

T0030325

최종보고서

한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)

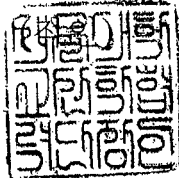
Study on the isolation and analysis of biologically active components from Bupleuri Radix and Saposhnikoviae Radix

주관연구기관 : 서울대학교

2008

식품의약품안전청

[별지 제12호 서식]

용역연구개발과제 최종보고서			
과제번호	08182한약재255		
단위과제명	한약재생리활성성분분리		
과제명	국문	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)	
	영문	Study on the isolation and analysis of biologically active components from Bupleuri Radix and Saposhnikoviae Radix	
주관 연구기관	기관명	소재지	대표
	서울대학교		이장무
주관 연구책임자	성명	소속 및 부서	전공
	김진웅	서울대학교 약학대학	생약학
총연구기간	2007년 2월 28일 - 2008년 11월 30일(년 8.6개월)		
총연구개발비	320,000천원		
연구년차	연구기간	연구개발비	
1차년도	2007. 2. 28 - 2007. 11. 10	160,000 천원	
2차년도	2008. 3. 10 - 2008. 11. 30	160,000 천원	
총참여연구원	17명 (책임연구원: 2명, 연구원: 1명, 연구보조원: 13명, 보조원: 1명)		
<p>년도 용역연구개발과제에 의하여 수행중인 연구과제의 최종보고서를 붙임과 같이 제출합니다.</p> <p style="text-align: right;">2009년 2월 27일</p> <p>주관연구책임자 김진웅</p> <p>주관연구기관장 서울대학교 산학협력단</p>			
<p style="text-align: right;">2009년 2월 27일</p> <p>주관연구책임자 김진웅</p> <p>주관연구기관장 서울대학교 산학협력단</p> <p style="text-align: right;">  </p> <p>식품의약품안전청장 귀하</p>			

제 출 문

식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “과제명(주관연구기관명/주관연구책임자)”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 . 11 . 30

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 김진웅

제 1 세부과제명 : 시호, 방풍의 생리활성성분 분리 연구
(제 1 세부연구기관/세부과제책임자): 서울대학교/김진웅

제 2 세부과제명 : TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS를 이용한 시호, 방풍의
생리활성성분 동시분석법 개발
(제 2 세부연구기관/세부과제책임자): 중앙대학교/한상범

목 차

I. 연구개발결과 요약문

(한글)

(영문)

II. 총괄연구개발과제 연구결과

- 제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표
- 제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법
- 제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과
- 제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론
- 제5장 총괄연구개발과제의 연구성과
- 제6장 기타 주요변경사항
- 제7장 참고문헌
- 제8장 첨부서류

III. 제 1 세부연구개발과제 연구결과

- 제1장 제 1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표
- 제2장 제 1 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법
- 제3장 제 1 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과
- 제4장 제 1 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론
- 제5장 제 1 세부연구개발과제의 연구성과
- 제6장 기타 주요변경사항
- 제7장 참고문헌
- 제8장 첨부서류

IV. 제 2 세부연구개발과제 연구결과

- 제1장 제 2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표
- 제2장 제 2 세부연구개발과제의 연구대상 및 방법

- 제3장 제 2 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과
- 제4장 제 2 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론
- 제5장 제 2 세부연구개발과제의 연구성과
- 제6장 기타 주요변경사항
- 제7장 참고문헌
- 제8장 첨부서류

최종보고서 요약문

과 제 명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)		
중심단어	시호, 방풍, 생리활성성분, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 표준품		
주관연구기관	서울대학교 약학대학	주관연구책임자	김진웅
연구기간	2008. 3. 10 ~ 2008. 11. 30		
<p>본 연구는 시호, 방풍에 대한 체계적이고 과학적인 성분 분리 및 분석법을 확립하고 이를 검증하기 위해 시호, 방풍의 지표물질의 분리법 확립 및 대량 분리, 시호, 방풍의 미량 함유 물질 중 지표물질에 준할 수 있는 물질 선별 및 분리, 시호 및 방풍의 분석용 표준품의 제조 및 제출, TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 분석법을 이용하여 시호, 방풍의 생리활성성분 동시분석법을 개발하고 분석법 검증(validation)을 실시하며, 이를 기반으로 패턴인식 또는 지문인식법에 따른 기원별, 산지별 한약재 정보 구축을 목표로 한다.</p> <p>방풍의 EtOAc분획에서 21종의 화합물(3'-<i>O</i>-angeloylhamaudol, β-sitosterol, marmesin, phellopterin, anomalin, imperatorin, xanthotoxin, deltoin, bergapten, stigmasterol, ledebouriellol, hamaudol, 8'-epicleomioscin, xanthoarnol, cimifugin, 5-<i>O</i>-methylvisamminol, daucosterol, 4'-<i>O</i>-glucosyl-5-<i>O</i>-methylvisamminol, nodakenin, <i>sec-O</i>-glucosylhamaudol, <i>prim-O</i>-glucosylcimifugin)을, 시호의 <i>n</i>-BuOH 분획물을 대상으로 하여 12종의 물질(saikosaponin D, saikosaponin C, saikosaponin B₄, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin A, saikosaponin H, saikosaponin I, saikosaponin B₁, saikosaponin G와 미지시료 crystal, 5-1, 5-2. 현재 구조분석중)을 분리하였다. 방풍의 지표성분으로는 imperatorin, phellopterin, 3'-<i>O</i>-angeloylhamaudol을, 시호의 지표성분으로는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 선정하였다. 시호 및 방풍의 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-ELSD 및 LC-MS의 동시분석법을 개발하였다. 시호의 HPLC-ELSD 동시 분석법 및 방풍의 HPLC-UV 동시 분석법에 대한 분석법 검증 (analytical method validation)이 실시되었으며 그 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성 기울기, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 tailing factor (T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다. 시호 및 방풍 한약재에서 각 한약재의 주 생리활성성분을 추출하는 추출법을 최적화하였다. 시중에서 구입하거나 제 1세부 기관으로부터 제공 받은 시호 20종, 방풍 24종의 한약재를 추출하여 확립한 시호의 HPLC-ELSD 및 방풍의 HPLC-UV법에 적용하여 함량분석을 하였다. 함량분석의 결과를 근거로 하여 군집 분석 (Cluster analysis) 및 주성분 분석 (Principal Component Analysis)을 실시하였다. 시호의 생리활성 성분에 대한 LC-MS 동시분석법을 개발하였으며 MRM mode와 SIM mode를 비교한 결과 감도가 더 좋은 SIM mode로 분석하였다. 방풍의 생리활성성분 LC-MS/MS 동시분석은 선택성이 높은 MRM mode로 실시되었다. 각 LC-MS/MS분석법에 대하여 분석법 검증을 실시한 결과 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다.</p>			

주관연구책임자 의견	
연구의 범위	시호 및 방풍의 활성성분을 분리하고 시호 및 방풍의 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-ELSD 및 LC-MS의 동시분석법을 성공적으로 개발하였다.
연구의 한계점	활성연구가 동시에 병행되어 생리활성성분들중 주성분 선택에 어려움이 있었음
인용시 주의사항	인용전 주관부서와 미리 상의할 것
주관부서 연락처	독성과학연구원 응용통계과

Summary

Title of Project	Study on the isolation and analysis of biologically active components from Bupleuri Radix and Saposhnikoviae Radix		
Key Words	Bupleurum root, Saposhnikovia root, bioactive component, assay, pattern recognition analysis, chemical fingerprint, control reference standard		
Institute	Seoul National University	Project Leader	Kim, Jinwoong
Project Period	2008. 3. 10 ~ 2008. 11. 30		
<p>This study aimed to set up the method of isolation and analysis of the Bupleuri Radix and Saposhnikoviae Radix. For this purpose, we isolated the active components from these herbal medicines and selected major active compounds. The method of simultaneous analysis was developed and validated. At this basis, the information (its origin and growing district) of these herbal medicines was achieved by pattern analysis and fingerprinting recognition.</p> <p>We isolated 21 compounds from the EtOAc fraction of methanolic Saposhnikoviae Radix (3'-<i>O</i>-angeloylhamaudol, β-sitosterol, marmesin, phellopterin, anomalin, imperatorin, xanthotoxin, deltoin, bergapten, stigmasterol, ledebouriellol, hamaudol, 8'-epicleomioscin, xanthoarnol, cimifugin, 5-<i>O</i>-methylvisamminol, daucosterol, 4'-<i>O</i>-glucosyl-5-<i>O</i>-methylvisamminol, nodakenin, <i>sec-O</i>-glucosylhamaudol, <i>prim-O</i>-glucosylcimifugin) and 10 saikosaponins (saikosaponin D, saikosaponin C, saikosaponin B₄, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin A, saikosaponin H, saikosaponin I, saikosaponin B₁, saikosaponin G) from the <i>n</i>-BuOH fraction of 80% methanolic extract of Bupleuri Radix. Among these compounds, imperatorin, phellopterin, 3'-<i>O</i>-angeloylhamaudol were selected as the major active compounds of Saposhnikoviae Radix, saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D were selected as the major active compounds of Bupleuri Radix. The methods of simultaneous analysis using TLC, HPLC-ELSD and LC-MS were developed. HPLC-ELSD analysis method of Bupleuri Radix and HPLC-UV analysis methods of Saposhnikoviae Radix were validated. The validation was performed at the points of linearity, precision, accuracy, robustness. In robustness test, area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N), and tailing factor (T) were evaluated while changed the column temperature, flow rate, mobile phase composition, column. And the extraction methods of Bupleuri Radix and Saposhnikoviae Radix were optimized. 20 Bupleuri Radix samples and 24 Saposhnikoviae Radix samples were extracted by optimized extraction methods. These extracts were analysed by composition analysis method. This results were performed by Cluster analysis and Principal Component Analysis. LC-MS simultaneous analysis of the active components of Bupleuri were developed using SIM mode and LC-MS/MS analysis of the components of Saposhnikoviae Radix were developed using MRM mode.</p>			

Opinion of Project Manager	
Scope	This study aimed to set up the method of isolation and analysis of the Bupleuri Radix and Saposhnikovia Radix. Active compounds of these herbal medicines were isolated and the methods of simultaneous analysis using the TLC, HPLC-ELSD, LC-MS were developed successfully.
Limitation	The biological activity study was performed the same time, so there was some problem select the major active components.
Direction For Citation	Before citation, contacts the supervisory office.
Supervisory Office	NITR Biostatistics Division

총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 총괄연구개발과제의 목표

본 연구는 한약재 과학화 사업 중의 시호, 방풍에 대한 체계적이고 과학적인 성분 분리 및 분석법을 확립하고 이를 검증하는 것을 그 최종 목표로 한다. 이를 위해서 다음과 같은 구체적인 목표를 제시하는 바이다.

- 시호, 방풍의 지표물질의 분리법 확립 및 대량 분리
- 시호, 방풍의 미량 함유 물질 중 지표물질에 준할 수 있는 물질 선별 및 분리
- 다양한 기기분석법을 통한 효율적인 유효성분 분석법 및 validation법을 확립하여 시호, 방풍에 대한 품질 및 규격 관리법 확립
- 시호 및 방풍의 분석용 표준품의 제조 및 제출

각종 크로마토그래피법을 이용하여 다양한 성분을 시호, 방풍으로부터 분리해내며 이를 대량 분리한다. 또한 분리된 여러 성분중에서 지표물질을 선별하고 지표물질에 준할 수 있는 물질을 선별하는 것을 목표로 한다. 그리고 분석팀에서는 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 분석법을 이용하여 시호, 방풍의 생리활성성분 동시분석법을 개발하고 분석법 검증(validation)을 실시하며, 이를 기반으로 패턴인식 또는 지문인식법에 따른 기원별, 산지별 한약재 정보 구축을 목표로 한다.

1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

연구개발 추진내용	연구개발 연차	
	1차년	2차년
- 방풍의 성분 분리	100%	-
- 시호의 성분 분리	100%	-
- 방풍의 TLC 및 HPLC-UV 분석	100%	-
- 방풍의 LC-MS/MS 분석	100%	-
- 방풍 분석법 validation	100%	-
- 방풍의 함량분석	100%	-
- 방풍의 추출법 확립	100%	-
- 방풍의 TLC 패턴 평가	100%	-

연구개발 추진내용	연구개발 연차	
	1차년	2차년
- 방풍의 성분 대량 분리 및 지표성분 설정	-	100%
- 시호의 성분 대량 분리 및 지표성분 설정	-	100%
- 시호의 TLC 및 HPLC-ELSD 분석	-	100%
- 시호의 LC-MS 분석	-	100%
- 시호 분석법 validation	-	100%
- 시호의 함량분석	-	100%
- 시호의 추출법 확립	-	100%
- 시호의 TLC 패턴 평가	-	100%
- 시호의 HPLC-ELSD 및 방풍의 HPLC-UV 패턴 분석	-	100%
- 시호와 방풍의 주 생리활성성분에 대한 안정성 측정	-	100%
- 시호와 방풍의 추출법에 대한 회수를 측정	-	100%

1.3 국내·외 기술개발 현황

1. 방풍

저자(국가)	분석기기	분석성분	분석대상	비고	발행 년도
Jinna <i>et al.</i> (China)	LC-ESI-MS	prim-O-glucosylcimifugin 4-O-d-glucosyl-5-O-methylvisam inol	귀 혈장 중 방풍 성분 분석		2008
Jie <i>et al.</i> (China)	LC-ESI-MS ⁿ	방풍 32 성분	방풍	방풍 성분 동정	2008
Emi <i>et al.</i> (Japan)	HPLC-UV 2D-NMR	방풍 성분 중 chromones, coumarins, polyacetylenes, 1-acylglycerols	방풍	방풍의 진통 성분의 확인	2001

2. 시호

가. 국내 기술개발 현황

저자(국가)	분석기기	분석성분	분석대상	비고	발행 년도
Park <i>et al.</i> (Korea)	HPLC-UV	saikosaponin A, C, D	시호	-	2000
Kim <i>et al.</i> (Korea)	HP-TLC, HPLC-UV	saikosaponin A, B ₁ , B ₂ , D	시호	HP-TLC와 HPLC-UV 분석법의 비교 (함량분석 ×)	1995

나. 국외 기술개발 현황

저자(국가)	분석기기	분석성분	분석대상	비고	발행 년도
Liau <i>et al.</i> (Taiwan)	LC-ESI-MS/MS	saikosaponn A, C	시호 및 시호를 포함한 한약제제	-	2007
Xiao <i>et al.</i> (China)	HPLC-UV	-	시호	fingerprint analysis	2006
Li <i>et al.</i> (China)	HPLC-PDA HPLC-MS	saikosaponin A, B ₁ , B ₂ , C, D	시호	함량분석은 saikosaponin A, D 만을 대상으로 함.	2005
Bao <i>et al.</i> (China)	LC-ESI-MS/MS	saikosaponin A, B ₁ , B ₂ , C, D, G, H, I, A, C, D, H, B ₂ , C ₂	시호 및 시호를 포함한 한약제제	함량분석은 8종 saikosaponin만을 대상으로 함.	2004

제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

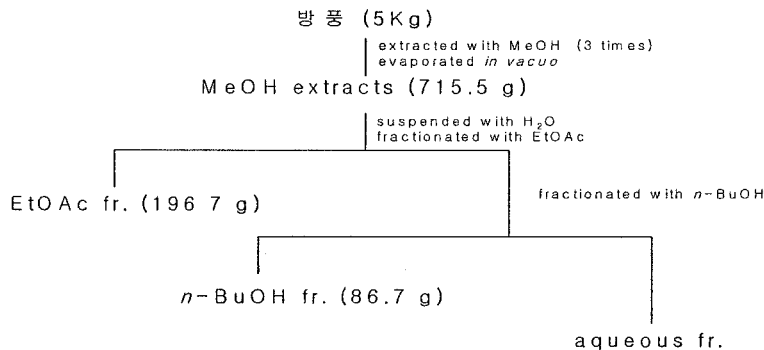
제 1 절 방풍의 생리활성성분의 분리

1차로 건조된 방풍 5Kg을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 715.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 차례로 EtOAc와 *n*-BuOH로 분획하고, 이들 분획물들을 각각 감압 농축하여 EtOAc분획 (196.7g), *n*-BuOH (8.7g)의 분획물을 얻었다.

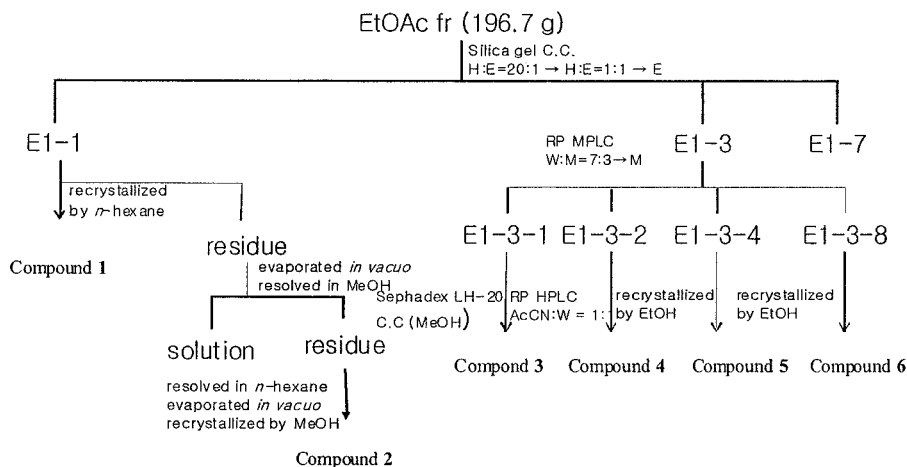
EtOAc분획 (196.7g)에 대하여 silica gel C.C. (*n*-Hexane:EtOAc = 20:1 → 1:1 → EtOAc)을 실시하여 7개의 대분획 (E1-1~E1-7)으로 나누었다. 이 중 소분획 E1-2을 *n*-Hexane으로 재결정하여 화합물 1을 분리하였다. 나머지 여액을 MeOH:Hexane = 1:1에 녹여 10%의 물이 넣어 두 층으로 나눈 다음 MeOH여액을 모아 농축한 다음 MeOH로 재결정 하여 화합물 2를 분리하였다. E1-3을 RP MPLC (M:W = 3:7 → MeOH)를 수행하여 14개의 소분획 (E1-3-1~E1-3-14)을 얻었다. 이중소분획 E1-3-1을 Sephadex LH-20 C.C. (MeOH)를 실시하여 화합물 3, 소분획 E1-3-2을 HPLC (Water : AcCN = 1:1)를 수행하여 화합물 4, 소분획 E1-3-4를 EtOH로 재결정해 화합물 5, 소분획 E1-3-8을 EtOH로 재결정하여 화합물 6를 분리했다.

2차로 방풍을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 1315.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 EtOAc로 분획하고 얻은분획물을 감압 농축하여 EtOAc분획 (397.5g)의 분획물을 얻었다.

방 풍 의 분 리

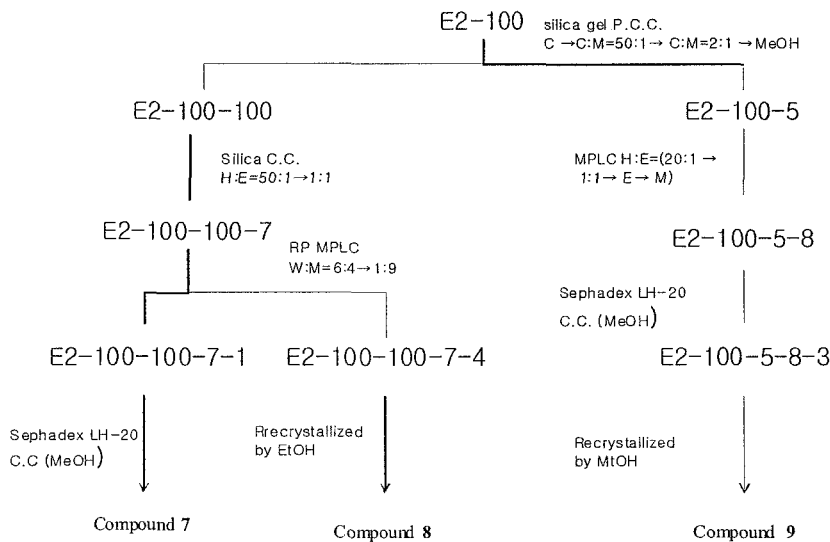


EtOAc 분획을 silica gel partition C.C. (100% CHCl₃ → CHCl₃:MeOH =50:1 → CHCl₃:MeOH = 20:1 → CHCl₃:MeOH =10:1 → CHCl₃:MeOH = 5:1 → CHCl₃:MeOH = 2:1 → 100% MeOH) 를 수행하여 7개의

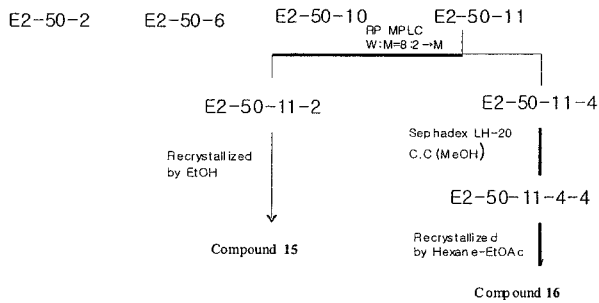
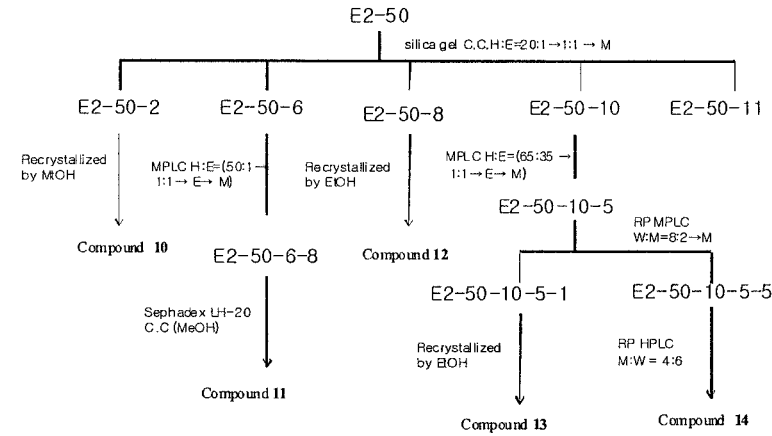


대분획 (E2-100, E2-50, E2-20, E-10, E2-5, E2-2, E2-M)으로 나누었다. 소분획E2-100을 silica gel partition C.C. (Hexane → Hexane:EtOAc = 100:1 → 50:1 → 40:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1 → MeOH) 를 수행하여 11개의 소분획 (E2-100-H, E2-100-100, E2-100-50, E2-40, E2-100-30, E2-100-20, E2-100-10, E2-100-5, E2-100-2, E2-100-1, E2-100-M)을 얻었고, 이 중 소분획 E2-100-H, E2-100-100을 silica gel C.C. (Hexane:EtOAc = 50:1 → 1:1) 을 이용해 11개의 소분획 (E2-100-100-1~ E2-100-100-11)을 얻었다. 소분획 E2-100-100-7을 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 60:40 → 10:90) 을 수행하여 8개의 소분획 (E2-100-100-7-1~ E2-100-100-7-8) 을 얻었다. 이 중 E2-100-100-7-1을 sephadex LH-20 C.C. (MeOH) 를 수행하여 화합물 7를 분리 하였고, 소분획 E2-100-100-7-4을 sephadex LH-20 C.C (MeOH) 를 수행하여 세 개의 소분획 (E2-100-100-7-4-3~E2-100-100-7-4-3) 을 얻어, E2-100-100-7-4-3을 MeOH로 재결정 해 화합물

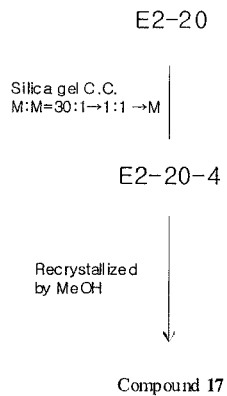
8을 분리 하였다. 소분획 E2-100-5을 MPLCC.C. (Hexane:EtOAc = 20:1 → 1:1 → EtOAc → MeOH)을 실시해서 열다섯 개의 소분획 (E2-100-5-1~ E2-100-5-15) 을 얻었다. 이 중 E2-100-5-8을 Sephadex LH-20 C.C. (MeOH) 를 실시하여 네 개의 소분획 (E2-100-5-8-1~E2-100-5-8-4) 으로 나누고 E2-100-5-8-3을 MeOH로 재결정하여 화합물 9를 얻었다.



소분획 E2-50을 silica gel C.C (Hexane:EtOAc = 20:1 → 1:1 → EtOAc → MeOH)를 수행하여 11개의 소분획 (E2-50-1~E2-50-11) 으로 나누었고, 이 중 소분획E2-50-2을 MeOH로 재결정해 화합물 10을 분리 하였고, 소분획 E2-50-6을MPLC C.C. (Hexane:EtOAc = 50:1 → 1:1 → EtOAc → MeOH)을 수행하여 8개의 소분획 (E2-50-6-1~E2-50-6-8)으로 나누었고, 이 중 E2-50-6-4를 sephadex LH-20 C.C. (MeOH)를 수행 해 화합물 11를 분리 하였다. 소분획 E2-50-8을 EtOH로 재결정해 화합물 12을 분리 하였고, 소분획 E2-50-10을 MPLCC.C. (Hexane:EtOAc = 65:35 → 1:1 → EtOAc → MeOH)을 실시해서 7개의 소분획 (E2-50-10-1~ E2-50-10-7) 을 얻어 E2-50-10-5를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 80:20 → MeOH) 을 수행하여 10개의 소분획 (E2-50-10-5-1~ E2-50-10-5-10) 을 얻었다. 이 중 E2-50-10-5-1를 EtOH로 재결정 하여 화합물 13, 소분획E2-50-10-5-5을RP HPLC C.C. (Water:MeOH = 60:40)를 실시 해 화합물 14를 분리하였다. E2-50-11을 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 20:80 → MeOH)을 수행하여 11개의 소분획 (E2-50-11-1~E2-50-11-11) 을 얻었다. 소분획 E2-50-11-2 를 EtOH로 재결정 하여 화합물 15를 분리 하였다. 소분획 E2-50-11-4을Sephadex LH-20 C.C. 을 수행하여 얻은 4번째 소분획을 Hexane-EtOAc로 재결정하여 화합물 16을 분리 하였다.

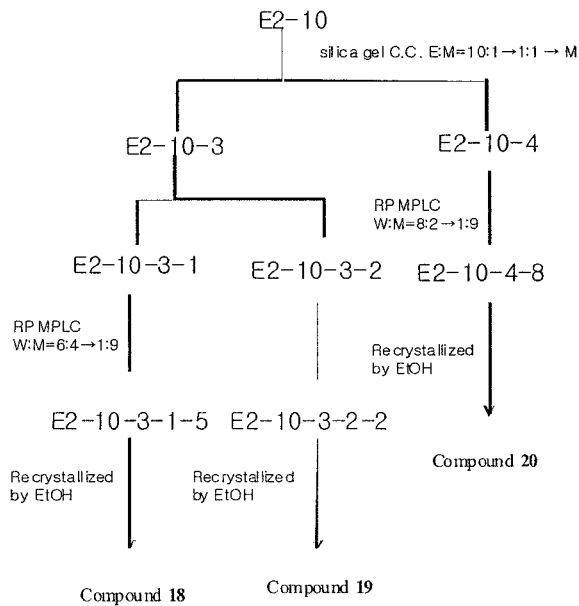


소분획 E2-20을 silica gel C.C. (Methylene chloride:MeOH = 30:1 → MeOH) 를 실시하여 10개의 분획 (E2-20-1~ E2-20-6) 을 얻었고, 이 중 소분획 E2-20-4를 MeOH로 재결정 하여 화합물 17을 얻었다.

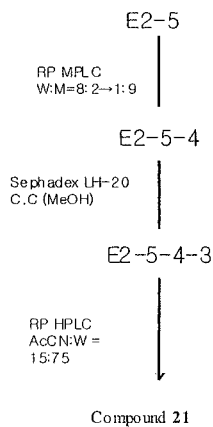


소분획 E2-10을 silica gel C.C. (EtOAc:MeOH = 10:1 → MeOH)를 수행해 4개의 소분획 (E2-10-1~E2-10-4) 을 얻었다. 소분획 E2-10-3을 TLC패턴에 따라 2개의 소분획 (E2-10-3-1, E2-10-3-2)으로 나누어 소분획 E2-10-3-1를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 60:40 → 10:90)를 수행하여 6개의 소분획 (E2-10-3-1-1~E2-10-3-1-6) 으로 나누고 이 중 E2-10-3-1-5를 EtOH로 재결정하여 화합물 18을

분리했다. 소분획 E2-10-3-2를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 80:20 → 10:90) 를 수행하여 6개의 소분획 (E2-10-3-2-1~ E2-10-3-2-6) 으로 나누고 이 중 이 중 E2-10-3-2-2 를 EtOH로 재결정하여 화합물 **19**를 분리했다. 소분획 E2-10-4를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 80:20 → Water:MeOH = 10:90) 를 수행하여 8 개의 소분획 (E2-10-4-1~ E2-10-4-8) 을 얻었고, 소분획 E2-10-4-5 를 EtOH로 재결정하여 화합물 **20**를 분리했다.



소분획 E2-5을 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 20:80 → Water:MeOH = 10:90) 10개의 분획 (E2-5-1~E2-5-10) 을 얻었고 소분획 E2-5-4를 Sephadex LH-20 C.C. (MeOH) 를 수행하여 8개의 소분획으로 (E2-5-4-1~E2-5-4-8) 나누고, 이 중 E2-5-4-3을 RP HPLC C.C. (Water : AcCN = 85:15) 를 실시하여 화합물 **21**을 분리 했다.

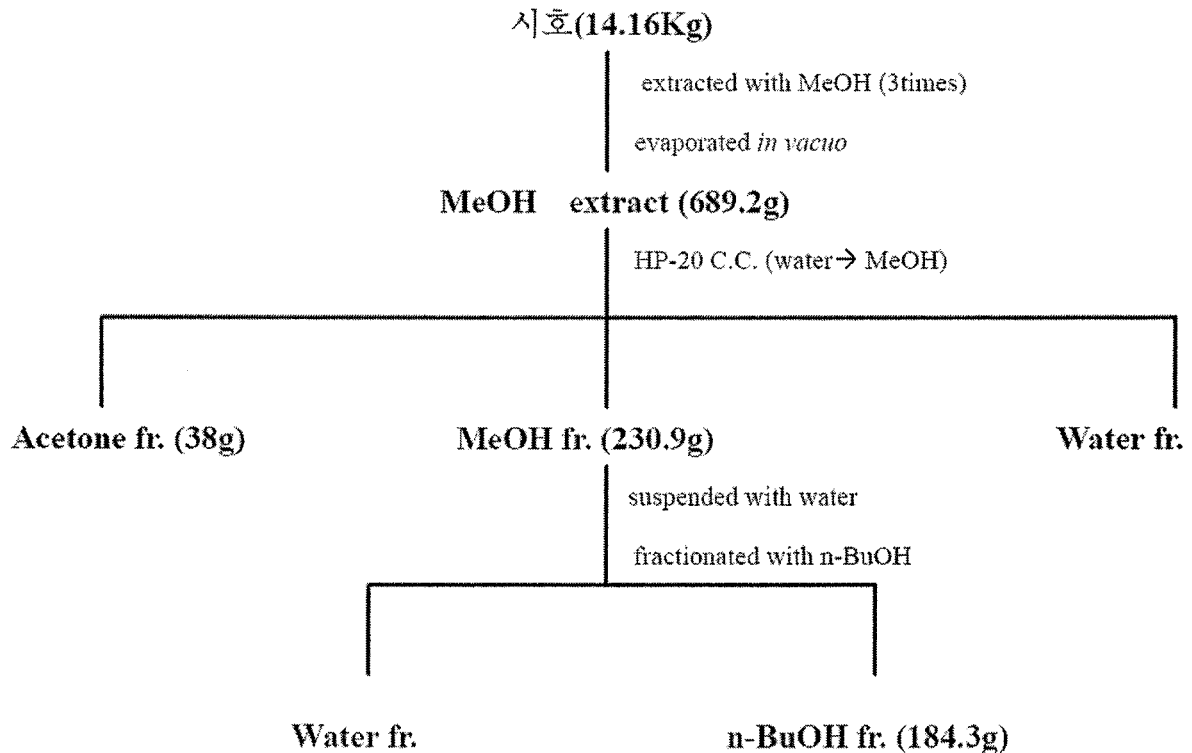


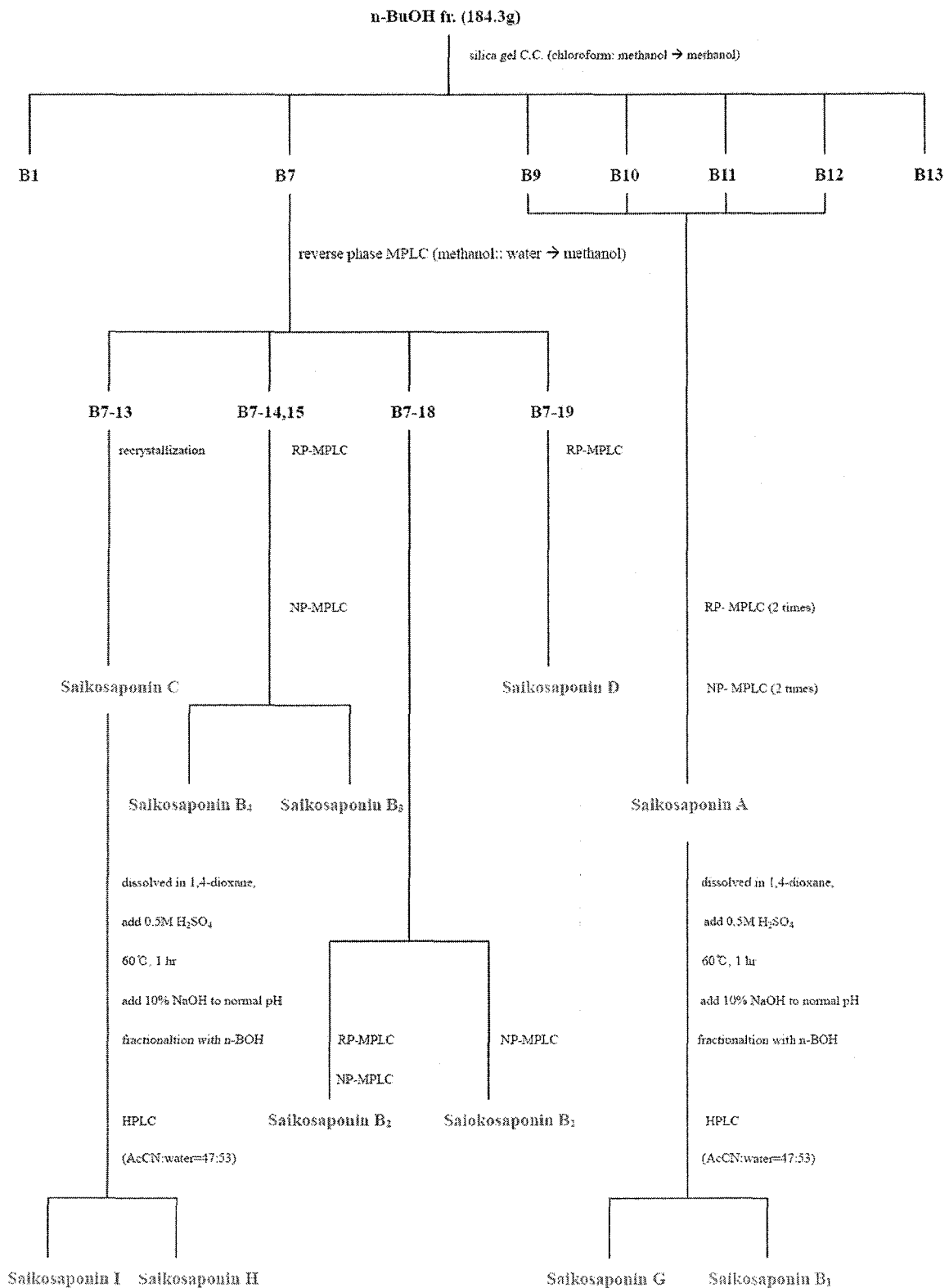
제 2 절 시호의 생리활성성분의 분리

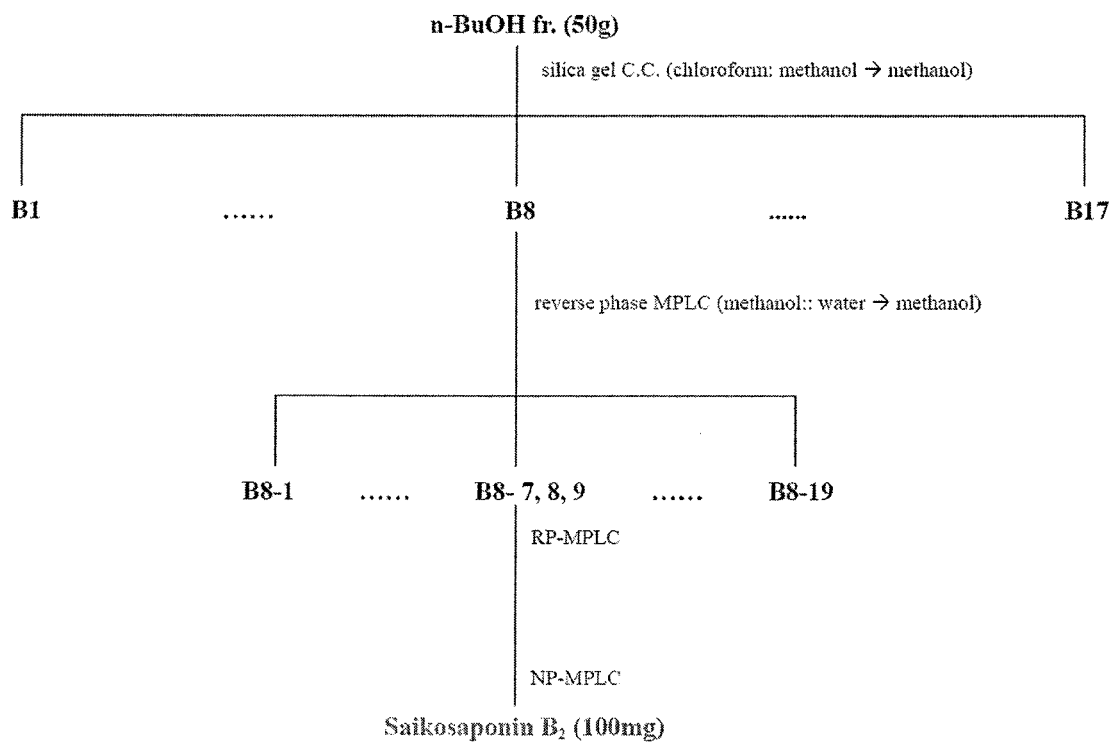
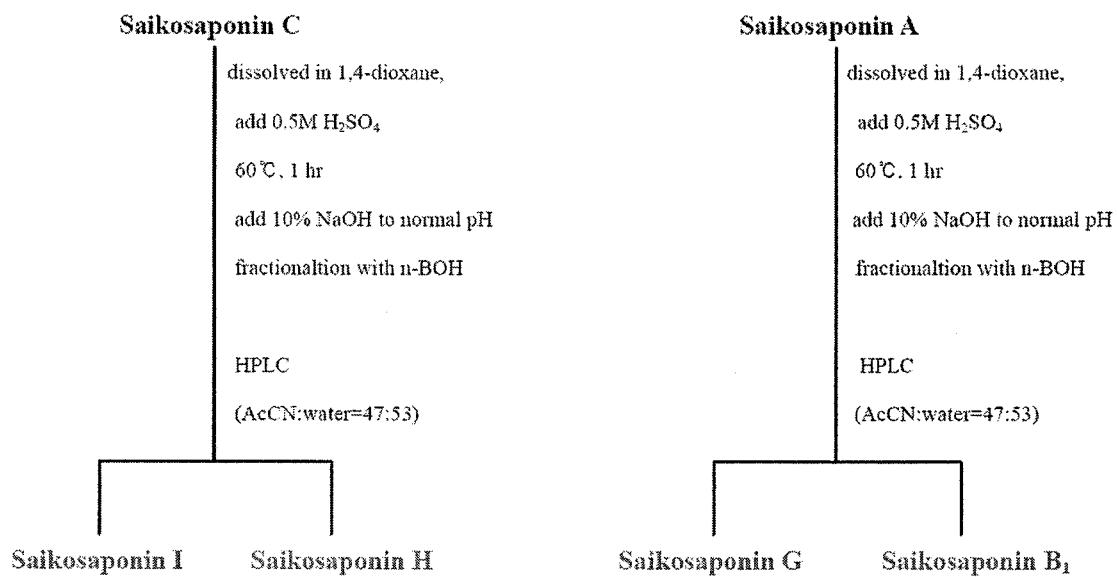
시호 14.16kg을 세절한 후 메탄올을 이용하여 3회 추출하여 1089.2g의 추출물을 얻었다. 이중 689.2g을 HP-20수지(resin)를 고정상으로 한 column chromatography를 이용하여 분리, 메탄올 층 230.9g을 얻고 n-BuOH로 분획하여 184.3g의 분획물을 얻었다.

n-BuOH 분획물을 column chromatography (normal phase silica)를 통해 13개의 분획으로 크게 분류 한 후 각 분획을 대상으로 다양한 분리 방법을 적용하여 단일 물질을 분리 했다. 이 중 7번 분획에서 saikosaponin B₂, B₃, B₄, C, D를 얻었고 9,10,11,12번 분획과 7번 분획의 69번 세부 분획으로부터 saikosaponin A를 분리했다. 또한 잘 알려진 saikosaponin의 가수분해법에 따라 saikosaponin A, saikosaponin C를 반응 시켜 각각 3개의 compound를 얻었다.

활성평가에 필요한 saikosaponinB₂를 추가로 분리하기 위하여 n-BuOH 분획물(50g)을 이용하여 100mg의 화합물을 분리하였다. (이미 분리한 saikosaponin A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, D, G, H, I 등에 대하여 추가적인 분리를 시행 중이다.)







제 3 절 방풍의 생리활성성분 동시분석법 개발

1. TLC 분석법 개발

가. 표준액의 조제

- (1) 제 1 세부 기관으로부터 유통중인 방풍과 갯방풍, 식방풍을 제공 받았다.
- (2) 방풍과 식방풍, 갯방풍을 분말화한 후 70 호 체로 균질화하여 10 mg을 정밀하게 취하여 10 mL의 methanol을 가하였다.
- (3) 방풍 생리활성성분 (imperatorin, phellopterin, 3'-*O*-angeloylhamaudol) 표준품을 5 mg씩 각각 취하여 5 mL 용량플라스크에 담은 후 methanol로 표선을 맞추었다. 이 표준용액에 methanol을 가하여 각각 20 µg/mL의 농도로 희석하였다.

나. 분석조건

- 역상의 고정상과 순상의 고정상에 각 성분의 표준용액과 각 추출용액을 40 µL씩 점적한 후, 전개용매의 종류와 조성을 변경하며, 두 가지 검출파장 (단파장; 254 nm, 장파장; 366 nm)에서의 UV/Vis 발색과 황산발색, anisaldehyde 발색으로 확인하여 비교분석 하였다.

2. HPLC-UV 분석법 개발

가. 표준액과 방풍 추출용액의 조제

- (1) 제 1세부 기관으로부터 제공받은 방풍의 생리활성성분 (imperatorin, phellopterin, 3'-*O*-angeloylhamaudol) 표준품을 각각 5 mg씩 정밀히 달아 5 mL의 methanol에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 각각 1000 µg/mL의 stock solution을 만들었다. 이를 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 희석하여 그 농도가 600 µg/mL이 되도록 하였다.
- (2) 내부표준물질인 byakangelicol을 5 mg 정밀히 달아 5 mL의 methanol에 녹여 1000 µg/mL의 stock solution을 만들었다. 이를 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 희석하여 그 농도가 20 µg/mL이 되도록 하였다.
- (3) 각 성분별로 적정농도가 되도록 3종류의 표준액을 각각 취하여 잘 섞은 후 농도별로 희석하고 내부표준물질을 균등하게 첨가하여 표준액을 조제하였다.

나. 분석조건

- (1) Methanol 추출물을 검출파장 254 nm, 칼럼 온도 30°C에서 10 µL 주입하였으며 다음의 칼

럼들을 비교하여 분석하였다.

가) Luna 5u C18(2) (4.6 × 150 mm, 5 μm) column : 일반적인 ODS column

(나) Luna Phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm) column : Phenyl-hexyl column

(다) Deverosil RPAQUEOUS C30 (4.6 × 250 mm, 5 μm) column : C 30 Column

(라) Xbridge (4.6 × 100 mm, 3.5 μm) column

(2) Phenyl-hexyl을 사용하여 칼럼 온도 30 °C에서 이동상의 유기용매 조성별 (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%) 분리능과 분리시간을 비교하며 분석하였다.

(3) 유기용매 조성과 유속을 기울기용리로 변경하며 비교 분석하였다.

3. HPLC-UV 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 2 종류의 coumarine계 성분과 1 종류의 chromone계 성분 및 내부표준물질 (byakangelicol)을 HPLC-UV 분석법으로 분석한 후, 다른 피크에 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 방풍의 세 가지 생리활성성분에 대하여 1 ~ 100 μg/mL의 농도 범위에서 내부표준물질과의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 4가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다.

- 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

- 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

라. 완건성 시험 (Robustness)

- 분석조건을 고의로 변경시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 칼럼, 온도, 이동상 조성과 유속에 대한 기울기용리조건을 변화시켜 완건성을 평가하였다.

마. 회수율

- 균일한 입자로 간 방풍 한약재 500 mg씩 정밀히 세 번 무게를 재어 세 가지 농도 (15, 75, 150 $\mu\text{g/mL}$)의 생리활성성분 표준품 혼합 용액 500 μL 를 각각 가한 후 확립된 추출법으로 추출하였다. 혼합 용액을 가하지 않은 방풍 한약재 500 mg을 동일한 방법으로 추출하여 각 추출액을 확립된 HPLC-UV 동시분석법 적용하였다. 또한 추출용매에 의한 회석배율을 고려하여 세 가지 방풍의 생리활성성분 표준품이 15, 7.5, 15 $\mu\text{g/mL}$ 인 혼합용액을 같은 HPLC-UV 분석법에 적용하였다. 이렇게 구하여진 HPLC-UV 크로마토그램에서 방풍의 생리활성성분에 해당하는 피크의 면적을 계산하였다. 혼합용액을 가한 것과 가하지 않은 추출액의 HPLC-UV 크로마토그램에서 방풍의 생리활성성분에 해당하는 피크 면적의 차이를 구한 후 회석한 혼합용액의 HPLC-UV 크로마토그램에서 얻어진 각 성분에 해당하는 피크 면적을 나누어 회수율을 구하였다.

바. 안정성

- 방풍의 세 가지 생리활성성분 각각을 50% acetonitrile로 회석하여 15 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 되도록 한 혼합용액을 두 개의 폴리프로필렌 튜브에 4 mL 씩 취하여 하나는 4°C로 유지되는 냉장고에 두었고 하나는 실온에 두었다. 이를 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일 제에 확립된 HPLC-UV 분석법에 적용하여 두 조건에서 각 성분들의 안정성을 시험하였다.

4. 추출법 개발

가. 시료의 조제

- 제 1세부 기관으로부터 국산 방풍을 제공받아 이를 분말화한 후 70호 체로 균질화하고 이를 100 mg씩 정밀하게 취하여 10 mL의 추출용매를 가하였다.

나. 분석 조건

- 위 시료를 추출법, 추출용매의 종류, 추출용매의 조성, 추출시간을 변화시켜 추출한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 하고 0.45 μm membrane filter로 여과하여 추출용액을 만들었다. 이를 HPLC-UV에 10 μL 주입하여 피크 면적을 비교분석하였다.

Table 1. 추출을 비교에 적용한 HPLC-UV 조건

Pump	YOUNGLIN SP930D
Detector	YOUNGLIN UV730D
Column	Luna 5u C18(2) (4.6 × 250 mm, 5 μm)
Guard Column	SecurityGuard C18 (4.0 × 3.0 mm)
Mobile phase	Acetonitrile / Water (50/50, v/v)
Injection volume	10 μL
Column Temp.	25℃

5. HPLC-UV 분석법을 이용한 방풍 성분의 함량 분석

가. 시료의 조제

(1) 시중에서 판매되는 방풍에서 생리활성성분의 함량 분석을 하기 위하여 내부표준물질법을 사용하였다. 유통되고 있는 24종의 방풍 (국내산 11종, 중국산 13종)을 시중에서 구입 혹은 제 1 세부기관으로부터 제공받아 이를 개발한 추출법으로 추출하였다.

(2) 각각의 추출용액과 20 μg/mL의 내부표준물질 (byakangelicol)과 동량으로 섞어 시료를 조제하였다.

나. 검량선

(1) 제 1 세부로부터 제공 받은 방풍의 생리활성성분 표준품 세 가지 (imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol)의 stock solution 각각을 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 600 μg/mL이 되도록 희석한 후, 동량으로 섞어 혼합용액에서 각 성분의 농도가 200 μg/mL이 되도록 하였다. 이 용액을 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 희석하여 200, 100, 20, 10, 4, 2 μg/mL이 되도록 하였다.

(2) 위의 각 농도의 용액을 20 μg/mL의 내부표준물질과 동량으로 섞어 방풍의 생리활성성분의 농도가 100, 50, 10, 5, 2, 1 μg/mL, 내부표준물질의 농도가 10 μg/mL이 되도록 한 후 검량선을 작성하였다.

다. 함량 분석

- 각 시료를 개발한 HPLC-UV 분석법에 적용하여 내부표준물질의 피크와 방풍의 생리활성성분 세 가지 (imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol) 피크의 면적비를 구한 후 검량선에 대입하여 추출용액에서 각 생리활성성분의 농도를 구하였다. 이를 이용하여 24종의 방풍에 함유되어 있는 각 생리활성성분의 백분율 함량을 구하였다. (Table 2. 참조)

Table 2. 시중에 유통 중인 혹은 제 1 세부 기관으로부터 제공받은 방풍 목록

Sample	국내산	Sample	중국산
K1	경상북도 영천	C1	중국산
K2	전라남도 강진	C2	중국산
K3	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 국산	C3	중국산
K4	경상북도 영덕	C4	중국산
K5	전라북도 장수	C5	중국산
K6	강원도 삼척	C6	중국산
K7	경상남도 고성	C7	중국산
K8	강원도 강릉	C8	중국산
K9	전라남도 여수	C9	중국산
K10	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 국산 갯방풍	C10	중국산, 해방풍
K11	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 국산 식방풍	C11	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 내몽고산
-	-	C12	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 중국산
-	-	C13	중국산

6. 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. 함량분석에서 구하여진 산지별 기원별 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램에서 주된 피크 15개를 골라 그 면적을 변수로 하여 군집 분석 (Cluster analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis)에 적용하여 패턴분석을 하였다.

나. 이 때 군집 분석과 주성분 분석에는 Kovach Computery Services사의 Multi-Variate Statistical Package (Version 3.13p) 프로그램을 사용하였고, 주성분 분석 결과를 삼차원 plotting할 때 SigmaPlot 2002 for windows (Version 8.0)을 사용하였다.

7. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 개발

가. 방풍의 생리활성 성분의 극성에 따라 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 조건 선택하였다. (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교한 결과 방풍은 (+) ion mode에서 훨씬 더 좋은 감도를 보였다.

나. LC-MS/MS 분석 시 MRM(multiple reaction monitoring) mode로 분석하며, 이 때 각 성분별로

collision cell에서 강도를 조절하여 product ion의 response나 specificity를 고려하며, 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다.

다. 각 성분별로 ion source와 ion detection polarity를 결정하고 LC-MS/MS의 declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP), collision cell entrance potential (CEP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP), curtain gas (CUR), collision gas (CAD), ion spray voltage (IS), temperature (TEM), ion source gas 1 (NEB), ion source gas 2 (Turbo gas) 등과 같은 파라미터를 최적화하여, 각 성분별로 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다.

8. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 2 종류의 coumarine계 성분과 1 종류의 chromone계 성분 및 내부표준물질 (glimepiride)이 선택성 높은 LC-MS/MS의 MRM mode로 분석한 후, 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 방풍의 생리활성성분인 imperatorin, phellopterin에 대하여 2.5 ~ 500 ng/mL의 농도 범위에서 3'-O-angeloylhamaudol에 대하여 1 ~ 200 ng/mL의 농도 범위에서 내부표준물질과의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선성을 갖는지 확인하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다.

- 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

- 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

라. 정량한계 (Limit of Quantitation)

- 크로마토그램에서 생리활성성분 피크의 신호대 잡음비 (Ratio of signal to noise)가 10 이

상인 최저 농도를 구하여 최저 정량한계 농도로 정하였다.

9. 주요기기 및 시약

가. 주요기기

(1) TLC 분석법

- TLC (Linomat IV, CAMAG, USA)

(2) HPLC-UV 분석법

- HPLC : Pump (Waters 600, Waters, USA)
- Autosampler (717 plus, Waters, USA)
- Column oven (Waters Temperature Control Module, Millipore, USA)
- UV detector (Waters 2487, Waters, USA)
- Degasser (ABBOTA, USA)

(3) LC-MS/MS 분석법

- System controller : SCL-10A
- Autosampler : SIL-10AD
- Pumps : LC-10AD
- Degasser : DGU-12A
- Column oven : CTO-10AS
- MS : PE SCIEX API 2000

(4) 기타 기기

- Vortex mixer (G-560, Scientific industries, USA)
- Autopipet (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, BIOHIT, USA)
- Sonicater (D300H, DAIHAN, KR)

나. 표준품 및 시약

- Imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol 표준품
- Byakangelicol (HPLC-UV 내부표준물질)
- Glimepitide (LC-MS/MS 내부표준물질)
- Acetonitrile (HPLC grade, J.T.Baker)
- Methanol (HPLC grade, J.T.Baker)
- Water (HPLC grade, J.T.Baker)

제 4 절 시호의 생리활성성분 동시분석법 개발

1. TLC 분석법 개발

가. 표준액의 조제

- (1) 시중에 유통 중인 20종의 시호를 구입하거나 제 1 세부 기관으로부터 제공 받았다.
- (2) 시호를 분말화한 후 70 호 체로 균질화하여 10 mg을 정밀하게 취하여 10 mL의 methanol을 가하였다.
- (3) 시호 생리활성성분 (saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D) 표준품을 5 mg씩 각각 취하여 5 mL 용량플라스크에 담은 후 methanol로 표선을 맞추었다. 이 표준용액에 methanol을 가하여 각각 20 µg/mL의 농도로 희석하였다.

나. 분석조건

- 역상의 고정상과 순상의 고정상에 각 성분의 표준용액과 각 추출용액을 40 µL씩 점적한 후 전개용매의 종류와 조성을 변경하며 황산발색으로 확인하여 분석 하였다.

2. HPLC-ELSD 분석법의 개발

가. 여러 가지 칼럼을 이용하여 분리능을 비교하고 최적의 칼럼을 선정하고, 선정한 칼럼을 대상으로 기울기 용리로 최적의 분석조건을 확립했다.

나. 이동상은 유기용매의 종류와 조성, 기울기 용리 유무, 기울기 용리 조건, 완충용액의 pH, buffer의 농도, 유량 등을 변화시켜가며 동시에 유효성분들을 분석할 수 있는 최적의 조건을 결정했다

다. 검출기의 최적 조건 선택, 기타 칼럼 온도 등에 따른 분리능 변화도 평가하였다.

라. 확립된 분석법에 대한 validation을 수행하였다. 확립된 분석법으로 시호추출물에 대한 함량 분석을 실시하였다.

3. HPLC-ELSD 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I)이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I)이 대하여 직선성을 확인하였다. 신호 대 잡음비 (Signal to Noise Ratio, S/N ratio)가 10이 되는 농도를 최저정량한계 (Limit of Quantification, LOQ)로 설정하였으며, 이를 바탕으로 직선성 범위 (Range)를 설정하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5가지 농도에 대하여 하루에 5번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분 피크 면적의 표준편차를 각 성분의 피크 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

라. 안정성 (Stability)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 각각을 50% acetonitrile로 희석하여 30 µg/mL의 농도가 되도록 한 혼합용액을 두 개의 폴리프로필렌 튜브에 4 mL 씩 취하여 하나는 실온에 두었고 하나는 4°C로 유지되는 냉장고에 두었다. 이를 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일 동안 실온, 4°C에서 보관한 표준액과 안정성시험을 수행하는 날 새로 조제한 표준액과의 면적비로 구했다.

마. 회수율 (Recovery)

- 회수율을 검토하기 위하여 표준품 첨가법을 사용하였다. 10 mL 용량 플라스크에 저, 중, 고 농도의 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D 표준액을 각각 1.0 mL씩 가한 후 70% MeOH로 표시선까지 정확하게 맞추었다. 여기에 균질하게 분말화한 시호 시료를 200 mg씩 정밀히 취하여 실온에서 40분 동안 초음파 추출한 후 membrane filter를 하였다. 여과액 20 µL를 HPLC에 주입하여 분석하고 표준품과의 농도비를 비교하여 회수율을 구하였다.

$$R\% = \frac{(\text{Amount from root sample spiked standard} - \text{Amount from root sample})}{\text{Amount from spiked standard}} \times 100$$

바. Robustness (완건성)

- (1) 완건성은 분석법을 개발하는 단계에서 수행하며, 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하였다.
- (2) 칼럼 온도, 유속 그리고 이동상 조성을 변화시켜 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 peak asymmetry (T)를 비교하여 평가하였다.
- (3) 여러가지 조건에서 각각 3번 반복하여 완건성을 평가하였다.

4. 시호의 추출법 개발

가. 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법 중 가장 추출률이 좋은 방법을 선택하였다.

나. Methanol과 ethanol 중 가장 추출률이 좋은 용매를 선택하였다.

다. 100%, 70%, 50% methanol 중 가장 추출률이 좋은 조성을 선택하였다.

라. 추출시간 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분 중 가장 추출률이 좋은 시간을 선택하였다.

5. HPLC-ELSD 분석법을 이용한 시호 성분의 함량 분석

- 유통되고 있는 국내산 시호 9종과 중국산 시호 11종을 시중에서 구입하거나 제 1 세부 기관으로부터 제공받아, 이를 각각 균질하게 분말화하였다. 분말화한 시호 200 mg를 정밀하게 취한 뒤, 70% MeOH 10 mL를 가하고 40분 동안 실온에서 초음파 추출하였다. 추출물을 membrane filter (0.45 μm)로 여과한 후 확립한 HPLC-ELSD 분석법을 이용하여 10종의 생리활성성분을 정량분석 하였다. (Table 3. 참조)

Table 3. Origins of samples collected from local market and Seoul National University

번호	LABEL	기원식물	산지 (한국/ 중국)	생산지역명	구매경로	비고	동정결과
1	K1	북시호	한국	전남 여수 남면	경동시장	-	B. chinense
2	K2	북시호	한국	전남 고흥	경동시장	-	B. falcatum
3	K3	원시호	한국	경남 합천	경동시장	-	미확인
4	K4	북시호	한국	경북 영천 완산	경동시장	-	B. chinense
5	K5	북시호	한국	경기 포천	경동시장	-	B. falcatum
6	K6	북시호	한국	경북 영천 입고	경동시장	-	B. falcatum
7	K7	북시호	한국	김북 영천 화산	한의유통	검열된 것	B. falcatum
8	K8	북시호	한국	-	HMAX	검열된 것	B. falcatum
9	K9	Bupleurum falcatum L.	한국	-	-	서울대 제공	B. falcatum
10	C1	북시호	중국	-	한의유통	검열된 것	B. chinense
11	C2	북시호	중국	-	경동시장	-	미확인
12	C3	북시호	중국	-	경동시장	-	미확인
13	C4	북시호	중국	-	흑석재래시장	-	미확인
14	C5	북시호	중국	감숙성	HMAX	검열된 것	미확인
15	C6	야생채집	중국	사천	Omni-herb	검열된 것	B. chinense
16	C7	Bupleurum chinense D.C.	중국	감숙성	-	서울대 제공	B. chinense
17	C8	Bupleurum scorzoneri folium var.	중국	-	-	서울대 제공	B. sibiricum
18	C9	Bupleurum scorzonerae folium var. 삼도시호	중국	-	-	서울대 제공	B. falcatum
19	C10	Bupleurum longeradin tum Turcz. 죽시호	중국	-	-	서울대 제공	B. longiradiatum
20	C11	Buplurum chinense D.C.	중국	내몽고	-	서울대 제공	B. longiradiatum

6. 시호의 HPLC-ELSD 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. 함량분석에서 구하여진 산지별 기원별 방풍의 HPLC-ELSD 크로마토그램에서 시호의 생리활성성분 피크의 면적을 변수로 하여 군집 분석 (Cluster analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis)에 적용하여 패턴분석을 하였다.

나. 이 때 군집 분석과 주성분 분석에는 Kovach Computery Survices사의 Multi-Variate Statistical Package (Version 3.13p) 프로그램을 사용하였고, 주성분 분석 결과를 삼차원 plotting할 때 SigmaPlot 2002 for windows (Version 8.0)을 사용하였다.

7. LC-MS/MS 분석법의 개발

- 시호의 생리활성 성분의 극성에 따라 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 조건 선택하였다. 또한 (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교하여 더 감도가 좋은 조건을 선택하였다.
- LC-MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 SIM (selected ion monitoring) mode를 비교하여 감도와 선택성이 높은 것을 선택하였다.
- 각 성분별로 nebulizer gas, dry gas, dry temperature 등과 같은 파라미터를 최적화하여, 각 성분별로 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다.

8. LC-MS/MS 분석법 검증 (Validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 10 종류의 saponin계 성분이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 10 종의 시호 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 에 대하여 50 ~ 2000 ng/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 가지 농도에 대하여 하루에 3 번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

9. 주요기기 및 시약

가. 주요기기

(1) TLC 분석법

- TLC (Linomat IV, CAMAG, USA)

(2) HPLC-ELSD 분석법

- Instrument : PerkinElmer Series 200 pump, Waters 717plus Autosampler, PerkinElmer Series 200 Column oven, Sedere SEDEX 75 ELSD
- ELSD detector : Sedere SEDEX 75 ELSD

(3) LC-MS/MS 분석법

- HPLC : Agilent 1100 series
- Degasser : G1322A
- BinPump : G1312A
- Autosampler : G1329A
- Autosampler Cooler(ALS Therm) : G1330B
- Column Oven : G1316A
- MS : Agilent 1100 Series LC/MSD TrapSoftWare
- LC control : ChemStration for LC 3D, Rev. A. 08.03 [847]
- MSD Trap Control Ver. 5.0 Build No. 65.0
- LC/MSD Trap Software 4.1 Build 143
- Data Analysis Version 2.1 [Build 49]

(4) 기타 기기

- Vortex mixer (G-560, Scientific industries, USA)
- Autopipet (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, BIOHIT, USA)
- Sonicater (D300H, DAIHAN, KR)

나. 표준품 및 시약

- Saikosaponin A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, D, G, H, I(표준품)
- Ginsenoside R_{b1} (LC-MS 내부표준물질)
- Acetic acid (99.7+%, A.C.S. reagent)
- Formic acid (99.7+%, A.C.S. reagent)
- Acetonitrile (HPLC grade, J.T.Baker)

- Methanol (HPLC grade, J.T.Baker)
- Water (HPLC grade, J.T.Baker)

제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

제 1 절 방풍의 생리활성성분의 분리

Compound 1 의 구조분석

FAB MS m/z 359 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{20}H_{22}O_6$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 두 개의 6.30, 5.97의 singlet으로 chromone을, 5.15 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 3.00 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz), 2.77 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz) pyrano ring을 예상할 수 있었다. 2.30 (3H, s) 으로 2- CH_3 를, 1.35, 1.34 (3H, s)로 gem -(CH_3)₂ 를, 6.06 (1H, q, $J = 6.2$ Hz), 1.89 (3H, dq, $J = 7.4, 1.3$ Hz), 1.82 (3H, s) 를 통해 Angeloyl moiety를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 3'-*O*-Angeloylhamaudol 으로 동정하였다(Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 2 의 구조분석

1H -NMR spectrum 에서 δ 1~4 에서 peak와 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 10~40 peak가 많음을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상했고, ^{13}C -NMR spectrum 33.9, 26.1 peak 를 통해 double bond가 없음을, Positive FAB MS m/z 415 $[M+H]^+$ 를 통해 분자량을 414로 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 b-sitosterol 로 동정하였다 (Chang *et al.*, 1981).

Compound 3 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 247 $[M+H]^+$ peak와 ^{13}C -NMR spectrum 을 통해 화합물의 분자식을 $C_{14}H_{14}O_4$ 로 추정할 수 있었다. 1H -NMR spectrum δ 7.58, 6.19 (1H, d, $J=9.5$ Hz) 를 통해 coumarin임을 예상할 수 있었고, 4.71 (1H, t, $J=9.0$ Hz), 3.20 (2H, d, $J=9.0$ Hz) 을 통해 fura ring을, 1.53, 1.22 (3H, s) 을 통해 gem -(CH_3)₂를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 marmesin으로 동정하였다 (Hagemeier *et al.*, 1999).

Compound 4 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 301 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{17}H_{16}O_5$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 doublet 8.09, 6.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz)으로 coumarin임을 예상할 수 있었고, 7.59, 6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)으로 furan ring을, 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.82 (2H, d, $J = 7.1$ Hz)로 O-CH₂-CH를 예상할 수 있었다. 1.71, 1.67 (3H, s)로 2개의 methyl기를 4.15에서 methoxyl 기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물 의 구조를Phelloptrin으로 동정하였다 (Bergendorf *et al.*, 1997).

Compound 5 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 427 $[M+H]^+$ 의 peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{24}H_{26}O_7$ 으로 추정할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 7.56, 6.18 (1H, d, $J=9.5$ Hz)를 통해 coumarin 임을 예상할 수 있었고, 두 개의 1.46, 1.43 (3H, s) 을 통해 *gem*-dimethyl 기를, 6.00, 5.98 (1H, m), 1.93, 1.80 (6H, m)를 통해 2개의 Angeloyl moiety를 확인했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 anomalin 으로 동정하였다 (Tosun *et al.*, 2006).

Compound 6 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 271 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{14}O_4$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 7.74, 6.34 (1H, d, $J = 9.5$ Hz)를 통해 coumarin을 예상할 수 있었고, 7.66, 6.79 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)를 통해 furan ring, 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.98 (2H, d, $J = 7.1$ Hz) peak를 통해 O-CH₂-CH를, 1.71, 1.69 (3H, s)로 2개의 methyl기를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를impertorin으로 동정하였다 (Bergendorf *et al.*, 1997).

Compound 7 의 구조분석

Positive EI MS m/z 216 $[M]^+$ 와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{12}H_8O_4$ 으로 추정할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 7.83, 6.43 (1H, d, $J=9.6$ Hz) coumarin임을 예상할 수 있었고, 7.90, 6.87 (1H, d, $J=2.2$ Hz)에서 furan ring을 4.15 에서 singlet 의 methoxyl 기를 확인

했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 xanthotoxin으로 동정하였다(Muller *et al.*, 2004).

Compound 8 의 구조분석

Positive EI MS 에서 m/z 328 $[M]^+$ peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_8$ 으로 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 7.57, 6.19 (1H, d, $J=9.5$ Hz) coumarin임을 예상할 수 있었고, 5.03 (1H, t, $J=9.1$), 3.26 (2H, br d, $J=9.1$)에서 furan ring을, 5.95 (1H, q, $J=8$ Hz), 1.29, 1.15 (each 3H, s)에서 angeloyl기를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 deltoin으로 동정하였다 (Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 9의 구조분석

Positive EI MS m/z 216 $[M]^+$ 와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ 으로 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 8.15, 6.26 (1H, d, $J=9.9$ Hz)을 통해 coumarin을 예상할 수 있었고, 7.57, 6.87 (1H, d, $J=2.5$ Hz)에서 furan ring을, 4.25 에서 singlet 의 methoxyl 기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 bergapten으로 동정하였다(Muller *et al.*, 2004).

Compound 10의 구조분석

$^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 δ 1~4 에서 peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 10~40 peak가 많음을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상했고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 138.3, 129.3 peak 를 통해 double bond를 예상할 수 있었고, Positive FAB MS m/z 413 $[M+H]^+$ 를 통해 분자량을 412로 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 stigmasterol 로 동정하였다 (Susidarti *et al.*,2007).

Compound 11 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 375 $[M+H]^+$ Peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_7$ 로 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의6.74, 6.52의 singlet으로 chromone을, 5.37 (1H, t, $J = 5.2$ Hz), 3.18 (1H, dd, $J = 17.5, 5.0$ Hz), 3.01 (1H, dd, $J = 17.5,$

5.0 Hz)를 통해 pyrano ring을 예상할 수 있었다. 4.66 (2H, s) 으로 CH₂-O를, 1.40 (3H, s), 1.33 (3H, s)로 *gem*-(CH₃)₂ 를, 5.94 (1H, q, *J* = 7.2Hz), 1.91 (3H, d, *J* = 7.1 Hz), 1.83 (3H, s)를 통해 Angeloyl moiety를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Ledebouriellol 으로 동정하였다 (Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 12 의 구조분석

Positive EI MS *m/z* 276 [M]⁺ Peak와 ¹³C-NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 C₁₅H₁₆O₅로 예상할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 에서 두 개의 6.27, 5.93의 singlet으로 chromone을, 3.86 (1H, t, *J*=5.0 Hz), 2.93 (1H, dd, *J*=17.4, 5.0 Hz)을 통해 치환된 pyrano ring을 예상 할 수 있었다. 1.38, 1.33 (3H, s)을 통해 *gem*-(CH₃)₂을, 13.02 singlet 의 OH기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Hamaudol으로 동정하였다 (Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 13 의 구조분석

Positive EI MS *m/z* 386 [M]⁺ peak와 ¹³C-NMR spectrum 을 통해 화합물의 분자식을 C₂₀H₁₈O₈ 예상할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 7.71, 6.41 (1H, d, *J*=9.4 Hz)를 통해 coumarin임을 예상할 수 있었고, 7.39, 7.32, 7.26, 4.44를benzene ring을, 4.28 (2H, br d, *J*=13.0 Hz) 를 통해 CH₂-O, 3.77, 3.70 (3H, s)를 통해 2개의 methoxyl 기를 확인 했다 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 8'-Epicleomioscin으로 동정하였다 (Ahmad *et al.*, 2004).

Compound 14 의 구조분석

Positive FAB MS *m/z* 263 [M+H]⁺ peak와 ¹³C-NMR spectrum 을 통해 분자 화합물의 분자식을 C₁₄H₁₄O₅로 추정할 수 있었고, ¹H-NMR δ 7.61, 6.20 (1H, d, *J*=9.5 Hz)을 통해 coumarin임을 예상할 수 있었다. 5.41 (1H, d *J*=4.5 Hz), 4.40 (1H, d, *J*=4.5) 을 통해 furan ring을, 1.32, 1.30 3H peak를 통해*gem*-(CH₃)₂를 예상할 수 있었다 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 Xanthoarnol 으로 동정하였다 (Zou *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 1973).

Compound 15 의 구조분석

FAB MS m/z 307 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{18}O_6$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 두 개의 6.42, 6.21의 singlet으로 chromone을, 4.69 (1H, t, $J=8.79$ Hz), 3.23 (2H, d, $J=8.79$ Hz)를 통해 furan ring을 예상할 수 있었다. 3.90 singlet 의 methoxyl 기를, 4.45 (2H, br s)에서 CH_2OH 를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 cimigugin으로 동정하였다(Sasaki et al., 1982).

Compound 16 의 구조분석

FAB MS m/z 291 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{18}O_5$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 두 개의 6.50, 5.96 singlet 으로 chromone임을 예상할 수 있었고, 4.70 (1H, t, $J=8.79$ Hz), 3.23 (2H, d, $J=8.79$ Hz)를 통해 furan ring을, 3.92 singlet 의 methoxyl 기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 5-*O*-methylvisaminol으로 동정하였다 (Sasaki et al., 1982).

Compound 17 의 구조분석

1H -NMR spectrum 에서 δ 1~4 에서 peak와 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 10~40 peak가 많음을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상했고, ^{13}C -NMR spectrum 33.9, 26.1 peak 를 통해 double bond가 없음을, Positive FAB MS m/z 597 $[M+Na]^+$ 를 통해 분자량을 576로 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Daucosterol로 동정하였다 (Chang et al., 1981).

Compound 18 의 구조분석

FAB MS m/z 453 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{22}H_{28}O_{10}$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 두 개의 6.65, 5.96의 singlet으로 chromone을, 4.84 (1H, dd, $J = 8.5, 9.0$ Hz), 3.32 (2H, m)으로 furan ring을 예상했고, 2.26 (3H, s) 2- CH_3)을 1.26 1.24 (3H, s) 으로 *gem*-(CH_3)₂를 3.81 (3H, s) methoxyl기를 확인, 4.40 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)을 통해 glu-H-1'를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 4'-*O*- β -D-glucosyl-5-*O*-methylvisaminol 으로 동정하였다 (Sasaki H. et al., 1982; Sun A. et al., 2006).

Compound 19 의 구조분석

Positive FAB MS 에서 m/z 409의 $[M+H]^+$ peak 와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5$ 으로 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의doublet 7.94, 6.22 (1H, d, $J=9.7$ Hz) 으로 coumarin임을 예상할 수 있었고, 1.31, 1.13 (3H, s) 을 통해 *gem*-(CH_3)₂을, 4.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 을 통해 glu-H-1'예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Nodakenin 으로 동정하였다 (Li *et al.*, 2006).

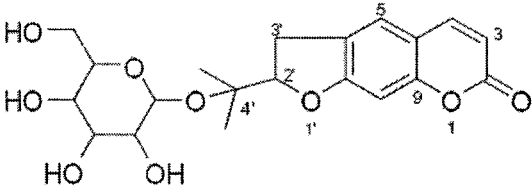
Compound 20 의 구조분석

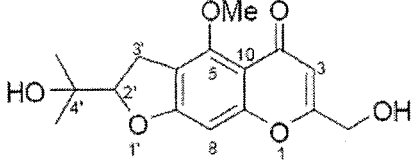
FAB MS m/z 469 $[M+H]^+$ Peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ 로 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의6.46, 6.07의 singlet으로 chromone을, 2.03 (3H, s) 를 통해 $-\text{CH}_3$ 를, 5.02 (1H, d, $J=7.8$ Hz)를 통해 glu-H-1' 를 확인할 수 있었다. 13.74 (1H, s)를 통해 OH기를 1.51, 1.38 (3H, s) *gem*-(CH_3)₂기를 확인했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 *sec-O-Glucosylhamaudol* 으로 동정하였다(Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 21 의 구조분석

FAB MS m/z 469 $[M+H]^+$ Peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ 로 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의6.65, 6.30의 singlet으로 chromone을 예상했다. 4.52 (2H, br s) 를 통해 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ 를, 4.28 (1H, d, $J=7.6$ Hz)를 통해 glu-H-1' 를 예상할 수 있었다. 3.82 (3H, s)를 통해methoxyl기를 1.13 (6H, d, $J=3.3$ Hz) *gem*-(CH_3)₂기를 확인했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 *prim-O-Glucosylcimifugin* 으로 동정하였다 (Sasaki H. *et al.*, 1982; Sun A. *et al.*, 2006).

Compound name	Anomalin		
Molecular formula	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	Molecular weight	426
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
<p>¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.56 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-4), 7.33 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, H-5), 6.78 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, H-6), 6.67 (H, d, <i>J</i> = 4.7 Hz, H-4'), 6.18 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-3), 5.42 (1H, d, <i>J</i> = 4.7 Hz, H-3'), 1.46 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.43 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), angeloyl moiety: 6.00 (1H, m, β-H), 5.98 (1H, m, β-H), 1.93 (6H, m, CH₃), 1.80 (6H, brd, <i>J</i> = 7.4 Hz, CH₃)</p> <p>¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 166.4 (angeloyl C=O), 166.2 (angeloyl C=O), 159.7 (C-2), 156.6 (C-7), 154.0 (C-9), 143.1 (C-4), 140.0 (angeloyl C=C), 138.4 (angeloyl C=C), 129.2 (C-5), 127.3 (angeloyl C=C), 137.0 (angeloyl C=C), 114.3 (C-6), 113.2 (C-3), 112.4 (C-10), 107.5 (C-8), 77.4 (C-2'), 70.1 (C-3'), 60.1 (C-4'), 25.4 (<i>gem</i>-CH₃), 22.4 (<i>gem</i>-CH₃), 20.4 (angeloyl-CH₃), 20.3 (angeloyl-CH₃)</p> <p>Positive FAB MS <i>m/z</i> 427 [M+H]⁺</p>			
References			
1. Pharmaceutical Biology, 44 , 528–533 (2006)			

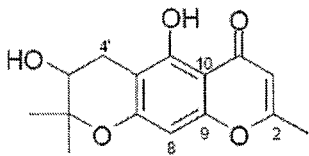
Compound name	Nodakenin		
Molecular formula	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	Molecular weight	408
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ : 7.94 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz, H-4), 7.50 (1H, s, H-5), 6.83 (1H, s, H-8), 6.22 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz, H-3), 4.91 (1H, m, H-3'), 4.41 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, glu-H-1'), 3.26-2.89 (4H, m, sugar proton), 1.31 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.13 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ : 163.0 (C-7), 160.4 (C-2), 155.5 (C-9), 144.7 (C-4), 125.6 (C-6), 124.0 (C-5), 112.2 (C-3), 111.3 (C-10), 97.2 (C-8), 96.9 (glu-1'), 90.0 (C-2'), 77.0 (glu-5'), 76.9 (glu-3'), 76.8 (C-4'), 73.5 (glu-2'), 70.0 (glu-4'), 61.2 (glu-6'), 29.1 (C-3'), 23.2 (<i>gem</i> -CH ₃), 21.8 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 409 [M+H] ⁺			
References			
1. Natural Product Research, 20 , 860–865 (2006)			

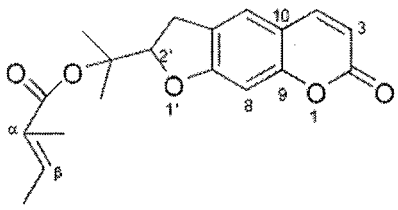
Compound name	Cimifugin		
Molecular formula	$C_{16}H_{18}O_6$	Molecular weight	306
Source	망풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.42 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, s, H-3), 4.69 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 4.45 (2H, brs, CH_2OH), 3.90 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.23 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 1.35 (3H, s, <i>gem</i> - CH_3), 1.22 (3H, s, <i>gem</i> - CH_3)			
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 175.5 (C-4), 166.4 (C-2), 164.6 (C-5), 158.9 (C-7), 155.1 (C-9), 117.4 (C-6), 111.4 (C-10), 108.4 (C-3), 93.3 (C-8), 91.1 (C-2'), 70.0 (C-4'), 60.3 ($-\text{OCH}_3$), 59.4 (2-CH_2), 27.0 (C-3'), 25.8 (<i>gem</i> - CH_3), 24.9 (<i>gem</i> - CH_3)			
Positive FAB MS m/z 307 $[\text{M}+\text{H}]^+$			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 30, 3555-3562 (1982)			

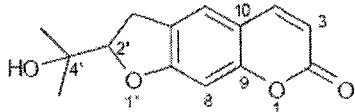
Compound name	<i>sec-O-Glucosylhamaudol</i>		
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	Molecular weight	438
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (500 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 13.74 (1H, s, 5-OH), 6.46 (1H, s, H-8), 6.07 (1H, s, H-3), 5.02 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, glu-H-1') 3.98-3.15 (4H, m, sugar protons) 3.15 (2H, qd, <i>J</i> = 17.1, 5.8 Hz, H-4'), 2.03 (3H, s, 2-CH ₃), 1.51 (3H, s, gem-CH ₃), 1.38 (3H, s, gem-CH ₃)			
¹³ C-NMR (125 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 182.7 (C-4), 167.3 (C-2), 160.1 (C-5), 159.6 (C-7), 156.3 (C-9), 104.5 (C-10), 104.0 (C-6) 102.6 (glu-1') 108.4 (C-3), 94.9 (C-8), 78.4 (C-2'), 78.4 (C-3'), 78.4 (glu-2',5'), 71.8 (glu-4'), 63.0 (glu-6'), 60.4 (-OCH ₃), 25.6 (gem-CH ₃), 22.5 (gem-CH ₃) 22.4 (C-4'), 20.0 (2-CH ₃)			
Positive FAB <i>m/z</i> 439 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30 , 3555-3562 (1982)			

Compound name	<i>prim-O-Glucosylcimifugin</i>		
Molecular formula	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	Molecular weight	468
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6.65 (1H, s, H-8), 6.30 (1H, s, H-3), 4.70 (1H, m, H-2'), 4.52 (2H, brs, 2-CH ₂), 4.28 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, glu-H-1'), 3.82 (3H, s, -OCH ₃), 3.32 (2H, m, H-3' overlapped), 3.02~3.66 (4H, m, sugar proton), 1.13 (6H, d, <i>J</i> = 3.3 Hz, <i>gem</i> -(CH ₃) ₂)			
¹³ C-NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 175.6 (C-4), 166.4 (C-2), 162.5 (C-5), 159.0 (C-7), 155.2 (C-9), 117.6 (C-6), 111.5 (C-10), 110.3 (C-3), 102.4 (glu-1'), 93.4 (C-8), 91.1 (C-2'), 77.1 (glu-5'), 76.7 (glu-3'), 73.5 (glu-2'), 70.1 (C-4'), 65.2 (2-CH ₂), 61.2 (glu-6'), 60.4 (-OCH ₃), 27.1 (C-3'), 25.9 (<i>gem</i> -CH ₃), 25.0 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 469 [M+H] ⁺			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 3555-3562 (1982) 2. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29, 751-759 (2006) 			

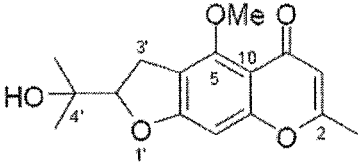
Compound name	8'- <i>epi</i> -Cleomiscosin		
Molecular formula	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	Molecular weight	386
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (400 MHz, C ₅ D ₅ N) : δ 7.71 (1H, d, <i>J</i> =9.4 Hz, H-4), 7.39 (1H, s, H-2'), 7.32 (1H, d, <i>J</i> =8.0 Hz, H-6'), 7.26 (1H, d, <i>J</i> =8.0 Hz, H-5'), 6.70 (1H, s, H-5), 6.41 (1H, d, <i>J</i> =9.4 Hz, H-3), 5.55 (1H, d, <i>J</i> =8.0 Hz, H-7'), 4.44 (1H, d, <i>J</i> =8.0 Hz, H-8'), 4.28 (2H, brd, <i>J</i> =13.0 Hz, H-9'), 3.77 (3H, s, 6-OCH ₃), 3.70 (3H, s, 3'-OCH ₃)			
¹³ C-NMR (100 MHz, C ₅ D ₅ N): δ 160.8 (C-2), 149.2 (C-3'), 148.9 (C-4'), 146.5 (C-6), 144.5 (C-4), 139.5 (C-9), 138.5 (C-7), 133.1 (C-8), 127.7 (C-1'), 121.8 (C-6'), 116.7 (C-5'), 114.0 (C-3), 112.4 (C-2'), 112.0 (C-10), 101.2 (C-5), 80.0 (C-8'), 77.6 (C-7'), 60.8 (C-9'), 56.1 (6-OCH ₃), 56.0 (3'-OCH ₃)			
Positive EI MS <i>m/z</i> 386 [M] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52 , 1458-1461 (2004)			

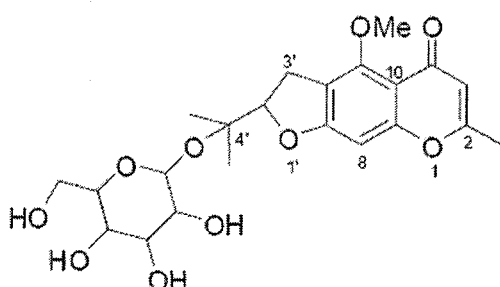
Compound name	Hamaudol		
Molecular formula	$C_{15}H_{16}O_5$	Molecular weight	276
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 13.02 (1H, s, 5-OH), 6.27 (1H, s, H-8), 5.93 (1H, s, H-3), 3.86 (1H, t, $J=5.0$ Hz, H-3'), 2.93 (1H, dd, $J=17.4, 5.0$ Hz, H-4'), 2.62 (1H, dd, $J=17.4, 5.0$ Hz, H-4'), 1.38 (3H, s, <i>gem</i> - CH_3), 1.33 (3H, s, <i>gem</i> - CH_3)			
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 182.5 (C-4), 166.8 (C-2), 159.7 (C-5), 159.1 (C-7), 156.2 (C-9), 108.3 (C-3), 104.4 (C-10), 102.8 (C-6), 94.8 (C-8), 78.4 (C-2'), 68.7 (C-3'), 25.4 (C-4'), 24.8 (<i>gem</i> - CH_3), 22.1 (<i>gem</i> - CH_3), 20.6 (2- CH_3)			
Positive EI MS m/z 276 $[\text{M}]^+$			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30 , 3555-3562 (1982)			

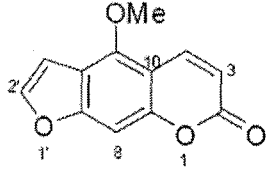
Compound name	Deltoin		
Molecular formula	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	Molecular weight	328
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.57 (1H, d, <i>J</i> =9.5, H-4), 7.19 (1H, s, H-8), 6.72 (1H, s, H-5), 6.19 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, H-3), 5.95 (1H, q, <i>J</i> =8 Hz, β-H), 5.03 (1H, t, <i>J</i> =9.1 Hz, H-2'), 3.26 (2H, br d, <i>J</i> =9.1 Hz, H-3'), 1.60 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.59 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃) angeloyl moiety: 6.06 (1H, q, <i>J</i> = 6.2 Hz, β-H), 1.82 (3H, dq, <i>J</i> = 7.3, 1.2 Hz CH ₃), 1.89 (3H, p, <i>J</i> = 1.5 Hz, CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 167.1 (angeloyl C=O), 163.7 (C-7), 161.4 (C-2), 155.8 (C-9), 143.6 (C-4), 137.6 (angeloyl C=C), 128.7 (angeloyl C=C), 124.5 (C-6), 123.2 (C-5), 112.3 (C-3), 97.9 (C-8), 89.1 (C-2'), 82.0 (C-4'), 29.6 (C-3'), 22.3 (<i>gem</i> -CH ₃), 21.4 (<i>gem</i> -CH ₃), 20.5 (angeloyl CH ₃), 15.6 (angeloyl CH ₃)			
Positive EI MS <i>m/z</i> 328 [M] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 3555-3562 (1982)			

Compound name	Marmesin		
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	Molecular weight	246
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.58 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-4), 7.20 (1H, s, H-5), 6.73 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-3), 4.71 (1H, t, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-2'), 3.20 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-3'), 1.53 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.22 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ : 163.1 (C-7), 161.4 (C-2), 155.0 (C-9), 143.6 (C-4), 125.0 (C-6), 123.4 (C-5), 112.8 (C-10), 112.4 (C-3), 98.8 (C-8), 91.1 (C-2'), 71.3 (C-4'), 28.1 (C-3') 25.7 (<i>gem</i> -CH ₃), 24.8 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 247 [M+H] ⁺			
References			
1. Phytochemistry, 51 , 629-635 (1999)			

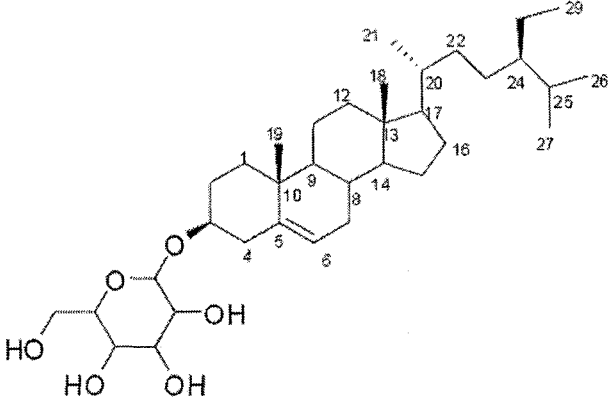
Compound name	Xanthoarnol		
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	Molecular weight	262
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.61 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, H-4), 7.45 (1H, s, H-5), 6.76 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, H-3), 5.41 (1H, d <i>J</i> =4.5 Hz, H-3'), 4.40 (H, d, <i>J</i> =4.5, H-2'), 1.32 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.30 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃)			
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃) δ : 163.0 (C-7), 161.1 (C-2), 155.9 (C-9), 143.6 (C-4), 129.7 (C-6), 124.7 (C-5), 113.4 (C-10), 112.9 (C-3), 98.7 (C-8), 98.4 (C-2'), 72.3 (C-3'), 71.2 (C-4'), 25.7 (<i>gem</i> -CH ₃), 24.9 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 263 [M+H] ⁺			
References			
1. Journal of Organic Chemistry, 70 , 1761-1770 (2004)			
2. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 21 , 2346-2348 (1973)			

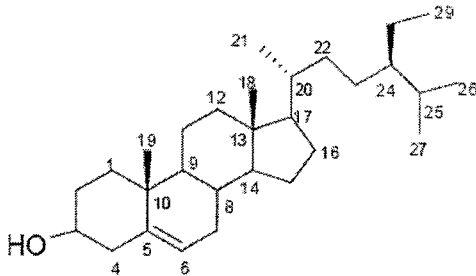
Compound name	5-O-Methylvisamminol		
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	Molecular weight	290
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.50 (1H, s, H-8), 5.96 (1H, s, H-3), 4.70 (1H, t, <i>J</i>=8.8 Hz, H-2'), 3.92 (3H, -OCH₃), 3.23 (2H, d, <i>J</i>=8.8 Hz, H-3'), 2.25 (3H, brs, 2-CH₃), 1.34 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.22 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃)</p>			
<p>¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 177.0 (C-4), 164.2 (C-5), 163.2 (C-2), 159.6 (C-7), 155.7 (C-9), 117.0 (C-6), 111.7 (C-3), 112.2 (C-10), 93.6 (C-8), 91.3 (C-2'), 71.3 (C-4'), 60.8 (-OCH₃), 27.6 (C-3'), 25.5 (<i>gem</i>-CH₃), 24.4 (<i>gem</i>-CH₃)</p>			
Positive FAB <i>m/z</i> 291 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52 , 1458-1461 (2004)			

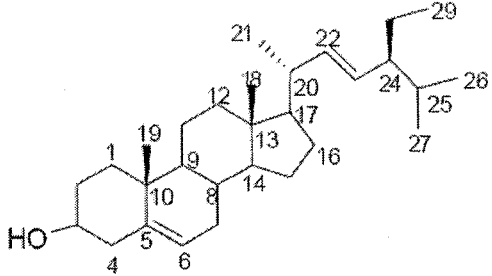
Compound name	4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol		
Molecular formula	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	Molecular weight	452
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) : 6.65 (1H, s, H-8), δ 5.96 (1H, brs, H-3), 4.84 (1H, dd, <i>J</i> = 9.0, 8.5 Hz, H-2'), 3.32 (2H, m, H-3', overlapped), 2.26 (3H, s, 2-CH₃), 1.26 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.24 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 4.40 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, glu-H-1'), 3.02~3.40 (6H, m, sugar protons)</p>			
<p>¹³C-NMR (75MHz, DMSO-<i>d</i>₆): δ 176.9 (C-4), 165.0 (C-5), 164.7 (C-2), 159.7 (C-7), 155.7 (C-9), 117.5 (C-6), 111.2 (C-10), 111.1 (C-3), 97.7 (glu-1'), 93.6 (C-8), 90.7 (C-2'), 77.6 (C-4'), 77.2 (glu-5'), 76.8 (glu-3'), 74.0 (glu-2'), 70.5 (glu-4'), 61.3 (glu-6'), 60.7 (-OCH₃), 27.9 (C-3'), 23.4 (<i>gem</i>-CH₃), 22.5 (<i>gem</i>-CH₃), 19.8 (2-CH₃),</p>			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 453 [M+H] ⁺			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52, 1458-1461 (2004) 2. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29, 751-759 (2006) 			

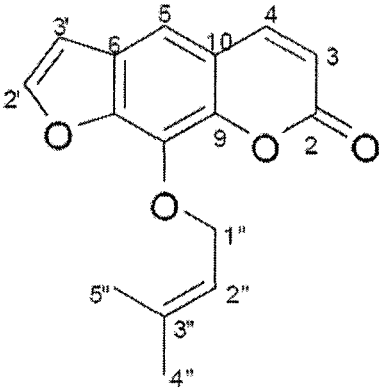
Compound name	Bergapten		
Molecular formula	C ₁₂ H ₈ O ₄	Molecular weight	216
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 8.15 (1H, d, <i>J</i> =9.8 Hz, H-4), 7.57 (1H, d, <i>J</i> =2.5 Hz, H-3'), 7.12 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, d, <i>J</i> =2.5 Hz, H-2'), 6.26 (1H, d, <i>J</i> =9.8 Hz, H-3), 4.25 (3H, s, -OCH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ : 161.2 (C-2), 158.4 (C-7), 152.7 (C-9), 149.6 (C-5), 144.8 (C-2'), 139.3 (C-4), 112.9 (C-6), 112.6 (C-3), 106.4 (C-10), 105.0 (C-3'), 93.9 (C-8), 60.1 (-OCH ₃)			
Positive EI MS <i>m/z</i> 216 [M] ⁺			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30, 3555-3562 (1982) 2. Acta Pharmaceutica, 54, 277-285 (2004) 			

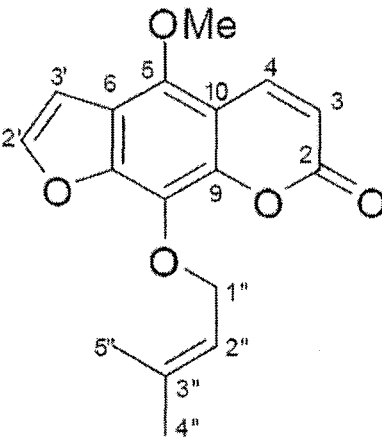
Compound name	Xanthotoxin		
Molecular formula	C ₁₂ H ₈ O ₄	Molecular weight	216
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (400 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 7.91 (1H, d, J=2.1 Hz, H-2'), 7.78 (1H, d, J=9.6 Hz, H-4), 7.37 (1H, s, H-5), 6.87 (1H, d, J=2.4 Hz, H-3'), 6.41 (1H, d, J=9.4 Hz, H-3), 4.15 (3H, s, -OCH ₃)			
¹³ C-NMR (100 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 160.4 (C-2), 147.8 (C-7), 147.8 (C-4), 147.5 (C-2'), 143.9 (C-9), 132.8 (C-8), 126.5 (C-6), 116.4 (C-10), 114.9 (C-3), 113.0 (C-5), 107.2 (C-3'), 60.1 (-OCH ₃)			
Positive EI MS m/z 216 [M] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52 , 1458-1461 (2004) 2. Acta Pharmaceutica, 54 , 277-285 (2004)			

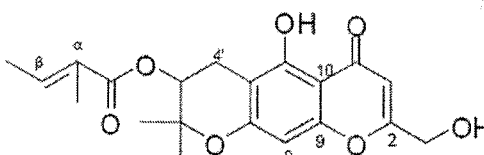
Compound name	Daucosterol		
Molecular formula	C ₃₅ H ₆₀ O	Molecular weight	576
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹³ C-NMR (75Hz, C ₃ D ₃ N) δ : 141.0 (C-5), 122.3 (C-6), 102.7 (C-1'), 78.7 (C-3'), 78.7 (C-3), 78.5 (C-5'), 76.4 (C-2'), 71.8 (C-4'), 62.9 (C-6'), 56.9 (C-14), 56.3 (C-17), 50.4 (C-9), 46.1 (C-24), 42.5 (C-13), 40.1 (C-4), 39.4 (C-12), 36.4 (C-20), 37.5 (C-1), 36.9 (C-10), 32.2 (C-8), 32.1 (C-22), 32.1 (C-7), 30.3 (C-2), 29.6 (C-25), 28.2 (C-16), 28.6 (C-23), 26.6 (C-15), 23.0 (C-28), 21.1 (C-11), 21.0 (C-27), 19.4 (C-19), 19.3 (C-26), 19.1 (C-21), 12.2 (C-29), 12.1 (C-18)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 599 [M+Na] ⁺			
References			
1. Korean Journal of Pharmacognosy, 12 , 12-24 (1981)			

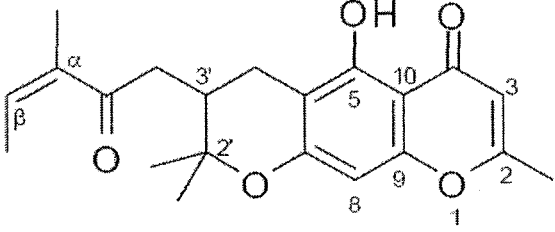
Compound name	β -sitosterol		
Molecular formula	$C_{29}H_{50}O$	Molecular weight	414
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 140.7 (C-5), 121.7 (C-6) 71.8 (C-3), 56.7 (C-14), 56.0 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13), 42.3 (C-4), 39.8 (C-12), 37.3 (C-1), 36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-8), 31.9 (C-7), 31.7 (C-2), 29.7 (C-25), 28.2 (C-16), 26.1 (C-23), 24.3 (C-15), 23.0 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-27), 19.4 (C-19), 19.0 (C-26), 18.8 (C-21), 12.0 (C-29), 11.8 (C-18)			
Positive FAB MS m/z 415 $[M+H]^+$			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Korean Journal of Pharmacognosy, 12, 12-24 (1981) 2. Goad L., Akihisa T. <i>Analysis of Sterol</i>, Blackid Academie & Professional, London, 378 (1997) 			

Compound name	Stigmastrol		
Molecular formula	C ₂₉ H ₄₈ O	Molecular weight	412
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 140.7 (C-5), 138.3 (C-22), 129.3 (C-23), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.9 (C-14), 55.9 (C-17), 51.2 (C-24), 50.1 (C-9), 42.3 (C-4), 42.2 (C-13), 40.5 (C-20), 39.8 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 31.9 (C-25), 31.9 (C-8), 31.9 (C-7), 31.6 (C-2), 29.1 (C-16), 25.4 (C-28), 24.3 (C-15), 22.2 (C-21), 21.2 (C-27), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 19.0 (C-26), 12.8 (C-29), 12.0 (C-18)</p>			
<p>Positive FAB MS m/z 413 [M+H]⁺</p>			
<p>References</p> <ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="211 1493 1364 1581">1. Goad L., Akihisa T. <i>Analysis of Sterol</i>, Blackid Academie & Professional, London, 380 (1997) 			

Compound name	Imperatorin		
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Molecular weight	270
Source	망풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 Hz, CDCl ₃) δ: 7.74 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-4) 7.66 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz, H-2'), 7.33 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz, H-3'), 6.34 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-3), 5.58 (1H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz, H-2''), 4.98 (2H, d, <i>J</i> = 7.1 Hz, H-1''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-5'')			
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹ : 1720 (C=O), 1587, 1448			
UV λ _{max} (log ε) nm: 223 (4.5), 241 (4.2), 269 (4.3), 313 (4.1)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 271 [M+H] ⁺			
References			
1. Phytochemistry, 44 , 1121-1124 (1997)			

Compound name	Phellopterin		
Molecular formula	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	Molecular weight	300
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 8.09 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz, H-4) 7.59 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz, H-3'), 6.25 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz, H-3), 5.58 (1H, t, <i>J</i> = 7.1 Hz, H-2''), 4.82 (2H, d, <i>J</i> = 7.1 Hz, H-1''), 4.15 (OCH ₃), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.67 (3H, s, H-5'')			
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹ : 1729 (C=O), 1604, 1477			
UV λ _{max} (log ε) nm : 230 (4.2), 250 (4.1), 257 (4.1), 294 (3.8)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 301 [M+H] ⁺			
References			
1. Phytochemistry, 44 , 1121-1124 (1997)			
2. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30 , 3555-3562 (1982)			

Compound name	Ledebouriellol		
Molecular formula	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	Molecular weight	374
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (500 MHz, C ₅ D ₅ N) δ: 13.7 (1H, s, 5-OH), 6.74 (1H, s, H-8), 6.52 (1H, s, H-3), 5.37 (1H, t, <i>J</i> = 5.1 Hz, H-3'), 4.66 (2H, s, 2-CH ₂), 3.18 (1H, dd, <i>J</i> = 17.5, 5.1 Hz, H-4'), 3.01 (1H, dd, <i>J</i> = 17.5, 5.0 Hz, H-4'), 1.40 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.33 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), angeloyl moiety: 5.94 (1H, q, <i>J</i> = 7.2 Hz, β-H), 1.91 (3H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃), 1.83 (3H, s, CH ₃)			
¹³ C-NMR (125 MHz, C ₅ D ₅ N ₃) δ: 183.1 (C-4), 171.6 (angeloyl C=O), 166.9 (C-2), 160.1 (C-5), 159.4 (C-7), 156.3 (C-9), 139.1 (angeloyl C=C), 127.8 (angeloyl C=C), 106.0 (C-3), 105.2 (C-10), 102.9 (C-6), 95.1 (C-8), 77.4 (C-2'), 69.9 (C-3'), 60.7 (2-CH ₂), 24.6 (<i>gem</i> -CH), 23.1 (<i>gem</i> -CH ₃), 23.1 (C-4'), 20.6 (angeloyl CH ₃), 15.8 (angeloyl CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 375 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30 , 3555-3562 (1982)			

Compound name	3'-O-Angeloylhamaudol		
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	Molecular weight	358
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 12.98 (1H, s, 5-OH), 6.30 (1H, s, H-8), 5.97 (1H, s, H-3), 5.15 (1H, t, <i>J</i> = 5.1 Hz, H-3'), 3.00 (1H, dd, <i>J</i> = 17.6, 5.1 Hz, H-4'), 2.77 (1H, dd, <i>J</i> = 17.6, 5.1 Hz, H-4'), 2.30 (3H, s, 2-CH ₃), 1.35 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.34 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), angeloyl moiety: 6.06 (1H, q, <i>J</i> = 6.2 Hz, β-H), 1.89 (3H, dq, <i>J</i> = 7.4, 1.3 Hz, β-CH ₃), 1.82 (3H, s, α-CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 182.5 (C-4), 166.8 (angeloyl C=O), 166.7 (C-2), 159.5 (C-5), 158.8 (C-7), 156.2 (C-9), 139.0 (angeloyl C=C), 127.4 (angeloyl C=C), 108.3 (C-3), 104.3 (C-10), 102.6 (C-6), 94.7 (C-8), 76.9 (C-3'), 69.5 (C-2'), 24.9 (<i>gem</i> -CH ₃), 23.0 (<i>gem</i> -CH ₃), 22.7 (C-4'), 20.5 (angeloyl CH ₃), 15.7 (angeloyl CH ₃),			
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹ : 1714 (C=O), 1654 (C=O, angeloyl moiety)			
UV λ _{max} (log ε) nm : 230.1 (3.2), 250.2 (3.1), 257.9 (3.1), 294.7 (2.8)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 359 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30 , 3555-3562 (1982)			

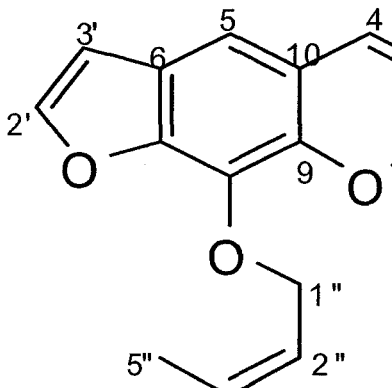
-규격서-

imperatorin

기원: 방풍 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]

성상: 무색 분말

구조:



imperatorin은 방풍의 뿌리의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획한 층에서 분리된 쿠마린계 물질이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 270, 분자식 $C_{16}H_{14}O_4$ 을 가진다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) δ : 7.74 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4) 7.66 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.33 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3'), 6.34 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 4.98 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-5'')

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1720 (C=O), 1587, 1448

UV λ_{max} (log ϵ) nm : 223 (4.5), 241 (4.2), 269 (4.3), 313 (4.1)

Positive FAB MS m/z 271 $[\text{M}+\text{H}]^+$

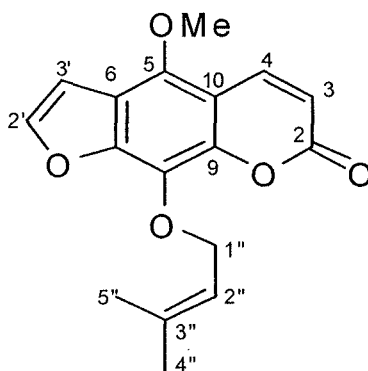
-규격서-

phellopterin

기원: 방풍 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]

성상: 약간의 노란색을 띤 분말

구조:



imperatorin은 방풍의 뿌리의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획한 층에서 분리된 쿠마린계 물질이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 300, 분자식 $C_{17}H_{16}O_5$ 을 가진다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.09 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4) 7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-3), 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 4.82 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 4.15 (OCH₃), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.67 (3H, s, H-5'')

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1729 (C=O), 1604, 1477

UV λ_{max} (log ϵ) nm : 230 (4.2), 250 (4.1), 257 (4.1), 294 (3.8)

Positive FAB MS m/z 301 $[\text{M}+\text{H}]^+$

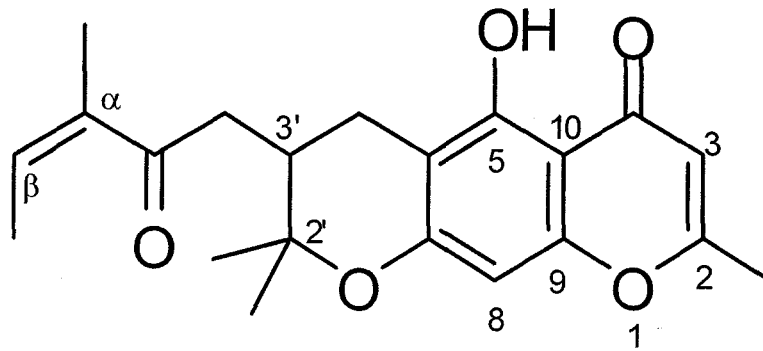
-규격서-

3'-O-angeloylhamaudol

기원: 방풍 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]

성상: 무색 분말

구조:



3'-O-angeloylhamaudol은 방풍의 뿌리의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획한 층에서 분리된 페놀릭계 물질이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 358, 분자식 $C_{21}H_{24}O_5$ 을 가진다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 6.30 (1H, s, H-8), 5.97(1H, s, H-3), 5.15 (1H, t, $J = 5.1$ Hz, H-3'), 3.00 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz, H-4'), 2.77 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz, H-4'), 2.30 (3H, s, 2- CH_3), 1.35 (3H, s, *gem*- CH_3), 1.34 (3H, s, *gem*- CH_3), angeloyl moiety: 6.06(1H, q, $J = 6.2$ Hz, β -H), 1.89 (3H, dq, $J = 7.4, 1.3$ Hz, β - CH_3), 1.82 (3H, s, α - CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 182.5 (C-4), 166.8(angeloyl C=O), 166.7 (C-2), 159.5 (C-5), 158.8 (C-7), 156.2 (C-9), 139.0 (angeloyl C=C), 127.4 (angeloyl C=C), 108.3 (C-3), 104.3 (C-10), 102.6 (C-6), 94.7 (C-8), 76.9 (C-3'), 69.5 (C-2'), 24.9 (*gem*- CH_3), 23.0 (*gem*- CH_3), 22.7 (C-4'), 20.5 (angeloyl CH_3), 15.7 (angeloyl CH_3),

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1714 (C=O), 1654 (C=O, angeloyl moiety)

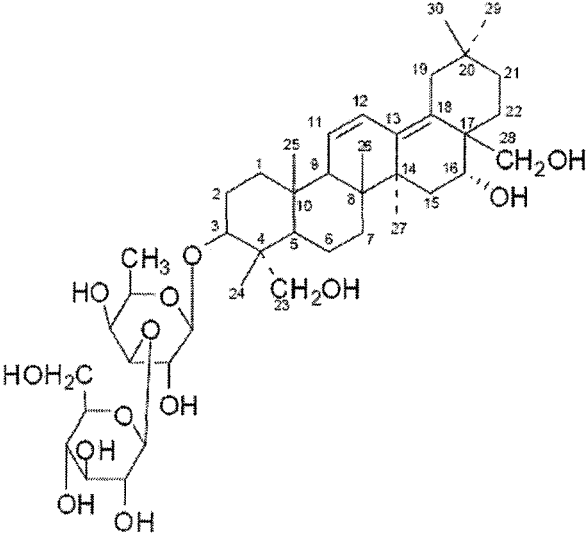
UV λ_{max} (log ϵ) nm : 230.1 (3.2), 250.2 (3.1), 257.9 (3.1), 294.7 (2.8)

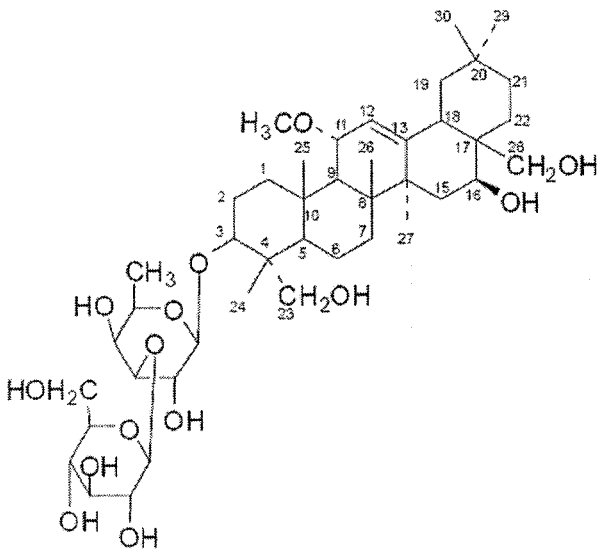
Positive FAB MS m/z 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$

방풍에서 분리한 화합물

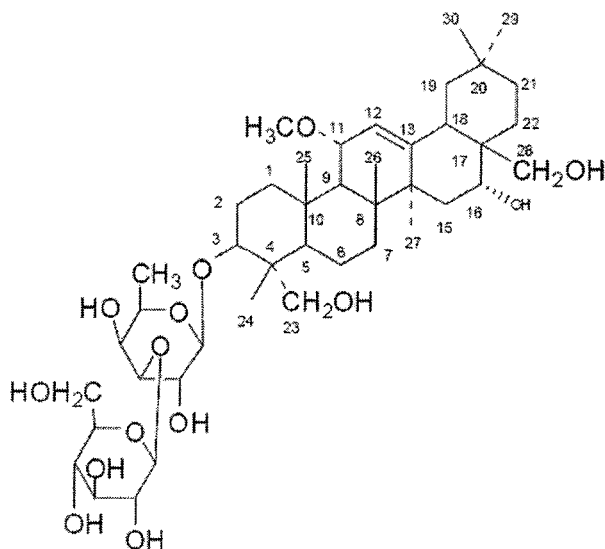
화합물	이름	성상	양	현재 보유량	제공량
1	3'- <i>O</i> -angeloylhamaudol	colorless crystal	1000mg	730mg	250mg
2	β -sitosterol	white crystal	200mg	200mg	0mg
3	marmesin	colorless powder	3mg	3mg	0mg
4	phellopterin	slightly yellow powder	40mg	20mg	20mg
5	anomalin	white powder	200mg	190mg	10mg
6	imperatorin	colorless powder	150mg	20mg	100mg
7	xanthotoxin	white solid	5mg	5mg	0mg
8	deltoin	Colorless plate	30mg	10mg	20mg
9	bergapten	white solid	60 mg	10mg	50mg
10	stigmasterol	white crystal	30 mg	30 mg	0mg
11	ledebouriellol	Slightly powder	30mg	30mg	0mg
12	hamaudol	Slightly powder	220mg	200mg	10mg
13	8'-epicleomioscin	white powder	8 mg	8mg	0mg
14	xanthoarnol	colorless solid	5mg	5mg	0mg
15	cimifugin	Slightly powder	15mg	5mg	10mg
16	5- <i>O</i> -methylvisamminol	white powder	40mg	30mg	10mg
17	daucosterol	Slightly powder	1000mg	1000mg	0mg
18	4'- <i>O</i> -glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisam minol	white powder	40mg	10mg	20mg
19	nodakenin	white powder	30mg	20mg	10mg
20	sec- <i>O</i> -glucosylhamaudol	colorless solid	1200mg	1000mg	100mg
21	prim- <i>O</i> -glucosylcimifugin	colorless solid	100mg	80mg	10mg

제 2 절 시호의 생리활성성분의 분리

Compound name	Saikosaponin B ₂		
Molecular formula	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	Molecular weight	780
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (300 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 0.87 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-24), 0.98 (3H, s, H-30), 1.00 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-25), 1.44 (3H, s, H-6'), 1.68 (3H, s, H-27), ¹³C-NMR (75 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 136.0 (C-13), 133.0 (C-18), 126.2 (C-11), 126.2 (C-12), 106.6 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.2 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.7 (C-3''), 78.4 (C-5''), 75.8 (C-2''), 72.1 (C-4'), 72.1 (C-4''), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 67.6 (C-16), 64.7 (C-28), 64.0 (C-23), 62.6 (C-6''), 53.9 (C-9), 47.3 (C-5), 45.2 (C-17), 43.6 (C-4), 41.8 (C-14), 41.0 (C-8), 38.9 (C-19), 38.3 (C-1), 36.4 (C-10), 35.4 (C-21), 32.5 (C-15), 32.5 (C-20), 32.2 (C-7), 31.8 (C-30), 26.1 (C-2), 25.0 (C-29), 24.4 (C-22), 21.8 (C-27), 18.8 (C-6), 18.2 (C-25), 17.2 (C-26), 17.2 (C-6'), 13.1 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3424 (-OH), 1376, 1070, FABMS <i>m/z</i> 803 [M+Na]⁺</p>			
References			
1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980)			
2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985)			

Compound name	Saikosaponin B ₃		
Molecular formula	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	Molecular weight	812
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (300 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 0.87 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-30), 0.98 (3H, s, H-29), 1.06 (3H, s, H-25), 1.09 (3H, s, H-27), 1.38 (3H, s, H-26), 1.40 (3H, s, H-6'), ¹³C-NMR (100 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 148.2 (C-13), 122.5 (C-12), 106.7 (C-1''), 106.0 (C-1'), 85.2 (C-3''), 81.7 (C-3), 78.7 (C-3''), 78.4 (C-5''), 75.8 (C-11), 75.8 (C-2''), 72.1 (C-4''), 72.1 (C-4'), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 68.5 (C-28), 66.1 (C-16), 64.2 (C-23), 62.6 (C-6''), 52.0 (C-9), 49.6 (C-5), 47.6 (C-19), 43.9 (C-14), 43.9 (C-18), 43.8 (C-4), 43.8 (C-17), 41.9 (C-8), 40.1 (C-1), 38.0 (C-10), 36.8 (C-15), 34.2 (C-21), 33.2 (C-7), 33.1 (C-29), 31.0 (C-20), 26.4 (C-27), 26.2 (C-2), 26.2 (C-22), 24.0 (C-30), 18.3 (C-6), 18.2 (C-26), 17.9 (C-25), 17.1 (C-6'), 13.5 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3421 (-OH), 1376, 1070, FABMS <i>m/z</i> 835 [M+Na]⁺</p>			
References			
1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980)			
2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985)			

Compound name	Saikosaponin B ₄		
Molecular formula	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	Molecular weight	812
Source	시호 [Bupleurum falcatum L. (Umbelliferae)]		

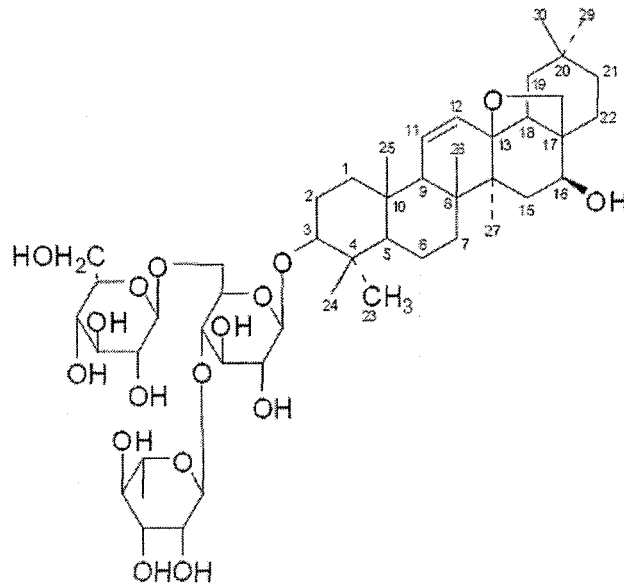


¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.96 (3H, s, H-24), 1.00 (3H, s, H-30), 1.00 (3H, s, H-29), 1.12 (3H, s, H-25), 1.13 (3H, s, H-26), 1.39 (3H, s, H-6'), 1.87 (3H, s, H-27), ¹³C-NMR (100 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 149.8 (C-13), 122.4 (C-12), 106.6 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.3 (C-3'), 82.7 (C-3), 78.3 (C-3''), 78.3 (C-5''), 76.3 (C-11), 75.6 (C-2''), 74.3 (C-16), 72.0 (C-4'), 72.0 (C-4''), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 70.0 (C-28), 64.3 (C-23), 62.6 (C-6''), 51.7 (C-9), 49.6 (C-5), 48.3 (C-19), 43.8 (C-4), 43.4 (C-17), 42.0 (C-14), 41.9 (C-18), 40.7 (C-8), 40.1 (C-1), 38.2 (C-10), 37.2 (C-15), 35.0 (C-21), 33.3 (C-7), 33.3 (C-29), 31.3 (C-20), 30.8 (C-22), 26.5 (C-27), 26.2 (C-2), 25.0 (C-30), 18.4 (C-26), 18.2 (C-6), 17.9 (C-25), 17.2 (C-6'), 13.6 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3426(-OH), 1378, 1072, FABMS *m/z* 835 [M+Na]⁺

References

1. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2367-2383(1980)
2. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3349-3355(1985)

Compound name	Saikosaponin C		
Molecular formula	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	Molecular weight	926
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		

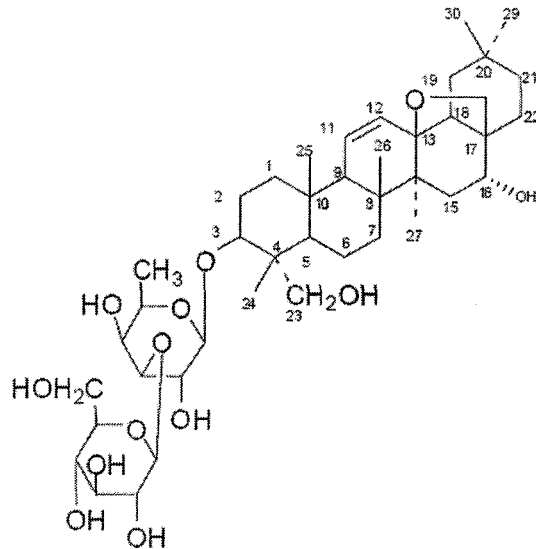


¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.83 (3H, s, H-29), 0.89 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-25), 1.12 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.33 (3H, s, H-26), 1.64 (3H, s, H-6'), ¹³C-NMR (100 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 132.1 (C-11), 131.1 (C-12), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 89.0 (C-3), 83.9 (C-13), 79.8 (C-4'), 78.4 (C-3'''), 78.3 (C-5'''), 76.7 (C-3'), 75.1 (C-5'), 74.8 (C-2'), 74.5 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.7 (C-28), 72.5 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.5 (C-5''), 69.1 (C-6'), 64.0 (C-16), 62.5 (C-6'''), 55.2 (C-5), 52.8 (C-9), 52.1 (C-18), 47.0 (C-17), 45.6 (C-14), 42.1 (C-8), 39.6 (C-4), 38.4 (C-1), 37.7 (C-19), 36.3 (C-10), 36.1 (C-15), 34.7 (C-21), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.6 (C-20), 27.9 (C-23), 26.4 (C-2), 25.7 (C-22), 23.8 (C-30), 20.9 (C-27), 20.0 (C-26), 18.5 (C-6), 18.1 (C-25), 17.8 (C-6''), 16.3 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3432 (-OH), 1376, 1070, FABMS *m/z* 949 [M+Na]⁺

References

1. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2367-2383(1980)
2. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3349-3355(1985)

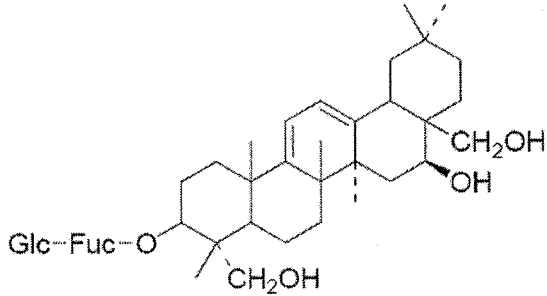
Compound name	Saikosaponin D		
Molecular formula	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	Molecular weight	780
Source	시호 [Bupleurum falcatum L. (Umbelliferae)]		



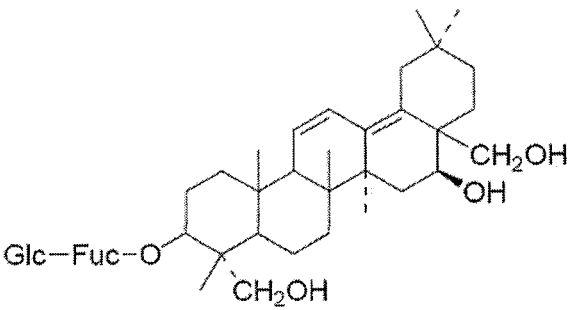
¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.94 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-25), 1.36 (3H, s, H-26), 1.45(3H, s, H-6'), 1.63 (3H, s, H-27), ¹³C-NMR (100Hz, pyridine-*d*₅) δ: 131.9 (C-11), 131.9 (C-12), 106.5 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.2 (C-13), 85.1 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.6 (C-3''), 78.3 (C-5''), 77.7 (C-28), 77.1 (C-16), 75.7 (C-2''), 72.1 (C-4''), 71.7 (C-4'), 71.5 (C-2'), 71.0 (C-5'), 71.0 (C-23), 62.7 (C-6''), 53.9 (C-9), 51.5 (C-18), 47.3 (C-5), 45.3 (C-17), 43.8 (C-14), 43.7 (C-4), 41.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.3 (C-19), 36.7 (C-21), 36.7 (C-10), 35.4 (C-15), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.8 (C-20), 31.3 (C-22), 26.1 (C-2), 24.3 (C-30), 19.5 (C-26), 18.8 (C-25), 18.0 (C-27), 17.9 (C-6), 17.2 (C-6'), 13.0 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3426 (-OH), 1378, 1072, FABMS *m/z* 803 [M+Na]⁺

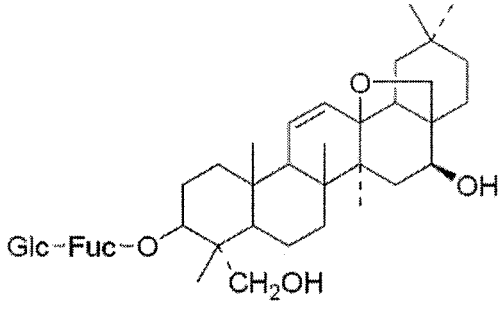
References

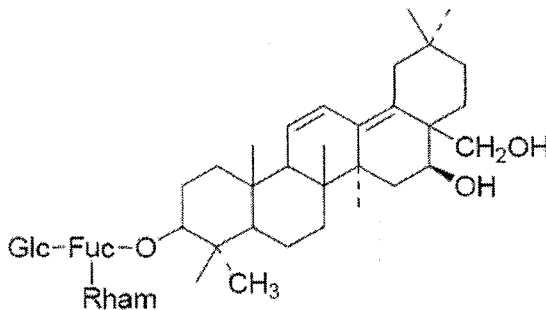
1. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2367-2383(1980)
2. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3349-3355(1985)

Compound name	Saikosaponin G		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
¹³ C-NMR (100Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 155.0 (C-9), 145.3 (C-13), 121.2 (C-12), 116.1 (C-11), 106.7 (C-1''), 106.0 (C-1'), 85.3 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.8 (C-3''), 78.4 (C-5''), 75.8 (C-2''), 72.1 (C-4''), 71.8 (C-4'), 71.6 (C-2'), 71.0 (C-5'), 69.5 (C-28), 66.8 (C-16), 64.4 (C-23), 62.7 (C-6''), 47.0 (C-19), 43.8 (C-4), 43.8 (C-5), 43.3 (C-14), 43.2 (C-8), 42.7 (C-18), 40.6 (C-17), 38.7 (C-10), 37.7 (C-1), 36.2 (C-15), 34.1 (C-21), 33.2 (C-29), 32.1 (C-7), 31.0 (C-20), 26.9 (C-2), 26.2 (C-27), 26.2 (C-22), 24.1 (C-30), 21.3 (C-26), 21.1 (C-25), 18.0 (C-6), 17.3 (C-6'), 13.7 (C-24)			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin I		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 <i>[Bupleurum falcatum L. (Umbelliferae)]</i>		
¹³ C-NMR (100Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 154.7 (C-9), 145.3 (C-13), 121.2 (C-12), 116.1 (C-11), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 88.8 (C-3), 79.8 (C-4'), 78.5 (C-3'''), 78.4 (C-5'''), 76.8 (C-3'), 75.5 (C-5'), 75.1 (C-2'), 74.8 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.6 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.6 (C-5''), 69.3 (C-28), 69.0 (C-6'), 66.8 (C-16), 62.5 (C-6'''), 51.8 (C-5), 47.1 (C-19), 43.2 (C-14), 43.1 (C-8), 42.7 (C-18), 40.6 (C-17), 39.7 (C-4), 38.7 (C-10), 37.4 (C-1), 36.1 (C-15), 34.1 (C-21), 33.2 (C-29), 32.4 (C-7), 31.0 (C-20), 28.4 (C-23), 27.3 (C-2), 26.1 (C-22), 25.4 (C-27), 24.0 (C-30), 21.2 (C-26), 21.1 (C-25), 18.5 (C-6''), 18.5 (C-6), 17.1 (C-24)			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin B ₁		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹³C-NMR (100Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 136.8 (C-13), 133.6 (C-18), 127.1 (C-11), 125.7 (C-12), 106.0 (C-1''), 105.5 (C-1'), 85.2 (C-3'), 82.4 (C-3), 78.3 (C-5''), 78.3 (C-3''), 76.5 (C-16), 75.7 (C-2''), 72.1 (C-4''), 72.1 (C-4'), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 65.2 (C-23), 63.1 (C-6''), 54.7 (C-9), 48.1 (C-5), 44.8 (C-17), 44.6 (C-14), 43.7 (C-4), 40.8 (C-8), 38.7 (C-1), 38.7 (C-19), 36.9 (C-10), 35.4 (C-21), 35.1 (C-15), 32.8 (C-20), 32.8 (C-30), 32.2 (C-7), 30.2 (C-22), 25.8 (C-2), 25.0 (C-29), 22.1 (C-27), 18.8 (C-6), 18.5 (C-25), 17.3 (C-26), 12.9 (C-24), 6.41 (C-28)</p>			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin A		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹³C-NMR (75 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 132.2 (C-11), 131.1 (C-12), 106.4 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.1 (C-3'), 83.9 (C-13), 81.6 (C-3), 78.6 (C-3''), 78.3 (C-5''), 75.7 (C-2''), 73.0 (C-28), 72.1 (C-4''), 71.7 (C-4'), 71.5 (C-2'), 70.9 (C-5'), 64.0 (C-16), 64.0 (C-23), 62.6 (C-6''), 53.0 (C-9), 52.1 (C-18), 47.3 (C-5), 46.9 (C-17), 45.6 (C-14), 43.7 (C-4), 42.2 (C-8), 38.7 (C-1), 37.7 (C-19), 36.2 (C-10), 36.2 (C-15), 34.7 (C-21), 33.6 (C-29), 31.5 (C-20), 31.5 (C-7), 26.0 (C-2), 25.7 (C-22), 23.8 (C-30), 20.8 (C-27), 20.0 (C-26), 18.7 (C-25), 17.6 (C-6), 17.2 (C-6'), 13.0 (C-24)</p>			
<p>References</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

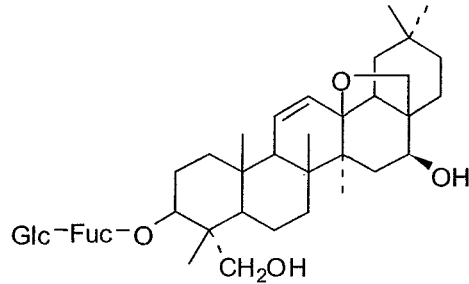
Compound name	Saikosaponin H		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
¹³ C-NMR (100 Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 135.8 (C-13), 133.4 (C-28), 133.4 (C-18), 127.0 (C-11), 125.7 (C-12), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 89.0 (C-3), 79.9 (C-4'), 78.4 (C-5'''), 78.4 (C-3'''), 76.8 (C-3'), 76.6 (C-16), 75.5 (C-5'), 75.2 (C-2'), 74.8 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.6 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.6 (C-5''), 69.1 (C-6'), 62.6 (C-6'''), 55.3 (C-5), 54.2 (C-9), 44.4 (C-17), 44.3 (C-14), 40.4 (C-8), 39.6 (C-4), 38.6 (C-1), 38.5 (C-19), 36.5 (C-10), 35.1 (C-21), 34.8 (C-15), 32.7 (C-7), 32.7 (C-20), 32.3 (C-30), 30.0 (C-22), 28.0 (C-23), 26.5 (C-2), 24.8 (C-29), 22.0 (C-27), 18.5 (C-6), 18.5 (C-25), 18.2 (C-6''), 17.0 (C-26), 16.4 (C-24)			
References <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

-규격서-**saikosaponin A**

기원: 시호 [*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae)]

성상: 흰색 분말

구조:



Saikosaponin A는 시호의 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올(*n*-BuOH)로 분획한 층에서 분리된 시호사포닌이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 780, 분자식 C₄₂H₆₈O₁₃ 을 가진다. 227°C에서 액상으로 녹는다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

¹³C-NMR (75 Hz, pyridine-*d*₅)δ: 83.9 (C-13), 52.1 (C-18), 132.2 (C-11), 131.1 (C-12), 106.4 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.1 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.6 (C-3''), 78.3 (C-5''), 75.7 (C-2''), 71.7 (C-4'), 72.1 (C-4''), 71.5 (C-2'), 70.9 (C-5'), 64.0 (C-16), 73.0 (C-28), 64.0 (C-23), 62.6 (C-6''), 53.0 (C-9), 47.3 (C-5), 46.9 (C-17), 43.7 (C-4), 45.6 (C-14), 42.2 (C-8), 37.7 (C-19), 38.7 (C-1), 36.2 (C-10), 34.7 (C-21), 36.2 (C-15), 31.5 (C-20), 31.5 (C-7), 23.8 (C-30), 26.0 (C-2), 33.6 (C-29), 25.7 (C-22), 20.8 (C-27), 17.6 (C-6), 18.7 (C-25), 20.0 (C-26), 17.2 (C-6'), 13.0 (C-24)

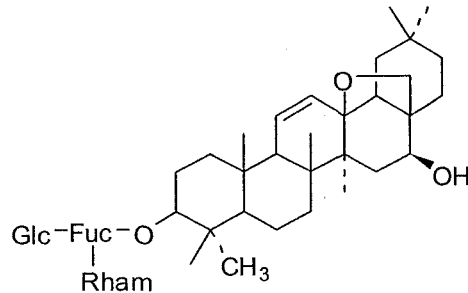
-규격서-

saikosaponin C

기원: 시호 [*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae)]

성상: 흰색 분말

구조:



Saikosaponin C는 시호의 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올(*n*-BuOH)로 분획한 층에서 분리된 시호사포닌이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 926, 분자식 $C_{48}H_{78}O_{17}$ 을 가진다. $312^{\circ}C$ 에서 액상으로 녹는다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

1H -NMR (300 Hz, pyridine- d_5) δ : 0.83 (3H, s, H-29), 0.89 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-25), 1.12 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.33 (3H, s, H-26), 1.64 (3H, s, H-6''),
 ^{13}C -NMR (100Hz, pyridine- d_5) δ : 132.1 (C-11), 131.1 (C-12), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 89.0 (C-3), 83.9 (C-13), 79.8 (C-4'), 78.4 (C-3'''), 78.3 (C-5'''), 76.7 (C-3'), 75.1 (C-5'), 74.8 (C-2'), 74.5 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.7 (C-28), 72.5 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.5 (C-5''), 69.1 (C-6'), 64.0 (C-16), 62.5 (C-6'''), 55.2 (C-5), 52.8 (C-9), 52.1 (C-18), 47.0 (C-17), 45.6 (C-14), 42.1 (C-8), 39.6 (C-4), 38.4 (C-1), 37.7 (C-19), 36.3 (C-10), 36.1 (C-15), 34.7 (C-21), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.6 (C-20), 27.9 (C-23), 26.4 (C-2), 25.7 (C-22), 23.8 (C-30), 20.9 (C-27), 20.0 (C-26), 18.5 (C-6), 18.1 (C-25), 17.8 (C-6''), 16.3 (C-24), IR $\nu_{max}(KBr)$ cm^{-1} : 3432(-OH), 1376, 1070, FABMS m/z 949[M+Na] $^{+}$

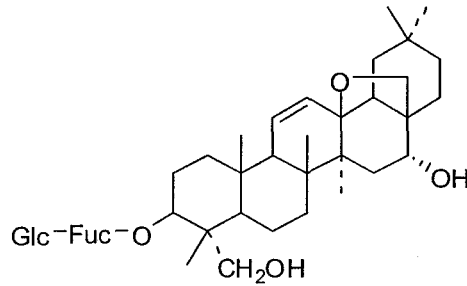
-규격서-

saikosaponin D

기원: 시호 [*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae)]

성상: 흰색 분말

구조:



Saikosaponin D는 시호의 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올(*n*-BuOH)로 분획한 층에서 분리된 시호사포닌이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 780, 분자식 $C_{42}H_{68}O_{13}$ 을 가진다. 214°C에서 액상으로 녹는다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, pyridine- d_5) δ : 0.94 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-25), 1.36 (3H, s, H-26), 1.45(3H, s, H-6'), 1.63 (3H, s, H-27), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, pyridine- d_5) δ : 131.9 (C-11), 131.9 (C-12), 85.2 (C-13), 81.6 (C-3), 77.7 (C-28), 77.1 (C-16), 71.0 (C-23), 53.9 (C-9), 51.5 (C-18), 47.3 (C-5), 45.3 (C-17), 43.8 (C-14), 43.7 (C-4), 41.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.3 (C-19), 36.7 (C-21), 36.7 (C-10), 35.4 (C-15), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.8 (C-20), 31.3 (C-22), 26.1 (C-2), 24.3 (C-30), 19.5 (C-26), 18.8 (C-25), 18.0 (C-27), 17.9 (C-6), 13.0 (C-24), 105.9 (C-1'), 71.5 (C-2'), 85.1 (C-3'), 71.7 (C-4'), 71.0 (C-5'), 17.2 (C-6'), 106.5 (C-1''), 75.7 (C-2''), 78.6 (C-3''), 72.1 (C-4''), 78.3 (C-5''), 62.7 (C-6''), IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} :3426(-OH),1378,1072, FABMS m/z 803 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

시호의 분리성분

	화합물명	보유량(mg)	총분리량(mg)	제공량(mg)
1	saikosaponin D	1150	1700	500
2	saikosaponin C	610	1600	700
3	saikosaponin B ₄	550	1100	500
4	saikosaponin B ₂	550	1050	500
5	saikosaponin B ₃	540	1000	500
6	saikosaponin A	100	240	100
7	saikosaponin H	125	125	0
8	saikosaponin I	90	90	0
9	saikosaponin B ₁	60	60	0
10	saikosaponin G	10	10	0

제 3 절 방풍의 생리활성성분 동시분석법 개발

1. TLC 분석 법 개발

가. 방풍과 갯방풍, 식방풍 추출물과 방풍의 생리활성성분의 순상 크로마토그램

- 순상 고정상에서 이동상은 hexane/ethylacetate (3/1, V/V)일 때 가장 좋은 분리도를 보였다.

(Figure 1. 참조)

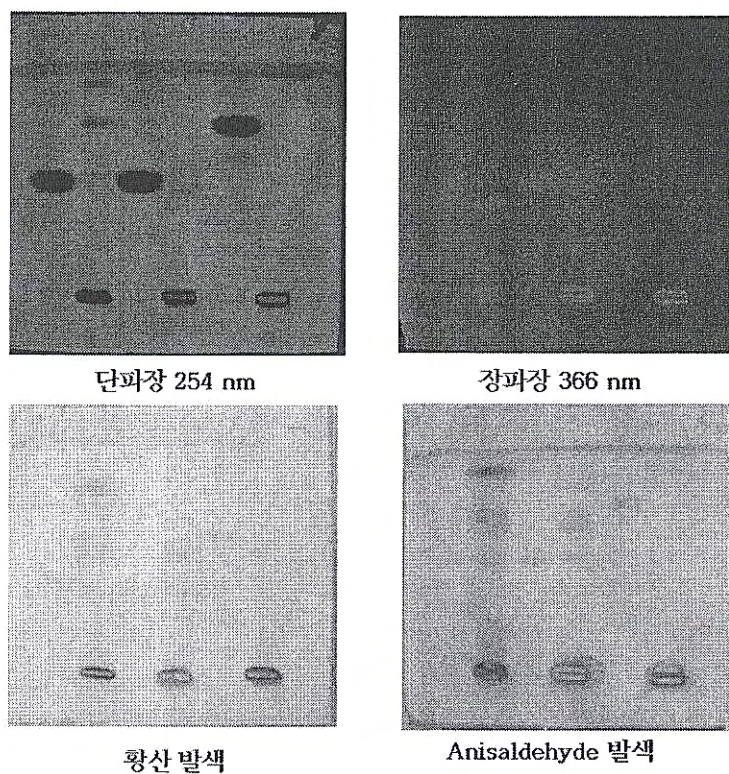


Figure 1. 방풍, 갯방풍, 식방풍의 추출물과 방풍 생리활성성분의 순상 크로마토그램 (점적순서 : 왼쪽부터 phellopterin, 방풍 추출물, imperatorin, 갯방풍 추출물, 3'-O-angleoylhamaudol, 식방풍 추출물)

나. 방풍과 갯방풍, 식방풍 추출물과 방풍의 생리활성성분의 역상 크로마토그램

- 역상 고정상에서 이동상은 methanol/water (3/1)일 때 가장 좋은 분리도를 보였다. (Figure 2. 참조)

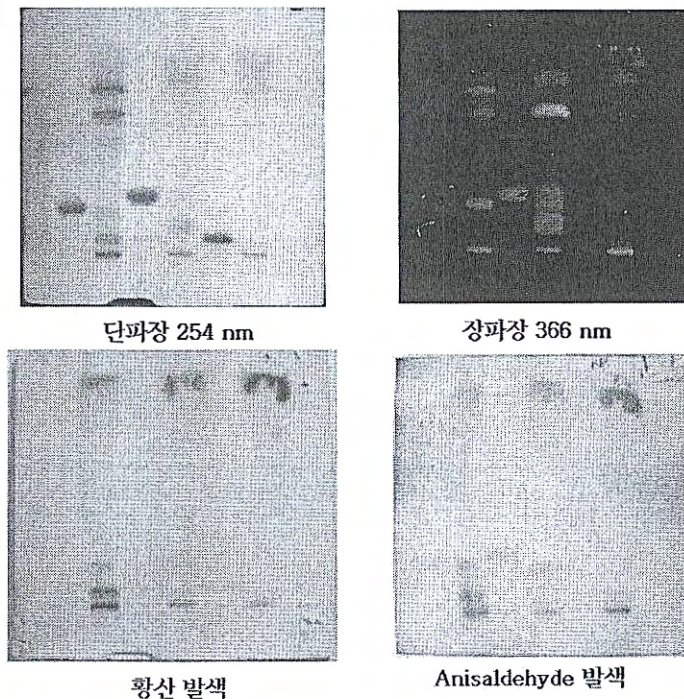


Figure 2. 방풍, 갯방풍, 식방풍의 추출물과 방풍 생리활성성분의 역상 크로마토그램 (점적 순서 : 왼쪽부터 phellopterin, 방풍 추출물, imperatorin, 갯방풍 추출물, 3'-*O*-angleoylhamaudol, 식방풍 추출물)

2. HPLC-UV 분석법의 개발

가. 4 가지 칼럼 비교

- 실온 상태에서 water/acetonitrile (60/40, v/v)의 이동상을 사용하여 비교하였다. Luna 5u C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), Hypersil GOLD (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), Xbridge (2.1 × 100 mm, 3.5 μm particle size), Deverosil RPAQUEOUS C30 (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size)에 10분의 1로 희석한 methanol 추출용액을 주입하여 비교하였다. 추출용액의 크로마토그램에서 imperatorin의 피크의 분리가 가장 큰 문제였으며 Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm)에서 분리가 가장 잘되었으며 총 분석시간도 가장 짧았다. (Figure 3. 참조)

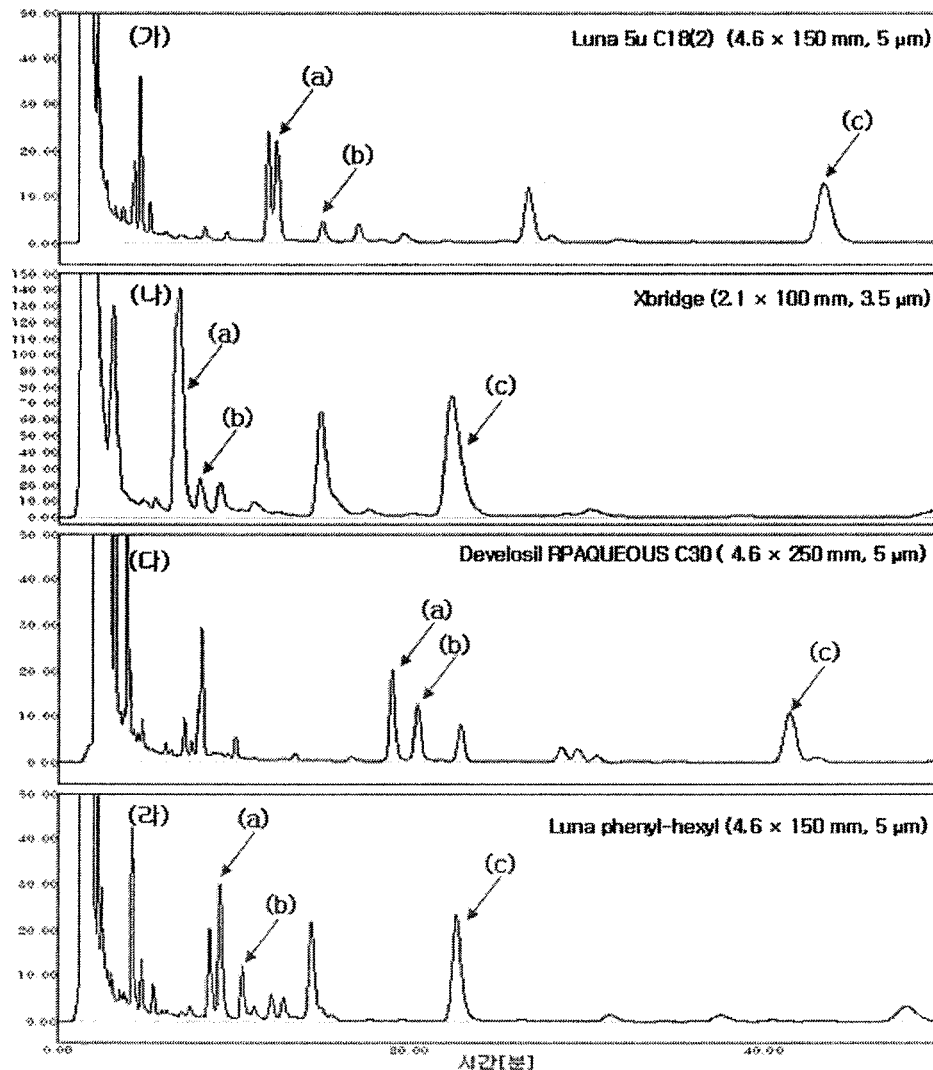


Figure 3. Saposhnikovia Radix methanol HPLC-UV chromatograms using 5 different columns (가) Luna 5u C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), (나) Xbridge (2.1 × 100 mm, 3.5 μm particle size), (다) Develosil RPAQUEOUS C30 (4.6 × 250 mm, 5 μm particle size), (라) Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), (a) Imperatorin, (b) Phellopterin, (c) 3'-O-angeloylhamaudol; (Mobile Phase : water/acetonitrile (50/50, v/v), Room Temperature, Flow rate : 1 mL/min except for (나), (Flow rate of (나) : 0.25 mL/min)

나. 기율기 용기조건 확립

- (1) 분석법을 더욱 개선하기 위하여 가장 단시간에 3개 표준품이 잘 분리되는 Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size) column을 이용하여 유기용매의 조성을 변화시켰을 때 분석 시간이 짧고 방풍 추출용액의 크로마토그램에서 생리활성성분의 분리능이 가장 좋은 조건을 확립하였다.
- (2) 유기용매의 비율이 낮을수록 분석시간은 길어지나 방풍 추출용액의 크로마토그램에서

imperatorin의 분리능이 좋아졌다.

- (3) 정량이 가능한 정도로 imperatorin의 피크를 분리하기 위해 acetonitrile/water (40/60, v/v)까지 유기용매의 조성을 낮추었으나 총 분석시간이 200 분 이상으로 길었다. 유기용매의 조성 및 유속에 대하여 기울기용리조건을 확립하여 총 분석시간을 45 분 이내로 단축하여 최적의 분석법을 확립하였다. (Table 4. 참조)

Table 4. 방풍의 HPLC-UV 분석 최적 조건

Column	Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size)			
Guard Column	SecurityGuard C18 (4.0 × 3.0 mm)			
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water (40/60, v/v) (B) Acetonitrile/Water (90/10, v/v)			
Gradient profile	Time (min)	A (%)	B (%)	유속 (mL/min)
	0.0	100	0	1
	20 → 35	100 → 25	0 → 75	1 → 1.75
	35 → 36	25 → 0	75 → 100	1.75 → 2
Injection volume	10 μL			
Column Temp.	30℃			

3. HPLC-UV 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 세 가지 방풍 생리활성성분 및 내부표준물질의 머무름 시간은 내부표준물질이 약 11.6분, imperatorin이 약 22.2분, phellopterin이 약 26.3분 그리고 3'-O-angeloylhamaudol은 약 32.6분 이었고 방풍의 다른 성분들로부터 양호하게 분리되었다.

나. 직선성 (Linearity)

- 세 가지 방풍 생리활성성분의 표준품에 대하여 1 ~ 100 μg/mL의 농도 범위에서 내부표준물질과의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.9995 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Figure 4. 참조)

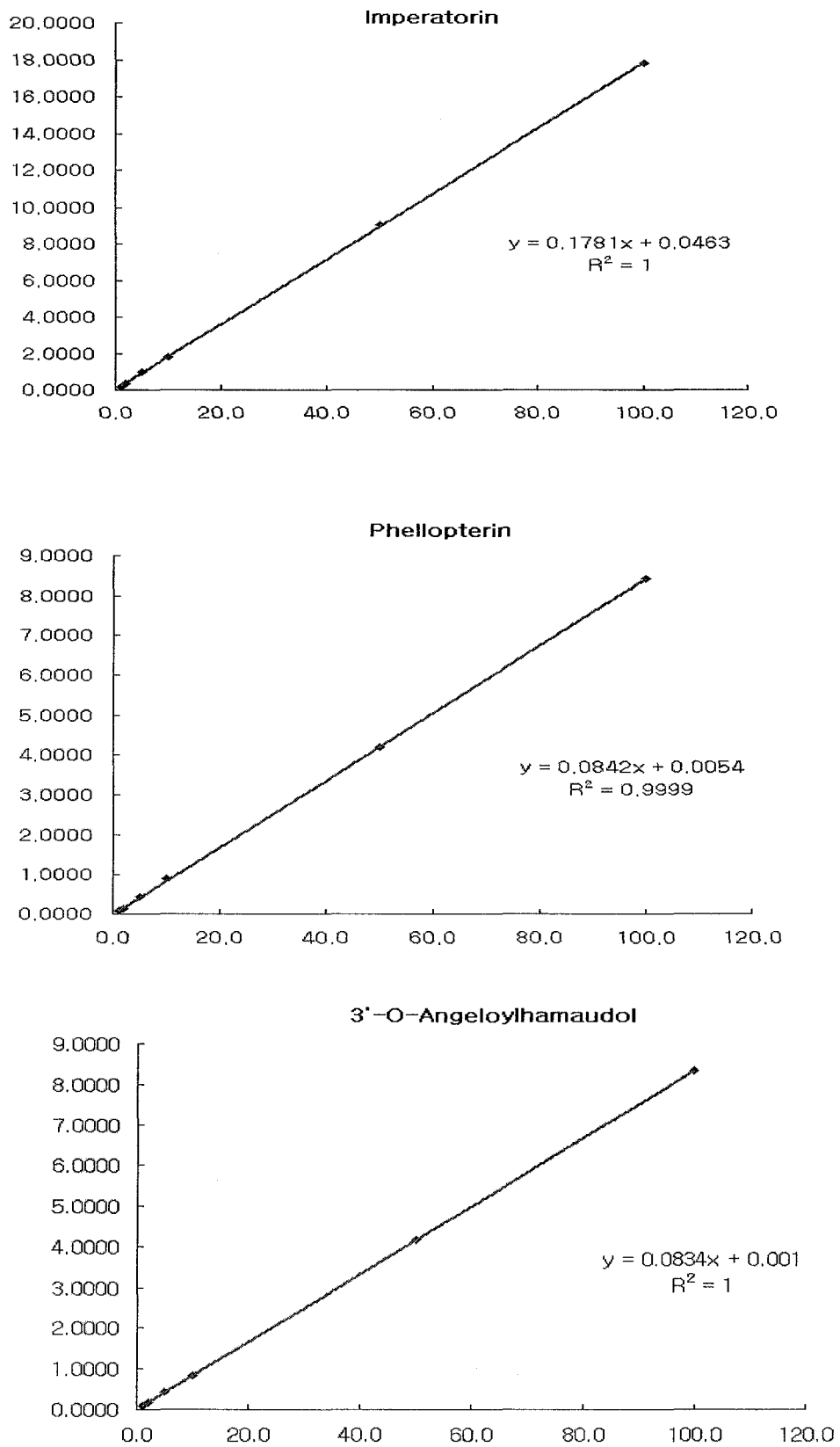


Figure 4. 방풍의 생리활성성분 3종에 대한 검량선

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 4가지 농도에 대하여 하루에 5번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며 그 값은 1.12 ~ 6.07% 와 1.64 ~ 6.83% 내에 들었다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 83.54 ~ 110.97% 와 96.21 ~ 104.51% 이었다. (Table 5. 참조)

Table 5. 방풍 생리활성성분의 분석법의 일내, 일간의 정밀도와 정확도

Compound	Conc. (mL/min)	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)	
		Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)
imperatorin	1	1.12	5.23	83.54	97.00
	2	2.30	1.65	91.02	99.13
	10	1.60	1.64	101.46	100.44
	100	5.15	2.90	101.24	96.21
phellopterin	1	6.07	6.00	97.041	101.92
	2	2.75	1.68	99.39	104.51
	10	3.96	4.48	107.27	103.31
	100	4.27	2.89	110.97	101.16
3'-O-angeloyl hamaudol	1	2.43	6.83	91.72	97.48
	2	3.66	4.60	92.52	100.80
	10	2.01	6.86	99.44	98.35
	100	4.17	5.66	107.64	99.51

라. 완건성 (Robustness)

- 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완건성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속 기울기, 이동상 조성 기울기, 칼럼을 변화시켜 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 tailing factor (T)를 비교하여 평가하였다. 칼럼 온도는 $30 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 3 포인트에서 각각 3번 반복하였으며, 유속 기울기는 20 분에서 35 분까지 $1 \text{ mL/min} \rightarrow 1.75 \pm 0.25 \text{ mL/min}$ 의 3 포인트에서 각각 3번 반복하여 평가하였다. 또한 20 분에서 35 분까지 A용매 100% \rightarrow A용매 $25 \pm 5\%$, B용매 $75 \pm 5\%$ 의 3가지 이동상 조성에서 각각 3번 반복하였고 칼럼을 Luna phenyl-hexyl ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)과 BETASIL phenyl/hexyl ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)로 바꾸며 완건성을 평가하였다. (Figure 6. 참조)

Table 6. 방풍의 생리활성성분 분석법의 완전성 평가

Robustness						
Compounds	Analytical condition		Area. C.V (%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
imperatorin	Column Temperature	25°C	0.47	0.8395	14373.00	1.20
		30°C	0.01	0.8432	14601.52	1.11
		35°C	0.35	0.8330	13507.20	1.13
	Flow rate Gradient	1 → 1.50 mL/min	1.53	0.8513	14933.69	1.24
		1 → 1.75 mL/min	0.01	0.8539	15898.61	1.21
		1 → 2.00 mL/min	2.19	0.8619	23335.22	1.20
	Mobile Phase Gradient	A 100% → A 30% B 70%	5.86	0.8386	13221.37	1.24
		A 100% → A 25% B 75%	0.01	0.8432	14601.52	1.11
		A 100% → A 20% B 80%	4.60	0.8387	14949.99	1.26
	Column*	Luna phenyl-hexyl	4.53	0.9620	19374.83	1.09
BETASIL phenyl/hexyl		2.34	0.8143	2624.11	1.07	
phellopterin	Column Temperature	25°C	0.48	1.000	18091.35	1.23
		30°C	0.04	1.000	19016.36	1.21
		35°C	2.09	1.000	18061.21	1.20
	Flow rate Gradient	1 → 1.50 mL/min	1.53	1.000	35305.27	1.13
		1 → 1.75 mL/min	0.00	1.000	33814.49	1.12
		1 → 2.00 mL/min	4.79	1.000	46889.57	1.13
	Mobile Phase Gradient	A 100% → A 30% B 70%	1.02	1.000	19383.87	1.13
		A 100% → A 25% B 75%	0.04	1.000	19016.36	1.21
		A 100% → A 20% B 80%	6.39	1.000	19994.16	1.20
	Column	Luna phenyl-hexyl	4.29	1.000	26036.10	1.08
BETASIL phenyl/hexyl		2.51	1.000	4040.82	0.97	
3'-O-angeloyl hamaudol	Column Temperature	25°C	0.62	1.2534	362495.06	2.08
		30°C	0.04	1.2447	368672.74	2.02
		35°C	1.53	1.2890	373215.21	2.22
	Flow rate Gradient	1 → 1.50 mL/min	1.83	1.1961	342419.02	1.81
		1 → 1.75 mL/min	0.00	1.1966	357703.37	1.87
		1 → 2.00 mL/min	0.45	1.1864	387732.29	1.64
	Mobile Phase Gradient	A 100% → A 30% B 70%	8.38	1.2708	324812.37	1.95
		A 100% → A 25% B 75%	0.04	1.2419	368672.74	2.02
		A 100% → A 20% B 80%	7.83	1.2378	372749.99	1.93
	Column	Luna phenyl-hexyl	4.32	1.1142	24890.92	1.26
BETASIL phenyl/hexyl		1.77	1.1301	22392.93	1.04	

a : relative retention time

b : theoretical plate number

c : peak tailing factor

A : acetonitrile/water (40/60, v/v)

B : acetonitrile/water (90/10, v/v)

* : 국내에서 접근할 수 있는 phenyl hexyl column 제조사는 phenomenex사와 Thermo Scientific사여서 2종의 칼럼으로만 실시. 또한 대부분의 문헌에서 적용한 것으로 보고되어 있는 phenyl hexyl column은 이 두 제조사로 한정되어 있음.

마. 회수율

- 방풍 한약재 중 방풍 생리활성성분이 15 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL가 되도록 생리활성성분 표준품의 혼합용액을 가한 후 확립한 추출법으로 추출한 후 회수율을 측정하였다. 이 시험은 두

번에 반복하였다. 그 결과 모두 70% 이내의 추출율로 양호한 회수율을 보였다. (Table 7. 참조)

Table 7. Recoveries of 3 major bioactive compounds from Saposhnikovia Radix

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)		
	Imperatorin	Phellopterin	3'-O-angeloylhamaudol
15	71.5	70.5	84.4
75	78.8	87.7	77.1
150	89.2	91.7	92.3

바. 안정성

- 방풍의 세 가지 생리활성성분인 imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol을 실온과 4°C 냉장고에 두어 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일이 경과하였을 때 HPLC-UV 분석법에 적용하여 각 성분의 면적을 측정하여 각 성분들의 안정성을 시험한 결과 다음 그래프와 같았다. (Figure 5, Figure 6, Figure 7. 참조)

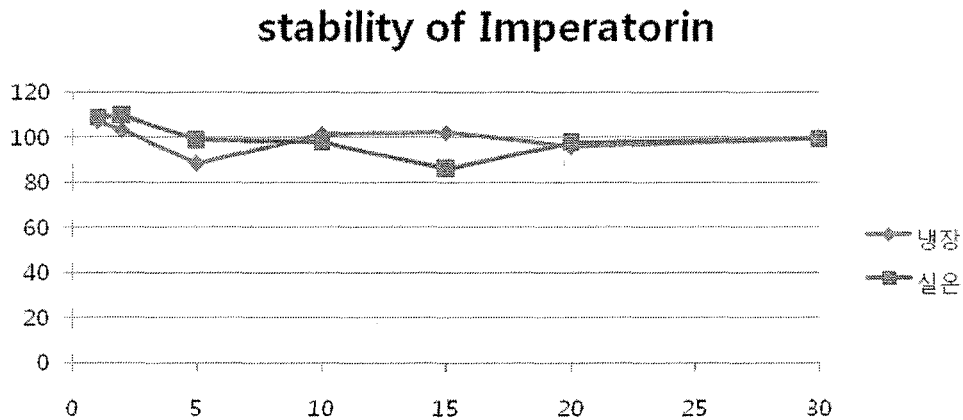


Figure 5. Stability of imperatorin

stability of phellopterin

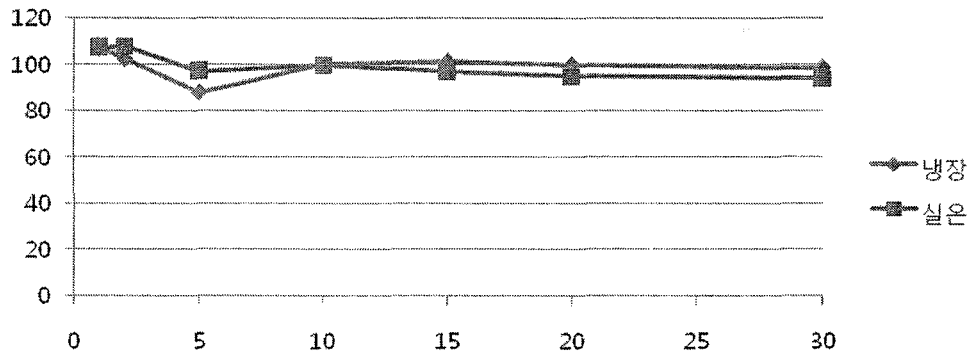


Figure 6. Stability of phellopterin

stability of 3'-O-angeloylhamaudol

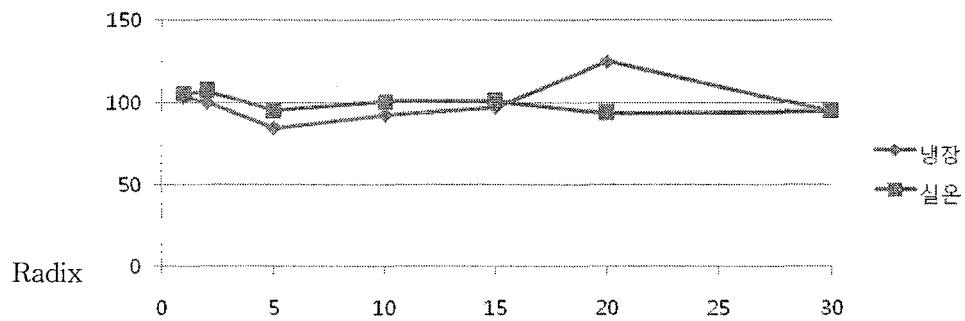


Figure 7. Stability of 3'-O-angeloylhamaudol

4. 추출법 개발

가. 추출방법의 비교 및 선정

- 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법 중 초음파추출법으로 추출할 때 방풍의 생리활성성분의 추출율이 가장 좋았다. (Figure 8. 참조)

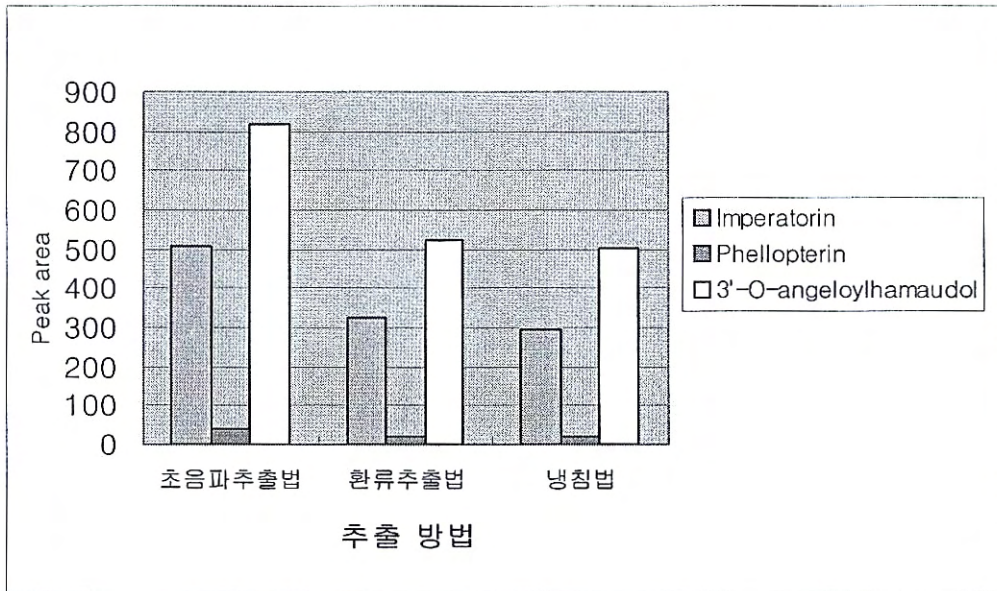


Figure 8. 방풍 주요 성분의 추출 방법별 피크 면적

나. 추출용매의 비교 및 선정

- Methanol과 ethanol 중 methanol을 추출용매로 하여 추출할 때 방풍의 생리활성성분의 추출을 가장 좋았다. (Figure 9. 참조)

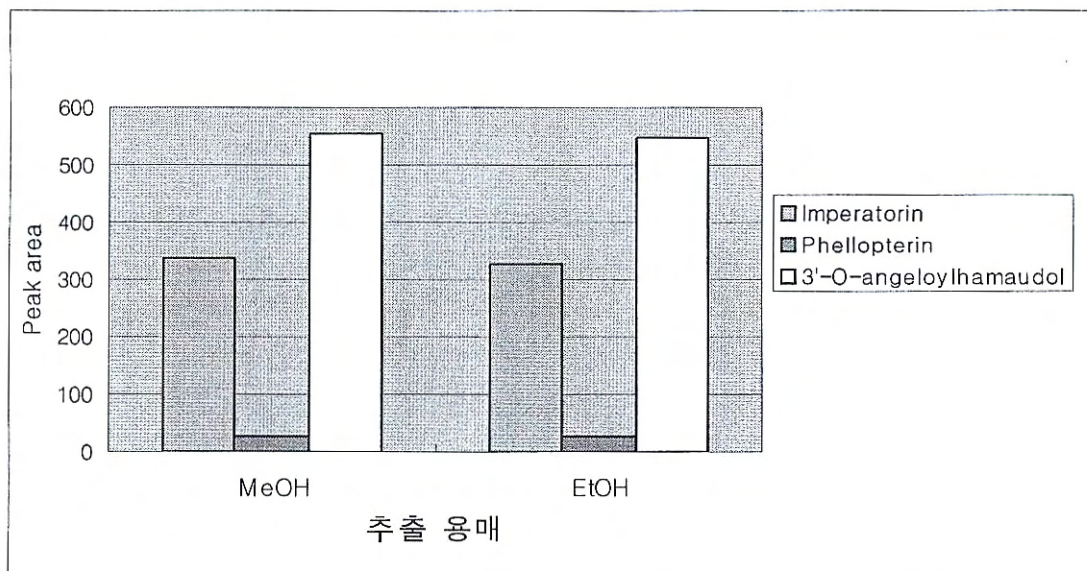


Figure 9. 방풍 주요 성분의 추출 용매별 피크 면적

라. 추출용매의 유기용매 함량의 비교 및 선정

- 100%, 70%, 50% methanol 중 70% methanol로 추출할 때 방풍의 생리활성성분의 추출을 가장 좋았다. (Figure 10. 참조)

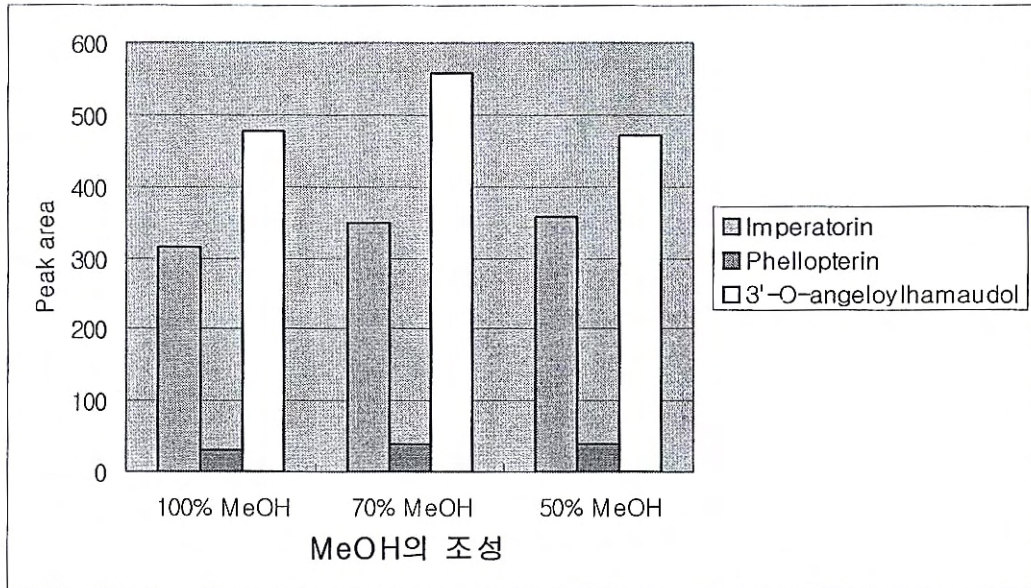


Figure 10. 방풍 주요 성분의 추출 용매별 피크 면적

마. 추출시간의 비교 및 선정

- 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분 중 50분간 초음파추출법으로 추출할 때 방풍의 생리활성 성분의 추출을 가장 좋았다.(Figure 11. 참조)

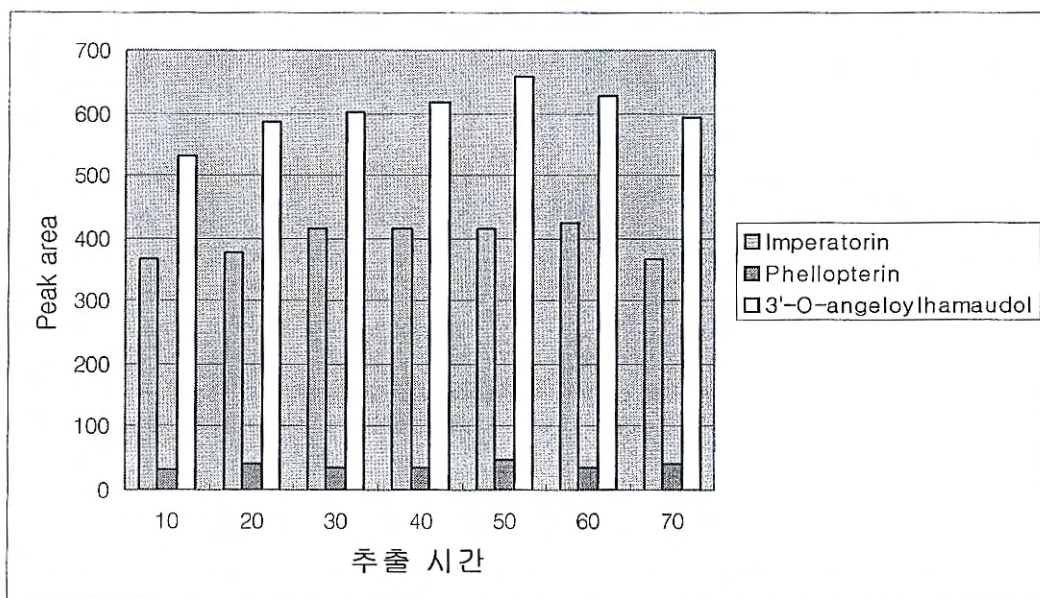


Figure 11. 방풍 주요 성분의 추출 시간별 피크 면적

바. 확립된 추출법

- 70% methanol을 추출용매로 하여 초음파 추출법으로 50분간 추출할 때 가장 좋은 추출율을 보였

다.

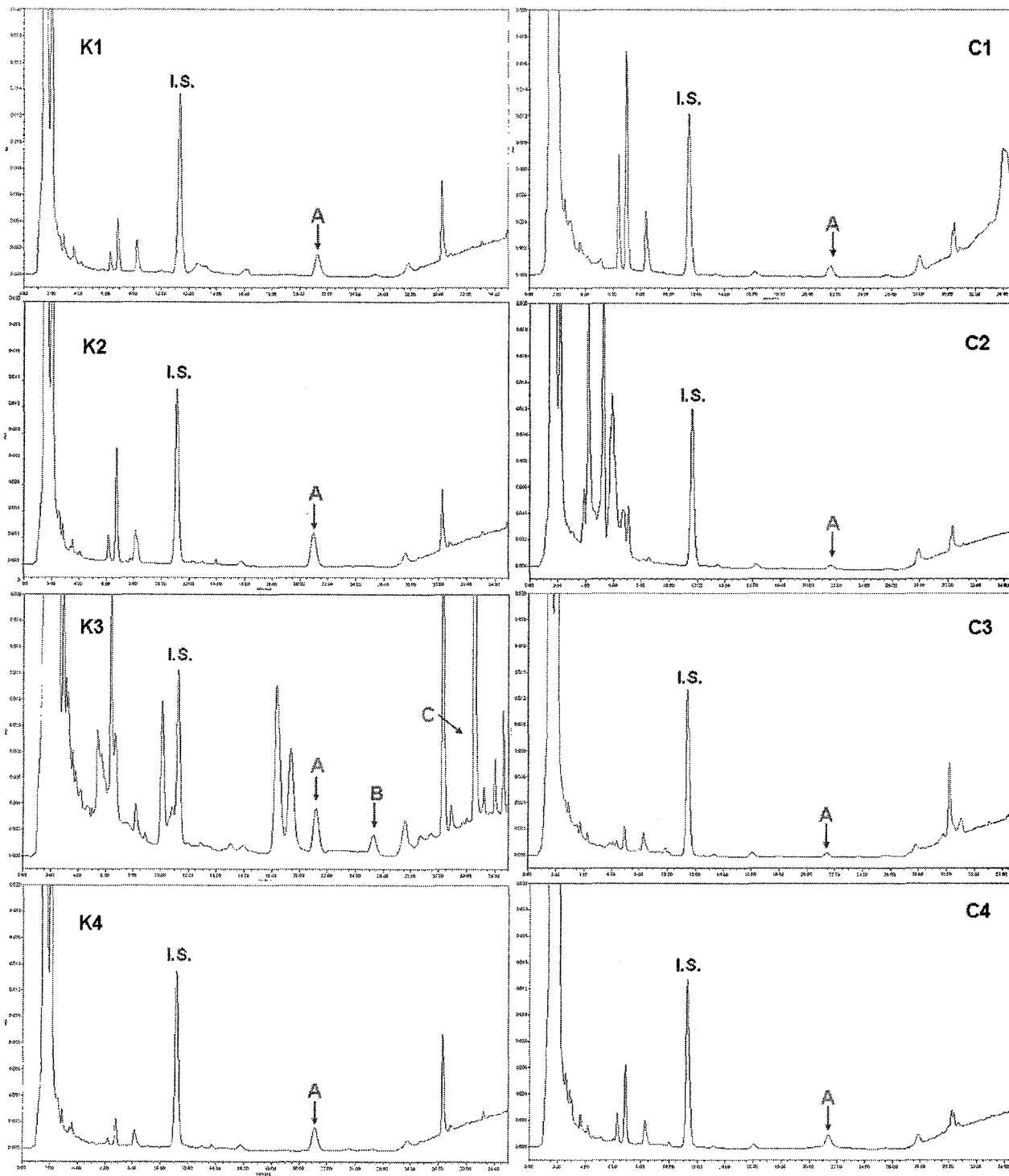
5. HPLC-UV 분석법을 이용한 방풍 성분의 함량 분석

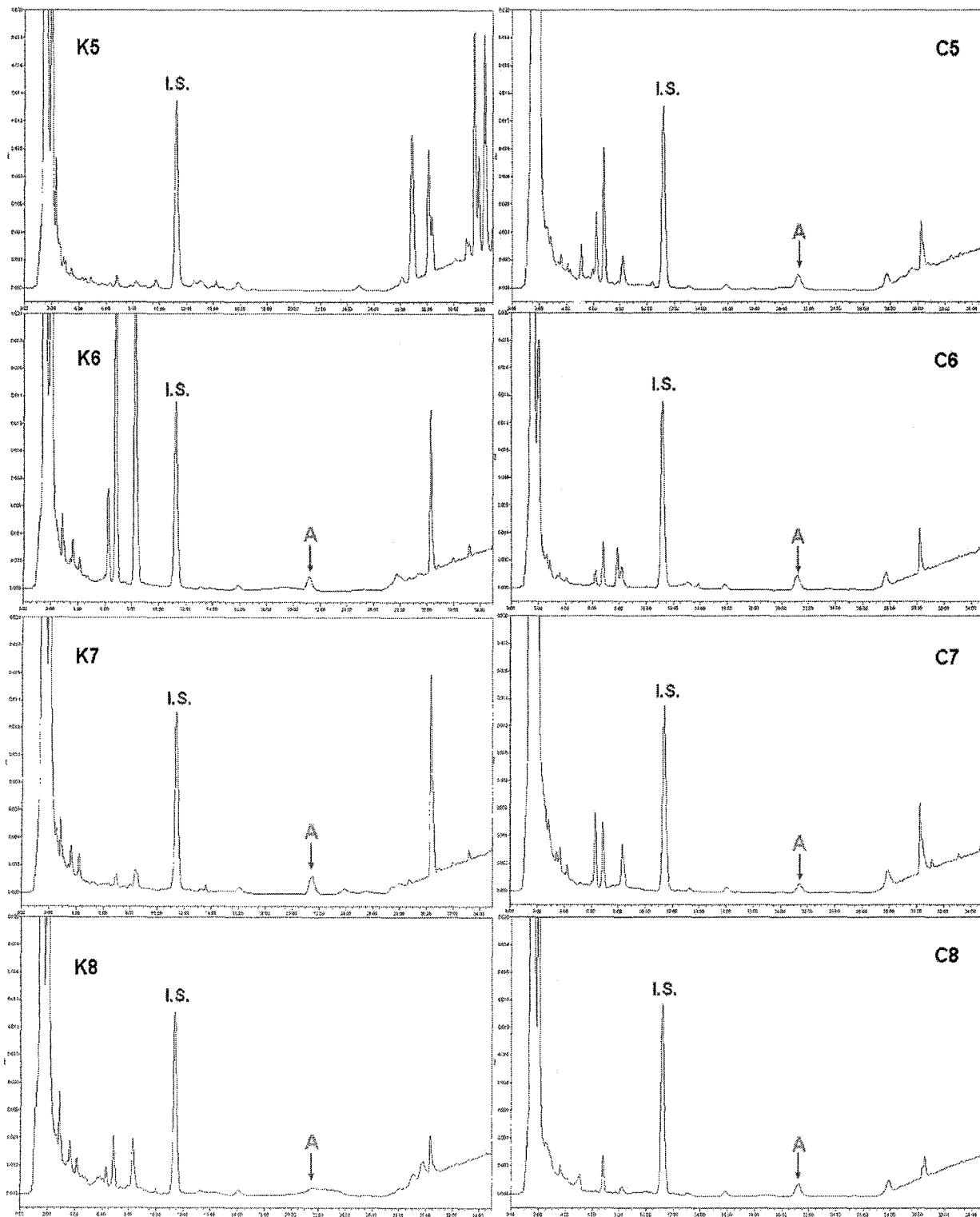
가. 시중에 유통중인 국산 방풍 8종과 중국산 방풍 11종, 제 1세부 기관으로부터 제공받은 산지별 품종별 방풍 5종을 개발한 방풍 추출법으로 추출하였다. 각각의 추출용액과 20 µg/mL 농도의 내부표준물질을 동일량 섞고 이를 HPLC-UV 분석법에 적용하였다. 구하여진 HPLC-UV 크로마토그램에서 내부표준물질 피크의 면적에 대한 방풍의 생리활성성분 피크의 면적비를 검량선에 대입하여 함량을 구하였다. (Table 8., Figure 12. 참조)

나. 제 1세부 기관으로부터 제공받은 국산 방풍 (K3), 내몽고산 방풍 (C11), 중국산 방풍 (C12)을 제외한 나머지 방풍에서 방풍 생리활성성분 중 phellopterin과 3'-O-angeloylhamaudol은 검출되지 않았다.

Table 8. 산지별 품종별 방풍 중의 방풍 생리활성성분의 함량

Sample	산지	imperatorin (%)	phellopterin (%)	3'-O-angeloylhamaudol (%)
K1	경북 영천	0.0118	-	-
K2	전남 강진	0.0193	-	-
K3	1세부로부터 제공받음, 원방풍	0.0236	0.0020	0.0341
K4	경북 영덕	0.0132	-	-
K5	전북 장수	-	-	-
K6	강원 삼척	0.0077	-	-
K7	경남 고성	0.0100	-	-
K8	강원 강릉	0.0017	-	-
K9	전남 여수	0.0082	-	-
K10	1세부로부터 제공받음, 갯방풍	0.0044	-	-
K11	1세부로부터 제공받음, 식방풍	0.0053	-	-
C1	중국산	0.0054	-	-
C2	중국산	-	-	-
C3	중국산	-	-	-
C4	중국산	0.0053	-	-
C5	중국산	0.0059	-	-
C6	중국산	0.0069	-	-
C7	중국산	0.0039	-	-
C8	중국산	0.0058	-	-
C9	중국산	-	-	-
C10	중국산, 해방풍	0.0276	-	0.0010
C11	1세부로부터 제공받음, 내몽고산	0.0211	0.0022	0.0335
C12	1세부로부터 제공받음, 중국산	0.0197	0.0020	0.0330
C13	중국산	-	-	-





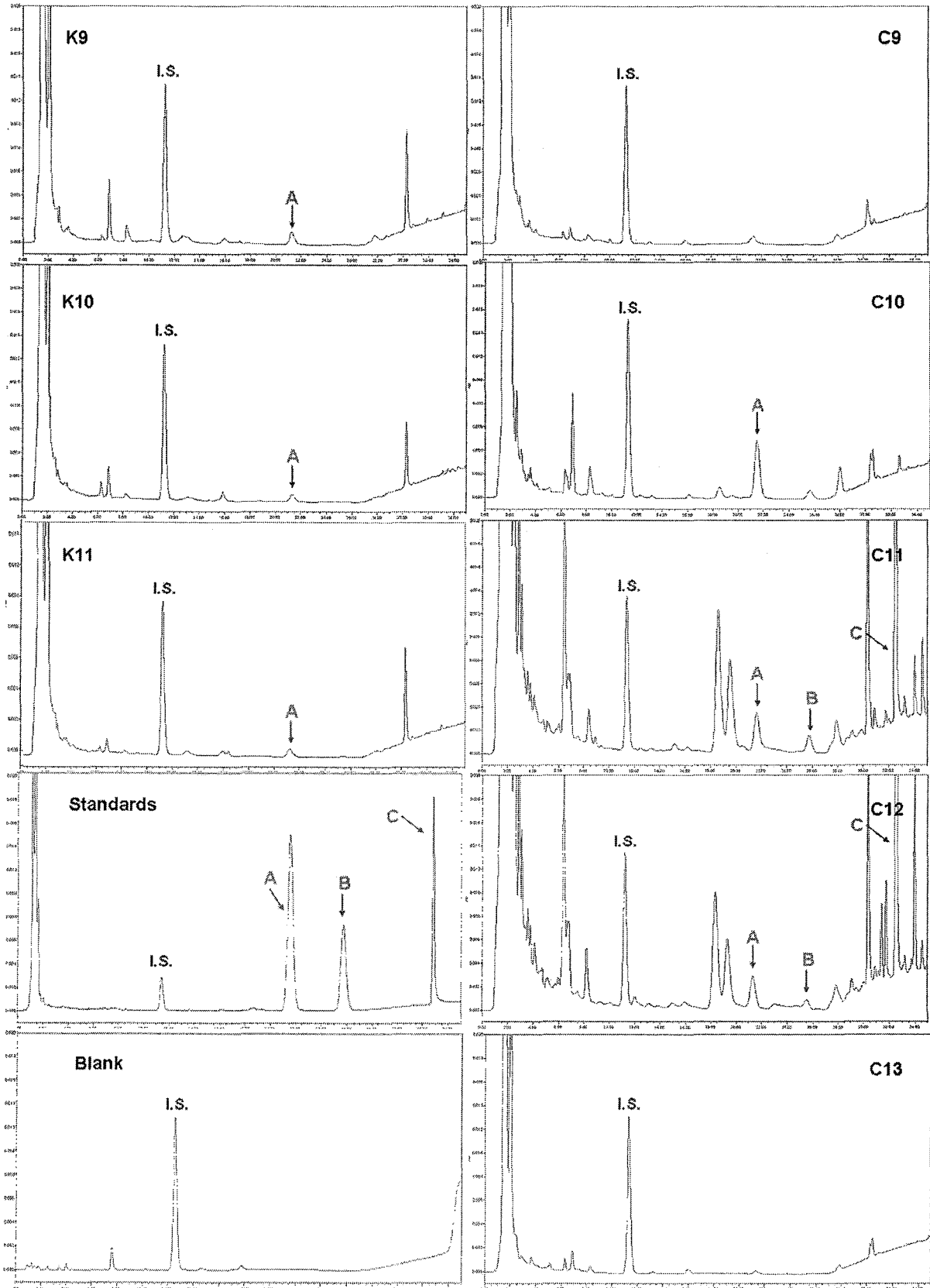


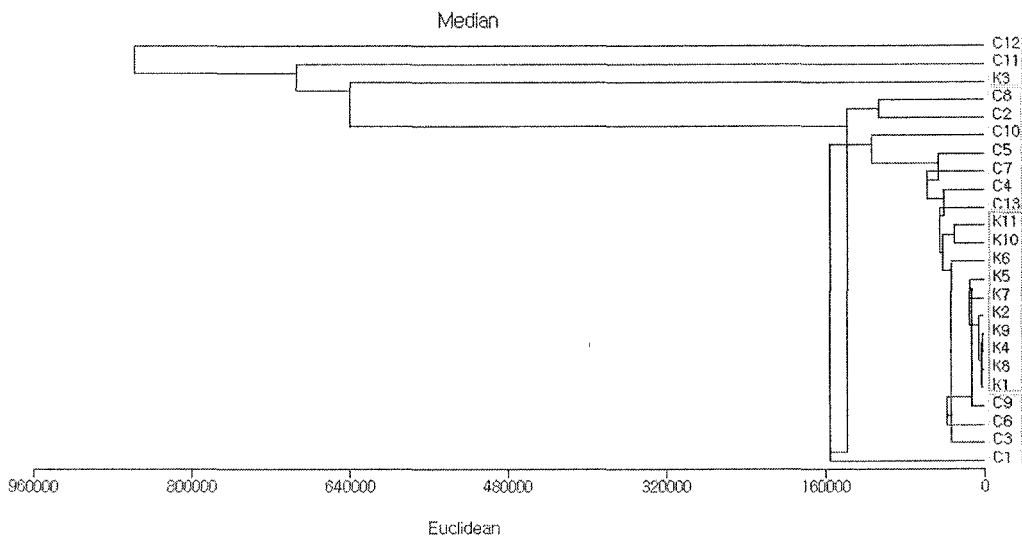
Figure 12. 국내산 방풍 11종과 중국산 방풍 13종의 70% methanol 추출물의 HPLC-UV 크로마토그램, I.S. : Byakangelicol, A : Imperatorin, B : Phellopterin C : 3'-O-angeloylhamaudol

6. 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. 제 1세부 기관으로부터 제공받은 국산 방풍 1종, 국산 갯방풍 1종, 국산 식방풍 1종과 중국산 방풍 1종, 내몽고산 방풍 1종과 시중에 방풍으로 유통되고 있는 국산 방풍 8종과 중국산 방풍 11종을 확립된 추출법으로 추출하여 확립된 HPLC-UV 분석법에 적용하였다. 이렇게 구하여진 HPLC-UV 크로마토그램으로 산지별 기원별 패턴분석을 하였다.

나. 크로마토그램에 보이는 15개의 피크의 면적을 변수로 하였으며 각각을 자연수 로그 변환하여 수치를 조정하고 이를 군집 분석 (Cluster Analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)에 적용하였다. (Figure 13., Figure 14., Figure 15. 참조)

다. 제 1세부로부터 방풍 (*Saposhnikovia Radix*)으로 감별 받은 국산 방풍 (K3)과 중국산 방풍 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)은 크로마토그램 상으로도 나머지 방풍들과 확연한 차이를 보였으며 이는 군집 분석과 주성분 분석의 결과에서도 확인할 수 있었다. 국산 갯방풍 (*Glehnia littoralis*, K10)과 국산 식방풍 (*Peucedanum japonicum*, K11)은 감별 받은 시료로써 크로마토그램 상으로 방풍으로 유통되는 국산 방풍 8종, 중국산 방풍 11종과 비슷한 크로마토그램을 보였으며 군집 분석과 주성분 분석에서도 확인할 수 있었다. 국산 방풍 8종과 중국산 방풍 11종은 군집 분석과 주성분 분석을 통하여 국산과 중국산 산지별로 분류되어짐을 알 수 있었다.



방풍 (*Saposhnikovia Radix*)로 감별받은 국산 (K3)과 중국산 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)

시중에 유통되는 중국산 방풍

시중에 유통되는 국산 방풍 및 감별 받은 국산 갯방풍 (K10)와 식방풍 (K11)

Figure 13. Cluster Analysis Graph of 24 *Saposhnikovia Radix* samples

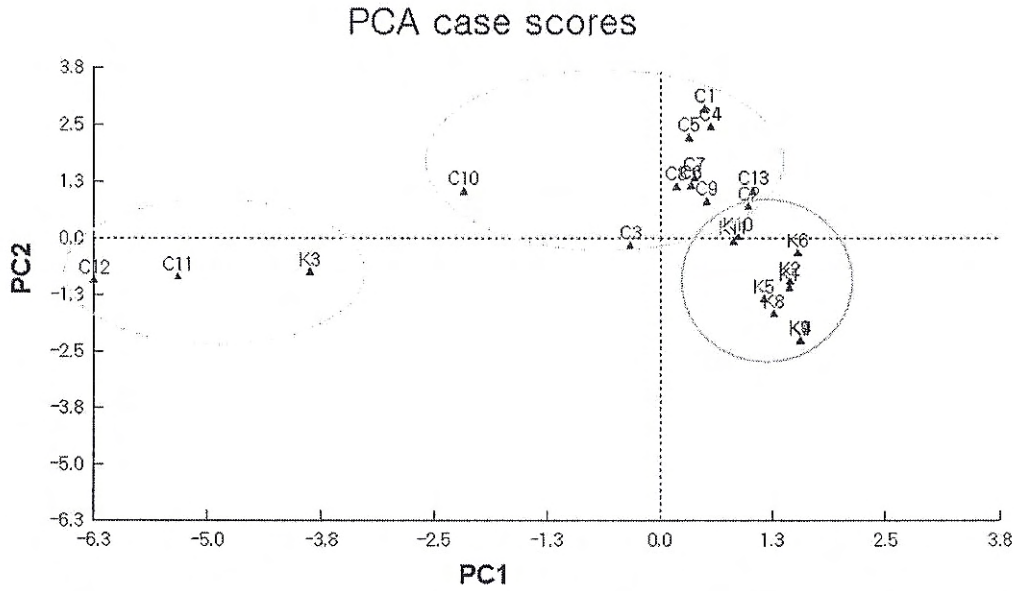


Figure 14. Principal Component Analysis 2D-potting of 24 *Saposhnikovia Radix* samples

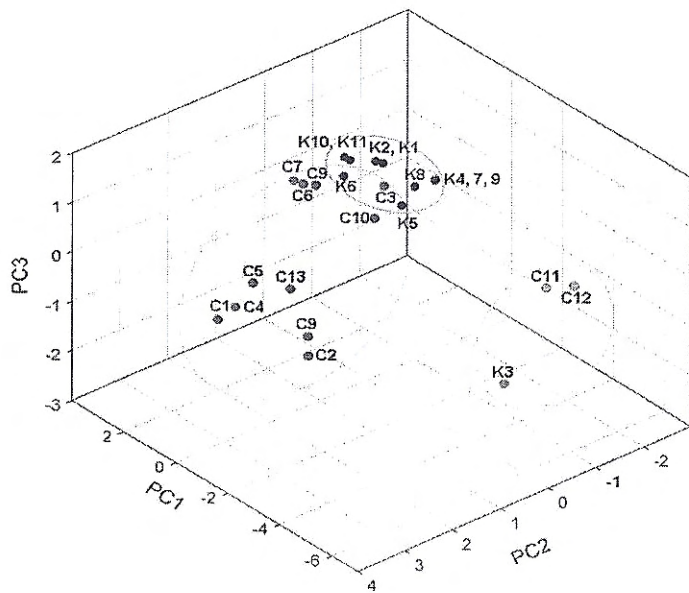


Figure 15. Principal Component Analysis 3D-plotting of 24 *Saposhnikovia Radix* samples

7. 방풍의 DNA 종감별 결과와 HPLC 분석 결과의 비교

가. 방풍 동정시료의 ITS 부위 염기서열 분석 결과, K3, C11, C12의 시료는 방풍(*S. divaricata*)으로 확인이 되었으며, K11, K5 시료는 식방풍(*Peucedanum japonicum*), 나머지 시료는 모두 해방풍(*Glehnia littoralis*)으로 확인이 되었다. C13은 방풍과 식방풍이 혼합되어있는 것으로 여겨진다.

나. 방풍의 성분 함량분석을 위해 HPLC-UV 크로마토그램에서 내부표준물질 피크의 면적에 대한 방풍의 생리활성성분 피크의 면적비를 검량선에 대입하여 함량을 구한 결과, 국산 방풍 (K3), 내몽고산 방풍 (C11), 중국산 방풍 (C12)은 방풍의 생리활성성분 중 imperatorin, phellopterin과 3'-*O*-angeloylhamaudol이 모두 검출되었지만 나머지 방풍시료에서는 주로 imperatorin만 검출되었다.

다. HPLC를 이용한 함량분석 결과에서는 DNA 종감별에서 식방풍으로 동정된 C13, K5, K11 시료의 함량분석에서 뚜렷한 패턴 변화가 없었으며, 다만 해방풍에 비하여 분석시간 4-10분 이내에 피크가 거의 관찰되지 않는다는 특징이 있었다. 하지만 이러한 경향은 C3, C9에서도 관측되어 식방풍의 화학분석 특징으로 단정하기엔 어려움이 있을 것으로 보이며, HPLC 크로마토그램의 성분 피크 데이터를 이용한 군집분석과 주성분 분석에서도 C13, K5, K11 시료가 다른 시료 (해방풍)와 분류되는 경향을 확인할 수 없었다.

라. HPLC-UV 크로마토그램으로 군집 분석 (Cluster Analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)에 적용한 결과, 방풍 (*Saposhnikovia Radix*)은 국산 방풍 (K3)과 중국산 방풍 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)에서 군집 분석과 주성분 분석의 결과에서 다른 방풍과 구별이 되었으며, 크로마토그램 상으로도 나머지 방풍들과 확연한 차이를 보였다.

바. 결론적으로, 방풍의 종류는 크게 세가지 종류로 유통되고 있다. 중국방풍은 방풍(*S. divaricata*)으로 기원이 명확하지만 국내에서 원방풍으로 유통되는 해방풍(*Glehnia littoralis*)과 혼용되어 사용되고 있어 약제사용에 있어 명확히 할 필요성이 있다. 그리고 국내산 방풍은 식방풍과 해방풍으로서 이에 대한 명확한 구분없이 사용되고 있음을 알 수 있었다. DNA 분석결과, 기원이 확인된 국산 해방풍 (*Glehnia littoralis*, K10)과 국산 식방풍 (*Peucedanum japonicum*, K11)은 시료 수집팀에서 제공한 기원종과 DNA 분석 결과가 일치하였으나, 크로마토그램 상으로 식방풍과 해방풍이 구분이 안되었으므로 향후, 방풍외에 식방풍(*Peucedanum japonicum*)과 해방풍(*Glehnia littoralis*)을 구분 지을 수 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

8. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 개발

가. LC-MS/MS 분석조건 검토

- (1) 방풍의 주요 생리활성성분을 대상으로 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 조건을 비교한 결과 electrospray ionization (ESI) ion source 방식에서 검출이 용이하였다.
- (2) (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교한 결과 (+) ion mode에서 훨씬 더 좋은 감도를 보였다.
- (3) 고정상으로는 일반적인 ODS 칼럼인 YMC-Pack Pro C18 RS (100 × 2.1 mm, 3 μm particle size)을 선택하였으며, 분리능을 향상시켜 방풍 추출물의 간섭물질에 의한 ion suppression의 영향을 최소화하기 위하여 고정상의 입자 크기가 3 μm로 작은 것을 사용하였다.
- (4) 분석의 선택성과 검출감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였으며, 이 때 각 성분별로 collision cell에서 collision 강도를 조절하여 product ion의 response가 크도록 조정하였으며, 그 결과 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다. 내부표준물질을 포함하여 대상 성분 모두 precursor ion으로 [M+H]⁺ ion을 선정하였으며 특징적인 화학구조에 따라 서로 다른 product ion이 검출되었다. (Figure 16. ~ Figure 19. 참조)
- (5) 기타 MS/MS의 declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP), collision cell entrance potential (CEP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP), curtain gas (CUR), collision gas (CAD), ion spray voltage (IS), temperature (TEM), ion source gas 1 (NEB), ion source gas 2 (Turbo gas) 등과 같은 파라미터를 최적화하여, 각 성분별로 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다. (Table 9., Table 10. 참조)
- (6) 방풍의 주요 생리활성성분 3종을 대상으로 MS/MS의 MRM 방식으로 분석한 결과 10분 이내에 양호하게 분리되었으며, 70% EtOH 추출물에서도 방풍의 다른 성분들에 의하여 전혀 간섭을 받지 않았다. (Figure 20. 참조)

Table 9. 방풍 생리활성성분의 LC-MS/MS분석 조건

Instrument	HPLC - Agilent 1200 Series		
	MS/MS - ABI API 2000		
Detection mode	Positive mode		
Column	YMC-Pack Pro C18 RS (100 × 2.1 mm, 3 μm particle size)		
Mobile phase	1 mM Ammonium acetate/Acetonitrile = 30/70 (pH 5.0 with acetic acid)		
Oven Temperature	Room temperature		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	0.2 mL/min		
Run time	10 min		
Mode	positive, MRM		
CUR	40 psi	TEM	450°C
CAD	5 psi	NEB	40 psi
IS	5500 volt	Turbo gas	75 psi

Table 10. 방풍 생리활성 성분의 MRM ion transition 선정.

Compound	Ion transition	DP (v)	FP (v)	EP (v)	CEP (v)	CE (v)	CXP (v)
3'-O-angeloylhamaudol	359.03 → 259.3	56	350	8.5	26	29	6
Imperatorin	270.996 → 147.2	36	360	12	34	47	4
Phellopterin	300.737 → 217.9	41	370	9	34	39	6
Glimepiride (I.S.)	491 → 352.2	40.8	385	8	33.93	20.8	9.3

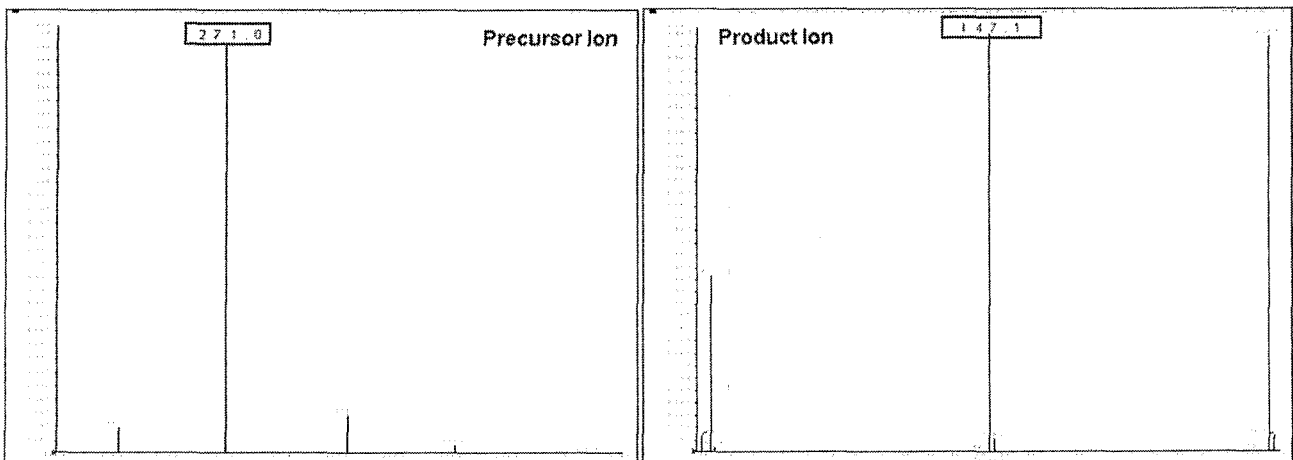


Figure 16. Precursor and product ion Spectra of imperatorin

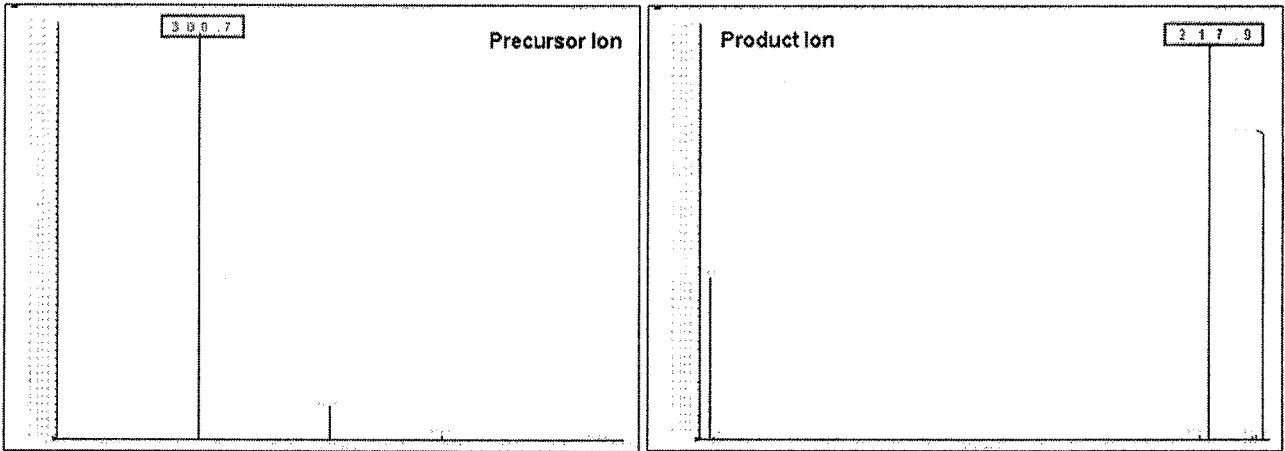


Figure 17. Precursor and product ion Spectra of phellopterin

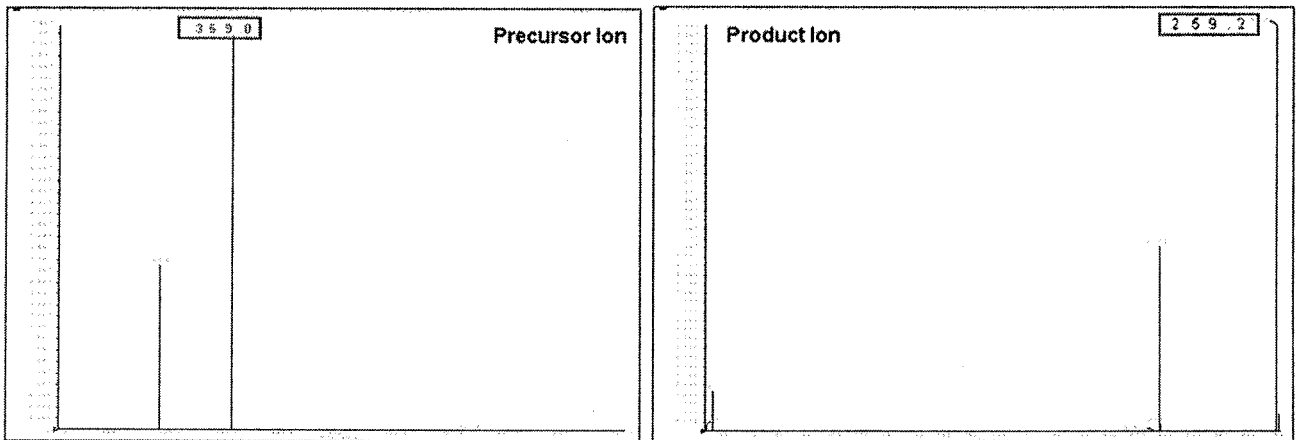


Figure 18. Precursor and product ion Spectra of 3'-O-angeloylhamadol

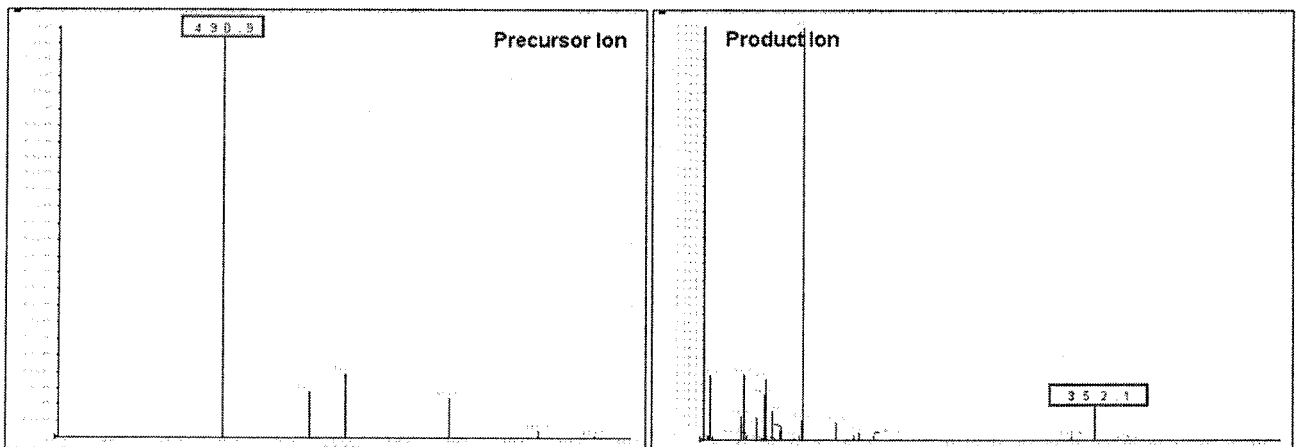


Figure 19. Precursor and product ion Spectra of glimepiride (internal standard)

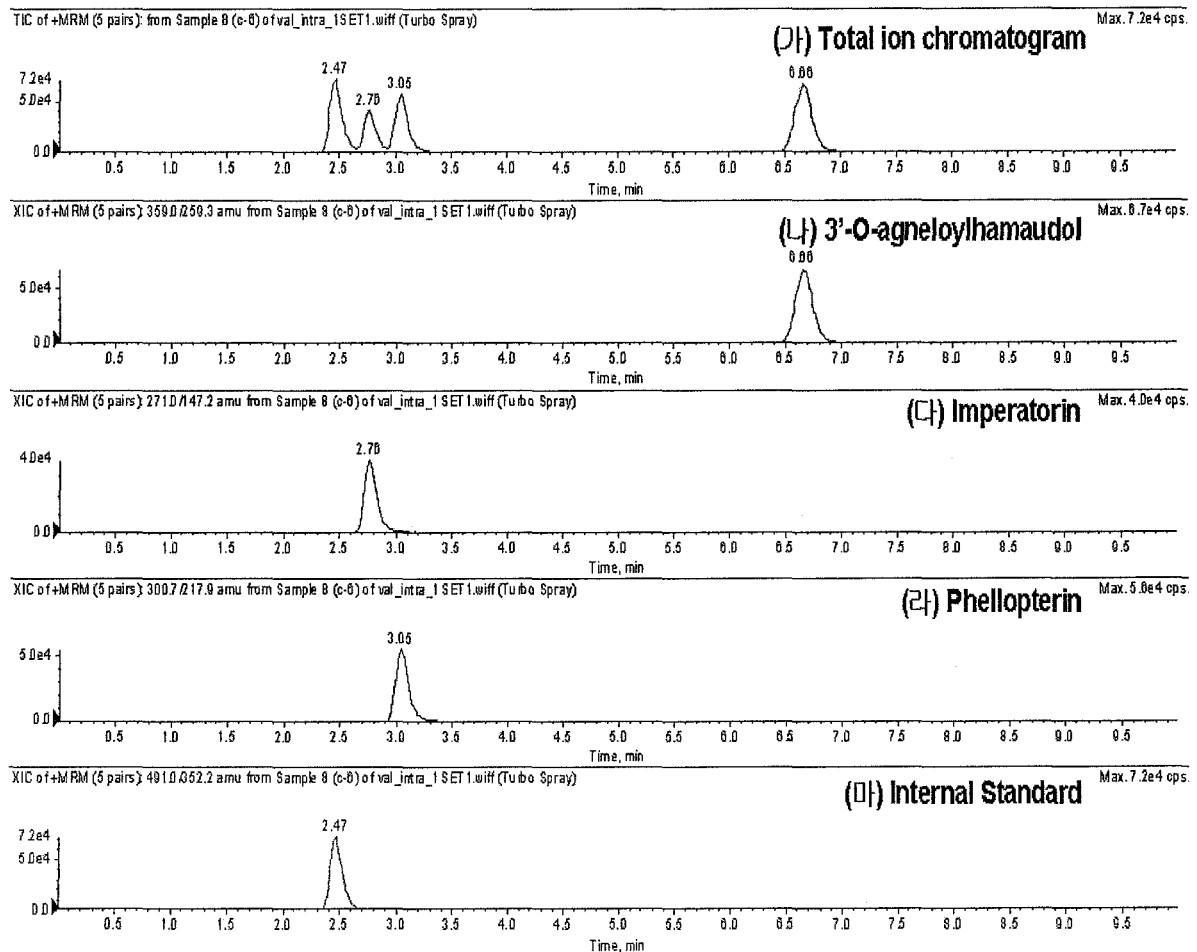


Figure 20. 방풍 생리활성성분의 LC-MS/MS 크로마토그램, 가) Total ion chromatogram 나) 3'-O-angeloylhamaudol, 다) imperatorin, 라) phellopterin, 마) Glimperide (내부표준물질)

9. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 검증 (Validation)

가. 선택성

- 방풍의 세 가지 성분 및 내부표준물질의 머무름 시간은 imperatorin이 약 2.77분, phellopterin이 약 3.04분, 3'-O-angeloylhamaudol이 약 6.68분, 내부표준물질이 약 2.45분이었고, 약 추출물의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

나. 직선성

- 내부표준물질의 피크 면적비에 대한 약액 생리활성성분의 피크 면적비를 가지고 검량선 (imperatorin 과 phellopterin : 2.5 - 500 ng/mL, 3'-O-angeloylhamauel : 1 ~ 200 ng/mL)을 작성하였다. 모든 성분에 대한 검량선의 상관계수가 0.9979 이상으로 양호한 직선성을 나타내었

다. (Figure 21. 참조)

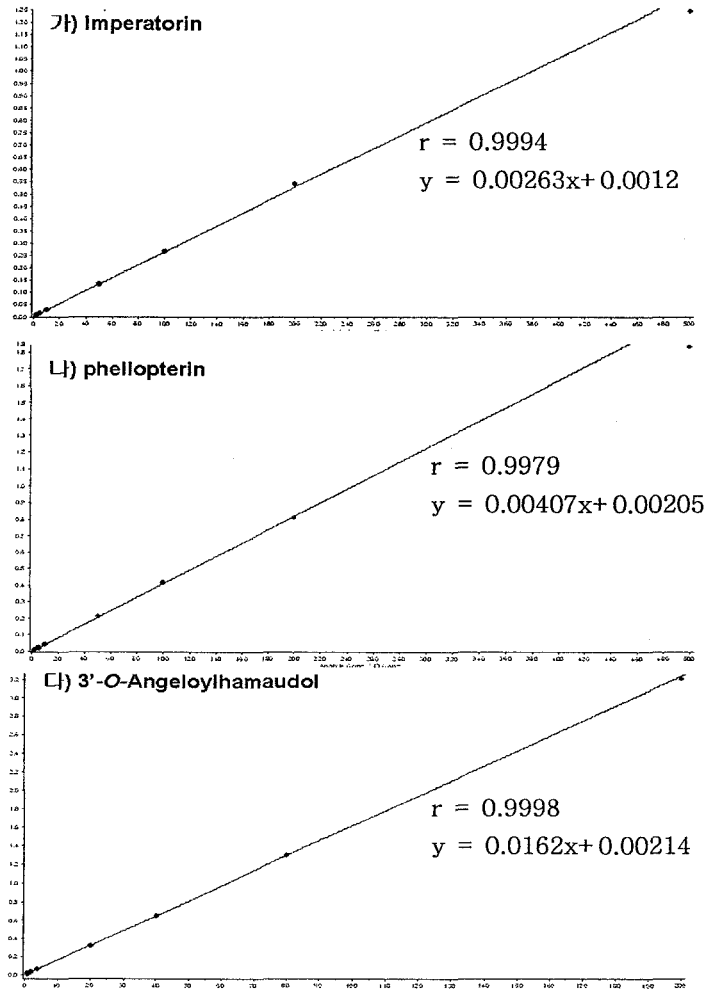


Figure 21. Calibration curves of 3 major bioactive compounds from Saposhnikovia Radix

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- 일내 정밀성은 방풍의 각 생리활성성분인 imperatorin, phellopterin과 3'-*O*-angeloylhamaudol과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며 그 값은 0.64 ~ 4.59 %, 1.69 ~ 5.49% 그리고 2.07 ~ 5.08% 내에 들었다. 일내 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기저의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 92.93 ~ 103.73%, 89.47 ~ 105.00 그리고 96.67 ~ 106.27% 이었다. (Table 11. 참조)

Table 11. Precision, accuracy, and limit of quantification (LOQ) of 3 major bioactive compounds from *Saposhnikovia Radix*

Compound	Conc. (ng/mL)	Precision (C.V. %, n = 3)		Accuracy (% , n = 3)		LOQ (ng/mL)
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
Imperatorin	2.5	3.66	7.84	92.93	97.20	2.5
	5	4.59	3.34	94.67	96.73	
	50	1.73	2.21	103.73	104.47	
	200	2.11	0.86	98.67	100.50	
	500	0.64	0.62	93.20	93.47	
Phellopterin	2.5	3.31	2.43	93.87	95.07	2.5
	5	2.72	5.82	104.40	103.13	
	50	3.07	2.04	105.00	107.33	
	200	5.49	2.55	97.33	102.00	
	500	1.69	0.13	89.47	91.27	
3'- <i>O</i> -angeloylhamaudol	1	4.99	0.56	97.57	103.33	1
	2	2.32	0.59	97.17	97.33	
	20	4.56	4.13	100.50	97.83	
	80	2.07	4.91	106.27	95.46	
	200	5.08	3.72	96.67	93.00	

제 4 절 시호의 생리활성성분 동시분석법 개발

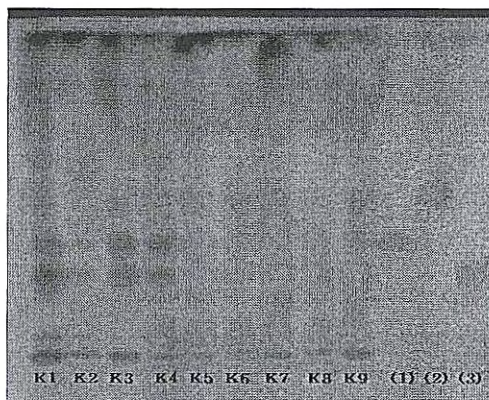
1. TLC 분석법 개발

가. 시호 추출물에 대한 순상(NP) TLC

- 순상 고정상에서는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D가 원활하게 분리되는 조건을 찾을 수 없었다.

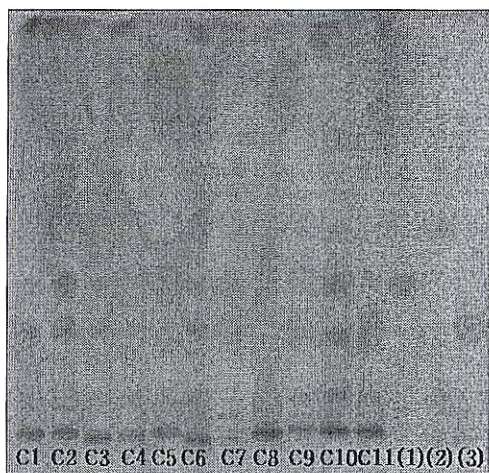
나. 시호 추출물에 대한 역상(RP) TLC

- 역상 고정상에서 전개용매가 methanol/water = 4/1 일 때 가장 좋은 분리도를 보였다. (Figure 22., Figure 23. 참조)



(1) saikosaponin A (2) saikosaponin C (3) saikosaponin D

Figure 22. Thin Layer Chromatography result of 9 *Bupleuri Radix* samples from Korea



(1) saikosaponin A (2) saikosaponin C (3) saikosaponin D

Figure 23. Thin Layer Chromatography result of 11 *Bupleuri Radix* samples from China

2. HPLC-ELSD 분석법의 개발

가. 3가지 칼럼을 이용하여 분리능을 비교하고 최적의 칼럼을 선정하였으며, 선정된 칼럼을 대상으로 기울기 용리로 최적의 분석조건을 확립하였다. (Table 12. 참조)

나. 비교대상 칼럼 : Hypersil GOLD C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm), Ascentis® Express C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm), Luna C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)

다. Ascentis Express C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm) 칼럼이 분리능 가장 우수하고, 총 분석시간도 가장 짧았다. (Figure 24., ~ Figure 26. 참조)

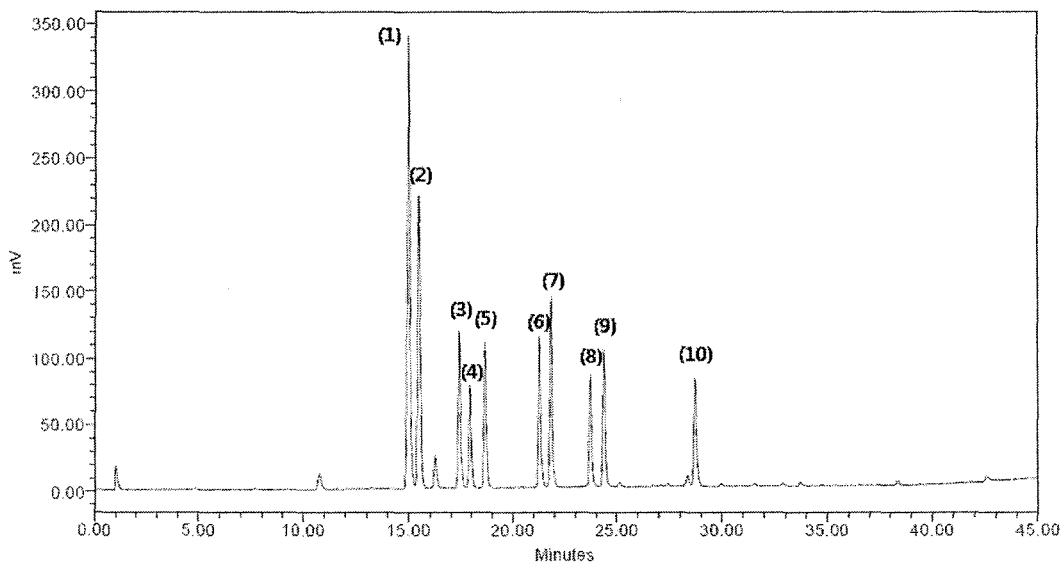


Figure 24. HPLC-ELSD chromatogram using Ascentis® Express C18 column

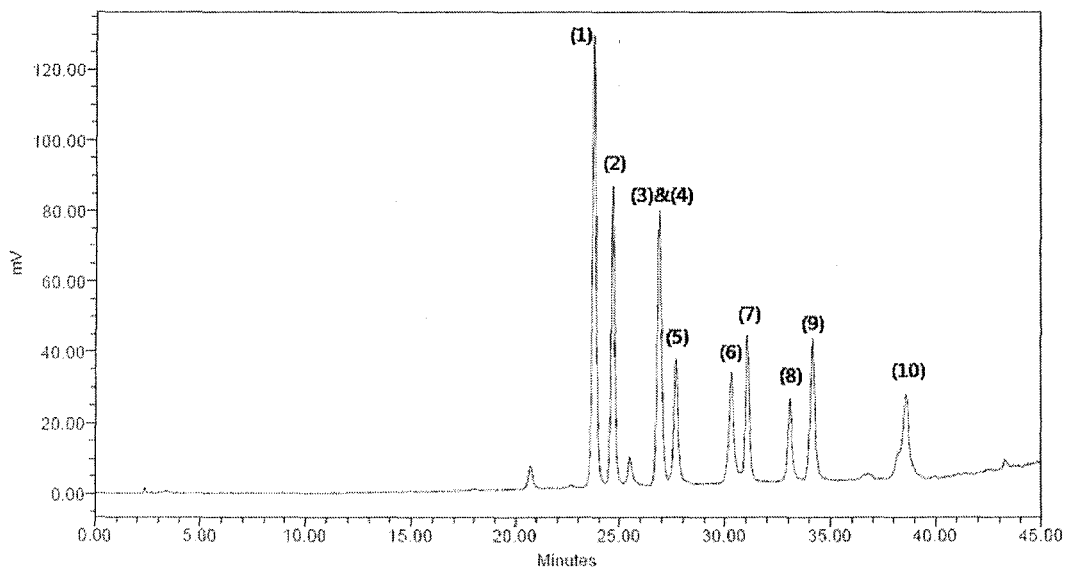


Figure 25. HPLC-ELSD chromatogram using Hypersil GOLD C18 column

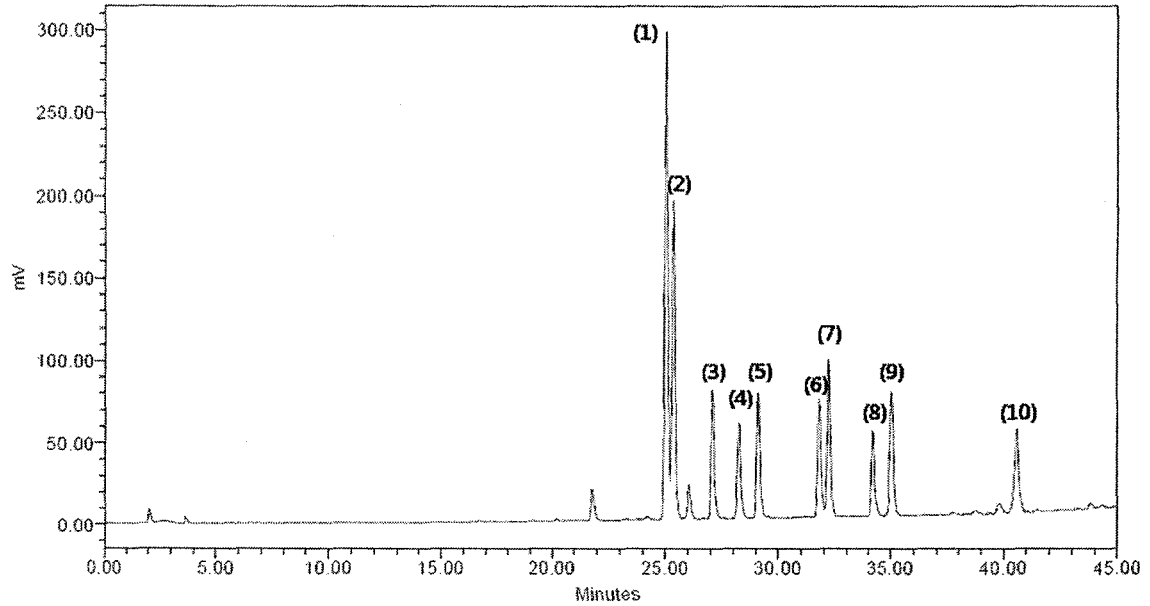


Figure 26. HPLC-ELSD chromatogram using Luna C18 column

(1) saikosaponin C (2) saikosaponin I (3) saikosaponin H (4) saikosaponin B₃ (5) saikosaponin B₄
 (6) saikosaponin A (7) saikosaponin B₂ (8) saikosaponin G (9) saikosaponin B₁ (10) saikosaponin D

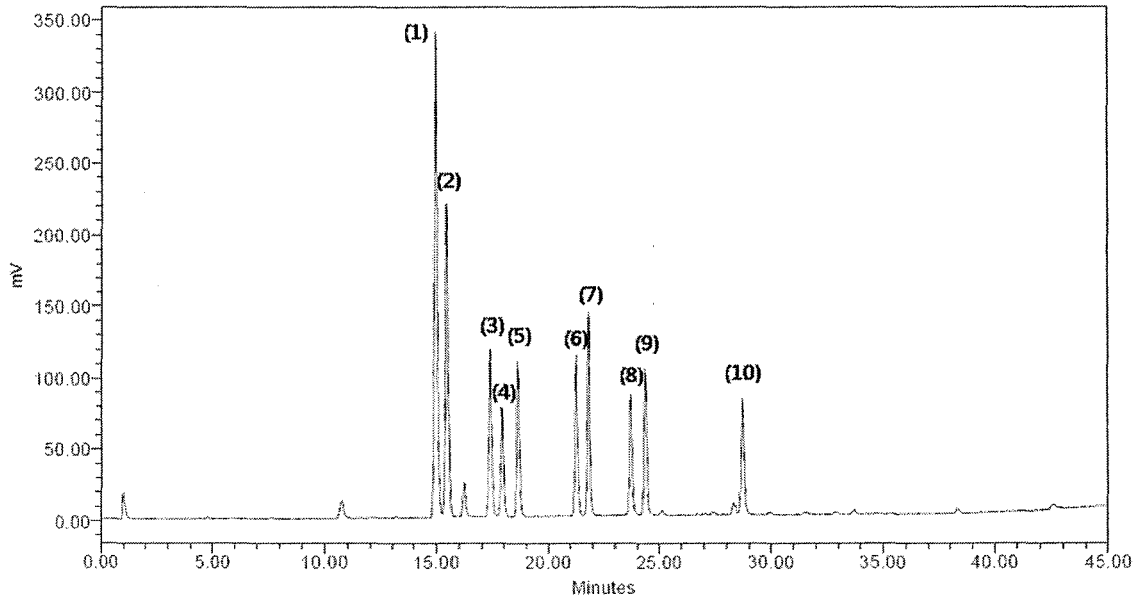
Table 12. Optimum conditions of HPLC-ELSD for *Bupleuri Radix*

Pump	PerkinElmer Series 200 pump		
Detector	Sedere SEDEX 75 ELSD Drift tube temp. - 50°C Gas pressure - 3.0 bar		
Column	Ascentis [®] Express C18 (100 × 4.6 mm, 2.7 μm)		
Guard Column	Security Guard C18 (4.0 × 3.0 mm)		
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water = 90/10, with 0.1% acetic acid (B) Acetonitrile/Water = 10/90, with 0.1% acetic acid		
Gradient profile	시간	Solvent A	Solvent B
	0	20	80
	5	20	80
	35	50	50
	45	90	10
	65	90	10
	65.1	20	80
	75	20	80
Injection volume	20 μL		
Column Temp.	27.5°C		

3. HPLC-ELSD 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 10 종류의 saponin계 성분이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다. (Figure 27. 참조)



(1) saikosaponin C (2) saikosaponin I (3) saikosaponin H (4) saikosaponin B₃ (5) saikosaponin B₄
 (6) saikosaponin A (7) saikosaponin B₂ (8) saikosaponin G (9) saikosaponin B₁ (10) saikosaponin D

Figure 27. HPLC-ELSD chromatogram of 10 saikosaponins

나. 직선성 (Linearity)

- 7 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin D, saikosaponin H) 에 대하여 5-100 µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였고, 1 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin I) 에 대하여 10-200 µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였고, 2 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin C, saikosaponin G)에 대하여 15-300µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.965 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Figure 28. 참조)

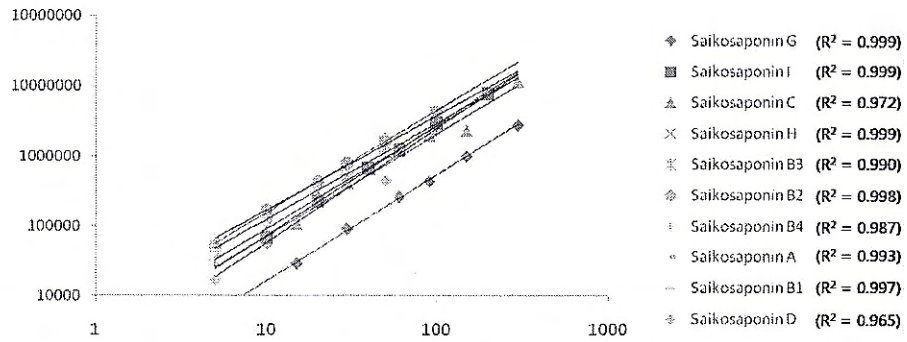


Figure 28. Log-Log Calibration curves of 10 saikosaponins

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5 가지 농도에 대하여 하루에 5 번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5 일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 그 값은 0.67-15.92% 와 1.53-14.84% 이었다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 그 값은 85.66-114.90% 와 92.12-110.41% 이었다. (Table 13. 참조)

Table 13. Intra-, inter day precision, accuracy, and limit of quantification(LOQ)

Compound	Conc. (ppm)	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)		LOQ (ppm)
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
Saikosaponin A	5	8.1976	3.0678	95.7524	105.1166	5
	10	3.0744	7.7753	102.6252	108.6021	
	20	3.8148	5.6528	102.6932	106.3442	
	50	3.1957	6.0127	102.5218	100.0634	
	100	3.6909	14.8369	96.3867	92.1221	
Saikosaponin B ₁	5	4.0062	2.0677	95.3745	100.7897	5
	10	2.4898	10.2815	101.7840	110.4087	
	20	2.1518	7.5514	98.7619	108.6132	
	50	4.8070	5.9721	94.5340	97.6451	
	100	1.9568	7.0756	91.6707	95.3082	
Saikosaponin B ₂	5	5.3871	2.5396	95.3799	103.9651	5
	10	2.8616	11.3831	95.1402	106.6811	
	20	0.9304	7.6949	98.1189	107.4892	
	50	4.8503	3.5605	97.7820	98.6320	
	100	1.3493	8.0840	92.3780	95.0567	
Saikosaponin B ₃	5	8.0328	5.1255	102.6755	101.5972	5
	10	4.2638	11.5839	95.5322	106.7503	
	20	6.1858	11.9416	96.2898	109.0439	
	50	6.7230	6.2521	89.8690	96.6111	
	100	1.7650	11.1991	85.6607	94.5768	
Saikosaponin B ₄	5	12.0323	11.6686	90.9670	105.5967	5
	10	3.0314	9.1923	104.2293	108.5301	
	20	11.6778	14.5378	92.1038	104.7043	
	50	11.5120	4.0155	95.1995	97.9040	
	100	6.1009	6.6749	93.9606	100.4123	
Saikosaponin C	15	14.3351	4.6258	89.8808	101.8379	15
	30	1.9064	6.2340	107.2781	108.4644	
	60	5.8235	10.0829	106.0614	108.1812	
	150	2.8435	7.1328	110.0727	101.4281	
	300	4.3325	7.7605	103.0804	104.9779	
Saikosaponin D	5	15.9193	12.2439	98.9123	98.0279	5
	10	0.6653	7.2617	114.8970	107.9990	
	20	14.8640	8.6611	103.4689	105.0748	
	50	7.0373	4.5184	109.5020	102.2661	
	100	10.3877	5.6316	102.6961	98.8664	
Saikosaponin G	15	3.2316	4.6948	94.6087	102.5145	15
	30	2.2728	8.9993	97.8408	105.2408	
	60	4.1299	7.9852	99.3559	105.6190	
	150	2.5440	1.5322	98.0086	98.0047	
	300	2.6928	6.4500	93.0065	96.1057	
Saikosaponin H	5	4.9986	6.5847	95.4167	102.7397	5
	10	1.0565	8.2187	96.0893	103.9254	
	20	3.5933	5.0504	96.0307	104.9813	
	50	3.0501	3.7856	97.8933	97.2168	
	100	2.1492	4.5282	93.7499	98.1544	
Saikosaponin I	10	5.7350	3.5457	97.7082	98.8243	10
	20	2.4640	8.6769	98.5753	104.5204	
	40	0.9489	5.7897	100.3985	107.0692	
	100	3.7857	3.1563	98.0194	97.8621	
	200	1.8890	6.4567	90.3446	96.1632	

라. 안정성 (Stability)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 각각을 50% acetonitrile로 희석하여 30 µg/mL의 농도가 되도록 한 혼합용액을 두 개의 폴리프로필렌 튜브에 4 mL 씩 취하여 하나는 실온에 두었고 하나는 4°C로 유지되는 냉장고에 두었다. 이를 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일 동안 실온, 4°C에서 보관한 표준액과 안정성시험을 수행하는 날 새로 조제한 표준액과의 면적비로 구했다. (Table 14., Figure 29. 참조)

Table 14. Result of stability test

Compound	온도(°C)	reference	1일	2일	5일	10일	20일	30일	평균	표준편차	R.S.D. (%)
Saikosaponin A	R.T.	100.00	96.60	99.70	93.38	77.64	73.95	90.28	88.59	10.47	11.81
	4°C	100.00	88.75	87.66	88.80	78.63	84.20	80.92	84.83	4.32	5.09
Saikosaponin B ₁	R.T.	100.00	100.46	105.23	86.68	77.07	75.88	86.65	88.66	12.00	13.53
	4°C	100.00	87.60	88.99	86.89	71.63	78.03	78.86	82.00	6.89	8.40
Saikosaponin B ₂	R.T.	100.00	101.79	106.10	95.87	80.34	80.34	91.21	92.61	10.77	11.63
	4°C	100.00	97.03	96.02	93.10	74.39	79.72	84.68	87.49	9.33	10.66
Saikosaponin B ₃	R.T.	100.00	110.37	115.77	105.85	90.39	89.26	108.22	103.31	10.95	10.60
	4°C	100.00	84.72	92.06	92.07	82.48	85.67	88.51	87.59	3.97	4.54
Saikosaponin B ₄	R.T.	100.00	105.34	108.67	128.19	99.68	105.12	132.11	113.18	13.51	11.94
	4°C	100.00	100.73	103.68	125.20	91.57	107.51	117.45	107.69	12.05	11.19
Saikosaponin C	R.T.	100.00	93.46	116.15	113.04	97.51	89.45	111.11	103.45	11.34	10.96
	4°C	100.00	89.05	92.71	103.25	90.62	93.66	99.69	94.83	5.50	5.80
Saikosaponin D	R.T.	100.00	107.03	106.06	102.35	84.87	80.73	88.88	94.99	11.53	12.14
	4°C	100.00	93.14	99.09	98.96	83.51	86.60	97.15	93.07	6.65	7.14
Saikosaponin G	R.T.	100.00	91.70	104.31	81.48	69.06	63.41	85.24	82.53	14.93	18.09
	4°C	100.00	94.96	93.97	76.85	72.04	85.75	76.61	83.36	9.69	11.62
Saikosaponin H	R.T.	100.00	110.41	119.31	109.08	84.63	85.84	102.72	102.00	14.03	13.76
	4°C	100.00	90.86	95.71	94.42	80.74	86.72	94.84	90.55	5.85	6.46
Saikosaponin I	R.T.	100.00	97.32	112.37	113.11	89.86	86.99	102.13	100.30	11.03	11.00
	4°C	100.00	93.14	96.14	117.12	86.48	93.54	96.68	97.18	10.42	10.72

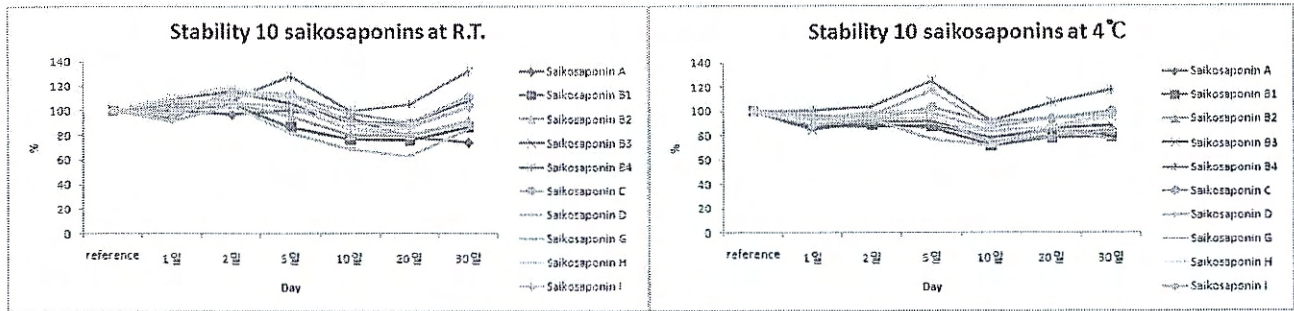


Figure 29. Result of stability test

마. 회수율 (Recovery)

- 회수율을 검토하기 위하여 표준품 첨가법을 사용하였다. 10 mL 용량 플라스크에 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL 농도의 saikosaponin A, saikosaponin D 표준액을 각각 1.0 mL 씩, 300 µg/mL, 600 µg/mL, 900 µg/mL 농도의 saikosaponin C 표준액을 1.0 mL 가한 후 70% MeOH로 표시선까지 정확하게 맞추었다. 여기에 균질하게 분말화한 시호 시료를 200 mg씩 정밀히 취하여 실온에서 40분 동안 초음파 추출한 후 membrane filter를 하였다. 여과액 20 µL를 HPLC에 주입하여 분석하고 표준품과의 농도비를 비교하여 회수율을 구하였다. (Table 15. 참조)

$$R\% = \frac{(\text{Amount from root sample spiked standard} - \text{Amount from root sample})}{\text{Amount from spiked standard}} \times 100$$

Table 15. Recovery of 3 major bioactive compounds from *Bupleuri Radix*.

Saikosaponin A		Saikosaponin C		Saikosaponin D	
Concentration	Recovery (n=3)	Concentration	Recovery (n=3)	Concentration	Recovery (n=3)
10 µg/mL	77.42%	30 µg/mL	122.90%	10 µg/mL	133.87%
30 µg/mL	98.64%	90 µg/mL	91.09%	30 µg/mL	148.04%

바. 완전성 (Robustness)

- 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time(RRT), theoretical plate number(N) 그리고 peak asymmetry(T)를 비교하여 평가하였다. 칼럼 온도는 30 ± 2.5°C의 3 포인트에서 각각 3 번 반복하였으며, 유속은 1 ± 0.1 mL/min 의 3 포인트에서 각각 3 번 반복하여 평가하였다. 또한 이동상에 첨가한 산의 조성을 0.05%, 0.1%, 0.2%의 3 포인트에서 각각 3 번 반복하여 평가하였으며, 칼럼을 Hypersil Gold C18 (4.6 × 250 mm, 5

μm), Ascentis Express C18 ($4.6 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$), Luna 5 μ C18 ($4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)로 바꾸며 각각 3 번 반복하여 완전성을 평가하였다. (Table 16. ~ Table 19. 참조)

Table 16. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin C	Flow rate	0.9 mL/min	4.13	1.10	15001.46	0.78
		1.0 mL/min	4.13	1.00	11172.41	0.82
		1.1 mL/min	12.17	0.99	11001.34	0.81
	Column Temperature	25°C	12.16	1.02	9000.31	1.11
		27.5°C	4.13	1.00	11172.41	0.82
		30°C	15.61	1.04	16451.69	1
	Mobile phase	0.05% acetic acid	9.38	1.01	11798.15	0.93
		0.1% acetic acid	4.13	1.00	11172.41	0.82
		0.2% acetic acid	23.07	1.00	10406.18	0.97
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	2.29	1.59	9683.07	1.06
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 μm	4.13	1.00	11172.41	0.82
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	6.56	1.67	50962.10	0.96
Saikosaponin I	Flow rate	0.9 mL/min	3.60	1.10	9661.45	0.96
		1.0 mL/min	6.04	1.00	7557.60	0.97
		1.1 mL/min	14.13	0.99	7246.28	0.92
	Column Temperature	25°C	8.53	1.02	7491.56	0.81
		27.5°C	6.04	1.00	7557.60	0.97
		30°C	17.60	1.03	8896.32	1.03
	Mobile phase	0.05% acetic acid	12.87	1.01	7863.43	1.33
		0.1% acetic acid	6.04	1.00	7557.60	0.97
		0.2% acetic acid	29.45	1.00	7921.74	0.94
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	3.92	1.60	12962.00	1.30
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 μm	6.04	1.00	7557.60	0.97
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	5.11	1.64	32622.40	1.83

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

Table 17. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin H	Flow rate	0.9 mL/min	3.83	1.08	17717.50	1.35
		1.0 mL/min	11.18	1.00	14787.50	1.58
		1.1 mL/min	18.73	0.99	17864.90	1.20
	Column Temperature	25°C	9.81	1.02	25010.56	1.19
		27.5°C	11.18	1.00	14787.50	1.58
		30°C	12.68	1.03	12905.77	1.15
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.96	1.00	15179.47	1.06
		0.1% acetic acid	11.18	1.00	14787.50	1.58
		0.2% acetic acid	24.12	1.00	13551.70	1.39
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	-	-	-	-
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	11.18	1.00	14787.50	1.58
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	7.73	1.56	35163.71	1.09
Saikosaponin B ₃	Flow rate	0.9 mL/min	1.60	1.08	12831.40	1.46
		1.0 mL/min	6.05	1.00	14071.40	1.33
		1.1 mL/min	12.65	0.99	11494.22	1.17
	Column Temperature	25°C	7.21	1.01	13677.65	1.05
		27.5°C	6.05	1.00	14071.40	1.33
		30°C	15.84	1.03	12136.97	1.23
	Mobile phase	0.05% acetic acid	12.30	1.00	13515.36	1.39
		0.1% acetic acid	6.05	1.00	14071.40	1.33
		0.2% acetic acid	14.67	1.00	12040.18	1.21
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	-	-	-	-
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	6.05	1.00	14071.40	1.33
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	9.14	1.58	18960.31	1.06
Saikosaponin B ₄	Flow rate	0.9 mL/min	2.01	1.08	17862.04	1.21
		1.0 mL/min	4.34	1.00	12526.28	1.14
		1.1 mL/min	15.85	0.99	15818.60	1.18
	Column Temperature	25°C	10.07	1.01	14607.43	1.10
		27.5°C	4.34	1.00	12526.28	1.14
		30°C	14.37	1.03	16107.62	1.53
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.43	1.00	16771.98	1.37
		0.1% acetic acid	4.34	1.00	12526.28	1.14
		0.2% acetic acid	17.11	1.00	14467.53	1.43
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	2.65	1.49	21248.44	0.92
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	4.34	1.00	12526.28	1.14
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	5.61	1.56	32921.70	1.48

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

Table 18. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin A	Flow rate	0.9 mL/min	4.68	1.07	28832.98	1.13
		1.0 mL/min	7.64	1.00	21631.52	1.53
		1.1 mL/min	17.35	0.99	18601.68	1.27
	Column Temperature	25°C	9.08	1.01	19932.30	1.17
		27.5°C	7.64	1.00	21631.52	1.53
		30°C	22.24	1.03	24031.11	1.02
	Mobile phase	0.05% acetic acid	10.36	1.00	21618.40	1.54
		0.1% acetic acid	7.64	1.00	21631.52	1.53
		0.2% acetic acid	27.12	1.00	19836.19	1.22
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	5.47	1.43	20611.77	1.15
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	7.64	1.00	21631.52	1.53
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	5.86	1.50	69393.86	1.12
Saikosaponin B ₂	Flow rate	0.9 mL/min	4.77	1.06	26185.20	0.96
		1.0 mL/min	6.23	1.00	23275.11	1.50
		1.1 mL/min	13.81	0.99	23670.37	1.13
	Column Temperature	25°C	9.92	1.01	25042.84	0.70
		27.5°C	6.23	1.00	23275.11	1.50
		30°C	7.27	1.03	26175.33	1.24
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.03	1.00	24650.41	1.28
		0.1% acetic acid	6.23	1.00	23275.11	1.50
		0.2% acetic acid	23.08	1.00	22567.04	1.11
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	2.63	1.43	24551.89	1.01
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	6.23	1.00	23275.11	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	9.59	1.48	51780.44	1.16
Saikosaponin G	Flow rate	0.9 mL/min	6.78	1.06	29146.30	1.58
		1.0 mL/min	7.28	1.00	23350.02	1.50
		1.1 mL/min	13.44	0.99	25000.28	1.49
	Column Temperature	25°C	5.47	1.01	26769.45	1.33
		27.5°C	7.28	1.00	23350.02	1.50
		30°C	9.94	1.02	27748.76	1.08
	Mobile phase	0.05% acetic acid	12.61	1.00	22947.13	2.00
		0.1% acetic acid	7.28	1.00	23350.02	1.50
		0.2% acetic acid	23.97	1.00	23498.78	1.74
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	2.95	1.40	22599.25	1.00
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	7.28	1.00	23350.02	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	11.44	1.44	32836.14	1.41

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

Table 19. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin B ₁	Flow rate	0.9 mL/min	2.14	1.06	21285.04	1.33
		1.0 mL/min	8.13	1.00	29758.38	1.50
		1.1 mL/min	12.41	0.99	24834.79	1.32
	Column Temperature	25°C	10.48	1.01	24700.26	1.33
		27.5°C	8.13	1.00	29758.38	1.50
		30°C	10.43	1.02	26271.15	1.33
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.20	1.00	30769.92	1.51
		0.1% acetic acid	8.13	1.00	29758.38	1.50
		0.2% acetic acid	20.72	1.00	21741.09	1.19
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	6.45	1.40	20205.09	1.01
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	8.13	1.00	29758.38	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	6.75	1.42	38203.45	1.17
Saikosaponin D	Flow rate	0.9 mL/min	2.31	1.05	35942.00	1.62
		1.0 mL/min	10.19	1.00	43080.45	1.50
		1.1 mL/min	8.41	0.99	36490.82	1.04
	Column Temperature	25°C	7.44	1.00	38083.39	1.57
		27.5°C	10.19	1.00	43080.45	1.50
		30°C	18.11	1.02	37482.11	1.00
	Mobile phase	0.05% acetic acid	13.21	0.88	35922.34	1.38
		0.1% acetic acid	10.19	1.00	43080.45	1.50
		0.2% acetic acid	26.37	1.00	41172.71	1.45
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	13.61	1.34	40365.38	0.80
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	10.19	1.00	43080.45	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	10.12	1.41	34324.19	0.79

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

4. 시호의 추출법 개발

가. 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법 중 초음파추출법에서 추출률이 가장 좋았다. (Table 20, Figure 30. 참조)

Table 20. Optimization of extraction method(peak area)

Sonication	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1836075	2108558	2341006	2095213.00	252729.89
Saikosaponin C	259951	321857	321881	301229.67	35748.38
Saikosaponin D	1529109	1699561	1875551	1701407.00	173228.38
환류	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1107105	1278194	1325888	1237062.33	115045.04
Saikosaponin C	124978	157429	164574	148993.67	21102.77
Saikosaponin D	848653	1009925	1085919	981499.00	121160.29
냉침	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	855892	667779	623805	715825.33	123277.86
Saikosaponin C	97349	57519	59811	71559.67	22363.60
Saikosaponin D	663364	456294	489828	536495.33	111143.49

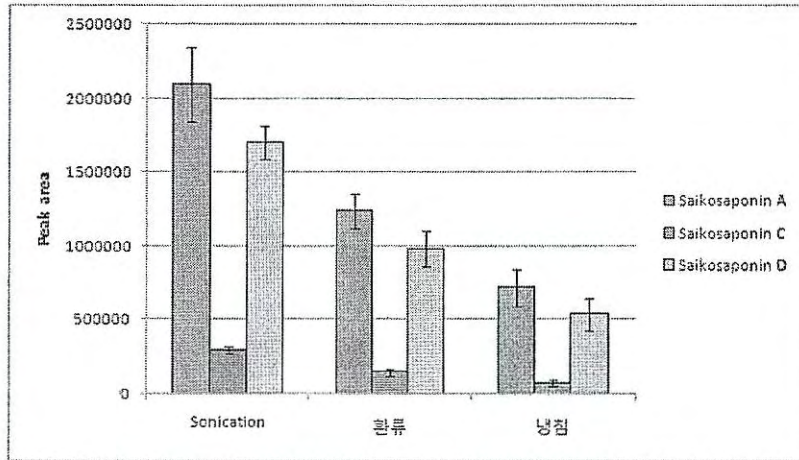


Figure 30. Optimization of extraction method

나. MeOH과 EtOH 중 MeOH을 추출용매로 하였을 때, 추출률이 가장 좋았다. (Table 21., Figure 31. 참조)

Table 21. Optimization of extraction solvent(peak area)

EtOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1097302	1415420	1380931	1297884.33	174563.25
Saikosaponin C	143945	188823	161996	164921.33	22581.56
Saikosaponin D	933239	1133997	1113587	1060274.33	110488.12
MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1836075	2108558	2341006	2095213.00	252729.89
Saikosaponin C	259951	321857	321881	301229.67	35748.38
Saikosaponin D	1529109	1699561	1875551	1701407.00	173228.38

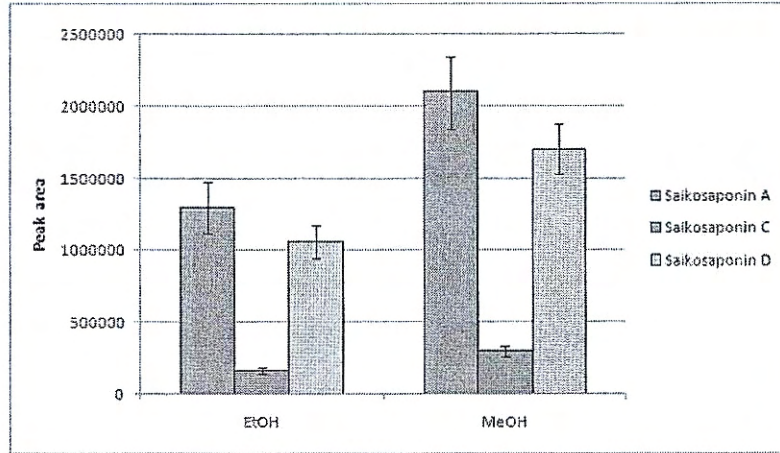


Figure 31. Optimization of extraction solvent

다. 100%, 70%, 50% MeOH 중 70% MeOH로 추출할 때 추출률이 가장 좋았다. (Table 22., Figure 32. 참조)

Table 22. Optimization of extraction solvent composition

100% MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1836075	2108558	2341006	2095213.00	252729.89
Saikosaponin C	259951	321857	321881	301229.6667	35748.38
Saikosaponin D	1529109	1699561	1875551	1701407.00	173228.38
70% MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	2373664	2512827	2148103	2344864.67	184059.64
Saikosaponin C	389316	414822	334027	379388.33	41302.26
Saikosaponin D	1586380	1613849	1044777	1415002.00	320918.29
50% MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	2069415	2322066	2251133	2214204.67	130310.81
Saikosaponin C	339836	411377	374993	375402.00	35772.25
Saikosaponin D	917990	1063772	1041469	1007743.67	78524.81

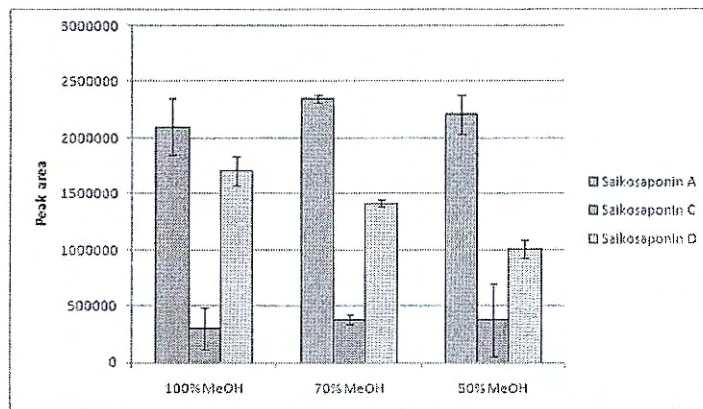


Figure 32. Optimization of extraction solvent composition

라. 추출시간 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분 중 40분 추출에서 추출률이 가장 좋았다.
(Table 23., Figure33. 참조)

Table 23. Optimization of extraction time

추출시간	Saikosaponin A	Saikosaponin C	Saikosaponin D
10분	922355	118941	709978
20분	2164479	301049	1582723
30분	2365567	361206	1832392
40분	2684734	396746	1876744
50분	2411879	412831	1741059
60분	2373664	389316	1586380
70분	2344235	396691	1413802

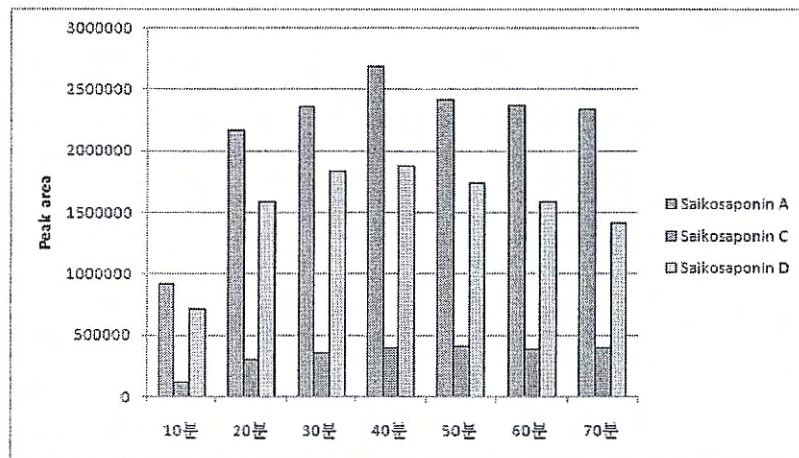


Figure 33. Optimization of extraction time

5. HPLC-ELSD 분석법을 이용한 시호 성분의 함량 분석

- 국산 9 종, 중국산 11 종의 시호를 시중에서 구입하거나 제 1 세부 기관으로부터 제공받아 추출한 후, 확립한 HPLC-ELSD 분석법에 적용하여 시호 생리활성성분의 함량을 구하였다. (Figure 34. ~ Figure 54. 참조, Table 24. 참조)
- 대한약전 제 9개정에서 시호는 “이 약은 정량할 때 사이코사포닌 a로서 0.3% 이상을 함유한다.”로 규정하고 있어, 본 연구에서의 함량결과로 판단하면 20개의 시호 시료 중 5개만 약전 규정에 적합한 결과로 나타나, DNA 종감별 결과와는 다소 차이가 있다.
- 이는 약전의 정량법과 본 연구과제에서 최적화한 분석법 사이에, 아래와 같이 전처리조건과 분석조건이 차이가 존재하고 있어, 함량 결과에 많은 영향을 줄 것으로 판단된다. 특히, 추출용매와 용매 부피, 추출시간 등이 차이가 많이 있으므로, 이에 따른 추출효율에서 크게 영향을 받을 것으로 생각

된다.

전처리조건	약전의 정량법	본 연구과제의 전처리법
채취량	0.5 g	0.2 g
추출용매	수산화암모늄 · 메탄올혼합액(1→20)	70% MeOH
용매량	50 mL	10 mL
추출방법	초음파추출	초음파추출
추출시간	2시간	40분
HPLC 분석 조건	약전의 정량법	본 연구과제의 전처리법
이동상 조성	ACN/H ₂ O = 35/65	ACN/H ₂ O (0.1% HAc 포함)
이동상 용리	등용매 용리	기울기 용리
검출기	자외부 흡광광도계 (203 nm)	증기화광산란검출기 (ELSD)
유량	0.8 mL/min	1.0 mL/min

- 따라서, 함량기준의 변경에 대한 결정은 현 상황에서 할 수 없으며, 2009년도에 수행할 “한약제 생리 활성성분 모니터링” 연구 사업에서 80여 종 이상의 시호 시료를 수집하고 함량을 분석하여 통계적으로 처리한 후, 그 연구결과에 따라 함량기준 변경여부를 판단해야 한다고 생각한다.

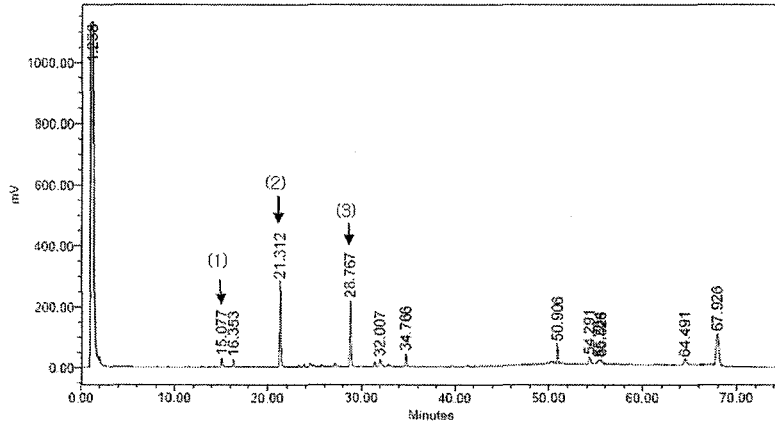


Figure 34. HPLC-ELSD chromatogram of K1

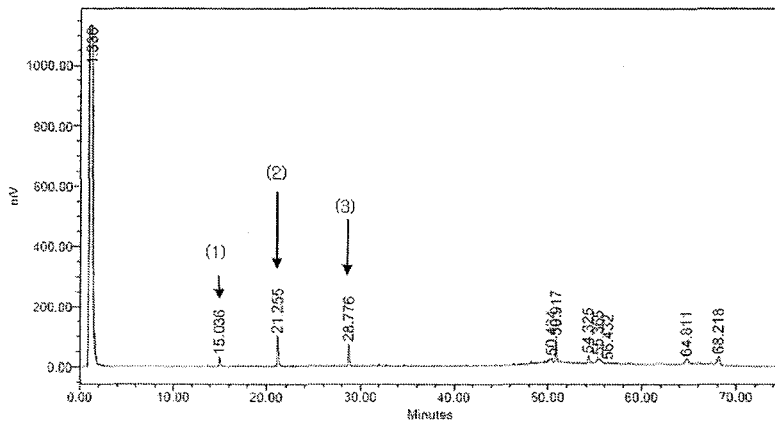


Figure 35. HPLC-ELSD chromatogram of K2

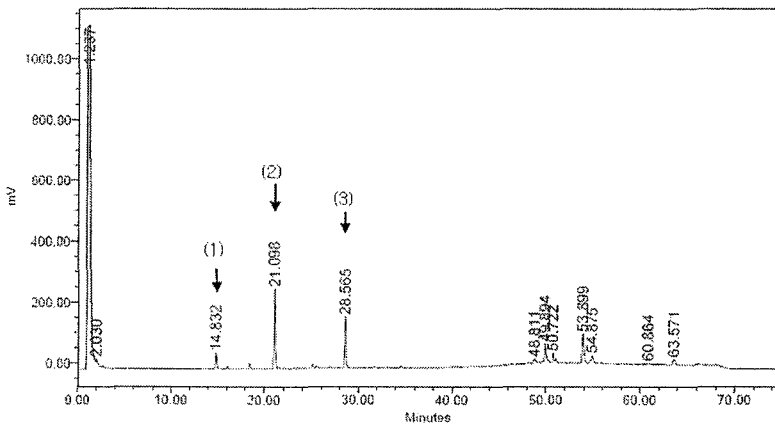


Figure 36. HPLC-ELSD chromatogram of K3

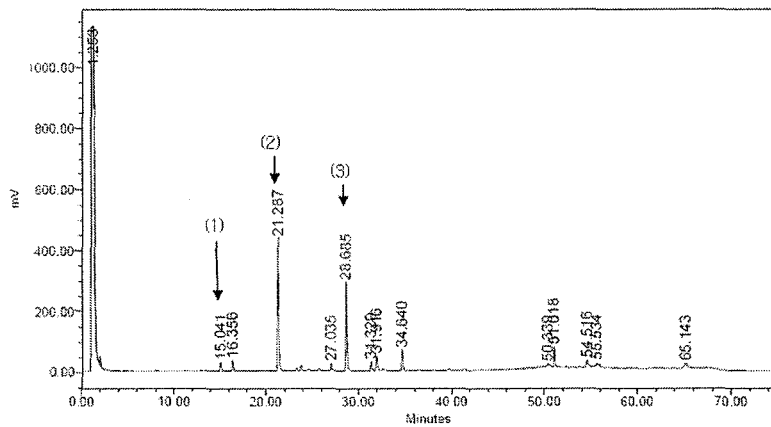


Figure 37. HPLC-ELSD chromatogram of K4

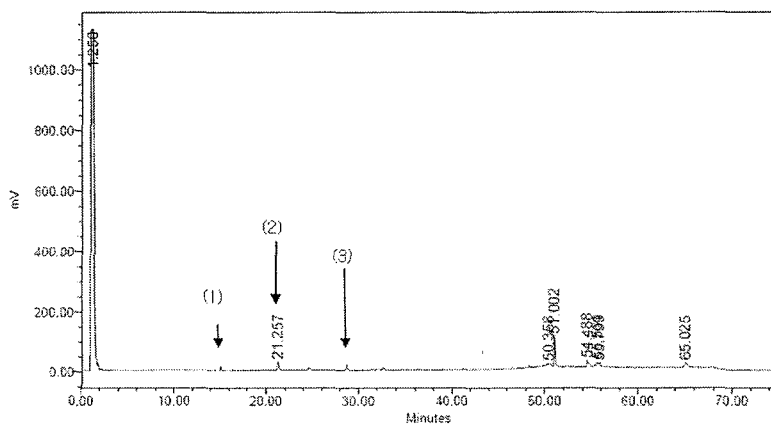


Figure 38. HPLC-ELSD chromatogram of K5

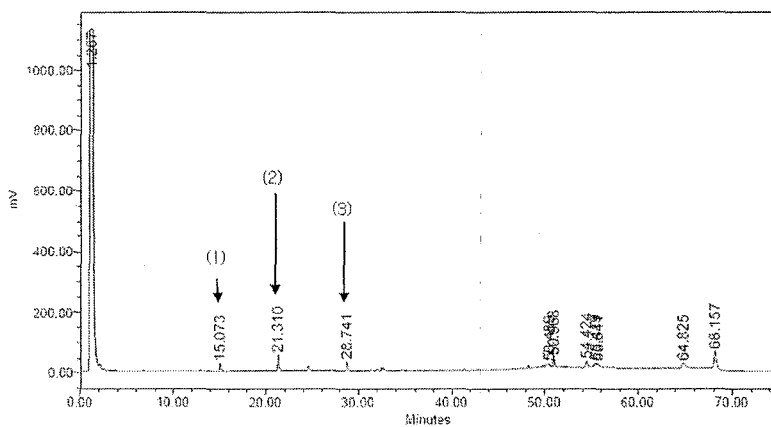


Figure 39. HPLC-ELSD chromatogram of K6

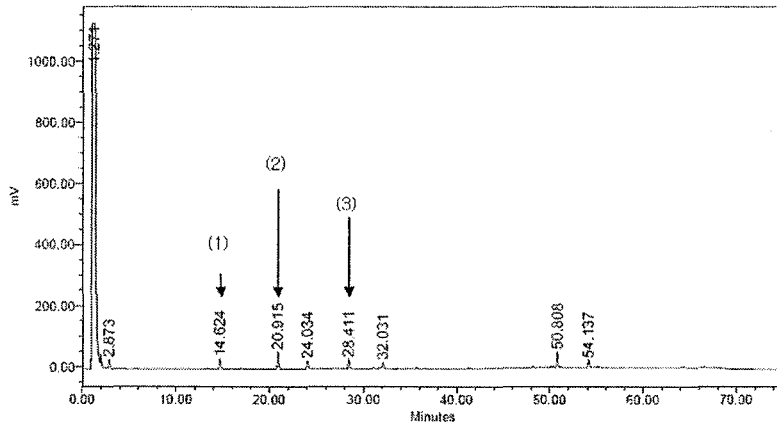


Figure 40. HPLC-ELSD chromatogram of K7

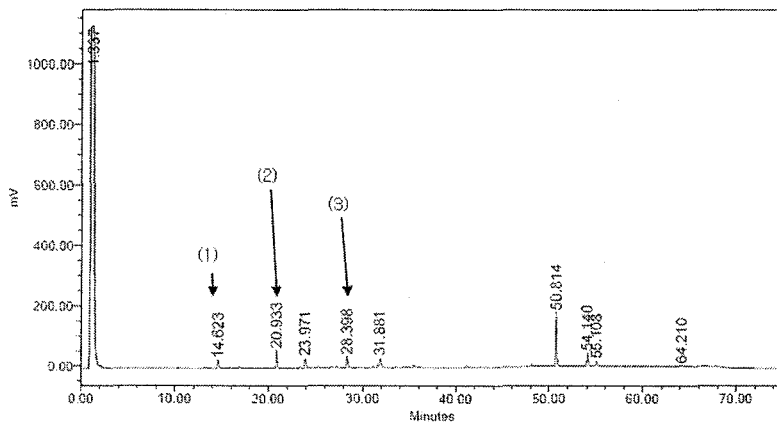


Figure 41. HPLC-ELSD chromatogram of K8

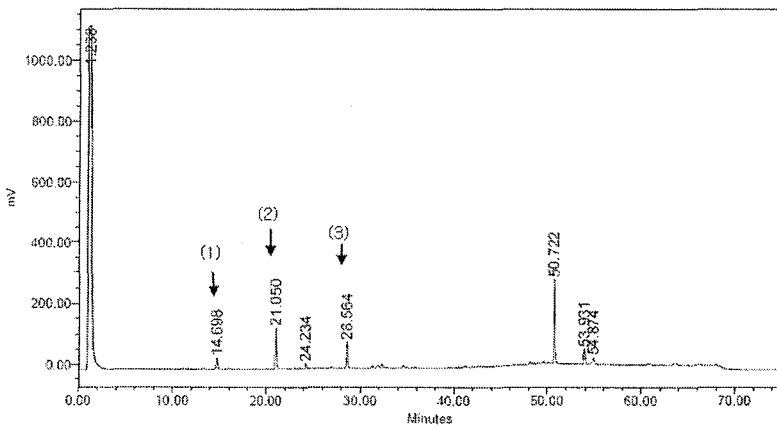


Figure 42. HPLC-ELSD chromatogram of K9

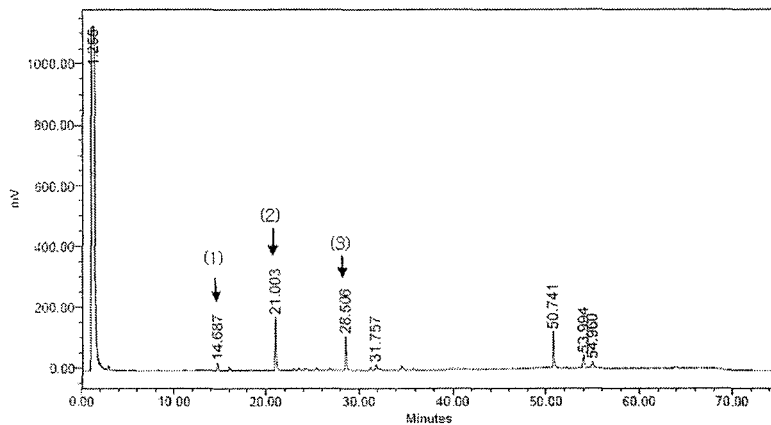


Figure 43. HPLC-ELSD chromatogram of C1

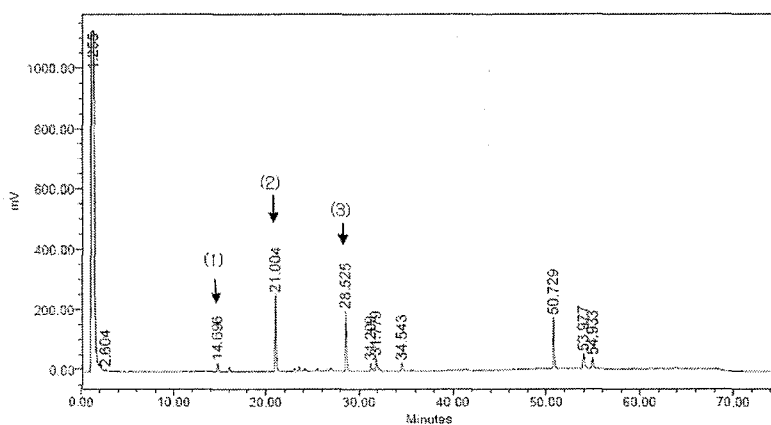


Figure 44. HPLC-ELSD chromatogram of C2

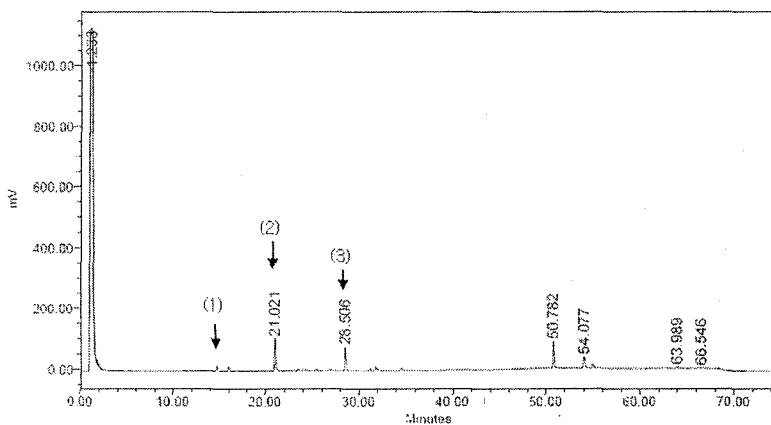


Figure 45. HPLC-ELSD chromatogram of C3

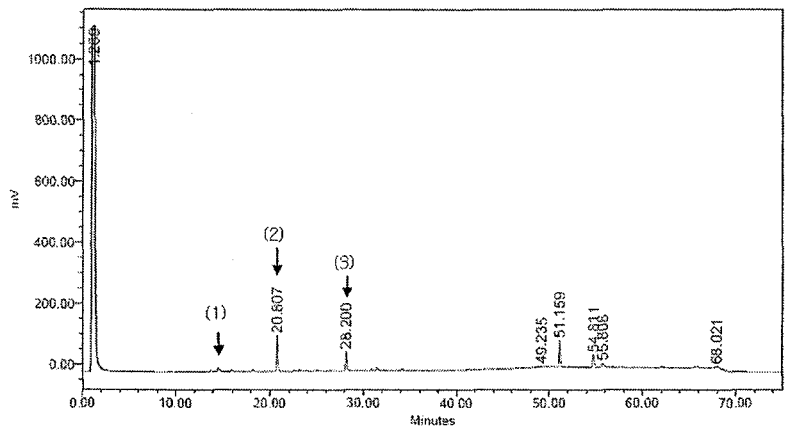


Figure 46. HPLC-ELSD chromatogram of C4

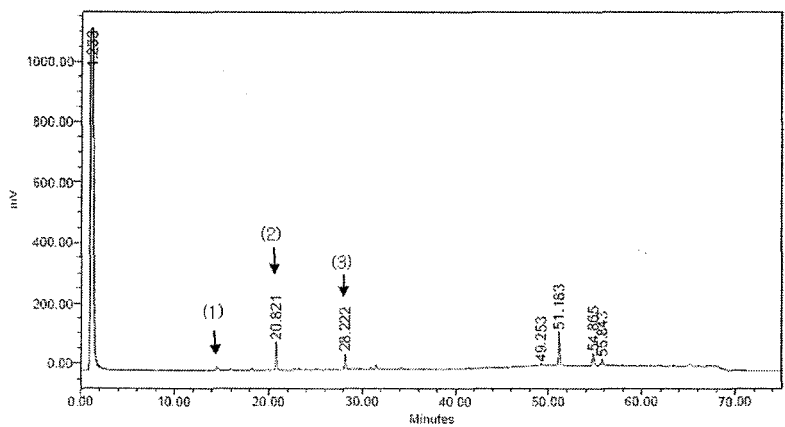


Figure 47. HPLC-ELSD chromatogram of C5

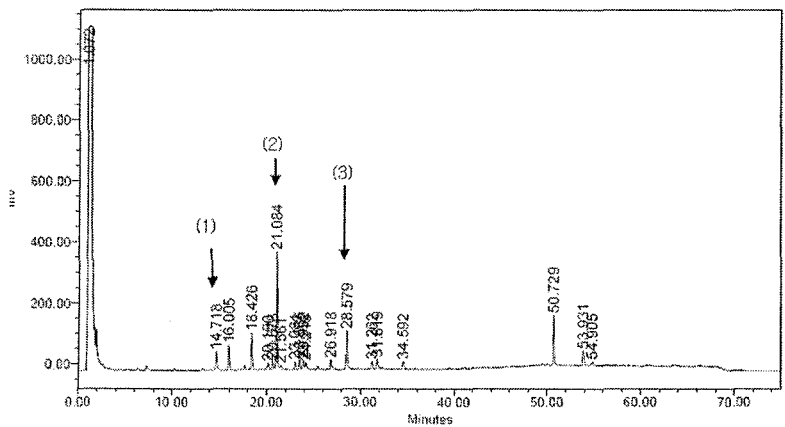


Figure 48. HPLC-ELSD chromatogram of C6

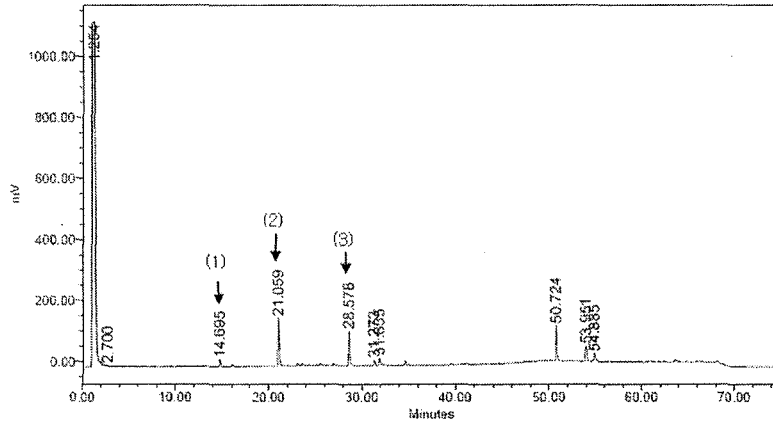


Figure 49. HPLC-ELSD chromatogram of C7

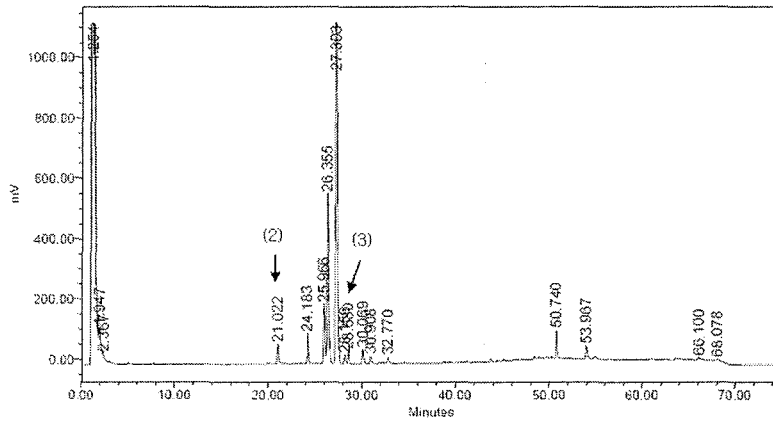


Figure 50. HPLC-ELSD chromatogram of C8

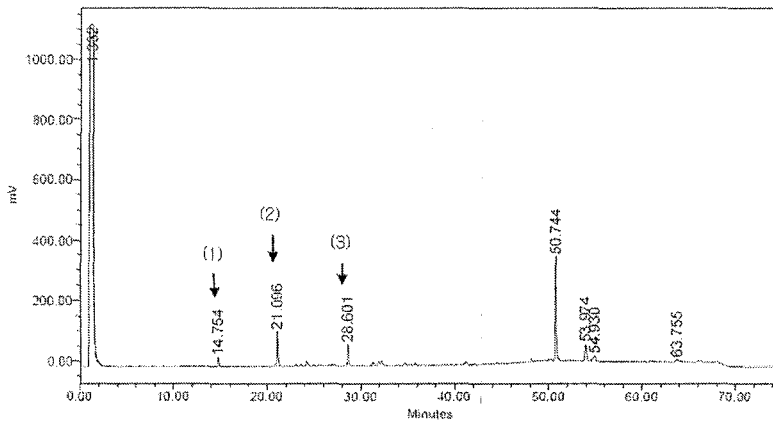


Figure 51. HPLC-ELSD chromatogram of C9

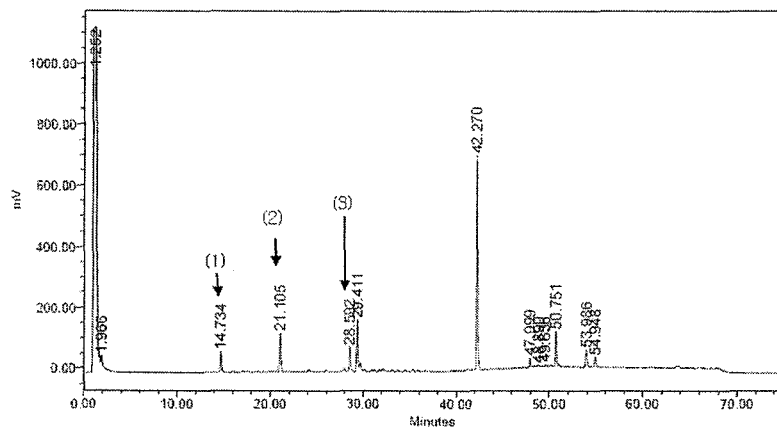


Figure 52. HPLC-ELSD chromatogram of C10

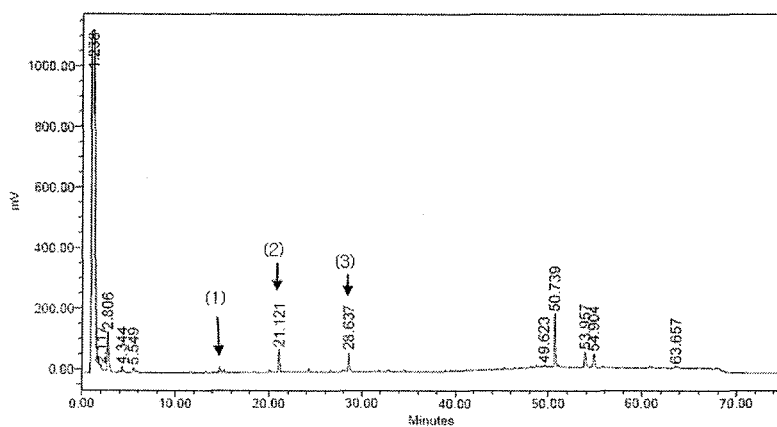
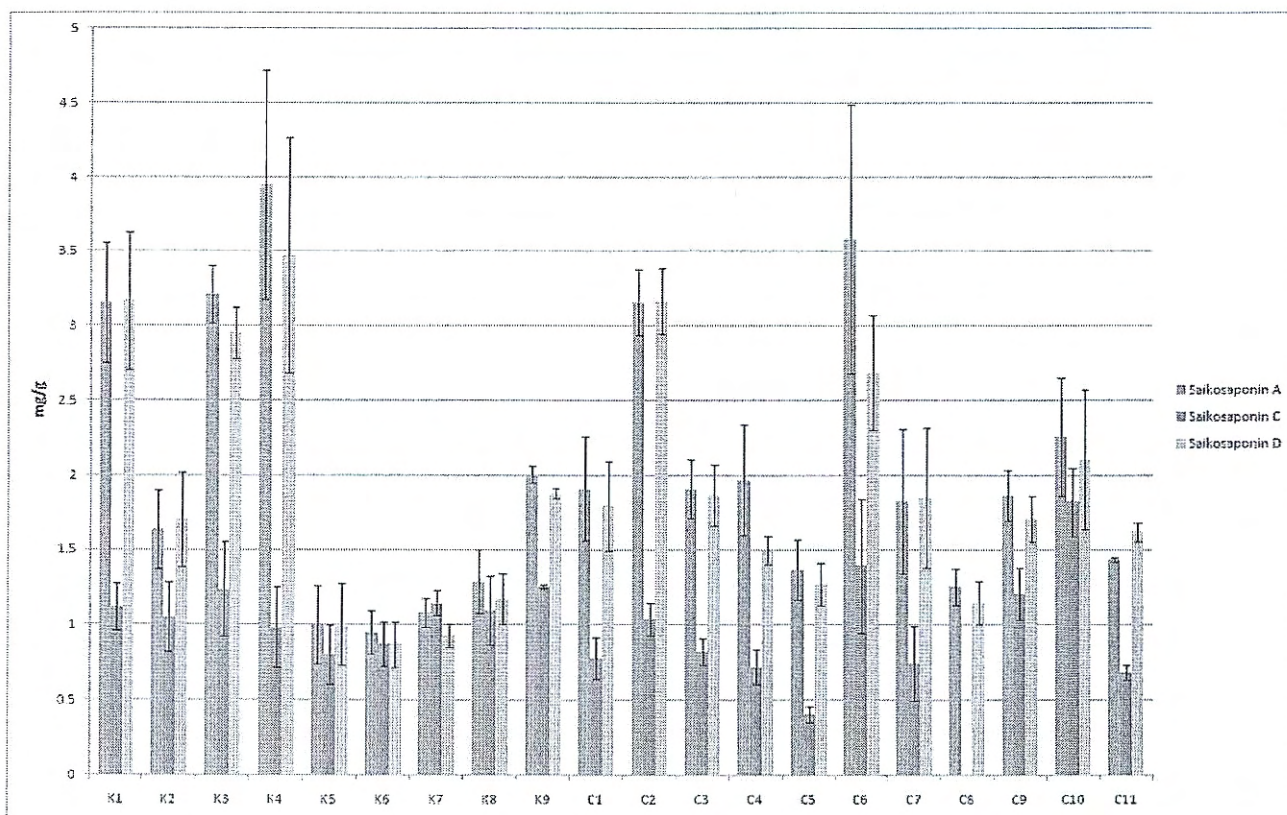


Figure 53. HPLC-ELSD chromatogram of C11

Table 24. Content of 20 *Bupleuri Radix* samples (mg/g)

	Saikosaponin A	Saikosaponin C	Saikosaponin D
K1	3.16 ± 0.41	1.12 ± 0.16	3.17 ± 0.46
K2	1.64 ± 0.27	1.05 ± 0.23	1.70 ± 0.31
K3	3.21 ± 0.19	1.24 ± 0.32	2.95 ± 0.17
K4	3.95 ± 0.77	0.98 ± 0.27	3.47 ± 0.79
K5	1.00 ± 0.26	0.80 ± 0.20	1.01 ± 0.27
K6	0.95 ± 0.14	0.87 ± 0.15	0.87 ± 0.15
K7	1.08 ± 0.10	1.15 ± 0.08	0.93 ± 0.08
K8	1.29 ± 0.21	1.10 ± 0.24	1.17 ± 0.17
K9	2.01 ± 0.06	1.26 ± 0.01	1.88 ± 0.04
C1	1.91 ± 0.35	0.78 ± 0.14	1.80 ± 0.30
C2	3.16 ± 0.22	1.04 ± 0.11	3.17 ± 0.22
C3	1.91 ± 0.20	0.82 ± 0.09	1.87 ± 0.21
C4	1.97 ± 0.37	0.72 ± 0.12	1.50 ± 0.09
C5	1.37 ± 0.20	0.41 ± 0.05	1.27 ± 0.14
C6	3.59 ± 0.90	1.40 ± 0.45	2.69 ± 0.39
C7	1.83 ± 0.48	0.74 ± 0.25	1.85 ± 0.47
C8	1.26 ± 0.12	0	1.15 ± 0.14
C9	1.86 ± 0.17	1.21 ± 0.17	1.71 ± 0.15
C10	2.26 ± 0.40	1.82 ± 0.23	2.11 ± 0.47
C11	1.43 ± 0.02	0.68 ± 0.05	1.62 ± 0.06

Figure 54. Contents of 20 *Bupleuri Radix* samples

6. 시호의 HPLC-ELSD 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. HPLC-ELSD를 통한 시호의 함량분석에서 구하여진 HPLC-ELSD 크로마토그램으로 산지별 기원별 패턴분석을 하였다.

나. 시호의 세 가지 주 생리활성성분 피크의 면적을 변수로 하였으며 이를 군집 분석 (Cluster Analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)에 적용하였다. (Figure 55 ~ Figure 57. 참조) 또한 시호의 아홉 가지 생리활성성분의 피크의 면적을 변수로 하여 마찬가지로 군집 분석과 주성분 분석을 하였다. (Figure 58., Figure 59. 참조)

다. 한국산과 중국산 시호를 구분하기 위하여 시호의 주요 saikosaponin인 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용하여 3D-plotting을 실시하였고, saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용하여 패턴분석을 실시하였으며, 전체적인 주성분 9 종을 선정하여 패턴분석을 실시하였으나, 한국산과 중국산 시호의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

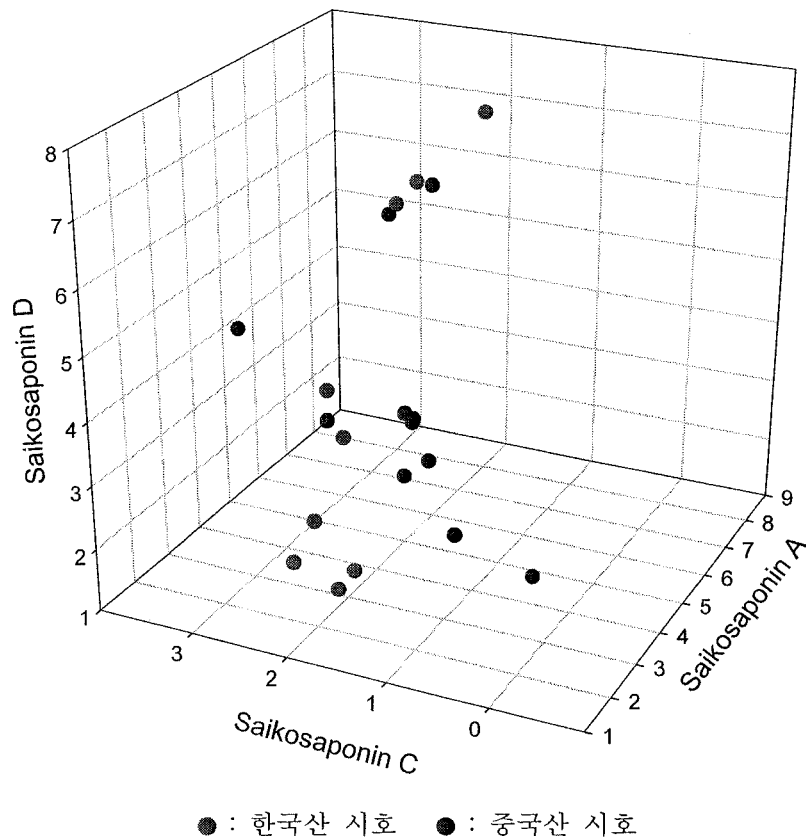


Figure 55. 3D-plotting of 20 *Bupleuri Radix* samples with 3 major saikosaponins

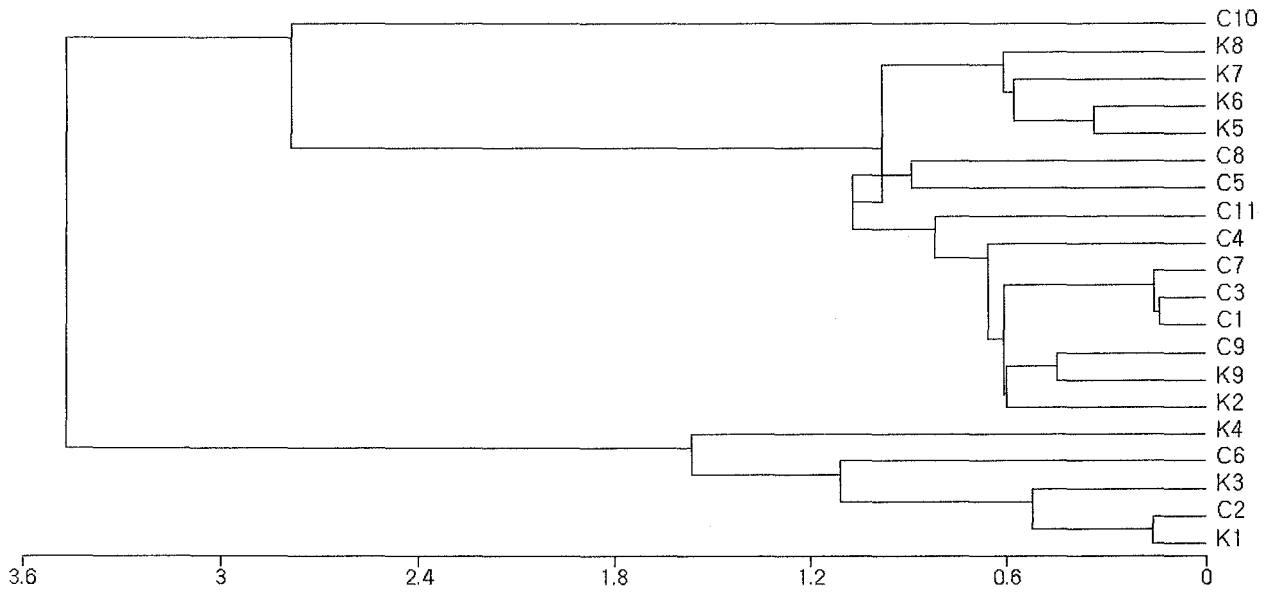


Figure 56. Cluster analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 3 major saikosaponins

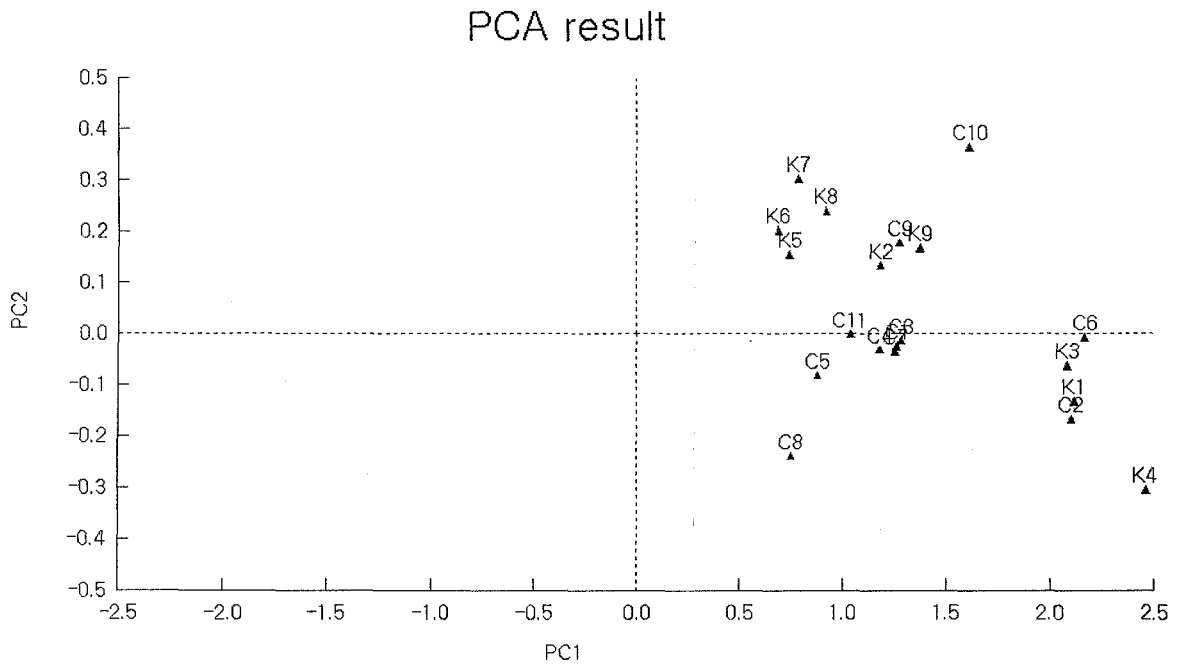


Figure 57. Principle component analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 3 major saikosaponins

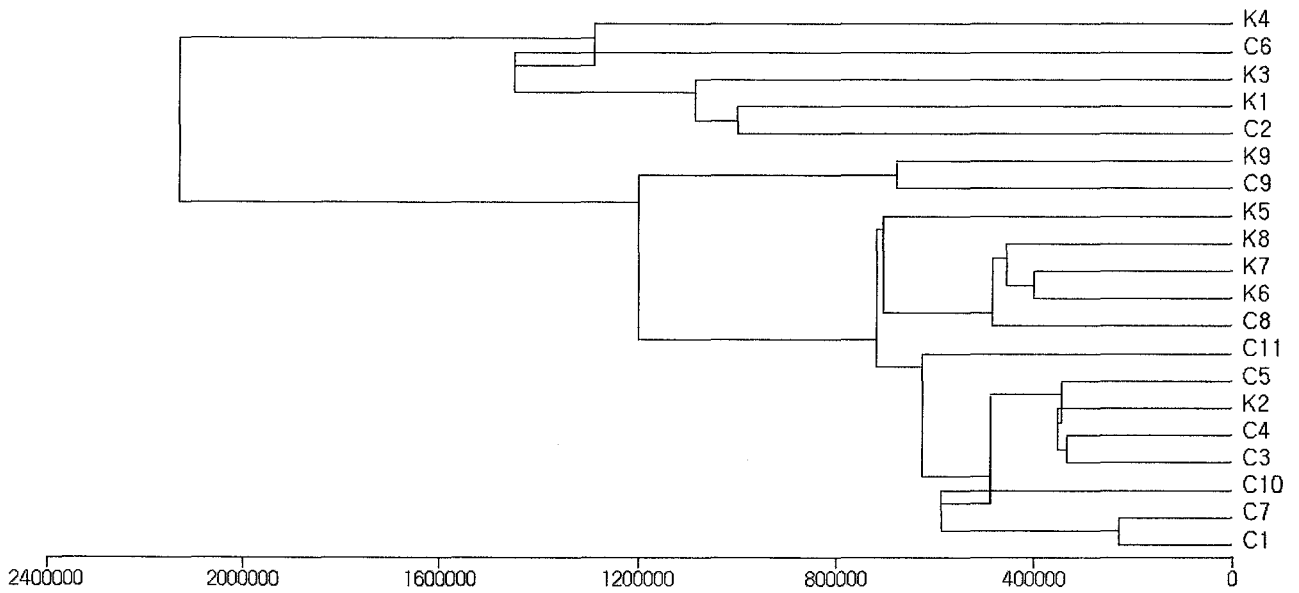


Figure 58. Cluster analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 9 major components

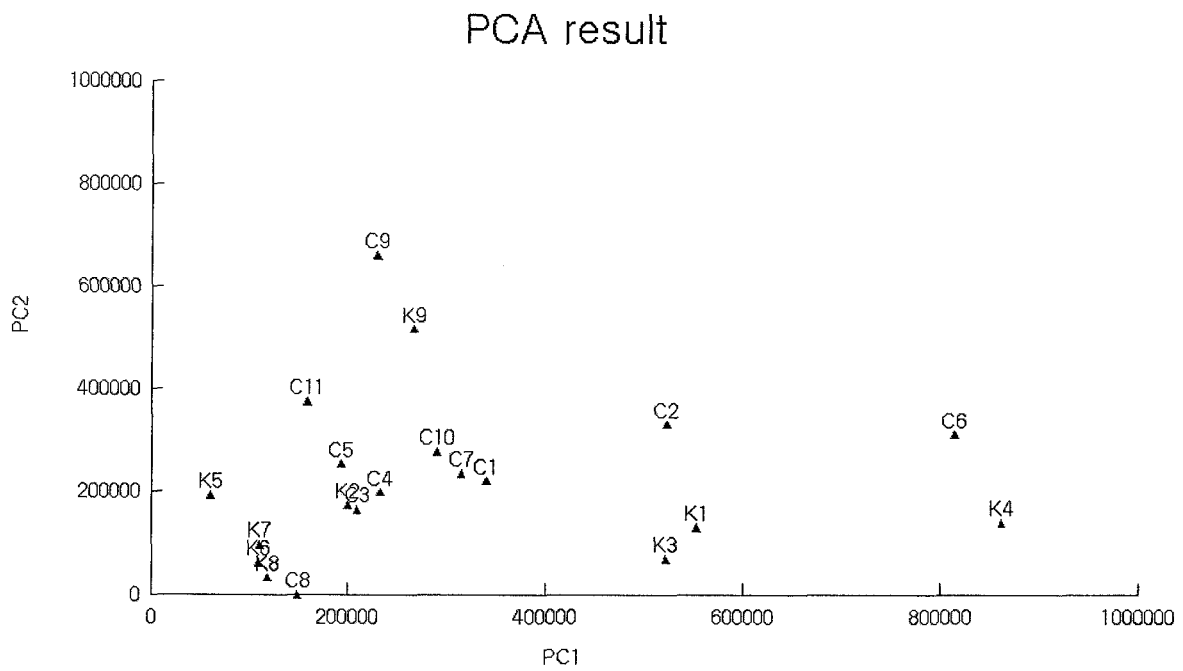


Figure 59. Principle component analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 9 major components

7. 시호의 DNA 종감별 결과와 HPLC 분석 결과의 비교

가. 시호 동정시료의 ITS 부위 염기서열 분석 결과, 6개 시료(K1, K4, C1, C2, C6, C7)는 북시호(B.

chinense)로 확인되었으며, 11개 시료(K2, K3, K5, K6, K7, K8, K9, C3, C4, C5, C9)는 시호(*B. falcatum*), 그 외 C8은 남시호(*B. sibiricum*), C10, C11은 죽시호(*B. longiradiatum*)로 확인되었다.

- 나. HPLC를 이용한 함량분석 결과에서는 DNA 종감별에서 북시호로 동정된 K1, K4, C1, C2, C6, C7 시료의 뚜렷한 패턴 변화를 발견할 수 없었으나, 다른 시료에 비하여 분석시간 30-36분 이내에 3개의 피크가 관찰된다는 특징을 발견할 수 있다. 하지만 이러한 경향은 C1에서 매우 약하게 보이며 (거의 검출되지 않음) 다른 시료와 비교하여 뚜렷하지 않아, 북시호의 화학분석 특징으로 단정하기엔 어려움이 있다.
- 다. HPLC를 이용한 함량분석 내용에서 북시호로 확인된 K1, K4, C2, C6 시료는 주요 사포닌인 saikosaponin A, C, D의 함량이 매우 높았다. 하지만 역시 북시호로 확인된 C1, C7 시료에서는 다른 시료와 주요 성분의 함량차이가 크지 않았다.
- 라. HPLC 크로마토그램의 성분 피크 데이터를 이용한 군집분석과 주성분 분석에서 K1, K4, C2, C6 시료가 다른 시료와 뚜렷하게 분류되는 경향을 확인할 수 있었다. 하지만 C1과 C7 시료는 많은 차이가 있었다. 오히려 K3 시료가 군집분석과 주성분 분석에서 한 그룹으로 분류되는 것을 확인할 수 있었으나, HPLC 크로마토그램에서는 30-36분 사이의 3개의 피크가 관찰되지 않아 종구별과의 일관된 상관성이 있지는 않았다.
- 마. HPLC-ELSD를 통한 시호의 함량분석에서 구하여진 HPLC-ELSD 크로마토그램으로 산지별 기원별 패턴분석을 위해 시호의 아홉 가지 생리활성성분의 피크의 면적을 변수로 하여 군집 분석(Cluster Analysis)과 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)에 적용하였을 때, 시호의 주요 saikosaponin인 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용한 패턴분석에서 한국산과 중국산 시호의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.
- 바. 결론적으로, 수집한 시호의 종류는 시호(*B. falcatum*), 북시호(*B. chinense*), 남시호(*B. sibiricum*), 죽시호(*B. longiradiatum*)로 확인이 되었다. 그리고 우리나라 시호는 대부분 시호(*B. falcatum*)이었으며, 중국산 시호는 북시호(*B. chinense*)와 시호(*B. falcatum*)가 대부분이었다. 성분분석을 통한 국산 시호와 중국산 시호의 구분을 위해서는 향후 이에 대한 연구가 추가로 진행되어야 할 것이다.

8. LC-MS 분석법의 개발

- 가. 시호의 생리활성 성분의 극성에 따라 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 ESI (electrospray ionization)를 선택하였다. 또

한 (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교하여 더 감도가 좋은 (-) ion mode를 선택하였다.

- 나. LC-MS/MS 분석 시 MRM(multiple reaction monitoring) mode로 분석하며, 이 때 각 성분별로 collision cell에서 강도를 조절하여 product ion의 response나 specificity를 고려하며, 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다. 그러나 시호사포닌의 구조적 특성상 collision이 잘 일어나지 않았고, 고농도범위(500 - 20000 ng/mL)에서 분석을 수행하려 하였으나, 이러한 고농도범위에서는 Mass spectrometer의 intensity가 포화되는 경향을 보여 정량을 할 수 없었다. 따라서 시호사포닌은 SIM(selected ion monitoring) mode로 분석하기로 하였다. (Table 25. 참조)
- 다. 내부표준물질을 포함하여 대상 성분 모두 $[M-H]^-$ ion을 선정하였으며, 서로 다른 ion이 검출되었다. 내부표준물질의 질량대하전비는 1108이었고 saikosaponin C, H, I의 질량대하전비는 925.8, saikosaponin B₃, B₄의 질량대하전비는 811.6, saikosaponin A, B₁, B₂, G, D의 질량대하전비는 779.6이었다.

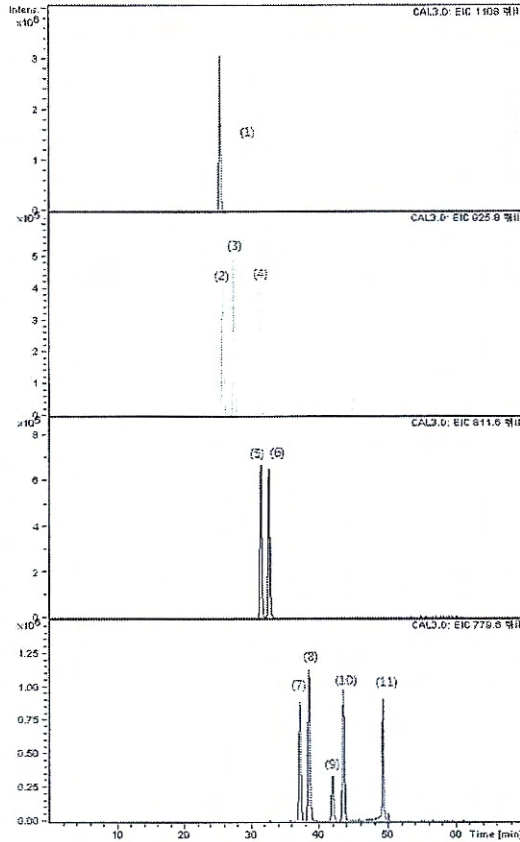
Table 25. Optimum LC-MS conditions for 10 saikosaponins

Pump	Agilent 1100 series G1312A		
Detector	Agilent 1100 series LC/MSD Trap		
Column	Hypersil GOLD C18 (150 × 2.1 mm, 3 μm)		
Guard Column	Security Guard C18 (4.0 × 3.0 mm)		
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water = 90/10, with 0.1% formic acid (B) Acetonitrile/Water = 10/90, with 0.1% formic acid		
Gradient profile	시간	Solvent A	Solvent B
	0	20	80
	5	20	80
	35	50	50
	45	90	10
	65	90	10
	65.1	20	80
	75	20	80
Injection volume	10 μL		
Column Temp.	27.5℃		
MS condition	Nebulizer : 35 psi Dry Gas : 8 L/min Dry Temp. : 350 ℃		

9. LC-MS 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 10 종류의 saponin계 성분이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다. (Figure 60. 참조)



(1) Internal standard(Ginsenoside R_{b1}) (2) saikosaponin C (3) saikosaponin I (4) saikosaponin H (5) saikosaponin B₃
 (6) saikosaponin B₄ (7) saikosaponin A (8) saikosaponin B₂ (9) saikosaponin G (10) saikosaponin B₁ (11) saikosaponin D

Figure 60. HPLC-MS chromatogram of 10 saikosaponins

나. 직선성 (Linearity)

- 10 종의 시료 saikosaponin(saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 에 대하여 50 - 2000 ng/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분 에 대하여 검량선 의 상관계수가 0.992 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Figure 61. 참조)

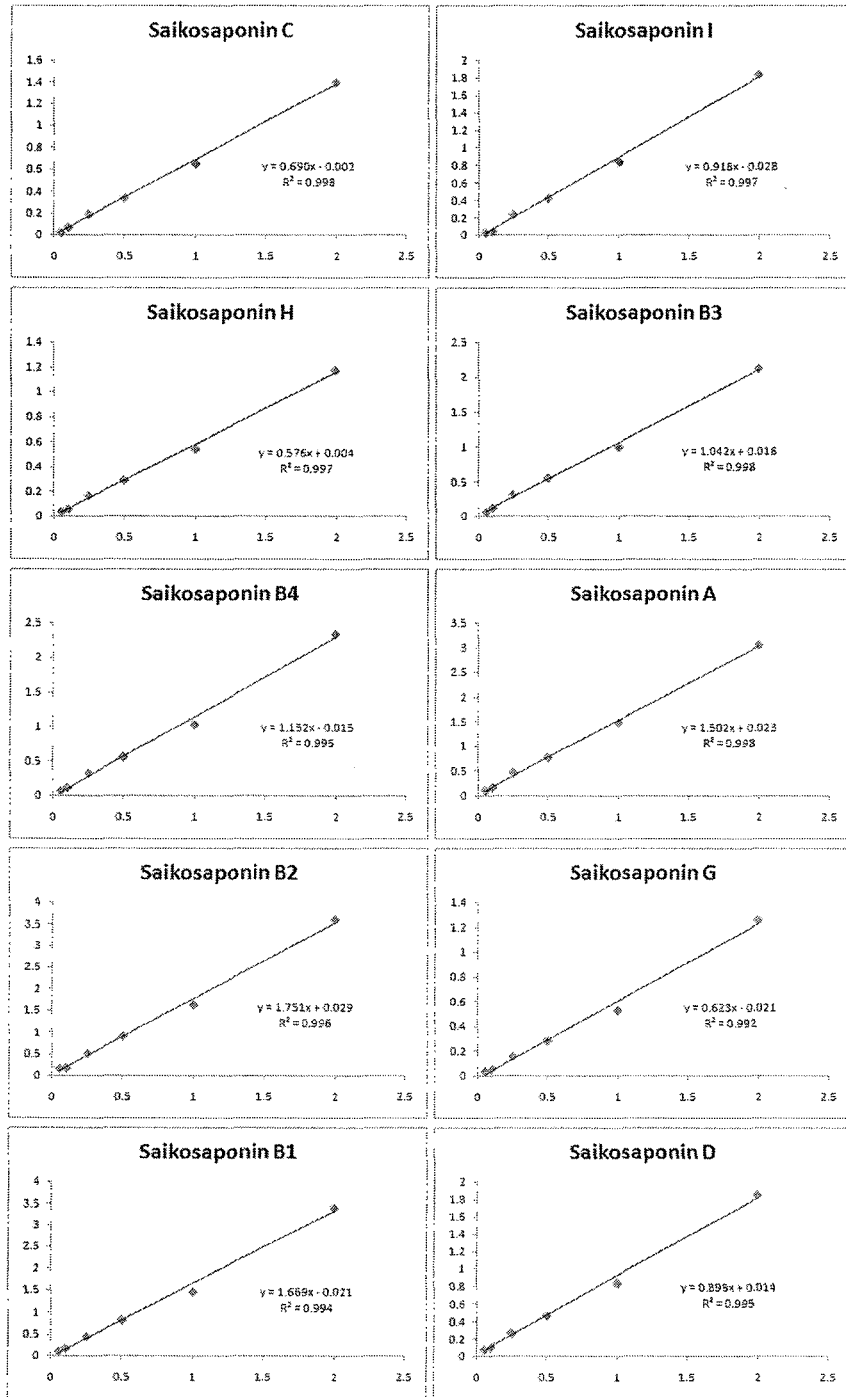


Figure 61. Calibration curves of 10 saikosaponins

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 가지 농도에 대하여 하루에 3 번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 그 값은 0.73 ~ 7.41% 와 0.98 ~ 16.27% 이었다.

(3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 80.02 ~ 119.98% 와 83.69 ~ 126.73% 이었다. (Table 26. 참조)

Table 26. Intra-, inter- day precision, accuracy, and limit of quantification(LOQ)

Compound	Conc. (ng/mL)	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)		LOQ (ng/mL)
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
Saikosaponin A	50	1.9185	1.6971	83.0519	97.7426	50
	250	0.9584	0.9780	94.8838	107.2266	
	2000	4.4109	7.0519	86.1918	92.1286	
Saikosaponin B ₁	50	3.9028	10.0700	115.3787	126.7314	50
	250	2.5870	2.6900	99.2429	116.5938	
	2000	2.9768	3.8375	85.5488	95.3061	
Saikosaponin B ₂	50	4.4951	2.3020	80.0171	84.7325	50
	250	3.3901	1.3419	96.0696	105.2319	
	2000	1.7646	3.4093	86.7102	86.3549	
Saikosaponin B ₃	50	1.4297	1.0163	80.3828	83.6948	50
	250	2.9989	2.4224	95.8153	100.6254	
	2000	1.5097	5.9397	87.0359	86.9896	
Saikosaponin B ₄	50	3.7244	7.2421	116.1296	100.3558	50
	250	2.0727	3.9359	98.4622	106.3305	
	2000	0.7255	2.6585	84.8754	92.0265	
Saikosaponin C	50	1.2182	5.4327	110.2222	110.2594	50
	250	3.2340	4.4385	96.2079	101.7544	
	2000	3.4984	3.0657	85.5237	85.7115	
Saikosaponin D	50	7.4057	2.2025	81.5578	84.6674	50
	250	3.1270	2.3294	97.2227	106.8953	
	2000	5.2815	12.7448	92.1308	91.1764	
Saikosaponin G	50	5.9713	16.2722	118.7799	108.3616	50
	250	1.4995	2.1882	98.6422	103.3203	
	2000	2.7053	2.5119	86.1150	89.1693	
Saikosaponin H	50	1.7829	6.2177	90.1486	86.1422	50
	250	4.2588	2.7209	90.8807	107.4568	
	2000	1.2454	3.4064	87.1647	97.4938	
Saikosaponin I	50	5.6314	12.3232	119.9776	87.6225	50
	250	1.0442	1.6496	100.8443	101.0827	
	2000	1.9025	3.8619	88.6447	90.7721	

제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

제 1 절 방풍의 생리활성성분의 분리

- 방풍으로부터 21종의 화합물(3'-*O*-angeloylhamaudol, β -sitosterol, marmesin, phellopterin, anomalin, imperatorin, xanthotoxin, deltoin, bergapten, stigmasterol, ledebouriellol, hamaudol, 8'-epicleomioscin, xanthoarnol, cimifugin, 5-*O*-methylvisamminol, daucosterol, 4'-*O*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, nodakenin, *sec-O*-glucosylhamaudol, *prim-O*-glucosylcimifugin)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 방풍의 지표성분으로는 imperatorin, phellopterin, 3'-*O*-angeloylhamaudol을 제시하는 바이다.

제 2 절 시호의 생리활성성분의 분리

- 시호로부터 13종의 화합물(saikosaponin D, saikosaponin C, saikosaponin B₄, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin A, saikosaponin H, saikosaponin I, saikosaponin B₁, saikosaponin G와 미지시료 crystal, 5-1, 5-2. 현재 구조분석중)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 시호의 지표성분으로는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 제시하는 바이다.

제 3 절 방풍의 생리활성성분의 동시분석법 개발

1. 본 연구에서는 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 등을 이용한 방풍의 생리활성성분의 동시분석법을 개발하였고, 분석법 검증과 시호의 최적추출조건 설정, 함량분석, 패턴분석 등을 수행하였다.
2. 방풍의 세 가지 생리활성성분에 대한 분석법 검증을 실시한 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time(RRT), theoretical plate number(N) 그리고 peak asymmetry(T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다.
3. 추출법, 추출용매, 추출용매의 조성, 추출 시간 등의 factor를 고려하여 방풍의 최적추출조건을 설정하였다.
4. 최적의 추출조건과 분석조건을 이용하여, 제 1세부 기관으로부터 제공받은 감별된 국산 방풍, 국산 갯방풍, 국산 식방풍, 중국산 방풍, 내몽고산 방풍과 시중에 유통되고 있는 방풍 19종 (한국산 8종, 중국산 11종)을 구입 또는 제공받아 함량분석을 실시하였다.
5. 함량분석 결과를 토대로 한국산, 중국산 방풍의 패턴분석을 실시하였다.
6. 본 연구에서는 방풍의 세가지 생리활성성분에 대한 신속하고 정확한 분석법을 개발하였으며, 이는 방풍의 품질관리 및 함량분석에 유용하게 쓰일 것으로 기대된다.
7. 제 1세부 기관으로부터 제공받은 감별된 국산 방풍, 국산 갯방풍, 국산 식방풍, 중국산 방풍, 내몽고산 방풍의 크로마토그램에서 갯방풍, 식방풍과 달리 방풍은 전혀 다른 패턴을 보였다. 시중에서 구입한 방풍 19종(한국산 8종, 중국산 11종)의 크로마토그램으로 패턴 분석을 한 결과 시중에서 유통되는 방풍은 갯방풍이나 식방풍 중의 하나일 것으로 추정된다.

별첨. 1. 방풍 중 방풍 생리활성성분의 함량 시험법

별첨. 2. 방풍 중 방풍 생리활성성분 HPLC-UV 및 LC-MS/MS 동시분석법 SOP (Standard Operating Procedure)

별첨 1.

방 풍 (防 風)

Saposhnikovia Root

Saposhnikovia Radix

정 량 법 이 약의 가루 약 0.05 g을 정밀하게 달아 제 1 내부표준액 0.5 mL 및 70% 메탄올 4.5 mL를 넣고 상온에서 초음파추출기로 50 분 동안 추출한 후 여과한다. 여액을 모두 취하고 70% 메탄올을 넣어 정확하게 5 mL로 하여 검액으로 한다. 각 표준품은 미리 60℃에서 감압으로 4 시간동안 건조한다. 따로 imperatorin 표준품 약 1 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 2.5 mL로 만든다. phellopterin 표준품 약 1 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 2.5 mL로 만든다. 3'-O-angeloylhamaudol 표준품 약 1 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 2.5 mL로 만든다. 각 표준품을 아세트니트릴 (1 → 2)에 넣어 녹인 용액 2.5 mL 및 제 2 내부표준액 2.5 mL를 정확하게 취하여 균일하게 섞은 후 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10 µL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 각 표준품의 피크면적비 Q_T 와 Q_S 를 구한다.

$$\begin{aligned} \text{imperatorin의 양 (mg)} &= \text{imperatorin 표준품의 양 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \\ \text{phellopterin} &= \text{phellopterin 표준품의 양 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \\ \text{의 양 (mg)} & \\ 3'\text{-O-angeloylhamaudol의 양 (mg)} &= 3'\text{-O-angeloylhamaudol 표준품의 양 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \end{aligned}$$

제 1 내부표준액 : byakangelicol 약 1 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 10 mL로 만든다.

제 2 내부표준액 : 제 1 내부 표준액 2 mL를 정확하게 취하여 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)로 10 mL로 만든다.

조작조건

검출기 : 자외부 흡광광도계 (측정파장 254 nm)

칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 15 cm인 스테인레스 강관에 5 µm의 액체크로마토그래프용 페닐헥실실릴화한 실리카겔을 충전한다.

칼럼온도 : 30℃

이동상 : 기울기 용리

(A) 물 : 아세트니트릴혼합액 (6:4)

(B) 물 : 아세트니트릴혼합액 (1:9)

시간 (분)	용액 A (%)	용액 B (%)	유속 (mL/min)	유출
0	100	0	1	용매평형
0 → 20	100	0	1	일정조성
20 → 35	100 → 25	0 → 75	1 → 1.75	직선기울기
35 → 36	25 → 0	75 → 100	1.75 → 2	직선기울기
36 → 50	0	100	2	일정조성
50 → 51	0 → 100	100 → 0	2 → 1	직선기울기

유량 : imperatorin의 유지시간이 약 22.2 분, phellopterin의 유지시간이 약 26.3 분, 3'-O-angeloylhamaudol의 유지시간이 약 32.6 분이 되도록 유지한다. 방풍 추출물의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

별첨 2.



STANDARD OPERATING PROCEDURES

HPLC-UV 및 LC-MS/MS를 이용한 방풍의 생리활성성분 동시법

작 성 자 : _____ 날짜 : _____ 년 _____ 월 _____ 일
 SOP 관리책임자 : _____ 날짜 : _____ 년 _____ 월 _____ 일
 운 영 책 임 자 : _____ 날짜 : _____ 년 _____ 월 _____ 일 (발행일)

SOP 번호		판수	1	총페이지수	7
SOP 배포장소					
1. 운영 책임자실			6. 제 1 MS 기기실		
2. QAU			7. 제 2 MS 기기실		
3. 데이터 처리실			8. 용출실험실		
4. 전처리실			9. 측정시료 접수장소		
5. HPLC 기기실			10. 기타 ()		

목 차

제목	1
목차	2
1. 서론	3
2. 실험의 원리	3
3. 안전책	3
4. 기구, 시약 및 시료	3
5. 시약의 준비	5
6. 실험방법	6
7. 분석법의 검증	7

1. 서론

본 표준작업지침서는 TLC 및 HPLC-UV, LC-MS/MS를 이용한 방풍의 생리활성성분 분석법에 관하여 정한다.

2. 실험의 원리

3. 안전책

실험을 행하는 동안 실험가운을 입어야 하며, 추출 용액을 다룰 때에는 반드시 장갑을 껴야 한다. 작업에 사용되는 시약과 화학약품은 만약 잘못 취급할 경우 작업자의 건강에 해를 끼칠 수 있다. 작업에 사용되는 시약과 화학물질의 주의점과 안전취급에 대한 정보는 Material Safety Data Sheet (MSDS)에서 얻을 수 있다. 작업을 실시하기 전에 작업자는 모든 주의사항을 숙지하여야 하며, 모든 실험은 노란 불빛 아래에서 수행되어야 한다.

4. 기구, 시약 및 시료

본 실험에는 아래의 기구, 표준물질, 시약 및 측정시료가 필요하다. 실험에 사용한 기구, 표준물질, 시약은 아래와 다른 제조사로부터 같은 종류의 제품으로 제공받을 수도 있으며, 그러한 경우에는 실험노트에 반드시 기록되어야 한다.

4.1. 기구

4.1.1. 일반기구

종류 및 세부사항	제조사
Vortex mixer	Scientific industries
Analytical balance	Mettler
Adjustable pipet (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)	Biohit
Disposable pipet tips (range 5-200 μ L)	Biohit
Disposable pipet tips (range 200-1000 μ L)	Biohit
Polypropylene conical tubes	Becton Dickinson Labware
Ultrasonicator	DAIHAN

4.1.2. HPLC-UV 분석법의 기구

4.1.2.1. HPLC : Pump (Waters 600, Waters, USA)

Autosampler (717 plus, Waters, USA)

4.1.2.2. 검출기 : UV detector (Waters 2487, Waters, USA)

4.1.2.3. 칼럼

4.1.2.3.1. Guard-column : SecurityGuard (Phenomenex)

4.1.2.3.2. 분석용 column : Luna Phenyl-hexyl (4.6×150 mm, 5 μm)

4.1.2.4. 데이터 시스템 : Empower

4.1.3. LC-MS/MS 분석법의 기구

4.1.3.1. HPLC : Pumps (LC-10ADvp, Shimadzu, Japan)

Autosampler (SIL-10ADvp, Shimadzu, Japan)

4.1.3.2. 검출기 : ESI-MS/MS (API 2000™, Applied biosystems, USA)

4.1.3.3. 칼럼

4.1.3.3.1. Guard-column : SesurityGuard (Phenomenex)

4.1.3.3.2. 분석용 column : YMC C18 (2.1 × 150 mm, 5 μm, Waters)

4.1.3.4. 데이터시스템 : Analyst 1.4.2

4.2. 표준물질

4.2.1. Imperatorin

4.2.2. Phellopterin

4.2.3. 3'-*O*-angeloylhamaudol

4.2.4. Byakangelicol (HPLC-UV 분석법 내부표준물질)

4.2.5. Glimepiride (LC-MS/MS 분석법 내부표준물질)

4.3. 시약

4.3.1. Acetonitrile (HPLC 급)

4.3.2. Methanol (HPLC 급)

4.3.3. 탈이온수 (purified using Milli-Q systems, HPLC-UV 분석법에 사용)

4.3.4. Water (HPLC 급. LC-MS/MS 분석법에 사용)

4.4. 측정대상 시료

4.4.1. 시료의 종류 : 방풍 한약재

4.4.2. 시료량 : 50 mg

4.4.3. 시료 취급 시 주의사항

시료를 장기 보관시 곤충이나 유충, 곰팡이 등이 생겨날 수 있으므로 서늘하고 차광이 잘 되는 곳에 보관하도록 한다.

5. 시약의 준비

5.1. Stock 용액

5.1.1. Imperatorin 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.

5.1.2. Phellopterin 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1

mg/mL이 되도록 한다.

5.1.3. 3'-*O*-angeloylhamaudol 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.

5.1.4. Byakangelicol (HPLC-UV 분석법 내부표준물질) 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.

5.1.5. Glimpiride (LC-MS/MS 분석법 내부표준물질) 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.

5.2. Working 용액

5.2.1. HPLC-UV 분석법의 working 용액

5.2.1.1. “5.1.1., 5.1.2. 및 5.1.3 항”에 준하여 조제한 imperatorin, phellopterin 및 3'-*O*-angeloylhamaudol의 stock 용액 각각을 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 순차적으로 희석하여 농도가 600 µg/mL 이 되도록 한다. 그 세 용액을 같은 양 혼합하여 각 농도가 200 µg/mL이 되도록 혼합용액을 만든다. 이를 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 순차적으로 희석하여 각 성분의 농도가 2, 4, 10, 20, 100, 200 µg/mL 이 되도록 한다.

5.2.1.2. “5.1.4.”항에 준하여 조제한 byakangelicol (HPLC-UV 분석법 내부표준물질)의 stock 용액을 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 희석하여 20 µg/mL 의 농도가 되도록 한다.

5.2.2. LC-MS/MS 분석법의 working 용액

5.2.2.1. “5.1.1., 5.1.2. 및 5.1.3 항”에 준하여 조제한 imperatorin, phellopterin 및 3'-*O*-angeloylhamaudol의 stock 용액 각각을 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 순차적으로 희석하여 imperatorin과 phellopterin의 농도가 3000 ng/mL, 그리고 3'-*O*-angeloylhamaudol의 농도가 1200 ng/mL 이 되도록 한다. 그 세 용액을 같은 양 혼합하여 imperatorin, phellopterin 농도가 1000 ng/mL, 3'-*O*-angeloylhamaudol의 농도가 400 ng/mL이 되도록 혼합용액을 만든다. 이를 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 순차적으로 희석하여 imperatorin과 phellopterin의 농도가 5, 10, 50, 100, 200, 400 및 1000 ng/mL, 3'-*O*-angeloylhamaudol의 농도가 2, 4, 20, 40, 80, 160 및 400 ng/mL 이 되도록 한다.

5.2.2.2. “5.1.4.”항에 준하여 조제한 glimepiride (LC-MS/MS 분석법 내부표준물질)의 stock 용액을 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 희석하여 600 ng/mL 의 농도가 되도록 한다.

5.2.3. “5.1.4.”항에 준하여 조제한 glimepiride (LC-MS/MS 분석법 내부표준물질)의 stock 용액을 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 희석하여 50 µg/mL 의 농도가 되도록 한다.

5.3. 기타 용액

5.3.1. HPLC-UV분석법의 이동상

A 이동상 : acetonitrile / water (40 / 60, v/v)

B 이동상 : acetonitrile / water (90 / 10, v/v)

5.3.2. LC-MS/MS분석법의 이동상 : 1 mM Ammonium acetate (pH 5.0 with acetic acid) / acetonitrile (70 / 30, v/v)

5.3.3. 추출 용매 : Methanol / water (70 / 30, v/v)

6. 방풍 한약재 시료의 준비

방풍 한약재를 2 ~ 3 cm 정도의 적당한 크기로 자른 후 전동 믹서기로 균일하게 분말화한다

7. 실험방법

7.1. 방풍 한약재의 추출

7.1.1. HPLC-UV분석법을 위한 방풍 한약재의 추출

"6"항의 시료 50 mg을 정밀히 취하여 폴리프로필렌 튜브에 담고 methanol / water (70 / 30, v/v) 5 mL을 넣고 균질액상으로 한 후, 50분 동안 초음파 추출기로 추출한다. 추출 후 3000 rpm에서 원심분리하여 상정액을 취하여 syringe filter (0.45 μ m)로 여과하고 이 용액과 "5.2.1.2."항에서 조제한 HPLC-UV분석법의 내부표준물질 working 용액을 동일 량 혼합하여 이 중 10 μ L를 HPLC-UV에 주입한다.

7.1.2. HPLC-UV분석법을 위한 방풍 한약재의 추출

"7.1.1."항에서 만든 추출액을 10배로 희석하여 "5.2.2.2."항에서 조제한 LC-MS/MS 분석법의 내부표준물질 working 용액과 동일량 혼합하여 이 중 10 μ L 주입하도록 한다.

7.2. 검량선용 시료

7.2.1. HPLC-UV 검량선용 시료

"5.2.1.1"항의 농도별 검량선용 working 용액과 "5.2.1.2."항에서 조제한 내부표준물질 working 용액을 동일 량 혼합하여 이 중 10 μ L를 HPLC-UV에 주입한다.

7.2.2. LC-MS/MS검량선용 시료

"5.2.2.1"항의 농도별 검량선용 working 용액과 "5.2.2.2."항에서 조제한 내부표준물질 working 용액을 동일 량 혼합하여 이 중 10 μ L를 LC-MS/MS에 주입한다.

7.3. HPLC-UV 분석조건

7.3.1. Internal standard : Byakangelicol

7.3.2. UV detention : 254 nm

7.3.3. Column : Luna phenyl-hexyl (150 mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m)

7.3.4. Mobile phase

A : Acetonitrile / water (40 / 60, v/v)

B : Acetonitrile / water (90 / 10, v/v)

7.3.5. Column temperature : 30°C

7.3.6. Gradient Profile

Time (min)	A (%)	B (%)	유속 (mL/min)
0.0	100	0	1
20 → 35	100 → 25	0 → 75	1 → 1.75
35 → 36	25 → 0	75 → 100	1.75 → 2

7.3.7. Injection volumn : 10 µL

7.4. LC-MS/MS 분석조건

7.4.1. Internal standard : Glimepiride

7.4.2. MS/MS detection : Positive ion mode, MRM model

Imperatorin 270.996 → 147.2 *m/z*

Phellopterin 300.737 → 217.9 *m/z*

3'-O-angeloylhamaudol 359.03 → 259.3 *m/z*

Glimepiride (I.S.) 491 → 352.2 *m/z*

Compound	DP (v)	FP (v)	EP (v)	CEP (v)	CE (v)	CXP (v)
3'-O-angeloylhamaudol	56	350	8.5	26	29	6
Imperatorin	36	360	12	34	47	4
Phellopterin	41	370	9	34	39	6
Glimepiride (I.S.)	40.8	385	8	33.93	20.8	9.3

Run time	10 min		
Mode	positive, MRM		
CUR	40 psi	TEM	450°C
CAD	5 psi	NEB	40 psi
IS	5500 volt	Turbo gas	75 psi

7.4.3. Column : XTerra C18 (2.1×150 mm, 5 µm)

7.4.4. Mobile phase : 1 mM Ammonium formate / acetonitrile (70 / 30, v/v) (pH 5.0 with formic acid)

7.4.5. Column temperature : 30°C

7.4.6. Flow rate : 0.2 mL/min

7.4.7. Injection volume : 10 µL

8. 분석법의 검증

8.1. 정량한계 (Limit of Quantitation)

신호대 잡음비 (S/N ratio)를 9 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하이고 정확성이 80~120% 인 조건을 만족하여야 한다.

8.2. 직선성 (Linearity)

8.2.1. HPLC-UV분석법의 직선성

HPLC-UV분석법의 경우 방풍의 세 가지 성분이 1 ~ 100 µg/mL 범위에서 직선성이 있는지 즉, 검량선의 상관계수가 $R = 0.95$ 이상인지 조사한다.

8.2.2 LC-MS/MS분석법의 직선성

LC-MS/MS분석법의 경우 imperatorin과 phellopterin은 2.5 ~ 500 ng/mL 의 범위에서, 3'-*O*-angeloylhamaudol은 1 ~ 200 ng/mL의 범위에서 직선성이 있는지 즉, 검량선의 상관계수가 $R = 0.95$ 이상인지 조사한다.

8.3. 정밀도 (Precision)

8.3.1. HPLC-UV분석법의 정밀도

1, 2, 10, 100 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, C.V.%가 $\pm 15\%$ 이내 (LOQ 농도에서는 20% 이내)에 드는지 조사한다.

8.3.2. LC-MS/MS분석법의 정밀도

Imperatorin과 phellopterin의 경우 2.5, 5, 50, 200, 500 ng/mL 각 농도에서, 3'-*O*-angeloylhamaudol의 경우 1, 2, 20, 80, 200 ng/mL 각 농도에서 일내 최하 3번 정량하고, 3일간 정량하여, C.V.%가 $\pm 15\%$ 이내 (LOQ 농도에서는 $\pm 20\%$ 이내)에 드는지 조사한다.

8.4. 정확도 (Accuracy)

8.4.1. HPLC-UV분석법의 정확도

1, 2, 10, 100 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, 정확도 %가 85 ~ 115% 이내 (LOQ 농도에서는 80 ~ 120% 이내)에 드는지 조사한다.

8.4.2. LC-MS/MS분석법의 정확도

Imperatorin과 phellopterin의 경우 2.5, 5, 50, 200, 500 ng/mL 각 농도에서, 3'-*O*-angeloylhamaudol의 경우 1, 2, 20, 80, 200 ng/mL 각 농도에서 일내 최하 3번 정량하고, 3일

간 정량하여, 이론농도에 대한 정확도 (%)가 85 ~ 115 % 이내 (LOQ 농도에서는 80 ~ 120 % 이내)에 드는지 조사한다.

제 4 절 시호의 생리활성성분의 동시분석법 개발

1. 본 연구에서는 TLC, HPLC-ELSD, LC-MS/MS 등을 이용한 시호의 생리활성성분의 동시분석법을 개발하였고, 분석법 검증과 시호의 최적추출조건 설정, 함량분석, 패턴분석 등을 수행하였다.
2. 10 종의 saikosaponin에 대한 분석법 검증을 실시한 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time(RRT), theoretical plate number(N) 그리고 peak asymmetry(T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다.
3. 추출법, 추출용매, 추출용매의 조성, 추출 시간 등의 factor를 고려하여 시호의 최적추출조건을 설정하였다.
4. 최적의 추출조건과 분석조건을 이용하여, 시중에 유통되고 있는 시호 20종(한국산 9종, 중국산 11종)을 구입 또는 제공받아 함량분석을 실시하였다.
5. 함량분석 결과를 토대로 한국산, 중국산 시호의 패턴분석을 실시하였다.
6. 본 연구에서는 10 종의 saikosaponin에 대한 신속하고 정확한 분석법을 개발하였으며, 이는 시호의 품질관리 및 함량분석에 유용하게 쓰일 것으로 기대된다.
한국산과 중국산 시호를 구분하기 위하여 시호의 주요 saikosaponin인 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용하여 패턴분석을 실시하였고, 전체적인 주성분 9 종을 선정하여 패턴분석을 실시하였으나, 한국산과 중국산 시호의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

별첨. 1. 시호 중 방풍 생리활성성분의 함량 시험법

별첨. 2. 시호 중 방풍 생리활성성분 HPLC-UV 및 LC-MS/MS 동시분석법 SOP (Standard Operating Procedure)

별첨 1.

시 호 (柴 胡) Bupleurum Root

Bupleuri Radix

정 량 법 이 약의 가루 약 0.2 g을 정밀하게 달아 70% 메탄올 10 mL를 넣고 상온에서 초음파추출기로 40 분동안 추출한 후 여과한다. 여액을 모두 취하고 70% 메탄올을 넣어 정확하게 10 mL로 하여 검액으로 한다. 각 표준품은 미리 60℃에서 감압으로 4 시간동안 건조한다. 따로 saikosaponin A 표준품 약 1 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 10 mL로 만든다. Saikosaponin C 표준품 약 3 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 10 mL로 만든다. Saikosaponin D 표준품 약 1 mg을 정밀하게 달아 희석시킨 아세트니트릴 (1 → 2)을 넣어 정확하게 10 mL로 만든다. 각 표준품을 아세트니트릴 (1 → 2)에 넣어 녹인 용액 10 mL를 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 20 µL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각 표준품의 피크면적을 구한다.

$$\begin{aligned} \text{saikosaponin A의 양 (mg)} &= \text{saikosaponin A 표준품의 양 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \\ \text{saikosaponin C의 양 (mg)} &= \text{saikosaponin C 표준품의 양 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \\ \text{saikosaponin D의 양 (mg)} &= \text{saikosaponin D 표준품의 양 (mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S} \end{aligned}$$

조작조건

검출기 : 증기화광산란검출기

(측정조건 - 드리프트튜브 온도 : 50℃, 질소가스 압력 : 3.0 bar)

칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 10 cm인 스테인레스 강관에 2.7 µm의 액체크로마토그래프용 옥타데실실릴화한 실리카겔을 충전한다.

칼럼온도 : 27.5℃

이동상 : 기울기 용리

(A) 초산을 0.1% 함유한 물/아세트니트릴혼합액 (10/90)

(B) 초산을 0.1% 함유한 물/아세트니트릴혼합액 (90/10)

시간 (분)	용액 A (%)	용액 B (%)	유출
0	20	80	용매평형
0 → 5	20	80	일정조성
5 → 35	20 → 50	80 → 50	직선기울기
35 → 45	50 → 90	50 → 10	직선기울기
45 → 65	90	10	일정조성

유량 : Saikosaponin A의 유지시간이 약 21.4 분, saikosaponin C의 유지시간이 약 15.1 분, saikosaponin D의 유지시간이 약 28.7 분이 되도록 유지한다. 시호 추출물의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

별첨 2.



STANDARD OPERATING PROCEDURES

HPLC-ELSD 및 LC-MS를 이용한 시호의 생리활성성분 동시법

작 성 자 : _____ 날짜 : _____ 년 _____ 월 _____ 일
 SOP 관리책임자 : _____ 날짜 : _____ 년 _____ 월 _____ 일
 운 영 책 임 자 : _____ 날짜 : _____ 년 _____ 월 _____ 일 (발행일)

SOP 번호		판수	1	총페이지수	7
SOP 배포장소					
1. 운영 책임자실			6. 제 1 MS 기기실		
2. QAU			7. 제 2 MS 기기실		
3. 데이터 처리실			8. 용출실험실		
4. 전처리실			9. 측정시료 접수장소		
5. HPLC 기기실			10. 기타 ()		

목 차

제목	1
목차	2
1. 서론	3
2. 실험의 원리	3
3. 안전책	3
4. 기구, 시약 및 시료	3
5. 시약의 준비	5
6. 실험방법	6
7. 분석법의 검증	7
8. 참고문헌	7

1. 서론

본 표준작업지침서는 TLC 및 HPLC-ELSD, LC-MS를 이용한 시호의 생리활성성분 분석법에 관하여 정한다.

2. 실험의 원리

3. 안전책

실험을 행하는 동안 실험가운을 입어야 하며, 추출용액을 다룰 때에는 반드시 장갑을 끼야 한다. 작업에 사용되는 시약과 화학약품은 만약 잘못 취급할 경우 작업자의 건강에 해를 끼칠 수 있다. 작업에 사용되는 시약과 화학물질의 주의점과 안전취급에 대한 정보는 Material Safety Data Sheet (MSDS)에서 얻을 수 있다. 작업을 실시하기 전에 작업자는 모든 주의사항을 숙지하여야 하며, 모든 실험은 노란 불빛 아래에서 수행되어야 한다.

4. 기구, 시약 및 시료

본 실험에는 아래의 기구, 표준물질, 시약 및 측정시료가 필요하다. 실험에 사용한 기구, 표준물질, 시약은 아래와 다른 제조사로부터 같은 종류의 제품으로 제공받을 수도 있으며, 그러한 경우에는 실험노트에 반드시 기록되어야 한다.

4.1. 기구

4.1.1. 일반기구

종류 및 세부사항	제조사
Vortex mixer	Scientific industries
Analytical balance	Mettler
Adjustable pipet (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)	Biohit
Disposable pipet tips (range 5-200 μ L)	Biohit
Disposable pipet tips (range 200-1000 μ L)	Biohit
Polypropylene conical tubes	Becton Dickinson Labware
Ultrasonicator	DAIHAN

4.1.2. HPLC-ELSD 분석법의 기구

4.1.2.1. HPLC

4.1.2.2. 검출기

4.1.2.3. 칼럼

4.1.2.3.1. Guard-column : SesurityGuard (Phenomenex)

4.1.2.3.2. 분석용 column : Ascentis[®] Express C18 (4.6×100 mm, 2.7 μ m)

4.1.2.4. 데이터 시스템 : Empower

4.1.3. LC-MS 분석법의 기구

4.1.3.1. HPLC

4.1.3.2. 검출기

4.1.3.3. 칼럼

4.1.3.3.1. Guard-column : SesurityGuard (Phenomenex)

4.1.3.3.2. 분석용 column : Hypersil GOLD C18 (2.1×150 mm, 3 μm)

4.1.3.4. 데이터시스템 : LCMSD trap

4.2. 표준물질

4.2.1. Saikosaponin A

4.2.2. Saikosaponin B₁

4.2.3. Saikosaponin B₂

4.2.4. Saikosaponin B₃

4.2.5. Saikosaponin B₄

4.2.6. Saikosaponin C

4.2.7. Saikosaponin D

4.2.8. Saikosaponin G

4.2.9. Saikosaponin H

4.2.10. Saikosaponin I

4.2.11. Ginsenoside R_{b1} (LC-MS 분석법 내부표준물질)

4.3. 시약

4.3.1. Acetonitrile (HPLC 급)

4.3.2. Methanol (HPLC 급)

4.3.9. 탈이온수 (purified using Milli-Q systems)

4.4. 측정대상 시료

4.4.1 시료의 종류 : 시호 한약재

4.4.2. 시료량 : 500 mg

4.4.3. 시료 취급 시 주의사항

시료를 장기 보관시 곤충이나 유충, 곰팡이등이 생겨날 수 있으므로 서늘하고 차광이 잘 되는 곳에 보관하도록 한다.

5. 시약의 준비

5.1. Stock 용액

- 5.1.1. Saikosaponin A 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.2. Saikosaponin B₁ 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.3. Saikosaponin B₂ 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.4. Saikosaponin B₃ 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.5. Saikosaponin B₄ 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.6. Saikosaponin C 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.7. Saikosaponin D 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.8. Saikosaponin G 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.9. Saikosaponin H 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.10. Saikosaponin I 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.
- 5.1.11. Ginsenoside R_{b1} (LC-MS 분석법 내부표준물질) 표준품을 정확하게 칭량한 후 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)에 녹여 농도가 1 mg/mL이 되도록 한다.

5.2. Working 용액

5.2.1. HPLC-ELSD 분석법의 working 용액

- 5.2.1.1. “5.1.1. - 5.1.10. 항”에 준하여 조제한 Saikosaponin A, saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin C, Saikosaponin D, Saikosaponin G, Saikosaponin H, Saikosaponin I의 stock 용액 각각을 적정 양 혼합하여 Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin D, Saikosaponin H의 농도가 100 µg/mL, Saikosaponin I의 농도가 200 µg/mL, Saikosaponin C, Saikosaponin G의 농도가 300 µg/mL이 되도록 혼합용액을 만든다. 이를 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 순차적으로 희석하여 Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin D, Saikosaponin H의 농도가 5, 10, 20, 30, 50, 100 µ

g/mL 이 되도록, Saikosaponin I의 농도가 10, 20, 40, 60, 100, 200 µg/mL 이 되도록, Saikosaponin C, Saikosaponin G의 농도가 15, 30, 60, 90, 150, 300 µg/mL 이 되도록 한다.

5.2.2. LC-MS 분석법의 working 용액

5.2.2.1. “5.1.1. - 5.1.10. 항”에 준하여 조제한 Saikosaponin A, saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin C, Saikosaponin D, Saikosaponin G, Saikosaponin H, Saikosaponin I의 stock 용액을 혼합하여 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 순차적으로 희석하여 농도가 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 ng/mL 이 되도록 한다.

5.2.2.2. “5.1.11.”항에 준하여 조제한 Ginsenoside R_{b1} (LC-MS 분석법 내부표준물질)의 stock 용액을 acetonitrile / water (50 / 50, v/v)으로 희석하여 4 µg/mL 의 농도가 되도록 한다.

5.3. 기타 용액

5.3.1. HPLC-ELSD분석법의 이동상

A 이동상 : acetonitrile / water (90 / 10, v/v) with 0.1% acetic acid

B 이동상 : acetonitrile / water (10 / 90, v/v) with 0.1% acetic acid

5.3.2. LC-MS분석법의 이동상

A 이동상 : acetonitrile / water (90 / 10, v/v) with 0.1% formic acid

B 이동상 : acetonitrile / water (10 / 90, v/v) with 0.1% formic acid

5.3.3. 추출 용매 : Methanol / water (70 / 30, v/v)

6. 시호 한약재 시료의 준비

시호 한약재를 2 ~ 3 cm정도의 적당한 크기로 자른 후 전동 믹서기에 넣고 균일하게 분말화한다

7. 실험방법

7.1. 시호 한약재의 추출

7.1.1. HPLC-ELSD분석법을 위한 시호 한약재의 추출

“6”항의 시료 200 mg을 정밀히 취하여 폴리프로필렌 튜브에 담고 Methanol / water (70 / 30, v/v) 10 mL을 넣고 균질액상으로 한 후, 40분 동안 초음파 추출기로 추출한다. 추출 후 3000 rpm에서 원심분리하여 상정액을 취하여 syringe filter (0.45 µm)로 여과하고 이 중 20 µL를 HPLC-ELSD에 주입한다.

7.1.2. LC-MS 분석법을 위한 시호 한약재의 추출

“7.1.1.”항에서 만든 추출액을 50 배로 희석하여 “5.2.2.2.”항에서 조제한 LC-MS 분석법의 내부표준물질 working 용액과 동일량 혼합하여 이 중 10 µL 주입하도록 한다.

7.2. 검량선용 시료

7.2.1. HPLC-ELSD 검량선용 시료

"5.2.1.1"항의 검량선용 working 용액 20 μ L를 HPLC-ELSD에 주입한다.

7.2.2. LC-MS검량선용 시료

"5.2.2.1"항의 검량선용 working 용액과 "5.2.2.2."항에서 조제한 내부표준물질 working 용액을 동일 량 혼합하여 이 중 10 μ L를 LC-MS에 주입한다.

7.3. HPLC-ELSD 분석조건

7.3.1. ELSD conditions

Drift tube temperature – 50°C, Gas pressure – 3.0 bar

7.3.3. Column : Ascentis[®] Express C18 (100 mm × 4.6 mm i.d., 2.7 μ m)

7.3.4. Mobile phase

A : Acetonitrile / water (90 / 10, v/v)

B : Acetonitrile / water (10 / 90, v/v)

7.3.5. Column temperature : 27.5°C

7.3.6. Gradient Profile

시간	Solvent A	Solvent B
0	20	80
5	20	80
35	50	50
45	90	10
65	90	10
65.1	20	80
75	20	80

7.3.7. Injection volumn : 20 μ L

7.4. LC-MS 분석조건

7.4.1. Internal standard : Ginsenoside R_{b1}

7.4.2. MS detection : Negative ion mode, SIM mode

7.4.3. Column : Hypersil GOLD C18 (2.1×150 mm, 3 μ m)

7.4.4. Mobile phase

A : Acetonitrile / water (90 / 10, v/v)

B : Acetonitrile / water (10 / 90, v/v)

7.4.5. Column temperature : 27.5 °C

7.4.6. Flow rate : 0.2 mL/min

7.4.7. Injection volume : 10 μ L

8. 분석법의 검증

8.1. 정량한계 (Limit of Quantitation)

신호대 잡음비 (S/N ratio)를 9 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하이고 정확성이 80~110% 인 조건을 만족하여야 한다.

8.2. 직선성 (Linearity)

8.2.1. HPLC-ELSD 분석법의 직선성

HPLC-ELSD 분석법의 경우 시호의 7 가지 Saikosaponin(Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin D, Saikosaponin H)이 5 - 100 µg/mL 범위에서 직선성이 있는지 즉, 검량선의 상관계수가 R = 0.95 이상인지 조사하고, 1 가지 Saikosaponin(Saikosaponin I)이 10 - 200 µg/mL 범위에서 직선성이 있는지 즉, 검량선의 상관계수가 R = 0.95 이상인지 조사하고, 2 가지 Saikosaponin(Saikosaponin C, Saikosaponin G)이 15 - 300 µg/m 범위에서 직선성이 있는지 즉, 검량선의 상관계수가 R = 0.95 이상인지 조사한다.

8.2.2 LC-MS 분석법의 직선성

LC-MS 분석법의 경우 10 가지 Saikosaponin이 50 - 2000 ng/mL의 범위에서 직선성이 있는지 즉, 검량선의 상관계수가 R = 0.95 이상인지 조사한다.

8.3. 정밀도 (Precision)

8.3.1. HPLC-ELSD 분석법의 정밀도

7 가지 Saikosaponin(Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin D, Saikosaponin H)의 경우 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, C.V.%가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다. 1 가지 Saikosaponin(Saikosaponin I)의 경우 10, 20, 40, 100, 200 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, C.V.%가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다. 2 가지 Saikosaponin(Saikosaponin C, Saikosaponin G)의 경우 15, 30, 60, 150, 300 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, C.V.%가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다.

8.3.2. LC-MS 분석법의 정밀도

10 가지 Saikosaponin(Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin C, Saikosaponin D, Saikosaponin G, Saikosaponin H, Saikosaponin I)에 대하여 50, 250, 2000 ng/mL 각 농도에서 일내 최하 3번 정량하고, 3일간 정량하여, C.V.%가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다.

8.4. 정확도 (Accuracy)

8.4.1. HPLC-ELSD분석법의 정확도

7 가지 Saikosaponin(Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin D, Saikosaponin H)의 경우 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, 이론농도에 대한 정확도가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다. 1 가지 Saikosaponin(Saikosaponin I)의 경우 10, 20, 40, 100, 200 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, 이론 농도에 대한 정확도가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다. 2 가지 Saikosaponin(Saikosaponin C, Saikosaponin G)의 경우 15, 30, 60, 150, 300 µg/mL 각 농도에서 일내 최하 5번 정량하고, 5일간 정량하여, 이론농도에 대한 정확도가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다.

8.4.2. LC-MS분석법의 정확도

10 가지 Saikosaponin(Saikosaponin A, Saikosaponin B₁, Saikosaponin B₂, Saikosaponin B₃, Saikosaponin B₄, Saikosaponin C, Saikosaponin D, Saikosaponin G, Saikosaponin H, Saikosaponin I)에 대하여 50, 250, 2000 ng/mL 각 농도에서 일내 최하 3번 정량하고, 3일간 정량하여, 이론농도에 대한 정확도가 ±15 % 이내 (LOQ 농도에서는 20 % 이내)에 드는지 조사한다.

9. 참고문헌

- 1) Park I.S., Kang E.M., and Kim N., Journal of Chromatographic Science, 38(6), 229-233, (2000).
- 2) 김관수, 이승택, 성낙술, 이정일, 채영암, 한국약용작물학회, 3(3), 226-232, (1995).
- 3) Liao B.C., Hsiao S.S., Lee M.R., Jong T.T. and Chiang S.T., Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 43, 1174-1178, (2007).
- 4) Xiao R., Wang C.Y., Zhang Z.F., Yuan Z.F. and Zhang L.T., Journal of Chinese medicinal materials, 29(2), 119-123, (2006).
- 5) Li X.Q., Gao Q.T., Chen X.H. and Bi K.S., Biological & pharmaceutical bulletin, 28(9), 1736-1742, (2005).
- 6) Bao Y., Li C., Shen H. and Nan F., Analytical chemistry, 76, 4208-4216, (2004).

제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)
총괄과제책임자	김진웅 / 서울대학교 약학대학 / 생약학

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	coumain from Saposhnikoviae Radix	포스터 발표	김소준, 정유현	한중일 생약학 심포지움	2008.		국내
2	Quantitative evaluation of <i>Bupleuri Radix</i> through the simultaneous determination of bioactive saikosaponins by high performance liquid chromatography with ultraviolet and evaporative light scattering detector	포스터 발표	이재현	한국분석과학회	2008.5.15.		국내
3	Quantitative Evaluation of <i>Bupleuri Radix</i> through The Simultaneous Determination of Bioactive Saikosaponins by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector	포스터 발표	이재현	대한약학회	2008.10.23.		국내
4	Quantitative evaluation of Saposhnikoviae Radix through the simultaneous determination of bioactive coumarins and chromone by HPLC/UV	포스터 발표	정미혜 염정록 한상범	한국분석과학회	2007. 11. 7.	제주도	국내
5	Acetylcholinesterase Inhibitory Components from <i>Saposhnikovia divaricata</i>	포스터 발표	김소준	생약학회 정기총회	2008.12	서울	국내

다. 지식재산권

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, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

제6장 기타 중요변경사항

○ 처음 선정 시와 비교하여 변경된 내용을 명시

제7장 참고문헌

Susidarti R., Rahmani M., Ali M., Sukari A., Ismail H. , Kulip J., Waterman G.(2007) 8-Methoxycapnolactone and stigmasterol from *Micromelum minutum*, *Majalah Farmasi Indonesia*, 18 105 – 109

Tosun A., Baba M., Bahadir O., Okuyama T.(2006) Coumarins isolated from the roots of *Seseli resinosum* in Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 44 528 – 533

Hagemeyer J., Batz O., Schmidt J., Wray V., Hahlbrock K., Strack D. (1999) Accumulation of phthalides in elicitor-treated cell suspension cultures of *Petroselinum crispum*, *Phytochemistry*, **51** 629 - 635

Sun A., Feng L., Liu R. (2006) Preparative isolation and purification of *prim-O*-glucosyl-cinnifugin and 4'-*O*- β -D-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol from *Radix Saposhnikoviae* by high speed countercurrent chromatography, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **29** 751 - 759

Li Y., Luo F., Peng S., Liang J., Ding L. (2006) A new dihydroisocoumarin from the rhizomes of *Notopterygium forbesii*, *Natural Product Research*, **20** 860 - 865

Bergendorff O., Kim D., Nielsen M., Shayr R., Witt R., Ai J. Sterner O. (1997) Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors *in vitro*, *Phytochemistry*, **44** 1121 - 1124

Ahmad V., Ullah F., Hussain J., Farooq U., Zubair M., Khan M., Choudhary M. (2004) Tyrosinase Inhibitors from *Rhododendron collettianum* and Their structure-activity relationship (SAR) studies, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **52** 1458 - 1461

Sasaki D., Taguchi H., Endo T., Itiro I. (1982) The constituents of *Ledebouriella seseloides* WOLFF. I. structures of three new chromones, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **30** 3555-3562

Zou Y., Lobera M., Snider B. (2004) Synthesis of 2,3-dihydro-3-hydroxy-2-hydroxylalkylbenzofurans from epoxy aldehydes. one-step syntheses of brosimacutin G, vaginidiol, vaginol, smyrindiol, xanthoarnol, and avicenol A. biomimetic syntheses of angelicin and psoralen, *Journal of organic chemistry*, **70** 1761 - 1770

Muller M., Byres M., Jaspars M., Kumarasamy Y., Middletonlutfunnahar M., Shoeb M., Sarker S., (2004) 2D nmr spectroscopic analyses of archangelicin from the seeds of *Angelica archangelica*, *Acta Pharmaceutica*, **54** 277 - 285

Ishii H., Ishikawa T., Sekiguchi H., Hosoya K. (1973) Xanthoarnol: A new dihydrofuranocoumarin, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **21** 2346 - 2348 (1973)

제8장 첨부서류

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

제 1 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 시호, 방풍의 성분 분리

세부과제책임자 : 김진웅 / 서울대학교 약학대학

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

본 연구는 한약재 과학화 사업 중의 시호, 방풍에 대한 체계적이고 과학적인 성분 분리 및 분석법을 확립하고 이를 검증하는 것을 그 최종 목표로 한다. 이를 위해서 다음과 같은 구체적인 목표를 제시하는 바이다.

- 시호, 방풍의 지표물질의 분리법 확립 및 대량 분리
- 시호, 방풍의 미량 함유 물질 중 지표물질에 준할 수 있는 물질 선별 및 분리
- 시호 및 방풍의 분석용 표준품의 제조 및 제출

각종 크로마토그래피법을 이용하여 다양한 성분을 시호, 방풍으로부터 분리해내며 이를 대량 분리한다. 또한 분리된 여러 성분중에서 지표물질을 선별하고 지표물질에 준할 수 있는 물질을 선별하는 것을 목표로 한다.

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

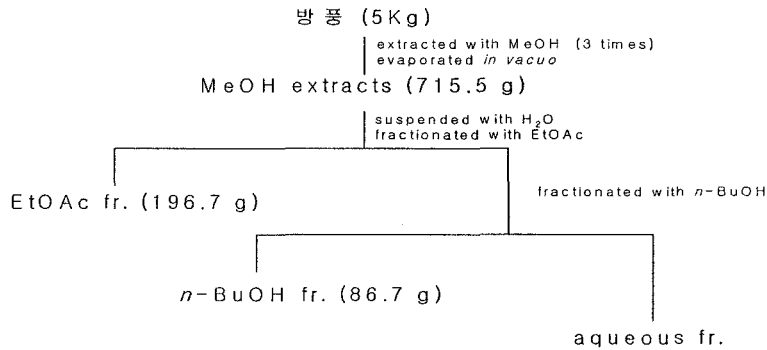
연구개발 추진내용	연구개발 연차	
	1차년	2차년
- 방풍의 성분 분리	100%	-
- 시호의 성분 분리	100%	-
- 방풍의 성분 대량 분리 및 지표성분 설정	-	100%
- 시호의 성분 대량 분리 및 지표성분 설정	-	100%

1.3 국내·외 기술개발 현황

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

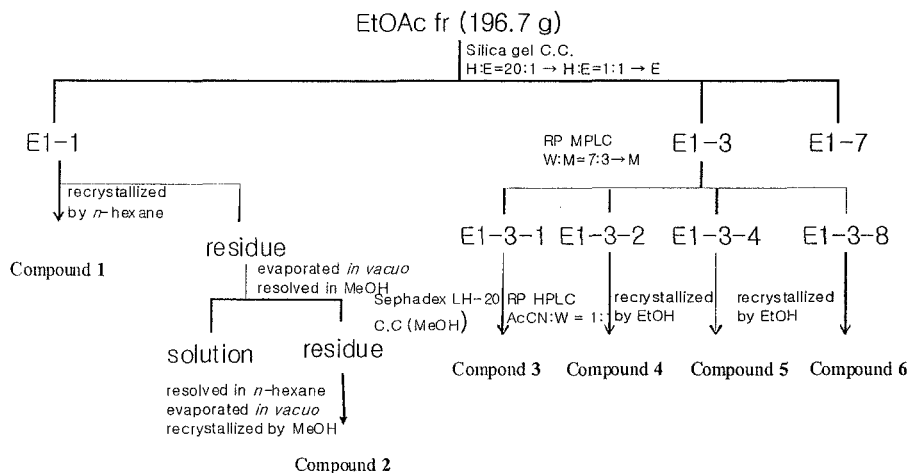
제 1 절 방풍의 생리활성성분의 분리

방 풍 의 분 리



1차로 건조된 방풍 5Kg을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 715.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 차례로 EtOAc와 *n*-BuOH로 분획하고, 이들 분획물들을 각각 감압 농축하여 EtOAc분획 (196.7g), *n*-BuOH (8.7g)의 분획물을 얻었다.

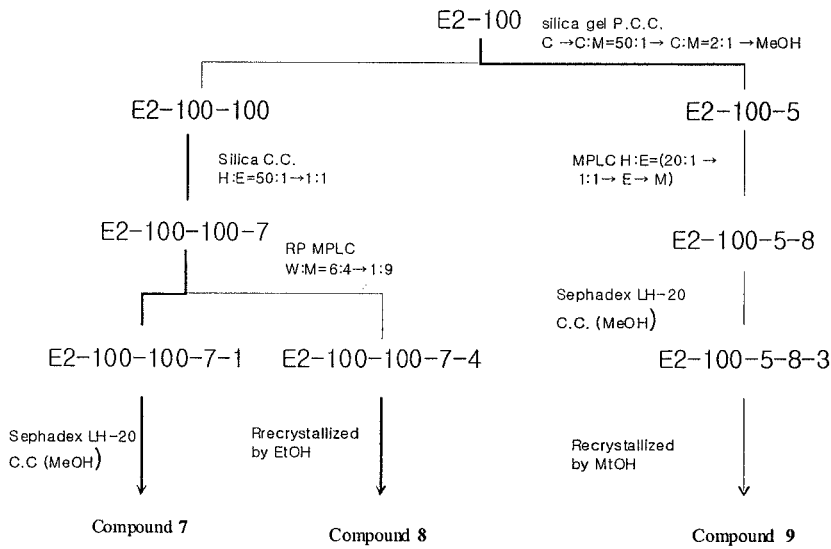
EtOAc분획 (196.7g)에 대하여 silica gel C.C. (*n*-Hexane:EtOAc = 20:1 → 1:1 → EtOAc)을 실시하여 7개의 대분획 (E1-1~E1-7)으로 나누었다. 이 중 소분획 E1-2을 *n*-Hexane으로 재결정하여 화합물 1을 분리하였다. 나머지 여액을 MeOH:Hexane = 1:1에 녹여 10%의 물이 넣어 두 층으로 나눈 다음 MeOH여액을 모아 농축한 다음 MeOH로 재결정 하여 화합물 2를 분리하였다. E1-3을 RP MPLC (M:W = 3:7 → MeOH)를 수행하여 14개의 소분획 (E1-3-1~E1-3-14)을 얻었다. 이중소분획 E1-3-1을 Sephadex LH-20 C.C.



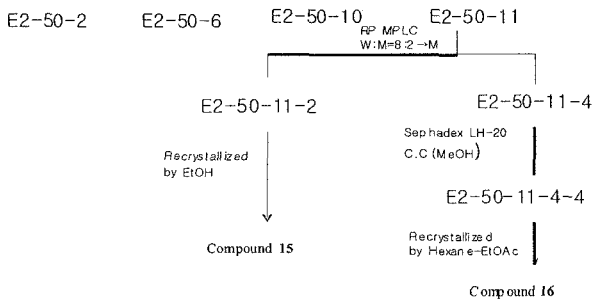
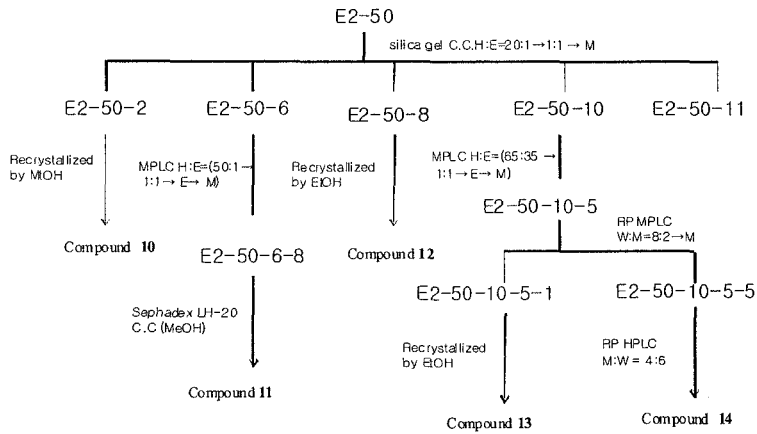
(MeOH) 를 실시하여 화합물 3, 소분획 E1-3-2을 HPLC (Water : AcCN = 1:1)를 수행하여 화합물 4, 소분획 E1-3-4를 EtOH로 재결정해 화합물 5, 소분획 E1-3-8을 EtOH로 재결정하여 화합물 6를 분리했다.

2차로 방풍을 세질하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 1315.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 EtOAc로 분획하고 얻은 분획물을 감압 농축하여 EtOAc분획 (397.5g)의 분획물을 얻었다.

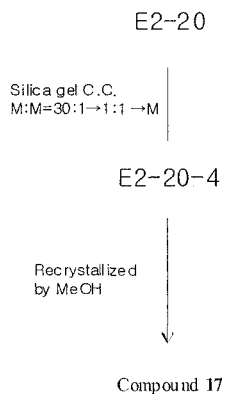
EtOAc 분획을 silica gel partition C.C. (100% CHCl₃ → CHCl₃:MeOH = 50:1 → CHCl₃:MeOH = 20:1 → CHCl₃:MeOH = 10:1 → CHCl₃:MeOH = 5:1 → CHCl₃:MeOH = 2:1 → 100% MeOH) 를 수행하여 7개의 대분획 (E2-100, E2-50, E2-20, E-10, E2-5, E2-2, E2-M)으로 나누었다. 소분획 E2-100을 silica gel partition C.C. (Hexane → Hexane:EtOAc = 100:1 → 50:1 → 40:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 2:1 → 1:1 → MeOH) 를 수행하여 11개의 소분획 (E2-100-H, E2-100-100, E2-100-50, E2-40, E2-100-30, E2-100-20, E2-100-10, E2-100-5, E2-100-2, E2-100-1, E2-100-M)을 얻었고, 이 중 소분획 E2-100-H, E2-100-100을 silica gel C.C. (Hexane:EtOAc = 50:1 → 1:1) 을 이용해 11개의 소분획 (E2-100-100-1~ E2-100-100-11)을 얻었다. 소분획 E2-100-100-7을 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 60:40 → 10:90) 을 수행하여 8개의 소분획 (E2-100-100-7-1~ E2-100-100-7-8) 을 얻었다. 이 중 E2-100-100-7-1을 sephadex LH-20 C.C. (MeOH) 를 수행하여 화합물 7를 분리 하였고, 소분획 E2-100-100-7-4을 sephadex LH-20 C.C (MeOH) 를 수행하여 세 개의 소분획 (E2-100-100-7-4-3~E2-100-100-7-4-3) 을 얻어, E2-100-100-7-4-3을 MeOH로 재결정 해 화합물 8을 분리 하였다. 소분획 E2-100-5을 MPLC C.C. (Hexane:EtOAc = 20:1 → 1:1 → EtOAc → MeOH)을 실시해서 열다섯 개의 소분획 (E2-100-5-1~ E2-100-5-15) 을 얻었다. 이 중 E2-100-5-8을 Sephadex LH-20 C.C. (MeOH) 를 실시하여 네 개의 소분획 (E2-100-5-8-1~E2-100-5-8-4) 으로 나누고 E2-100-5-8-3을 MeOH로 재결정하여 화합물 9를 얻었다.



소분획 E2-50을 silica gel C.C. (Hexane:EtOAc = 20:1 → 1:1 → EtOAc → MeOH)를 수행하여 11개의 소분획 (E2-50-1~E2-50-11) 으로 나누었고, 이 중 소분획E2-50-2을 MeOH로 재결정해 화합물 10을 분리 하였고, 소분획 E2-50-6을MPLC C.C. (Hexane:EtOAc = 50:1 → 1:1 → EtOAc → MeOH)을 수행하여 8개의 소분획 (E2-50-6-1~E2-50-6-8)으로 나누었고, 이 중 E2-50-6-4를 sephadex LH-20 C.C. (MeOH)를 수행 해 화합물 11를 분리 하였다. 소분획 E2-50-8을 EtOH로 재결정해 화합물 12을 분리 하였고, 소분획 E2-50-10을 MPLCC.C. (Hexane:EtOAc = 65:35 → 1:1 → EtOAc → MeOH)을 실시해서 7개의 소분획 (E2-50-10-1~ E2-50-10-7) 을 얻어 E2-50-10-5를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 80:20 → MeOH) 을 수행하여 10개의 소분획 (E2-50-10-5-1~ E2-50-10-5-10) 을 얻었다. 이 중 E2-50-10-5-1를 EtOH로 재결정 하여 화합물 13, 소분획E2-50-10-5-5을RP HPLC C.C. (Water:MeOH = 60:40)를 실시 해 화합물 14를 분리하였다. E2-50-11을 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 20:80 → MeOH)을 수행하여 11개의 소분획 (E2-50-11-1~E2-50-11-11) 을 얻었다. 소분획 E2-50-11-2 를 EtOH로 재결정 하여 화합물 15를 분리 하였다. 소분획 E2-50-11-4을Sepadex LH-20 C.C. 을 수행하여 얻은 4번째 소분획을 Hexane-EtOAc로 재결정하여 화합물 16을 분리 하였다.

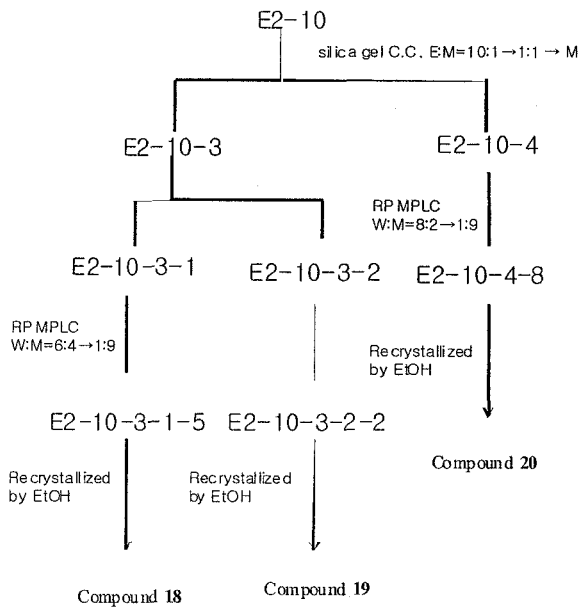


소분획 E2-20을 silica gel C.C. (Methylene chloride:MeOH = 30:1 → MeOH) 를 실시하여 10개의 분획 (E2-20-1~ E2-20-6) 을 얻었고, 이 중 소분획 E2-20-4를 MeOH로 재결정 하여 화합물 17을 얻었다.

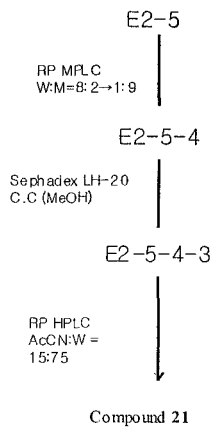


소분획 E2-10을 silica gel C.C. (EtOAc:MeOH = 10:1 → MeOH)를 수행해 4개의 소분획 (E2-10-1~E2-10-4) 을 얻었다. 소분획 E2-10-3을 TLC패턴에 따라 2개의 소분획 (E2-10-3-1, E2-10-3-2)으로 나누어 소분획 E2-10-3-1를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 60:40 → 10:90)를 수행하여 6개의 소분획 (E2-10-3-1-1~E2-10-3-1-6) 으로 나누고 이 중 E2-10-3-1-5를 EtOH로 재결정하여 화합물 18을

분리했다. 소분획 E2-10-3-2를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 80:20 → 10:90) 를 수행하여 6개의 소분획 (E2-10-3-2-1~ E2-10-3-2-6) 으로 나누고 이 중 이 중 E2-10-3-2-2 를 EtOH로 재결정하여 화합물 **19**를 분리했다. 소분획 E2-10-4를 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 80:20 → Water:MeOH = 10:90) 를 수행하여 8 개의 소분획 (E2-10-4-1~ E2-10-4-8) 을 얻었고, 소분획 E2-10-4-5 를 EtOH로 재결정하여 화합물 **20**를 분리했다.



소분획 E2-5을 RP ODS-MPLC C.C. (Water:MeOH = 20:80 → Water:MeOH = 10:90) 10개의 분획 (E2-5-1~E2-5-10) 을 얻었고 소분획 E2-5-4를 Sephadex LH-20 C.C. (MeOH) 를 수행하여 8개의 소분획으로 (E2-5-4-1~E2-5-4-8) 나누고, 이 중 E2-5-4-3을 RP HPLC C.C. (Water : AcCN = 85:15) 를 실시하여 화합물 **21**을 분리 했다.

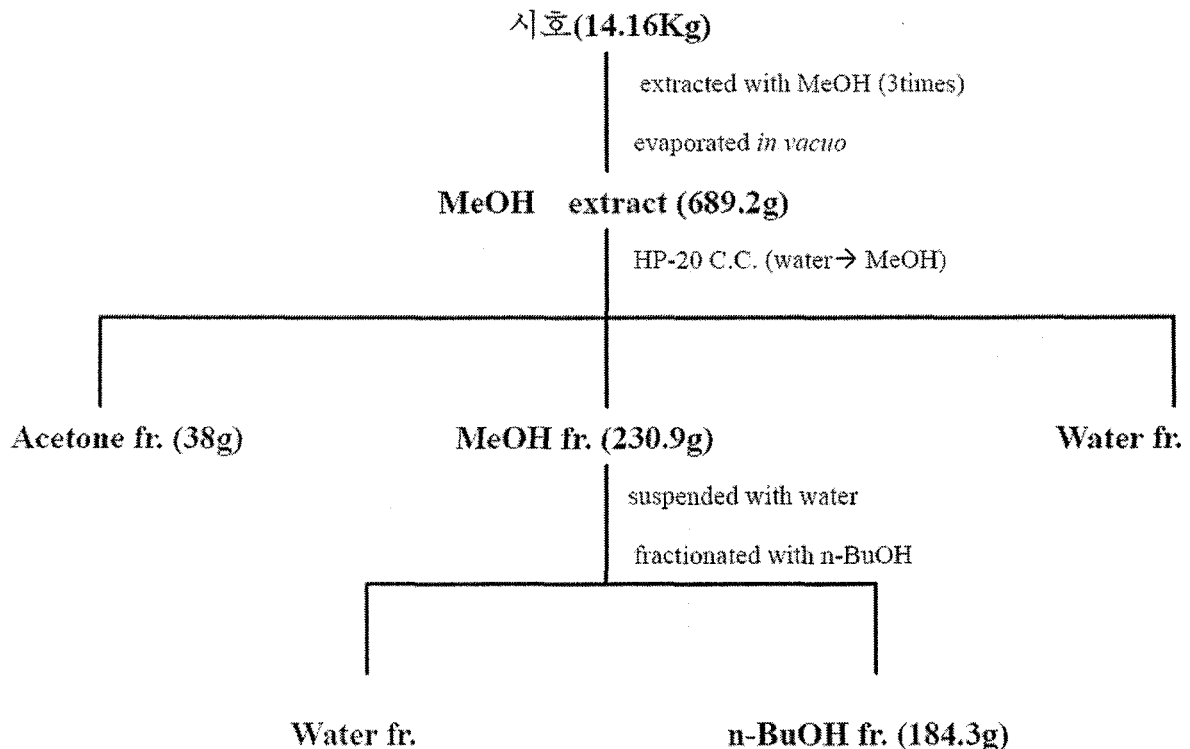


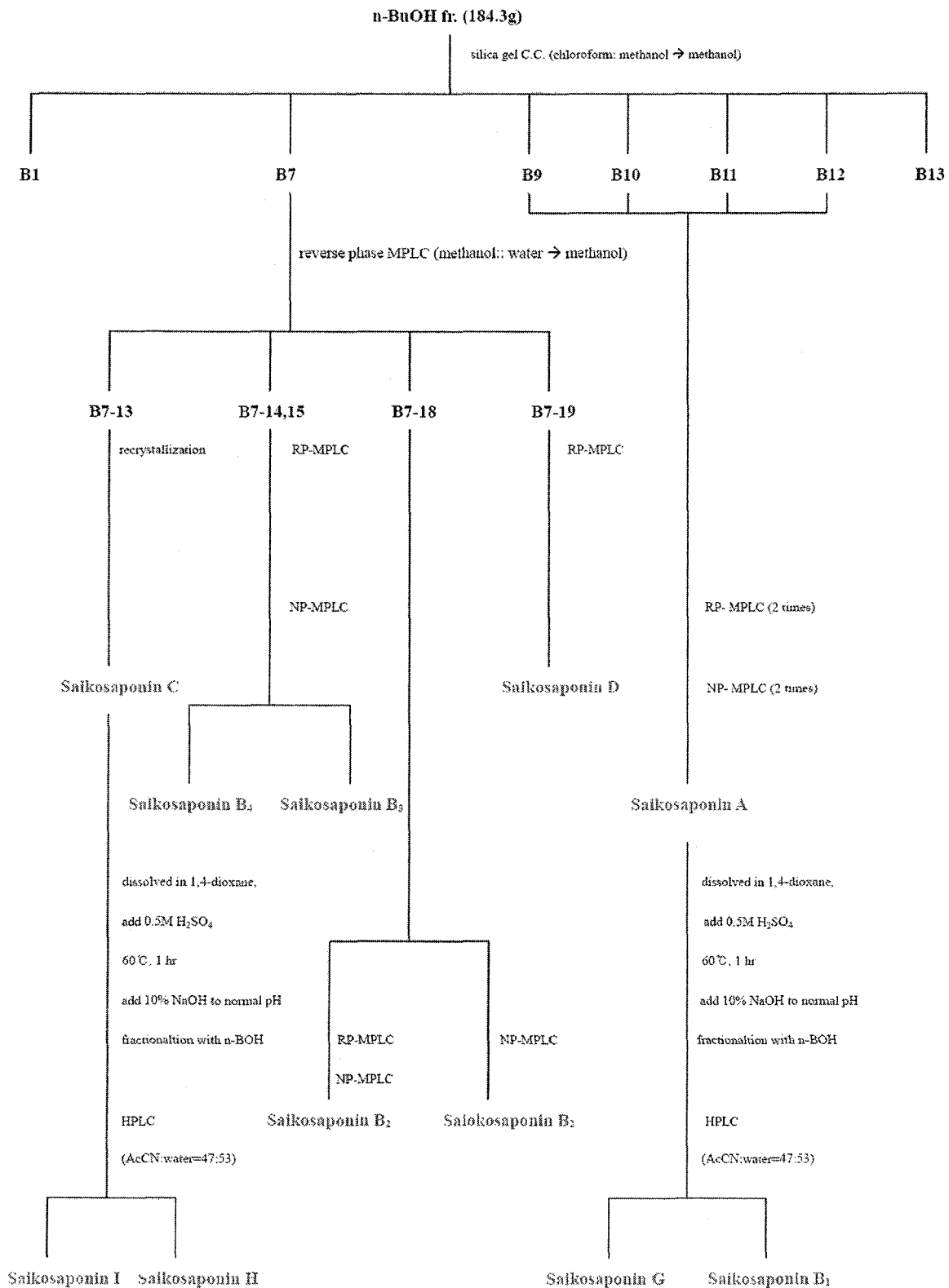
제 2 절 시호의 생리활성성분의 분리

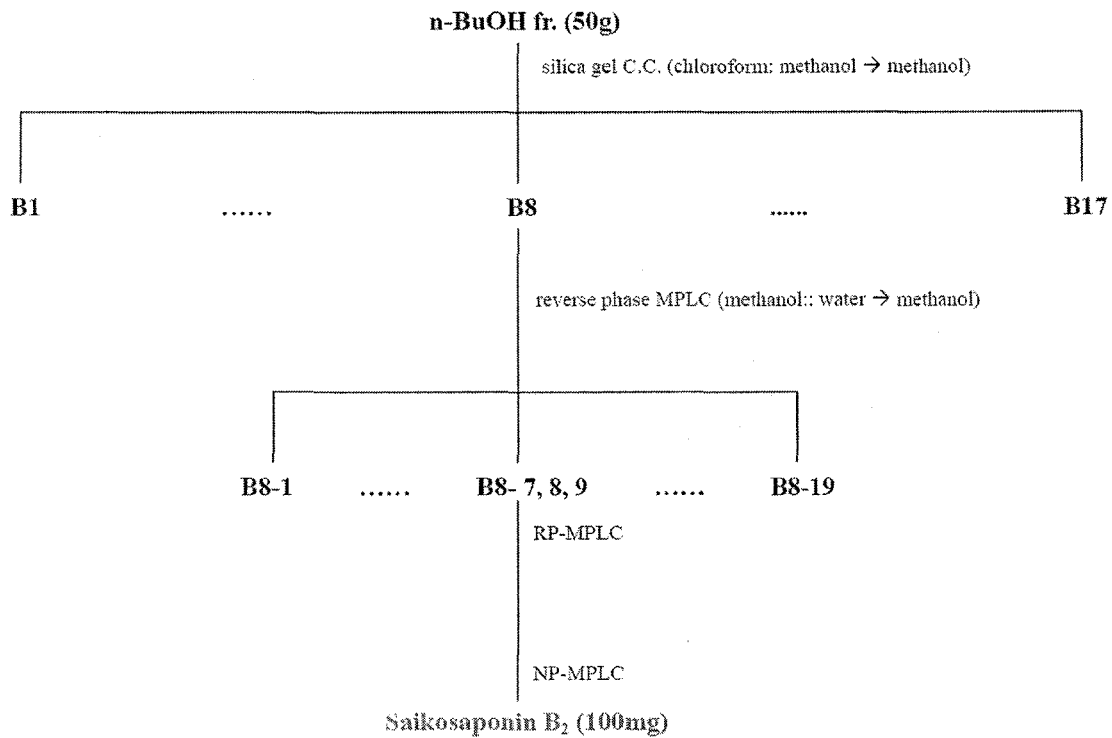
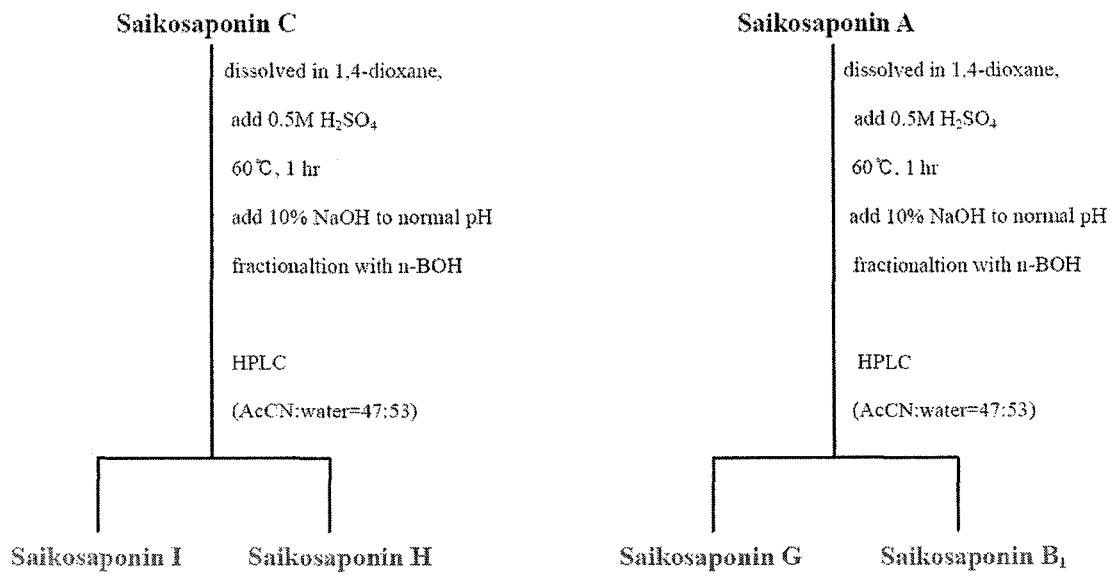
시호 14.16kg을 세절한 후 메탄올을 이용하여 3회 추출하여 1089.2g의 추출물을 얻었다. 이중 689.2g을 HP-20수지(resin)를 고정상으로 한 column chromatography를 이용하여 분리, 메탄올 층 230.9g을 얻고 n-BuOH로 분획하여 184.3g의 분획물을 얻었다.

n-BuOH 분획물을 column chromatography (normal phase silica)를 통해 13개의 분획으로 크게 분류 한 후 각 분획을 대상으로 다양한 분리 방법을 적용하여 단일 물질을 분리 했다. 이 중 7번 분획에서 saikosaponin B₂, B₃, B₄, C, D를 얻었고 9,10,11,12번 분획과 7번 분획의 69번 세부 분획으로부터 saikosaponin A를 분리했다. 또한 잘 알려진 saikosaponin의 가수분해법에 따라 saikosaponin A, saikosaponin C를 반응 시켜 각각 3개의 compound를 얻었다.

활성평가에 필요한 saikosaponinB₂를 추가로 분리하기 위하여 n-BuOH 분획물(50g)을 이용하여 100mg의 화합물을 분리하였다.







제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

** 시료의 제공 **

시호 70% ETOH extracts

No.	기원식물 학명	산지			수득률(%)		
		국산	경북 의성	2006년산			
No. 1	<i>Bupleurum falcatum</i> L.		경북 의성	2006년산	전형	12.96	
No. 2	<i>Bupleurum chinense</i> DC.	북시호	중국	감숙성	2006년 수입H	음편	10.88
No. 3	<i>B. scorzonerifolium</i> Willd. -추정-	남시호	중국	-	서녕시장 수집	음편	10.12
No. 4	<i>B. scorzoneraefolium</i> var. <i>stenophyllum</i> Nakai -추정-	삼도시호	중국	-	서울시장 수집	전형	10.18
No. 5	<i>B. longeradiatum</i> Turcz. -추정-	죽시호	중국	-	서울시장 수집	음편	13.26
No. 6	<i>Bupleurum chinense</i> DC. -추정-	북시호	중국	내몽고	안국시장 수집	음편	8.16

방풍 70% ETOH extracts

No.	기원식물 이름 - 학명	산지			수득률(%)
		국산	재배지 불명	전형	
No. 1	방풍 - <i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	국산	2년근 07년 3월 수확건조	전형	35.0
No. 2	방풍 - <i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	중국산	내몽고산 07년 수입	음편	24.2
No. 3	갯기름나물 - <i>Peucedanum japonicum</i> Thunberg	국산	재배지 불명 06년 3월 수확가공	음편	39.6
No. 4	갯방풍 - <i>Glehnia littoralis</i> Fr. Schmidt et Miquel	국산	영해면 대리 06년 수확	음편	36.4
No. 5	방풍 - <i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	중국산	섬서성 05년 12월 수확	음편	26.4

각각의 분리한 화합물들은 분석팀 및 효능팀에게 수시제공

70% EtOH 추출물 제조 방법

환류냉각기를 설치한 500ml 플라스크에 50g을 시료를 정확하게 측량하여 담고 70% EtOH 300ml를 넣고 80℃로 그 온도를 유지하여 reflux하였다. 이 과정을 3시간동안 진행한 뒤 용매를 온시에 거름종이를 이용하여 거른 뒤 실온에서 잠시 방치하여 온도를 낮게 한 뒤에 감압농축하였다. 한 시료당 reflux를 3시간씩 2회 수행하였으며 감압농축한 추출물을 동결건조 (48h)하여 무게를 측정하여 수득률을 계산한 뒤 바이알에 담아 최종무게를 측정하였다.

위 표의 시호, 방풍을 각각 100g씩 세절하여 DNA 분석에 의한 한약재 종감별 연구 담당자들에게 전달하였으며 각 추출물을 0.5g 단위로 사업단 본부와 분석팀에게 제공하였다.

제 1 절 방풍의 생리활성성분의 분리

Compound 1 의 구조분석

FAB MS m/z 359 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{20}H_{22}O_6$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 두 개의 6.30, 5.97의 singlet으로 chromone을, 5.15 (1H, t, $J = 5.1$ Hz), 3.00 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz), 2.77 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz) pyrano ring을 예상할 수 있었다. 2.30 (3H, s) 으로 2- CH_3 를, 1.35, 1.34 (3H, s)로 *gem*-(CH_3)₂ 를, 6.06 (1H, q, $J = 6.2$ Hz), 1.89 (3H, dq, $J = 7.4, 1.3$ Hz), 1.82 (3H, s) 를 통해 Angeloyl moiety를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 3'-*O*-Angeloylhamaudol 으로 동정하였다(Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 2 의 구조분석

1H -NMR spectrum 에서 δ 1~4 에서 peak와 ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 10~40 peak가 많음을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상했고, ^{13}C -NMR spectrum 33.9, 26.1 peak 를 통해 double bond가 없음을, Positive FAB MS m/z 415 $[M+H]^+$ 를 통해 분자량을 414로 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 b-sitosterol 로 동정하였다 (Chang *et al.*, 1981).

Compound 3 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 247 $[M+H]^+$ peak와 ^{13}C -NMR spectrum 을 통해 화합물의 분자식을 $C_{14}H_{14}O_4$ 로 추정할 수 있었다. 1H -NMR spectrum δ 7.58, 6.19 (1H, d, $J=9.5$ Hz) 를 통해 coumarin임을 예상할 수 있었고, 4.71 (1H, t, $J=9.0$ Hz), 3.20 (2H, d, $J=9.0$ Hz) 을 통해 fura ring을, 1.53, 1.22 (3H, s) 을 통해 *gem*-(CH_3)₂를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 marmesin으로 동정하였다 (Hagemeier *et al.*, 1999).

Compound 4 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 301 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{17}H_{16}O_5$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 doublet 8.09, 6.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz)으로 coumarin임을 예상할 수 있었고, 7.59, 6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)으로 furan ring을, 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.82 (2H, d, $J = 7.1$ Hz)로 O-CH₂-CH를 예상할 수 있었다. 1.71, 1.67 (3H, s)로 2개의 methyl기를 4.15에서 methoxyl 기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물 의 구조를Phelloptin으로 동정하였다 (Bergendorf *et al.*, 1997).

Compound 5 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 427 $[M+H]^+$ 의 peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{24}H_{26}O_7$ 으로 추정할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 7.56, 6.18 (1H, d, $J=9.5$ Hz)를 통해 coumarin 입을 예상할 수 있었고, 두 개의 1.46, 1.43 (3H, s) 을 통해 *gem*-dimethyl 기를, 6.00, 5.98 (1H, m), 1.93, 1.80 (6H, m)를 통해 2개의 Angeloyl moiety를 확인했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 anomalin 으로 동정하였다 (Tosun *et al.*, 2006).

Compound 6 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 271 $[M+H]^+$ Peak와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{14}O_4$ 로 예상할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 7.74, 6.34 (1H, d, $J = 9.5$ Hz)를 통해 coumarin을 예상할 수 있었고, 7.66, 6.79 (1H, d, $J = 2.2$ Hz)를 통해 furan ring, 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz), 4.98 (2H, d, $J = 7.1$ Hz) peak를 통해 O-CH₂-CH를, 1.71, 1.69 (3H, s)로 2개의 methyl기를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를impertorin으로 동정하였다 (Bergendorf *et al.*, 1997).

Compound 7 의 구조분석

Positive EI MS m/z 216 $[M]^+$ 와 ^{13}C -NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $C_{12}H_8O_4$ 으로 추정할 수 있었다. 1H -NMR spectrum 에서 7.83, 6.43 (1H, d, $J=9.6$ Hz) coumarin임을 예상할 수 있었고, 7.90, 6.87 (1H, d, $J=2.2$ Hz)에서 furan ring을 4.15 에서 singlet 의 methoxyl 기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 xanthotoxin으로 동정하였다(Muller *et al.*, 2004).

Compound 8 의 구조분석

Positive EI MS 에서 m/z 328 $[M]^+$ peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_8$ 으로 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 7.57, 6.19 (1H, d, $J=9.5$ Hz) coumarin임을 예상할 수 있었고, 5.03 (1H, t, $J=9.1$), 3.26 (2H, br d, $J=9.1$)에서 furan ring을, 5.95 (1H, q, $J=8$ Hz), 1.29, 1.15 (each 3H, s)에서 angeloyl기를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 deltoin으로 동정하였다 (Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 9의 구조분석

Positive EI MS m/z 216 $[M]^+$ 와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$ 으로 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 8.15, 6.26 (1H, d, $J=9.9$ Hz)을 통해 coumarin을 예상할 수 있었고, 7.57, 6.87 (1H, d, $J=2.5$ Hz)에서 furan ring을, 4.25 에서 singlet 의 methoxyl기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 bergapten으로 동정하였다(Muller *et al.*, 2004).

Compound 10의 구조분석

$^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 δ 1~4 에서 peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 10~40 peak가 많음을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상했고, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 138.3, 129.3 peak 를 통해 double bond를 예상할 수 있었고, Positive FAB MS m/z 413 $[M+H]^+$ 를 통해 분자량을 412로 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 stigmasterol 로 동정하였다 (Susidarti *et al.*, 2007).

Compound 11 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 375 $[M+H]^+$ Peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_7$ 로 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의 6.74, 6.52의 singlet으로 chromone을, 5.37 (1H, t, $J = 5.2$ Hz), 3.18 (1H, dd, $J = 17.5, 5.0$ Hz), 3.01 (1H, dd, $J = 17.5, 5.0$ Hz)를 통해 pyrano ring을 예상할 수 있었다. 4.66 (2H, s) 으로 $\text{CH}_2\text{-O}$ 를, 1.40 (3H, s), 1.33 (3H, s)로 $\text{gem-(CH}_3)_2$ 를, 5.94 (1H, q, $J = 7.2\text{Hz}$), 1.91 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.83 (3H, s)를 통해

Angeloyl moiety를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Ledebouriellol 으로 동정하였다 (Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 12 의 구조분석

Positive EI MS m/z 276 $[M]^+$ Peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 로 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의 6.27, 5.93의 singlet으로 chromone을, 3.86 (1H, t, $J=5.0$ Hz), 2.93 (1H, dd, $J=17.4, 5.0$ Hz)을 통해 치환된 pyrano ring을 예상 할 수 있었다. 1.38, 1.33 (3H, s)을 통해 *gem*-(CH_3)₂을, 13.02 singlet 의 OH기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Hamadol으로 동정하였다 (Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 13 의 구조분석

Positive EI MS m/z 386 $[M]^+$ peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 을 통해 화합물의 분자식을 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_8$ 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 7.71, 6.41 (1H, d, $J=9.4$ Hz)를 통해 coumarin임을 예상할 수 있었고, 7.39, 7.32, 7.26, 4.44를benzene ring을, 4.28 (2H, br d, $J=13.0$ Hz) 를 통해 $\text{CH}_2\text{-O}$, 3.77, 3.70 (3H, s)를 통해 2개의 methoxyl 기를 확인 했다 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 8'-Epicleomioscin으로 동정하였다 (Ahmad *et al.*, 2004).

Compound 14 의 구조분석

Positive FAB MS m/z 263 $[M+H]^+$ peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 을 통해 분자 화합물의 분자식을 $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 로 추정할 수 있었고, $^1\text{H-NMR}$ δ 7.61, 6.20 (1H, d, $J=9.5$ Hz)을 통해 coumarin임을 예상할 수 있었다. 5.41 (1H, d $J=4.5$ Hz), 4.40 (1H, d, $J=4.5$) 을 통해 furan ring을, 1.32, 1.30 3H peak를 통해*gem*-(CH_3)₂를 예상할 수 있었다 이상의 결과를 종합하여 문헌치과 비교하여 화합물의 구조를 Xanthoarnol 으로 동정하였다 (Zou *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 1973).

Compound 15 의 구조분석

FAB MS m/z 307 $[M+H]^+$ Peak와 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 로 예상할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum 에서 두 개의6.42, 6.21의 singlet으로 chromone을, 4.69 (1H, t, $J=8.79$ Hz), 3.23 (2H, d, $J=8.79$ Hz)를 통해 furan ring을 예상할 수 있었다. 3.90 singlet

의 methoxyl 기를, 4.45 (2H, br s)에서 CH₂OH를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 cimigugin으로 동정하였다(Sasaki et al., 1982).

Compound 16 의 구조분석

FAB MS m/z 291 [M+H]⁺ Peak와 ¹³C-NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 C₁₆H₁₈O₅로 예상할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 에서 두 개의 6.50, 5.96 singlet 으로 chromone임을 예상할 수 있었고, 4.70 (1H, t, J=8.79 Hz), 3.23 (2H, d, J=8.79 Hz)를 통해 furan ring을, 3.92 singlet 의 methoxyl 기를 확인 했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 5-O-methylvisaminol으로 동정하였다 (Sasaki et al., 1982).

Compound 17 의 구조분석

¹H-NMR spectrum 에서 δ 1~4 에서 peak와 ¹³C-NMR spectrum에서 δ 10~40 peak가 많음을 통해 sterol 계열의 화합물임을 예상했고, ¹³C-NMR spectrum 33.9, 26.1 peak 를 통해 double bond가 없음을, Positive FAB MS m/z 597 [M+Na]⁺ 를 통해 분자량을 576로 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Daucosterol로 동정하였다 (Chang et al., 1981).

Compound 18 의 구조분석

FAB MS m/z 453 [M+H]⁺ Peak와 ¹³C-NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 C₂₂H₂₈O₁₀로 예상할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 에서 두 개의 6.65, 5.96의 singlet으로 chromone을, 4.84 (1H, dd, J = 8.5, 9.0 Hz), 3.32 (2H, m)으로 furan ring을 예상했고, 2.26 (3H, s) 2-CH₃)을 1.26 1.24 (3H, s) 으로 gem-(CH₃)₂를 3.81 (3H, s) methoxyl기를 확인, 4.40 (1H, d, J =7.6 Hz)을 통해 glu-H-1'를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisaminol 으로 동정하였다 (Sasaki H. et al., 1982; Sun A. et al., 2006).

Compound 19 의 구조분석

Positive FAB MS 에서 m/z 409의 [M+H]⁺ peak 와 ¹³C-NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 C₁₇H₁₅O₅으로 추정할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 에서 두 개의 doublet 7.94, 6.22

(1H, d, $J=9.7$ Hz) 으로 coumarin임을 예상할 수 있었고, 1.31, 1.13 (3H, s) 을 통해 *gem*-(CH₃)₂을, 4.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 을 통해 glu-H-1'예상할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 Nodakenin 으로 동정하였다 (Li *et al.*, 2006).

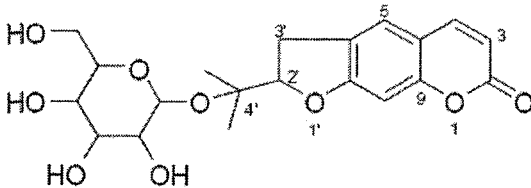
Compound 20 의 구조분석

FAB MS m/z 469 [M+H]⁺ Peak와 ¹³C-NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 C₂₁H₂₁O₁₀로 예상할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 에서 두 개의 6.46, 6.07의 singlet으로 chromone을, 2.03 (3H, s) 를 통해 -CH₃를, 5.02 (1H, d, $J=7.8$ Hz)를 통해 glu-H-1' 를 확인할 수 있었다. 13.74 (1H, s)를 통해 OH기를 1.51, 1.38 (3H, s) *gem*-(CH₃)₂기를 확인했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 *sec-O*-Glucosylhamaudol 으로 동정하였다(Sasaki *et al.*, 1982).

Compound 21 의 구조분석

FAB MS m/z 469 [M+H]⁺ Peak와 ¹³C-NMR spectrum 으로부터 화합물의 분자식을 C₂₂H₂₈O₁₁로 예상할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum 에서 두 개의 6.65, 6.30의 singlet으로 chromone을 예상했다. 4.52 (2H, br s) 를 통해 -CH₂-O-를, 4.28 (1H, d, $J=7.6$ Hz)를 통해 glu-H-1' 를 예상할 수 있었다. 3.82 (3H, s)를 통해methoxyl기를 1.13 (6H, d, $J=3.3$ Hz) *gem*-(CH₃)₂기를 확인했다. 이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물의 구조를 *prim-O*-Glucosylcimifugin 으로 동정하였다 (Sasaki H. *et al.*, 1982; Sun A. *et al.*, 2006).

Compound name	Anomalin		
Molecular formula	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	Molecular weight	426
Source	망풍 [Saposhnikovia divaricata (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
<p>¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.56 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-4), 7.33 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, H-5), 6.78 (1H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz, H-6), 6.67 (H, d, <i>J</i> = 4.7 Hz, H-4'), 6.18 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-3), 5.42 (1H, d, <i>J</i> = 4.7 Hz, H-3'), 1.46 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.43 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), angeloyl moiety: 6.00 (1H, m, β-H), 5.98 (1H, m, β-H), 1.93 (6H, m, CH₃), 1.80 (6H, brd, <i>J</i>=7.4 Hz, CH₃)</p> <p>¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 166.4 (angeloyl C=O), 166.2 (angeloyl C=O), 159.7 (C-2), 156.6 (C-7), 154.0 (C-9), 143.1 (C-4), 140.0 (angeloyl C=C), 138.4 (angeloyl C=C), 129.2 (C-5), 127.3 (angeloyl C=C), 137.0 (angeloyl C=C), 114.3 (C-6), 113.2 (C-3), 112.4 (C-10), 107.5 (C-8), 77.4 (C-2'), 70.1 (C-3'), 60.1 (C-4'), 25.4 (<i>gem</i>-CH₃), 22.4 (<i>gem</i>-CH₃), 20.4 (angeloyl-CH₃), 20.3 (angeloyl-CH₃)</p> <p>Positive FAB MS <i>m/z</i> 427 [M+H]⁺</p>			
References			
1. Pharmaceutical Biology, 44 , 528–533 (2006)			

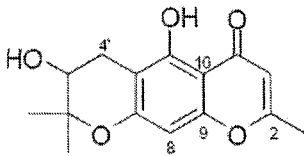
Compound name	Nodakenin		
Molecular formula	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	Molecular weight	408
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (300 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ : 7.94 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz, H-4), 7.50 (1H, s, H-5), 6.83 (1H, s, H-8), 6.22 (1H, d, <i>J</i> = 9.7 Hz, H-3), 4.91 (1H, m, H-3'), 4.41 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, glu-H-1'), 3.26-2.89 (4H, m, sugar proton), 1.31 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.13 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃)</p>			
<p>¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ : 163.0 (C-7), 160.4 (C-2), 155.5 (C-9), 144.7 (C-4), 125.6 (C-6), 124.0 (C-5), 112.2 (C-3), 111.3 (C-10), 97.2 (C-8), 96.9 (glu-1'), 90.0 (C-2'), 77.0 (glu-5'), 76.9 (glu-3'), 76.8 (C-4'), 73.5 (glu-2'), 70.0 (glu-4'), 61.2 (glu-6'), 29.1 (C-3'), 23.2 (<i>gem</i>-CH₃), 21.8 (<i>gem</i>-CH₃)</p>			
<p>Positive FAB MS <i>m/z</i> 409 [M+H]⁺</p>			
<p>References</p> <p>1. Natural Product Research, 20, 860–865 (2006)</p>			

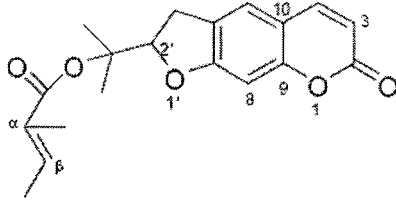
Compound name	Cimifugin		
Molecular formula	$C_{16}H_{18}O_6$	Molecular weight	306
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 6.42 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, s, H-3), 4.69 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-2'), 4.45 (2H, brs, CH_2OH), 3.90 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3.23 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 1.35 (3H, s, <i>gem</i> - CH_3), 1.22 (3H, s, <i>gem</i> - CH_3)			
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 175.5 (C-4), 166.4 (C-2), 164.6 (C-5), 158.9 (C-7), 155.1 (C-9), 117.4 (C-6), 111.4 (C-10), 108.4 (C-3), 93.3 (C-8), 91.1 (C-2'), 70.0 (C-4'), 60.3 ($-\text{OCH}_3$), 59.4 (2-CH_2), 27.0 (C-3'), 25.8 (<i>gem</i> - CH_3), 24.9 (<i>gem</i> - CH_3)			
Positive FAB MS m/z 307 $[\text{M}+\text{H}]^+$			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 3555-3562 (1982)			

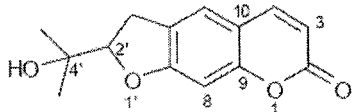
Compound name	<i>sec-O-Glucosylhamaudol</i>		
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	Molecular weight	438
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (500 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 13.74 (1H, s, 5-OH), 6.46 (1H, s, H-8), 6.07 (1H, s, H-3), 5.02 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz, glu-H-1') 3.98-3.15 (4H, m, sugar protons) 3.15 (2H, qd, <i>J</i> = 17.1, 5.8 Hz, H-4'), 2.03 (3H, s, 2-CH ₃), 1.51 (3H, s, gem-CH ₃), 1.38 (3H, s, gem-CH ₃)			
¹³ C-NMR (125 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 182.7 (C-4), 167.3 (C-2), 160.1 (C-5), 159.6 (C-7), 156.3 (C-9), 104.5 (C-10), 104.0 (C-6) 102.6 (glu-1') 108.4 (C-3), 94.9 (C-8), 78.4 (C-2'), 78.4 (C-3'), 78.4 (glu-2',5'), 71.8 (glu-4'), 63.0 (glu-6'), 60.4 (-OCH ₃), 25.6 (<i>gem</i> -CH ₃), 22.5 (<i>gem</i> -CH ₃) 22.4 (C-4'), 20.0 (2-CH ₃)			
Positive FAB <i>m/z</i> 439 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30 , 3555-3562 (1982)			

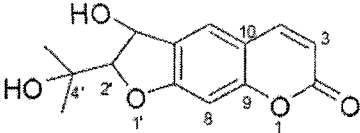
Compound name	<i>prim-O-Glucosylcimifugin</i>		
Molecular formula	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	Molecular weight	468
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 6.65 (1H, s, H-8), 6.30 (1H, s, H-3), 4.70 (1H, m, H-2'), 4.52 (2H, brs, 2-CH ₂), 4.28 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, glu-H-1'), 3.82 (3H, s, -OCH ₃), 3.32 (2H, m, H-3', overlapped), 3.02~3.66 (4H, m, sugar proton), 1.13 (6H, d, <i>J</i> = 3.3 Hz, <i>gem</i> -(CH ₃) ₂)			
¹³ C-NMR (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 175.6 (C-4), 166.4 (C-2), 162.5 (C-5), 159.0 (C-7), 155.2 (C-9), 117.6 (C-6), 111.5 (C-10), 110.3 (C-3), 102.4 (glu-1'), 93.4 (C-8), 91.1 (C-2'), 77.1 (glu-5'), 76.7 (glu-3'), 73.5 (glu-2'), 70.1 (C-4'), 65.2 (2-CH ₂), 61.2 (glu-6'), 60.4 (-OCH ₃), 27.1 (C-3'), 25.9 (<i>gem</i> -CH ₃), 25.0 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 469 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30 , 3555-3562 (1982)			
2. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29 , 751-759 (2006)			

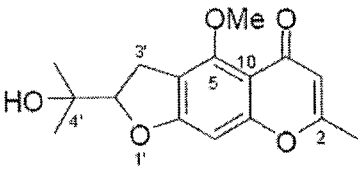
Compound name	8'-<i>epi</i>-Cleomiscosin		
Molecular formula	$C_{20}H_{18}O_8$	Molecular weight	386
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_5D_5N): δ 7.71 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H-4), 7.39 (1H, s, H-2'), 7.32 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6'), 7.26 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.70 (1H, s, H-5), 6.41 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H-3), 5.55 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7'), 4.44 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-8'), 4.28 (2H, brd, $J=13.0$ Hz, H-9'), 3.77 (3H, s, 6-OCH ₃), 3.70 (3H, s, 3'-OCH ₃)			
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_5D_5N): δ 160.8 (C-2), 149.2 (C-3'), 148.9 (C-4'), 146.5 (C-6), 144.5 (C-4), 139.5 (C-9), 138.5 (C-7), 133.1 (C-8), 127.7 (C-1'), 121.8 (C-6'), 116.7 (C-5'), 114.0 (C-3), 112.4 (C-2'), 112.0 (C-10), 101.2 (C-5), 80.0 (C-8'), 77.6 (C-7'), 60.8 (C-9'), 56.1 (6-OCH ₃), 56.0 (3'-OCH ₃)			
Positive EI MS m/z 386 [M] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52 , 1458-1461 (2004)			

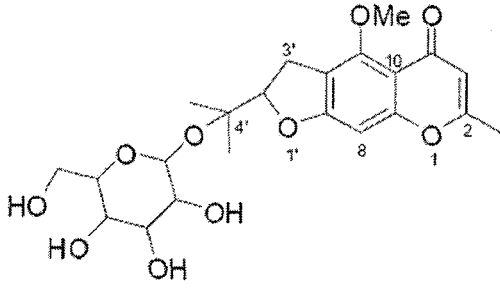
Compound name	Hamaudol		
Molecular formula	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	Molecular weight	276
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ: 13.02 (1H, s, 5-OH), 6.27 (1H, s, H-8), 5.93 (1H, s, H-3), 3.86 (1H, t, <i>J</i> =5.0 Hz, H-3'), 2.93 (1H, dd, <i>J</i> =17.4, 5.0 Hz, H-4'), 2.62 (1H, dd, <i>J</i> =17.4, 5.0 Hz, H-4'), 1.38 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.33 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃)			
¹³ C-NMR (125 MHz, CDCl ₃) δ: 182.5 (C-4), 166.8 (C-2), 159.7 (C-5), 159.1 (C-7), 156.2 (C-9), 108.3 (C-3), 104.4 (C-10), 102.8 (C-6), 94.8 (C-8), 78.4 (C-2'), 68.7 (C-3'), 25.4 (C-4'), 24.8 (<i>gem</i> -CH ₃), 22.1 (<i>gem</i> -CH ₃), 20.6 (2-CH ₃)			
Positive EI MS <i>m/z</i> 276 [M] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30, 3555-3562 (1982)			

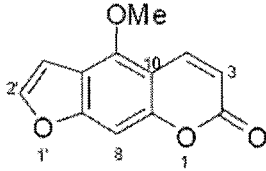
Compound name	Deltoin		
Molecular formula	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	Molecular weight	328
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.57 (1H, d, <i>J</i> =9.5, H-4), 7.19 (1H, s, H-8), 6.72 (1H, s, H-5), 6.19 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, H-3), 5.95 (1H, q, <i>J</i> =8 Hz, β-H), 5.03 (1H, t, <i>J</i> =9.1 Hz, H-2'), 3.26 (2H, br d, <i>J</i> =9.1 Hz, H-3'), 1.60 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.59 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃) angeloyl moiety: 6.06 (1H, q, <i>J</i> = 6.2 Hz, β-H), 1.82 (3H, dq, <i>J</i> = 7.3, 1.2 Hz CH ₃), 1.89 (3H, p, <i>J</i> = 1.5 Hz, CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 167.1 (angeloyl C=O), 163.7 (C-7), 161.4 (C-2), 155.8 (C-9), 143.6 (C-4), 137.6 (angeloyl C=C), 128.7 (angeloyl C=C), 124.5 (C-6), 123.2 (C-5), 112.3 (C-3), 97.9 (C-8), 89.1 (C-2'), 82.0 (C-4'), 29.6 (C-3'), 22.3 (<i>gem</i> -CH ₃), 21.4 (<i>gem</i> -CH ₃), 20.5 (angeloyl CH ₃), 15.6 (angeloyl CH ₃)			
Positive EI MS <i>m/z</i> 328 [M] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 3555-3562 (1982)			

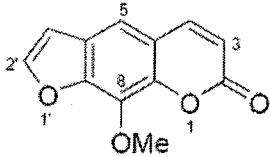
Compound name	Marmesin		
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	Molecular weight	246
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.58 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-4), 7.20 (1H, s, H-5), 6.73 (1H, s, H-8), 6.19 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz, H-3), 4.71 (1H, t, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-2'), 3.20 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz, H-3'), 1.53 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.22 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ : 163.1 (C-7), 161.4 (C-2), 155.0 (C-9), 143.6 (C-4), 125.0 (C-6), 123.4 (C-5), 112.8 (C-10), 112.4 (C-3), 98.8 (C-8), 91.1 (C-2'), 71.3 (C-4'), 28.1 (C-3') 25.7 (<i>gem</i> -CH ₃), 24.8 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 247 [M+H] ⁺			
References			
1. Phytochemistry, 51 , 629-635 (1999)			

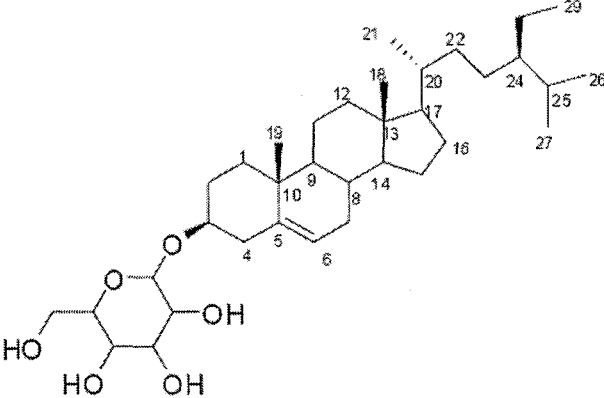
Compound name	Xanthoarnol		
Molecular formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	Molecular weight	262
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 7.61 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, H-4), 7.45 (1H, s, H-5), 6.76 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, H-3), 5.41 (1H, d, <i>J</i> =4.5 Hz, H-3'), 4.40 (H, d, <i>J</i> =4.5, H-2'), 1.32 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.30 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃)			
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃) δ : 163.0 (C-7), 161.1 (C-2), 155.9 (C-9), 143.6 (C-4), 129.7 (C-6), 124.7 (C-5), 113.4 (C-10), 112.9 (C-3), 98.7 (C-8), 98.4 (C-2'), 72.3 (C-3'), 71.2 (C-4'), 25.7 (<i>gem</i> -CH ₃), 24.9 (<i>gem</i> -CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 263 [M+H] ⁺			
References			
1. Journal of Organic Chemistry, 70 , 1761-1770 (2004)			
2. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 21 , 2346-2348 (1973)			

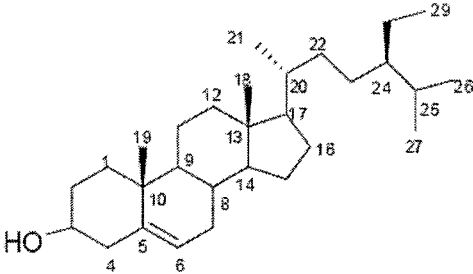
Compound name	5-O-Methylvisamminol		
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	Molecular weight	290
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 6.50 (1H, s, H-8), 5.96 (1H, s, H-3), 4.70 (1H, t, <i>J</i>=8.8 Hz, H-2'), 3.92 (3H, -OCH₃), 3.23 (2H, d, <i>J</i>=8.8 Hz, H-3'), 2.25 (3H, brs, 2-CH₃), 1.34 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.22 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃)</p>			
<p>¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 177.0 (C-4), 164.2 (C-5), 163.2 (C-2), 159.6 (C-7), 155.7 (C-9), 117.0 (C-6), 111.7 (C-3), 112.2 (C-10), 93.6 (C-8), 91.3 (C-2'), 71.3 (C-4'), 60.8 (-OCH₃), 27.6 (C-3'), 25.5 (<i>gem</i>-CH₃), 24.4 (<i>gem</i>-CH₃)</p>			
Positive FAB <i>m/z</i> 291 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52 , 1458-1461 (2004)			

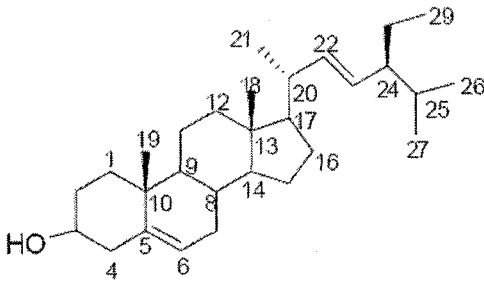
Compound name	4'-O-β-D-glucosyl-5-O-methylvisamminol		
Molecular formula	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	Molecular weight	452
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) : 6.65 (1H, s, H-8), δ 5.96 (1H, brs, H-3), 4.84 (1H, dd, <i>J</i> = 9.0, 8.5 Hz, H-2'), 3.32 (2H, m, H-3', overlapped), 2.26 (3H, s, 2-CH₃), 1.26 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 1.24 (3H, s, <i>gem</i>-CH₃), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 4.40 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, glu-H-1'), 3.02~3.40 (6H, m, sugar protons)</p>			
<p>¹³C-NMR (75MHz, DMSO-<i>d</i>₆): δ 176.9 (C-4), 165.0 (C-5), 164.7 (C-2), 159.7 (C-7), 155.7 (C-9), 117.5 (C-6), 111.2 (C-10), 111.1 (C-3), 97.7 (glu-1'), 93.6 (C-8), 90.7 (C-2'), 77.6 (C-4'), 77.2 (glu-5'), 76.8 (glu-3'), 74.0 (glu-2'), 70.5 (glu-4'), 61.3 (glu-6'), 60.7 (-OCH₃), 27.9 (C-3'), 23.4 (<i>gem</i>-CH₃), 22.5 (<i>gem</i>-CH₃), 19.8 (2-CH₃).</p>			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 453 [M+H] ⁺			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52, 1458-1461 (2004) 2. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29, 751-759 (2006) 			

Compound name	Bergapten		
Molecular formula	C ₁₂ H ₈ O ₄	Molecular weight	216
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (300 MHz, C ₅ D ₅ N) δ : 8.15 (1H, d, J=9.8 Hz, H-4), 7.57 (1H, d, J=2.5 Hz, H-3'), 7.12 (1H, s, H-8), 6.87 (1H, d, J=2.5 Hz, H-2'), 6.26 (1H, d, J=9.8 Hz, H-3), 4.25 (3H, s, -OCH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ : 161.2 (C-2), 158.4 (C-7), 152.7 (C-9), 149.6 (C-5), 144.8 (C-2'), 139.3 (C-4), 112.9 (C-6), 112.6 (C-3), 106.4 (C-10), 105.0 (C-3'), 93.9 (C-8), 60.1 (-OCH ₃)			
Positive EI MS <i>m/z</i> 216 [M] ⁺			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30, 3555-3562 (1982) 2. Acta Pharmaceutica, 54, 277-285 (2004) 			

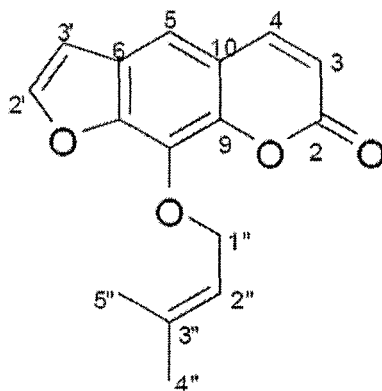
Compound name	Xanthotoxin		
Molecular formula	$C_{12}H_8O_4$	Molecular weight	216
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_5D_5N) δ : 7.91 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 7.78 (1H, d, $J=9.6$ Hz, H-4), 7.37 (1H, s, H-5), 6.87 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.41 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H-3), 4.15 (3H, s, -OCH ₃)			
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_5D_5N) δ : 160.4 (C-2), 147.8 (C-7), 147.8 (C-4), 147.5 (C-2'), 143.9 (C-9), 132.8 (C-8), 126.5 (C-6), 116.4 (C-10), 114.9 (C-3), 113.0 (C-5), 107.2 (C-3'), 60.1 (-OCH ₃)			
Positive EI MS m/z 216 [M] ⁺			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 52, 1458-1461 (2004) 2. Acta Pharmaceutica, 54, 277-285 (2004) 			

Compound name	Daucosterol		
Molecular formula	C ₃₅ H ₆₀ O	Molecular weight	576
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹³C-NMR (75Hz, C₅D₅N) δ : 141.0 (C-5), 122.3 (C-6), 102.7 (C-1'), 78.7 (C-3'), 78.7 (C-3), 78.5 (C-5'), 76.4 (C-2'), 71.8 (C-4'), 62.9 (C-6'), 56.9 (C-14), 56.3 (C-17), 50.4 (C-9), 46.1 (C-24), 42.5 (C-13), 40.1 (C-4), 39.4 (C-12), 36.4 (C-20), 37.5 (C-1), 36.9 (C-10), 32.2 (C-8), 32.1 (C-22), 32.1 (C-7), 30.3 (C-2), 29.6 (C-25), 28.2 (C-16), 28.6 (C-23), 26.6 (C-15), 23.0 (C-28), 21.1 (C-11), 21.0 (C-27), 19.4 (C-19), 19.3 (C-26), 19.1 (C-21), 12.2 (C-29), 12.1 (C-18)</p>			
<p>Positive FAB MS <i>m/z</i> 599 [M+Na]⁺</p>			
<p>References</p> <ol style="list-style-type: none"> <li data-bbox="211 1537 917 1581">1. Korean Journal of Pharmacognosy, 12, 12-24 (1981) 			

Compound name	β -sitosterol		
Molecular formula	$C_{29}H_{50}O$	Molecular weight	414
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 140.7 (C-5), 121.7 (C-6) 71.8 (C-3), 56.7 (C-14), 56.0 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13), 42.3 (C-4), 39.8 (C-12), 37.3 (C-1), 36.5 (C-10), 36.1 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-8), 31.9 (C-7), 31.7 (C-2), 29.7 (C-25), 28.2 (C-16), 26.1 (C-23), 24.3 (C-15), 23.0 (C-28), 21.1 (C-11), 19.8 (C-27), 19.4 (C-19), 19.0 (C-26), 18.8 (C-21), 12.0 (C-29), 11.8 (C-18)			
Positive FAB MS m/z 415 $[M+H]^+$			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Korean Journal of Pharmacognosy, 12, 12-24 (1981) 2. Goad L., Akihisa T. <i>Analysis of Sterol</i>, Blackid Academie & Professional, London, 378 (1997) 			

Compound name	Stigmastrol		
Molecular formula	C ₂₉ H ₄₈ O	Molecular weight	412
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃) δ : 140.7 (C-5), 138.3 (C-22), 129.3 (C-23), 121.7 (C-6), 71.8 (C-3), 56.9 (C-14), 55.9 (C-17), 51.2 (C-24), 50.1 (C-9), 42.3 (C-4), 42.2 (C-13), 40.5 (C-20), 39.8 (C-12), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 31.9 (C-25), 31.9 (C-8), 31.9 (C-7), 31.6 (C-2), 29.1 (C-16), 25.4 (C-28), 24.3 (C-15), 22.2 (C-21), 21.2 (C-27), 21.1 (C-11), 19.4 (C-19), 19.0 (C-26), 12.8 (C-29), 12.0 (C-18)			
Positive FAB MS m/z 413 [M+H] ⁺			
References			
1. Goad L., Akihisa T. <i>Analysis of Sterol</i> , Blackid Academie & Professional, London, 380 (1997)			

Compound name	Imperatorin		
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	Molecular weight	270
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		



¹H-NMR (300 Hz, CDCl₃) δ: 7.74 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4) 7.66 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 7.33 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-3'), 6.34 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 5.58 (1H, t, *J* = 7.1 Hz, H-2''), 4.98 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, H-1''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-5'')

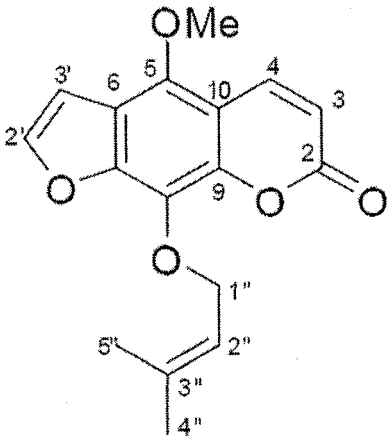
IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 1720 (C=O), 1587, 1448

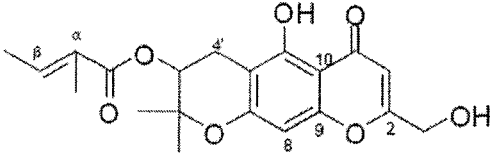
UV λ_{\max} (log ϵ) nm: 223 (4.5), 241 (4.2), 269 (4.3), 313 (4.1)

Positive FAB MS *m/z* 271 [M+H]⁺

References

1. *Phytochemistry*, **44**, 1121-1124 (1997)

Compound name	Phellopterin		
Molecular formula	$C_{17}H_{16}O_5$	Molecular weight	300
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.09 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4), 7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-3), 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 4.82 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 4.15 (OCH ₃), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.67 (3H, s, H-5'')			
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1729 (C=O), 1604, 1477			
UV λ_{max} (log ϵ) nm: 230 (4.2), 250 (4.1), 257 (4.1), 294 (3.8)			
Positive FAB MS m/z 301 [M+H] ⁺			
References			
1. Phytochemistry, 44 , 1121-1124 (1997)			
2. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30 , 3555-3562 (1982)			

Compound name	Ledebouriellol		
Molecular formula	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	Molecular weight	374
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
			
¹ H-NMR (500 MHz, C ₅ D ₅ N) δ: 13.7 (1H, s, 5-OH), 6.74 (1H, s, H-8), 6.52 (1H, s, H-3), 5.37 (1H, t, <i>J</i> = 5.1 Hz, H-3'), 4.66 (2H, s, 2-CH ₂), 3.18 (1H, dd, <i>J</i> = 17.5, 5.1 Hz, H-4'), 3.01 (1H, dd, <i>J</i> = 17.5, 5.0 Hz, H-4'), 1.40 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.33 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), angeloyl moiety: 5.94 (1H, q, <i>J</i> = 7.2 Hz, β-H), 1.91 (3H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz, CH ₃), 1.83 (3H, s, CH ₃)			
¹³ C-NMR (125 MHz, C ₅ D ₅ N ₃) δ: 183.1 (C-4), 171.6 (angeloyl C=O), 166.9 (C-2), 160.1 (C-5), 159.4 (C-7), 156.3 (C-9), 139.1 (angeloyl C=C), 127.8 (angeloyl C=C), 106.0 (C-3), 105.2 (C-10), 102.9 (C-6), 95.1 (C-8), 77.4 (C-2'), 69.9 (C-3'), 60.7 (2-CH ₂), 24.6 (<i>gem</i> -CH), 23.1 (<i>gem</i> -CH ₃), 23.1 (C-4'), 20.6 (angeloyl CH ₃), 15.8 (angeloyl CH ₃)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 375 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 3555-3562 (1982)			

Compound name	3'-O-Angeloylhamaudol		
Molecular formula	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	Molecular weight	358
Source	방풍 [<i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]		
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 12.98 (1H, s, 5-OH), 6.30 (1H, s, H-8), 5.97 (1H, s, H-3), 5.15 (1H, t, <i>J</i> = 5.1 Hz, H-3'), 3.00 (1H, dd, <i>J</i> = 17.6, 5.1 Hz, H-4'), 2.77 (1H, dd, <i>J</i> = 17.6, 5.1 Hz, H-4'), 2.30 (3H, s, 2-CH ₃), 1.35 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), 1.34 (3H, s, <i>gem</i> -CH ₃), angeloyl moiety: 6.06 (1H, q, <i>J</i> = 6.2 Hz, β-H), 1.89 (3H, dq, <i>J</i> = 7.4, 1.3 Hz, β-CH ₃), 1.82 (3H, s, α-CH ₃)			
¹³ C-NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 182.5 (C-4), 166.8 (angeloyl C=O), 166.7 (C-2), 159.5 (C-5), 158.8 (C-7), 156.2 (C-9), 139.0 (angeloyl C=C), 127.4 (angeloyl C=C), 108.3 (C-3), 104.3 (C-10), 102.6 (C-6), 94.7 (C-8), 76.9 (C-3'), 69.5 (C-2'), 24.9 (<i>gem</i> -CH ₃), 23.0 (<i>gem</i> -CH ₃), 22.7 (C-4'), 20.5 (angeloyl CH ₃), 15.7 (angeloyl CH ₃).			
IR ν _{max} (KBr) cm ⁻¹ : 1714 (C=O), 1654 (C=O, angeloyl moiety)			
UV λ _{max} (log ε) nm : 230.1 (3.2), 250.2 (3.1), 257.9 (3.1), 294.7 (2.8)			
Positive FAB MS <i>m/z</i> 359 [M+H] ⁺			
References			
1. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 30 , 3555-3562 (1982)			

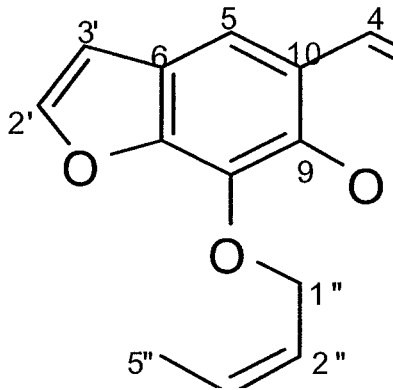
-규격서-

imperatorin

기원: 방풍 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]

성상: 무색 분말

구조:



imperatorin은 방풍의 뿌리의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획한 층에서 분리된 쿠마린계 물질이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 270, 분자식 $C_{16}H_{14}O_4$ 을 가진다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) δ : 7.74 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4) 7.66 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.33 (1H, s, H-5), 6.79 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3'), 6.34 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 4.98 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.69 (3H, s, H-5'')

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1720 (C=O), 1587, 1448

UV λ_{max} (log ϵ) nm : 223 (4.5), 241 (4.2), 269 (4.3), 313 (4.1)

Positive FAB MS m/z 271 $[\text{M}+\text{H}]^+$

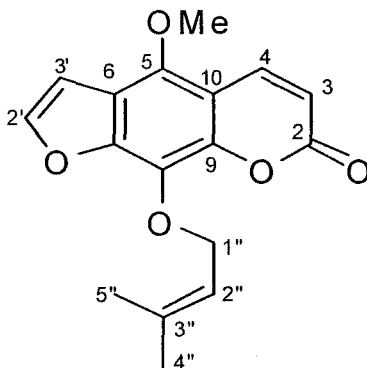
-규격서-

phellopterin

기원: 방풍 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]

성상: 약간의 노란색을 띤 분말

구조:



imperatorin은 방풍의 뿌리의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획한 층에서 분리된 쿠마린계 물질이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 300, 분자식 $C_{17}H_{16}O_5$ 을 가진다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.09 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4) 7.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 6.25 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-3), 5.58 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2''), 4.82 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 4.15 (OCH₃), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.67 (3H, s, H-5'')

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1729 (C=O), 1604, 1477

UV λ_{max} (log ϵ) nm : 230 (4.2), 250 (4.1), 257 (4.1), 294 (3.8)

Positive FAB MS m/z 301 $[\text{M}+\text{H}]^+$

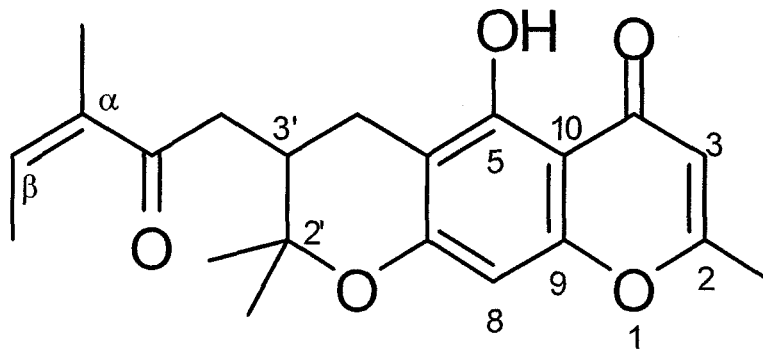
-규격서-

3'-O-angeloylhamaudol

기원: 방풍 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (Umbelliferae)]

성상: 무색 분말

구조:



3'-O-angeloylhamaudol은 방풍의 뿌리의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트(EtOAc)로 분획한 층에서 분리된 페놀릭계 물질이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 358, 분자식 $C_{21}H_{24}O_5$ 을 가진다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 6.30 (1H, s, H-8), 5.97(1H, s, H-3), 5.15 (1H, t, $J = 5.1$ Hz, H-3'), 3.00 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz, H-4'), 2.77 (1H, dd, $J = 17.6, 5.1$ Hz, H-4'), 2.30 (3H, s, 2- CH_3), 1.35 (3H, s, *gem*- CH_3), 1.34 (3H, s, *gem*- CH_3), angeloyl moiety: 6.06(1H, q, $J = 6.2$ Hz, β -H), 1.89 (3H, dq, $J = 7.4, 1.3$ Hz, β - CH_3), 1.82 (3H, s, α - CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 182.5 (C-4), 166.8(angeloyl C=O), 166.7 (C-2), 159.5 (C-5), 158.8 (C-7), 156.2 (C-9), 139.0 (angeloyl C=C), 127.4 (angeloyl C=C), 108.3 (C-3), 104.3 (C-10), 102.6 (C-6), 94.7 (C-8), 76.9 (C-3'), 69.5 (C-2'), 24.9 (*gem*- CH_3), 23.0 (*gem*- CH_3), 22.7 (C-4'), 20.5 (angeloyl CH_3), 15.7 (angeloyl CH_3),

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 1714 (C=O), 1654 (C=O, angeloyl moiety)

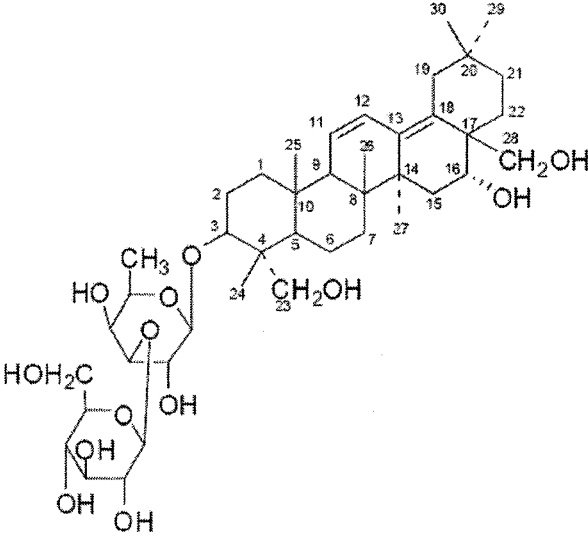
UV λ_{max} (log ϵ) nm : 230.1 (3.2), 250.2 (3.1), 257.9 (3.1), 294.7 (2.8)

Positive FAB MS m/z 359 [M+H] $^+$

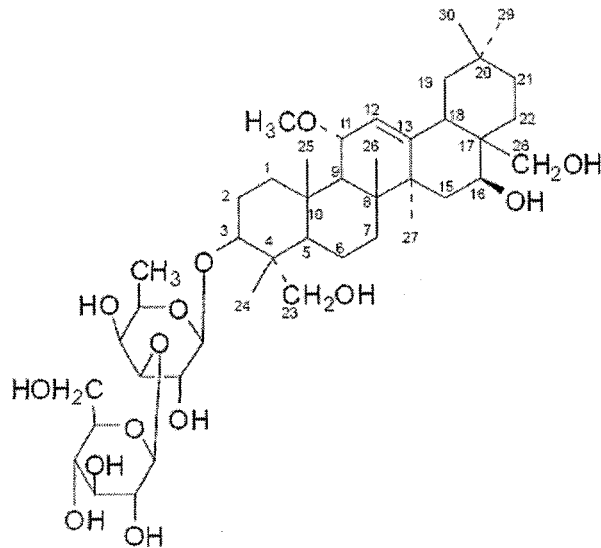
방풍에서 분리한 화합물

화합물	이름	성상	양	현재 보유량	제공량
1	3'- <i>O</i> -angeloylhamaudol	colorless crystal	1000mg	730mg	250mg
2	β -sitosterol	white crystal	200mg	200mg	0mg
3	marmesin	colorless powder	3mg	3mg	0mg
4	phellopterin	slightly yellow powder	40mg	20mg	20mg
5	anomalin	white powder	200mg	190mg	10mg
6	imperatorin	colorless powder	150mg	20mg	100mg
7	xanthotoxin	white solid	5mg	5mg	0mg
8	deltoin	Colorless plate	30mg	10mg	20mg
9	bergapten	white solid	60 mg	10mg	50mg
10	stigmasterol	white crystal	30 mg	30 mg	0mg
11	ledebouriellol	Slightly powder	30mg	30mg	0mg
12	hamaudol	Slightly powder	220mg	200mg	10mg
13	8'-epicleomioscin	white powder	8 mg	8mg	0mg
14	xanthoarnol	colorless solid	5mg	5mg	0mg
15	cimifugin	Slightly powder	15mg	5mg	10mg
16	5- <i>O</i> -methylvisamminol	white powder	40mg	30mg	10mg
17	daucosterol	Slightly powder	1000mg	1000mg	0mg
18	4'- <i>O</i> -glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisamminol	white powder	40mg	10mg	20mg
19	nodakenin	white powder	30mg	20mg	10mg
20	sec- <i>O</i> -glucosylhamaudol	colorless solid	1200mg	1000mg	100mg
21	prim- <i>O</i> -glucosylcimifugin	colorless solid	100mg	80mg	10mg

제 2 절 시호의 생리활성성분의 분리

Compound name	Saikosaponin B ₂		
Molecular formula	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	Molecular weight	780
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹H-NMR (300 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 0.87 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-24), 0.98 (3H, s, H-30), 1.00 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-25), 1.44 (3H, s, H-6'), 1.68 (3H, s, H-27), ¹³C-NMR (75 Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 136.0 (C-13), 133.0 (C-18), 126.2 (C-11), 126.2 (C-12), 106.6 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.2 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.7 (C-3''), 78.4 (C-5''), 75.8 (C-2''), 72.1 (C-4'), 72.1 (C-4''), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 67.6 (C-16), 64.7 (C-28), 64.0 (C-23), 62.6 (C-6''), 53.9 (C-9), 47.3 (C-5), 45.2 (C-17), 43.6 (C-4), 41.8 (C-14), 41.0 (C-8), 38.9 (C-19), 38.3 (C-1), 36.4 (C-10), 35.4 (C-21), 32.5 (C-15), 32.5 (C-20), 32.2 (C-7), 31.8 (C-30), 26.1 (C-2), 25.0 (C-29), 24.4 (C-22), 21.8 (C-27), 18.8 (C-6), 18.2 (C-25), 17.2 (C-26), 17.2 (C-6'), 13.1 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3424 (-OH), 1376, 1070, FABMS <i>m/z</i> 803 [M+Na]⁺</p>			
References			
1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980)			
2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985)			

Compound name	Saikosaponin B ₃		
Molecular formula	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	Molecular weight	812
Source	시호 [Bupleurum falcatum L. (Umbelliferae)]		

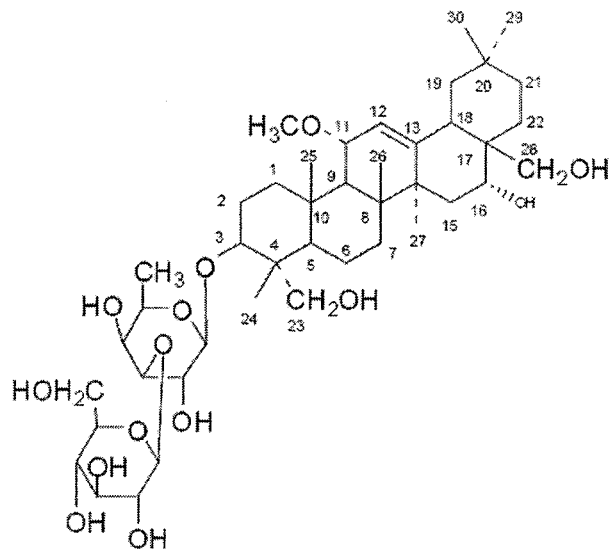


¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.87 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-30), 0.98 (3H, s, H-29), 1.06 (3H, s, H-25), 1.09 (3H, s, H-27), 1.38 (3H, s, H-26), 1.40 (3H, s, H-6'), ¹³C-NMR (100 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 148.2 (C-13), 122.5 (C-12), 106.7 (C-1''), 106.0 (C-1'), 85.2 (C-3'), 81.7 (C-3), 78.7 (C-3''), 78.4 (C-5''), 75.8 (C-11), 75.8 (C-2''), 72.1 (C-4''), 72.1 (C-4'), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 68.5 (C-28), 66.1 (C-16), 64.2 (C-23), 62.6 (C-6''), 52.0 (C-9), 49.6 (C-5), 47.6 (C-19), 43.9 (C-14), 43.9 (C-18), 43.8 (C-4), 43.8 (C-17), 41.9 (C-8), 40.1 (C-1), 38.0 (C-10), 36.8 (C-15), 34.2 (C-21), 33.2 (C-7), 33.1 (C-29), 31.0 (C-20), 26.4 (C-27), 26.2 (C-2), 26.2 (C-22), 24.0 (C-30), 18.3 (C-6), 18.2 (C-26), 17.9 (C-25), 17.1 (C-6'), 13.5 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3421 (-OH), 1376, 1070, FABMS *m/z* 835 [M+Na]⁺

References

1. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2367-2383(1980)
2. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3349-3355(1985)

Compound name	Saikosaponin B ₄		
Molecular formula	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	Molecular weight	812
Source	쑥 [Bupleurum falcatum L. (Umbelliferae)]		



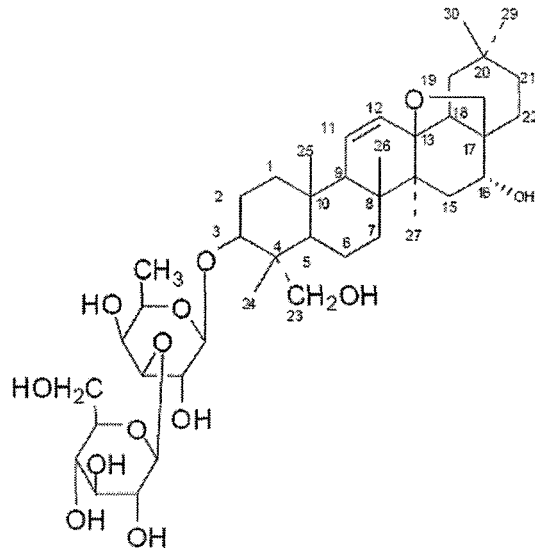
¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.96 (3H, s, H-24), 1.00 (3H, s, H-30), 1.00 (3H, s, H-29), 1.12 (3H, s, H-25), 1.13 (3H, s, H-26), 1.39 (3H, s, H-6'), 1.87 (3H, s, H-27), ¹³C-NMR (100 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 149.8 (C-13), 122.4 (C-12), 106.6 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.3 (C-3'), 82.7 (C-3), 78.3 (C-3''), 78.3 (C-5''), 76.3 (C-11), 75.6 (C-2''), 74.3 (C-16), 72.0 (C-4'), 72.0 (C-4''), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 70.0 (C-28), 64.3 (C-23), 62.6 (C-6''), 51.7 (C-9), 49.6 (C-5), 48.3 (C-19), 43.8 (C-4), 43.4 (C-17), 42.0 (C-14), 41.9 (C-18), 40.7 (C-8), 40.1 (C-1), 38.2 (C-10), 37.2 (C-15), 35.0 (C-21), 33.3 (C-7), 33.3 (C-29), 31.3 (C-20), 30.8 (C-22), 26.5 (C-27), 26.2 (C-2), 25.0 (C-30), 18.4 (C-26), 18.2 (C-6), 17.9 (C-25), 17.2 (C-6'), 13.6 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3426(-OH), 1378, 1072, FABMS *m/z* 835 [M+Na]⁺

References

1. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2367-2383(1980)
2. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3349-3355(1985)

Compound name	Saikosaponin C		
Molecular formula	$C_{48}H_{78}O_{17}$	Molecular weight	926
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
<p>$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, pyridine-d_5) δ: 0.83 (3H, s, H-29), 0.89 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-25), 1.12 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.33 (3H, s, H-26), 1.64 (3H, s, H-6'), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, pyridine-d_5) δ: 132.1 (C-11), 131.1 (C-12), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 89.0 (C-3), 83.9 (C-13), 79.8 (C-4'), 78.4 (C-3'''), 78.3 (C-5'''), 76.7 (C-3'), 75.1 (C-5'), 74.8 (C-2'), 74.5 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.7 (C-28), 72.5 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.5 (C-5''), 69.1 (C-6'), 64.0 (C-16), 62.5 (C-6''), 55.2 (C-5), 52.8 (C-9), 52.1 (C-18), 47.0 (C-17), 45.6 (C-14), 42.1 (C-8), 39.6 (C-4), 38.4 (C-1), 37.7 (C-19), 36.3 (C-10), 36.1 (C-15), 34.7 (C-21), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.6 (C-20), 27.9 (C-23), 26.4 (C-2), 25.7 (C-22), 23.8 (C-30), 20.9 (C-27), 20.0 (C-26), 18.5 (C-6), 18.1 (C-25), 17.8 (C-6''), 16.3 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm^{-1}: 3432 (-OH), 1376, 1070. FABMS m/z 949 $[\text{M}+\text{Na}]^+$</p>			
References			
1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980)			
2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985)			

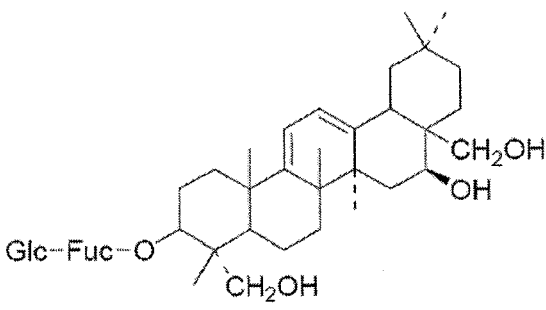
Compound name	Saikosaponin D		
Molecular formula	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	Molecular weight	780
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		



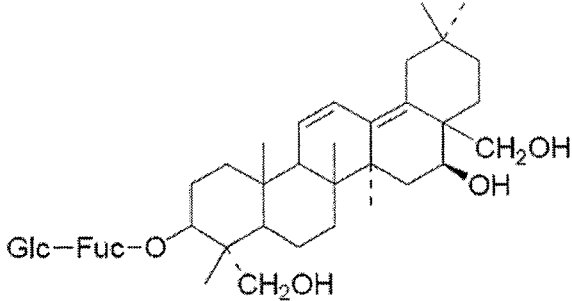
¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.94 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-25), 1.36 (3H, s, H-26), 1.45(3H, s, H-6'), 1.63 (3H, s, H-27), ¹³C-NMR (100Hz, pyridine-*d*₅) δ: 131.9 (C-11), 131.9 (C-12), 106.5 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.2 (C-13), 85.1 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.6 (C-3''), 78.3 (C-5''), 77.7 (C-28), 77.1 (C-16), 75.7 (C-2''), 72.1 (C-4''), 71.7 (C-4'), 71.5 (C-2'), 71.0 (C-5'), 71.0 (C-23), 62.7 (C-6''), 53.9 (C-9), 51.5 (C-18), 47.3 (C-5), 45.3 (C-17), 43.8 (C-14), 43.7 (C-4), 41.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.3 (C-19), 36.7 (C-21), 36.7 (C-10), 35.4 (C-15), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.8 (C-20), 31.3 (C-22), 26.1 (C-2), 24.3 (C-30), 19.5 (C-26), 18.8 (C-25), 18.0 (C-27), 17.9 (C-6), 17.2 (C-6'), 13.0 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹: 3426 (-OH), 1378, 1072, FABMS *m/z* 803 [M+Na]⁺

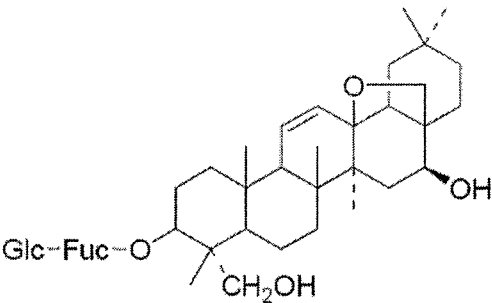
References

1. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2367-2383(1980)
2. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3349-3355(1985)

Compound name	Saikosaponin G		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
¹³ C-NMR (100Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 155.0 (C-9), 145.3 (C-13), 121.2 (C-12), 116.1 (C-11), 106.7 (C-1''), 106.0 (C-1'), 85.3 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.8 (C-3''), 78.4 (C-5''), 75.8 (C-2''), 72.1 (C-4''), 71.8 (C-4'), 71.6 (C-2'), 71.0 (C-5'), 69.5 (C-28), 66.8 (C-16), 64.4 (C-23), 62.7 (C-6''), 47.0 (C-19), 43.8 (C-4), 43.8 (C-5), 43.3 (C-14), 43.2 (C-8), 42.7 (C-18), 40.6 (C-17), 38.7 (C-10), 37.7 (C-1), 36.2 (C-15), 34.1 (C-21), 33.2 (C-29), 32.1 (C-7), 31.0 (C-20), 26.9 (C-2), 26.2 (C-27), 26.2 (C-22), 24.1 (C-30), 21.3 (C-26), 21.1 (C-25), 18.0 (C-6), 17.3 (C-6'), 13.7 (C-24)			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin I		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시 호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
¹³ C-NMR (100Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 154.7 (C-9), 145.3 (C-13), 121.2 (C-12), 116.1 (C-11), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 88.8 (C-3), 79.8 (C-4'), 78.5 (C-3'''), 78.4 (C-5'''), 76.8 (C-3'), 75.5 (C-5'), 75.1 (C-2'), 74.8 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.6 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4''), 70.6 (C-5''), 69.3 (C-28), 69.0 (C-6'), 66.8 (C-16), 62.5 (C-6'''), 51.8 (C-5), 47.1 (C-19), 43.2 (C-14), 43.1 (C-8), 42.7 (C-18), 40.6 (C-17), 39.7 (C-4), 38.7 (C-10), 37.4 (C-1), 36.1 (C-15), 34.1 (C-21), 33.2 (C-29), 32.4 (C-7), 31.0 (C-20), 28.4 (C-23), 27.3 (C-2), 26.1 (C-22), 25.4 (C-27), 24.0 (C-30), 21.2 (C-26), 21.1 (C-25), 18.5 (C-6''), 18.5 (C-6), 17.1 (C-24)			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin B ₁		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시 호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
<p>¹³C-NMR (100Hz, pyridine-<i>d</i>₅) δ: 136.8 (C-13), 133.6 (C-18), 127.1 (C-11), 125.7 (C-12), 106.0 (C-1''), 105.5 (C-1'), 85.2 (C-3'), 82.4 (C-3), 78.3 (C-5''), 78.3 (C-3''), 76.5 (C-16), 75.7 (C-2''), 72.1 (C-4''), 72.1 (C-4'), 71.8 (C-2'), 71.0 (C-5'), 65.2 (C-23), 63.1 (C-6''), 54.7 (C-9), 48.1 (C-5), 44.8 (C-17), 44.6 (C-14), 43.7 (C-4), 40.8 (C-8), 38.7 (C-1), 38.7 (C-19), 36.9 (C-10), 35.4 (C-21), 35.1 (C-15), 32.8 (C-20), 32.8 (C-30), 32.2 (C-7), 30.2 (C-22), 25.8 (C-2), 25.0 (C-29), 22.1 (C-27), 18.8 (C-6), 18.5 (C-25), 17.3 (C-26), 12.9 (C-24), 6.41 (C-28)</p>			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin A		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
			
¹³ C-NMR (75 Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 132.2 (C-11), 131.1 (C-12), 106.4 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.1 (C-3'), 83.9 (C-13), 81.6 (C-3), 78.6 (C-3''), 78.3 (C-5''), 75.7 (C-2''), 73.0 (C-28), 72.1 (C-4''), 71.7 (C-4'), 71.5 (C-2'), 70.9 (C-5'), 64.0 (C-16), 64.0 (C-23), 62.6 (C-6''), 53.0 (C-9), 52.1 (C-18), 47.3 (C-5), 46.9 (C-17), 45.6 (C-14), 43.7 (C-4), 42.2 (C-8), 38.7 (C-1), 37.7 (C-19), 36.2 (C-10), 36.2 (C-15), 34.7 (C-21), 33.6 (C-29), 31.5 (C-20), 31.5 (C-7), 26.0 (C-2), 25.7 (C-22), 23.8 (C-30), 20.8 (C-27), 20.0 (C-26), 18.7 (C-25), 17.6 (C-6), 17.2 (C-6'), 13.0 (C-24)			
References <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

Compound name	Saikosaponin H		
Molecular formula		Molecular weight	
Source	시호 [<i>Bupleurum falcatum</i> L. (Umbelliferae)]		
¹³ C-NMR (100 Hz, pyridine- <i>d</i> ₅) δ: 135.8 (C-13), 133.4 (C-28), 133.4 (C-18), 127.0 (C-11), 125.7 (C-12), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 89.0 (C-3), 79.9 (C-4'), 78.4 (C-5'''), 78.4 (C-3'''), 76.8 (C-3'), 76.6 (C-16), 75.5 (C-5'), 75.2 (C-2'), 74.8 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.6 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.6 (C-5''), 69.1 (C-6'), 62.6 (C-6'''), 55.3 (C-5), 54.2 (C-9), 44.4 (C-17), 44.3 (C-14), 40.4 (C-8), 39.6 (C-4), 38.6 (C-1), 38.5 (C-19), 36.5 (C-10), 35.1 (C-21), 34.8 (C-15), 32.7 (C-7), 32.7 (C-20), 32.3 (C-30), 30.0 (C-22), 28.0 (C-23), 26.5 (C-2), 24.8 (C-29), 22.0 (C-27), 18.5 (C-6), 18.5 (C-25), 18.2 (C-6''), 17.0 (C-26), 16.4 (C-24)			
References			
<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 28, 2367-2383(1980) 2. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> 33, 3349-3355(1985) 			

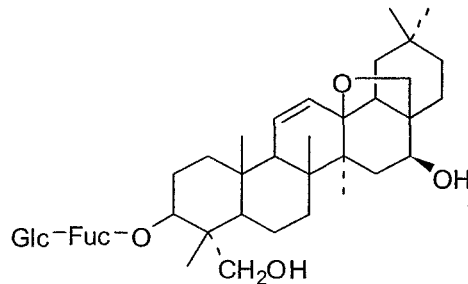
-규격서-

saikosaponin A

기원: 시호 [*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae)]

성상: 흰색 분말

구조:



Saikosaponin A는 시호의 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올(*n*-BuOH)로 분획한 층에서 분리된 시호사포닌이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 780, 분자식 $C_{42}H_{68}O_{13}$ 을 가진다. 227°C에서 액상으로 녹는다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

^{13}C -NMR (75 Hz, pyridine- d_5) δ : 83.9 (C-13), 52.1 (C-18), 132.2 (C-11), 131.1 (C-12), 106.4 (C-1''), 105.9 (C-1'), 85.1 (C-3'), 81.6 (C-3), 78.6 (C-3''), 78.3 (C-5''), 75.7 (C-2''), 71.7 (C-4'), 72.1 (C-4''), 71.5 (C-2'), 70.9 (C-5'), 64.0 (C-16), 73.0 (C-28), 64.0 (C-23), 62.6 (C-6''), 53.0 (C-9), 47.3 (C-5), 46.9 (C-17), 43.7 (C-4), 45.6 (C-14), 42.2 (C-8), 37.7 (C-19), 38.7 (C-1), 36.2 (C-10), 34.7 (C-21), 36.2 (C-15), 31.5 (C-20), 31.5 (C-7), 23.8 (C-30), 26.0 (C-2), 33.6 (C-29), 25.7 (C-22), 20.8 (C-27), 17.6 (C-6), 18.7 (C-25), 20.0 (C-26), 17.2 (C-6'), 13.0 (C-24)

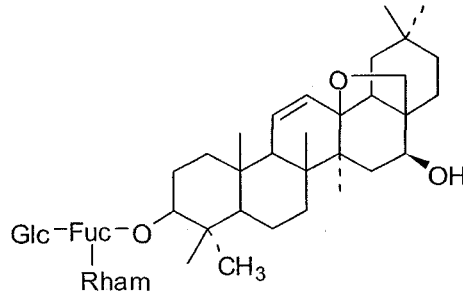
-규격서-

saikosaponin C

기원: 시호 [*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae)]

성상: 흰색 분말

구조:



Saikosaponin C는 시호의 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올(*n*-BuOH)로 분획한 층에서 분리된 시호사포닌이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 926, 분자식 C₄₈H₇₈O₁₇ 을 가진다. 312°C에서 액상으로 녹는다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

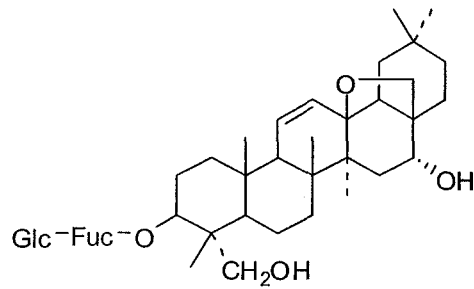
¹H-NMR (300 Hz, pyridine-*d*₅) δ: 0.83 (3H, s, H-29), 0.89 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-30), 0.95 (3H, s, H-25), 1.12 (3H, s, H-27), 1.27 (3H, s, H-23), 1.33 (3H, s, H-26), 1.64 (3H, s, H-6''),
¹³C-NMR (100Hz, pyridine-*d*₅) δ: 132.1 (C-11), 131.1 (C-12), 106.7 (C-1'), 105.1 (C-1'''), 102.9 (C-1''), 89.0 (C-3), 83.9 (C-13), 79.8 (C-4'), 78.4 (C-3'''), 78.3 (C-5'''), 76.7 (C-3'), 75.1 (C-5''), 74.8 (C-2'), 74.5 (C-2'''), 73.8 (C-4''), 72.7 (C-28), 72.5 (C-3''), 72.5 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 70.5 (C-5''), 69.1 (C-6'), 64.0 (C-16), 62.5 (C-6'''), 55.2 (C-5), 52.8 (C-9), 52.1 (C-18), 47.0 (C-17), 45.6 (C-14), 42.1 (C-8), 39.6 (C-4), 38.4 (C-1), 37.7 (C-19), 36.3 (C-10), 36.1 (C-15), 34.7 (C-21), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.6 (C-20), 27.9 (C-23), 26.4 (C-2), 25.7 (C-22), 23.8 (C-30), 20.9 (C-27), 20.0 (C-26), 18.5 (C-6), 18.1 (C-25), 17.8 (C-6''), 16.3 (C-24), IR ν_{max}(KBr) cm⁻¹:3432(-OH),1376,1070, FABMS *m/z* 949[M+Na]⁺

-규격서-**saikosaponin D**

기원: 시호 [*Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae)]

성상: 흰색 분말

구조:



Saikosaponin D는 시호의 뿌리의 메탄올 추출물을 부탄올(*n*-BuOH)로 분획한 층에서 분리된 시호사포닌이다. 그 구조는 위 그림과 같으며 분자량은 780, 분자식 $C_{42}H_{68}O_{13}$ 을 가진다. 214°C에서 액상으로 녹는다. 그 분광학적 데이터는 다음과 같다.

$^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, pyridine- d_5) δ : 0.94 (3H, s, H-24), 0.96 (3H, s, H-30), 1.02 (3H, s, H-29), 1.02 (3H, s, H-25), 1.36 (3H, s, H-26), 1.45(3H, s, H-6'), 1.63 (3H, s, H-27), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, pyridine- d_5) δ : 131.9 (C-11), 131.9 (C-12), 85.2 (C-13), 81.6 (C-3), 77.7 (C-28), 77.1 (C-16), 71.0 (C-23), 53.9 (C-9), 51.5 (C-18), 47.3 (C-5), 45.3 (C-17), 43.8 (C-14), 43.7 (C-4), 41.9 (C-8), 38.6 (C-1), 38.3 (C-19), 36.7 (C-21), 36.7 (C-10), 35.4 (C-15), 33.7 (C-29), 31.8 (C-7), 31.8 (C-20), 31.3 (C-22), 26.1 (C-2), 24.3 (C-30), 19.5 (C-26), 18.8 (C-25), 18.0 (C-27), 17.9 (C-6), 13.0 (C-24), 105.9 (C-1'), 71.5 (C-2'), 85.1 (C-3'), 71.7 (C-4'), 71.0 (C-5'), 17.2 (C-6'), 106.5 (C-1''), 75.7 (C-2''), 78.6 (C-3''), 72.1 (C-4''), 78.3 (C-5''), 62.7 (C-6''), IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} :3426(-OH),1378,1072, FABMS m/z 803 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

시호의 분리성분

	화합물명	보유량(mg)	총분리량(mg)	제공량(mg)
1	saikosaponin D	1150	1700	500
2	saikosaponin C	610	1600	700
3	saikosaponin B ₄	550	1100	500
4	saikosaponin B ₂	550	1050	500
5	saikosaponin B ₃	540	1000	500
6	saikosaponin A	100	240	100
7	saikosaponin H	125	125	0
8	saikosaponin I	90	90	0
9	saikosaponin B ₁	60	60	0
10	saikosaponin G	10	10	0

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

- 방풍으로부터 21종의 화합물(3'-*O*-angeloylhamaudol, β -sitosterol, marmesin, phellopterin, anomalin, imperatorin, xanthotoxin, deltoin, bergapten, stigmasterol, ledebouriellol, hamaudol, 8'-epicleomioscin, xanthoarnol, cimifugin, 5-*O*-methylvisamminol, daucosterol, 4'-*O*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, nodakenin, *sec-O*-glucosylhamaudol, *prim-O*-glucosylcimifugin)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 방풍의 지표성분으로는 imperatorin, phellopterin, 3'-*O*-angeloylhamaudol을 제시하는 바이다.
- 시호로부터 13종의 화합물(saikosaponin D, saikosaponin C, saikosaponin B₄, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin A, saikosaponin H, saikosaponin I, saikosaponin B₁, saikosaponin G와 미지시료 crystal, 5-1, 5-2. 현재 구조분석 중)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 시호의 지표성분으로는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 제시하는 바이다.

제5장 제 1 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)
총괄과제책임자	김진웅 / 서울대학교 약학대학 / 생약학

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	coumain from Saposhnikoviae Radix	포스터 발표	김소준, 정유현	한중일 생약학 심포지움	2008.		국내
2	Acetylcholinesterase Inhibitory Components from Saposhnikovia divaricata	포스터 발표	김소준	생약학회 정기총회	2008.12	서울	국내

다. 지식재산권

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, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

제6장 기타 중요변경사항

1세부과제 연구비 5백만원 증가.

제7장 참고문헌

제8장 첨부서류

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

제 2 세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS를 이용한 시호, 방풍의 생리활성성분
동시분석법 개발

세부과제책임자 : 한 상 범 / 중앙대학교 약학대학 / 약품분석학

제 1 장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

제 1 절 세부연구개발과제의 목표

목
표

□ 1 년차 연구개발과제의 목표

- 방풍을 대상으로 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 동시분석법을 확립하고, HPLC-UV 분석법 검증을 수행하며, 방풍에 대한 시중 유통 한약재 수집과 추출법 최적화 방법 개발, 함량분석을 실시한다

□ 2 년차 연구개발과제의 목표

- 시호에 대한 TLC, HPLC-ELSD, LC-MS 분석법을 동시에 개발하고 분석법 검증을 수행하며, 이를 바탕으로 시중 유통되고 있는 시호를 수집하여 확립된 분석법으로 함량분석을 실시하고 시호와 방풍에 대한 패턴분석을 실시한다.

제 2 절 세부연구개발과제의 목표달성도

연구개발 추진내용	연구개발 연차	
	1차년	2차년
- 방풍의 TLC 및 HPLC-UV 분석	100%	-
- 방풍의 LC-MS/MS 분석	100%	-
- 방풍 분석법 validation	100%	-
- 방풍의 함량분석	100%	-
- 방풍의 추출법 확립	100%	-
- 방풍의 TLC 패턴 평가	100%	-
- 시호의 TLC 및 HPLC-ELSD 분석	-	100%
- 시호의 LC-MS 분석	-	100%
- 시호 분석법 validation	-	100%
- 시호의 함량분석	-	100%
- 시호의 추출법 확립	-	100%
- 시호의 TLC 패턴 평가	-	100%
- 시호의 HPLC-ELSD 및 방풍의 HPLC-UV 패턴 분석	-	100%
- 시호와 방풍의 주 생리활성성분에 대한 안정성 추정	-	100%
- 시호와 방풍의 추출법에 대한 회수율 추정	-	100%

제 3 절 국내·외 기술개발 현황

1. 방풍

저자(국가)	분석기기	분석성분	분석대상	비고	발행 년도
Jinna <i>et al.</i> (China)	LC-ESI-MS	prim-O-glucosylcimifugin 4-O-d-glucosyl-5-O-methylvisaminol	취 혈장 중 방풍 성분 분석		2008
Jie <i>et al.</i> (China)	LC-ESI-MS ⁿ	방풍 32 성분	방풍	방풍 성분 동정	2008
Emi <i>et al.</i> (Japan)	HPLC-UV 2D-NMR	방풍 성분 중 chromones, coumarins, polyacetylenes, 1-acylglycerols	방풍	방풍의 진통 성분의 확인	2001

2. 시호

가. 국내 기술개발 현황

저자(국가)	분석기기	분석성분	분석대상	비고	발행 년도
Park <i>et al.</i> (Korea)	HPLC-UV	saikosaponin A, C, D	시호	-	2000
Kim <i>et al.</i> (Korea)	HP-TLC, HPLC-UV	saikosaponin A, B ₁ , B ₂ , D	시호	HP-TLC와 HPLC-UV 분석법의 비교 (함량분석 x)	1995

나. 국외 기술개발 현황

저자(국가)	분석기기	분석성분	분석대상	비고	발행 년도
Liau <i>et al.</i> (Taiwan)	LC-ESI-MS/MS	saikosaponin A, C	시호 및 시호를 포함한 한약제제	-	2007
Xiao <i>et al.</i> (China)	HPLC-UV	-	시호	fingerprint analysis	2006
Li <i>et al.</i> (China)	HPLC-PDA HPLC-MS	saikosaponin A, B ₁ , B ₂ , C, D	시호	함량분석은 saikosaponin A, D 만을 대상으로 함.	2005
Bao <i>et al.</i> (China)	LC-ESI-MS/MS	saikosaponin A, B ₁ , B ₂ , C, D, G, H, I, A, C, D, H, B ₂ , C ₂	시호 및 시호를 포함한 한약제제	함량분석은 8종 saikosaponin만을 대상으로 함.	2004

제 2 장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

제 1 절 방풍의 생리활성성분 동시분석법 개발

1. TLC 분석법 개발

가. 표준액의 조제

- (1) 제 1 세부 기관으로부터 유통중인 방풍과 갯방풍, 식방풍을 제공 받았다.
- (2) 방풍과 식방풍, 갯방풍을 분말화한 후 70 호 체로 균질화하여 10 mg을 정밀하게 취하여 10 mL의 methanol을 가하였다.
- (3) 방풍 생리활성성분 (imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol) 표준품을 5 mg씩 각각 취하여 5 mL 용량플라스크에 담은 후 methanol로 표선을 맞추었다. 이 표준용액에 methanol을 가하여 각각 20 µg/mL의 농도로 희석하였다.

나. 분석조건

- 역상의 고정상과 순상의 고정상에 각 성분의 표준용액과 각 추출용액을 40 µL씩 점적한 후, 전개용매의 종류와 조성을 변경하며, 두 가지 검출파장 (단파장; 254 nm, 장파장; 366 nm)에서의 UV/Vis 발색과 황산발색, anisaldehyde 발색으로 확인하여 비교분석 하였다.

2. HPLC-UV 분석법 개발

가. 표준액과 방풍 추출용액의 조제

- (1) 제 1세부 기관으로부터 제공받은 방풍의 생리활성성분 (imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol) 표준품을 각각 5 mg씩 정밀히 달아 5 mL의 methanol에 녹인 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 각각 1000 µg/mL의 stock solution을 만들었다. 이를 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 희석하여 그 농도가 600 µg/mL이 되도록 하였다.
- (2) 내부표준물질인 byakangelicol을 5 mg 정밀히 달아 5 mL의 methanol에 녹여 1000 µg/mL의 stock solution을 만들었다. 이를 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 희석하여 그 농도가 20 µg/mL이 되도록 하였다.
- (3) 각 성분별로 적정농도가 되도록 3종류의 표준액을 각각 취하여 잘 섞은 후 농도별로 희석하고 내부표준물질을 균등하게 첨가하여 표준액을 조제하였다.

나. 분석조건

- (1) Methanol 추출물을 검출파장 254 nm, 칼럼 온도 30℃에서 10 μL 주입하였으며 다음의 칼럼들을 비교하여 분석하였다.
 - (가) Luna 5u C18(2) (4.6 × 150 mm, 5 μm) column : 일반적인 ODS column
 - (나) Luna Phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm) column : Phenyl-hexyl column
 - (다) Deverosil RPAQUEOUS C30 (4.6 × 250 mm, 5 μm) column : C 30 COlumn
 - (라) Xbridge (4.6 × 100 mm, 3.5 μm) column
- (2) Phenyl-hexyl을 사용하여 칼럼 온도 30 ℃에서 이동상의 유기용매 조성별 (40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%) 분리능과 분리시간을 비교하며 분석하였다.
- (3) 유기용매 조성과 유속을 기울기용리로 변경하며 비교 분석하였다.

3. HPLC-UV 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 2 종류의 coumarine계 성분과 1 종류의 chromone계 성분 및 내부표준물질 (byakangelicol)을 HPLC-UV 분석법으로 분석한 후, 다른 피크에 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 방풍의 세 가지 생리활성성분에 대하여 1 ~ 100 μg/mL의 농도 범위에서 내부표준물질과의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 4가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다.
- 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.
- 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

라. 완전성 시험 (Robustness)

- 분석조건을 고의로 변경시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 칼럼, 온도, 이동상조성

과 유속에 대한 기울기용리조건을 변화시켜 완건성을 평가하였다.

마. 회수율 (Recovery)

- 균일한 입자로 간 방풍 한약재 500 mg씩 정밀히 세 번 무게를 재어 세 가지 농도 (15, 75, 150 μ g/mL)의 생리활성성분 표준품 혼합 용액 500 μ L를 각각 가한 후 확립된 추출법으로 추출하였다. 혼합 용액을 가하지 않은 방풍 한약재 500 mg을 동일한 방법으로 추출하여 각 추출액을 확립된 HPLC-UV 동시분석법 적용하였다. 또한 추출용매에 의한 회석배율을 고려하여 세 가지 방풍의 생리활성성분 표준품이 1.5, 7.5, 15 μ g/mL인 혼합용액을 같은 HPLC-UV분석법에 적용하였다. 이렇게 구하여진 HPLC-UV 크로마토그램에서 방풍의 생리활성성분에 해당하는 피크의 면적을 계산하였다. 혼합용액을 가한 것과 가하지 않은 추출액의 HPLC-UV 크로마토그램에서 방풍의 생리활성성분에 해당하는 피크 면적의 차이를 구한 후 회석한 혼합용액의 HPLC-UV 크로마토그램에서 얻어진 각 성분에 해당하는 피크 면적을 나누어 회수율을 구하였다.

바. 안정성 (Stability)

- 방풍의 세 가지 생리활성성분 각각을 50% acetonitrile로 회석하여 15 μ g/mL의 농도가 되도록 한 혼합용액을 두 개의 폴리프로필렌 튜브에 4 mL 씩 취하여 하나는 4 $^{\circ}$ C로 유지되는 냉장고에 두었고 하나는 실온에 두었다. 이를 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일 째에 확립된 HPLC-UV 분석법에 적용하여 두 조건에서 각 성분들의 안정성을 시험하였다.

4. 추출법 개발

가. 시료의 조제

- 제 1세부 기관으로부터 국산 방풍을 제공받아 이를 분말화한 후 70호 체로 균질화하고 이를 100 mg씩 정밀하게 취하여 10 mL의 추출용매를 가하였다.

나. 분석 조건

- 위 시료를 추출법, 추출용매의 종류, 추출용매의 조성, 추출시간을 변화시켜 추출한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 하고 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 추출용액을 만들었다. 이를 HPLC-UV에 10 μ L 주입하여 피크 면적을 비교분석하였다.

Table 1. 추출율 비교에 적용한 HPLC-UV 조건

Pump	YOUNGLIN SP930D
Detector	YOUNGLIN UV730D
Column	Luna 5u C18(2) (4.6 × 250 mm, 5 μm)
Guard Column	SecurityGuard C18 (4.0 × 3.0 mm)
Mobile phase	Acetonitrile / Water (50/50, v/v)
Injection volume	10 μL
Column Temp.	25°C

5. HPLC-UV 분석법을 이용한 방풍 성분의 함량 분석

가. 시료의 조제

- (1) 시중에서 판매되는 방풍에서 생리활성성분의 함량 분석을 하기 위하여 내부표준물질법을 사용하였다. 유통되고 있는 24종의 방풍 (국내산 11종, 중국산 13종)을 시중에서 구입 혹은 제 1세부 기관으로부터 제공받아 이를 개발한 추출법으로 추출하였다.
- (2) 각각의 추출용액과 20 μg/mL의 내부표준물질 (byakangelicol)과 동량으로 섞어 시료를 조제하였다.

나. 검량선

- (1) 제 1 세부로부터 제공 받은 방풍의 생리활성성분 표준품 세 가지 (imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol)의 stock solution 각각을 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 600 μg/mL이 되도록 희석한 후, 동량으로 섞어 혼합용액에서 각 성분의 농도가 200 μg/mL이 되도록 하였다. 이 용액을 acetonitrile/water 혼합용매 (50/50, v/v)로 희석하여 200, 100, 20, 10, 4, 2 μg/mL이 되도록 하였다.
- (2) 위의 각 농도의 용액을 20 μg/mL의 내부표준물질과 동량으로 섞어 방풍의 생리활성성분의 농도가 100, 50, 10, 5, 2, 1 μg/mL, 내부표준물질의 농도가 10 μg/mL이 되도록 한 후 검량선을 작성하였다.

다. 함량 분석

- 각 시료를 개발한 HPLC-UV 분석법에 적용하여 내부표준물질의 피크와 방풍의 생리활성성분 세 가지 (imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol) 피크의 면적비를 구한 후 검량선에 대입하여 추출용액에서 각 생리활성성분의 농도를 구하였다. 이를 이용하여 24종의 방풍에 함유되어 있는 각 생리활성성분의 백분을 함량을 구하였다. (Table 2. 참조)

Table 2. 시중에 유통 중인 혹은 제 1 세부 기관으로부터 제공받은 방풍 목록

Sample	국내산	Sample	중국산
K1	경상북도 영천	C1	중국산
K2	전라남도 강진	C2	중국산
K3	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 국산	C3	중국산
K4	경상북도 영덕	C4	중국산
K5	전라북도 장수	C5	중국산
K6	강원도 삼척	C6	중국산
K7	경상남도 고성	C7	중국산
K8	강원도 강릉	C8	중국산
K9	전라남도 여수	C9	중국산
K10	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 국산 깃방풍	C10	중국산, 해방풍
K11	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 국산 식방풍	C11	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 내몽고산
-	-	C12	제 1세부 기관으로부터 제공받음, 중국산
-	-	C13	중국산

6. 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. 함량분석에서 구하여진 산지별 기원별 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램에서 주된 피크 15개를 골라 그 면적을 변수로 하여 군집 분석 (Cluster analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis)에 적용하여 패턴분석을 하였다.

나. 이 때 군집 분석과 주성분 분석에는 Kovach Computery Services사의 Multi-Variate Statistical Package (Version 3.13p) 프로그램을 사용하였고, 주성분 분석 결과를 삼차원 plotting할 때 SigmaPlot 2002 for windows (Version 8.0)을 사용하였다.

7. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 개발

가. 방풍의 생리활성 성분의 극성에 따라 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 조건 선택하였다. (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교한 결과 방풍은 (+) ion mode에서 훨씬 더 좋은 감도를 보였다.

나. LC-MS/MS 분석 시 MRM(multiple reaction monitoring) mode로 분석하며, 이 때 각 성분별로 collision cell에서 강도를 조절하여 product ion의 response나 specificity를 고려하며, 최적의

precursor/product ion pair를 선정하였다.

다. 각 성분별로 ion source와 ion detection polarity를 결정하고 LC-MS/MS의 declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP), collision cell entrance potential (CEP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP), curtain gas (CUR), collision gas (CAD), ion spray voltage (IS), temperature (TEM), ion source gas 1 NEB), ion source gas 2 (Turbo gas) 등과 같은 파라미터를 최적화하여, 각 성분별로 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다.

8. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 2 종류의 coumarine계 성분과 1 종류의 chromone계 성분 및 내부표준물질 (glimpiride)이 선택성 높은 LC-MS/MS의 MRM mode로 분석한 후, 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 방풍의 생리활성성분인 imperatorin, phellopterin에 대하여 2.5 ~ 500 ng/mL의 농도 범위에서 3'-O-angeloylhamaudol에 대하여 1 ~ 200 ng/mL의 농도 범위에서 내부표준물질과의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선성을 갖는 지 확인하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5가지 농도에 대하여 하루에 3번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3일간 반복 실험하였다.
- 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.
- 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

라. 정량한계 (Limit of Quantitation)

- 크로마토그램에서 생리활성성분 피크의 신호대 잡음비 (Ratio of signal to noise)가 10 이상인 최저 농도를 구하여 최저 정량한계 농도로 정하였다.

9. 주요기기 및 시약

가. 주요기기

(1) TLC 분석법

- TLC (Linomat IV, CAMAG, USA)

(2) HPLC-UV 분석법

- HPLC : Pump (Waters 600, Waters, USA)
- Autosampler (717 plus, Waters, USA)
- Column oven (Waters Temperature Control Module, Millipore, USA)
- UV detector (Waters 2487, Waters, USA)
- Degasser (ABBOTA, USA)

(3) LC-MS/MS 분석법

- System controller : SCL-10A (Shimadzu, Japan)
- Autosampler : SIL-10AD (Shimadzu, Japan)
- Pumps : LC-10ADvp (Shimadzu, Japan)
- Degasser : DGU-12A (Shimadzu, Japan)
- Column oven : CTO-10ASvp (Shimadzu, Japan)
- MS : API 2000TM (Applied Biosystems, USA)

(4) 기타 기기

- Vortex mixer (G-560, Scientific industries, USA)
- Autopipet (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, BIOHIT, USA)
- Sonicator (D300H, DAIHAN, KR)

나. 표준품 및 시약

- Imperatorin, phellopterin, 3'-*O*-angeloylhamaudol 표준품
- Byakangelicol (HPLC-UV 내부표준물질)
- Glimepiride (LC-MS/MS 내부표준물질)
- Acetonitrile (HPLC grade, J.T.Baker)
- Methanol (HPLC grade, J.T.Baker)
- Water (HPLC grade, J.T.Baker)

제 2 절 시호의 생리활성성분 동시분석법 개발

1. TLC 분석법 개발

가. 표준액의 조제

- (1) 시중에 유통 중인 20종의 시호를 구입하거나 제 1 세부 기관으로부터 제공 받았다.
- (2) 시호를 분말화한 후 70 호 체로 균질화하여 10 mg을 정밀하게 취하여 10 mL의 methanol을 가하였다.
- (3) 시호 생리활성성분 (saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D) 표준품을 5 mg씩 각각 취하여 5 mL 용량플라스크에 담은 후 methanol로 표선을 맞추었다. 이 표준용액에 methanol을 가하여 각각 20 µg/mL의 농도로 희석하였다.

나. 분석조건

- 역상의 고정상과 순상의 고정상에 각 성분의 표준용액과 각 추출용액을 40 µL씩 점적한 후 전개 용매의 종류와 조성을 변경하며 황산발색으로 확인하여 분석 하였다.

2. HPLC-ELSD 분석법의 개발

가. 여러 가지 칼럼을 이용하여 분리능을 비교하고 최적의 칼럼을 선정하고, 선정한 칼럼을 대상으로 기울기 용리로 최적의 분석조건을 확립했다.

나. 이동상은 유기용매의 종류와 조성, 기울기 용리 유무, 기울기 용리 조건, 완충용액의 pH, buffer의 농도, 유량 등을 변화시켜가며 동시에 유효성분들을 분석할 수 있는 최적의 조건을 결정했다

다. 검출기의 최적 조건 선택, 기타 칼럼 온도 등에 따른 분리능 변화도 평가하였다.

라. 확립된 분석법에 대한 validation을 수행하였다. 확립된 분석법으로 시호추출물에 대한 함량분석을 실시하였다.

3. HPLC-ELSD 분석법에 대한 검증 (Validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin

B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I)이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I)이 대하여 직선성을 확인하였다. 신호 대 잡음비 (Signal to Noise Ratio, S/N ratio)가 10이 되는 농도를 최저정량한계 (Limit of Quantification, LOQ)로 설정하였으며, 이를 바탕으로 직선성 범위 (Range)를 설정하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5가지 농도에 대하여 하루에 5번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분 피크 면적의 표준편차를 각 성분의 피크 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

라. 안정성 (Stability)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 각각을 50% acetonitrile로 희석하여 30 µg/mL의 농도가 되도록 한 혼합용액을 두 개의 폴리프로필렌 튜브에 4 mL 씩 취하여 하나는 실온에 두었고 하나는 4°C로 유지되는 냉장고에 두었다. 이를 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일 동안 실온, 4°C에서 보관한 표준액과 안정성시험을 수행하는 날 새로 조제한 표준액과의 면적비로 구했다.

마. 회수율 (Recovery)

- 회수율을 검토하기 위하여 표준품 첨가법을 사용하였다. 10 mL 용량 플라스크에 저, 중, 고농도의 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D 표준액을 각각 1.0 mL씩 가한 후 70% MeOH로 표시선까지 정확하게 맞추었다. 여기에 균질하게 분말화한 시호 시료를 200 mg씩 정밀히 취하여 실온에서 40분 동안 초음파 추출한 후 membrane filter를 하였다. 여과액

(Amount from root sample spiked standard - Amount from root sample)

$$R\% = \frac{\text{Amount from root sample spiked standard} - \text{Amount from root sample}}{\text{Amount from root sample spiked standard}} \times 100$$

Amount from spiked standard

바. 완전성 (Robustness)

- (1) 완전성은 분석법을 개발하는 단계에서 수행하며, 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하였다.
- (2) 칼럼 온도, 유속 그리고 이동상 조성을 변화시켜 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 peak asymmetry (T)를 비교하여 평가하였다.
- (3) 여러가지 조건에서 각각 3번 반복하여 완전성을 평가하였다.

4. 시호의 추출법 개발

가. 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법 중 가장 추출률이 좋은 방법을 선택하였다.

나. Methanol과 ethanol 중 가장 추출률이 좋은 용매를 선택하였다.

다. 100%, 70%, 50% methanol 중 가장 추출률이 좋은 조성을 선택하였다.

라. 추출시간 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분 중 가장 추출률이 좋은 시간을 선택하였다.

5. HPLC-ELSD 분석법을 이용한 시호 성분의 함량 분석

가. 유통되고 있는 국내산 시호 9종과 중국산 시호 11종을 시중에서 구입하거나 제 1 세부 기관으로부터 제공받아, 이를 각각 균질하게 분말화하였다. 분말화한 시호 200 mg를 정밀하게 취한 뒤, 70% MeOH 10 mL를 가하고 40분 동안 실온에서 초음파 추출하였다. 추출물을 membrane filter (0.45 μ m)로 여과한 후 확립한 HPLC-ELSD 분석법을 이용하여 10종의 생리활성성분을 정량분석 하였다. 또한 수집한 시호 20종을 한국한의학연구원에 동정을 의뢰하였다.(Table 3. 참조)

Table 3. Origins of samples collected from local market and Seoul National University

번호	LABEL	기원식물	산지 (한국/ 중국)	생산지역명	구매경로	비고	동정결과
1	K1	북시호	한국	전남 여수 남면	경동시장	-	B. chinense
2	K2	북시호	한국	전남 고흥	경동시장	-	B. falcatum
3	K3	원시호	한국	경남 합천	경동시장	-	미확인
4	K4	북시호	한국	경북 영천 완산	경동시장	-	B. chinense
5	K5	북시호	한국	경기 포천	경동시장	-	B. falcatum
6	K6	북시호	한국	경북 영천 임고	경동시장	-	B. falcatum
7	K7	북시호	한국	검북 영천 화산	한의유통	검열된 것	B. falcatum
8	K8	북시호	한국	-	HMAX	검열된 것	B. falcatum
9	K9	Bupleurum falcatum L.	한국	-	-	서울대 제공	B. falcatum
10	C1	북시호	중국	-	한의유통	검열된 것	B. chinense
11	C2	북시호	중국	-	경동시장	-	미확인
12	C3	북시호	중국	-	경동시장	-	미확인
13	C4	북시호	중국	-	흑석재래시장	-	미확인
14	C5	북시호	중국	감숙성	HMAX	검열된 것	미확인
15	C6	야생채집	중국	사천	Omni-herb	검열된 것	B. chinense
16	C7	Bupleurum chinense D.C.	중국	감숙성	-	서울대 제공	B. chinense
17	C8	Bupleurum scorzoneri folium var.	중국	-	-	서울대 제공	B. sibiricum
18	C9	Bupleurum scorzonerae folium var. 삼도시호	중국	-	-	서울대 제공	B. falcatum
19	C10	Bupleurum longiradiatum Turcz. 죽시호	중국	-	-	서울대 제공	B. longiradiatum
20	C11	Bupleurum chinense D.C.	중국	내몽고	-	서울대 제공	B. longiradiatum

6. 시호의 HPLC-ELSD 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. 함량분석에서 구하여진 산지별 기원별 방풍의 HPLC-ELSD 크로마토그램에서 시호의 생리활성성분 피크의 면적을 변수로 하여 군집 분석 (Cluster analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis)에 적용하여 패턴분석을 하였다.

나. 이 때 군집 분석과 주성분 분석에는 Kovach Computery Survices사의 Multi-Variate Statistical Package (Version 3.13p) 프로그램을 사용하였고, 주성분 분석 결과를 삼차원 plotting 할 때 SigmaPlot 2002 for windows (Version 8.0)을 사용하였다.

7. LC-MS/MS 분석법의 개발

- 시호의 생리활성 성분의 극성에 따라 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 조건 선택하였다. 또한 (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교하여 더 감도가 좋은 조건을 선택하였다.
- LC-MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 SIM (selected ion monitoring) mode를 비교하여 감도와 선택성이 높은 것을 선택하였다.
- 각 성분별로 nebulizer gas, dry gas, dry temperature 등과 같은 파라미터를 최적화하여, 각 성분별로 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다.

8. LC-MS 분석법 검증 (Validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 10 종류의 saponin계 성분이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되는지 확인하였다.

나. 직선성 (Linearity)

- 10 종의 시호 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 에 대하여 50 ~ 2000 ng/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타내는지 확인하였다.

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 가지 농도에 대하여 하루에 3 번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

9. 주요기기 및 시약

가. 주요기기

(1) TLC 분석법

- TLC (Linomat IV, CAMAG, USA)

(2) HPLC-ELSD 분석법

- Instrument : PerkinElmer Series 200 pump, Waters 717plus Autosampler, PerkinElmer Series 200 Column oven, Sedere SEDEX 75 ELSD
- ELSD detector : Sedere SEDEX 75 ELSD

(3) LC-MS 분석법

- HPLC : Agilent 1100 series (Agilent, USA)
- Degasser : G1322A (Agilent, USA)
- BinPump : G1312A (Agilent, USA)
- Autosampler : G1329A (Agilent, USA)
- Autosampler Cooler(ALS Therm) : G1330B (Agilent, USA)
- Column Oven : G1316A (Agilent, USA)
- MS : Agilent 1100 Series LC/MSD TrapSoftWare (Agilent, USA)
- LC control : Chemstation for LC 3D, Rev. A. 08.03 (Agilent, USA)
- MSD Trap Control Ver. 5.0 Build No. 65.0
- LC/MSD Trap Software 4.1 Build 143
- Data Analysis Version 2.1 [Build 49]

(4) 기타 기기

- Vortex mixer (G-560, Scientific industries, USA)
- Autopipet (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, BIOHIT, USA)
- Sonicator (D300H, DAIHAN, KR)

나. 표준품 및 시약

- Saikosaponin A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, D, G, H, I(표준품)
- Ginsenoside R_{b1} (LC-MS 내부표준물질)
- Acetic acid (99.7+%, A.C.S. reagent)
- Formic acid (99.7+%, A.C.S. reagent)
- Acetonitrile (HPLC grade, J.T.Baker)

- Methanol (HPLC grade, J.T.Baker)
- Water (HPLC grade, J.T.Baker)

제 3 장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

제 1 절 방풍의 생리활성성분 동시분석법 개발

1. TLC 분석 법 개발

가. 방풍과 갯방풍, 식방풍 추출물과 방풍의 생리활성성분의 순상 크로마토그램

- 순상 고정상에서 이동상은 hexane/ethylacetate (3/1, V/V)일 때 가장 좋은 분리도를 보였다.

(Figure 1. 참조)

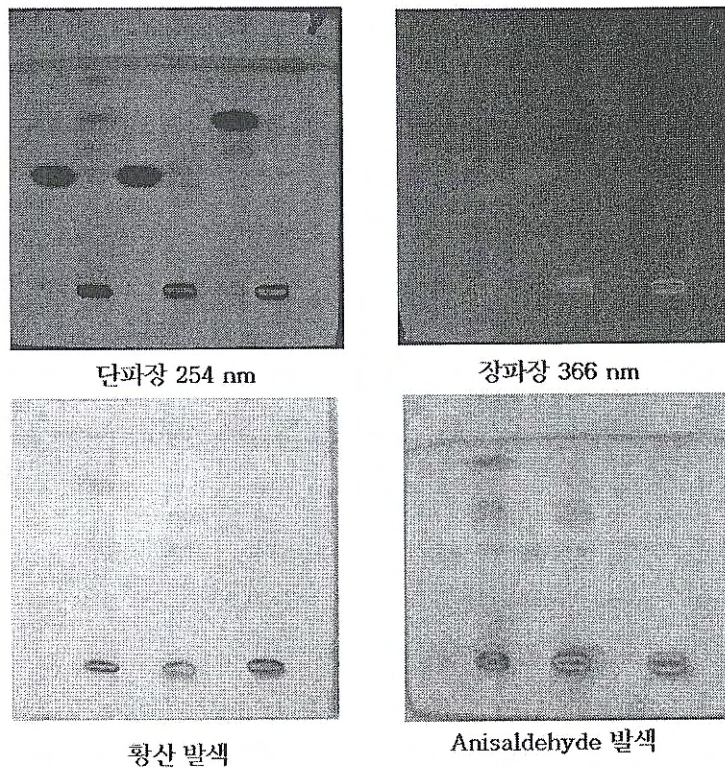


Figure 1. 방풍, 갯방풍, 식방풍의 추출물과 방풍 생리활성성분의 순상 크로마토그램 (점적순서 : 왼쪽부터 phellopterin, 방풍 추출물, imperatorin, 갯방풍 추출물, 3'-O-angleoylhamaudol, 식방풍 추출물)

나. 방풍과 갯방풍, 식방풍 추출물과 방풍의 생리활성성분의 역상 크로마토그램

- 역상 고정상에서 이동상은 methanol/water (3/1)일 때 가장 좋은 분리도를 보였다. (Figure 2. 참조)

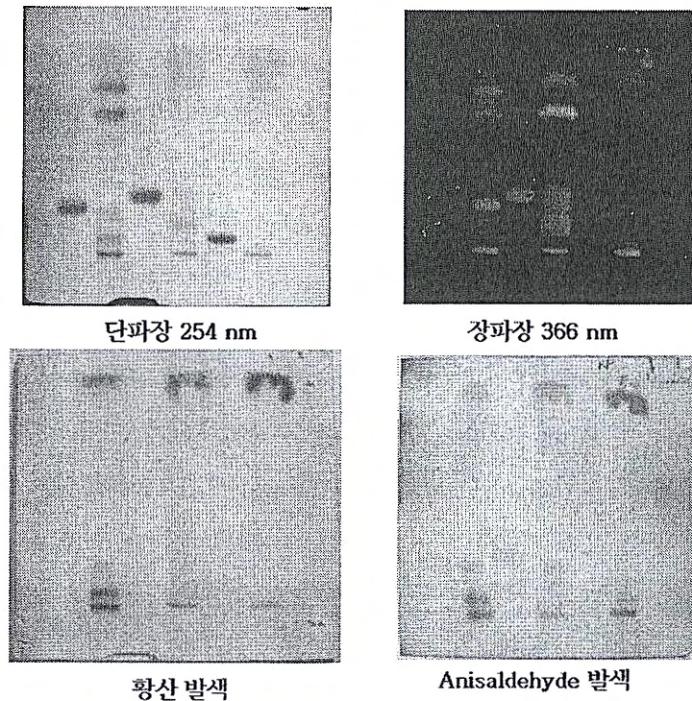


Figure 2. 방풍, 갯방풍, 식방풍의 추출물과 방풍 생리활성성분의 역상 크로마토그램 (점적 순서 : 왼쪽부터 phellopterin, 방풍 추출물, imperatorin, 갯방풍 추출물, 3'-*O*-angleoylhamaudol, 식방풍 추출물)

2. HPLC-UV 분석법의 개발

가. 방풍의 주요 생리활성성분으로 chromone 계열인 3'-*O*-angeloylhamaudol과 coumarine 계열인 imperatorin, phellopterin을 한약재표준화를 위한 동시분석의 대상성분으로 결정하였다. 이는 본 연구팀이 2006년도에 수행한 백지의 coumarine 계열 화합물인 byakangelicol, oxypeucedanin, imperatorin, phellopterin, isoimperatorin과 2개의 성분이 동일한 상황이다. 특히 2006년도에 다른 연구팀에서 수행한 한약재 강활의 생리활성성분 동시분석법에서 대상 성분을 coumarin glycoside 계열인 prim-*O*-glucopyranosyl-cimifugin, marmesinin, 3-hydroxymarmesinin과 coumarin aglycoside 계열인 isoimperatorin, oxypeucedanin으로 선정하였는데, 이 연구팀에서도 백지 분석과 유사한 분석법을 적용하여 동시분석을 수행하였다. 따라서 본 연구팀은 2006년도의 백지, 강활 동시분석법과 같이 C30 칼럼을 사용한 분석법을 사용할 수도 있었으나, 더 개선된 우수한 동시분석법을 확립하기 위하여 다시 다양한 칼럼을 검토하기로 결정하였다. 특히 본 연구에서는 방향족 화합물 (aromatic compound)에 대한 선택성이 우수한 phenyl-hexyl 칼럼을 사용하여 분석을 수행하고자 하였다.

나. 4 가지 칼럼 비교

- 실온 상태에서 water/acetonitrile (60/40, v/v)의 이동상을 사용하여 비교하였다. Luna 5u C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), Hypersil GOLD (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), Xbridge (2.1 × 100 mm, 3.5 μm particle size), Develosil RPAQUEOUS C30 (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size)에 10분의 1로 희석한 methanol 추출용액을 주입하여 비교하였다. 추출용액의 크로마토그램에서 imperatorin의 피크의 분리가 가장 큰 문제였으며 Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm)에서 분리가 가장 잘되었으며 총 분석시간도 가장 짧았다. (Figure 3. 참조)

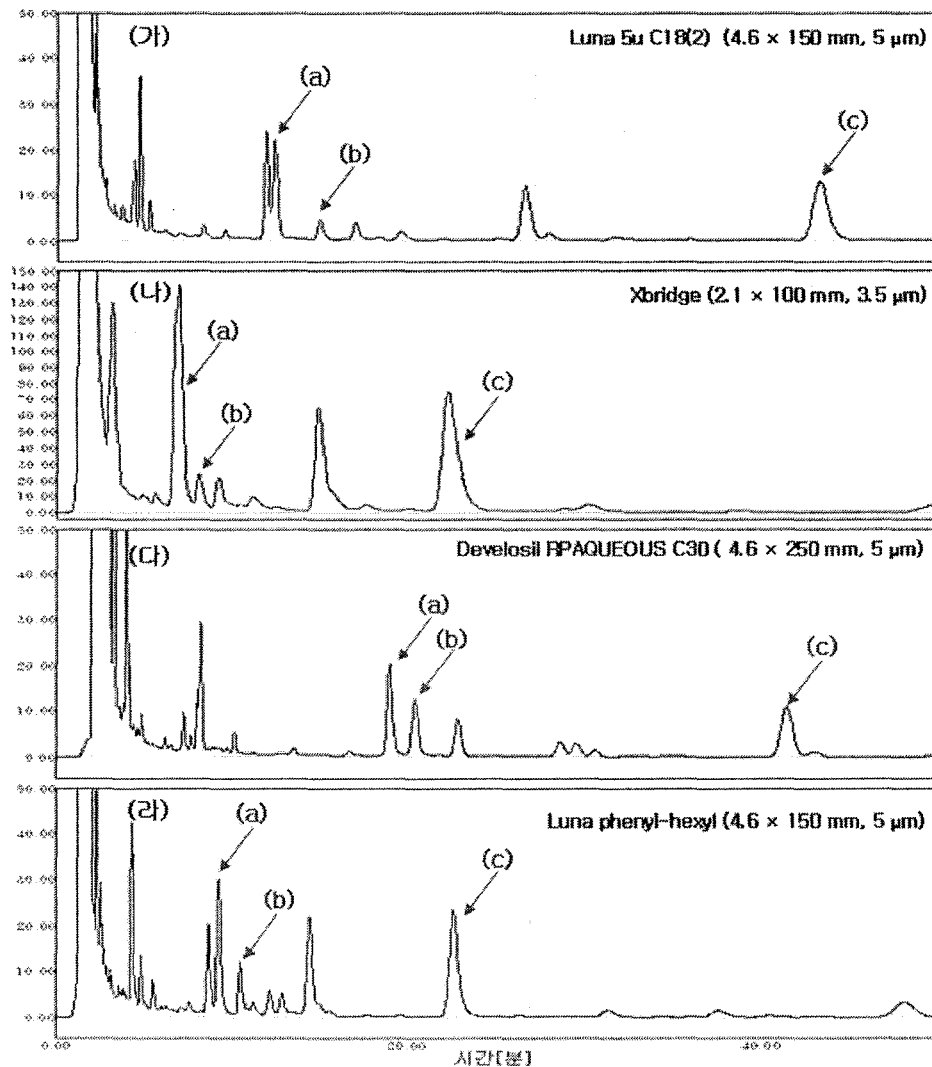


Figure 3. Saposnikovia Radix methanol HPLC-UV chromatograms using 5 different columns (가) Luna 5u C18 (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), (나) Xbridge (2.1 × 100 mm, 3.5 μm particle size), (다) Develosil RPAQUEOUS C30 (4.6 × 250 mm, 5 μm particle size), (라) Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size), (a) Imperatorin, (b) Phellopterin, (c)

3'-*O*-angeloylhamaudol; (Mobile Phase : water/acetonitrile (50/50, v/v), Room Temperature, Flow rate : 1 mL/min except for (나), (Flow rate of (나) : 0.25 mL/min)

다. 기울기 용기조건 확립

- (1) 분석법을 더욱 개선하기 위하여 가장 단시간에 3개 표준품이 잘 분리되는 Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size) column을 이용하여 유기용매의 조성을 변화시켰을 때 분석 시간이 짧고 방풍 추출용액의 크로마토그램에서 생리활성성분의 분리능이 가장 좋은 조건을 확립하였다.
- (2) 유기용매의 비율이 낮을수록 분석시간은 길어지나 방풍 추출용액의 크로마토그램에서 imperatorin의 분리능이 좋아졌다.
- (3) 정량이 가능한 정도로 imperatorin의 피크를 분리하기 위해 acetonitrile/water (40/60, v/v)까지 유기용매의 조성을 낮추었으나 총 분석시간이 200 분 이상으로 길었다. 유기용매의 조성과 유속에 대하여 기울기용리조건을 확립하여 총 분석시간을 45 분 이내로 단축하여 최적의 분석법을 확립하였다. (Table 4. 참조)

Table 4. 방풍의 HPLC-UV 분석 최적 조건

Column	Luna phenyl-hexyl (4.6 × 150 mm, 5 μm particle size)			
Guard Column	SecurityGuard C18 (4.0 × 3.0 mm)			
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water (40/60, v/v) (B) Acetonitrile/Water (90/10, v/v)			
Gradient profile	Time (min)	A (%)	B (%)	유속 (mL/min)
	0.0	100	0	1
	20 → 35	100 → 25	0 → 75	1 → 1.75
	35 → 36	25 → 0	75 → 100	1.75 → 2
Injection volume	10 μL			
Column Temp.	30℃			

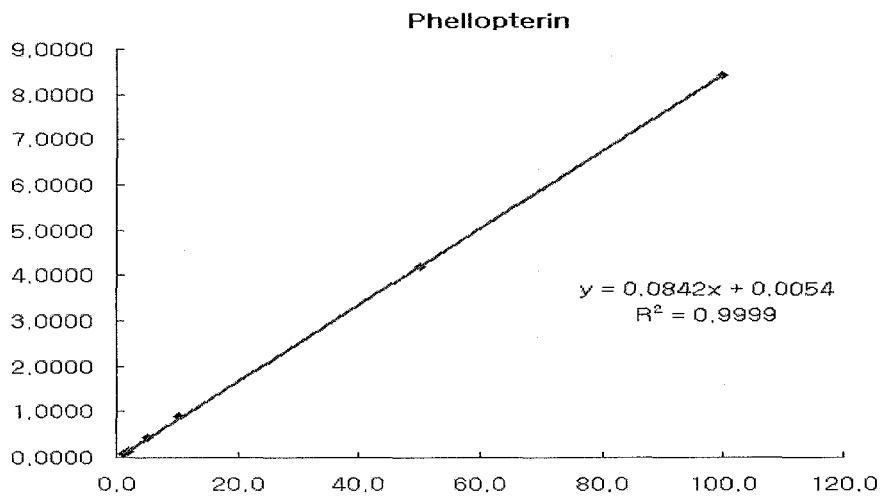
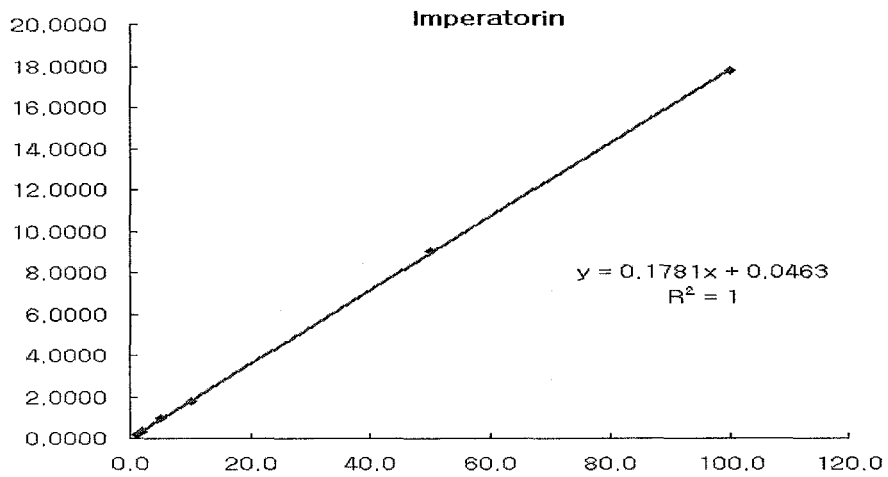
3. HPLC-UV 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 세 가지 방풍 생리활성성분 및 내부표준물질의 머무름 시간은 내부표준물질이 약 11.6분, imperatorin이 약 22.2분, phellopterin이 약 26.3분 그리고 3'-*O*-angeloylhamaudol은 약 32.6분 이었고 방풍의 다른 성분들로부터 양호하게 분리되었다.

나. 직선성 (Linearity)

- 세 가지 방풍 생리활성성분의 표준품에 대하여 1 ~ 100 µg/mL의 농도 범위에서 내부표준물질과의 피크 면적비로 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.9995 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Figure 4. 참조)



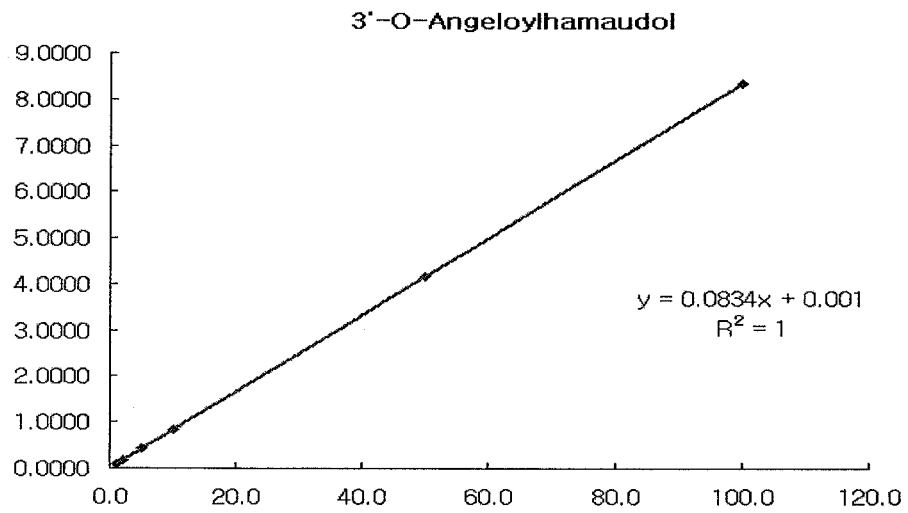


Figure 4. 방풍의 생리활성성분 3종에 대한 검량선

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 4가지 농도에 대하여 하루에 5번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며 그 값은 1.12 ~ 6.07% 와 1.64 ~ 6.83% 내에 들었다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 83.54 ~ 110.97% 와 96.21 ~ 104.51% 이었다. (Table 5. 참조)

Table 5. 방풍 생리활성성분의 분석법의 일내, 일간의 정밀도와 정확도

Compound	Conc. (mL/min)	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)	
		Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)
imperatorin	1	1.12	5.23	83.54	97.00
	2	2.30	1.65	91.02	99.13
	10	1.60	1.64	101.46	100.44
	100	5.15	2.90	101.24	96.21
phellopterin	1	6.07	6.00	97.041	101.92
	2	2.75	1.68	99.39	104.51
	10	3.96	4.48	107.27	103.31
	100	4.27	2.89	110.97	101.16
3'-O-angeloyl hamaudol	1	2.43	6.83	91.72	97.48
	2	3.66	4.60	92.52	100.80
	10	2.01	6.86	99.44	98.35
	100	4.17	5.66	107.64	99.51

라. 완건성 (Robustness)

- 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완건성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속 기울기, 이동상 조성 기울기, 칼럼을 변화시켜 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 tailing factor (T)를 비교하여 평가하였다. 칼럼 온도는 $30 \pm 5^\circ\text{C}$ 의 3 포인트에서 각각 3번 반복하였으며, 유속 기울기는 20 분에서 35 분까지 $1 \text{ mL/min} \rightarrow 1.75 \pm 0.25 \text{ mL/min}$ 의 3 포인트에서 각각 3번 반복하여 평가하였다. 또한 20 분에서 35 분까지 A용매 100% \rightarrow A용매 $25 \pm 5\%$, B용매 $75 \pm 5\%$ 의 3가지 이동상 조성에서 각각 3번 반복하였고 칼럼을 Luna phenyl-hexyl ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)과 BETASIL phenyl/hexyl ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)로 바꾸며 완건성을 평가하였다. (Figure 6. 참조)

Table 6. 방풍의 생리활성성분 분석법의 완전성 평가

Robustness						
Compounds	Analytical condition		Area. C.V (%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
imperatorin	Column Temperature	25°C	0.47	0.8395	14373.00	1.20
		30°C	0.01	0.8432	14601.52	1.11
		35°C	0.35	0.8330	13507.20	1.13
	Flow rate Gradient	1 → 1.50 mL/min	1.53	0.8513	14933.69	1.24
		1 → 1.75 mL/min	0.01	0.8539	15898.61	1.21
		1 → 2.00 mL/min	2.19	0.8619	23335.22	1.20
	Mobile Phase Gradient	A 100% → A 30% B 70%	5.86	0.8386	13221.37	1.24
		A 100% → A 25% B 75%	0.01	0.8432	14601.52	1.11
		A 100% → A 20% B 80%	4.60	0.8387	14949.99	1.26
	Column*	Luna phenyl-hexyl	4.53	0.9620	19374.83	1.09
BETASIL phenyl/hexyl		2.34	0.8143	2624.11	1.07	
phellopterin	Column Temperature	25°C	0.48	1.000	18091.35	1.23
		30°C	0.04	1.000	19016.36	1.21
		35°C	2.09	1.000	18061.21	1.20
	Flow rate Gradient	1 → 1.50 mL/min	1.53	1.000	35305.27	1.13
		1 → 1.75 mL/min	0.00	1.000	33814.49	1.12
		1 → 2.00 mL/min	4.79	1.000	46889.57	1.13
	Mobile Phase Gradient	A 100% → A 30% B 70%	1.02	1.000	19383.87	1.13
		A 100% → A 25% B 75%	0.04	1.000	19016.36	1.21
		A 100% → A 20% B 80%	6.39	1.000	19994.16	1.20
	Column	Luna phenyl-hexyl	4.29	1.000	26036.10	1.08
BETASIL phenyl/hexyl		2.51	1.000	4040.82	0.97	
3'-O-angeloyl hamaudol	Column Temperature	25°C	0.62	1.2534	362495.06	2.08
		30°C	0.04	1.2447	368672.74	2.02
		35°C	1.53	1.2890	373215.21	2.22
	Flow rate Gradient	1 → 1.50 mL/min	1.83	1.1961	342419.02	1.81
		1 → 1.75 mL/min	0.00	1.1966	357703.37	1.87
		1 → 2.00 mL/min	0.45	1.1864	387732.29	1.64
	Mobile Phase Gradient	A 100% → A 30% B 70%	8.38	1.2708	324812.37	1.95
		A 100% → A 25% B 75%	0.04	1.2419	368672.74	2.02
		A 100% → A 20% B 80%	7.83	1.2378	372749.99	1.93
	Column	Luna phenyl-hexyl	4.32	1.1142	24890.92	1.26
BETASIL phenyl/hexyl		1.77	1.1301	22392.93	1.04	

a : relative retention time

b : theoretical plate number

c : peak tailing factor

A : acetonitrile/water (40/60, v/v)

B : acetonitrile/water (90/10, v/v)

* : 국내에서 접근할 수 있는 phenyl hexyl column 제조사는 phenomenex사와 Thermo Scientific사에서 2종의 칼럼으로만 실시.

또한 대부분의 문헌에서 적용한 것으로 보고되어 있는 phenyl hexyl column은 이 두 제조사로 한정되어 있음.

마. 회수율

- 방풍 한약재 중 방풍 생리활성성분이 15 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL가 되도록 생리활성성분 표준품의 혼합용액을 가한 후 확립한 추출법으로 추출한 후 회수율을 측정하였다. 이 시험은 두

번에 반복하였다. 그 결과 모두 70% 이내의 추출율로 양호한 회수율을 보였다. (Table 7. 참조)

Table 7. Recoveries of 3 major bioactive compounds from Saposhnikovia Radix

Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)		
	Imperatorin	Phellopterin	3'-O-angeloylhamaudol
15	71.5	70.5	84.4
75	78.8	87.7	77.1
150	89.2	91.7	92.3

바. 안정성

- 방풍의 세 가지 생리활성성분인 imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol을 실온과 4°C 냉장고에 두어 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일이 경과하였을 때 HPLC-UV 분석법에 적용하여 각 성분의 면적을 측정하여 각 성분들의 안정성을 시험한 결과 다음 그래프와 같았다. (Figure 5, Figure 6, Figure 7. 참조)

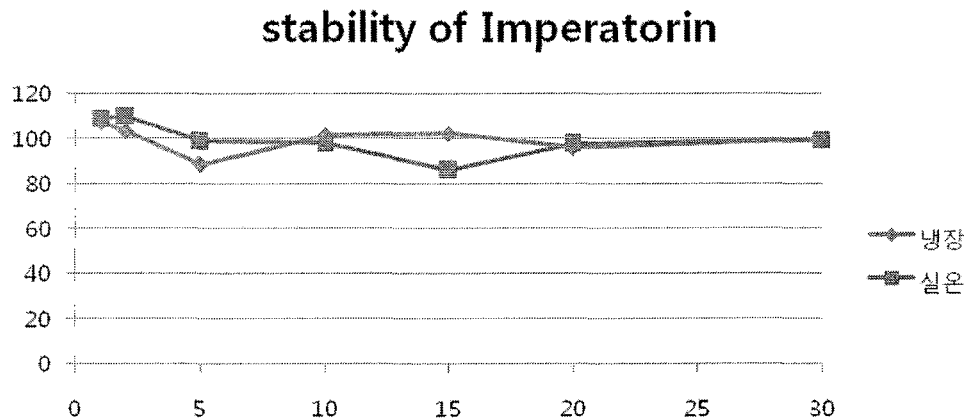


Figure 5. Stability of imperatorin

stability of phellopterin

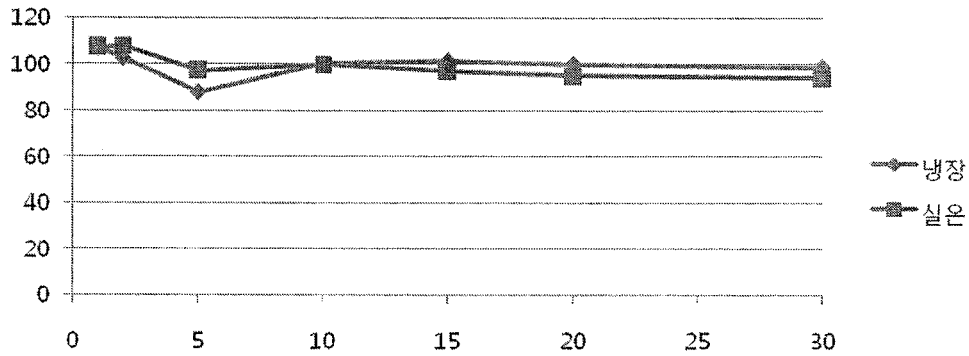


Figure 6. Stability of phellopterin

stability of 3'-O-angeloylhamaudol

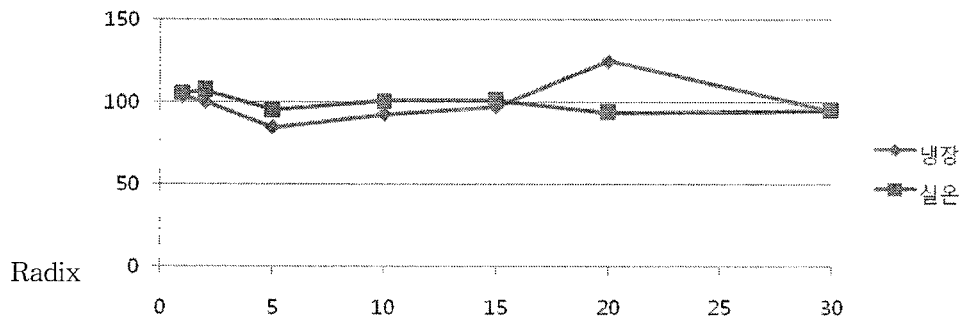


Figure 7. Stability of 3'-O-angeloylhamaudol

4. 추출법 개발

가. 추출방법의 비교 및 선정

- 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법 중 초음파추출법으로 추출할 때 방풍의 생리활성성분의 추출율이 가장 좋았다. (Figure 8. 참조)

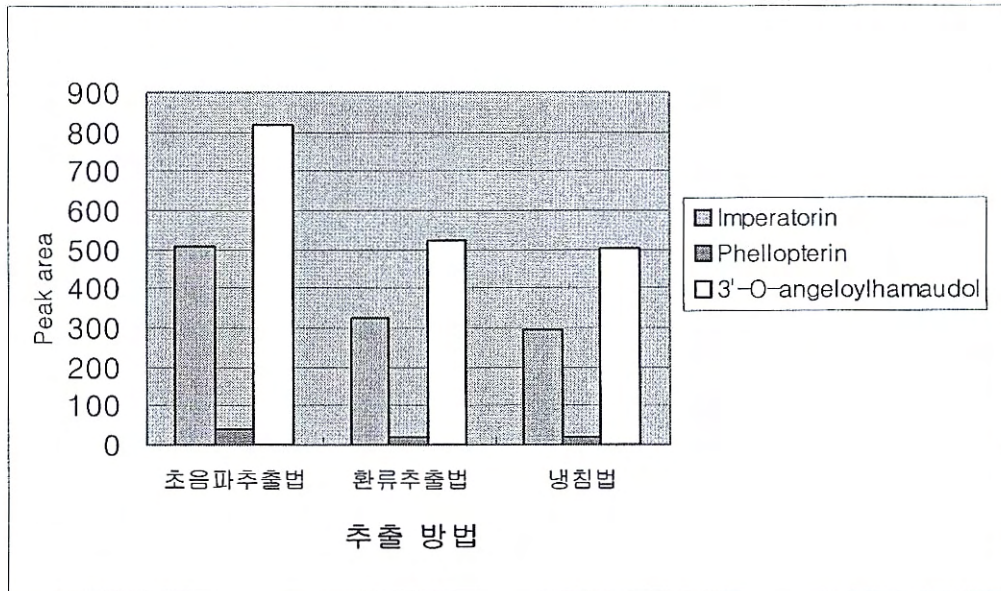


Figure 8. 방풍 주요 성분의 추출 방법별 피크 면적

나. 추출용매의 비교 및 선정

- Methanol과 ethanol 중 methanol을 추출용매로 하여 추출할 때 방풍의 생리활성성분의 추출을 가장 좋았다. (Figure 9. 참조)

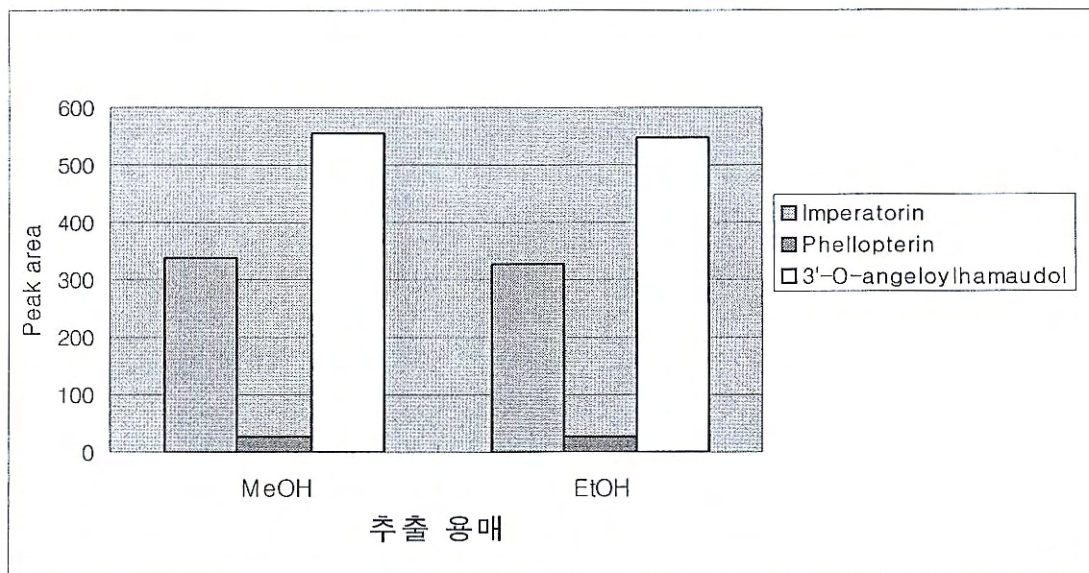


Figure 9. 방풍 주요 성분의 추출 용매별 피크 면적

라. 추출용매의 유기용매 함량의 비교 및 선정

- 100%, 70%, 50% methanol 중 70% methanol로 추출할 때 방풍의 생리활성성분의 추출을 가장 좋았다. (Figure 10. 참조)

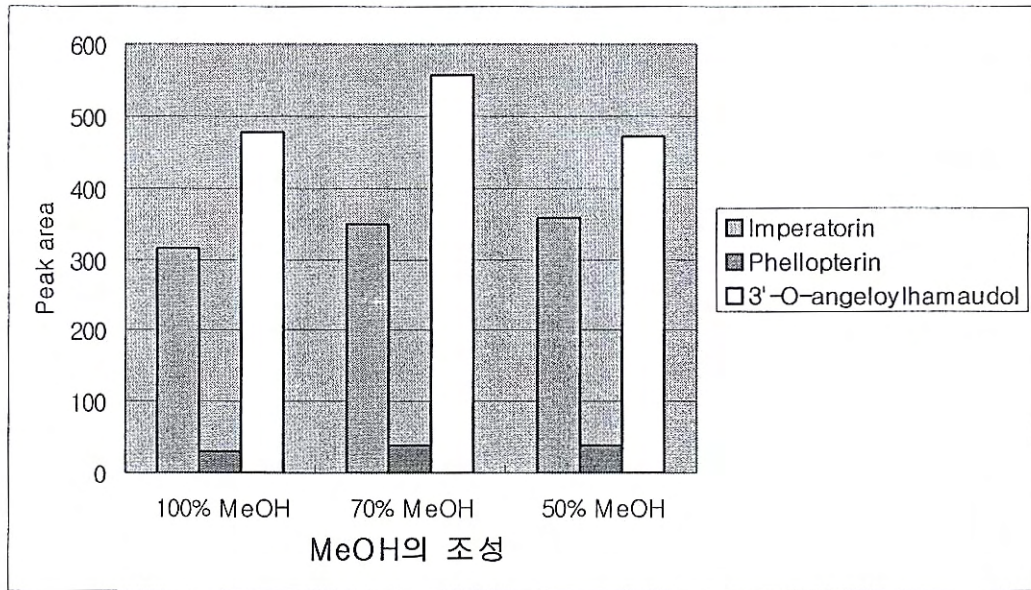


Figure 10. 방풍 주요 성분의 추출 용매별 피크 면적

마. 추출시간의 비교 및 선정

- 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분 중 50분간 초음파추출법으로 추출할 때 방풍의 생리활성 성분의 추출을 가장 좋았다.(Figure 11. 참조)

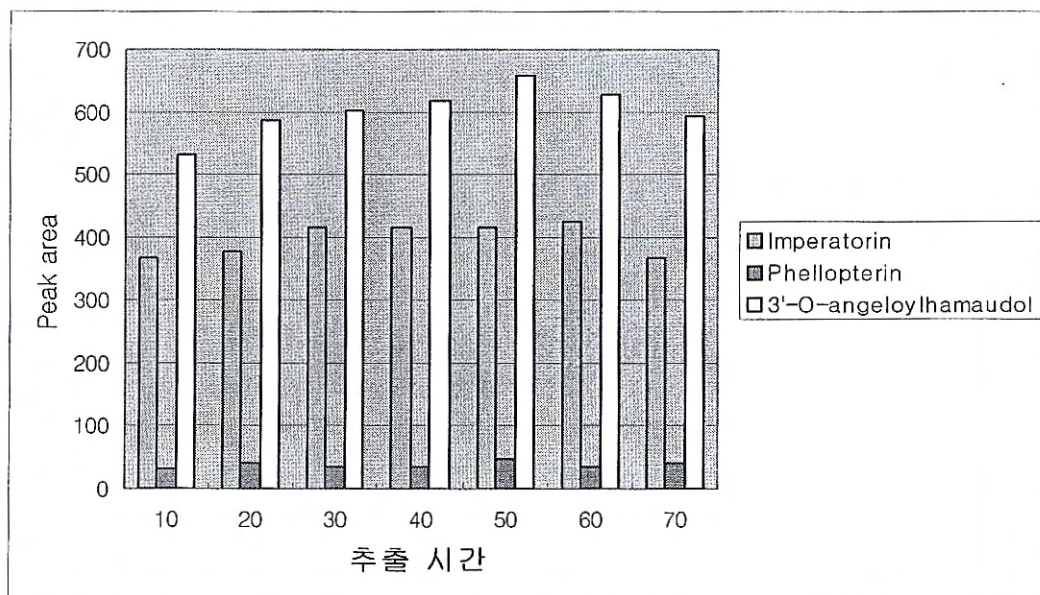


Figure 11. 방풍 주요 성분의 추출 시간별 피크 면적

바. 확립된 추출법

- 70% methanol을 추출용매로 하여 초음파 추출법으로 50분간 추출할 때 가장 좋은 추출율을 보였

다.

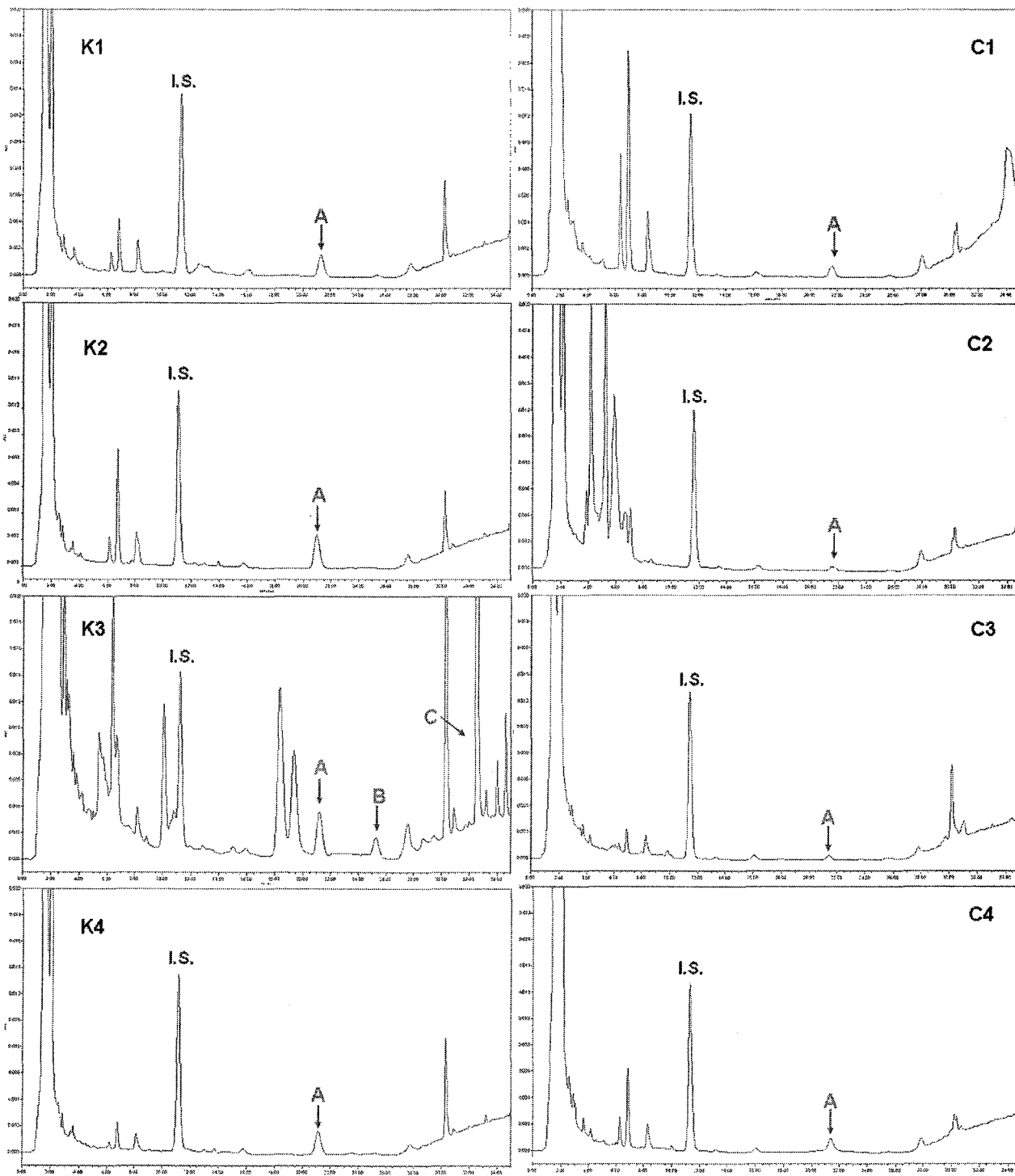
5. HPLC-UV 분석법을 이용한 방풍 성분의 함량 분석

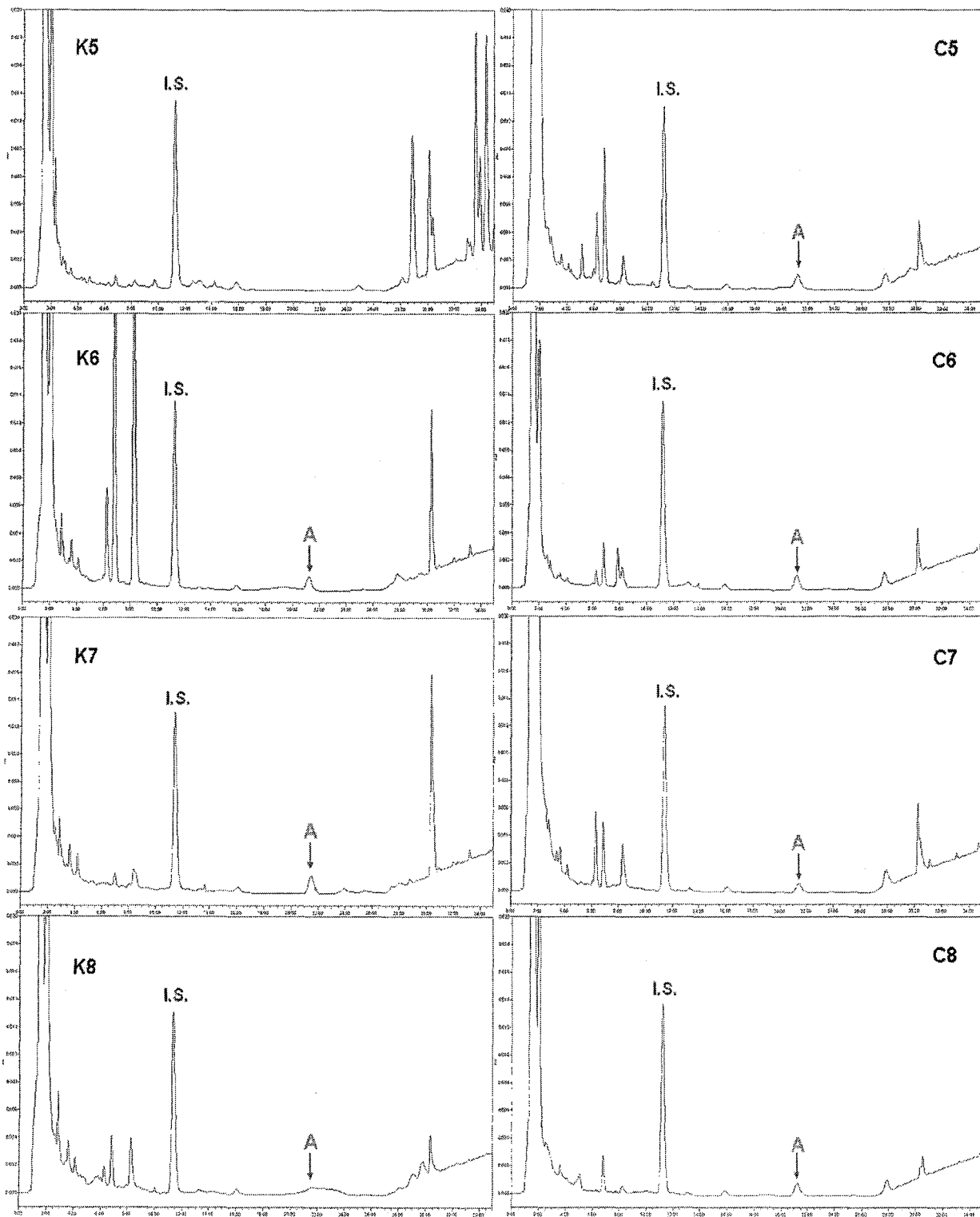
가. 시중에 유통중인 국산 방풍 8종과 중국산 방풍 11종, 제 1세부 기관으로부터 제공받은 산지별 품종별 방풍 5종을 개발한 방풍 추출법으로 추출하였다. 각각의 추출용액과 20 µg/mL 농도의 내부표준물질을 동일량 섞고 이를 HPLC-UV 분석법에 적용하였다. 구하여진 HPLC-UV 크로마토그램에서 내부표준물질 피크의 면적에 대한 방풍의 생리활성성분 피크의 면적비를 검량선에 대입하여 함량을 구하였다. (Table 8, Figure 12. 참조)

나. 제 1세부 기관으로부터 제공받은 국산 방풍 (K3), 내몽고산 방풍 (C11), 중국산 방풍 (C12)을 제외한 나머지 방풍에서 방풍 생리활성성분 중 phellopterin과 3'-O-angeloylhamaudol은 검출되지 않았다.

Table 8. 산지별 품종별 방풍 중의 방풍 생리활성성분의 함량

Sample	산지	imperatorin (%)	phellopterin (%)	3'-O-angeloylhamaudol (%)
K1	경북 영천	0.0118	-	-
K2	전남 강진	0.0193	-	-
K3	1세부로부터 제공받음, 원방풍	0.0236	0.0020	0.0341
K4	경북 영덕	0.0132	-	-
K5	전북 장수	-	-	-
K6	강원 삼척	0.0077	-	-
K7	경남 고성	0.0100	-	-
K8	강원 강릉	0.0017	-	-
K9	전남 여수	0.0082	-	-
K10	1세부로부터 제공받음, 갯방풍	0.0044	-	-
K11	1세부로부터 제공받음, 식방풍	0.0053	-	-
C1	중국산	0.0054	-	-
C2	중국산	-	-	-
C3	중국산	-	-	-
C4	중국산	0.0053	-	-
C5	중국산	0.0059	-	-
C6	중국산	0.0069	-	-
C7	중국산	0.0039	-	-
C8	중국산	0.0058	-	-
C9	중국산	-	-	-
C10	중국산, 해방풍	0.0276	-	0.0010
C11	1세부로부터 제공받음, 내몽고산	0.0211	0.0022	0.0335
C12	1세부로부터 제공받음, 중국산	0.0197	0.0020	0.0330
C13	중국산	-	-	-





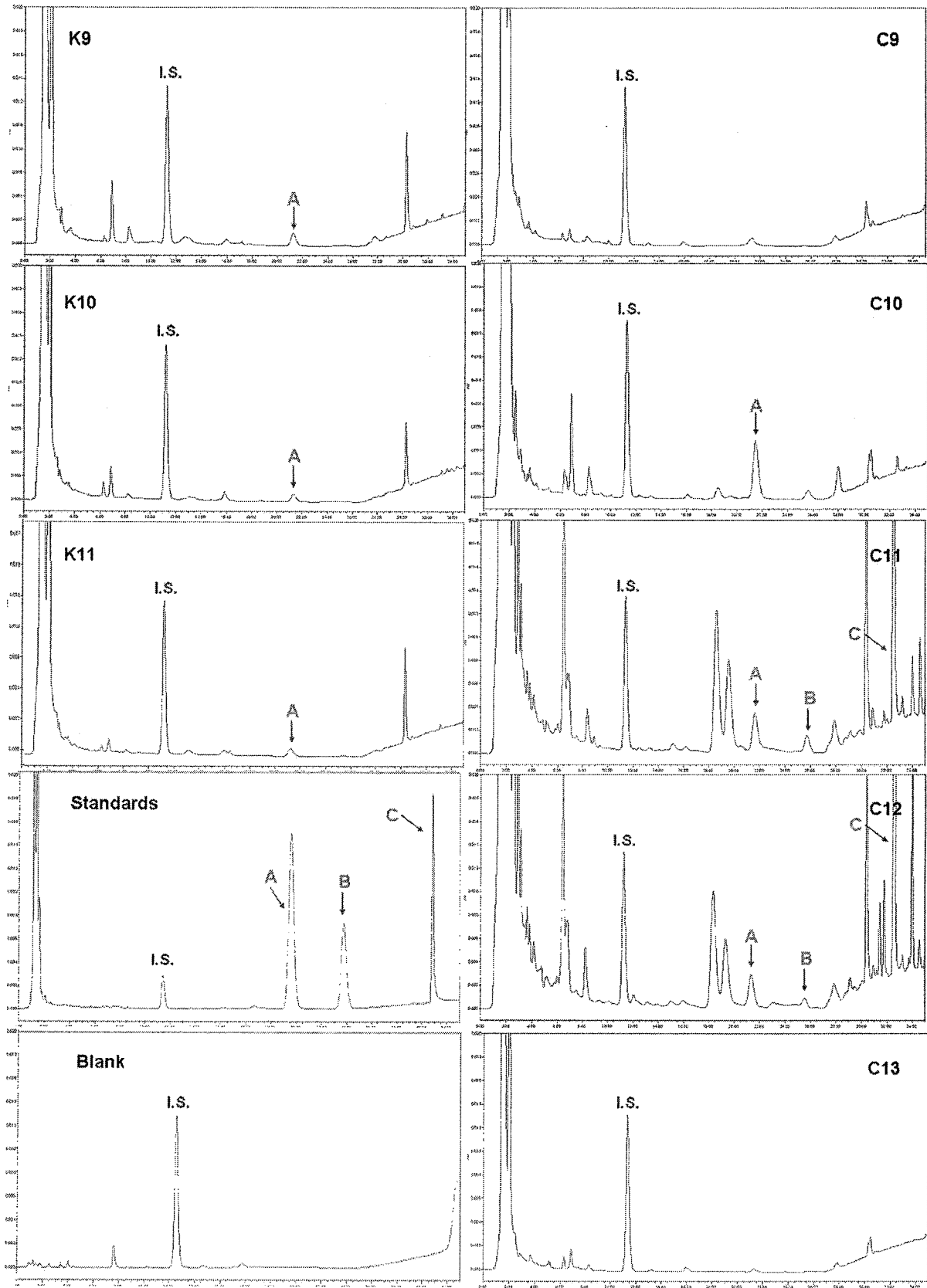


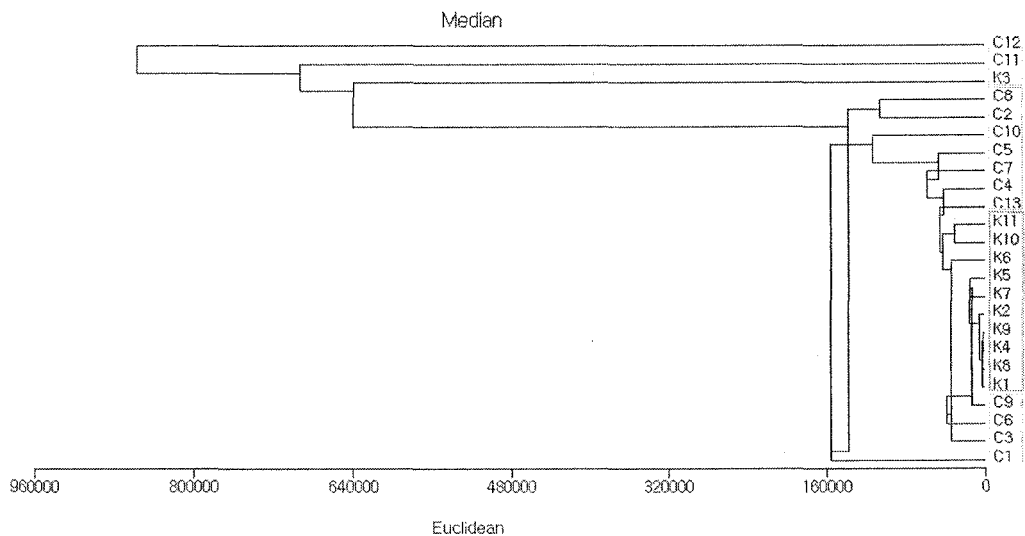
Figure 12. 국내산 방풍 11종과 중국산 방풍 13종의 70% methanol 추출물의 HPLC-UV 크로마토그램, I.S. : Byakangelicol, A : Imperatorin, B : Phellopterin C : 3'-O-angeloylhamaudol

6. 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. 제 1세부 기관으로부터 제공받은 국산 방풍 1종, 국산 갯방풍 1종, 국산 식방풍 1종과 중국산 방풍 1종, 내몽고산 방풍 1종과 시중에 방풍으로 유통되고 있는 국산 방풍 8종과 중국산 방풍 11종을 확립된 추출법으로 추출하여 확립된 HPLC-UV 분석법에 적용하였다. 이렇게 구하여진 HPLC-UV 크로마토그램으로 산지별 기원별 패턴분석을 하였다.

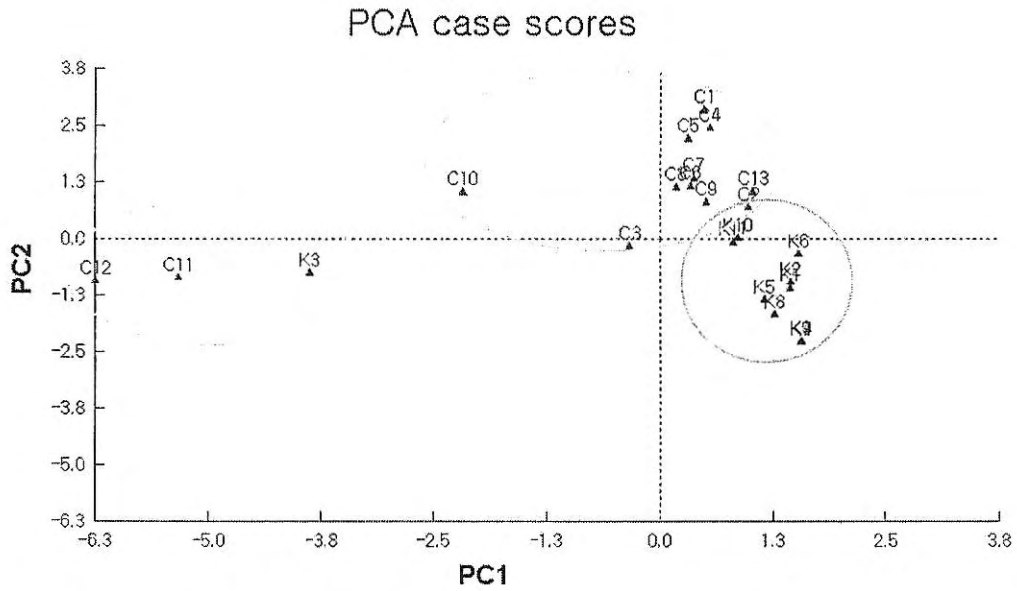
나. 크로마토그램에 보이는 15개의 피크의 면적을 변수로 하였으며 각각을 자연수 로그 변환하여 수치를 조정하고 이를 군집 분석 (Cluster Analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)에 적용하였다. (Figure 13., Figure 14., Figure 15. 참조)

다. 제 1세부로부터 방풍 (*Saposhnikovia Radix*)으로 감별 받은 국산 방풍 (K3)과 중국산 방풍 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)은 크로마토그램 상으로도 나머지 방풍들과 확연한 차이를 보였으며 이는 군집 분석과 주성분 분석의 결과에서도 확인할 수 있었다. 국산 갯방풍 (*Glehnia littoralis*, K10)과 국산 식방풍 (*Peucedanum japonicum*, K11)은 감별 받은 시료로써 크로마토그램 상으로 방풍으로 유통되는 국산 방풍 8종, 중국산 방풍 11종과 비슷한 크로마토그램을 보였으며 군집 분석과 주성분 분석에서도 확인할 수 있었다. 국산 방풍 8종과 중국산 방풍 11종은 군집 분석과 주성분 분석을 통하여 국산과 중국산 산지별로 분류되어짐을 알 수 있었다.



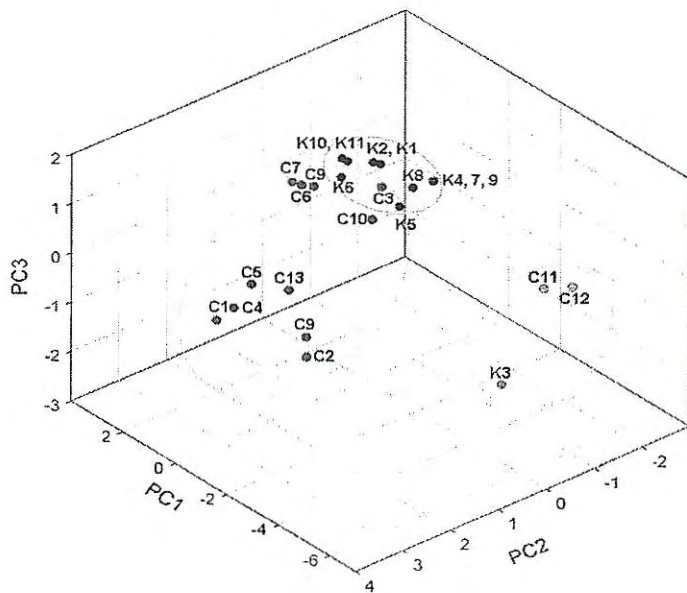
- 방풍 (*Saposhnikovia Radix*)로 감별받은 국산 (K3)과 중국산 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)
- 시중에 유통되는 중국산 방풍
- 시중에 유통되는 국산 방풍 및 감별 받은 국산 갯방풍 (K10)와 식방풍 (K11)

Figure 13. Cluster Analysis Graph of 24 *Saposhnikovia Radix* samples



- 방풍 (Saposhnikovia Radix)로 감별받은 국산 (K3)과 중국산 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)
- 시중에 유통되는 중국산 방풍
- 시중에 유통되는 국산 방풍 및 감별 받은 국산 갯방풍 (K10)와 식방풍 (K11)

Figure 14. Principal Component Analysis 2D-potting of 24 *Saposhnikovia Radix* samples



- 방풍 (Saposhnikovia Radix)로 감별받은 국산 (K3)과 중국산 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)
- 시중에 유통되는 중국산 방풍
- 시중에 유통되는 국산 방풍 및 감별 받은 국산 갯방풍 (K10)와 식방풍 (K11)

Figure 15. Principal Component Analysis 3D-plotting of 24 *Saposhnikovia Radix* samples

7. 방풍의 DNA 종감별 결과와 HPLC 분석 결과의 비교

- 가. 방풍 동정시료의 ITS 부위 염기서열 분석 결과, K3, C11, C12의 시료는 방풍(*S. divaricata*)으로 확인이 되었으며, K11, K5 시료는 식방풍(*Peucedanum japonicum*), 나머지 시료는 모두 해방풍(*Glehnia littoralis*)으로 확인이 되었다. C13은 방풍과 식방풍이 혼합되어있는 것으로 여겨진다.
- 나. 방풍의 성분 함량분석을 위해 HPLC-UV 크로마토그램에서 내부표준물질 피크의 면적에 대한 방풍의 생리활성성분 피크의 면적비를 검량선에 대입하여 함량을 구한 결과, 국산 방풍 (K3), 내몽고산 방풍 (C11), 중국산 방풍 (C12)은 방풍의 생리활성성분 중 imperatorin, phellopterin과 3'-*O*-angeloylhamaudol이 모두 검출되었지만 나머지 방풍시료에서는 주로 imperatorin만 검출되었다.
- 다. HPLC를 이용한 함량분석 결과에서는 DNA 종감별에서 식방풍으로 동정된 C13, K5, K11 시료의 함량분석에서 뚜렷한 패턴 변화가 없었으며, 다만 해방풍에 비하여 분석시간 4-10분 이내에 피크가 거의 관찰되지 않는다는 특징이 있었다. 하지만 이러한 경향은 C3, C9에서도 관측되어 식방풍의 화학분석 특징으로 단정하기엔 어려움이 있을 것으로 보이며, HPLC 크로마토그램의 성분 피크 데이터를 이용한 군집분석과 주성분 분석에서도 C13, K5, K11 시료가 다른 시료 (해방풍)와 분류되는 경향을 확인할 수 없었다.
- 라. HPLC-UV 크로마토그램으로 군집 분석 (Cluster Analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)에 적용한 결과, 방풍 (*Saposhnikovia Radix*)은 국산 방풍 (K3)과 중국산 방풍 (C11), 내몽고산 방풍 (C12)에서 군집 분석과 주성분 분석의 결과에서 다른 방풍과 구별이 되었으며, 크로마토그램 상으로도 나머지 방풍들과 확연한 차이를 보였다.
- 바. 결론적으로, 방풍의 종류는 크게 세가지 종류로 유통되고 있다. 중국방풍은 방풍(*S. divaricata*)으로 기원이 명확하지만 국내에서 원방풍으로 유통되는 해방풍(*Glehnia littoralis*)과 혼용되어 사용되고 있어 약재사용에 있어 명확히 할 필요성이 있다. 그리고 국내산 방풍은 식방풍과 해방풍으로서 이에 대한 명확한 구분없이 사용되고 있음을 알 수 있었다. DNA 분석결과, 기원이 확인된 국산 해방풍 (*Glehnia littoralis*, K10)과 국산 식방풍 (*Peucedanum japonicum*, K11)은 시료 수집팀에서 제공한 기원종과 DNA 분석 결과가 일치하였으나, 크로마토그램 상으로 식방풍과 해방풍이 구분이 안되었으므로 향후, 방풍외에 식방풍(*Peucedanum japonicum*)과 해방풍(*Glehnia littoralis*)을 구분 지을 수 있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

8. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 개발

가. LC-MS/MS 분석조건 검토

- (1) 방풍의 주요 생리활성성분을 대상으로 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 조건을 비교한 결과 electrospray ionization (ESI) ion source 방식에서 검출이 용이하였다.
- (2) (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교한 결과 (+) ion mode에서 훨씬 더 좋은 감도를 보였다.
- (3) 고정상으로는 일반적인 ODS 칼럼인 YMC-Pack Pro C18 RS (100 × 2.1 mm, 3 μm particle size)을 선택하였으며, 분리능을 향상시켜 방풍 추출물의 간섭물질에 의한 ion suppression의 영향을 최소화하기 위하여 고정상의 입자 크기가 3 μm로 작은 것을 사용하였다.
- (4) 분석의 선택성과 검출감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM (multiple reaction monitoring) mode로 분석하였으며, 이 때 각 성분별로 collision cell에서 collision 강도를 조절하여 product ion의 response가 크도록 조정하였으며, 그 결과 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다. 내부표준물질을 포함하여 대상 성분 모두 precursor ion으로 [M+H]⁺ ion을 선정하였으며 특징적인 화학구조에 따라 서로 다른 product ion이 검출되었다. (Figure 16. ~ Figure 19. 참조)
- (5) 기타 MS/MS의 declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP), collision cell entrance potential (CEP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP), curtain gas (CUR), collision gas (CAD), ion spray voltage (IS), temperature (TEM), ion source gas 1 (NEB), ion source gas 2 (Turbo gas) 등과 같은 파라미터를 최적화하여, 각 성분별로 최적의 감도와 분리능을 갖도록 조건을 설정하였다. (Table 9., Table 10. 참조)
- (6) 방풍의 주요 생리활성성분 3종을 대상으로 MS/MS의 MRM 방식으로 분석한 결과 10분 이내에 양호하게 분리되었으며, 70% EtOH 추출물에서도 방풍의 다른 성분들에 의하여 전혀 간섭을 받지 않았다. (Figure 20. 참조)

Table 9. 방풍 생리활성성분의 LC-MS/MS분석 조건

Instrument	HPLC - Agilent 1200 Series		
	MS/MS - ABI API 2000		
Detection mode	Positive mode		
Column	YMC-Pack Pro C18 RS (100 × 2.1 mm, 3 μm particle size)		
Mobile phase	1 mM Ammonium acetate/Acetonitrile = 30/70 (pH 5.0 with acetic acid)		
Oven Temperature	Room temperature		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	0.2 mL/min		
Run time	10 min		
Mode	positive, MRM		
CUR	40 psi	TEM	450°C
CAD	5 psi	NEB	40 psi
IS	5500 volt	Turbo gas	75 psi

Table 10. 방풍 생리활성 성분의 MRM ion transition 선정.

Compound	Ion transition (m/z)	DP (v)	FP (v)	EP (v)	CEP (v)	CE (v)	CXP (v)
3'- <i>O</i> -angeloylhamaudol	359.03 → 259.3	56	350	8.5	26	29	6
Imperatorin	270.996 → 147.2	36	360	12	34	47	4
Phellopterin	300.737 → 217.9	41	370	9	34	39	6
Glimepiride (I.S.)	491 → 352.2	40.8	385	8	33.93	20.8	9.3

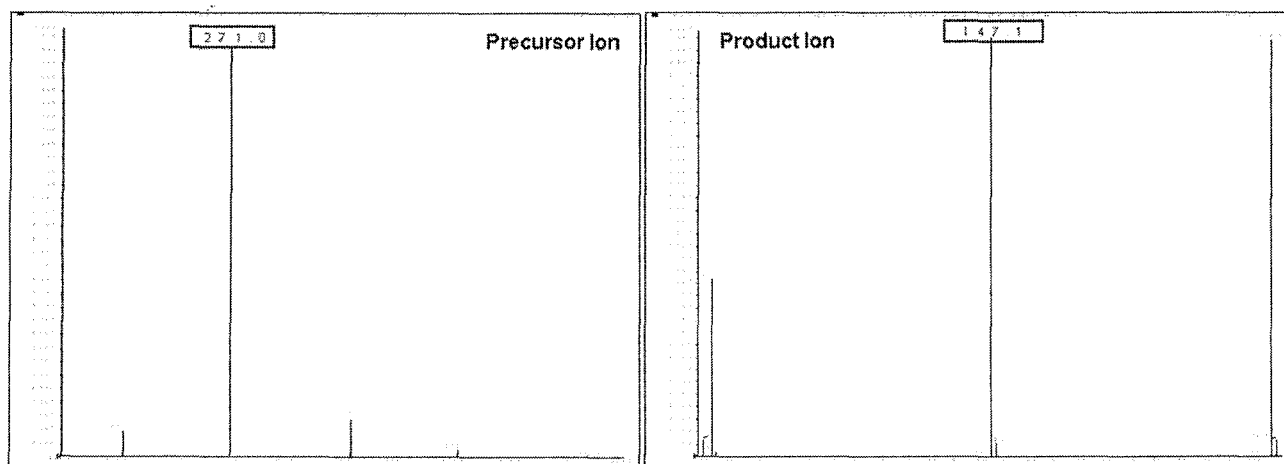


Figure 16. Precursor and product ion Spectra of imperatorin

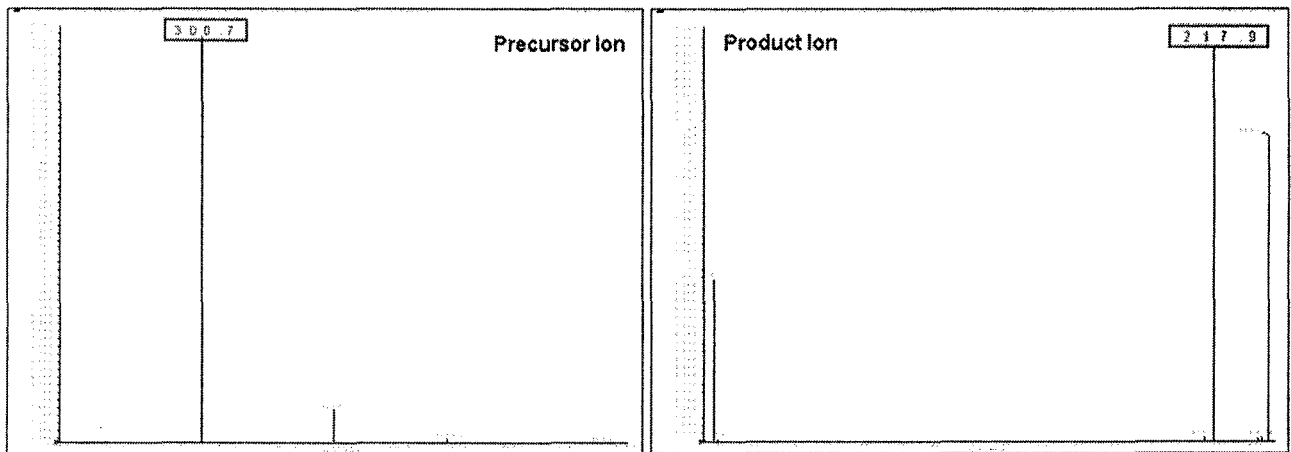


Figure 17. Precursor and product ion Spectra of phellopterin

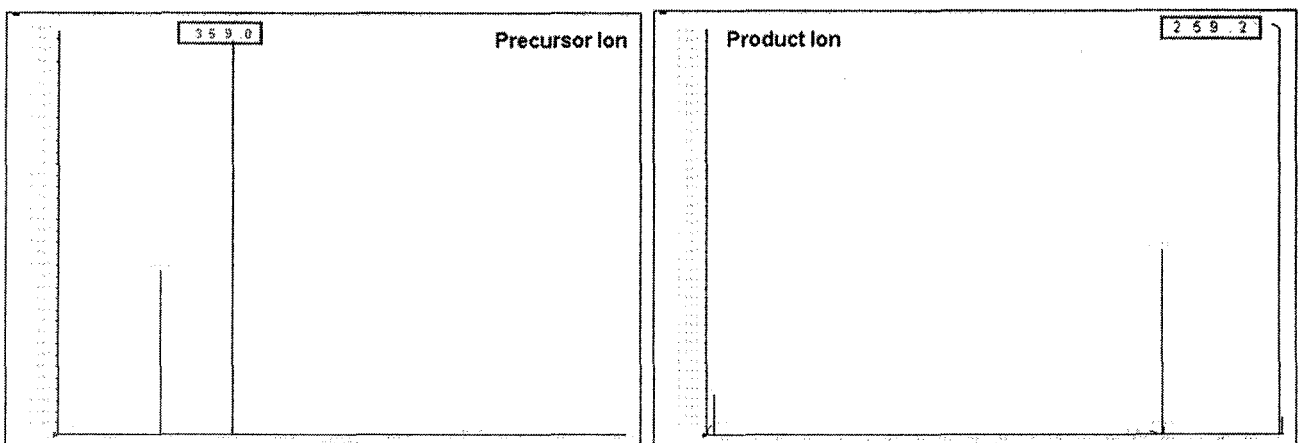


Figure 18. Precursor and product ion Spectra of 3'-O-angeloylhamaudol

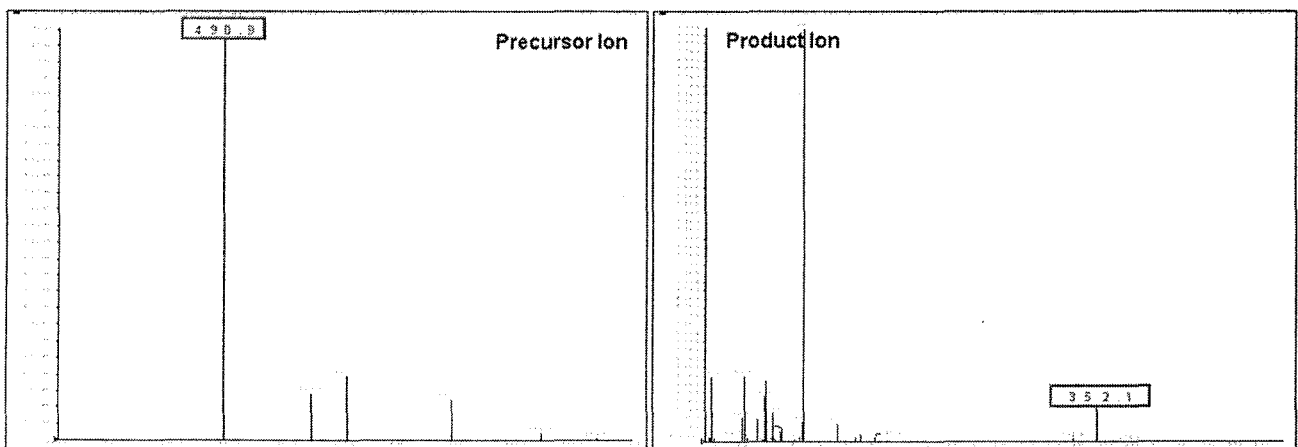


Figure 19. Precursor and product ion Spectra of glimepiride (internal standard)

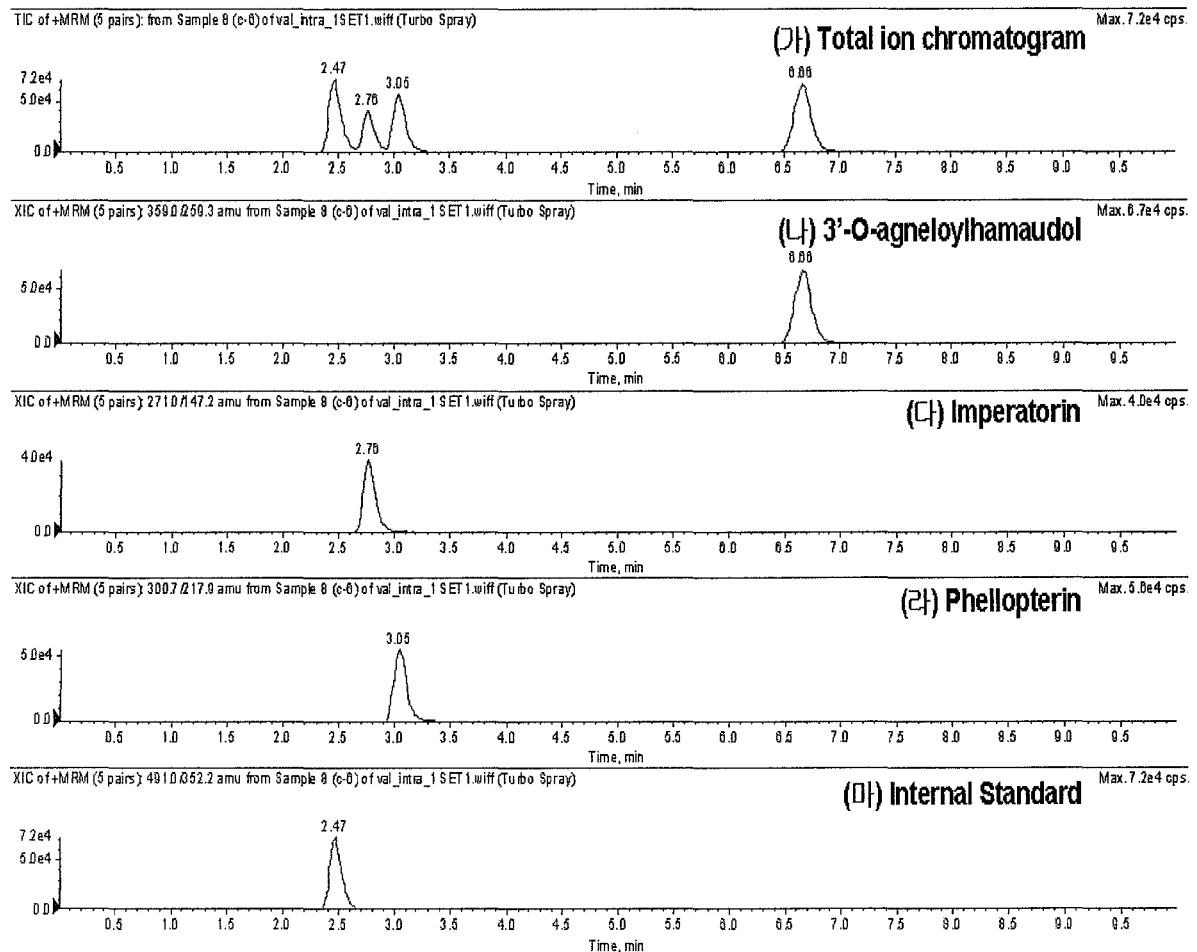


Figure 20. 방풍 생리활성성분의 LC-MS/MS 크로마토그램, 가) Total ion chromatogram 나) 3'-O-angeloylhamaudol, 다) imperatorin, 라) phellopterin, 마) Glimepiride (내부표준물질)

9. 방풍의 LC-MS/MS 동시분석법 검증 (Validation)

가. 선택성

- 방풍의 세 가지 성분 및 내부표준물질의 머무름 시간은 imperatorin이 약 2.77분, phellopterin이 약 3.04분, 3'-O-angeloylhamaudol이 약 6.68분, 내부표준물질이 약 2.45분이었고, 작약 추출물의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

나. 직선성

- 내부표준물질의 피크 면적비에 대한 작약 생리활성성분의 피크 면적비를 가지고 검량선 (imperatorin 과 phellopterin : 2.5 - 500 ng/mL, 3'-O-angeloylhamaudol : 1 ~ 200 ng/mL)을 작성하였다. 모든 성분에 대한 검량선의 상관계수가 0.9979 이상으로 양호한 직선성을 나타내었

다. (Figure 21. 참조)

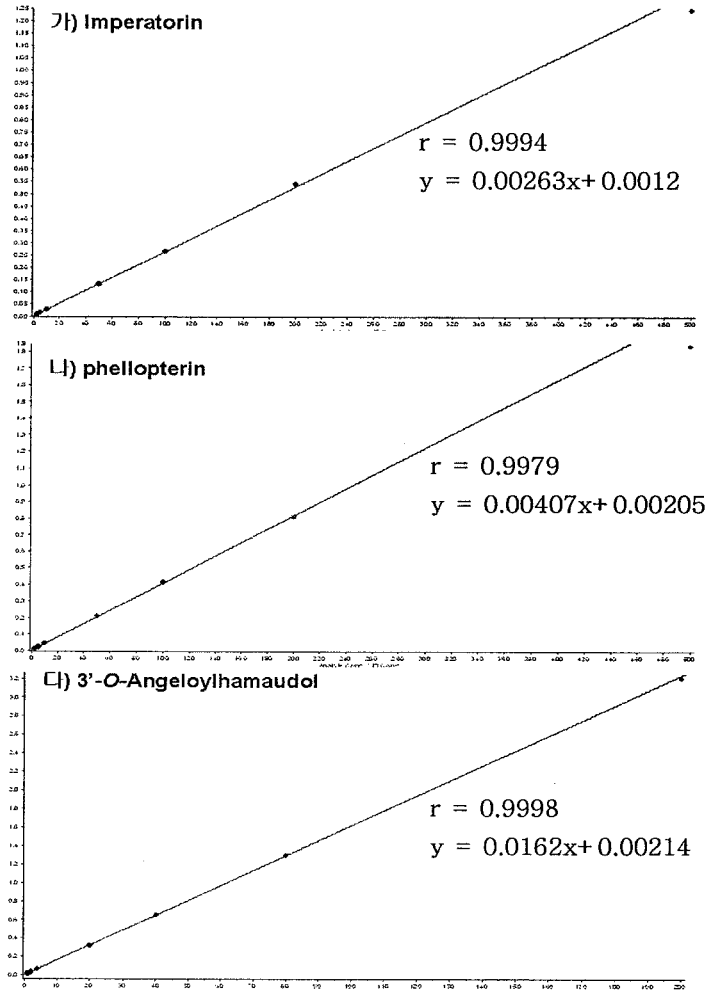


Figure 21. Calibration curves of 3 major bioactive compounds from *Saposhnikovia Radix*

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- 일내 정밀성은 방풍의 각 생리활성성분인 imperatorin, phellopterin과 3'-O-angeloylhamaudol과 내부표준물질의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며 그 값은 0.64 ~ 4.59%, 1.69 ~ 5.49% 그리고 2.07 ~ 5.08 % 내에 들었다. 일내 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 92.93 ~ 103.73%, 89.47 ~ 105.00 그리고 96.67 ~ 106.27% 이었다. (Table 11. 참조)

Table 11. Precision, accuracy, and limit of quantification (LOQ) of 3 major bioactive compounds from Saposhnikovia Radix

Compound	Conc. (ng/mL)	Precision (C.V. %, n = 3)		Accuracy (% , n = 3)		LOQ (ng/mL)
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
Imperatorin	2.5	3.66	7.84	92.93	97.20	2.5
	5	4.59	3.34	94.67	96.73	
	50	1.73	2.21	103.73	104.47	
	200	2.11	0.86	98.67	100.50	
	500	0.64	0.62	93.20	93.47	
Phellopterin	2.5	3.31	2.43	93.87	95.07	2.5
	5	2.72	5.82	104.40	103.13	
	50	3.07	2.04	105.00	107.33	
	200	5.49	2.55	97.33	102.00	
	500	1.69	0.13	89.47	91.27	
3'-O-angeloylhamaudol	1	4.99	0.56	97.57	103.33	1
	2	2.32	0.59	97.17	97.33	
	20	4.56	4.13	100.50	97.83	
	80	2.07	4.91	106.27	95.46	
	200	5.08	3.72	96.67	93.00	

제 2 절 시호의 생리활성성분 동시분석법 개발

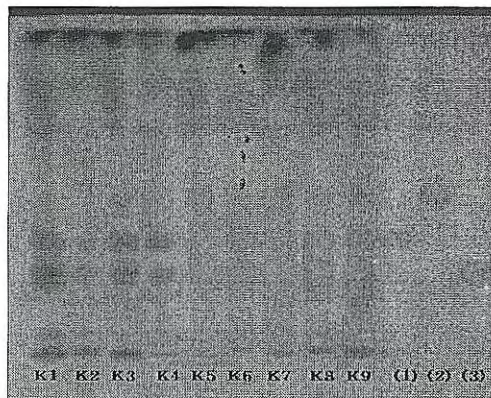
1. TLC 분석법 개발

가. 시호 추출물에 대한 순상(NP) TLC

- 순상 고정상에서는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D가 원활하게 분리되는 조건을 찾을 수 없었다.

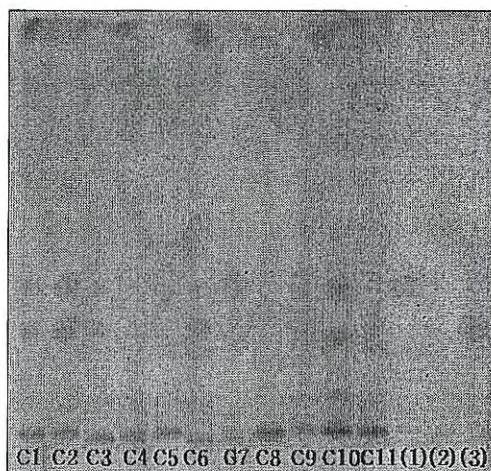
나. 시호 추출물에 대한 역상(RP) TLC

- 역상 고정상에서 전개용매가 methanol/water = 4/1 일 때 가장 좋은 분리도를 보였다. (Figure 22., Figure 23. 참조)



(1) saikosaponin A (2) saikosaponin C (3) saikosaponin D

Figure 22. Thin Layer Chromatography result of 9 *Bupleuri Radix* samples from Korea



(1) saikosaponin A (2) saikosaponin C (3) saikosaponin D

Figure 23. Thin Layer Chromatography result of 11 *Bupleuri Radix* samples from China

2. HPLC-ELSD 분석법의 개발

- 가. 시호의 주요 생리활성 성분은 oleanane계 saponin인 saikosaponin으로 이에 대한 분석을 위하여 thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), capillary electrophoresis (CE), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 등의 분석법이 적용되어 왔다. 특히 이 중에서도 UV 검출기를 이용한 HPLC-UV 방법이 사용의 편리성, 기기의 대중성 등의 이유로 많이 사용되었다. 하지만 saikosaponins은 화학구조 내에 발색단(chromophores)이 없어서 UV 검출기로 분석할 경우에 210 nm 이하(주로 203 ~ 210 nm)의 단파장에서 사용해야 했는데, 이는 이동상 용매의 제한(고순도 용매 사용, 용매 선택의 제한), 감도의 저하(단파장을 사용하더라도 분자 내에 불포화 결합이 없거나 매우 작아 흡광도가 떨어짐)와 간섭물질의 증가(매우 미량의 성분이라도 에너지가 높은 단파장에서는 큰 피크로 검출될 수 있음)라는 문제점을 유발하였다.
- 나. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 증기화광산란검출기(evaporative light scattering detector, ELSD)가 발색단이 없는 성분의 분석에 UV 검출기를 대신하여 많이 사용되고 있다. ELSD는 칼럼에서 분리되어 나오는 용리액을 분무하여 휘발성인 용매를 증발시키고 비휘발성인 입자를 레이저 광에 의하여 산란시켜 검출하는 방법으로, 분자 내의 발색단과 관련 없이 비휘발성인 성분은 모두 분석이 가능한 검출기이다. 특히 인삼사포닌의 분석과 같이 천연물 중에서 사포닌 성분들을 분석하는데 많이 적용되고 있다. 따라서 본 연구에서도 시호 사포닌의 분석에 검출기로서 ELSD를 이용하여 최적의 분석법을 확립하였다.
- 다. 3가지 칼럼을 이용하여 분리능을 비교하고 최적의 칼럼을 선정하였으며, 선정된 칼럼을 대상으로 기울기 용리로 최적의 분석조건을 확립하였다. (Table 12. 참조)
- 라. 비교대상 칼럼 : Hypersil GOLD C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm), Ascentis[®] Express C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm), Luna C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)
- 마. Ascentis Express C18 (4.6 × 100 mm, 2.7 μm) 칼럼이 분리능 가장 우수하고, 총 분석시간도 가장 짧았다. (Figure 24., ~ Figure 26. 참조)

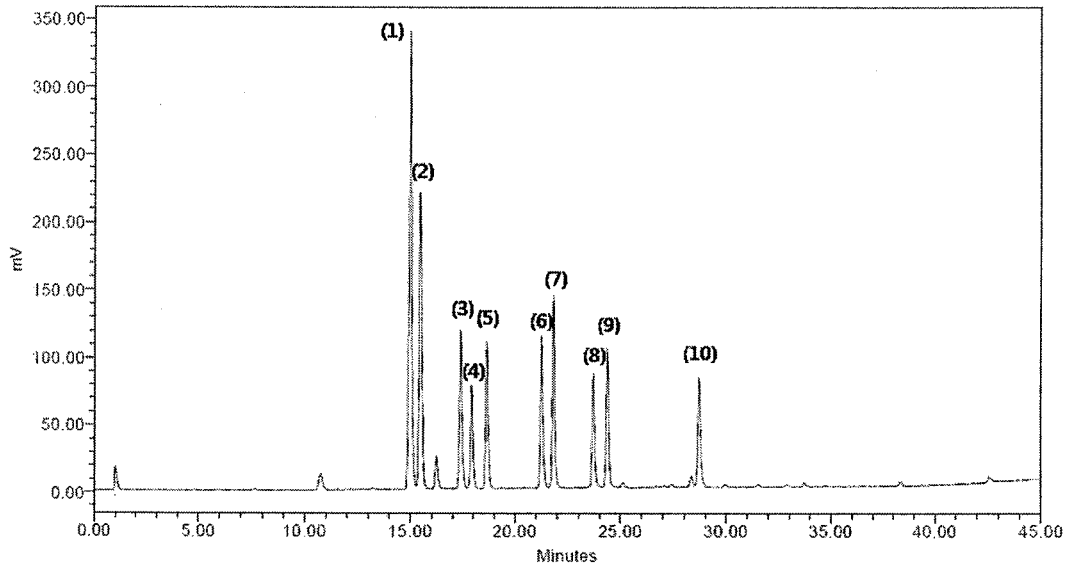


Figure 24. HPLC-ELSD chromatogram using Ascentis[®] Express C18 column

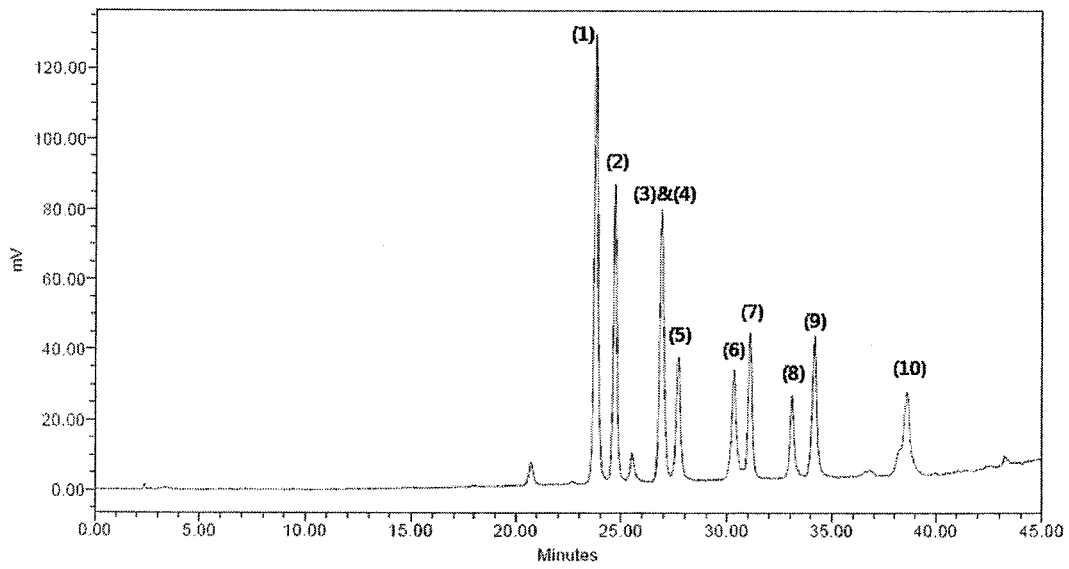


Figure 25. HPLC-ELSD chromatogram using Hypersil GOLD C18 column

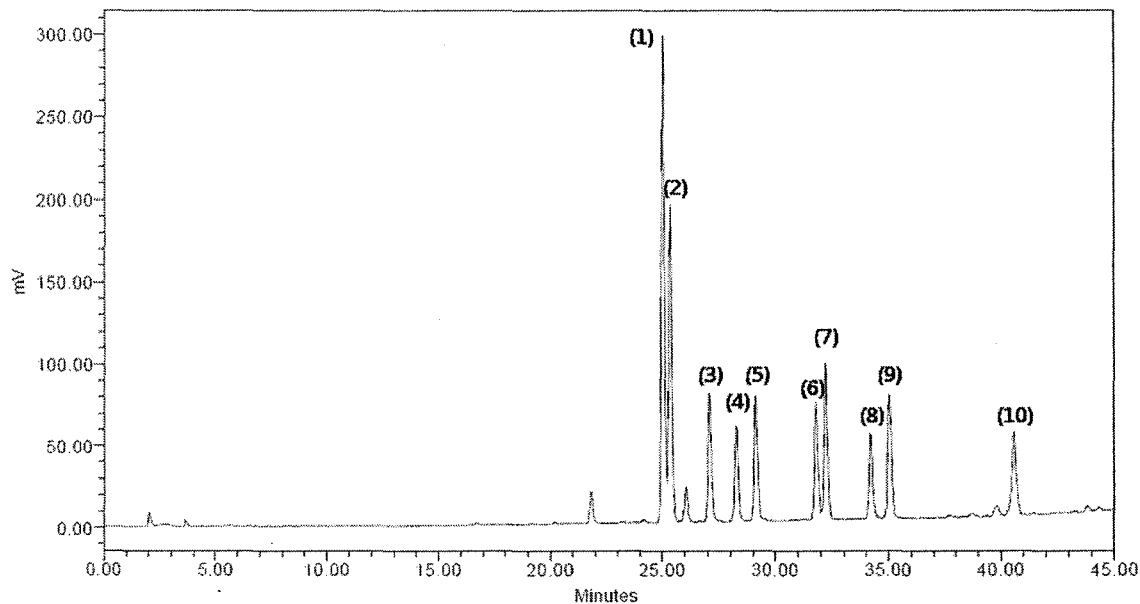


Figure 26. HPLC-ELSD chromatogram using Luna C18 column

(1) saikosaponin C (2) saikosaponin I (3) saikosaponin H (4) saikosaponin B₃ (5) saikosaponin B₄
 (6) saikosaponin A (7) saikosaponin B₂ (8) saikosaponin G (9) saikosaponin B₁ (10) saikosaponin D

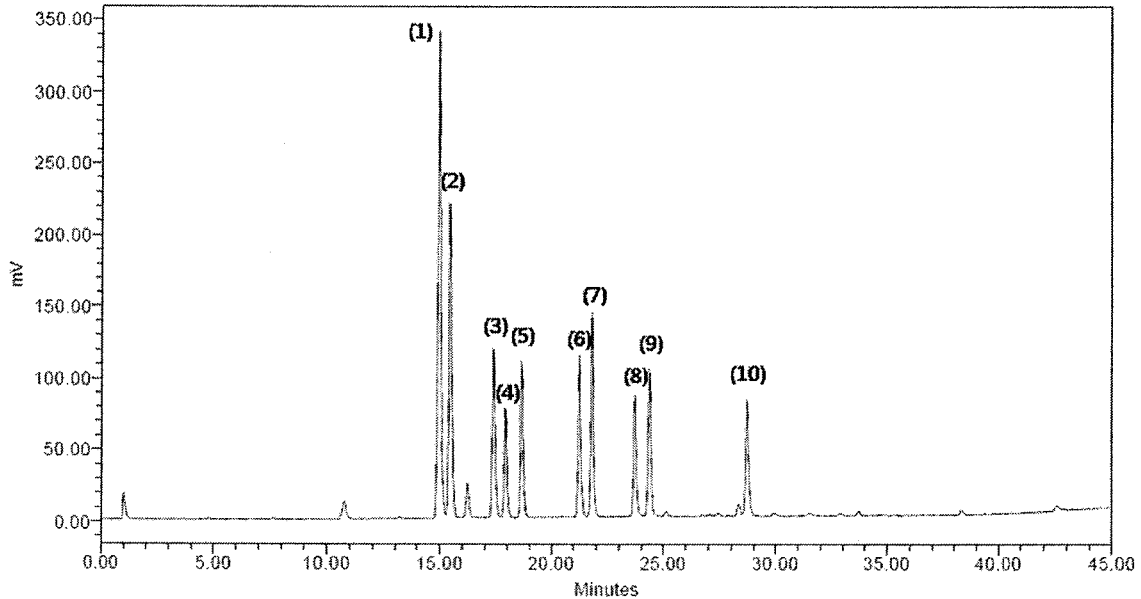
Table 12. Optimum conditions of HPLC-ELSD for *Bupleuri Radix*

Pump	PerkinElmer Series 200 pump		
Detector	Sedere SEDEX 75 ELSD Drift tube temp. - 50°C Gas pressure - 3.0 bar		
Column	Ascentis [®] Express C18 (100 × 4.6 mm, 2.7 μm)		
Guard Column	Security Guard C18 (4.0 × 3.0 mm)		
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water = 90/10, with 0.1% acetic acid (B) Acetonitrile/Water = 10/90, with 0.1% acetic acid		
Gradient profile	시간	Solvent A	Solvent B
	0	20	80
	5	20	80
	35	50	50
	45	90	10
	65	90	10
	65.1	20	80
	75	20	80
Injection volume	20 μL		
Column Temp.	27.5°C		

3. HPLC-ELSD 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 10 종류의 saponin계 성분이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다. (Figure 27. 참조)



(1) saikosaponin C (2) saikosaponin I (3) saikosaponin H (4) saikosaponin B₃ (5) saikosaponin B₄
 (6) saikosaponin A (7) saikosaponin B₂ (8) saikosaponin G (9) saikosaponin B₁ (10) saikosaponin D

Figure 27. HPLC-ELSD chromatogram of 10 saikosaponins

나. 직선성 (Linearity)

- 7 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin D, saikosaponin H) 에 대하여 5-100 µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였고, 1 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin I) 에 대하여 10-200 µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였고, 2 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin C, saikosaponin G)에 대하여 15-300µg/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.965 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Figure 28. 참조)

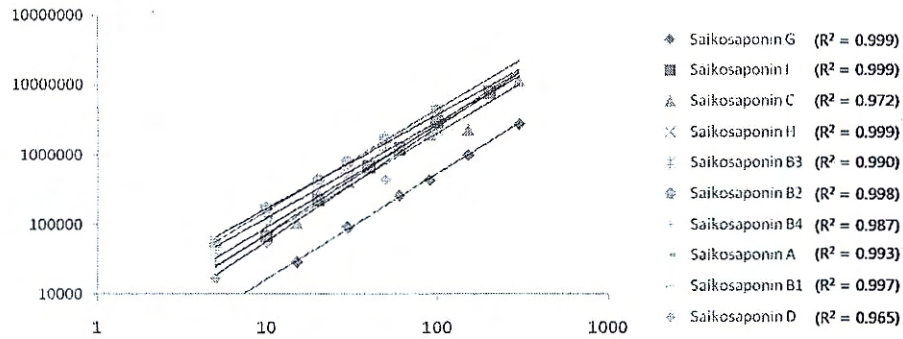


Figure 28. Log-Log Calibration curves of 10 saikosaponins

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5 가지 농도에 대하여 하루에 5 번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 5 일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 그 값은 0.67-15.92% 와 1.53-14.84% 이었다.
- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며, 그 값은 85.66-114.90% 와 92.12-110.41% 이었다. (Table 13. 참조)

Table 13. Intra-, inter day precision, accuracy, and limit of quantification(LOQ)

Compound	Conc. (ppm)	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)		LOQ (ppm)
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
Saikosaponin A	5	8.1976	3.0678	95.7524	105.1166	5
	10	3.0744	7.7753	102.6252	108.6021	
	20	3.8148	5.6528	102.6932	106.3442	
	50	3.1957	6.0127	102.5218	100.0634	
	100	3.6909	14.8369	96.3867	92.1221	
Saikosaponin B ₁	5	4.0062	2.0677	95.3745	100.7897	5
	10	2.4898	10.2815	101.7840	110.4087	
	20	2.1518	7.5514	98.7619	108.6132	
	50	4.8070	5.9721	94.5340	97.6451	
	100	1.9568	7.0756	91.6707	95.3082	
Saikosaponin B ₂	5	5.3871	2.5396	95.3799	103.9651	5
	10	2.8616	11.3831	95.1402	106.6811	
	20	0.9304	7.6949	98.1189	107.4892	
	50	4.8503	3.5605	97.7820	98.6320	
	100	1.3493	8.0840	92.3780	95.0567	
Saikosaponin B ₃	5	8.0328	5.1255	102.6755	101.5972	5
	10	4.2638	11.5839	95.5322	106.7503	
	20	6.1858	11.9416	96.2898	109.0439	
	50	6.7230	6.2521	89.8690	96.6111	
	100	1.7650	11.1991	85.6607	94.5768	
Saikosaponin B ₄	5	12.0323	11.6686	90.9670	105.5967	5
	10	3.0314	9.1923	104.2293	108.5301	
	20	11.6778	14.5378	92.1038	104.7043	
	50	11.5120	4.0155	95.1995	97.9040	
	100	6.1009	6.6749	93.9606	100.4123	
Saikosaponin C	15	14.3351	4.6258	89.8808	101.8379	15
	30	1.9064	6.2340	107.2781	108.4644	
	60	5.8235	10.0829	106.0614	108.1812	
	150	2.8435	7.1328	110.0727	101.4281	
	300	4.3325	7.7605	103.0804	104.9779	
Saikosaponin D	5	15.9193	12.2439	98.9123	98.0279	5
	10	0.6653	7.2617	114.8970	107.9990	
	20	14.8640	8.6611	103.4689	105.0748	
	50	7.0373	4.5184	109.5020	102.2661	
	100	10.3877	5.6316	102.6961	98.8664	
Saikosaponin G	15	3.2316	4.6948	94.6087	102.5145	15
	30	2.2728	8.9993	97.8408	105.2408	
	60	4.1299	7.9852	99.3559	105.6190	
	150	2.5440	1.5322	98.0086	98.0047	
	300	2.6928	6.4500	93.0065	96.1057	
Saikosaponin H	5	4.9986	6.5847	95.4167	102.7397	5
	10	1.0565	8.2187	96.0893	103.9254	
	20	3.5933	5.0504	96.0307	104.9813	
	50	3.0501	3.7856	97.8933	97.2168	
	100	2.1492	4.5282	93.7499	98.1544	
Saikosaponin I	10	5.7350	3.5457	97.7082	98.8243	10
	20	2.4640	8.6769	98.5753	104.5204	
	40	0.9489	5.7897	100.3985	107.0692	
	100	3.7857	3.1563	98.0194	97.8621	
	200	1.8890	6.4567	90.3446	96.1632	

라. 안정성 (Stability)

- 시호의 생리활성성분인 10 종류의 saikosaponin (saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 각각을 50% acetonitrile로 희석하여 30 µg/mL의 농도가 되도록 한 혼합용액을 두 개의 폴리프로필렌 튜브에 4 mL 씩 취하여 하나는 실온에 두었고 하나는 4°C로 유지되는 냉장고에 두었다. 이를 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30일 동안 실온, 4°C에서 보관한 표준액과 안정성시험을 수행하는 날 새로 조제한 표준액과의 면적비로 구했다. (Table 14., Figure 29. 참조)

Table 14. Result of stability test

Compound	온도(°C)	reference	1일	2일	5일	10일	20일	30일	평균	표준편차	R.S.D. (%)
Saikosaponin A	R.T.	100.00	96.60	99.70	93.38	77.64	73.95	90.28	88.59	10.47	11.81
	4°C	100.00	88.75	87.66	88.80	78.63	84.20	80.92	84.83	4.32	5.09
Saikosaponin B ₁	R.T.	100.00	100.46	105.23	86.68	77.07	75.88	86.65	88.66	12.00	13.53
	4°C	100.00	87.60	88.99	86.89	71.63	78.03	78.86	82.00	6.89	8.40
Saikosaponin B ₂	R.T.	100.00	101.79	106.10	95.87	80.34	80.34	91.21	92.61	10.77	11.63
	4°C	100.00	97.03	96.02	93.10	74.39	79.72	84.68	87.49	9.33	10.66
Saikosaponin B ₃	R.T.	100.00	110.37	115.77	105.85	90.39	89.26	108.22	103.31	10.95	10.60
	4°C	100.00	84.72	92.06	92.07	82.48	85.67	88.51	87.59	3.97	4.54
Saikosaponin B ₄	R.T.	100.00	105.34	108.67	128.19	99.68	105.12	132.11	113.18	13.51	11.94
	4°C	100.00	100.73	103.68	125.20	91.57	107.51	117.45	107.69	12.05	11.19
Saikosaponin C	R.T.	100.00	93.46	116.15	113.04	97.51	89.45	111.11	103.45	11.34	10.96
	4°C	100.00	89.05	92.71	103.25	90.62	93.66	99.69	94.83	5.50	5.80
Saikosaponin D	R.T.	100.00	107.03	106.06	102.35	84.87	80.73	88.88	94.99	11.53	12.14
	4°C	100.00	93.14	99.09	98.96	83.51	86.60	97.15	93.07	6.65	7.14
Saikosaponin G	R.T.	100.00	91.70	104.31	81.48	69.06	63.41	85.24	82.53	14.93	18.09
	4°C	100.00	94.96	93.97	76.85	72.04	85.75	76.61	83.36	9.69	11.62
Saikosaponin H	R.T.	100.00	110.41	119.31	109.08	84.63	85.84	102.72	102.00	14.03	13.76
	4°C	100.00	90.86	95.71	94.42	80.74	86.72	94.84	90.55	5.85	6.46
Saikosaponin I	R.T.	100.00	97.32	112.37	113.11	89.86	86.99	102.13	100.30	11.03	11.00
	4°C	100.00	93.14	96.14	117.12	86.48	93.54	96.68	97.18	10.42	10.72

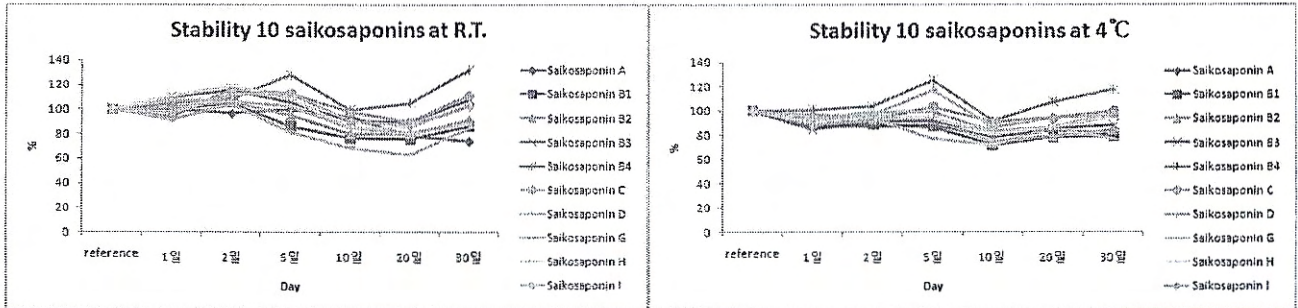


Figure 29. Result of stability test

마. 회수율 (Recovery)

- 회수율을 검토하기 위하여 표준품 첨가법을 사용하였다. 10 mL 용량 플라스크에 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL 농도의 saikosaponin A, saikosaponin D 표준액을 각각 1.0 mL 씩, 300 µg/mL, 600 µg/mL, 900 µg/mL 농도의 saikosaponin C 표준액을 1.0 mL 가한 후 70% MeOH로 표시선까지 정확하게 맞추었다. 여기에 균질하게 분말화한 시호 시료를 200 mg씩 정밀히 취하여 실온에서 40분 동안 초음파 추출한 후 membrane filter를 하였다. 여과액 20 µL를 HPLC에 주입하여 분석하고 표준품과의 농도비를 비교하여 회수율을 구하였다. (Table 15. 참조)

$$R\% = \frac{(\text{Amount from root sample spiked standard} - \text{Amount from root sample})}{\text{Amount from spiked standard}} \times 100$$

Table 15. Recovery of 3 major bioactive compounds from *Bupluri Radix*.

Saikosaponin A		Saikosaponin C		Saikosaponin D	
Concentration	Recovery (n=3)	Concentration	Recovery (n=3)	Concentration	Recovery (n=3)
10 µg/mL	77.42%	30 µg/mL	122.90%	10 µg/mL	133.87%
30 µg/mL	98.64%	90 µg/mL	91.09%	30 µg/mL	148.04%

바. 완건성 (Robustness)

- 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완건성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time(RRT), theoretical plate number(N) 그리고 peak asymmetry(T)를 비교하여 평가하였다. 칼럼 온도는 30 ± 2.5°C의 3 포인트에서 각각 3 번 반복하였으며, 유속은 1 ± 0.1 mL/min 의 3 포인트에서 각각 3 번 반복하여 평가하였다. 또한 이동상에 첨가한 산의 조성을 0.05%, 0.1%, 0.2%의 3 포인트에서 각각 3 번 반복하여 평가하였으며, 칼럼을 Hypersil Gold C18 (4.6 × 250 mm, 5

μm), Ascentis Express C18 ($4.6 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$), Luna 5u C18 ($4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)로 바꾸며 각각 3 번 반복하여 완전성을 평가하였다. (Table 16. ~ Table 19. 참조)

Table 16. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin C	Flow rate	0.9 mL/min	4.13	1.10	15001.46	0.78
		1.0 mL/min	4.13	1.00	11172.41	0.82
		1.1 mL/min	12.17	0.99	11001.34	0.81
	Column Temperature	25°C	12.16	1.02	9000.31	1.11
		27.5°C	4.13	1.00	11172.41	0.82
		30°C	15.61	1.04	16451.69	1
	Mobile phase	0.05% acetic acid	9.38	1.01	11798.15	0.93
		0.1% acetic acid	4.13	1.00	11172.41	0.82
		0.2% acetic acid	23.07	1.00	10406.18	0.97
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	2.29	1.59	9683.07	1.06
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 μm	4.13	1.00	11172.41	0.82
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	6.56	1.67	50962.10	0.96
Saikosaponin I	Flow rate	0.9 mL/min	3.60	1.10	9661.45	0.96
		1.0 mL/min	6.04	1.00	7557.60	0.97
		1.1 mL/min	14.13	0.99	7246.28	0.92
	Column Temperature	25°C	8.53	1.02	7491.56	0.81
		27.5°C	6.04	1.00	7557.60	0.97
		30°C	17.60	1.03	8896.32	1.03
	Mobile phase	0.05% acetic acid	12.87	1.01	7863.43	1.33
		0.1% acetic acid	6.04	1.00	7557.60	0.97
		0.2% acetic acid	29.45	1.00	7921.74	0.94
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	3.92	1.60	12962.00	1.30
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 μm	6.04	1.00	7557.60	0.97
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 μm	5.11	1.64	32622.40	1.83

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

Table 17. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin H	Flow rate	0.9 mL/min	3.83	1.08	17717.50	1.35
		1.0 mL/min	11.18	1.00	14787.50	1.58
		1.1 mL/min	18.73	0.99	17864.90	1.20
	Column Temperature	25°C	9.81	1.02	25010.56	1.19
		27.5°C	11.18	1.00	14787.50	1.58
		30°C	12.68	1.03	12905.77	1.15
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.96	1.00	15179.47	1.06
		0.1% acetic acid	11.18	1.00	14787.50	1.58
		0.2% acetic acid	24.12	1.00	13551.70	1.39
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	-	-	-	-
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	11.18	1.00	14787.50	1.58
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	7.73	1.56	35163.71	1.09
Saikosaponin B ₃	Flow rate	0.9 mL/min	1.60	1.08	12831.40	1.46
		1.0 mL/min	6.05	1.00	14071.40	1.33
		1.1 mL/min	12.65	0.99	11494.22	1.17
	Column Temperature	25°C	7.21	1.01	13677.65	1.05
		27.5°C	6.05	1.00	14071.40	1.33
		30°C	15.84	1.03	12136.97	1.23
	Mobile phase	0.05% acetic acid	12.30	1.00	13515.36	1.39
		0.1% acetic acid	6.05	1.00	14071.40	1.33
		0.2% acetic acid	14.67	1.00	12040.18	1.21
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	-	-	-	-
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	6.05	1.00	14071.40	1.33
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	9.14	1.58	18960.31	1.06
Saikosaponin B ₄	Flow rate	0.9 mL/min	2.01	1.08	17862.04	1.21
		1.0 mL/min	4.34	1.00	12526.28	1.14
		1.1 mL/min	15.85	0.99	15818.60	1.18
	Column Temperature	25°C	10.07	1.01	14607.43	1.10
		27.5°C	4.34	1.00	12526.28	1.14
		30°C	14.37	1.03	16107.62	1.53
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.43	1.00	16771.98	1.37
		0.1% acetic acid	4.34	1.00	12526.28	1.14
		0.2% acetic acid	17.11	1.00	14467.53	1.43
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	2.65	1.49	21248.44	0.92
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	4.34	1.00	12526.28	1.14
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	5.61	1.56	32921.70	1.48

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

Table 18. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin A	Flow rate	0.9 mL/min	4.68	1.07	28832.98	1.13
		1.0 mL/min	7.64	1.00	21631.52	1.53
		1.1 mL/min	17.35	0.99	18601.68	1.27
	Column Temperature	25°C	9.08	1.01	19932.30	1.17
		27.5°C	7.64	1.00	21631.52	1.53
		30°C	22.24	1.03	24031.11	1.02
	Mobile phase	0.05% acetic acid	10.36	1.00	21618.40	1.54
		0.1% acetic acid	7.64	1.00	21631.52	1.53
		0.2% acetic acid	27.12	1.00	19836.19	1.22
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	5.47	1.43	20611.77	1.15
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	7.64	1.00	21631.52	1.53
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	5.86	1.50	69393.86	1.12
Saikosaponin B ₂	Flow rate	0.9 mL/min	4.77	1.06	26185.20	0.96
		1.0 mL/min	6.23	1.00	23275.11	1.50
		1.1 mL/min	13.81	0.99	23670.37	1.13
	Column Temperature	25°C	9.92	1.01	25042.84	0.70
		27.5°C	6.23	1.00	23275.11	1.50
		30°C	7.27	1.03	26175.33	1.24
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.03	1.00	24650.41	1.28
		0.1% acetic acid	6.23	1.00	23275.11	1.50
		0.2% acetic acid	23.08	1.00	22567.04	1.11
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	2.63	1.43	24551.89	1.01
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	6.23	1.00	23275.11	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	9.59	1.48	51780.44	1.16
Saikosaponin G	Flow rate	0.9 mL/min	6.78	1.06	29146.30	1.58
		1.0 mL/min	7.28	1.00	23350.02	1.50
		1.1 mL/min	13.44	0.99	25000.28	1.49
	Column Temperature	25°C	5.47	1.01	26769.45	1.33
		27.5°C	7.28	1.00	23350.02	1.50
		30°C	9.94	1.02	27748.76	1.08
	Mobile phase	0.05% acetic acid	12.61	1.00	22947.13	2.00
		0.1% acetic acid	7.28	1.00	23350.02	1.50
		0.2% acetic acid	23.97	1.00	23498.78	1.74
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	2.95	1.40	22599.25	1.00
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	7.28	1.00	23350.02	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	11.44	1.44	32836.14	1.41

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

Table 19. Robustness data of 10 saikosaponins

Compound	Analytical condition		Area C.V.(%)	RRT ^a	N ^b	T ^c
Saikosaponin B ₁	Flow rate	0.9 mL/min	2.14	1.06	21285.04	1.33
		1.0 mL/min	8.13	1.00	29758.38	1.50
		1.1 mL/min	12.41	0.99	24834.79	1.32
	Column Temperature	25°C	10.48	1.01	24700.26	1.33
		27.5°C	8.13	1.00	29758.38	1.50
		30°C	10.43	1.02	26271.15	1.33
	Mobile phase	0.05% acetic acid	11.20	1.00	30769.92	1.51
		0.1% acetic acid	8.13	1.00	29758.38	1.50
		0.2% acetic acid	20.72	1.00	21741.09	1.19
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	6.45	1.40	20205.09	1.01
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	8.13	1.00	29758.38	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	6.75	1.42	38203.45	1.17
Saikosaponin D	Flow rate	0.9 mL/min	2.31	1.05	35942.00	1.62
		1.0 mL/min	10.19	1.00	43080.45	1.50
		1.1 mL/min	8.41	0.99	36490.82	1.04
	Column Temperature	25°C	7.44	1.00	38083.39	1.57
		27.5°C	10.19	1.00	43080.45	1.50
		30°C	18.11	1.02	37482.11	1.00
	Mobile phase	0.05% acetic acid	13.21	0.88	35922.34	1.38
		0.1% acetic acid	10.19	1.00	43080.45	1.50
		0.2% acetic acid	26.37	1.00	41172.71	1.45
	Column	Hypersil Gold C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	13.61	1.34	40365.38	0.80
		Ascentis Express C18 4.6 x 100 mm, 2.7 µm	10.19	1.00	43080.45	1.50
		Luna C18 4.6 x 250 mm, 5 µm	10.12	1.41	34324.19	0.79

(a : relative retention time b : theoretical plate number c : peak asymmetry)

4. 시호의 추출법 개발

가. 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법 중 초음파추출법에서 추출률이 가장 좋았다. (Table 20, Figure 30. 참조)

Table 20. Optimization of extraction method(peak area)

Sonication	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1836075	2108558	2341006	2095213.00	252729.89
Saikosaponin C	259951	321857	321881	301229.67	35748.38
Saikosaponin D	1529109	1699561	1875551	1701407.00	173228.38
환류	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1107105	1278194	1325888	1237062.33	115045.04
Saikosaponin C	124978	157429	164574	148993.67	21102.77
Saikosaponin D	848653	1009925	1085919	981499.00	121160.29
냉침	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	855892	667779	623805	715825.33	123277.86
Saikosaponin C	97349	57519	59811	71559.67	22363.60
Saikosaponin D	663364	456294	489828	536495.33	111143.49

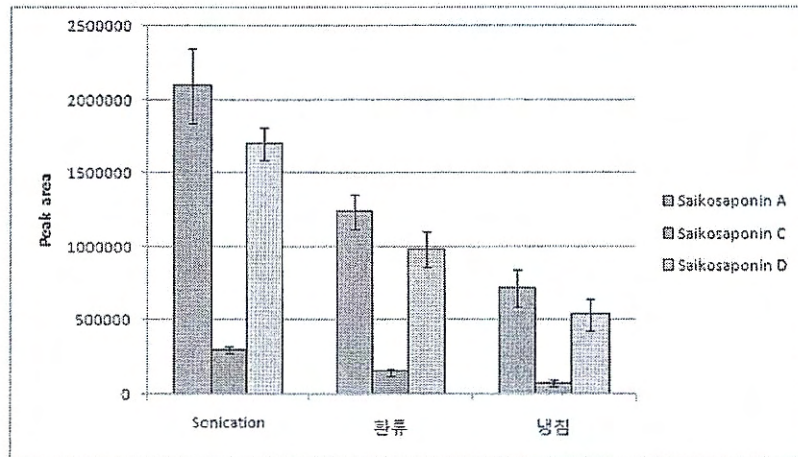


Figure 30. Optimization of extraction method

나. MeOH과 EtOH 중 MeOH을 추출용매로 하였을 때, 추출률이 가장 좋았다. (Table 21., Figure 31. 참조)

Table 21. Optimization of extraction solvent(peak area)

EtOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1097302	1415420	1380931	1297884.33	174563.25
Saikosaponin C	143945	188823	161996	164921.33	22581.56
Saikosaponin D	933239	1133997	1113587	1060274.33	110488.12
MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1836075	2108558	2341006	2095213.00	252729.89
Saikosaponin C	259951	321857	321881	301229.67	35748.38
Saikosaponin D	1529109	1699561	1875551	1701407.00	173228.38

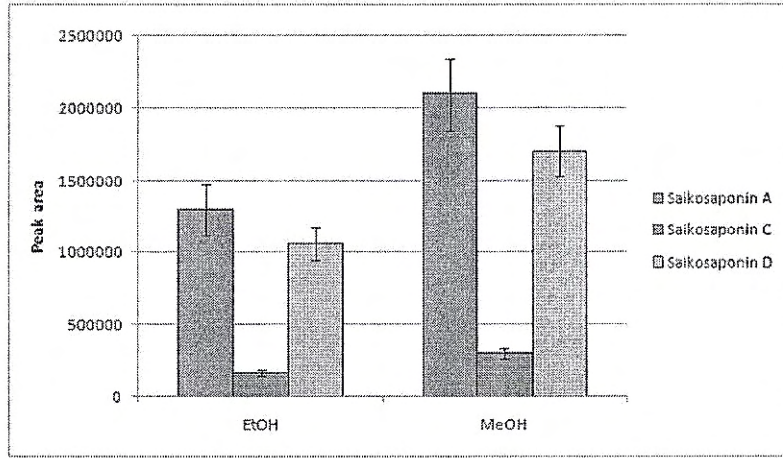


Figure 31. Optimization of extraction solvent

다. 100%, 70%, 50% MeOH 중 70% MeOH로 추출할 때 추출률이 가장 좋았다. (Table 22., Figure 32. 참조)

Table 22. Optimization of extraction solvent composition

100% MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	1836075	2108558	2341006	2095213.00	252729.89
Saikosaponin C	259951	321857	321881	301229.6667	35748.38
Saikosaponin D	1529109	1699561	1875551	1701407.00	173228.38
70% MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	2373664	2512827	2148103	2344864.67	184059.64
Saikosaponin C	389316	414822	334027	379388.33	41302.26
Saikosaponin D	1586380	1613849	1044777	1415002.00	320918.29
50% MeOH	1회	2회	3회	평균	표준편차
Saikosaponin A	2069415	2322066	2251133	2214204.67	130310.81
Saikosaponin C	339836	411377	374993	375402.00	35772.25
Saikosaponin D	917990	1063772	1041469	1007743.67	78524.81

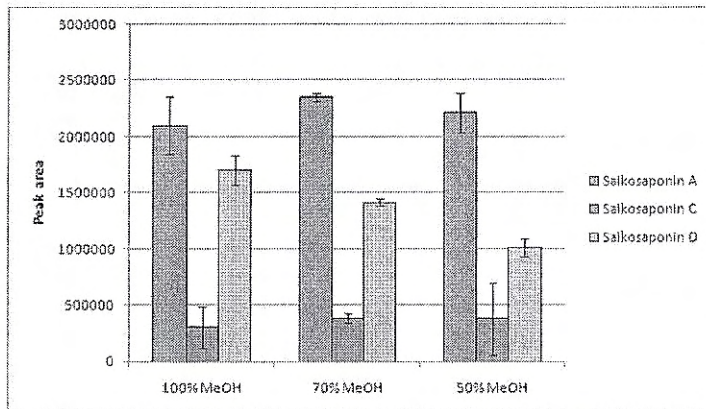


Figure 32. Optimization of extraction solvent composition

라. 추출시간 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 70분 중 40분 추출에서 추출률이 가장 좋았다.
(Table 23., Figure33. 참조)

Table 23. Optimization of extraction time

추출시간	Saikosaponin A	Saikosaponin C	Saikosaponin D
10분	922355	118941	709978
20분	2164479	301049	1582723
30분	2365567	361206	1832392
40분	2684734	396746	1876744
50분	2411879	412831	1741059
60분	2373664	389316	1586380
70분	2344235	396691	1413802

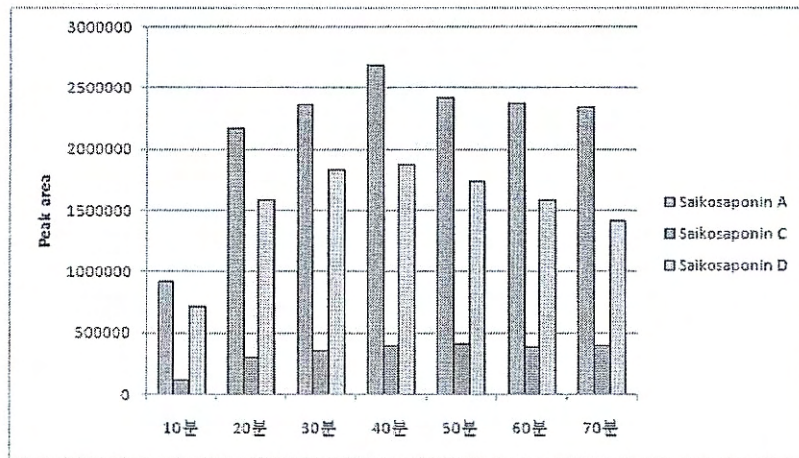


Figure 33. Optimization of extraction time

5. HPLC-ELSD 분석법을 이용한 시호 성분의 함량 분석

- 국산 9 종, 중국산 11 종의 시호를 시중에서 구입하거나 제 1 세부 기관으로부터 제공받아 추출한 후, 확립한 HPLC-ELSD 분석법에 적용하여 시호 생리활성성분의 함량을 구하였다. (Figure 34. ~ Figure 54. 참조, Table 24. 참조)
- 대한약전 제 9개정에서 시호는 “이 약은 정량할 때 사이코사포닌 a로서 0.3% 이상을 함유한다.”로 규정하고 있어, 본 연구에서의 함량결과로 판단하면 20개의 시호 시료 중 5개만 약전 규정에 적합한 결과로 나타나, DNA 종감별 결과와는 다소 차이가 있다.
- 이는 약전의 정량법과 본 연구과제에서 최적화한 분석법 사이에, 아래와 같이 전처리조건과 분석조건의 차이가 존재하고 있어, 함량 결과에 많은 영향을 줄 것으로 판단된다. 특히, 추출용매와 용매 부피, 추출시간 등이 차이가 많이 있으므로, 이에 따른 추출효율에서 크게 영향을 받을 것으로 생각

된다.

전처리조건	약전의 정량법	본 연구과제의 전처리법
채취량	0.5 g	0.2 g
추출용매	수산화암모늄 · 메탄올혼합액(1→20)	70% MeOH
용매량	50 mL	10 mL
추출방법	초음파추출	초음파추출
추출시간	2시간	40분
HPLC 분석 조건	약전의 정량법	본 연구과제의 전처리법
이동상 조성	ACN/H ₂ O = 35/65	ACN/H ₂ O (0.1% HAc 포함)
이동상 용리	등용매 용리	기울기 용리
검출기	자외부 흡광광도계 (203 nm)	증기화광산란검출기 (ELSD)
유량	0.8 mL/min	1.0 mL/min

- 따라서, 함량기준의 변경에 대한 결정은 현 상황에서 할 수 없으며, 2009년도에 수행할 “한약재 생리 활성성분 모니터링” 연구 사업에서 80여 종 이상의 시호 시료를 수집하고 함량을 분석하여 통계적으로 처리한 후, 그 연구결과에 따라 함량기준 변경여부를 판단해야 한다고 생각한다.

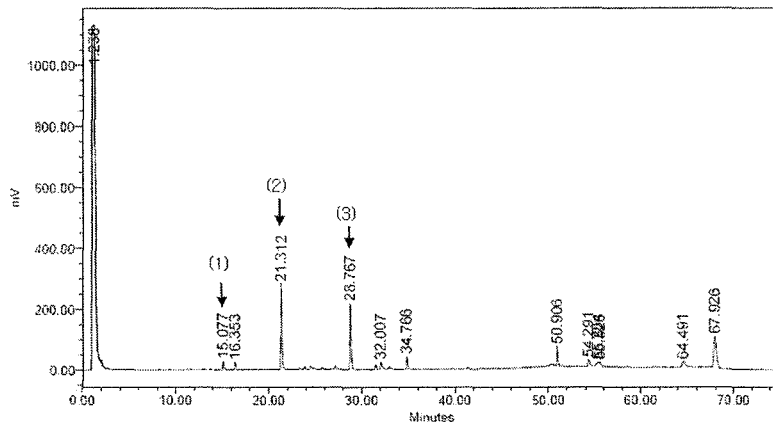


Figure 34. HPLC-ELSD chromatogram of K1

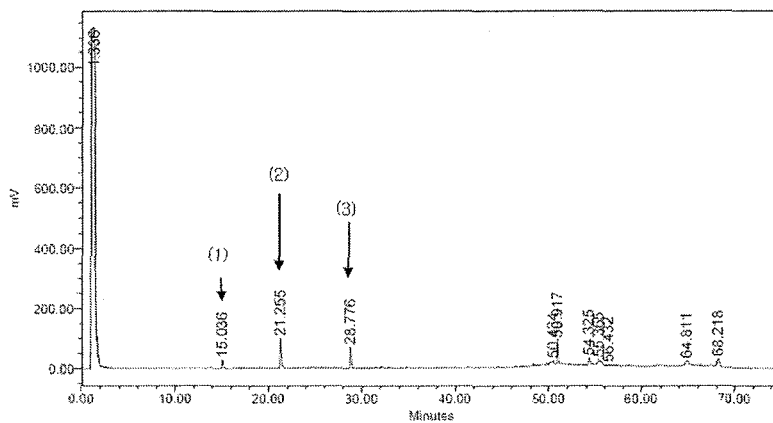


Figure 35. HPLC-ELSD chromatogram of K2

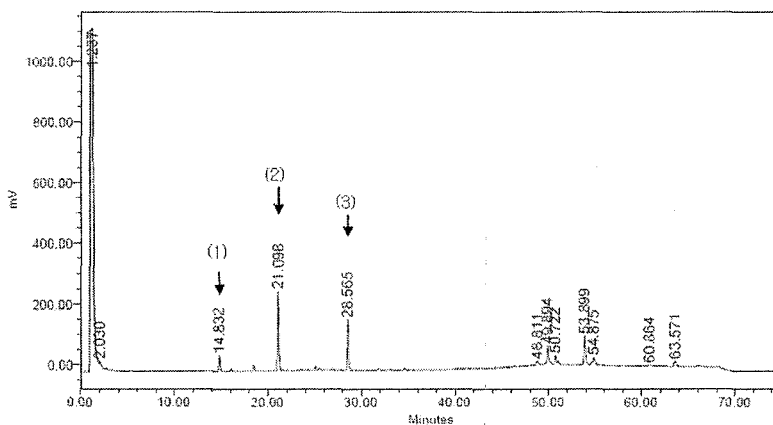


Figure 36. HPLC-ELSD chromatogram of K3

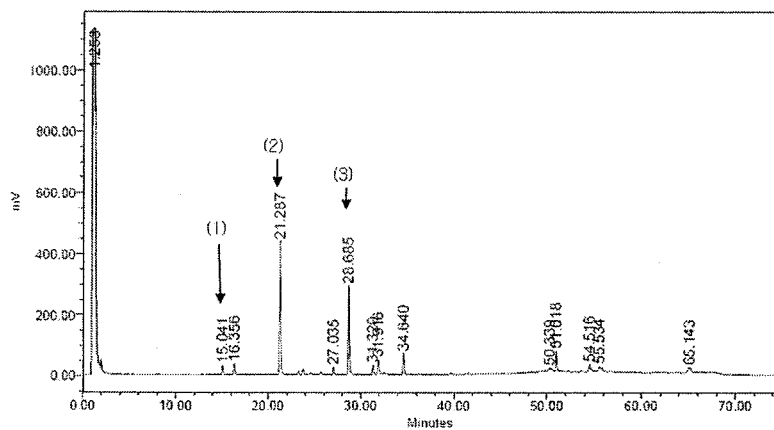


Figure 37. HPLC-ELSD chromatogram of K4

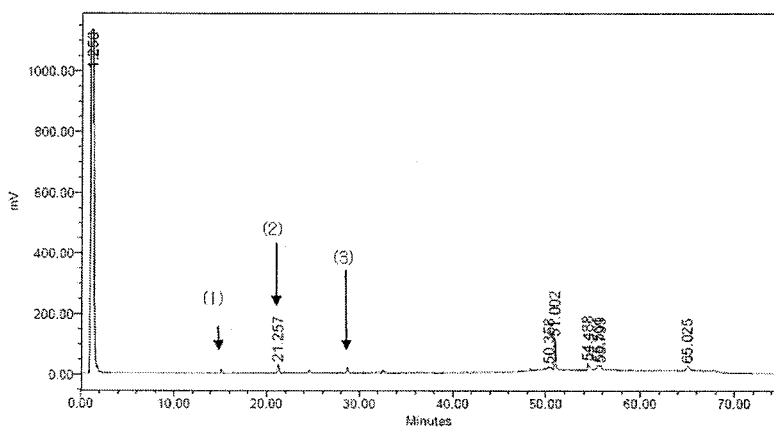


Figure 38. HPLC-ELSD chromatogram of K5

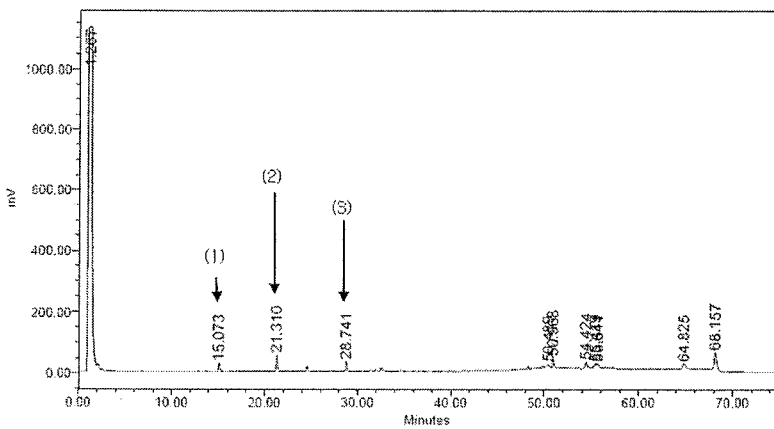


Figure 39. HPLC-ELSD chromatogram of K6

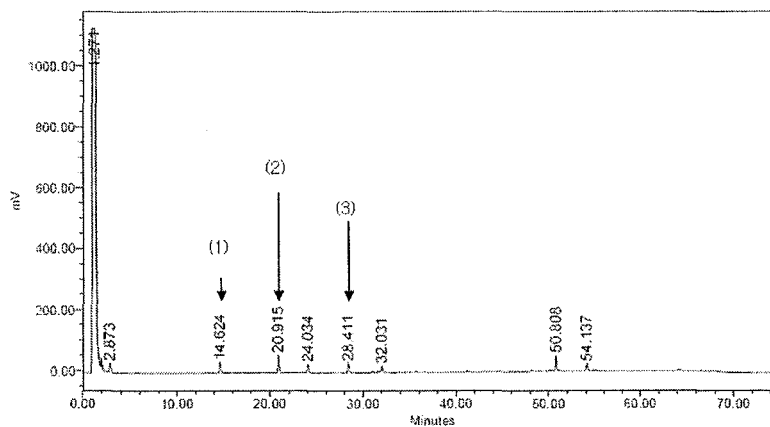


Figure 40. HPLC-ELSD chromatogram of K7

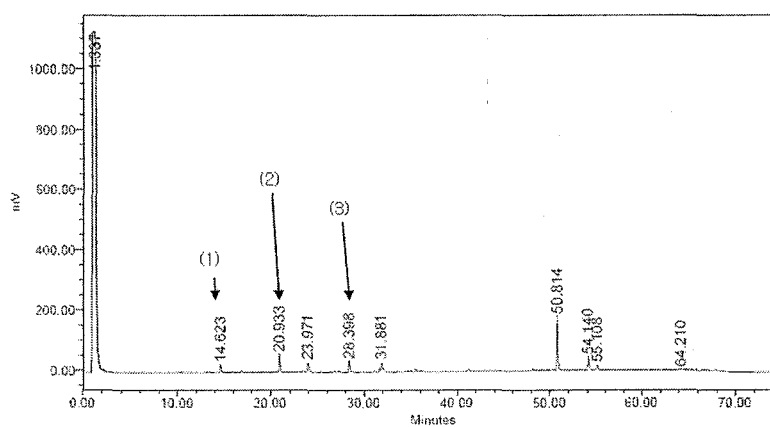


Figure 41. HPLC-ELSD chromatogram of K8

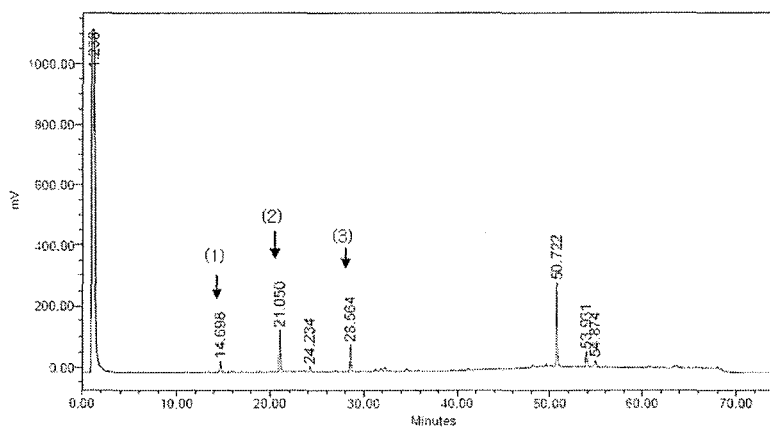


Figure 42. HPLC-ELSD chromatogram of K9

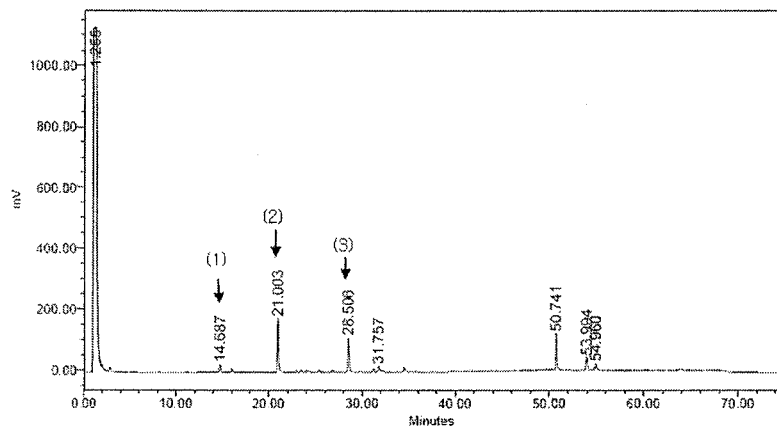


Figure 43. HPLC-ELSD chromatogram of C1

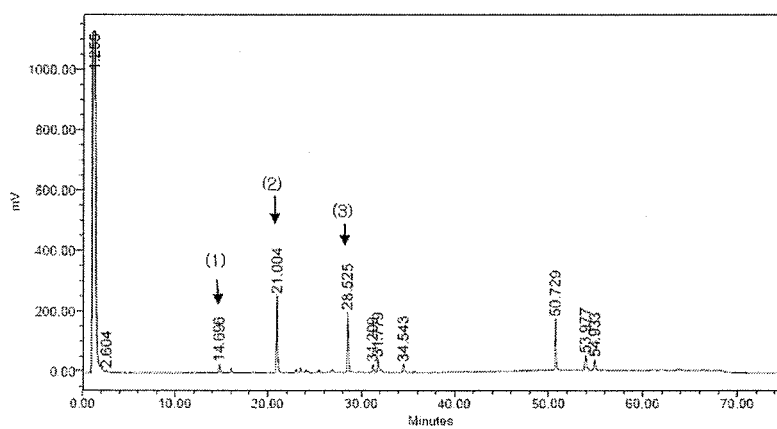


Figure 44. HPLC-ELSD chromatogram of C2

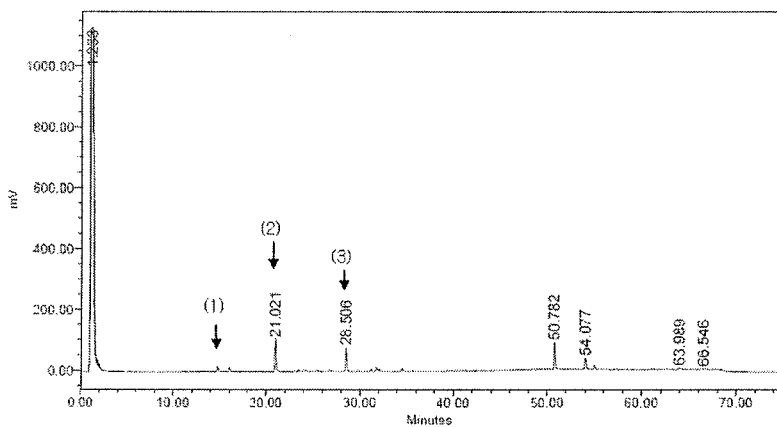


Figure 45. HPLC-ELSD chromatogram of C3

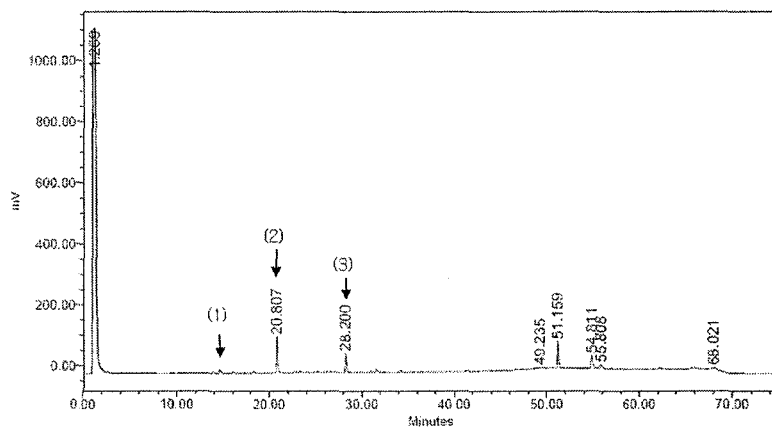


Figure 46. HPLC-ELSD chromatogram of C4

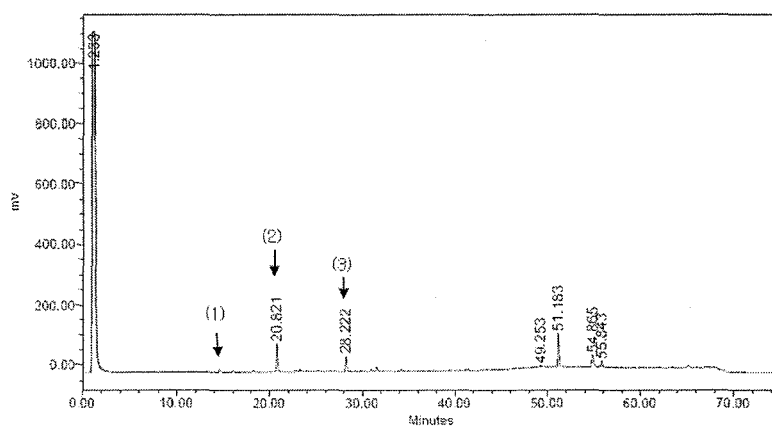


Figure 47. HPLC-ELSD chromatogram of C5

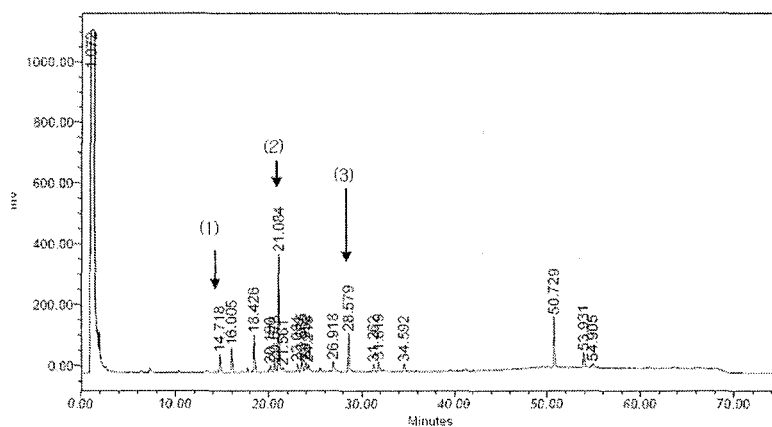


Figure 48. HPLC-ELSD chromatogram of C6

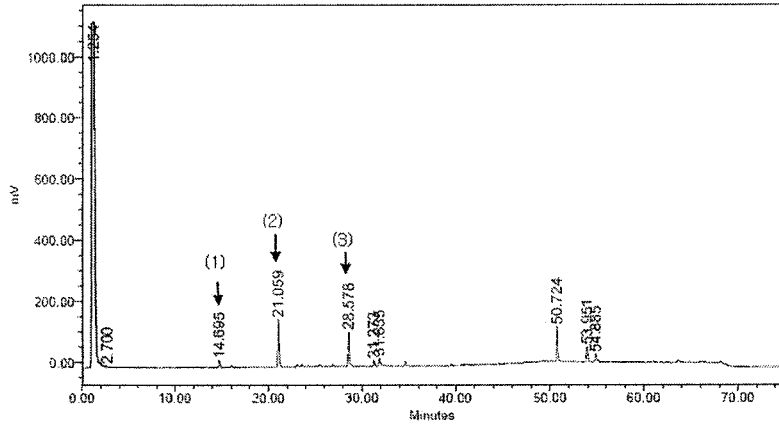


Figure 49. HPLC-ELSD chromatogram of C7

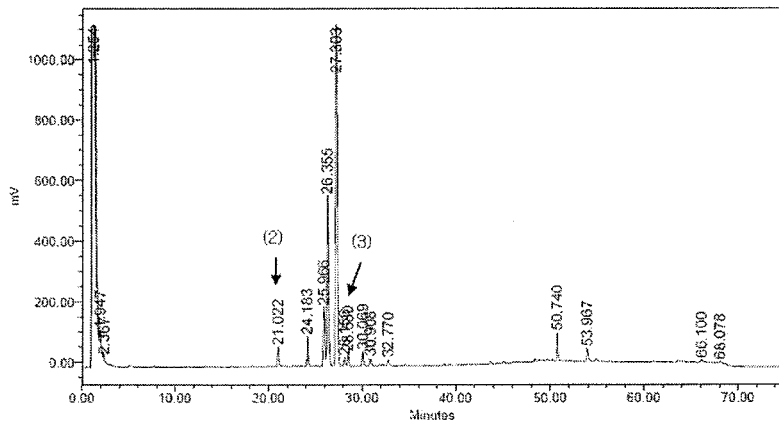


Figure 50. HPLC-ELSD chromatogram of C8

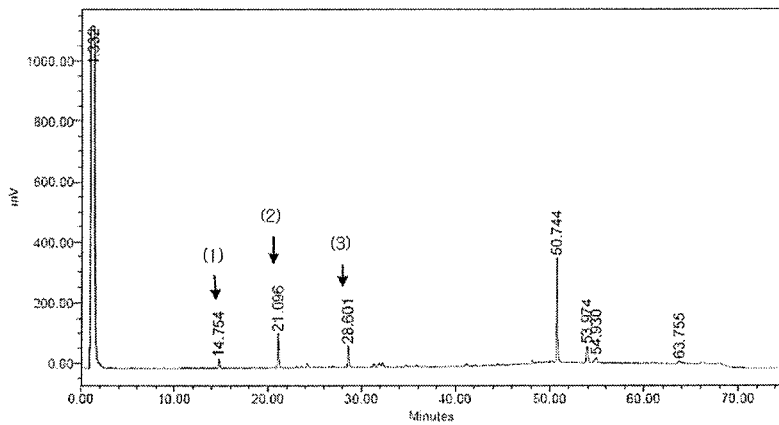


Figure 51. HPLC-ELSD chromatogram of C9

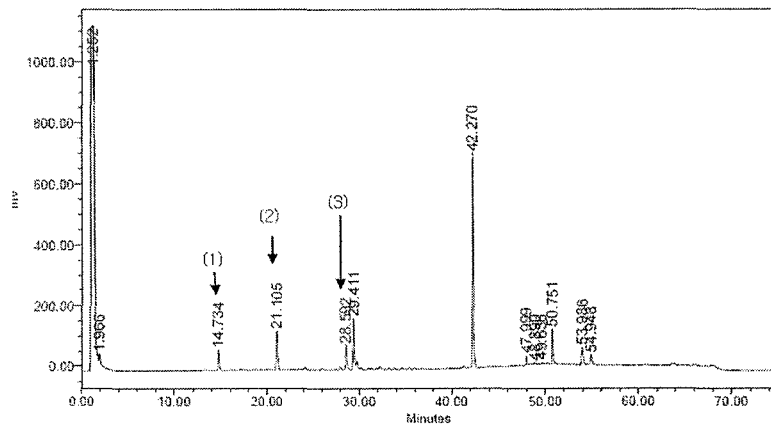


Figure 52. HPLC-ELSD chromatogram of C10

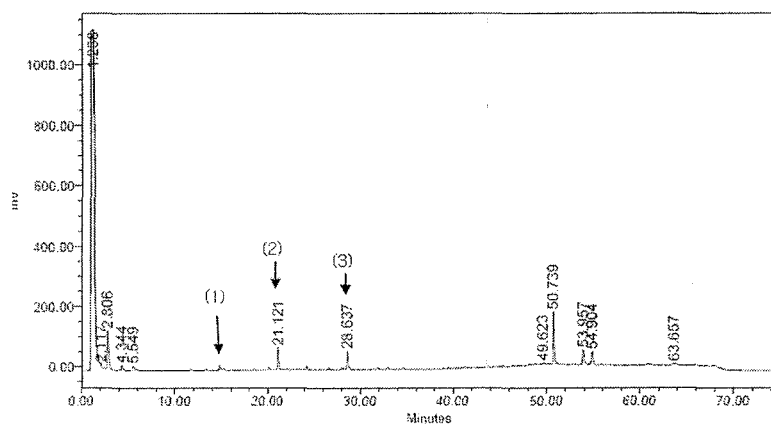
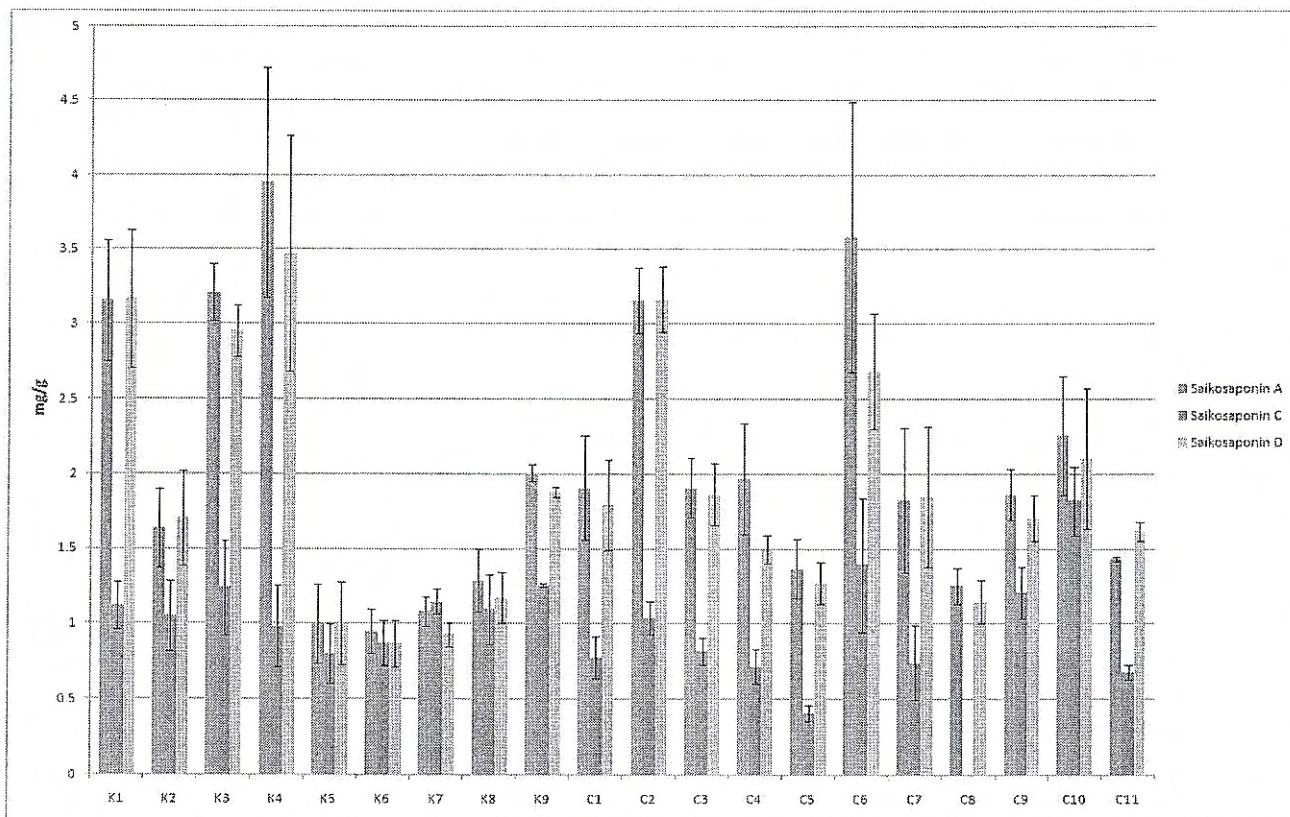


Figure 53. HPLC-ELSD chromatogram of C11

Table 24. Content of 20 *Bupleuri Radix* samples (mg/g)

	Saikosaponin A	Saikosaponin C	Saikosaponin D
K1	3.16 ± 0.41	1.12 ± 0.16	3.17 ± 0.46
K2	1.64 ± 0.27	1.05 ± 0.23	1.70 ± 0.31
K3	3.21 ± 0.19	1.24 ± 0.32	2.95 ± 0.17
K4	3.95 ± 0.77	0.98 ± 0.27	3.47 ± 0.79
K5	1.00 ± 0.26	0.80 ± 0.20	1.01 ± 0.27
K6	0.95 ± 0.14	0.87 ± 0.15	0.87 ± 0.15
K7	1.08 ± 0.10	1.15 ± 0.08	0.93 ± 0.08
K8	1.29 ± 0.21	1.10 ± 0.24	1.17 ± 0.17
K9	2.01 ± 0.06	1.26 ± 0.01	1.88 ± 0.04
C1	1.91 ± 0.35	0.78 ± 0.14	1.80 ± 0.30
C2	3.16 ± 0.22	1.04 ± 0.11	3.17 ± 0.22
C3	1.91 ± 0.20	0.82 ± 0.09	1.87 ± 0.21
C4	1.97 ± 0.37	0.72 ± 0.12	1.50 ± 0.09
C5	1.37 ± 0.20	0.41 ± 0.05	1.27 ± 0.14
C6	3.59 ± 0.90	1.40 ± 0.45	2.69 ± 0.39
C7	1.83 ± 0.48	0.74 ± 0.25	1.85 ± 0.47
C8	1.26 ± 0.12	0	1.15 ± 0.14
C9	1.86 ± 0.17	1.21 ± 0.17	1.71 ± 0.15
C10	2.26 ± 0.40	1.82 ± 0.23	2.11 ± 0.47
C11	1.43 ± 0.02	0.68 ± 0.05	1.62 ± 0.06

Figure 54. Contents of 20 *Bupleuri Radix* samples

6. 시호의 HPLC-ELSD 크로마토그램을 이용한 산지별 기원별 패턴인식법 확립

가. HPLC-ELSD를 통한 시호의 함량분석에서 구하여진 HPLC-ELSD 크로마토그램으로 산지별 기원별 패턴분석을 하였다.

나. 시호의 세 가지 주 생리활성성분 피크의 면적을 변수로 하였으며 이를 군집 분석 (Cluster Analysis)과 주성분 분석 (Principal Component Analysis, PCA)에 적용하였다. (Figure 55 ~ Figure 57. 참조) 또한 시호의 아홉 가지 생리활성성분의 피크의 면적을 변수로 하여 마찬가지로 방법으로 군집 분석과 주성분 분석을 하였다. (Figure 58., Figure 59. 참조)

다. 한국산과 중국산 시호를 구분하기 위하여 시호의 주요 saikosaponin인 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용하여 3D-plotting을 실시하였고, saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용하여 패턴분석을 실시하였으며, 전체적인 주성분 9 종을 선정하여 패턴분석을 실시하였으나, 한국산과 중국산 시호의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

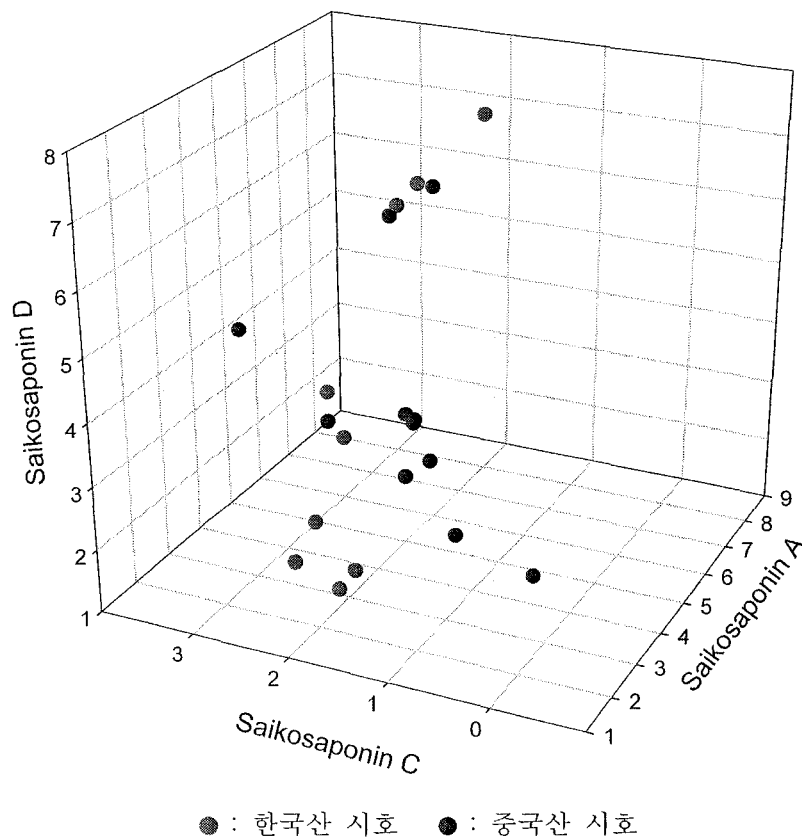


Figure 55. 3D-plotting of 20 *Bupleuri Radix* samples with 3 major saikosaponins

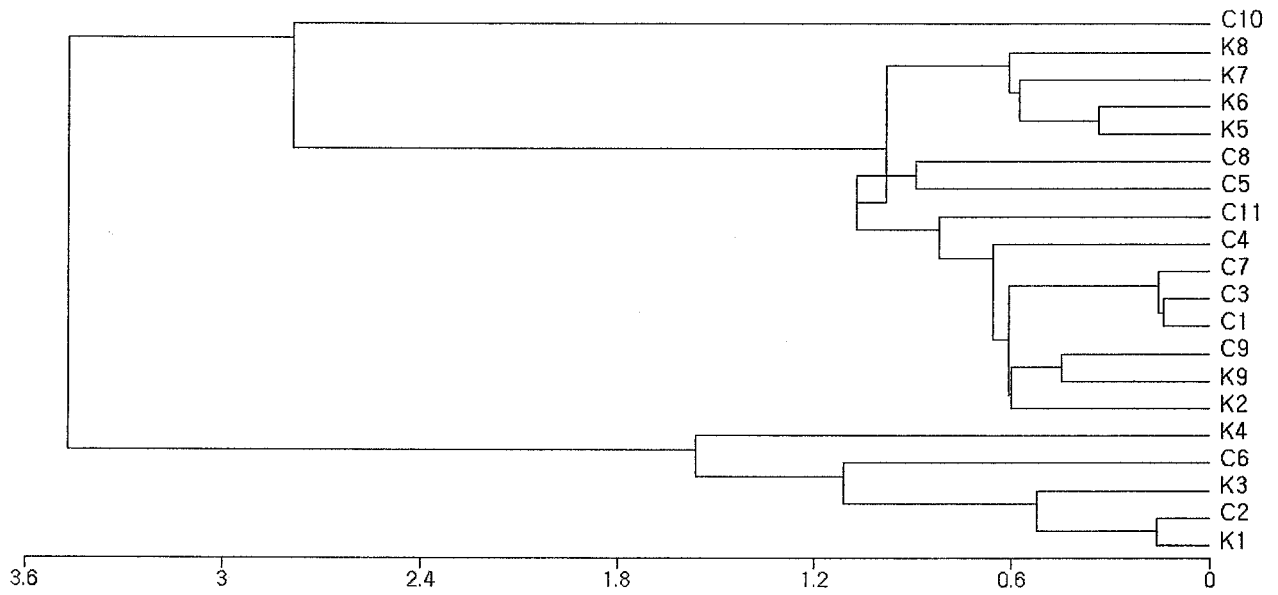


Figure 56. Cluster analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 3 major saikosaponins

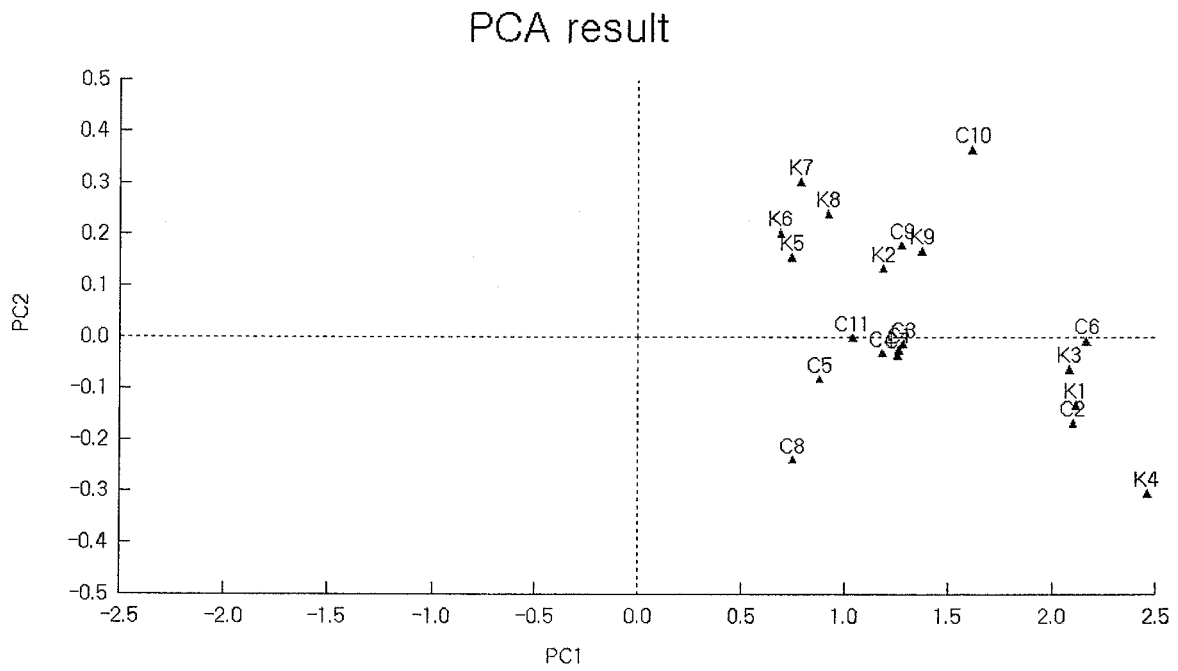


Figure 57. Principle component analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 3 major saikosaponins

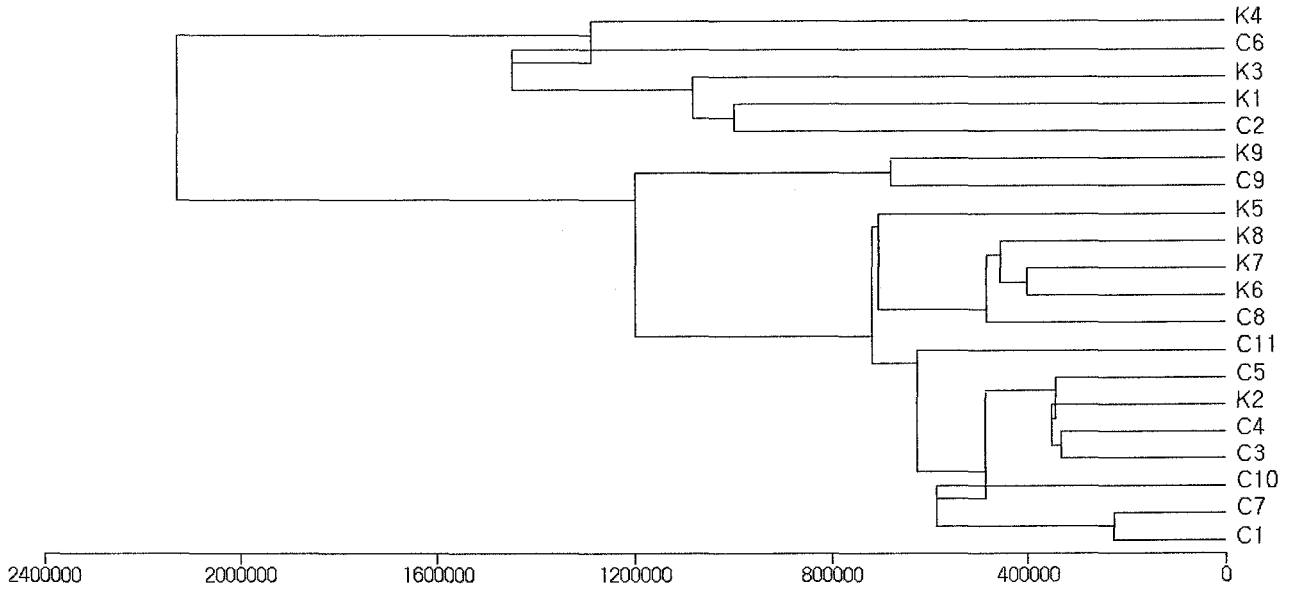


Figure 58. Cluster analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 9 major components

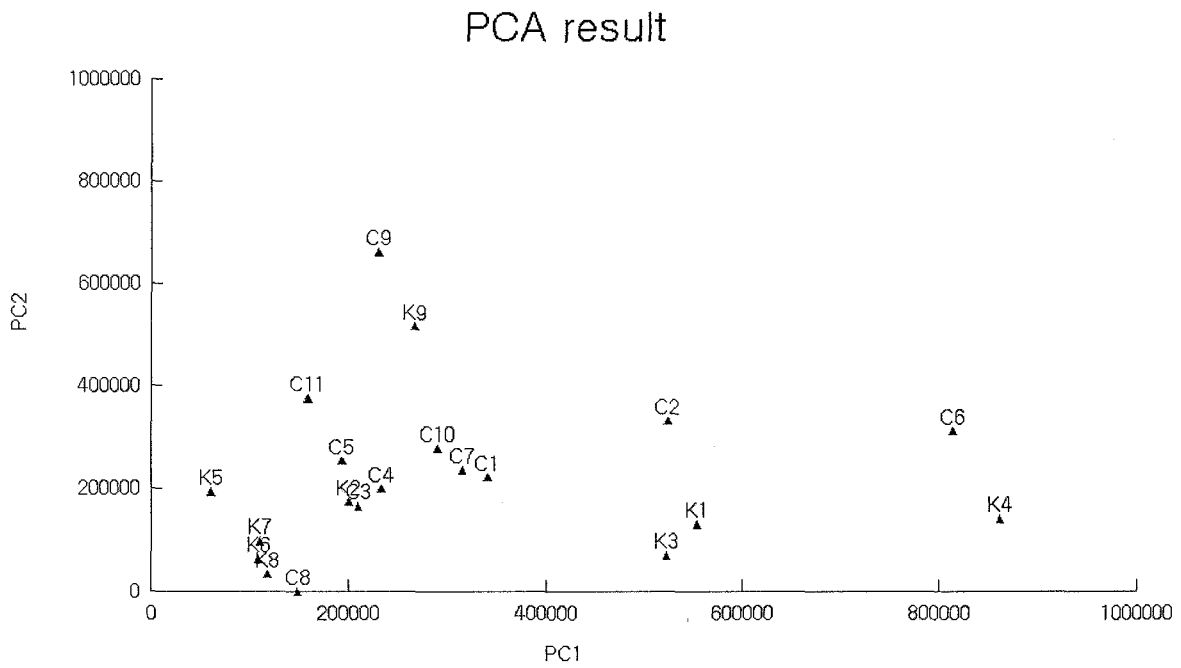


Figure 59. Principle component analysis result of 20 *Bupleuri Radix* samples with 9 major components

7. 시호의 DNA 종감별 결과와 HPLC 분석 결과의 비교

가. 시호 동정시료의 ITS 부위 염기서열 분석 결과, 6개 시료(K1, K4, C1, C2, C6, C7)는 복시호(B.

chinense)로 확인되었으며, 11개 시료(K2, K3, K5, K6, K7, K8, K9, C3, C4, C5, C9)는 시호(*B. falcatum*), 그 외 C8은 남시호(*B. sibiricum*), C10, C11은 죽시호(*B. longiradiatum*)로 확인되었다.

나. HPLC를 이용한 함량분석 결과에서는 DNA 종감별에서 북시호로 동정된 K1, K4, C1, C2, C6, C7 시료의 뚜렷한 패턴 변화를 발견할 수 없었으나, 다른 시료에 비하여 분석시간 30-36분 이내에 3개의 피크가 관찰된다는 특징을 발견할 수 있다. 하지만 이러한 경향은 C1에서 매우 약하게 보이며 (거의 검출되지 않음) 다른 시료와 비교하여 뚜렷하지 않아, 북시호의 화학분석 특징으로 단정하기엔 어려움이 있다.

다. HPLC를 이용한 함량분석 내용에서 북시호로 확인된 K1, K4, C2, C6 시료는 주요 사포닌인 saikosaponin A, C, D의 함량이 매우 높았다. 하지만 역시 북시호로 확인된 C1, C7 시료에서는 다른 시료와 주요 성분의 함량차이가 크지 않았다.

라. HPLC 크로마토그램의 성분 피크 데이터를 이용한 군집분석과 주성분 분석에서 K1, K4, C2, C6 시료가 다른 시료와 뚜렷하게 분류되는 경향을 확인할 수 있었다. 하지만 C1과 C7 시료는 많은 차이가 있었다. 오히려 K3 시료가 군집분석과 주성분 분석에서 한 그룹으로 분류되는 것을 확인할 수 있었으나, HPLC 크로마토그램에서는 30-36분 사이의 3개의 피크가 관찰되지 않아 종구별과의 일관된 상관성이 있지는 않았다.

마. HPLC-ELSD를 통한 시호의 함량분석에서 구하여진 HPLC-ELSD 크로마토그램으로 산지별 기원별 패턴분석을 위해 시호의 아홉 가지 생리활성성분의 피크의 면적을 변수로 하여 군집 분석(Cluster Analysis)과 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)에 적용하였을 때, 시호의 주요 saikosaponin인 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용한 패턴분석에서 한국산과 중국산 시호의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

바. 결론적으로, 수집한 시호의 종류는 시호(*B. falcatum*), 북시호(*B. chinense*), 남시호(*B. sibiricum*), 죽시호(*B. longiradiatum*)로 확인이 되었다. 그리고 우리나라 시호는 대부분 시호(*B. falcatum*)이었으며, 중국산 시호는 북시호(*B. chinense*)와 시호(*B. falcatum*)가 대부분이었다. 성분분석을 통한 국산 시호와 중국산 시호의 구분을 위해서는 향후 이에 대한 연구가 추가로 진행되어야 할 것이다.

8. LC-MS 분석법의 개발

가. 시호의 생리활성 성분의 극성에 따라 ESI (electrospray ionization)와 APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ion source 중 검출이 잘되는 ESI (electrospray ionization)를 선택하였다. 또

한 (+) ion mode 또는 (-) ion mode를 비교하여 더 감도가 좋은 (-) ion mode를 선택하였다.

나. LC-MS/MS 분석 시 MRM(multiple reaction monitoring) mode로 분석하며, 이 때 각 성분별로 collision cell에서 강도를 조절하여 product ion의 response나 specificity를 고려하며, 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다. 그러나 시호사포닌의 구조적 특성상 collision이 잘 일어나지 않았고, 고농도범위(500 - 20000 ng/mL)에서 분석을 수행하려 하였으나, 이러한 고농도범위에서는 Mass spectrometer의 intensity가 포화되는 경향을 보여 정량을 할 수 없었다. 따라서 시호사포닌은 SIM(selected ion monitoring) mode로 분석하기로 하였다. (Table 25. 참조)

다. 내부표준물질을 포함하여 대상 성분 모두 $[M-H]^-$ ion을 선정하였으며, 서로 다른 ion이 검출되었다. 내부표준물질의 질량대하전비는 1108이었고 saikosaponin C, H, I의 질량대하전비는 925.8, saikosaponin B₃, B₄의 질량대하전비는 811.6, saikosaponin A, B₁, B₂, G, D의 질량대하전비는 779.6이었다.

Table 25. Optimum LC-MS conditions for 10 saikosaponins

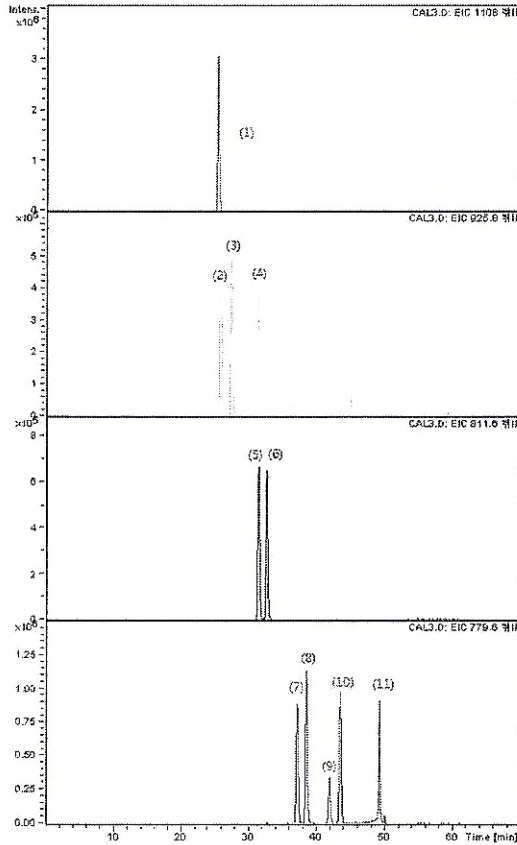
Pump	Agilent 1100 series G1312A		
Detector	Agilent 1100 series LC/MSD Trap		
Column	Hypersil GOLD C18 (150 × 2.1 mm, 3 μm)		
Guard Column	Security Guard C18 (4.0 × 3.0 mm)		
Mobile phase	(A) Acetonitrile/Water = 90/10, with 0.1% formic acid (B) Acetonitrile/Water = 10/90, with 0.1% formic acid		
Gradient profile	시간	Solvent A	Solvent B
	0	20	80
	5	20	80
	35	50	50
	45	90	10
	65	90	10
	65.1	20	80
75	20	80	
Injection volume	10 μL		
Column Temp.	27.5 °C		
MS condition	Nebulizer : 35 psi Dry Gas : 8 L/min Dry Temp. : 350 °C		

9. LC-MS 분석법에 대한 검증 (validation)

가. 선택성 (Selectivity)

- 10 종류의 saponin계 성분이 시호의 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다.

(Figure 60. 참조)



(1) Internal standard(Ginsenoside R_{b1}) (2) saikosaponin C (3) saikosaponin I (4) saikosaponin H (5) saikosaponin B₃
 (6) saikosaponin B₄ (7) saikosaponin A (8) saikosaponin B₂ (9) saikosaponin G (10) saikosaponin B₁ (11) saikosaponin D

Figure 60. LC-MS chromatogram of 10 saikosaponins

나. 직선성 (Linearity)

- 10 종의 시호 saikosaponin(saikosaponin A, saikosaponin B₁, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin B₄, saikosaponin C, saikosaponin D, saikosaponin G, saikosaponin H, saikosaponin I) 에 대하여 50 - 2000 ng/mL의 농도 범위에서 검량선을 작성하였다. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수가 0.992 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. (Figure 61. 참조)

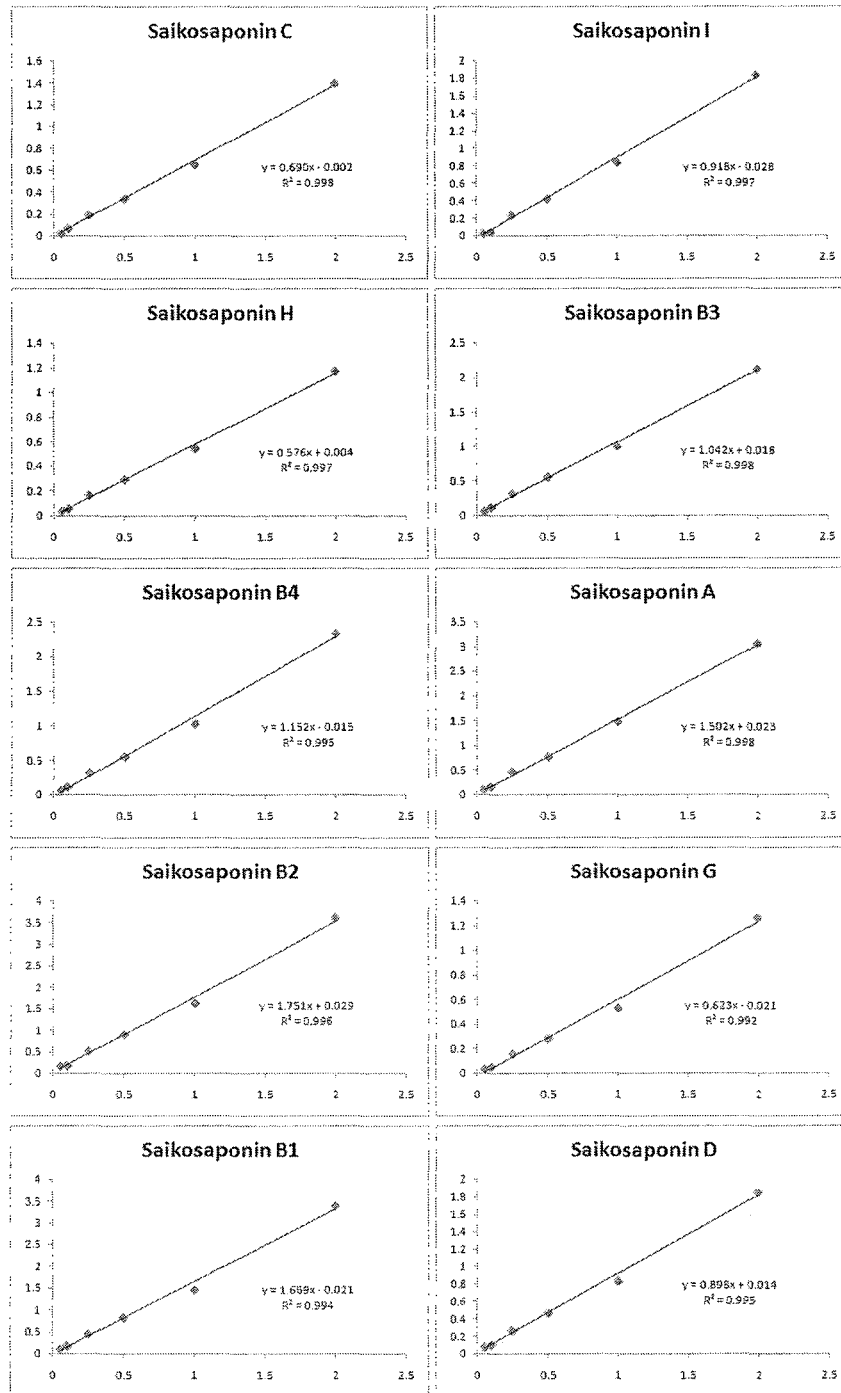


Figure 61. Calibration curves of 10 saikosaponins

다. 정밀성 (Precision) 및 정확성 (Accuracy)

- (1) 각 생리활성성분 분석의 일내 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 가지 농도에 대하여 하루에 3 번 반복 실험하였으며, 일간 정확성, 정밀성을 확인하기 위하여 3 일간 반복 실험하였다.
- (2) 일내, 일간 정밀성은 각 성분의 피크 면적비의 표준편차를 각 성분의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 그 값은 0.73 ~ 7.41% 와 0.98 ~ 16.27% 이었다.

- (3) 일내, 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 80.02 ~ 119.98% 와 83.69 ~ 126.73% 이었다. (Table 26. 참조)

Table 26. Intra-, inter- day precision, accuracy, and limit of quantification(LOQ)

Compound	Conc. (ng/mL)	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)		LOQ (ng/mL)
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day	
Saikosaponin A	50	1.9185	1.6971	83.0519	97.7426	50
	250	0.9584	0.9780	94.8838	107.2266	
	2000	4.4109	7.0519	86.1918	92.1286	
Saikosaponin B ₁	50	3.9028	10.0700	115.3787	126.7314	50
	250	2.5870	2.6900	99.2429	116.5938	
	2000	2.9768	3.8375	85.5488	95.3061	
Saikosaponin B ₂	50	4.4951	2.3020	80.0171	84.7325	50
	250	3.3901	1.3419	96.0696	105.2319	
	2000	1.7646	3.4093	86.7102	86.3549	
Saikosaponin B ₃	50	1.4297	1.0163	80.3828	83.6948	50
	250	2.9989	2.4224	95.8153	100.6254	
	2000	1.5097	5.9397	87.0359	86.9896	
Saikosaponin B ₄	50	3.7244	7.2421	116.1296	100.3558	50
	250	2.0727	3.9359	98.4622	106.3305	
	2000	0.7255	2.6585	84.8754	92.0265	
Saikosaponin C	50	1.2182	5.4327	110.2222	110.2594	50
	250	3.2340	4.4385	96.2079	101.7544	
	2000	3.4984	3.0657	85.5237	85.7115	
Saikosaponin D	50	7.4057	2.2025	81.5578	84.6674	50
	250	3.1270	2.3294	97.2227	106.8953	
	2000	5.2815	12.7448	92.1308	91.1764	
Saikosaponin G	50	5.9713	16.2722	118.7799	108.3616	50
	250	1.4995	2.1882	98.6422	103.3203	
	2000	2.7053	2.5119	86.1150	89.1693	
Saikosaponin H	50	1.7829	6.2177	90.1486	86.1422	50
	250	4.2588	2.7209	90.8807	107.4568	
	2000	1.2454	3.4064	87.1647	97.4938	
Saikosaponin I	50	5.6314	12.3232	119.9776	87.6225	50
	250	1.0442	1.6496	100.8443	101.0827	
	2000	1.9025	3.8619	88.6447	90.7721	

제 4 장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

제 1 절 방풍의 생리활성성분의 동시분석법 개발

1. 본 연구에서는 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 등을 이용한 방풍의 생리활성성분의 동시분석법을 개발하였고, 분석법 검증과 방풍의 최적추출조건 설정, 함량분석, 패턴분석 등을 수행하였다.
2. 방풍의 세 가지 생리활성성분에 대한 분석법 검증을 실시한 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time(RRT), theoretical plate number(N) 그리고 peak asymmetry(T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다.
3. 추출법, 추출용매, 추출용매의 조성, 추출 시간 등의 factor를 고려하여 방풍의 최적추출조건을 설정하였다.
4. 최적의 추출조건과 분석조건을 이용하여, 제 1세부 기관으로부터 제공받은 감별된 국산 방풍, 국산 갯방풍, 국산 식방풍, 중국산 방풍, 내몽고산 방풍과 시중에 유통되고 있는 방풍 19종 (한국산 8종, 중국산 11종)을 구입 또는 제공받아 함량분석을 실시하였다.
5. 함량분석 결과를 토대로 한국산, 중국산 방풍의 패턴분석을 실시하였다.
6. 본 연구에서는 방풍의 세가지 생리활성성분에 대한 신속하고 정확한 분석법을 개발하였으며, 이는 방풍의 품질관리 및 함량분석에 유용하게 쓰일 것으로 기대된다.
7. 제 1세부 기관으로부터 제공받은 감별된 국산 방풍, 국산 갯방풍, 국산 식방풍, 중국산 방풍, 내몽고산 방풍의 크로마토그램에서 갯방풍, 식방풍과 달리 방풍은 전혀 다른 패턴을 보였다. 시중에서 구입한 방풍 19종(한국산 8종, 중국산 11종)의 크로마토그램으로 패턴 분석을 한 결과 시중에서 유통되는 방풍은 갯방풍이나 식방풍 중의 하나일 것으로 추정된다.

제 2 절 시호의 생리활성성분의 동시분석법 개발

1. 본 연구에서는 TLC, HPLC-ELSD, LC-MS 등을 이용한 시호의 생리활성성분의 동시분석법을 개발하였고, 분석법 검증과 시호의 최적추출조건 설정, 함량분석, 패턴분석 등을 수행하였다.
2. 10 종의 saikosaponin에 대한 분석법 검증을 실시한 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완건성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time(RRT), theoretical plate number(N) 그리고 peak asymmetry(T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다.
3. 추출법, 추출용매, 추출용매의 조성, 추출 시간 등의 factor를 고려하여 시호의 최적추출조건을 설정하였다.
4. 최적의 추출조건과 분석조건을 이용하여, 시중에 유통되고 있는 시호 20종(한국산 9종, 중국산 11종)을 구입 또는 제공받아 함량분석을 실시하였다.
5. 함량분석 결과를 토대로 한국산, 중국산 시호의 패턴분석을 실시하였다.
6. 본 연구에서는 10 종의 saikosaponin에 대한 신속하고 정확한 분석법을 개발하였으며, 이는 시호의 품질관리 및 함량분석에 유용하게 쓰일 것으로 기대된다.
한국산과 중국산 시호를 구분하기 위하여 시호의 주요 saikosaponin인 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 이용하여 패턴분석을 실시하였고, 전체적인 주성분 9 종을 선정하여 패턴분석을 실시하였으나, 한국산과 중국산 시호의 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다.

제 5 장 제 2 세부연구개발과제의 연구성과

제 1 절 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)
총괄과제책임자	김진웅 / 서울대학교 / 약학

1. 연구논문

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

2. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	Quantitative evaluation of <i>Bupleuri Radix</i> through the simultaneous determination of bioactive saikosaponins by high performance liquid chromatography with ultraviolet and evaporative light scattering detector	포스터발표	이재현	한국분석과학회	2008.5.15.		국내
2	Quantitative Evaluation of <i>Bupleuri Radix</i> through The Simultaneous Determination of Bioactive Saikosaponins by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector	포스터발표	이재현	대한약학회	2008.10.23.		국내
3	Quantitative evaluation of <i>Saposhnikoviae Radix</i> through the simultaneous determination of bioactive coumarins and chromone by HPLC/UV	포스터발표	정미혜	한국분석과학회	2007. 11. 7.	제주도	국내

3. 지식재산권

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

4. 정책활용

- 1) 효능에 근거한 시호와 방풍의 품질 평가지표 및 기준규격 설정에 활용함.
- 2) 기준규격에 의한 국내산 및 수입 한약재의 품질평가 및 관리에 이용함으로써 한약재 표준화에 활용함.
- 3) 시호와 백지의 품질평가를 위한 기초자료 제공으로 대한약전 등 공정서의 개정시 기준시험법 등에 반영함
- 4) 한약제제의 품질평가를 HPLC-ELSD 및 HPLC-UV 또는 LC-MS/MS 동시분석법으로 할 수 있는 기초자료로 활용함.

5. 타연구/차기연구에 활용

6. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

7. 기타

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

제 2 절 활용계획

1. 효능에 근거한 시호와 방풍의 품질 평가지표 및 기준규격 설정에 활용한다.
2. 기준규격에 의한 국내산 및 수입 한약재의 품질평가 및 관리에 이용함으로써 한약재 표준화에 활용한다.
3. 시호와 방풍 의 품질평가를 위한 기초자료 제공으로 대한약전 등 공정서의 개정 시 기준시험법 등에 반영한다.
4. 유통되고 있는 국산 및 수입산 한약재에 대한 평가를 과학화, 체계화시켜 효율적으로 수행할 수 있을 것이며 이를 통하여 한약재 오남용을 막아 국민 보건 증진에 이바지한다.
5. 한약제제의 품질평가를 HPLC-UV 동시분석법 혹은 HPLC-ELSD 분석법으로 할 수 있는 기초자료로 활

용한다.

6. 시호와 방풍에 대한 약효, 독성, 임상 등 관련 학문분야의 실험을 위한 기초자료로 활용한다.
7. 시호와 방풍의 dereplication을 위한 기반기술에 활용한다.

제 6 장 기타 중요변경사항

- 2 차년도 총 연구비가 70,000,000 원에서 65,000,000 원으로 조정됨
- 참여 연구원이 변경됨.

제7장 참고문헌

- 1) Okuyama E., Hasegawa T., Matsushita T., Fujimoto H., Ishibashi M., and Yamazaki M., *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 49(2), 154-160(2001)
- 2) Li Y., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40, 1253-1256(2006)
- 3) Park I.S., Kang E.M., and Kim N., *Journal of Chromatographic Science*, 38(6), 229-233, (2000).
- 4) 김관수, 이승택, 성낙술, 이정일, 채영암, *한국약용작물학회*, 3(3), 226-232, (1995).
- 5) Liao B.C., Hsiao S.S., Lee M.R., Jong T.T. and Chiang S.T., *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 43, 1174-1178, (2007).
- 6) Xiao R., Wang C.Y., Zhang Z.F., Yuan Z.F. and Zhang L.T., *Journal of Chinese medicinal materials*, 29(2), 119-123, (2006).
- 7) Li X.Q., Gao Q.T., Chen X.H. and Bi K.S., *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(9), 1736-1742, (2005).
- 8) Bao Y., Li C., Shen H. and Nan F., *Analytical chemistry*, 76, 4208-4216, (2004).

제8장 첨부서류

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

총괄 연구과제 요약

과제번호	08182한약재255		공개가능여부	공개 / 비공개
단위과제명	한약재생리활성성분분리			
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 분석연구(시호, 방풍)			
연구책임자	성명	김진웅	주민등록번호 (앞번호만 기재)	
	소속기관명	서울대학교 약학대학		
	전자우편		전화번호	

○ 연구목표 (400~600자)

한약재 과학화 사업 중의 시호, 방풍에 대한 체계적이고 과학적인 성분 분리 및 분석법을 확립하고 이를 검증하는 것을 그 최종 목표로 한다. 이를 위해서 다음과 같은 구체적인 목표를 제시하는 바이다.

- 시호, 방풍의 지표물질의 분리법 확립 및 대량 분리
- 시호, 방풍의 미량 함유 물질 중 지표물질에 준할 수 있는 물질 선별 및 분리
- 시호 및 방풍의 분석용 표준품의 제조 및 제출

각종 크로마토그래피법을 이용하여 다양한 성분을 시호, 방풍으로부터 분리해내며 이를 대량분리한다. 또한 분리된 여러 성분중에서 지표물질을 선별하고 지표물질에 준할 수 있는 물질을 선별하는 것을 목표로 한다. 또한 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 분석법을 이용하여 시호, 방풍의 생리활성성분 동시분석법을 개발하고 분석법 검증(validation)을 실시하며, 이를 기반으로 패턴인식 또는 지문인식법에 따른 기원별, 산지별 한약재 정보 구축을 목표로 한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

1차로 건조된 방풍 5Kg을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 715.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 차례로 EtOAc로 분획하여 EtOAc분획(196.7g)의 분획물을 얻었다. EtOAc분획에 대하여 다양한 컬럼 크로마토그래피 기법을 이용하여 6종의 화합물을, 2차로 방풍 10Kg을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 1315.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 EtOAc로 분획하고 얻은 분획물을 감압 농축하여 EtOAc분획(397.5g)의 분획물을 얻었다. 이 분획에 대해 마찬가지로 다양한 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 15종의 화합물을 얻었다.

시호 14.16kg을 세절한 후 메탄올을 이용하여 3회 추출하여 1089.2g의 추출물을 얻었다. 이중 689.2g을 HP-20수지(resin)를 고정상으로 한 column chromatography를 이용하여 분리, 메탄올 층 230.9g을 얻고 *n*-BuOH로 분획하여 184.3g의 분획물을 얻었다. *n*-BuOH 분획물을 column chromatography (normal phase silica)를 통해 13개의 분획으로 크게 분류 한 후 각 분획을 대상으로 다양한 분리 방법을 적용하여 12종의 물질을 분리하였다.

시호 및 방풍의 품질관리 과학화를 위하여 시호의 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-ELSD 및 LC-MS의 동시분석법과 방풍의 생리활성성분들에 대한 TLC, HPLC-UV 및 LC-MS/MS 동시 분석법을 개발하였다. 시호의 HPLC-ELSD 동시 분석법 및 방풍의 HPLC-UV 동시 분석법에 대한 분석법 검증(analytical method validation)이 실시되었으며 그 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성 기울기, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 tailing factor (T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다. 시호 및 방풍 한약재에서 각 한약재의 주 생리활성성분을 추출하는 추출법을 최적화하기 위하여 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법을 비교하고 추출용매, 추출시간을 검토하였다. 그 결과 각 한약재에 대한 최적화된 추출법을 개발하였으며 각각의 방법으로 시중에서 구입하거나 제 1세부 기관으로부터 제공 받은 시호 20종, 방풍 24종의 한약재를 추출하여 확립한 시호의 HPLC-ELSD 및 방풍의 HPLC-UV법에 적용하여 함량분석을 하였다. 함량분석에서 구한 시호의 HPLC-ELSD 크로마토그램과 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램을 토대로 각 한약재에 대한 군집 분석(Cluster analysis) 및 주성분 분석(Principal Component Analysis)을 실시하였다. 시호의 생리활성 성분에 대한 LC-MS 동시분석법을 개발하였으며 MRM mode와 SIM mode를 비교한 결과 감도가 더 좋은 SIM mode로 분석하였다. 방풍의 생리활성성분 LC-MS/MS 동시분석은 선택성이 높은 MRM mode로 실시되었다. 각 LC-MS/MS분석법에 대하여 분석법 검증을 실시한 결과 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

- 방풍으로부터 21종의 화합물(3'-*O*-angeloylhamaudol, β -sitosterol, marmesin, phellopterin, anomalin, imperatorin, xanthotoxin, deltoin, bergapten, stigmasterol, ledebouriellol, hamaudol, 8'-epicleomioscin, xanthoarnol, cimifugin, 5-*O*-methylvisamminol, daucosterol, 4'-*O*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, nodakenin, *sec-O*-glucosylhamaudol, *prim-O*-glucosylcimifugin)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 방풍의 지표성분으로는 imperatorin, phellopterin, 3'-*O*-angeloylhamaudol을 제시하는 바이다.
- 시호로부터 13종의 화합물(saikosaponin D, saikosaponin C, saikosaponin B₄, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin A, saikosaponin H, saikosaponin I, saikosaponin B₁, saikosaponin G와 미지시료 crystal, 5-1, 5-2. 현재 구조분석중)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 시호의 지표성분으로는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 제시하는 바이다.
- 방풍 및 시호의 주요 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 동시분석법을 개발함.
- 시호 및 방풍을 포함한 한약제제의 품질평가를 TLC, HPLC-UV, HPLC-ELSD, LC-MS/MS 동시분석법으로 할 수 있는 기초자료로 활용함.
- 시호 및 방풍의 품질관리를 활성성분 위주로 함으로써 한약제의 품질수준 향상 및 안전성 제고.
- 기준규격에 의한 국내산 및 수입 한약제의 품질평가 및 관리에 이용함으로써 한약제 표준화에 활용함.
- 시호 및 방풍의 품질평가를 위한 기초자료 제공으로, 대한약전 등 공정서의 개정시 기준시험법에 반영함.
- 시호 및 방풍에 대한 약효, 독성, 임상 등 관련 학문분야의 실험을 위한 기초자료로 활용함.
- 기능성식품과 같은 한약제 관련산업의 동반발전을 기대할 수 있음.
- 한약제 품질에 대한 국민의 신뢰성 제고.

○ 총괄 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
김 진 용		김 민 경	
윤 기 동		엄 한 영	
류 민 열		이 병 규	
양 민 해			
한 경 립			
김 소 준			
김 성 민			
정 유 현			
한 상 범			
정 미 해			
이 재 현			
서 준 혁			
염 혜 선			
김 운 용			

Keywords (5개 내외)	한글	생리활성성분, 함량분석, 패턴인식법, 지문인식, 표준품
	영문	bioactive component, assay, pattern recognition analysis, chemical fingerprint, control reference standard

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “비공개”로 표시
- 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술

제 1 세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재255		공개가능여부	공개 / 비공개
단위과제명	한약재생리활성성분분리			
제 1 세부과제명	시호, 방풍의 생리활성성분 분리 연구			
연구책임자	성명	김진웅	주민등록번호 (앞번호만 기재)	
	소속기관명	서울대학교 약학대학		
	전자우편		전화번호	

○ 연구목표 (400~600자)

한약재 과학화 사업 중의 시호, 방풍에 대한 체계적이고 과학적인 성분 분리 및 분석법을 확립하고 이를 검증하는 것을 그 최종 목표로 한다. 이를 위해서 다음과 같은 구체적인 목표를 제시하는 바이다.

- 시호, 방풍의 지표물질의 분리법 확립 및 대량 분리
- 시호, 방풍의 미량 함유 물질 중 지표물질에 준할 수 있는 물질 선별 및 분리
- 시호 및 방풍의 분석용 표준품의 제조 및 제출

각종 크로마토그래피법을 이용하여 다양한 성분을 시호, 방풍으로부터 분리해내며 이를 대량분리한다. 또한 분리된 여러 성분중에서 지표물질을 선별하고 지표물질에 준할 수 있는 물질을 선별하는 것을 목표로 한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

1차로 건조된 방풍 5Kg을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 715.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 차례로 EtOAc로 분획하여 EtOAc분획(196.7g)의 분획물을 얻었다. EtOAc분획에 대하여 다양한 컬럼 크로마토그래피 기법을 이용하여 6종의 화합물을, 2차로 방풍 10Kg을 세절하여 MeOH로 90분씩 3회 초음파 추출하여 이를 감압 건조하여 1315.5g의 추출물을 얻었다. 이를 다시 증류수에 현탁하여 EtOAc로 분획하고 얻은 분획물을 감압 농축하여 EtOAc분획(397.5g)의 분획물을 얻었다. 이 분획에 대해 마찬가지로 다양한 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 15종의 화합물을 얻었다.

시호 14.16kg을 세절한 후 메탄올을 이용하여 3회 추출하여 1089.2g의 추출물을 얻었다. 이 중 689.2g을 HP-20수지(resin)를 고정상으로 한 column chromatography를 이용하여 분리, 메탄올 층 230.9g을 얻고 n-BuOH로 분획하여 184.3g의 분획물을 얻었다. n-BuOH 분획물을 column chromatography (normal phase

silica)를 통해 13개의 분획으로 크게 분류한 후 각 분획을 대상으로 다양한 분리 방법을 적용하여 단일 물질을 분리했다. 이 중 7번 분획에서 saikosaponin B₂, B₃, B₄, C, D를 얻었고 9,10,11,12번 분획과 7번 분획의 69번 세부 분획으로부터 saikosaponin A를 분리했다. 또한 잘 알려진 saikosaponin의 가수분해법에 따라 saikosaponin A, saikosaponin C를 반응시켜 각각 3개의 compound를 얻었다.

시호에 미량 함유된 것으로 알려진 saponin계열 이외의 flavonoid나 polyacetylene계열의 물질을 분리하기 위하여 매탄을 추출물 100g을 dichloromethane으로 분획하여 49.3g의 분획물을 얻었다. 이를 column chromatography (normal phase silica)를 통해 20개의 분획으로 크게 분류한 후 결정을 여과하거나 RP-MPLC, HPLC 등을 이용하여 3개의 새로운 compounds를 분리하였다.

활성평가에 필요한 saikosaponinB₂를 추가로 분리하기 위하여 n-BuOH 분획물(50g)을 이용하여 100mg의 화합물을 분리하였다. (이미 분리한 saikosaponin A, B₁, B₂, B₃, B₄, C, D, G, H, I 등에 대하여 추가적인 분리를 시행 중이다.)

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

- 방풍으로부터 21종의 화합물(3'-O-angeloylhamaudol, β -sitosterol, marmesin, phellopterin, anomalin, imperatorin, xanthotoxin, deltoin, bergapten, stigmasterol, ledebouriellol, hamaudol, 8'-epicleomioscin, xanthoarnol, cimifugin, 5-O-methylvisamminol, daucosterol, 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisamminol, nodakenin, sec-O-glucosylhamaudol, prim-O-glucosylcimifugin)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 방풍의 지표성분으로는 imperatorin, phellopterin, 3'-O-angeloylhamaudol을 제시하는 바이다.
- 시호로부터 13종의 화합물(saikosaponin D, saikosaponin C, saikosaponin B₄, saikosaponin B₂, saikosaponin B₃, saikosaponin A, saikosaponin H, saikosaponin I, saikosaponin B₁, saikosaponin G와 미지시료 crystal, 5-1, 5-2. 현재 구조분석중)을 다양한 크로마토그래피법으로 분리하고 그 구조를 다양한 분광학적 방법으로 확인하였다.
- 시호의 지표성분으로는 saikosaponin A, saikosaponin C, saikosaponin D를 제시하는 바이다.

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
김진웅			
윤기동			
류민열			
양민혜			
한경림			
김소준			
김성민			
정유현			

Keywords (5개 내외)	한글	시호, 방풍, 생리활성성분, 지표성분, 준지표성분, 표준품
	영문	Bupleurum root, Saposhnikovia root, bioactive components, control reference standard

- 주1) 연구목표, 연구내용, 연구성과를 서술형으로 기재
- 2) 국가연구개발사업 DB를 통한 공개를 희망하지 않는 경우 공개가능여부란에 “비공개”로 표시
 - 3) 연구성과는 그간의 연구결과 및 기대성과를 서술
 - 4) 세부과제가 없을시 작성하지 않음 (세부과제별로 작성)

제 2 세부 연구과제 요약

과제번호	08182한약재255		공개가능여부	공개 / 비공개
단위과제명	한약재생리활성성분분리			
제 2 세부과제명	TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS를 이용한 시호, 방풍의 생리활성성분 동시분석법 개발			
연구책임자	성 명	한상범	주민등록번호	
	소속 기관명	중앙대학교 약학대학		
	전자우편		전화번호	

○ 연구목표 (400~600자)

TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 분석법을 이용하여 시호, 방풍의 생리활성성분 동시분석법을 개발하고 분석법 검증(validation)을 실시하며, 이를 기반으로 패턴인식 또는 지문인식법에 따른 기원별, 산지별 한약재 정보 구축을 목표로 한다.

○ 연구내용 (1000~1200자)

시호 및 방풍의 품질관리 과학화를 위하여 시호의 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-ELSD 및 LC-MS의 동시분석법과 방풍의 생리활성성분들에 대한 TLC, HPLC-UV 및 LC-MS/MS 동시 분석법을 개발하였다. 시호의 HPLC-ELSD 동시 분석법 및 방풍의 HPLC-UV 동시 분석법에 대한 분석법 검증 (analytical method validation)이 실시되었으며 그 결과, 각 성분에 대하여 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다. 또한 분석조건을 고의로 변동시켰을 때의 분석법의 신뢰성을 평가하기 위하여 완전성 실험을 수행하였다. 칼럼 온도, 유속, 이동상 조성 기울기, 칼럼을 변화시켜가며 area precision (C.V.), relative retention time (RRT), theoretical plate number (N) 그리고 tailing factor (T)를 비교하여 평가한 결과 대부분의 조건에서 분석법이 완전함을 확인하였다. 시호 및 방풍 한약재에서 각 한약재의 주 생리활성성분을 추출하는 추출법을 최적화하기 위하여 초음파추출법, 환류추출법, 냉침법을 비교하고 추출용매, 추출시간을 검토하였다. 그 결과 각 한약재에 대한 최적화된 추출법을 개발하였으며 각각의 방법으로 시중에서 구입하거나 제 1세부 기관으로부터 제공 받은 시호 20종, 방풍 24종의 한약재를 추출하여 확립한 시호의 HPLC-ELSD 및 방풍의 HPLC-UV법에 적용하여 함량분

석을 하였다. 합량분석에서 구한 시호의 HPLC-ELSD 크로마토그램과 방풍의 HPLC-UV 크로마토그램을 토대로 각 한약재에 대한 군집 분석 (Cluster analysis) 및 주성분 분석 (Principal Component Analysis)을 실시하였다. 시호의 생리활성 성분에 대한 LC-MS 동시분석법을 개발하였으며 MRM mode와 SIM mode를 비교한 결과 감도가 더 좋은 SIM mode로 분석하였다. 방풍의 생리활성성분 LC-MS/MS 동시분석은 선택성이 높은 MRM mode로 실시되었다. 각 LC-MS/MS 분석법에 대하여 분석법 검증을 실시한 결과 넓은 농도 범위 내에서 양호한 직선성, 정밀성, 정확성과 낮은 정량한계를 갖고 있음을 확인하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400~600자)

- 방풍의 주요 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-UV, LC-MS/MS 동시분석법을 개발함.
- 시호의 주요 생리활성성분에 대한 TLC, HPLC-ELSD, LC-MS 동시분석법을 개발함.
- 시호 및 방풍을 포함한 한약제제의 품질평가를 TLC, HPLC-UV, HPLC-ELSD, LC-MS/MS 동시분석법으로 할 수 있는 기초자료로 활용함.
- 시호 및 방풍의 품질관리를 활성성분 위주로 함으로써 한약재의 품질수준 향상 및 안전성 제고.
- 기준규격에 의한 국내산 및 수입 한약재의 품질평가 및 관리에 이용함으로써 한약재 표준화에 활용함.
- 시호 및 방풍의 품질평가를 위한 기초자료 제공으로, 대한약전 등 공정서의 개정시 기준시험법 등에 반영함.
- 시호 및 방풍에 대한 약효, 독성, 임상 등 관련 학문분야의 실험을 위한 기초자료로 활용함.
- 기능성식품과 같은 한약재 관련산업의 동반발전을 기대할 수 있음.
- 한약재 품질에 대한 국민의 신뢰성 제고.

○ 참여연구원

성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)	성 명	주민등록번호(앞번호만 기재)
한 상 범			
이 병 규			
정 미 혜			
이 재 현			
서 준 혁			
염 혜 선			
김 운 용			
김 민 경			
엄 한 영			

Keywords (5개 내외)	한글	시호, 방풍, 생리활성성분, TLC, HPLC-ELSD, HPLC-UV, LC-MS/MS. 동시 분석법
	영문	Bupleuri Radix, Saposhnikovia Radix, Bioactive compound, TLC, HPLC-ELSD, LC-MS/MS