 정도를 보기 위하여 연속 5회 injection하여 retention time과 면적의 변화되는 정도를 확인하였다.

라. 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다. 단삼과 황금의 standard의 추가량은 회수율에서 첨가한 양과 같다. 정확성과 정밀성을 측정하기 위하여 일내, 일간으로 나누어 3 회씩 반복 실험하였다. Accuracy (% bias)는 다음 식에 따라 nominal concentration (C_{nom})과 observed concentration (C_{obs})의 평균값으로부터 계산하였다.

$bias (\%) = [(C_{obs} - C_{nom}) / (C_{nom})] \times 100$. Relative standard deviation (RSD)는 다음 식으로부터 계산하였다. $\%RSD = [standard\ deviation\ (SD) / (C_{obs})] \times 100$

마. 안정성 (stability)

안정성 실험에서 표준품의 메탄올 용액을 상온과 냉장 조건하에서 실험 하였다. 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 거쳐 각각 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 30 일에 한번씩 실험하였다.

바. 완건성 (robustness)

완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건 변화, 검출 파장, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충 용액의 이온강도변화, 컬럼 온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리 인자의 변화정도를 나타내는데 본 연구에서는 column의 종류와 column의 온도에 대해 검토하였다. 컬럼의 종류 및 온도를 변화시켜 **Theoretical plate (N)**, **capacity factor (k')**, **separation factor (α)**, **Resolution (Rs)** 등 상수를 계산하여 검토하였다.

4. 황금과 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 재배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다.

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 국내 중국산 수입품으로서 미룡상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 국외에서 수집한 시료로서 산동성산 (C-3, 안국시장 수집), 성도시장 수집 (C-6), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9) 등의 16종을 대상으로 분석하였다.

2.2.2 LC-MS/MS 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 기기 및 시약

가. 황금:

황금의 성분 중 본 실험에 사용한 표준물질 wogonin-7-O-glucuronide methyl ester(1), wogonin(2), baicalein(3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(4), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone(6), baicalin(8), chrysin(9)의 표준품은 안동대학교로부터 제공받았다. 내부표준품으로 사용한 puerarin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용

methanol은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 정제수는 Millipore와 Milli-RO4, Milli-Q 증류장치(Bedford, USA)를 통과한 탈이온수를 사용하였다. 이동상은 0.2 μm membrane filter (Phenomenex, CA, USA)통과 시킨 다음 ultrasonication하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 사용하였다. Wogonin-7-O-glucuronide methyl ester(102.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), wogonin(144 $\mu\text{g}/\text{mL}$), baicalein(88 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon(132.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavon(58.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), baicalin(97 $\mu\text{g}/\text{mL}$), chrysin(108.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 stock solution을 methanol로 제조한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉장보관하였다. Standard solution은 사용 직전에 working 농도로 이동상에 serial dilution 하여 사용하였다. 내부표준물질(I.S, puerarin)은 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 methanol에 제조하여 사용하였다. 검량선은 compound 1 (0.2 - 1020 ng/mL), compound 2 (0.3 - 1440 ng/mL), compound 3 (1.1 - 1100 ng/mL), compound 4 (1.3 - 1320 ng/mL), compound 6 (1.2 - 1180 ng/mL), compound 8 (1.0 - 970 ng/mL), compound 9 (1.1 - 1090 ng/mL) 의 농도로 작성하였다. Quality control (QC) sample은 황금 분말에 puerarin을 surrogate standard로 하여 표준물 첨가를 하였다. QC sample은 최종 농도 10, 500, 1000 ng/mL로 준비하였다. Surrogate standard는 한약재와 같은 blank 시료를 구하기 힘든 경우 구조가 비슷한 물질을 선택하여 다른 성분을 대신하는 것을 말한다. Puerarin은 flavonoid계로써 황금의 지표성분과 구조가 비슷하다.

나. 단삼

단삼 성분 중 본 실험에 사용한 tanshinone I, tanshinone IIA, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B의 표준품은 안동대학교로부터 제공받아 별도의 정제 없이 사용하였다. 내부표준물질로 사용한 imperatorin(지실의 성분 중 하나)은 영남대학교로부터 제공받았다. HPLC용 methanol과 acetonitrile은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 formic acid는 Fluka사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 정제수는 Millipore와 Milli-RO4, Milli-Q 증류장치(Bedford, USA)를 통과한 탈이온수를 사용하였다. 이동상은 0.45 μm membrane filter(Phenomenex, CA, USA)를 통과시킨 후 ultrasonication에 의해 탈기하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 그대로 사용하였다. 한약재 검체는 Ball mill (Retsch, Rheinsche, Germany)을 사용하여 분말로 만든 다음 표준체 (standard test sieve No.25, 0.710mm, Cisa, Barcelona, Spain)를 통과시켜 균질한 재료로 만들어 분석하였다. 성분 추출은 Ultrasonicator (Bransen 8510, Branson, Danbury, CT, USA) 를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 표준품의 구조는 Fig. 4에 나타내었다.

각 표준품의 보존용액(stock solution)은 tanshinone I (92 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tanshinone IIA (108 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cryptotanshinone (95 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 15,16-dihydrotanshinone I (132 $\mu\text{g}/\text{mL}$), rosmarinic acid (190 $\mu\text{g}/\text{mL}$), salvianolic acid B (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 의 농도로 methanol로 제조한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장 보관하고 분석 시마다 작업농도(working range)로 이동상 용매에 계열희석(serial dilution)하여 사용하였다. 내부표준물질 (Imperatorin)은 96.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 methanol에 제조하여 사용하였다. 각 물질의 검량선은 LOQ와 실제 함량을 고려해서 tanshinone I (0.92 ~ 92.0 ng/mL), tanshinone IIA (1.08 ~ 108.0 ng/mL), 15,16-dihydrotanshinone I (0.66 ~ 66.0 ng/mL), cryptotanshinone (0.95 ~ 95.0 ng/mL), salvianolic acid B (7.5 ~ 1500.0 ng/mL), rosmarinic acid (4.75 ~ 475.0 ng/mL) 의 범위로 작성하였으며 내부표준물질의 최종 검액 중 농도는 6.45 ng/mL가 되도록 하였다.

2. 황금과 단삼 시료의 추출조건 설정

가. 황금

HPLC system은 degasser와 binary pump, autosampler 가 장착된 HP 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, column oven을 추가로 장착하여 사용하였다. HPLC분리는 역상 Luna C18 analytical column을 사용하였고 컬럼과 동일한 고정상으로 충전된 guard 컬럼 (4.0 L mm x 2.0 ID mm)을 사용하였다. 컬럼 온도는 40℃로 유지하여 사용하였고, autosampler는 10℃로 유지하였으며 주입량은 10 μ L로 하였다. 황금 시료를 0.1 g을 사용하여 70 % 에탄올 50 mL를 추가하여 60 분간 sonication한 다음 여과하여 HPLC를 사용하여 황금 각 성분이 가장 잘 분리 되는 조건을 분석조건으로 설정하였다.

나. 단삼

HPLC system은 degasser와 binary pump, autosampler 가 장착된 HP 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, column oven을 추가로 장착하여 사용하였다. 크로마토그래피 분리는 78% acetonitrile (0.1% formic acid를 포함)로 isocratic elution하여 사용하였다. 유속은 0.2 mL/min으로 하였다. Mass system은 Turbo-IonSpray interface가 장착된 Sciex API 3000 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Concord, Canada) 사용하였다.

Ion spray interfac는 터보 가스 온도360 ℃ 와 함께5.5 kV에서 양이온모드로 사용하였다. 최적 측정 파라메타는 모든 성분 혼합물을 흐름주입(flow injection)하여 최적조건을 구하였고 다음 조건으로 정량하였다. : nebulizing gas flow, 1.31 L/min (setting 11); auxiliary gas flow, 6.1 L/min; curtain gas flow, 1.25 L/min (setting 10); orifice voltage, 53V; ring voltage, 400V, collision gas (nitrogen) pressure, 3.58×10^{-5} Torr(setting7).단삼의 지표성분들의 정량은 내부표준법에 의해 precursor 와 그와 관련된 product 이온의 MRM 방법으로 분석하였다. 지표성분들과 I.S의 특징적인 이온 변화는 T-I (m/z 277 \rightarrow m/z 249), T-IIA (m/z 295 \rightarrow m/z 277), DT (m/z 279 \rightarrow m/z 261), CT (m/z 297 \rightarrow m/z 251), SA (m/z 719 \rightarrow m/z 520), RA (m/z 361 \rightarrow m/z 163), I.S (m/z 271 \rightarrow m/z 203) 이다.

검액의 추출방법은 HPLC에서 입증된 추출법을 바탕으로 하였다. HPLC 분석방법에서 추출에 대한 실험을 한 결과 75% MeOH로 30분간 sonication 추출한 방법이 가장 적절하여 본 추출방법도 동일하게 하였으며, LC/MS/MS의 주입 시 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 단삼의 분말검체 100 mg 을 75% MeOH을 50 mL 가하여 30분간 sonication 추출하였다. 이 추출액을 원심분리 한 후 상층액만 취하여0.2 μ m membrane filter하였다. 이를 이동상에 100배 희석한 후 I.S와 함께 LC/MS/MS에 주입 하였다.

3. 분석법 검증을 위한 validation 실시

가. 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 내부 표준물과의 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 r^2 를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인 하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

(1) 황금 :

각 standard 의 직선성 농도범위를 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester(0.2 ng/mL~1020 ng/mL), wogonin(0.3 ng/mL~1440 ng/mL), baicalein(1.1 ng/mL~1100 ng/mL), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(1.3 ng/mL~1320 ng/mL), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone (1.2 ng/mL~1180 ng/mL), baicalin(1.0 ng/mL~970 ng/mL), chrysin(1.1 ng/mL~1090 ng/mL) 로 하였다.

(2) 단삼 :

각 standard의 직선성 농도범위를 salvianolic acid B, 7.5~1500 ng/mL; rosmarinic acid, 4.5~475 ng/mL; 15,16-dihydrotanshinone I, 0.66~66 ng/mL; cryptotanshinone, 0.95~95 ng/mL; tanshinone I, 0.92~92 ng/mL; tanshinone IIA, 1.08~108 ng/mL로 하였다.

나. 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의(단삼은 4 batch) 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구하였다. 회수율은 maker compound들의 양을 세 농도씩 첨가하여 측정하였다. Sample에 첨가된 표준품의 양은 황금 sample에 존재하는 각 분석물질의 양에 저, 중, 고 농도가 더해지도록 하여 5회 측정하였다. Marker compound 들의 회수율은 표준품의 양을 첨가한 sample(C_{obs})과 첨가하지 않은 sample(C_{basal})을 분석하여 분석물질의 면적과 내부 표준물의 면적비를 각자의 검량선식에 대입하여 농도를 측정 후 첨가된 농도(C_{add})와 비교하여 계산하였다. 이용된 회수율의 식은 다음과 같다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{[(\text{observed concentration} - \text{basal analyte concentration})]}{\text{added analyte concentration}} \times 100 \%$$

(1) 황금 :

20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액 농도는 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, baicalin, chrysin, 전부 10 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL로 하였다.

(2) 단삼 :

5개의 QC sample(control sample 포함)은 method validation 실험으로, 최종 농도가 tanshinone I (0, 1.84, 3.68, 9.20, 18.40 ng/mL), tanshinone IIA (0, 2.70, 5.40, 13.61, 27.00 ng/mL), cryptotanshinone (0, 1.52, 3.04, 7.60, 15.20 ng/mL), 15, 16-dihydrotanshinone I (0, 0.66, 1.32, 3.30, 6.60 ng/mL), rosmarinic acid(0, 4.75, 9.50, 23.94, 47.88 ng/mL)이 되도록 준비하였다.

다. 피크면적의 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성 (repeatability)은 standard mixture를 가지고 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화되는 정도를 보기 위하여 연속 5회 injection 하여 retention time과 면적의 변화되는 정도를 확인하였다.

라. 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다.

단삼과 황금의 standard의 추가량은 회수율에서 첨가한 양과 같다. 정확성과 정밀성을 측정하기 위하여 일내, 일간으로 나누어 3 회씩 반복 실험하였다. Accuracy (% bias)는 다음 식에 따라 nominal concentration (C_{nom})과 observed concentration (C_{obs})의 평균값으로부터 계산하였다.

$\text{bias}(\%) = [(C_{obs} - C_{nom}) / (C_{nom})] \times 100$. Relative standard deviation (RSD)는 다음 식으로부터 계산하였다. $\%RSD = [\text{standard deviation (SD)} / (C_{obs})] \times 100$

마. 안정성 (stability)

안정성 실험에서 표준품의 메탄올 용액을 상온과 냉장 조건하에서 실험 하였다. 표준품에 대하여 상

온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 거쳐 각각 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 30 일에 한번씩 실험 하였다.

바. 완건성 (robustness)

완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건 변화, 검출 파장, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충 용액의 이온강도변화, 컬럼 온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리 인자의 변화정도를 나타내는데 본 연구에서는 column의 종류와 column의 온도에 대해 검토하였다. 컬럼의 종류 및 온도를 변화시켜 **Theoretical plate (N)**, **capacity factor (k')**, **separation factor (α)**, **Resolution (Rs)** 등 상수를 계산하여 검토하였다.

4. 황금과 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 현재 국내에서 유통 중인 것과 재배한 것을 대상으로 수집하여 사용하였다. 순천산(SUNCHN), 경동시장에서 구입한 한국산(GYD-KOR)과 중국산(GYD-CHN), 대구 약령시장에서 구입한 한국산(DEG-KOR)과 중국산(DEG-CHN), 대구가톨릭 대학교에서 직접 재배(UNI-CAT)한 황금검체는 대구가톨릭대학교로부터 제공받았다. 그 외 KJG-1과 2는 청주 동제원에서 구입하였다.

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 국내 중국산 수입품으로서 미룡상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 서울 제기동 수집품 중국 감숙성산 (K-3), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 기정장약 중국 난주시장수집 감숙성산 (C-1), 창달중약 안국시장수집품 중국 하북성산 (C-2), 창달중약 안국시장수집품 중국 산둥성산 (C-3), 성도시장수집품 사천성산 (C-4), 중국 장사시장수집품 (C-5), 성도시장 수집 (C-6), 중국 곤명시장수집품 (C-7), 중국 난주시장수집품 (C-8), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9), 중국 곤명시장수집품 운남성산 (C-10), 중국 장사시장수집품 (C-11), 중국 시상판나시장 수집품 (C-12)의 16종을 대상으로 분석하였다.

2.3 유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성성분의 효능 유전자 검증

1. 연구개발 내용

가. 1차년도

- 청열약으로 분류되는 황금과 성분 8종을 제 1세부에서 제공받아 황금의 효능 중 항염증 효과에 대한 실험을 진행.
- Microarray를 실행하기 위하여 mouse macrophage cell line Raw 264.7 cell과 J774.1 cell를 비교하여 Raw 264.7 cell로 결정하고 각 약재를 시간별·농도별로 처리.
→ 각 약재의 시간 및 농도는 Cytotoxicity assay와 PGE₂ assay (COX 활성화) 및 NO assay를 진행하여 결정.
- Raw 264.7 cell에 각 약재를 처리 후 ABI mouse chip (whole gene)을 이용하여 scan 후 Avadis[®], R을 이용하여 분석
→ 염증을 유도한 시료를 사용하였기 때문에 대부분의 gene들이 염증 관련 gene의 변화를 볼 수 있었음.
- 그 외 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남을 알 수 있었음.
- 염증 관련 유전자들 중에 22개의 대표적인 gene을 선별하여 RT-PCR을 실행한 결과 시간별로

gene들이 변화함을 알 수 있었음.

- Oligochip을 이용한 약리효능에 대한 biomarker genes들에 대한 결과는 data base 시스템 구축을 위한 기초 자료로 제공 완료.

나. 2차년도

- 한의학적으로 활혈거어약으로 분류되는 단삼의 70% 추출물과 성분 6종 중 7종의 약물을 제 1 세부에서 제공받았음.
- 단삼은 주로 cardiovascular에 관련된 치료에 사용되는 것으로 이를 증명하기 위해 항산화 효과에 중점을 두어 실험을 진행함.
- Raw 264.7 cell에 각 약물을 2, 4, 8, 24시간을 처리 후 대표적인 항산화효과 지표인 SOD, NO, GSH를 측정된 결과 시간이 지날수록 NO와 SOD의 생성이 많아지고 GSH는 4시간 이하에서 많이 생성을 됨을 알 수 있었음.
- cytotoxicity와 각 항산화 효과에 대한 실험 결과를 토대로 DNA chip에 적용할 농도와 시간을 정하여 ABI mouse chip (whole gene)을 실행하여 분석한 결과, 항산화와 관련된 유전자가 포함된 pathway가 가장 많이 변화함을 알 수 있었음. (oxidative stress, inflammation, TGF- β 등)
- 변화된 Pathway들을 분석한 결과, Mapkapk5, Mapk13, Dusp6, Dusp2 등의 유전자들이 공통적으로 변화함.
- 선별된 유전자들에 대한 RT-PCR을 시행함.
- 그 외, Apoptosis, PDFG, VGF, TCA cycle 등에 영향을 미침을 알 수 있었음.
- Oligochip을 이용한 약리효능에 대한 biomarker genes들에 대한 결과는 data base 시스템 구축을 위한 기초 자료로 제공함.

2.2. 연구방법

가. Cytotoxicity assay

세포독성 측정은 WST-8을 사용하는 Cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)을 이용해 측정. 96 well microplate에 Raw 264.7 세포는 7×10^3 cells/well, J774A.1 세포는 1×10^4 cells/well이 되도록 분주. 여러 가지 농도로 희석한 약물들을 각 well에 첨가 후 48시간 동안 배양. 각 약물들은 DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma)에 녹인 후 배지 용액으로 희석하여 사용하였으며, 최종 DMSO농도는 1%가 되게 하였으며 well 당 총 부피는 100 μ l가 되도록 함. 48시간 배양 후 CCK-8용액을 10 μ l씩 첨가하여 4시간 배양 후 microplate reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도 측정. 대조군에 대한 %로 표시.

$$\% = \frac{(\text{약물첨가well의OD}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}) - 1\text{A} \text{Bkwell의OD}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}}{(\text{Controlwell의OD}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}) - 1\text{A} \text{Bkwell의OD}_{450\text{nm}} \text{ 평균값}} \times 100$$

나. Raw 264.7 세포와 J774.1A 세포에서 COX-2 유발

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 세포주와 J774.1A 세포주는 ATCC (U.S.A.)에서 분양받아 사용하였고, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), FBS (5.5%)을 함유하는 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였음. COX-2를 유발하기 위하여 배양된 Raw 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well, J774A.1 세포는 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml)를 가한 후 18시간동안 배양함. 대조군은 LPS만 첨가한 군 (100% 활성 유발)과 LPS를 첨가하지 않은 군 (0% 활성 유발: blank)을 사용하였음. 비교약물로

대표적인 NSAIDs인 ASA (acetylsalicylic acid; aspirin, Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)를 사용함. 약물처리 후 각 well에 arachidonic acid를 최종농도가 30 μ M이 되도록 첨가하고 37°C에서 15분간 배양한 후, 상등액을 취하여 PGE₂를 측정할 때까지 -70°C에 보관하였음.

다. PGE₂의 정량

LPS의 첨가로 유발된 COX-2의 농도는 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 농도 변화를 측정하는 간접적인 방법을 사용함. PGE₂ assay는 EIA kit (Amershampharmacia, Ltd., U.K.)를 사용하였음. Goat anti-mouse Ig가 부착되어 있는 96-well plate에 320~2.5 pg/well 농도의 PGE₂ 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE₂-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE₂를 각각 50 μ l씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 phosphate buffered saline (PBS)로 항체와 결합하지 않은 PGE₂ 혹은 PGE₂-peroxidase conjugate를 제거함. 항원-항체 복합체에 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)용액 150 μ l를 가하고 실온에서 30 분간 반응시킨 후, 1 M H₂SO₄ 100 μ l를 가하여 반응을 중단시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정함. 이 방법은 시료의 PGE₂와 첨가한 PGE₂-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였음.

라. NO assay (Griess reagent System)

제공된 시료의 NO 생성을 측정하기 위하여 1879년에 Griess가 제시한 diazotization reaction에 의해 진행. No assay kit (Promega, Corp, USA)를 사용하였음. 산성 상태에서 sulfanilamide와 NED (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) 사용하여 assay를 진행함. Raw 264.7 cell과 J774.1A cell을 24well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 LPS를 가한 후 24시간 배양함. 제공된 약물을 농도 · 시간별로 처리 한 후 상등액 수집. 제공된 standard와 시료 상등액을 50 μ l를 취해 96 well plate에 넣고 sulfanilamide sol'n 50 μ l를 첨가하여 상온에서 약 10분간 반응시킨 후 NED sol'n을 50 μ l를 분주하고 10분 반응 후 550 nm에서 흡광도 측정.

마. SOD assay (WST-1)

NO assay와 같은 조건으로 처리한 후 well에 부착된 세포를 수집하여 차가운 (ice-cold) PBS 300 μ l를 넣고 30초간 sonication 한 후 13000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 sample을 준비. SOD assay kit (Dojindo inc. Japan)를 사용함. 준비한 sample과 제공되어 희석한 standard를 96 well plate에 넣고 WST 200 μ l씩 분주하고 제시한대로 dilution buffer와 Enzyme working sol'n을 해당 well에 분주함. 37°C에서 20분간 incubation 한 후 450nm에서 흡광도 측정. Bradford법으로 rotein을 정량하고 SOD 활성을 protein 량으로 보정.

바. Glutathione (GSH) assay

GSH assay kit (Oxisreserach, USA)를 사용함. SOD assay를 위해 준비한 시료 중 100 μ l를 취하여 Metaphosphoric acid (MPA)를 10 g/100 ml로 제조하여 100 μ l를 넣은 후 13000rpm에서 10분간 원심분리하여 protein을 제거. 시료 용액과 standard를 제공된 buffer에 희석하여 96 well plate에 180 μ l씩 첨가 후 R1 reagent 10 μ l, R2 reagent (30% NaOH)를 10 μ l 첨가하여 상온에서 빛을 차단시켜 10분간 반응시킴. 400 nm에서 흡광도 측정하여 GSH의 양 계산. SOD assay 시료와 동일한 시료이므로 SOD assay에서 정량한 protein 양으로 보정.

사. Total RNA 분리

약제를 시간별로 처리한 후 RNA purification kit (Qiagen)로 RNA를 분리하여 Spectrophotometer와 전기영동으로 양 및 순도 결정.

아. 항염증 / 항산화 관련 유전자의 발현 변화

Chip 실험 전에 본 연구에서 항염증 / 항산화와 관련된 대표적인 유전자들의 변화를 검색하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 유전자의 발현 변화를 검색함. 황금의 항염증 효과의 확인을 위해

IL-1, ptges2, TNF- α 의 발현 변화를 검색함. 단삼의 항산화 효과 확인을 위해 GCS, GPx, NOS, SOD의 발현 변화를 검색함.

자. DNA chip 실험을 위한 시료의 전처리

Microarray chip에 적용시키기 위하여 total RNA에서 cDNA 또는 cRNA 합성 및 labeling을 진행하고자 제공된 RT labeling kit (1차년도) 또는 RT-IVT labeling kit (2차년도)와 Purification kit (이상 Applied Biosystem, USA)을 사용하여 제공된 사용방법으로 실험을 진행.

차. Hybridization (혼성화 반응)

합성한 cDNA 또는 cRNA를 chip에 첨가한 후 55°C에서 16시간 hybridization 시킴. 그 후 반응한 chip을 washing 한 후 Ab 부착 및 substrate 첨가하여 scan 및 분석 진행.

카. DNA chip의 분석

Chip을 AB 1700 scanner에서 scan함. 각 position에서의 signal을 Avadis[®], R, GenPlex[®]을 사용하여 분석하여 대조군과 실험군의 data를 비교하여 유전자발현 양상의 차이를 분석. 통계적으로 $p < 0.05$ 이하이며 2배 이상 증가하거나 2배 이상 감소한 유전자를 유의하게 변한 것으로 선택.

타. DNA chip의 결과 확인 (RT-PCR)

Chip의 분석 결과 선정된 유전자들의 실질적인 증감을 증명하기 위하여 chip 분석에 사용한 RNA 시료로 선정된 유전자들에 대한 RT-PCR 수행. 효능 유전자의 발현 여부 확정.

파. DB 구축

한약재 과학화 DB 구축 과제에 DB 구축을 위한 자료 제공.

제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 황금과 단삼의 생리활성성분 분리

2.2.1 황금의 생리활성물질 분리

Compound 1 (guaiacol); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200MHz)ppm: 6.86~6.84(4H, m, H-3, 4, 5, 6), 3.85(3H, s, OCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 50MHz)ppm: 146.7(C-1), 145.7(C-6), 121.6(C-2), 120.3(C-5), 114.7(C-3), 110.8(C-4), 56.0(OCH_3)

Compound 2(paeonol); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 300MHz)ppm: 7.84(1H, d, $J=9\text{Hz}$, H-6), 6.53(1H, dd, $J=9\text{Hz}$ and 2.7Hz , H-5), 6.47(1H, d, $J=2.7$, H-3), 3.82(3H, s, OCH_3), 2.56(3H, s, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 75.5MHz)ppm: 113.7(C-1), 165.7(C-2), 100.7(C-3), 164.1(C-4), 107.3(C-5), 133.3(C-6), 55.7(OCH_3), 203.1(C=O), 26.6(CH_3)

Compound 3 (oroxylin A); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 250MHz)ppm: 3.75(3H, s, OCH_3), 6.63(1H, s, H-3), 6.97(1H, s, H-8), 8.10~7.52(5H, m, H-2'~6'), 12.95(1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 62.5MHz)ppm: 182.5 (C-4), 163.4(C-2), 157.9(C-7), 153.0 (C-9), 152.8(C-5), 132.2(C-4'), 131.7(C-1'), 130.9(C-8), 129.4(C-3', C-5'), 126.6(C-2', C-6'), 104.9(C-3), 104.5 (C-10), 94.6(C-6), 60.2(OCH_3)

Compound 4 (chrysin); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 250MHz)ppm: 6.21(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-6), 6.51(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-8), 6.95(1H, s, H-3), 7.52~7.63(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.03~8.06 (2H, m, H-2', 6'), 12.81(1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 62.5MHz)ppm: 182.1 (C-4), 164.7(C-7), 163.4(C-2), 161.7(C-5), 157.7 (C-9), 132.3(C-4'), 130.9 (C-1'), 129.4(C-2', C-6'), 126.6(C-3', C-5'), 105.4(C-3), 104.2 (C-10), 99.3(C-6), 94.4(C-8)

Compound 5(tenaxin I); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 250MHz)ppm: 3.81, 3.89, 4.01(3H, s, each $3\times\text{OCH}_3$), 7.09~7.01(2H, m H-3', 5'), 7.13(1H, s, H-3), 7.45~7.39(1H, m, H-4'), 7.87(1H, dd, $J=6.5$ and 1.5Hz , H-6') 10.93(1H, br.s, 2'OH), 12.67(1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 62.5MHz)ppm: 183.0(C-4), 162.1(C-2), 157.2(C-2'), 152.8(C-7), 148.7(C-9), 145.7(C-5), 135.9(C-6), 133.4(C-4'), 132.9(C-8), 128.5(C-6'), 119.9(C-5'), 117.4(C-1'), 117.3(C-3'), 109.0(C-3), 106.4(C-10), 62.1(8- OCH_3), 61.7(7- OCH_3), 60.8(6- OCH_3)

Compound 6(skullcapflavone II); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 250MHz)ppm: 3.74, 3.78, 3.81, 4.00(3H, s, each $4\times\text{OCH}_3$), 6.34(1H, s, H-3), 6.61(2H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-3', 5'), 7.31(1H, t, $J=7.5\text{Hz}$, H-4') 10.16(1H, br.s, 2' OH), 12.64(1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 62.5MHz)ppm: 182.7(C-4), 162.6(C-2), 158.5(C-6'), 156.9(C-2'), 152.8(C-7), 148.8(C-9), 146.5(C-5), 136.0(C-6), 132.8(C-8), 132.8(C-4'), 118.9(C-10), 112.1(C-3), 109.1(C-1'), 109.0(C-3'), 102.5(C-5'), 62.0(8- OCH_3), 61.7(7- OCH_3), 60.8(6- OCH_3), 56.1(6'- OCH_3)

Compound 7(rivularin); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 250MHz)ppm: 3.69, 3.74, 3.90 (3H, s, each $3\times\text{OCH}_3$), 6.28(1H, s, H-3), 6.60(1H, s, H-6), 6.60(2H, d, $J=8.2\text{Hz}$, H-3', 5'), 7.31(1H, t, $J=8.2\text{Hz}$, H-4'), 12.70(1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 62.5MHz)ppm: 182.4(C-4), 162.4(C-2), 158.6(C-7), 158.6(C-6'), 157.0(C-5), 156.9(C-2'), 150.0(C-9), 132.8(C-4'), 128.6(C-8), 112.2(C-3), 109.2(C-1'),

109.0(C-3'), 104.2(C-10), 102.5(C-5'), 96.2(C-6), 61.3(8-OCH₃), 56.8(7-OCH₃), 56.1(6'-OCH₃)

Compound 8 (wogonin); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 3.84(3H, s, C8 -OCH₃), 6.30(1H, s, H-3), 6.99(1H, s, H-6), 7.57~7.62 (3H, m, H-3', 4', 5'), 8.04~8.08(2H, m, H-2', 6')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.3 (C-4), 163.2(C-2), 157.7(C-7), 156.5 (C-9), 149.9(C-5), 132.3(C-4'), 131.1 (C-1'), 129.5(C-3', C-5'), 128.0(C-8), 126.5(C-2', C-6'), 105.3(C-3), 104.0 (C-10), 99.4(C-6), 61.3(8-OCH₃)

Compound 9 (baicalein); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 6.62(1H, s, H-3), 6.92(1H, s, H-8), 7.51~7.62(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.03~8.07(2H, m, H-2', 6')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.4 (C-4), 163.1(C-2), 153.9(C-7), 150.1 (C-9), 147.2(C-5), 132.1(C-4'), 131.2 (C-1'), 129.6(C-6), 129.4(C-3', C-5'), 126.5(C-2', C-6'), 104.7(C-10), 104.5 (C-3), 94.2(C-8)

Compound 10 (2',5,6'-trihydroxy-7,8- dimethoxyflavone : viscidulin II) ; ¹H-NMR (pyridine-*d*₅, 250 MHz, δ ppm) : 3.75, 3.93 (ea. 3H, ea. s, 7,8-OCH₃), 6.63 (1H, s, H-3), 6,95 (1H, s, H-6), 6.81 (2H, d, *J*=8.2, H-3', 5'), 7.28 (1H, t, *J*=8.2, H-4'), 13.42 (1H, br s, 5-OH)

¹³C-NMR (pyridine-*d*₅, 62.5 MHz, δ ppm) : 164.1 (C-2), 113.1 (C-3), 183.4 (C-4), 158.1 (C-5), 96.1 (C-6), 158.7 (C-7), 129.5 (C-8), 151.1 (C-9), 105.5 (C-10), 107.5 (C-1'), 158.8 (C-2' , 6'), 110.3 (C-3' , 5'), 132.7 (C-4'), 56.2 (7-OCH₃), 61.4 (8-OCH₃)

Compound 11 (2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone) ; ¹H-NMR (CD₃OD, 250 MHz, δ ppm) : 3.79, 3.82 (ea 3H, ea s, 8, 6' -OCH₃), 6.23 (1H, s, H-6), 6,27 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, d, *J*=8.5, H-3'), 6.60 (1H, d, *J*=8.5, H-5'), 7.29 (1H, dd, *J*=7.8 and 8.5, H-4')

¹³C-NMR (CD₃OD, 62.5 MHz, δ ppm) : 163.7 (C-2), 113.2 (C-3), 184.1 (C-4), 158.1 (C-5), 100.4 (C-6), 158.3 (C-7), 129.1 (C-8), 152.3 (C-9), 103.3 (C-10), 105.4 (C-1'), 158.5 (C-2'), 109.6 (C-3'), 133.6 (C-4'), 110.8 (C-5'), 160.2 (C-6'), 62.0 (8-OCH₃), 56.4 (6' -OCH₃)

Compound 12 (5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz) ppm: 6.21(1H, s, H-3), 6.32(1H, d, *J*=2Hz, H-6), 6.34(1H, d, *J*=2Hz, H-8), 6.42(2H, d, *J*=8.4Hz, H-3', H-5'), 7.12(1H, t, *J*=8.4Hz, H-4')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 75MHz)ppm: 181.6 (C-4), 164.0(C-7), 162.2(C-2), 161.4 (C-9), 158.2(C-5), 156.5(C-2", C-6"), 131.7(C-4'), 111.8(C-3'), 108.2(C-3), 106.5(C-3', C-5'), 103.7(C-10), 98.6 (C-6), 93.7(C-8)

Compound 13 (5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone); ¹H-NMR (Acetone -*d*₆, 300MHz)ppm: 3.74(3H, s, -OCH₃), 3.77(3H, s, -OCH₃), 6.32(1H, s, H-6), 6.34(1H, s, H-3), 6.56(1H, d, *J*=8.9Hz, H-3'), 6.93(1H, d, *J*=8.9Hz, H-4')

¹³C-NMR(Acetone-*d*₆, 75MHz)ppm: 183.1 (C-4), 162.2(C-2), 158.3(C-7), 157.6 (C-5), 149.4(C-9), 147.2(C-6'), 143.9 (C-5'), 128.5(C-8), 120.4(C-4'), 115.9 (C-1'), 113.0(C-3), 112.3(C-3'), 105.4 (C-10), 99.6(C-6), 61.8(8-OCH₃), 61.5 (6'-OCH₃)

Compound 14 (wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz)ppm: 3.66(3H, s, -COOCH₃), 3.88(3H, s, C8-OCH₃), 5.33(1H, d, *J*=6.4Hz, anomeric H), 6.71(1H, s, H6), 7.06(1H, s, H-3), 7.57~7.66(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.06~8.09(2H, m, H-2', 6')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 75MHz)ppm: 182.5(C-4), 169.3(C-6"), 163.7(C-2), 156.2(C-7 or

C-9), 156.0(C-9 or C-7), 149.4(C-5), 132.4(C-4'), 130.9(C-1'), 129.4(C-8, C-3', C-5'), 126.6(C-2', C-6'), 105.6(C-3), 105.4(C-10), 99.7(C-1"), 75.7(C-5"), 75.3(C-3"), 73.0(C-2"), 71.5(C-4"), 61.6(8-OCH₃), 52.2(COOCH₃)

Compound 15(6"-ethyl-wogonoside); ¹H-NMR (CD₃OD, 250MHz)ppm: 1.27(3H, t, *J*=7.1Hz, -OCH₂CH₃), 3.95(3H, s, -OCH₃), 4.23(2H, q, *J*=7.1Hz, -OCH₂CH₃), 5.20(1H, d, *J*=7.2Hz, anomeric H), 6.60(1H, s, H-6), 6.79(1H, s, H-3), 7.57(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.01(2H, m, H-2', 6')

¹³C-NMR(CD₃OD, 62.5MHz)ppm: 184.2(C-4), 170.3(C-6"), 165.9(C-2), 157.6(C-7), 158.0(C-9), 151.1(C-5), 133.3(C-4'), 132.4(C-1'), 130.3(C-3', C-5'), 131.2(C-8), 127.5(C-2', C-6'), 106.2(C-3), 107.2(C-10), 101.9(C-1"), 100.3(C-6), 76.8(C-3"), 77.2(C-5"), 74.5(C-2"), 72.8(C-4"), 62.5(8-OCH₃), 61.6(-OCH₂CH₃), 14.4(-OCH₂CH₃)

Compound 16(viscidulin III-2' -O-glucoside); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 3.68(3H, s, 8-OCH₃), 3.74(3H, s, 6'-OCH₃), 4.77(1H, d, *J*=7.7Hz, anomeric H), 6.21(1H, s, H-6), 6.25(1H, s, H-3), 6.88(1H, d, *J*=9.0Hz, H-3'), 6.98(1H, d, *J*=9.0Hz, H-4')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 181.6(C-4), 160.3(C-2), 156.7(C-5), 156.7(C-7), 150.6(C-9), 147.9(C-2'), 146.1(C-6'), 145.3(C-5'), 127.6(C-8), 119.3(C-4'), 118.0(C-1'), 112.0(C-3), 111.6(C-3'), 103.8(C-10), 101.5(C-1"), 99.9(C-6), 77.3(C-5"), 76.8(C-3"), 73.4(C-2"), 69.9(C-4"), 61.0(C-6"), 60.8(8-OCH₃), 60.8(6'-OCH₃)

Compound 17(wogonoside); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 3.88(3H, s, C8-OCH₃), 5.09(1H, d, *J*=11Hz, anomeric H), 6.68(1H, s, H-6), 7.06(1H, s, H-3), 7.60~7.62(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.06~8.09(2H, m, H-2', 6'), 12.80(1H, s, 5-OH)

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.6(C-4), 171.9(C-6"), 163.7(C-2), 156.8(C-7), 156.2(C-9), 149.3(C-5), 132.5(C-4'), 131.0(C-1'), 129.5(C-3', C-5'), 129.4(C-8), 126.6(C-2', C-6'), 105.4(C-3), 105.4(C-10), 100.3(C-1"), 99.2(C-6), 76.7(C-3"), 74.2(C-5"), 73.3(C-2"), 72.1(C-4"), 61.6(8-OCH₃)

Compound 18(rutin); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300MHz)ppm: 1.34(3H, brs, CH₃), 3.80~4.10(10carbohydrate protons), 5.14(1H, s, H-1"), 5.78(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1"), 6.53(2H, brs, H-6 and H-8), 7.17(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 7.90(1H, dd, *J*=8.5 and 2.5 Hz, H-6'), 8.13(1H, brs, H-2')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 75MHz)ppm: 177.4(C-4), 164.0(C-7), 161.3(C-5), 156.8(C-9), 156.6(C-2), 148.5(C-4'), 144.8(C-3'), 133.5(C-3), 121.5(C-6'), 121.4(C-1'), 116.5(C-5'), 115.4(C-2'), 104.2(C-10), 101.4(C-1"), 100.9(C-1"), 99.0(C-6), 93.9(C-8), 76.6(C-3"), 76.1(C-5"), 74.3(C-2"), 72.1(C-4"), 70.6(C-2", C-3"), 70.3(C-4"), 68.5(C-5"), 67.3(C-6"), 18.0(C-6")

Compound 19(baicalin); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 5.01(1H, d, *J*=11Hz, anomeric H), 6.99(1H, s, H-3), 7.03(1H, s, H-8), 7.57~7.59(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.04~8.07(2H, m, H-2', 6'), 12.55(1H, s, 5-OH)

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.8(C-4), 171.9(C-6"), 163.7(C-2), 152.0(C-7), 149.4(C-9), 146.8(C-5), 132.3(C-4'), 131.0(C-6), 131.0(C-1'), 129.4(C-3', C-5'), 126.6(C-2', C-6'), 106.3(C-10), 104.9(C-3), 100.9(C-1"), 94.5(C-8), 76.0(C-3"), 74.4(C-5"), 73.1(C-2"), 72.2(C-4")

2.2.2 단삼의 생리활성물질 분리

Compound 1 (danshenspiroketallactone); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : 8.85 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-1), 8.33 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-6), 7.62 (1H, dd, $J=8.5$ and 7 Hz, H-2), 7.54 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-7), 7.45 (1H, d, $J=7$ Hz, H-3), 4.46 (1H, t, $J=8.1$ Hz, H-14), 3.80 (1H, t, $J=8.1$ Hz, H-14), 2.95 (1H, m, H-15), 2.73 (3H, s, 18- CH_3), 2.52 (1H, dd, $J=12.9$ and 7 Hz, H-16), 2.10 (1H, dd, $J=12.9$ and 10.5 Hz, H-16), 1.24 (3H, d, $J=7$ Hz, H-17)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 118.2 (C-1), 131.9 (C-2), 128.9 (C-3), 135.1 (C-4), 122.1 (C-5), 128.5 (C-6), 122.1 (C-7), 147.1 (C-8), 129.2 (C-9), 133.4 (C-10), 168.4 (C-11), 113.2 (C-13), 77.5 (C-14), 32.6 (C-15), 45.3 (C-16), 17.3 (C-17), 19.9 (C-18)

Compound 2 (tanshinone II A); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.63, 7.54 (2H, ABq, $J=8.2$ Hz, H-6 and H-7), 7.22 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-15), 3.18 (2H, brt, $J=6.3$ Hz, 1- CH_2), 2.26 (3H, d, $J=1.2$ Hz, 17- CH_3), 1.81-1.63 (4H, m, 2- CH_2 and 3- CH_2), 1.31 (6H, s, 18- CH_3 and 19- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) 30.6 (C-1), 19.8 (C-2), 38.5 (C-3), 35.3 (C-4), 145.1 (C-5), 134.1 (C-6), 120.9 (C-7), 128.1 (C-8), 127.2 (C-9), 150.8 (C-10), 184.3 (C-11), 176.4 (C-12), 120.6 (C-13), 162.4 (C-14), 142.0 (C-15), 121.8 (C-16), 9.5 (C-17), 32.5 (C-18), 32.5 (C-19)

Compound 3 (tanshinone I); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : 9.19 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1), 8.23 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6), 7.73 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 7.50 (1H, dd, $J=7.1$ and 8.7 Hz, H-2), 7.38-7.27 (3H, m, H-3 and H-15), 2.64 (3H, s, 18- CH_3), 2.26 (3H, d, $J=1.3$ Hz, 17- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) : 118.7 (C-1), 132.7 (C-2), 129.6 (C-3), 135.2 (C-4), 123.0 (C-5), 132.9 (C-6), 124.7 (C-7), 130.6 (C-8), 128.3 (C-9), 133.6 (C-10), 183.4 (C-11), 175.6 (C-12), 121.7 (C-13), 161.1 (C-14), 142.0 (C-15), 120.4 (C-16), 8.8 (C-17), 19.8 (C-18)

Compound 4 (cryptotanshinone); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : 7.61, 7.46 (2H, ABq, $J=8.0$ Hz, H-6 and H-7), 4.86 (1H, t, $J=9.5$ Hz, H-15), 4.34 (1H, dd, $J=9.5$ and 6.8 Hz, H-16), 3.64~3.53 (1H, m, H-15), 3.18 (2H, br t, $J=6.3$ Hz, 1- CH_2), 1.79~1.60 (4H, m, 2- CH_2 and 3- CH_2), 1.33 (3H, d, $J=6.8$ Hz, 17- CH_3), 1.28 (6H, s, 18- CH_3 and 19- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) : 29.6 (C-1), 19.0 (C-2), 37.7 (C-3), 34.8 (C-4), 143.7 (C-5), 132.6 (C-6), 122.5 (C-7), 128.3 (C-8), 126.2 (C-9), 152.3 (C-10), 184.2 (C-11), 175.7 (C-12), 118.3 (C-13), 170.8 (C-14), 81.4 (C-15), 34.6 (C-16), 18.8 (C-17), 31.9 (C-18), 31.8 (C-19)

Compound 5 (15,16-dihydratanshinone I); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) : 9.25 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-1), 8.24 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6), 7.70 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-7), 7.35-7.57 (2H, m, H-2 and H-3), 4.94 (1H, t, $J=9.5$ Hz, H-15), 4.41 (1H, dd, $J=9.5$ and 6.8 Hz, H-16), 3.70~3.55 (1H, m, H-15), 2.66 (3H, s, 18- CH_3), 1.39 (3H, d, $J=6.8$ Hz, 17- CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3) : 125.0 (C-1), 130.4 (C-2), 128.8 (C-3), 135.0 (C-4), 132.1 (C-5), 131.9 (C-6), 120.3 (C-7), 128.2 (C-8), 126.0 (C-9), 134.7 (C-10), 184.3 (C-11), 175.7 (C-12), 118.3 (C-13), 170.6 (C-14), 34.7 (C-15), 81.6 (C-16), 18.8 (C-17), 19.9 (C-18)

Compound 6 (salvianolic acid B); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, acetone- d_6) : 7.62 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7), 7.25 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6), 6.90 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5), 6.83~6.62 (9H, m, Ar-H), 6.28 (1H, d, $J=16$ Hz, H-8), 5.90 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-7'), 5.19 (2H, dd, $J=4.5$ Hz and 7.3 Hz, H-8'' and H-8'''),

4.47(1H, d, $J=5.2\text{Hz}$, H-8'), 2.86~3.13(4H, m, H-7"and H-7''')

^{13}C -NMR (62.5MHz, acetone- d_6) : 171.4(C-9'''), 171.1(C-9''), 170.5(C-9'), 166.5(C-9), 148.0(C-3), 145.9(C-4'), 145.5(C-3'), 145.4(C-3'''), 144.6(C-3''), 144.6(C-4'''), 144.3(C-4 and C-4''), 142.8(C-7), 133.2(C-1'), 129.0(C-1'''), 128.6(C-1''), 126.1(C-2), 124.5(C-1), 121.8(C-6), 121.6(C-6'''), 121.6(C-6''), 118.2(C-6'), 117.2(C-5), 117.1(C-2'''), 116.7(C-2''), 116.0(C-8), 116.0(C-5'), 115.9(C-5"and C-5'''), 113.1(C-2'), 87.5(C-7'), 74.8(C-8''), 73.7(C-8'''), 57.0(C-8'), 37.4(C-7''), 37.0(C-7''')

Compound 7 (rosmarinic acid); ^1H -NMR (250MHz, CD_3OD) : 7.49 (1H, d, $J=15.9\text{ Hz}$, H-7), 6.98 (1H, d, $J=1.5\text{Hz}$, H-2), 6.89(1H, dd, $J=1.5$ and 8 Hz , H-6), 6.71 (1H, d, $J=8\text{ Hz}$, H-5), 6.69 (1H, d, $J=1.5\text{ Hz}$, H-2'), 6.63 (1H, d, $J=7.7\text{ Hz}$, H-5'), 6.55(1H, dd, $J=1.5$ and 7.7 Hz , H-6'), 6.21(1H, d, $J=15.9\text{ Hz}$, H-8), 5.12 (1H, dd, $J=4.5$ and 8 Hz , H-8'), 2.89~3.08(2H, m, H-7')

^{13}C -NMR (62.5MHz, CD_3OD) : 127.6 (C-1), 114.4 (C-2), 146.8 (C-3), 149.7 (C-4), 116.5 (C-5), 123.2 (C-6), 147.7 (C-7), 115.2 (C-8), 168.5 (C-9), 129.3 (C-1'), 117.5 (C-2'), 146.1(C-3'), 145.3 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.8 (C-6'), 37.9 (C-7'), 74.7(C-8'), 173.4 (C-9')

Compound 8 (9'-methyl lithospermate); ^1H -NMR (250MHz, CD_3OD) : 7.86(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-7), 7.14(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-6), 6.92~6.46(7H, m, Ar-H), 6.26(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-8), 5.82(1H, d, $J=5.1\text{Hz}$, H-7'), 4.25(1H, d, $J=5.1\text{Hz}$, H-8'), 3.64(3H, s, $-\text{OCH}_3$) 2.97~3.94(2H, m, H-7'')

^{13}C -NMR (62.5MHz, CD_3OD) : 172.1(C-9" and C-9'), 168.1(C-9), 148.8(C-3), 146.5(C-4), 146.3(C-3''), 145.3(C-3'), 145.1(C-4' and C-4''), 144.3(C-7), 134.4(C-1'), 130.0(C-1''), 129.0(C-2), 124.4(C-1), 121.3(C-6), 121.2(C-6''), 118.5(C-6'), 118.3(C-5), 117.8(C-2''), 116.3(C-8), 116.1(C-5'), 115.8(C-5''), 113.7(C-2'), 90.0(C-7'), 75.0(C-8''), 60.2(C-8'), 52.7(9'- OCH_3) 37.8(C-7'')

Compound 9 (monomethyl lithospermate B); ^1H -NMR (600MHz, CD_3OD) : 7.46(1H, d, $J=15.9\text{Hz}$, H-7), 7.09(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-6), 6.78(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-5), 6.73~6.25(9H, m, Ar-H), 6.13(1H, d, $J=15.9\text{Hz}$, H-8), 5.85(1H, d, $J=4.8\text{Hz}$, H-7'), 5.13~5.08(2H, m, H-8" and H-8'''), 4.29(1H, d, $J=4.8\text{Hz}$, H-8'), 3.61(3H, s, OCH_3), 2.97~2.77(4H, m, H-7"and H-7''')

^{13}C -NMR (150MHz, CD_3OD) : 171.2(C-9'''or9''), 171.1(C-9' and 9'' or 9''), 166.5(C-9), 147.9(C-3), 145.5(C-4'), 145.4(C-3'), 144.9(C-3'''), 144.7(C-3''), 144.1(C-4'''), 143.9(C-4''), 143.8(C-4), 142.6(C-7), 132.5(C-1'), 128.1(C-1'''), 127.6(C-1''), 125.3(C-2), 123.4(C-1), 121.1(C-6), 120.9(C-6'''), 120.5(C-6''), 117.2(C-6'), 117.1(C-5), 116.4(C-2'''), 116.1(C-2''), 115.3(C-5'''), 115.2(C-5"andC-5'), 115.1(C-8), 112.3(C-2'), 87.1(C-7'), 73.6(C-8" and C-8'''), 56.9(C-8'), 51.5(OCH_3), 36.7(C-7''), 36.5(C-7''')

Compound 10 (dimethyl lithospermate B); ^1H -NMR (400MHz, CD_3OD) : 7.59(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-7), 7.17(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-6), 6.81(1H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-5), 6.74~6.53(9H, m, Ar-H), 6.24(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-8), 5.79(1H, d, $J=4.6\text{Hz}$, H-7'), 5.18~5.14(2H, m, H-8" and H-8'''), 4.35(1H, d, $J=4.6\text{Hz}$, H-8'), 3.63, 3.62(3H, s, $-\text{OCH}_3 \times 2$), 3.00~2.81(4H, m, H-7"and H-7''')

^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD) : 172.2(C-9'), 172.2(C-9'''), 171.2(C-9''), 168.0(C-9), 149.0(C-3), 146.8(C-4'), 146.6(C-3'), 146.2(C-3'''), 146.1(C-3''), 145.4(C-4'''), 145.3(C-4''), 145.2(C-4), 144.0(C-7), 133.5(C-1'), 128.8(C-1'''), 128.6(C-1''), 126.3(C-2), 124.6(C-1), 122.2(C-6), 121.9(C-6'''), 121.8(C-6''), 118.4(C-6'), 118.4(C-5), 117.5(C-2'''), 117.3(C-2''),

116.5(C-5^{'''}), 116.4(C-5^{''}), 116.4(C-5[']), 116.2(C-8), 113.3(C-2[']), 87.2(C-7[']), 75.7(C-8^{''}), 74.8(C-8^{'''}), 57.5(C-8[']), 52.8(-OCH₃), 52.7(-OCH₃), 37.4(C-7^{''}), 37.0(C-7^{'''})

Compound 11 (methyl salvianolate C); ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD) : 7.91(1H, d, *J*=16Hz, H-7), 7.17(1H, s, H-8[']), 7.37~6.57(8H, m, Ar-H), 6.43(1H, d, *J*=16Hz, H-8), 5.26(1H, dd, *J*=5.2Hz and 7.2Hz, H-8^{''}), 3.70(3H, s, OCH₃), 3.06~3.04(2H, m, H-7^{''})

¹³C-NMR (100MHz, CD₃OD) : 175.0(C-9^{''}), 171.3(C-9), 162.2(C-7[']), 150.8(C-4['] and C-4), 149.5(C-4^{''}), 149.0(C-3^{''}), 148.9(C-3[']), 148.2(C-7), 147.1(C-3), 135.5(C-2), 131.5(C-1^{''}), 129.1(C-2[']), 126.0(C-1[']), 124.6(C-6^{''}), 122.2(C-1), 121.5(C-6), 120.4(C-5[']), 119.1(C-2^{''}), 117.2(C-5^{''}), 116.1(C-6[']), 114.6(C-5), 102.0(C-8[']), 77.4(C-8^{''}), 55.5(OCH₃), 40.7(C-7^{''})

3.2 황금과 단삼의 생리활성물질분석 및 동시정량법개발

3.2.1 HPLC/UV 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 황금

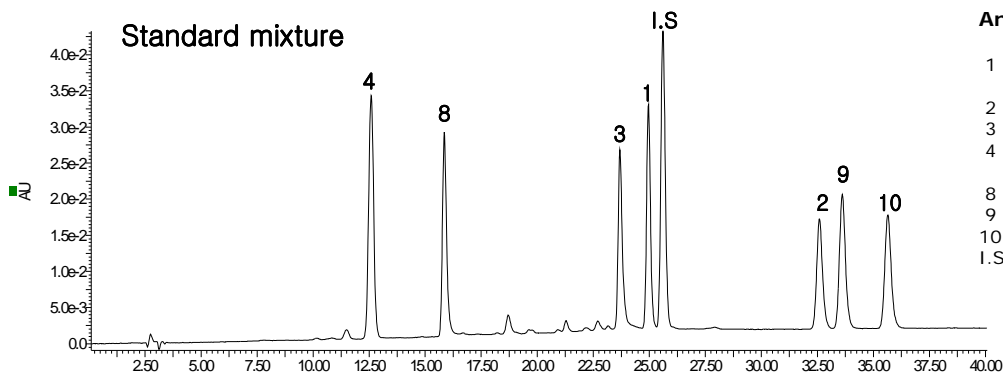
가. HPLC 분석조건

Table 4. HPLC condition of *Scutellaria baicalensis*.

Detector	A photodiode array detector (Waters 2996)
Column	Luna C18 analytical column (250 x 4.6mm, I.D. 5um, Phenomenex Torrance, CA, USA)
Temperature	• Column - 40℃ • Autosampler - 10℃
Mobile Phase	• A - 1% acetic acid • B - acetonitrile : methanol = 7 : 3(v/v), 1% acetic acid)
Flow rate	1mL/min (All compounds were eluted within 36 min)

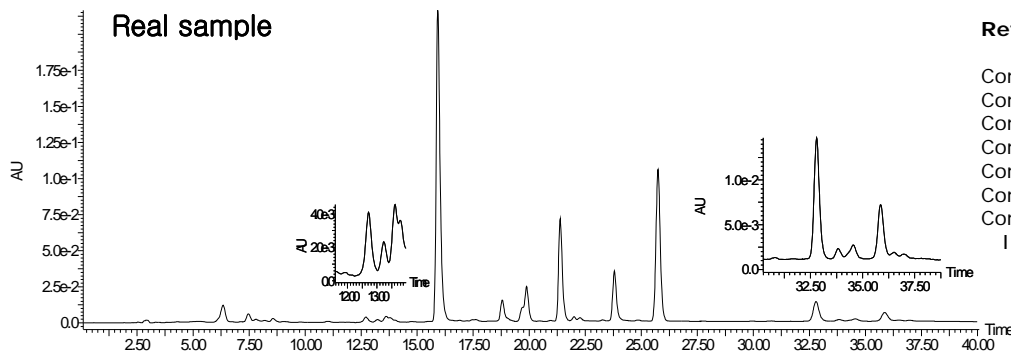
Table 5. HPLC gradient condition.

Time(min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	75	25
10	68	32
20	55	45
24	55	45
35	52	48
40	75	25
45	75	25



Analytes :

- 1 : Wogonin-7b-D-glucuronide (20 ug/mL)
- 2 : Wogonin (5 ug/mL)
- 3 : Baicalein (9 ug/mL)
- 4 : 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon (29ug/mL)
- 8 : Baicalin (18.2ug/mL)
- 9 : Chrysin (8 ug/mL)
- 10 : Oroxylin A (6.5 ug/mL)
- I.S : Propylparaben (29 ug/mL)



Retention Time:

- Comp-1 : 25.0 min
- Comp-2 : 32.6 min
- Comp-3 : 23.7 min
- Comp-4 : 12.5 min
- Comp-8 : 15.8 min
- Comp-9 : 33.6 min
- Comp-10 : 36.7 min
- I.S : 25.6 min

나. 추출조건 및 정량법 조작 설정

항금 분말 시료 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70% ethanol 50 mL를 가하고 50,000 ppm의 propylparaben (I.S.) 80 μ L를 가한 후 60분간 초음파 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가한다. 원심분리하고 여과하여 membrane filter (0.45 μ m)를 통과시킨 후 그 10 uL를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다.

다. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

Table 6. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

compound	Range	a	b	R ²	LOD (μ g/mL)	LOQ (μ g/mL)
2	0.2 ~ 20 ug/mL	0.0369	-0.0001	0.9999	0.02	0.07
3	0.2 ~ 50 ug/mL	0.0227	-0.0021	0.9997	0.04	0.13
4	0.1 ~ 10 ug/mL	0.0099	0.0002	0.9995	0.03	0.09
8	1.0 ~ 336 ug/mL	0.0138	-0.0045	0.9998	0.05	0.16
9	0.1 ~ 10 ug/mL	0.0295	0.0001	0.9999	0.02	0.08
10	0.1 ~ 10 ug/mL	0.0309	0.0004	0.9999	0.01	0.03

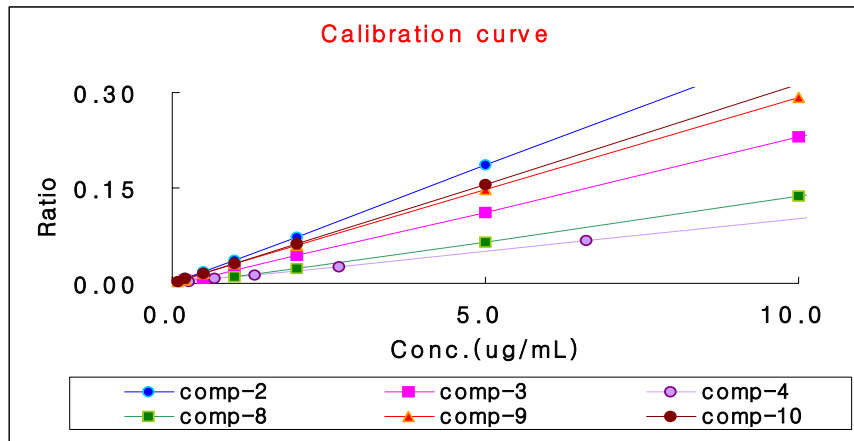


Fig. 1. Calibration graphs of 2~10.

(2) 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 각각 10 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL의 농도로 첨가한 3 batch의 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 전부 98 %~102 %사이로 우수하게 나타났다.

(3) 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였고 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다. 그 결과는 wogonin의 intra-day and inter-day의 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 97.1, 96.7 %로 나왔고 나머지는 전부 98 %~102 %사이로 우수하게 나왔다.

(4) 안정성 (stability)

본 실험에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavon, baicalin, chrysin 등 7가지 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30일간 실험한 결과 baicalein과 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon을 제외하고 전부 안정하였다.

라. 황금 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 재배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 황금의 주요 성분은 baicalin (compound 5)으로 대한약전 (KP)에 10 % 이상을 함량으로 규정되어 있다. 본 연구에서 분리한 7종의 marker compound 중 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester(compound 1)은 검출은 되나 정량 한계 이하였다. 8종의 황금 중 KJG-2은 7.48 %로 약전규정 함량 미만이었고 이를 제외한 나머지 7종은 12.00 %~21.00 %로 10 % 이상의 함량을 보였다. 이를 제외한 나머지 6종의 compound들의 함량의 경향은 baicalin > baicalein > wogonin > 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone > oroxylin A > chrysin 순으로 나타났다.

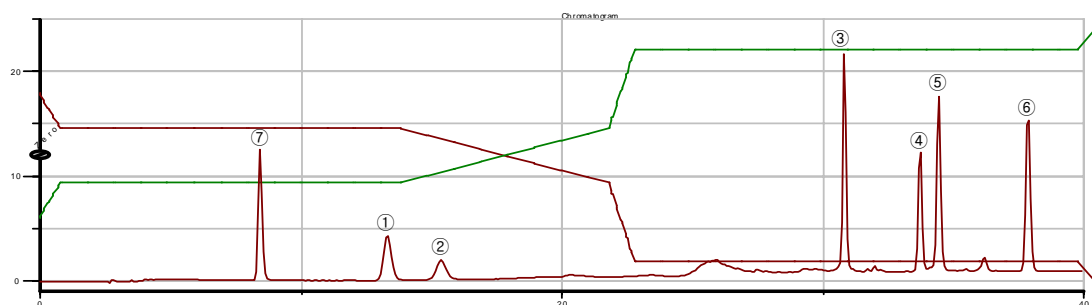
2. 단삼

가. 단삼 시료의 HPLC 분리조건 개발

Table 7. HPLC conditions for assay of analytes in *Salvia miltiorrhizae* Radix.

Mobile phase	time (min)	A (H ₂ O:HCOOH = 100:1) %	B (MeOH:CH ₃ CN:HCOOH = 100:75:1) %
	0	75	25
	1	60	40
	14	60	40
	22	40	60
	23	11	89
	40	11	89
Detector	UV (280 nm)		
Column	Waters YMC (4.6 × 250 mm)		
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	20 °C		
Injection volume	10 μL		
Device	GILSON 321 PUMP, UV/VIS-151 Detector, 321 XL sampling injector		

(A)



(B)

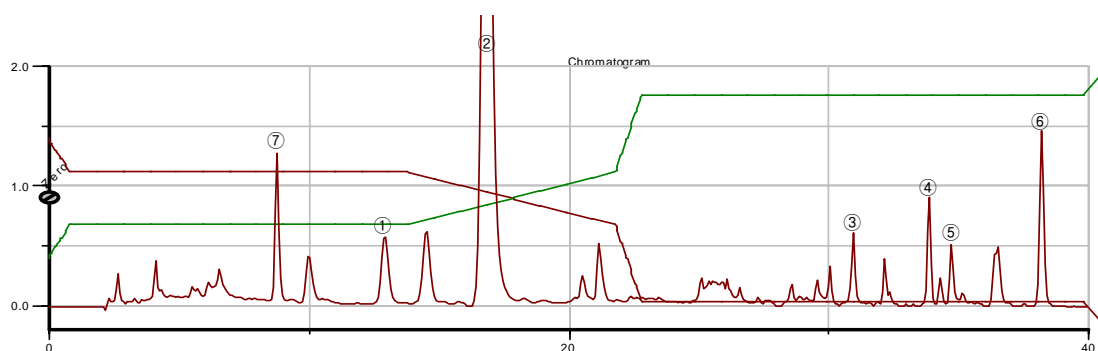


Fig. 2. HPLC chromatogram of standard mixture (A) and sample (B) of *Salvia miltiorrhizae* Radix.

① rosmarinic acid (t_R 12.91), ② salvianolic acid B (t_R 16.83), ③ 15,16-dihydrotanshinone I (t_R 30.95), ④ cryptotanshinone (t_R 33.26), ⑤ tanshinone I (t_R 34.72), ⑥ tanshinone IIA (t_R 38.19), ⑦ p-hydroxycinnamic acid (IS, t_R 8.75).

나. 단삼 시료의 추출조건 설정

단삼 시료를 분말로 한 후 0.3 g을 사용하여 1) 100% methanol 50 mL (15분, 30분, 1시간 추출), 2) 75% methanol 50 mL (15분, 30분, 1시간 추출), 3) 100% methanol 25 mL (15분, 30분, 1시간 추출)와 50% methanol 25 mL (15분, 30분, 1시간 추출)로 환류 추출 및 초음파 추출의 방법을 이용하여 단삼에 함유된 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)의 함량을 p-hydroxycinnamic acid (7)를 internal standard로 여 새로 개발한 단삼의 HPLC 분석법 조건으로 실험한 결과 **유효성분의 최적 추출용매로는 75% MeOH 사용과 100% MeOH 25 mL과 50% MeOH 25 mL의 연속 사용이 비슷하였으며, 추출방법은 환류추출법과 초음파추출법이 비슷하였다. 추출시간은 15분에는 완전히 추출되지 않았으며, 30분과 1시간이 비슷하였다. 그러므로 추출조건으로서 75% MeOH로 30분간 초음파 추출로 설정하였다.**

(1) 추출용매 (Extraction solvent)

sonication 방법으로 30 분 추출 시 추출용매에 따른 영향은 100% 메탄올 추출조건에서 rosmarinic acid와 salvianolic acid B가 75%메탄올 및 100% + 50% 메탄올 추출조건에 비하여 적게 용출되었으며 diterpenoid 성분은 큰 차이가 없었다. 그러므로 추출용매는 75% 메탄올로 설정하였다.

(2) 추출방법 (extraction methods)

75% MeOH로 30분 추출 시 추출방법으로 초음파추출과 환류냉각 추출을 비교하였고 그 결과 두 가지 방법은 뚜렷한 차이를 보이지 않으나 sonication 방법이 간편하므로 sonication 방법을 선택하였다.

(3) 추출시간 (Extraction time)

75% MeOH로 sonication 시 추출시간에 따른 영향을 15, 30, 60분으로 하여 비교하였다. 15분 추출하였을 때는 함량이 일정하게 나오지 않았으며, 30분과 60분에서는 함량이 일정하게 나왔고, 뚜렷한 차이가 없었다. 그러므로 추출시간을 30분으로 결정하였다.

다. 단삼의 HPLC 정량법 조작 설정

단삼에 함유된 생리활성성분에 대한 새로운 HPLC 동시정량법을 다음과 같이 설정하였다. 단삼 분말 시료 (150 mesh 통과) 0.3 g을 취하여 75% methanol 50 mL를 가하여 30분간 초음파 추출한 다음 75% methanol로 그 감실량을 추가한다. 5,000 ppm의 p-hydroxycinnamic acid (I.S.) 50 μ L를 가한 후 여과하여 membrane filter (0.45 μ m) 를 통과시킨 후 그 10 uL를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다.

라. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

Table 8. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

Analytes	linear range (mg/mL)	slope(a)	intercept(b)	correlation coefficient(r)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
rosmarinic acid (1)	0.2~40	0.0663	-0.0149	0.9999	36.2	120.6
salvianolic acid (2)	0.2~800	0.0393	0.0060	0.9999	51.5	155.0
15,16-dihydrotanshinone I (3)	0.2~40	0.1522	-0.0431	0.9999	30.1	100.4
cryptotanshinone (4)	0.2~40	0.0881	-0.0031	1.0000	34.1	113.6
tanshinone I (5)	0.2~40	0.1529	-0.0424	0.9999	36.7	122.2
tanshinone IIA (6)	0.2~40	0.1510	-0.0154	0.9999	32.4	108.1

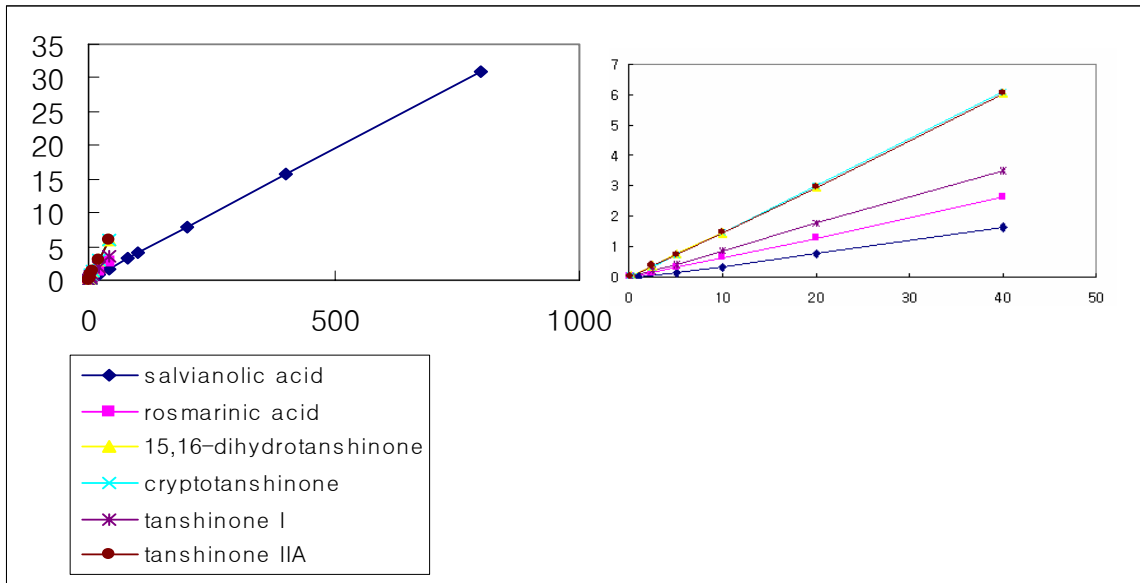


Fig. 3. Calibration graphs of ① ~ ⑥.

(2) 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분 에 대하여 20~200% 범위에서 (rosmarinic: acid 20%, 50%, 100%; 15,16-dihydrotanshinone I: 50%, 100%, 150%; cryptotanshinone: 50%, 100%, 150%; tanshinone I: 50%, 100%, 150%; tanshinone IIA: 50%, 100%, 150%) 첨가한 3 batch의 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 salviaolic acid B가 회수율이 80~90 %로 낮았고 tanshinone I 과 cryptotanshinone 2.0, tanshinone IIA 1.0 농도를 제외하고 전부 98 % 이상으로 나왔다.

(3) 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성 (repeatability)은 salviaolic acid B를 제외하고 RSD 1 % 이내로 우수하였으며 머무름시간 (RT)의 재현성도 장기간의 실험기간 중 일간 및 일내 RSD 1% 이내를 나타내었다.

(4) 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

분석결과 일간 및 일내 정밀성은 salviaolic acid B를 제외하고 3% 이내였다. 일간 및 일내 정확성도 salviaolic acid B를 제외하고 모두 ± 3% 이내였다. Accuracy는 intraday 실험에서 salviaolic acid B의 60, 150 농도 15,16-dihydrotanshinone I의 2.0 농도를 제외하고 전부 98 % ~ 102 %로 나왔고 inter-day에서 salviaolic acid B의 60, 150농도 15,16-dihydrotanshinone I의 1.0 농도를 제외하고 전부 98 % ~ 102 %로 나왔다. Precision은 intra-day 및 inter-day 실험에서 salviaolic acid B를 제외하고 전부 3 % 이내로 나왔다.

(5) 안정성 (stability)

Rosmarinic acid, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA 등 6가지 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 실험한 결과 salviaolic acid B는 상온과 냉장에서 전부 안정하지 않았으며 나머지 표준품은 상온과 냉장에서 안정하였다. Salviaolic acid B는 상온 및 냉장에서 전부 불안정하였으며 상온에서 냉장보다 더 불안정하였다. Salviaolic acid B를 제외한 다른 표준품은 상온 및 냉장 에서 전부 안정하였다. 다만 15, 16-dihydrotanshinone은 15일까지는 분해되지 않았으며 30일째는 상온에서 소량 분해되었다.

(6) 완건성 (robustness)

완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건 변화, 검출 파장, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충 용액의 이온강도 변화, 컬럼 온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리인자의 변화정도를 나타내는데 본 연구에서는 column의 종류와 column의 온도에 대해 컬럼의 종류를 변화시켜 **Theoretical plate (N), capacity factor (k'), separation factor (α), Resolution (Rs)** 등 상수를 검토한 결과 이론단수 및 분리도는 YMC column 이 제일 크게 나왔고 다른 상수는 큰 차이가 없었다.

마. 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 중국약전에 단삼의 salivianolic acid B 함량은 3% 이상, tanshinone IIA는 0.2% 이상을 함유하도록 규정되어 있다. Salivianolic acid B의 함량은 K-2와 C-6이 3% 이하에 해당하여 중국약전 규정에 적합하지 않았으며, 단삼 위품인 C-9은 salivianolic acid B의 peak가 전혀 검출되지 않았다. 또한 tanshinone IIA의 함량은 K-1, K-3, C-3, C-9을 제외하고 전부 0.2% 이하로서 중국약전 규정에 적합하지 않았다. 단삼 위품인 C-9에는 salivianolic acid B의 함량이 0.3% 정도로 다른 시료에 비해 매우 낮게 함유되어 있는 것이 그 특징이며, tanshinone I과, tanshinone IIA의 함량은 다른 시료에 비해 상대적으로 높았다. 위품인 C-9의 HPLC chromatogram에서 diterpene 4종(15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA) 물질의 retention time과 peak pattern은 단삼과 유사하였으며, 6종 지표성분이 모두 함유되어 있음이 LC-MS/MS 법에 의해 확인되었다.

3.2.2 LC-MS/MS 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 황금

가. LC-MS/MS 분석조건 설정

(1) HPLC 분석조건

HPLC system은 binary pump, autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA) 을 이용하였다. 5% acetic acid - methanol (30 : 70, v/v) 으로 isocratic elution하였고 Luna C18 3 μ (2.1 x 150mm, Phenomenex)의 역상 컬럼으로 분리하였다. 컬럼 온도는 40 °C로 유지하였으며 유속은 0.12 mL/min으로 하였다.

(2) LC-MS 분석조건

MS system은 Sciex API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometry (Applied Biosystems, MDS Sciex, Concord, Canada)를 사용하였다. Ion spray interface 는 turbo ion spray로써 turbo gas temperature를 350 °C에서 5.5 kV로 하여 positive ion detection mode로 측정하였다. 최적 측정 파라미터는 모든 성분 혼합물을 flow injection 하여 다음의 최적조건을 구하였다. : nebulizing gas flow, 1.46L/min (setting 12); auxiliary gas flow, 6.1L/min; curtain gas flow, 0.95L/min (setting 7); orifice voltage, 53V; ring voltage, 400V; collision gas (nitrogen) pressure, 3.58 x 10⁻⁵ Torr (setting 7) 정량은 내부표준법으로 precursor와 product ions의 multiple reaction monitoring (MRM)을 사용하였고 1/x의 weighting factor를 반영하여 면적비를 계산하였다. compound 1, m/z 475.2 → m/z 285.1; compound 2, m/z 285 → m/z 270.1; compound 3, m/z 271.1 → m/z 123.2; compound 4, m/z 347.2 → m/z 332.2; compound 6, m/z 287.1 → m/z 153.1; compound 8, m/z 447 → m/z 271; compound 9, m/z 255.1 → m/z 153.1 그리고 I.S, m/z 417.1 → m/z 297.1 분석 결과는 Analyst software (version 1.4)를 사용하였다.

나. 추출조건 설정

황금을 가루로 한 다음 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70 % 에탄올 50 mL를 가하고 1시간 sonication 한 후 0.2 um membrane filter로 여과한다. 여액을 1 mL 취하여 mobile phase 로 50 mL로 희석한 다음 1 mL를 취하여 internal standard (10,000 ppm) 10 uL를 가한 후 그 10 uL를 취하여 injection 한다.

다. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

Table 9. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

Compound	a	b	R	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
1. wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester	0.01050	0.00049	0.9998	0.02	0.2
2. wogonin	0.01580	0.00175	0.9999	0.01	0.3
3. baicalein	0.00199	-0.00076	0.9999	0.14	1.1
4. 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone	0.00274	0.00015	0.9999	0.37	1.3
6. 5,7,2',6'- tetrahydroxyflavone	0.00467	0.00332	0.9997	0.52	1.2
8. baicalin	0.00264	0.00220	0.9998	0.12	1.0
9. chrysin	0.00194	0.00124	0.9999	0.11	1.1

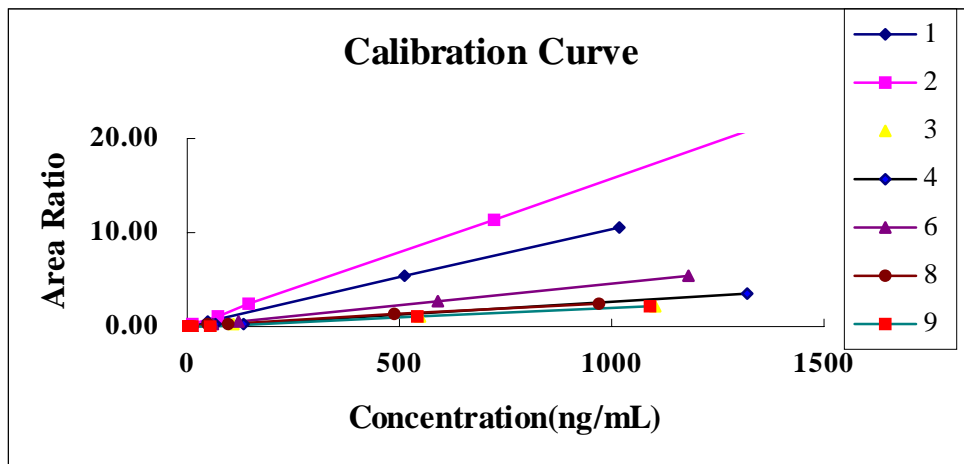


Fig. 4. Calibration graphs of 1 ~ 9.

(2) 회수율 (recovery)

황금의 회수율은 황금의 지표성분과 구조가 비슷한 surrogate standard (puerarin)를 사용하였다. Surrogate standard 의 최종 농도가 10, 500, 1000 ng/mL 이 되도록 첨가하여 반복 측정 (n = 4) 하였다. 추출 회수율은 95.1 - 98.8 % 이내이다.

(3) 정밀성 및 정확성 (Precision and Accuracy)

일내와 일간의 정밀성과 정확성은 세 개의 다른 농도의 QC sample 분석에 의하여 정하였다. 정밀성은 반복 실험에 대한 RSD(%)로 정의하였다. 일내와 일간의 정밀성 (RSD%)은 각각 0.42 - 1.64 % 와 0 - 9.73 % 이며, 정확성은 일내 98.0 - 104.8%, 일간 95.2 - 109.3 % 이다. 황금의 정밀성 및 정확성은 황금의 지표성분과 구조가 비슷한 surrogate standard (puerarin)를 사용하였다.

(4) 안정성 (stability)

Wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy

-8,6'-dimethoxy flavon, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavon, baicalin, chrysin 등 7가지 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 실험한 결과 baicalein과 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6' -dimethoxyflavone을 제외하고 전부 안정하였다.

라. 황금 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 황금의 주요 성분은 baicalin (compound 5)으로 대한약전 (KP)에 10 % 이상(중국약전 9 % 이상)을 함량으로 규정되어 있다. 8종의 시료 중 KJG-2 시료는 baicalin 함량이 7.13%로서 대한약전 규정 미만이었으며 나머지 7종의 시료는 전부 10 % 이상이였다. Wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, chrysin, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone 성분은 각 시료에서 함량이 비슷하게 나왔으며 크게 차이가 나지 않았다. Wogonin, baicalein, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone 성분은 DAE-KOR 시료에서 함량이 다른 시료에 비하여 적게 나타났다.

2. 단삼

가. LC-MS/MS 분석조건 설정

(1) Mass spectra

지표성분들의 LC-MS/MS조건은 지표성분 각각을 이동상에 약 100 ng/mL이 되도록 희석하여 유속 10 uL/min으로 직접 주입하여 최적화하였다. 단삼의 75% methanol 추출물에 대한 지표성분의 MS/MS분석을 위한 이온화방법으로 전자분무이온화 (ESI)의 양이온 모드의 검출법을 사용하였다. 혼합물을 HPLC 분리한 다음 ESI 양이온 모드에서 높은 수율로 이온화시킨다(Q1). 이 분자 adduct 이온 (precursor ion)을 Q2에서 CID(collisionally induced dissociation) 과정을 통해 분해되는 product fragments를 scanning 하여(Q3) 얻어지는 주요 딸이온(daughter ion)을 그 성분의 특징적 피크로 정하여 mass 분리분석이 이루어지는 multiple reaction monitoring (MRM) 방법을 이용하였다. 단삼의 6개의 지표성분과 I.S.에서 가장 많이 생성된 이온형은 모두 $[M+H]^+$ 이었다. 가장 많이 나타난 fragment는 LC-MS 분석을 위해 Q3에서 scan 하였으며, 그 결과는 Fig. 21에서와 같다. Tanshinone I의 대부분의 fragment 는 “CO” 를 잃은 $[M+H-28]^+$ 이고 tanshinone IIA와 15,16-dihydrotanshinone I의 대부분의 fragment는 “H₂O” 를 잃은 $[M+H-18]^+$ 이다. LC-MS-MS에 대한 HPLC 분석조건은 HPLC/DAD 분석과 동일하다. Sciex API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Concord, Canada)를 사용하였으며, $[M+H]^+$ 를 생성하기 위해 Turbolon Spray interface를 부착하였다.

(2) 크로마토그래피 (Chromatography)

표준품 혼합물의 각 농도는 T-I (108 ng/mL), T-IIA (92 ng/mL), CT (95 ng/mL), DT (66 ng/mL), SA (1500 ng/mL), RA (475ng/mL)이고 I.S의 농도는 (6.4 ng/mL)이며 분석물질의 머무름 시간은 T-I (5.4 분), T-IIA(8.0분), CT(5.7분), DT(4.2분), SA(2.3분), RA(2.0분), I.S(3.6분)이다. 최적의 조건 탐색에서 효과적인 이온화를 위하여 이동상에 산(formic acid)을 첨가하였다. Formic acid를 포함한 이동상이 acetic acid를 포함한 이동상보다 분석물질들의 감도가 더 높게 나타났으며 두 이동상간의 머무름 시간에는 차이가 거의 없었다. 내부표준물로 사용한 imperatorin은 한약재 지실의 성분 중 하나로 단삼에는 그 성분을 포함하지 않으며 머무름 시간이 ~ 3.7 분대에 용출되어 다른 분석 성분들과 비교할 때 적절하였다. Salvianolic acid B와 rosmarinic acid 는 음이온모드(negative ion mode)에서 감도가 우수하였으나 다른 4성분과 동시분석을 위하여 양이온 모드에서 분석하였다. 두 acid 성분의 양이온 모드로 분석 시 여러 번 반복 주입한 결과 재현성이 좋았으며 정량에는 문제가 없었다.

나. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

Table 10. Calibration curves of 6 analytes.

Analytes	Linear Range (ng/mL)	Slope (a)	Intercept (b)	Coefficient R	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
tanshinone I	0.92 ~ 92	0.0202	-0.00119	0.9999	0.26	0.92
tanshinone II A	1.08 ~ 108	0.0290	0.00218	0.9998	0.31	1.08
15, 16-dihydrotanshinone I	0.66 ~ 66	0.0552	0.00614	0.9998	0.24	0.95
cryptotanshinone	0.95 ~ 95	0.0218	0.00613	0.9995	0.14	0.66
salvianolic acid B	7.50 ~ 1500	0.0028	-0.00444	0.9996	2.30	7.5
rosmarinic acid	4.75 ~ 475	0.0037	-0.00425	0.9995	1.33	4.75

(2) 회수율 (recovery)

전 분석과정에 있어서 성분의 회수율을 검토하기 위해 시료 중 예상되는 각 성분의 함량을 기준으로 10, 20, 50, 100%로 추정되는 4농도에 대하여 표준물을 첨가하였다. 표준물을 첨가하여 조제한 QC sample 5 batch (1 control) 에 대하여 각 5 회씩 분석하여 회수율을 구하였다. 각 성분의 회수율은 tanshinone I 96.2 - 101.9 %, tanshinone IIA 96.3 - 101.8 %, cryptotanshinone 96.7 - 101.3 %, 15, 16-dihydrotanshinone I 96.1 - 99.5 %, rosmarinic acid 97.5-99.9%로 모두 높은 회수율을 보인다. 각 농도에 대한 회수율의 %RSD는 5 % 미만이다.

(3) 정밀성 및 정확성 (Precision and Accuracy)

정밀성 (precision)은 QC sample을 일내 (intra-day), 일간 (inter-day)으로 각각 3회, 4회씩 분석하여 나타내었다. 모든 분석물질의 precision (RSD)은 일내 0.18 ~ 13.44 %, 일간 0.40 ~ 15.37 % 이내이고 accuracy (%)는 일내 91.9 ~ 104.7 %, 일간 90.8 ~ 104.8 % 이내이다.

다. 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

구입처가 다른 15종의 단삼에 대하여 6개의 지표성분을 분석한 결과 단삼의 주요성분인 salvianolic acid B의 함량은 2.4 - 10.2 %로 구입처에 따라 다양한 함량 변화를 나타내었다. 또한 단삼 중에 rosmarinic acid의 함량은 0.13 - 0.66 %로 나타났다. Tanshinone IIA는 중국약전규정에서 0.2 % 이상이지만 k-1, k-3, c-3을 제외한 나머지 시료는 전부 0.2 % 미만이었다.

3.3 유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성성분의 효능 유전자 검증

한의학적으로 청열약으로 분류되는 황금은 항염증 효능을 주 효능으로 분류하고 활혈거어약으로 분류되는 단삼은 항산화 효과를 주 효능으로 분류하여 각 약재 및 그 성분들에 대한 유효 성분과 효능 유전자 선정 연구를 시행함.

황금은 70% EtOH 추출물과 baicalein, wogonin, chrysin, 5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone, wogonin 7-O-glucuronide methyl ester, baicalin, guaiacol, paeonol 등의 성분 8종에 대하여 항염증 효과를 검색함. LPS 처리한 Raw 264.7 세포 (murin macrophage cell line)에 시료를 처리하여 PGE₂의 생성 억제 효과를 검색한 결과 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제시키는 대표 성분으로 baicalein (C1), wogonin (C2), chrysin (C3)의 3종을 효능 성분으로 선정. Baicalein의 배당체인 baicalin은 *in vitro* assay에서는 효과가 없었음. DNA microarray를 이용한 효능 유전자 검색 결과 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 70E, C1, C2, C3에 대해서 공통적으로 inflammation 관련 유전자의 변화가 가장 크게 나타남. 그 외에 apoptosis, angiogenesis, PDGF, T cell 등과 관련된 유전자들의 변화가 나타남. 이는 청열약으로 사용되는 황금의 항염증 반응과 관련이 있는 것으로 사료됨. 그 중 가장 많은 변화를 나타낸 22개를 유전자를 선정하여 RT-PCR로

확인함. 이들은 황금의 항염증 효과와 관련된 유전자들로 모든 성분들에서 변화를 나타냄 (Table 9). IL-11 receptor α 1, IL-6 ST, Activin-R IIA 등을 효능 유전자로 제시함.

단삼 70% ethanol 추출물과 tanshinone I, tanshinone II A, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B 등의 성분 6종에 대해서 항산화 효능을 검색한 결과 salvianolic acid B를 제외한 단삼의 70E 및 모든 성분은 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시킴. 15,16-dihydrotanshinone I은 10 μ g/ml에서 SOD 활성이 감소하였는데 이는 15,16-dihydrotanshinone I의 세포독성에 의한 것으로 사료됨. tanshinone I, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid는 LPS 처리군보다 더 높게 SOD 활성을 증가시킴. 단삼 70E, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B는 4 hr 및 24 hr에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시킴. Reduced form의 glutathione의 정량 결과 24 시간 LPS 처리시 대조군의 1/3으로 감소하였으나 rosmarinic acid 처리시 GSH의 양이 대조군과 유사하게 증가됨. 결론적으로 단삼의 항산화 효과에 대한 효능 성분으로 tanshinone I (C7), cryptotanshinone (C9), rosmarinic acid (C14), salvianolic acid B (C15)를 선정함. DNA microarray를 이용하여 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 oxidataion, inflammation 관련 유전자들의 변화가 가장 크게 나타났으며 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남. 특히 항산화와 관련한 oxidative stress와 관련된 gene들의 변화가 크게 나타났으며 관련 gene들의 분석 후, 단삼의 대표적인 생리활성 효과인 cardiovascular 질병 치료와 관련됨이 나타남. 이러한 결과는 단삼이 심근경색 흰쥐 모델에서 심근에 SOD의 발현을 증가시키고 지질과산화를 억제하였다는 보고 및 tanshinone 등이 심근 지질의 과산화를 억제하고 SOD 활성을 증가시키고 PGE₂의 생성을 감소시켰다는 보고와 일치하여 단삼 및 유효 성분의 항산화 활성을 증명함.

현재 단삼의 효능 유전자에 대한 확인 연구를 진행 중에 있으며 RT-PCR 등을 이용한 유효 유전자의 확인 후 유효 유전자의 제시가 가능 함.

제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1 황금과 단삼의 생리활성성분 분리

황금으로부터 column chromatography를 이용해 총 19종의 화합물을 분리하였고 각 화합물을 구조결정 한 결과 flavonoid 17종과 penolic compound 2종(guaiacol, paeonol)임을 확인하였다. 이중 compound 3~13은 flavonoid 화합물이고 14~19는 flavonoid에 당이 ester결합하고 있는 화합물이다. Compound 1과 2의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum data를 분석한 결과 penolic compound인 guaiacol⁸⁶⁾과 paeonol⁸⁷⁾임을 확인할 수 있었고 문헌치와도 일치하였다. Compound 3은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 H-3의 singlet signal이 δ 6.63에서 나타나고 6.97ppm에서 H-8에 기인하는 singlet가, 8.10~7.52ppm에서 5개의 B ring의 proton signal이 multiplet으로 관찰되었으며 3.75ppm에서 1개의 methoxy singlet가 나타났다. 이상의 결과 및 $^{13}\text{C-NMR}$ data와 문헌치 및 표준품과의 직접 대조로서 이 화합물은 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone인 oroxylin A⁸⁸⁾로 확인하였다. Compound 4는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 H-6과 H-8에 기인하는 2개의 doublet($J=2.0\text{Hz}$)이 6.21과 6.51ppm에서 나타나고 6.95ppm에서 H-3의 singlet이 나타났다. 따라서 이 화합물은 5,7-dihydroxyflavone인 chrysin⁸⁹⁾임을 확인하였다. compound 5와 7은 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 3개의 methoxy signal이 관찰되었고 compound 6은 4개의 methoxy signal이 관찰되었다. 5번 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 에서 δ 7.87에서 H-6'의 signal이 double doublet으로 나타나고 있으나 6번과 7번 화합물에서는 나타나지 않았고 또한 7의 $^1\text{H-NMR}$ data에서는 δ 6.60에서 H-6에 기인되는 singlet이 관찰되나 5, 6에서는 관찰되지 않았다. 각각의 NMR data를 문헌치와 비교결과 compound 5는 Tanaxin I⁹⁰⁾, compound 6은 skullcapflavone II⁹¹⁾로 compound 7은 rivularin⁹²⁾으로 각각 확인하였다. compound 8~13도 앞의 화합물과 유사한 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data와 유사한 signal을 나타내어 문헌치와 비교결과 compound 8은 wogonin⁸⁸⁾, compound 9는 baicalein⁹³⁾, compound 10은 2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavone (viscidulin II)⁹⁴⁾, compound 11은 2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone⁹⁴⁾, compound 12는 5,7,2',6'-tetrahydroxy flavone⁹⁵⁾,이며 compound 13은 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone⁸⁹⁾으로 확인하였고 문헌과도 잘 일치하였다. Compound 14는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 이물질에 2개의 methoxy group이 존재하고 있음을 알 수 있고 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 glucuronide methyl ester에 기인하는 peak 7개를 볼 수 있으며 aromatic 지역에 14개의 peak와 180ppm 부근의 ketone에 기인하는 peak(182.9 ppm) 1개를 확인하므로써 flavon 모핵을 추정할 수 있다. 이상과 같은 분석결과를 기초로 하여 문헌치와 비교한 결과 이물질은 wogonin 7-O-glucuronide methyl ester⁹⁵⁾임을 확인하였다. compound 15는 $^1\text{H-NMR}$ 에서 δ 1.27과 δ 4.23에서 각각 triplet과 quarterlet의 signal이 관찰된 것 외에는 compound 14와 매우 유사한 pattern을 나타내었으므로 wogonin 7-O-glucuronide methyl ester의 glucose 6번 탄소에 $-\text{OCH}_3$ 가 아닌 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 가 치환된 6"-ethyl-wogonoside⁹⁵⁾임을 확인하였다. compound 17 또한 compound 15와 유사한 pattern이 관찰되나 $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ 에 의한 signal이 없으므로 문헌치와 비교한 결과 17은 wogonin 7번에 glucuronic acid가 결합된 wogonoside⁹⁶⁾임을 확인하였다. compound 16의 $^1\text{H-NMR}$ data에서 2개의 methoxy group(3.68, 3.74ppm)이 존재하고 있음을 볼 수 있고 δ 4.77에서 anomeric proton의 signal이 doublet($J=7.7\text{Hz}$)으로 관찰되었으며 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 glucoside에 기인하는 peak 6개(61.0, 69.9, 73.4, 76.8, 77.3, 101.5ppm)를 볼 수 있다. 이들 data를 문헌치와 비교결과 viscidulin III-2'-O-glucoside⁹⁰⁾임을 확인하였다. Compound 18은 가수분해하여 aglycone으로 guercetin, 당은 glucose와 rhamnose를 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ 의 분석으로 terminal rhamnose가 glucose의 6번에 결합하고 있고 다시 guercetin의 3번에 결합한 rutin⁹⁶⁾임을 문헌치와 비교한 결과 확인하였으며 Compound 19는 Compound 7의

data와 매우 유사한 pattern을 나타내었으나 1mol의 glucuronic acid의 signal이 ^1H 및 ^{13}C -NMR에서 관찰되었고 ^{13}C -NMR signal을 비교해 본 결과 baicalein의 C-7에 glycosidation shift가 관찰되었으므로 19는 baicalin으로 동정하였으며 문헌치와의 비교⁸⁸⁾에서도 잘 일치하였다.

단삼 또한 column chromatography하여 총 11종의 화합물을 분리하였고 그 구조를 동정한 결과 compound 1~5는 abietanoid계열의 diterpenoid 화합물이다. compound 1의 ^1H -NMR spectrum을 살펴보면 δ 2.73에서 methyl group의 signal이 singlet으로 나타나고 δ 8.33 및 δ 7.54에서 각각 $J=8.4\text{Hz}$ 의 doublet으로 H-6 및 H-7의 aromatic proton들이 관찰되고 있다. H-1의 signal이 δ 8.85에서 doublet($J=8.5\text{Hz}$), H-2의 signal이 δ 7.62에서 double doublet($J=8.5, 7\text{Hz}$)로 나타나며 H-3은 δ 7.45에서 doublet($J=7\text{Hz}$)로 나타나는것을 각각 확인하였다. 이상의 data와 ^{13}C -NMR data를 문헌치와 비교해본결과 단삼으로부터 이미 보고 되어진 화합물로서 abietanoid계열의 danshenspiroketalactone⁹⁷⁾임을 확인하였다. compound 2는 ^1H -NMR spectrum에서 δ 1.31에서 germinal dimethyl의 singlet signal이 강하게 나타나며 δ 1.81~1.63에서 C-2 및 C-3의 methylene proton들이 나타나고 δ 2.25에서 furan ring에 결합되어 있는 methyl group이 doublet($J=1.2\text{Hz}$)으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. ^{13}C -NMR spectrum에서는 30.6ppm에서 CH_2 인 C-1의 pick를 볼수 있고 19.8ppm, 38.5ppm에서 C-2 및 C-3의 methylene carbon의 pick를 확인할수 있으며 9.5, 32.5ppm에서 3개의 methyl기의 pick가 나타남을 확인하였다. 이상의 결과를 문헌치와 비교결과 (kang et al) tanshinone II A⁹⁸⁾임을 확인하였다. compound 3의 ^1H -NMR data에서 methyl group이 δ 2.64에서 singlet signal로 나타나고 ^{13}C -NMR에서 A ring의 carbon pick가 compound 2와 비교해서 전체적으로 down field로 이동되어 나타나는 것 외에 2와 유사한 pattern을 보였다. 문헌치와 비교해 본 결과 compound 3은 tanshinone I⁹⁸⁾임을 확인하였다. compound 4의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR을 살펴보면 A ring의 signal은 compound 2와 같으나 furan ring의 signal이 다른 pattern으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 문헌치와 비교결과 compound 4는 cryptotanshinone⁹⁸⁾임을 확인하였으며 compound 5는 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR spectrum에서 furan ring을 제외한 나머지 signal은 compound 3과 같고 furan ring의 signal은 compound 4와 같은 pattern이 나타나는 것이 관찰되었으므로 15,16-dihydrotanshinone I⁹⁹⁾임을 확인하였다.

compound 6~11은 lignin화합물임을 확인하였다. compound 6의 ^1H -NMR의 spectrum data를 살펴보면 δ 6.28, δ 7.62에서 trans-olefin proton signal인 H-7과 H-8의 doublet($J=16\text{Hz}$)이 관찰되고 δ 7.25~6.62에서 4개의 aromatic ring에 결합된 proton의 signal들이 doublet과 multiplet으로 나타나고 있으며 H-7'과 H-8'의 signal은 δ 4.47 및 5.90에서 각각 doublet($J=5.2\text{Hz}$)로 나타난다. double doublet($J=4.5, 7.3\text{Hz}$) signal이 δ 5.19에서 δ 2.86~3.13에서 multiplet signal이 관찰되므로 6개의 aliphatic carbon이 존재함을 확인하였다. ^{13}C -NMR data에서는 총 36개의 carbon pick가 관찰되고 171.4ppm, 171.1ppm, 170.5ppm, 166.5ppm에서 4개의 carboxyl carbon의 존재를 확인하였으며 DEPT에서 CH_2 peak가 2개(37.4ppm, 37.0ppm) 관찰되었다. 이상의 data를 문헌과 비교결과 이 화합물은 분자식이 $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ 인 salvianolic acid B 또는 lithospermic acid B임을 확인하였고 한 화합물의 화합물명이 두개 기재되어있어 본 연구자는 보다 널리 알려져 있는 명칭인 salvianolic acid B¹⁰⁰⁾로 사용하였다. compound 9와 10의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR은 compound 6의 data와 비교해서 methylester group의 signal이 나타나는것외에는 유사한 pattern이 나타난다. 2D-NMR측정결과 compound 10은 *Salvia preswalskii*에서 이미 분리된 dimethyl lithospermate B¹⁰⁰⁾임을 확인하였으나 *Salvia miltiorrhiza*에서는 처음으로 분리된 화합물이었다. Compound 9 또한 C-9"과 C-9"' 중 한 군데에 methylester group이 위치한것으로 추정¹⁰⁰⁾되나 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT spectrum으로는 그 위치를 찾기 어려워 2D-NMR 측정중에 있다. 문헌조사결과 9"-monomethyl lithospermate B와 9"'-monomethyl lithospermate B가 *Salvia preswalskii*로부터 이미 분리되었으나 단삼으로부터

는 아직 보고 된 문헌이 없는 화합물임을 확인하였다. compound 7의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 trans-olefin proton signal과 aromatic ring에 결합된 proton의 signal이 나타났으며 methylene proton의 존재와 oxygen에 결합된 CH의 pick가 나타났다. 이 화합물은 단삼으로부터 이미 분리 보고 된 rosmarinic acid¹⁰¹⁾임을 확인하였고 문헌과도 잘 일치하였다. compound 8은 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ data가 compound 6과 유사한 pattern이 나타나나 $^{13}\text{C-NMR}$ data에서 총 28개의 carbon pick가 나타났고 aromatic ring signal이 3개 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 단삼으로부터 이미 분리 보고 되어진 lithospermic acid의 9' carbon 에 monomethylester결합된 9' -methyl lithospermate¹⁰¹⁾임을 문헌치와 비교하여 확인하였다. compound 11의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 6.43, δ 7.91에서 H-7과 H-8의 doublet($J=16\text{Hz}$)이 관찰되고 δ 7.37~6.57에서 aromatic ring proton의 signal이 관찰되며 δ 7.17에서 H-8' 의 singlet이 관찰되었다. δ 5.26에서 H-8'' 의 signal이 double doublet($J=5.2, 7.2\text{Hz}$)으로 관찰되었으며 δ 3.70에서 1개의 $-\text{OCH}_3$ signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ data에서 두개의 carboxyl group의 pick가 175.0ppm, 171.3ppm에서 나타나고 compound 8과 비교해서 C-7' 과 C-8' pick가 downfield 되어 각각 162.2ppm과 102.0ppm에서 관찰되고 DEPT spectrum에서 CH_3 pick가 1개(55.5ppm)와 CH_2 pick가 1개(40.7ppm)가 확인되었다. 이상의 결과를 종합하면 salvianolic acid C의 9'' 의 carboxyl group에 methyl기가 ester결합된 화합물임을 확인하였다. salvianolic acid C는 *Salvia miltiorrhiza*에서 이미 분리 보고 되었지만 methylester group이 결합된 화합물은 아직 보고 된 문헌이 없음을 확인하였으므로 이 화합물은 methyl salvianolate C로 명명하였다.

이상과 같이 황금(19종의 화합물)과 단삼(11종의 화합물)으로부터 화합물을 분리, 구조결정한결과 황금은 17종의 flavonoid와 2종의 phenolic compound가 분리되었고 단삼에서는 5종의 diterpenoid와 6종의 lignin이 분리되었다. 본연구의 세부과제와 활성팀에게 연구에 필요한 시료를 제공하였고 황금시료는 식약청에 유효성분 3종(wogonin, baicalein, baicalin)을 대량분리를 통해 제공하고 그 외 7종의 화합물도 제공하였다.

4.2 황금과 단삼의 생리활성물질분석 및 동시정량법개발

황금과 단삼의 생리활성성분에 대하여 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 동시분석법을 개발하였으며, 동시분석법의 validation을 통하여 동시분석법의 타당성을 입증하였으며 본 연구에서는 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황금의 경우 HPLC/UV 법은 wogonin (2), baicalein (3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone (4), baicalin (8), chrysin (9), oroxylin A (10)의 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였으며, LC-MS/MS 법은 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester(1), wogonin(2), baicalein (3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(4), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone(6), baicalin (8), chrysin(9)의 7종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 위의 성분에 대하여 r^2 가 0.999 이상의 직선성에 해당하는 검량선(calibration curve)을 얻었다.

2. 단삼의 경우 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법 모두 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)의 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 위의 성분에 대하여 r^2 가 0.999 이상의 직선성에 해당하는 검량선(calibration curve)을 얻었다.

3. 확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법

으로 각각 지표성분의 함량을 동시 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 재배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법에서 baicalin 은 두 가지 방법에서 오차가 최대 2 % (황금 중 baicalein 의 함량이 높은 원인으로 간주됨)까지 되었으며 대부분의 시료는 오차가 1 % 미만이었다. wogonin baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'- dimethoxyflavone 시료는 오차가 0.5 % 미만이었다.

4. 확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 동시 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 국내 중국산 수입품으로서 미룡상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 서울 제기동 수집품 중국 감속성산 (K-3), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 기정장약 중국 난주시장수집 감속성산 (C-1), 창달중약 안국시장수집품 중국 하북성산 (C-2), 창달중약 안국시장수집품 중국 산둥성산 (C-3), 성도시장수집품 사천성산 (C-4), 중국 장사시장수집품 (C-5), 성도시장 수집 (C-6), 중국 곤명시장수집품 (C-7), 중국 난주시장수집품 (C-8), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9), 중국 곤명시장수집품 운남성산 (C-10), 중국 장사시장수집품 (C-11), 중국 시상판나시장 수집품 (C-12)의 16종을 대상으로 분석하였다. 함량 분석 결과 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법에서 slavianolic acid B는 두 가지 방법에서 0.3 % 미만이었고 나머지 성분들은 대부분 0.03 % 미만이었으며, 몇 개 시료는 0.06 % 전후의 오차도 있었다.

5. 생리활성팀에서 연구한 활성정보와 연계할 경우 황금의 경우 대한약전 수재 시 지표성분으로서 생리활성이 강하면서 황금에 많이 함유되어 있는 baicalin (현재 10% 이상 함유하도록 규정되어 있음), wogonin, baicalein 중에서 설정함이 바람직할 것으로 사료된다. 단삼의 경우 대한약전에는 현재 지표성분이 설정되어 있지 않으며, 중국약전에는 salvianolic acid B 3% 이상, tanshinone IIA가 0.2% 이상 함유하도록 규정되어 있다. 단삼 시료에 함유된 salvianolic acid B 함량은 단삼 위품을 제외한 15종 시료 중 13종이 3% 이상 함유되어 있었으며, tanshinone IIA는 단삼 위품을 제외한 15종 시료 중 3종만이 0.2% 이상 함유되어 있었다.

6. 본 연구에서 개발된 황금과 단삼의 동시분석법은 향후 대한약전 개정 시 황금과 단삼의 지표성분 분석법으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 황금과 단삼 시료의 산지별 성분 분석결과를 활용하여 산지별 패턴 분석 및 품질관리를 할 수 있을 것으로 간주된다.

4.3 유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성성분의 효능 유전자 검증

황금 및 황금의 성분 중 청열약의 효능으로 대표적인 항염증 효과에 대해 우수한 효과를 나타내는 성분 3종 (baicalein, wogonin, chrysin)^{6-7, 96)}을 황금의 효능 성분으로 제시함. 황금의 성분 중 baicalein의 배당체인 baicalin¹⁻⁶⁾도 항염증 효능이 있는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서는 *in vitro* 검색에 중점을 두었으므로 배당체의 경우 그 효능이 aglycone 보다 낮게 나타날 수 있음. DNA microarry를 이용한 효능 유전자 검색 결과 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 황금과 유효 성분들에 대해서 공통적으로 inflammation 관련 유전자의 변화가 가장 크게 나타남. 그 외에 apoptosis, angiogenesis, PDGF, T cell 등과 관련된 유전자들의 변화가 나타남. 이는 청열약으로 사용되는 황금의 항염증 반응과 관련이 있는 것으로 사료됨.

단삼 및 그 성분들은 심혈관 질환과 관련하여 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려짐^{55, 102-109}. 또한 한의학적으로 활혈거어약으로 분류되어 이같은 사실을 입증함. 본 연구에서는 항산화 활성에 중점을 두고 단삼 및 그 성분들에 대해 효능을 검색한 결과 tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B 등의 성분 4종을 유효 성분으로 제시함. 15,16-dihydrotanshinone I의 경우 높은 항산화 활성을 나타내긴 했으나 독성이 커서 유효 성분에서 제외함. DNA microarray를 이용하여 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 oxidataion, inflammation 관련 유전자들의 변화가 가장 크게 나타났으며 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남. 특히 항산화와 관련한 oxidative stress와 관련된 gene들의 변화가 크게 나타났으며 관련 gene들의 분석 후, 단삼의 대표적인 생리활성 효과인 cardiovascular 질병 치료와 관련됨이 나타남. 이러한 결과는 단삼이 심근경색 흰쥐 모델에서 심근에 SOD의 발현을 증가시키고 지질과산화를 억제하였다는 보고 및 tanshinone 등이 심근 지질의 과산화를 억제하고 SOD 활성을 증가시키고 PGE₂의 생성을 감소시켰다는 보고^{55, 102-104, 107}와 일치하여 단삼 및 유효 성분의 항산화 활성을 증명함 .

제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재 생리활성성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구(황금, 단삼)
총괄과제책임자	손건호/안동대학교/천연물화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	Different effects of flavonoids in <i>Scutellaria baicalensis</i> on anxious and sedative behaviors	박형근, 최지영, 이금선, 최중현, 손건호, 고흥숙, 고광호, 류종훈, 정재훈	<i>Journal of Applied Pharmacology</i>		83-89		국내	비SCI
2	Hepatoprotective activities of glycyrrhizin and baicalin in primary cultured rat hepatocytes	Sung-Hwa Kim et al	약학회지	게재 확정	게재 확정		국내	
3	Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice	DH Kim, SJ Jeon, KH Son, JW Jung, SJ Lee, BH Yoon, JW Choi, JH Cheong, KH Ko	<i>Pharmacology, Biochemistry and Behavior</i>	게재 확정	게재 확정		국외	SCI

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Simultaneous analysis of flavonoid compounds in <i>Scutellaria baicalensis</i> by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry	포스터	정민교, 정은숙, 김남희, 김창수, 정미향, 손건호, 문동철, 우미희	한국분석과학회	2005.11.17-18	제 35회 한국분석과학회 추계학술대회 초록집	국내
2	황금 중 생리활성 지표성분의 동시분석	포스터	정은숙, 방철, 정민교, 문동철, 손건호, 우미희	한국분석과학회	2006.5.18-19	제 36회 한국분석과학회 춘계학술대회 초록집	국내
3	Anti-inflammation activity of compounds isolated from <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	포스터	MK Kim, H Ha, HY Lee, DY Jung, SJ Lee, JY chol, HS Choi, C Kim, KH Son	63rd KSBMB annual meeting	2006.5.25		국내

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/ 국제
4	Different effects of wogonin, baicalein and oroxylin A in <i>Scutellaria baicalensis</i> on anxious behaviors	포스터 발표	박형근, 최지영, 이금선, 최종현, 임병우, 고흥숙, 김성목, 이용수, 손건호, 정재훈	한국 뇌학회	2006년 6월30일	2006년 한국뇌학회 학술대회집	국내
5	Different effects of wogonin, baicalein and oroxylin A in <i>Scutellaria baicalensis</i> on anxious behaviors	포스터 발표	박형근, 최지영, 이금선, 최종현, 임병우, 고흥숙, 김성목, 이용수, 손건호, 정재훈	한국 뇌학회	2006년 6월30일	2006년 한국뇌학회 학술대회집	국내
6	Effects of baicalin, baicalein and wogonin on mucin release from airway goblet cells	포스터 발표	허호진 외	미국 생약학회	2006.8.5 -9	미국 생약학회지	국제
7	Hepatoprotective effects of baicalin and glycyrrhizin on carbon tetrachloride-induced mouse liver injury	포스터 발표	박상원 외	미국 생약학회	2006.8.5 -9	미국생약학회 지	국제
8	Effects of Scutellariae Radix on gene expression in macrophage cell line using microarray	포스터	HY Lee, H Ha, Y Chang, DY Jung, JY Choi, C Kim, SS Kang, KH Son, SJ Jeon	2006년 대한약학 회 추계학술 대회	2006. 11. 6.~7.		
9	The study of antioxidant in <i>Salvia Miltiorrhizae</i> Radix	포스터	Y Chang, H Ha, HY Lee, DY Jung, JY Choi, SS Kang, KH Son, SJ Jeon, C Kim	2006년 대한약학 회 추계학술 대회	2006. 11. 6.~7.		
10	Simultaneous analysis of 2 phenolics and 4 diterpenoids in <i>Salvia miltiorrhizae</i> Radix by high-performance liquid chromatography	포스터	방철, 전수진, 정은숙, 정민교, 손건호, 문동철, 우미희	한국분석 과학회	2006.11 .23-24	제 37회 한 국분석과학회 추계학술대회 초록집	국내

11	Quality evaluation of Scutellariae radix through simultaneous assay of major active components by HPLC	포스터	EK Kim, KR ZE, JP Lee, JY Park, JH Kim, JS Shin, JH Lee, KH Son, MH Woo, SY Chang	2006년 대한 약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.	국내
12	Anti-diabetic effect of the major active components isolated from <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge by an analysis of the effect on insulin receptor signaling	포스터	SH Jung, HJ Seol, SJ Jeon, KH Son, YS Kim, SS Kang, JR Lee	2006년 대한 약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.	국내
13	Effect of oroxylin A on transient cerebral hypoperfusion -induced memory impairment	포스터	DH Kim, SJ Jeon, KH Son, JW Jung, SJ Lee, BH Yoon, JW Choi, JH Cheong, KH Ko, JH Ryu	2006년 대한 약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.	국내

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

황금은 17종의 flavonoid와 2종의 penolic compound가 분리되었고 단삼에서는 5종의 diterpenoid와 6종의 lignin이 분리되었다. 본연구의 세부과제와 활성팀에게 연구에 필요한 시료를 제공하였고 황금시료는 식약청에 유효성분 3종(wogonin, baicalein, baicalin)을 대량분리를 통해 제공하고 그 외 7종의 화합물도 제공 완료하였다. 단삼시료도 차후에 유효물질 3종을 포함해 총 10종을 제공하여 대한 약전등 개정시 기준 시험법에 반영하고 생약의 효능시험, biochip을 활용한 생약의 유용성분 개발에 활용 될 것이다.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

- 황금, 단삼의 품질 평가를 위한 기초 자료 제공으로 대한 약전등 개정시 기준 시험법에 반영
- 생약의 효능시험, biochip을 활용한 생약의 유용성분 개발에 활용될 시료제공
- 한약재 생리활성 물질의 효능 유전자 확인으로 한약재 및 한약제제의 표준화 기준 설정
- 한약재 규격관리 과학화
- 한약재 표시·품질등급화
- Biochip을 이용한 기전 연구 및 다양한 효능 유전자 발굴로 신약 개발 가능
- 한약재에 포함되어 있는 성분들의 효능 및 유해성 연구

제6장 기타 중요변경사항

- 3세부 과제의 연구책임자가 한국한의학연구원 최환수 → 한국한의학연구원 신현규 (2006. 6.)→ 한국한의학연구원 하혜경 (2006. 8.)으로 변경됨

제7장 참고문헌

1. A. Ohnishi et al., *Agr. Biol. Chem.*, **51**, 5, 1449, 1987
2. M. Shimizu et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2, 577, 1983
3. N. Kumar et al., *Phytochemistry*, **25**, 1, 250, 1986
4. S. Hasehawa et al., *Phytochemistry*, **21**, 643, 1982
5. S. Hada et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 9, 3885, 1986
6. Koda A., Watanabe S., Yanagihara Y., Nagai H., Sakamoto K.(1977) A comparative study of the anti-allergic effects of disodium baicalein 6-phosphate (BPS) and disodium cromoglycate (DSCG), *Jpn. J. Pharmacol.*, **27** : 31.
7. BQ. Li, T. Fu, W.H. Gong, N. Dunlop, H. F. Kung, Y. D. Yan, J. Kang, J. M. Wang, (2000) The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, **49** : 295
8. B.Q. Li, T. Fu, Y.D. Yan, N.W. Baylor, F.W. Ruscetti, H.F. Kung (1993) Inhibition of HIV infection by baicalin—a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol. Biol. Res.*, **39** : 119
9. J.A. Wu, A.S. Attele, L. Zhang, C.S. Yuan (2001) Anti-HIV activity of medicinal herbs: usage and potential development. *Am. J. Chinese Med.*, **29** : 69
10. T. Konoshima, M. Kokumai, M. Kozuka, M. Inuma, M. Mizuno, T. Tanaka, H. Tokuda, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima (1992) STUDIES ON INHIBITORS OF SKIN TUMOR PROMOTION; Inhibitory Effects of Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* on Epstein-Barr Virus Activation and Their Anti-tumor-Promoting Activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **40** : 531
11. F. L. Chan, H. L. Choi, Z. Y. Chen, P. S. F. Chan, Y. Huang (2000) Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett.*, **160** : 219
12. S. Ikemoto, K. Sugimura, N. Yoshida, R. Yasumoto, S. Wada, K. Yamamoto, T. Kishimoto (2000) Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology*, **55** : 951
13. Z. H. Gao, K. X. Huang, H. B. Xu (2001)Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells.*Pharmacol. Res.*, **43** : 173
14. D. E. Shieh, L. T. Liu, C. C, Lin (2000) Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.*, **20** : 2861
15. F. Chen, K. H. Chan, Y. Jiang, R. Y. T. Kao, H. T. Lu, K. W. Fan, V. C. C. Cheng, W. H. W. Tsui, T. S. W. Lee, J. S. M. Peiris, K. Y. Yuen, *J. Clin. Virol.*, **31**, 69, 2004.
16. S.C. Ma, J. Du, P.P.H. But, X.L. Deng, Y.W. Zhang, V.E.C. Ooi, H.X. Xu, S.H.S. Lee, S.F. Lee (2002) Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus.*J. Ethnopharmacol.*, **79** : 205
17. Huang RL, Chen CC, Huang HL, Chang CG, Chen CF, Chang C, Hsieh MT. (2000) Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med.* 66(8):694-8.
18. Lin, Ta-Chen et al., *Chinese Pharm. J. (Taipei,Taiwzn)* (2002), **54**(3), 193-198
19. Sonoda, Maki et al., *J. Ethnopharmacology* (2004), **91**(1), 65-68

20. morimoto, Masanori et al., *J. Agr. and Food Chem.* (2003), **51**(2), 389–393
21. A. Boucheny et al., *Plant Med. Phytother.*, **24**, 3, 179, 1990
22. Z. Kowalewski, *Planta Med.*, **19**, 311, 1971
23. Z. Yang et al., *Tetrahedron Lett.*, **32**, 8, 2061, 1991
24. S. Yahara et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 527, 1985
25. Z. Chen et al., *Yao Hsueh T'ung Pao*, **16**, 24, 1981
26. M. Aritomi et al., *Phytochemistry*, **24**, 10, 2438, 1985
27. CB. Ai et al., *Chin. Chem. Lett.*, **7**, 427, 1996
28. HC. Lin et al., *CA*, **120**, 240076u, 1994
29. M. Onitsuka et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 5, 1670, 1983
30. HY. Li et al., *Phytochemistry*, **35**, 3, 751, 1994
31. S. Takabe et al., *Shoyakugaku Zasshi*, **34**, 69, 1980
32. J. Liu et al., *Planta Med.*, **61**, 453, 1995
33. YL. Lie et al., *J. Nat. Prod.*, **44**, 6, 722, 1981
34. H. Kojima et al., *Phytochemistry*, **25**, 729, 1986
35. H. Youn et al., *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**, 1, 18, 1991
36. N. Wang. et al., *Phytochemistry*, **27**, 301, 1988
37. S. Huneck et al., *Phytochemistry*, **10**, 3279, 1971
38. T. Okuda et al., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 1273, 1977
39. Zhang, Jin-lan; Cui, Ming; He, Yun; Yu, Hai-lan; Guo, De-an. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2005), **36**(5), 1029–1035
40. Gu, Ming; Zhang, Guifeng; Su, Zhiguo; Ouyang, Fan. *Journal of Chromatography, A* (2004), **1041**(1–2), 239–243
41. Mosaddik, M. Ashik; Karagianis, G.; Waterman, P. G. *Phytochemistry*, (2002), **30**(3), 87–93
42. Gu, Sheng; Wang, Xiaoru; Li, Lei; Lee, Frank S. C. *Analytical Sciences* (2001), **17**(Suppl.), 475–478.
43. Xue, M.; Cui, Y.; Wang, H. Q.; Hu, Zh. Y.; Zhang, B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (1999), **21**(1), 207–213
44. Ren, Yuhao; Houghton, Peter J.; Hider, Robert C.; Howes, Melanie-Jayne R. *Planta Medica* (2004), **70**(3), 201–204.
45. Mosaddik, M. A. *Phytomedicine* (2003), **10**(8), 682–685.
46. Okuno, Yoshiharu; Miyazawa, Mitsuo. *Letters in Drug Design & Discovery* (2004), **1**(1), 66–68.
47. Lam, B. Y. H.; Lo, A. C. Y.; Sun, X.; Luo, H. W.; Chung, S. K.; Sucher, N. J. *Phytomedicine* (2003), **10**(4), 286–291.
48. Ueng, Yune-Fang; Kuo, Ya-Hui; Peng, Hsiao-Chi; Chen, Ta-Liang; Jan, Woan-Ching; Guengerich, F. Peter; Lin, Yun-Lian. *Xenobiotica* (2003), **33**(6), 603–613.
49. Niu, Xi-Lin; Ichimori, Kohji; Yang, Xia; Hirota, Yuki; Hoshiai, Kiyotaka; Li, Min; Nakazawa, Hiroe. *Japan. Free Radical Research* (2000), **33**(3), 305–312.
50. Wang, Xihong; Bastow, Kenneth F.; Sun, Chang-Ming; Lin, Yun-Lian; Yu, Hsi-Jung; Don, Ming-Jaw; Wu, Tian-Shung; Nakamura, Seikou; Lee, Kuo-Hsiung. *Journal of Medicinal*

- Chemistry* (2004), **47**(23), 5816–5819.
51. Mostallino, Maria Cristina; Mascia, Maria Paola; Pisu, Maria Giuseppina; Busonero, Fabio; Talani, Giuseppe; Biggio, Giovanni. *European Journal of Pharmacology* (2004), **494**(2–3), 83–90.
52. Wang, Xin–Jian; Xu, Jian–Xing. *Neuroscience Research (Amsterdam, Netherlands)* (2005), **51**(2), 129–138.
53. Li, Hong–Yan; Li, Yan; Yan, Chun–Hong; Li, Lian–Niang; Chen, Xiao–Guang. *Journal of Asian Natural Products Research* (2002), **4**(4), 271–280.
54. Liu, Cheng–Hai; Liu, Ping; Hu, Yi–Yang; Xu, Lie–Ming; Tan, Yin–Zi; Wang, Zhen–Nan; Liu, Cheng. *Acta Pharmacologica Sinica* (2000), **21**(8), 721–726.
55. Li, Min; Zhao, Chi; Wong, Ricky N. S.; Goto, Shinya; Wang, Zhimin; Liao, Fulong. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2004), **31**(2), 97–103.
56. Lay, Ing–Shiow; Chiu, Jen–Hwey; Shiao, Ming–Shi; Lui, Wing–Yiu; Wu, Chew–Wun. *Planta Medica* (2003), **69**(1), 26–32.
57. Abd–Elazem, Ibrahim S.; Chen, Hong S.; Bates, Robert B.; Huang, Ru Chih C. *Antiviral Research* (2002), **55**(1), 91–106.
58. Liu, Cheng–Hai; Liu, Ping; Hu, Yi–Yang; Xu, Lie–Ming; Tan, Yin–Zi; Wang, Zhen–Nan; Liu, Cheng. *Acta Pharmacologica Sinica* (2000), **21**(8), 721–726.
59. Jiang Ren–Wang; Lau Kit–Man; Hon Po–Ming; Mak Thomas C W; Woo Kam–Sang; Fung Kwok–Pui *Current medicinal chemistry* (2005 Jan), **12**(2), 237–46.
60. Kang, Bok Yun et al., *Planta Medica* (2003), **69**(8), 687–691
61. Suk, Kyoungho et al., *J. Pharm. and Experimental Therapeutics* (2003), **305**(2), 638–645
62. Park, SJ et al., *Digestive Diseases and Sciences* (2004), **49**(3), 384–394
63. Lee, Heasuk et al., *FASEB Journal* (2003), **17**(13), 1943–1944
64. Heo, HJ et al., *J. Agr. and Food Chem.* (2004), **52**(13), 4128–4132
65. Hahm, Dae–Hyun et al., *J. Microbio. Biotech.* (2001), **11**(6), 1061–1065
66. Chung, Jin–Su et al., *Natural Product Sciences* (2001), **7**(2), 45–48
67. Kim, Bok–Ryang et al., *Planta Medica* (2001), **67**(5), 396–399
68. Hwang, YS et al., *Life Sciences* (2002), **71**(18), 2105–2117
69. Nan, Ji–Xing et al., *J. Pharmacy and Pharmacology* (2002), **54**(4), 555–563
70. Kang, Hye Sook; Chung, Hae Young; Byun, Dae Seok; Choi, Jae Sue. *Archives of Pharmacal Research* (2003), **26**(1), 24–27.
71. Choi, J. S.; Kang, H. S.; Jung, H. A.; Jung, J. H.; Kang, S. S. *Fitoterapia* (2001), **72**(1), 30–34.
72. Ryu, Shi Yong; Lee, Chong Ock; Choi, Sang Un. *Planta Medica* (1997), **63**(4), 339–342.
73. Choi, Hong–Seok; Cho, Dong–Im; Choi, Hoo–Kyun; Im, Suhn Yong; Ryu, Shi–Yong; Kim, Kyeong–Man. *Archives of Pharmacal Research* (2004), **27**(12), 1233–1237.
74. Kim, Sung Young; Moon, Tae Cheol; Chang, Hyeun Wook; Son, Kun Ho; Kang, Sam Sik; Kim, Hyun Pyo. *Phytotherapy Research* (2002), **16**(7), 616–620.
75. Ko, Jeong Suk; Ryu, Shi Young; Kim, Young Sup; Chung, Mi Yeon; Kang, Jong Seong; Rho, Mun–Chual; Lee, Hyun Sun; Kim, Young Kook. *Archives of Pharmacal Research* (2002), **25**(4), 446–448.

76. Lee, Dong-Sun; Lee, Sang-Han; Noh, Jae-Geun; Hong, Soon-Duck. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (1999), **63**(12), 2236–2239.
77. Kang, B. Y.; Chung, S. W.; Kim, S. H.; Ryu, S. Y.; Kim, T. S. *Immunopharmacology* (2000), **49**(3), 355–361.
78. Choi Hong-Seok; Cho Dong-Im; Choi Hoo-Kyun; Im Sunh Yong; Ryu Shi-Yong; Kim Kyeong-Man *Archives of pharmacal research* (2004 Dec), **27**(12), 1233–1237.
79. Choi, Hong-Seok; Kim, Kyeong-Man. *Planta Medica* (2004), **70**(2), 178–180.
80. Ryu, Shi Yong; Oak, Min-Ho; Kim, Kyeong-Man. *Planta Medica* (1999), **65**(7), 654–655.
81. Kim, Hong-Hee; Kim, Jung Ha; Kwak, Han Bok; Huang, Hao; Han, Song-Hee; Ha, Hyunil; Lee, Soo Woong; Woo, Eun-Ran; Lee, Zang Hee. *Biochemical Pharmacology* (2004), **67**(9), 1647–1656.
82. Sung, Hyun Jea; Choi, Sun Mi; Yoon, Yoosik; An, Kyu Suk. *Experimental and Molecular Medicine* (1999), **31**(4), 174–178.
83. Yoon, Y.; Kim, Y.-O.; Jeon, W.-K.; Park, H.-J.; Sung, H. J. *Journal of Ethnopharmacology* (1999), **68**(1–3), 121–127.
84. Soung, Do You; Rhee, Sook Hee; Kim, Jung Sun; Lee, Ji Young; Yang, Hee-sun; Choi, Jae Sue; Yokozawa, Takako; Han, Yong Nam; Chung, Hae Young. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2003), **55**(10), 1427–1432.
85. Lee, Chu-Hyun; Kim, Sang-In; Lee, Kyung-Bok; Yoo, Yung-Choon; Ryu, Si-Young; Song, Kyung-Sik. *Archives of Pharmacal Research* (2003), **26**(5), 367–374.
86. D. de Ruke et al., *Phytochemistry*, **17**, 1664, 1978
87. CK. Lau et al., *J. Org. Chem.*, **52**, 1670, 1987
88. Kimura Y., Okuda H., Taira Z., Shoji N., Takemoto T. and Arichi S. (1984) STUDIES ON SCUTELLARIAE RADIX ; New Component Inhibiting Lipid Peroxidation in Rat Liver. *Planta Med.*, **50** : 290
89. Kubo M., Matsuka H., Kimura Y., Okuda H. and Arichi S. (1984) Scutellariae Radix. X. Inhibitory effects of various flavonoids on histamine release from rat peritoneal Mast cells in vitro. *Chem. Pharm. Bull.*, **32** : 5051
90. M. Iinuma and M. Mizuno, *Phytochemistry*, **28**, 681, 1989
91. M. Kubo et al., *Planta Med.*, **43**, 199, 1981
92. Y. Miyaichi et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3720, 1987
93. Hanaoka M., Kohsu M. and Yasuda S. (1985) A first and stereoselective synthesis of (\pm)-Raddeanamine. *Chem. Pharm. Bull.*, **33** : 4113
94. M. Iinuma and M. Mizuno (1989) Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones. *Phytochemistry*, **28** : 681
95. Tomimori T., Miyaichi Y. and Kizu H. (1982) On the flavonoid constituents from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Yakugaku Zasshi*, **102** : 388
96. Kimuya Y., Kubo M., Tani T., Arichi S., Okuda H. (1981) Studies on Scutellariae Radix. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **29** : 2610.
97. H. W. Luo et al., *Phytochemistry*, **27**, 290, 1988
98. H. S. Kane et al., *Arch. Pharm. Res.*, **20**, 496, 1997
99. S. Y. Ryu et al.. *Planta Medica*, **63**, 44, 1997

100. CB. Ai et al., *J. Nat. Prod.*, **51**, 145, 1988
101. H. Kohda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1287, 1989
102. Zhang X, Kuang P, Wu W, Yin X, Kanazawa T, Onodera K, Metoki H, Oike Y. (1994) The effect of radix *Salviae Miltiorrhizae Composita* on peroxidation of low density lipoprotein due to copper dichloride. *J Tradit Chin Med.* 14(3):195-201
103. Zhang X, Wu W, Kuang P, Takemichi K, Kogo O, Hirobumi M, Yasaburo O. (1994) The effect of radix *salviae miltiorrhizae composita* and ligustrazine on lipid peroxidation in low density lipoprotein due to copper dichloride. *J Tradit Chin Med.* 14(4):292-7
104. Kuang P, Tao Y, Tian Y. (1996) Radix *Salviae miltiorrhizae* treatment results in decreased lipid peroxidation in reperfusion injury. *J Tradit Chin Med.* 16(2):138-42.
105. Wu W, Kuang P, Li Z. (1998) Effect of radix *Salviae miltiorrhizae* on the gene expression of nitric oxide synthase in ischemic rat brains. *J Tradit Chin Med.* 18(2):128-33.
106. Yu S, Kuang P, Kanazawa T, Onodera K, Metoki H, Oike Y. (1998) The effects of radix *Salviae miltiorrhizae* on lipid accumulation of peroxidized low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages--lipid analysis and morphological studies. *J Tradit Chin Med.* 18(4):292-9.
107. Tang MK, Ren DC, Zhang JT, Du GH. (2002) Effect of salvianolic acids from Radix *Salviae miltiorrhizae* on regional cerebral blood flow and platelet aggregation in rats. *Phytomedicine.* 9(5):405-9.
108. Koo BS, Kwon TS, Kim CH. (2004) *Salviae miltiorrhizae* radix inhibits superoxide generation by activated rat microglia and mimics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. *Neurochem Res.* 29(10):1837-45.
109. Chung TW, Koo BS, Kim KO, Jeong HS, Kim MG, Chung KH, Lee IS, Kim CH. (2006) *Salviae Miltiorrhizae* BGE Radix increases rat striatal K(+)-stimulated dopamine release and activates the dopamine release with protection against hydrogen peroxide-induced injury in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Neurochem Res.* 31(1):109-20.

제8장 첨부서류

- 본 연구개발사업의 성과로 기술된 게재된 학술지 논문 전체 사본(게재 허가를 받은 경우 게재 증명서)과 산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본을 반드시 첨부할 것.

편집순서 7 : 세부연구과제의 연구결과

제1세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 황금, 단삼의 생리활성물질분리

세부과제책임자 : 손건호/안동대학교

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

황금 (黃芩)은 꿀풀과의 여러해살이풀로 속썩은풀 *Scutellaria baicalensis* Georgi(꿀풀과 Labiatae)의 주피를 벗긴 뿌리이다. 꽃은 7~8월에 피고 열매는 9월에 결실하며 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다. 한방에서는 뿌리를 해열, 이노, 지사, 이담, 소염제로 이용한다. 문헌에서는 50여종의 flavonoid가 보고되어 있으며 이외에도 alpha-pyrone type의 butylphthalide 외 5종¹⁾, benzenoid 화합물인 benzoic acid²⁾, phenylacetaldehyde³⁾등 21종, diterpenoid 계열인 ferruginol⁴⁾ 1종이 보고되어 있으며 이외에도 lipid성분 3종, monoterpene 성분 3종, phenylpropanoid 화합물인 elemicin⁵⁾을 비롯하여 3종, protein 10종, sesquiterpenoid 4종, steroid 2종의 화합물들이 분리 보고되었다. 활성연구로는 flavonoid계열의 화합물인 baicalein, baicalin, wogonin, oroxylin A에 관한 연구가 많은 비중을 차지하고 있으며 그 외에도 3종의 기타성분에 관한 연구가 진행되었다. 그 중 baicalin은 항알러지⁶⁾, 항염증⁷⁾, 항HIV^{7,8)}, 항암^{9,10,11)}, 항산화^{12,13)}, 항-SARS 코로나바이러스 효과¹⁴⁾가 있음이 보고되어었고, baicalein은 항HIV^{7,8)}, 항암¹¹⁾, 항산화^{12,13)}효과를 가지며, wogonin은 anti-respiratory syncytial virus¹⁵⁾, anti-hepatitis B virus¹⁶⁾, 항암¹¹⁾, 항산화 효과¹³⁾를 나타내며, oroxylin A는 anti-respiratory syncytial virus¹⁵⁾ 활성을 나타내는 것으로 알려졌다.

단삼(丹蔘)은 *Salvia miltiorrhiza* Bunge(꿀풀과 Labiatae)의 뿌리이다. 단삼은 다년생초본으로서 40-80cm정도 자라며 전주에 황백색의 털이 나 있다. 중국이 원산이며 우리나라는 수입에 의존한다. 한방에서는 기염, 심교통, 협심통, 혈전 및 혈관염, 월경통 등의 치료에 이용되었다. 단삼의 경우 diterpenoid와 lignin등이 많이 보고 되었고 이외에도 Boucheny등이 benzenoid 화합물인 protocatechuic acid와 rancinamycin IV 2종을 분리 보고¹⁷⁾하였고 flavonoid 화합물 2종¹⁸⁻¹⁹⁾, phenylpropanoid 화합물인 danshensuan²⁰⁾, Chen등이 danshensuan A, danshensuan C²¹⁾, rosmarinic acid²²⁾, salvianolic acid F²³⁾외 2종의 화합물들을 보고하는등 많은 연구결과가 보고되었다. 단삼의 활성연구는 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydrotanshinone I이 acetylcholinesterase 활성²⁴⁾과 cytotoxicity활성효과²⁵⁾를 나타낸다고 보고하였고 Okuno등은 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone이 SOS inducing 활성을 저해한다고 보고²⁶⁾하였으며, Lam등은 tanshinone II A, tanshinone II B가 neuroprotective 효과를 가진다고 보고²⁷⁾하는등 주요성분인 diterpenoid계열 화합물들에 대해 많은 연구가 진행되었다. 또한 lignin화합물의 활성연구는 salvianolic acid A의 cytotoxicity²⁸⁾, antitumor 효과²⁹⁾, anti-fibrosis 효과³⁰⁾가 보고되었고 salvianolic acid B의 항혈전효과³¹⁾와 enhance angiogenic process³²⁾를 보고하였으며 lithospermic acid와 lithospermic acid B는 anti-HIV효과를 가진다는 활성연구가 보고³³⁾되었다.

이상에서 기술한 바와 같이 황금과 단삼은 화학적으로나 생리활성적인 측면에서 많은 연구결과가 보고 되었음에도 불구하고 우리나라에서 재배되고 있는 이들 한약재들에 대한 연구와 최근에 급증하고 있는 수입품에 대한 연구검토 결과는 미미한 수준이다. 이에 본 연구에서는 황금과 단삼에 함유되어 있는 유효성분 중심의 한약재 규격관리에 필요한 생리활성물질을 분리하고자 하였다. 황금의 주요성분인 flavonoid 8종과 기타화합물 2종을 포함하여 10종이상의 화합물을, 단삼으로부터 주성분인 diterpenoid 8종과 미량성분으로서 생리활성을 나타낼 가능성이 있는 lignin 2종을 크로마토그래피법으로 분리하여 구조결정 후 생리활성검색 시료로 제공한다. 또한 황금과 단삼의 유효성분 3종이상을 대량 분리를 통하여 확보 제출한다.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

<당초목표>

황금의 주요성분인 flavonoid 8종 및 기타화합물 2종을 포함하여 10종 이상의 물질을 분리하고 단삼은 주요성분인 diterpenoid 8종 및 lignin화합물 2종을 포함하여 10종 이상의 물질을 분리한다.

<목표달성도>

황금으로부터 flavonoid 17종 및 penolic compound 2종을 포함하여 19종의 화합물을 분리하였고 단삼으로부터 diterpenoid 5종 및 lignin 화합물 6종을 포함하여 11종의 화합물을 분리하였다. 단삼의 당초목표는 diterpenoid 8종 및 lignin화합물 2종을 분리하는 것이었으나 단삼의 추출용매를 70% EtOH을 사용하여 비극성물질인 diterpenoid보다 lignin 화합물의 함량이 많아 당초목표보다 lignin화합물이 많이 분리되었고 반면 diterpenoid화합물 수는 당초목표에 부족한 결과를 얻었다.

1.3 국내외 기술개발 현황

Table 1. 국외에서 진행된 황금의 성분 연구(Flavonoid)

Compound type	Compound name	Reference
Flavonoid	6-C- α -L-Arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranosylchrysin	S. Takagi et al., Phytochemistry, 20, 2443, 1981 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Apigenin	H. Itokawa, Chem. Pharm. Bull., 29, 254, 1981
	Apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989
	Baicalein (Noroxylin)	K. Sagara et al., Shoyakugaku Zasshi, 40, 1, 84, 1986
	Baicalein-7-methyl ether	TP. Popova et al., Chem. Nat. Comp., 9, 6, 699, 1973
	Baicalein-7-O- β -D-glucopyranoside	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 524, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Baicalin	SS. Subramanian et al., Phytochemistry, 11, 439, 1972
	Carthamidin	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 1792, 1982
	Chrysin	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 1792, 1982
	Chrysin-6-C- β -D-glucopyranoside-8-C- α -L-arabinopyranoside	S. Takagi et al., Phytochemistry, 20, 2443, 1981 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Cichlorooxylin A	H. Yamamoto et al., Shoyakugaku Zasshi, 41, 2, 97, 1987
	Dihydrobaicalin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Dihydrooxylin A	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	5,8-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 4, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	5-Hydroxy-7,8-dimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	4'-Hydroxywogonin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 4, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Isocarthamidin	M. Takido et al., Yakugaku Zasshi, 96, 381, 1976 (uv, ir, pmr, ms)
	Isoscutellarein	Y. Miyachi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989
	Isoscutellarein-8-O-glucuronopyranoside	Y. Miyachi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989
	Maltol	A. Ohnishi et al., Agr. Biol. Chem., 51, 5, 1449, 1987
	Neobaicalein	Anon, Natl. Med. J. China, 53, 417, 1973
	Norwogonin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Oroxylin A	M. Goudard, Phytochemistry, 17, 145, 1978(ms)
Oroxylin A-7-O-glucuronidemethyl ether	TP. Popova et al., Chem. Nat. Comp., 9, 6, 699, 1973	
2(R), 3(R)-2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanone	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 5, 1792, 1982 (uv, ir, pmr, ms)	
Salvigenin	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 101, 899, 1981	
Scutellarein	E. Wollenweber et al., Phytochemistry, 24, 9, 2129, 1985 (uv, pmr, cmr) ; B. Voirin, 22, 2107, 1983	
	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989	

Compound type	Compound name	Reference
Flavonoid	Scutellarin	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 3, 794, 1989 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Scutevulin	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Skullcapflavone II-2'-methyl ether	M.Takido et al., Yakugaku Zasshi, 95, 108, 1975
	Tectorigenin	SO. Lee et al., Korean J. Pharmacogn., 20, 4, 219, 1989
	Tenaxin I	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	(2S)-2',6',7-Trihydroxy-5-methoxy-flavanone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	(2S)-4',5,6,7-Tetrahydroxyflavanone-7-O- β -D-glucuronopyranoside	Y. Miyaichi et al., Shoyakugaku Zasshi, 42, 3, 216, 1988
	(2S)-4',5,7,8-Tetrahydroxyflavanone-7-O- β -D-glucuronopyranoside	Y. Miyaichi et al., Shoyakugaku Zasshi, 42, 3, 216, 1988
	2(S)-2',5,6',7-Tetrahydroxyflavanone	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 5, 1792, 1982 (uv, ir, pmr, ms)
	2,2',4',6-Tetrahydroxy-6'-methoxychalcone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',3',5,7-Tetrahydroxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jpn.), 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,5',7-Tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavone	Y. Kimura et al., Planta Med., 50, 4, 290, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,5'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,6,7-Tetrahydroxyflavanone	J. Geigert et al., Tetrahedron, 29, 2703, 1973
	2',5,6',7-Tetrahydroxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 5, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	Y. Miyaichi et al., Chem. Pharm. Bull., 35, 9, 3720, 1987
	2',5,7-Trihydroxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,8-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavone	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 12, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,7-Trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavone	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 103, 6, 607, 1983 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	2',5,8-Trihydroxy-7-methoxyflavone	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 12, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavanone	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 12, 1220, 1980 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
	Viscidulin I	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 104, 5, 529, 1984 (uv, ir, pmr, cmr, ms)
Wogonin	Y. Kimura et al., Chem. Pharm. Bull., 30, 219, 1982	
Wogonoside	T. Tomimori et al., Chem. Pharm. Bull., 33, 4457, 1985	
Wogonin-7-O- β -D-glucuronopyranosyl methyl ester	T. Tomimori et al., Yakugaku Zasshi, 102, 388, 1982 (uv, ir, pmr, cmr, ms)	
Wogonin-5-O- β -D-glucopyranoside	S. Takagi et al., Yakugaku Zasshi, 100, 1220, 1980	

Table 2. 국외에서 진행된 단삼의 성분 연구 (Diterpenoid, Lignin)

Compound type	Compound name	Reference
Diterpenoid	1,2,5,6-Tetrahydrotanshinone I	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	1,2-Dihydrotanshinquinone	N. Okamura et al., J. Chromatogr., 542, 317, 1991
	12-Methoxysalvinone	N. Wang et al., Planta Med., 55, 4, 390, 1989
	3- α -Hydroxytanshinone II a	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	1-Dehydromiltirone	HW. Luo et al., Yao Hsueh Pao, 23, 830, 1988
	1-Dehydrotanshinone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	4-Methylenemiltirone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	6,7,8,9-Tetrahydro-1,6,6-trimethylfuro(3,2-c)naphth(2,1-E)oxepine	HM. Chang et al., J. Chem. res.(S), 4, 1990
	-10, 12-dione	
	7- β -Hydroxy-abieta-8,13-diene-11, 12-dione	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	7-Oxo-sandaracopimaric acid	B. Esquivel et al., J. Nat. Prod., 50, 4, 738, 1987
	Arucadiol	LZ. Lin et al., Planta Med., 54, 5, 443, 1988
	Cryptoacetalide	F. Asari et al., Chem. Lett., 10, 1885, 1990
	Cryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Cyptanshinone	S. Luo et al., Yaowu Fenxi Zazhi, 8, 154, 1988
	Dan shen spiroketallactone	HW. Luo et al., Phytochemistry, 27, 270, 1988
	Danshenol A	Y. Tezuka et al., Chem. Pharm. Bull., 45, 1306, 1997
	Danshenol B	Y. Tezuka et al., Chem. Pharm. Bull., 45, 1306, 1997
	Danshexinkun A	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Danshexinkun B	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Danshexinkun C	CN. Fang et al., Hua Hsueh Pao, 34, 197, 1976
	Danshexinkun D	HW. Luo et al., Yao Hsueh Pao, 20, 542, 1985
	Deoxyneocryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Dihydroisotanshinone I	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Dihydromethylenetanshinquinone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	Dihydrotanshinone I	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Epi dan shen spirospiroketallactone	HW. Luo et al., Phytochemistry, 27, 270, 1988
	Epicryptoacetalide	F. Asari et al., Chem. Lett., 10, 1885, 1990
	Euphracal	A. Ulubelen, J. Nat. Prod., 52, 6, 1313, 1989
	Formyltanshinone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 3537, 1990
	Hydroxytanshinone II	HW. Luo et al., Phytochemistry, 24, 815, 1985
	Isocryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	Isotanshinone II b	AR. Lee et al., J. Nat. Prod., 50, 157, 1987
	Methyl dihydrotanshinone	HC. Lin et al., Chin. Pharm. J., 43, 11, 1991
Methyl tanshininate	MK. Chien et al., Hua Hsueh Hsueh Pao, 36, 199, 1978	
Methyl tanshinonate	MK. Chien et al., Hua Hsueh Hsueh Pao, 36, 199, 1978	
Methylenetanshinone	HW. Luo et al., Yao Hsueh Pao, 24, 341, 1989	

Compound type	Compound name	Reference
Diterpenoid	Methylenetanshinquinone	XL. Huang et al., Shin Wu Hsueh Pao, 22, 98, 1980
	Miltionone I	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	Miltionone II	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 28, 3139, 1989
	Miltipolone	G. Haro et al., Chem. Lett., 9, 1599, 1990
	Miltirone	N. Wang et al., Planta Med., 55, 390, 1989
	Neocryptotanshinone	Y. Ikeshiro et al., Phytochemistry, 30, 2791, 1991
	Nordihydrotanshinone	HC. Lin et al., Chin. Pharm. J., 43, 11, 1991
	Norsalvioxide	H. Ginda et al., Tetrahedron Lett., 29, 36, 4603, 1988
	Nortanshinone	HW. Luo et al., Phytochemistry, 24, 815, 1985
	Przewaquinone A	B. Li et al., Phytochemistry, 30, 3815, 1991
	Przewaquinone B	B. Yang et al., Yaoxue Xuebao, 16, 837, 1981; CA, 96, 177900
	Salvia diterpene lactone V	HM. Chang et al., J. Chem. Res. (S), 4, 1990
	Salvia diterpene lactone VI	HM. Chang et al., J. Chem. Res. (S), 4, 1990
	Salvia tanshinone 31	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvia tanshinone 32	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvia tanshinone 33	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvilenone	LZ Lin et al., Planta Med., 54, 5, 443, 1988
	Salvinone	N. Wang et al., Planta Med., 55, 390, 1989
	Salviol	E. Wenkert et al., Phytochemistry, 13, 2545, 1974
	Salviolone	HM. Chang et al., J. Org. Chem., 55, 11, 3537, 1990
	Salvonitin	M. Noguchi et al., J. Nat. Prod., 48, 342, 1985
	Tanshindiol A	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991
	Tanshindiol B	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991
	Tanshindiol C	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991
	Tanshinketolactone	HC. Lin et al., J. Chin. Chem. Soc. (Taipei), 43, 199, 1996
	Tanshinol 1	HW. Luo et al., Chem. Pharm. Bull., 34, 3166, 1986
Tanshinonal	N. Okamura et al., Planta Med., 58, 571, 1992	
Tanshinone EE-B	A. Yagi et al., Planta Med., 57, 288, 1991	
Tanshinone I	G. Honda et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 1, 408, 1988	
Tanshinone IIb	CN. Fang et al., Hua Hsueh Hsueh Pao, 34, 197, 1976	
Tanshinone II A	G. Honda et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 1, 408, 1988	
Tanshinone V	A. Yagi et al., Planta Med., 55, 51, 1989	
Tanshinone VI	A. Yagi et al., Planta Med., 55, 51, 1989	
Lignin	Ammonium-potassium lithospermic acid B	T. Tanaka et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 2, 340, 1989
	Catecholaldehyde	W. Chen et al., Chung Ts'ao Yao, 11, 442, 1980
	Danshensuan B	Z. Chen et al., Yao Hsueh T'ung Pao, 16, 24, 1981
	Dihydrocaffeic acid(tetramer)	T. Yokozawa et al., Chem. Pharm. Bull., 36, 1, 316, 1988
	Ethyl lithospermate	CB. AI et al., Planta Med., 58, 2, 197, 1992
	Magnesium lithospermic acid B	T. Tanaka et al., Chem. Pharm. Bull., 37, 2, 340, 1989
	Salvianolic acid A	LM. Li et al., Planta Med., 50, 227, 1984
	Salvianolic acid C	CB. Ai et al., J. Nat. Prod., 51, 1, 145, 1988
	Salvianolic acid D	CB. AI et al., Planta Med., 58, 197, 1992
	Salvianolic acid E	CB. AI et al., Planta Med., 58, 197, 1992
Salvianolic acid G	CA. AI et al., Chin. Chem. Lett., 2, 1, 17, 1991	

황금 및 단삼의 성분이나 그 활성에 관하여서는 이미 매우 많은 연구가 수행되어 왔으며 그 결과들도 보고되었다. 황금의 경우 flavonoid가 주성분으로 Table 2에서와 같이 보고되어 있으며 이외에도 alpha-pyrone type의 butylphthalide 외 5종¹⁾, benzenoid 화합물인 benzoic acid²⁾, phenylacetaldehyde³⁾ 등 21종, diterpenoid 계열인 ferruginol⁴⁾ 1종이 보고되어 있으며 이외에도 lipid성분 3종, monoterpene 성분 3종, phenylpropanoid 화합물인 elemicin⁵⁾을 비롯하여 3종,

protein 10종, sesquiterpenoid 4종, steroid 2종의 화합물들이 분리 보고되었다. 단삼의 경우에도 많은 연구결과가 보고 되어 있으며 주성분으로는 Table 3와 같이 많은 종류의 diterpenoid와 lignin등이 보고 되었다. 이외에도 Boucheny등이 benzoid 화합물인 protocatechuic acid와 rancinamycin IV 2종을 분리 보고¹⁷⁾하였고 flavonoid 화합물 2종¹⁸⁻¹⁹⁾, phenylpropanoid 화합물인 danshensuan²⁰⁾, Chen등이 danshensuan A, danshensuan C²¹⁾, rosmarinic acid²²⁾, salvanolic acid F²³⁾외 2종의 화합물들이 보고 되었으며 그 외 quinoid 2종³⁴⁻³⁵⁾, saponin 2종³⁶⁻³⁷⁾, sesquiterpenoid 2종³⁸⁻³⁹⁾, triterpenoid 5종⁴⁰⁻⁴³⁾, tannin 1종의 화합물⁴⁴⁾들이 각각 분리 보고 되었다.

이상에서 기술한 바와 같이 황금 및 단삼으로부터 많은 성분이 분리 보고 되었음에도 불구하고 우리나라에서 재배되고 있는 이들 한약재들에 대한 연구와 최근에 급증하고 있는 수입품에 대한 연구검토 결과는 미미한 수준이다. 두 한약재가 식품으로서 대량 수입되어 의약품으로 둔갑하여 유통 질서를 어지럽히고 있는 현실에서 이들 한약재들에 대한 화학적 성분분리를 통한 유효성분들의 분리 및 화학구조 결정은 이들 한약재에 대한 품질평가 면에서 매우 중요하다고 사료된다.

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

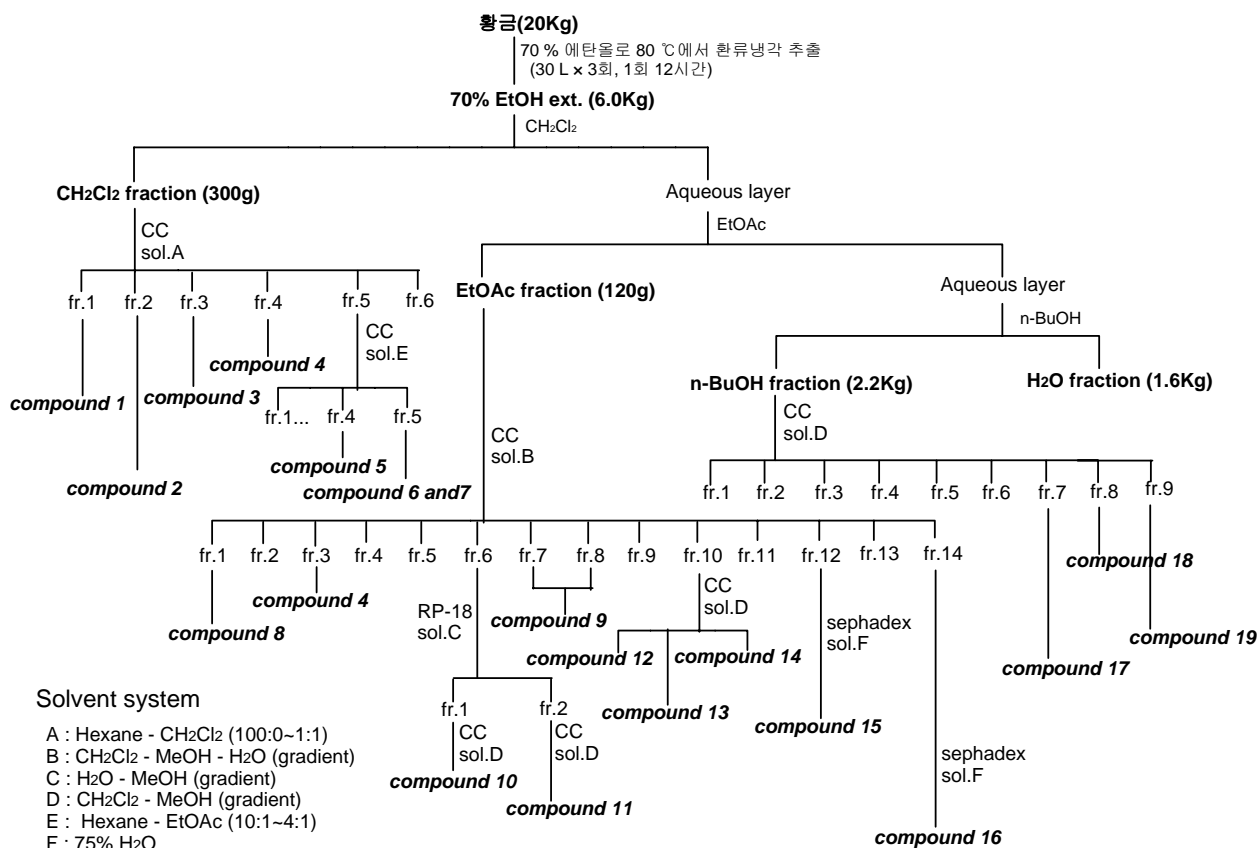
2.1 황금의 생리활성성분 분리

가. 실험재료 - 전남 순천에서 재배한 황금(Scutellaria Roots)을 구입(2005년 7월)하여 경희대학교 이재현교수의 확인을 거친 후 사용하였다.

나. 기기 및 시약 - ^1H , ^{13}C -NMR spectrum은 Varian의 Gemini 2000 (300 MHz)를 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. 용점은 fisher사의 melting point 를 사용해 측정하였으며 Column chromatography용 고정상은 Merck사의 Kieselgel 60 (No. 7734, 0.063-0.200 mm) 또는 Kieselgel 60 (No. 7729, 0.063 mm 이하), Kieselgel 60 (No. 9385, 0.040-0.063mm)과 Lichroprep RP-18 (NO. 13900, 0.040-0.063 mm)을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ 과 RP-18 F_{254S} (Merck)를 사용하였다. 발색시약은 10% H₂SO₄를 사용하였으며, UV 254 nm, 365 nm detection을 병행하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 1급 시약을 정제 없이 사용하였고 나머지 시약은 1급 시약을 정제해서 사용하거나 특급 시약을 사용하였다. glucuronic acid 와 sugar standard는 Sigma Chemical Company, LTD에서 구입 사용하였다.

다. 추출 및 분리 - 황금 20 Kg을 80 °C에서 70 % 에탄올 (30 l)로 12시간씩 3회추출하여 그 추출액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 70% EtOH extract 약 6 Kg을 얻었다. 이 중 일부는 3세 부과제의 유전자칩연구에 필요한 시료로 제공하였고 5.9 Kg을 물 20 l에 녹여 여기에 CH₂Cl₂(15 l)를 가하여 분획칼대기로 CH₂Cl₂ 와 수층으로 분획한 다음 CH₂Cl₂층을 감압농축하여 CH₂Cl₂ extract(300g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 EtOAc (15 l), n-BuOH (15 l)순으로 추출하여 EtOAc extract 120g, n-BuOH extract 2.2kg 과 H₂O extract 1.6kg을 얻었다. 이들 중 CH₂Cl₂ extract 일부(30.5g)을 silica gel column으로 분리하였다. column(길이 80cm, 지름 7cm)에 silica gel(0.063-0.200 mm)을 25cm 채우고 용매는 Hexane 100% mobile phase의 elution을 시작하여 n-Hexane: CH₂Cl₂ = 1:1순으로 극성을 높이면서 fraction 1~10을 얻었다. fraction 1, 2, 3을 각각 재결정하여 compound 1, 2, 3을 분리하였다. 또한 fraction 4를 재결정하여 compound 4를 얻었고 fraction 5는 silica gel (0.063 mm 이하) column chromatography를 이용하여 용매 Hexane: EtOAc = 10:1~4:1로 용리시켜 총 5-1 ~ 5-6까지 6개의 소분획을 만들었다. 이 중 5-4를 재결정하여 compound 5를 얻었고 5-5를 재결정하여 compound 6과 7을 얻었다. EtOAc extract 또한 일부 (120g)를 silica gel column으로 아래와 같이 분리하였다. column(길이 75cm, 지름 12cm)에 silica gel(0.063-0.200 mm)을 20cm 채우고 n-Hexane용매로 elution 시켜 stationary phase를 균일한 상태로 만든 후, EtOAc extract 120g을 silicagel (0.063-0.200 mm)180g에 흡착시켜 column에 loading시켰다. 이후 CH₂Cl₂ 100 %로 mobil phase의 elution을 시작하여 CH₂Cl₂: MeOH : H₂O = 100:1:0.1, 95:1:0.1, 90:1:0.1, 80:1:0.1의 순으로 극성을 높이면서 각각 elution 시켜 fraction 1~14를 얻었다. 상기 분획 중 fraction 1을 MeOH로 재결정하여 compound 8을 얻었고 fraction 7, 8을 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 9를 얻었다. 상기 분획 중 fraction 6은 다시 RP-18 column chromatography 법으로 분리하였다. H₂O 100%로 elution시켜 stationary phase를 균일하게 만든 후 fraction 6을 CHCl₃-MeOH 혼합용매에 완전히 녹인 후 column에 완전히 흡착시킨 후 MeOH의 비율을 단계적으로 높이면서 elution 시켰다. 그 결과 compound 10, 11을 얻었다. 또 상기분획 중 fraction 10를 다시 flash column chromatography법으로 분리하였다. column에 silica gel(0.040-0.063mm)을 약 20cm 정도 채우고 CHCl₃-MeOH 혼합용매에 완전히 녹인 후 silica gel

column에 loading시켰다. 그리고 MeOH의 비율을 단계적으로 높이면서 elution시켰다. 결과 compound 12, 13, 14를 얻었다. fraction 12를 재결정하여 얻은 결정부분을 MeOH에 용해시켜 sephadex LH-20 column에 완전히 흡착시킨후 75% H₂O로 elution시켰다. 그 결과 compound 15를 분리하였고 fraction 10을 재결정 후 앞의 방법과 같은 방법으로 분리한 결과 compound 16을 분리하였다. 또 BuOH extract 중 50g을 silica gel column으로 분리하였는데 용매는 CH₂Cl₂ 100% mobile phase의 elution을 시작하여 CH₂Cl₂ :MeOH =9 : 1순으로 극성을 높이면서 용리하였고 그 결과 compound 17, 18, 19를 얻었다.



Scheme 1. Extraction and isolation procedure of compounds from Scutellaria Root.

2.2 단삼의 생리활성물질 분리

가. 실험재료 - 원산지가 중국의 산동성인 단삼(Salvia Miltiorrhiza Roots) 3~4년근을 성립무역을 통해 구입(2005년 10월)하여 경희대 이재현 교수님의 확인을 거쳐 사용하였다.

나. 기기 및 시약 - ¹H, ¹³C-NMR spectrum은 Varian의 Gemini 2000 (300 MHz)과 Bruker의 AMX 500 (500 MHz)을 사용하여 측정하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. 용점은 fisher사의 melting point를 사용해 측정하였으며 Column chromatography용 고정상은 Merck사의 Kieselgel 60 (No. 7734, 0.063-0.200 mm) 또는 Kieselgel 60 (No. 9385, 0.040-0.063mm)을 사용하였고 Lichroprep RP-18 (NO. 13900, 0.040-0.063 mm)과 Mitsubishi

kasei사의 MCI-gel(75-150 μ), sephadex LH-20을 사용하였으며, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄ 과 RP-18 F_{254S} (Merck)를 사용하였다. 발색시약은 10% H₂SO₄를 사용하였으며, UV 254 nm, 365 nm detection을 병행하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 1급 시약을 정제 없이 사용하였고 나머지 시약은 1급 시약을 정제해서 사용하거나 특급 시약을 사용하였다.

다. 추출 및 분리-경희대 이제현교수의 확인을 거친 중국산 단삼(3-4년근) 17.45kg을 70% EtOH로 상온에서 일주일간 3회 추출 후 농축하여 70% EtOH extract 2.37kg을 만들었다. 이중 일부는 3세부과제의 유전자칩연구에 필요한 시료로 제공하였고 나머지를 70% EtOH extract를 물에 녹여 여기에 n-Hexane을 가하여 분획칼대기로 n-Hexane과 수층으로 분획한 다음 n-Hexane층을 감압농축하여 n-Hexane extract(48.8g)을 얻었고 다시 수층은 상기와 같은 방법으로 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH순으로 추출하여 CH₂Cl₂ extract 27.89g, EtOAc extract 212.23g, n-BuOH extract 149.11g 과 H₂O extract 1.79kg을 얻었다. 이중 Hexane, CH₂Cl₂ 분획을 합쳐 silica gel 60(0.063-0.200mm)를 이용해 column chromatography를 실시하였고 용매는 Hexane : CH₂Cl₂ =8:2~4:6을 단계적으로 용리시켜 fraction1~11을 얻었다. 이 중 fraction 3번을 MeOH로 재결정하여 compound 1을 얻었고 fraction 4를 EtOAc로 재결정하여 compound 2를 얻었으며 fraction 6을 MeOH로 재결정하여 compound 3을 얻었다. 또한 fraction 8~10을 합쳐 Hexane : CH₂Cl₂ 용매 system을 이용해 silica gel 60(0.040-0.063mm)으로 chromatography를 실시한 결과 fraction8-1~8-6으로 6개의 소분획을 얻었다. 이렇게 얻어진 소분획 중 8-3과 8-6을 각각 재결정하여 compound 4와 5를 분리하였다. EtOAc분획 또한 silica gel column chromatography를 용매 system CHCl₃ : MeOH : H₂O(gradient)을 이용하여 실시하였다. 그 결과 총 10(fraction 1~10)개의 소분획을 만들었고 fraction 7~10을 합쳐 MCI-gel을 이용해 분리하였다. column(길이90cm, 지름5cm)에 MCI-gel을 30cm 채운후 stationary phase를 MeOH 100%로 elution 시키면서 균일하게 만든 후 H₂O 100%로 elution시킨다. fraction 7~10을 MeOH에 녹여 MCI-gel에 완전히 흡착시킨 후 MeOH의 비율을 10%씩 높이면서 elution 시킨결과 fraction 7-1~7-10을 얻었다. 이중 7-2번 소분획을 silica gel(0.040-0.063mm) column에 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 52:28:8 용매를 이용하여 용리시켜 compound 6을 얻었고 fraction 4는 RP-18 column을 이용해 분리하였다. H₂O 100%로 elution 시킨뒤 fraction 7-4를 MeOH에 용해시켜 흡착시킨뒤 MeOH 비율을 높이면서 분리한 결과 8개의 fraction을 얻었으며 이중 fraction 7-4-2에서 compound 7을 얻었고 fraction 7-4-4에서 compound 8을 얻었으며 fraction 7-4-7에서 compound 9를 얻었다. 또한 fraction 7-8은 MeOH에 용해시켜 sephadex LH-20 column에 완전히 흡착시킨후 H₂O100%에서 MeOH의 비율을 단계적으로 높이면서 분리한 결과 fraction 7-8-1~7-8-3을 얻었고 이중 fraction 7-8-2에서 compound 10을 얻었고 fraction 7-8-3에서 compound 11을 얻었다.

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 황금의 생리활성물질 분리

Compound 1 (guaiacol); (IUPAC name : 2-methoxyphenol), (이명 : catechol methylester, O-hydroxyanisole); $C_7H_8O_2$ (M.W. 124); liquid; UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 275 (3.23); 1H -NMR ($CDCl_3$, 200MHz)ppm: 6.86~6.84(4H, m, H-3, 4, 5, 6), 3.85(3H, s, OCH_3)
 ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 50MHz)ppm: 146.7(C-1), 145.7(C-6), 121.6(C-2), 120.3(C-5), 114.7(C-3), 110.8(C-4), 56.0(OCH_3)

Compound 2(paeonol); (IUPAC name : 2'-hydroxy4'-methoxyacetophenone), (이명 : peonol); $C_9H_{10}O_3$ (M.W. 166); mp : 48~50°C; white crystallin powder; IR V_{max} cm^{-1} 3435(OH), 2936(OCH_3), 1630, 1578(C=C aromatic ring) ; UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 313 (3.86), 273(3.19), 228(4.03), 213(4.26) ; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 300MHz)ppm: 7.84(1H, d, $J=9$ Hz, H-6), 6.53(1H, dd, $J=9$ Hz and 2.7Hz, H-5), 6.47(1H, d, $J=2.7$, H-3), 3.82(3H, s, OCH_3), 2.56(3H, s, CH_3)

^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 75.5MHz)ppm: 113.7(C-1), 165.7(C-2), 100.7(C-3), 164.1(C-4), 107.3(C-5), 133.3(C-6), 55.7(OCH_3), 203.1(C=O), 26.6(CH_3)

Compound 3 (oroxylin A); (IUPAC name : 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone), (이명 : baicalein 6-methylester); $C_{16}H_{12}O_5$ (M.W. 284); mp : 218~219°C; pale yellow neddles; IR V_{max} cm^{-1} 3394(OH), 2949(OCH_3), 1657(C=O), 1558(C=C) ; UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 317(4.29), 271(4.58), 214(4.68); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 250MHz)ppm: 3.75(3H, s, OCH_3), 6.63(1H, s, H-3), 6.97(1H, s, H-8), 8.10~7.52(5H, m, H-2'~ 6'), 12.95(1H, s, 5-OH)

^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 62.5MHz)ppm: 182.5 (C-4), 163.4(C-2), 157.9(C-7), 153.0 (C-9), 152.8(C-5), 132.2(C-4'), 131.7(C-1'), 130.9(C-8), 129.4(C-3', C-5'), 126.6(C-2', C-6'), 104.9(C-3), 104.5 (C-10), 94.6(C-6), 60.2(OCH_3)

Compound 4 (chrysin); (IUPAC name : 5,7-dihydroxyflavone), (이명 : chrysinic acid); $C_{15}H_{10}O_4$ (M.W. 254); mp : 290~292°C; pale yellow powder; IR V_{max} cm^{-1} 3435(OH), 1655(C=O), 1614, 1578(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 313 (4.19), 268(4.57), 211(4.69); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 250MHz)ppm: 6.21(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.51(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.95(1H, s, H-3), 7.52~7.63(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.03~8.06 (2H, m, H-2', 6'), 12.81(1H, s, 5-OH)

^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 62.5MHz)ppm: 182.1 (C-4), 164.7(C-7), 163.4(C-2), 161.7(C-5), 157.7 (C-9), 132.3(C-4'), 130.9 (C-1'), 129.4(C-2', C-6'), 126.6(C-3', C-5'), 105.4(C-3), 104.2 (C-10), 99.3(C-6), 94.4(C-8)

Compound 5(tenaxin I); (IUPAC name : 5, 2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone); $C_{18}H_{16}O_7$ (M.W. 344); mp : 234~235°C; yellow neddles; IR V_{max} cm^{-1} 3444(OH), 2937(OCH_3), 1647(C=O), 1607, 1571(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 337(4.26), 276(4.54), 205(4.69); 1H -NMR (DMSO- d_6 , 250MHz)ppm: 3.81, 3.89, 4.01(3H, s, each $3 \times OCH_3$), 7.09~7.01(2H, m H-3', 5'), 7.13(1H, s, H-3), 7.45~7.39(1H, m, H-4'), 7.87(1H, dd, $J=6.5$ and 1.5Hz, H-6') 10.93(1H, br.s, 2'OH), 12.67(1H, s, 5-OH)

^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 62.5MHz)ppm: 183.0(C-4), 162.1(C-2), 157.2(C-2'), 152.8(C-7), 148.7(C-9), 145.7(C-5), 135.9(C-6), 133.4(C-4'), 132.9(C-8), 128.5(C-6'), 119.9(C-5'),

117.4(C-1'), 117.3(C-3'), 109.0(C-3), 106.4(C-10), 62.1(8-OCH₃), 61.7(7-OCH₃), 60.8(6-OCH₃)

Compound 6 (skullcapflavone II); (IUPAC name : 5,2'-dihydroxy-6,7,8,6'-tetramethoxyflavone), (이명 : neobaicalein); C₁₈H₁₆O₇ (M.W. 344); mp : 280-281°C; yellow needles; IR V_{max} cm⁻¹ 3435(OH), 1651(C=O), 1605, 1567(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ε) 269 (4.44); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 3.74, 3.78, 3.81, 4.00(3H, s, each 4×OCH₃), 6.34(1H, s, H-3), 6.61(2H, d, *J*=7.5Hz, H-3', 5'), 7.31(1H, t, *J*=7.5Hz, H-4') 10.16(1H, br.s, 2' OH), 12.64(1H, s, 5-OH)

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.7(C-4), 162.6(C-2), 158.5(C-6'), 156.9(C-2'), 152.8(C-7), 148.8(C-9), 146.5(C-5), 136.0(C-6), 132.8(C-8), 132.8(C-4'), 118.9(C-10), 112.1(C-3), 109.1(C-1'),109.0(C-3'), 102.5(C-5'), 62.0(8-OCH₃), 61.7(7-OCH₃), 60.8(6-OCH₃), 56.1(6'-OCH₃)

Compound 7 (rivularin); (IUPAC name : 5,2'-dihydroxy-7,8,6'-trimethoxyflavone); C₁₈H₁₆O₇ (M.W. 344); mp : 259°C; yellow needles; IR V_{max} cm⁻¹ 3434(OH), 2942(OCH₃), 1658(C=O), 1572(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ε) 264(4.51); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 3.69, 3.74, 3.90 (3H, s, each 3×OCH₃), 6.28(1H, s, H-3), 6.60(1H, s, H-6), 6.60(2H, d, *J*=8.2Hz, H-3', 5'), 7.31(1H, t, *J*=8.2Hz, H-4'), 12.70(1H, s, 5-OH)

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.4(C-4), 162.4(C-2), 158.6(C-7), 158.6(C-6'), 157.0(C-5), 156.9(C-2'), 150.0(C-9), 132.8(C-4'), 128.6(C-8), 112.2(C-3), 109.2(C-1'), 109.0(C-3'), 104.2(C-10), 102.5(C-5'), 96.2(C-6), 61.3(8-OCH₃), 56.8(7-OCH₃), 56.1(6'-OCH₃)

Compound 8 (wogonin); (IUPAC name : 5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone); C₁₆H₁₂O₅ (M.W. 284); mp : 202~203°C; yellow needles; IR V_{max} cm⁻¹ 3431(OH), 1658(C=O), 1614, 1581(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ε) 275 (4.57); EI-MS *m/z* : 284[M]⁺; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 3.84(3H, s, C8 -OCH₃), 6.30(1H, s, H-3), 6.99(1H, s, H-6), 7.57~7.62 (3H, m, H-3', 4', 5'), 8.04~8.08(2H, m, H-2', 6')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.3 (C-4), 163.2(C-2), 157.7(C-7), 156.5 (C-9), 149.9(C-5), 132.3(C-4'), 131.1 (C-1'), 129.5(C-3', C-5'), 128.0(C-8), 126.5(C-2', C-6'), 105.3(C-3), 104.0 (C-10), 99.4(C-6), 61.3(8-OCH₃)

Compound 9 (baicalein); (IUPAC name : 5,6,7-trihydroxyflavone), (이명 : noroxylin); C₁₅H₁₀O₅ (M.W. 270); mp : 260~262°C; yellow prisms; IR V_{max} cm⁻¹ 3411(OH), 1658(C=O), 1620, 1585(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ε) 323(4.27), 274(4.50), 215(4.59); EI-MS *m/z* : 270[M]⁺; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 6.62(1H, s, H-3), 6.92(1H, s, H-8), 7.51~7.62(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.03~8.07(2H, m, H-2', 6')

¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.4 (C-4), 163.1(C-2), 153.9(C-7), 150.1 (C-9), 147.2(C-5), 132.1(C-4'), 131.2 (C-1'), 129.6(C-6), 129.4(C-3', C-5'), 126.5(C-2', C-6'), 104.7(C-10), 104.5 (C-3), 94.2(C-8)

Compound 10 (2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone) ; (이명 :viscidulin II); C₁₇H₁₄O₇ (M.W. 330); mp : 286°C; yellow needles; IR V_{max} cm⁻¹ 3473(OH), 1660(C=O), 1608, 1568(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ε) 325(4.00), 265(4.48), 203(4.76); ¹H-NMR (pyridine-*d*₅, 250 MHz, δ ppm) : 3.75, 3.93 (ea. 3H, ea. s, 7,8-OCH₃), 6.63 (1H, s, H-3),

6,95 (1H, s, H-6), 6.81 (2H, d, $J=8.2$, H-3', 5'), 7.28 (1H, t, $J=8.2$, H-4'), 13.42 (1H, br s, 5-OH)

^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 62.5 MHz, δ ppm) : 164.1 (C-2), 113.1 (C-3), 183.4 (C-4), 158.1 (C-5), 96.1 (C-6), 158.7 (C-7), 129.5 (C-8), 151.1 (C-9), 105.5 (C-10), 107.5 (C-1'), 158.8 (C-2', 6'), 110.3 (C-3', 5'), 132.7 (C-4'), 56.2 (7-OCH₃), 61.4 (8-OCH₃)

Compound 11 (2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone) ; C₁₇H₁₄O₇ (M.W. 330); mp : 26 °C ; yellow needles; IR V_{\max} cm⁻¹ 3392(OH), 1657(C=O), 1618, 1512(C=C); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 325(3.69), 266(4.19), 202(4.55); ^1H -NMR (CD₃OD, 250 MHz, δ ppm) : 3.79, 3.82 (ea 3H, ea s, 8, 6' -OCH₃), 6.23 (1H, s, H-6), 6.27 (1H, s, H-3), 6.56 (1H, d, $J=8.5$, H-3'), 6.60 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 7.29 (1H, dd, $J=7.8$ and 8.5 , H-4')

^{13}C -NMR (CD₃OD, 62.5 MHz, δ ppm) : 163.7 (C-2), 113.2 (C-3), 184.1 (C-4), 158.1 (C-5), 100.4 (C-6), 158.3 (C-7), 129.1 (C-8), 152.3 (C-9), 103.3 (C-10), 105.4 (C-1'), 158.5 (C-2'), 109.6 (C-3'), 133.6 (C-4'), 110.8 (C-5'), 160.2 (C-6'), 62.0 (8-OCH₃), 56.4 (6' -OCH₃)

Compound 12 (5,7,2',6' -tetrahydroxyflavone); C₁₅H₁₀O₆ (M.W. 286); mp>300°C; colorless yellow powder; IR V_{\max} cm⁻¹ 3402(OH), 1660(C=O), 1618, 1580(C=C); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 260(4.31); EI-MS m/z : 286[M]⁺; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300MHz) ppm: 6.21(1H, s, H-3), 6.32(1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-6), 6.34(1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-8), 6.42(2H, d, $J=8.4\text{Hz}$, H-3', H-5'), 7.12(1H, t, $J=8.4\text{Hz}$, H-4')

^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 75MHz)ppm: 181.6 (C-4), 164.0(C-7), 162.2(C-2), 161.4 (C-9), 158.2(C-5), 156.5(C-2", C-6"), 131.7(C-4'), 111.8(C-3'), 108.2(C-3), 106.5(C-3', C-5'), 103.7(C-10), 98.6 (C-6), 93.7(C-8)

Compound 13 (5,7,2',5' -tetrahydroxy-8,6' -dimethoxyflavone); C₁₇H₁₄O₈ (M.W. 346); mp : 254~255°C; colorless yellow powder; IR V_{\max} cm⁻¹ 3429(OH), 1658(C=O), 1619, 1587(C=C); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 334(3.79), 264(4.33); EI-MS m/z : 346[M]⁺; ^1H -NMR (Acetone - d_6 , 300MHz)ppm: 3.74(3H, s, -OCH₃), 3.77(3H, s, -OCH₃), 6.32(1H, s, H-6), 6.34(1H, s, H-3), 6.56(1H, d, $J=8.9\text{Hz}$, H-3'), 6.93(1H, d, $J=8.9\text{Hz}$, H-4')

^{13}C -NMR(Acetone- d_6 , 75MHz)ppm: 183.1 (C-4), 162.2(C-2), 158.3(C-7), 157.6 (C-5), 149.4(C-9), 147.2(C-6'), 143.9 (C-5'), 128.5(C-8), 120.4(C-4'), 115.9 (C-1'), 113.0(C-3), 112.3(C-3'), 105.4 (C-10), 99.6(C-6), 61.8(8-OCH₃), 61.5 (6'-OCH₃)

Compound 14 (wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester); C₂₃H₂₂O₁₁ (M.W. 474); mp : 238~239°C; yellow needles; IR V_{\max} cm⁻¹ 3433(OH), 1653(C=O), 1615, 1578(C=C) ; UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 274(4.39); EI-MS m/z : 474[M]⁺; ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300MHz)ppm: 3.66(3H, s, -COOCH₃), 3.88(3H, s, C8-OCH₃), 5.33(1H, d, $J=6.4\text{Hz}$, anomeric H), 6.71(1H, s, H6), 7.06(1H, s, H-3), 7.57~7.66(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.06~8.09(2H, m, H-2', 6')

^{13}C -NMR(DMSO- d_6 , 75MHz)ppm: 182.5(C-4), 169.3(C-6"), 163.7(C-2), 156.2(C-7 or C-9), 156.0(C-9 or C-7), 149.4(C-5), 132.4(C-4'), 130.9(C-1'), 129.4(C-8, C-3', C-5'), 126.6(C-2', C-6'), 105.6(C-3), 105.4(C-10), 99.7(C-1"), 75.7(C-5"), 75.3(C-3"), 73.0(C-2"), 71.5(C-4"), 61.6(8-OCH₃), 52.2(COOCH₃)

Compound 15 (6"-ethyl-wogonoside); C₂₄H₂₄O₁₁ (M.W. 488); mp 194°C; yellow powder; IR V_{\max} cm⁻¹ 3423(OH), 1638(C=O), 1608, 1584(C=C), 1077, 1031(C-O glycosides) ; UV λ_{\max}

MeOH nm (log ϵ) 276(4.50); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 250MHz)ppm: 1.27(3H, t, $J=7.1\text{Hz}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 3.95(3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.23(2H, q, $J=7.1\text{Hz}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 5.20(1H, d, $J=7.2\text{Hz}$, anomeric H), 6.60(1H, s, H-6), 6.79(1H, s, H-3), 7.57(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.01(2H, m, H-2', 6')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 62.5MHz)ppm: 184.2(C-4), 170.3(C-6"), 165.9(C-2), 157.6(C-7), 158.0(C-9), 151.1(C-5), 133.3(C-4'), 132.4(C-1'), 130.3(C-3', C-5'), 131.2(C-8), 127.5(C-2', C-6'), 106.2(C-3), 107.2(C-10), 101.9(C-1"), 100.3(C-6), 76.8(C-3"), 77.2(C-5"), 74.5(C-2"), 72.8(C-4"), 62.5(8-OCH₃), 61.6($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$), 14.4($-\text{OCH}_2\text{CH}_3$)

Compound 16(viscidulin III-2' -O-glucoside); (IUPAC name : 5,7,3',6' -tetrahydroxy -8,2'-dimethoxyflavone 6'-glucoside); $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$ (M.W. 508); mp : 272-275°C; pale yellow powder; IR V_{max} cm^{-1} 3394-3270(OH), 1655(C=O), 1621, 1588, 1490(C=C), 1077, 1041(C-O glycosides); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 264(4.49); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250MHz)ppm: 3.68(3H, s, 8-OCH₃), 3.74(3H, s, 6'-OCH₃), 4.77(1H, d, $J=7.7\text{Hz}$, anomeric H), 6.21(1H, s, H-6), 6.25(1H, s, H-3), 6.88(1H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-3'), 6.98(1H, d, $J=9.0\text{Hz}$, H-4')

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 62.5MHz)ppm: 181.6(C-4), 160.3(C-2), 156.7(C-5), 156.7(C-7), 150.6(C-9), 147.9(C-2'), 146.1(C-6'), 145.3(C-5'), 127.6(C-8), 119.3(C-4'), 118.0(C-1'), 112.0(C-3), 111.6(C-3'), 103.8(C-10), 101.5(C-1"), 99.9(C-6), 77.3(C-5"), 76.8(C-3"), 73.4(C-2"), 69.9(C-4"), 61.0(C-6"), 60.8(8-OCH₃), 60.8(6'-OCH₃)

Compound 17(wogonoside); (이명 : oroxindin, wogonin-7-O-glucuronide); $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ (M.W. 460); mp : 194-196°C; pale yellow powder; IR V_{max} cm^{-1} 3421, 3275(OH), 1655(C=O), 1615, 1507, 1455(C=C), 1075, 1029(C-O glycosides); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 275(4.63), 205(4.66); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250MHz)ppm: 3.88(3H, s, C8-OCH₃), 5.09(1H, d, $J=11\text{Hz}$, anomeric H), 6.68(1H, s, H-6), 7.06(1H, s, H-3), 7.60~7.62(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.06~8.09(2H, m, H-2', 6'), 12.80(1H, s, 5-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 62.5MHz)ppm: 182.6(C-4), 171.9(C-6"), 163.7(C-2), 156.8(C-7), 156.2(C-9), 149.3(C-5), 132.5(C-4'), 131.0(C-1'), 129.5(C-3', C-5'), 129.4(C-8), 126.6(C-2', C-6'), 105.4(C-3), 105.4(C-10), 100.3(C-1"), 99.2(C-6), 76.7(C-3"), 74.2(C-5"), 73.3(C-2"), 72.1(C-4"), 61.6(8-OCH₃)

Compound 18(rutin); (이명 : Quercetin 3-rutinoside); $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ (M.W. 610);mp : 189~191°C; pale yellow needles; IR V_{max} cm^{-1} 3426, 3275(OH), 1652(C=O), 1605, 1508, 1457(C=C); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 358(4.24), 257(4.34), 257(4.64); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz)ppm: 1.34(3H, brs, CH₃), 3.80~4.10(10carbohydrate protons), 5.14(1H, s, H-1"), 5.78(1H, d, $J=7.5\text{Hz}$, H-1"), 6.53(2H, brs, H-6 and H-8), 7.17(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5'), 7.90(1H, dd, $J=8.5$ and 2.5Hz , H-6'), 8.13(1H, brs, H-2')

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75MHz)ppm: 177.4(C-4), 164.0(C-7), 161.3(C-5), 156.8(C-9), 156.6(C-2), 148.5(C-4'), 144.8(C-3'), 133.5(C-3), 121.5(C-6'), 121.4(C-1'), 116.5(C-5'), 115.4(C-2'), 104.2(C-10), 101.4(C-1"), 100.9(C-1"), 99.0(C-6), 93.9(C-8), 76.6(C-3"), 76.1(C-5"), 74.3(C-2"), 72.1(C-4"), 70.6(C-2", C-3"), 70.3(C-4"), 68.5(C-5"), 67.3(C-6"), 18.0(C-6")

Compound 19(baicalin); (IUPAC name : 5,6,7-trihydroxyflavone 7-glucuronide), (이명 : baicaloside, baicalein 7-glucuronide); $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ (M.W. 446); mp : 220~222°C; yellow crystallin

powder; IR V_{\max} cm^{-1} 3480-3275(OH), 1662(C=O), 1615, 1575, 1491(C=C), 1112, 1067(C-O glycosides); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 277(4.48), 213(4.59); EI-MS m/z : 124[M]⁺; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 250MHz)ppm: 5.01(1H, d, J =11Hz, anomeric H), 6.99(1H, s, H-3), 7.03(1H, s, H-8), 7.57~7.59(3H, m, H-3', 4', 5'), 8.04~8.07(2H, m, H-2', 6'), 12.55(1H, s, 5-OH)
¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 62.5MHz)ppm: 182.8(C-4), 171.9(C-6"), 163.7(C-2), 152.0(C-7), 149.4(C-9), 146.8(C-5), 132.3(C-4'), 131.0(C-6), 131.0(C-1'), 129.4(C-3', C-5'), 126.6(C-2', C-6'), 106.3(C-10), 104.9(C-3), 100.9(C-1"), 94.5(C-8), 76.0(C-3"), 74.4(C-5"), 73.1(C-2"), 72.2(C-4")

3.2 단삼의 생리활성물질 분리

Compound 1 (danshenspiroketallactone); C₁₇H₁₆O₃ (M.W. 268); mp 171°C; white needles; IR V_{\max} cm^{-1} 3421-3257(OH), 1749(C=O); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 312(3.90), 245(4.61), 210(4.66); ¹H-NMR (CDCl₃) : 8.85 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-1), 8.33 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6), 7.62(1H, dd, J = 8.5 and 7 Hz, H-2), 7.54 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-7), 7.45 (1H, d, J = 7 Hz, H-3), 4.46(1H, t, J = 8.1 Hz, H-14), 3.80(1H, t, J = 8.1 Hz, H-14), 2.95 (1H, m, H-15), 2.73(3H, s, 18-CH₃), 2.52(1H, dd, J = 12.9 and 7Hz, H-16), 2.10(1H, dd, J = 12.9 and 10.5Hz, H-16), 1.24 (3H, d, J = 7 Hz, H-17)

¹³C-NMR (CDCl₃) : δ 118.2 (C-1), 131.9 (C-2), 128.9 (C-3), 135.1 (C-4), 122.1 (C-5), 128.5 (C-6), 122.1 (C-7), 147.1 (C-8), 129.2 (C-9), 133.4 (C-10), 168.4 (C-11), 113.2 (C-13), 77.5 (C-14), 32.6 (C-15), 45.3 (C-16), 17.3 (C-17), 19.9 (C-18)

Compound 2 (tanshinone II A); (IUPAC name : 14,16-epoxy-20-nor-5(10),6,8,13,15-abietapentaene-11,12-dione), (이명 : 6,7,8,9-tetrahydro-1,6,6-trimethylphenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione, tanshinone II); C₁₉H₁₈O₃ (M.W. 294); mp 215-216 °C ; red needles; IR V_{\max} cm^{-1} 3421-3257(OH), 1671(C=O), 1193(C-O); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 457(3.60), 352(3.39), 268(4.59), 222(4.51); EI-MS m/z : 194[M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.63, 7.54 (2H, ABq, J =8.2 Hz, H-6 and H-7), 7.22 (1H, d, J =1.2 Hz, H-15), 3.18 (2H, brt, J =6.3 Hz, 1-CH₂), 2.26 (3H, d, J =1.2Hz, 17-CH₃), 1.81-1.63 (4H, m, 2-CH₂ and 3-CH₂), 1.31 (6H, s, 18-CH₃ and 19-CH₃)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃) 30.6 (C-1), 19.8 (C-2), 38.5 (C-3), 35.3 (C-4), 145.1 (C-5), 134.1 (C-6), 120.9 (C-7), 128.1 (C-8), 127.2 (C-9), 150.8 (C-10), 184.3 (C-11), 176.4 (C-12), 120.6 (C-13), 162.4 (C-14), 142.0 (C-15), 121.8 (C-16), 9.5 (C-17), 32.5 (C-18), 32.5 (C-19)

Compound 3 (tanshinone I); (IUPAC name : 14,16-epoxy-18,20-dinor-1,3,5(10),6,8,13,15-abietaheptaene-11,12-dione), (이명 : 1,6-dimethylphenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione); C₁₈H₁₂O₃ (M.W. 276); mp 240-241°C; orange needles; IR V_{\max} cm^{-1} 3433-3257(OH), 1671(C=O); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 416(3.82), 244(4.71); EI-MS (m/z) : 276[M]⁺; ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) : 9.19 (1H, d, J =8.0 Hz, H-1), 8.23 (1H, d, J =8.0 Hz, H-6), 7.73 (1H, d, J =8.0Hz, H-7), 7.50(1H, dd, J =7.1 and 8.7Hz, H-2), 7.38-7.27(3H, m, H-3 and H-15), 2.64 (3H, s, 18-CH₃), 2.26 (3H, d, J =1.3Hz, 17-CH₃)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3) : 118.7 (C-1), 132.7 (C-2), 129.6 (C-3), 135.2(C-4), 123.0 (C-5), 132.9 (C-6), 124.7 (C-7), 130.6 (C-8), 128.3 (C-9), 133.6 (C-10), 183.4 (C-11), 175.6 (C-12), 121.7 (C-13), 161.1 (C-14), 142.0 (C-15), 120.4 (C-16), 8.8 (C-17), 19.8 (C-18)

Compound 4 (cryptotanshinone); (IUPAC name : 14,16-epoxy-20-nor-5(10),6,8,13-abietatetraene-11,12-dione); $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$ (M.W. 296); mp : 191°C ; Orange needles; IR V_{\max} cm^{-1} 3431-3273(OH), 1653(C=O), 1624, 1558, 1507(C=C), 1194(C-O); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 445(3.55), 356(3.54), 262(4.54), 217(4.40); EI-MS (m/z) : 296[M]⁺, 253; ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) : 7.61, 7.46 (2H, ABq, $J=8.0$ Hz, H-6 and H-7), 4.86(1H, t, $J=9.5$ Hz, H-15), 4.34 (1H, dd, $J=9.5$ and 6.8 Hz, H-16), 3.64~3.53 (1H, m, H-15), 3.18 (2H, br t, $J=6.3\text{Hz}$, 1- CH_2), 1.79~1.60 (4H, m, 2- CH_2 and 3- CH_2), 1.33 (3H, d, $J=6.8$ Hz, 17- CH_3), 1.28 (6H, s, 18- CH_3 and 19- CH_3)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3) : 29.6 (C-1), 19.0 (C-2), 37.7 (C-3), 34.8 (C-4), 143.7 (C-5), 132.6 (C-6), 122.5 (C-7), 128.3 (C-8), 126.2 (C-9), 152.3 (C-10), 184.2 (C-11), 175.7 (C-12), 118.3 (C-13), 170.8 (C-14), 81.4 (C-15), 34.6 (C-16), 18.8 (C-17), 31.9 (C-18), 31.8 (C-19)

Compound 5(15,16-dihydrotanshinone I); (IUPAC name : 14,16-epoxy-18,20-dinor-1,3,5(10),6,8,13,15-abietaheptaene-11,12-dione; 15,16-dihydro), (이명 : dihydrotanshinone I); $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$ (M.W. 278); mp 224-225°C ; red needles; IR V_{\max} cm^{-1} 3421-3256(OH), 1684(C=O), 1622, 1508(C=C), 1192(C-O); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 409(3.72), 331(3.61), 290(4.31), 240(4.50), 215(4.42); EI-MS (m/z) : 278[M]⁺; ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) : 9.25 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-1), 8.24 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6), 7.70 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$, H-7), 7.35-7.57 (2H, m, H-2 and H-3), 4.94 (1H, t, $J=9.5\text{Hz}$, H-15), 4.41 (1H, dd, $J=9.5$ and 6.8Hz, H-16), 3.70~3.55 (1H, m, H-15), 2.66 (3H, s, 18- CH_3), 1.39 (3H, d, $J=6.8$ Hz, 17- CH_3)

^{13}C -NMR (62.5 MHz, CDCl_3) : 125.0 (C-1), 130.4 (C-2), 128.8 (C-3), 135.0 (C-4), 132.1 (C-5), 131.9 (C-6), 120.3 (C-7), 128.2 (C-8), 126.0 (C-9), 134.7 (C-10), 184.3 (C-11), 175.7 (C-12), 118.3 (C-13), 170.6 (C-14), 34.7 (C-15), 81.6 (C-16), 18.8 (C-17), 19.9 (C-18)

Compound 6(salvianolic acid B); (이명 : lithospermic acid B); $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ (M.W. 718); mp 102°C; amor. powder; IR V_{\max} cm^{-1} 3421-3276(OH), 1731(COOH), 1717(C=O), 1613, 1522, 1510(C=C aromatic), 1191(C-O ester); UV λ_{\max} MeOH nm (log ϵ) 287(4.23); EI-MS m/z : 718[M]⁺; ^1H -NMR (250MHz, acetone- d_6) : 7.62(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-7), 7.25(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-6), 6.90(1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-5), 6.83~6.62(9H, m, Ar-H), 6.28(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-8), 5.90(1H, d, $J=5.2\text{Hz}$, H-7'), 5.19(2H, dd, $J=4.5\text{Hz}$ and 7.3Hz, H-8" and H-8'''), 4.47(1H, d, $J=5.2\text{Hz}$, H-8'), 2.86~3.13(4H, m, H-7"and H-7''')

^{13}C -NMR (62.5MHz, acetone- d_6) : 171.4(C-9'''), 171.1(C-9''), 170.5(C-9'), 166.5(C-9), 148.0(C-3), 145.9(C-4'), 145.5(C-3'), 145.4(C-3'''), 144.6(C-3''), 144.6(C-4'''), 144.3(C-4 and C-4''), 142.8(C-7), 133.2(C-1'), 129.0(C-1'''), 128.6(C-1''), 126.1(C-2), 124.5(C-1), 121.8(C-6), 121.6(C-6'''), 121.6(C-6''), 118.2(C-6'), 117.2(C-5), 117.1(C-2'''), 116.7(C-2''), 116.0(C-8), 116.0(C-5'), 115.9(C-5"and C-5'''), 113.1(C-2'), 87.5(C-7'), 74.8(C-8''), 73.7(C-8'''), 57.0(C-8'), 37.4(C-7''), 37.0(C-7''')

Compound 7 (rosmarinic acid); (IUPAC name : α -[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-3,4-dihydroxy-benzenepropanoic acid), (이명 : rosmarinic acid, labiatenic acid); $C_{18}H_{16}O_8$ (M.W. 360); mp : 204°C; yellow powder; IR V_{max} cm^{-1} 3455-3183(OH), 1725(COOH), 1709(C=O), 1618, 1522(C=C aromatic), 1202(C-O ester); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 327(4.09), 290(4.01); EI-MS m/z : 360[M]⁺; ¹H-NMR (250MHz, CD₃OD) : 7.49 (1H, d, J =15.9 Hz, H-7), 6.98 (1H, d, J =1.5Hz, H-2), 6.89(1H, dd, J =1.5 and 8 Hz, H-6), 6.71 (1H, d, J =8 Hz, H-5), 6.69 (1H, d, J =1.5 Hz, H-2'), 6.63 (1H, d, J =7.7 Hz, H-5'), 6.55(1H, dd, J =1.5 and 7.7 Hz, H-6'), 6.21(1H, d, J =15.9 Hz, H-8), 5.12 (1H, dd, J =4.5 and 8 Hz, H-8'), 2.89~3.08(2H, m, H-7')

¹³C-NMR (62.5MHz, CD₃OD) : 127.6 (C-1), 114.4 (C-2), 146.8 (C-3), 149.7 (C-4), 116.5 (C-5), 123.2 (C-6), 147.7 (C-7), 115.2 (C-8), 168.5 (C-9), 129.3 (C-1'), 117.5 (C-2'), 146.1(C-3'), 145.3 (C-4'), 116.3 (C-5'), 121.8 (C-6'), 37.9 (C-7'), 74.7(C-8'), 173.4 (C-9')

Compound 8 (9'-methyl lithospermate); (이명 : lithospermic acid monomethylester); $C_{28}H_{24}O_{12}$ (M.W. 552); mp 162-165°C; amor. powder; IR V_{max} cm^{-1} 3406-3256(OH), 1698(C=O), 1615, 1523(C=C aromatic), 1192(C-O ester); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 313(4.03), 288(4.02), 256(4.04); ¹H-NMR (250MHz, CD₃OD) : 7.86(1H, d, J =16Hz, H-7), 7.14(1H, d, J =8.4Hz, H-6), 6.92~6.46(7H, m, Ar-H), 6.26(1H, d, J =16Hz, H-8), 5.82(1H, d, J =5.1Hz, H-7'), 4.25(1H, d, J =5.1Hz, H-8'), 3.64(3H, s, -OCH₃) 2.97~3.94(2H, m, H-7'')

¹³C-NMR (62.5MHz, CD₃OD) : 172.1(C-9' and C-9''), 168.1(C-9), 148.8(C-3), 146.5(C-4), 146.3(C-3''), 145.3(C-3'), 145.1(C-4' and C-4''), 144.3(C-7), 134.4(C-1'), 130.0(C-1''), 129.0(C-2), 124.4(C-1), 121.3(C-6), 121.2(C-6''), 118.5(C-6'), 118.3(C-5), 117.8(C-2''), 116.3(C-8), 116.1(C-5'), 115.8(C-5''), 113.7(C-2'), 90.0(C-7'), 75.0(C-8''), 60.2(C-8'), 52.7(9'-OCH₃) 37.8(C-7'')

Compound 9 (monomethyl lithospermate B); $C_{37}H_{32}O_{16}$ (M.W. 732); mp 126-128°C; amor. powder; IR V_{max} cm^{-1} 3421-3274(OH), 1731(COOH), 1717(C=O), 1615, 1522, 1509(C=C aromatic), 1192(C-O ester); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 287(4.16); ¹H-NMR (600MHz, CD₃OD) : 7.46(1H, d, J =15.9Hz, H-7), 7.09(1H, d, J =8.4Hz, H-6), 6.78(1H, d, J =8.4Hz, H-5), 6.73~6.25(9H, m, Ar-H), 6.13(1H, d, J =15.9Hz, H-8), 5.85(1H, d, J =4.8Hz, H-7'), 5.13~5.08(2H, m, H-8'' and H-8'''), 4.29(1H, d, J =4.8Hz, H-8'), 3.61(3H, s, OCH₃), 2.97~2.77(4H, m, H-7'' and H-7''')

¹³C-NMR (150MHz, CD₃OD) : 171.2(C-9'' or 9'''), 171.1(C-9' and 9'' or 9'''), 166.5(C-9), 147.9(C-3), 145.5(C-4'), 145.4(C-3'), 144.9(C-3'''), 144.7(C-3''), 144.1(C-4'''), 143.9(C-4''), 143.8(C-4), 142.6(C-7), 132.5(C-1'), 128.1(C-1'''), 127.6(C-1''), 125.3(C-2), 123.4(C-1), 121.1(C-6), 120.9(C-6'''), 120.5(C-6''), 117.2(C-6'), 117.1(C-5), 116.4(C-2'''), 116.1(C-2''), 115.3(C-5'''), 115.2(C-5'' and C-5'), 115.1(C-8), 112.3(C-2'), 87.1(C-7'), 73.6(C-8'' and C-8'''), 56.9(C-8'), 51.5(OCH₃), 36.7(C-7''), 36.5(C-7''')

Compound 10 (dimethyl lithospermate B); $C_{38}H_{34}O_{16}$ (M.W. 746); mp 102°C; amor. powder; IR V_{max} cm^{-1} 3421-3274(OH), 1733(C=O), 1615, 1521, 1509(C=C aromatic), 1192(C-O ester); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 287(4.24); ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD) : 7.59(1H, d, J =16Hz, H-7), 7.17(1H, d, J =8.4Hz, H-6), 6.81(1H, d, J =8.4Hz, H-5), 6.74~6.53(9H, m, Ar-H), 6.24(1H, d, J =16Hz, H-8), 5.79(1H, d, J =4.6Hz, H-7'), 5.18~5.14(2H, m, H-8'' and

H-8'''), 4.35(1H, d, $J=4.6\text{Hz}$, H-8'), 3.63, 3.62(3H, s, $-\text{OCH}_3 \times 2$), 3.00~2.81(4H, m, H-7'' and H-7''')

^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD) : 172.2(C-9'), 172.2(C-9'''), 171.2(C-9''), 168.0(C-9), 149.0(C-3), 146.8(C-4'), 146.6(C-3'), 146.2(C-3'''), 146.1(C-3''), 145.4(C-4'''), 145.3(C-4''), 145.2(C-4), 144.0(C-7), 133.5(C-1'), 128.8(C-1'''), 128.6(C-1''), 126.3(C-2), 124.6(C-1), 122.2(C-6), 121.9(C-6'''), 121.8(C-6''), 118.4(C-6'), 118.4(C-5), 117.5(C-2'''), 117.3(C-2''), 116.5(C-5'''), 116.4(C-5''), 116.4(C-5'), 116.2(C-8), 113.3(C-2'), 87.2(C-7'), 75.7(C-8''), 74.8(C-8'''), 57.5(C-8'), 52.8($-\text{OCH}_3$), 52.7($-\text{OCH}_3$), 37.4(C-7''), 37.0(C-7''')

Compound 11 (methyl salvianolate C); $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ (M.W. 494); mp 134°C; amor. powder; IR ν_{max} cm^{-1} 3398-3257(OH), 1614, 1520, 1508(C=C aromatic), 1193(C-O ester); UV λ_{max} MeOH nm (log ϵ) 314(4.31), 289(4.37); ^1H -NMR (400MHz, CD_3OD) : 7.91(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-7), 7.17(1H, s, H-8'), 7.37~6.57(8H, m, Ar-H), 6.43(1H, d, $J=16\text{Hz}$, H-8), 5.26(1H, dd, $J=5.2\text{Hz}$ and 7.2Hz , H-8''), 3.70(3H, s, OCH_3), 3.06~3.04(2H, m, H-7'')

^{13}C -NMR (100MHz, CD_3OD) : 175.0(C-9''), 171.3(C-9), 162.2(C-7'), 150.8(C-4' and C-4), 149.5(C-4''), 149.0(C-3''), 148.9(C-3'), 148.2(C-7), 147.1(C-3), 135.5(C-2), 131.5(C-1''), 129.1(C-2'), 126.0(C-1'), 124.6(C-6''), 122.2(C-1), 121.5(C-6), 120.4(C-5'), 119.1(C-2''), 117.2(C-5''), 116.1(C-6'), 114.6(C-5), 102.0(C-8'), 77.4(C-8''), 55.5(OCH_3), 40.7(C-7'')

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1 황금의 생리활성물질 분리

황금을 70% EtOH로 80°C에서 추출하고 이 70% EtOH extract를 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH용매로 분획한 후 CH₂Cl₂와 EtOAc extract를 여러 가지 column chromatography에 의해 compound 1~19를 분리하였다.

Compound 1은 액상의 물질로서 ¹H-NMR spectrum에서 4H의 aromatic ring에 기인하는 multiplet signal이 나타나고 3.92ppm에서 하나의 methoxy singlet이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 6개의 aromatic carbon signal이 145ppm, 120ppm, 110ppm 영역에서 3쌍이 각각 나타났으며 56.0ppm에 하나의 methoxyl carbon이 관찰되었으므로 이 화합물을 phenolic compound인 guaiacol⁴⁵⁾로 동정하였다.

Compound 2는 융점은 48-50°C이고 ¹H-NMR spectrum에서는 δ 3.82에서 methoxyl기에 해당하는 signal과 δ 2.56에서 methyl기에 기인하는 signal이 각각 singlet으로 나타나고 δ 6.53에서 δ 7.84와 δ 6.47과 double-doublet(J=8.7 and 2.7) signal이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 203.1ppm에서 carbonyl에 해당하는 signal 관찰되었으며 문헌치⁴⁶⁾와 비교해 본 결과 paeonol임을 확인하였다.

Compound 3은 ¹H-NMR spectrum에서 H-3의 singlet signal이 δ 6.63에서 나타나고 6.97ppm에서 H-8에 기인하는 singlet가, 8.10~7.52ppm에서 5개의 B ring의 proton signal이 multiplet으로 관찰되었으며 3.75ppm에서 1개의 methoxy singlet가 나타났다. 이상의 결과 및 ¹³C-NMR data와 문헌치 및 표준품과의 직접 대조로서 이 화합물은 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone인 oroxylin A⁴⁷⁾로 확인하였다.

Compound 4는 ¹H-NMR spectrum에서 H-6과 H-8에 기인하는 2개의 doublet(J=2.0Hz)이 6.21과 6.51ppm에서 나타나고 6.95ppm에서 H-3의 singlet, 그리고 7.52~7.63 및 8.03~8.06ppm에 B ring의 5개의 수소에 기인하는 multiplet이 관찰되었다. 따라서 이 화합물은 5,7-dihydroxyflavone인 chrysin⁴⁸⁾임을 확인하였다.

Compound 5와 7은 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR에서 3개의 methoxy signal이 관찰되었고 compound 6은 4개의 methoxy signal이 관찰되었다. 5번 화합물의 ¹H-NMR에서 δ 7.87에서 H-6'의 signal이 double doublet으로 나타나고 있으나 6번과 7번 화합물에서는 나타나지 않았고 또한 7의 ¹H-NMR data에서는 δ 6.60에서 H-6에 기인되는 singlet이 관찰되나 5, 6에서는 관찰되지 않았다. 각각의 NMR data를 문헌치와 비교결과 compound 5는 tanaxin I⁴⁹⁾, compound 6은 skullcapflavone II⁵⁰⁾로 compound 7은 rivularin⁵¹⁾으로 각각 확인하였다.

Compound 8의 ¹H-, noised decoupled ¹³C-NMR 및 Dept 135° spectrum을 보면 14의 spectrum과 거의 유사하며, 차이점은 50ppm, 70ppm~100ppm, 170ppm의 glucuronide methyl ester에 기인하는 peak가 없다는 것이다. 문헌조사 결과 8은 wogonin⁴⁷⁾으로 확인하였다.

Compound 9의 ¹³C-NMR spectrum을 보면 flavone류의 carbon spectrum의 전형적인 특징 중 하나인 182ppm의 ketone에 기인하는 peak와 120ppm~130ppm사이 3개의 chemically equivalent 한 carbon peak(129.6ppm, 129.4ppm, 126.5ppm)을 볼 수 있다. Dept 135° spectrum에서 5개의 CH peak(94.2, 104.5, 126.5, 129.4, 132.1 ppm), 8개의 4급탄소에 기인하는 peak(104.7, 129.4, 131.2, 146.9, 147.2, 153.9, 163.1, 182.4 ppm)가 존재함을 알 수 있다. 이들 분석 결과는 보고된 baicalein⁵²⁾의 문헌치와 일치하였다.

Compound 10과 11은 ¹H-NMR spectrum에서 H-6의 signal이 관찰되었으나 B ring의 3개의 proton에 의한 signal pattern은 근소한 차이를 나타내었다. 각각의 NMR data를 문헌치와 비교해 본

결과 compound 10과 11은 황금에서 분리되고 된 2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone (viscidulin II)⁵³⁾와 2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone⁵³⁾임을 각각 확인하였다.

Compound 12의 ¹H-NMR spectrum을 보면 chemically equivalent 한 2개의 proton (6.42ppm, H-3', H-5')을 확인할 수 있다. 또 이 2개의 chemically equivalent 한 proton이 다른 proton(7.12ppm, H-4')과 서로 coupling(J=8.4Hz)하는 것을 볼 수 있다. ¹³C-NMR spectrum에서 2개의 chemically equivalent한 carbon peak(106.5ppm, 156.5ppm)가 나타나며, 181.6ppm에 flavone의 ketone에 기인하는 peak를 볼 수 있다. Dept 135° spectrum을 보면 CH peak가 5개 (93.7, 98.6, 106.5, 111.8, 131.7ppm)이며 CH₂ peak는 없으며 나머지 나타나지 않는 8개의 peak(103.7, 108.2, 156.5, 158.2, 161.4, 162.2, 164.0, 181.6ppm)는 quaternary carbon peak임을 알 수 있다. 12의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR data는 5,7,2',6'-tetrahydroxy flavone⁵⁴⁾의 문헌치와 일치하였다.

Compound 13의 ¹H-NMR spectrum에 2개의 methoxy group(3.74ppm, 3.77ppm)이 존재하고 있음을 볼 수 있다. 또 aromatic carbon에 결합된 proton의 peak 중 2개의 proton(6.56ppm, 6.93ppm)이 서로 coupling(J=8.8Hz)하고 있음을 알 수 있다. ¹³C-NMR spectrum을 보면 60ppm 부근의 2개의 methoxy group peak(61.5ppm, 61.8ppm)를 볼 수 있다. 또 183.1ppm의 ketone에 기인하는 peak 1개를 볼 수 있다. Dept 135° spectrum을 보면 CH₃가 2개 (61.4ppm, 61.8ppm), CH peak가 4개(99.6, 112.3, 113.1, 120.5ppm)보이며 CH₂ peak는 없으며 나머지 11개의 peak(105.4, 115.9, 143.9, 147.3, 149.5, 151.5, 157.6, 158.3, 162.4, 183.1ppm)는 4급탄소 peak임을 알 수 있다. 이들 data는 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone⁴⁸⁾의 data와 일치하였다.

Compound 14의 ¹H-NMR spectrum에서 이물질에 2개의 methoxy group(3.66ppm, 3.88ppm)이 존재하고 있음을 알 수 있다. ¹³C-NMR spectrum에서 glucuronide methyl ester에 기인하는 peak 7개 (52.2, 71.5, 73.1, 75.3, 75.8, 99.7, 169.4ppm)를 볼 수 있으며 또 100ppm~165ppm사이 aromatic 지역에 14개(98.7, 105.5, 105.6, 126.6, 129.4, 129.5, 130.9, 132.5, 149.4, 156.1, 156.2, 163.7ppm)의 peak와 180ppm 부근의 ketone에 기인하는 peak(182.9 ppm) 1개를 확인함으로써 flavon 모핵을 추정할 수 있다. 60ppm부근에 methoxyl group에 기인하는 peak(61.6ppm) 1개를 볼 수 있다. Dept 135° spectrum을 보면 CH₃ carbon peak가 2개(52.2ppm, 61.6ppm)나타나고 CH peak가 11개(71.1, 73.1, 75.3, 75.8, 98.7, 99.7, 105.5, 126.6, 129.4, 129.5, 132.5ppm), quaternary carbon peak가 8개(105.6, 130.9, 149.44, 156.1, 156.2, 163., 169.4, 182.6 ppm) 존재함을 알 수 있다. 이상과 같은 분석결과를 기초로하여 문헌치와 비교한 결과 이물질은 wogonin 7-O-glucuronide methyl ester⁵⁴⁾임을 확인하였다.

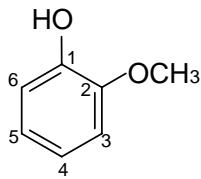
Compound 15의 ¹H-NMR에서 δ 1.27과 δ 4.23에서 각각 triplet과 quarterlet의 signal이 관찰된 것 외에는 compound 14와 매우 유사한 pattern을 나타내었으므로 wogonin 7-O-glucuronide methyl ester의 glucose 6번 탄소에 -OCH₃가 아닌 -OCH₂CH₃가 치환된 6"-ethyl-wogonoside⁵⁴⁾임을 확인하였다. compound 17 또한 compound 15와 유사한 pattern이 관찰되나 -OCH₂CH₃에 의한 signal이 없으므로 문헌치와 비교한 결과 17은 wogonin 7번에 glucuronic acid가 결합된 wogonoside⁵⁵⁾임을 확인하였다.

Compound 16의 ¹H-NMR data에서 2개의 methoxy group(3.68, 3.74ppm)이 존재하고 있음을 볼 수 있고 δ 4.77에서 anomeric proton의 signal이 doublet(J=7.7Hz)으로 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 glucoside에 기인하는 peak 6개(61.0, 69.9, 73.4, 76.8, 77.3, 101.5ppm)를 볼 수 있으며 DEPT spectrum에서는 CH₃가 2개(60.8ppm×2), CH₂ Peak가 1개(61.0ppm), CH peak는 9개(69.9, 73.4, 76.8, 77.3, 99.9, 101.5, 111.6, 112.0, 119.3ppm)가 존재함을 확인할 수 있다. 이들 data를 문헌치와 비교결과 5,7,3',6'-tetrahydroxy-8,2'-dimethoxyflavone (viscidulin III)의 2번

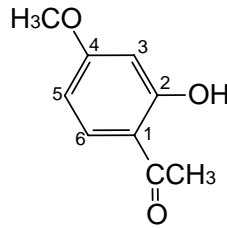
에 glucoside가 결합된 viscidulin III-2' -O-glucoside⁴⁹⁾임을 확인하였다.

Compound 18은 가수분해하여 aglycone으로 guercetin, 당은 glucose와 rhamnose를 확인하였다. ¹³C-NMR의 분석으로 terminal rhamnose가 glucose의 6번에 결합하고 있고 다시 guercetin의 3번에 결합한 rutin⁵⁵⁾임을 문헌치와 비교한 결과 확인하였다.

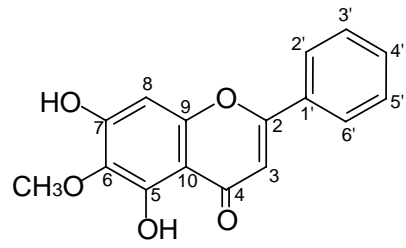
Compound 19는 Compound 7의 data와 매우 유사한 pattern을 나타내었으나 1mol의 glucuronic acid의 signal이 ¹H 및 ¹³C-NMR에서 관찰되었다. ¹³C-NMR signal을 비교해 본 결과 baicalein의 C-7에 glycosidation shift가 관찰되었으므로 19는 baicalin으로 동정하였으며 문헌치와의 비교⁴⁷⁾에서도 잘 일치하였다.



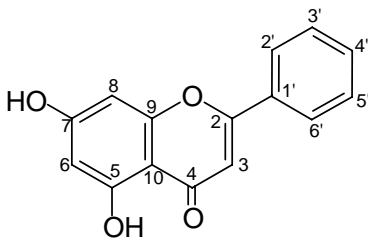
Compound 1 (guaiacol)



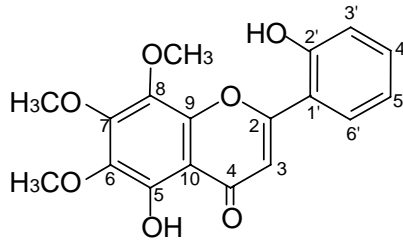
Compound 2 (paeonol)



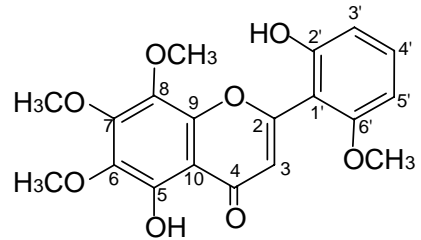
Compound 3 (oroxylin A)



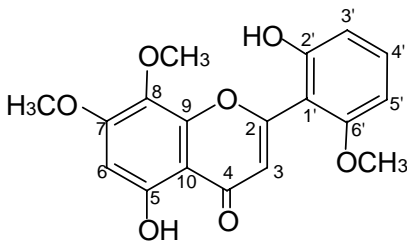
Compound 4 (chrysin)



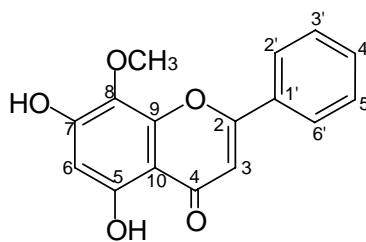
Compound 5 (tenaxin I)



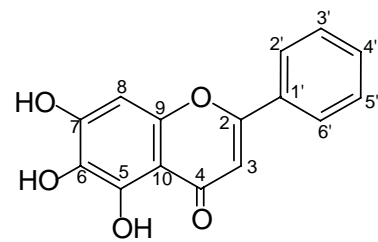
Compound 6 (skullcapflavone II)



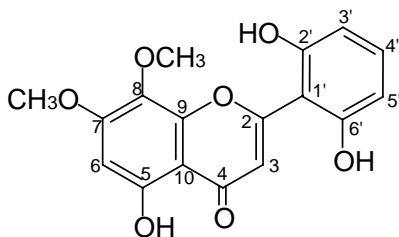
Compound 7 (rivularin)



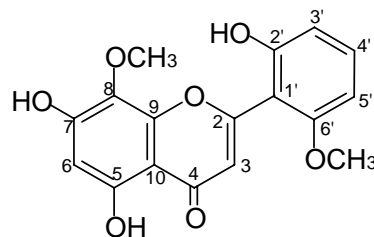
Compound 8 (wogonin)



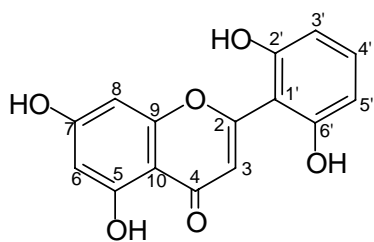
Compound 9 (baicalein)



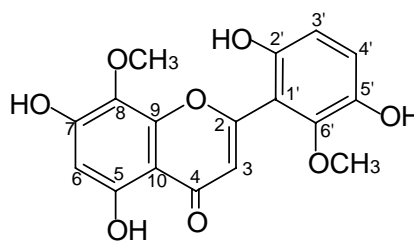
Compound 10 (viscidulin II)



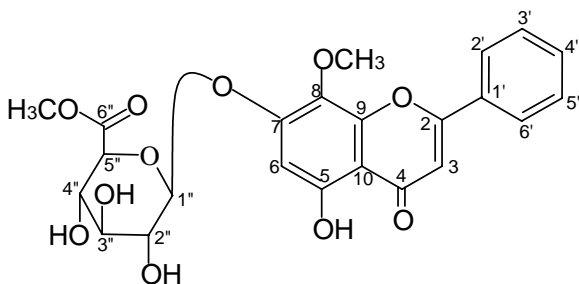
Compound 11 (2',5',7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone)



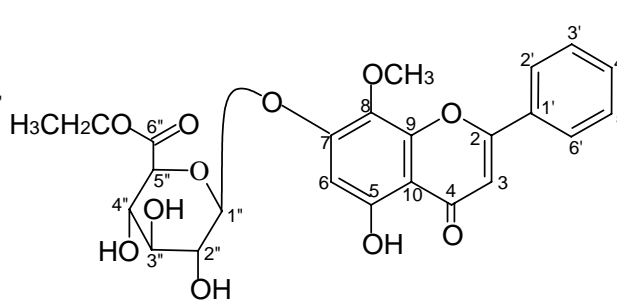
Compound 12 (5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone)



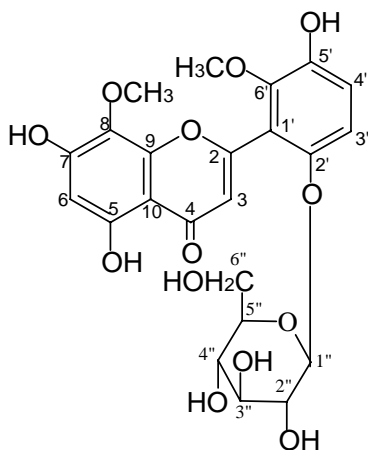
Compound 13 (5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone)



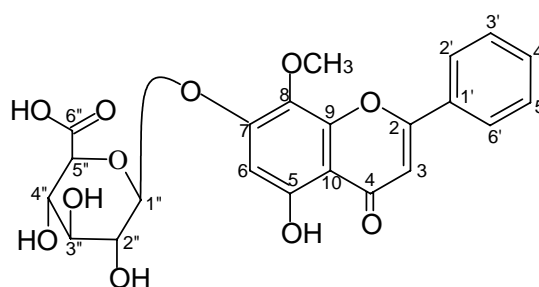
Compound 14 (wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester)



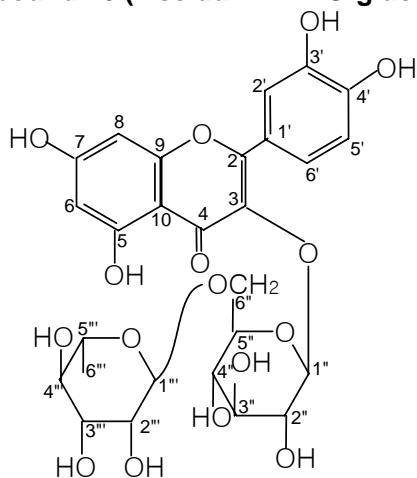
Compound 15 (6''-ethyl wogonoside)



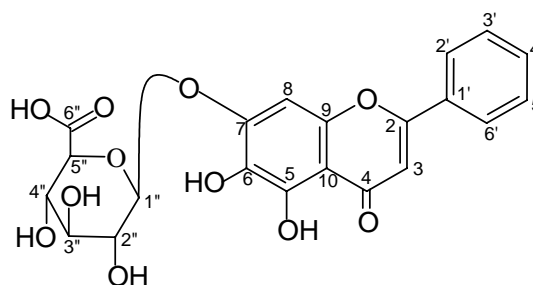
Compound 16 (viscidulinIII-2'-O-glucoside)



Compound 17 (wogonoside)



Compound 18 (rutin)



Compound 19 (baicalin)

fig 1. Structure of compound from Scutellariae Roots.

4.2 단삼의 생리활성물질 분리

단삼은 70% EtOH로 상온추출하고 이 70% EtOH extract를 Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH 용매로 분획한 후 Hexane, CH₂Cl₂ 분획을 합쳐 column chromatography한 결과 compound 1~5를 분리하였고 EtOAc 분획을 여러가지 chromatography법을 이용하여 분리한결과 compound 6~11을 얻었으며 이 화합물들의 구조를 결정하였다.

Compound 1의 ¹H-NMR spectrum을 살펴보면 δ 2.73에서 methyl group의 signal이 singlet으로 나타나고 δ 8.33 및 δ 7.54에서 각각 J=8.4Hz의 doublet으로 H-6 및 H-7의 aromatic proton들이 관찰되고 있다. H-1의 signal이 δ 8.85에서 doublet(J=8.5Hz), H-2의 signal이 δ 7.62에서 double doublet(J=8.5, 7Hz)로 나타나며 H-3은 δ 7.45에서 doublet(J=7Hz)로 나타나는것을 각각 확인하였다. 또한 H-14의 proton들이 δ 4.46과 δ 3.80에서 각각 triplet(J=8.1Hz)로 관찰되고 δ 2.95에서 multiplet으로 H-15의 signal이 나타나며 H-16의 signal이 δ 2.52에서 double doublet(J=12.9, 7Hz), δ 2.10에서 double doublet (J=12.9, 10.5)으로 각각 관찰되고 있으며 δ 1.24에서 C-15번에 결합된 methyl group이 doublet(J=7Hz)로 나타나는 것을 확인하였다. 이상의 data와 ¹³C-NMR data를 문헌치와 비교해본결과 단삼으로부터 이미 보고 되어진 화합물로서 abietanoid계열의 danshenspiroketallactone⁵⁶⁾임을 확인하였다.

Compound 2의 ¹H-NMR spectrum에서 δ 1.31에서 germinal dimethyl의 singlet signal이 강하게 나타나며 δ 1.81~1.63에서 C-2 및 C-3의 methylene proton들이 나타나고 δ 2.25에서 furan ring에 결합되어 있는 methyl group이 doublet(J=1.2Hz)으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 또한 δ 3.18에서 C-1 methylene proton이 triplet(J=6.3Hz)로 나타나고 δ 7.22에서 furan ring proton이 J=1.2Hz의 doublet으로, δ 7.63 및 δ 7.54에서 각각 J=8.2Hz의 doublet으로 H-6 및 H-7의 aromatic proton들이 나타나고 있다. ¹³C-NMR spectrum에서는 30.6ppm에서 CH₂인 C-1의 pick를 볼수있고 19.8ppm, 38.5ppm에서 C-2 및 C-3의 methylene carbon의 pick를 확인할수 있으며 9.5, 32.5ppm에서 3개의 methyl기의 pick가 나타남을 확인하였다. 이상의 결과를 문헌치와 비교결과 furano-ortho-naphthoquinone abietanoid계 화합물인 tanshinone II A⁵⁷⁾임을 확인하였다.

Compound 3의 ¹H-NMR data를 살펴보면 δ 2.28에서 furan ring에 결합되어 있는 methylene proton이 doublet(J=1.2Hz)으로 나타나고 δ 8.23 및 δ 7.33에서 각각 J=8.0Hz의 doublet으로 aromatic ring proton들이 나타나고 있다. Ring A의 proton signal들을 살펴보면 H-1이 δ 9.19에서 doublet(J=8.0Hz), H-2는 δ 7.50에서 double doublet(J=7.1, 8.7Hz)으로 각각 나타나고 있으며 methyl group이 δ 2.64에서 singlet signal로 나타남을 볼 수 있다. ¹³C-NMR은 compound 2와 비교해서 Aring의 carbon pick가 전체적으로 down field로 이동되어 나타나며 8.8ppm, 19.8ppm에서 methyl group의 pick가 2개 나타나는 것 외에 2와 유사한 pattern을 보였다. 문헌치와 비교해 본 결과 compound 3은 tanshinone I⁵⁷⁾임을 확인하였다.

Compound 4의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 살펴보면 Aring의 signal은 compound 2와 같으나 furan ring의 signal이 다른 pattern으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 먼저 ¹H-NMR을 살펴보면 δ 7.61과 δ 7.46에서 J=8.0Hz의 doublet이 각각 나타나 H-6과 H-7의 존재를 확인할 수 있고 δ 1.79~1.60에서 C-2 및 C-3의 methylene proton들이 나타나고 있다. 또한 δ 3.18에서 C-1인 methylene proton의 signal이 triplet(J=6.3Hz)로 나타나고 δ 1.28에서 germinal dimethyl의 singlet signal이 강하게 나타나는 것을 확인하였다. furan ring의 chemical shift를 살펴보면 H-15의 methylene proton들이 각각 δ 4.86에서 triplet(J=9.5Hz), δ 3.64~3.53에서 multiplet으로 나타나고 H-16의 signal이 double doublet(J=9.5, 6.8Hz)으로 δ 4.34에서 나타났으며 δ 1.33에서 doublet(J=6.8Hz)의 furan ring에 결합된 methyl group의 signal이 관찰되었으며 ¹³C-NMR에서는 81.4ppm, 34.6ppm에서 furan ring의 carbon pick가 compound 2와 비교해 up field로 이동되어 나타남을 확인하였다. 이상의

결과로 compound 4는 cryptotanshinone⁵⁷⁾임을 확인하였고 문헌치와도 일치함을 확인하였다. compound 5의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum에서 furan ring을 제외한 나머지 signal은 compound 3과 같고 furan ring의 signal은 compound 4와 같은 pattern이 나타나는 것이 관찰되었고 문헌치와 비교결과 이 화합물은 tanshinone I에서 15, 16번이 dihydration된 15,16-dihydro tanshinone I⁵⁸⁾임을 확인하였다.

Compound 6의 ¹H-NMR의 spectrum data를 살펴보면 δ 6.28, δ 7.62에서 trans-olefin proton signal인 H-7과 H-8의 doublet(J=16Hz)이 관찰되고 δ 7.25~6.62에서 4개의 aromatic ring에 결합된 proton의 signal들이 doublet과 multiplet으로 나타나고 있으며 H-7'과 H-8'의 signal은 δ 4.47 및 5.90에서 각각 doublet(J=5.2Hz)로 나타난다. double doublet(J=4.5, 7.3Hz) signal이 δ 5.19에서 δ 2.86~3.13에서 multiplet signal이 관찰되므로 6개의 aliphatic carbon이 존재함을 확인하였다. ¹³C-NMR data에서는 총 36개의 carbon pick가 관찰되고 171.4ppm, 171.1ppm, 170.5ppm, 166.5ppm에서 4개의 carboxyl carbon의 존재를 확인하였으며 DEPT에서 CH₂ peak가 2개(37.4ppm, 37.0ppm) 관찰되었다. 이상의 data를 문헌과 비교결과 이 화합물은 분자식이 C₃₆H₃₀O₁₆인 salvianolic acid B 또는 lithospermic acid B임을 확인하였고 한 화합물의 화합물명이 두개 기재되어 있어 본 연구자는 보다 널리 알려져 있는 명칭인 salvianolic acid B⁵⁹⁾로 사용하였다.

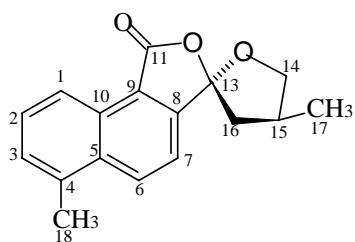
Compound 7의 ¹H-NMR에서는 trans-olefin proton signal들이 δ 6.21 및 δ 7.49에서 각각 doublet(J=15.9)로 관찰되고 δ 6.98~6.55에서 aromatic ring에 결합된 proton의 signal들이 각각 doublet(H-2, H-5, H-2', H-5')과 double doublet(H-6, 6')으로 나타나며 H-8'의 signal이 δ 5.12에서 double doublet(J=4.5 and 8Hz)으로 나타남을 확인할 수 있다. 또한 δ 2.89~3.80에서 2개의 proton이 multiplet의 signal로 나타나고 ¹³C-NMR의 37.9ppm에서 pick가 나타나는 것으로 보아 C-7'의 methylene proton의 존재를 확인하였다. 173.4ppm과 168.5ppm에서 두개의 carboxyl group에 의한 pick가 관찰되고 74.6ppm에서 oxygen에 결합된 CH의 pick가 나타났다. 이 화합물은 단삼으로부터 이미 분리 보고 된 rosmarinic acid⁶⁰⁾임을 확인하였고 문헌과도 잘 일치하였다.

Compound 8은 ¹H-NMR에서 δ 6.26, 7.86에서 H-7과 H-8의 doublet(J=16Hz)이 나타나고 δ 7.14~6.46에서 8개의 aromatic ring에 결합된 proton의 signal이 관찰되며 δ 4.25 및 δ 5.82에서 각각 doublet(J=5.1Hz)으로 H-7' 및 H-8'의 signal이 나타났다. δ 3.64에서 methylester group의 signal이 multiplet으로 나타났다. ¹³C-NMR data에서는 총 28개의 carbon pick가 나타났고 (172.1ppm×2), 168.1ppm에서 세 개의 carboxyl group에 의한 pick가 관찰되며 DEPT spectrum으로 CH₃가 1개(52.7ppm) 나타나고 CH₂의 pick가 1개(90.0ppm) 나타남을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하여 이 화합물은 단삼으로부터 이미 분리 보고 되어진 lithospermic acid의 9' carbon에 monomethylester결합된 9'-methyl lithospermate⁶⁰⁾임을 문헌치와 비교하여 확인하였다.

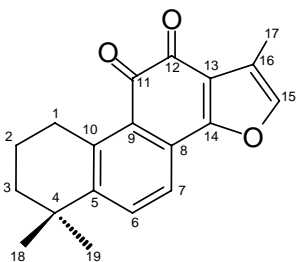
Compound 9와 10의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 compound 6의 data와 비교해서 methylester group의 signal이 compound 9에서 1개(δ 3.61, s), compound 10에는 2개(δ 3.63, δ 3.62)가 나타나는 것외에는 유사한 pattern이 나타난다. 이것으로 9와 10은 salvianolic acid B에 methyl기가 1개 또는 2개 ester결합하고 있는 화합물임을 추정하고 methylester된 carbon의 위치를 찾기 위해 compound 10에대한 2D-NMR(¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC)을 측정하였다. 그 결과 HMBC spectrum에서 δ 3.63과 δ 3.62(OCH₃)의 proton이 C-9의 carbon과 long-range coupling하는 것으로 관찰되어 이 화합물의 C-9'과 C-9''에 methyl기가 ester결합되어 있음을 확인하였다. 문헌조사결과 이 화합물은 *Salvia preswalskii*에서 이미 분리된 dimethyl lithospermate B⁵⁹⁾임을 확인하였으나 *Salvia miltiorrhiza*에서는 처음으로 분리된 화합물이다. Compound 9 또한 C-9'과 C-9'' 중 한군데에 methylester group이 위치한 것으로 추정⁵⁹⁾되나 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT spectrum으로는 그 위치를 찾기 어려워 2D-NMR 측정중에 있다. 문헌조사결과 9'-monomethyl lithospermate B와 9''

-monomethyl lithospermate B가 *Salvia preswalskii*로부터 이미 분리되었으나 단삼으로부터는 아직 보고된 문헌이 없는 화합물임을 확인하였다.

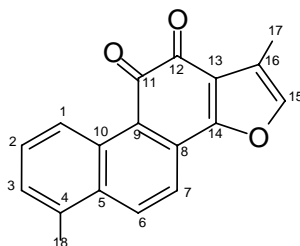
Compound 11의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 δ 6.43, δ 7.91에서 H-7과 H-8의 doublet($J=16\text{Hz}$)이 관찰되고 δ 7.37~6.57에서 aromatic ring proton의 signal이 관찰되며 δ 7.17에서 H-8'의 singlet이 관찰되었다. δ 5.26에서 H-8''의 signal이 double doublet($J=5.2, 7.2\text{Hz}$)으로 관찰되었으며 δ 3.70에서 1개의 $-\text{OCH}_3$ signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ data에서 두개의 carboxyl group의 pick가 175.0ppm, 171.3ppm에서 나타나고 compound 8과 비교해서 C-7'과 C-8' pick가 downfield 되어 각각 162.2ppm과 102.0ppm에서 관찰되고 DEPT spectrum에서 CH_3 pick가 1개 (55.5ppm)와 CH_2 pick가 1개 (40.7ppm)가 확인되었다. 이상의 결과를 종합하면 salvianolic acid C의 9''의 carboxyl group에 methyl기가 ester결합된 화합물임을 확인하였다. salvianolic acid C는 *Salvia miltiorrhiza*에서 이미 분리 보고되었지만 methylester group이 결합된 화합물은 아직 보고된 문헌이 없음을 확인하였으므로 이 화합물은 methyl salvianolate C로 명명하였다.



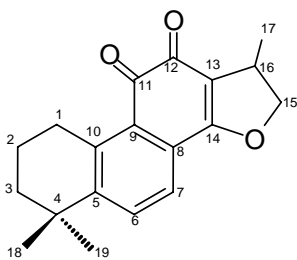
Compound 1 (danshenspiroketalactone)



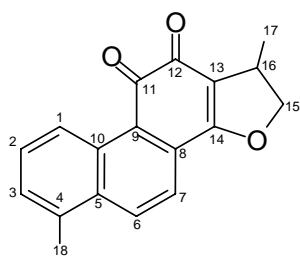
Compound 2 (tanshinone IIA)



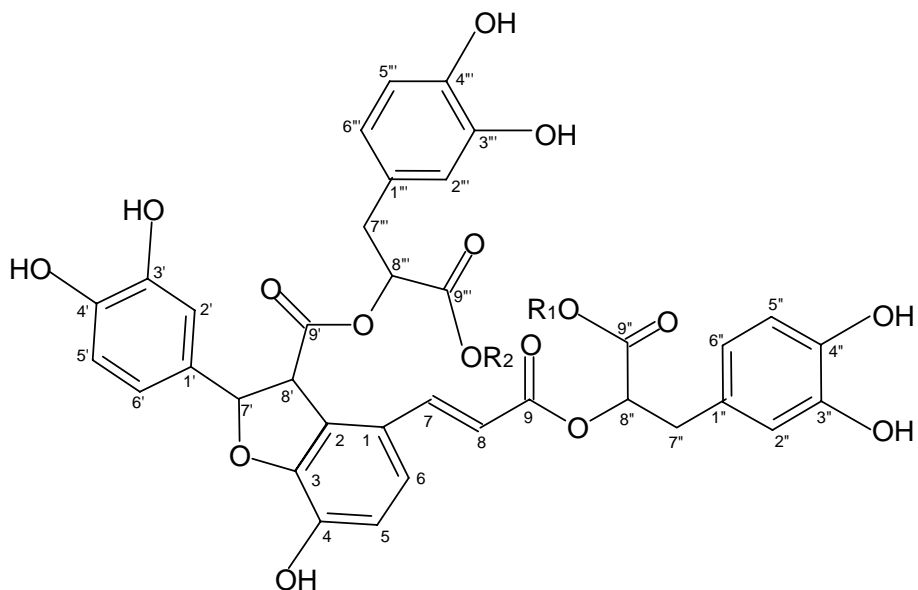
Compound 3 (tanshinone I)



Compound 4 (cryptotanshinone)



Compound 5 (15, 16-dihydrotanshinone I)



Compound 6 (salvianolic acid B)

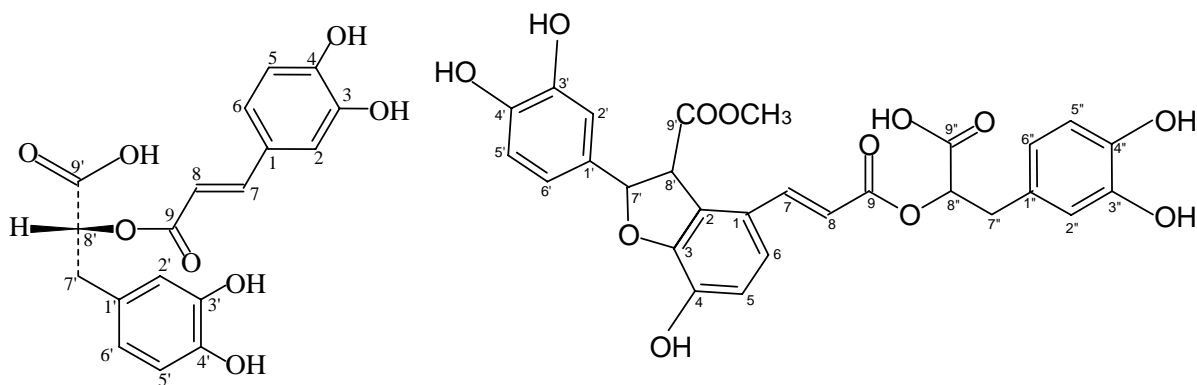
$R_1=R_2=H$

Compound 9 (monomethyl lithospermate B)

$R_1=CH_3, R_2=H$ (or $R_1=H, R_2=CH_3$)

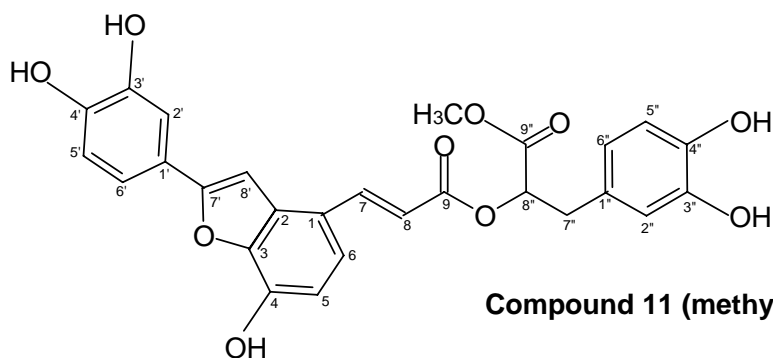
Compound 10 (dimethyl lithospermate B)

$R_1=CH_3, R_2=CH_3$



Compound 7 (rosmarinic acid)

Compound 8 (9'-methyl lithospermate)



Compound 11 (methyl salvianolate C)

fig 2. Structure of compound from *Salvia miltiorrhizae* Radix (*Salvia miltiorrhiza*).

4.3 황금과 단삼으로부터 화합물분리량과 순도 및 타 과제 제공량

이상과같이 황금(19종의 화합물)과 단삼(11종의 화합물)으로부터 화합물을 분리, 구조결정한결과 황금은 17종의 flavonoid와 2종의 penolic compound가 분리되었고 단삼에서는 5종의 diterpenoid와 6종의 lignin이 분리되었다. 본연구의 세부과제와 활성팀에게 연구에 필요한 시료를 제공하였고 화합물 분리량과 순도 및 타 과제에 제공한 sample량은 다음과 같다.

Table 3. Isolated compound from Scutellariae Roots.

Name	순도 (%)	분리량 (mg)	활성팀 제공량(mg)	2세부 제공량(mg)	3세부 제공량(mg)	식약청 제공량(mg)
guaiacol	95.2	2500	1000		26.8	
paeonol	96.8	22.2	20		2.2	
oroxylin A	100	3400	2601	20	10	501.7
chrysin	96.9	3200	2000	10	10	1000
tenaxin I	100	40				20.8
skullcapflavone II	100	220				100.8
rivularin	97.2	230				
wogonin	100	22000	4302.9	10	10	5150
baicalein	100	22700	6501.1	15	10	5000
viscidulin II	95.2	30	30			
2',5,7-Trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone	96.1	5	5			
5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	97.2	20	20			
5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone	96.7	77.3	50.3	10	10	
wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester	95.8	70.3	50.3	10	10	
6"-ethyl-wogonoside	98.2	8.3				
viscidulinIII-2'-O-glucoside	100	130				50.1
wogonoside	100	200				100.4
rutin	100	400	300			100
baicalin	99.3	2300	1802	10	10	450

Table 4. Isolated of compound from *Salvia miltiorrhizae* Radix.

Name	순도(%)	분리량 (mg)	활성탑 제공량(mg)	2세부 제공량(mg)	3세부 제공량(mg)	식약청 제공량(mg)
dansenspiroketallactone	99.0	79				
tanshinone II A	97.4	3530.9	2000.9	15	10	1500
tanshinone I	96.1	3880.2	2353.3	15	10	1500
cryptotanshinone	96.7	5024	2355.8	15	20	2000
15,16-dihydrotanshinone I	96.5	1252.8	1181	15	10	
salvianolic acid B	98.6	2567.9	1607.9	40	10	700
rosmarinic acid	97.7	1500	1003.8	10	20	200
9'-methyl lithospermate	97.6	13				
monomethyl lithospermate B	97.0	38				
dimethyl lithospermate B	96.1	450				
methyl salvianolate C	95.9	280				

제5장 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

세부과제명	황금의 생리활성물질분리
세부과제책임자	손건호/안동대학교/천연물화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	Different effects of flavonoids in <i>Scutellaria baicalensis</i> on anxious and sedative behaviors	박형근, 최지영, 이금선, 최중현, 손건호, 고흥숙, 고광호, 류중훈, 정재훈	<i>Journal of Applied Pharmacology</i>		83-89		국내	비SCI
2	Hepatoprotective activities of glycyrrhizin and baicalin in primary cultured rat hepatocytes	Sung-Hwa Kim et al	약학회지	게재 확정	게재 확정		국내	
3	Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice	DH Kim, SJ Jeon, KH Son, JW Jung, SJ Lee, BH Yoon, JW Choi, JH Cheong, KH Ko	<i>Pharmacology, Biochemistry and Behavior</i>	게재 확정	게재 확정		국외	SCI

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Simultaneous analysis of flavonoid compounds in <i>Scutellaria baicalensis</i> by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry	포스터	정민교, 정은숙, 김남희, 김창수, 정미향, 손건호, 문동철, 우미희	한국분석과학회	2005.11.17-18	제 35회 한국분석과학회 추계학술대회 초록집	국내
2	황금 중 생리활성 지표성분의 동시분석	포스터	정은숙, 방철, 정민교, 문동철, 손건호, 우미희	한국분석과학회	2006.5.18-19	제 36회 한국분석과학회 춘계학술대회 초록집	국내
3	Anti-inflammation activity of compounds isolated from <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	포스터	MK Kim, H Ha, HY Lee, DY Jung, SJ Lee, JY chol, HS Choi, C Kim, KH Son	63rd KSBMB annual meeting	2006.5.25		국내

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/ 국제
4	Different effects of wogonin, baicalein and oroxylin A in <i>Scutellaria baicalensis</i> on anxious behaviors	포스터 발표	박형근, 최지영, 이금선, 최종현, 임병우, 고흥숙, 김성목, 이용수, 손건호, 정재훈	한국 뇌학회	2006년 6월30일	2006년 한국뇌학회 학술대회집	국내
5	Different effects of wogonin, baicalein and oroxylin A in <i>Scutellaria baicalensis</i> on anxious behaviors	포스터 발표	박형근, 최지영, 이금선, 최종현, 임병우, 고흥숙, 김성목, 이용수, 손건호, 정재훈	한국 뇌학회	2006년 6월30일	2006년 한국뇌학회 학술대회집	국내
6	Effects of baicalin, baicalein and wogonin on mucin release from airway goblet cells	포스터 발표	허호진 외	미국 생약학회	2006.8.5-9	미국 생약학회지	국제
7	Hepatoprotective effects of baicalin and glycyrrhizin on carbon tetrachloride-induced mouse liver injury	포스터 발표	박상원 외	미국 생약학회	2006.8.5-9	미국생약학회지	국제
8	Effects of Scutellariae Radix on gene expression in macrophage cell line using microarray	포스터	HY Lee, H Ha, Y Chang, DY Jung, JY Choi, C Kim, SS Kang, KH Son, SJ Jeon	2006년 대한약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.		
9	The study of antioxidant in <i>Salvia Miltiorrhizae</i> Radix	포스터	Y Chang, H Ha, HY Lee, DY Jung, JY Choi, SS Kang, KH Son, SJ Jeon, C Kim	2006년 대한약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.		
10	Simultaneous analysis of 2 phenolics and 4 diterpenoids in <i>Salvia miltiorrhizae</i> Radix by high-performance liquid chromatography	포스터	방철, 전수진, 정은숙, 정민교, 손건호, 문동철, 우미희	한국분석과학회	2006.11.23-24	제 37회 한국분석과학회 추계학술대회 초록집	국내

11	Quality evaluation of Scutellariae radix through simultaneous assay of major active components by HPLC	포스터	EK Kim, KR ZE, JP Lee, JY Park, JH Kim, JS Shin, JH Lee, KH Son, MH Woo, SY Chang	2006년 대한 약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.	국내
12	Anti-diabetic effect of the major active components isolated from <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge by an analysis of the effect on insulin receptor signaling	포스터	SH Jung, HJ Seol, SJ Jeon, KH Son, YS Kim, SS Kang, JR Lee	2006년 대한 약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.	국내
13	Effect of roxylin A on transient cerebral hypoperfusion -induced memory impairment	포스터	DH Kim, SJ Jeon, KH Son, JW Jung, SJ Lee, BH Yoon, JW Choi, JH Cheong, KH Ko, JH Ryu	2006년 대한 약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.	국내

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

황금은 17종의 flavonoid와 2종의 penolic compound가 분리되었고 단삼에서는 5종의 diterpenoid와 6종의 lignin이 분리되었다. 본연구의 세부과제와 활성팀에게 연구에 필요한 시료를 제공하였고 황금시료는 식약청에 유효성분 3종(wogonin, baicalein, baicalin)을 대량분리를 통해 제공하고 그 외 7종의 화합물도 제공 완료하였다. 단삼시료도 차후에 유효물질 3종을 포함해 총 10종을 제공하여 대한 약전등 개정시 기준 시험법에 반영하고 생약의 효능시험 및 biochip을 활용한 생약의 유용성분 개발에 활용 될 것이다.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

- 황금, 단삼의 품질 평가를 위한 기초 자료 제공으로 대한 약전등 개정시 기준 시험법에 반영
- 생약의 효능시험, biochip을 활용한 생약의 유용성분 개발에 활용될 시료제공

제6장 기타 중요변경사항

없음.

제7장 참고문헌

1. V.M. Malikov and M.P. Yuldashev (2002) Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. GENUS. *Chem. Nat. Com.*, **38** : 358
2. M. Shimiz, T. Hayashi, N. Morita, F. Kiuchi, H. Nogu(1983), The structure of paeoniflorigenone, a new monoterpene isolated from *Paeoniae Radix*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**: 577
3. Kumar N. and Motto Michael G. (1986) Volatile constituents of *Peony Flowers* *Phytochemistry*, **25** : 250,
4. Hasegawa S. and Hirose Y. (1982) Terpenoids from the seed of *Thujopsis Dilabrata* Var. DOLABRATA *Phytochemistry*, **21** : 643,
5. M.Hattori, S.Hada, A.Watahiki, H.Ihara, Yue-Zhong Shu, N.Kakiuchi, T.Mizuno(1986) Antibacterial Action of Phenolic Components from Mace Against *Streptococcus Mutans*. *Chem. Pharm. Bull.*, **34** : 3885,
6. Koda A., Watanabe S., Yanagihara Y., Nagai H., Sakamoto K.(1977) A comparative study of the anti-allergic effects of disodium baicalein 6-phosphate (BPS) and disodium cromoglycate (DSCG), *Jpn. J. Pharmacol.*, **27** : 31.
7. B.Q. Li, T. Fu, W.H. Gong, N. Dunlop, H. F. Kung, Y. D. Yan, J. Kang, J. M. Wang, (2000) The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, **49** : 295
8. B.Q. Li, T. Fu, Y.D. Yan, N.W. Baylor, F.W. Ruscetti, H.F. Kung (1993) Inhibition of HIV infection by baicalin—a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol. Biol. Res.*, **39** : 119
9. J.A. Wu, A.S. Attele, L. Zhang, C.S. Yuan (2001) Anti-HIV activity of medicinal herbs: usage and potential development. *Am. J. Chinese Med.*, **29** : 69
10. T. Konoshima, M. Kokumai, M. Kozuka, M. Iinuma, M. Mizuno, T. Tanaka, H. Tokuda, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima (1992) STUDIES ON INHIBITORS OF SKIN TUMOR PROMOTION; Inhibitory Effects of Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* on Epstein-Barr Virus Activation and Their Anti-tumor-Promoting Activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **40** : 531
11. F. L. Chan, H. L. Choi, Z. Y. Chen, P. S. F. Chan, Y. Huang (2000) Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett.*, **160** : 219
12. S. Ikemoto, K. Sugimura, N. Yoshida, R. Yasumoto, S. Wada, K. Yamamoto, T. Kishimoto (2000) Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology*, **55** : 951
13. Z. H. Gao, K. X. Huang, H. B. Xu (2001)Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells.*Pharmacol. Res.*, **43** : 173
14. D. E. Shieh, L. T. Liu, C. C. Lin (2000) Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.*, **20** : 2861
15. F. Chen, K. H. Chan, Y. Jiang, R. Y. T. Kao, H. T. Lu, K. W. Fan, V. C. C. Cheng, W. H. W. Tsui, T. S. W. Lee, J. S. M. Peiris, K. Y. Yuen (2004) In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *J. Clin. Virol.*, **31** : 69

16. S.C. Ma, J. Du, P.P.H. But, X.L. Deng, Y.W. Zhang, V.E.C. Ooi, H.X. Xu, S.H.S. Lee, S.F. Lee (2002) Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *J. Ethnopharmacol.*, **79** : 205
17. Z. Kowalewski, *Planta Med.*, **19**, 311, 1971
18. Z. Yang et al., *Tetrahedron Lett.*, **32**, 8, 2061, 1991
19. S. Yahara et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 527, 1985
20. Z. Chen et al., *Yao Hsueh T'ung Pao*, **16**, 24, 1981
21. M. Aritomi et al., *Phytochemistry*, **24**, 10, 2438, 1985
22. CB. Ai et al., *Chin. Chem. Lett.*, **7**, 427, 1996
23. HC. Lin et al., *CA*, **120**, 240076u, 1994
24. Xue, M.; Cui, Y.; Wang, H. Q.; Hu, Zh. Y.; Zhang, B. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (1999), **21**(1), 207–213
25. Ren, Yuhao; Houghton, Peter J.; Hider, Robert C.; Howes, Melanie–Jayne R. *Planta Medica* (2004), **70**(3), 201–204.
26. Mosaddik, M. A. *Phytomedicine* (2003), **10**(8), 682–685.
27. Okuno, Yoshiharu; Miyazawa, Mitsuo. *Letters in Drug Design & Discovery* (2004), **1**(1), 66–68.
28. Mostallino, Maria Cristina; Mascia, Maria Paola; Pisu, Maria Giuseppina; Busonero, Fabio; Talani, Giuseppe; Biggio, Giovanni. *European Journal of Pharmacology* (2004), **494**(2–3), 83–90.
29. Wang, Xin–Jian; Xu, Jian–Xing. *Neuroscience Research (Amsterdam, Netherlands)* (2005), **51**(2), 129–138.
30. Li, Hong–Yan; Li, Yan; Yan, Chun–Hong; Li, Lian–Niang; Chen, Xiao–Guang. *Journal of Asian Natural Products Research* (2002), **4**(4), 271–280.
31. Liu, Cheng–Hai; Liu, Ping; Hu, Yi–Yang; Xu, Lie–Ming; Tan, Yin–Zi; Wang, Zhen–Nan; Liu, Cheng. *Acta Pharmacologica Sinica* (2000), **21**(8), 721–726.
32. Li, Min; Zhao, Chi; Wong, Ricky N. S.; Goto, Shinya; Wang, Zhimin; Liao, Fulong. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2004), **31**(2), 97–103.
33. Lay, Ing–Shiow; Chiu, Jen–Hwey; Shiao, Ming–Shi; Lui, Wing–Yiu; Wu, Chew–Wun. *Planta Medica* (2003), **69**(1), 26–32.
34. M. Onitsuka et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 5, 1670, 1983
35. HY. Li et al., *Phytochemistry*, **35**, 3, 751, 1994
36. S. Takabe et al., *Shoyakugaku Zasshi*, **34**, 69, 1980
37. J. Liu et al., *Planta Med.*, **61**, 453, 1995
38. YL. Lie et al., *J. Nat. Prod.*, **44**, 6, 722, 1981
39. H. Kojima et al., *Phytochemistry*, **25**, 729, 1986
40. H. Youn et al., *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**, 1, 18, 1991
41. N. Wang. et al., *Phytochemistry*, **27**, 301, 1988
42. S. Huneck et al., *Phytochemistry*, **10**, 3279, 1971
43. T. Okuda et al., *Yakugaku Zasshi*, **97**, 1273, 1977
44. Zhang, Jin–lan; Cui, Ming; He, Yun; Yu, Hai–lan; Guo, De–an. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2005), **36**(5), 1029–1035

45. D. de Ruke et al., *Phytochemistry*, **17**, 1664, 1978
46. CK. Lau et al., *J. Org. Chem.*, **52**, 1670, 1987
47. Kimura Y., Okuda H., Taira Z., Shoji N., Takemoto T. and Arichi S. (1984) STUDIES ON SCUTELLARIAE RADIX ; New Component Inhibiting Lipid Peroxidation in Rat Liver. *Planta Med.*, **50** : 290
48. Kubo M., Matsuka H., Kimura Y., Okuda H. and Arichi S. (1984) Scutellariae Radix. X. Inhibitory effects of various flavonoids on histamine release from rat peritoneal Mast cells in vitro. *Chem. Pharm. Bull.*, **32** : 5051
49. M. Iinuma and M. Mizuno, *Phytochemistry*, **28**, 681, 1989
50. M. Kubo et al., *Planta Med.*, **43**, 199, 1981
51. Y. Miyaichi et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3720, 1987
52. Hanaoka M., Kohsu M. and Yasuda S. (1985) A first and stereoselective synthesis of (\pm)-Raddeanamine. *Chem. Pharm. Bull.*, **33** : 4113
53. M. Iinuma and M. Mizuno (1989) Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones. *Phytochemistry*, **28** : 681
54. Tomimori T., Miyaichi Y. and Kizu H. (1982) On the flavonoid constituents from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Yakugaku Zasshi*, **102** : 388
55. Kimuya Y., Kubo M., Tani T., Arichi S., Okuda H. (1981) Studies on Scutellariae Radix. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **29** : 2610
56. H. W. Luo et al., *Phytochemistry*, **27**, 290, 1988
57. H. S. Kane et al., *Arch. Pharm. Res.*, **20**, 496, 1997
58. S. Y. Ryu et al., *Planta Medica*, **63**, 44, 1997
59. CB. Ai et al., *J. Nat. Prod.*, **51**, 145, 1988
60. H. Kohda et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1287, 1989

제8장 첨부서류

- 본 연구개발사업의 성과로 기술된 **게재된 학술지 논문 전체 사본**(게재 허가를 받은 경우 게재 증명서)과 **산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본**을 반드시 첨부할 것.

제 2 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 황금과 단삼의 생리활성성분 분석 및 동시정량법 개발

세부과제책임자 : 우 미희

대구가톨릭대학교

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

가. 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시분석법 개발

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질 (3종 이상)의 동시정량법을 설정함으로써 황금과 단삼의 유효성분 정량법을 개발한다.

나. 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시분석법 검증 (validation)

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질 (3종 이상)의 동시정량법에 대한 validation을 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증한다.

다. 황금과 단삼의 시중 유통품의 활성성분 (3종 이상) 함량 측정

황금과 단삼의 시중 유통품의 활성성분 (3종 이상)의 함량을 측정함으로써 산지별 성분 분석결과를 활용하여 산지별 패턴 분석을 할 수 있다.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

가. 황금과 단삼의 활성물질들 (6종 혹은 7종)의 동시분석법 개발

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질들 (황금의 경우 HPLC법은 6종, LC-MS/MS법은 7종, 단삼의 경우 HPLC법과 LC-MS/MS법 모두 6종)의 동시정량조건을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 설정함으로써 황금과 단삼의 유효성분 정량법을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 새로이 개발하였다.

나. 황금과 단삼의 활성물질들 (6종 혹은 7종)의 동시분석법 검증 (validation)

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질들 (황금의 경우 HPLC법은 6종, LC-MS/MS법은 7종, 단삼의 경우 HPLC법과 LC-MS/MS법 모두 6종)의 동시정량법에 대한 validation을 다음 항목에 대해 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다.

- 반복성 (repeatability)
- 정확도 및 정밀도 (Accuracy and Precision)
- 회수율 (Recovery)
- 완건성 (Robustness)
- 안정성 (Stability)

다. 황금과 단삼의 시중 유통품의 활성성분 (6종) 함량 측정

황금과 단삼의 시중 유통품 (황금은 8종, 단삼은 16종)의 활성성분 (6종)의 함량을 측정하였다. 산지별 성분 분석결과를 활용하여 산지별 패턴 분석을 할 수 있다.

1.3 국내외 기술개발 현황

황금 (黃芩)은 꿀풀과의 여러해살이풀로 속썩은풀 *Scutellaria baicalensis* Georgi(꿀풀과 Labiatae)의 주피를 벗긴 뿌리이다. 이 약을 건조한 것은 정량할 때 baicalin(C₂₁H₈O₁₁: 446.37) 10.0 % 이상을 함유한다고 대한약전에 규정하고 있다. 꽃은 7~8월에 피고 열매는 9월에 결실하며 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다. 한방에서는 뿌리를 해열, 이뇨, 지사, 이담, 소염제로 이용한다. 채취는 봄, 가을에 파내어 흙을 털고 길 꺾질과 썩은 속을 긁어 버리고 한 시간 가량 썬 다음 썰어서 햇볕에 말려 그대로 쓰거나 상부의 열을 제거하기 위해 솔로 볶아 쓴다. 성질은 쓰고 차다.

동의보감에 의하면, “황금 (黃芩, 속썩은풀)은 열독, 골증, 추웠다 열이 났다 하는 것을 치료하고 열로

나는 갈증을 멎게 하고 황달, 이질, 설사, 담열, 위열을 낮게 한다. 소장을 잘 통하게 하고 유용(화농균이 옮겨서 생기는 나쁜 흑의 한 가지), 등창, 악창과 돌림열병을 낮게 한다. 황금이 들어가는 처방전으로는 갈근승기탕(葛根承氣湯), 녹용대조탕(鹿茸大造湯), 마황금수탕(麻黃金水湯), 만금문무탕(萬金文武湯), 맥문동탕(麥門冬湯), 청심연자탕(淸心蓮子湯) 등이 있다.

황금은 항염증, 항암, 항박테리아, 항바이러스, 해열, 습윤, 중독해독, total cholesterol level 저하, 혈압강하 등의 활성을 나타내며, baicalin, baicalein, wogonin과 oroxylin A는 황금의 주요한 활성성분이다^(1, 2, 3, 4). 그 중 baicalin은 가장 많이 함유되어 있는 성분이며 항알러지⁽⁵⁾, 항염증⁽⁶⁾, 항HIV^(7, 8), 항암^(9, 10, 11), 항산화^(12, 13), 항-SARS 코로나바이러스 효과⁽¹⁴⁾를 가지고 있다. Baicalein은 항HIV^(7, 8), 항암⁽¹¹⁾, 항산화^(12, 13) 효과를 가지며, wogonin은 anti-respiratory syncytial virus⁽¹⁵⁾, anti-hepatitis B virus⁽¹⁶⁾, 항암⁽¹¹⁾, 항산화 효과⁽¹³⁾를 나타내며, oroxylin A는 anti-respiratory syncytial virus⁽¹⁵⁾ 활성을 나타낸다.

황금의 성분분석법은 대부분 지표성분인 baicalin을 비롯하여 baicalein, wogonin과 oroxylin A 등을 대상으로 정량법이 보고되어 있다(17-21). Baicalin을 비롯한 황금의 flavonoid 성분에 대해 보고된 HPLC 분석조건을 Table 1에 나타내었다.

단삼(丹蔘)은 *Salvia miltiorrhiza* Bunge(꿀풀과 Labiatae)의 뿌리이다. 단삼은 다년생초본으로서 40-80 cm 정도 자라며 전주에 황백색의 털이 나 있다. 뿌리는 가늘고 길며 원주형으로서, 외피는 주홍색이다. 꽃은 5-7월에 피며 과기는 8-9월이고 뿌리가 붉기 때문에 단삼이라고 한다. 중국이 원산이며 우리나라는 수입에 의존한다. 한방에서는 기염, 심교통, 협심통, 혈전 및 혈관염, 월경통 등의 치료에 이용되었다.

단삼은 항암, 항염증, 항산화, 항박테리아, 항알러지효과, 항혈전효과, antifibrosis효과 등의 활성을 나타내며 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydrotanshinone I, salvianolic acid A, salviannolic acid B는 단삼의 주요한 활성성분이다. 그 중 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydrotanshinone은 항산화효과^{22,23)}, 항박테리아효과²⁴⁾, 항염증효과²⁵⁾, 항알러지효과²⁶⁾와 DNA damage를 저해하는 효과²⁷⁾를 가지고 tanshinone II A는 SOS inducing 활성을 저해²⁸⁾하고 neuroprotective 효과와²⁹⁾ cytochrome p4051A₂에 대한 선택적 저해효과³⁰⁾, antioxidant 활성³¹⁾을 가진다. 또한 salvianolic acid A는 cytotoxicity³²⁾, antitumor 효과³³⁾, anti-fibrosis 효과³⁴⁾를 나타내고 salvianolic acid B는 항혈전효과³⁵⁾를 나타낸다.

단삼으로부터 분리 보고된 물질들은 약 100여종에 이르며 지표성분은 알려져 있지 않으며, 70여종의 diterpenoid와 10여종의 lignin 유도체들이 주를 이루고 있다. 단삼의 성분분석법은 tanshinone II A, salvianolic acid B, tanshinone I, cryptotanshinone, lithospermic acid B를 대상으로 정량법이 보고되어 있으며, 단삼에 대한 HPLC 및 LC-MS/MS 정량조건을 Table 2와 3에 나타내었다.

Table 1. 황금의 Flavonoid 성분에 대한 HPLC 정량조건

Component	Column	Mobile Phase	Detection	참고문헌
baicalin	Hypersil C ₁₈ (25 cm × 4.6 mm I.d.)	MeOH/0.04% H ₃ PO ₄ (23:27) (1 mL/min)	UV (280nm)	17
baicalin, wogonin	YMC-Pack ODS A-132 (15 cm × 6mm I.d.)	MeOH/0.1M phosphate buffer (1:1)	UV (270nm)	18
baicalein, wogonin-7-O-glucuronide		MeOH/0.1M phosphate buffer (17:8)		
baicalin, baicalein, wogonin	10 μm ODS Hypersil (25 cm × 4.6 mm I.d.)	gradient elution of acetonitrile and 0.1M H ₃ PO ₄	UV (280nm)	19
baicalein, baicalin, wogonin, wogonin glucuronide, oroxylin-A, oroxylin-A glucuronide	ion pair HPLC on a stainless-steel (15 cm × 4 mm I.d.) packed with TSK gel LS-410(5 μm)	aqueous 32% acetonitrile, containing 5 mM tetrapentylammonium bromide, adjust to pH 4 with H ₃ PO ₄	UV	20
flavonoid constituents	Develosil ODS-5 (20 cm × 6 mm) at 50 °C	tetrahydrofuran-dioxan-MeOH-acetic acid-5% H ₃ PO ₄ -H ₂ O (145:125:50:20:2:322) or tetrahydrofuran-acetic acid-5% H ₃ PO ₄ -H ₂ O (95:10:1:444)	UV (275nm)	21

Table 2. 단삼의 성분에 대한 HPLC 정량조건

Component	Column	Mobile Phase	Detection	참고문헌
tanshinone II A	ODS Hypersil (5 μm, 200 × 4.6 mm.) temperature : 20°C	CH ₃ CN-H ₂ O (75:25) flow rate : 1.0 mL/min	UV (268nm)	36
salvianolic acid B	reversed-phase column(C ₁₈ , 4.6 × 250 mm, 5 μm I.D.)	gradient elution of MeOH and water (from 25% to 40%) containing 0.5% acetic acid	on-line diode array detector (290 nm)	37
tanshinone- II A, tanshinone- I, cryptotanshinone	Nova-Pak C ₁₈ (3.9 mm i.d. × 300 mm, 5 microns)	CH ₃ OH-H ₂ O (80:20, v/v)	UV (280 nm)	38

Table 3. 단삼의 성분에 대한 LC-MS/MS 정량조건

Component	Column	Mobile Phase	Detection	참고문헌
lithospermic acid B	Luna C ₈ (3μm, 2 mm I.d. × 100 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)	acetonitrile-ammonium formate (10mA, pH 6.5) (50:50, v/v) flow rate : 0.2 mL/min temperature of column : 30°C	UV	39
salvianolic acid B, rosmarinic acid, diterpenoids	C18(4.6mm I.d. × 250 mm, 5μm, Alltech, Illinois, USA)	A: H ₂ O:MeCN:formic acid (90:10:0.4), B: MeCN	DAD MS	40

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

제1절. HPLC/UV 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 기기 및 시약

가. 황금:

황금의 성분 중 본 실험에 사용한 표준물질 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester (1), wogonin (2), baicalein (3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone (4) baicalin (8), chrysin (9), oroxylin A (10)의 표준품은 안동대학교에서 분리 정제한 표준품을 제공받아 별도의 정제 없이 사용하였다. (Fig. 1) 내부표준물로 사용한 Propylparaben은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 메탄올과 아세트니트릴은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 탈이온수는 Millipore와 Milli-RO4, Milli-Q 증류장치(Bedford, USA)를 통과한 탈이온수를 사용하였다. 이동상은 0.2 μ m membrane filter (Phenomenex, CA, USA)를 통과시킨 다음 ultrasonication하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 사용하였다. HPLC system은 1525 binary pump와 autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Waters 2796 (Waters, America) system에 photodiode array detector (Waters 2996)가 장착된 기기를 사용하였다. HPLC 컬럼은 같은 고정상의 guard 컬럼 (4.0 mm x 3.0 ID mm)이 달린 Luna C18 analytical column (4.6 x 250 mm, I.D. 5 μ m, Phenomenex Torrance, CA, USA)을 사용하였고 컬럼온도를 40 $^{\circ}$ C로 유지하여 사용하였다.

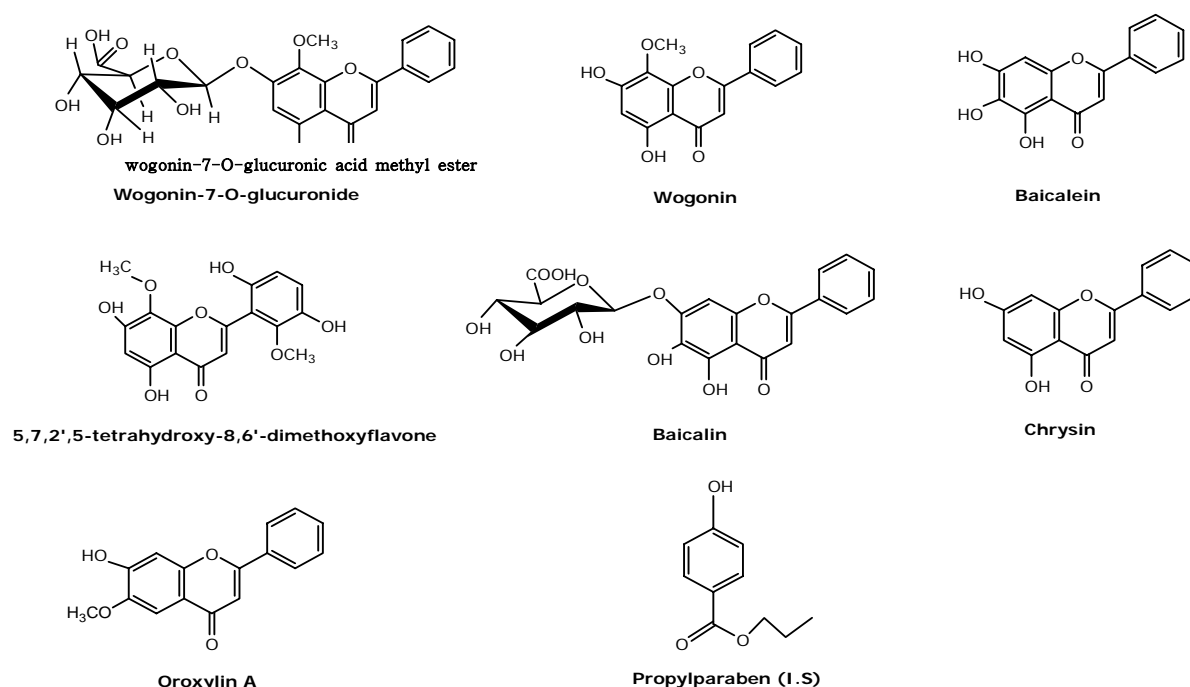


Fig. 1. Structures of marker compounds and internal standard.

나. 단삼:

단삼의 성분 중 본 실험에 사용한 표준물질 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)는 안동대학교에서 분리 정제한 표준품을 제공받아 별도의 정제 없이 사용하였다. (Fig.2) 내부표준물로

사용한 4-hydroxycinnamic acid는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 메탄올과 아세트니트릴은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA) 로부터 구입하였고 acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 초순수는 3차 증류수를 구입하여 Milli-Q 초순수제조 장치를 통과하여 사용하였다. 이동상은 0.2 μ m membrane filter (Phenomenex, CA, USA)를 통과시킨 다음 ultrasonication하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 사용하였다. 단삼의 생리활성성분에 대한 정량법을 개발하기 위해 사용된 표준물질의 구조는 Fig. 2와 같다. 표준품 보존용액(stock solution)은 각 물질 즉, rosmarinic acid (500 μ g/mL), salvianolic acid B (1,000 μ g/mL), 15,16-dihydrotanshinone I (500 μ g/mL), cryptotanshinone (500 μ g/mL), tanshinone I (500 μ g/mL), tanshinone IIA (500 μ g/mL)의 농도로 메탄올에 녹여 조제한 후 4 $^{\circ}$ C로 냉장보관 하였다. 사용한 기기로는 GILSON 321 PUMP, UV/VIS 151 detector, 231XL sampling injector, 및 Waters 600 PUMP, 486 Tunable Absorbance detector, 717 Plus Autosampler를 사용하였다.

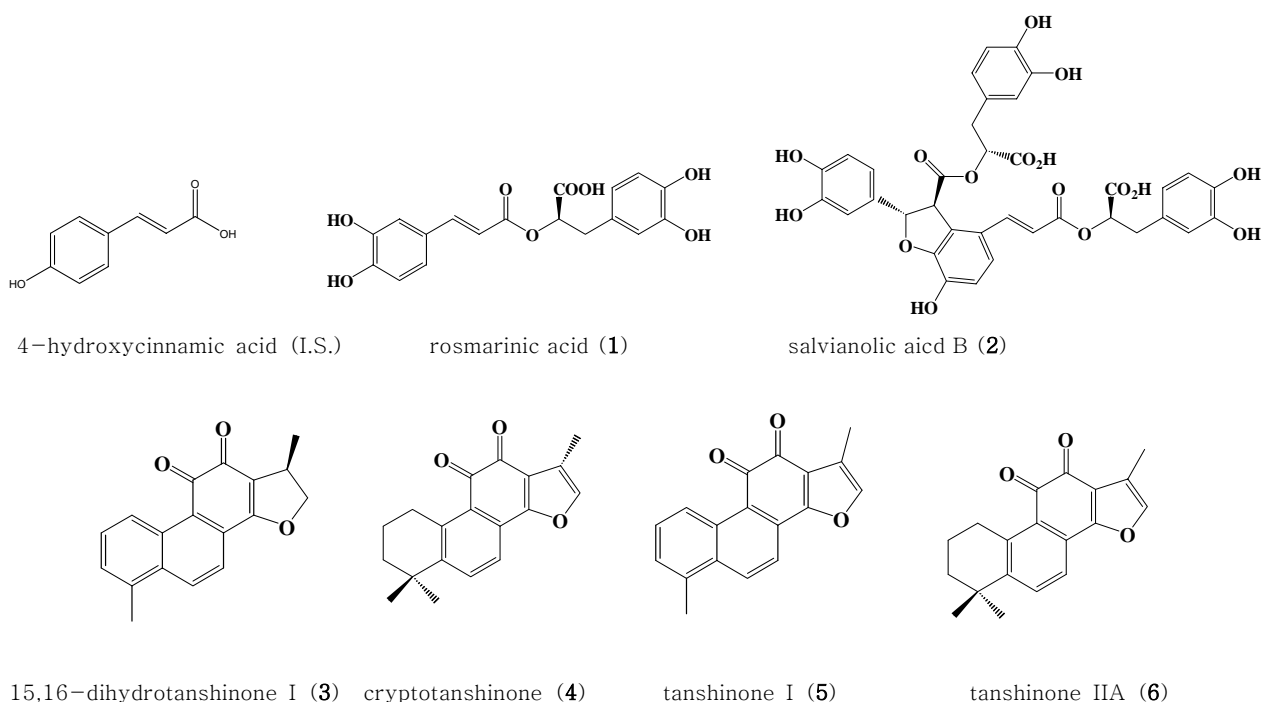


Fig. 2. Structures of marker compounds and internal standard.

2. 황금과 단삼 시료의 추출조건 설정

가. 황금

황금 시료를 0.1 g을 사용하여 70 % 에탄올 50 mL를 추가하여 60 분간 sonication한 다음 여과하여 HPLC를 사용하여 황금 각 성분이 가장 잘 분리 되는 조건을 분석조건으로 설정하였다. 즉, 황금 분말 시료 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70% ethanol 50 mL를 가하고 50,000 ppm의 propylparaben (I.S.) 80 μ L를 가한 후 60분간 초음파 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가한다. 원심분리하고 여과하여 membrane filter (0.45 μ m)를 통과시킨 후 그 10 μ L를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다.

나. 단삼

단삼 시료를 분말로 한 후 0.3 g을 사용하여 75 % methanol 50 mL를 추가하여 30 분간 reflux하여 추출한 후 여과하여 HPLC를 사용하여 peak가 가장 잘 분리되는 조건을 분석조건으로 설정하였

다. 단삼 시료를 분말로 한 후 0.3 g을 사용하여 1) 100% methanol 50 mL (15분, 30분, 1시간 추출), 2) 75% methanol 50 mL (15분, 30분, 1시간 추출), 3) 100% methanol 25 mL (15분, 30분, 1시간 추출)와 50% methanol 25 mL (15분, 30분, 1시간 추출)로 환류 추출 및 초음파 추출의 방법을 이용하여 단삼에 함유된 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)의 함량을 p-hydroxycinnamic acid (7)를 internal standard로 하여 위에서 설정한 단삼의 HPLC 분석법으로 실험하여 함량이 가장 많이 나오는 추출방법을 추출조건으로 설정하였다. 즉 단삼 분말 시료 (150 mesh 통과) 0.3 g을 취하여 75% methanol 50 mL를 가하여 30분간 초음파 추출한 다음 75% methanol로 그 감실량을 추가한다. 5,000 ppm의 p-hydroxycinnamic acid (I.S.) 50 μ L를 가한 후 여과하여 membrane filter (0.45 μ m) 를 통과시킨 후 그 10 μ L를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다.

3. 분석법 검증을 위한 validation 실시

가. 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 내부 표준물과의 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 r^2 를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인 하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

(1) 황금 :

각 standard 의 직선성 농도범위를 wogonin, 0.2~20 μ g/mL, baicalein, 0.2~50 μ g/mL, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 0.1~10 μ g/mL, baicalin, 1.0~336 μ g/mL, chrysin, 0.1~10 μ g/mL, oroxylin A, 0.1~10 μ g/mL로 하였다.

(2) 단삼 :

각 standard의 직선성 농도범위를 salvianolic acid B, 0.2~800 μ g/mL; rosmarinic acid, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA, 0.2~40 μ g/mL로 하였다.

나. 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구하였다. 회수율은 maker compound들의 양을 세 농도씩 첨가하여 측정하였다. Sample에 첨가된 표준품의 양은 황금 sample에 존재하는 각 분석물질의 양에 저, 중, 고 농도가 더해지도록 하여 5회 측정하였다. Marker compound 들의 회수율은 표준품의 양을 첨가한 sample(C_{obs})과 첨가하지 않은 sample(C_{basal})을 분석하여 분석물질의 면적과 내부표준물의 면적비를 각자의 검량선식에 대입하여 농도를 측정한 후 첨가된 농도(C_{add})와 비교하여 계산하였다. 이용된 회수율의 식은 다음과 같다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{[(\text{observed concentration} - \text{baseline analyte concentration})]}{\text{added analyte concentration}} \times 100 \%$$

(1) 단삼 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액 농도는 rosmarinic: acid 5.0, 10.0, 15.0 μ g/mL; salvianolic acid B 60.0, 150.0, 300 μ g/mL, 15,16-dihydrotanshinone I: 1.0, 2.0, 3.0 μ g/mL; cryptotanshinone: 2.0, 4.0, 6.0 μ g/mL; tanshinone I: 1.0, 2.0, 3.0 μ g/mL; tanshinone

IIA: 2.0, 4.0, 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 이다.

(2) 황금 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액 농도는 LC-MS/MS에서 wogonin-7-O-glucuronide methyl ether, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, baicalin, chrysin, 전부 10 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL로 하였고, HPLC-UV에서는 wogonin, 0.40, 1.00, 2.00 $\mu\text{g/mL}$, baicalein, 0.80, 2.00, 4.00 $\mu\text{g/mL}$, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 0.13, 0.26, 0.66 $\mu\text{g/mL}$, chrysin, 0.02, 0.05, 0.10 $\mu\text{g/mL}$, oroxylin A, 0.10, 0.20, 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 로 하였다.

다. 피크면적의 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성 (repeatability)은 standard mixture를 가지고 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화되는 정도를 보기 위하여 연속 5회 injection하여 retention time과 면적의 변화되는 정도를 확인하였다.

라. 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다.

단삼과 황금의 standard의 추가량은 회수율에서 첨가한 양과 같다. 정확성과 정밀성을 측정하기 위하여 일내, 일간으로 나누어 3 회씩 반복 실험하였다. Accuracy (% bias)는 다음 식에 따라 nominal concentration (C_{nom})과 observed concentration (C_{obs})의 평균값으로부터 계산하였다.

$\text{bias (\%)} = [(C_{\text{obs}} - C_{\text{nom}})/(C_{\text{nom}})] \times 100$. Relative standard deviation (RSD)는 다음 식으로부터 계산하였다. $\%RSD = [\text{standard deviation (SD)} / (C_{\text{obs}})] \times 100$

마. 안정성 (stability)

안정성 실험에서 표준품의 메탄올 용액을 상온과 냉장 조건하에서 실험 하였다. 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 거쳐 각각 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 30 일에 한번씩 실험하였다.

바. 완건성 (robustness)

완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건 변화, 검출 파장, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충 용액의 이온강도변화, 컬럼 온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리 인자의 변화정도를 나타내는데 본 연구에서는 column의 종류와 column의 온도에 대해 검토하였다. 컬럼의 종류 및 온도를 변화시켜 Theoretical plate (N), capacity factor (k'), separation factor (α), Resolution (Rs) 등 상수를 계산하여 검토하였다.

4. 황금과 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 재배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다.

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 국내 중국산 수입품으로서 미룡상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 국외에서 수집한 시료로서 산동성산 (C-3, 안국시장 수집), 성도시장 수집 (C-6), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9) 등의 16종을 대상으로 분석하였다.

제2절. LC-MS/MS 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 기기 및 시약

가. 황금:

황금의 성분 중 본 실험에 사용한 표준물질 wogonin-7-O-glucuronide methyl ester(1), wogonin(2), baicalein(3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(4), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone(6), baicalin(8), chrysin(9)의 표준품은 안동대학교로부터 제공받았다. 내부표준품으로 사용한 puerarin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 methanol은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 acetic acid는 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 정제수는 Millipore와 Milli-RO4, Milli-Q 증류장치(Bedford, USA)를 통과한 탈이온수를 사용하였다. 이동상은 0.2 μ m membrane filter (Phenomenex, CA, USA)통과 시킨 다음 ultrasonication하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 사용하였다. Wogonin-7-O-glucuronide methyl ester(102.3 μ g/mL), wogonin(144 μ g/mL), baicalein(88 μ g/mL), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(132.4 μ g/mL), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone (58.9 μ g/mL), baicalin(97 μ g/mL), chrysin(108.9 μ g/mL)의 stock solution을 methanol로 제조한 후 4 $^{\circ}$ C로 냉장보관하였다. Standard solution은 사용 직전에 working 농도로 이동상에 serial dilution 하여 사용하였다. 내부표준물질(I.S, Puerarin)은 105 μ g/mL로 methanol에 제조하여 사용하였다. 검량선은 compound 1 (0.2 - 1020 ng/mL), compound 2 (0.3 - 1440 ng/mL), compound 3 (1.1 - 1100 ng/mL), compound 4 (1.3 - 1320 ng/mL), compound 6 (1.2 - 1180 ng/mL), compound 8 (1.0 - 970 ng/mL), compound 9 (1.1 - 1090 ng/mL) 의 농도로 작성하였다. Quality control (QC) sample은 황금 분말에 puerarin을 surrogate standard로 하여 표준물 첨가를 하였다. QC sample은 최종 농도 10, 500, 1000 ng/mL로 준비하였다. Surrogate standard는 한약재와 같은 blank 시료를 구하기 힘든 경우 구조가 비슷한 물질을 선택하여 다른 성분을 대신하는 것을 말한다. Puerarin은 flavonoid계로써 황금의 지표성분과 구조가 비슷하다.

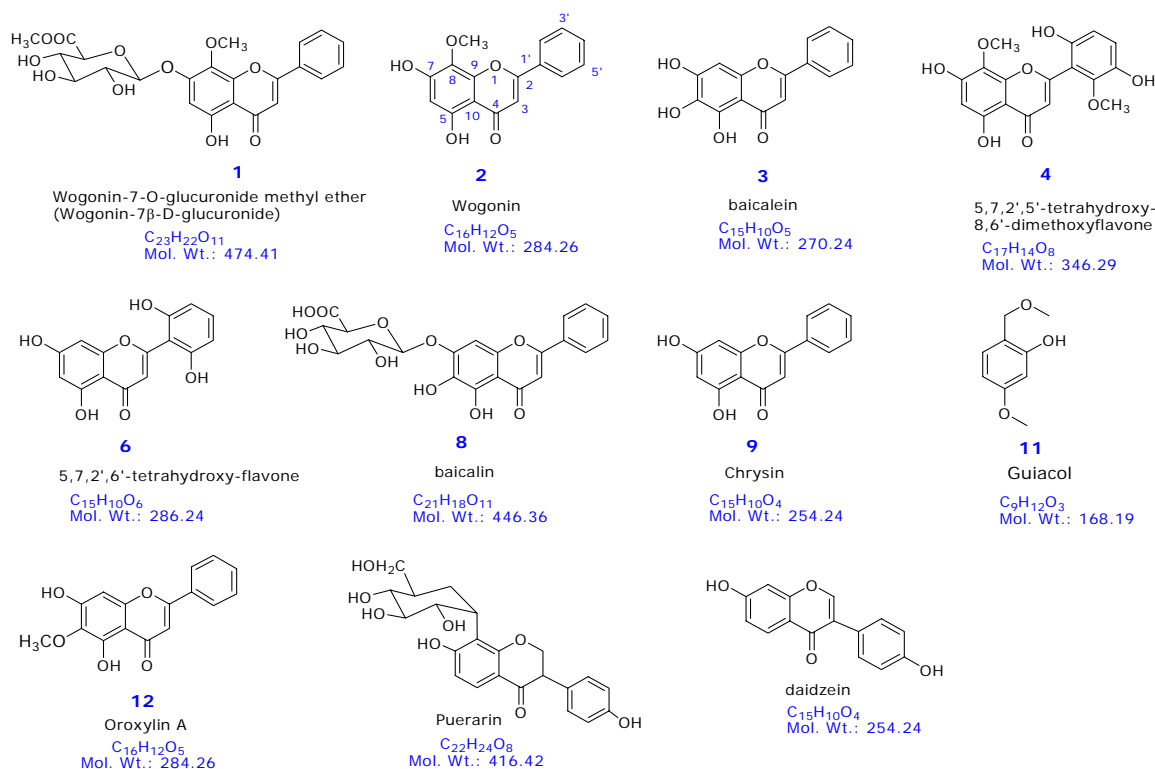


Fig. 3. Structures of marker compounds and internal compound.

나. 단삼

단삼 성분 중 본 실험에 사용한 tanshinone I, tanshinone IIA, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B의 표준품은 안동대학교로부터 제공받아 별도의 정제 없이 사용하였다. 내부표준물로 사용한 imperatorin(지실의 성분 중 하나)은 영남대학교로부터 제공받았다. HPLC용 methanol과 acetonitrile은 Fisher Scientific Co.(Fairlawn, NJ, USA)로부터 구입하였고 formic acid는 Fluka사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 정제수는 Millipore와 Milli-RO4, Milli-Q 증류장치(Bedford, USA)를 통과한 탈이온수를 사용하였다. 이동상은 0.45 μm membrane filter(Phenomenex, CA, USA)를 통과시킨 후 ultrasonication에 의해 탈기하여 사용하였다. 그 외 모든 시약들은 분석급 시약을 그대로 사용하였다. 한약재 검체는 Ball mill (Retsch, Rheinsche, Germany)을 사용하여 분말로 만든 다음 표준체 (stannic acid coated sieve No.25, 0.710mm, Cisa, Barcelona, Spain)를 통과시켜 균질한 재료로 만들어 분석하였다. 성분 추출은 Ultrasonicator (Branssen 8510, Branson, Danbury, CT, USA)를 사용하였다. 본 실험에서 사용한 표준품의 구조는 Fig. 4에 나타내었다.

HPLC system은 degasser와 binary pump, autosampler 가 장착된 HP 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, column oven을 추가로 장착하여 사용하였다. 크로마토그래피 분리는 78% acetonitrile (0.1% formic acid를 포함)로 isocratic elution하여 사용하였다. 유속은 0.2 mL/min으로 하였다. Mass system은 Turbo-IonSpray interface가 장착된 Sciex API 3000 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Concord, Canada) 사용하였다. 분석결과의 data 처리는 Analyst software (version 1.4)를 사용하였다.

각 표준품의 보존용액(stock solution)은 tanshinone I (92 ug/mL), tanshinone IIA (108 ug/mL), cryptotanshinone (95 ug/mL), 15,16-dihydrotanshinone I (132 ug/mL), rosmarinic

acid (190 ug/mL), salvianolic acid B (150 ug/mL) 의 농도로 methanol로 제조한 후 4°C에서 냉장 보관하고 분석 시마다 작업농도(working range)로 이동상 용매에 계열희석(serial dilution)하여 사용하였다. 내부표준물질 (Imperatorin)은 96.5 $\mu\text{g/mL}$ 으로 methanol에 제조하여 사용하였다. 각 물질의 검량선은 LOQ와 실제 함량을 고려해서 tanshinone I (0.92 ~ 92.0 ng/mL), tanshinone IIA (1.08 ~ 108.0 ng/mL), 15,16-dihydrotanshinone I (0.66 ~ 66.0 ng/mL), cryptotanshinone (0.95 ~ 95.0 ng/mL), salvianolic acid B (7.5 ~ 1500.0 ng/mL), rosmarinic acid (4.75 ~ 475.0 ng/mL)의 범위로 작성하였으며 내부표준물질의 최종 검액 중 농도는 6.45 ng/mL가 되도록 하였다.

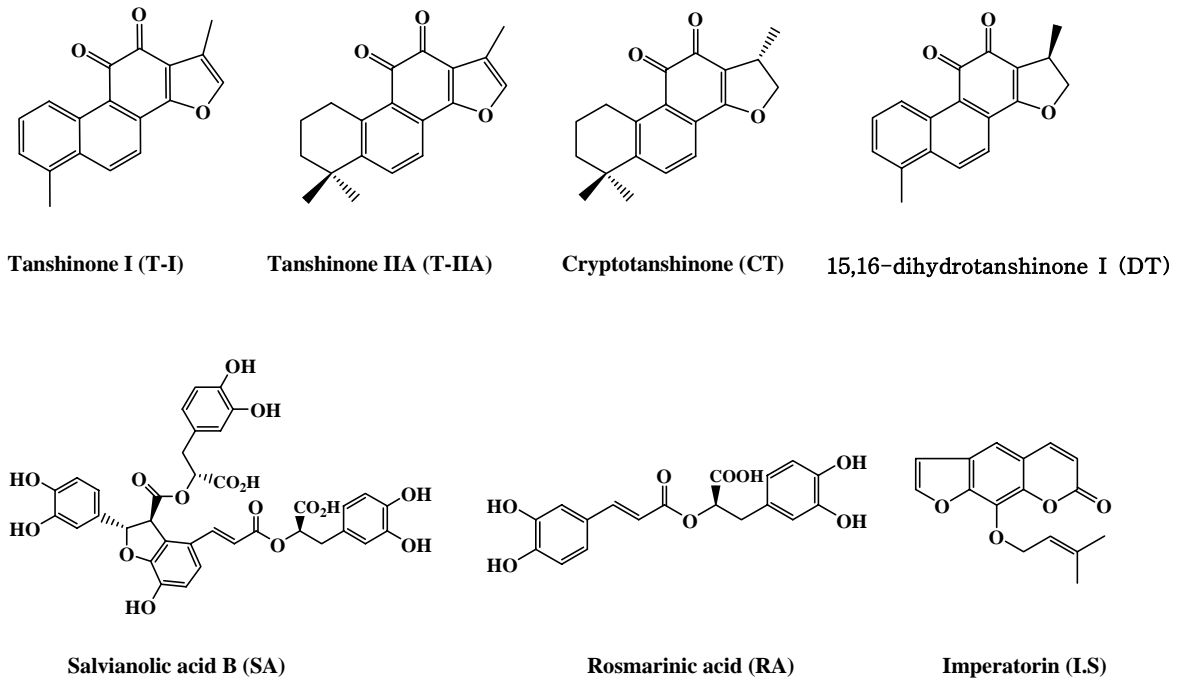


Fig. 4. Structures of the compounds from *Salvia miltriorrhiza* and I.S.

2. 황금과 단삼 시료의 추출조건 설정

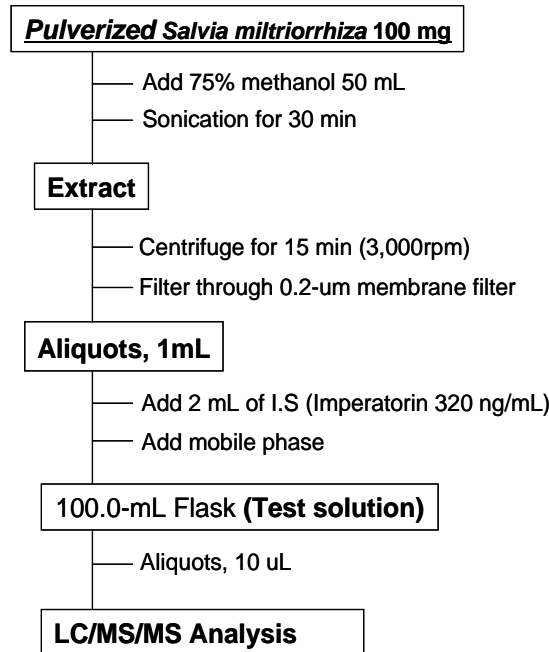
가. 황금

HPLC system은 degasser와 binary pump, autosampler 가 장착된 HP 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, column oven을 추가로 장착하여 사용하였다. HPLC분리는 역상 Luna C18 analytical column (2.1 x 150 mm, I.D., 3 μm , Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였고 컬럼과 동일한 고정상으로 충전된 guard 컬럼 (4.0 L mm x 2.0 ID mm)을 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C로 유지하여 사용하였고, Autosampler는 10°C로 유지하였으며 주입량은 10 μL 로 하였다. 황금 시료를 0.1 g을 사용하여 70 % 에탄올 50 mL를 추가하여 60 분간 sonication한 다음 여과하여 HPLC를 사용하여 황금 각 성분이 가장 잘 분리 되는 조건을 분석조건으로 설정하였다. 즉 황금을 가루로 한 다음 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70 % 에탄올 50 mL를 가하고 1시간 sonication 한 후 0.2 μm membrane filter로 여과한다. 여액을 1 mL 취하여 mobile phase 로 50 mL로 희석한 다음 1 mL를 취하여 internal standard (10,000 ppm) 10 μL 를 가한 후 그 10 μL 를 취하여 injection 한다.

나. 단삼

검액의 추출방법은 HPLC에서 입증된 추출법을 바탕으로 하였다. HPLC 분석방법에서 추출에 대한 실

험을 한 결과 75% MeOH로 30분간 sonication 추출한 방법이 가장 적절하여 본 추출방법도 동일하게 하였으며, LC/MS/MS의 주입 시 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 단삼의 분말검체 100 mg 을 75% MeOH을 50 mL 가하여 30분간 sonication 추출하였다. 이 추출액을 원심분리 한 후 상층액만 취하여 0.2 um membrane filter하였다. 이를 이동상에 100배 희석한 후 I.S와 함께 LC/MS/MS에 주입 하였다. 분석과정을 요약하면 Scheme 1과 같다. 즉 단삼분말 100 g을 취하여 75% methanol 50 ml추가하고 30분 sonication한 후 원심분리하고 그 액을 0.2 um membrane filter를 통과시킨다. 이 액을 1 ml 취하여 여기에 internal standard 2 mL (96.5 ppm)추가하고 mobile phase를 추가하여 100 ml로 한다 이 액을 10 ul 취하여 injection 한다.



Scheme. 1. Typical assay procedure.

3. 분석법 검증을 위한 validation 실시

가. 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도로 표시하였으며 내부 표준물과의 면적비를 이용한 검량선으로 상관계수 r^2 를 구하여 양호한 직선성을 나타내는지 확인 하였다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다.

(1) 황금 :

각 standard 의 직선성 농도범위를 wogonin-7-O-glucuronide methyl ether(0.2 ng/mL~1020 ng/mL), wogonin(0.3 ng/mL~1440 ng/mL), baicalein(1.1 ng/mL~1100 ng/mL), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy flavone(1.3 ng/mL~1320 ng/mL), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone (1.2 ng/mL~1180 ng/mL), baicalin(1.0 ng/mL~970 ng/mL), chrysin(1.1 ng/mL~1090 ng/mL) 로 하였다.

(2) 단삼 :

각 standard의 직선성 농도범위를 salvianolic acid B, 7.5~1500 ng/mL; rosmarinic acid, 4.5~475 ng/mL; 15,16-dihydrotanshinone I, 0.66~66 ng/mL; cryptotanshinone, 0.95~95 ng/mL; tanshinone I, 0.92~92 ng/mL; tanshinone IIA, 1.08~108 ng/mL로 하였다.

나. 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의(단삼은 4 batch) 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구하였다. 회수율은 maker compound들의 양을 세 농도씩 첨가하여 측정하였다. Sample에 첨가된 표준품의 양은 황금 sample에 존재하는 각 분석물질의 양에 저, 중, 고 농도가 더해지도록 하여 5회 측정하였다. Marker compound 들의 회수율은 표준품의 양을 첨가한 sample(C_{obs})과 첨가하지 않은 sample(C_{basal})을 분석하여 분석물질의 면적과 내부표준물의 면적비를 각자의 검량선식에 대입하여 농도를 측정 후 첨가된 농도(C_{add})와 비교하여 계산하였다. 이용된 회수율의 식은 다음과 같다.

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{[(\text{observed concentration} - \text{basal analyte concentration})]}{\text{added analyte concentration}} \times 100 \%$$

(1) 황금 :

20~200% 범위에서 첨가한 3 batch의 검액 농도는 wogonin-7-O-glucuronide methyl ether, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxy flavone, baicalin, chrysin, 전부 10 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL로 하였다.

(2) 단삼 :

5개의 QC sample(control sample 포함)은 method validation 실험으로, 최종 농도가 tanshinone I (0, 1.84, 3.68, 9.20, 18.40 ng/mL), tanshinone IIA (0, 2.70, 5.40, 13.61, 27.00 ng/mL), cryptotanshinone (0, 1.52, 3.04, 7.60, 15.20 ng/mL), 15,16-dihydrotanshinone I (0, 0.66, 1.32, 3.30, 6.60 ng/mL), rosmarinic acid(0, 4.75, 9.50, 23.94, 47.88 ng/mL)이 되도록 준비하였다.

다. 피크면적의 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성 (repeatability)은 standard mixture를 가지고 분석기기가 시간의 변화에 따라 변화되는 정도를 보기 위하여 연속 5회 injection 하여 retention time과 면적의 변화되는 정도를 확인 하였다.

라. 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다.

단삼과 황금의 standard의 추가양은 회수율에서 첨가한 양과 같다. 정확성과 정밀성을 측정하기 위하여 일내, 일간으로 나누어 3 회씩 반복 실험하였다. Accuracy (% bias)는 다음 식에 따라 nominal concentration (C_{nom})과 observed concentration (C_{obs})의 평균값으로부터 계산하였다.

$\text{bias}(\%) = [(C_{obs} - C_{nom}) / (C_{nom})] \times 100$. Relative standard deviation (RSD)는 다음 식으로부터 계산하였다. $\%RSD = [\text{standard deviation (SD)} / (C_{obs})] \times 100$

마. 안정성 (stability)

안정성 실험에서 표준품의 메탄올 용액을 상온과 냉장 조건하에서 실험 하였다. 표준품에 대하여 상 온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 거쳐 각각 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 30 일에 한번씩 실험 하였다.

바. 완건성 (robustness)

완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건 변화, 검출 파장, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충

용액의 이온강도변화, 컬럼 온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리 인자의 변화정도를 나타내는데 본 연구에서는 column의 종류와 column의 온도에 대해 검토하였다. 컬럼의 종류 및 온도를 변화시켜 **Theoretical plate (N)**, **capacity factor (k')**, **separation factor (α)**, **Resolution (Rs)** 등 상수를 계산하여 검토하였다.

4. 황금과 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료 (Fig. 5)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 현재 국내에서 유통 중인 것과 재배한 것을 대상으로 수집하여 사용하였다. 순천산(SUNCHN), 경동시장에서 구입한 한국산 (GYD-KOR)과 중국산(GYD-CHN), 대구 약령시장에서 구입한 한국산(DEG-KOR)과 중국산 (DEG-CHN), 대구가톨릭대학교에서 직접 재배(UNI-CAT)한 황금검체는 대구가톨릭대학교로부터 제공받았다. 그 외 KJG-1과 2는 청주 동체원에서 구입하였다.

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 (Fig. 6) 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 국내 중국산 수입품으로서 미륵상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 서울 제기동 수집품 중국 감숙성산 (K-3), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 기정장약 중국 난주시장수집 감숙성산 (C-1), 창달중약 안국시장수집품 중국 하북성산 (C-2), 창달중약 안국시장수집품 중국 산둥성산 (C-3), 성도시장수집품 사천성산 (C-4), 중국 장사시장수집품 (C-5), 성도시장수집 (C-6), 중국 곤명시장수집품 (C-7), 중국 난주시장수집품 (C-8), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9), 중국 곤명시장수집품 운남성산 (C-10), 중국 장사시장수집품 (C-11), 중국 시상판나시장수집품 (C-12)의 16종을 대상으로 분석하였다.

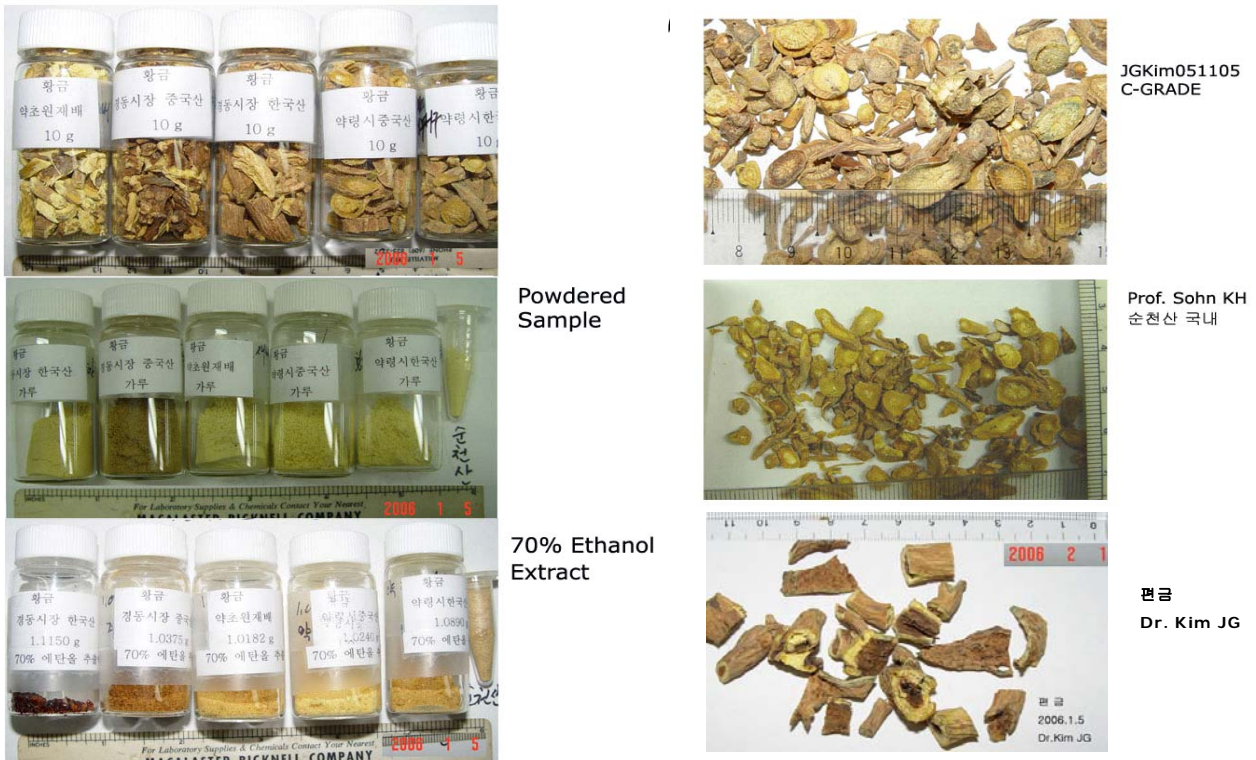


Fig. 5. Scutellariae Radix collected from different markets.



Fig. 6. *Salvia miltiorrhizae* Radix collected from different markets.

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

제1절 HPLC/UV 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 황금

가. HPLC 분석조건

HPLC system은 1525 binary pump와 autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Waters 2796 (Waters, America) system에 photodiode array detector (Waters 2996)가 장착된 기기를 사용하였다. HPLC 컬럼은 같은 고정상의 guard 컬럼 (4.0 mm x 3.0 ID mm)이 달린 Luna C18 analytical column (4.6 x 250 mm, I.D. 5 um, Phenomenex Torrance, CA, USA)을 사용하였고 컬럼온도를 40℃로 유지하여 사용하였으며 이 조건을 Table 4에 나타내었다. Autosampler는 10 ℃로 유지하였으며 주입량은 10 μL로 하였다. 크로마토그래피 분리는 Table 5의 gradient 조건을 사용하였고 이동상은 용매 A (1% acetic acid)와 용매 B (ACN: MeOH = 7:3, v/v in 1% acetic acid)를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min을 사용하였다. DAD는 210 nm부터 400 nm까지 full scanning 하였고 275 nm에서 정량하였고 chromatogram은 Fig. 7에 나타내었다. (표준품의 파장이 약 275 nm에서 흡수도가 유사함)

Table 4. HPLC condition of *Scutellaria baicalensis*.

Detector	A photodiode array detector (Waters 2996)
Column	Luna C18 analytical column (250 x 4.6mm, I.D. 5um, Phenomenex Torrance, CA, USA)
Temperature	• Column - 40℃ • Autosampler - 10℃
Mobile Phase	• A - 1% acetic acid • B - acetonitrile : methanol = 7 : 3(v/v), 1% acetic acid)
Flow rate	1mL/min (All compounds were eluted within 36 min)

Table 5. HPLC gradient condition.

Time(min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	75	25
10	68	32
20	55	45
24	55	45
35	52	48
40	75	25
45	75	25

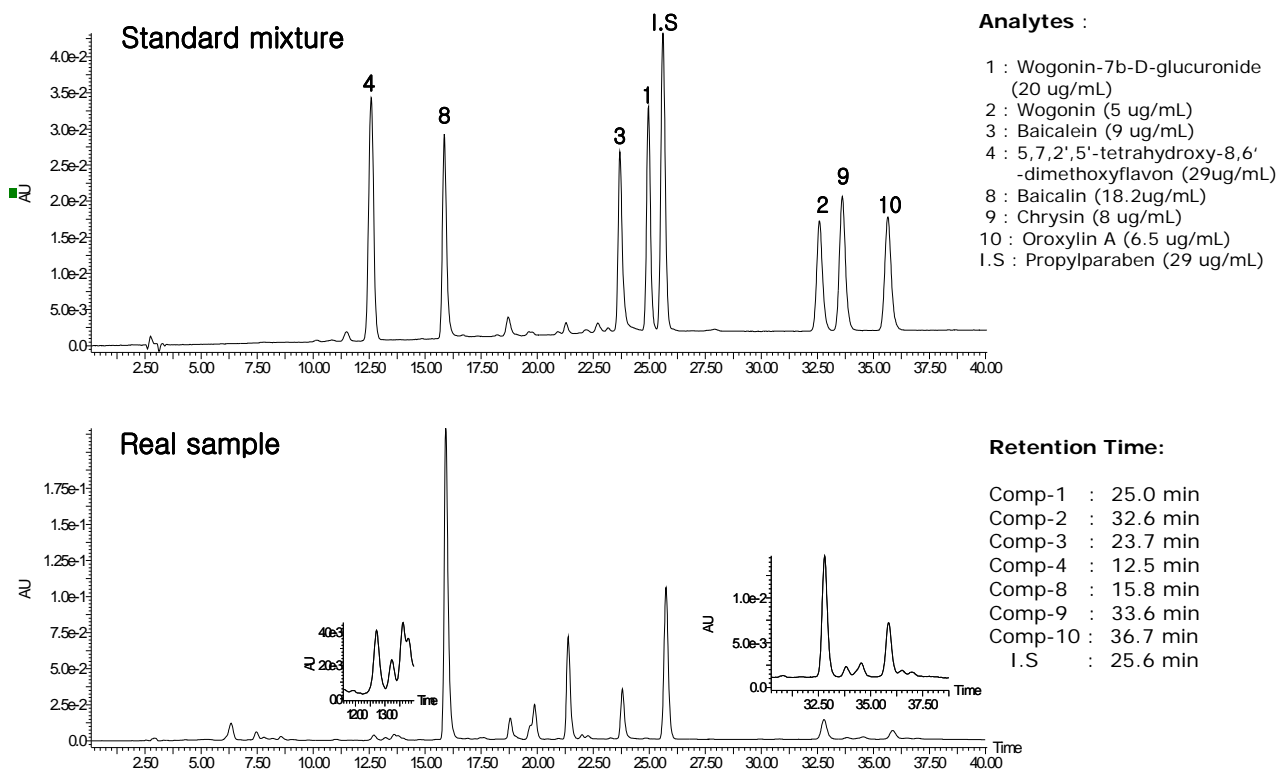
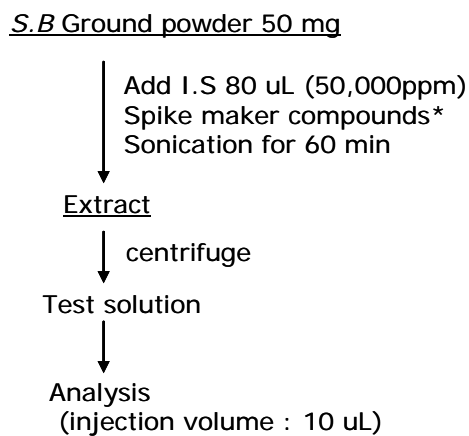


Fig. 7. HPLC chromatogram of *Scutellaria baicalensis*

나. 추출조건 및 정량법 조작 설정

추출용매, 추출방법, 추출시간 등을 변화시키면서 최종적으로 확립한 추출조건과 정량조작을 Scheme 2에 나타내었다. 즉, 황금 분말 시료 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70% ethanol 50 mL를 가하고 50,000 ppm의 propylparaben (I.S.) 80 μ L를 가한 후 60분간 초음파 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가한다. 원심분리하고 여과하여 membrane filter (0.45 μ m)를 통과 시킨 후 그 10 uL를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다.



Scheme 2. Analytical procedure of *Scutellaria baicalensis*.

다. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도, 즉 wogonin, 0.2~20 $\mu\text{g/mL}$, baicalein, 0.2~50 $\mu\text{g/mL}$, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$, baicalin, 1.0~336 $\mu\text{g/mL}$, chrysin, 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$, oroxylin A, 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 로 표시할 수 있었으며 내부표준물과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.999$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다. 이 결과는 Table 6에 나타내었고 그래프는 Fig. 8에 나타내었다.

Table 6. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

compound	Range	a	b	R ²	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
2	0.2 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$	0.0369	-0.0001	0.9999	0.02	0.07
3	0.2 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$	0.0227	-0.0021	0.9997	0.04	0.13
4	0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$	0.0099	0.0002	0.9995	0.03	0.09
8	1.0 ~ 336 $\mu\text{g/mL}$	0.0138	-0.0045	0.9998	0.05	0.16
9	0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$	0.0295	0.0001	0.9999	0.02	0.08
10	0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$	0.0309	0.0004	0.9999	0.01	0.03

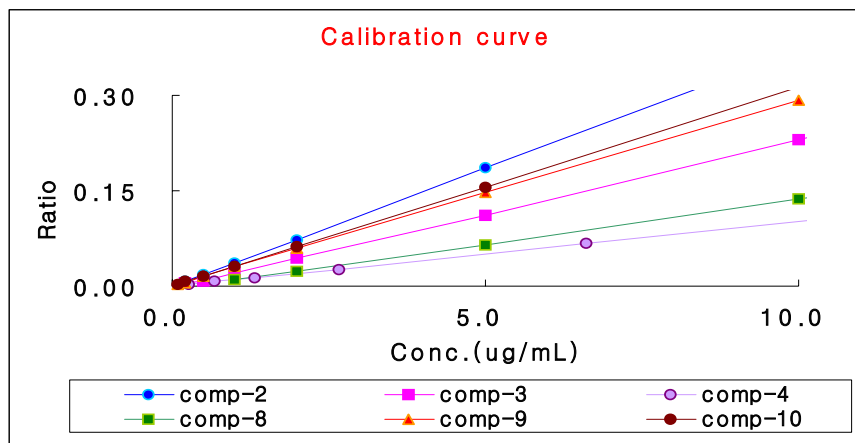


Fig. 8. Calibration graphs of 2~10.

(2) 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 각각 10 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL의 농도로 첨가한 3 batch의 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 Table 7과 같다. Table 7에서 볼 수 있는 바와 같이 전부 98 %~102 %사이로 우수하게 나타났다.

Table 7. Recovery of marker compounds through standard addition (n=5).

Analytes	Added Analytes concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Observed concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Mean (%)	CV (%)
compound 2	0.40	2.14 ± 0.026	101.2 ± 6.4	100.4	1.61
	1.00	2.75 ± 0.024	101.4 ± 2.4		
	2.00	3.70 ± 0.042	98.5 ± 2.1		
compound 3	0.80	4.33 ± 0.124	98.7 ± 7.8	99.6	0.81
	2.00	5.55 ± 0.046	100.2 ± 2.3		
	4.00	7.54 ± 0.059	99.9 ± 1.5		
compound 4	0.13	1.74 ± 0.004	101.3 ± 3.1	102.2	1.57
	0.26	1.88 ± 0.012	104.1 ± 4.5		
	0.66	2.27 ± 0.016	101.2 ± 2.4		
compound 9	0.02	0.16 ± 0.001	100.0 ± 3.7	99.8	1.02
	0.05	0.19 ± 0.002	98.3 ± 4.1		
	0.10	0.24 ± 0.003	98.3 ± 2.6		
compound 10	0.10	0.52 ± 0.002	99.0 ± 2.3	100.7	1.55
	0.20	0.62 ± 0.008	102.0 ± 3.8		
	0.40	0.82 ± 0.007	101.2 ± 1.9		

(3) 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

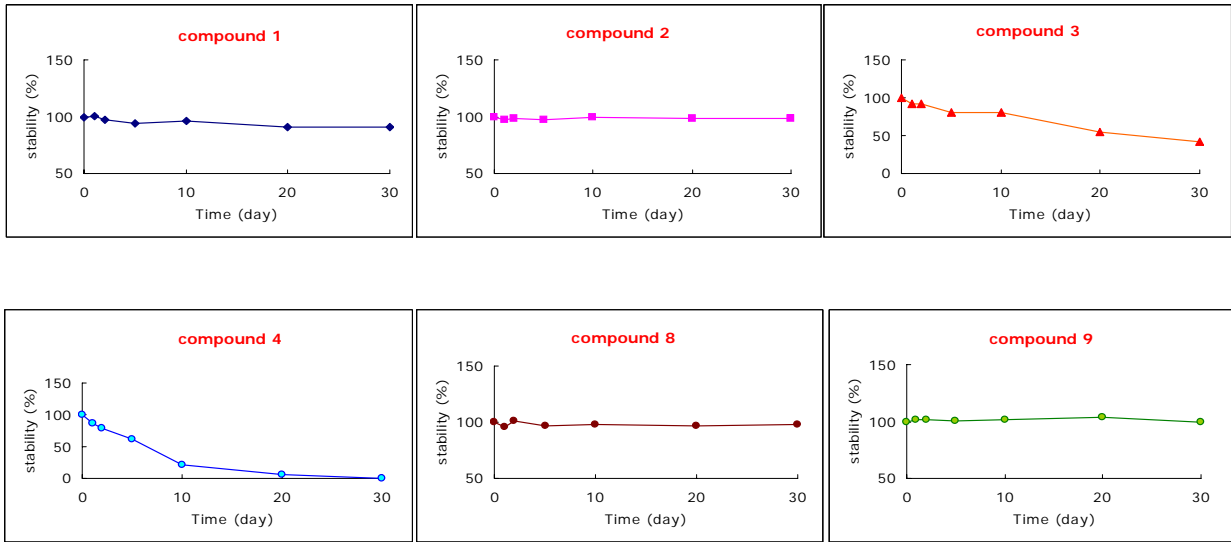
전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였으며 그 결과를 Table 8에 나타내었다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다. Table 8에서 볼 수 있는 바와 같이 wogonin의 intra-day and inter-day의 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 97.1, 96.7 %로 나왔고 나머지는 전부 98 %~102 %사이로 우수하게 나왔다.

Table 8. Precision and accuracy of analytical results.

Analytes	nominal concentration (µg/mL)	Intra-assay (n=3)			Inter-assay (n=3)		
		Observed concentration (µg/mL)	Precision (CV %)	Accuracy (%)	Observed concentration (µg/mL)	Precision (CV %)	Accuracy (%)
wogonin	0.40	0.388 ± 0.017	4.49	97.1	0.387 ± 0.014	3.68	96.7
(2)	1.00	1.017 ± 0.028	2.79	101.7	1.020 ± 0.023	2.21	102.0
	2.00	1.992 ± 0.011	0.56	99.6	1.991 ± 0.008	0.41	99.5
baicalein	0.80	0.776 ± 0.016	2.06	97.0	0.801 ± 0.040	5.00	100.1
(3)	2.00	2.035 ± 0.028	1.39	101.7	1.996 ± 0.067	3.35	99.8
	4.00	3.983 ± 0.007	0.18	99.6	3.999 ± 0.022	0.56	100.0
5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dime thoxyflavone	0.13	0.132 ± 0.004	2.91	99.7	0.129 ± 0.006	4.75	97.6
	0.26	0.270 ± 0.007	2.49	102.0	0.269 ± 0.005	1.79	101.6
(4)	0.66	0.663 ± 0.004	0.63	100.2	0.660 ± 0.006	0.95	99.7
chrysin	0.02	0.021 ± 0.001	4.82	103.0	0.020 ± 0.0004	2.21	102.5
(9)	0.05	0.051 ± 0.002	2.99	101.4	0.049 ± 0.002	3.41	99.8
	0.10	0.101 ± 0.001	1.05	100.5	0.100 ± 0.0005	0.50	100.4
oroxylin A	0.10	0.099 ± 0.002	2.11	99.5	0.097 ± 0.004	0.44	97.6
(10)	0.20	0.199 ± 0.001	0.26	99.7	0.203 ± 0.004	2.01	101.6
	0.40	0.399 ± 0.002	0.42	99.9	0.398 ± 0.001	0.23	99.7

(4) 안정성 (stability)

본 실험에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 Fig. 9과 같다. Wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavon, baicalin, chrysin 등 7가지 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 실험한 결과 baicalein과 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy-flavone를 제외하고 전부 안정하였다.



Analytes :

*Compound 1 : Wogonin-7b-D-glucuronide *Compound 2 : Wogonin *Compound 3 : Baicalein
 *Compound 4 : 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon *Compound 8 : Baicalin *Compound 9 : Chrysin

Fig. 9. Stability of standard mixture.

라. 황금 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 재배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. Table 9와 Fig 10은 구입처가 다른 8종의 황금에 대하여 정량한 결과를 나타낸 표와 그림이다. 황금의 주요 성분은 baicalin (compound 8)으로 대한약전 (KP)에 10 % 이상을 함량으로 규정되어 있다. 본 연구에서 분리한 7종의 marker compound 중 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester(compound 1)은 검출은 되나 정량 한계 이하였다. Baicalin (compound 8)의 함량은 8종의 황금 중 KJG-2은 7.48 %로 약전규정 함량 미만이었고 이를 제외한 나머지 7종은 12.00 %~21.00 %로 10 % 이상의 함량을 보였다. 이를 제외한 나머지 6종의 compound들의 함량의 경향은 baicalin > baicalein > wogonin > 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone > oroxylin A > chrysin 순으로 나타났다.

Table 9. The contents (w/w%) of six analytes in *Scutellariae Radix* from different sources. (N=3)

SAMPLE	contents (w/w%)					
	comp-2	comp-3	comp-4	comp-8	comp-9	comp-10
SUNCHN	0.162 ± 0.0007	0.315 ± 0.023	0.161 ± 0.038	17.325 ± 0.21	0.012 ± 0.0003	0.034 ± 0.0013
GYD-KOR	0.378 ± 0.0007	0.627 ± 0.017	0.311 ± 0.030	21.004 ± 0.07	0.016 ± 0.0005	0.077 ± 0.0036
GYD-CHN	0.428 ± 0.0024	1.099 ± 0.142	0.360 ± 0.066	12.005 ± 0.29	0.047 ± 0.0019	2.055 ± 0.0024
DAE-KOR	0.144 ± 0.0020	0.339 ± 0.100	0.149 ± 0.068	17.578 ± 0.59	BLQ	0.033 ± 0.0015
DAE-CHN	0.391 ± 0.0004	1.356 ± 0.102	0.161 ± 0.016	19.185 ± 0.06	0.021 ± 0.0009	0.092 ± 0.0013
UNI-CAT	0.077 ± 0.0019	0.337 ± 0.044	0.157 ± 0.042	20.740 ± 0.13	BLQ	0.022 ± 0.0011
KJG-1	0.547 ± 0.0007	2.555 ± 0.258	0.181 ± 0.018	17.808 ± 0.09	0.037 ± 0.0002	0.172 ± 0.0047
KJG-2	0.258 ± 0.0013	0.625 ± 0.063	0.274 ± 0.016	7.480 ± 0.08	0.017 ± 0.0005	0.304 ± 0.0021

The compound 1 is BLQ (Below the limit of quantification). The contents (g/100 g) of the six analytes in sample of S.B mean ± SD.

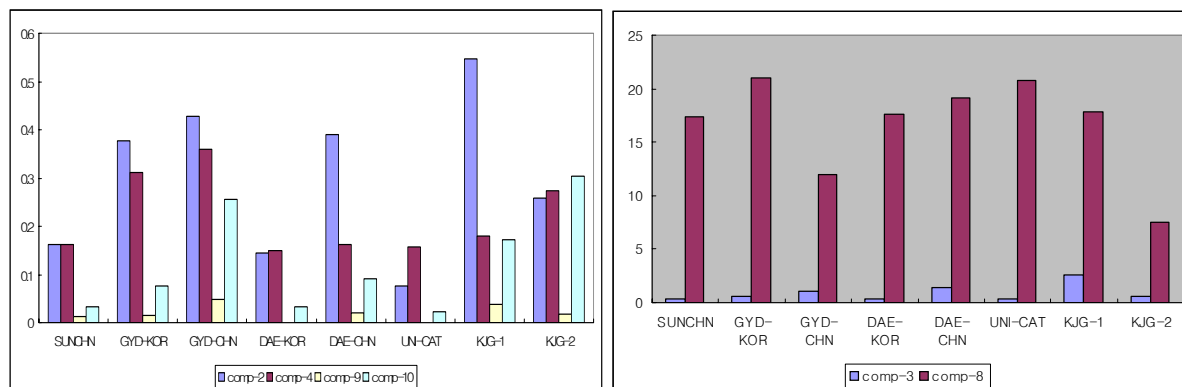


Fig. 10. Analytical results(w/w%) of the marker compounds in *Scutellaria baicalensis*.

2. 단삼

가. 단삼 시료의 HPLC 분석조건 개발

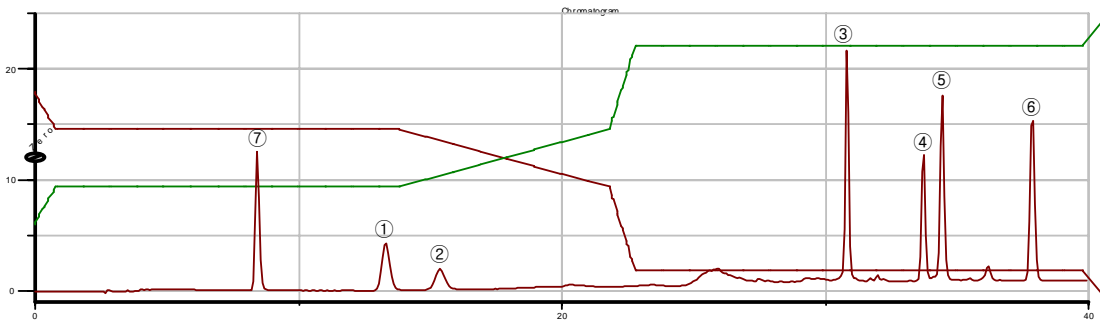
단삼시료를 가루로 하여 70 % 메탄올로 30분간 환류냉각 추출하여 internal standard를 추가하고 여과하여 HPLC 분석용 sample로 하였다. 이동상 system은 1) A: H₂O, B: MeOH, 2) A: H₂O, B: CH₃CN, 3) A: H₂O, B: MeOH:CH₃CN(3:1), 4) A: H₂O, B: MeOH:CH₃CN(1:1) 등의 조건으로 실험해 보았고, 위의 조건에서 0.1 % HCOOH, 0.5 % HCOOH, 1 % HCOOH를 추가하여 실험해 보았으며, 또한 0.5 % CH₃COOH, 1 % CH₃COOH를 추가하여 실험해 본 결과 A: H₂O, B: MeOH:CH₃CN(3:1)에 1 % HCOOH를 추가한 조건의 chromatogram이 분석시간을 40분 내로 단축하면서 분리가 가장 잘 되었다.

이동상을 isocratic과 gradient 조건으로 검토해 본 결과 isocratic으로 하면 salvianolic acid B와 같은 극성이 큰 phenolic 물질과 tanshinone IIA와 같은 극성이 작은 diterpenoid 물질은 극성 차이가 너무 많이 나므로 동시에 분석할 수가 없기에 각각 두 번 분석을 해야 하기에 gradient 조건으로 동시에 분석할 수 있는 조건을 찾았다. 또한 분석에 소요되는 시간을 비교하면 각각 분석하는 시간과 동시에 분석하는 시간이 비슷하였으므로 각각 분석하는 번거로움을 피할 수 있는 gradient 조건의 동시분석을 분석 조건으로 잡았다. 최종 분석조건은 Table 10에 나타내었고 chromatogram을 Fig. 11에 나타내었다.

Table 10. HPLC conditions for assay of analytes in *Salvia miltiorrhizae* Radix.

Mobile phase	time (min)	A (H ₂ O:HCOOH = 100:1) %	B (MeOH:CH ₃ CN:HCOOH = 100:75:1) %
	0	75	25
	1	60	40
	14	60	40
	22	40	60
	23	11	89
	40	11	89
Detector	UV (280 nm)		
Column	Waters YMC (4.6 × 250 mm)		
Flow rate	1 mL/min		
Column temp.	20 °C		
Injection volume	10 µL		
Device	GILSON 321 PUMP, UV/VIS-151 Detector, 321 XL sampling injector		

(A)



(B)

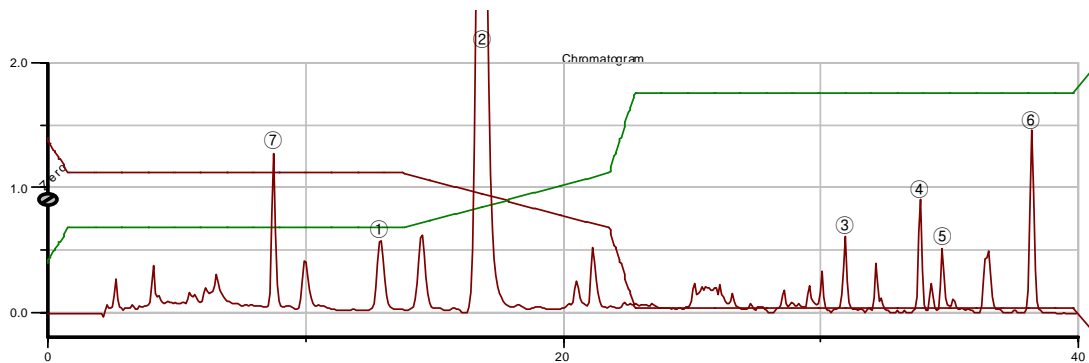


Fig. 11. HPLC chromatogram of standard mixture (A) and sample (B) of *Salvia miltiorrhizae* Radix.

① rosmarinic acid (t_R 12.91), ② salvianolic acid B (t_R 16.83), ③ 15,16-dihydrotanshinone I (t_R 30.95), ④ cryptotanshinone (t_R 33.26), ⑤ tanshinone I (t_R 34.72), ⑥ tanshinone IIA (t_R 38.19), ⑦ *p*-hydroxycinnamic acid (IS, t_R 8.75).

나. 단삼 시료의 추출조건 설정

단삼 시료를 분말로 한 후 0.3 g을 사용하여 1) 100% methanol 50 mL (15분, 30분, 1시간 추출), 2) 75% methanol 50 mL (15분, 30분, 1시간 추출), 3) 100% methanol 25 mL (15분, 30분, 1시간 추출)와 50% methanol 25 mL (15분, 30분, 1시간 추출)로 환류 추출 및 초음파 추출의 방법을 이용하여 단삼에 함유된 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)의 함량을 *p*-hydroxycinnamic acid (7)를 internal standard로 여 새로 개발한 단삼의 HPLC 분석법인 Table 7의 조건으로 실험한 결과를 Table 11에 나타내었다. 유효성분의 최적 추출용매로는 75% MeOH 사용과 100% MeOH 25 mL과 50% MeOH 25 mL의 연속 사용이 비슷하였으며, 추출방법은 환류추출법과 초음파추출법이 비슷하였다. 추출시간은 15분에는 완전히 추출되지 않았으며, 30분과 1시간이 비슷하였다. 그러므로 추출조건으로서 75% MeOH로 30분간 초음파 추출로 설정하였다.

Table 11. Effect of sample extraction and pre-treatments on assay of analytes in *Salvia miltiorrhizae* Radix. (n=3)

time (min)	method	solvent		assay (%)					
				①	②	③	④	⑤	⑥
15	reflux	A	mean	0.1329	3.2231	0.0321	0.0630	0.0317	0.0725
			SD	0.0203	0.5124	0.0037	0.0088	0.0042	0.0098
			%SD	15.2629	15.8993	11.5522	14.0219	13.1219	13.5195
		B	mean	0.1946	4.6358	0.0348	0.0715	0.0310	0.0750
			SD	0.0040	0.0762	0.0014	0.0025	0.0042	0.0067
			%SD	2.0607	1.6431	3.9268	3.4355	13.4574	8.9907
		C	mean	0.1934	4.6024	0.0394	0.0784	0.0421	0.0918
			SD	0.0042	0.0883	0.0028	0.0039	0.0040	0.0067
			%SD	2.1633	1.9189	7.2024	4.9553	9.6216	7.2681
	sonication	A	mean	0.1622	3.9918	0.0350	0.0822	0.0416	0.0971
			SD	0.0007	0.0215	0.0016	0.0032	0.0037	0.0058
			%SD	0.4104	0.5375	4.4750	3.8418	8.9898	6.0168
		B	mean	0.2134	5.0462	0.0327	0.0702	0.0336	0.0853
			SD	0.0006	0.0160	0.0015	0.0096	0.0048	0.0086
			%SD	0.2835	0.3176	4.5816	13.6866	14.1461	10.0606
		C	mean	0.2221	5.1334	0.0359	0.0837	0.0397	0.0967
			SD	0.0043	0.0098	0.0002	0.0018	0.0007	0.0005
			%SD	1.9517	0.1913	0.4520	2.0978	1.7802	0.5167
30	reflux	A	mean	0.1937	4.2682	0.0347	0.0770	0.0403	0.0925
			SD	0.0001	0.0691	0.0012	0.0033	0.0011	0.0015
			%SD	0.0490	1.6186	3.5745	4.2910	2.6303	1.5949
		B	mean	0.2304	4.9790	0.0347	0.0824	0.0360	0.0927
			SD	0.0047	0.1160	0.0011	0.0019	0.0005	0.0029
			%SD	2.0339	2.3307	3.2154	2.2720	1.2820	3.1536
		C	mean	0.2202	4.7436	0.0349	0.0822	0.0386	0.0914
			SD	0.0055	0.0613	0.0007	0.0017	0.0007	0.0013
			%SD	2.4770	1.2926	1.8803	2.0586	1.7801	1.4351
	sonication	A	mean	0.1696	4.0619	0.0370	0.0782	0.0377	0.0923
			SD	0.0059	0.1035	0.0012	0.0017	0.0012	0.0015
			%SD	3.5024	2.5487	3.1311	2.1973	3.0973	1.6498
		B	mean	0.2309	4.8904	0.0371	0.0809	0.0387	0.0910
			SD	0.0054	0.0616	0.0012	0.0037	0.0014	0.0012
			%SD	2.3367	1.2604	3.1755	4.5286	3.6691	1.3476
		C	mean	0.2122	4.9769	0.0414	0.0834	0.0395	0.0944
			SD	0.0014	0.1426	0.0009	0.0007	0.0007	0.0010
			%SD	0.6438	2.8661	2.2653	0.8824	1.7678	1.1102

A: 100% MeOH 50 mL, B: 75% MeOH 50 mL, C: 100% MeOH 25 mL + 50% MeOH 25 mL

① rosmarinic acid ② salvianolic acid B ③ 15,16-dihydrotanshinone I

④ cryptotanshinone ⑤ tanshinone I ⑥ tanshinone IIA

Table 11. Effect of sample extraction and pre-treatments on assay of analytes in *Salvia miltiorrhizae* Radix. (n=3) (continued)

time (min)	method	solvent		assay (%)					
				①	②	③	④	⑤	⑥
60	reflux	A	mean	0.1823	4.1866	0.0389	0.0822	0.0393	0.0896
			SD	0.0069	0.1548	0.0011	0.0027	0.0017	0.0027
			%SD	3.7684	3.6973	2.7424	3.3018	4.2684	3.0554
		B	mean	0.2116	4.6905	0.0403	0.0802	0.0393	0.0883
			SD	0.0020	0.0242	0.0015	0.0005	0.0009	0.0009
			%SD	0.9676	0.5155	3.7738	0.5735	2.2921	0.9830
		C	mean	0.2106	4.6863	0.0386	0.0825	0.0382	0.0903
			SD	0.0018	0.0173	0.0012	0.0010	0.0009	0.0004
			%SD	0.8759	0.3702	3.2263	1.2598	2.4006	0.4894
	sonication	A	mean	0.1755	4.1655	0.0384	0.0823	0.0402	0.0940
			SD	0.0010	0.0552	0.0007	0.0017	0.0006	0.0019
			%SD	0.5623	1.3256	1.7573	2.0653	1.5983	2.0029
		B	mean	0.2151	4.7546	0.0405	0.0819	0.0397	0.0911
			SD	0.0003	0.0488	0.0007	0.0006	0.0006	0.0002
			%SD	0.1303	1.0254	1.6572	0.7243	1.4020	0.2428
		C	mean	0.2107	4.7824	0.0406	0.0827	0.0411	0.0922
			SD	0.0038	0.0193	0.0012	0.0005	0.0008	0.0009
			%SD	1.8074	0.4027	2.8659	0.5958	1.8415	1.0114

A: 100% MeOH 50 mL, B: 75% MeOH 50 mL, C: 100% MeOH 25 mL + 50% MeOH 25 mL

① rosmarinic acid ② salvianolic acid B ③ 15,16-dihydrotanshinone I

④ cryptotanshinone ⑤ tanshinone I ⑥ tanshinone IIA

(1) 추출용매 (Extraction solvent)

Table 11에서 sonication 방법으로 30 분 추출 시 추출용매에 따른 영향을 나타내면 Table 12와 같다. 100% 메탄올 추출조건에서 rosmarinic acid와 salvianolic acid B가 75%메탄올 및 100% + 50% 메탄올 추출조건에 비하여 적게 용출되었으며 diterpenoid 성분은 큰 차이가 없었다. 그러므로 추출용매는 75% 메탄올로 설정하였다.

Table 12. Extraction efficiency (%) vs. extracting solvents. (extraction time 30 min, sonication)

extraction solvents	Analytes, content								
	rosmarinic acid			salvianolic acid B			15,16-dihydrotanshinone I		
	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)
100% MeOH	0.1696	0.0059	3.5024	4.0619	0.1035	2.5487	0.0370	0.0012	3.1311
75% MeOH	0.2309	0.0054	2.3367	4.8904	0.0616	1.2604	0.0371	0.0012	3.1755
100% MeOH + 50% MeOH	0.2122	0.0014	0.6438	4.9769	0.1426	2.8661	0.0414	0.0009	2.0653

extraction solvents	Analytes, content								
	cryptotanshinone			tanshinone I			tanshinone IIA		
	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)
100% MeOH	0.0782	0.0017	2.1973	0.0377	0.0012	3.0973	0.0923	0.0015	1.6498
75% MeOH	0.0809	0.0037	4.5286	0.0387	0.0014	3.6691	0.0910	0.0012	1.3476
100% MeOH + 50% MeOH	0.0834	0.0007	0.8824	0.0395	0.0007	1.7678	0.0944	0.0010	1.1102

(2) 추출방법 (extraction methods)

Table 11에서 75% MeOH로 30분 추출 시 추출방법으로 초음파추출과 환류냉각 추출을 비교하였고 그 결과를 Table 13에 나타내었다. 두 가지 방법은 뚜렷한 차이를 보이지 않으나 sonication 방법이 간편하므로 sonication 방법을 선택하였다.

Table 13. Extraction efficiency (%) vs. extracting methods. (solvent 75% MeOH, extraction time 30 min,)

extraction methods	Analytes, content								
	rosmarinic acid			salvianolic acid B			15,16-dihydrotanshinone I		
	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)
reflux	0.2304	0.0047	2.0339	4.9790	0.1160	2.3307	0.0347	0.0011	3.2154
sonication	0.2309	0.0054	2.3367	4.8904	0.0616	1.2604	0.0371	0.0012	3.1755

extraction methods	Analytes, content								
	cryptotanshinone			tanshinone I			tanshinone IIA		
	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)
reflux	0.0824	0.0019	2.2720	0.0360	0.0005	1.2820	0.0927	0.0029	3.1536
sonication	0.0809	0.0037	4.5286	0.0387	0.0014	3.6691	0.0910	0.0012	1.3476

(3) 추출시간 (Extraction time)

Table 11에서 75% MeOH로 sonication 시 추출시간에 따른 영향을 Table 14과 같이 15, 30, 60분으로 하여 비교하였다. 15분 추출하였을 때는 함량이 일정하게 나오지 않았으며, 30분과 60분에서는 함량이 일정하게 나왔고, 뚜렷한 차이가 없었다. 그러므로 추출시간을 30분으로 결정하였다.

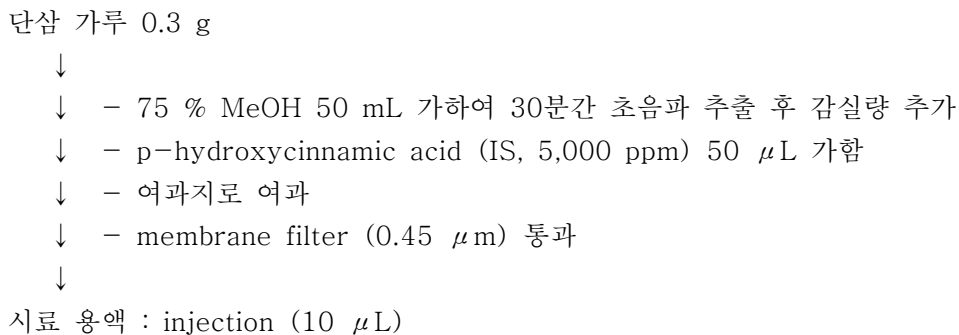
Table 14. Extraction efficiency (%) vs. extracting time. (solvent 75% MeOH, sonication)

extraction time	Analytes, content								
	rosmarinic acid			salvianolic acid B			15,16-dihydrotanshinone I		
	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)
15	0.2134	0.0006	0.2835	5.0462	0.0160	0.3176	0.0327	0.0015	4.5816
30	0.2309	0.0054	2.3367	4.8904	0.0616	1.2604	0.0371	0.0012	3.1755
60	0.2151	0.0003	0.1303	4.7546	0.0488	1.0254	0.0405	0.0007	1.6572

extraction time	Analytes, content								
	cryptotanshinone			tanshinone I			tanshinone IIA		
	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)	mean	SD	cv(%)
15	0.0702	0.0096	13.6866	0.0336	0.0048	14.14	0.0853	0.0086	10.0606
30	0.0809	0.0037	4.5286	0.0387	0.0014	3.6691	0.0910	0.0012	1.3476
60	0.0819	0.0006	0.7243	0.0397	0.0006	1.4020	0.0911	0.0002	0.2428

다. 단삼의 HPLC 정량법 조작 설정

단삼에 함유된 생리활성성분에 대한 새로운 HPLC 동시정량법을 다음과 같이 설정하였다. 단삼 분말 시료 (150 mesh 통과) 0.3 g을 취하여 75% methanol 50 mL를 가하여 30분간 초음파 추출한 다음 75% methanol로 그 감실량을 추가한다. 5,000 ppm의 4-hydroxycinnamic acid (I.S.) 50 μ L를 가한 후 여과하여 membrane filter (0.45 μ m) 를 통과시킨 후 그 10 uL를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다. 정량 조작을 Scheme 3에 나타내었다.



Scheme 3. Sample preparation for the analysis of marker components in *Salvia miltiorrhizae* Radix.

라. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도, 즉 salvianolic acid B, 0.2~800ug/mL; rosmarinic acid, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA, 0.2~40 ug/mL로 표시할수 있었으며 내부표준물과의 면적비를 이용한 검량선은 상관 계수 $r^2 \geq 0.999$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. 검출한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계(LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다. 이 결과는 Table 15에 나타내

있고 그래프는 Fig. 12에 나타내었다.

Table 15. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

Analytes	linear range (mg/mL)	slope(a)	intercept(b)	correlation coefficient(r)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
rosmarinic acid (1)	0.2~40	0.0663	-0.0149	0.9999	36.2	120.6
salvianolic acid (2)	0.2~800	0.0393	0.0060	0.9999	51.5	155.0
15,16-dihydrotanshinone I (3)	0.2~40	0.1522	-0.0431	0.9999	30.1	100.4
cryptotanshinone (4)	0.2~40	0.0881	-0.0031	1.0000	34.1	113.6
tanshinone I (5)	0.2~40	0.1529	-0.0424	0.9999	36.7	122.2
tanshinone IIA (6)	0.2~40	0.1510	-0.0154	0.9999	32.4	108.1

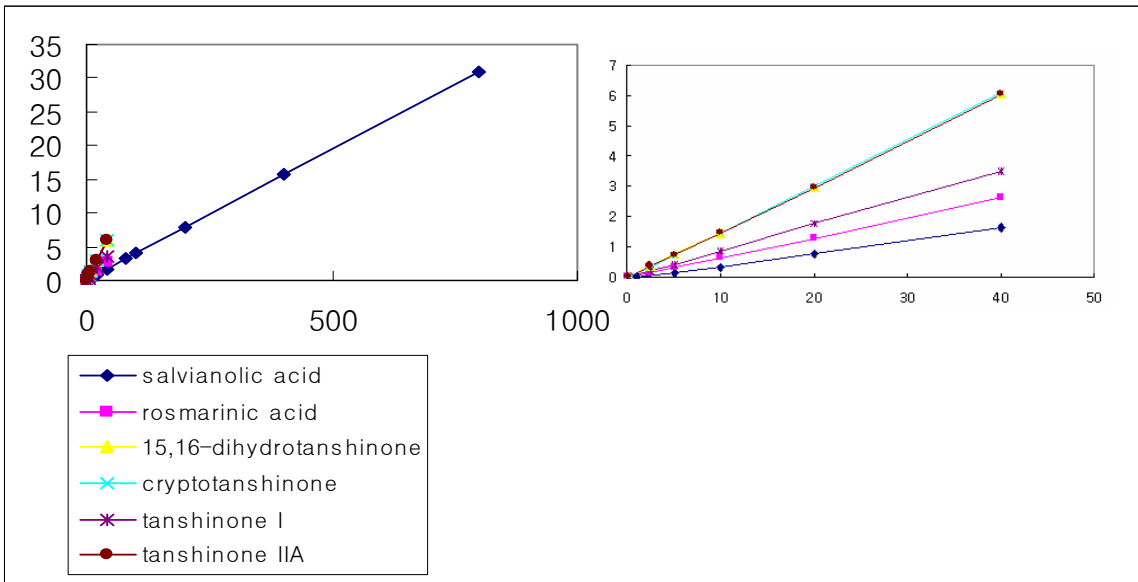


Fig. 12. Calibration graphs of ① ~ ⑥.

(2) 회수율 (recovery)

균질한 검체 분말을 추출, 여과 등 전처리 조작을 거치는 동안 지표성분의 회수율을 검토하기 위하여 표준물 첨가법에 의한 분석결과로부터 구하였다. 최종 검액 중 spike한 표준물의 농도가 대조검체의 각 성분에 대하여 20~200% 범위에서 (rosmarinic: acid 20%, 50%, 100%; 15,16-dihydrotanshinone: 50%, 100%, 150%; cryptotanshinone: 50%, 100%, 150%; tanshinone I: 50%, 100%, 150%; tanshinone IIA: 50%, 100%, 150%) 첨가한 3 batch의 검액(QC sample)과 대조검체로 표준물을 첨가하지 않은 검체를 분석하여 회수율을 구한 결과는 Table 16과 같다. Salvianolic acid B가 회수율이 80~90 %로 낮았고 tanshinone I 과 cryptotanshinone 2.0, tanshinone IIA 1.0 농도를 제외하고 전부 98 % 이상으로 나왔다.

Table 16. Recovery of marker compounds through standard addition (n=6).

analyte	fortified conc.(ug/mL)	observed conc.(ug/mL)	mean recovery(%)	recovery cv(%)
rosmarinic acid	0.0	13.66±0.18	-	-
	5.0	18.79±0.16	102.6	3.0
	10.0	23.78±0.19	101.2	3.9
	15.0	28.71±0.25	100.4	5.1
salvianolic acid B	0.0	332.84±1.81	-	-
	60.0	382.41±3.06	82.6	5.24
	150.0	465.82±4.37	88.6	4.67
	300.0	591.85±5.62	86.3	6.18
15,16-dihydrotanshi none I	0.0	1.96±0.02	-	-
	1.0	3.07±0.04	110.9	2.4
	2.0	4.07±0.04	109.5	3.3
	3.0	5.12±0.09	105.4	9.6
cryptotanshinone	0.0	5.05±0.07	-	-
	2.0	6.98±0.03	96.6	1.6
	4.0	8.99±0.09	98.7	4.4
	6.0	11.00±0.17	99.2	8.6
tanshinoen I	0.0	2.39±0.04	-	-
	1.0	3.24±0.03	84.9	3.4
	2.0	4.22±0.03	91.4	3.1
	3.0	5.24±0.05	95.8	5.0
tanshinone IIA	0.0	5.64±0.04	-	-
	1.0	7.56±0.05	96.1	2.5
	2.0	9.56±0.09	98.0	4.7
	3.0	11.57±0.14	98.8	6.9

(3) 반복성 (repeatability)

피크면적의 반복성 (repeatability)은 Table 17과 같이 salvianolic acid B를 제외하고 RSD 1 % 이내로 우수하였으며 머무름시간 (RT)의 재현성도 장기간의 실험기간 중 일간 및 일내 RSD 1% 이내를 나타내었다.

Table 17. Repeatability of peak area ratio and retention time for standard by HPLC (n=5).

compound	Peak area ratio (Peak area/IS area)			Retention time (min)		
	mean	SD	RSD(%)	mean	SD	RSD(%)
rosmarinic acid	0.6799	0.0021	0.3089	13.11	0.0460	0.3512
salvianolic acid B	0.3939	0.0116	3.03	15.09	0.0970	0.6008
15,16-dihydrotanshinone I	1.4602	0.0057	0.3693	30.70	0.0136	0.0442
cryptotanshinone	0.9009	0.0032	0.3928	33.57	0.0287	0.0855
tanshinone I	1.3341	0.0016	0.1199	34.28	0.0276	0.0804
tanshinone IIA	1.3929	0.0055	0.3952	37.66	0.0387	0.1027

(4) 정밀성 및 정확성 (precision and accuracy)

전 분석과정을 통한 분석결과의 일내 및 일간의 정확성과 정밀성은 지표성분의 표준물을 농도가 각각 다른 세 가지 농도로 첨가한 검체를 분석하여 구한 결과값으로부터 계산하였으며 그 결과를 Table 18에 나타내었다. 정확성은 표준물 첨가법에서 실제첨가한 표준물의 spike량과 표준물 첨가법에 따라 분석한 결과값의 차이로 표시하였다. 분석결과 일간 및 일내 정밀성은 salvianolic acid B를 제외하고 3% 이내였다. 일간 및 일내 정확성도 salvianolic acid B를 제외하고 모두 $\pm 3\%$ 이내였다. Accuracy는 intraday 실험에서 salvianolic acid B의 60, 150 농도 15,16-dihydrotanshinone I의 2.0 농도를 제외하고 전부 98 % ~ 102 %로 나왔고 inter-day에서 salvianolic acid B의 60, 150농도 15,16-dihydrotanshinone I의 1.0 농도를 제외하고 전부 98 % ~ 102 %로 나왔다. Precision은 intra-day 및 inter-day 실험에서 salvianolic acid B를 제외하고 전부 3 % 이내로 나왔다.

Table 18. Precision and accuracy of analytical results.

analyte	nominal conc. (ug/mL)	intraday (n=3)				interday (n=3)			
		observed	SD	accuracy	precision	observed	SD	accuracy	precision
rosmarinic acid	5.0	5.02	0.07	101.6	1.40	5.08	0.10	100.4	2.04
	10.0	10.04	0.92	100.7	0.92	10.07	0.15	100.4	1.50
	15.0	15.01	0.05	99.9	0.32	14.99	0.28	100.1	1.87
salvianolic acid B	60.0	64.31	3.24	107.2	4.03	56.71	3.34	94.51	5.89
	150.0	144.38	3.12	96.3	4.01	144.28	3.76	96.19	4.21
	300.0	294.19	3.01	98.1	3.01	303.52	4.12	101.17	4.46
15,16-dihydrotanshinone I	1.0	0.96	0.03	97.7	3.45	0.98	0.02	96.1	2.41
	2.0	2.04	0.04	104.2	2.01	2.08	0.04	102.0	1.89
	3.0	3.04	0.05	99.8	1.75	3.00	0.08	101.5	2.59
cryptotanshinone	2.0	1.97	0.03	102.3	1.67	2.05	0.04	98.7	1.80
	4.0	3.96	0.11	99.8	2.65	3.99	0.04	99.1	1.04
	6.0	6.02	0.10	98.9	1.72	5.94	0.08	100.4	1.35
tanshinone I	1.0	0.96	0.01	99.7	0.73	1.00	0.02	96.3	2.39
	2.0	1.96	0.03	97.4	1.49	1.95	0.03	98.2	1.65
	3.0	3.00	0.06	99.7	2.01	2.99	0.06	99.9	1.93
tanshinone II A	2.0	2.01	0.05	98.9	2.74	1.98	0.02	100.5	0.82
	4.0	3.95	0.05	100.2	1.36	4.01	0.12	98.7	2.94
	6.0	6.00	0.17	99.5	2.76	5.97	0.08	100.1	1.41

(5) 안정성 (stability)

본 실험에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 Table 19, Fig. 13과 같다. Rosmarinic acid, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA 등 6가지 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30일간 실험한 결과 salvianolic acid B는 상온과 냉장에서 전부 안정하지 않았으며 나머지 표준품은 상온과 냉장에서 안정하였다. Salvianolic acid B는 상온 및 냉장에서 전부 불안정하였으며 상온에서 냉장보다 더 불안정하였다. Salvianolic acid B를 제외한 다른 표준품은 상온 및 냉장에서 전부 안정하였다. 다만 15, 16-dihydrotanshinone I은 15일까지는 분해되지 않았으며 30일째는 상온에서 소량 분해되었다.

Table 19. Stability of analytes in MeOH.

analyte	Temp. °C	Day								Mean (n=8)	SD	RSD (%)
		0	0.5	1	2	5	10	15	30			
rosmarinic acid	상온	100.00	99.54	100.19	99.49	100.47	100.47	97.21	91.40	98.59	2.89	2.93
	냉장	100.00	98.85	98.36	101.13	96.76	96.76	95.21	89.93	97.13	3.25	3.34
salvianolic acid B	상온	100.00	97.25	97.25	89.46	79.12	79.12	70.92	54.62	89.91	12.26	13.63
	냉장	100.00	99.21	98.14	96.46	90.84	90.84	83.10	60.67	83.50	14.67	17.57
15,16-dihydrot anshinone I	상온	100.00	100.39	99.77	101.25	101.40	101.39	98.67	98.13	100.13	1.16	1.16
	냉장	100.00	102.34	99.04	98.93	100.41	100.41	95.61	85.26	97.75	5.05	56.16
cryptotanshinon e	상온	100.00	99.76	100.29	100.19	101.75	101.75	101.64	95.96	100.42	2.08	2.06
	냉장	100.00	99.58	98.52	98.98	101.70	101.69	100.29	94.29	99.38	2.20	2.21
tanshinone I	상온	100.00	99.38	100.77	101.43	101.89	101.88	100.02	92.50	99.73	2.86	2.87
	냉장	100.00	100.47	98.76	99.42	98.93	98.94	97.23	90.69	98.05	2.92	2.98
tanshinone IIA	상온	100.00	99.57	99.82	99.52	99.83	99.83	98.85	93.76	98.89	1.97	1.99
	냉장	100.00	99.05	97.78	97.22	96.53	96.53	96.26	90.51	96.73	2.66	2.74

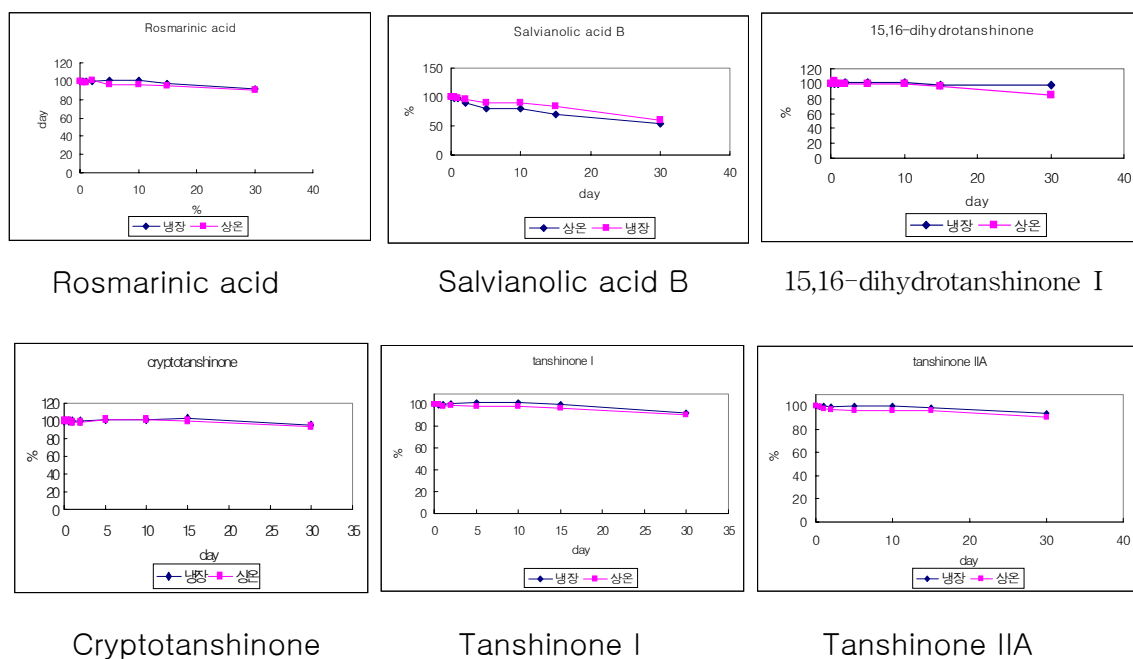


Fig. 13. Stability of analytes in MeOH.

(6) 완건성 (robustness)

완건성은 HPLC column에 따른 영향, 이동상 조건 변화, 검출 파장, 유기첨가제 영향, pH 변화, 완충 용액의 이온강도 변화, 컬럼 온도, gradient 조건의 변화 등을 임의적으로 약간씩 변화를 주었을 때 분리인자의 변화정도를 나타내는데 본 연구에서는 column의 종류와 column의 온도에 대해 검토한 결과를 Table 20, 21에 나타내었다. 컬럼의 종류를 변화시켜 **Theoretical plate (N)**, **capacity factor (k')**, **separation factor (α)**, **Resolution (Rs)** 등 상수를 검토한 결과 이론단수 및 분리도는 YMC column 이 제일 크게 나왔고 다른 상수는 큰 차이가 없었다.

Table 20. Efficiency of marker compounds in different column.

Salvia miltiorrhizae sample	Analyte content (w/w %)					
	rosmarinic acid		salvianolic acid B		15,16-dihydrotanshinone I	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Theoretical plate(N)						
ymc	10767	246	8274	226	356421	690
shisheido	6876	437	5418	223	371429	492
sodex	4825	320	3053	178	298525	280
capacity factor(k')						
ymc	5.05	0.00	5.82	0.01	12.16	0.01
shisheido	4.17	0.01	4.50	0.01	11.38	0.01
sodex	4.95	0.00	5.87	0.02	12.06	0.01
separation factor(a)						
ymc	1.51	0.01	1.15	0.01	2.09	0.00
shisheido	1.32	0.01	1.07	0.00	2.53	0.00
sodex	1.56	0.02	1.18	0.00	2.06	0.00
Resolution (Rs)						
ymc	19.84	0.32	5.78	0.32	63.91	0.54
shisheido	11.50	0.13	2.47	0.01	73.28	0.25
sodex	15.27	0.64	4.43	0.18	40.91	0.83
Salvia miltiorrhizae sample	Analyte content (w/w %)					
	cryptotanshinone		tanshinone I		tanshinone IIA	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Theoretical plate(N)						
ymc	360671	814	325287	1067	298134	1020
shisheido	377109	309	361912	890	306002	836
sodex	289657	372	262415	401	296153	418
capacity factor(k')						
ymc	13.26	0.02	13.56	0.02	14.83	0.03
shisheido	12.13	0.01	12.58	0.02	13.15	0.02
sodex	12.79	0.01	13.05	0.01	13.86	0.01
separation factor(a)						
ymc	1.09	0.00	1.02	0.00	1.09	0.00
shisheido	1.07	0.00	1.01	0.00	1.07	0.00
sodex	1.06	0.00	1.02	0.00	1.06	0.00
Resolution (Rs)						
ymc	21.84	0.07	5.58	0.14	21.26	0.05
shisheido	16.59	0.22	2.59	0.01	17.15	0.06
sodex	13.58	0.07	4.37	0.03	13.55	0.03

Table 21. Efficiency of marker compounds in different temperature.

Salvia miltiorrhizae sample	Analyte content (w/w %)					
	rosmarinic acid		salvianolic acid B		15,16-dihydrotanshinone I	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Theoretical plate(N)						
25	11979	687	7853	216	420274	988
30	10722	286	8813	134	403158	1319
35	11766	392	8758	281	421200	524
40	11066	661	8288	532	367048	1213
capacity factor(k')						
25	4.89	0.01	5.56	0.07	12.11	0.01
30	5.09	0.01	5.90	0.04	12.19	0.01
35	4.85	0.01	5.51	0.02	12.12	0.01
40	4.82	0.00	5.66	0.01	12.34	0.02
separation factor(a)						
25	1.46	0.02	1.14	0.00	2.18	0.02
30	1.60	0.00	1.15	0.00	2.06	0.01
35	1.56	0.01	1.13	0.00	2.20	0.01
40	1.54	0.01	1.17	0.00	2.18	0.01
Resolution (Rs)						
25	19.02	0.16	5.34	0.19	68.14	0.67
30	21.84	0.14	6.05	0.29	65.08	0.56
35	20.03	0.57	5.47	0.09	72.42	0.62
40	19.53	0.51	6.62	0.09	68.74	2.21
Salvia miltiorrhizae sample	Analyte content (w/w %)					
	cryptotanshinone		tanshinone I		tanshinone IIA	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Theoretical plate(N)						
25	357558	737	372946	1433	308980	1837
30	312490	406	327465	505	300496	475
35	357847	468	356196	1243	295459	272
40	344390	1234	311681	1984	286093	1649
capacity factor(k')						
25	13.19	0.01	13.48	0.03	14.77	0.02
30	13.29	0.01	13.60	0.01	14.89	0.01
35	13.20	0.01	13.48	0.01	14.77	0.01
40	13.26	0.011	13.56	0.01	14.81	0.01
separation factor(a)						
25	1.09	0.00	1.02	0.00	1.09	0.00
30	1.09	0.00	1.02	0.00	1.09	0.00
35	1.09	0.00	1.02	0.00	1.09	0.00
40	1.07	0.02	1.02	0.00	1.09	0.00
Resolution (Rs)						
25	22.72	0.04	5.41	0.24	22.50	0.50
30	21.72	0.35	5.62	0.03	21.49	0.03
35	22.56	0.04	5.37	0.08	21.82	0.35
40	18.10	0.53	5.50	0.19	20.38	0.77

마. 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 국내 중국산 수입품으로서 미룡상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 서울 제기동 수집품 중국 감속성산 (K-3), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 기정장약 중국 난주시장수집 감속성산 (C-1), 창달중약 안국시장수집품 중국 하북성산 (C-2), 창달중약 안국시장수집품 중국 산둥성산 (C-3), 성도시장수집품 사천성산 (C-4), 중국 장사시장수집품 (C-5), 성도시장 수집 (C-6), 중국 곤명시장수집품 (C-7), 중국 난주시장수집품 (C-8), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9), 중국 곤명시장수집품 운남성산 (C-10), 중국 장사시장수집품 (C-11), 중국 시상판나시장 수집품 (C-12)의 16종을 대상으로 분석한 결과는 Table 22, Fig. 14,15와 같다.

중국약전에 단삼의 salivianolic acid B 함량은 3% 이상, tanshinone IIA는 0.2% 이상을 함유하도록 규정되어 있다. Salvianolic acid B의 함량은 K-2와 C-6이 3% 이하에 해당하여 중국약전 규정에 적합하지 않았으며, 단삼 위품인 C-9은 salivianolic acid B의 peak가 전혀 검출되지 않았다. 또한 tanshinone IIA의 함량은 K-1, K-3, C-3, C-9을 제외하고 전부 0.2% 이하로서 중국약전 규정에 적합하지 않았다. 단삼 위품인 C-9에는 salivianolic acid B의 함량이 0.3% 정도로 다른 시료에 비해 매우 낮게 함유되어 있는 것이 그 특징이며, tanshinone I과, tanshinone IIA의 함량은 다른 시료에 비해 상대적으로 높았다. 위품인 C-9의 HPLC chromatogram에서 diterpene 4종(15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA) 물질의 retention time과 peak pattern은 단삼과 유사하였으며, 6종 지표성분이 모두 함유되어 있음이 LC-MS/MS 법에 의해 확인되었다.

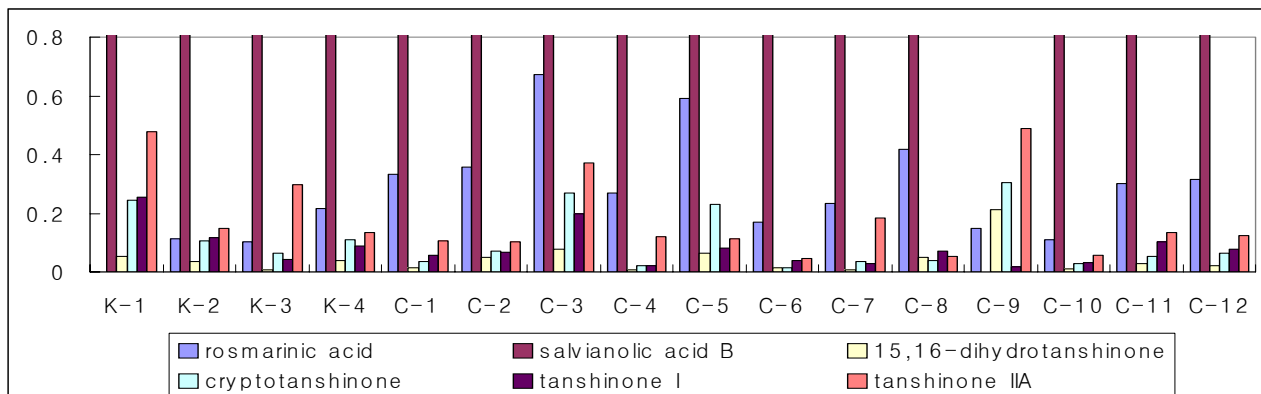
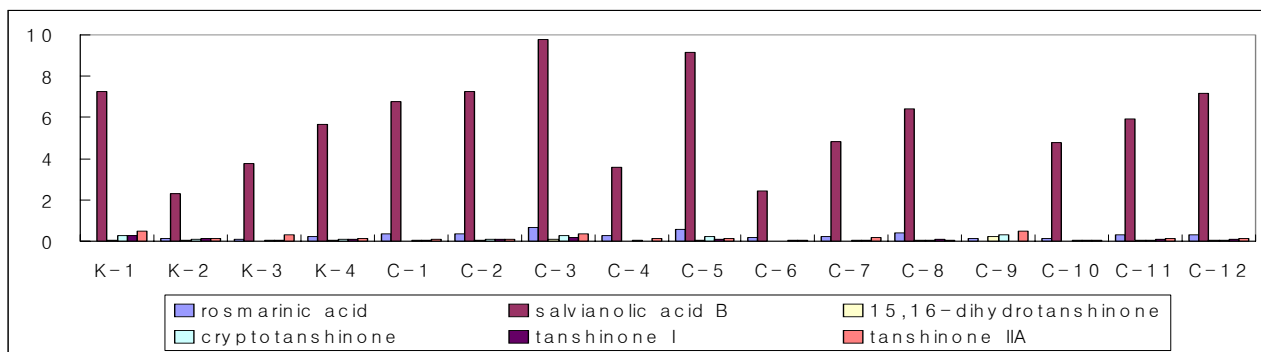


Fig. 14. Analytical results(w/w %) of the marker compounds in *Salvia miltiorrhizae* Radix.

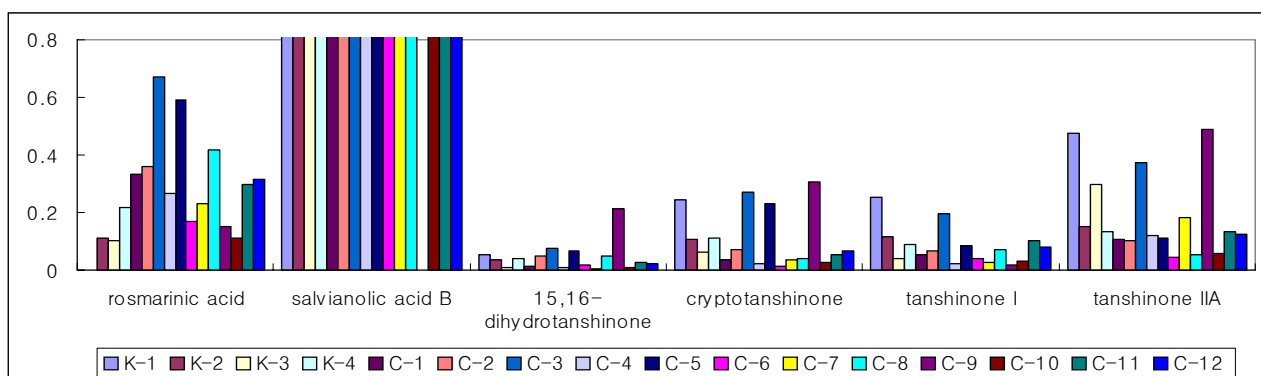
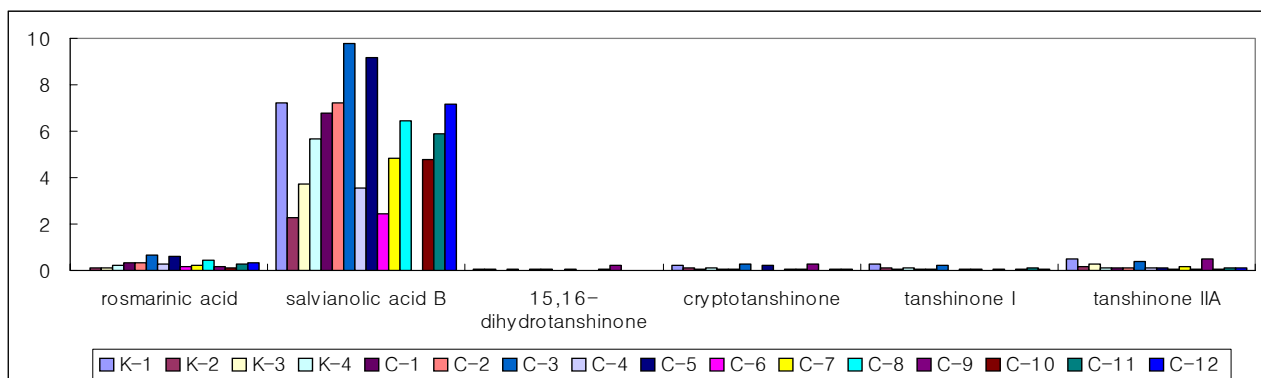


Fig. 15. Analytical results(w/w %) of the marker compounds in *Salvia miltiorrhizae* Radix.

Table 22. Analytical results(w/w %) of the marker compounds in *Salvia miltiorrhizae* Radix. (n=3)

Salvia miltiorrhizae sample	Analyte content (w/w %)					
	rosmarinic acid		salvianolic acid B		15,16-dihydrotanshinone I	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
K-1	0.2201	0.0012	7.2352	0.0712	0.0542	0.0075
K-2	0.1127	0.0008	2.2792	0.0023	0.0346	0.0030
K-3	0.1010	0.0089	3.7430	0.0379	0.0086	0.0010
K-4	0.2170	0.0026	5.6834	0.0127	0.0398	0.0005
C-1	0.3337	0.0023	6.7917	0.1036	0.0134	0.0010
C-2	0.3586	0.0041	7.2463	0.0192	0.0487	0.0001
C-3	0.6717	0.0032	9.7992	0.1055	0.0772	0.0023
C-4	0.2688	0.0075	3.5783	0.1325	0.0071	0.0006
C-5	0.5912	0.0097	9.1417	0.0269	0.065	0.0002
C-6	0.1685	0.0062	2.4274	0.0316	0.0157	0.0039
C-7	0.2328	0.0009	4.8186	0.0034	0.0058	0.0001
C-8	0.4190	0.0033	6.4239	0.0576	0.0488	0.0005
C-9	0.1490	0.0089	0.3192	0.0093	0.0864	0.0013
C-10	0.1108	0.0099	4.7821	0.0768	0.0105	0.0012
C-11	0.2992	0.0003	5.9090	0.0019	0.0272	0.0013
C-12	0.3151	0.0026	7.1792	0.0233	0.0227	0.0002

Salvia miltiorrhizae sample	Analyte content (w/w %)					
	cryptotanshinone		tanshinone I		tanshinone IIA	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD
K-1	0.2438	0.0046	0.2532	0.0022	0.4769	0.0039
K-2	0.1073	0.0010	0.1175	0.0002	0.1503	0.0012
K-3	0.0638	0.0080	0.0417	0.0060	0.2961	0.0039
K-4	0.1099	0.0006	0.0897	0.0030	0.1340	0.0008
C-1	0.0344	0.0128	0.0553	0.0045	0.1079	0.0078
C-2	0.0695	0.0003	0.0685	0.0007	0.1011	0.0013
C-3	0.2696	0.0088	0.1976	0.0007	0.3729	0.0079
C-4	0.0230	0.0036	0.0211	0.0040	0.1188	0.0012
C-5	0.2309	0.0042	0.0827	0.0024	0.1126	0.0024
C-6	0.0151	0.0067	0.0403	0.0037	0.0451	0.0007
C-7	0.0338	0.0014	0.0275	0.0001	0.1827	0.0004
C-8	0.0403	0.0032	0.0718	0.0017	0.0526	0.0005
C-9	0.2120	0.0007	0.3053	0.0046	0.4872	0.0040
C-10	0.0272	0.0009	0.0302	0.0002	0.0576	0.0003
C-11	0.0523	0.0006	0.1040	0.0006	0.1331	0.0003
C-12	0.0650	0.0002	0.0784	0.0004	0.1224	0.0004

The contents of the twelve analytes in sample of *Salvia miltiorrhizae* Radix mean \pm SD, g/100g

제2절 LC-MS/MS 방법에 의한 황금과 단삼의 활성물질들 (3종 이상)의 동시정량법 개발

1. 황금

가. LC-MS/MS 분석조건 설정

(1) HPLC 분석조건

HPLC system은 binary pump, autosampler, degasser, column oven 으로 구성된 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA) 을 이용하였다. 5% acetic acid - methanol (30 : 70, v/v) 으로 isocratic elution하였고 Luna C18 3 μ (2.1 x 150mm, Phenomenex)의 역상 컬럼으로 분리하였다. 컬럼 온도는 40 $^{\circ}$ C로 유지하였으며 유속은 0.12 mL/min으로 하였다.

Table 23. HPLC condition of *Scutellaria baicalensis*

Column	Luna C18 (150 x 2.1 mm, 3 μ)
Column Temp.	A constant temperature of about 40 $^{\circ}$ C
Mobile Phase	A mixture of diluted acetic acid (5%) and methanol (v:v =3:7)
Flow rate	0.12 mL/min (Total Analytical time within 15min)

(2) LC-MS 분석조건

MS system은 Sciex API 3000 triple-quadrupole tandem mass spectrometry (Applied Biosystems, MDS Sciex, Concord, Canada)를 사용하였다. Ion spray interface 는 turbo ion spray로써 turbo gas temperature를 350 $^{\circ}$ C에서 5.5 kV로 하여 positive ion detection mode로 측정하였다. 최적 측정 파라미터는 모든 성분 혼합물을 flow injection 하여 다음의 최적조건을 구하였다. : nebulizing gas flow, 1.46L/min (setting 12); auxiliary gas flow, 6.1L/min; curtain gas flow, 0.95L/min (setting 7); orifice voltage, 53V; ring voltage, 400V; collision gas (nitrogen) pressure, 3.58×10^{-5} Torr (setting 7) 정량은 내부표준법으로 precursor와 product ions의 multiple reaction monitoring (MRM)을 사용하였고 1/x의 weighting factor를 반영하여 면적비를 계산하였다. compound **1**, m/z 475.2 \rightarrow m/z 285.1; compound **2**, m/z 285 \rightarrow m/z 270.1; compound **3**, m/z 271.1 \rightarrow m/z 123.2; compound **4**, m/z 347.2 \rightarrow m/z 332.2; compound **6**, m/z 287.1 \rightarrow m/z 153.1; compound **8**, m/z 447 \rightarrow m/z 271; compound **9**, m/z 255.1 \rightarrow m/z 153.1 그리고 I.S, m/z 417.1 \rightarrow m/z 297.1 분석 결과는 Analyst software (version 1.4)를 사용하였다. 최적화한 MS parameter를 Table 24에, tandem MS spectra와 chromatogram을 Fig. 16-18에 나타내었다.

Table 24. Optimized MS operation parameters of *Scutellaria baicalensis*.

Optimized MS Operation Parameters						LCMS parameters rv.XLS							
CODE	Compound Name	Nominal Mass (dalton)	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Dwell time (msec)	Parameter					Parameter Table		
						DP	FP	EP	CE	CXP	NEB:		
SB-1	Wogonin-7β-D-glucuronide	474	475.2	285.1	200	42	190	9	20	20	CUR:	7	
SB-2	Wogonin	284	285	270.1	200	50	200	5	38	25	CAD:	7	
SB-3	Baicalin	270	271.1	123.2	200	45	170	10	47	23	IS:	5500	
SB-4	5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavon	346	347.2	332.2	200	70	280	7	33	10	TEM:	350	
SB-6	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavon	286	287.1	153.1	200	72	200	10	40	13	Instrument Parameters		
SB-8	Baicalin	446	447	271	200	50	200	7	30	13	Detector Parameters (Positive):		
SB-9	Chrysin	254	255.1	153.1	200	62	400	10	45	10	DF	-250	
I.S.	Puerarin	416	417.1	297.1	200	100	200	10	30	13	CEM	2100	

Note: MS spectrometer: API3000; LC system Agilent 1100 series with column oven and autosampler equipments; Software was Analyst 1.4.1 DP (declustering potential); FP (Focusing potential); CE (Collision Energy)eV; CXP (Collision Exit Potential); NEB (Nebulizer Gas Flow or Ion Spray Flow)L/min; CUR (Curtain Gas Flow)L/min; CAD (Auxiliary Gas Flow) L/min; TEM (Temperature)oC; etc. refer to the instrument operation guide

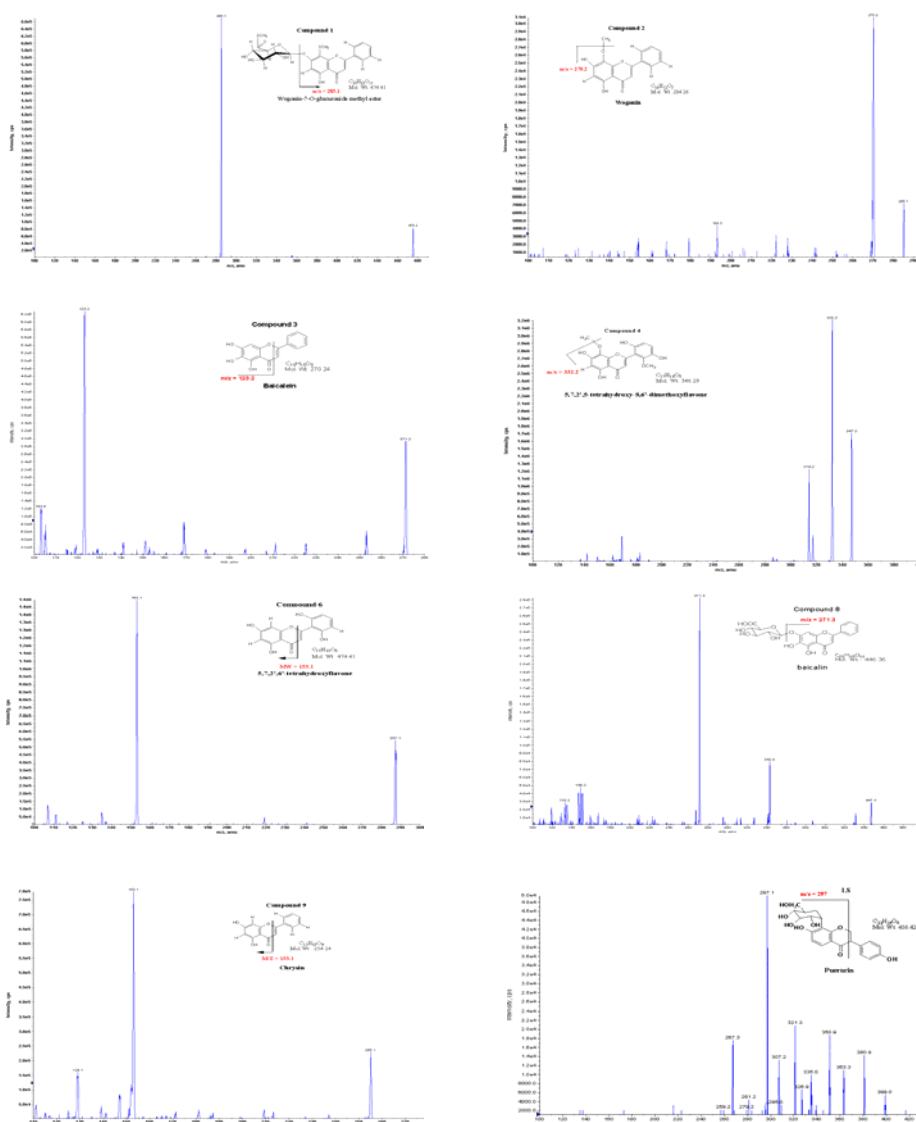


Fig. 16. Tandem MS spectra of the marker compounds (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, I.S.)

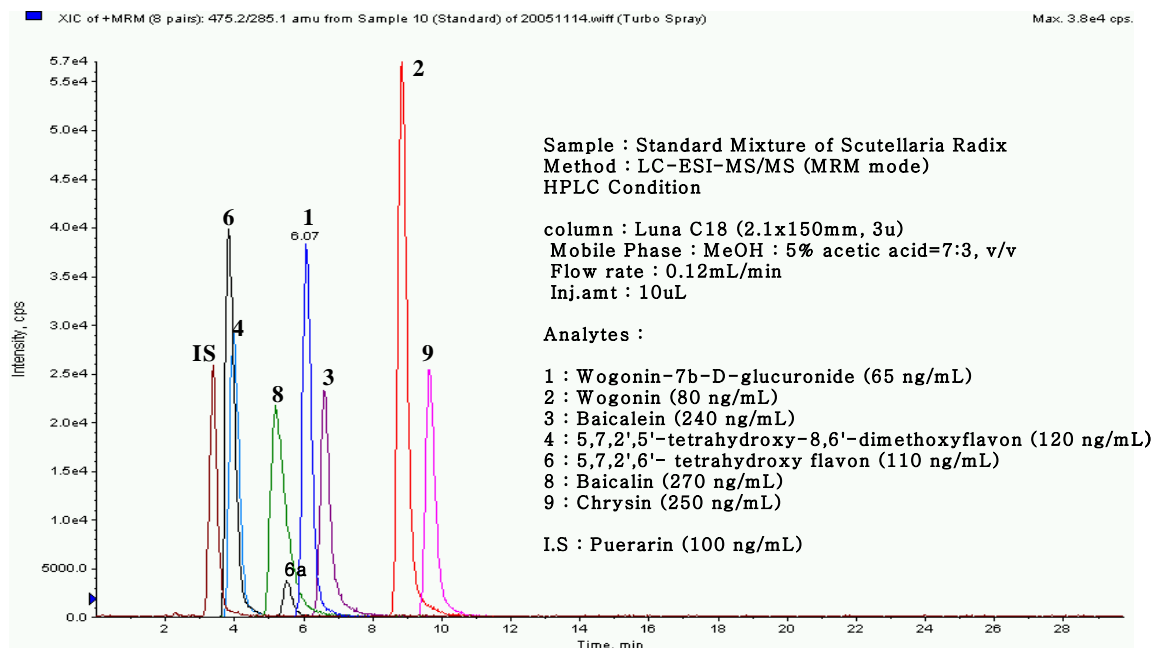
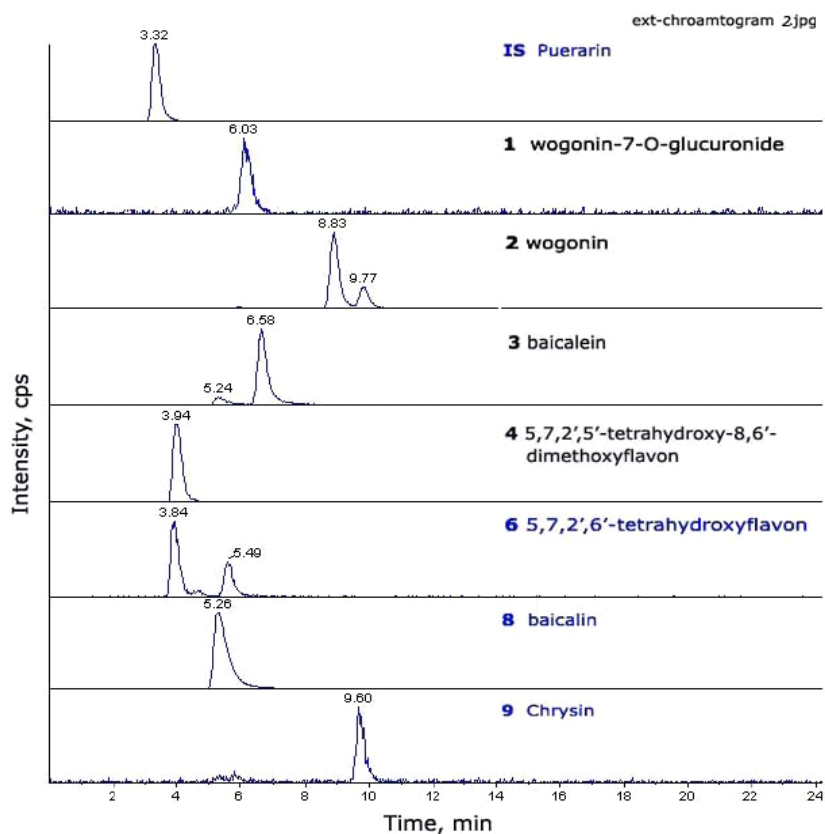


Fig. 17. HPLC-MS chromatogram of standard mixture.

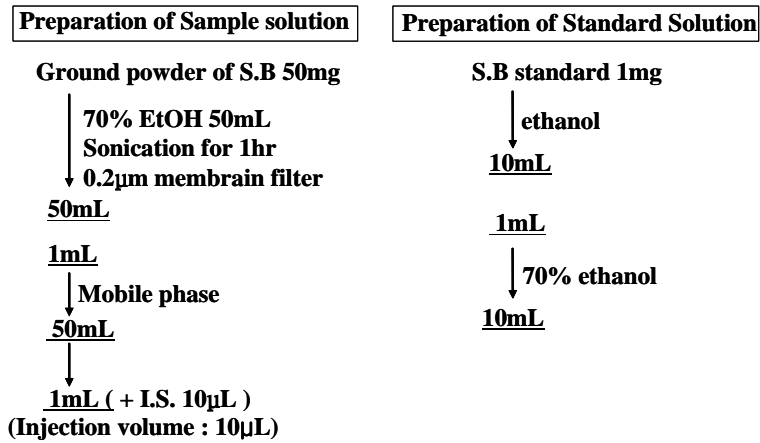


LC-tandem mass chromatograms of the seven flavonoid marker compounds from 70% ethanol extract of *Scutellaria Bicalensis*

Fig. 18. HPLC-MS chromatogram of 70 % ethanol extract.

나. 추출조건 설정

추출용매, 추출시간, 추출방법을 변화시키면서 분석에 가장 적합한 조건을 Scheme 4에 나타내었다. 황금을 가루로 한 다음 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70 % 에탄올 50 mL를 가하고 1 시간 sonication 한 후 0.2 um membrane filter로 여과한다. 여액을 1 mL 취하여 mobile phase 로 50 mL로 희석한 다음 1 mL를 취하여 internal standard (10,000 ppm) 10 uL를 가한 후 그 10 uL를 취하여 injection 한다.



Scheme 4. Analytical procedure of *Scutellaria baicalensis*

다. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 지표성분의 정량범위는 검토한 각 성분의 농도에서 직선성을 나타내는 농도, 즉 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, 0.2ng/mL~1020ng/mL; wogonin, 0.3ng/mL~1440ng/mL, baicalein, 1.1ng/mL~1100ng/mL, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 1.3ng/mL~1320ng/mL, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, 1.2ng/mL~1180ng/mL, baicalin, 1.0ng/mL~970ng/mL, chrysin, 1.1mg/mL~1090ng/mL로 표시할 수 있었으며 내부표준물과의 면적비를 이용한 검량선은 상관계수 $r^2 \geq 0.999$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. 검출한계 (LOD)는 신호대 잡음비 (S/N)=3을 기준으로 정하였고, 정량한계 (LOQ)는 S/N=10을 나타내는 농도로써 표기하였다. 이 결과는 Table 25에 나타내었고 그래프는 Fig. 19에 나타내었다.

Table 25. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

Compound	a	b	R	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
1. wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester	0.01050	0.00049	0.9998	0.02	0.2
2. wogonin	0.01580	0.00175	0.9999	0.01	0.3
3. baicalein	0.00199	-0.00076	0.9999	0.14	1.1
4. 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone	0.00274	0.00015	0.9999	0.37	1.3
6. 5,7,2',6'- tetrahydroxyflavone	0.00467	0.00332	0.9997	0.52	1.2
8. baicalin	0.00264	0.00220	0.9998	0.12	1.0
9. chrysin	0.00194	0.00124	0.9999	0.11	1.1

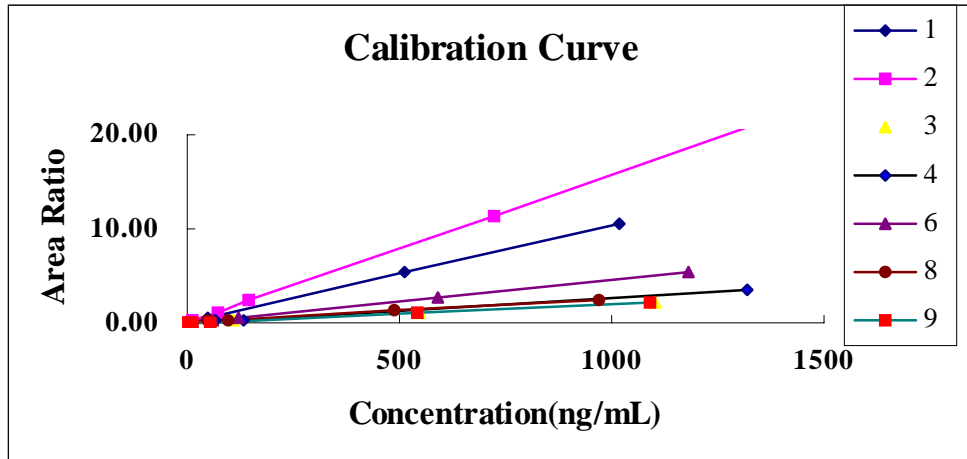


Fig. 19. Calibration graphs of 1 ~ 9.

(2) 회수율 (recovery)

Table 26은 추출회수율의 결과를 나타낸 표이다. 황금의 회수율은 황금의 지표성분과 구조가 비슷한 surrogate standard (puerarin)를 사용하였다. Surrogate standard 의 최종 농도가 10, 500, 1000 ng/mL 이 되도록 첨가하여 반복 측정 (n = 4) 하였다. 추출 회수율은 95.1 - 98.8 % 이내이다.

Table 26. Recovery of marker compounds through standard addition (n=4).

Nominal concentration (ng/mL)	Recovery (%) (mean ± S.D.)
10	98.8 ± 0.93
500	95.1 ± 0.53
1000	97.7 ± 2.47

(3) 정밀성 및 정확성 (Precision and Accuracy)

Table 27은 정확성과 정밀성에 대한 실험 결과를 나타낸 표이다. 일내와 일간의 정밀성과 정확성은 세 개의 다른 농도의 QC sample 분석에 의하여 정하였다. 정밀성은 반복 실험에 대한 RSD(%)로 정의하였다. 일내와 일간의 정밀성 (RSD%)은 각각 0.42 - 1.64 % 와 0 - 9.73 % 이며, 정확성은 일내 98.0 - 104.8%, 일간 95.2 - 109.3 % 이다. 황금의 정밀성 및 정확성은 황금의 지표성분과 구조가 비슷한 surrogate standard (puerarin)를 사용하였다.

Table 27. Precision and accuracy of analytical results.

Intra-Mean(n=3)				
conc.(ng/ml)	Area	RSD (%)	Cal. ConC	Accuracy (%)
0	0			
10	1.95E+04	0.78	9.8	98.0
500	7.39E+05	1.64	520.3	104.3
1000	1.39E+06	0.42	979.7	98.0
Inter-Mean(n=3)				
conc.(ng/ml)	Area	RSD (%)	Cal. ConC	Accuracy (%)
0	0			
10	1.95E+04	0.00	9.5	95.2
500	7.15E+05	3.47	547.3	109.3
1000	1.24E+06	9.73	953.0	95.3
Mean				
conc.(ng/ml)	Area	RSD (%)	Cal. ConC	Accuracy (%)
0	0			
10	1.95E+04	0.39	9.7	96.6
500	7.27E+05	2.54	533.8	106.8
1000	1.32E+06	4.82	966.3	96.6

(4) 안정성 (stability)

본 실험에서 표준품의 용액에 대한 안정성은 Fig. 20과 같다. Wogonin-7-O-glucuronic acid methyl esger, wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxy flavone, baicalin, chrysin 등 7가지 표준품에 대하여 상온과 냉장에서 메탄올 용매에서의 안정성에 관하여 30 일간 실험한 결과 baicalein과 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy-flavone을 제외하고 전부 안정하였다.

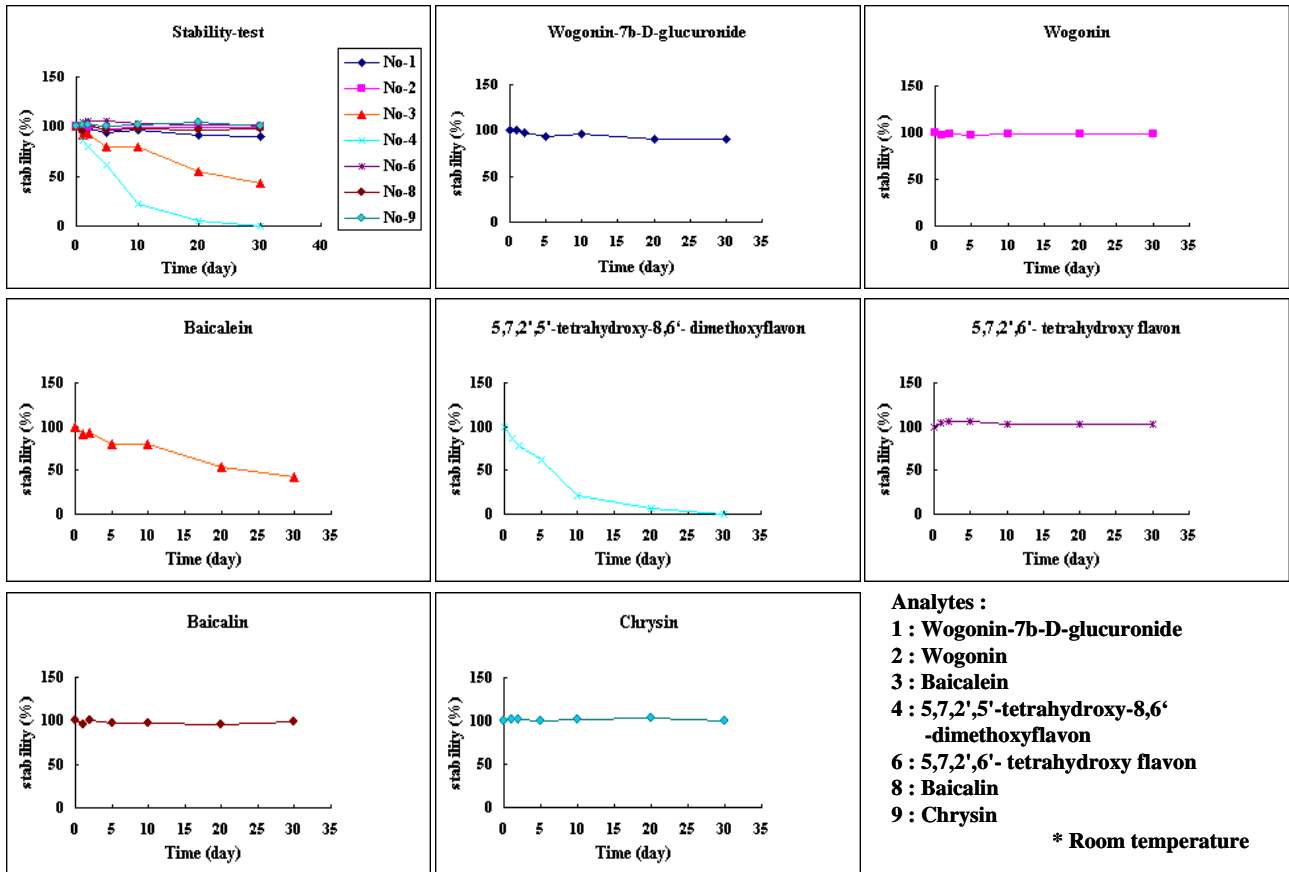


Fig. 20. Stability of standard mixture.

라. 황금 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 채배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 분석한 결과는 Table 28에 나타내었다.

황금의 주요 성분은 baicalin (compound 5)으로 대한약전 (KP)에 10 % 이상(중국약전 9 % 이상)을 함량으로 규정되어 있다. 8종의 시료 중 KJG-2 시료는 baicalin 함량이 7.13%로서 대한약전 규정 미만이었으며 나머지 7종의 시료는 전부 10 % 이상이었다. Wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, chrysin, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone 성분은 각 시료에서 함량이 비슷하게 나왔으며 크게 차이가 나지 않았다. Wogonin, baicalein, 5,7,2',6'- tetrahydroxyflavone 성분은 DAE-KOR 시료에서 함량이 다른 시료에 비하여 적게 나타났다.

Table 28. Analytical results(w/w %) of the marker compounds in *Scutellaria baicalensis*.
(n=3)

SAMPLE	contents (w/w%)			
	Wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester(1)	wogonin (2)	baicalein (3)	5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone (4)
SUNCHN	0.0075 ± 0.0003	0.2034 ± 0.0055	0.7847 ± 0.0070	0.1371 ± 0.0006
GYD-KOR	0.0084 ± 0.0003	0.3595 ± 0.0153	0.8688 ± 0.0280	0.2794 ± 0.0182
GYD-CHN	0.0050 ± 0.0002	0.4088 ± 0.0135	1.4128 ± 0.0262	0.1229 ± 0.0042
DAE-KOR	0.0079 ± 0.0001	0.1400 ± 0.0037	0.5000 ± 0.0045	0.1100 ± 0.0003
DAE-CHN	0.0067 ± 0.0002	0.3780 ± 0.0154	2.0123 ± 0.0068	0.1767 ± 0.0108
UNI-CAT	0.0085 ± 0.0002	0.0849 ± 0.0003	0.5814 ± 0.0026	0.1114 ± 0.0032
KJG-1	0.0062 ± 0.0001	0.5104 ± 0.0016	3.0388 ± 0.0437	0.1812 ± 0.0009
KJG-2	0.0062 ± 0.0002	0.2540 ± 0.0050	0.7067 ± 0.0022	0.0603 ± 0.0005
	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone (6)	baicalin (8)	chrysin (9)	
SUNCHN	0.0531 ± 0.0013	19.40 ± 0.4271	0.0271 ± 0.0006	
GYD-KOR	0.0697 ± 0.0028	23.32 ± 0.9757	0.0280 ± 0.0006	
GYD-CHN	0.1282 ± 0.0020	14.67 ± 0.4214	0.0785 ± 0.0006	
DAE-KOR	0.0360 ± 0.0008	19.53 ± 0.8817	0.0105 ± 0.0006	
DAE-CHN	0.0475 ± 0.00158	18.97 ± 0.2954	0.0320 ± 0.0009	
UNI-CAT	0.0745 ± 0.0018	18.15 ± 0.0957	0.0737 ± 0.0002	
KJG-1	0.0629 ± 0.0016	17.22 ± 0.1506	0.0629 ± 0.0009	
KJG-2	0.0975 ± 0.0019	7.13 ± 0.2483	0.0297 ± 0.0002	

The contents of the eight analytes in sample of *Scutellaria baicalensis* mean ± SD, g/100g.

2. 단삼

가. LC-MS/MS 분석조건 설정

(1) Mass spectra

Ion spray interfacer는 터보 가스 온도 360 °C 와 함께 5.5 kV에서 양이온모드로 사용하였다. 최적 측정 파라메타는 모든 성분 혼합물을 흐름주입(flow injection)하여 최적조건을 구하였고 다음 조건으로 정량하였다. : nebulizing gas flow, 1.31 L/min (setting 11); auxiliary gas flow, 6.1 L/min; curtain gas flow, 1.25 L/min (setting 10); orifice voltage, 53V; ring voltage, 400V, collision gas (nitrogen) pressure, 3.58 x 10⁻⁵Torr(setting7). 단삼의 지표성분들의 정량은 내부표준법에 의해 precursor 와 그와 관련된 product 이온의 MRM 방법으로 분석하였다. 지표성분들과 I.S의 특징적인 이온 변화는 T-I (m/z 277 → m/z 249), T-IIA (m/z 295 → m/z 277), DT (m/z 279 → m/z 261), CT (m/z 297 → m/z 251), SA (m/z 719 → m/z 520), RA (m/z 361 → m/z 163), I.S (m/z 271 → m/z 203) 이다.

지표성분들의 LC-MS/MS조건은 지표성분 각각을 이동상에 약 100 ng/mL이 되도록 희석하여 유속 10 uL/min으로 직접 주입하여 최적화하였다. 단삼의 75% methanol 추출물에 대한 지표성분의 MS/MS분석을 위한 이온화방법으로 전자분무이온화 (ESI)의 양이온 모드의 검출법을 사용하였다. 혼합물을 HPLC 분리한 다음 ESI 양이온 모드에서 높은 수율로 이온화시킨다(Q1). 이 분자 adduct 이온

(precursor ion)을 Q2에서 CID(collisionally induced dissociation) 과정을 통해 분해되는 product fragments를 scanning 하여(Q3) 얻어지는 주요 딸이온(daughter ion)을 그 성분의 특징적 피크로 정하여 mass 분리분석이 이루어지는 multiple reaction monitoring (MRM) 방법을 이용하였다. 단삼의 6개의 지표성분과 I.S.에서 가장 많이 생성된 이온형은 모두 $[M+H]^+$ 이었다. 가장 많이 나타난 fragment는 LC-MS 분석을 위해 Q3에서 scan 하였으며, 그 결과는 Fig. 21에서와 같다. Tanshinone I의 대부분의 fragment 는 “CO” 를 잃은 $[M+H-28]^+$ 이고 tanshinone IIA와 15,16-dihydrotanshinone I의 대부분의 fragment는 “H₂O” 를 잃은 $[M+H-18]^+$ 이다. LC-MS-MS에 대한 HPLC 분석조건은 HPLC/DAD 분석과 동일하다. Sciex API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Concord, Canada)를 사용하였으며, $[M+H]^+$ 를 생성하기 위해 Turbolon Spray interface를 부착하였다.

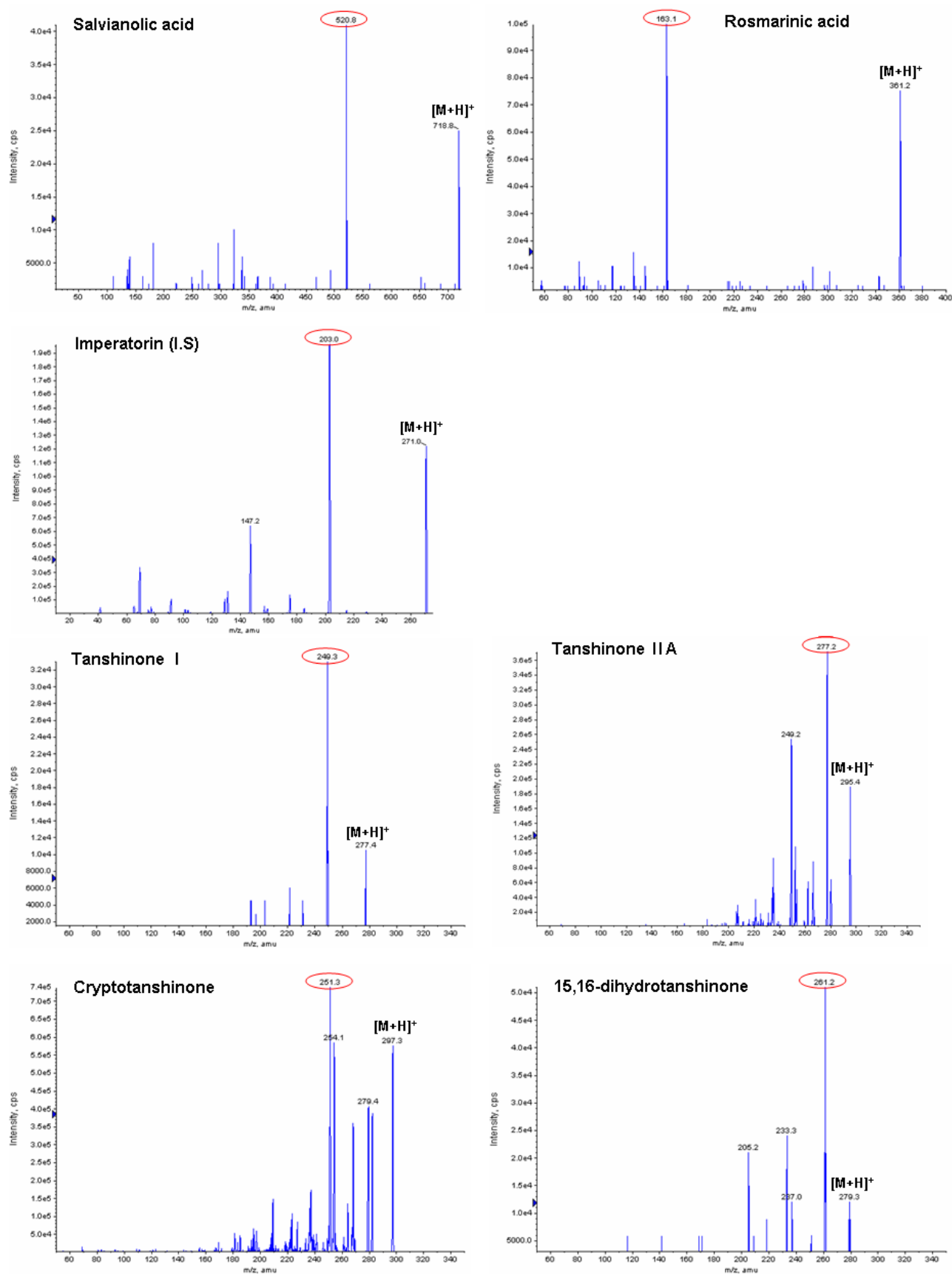


Fig. 21. Mass–mass spectra of six standards and I.S. using electrospray ionization mode.

(2) 크로마토그래피 (Chromatography)

Fig. 22의 크로마토그램은 표준품 혼합물과 실제 단삼 시료를 비교한 그림이다. 표준품 혼합물의 각 농도는 T-I (108 ng/mL), T-IIA (92 ng/mL), CT (95 ng/mL), DT (66 ng/mL), SA (1500 ng/mL), RA (475ng/mL)이고 I.S의 농도는 (6.4 ng/mL)이며 분석물질의 머무름 시간은 T-I (5.4 분), T-IIA(8.0분), CT(5.7분), DT(4.2분), SA(2.3분), RA(2.0분), I.S(3.6분)이다.

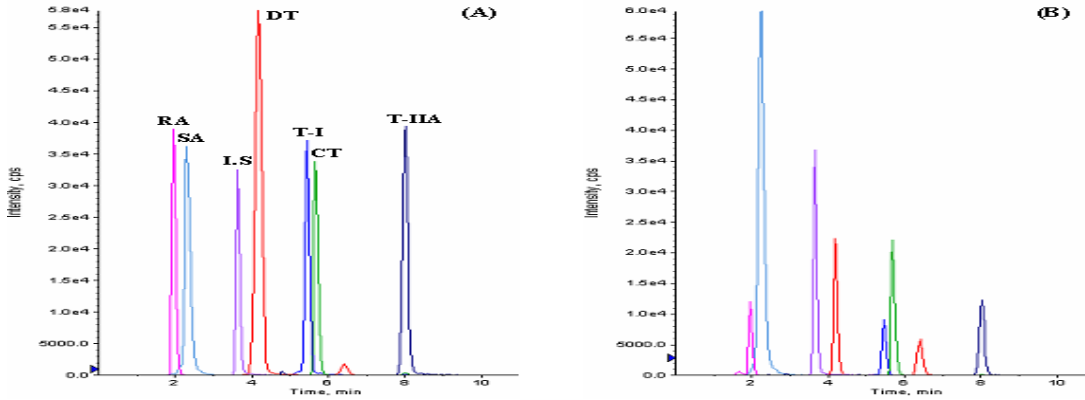


Fig. 22. Typical chromatogram of standard mixture (A) and sample (B).

최적의 조건 탐색에서 효과적인 이온화를 위하여 이동상에 산(formic acid)을 첨가하였다. Formic acid를 포함한 이동상이 acetic acid를 포함한 이동상보다 분석물질들의 감도가 더 높게 나타났으며 두 이동상간의 머무름 시간에는 차이가 거의 없었다.

내부표준물로 사용한 Imperatorin은 한약재 지질의 성분 중 하나로 단삼에는 그 성분을 포함하지 않으며 머무름 시간이 ~ 3.7 분대에 용출되어 다른 분석 성분들과 비교할 때 적절하였다.

Salvianolic acid B와 rosmarinic acid 는 음이온모드(negative ion mode)에서 감도가 우수하였으나 다른 4성분과 동시분석을 위하여 양이온 모드에서 분석하였다. 두 acid 성분의 양이온 모드로 분석 시 여러 번 반복 주입한 결과 재현성이 좋았으며 정량에는 문제가 없었다.

나. 분석방법 검증 (Validation)

(1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계 (Linearity, range, LOD and LOQ)

각 물질들의 검량선은 Table 29에서와 같은 농도 범위로 제조하여 표준물질과 내부표준물 의 면적비로 1/x 의 weighting factor 고려하여 나타내었으며 그 결과 좋은 직선성을 나타내었다. ($R \geq 0.9995$) 검량선의 최저 농도는 정량한계(LOQ , limit of quantification)로 정의하였고, 검출한계 (LOD, limit of detection)는 각 성분의 신호 대 잡음 비 ($S/N = 3:1$)을 나타내는 농도로 정의하였다.

Table 29. Calibration curves of 6 analytes.

Analytes	Linear Range (ng/mL)	Slope (a)	Intercept (b)	Coefficient (R)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
tanshinone I	0.92 ~ 92	0.0202	-0.00119	0.9999	0.26	0.92
tanshinone II A	1.08 ~ 108	0.0290	0.00218	0.9998	0.31	1.08
15, 16-dihydrotanshinone I	0.66 ~ 66	0.0552	0.00614	0.9998	0.24	0.95
cryptotanshinone	0.95 ~ 95	0.0218	0.00613	0.9995	0.14	0.66
salvianolic acid B	7.50 ~ 1500	0.0028	-0.00444	0.9996	2.30	7.5
rosmarinic acid	4.75 ~ 475	0.0037	-0.00425	0.9995	1.33	4.75

(2) 회수율 (recovery)

전 분석과정에 있어서 성분의 회수율을 검토하기 위해 시료 중 예상되는 각 성분의 함량을 기준으로 10, 20, 50, 100%로 추정되는 4농도에 대하여 표준물을 첨가하였다. 표준물을 첨가하여 조제한 QC sample 5 batch (1 control) 에 대하여 각 5 회씩 분석하여 회수율을 구한 결과는 Table 30과 같다. 각 성분의 회수율은 tanshinone I 96.2 - 101.9 %, tanshinone IIA 96.3 - 101.8 %, cryptotanshinone 96.7 - 101.3 %, 15,16-dihydrotanshinone I 96.1 - 99.5 %, rosmarinic acid 97.5-99.9%로 모두 높은 회수율을 보인다. 각 농도에 대한 회수율의 %RSD는 5 % 미만이다.

Table 30. Analytical results of recovery (n = 5)

Analytes	Added analytes conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
tanshinone I	0	18.82 ± 0.75	-	-
	1.84	20.62 ± 0.09	97.4	4.91
	3.68	22.41 ± 0.12	97.5	3.28
	9.20	27.68 ± 0.18	96.2	2.03
	18.40	37.57 ± 0.30	101.9	1.61
tanshinone II A	0	23.95 ± 0.39	-	-
	2.70	26.57 ± 0.07	96.8	2.85
	5.40	29.30 ± 0.18	99.0	3.38
	13.61	37.81 ± 0.24	101.8	1.73
	27.00	49.96 ± 0.54	96.3	2.08
cryptotanshinone	0	18.21 ± 0.39	-	-
	1.52	19.64 ± 0.28	101.3	4.33
	3.04	21.15 ± 0.10	96.7	3.38
	7.60	25.79 ± 0.24	99.8	3.15
	15.20	33.37 ± 0.48	99.7	3.20
15, 16-dihydrotanshinone I	0	7.61 ± 0.15	-	-
	0.66	8.23 ± 0.06	97.2	4.62
	1.32	8.88 ± 0.05	96.1	4.11
	3.30	10.89 ± 0.10	99.5	3.11
	6.60	14.13 ± 0.20	98.7	3.13
rosmarinic acid	0	55.10 ± 1.29	-	-
	4.75	59.77 ± 0.12	98.1	2.66
	9.50	64.38 ± 0.24	97.6	2.55
	23.94	79.03 ± 0.45	99.9	1.89
	47.88	101.06 ± 1.88	97.5	1.28

(3) 정밀성 및 정확성 (Precision and Accuracy)

정밀성(precision)은 QC sample을 일내(intra-day), 일간(inter-day)으로 각각3회, 4회씩 분석하여 나타내었다. Table 31은 첨가된 분석물질의 농도에 대해 relative standard deviation(RSD, %)와 accuracy(%)를 나타낸 표이다. 모든 분석물질의 precision(RSD)은 일내 0.18 ~ 13.44 %, 일간 0.40 ~ 15.37 % 이내이고 accuracy (%)는 일내 91.9 ~ 104.7 %, 일간 90.8 ~ 104.8 % 이내이다.

Table 31. Analytical results of intra-day and inter-day.

Analytes	Added Conc. (ng/mL)	Intra - assay (n=3)			Inter - assay (n=3)		
		Observed conc. (ng/mL)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)	Observed conc. (ng/mL)	Precision (RSD %)	Accuracy (%)
tanshinone I	1.84	1.74 ± 0.23	13.09	94.3	1.93 ± 0.30	15.37	104.8
	3.68	3.52 ± 0.22	6.36	95.7	3.71 ± 0.22	6.00	100.8
	9.20	8.73 ± 0.12	1.37	94.9	8.88 ± 0.22	2.47	96.5
	18.40	18.68 ± 0.03	0.18	101.5	18.54 ± 0.13	0.72	100.8
tanshinone II A	2.70	2.52 ± 0.11	4.20	93.3	2.55 ± 0.16	6.09	94.4
	5.40	5.39 ± 0.24	4.42	99.9	5.31 ± 0.21	3.96	98.4
	13.61	14.25 ± 0.47	3.31	104.7	14.07 ± 0.22	1.55	103.4
cryptotanshinone	27.00	26.69 ± 0.30	1.11	98.9	26.80 ± 0.11	0.40	99.3
	1.52	1.41 ± 0.19	13.44	92.5	1.72 ± 0.12	7.26	102.8
	3.04	2.90 ± 0.10	3.34	95.5	3.04 ± 0.10	3.39	100.0
15, 16-dihydrotanshinone I	7.60	7.75 ± 0.26	3.30	102.0	7.56 ± 0.13	1.74	99.5
	15.20	15.19 ± 0.12	0.79	99.9	15.23 ± 0.07	0.45	100.2
	0.66	0.65 ± 0.08	12.41	98.9	0.60 ± 0.09	15.25	90.8
rosmarinic acid	1.32	1.31 ± 0.10	7.33	99.1	1.26 ± 0.07	5.85	95.6
	3.30	3.43 ± 0.18	5.22	104.0	3.37 ± 0.13	3.95	102.2
	6.60	6.54 ± 0.06	0.99	99.0	6.58 ± 0.06	0.93	99.7
	4.75	4.37 ± 0.37	8.44	91.9	4.77 ± 0.44	9.23	100.3
	9.50	9.16 ± 0.23	2.46	96.4	9.54 ± 0.48	5.00	100.4
	23.94	24.56 ± 1.35	5.49	102.6	24.50 ± 0.46	1.89	102.3
	47.88	47.50 ± 1.21	2.55	99.2	47.70 ± 0.85	1.78	99.6

다. 단삼 중 생리활성 성분 함량 분석 (assay)

Table 32와 Fig. 23은 구입처가 다른 15종의 단삼에 대하여 6개의 지표성분을 분석한 결과를 나타낸 표이다. 단삼 시료 15종은 현재 중국과 한국에서 유통 중인 상품을 대상으로 수집하였다. 단삼의 주요성분인 salvianolic acid B의 함량은 2.4 - 10.2 %로 구입처에 따라 다양한 함량 변화를 나타내었다. 또한 단삼 중에 rosmarinic acid의 함량은 0.13 - 0.66 %로 나타났다. Tanshinone IIA는 중국 약전규정에서 0.2 % 이상이지만 k-1, k-3, c-3을 제외한 나머지 시료는 전부 0.2 % 미만이었다.

Table 32. The contents (w/w%) of 6 analytes in *Salvia miltiorrhizae* Radix from different sources. (n=3)

Sample Name	tanshinone I	tanshinone II A	crypto tanshinone	15,16-dihydro tanshinone I	salvianolic acid B	rosmarinic acid
K-1	0.293 ± 0.002	0.438 ± 0.010	0.285 ± 0.005	0.058 ± 0.002	7.367 ± 0.153	0.280 ± 0.006
K-2	0.099 ± 0.005	0.159 ± 0.004	0.096 ± 0.003	0.032 ± 0.001	2.363 ± 0.077	0.136 ± 0.005
K-3	0.047 ± 0.002	0.254 ± 0.004	0.072 ± 0.002	0.007 ± 0.000	3.875 ± 0.063	0.126 ± 0.001
K-4	0.086 ± 0.004	0.111 ± 0.004	0.084 ± 0.003	0.035 ± 0.001	5.533 ± 0.144	0.281 ± 0.012
C-1	0.053 ± 0.001	0.084 ± 0.001	0.037 ± 0.001	0.013 ± 0.000	6.683 ± 0.104	0.380 ± 0.008
C-2	0.072 ± 0.002	0.082 ± 0.001	0.063 ± 0.001	0.040 ± 0.002	7.100 ± 0.3.12	0.338 ± 0.006
C-3	0.206 ± 0.002	0.359 ± 0.003	0.254 ± 0.006	0.076 ± 0.003	10.167 ± 0.153	0.657 ± 0.008
C-4	0.016 ± 0.001	0.111 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.005 ± 0.000	3.835 ± 0.087	0.240 ± 0.004
C-5	0.081 ± 0.003	0.119 ± 0.003	0.240 ± 0.007	0.064 ± 0.002	9.250 ± 0.100	0.628 ± 0.008
C-6	0.040 ± 0.002	0.040 ± 0.000	0.018 ± 0.001	0.016 ± 0.001	2.602 ± 0.053	0.163 ± 0.003
C-7	0.022 ± 0.001	0.162 ± 0.003	0.030 ± 0.001	0.004 ± 0.000	4.163 ± 0.099	0.207 ± 0.003
C-8	0.071 ± 0.002	0.075 ± 0.001	0.045 ± 0.002	0.049 ± 0.001	6.950 ± 0.260	0.409 ± 0.005
C-9	0.170 ± 0.003	0.370 ± 0.003	0.418 ± 0.002	0.060 ± 0.001	0.350 ± 0.004	0.220 ± 0.004
C-10	0.032 ± 0.001	0.062 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.009 ± 0.000	4.483 ± 0.115	0.188 ± 0.002
C-11	0.092 ± 0.001	0.114 ± 0.002	0.058 ± 0.002	0.024 ± 0.000	5.850 ± 0.218	0.310 ± 0.004
C-12	0.077 ± 0.002	0.113 ± 0.001	0.065 ± 0.001	0.021 ± 0.001	6.67 ± 0.058	0.368 ± 0.005

The contents of the eight analytes in sample of *Salvia miltiorrhizae* Radix mean ± SD, g/100g

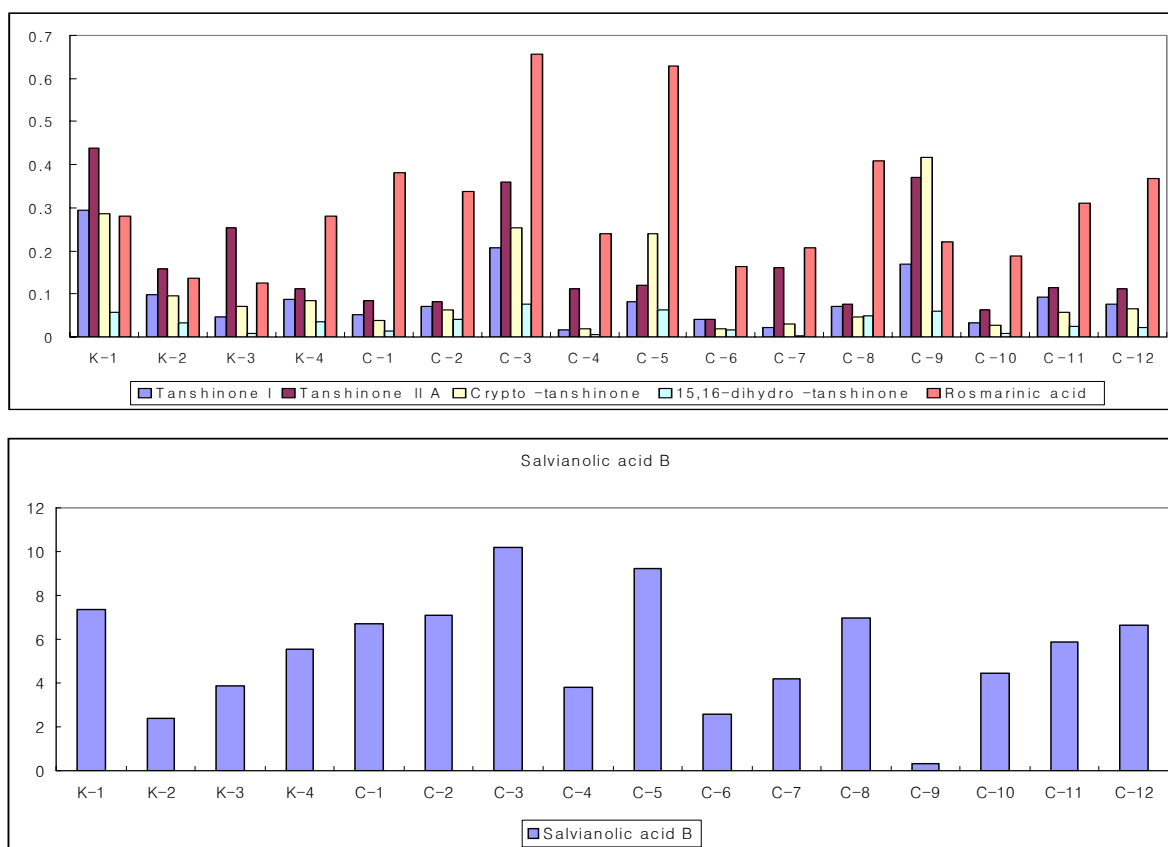


Fig. 23. Analytical results of *Salvia miltiorrhizae* Radix obtained from different markets.

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

황금과 단삼의 생리활성성분에 대하여 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 동시분석법을 개발하였으며, 동시분석법의 validation을 통하여 동시분석법의 타당성을 입증하였으며 본 연구에서는 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황금의 경우 HPLC/UV 법은 wogonin (2), baicalein (3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy flavone (4), baicalin (8), chrysin (9), oroxylin A (10)의 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였으며, LC-MS/MS 법은 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester(1), wogonin(2), baicalein (3), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(4), 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone(6), baicalin(8), chrysin(9)의 7종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 위의 성분에 대하여 r^2 가 0.999 이상의 직선성에 해당하는 검량선(calibration curve)을 얻었다.

2. 단삼의 경우 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법 모두 rosmarinic acid (1), salvianolic acid B (2), 15,16-dihydrotanshinone I (3), cryptotanshinone (4), tanshinone I (5), tanshinone IIA (6)의 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 위의 성분에 대하여 r^2 가 0.999 이상의 직선성에 해당하는 검량선(calibration curve)을 얻었다.

3. 확립한 분석법에 따라 구입처가 다른 8종의 황금 시료를 대상으로 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 지표성분의 함량을 동시 분석하였다. 시중 황금의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 순천시장구입 국산 재배 (SUNCHN), 경동시장구입 국산 (GYD-KOR), 경동시장구입 중국산 (GYD-CHN), 대구약령시 구입 국산 (DAE-KOR), 대구약령지구입 중국산 (DAE-CHN), 김재길 박사가 구입한 상품시료 (KJG-1), 김재길 박사가 구입한 하품시료 (KJG-2)를 대상으로 지표성분의 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법에서 baicalin 은 두 가지 방법에서 오차가 최대 2 % (황금 중 baicalein 의 함량이 높은 원인으로 간주됨)까지 되었으며 대부분의 시료는 오차가 1 % 미만 이었다. wogonin baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone 시료는 오차가 0.5 % 미만이었다.

4. 확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 16종의 단삼 검체 중 지표성분의 함량을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 동시 분석하였다. 시중 단삼의 구입처 및 종류에 따른 함량을 검토하기 위하여 국산으로서 강원도 철원 재배 (K-1, 2005년 11월 수확), 국내 중국산 수입품으로서 미룡상사에서 수입 (K-2, 06년 2월 수입), 서울 제기동 수집품 중국 감속성산 (K-3), 대구 약령시 국산 구입 (K-4, 2005년 4월 구입), 기정장약 중국 난주시장수집 감속성산 (C-1), 창달중약 안국시장수집품 중국 하북성산 (C-2), 창달중약 안국시장수집품 중국 산둥성산 (C-3), 성도시장수집품 사천성산 (C-4), 중국 장사시장수집품 (C-5), 성도시장 수집 (C-6), 중국 곤명시장수집품 (C-7), 중국 난주시장수집품 (C-8), 난주시장에서 수집한 위품 (C-9), 중국 곤명시장수집품 운남성산 (C-10), 중국 장사시장수집품 (C-11), 중국 시상판나시장 수집품 (C-12)의 16종을 대상으로 분석하였다. 함량 분석 결과 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법에서 salvianolic acid B는 두 가지 방법에서 0.3 % 미만이었고 나머지 성분들은 대부분 0.03 % 미만이었으며, 몇 개 시료는 0.06 % 전후의 오차도 있었다.

5. 생리활성팀에서 연구한 활성정보와 연계할 경우 황금의 경우 대한약전 수재 시 지표성분으로서 생리활성이 강하면서 황금에 많이 함유되어 있는 baicalin (현재 10% 이상 함유하도록 규정되어 있음),

wogonin, baicalein 중에서 설정함의 바람직할 것으로 사료된다. 단삼의 경우 대한약전에는 현재 지표 성분이 설정되어 있지 않으며, 중국약전에는 salvianolic acid B 3% 이상, tanshinone IIA가 0.2% 이상 함유하도록 규정되어 있다. 단삼 시료에 함유된 salvianolic acid B 함량은 단삼 위품을 제외한 15종 시료 중 13종이 3% 이상 함유되어 있었으며, tanshinone IIA는 단삼 위품을 제외한 15종 시료 중 3종만이 0.2% 이상 함유되어 있었다.

6. 본 연구에서 개발된 황금과 단삼의 동시분석법은 향후 대한약전 개정 시 황금과 단삼의 지표성분 분석법으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 황금과 단삼 시료의 산지별 성분 분석결과를 활용하여 산지별 패턴 분석 및 품질관리를 할 수 있을 것으로 간주된다.

제5장 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

세부과제명	한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구(황금, 단삼)
세부과제책임자	우미희 / 대구가톨릭대학교 / 약학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1								
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Simultaneous analysis of flavonoid compounds in <i>Scutellaria baicalensis</i> by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry	포스터	정민교, 정은숙, 김남희, 김창수, 정미향, 손건호, 문동철, 우미희	한국분석과학회	2005.11.17-18	제 35회 한국분석과학회 추계학술대회 초록집	국내
2	황금 중 생리활성 지표성분의 동시분석	포스터	정은숙, 방철, 정민교, 문동철, 손건호, 우미희	한국분석과학회	2006.5.18-19	제 36회 한국분석과학회 춘계학술대회 초록집	국내
3	Simultaneous analysis of 2 phenolics and 4 diterpenoids in <i>Salvia miltiorrhizae</i> Radix by high-performance liquid chromatography	포스터	방철, 전수진, 정은숙, 정민교, 손건호, 문동철, 우미희	한국분석과학회	2006.11.23-24	제 37회 한국분석과학회 추계학술대회 초록집	국내

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크숍 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

제6장 기타 중요변경사항

없음.

제7장 참고문헌

- (1) H. Z. Zheng, Z. H. Dong, J. She, *Modern Research and Application of Traditional Chinese Medicine*, **4**, 3943, 1998.
- (2) Y. J. Shen, *Pharmacology of Traditional Chinese Medicine*, 200, 2000.
- (3) Sichuan College of Medical Sciences, *Pharmacy of Chinese Herbal Medicine*, 325, 1979.
- (4) K. Nishikawa, H. Furukawa, T. Fujioka, H. Fujii, K. Mihashi, K. Shimomura, K. Ishimaru, *Phytochemistry*, **52**, 885, 1999.
- (5) A. Koda, S. Watanabe, Y. Yanagihara, H. Nagai, K. Sakamoto, *Jpn. J. Pharmacol.*, **27**, 31, 1977.
- (6) B. Q. Li, T. Fu, W. H. Gong, N. Dunlop, H. F. Kung, Y. D. Yan, J. Kang, J. M. Wang, *Immunopharmacology*, **49**, 295, 2000.
- (7) B. Q. Li, T. Fu, Y. D. Yan, N. W. Baylor, F. W. Ruscetti, H. F. Kung, *Cell Mol. Biol. Res.*, **39**, 119, 1993.
- (8) J. A. Wu, A. S. Attele, L. Zhang, C. S. Yuan, *Am. J. Chinese Med.*, **29**, 69, 2001.
- (9) T. Konoshima, M. Kokumai, M. Kozuka, M. Iinuma, M. Mizuno, T. Tanaka, H. Tokuda, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 531, 1992.
- (10) F. L. Chan, H. L. Choi, Z. Y. Chen, P. S. F. Chan, Y. Huang, *Cancer Lett.*, **160**, 219, 2000.
- (11) S. Ikemoto, K. Sugimura, N. Yoshida, R. Yasumoto, S. Wada, K. Yamamoto, T. Kishimoto, *Urology*, **55**, 951, 2000.
- (12) Z. H. Gao, K. X. Huang, H. B. Xu, *Pharmacol. Res.*, **43**, 173, 2001.
- (13) D. E. Shieh, L. T. Liu, C. C. Lin, *Cancer Res.*, **20**, 2861, 2000.
- (14) F. Chen, K. H. Chan, Y. Jiang, R. Y. T. Kao, H. T. Lu, K. W. Fan, V. C. C. Cheng, W. H. W. Tsui, T. S. W. Lee, J. S. M. Peiris, K. Y. Yuen, *J. Clin. Virol.*, **31**, 69, 2004.
- (15) S. C. Ma, J. Du, P. P. H. But, X. L. Deng, Y. W. Zhang, V. E. C. Ooi, H. X. Xu, S. H. S. Lee, S. F. Lee, *J. Ethnopharmacol.*, **79**, 205, 2002 .
- (16) R. L. Huang, C. C. Chen, H. L. Huang, C. G. Chang, C. F. Chen, C. M. Chang, M. T. Hsieh, *Planta Med.*, **66**, 694, 2000.
- (17) Z. Y. He, P. X. Cao, G. Y. Liang, Z. C. Liu, X. G. Wu, *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **27**, 258, 2002.
- (18) Y. Y. Zhang, H. Y. Don, Y. Z. Guo, H. Ageta, Y. Harigaya, M. Onda, K. Hashimoto, Y. Ikeya, M. Okada, M. Maruno, *Biomed. Chromatogr.*, **27**, 31, 1998.
- (19) J. S. Rhee, E. R. Woo, N. H. Kim, E. J. Lee, D. K. An, J. H. Lee, S. K. Park, H. K. Park, *Anal.*

Sci. Technol., **10**, 91, 1997.

(20) K. Sagara, Y. Ito, T. Oshima, T. Misaki, H. Murayama, H. Itokawa, *J. Chromatogr.*, **328**, 289, 1985.

(21) T. Tomimori, H. Jin, Y. Miyaichi, S. Toyofuku, T. Namba, *Yakugaku Zasshi*, **105**, 148, 1985.

(22) Mosaddik, M. A. *Phytomedicine* (2003), **10**(8), 682–685.

(23) Choi, Hong–Seok; Cho, Dong–Im; Choi, Hoo–Kyun; Im, Suhn Yong; Ryu, Shi–Yong; Kim, Kyeong–Man. *Archives of Pharmacal Research* (2004), **27**(12), 1233–1237.

(24) Lee, Dong–Sun; Lee, Sang–Han; Noh, Jae–Geun; Hong, Soon–Duck. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (1999), **63**(12), 2236–2239.

(25) Kang, B. Y.; Chung, S. W.; Kim, S. H.; Ryu, S. Y.; Kim, T. S. *Immunopharmacology* (2000), **49**(3), 355–361.

(26) Choi, Hong–Seok; Kim, Kyeong–Man. *Planta Medica* (2004), **70**(2), 178–180.

(27) Ryu, Shi Yong; Oak, Min–Ho; Kim, Kyeong–Man. *Planta Medica* (1999), **65**(7), 654–655.

(28) Okuno, Yoshiharu; Miyazawa, Mitsuo. *Letters in Drug Design & Discovery* (2004), **1**(1), 66–68.

(29) Lam, B. Y. H.; Lo, A. C. Y.; Sun, X.; Luo, H. W.; Chung, S. K.; Sucher, N. J. *Phytomedicine* (2003), **10**(4), 286–291.

(30) Ueng, Yune–Fang; Kuo, Ya–Hui; Peng, Hsiao–Chi; Chen, Ta–Liang; Jan, Woan–Ching; Guengerich, F. Peter; Lin, Yun–Lian. *Xenobiotica* (2003), **33**(6), 603–613.

(31) Niu, Xi–Lin; Ichimori, Kohji; Yang, Xia; Hirota, Yuki; Hoshiai, Kiyotaka; Li, Min; Nakazawa, Hiroe. *Japan. Free Radical Research* (2000), **33**(3), 305–312.

(32) Wang, Xin–Jian; Xu, Jian–Xing. *Neuroscience Research (Amsterdam, Netherlands)* (2005), **51**(2), 129–138.

(33) Li, Hong–Yan; Li, Yan; Yan, Chun–Hong; Li, Lian–Niang; Chen, Xiao–Guang. *Journal of Asian Natural Products Research* (2002), **4**(4), 271–280.

(34) Liu, Cheng–Hai; Liu, Ping; Hu, Yi–Yang; Xu, Lie–Ming; Tan, Yin–Zi; Wang, Zhen–Nan; Liu, Cheng. *Acta Pharmacologica Sinica* (2000), **21**(8), 721–726.

(35) Li, Min; Zhao, Chi; Wong, Ricky N. S.; Goto, Shinya; Wang, Zhimin; Liao, Fulong. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* (2004), **31**(2), 97–103.

(36) K. H. Son, M. J. Park, S. H. Lee, J. H. Park, *Kor. J. Pharmacogn.*, **30**(2), 158, 1999.

(37) I. S. Lay, C. C. Hsieh, J. H. Chiu, M. S. Shiao, W. Y. Lui, C. W. Wu, *J. Surgical Res.*, **115**, 279, 2003.

(38) Y. C. Li, J. Q. Zeng, X. S. Jin, *Se Pu.*, **20**(1), 40, 2002.

(39) H. H. Kim, H. Y. Ji, H. W. Lee, Y. C. Kim, D. H. Sohn, H. S. Lee, *Arch. Pharm. Res.* **27**(12), 1202, 2004.

(40) H. Ping , L. L. Qiong, A. L. Guo, *Chem. Pharm. Bull.* **53**(6), 677–683, 2005.

제8장 첨부서류

- 본 연구개발사업의 성과로 기술된 게재된 학술지 논문 전체 사본(게재 허가를 받은 경우 게재 증명서)과 산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본을 반드시 첨부할 것.

편집순서 7 : 세부연구과제의 연구결과

제3세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성 성분의 효능 유전자 검증

세부과제책임자 : 하 혜 경 / 한국한의학연구원

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

- 현재 국내의 한약재관련 연구는 이화학적 규격표준화를 위한 품질 평가법 개발 방향으로 추진 되었음. 한약재 표준화 연구는 유효성분·유효 물질군을 중심으로 전환이 요구됨.
⇒ 한약재의 효능검색에 biochip을 활용할 경우 수천 개의 성분이 집중된 한약재의 효능에 관여하는 유전자들의 전체적인 경향을 분류할 수 있음.
- Biochip을 이용하여 황금과 단삼에 포함되어 있는 성분들의 효능, 유해성 및 지표물질 확인.
- 황금, 단삼의 유효 성분 및 효능과 관련된 biomarker genes 제시.
- 황금과 단삼의 약리효능 유전자와 유효 물질에 대한 data base를 구축하여 Biochip을 활용한 한약재 및 한약제제의 규격화, 과학화, 표준화의 기준 설정.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

구분	연구 목표	연구 범위	목표 달성도
1차 년도 (황금)	- 황금 추출물 및 성분 확보	70% EtOH 추출물 및 성분 8개 확보	100
	- <i>In vitro</i> assay : 처리 농도 및 시간별	Cytotoxicity assay, PGE ₂ assay를 실행하여 각 시료의 처리농도와 시간결정	100
	- 약물처리 후 RNA 분리	- Cell Line : Raw 264.7 cell + LPS 처리 (100 ng/ml) - Time : 2, 4, 8, 18hr - Sample : 70E, Baicalein, Wogonin, Chrysin	100
	- DNA microarray	- Applied Biosystems chemiluminescent RT Labeling kit - Scanner : Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Analyzer	100
	- 효능 유전자 확인 : RT-PCR 등	- Program : Avadis [®] , R, Panther 등 - 2 fold 이상의 유효 gene을 선정 - 항염증과 관련된 gene 22개 선정	100
	- 독성유전자의 발현 여부 확인	- 황금 및 성분의 처리농도에 대한 독성이 없었기 때문에 유전자는 발견하지 못함	100
	- DB 제공	- DB 구축 자료 제공	100
2차 년도 (단삼)	- 단삼 추출물 및 성분 확보	70% EtOH 추출물 및 성분 6개 확보	100
	- <i>In vitro</i> assay : 처리 농도 및 시간별	Cytotoxicity assay, NO, SOD, GSH assay를 실행하여 각 시료의 처리농도와 시간결정	100
	- 약물처리 후 RNA 분리	-Cell Line : Raw 264.7 cell + LPS 처리 (1 mg/ml) - Time : 2, 4, 8, 24hr - Sample : 70E, tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B	100
	- DNA microarray	- Applied Biosystems chemiluminescent RT IVT Labeling kit	100
	- 효능 유전자 확인 : RT-PCR 등	- Program : Avadis [®] , GenPlex, R, Panther - 2 fold 이상의 유효 gene을 선정 - 항산화 관련 gene들을 선정	100
	- 독성유전자의 발현 여부 확인	- 독성 관련 유전자 검색	100
	- DB 제공	- DB 구축 자료 완성	100

1.3 국내외 기술개발 현황

- 미 FDA는 Guideline for Industry-Botanical Drug Products의 초안(2000. 8) 마련. 생약제의 경우 의약품과 같은 수준의 신약허가자료 제출 의무화. 신약허가자료가 부족할 경우, 이를 증명할 수 있는 임상시험자료를 제출해야 할 것과 특히 유효성분 및 약리학적 활성을 규명하는 자료제출을 의무화하고 있음.
- WHO에서 전통약물(한약재)접취로 인한 부작용을 줄이기 위하여 다양한 과학적 guideline 등을 마련하여 전세계에 권고하고 있음.
- 중국의 경우 WTO 가입 (2001. 11)이후 WTO/DDA(Doha Development Agenda) 등에 의해 농산물시장 개방 촉진으로 한약재시장의 국가간 경쟁이 높아짐에 따라 한약품질관리를 규범화하여 (2002. 6) 한약재 품질관리를 국제수준으로 개선시키고 있음.
- 최근 국내 한약재 소비량이 매년 증가하여 현재 67,244톤에 달하고 있으며, 매년 증가추세에 있음(보건백서, 2003년).
- 국내의 경우 한약재 관련 연구는 소규모 연구로 *in vitro* 및 *in vivo* 검색수준임.
- 한의약육성법 제정·공포하였으며, 한약재 및 천연물 의약품의 개발촉진과 세계진출·지원육성을 목적으로 한 민간전문기구인 한국천연물신약·한약제제개발센터 등이 설립(2003. 5. 9), 운영되고 있어 한약재 과학화·국제화사업을 추진하기 위한 국내연구여건이 마련되었음.
→ 선진국과 같은 과학적인 방법으로 한약재 관리·규격화·과학화를 이루어야 할 때임.
- Biochip연구는 미국에서 주로 개발 및 활용하였으며 한약재의 효능검색에 활용할 경우 수천 개의 성분이 집중된 한약재의 효능에 관여하는 유전자들의 전체적인 경향을 분류할 수 있음.
- Biochip 연구 결과를 활용하여 한약재에 포함되어 있는 성분들의 효능 및 유해성을 판단하여 국제적인 선두주자가 될 수 있음.

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1 . 연구 개발 내용

가. 황금

- 황금의 효능 분류 : 한의학적으로 황금은 청열약 (淸熱藥)으로 분류되며 청열약의 대표적인 효능은 항염증 효과임. 문헌 및 논문 검색 결과 염증 반응과 관련된 연구 결과가 가장 많았으므로⁽¹⁻¹³⁾ 본 연구에서는 황금의 대표적인 효능으로 항염증 효과를 검색하였음.
- 황금의 70% 에탄올 추출물과 성분 8종을 제 1세부에서 제공받아 황금의 효능 중 항염증 효과에 대한 실험을 진행.
- *In vitro*에서 항염증 효능을 검색하기 위하여 문헌 검색을 통해 macrophage cell line에 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증 반응을 유발시키고 황금 추출물 및 성분을 처리하여 염증 반응과 관련된 물질들의 발현 억제 효과를 측정하였음.
- 황금 및 성분의 세포독성이 없는 농도 범위에서의 항염증 효과를 검색하기 위하여 각 세포주에 대해 시료의 세포독성연구를 시행하였고 세포독성이 나타나지 않은 최고농도 이하에서 항염증 효능을 검색함.
- Microarray를 실행하기 위하여 mouse macrophage cell line인 Raw 264.7 cell과 J774.1 cell를 비교하여 Raw 264.7 cell 로 결정하고 각 약재를 시간별·농도별로 처리.
→ 각 약재의 시간 및 농도는 Cytotoxicity assay와 PGE₂ assay (COX 활성화) 및 NO assay를 진행하여 결정.
- Raw 264.7 cell에 LPS와 각 약재를 2, 4, 8, 18 시간 처리 후 RNA를 분리하여 ABI mouse chip (whole gene)을 이용하여 scan 후 Avadis[®], R을 이용하여 분석
→ 염증을 유도한 시료를 사용하였기 때문에 대부분의 gene들이 염증 관련 gene의 변화를 볼 수 있었음.
- 그 외 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남을 알 수 있었음.
- 염증 관련 유전자들 중에 22개의 대표적인 gene을 선별하여 RT-PCR을 실행한 결과 시간별로 gene들이 변화함을 알 수 있었음.
- Oligochip을 이용한 약리효능에 대한 biomarker genes들에 대한 결과는 data base 시스템 구축을 위한 기초 자료로 제공 완료.

나. 단삼

- 단삼의 효능 분류 : 한의학적으로 단삼은 활혈거어약 (活血祛瘀藥)으로 분류되고 이에 대한 약리작용은 문헌 및 논문 검색 결과 단삼 및 성분들의 항산화 효능과 관련된 논문이 가장 많았으므로⁽¹⁴⁻²²⁾ 단삼의 대표적인 효능을 항산화 효과로 선정하여 그 효능을 검색함.
- 단삼의 70% 추출물과 성분 6종 총 7종의 약물을 제 1세부에서 제공받았음.
- *In vitro*에서 항산화 효능을 검색하기 위하여 문헌 검색을 통해 macrophage cell line에 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하고 단삼 추출물 및 성분을 처리하여 항산화 작용과 관련된 NO, superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH)의 발현 변화를 효과를 측정하였음.
- 단삼 및 성분의 세포독성이 없는 농도 범위에서의 항산화 효과를 검색하기 위하여 세포주에 대해 시료의 세포독성연구를 시행하였고 세포독성이 나타나지 않은 최고농도 이하에서 항산화 효능을 검색함.
- Raw 264.7 cell에 LPS와 각 약물을 2, 4, 8, 24 시간 처리 후 대표적인 항산화효과 지표인

SOD, NO, GSH를 측정된 결과 시간이 지날수록 NO와 SOD의 생성이 많아지고 GSH는 4시간 이하에서 많이 생성을 됨을 알 수 있었음.

- Cytotoxicity와 각 항산화 효과에 대한 실험 결과를 토대로 DNA chip에 적용할 농도와 시간을 정하여 ABI mouse chip (whole gene)을 실행하여 분석한 결과, 항산화와 관련된 유전자가 포함된 pathway가 가장 많이 변화함을 알 수 있었음. (oxidative stress, inflammation, TGF- β 등)
- 변화된 Pathway들을 분석한 결과, Mapkapk5, Mapk13, Dusp6, Dusp2 등의 유전자들이 공통적으로 변화함.
- 선별된 유전자들에 대한 RT-PCR을 시행함.
- 그 외, Apoptosis, PDFG, VGF, TCA cycle 등에 영향을 미침을 알 수 있었음.
- Oligochip을 이용한 약리효능에 대한 biomarker genes들에 대한 결과는 data base 시스템 구축을 위한 기초 자료로 제공함.

2.2. 연구방법

가. Cytotoxicity assay

황금, 단삼의 추출물 및 성분들의 세포독성 측정은 tetrazolium salt로 WST-8을 사용하는 Cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)을 이용해 측정. 96 well microplate에 Raw 264.7 세포는 7×10^3 cells/well, J774A.1 세포는 1×10^4 cells/well이 되도록 분주. 여러 가지 농도로 희석한 약물들을 각 well에 첨가 후 48시간 동안 배양. 각 약물들은 DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma)에 녹인 후 배지 용액으로 희석하여 사용하였으며, 최종 DMSO농도는 1%가 되게 하였으며 well 당 총 부피는 100 μ l가 되도록 함. 48시간 배양 후 CCK-8용액을 10 μ l씩 첨가하여 4시간 배양 후 microplate reader (Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도 측정. 대조군에 대한 %로 표시.

$$\% = \frac{(\text{약물첨가well의 } OD_{450nm} \text{ 평균값}) - 1\text{Bkwell의 } OD_{450nm} \text{ 평균값}}{(\text{Controlwell의 } OD_{450nm} \text{ 평균값}) - 1\text{Bkwell의 } OD_{450nm} \text{ 평균값}} \times 100$$

나. Raw 264.7 세포와 J774.1A 세포에서 COX-2 유발

Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 세포주와 J774.1A 세포주는 ATCC (U.S.A.)에서 분양받아 사용하였고, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), FBS (5.5%)을 함유하는 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였음. COX-2를 유발하기 위하여 배양된 Raw 264.7 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well, J774A.1 세포는 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml)를 가한 후 18시간동안 배양함. 대조군은 LPS만 첨가한 군 (100% 활성 유발)과 LPS를 첨가하지 않은 군 (0% 활성 유발: blank)을 사용하였음. 비교약물로 대표적인 NSAIDs인 ASA (acetylsalicylic acid; aspirin, Sigma Chemical Co, MO, U.S.A.)를 사용함. 약물처리 후 각 well에 arachidonic acid를 최종농도가 30 μ M이 되도록 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양한 후, 상등액을 취하여 PGE₂를 측정할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였음.

다. PGE₂의 정량

LPS의 첨가로 유발된 COX-2의 농도는 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 농도 변화를 측정하는 간접적인 방법을 사용함. PGE₂ assay는 EIA kit (Amershampharmacia, Ltd., U.K.)를 사용하였음. Goat anti-mouse Ig가 부착되어 있는 96-well plate에 320~2.5 pg/well 농도의 PGE₂ 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE₂-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE₂를 각각 50 μ l씩 가하고

실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 phosphate buffered saline (PBS)로 항체와 결합하지 않은 PGE₂ 혹은 PGE₂-peroxidase conjugate를 제거함. 항원-항체 복합체에 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)용액 150 μ l를 가하고 실온에서 30 분간 반응시킨 후, 1 M H₂SO₄ 100 μ l를 가하여 반응을 중단시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정함. 이 방법은 시료의 PGE₂와 첨가한 PGE₂-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였음.

라. NO assay (Griess reagent System)

제공된 시료의 NO 생성을 측정하기 위하여 1879년에 Griess가 제시한 diazotization reaction에 의해 진행. No assay kit (Promega, Corp, USA)를 사용하였음. 산성 상태에서 sulfanilamide와 NED (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) 사용하여 assay를 진행함. Raw 264.7 cell과 J774.1A cell을 24well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 LPS를 가한 후 24시간 배양함. 제공된 약물을 농도 · 시간별로 처리 한 후 상등액 수집. 제공된 standard와 시료 상등액을 50 μ l를 취해 96 well plate에 넣고 sulfanilamide sol'n 50 μ l를 첨가하여 상온에서 약 10분간 반응시킨 후 NED sol'n을 50 μ l를 분주하고 10분 반응 후 550 nm에서 흡광도 측정.

마. SOD assay (WST-1)

NO assay와 같은 조건으로 처리한 후 well에 부착된 세포를 수집하여 차가운 (ice-cold) PBS 300 μ l를 넣고 30초간 sonication 한 후 13000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 sample을 준비. SOD assay kit (Dojindo inc. Japan)를 사용함. 준비한 sample과 제공되어 희석한 standard를 96 well plate에 넣고 WST 200 μ l씩 분주하고 제시한대로 dilution buffer와 Enzyme working sol'n을 해당 well에 분주함. 37°C에서 20분간 incubation 한 후 450nm에서 흡광도 측정. Bradford법으로 rotein을 정량하고 SOD 활성을 protein 량으로 보정.

바. Glutathione (GSH) assay

GSH assay kit (Oxisreserach, USA)를 사용함. SOD assay를 위해 준비한 시료 중 100 μ l를 취하여 Metaphosphoric acid (MPA)를 10 g/100 ml로 제조하여 100 μ l를 넣은 후 13000rpm에서 10분간 원심분리하여 protein을 제거. 시료 용액과 standard를 제공된 buffer에 희석하여 96 well plate에 180 μ l씩 첨가 후 R1 reagent 10 μ l, R2 reagent (30% NaOH)를 10 μ l 첨가하여 상온에서 빛을 차단시켜 10분간 반응시킴. 400 nm에서 흡광도 측정하여 GSH의 양 계산. SOD assay 시료와 동일한 시료이므로 SOD assay에서 정량한 protein 양으로 보정.

사. Total RNA 분리

약제를 시간별로 처리한 후 RNA purification kit (Qiagen)로 RNA를 분리하여 Spectrophotometer와 전기영동으로 양 및 순도 결정.

아. 항염증 / 항산화 관련 유전자의 발현 변화

Chip 실험 전에 본 연구에서 항염증 / 항산화와 관련된 대표적인 유전자들의 변화를 검색하기 위하여 RT-PCR을 수행하여 유전자의 발현 변화를 검색함. 황금의 항염증 효과의 확인을 위해 IL-1, ptges2, TNF- α 의 발현 변화를 검색함. 단삼의 항산화 효과 확인을 위해 GCS, GPx, NOS, SOD의 발현 변화를 검색함.

No.	gene	Tm (°C)	cycle	size (bp)	비고
1	IL-1a	60.0	28	147	황금 (예비)
2	TNF- α	57.1	25	264	"
3	Ptges-2	54.4	25	243	"
4	iNOS	65.3	38	511	단삼 (예비)
5	SOD(Cu/Zn)	65.3	36	246	"
6	SOD(Mn)	60.8	30	241	"
7	GPx	65.3	35	197	"
8	GR	65.3	24	601	"
9	GCs	55.0	34	346	"
10	catalase	60.8	35	229	"
11	β -actin	59.5°C	20	477	housekeeping gene

자. DNA chip 실험을 위한 시료의 전처리

Microarray chip에 적용시키기 위하여 total RNA에서 cDNA 또는 cRNA 합성 및 labeling을 진행하고자 제공된 RT labeling kit (1차년도) 또는 RT-IVT labeling kit (2차년도)와 Purification kit (이상 Applied Biosystem, USA)을 사용하여 제공된 사용방법으로 실험을 진행.

차. Hybridization (혼성화 반응)

합성한 cDNA 또는 cRNA를 chip에 첨가한 후 55°C에서 16시간 hybridization 시킴. 그 후 반응한 chip을 washing 한 후 Ab 부착 및 substrate 첨가하여 scan 및 분석 진행.

카. DNA chip의 분석

Chip을 AB 1700 scanner에서 scan함. 각 position에서의 signal을 Avadis[®], R, GenPlex[®]을 사용하여 분석하여 대조군과 실험군의 data를 비교하여 유전자발현 양상의 차이를 분석. 통계적으로 p<0.05이하이며 2배 이상 증가하거나 2배 이상 감소한 유전자를 유의하게 변한 것으로 선택.

타. DNA chip의 결과 확인 (RT-PCR)

Chip의 분석 결과 선정된 유전자들의 실질적인 증감을 증명하기 위하여 chip 분석에 사용한 RNA 시료로 선정된 유전자들에 대한 RT-PCR 수행. 각 유전자별로 PCR cycle을 여러 가지로 수행하여 최적의 cycle을 정함. 효능 유전자의 발현 여부 확정.

No.	gene	Tm (°C)	cycle	size (bp)	비고
1	Activin A-R I	46.0	33	229	황금 (chip)
2	Activin R II A	52.2	32	294	"
3	TGF- β 1	56.7	27	285	"
4	IL-11-R, α 1	61.4	30	244	"
5	IL-6 ST	61.4	33	339	"
6	IFN γ -R2	55.0	26	232	"
7	IL-4-R, α	55.0	24	245	"
8	SCS-4	56.0	31	283	"
9	Txn2	64.0	40	200	단삼 (chip)
10	Cyp51	53.8	40	206	"
11	Fasn	53.8	23	116	"
12	Aldh2	47.0	30	284	"
13	Glud1	47.0	30	181	"
14	Acadl	47.0	40	121	"
15	Phgdh	49.0	40	295	"
16	Impdh2	49.0	38	231	"
17	Hadh	49.0	40	267	"
18	Gpd2	47.0	40	212	"
19	β -actin	59.5°C	20	477	housekeeping gene

파. DB 구축

한약재 과학화 DB 구축 과제에 DB 구축을 위한 자료 제공.

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1. 황금 (유전자칩을 활용한 황금 및 생리활성 성분의 효능 유전자 검증)

가. 황금 추출물 및 단일 화합물의 시료 확보

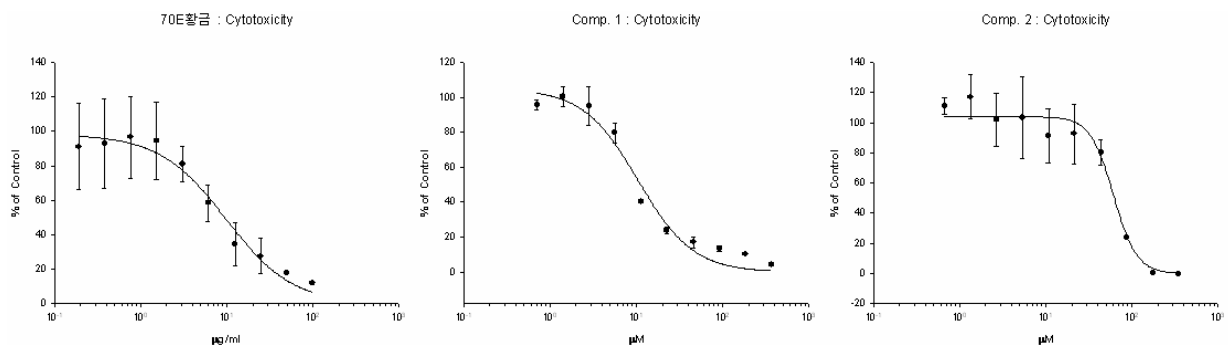
황금 70% 추출물과 단일화합물 8종을 제 1세부에서 제공받음. (Table 1)

Table 1. Extract and components of Scutellaria Root.

Name	Molecular weight	Sample No.
70% ethanol extract		70-E
baicalein	270.23	C-1
wogonin	284.27	C-2
chrysin	254.24	C-3
5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone	346	C-4
wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester	462	C-5
baicalin	446.37	C-6
guaiacol	124.13	C-11
paeonol	166	C-12

나. Cytotoxicity assay

Raw 264.7 세포와 J774A.1 세포에서의 cytotoxicity를 분석한 결과 Raw 264.7 세포가 J774A.1 세포보다 독성이 적은 것으로 나타남. 세포독성의 검색 결과를 IC₅₀로 계산하여 Table 2에 나타냄.



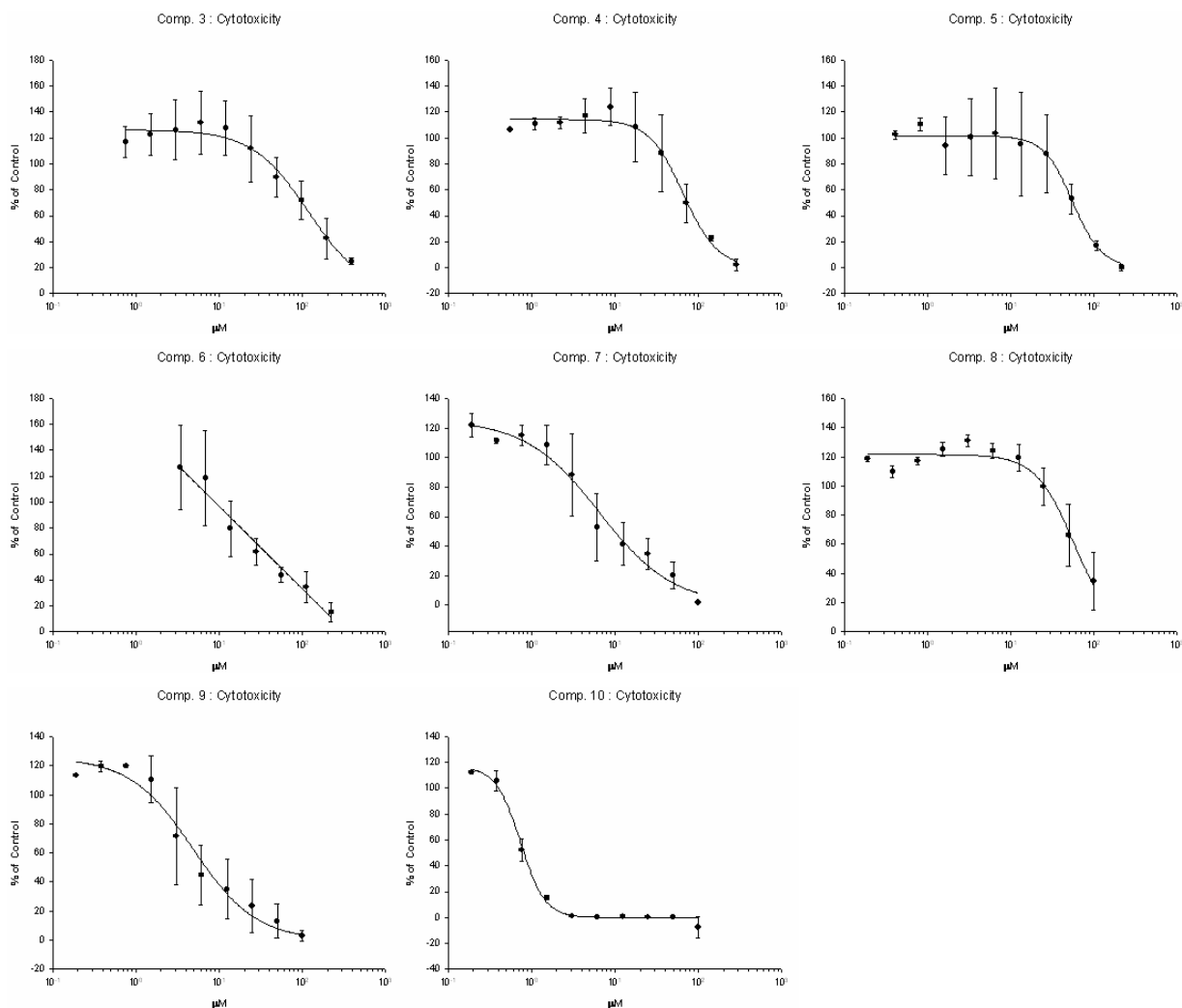


Fig. 1. Cytotoxicity of samples on Raw 264.7 cells.

Table 2. IC₅₀ value of cytotoxicity on murin macrophage cell lines.

No.	Sample No.	IC ₅₀ (µg/ml)	
		Raw 264.7	J774A.1
1	70-E	9.32±0.05	37.5
2	C-1	2.55±0.08 (9.4 µM)	36.0 (133.2 µM)
3	C-2	18.76±0.03 (66.0 µM)	20.8 (73.2 µM)
4	C-3	40.62±4.65 (159.8 µM)	78.5 (308.8 µM)
5	C-4	22.92±5.18 (66.2 µM)	72.9(210.7 µM)
6	C-5	28.13±4.67 (60.9 µM)	37.6 (81.4 µM)
7	C-6	18.75±3.11 (42.0 µM)	83.3 (186.6 µM)
8	C-11	19.00±2.99 (153.1 µM)	14.7 (118.4 µM)
9	C-12	>100	>100

다. 항염증 효과 (murine macrophage cell line)

Raw 264.7 세포와 J774A.1 세포에 LPS를 처리하여 PGE₂의 생성량을 측정한 결과 J774A.1에서의 PGE₂ 생성 및 억제능력은 약하고 Raw 264.7 세포가 더 효과적으로 나타남. 이후의 실험에서는 Raw 264.7 세포만 사용. Raw 264.7 세포에 LPS (1 μg/ml)를 처리하여 COX 활성을 증가시키고 시료를 농도별로 처리하여 PGE₂를 생성 억제 효과를 측정한 결과 PGE₂ 생성의 IC₅₀에서 cytotoxicity는 없었음.

제공된 황금의 성분 중에서 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제시키는 대표 성분으로 baicalein (C1), wogonin (C2), chrysin (C3)의 3종을 효능 성분으로 선정. Baicalein의 배당체인 baicalin은 *in vitro* assay에서는 효과가 없었음.

Table 3. IC₅₀ value of prostaglandin E₂ (PGE₂) formation on LPS (1 μg/ml) treated Raw 264.7 cells.

No.	Sample No.	IC ₅₀ (μg/ml)	No.	Sample No.	IC ₅₀ (μg/ml)
1	70-E	3.64±2.31	6	C-5	9.79±3.06 (21.19 μM)
2	C-1	0.52±0.18 (1.85 μM)	7	C-6	> 100
3	C-2	2.52±0.90 (8.86 μM)	8	C-11	20.08±8.31 (161.77 μM)
4	C-3	3.64±1.06 (14.32 μM)	9	C-12	15.6±6.59 (94.98 μM)
5	C-4	> 100	10	ASA	(7.89±1.15 μM)

라. DNA chip 실험을 위한 예비실험

DNA chip 실험을 실행하기 위하여 Raw 264.7 cell에 처리할 LPS 농도를 검색함. 10, 100, 1000 ng/ml로 처리한 후 inflammation 관련 유전자들의 발현을 RT-PCR로 검색한 결과 LPS 10 ng/ml 이상의 농도에서 inflammation 관련 유전자들의 발현이 증가됨을 관찰하였음. 본 연구에서는 chip 실험을 위하여 LPS 처리농도를 100 ng/ml로 결정함. Raw 264.7 세포에 LPS (100 ng/ml)를 처리하여 선정된 성분 C1, C2, C3와 70% 추출물을 2 hr 및 18 hr 처리하여 RNA를 분리함. Chip 실험을 진행하기 전에 대표적인 inflammation 관련 유전자인 IL-1, ptges2, TNF-α의 발현 변화를 검색함. 그 결과 IL-1은 LPS 처리시 발현이 크게 증가되었고 70E 처리 시 2 hr 및 18 hr에서 모두 다시 감소됨을 나타냄. Baicalein (C1)은 LPS 처리로 인한 IL-1의 발현을 18 hr에 감소시킴. Wogonin (C2)은 2hr 및 18 hr에서 모두 LPS 처리군보다 강하게 발현시켰으나 Chrysin (C3)은 2시간에서 발현 증가되었다가 18 hr에 감소되었음. ptges2는 C, L, 70E, C11의 경우는 시간이 지날수록 발현이 증가하고 나머지 성분들과 ASA는 발현이 감소함을 나타냄. TNF-α는 대조군은 시간이 지날수록 감소하고 LPS, 70E는 거의 차이가 없지만 약간의 감소를 나타냈으나 성분들은 시간이 지날수록 현저히 발현이 증가함.

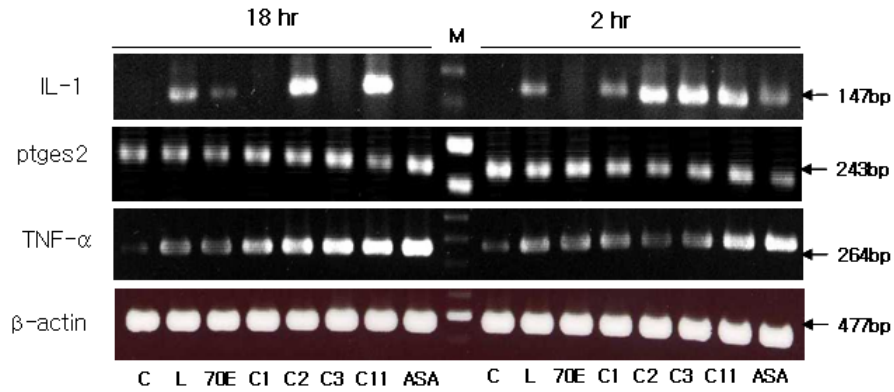


Fig. 2. The confirmation of genes by RT-PCR

마. DNA chip

확실한 유전자의 발현 변화를 측정하기 위하여 Raw 264.7 세포에 대해 각 약물의 세포독성을 나타내지 않은 최고 농도를 선정하여 처리. PGE₂ 생성 억제 효과를 나타낸 IC₅₀ 보다 3배 높은 농도로 실험을 진행 (Table 4). Raw 264.7 세포에서 약물에 따른 효능 유전자의 변화를 측정하기 위하여 2×10^7 cells/dish (100 ϕ)의 농도로 세포를 분주하여 24배양 후 LPS (100 ng/ml)와 70-E, C-1 (baicalein), C-2 (wogonin), C-3 (chrysin)를 처리 후 2, 4, 8시간 및 18시간에 RNA 분리. 분리한 RNA 50 μ g을 취하여 Applied Biosystems chemiluminescent RT Labeling kit (Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 cDNA를 합성하면서 digoxigenin으로 labeling 한 후 Applied Biosystems mouse genome survey microarray (Applied Biosystems, U.S.A.)에 적용. Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Analyzer로 scan하고 Avadis[®] 프로그램을 이용하여 분석. 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 염증 관련 유전자들의 변화가 가장 크게 나타났으며 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남. 그 중 가장 많은 변화를 나타낸 유전자를 선정하여 RT-PCR로 확인.

Table 4. The concentration of samples on LPS (100 ng/ml) treated Raw 264.7 cells.

Compound	농도	Compound	농도
70-E	10 μ g/ml	C-3	40 μ M
C-1	5 μ M	C-11	15 μ M
C-2	25 μ M	ASA	50 μ M

바. DNA chip analysis

ABI mouse chip을 분석하기 위하여 Avadis[®], R program 등을 이용하여 각각 filtering, normalization 및 clustering을 진행함. 그 결과 2 fold 이상 차이가 나는 유전자들을 선별하여 각각의 pathway과 유전자들을 분류함. 각각의 fold change 분류와 cluster image를 Fig. 3 ~ 6에 나타냄. 분석 결과 대체적으로 33,000의 유전자들 중에서 2,000 ~ 3,000의 유전자로 filtering 되었음.

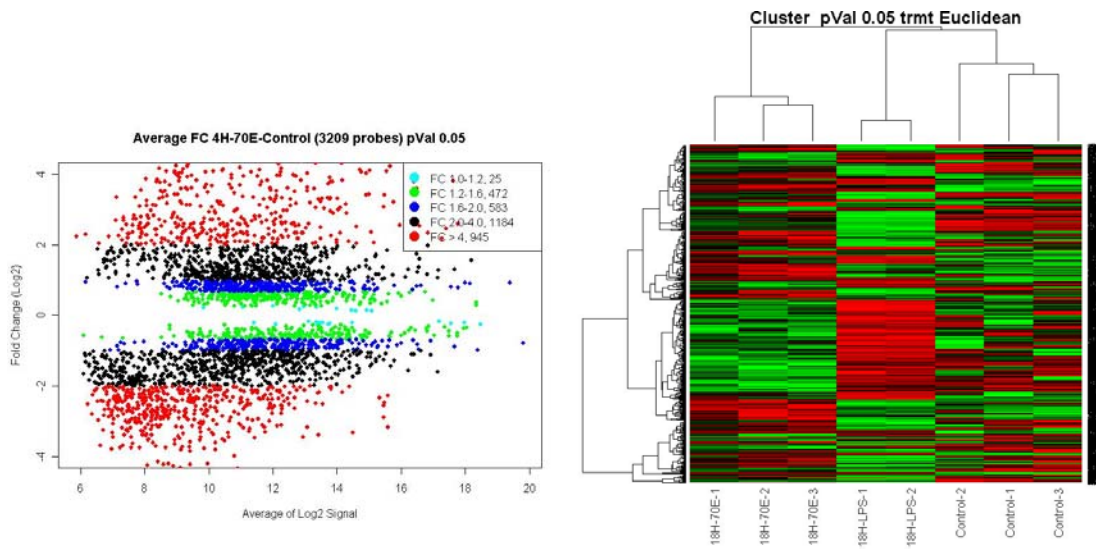


Fig. 3. The images of clustering of 70% Ethanol extract.

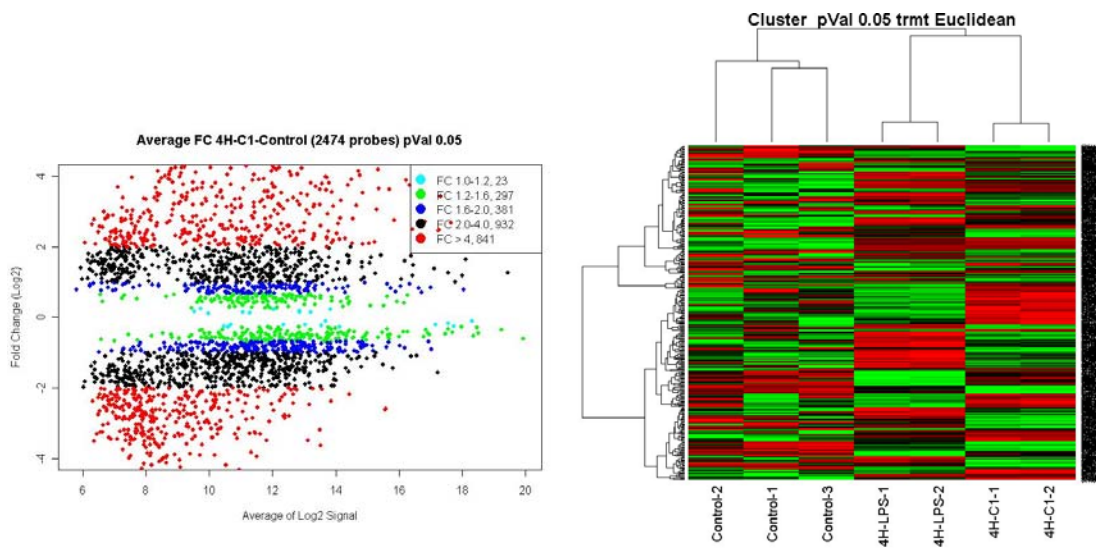


Fig. 4. The images of clustering of baicalein (C-1).

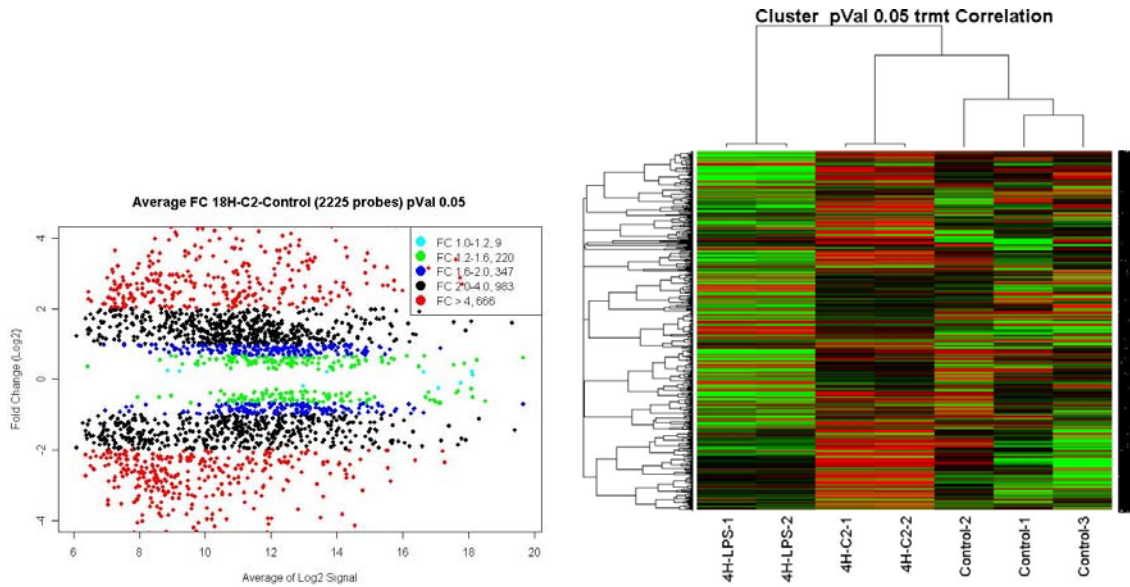


Fig 5. The images of clustering of wogonin (C-2).

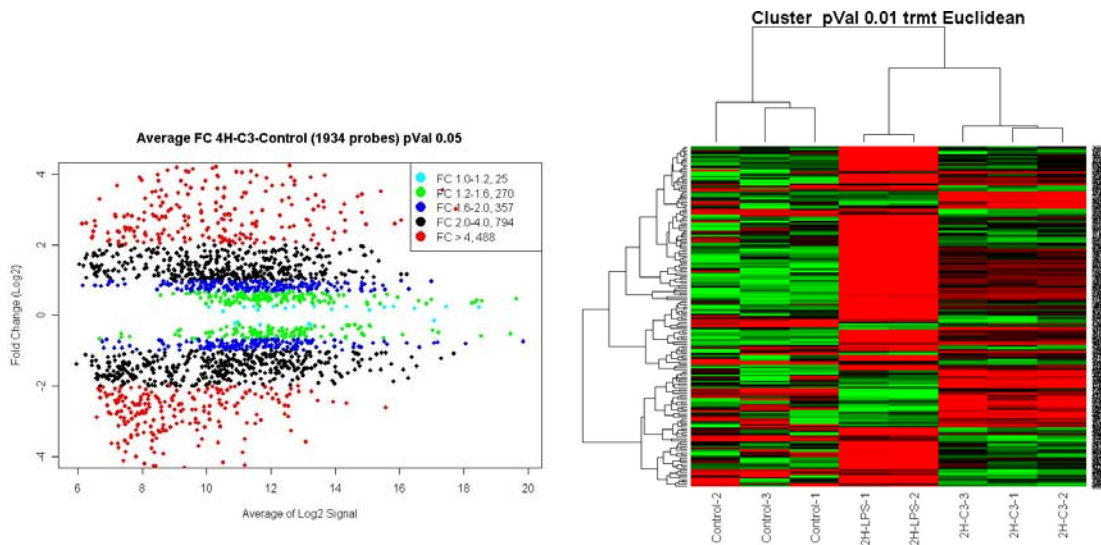


Fig. 6. The images of clustering of chrysin (C-3).

(1) Pathway 및 유전자 분석

Pathway 분석 결과, 70E, C1, C2, C3에 대해서 공통적으로 inflammation 관련 유전자의 변화가 가장 크게 나타남. 그 외에 apoptosis, angiogenesis, PDGF, T cell 등과 관련된 유전자들의 변화가 나타남. 이는 청열약으로 사용되는 황금의 항염증 반응과 관련이 있는 것으로 사료됨. 그 중 항염증과 관련되어 변화한 pathway에 해당하는 유전자들을 panther의 gene analysis tool을 이용하여 각 유전자들을 검색한 결과를 Table 5 ~ 8에 나타냄.

Table 5. Gene list of 70% Ethanol extract

Pathway	Biological process	Gene
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	Carbohydrate transport;	Src, Itgb1
	Cell culture	LOC 434782, Arpc1b
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Socs7, Cxcl10, Ccl2, Ccl3,Ccl4, Ccl5, Cc:7, Ccl22, Ifngr1
	Extracellular matrix protein-mediated signaling	Tnc
	G-protein mediated signaling	Rgs14, Gna11, Gnai2, GGng2, Gnai2, Rgs4, Ptafr, Vav1, Fpr-rs3, Rhob, Cxc4, Cx3cr1, Ccr12, Arrb2
	mRNA transcriptio	Stab1, Stab6, Jun, Nfkb1, Nfkbib, Nfknia, Nfkb2, Rel
	Protein phosphorylation	Camk2d, Mpp1, Mapk3, Ikbke, Map3k3, Pak3, Pak4, Map3k7, Jak2
PDGF signaling pathway	G-protein mediated signaling	Vav3, Sos2
	Intracellular signaling cascade	Srgap2, Rab11b
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Araf, Hras1, Kras, Nras, Reas, Reas2
	mRNA transcription	Stat1, Stat2, Stab5a, Stab5b, Fos, Myc, Fli1, Loc232974, Elf2
	Phosphate metabolism	Gsk3b
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Pik3c3, Mapk7, Rps6ka3, Akt2, Akt3, Map2k2, Jak3
Interleukin signaling pathway	Carbohydrate metabolism	Foxm1, Foxk1, Foxj2, Foxp1, Foxn2, Src, Lck
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Il13ra1, Il15ra, Il1a, Il10, Il6ra, Il6st, Il6
	G-protein mediated signaling	Sos2
	MAPKKK cascade	Araf, Hras1, Kras, Nras, Rras, Rras2
	mRNA transcription regulation	Stat1, Fos, Myc, Stat2, Stat5a, Stat5b
	Other polysaccharide metabolism	Gsk3b

Pathway	Biological process	Gene
Interleukin signaling pathway	Lipid metabolism	Pik3cd
	Protein phosphorylation	Mapk7, Rps6ka3, Chuk, Akt2, Akt3, Jak3
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Grb2
	Spermatogenesis and motility	Insl3
Angiogenesis	Carbohydrate transport	Src, Lck
	Cell cycle control	Ppp1r7, Lpxn
	G-protein mediated signaling	Sos2
	Inhibition of apoptosis	Birc5
	Ligand-mediated signaling	Pik3cd, Wnt2
	MAPKKK cascade	Araf, Hras1, Kras, Nras, Rras, Rras2
	mRNA transcription	Stat1, Fos
	Phosphate metabolism	Pik3c3, Pla2g4a
	Protein phosphorylation	Ptpn11, Akt2, Akt3, Map2k4,
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Grb2, Vegfa
T cell activation	Calcium mediated signaling	Calm2, Calm3, LOC381811
	Carbohydrate transport;	SRC, Lck
	G-protein mediated signaling	Vav3, Rac1, Sos2,
	Immunity and defense	Wasl
	Ligand-mediated signaling	Cd86, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Pik3cd
	MHCII-mediated immunity	Araf, Hras1, Kras, Nras, Rras, Rras2
	mRNA transcription regulation	H2-DMb1, H2-DMb2
	Phosphate metabolism	Fos, Nfkb1, Nfkb1a, Nfkb2
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Pik3c3, Chuk, Akt2, Akt3, Map2k2,

Pathway	Biological process	Gene
EGF receptor signaling pathway	G-protein mediated signaling	Rac1, Soc2
	Ligand-mediated signaling	Hbegf
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Araf, Kras, Nras, Rras, Rras2
	mRNA transcription	Stab1, Stab2, Stab5a, Stab5b
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Pre-mRNA processing	Ppp2ca
	Protein phosphorylation	Mapk7, Akt2, Akt3, Map2k2, Map2k4
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Grb2
TGF-beta signaling pathway	Carbohydrate metabolism	Foxm1, Foxk1, Foxj2, Foxp1, Foxn2
	General vesicle transport	Rab10
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras, Nras, Rras, Rras2
	mRNA transcription regulation	Fos, Atf2, Cited2, Smad7, Fosl1
	Protein folding	Fkbp2
	Protein phosphorylation	Tgfbr1, Mapk7
	Proteolysis	Smurf1
Interferon-gamma signaling pathway	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Socs4, Ifngr1
	JAK-STAT cascade	Socs3, Cish
	mRNA transcription	Stat1
	Protein phosphorylation	Ptpn11, Mapk7

Table 6. Gene list of baicalein (C-1)

Pathway	Biological process	Gene
Interferon-gamma signaling pathway	Carbohydrate transport	Lck, Src
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Il13ra1, Il15ra, Il10, Il18, Il6ra, Il6st, Il6
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	mRNA transcription	Stat1, Fos, Myc, Stat2, Stat5a, Stat5b
	Other polysaccharide metabolism	Gsk3b
	Protein phosphorylation	Rps6ka3, Akt3, Jak3
	Spermatogenesis and motility	Ins3
VEGF signaling pathway	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	Protein phosphorylation	Prkci, Akt3
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	Carbohydrate transport	Lck,Src
	Cell adhesion	Itga4, Itgal
	Cell structure	Arpc1a, Arpc1b
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Ccl7, Ccl4, Ccl3, Ccl5, Ccl2, Il18, Ifngr1
	G-protein mediated signaling	Rgs14, Gnai2, Rgs18, Gng5, Gng12, Gnai2, Rac1, Ccr1
	Immunity and defense	Ptgs1, Ptgs2
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	mRNA transcription	Stat1, Bcl3, Nfkb1, Nfkbia, Nfkb2
	Other lipid, fatty acid and steroid metabolism	Alox5ap, Alox12
Protein phosphorylation	Camk2d, Prkci, Prkx, Akt3, Pak4, Jak3	

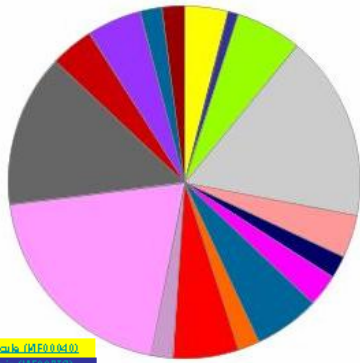
Pathway	Biological process	Gene
Angiogenesis	Carbohydrate transport	Src, Lck
	Cell structure	Lpxn
	Cell surface receptor mediated signal transduction	Grb10
	Ligand-mediated signaling	Wnt7b
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	mRNA transcription	Stat1
	mRNA transcription regulation	Fos
	Other intracellular signaling cascade	Bcr
	Other polysaccharide metabolism	Gsk3b
	Other receptor mediated signaling pathway	Dvl2
	Other signal transduction	Sphk2
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Protein phosphorylation	Prkci, Akt3, Pak4
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Pdgfa, Vegfa
T cell activation	Calcium mediated signaling	Calm3, Calm2, LOC381811
	Carbohydrate transport	Lck, Src
	G-protein mediated signaling	Rac1
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	MHCII-mediated immunity	H2-DMb1, H2-DMb2
	mRNA transcription regulation	Fos, Nfkb1, Nfkbia, Nfkb2
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Protein phosphorylation	Akt3, Pak4
	T-cell mediated immunity	LOC386479

Pathway	Biological process	Gene
EGF receptor signaling pathway	GRB2-ASSOCIATED BINDER, GAB (PTHR12156)	LOC232970
	DNA repair	Atm
	G-protein mediated signaling	Rac1
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	mRNA transcription	Stat1, Stat2, Stat5a, Stat5b
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Protein phosphorylation	Prkci, Akt3
	Signal transduction	Rasa2
B cell activation	Calcium mediated signaling	Calm3, Calm2, LOC381811
	Carbohydrate transport	Lck, Src
	G-protein mediated signaling	Rac1
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	mRNA transcription regulation	Fos, Nfkb1, Nfkbia, Nfkb2
TGF-beta signaling pathway	General vesicle transport	Rab13, Rab10
	G-protein mediated signaling	Rac1
	MAPKKK cascade	Hras1, Kras
	mRNA transcription regulation	Fos
	Other receptor mediated signaling pathway	Lefty1
	Protein folding	Fkbp2
	Protein phosphorylation	Bmpr1a
	Proteolysis	Smurf1
Oxidative stress response	mRNA transcription	Stat1, Myc
	Neuronal activities	Fus
	Protein phosphorylation	Dusp16, Dusp5, Dusp1

Category of Gene : Baicalein

PANTHER Molecular Function

Total # Genes: 85 Total # function hits: 103



- Cell adhesion molecule (MF00040)
- Cell junction protein (MF00203)
- Cytoskeletal anchor (MF00091)
- Kinase (MF00107)
- Miscellaneous function (MF00197)
- Molecular function unclassified
- Nucleic acid binding (MF00042)
- Chemokine (MF00137)
- Phosphatase (MF00133)
- Receptor (MF00069)
- Select calcium binding protein
- Select regulatory molecule
- Structural molecule
- Synthase and synthetase
- Transcription factor (MF00005)
- Transferase (MF00131)

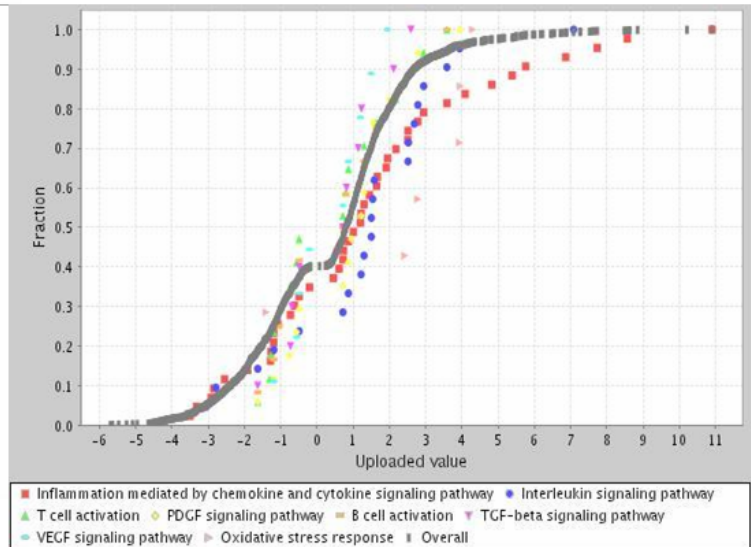


Table 7. Gene list of wogonin (C-2)

Pathway	Biological process	Gene
Oxidative stress response	mRNA transcription	Stat1, Myc
	Neuronal activities	Fus
	Protein phosphorylation	Dusp10, Dusp8, Dusp16, Dusp5, Dusp1, Dusp4, Mapkapk5, Map2k4
Interferon-gamma signaling pathway	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Socs4, Ifngr1
	Protein modification	Pias2, Miz1
VEGF signaling pathway	Biological process unclassified	3110043J09Rik, Arhgap8
	Lipid metabolism	Pik3cb, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2
	Protein phosphorylation	Mapkapk5, Akt2
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	Carbohydrate transport	Lck, Src
	Cell adhesion	Itga4, Itgal
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Ccl7, Ccl4, Ccl3, Ccl5, Ccl22, Ccl2, Ifngr1
	G-protein mediated signaling	Gna11, Gna15, Gnai2, Gng5, Gng12, Fpr-rs3, Rac1, Rac3, Cdc42, Cxcr4, Cx3cr1, Ccr12, Ccr1
	Immunity and defense	Ptgs1, Ptgs2
	Lipid metabolism	Pik3cb, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2
Stat1, Nfkb1, Nfkbia, Nfkb2, Nfatc3mRNA transcription	Protein phosphorylation	Camk2d, Prkx, D830007F02Rik, Akt2
Interleukin signaling pathway	Carbohydrate metabolism	Foxk1, Foxp1, Foxn2
	Carbohydrate transport	Src, Lck
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Il1a, Il10, Il6ra, Il6

Pathway	Biological process	Gene
Angiogenesis	Biological process unclassified	3110043J09Rik, Arhgap8
	Carbohydrate transport	Lck, Src
	Lipid metabolism	Pik3cb, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2
	mRNA transcription	Stat1, Fos
	Other polysaccharide metabolism	Gsk3b, Sphk2
T cell activation	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway Ptpn11, Mapkapk5, Akt2, Map2k4, Ptpbj	Grb2, Frs2, Angpt2, Vegfa
	Protein phosphorylation Carbohydrate transport Calm2, LOC381811 Calcium mediated signaling	Lck, Src
Rac1, Rac3, Cdc42 G-protein mediated signaling	Lipid metabolism	Pik3cb, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2
	MHCII-mediated immunity	H2-DMb2, Cd74, H2-DMb1, Ii
	mRNA transcription regulation	Fos, Nfkb1, Nfkb2, Nfkb3, Nfatc3
	signaling Calcium mediated EGF receptor signaling pathway	Calm2, LOC381811
	G-protein mediated signaling Lck, Src Carbohydrate transport	Rac1, Rac3, Cdc42
	MAPKKK cascade Pik3cb, Pik3cd Lipid metabolism	Rras, Rras2
TGF-beta signaling pathway Fos, Nfkb1, Nfkb2, Nfkb3, Nfatc3 mRNA transcription regulation	Carbohydrate metabolism	Foxk1, Foxp1, Foxn2
	G-protein mediated signaling	Rac1, Rac3, Cdc42
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2

Pathway	Biological process	Gene
Interleukin signaling pathway	Lipid metabolism	Pik3cb, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2
	mRNA transcription	Stat1, Fos, Myc
	Protein phosphorylation	Rps6ka1, Rps6ka3, Mapkapk5, Akt2
PDGF signaling pathway	Biological process unclassified	3110043J09Rik, Arhgap8
	Intracellular signaling cascade	Srgap2, Rab11b
	Lipid metabolism	Pik3cb, Pik3cd
	MAPKKK cascade	Rras, Rras2

Category of Gene : Wogonin

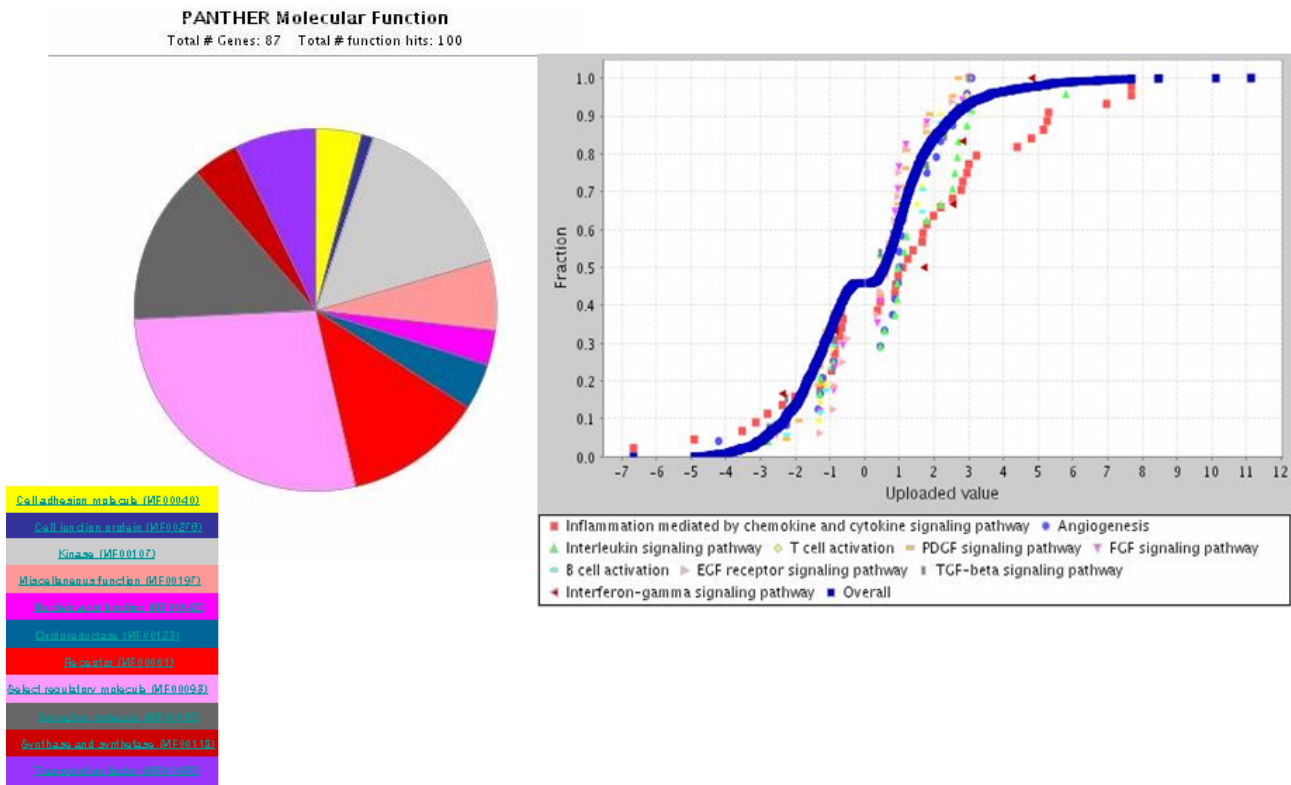


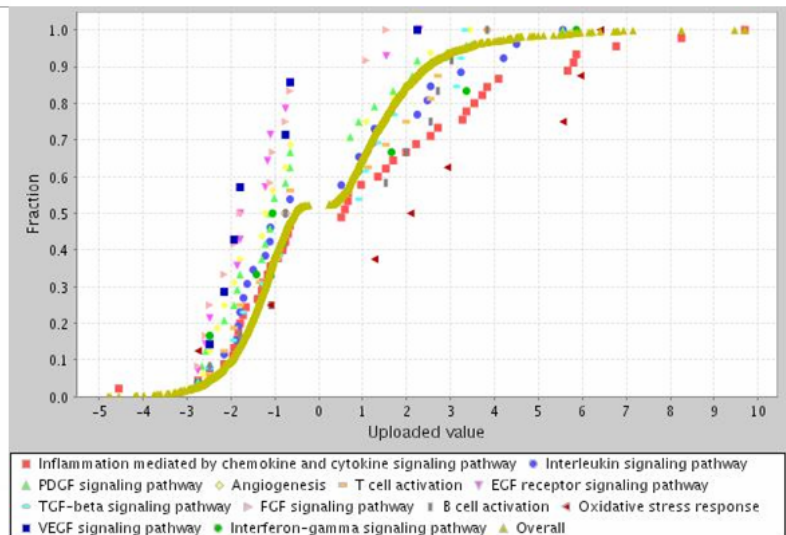
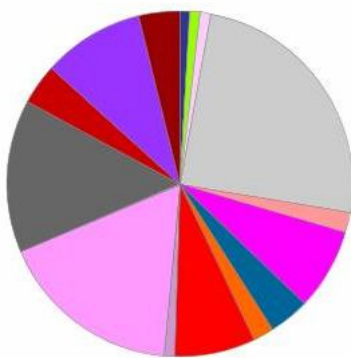
Table 8. Gene list of chrysin (C-3)

Pathway	Biological process	Gene
Angiogenesis	MAPKKK cascade	Raf1
	mRNA transcription regulation	Jag1
	Other signal transduction	Dok3
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Phospholipid metabolism	Pik4cb
	Protein phosphorylation	Ptpn6, Mapk3, Mapk6, Akt1
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Frs3
T cell activation	MHCII-mediated immunity	Cd74, Ii
	mRNA transcription regulation	Nfkb1, Nfkbib, Nfkbia, Nfkb2
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Protein phosphorylation	Csk, Mapk3, Akt1
B cell activation	Calcium mediated signaling	Calm3, LOC384500
	mRNA transcription regulation	Nfkb1, Nfkbib, Nfkbia, Nfkb2
	Protein phosphorylation	Ptpn6, Mapk3, Map3k3
EGF receptor signaling pathway	Biological process unclassified	Ccm2, Stat3
	Ligand-mediated signaling	Areg
	Protein phosphorylation	Mapk3, Akt1, Map3k3, Map3k4
	Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	Cbl, LOC384390, Spry2
	Signal transduction	Rasa3
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	Phospholipid metabolism;Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Inpp5d
	Protein phosphorylation	Camk2d, Gprk6, Prkaca, Mapk3, Akt1, Map3k3, Map3k4, Map3k7, Jak2, Pdpk1
Oxidative stress response	mRNA transcription regulation	Myc
	Protein phosphorylation	Dusp16, Dusp5, Dusp1, Dusp4, Map3k3, Map3k4

Pathway	Biological process	Gene
Interleukin signaling pathway	mRNA transcription regulation	Srf, Myc, Bmyc, Stat6, Sfp1l
	Protein phosphorylation	Mapk3, Mapk6, Rps6ka1, Akt1, Map3k3, Map3k4, Map3k7, Pdpk1
Interferon-gamma signaling pathway	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	Socs4
	JAK-STAT cascade; Inhibition of apoptosis	Socs3
	Protein modification	Pias4
VEGF signaling pathway	Protein phosphorylation	Ptpn6, Mapk3, Jak2
	Intracellular signaling cascade	Pik3r2
	Lipid metabolism	Pik3cd
	MAPKKK cascade	Raf1
	Phosphate metabolism	Pik3c3
PDGF	Protein phosphorylation	Mapk3, Mapk6, Akt1
	Phosphate metabolism	Pik3c3
	Signal transduction	Rasa3

Category of Gene : Chrysin

PANTHER Molecular Function
 Total # Genes: 85 Total # function hits: 108

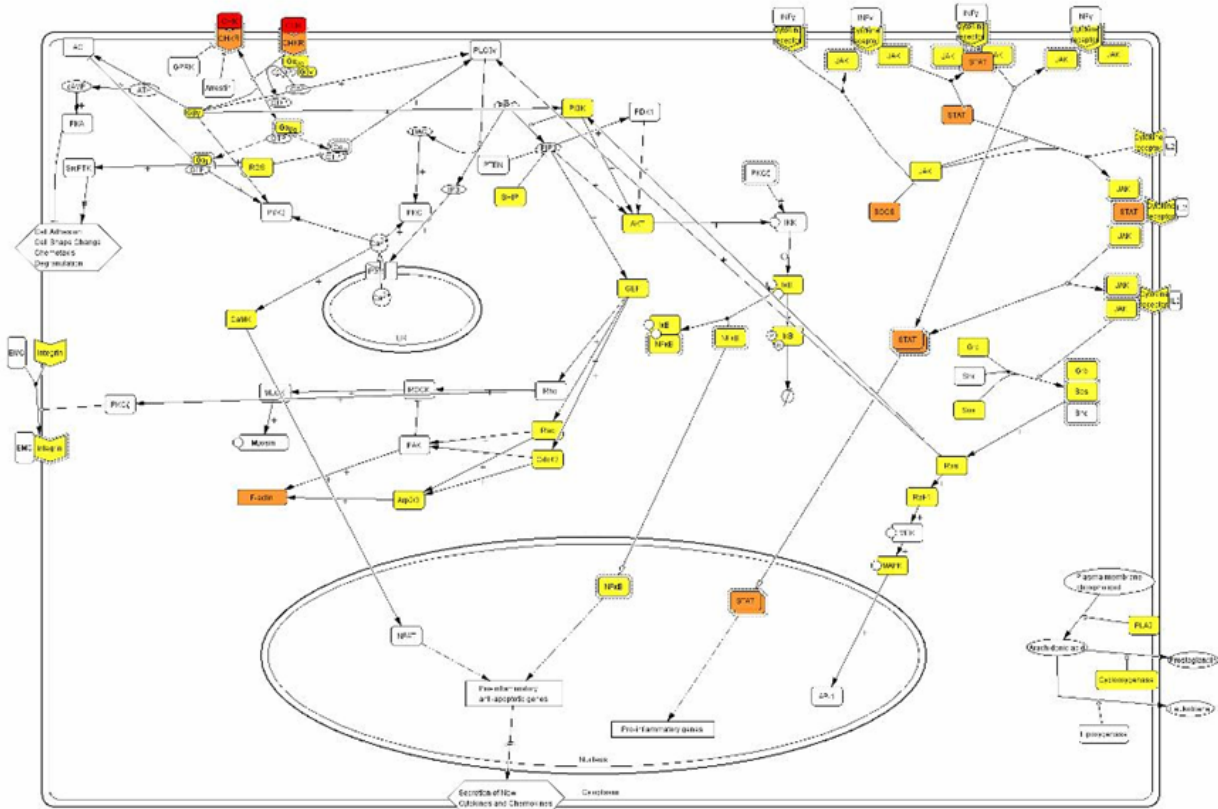


사. Signal pathway에서 발현 변화 유전자들의 작용 단계

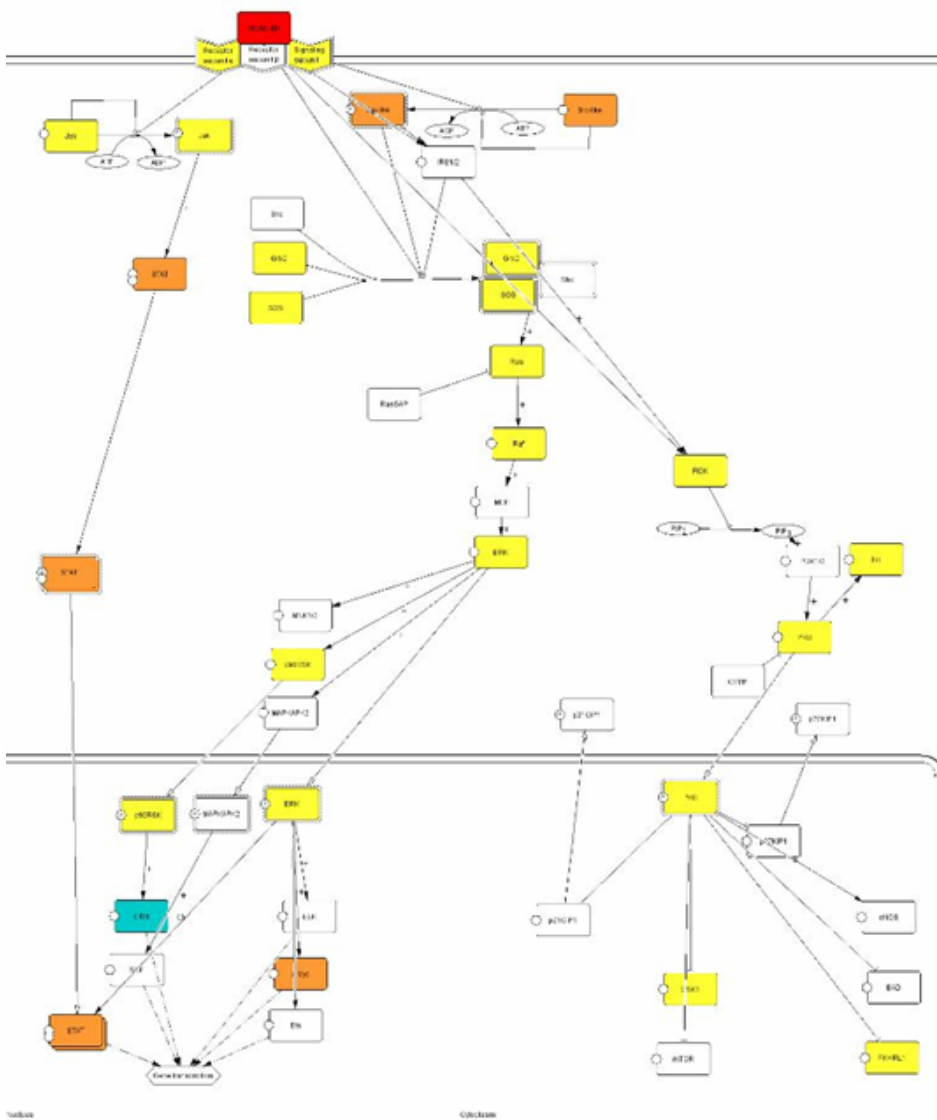
항염증과 관련된 대표적인 signal pathway에서의 발현 변화 유전자들의 작용 단계는 다음과 같 음.

Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway

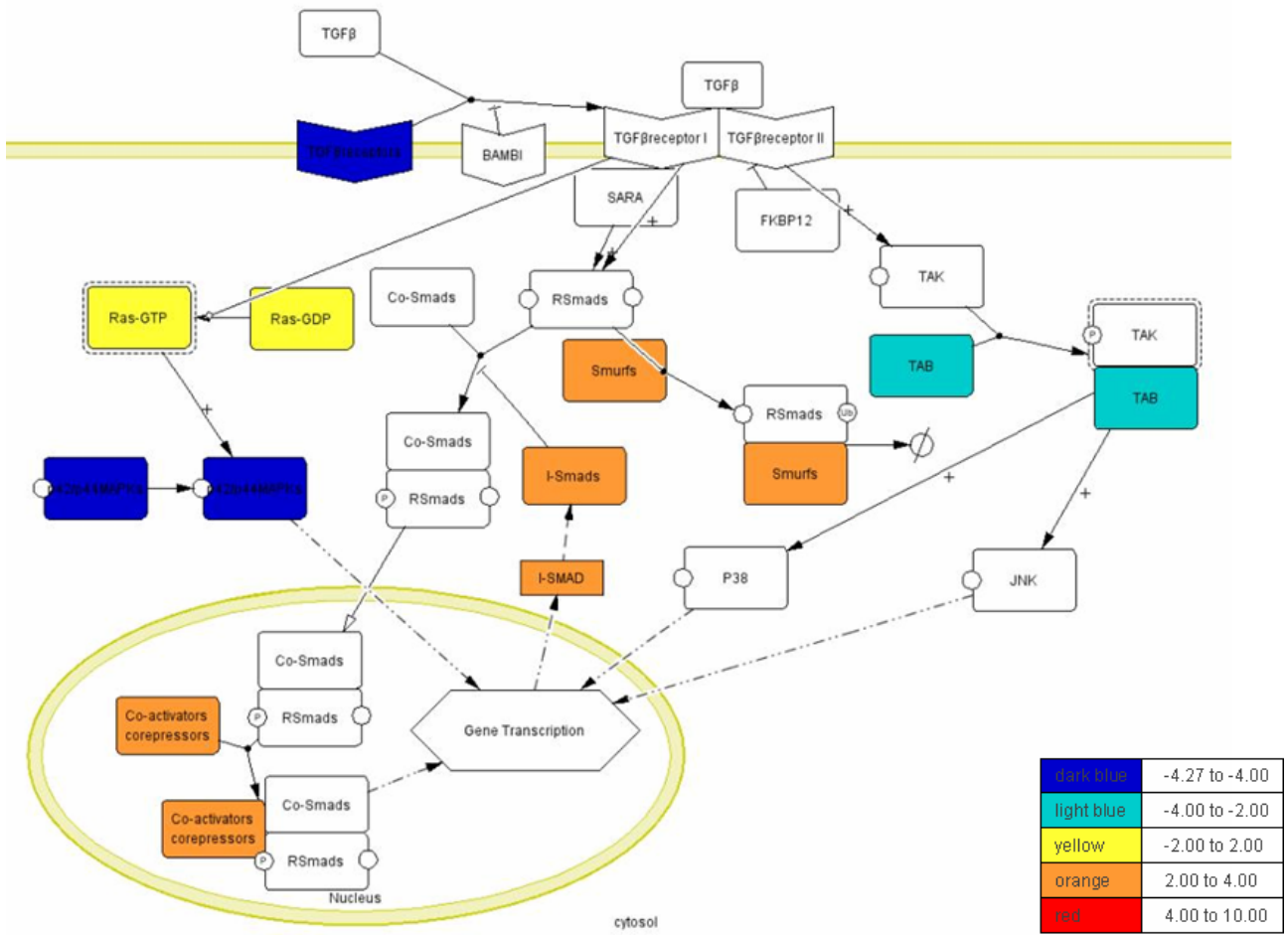
dark blue	-4.27 to -4.00
light blue	-4.00 to -2.00
yellow	-2.00 to 2.00
orange	2.00 to 4.00
red	4.00 to 10.00



Interleukin signaling pathway



TGF beta signaling pathway



아. 최종 선정된 유전자

황금 70% 추출물과 C1, C2, C3에 대해 공통적으로 변화된 유전자들을 검색한 결과 4배 이상의 발현 차이가 나타난 유전자들을 중심으로 14개의 유전자를 선정 (Table 9). 이들은 황금의 항염증 효과와 관련된 유전자들로 모든 효능 성분들에서 변화를 나타냄.

Table 9. 최종 선정 gene list (항염증 관련 유전자 선별)

Gene symbol		Molecular funtion
activin A receptor, type 1;	Acvr1	TGF-beta receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase
activin receptor IIA;	Acvr2a	TGF-beta receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase
interferon gamma receptor 2;	Ifngr2	Interferon receptor;Defense/immunity protein
interleukin 11 receptor, alpha chain 1;	Il11ra1	Interleukin receptor
interleukin 11 receptor, alpha chain 2;	Il11ra2	Interleukin receptor
interleukin 4;	Il4	Interleukin
interleukin 4 receptor, alpha;Il4ra	Il4ra	Interleukin receptor
interleukin 6 signal transducer;Il6st	Il6st	Interleukin receptor
leukotriene C4 synthase;Ltc4s	Ltc4s	Other transferase
transforming growth factor, beta 1;	Tgfb1	Growth factor
transforming growth factor, beta receptor II;	Tgfbr2	Other cytokine receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase
suppressor of cytokine signaling 4;	Socs4	Cytokine
integrin alpha 6;	Itga6	Other cell adhesion molecule
leukotriene C4 synthase;	Ltc4s	Other transferase

이들 유전자를 대상으로 각각의 유전자에 대해서 RT-PCR product가 Chip의 probe를 포함하도록 primer를 디자인하여 각 유전자의 발현 변화를 RT-PCR로 확인함 (Fig. 7). PCR 결과 각 유전자별 band를 housekeeping gene인 β -actin의 발현량으로 보정하여 그래프로 나타냄. Activin A-R은 LPS 처리 2시간 및 8시간에 대조군과 비교하여 발현이 급격히 감소되었으나 baicalein 및 wogonin의 처리로 발현이 증가됨 (Fig. 8). Activin-R II A는 LPS 처리 2, 4, 8시간에 대조군과 비교하여 변화가 없었고 약물의 처리로 발현 변화가 없었으나 wogonin과 chrysin의 18시간 처리 시 발현이 감소되었음 (Fig. 8). IFN- γ 는 LPS 18시간 처리시 대조군과 비교하여 발현이 감소되었으나 wogonin의 처리로 대조군과 같은 수준으로 발현이 증가되어 LPS 처리로 인한 손상이 회복됨을 나타냄 (Fig. 9). IL4-R은 2시간에서 8시간 까지 LPS의 처리로 발현이 증가되었으나 2시간에 wogonin과 chrysin의 처리로 대조군의 수준으로 발현이 감소되었고 4시간에는 모든 약물 처리군에서 LPS 처리군보다 발현이 감소되었으며 8시간에는 wogonin과 chrysin의 처리로 발현이 감소되었음 (Fig. 9). IL6-ST는 LPS 처리 4시간에 대조군보다 발현이 증가되었고 약물 처리로 발현이 감소됨. 8시간과 18시간에는 LPS의 처리로 발현이 감소되었으나 70E과 wogonin 또는 chrysin의 처리로 다시 발현이 증가됨 (Fig. 10). IL11-R은 2시간에 LPS 처리로 발현이 감소되었으나 약물의 처리로 대조군 수준으로 발현이 증가되었음 (Fig. 10). TGF- β 는 18시간 LPS 처리시 발현이 감소되었으나 wogonin과 chrysin의 처리로 대조군과 유사하게 발현이 증가됨 (Fig. 11).

이상의 결과로 IL-1, Ptges2, TNF- α 를 비롯하여 Activin A-R I, Activin-R II A, IFN- γ , IL4-R, IL6-ST, IL11-R, SCS4, TGF- β 등을 효능 유전자로 제시함.

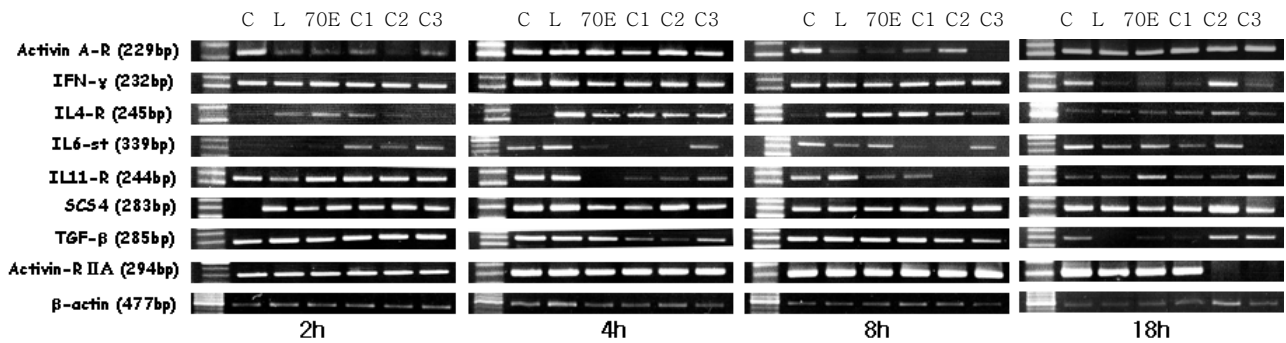


Fig 7. The confirmation of genes (The RT-PCR products of selected genes).

70E; 70% EtOH ext. of Scutellaria Root, C1; Baicalein, C2; Wogonin, C3; Chrysin.

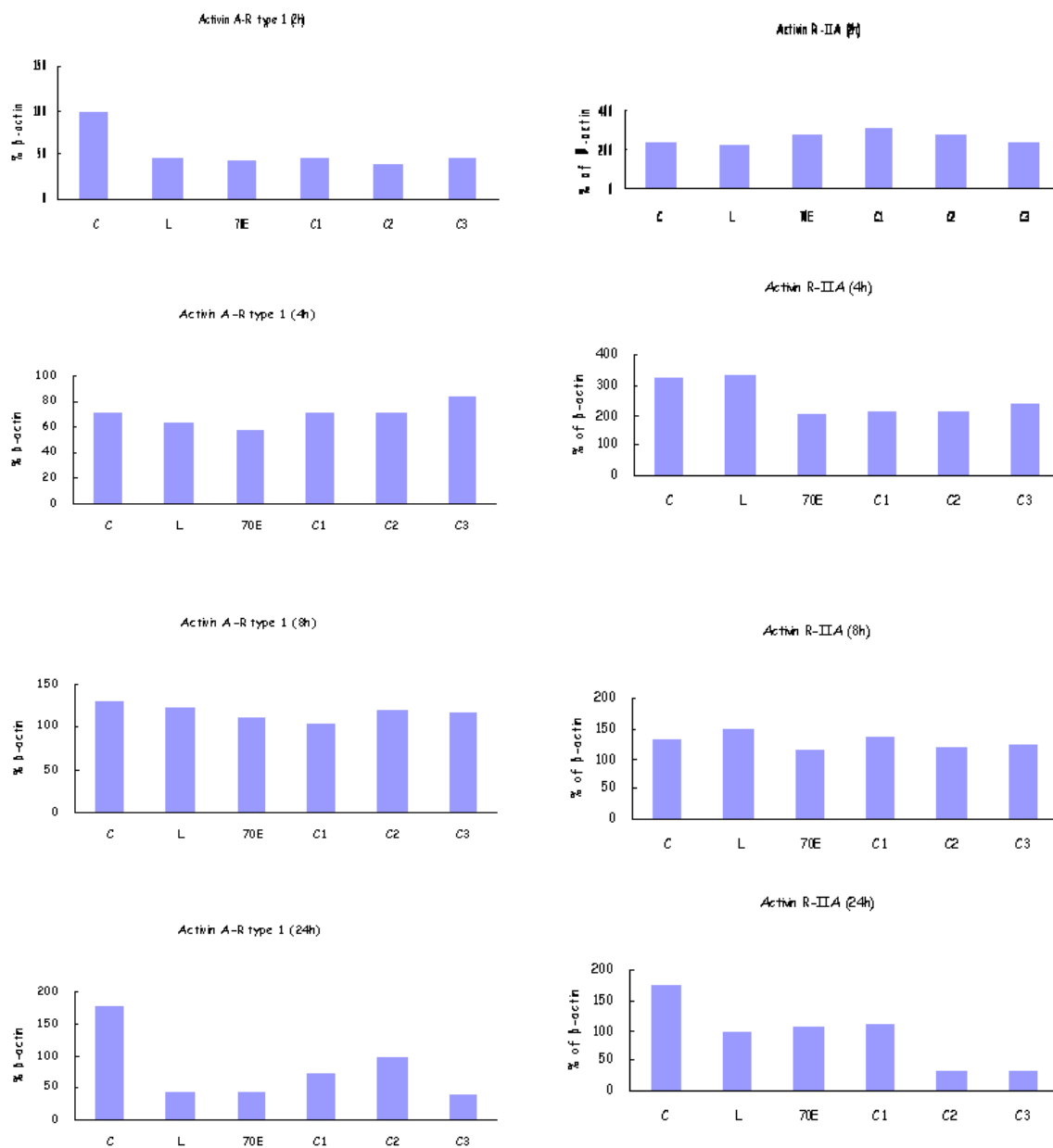


Fig. 8. The expression ratios of Activin A-R I and -R II A (% of β -action).

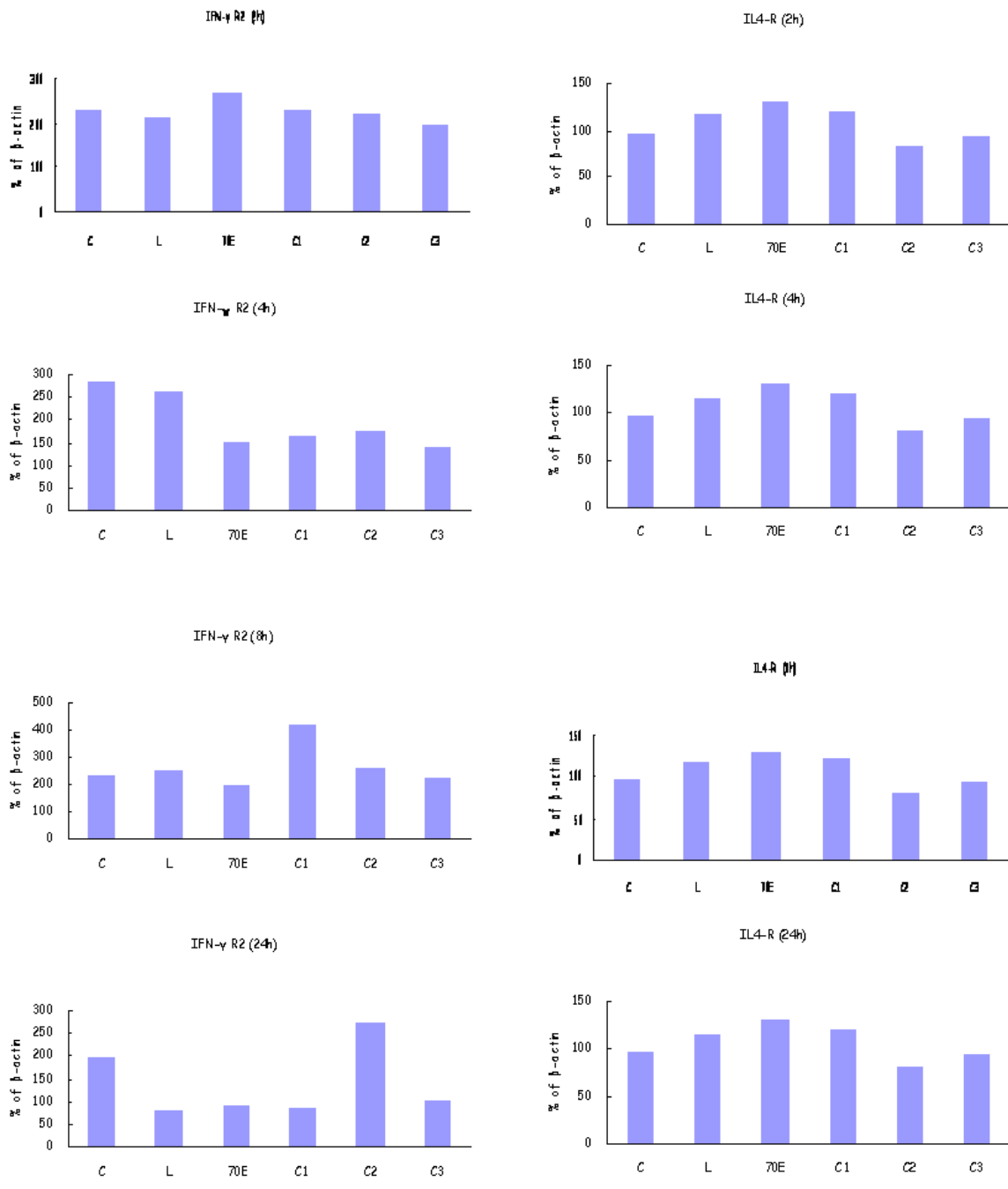


Fig. 9. The expression ratios of IFN- γ R2 and IL4-R (% of β -actin).

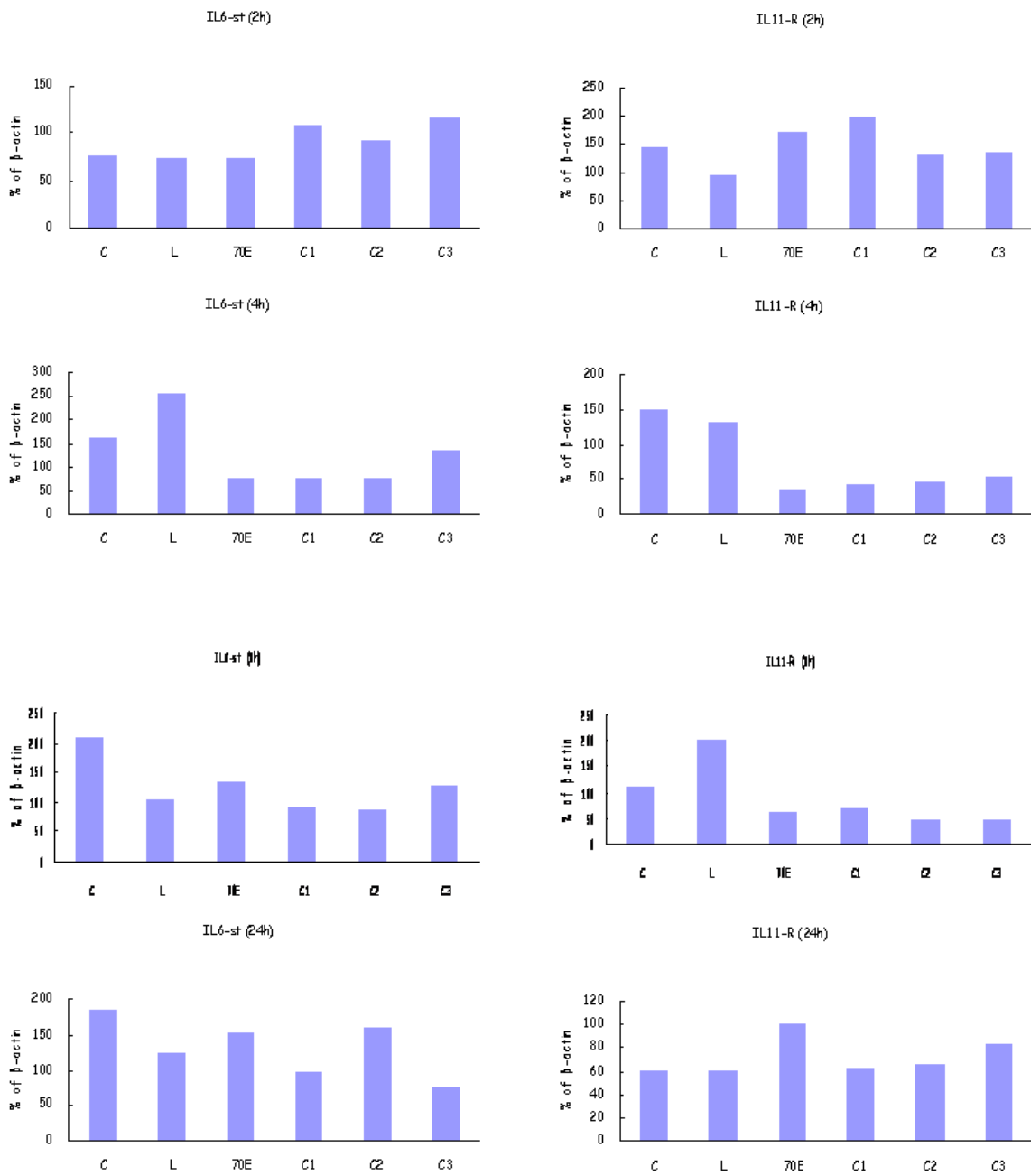


Fig. 10. The expression ratios of IL6-ST and IL11-R (% of β -action).

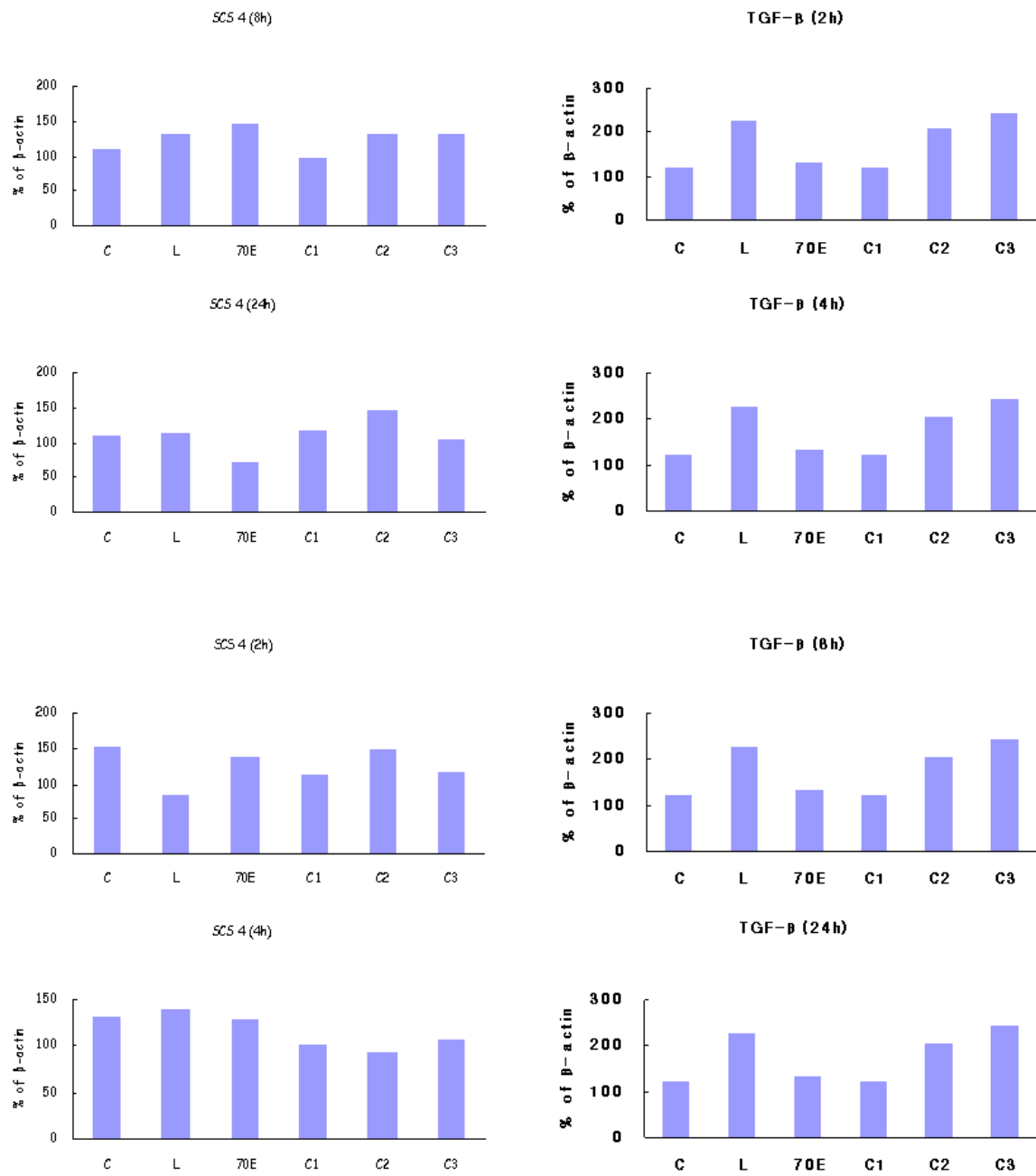


Fig. 11. The expression ratios of SSC-4 and TGF-β1 (% of β-actin).

자. 효능 성분 및 약리 유전자 DB 자료 제공

상기 검색 조건과 연구 결과 선정된 유효 성분 (Baicalein, Wogonin, Chrysin), 황금과 유효 성분들의 약리 효능 유전자 정보를 한약재 과학화 DB 구축 사업팀에 제공함.

번호	제공 내용
1	사용한 cell line 정보
2	예비 실험 data - Cytotoxicity - <i>In vitro</i> 활성 검색 결과
3	Chip 실험을 위한 RNA 분리 조건 - Cell line - 처리 농도 - 처리 시간 - Replication No.
4	Chip의 종류 (mouse whole gene chip; ABI)
5	Labeling 방법 : RT labeling 법
6	Chip scanning data - QC report - Image file - 분석 프로그램에 사용한 Raw data (scan data)
7	분석 프로그램 - Avadis - R - J-express
8	분석 조건 - Filtering : $S/N \geq 3$, $Flag \geq 500$ - 기타
9	분석 후 발현 변화가 유의한 gene list
10	분석된 genes이 포함된 signal pathway 정보 등

3.2. 단삼 (유전자칩을 활용한 단삼 및 생리활성 성분의 효능 유전자 검증)

가. 단삼 추출물 및 단일 화합물의 시료 확보

단삼 70% ethanol 추출물과 단일화합물 6개를 제1세부에서 제공받음.

Table 10. Extract and components of *Salviae Miltiorrhizae Radix*

Name	Molecular weight	Sample No.
70% ethanol extract		70-E
tanshinone I	276	C-7
tanshinone II A	294	C-8
cryptotanshinone	296	C-9
15,16-dihydrotanshinone I	278	C-10
rosmarinic acid	376	C-14
salvianolic acid B	750	C-15

나. Cytotoxicity assay

단삼 추출물 및 단일성분들의 J774A.1 세포 및 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성 측정 결과 tanshinone I 및 15,16-dihydrothanshinone I의 1~2 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서도 세포 독성이 높은 것으로 나타났으며 70E 및 rosmarinic acid와 salvianolic acid B는 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 세포독성이 나타나기 시작함 (Fig. 12, Table 10).

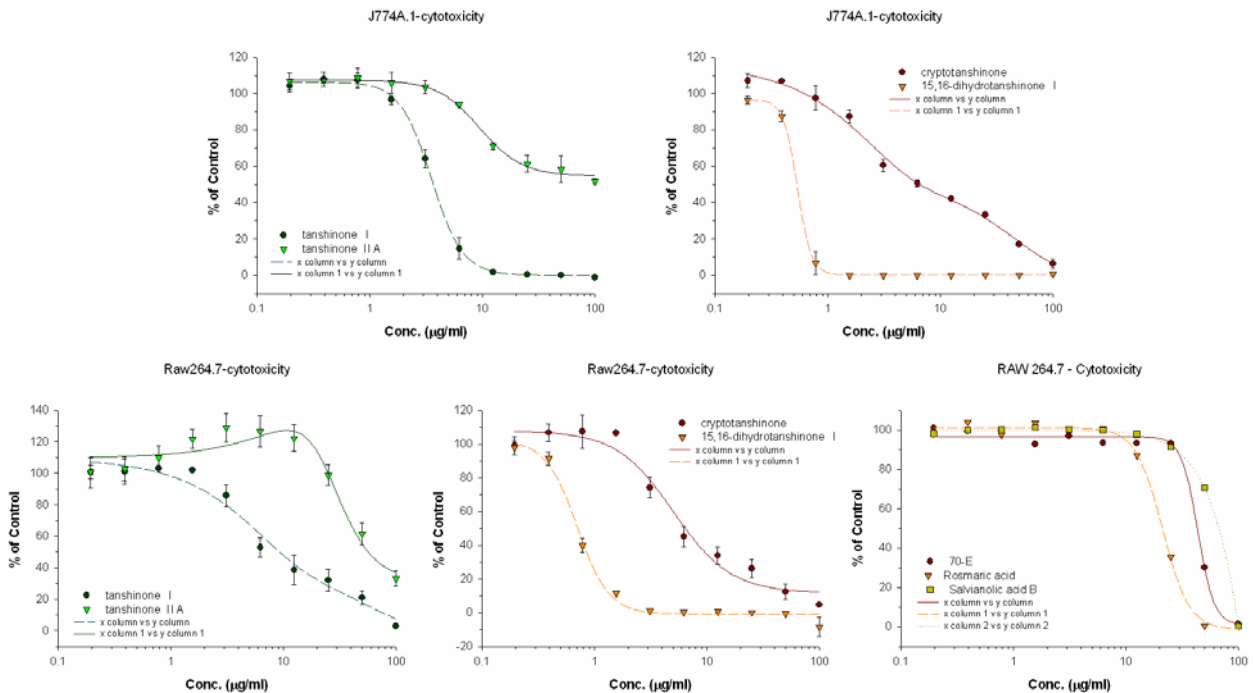


Fig. 12. Cytotoxicity of samples on Raw 264.7 cells.

Table 10. The cytotoxicity of *Salviae Miltiorrhizae Radix* on Raw 264.7 and J774A.1

sample	IC ₅₀ (μg/ml)	
	Raw 264.7	J774A.1
70-E 단삼	43.16 μg/ml	
tanshinone I	9.83 μg/ml (35.6 μM)	3.55 μg/ml (12.9 μM)
tanshinone II A	80.26 μg/ml (273.0 μM)	>100 μg/ml (>340.0 μM)
cryptotanshinone	6.85 μg/ml (23.1 μM)	7.48 μg/ml (25.3 μM)
15,16-dihydrotanshinone I	0.63 μg/ml (2.27 μM)	0.41 μg/ml (1.48 μM)
rosmarinic acid	21.11 μg/ml (56.1 μM)	
salvianolic acid B	67.19 μg/ml (89.6 μM)	

다. 항산화 효과 (murine macrophage cell line)

(1) LPS 농도 및 처리시간 결정

제공된 시료들의 처리시간과 LPS의 처리농도를 결정하기 위하여 LPS를 농도별, 시간별로 처리한 후 NO assay, GSH assay를 실시한 결과 처리시간은 최대 24시간으로 세포수는 2×10^5 cell/well (24 well plate), LPS 처리농도는 1000 ng/ml, NO 검사를 위한 처리시간은 18 hr ~ 24 hr, GSH 검사를 위한 처리시간은 4 hr 이하로 확정함 (Fig. 13).

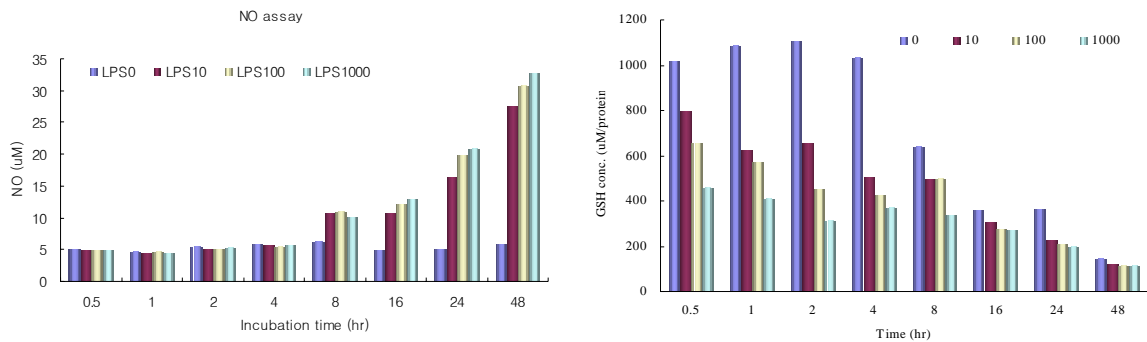


Fig. 13. NO and GSH concentration on the dose- and time-dependent for LPS.

(2) SOD activity 검색

Raw 264.7 세포에 LPS (1 μg/ml)를 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 시간 및 48시간을 처리하여 SOD의 활성을 검색한 결과 시간이 증가함에 따라 LPS 처리 4시간에는 대조군과 비교하여 SOD 활성의 차이가 나타나지 않았으나 24시간 처리시 대조군과 비교하여 3배 이상 SOD 활성이 증가하였음. Salvianolic acid B를 제외한 단삼의 70E 및 모든 성분은 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시킴. 15,16-dihydrotanshinone I은 10 μg/ml에서 SOD 활성이 감소하였는데 이는 15,16-dihydrotanshinone I의 세포독성에 의한 것으로 사료됨. Tanshinone I, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid는 LPS 처리군보다 더 높게 SOD 활성을 증가시킴 (Fig. 14).

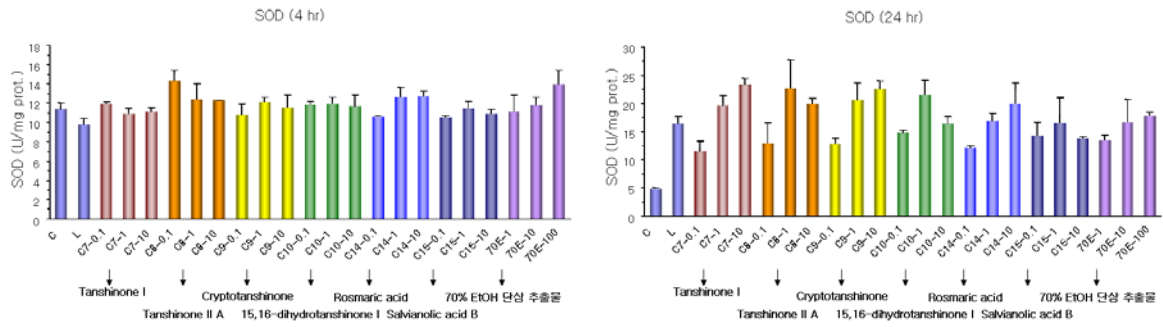


Fig. 14. SOD activity of *Salviae Miltiorrhizae Radix*

(3) NO assay

LPS 처리 4시간 및 24시간에 대조군과 비교하여 NO의 농도가 2.5배 증가됨. 약물 처리시 단삼 70E, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B는 4 hr 및 24 hr에서 농도의존적으로 NO 생성을 감소시킴 (Fig. 15).

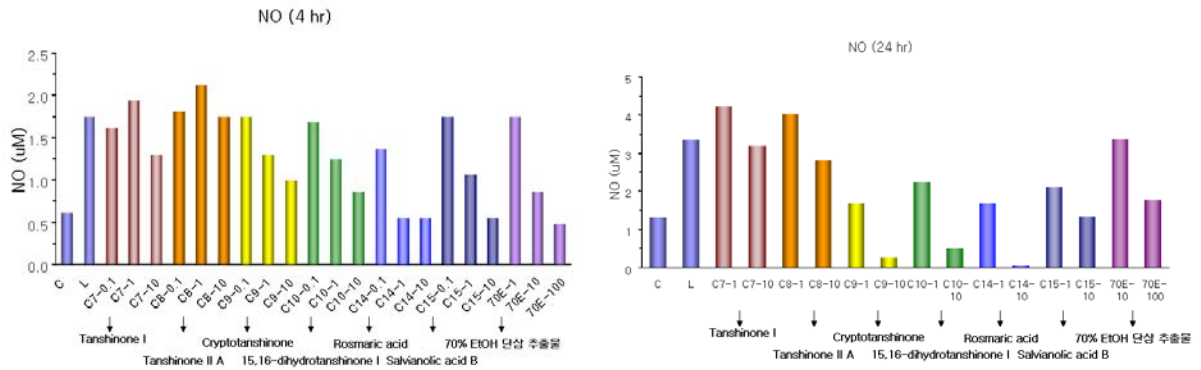


Fig. 15. NO activity of *Salviae Miltiorrhizae Radix*

(4) Glutathione (GSH) assay

Reduced form의 glutathione의 정량 결과 LPS 처리 4시간에는 대조군과 비교하여 GSH 양의 변화가 없었음. 24시간 LPS 처리시 대조군의 1/3으로 감소하였으나 rosmarinic acid 처리시 GSH의 양이 대조군과 유사하게 증가됨 (Fig. 16).

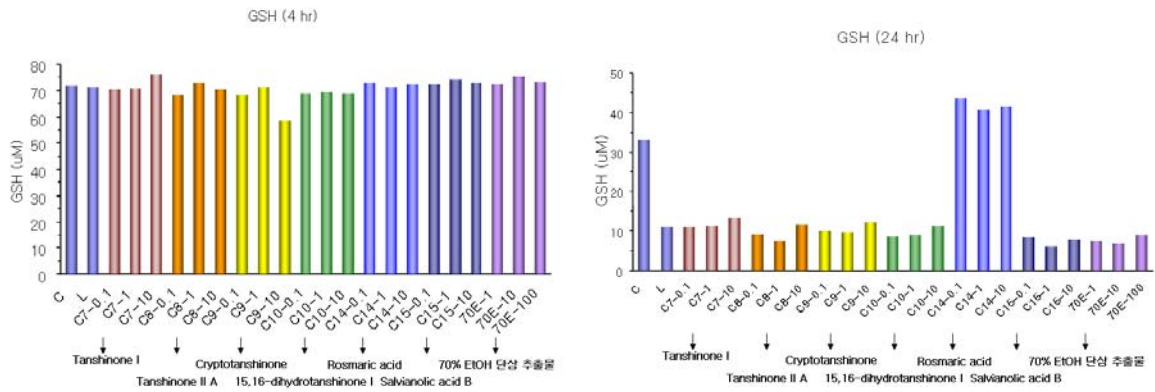


Fig. 16. GSH activity of *Salviae Miltiorrhizae* Radix

이상의 결과를 종합하여 단삼의 항산화 효과에 대한 효능 성분으로 tanshinone I (C7), cryptotanshinone (C9), rosmarinic acid (C14), salvianolic acid B (C15)를 선정하고 제시함. 이후 DNA chip 실험에 이들 성분을 적용함.

라. DNA chip 연구를 위한 예비 실험

DNA chip 실험을 실행하기 위하여 Raw 264.7 cell에 처리할 LPS 농도는 1 mg/ml로 고정시킴. 단삼의 항산화 관련 유전자들의 발현 변화를 검색하고자 Raw 264.7 세포에 단삼 70% EtOH 추출물을 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 1, 2, 4, 8, 16, 24 시간 처리 후 RNA를 분리하여 RT-PCR로 확인한 결과 단시간에 단삼의 농도 의존적으로 GR과 SOD (Mn) gene의 발현이 증가 되었으며 처리 시간이 증가함에 따라 GPx, SOD (Cu/Zn), iNOS의 발현이 감소되는 것으로 나타남 (Fig. 17).

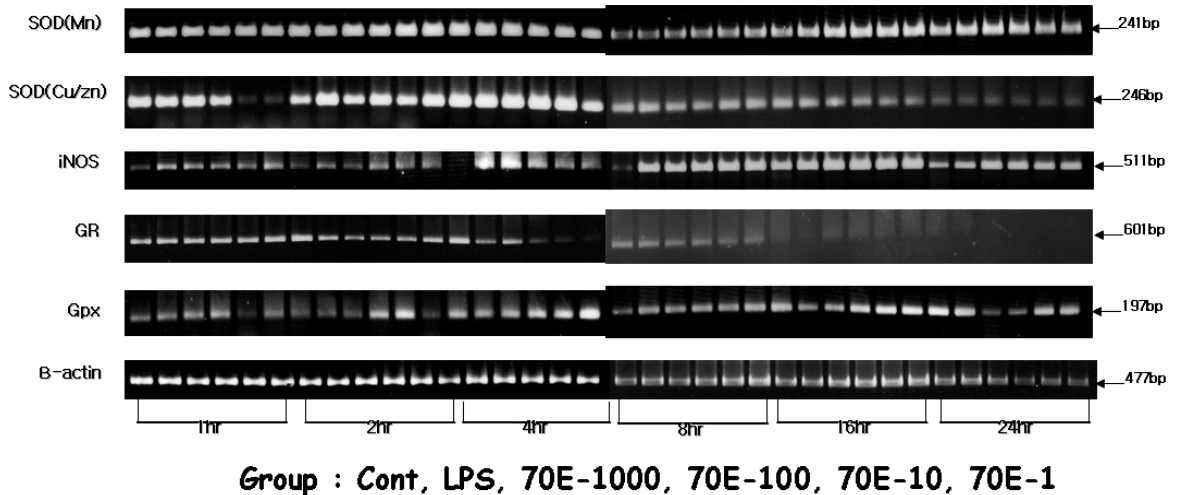


Fig. 17. Effects of 70% EtOH ext. of *Salviae Miltiorrhizae* Radix on SOD, iNOS, GR, and Gpx by LPS induced in RAW 264.7 cells.

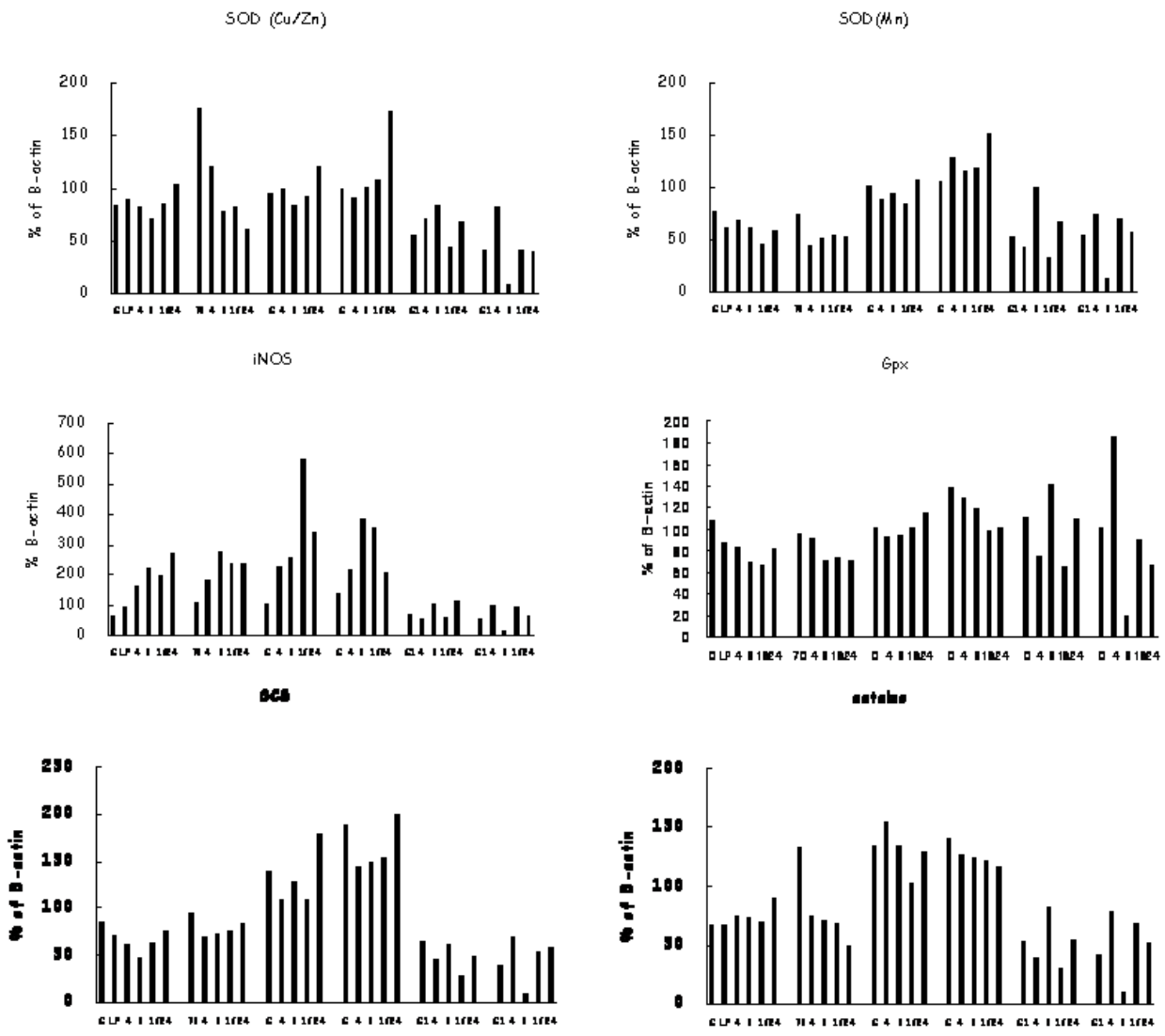
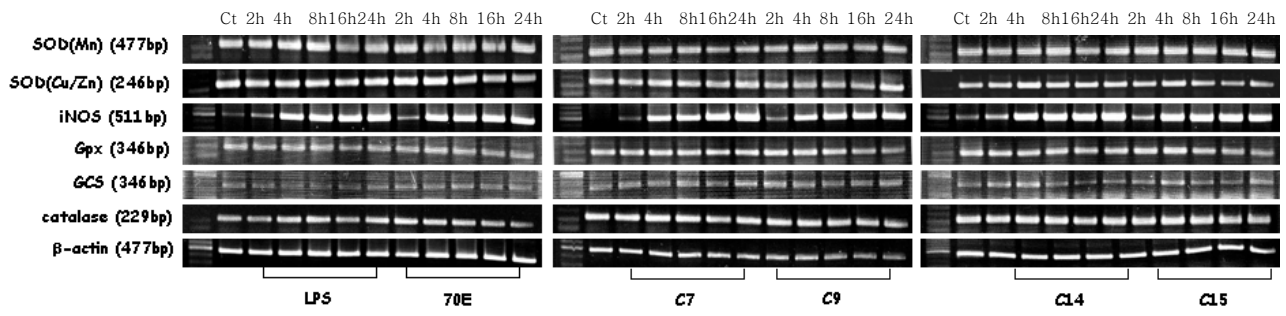


Fig. 18. Effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* and its ingredients on SOD, iNOS, Gpx, GCS, and catalase by LPS induced in RAW 264.7 cells.

Chip 실험을 진행하기 위하여 약물처리 후 분리한 RNA를 이용하여 SOD, iNOS, Gpx, GCS, catalase의 발현 변화를 RT-PCR로 확인한 결과 70% EtOH 추출물은 2시간 처리에서 Cu/Zn SOD의 발현이 증가하여 처리시간이 증가함에 따라 대조군과 같은 수준으로 발현이 감소되었으나 C9 (cryptotanshinone)은 처리시간의 증가에 따라 발현이 증가됨. C7 (tanshinone I)과 C9을 처리했을 때 Mn SOD의 발현이 증가됨. LPS 단독 처리 시에도 시간의 증가에 따라 iNOS의 발현이 증가하였으나 C7과 C9의 처리로 시간이 증가함에 iNOS의 발현이 크게 증가됨. C15 (salvianolic acid B) 처리시 GPx의 발현이 증가되었고 C7과 C9 처리시 GCS의 발현이 증가되었음. Catalase의 경우 70E 처리 시 2시간에 발현이 증가되었으며 C7과 C9 처리시에도 발현이 증가된 것으로 나타나 단삼과 그 성분들의 항산화 효과를 유전자 level에서도 확인함 (Fig. 18).

마. DNA chip

Raw 264.7 세포에서 약물에 따른 효능 유전자의 변화를 측정하기 위하여 2×10^6 cells/well (6-well plate)의 농도로 세포를 분주하여 24배양 후 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 70E-단삼 (70E), tanshinone I (C7), cryptotanshinone (C9), rosmarinic acid (C14), salvianolic acid B (C15)를 처리 후 2, 4, 8시간 및 24시간에 RNA 분리. 확실한 유전자의 발현 변화를 측정하기 위하여 Raw 264.7 세포에 대해 각 약물의 세포독성을 나타내지 않은 최고 농도를 선정하여 처리 (Table 11).

Table 11. The concentration of the extract and components.

Compound	Concentration	Compound	Concentration
70-E	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	C-14	20 μM
C-7	10 μM	C-15	20 μM
C-9	10 μM		

분리한 total RNA을 10 μg 취하여 Applied Biosystems chemiluminescent RT-IVT Labeling kit (Applied Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 cRNA 합성 시에 digoxigenin으로 labeling 한 후 Applied Biosystems mouse genome survey microarray (Applied Biosystems, U.S.A.)에 적용. Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Analyzer로 scan하고 Avadis[®], R, GenPlex 프로그램 등을 이용하여 분석. 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 항산화·항염증 관련 유전자들의 변화가 가장 크게 나타났으며 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남. 특히 항산화와 관련한 oxidative stress와 관련된 gene들의 변화가 크게 나타났으며 관련 gene들의 분석 후, 단삼의 대표적인 생리활성 효과인 cardiovascular 질병 치료와 관련됨이 나타남.

(1) Filtering & Clustering

ABI mouse chip을 분석하기 위하여 Avadis[®], R, GenPlex[®] program을 이용하여 각각 filtering, normalization 및 clustering을 진행함. Hierarchical 과 K-means cluster를 사용하여 분석한 결과 유전자의 증감에 따라 분류함. 각각의 cluster image와 의미있는 발현 변화를 나타낸 cluster의 genes의 발현 증감을 그래프로 나타냄 (Fig. 19 ~ 23). 본 연구에 사용한 전체 chip들에 대한 data를 hierachical clustering을 통하여 같은 처리군들이 clustering 되는 것을 확인하였음.

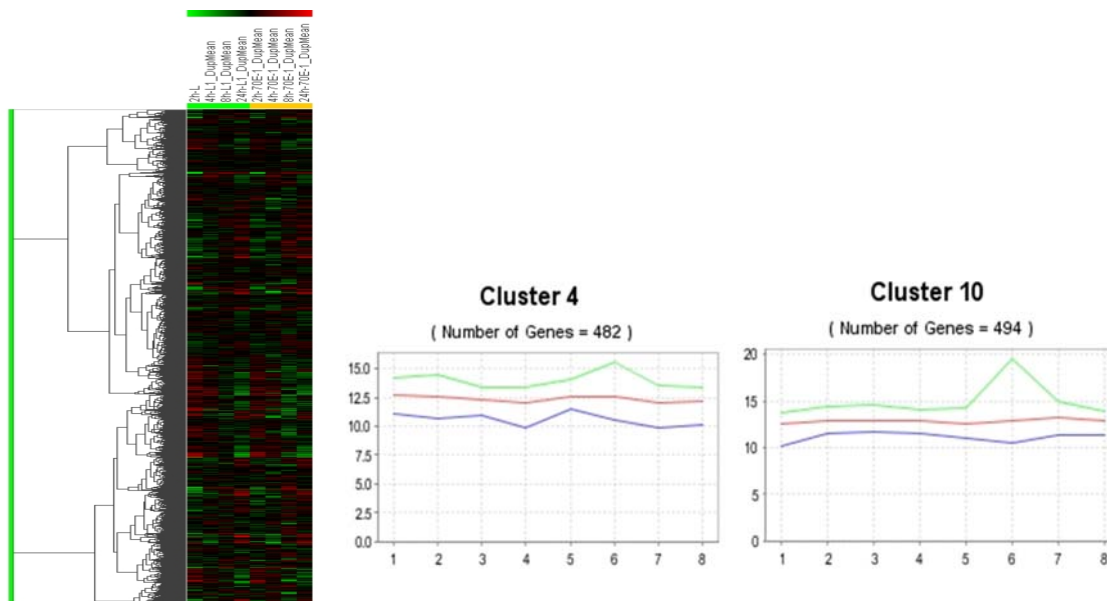


Fig. 19. The image of cluster for 70% ethanol extract of *Salviae Miltiorrhizae* Radix

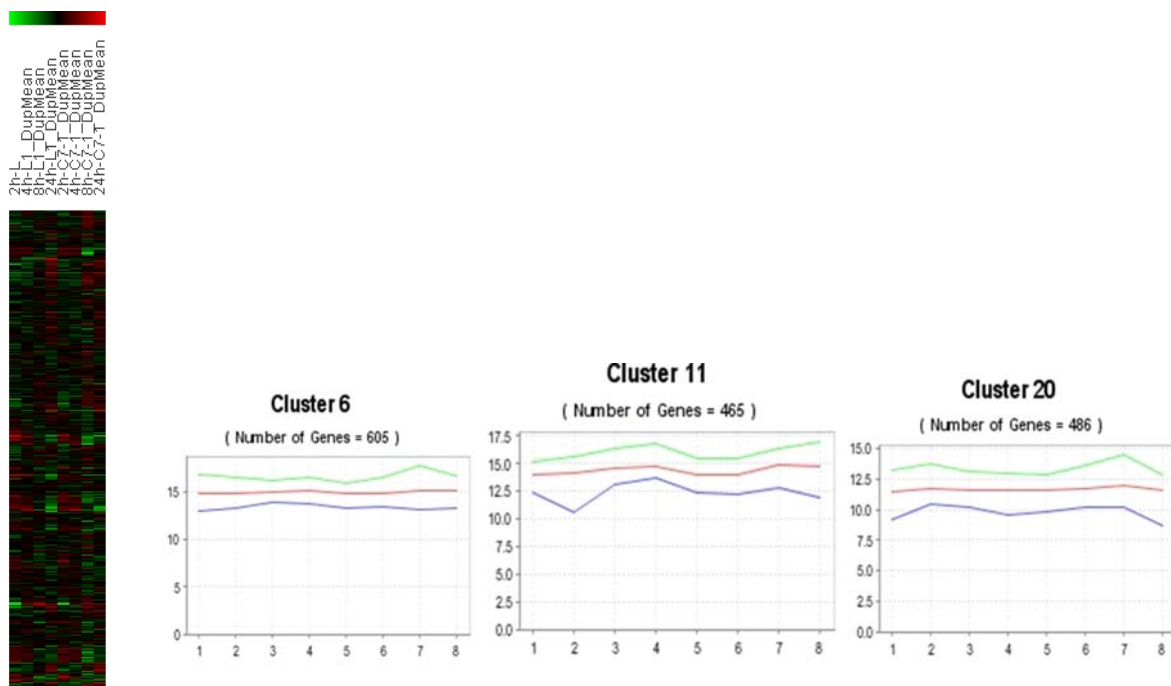


Fig. 20. The image of cluster for tanshinone I (C7)

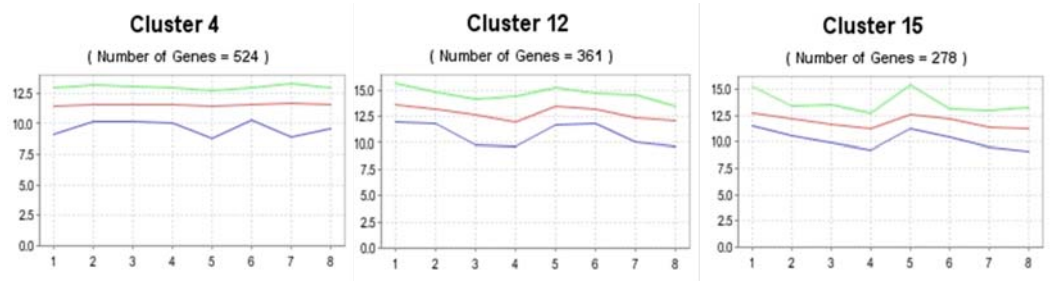
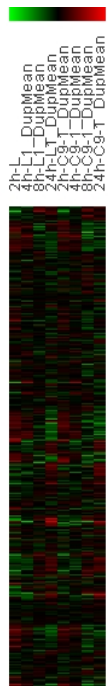


Fig. 21. The image of cluster for cryptotanshinone (C9)

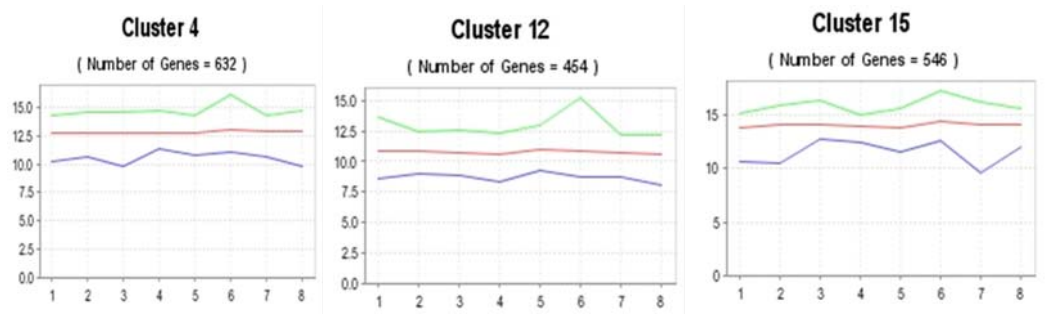
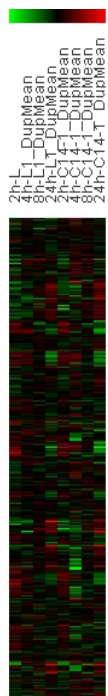


Fig. 22. The image of cluster for rosmarinic acid (C14)

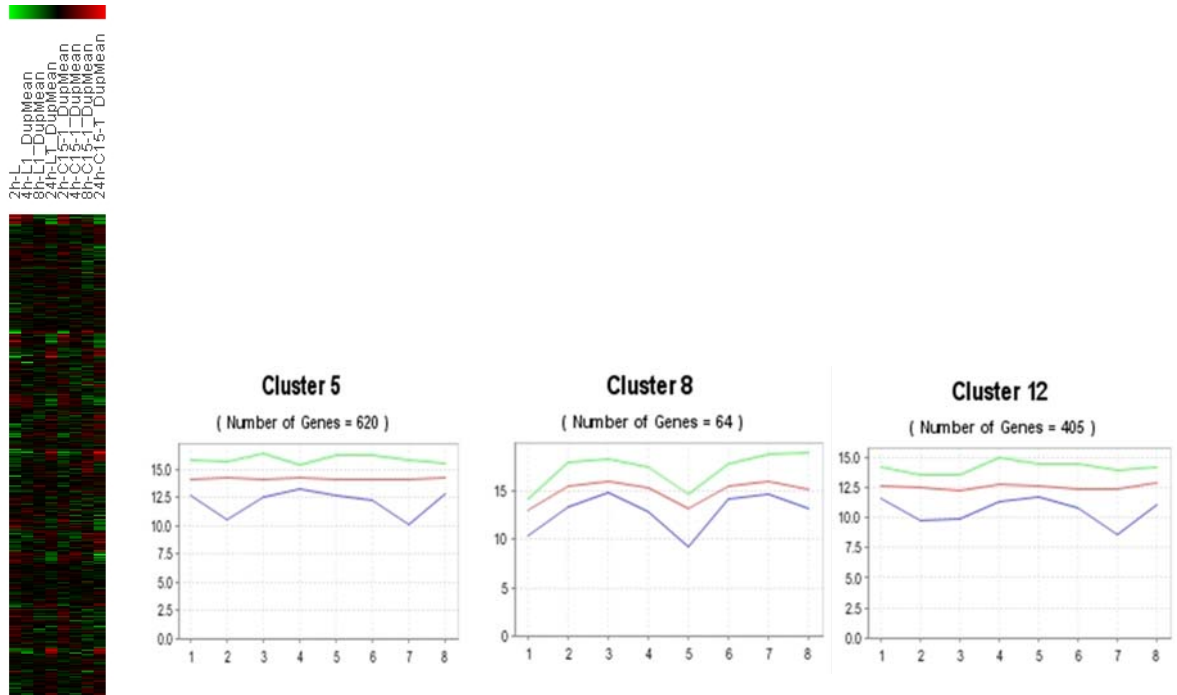


Fig. 23. The image of cluster for salvianolic acid B (C15)

(2) 발현 변화 유전자 분석

(가) 유전자 관련 pathway

Filtering과 clustering한 결과 통계적으로 $P < 0.05$, fold change 2 이상 차이가 나타나는 유전자들을 각각의 pathway로 분류함. Inflammation 관련 유전자의 변화가 가장 컸으며 oxidative stress, TGF- β , PDGF, interleukin 및 항산화와 관련이 있는 Huntington disease, Parkinson disease 관련 유전자 등의 변화가 큰 것으로 나타남 (Table 12 ~ 16).

Table 12. The pathway of 70% ethanol extract of *Salviae Miltiorrhizae Radix*

Pathway	number	overUnder
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	62	+
Wnt signaling pathway	57	+
Angiogenesis	43	+
PDGF signaling pathway	40	-
Interleukin signaling pathway	40	+
Integrin signalling pathway	37	-
Huntington disease	37	+
p53 pathway	34	+
TGF-beta signaling pathway	33	+
EGF receptor signaling pathway	32	-
Apoptosis signaling pathway	31	-
T cell activation	30	+
Parkinson disease	28	+
FGF signaling pathway	28	-
Ras Pathway	24	+
B cell activation	23	+
PI3 kinase pathway	22	+
p53 pathway feedback loops 2	18	+
Oxidative stress response	16	+
Endothelin signaling pathway	15	-
Alzheimer disease-presenilin pathway	14	+
VEGF signaling pathway	14	+
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	13	+
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	12	-
FAS signaling pathway	12	-
De novo purine biosynthesis	11	-
Interferon-gamma signaling pathway	9	+
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	7	-
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	6	-
JAK/STAT signaling pathway	6	+
5-Hydroxytryptamine degradation	6	+
Glutamine glutamate conversion	2	-

Table 13. The pathway of tanshinone I (C7)

Pathway	number	overUnder
Wnt signaling pathway	39	+
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	36	+
Angiogenesis	35	+
Interleukin signaling pathway	34	-
Apoptosis signaling pathway	30	+
PDGF signaling pathway	30	-
Integrin signalling pathway	29	+
EGF receptor signaling pathway	28	-
FGF signaling pathway	27	+
Huntington disease	25	-
T cell activation	24	-
TGF-beta signaling pathway	20	-
p53 pathway	18	-
Parkinson disease	18	+
Ras Pathway	18	+
B cell activation	18	-
Toll receptor signaling pathway	17	-
Oxidative stress response	17	+
p53 pathway feedback loops 2	16	-
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	16	+
Alzheimer disease-presenilin pathway	15	+
VEGF signaling pathway	14	+
Axon guidance mediated by semaphorins	12	+
PI3 kinase pathway	12	-
Cadherin signaling pathway	11	+
Notch signaling pathway	10	-
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	9	+
Interferon-gamma signaling pathway	9	+
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	9	-
Endothelin signaling pathway	9	-
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	8	+
JAK/STAT signaling pathway	6	-
De novo purine biosynthesis	5	+
Blood coagulation	5	+

Table 14. The pathway of cryptotanshinone (C9)

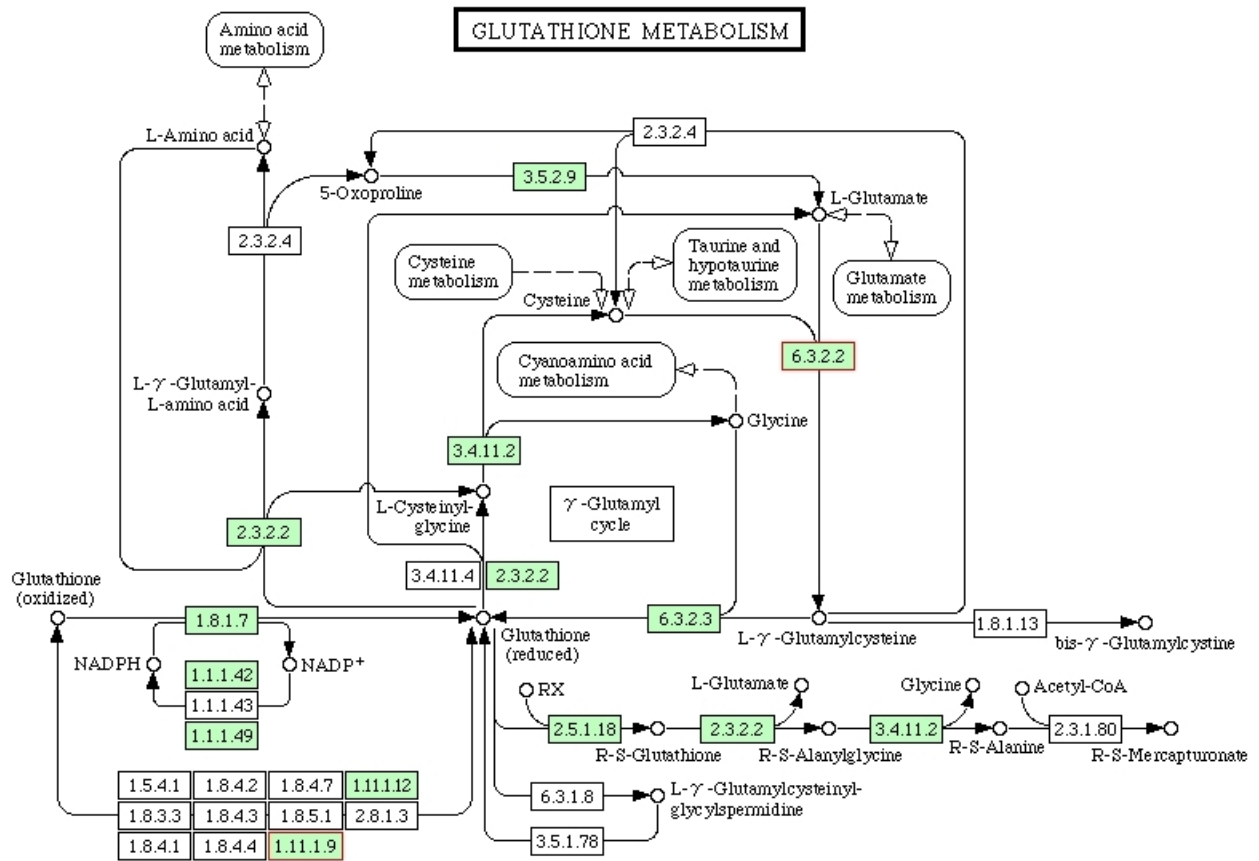
Pathway	number	overUnder
Wnt signaling pathway	58	-
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	54	-
Angiogenesis	52	-
PDGF signaling pathway	46	+
Integrin signalling pathway	41	+
EGF receptor signaling pathway	41	-
Apoptosis signaling pathway	39	+
Interleukin signaling pathway	37	-
FGF signaling pathway	35	+
TGF-beta signaling pathway	30	-
Parkinson disease	30	-
B cell activation	30	-
T cell activation	28	-
Huntington disease	28	-
p53 pathway	25	-
VEGF signaling pathway	20	+
p53 pathway feedback loops 2	19	+
Alzheimer disease-presenilin pathway	18	-
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	18	+
Oxidative stress response	15	+
Interferon-gamma signaling pathway	14	+
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	14	-
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	12	-
FAS signaling pathway	11	+
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	10	-
JAK/STAT signaling pathway	9	-
Blood coagulation	9	-
Ionotropic glutamate receptor pathway	8	+
General transcription by RNA polymerase I	8	-
De novo purine biosynthesis	7	-
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	7	-
Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway	7	+
Axon guidance mediated by netrin	6	-
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	6	-
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	6	-
Glutamine glutamate conversion	2	-

Table 15. The pathway of rosmarinic acid (C14)

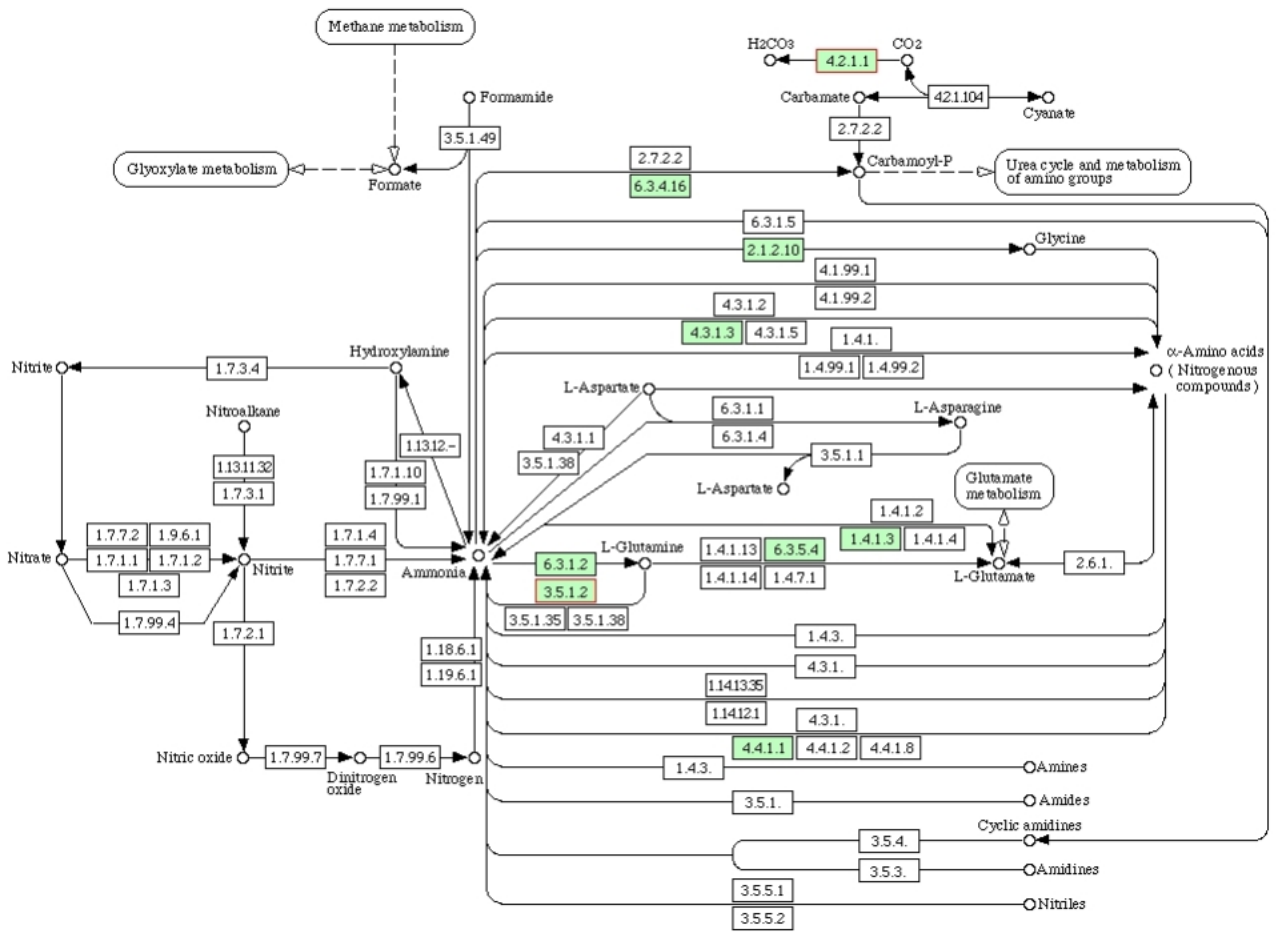
Pathway	number	overUnder
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	97	+
Integrin signalling pathway	63	-
Wnt signaling pathway	61	+
PDGF signaling pathway	52	-
Huntington disease	48	-
Apoptosis signaling pathway	46	+
Angiogenesis	46	+
p53 pathway	44	+
EGF receptor signaling pathway	44	+
FGF signaling pathway	39	+
T cell activation	38	+
Parkinson disease	37	+
B cell activation	32	+
TGF-beta signaling pathway	31	+
Interleukin signaling pathway	30	+
Alzheimer disease-presenilin pathway	28	+
Oxidative stress response	22	+
VEGF signaling pathway	19	+
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	18	+
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	18	+
Interferon-gamma signaling pathway	15	+
De novo purine biosynthesis	11	-
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	11	-
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	11	+
Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	10	+
Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway	10	-
Beta3 adrenergic receptor signaling pathway	10	+
Blood coagulation	10	+
JAK/STAT signaling pathway	9	-
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	8	-
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	7	+
Ionotropic glutamate receptor pathway	7	+

Table 16. The pathway of salvianolic acid B (C15)

Pathway	number	overUnder
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	47	+
Wnt signaling pathway	39	-
PDGF signaling pathway	36	+
Angiogenesis	34	-
Interleukin signaling pathway	30	-
Apoptosis signaling pathway	29	+
Integrin signalling pathway	29	-
EGF receptor signaling pathway	26	+
T cell activation	23	-
TGF-beta signaling pathway	23	+
Huntington disease	22	-
FGF signaling pathway	22	+
B cell activation	22	+
p53 pathway	19	+
PI3 kinase pathway	15	+
Alzheimer disease-presenilin pathway	14	-
VEGF signaling pathway	14	+
Ras Pathway	14	-
Parkinson disease	13	-
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	12	+
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	10	+
Interferon-gamma signaling pathway	9	+
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	9	-
p53 pathway feedback loops 2	9	-
De novo purine biosynthesis	8	+
Oxidative stress response	8	-
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	8	-
JAK/STAT signaling pathway	8	+
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	7	+
Hedgehog signaling pathway	6	+
Blood coagulation	5	-



NITROGEN METABOLISM: REDUCTION AND FIXATION



(나) Gene list

분석한 pathway 중에서 항산화와 가장 관련이 있는 pathway의 유전자들을 분석한 결과, oxidative stress, inflammation, TGF- β 등과 관련한 유전자의 변화가 크게 나타남. 특히, oxidative stress 유전자들의 변화는 단삼이 cardiovascular 질환에서 항산화 효능으로 사용된다는 문헌을 증명해주는 것임 (Table 17 ~ 21).

Table 17. The gene list of 70% ethanol extract

Pathway	Molecular function	Gene symbol
Oxidative Stress	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapkapk5
	Protein kinase;Transferase	Map2k4
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Jun, Mef2c, Mef2a
	Phospholipase	Pla2g4b
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mknk1, Eef2k
	Kinase inhibitor;Protein phosphatase	Dusp10, Dusp8 Dusp16,Dusp4
	Protein phosphatase	Dusp12
	Kinase inhibitor;Protein phosphatase	Dusp18
	Basic helix-loop-helix transcription factor;Nucleic acid binding	Max
TGF- β	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk3,Mapk1
	Other transcription factor;Nucleic acid binding Small GTPase	Jun, Nras, Rras, Rac3, Cdc42, Rhoq, Junb, Foxp4, Foxp1, Foxj3, Foxj3, Ski, Foxh1, Skil, Smad7, Smad6
	Other isomerase	Fkbp1b, Fkbp2
	Small GTPase	Rab8a, Rab35
	Ubiquitin-protein ligase	LOC640390, Smurf1
	TGF-beta receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Acvr1l, Acvr1b, Bmpr2 Acvr2b, Acvr2a, Bmpr2 Acvr2b
	Other cytokine receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Amhr2, Tgfbr2
	Growth factor	Gdf1, Tgfb1

Pathway	Molecular function	Gene symbol
Inflammation	Large G-protein	Gna11, Gnaq, Gna15
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk3, Mapk1, Rock1, Rock2, Camk2g, Ikbke
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Jun, Grb2, Nfatc1, Junb Arpc4,
	Protein kinase;Transferase	Pak4
	Phospholipase	Pla2g4b
	Other signaling molecule;Guanyl-nucleotide exchange factor;Hydrolase;Select calcium binding protein	Plcg2, LOC433158, Shc1
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Akt1m Akt2
	Small GTPase	Nras, Rras, Rhob, Rhoc Rac3, Cdc42, Rhoq
	Guanyl-nucleotide exchange factor	Sos1
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Lck, Hck, Ikbkb, Jak3
	Adenylate cyclase	Adcy2, Prkx
	Large G-protein	Gng5, Gng10, Gng12
	G-protein modulator	Rgs14
	Other G-protein modulator	Rgs20, Rgs19
	G-protein coupled receptor	C5r1, Cxcr3, Ccrl2, C3ar1
	Chemokine	Ccl7, Cxcl4
	Synthase and synthetase;Oxygenase	Ptgs1
	Interferon receptor;Defense/immunity protein	Ifnar1, Ifngr2
	Extracellular matrix structural protein	Col20a1, 2610510H03Rik
	Cell adhesion molecule;Extracellular matrix glycoprotein	Tnc
	Other receptor;Cell adhesion molecule	Itgb1
	Phospholipase;Select calcium binding protein	Plcd3
	Cytokine;Other miscellaneous function protein	Socs6
	Cytokine;Other signaling molecule;Kinase inhibitor;Other miscellaneous function protein	Socs5
	Peptide hormone	Insl3

Pathway	Molecular function	Gene symbol
Interleukin	Transfer/carrier protein;Non-receptor serine/threonine protein kinase;Calmodulin related protein;Annexin	Prkca
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk3, Mapk1, Mapk6, Mapkapk5, Frap1
	Transfer/carrier protein;Non-receptor serine/threonine protein kinase;Calmodulin related protein;Annexin	Pkn2
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Gsk3b, Jak3, Rps6kb2, Mknk1
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Jun, Grb2, Nck1, Plcg2, Stat3, Stat2
	Growth factor	Pdgfa, Cops5, Elf1
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Akt2, Akt1
	Small GTPase	Nras, Rras, Rhoc, Rhob, Rab11b, LOC620747
	Guanyl-nucleotide exchange factor	Sos1
	Kinase modulator	Pik3r5
	Non-receptor serine/threonine protein kinase;Nucleotide kinase	
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Srf
	Other signaling molecule;Other transcription factor	Etv3, LOC433158, Shc1, LOC632501
	Other G-protein modulator	Arhgap15, Arhgap9, Arhgap5, Srgap3, Rasa4, Rasa1
	Peptide hormone	Insl3

Table 18. The gene list of tanshinone I (C7)

Pathway	Molecular function	Gene name
Oxidative stress	Kinase inhibitor;Protein phosphatase	Dusp6, Dusp2, Dusp18, 0710001B24Rik
	Metalloprotease	Adam1a
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapkapk5, Mapk13, Eef2k
	Other miscellaneous function protein	Styx, Jun, Atf2, Mef2c
	Protein kinase;Transferase	Map2k4, Map3k2
Inflammation	Actin and actin related protein	Actr1b, Myh13
	Cell adhesion molecule;Extracellular matrix glycoprotein	Tnc
	Cytokine;Other miscellaneous function protein	Socs6, Socs7
	G-protein coupled receptor	Fpr-rs3, C3ar1
	Guanyl-nucleotide exchange factor	BC067047
	Interferon receptor	Ifngr1
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk3, Mapk7, Akt2, Akt3, LOC544757, Araf, Prkaca, Camk2g,
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Lck, Fgr
	Other G-protein modulator	Rgs1
	Other kinase	Pik3ca, Pik3cd
	Other signaling molecule;Other miscellaneous function protein;Transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	Grap
	Other transcription factor	Relb, Jun, Rel, Stat6
	Phospholipase;Select calcium binding protein	Plcg1
	Protein kinase;Transferase	Pak2, Pak7, Map3k2
Small GTPase	Hras1, Kras	

Pathway	Molecular function	Gene name
TGF- β	Growth factor	Gdf1, Bmp15,
	Kinase activator	Map3k7ip1
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk3, Mapk13, Mapk7
	Other cytokine receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Tgfbr2
	Other RNA-binding protein;mRNA processing factor	Dcp1b
	Other transcription factor	Ski, Smad6, Jun, Atf2, Foxk2, Ches1
	Small GTPase	Hras1, Kras
	TGF-beta receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Tgfbr1, Acvr2a
	Transcription cofactor	Dcp1a
	Ubiquitin-protein ligase	Smurf2
Interleukin	Basic helix-loop-helix transcription factor;Nucleic acid binding	Myc, Bmyc
	Interleukin	Il10, Il15, Il17c, Il4ra, Il13ra1, Il6ra, Il13ra2, Il4ra, LOC628021, LOC621887, Il11ra1, Il11ra2, Il6st
	Metalloprotease	Adam1a
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapkapk5, Mapk3, Mapk7, Mapk15, Akt3, LOC544757, Akt2, Araf, Map3k7, Lck, Fgr
	Other kinase	Pik3cd, Pik3ca
	Other signaling molecule;Other miscellaneous function protein;Transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	Grap, Elk3, Elk4
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Stat6, Stat5b, Stat2, Foxk2, Ches1
	Protein kinase;Transferase	Map3k2
	Small GTPase	Kras

Table 19. The gene list of cryptotanshinone (C9)

Pathway	Molecular function	Gene name
Oxidative Stress	CREB transcription factor;Nucleic acid binding	LOC626891, LOC637051
	Kinase inhibitor;Protein phosphatase	Dusp6, Dusp7, Dusp4, Dusp2, 710001B24Rik
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Eef2k, Mapk12, Alpk1
	Other oxidoreductase	Txn1
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Mef2c, Atf2
	Protein kinase;Transferase	Map2k4, Map3k2, Map3k4
Inflammation	Actin binding motor protein	Myh13
	Cytokine;Other miscellaneous function protein	Socs6, Socs7
	Extracellular matrix structural protein	Col7a1
	G-protein coupled receptor	C5r1, Cx3cr1, LOC636551, Ptafr, C5r1, C3ar1
	Guanyl-nucleotide exchange factor	Sos1, Vav1, Pscd2,
	Interferon receptor	Ifnar2, Ifngr1
	Large G-protein	Gnai2, Gna11, LOC636805, Gng2
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Prkacb, Araf, Mapk3, Mapk1, Gprk6, Ikkkb, Camk2b, Camk2g, Mapk3, Raf1, Adrbk1
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Lck, Tyk2, Src
	Other cell adhesion molecule	Itga6
	Other kinase	Pik3cd
	Other signaling molecule;Guanyl-nucleotide exchange factor;Hydrolase>Select calcium binding protein	Plcg2, Grb2
	Other transcription factor	Nfatc3, Junb, Stat3, Rela, Junb
	Other transferase	Ltc4s
	Protein kinase;Transferase	Pak2, Map3k2, Map3k4, Pak7, Pak2
	Select regulatory molecule;Other miscellaneous function protein	Arrb2
	Small GTPase	Rhob, Hras1, Kras, Nras, Rras2,
	Synthase and synthetase;Oxygenase	Ptgs2, Ptgs1
Transfer/carrier protein;Non-receptor serine/threonine protein kinase;Calmodulin related protein;Annexin	Prkcd, Prkch	

Pathway	Molecular function	Gene name
TGF- β	Growth factor	Tgfb2, Bmp15, Gdf1, Tgfb2
	Kinase activator	Zfyve9, Map3k7ip1
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk1, Mapk12, Mapk3
	Other isomerase	Fkbp1a, Fkbp2
	Other RNA-binding protein;mRNA processing factor	Dcp1b
	Other transcription factor	Skil, Smad2, Atf2, Fos, Fosl1, Atf2, Junb, Foxm1, Foxp4, Foxk1, Foxh1
	Small GTPase	Rab1b, Rab10, Rab35, Rab28, Hras1, Kras, Nras, Rras2
Interleukin	Cytokine receptor	Il10ra
	Guanyl-nucleotide exchange factor	Sos1
	Interleukin	Il10, Il15, Il6, Il6st, Il13ra1, Il6ra, Il13ra2, Il15ra
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Raf1, Ikbkb, Araf, Mapk1, Mapk6, Mapk15, Mapk3, Chuk
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Lck, Src
	Other G-protein modulator	Rasa1
	Other kinase	Pik3cd
	Other signaling molecule;Other miscellaneous function protein;Transmembrane receptor regulatory/adaptor protein	Grb2
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Stat5a, Stat3, Fos, Stat2, Foxm1, Foxp4, Foxh1
	Protein kinase;Transferase	Map3k2, Map3k4
	Small GTPase	Hras1, Kras, Nras, Rras2

Table 20. The gene list of rosmarinic acid (C14)

Pathway	Molecular function	Gene name
Oxidative Stress	Kinase inhibitor;Protein phosphatase	Dusp1, Dusp8, Dusp4, Dusp10, Dusp5, Dusp14
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mknk2, Mapk13, Eef2k
	Other oxidoreductase	Txn1
	Other transcription factor;mRNA splicing factor;Other DNA-binding protein	Fus, Mef2c, Jun
	Phospholipase	Pla2g4a
	Protein kinase;Transferase	Map3k3, Map3k2, Map3k4
	Protein phosphatase	Dusp3
Interferon	Cytokine	Socs4, Socs6, Socs5
	Ligase	Pias2, Miz1, Pias3, Pias4
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk7, Mapk13, Jak1
	Other miscellaneous function protein	Socs3, Cish
	Protein phosphatase	Ptpn6
TGF	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk13, Mapk7
	Other cytokine receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Tgfbr2
	Other isomerase	Fkbp2
	Other signaling molecule	Bmp4
	Other transcription factor	Smad7, Smad6, Jun, Junb, Ches1, Foxo3a, Foxm1, Foxh1
	Small GTPase	Rac1, Rac2, Rab1, Rab8b, Rab8a, Rab10, Rab35, Rab28, Kras, LOC628898
	TGF-beta receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Tgfbr1, Bmpr2, Bmpr1a
	Transcription cofactor	Cited2, Dcp1a,
	Ubiquitin-protein ligase	Smurf2, LOC640390, Smurf1

Pathway	Molecular function	Gene name
Inflammation	Actin and actin related protein	Actr1a, LOC207318, Apeg1, Myh13
	Chemokine	Ccl4, Ccl3, Ccl5, Ccl2
	Cytokine;Other miscellaneous function protein	Socs6, Socs5
	Extracellular matrix structural protein	Col20a1
	G-protein coupled receptor	C5r1, Cx3cr1, Cxcr3, Fpr-rs3, Cxcr3,
	G-protein modulator	Rgs14
	Guanyl-nucleotide exchange factor	BC067047, Pscd2, Pscd4
	Large G-protein	Gna11, Gnaq, Gnai2, LOC636805, Gng2
	Microtubule family cytoskeletal protein;Other ligase	4833441J24Rik
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Araf, Akt2, Raf1, Gprk6, Camk2d, Prkx, Apeg1, Gprk5, Mapk7, Prkaca, LOC544757
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Lyn, Jak1, Tyk2
	Other actin family cytoskeletal protein	Arpc3, Arpc1b, Arpc4, Arpc5, LOC629364
	Other cell adhesion molecule	Itga6
	Other cytokine;Chemokine	Cxcl10
	Other G-protein modulator	Rgs1, Rgs20, Rgs19
	Other kinase	Pik3c2a, Pik3cd, C330011J12Rik
	Other ligand-gated ion channel;Ion channel	Itpr1
	Other miscellaneous function protein	Socs3, Cish, Alox5ap, Socs3,
	Other phosphatase	Inpp5d
	Other receptor;Cell adhesion molecule	Itgb2, Itgb1,
	Other signaling molecule	Shc1, LOC433158, Plcg2, Grap
	Other transcription factor	Nfatc1, Nfkb1, Nfatc3, Junb, Jun, Stat6, Nfkb2,
	Other transferase	Ltc4s
	Phospholipase	Pla2g4a, Plcg1
	Protein kinase	Pdpk1, Map3k2, Map3k4, Pak4, Map3k3, Map3k2
	Protein phosphatase;Other phosphatase	Pten
	Select regulatory molecule	Nfkbib, Nfkbia, Arrb2
	Small GTPase	Rhob, Rhoa, LOC631743, Rhoc, LOC433749, Rac1, Rac2, Kras, LOC628898
Synthase and synthetase;Oxygenase	Ptgs2, Ptgs1	
Transfer/carrier protein;Non-receptor serine/threonine protein kinase;Calmodulin related protein;Annexin	Prkca	

Table 21. The gene list of salvianolic acid B (C15)

Pathway	Molecular function	Gene name
Inflammation	Actin and actin related protein	Actr1b
	Actin binding cytoskeletal protein;Non-receptor serine/threonine protein kinase	Apeg1
	Cytokine;Other miscellaneous function protein	Socs6
	Extracellular matrix structural protein	Col20a1, 2610510H03Rik
	G-protein coupled receptor	C5r1
	G-protein modulator	Rgs14
	Interferon receptor	Ifnar2, Ifngr2
	Large G-protein	Gnaq, Gnai2, LOC636805
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Prkacb, Mapk1, Prkx, Apeg1, Gprk5, Akt1, Gprk6, Ikbkb
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Jak3, Jak1, Fgr
	Other G-protein modulator	Rgs20, Rgs19
	Other kinase	Pik3ca
	Other ligand-gated ion channel;Ion channel	Itpr1, Itpr3
	Other phosphatase	Inpp5d
	Other signaling molecule	LOC433158, Shc1, Plcg2, Grb2, Grap
	Other transcription factor	Nfatc1, Relb, Nfatc3, Jund1, Rela, Jund1,
	Peptide hormone	Ins13
	Protein kinase;Transferase	Pak7, Map3k4
Small GTPase	Hras1, Kras, Rras2	
Transfer/carrier protein;Non-receptor serine/threonine protein kinase;Calmodulin related protein;Annexin	Prkch, Prkca	
Oxidative Stress	Kinase inhibitor;Protein phosphatase	Dusp10, Dusp7
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Eef2k
	Other miscellaneous function protein	Styx, Fus
	Protein kinase;Transferase	Map3k4
	Protein phosphatase	Dusp3

Pathway	Molecular function	Gene name
Interleukin	Interleukin	Il16, Il15, Il6, Il11ra2, Il11ra1, LOC628021, LOC621887, Il15ra
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Ikbkb, Mapk1, Mapk15, Mapk6, Akt1, Chuk
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Fgr, Jak3
	Other G-protein modulator	Rasa1
	Other kinase	Pik3ca
	Other signaling molecule	LOC433158, Elk4, Plcg2, Grb2, Grap
	Other transcription factor;Nucleic acid binding	Stat5a, Stat2, Fos, Foxo1
	Peptide hormone	Insl3
	Protein kinase;Transferase	Map3k4
	Small GTPase	Hras1, Kras, Rras2
Interferon	Cytokine;Other miscellaneous function protein	Socs6
	Interferon receptor;Defense/immunity protein	Ifngr2
	Ligase	Pias2, Miz1, Pias1, Rai17
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk1, Mapk15
	Non-receptor tyrosine protein kinase	Jak1
	Protein phosphatase	Ptpn11
TGF	Growth factor	Bmp15
	Kinase activator	Map3k7ip1
	Non-receptor serine/threonine protein kinase	Mapk1
	Other isomerase	Fkbp1a, Fkbp2
	Other transcription factor	Ski, Smad2, Smad7, Jund1, Fos, Foxo1
	Small GTPase	Rab8b, Rab35, Rab28, Hras1, Kras, Rras2
	TGF-beta receptor;Serine/threonine protein kinase receptor;Protein kinase	Tgfbr1, Bmpr2, Acvr2b, Tgfbr1
	Transcription cofactor	Dcpl1a
	Ubiquitin-protein ligase	Smurf2

(다) 유전자 관련 biological process와 molecular function

Fold change > 2, 2 way ANOVA $p < 0.05$ 의 발현 변화를 나타낸 유전자를 검색하여 biological process와 molecular function에서 oxidation과 관련된 유전자들을 선별하여 정리하면 Table 22와 같음. 이들 중 10종의 유전자들에 대한 validation 결과를 보면 (Fig. 24), Acad1은 LPS 처리 8시간에 대조군과 비교하여 발현이 증가되었으나 단삼 및 그 성분들의 처리군에서는 대조군의 수준으로 발현이 감소됨 (Fig. 25). Aldh2는 LPS 처리 4시간에 대조군과 비교하여 발현이 증가했으나 단삼 및 그 성분들의 처리군에서는 대조군의 수준으로 발현이 감소됨 (Fig. 25). Fasn은 LPS의 처리시간에 따라 대조군과 비교하여 발현이 감소하는데 4시간 처리시 C7 및 C15는 발현의 증가를 나타내며 24시간 처리 시 70E와 C15는 대조군 이상으로 발현이 증가됨 (Fig. 26). Glud1은 LPS 처리 8시간에 대조군과 비교하여 발현이 감소하는 반면 C9 및 C14 처리 시에는 대조군 이상으로 발현이 증가됨 (Fig. 26). Impdh2는 처리 2시간에 70E에 의해 발현이 증가되었고 4시간에서는 C14, C15에 의해, 24시간에는 C9에 의해 발현이 증가됨 (Fig. 27). Hadh는 처리 2시간에 70E 및 C7에 의해 발현이 증가되었고 4시간 및 24시간에는 LPS에 의해 발현이 감소되었으나 약물의 처리로 인해 발현의 감소가 억제된 것으로 나타남 (Fig. 27). Txn2는 LPS 처리 2시간에서 대조군과 차이가 없었으나 70E, C9, C14처리군은 대조군과 비교하여 발현이 증가되었으며 4시간에는 LPS 처리시 발현이 감소되나 70E, C7, C9의 처리로 발현이 증가됨. Txn2는 비교적 약물 처리의 초기에 발현되는 것으로 사료됨. Cyp51은 처리 2시간에 70E, C15에서 대조군보다 높게 발현되었고 4시간에서는 C7에 의해 발현이 증가됨. 8시간에는 70E에 의해, 24시간에는 70E 및 C7에 의해 발현이 증가됨 (Fig. 28). Cyp51은 70E, C15의 처리로 2시간에 발현이 증가되었으며 4시간에는 LPS로 인해 발현이 감소되었으나 C9, C14, C15의 처리로 대조군 이상으로 발현이 증가됨. 8시간 처리에서 70E에 의해 발현이 증가되었고 24시간에는 70E 및 C7의 처리로 발현이 증가된 것으로 나타남 (Fig. 28). Gpd2는 LPS의 처리로 발현이 감소되고 2시간에서는 약물의 처리로도 회복되지 않는 것으로 나타나지만 4시간에 70E 및 C14의 처리로 대조군과 유사하게 발현이 증가됨. 8시간에는 C15의 처리로 대조군 이상으로 발현이 증가되면 24시간에는 C7 및 C14의 처리로 대조군 이상으로 발현이 증가됨을 나타냄 (Fig. 29).

이상의 결과로 단삼 및 그 성분들의 항산화 효능 유전자로 SOD, catalase, GPx, iNOS 외에 Acad1, Aldh2, Fasn, Fasn, Glud1, Impdh2, Hadh, Txn2, Cyp51, Gpd2 등을 제시함.

Table 22. Oxidation 관련 최종 선정 유전자

Gene_Symbol	Gene_Name	p value (treatment)	p value (time)
Phgdh	3-phosphoglycerate dehydrogenase	0.03	0.00
Impdh2	inosine 5'-phosphate dehydrogenase 2	0.00	0.00
Fasn	fatty acid synthase	0.00	0.00
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	0.01	0.02
Glud1	glutamate dehydrogenase 1	0.01	0.00
Aldh9a1	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	0.00	0.00
Acadl	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	0.61	0.00
Dhrs3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	0.64	0.00
Hadhsc	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	0.01	0.00
Sord	sorbitol dehydrogenase	0.01	0.00
Gpd2	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	0.00	0.00
Cry11	crystallin, lamda 1	0.00	0.00
Zadh2	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2	0.00	0.00
Hibch	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase	0.04	0.00
Etfb	electron transferring flavoprotein, beta polypeptide	0.00	0.01
Glrx	glutaredoxin	0.00	0.00
Txn2	thioredoxin 2	0.00	0.00
Mthfd11	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	0.02	0.00
Mthfd1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthase	0.17	0.00
Cyp20a1	cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1	0.15	0.00
Cyp51	cytochrome P450, family 51	0.04	0.00
Prdx5	peroxiredoxin 5	0.08	0.00
Prdx1	peroxiredoxin 1	0.00	0.05
Lbr	lamin B receptor	0.00	0.00
Txnrd1	thioredoxin reductase 1	0.03	0.00
Pycr1	pyrroline-5-carboxylate reductase-like	0.00	0.00
Pycr2	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2	0.01	0.00
Sepx1	selenoprotein X 1	0.36	0.00
Mecr	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase	0.00	0.00

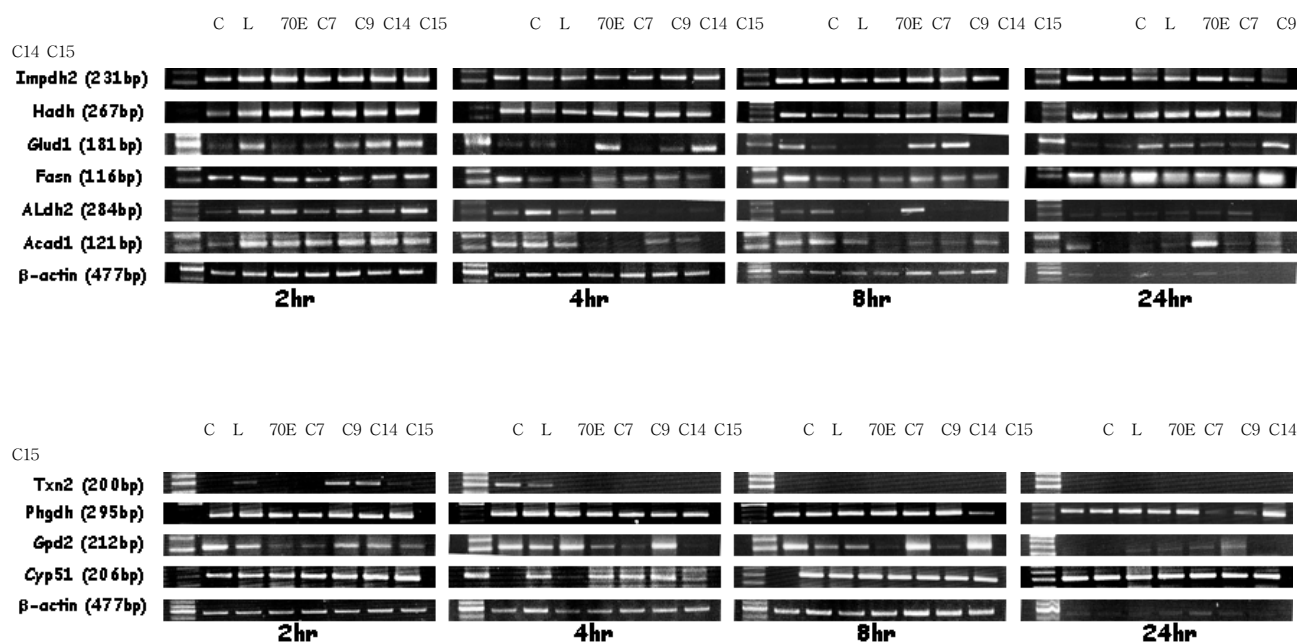


Fig 24. The confirmation of genes (The RT-PCR products of selected genes).
 70E; 70% EtOH ext. of *Salviae Miltiorrhizae Radix*, C7; Tanshinine I, C9;
 Chryptotanshinone, C14; Roamarinic acid, C15; Salvianolic acid.

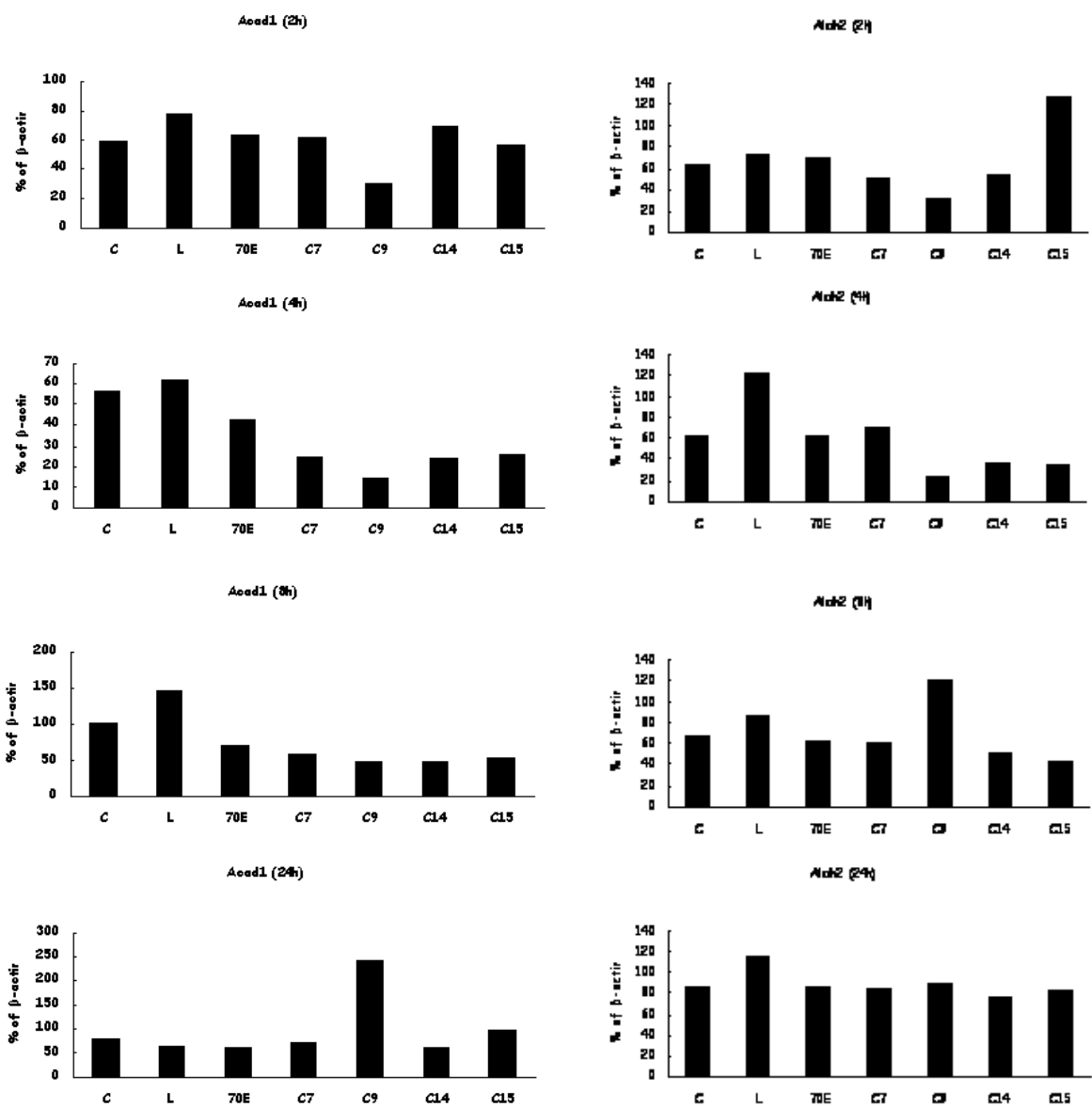


Fig. 25. The expression ratios of Acad1 and Aldh2 (% of β -action).

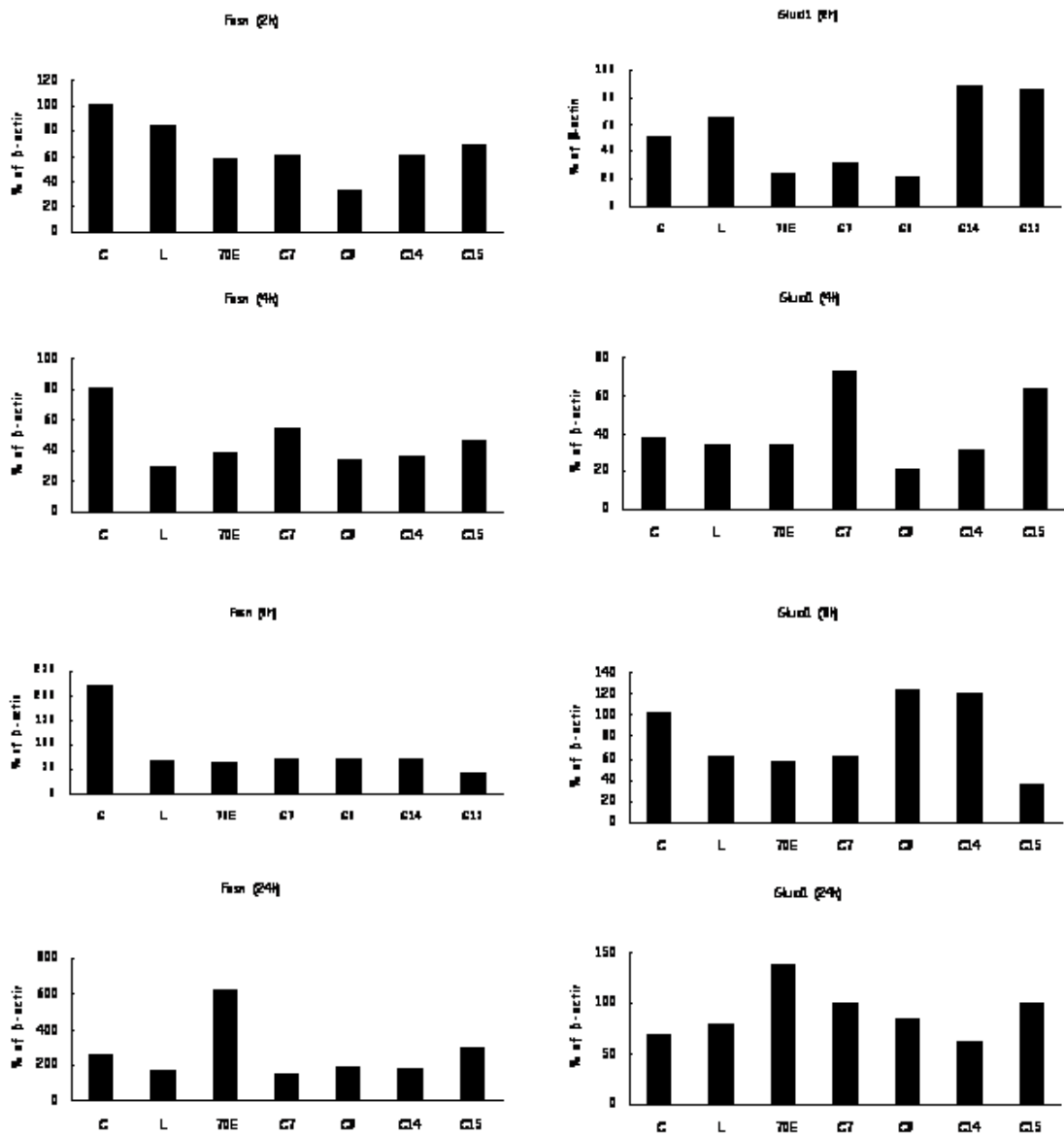


Fig. 26. The expression ratios of Fasn and Glud1 (% of β -action).

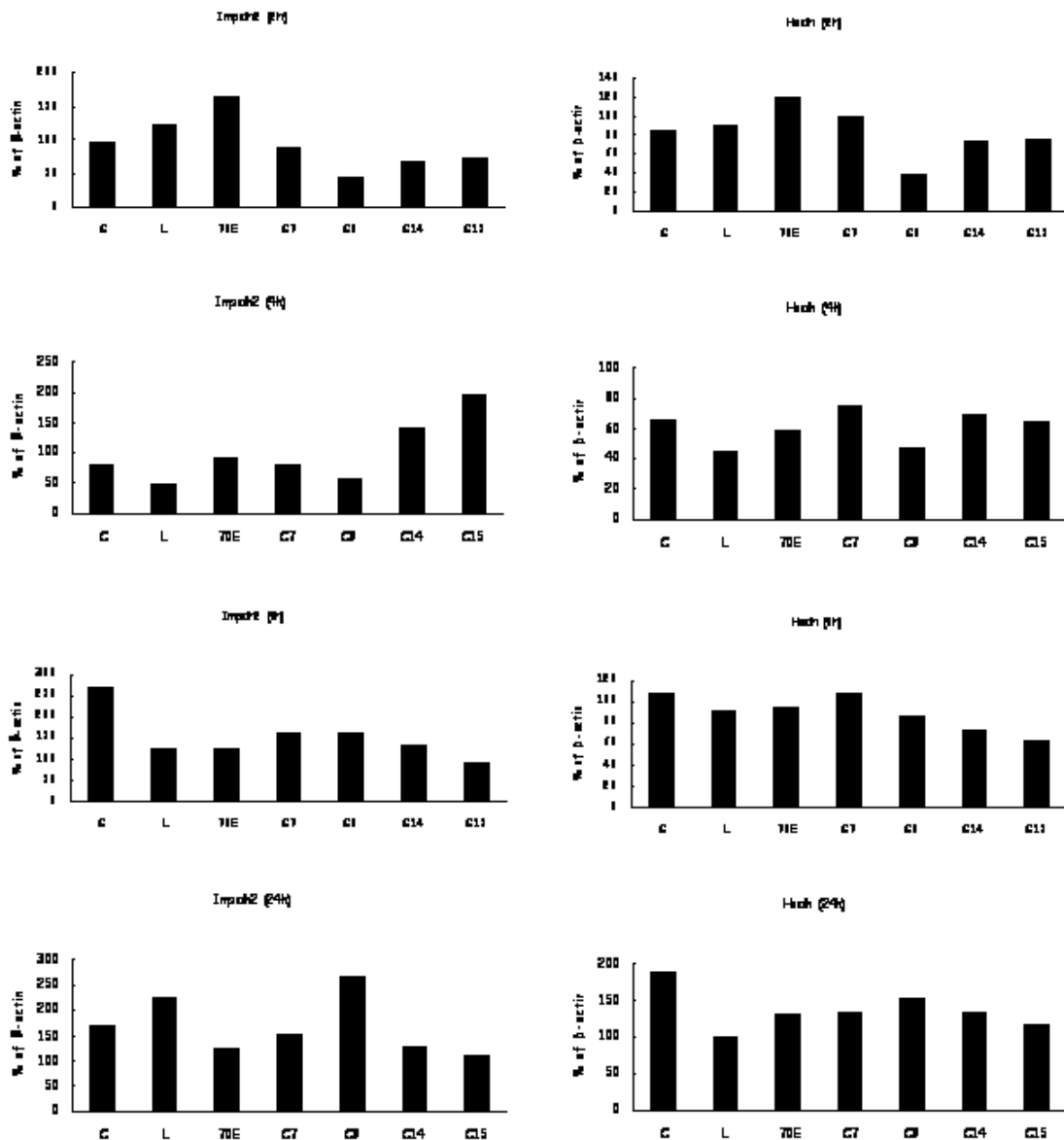


Fig. 27. The expression ratios of Impdh2 and Hadh (% of β -actin).

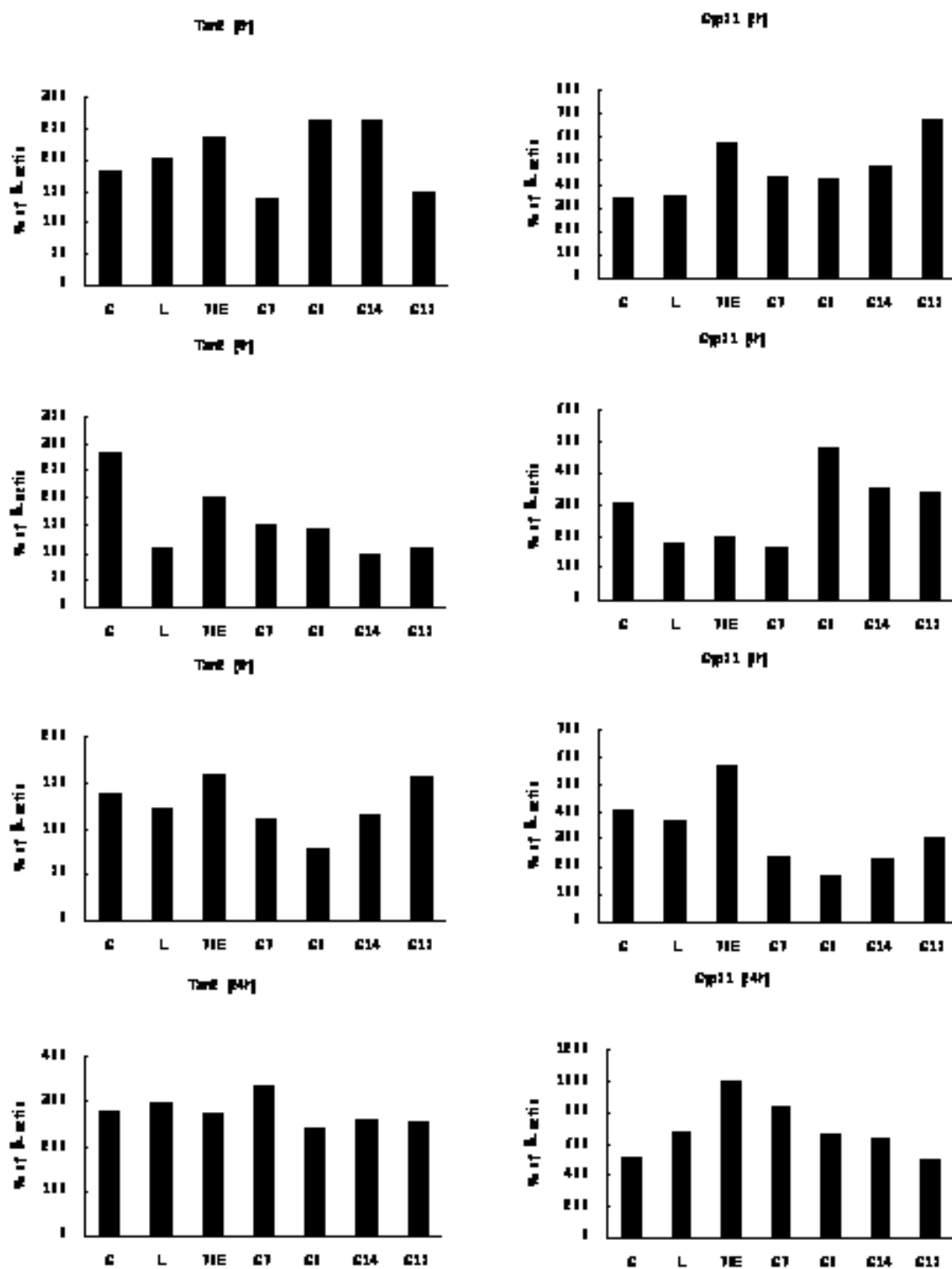


Fig. 28. The expression ratios of Txn2 and Cyp51 (% of β -action).

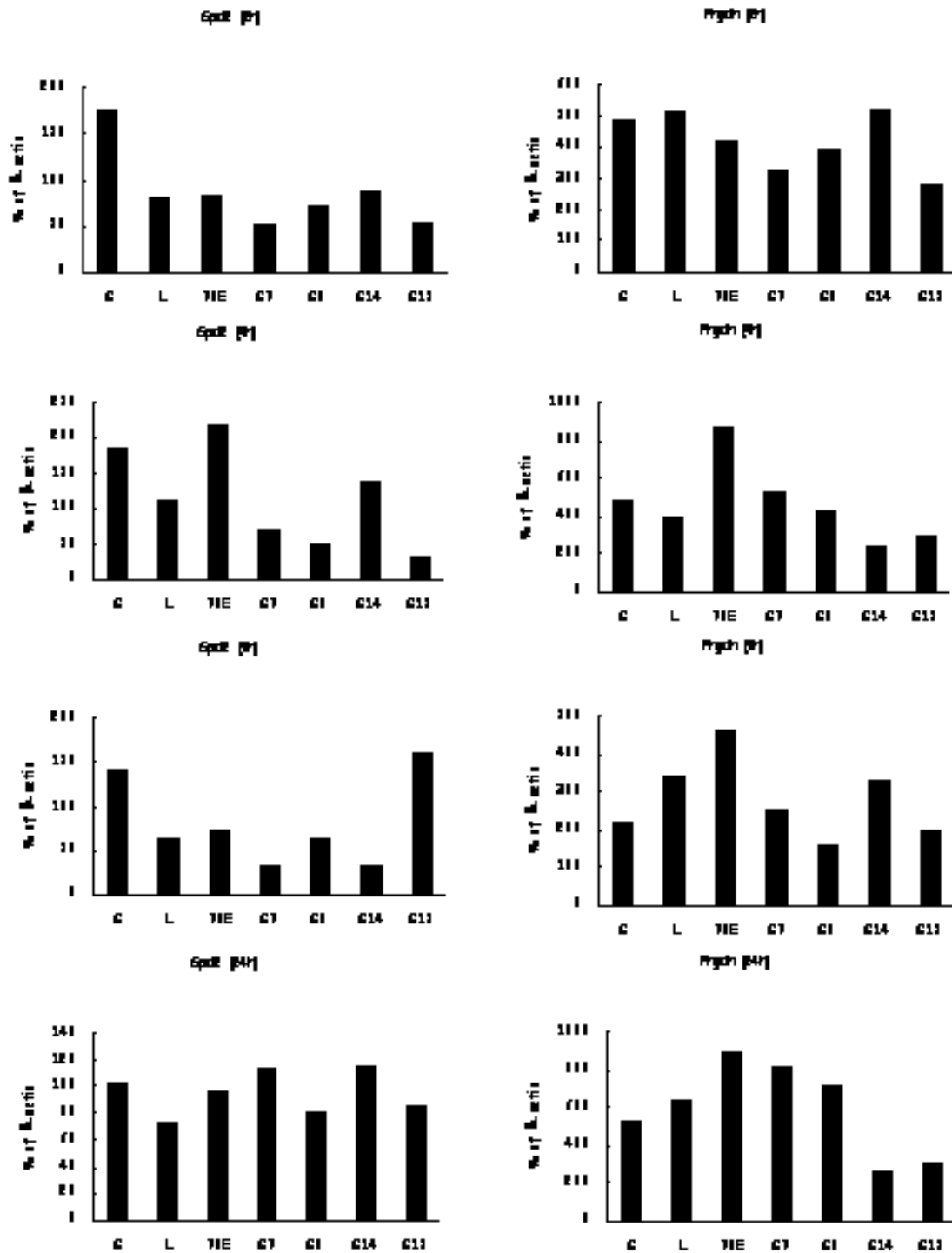


Fig. 29. The expression ratios of Gpd2 and Phgdh (% of β -action).

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

한의학적으로 청열약으로 분류되는 황금은 항염증 효능¹⁻¹³⁾을 주 효능으로 분류하고 활혈거어약으로 분류되는 단삼은 항산화 효과¹⁴⁻²²⁾를 주 효능으로 분류하여 각 약재 및 그 성분들에 대한 유효 성분과 효능 유전자 선정 연구를 시행함.

황금은 70% EtOH 추출물과 baicalein, wogonin, chrysin, 5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavone, wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, baicalin, guaiacol, paeonol 등의 성분 8종에 대하여 항염증 효과를 검색함. LPS 처리한 Raw 264.7 세포 (murine macrophage cell line)에 시료를 처리하여 PGE₂의 생성 억제 효과를 검색한 결과 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제시키는 대표 성분으로 baicalein (C1)^{7,9,10)}, wogonin (C2)^{7,9,10,12)}, chrysin (C3)^{7,9)}의 3종을 효능 성분으로 선정. baicalein의 배당체인 baicalin^{1-3,6)}은 *in vitro* assay에서는 효과가 없었음. DNA microarray를 이용한 효능 유전자 검색 결과 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 70E, C1, C2, C3에 대해서 공통적으로 inflammation 관련 유전자의 변화가 가장 크게 나타남. 그 외에 apoptosis, angiogenesis, PDGF, T cell 등과 관련된 유전자들의 변화가 나타남. 이는 청열약으로 사용되는 황금의 항염증 반응과 관련이 있는 것으로 사료됨. 그 중 가장 많은 변화를 나타낸 14개를 유전자를 선정하여 RT-PCR로 확인함. 이들은 황금의 항염증 효과와 관련된 유전자들로 모든 성분들에서 변화를 나타냄 (Table 9).

황금 및 그 성분들의 효능 유전자로 IL-1, Ptges2, TNF- α 를 비롯하여 Activin A-R I, Activin-R II A, IFN- γ , IL4-R, IL6-ST, IL11-R, SCS4, TGF- β 등을 제시함.

상기의 연구 방법 및 결과 자료를 한약재 과학화 DB 구축과제팀에 제출함.

Table 22. 황금의 효능 유전자 확인을 위한 chip 실험 조건

	Control	70% EtOH extract	Baicalein,	Wogonin,	Chrysin
LPS (100ng/ml)	-	+	+	+	+
처리 농도	-	10 μ g/ml	5 μ M	25 μ M	40 μ M
처리 시간	2 h, 4 h, 8 h, 18 h				
사용한 세포	Raw 264.7 (murine macrophage cell)				
시료 용매	1% DMSO / DMEM (10% FBS)				

단삼 70% ethanol 추출물과 tanshinone I, tanshinone II A, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B 등의 성분 6종에 대해서 항산화 효능을 검색한 결과 salvianolic acid B 를 제외한 단삼의 70E 및 모든 성분은 농도 의존적으로 SOD 활성을 증가시킴. 15,16-dihydrotanshinone I은 10 μ g/ml에서 SOD 활성이 감소하였는데 이는 15,16-dihydrotanshinone I의 세포독성에 의한 것으로 사료됨. Tanshinone I, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid는 LPS 처리군보다 더 높게 SOD 활성을 증가시킴. 단삼 70E, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B는 4 hr 및 24 hr에서 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시킴. Reduced form의 glutathione의 정량 결과 24 시간 LPS 처리시 대조군의 1/3으로 감소하였으나 rosmarinic acid 처리시 GSH의 양이 대조군과 유사

하게 증가됨. 결론적으로 단삼의 항산화 효과에 대한 효능 성분으로 tanshinone I (C7), cryptotanshinone (C9), rosmarinic acid (C14), salviolic acid B (C15)를 선정함. DNA microarray를 이용하여 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 oxidataion, inflammation 관련 유전자들의 변화가 가장 크게 나타났으며 Apoptosis signaling pathway, PDGF signaling pathway 등의 순으로 나타남. 특히 항산화와 관련한 oxidative stress와 관련된 gene들의 변화가 크게 나타났으며 관련 gene들의 분석 후, 단삼의 대표적인 생리활성 효과인 cardiovascular 질병 치료와 관련됨이 나타남. 이러한 결과는 단삼이 심근경색 흰쥐 모델에서 심근에서 SOD의 발현을 증가시키고 지질과산화를 억제하였다는 보고 및 tanshinone 등이 심근 지질의 과산화를 억제하고 SOD 활성을 증가시키고 PGE₂의 생성을 감소시켰다는 보고¹⁴⁻²²⁾와 일치하여 단삼 및 유효 성분의 항산화 활성을 증명함.

단삼 및 그 성분들의 항산화 효능 유전자로 SOD, catalase, GPx, iNOS 외에 Acad1, Aldh2, Fasn, Fasn, Glud1, Impdh2, Hadh, Txn2, Cyp51, Gpd2 등을 제시함.

Table 23. 단삼의 효능 유전자 확인을 위한 chip 실험 조건

	Control	70% extracts	Tanshinone I	Cryptotanshinone	Rosmarinic acid	Salviolic acid
LPS (1mg/ml)	-	+	+	+	+	+
처리 농도	-	30 µg/ml	10 µM	10 µM	20 µM	20 µM
처리 시간	2 h, 4 h, 8 h, 24 h					
사용 세포주	Raw 264.7 (murine macrophage cell)					
시료 용매	1% DMSO / DMEM (10% FBS)					

제5장 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

세부과제명	유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성 성분의 효능 유전자 검증
세부과제책임자	하 혜 경 / 한국한의학연구원 / 생화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1								
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Anti-inflammation activity of compounds isolated from <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	포스터	MK Kim, H Ha, HY Lee, DY Jung, SJ Lee, JY chol, HS Choi, C Kim, KH Son	63rd KSBMB annual meeting	2006. 5. 25		국내
2	Effects of <i>Scutellariae Radix</i> on gene expression in macrophage cell line using microarray	포스터	HY Lee, H Ha, Y Chang, DY Jung, JY Choi, C Kim, SS Kang, KH Son, SJ Jeon	2006년 대한약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.		
3	The Study of antioxidant in <i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	포스터	Y Chang, H Ha, HY Lee, DY Jung, JY Choi, SS Kang, KH Son, SJ Jeon, C Kim	2006년 대한약학회 추계학술대회	2006. 11. 6.~7.		

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책 활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

- 한약재 생리활성 물질의 효능 유전자 확인으로 한약재 및 한약제제의 표준화 기준 설정
- 효능 성분 중심의 한약재 규격관리 과학화
- 효능 성분 중심의 한약재 표시·품질등급화
- Biochip을 이용한 기전 연구 및 다양한 효능 유전자 발굴로 신약 개발 가능
- 한약재에 포함되어 있는 성분들의 효능 및 유해성 연구

한약재의 대표적인 생리활성 물질의 효능 유전자를 biochip으로 확인하여 현재 무분별하게 유통되고 있는 많은 한약재들에 대한 품질관리 및 유통관리가 체계적으로 이루어질 것임. 또한 유효 유전자들의 검색으로 수입 한약재에 대한 효능 중심의 품질 평가 기준 설정에 필요한 과학적인 기준을 제시할 수 있으며 약재 효능에 대한 증거 자료로 사용될 수 있음. 이를 바탕으로 한약재 유통 시 약재의 품질을 표시하고 등급화하여 보다 과학적인 약재 관리에 이용하여 국민들의 한약재에 대한 불만을 제거함. Biochip을 이용한 기전 연구 및 다양한 효능 유전자 발굴로 신약 개발의 가능성을 높이고 더불어 한약재에 포함되어 있는 생리활성 성분들의 효능 및 유해성 연구를 접목할 수 있을 것으로 사료됨. 따라서 활성 성분에 대한 과학적이고 체계적인 DB를 보유하여 세계적으로 한약재 관리의 선두주자가 될 수 있음.

제6장 기타 중요변경사항

6.1. 연구 책임자 변경

2006. 6. 01일자로 연구 책임자인 최환수가 개인 사정으로 인하여 한국한의학 연구원을 퇴사함으로써 한약제제연구부장인 신현규가 연구책임자로 변경되었음. 이후 원활한 연구 수행을 위하여 2006. 8. 25.일자로 기존의 참여 연구원인 하혜경으로 연구 책임자를 다시 변경함.

6.2. 연구 수행의 문제

DNA microarray를 시행하기 위한 전처리 과정으로 RNA를 증폭시키고 labeling을 하는데 사용되는 RT IVT labeling kit의 이상으로 연구 진행 일정에 차질이 발생함. 10월 초에 검증된 RT IVT labeling kit를 입수하여 연구를 진행하게 되어 전체적으로 microarray 연구 진행이 늦어짐.

제7장 참고문헌

1. Koda A., Watanabe S., Yanagihara Y., Nagai H., Sakamoto K.(1977) A comparative study of the anti-allergic effects of disodium baicalein 6-phosphate (BPS) and disodium cromoglycate (DSCG), *Jpn. J. Pharmacol.*, **27** : 31.
2. BQ. Li, T. Fu, W.H. Gong, N. Dunlop, H. F. Kung, Y. D. Yan, J. Kang, J. M. Wang, (2000) The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacology*, **49** : 295
3. B.Q. Li, T. Fu, Y.D. Yan, N.W. Baylor, F.W. Ruscetti, H.F. Kung (1993) Inhibition of HIV infection by baicalin—a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol. Biol. Res.*, **39** : 119
4. J.A. Wu, A.S. Attele, L. Zhang, C.S. Yuan (2001) Anti-HIV activity of medicinal herbs: usage and potential development. *Am. J. Chinese Med.*, **29** : 69
5. T. Konoshima, M. Kokumai, M. Kozuka, M. Iinuma, M. Mizuno, T. Tanaka, H. Tokuda, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima (1992) STUDIES ON INHIBITORS OF SKIN TUMOR PROMOTION; Inhibitory Effects of Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* on Epstein-Barr Virus Activation and Their Anti-tumor-Promoting Activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **40** : 531
6. F. L. Chan, H. L. Choi, Z. Y. Chen, P. S. F. Chan, Y. Huang (2000) Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Lett.*, **160** : 219
7. S. Ikemoto, K. Sugimura, N. Yoshida, R. Yasumoto, S. Wada, K. Yamamoto, T. Kishimoto (2000) Antitumor effects of Scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology*, **55** : 951
8. Z. H. Gao, K. X. Huang, H. B. Xu (2001)Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells.*Pharmacol. Res.*, **43** : 173
9. D. E. Shieh, L. T. Liu, C. C, Lin (2000) Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.*, **20** : 2861
10. F. Chen, K. H. Chan, Y. Jiang, R. Y. T. Kao, H. T. Lu, K. W. Fan, V. C. C. Cheng, W. H. W. Tsui, T.
11. S.C. Ma, J. Du, P.P.H. But, X.L. Deng, Y.W. Zhang, V.E.C. Ooi, H.X. Xu, S.H.S. Lee, S.F. Lee (2002) Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus.*J. Ethnopharmacol.*, **79** : 205
12. Huang RL, Chen CC, Huang HL, Chang CG, Chen CF, Chang C, Hsieh MT. (2000) Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Med.* 66(8):694-8.
13. Kimuya Y., Kubo M., Tani T., Arichi S., Okuda H. (1981) Studies on *Scutellariae Radix*. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **29** : 2610.
14. Zhang X, Kuang P, Wu W, Yin X, Kanazawa T, Onodera K, Metoki H, Oike Y. (1994) The effect of radix *Salviae Miltiorrhizae* Composita on peroxidation of low density lipoprotein due to copper dichloride. *J Tradit Chin Med.* 14(3):195-201
15. Zhang X, Wu W, Kuang P, Takemichi K, Kogo O, Hirobumi M, Yasaburo O. (1994) The effect of radix *salviae miltiorrhizae* composita and ligustrazine on lipid peroxidation in low

- density lipoprotein due to copper dichloride. *J Tradit Chin Med.* 14(4):292-7
16. Kuang P, Tao Y, Tian Y. (1996) Radix Salviae miltiorrhizae treatment results in decreased lipid peroxidation in reperfusion injury. *J Tradit Chin Med.* 16(2):138-42.
 17. Wu W, Kuang P, Li Z. (1998) Effect of radix Salviae miltiorrhizae on the gene expression of nitric oxide synthase in ischemic rat brains. *J Tradit Chin Med.* 18(2):128-33.
 18. Yu S, Kuang P, Kanazawa T, Onodera K, Metoki H, Oike Y. (1998) The effects of radix Salviae miltiorrhizae on lipid accumulation of peroxidized low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages—lipid analysis and morphological studies. *J Tradit Chin Med.* 18(4):292-9.
 19. Tang MK, Ren DC, Zhang JT, Du GH. (2002) Effect of salvianolic acids from Radix Salviae miltiorrhizae on regional cerebral blood flow and platelet aggregation in rats. *Phytomedicine.* 9(5):405-9.
 20. Li M, Zhao C, Wong RN, Goto S, Wang Z, Liao F. (2004) Inhibition of shear-induced platelet aggregation in rat by tetramethylpyrazine and salvianolic acid B. *Clin Hemorheol Microcirc.* 31(2):97-103.
 21. Koo BS, Kwon TS, Kim CH. (2004) Salviae miltiorrhizae radix inhibits superoxide generation by activated rat microglia and mimics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. *Neurochem Res.* 29(10):1837-45.
 22. Chung TW, Koo BS, Kim KO, Jeong HS, Kim MG, Chung KH, Lee IS, Kim CH. (2006) Salviae Miltiorrhizae BGE Radix increases rat striatal K(+)-stimulated dopamine release and activates the dopamine release with protection against hydrogen peroxide-induced injury in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Neurochem Res.* 31(1):109-20.

제8장 첨부서류

- 본 연구개발사업의 성과로 기술된 **게재된 학술지 논문 전체 사본**(게재 허가를 받은 경우 게재 증명서)과 **산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본**을 반드시 첨부할 것.

총괄 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여		공개가능여부
사업명	한약재과학화사업		
과제명	한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구(황금, 단삼)		
연구책임자	성 명	손 건 호	주민등록번호
	소속 기관명	안동대학교	
	전자우편		전화번호

○ 연구목표 (400 ~600자)

황금으로부터 baicalin, wogonin 등의 flavonoid 8종과 phenylpropanoid 2종 화합물과 단삼으로부터 tanshinone I, II A 등의 diterpenoid 8종과 dimethyl lithospermate 등의 lignin 2종 화합물들을 크로마토그래피법으로 분리하여 생리활성검색 시료로 제공한다. 분리된 화합물들을 지표물질로 한 동시분석법을 개발하고 finger-print analysis를 실시한다. 분리된 유효성분을 중심으로 유전자 칩을 활용한 생리활성성분의 효능유전자 확인 연구를 진행하며, 대량분리를 통하여 유효성분 3종이상을 확보 제출한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

황금과 단삼을 추출 및 분획하고 이들을 각각 크로마토그래피를 실시하여 황금으로부터 19종의 화합물, 단삼으로부터 11종의 화합물을 분리하였다. 각각을 분광학적 수단을 사용하여 구조결정한 결과 황금은 17종의 flavonoids 화합물과 phenolic 화합물인 guaiacol과 paeonol 2종임을 확인하였고 단삼은 diterpenoid 5종과 lignin 6종임을 확인하였으며 생리활성검색의 시료로 제공하였다. 황금과 단삼에 함유된 생리활성물질들 (황금의 경우 HPLC법은 6종, LC-MS/MS법은 7종, 단삼의 경우 HPLC법과 LC-MS/MS법 모두 6종)의 동시정량법을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 새로이 개발하였다. 동시정량법에 대한 validation을 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다. 황금과 단삼의 시중 유통품 (황금은 8종, 단삼은 16종)에 대해 활성성분의 함량을 측정하였다. 또한 한약재 및 각 약재별 유효 성분을 제시하고 각각의 효능을 제시하고자 DNA microarray를 이용하였다. 한약재추출물 또는 성분을 처리 후 약 3만개의 유전자 중 발현 변화를 나타내는 효능 유전자를 발굴하고자 청열약으로 분류되는 황금과 활혈거어약으로 분류되는 단삼 및 그 성분들을 LPS 처리한 대식세포에 처리하여 항염 효과 및 항산화 효능을 검색하였다. 황금의 항염 효능 성분으로는 baicalein, wogonin, chrysin을 제시하였고, 단삼의 항산화 효능 성분으로 tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B을 제시하였다. DNA microarray 분석결과 inflammation, apoptosis, anti-oxidant 등과 관련된 pathway 관련 유전자들의 발현 변화가 가장 크게 나타났으며 선정된 효능 유전자들에 대해서 RT-PCR을 이용한 검증결과 IL-11 R α 1, IL-6 ST, Tgfb1 등의 유전자를 효능 유전자로 제시하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~600자)

한약재에 함유된 유효성분 표준품 확보 및 분리기술 확립하고 유효성분중심의 한약재 관리에 의한 한약재 품질수준향상 및 분리된 물질들의 확인 및 순도결정을 함으로써 생리활성 및 proteomics 연구를 위한 표준화된 시료를 제공할 수 있다. 또 동시정량법 개발로 식물의 용매추출물의 성분확인 및 함량결정을 함으로써 추출물의 생리활성실험 결과의 분석 및 산지별 패턴 분석에 응용할 수 있다.

한약재의 효능검색에 biochip을 활용할 경우, 수천 개의 성분이 집중된 한약재의 효능에 관여하는 유전자들의 전체적인 경향을 분류할 수 있고 Biochip 연구 결과를 활용하여 한약재에 포함되어 있는 성분들의 효능 및 유해성을 판단하여 국제적인 선두주자가 될 수 있으며 Biochip을 활용하여 한약재 생리활성 물질의 효능 유전자 확인으로 한약제제의 표준화 기준 설정 및 Biochip 활용의 활성화를 꾀할 수 있다.

○ 총괄 참여연구원

성 명	주민등록번호	성 명	주민등록번호

Keywords (5개 내외)	한글	활성 성분분리, LC-MS/MS 분석법, 효능유전자, 황금, 단삼
	영문	Isolation of bioactive components, LC-MS/MS analysis, bio-marker genes, Scutellaria Root, Salvia Miltiorrhiza Roots

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “공개불가”로 표시
 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술

제 1 세부 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여		공개가능여부	
주관과제명	한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구(황금, 단삼)			
제 1 세부과제명	황금, 단삼의 생리활성물질분리			
연구책임자	성 명	손 건 호	주민등록번호	
	소속 기관명	안동대학교		
	전자우편		전화번호	

○ 연구목표 (400 ~600자)

황금과 단삼은 화학적으로나 생리활성적인 측면에서 많은 연구결과가 보고 되었음에도 불구하고 우리나라에서 재배되고 있는 이들 한약재들에 대한 연구와 최근에 급증하고 있는 수입품에 대한 연구검토 결과는 미미한 수준이다. 이에 본 연구에서는 황금과 단삼에 함유되어 있는 유효성분 중심의 한약재 규격관리에 필요한 생리활성물질을 분리하고자 하였다. 황금의 주요성분인 flavonoid 8종과 기타화합물 2종을 포함하여 총 10종이상의 화합물을 분리하고 단삼으로부터 주성분인 diterpenoid 8종과 미량성분으로서 생리활성을 나타낼 가능성이 있는 lignin 2종을 포함하여 총 10종의 화합물을 크로마토그래피법으로 분리하여 구조결정 후 생리활성검색 시료로 제공한다. 또한 황금과 단삼의 유효성분 3종이상을 대량분리를 통하여 확보 제출한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

황금 20Kg을 추출하여 70% EtOH extract 약 6 Kg을 얻었다. 이중 5.9 Kg을 분획하여 CH₂Cl₂ extract(300g), EtOAc extract 120g, n-BuOH extract 2.2kg 과 H₂O extract 1.6kg을 얻었다. 이들 중 CH₂Cl₂, EtOAc와 BuOH extract를 silica gel column을 이용하여 다음 19종의 화합물을 분리하였다. 각각을 분광학적 수단을 사용하여 구조결정한 결과 oroxylin A, chrysin, tanaxin I, skullcapflavone II, rivularin, wogonin, baicalein, 2',5,6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone, 2',5,7-trihydroxy-6',8-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, 6''-ethyl-wogonoside, viscidulinIII-2'-O-glucoside, wogonoside, rutin, baicalin등 flavonoid 17종과 penolic 화합물인 guaiacol과 paeonol임을 확인하였다. 또한 단삼은 17.45kg을 70% EtOH추출하여 70% EtOH extract 2.37kg을 만들었다. 70% EtOH extract 분획하여 n-Hexane extract(48.8g), CH₂Cl₂ extract 27.89g, EtOAc extract 212.23g, n-BuOH extract 149.11g 과 H₂O extract 1.79kg을 얻었다. 이중 Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc 분획을 각각 크로마토그래피를 실시하여 11종의 화합물을 분리하였다. 각 화합물들을 구조결정한 결과 diterpenoid화합물계열인 tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, 15, 16-dihydratanshinone I 과 dansenspiroketallacton임을 확인하였고 lignin 계열인 salvianolic acid B, rosmarinic acid, 9'-methyl lithospermate, monomethyl lithospermate B, dimethyl lithospermate B와 methylsalvianolate C임을 확인하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~600자)

황금으로 부터 19종의 화합물과 단삼으로부터 11종의 화합물을 분리하여 각종 분광학적 방법으로 구조결정 한 결과 황금에서는 17종의 flavonoid와 2종의 penolic compound가 분리되었고 단삼에서는 5종의 diterpenoid와 6종의 lignin화합물이 분리되었다. 본 연구의 세부과제와 활성팀에게 연구에 필요한 시료를 분리하여 제공하였고 황금시료의 경우 식약청에 10종의 화합물(유효성분 3종 (wogonin, baicalein, baicalin- 3g 이상제공)과 그 외 7종의 화합물)을 제공 완료하였다. 단삼시료도 차후에 유효물질 3종을 포함해 총 10종을 제공하여 대한 약전등 개정시 기준 시험법에 반영하고 생약의 효능시험 및 biochip을 활용한 생약의 유용성분 개발에 활용 될 것으로 사료된다.

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호	성 명	주민등록번호

Keywords (5개 내외)	한글	생리활성성분분리, 황금, 단삼
	영문	Isolation of bioactive components, Scutellaria Root, Salvia Miltiorrhiza Roots

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “공개불가”로 표시
- 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
- 4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)

제 2 세부 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여	공개가능여부	
주관과제명	한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구(황금, 단삼)		
제 2 세부과제명	황금과 단삼의 생리활성성분 분석 및 동시정량법 개발		
연구책임자	성 명	우미희	주민등록번호
	소속 기관명	대구가톨릭대학교	
	전자우편		전화번호

○ 연구목표 (400 ~600자)

황금과 단삼에 함유된 생리활성물질 (3종 이상)의 동시정량법을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법을 이용하여 설정함으로써 황금과 단삼의 유효성분 정량법을 개발하고 황금과 단삼에 함유된 생리활성물질 (3종 이상)의 동시정량법에 대한 validation(반복성 (repeatability), 정확도 및 정밀도 (Accuracy and Precision), 회수율(Recovery), 완전성 (Robustness), 안정성 (Stability))을 실시함으로써 동시 분석법에 대한 타당성을 입증한다. 황금과 단삼의 시중 유통품의 활성성분 (3종 이상)의 함량을 측정함으로써 산지별 성분 분석결과를 활용하여 산지별 패턴 분석을 할 수 있고 또한 시중에 유통되고 있는 국내생산품과 국내유통 수입한약재를 포함한 유통품의 모니터링을 통하여 적절한 함량기준을 제시하고자 한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

분리된 물질의 구조 데이터를 통하여 동시정량이 가능한 기기를 선정하고 이에 적합한 컬럼과 이동상을 결정하여 분리된 물질들의 최적의 동시분석법을 개발하고 validation을 통하여 동시정량법을 개발하였으며 시판되고 있는 한약재를 구입하여 지표성분함량을 정량하였다. 황금의 경우 HPLC/UV 법은 wogonin, baicalin, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'- dimethoxyflavone , baicalin, chrysin, oroxylin A의 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였으며, LC-MS/MS 법은 wogonin-7-O-glucuronic acid methyl ester, wogonin, baicalin, 5,7,2',5'-tetra hydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone, baicalin, chrysin의 7종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였고 단삼의 경우 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법 모두 rosmarinic acid, salvianolic acid B, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone IIA 의 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 또한 황금과 단삼에 함유된 생리활성물질 (6종)의 동시정량법에 대한 validation을 다음 항목에 대해 실시함으로써 동시분석법에 대한 타당성을 입증하였다.

확립한 분석법에 의해 구입처가 서로 다른 8종의 황금 시료와 대상구입처가 다른 16종의 단삼 검체 각각의 지표성분의 함량을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 동시 분석한 결과 황금의 경우 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법에서 baicalin 은 두 가지 방법에서 오차가 최대 2 % (황금 중 baicalin 의 함량이 높은 원인으로 간주됨)까지 되었으며 대부분의 시료는 오차가 1% 미만이었다. wogonin baicalin, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'- dimethoxyflavone시료는 오차가 0.5 % 미만이었다. 단삼의 경우 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법에서 salvianolic acid B는 두 가지 방법에서 0.3 % 미만이었고 나머지 성분들은 대부분 0.03 % 미만이었으며, 몇 개 시료는 0.06 % 전후의 오차도 있었다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~600자)

본 연구에서는 황금의 경우 HPLC/UV 법으로 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였고 LC-MS/MS법으로 7종의 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 단삼의 경우 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS법 모두 6종 성분에 대하여 동시분석법을 개발하였다. 개발된 황금과 단삼의 동시분석법은 향후 대한약전 개정 시 황금과 단삼의 지표성분 분석법으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한 확립한 분석법에 의해 구입처가 다른 8종의 황금 시료와 대상구입처가 다른 16종의 단삼 검체 각각의 지표성분의 함량을 HPLC/UV 법과 LC-MS/MS 법으로 각각 동시 분석하여 황금과 단삼 시료의 산지별 성분 분석결과를 얻었다. 이 자료를 활용하여 산지별 패턴 분석 및 품질관리를 할 수 있을 것으로 간주된다.

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호	성 명	주민등록번호

Keywords (5개 내외)	한글	황금, 단삼, 정량법 개발, 분석법 검증, 함량 측정.
	영문	Scutellariae Radix, Salvia miltiorrhizae Radix, Assay development, Validation, Quantity determination.

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “공개불가”로 표시
- 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
- 4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)

3세부 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여		공개가능여부
주관과제명	한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구(황금, 단삼)		
제 0 세부과제명	유전자칩을 활용한 황금, 단삼 생리활성 성분의 효능 유전자 검증		
연구책임자	성 명	하 혜 경	주민등록번호
	소속 기관명	한국한의학연구원	
	전자우편		전화번호

○ 연구목표 (400 ~600자)

한약은 여러 가지 화합물들이 혼합되어 있어 그 생리학적 작용을 정확하게 이해하기가 어렵다. 약 3만 개의 genes이 집적되어 있는 oligonucleotide chip array를 통하여 각 약재 및 화합물의 gene 발현 경향을 분석하고자 하였다. Biochip을 이용하여 청열약으로 분류되는 황금과 활혈거어약으로 분류되는 단삼 및 그 성분들의 효능, 유해성 및 효능물질을 확인하고자 염증을 유발시킨 mouse macrophage cell line에 황금 추출물 및 성분을 처리하여 mouse whole gene microarray를 사용하여 분석 후 약리효능 유전자 검색으로 황금과 단삼의 추출물 및 성분의 약리효능에 대한 biomarker genes 검색하고자 하였다. 또한 한약재의 규격화/과학화를 위한 data base 시스템 구축을 위한 기초 자료를 제공하여 한약재 및 한약제제의 규격화, 과학화, 표준화의 기준을 설정하도록 한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

황금은 70% EtOH 추출물과 황금으로부터 분리된 성분 8종에 대하여 항염증 효과를 검색 결과 PGE₂의 생성을 효과적으로 억제시키는 대표 성분으로 baicalein(C1), wogonin(C2), chrysin(C3)의 3종을 효능 성분으로 선정. DNA microarray를 이용한 효능 유전자 검색으로 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway는 70E, C1, C2, C3에 대해서 공통적으로 inflammation 관련 유전자의 변화가 가장 크게 나타남. 그 외에 apoptosis, angiogenesis, PDGF, T cell 등과 관련된 유전자들의 변화가 나타남. 이는 황금의 항염증 반응과 관련이 있는 것으로 사료됨. 황금 및 그 성분들의 효능 유전자로 IL-1, Ptges2, TNF- α 를 비롯하여 Activin A-R I, Activin-R II A, IFN- γ , IL4-R, IL6-ST, IL11-R, SCS4, TGF- β 등을 제시하였다. 단삼은 70% ethanol 추출물과 tanshinone I, tanshinone II A, cryptotanshinone, 15,16-dihydrotanshinone I, rosmarinic acid, salvianolic acid B에 대해서 항산화 효능을 검색한 결과 항산화 효과에 대한 효능 성분으로 tanshinone I, cryptotanshinone, rosmarinic acid, salvianolic acid B를 선정함. DNA microarray를 이용하여 변화된 유전자에 의한 관련 Signal pathway 검색 결과 oxidataion, inflammation 관련 유전자들의 변화가 가장 크게 나타남. 특히 oxidative stress와 관련된 gene들의 변화가 크게 나타났으며 관련 gene들의 분석 후, cardiovascular 질병 치료와 관련됨이 나타남. 이러한 결과는 단삼이 심근경색 흰쥐 모델에서 SOD의 발현을 증가시키고 지질과산화를 억제하였다는 보고 및 tanshinone 등이 심근 지질의 과산화를 억제하고 SOD 활성을 증가시키고 PGE₂의 생성을 감소시켰다는 보고와 일치하여 항산화 활성을 증명함. 단삼 및 그 성분들의 항산화 효능 유전자로 SOD, catalase, GPx, iNOS 외에 Acad1, Aldh2, Fasn, Fasn, Glud1, Impdh2, Hadh, Txn2, Cyp51, Gpd2 등을 제시함.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~600자)

DNA chip을 이용한 독성 유전자 검색이나 약리활성 유전자의 효능 연구는 이미 선진국에서 많이 연구되는 방법으로 DNA chip을 이용하여 한약재의 효능검색에 활용할 경우 수천 개의 성분이 집중된 한약재의 효능에 관여하는 유전자들의 전체적인 경향을 분류할 수 있는 장점이 있음. 한약재의 대표적인 생리활성 물질의 효능 유전자를 biochip으로 확인하여 현재 무분별하게 유통되고 있는 많은 한약재들에 대한 품질관리 및 유통관리가 체계적으로 이루어질 것임. 또한 수입 한약재에 대한 품질 기준 설정에 필요한 과학적인 기준을 제시할 수 있으며 약재 효능에 대한 증거 자료로 사용될 수 있음. 이를 바탕으로 한약재에 유통 시 약재의 품질의 표시화 하고 등급화하여 보다 과학적인 약재 관리에 이용하여 국민들의 한약재에 대한 불만을 제거함. Biochip을 이용한 기전 연구 및 다양한 효능 유전자 발굴로 신약 개발의 가능성을 높이고 더불어 한약재에 포함되어 있는 생리활성 성분들의 효능 및 유해성 연구를 접목할 수 있을 것으로 사료됨. 따라서 활성 성분에 대한 과학적이고 체계적인 DB를 보유하여 세계적으로 한약재 관리의 선두주자가 될 수 있음.

○ 참여연구원

성명	주민등록번호	성명	주민등록번호

Keywords (5개 내외)	한글	유전자 칩, 효능 유전자, 한약재 과학화, 황금, 단삼
	영문	Biochip, biomarker genes, Standardization of medicinal herbs, Scutellaria Root, Salvia Miltiorrhiza Roots

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “공개불가”로 표시
- 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
- 4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)

부 록

1. 황금 HPLC 분석법

함량측정(정량법)

고속액체크로마토그래피법에 의해 측정한다.

표준용액 조제

- 1) 각 표준품을 정밀하게 달아 에탄올을 넣어 각각 wogonin(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), baicalein(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone(132.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), baicalin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), chrysin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), oroxylin A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 농도로 만들어 표준액으로 사용한다.
- 2) 내부표준물질인 propylparaben 표준품을 정밀하게 달아 에탄올을 넣어 50,000 ppm으로 희석한다.
상기의 보존용액 (stock solution)을 4 °C 냉장 보관한 다음 계열 희석하여 검량용액을 각각 만든다.

검액의 제조

황금 분말 시료 (100 mesh 통과) 50 mg을 취하여 70% ethanol 50 mL를 가하고 50,000 ppm의 propylparaben (I.S.) 80 μL 를 가한 후 60분간 초음파 추출한 다음 70% ethanol로 그 감실량을 추가한다. 원심분리하고 여과하여 membrane filter (0.45 μm)를 통과시킨 후 그 10 μL 를 가지고 액체크로마토그래피법에 따라 시험한다.

조작

검액 및 표준액 10 μL 씩을 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래피법에 따라 시험한다.

조작조건

- 1) 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 275 nm)
- 2) 칼럼 : 안지름 4~6mm, 길이 15~25mm인 5~10 μm 옥타데실실릴화한 실리카겔을 충전제로한다.
- 3) 칼럼온도 : 40 °C
- 4) 내부표준물질 : propylparaben
- 5) 이동상 : A (1% acetic acid); B (ACN: MeOH = 7:3, v/v in 1% acetic acid)

Table 5. HPLC gradient condition.

Time(min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	75	25
10	68	32
20	55	45
24	55	45
35	52	48
40	75	25
45	75	25

- 6) 유량 : 1.0 mL/min
- 7) 시스템적합성

시스템의 성능 : Wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxy-flavone, baicalin, chrysin, oroxylin A 표준품을 혼합하여 Table 5의 조건으로 조작할 때 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, baicalin, baicalein, wogonin, chrysin, oroxylin A의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리된다.

검량선 작성

Wogonin, baicalein, 5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone, baicalin, chrysin, oroxylin A, 내부표준법에 의한 검량선을 검체분석 전에 Table 와 같은 농도 범위에서 작성한다.

Table 6. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

compound	range	a	b	R ²	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
wogonin	0.2 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$	0.0369	-0.0001	0.9999	0.02	0.07
baicalein	0.2 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$	0.0227	-0.0021	0.9997	0.04	0.13
5,7,2',5'-tetrahydroxy-8,6'-dimethoxyflavone	0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$	0.0099	0.0002	0.9995	0.03	0.09
baicalin	1.0 ~ 336 $\mu\text{g/mL}$	0.0138	-0.0045	0.9998	0.05	0.16
chrysin	0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$	0.0295	0.0001	0.9999	0.02	0.08
oroxylin	0.1 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$	0.0309	0.0004	0.9999	0.01	0.03

LOD = 3 x S/N; LOQ = 10 x S/N

함량계산

검체로부터 각 성분의 함량 (weight, %)은 시험 직전 작성된 검량선으로부터 각 성분의 농도를 구한 후 취한 검체의 양과 단위환산을 고려하여 다음과 같이 계산한다.

$$\text{Content (g/g)\%} = \frac{C_{c.c.} (\mu\text{g/mL}) \times V_{\text{final}} (\text{mL}) \times 10^{-6}}{S (\text{g})}$$

S (g) = Sample weight (g) (건조한 검체분말의 무게 g)

C_{c.c.} ($\mu\text{g/mL}$) = Conc. calculated from calibration graph ($\mu\text{g/mL}$)

V_{final} (mL) = volume of extraction solution (mL)

2. 단삼 HPLC 분석법

함량측정(정량법)

고속액체크로마토그래피법에 의해 측정한다.

표준용액조제:

- 1) 각 표준품을 정밀하게 달아 에탄올을 넣어 각각 500 ppm으로 만들어 표준액으로 한다. salvianolic acid B는 1000 ppm으로 한다.
- 2) 내부표준물질인 4-hydroxysinnamic acid 표준품을 정밀하게 달아 에탄올을 넣어 5000 ppm으로 희석한다.
상기의 보존용액 (stock solution)을 4 °C 냉장 보관한 다음 계열 희석하여 검량용액을 각각 만든다.

검액의 제조

단삼 분말 시료 (150 mesh 통과) 0.3 g을 취하여 75% methanol 50 mL를 가하여 30분간 초음파 추출한 다음 75% methanol로 그 감실량을 추가한다. 5,000 ppm의 4-hydroxycinnamic acid (I.S.) 50 µL를 가한 후 여과하여 membrane filter (0.45 µm) 를 통과시킨 후 그 10 µL를 injection하여 HPLC 분석을 실시한다.

조작

검액 및 표준액 10 µL씩을 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래피법에 따라 시험한다.

조작조건

- 1) 검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)
- 2) 칼럼 : 안지름 4~6mm, 길이 15~25mm인 5~10 µm옥타데실실릴화한 실리카겔을 충전제로 한다.
- 3) 칼럼온도 : 40 °C
- 4) 내부표준물질 : 4-hydroxysinnamic acid
- 5) 이동상 : A (H₂O:HCOOH = 100:1); B (MeOH:CH₃CN:HCOOH = 100:75:1)

Table 10. HPLC gradient condition.

time (min)	A (H ₂ O:HCOOH = 100:1) %	B (MeOH:CH ₃ CN:HCOOH = 100:75:1) %
0	75	25
1	60	40
14	60	40
22	40	60
23	11	89
40	11	89

6) 유량 : 1.0 mL/min

7) 시스템적합성

- (1) 시스템의 성능 : 각 성분의 표준품과 내부표준품을 혼합하여 Table 10의 조건으로 조작할 때 I.S., rosmarinic acid , salvianolic acid B, 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone

I, tanshinone IIA의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리된다.

각각의 표준품에 대한 이론단수 (N), capacity factor (k'), selectivity (α) 및 분해능 (Rs)은 Table 20와 같다.

Table 20. System suitability: Theoretical plate(N), capacity factor(k'), selectivity (α), and resolution (Rs), n=3

compound	Theoretical plate(N)		capacity factor(k')		separation factor(α)		Resolution (Rs)	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
rosmarinic acid	10767	246	5.05	0.00	1.51	0.01	19.84	0.32
salvianolic acid B	8274	226	5.82	0.01	1.15	0.01	5.78	0.14
15,16-dihydrotanshinone I	356421	690	12.16	0.01	2.09	0.00	63.91	0.54
cryptotanshinone	360671	814	13.26	0.02	1.09	0.00	21.84	0.07
tanshinone I	325287	1067	13.56	0.02	1.02	0.00	5.58	0.14
tanshinone IIA	298134	1020	14.83	0.03	1.09	0.00	21.26	0.05

(2) 시스템의 재현성 : 표준품 혼합액 10 uL를 가지고 Table 1의 조건으로 5회 반복하여 주입할 때 내부표준물질에 대한 표준품의 피크 면적비와 표준품 피크의 머무름시간의 상대표준편차는 1.0%이하이다 (Table 17).

Table 17. Repeatability of peak area ratio and retention time for standard by HPLC (n=5).

compound	Peak area ratio (Peak area/IS area)			Retention time (min)		
	mean	SD	RSD(%)	mean	SD	RSD(%)
rosmarinic acid	0.6799	0.0021	0.3089	13.11	0.0460	0.3512
salvianolic acid B	0.3939	0.0116	3.03	15.09	0.0970	0.6008
15,16-dihydrotanshinone I	1.4602	0.0057	0.3693	30.70	0.0136	0.0442
cryptotanshinone	0.9009	0.0032	0.3928	33.57	0.0287	0.0855
tanshinone I	1.3341	0.0016	0.1199	34.28	0.0276	0.0804
tanshinone II A	1.3929	0.0055	0.3952	37.66	0.0387	0.1027

검량선 작성

각 표준물질을 내부표준법에 의한 검량선을 검체분석 전에 Table 15와 같은 농도 범위에서 작성한다.

Table 15. Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ.

Analytes	linear range (mg/mL)	slope(a)	intercept(b)	correlation coefficient(r)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
rosmarinic acid (1)	0.2~40	0.0663	-0.0149	0.9999	36.2	120.6
salvianolic acid (2)	0.2~800	0.0393	0.0060	0.9999	51.5	155.0
15,16-dihydrotanshi none I (3)	0.2~40	0.1522	-0.0431	0.9999	30.1	100.4
cryptotanshinone (4)	0.2~40	0.0881	-0.0031	1.0000	34.1	113.6
tanshinone I (5)	0.2~40	0.1529	-0.0424	0.9999	36.7	122.2
tanshinone IIA (6)	0.2~40	0.1510	-0.0154	0.9999	32.4	108.1

함량계산

검체로부터 각 성분의 함량 (weight, %)은 시험 직전 작성된 검량선으로부터 각 성분의 농도를 구한 후 취한 검체의 양과 단위환산을 고려하여 다음과 같이 계산한다.

$$\text{Content (g/g) \%} = \frac{C_{c.c.} (\mu\text{g/mL}) \times V_{\text{final}} (\text{mL}) \times 10^{-6}}{S (\text{g})}$$

$S (\text{g})$ = Sample weight (g) (건조한 검체분말의 무게 g)

$C_{c.c.} (\mu\text{g/mL})$ = Conc. calculated from calibration graph ($\mu\text{g/mL}$)

$V_{\text{final}} (\text{mL})$ = volume of extraction solution